

استخراج و شناسایی فرمون‌های حلزون‌های خاکی با استفاده از روش استخراج مایع -

مایع ترکیب شده با کروماتوگرافی گازی-آشکارساز طیف سنج جرمی

میلاذ غنی*، محمدجواد چایچی، مائده ولی‌زاده

گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران

تاریخ پذیرش: ۰۰/۱۰/۰۴

تاریخ تصحیح: ۰۰/۰۹/۱۸

تاریخ دریافت: ۰۰/۰۷/۰۵

چکیده

فرمون‌ها، مواد شیمیایی ترشح شده از جانوران می‌باشند که برای منظم ساختن جمعیت‌های حیوانی و تعامل‌های اجتماعی آنان در بین حیوانات هم نوع عمل می‌کند. حلزون‌های خاکی از جمله آفاتنی هستند که به محصولات کشاورزی آسیب‌های قابل توجهی وارد می‌سازند. این حلزون‌ها جهت برقراری ارتباط، از فرمون‌های فرار استفاده می‌کنند و از این راه، پیغام‌های مختلف را بین اعضای گونه‌ی خود رد و بدل می‌نمایند. در این تحقیق سعی شد برای اولین بار، فرمون‌های موجود در بدن حلزون خاکی به کمک روش استخراج فاز مایع، استخراج شده و سپس به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی ترکیب شده با دستگاه طیف سنج جرمی، اجزای استخراج شده، شناسایی شوند. در نهایت، از تطبیق پیک‌های موجود در کروماتوگرام با پیک‌های مرجع مربوط به فرمون‌ها، شناسایی پیک‌های مربوط به فرمون در حلزون، صورت پذیرفت. در نمونه تزریق شده به دستگاه، ترکیب اصلی فرمون، دی متوکسی فنیل، ۷-متیل-۳-اکتا-دی‌ان، کولستا دی‌ان، دسموسترول، ۶،۱۰،۱۴-تری‌متیل-۲-پنتا دکانون و ۷-هگزا دکن، شناسایی شد. این پژوهش، مطالعه‌ای تجربی است که طی آن، فرمون‌های فراری که در برقراری ارتباط بین حلزون‌های یک گونه‌ی خاص، ایفای نقش می‌کنند را مورد استخراج، بررسی و شناسایی قرار می‌دهد. در نتیجه، می‌توان از این فرمون‌ها در ساخت تله فرمونی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: استخراج فاز مایع، حلزون خاکی، فرمون، کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی.

۱- مقدمه

جهت دستیابی به یک گزینش پذیری خوب، صحت و دقت بالا، انتخاب یک روش جداسازی کارآمد، بسیار مهم و کلیدی است. زیرا از هدر رفت هزینه، زمان و نیز در جلوگیری از ایجاد خطا، نقش به‌سزایی را ایفا می‌کند. همواره، اولین اصل در اندازه‌گیری ترکیبات مختلف، آماده‌سازی نمونه است. اساساً مفهوم آماده‌سازی نمونه، تبدیل یک بافت حقیقی پیچیده به شکلی است که برای آنالیز توسط روش‌های تجزیه‌ای مناسب باشد. در پی آماده‌سازی نمونه، اهدافی دنبال می‌شود که برخی از آنها عبارتست از: رفع و حذف مزاحمت‌های موجود در بافت نمونه و دستیابی به گزینش پذیری بهتر، بهبود حساسیت روش و افزایش غلظت گونه موردنظر، تبدیل نمونه از فرم موجود به حالت قابل اندازه‌گیری. مرحله بعدی که مدنظر است جداسازی و پیش‌تغلیظ است که با استفاده از روش‌های مختلف انجام می‌شود.

به بیان دیگر، کلیه اعمال و فرآیندهای فیزیکی یا شیمیایی که در جهت خالص سازی گونه شیمیایی به کار می‌رود را روش‌های جداسازی گویند. هریک از این روش‌ها با توجه به عملکردشان در یکی از چهارگروه زیر جای می‌گیرد: الف) روش‌هایی که جهت افزایش گزینش‌پذیری صورت می‌گیرد مثل مشتق سازی قبل و بعد از ستون، ب) روش‌هایی که شامل استخراج ترکیبات از درون محلول می باشد، مانند استخراج مایع- مایع (LLE) و استخراج با فاز جامد (SPE)، ج) روش‌هایی که هدف از آن تخریب بافت نمونه و آزادسازی آنالیت است و د) روشی که برای ایجاد تغییر در مایع شامل رقیق سازی، تبخیر و... صورت می‌گیرد [۱]. در نتیجه، روشی که بتواند گونه مورد نظر را به صورت کامل از نمونه استخراج کند همواره مدنظر بوده است. استحصال یک گونه شیمیایی از نمونه‌های طبیعی یا آزمایشگاهی به منظور آنالیز یا کاربرد دارویی، خوراکی و صنعتی آنها مستلزم حذف سایر گونه‌های شیمیایی همراه در داخل نمونه است. به بیان دیگر، همواره لازم است که گونه‌های شیمیایی مورد نیاز، خالص سازی شده، سپس برای اهداف نامبرده مورد استفاده قرار گیرند. کلیه اعمال و فرآیندهای فیزیکی یا شیمیایی که در این راستا به کار می‌روند، به نام روش‌های جداسازی نامیده می‌شوند. از روش‌های جداسازی می‌توان ته نشینی، نوبلورسازی، انجماد، تبخیر، تقطیر، استخراج مایع- مایع، استخراج فاز جامد، استخراج قطره‌ای، ریزاستخراج با فاز جامد، مبادله یونی، الکترو کروماتوگرافی، الکترو دیالیز و... را نام برد.

استخراج مایع- مایع، عبارتست از انتقال انتخابی یک ماده از یک فاز مایع به فاز دیگر و معمولاً محلول آبی نمونه، با یک حلال آلی امتزاج ناپذیر با آب، استخراج می‌شود. وسیله‌ای که برای ترکیب دو فاز و جدا کردن آنها مورد استفاده است، قیف جدا کننده نام دارد. اساس عملکرد این روش، بر پایه قانون توزیع نرنست است که بیانگر توزیع یک ماده بین دو مایع امتزاج ناپذیر با نسبت‌های یکسان در حال تعادل است. استخراج مایع- مایع به طور گسترده ای به عنوان یک تکنیک اولیه برای جداسازی و پیش تغلیظ آنالیت در نمونه‌های آبی برای ترکیبات آلی و معدنی استفاده می‌شود. با این وجود، این تکنیک دارای نقاط ضعفی از جمله تشکیل امولسیون، استفاده از حجم زیاد حلال، گرانی روش و... است. مزایای این روش، سادگی و عدم نیاز به دستگاه گران قیمت است. این روش کاربرد فراوانی در پیش تغلیظ، استخراج و آنالیزهای زیست محیطی دارد. از آنجائیکه این روش، یک روش کامل محسوب میشود، هنوز هم پر طرفدار بوده و برای استخراج کامل نمونه‌ها از بافت، مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲ و ۳].

ارتباط شیمیایی، یک پدیده‌ی شایع در میان موجودات، از پروکاریوت‌ها تا انسان‌ها است. این ارتباط، شامل انتقال اطلاعات بوسیله پیام‌های رمزگذاری شده می‌باشد. این پیام‌ها می‌توانند از طریق کانال‌های دیداری، شنیداری، شیمیایی، لمسی و حتی الکتریکی فرستاده شوند. پیام‌های شیمیایی، غالباً بین اعضای یک گونه، ارتباط برقرار می‌کنند. بویایی، یکی از حس‌های مهم و ضروری برای انواع جانداران است. اهمیت حس بویایی در حیات و سلامتی جانداران توسط لیندا بوک و ریچارد اکسل که از

جمله پیشگامان کشف پروتئین‌های گیرنده بویایی و درک عملکرد بویایی بودند، اثبات شد. این دو دانشمند، در سال ۲۰۰۴ موفق به دریافت جایزه نوبل شدند. حساسیت نسبت به مواد شیمیایی و کشف غلظت‌های کم مواد شیمیایی پخش شده در هوا از جمله کارایی سیستم بویایی می‌باشد [۴]. یافتن پیام‌های بویایی یا رایحه‌ها که به صورت رمزگذاری شده در هوا و محیط اطراف پخش می‌شوند، برای اکثر جانداران از اهمیت بالایی برخوردار است. رایحه‌هایی که از انواع گونه‌های موجودات زنده منتشر می‌گردند، به طور کلی، با عنوان ترکیبات آلو شیمیایی شناخته می‌شوند. این ترکیبات، توسط موجودات زنده سنتز می‌شوند و برای برقراری ارتباط بین گونه‌های مختلف، استفاده می‌گردند. تعیین محدوده قلمرو، یافتن مسیر لانه، یافتن مکان تجمع با همزیستان و فرار از شکارچی، مثال‌هایی در این باره می‌باشد. به رایحه‌های ناشی شده از هم‌نوع، فرمون گفته می‌شود. واژه فرمون از دو کلمه لاتین Pher به معنای حامل بودن و Hormone به معنای تحریک کننده گرفته شده است در حقیقت نقش فرمون مشابه نقش هورمون‌ها است با این تفاوت که هورمون از غدد مترشحه داخلی حاصل می‌شود در حالی که فرمون‌ها نتیجه فعالیت غدد خارجی است. ترکیب شیمیایی فرمون‌ها و هورمون‌های جانوری مشابه هم است و اغلب آنها از مشتقات استروئیدها هستند. یک فرمون، ایجادکننده یک پیام حسی خارجی است که اطلاعات معناداری را بین اعضای یک گونه‌ی معین منتقل می‌کند. فرمون‌ها، معمولاً محدوده وسیعی از وظایف را در جانداران به عهده دارند [۵].

اولین فرمونی که از نظر شیمیایی شناخته شد، فرمون کرم ابریشم بود که بومبیکول نام داشت. این ماده در سال ۱۹۵۹ میلادی توسط آدولف بوتنانت، بیوشیمی‌دان آلمانی کشف شد [۴]. فرمون‌هایی که بطور آهسته بر روی رفتارهای بعدی تأثیر می‌گذارند را آغازگر (Primer Effect) می‌گویند و از طریق سیستم غدد درون ریز عمل می‌کنند؛ فرمون‌ها قادرند بر روی مراحل تولید مثلی در پستانداران نیز اثر بگذارند. آنها به جذابیت جنسی و رفتارهای مقاربتی کمک کرده و قادرند فیزیولوژی تولید مثل را تعدیل کنند. امروزه، فرمون‌های آفات مختلف، شناسایی و در آزمایشگاه ساخته می‌شود و به صورت تله‌های مختلف در مدیریت آفات به کار بسته می‌شود. از فرمون‌ها می‌توان به طرق مختلف و به منظور کاهش مصرف سموم شیمیایی متداول در جهت کنترل آفات استفاده نمود. از این مواد می‌توان جهت تعیین مقدار تراکم آفات، به دام انداختن آفات در تله‌های مخصوص و همچنین، گمراه کردن آنان جهت جلوگیری از تولید مثلشان استفاده کرد. علاوه بر آن، استفاده روز افزون از حشره‌کش‌های متداول، باعث پیدایش حشرات مقاوم، تغییرات شدید اکولوژیک، نابودی محیط زیست و در نتیجه رکود اقتصادی شده است. تعداد حشرات و آفاتی که به حشره‌کش‌ها مقاوم می‌گردند، روز به روز در حال افزایش است. شایان ذکر است که مقدار فرمونی که بوسیله حشرات ترشح و در هوا منتشر گردیده بسیار کم و در حدود ۱ نانوگرم است. از آنجائیکه ساختار فرمون‌ها در هر گونه از حشرات یگانه و منحصر به فرد است و گونه‌ها، فرمون‌های مجزایی را دارا هستند، از این لحاظ

می‌توان جهت تعیین جمعیت آفت، از این پدیده طبیعی استفاده کرد. تله‌های حاوی فرمون‌ها، به صورت طعمه جهت جلب و به دام انداختن جنس مخالف در مزرعه قرار داده می‌شوند.

حلزون‌های خاکی، دسته‌ای از حلزون‌ها می‌باشند که خارج از آب زندگی می‌کنند و دارای شش یا ریه هستند [۶]. فرمون‌ها، بیش‌تر در نرم‌تنان و موجودات بی‌مهره، نظیر حشرات یافت می‌گردند و در مهره‌داران از اهمیت کمتری برخوردارند. حلزون‌های خاکی، برای برقراری ارتباط با سایر موجودات، از محرک‌های شیمیایی کمک می‌گیرند. روی سر حلزون‌ها دو جفت شاخک حسی قرار گرفته است که در دریافت اطلاعات شیمیایی ایفای نقش می‌کنند. حلزون پوسته‌دار و حلزون بدون پوسته خاکی (اسلاگ)، دارای اندام‌های بینایی ابتدایی بوده و فاقد اندام شنیداری هستند. از این رو، "بویایی" مهم‌ترین ابزار حسی آن‌ها جهت کشف و تعیین موقعیت اشیا از یک مسافت خاص است. حلزون‌ها از حس بویایی برای تشخیص محرک‌هایی از قبیل محدوده محل سکونت، وجود موجودات هم‌نوع و وجود غذا استفاده می‌کنند. بنابراین، قابل درک است که آن‌ها برای بسیاری از رفتارهای جهت‌یابی، به حس بویایی تکیه کنند. بیشتر ریه‌داران خاکی از جمله حلزون‌ها، به دسته‌ی *استیلوماتوفورا* تعلق دارند که بوسیله وجود یک جفت شاخک حسی جلویی و یک جفت شاخک حسی عقبی همراه با سرشان، توصیف می‌شوند [۷].

