تحديد التركيب الكيميائي للزيت الأساسي المستخلص من بذور نبات السلبين GC/MS باستخدام تقنية

الدكتور حسن البودي* الدكتور محمد ناصر** نور آصف عباس***

(تاريخ الإيداع 27 / 4 / 2017. قُبِل للنشر في 26 / 10 /2017)

□ ملخّص □

تم فصل الزيت من بذور نبات السلبين Gundelia Tournefortii ، الذي ينتمي إلى العائلة النباتية النجمية (Asteraceae) والذي يعد من النباتات العشبية الطبية المنتشرة بشكل واسع في البيئة السورية، بطريقة الاستخلاص المستمر بالمذيبات باستخدام جهاز سوكسليت. تم تحديد التركيب الكيميائي للزيت المستخلص باستخدام تقنية الكرماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطيافية الكتلة GC/MS . وأدى التحليل إلى التعرف على 20 مركب وتميز الزيت المستخلص بالتركيز العالي لكل من المركبات التالية: حمض اللينوليك (%52.9)، حمض البالميتيك (%10.1) والسكوالين (%10.1)

الكلمات المفتاحية: الفصيلة النجمية ، Gundelia Tournefortii ، الزيت العطري ، الكروماتوغرافيا .GC/MS

^{*} أستاذ مساعد - قسم الكيمياء- كلية العلوم- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

^{**} أستاذ - قسم الكيمياء- كلية العلوم- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

^{**} طالبة دراسات عليا (ماجستير) - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

Determination of the chemical composition of the extracted Oil from Gundelia Tournefortii Seeds using GC/MS

Dr.Hasan Alboudi* Dr.Mohamad Naser** Nour Asef Abbas***

(Received 27 / 4 / 2017. Accepted 26 / 10 /2017)

\Box ABSTRACT \Box

The extracted oil from Gundelia Tournefortii seeds, which belongs to Asteraceae family and which is known as one of the medical herbal plants that is widely spread in the Syrian environment, was isolated using soxhlet continuous extraction. It's chemical composition was determined by GC/MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry). The analysis led to identification of 20 components. The extracted oil was characterized by high content of Linoleic Acid (52.9%), Palmitic Acid (20.1%) and Squalene (10.1%).

Keywords: Asteraceae, Gundelia Tournefortii L., Essential Oil, GC-MS.

^{*}Associat Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Tishreen, Lattakia, Svria.

^{***} Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Tishreen, Lattakia, Syria.

*** Postgraduate Student, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Tishreen, Lattakia, Syria.

مقدمة:

عرف الإنسان النباتات الطبية منذ القدم وقد اهتم بها لكونها أحد المصادر الرئيسة للمواد الفعالة بيولوجياً بهدف الحصول على الأدوية اللازمة لمعالجة الكثير من الأمراض. ونظراً لأهميتها في غذاء الإنسان وعلاج أمراضه المتعددة، وقع اختيارنا على نباتGundelia Tournefortii لوفرته في البيئة السورية المحلية ولعدم التطرق إليه من قبل الباحثين السوريين في دراساتهم حتى تاريخه.

يعد نبات (Gundelia Tournefortii) نبات شوكي ينتمي إلى الفصيلة النجمية (Asteraceae) من الجنس (Gundelia Tournefortii)، وينتشر بشكل كبير في بلدان منطقة البحر المتوسط مثل سوريا، تركيا، مصر وأيضاً يتواجد في إيران و أذربيجان.[1] ويعرف بأسماء شائعة عديدة منها: العكوب – شوكة النصاري – الخرشوف.

ينمو سنوياً من بداية فصل الربيع وحتى نهاية فصل الصيف. يصل ارتفاعه إلى 50 سم وينتهي كل جذع برأس شوكي بيضوي الشكل والأوراق الخضراء تحتوي على عروق بيضاء على طول الورقة. ويوضح الشكل (1) شكل نبات Gundelia Tournefortii



