Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ چهاردهم، شمارهٔ ۱، ص ۴۳-۳۳، ۱۳۸۵

مقالهٔ پژوهشی

اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره گیاه آویشن شیرازی در برون‌تن

دکتر محمدحسن مصحفی[*1]، دکتر شهلا منصوری[2]، دکتر فریبا شریفی‌فر[3] و دکتر محمد خشنودی[4]

خلاصه

مقدمه: در این مطالعه اثر ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی گیاه بومی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش: اثر آنتی‌اکسیدان اسانس و عصاره گیاه با استفاده از دو روش آمونیوم تیوسیانات و مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) در مقایسه با BHA (Butylated Hydroxy Anaisol) و اسکوربیک اسید مورد مطالعه قرار گرفته است. برای ارزیابی اثرات ضدمیکروبی از روش انتشار در آگار به روش disc diffusion استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمایشات میکروبی با استفاده ازمتد رقت آگار نشان می‌دهند که اسانس گیاه قادر به مهار رشد همه سوش‌های باکتریایی مورد آزمایش به خصوص انواع گرم منفی است. بخش قطبی عصاره متانولی گیاه بیشتر روی سوش‌های گرم مثبت اثر مهاری نشان داد در صورتی که قسمت غیرقطبی عصاره دارای طیف اثر مشابه با اسانس اما با قدرت ضعیف‌تر بود. اسانس گیاه با قدرت IC_{50}: ۱/۰ ± ۲۲/۴ قادر به مهار رادیکال پایدار DPPH بوده در حالی که فراکسیون‌های قطبی و غیرقطبی عصاره متانولی با IC_{50}: ۱/۶ ± ۱۶/۲ و ۱/۶ ± ۲۱/۷ در مقایسه با BHA با IC50: ۱/۹ ± ۱۸/۲ رادیکال DPPH را مهار نمودند. قدرت مهارکنندگی اکسیداسیون لینولئیک اسید برای اسانس گیاه ۲/۵± ۸۹/۷ و برای فراکسیون‌های قطبی و غیرقطبی عصاره به ترتیب ۲/۳±۸۲/۴ و ۱/۹±۸۰/۳ به دست آمد. قدرت مهاری BHA و اسیداسکوربیک در این سیستم به ترتیب برابر ۲/۹±۹۷/۸ و ۲/۱±۹۳/۲ بود. ترکیبات شیمیایی اسانس حاصل از روش هیدرودیستیلیشن با دستگاه GC/MS آنالیز گردید. در مجموع ۲۵ ترکیب که حدود ۹۷/۸٪ اسانس را تشکیل می‌دهد شناسایی گردیدند. ترکیبات اصلی شناسایی شده عبارتند از: تیمول ۳۷/۵۹٪، کارواکرول ۳۳/۶۵٪، پاراسایمن ۷/۷۲٪، گاماترپینن ۳/۸۸٪ و بتاکاریوفیلن ۲/۰۶٪ که حدود ۸۴/۹٪ اسانس را تشکیل می‌دهند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اسانس و عصاره متانولی گیاه هر دو دارای اثر آنتی‌اکسیدان و ضدباکتری می‌باشند و می‌توانند به عنوان محافظ در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: *Zataria multiflora* فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت آنتی‌اکسیدان، آویشن شیرازی

۱- دانشیار گروه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان ۲- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان ۳- استادیار گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی کرمان ۴- دکتر داروساز

* **نویسنده مسؤول:** گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک:** moshafi14@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۵/۲۱ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۵/۸/۱۰ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۵/۹/۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها از زمان‌های بسیار قدیم معمول بوده و بشر بنا به تجربه به اثرات مفید گیاهان پی برده و از گیاهان مختلف برای درمان استفاده می‌کرده است. با رونق زندگی شهری و افزایش جمعیت به تدریج از مصرف گیاهان دارویی کاسته شده و داروهای صناعی در بسیاری موارد جایگزین گیاهان دارویی شده‌اند که البته با مصرف این داروها نیز مشکلاتی از قبیل ایجاد مقاومت روزافزون در میکروارگانیسم‌ها و کاهش تأثیر در اثر کاربرد مداوم ایجاد شده است.گیاه مورد مطالعه در این پژوهش در طب سنتی به عنوان افزودنی به مواد غذایی سابقه مصرف داشته است (۳۳). بدین جهت اجزا و خواص آن مورد بررسی قرار گرفت.

پراکسیداسیون لیپیدی فرایندی چند مرحله‌ای است که در سلول‌های هوازی رخ داده و به فعل و انفعالات میان اکسیژن مولکولی و اسیدچرب غیراشباع منتهی می‌شود. احتمالاً رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در مبدأ حیات و چرخه‌های زیستی ایفا می‌نمایند (۲۰). رادیکال‌های آزاد عوامل شناخته شده‌ای هستند که سهم به سزایی در پراکسیداسیون لیپیدی داشته و باعث نابودی مواد غذایی، زمینه رشد میکروارگانیسم‌ها و پیشروی سرطان می‌شوند (۶). گزارش شده است اکسیژن واکنش‌دهنده دارای نقش مؤثری در آسم، پدیده التهاب، آرتریت، اختلالات عصبی، بیماری پارکینسون، مونگولیسم و احتمالاً عقب‌افتادگی ذهنی می‌باشد (۲۷). رادیکال‌های آزاد همچنین در اعمال بحرانی از قبیل هدایت سیگنال عصبی، رونویس ژن‌ها و تنظیم فعالیت نوع محلول گوانیلات سیکلاز در سلول‌ها تداخل دارند (۱۸). در حالی که رادیکال آزاد و سایر عوامل وابسته به آن باعث اکسیداسیون بیومولکول‌ها می‌شوند. با توجه به ایجاد مقاومت‌های باکتریایی و موارد حساسیت نسبت به نگهدارنده‌های سنتتیک می‌توان از ترکیبات طبیعی استفاده نمود (۱۳).

