Archive of SID

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.110748.2042
جلد ۳۳، شماره ۴، صفحه ۷۰۲- ۶۸۹ (۱۳۹۶)

شناسایی ترکیب‌های شیمیایی، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی و سمّیت سلولی اسانس برگ پسته (*Pistacia vera* L. var. *Sarakhs*)

سیده فائزه تقی‌زاده[۱]، غلامحسین داوری‌نژاد[۲*]، جواد اصیلی[۳]، سید حسین نعمتی[۴] و غلامرضا کریمی[۵]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران پست الکترونیک: davarynej@um.ac.ir

۳- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد مشهد، ایران

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد مشهد، ایران

۵- استاد، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۶

چکیده

این مطالعه با هدف شناسایی ترکیب‌های شیمیایی، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و سمّیت سلولی اسانس حاصل از برگ پسته (*Pistacia vera* L. var. *Sarakhs*) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ترکیب‌های موجود در اسانس با استفاده از گاز کروماتوگرافی جرمی (GC-MS) تعیین شدند و شامل ۲۸ ترکیب بودند که ۹۸/۲۸٪ از کل ترکیب اسانس را شامل شد. بخش اعظم این ترکیب‌ها روغن‌های اسانسی هیدروکربنه (۴۸/۸٪)، سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربن (۳۵/۶۸٪) و روغن‌های اسانسی اکسیژنه (۱۱/۵٪) بودند. در بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس بر روی ۴ سویه باکتری و یک قارچ مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها حساس‌تر بودند، به‌طوری‌که MIC و MBC در مقادیر برابر برای *Staphylococcus aureus* ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری *Bacillus cereus* و قارچ *Candida albicans* ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. شاخص MIC و MBC برای باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* ۱۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس به روش سنجش میزان بازداری رادیکال‌های آزاد (DPPH)، شاخص IC50 اسانس ۰/۰۰۵±۱۹/۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. میزان اثرات آنتی‌اکسیدانی در روش FRAP ۹/۹ میلی‌مول بر گرم و درصد بازداری بتاکاروتن ۵۰/۱۴ تعیین گردید. در بررسی اثرات سمّیت سلولی اسانس به روش آلامار بلو، شاخص IC50 به روی رده سلولی MCF-7، پایین‌تر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۲/۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برای رده‌های سلولی PC3 و DU-145 به‌ترتیب ۵۲/۳۸ و ۹۸/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

واژه‌های کلیدی: پسته (*Pistacia vera* L. var. *Sarakhs*)، رده سلولی، سویه‌های میکروبی، مونوترپن.

مقدمه

گروه بزرگی از الکل‌های معطر، آلدئیدها، کتون‌ها و استرهای معطر به مقدار کم، در برخی از گونه‌های گیاهی و در قسمت‌های مختلف آنها ازجمله گل، میوه، دانه، برگ، پوست، چوب و ریشه یافت می‌شوند که از آنها به‌عنوان روغن‌های فرّار یا اسانس‌ها یاد می‌شود (Khaksa *et al.*,

www.SID.ir

Archive of SID

1996). امروزه نیاز بدن به ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی که سبب حذف یا مانع فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شوند مورد توجه قرار گرفته است. از این‌رو، گرایش به سمت بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های گیاهی بیشتر شده است. مواد آنتی‌اکسیدانی طبیعی باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما و کاهش ابتلا به بیماری‌هایی مانند سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی و عروقی و سکته‌های مغزی می‌شوند (Jalilzadeh-Amin & Maham, 2015). ازجمله مشکلاتی که حوزه سلامت با آن روبروست این است که باکتری‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا پس از مدتی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی مقاوم می‌شوند (Billerbeck *et al.*, 2007)، از این‌رو نیاز به ساخت آنتی‌بیوتیک‌های جدید پیش می‌آید (Fisher & Phillips, 2008). در بررسی اسانس‌های گیاهی، اثرات ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضد انگلی و ضد حشرات اسانس‌ها به اثبات رسیده است (Liggins & Burt, 2004). البته در استفاده از اسانس‌ها مشکلات مربوط به ایجاد مقاومت در اثر مدت زمان کاربرد آنها نیز وجود ندارد (Stefanakis *et al.*, 2013). با توجه به اهمیت مصرف فراورده‌های گیاهی، بررسی خواص دارویی گیاهان اندمیک از اهمیت زیادی برخوردار است. پسته (*Pistacia vera* var. *Sarakhs*) که متعلق به خانواده Anacardiaceae است با دارا بودن ۳۷۵۵۳ هکتار جنگل‌های حفاظت شده منطقه سرخس در خراسان رضوی، ازجمله محصولات ارگانیک و بومی ایران به‌شمار می‌رود. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیب‌ها، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و سمّیت سلولی اسانس حاصل از برگ پسته (*Pistacia vera* var. *Sarakhs*) در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی مواد گیاهی

برگ‌های درختان پسته (*Pistacia vera* var. *Sarakhs*) پس از جمع‌آوری از درختان خودرو منطقه حفاظت شده جنگل خواجه شهرستان سرخس در خراسان رضوی، برای شناسایی به هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انتقال یافتند. سپس در مکانی به دور از نور مستقیم خورشید (انبار گیاهان دارویی دانشکده داروسازی مشهد) و با تهویه مناسب خشک شدند.

استخراج اسانس

برای تهیه اسانس از برگ‌های خشک شده، از دستگاه کلونجر و روش تقطیر با آب استفاده شد. مقداری از برگ‌های خشک شده با آسیاب برقی پودر و ۳۰۰ گرم از پودر پس از توزین، درون بالن اسانس‌گیری ریخته شد و تا دو سوم حجم آن آب مقطر اضافه گردید. اسانس‌گیری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انجام شد. اسانس بدست‌آمده در ویال‌های استریل که با فویل آلومینیم پوشانده شده بود و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (Shakeri *et al.*, 2017).