فرمون‌ها بوسیله‌ی سیستم بویایی سریع‌تر از سیستم چشایی تشخیص داده می‌شوند. ساختار اندام بویایی در بی‌مهرگان و مهره‌داران به طور قابل ملاحظه‌ای شبیه به یکدیگر است. انعطاف‌پذیری بزرگ سیستم بویایی این است که تقریباً هر نوع ماده شیمیایی که اطلاعات مفیدی را برای گیرنده‌های آن‌ها داشته باشد، می‌تواند به عنوان فرمون شناخته شود. سیستم بویایی جانداران، قادر به تشخیص مواد تولیدکننده بو، رایحه‌های ناشی شده از مواد غذایی، محیط‌زیست و شناسایی مواد نیمه شیمیایی می‌باشد [۸]. بیشتر جانداران، هنگام مواجه شدن با رایحه‌های محیطی، از خود عکس‌العمل نشان می‌دهند. توانایی تشخیص رایحه‌ها در جانداران تک‌سلولی مثل باکتری‌ها و همچنین در سایر جانداران، نظیر پستانداران، جانوران مفصل‌دار و نرم‌تنان وجود دارد. دریافت اطلاعات شیمیایی باعث فراهم آمدن اطلاعات بسیار ویژه‌ای راجع به غذا، خطر، جذب هم‌نوعان برای جفت‌گیری یا دفاع از قلمرو می‌گردد. از این جهت، اکثر جانداران برای تضمین بقا و تولید مثل خود، به سیستم بویایی تکیه می‌کنند [۹].

مطالعات نشان داده، حلزون *لیماکس ماکسیموس* از نشانه‌های بویایی برای بازگشت به محل زندگی خود استفاده می‌کند و حلزون‌های *هلیکس پوماتیا* هم، احتمالاً محل زندگی خود را با مکانیزم مشابهی می‌یابند [۱۰]. در آزمایشاتی که بر روی تعدادی از گونه‌های حلزون خاکی انجام دادند، نتایج خوبی راجع به رفتارهای جهت‌یابی و تجمعی حلزون‌ها [۶] و همچنین، منشا محرک‌هایی که این رفتارها را مدیریت می‌کنند، بدست آمد [۷].

علاوه بر آنچه گفته شد، از فرمونهای جنسی جهت کنترل آفات به صورت غیرمستقیم برای ردیابی و یا به صورت مستقیم برای اختلال در جفتگیری و جلب و شکار می‌توان استفاده نمود [۱۱]. فرمون جنسی کرم گلوگاه انار که توسط حشرات ماده تولید می‌گردد، توسط بیکر و همکاران [۱۲] شناسایی شد. فرمون شناسایی شده از غدد فرومونی پروانه‌های ماده مربوط به جمعیت مستقر در خرماهای آلوده واقع در دره Coachella کالیفرنیا جمع آوری شده بود که به وسیله تکنیک‌های گوناگون از جمله کروماتوگرافی گازی- الکتروانتوگرافی، آنالیز کروماتوگرافی جرمی ترکیب شده با طیف سنج جرمی، شناسایی گردید. اجزاء فرمون جنسی شناسایی شده شامل سه ترکیب $9,11,13\text{-tetradecatrienal}$ و ترکیب فرعی آن $9,11\text{-tetradecenal}$ و 9-tetradecadienal به ترتیب با نسبت $10:1:1$ بود. ترکیب اصلی $9\text{-tetradecatrienal}$ به تنهایی قدرت جلب حشرات نر را دارد اما افزودن هر یک از دو ترکیب جزئی و یا حتی یکی از آنها به تنهایی به ترکیب اصلی فرمون، موجب بهبود پاسخ پرواز حشرات نر بر خالف جریان باد شد. زاگاتی و همکاران [۱۳]، فرمون جنسی را از غدد فرومون پروانه‌های ماده استخراج و پس از خالص سازی، ساختار شیمیایی آنها را بوسیله الکتروانتوگرافی- طیف سنج جرمی شناسایی نمود. به طور معمول روش استخراج فرمون‌ها از جانداران، شامل روش‌های استخراج با حلال (روش استخراج فاز مایع) و یا ریز روش استخراج با فاز جامد می‌باشد. همانگونه که اشاره شد، وجود حلزون‌ها در محیط‌های کشاورزی، از جمله آفات برای زمین‌ها و محصولات کشاورزی می‌باشد که برای حذف این آفات از مزارع، از سموم مختلف شیمیایی استفاده می‌شود که این سموم، علاوه بر مضر بودن برای انسان، می‌تواند صدمات جبران ناپذیری را به محیط زیست پیرامون وارد نماید. از این رو، در این پژوهش سعی بر آن خواهد شد تا با استفاده از فرمون‌های موجود در بدن حلزون‌ها، تله فرمونی تهیه شده و در نهایت به کمک این تله فرومونی طبیعی، این آفات را در مزارع و باغات کشاورزی کنترل نماییم. برای این منظور، گام اول شناسایی فرمون‌های موجود در حلزون‌های خاکی خواهد بود، که برای اولین بار در این پژوهش دست به انجام آن، زده شد. علاوه بر آن، دستیابی به این فرمون‌ها می‌تواند به ایجاد محصولی طبیعی و زیست سازگار برای کنترل حلزون‌ها از محیط پیرامون، منجر شود. در این پژوهش، سعی شد تا با استفاده از فنون استخراج فاز مایع ترکیب شده با دستگاه کروماتوگرافی- آشکارساز طیف سنج جرمی، ابتدا، فرمون‌های موجود در بدن برخی گونه‌های حلزون خاکی، با ساده ترین و مقرون به صرفه ترین روش، استخراج شده و در نهایت شناسایی شود. وجود کتابخانه‌های به روز در دستگاه طیف سنج جرمی، می‌تواند اطلاعات دقیقی از فرمون‌های استخراج شده، در اختیار قرار دهد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

در این مطالعه از متانول (درجه خلوص کروماتوگرافی)، آب دوبار تقطیر، استونیتریل (درجه خلوص کروماتوگرافی) و اسید هیدروکلریدریک استفاده شد. همه مواد با درجه خلوص بسیار بالا و از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. فسفریک اسید، استیک اسید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و پتاسیم هیدروکسید استفاده شده در تهیه بافرها، همگی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. همه مواد شیمیایی دیگر با خلوص "معرف تجزیه‌ای" از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- نمونه برداری

در این تحقیق از ۱۲ حلزون خاکی استفاده شد که همگی از یک قطعه زمین جمع‌آوری شدند و در شرایط استاندارد (دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) از آنها نگهداری شد. همگی آنها متعلق به یک خانواده بوده و وزن آنها در حدود ۲/۵ گرم در نظر گرفته شد. حلزون‌ها در درون یک محفظه شیشه‌ای دارای درپوش، قرار گرفتند. تصویر حلزون‌های مورد استفاده در شکل ۱ نشان داده شده است. شایان ذکر است که در مرحله نمونه‌برداری از حلزون‌های خاکی، قطعه زمینی با مختصات جغرافیایی ۵۲/۶۸۹۲۱۱ و ۳۶/۷۱۱۸۴۷ واقع در شهرستان بابلسر انتخاب شد. حلزون‌های متعلق به گونه *Xerolenta obvia* از محل نمونه‌برداری جمع‌آوری شدند.