الشكل (1): شكل نبات Gundelia Tournefortii

يتواجد هذا النبات برياً في مناطق مختلفة مثلاً جوانب الطرق وفي الأراضي القاحلة والجافة، ويُعنى بزراعته واستثماره طبياً في أوروبا والولايات المتحدة الأمريكية نظراً لفوائده الطبية المختلفة [2] . حيث تستخدم خلاصة بنور هذا النبات في معظم بلدان العالم كدواء مهم للكبد نظراً لاحتوئه على مادة السيليمارين العالم كدواء مهم للكبد نظراً لاحتوئه على مادة السيليمارين هي عبارة عن خليط معقد من جزيئات بولي فينولية تحتوي على 7 أنواع من الفلاقوليغنان.[4]

Silybin A, Silybin B, Isosilybin A, Isosilybin B, Silychristin A, Silychristin B, Silydianin

أظهرت بعض الدراسات أن نبات Gundelia Tournefortii هو نبات متعدد الاستخدامات الطبية وعلى سبيل المثال يستخدم في: يعالج البهاق Vitiligo، يزيل آلام الصدر Chest Pain، يحمي من السكتات القلبية Heart المثال يستخدم في: يعالج البهاق Vitiligo، يزيل آلام الصدر Stroke، يخفض مستوى السكر في الدم Diabetes، مضاد الالتهابات Inflammations ومعالج لبعض مشاكل

الكبد Kidney Problems. بالإضافة إلى مادة السيليمارين يحتوي نبات Gundelia Tournefortii على عدة مكونات فعَالة أهمها الفلافونيدات. [5]

أثبتت الدراسات والأبحاث التي أُجريت على نبات Gundelia Tournefortii لتحديد التركيب الكيميائي للزيت المستخلص من بذور هذا النبات المتواجد في منطقة زاغروس في إيران باستخدام طريقة الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطيافية الكتلة GC/MS ، بأن المكونات الأساسية هي: [6] Palmitic Acid(12.48%) ,Lauric Acid(10.59%) ,Myristic Acid (4.45%)

كما أظهرت دراسة أخرى أجريت في إيران أن نسب الحموض الدهنية في بذور هذا النبات بلغت: [7] Linoleic Acid (57.8%), Oleic Acid (28.5%), Palmitic Acid (8.1%), Stearic Acid (2.5%)

وفي دراسة أجريت في منطقة كردستان العراق تبين وجود الحموض الدهنية التالية: [8] Myristic Acid, Stearic Acid, Linoleic Acid, Oleic Acid, Palmitic Acid وبلغت نسبتها:

Oleic Acid(40.13%), Palmitic Acid (29.42%), Linoleic Acid(20.33%), Stearic Acid(9.78%)

وبينت دراسة في تركيا أن نسب المكونات الرئيسية للزيت الأساسي المستخلص من نبات Gundelia وبينت دراسة في تركيا

Linoleic Acid (57.85), Oleic Acid (28.5%), Palmitic Acid (8.1%), Stearic Acid(2.5%)

وفي دراسة أخرى في إيران لوحظ وجود الحموض التالية: Oleic, المحموض إيران لوحظ وجود الحموض التالية: Linoleic Acid في إيران لوحظ وجود (27.99%), Palmitic Acid (9.8%), Stearic Acid (3.3%) الموجودة في زيت عباد الشمس والتي كانت: Oleic Acid (55.4%), Oleic Acid (55.4%), وهذه القيم دلت على صلاحية هذا الزيت للاستهلاك البشري.[10]

من هذه الدراسات ودراسات أخرى تبين وجود عوامل طبيعية تؤثر على محتوى النبات من الحموض الدسمة وهي التي تحدد تركيب مكوناته الكيميائية وأيضاً تساهم في زيادة أو خفض تراكيز هذه المكونات داخل النبات، ومن أهم هذه العوامل طبيعة المنطقة ونوع التربة.

أهمية البحث وأهدافه:

يمتاز نبات Gundelia Tournefortii بأهمية كبيرة لاحتوائه على العديد من المركبات الكيميائية الفعالة ذات التأثيرات البيولوجية المختلفة، لذلك فقد اهتم العديد من الباحثين من دول متعددة بدراسته ووقع اختيارنا على هذا النبات لكونه أولاً ينتشر بشكل واسع في الأراضي السورية، ويحتوي على بعض المركبات التي تملك قيمة غذائية و فعالية بيولوجية كالحموض الدهنية والتربينات وبعض الألدهيدات والكحولات، وثانياً كونه لم يدرس في الجمهورية العربية السورية في مراحل سابقة.

