



تعیین کمی و کیفی ترکیبات شیمیایی روغن اسانسی حاصل از اندام‌های هوایی گیاه آویشن به روش تقطیر با آب همراه با کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) و بررسی جامع فیتوشیمیایی عصاره‌ی آن

پروانه رضایی^۱، مجید محمدحسینی^{۲*}

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه شیمی، تنکابن، ایران

^۲ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه شیمی، شاهرود، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۳/۱/۱۹، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۳/۲/۱۸، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۳/۳/۴

چکیده

روغن‌های اسانسی به‌طور گسترده در صنایع معطره، دارویی و آرایشی-بهداشتی، جهت طعم‌دهی و محافظت محصولات غذایی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC/MS)، جزو توانمندترین ابزارها در تجزیه‌ی گسترده‌ی وسیعی از ترکیبات فرار نظیر روغن‌های اسانسی محسوب می‌شوند. در این تحقیق، روغن‌های اسانسی گیاه معطر آویشن که از منطقه‌ی لواسان در موسم گلدهی جمع‌آوری شد، با استفاده از روش کلاسیک تقطیر با آب (HD)، استحصال و ترکیبات متشکله‌ی آنها به کمک روش GC/MS، بررسی و شناسایی شده است. به‌علاوه، یک بررسی جامع فیتوشیمیایی شامل ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان و آنتی‌باکتریال روی عصاره‌های این گیاه انجام شد. نتایج امیدبخش حاصله، تأییدکننده‌ی امکان استفاده از این گیاه به عنوان گزینه‌ی جایگزین برخی از داروها با اثرات جانبی نامطبوع می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: روغن‌های اسانسی، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی، آویشن، فعالیت آنتی‌اکسیدان، فعالیت آنتی‌باکتریال.

۱. مقدمه

آویشن معمولی با نام علمی *Thymus vulgaris*، گیاهی از سرده‌ی آویشنیان است [۱]. گیاه آویشن (شکل ۱)، در طب سنتی ایران و اروپا، از دیرباز تاکنون کاربرد دارویی داشته است. از آویشن در صنایع غذایی (پیتزا، پاستا، ماهی، پنیر، لیکور، ذرت مکزیکی و...)، دارویی، بهداشتی و آرایشی به‌فوق استفاده می‌شود. آویشن، گیاهی چوبی، کوتاه، بوته‌ای، بالشتکی و یا علفی با قاعده‌ی چوبی، به ارتفاع ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر با ساقه‌ی

*عهده‌دار مکاتبات: مجید محمدحسینی

نشانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه شیمی

پست الکترونیک: majidmohammadhosseini@yahoo.com

تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۴۵۳۰

راست، خیزان و یا خوابیده، منشعب، پوشیده از کرک‌های زبر و سفیدرنگ می‌باشد. در این گیاه، برگ‌ها با حاشیه‌ی صاف، مسطح یا تاخورد و برگ‌های جوان به صورت هم‌پوش می‌باشد. برگ‌های آن معمولاً به صورت خطی - سرنیزه‌ای و مژه‌دار دیده می‌شود. گل آذین سنبله‌ی انتهایی، متراکم و چرخه‌های گل با تعداد زیادی گل بدون دم گل می‌باشند [۲]. کاسه‌ی گل لوله‌ای، با ۱۳ رگه، با تعدادی از رگه‌های برجسته، دارای دو لبه، در سطح شکمی پیخ، در قسمت گلو کرک‌دار، لبه‌ی بالایی با سه دندانه‌ی کوتاه سه‌گوش و لبه‌ی پایینی با دودندانه، سرنیزه‌ای مژه‌دار، به طرف داخل خمیده می‌باشند. جام گل دارای دو لبه، لبه‌ی بالایی، تقریباً راست دارای فرورفتگی در وسط، لبه‌ی پایینی، دارای سه لوب تقریباً مساوی می‌باشد. پرچم‌ها ۴ عدد و زیر لبه‌ی بالایی جام گل قرار دارند، کیسه‌های بساک تقریباً موازی، کلاله با دو شاخه‌ی تقریباً مساوی و فندقه تخم‌مرغی شکل می‌باشد [۳].



شکل ۱. تصویر گیاه آویشن در منطقه‌ی نمونه‌برداری (برگ جهان لواسان) در اردیبهشت‌ماه ۹۲

از جمله‌ی خواص مهم گیاه آویشن می‌توان به استفاده‌ی متعدد آن به عنوان طعم‌دهنده، ضد عفونی کننده، ضد سرفه، درمان کننده‌ی سرماخوردگی، ضد باکتری، ضد ویروس و آنتی‌اکسیدان، ضد نفخ، خلط آور و عامل مؤثر در درمان اختلالات روده‌ای اشاره نمود [۱-۳].

۲. بخش تجربی

۲-۱. مواد و واکنش‌گرها

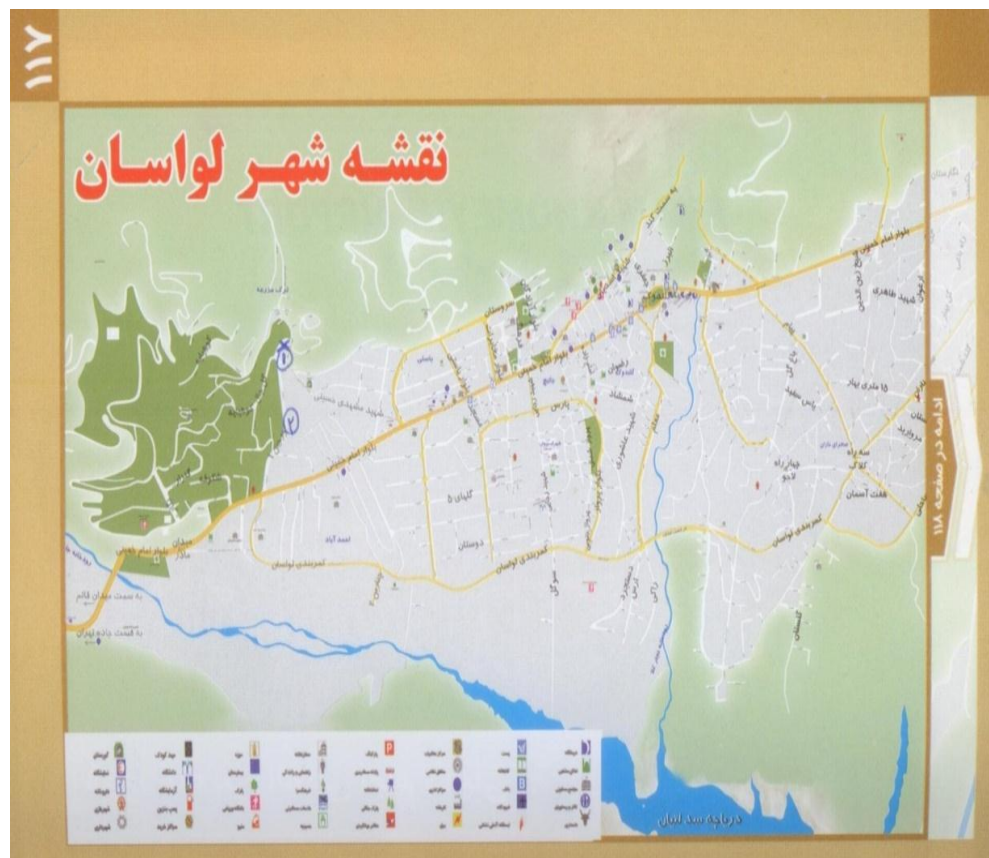
تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق اعم از معرف فولین سیوکالتیو، سدیم کربنات، گالیک اسید، آلومینیوم کلراید، پتاسیم استات، کوئرستین، آسکوربیک اسید، متانول، محیط کشت مولر هینتون آگار، دیسک‌های بلانک، دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و متانول از شرکت مرک (آلمان) و رادیکال آزاد DPPH از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند.

۲-۲. جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ی گیاهی

در این تحقیق، گیاه آویشن با نام علمی تیموس ولگاریس مورد بررسی قرار گرفته است. نمونه‌ی گیاهی، پس از جمع‌آوری توسط آقای دکتر مظفریان، گیاه‌شناس مؤسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران در تهران مورد شناسایی قرار گرفت. فهرست مبسوطی از اطلاعات مربوط به این گیاه، در جدول ۱ آورده شده است. همچنین، نقشه‌ی جغرافیایی محل نمونه‌برداری (منطقه‌ی لواسان) در شکل ۲، آورده شده است.

جدول ۱. اطلاعات جامع مربوط به منطقه‌ی نمونه‌برداری گیاه

محل جمع‌آوری	تاریخ جمع‌آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا	منبع گیاهی	اندام مورد استفاده	ساعت
برگ جهان لواسان	۱۳۹۲/۲/۲۷	51°44' E	35°50' N	۲۱۶۸	آویشن	هوایی	۱۰ صبح



شکل ۲. مختصات جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌ی گیاهی آویشن

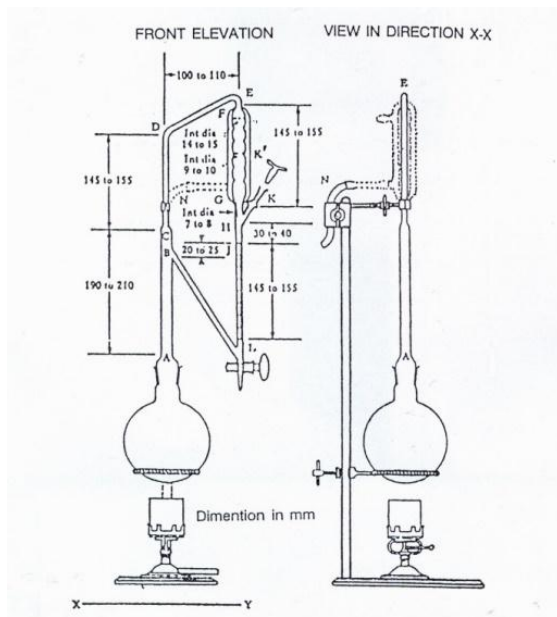
۳-۲. آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های مورد استفاده، پس از جمع‌آوری در دمای محیط و دور از نور خورشید، خشک شدند. پس از انجام نمونه‌برداری، گیاهان خشک شده را آسیاب کرده و در ادامه عملیات اسانس‌گیری و عصاره‌گیری از آنها انجام شد.

۴-۲. استخراج اسانس

برای استخراج روغن اسانسی از گونه‌های نام برده، از روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر (شکل ۳) بهره گرفته شد [۴]. این دستگاه، دقیقاً مطابق استانداردهای فارماکوپه‌ی اروپا طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. بر این اساس، بخش‌های ۱۰۰ گرمی از اندام‌های هوایی خردشده‌ی این گیاه را درون بالن تقطیر ریخته و تقریباً به میزان نصف حجم مخزن، آب مقطر به آن اضافه شد. سپس، بالن را روی منتل قرار داده و با سوار کردن قطعات مربوطه، عمل اسانس‌گیری برای مدت ۳-۳/۵ ساعت ادامه پیدا کرد. بعد از این مدت، روغن اسانسی موردنظر جمع‌آوری و از مقدار کمی سدیم سولفات به عنوان جاذبه‌الرطوبه برای خشک کردن آن استفاده شد. نهایتاً، اسانس به دست آمده، به دقت توزین و در ویال‌های تیره‌رنگ تا هنگام آنالیز در یخچال نگهداری گردید. البته، در مواردی که میزان اسانس کم است، می‌توان از حلال هگزان

نرمال برای جمع آوری اسانس استفاده کرد. بعلاوه، بازدهی اسانس، به صورت نسبت وزن اسانس به وزن گیاه کاملاً خشک اولیه به صورت درصد وزنی- وزنی (W/W%) گزارش شد.



شکل ۳. نمایشی از نحوه‌ی استحصال اسانس گیاه با روش تقطیر با آب (HD) با کلونجر استاندارد

۲-۵. شناسایی اجزاء شیمیایی اسانس

با آماده‌سازی اسانس و تزریق آن به دستگاه GC، بهترین شرایط برای آنالیز و جداسازی به دست آمد. سپس، با تزریق آن به دستگاه GC/MS، اجزاء شیمیایی اسانس به صورت کمی و کیفی شناسایی شدند. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان بازداری، شاخص بازداری (RI)، مطالعه‌ی طیف‌های جرمی حاصله و مقایسه‌ی آنها با ترکیب‌های استاندارد و داده‌های موجود در کتابخانه‌ی رایانه‌ی GC/MS (Wiley 7.0) صورت گرفت [۵]. در صورت وجود نمونه‌های استاندارد مربوط به ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی اسانس در آزمایشگاه، آنها نیز به دستگاه GC تزریق شدند. درصد نسبی محصولات از روی طیف‌های GC از طریق روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ به دست آمدند. بعلاوه، جهت شناسایی تکمیلی از الگوهای شکافتگی طیف‌های جرمی یک‌سری از مقالات پیشین گروه تحقیقاتی ما استفاده شد [۱۳-۶].

۲-۶. خصوصیات دستگاه GC/MS در تجزیه‌ی کمی و کیفی اسانس گیاه آویشن

جهت تعیین ساختار شیمیایی روغن اسانسی جداسازی شده، حجمی معادل یک میکرولیتر از اسانس‌های استخراج‌شده از اندام‌های هوایی گیاه آویشن با استفاده از یک سرنگ هاملتونی به دستگاه GC-MS محصول شرکت Agilent مدل 7890 با ستونی از نوع HP5-MS به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر تزریق شد. بر اساس برنامه‌ریزی حرارتی تعریف‌شده‌ی ستون، درجه‌ی حرارت محل تزریق در ۲۵۰ درجه‌ی سانتی-گراد، دمای ابتدایی آن در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم و سپس این دما به مدت ۱ دقیقه برای ستون تثبیت شد. سپس، افزایش دما تا ۲۸۰

درجه‌ی سانتی‌گراد با روند افزایش ۲/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بر دقیقه انجام و ستون به مدت ۱۵ دقیقه تحت این دما قرار گرفت. همچنین، از گاز هلیوم با سرعت جریان حجمی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده گردید.

مدل دستگاه طیف‌سنجی جرمی (Mass)، QQQ-7000 B و از انرژی یونش ۷۰ الکترون‌ولت جهت ایجاد فراگمان‌های جرمی در آن بهره‌گرفته شد. مشخصات کلی دستگاه تلفیقی GC-MS مورد استفاده در این تحقیق جهت تجزیه‌ی روغن اسانسی گیاه آویشن، در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲. مشخصات دستگاه GC/MS

توضیح	شاخص
7890 Agilent	مدل دستگاه GC
QQQ-7000 B	مدل دستگاه Mass
HP5- MS	نوع ستون
۳۰ متر	طول ستون
۰/۲۵ میلی‌متر	قطر داخلی ستون
۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد	دمای اولیه ستون
۲۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد	دمای نهایی ستون
هلیوم	نوع گاز حامل
طیف‌سنج جرمی	دتکتور

شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها، مقایسه‌ی آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات، با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه‌ی کامپیوتری صورت گرفت. شاخص بازداری کوآتس برای هر ترکیب با استفاده از فرمول ۱، محاسبه شد.

$$I = 100 N + 100 \frac{tR(A) - tR(N)}{tR(N+1) - tR(N)} \quad \text{فرمول ۱}$$

۲-۲. زمان‌های بازداری آلکان‌های نرمال

تحت شرایط برنامه‌ریزی حرارتی گفته‌شده در بخش ۲-۶، زمان‌های بازداری حاصل از تزریق آلکان‌های هومولوگ ۹ تا ۲۴ کربنه در جدول ۳ درج شده‌اند. این زمان‌ها در محاسبه‌ی شاخص بازداری کوآتس به عنوان اصلی‌ترین معیار تأیید روند شناسایی اجزا روغن‌های اسانسی، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۲-۸. تهیه‌ی عصاره‌ها

عصاره‌گیری، توسط حلال متانول (مرک) به طریقه‌ی ماسراسیون یا خیساندن انجام شد. برای این منظور، ابتدا ۱۰۰ گرم از هر نمونه در ۳۵۰ حدود میلی‌لیتر متانول خیسانده شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط نگهداری و هر چندساعت یک‌بار همزده شد تا استخراج عصاره‌ها به طور کامل انجام گیرد. پس از گذشت این مدت زمان، مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی از هم جدا و سپس عصاره‌های به دست آمده

با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد، تغلیظ و در فور ۴۰ درجه خشک شدند. از طرف دیگر، جهت استحصال عصاره می توان از مقادیر کمتر نمونه گیاهی نیز به شرح مندرج در بخش های ۲-۹ تا ۲-۱۱، استفاده نمود.

جدول ۳. تعداد اتم های کربن و زمان های بازداری در آلکان های زنجیری سیر شده ی هومولوگ ۹ تا ۲۰ کربنه

تعداد اتم کربن	زمان بازداری
۹	۴/۸۷
۱۰	۷/۳۲
۱۱	۹/۸۹
۱۲	۱۲/۴۲
۱۳	۱۴/۶۶
۱۴	۱۶/۹۵
۱۵	۱۹/۰۷
۱۶	۲۰/۹۹
۱۷	۲۲/۹۲
۱۸	۲۴/۶۹
۱۹	۲۶/۳۵
۲۰	۲۷/۹۲

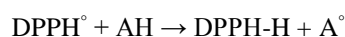
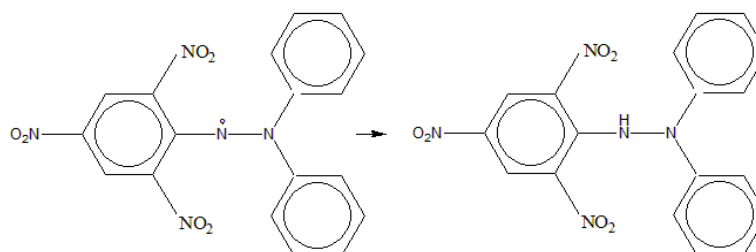
۲-۹. تعیین محتوای کلی ترکیبات فنولی

محتوای ترکیبات فنولی موجود در عصاره گیاه آویشن، از طریق روش های استاندارد ارائه شده در منابع علمی با اعمال تغییرات جزئی سنجیده می شود [۱۷-۱۴]. بدین ترتیب، ۱ گرم از پودر حاصل از اندام های هوایی گیاه آویشن را پس از توزین دقیق، داخل هاون ریخته به آن ۲ میلی لیتر متانول اضافه کرده و مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه در هاون کوبیده می شود. سپس، محتویات داخل هاون به دقت با کاغذ صافی صاف می شود. در مرحله بعد، ۰/۵ میلی لیتر از عصاره ی الکلی به دست آمده، در سه تکرار به سه لوله ی آزمایش یکسان اضافه و در گام بعد، ۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتیوی رقیق شده (به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر) به عصاره های موجود در هر لوله ی آزمایش افزوده می شود. سپس، مخلوط حاصل را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته و در ادامه، ۴ میلی لیتر از محلول سدیم کربنات ۷/۵ درصد به هر لوله ی آزمایش می افزایم. پس از ساکن نگه داشتن مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، جذب مخلوط در هر لوله ی آزمایش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت می شود. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد گالیک اسید برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. در این آزمایش، بلانک ۰/۵ میلی لیتر متانول، ۵ میلی لیتر فولین سیوکالتیو و ۴ میلی لیتر سدیم کربنات می باشد [۲۴-۲۱].

۲-۱۰. سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی

سازوکار اصلی عمل آنتی اکسیدان ها در مواد غذایی و گیاهان، جذب رادیکال های آزاد است. در این آزمون، قدرت حذف رادیکال های آزاد DPPH (۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل)، از طریق اندازه گیری کاهش میزان جذب در طول موج استاندارد مربوطه (۵۱۷ نانومتر) ارزیابی می شود. حذف رادیکال های DPPH، از طریق احیا توسط آنتی اکسیدان (AH) (شکل ۴)، انجام می شود. در بیشتر مقالات و آزمایشات

فیتوشیمیایی، ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مبتنی بر استفاده از واکنش گر DPPH، خنثی شدن رادیکال پس از سپری شدن ۶۰-۱۵ دقیقه از زمان واکنش رخ می‌دهد. نتایج این آزمون معمولاً برحسب IC_{50} (Inhibitory Concentration) گزارش می‌شود که طبق تعریف بیانگر غلظتی از آنتی-اکسیدان است که برای از بین بردن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH در یک بازه‌ی زمانی مشخص، مورد نیاز می‌باشد [۲۰-۱۸].



(Purple) (Yellow)

شکل ۴. واکنش تبدیل رادیکال DPPH به DPPH غیر رادیکال با واکنش پذیری کمتر و ایمنی بیشتر

جهت تعیین وجود یا عدم وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ی گیاه آویشن، ابتدا بخش‌های ۰/۵ گرمی از پودر خشک حاصل از اندام‌های هوایی گیاه آویشن را تحت شرایط یکسان به دو سری لوله‌ی آزمایش یکسان افزوده، به محتویات هر لوله حجمی معادل ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه و مجموعه‌ی حاصل به مدت ۲۴ ساعت، ساکن باقی می‌ماند. سپس، محتویات هر لوله‌ی آزمایش را به مدت ۲۰ دقیقه (با روند ۴۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ کرده و فاز فوقانی لوله‌های آزمایش را به درون ظرف‌های شیشه‌ای (با وزن کاملاً معین) اضافه می‌کنیم. پس از حذف متانول، وزن عصاره‌های حاصل را به دقت تعیین و جهت تهیه‌ی محلول مادر، ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال متانول به بخش‌های ۰/۱ گرمی از عصاره‌های خشک افزوده می‌شود. سپس، رقت‌های مناسب از عصاره‌ی الکلی گیاه آویشن (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، در بالن‌های ژوژه‌ی مناسب تهیه و محتویات هر بالن با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول، به حجم می‌رسد.

در ادامه، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر محلول الکلی عصاره‌ی گیاه آویشن با غلظت‌های فوق‌الذکر را به هفت لوله‌ی آزمایش افزوده و بلافاصله به هر لوله، ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۲۵ گرم در لیتر معرف DPPH را اضافه می‌کنیم. جهت اجتناب از انجام واکنش‌های اکسایش نامطبوع، دهانه‌ی لوله‌های آزمایش را با دقت با ورقه‌های نازک فویل آلومینیومی پوشانده تا محتویات هر لوله به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گیرد. بدیهی است اگر پس از سپری شدن این زمان، رنگ محلول‌های موجود در لوله‌های آزمایش از بنفش به زرد متمایل شود، دلالت بر وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای عصاره‌های الکلی گیاه خواهد داشت. در مرحله‌ی نهایی، جذب لوله‌های آزمایش حاوی عصاره‌های متانولی گیاه آویشن را توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت می‌کنیم. در کلیه‌ی آزمایشات تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی الکلی گیاه آویشن، محلول بلانک، شامل متانول محلول ۰/۰۲۵ گرم در لیتر معرف DPPH (دقیقاً، مشابه محلول‌های لوله‌های آزمایش و تنها فاقد

غلظت‌های مختلف از عصاره) می‌باشد. با توجه به مقادیر عددی جذب، درصد ربایش رادیکال‌های آزاد موجود، با استفاده از فرمول ۲، محاسبه می‌شود.

$$I (\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100 \quad \text{فرمول ۲}$$

A_0 = جذب شاهد یا کنترل (شامل تمامی عوامل مثل DPPH و حلال بدون عصاره)

A_s = جذب عصاره‌ی مورد آزمایش

$I (\%)$ = درصد ربایش رادیکال آزاد

۱۱-۲. تعیین محتوای کلی فلاونوئید

در منابع علمی، سنجش فلاونوئید معمولاً براساس روش کالریمتری انجام می‌شود. در این راستا، با همان روش گفته شده در مرحله‌ی سنجش فنولی، عصاره متانولی استحصال، سپس حجمی معادل ۰/۵ میلی لیتر از آن را به سه سری لوله‌ی آزمایش تحت شرایط یکسان اضافه می‌کنیم. در مرحله بعد، به هر لوله‌ی آزمایش ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم استات یک مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر افزوده می‌شود. پس از یکنواخت کردن محتوای مخلوط‌ها و حصول اطمینان از اختلاط کامل این واکنشگرها، مخلوط نهائی حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق ساکن نگه داشته شده و در مرحله‌ی پایانی جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت می‌شود. بعلاوه، نتایج حاصله به صورت مقادیر هم‌ارز با استاندارد کوئرستین برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. در این آزمایش، محلول بلانک شامل ۲ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید، ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم استات و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر می‌باشد.

۱۲-۲. بررسی اثرات ضدباکتری روغن اسانسی گیاه آویشن

۱-۱۲-۲. سویه‌های میکروبی

در این تحقیق، جهت بررسی خاصیت ضدباکتری، از ۴ سویه‌ی باکتری (باکتری باسیلوس سوبتیلیس، سودومناس آثرژینوزا، اشریشیا کلای و استفیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین)، استفاده شدند. مشخصات کلی باکتری‌های مورد استفاده در جدول (۴)، آورده شده است.

جدول ۴. مشخصات باکتری‌ها

واکنش گرم	شماره استاندارد	نام باکتری
مثبت	PTCC 1023	<i>Bacillus subtilis</i>
مثبت	ATCC25925	<i>Methisillin resistant staphylococcus aureus</i>
منفی	PTCC1430	<i>Pseudomonas aeroginos</i>
منفی	PTCC 1399	<i>Escherichia coli</i>

۲-۱۲-۲. روش تهیه‌ی دیسک‌های آنتی‌بیوگرام

در این روش، دیسک‌هایی به قطر ۶/۴ میلی متر تهیه و در یک بطری شیشه‌ای استریل قرار داده شد. سپس، استریل شدن آنها با حرارت خشک تحت دمای ۱۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام شد.

۲-۱۲-۳. تهیهی محلول میکروبی

در ابتدا، محیط کشت مولر هیتون با غلظت ۳۴ گرم بر لیتر آماده شد. پس از استریل شدن محیط کشت در اتوکلاو، حجمی معادل ۱۵ میلی لیتر از آن را به هر پتری دیش یا پتری پلیت^۱ اضافه کردیم تا در محیط آزمایشگاه به صورت ژله‌ای در آید. در ادامه، سویه‌های میکروبی بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار جهت فعال شدن کشت داده شدند. در مرحله‌ی بعد، یک کلنی مشخص حاصل از کشت خالص باکتری در ۳-۴ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل شد. بعلاوه، تعیین غلظت میکروبی و استاندارد شدن آن، با سوسپانسیون نیم مک‌فارلند استاندارد انجام شد.

۲-۱۲-۴. روش بررسی اثرات ضدباکتری

در این تحقیق، جهت بررسی اثرات ضدباکتری از دو روش دیسک دیفیوژن^۲ و چاهک استفاده شد.

۲-۱۲-۴-۱. روش دیسک دیفیوژن^۲

دیسک بلانک استریل، به مدت ۵ دقیقه در غلظت‌های متفاوت اسانس حل شده در دی‌متیل سولفوکساید^۳ (DMSO) (به نسبت ۱ به ۵) موردنظر قرار داده شد. سپس، دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند. از کشت ۲۴ ساعته هر یک از باکتری آماده شده، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند تهیه و به وسیله‌ی سوآپ بر سطح محیط کشت مولر هیتون آگار کشت شد. سپس، دیسک‌های حاوی اسانس در غلظت‌های (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر) را بر سطح آگار قرار داده، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوباته و با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف دیسک‌ها، حساسیت یا مقاومت باکتری‌های موردنظر به اسانس تعیین شد [۲۵].

۲-۱۲-۴-۲. روش چاهک

در این روش، از کشت ۲۴ ساعته هر یک از باکتری آماده شده، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند تهیه و به وسیله‌ی سوآپ بر سطح محیط کشت مولر هیتون آگار به میزان ۱۰ میلی لیتر کشت شد. سپس، توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن چاهک‌هایی را ایجاد کرده و از روغن اسانسی با غلظت‌های (۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکرولیتر)، در چاهک‌ها ریخته شد. نهایتاً، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد آنکوباته شده و با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف چاهک‌ها، حساسیت یا مقاومت باکتری‌های موردنظر به اسانس تعیین شد [۲۶-۲۸].

۲-۱۲-۵. آزمایش تأثیر حلال بر میکروارگانیزم‌ها

از حلال‌های مختلف که در رقیق‌سازی اسانس مورد استفاده قرار گرفته بودند، روی باکتری‌های مورد استفاده در روش دیسک دیفیوژن و چاهک استفاده شد. از بین حلال‌ها، دی‌متیل سولفوکساید که اثر ضدباکتری محسوسی از خود نشان نداد، به عنوان حلال مناسب برای تهیه‌ی رقت‌های مختلف اسانس‌ها یا عصاره‌ها در نظر گرفته شد.

1-Petri plate

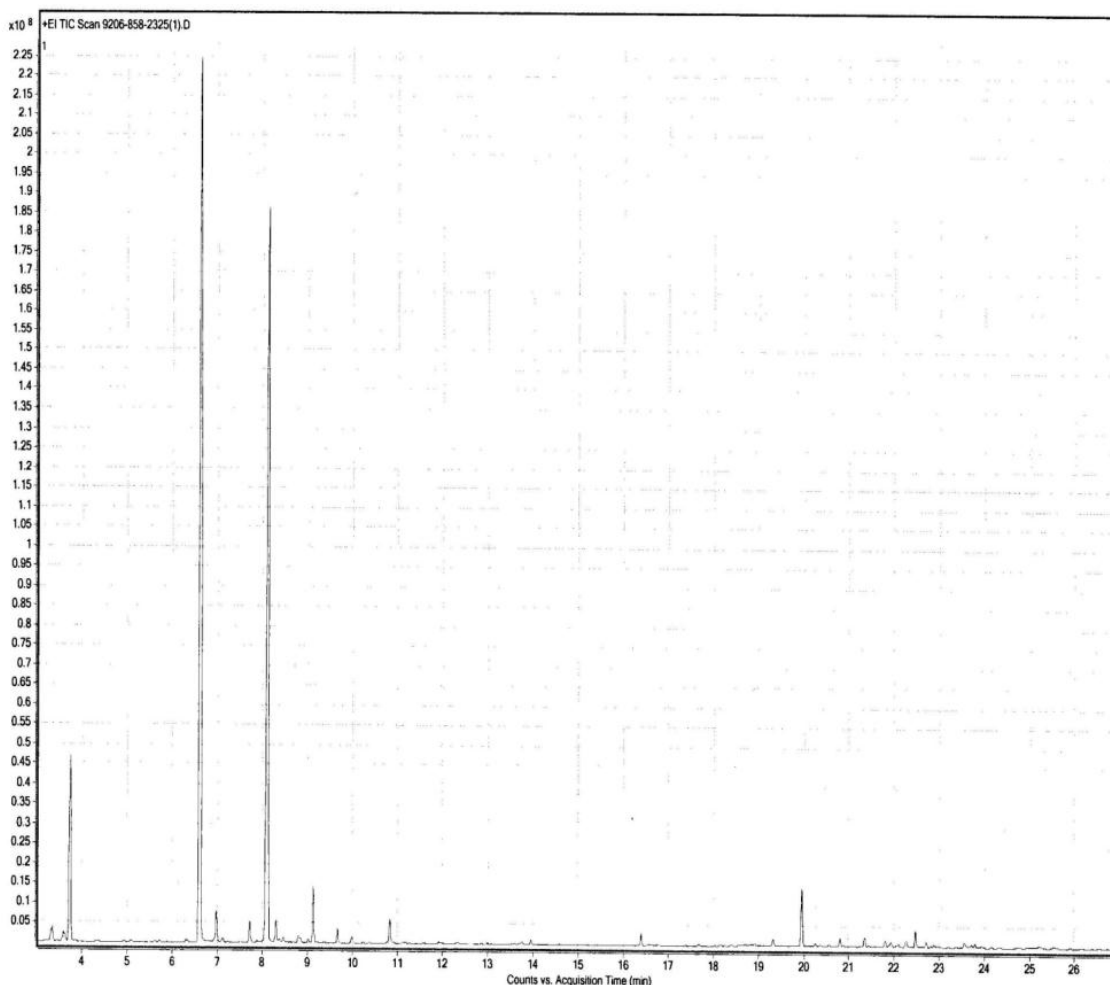
2-Disk Diffusion

3-Dimethyl sulfoxide

۳. نتایج و بحث

۳-۱. نتایج مربوط به طیف کروماتوگرام GC/MS گیاه آویشن

پیک‌های مربوط به کروماتوگرام GC/MS اسانس اندام‌های هوایی گیاه آویشن که با درصد وزنی-وزنی (W/W%) ۰/۴ با استفاده از روش تقطیر با آب استحصال شده، در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵. کروماتوگرام GC/MS مربوط به اسانس استحصال شده از اندام‌های هوایی گیاه آویشن

۳-۲. ترکیبات طبیعی تشکیل دهنده‌ی روغن اسانسی گیاه آویشن

بخش‌های ۱۰۰ گرمی از برگ‌های خشک شده و پودر شده‌ی گیاه آویشن به وسیله‌ی دستگاه کلونجر، اسانس‌گیری شد. سپس، اسانس استحصال شده به دستگاه GC/MS تزریق و ترکیبات طبیعی موجود در آن مورد شناسایی قرار گرفت. در جدول ۵، نام، شاخص بازداری کواتس، درصد نسبی، زمان بازداری (دقیقه) و گروه ترکیبات طبیعی موجود در ساختار شیمیایی روغن اسانسی حاصل از اندام‌های هوایی گیاه آویشن جمع‌آوری شده از منطقه‌ی لواسان آورده شده است.

جدول ۵. ترکیبات طبیعی تشکیل دهنده‌ی روغن اسانسی استحصال شده از اندام‌های هوایی گیاه آویشن

شماره	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد نسبی	زمان بازداری (دقیقه)	گروه ترکیب طبیعی
۱	α -Thujene	۹۲۶	۰/۲	۶/۴	MH
۲	1R- α -Pinene	۹۳۳	۰/۳	۶/۶	MH
۳	Camphene	۹۴۸	۰/۲	۶/۷	MH
۴	β -Myrcene	۹۹۰	۰/۳	۸/۱	MH
۵	α -Phellandrene	۱۰۰۵	۰/۱	۸/۵	MH
۶	α -Terpinene	۱۰۱۷	۰/۶	۸/۸	MH
۷	β -Cymene	۱۰۲۴	۱/۹	۹/۰	MH
۸	1,8-Cineole	۱۰۳۲	۰/۴	۹/۲	OM
۹	γ -Terpinene	۱۰۵۹	۳/۰	۱۰/۰	MH
۱۰	Terpinolene	۱۰۸۸	۰/۱	۱۰/۸۰	MH
۱۱	β -Linalool	۱۱۰۰	۰/۸	۱۱/۱	OM
۱۲	Borneol	۱۱۶۷	۰/۸	۱۳/۱	OM
۱۳	4-Terpineol	۱۱۷۸	۰/۴	۱۳/۴	OM
۱۴	α -Terpineol	۱۱۹۲	۰/۱	۱۳/۸	OM
۱۵	cis-Geraniol	۱۲۲۸	۰/۷	۱۴/۸	OM
۱۶	Anisole ,2-isopropyl-5-methyl-	۱۲۳۵	۰/۱	۱۵/۰	NH
۱۷	Citral	۱۲۴۱	۰/۲	۱۵/۲	OM
۱۸	Anisole , 2-isopropyl-4-methyl-	۱۲۴۴	۰/۸	۱۵/۳	NH
۱۹	<i>trans</i> -Geraniol	۱۲۵۶	۲۸/۱	۱۵/۶	OM
۲۰	α -Citral	۱۲۹۳	۰/۴	۱۶/۰	OM
۲۱	Thymol	۱۳۰۲	۲۸/۹۹	۱۶/۶	OM
۲۲	Carvacrol	۱۳۵۴	۰/۱	۱۶/۸	OM
۲۳	O-Acetylthymol	۱۳۷۳	۰/۱	۱۸/۲	OM
۲۴	Carvacrol acetate	۱۳۸۴	۱۲/۹	۱۸/۷	MH
۲۵	Granyl acetate	۱۴۲۳	۱/۵	۱۸/۹	MH
۲۶	β -Caryophyllene	۱۴۴۳	۰/۱	۲۰/۰	SH
۲۷	α -caryophyllene	۱۴۶۴	۰/۱	۲۰/۸	SH
۲۸	Elixene	۱۵۱۰	۰/۲	۲۱/۹	SH
۲۹	β -Bisabolene	۱۵۱۷	۰/۵	۲۲/۱	SH
۳۰	γ -Cadinene	۱۵۲۶	۰/۵	۲۲/۳	SH
۳۱	δ -Cadinene	۱۵۴۴	۰/۲	۲۲/۵	SH
۳۲	α -Bisabolene	۱۵۶۰	۰/۱	۲۲/۹	SH
۳۳	Geraniol butyrate	۱۵۸۲	۰/۲	۲۳/۳	NH
۳۴	(-)-Spathulenol	۱۵۸۸	۰/۲	۲۳/۸	OM
۳۵	Caryophyllene oxide	۱۵۹۷	۰/۳	۲۴/۰	OM

ادامه‌ی جدول ۵.

شماره	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد نسبی	زمان بازداری (دقیقه)	گروه ترکیب طبیعی
۳۶	Cubenol	۱۶۳۴	۰/۱	۲۴/۷	OS
۳۷	T-Cadinol	۱۷۵۶	۰/۵	۲۵/۲	OS
۳۸	Geranylhexanoate	۱۸۹۲	۰/۱	۲۷/۶	NH
۳۹	Sclareol oxide	۱۹۰۹	۰/۱	۳۰/۴	NH
مجموع					۸۵/۲

با مطالعه و بررسی دقیق اندیس‌های بازداری، طیف‌های جرمی موجود در کتابخانه‌ی دستگاه GC/MS، مقایسه‌ی این پارامترها با ترکیبات استاندارد و نتایج مندرج در جدول ۵، ۳۹ ترکیب شیمیایی در روغن اسانسی این گیاه شناسایی شد که مجموعاً ۸۵/۲۵ درصد از کل ساختار اسانس را تشکیل می‌دهند. ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده‌ی اسانس، گاما-ترپین (۳/۰۱٪)، کارواکرول استات (۱۲/۹۳٪)، ترانس-ژرانیول (۲۸/۱۴٪) و تیمول (۲۸/۹۹٪) می‌باشد. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، اسانس حاصل از ۶/۷۴٪ مونو ترپن هیدروکربنی، ۶۲/۵۴٪ مونو ترپن اکسیژن-دار، ۱/۶۸٪ سزکوئی ترپن هیدروکربنی و ۰/۵۶٪ سزکوئی ترپن اکسیژن‌دار تشکیل شده است.

۳-۳. مروری بر تحقیقات پیشین پیرامون تجزیه‌ی اسانس آویشن

کریمی اسبو و همکاران در سال ۲۰۱۰ میلادی، ضمن بررسی اسانس استحصال‌شده از گیاه آویشن، به وجود تیمول و کارواکرول اشاره کردند [۲۹]. المقطری و همکاران (سال ۲۰۱۱ میلادی)، در بررسی ساختار شیمیایی روغن اسانسی استحصال‌شده از منطقه‌ی یمن، تیمول و پی-سایمن را به عنوان ترکیبات طبیعی عمده شناسایی و گزارش نمودند [۳۰]. سایر ترکیبات شناسایی‌شده با درصد کمتر در ساختار روغن‌های اسانسی مربوطه شامل کاریوفیلین، آلفا پینن، میرسن، تیمیل متیل استر، کارواکرول، بتا پینن، آلفا کادینول، ۳-کارن، تیمیل استات، کامفن، ژرماکرن دی، ساینن، ا-سایمن، لینالول، ترپینول، او۱-سینئول، فانسول، ۳-اکتانول، کاریوفیلین اکسید و آلفا فلاندرن بودند. زامبولی و همکاران در سال ۲۰۰۴ میلادی، در بررسی روغن‌های اسانسی تجاری آویشن با روش تقطیر با آب، مقادیر قابل توجه تیمول را در تمامی نمونه‌ها شناسایی نمودند [۳۱]. در تحقیق جالب تراس و همکاران در سال ۲۰۰۷ میلادی، روغن‌های اسانسی حاصل از اندام‌های هوایی گیاه آویشن در منطقه‌ی کاتالونیا در ۴ ارتفاع متفاوت از سطح دریا مورد ارزیابی قرار گرفته و دو نوع شیمیایی شاخص یکی شامل ترکیب غالب او۱-سینئول و دیگری واجد لینالول را گزارش نمودند [۳۲]. جردن و همکاران در سال ۲۰۰۶ میلادی، روغن‌های اسانسی گیاه آویشن اسپانیایی را با روش تقطیر با آب بررسی و اجزای اصلی تشکیل‌دهنده‌ی آنها را با یکدیگر مقایسه نمودند. در این تحقیق، اجزاء اصلی موجود در روغن حاصل از روش تقطیر با آب به ترتیب او۱-سینئول، ترپینیل استات، بورنتول، لینالول، بتا پینن، آلفا-ترپینول و کامفور شناسایی و گزارش گردید [۳۳].

۳-۴. تعیین ترکیبات فلاونوئیدی، فنولیک و IC₅₀

جهت تعیین ترکیبات فلاونوئیدی، فنول و IC₅₀، طبق روش‌های ذکر شده در بخش‌های پیشین (۲-۹، ۲-۱۰ و ۲-۱۱)، یک سری آزمایش جامع انجام و خلاصه‌ی نتایج حاصله در جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۶. میانگین میزان فنول کل، فلاونوئید و مقدار IC_{50} عصاره‌ی متانولی گیاه آویشن

عصاره‌ی گیاه آویشن	میانگین فنول کل (mg/g)	میانگین فلاونوئید (mg/g)	IC_{50} (mg/mL)
	$522/33 \pm 2/97$	$7/35 \pm 0/3$	$25/13 \pm 0/84$

میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد.

۳-۵. نتایج اثرات ضدباکتریایی در روش دیسک دیفیوژن

جهت تعیین اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاه آویشن، طبق روش‌های دیسک دیفیوژن در بخش‌های پیشین، یک‌سری آزمایش تکمیلی انجام و نتایج حاصله در جدول (۷) آورده شده است.

جدول ۷. مقایسه‌ی میانگین تأثیر نوع اسانس و نوع باکتری بر قطر هاله‌ی عدم رشد در روش دیسک دیفیوژن

اسانس	باکتری	تکرار	میانگین (دیسک)	خطای معیار	انحراف معیار
Thymus vulgaris	<i>Staphylococcus aureus</i>	۱۵	۶۷/۲۰	۶/۰	۷۱/۶
	<i>Bacillus subtilis</i>	۱۵	۱۳/۲۸	۱۲/۱	۸۷/۲
	<i>Escherichia coli</i>	۱۵	۶/۱۹	۱۲/۱	۷۳/۶
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	۱۵	۶/۸	۱۲/۱	۲۶/۶

نتایج مندرج در جدول ۷ (روش دیسک دیفیوژن)، نشان می‌دهند که گیاه آویشن بر روی هر چهار باکتری اثر مهار رشد داشته و دارای فعالیت ضدباکتریایی می‌باشند. در انجام این سری آزمایشات، آنتی‌بیوتیک جنتامیسین به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به مندرجات این جدول، روغن اسانسی گیاه آویشن به طور تجربی، بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد را بر روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس با مقدار $28/13 \pm 2/87$ و کمترین قطر هاله‌ی عدم رشد مربوط به باکتری سودمناس آئرژینوزا با مقدار $8/6 \pm 6/26$ را در بر داشته است.

۴. نتیجه‌گیری

امروزه، کشورهای مختلف در پی یافتن گیاهان و ترکیبات طبیعی ارزشمندی هستند که در درمان بیماری‌ها مفید باشند، یا بتوان از آنها به عنوان یک ماده‌ی طبیعی در صنایع مختلف استفاده نمود. از آنجایی که گیاهان دارویی و معطر در دنیا جهت تغذیه و درمان بیماری‌ها بسیار مؤثر و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند، شناسایی ترکیبات موجود در آنها به خصوص گونه‌های بومی کشور، مورد توجه محققان و پژوهشگران این رشته قرار گرفته است. کشور ما به دلیل شرایط خاص اقلیمی خود منبع سرشاری از این گونه‌های مهم و نادر گیاهی محسوب می‌شود. با وجود بررسی‌های فراوان صورت گرفته در گونه‌های معطر و دارویی کشور، هنوز زمینه‌های تحقیقاتی متعددی جهت شناسایی گونه‌ها و یا ترکیبات مهم تشکیل‌دهنده‌ی ساختار آنها وجود دارد. ارائه‌ی راهکارهایی جهت تضمین سلامت جامعه‌ی جهانی از منابع طبیعی موجود، در دنیای کنونی از اهمیت بسزایی برخوردار است. در شرایطی که داروهای شیمیایی علاوه بر اثرات سوء بر سلامت جامعه انسانی، طبیعت پیرامون ما را به مخاطره انداخته‌اند، ضروری است تا جهت شناخت مواد مؤثره‌ی گیاهان از جمله اسانس‌ها، روش‌های استحصال و سنجش کمی و کیفی آنها، تحقیقات دامنه‌داری صورت پذیرد. گیاه آویشن، گیاهی دارویی و علفی، چندساله و چوبی است که در نقاط مختلف ایران می‌روید. بررسی نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن اسانسی این گیاه در این پژوهش نشان داد که از مجموع ۴۳ ترکیب شیمیایی

شناسایی شده که ۸۵/۲۵٪ ساختار اسانس حاصل از اندام‌های هوایی آن را تشکیل می‌دهند، عمده‌ترین ترکیبات، گاما-ترپینن (۳/۰۱٪)، کارواکرول استئات (۱۲/۹۳٪)، ترانس-ژرانیول (۲۸/۱۴٪) و تیمول (۲۸/۹۹٪) می‌باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان IC_{50} در گیاه آویشن $25/13 \pm 0/84$ mg/mL می‌باشد. از طرف دیگر، اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی به روش فولین سیو کالتیو مشخص شد. بر اساس این سنجش، میزان میانگین ترکیبات فنول کل در گیاه آویشن معادل $817/9 \pm 2/97$ mg/g بود. بعلاوه، میزان فلاونوئیدهای موجود در اسانس نیز به روش کالریتری تعیین و میزان میانگین فلاونوئید در این گیاه $7/35 \pm 0/3$ mg/g برآورد می‌شود. در بررسی اثر ضدباکتریایی، از روش‌های مختلفی چون روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها بر روی ۴ سوش باکتری با نام‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، باسیلوس سوبتیلیس (باکتری‌های گرم-مثبت) و باکتری‌های سودمناس آئرژینوزا، اشیریشیا کلای (باکتری‌های گرم-منفی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان دادند که گیاه آویشن بر روی ۴ باکتری اثر بازدارندگی داشته (دارای فعالیت ضدباکتری) و از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت در آزمایشات مربوطه استفاده شده است. گیاه آویشن بیشترین و کمترین قطر هاله‌ی عدم رشد را به ترتیب بر باکتری باسیلوس سوبتیلیس با مقدار میانگین $2/87 \pm 28/13$ و باکتری سودمناس آئرژینوزا با مقدار میانگین $6/26 \pm 8/6$ اعمال نمود. در عین حال، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، روغن اسانسی گیاه آویشن اثر ضدباکتریایی کمتری از خود نشان داد. در نهایت، نتایج حاصله نشان داد که گیاه آویشن در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، اثر ضدباکتریایی کمتری را از خود نشان داده است.

بنابراین از مهمترین دلایل مشاهده‌ی اثرات ضدباکتریایی در اسانس یا عصاره‌ی گیاهان می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

الف- ماده‌ی مؤثره دارای اثرات ضدباکتریایی در اسانس و عصاره‌ی گیاهان می‌باشند، به علت پایین بودن غلظت اسانس و عصاره در برخی گیاهان اثرات ضدباکتریایی در آنها مشاهده نمی‌شود.

ب- عامل دیگری که می‌تواند اثرات ضدباکتریایی عصاره یا اسانس یک گیاه را تحت تأثیر قرار دهد، محیط کشت مورد استفاده می‌باشد. تفاوت در اثرات ضدباکتریایی یک ماده در محیط کشت‌های گوناگون به اثبات رسیده است. در مجموع با توجه به اثر ضد میکروبی عصاره‌ی گیاه آویشن مورد مطالعه، می‌توان از این گیاه (با منشأ طبیعی) به عنوان منبع مناسبی با اثرهای میکروب‌کشی شاخص استفاده کرد.

۵. مراجع

- [1] V. Mozaffarian, *A Dictionary of Iranian Plant Names*, Farhang Moaser Press, Iran, (1996).
- [2] K.H. Rechinger, *Flora Iranica*, Akademische Druck- u. Verlagsanstalt, Wien, Austria, (1963).
- [3] A. Zargari, *Medicinal Plants*, University of Tehran Press, Tehran (In Persian), (1989).
- [4] Great Britain Scottish Home and Health Department and Great Britain Department of Health and Social Services Northern Ireland *British Pharmacopoeia* British Pharmacopoeia Commission, HMSO, London, (1998).
- [5] R.P. Adams *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publishing Co., Carol Stream, IL., USA, (2007).
- [6] M. Shahnama, S. Azami and M. Mohammadhosseini, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4 (2015) 275.
- [7] H. Hashemi-Moghaddam, M. Mohammadhosseini and M. Basiri, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 18 (2015) 884.
- [8] M. Mohammadhosseini, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 18 (2015) 464.
- [9] M. Mohammadhosseini, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 18 (2015) 1360.
- [10] M. Mohammadhosseini, B. Mahdavi and M. Shahnama, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 18 (2015) 1321.
- [11] M. Nekoei and M. Mohammadhosseini, *Anal. Chem. Lett.*, 4 (2014) 93.
- [12] H. Hashemi-Moghaddam, M. Mohammadhosseini and M. Salar, *Anal. Methods*, 6 (2014) 2572.

- [13] M. Mohammadhosseini, *J. Chem. Health Risks*, 4 (2014) 75.
- [14] S.S. Erdogan, U. Karik and K.H.C. Baser, *Planta Med.*, 77 (2011) 1319.
- [15] S. Gharibi, B.E.S. Tabatabaei, G. Saeidi, S.A.H. Goli and M. Talebi, *Ind. Crop Prod.*, 50 (2013) 154.
- [16] L.A. Conde-Hernandez and J.A. Guerrero-Beltran, *Food Chem.*, 142 (2014) 455.
- [17] A. Alizadeh, O. Alizadeh, G. Amari and M. Zare, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 16 (2013) 59.
- [18] A. Delazar, M. Naseri, L. Nahar, S.B. Moghadam, S. Esnaashari, H. Nazemiyeh and S.D. Sarker, *Chem. Nat. Comp.*, 43 (2007) 112.
- [19] H. Babael, O. Sadeghpour, L. Nahar, A. Delazar, H. Nazemiyeh, M.R. Mansouri, N. Poursaeid, S. Asnaashari, S.B. Moghadam and S.D. Sarker, *Turk. J. Biol.*, 32 (2008) 203.
- [20] A.I. Hussain, F. Anwar, S. Rasheed, P.S. Nigam, O. Jannah and S.D. Sarker, *Rev. bras. farmacogn.*, 21 (2011) 94.
- [21] I.E. Orhan, F.S. Senol, T. Ercetin, A. Kahramand, F. Celep, G. Akaydin, B. Sener and M. Dogan, *Ind. Crop Prod.*, 41 (2012) 21.
- [22] Q.M. Ru, L.J. Wang, W.M. Li, J.L. Wang and Y.T. Ding, *Molecules*, 17 (2012) 11281.
- [23] I.E. Orhan, F.S. Senol, T. Ercetin, A. Kahraman, F. Celep, G. Akaydin, B. Sener and M. Dogan, *Ind. Crop Prod.*, 41 (2013) 21.
- [24] T. Wu, X. Zang, M. He, S. Pan and X. Xu, *J. Agric. Food. Chem.*, 61 (2013) 8185.
- [25] T. Moon, H.M. Cavanagh and J.M. Wilkinson, *J. Essent. Oil Res.*, 18 (2006) 578.
- [26] J.R. Hood, J.M. Wilkinson and H.M.A. Cavanagh, *J. Essent. Oil Res.*, 15 (2003) 428.
- [27] A.K. Indrayan, P.K. Tyagi and N.K. Agrawal, *J. Essent. Oil Res.*, 22 (2010) 179.
- [28] G. Singh, S. Kim, P. Marimuthu, V. Isidorov and V. Vinogorova, *J. Sci. Food Agric.*, 88 (2008) 280.
- [29] R. Karami-Osboo, M. Khodaverdi and F. Ali-Akbari, *J. Agric. Sci. Technol.*, 12 (2010) 35.
- [30] M.A.A. Al Maqtari, S.M. Alghalibi and E.H. Alhamzy, *Turk. J. Biochem.*, 36 (2011) 342.
- [31] A. Zambonelli, A.Z. D'Aulerio, A. Severi, S. Benvenuti, L. Maggi and A. Bianchi, *J. Essent. Oil Res.*, 16 (2004) 69.
- [32] J. Torras, M.D. Grau, J.F. Lopez and F.X.C. de Las Heras, *J. Sci. Food Agric.*, 87 (2007) 2327.
- [33] M.J. Jordan, R.M. Martinez, K.L. Goodner, E.A. Baldwin and J.A. Sotomayor, *Ind. Crop Prod.*, 24 (2006) 253.