شکل ۱- تصاویر مربوط به شکل ظاهری حلزون مورد بررسی

۲-۳- وسایل و ابزار مورد استفاده

در این آزمایش، از وسایل زیر استفاده شد که عبارتند از: کیف شیشه‌ای، بشر، هاون، کاغذ صافی واتمن، ارلن مایر، بالن حجمی با حجم‌های مختلف ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی لیتری، پی پت ۱ و ۲ میلی لیتری، لوله آزمایش، آسیاب، شیشه نگهداری مخصوص عصاره، سرنگ مخصوص تزریق به GC/MS.

۲-۴- دستگاه کروماتوگرافی مورد استفاده

در این پژوهش، به منظور شناسایی فرمون استخراج شده از حلزون‌ها، از دستگاه کروماتوگرافی گازی کوپل شده با آشکارساز اسپکترومتر جرمی، استفاده شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی نوع Varian CP-3800 و دستگاه طیف سنج جرمی Saturn ۲۲۰۰

مورد استفاده قرار گرفت. محفظه تزریق دستگاه از نوع Spilt/Spiltless بود. فاز متحرک، گاز حامل هلیوم بود. ستون مورد استفاده در این روش از نوع DP-5 MS بوده که ستونی غیر قطبی با طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر بود. دمای محفظه تزریق و آشکارساز دستگاه بر روی ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد، تنظیم شد. به منظور جداسازی اجزا، دمای ستون در ابتدا برای مدت ۲ دقیقه بر روی ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه به دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و برای مدت زمان ۳۰ دقیقه در این دما، باقی ماند.

۲-۵- استخراج و شناسایی ترکیبات فرار اختصاصی حلزون ها به کمک روش استخراج فاز مایع

به منظور انجام فرآیند استخراج، ابتدا حلزون‌های جمع آوری شده، از محیط نگهداری، خارج شده و شسته شدند. سپس، حلزون‌های شسته شده، به درون یک بشر ۵۰ mL که حاوی ۵ mL متانول و ۵ mL آب بود، وارد شدند و توسط دسته هاون، کاملاً خرد گشتند. محلول داخل بشر، کمی تکان داده شد تا محتویات بدن حلزون، در مجاورت حلال قرار گرفته و فرمون‌های مورد نظر، استخراج شوند. محلول حاوی نمونه‌های مورد اندازه‌گیری، به یک ظرف درب‌دار پلاستیکی منتقل گشت. درب ظرف به خوبی پلمپ گردید و برای چند ساعت درون یخچال قرار گرفت. پس از گذشت زمان مورد نظر، محلول از یخچال خارج شد، قسمت مایع آن از اندام‌های بدن حلزون جدا شد و به مدت ۱۰ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ دور بر دقیقه، قرار گرفت. سپس، محلول رویی توسط کاغذ صافی، صاف شده و به قیف دکانتور منتقل شد. این محلول در مجاورت مخلوط ۵ mL متانول و ۵ mL هگزان قرار گرفت و به آرامی هم زده شد. این عمل برای ۵ mL متانول خالص نیز تکرار شد. در نهایت، حجم حلال آلی بدست آمده، توسط دمیدن جریان گاز نیتروژن، کاهش پیدا کرد تا نمونه‌های مورد نظر تغلیظ شده و در نهایت، ۱ میکرولیتر از عصاره بدست آمده با دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، مورد آنالیز قرار گرفت. شمای کلی از روش استخراج، در شکل ۲ نشان داده شده است.

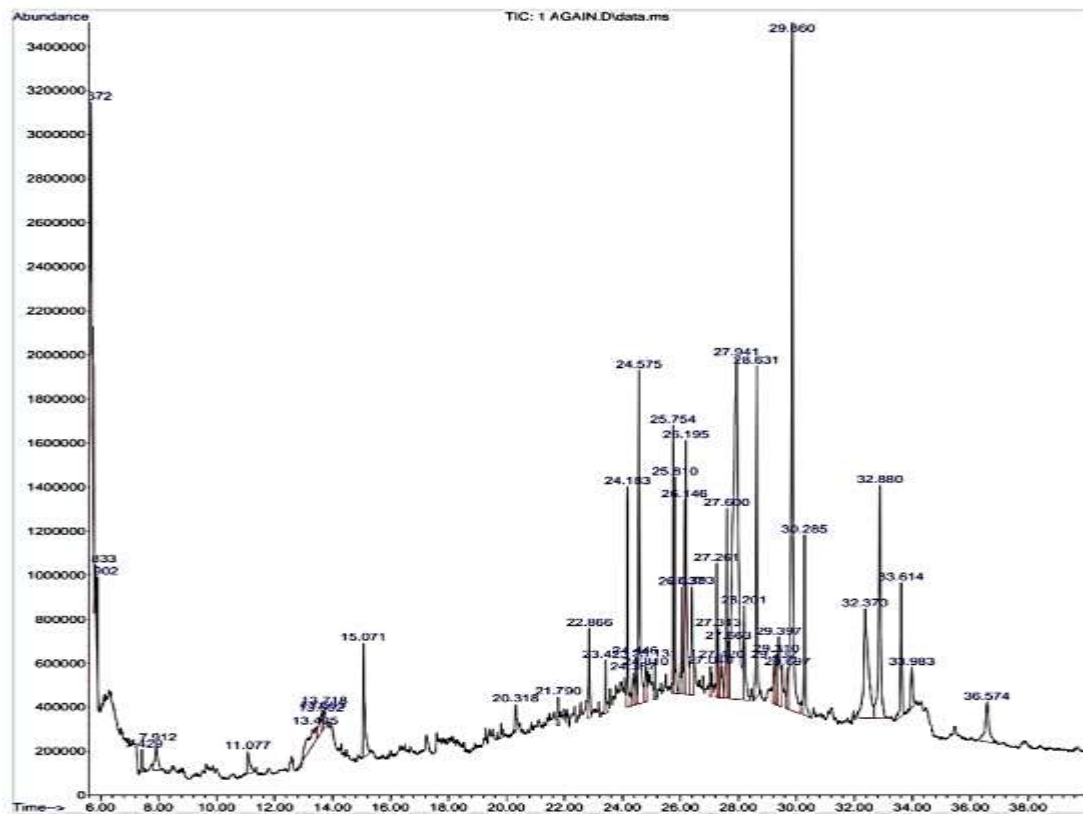


شکل ۲- شمای کلی روش استخراج پیشنهادی

۳- بحث و نتیجه‌گیری:

۳-۱- بررسی نتایج حاصل از آنالیز GC-MS

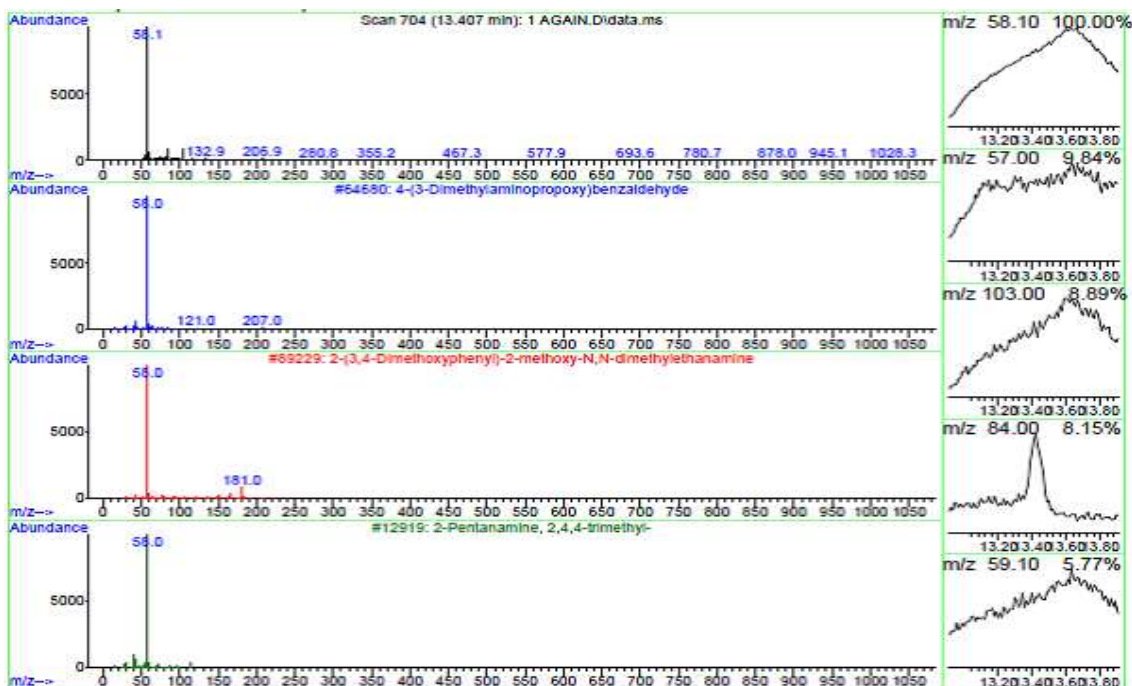
کروماتوگرام کلی حاصل از آنالیز عصاره استخراج شده به کمک دستگاه GC-MS، در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که نشان داده شده است، این کروماتوگرام، بیانگر وجود ترکیبات زیاد و متنوعی درون محلول نمونه استخراج شده حاوی فرمون حلزون، می‌باشد. با این حال، پیک‌های شاخص ظاهر شده در دقیقه‌های ۱۵/۰۷، ۲۳/۴۲، ۲۷/۹۱، ۲۸/۶، ۲۹/۸۶ و ۳۲/۸ به ترتیب شامل مولکول‌های 3,4-Octadiene, 7-methyl-2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methoxy-N,N-dimethylethanamine، Dimethyl aminomethyl (triethyl) stannane، 4-Hexadecen-6-yne, (E)-، 2-Pentadecanone- 6,10,14-trimethyl، Desmosterol، 2,3-dihydroxypropyl ester و 7-methyl- 3,4-Octadiene، 4-Methyl-2,5-dimethoxybenzaldehyde بود. براساس مقایسه شکست‌های یونی این ترکیبات با شکست‌های یونی فرمون حشرات و نیز منابع قبلی مشخص شد ساختار شیمیایی این پیک‌ها متعلق به اجزای تشکیل دهنده فرمون حلزون است. از اینرو، پس از بررسی ترکیبات شناسایی شده و مقایسه آنها با کتابخانه موجود در دستگاه GC-MS، و نیز مقایسه آنها با نتایج سایر مقالات، مشخص شد که تعداد قابل توجهی از مواد موجود در عصاره بدن حلزون، شباهت‌های ساختاری با فرمون‌های سایر موجودات دارند.



شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC-MS عصاره حلزون ۶ها

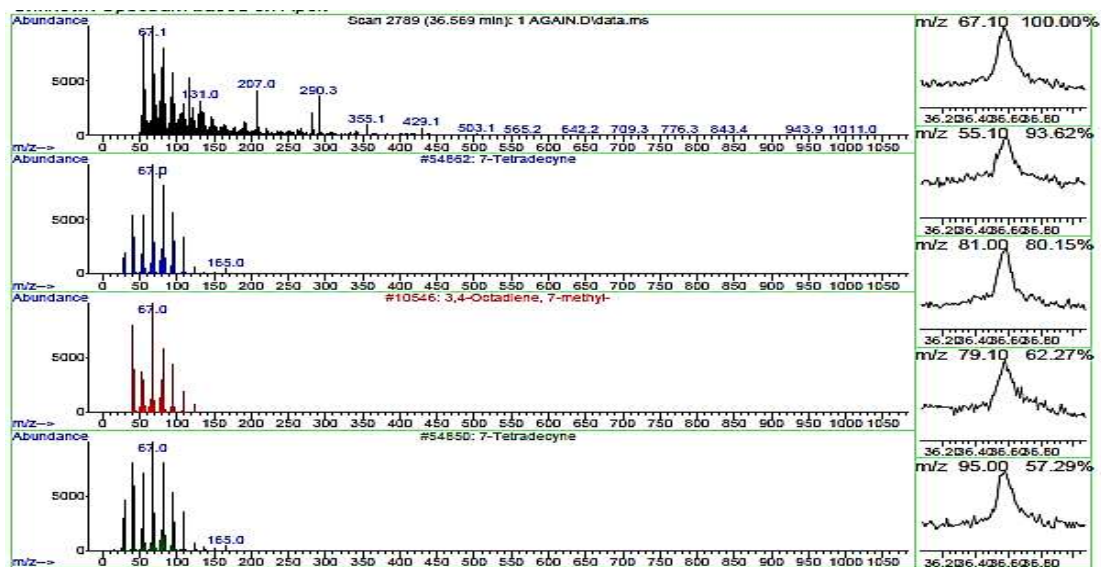
۳-۲- مقایسه نتایج حاصل با فرمون سایر جانداران

پس از بررسی ترکیبات شناسایی شده توسط کتابخانه دستگاه GC-MS و مطالعه و بررسی فرمون‌های شناخته شده در سایر جانداران، شباهت‌های قابل توجهی، یافت گردید و از این رو، می‌توان اظهار داشت که احتمالاً این ترکیبات برای حلزون‌ها نیز نقش فرمون را دارا هستند. یکی از این ترکیبات، 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methoxy-N,N-dimethylethanamine می‌باشد. این ترکیب، از جمله ترکیباتی است که در ساختار ترکیبات فرمونی خفاش شانه زرد شمالی وجود دارد [۱۴]. آنالیز طیف جرمی مربوط به این ماده، در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۴ مشخص است، وجود دی متوکسی فنیل در ساختار یکی از ترکیبات شناسایی شده عصاره حلزون خاکی قابل اثبات است. این ترکیب دارای فرمول شیمیایی $C_{13}H_{21}NO_3$ بوده و دارای جرمی معادل با ۲۳۹/۳۱ می‌باشد.



