Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

بررسی تنوع ترکیبات فیتوشیمیایی و اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه درمنه معطر (*Artemisia fragrans* Willd.) در فصول مختلف

مهدی یونسی حمزه‌خانلو[1*]، بیوک آقا فرمانی[2]، کاظم علیرضالو[2]، امید فتحی‌زاده[1]، محسن سبزی نوجه‌ده[1]

۱- استادیار، گروه جنگلداری و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۱۱)

چکیده

در این تحقیق تاثیر تنوع فصلی بر نوع و درصد ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس گیاه معطر درمنه برای نخستین بار در گیاه دارویی درمنه معطر *Artemisia fragrans* Willd. بررسی شد. نمونه‌های گیاهی در چهار فصل متفاوت جمع‌آوری و سپس توسط دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شدند.در ادامه اسانس فصول مختلف با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی آنالیز شدند. در مجموع ۵۰ ترکیب مختلف در ٤ نوع اسانس حاصل از فوصل مختلف شناسایی شد. اجزای اصلی اسانس در فصل‌های مختلف شامل کامفور، توجون، ۱،۸- سینئول بودند. همچنین نتایج آنالیز نشان داد که منوترپن‌ها بخش عمده ترکیبات اسانس در شهریور (۹۱/۸۷ ٪)، آذر (۹۰/۵۵ ٪)، اردیبهشت (۹۶/۳۲ ٪) و تیر (۹۵/٤ ٪) بودند. بیشترین مقدار ترکیبات فنولی (mg GAE/g ۵/٤۹) و ظرفیت آنتی اکسیدانی (۲۸/۸۹ ٪) در اسانس حاصل از شهرویور ماه مشاهده شد. اثرات ضد باکتریایی اسانس فصول مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی باکتری‌های *Escherichia coli*، *Proteus vulgaris*، *Klebsiella pneumonia*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtillus* انجام گرفت. بر اساس نتایج تحقیق، باکتری‌های گرم منفی (*E. coli*، *P. vulgaris* و *K. Pneumonia*) در برابر اسانس درمنه معطر در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *B. subtillus*) حساس‌تر بودند. نتایج این تحقیق می‌تواند در تعیین بهترین تاریخ نمونه‌برداری از این گیاه جهت مصارف دارویی و ضدباکتریایی مفید باشد.

کلید واژگان: تغییرات فصلی، درمنه، توجون، ۱-کامفور، ۱،۸- سینئول، کارواکرول

* مسئول مکاتبات: mehdiyounessi377@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

۱- مقدمه

ایمنی میکربی محصولات غذایی موضوع نگرانی اصلی مصرف کنندگان و نیز صنعت غذایی می‌باشد. روش‌های نگهداری مواد غذایی مانند سرد کردن، انجماد، تخمیر، پاستوریزاسیون و استفاده از ترکیبات ضدمیکربی سنتزی به صورت گسترده‌ای برای کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد و نیز بیماری‌زا در مواد غذایی به کار رفته است. در حال حاضر، تقاضای جایگزینی ترکیبات ضدمیکربی طبیعی جهت حصول اطمینان از ایمنی مواد غذایی رو به افزایش است. در این رابطه، اسانس‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده‌های خوراکی طبیعی توجه زیادی را جلب نموده است. علاوه بر این، اسانس‌های گیاهی از گذشته‌های دور به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی به کار می‌روند که واجد طیف وسیعی از فعالیت‌های ضدمیکربی در برابر پاتوژن‌های مواد غذایی و میکروارگانیسم‌های عامل فساد هستند [۱].

بسیاری از گیاهان مرتعی خاصیت دارویی دارند که تا کنون مطالعات زیادی روی آنها انجام نشده است. خانواده کاسنیان[1] یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی می‌باشد که بیش از ۲۸۰۰ ترکیب در مطالعات انجام گرفته روی اسانس این خانواده شناسایی شده است. درمنه گیاهی علفی است که در ایران در مناطق مختلفی می‌روید. گیاه درمنه از دوران گذشته در طب سنتی دارای اهمیت و مصارف گوناگون داشته و از آنها با نام‌های درمنه، افسنطین، یوشان، برنجاسف، قیصوم و ترخون نام برده شده است [۲]. جنس Artemisia، بیش از ٤۰۰ گونه در سرتاسر جهان دارد که یکی از مهمترین و گسترده‌ترین جنس‌های خانواده کاسنیان می‌باشد و ۳٤ گونه از این جنس در ایران یافت می‌شوند [۳ و ٤]. کشور ایران و منطقه آذربایجان یکی از خاستگاه‌های مهم این جنس می‌باشد، به طوری که در تقسیم بندی جوامع گیاهی ایران، این جنس به همراه جنس آستراگالوس یا گون پراکندگی گسترده‌ای در مراتع ایران دارد. بسیاری از گونه‌های این جنس از معروفترین گیاهان دارویی می‌باشند، به طوری که بررسی‌های مختلف وجود خواص ضدباکتریایی، ضدتب و ضدقارچی نشان داده است. همچنین گونه‌های مختلف گیاه درمنه معطر در کمک به درمان التهاب مثانه، هپاتیت، یرقان، سرماخوردگی، مالاریا و حتی تومورهای انسانی نقش دارند و نیز به عنوان حشره‌کش طبیعی علیه آفات گلخانه‌ای به کار می‌روند. علاوه بر این، برخی گونه‌های درمنه معطر از قبیل *A. Vulgaris* و *A.dracunculus* به خاطر طعم و بوی مطبوع، دارای اهمیت اقتصادی هستند که از آنها در تهیه مواد غذایی استفاده می شود [٤].