تعیین دانسیته اسانس

ابتدا وزن سرنگ انسولین توسط ترازوی دیجیتال (۳ مرتبه) سنجیده شد. آنگاه مقدار ۱ میلی‌لیتر اسانس را با سرنگ انسولینی که در مرحله قبل وزن شده بود برداشته و دوباره وزن گردید (۳ مرتبه). تفاوت وزن‌ها نشان‌دهنده جرم اسانس بود. دانسیته اسانس بر حسب گرم بر میلی‌لیتر (جرم واحد حجمی) محاسبه شد.

روش شناسایی ترکیب‌های موجود در اسانس با استفاده از آنالیز گاز- کروماتوگرافی/ اسپکترومتری جرمی (GC-MS)

شناسایی و تعیین درصد ترکیب‌های موجود در اسانس استخراج شده توسط دستگاه GC-MS انجام شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی استفاده شده از نوع ۵۹۷۵ Agilent با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ µm از نوع HP -5ms بود. برنامه دمایی ستون به این صورت تنظیم گردید: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ۵ دقیقه، افزایش دما تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه در هر دقیقه، ۱۰ دقیقه توقف در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد. دمای اتاقک تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۱/۱ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتاب‌های مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه‌ای (Wiley 7n.l) انجام شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس

در این مطالعه از روش کدورت‌سنجی استفاده شده است. این روش یک روش رقیق‌سازی است. حساسیت آن نسبت به روش رقّت آگار، قابلیت تکرارپذیری و استفاده از حجم کم نمونه از مزایای مهم آن به‌شمار می‌آید (Raman *et al.*, 1995).

تهیه سوش‌های باکتری و محلول ۰/۵ مک‌فارلند

Escherichia coli (ATTC 10536) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) به‌عنوان باکتری‌های گرم منفی، *Bacillus cereus* (PTCC 1247) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737) به‌عنوان باکتری‌های گرم مثبت و قارچ *Candida albicans* مورد استفاده قرار گرفتند (IROST, IRAN). برای تهیه محلول ۰/۵ مک‌فارلند، ۰/۶ میلی‌لیتر کلرید باریم ۰/۰۴۸ مولار با ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۳۶ نرمال مخلوط شد.

تلقیح میکروبی

باکتری‌ها ۲۴ ساعت قبل و قارچ ۴۸ ساعت قبل کشت داده شدند. برای تهیه کشت تازه از کشت ذخیره میکروب‌ها استفاده شد. ابتدا لوپ را توسط حرارت استریل کرده و بعد از سرد شدن، به‌وسیله آن از کشت ذخیره برداشته و روی محیط کشت جامد (soybean casein) (لوله‌های کشت مک‌کارتنی) به صورت زیگزاگ کشیده و گرماگذاری شد. سپس لوله‌های کشت مک‌کارتنی را از انکوباتور خارج کرده، به هریک از آنها ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین افزوده شد تا سطح آن کاملاً شسته و سوسپانسیون غلیظی بدست آید. از این سوسپانسیون قطره قطره به داخل لوله‌های حاوی نرمال سالین استریل ریخته و با ورتکس کاملاً مخلوط شد تا کدورتی برابر کدورت محلول ۰/۵ مک‌فارلند بدست آید. این کدورت برابر 10^8 CFU/ml بود. چون برای آزمایش‌ها نیاز به غلظت 10^6 CFU/ml است، باید ۱ میلی‌لیتر از لوله 10^8 CFU/ml برداشته و به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل اضافه و مخلوط کرد. غلظت حاصل 10^8 CFU/ml شده که با تکرار به غلظت مطلوب می‌رسد (Flach *et al.*, 2002).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

بعد از آماده‌سازی غلظت‌های اسانس (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و سوسپانسیون میکروبی، از پلیت‌های ۲۴ خانه دارای ۴ ستون (A، B، C و D) و ۶ ردیف (۱ تا ۶) استفاده شد. محلول جنتامایسین و کتوکونازول به‌عنوان کنترل مثبت بکار رفتند. خانه‌های A، B و C به غلظت‌های مختلف اسانس اختصاص یافت. به این صورت که در ردیف ۱ از این ستون‌ها میزان ۱ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و این کار تا ردیف ۶ که در آن غلظت ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته شد پایان پذیرفت. سپس به هریک از خانه‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی 10^6 CFU/ml اضافه شد. به خانه‌های D1 و D2، ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت برای بررسی استریلیته محیط کشت اضافه گردید. خانه‌های D3 و D4 برای کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. از این‌رو در آنها ۱ میلی‌لیتر از محلول ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین و

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی مورد آزمایش اضافه شد. برای آزمایش کاندیدا محلول ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کتوکونازول جایگزین جنتامایسین گردید. کنترل منفی هم در خانه‌های D5 و D6 قرار گرفت. به آنها یک میلی‌لیتر از محیط کشت و ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. بعد از آماده‌سازی، پلیت‌هایی که به باکتری اختصاص یافتند ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت مربوط به قارچ ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت این زمان به هریک از خانه‌های پلیت‌ها مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول نمک تترازولیوم به غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید و دوباره پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Rios *et al.*, 1988). این آزمایش‌ها در سه روز مختلف تکرار شدند. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، یک پتری‌دیش بزرگ حاوی محیط کشت آگاردار جامد را به ۴ قسمت مساوی تقسیم کرده، سپس از خانه‌های پلیت ۲۴ خانه مربوط به هر میکروب که هیچ رشدی در آنها مشاهده نشده بود به‌وسیله یک لوپ استریل برداشته و به‌صورت زیگزاگ در یک قسمت از پتری‌دیش کشت داده شد. بعد از مدت زمان لازم برای انکوباسیون هر قسمتی که در آن رشدی مشاهده نشده بود، کمترین غلظت آن به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) مشخص شد.