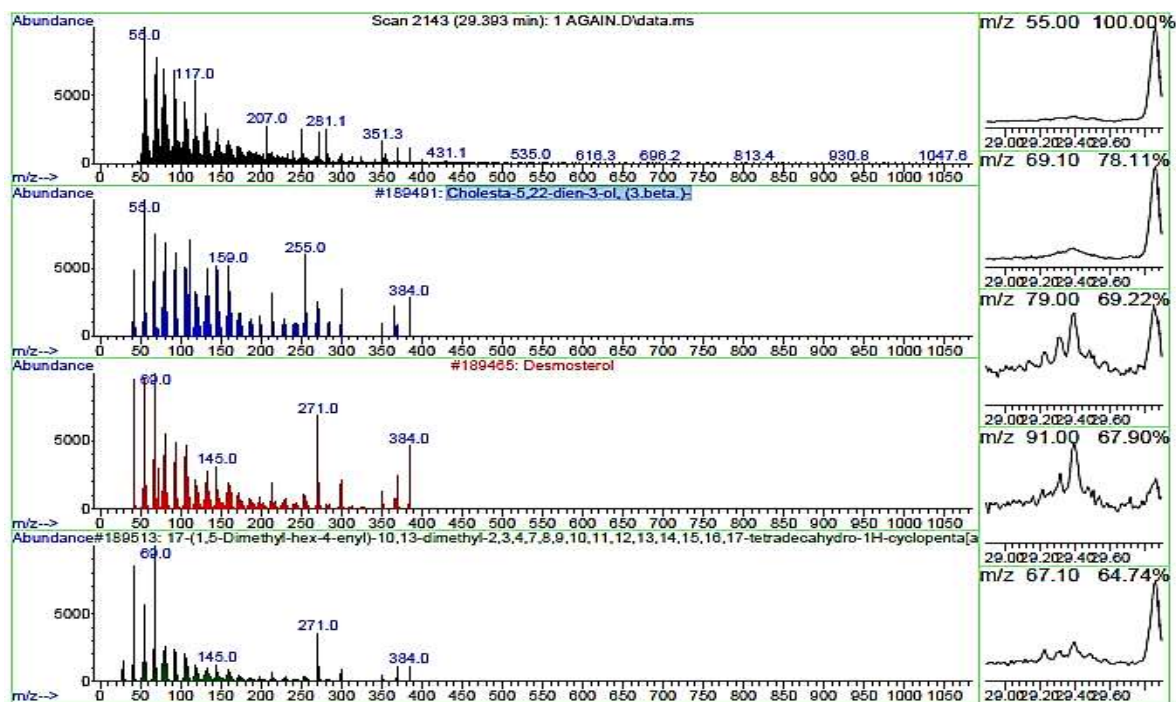
شکل ۴- طیف آنالیز جرمی مربوط به ترکیب دارای دی متوکسی فنیل، در عصاره حلزون خاکی

ترکیب دیگری که به عنوان فرمون در بدن حلزون شناسایی گردید، 3,4-Octadiene, 7-methyl- می‌باشد. این ترکیب در ساختار مواد فرمونی حشره توری چنار نیز وجود دارد [۹]. آنالیز طیف جرمی این ماده، در شکل ۵ آورده شده است. این ترکیب دارای فرمول شیمیایی C_9H_{16} بوده و وزنی معادل ۱۲۴/۲۲ را دارا می باشد.



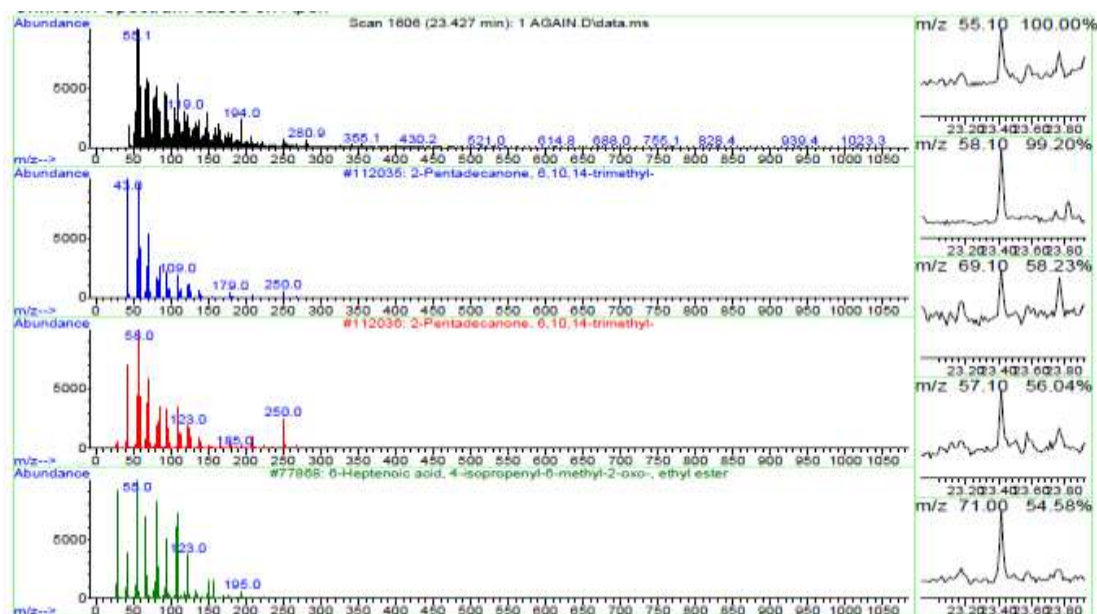
شکل ۵- آنالیز طیف جرمی مربوط به ترکیب دارای اکتا دی ان در عصاره حلزون خاکی

دموسترول با نام دیگر Cholesta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.)-، به عنوان پرو ویتامین D، در مارمولک سنگی نقش نوعی فرمون جنسی را ایفا می‌کند [۱۵]. این ترکیب، در عصاره حلزون خاکی نیز شناسایی شده است. آنالیز طیف جرمی این ماده در شکل ۶ نشان داده شده است. این ترکیب دارای فرمول شیمیایی $C_{27}H_{44}O$ و وزن مولکولی معادل با ۳۸۴/۶۳ می‌باشد.



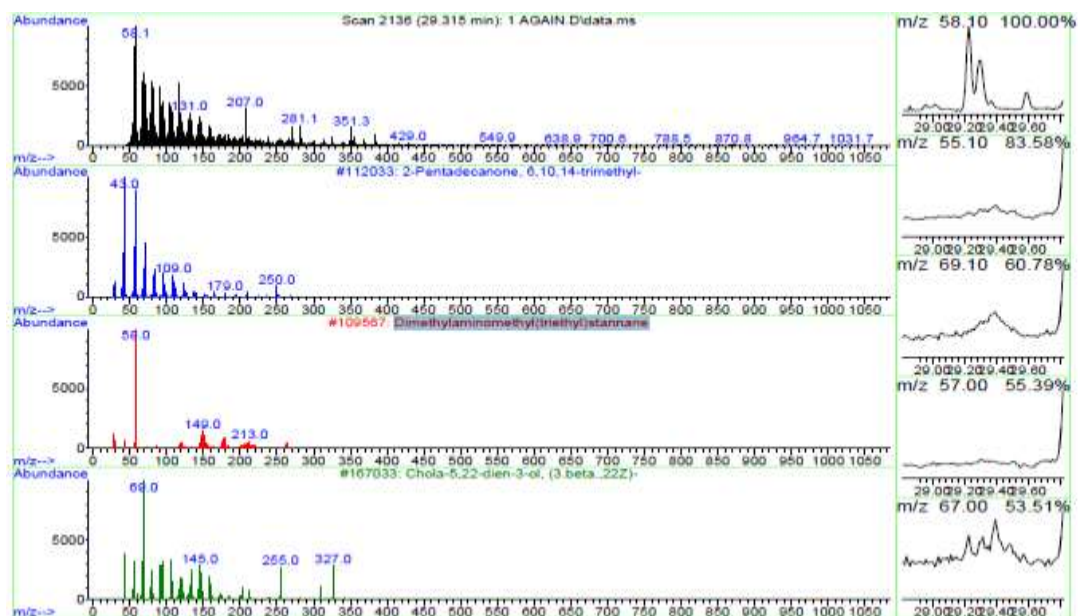
شکل ۶- آنالیز طیف جرمی مربوط به ترکیب دارای کولستا دی ان (دموسترول)، در عصاره حلزون خاکی

همانگونه که اشاره شد، دسموسترول، یکی از استروئیدهایی است که به طور طبیعی در بدن برخی نرم‌تنان وجود دارد. این ترکیب، می‌تواند به عنوان ماده پیش فرمون عمل کرده و طی فرایندهایی به فرمون تبدیل شود [۱۶]. ترکیب دیگری که در نمونه‌های استخراجی از بدن حلزون توسط دستگاه GC/MS شناسایی شد 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl می‌باشد. این ترکیب دارای فرمول شیمیایی $C_{18}H_{36}O$ بوده و جرم مولکولی معادل با ۲۶۸/۴۷ دارد. طیف آنالیز جرمی مربوط به این ماده در شکل ۷ آورده شده است. مطالعات کتابخانه‌ای نشان داد که این ماده، در روند شناسایی فرمون جنسی نوعی سوسک، به عنوان یکی از مواد اصلی یافت شده در طیف GC-MS بوده است [۱۷].



شکل ۷- طیف آنالیز جرمی مربوط به ترکیب ۱۴،۱۰۶-تری متیل-۲-پنتا دکانون موجود در عصاره حلزون خاکی

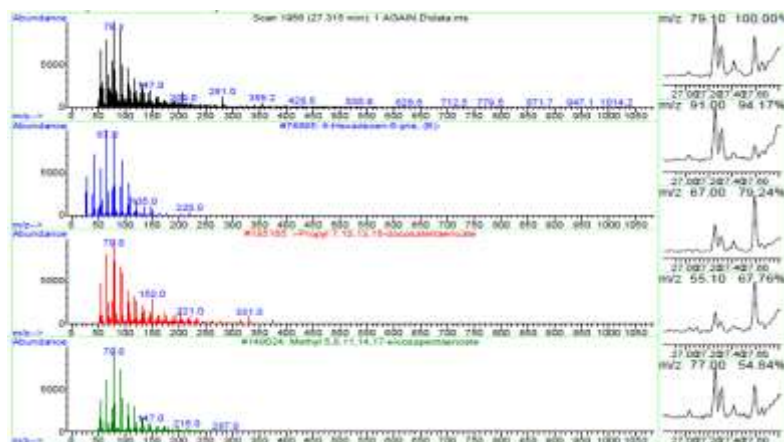
استانان، با نام کامل Dimethyl aminomethyl (triethyl) stannane ترکیبی است که به عنوان ماده اولیه سنتز فرمون پروانه کولی مورد استفاده قرار گرفته است [۱۸]. طیف آنالیز جرمی این ماده، در شکل ۸ قابل مشاهده است. این ماده، دارای ساختار شیمیایی معادل با $C_9H_{23}NSn$ بوده و وزن مولکولی برابر با ۲۶۴ گرم بر مول دارد.



شکل ۸- آنالیز طیف جرمی مربوط به ترکیب دارای استانان موجود در عصاره حلزون خاکی

ترکیب دیگری که در ساختار ماده استخراج شده از بدن حلزون، مشاهده شد، Hexadecen-6-yne می‌باشد. مطالعات کتابخانه‌ای نشان داد که این ماده، به عنوان فرمون جنسی تجمعی نوعی سوسک متعلق به آمریکای جنوبی شناخته شده است

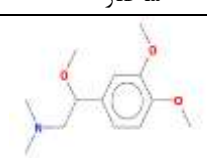
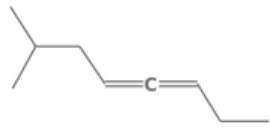
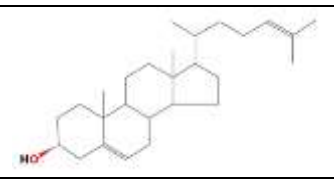
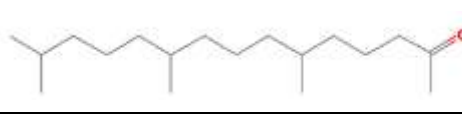
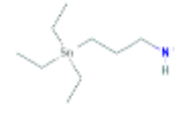

[۱۹]. همانطور که در شکل ۹ مشخص است، این ترکیب در عصاره حلزون حاکی شناسایی شده است. این ماده دارای ساختار شیمیایی معادل با $C_{16}H_{28}$ و وزن مولکولی برابر با ۲۲۰/۳۹ گرم بر مول را دارا می‌باشد.



شکل ۹- آنالیز طیف جرمی مربوط به-4-Hexadecen-6-yne, (E) موجود در عصاره حلزون حاکی

نتایج حاصل از این بررسی و تطبیق نتایج حاصل با مطالعات قبلی نشان داد که برخی از ترکیبات استخراج شده از بدن حلزون، می‌توانند به عنوان فرمون شناسایی شوند. ساختار ترکیبات حاصل در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ساختار شیمیایی، فرمول مولکولی و وزن مولکولی فرمون‌های شناسایی شده در بدن حلزون

نام ترکیب	وزن مولکولی	فرمول مولکولی	ساختار
2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methoxy-N,N-dimethylethanamine	۲۳۹/۳۱	$C_{13}H_{21}NO_3$	
3,4-Octadiene, 7-methyl-	۱۲۴/۲۲	C_9H_{16}	
Desmosterol	۳۸۴/۶۳	$C_{27}H_{44}O$	
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	۲۶۸/۲۴	$C_{18}H_{36}O$	
Dimethyl amino propyl triethyl stannane	۲۶۴/۰۰	$C_9H_{23}NSn$	
4-Hexadecen-6-yne	۲۲۰/۲۹	$C_{16}H_{28}$	

علاوه بر آنچه بیان شد، مطالعه جدید و مشابهی بر روی فرمون‌های حلزون سیاه خانواده *Cornu aspersum* انجام شد [۲۰]. نتایج حاصل نشان داد که ترکیبات مختلفی از جمله استایرن، بنزالدهید، دکان، لیمونن، اتیل هگزانول، نونانال، دکانال، تترادکان و پروپانوئیک اسید، به عنوان فرمون در بدن این گونه خاص از حلزون وجود دارد. نگاه دقیق تر به طیف حاصل از GC/MS مربوط به حلزون مورد مطالعه در این پژوهش (گونه *Xerolenta obvia*)، نشان داد که در این حلزون مواد مشابه به شرح زیر وجود دارد که این ترکیبات نیز می‌توانند به نقش فرمون را ایفا نمایند:

۱- (3-Dimethylaminopropoxy) benzaldehyde-4 در زمان بازداری ۱۳/۴۰

۲- 4-Methyl-2,5-dimethoxybenzaldehyde در زمان بازداری ۲۰/۳۱

۳- Octadecanoic acid در زمان بازداری ۲۶/۰۳

۴- Tetradecanone در زمان بازداری ۲۹/۲۳

۵- 1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester در زمان بازداری ۳۰/۲۸

۶- Propanoic acid در زمان بازداری ۳۲/۳۷

همانگونه که مشاهده می‌شود، اگر چه خانواده دو حلزون، متفاوت می‌باشد، ولی در بین این دو گونه، ترکیبات حاوی بنزالدهید، دکان، تترادکان و پروپانوئیک اسید، مشترک می‌باشد که می‌تواند این موضوع را اثبات کند که اگرچه هر گونه دارای فرمون‌های مخصوص به خود می‌باشد، ولی برخی از فرمون‌ها در بین جانداران مشترک است.

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق، برای اولین بار، فرمون‌های موجود در بدن حلزون خاکی گونه *Xerolenta obvia*، استخراج و شناسایی شد. حلزون‌های خاکی، از جمله آفات مهمی هستند که به محصولات کشاورزی آسیب‌های قابل توجهی وارد می‌سازند. حلزون‌ها همانند حشرات، جهت برقراری ارتباط با همدیگر، از فرمون‌های فرار استفاده می‌کنند و از این راه، پیغام‌های مختلف را در بین اعضای گونه‌ی خود رد و بدل می‌نمایند. از این جهت، شناسایی این فرمون‌ها و استفاده از آن‌ها جهت طراحی تله‌های فرمونی، می‌تواند نوید بخش ایجاد روشی بهتر جهت کنترل حلزون‌های زمین‌های کشاورزی و مبارزه با آن‌ها گردد. امروزه جهت کنترل جمعیت حلزون‌ها و مبارزه با آن‌ها، از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که پرکاربردترین آن‌ها، استفاده از سموم شیمیایی است. این سموم علی‌رغم از بین بردن این آفت مهم زمین‌های کشاورزی، به مرور زمان خاک را آلوده می‌کنند و به محیط زیست آسیب می‌رسانند. از این رو، یافتن روشی جهت مبارزه با حلزون‌ها که در عین موثر بودن، دوست‌دار محیط زیست باشد، جزو دغدغه‌های مهم حامیان محققین است.

در این پژوهش سعی شد تا با استفاده از روش استخراج فاز مایع، فرمون‌های موجود در بدن حلزون خاکی، استخراج شده و سپس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز طیف سنج جرمی، این اجزاء جداسازی و شناسایی شوند. نتایج حاصل به همراه تطبیق آنها با مطالعات کتابخانه‌ای پیشین، نشان داد که در بدن حلزون خاکی، ترکیبات شیمیایی مختلفی از جمله 2-3,4-Octadiene, 7-methyl-,2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methoxy-N,N-dimethylethanamine, Dimethyl aminomethyl (triethyl) stannane, 4-Hexadecen-6-yne, (E)-, Pentadecanone- 6,10,14-trimethyl, Desmosterol, 2,3-dihydroxypropyl ester و methyl- 3,4-Octadiene, 7- 4-Methyl-2,5-dimethoxybenzaldehyde وجود دارد که می‌توانند در نقش پیام رسان شیمیایی (فرمون) عمل کند. علاوه بر آن، مقایسه نتایج به دست آمده از حلزون گونه مورد نظر با فرمون‌های حلزون سیاه خانواده Cornu aspersum نشان داد که ترکیبات حاوی بنزآلدهید، دکان، تترادکان و پروپانویک اسید، در هر دو گونه یافت شده و مشترک می‌باشد که می‌تواند این موضوع را اثبات کند که اگرچه هر گونه دارای فرمون‌های مخصوص به خود می‌باشد، ولی برخی از فرمون‌ها در بین جانداران مشترک است.

۵- تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنه) دانشگاه مازندران انجام شده است.

۶-مراجع

- [1] M. Bazregar, A. Asghari, M. Rajabi, *J. Of Applied Chemistry*, **9(32)** (2015) 81-88. doi: 10.22075/chem.2017.684. In Persian.
- [2] M. Rezaee, F. Khalilian, *J. Of Applied Chemistry*, **11(41)** (2016) 99-108. doi: 10.22075/chem.2016.2281. In Persian.
- [3] S. Masoum; N. Ghasemi., *J. Of Applied Chemistry*, **11**, (2016) 165. doi: 10.22075/chem.2017.749, In Persian
- [4] V.A. Butenandt, *Zeitschrift für Naturforschg*, **14** (1959) 283.
- [5] M.D. Ginzl, *Encyclopedia of Animal Behavior*. 2th ed. Elsevier Ltd., Oxford, UK, 2010, pp. 26.
- [6] R. Chase, R.P. Croll, *J. Comp. Physiol.*, **143** (1981) 357.
- [7] T. Wyatt, *Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures*, Elsevier Ltd., University of Oxford, Oxford, UK, (2009), pp. 110.
- [8] V. Grabe, S. Sachse, *Fundamental principles of the olfactory code*, BioSystems, Department of Evolutionary Neuroethology, Germany, (2017), pp. 3.
- [9] D. Senseman, A. Gelperin, *Malacol. Review*, **7** (1971) 51.
- [10] P.E. Howse, *Insect pheromones and their use in pest management*, Chapman and Hall, London, UK, (1998), pp. 12.
- [11] T.C. Baker, W. Francke, J.G. Millar, C. Lofstedt, B. Hansson, *J. Chem. Ecol.*, **17** (1991) 1973.

- [12] P. Zagatti, P. Lucas, P. Genty, *J. Chem. Ecol.* **22** (1996) 1103.
- [13] C.G. Faulkes, J.S. Elmore, D.A. Baines, B. Fenton, Peer J, *Zool. Sci.*, **7** (2019) 7734.
- [14] J. Martin, P. Lopez, *Proc. Royal Soc. B*, **273** (2006) 2619.
- [16] E. Zeeck, J.D. Hardege, A. Willig, *Steroids*, **59** (1994) 341.
- [17] K. Shimomura, S. Matsui, K. Ohsawa, *Chemoecology*, **26** (2016) 15.
- [18] J.A. Marshall, J.A. Jablonowski, H. Jiang, *J. Org. Chem.*, **64** (1991) 2152.
- [19] W.D. Silva, J.M.S. Bento, L. Hanks, J.G. Millar, *J. Chem. Ecol.*, **44** (2018) 1115.
- [20] K.R. Ballard, A.H. Klein, R.A. Hayes, T. Wang, S.F. Cummins, *Cornu aspersum. PLoS One* **16** (2021) 0251565.