درمنه معطر با نام علمی *A. fragrans* Will گیاهی است بوته‌ای خودرو از Asteraceae که دارای برگ و گلی معطر و خاصیت دارویی است. ارتفاع این گیاه چند ساله تقریبا ٤٥ cm می‌باشد که در ابتدا برگ‌های رنگ متمایل به سفید داشته و در ادامه رشد خود کرک خود را از دست می‌دهند [۵]. تنوع ترکیبات فیتوشیمیایی در کموتایپ‌های مختلف، تحت تاثیر عواملی مانند دما، نور فرابنفش، شرایط خاک، رطوبت، تغییر فصول، روش جمع‌آوری، خشک کردن و بخش مورد استفاده نیز تغییر می‌کنند [٦ و ۷]. گزارشات قبلی نشان می‌دهد که اسانس گیاه درمنه معطر دارای ترکیبات متعددی از جمله، ۱،۸-سینئول، توجون، کامفور، کامفن، یوکالیپتو، بورنئول، بتا-کاریوفیلن، کریسانتنون و غیره می‌باشد. اغلب ترکیبات شناسایی شده در این گیاه در گروه مونوترپن‌ها، مونوترپنوئیدهای اکسیژن‌دار و سسکوئی ترپن‌ها (ساده و اکسیژندار) قرار می‌گیرند. علاوه براین مقادیر کمی از ترکیبات آلیفاتیک مانند آلکان‌ها، آلکن‌ها، اسیدها و الکل‌ها نیز در این گیاه شناسایی شده‌اند. پیشنهاد شده است که برخی از این ترکیبات مانند ۱،۸-سینئول و آلفا-پین نقش ضدباکتریایی داشته باشند. گزارش داده شده است که گیاهان جنس Artemisia دارای قابلیت بازدارندگی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارند [۸].

با توجه به این که تا کنون گزارشی مبنی بر مطالعه تاثیر تغییر فصول مختلف بر ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه درمنه معطر وجود نداشته است، هدف این بررسی تعیین میزان اسانس و ترکیبات فیتوشیمیایی در طی فصول مختلف می‌باشد تا بتوان ارتباط بین تغییرات فصلی و ترکیبات ثانویه این گیاه با اثر ضدباکتریایی پیدا کرد.

1. Asteraceae

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاه درمنه معطر در چهار تاریخ مختلف (اردیبهشت، تیر، شهریور و آذر ۱۳۹۷) از روستای حسی کندی شهرستان گرمی با مشخصات جغرافیایی و آب و هوایی زیر برداشت شدند (شکل‌های ۱ و ۲).

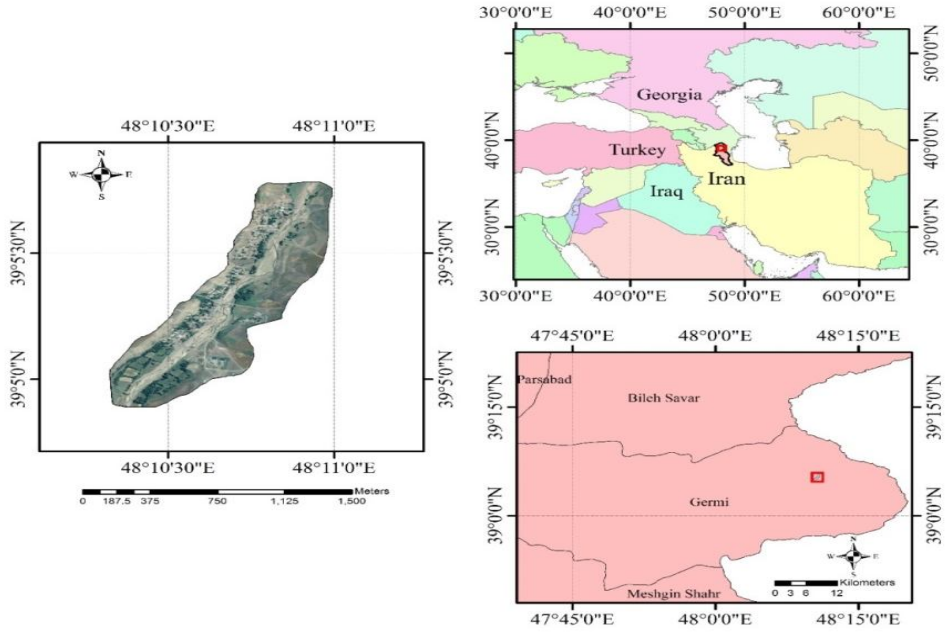

Fig 1 Study site location (red rectangle on the right-side maps and bordered dark line on the left-side map)

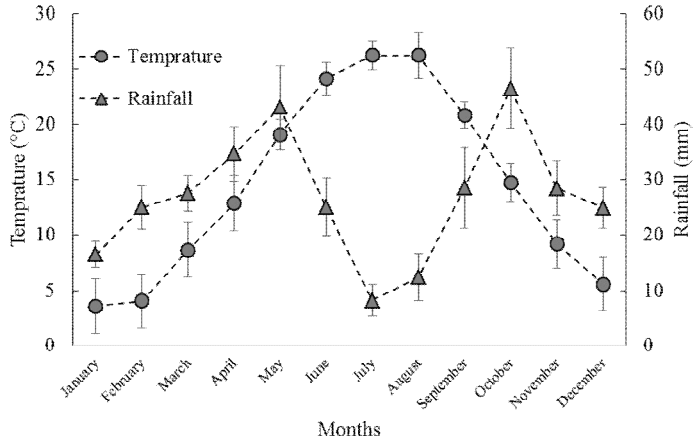

Fig 2 curve of the study site based on a long-term 13-year history (2005-2017) as recorded by Germi synoptic meteorological station