ونفذت هذه الدراسة كخطوة أولى بهدف:

- إلقاء الضوء على أحد النباتات المهمة من الناحية الطبية والغذائية المتواجد في حوض البحر المتوسط والعديد من الأقطار العربية.

- إجراء عملية استخلاص للزيت الأساس من بذور نبات Gundelia Tournefortii وتحديد النسبة المئوية لمكوناته.

- مقارنة المكونات الأساسية للزيت المستخلص من بذور نبات GundeliaTournefortii مع تلك الموجودة في مناطق أخرى في العالم.

طرائق البحث ومواده:

الأجهزة: جهاز الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطيافية الكتلة Triple Quad GC/MS طراز 7000 من إنتاج شركة Agilent ، جهاز سوكسليت ، المبخر الدوار.

المواد: بذور نبات السلبين Gundelia Tournefortii تم جمعها من منطقة القدموس في محافظة طرطوس ، ايتر البترول ، هكسان.

الجزء العملى:

• جمع بذور النبات:

تم جمع بذور نبات السلبين Gundelia Tournefortii بين شهر آب وأيلول سنة 2016 من منطقة القدموس في محافظة طرطوس ونظفت جيداً من الشوائب العالقة بها ثم تم تجفيفها في الظل مع التقليب المستمر لمنعها من التعفن، بعد ذلك تم الحصول على مسحوق البذور الناعم من خلال طحنها بواسطة مطحنة كهربائية.

• استخلاص الزيت الأساسى:

تم فصل الزيت من بذور نبات السلبين Gundelia Tournefortii بطريقة الاستخلاص المستمر بجهاز سوكسليت Soxhlet Contiuous Extraction وباستخدام ايتر البترول كمذيب. حيث تم وضع 10 غرام من مسحوق بذور النبات الموضوعة في خرطوشة (Thumble) و 250ml من ايتر البترول واستغرقت عملية الاستخلاص مدة 4 ساعات وبدرجة حرارة (60-40 درجة مئوية)، بعدها ركز المحلول باستخدام جهاز المبخر الدوار (Evaporater عرف فصل كامل المذيب وحصلنا على زيت ذو لون بني مصفر، تم جمعه ووضعه في أنبوب اختبار محكم الإغلاق ووضع في الثلاجة بدرجة حرارة (4) مئوية حتى وقت التحليل بجهاز GC/MS. [11]

• التحليل بجهاز الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطيافية الكتلة GC/MS:

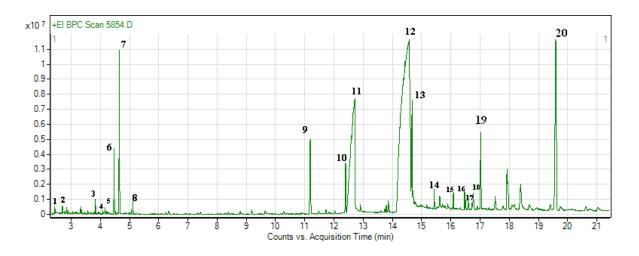
أجري التحليل الكيفي باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطيافية الكتلة GC/MS، وذلك التعرف على المكونات الأساسية للزيت المستخلص من بذور نبات Gundelia Tournefortii تم استخدام جهاز HP5-MS(30m* 0.25mm, من نوع Agilent مزود بعمود شعري من نوع Quad GC/MS طراز 7000 من شركة Agilent مزود بعمود شعري من نوع ,PI من محلول الزيت في الجهاز، 0.25µm) وكان المحل المستخدم هو الهكسان بنسبة تدفق 1:10 حيث حقن الها من محلول الزيت في الجهاز، واستخدم الهيليوم كغاز حامل(الجرف) بدرجة نقاوة (99.999%) بمعدل تدفق Flow Rate 0.9ml/min . وقد وضعت عدة برامج الفصل تبعاً للمرجع العلمي[12] وتميز البرنامج بإمكانية الفصل الجيد. بدأت عملية التحليل بإتباع برنامج حراري يبدأ من الدرجة 50 درجة مئوية والتي تثبت لمدة دقيقتين ثم رفعت درجة الحرارة بمعدل 10 درجة في الدولوة حتى الدرجة حتى الدرجة حتى الدرجة وتم تثبيت الحرارة عند هذه الدرجة لمدة ثلاث دقائق، تلاها رفع الحرارة حتى

الدرجة 230 درجة مئوية بمعدل 3 درجة مئوية في الدقيقة، وأخيراً ثبتت درجة الحرارة عند 230 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، ليكون الزمن الكلي لعملية القياس يقارب 32 دقيقة فقط. وبعدها تم التعرف على مكونات الزيت المستخلص من بذور النبات بمقارنة أطياف الكتلة الناتجة لكل قمة من الكروماتوغرام GC/MS مع أطياف الكتلة المخزنة في المكتبات المتواجدة في حاسوب الجهاز المستخدم في القياس.