فعالیت بسیاری از گیاهان و ادویه‌جات مربوط به اسانس‌های موجود در آنهاست. Nychas گزارش کرده گیاهانی مانند رزماری، پونه، آویشن، درمنه، میخک، گشنیز، سیر و پیاز دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی هستند که این اثرات مربوط به اجزاء دارای اسانس است (۲۶). فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها مربوط به ترکیبات فنلی موجود در آنهاست و بسیاری از آنها در دسته مواد بدون ضرر طبقه‌بندی شده‌اند و به همین جهت به عنوان مواد ضدباکتری‌های ساپروفیت و آلوده‌کننده به مواد غذایی افزوده می‌شوند (۳۱).

Zataria multiflora Boiss. با نام فارسی آویشن شیرازی جزو خانواده نعنائیان و از گیاهان بومی ایران است که به طور سنتی به عنوان افزودنی و چاشنی به مواد غذایی خصوصاً ماست افزوده می‌شود و دارای اثرات طعم‌دهنده، محرک و بادشکن است (۲،۱۵). فرآورده‌های دارویی با ماده مؤثره اسانس این گیاه نیز در بازار موجود است. اسانس این گیاه در موارد درمان عفونت‌های دستگاه تنفسی همچنین به عنوان آنتی‌سپتیک، ضدسرفه و در سندرم روده تحریک‌پذیر کاربرد دارد (۱). از طرفی عصاره بخش‌های هوایی گیاه دارای اثرات ضدالتهابی است و در موارد التهاب‌های حاد و مزمن در موش و رات مؤثر بوده است (۱۶). این گیاه همچنین دارای اثرات ضدقارچی می‌باشد (۵). گزارشات مختلفی از ترکیب شیمیایی اسانس و بررسی اثرات ضدمیکروبی این گیاه وجود دارد (۴،۱۱،۲۱،۲۲) اما از آنجا که شرایط آب و هوایی و احتمالاً کموتایپ گیاه تأثیر زیادی روی ترکیبات شیمیایی اسانس آن دارد و از سویی تاکنون در مورد گیاه آویشن شیرازی جمع‌آوری شده از منطقه فیروزآباد فارس گزارش نشده است، در این تحقیق ضمن مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس اثر ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدان اسانس و عصاره متانولی گیاه نیز بررسی شده است (۳۰). روش‌های متعددی برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دسترس است. بدیهی است که استفاده از یک روش به تنهایی نمی‌تواند تمامی مکانیسم‌های اختصاصی آنتی‌اکسیدانی را توجیه نماید. به هر جهت در این تحقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی با دو روش از بین بردن رادیکال آزاد به وسیله

www.SID.ir

Archive of SID

DPPH (دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازیل) و روش آمونیوم تیوسیانات، مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

مواد گیاهی: سرشاخه‌های هوایی گیاه *Zataria multiflora* در فصل گل‌دهی از منطقه فیروزآباد استان فارس جمع‌آوری گردید و نهایتاً تشخیص گیاهان جمع‌آوری شده به کمک گیاه‌شناس انجام گرفت و کلیه مدارک و شواهد تشخیصی به هرباریوم دانشکده داروسازی کرمان تحویل گردید (کد اختصاصی ۱۱۳۳). بدیهی است که محل جمع‌آوری و شرایط اقلیمی می‌تواند در کمیت و کیفیت اسانس مؤثر باشد.

تهیه عصاره متانولی: سرشاخه‌های هوایی گیاه در سایه خشک شد. سپس در آسیاب دارای الک با منافذ به قطر ۲ میلی‌لیتر به صورت پودر در آورده شد. برای عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون حدود ۲۰۰ گرم پودر فوق با یک لیتر متانول ۸۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت عصاره‌گیری و سپس تحت شرایط خلأ تا حد خشک شدن تغلیظ گردید. عصاره حاصله برای داشتن فاز قطبی و غیرقطبی و در نتیجه تمایز بین ترکیبات این دو قسمت آب و کلروفرم تقسیم شد.

جداسازی اسانس: سرشاخه‌های هوایی و سایر قسمت‌های جمع‌آوری شده گیاه به مدت ۴ ساعت در دستگاه Clevenger اسانس‌گیری شد (محصول به دست آمده دارای ۲/۸ v/w اسانس بود). اسانس به دست آمده به وسیله سولفات سدیم بی‌آب آب‌گیری و خشک شد و در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد برای آنالیز آزمایشات بعدی نگهداری شد.