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس

بررسی فعالیت رادیکال آزاد ۱،۱–دی فنیل–۲–پیکریل هیدرازیل (DPPH)

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط اسانس برگ پسته با روش DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت (Mensor *et al.*, 2001). بدین‌منظور ۵۰ میکرولیتر از اسانس در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ۱۵۰ میکرولیتر محلول متانولی DPPH اضافه و بشدت تکان داده شد. سپس در دمای اتاق و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و آنگاه جذب آن در طول موج ۵۱۵ نانومتر، توسط اسپکتروفتومتر UV/Vis مدل Cecil ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد. برای بلانک ۵۰ میکرولیتر متانول به محلول DPPH اضافه گردید. ویتامین C و BHT به‌عنوان کنترل مثبت بکار رفتند (Fernández-Agulló *et al.*, 2013). قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد توسط اسانس از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$\text{مهار (٪)} = (B_0 - B_1/B_0) \times ۱۰۰ \qquad \text{رابطه ۱}$$

B_0= جذب محلول کنترل منفی

B_1= جذب مخلوط واکنش

قدرت آنتی‌اکسیدانی– احیاءکنندگی فریک (FRAP)

کمپلکس فروزین– Fe^{2+} در حضور عوامل شلات‌کننده تخریب شده، در نتیجه رنگ بنفش این کمپلکس کاهش می‌یابد. با اندازه‌گیری میزان کاهش رنگ بنفش می‌توان فعالیت شلات‌کنندگی شلاتورهای موجود را تخمین زد. ۳۰۰ میلی‌مول بافر استات، ۱۰ میلی‌مول TPTZ در ۴۰ میلی‌مول اسید کلریدریک و ۲۰ میلی‌مول $FeCl_3$. 6H2O به‌عنوان استوک تهیه شدند. محلول‌های استوک به نسبت ۱۰:۱:۱ مخلوط گردیدند. محلول تهیه شده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شد. بعد از اینکه جذب بلانک توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد، اسانس به استوک FRAP اضافه گردید و جذب در صفر و ۴ دقیقه پس از انجام واکنش تعیین گردید. اختلاف بین اعداد مربوط به دو جذب و مقایسه آن با منحنی استاندارد انجام شد. سولفات آهن (II) به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (Razali *et al.*, 2012).

روش بتاکاروتن (BCB)

یک میلی‌لیتر از محلول بتاکاروتن (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر در کلروفرم) به ۲ میلی‌گرم لینولئیک اسید و ۱۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ اضافه شد. برای تهیه امولسیون A، کلروفرم در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تبخیر

www.SID.ir

Archive of SID

شد، سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه گردید و به‌مدت ۱ دقیقه در سونیکاتور در محلول حل شد. امولسیون دوم یا امولسیون B، شامل ۲۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید، ۲۰۰ میلی‌گرم توییین ۴۰ و ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه است. ۲۰۰ میکرولیتر از هریک از غلظت‌های اسانس یا BHT و Vit C به ۵ میلی‌لیتر امولسیون A در لوله‌های آزمایش اضافه شد. نمونه کنترل فاقد آنتی‌اکسیدان و شامل ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول و ۵ میلی‌لیتر امولسیون A بود. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis، از ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول و ۵ میلی‌لیتر امولسیون B استفاده شد. جذب در زمان صفر و بعد از ۱۲۰ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی (درصد مهار) نمونه‌ها طبق رابطه ۲ محاسبه شد:

رابطه ۲:

$$\text{مهار (٪)} = (A_{A(120)} - A_{C(120)})/(A_{C(0)} - A_{C(120)}) \times ۱۰۰$$

$A_{C(o)}$= جذب کنترل در زمان t =۰

A_{A120}= جذب آنتی‌اکسیدان در زمان t = ۱۲۰

هرچه قدرت ماده آنتی‌اکسیدان بیشتر باشد رنگبری بتاکاروتن کمتر است، یعنی هرچه رنگ بتاکاروتن بیشتر حفظ شود، جذب نمونه بالاتر و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است. ویتامین C و BHT نیز به‌عنوان کنترل مثبت بکار رفتند (Kulisic *et al.*, 2004).

بررسی اثرات سمّیت سلولی اسانس

کشت سلول‌ها

مطالعه رده‌های سلولی سرطانی MCF-7، DU-145 و PC3 با استفاده از روش آلامار بلو (Alamar blue®) انجام شد (Stoddart, 2011). این رده‌های سلولی به صورت چسبیده به کف فلاسک رشد می‌کنند. اگر تراکم سلولی در فلاسک به ۸۰٪ می‌رسید، سلول‌ها به فلاسک جدید انتقال داده می‌شدند. برای این کار در شرایط کاملاً اسپتیک و در زیر هود لامینار محیط کشت فلاسک تخلیه و سلول‌ها با فسفات بافر سالین (PBS) شستشو داده شد و بعد با افزودن ۲ میلی‌لیتر تریپسین و گرماگذاری کردن به مدت ۵ دقیقه از کف فلاسک جدا شدند. محتوای فلاسک به یک فالکون استریل منتقل و ۷ دقیقه در ۱۱۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. به رسوب سلولی محیط کشت جدید اضافه شد و این سوسپانسیون سلولی بین فلاسک‌های جدید با محیط کشت تازه ۱۰٪ تقسیم و در انکوباتور CO_2 قرار داده شد.

منجمد کردن و فعال کردن دوباره سلول‌ها

سازوکار عمل به این صورت است که افزودن کلیسرول یا دی متیل سولفوکسید (DMSO) به میزان ۱۰-۵٪ حجمی به محیط کشت، تراوایی غشاء را تغییر داده و اجازه می‌دهد تا هنگام سرد شدن آب به‌تدریج از سلول خارج شود (Kulkarni & Chitte, 2015). برای این کار باید سلول‌ها در مرحله رشد لگاریتمی باشند ($۱۰^۶ \times ۶-۱$ سلول در میلی‌لیتر). سلول‌های شناور از فلاسک به فالکون استریل منتقل و بعد به مدت ۷ دقیقه در ۱۱۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. بر روی پلیت سلولی محیط مخصوص انجماد (۹۰۰ میکرولیتر سرم رشد جنینی FBS و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO) به آرامی اضافه شد. بعد به یک کرایوتیوپ استریل منتقل و پس از درج مشخصات به فریزر ۸۰- سانتی‌گراد و در آخر به تانک ازت انتقال داده شد. برای فعال کردن دوباره، پس از خارج کردن نمونه‌ها از تانک ازت در دمای ۳۷ یخ‌زدایی انجام شد. قبل از باز شدن کامل یخ‌ها ۱ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰٪ به آن اضافه شد. برای حذف DMSO سلول‌ها به مدت ۷ دقیقه با دور ۱۱۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از حذف محیط کشت رویی، با محیط کشت تازه ۱۰٪ به فلاسک منتقل شدند.

جداسازی سلول‌ها و روش انجام آزمایش

پس از اینکه سلول‌ها مورفولوژی مطلوب را بدست آوردند، تعداد $۱۰^۴$ سلول برای هر چاهک به پلیت‌های ۹۶ خانه برای انجام آزمون آلامار بلو (Alamar blue®)

www.SID.ir

Archive of SID

منتقل شدند. بدین‌منظور سلول‌های چسبیده ابتدا دو بار با PBS شسته شدند، سپس ۱ میلی‌لیتر تریپسین روی سلول‌ها ریخته شد و به‌مدت ۲ تا ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای خنثی‌کردن تریپسین، محیط کشت ۱۰٪ به روی نمونه‌ها ریخته شد، سپس به مدت ۷ دقیقه با دور ۱۱۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از حذف محیط کشت رویی، پلاک سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰٪ به حالت سوسپانسیون درآمد. ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی به ۲۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلو در یک میکروتیوپ اضافه شد و با سمپلر کاملاً مخلوط و روی لام هموسایتومتر با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ شمرده شدند. به هریک از خانه‌های میکروپلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های آماده شده اسانس و محیط کشت بدون سلول و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با سلول انتقال داده شد. برای کنترل منفی، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت با سلول و همین میزان محیط کشت بدون سلول افزوده شد. برای کنترل مثبت به ۳ چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت با سلول و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۰، ۱ و ۰/۱ (میکروگرم در میلی‌لیتر) دوکسوروبیسین افزوده شد. پلیت در انکوباتور دارای ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس به میزان یک دهم حجم موجود در هر سلول یعنی ۲۰ میکرولیتر رنگ آلاماربلو برای سلول‌های متصل به پلیت اضافه و پلیت با فویل آلومینیومی پوشیده و ۱۰ دقیقه روی دستگاه شیکر و ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جذب در طول موج‌های ۶۰۰ و ۵۷۰ نانومتر با پلیت ریدر (Greiner, UK.) خوانده شد (Qiao *et al.*, 2012).

تجزیه‌وتحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزارهای JMP 8 (SAS Campus Drive, Cary, NC 27513) و Excel و Prism 5 استفاده شد. مقایسه میانگین با آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

نتایج بررسی خصوصیات فیزیکی اسانس

نتایج مربوط به درصد استحصال (درصد استحصال براساس حجم اسانس به وزن برگ محاسبه می‌شود)، رنگ اسانس و دانسیته حاصل از اندام‌های هوایی گیاه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- رنگ، درصد استحصال (v/w) و دانسیته اسانس برگ پسته (*Pistacia vera* var. *Sarakhs*)

نام گیاه	رنگ	درصد استحصال (v/w)	D
Pistacia vera var. *Sarakhs*	زرد شفاف	۰/۴۰	۰/۹۰۸

نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل اسانس برگ پسته (*Pistacia vera* var. *Sarakhs*)

تعداد ۲۸ ترکیب شناسایی شد که شامل ۹۸/۲۸٪ از کل ترکیب اسانس بود. در میان آنها لیمونن با ۸/۲٪، بتا-کاریوفیلن با ۱۰/۸۸٪، آلفا-هومولن با ۱۱/۲٪ و میرسن با ۱۱/۵٪ به‌عنوان ترکیب‌های عمده شناسایی شدند. در میان گروه‌های عمده شناسایی شده، به‌ترتیب روغن‌های اسانسی هیدروکربنه با ۴۸/۸٪، سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربن با ۳۵/۶۸٪، روغن‌های اسانسی اکسیژنه با ۱۱/۵٪، سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژنه با ۱/۹٪ و پلی‌فنل‌ها با ۰/۴٪، بیشترین ترکیب‌های موجود در اسانس بودند (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مشخصات و درصد اجزای موجود در اسانس حاصل از برگ پسته (*Pistacia vera* var. *Sarakhs*)

ردیف	ترکیب‌ها	درصد ترکیب‌ها	شاخص بازداری
۱	Tricyclene	۲/۵	۹۱۱
۲	α-Pinene	۴/۲	۹۴۲
۳	β-Pinene	۲/۸	۹۸۶
۴	Myrcene	۱۱/۵	۹۹۲
۵	Camphene	۲/۲	۱۰۰۱
۶	α-Phellandrene	۲/۸	۱۰۰۳
۷	α-Terpinene	۱/۳	۱۰۲۳
۸	Limonene	۸/۲	۱۰۳۲
۹	Isobutyl hexanoate	۰/۲	۱۱۶۲
۱۰	Terpinolene	۰/۹	۱۰/۸۸
۱۱	cis-Ocimene	۴/۱	۱۰۴۹
۱۲	Trans-Ocimene	۴/۰	۱۰۵۳
۱۳	β-Ocimene	۰/۳	۱۰۵۸
۱۴	Linalool	۰/۸	۱۱۰۶
۱۵	cis-Limonene oxide	۰/۹	۱۱۳۷
۱۶	Camphor	۰/۹	۱۱۵۳
۱۷	α-Terpineol	۳/۷	۱۱۸۰
۱۸	Citronellyl acetate	۳/۸	۱۳۶۶
۱۹	Octanol acetate	۵/۲	۱۲۱۰
۲۰	β-Caryophyllene	۱۰/۸۸	۱۴۳۲
۲۱	Guaiene	۴/۲	۱۴۳۲
۲۲	β-Humulene	۵/۲	۱۴۴۰
۲۳	α-Humulene	۱۱/۲	۱۴۵۸
۲۴	Sesquisabinene	۱/۷	۱۴۵۸
۲۵	Acoradiene	۱/۹	۱۴۷۳
۲۶	β-Curcumene	۰/۴	۱۵۰۰
۲۷	Epizonarene	۰/۶	۱۵۰۹
۲۸	Humulene epoxide II	۱/۹	۱۶۰۱
	گروه‌های اصلی		
	مونوترپن‌های هیدروکربنه		۴۸/۸
	مونوترپن‌های اکسیژنه		۱۱/۵
	سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه		۳۵/۷
	سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژنه		۱/۹
	پلی‌فنل‌ها		۰/۴
	مجموع		۹۸/۳

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC)

اسانس گیاه اثرات متفاوتی روی سویه‌های میکروبی تعیین شده (۲ باکتری گرم مثبت، دو باکتری گرم منفی و یک قارچ) از خود نشان داد. اما نکته مشترک آن حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها در پاسخ‌دهی به اسانس بود. حساس‌ترین سویه‌ها، *Staphylococcus aureus* (MIC=۱۶ و MBC میکروگرم بر میلی‌لیتر) و *Bacillus cereus* (MIC=۹۰ و MBC=۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بودند. باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری را از خود نشان دادند که این مقاومت در واقع نشان‌دهنده مقاومت آنها در برابر ترکیب‌های آب‌گریز (هیدرفوبیکی) مانند اسانس‌هاست. طبق نتایج حاصل مقادیر MIC و MBC برای سویه‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* ۱۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. مقادیر MIC و MBC برای قارچ *Candida albicans* ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل شد (جدول ۳). علاوه بر تفاوت‌هایی که دو دسته باکتری‌های گرم مثبت و منفی در ساختار غشای سلولی دارند، نحوه استحصال اسانس، حجم و مرحله رشدی تلقیح، طول مدت انکوباسیون و نوع محیط کشت بکار رفته در این تغییرات مؤثرند.

جدول ۳- نتایج اثرات ضدمیکروبی اسانس و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC)

نام میکروارگانیسم	حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (MBC) (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
Staphylococcus aureus	۱۶	۱۶
Bacillus cereus	۹۰	۹۰
Escherichia coli	۱۳۵	۱۳۵
Pseudomonas aeruginosa	۱۳۵	۱۳۵
Candida albicans	۹۰	۹۰

نتایج بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس حاصل از برگ پسته (*Pistacia vera* var. *Sarakhs*)

در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس به روش DPPH، از شاخص IC_{50} به‌منظور بیان اثرات مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد استفاده شد. بر این اساس هر چه مقدار IC_{50} کمتر باشد قدرت بازداری اسانس بیشتر بوده است. بر این اساس، شاخص IC_{50} اسانس ۰/۰۰۵ ± ۱۹/۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. این مقدار در مقایسه با شاخص IC_{50} استانداردهای BHT (۰/۰۰۵± ۷/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ویتامین C (۰/۰۱± ۶/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از سطح نسبتاً مطلوبی برخوردار بود. در شناسایی ترکیب‌های اسانس حاصل از برگ پسته (جدول ۲)، سهم روغن‌های اسانسی قابل توجه بود. البته روغن‌های اسانسی فاقد اثرات خیلی قوی آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. مقادیر پایین شاخص IC_{50} اسانس نسبت به نمونه‌های استاندارد را می‌توان بوجود مقادیر بالای روغن‌های اسانسی آن نسبت داد (Wojtunik *et al.*, 2014). نتایج خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس به روش FRAP افزایش بیش از دو برابری این اثرات را در مقایسه با استانداردهای BHT و ویتامین C نشان داد. در تعیین اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس به روش BCB، اثرات آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب در BHT، اسانس و ویتامین C بیشترین مقادیر را نشان دادند. پایین بودن درصد بازداری اسانس نسبت به BHT را می‌توان به مقادیر بسیار پایین ترکیب‌های پلی‌فنلی در اسانس نسبت داد (Dorman & Deans, 2000) (جدول ۴). قطبیت بالای ساختار ویتامین C، عامل اصلی برای پایین بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی آن در روش BCB است (Ahmadi *et al.*, 2007).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- نتایج اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس حاصل از برگ پسته (***Pistacia vera* var. *Sarakhs***)

نمونه	DPPH (IC_{50}) (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	FRAP (میلی‌مول بر گرم)	BCB (٪)
اسانس	۱۹/۰۳±۰/۰۵ a	۹/۹±۰/۰۱ a	۵۰/۱۴±۰/۰۱ b
BHT	۷/۵۵±۰/۰۵ b	۲/۳۳±۰/۰۲ c	۹۱/۳۳±۰/۰۲ a
Vit C	۶/۳۶±۰/۰۵ c	۶/۱۸±۰/۰۲ b	۲۸/۶۹ ±۰/۰۱ c

نتایج بر حسب میانگین ± SD با سه تکرار بیان شده است.

مقادیر هر ستون که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

نتایج بررسی اثرات سمّیت سلولی اسانس حاصل از برگ پسته (***Pistacia vera* var. *Sarakhs***)

نتایج نشان داد که در بررسی سمّیت غلظت‌های مختلف اسانس بر روی سلول‌های MCF-7 به‌وسیله آزمایش آلاماربلو (Alamar blue®) و پس از ۴۸ ساعت، اسانس این گیاه به روی رده سلولی MCF-7 سمّیت وابسته به غلظت دارد. بدین صورت که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ میان غلظت‌های مختلف اسانس با نمونه شاهد کنترل منفی (نمونه بدون اسانس) مشاهده شد. اما در مقایسه اثرات بین غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در بررسی مشابه مربوط به رده سلولی PC3 و DU-145 مشخص گردید که اسانس این گیاه به روی این رده‌های سلولی سمّیت وابسته به غلظت ندارد (جدول ۵).

جدول ۵- بررسی سمّیت غلظت‌های مختلف اسانس بر روی سلول‌های **MCF-7**، **PC3** و **DU-145**

	غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	درصد بقای سلولی (**MCF-7**)	درصد بقای سلولی (**PC3**)	درصد بقای سلولی (**DU-145**)
شاهد		۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰۰±۰/۰۰a
اسانس	۱۵	۶۲/۰۹±۰/۰۲e	۱۰۰±۰/۰۰a	۹۰/۷۶±۰/۰۲b
	۳۱	۸۰/۴۳±۰/۰۴c	۸۳/۱۱±۰/۰۱c	۹۰/۷±۰/۰۱b
	۶۲	۶۰/۲۲±۰/۰۲e	۸۲/۹۷±۰/۰۲c	۸۷/۳۴±۰/۰۴c
	۱۲۵	۳۱/۸۹±۰/۰۱h	۸۲/۵۵±۰/۰۱c	۸۷/۲±۰/۰۲c
	۲۵۰	۳۰/۷۷±۰/۰۱h	۸۲/۰۳±۰/۰۴c	۸۰/۴۸±۰/۰۱c
	۵۰۰	۳۰/۰۴±۰/۰۲h	۸۱/۹۸±۰/۰۱c	۷۸/۷۲±۰/۰۲d
	۰/۱	۶۰/۱۸±۰/۰۱e	۸۱/۸۴±۰/۰۱c	۹۰/۷۳±۰/۰۱b
دوکسوروبیسین	۱	۵۸/۶۹±۰/۰۴f	۸۱/۷±۰/۰۲c	۸۷/۲۱±۰/۰۲c
	۱۰	۵۴/۷۳±۰/۰۱f	۸۰/۹±۰/۰۱c	۷۸/۸±۰/۰۱d

نتایج بر حسب میانگین ± SD با سه تکرار بیان شده است.

مقادیر هر ستون که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از محاسبه IC_{50} اسانس در رده سلول‌های MCF-7، DU-145 و PC3

IC_{50} حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف MCF-7 نشان‌دهنده کاهش حیات سلول‌های سرطانی به صورت وابسته به غلظت است. این در حالیست که IC_{50} بالای حاصل از تأثیر اسانس به روی رده‌های سلولی PC3 و DU-145 حکایت از آن دارد که اسانس سمّیت چندانی در این رده‌های سلولی ایجاد نمی‌کند (جدول ۶). بنابراین به نظر می‌رسد چون DU-145 یک سلول سرطانی پروستات غیرحساس به هورمون است و MCF-7 و PC3 حساس به هورمون هستند، اثرات اسانس در سلول‌های حساس به هورمون بیشتر بوده است.

جدول ۶- IC_{50} بدست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار PRISM در رده سلول‌های MCF-7، DU-145 و PC3

رده سلولی	IC_{50} (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
MCF-7	۳۲/۲۰c
DU-145	۹۸/۷۸ a
PC3	۵۲/۳۸ b

مقادیر هر ستون که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بحث

در این مطالعه، عمده ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس، میرسن با ۱۱/۵٪، آلفا-هومولن با ۱۱/۲٪، بتا-کاریوفیلن با ۱۰/۸۸٪ و لیمونن با ۸/۲٪ بودند، که در مورد ترکیب بتا-کاریوفیلن با نتایج مطالعه Bachrouch و همکاران (۲۰۱۰) که به شناسایی ترکیب‌های اسانس برگ *Pistacia lentiscus* L. پرداخته بودند تشابه داشت، که در پژوهش آنان عمده ترکیب‌های شناسایی شده شامل ترپینن-۴-اُل با ۲۳/۳۲٪، آلفا-ترپینئول با ۷/۱۲٪ و بتا-کاریوفیلن با ۲۲/۶۲٪ بود. در پژوهشی که توسط Dragull و همکاران (۲۰۱۰) بر روی اسانس برگ پسته *Pistacia vera* var. *Kerman* انجام شد، لیمونن و آلفا-ترپینولن در صدر بودند که با نتایج ما مشابهت داشت. لیمونن با ۲۶/۲۱٪، آلفا-پینن با ۱۸/۰۷٪ و آلفا-توجن با ۹/۳۱٪ عمده‌ترین ترکیب‌های موجود در اسانس اندام‌های هوایی (شاخه) پسته (*Pistacia khinjuk*) بودند (Ezatpour *et al.*, 2015). با توجه به قرار گرفتن لیمونن در میان عمده‌ترین ترکیب‌های موجود در اسانس قسمت‌های هوایی پسته (*Pistacia khinjuk*)، می‌توان گفت که این نتایج نیز با یافته‌های ما مشابهت دارد. Tsokou و همکاران (۲۰۰۷) ۳۳ ترکیب از اسانس برگ پسته (*Pistacia vera* L.) را مشخص کردند که از میان آنها آلفا-پینن با ۳۰٪، ترپینولن با ۱۷/۶٪ و برونیل استات با ۱۱/۳٪ سهم بیشتری را به خود اختصاص دادند. عمده ترکیب‌های اسانس پوسته خارجی (Hull) پسته (*Pistacia vera* L.)، آلفا-پینن و آلفا-ترپینئول بودند (Ozel *et al.*, 2004). در بررسی ترکیب‌های اسانس پوسته خارجی (Hull) بنه (*Pistacia atlantica* subsp. *Mutica*)، آلفا-پینن با ۲۰/۸٪ در جایگاه نخست، کامفن با ۸/۴٪، بتا-میرسن با ۸/۲٪ و لیمونن با ۸٪ در جایگاه بعدی قرار داشتند (Rezaie *et al.*, 2015). اثربخشی اثرات سمّیت سلولی عصاره پوسته خارجی و مغز پسته به‌ترتیب به روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF-7 (پستان)، A549 (ریه) و HT-29 (کولون) بیشتر بود. IC50 رده سلولی MCF-7 برای عصاره پوسته خارجی و مغز پسته (*Pistacia vera* L.) به‌ترتیب ۳۱/۲ و ۴۳/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (Dahooee *et al.*, 2016). این مقادیر با IC50 ما (میکروگرم بر میلی‌لیتر IC50=۳۲/۲۰) تشابه داشت. وجود آنتوسیانین‌هایی مانند سیانیدین-۳-گالاکتوزید (Miniati, 1981) و سیانیدین-۳-گلوکوزید در مغز و پوست پسته می‌توانند دلیل

