

## کارآیی لایه‌های دوگانه هیدروکسیدی با ساختار نانو در استخراج و شناسایی ترکیب‌های فرّار گیاه افسنتین (*Artemisia absinthium L.*) با استفاده از روش میکرواستخراج فاز جامد در فضای فوقانی و کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی

مرضیه باباش‌پور اصل<sup>۱\*</sup>، مرضیه پیریایی<sup>۲</sup> و ایرج فرهنگ<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه باغبانی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران، پست الکترونیک: babashpour@gmail.com

۲- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷

### چکیده

جنس آرتمیسیا شامل تعداد زیادی گونه بوده که برخی از آنها با کاربرد متنوع به صورت تجاری کشت می‌شوند. تجمع زیاد روغن‌های فرّار و سایر ترپنوئیدها در اعضای معینی از خانواده آستراسه مانند افسنتین (*Artemisia absinthium L.*) سبب شده که از آنها به عنوان طعم‌دهنده غذا استفاده گردد. ترپنوئیدها و ترکیب‌های فنولیکی همچنین مسئول ارزش دارویی و پزشکی بسیاری از اعضای این خانواده هستند. میکرواستخراج فاز جامد (SPME) یک روش سریع، آسان، کارآمد، بی‌نیاز از حلال زیاد و با امکان اتوماسیون راحت است. در این پژوهش، میکرواستخراج فاز جامد در فضای فوقانی (HS-SPME) با استفاده از فایبر پوشش داده شده با لایه‌های دوگانه هیدروکسیدی با ساختار نانو در ترکیب با کروماتوگرافی گازی-اسپکتروفتومتری جرمی برای جمع‌آوری و ردیابی ترکیب‌های فرّار گیاه افسنتین استفاده شد. پارامترهای آزمایشی شامل درجه حرارت و زمان واجذبی، درجه حرارت و زمان استخراج، مقدار نمونه و تأثیر مقدار آب مورد آزمون قرار گرفته و بهینه‌سازی شدند. روش پیشنهادی در مقایسه با روش‌های مرسوم آنالیز ساده بوده و هزینه تجهیزات آن اندک است. همچنین در این روش، زمان آنالیز کوتاه‌تر است و می‌تواند برای آنالیز ترکیب‌های فرّار گیاهان دارویی بکار رود.

واژه‌های کلیدی: افسنتین (*Artemisia absinthium L.*)، میکرواستخراج فاز جامد در فضای فوقانی، روغن‌های فرّار، لایه‌های دوگانه هیدروکسید، نانو ساختار اکسید آلومینیوم، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی.

### مقدمه

آنها گیاه دارویی افسنتین است (Kazemi et al., 2009). افسنتین (-common wormwood, absinthium, mader) با نام علمی *Artemisia absinthium L.* (wort, mingwort, mungwort) در طب سنتی دارای فعالیت‌های بیولوژیکی وسیع می‌باشد

جنس *Artemisia* متعلق به تیره آفتابگردان (Asteraceae) و طایفه Anthemideae بوده و شامل حدود ۵۰۰ گونه با پراکنش جهانی می‌باشد (Lachenmeier, 2010). این جنس در ایران دارای ۳۴ گونه بوده که یکی از

طبیعی موجود در گیاه صدمه می‌زند (Martin *et al.*, 2011b). فنون نوین متعددی به‌منظور به حداقل رساندن زمان استخراج، کاهش مصرف حلال، افزایش عملکرد و کیفیت استخراج فرآورده‌های طبیعی از گیاهان توسعه یافته است. در میان این روش‌ها میکرواستخراج فاز جامد در فضای فوقانی (HS-SPME: headspace solid-phase microextraction) به‌عنوان روش جایگزین آنالیز ترکیب‌های فرار از گیاهان معطر بکار می‌رود (Bendahou, *et al.*, 2008). روش SPME توسط Pawliszyn (۱۹۹۷) معرفی گردید. به‌دلیل مزایای منحصر به فرد این روش از نظر فناوری و کاربرد در کروماتوگرافی به‌ویژه کروماتوگرافی گازی، پیشرفت‌های وسیع و سریعی در این تکنیک حاصل شده است (Lord & Pawliszyn, 2000). در روش HS-SPME فایبر در تماس با نمونه قرار نمی‌گیرد و این عمر فایبر را افزایش می‌دهد. از سوی دیگر انتخاب حساسیت روش به میزان زیادی توسط برهم‌کنش بین آنالیت و ماتریکس نمونه و تبخیر آنالیت‌ها از نمونه تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Guillen & Sopelana, 2005). نتایج تحقیقات نشان داده است که HS-SPME جفت شده با کروماتوگرافی گازی - اسپکتروفتومتری جرمی (GC/MS) یک روش ساده و عاری از حلال برای آنالیز اسانس مواد گیاهی می‌باشد (Mescher & Howlett, 1999; Wercinski, 1999). HS-SPME با در معرض قرار دادن فایبر پوشش داده شده با یک یا چند پلیمر در فضای فوقانی یک ماتریکس نمونه انجام می‌شود تا زمانی که بین آنالیت جزءبندی شده در پوشش فایبر و آنالیت موجود در ماتریکس نمونه به تعادل برسد. بین مقدار آنالیت استخراج شده به داخل فایبر با غلظت اولیه آن در ماتریکس نمونه یک نسبت خطی وجود دارد. لایه پلیمری روی فایبر آنالیت‌های آلی را بر روی سطح آن از طریق جذب سطحی و جذب تغلیظ می‌نماید (Zhang *et al.*, 2007). مطالعات متعددی با استفاده از مواد پوششی مختلف بر روی لایه سیلیکا مانند پلاتینیوم، آلومینیوم آنداز شده (Djozan *et al.*, 2003; Gholivand *et al.*, 2011)؛ طلا، استیل و