آنالیز بوسیله دستگاه GC (Gas Chromatography)

دستگاه مورد استفاده مدل Shimadzu QP5000 دارای دتکتور FID و دارای ستون موئینه با مشخصات زیر بود:

(30m × 0.25mm, film thickness 0.25µm)

درجه حرارت تزریق و دتکتور به ترتیب روی ۲۲۰ و ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای آون به مدت ۳ دقیقه روی ۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم و سپس به مدت ۳ دقیقه تا ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد بالا برده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در این حالت قرار گرفت و نهایتاً به مدت ۳ دقیقه تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد بالا برده شد. گاز حامل مورد استفاده در دستگاه هلیوم بود که با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه جریان داشت. نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۰ با استون رقیق شد، سپس به میزان ۱/۰ میکرولیتر به صورت دستی به روش splitless mode تزریق شد.

آنالیز ترکیبات به وسیله گاز کروماتوگرافی (GC)

شرایط آنالیز اسانس با این دستگاه همان شرایط گاز کروماتوگراف بود (نوع ستون، دمای آون، سرعت جریان گاز حامل). در اینجا از گاز کروماتوگراف مدل Shimadzu QP5000 استفاده شد. دمای تزریق‌کننده روی ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

ترکیبات بر اساس مقایسه زمان نگهداری نسبی در مقایسه با استانداردها شناسایی شدند. (Wiley 2001 library data of the GC system and literature data) (۳).

برای محاسبه زمان نگهداری نسبی از آلکان‌ها به عنوان استاندارد استفاده شد.

فعالیت ضدمیکروبی: سوش‌های میکروبی:میکروب‌های مورد استفاده شامل دو گروه گرم مثبت و گرم منفی بودند و عبارت بودند از:

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29122, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Salmonella typhi* ATCC19430, *Seratia marcescens* NTCC1111, *Shigella flexneri* NTCC 8516

سوش‌های میکروبی برای غربالگری اولیه انتخاب شدند تا بتوان بر اساس نتایج آن شمای کلی از اثرات ضدمیکروبی را بیان نمود. عصاره متانولی و اسانس به

www.SID.ir

Archive of SID

صورت جداگانه روی میکروب‌های فوق اثر داده شدند. برای کشت میکروب از آمپول لیوفیلیزه استفاده شد و پس از فعال کردن روی محیط کشت مولرهینتون‌آگار کشت یک شبه تهیه شد. درجه حرارت رشد میکروب ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود.

برای ارزیابی اثرات ضد میکروبی از روش انتشار در آگار به روش دیسک (Disc-diffusion) استفاده شد (۲۵). بدین صورت که ابتدا اسانس و عصاره متانولی درDMSO (Dimethylsulfoxide) تا حدی که غلظت نهایی ۳۰mg/ml حاصل شود حل شدند. سپس به وسیله فیلتر مامبران ۰/۴۵µm سترون شدند.

آزمایشات ضدباکتریایی به روش دیسک انجام شد (۱۲). بدین صورت که ۰/۱میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی۱۰۸ CFU/ml از سوسپانسیون باکتریایی روی محیط نوترینت آگار پخش شد. سپس دیسک‌های با قطر ۶ میلی‌لیتر که حاوی ۱۰ میکرولیتر اسانس یا ۳۰ mg/ml عصاره بودند. (۳۰۰ میکروگرم عصاره در هر دیسک) روی محیط کشت باکتریایی قرار داده شدند. برای کنترل منفی از دیسک‌های حاوی DMSO استفاده شد. برای کنترل مثبت و برآورد میزان حساسیت سوش‌های باکتریایی از دیسک‌های جنتامایسین حاوی ۳۰ میکروگرم در هر دیسک استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. فعالیت ضدباکتریایی به وسیله اندازه‌گیری هاله‌های ممانعت از رشد در مورد هر باکتری انجام شد.

برای به دست آوردن حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration=MIC) نمونه‌ها از روش رقت- لوله استفاده شد (۲۴). هم‌زمان از جنتامایسین به عنوان شاهد استفاده شد و MIC آن برای میکروب‌های فوق به دست آمد. تمام آزمایشات۳ مرتبه تکرارشد.

تعیین MIC با استفاده از تهیه رقت‌های متوالی در چاهک:

میزان حداقل غلظت مهارکننده از رشد باکتری(MIC) در مورد سوش‌های باکتریایی به ترتیب ذیل انجام گرفت:

سوسپانسیون سوش‌های باکتریایی از محیط کشت مایع ۱۲ ساعته تهیه شدند و با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند استاندارد شدند. اسانس و عصاره ابتدا در DMSO، ۱۰٪ (رقیق شده با آب) با غلظت اولیه ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و رقت‌های متوالی تا ۷/۸ (۶ رقت) و به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع افزوده شد. تعیین MIC عصاره‌ها در مقابل سوش‌های باکتریایی به روش میکروچاهک انجام گردید (۲۹).