براساس آمار هواشناسی، میانگین بارندگی سالیانه ۳۲۰/۸ ±۲/۵ mm در سال که کمترین میزان آن در ماه ژولای ۸/۲ ± ۰/۲۵ mm و بیشترین میزان آن در ماه ۴۳ ± ۰/۵mm است. بر اساس نمودار آمبروترمیک دوره خشک در منطقه تقریبا از ماه ژوئن شروع و تا سپتامبر ادامه می‌یابد (شکل ۲). در میانگین دمای سالیانه ۱۴/۶ ±۱/۵°C، که گرمترین ماه سال ژولای با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

میانگین دمای ۱/۷۵°C± ۲۶/۳ و سردترین ماه سال، ژانویه با میانگین دمای ماهیانه ۰/۵°C± ۳/۶ است.

۲-۲- جمع آوری، شناسایی و استخراج اسانس

بعد از جمع آوری گیاه درمنه از رویشگاه اصلی، هویت و نام علمی آن در هرباریوم دانشکده کشاوزی مورد تایید قرار گرفت. در تاریخ‌های ذکر شده اسانس از بخش هوایی (شاخه‌های جانبی به همراه برگ‌ها) سایه خشک شده گیاه (به مدت یک هفته در دمای اتاق) به روش تقطیر با آب با سیستم کلونجر در طی به مدت h ۲ استخراج شد. اسانس اسخراج شده تا زمان آنالیز در شیشه‌های تیره دربدار غیرقابل نفوذ به هوا در °C ٤ نگهداری شد.

۲-۳- شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه درمنه معطر

پس از تهیه اسانس، آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (Agilent 7890A-5975C) انجام شد. آنالیز اسانس در دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به تزریق کننده (با حجم µl ۱ و دمای °C ۲۵۰) توسط گاز هلیوم به عنوان حامل (با نرخ ml/min ۱/۱) انجام شد. ستون کروماتوگرافی از نوع HP -5MS (۳۰m ×mm ۰/۲۵ و ضخامت فیلم µm ۰/۲۵) بود. دمای آون بعد از تزریق به مدت min ۲ در °C ۵۰ نگه داشته شد و سپس با نرخ افزایشی °C ۸ در دقیقه تا دمای °C ۲۵۰ افزایش یافت، در نهایت در دمای °C ۲۵۰ به مدت min ۲ نگه داشته شد. طیف-سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت انجام شد و دامنه جرمی بین m/z ۵۰۰-۳٤ در نظر گرفته شد. ترکیبات و درصد اسانس با استفاده ار داده‌های کتابخانه‌ای Wileey و NIST شناسایی شدند. سری‌های آلکان C8-C20 تحت شرایط مشابه با اسانس گیاه درمنه معطر در دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند تا RI مربوط به هر ترکیب محاسبه گردد.

۲-٤- اندازه‌گیری فنل کل

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنل کل اسانس از روش فولین-سیوکالتو استفاده گردید [۹].

۲-۵- تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

برای انجام این آزمون از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط اسانس درمنه استفاده شد [۱۰].

۲-٦- بررسی خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاه درمنه با روش آزمون انتشار دیسک کاغذی[۲]

برای بررسی اثرات تنوع فصلی ضدباکتریایی اسانس گیاه درمنه معطر به روش دیسک دیفیوژن با شرایط یکسان در برابر باکتریهای *K. P. vulgaris* (G-) *E. coli* (G-) *S. aureus* (G+) *B. subtilis* (G+) *pneumonia* (G-) بررسی شدند.

محیط کشت ناترینت آگار بعد از آماده‌سازی و استریل در اتوکلاو برای کشت باکتری‌ها استفاده شد. برای تهیه کشت تازه باکتری‌ها در ناترینت بروث با شرایط اینکوباسیون °C ۳۷ با سرعت rpm ۲۵۰ در طول شب استفاده گردید. از باکتری‌های تازه کشت داده شده با کمک سواپ استریل در پتری‌های حاوی محیط کشت ناترینت آگار به صورت چمنی کشت داده شدند.

در انتشار دیسک کاغذی اسانس از روش کربی بائر[۳] استفاده شد. دیسک‌های کاغذی استریل به قطر mm ۲ روی محیط‌های کشت ناترینت آگار حاوی باکتری‌های کشت داده شده قرار گرفتند. روی هر پتری سه دیسک قرار داده شد و سپس روی هر دیسک µL ۱۵ از اسانس گیاه درمنه با سمپلر استریل ریخته شد. برای جلوگیری از انتشار اسانس، دور پتری‌ها پارافیلم کشیده شد. پتری‌ها ۲٤ ساعت در °C ۳۷ انکوبه گردیدند. بعد از ۲٤ ساعت با بررسی هاله‌های اطراف دیسک‌ها، قطر هاله‌ها اندازه‌گیری شدند. با این شاخص حساسیت یا مقاومت باکتری-های مورد نظر به اسانس تعیین شدند [۱۱].

