بسمه تعالی

دانشگاه مازندران
دانشکده شیمی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته شیمی گرایش تجزیه

موضوع:

استخراج کورکیومین از ادویه‌جات با استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن واندازه‌گیری آن توسط HPLC

استاد راهنما:

دکتر محمدرضا حاج‌محمدی

استاد مشاور:

دکتر محمدحسین فاطمی

نگارش:

قمر سلامت

اردیبهشت ۱۳۹۱

سپاس گزاری

سپاس و ستایش خداوند بی همتا را که توفیق کسب علم و معرفت، به من عطا فرمود. به رسم ادب و سنت نیکوی سپاس، لازم می دانم از کلیه عزیزانی که مرا در تدوین این پایان نامه یاری کردند سپاس گزاری نمایم.

از پدر و مادرم، دو بی کران بی همتا، دو سرو قامتی که گوهر وجودشان، نسیم کلامشان و باران محبتشان را همواره بی هیچ منت و ادعا، مرهمی نمودند بر خستگی هایم. آنان که راستی قامتم در شکستگی قامتشان تجلی یافت و آنان که همیشه، همواره در مسیر تلاش هایم بوده اند، بسیار شکرم و بر دستان پر مهرشان بوسه می زنم. از خواهرانم، یاران راستین روزهای زندگیم که در طول دوران زندگی و تحصیل یاور و پشتیبانم بودند، کمال تشکر را دارم و با دلی مملو از محبت آرزوهایشان را آرزومندم.

از استاد فرزانه و گرانقدرم، جناب آقای دکتر محمدرضا حاج محمدی که افتخار شاگردی ایشان را داشتم و در تمامی مراحل اجرای این پایان نامه، همواره از پشتیبانی و رهنمودهای ارزندهٔ ایشان بهره مند بوده ام، سپاس گزارم. صمیمانه ترین تشکرات خود را به اساتید ارجمندم آقایان دکتر محمد حسین فاطمی، دکتر عبدالرئوف صمدی و دکتر محمد جواد چایچی تقدیم می دارم.

یاد و خاطرهٔ دوستان عزیز و کلیه همکارانم در آزمایشگاه تحقیقاتی جداسازی، که در طول دوران تحصیلم افتخار آشنایی با ایشان را داشته ام، گرامی می دارم و از درگاه ایزد منان آرزوی سلامتی و توفیق روز افزون برای همگی این عزیزان خواستارم.

قمر سلامت

اردیبهشت ۱۳۹۱

تقدیم به پدر و مادر مهربانم

ستارگان همیشه درخشان هستی ام،

و خواهرانم

با نهایت سپاس گزاری

چکیده

ترکیب کورکومین، از گیاه کورکیوما لانگا گرفته شده، به طور وسیعی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفته و اثرات سودمندی بر سلامت انسان دارد. در این پژوهش، یک روش ساده و سریع برای استخراج و اندازه گیری کورکومین در زردچوبه (کورکوما لانگا) و زعفران (کروکوس سایتووس) با استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (MIONs) به عنوان جاذب استخراج فاز جامد و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بکار گرفته شد. استخراج کورکومین بر پایه‌ی جذب سطحی کمپلکس آهن-کورکومین روی MIONs انجام گردید. واجذب کورکومین از جاذب MIONs توسط محلول مایی NaOH حاوی متانول انجام شده و مقدار آن توسط HPLC در طول موج ۴۶۰ نانومتر تعیین گردید. پارامترهای مختلف برای استخراج کورکومین نظیر: حجم محلول کورکومین، pH محلول نمونه، مقدار MIONs به عنوان جاذب، حجم و غلظت محلول $FeCl_3.6H_2O$، حجم و غلظت محلول مایی NaOH در محلول واجذب کننده و در صد متانول در محلول واجذب کننده، بهینه شدند. شرایط بهینه استخراج شامل: ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کورکومین با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، pH= ۲٫۰، ۰٫۱۵ گرم MIONs، ۱٫۵ میلی‌لیتر از محلول ۰٫۱ مولار $FeCl_3.6H_2O$ و ۱٫۰ میلی‌لیتر محلول ۰٫۲ مولار NaOH حاوی ۲۰ ٪ متانول، بودند. فاز متحرک HPLC شامل ۱۶ درصد حجمی متانول، ۴۸ درصد حجمی استونیتریل و۳۶ درصد حجمی آب بوده و در آن ۱ درصد حجمی استیک اسید غلیظ وجود داشت. حد آشکارسازی (LOD)، گستره خطی (LR)، تکرارپذیری و تکثیرپذیری روش (RSD %) و مجذور ضریب همبستگی (R^2) بترتیب ۰٫۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۰٫۰۶-۶۰٫۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ٪ ۴٫۰ ، ٪۷٫۰ و ۰٫۹۹۸۰ بودند. تحت شرایط بهینه فاکتور غنی‌سازی و بازیابی کورکومین در زردچوبه و زعفران به ترتیب ۱۰۰، ٪ ۸۹٫۶۷ و ٪ ۸۷٫۷۷ بدست آمدند. روش MIONs-HPLC/UV بطور موفقیت‌آمیزی برای استخراج و اندازه‌گیری کورکومین در زردچوبه و زعفران بکار گرفته شد. مقدار کورکومین در زردچوبه و زعفران به ترتیب ۴۰٫۰۰ و ۰٫۱۵ میلی‌گرم بر گرم بدست آمد.

