بررسی ترکیبات شیمیایی، خصوصیات ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس درمنه Artemisia Khorasanica در منطقه خراسان شمالی

مریم سردرودیان[1*]، اکرم آریان فر[1]

۱-باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۰۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۴

چکیده

به دلیل عوارض ناخواسته آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌میکروب‌های مصنوعی، این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی و برخی خواص آنتی-باکتریایی اسانس اندام هوایی گیاه درمنه با نام علمی Artemisia Khorasanica را مورد بررسی قرار می‌دهد.. در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با آزمون‌های مهار رادیکال آزاد به کمک روش (DPPH)، و آزمون گیرندگی آهن (FRAP) بررسی و با آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) مقایسه شد. اندازه‌گیری محتوای فنل کل اسانس با استفاده از معرف فولین سیو-کالچیو و اندازه‌گیری محتوای فلاوونوئید کل اسانس بر اساس روش کلریمتری آلومینیوم کلراید انجام شد. در این پژوهش، اثر ضدمیکروبی اسانس گونه مورد نظر بر علیه ۴ باکتری با استفاده از روش چاهک، دیسک دیفیوژن و براث میکرودیلوشن انجام شد. نتایج نشان داد که اسانس درمنه ۲۶ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۷/۳۵ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند که از بین آنها ۴ ترکیب بیش از ۷۰/۵۱ درصد اسانس را تشکیل می‌داد که به ترتیب سیس-وربونل (۲۶/۷۴ درصد)، ۱و۸-سینئول (۲۰/۰۵ درصد)، کامفور (۱۵/۰۶ درصد) و کریسانتینل استات (۸/۵۶ درصد) است. میزان کل ترکیبات فنلی معادل ۱۰۶/۲۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم اسانس و همچنین میزان فلاوونوئید موجود در اسانس ۱/۵۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم اسانس بود. در آزمون DPPH، میزان IC_{50} برای اسانس و BHT به ترتیب برابر با: ۴/۹ و ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. همچنین توانایی احیاکنندگی اسانس و BHT، به ترتیب برابر با: ۳۶/۷۷ و ۳۲/۲۸ میکرومول بر لیتر گزارش گردید. نتایج آزمایشات ضدباکتریایی نشان داد که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد اسانس درمنه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۷۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشنده‌ی آن‌ها ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. اسانس درمنه منبع قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی است و احتمالاً می‌توان از آن در فرآورده‌های غذایی، دارویی و صنعتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسانس، درمنه، سیس-وربونل، کامفور، ۱و ۸ سینئول

*مسوول مکاتبات: sardarodiyan_5@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱-مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژیکی حاکی از آن است که ترکیبات طبیعی و آنتی‌اکسیدان در میوه‌ها و سبزیجات در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها موثر است. بنابراین روند رو به رشد اهمیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاهان داروئی در جلوگیری یا کاهش آسیب-های اکسیداتیو ناشی از عملکرد رادیکال‌های آزاد و عوارض جانبی داروهای شیمیایی در بدن موثر است هستند. استرس‌های اکسیداتیو با بروز بسیاری از بیماری-های مزمن نظیر سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، ایدز، آرتریت، سندرم داون و ناهماهنگی‌های حرکتی مرتبط می‌باشند (۲۶). از مهمترین منابع آنتی‌اکسیدانی موجود در رژیم غذائی طبیعی، می‌توان به توکوفرول‌ها، گلوتاتیون‌ها، اسید آسکوربیک، نمک‌های آسکوربات، کاروتنوئیدهای و ترکیبات فنلی اشاره کرد. از بین ترکیبات آنتی‌اکسیدان گیاهی، ترکیبات فنلی توزیع گسترده‌ای در بسیاری گیاهان دارند. ویژگی‌های آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیایی آنهاست که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش کردن مولکول-های اکسیژن یگانه و سه گانه می‌سازد. ترکیبات فنلی از طریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند (۵۲). اسانس‌ها ترکیب‌های معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان مانند دانه، ریشه، جوانه، پوست، شاخه، غنچه و گل تهیه می‌شوند (۱۴). اسانس‌ها مخلوط پیچیده‌ای از ترکیب‌های با غلظت‌های متفاوت باشند (۴۷). معمولاً اسانس‌ها برای درمان مشکلات سلامتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۰). اسانس بسیاری از گیاهان باعث مهار رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود و بدین لحاظ گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضدمیکروبی، کاربردهای زیادی دارند. مواد تشکیل دهنده اسانس از نظر شیمیایی شامل فنیل پروپانوئید و سزکوئی‌ترپن‌ها هستند. بیشتر این ترکیبات در ساختار خود دارای گروه‌های فنولیک می‌باشند؛ زیرا این ترکیبات و به واسطه خاصیت ضداکسایشی و ضدمیکروبی ذاتی، نقش مهمی در سیستم‌های دفاعی گیاهان در برابر بیماری‌های میکروبی ایفا می‌کنند (۲۰). متابولیت‌های ثانویه بافت‌های گیاهی که به صورت پیش‌سازهای غیرفعال ذخیره شده‌اند شامل ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدها، فلاونول‌ها، گلیکوزیدها، پلی‌استیلن‌ها و آلکالوئیدها بوده که به علت خاصیت مهارکنندگی و کشندگی مورد توجه قرار گرفته‌اند. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب باعث مقاومت باکتری‌ها به این داروها و ایجاد عوارض جانبی در بدن انسان می‌شوند. به همین منظور استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند موثر باشد (۸). استفاده از گیاهان دارویی بومی که علاوه بر سازگاری اکولوژی قادرند با سنتز مواد موثره ثانوی و فعال در بحث پیشگیری و درمان بیماری‌ها موثر واقع شوند، در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در علم پزشکی یافته است (۴۱). گیاه درمنه (Artemisia) از خانواده Asteraceae compositae دارای ۳۴ گونه در ایران می‌باشد (۲۵). درمنه گیاهی علفی است که در ایران در مناطق مختلفی می‌روید. درمنه‌ها از دوران گذشته در طب سنتی دارای اهمیت و مصارف گوناگون بوده و از آنها با نام‌های درمنه، افسنطین، یوشان، برنجاسف، قیصوم و ترخون نام برده شده است و این نام‌ها امروزه نیز در اکثر مناطق متداول است (۴). بیشتر گونه‌های درمنه بو و مزه مشخصی داشته که ناشی از ترکیبات مونوترپن و سزکویی‌ترپن‌های موجود در آن‌ها است. از این ترکیبات می‌توان به آرتمیزینین، کومارین، کامفور، بورنیل استات و ۱و ۸- سینئول اشاره نمود (۵۴). سینئول بعد از آلفاپینن فراوان‌ترین جزء تشکیل دهنده درمنه در ترکیبات اسانس‌ها بوده و به طور گسترده در تهیه مواد داروئی کاربرد دارد (۲۴). درمنه در طب قدیم کاربرد دارویی داشته و به عنوان مقوی، اشتها آور، محرک، ضدعفونی کننده، گشادکننده رگ‌ها و درمان دردهای

Archive of SID

www.SID.ir

روماتیسمی به کار می‌روند (۲۲). گونه‌های درمنه از گذشته به عنوان منبع روغن‌های اسانسی شناخته شده‌اند و دارای فعالیت ضدمیکروبی طبیعی بر روی تعداد زیادی از باکتری‌ها هستند. مکانیسم عملکردی اسانس‌ها در ارتباط با ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی آنها بوده، ولی در تمامی موارد از مکانیسم مشابه‌ای برخوردار نیستند. ویژگی آب گریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آنها در لیپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری آن می‌گردد، که این امر سبب اختلال در کلیه فعالیتهای حیاتی وابسته به غشای سلولی، خروج یون‌ها، ترکیب-های حیاتی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد (۵۹). درمنه دارای ماده‌ای به نام سانتونین است که تا مدت‌ها معروف‌ترین داروی ضد کرم دستگاه گوارش محسوب می‌شده است (۶۹). برای انواع درمنه علاوه بر فعالیت ضد کرمی، فعالیت بیولوژیک فراوانی از جمله میکروب‌کشی، ضد قارچی، ویروس‌کشی، ضد انگلی و همچنین خواص آنتی اکسیدانی و بازکنندگی و اتساع عروق به اثبات رسیده است (۲۷). گونه‌های مختلف درمنه در طب سنتی اروپا جهت رفع سودا و جلوگیری از خونریزی بکار می‌رفته‌اند (۶۹). در مطالعه‌ای بر روی گونه .Artemisia annua L نقش مواد موثره موجود در عصاره سرشاخه‌های هوایی این گیاه (آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها، تانن‌ها و فنل‌ها) در تنظیم رشد گیاهان، مقابله با تومور و بیماری‌های باکتریایی در انسان و گیاه به اثبات رسیده است (۳۰). در طی تحقیقاتی که روی ۲۴۰ گونه از تیره Asteraceae جهت تعیین خواص دارویی آنها انجام شده، حدود ۸۴ ترکیب دارویی در گونه‌های Artemisia تشخیص داده شده است (۷۴). تعداد زیادی از گونه‌های Artemisia در کشور چین به عنوان دارو، غذا (گیاهان وحشی خوراکی)، علوفه، گیاهان معطر، گیاهان شهددار و گیاهان تولید کننده اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۱). در مطالعات گذشته خواص ضدباکتریایی بعضی از گونه‌های درمنه مانند A.diffusa، A.oliveriana، A.turanica بر علیه تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده در حالیکه خواص ضدباکتریایی بعضی گونه‌های دیگر درمنه از جمله A.scoparia، A.capillaries و A.lavandulifolia ثابت شده است (۱۷و۵۸). خان احمدی و همکاران (۲۰۰۹) ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس حاصل از A.housskenechtii را ارزیابی نمودند که کامفور از مهمترین ترکیبات شیمیایی شده در این گیاه می‌باشد (۳۷). شناسایی ترکیبات شیمیایی و خواص ضدباکتریایی اسانس دیگر گونه‌های درمنه نیز توسط محققین صورت گرفته است (۵۱ و ۵۵). هدف از این پژوهش، معرفی گیاه درمنه Artemisia Khorasanicaبعنوان گیاه دارویی که در استان خراسان شمالی پراکنش دارد، بررسی میزان اسانس و شناسایی مواد تشکیل دهنده اسانس گونه مذکور می-باشد. همچنین بررسی اثرات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی احتمالی گیاه مورد مطالعه، که می‌تواند به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان‌ها و آنتی بیوتیک‌های سنتتیک معرفی شود، می‌باشد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری، شناسایی، نگهداری و آسیاب نمونه‌های گیاهی