به طور خلاصه پلیت‌ها ۹۶ خانه‌ای بودند که به هرکدام ۹۵ میکرولیتر محیط مایع و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی افزوده می‌شد. به چاهک اول۱۰۰ میکرولیتر از اسانس یا عصاره با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مجدداً اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک بعدی افزوده شد. این کار به طور متوالی و شش مرتبه انجام گرفت. چاهک آخر حاوی ۱۹۵ میکرولیتر نوترینت براث و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی ولی فاقد ترکیب مورد آزمایش بود. این چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. غلظت نهایی در چاهک۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. Maxipime (شرکت Bristol-Myers Squibb) در محدوده غلظت‌های ۵۰۰- ۷/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر در نوترینت براث به عنوان استاندارد جهت کنترل مثبت در نظر گرفته شد. محتویات هر چاهک به وسیله شیکر دوار با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط گردید، سپس در دمای مناسب به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه قرار گرفت. رشد میکروبی در طول موج با جذب ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۱). در این مطالعه، تأثیر عصاره مورد آزمایش روی سوش‌های میکروبی ۳ مرتبه تکرار شد و MIC بر اساس معدل حداقل غلظت بازدارنده ترکیبات مورد آزمایش از رشد میکروبی مورد نظر محاسبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری DPPH (دی‌فنیل پیکریل‌هیدرازیل):

توانایی ترکیب با هیدروژن یا الکترون‌دهندگی عصاره‌ها و اسانس مورد آزمایش به وسیله توانایی بی‌رنگ کردن محلول متانولی DPPH که به رنگ صورتی بود، انجام شد. در این اندازه‌گیری که بر اساس اسپکتروفتومتری انجام شد از رادیکال ۲ و ۲- دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل به عنوان معرف استفاده شد (۷).

۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه‌های متانولی به ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴ درصد DPPH افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه قرارگرفتن در دمای آزمایشگاه، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقایسه با شاهد منفی خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH به طریق ذیل محاسبه گردید: $I\% = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$

A_{blank} عبارت است از جذب بلانک واکنش کنترل (حاوی تمام مواد به جز ترکیبات مورد آزمایش) و A_{sample} جذب نمونه مورد آزمایش می‌باشد. غلظتی از عصاره که باعث مهار ۵۰ ٪ شود (IC_{50}) بر اساس نموداری که درصد مهار در مقابل غلظت عصاره نشان می‌دهد، محاسبه می‌گردد. این آزمایش برای هر نمونه سه بار تکرار گردید.

اندازه‌گیری DPPH بر روی TLC

این روش برای اسانس و عصاره به کار رفت. به این ترتیب که ۵ میکرولیتر از عصاره رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰ در متانول جهت استفاده در TLC صفحه‌ای به کار رفت و از محلول‌های مناسب جهت پدیدارسازی استفاده شد. صفحه کروماتوگرافی با معرف ۲٪ متانولی DPPH اسپری شد و سپس در حرارت آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. با توجه به مطالب فوق ایجاد لکه‌های صورتی و بی‌رنگ شدن آن و نهایتاً تبدیل به لکه‌های زردرنگ مبین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مثبت بود.

روش آمونیوم تیوسولفات

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی گیاه به روش آمونیوم تیوسولفات مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷). به این صورت که ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در ۰/۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه در ۲/۵ میلی‌لیتر امولسیون لینولئیک اسید (M ۰/۰۲ و pH = ۷/۰) و ۲ میلی‌لیتر فسفات بافر (M ۰/۲ و pH = ۷/۰) مخلوط گردید. برای تهیه امولسیون لینولئیک‌اسید، ابتدا ۰/۲۸۴ گرم لینولئیک‌اسید با همین مقدار وزنی از توین ۸۰ به عنوان امولسیفایر و ۵۰ میلی‌لیتر فسفات بافر مخلوط شده و سپس مخلوط حاصل هموژنایزه گردید. مخلوط حاصله در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌های ۰/۱سی‌سی در فواصل زمانی مختلف در زمان انکوباسیون تهیه گردید. درجه اکسیداسیونی با افزودن تدریجی اتانول (۴/۷ میلی‌لیتر، ۷۵٪)، یک نمونه محلول آمونیوم تیوسیانات (۰/۱ میلی‌لیتر، ۳۰٪آبی) و کلریدآهن II (۰/۱ میلی‌لیتر، ۰/۰۲ مولار در اسیدکلریدریک ۳/۵٪). پس از ۳ دقیقه، حجم‌های پراکسید در ۵۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب خوانده شد. برای کنترل مثبت از لینولئیک‌اسید فاقد عصاره و BHA استفاده شد و برای کنترل منفی از حلال‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی اسانس:

اندام هوایی خشک شده گیاه آویشن شیرازی با استفاده از دستگاه کلوینجر تحت عمل هیدرودیستیلیشن قرار گرفت و اسانس متمایل به زرد به دست آمد (راندمان محصول برابر v/w ۲/۸٪ بود).