2. Paper Disc Diffusion Assay
3. Kirby Bauer

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

۲-۷- تجزیه آماری داده‌ها

اثرات اسانس حاصل از فصول مختلف بر روی هر باکتری به صورت جداگانه در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی بررسی شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSSنسخه 22 آنالیز شدند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تنوع ترکیبات فیتوشیمیایی شناسایی شده

بررسی ترکیبات فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان داد (جدول ۱) که بیشترین و کمترین مقادیر به ترتیب مربوط به ماه-های شهریور و اردیبهشت بودند.

Table 1 Effect of seasonal variation on total phenolic compounds and total antioxidant capacity of *Artemisia fragrans* Willd. (1397)

Measured parameter	Ordibehesht	Tir	Shahrivar	Azar
Total phenol (mg GAE/g)	1.97±0.11	2.24±0.09	5.29±0.17	3.95±0.12
Total antioxidant capacity (%)	10.30±0.21	11.80±0.35	28.84±0.45	21.35±0.25

برای آنالیز بهتر و دقیق‌تر اجراء تشکیل دهنده اسانس درمنه، شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با استفاده از شاخص‌های بازداری و بررسی طیف‌های جرمی ترکیبات و مقایسه آنها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه‌های کامپیوتری و مراجع معتبر صورت گرفت.

بررسی ترکیبات اسانسی درمنه معطر در فصول مختلف نشان داد که بین اجزای تشکیل دهنده اسانس و میزان آنها در ماه‌های مختلف تفاوت وجود دارد. عملکرد اسانس در شهریور ماه (فصل گلدهی) بیشتر از ماه‌های دیگر بود و کمترین میزان اسانس در آذر ماه، که مصادف با فصل رکود رشد رویشی است، به دست آمد (جدول ۲). در مجموع ۵۰ ترکیب متفاوت در اسانس درمنه معطر شناسایی شد که از بین آنها تنها ۵ ترکیب در فصول مختلف مشترک بود (جدول ۲). در بین ترکیبات شناسایی شده توجون (۴۰/۵۹٪)/ ۱،۸-سینئول (۲۱/۰۲ ٪)، توجون (۴۶/۵ ٪)، کامفور (۱۵/۹۷ ٪)، توجون (۵۲/۵۹ ٪)/۱،۸-سینئول (۱۹/۵۷ ٪)، توجون (۴۰/۷۲ ٪) و ۱،۸-سینئول (۴۳ ٪) به ترتیب ترکیبات اصلی اسانس‌های شهریور، آذر، اردیبهشت و تیر ۱۳۹۷ را تشکیل دادند. میزان کامفور از اجزای اصلی اسانس، از شهریور تا آذر ۱۳۹۷روند صعودی داشت. به طوری که مقدار آن از ۱۱/۸۹ به ۱۵/۹۷ ٪ افزایش یافته است. بیشترین (۴۳ ٪) و کمترین (۸/۰۹ ٪) میزان ۱،۸-سینئول به ترتیب در ماه‌های تیر و آذر ۱۳۹۷ به دست آمد. برخی از ترکیبات مونوترپنی مانند بتا-سیمن، ال-فلندرن، ایزوبورنیل الکل، ال-کاروون، میرتنول و پاپیریتون فقط در اسانس‌های شهریور ماه وجود داشتند و برخی از سسکوئی-ترپن‌ها مانند کوپائن، کاریوفیلن و بتا-سیکلوجرماکرن فقط در اسانس آذر بودند که نشان دهنده تنوع ترکیبات در فصول مختلف می‌باشد. نتایج بررسی نشان داد که بخش عمده اسانس فصول مختلف را مونوترپن‌های اکسیژن‌دار تشکیل می‌دهد. به طوری که این گروه فیتوشیمیایی به ترتیب ۸۶/۵۱، ۸۴/۳۸، ۹۳/۱۱ و ۸۹/۲۶٪ از اسانس ماه‌های شهریور، آذر، اردیبهشت و تیر ۱۳۹۷ را تشکیل می‌دهند. هیدروکربن‌های مونوترپنی ساده نیز به ترتیب ۵/۳۶، ۶/۱۷، ۳/۲۱ و ۶/۱۴٪ از اسانس ماه‌های شهریور، آذر، اردیبهشت و تیر ۱۳۹۷ را تشکیل می‌دادند. در بین چهار تاریخ مورد بررسی تنها دو ترکیب سسکوئی ترپنی اکسیژندار یعنی کارواکرول (۱/۱ ٪) و سیس-داوانون (۰/۹۶٪) در اسانس مربوط به شهریور ماه مشاهده شد. همچنین تولید اسانس در شهریور ماه (۱/۹ ٪) در مقایسه با سایر ماه‌های مورد بررسی بیشترین مقدار را داشت.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

Table 2 Identified phytochemical compounds in the *A. fragrans* Willd. essential oil in Shahrivar (S3), Azar (S4), Ordibehesht (S1) and Tir (S2) 1397