www.SID.ir

Archive of SID

خوبی بر بالا بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی در پسته باشند (Tomaino *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای که بر روی مقادیر ترکیب‌های فنلی و اثرات آنتی‌اکسیدانی برخی ارقام تجاری پسته ایران انجام شد، مقادیر فنل کل بین ۵/۳ تا ۹/۹ میلی‌گرم اکی والان گالیک اسید بر گرم وزن تر و بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی در رقم اکبری تعیین گردید (Davarynejad *et al.*, 2012). Barreca و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی پوسته خارجی پسته (Hull) پرداختند، به‌طوری‌که میزان بازداری عصاره متانولی آن ۶۵٪ و برای عصاره اتانولی ۵۶٪ تعیین شد. در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف پوست بنه پرداخته شده بود، بالاترین اثرات آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره اتانولی ۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با استاندارد آلفا-توکوفرول (۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود (Rezaie *et al.*, 2015). در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی مغز پسته شاخص IC50 ۴۶/۴۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با IC50 استاندارد BHT (۱/۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد (Kirbaslar *et al.*, 2012). Dahooee و همکاران (۲۰۱۶) تحقیقی بر روی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره پوسته خارجی و مغز پسته (*Pistacia vera* L.) انجام دادند که در آن شاخص IC50 در آزمون DPPH به‌ترتیب ۱۰/۲ و ۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با IC50 استاندارد BHT آزمون مربوط (میکروگرم بر میلی‌لیتر IC50 ۴/۹) محاسبه شد. همچنین اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مذکور در روش FRAP ۵/۳۲ و ۳/۱۸ میلی‌مول +Fe2 بر گرم عصاره پوسته خارجی و مغز پسته تعیین گردید. این نتایج با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در بررسی نتایج، علت حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی را می‌توان به اختلاف ساختار دیواره سلولی آنها نسبت داد. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت از یک لایه سلول تشکیل شده اما در گرم منفی‌ها دارای چندین لایه متصل به غشای سلولی هستند (Yao & Moellering, 1995). غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی دارای منافذی به نام پورین می‌باشد. این منافذ مجراهای پر آبی هستند که توسط پروتئین سازنده منفذ در غشاء ایجاد شده و فقط اجازه انتشار آزاد به مولکول‌های هیدروفیل را می‌دهد. بنابراین اسانس‌ها به‌دلیل خواص هیدروفوبی به‌راحتی نمی‌توانند از غشای باکتری‌های گرم منفی عبور کنند. در پژوهشی که به‌منظور ارزیابی اثرات ضدمیکروبی شاه بلوط، فندق، بادام زمینی، بادام درختی، پسته، گردو و مغز آفتاب‌گردان انجام شد، مشخص شد که شاه بلوط و پسته بیشترین اثرات را در مقابل باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت داشتند. از میان باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمایش، اثرات اسانس مغز پسته (*Pistacia vera* L.) در برابر باکتری گرم منفی *Escherichia coli* و باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* بیشتر بوده است (Kirbaslar *et al.*, 2012). این نتایج با یافته‌های این مطالعه مطابقت دارد. از این‌رو ترکیب‌هایی که مسئول این گونه اثرات در اسانس هستند ساختمان هیدروفوب داشته و اثرات مطلوب سمّیت سلولی، آن را برای انجام مطالعات بعدی در زمینه مقایسه اثرات سمّیت سلولی آن با ترکیب‌های خالص موجود در اسانس یا همان روغن‌های اسانسی و نیز جداسازی و تهیه ترکیب‌های خالص توکسیک در اولویت قرار می‌دهد. تعیین فراکسیون و بدست آوردن مهمترین ترکیب‌های اسانس و تأثیر به روی سوش‌های باکتریایی و نیز بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و سمّیت سلولی حاصل از این مطالعه می‌تواند به‌عنوان راهکارهای مهمی در جهت معرفی این گیاه به‌عنوان جایگزین برخی داروهای ضدمیکروبی و ضد سرطان باشد.

منابع مورد استفاده

- Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M., 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. Food Chemistry, 105(1): 57-64.
- Bachrouch, O., Mediouni-Ben Jemaa, J., Waness Wissem, A., Talou, T., Marzouk, B and Abderraba, M., 2010. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against ectomyelois ceratoniae zeller and ephestia kuehniella zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Products Research, 46: 242-247.
- Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D. and Bellocco, E., 2016. Evaluation of

www.SID.ir

Archive of SID

- Khaksa, G., Zolfaghari, M., Dehpour, A. and Samadian, T., 1996. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of disodium glycyrrhetinic acid hemiphthalate. Planta Medica, 62(4): 326-328.
- Kirbaslar, F.G., Türker, G., Özsoy-Günes, Z., Ünal, M., Dülger, B., Ertas, E. and Kizilkaya, B., 2012. Evaluation of Fatty Acid Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity, Mineral Composition and Calorie Values of Some Nuts and Seeds fromTurkey. Records of Natural Products, 6(4): 339-349.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M., 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry, 85(4): 633-640.
- Liggins, R.T. and Burt, H.M., 2004. Paclitaxel-loaded poly (L-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release. International Journal of Pharmaceutics, 282(1): 61-71.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C.d., Coube, C.S. and Leitão, S.G., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research, 15(2): 127-130.
- Miniati, E., 1981. Anthocyanin pigment in the pistachio nut. Fitoterapia, 52: 267-271.
- Ozel, M., Gogus, F., Hamilton, J. and Lewis, A., 2004. The essential oil of *Pistacia vera* L. at various temperatures of direct thermal desorption using comprehensive gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. Chromatographia, 60(1): 79-83.
- Qiao, Z., Koizumi, Y., Zhang, M., Natsui, M., Flores, M. J., Gao, L. and Sugiyama, T., 2012. Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 76(10): 1877-1883.
- Raman, A., Weir, U. and Bloomfield, S., 1995. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, Staph. epidermidis and Propionibacterium acnes. Letters in Applied Microbiology, 21(4): 242-245.
- Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A. F., Subramaniam, S. and Abdul-Aziz, A., 2012. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. Food Chemistry, 131(2): 441-448.
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Sharif, A., Asili, J. and Iranshahi, M., 2015. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull essential oil. Journal of Food Science and Technology, 52(10): 6784-6790.
- Rios, J., Recio, M. and Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. Journal of Ethnopharmacology, 23(2-3): 127-149.
the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L. var. Bronte) hulls. Food Chemistry, 196: 493-502.
- Billerbeck, E., Blum, H. E. and Thimme, R., 2007. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3− effector memory and de novo-generated FoxP3+ regulatory CD8+ T cells upon antigen recognition in vitro. The Journal of Immunology, 179(2): 1039-1048.
- Dahooee, F., Fatemi, S., Mandegary, A. and Sharififar, F., 2016. Iron Chelating and Antioxidant Activities and Cytotoxicity Effect of the Pistachio (*Pistachio vera* L.) hull and kernel Extracts in the A549, HT29 and MCF-7 Cancerous Cell lines. International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, 5(1): 195-201.
- Davarynejad, G., Stefanovits-Banyai, É. and Nagy, P.T., 2012. Investigation of Antioxidant Capacity and Some Bioactive Compounds of Iranian Pistachio (*Pistachio vera* L.) Cultivars. Notulae Scientia Biologicae, 4(4): 62-66.
- Dorman, H. and Deans, S., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88(2): 308-316
- Dragull, K., Beck, J.J. and Merrill, G.B., 2010. Essential oil yield and composition of *Pistacia vera* Kerman fruits, peduncles and leaves grown in California. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(4): 664-668.
- Ezatpour, B., Saedi Dezaki, E., Mahmoudvand, H., Azadpour, M. and Ezzatkhah, F., 2015. In vitro and in vivo antileishmanial effects of *Pistacia khinjuk* against Leishmania tropica and Leishmania major. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 149707: 1-6.
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M., Valentao, P., Andrade, P., González-Álvarez, J. and Pereira, J., 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. Industrial Crops and Products, 42: 126-132.
- Fisher, K. and Phillips, C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends in Food Science & Technology, 19(3): 156-164.
- Flach, A., Gregel, B., Simionatto, E., da Silva, U.F., Zanatta, N., Morel, A.F. and Alves, S.H., 2002. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. Planta medica, 68(9): 836-838.
- Kulkarni, G.A. and Chitte, R.R., 2015. Preservation of thermophilic bacterial spores using filter paper disc techniques. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, 5(4): 5(4): 1-3.
- Jalilzadeh-Amin, G. and Maham, M., 2015. The application of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in medicinal plants, inhibits castor oil-induced diarrhea in rats. Pharmaceutical Biology, 53(4): 594-599.

www.SID.ir

Archive of SID

- Shakeri, A., Akhtari, J., Soheili, V., Taghizadeh, S.F., Sahebkar, A., Shaddel, R. and Asili, J., 2017. Identification and biological activity of the volatile compounds of *Glycyrrhiza triphylla* Fisch. & CA Mey. Microbial Pathogenesis, 109: 39-44.
- Stefanakis, M.K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H.E. and Makridis, P., 2013. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus Origanum. Food Control, 34(2): 539-546.
- Stoddart, M.J., 2011. Cell viability assays: introduction. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, 1-6.
- Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C. and Saija, A., 2010. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. Biochimie, 92(9): 1115-1122.
- Tsokou, A., Georgopoulou, K., Melliou, E., Magiatis, P. and Tsitsa, E., 2007. Composition and enantiomeric analysis of the essential oil of the fruits and the leaves of *Pistacia vera* from Greece. Molecules, 12(6): 1233-1239.
- Wojtunik, K.A., Ciesla, L.M. and Waksmundzka-Hajnos, M., 2014. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(37): 9088-9094.
- Yao, J. and Moellering, R., 1995. Antimicrobial agent: Manual of Clinical Microbiology. ASM: Washington DC, 1281-1290.

www.SID.ir

Archive of SID

Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity of essential oil from *Pistacia vera* L. var. *Sarakhs* leaf

S.F. Taghizadeh[1], Gh.H. Davarynejad[2*], J. Asili[3], S.H. Nemati[4] and Gh.R. Karimi[5]

1- Ph.D. student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
E-mail: davarynej@um.ac.ir
3- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical sciences, Mashhad, Iran
4- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
5- Pharmaceutical Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: May 2017 Revised: August 2017 Accepted: August 2017

Abstract

Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity of the essential oil obtained from the leaf of *Pistacia vera* L. var. *Sarakhs* was investigated in the present study. Chemical composition of the essential oil was analyzed using Gas chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS) method. Twenty eight compounds, representing 98.28% of the total oil, were characterized. The oil was predominated by monoterpene hydrocarbons (48.8%), sesquiterpene hydrocarbons (35.68%) and oxygenated monoterpenes (11.5%). The antimicrobial activity of the essential oil was investigated against four bacterial strains and one fungus. The essential oil showed a good activity against Gram-positive bacteria particularly *Staphylococcus aureus* (minimum inhibitory concentration [MIC] and minimum bactericidal concentration [MBC] = 16 µg/ml) and *Bacillus cereus* (minimum inhibitory concentration [MIC] and minimum bactericidal concentration [MBC] = 90 µg/ml). However, Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) were resistant to the essential oil (minimum inhibitory concentration [MIC] and minimum bactericidal concentration [MBC] = 135 µg/ml). The antioxidant potential of essential oil was examined using DPPH, FRAP and β-carotene/linoleic acid (BCB) assay. The oil was considerably active in the DPPH assay (IC_{50} = 19.03 ± 0.005 µg/ml). Moreover, *in vitro* cytotoxic activity was assessed against three cancer cell lines (MCF-7, PC3 and DU-145) using Alamar blue assay, with IC_{50} value less than 32.20 µg/ml for MCF-7 cells.

Keywords: *Pistacia vera* L. var. *Sarakhs*, cell line, microbial strains, monoterpene.

www.SID.ir