نتایج آنالیز اسانس توسط دستگاه GC در جدول ۱ آمده است. بیست و پنج ترکیب شناسایی شده، ۹۹/۷۸٪ ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهد. راندمان محصول اسانس ۲/۸٪ بود. ترکیب عمده اسانس را تیمول (۳۷/۵۹٪) تشکیل می‌دهد. علاوه بر این ترکیبات اصلی دیگر عبارت بودند از کارواکرول (carvacrol) (۳۳/۶۵٪)، پاراسایمن (para cymene) (۷/۷۲٪)، گاماترپینن (gamma terpinene)

www.SID.ir

Archive of SID

(۳/۸۸٪) و بتاکاریوفیلن (beta caryophyllene) (۲/۰۶٪). از سزکوئی ترپن‌های هیدروکربنه، بتا-کاریوفیلین (۲/۰۶٪) ترکیب غالب بود. مشتقات فنیل‌پروپانوئید در مقادیر بالا (حدود ۷۳٪) در اسانس دیده شد و در مرحله بعدی منوترپن‌ها با ۱۹/۸٪ که ۵/۶۴٪ آن اکسیژنه بود. از طرف دیگر ترکیبات فنیل‌پروپانوئید و هیدروکربن‌های منوترپنه، ترکیبات اصلی بودند. گاماترپینن (۳/۸۸٪)، لینالول (linalool) (۱/۷۵٪)، آلفا ترپینئول (alpha terpineol) (۱/۲۸٪)، ۴-ترپینئول (terpineol) (۱/۱۴٪) و ۱ و ۸ سینئول (1,8 cineole) (۰/۹۸٪)، منوترپن‌های اصلی بودند.

تا آنجا که نویسندگان اطلاع دارند، ترکیبات متشکله اسانس گیاه آویشن شیرازی جمع آوری شده از منطقه فیروزآباد فارس تاکنون گزارش نشده است و نتایج مذکور، اولین گزارش راجع به ترکیبات اسانس این گیاه بومی و کمیاب می‌باشد. نکته حائز اهمیت آن است که ساختار شیمیایی اسانس هر گیاه تحت تأثیر عواملی از قبیل منطقه آب و هوایی، فصل و شرایط مطالعه می‌باشد (۱۰).

فعالیت ضدباکتریایی

مطابق نتایج ارائه شده در جدول ۲ اسانس آویشن شیرازی فعالیت ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای در مقابل هر ۸ باکتری مورد آزمایش نشان داد هر چند که روی باکتری‌های گرم منفی دارای اثر مهاری بیشتر بوده است. بخش غیرقطبی عصاره متانولی اثری مشابه اسانس داشت که احتمالاً به دلیل ترکیبات مشترک و همسان آنها می‌باشد. بخش قطبی آن بر باکتری‌های گرم مثبت تأثیر بیشتری داشت. با توجه به ساختار شیمیایی اسانس می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اثر ضدباکتریایی اسانس مربوط به ترکیبات فنولیک به خصوص کارواکول و تیمول می‌باشد که قبلاً هم گزارش شده است (۸). این مطلب می‌تواند با توجه به یافته‌های ما مبنی بر غلظت‌های بالای تیمول و کارواکول (۷۱/۲۴ V/V٪) در اسانس، تأیید شود (جدول ۱).

جدول ۱: *ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی (نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۰ وزنی- وزنی با استون رقیق شده است)*

شماره	ترکیبات	KI*	درصد نسبی ترکیبات
۱	alpha pinene	۹۳۶	۰/۸۶
۲	3-octanone	۹۸۳	۱/۶۲
۳	beta myrcene	۹۸۷	۰/۳۶
۴	3- octanol	۹۹۳	۰/۴۹
۵	delta-3-carene	۱۰۱۷	۰/۴۱
۶	para cymene	۱۰۲۶	۷/۷۲
۷	limonene	۱۰۳۱	۰/۲۴
۸	1,8 cineole	۱۰۳۵	۰/۹۸
۹	gamma terpinene	۱۰۶۰	۳/۸۸
۱۰	cis sabinene hydrate	۱۰۷۲	۰/۲۳
۱۱	linalol	۱۰۹۷	۱/۷۵
۱۲	n-nonanol	۱۱۰۱	۰/۱۵
۱۳	borneole	۱۱۷۹	۰/۲۸
۱۴	4- terpineol	۱۱۸۴	۱/۱۴
۱۵	alpha terpineol	۱۱۹۶	۱/۲۸
۱۶	decenal-z-4	۱۱۹۹	۰/۱۲
۱۷	thymol methyl ether	۱۲۳۴	۱/۳
۱۸	thymol	۱۲۸۸	۳۷/۵۹
۱۹	carvacrol	۱۲۹۷	۳۳/۶۵
۲۰	thymol acetate	۱۳۵۴	۰/۴۶
۲۱	beta caryophyllene	۱۴۲۸	۲/۰۶
۲۲	aromadendrene	۱۴۴۸	۰/۸۶
۲۳	alpha-selinene	۱۴۹۸	۰/۵۴
۲۴	caryophyllene oxide	۱۵۸۱	۰/۷۱
۲۵	apofarensol	۱۵۹۷	۰/۶۵
جمع			۹۹/۷۸