(Lachenmeier, 2010). مطالعات فیتوشیمیایی نشان داد که افسنتین دارای اسانس (روغن‌های فرار)، لاکتون‌های سزکوئی‌ترین، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و لیگنان‌ها می‌باشد (Wichtl, 1994). اسانس افسنتین دارای اثرهای ضدقارچ (Juteau *et al.*, 2003; Valdes *et al.*, 2008)، روبنده رادیکال‌های آزاد (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2005)، محافظ کبد (Gilani & Janbaz, 1995)، ضد انگل‌های گوارشی (Tariq *et al.*, 2009)، ضد پروتوزوا و ضد تریکینلوزیس (anti trichinellosis) (Caner *et al.*, 2008) می‌باشد. اسانس این گیاه (۱/۵-۲/۰٪) که از سبز تیره تا قهوه‌ای و آبی متغیر است، طعم تلخ گسی داشته و دارای رایحه تند می‌باشد (Hoffmann & Herrmann, 1982). با توجه به منشأ گیاه، اجزای عمده اسانس افسنتین عبارتند از: آلفا و بتا-توزون (Carnat *et al.*, 1992); Chialva *et al.*, 1983; Geszprych *et al.*, 2010; Umpierrez *et al.*, 2012); ترانس-سابینیل استات (Judzientiene *et al.*, 2012; Geszprych *et al.*, 2010); Karp & Croteau, 1982; Lopes-Lutz *et al.*, 2008); بتا-پینن (Kordali *et al.*, 2005); ۸،۱-سینتول (Kordali *et al.*, 2005); کامفور (Tariku *et al.*, 2011); سیس-اپوکسی اوسیمین (Chialva *et al.*, 1976); کریزانتینیل استات (Chialva *et al.*, 1983); Geszprych *et al.*, 2010); سایین (Kordali *et al.*, 2005); Baykan-Erel *et al.*, 2012); Kordali *et al.*, 2005; Geszprych *et al.*, 2010); میرتنول (Erichsen-Brown, 1979); Jaenson *et al.*, 2005); بورنیل استات (Pino *et al.*, 1997). آرتمیزیا کتون، لینالول، منوترین‌های هیدروکربنه (Kordali *et al.*, 2005)، لاکتون‌های سزکوئی‌ترین (Khan & Abourashed, 1980); Martin *et al.*, 2011a) و مخلوطی از برخی از این ترکیب‌ها (Carnat *et al.*, 1992; Chialva *et al.*, 1983); Geszprych *et al.*, 2010). روش مرسوم تقطیر با آب (hydrodistillation: HD) به دمای بالا (به‌تبع آن هزینه بالای مصرف انرژی) نیاز دارد که این مورد به فرآورده‌های

## دستگاه‌های مورد استفاده

دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل 7890A ساخت کمپانی Agilent (آمریکا) مجهز به آشکارساز طیف‌سنجی جرمی (mass spectroscopy) مدل 5975C و دریچه تزریق انشعابی / غیرانشعابی (split/ splitless injector) (system) مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی با ستون کاپیلاری مدل HP-5 MS ساخت کمپانی W&J (آمریکا) به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر با پوشش فاز ساکن سیلیکا به ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. شرایط کارکرد کروماتوگراف گازی بدین شرح بود: دمای اولیه ستون در ۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. با سرعت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۱۱۰ درجه و در مرحله بعد با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۱۴۰ درجه و در مرحله آخر با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد رسیده و به مدت ۱ دقیقه در آن دما نگه داشته شد. دمای دریچه تزریق، دمای حد وسط کروماتوگراف به آشکارساز، دمای چهارقطبی و دمای منبع یونیزاسیون به ترتیب ۲۷۵، ۲۸۰، ۲۳۰ و ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شدند. سرعت جریان گاز حامل هلیوم در ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم گردید. از نرم‌افزار و Chemstation برنامه کتابخانه رایانه‌ای (Wiley, New York, NY, USA) 7N برای ثبت کروماتوگرام‌ها و شناسایی ترکیب‌ها استفاده شد.

سنتز LDH بر روی سیم آلومینیوم آندایز شده نانوحفره‌دار سیم آلومینیومی آندایز شده مطابق روش Abolghasemi و همکاران (۲۰۱۵) تهیه گردید (شکل ۱). برای ساخت فایبر مورد نظر، سیم آلومینیوم به طول ۴ سانتی‌متر برش داده شده و در آب دیونیزه شستشو داده شد. به مدت ۱۵ دقیقه در استون در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شده و دوباره با آب دیونیزه شستشو داده شد. پولیش سیم به صورت الکتروشیمیایی با استفاده از محلول ۱۵ قسمت اسیدنیتریک ۶۸٪ و ۸۵ قسمت اسیدفسفریک ۸۵٪ و

مس انجام شده است. لایه‌های هیدروکسیدی دوگانه (LDH: layered double hydroxides) رس‌های غیر آلی آنیونیک با ساختار لایه‌لایه هستند که با فرمول  $[M^{2-x}M^3_x(OH)_2](A^{n-})_{x/n}\cdot mH_2O$  مشخص می‌شوند که در آن فلز دوظرفیتی و  $M^3$  فلز سه ظرفیتی و  $A^{n-}$  نمایانگر آنیون است. اجزای اصلی ساختار LDHها لایه‌های باردار هستند که ترکیب‌های شیمیایی مختلف به آنها خواص چندگانه مانند تبادل یون، جای‌گیری گونه‌های آنیونی مختلف بین لایه‌ها (intercalation)، جذب و سازگاری زیستی می‌دهد (Piryaei, 2018). مواد LDH به‌طور وسیعی برای جذب آلاینده‌های آلی و غیرآلی بکار رفته است (Abolghasemi & Piryaei, 2012). هدف از این پژوهش استخراج و شناسایی اجزای اسانس گیاه دارویی افسنتین با روش SPME جفت شده با GC/MS با استفاده از فایبر پوشش داده شده با نانوساختار LDH می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی

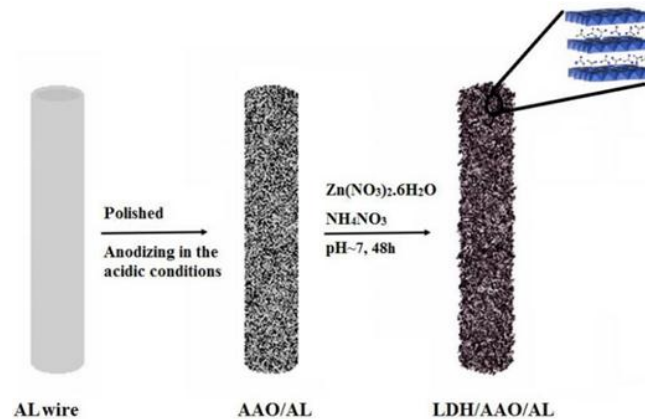
نمونه‌های گیاهی از ۲۵-۲۰ سانتی‌متری سرشاخه‌های گل‌دار گیاه افسنتین (*A. absinthium* L.) در تابستان ۱۳۹۵ از منطقه گردنه حیران شهرستان آستارا واقع در استان گیلان جمع‌آوری شده و در دمای آزمایشگاه به دور از نور آفتاب خشک گردید. نمونه هر بار یومی این گیاه در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه نگهداری شد.

## مواد شیمیایی

سیم آلومینیومی با درجه خلوص ۹۹/۵٪ و قطر ۳۰۰ میکرومتر از شرکت سیم‌کات (تبریز، ایران) خریداری شد. تمامی مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck آلمان و Fluka کشور تهیه گردیدند.

برای ایجاد لایه هیدروکسید روی فایبر سیم آلومینیومی آندایز شده در آب مقطر شستشو داده شده و در محلول  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  و  $NH_4NO_3$  به نسبت مولی یک به شش که در آب دیونیزه حل شده بود (pH=7)، به مدت ۴۸ ساعت نگه داشته شد.

۴۰ گرم در لیتر دی کرومات سدیم در درجه حرارت اتاق با ولتاژ ۱۵ ولت به مدت یک ساعت انجام گردید. نمونه بدست آمده با آب دیونیزه شستشو داده شده و در اسید اگزالیک ۰/۳ مولار در ولتاژ ۴۰ ولت به مدت یک ساعت در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد.



شکل ۱- نمای شماتیکی سنتز ZnAl-LDH/AAO/Al

نمونه کشیده شده و به منظور آنالیز در دریچه تزریق GC/MS وارد گردید.

میکرو استخراج فاز جامد در فضای فوقانی

سیم ZnAl-LDH-AAO-Al به لوله استیل زنگ نزن از یک هولدر SPME دست ساز متصل گردید. قبل از استفاده آن در آزمایش SPME، فایبر در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در آون گرم شده و در دریچه تزریق در دمای ۲۸۰ درجه سانتی گراد تحت گاز هلیوم به مدت یک ساعت قرار داده شد. یک آون مایکروویو با حداکثر توان حرارتی ۹۰۰ وات به عنوان وسیله گرمایش استفاده شد. به منظور جلوگیری از نشست حرارت از مایکروویو، حدواسط دیواره داخلی و خارجی با فویل آلومینیومی پوشانده شد. MA-HS-SPME مطابق روش زیر انجام شد: ۲ گرم از پودر گیاهی تهیه شده از گیاه افسنتین به ظرف ۲۵ میلی لیتری حاوی یک میلی لیتر آب ریخته شد. بعد از اتصال میرد، فایبر SPME در معرض فضای فوقانی نمونه گیاهی قرار داده شده و نمونه توسط مایکروویو (۴۵۰ وات) حرارت داده شد. بعد از استخراج، فایبر از ظرف حاوی

تقطیر با آب

۱۰۰ گرم از نمونه گیاه خرد شده افسنتین در معرض تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. روغن بدست آمده بعد از آب گیری توسط سولفات سدیم بی آب و محاسبه بازده اسانس (۰/۶۳٪) تا زمان آنالیز توسط دستگاه GC/MS در یخچال در ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

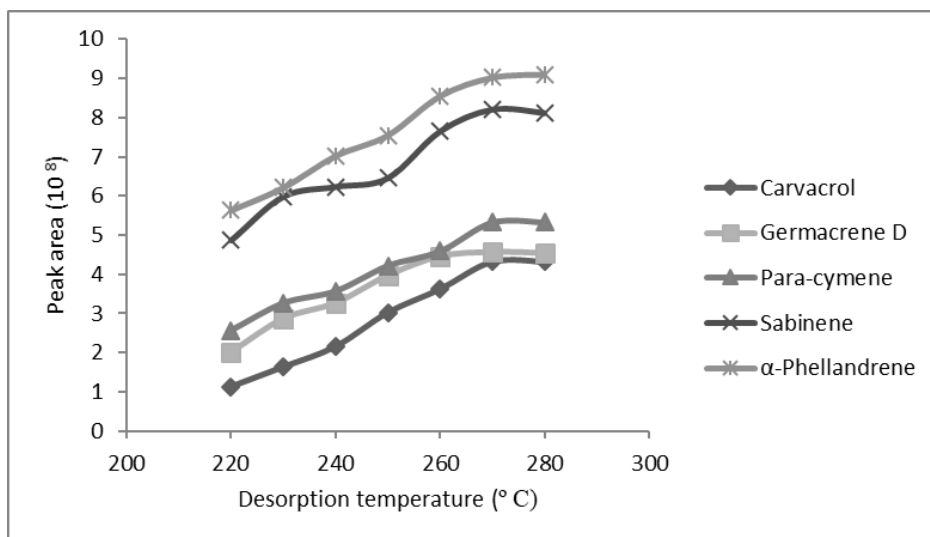
## نتایج

بهینه سازی پارامترهای واجذبی

قبل از بهینه سازی پارامترهای استخراج، پارامترهای مربوط به واجذبی کامل آنالیت جمع آوری شده در دریچه تزریق

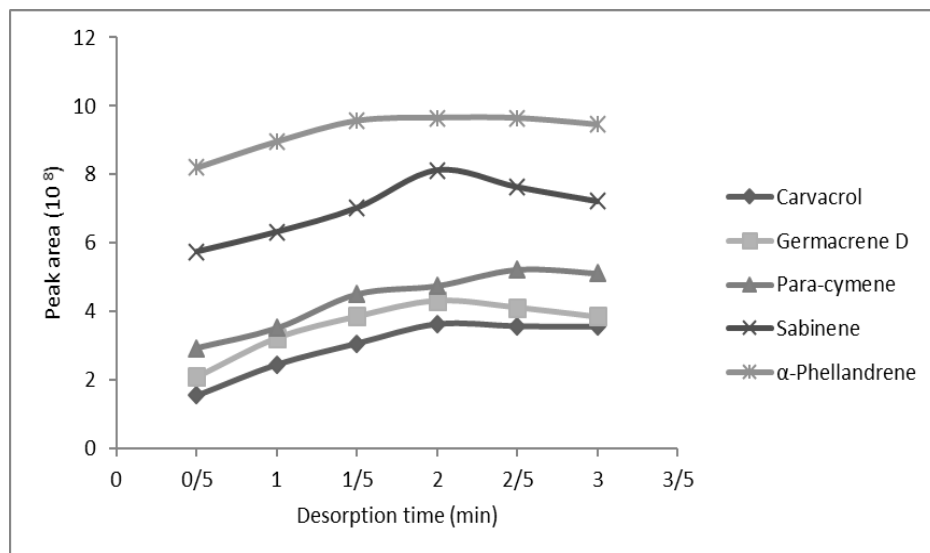
۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین واجذبی در دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود (شکل ۲). همچنین بهینه زمان واجذب برای تمام اندازه‌گیری‌ها ۲ دقیقه بدست آمد (شکل ۳).

GC-MS و جداسازی مناسب آنها در ستون بهینه سازی شدند. بدین‌منظور دماهای تزریق و زمان‌های واجذبی مختلف مورد آزمون قرار گرفت. دمای بالا که قادر است برای واجذبی آنالیت‌ها از یک فایبر بکار رود، توسط پایداری حرارتی پوشش آن محدود می‌گردد. دمای درجه تزریق از ۲۲۰ تا



شکل ۲- تغییرات مساحت پیک اسانس برحسب تغییرات دمای واجذب برای ترکیب‌های انتخابی

اسانس گیاه *A. absinthium*



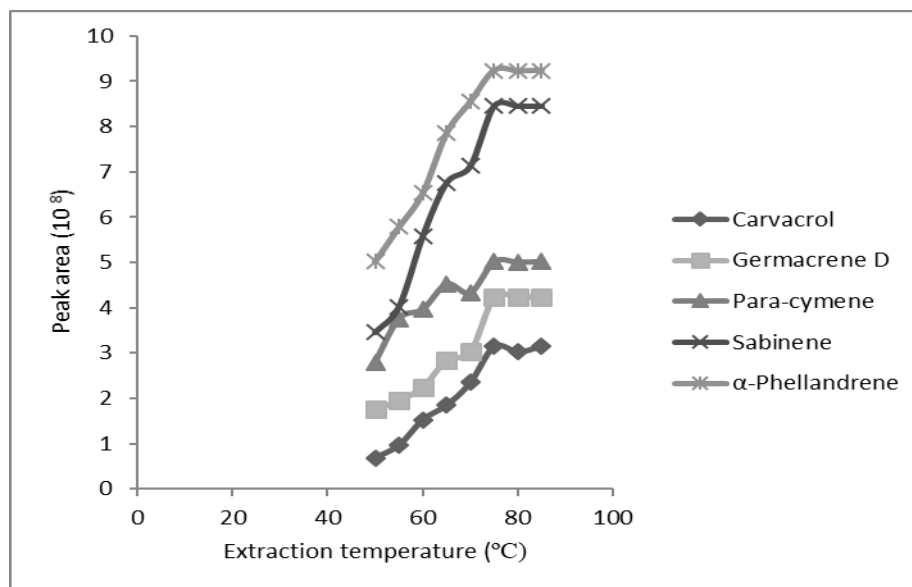
شکل ۳- تغییرات مساحت پیک اسانس برحسب تغییرات زمان واجذب برای ترکیب‌های انتخابی

اسانس گیاه *A. absinthium*

سانتی‌گراد انجام شد. شکل ۴ مساحت پیک اسانس گیاه افسنتین را در برابر دماهای اعمال شده برای ۵ ترکیب انتخابی نشان می‌دهد. با توجه به نتیجه حاصل، به دلیل افزایش ثابت پخش آنالیت‌ها بین فاز نمونه و فضای فوقانی با افزایش دما، بازده استخراج افزایش می‌یابد. به هر حال برای اغلب ترکیب‌های بالاتر از ۷۵ درجه سانتی‌گراد کاهش جزئی در ظرفیت جذب مشاهده شد. بنابراین برای آزمایش‌های بعدی دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید.

### بهینه‌سازی پارامترهای استخراج با روش HS-SPME

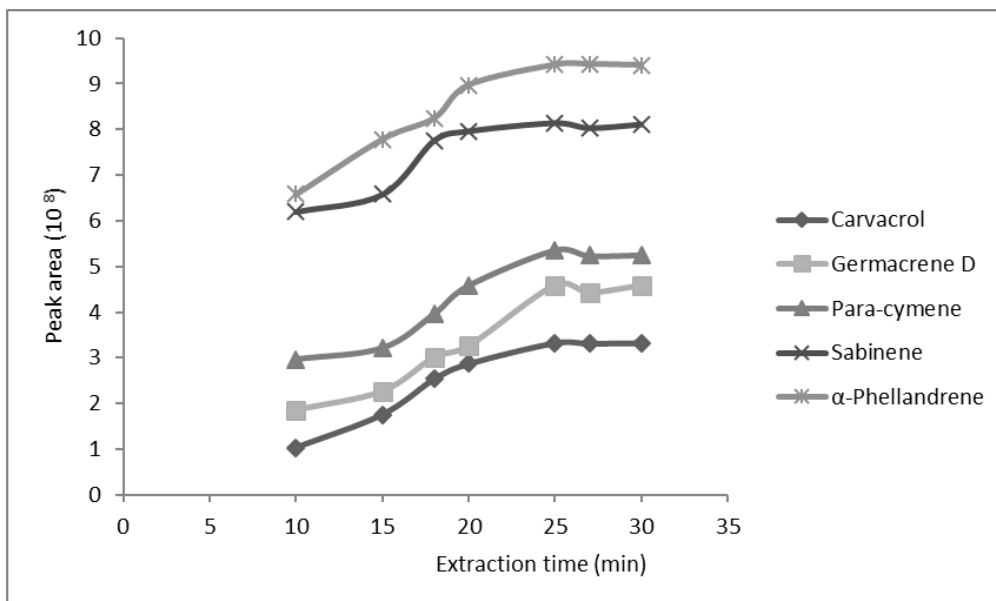
دمای استخراج از عوامل مهم در روش HS-SPME به‌شمار می‌رود و باید بهینه‌سازی گردد. دمای بالای استخراج، آزادسازی آنالیت را از ماتریکس نمونه افزایش داده، اما ضریب جداسازی (Partition coefficient) را کاهش می‌دهد و به دلیل ماهیت اگزوترمی جذب، از استخراج آنالیت از فضای فوقانی به پوشش فایبر می‌کاهد. استخراج اسانس با استفاده از ساختار سنتز شده از فضای فوقانی محلول نمونه در دماهای متنوع از ۵۰ تا ۸۵ درجه



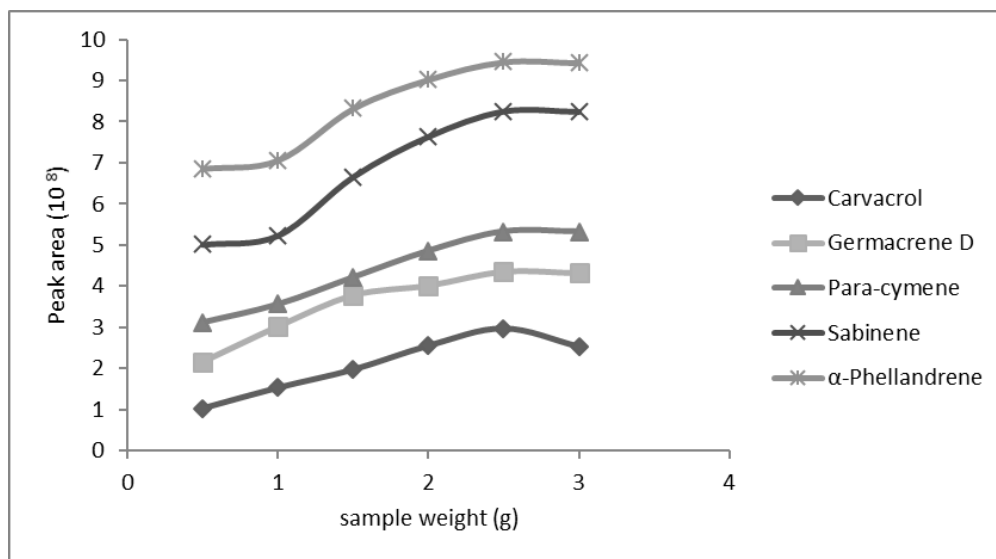
شکل ۴- تغییرات مساحت پیک اسانس برحسب تغییرات دمای استخراج برای ۵ ترکیب انتخابی اسانس گیاه *A. absinthium* (شرایط استخراج؛ مقدار نمونه: ۲/۵ گرم، زمان استخراج: ۲۵ دقیقه)

استخراج در بازه زمانی ۱۰ تا ۳۰ دقیقه بررسی شد. شکل ۵ نشان می‌دهد که بعد از ۲۵ دقیقه مقدار اسانس استخراج شده به مقدار ثابتی می‌رسد. بنابراین زمان استخراج ۲۵ دقیقه برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای بررسی اثر مقدار گیاه بر مقدار اسانس استخراج شده بر روی ساختار فایبر میکرواستخراج، فرایند استخراج برای ۰/۵ تا ۳ گرم از گیاه بررسی شد. نتیجه نشان داد که بعد از ۲/۵ گرم، مقدار اسانس استخراج شده به مقدار ثابتی می‌رسد (شکل ۶).

در روش HS-SPME یک رابطه مستقیم میان مقدار آنالیت استخراج شده و زمان استخراج وجود دارد. در این روش زمان استخراج آنالیت وابسته به ثابت‌های توزیع می‌باشد: ثابت توزیع فضای فوقانی/نمونه و ثابت توزیع پوشش فایبر/فضای فوقانی. در صورتی که اختلاف ثابت توزیع بین پوشش فایبر و فضای فوقانی بیشتر باشد، مقدار ماده استخراج شده افزایش یافته و زمان بیشتری برای رسیدن به تعادل مورد نیاز خواهد بود. در این پژوهش برای بررسی اثر زمان بر مقدار اسانس استخراج شده، فرایند



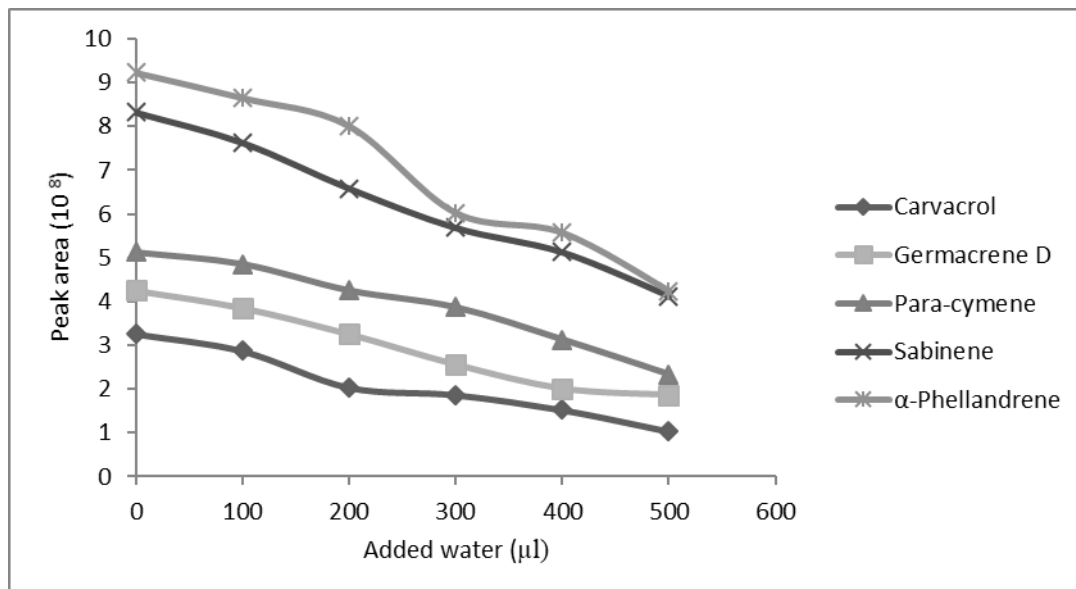
شکل ۵- تغییرات مساحت پیک اسانس برحسب تغییرات زمان استخراج برای ۵ ترکیب انتخابی اسانس گیاه *A. absinthium* (شرایط استخراج: مقدار نمونه: ۲/۵ گرم، دمای استخراج: ۷۵ درجه سانتی گراد)



شکل ۶- تغییرات مساحت پیک اسانس برحسب تغییرات مقدار نمونه برای ۵ ترکیب انتخابی اسانس گیاه *A. absinthium* (شرایط استخراج: دمای استخراج: ۷۵ درجه سانتی گراد، زمان استخراج: ۲۵ دقیقه)

بدست آمده، افزایش مقدار آب باعث پر شدن حفره‌های ساختار و کم شدن میزان جذب می‌شود (شکل ۷).

به منظور بررسی اثر مقدار آب بر روی جذب اسانس، مقدار ۰ تا ۵۰۰ میکرولیتر آب به نمونه اضافه شد. طبق نتیجه



شکل ۷- تغییرات مساحت پیک اسانس بر حسب تغییرات مقدار آب برای ۵ ترکیب انتخابی اسانس گیاه *A. absinthium* (شرایط استخراج؛ مقدار نمونه: ۲/۵ گرم، دمای استخراج: ۷۵ درجه سانتی گراد، زمان استخراج: ۲۵ دقیقه)

روش را نشان می‌دهد. با توجه به مقدار و تعداد ترکیب‌های بدست آمده در جدول، می‌توان گفت که فایبر پیشنهادی می‌تواند به عنوان یک ساختار کارآمد برای جداسازی و شناسایی اجزای اسانس گیاه افسنتین مورد استفاده قرار گیرد.

مقایسه کارآیی روش‌های HS-SPME و HD در استخراج و شناسایی اجزای اسانس

پس از بررسی تمامی شرایط مؤثر بر استخراج، اسانس بدست آمده از روش تقطیر با بخار آب و روش پیشنهادی میکرواستخراج با نانوساختار مورد مقایسه قرار گرفت. جدول ۱ کلیه ترکیب‌های بدست آمده با دو



جدول ۱- مقایسه ترکیب‌های اساسی گیاه افسنتین با دو روش تقطیر با آب و میکرواستخراج فاز جامد در فضای فوقانی

بازیابی (R.S.D.%)	تکرارپذیری R.S.D.% <sup>d</sup> (سه تکرار)	میکرواستخراج با فاز جامد (Area% <sup>c</sup> )	تقطیر با آب (Area% <sup>b</sup> )	ضریب کواتز (RI <sup>a</sup> )	ترکیب‌ها	ردیف
۱۱/۴	۸/۳	۱/۶	۱/۴	۹۳۳	$\alpha$ -thujene	۱
۹/۵	۵/۶	۰/۸	۱/۱	۹۳۷	$\alpha$ -pinene	۲
۱۰/۴	۱۰/۵	۱/۲	۱/۱	۹۵۵	camphene	۳
۱۲/۵	۱۴/۶	۹/۵	۱۱/۳	۹۷۴	sabinene	۴
۱۴/۶	۸/۶	۳/۰	۳/۳	۹۸۲	$\beta$ -pinene	۵
۸/۶	۱۰/۶	۱۲/۶	۱۸/۳	۱۰۰۷	$\alpha$ -phellandrene	۶
۹/۲	۸/۵	۱/۳	۲/۳	۱۰۱۱	$\delta$ -3-carene	۷
۹/۵	۷/۳	۱/۶	۱/۷	۱۰۱۵	$\alpha$ -terpinene	۸
۱۰/۲	۱۱/۳	۳/۳	۳/۴	۱۰۲۷	para-cymene	۹
۹/۴	۱۰/۱	۰/۷	۱/۳	۱۰۳۲	limonene	۱۰
۱۱/۶	۷/۶	۲/۷	۴/۲	۱۰۳۴	1,8-cineole	۱۱
۱۵/۸	۵/۲	۰/۲	۰/۳	۱۰۶۱	$\gamma$ -terpinene	۱۲
۱۲/۴	۱۰/۸	۰/۳	۰/۶	۱۰۶۸	cis-sabinene hydrate	۱۳
۹/۵	۷/۶	۰/۵	۰/۳	۱۰۷۲	cis-linalool oxid	۱۴
۸/۸	۵/۸	۰/۲	۰/۴	۱۰۸۸	terpinolene	۱۵
۱۲/۶	۱۱/۶	۱/۸	۳/۰	۱۰۹۶	linalool	۱۶
۱۳/۵	۱۲/۷	۱۴/۲	۱۵/۶	۱۱۱۲	trans-thujone	۱۷
۱۲/۴	۱۴/۳	۰/۴	۰/۹	۱۱۵۲	menthone	۱۸
۱۰/۵	۱۰/۴	۰/۳	۰/۳	۱۱۷۵	terpin-4-ol	۱۹
۱۴/۶	۸/۵	۰/۲	۰/۷	۱۱۹۰	$\alpha$ -terpineol	۲۰
۱۲/۷	۸/۶	۱/۴	۲/۱	۱۲۳۷	pulegone	۲۱
۱۱/۳	۱۰/۶	۲/۶	۳/۱	۱۲۴۱	carvone	۲۲
۸/۶	۹/۴	۱/۰	۱/۲	۱۲۵۱	piperitine	۲۳
۱۲/۲	۱۱/۵	۱/۱	۱/۳	۱۲۵۴	geraniol	۲۴
۹/۷	۷/۶	۳/۳	۴/۵	۱۲۵۸	linalool acetate	۲۵
۱۱/۳	۱۴/۸	۰/۳	۱/۶	۱۲۶۲	cis-chrysanthenyl acetate	۲۶
۱۰/۵	۱۱/۶	۲/۴	۳/۲	۱۲۹۱	thymol	۲۷
۱۲/۶	۱۳/۷	۱/۲	۱/۶	۱۲۹۹	carvacrol	۲۸

ادامه جدول ۱- ...

ردیف	ترکیب‌ها	ضریب کواتز (RIa)	تقطیر با آب (Area%b)	میکرواستخراج با فاز جامد (Area%c)	تکرارپذیری R.S.D.%d (سه تکرار)	بازایی (R.S.D.%)
۲۹	piperitenone oxide	۱۳۶۳	۱/۳	۰/۷	۱۲/۵	۱۴/۷
۳۰	$\beta$ -elemene	۱۳۹۰	۰/۵	۰/۸	۱۳/۷	۱۲/۹
۳۱	E-caryophyllene	۱۴۱۷	۰/۶	۰/۵	۸/۴	۱۴/۳
۳۲	$\alpha$ -humulene	۱۴۴۲	۰/۳	۰/۱	۱۰/۵	۱۲/۵
۳۳	germacrene D	۱۴۷۵	۲/۴	۲/۴	۱۳/۷	۱۰/۶
۳۴	bicyclogermacrene	۱۴۹۵	۱/۳	۱/۲	۹/۴	۱۳/۷
۳۵	$\beta$ -bisabolene	۱۵۱۰	۰/۲	۰/۱	۱۰/۷	۱۰/۶
۳۶	spathulenol	۱۵۷۵	۰/۸	۰/۲	۱۲/۴	۱۳/۲
۳۷	caryophyllene oxide	۱۵۸۲	۰/۴	۰/۲	۱۰/۶	۹/۷

a: شاخص بازداری، b: مساحت پیک اسانس در روش تقطیر با آب، c: مساحت پیک اسانس در روش SPME، d: انحراف معیار نسبی

## بحث

روش‌های میکرواستخراج نه تنها پاسخگوی نیاز به حلال کمتر و کاهش اندازه تجهیزات استخراج هستند، بلکه در این روش‌ها، امکان آماده‌سازی سریع و آسان نمونه هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در محل اصلی (On-site) وجود دارد (Pawliszyn, 2012). SPME روشی است بسیار قدرتمند برای آماده‌سازی نمونه که تغلیظ، استخراج و ورود نمونه به دستگاه کروماتوگرافی را در یک مرحله انجام می‌دهد. ضمن آنکه یک روش استخراج کاملاً عاری از حلال بوده و برای آنالیز توسط آن، چند میلی‌گرم نمونه کفایت می‌کند (Kaykhani & Saffari, 2008). به‌علاوه این روش برای آنالیز ترکیب‌های پیچیده دارویی و غذایی می‌تواند با کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی با عملکرد بالا (HPLC) جفت گردد. انواع مختلف فایبرهای تجاری SPME قابل دسترس است. با این حال این فایبرها علاوه بر هزینه بالا و استفاده دوباره ضعیف آنها، معمولاً پایداری حرارتی و شیمیایی مناسبی ندارند. برای غلبه به این مسائل تعدادی فایبر

با پوشش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و در منابع گزارش شده‌اند. اخیراً در چند پژوهش از اکسیدهای فلزی با ساختار نانو سنتز شده به‌عنوان پوشش در ساخت فایبرها استفاده شده است. اکسیدهای فلزی با ساختار نانو دارای این مزیت هستند که نسبت سطح به حجم بالایی دارند و این ظرفیت استخراج و کارآیی آن را افزایش می‌دهد (Ghasemi & Farahani, 2012). در این آزمایش لایه‌های هیدروکسیدی دوگانه Zn/Al با آلومینیوم / اکسید آلومینیوم آنودیک (AAO) به‌عنوان پوشش نانویی فایبر SPME استفاده شد و به‌منظور دستیابی به عامل پیش‌تغلیظ بالا و بررسی کارآیی استخراج، عوامل زمان و درجه حرارت واجذب، زمان و درجه حرارت استخراج، مقدار نمونه و مقدار آب بهینه‌سازی شدند. مطابق نتایج بدست آمده از استخراج با روش HS-SPME با فایبر پیشنهادی، ۳۷ ترکیب در اسانس گیاه افسنتین شناسایی شد که آلفا-فلاندرن (۱۲/۶٪)، ترانس-توزون (۱۴/۲٪)، سایینن (۹/۵٪)، لینالول استات (۳/۳٪)، پارا-سیمن (۳/۳٪) و ۸،۱-سینئول (۲/۷٪) بیشترین

- nanoporous silica-polypyrrole SPME fiber. *Chemija*, 23: 244-249.
- Abolghasemi, M.M., Yousefi, V. and Amirshaghghi, A., 2015. Preparation and evaluation of a layered double hydroxide film on a nanoporous anodic aluminum oxide/aluminum wire as a highly thermal-resistant solid-phase microextraction fiber. *New Journal of Chemistry*, 39: 3109-3115.
  - Arino, A., Arberas, I., Renobales, G., Arriaga, S. and Dominguez, J.B., 1999. Essential oil of *Artemisia absinthium* L. from the Spanish Pyrenees. *Journal of Essential Oil Research*, 11: 182-184.
  - Basta, A., Tzakou, O., Couladis, M. and Pavlovic, M., 2007. Chemical composition of *Artemisia absinthium* L. from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 19: 316-318.
  - Baykan-Erel, S., Reznicek, G., Senol, S.G., Karabay-Yavasogulu, N. U., Konyalioglu, S. and Zeybek, A.U., 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. *Turkish Journal of Biology*, 36: 75-84.
  - Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M. and Benyoucef, M., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oils and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106: 132-129.
  - Canadanovic-Brunet, J., Djilas, S., Cetkovic, G. and Tumbas, V., 2005. Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) extracts. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 85: 265-272.
  - Caner, A., Doskaya, M., Degirmenci, A., Can, H., Baykan, S., Uner, A., Basdemir, G., Zeybek, U. and Guruz, Y., 2008. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. *Experimental Parasitology*, 119: 173-179.
  - Carnat, A.P., Madesclaire, M., Chavignon, O. and Lamaison, J.I., 1992. Cis-chrysanthenol, amain component in essential oil of *Artemisia absinthium* L. growing in Auvergne (Massif Central) France. *Journal of Essential Oil Research*, 4: 487-490.
  - Chialva, F., Doglia, G., Gabri, G., Aime, S. and Milone, L., 1976. Isolamento ed identificazione del cis e trans-epossiocimene nell'olio essenziale de *Artemisia absinthium* L. innaeus Italiana. *Rivista Italiana EPPOS*, 10: 522-535.
  - Chialva, F., Liddle, P.A.P. and Doglia, G., 1983. Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) I. composition of the essential oil of درصد اجزای اسانس را به خود اختصاص دادند. در روش تقطیر با آب (HD) نیاز به حرارت بالایی است که این مورد، هم هزینه انرژی را افزایش می دهد و هم به فرآورده های طبیعی ماتریکس نمونه صدمه می زند. در روش HD مقادیر اجزای آلفا-فلاندرن، ترانس-توزون، ساینن، لینالول استات، پارا-سیمن و ۸،۱-سینئول به ترتیب ۱۸/۳، ۱۵/۶، ۳/۱۱، ۴/۵ و ۴/۲ درصد بدست آمد. سایر محققان بیشترین اجزای اسانس گیاه افسنتین را ساینن و میرسن (Orav *et al.*, 2006)، بتا-پینن و بتا-توزون (Rezaeinodehi & Karnat *et al.*, 2008)، سیس-کریسانتنول (Khangholi, 1992)، بورنیل استات (Pino *et al.*, 1997)، کاریوفیلین اکسید، پارا-سیمن و ۸،۱-سینئول (Basta *et al.*, 2007)، Z-اپوکسی اوسیمین و کریسانتنیل استات (Arino *et al.*, 1999) گزارش کردند؛ این تفاوت ها به اختلاف در منشأ گیاه، شرایط رشد، مرحله نمو گیاه، وجود کموتایپ های مختلف و استفاده از روش های مختلف استخراج اسانس در این گونه مربوط می شود.
- به عنوان نتیجه گیری کلی باید گفت که در این تحقیق برای تعیین و شناسایی اجزای اسانس گیاه افسنتین از روش میکرواستخراج با فاز جامد با استفاده از لایه های دوگانه هیدروکسیدی با ساختار نانو به عنوان پوشش فایبر مورد استفاده قرار گرفت. در این روش که با روش تقطیر با آب مورد مقایسه قرار گرفت، ۳۷ ترکیب در اسانس این گیاه شناسایی شد که در این میان، آلفا-فلاندرن، ترانس-توزون، ساینن، لینالول استات، پارا-سیمن و ۸،۱-سینئول بیشترین درصد اجزای اسانس را به خود اختصاص دادند. روش SPME در فضای فوقانی با فایبر پیشنهادی ساده بوده و به هزینه کمتری نیاز دارد. همچنین زمان آنالیز کوتاه تر بوده و می توان از این روش برای آنالیز ترکیب های فرار گیاهان دارویی استفاده نمود.
- منابع مورد استفاده**
- Abolghasemi, M.M. and Piryaee, M., 2012. Fast determination of *Prangos uloptera* essential oil by

- (*Artemisia absinthium* L.) essential oils. Record of Natural Products, 6(2): 180-183.
- Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti, V., Milos, M., Mastelic, J., Bessiere, J. and Viano, J., 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica*, 69(2): 158-161.
  - Karp, F. and Croteau, R., 1982. Evidence that sabinene is an essential precursor of C(3)-oxygenated thujane monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 216: 616-624.
  - Kaykhani, M. and Saffari, F., 2008. Application of polypyrrole coated stainless-steel wire to the determination of aliphatic amines using headspace solid-phase microextraction". *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 19(2): 111-117.
  - Kazemi, M., Dakhili, M., Rustaian, A., Larijani, K. and Ahmadi, M.A., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia tschermieviana* Besser from Iran. *Pharmacognosy Research*, 1: 120-124.
  - Khan, I.A. and Abourashed, E.A., 1980. Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in Food, Drugs, and Cosmetics. Wiley, New York, 810p.
  - Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. and Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *A. santonicum*, and *A. spicigera* essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 9452-9458.
  - Lachenmeier, D.W., 2010. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.)-a curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? *Journal of Ethnopharmacology*, 131: 224-227.
  - Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S. and Kolodziejczyk, P.P., 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69: 1732-1738.
  - Lord, H. and Pawliszyn, J., 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2): 153-193.
  - Martin, L., Julio, L.F., Burillo, J., Sanz, J., Mainar, A.M. and Gonzalez-Coloma, A., 2011a. Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (clevenger and soxhlet) and supercritical extracts (CO<sub>2</sub>) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. *Industrial Crops and Products*, 34: 1615-1621.
  - several chemotypes. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 176: 363-366.
  - Djozan, D., Assadi, Y. and Karim-Nezhad, G., 2003. Modified copper wire as solid-phase microextraction fiber, selective extraction of some amines. *Chromatographia*, 56: 611-616.
  - Erichsen-Brown, C., 1979. Use of Plants for the Past 500 Years. Aurora, Ontario, Canada, 510p.
  - Geszprych, A., Przybyl, J., Kuczerenko, A. and Weglarz, Z., 2010. Diversity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) growing wild in Poland in respect of the content and composition of essential oil and phenolic compounds. *ISHS Acta Horticulturae*, 925: 123-129.
  - Ghasemi, E. and Farahani, H., 2012. Head space solid phase microextraction based on nano-structured lead dioxide: application to the speciation of volatile organoselenium in environmental and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1258: 16-20.
  - Gholivand, M.B., Piryaei, M. and Abolghasemi, M.M., 2011. Anodized aluminum wire as a solid-phase microextraction fiber for rapid determination of volatile constituents in medicinal plant. *Analytica Chimica Acta*, 701: 1-5.
  - Gholivand, M.B., Piryaei, M., Abolghasemi, M.M., and Maassoumi, S.M., 2013. Rapid analysis of volatile components from *Teucrium polium* L. by Nanoporous silica polyaniline solid phase microextraction fibre. *Phytochemical Analysis*, 24: 69-74.
  - Gilani, A.H. and Janbaz, K.H., 1995. Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *General Pharmacology*, 26: 309-315.
  - Guillen, M.D. and Sopolana, P., 2005. Headspace solid phase microextraction as a tool to estimate the contamination of smoked cheeses by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Dairy Science*, 88: 13-20.
  - Hoffmann, B. and Herrmann, K., 1982. Flavonol glycosides of mugwort (*Artemisia vulgaris*), tarragon (*Artemisia dranunculus*) and absinthe (*Artemisia absinthium*). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 174: 211-215.
  - Jaenson, T., Palsson, K. and Borg-Karlson, A.K., 2005. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. *Medical and Veterinary Entomology*, 19: 345-352.
  - Judzentiene, A., Budiene, J., Giricyte, R., Masotti, V. and Laffont-Schwob, I., 2012. Toxic activity and chemical composition of Lithuanian wormwood

2011. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. *Chemistry and Biodiversity*, 8: 614-623.
- Tariq, K., Chishti, M., Ahmad, F. and Shawl, A., 2009. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*, 160: 83-88.
  - Tehrani, M.S., Azar, P.A., Hosain, S.W., Khalilzadeh, M.A. and Zalousi, M.B.P., 2012. Composition of essential oil of *Artemisia absinthium* by three different extraction methods: hydrodistillation, solvent-free microwave extraction & headspace solid-phase microextraction. *Asian Journal of Chemistry*, 24: 5371-5376.
  - Umpierrez, M.L., Lagreca, M.E., Cabrera, R., Grille, G. and Rossini, C., 2012. Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. *Phytochemistry Review*, 11: 339-350.
  - Valdes, A., Martinez, J., Lizama, R., Vermeersch, M., Cos, P. and Maes, L., 2008. In vitro anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC., *Melaleuca leucadendron* L. and *Artemisia absinthium* L. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 615-618.
  - Wercinski, S., 1999. *Solid-Phase Microextraction: A Practical Guide*. Dekker, New York, 257p.
  - Wichtl, M., 1994. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 566p.
  - Zhang, C., Qi, M.L., Shao, Q.L., Zhou, S. and Fu, R.N., 2007. Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME-GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(2): 464-470.
  - Martin, L., Mainar, A., Gonzalez-Coloma, A., Burillo, J. and Urieta, J., 2011b. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Journal of Supercritical Fluids*, 56: 64-71.
  - Mescher, J.P. and Howlett, A.C., 1999. Chemical composition of the essential oil of *A. absinthium* L. *Journal of Chromatography A*, 62: 413-480.
  - Mozaffarian, V., 2003. *A Dictionary of Iranian Plant Names*. Farhang Mo'aser Publisher, 739.
  - Orav, A., Raal, A., Arak, E., Müürisepp, M. and Kailas, T., 2006. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Chemistry*, 55: 155-165.
  - Pawliszyn, J., 1997. *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley VCH, New York, 264p.
  - Pawliszyn, J., 2012. *Handbook of Solid-Phase Microextraction*. Elsevier Pulication, 496p.
  - Pino, J.A., Rosado, A. and Fuentes, V., 1997. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 9: 87-89.
  - Piryaei, M., 2018. Layered double hydroxide films on nanoporous anodic aluminum oxide/aluminum wire: a new fiber for rapid analysis of *Origanum vulgare* essential oils. *Natural Product Research*, 32(2): 243-245.
  - Rezaeinodehi, A. and Khangholi, S., 2008. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11: 946-949.
  - Sharopov, F.S., Sulaimonova, V.A. and Setzer, W.N., 2012. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Tajikistan. *Records of Natural Products*, 6: 127-134.
  - Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A. and Rohloff, J.,

## Efficiency of nanostructure layered double hydroxide in extraction and identification of volatile oil constituents of *Artemisia absinthium* L. using headspace solid-phase microextraction method and gas chromatography-mass spectrometry methods

M. Babashpour-Asl<sup>1\*</sup>, M. Piryaei<sup>2</sup> and I. Farhang<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Horticulture, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

E-mail: babashpour@gmail.com

2- Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran

3- Department of Biotechnology, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

Received: January 2019

Revised: July 2019

Accepted: July 2019

### Abstract

The genus *Artemisia* comprises a large number of species, some of which are cultivated commercially in a variety of applications. The high accumulation of essential oils and other terpenoids in certain members of family *Asteraceae*, such as wormwood (*Artemisia absinthium* L.), has made them useful as flavorings. Terpenoids and phenolic compounds are also responsible for the medicinal and medical values of many members of this family. The solid-phase microextraction (SPME) is a fast, easy, efficient, highly solvent-free, and easy-to-automate method. In the present study, headspace SPME (HS-SPME) using nanostructured layered double hydroxide coated fiber in combination with gas chromatography-mass spectrometry was utilized as a monitoring technique for the collection and detection of essential oil constituents of wormwood. Experimental parameters including temperature and desorption time, temperature and extraction time, sample weight, and water content effect were tested and optimized. A temperature of 260 °C was found to be appropriate for efficient desorption. The best desorption time was obtained 2 min for all measurements. The optimized quantities were found for extraction temperature 75 °C, extraction time 25 min, sample weight 2.5 g. The added water deactivated the fiber surface by blocking the active sites; therefore, the proposed fiber is suitable for dry samples. The proposed method is simple and costly compared to conventional methods of analysis. In addition, in this method, the analysis time is shorter and could be used for the analysis of volatile compounds in medicinal plants.

**Keywords:** Wormwood (*Artemisia absinthium* L.), HS-SPME, essential oil, LDH, nanoporous anodic aluminum oxid, GC-MS.