واژه های کلیدی:

کورکومین، کورکوما لانگا، کروکوس سایتووس، نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن، استخراج فاز جامد، HPLC.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول- مقدمه

۱- مقدمه ۱

۱-۱ کاربرد درمانی کورکیومین در بیماری قلبی..... ۵

۱-۲- خواص شیمیایی کورکیومین ۵

۱-۳- روش های استخراج و اندازه‌گیری کورکیومین..... ۶

فصل دوم- تئوری

۲-۱- کروماتوگرافی ۷

۲-۱-۱- مکانیزم جداسازی در کروماتوگرافی مایع..... ۷

۲-۱-۱- ۱- نفوذ ادی یا نفوذ از راه‌های چندگانه..... ۱۲

۲-۱-۱-۲- انتقال جرم در فاز متحرک..... ۱۲

۲-۱-۱-۳- انتقال جرم در قسمت ساکن فاز متحرک..... ۱۳

۲-۱-۱-۴- انتقال جرم در فاز ساکن..... ۱۳

۲-۱-۱-۵- نفوذ طولی..... ۱۴

۲-۱-۲- انواع کروماتوگرافی مایع..... ۱۷

۲-۱-۲-۱ کروماتوگرافی توزیعی..... ۱۷

۲-۱-۲-۲- کروماتوگرافی جذب سطحی..... ۱۸

۲-۱-۲-۳- کروماتوگرافی تعویض یون..... ۱۸

۲-۱-۲-۴- کروماتوگرافی ژل - تراوا..... ۱۹

۲-۱-۳- انتخاب فاز متحرک در کروماتوگرافی مایع توزیعی..... ۱۹

۲-۱-۳-۱- برهمکنش پراکندگی..... ۲۰

۲-۱-۳- ۲- برهمکنش دو قطبی ۲۰

۲-۱-۳-۳- برهمکنش پیوند هیدروژنی ۲۱

۲-۱-۳-۴- برهمکنش دی الکتریک ۲۱

۲-۱-۴- پارامترهای کروماتوگرافی ۲۱

۲-۱-۵- شناسایی و تعیین مقدار توسط HPLC ۲۶
۲-۲- نانوذرات ۲۷
۲-۲-۱- نانوذرات مغناطیسی ۲۸
۲-۲-۱-۱- نانوذرات اکسیدی آهن ۲۸
۲-۲-۱-۲- روش‌های تولید نانوذرات مغناطیسی ۲۹
۲-۲-۱-۲-۱- روش هم رسوبی ۲۹

فصل سوم- بخش تجربی

۳-۱- وسایل و مواد شیمیایی مورد استفاده ۳۱
۳-۲- دستگاهها ۳۲
۳-۲-۱- دستگاه HPLC ۳۲
۳-۲-۲- تذکرات لازم جهت حفظ ستون HPLC ۳۳
۳-۲-۳- مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده و آدرس کارخانه سازنده آنها ۳۴
۳-۳- روش کار ۳۵
۳-۳-۱- تهیه محلول های مادر و استاندارد ۳۵
۳-۳-۲- روش استخراج کورکیومین از محلول استاندارد با استفاده از MIONs ۳۵
۳-۳-۳- طرز تهیه نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن ۳۶
۳-۳-۴- محاسبه فاکتور غنی‌سازی (EF) و درصد بازیابی استخراج (%ER) ۳۸
۳-۳-۵- محاسبه درصد انحراف استاندارد نسبی (%RSD) ۳۸
۳-۳-۶- تهیه فاز متحرک و تعیین شرایط کروماتوگرافی ۳۹
۳-۳-۷- استخراج و اندازه گیری کورکیومین در زردچوبه و زعفران ۳۹

فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بهینه‌سازی شرایط استخراج کورکیومین ۴۰
۴-۱-۱- بهینه سازی pH محلول ۴۱
۴-۱-۲- بهینه سازی حجم و غلظت محلول $FeCl_3.6H_2O$ ۴۲
۴-۱-۳- بهینه‌سازی غلظت NaOH در محلول واجذب کننده و حجم آن محلول ۴۳
۴-۱-۴- بهینه‌سازی اثر درصد متانول در محلول واجذب کننده ۴۵
۴-۱-۵- بهینه‌سازی مقدار نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (MIONs) ۴۵

۴-۱-۶- بهینه‌سازی حجم نمونه..... ۴۶
۴-۲- بهینه سازی شرایط استخراج کورکیومین از زردچوبه و زعفران..... ۴۷
۴-۳- بهینه سازی شرایط HPLC..... ۴۸
۴-۴- ارقام شایستگی مربوط به اندازه گیری کیورکیومین با روش MIONs-HPLC/UV..... ۵۰
۴-۵- استخراج و اندازه‌گیری کیورکیومین از ادویه‌جات..... ۵۱
۴-۶- نتیجه‌گیری..... ۵۶
۴-۷- پیشنهادات برای کارهای آینده..... ۵۶

فهرست منابع ۵۸

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- گیاه کورکیوما لانگا و کروکوس ستیووس ۲

شکل ۱-۲- ساختار شیمیایی کورکیومین و مشتقات آن ۳

شکل ۱-۳- برخی از موارد مصرف درمانی کورکیومین..... ۴

شکل ۲-۱- جداسازی فرضی یک مخلوط سه جزیی..... ۸

شکل ۲-۲- اساس بازداری در کروماتوگرافی مایع..... ۹

شکل ۲-۳- راه‌های پخش نمونه در کروماتوگرافی مایع..... ۱۱

شکل ۲-۴- منحنی وابستگی ارتفاع تشتک تئوری (H) به سرعت خطی فاز متحرک..... ۱۵

شکل ۲-۵- برهمکنش‌های مختلف بین نمونه و مولکول‌های حلال..... ۲۰

شکل ۲-۶- نمای یک پیک نامتقارن برای محاسبه فاکتور نامتقارن..... ۲۳

شکل ۲-۷- جداسازی یک مخلوط دو جزئی بوسیله کروماتوگرافی..... ۲۴

شکل ۳-۱- تصویر SEM نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن پوشش‌دار شده با TEOS..... ۳۷

شکل ۴-۱- اثر pH بر درصد بازیابی استخراج کیورکیومین..... ۴۱

شکل ۴-۲- اثر حجم محلول ۰/۱ مولار $FeCl_3.6H_2O$ بر درصد بازیابی استخراج کورکیومین ۴۲

شکل ۴-۳- اثر غلظت محلول ۰/۱ مولار $FeCl_3.6H_2O$ بر درصد بازیابی استخراج کورکیومین..... ۴۳

شکل ۴-۴- اثر حجم محلول واجذب کننده با غلظت ۰/۲ مولار NaOH بر درصد بازیابی استخراج کورکیومین ۴۴

شکل ۴-۵- اثر غلظت محلول NaOH در محلول واجذب کننده، بر درصد بازیابی استخراج کورکیومین.... ۴۴

شکل ۴-۶- اثر درصد متانول بر درصد بازیابی استخراج کورکیومین..... ۴۵

شکل ۴-۷- اثر وزن نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بر درصد بازیابی استخراج کورکیومین..... ۴۶

شکل ۴-۸- اثر حجم نمونه کورکیویمن بر درصد بازیابی استخراج کورکیومین..... ۴۷

شکل ۴-۹- کروماتوگرام محلول استاندارد ۵ میکروگرم بر میلی لیتر کورکیومین..... ۵۲

شکل ۴-۱۰- کروماتوگرام نمونهٔ زردچوبه بعد از استخراج کورکیومین در شرایط بهینه..... ۵۳