			Sampling dates			
Components	RI[a]	RI[b]	S_3	S_4	S_1	S_2
Alkane (ALKA)	-	-	3.64	0.67	0.59	3.79
Heptadecane	1771	1637	0.48	-	-	-
4-carene	1014	1008	0.45	0.67	0.59	3.79
Docosane	2200	2135	2.09	-	-	-
Eicosane	2050	2034	0.62	-	-	-
Ester (ES)	-	-	0.23	-	-	-
Methyl Cinnamat	1379	1400	0.23	-	-	-
Fatty acid (FA)	-	-	0.34	-	-	-
Palmitinic acid	1961	1920	0.34	-	-	-
Monoterpenes (MT)			5.36	6.17	3.21	6.14
3-carene			-	0.23	-	0.22
β-Cymene	1013	1050	1.38	-	-	-
p-Cymene	1021	1016	-	0.43	-	-
O-Cymene	1027	1017	-	-	-	2.9
Camphene	933	934	0.9	3.43	0.94	0.22
Cis - Salvene	856	836	0.2	-	-	0.3
l-Phellandrene	998	1015	0.48	-	-	-
Sabinene	971	961	0.44	1.80	-	-
Terpinolene	1093	1115	-	-	-	0.2
α -Terpinene	1014	1008	-	-	-	0.86
α - Terpinolene	1088	1090	0.78	0.26	0.38	-
α -Pinene	917	9.19	-	0.19	-	0.2
β -Phellandrene	1028	1016	0.5	-	-	0.21
β –Pinene	978	965	-	0.21	0.21	
γ -Terpinene	1060	1056	0.68	1.23	1.68	0.76
Pseudolimonene	1007	1012	-	-	-	0.27
verbenene	967	969	-	0.19	-	-
Oxygenated Monoterpenes (OMT)			86.51	84.38	93.11	89.26
1,8-Cineole	1026	1028	21.02	8.09	19.57	43
4-Terpineol	1178	1185	2.87	-	3.35	-
l -Camphor	1160	1157	11.89	15.97	3.47	1.3
cis-Jasmone	1378	1380	0.52	0.32	0.45	-
Isobornyl alcohol	1163	1173	3.48	-	-	-
l- Carvone	1279	1278	1.18	-	-	-
Myrtenal	1205	1205	-	0.19	-	1.05
Myrtenol	1215	1239	2.14		-	
Pinocarvone	1168	1171	-	0.23	-	0.43
Piperitone	1253	1253	0.97	-	-	-
p-Menth-1-en-8-ol, acetate	1155	1160	-	-	-	2.55
4-Terpinyl acetate	1367	1367	-	-	4.04	-
Sabinyl acetate	1291	1283	1.85	11.27	2.71	0.21
Thujone	1113	1115	40.59	46.50	59.52	40.72
Total monoterpenes			91.87	90.55	96.32	95.40
Sesquiterpenes (ST)			0.39	5.61	-	0.11
Germacrene-D	1453	1450	0.39	3.77	-	0.11
Copaene			-	0.34	-	-
Caryophyllene			-	0.29	-	-
β -cyclogermacrane			-	1.21	-	-
Oxygentated Sesquiterpenes (OST)			2.06	-	-	-
Carvacrol	1307	1308	1.1	-	-	-
Cis-Davanone	1592	1563	0.96	-	-	-
Total Sesquiterpenes			2.45	5.61	-	0.11
Others (OTH)			0.47	1.63	-	-
1 –Octen- 3 – ol	985	1005	0.47	-	-	-
Carvatan acetone			-	0.86	-	-
Iso-butylbenzne			-	0.77	-	-
Total				99		
Essential oil yield (%)			1.9	0.47	0.7	1.6

a. Linear retention index on HP-5MS column based on literature review
b. Linear retention index calculated by using series of n-alkanes (C8-C20) which they have been injected to the GC-MS apparatus and analyzed under the same conditions for evaluated essential oil

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

محمدی و همکاران (۲۰۱٤) نشان دادند که هیدروکربن‌های مونوترپنی (۵۳/۲۲ تا ۵۸/۲۳ ٪) بخش اصلی اسانس فصول مختلف گیاه *A. absinthium* را تشکیل می‌دهند. میزان سسکوئی ترپن‌ها نیز در بین اسانس سه مرحله رویشی مختلف متغیر بود. به طوری که بیشترین میزان آن در فصول قبل گلدهی و گلدهی (با ۱۹/٤۳ ٪) به دست آمد و کمترین میزان آن (۱۱/۸۲ ٪) مربوط به دوره بعد از گلدهی بود. میزان مونوترپن‌ها و سسکوئی ترپن‌های اکسیژندار در دوره‌های رویشی مختلف در مقابل گروه-های قبلی ناچیز بود [۱۲]. نتایج ما نشان داد که میزان مونوترپن-های اکسیژندار نسبت به مونوترپن‌های ساده و سسکوئی ترپن‌ها خیلی بیشتر می‌باشد به طوری که در دوره‌های نمونه‌برداری مختلف این گروه فیتوشیمیایی بیش از ۸۵ ٪ اسانس را تشکیل می‌داد. هرچند میزان این گروه‌های فیتوشیمیایی در فصول مختلف متغیر بود به طوری که در اردیبهشت هیچ ترکیب سسکوئی ترپنی مشاهده نشد [۱۲].

مشابه نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه‌ای روی تنوع اسانس گیاه آویشن مشخص شد که عملکرد اسانس در ماه‌های مختلف بین ۰/۱۱ تا ۰/۲۲ ٪ متغیر می‌باشد به طوری که بیشتر میزان اسانس در اکتبر و کمترین میزان آن در جولای به دست آمد [۷]. مطالعات مشابهی روی تاثیر تغییرات فصلی و رشدی روی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهان دیگر انجام گرفته است که به طور کلی نشان‌دهنده تنوع این ترکیبات طی فصول و دوره‌های رشدی مختلف می‌باشد. در مطالعه‌ای روی اسانس گیاه *Piper cernuum* مشخص گردید که میزان اسانس در فصول مختلف متفاوت می‌باشد، به طوری که این میزان در فصول زمستان، بهار، تابستان و پاییز به ترتیب برابر با ۱/٤۹، ۱/٦٦، ۲/۰۷ و ۲/۱٦ ٪ می‌باشد. در طول این فصول ۲۷ ترکیب مختلف شناسایی گردید که این ترکیبات به ترتیب ۹۸/۳، ۹۳/۲، ۹۸/٤ و ۹۲/۹ ٪ از اسانس فصول زمستان، بهار، تابستان و پاییز را توجیه می‌کردند. نتایج تحقیق نشان داد که ترکیبات اسانس در فصول مختلف تغییر می-کند [۱۳].

۳-۲- تاثیر تنوع فصلی بر خاصیت ضدباکتریایی اسانس درمنه معطر

بر عکس مطالعه حاضر، اکثرا تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر انواع میکروارگانیسم‌ها (انواع باکتری‌ها و قارچ‌های مهم در صنایع غذایی) بررسی شده و مقادیر بهینه حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی را بدست می‌آورند [۱٤]. اما در تنوع فصلی مراحل رشد و فیزیولوژی گیاه درمنه معطر مورد نظر بود تا مشخص گردد که در کدام شرایط فیزیولوزیکی و متابولیسمی، بیشترین تاثیر ضدباکتریایی را داشت. برای این هدف، مهمترین باکتری‌های مشکل‌ساز در صنایع غذایی از لحاظ بهداشتی، مسمومیت‌زایی و نشانگر انتخاب شدند و در طول مدت رشد گیاه درمنه مورد بررسی قرار گرفتند.

برای بررسی همزمان اثرات متقابل دو متغییر، استفاده از نمودار تارعنکبوتی (راداری) روش مناسبی برای مقایسه، تجزیه و تحلیل و نتیجه‌گیری توام تغییرات می‌باشد. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، میانگین قطر هاله مهار در باکتری‌های گرام مثبت و گرام منفی با هم تفاوت معنی‌داری دارند ($P<$ ۰/۰۵). به عبارت دیگر، نوع باکتری بر قطر هاله عدم رشد موثر بود. همچنین قطر هاله‌های بدست آمده از باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با قطر هاله‌های باکتری‌های گرام مثبت بزرگتر بودند. بیشترین و کمترین تاثیر اسانس درمنه معطر از لحاظ تنوع فصلی بر باکتری‌های گرام مثبت و منفی به ترتیب مربوط به فصل شهریور، فصل تیر، فصل اردیبهشت و فصل آذر بودند. تاثیر اسانس درمنه معطر بر قطر هاله مهار در جدول ۳ و شکل ۳ آورده شده است.

Table 3 Inhibitory effect of essential oils of *A. fragrans* Willd. (S1 to S4) on tested bacteria. Essential oils which have at least one common letter are not significantly different (in the level of P≤5%).

Samples	*E. coli* (G-)	*P. vulgaris* (G-)	*K. pneumonia* (G-)	*B. subtillus* (G+)	*S. aureus* (G+)
S1	20.7±0.11b	19.3±0.65c	9.7±0.65c	10.3±0.23b	7.3±0.15c
S2	28.3±0.27a	22.3±0.45b	14.0±0.54b	10.0±0.23b	12.7±0.65b
S3	32.7±0.78a	25.7±0.21a	21.0±0.42a	15.3±0.35a	20.0±0.78a
S4	7.3±0.35c	5.7±0.45d	8.0±0.13c	6.3±0.11c	8.0±0.45c

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

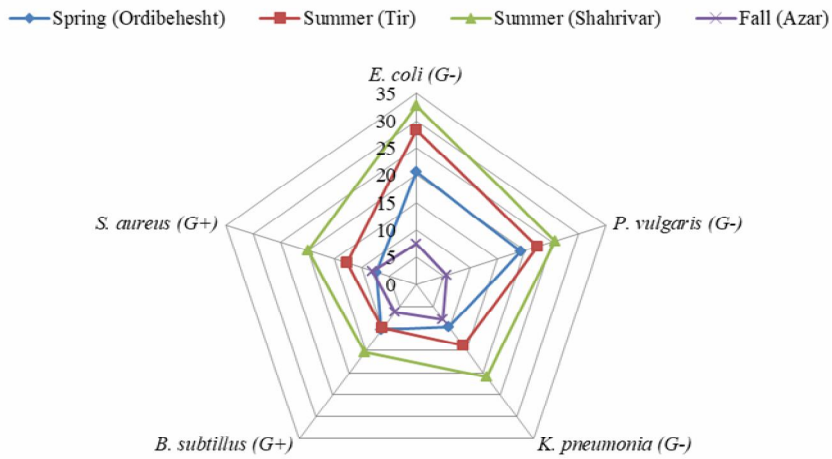

Fig 3 Effect of seasonal variation on *Artemisia fragrans* Willd. essential oil in the inhibition halo diameter of bacterial cultures

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، باکتری‌های گرم دارای منفی (*E. coli*، *P. vulgaris* و *K. pneumonia*) حساسیت بیشتری در برابر تنوع فصلی اسانس گیاه درمنه معطر نسبت به باکتری‌های گرام مثبت (*S. aureus* و *B. subtillus*) داشتند. علت حساس بودن باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت‌ها نسبت به اسانس درمنه، اختلاف ساختمان دیواره‌ی آن‌ها می‌باشد. باکتری-های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری‌های گرم منفی فقط لایه‌ی نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره آن‌ها لیپوپروتئین و لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد. تخریب دیواره سلولی منجر به نشت محتویات سلولی به بیرون و در نتیجه مرگ سلول می‌شود. ترکیبات ترپنی قادر هستند به غشای سلولی صدمه‌زده و در ساختار لیپیدی دیواره سلولی باکتری‌ها نفوذ کنند. این امر منجر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۱۵].

شکل ٤ شمای کلی مکانیسم فرضی عمل کارواکرول (یکی از اجزاء اسانس درمنه) را نشان می‌دهد. کارواکرول تفکیک نشده از میان غشای سیتوپلاسم به داخل سیتوپلاسم سلول انتشار می‌یابد. در داخل سیتوپلاسم با آزادسازی پروتون به صورت تفکیک شده در می‌آید. سپس یون پتاسیم (یا سایر یون‌ها) به کارواکرول ضمیمه می‌شوند، ترکیب حاصل از میان غشای سیتوپلاسمی به بیرون منتقل می‌گردد. در محیط بیرون با آزاد سازی یون پتاسیم، دوباره پروتون بر روی کارواکرال تثبیت می‌شود. این چرخه به طریق بین قسمت بیرونی و داخلی غشای سیتوپلاسمی تکرار شده تا هر چه بیشتر یون پتاسیم به بیرون سلول انتقال یابد [١٦].

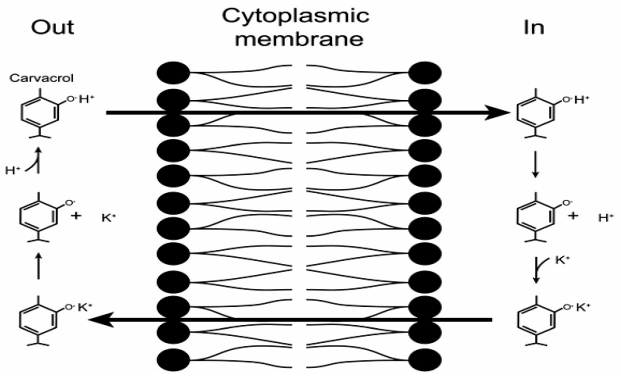

Fig 4 Schematic representation showing the hypothesis of carvacrol mechanism of action [16]

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

با بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی آنالیز شده اسانس درمنه معطر (جدول ۲)، کارواکرول فقط در اسانس آنالیزی شهریور ماه مشاهده شده است. به این دلیل اثرات ضدباکتریایی و قطر هاله مهار اسانس شهریور ماه از اسانس سایر ماه‌ها بیشتر بود. ثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها تنها ناشی از ترکیبات عمده آنها نمی‌باشد، ترکیباتی که مقادیر کمتری دارند نظیر ترپینئول و ٤-ال ترپینن هم در فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها نقش دارند. ٤-ال ترپینن به عنوان یک سری از ترکیبات، دارای خاصیت ضدباکتریایی بر علیه چندین میکروارگانیسم هستند [۱۷]. در حقیقت این امکان نیز وجود دارد که ترکیباتی با درصد کمتر احتمالا دارای اثر سینرژیستی با دیگر ترکیبات موثر و فعال باشند. خواص ضدباکتریایی گونه‌های جنس درمنه بیشتر مربوط به ماده موثره ۸،۱- سینئول، کامفور و آلفا توجون است که از اجزای اصلی در اسانس این گیاه معرفی شدند [۱۸]. بنابراین، به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر این ترکیبات، علت اصلی تاثیر ضدباکتریایی اسانس گیاه درمنه *A. fragrans* Willd. بوده باشند. رسولی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که مقدار اسانس لازم برای 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 [۱۹]. محمودی و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی بیان داشتند که خاصیت ضدمیکروبی اسانس درمنه کوهی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. همچنین اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه، اثر ضدقارچی اسانس از اثر ضد باکتریایی بیشتر و باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت مقاومتر هستند [۲۰]. محققین مختلفی اثرات متفاوت را برای اجزای درمنه ترکی گزارش نمودند. به عنوان مثال ژرانیل دارای اثر ضدباکتریایی به ویژه در مقابل سالمونلاتیفی موریوم و اثر ضدقارچی می‌باشد [۲۱].

٤- نتیجه گیری

نتایج بررسی تنوع فصلی اسانس درمنه معطر نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار تاثیر اسانس درمنه معطر در ماه‌های شهریور و آذر ماه به ترتیب مربوط به مرحله گلدهی و مرحله بعد از گلدهی (رشد رویشی ضعیف آخر فصل پاییز) بود. بررسی نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی نشان داد که از مجموع ۵۰ نوع ترکیب فیتوشیمیایی مختلف طی ماه‌های مورد بررسی، توجون عمده‌ترین ترکیب در ماه‌های شهریور، آذر، اردیبهشت و تیر را تشکیل داده‌اند. ترکیبات فیتوشیمیایی ۱،۸-سینئول، ۱-کامفور، کارواکرول و سیس-داوانون از ترکیبات اصلی شهریور ماه (دوره گلدهی)، مقدار قابل توجهی داشتند. آزمایشات بررسی تاثیر اسانس درمنه معطر در طی فصل‌های مختلف بر روی انواع باکتری‌های گرام منفی و گرام مثبت مهم از بعد صنایع غذایی نشان داد که بهترین زمان برداشت این گیاه از لحاظ بیشترین میزان اسانس، شهریور ماه می‌باشد.

٥- منابع

[1] Ponce, A., Roura, S.I. and Moreira, M.R. 2011. Essential oils as biopreservatives: different methods for the technological application in lettuce leaves. Journal of Food Science, 76 (1): 34-40.

[2] Mozaffarian, V. 1375. Culture of the Names of Iranian Plants, Contemporary cultural publication, Tehran, 750.

[3] Farghadan, M., Ghafoori, H., Vakhshiteh, F., Fazeli, S.A.S., Farzaneh, P. and Kokhaei, P. 2017. The Effect of *Artemisia fragrans* Willd: Essential Oil on Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression and Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-stimulated Murine Macrophage Cell Line. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology, 15 (6): 515-524.

[4] Shafaghat, A., Noormohammadi, Y. and Zaifizadeh, M. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oils of *Artemisia fragrans* Willd. leaves and roots from Iran. Natural product communications, 4 (2): 279-282.

[5] Mehdiyeva, N.P., Guliyev, I.S., Alizade, V.M., Alirzayeva, E.H. and Bussmann, R.W. 2017. Ethnobotany of the Caucasus–Azerbaijan. Ethnobotany of the Caucasus, pp.37-46.

[6] Gomes, A.F., Almeida, M.P., Leite, M.F., Schwaiger, S., Stuppner, H., Halabalaki, M., Amaral, J.G. and David, J.M. 2017. Seasonal

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

potential of essential oils from *Piper cernuum*. Industrial crops and products, 95: 256-263.

[14] Sardarodian, M. and Arianfar, A. 1398. Investigation of chemical compounds, antibacterial and antioxidant properties of Artemisia Khorasanica essential oil in North Khorasan Region. Journal of innovation in Sciences and Food Technology, 11 (1): 39-57.

[15] 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.

[16] Ultee, A., Bennik, M. H. J and Moezelaar, R. 2005. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen bacillus cereus. Appl. Environmental Microbiology, 68 (4): 1561-1568.

[17] Baron, J.E. and Finegold, S.M. 1990. Bailey and Scotts Diagonostic Microbiology. 8th, Toronto: The C.V. Mosby Company. 238-282.

[18] Kazemi, M., Shafizade, S. and Larijani, K. 2011. Comparison of essential oils composition of stem, leaf and flower from *Artemisia deserti* Kracsh. Journal of Applied Chemical Research, 18: 29-34.

[19] Rasooli, I., Gachkar, L., Yadegarinia, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Fakour, M. 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.

[20] 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. African Journal of Biotechnology, 8 (24): 7170-5.

[21] Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A. and Wei, C.I. 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against Salmonella typhimurium in culture medium and fish cubes. Journal of Food Science, 60 (6):1364-1368.

variation in the chemical composition of two chemotypes of Lippia alba. Food Chemistry, 273: 186-193.

[7] Lemos, M.F., Lemos, M.F., Pacheco, H.P., Guimarães, A.C., Fronza, M., Endringer, D.C. and Scherer, R. 2017. Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. Industrial crops and products, 95: 543-548.

[8] Orhan, I.E., Belhattab, R., Şenol, F.S., Gülpinar, A.R., Hoşbaş, S. and Kartal, M. 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. glandulossum and essential oil analysis of two Artemisia species. Industrial crops and products, 32 (3): 566-571.

[9] Jafari, S., Moradi, A., Salaritabar, A., Hadjiakhoondi, A. and Khanavi, M. 2010. Determination of total phenolic and flavonoid contents of *Leonurus cardiaca* L. in compare with antioxidant activity. Research Journal of Biological Sciences, 5(7): 484-487.

[10] Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G. and Özer, H. 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(7): 549-557.

[11] 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.

[12] Mohammadi, A., Sani, T.A., Ameri, A.A., Imani, M., Golmakani, E. and Kamali, H. 2015. Seasonal variation in the chemical composition, antioxidant activity, and total phenolic content of *Artemisia absinthium* essential oils. Pharmacognosy research, 7 (4): 329.

[13] Gasparetto, A., Cruz, A.B., Wagner, T.M., Bonomini, T.J., Correa, R. and Malheiros, A. 2017. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 12:15 IRST on Wednesday December 11th 2019

Study of phytochemical composition and antibacterial effects of *Artemisia fragrans* Willd. essential oil in different seasons

Younessi-Hamzekhanlu, M. [1*], Farmani, B. [2], Alirezalu, K. [2], Fathizadeh, O. [1], Sabzi nojadeh, M[1]

1. Assistant Professor, Department of Forestry and Medicinal Plants, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: 2019/06/01 Accepted:2019/11/02)

In the current study, the effect of seasonal variation on the type and percentage of phytochemical compounds of *Artemisia fragrans* Willd. essential oil was investigated. Herbal samples were collected in 4 different seasons and then their essential oils were extracted by the Clevenger type apparatus. In the following, the essential oil compositions of each season was analyzed by GC-MS apparatus. In total, 50 different compounds were identified in four sentential oil. The major components of the essential oil were camphor, thujone, and 1,8-cineole in different seasons. Also, the results showed that monotreptans were the major class of essential oil compounds in September (91.87%), December (90.55%), May (96.32%) and July (95.4%). The highest amount of phenolics (5.49 mg GAE/g) and antioxidant capacity (28.98%) were observed in essential oil of Septebmer. Antibacterial effects of the different essential oils using paper disc diffusion method were carried out on *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus,* and *Bacillus subtilus*. Based on the results of the study, gram negative bacteria (*E. coli*, *Proteus vulgaris,* and *K. pneumonia*) were more susceptible to artemisia essential oils in comparison with gram positive bacteria (*S. aureus* and *B. subtilus*). The results of this research can be useful in determining the best sampling date of this plant for pharmaceutical and antibacterial uses.

Keywords: Seasonal variation, Artemisia, Thujone, l–Camphor, 1,8-Cineole, Carvacral

*Corresponding Author E-Mail Address: mehdiyounessi377@gmail.com

www.SID.ir