النتائج والمناقشة:

تم تحليل الزيت الأساسي المستخلص من بذور نبات السلبين Gundelia Tournefortii من منطقة القدموس في محافظة طرطوس باستخدام GC/MS ، وتم التعرف على 20 مركب أي ما يعادل حوالي (99.7%) من المجموع الكلي للزيت المستخلص، وتميز الزيت الناتج بلون بني مصفر وكانت نسبته (1.82%) من وزن العينة الجافة، ويوضح الشكل (2) الكروماتوغرام الذي يبين نتائج تمرير عينة الزيت المستخلص من بذور هذا النبات في جهاز GC/MS.

ويبين الجدول (1) المركبات التي تم تحديدها، حيث شكلت الحموض الدهنية النسبة العظمى من مكونات الزيت المستخلص بنسبة المستخلص وبلغت (73.4%) ويشكل حمض اللينوليك Linoleic Acid المكون الرئيسي في الزيت المستخلص بنسبة (\$52.9%)، يليه حمض البالميتيك Palmitic Acid بنسبة (\$20.1%) ثم المركبات السكوالين Squalene والمركب (£2.9%)، يليه حمض البالميتيك Acid بنسبة (\$10.1%) و (\$9.0%) على الترتيب. وشكلت التربينات نسبة (£2.0%) من مكونات الزيت المستخلص وأحتوى أيضا على مواد أخرى كالأسترات والألدهيدات والكحولات بنسب بلغت (\$8.4%) ،(\$5.65%) و (\$9.0%) على الترتيب. ويوضح الجدول (2) المجموعات الكيميائية الرئيسية في الزيت الأساسي المستخلص من بذور نبات Gundelia tournefortii ويبين الجدول (3) الصيغ البنائية لبعض المركبات التي تم تحديدها في الزيت المستخلص.



الشكل(2): كروماتوغرام GC/MS للزيت المستخلص من بذور نبات GC/MS للزيت المستخلص

الجدول(1): النسب المئوية للزيت المستخلص من بذور نبات Gundelia Tournefortii باستخدام جهاز سوكسليت

النسبة المئوية	زمن الاستبقاء	اسم المركب	القمة
للمركب	RT	اسم المرحب	Peak
0.3	2.45	Stearic acid	1
0.28	2.7	2-Heptenal, (z)	2
0.32	3.83	3-Heptanol, 5-methyl-	3
0.18	4.08	Propanal, 3-cyclohexylidene-2-methyl-	4
0.12	4.15	Benzothiazole	5
1.29	4.47	2,4-Decadienal, (Z,E)-	6
3.9	4.65	2,4-Decadienal, (E,E)-	7
0.4	5.11	Fumaric acid, 3-methylbut-3-enyl undecyl ester	8
2.8	11.18	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	9
2.39	12.39	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl decyl ester	10
20.1	12.7	n-Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	11
52.9	14.57	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (Linoleic acid)	12
0.16	14.7	7-Methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate	13
0.5	15.43	1-Hexadecanol, 2-methyl-	14
0.41	16	17-Pentatriacontene	15
0.42	16.4	Cholestan-3-ol, 2-methylene-, (3β,5α)-	16
0.31	16.59	Ethyl iso-allocholate	17
0.22	16.7	Hexadecanoicacid,1-(hydroxymethyl)-1,2- ethanediyl ester	18
2.9	17.79	16-Trimethylsilyloxy-9-octadecenoic acid, methyl ester	19
10.1	19.59	Squalene	20

الجدول (2): المجموعات الكيميائية الرئيسة الموجودة في الزيت الأساسي المستخلص من بذور نبات Gundelia Tournefortii

المجموعة الكيميائية	النسبة المئوية لمركبات المجموعة		
حموض دهنية (Fatty Acids)	73.4%		
تربينات (Terpenes)	10.52%		
استرات (Esters)	8.47%		
ألدهيدات (Aldehydes)	5.65%		
كحولات (Alcohols)	0.82%		
مرکبات أخرى (Others)	0.84%		
المجموع الكلي (Total)	99.7%		

الجدول(3): الصيغ البنائية لبعض المركبات الرئيسية في الزيت المستخلص من بذور نبات Gundelia Tournefortii

ОН	Linoleic Acid
ОН	Palmitic Acid
	Squalene
∕∕∕∕ ∾∕ ∘	2,4-Decadienal, (E,E)
	1,2-Benzendicarbo- xylic acid butyl decyl ester
	1,2-Benzendicarbo- xylic acid,bis(2- methyl propyl) ester
Si O H	16- Trimethylsilyloxy- 9-octadecenoic acid, Methyl ester

ويوضح الجدول (4) المكونات الأساسية للزيت المستخلص من بذور نبات Gundelia Tournefortii ومقارنتها مع تلك المدروسة في المراجع العالمية.

الدراسات المرجعية					الدراسة الحالية	المركب	
البلد الذي تم فيه البحث ورقم المرجع							
إيران	تركيا	العراق	إيران	إيران	تركيا	النسبة المئوية	
[10]	[9]	[8]	[7]	[6]	[5]		Linoleic Acid
54.59%	57.85%	20.33%	57.8%			52.9%	
	8.1%	29.42%	8.1%	12.48%		20.1%	Palmitic Acid
3.3%	2.5%	9.7%	2.5%			0.3%	Stearic Acid
					0.3%	0.28%	2-Heptanal
				3.6%		0.5%	1-Hexadecanol, 2-Methyl
_						10.1%	Squalene

الجدول(4): مقارنة النتائج التي توصلنا إليها مع ما جاء في الدراسات السابقة

ومن خلال مقارنة النتائج التي توصلنا إليها مع ما جاء في دراسات علمية سابقة لهذا النبات نجد أن هناك بعض الاختلافات في نسب مكونات الزيت المستخلص، وقد يعزى سبب الاختلاف في نسب المكونات الأساسية في الزيت إلى الاختلاف في الموقع الجغرافي لنمو النبات ومن ثم اختلاف الظروف البيئية التي ينمو في ظلها النبات المدروس ، مما أثر بشكل كبير في نسبة المكونات التي تم الحصول عليها.

الاستنتاجات والتوصيات:

-بينت الدراسة أن نسبة الزيت المستخلص من بذور نبات Gundelia Tournefortii تبلغ (%1.82) من وزن العينة الجافة، وهذا يتوافق مع ما ورد في دستور النباتات الألماني (\$1.80) DAB) وما فوق. [13]، إذ يعد النبات دستورياً عندما تكون نسبة الزيت المستخلص(%1.8) وما فوق.

- بلغ عدد مكونات الزيت المستخلص من بذور نبات Gundelia Tournefortii باستخدام تقنية GC/MS باستخدام باستخدام بالمحدوث والتي شكلت ما يقارب (99.7%) من المجموع الكلي للزيت، وكانت المكونات الرئيسية للزيت المستخلص:

Linoleic Acid (52.9%) , Palmitic Acid (20.1%) , Squalene (10.1%)

- يشكل حمض اللينوليك النسبة الأعلى من مكونات الزيت الأساسية وبمقارنة نسبته مع النسب الناتجة في الدراسات والأبحاث المذكورة سابقاً تعد نسبته جيدة.

-بينت الدراسة أن هناك اختلاف في نسبة المكونات الأساسية في العينة النباتية المدروسة (مستخلص البذور) بالمقارنة مع النسب الموجودة في الدراسات المرجعية لنفس النبات يعود برأينا إلى الاختلاف في المعطيات البيئية للمواقع المدروسة، وخاصة فيما يتعلق بنوعية التربة، درجات الحرارة وجغرافية المكان الذي ينمو فيه النبات. وهذا ما يؤكد لنا ثانية أن العاملين الجيني والبيئي يلعبان دوراً كبيراً في تحديد نسب المكونات الأساسية فيه.