شکل ۴-۱۱- کروماتوگرام نمونهٔ زردچوبه اسپایک شده با غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی لیتر کیورکیومین بعد از استخراج در شرایط بهینه..... ۵۳
شکل ۴-۱۲- کروماتوگرام نمونهٔ زعفران بعد از استخراج کورکیومین در شرایط بهینه ۵۴
شکل ۴-۱۳- کروماتوگرام نمونهٔ زعفران اسپایک شده با غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر کیورکیومین بعد از استخراج در شرایط بهینه..... ۵۴
شکل ۴-۱۴- نمودار معیارگیری برای اندازه‌گیری کیورکیومین استخراج شده از نمونهٔ زردچوبه به روش افزایش استاندارد..... ۵۵
شکل ۴-۱۵- نمودار معیارگیری برای اندازه‌گیری کیورکیومین استخراج شده از نمونهٔ زعفران به روش افزایش استاندارد..... ۵۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- عوامل موثر بر پهن شدگی پیک‌ها در کروماتوگرافی..... ۱۶

جدول ۳-۱- وسایل و مواد شیمیایی مورد استفاده..... ۳۱

جدول ۴-۱- اثر درصد حجمی متانول، دما و زمان استخراج کورکیومین از زردچوبه..... ۴۷

جدول ۴-۲- اثر درصد حجمی متانول، دما و زمان استخراج کورکیومین از زعفران..... ۴۸

جدول ۴-۳- تعیین مقدار بهینه درصد حجمی متانول-استونیتریل در فاز متحرک حاوی آب، متانول و استونیتریل ۴۹

جدول ۴-۴- تعیین مقدار بهینه درصد استیک‌اسید غلیظ در فاز متحرک در شرایط بهینه جدول (۴-۳)..... ۴۹

جدول ۴-۵- ارقام شایستگی مربوط به اندازه‌گیری کیورکیومین در استخراج از نمونه استاندارد توسط روش MIONs-HPLC/UV..... ۵۱

جدول ۴-۶- نتایج حاصل از اندازه‌گیری کیورکیومین در نمونه زردچوبه و زعفران **با** روش- MIONs HPLC/UV..... ۵۲

فهرست علائم و اختصارات

مفهوم فارسی	معادل انگلیسی	علامت
کروماتوگرافی بالا با کارایی بالا	High performance liquid chromatography	HPLC
فرابنفش	Ultraviolet	UV
ضریب توزیع	Distribution coefficient	K
زمان بازداری	Retention time	t_R
نسبت بازداری	Retention ratio	R
فاکتور ظرفیت	Capacity factor	K'
فاکتور گزینش پذیری	Selectivity factor	α
فاکتور نامتقارنی	Asymmetry factor	B/A
تفکیک	Resolution	R_s
تعداد تشتک‌های تئوری	Number of theoretical plate	N
بازیابی استخراج	Extraction recovery	ER
فاکتور غنی سازی	Enrichment factor	EF
انحراف استاندارد	Standard deviation	S_d
حد تشخیص	Limit of detection	LOD
محدوده خطی	Linear range	LR
ترا اتیل اورتو سیلیکات	Tetraethyl ortho silicate	TEOS
نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن	Magnetic iron oxide nanoparticles	MIONs
میکروسکوپ الکترونی روبشی	Scanning electron microscopy	SEM

فصل اول

مقدمه

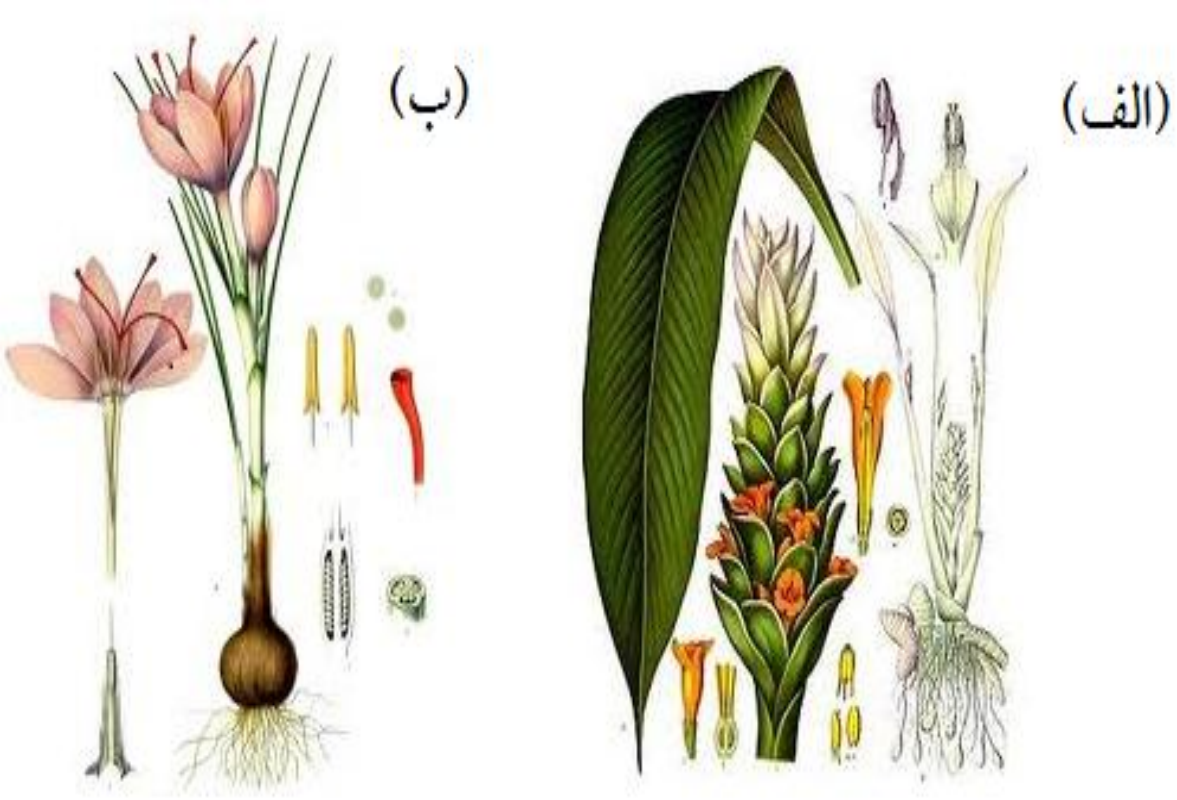
۱- مقدمه

ادویه‌جات از مکمل‌های غذایی بوده، هزاران سال است مورد استفاده قرار گرفته و به دلیل رنگ مطلوب، طعم مطبوع و تندی، وعده‌های غذایی انسان را به وعده‌هایی جذاب و اشتها آور تبدیل می‌کنند. علاوه بر این، تعدادی از آن‌ها مانند زردچوبه (کورکومالانگا[1]) و زعفران (کروکوس سایتووس[2]) دارای خواص دارویی بوده و بطور مؤثری در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱].

زردچوبه از دسته گیاهان گلدار، رده زنجبیل‌وارها و تیره زنجبیلیان می‌باشد. همچنین زعفران از دسته گیاهان گلدار، رده تک‌لپه‌ای ها و تیره زنبقبان می‌باشد.

1.*Curcuma longa*
2.*Crocus sativus*

زردچوبه و زعفران به‌دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی مهم، در تأمین سلامت انسان بسیار مؤثر می‌باشند. زردچوبه و زعفران دارای خواصی نظیر ضد التهاب [۳و۲]، ضد سرطان [۶-۴]، ضد پیری [۷] و ضد آلزایمر [۹و۸] می‌باشند. گیاهان کورکوما لانگا و کروکوس سایتووس در شکل (۱-۱) نشان داده شده‌اند.

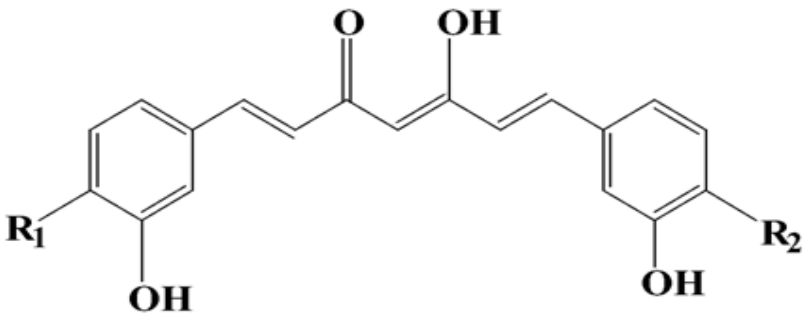


شکل (۱-۱): الف- کورکوما لانگا، ب- کروکوس سایتووس

رنگدانه‌ی اصلی ریشه گیاه کورکوما لانگا، کورکومین[1] است که جزء ترکیبات فنولیک می‌باشد. این ترکیب با دو مشتق فرعی دیگر آن (د- متوکسی کورکومین[2] و بیس د- متوکسی کورکومین[3]) همراه بوده و همگی

1. Curcumin
2 .Demethoxycurcumin
3. Bis-demethoxycurcumin

کورکومینوئید[1] نامیده شده و به عنوان اجزاء اصلی و مهم در زردچوبه به حساب می‌آیند [۱۰]. ساختار شیمیایی کورکومین و مشتقات آن در شکل (۱-۲) مشاهده می‌شود.



Curcumin $R_1=R_2=CH_3O$

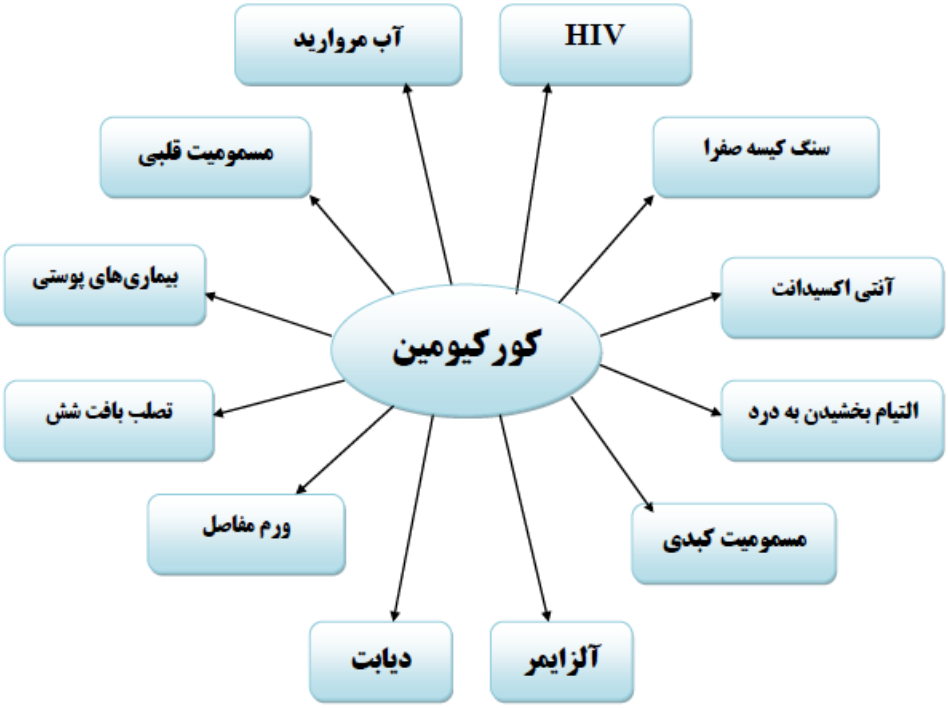
Demethoxycurcumin $R_1=H, R_2=CH_3O$

Bisdemethoxycurcumin $R_1=R_2=H$

شکل (۱-۲) : ساختار شیمیایی کورکومین و مشتقات آن

کورکومین و مشتقات آن خواص ضد سرطان [۱۴-۱۱]، ضد اکسید کنندگی [۱۵,۱۶]، ضد آلرژی [۱۷] و ضد باکتری دارند [۱۸]. ترکیب کورکومین در درمان سرطان سینه نیز مؤثر است [۱۹]. کورکومین باعث جلوگیری از تشکیل تومور در پوست، معده، بخش آغازین روده باریک (دوازدهه) و روده‌ی بزرگ در موش می‌شود [۲۰]. این ترکیب باعث کاهش التهاب پس از عمل جراحی نیز می‌شود. مطالعات ایمنی نشان می‌دهد که مصرف زیاد کورکومین، اثرات سمی کمی داشته و این ترکیب در پزشکی مدرن و سنتی، برای درمان بیماری‌های مختلف بسیار مؤثر است [۲۱]. برخی از قابلیت های درمانی کورکومین به طور مختصر در شکل (۱-۳) نشان داده شده است.

1 .Curcuminoid



شکل(۱-۳) : برخی از موارد مصرف درمانی کورکومین

کورکومین و مشتقات آن قابلیت هایی نظیر حذف رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس با یونهای فلزی را دارند [۲۲،۲۳]. فعالیت بیولوژیکی کورکومین به گروه هیدروکسیل روی حلقه بنزن و همچنین ساختار دی‌کتونی آن نسبت داده می‌شود [۲۴]. مطالعات نشان می‌دهد که ساختار متقارن کورکومین منجر به توزیع برابر پروتون انولی بین ۲ اتم اکسیژن می‌شود [۲۷-۲۵]. کورکومین در حالت دی‌کتون ، با یونهای فلزی کمپلکس داده و لذا اهمیت زیادی در درمان مسمومیت ناشی از فلزات سمی دارد.

۱-۱- کاربرد درمانی کورکومین در بیماری قلبی

در دهه‌های اخیر نقش کورکومین در جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های قلبی مورد مطالعه قرار گرفته است. توانایی کورکومین در تنظیم فشار خون، باعث می‌شود که کورکومین نقش مؤثری در جلوگیری از هیپرتروفی قلب و همچنین جلوگیری از مرگ سلول‌های بافت ماهیچه‌ای قلب[1] که پس از سکته قلبی پیش می‌آید، داشته باشد [۳۰-۲۸]. هیپرتروفی قلب، تغییر وضع بطن سمت چپ است که پس از فشار بیش از حد به قلب ایجاد شده، باعث ضخامت دیواره و بزرگی قلب شده و با گذشت زمان باعث ایجاد سکته قلبی می‌شود [۳۱،۳۲].

۱-۲- خواص شیمیایی کورکومین

کورکومین در pH قلیایی ناپایدار بوده و در طی مدت ۳۰ دقیقه به اجزای سازنده خود تجزیه می‌شود [۳۳]. افزودن آنتی‌اکسیدان هایی مانند آسکوربیک اسید[2] یا گلوتاتیون[3]، در بافرفسفات با pH>۷ به طور کامل از تخریب کورکومین جلوگیری می‌کند. در شرایط اسیدی تخریب کورکومین آهسته‌تر صورت گرفته و ۲۰ درصد کل کورکومین در یک ساعت تجزیه می‌شود [۳۴].

1 . Cardiomyocyte
2. Ascorbic acid
3. Glutathione

فرم کتوی[1] کورکومین نسبت به فرم انول[2] آن در pH ۷-۳ غالب بوده و در فرم کتو، پیوند هپتادیون بین دو حلقه متوکسی فنول، شامل یک اتم کربن با فعالیت بالا بوده و پیوند کربن - هیدروژن روی این اتم کربن، ضعیف شده و در نتیجه کورکومین به عنوان دهنده اتم هیدروژن عمل می‌کند [۳۵]. در pH های بیشتر از ۸، فرم انولات پیوند هپتادیون غالب است و کورکومین عمدتاً به عنوان دهنده الکترون عمل می‌کند [۳۶].

۱-۳- روش های استخراج و اندازه‌گیری کورکومین

استخراج کورکومین از مواد گیاهی با استفاده از روش‌هایی نظیر اولتراسونیک[3] [۳۷]، میکروویو[4] [۳۸] و روش گرمایی[5] [۳۹] انجام شده است. این روش‌ها دارای معایبی مانند زمان استخراج طولانی، مصرف زیاد حلال آلی و بازیابی پایین می‌باشند.

اندازه‌گیری کورکومین توسط روش‌های متعددی انجام شده که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC)[6] [۴۰].
- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[7] (HPLC) [۴۱-۴۳].
- اسپکترومتری جرمی[8] (MS) [۴۴].
- کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی دوپشته[9] (LC-MS/MS) [۴۵].

1. Keto
2. Enol
3 . Ultrasonic
4 . Microwave
5 . Heating method
6. High performance thin layer chromatography
7. High performance liquid chromatography
8. Mass spectrometry
9. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

فصل دوم

تئوری