بعد از جمع آوری گیاه Artemisia Khorasanica از رویشگاه اصلی و تایید هویت در هرباریوم مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های طبیعی، بلافاصله پس از جمع آوری، اندام‌های هوایی گیاه جدا، قطعه قطعه شد و بر روی پارچه‌ی توری در دمای اتاق و به دور از تابش مستقیم نور خورشید، خشک و آسیاب گردید.

۲-۲- اسانس‌گیری اندام هوایی گیاه با کلونجر

۳۰ گرم از پودرگیاه خشک شده، اندام هوایی، در دستگاه کلونجر قرار داده شد و پس از گذشت ۳ ساعت اسانس آن جدا گردید. توسط نرمال- هگزان اسانس را از آب جدا کرده و جهت آبگیری از سولفات سدیم

Archive of SID

www.SID.ir

انیدر استفاده شد. اسانس آبگیری شده در ظرف تیره در بسته جمع آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳).

۲-۳- دستگاه شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شد، مشخصات دستگاه مورد استفاده به این شرح است: کروماتوگرافی گازی مدل Shimadzu-QP2010SE مجهز به ستون Rtx-5MS (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) که برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این مدت ۵ دقیقه و دمای دستگاه ۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه افزایش یافت تا رسیدن به دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و باقی ماندن در این دما به مدت ۱۰ دقیقه. از گاز هلیم به عنوان گاز حامل و با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه و طیف سنج جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. شناسایی طیف‌های حاصل با رسم کروماتوگرام یک سری از پارافین‌های نرمال (C_5-C_{30}) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها انجام شد و با توجه به زمان بازداری این ترکیب‌ها اندیس کوارتز برای هر جزء موجود در کروماتوگرام اسانس محاسبه شد. این مقادیر با مقادیر اندیس کوارتز موجود در جداول استاندارد مقایسه شد و ترکیب‌های موجود دراسانس درمنه بر اساس این داده‌ها و اطلاعات موجود در کتابخانه GC-MS شناسایی شد.

۲-۳- اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل

مقدار کل ترکیبات فنولی در اسانس‌ها بر اساس روش فولین سیوکالچیو مورد بررسی قرار گرفت (۴۶). مقدار کل ترکیبات فنولیک از معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک با غلظت‌های (۰، ۳۰، ۷۰، ۱۱۰، ۱۵۰، ۱۹۰ و۲۲۰ میلی‌گرم در لیتر در متانول ۸۰ درصد) به صورت میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گیاه خشک شده بیان گردید. آزمون فولین، با سه تکرار انجام شد (۲۸).

۲-۴- تعیین میزان فلاوونوئید

محتوای فلاوونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد (۱۸). طبق این روش ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد با ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر از آب مقطر مخلوط گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروسکوپی خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین ۱۰۰ -۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در متانول جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاوونوئید به صورت اکی والان‌های کوئرستین بر گرم اسانس بیان شد.

۲-۵- میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH[1]

برای انجام این تست، ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس گیاه Artemisia Khorasanica به ۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد DPPH در متانول اضافه خواهد شد. بعد از ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای اتاق جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر بر علیه بلانک قرائت شد. درصد بازدارندگی رادیکال های آزاد از طریق زیر محاسبه می گردد (۶۵).

$$\%AI = \frac{\left(A_{control} - A_{sample}\right)}{A_{control}} \times 100 \quad (1)$$

در این معادله:

AI٪: درصد مهار رادیکال آزاد

$A_{Control}$: جذب محلول شاهد در ۵۱۷ نانومتر

A_{Sample} : جذب محلول نمونه در ۵۱۷ نانومتر

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۶- قدرت احیاءکنندگی آهن اسانس

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر اساس توانایی احیاکنندگی آهن[1](FRAP) انجام شد (۱۱). به منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، به ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس به دست آمده، ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه شد. سپس جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر همراه با ۳ میلی‌لیتر معرفFRAP)، اندازه‌گیری گردید. با قراردادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله مربوط به منحنی استاندارد کاتیون آهن دو ظرفیتی، توانایی احیاکنندگی اسانس محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌مول یون آهن دو ظرفیتی تولید شده بر گرم وزن گیاه بیان گردید.

۲-۷- بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس

برای بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه Artemisia Khorasanicaبه سه روش چاهک، دیسک و میکرو براث دیلوشن در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس[2] (PTCC۱۴۳۱)، لیستریا مونوسیتوژنز[3] (PTCC۱۲۹۸)، اشرشیاکلی[4] (PTCC۱۳۹۹) و سالمونلاتیفی موریوم[5](PTCC۱۷۰۹) بررسی شد.

۲-۷-۱- تهیه محلول کنترل مثبت جنتامایسین

ابتدا g ۰/۰۰۵ از پودر جنتامایسین در مقداری آب استریل حل گردید و به حجم ml ۱۰۰ رسانده شد. بدین ترتیب محلول ذخیره‌ای با غلظت µg/ml ۵۰ از جنتامایسین بدست آمد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول مورد نظر با آب مقطر استریل به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب غلظت µg/ml ۱۰ این محلول برای استفاده در تست‌های ضد باکتری تهیه گردید (۷۶).

۲-۷-۲- تهیه حلال کنترل منفی DMSO

DMSO از شرکت مرک آلمان تهیه شد. مولاریته حلال کامل gr/ml ۷۸/۱۳ بود و به صورت خالص استفاده شد.

۲-۷-۳- تهیه محیط‌های کشت میکروبی

در این تحقیق از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. برای تهیه محیط کشت مذکور ابتدا ۲۱ گرم از پودر آماده در یک لیتر آب مقطر حل و همراه به هم زدن به مدت ۱ دقیقه جوشانده شد تا بصورت محلول شفاف شود. تمام محیط‌های کشت بعد از حل کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار Ib/inch ۱۵ اتوکلاو و استریل گردید (۹).

۲-۷-۴- تهیه محلول نیم مک فارلند

استاندارد نیم مک فارلند با فرمول زیر:

0.5 ml BaCl2 0.048M (1.175 w/v $BaCl_2.H_2O$) +99.5 ml H_2SO_4 0.36N

کدورتی ایجاد می‌کند که ناشی از تعداد 10^8 کلونی میکروارگانیسم در یک میلی‌لیتر تلقیح است. برای تهیه این محلول، همانطور که در فرمول مشخص است، نیم میلی‌لیتر از باریم کلرید (با مشخصات ذکر شده در فرمول) با ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک N ۰/۳۶ مخلوط شد، برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، کدورت آن با کدورت این سوسپانسیون استاندارد مقایسه شد (۱۳).

۲-۷-۵- تهیه کشت میکروبی

برای تهیه کشت میکروبی، آمپول‌های لیوفیلیزه حاوی میکروارگانیسم‌های مورد نظر را شکسته و با پیپت پاستور استریل، ۰/۵ میلی‌لیتر از نرمال سالین استریل روی محتویات داخل آمپول ریخته شد. بدین ترتیب سوسپانسیون میکروبی حاصل گردید. سوسپانسیون میکروبی توسط لوپ استریل مخلوط گشته و مقداری از آن برای تهیه کشت مادر روی محیط مولر هینتون آگار

[2] Ferric reducing – antioxidant power
[2] Staphylococcus aureus
[3] Monocytogenes Listeria
[4] Escherichia coli
[5] Salmonella typhimurium

Archive of SID

www.SID.ir

کشت شد. سپس محیط کشت حاصل به مدت ۲۴ ساعت برای رشد باکتری و ۴۸ ساعت برای رشد قارچ به ترتیب در گرمخانه ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از این مدت از محیط کشت مادر کشت دیگری روی آگار تهیه شد، کشت مادر در یخچال نگهداری گردید و هر دو ماه یکبار تکرار شد (۵).