* اندیس کواتس(در مقایسه با n-alkanes)

www.SID.ir

Archive of SID

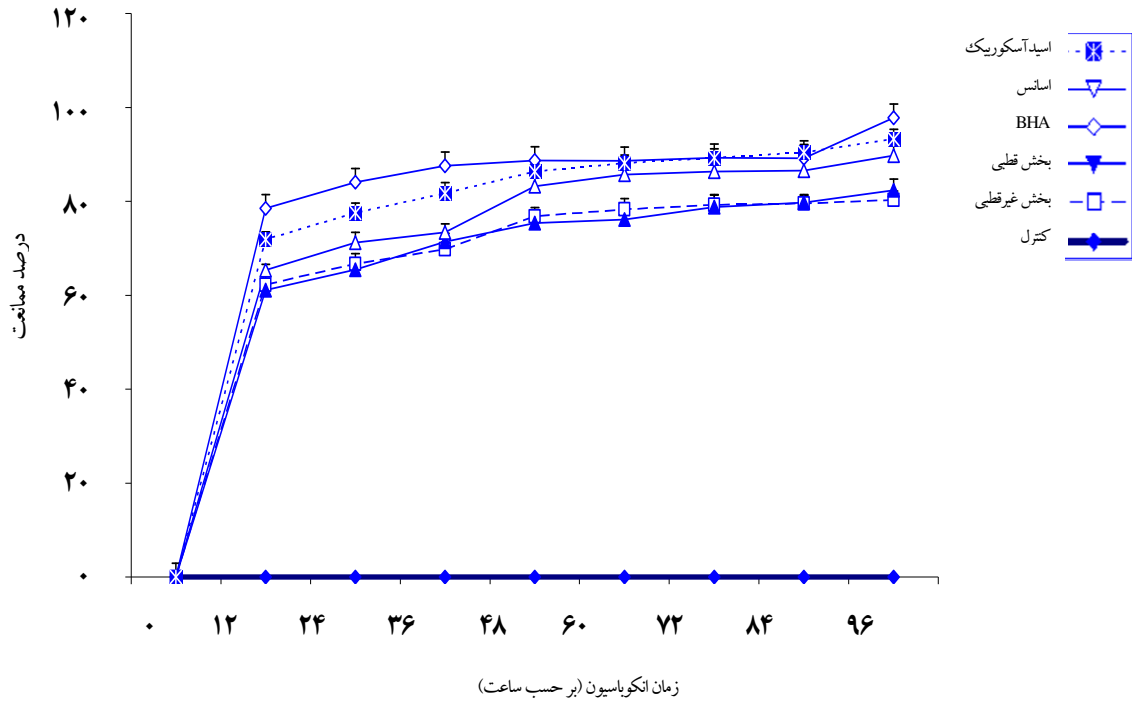
جدول ۲: فعالیت ضدباکتریایی اسانس و عصاره‌های متانولی حاصل از آویشن شیرازی

باکتری مورد آزمایش	اسانس		عصاره‌های متانولی				جنتامایسین	
			بخش غیرقطبی		بخش قطبی			
	MIC**	D*	MIC	DD	MIC	DD	MIC	DD
S. aureus	۲۱	۱۰±۱/۰	۳۸	۱۸±۱/۵	۳/۴	۱۲±۱/۲	۸	۱۶±۱/۵
E. coli	۴۲	۹±۱/۳	۵۱	۱۲±۱/۴	۶۴	۱۱±۱/۴	۱۶/۵	۱۰±۱/۲
K. pneumoniae	۳۰	۱۶±۱/۸	۳۶	۱۱±۱/۳	۴۰	۱۵±۱/۲	۱۲	۹±۱/۲
S. epidermidis	۵/۵	۱۴±۱/۵	۷	۱۲±۱/۲	۵	۱۶±۱/۴	۴	۱۸±۱/۹
E. faecalis	۳۸	۱۸±۱/۴	۴۲	۹±۱/۳	۵۶	۱۲±۱/۲	۶	۱۱±۱/۲
B. subtilis	۴۴	۱۶±۱/۸	۴۰	۱۳±۱/۶	۲/۵	۱۴±۱/۴	۱۸	۱۲±۱/۳
S. typhi	۱۵	۱۱±۱/۸	۲۰	۱۶±۱/۷	۶۲	۱۴±۱/۳	۸/۵	۸±۱/۱
S. marcescens	۵/۵	۹±۱/۳	۴	۱۰±۱/۳	۲۸	۱۳±۱/۵	۱/۲	۱۱±۱/۱
S. flexneri	۲/۴	۱۳±۱/۴	۵/۳	۱۶±۱/۴	۱۸	۱۱±۱/۸	۳	۱۲±۱/۲

نتایج حاصل سه مرتبه آزمایش است

* قطر هاله ممانعت از رشد

** حداقل غلظت ممانعت از رشد برحسب میلی گرم بر لیتر



نمودار ۱: *فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی آویشن شیرازی با استفاده از روش تیوسیانات آمونیوم*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: *فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی آویشن شیرازی*

میزان فعالیت / نمونه	DPPH (µg/ml)	آمونیوم تیوسیانات (درصد ممانعت)
اسانس	۲۲/۴±۱/۰	۸۹/۷±۲/۵
عصاره متانولی قطبی	۱۶/۲±۱/۶	۸۲/۴±۲/۳
عصاره متانولی غیر قطبی	۲۱/۷±۱/۶	۸۰/۳±۱/۹
BHA	۱۸/۲±۱/۹	۹۷/۸±۲/۹
اسید آسکوربیک	۶/۲±۰/۸	۹۳/۲±۲/۱
کنترل منفی	۰	۰