وأخيراً لابد من الانتباه للتوصيات التالية:

- متابعة الدراسة على مستخلصات هذا النبات من مختلف أجزائه بهدف التعرف على كامل مكوناته وتحديد بناها باستخدام الطرائق الطيفية المختلفة.

- دراسة التأثير الحيوي للخلاصات النباتية لمختلف أجزاء نبات Gundelia Tournefortii وخاصة تأثيره كمضاد أكسدة هام نظراً لوجود مادة السيليمارين Silymarin فيه وبنسب عالية.

- نبات Gundelia Tournefortii هو نبات مشهور عالمياً نظراً لفوائده الطبية في علاج أمراض الكبد والأمراض المزمنة[5] وأيضا لاستخدامه الكبير كوجبة غذائية وخاصةً في سوريا، فإننا ننصح بزراعة هذا النبات للاستفادة منه في الغذاء ولاستخدام خلاصاته في معالجة بعض أمراض الكبد، مع العلم أن هذا النبات ينمو تلقائياً وبالتالى فإن استثماره غير مكلف من الناحية الاقتصادية.

- العمل على حفظ الأنواع البرية للنباتات في قطرنا من التدهور والانقراض من خلال تعزيز التوعية الشعبية في المحافظة على النباتات ذات الفائدة الطبية والاقتصادية.

المراجع:

- [1] AZEEZ, O. H. and KHEDER, A. E. Effect of Gundelia Tournefortii on some biochemical parameters in dexamethasone-induced hyperglycemic and hyperlipidemic mice. Iraqi Journal of Veterinary Sciences. 26(2), 2012, 73-79.
- [2] HALABI, S.; BATTAH, A.; ABURJAI, T. and HUDAIB, M. *Phytochemical and Antiplatelet Investigation of Gundelia Tournefortii*. Pharmaceutical Biology. 43(6), 2005,496-500.
- [3] EREIFEJ, K.; FENG, H.; RABABH, T.; ALUDATT, M.; GAMMEH, S.; OWEIS, L. and Alkasrawi, M. Separation and Quantification of phenolic compounds of wild edible plants. Journal of plant sciences and research. 2(2), 2015, 139.
- [4] RADJABIAN, T.; REZZDEH, S. and HUSEINI, H. Analysis of Silymarin components in the seed extracts of some Milk Thistle ecotypes from Iran by HPLC. Iranian Journal of Science & Technology. 32(2), 2008, 141-146.
- [5] BAGCI, E.; HAYTA, S.; KILIC, O. and KOCAK, A. *Essential Oils of two varieties of Gundelia Tournefortii L.(Asteraceae) from Turkey*. Asian Journal of chemistry. 22(8), 2010, 6239-6244.
- [6] FARHANG, H. R.; VAHABI, M. R. and ALLFACHIAN, A. R. Chemical composition of the essential oil of Gundelia Tournefortii L.(Asteraceae) from central Zagros, Iran. Journal of Herbal Drugs. 6(4), 2016, 227-233.
- [7] SAMANI, M. A.; KOPAEI, M. R. and AZIMI, N. Gundelia: A Systematic review of medicinal and molecular perspective. Pakistan Journal of biological sciences. 16(21), 2013, 1238-1247.
- [8] ABDUL, D. A. and HAMD, N. S. Characteristics of fatty acids content in Gundelia Tournefortii L.oil extract. Iraqi National Journal of chemistry. 45, 2012, 144-148.
- [9] KHANZADEH, F.; KHODAPARAST, M.; RAD, A. and RAHMANI, F. *Physiochemical properties of Gundelia Tournefortii L.seed oil.* Journal of Agriculture science technology. 14, 2012, 1535-1542.

- [10] MATTHAUS, B. and OZCAN, M. M. Chemical Evaluation of flower bud and oils of Tumbleweed(Gundelia Tournefortii L.) as a new potential nutrition sources. Journal of food biochemistry. 35, 2011, 1257-1266.
- [11] PLUMMER, D. *Introduction to practical biochemistry*. McGraw Hill Book CO.Ltd. 1971, 186-190.
- [12] MASADA, Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. A Halsted Press Book, John Wiley Science. 1976, PP.334.
 - [13] Deutsches Arzneibuch (DAB8). (1988). Stuttgart: Deutscger Apotheker Verlag.