۲-۷-۶- روش چاهک

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس به روش چاهک پلیت انجام شد. در این روش هم از پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که آغشته به میکروارگانیسم بودند، استفاده شد. توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک حفره در محیط کشت ایجاد کرده و داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ لاندا از اسانس به طور جداگانه قرار داده شد سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. عملیات مذکور در مورد هر نمونه دو بار تکرار گردید، پس از آن میزان مناطق مهاری مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی‌متر محاسبه گردید (۶۰).

۲-۷-۷-روش دیسک کاغذی[1]

از روش انتشار دیسک کربی بائر Kirby Bauer استفاده شد. از کلنی ۲۴ ساعته هر کدام از باکتری‌های کشت شده مورد آزمایش در محیط کشت مولر هینتون آگار به کمک لوپ برداشته و در لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل کاملاً مخلوط گردید؛ سپس سوسپانسیون یکنواختی از باکتری‌های مورد آزمایش مشابه کدورت لوله استاندارد ۰/۵مک فارلند تهیه شد. توسط سواپ بر روی محیط‌های مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. جهت تهیه دیسک‌های حاوی اسانس ۵۰ میکرولیتر از اسانس بر روی دیسک-های بلانک استریل اضافه و به مدت یک ساعت زمان داده شد تا اسانس کاملاً جذب دیسک‌های کاغذی شوند. سپس دیسک‌ها روی پلیت به فواصل مناسب قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. دراین مطالعه از جنتامیسین (میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکساید DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد و آزمون‌ها به صورت سه بار تکرار انجام گردید. با اندازه‌گیری قطره هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظر به اسانس تعیین شد (۱۹).

۲-۷-۸-تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC[2]) به روش میکروبراث دایلوشن[3] و حداقل غلظت کشندگی(MBC)[4]

ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از اسانس مورد آزمایش را در دو سی‌سی (۰/۵ سی‌سی دی متیل سولفوکساید **DMSO** و ۱/۵ سی سی محیط مولر هینتون براث) حل نموده که رقت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس بدست می-آید. سپس در لوله هرکدام حاوی یک سی‌سی محیط مولر هینتون براث رقت سازی لوله‌ای را انجام نموده که به ترتیب غلظت هر شیشه نصف غلظت شیشه قبلی گردید (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵). در این روش مقدار۲۰۰ مایکرولیتر از غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲، ۰/۷۸۱، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵) میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس (تهیه شده در محیط کشت مولر هینتون براث) به خانه های یک پلیت ۹۶ خانه منتقل خواهد شد. سپس سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند تهیه شده را ده مرتبه رقیق ساخته تا از کدورت معادل 10^7 باکتری بدست آمده در هر میلی‌لیتر به میزان ۲۰ مایکرولیتر به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید. به عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از خانه‌های پلیت ۱۵۰

[1] Paper Disc Diffusion Assay

[2] Minimum Inhibitory Concentration
[3] Microbroth Dilution
[4] Minimum Bactricidal Concentration

Archive of SID

www.SID.ir

مایکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۵۰ مایکرولیتر آنتی-بیوتیک جنتامایسین اضافه شد. از خانه‌های حاوی ۲۰۰ مایکرولیتر از محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده خواهد شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه **C°** ۳۷ قرار داده خواهد شد. پس از این مدت به تمام خانه‌های هر پلیت۵۰ ماکرولیتر از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید **TTC** اضافه خواهد شد و مجدداً به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از خروج از گرمخانه، در هر ردیف مربوط به غلظت‌های مختلف یک اسانس، اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز تشکیل نشده باشد، به عنوان **MIC** در نظر گرفته خواهد شد. برای به دست آوردن مقادیر حداقل غلظت کشندگی **(MBC)** از کلیه خانه‌هایی که رنگ قرمز در آن‌ها تشکیل نشده باشد، ۱۰ ماکرولیتر یا یک لوپ به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل خواهد شد. اولین غلظتی از هر اسانس که در پلیت مربوط به آن رشد مشاهده نشود به عنوان **MBC** در نظر گرفته شد (۲۱).

۲-۸- تجزیه و تحلیل داده‌ها

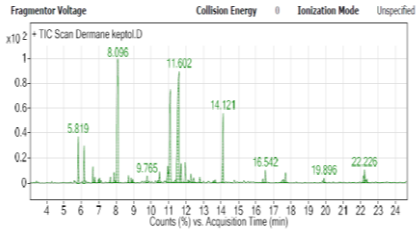
آزمون‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی و به روش آزمون فاکتوریل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P< ۰/۰۵$) استفاده شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی و خالص سازی اسانس Artemisia Khorasanica

تفکیک و شناسایی ترکیبات اسانس توسط روش‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی انجام شد (شکل ۱). شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از شاخص-های بازداری و بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آن‌ها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های کامپیوتری و مراجع معتبر صورت گرفت (جدول ۱). بازده متوسط تولید اسانس گیاه Artemisia Khorasanica در سه بار تکرار تقریباً ۰/۰۱± ۲/۲ درصد بود. اسانس رنگ زرد کهربایی و بویی کاملاً مشخص داشت. و بر اساس تحقیقات قبلی بازده اسانس گیری از گونه های دیگر A.diffusa ۵/۳۳ درصد، A.spicigera ۰/۴۶ درصد، A.absinthinum ۰/۹۲ درصد، A.vulgaris ۰/۹۲ درصد است (۱). نتایج این پژوهش نشان داد که این گونه ۲۶ ترکیب در اسانس خود دارد که در مجموع ۹۷/۳۵ درصد کل اسانس را تشکیل می‌دهند چهار ترکیب عمده در اسانس گیاه عبارتند از سیس-وربونل (۲۶/۷۴ درصد)، ۱و۸-سینئول (۲۰/۰۵ درصد)، کامفور (۱۵/۰۶ درصد) و کریسانتینل استات (۸/۵۶ درصد) است. همچنین منوترپن هیدروکربنه (۱۱/۳۲ درصد)، مونوترپن اکسیژنه (۷۳/۷۳ درصد)، سزکویی‌ترپن اکسیژنه (۲/۰۲ درصد) و ترکیبات غیرترپنی (۱۰/۲۸ درصد) دارا می‌باشد.

شکل۱- نمودار کروماتوگراف حاصل از GC-MSS گیاه Artemisia Khorasanica



Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- درصد وزنی و اندیس کوارتز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه Artemisia Khorasanica

ردیف	ترکیب شناسایی شده	درصد در اسانس	اندیس بازداری کوارتز
۱	Alpha-Pinene	۳/۶۸	۹۴۰
۲	Camphene	۳	۹۶۲
۳	Sabinene	۱/۸۶	۹۷۵
۴	Phellandrene	۱/۳۲	۹۸۴
۵	Myrcene	۰/۲۹	۹۹۱
۶	alpha-Terpinene	۰/۵۳	۱۰۱۷
۷	1,8-cineole	۲۰/۰۵	۱۰۳۰
۸	Cis-beta-terpineol	۰/۳۵	۱۰۵۶
۹	.gamma-Terpinene	۰/۶۴	۱۰۹۱
۱۰	Trans-sabinene hydrate	۰/۸۹	۱۰۹۷
۱۱	chrysanthenone	۱/۲۲	۱۱۲۵
۱۲	Trans-pinocarveol	۲/۲۴	۱۱۳۸
۱۳	camphor	۱۵/۰۶	۱۱۴۴
۱۴	Terpinen-4-ol	۱/۹۲	۱۱۷۶
۱۵	Alpha-terpineol	۰/۹۸	۱۱۹۰
۱۶	myrtenol	۰/۵۷	۱۱۹۵
۱۷	verbenone	۰/۵۶	۱۲۰۷
۱۸	borneol	۲/۱۲	۱۲۳۵
۱۹	Cis-verbenol	۲۶/۷۴	۱۲۳۸
۲۰	Chrysanthenyl acetate	۸/۵۶	۱۲۹۴
۲۱	carvone	۰/۳۲	۱۳۲۸
۲۲	Terpinyl acetate	۰/۳۷	۱۳۳۰
۲۳	Alpha-naginatene	۰/۷۱	۱۳۷۵
۲۴	(E)-Jasmone	۱/۳۵	۱۳۹۵
۲۵	spathulenol	۰/۷۵	۱۵۷۸
۲۶	davanone	۱/۲۷	۱۶۴۸
	درصد کل ترکیبات	۹۷/۳۵	
	مونوترپن هیدروکربنه	۱۱/۳۲	
	مونوترپن اکسیژنه	۷۳/۷۳	
	سزکویی‌ترپن هیدروکربنه	-	
	سزکویی‌ترپن اکسیژنه	۲/۰۲	
	غیر ترپنی	۱۰/۲۸	

Archive of SID

www.SID.ir

هادیان و همکاران (۲۰۰۷)، نشان دادند اسانس Artemisia khorasanica در مرحله گلدهی به طور عمده سزکویی-ترپن اکسیژنه وجود دارد. در این گونه داونون (۳۶/۴ درصد)، پاراسیمین (۱۶/۴ درصد)، سیترال (۸ درصد)، بتا آسکاریدول (۵/۹ درصد) و تیمول (۳/۷ درصد) به عنوان اجزاء اصلی شناسایی شدند (۲۹). کاظمی و همکاران (۲۰۱۱a)، گزارش دادند کامفور (۱۸ درصد)، به عنوان اصلی‌ترین ترکیب در اسانس گل Artemisia deserti شناخته شده است. ۱و ۸-سینئول (۱۰/۴ درصد) و ترانس توجن (۱۱/۸ درصد) نیز به عنوان سایر اجزای اصلی در اسانس این گل معرفی شدند (۳۳). نعمت‌الهی و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش کردند اسانس افسنطین Artemisia absinthiumاز اسکاتلند درصد مونوترپن‌های اکسیژنه ۲۵ درصد، مونوترپن‌های هیدروکربنه ۶۵ درصد، سزکویی‌ترپن هیدروکربنه ۴ درصد، سزکویی‌ترپن اکسیژنه ۶ درصد بودند (۴۸). در تحقیقی دیگر از اسانس A.sieberi بیش از ۱۶۰ ترکیب شناخته شد که ۱۵ درصد مونوترپن هیدروکربنه، ۷۸ درصد مونوترپن اکسیژن‌دار، ۴ درصد سزکویی‌ترپن اکسیژن دار و ۱ درصد سزکویی ترپن هیدروکربنی بوده است (۴۹). روستائیان و همکاران (۲۰۰۰)، با بررسی مقایسه اسانس گیاه آرتمیزیا دزرتی و آرتمیزیا اولیوریانا در ایران با استفاده از آنالیز ترکیبات شیمیایی با روش GC-MS نشان دادند اسانس گیاه آرتمیزیا دزرتی (جمع‌آوری شده از مناطق شمال ایران مازندران و فیزوزکوه) دارای کامفور (۴۵/۵ درصد)، ۱و۸-سینئول (۱۶/۷ درصد)، پی‌پریتون (۸/۶ درصد)، بتاپین (۵/۷ درصد) و ایزوبورنئول (۳/۲ درصد) بوده است و اسانس گیاه آرتمیزیا اولیوریانا (جمع‌آوری شده از مناطق اطراف اصفهان (دلیجان)) دارای آلفا-توجن (۶۵ درصد)، کامفور (۱۱/۵ درصد)، ۱و۸-سینئول (۹/۲ درصد) و پینوکاون (۸/۸ درصد) می‌باشد که دارای اثرات ضدباکتریایی است (۵۸). جلیلی و ربیعی (۱۳۸۲)، بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس ۴ گونه درمنه (شمال ایران) به نام‌های A. absinthium L.، A. scoparia Waldst. & Kit، A. spicigera C. Koch.، A.annua L. مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد، بالاترین مقدار اسانس از گونه A.absinthium (۹۲ درصد) پائین‌ترین میزان از گونه A.spicigera (۴۶ درصد) به دست آمد. در گونه A.annua، آرتمیزیا کتون (Artemisia ketone) (۱۴/۳ درصد)، در گونه A.scoparia کاپیلن (Capillene) (۴۸/۵ درصد) در گونه A.spicigera، کامفور (Camphor) (۴۰ درصد) و در گونه A.absinthium، آلفا-فلاندرن (α-phellandrene) (۲۵/۵ درصد) بالاترین مقادیر را دارا می‌باشند (۲). مطالعه-ای که در ایران توسط وردیان و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد، نشان داد که ۳۲ جزء در اسانس گونه A. annua وجود دارد و کامفور (۴۸ درصد)، ۱و۸-سینئول (۹/۳۱ درصد)، کامفن (۶/۹۸ درصد) و اسپاتولنول (۴/۸۹ درصد) به عنوان اجزاء اصلی شناسایی شد (۷۱)

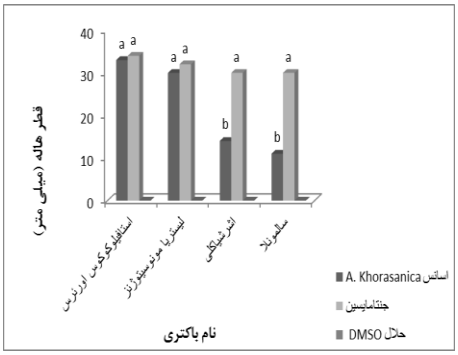
۳-۲- تعیین خاصیت ضد میکروبی اسانس درمنه

۳-۲-۱- روش چاهک

با توجه به شکل ۲ نتایج بدست آمده از محاسبه قطر هاله بر حسب میلی‌متر در روش چاهک نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در چهار باکتری مورد آزمایش مشاهده گردید ($P< ۰/۰۵$). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز نسبت به سایر باکتری‌ها در برابر اسانس مورد مطالعه، اثر ضد باکتریایی و هاله عدم رشد بیشتری را نشان داد که به دلیل مقاومت زیاد دیواره باکتری‌های گرم منفی در برابر نفوذ مواد خارجی نسبت به دیواره باکتری‌های گرم مثبت و تاثیر کمتر اسانس بر روی آنها دانست. همچنین قطر هاله‌های بدست آمده باکتری گرم مثبت در مقایسه با قطر هاله نمونه کنترل مثبت جنتامایسین تفاوت معنی داری وجود ندارد($P> ۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

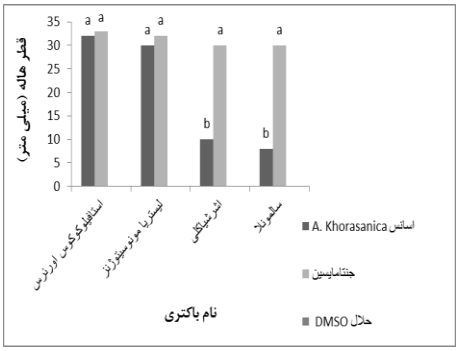


شکل ۲- اثر متقابل نوع باکتری و اسانس A. Khorasanica در ایجاد هاله مهار رشد به روش چاهک

(حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.)

۳-۲-۲- روش دیسک دیفیوژن

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مختلف با هم تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). به عبارت دیگر، نوع باکتری بر قطر هاله عدم رشد موثر بود. همچنین قطر هاله‌های بدست آمده باکتری گرم مثبت در مقایسه با قطر هاله نمونه کنترل مثبت جنتامایسین تفاوت معنی داری وجود ندارد (P> ۰/۰۵).

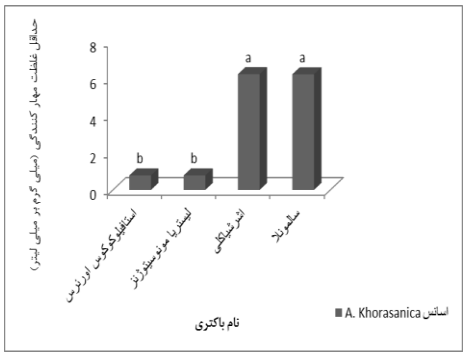


شکل ۳- اثر متقابل نوع باکتری و اسانس A. Khorasanica در ایجاد هاله مهار رشد به روش دیسک

(حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.)

۳-۲-۳- حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC)

در شکل ۴، مقایسه نتایج اثر مهارکنندگی (MIC) باکتری-های مورد مطالعه نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (P< ۰/۰۵). اسانس درمنه در غلظت ۰/۷۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (MIC) تنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) تاثیر داشته و غلظت ۶/۲۵ بر روی باکتری‌های گرم منفی (اشریشیاکلی و سالمونلاتیفی موریوم) اثر داشته که می‌توان این اختلاف را به مقاومت دیواره باکتری‌های گرم منفی نسبت به نفوذ مواد خارجی نسبت به باکتری های گرم مثبت دانست.

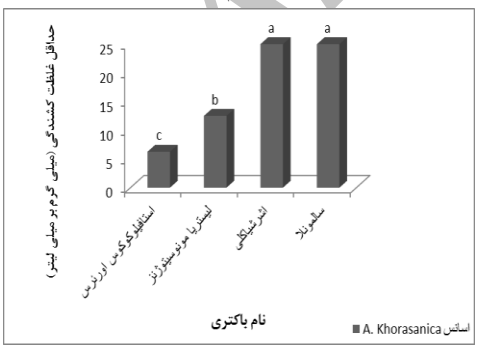


شکل ۴- مقایسه حداقل غلظت بازدارنگی اسانس A. Khorasanica در بر باکتری‌های مورد بررسی

(حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.)

۳-۲-۴- حداقل غلظت کشندگی (MBC)

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، اختلاف معنی داری در باکتری‌های مورد بررسی مشاهده شد (P< ۰/۰۵). در روش میکروبراث دایلوشن، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت پایین ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی (MBC) بهتری نسبت به سایر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. در مورد باکتری‌های گرم منفی، اثر کشندگی در غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر بود.



شکل ۵- مقایسه حداقل غلظت کشندگی اسانس A. Khorasanica در بر باکتری‌های مورد بررسی

(حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.)

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس نتایج این تحقیق باکتری‌های گرم مثبت دارای حساسیت بیشتری در برابر اسانس گیاه مورد نظر می باشند که این نتیجه با نتایج تحقیقات پیشین در مورد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یکسان است (۱۴ و ۶۳). علت حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به مواد شیمیایی و اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی، اختلاف ساختمان دیواری می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای موکوپپتید بوده، در حالیکه باکتری‌های گرم منفی فقط لایه‌ی نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آنها لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید است. در حقیقت باکتری‌های گرم منفی یک غشاء خارجی در اطراف دیواره سلولی خود دارند که به همین دلیل آنها را در برابر مواد ضد باکتریایی مقاوم‌تر می سازد (۶۴). تخریب دیواره سلولی منجر به نشت محتویات سلولی به بیرون و در نتیجه مرگ سلول می‌شود. میزان اثر این ترکیبات به دوز و زمان اثر آنها بستگی دارد. غلظت بالاتر منجر به افزایش سرعت نابودی میکروارگانیسم‌ها می‌شود در نتیجه برای ایجاد اثر ضد باکتریایی مشابه در دوزهای پایین از زمان بیشتری استفاده کرد (۱۴). ترپن‌ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری-ها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۵۰). اثر ضد میکروبی اسانس‌ها روغنی تنها ناشی از ترکیبات عمده آنها نمی‌باشد، ترکیباتی که مقادیر کمتری دارند نظیر ترپینئول و ترپینن-۴-ال نیز می‌توانند در فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها سهیم باشند. ترپینن-۴-ال به عنوان یک سری از ترکیبات، دارای خاصیت ضدباکتری بر علیه چندین میکروارگانیسم هستند (۱۰). آلفا-ترپینئول نیز به عنوان ضدباکتری گزارش شده است (۱۵). در حقیقت این امکان نیز وجود دارد که ترکیباتی با درصد کمتر احتمالاً دارای اثر سینرژیستی با دیگر ترکیبات موثر و فعال باشند (۴۵). خواص آنتی-باکتریال گونه‌های جنس درمنه بیشتر مربوط به ماده موثره ۱، ۸-سینئول و آلفا-توجون است (۴). ۱و ۸-سینئول (۱۰/۴ درصد) و ترانس-توجن (۱۱/۸ درصد) نیز به عنوان سایر اجزای اصلی در اسانس این گل معرفی شدند. ۱و۸-سینئول و کامفور از مهم‌ترین ترکیبات ضدمیکروبی جدا شده از گونه‌های گیاهی مختلف هستند که می‌توانند بالقوه ضدمیکروب باشند (۳۳). بنابراین، به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر این ترکیبات، علت اصلی تاثیر ضدباکتریایی اسانس گیاه درمنه Artemisia Khorasanica بوده‌اند. رسولی و همکاران (۲۰۰۸)، گزارش کردند که مقدار اسانس لازم یرای ایجاد هاله عدم رشد یا تاثیر مهارکنندگی و یا اثر کشندگی بر میکروارگانیسم‌ها متفاوت می‌باشد. آن‌ها این تفاوت را نشان دهنده اثر بخشی متفاوت ترکیبات مختلف شیمیایی اسانس‌ها بر میکروارگانیسم‌ها دانستند (۵۷). محبوبی و بیدگلی (۲۰۰۹)، در پژوهشی بیان داشتند که خاصیت ضد میکروبی اسانس درمنه کوهی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. همچنین اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه، اثر ضدقارچی بسیار خوبی دارد. اثر ضد قارچی اسانس از اثر ضد باکتریایی بیشتر و باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت مقاوم‌تر هستند (۴۲). محققین مختلفی اثرات متفاوت را برای اجزای درمنه ترکی گزارش نمودند. به عنوان مثال ژرانیل دارای اثر ضدباکتریایی به ویژه در مقابل سالمونلاتیفی موریوم[1]و اثر ضدقارچی می‌باشد (۳۶). مسادا و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند که اسانس Artemisia. L. Absinthium دارای اثرات ضدباکتریایی بالایی است (۴۳). سیلکتاز و همکاران (۲۰۰۷)، اعلام کردند اسانس‌ها اثر ضدباکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می‌کنند، که نتیجه بررسی در رابطه با نحوه عملکرد اسانس نشان داد نفوذپذیری غشا از طریق این ترکیبات افزایش می‌یابد و از طرفی، نفوذ اجزای اسانس در غشاء منجر به متورم شدن آن می‌گردد و فعالیت آن را نیز کاهش داده که در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود (۱۶). بنابراین، در تحقیق حاضر می‌توان دلیل اصلی اثر ضد میکروبی اسانس Artemisia Khorasanica بر باکتری-های مورد آزمون را به این عملکرد در اسانس نسبت داد.

[1] Salmonella typhimurium

Archive of SID

www.SID.ir

کاظمی و همکاران (b ۲۰۱۱)، نشان دادند اسانس یک گونه اندمیک از گیاه Artemisia به نام A.kermanensis، دارای فعالیت ضدباکتریایی است. براساس نتایج؛ استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا با MIC، ۱/۲۵ میلی-گرم بر میلی‌لیتر، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس بودند (۳۴). در یک مطالعه، فعالیت ضدباکتریایی اسانس گونه A. fragrans مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تست ضدباکتریایی اسانس این گیاه نشان داد این اسانس دارای فعالیت ضدباکتریایی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس آگالاکتیه، آنتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند، اما بر روی باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه اثری ندارد. همچنین ترکیبات اسانس این گونه از گیاه Artemisia با روش کروماتوگرافی جرمی بررسی و مشخص گردید، ۱و ۸- سینئول و توجن در ترکیبات اسانس این گیاه از غلظت بالایی برخوردارند (۷۰). در یک مطالعه دیگر، فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس اندام‌های هوایی گونه A.kermanensis در مقابل ۸ باکتری باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتلیس، سیتروباکتر، آنتروباکتر، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس و ۲ گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس با MIC ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس بوده و اسانس A.kermanesis دارای اثر ضدقارچی است. در آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس این گونه مشخص گردید ایزوبورنئول با ۲۱/۵ درصد، کامفور با ۹/۸ درصد و سیس-توجن با ۷/۶ درصد، از مهم‌ترین ترکیبات در این گیاه می-باشند (۳۲). وندیوسفی و همکاران (۱۳۷۴)، بیان نمودند اسانس درمنه صخره‌ای Artemisia hausskenechtii از رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماریزا جلوگیری می‌کند به طوری که در بعضی از موارد فعالیت ضدمیکروبی آن از آنتی‌بیوتیک‌های مانند نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، سفالوتین، آموکسی سیلین و کلرامنفنیکل بیشتر است. اسانس این گیاه دارای ترکیبات اصلی سینئول، کامفور، آرتمیزیا کتون، فراگراند و بورنئول است (۶). Laciar و همکاران (۲۰۰۹)، گزارش دادند اسانس گیاه آرتمیزیا اکه-گارای‌هیرون در غلظت‌های ۷۵-۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمون جلوگیری می‌کند و باکتری‌های گرم مثبت لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس سرئوس، حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس این گیاه می‌باشند (MIC: ۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر). براساس نتایج، اسانس این گونه از Artemisia بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی نیز اثر مهاری دارد. در این بررسی قطر هاله با ممانعت از رشد علیه این دو باکتری به ترتیب ۹ و ۱۰ میلی-متر گزارش شد. مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گیاه آرتمیزیا اکه‌گارای‌هیرون را کامفور (۵ درصد) و ترانس-توجن (۱۰ درصد) گزارش کردند. بنابراین، به نظر می‌رسد اثرات ضدمیکروبی این دو گونه Artemisia به علت وجود این ترکیبات می‌باشد (۳۸). Baykan و همکاران (۲۰۱۲)، در مطالعه خود با بررسی اثر ضدمیکروبی و ضداکسیدانی اسانس و عصاره متانولی چندین گونه آرتمیزیا شامل: آرتمیزیا ابسینتیوم، آرتمیزیا آربوسنس، آرتمیزیا کمپستریس، آرتمیزیا اسکوپاریا، آرتمیزیا سنتونیکوم و آرتمیزیا ولگاریس بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، حساس‌ترین باکتری نسبت به اسانس تمامی گونه-های آرتمیزیا می‌باشد. آرتمیزیا سنتونیکوم و آرتمیزیا اسکوپاریاز، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را علیه قارچ کاندیدا آلبیکنس از خود نشان دادند، بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی نیز مربوط به آرتمیزیا ولگاریس، آرتمیزیا آربورسنس و آرتمیزیا سنتونیکوم، بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و بیشترین اثر ضدباکتریایی آرتمیزیا ابسینتیوم بر اشرشیاکلی گزارش شد (۱۲). در یک مطالعه دیگر ترکیبات موجود در اسانس اندام‌های هوایی Artemisia deserti مورد بررسی قرار گرفت (۸)، که ۱و

Archive of SID

www.SID.ir

۸ سینئول، کامفور و پیپریتون به عنوان اجزای اصلی گزارش شدند (۳۳).

۳-۳- میزان فنل تام

معادله مربوط به منحنی استاندارد اسید گالیک برای محاسبه میزان ترکیبات فنولی به صورت $Y= 0.0038 X+0.0044$ $(R^2 =0.9926)$ است. میزان فنل تام اندام-های هوایی درمنه برابر با ۰/۱۲± ۱۰۶/۲۷ میلی گرم گالیک اسید بر گرم اسانس بود. گیاهان دارویی، منابع غنی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی هستند. اکثر آنتی اکسیدان‌های طبیعی قادرند، رادیکال‌های آزاد، رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل را از طریق انتقال الکترون‌های منفرد حذف کنند (۳۹). ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه خیلی از گیاهان، به ویژه گیاهان دارویی هستند. این ترکیبات، توان آنتی اکسیدان بالایی دارند و از طرق مختلف، در حذف و جلوگیری از ایجاد رادیکال‌های آزاد موثرند؛ به طوری که این ترکیبات، رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کنند و همچنین باعث رسوب عناصر اکسیدان مانند آهن می‌شوند (۷۲ و ۷۳). در مطالعه‌ای، میزان تام فنل اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز با ۹/۷±۱۹۴/۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش شده است (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر، میزان فنل عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ۱/۴ تا ۲/۳ میکروگرم بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است (۴۱).

۳-۴-میزان فلاوونوئید تام

معادله مربوط به منحنی استاندارد کوئرستین برای محاسبه محتوای فلاوونوئید کل به صورت $Y= 0.031X+0.0109$ $(R^2 =0.9913)$ است. محتوی فلاوونوئید اسانس درمنه برابر با ۰/۰۶ ±۱/۵۱ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم اسانس بود. در مطالعه‌ای نشان داده شد که میزان تام فلاوونوئید عصاره متانولی در عصاره برگ گونه درمنه برابر با ۰/۱۷±۱۳/۴۵ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره بود (۴۴).

در مطالعه‌ای دیگر، میزان تام فلاونووئید عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی گلستانک البرز، برابر با ۰/۶±۱۲/۴ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره گزارش شده است (۴۲). در مطالعه خلجی و همکاران (۲۰۱۱) نیز میزان فلاوونوئید عصاره متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ۰/۴ تا ۲/۱ میکرومولار کوئرسیتین بر صد میکروگرم عصاره گزارش شده است (۳۵). مطالعات متعددی بر روی گونه دیگر ویتکس انجام شده است. در یک مطالعه نشان داده شد که عصاره آبی گونه درمنه Artemisisa afra Jacq، باعث کاهش مالون دی‌آلدئید و افزایش سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در حیوانات آزمایشگاهی دیابتی شده می‌شود (۷). در مطالعات دیگری نشان داده شده است که درمنه، دارای اثرات ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد اسپاسم، ضد التهاب و ضد مالاریا است (۵۳). میزان فلاوونوئید عصاره آبی آرتمزیا ولگاریس (Artemisisa vulgaris) در مصر برابر با ۰/۰±۳/۴ معادل میلی‌گرم روتین بر گرم عصاره است (۶۸).

۳-۵- ارزیابی ۲ و ۲ دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

جهت مقایسه اثرات آنتی اکسیدان اسانس گیاه در DPPH از پارامتر دیگری به نام IC_{50} استفاده شد. IC_{50} اسانس، غلظتی از آن می باشد که باعث ۵۰ درصد مهار اکسیداسیون شود. هر چه اثر آنتی اکسیدان اسانس بیشتر باشد میزان IC_{50} کمتر می باشد زیرا اکسیداسیون را با غلظت کمتری مهار می نماید (۶۵). برای محاسبه IC_{50} از برنامه نرم افزاری آنلاین bipdatafit استفاده شد. در مطالعه حاضر، میزان IC_{50} اسانس گیاه درمنه و BHT به ترتیب برابر با: ۴/۹ و ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در یک مطالعه، میزان IC_{50} اسانس متانولی اندام‌های هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی مختلف آذربایجان شرقی، برابر با ۲۹/۷۴ تا ۶۴/۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است (۳۵). در یک

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعه، میزان درصد مهار رادیکال آزاد حاصل از ۲ و ۲ دی
فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل توسط عصاره متانولی اندام‌های

Archive of SID

www.SID.ir

هوایی درمنه جمع‌آوری شده از نواحی شهر بابک کرمان، برابر با ۱/۷ ±۷۱/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است؛ در حالی که در غلظتی از ترولوکس که برابر غلظت استفاده شده از عصاره متانولی درمنه بود، میزان درصد مهار برابر با ۱/۹ ± ۴۸/۱ بود (۳۳). مطالعه‌ای که بر روی عصاره آبی آرتمزیا ولگاریس (Artemisisa vulgaris) در مصر انجام شد، نشان داد که میزان IC_{50}، برابر با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۶۸). مطالعه دیگر که بر روی عصاره اتانولی بذر آرتمیزیا (Artemisisa pallens) در نیجریه انجام شد، نشان داد که میزان IC_{50}، برابر ۱/۵±۱۵۰/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۵۶). امروزه محققین، علاقه زیادی به مطالعه گیاهان دارویی و استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از آنها، برای استفاده به عنوان جانشین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی دارند. آنتی اکسیدان‌های طبیعی، سالم‌تر هستند؛ فواید بیشتری دارند و همچنین اثرات مضر جانبی کمتری دارند (۶۱).

۳-۶- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس درمنه به روش FRAP

در این روش توانایی اسانس گیاه درمنه برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. حضور عوامل احیاء کننده (آنتی اکسیدان‌ها) منجر به احیاء کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آنها به فرم فروس می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاء کنندگی اسانس مورد بررسی با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز و آبی همراه است (۶۲). معادله مربوط به منحنی استاندارد محلول آمونیوم فروس سولفات به صورت $Y= 0.502X- 0.008, \ (R^2=0.988)$ است. میزان توانایی احیاکنندگی اسانس درمنه و BHT به ترتیب برابر است با ۰/۲± ۳۶/۷۷ و ۳۲/۲۸ میکرومول بر لیتر به دست آمد. گزارشات نشان داد که در گیاهانی مانند شاه توت، تمشک و توت فرنگی بین محتوای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ و میوه‌های سنجش شده به روشFRAP، یک ارتباط خطی وجود دارد (۳۶). بنابراین با توجه به ارتباط مثبت بین سنجش FRAP و محتوای فنل، فلاوونوئیدهای مانندکوئرستین در این گیاه، به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان، می‌تواند یک دلیل اصلی برای قدرت احیایی بالا باشد. اکثر پلی‌فنل‌ها در بین ترکیبات فیتوشیمیایی آنتی‌اکسیدان به علت خصوصیت احیایی و عمل به دام انداختن رادیکال آزاد بسیار مهم هستند. آنها همچنین از طریق تعامل با سیستم‌های آنزیمی مختلف توانایی چلات کنندگی فلزات را دارند، علاوه بر آن این ترکیبات که در طی رشد و نمو متغیر است به علت شرکت داشتن در بو، رنگ و مزه در گیاهان نیز اهمیت دارند (۲۳). اسانس‌ها با محتوای فنلی بالا و خاصیت خوب آنتی‌اکسیدان می‌تواند برای اهداف تغذیه‌ای و نگهداری غذایی استفاده شود (۶۶). نسبت مثبت بین محتوای فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌ها گزارش شده (۶۷) و مطالعه حاضر تایید کننده آن است.

۴-نتیجه‌گیری

این مطالعه جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی، اندازه‌گیری قدرت آنتی اکسیدانی و آنتی‌میکروبی گیاه Artemisia Khorasanica انجام گشت. در گیاهان ترکیبات پلی‌فنلی نقش زیادی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. که این فعالیت به نظر مربوط به خاصیت اکسایش و کاهش آنها می‌باشد (۷۵). در این پژوهش، سطح ترکیبات پلی فنلی در اسانس گیاه درمنه قابل توجه بوده است. بنابراین این نتایج ارزشمند می‌تواند حاکی از نقش بیولوژیکی (زیستی) پراهمیت مواد پلی فنلی موجود در نمونه‌های این گیاه باشد. دانشمندان بر این باورند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاوونوئیدها به علت قابلیت در اختیار گذاشتن هیدروژن آنها می‌باشد (۱۳). بررسی خواص ضد میکروبی نشان داد، که مهار باکتری‌های گرم منفی توسط اسانس حاصل از اندام‌های هوایی گیاه بیشتر از انواع گرم مثبت می‌باشد و بیشترین تاثیر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند همچنین اسانس گیاه فوق علیه لیستریا مونوسیتوژنز و باکتری‌های گرم اثر ضد باکتریایی دارد و از طرفی میزان خاصیت ضد میکروبی

Archive of SID

www.SID.ir

اسانس این گیاه می‌تواند با جنتامایسین قابل مقایسه باشد.

نتایج به دست آمده از روش‌های چاهک، دیسک و

Archive of SID

www.SID.ir

میکروبراث دایلوشن نتایج فوق را نیز تایید نمود و با توجه به قطر هاله‌ی عدم رشد و مقایسه آن با سایر گونه‌های Artemisia می‌توان نتیجه گرفت اسانس گیاه فوق دارای خاصیت ضدباکتریایی بالقوه‌ای نسبت به سایر گونه‌ها می‌باشد. در آنالیز اسانس مجموعاً ۲۶ ترکیب در اسانس گیاه شناسایی شد که عمده‌ترین ترکیبات آن مربوط به ترکیبات مونوترپن اکسیژنه بوده و چهار ترکیب، عمده‌ترین ترکیبات اسانس را تشکیل دادند که عبارت بودند از سیس-وربونل (۲۶/۷۴ درصد)، ۱و۸-سینئول (۲۰/۰۵ درصد)، کامفور (۱۵/۰۶ درصد) و کریسانتینل استات (۸/۵۶ درصد) است، که ۷۰/۵۱ درصد از اسانس گیاه را تشکیل می‌دهند. در ادامه اثر آنتی‌اکسیدان اسانس به روش DPPH و FRAP نشان داد، اثر اسانس مذکور بیشتر از آنتی اکسیدان شناخته شده‌ی BHT بود. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که درمنه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان اولیه، از طریق تبادل هیدروژن و واکنش با رادیکال‌های آزاد، دارای توان بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد است. در نتیجه می‌توان گفت به واسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی و ترپنی دارای پتاسیل آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالایی می‌باشد، می‌توان این گیاه را به عنوان یک موضوع با ارزش جهت پژوهش‌های بیشتر، توصیه نمود.

۵-سپاسگزاری

این مقاله حاصل از طرح پژوهشی بوده که توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان حمایت مالی شده است. بدین وسیله از پژوهشکده علوم و صنایع غذایی که امکانات آزمایشگاهی جهت انجام این طرح را فراهم نمودند کمال تشکر را داریم.

۶-منابع

۱. سفیدکن، ف.، احمدی، ل.، میرزا، م. ۱۳۷۶. بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس ترخون Artemisia dracunculus پژوهش و سازندگی شماره ۳۴: ۱۵- ۱۷.

۲. جلیلی، ع.، ربیعی، م.، سفیدکن، ف. ۱۳۸۲. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس ۴ گونه Artemisia در شمال ایران. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی. ۶۱: ۵۷-۶۳.

۳. شافعی، م.، شریفان، ا، آقازاده، م. ۱۳۹۰. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر روی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس. علوم غذایی و تغذیه، ۹ (۱): ۱۰۸-۱۰۱.

۴. مظفریان، و. ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۷۵۰.

۵. معظمی، ن. ۱۳۶۸. کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی وعفونی ایران. چاپ سوم، سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، تهران.

۶. وندیوسفی، ج.، نصیراحمدی، ا.، و جاسبی، ا. ر. ۱۳۷۴. فعالیت بیولوژیکی اسانس گیاه Artemisia hausskenechtii، پژوهش و سازندگی، ۲۹: ۲۸-۳۰.

7. Afolayan, A.J. and Sunmonu, T.O. 2011. Artemisia afra Jacq. Amelirates Oxidative Stress in the pancreas of steptozocininduced diabetic wistar rats. Biosci Biotechnol Biochem, 75(11): 2083-6.
8. Ahmadi, L. and Mirza, M. 2001. Chemical composition of essential oils from two Iranian species of Artemisia. J Essent Oil Res, 13:30.
9. Anonymus. 1988. Culture Media Handbook. Darmstadt: Federal Republic of Germany, 123, 124, 137
10. Baron. J.E. and Finegold, S.M. 1990. Bailey and Scotts Diagonostic Microbiology. 8th ed. Toronto: The C.V. Mosby Company.172-184, 238-282.
11. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymology. 299: 15-27.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Baykan Erel, S., Reznicek, G., Gokhan Senol, S., et al. 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of Artemisia L. Species from western Anatolia. Turk J Biol, 36:75-84.
13. Baumann, J., Wurn, G. and Bruchlausen, F.V. 1979. Prostaglandin synthetase inhibiting O-2 radical scavenging properties of some flavonoids and related phenolic compounds, Arch Pharmacol, 307, 1-77.
14. Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. International Journal of Food Microbiology .94(3): 223-253.
15. Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29: 130–135.
16. Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., et al. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of Rosmarinus officinalis depending on location and seasonal variations. Food Chem, 100:553-9.
17. Cha, J., Jeong, M., Jeong, S., Moon, S., Kim, J., Kil, B. and Song, Y. 2005. Chemical composition and antimicroboial activity of the essential oils of Artemisia scoparia and A. capillaries. Planta Med, 71: 186 – 90.
18. Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10: 178-182.
19. Daneshmandi, S., Soleimani, N., Sattari, M. and Pourfathollah, A.A. 2010. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminumcyminum essential oil, Arak Medical University Journal (AMUJ), 13(2):78-82.
20. Dar, J.S., Rauf Tak, I., A Ganai B, Dawood, M. 2014. Phytochemical studies on the extract and essential oils of Artemisia dracunculus L. (Tarragon). Afr J Plant Sci, 8(1): 72-75.
21. Duffy, C. f. and Power, R.F, 2001, Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts, Internat. J. Antimicro. Age, 17, 527-529.
22. Dinani, N.J., Asgary, A., Madani, H., Naderi, G. and Mahzoni, P., 2010. Hypo cholesterolemic and antiatherosclerotic effect of Artemisia aucheriin hyper cholesterolemic rabbits. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 23(3): 321-325.
23. Deepa, N., Kaura, Ch., Georgea, B., Singhb, B. and Kapoor, H. C. 2007. Antioxidant constituents in some sweet pepper (Capsicum annuum L.) genotyps during maturity. LWT Food Science and Technology 40: 121-129.
24. Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Hadian, J. and Tehrani, A.S. 2005. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of Artemisia on some soil borne phytopathogens. Commun Agricul Appl Biol Sci, 71(3):1327-1333.
25. Gordanian, B., Behbahani, M., Carapetian, J. and Fazilatim, M. 2013. Evaluation of Cytotoxicity of Sagebrush Plain Extract on Human Breast Cancer MCF7 Cells. Armaghane Danesh, 18(3): 241-251 (Persian).
26. Hamad, I., Erol-Dayi, O., Pekmez, M., Onay- Ucar, E. and Arda, N. 2010. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Aphanes arvensis Extracts. Plant Food for Human Nutrition, 65, 44-49.
27. Hakimi Maybodi, M.H., Afkhami Aghdaee M. and Mijalili, B.F. 2003. An investigation into biological activities of Artemisia Persia's essential oil. Pajoohesh and Sazandegi,
28. Hayouni, E. A. Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts, 105: 1126- 1134.
29. Hadian,J., Ramak-Masoumi, T., Farzaneh, M., Mirjalili, Samad, M.H., Nejad-Ebrahimi, S. and Ghorbani, M. 2007. Chemical Compositions of

Archive of SID

www.SID.ir

microbial Properties of Artemisia haussknechtii. Journal of Medicinal Plans, 8 (31): 132-141.
38. Laciar, A., Vacaruiz, M.L., Carrizoflores, R., et al. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of Artemisia Echegarayi Hieron. (Asteraceae). Rev Argent Microbiol, 41:226-31.
39. Lloyd, D.R. and Phillips, D.H. 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. Mutat Res, 424(1-2): 23-36.
40. Mardafkan, N., Iranmanesh, M., Larijani, K., Mahasti, P., Nazari, F. and Zojaji, M. 2015. Chemical components and antibacterial activities of essential oils obtained from iranian local Lavandula officinalis and Thymus vulgaris against pathogenic bacteria Isolated from human. Journal of Food Biosciences and Technology, 1: 31-36.
41. Mazandarani, M. and Khormali, A. 2015. Autecology, ethnopharmacology, total phenol andflavonoids and antioxidant activity of Ditrichia graveolens (L.) Greuter. In different extraction from Bandargaz region. Ecophytochemical Journal. 6 (2):69-78.
42. Mahmoudi, M., Ebrahimzadeh, M.A., Ansaroudi, F., Nabavi, S.F. and Nabavi, S.M. 2009. Antidepressant and antioxidant activities of Artemisia absinthium L. at flowering stage. Afr J Biotech. 8 (24): 7170-5.
43. Msaada, K., Salem, N., Bachrouch, O., Bousselmi, S., Tammar, S., Alfaify, A., et al. 2015. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (Artemisia absinthium L.) Essential oils and phenolics. Journal of Chemistry, 1-12.
44. Mikkonen, T.P., Määttä, K.R., Hukkanen, A.T., Kokko, H.I., Törrönen, A.R, Kärenlampi, S.O., et al. 2001. Flavonol content varies among black currant cultivars. J Agric Food Chem, 49 (7): 3274-7.

Essential Oil of Artemisia khorasanica Podl. and its Antifungal Activity on Soil-Born Phytopathogens. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 10 (1): 53-59.
30. Heywood, V.H., Harborn, J.B., and Turner, B.L. 1997. The biology and chemistry of the composited. Academic Press, London, 868.
31. Huang, Y.P. and Ling, Y.R. 1996. In D.J.N. Hind and H.J. Beentje (eds.), Compositae: Systematics, proceedings of the International Compositae Conference, Royal Botanic Gardens, Kew, 36: 431-451.
32. Kazemi, M., Dakhili, M., Dadkhah, A., et al. 2011 b. Composition, antimicrobial and antioxidant activitiea of the essential oil of Artemisia Kermanensis Podl. An endemic species from Iran. J Med Plants Res, 5(18): 4481-6.
33. Kazemi, M., Shafizade, S. and Larijani, K. 2011 a. Comparison of essential oils composition of stem, leaf and flower from Artemisia deserti Kracsh. J Appl Chem Res, 18:29-34.
34. Kazemi, M., Dakhili, M., Dadkhah, A., Yasrebifar, Z. and Larijani, K. 2011 b. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of Artemisia kermanensis Podl., an endemic species from Iran. J Med Plants Res, 5(18): 4481-6.
35. Khalaji, S., Zaghari, M., Hatami, K., Hedari-Dastjerdi, S., Lotfi, L. and Nazarian, H. 2011. Black cumin seeds, Artemisia leaves (Artemisia sieberi), and Camellia L. plant extract as phytogenic products in broiler diets and their effects on performance, blood constituents, immunity, and cecal microbial population. Poult Sci, 90(11): 2500-10.
36. Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., J.F., P.R and WEI, C.I. 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against Salmonella typhimurium in culture medium and fish cubes. J Food Sci, 60(6):1364-1368.
37. Khanahmadi, M., Rezazadeh, Sh., Shahrezaei, F. and Taran, M. 2009. Study on Chemical Composition of Essential oil and anti-oxidant and anti-

Archive of SID

www.SID.ir

Antibacterial activity of some Artemisia species extract. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 113(3): 911-4.
54. Prabhakaran, J. and Maharaj, S. 2013. Allelopathic potential of Cissus quadrangularis L. on growth of floral millet (Pennesetum typhoides ST. and HUB). International Journal of Research in Biological Sciences, 3 (1): 18-21.
55. Rather, M. A., Dar, B.A., Shah, W.A., Prabhakar, A., Bindu, K., Banday, J.A., Qurishi, M.A. 2017. Comprehensive GC–FID, GC–MS and FT-IR spectroscopic analysis of the volatile aroma constituents of Artemisia indica and Artemisia vestita essential oils. Arabian Journal of Chemistry, 10, S3798–S3803.
56. Rashid, S., Rather, M.A., Shah, W.A. and Bhat, B.A. 2013. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of Artemisia indica Willd. Food Chem, 138 (1):693-700.
57. Rasooli, I., Gachkar, L., Yadegarinia, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Fakour, M., et al. 2008. Relation of antioxidative property and free radical scavenging capacity to the antimicrobial characteristics of essential oils from Mentha spicata L. and Chenopodium ambrosioides L. Iran J Med Aromatic Plants, 23(4):492-503.
58. Ramezania, M., Fazli-Bazzaza, B.S., Saghafi- Khademb, F., Dabaghiana, A. 2004. Antimicrobial activity of four Artemisia species of Iran. Fitoterapia, 75: 201- 3.
59. Sereshti, H. and Samadi, S. 2007. Comparison of hydrodistillation-headspace liquid phase microextraction techniques with hydrodistillation in determination of essential oils in Artemisia Haussknechtii Boiss. JSUT, 33 (2): 7-17.
60. Saeidnia, S., Yassa, N., Rezaeipoor, R. and Shafiee, A. 2004. Comparative investigation of the essential oils of Achilleatalagonica Boiss. and A. millefolium, chemical composition and immunological studies. Journal of
45. Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from lamiaceace and compositae. International Journal of Food Microbiology, 67, 187–195.
46. Mo Ku, K. and Juvik John, A. 2013. Environmental Stress and Methyl Jasmonate-mediated Changes in Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity in Broccoli Florets and Kale Leaf Tissues. Hortscience. 48(8):996–1002.
47. Naeini, A., Khosravi. A., Chitsaz. M., Shokri, H. and Kamlnejad, M. 2009. Anti- Candida albicans activity of some Iranian plants used in traditional medicine. Journal mycologic medicale, 19:168-172.
48. Nematollahi, F., Rustaiyan, A., Larijani, K., Nadimi, M. and Masoudi, S., 2006. Essential oil composition of Artemisia biennis Willd. and Publicaria undulate (L.) C.A. Mey., two Compositae herbs growing wild in Iran. Journal of Essential Oil Research, 18: 101-105
49. Orav, A., Raalb, A., Arakb, E., Müüriseppa, M. and Kailasa, T. 2006. Composition of the essential oil of Artemisia absinthium L. of different geographical origin. Proc. Estonian Acad. Sci. Chem, 55, 3, 155–165.
50. Oussalah, M., Caillet, S. and Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory oils against cell membrane and walls of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection, 69(5), 1046-1055.
51. Pandey, B.P., Thapa, R., Upreti, A. 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil and methanol extract of Artemisia vulgaris and Gaultheria fragrantissima collected from Nepal. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10(10): 952–959.
52. Pokorny, J. 2007. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant components? European Journal of Lipid Science and Technology, 109, 629-642.
53. Poiată, A., Tuchiluş, C., Ivănescu, B., Ionescu, A. and Lazăr, M.I. 2009.

Archive of SID

www.SID.ir

Temraz, A. and El-Tantawy, W.H. 2008. Characterization of antioxidant activity of extract from Artemisia vulgaris. Pak J Pharm Sci, 21(4): 321-6.
68. Teixeira da Silva, J.A. 2004. Mining the essential oils of the Anthemideae. African Journal of Biotechnology, 3(12): 706-720.
69. Valizade, E., Jafari, B., Dolgari-SHaraf, J., et al. 2012. Evaluating antibacterial activity from essential oil of Artemisia fragrans Willd. In North-Western of Iran. Afr J Microbiol Res, 6(4):834-7.
70. Verdian-rizi, M.R., Sadat-Ibrahimi, E., Hadjiakhoondi, A., et al. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of Artemisia annua L. essential Oil from Iran. J Med Plants, 7: 59-62.
71. Williams, R.J., Spencer, J.P. and Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radic Biol Med, 36(7): 838-49.
72. Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W. and Chen, F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chem, 97(4): 705-11.
73. Wright, C.W. 2002. Artemisia، medicinal and aromatic plants - Industrial Profiles, 1: 10- 22.
74. Zheng, W. and Wang, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, J Agr Food Chem, 49, 5165-5170.
75. Zgoda, J.R. and Porter, J.R. 2001. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. Pharma. Biol, 39:221-225.

Essential Oil Research, 16 (3):262-265.
61. Singal, P.K., Khaper, N., Palace, V. and Kumar, D. 1998. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. Cardiovasc Res, 40(3): 426-32.
62. Soares, A.A., Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Costa, S.M.G. and Peralta, R.M. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis (Agaricus blazei Murr.il) in two stages of maturity. Food Chemistry, 112, 775-781.
63. Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K. and Nychas, G.J.E. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on Escherichia coli O157:H7. Italian Journal of Food Science, 13(1): 65–75.
64. Soltani Nezhad, Sh., Mokhtari Sataeei, T. and Soltani Nezhad, M. 2010. Evaluation of antibacterial activity of eucalyptus leaf extract against Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Streptococcus pyogenes in vitro, Journal of Islamic Azad University of Microbial Biotechnology, 4: 21-28.
65. Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., et al. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control, 15: 549-57.
66. Thippeswamy, N.B and Naidu, K.A. 2005. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. Eur Food Res Technol, 220: 472-6.
67. Tsai, T.H., Chien, Y.C., Lee. C.W. and Tsai, P.J. 2008. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. Food Chem, 110(4): 859-64.

Archive of SID

www.SID.ir