اسانس در مقایسه با عصاره متانولی اثر ضدباکتریایی قوی‌تری نشان داد. فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های قطبی می‌تواند مربوط به وجود ترکیبات متعددی از جمله فلاونوئیدها (۱۴) و ترکیبات پلی‌فنولیک با قطبیت بیشتر و یا مقاوم در برابر حرارت باشد (۳۲). علاوه بر این وجود رزمارینیک‌اسید در عصاره متانولی گیاه (۱۹) احتمالاً باعث اثرات ضدباکتریایی می‌باشد (۲۳).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

خصوصیات پاکسازی رادیکال‌های آزاد و اثرات بازدارندگی آنها بر پراکسیداسیون چربی در جدول ۳ آمده است. در سیستم آمونیوم تیوسیانات، اکسیداسیون لینولئیک‌اسید به طور مؤثری توسط اسانس، ممانعت می‌شود (۲/۵± ۹۸/۷). اجزا قطبی و غیرقطبی عصاره متانولی (۱/۹± ۸۰/۳۱ و ۲/۳۴ ± ۸۲/۴) (جدول ۳، نمودار ۱). سرعت ممانعت اسانس گیاه در حد آنتی‌اکسیدان‌های صناعی مثل BHT است (۲/۹۴ ± ۹۷/۸).

میزان فعالیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد در مورد عصاره‌ها وابسته به غلظت است و در مواردی که IC_{50} پایین‌تر باشد، اثرات حفاظتی بهتری نشان می‌دهد.

بخش قطبی قادر به کاهش رادیکال آزاد پایدار 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) و ایجاد رنگ زرد بود. DPPH با IC_{50} برابر ۱/۶۱±۱۶/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان‌دهنده فعالیتی مشابه آنتی‌اکسیدان صناعی BHT (۱/۹۴± ۱۸/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) است. به نظر می‌رسد که این فعالیت بیشتر تحت تأثیر وجود ترکیبات فنولی از قبیل فلاونوئید و اسیدهای فنولیک در بخش قطبی می‌باشد. نقش اصلی ترکیبات فنولی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد در مقالات متعدد دیگری نیزآمده است (۹،۱۷،۳۳).

در هر حال فعالیت پاکسازی رادیکال‌ها، یکی از مکانیسم‌های مختلف در طی فعالیت و ایجاد اثرات سینرژیستی است. این فعالیت در مورد اسانس و بخش غیرقطبی کمتر است (۱/۵۸ ±۲۱/۷ و۱/۰۳± ۲۲/۴۲). خصوصیات آنتی‌اکسیدانی تیمول، کارواکرول و گاما-ترپین قبلاً گزارش شده است (۲۸). بدین جهت فعالیت اسانس تا حد زیادی مربوط به وجود این ترکیبات است. به هر حال اجزاء و ترکیبات اسانس در از بین بردن و خارج کردن دی‌ان‌های (diene) کنژوگه نسبت به پاکسازی رادیکال‌های آزاد مؤثرترند. با توجه به نتایج مذکور، بخش قطبی، توانایی قابل توجهی در هر دو مورد DPPH و تعیین مقدار آمونیوم‌تیوسیانات دارد در حالی که در سایر روش‌ها اسانس و بخش غیرقطبی، قدرت ممانعت‌کنندگی بالایی دارند.

در پایان قابل ذکر است که مطالعه حاضر در مورد اثرات آنتی‌اکسیدان اسانس و عصاره‌های متانولی Zataria multiflora اولین گزارش در این مورد است. نتایج به دست آمده گویای آن هستند که عصاره‌ها و اسانس این گیاه دارای خواص آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی جالب توجهی بوده می‌توان پس از بررسی بیشتر در صنایع غذایی با اطمینان کافی از آنها استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

Summary

Antibacterial and Antioxidant Effects of the Essential Oil and Extract of Zataria *Multiflora* Boiss

Moshafi M.H., PhD.[1], Mansouri SH, PhD.[2], Sharififar F, PhD.[3], Khoshnoodi M., Pharm D.[4]

1. Associate Professor, Pharmacology Department, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran 2. Professor of Microbiology School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran 3.Assiatant Professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran 4. Pharmacist

Introduction: In this study, Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of the endemic plant, *Zataria multiflora* Boiss. have been studied.

Method: The antioxidant potential of the samples was evaluated using two separate methods of inhibition of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ammonium thiocyanate systems. Antibacterial activity was determined by using disc diffusion method.

Results: The antibacterial test results showed that the essential oil of the plant strongly inhibited the growth of all of the microorganisms studied especially the Gram-negative strains. The polar fraction of methanolic extract showed inhibitory effect on Gram-positive strains, while the non-polar fraction showed similar activity similar to the essential oil but not as strong as that. Essential oil and sub fractions of the methanolic extract were able to reduce the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with an IC_{50} of 22.4 ± 1.0 for essential oil and 21.7 ± 1.6 and 16.2 ± 1.6 μg/ml respectively for non-polar and polar fractions, which the activity of the latter is almost equal to synthetic antioxidant BHA (18.2±1.9 μg/ml). Inhibition values of linoleic oxidation were calculated to be 82.4% and 80.3% for the polar and non-polar fractions respectively. The essential oil showed more inhibitory activity (89.7 ± 2.5) that is similar to the synthetic antioxidants BHA (97.8 ± 2.9) and ascorbic acid (93.2 ± 2.1). The chemical composition of hydrodistilled essential oils of *Z. multiflora* was analyzed by GC/MS. A total of 25 compounds representing 99.78% of the oil were identified. Thymol (37.59%), carvacrol (33.65%); para cymene (7.72%), gamma terpinene (3.88%) and beta caryophyllene (2.06%) were the main components comprising 84.9% of the oil.

Conclusion: The obtained results show that the essential oil and methanolic extract of *Z. multiflora* possess antioxidant and antibacterial activities, therefore *Z. multiflora* could be used as a natural preservative ingredient in food and drug industries.

Key words: *Zataria multiflora,* antibacterial activity, antioxidant activity, Essential oil

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(1): 33-43

منابع

۱. آینه‌چی، یعقوب: فارماکوگنوزی (مفردات پزشکی). تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۴-۳۲۳

۲. زرگری، علی: گیاهان دارویی. جلد چهارم، تهران ، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۵۹.

3. Adams RP: Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Illinois, Allured Publishing Corporation, 2001; pp 19-45.

4. Akhondzadeh Basti A, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modeling of the effects *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus. LWT - Food Science and*

www.SID.ir

Archive of SID

Technology, In Press. Available online 22 Aug 2006.

5. Amanlou M, Beitollahi JM, Abdollahzadeh S, Tohidast-Ekrad Z. Miconazole gel compared with Zataria multiflora Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis. *Phytother Res* 2006; 20(11): 966-9.
6. Ashok BT, Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999; 34(3): 293–303.
7. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 2000; 14(5): 323–8.
8. Cosentino S, Tuberoso C.I.G, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E and Palmas F. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol 1999; 29(2): 130–*5.
9. Dueñas M, Hernández T., Estrella I. Assessment of *in vitro* antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. *Food Chemistry,* In press 2005.
10. Daferera DJ, Ziogas BN. Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem* 2000; 48(6): 2576–81.
11. Fazeli M, Amin GH, Ahmadian Attari M.M. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control,* In Press. Available online 18 May 2006.
12. Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S., Bailey & Scott's, Diagnostic Microbiology. 11th ed., Mosby, Inc, USA, 2002; pp 253-5.
13. Gould G.W: Homeostatic mechanisms during food preservation by combined methods. In: Barbosa-Canovas G. and Welti-Chanes J (Editors) Food preservation by moisture control. Lancaster, Techromic Publishing Co., Inc., 1995.
14. Guillen M.D., Manzanos MJ. Composition of the extract in dichloromethane of the aerial parts of a Spanish wild growing plant *Thymus vulgaris* L. *Flavour and Fragrance Journal,* 1998; 13: 259–262.
15. Hooper D: Useful plants and drugs of Iran and Iraq. Chicago, Field Museum Press, 1937; pp 379-85.
16. Hosseinzadeh H, Ramezani M, Salmani G. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 73(3): 379-85.
17. Katalinic V, Milos M, Kulisic T. and Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry,* 2006; 94: 550-557.
18. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11(2): 118–24.
19. Masude T, Isibe D, Jitoe A. and Naramati N. Antioxidant curcuminoids from rhizomes of *Curcuma zanthorrhiza*. *Phytochemistry,* 1992; 33: 3645-47.
20. McCord JM. The evolution if free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108(8): 652–9.
21. Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M, Ghannadi A, Linalol-rich essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 2000; 15(2): 119–22.
22. Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M, Ghannadi A. Volatile constituents of callus and flower-bearing tops of Zataria multiflora Boiss. (Lamiaceae). 2000; 15(6): 373-76.
23. Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M, Ghannadi A, Minaeian M. Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and *in vitro* cultures. *Fitoterapia* 2004; 75(3-4): 315-21.
24. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for

www.SID.ir

Archive of SID

antimicrobial disk susceptibility test. 6th ed. Approved Standards M2-A6, Wayne, PA. 1997.

25. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 9th International Supplement M100-S9, Wayne, PA. 1999.
26. Nychas G.J.E: Natural antimicrobials from plants. In: Gould G.W. (Editor) New methods of food preservation. London, Academic and Professional, 1995; PP 58-89.
27. Perry G, Raina Ak. Nunomura A, Wataya LM, Sayre LM, Smith MA. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(5): 831–4.
28. Ruberto G. & Baratta, MM.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry,* 2000; 69: 167–71.
29. Sahin F, GÜllÜce M, Daferera D, SÖkmen A, SÖkmen M, Polissiou M, Agar G. and Özer H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control,* 2004; 15: 549-57.
30. Shafiee A, Javidnia K.Composition of essential oil of Z.multiflora. *Planta Med* 1997; 63(4): 371-2.
31. Singh A, Singh R.K, Bhunia A.K. & Simmon J.E. Use of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. In Program listing. The 2001 IFT Annual Meeting. New Orleans, LO 2001.
32. Sokmen A, Jones B.M., Erturk M. The *in vitro* antibacterial activity of Turkish plants. *J Ethnopharmacol* 1999; 67(1): 79–86.
33. Thériault M, Caillet S, Kermasha S., Lacroix M. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry* 2006; 98: 490-501.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir