

خاصیت آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی، جهش‌زایی و ضد جهش‌زایی روغن اسانس‌ی اسطوخدوس

طلوع‌اله قدری^۱، سیدلطیف موسوی‌گرگری^{۲*}، سیده‌مریم شرفی^۱، شکیبا درویش‌علی‌پورآستانه^۳، محمدباقر رضایی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴- استاد، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۲۶

دریافت مقاله: ۸۸/۱۰/۱۲

چکیده

هدف: گسترش روزافزون مصرف فرآورده‌های گیاهان دارویی در دنیا و تصور غلط عمومی از سالم و بی‌ضرر بودن آن‌ها لزوم بررسی این فرآورده‌ها را بیش از پیش می‌نماید. در این تحقیق روغن اسانس‌ی اسطوخدوس که در داخل کشور به‌صورت تجاری در داروخانه‌ها عرضه می‌شود، از دیدگاه فوق‌بررسی شده است.
مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، هماتولوژی و سیتوتوکسیسته اسانس اسطوخدوس آزمایش شد.
نتایج: نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس اسطوخدوس براساس حساس‌ترین به مقاوم‌ترین به ترتیب زیر بود:

سودوموناس آئروژینوزا > استرپتوکوکوس فکالیس > کلبسیلا نمونیا > اشرشیاکلی > استافیلوکوکوس اورئوس
خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بتا- کاروتن‌زدایی انجام و نتایج آن‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی استاندارد مقایسه شد. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به‌وسیله اسانس اسطوخدوس کمتر از قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بوتیلات هیدروکسی تولوئن و بوتیلات هیدروکسی آنیزول بود. مقدار اسانس لازم برای ۵۰ درصد رادیکال‌زدایی DPPH اسانس اسطوخدوس، ۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. فنل کل اسانس خالص اسطوخدوس ۸۵/۴۳ میکروگرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم بود. قدرت آنتی‌اکسیدانی احیای فریک در سرم خون موش‌هایی که به‌مدت یک ماه و روزانه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسانس گاوآژ شده بودند، به‌میزان ۱۶۷/۵۷ درصد افزایش نشان داد. تأثیرات درمانی نگران‌کننده در نتیجه تغذیه اسانس توسط موش‌ها در خون آن‌ها دیده شد. غلظت ۵۰ درصد کشندگی اسانس اسطوخدوس بر علیه سلول‌های هلا و خون محیطی به‌ترتیب ۲۶ و ۲۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر ارزیابی شد. درصد جهش‌زایی و ضد جهش‌زایی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر سویه‌های TA98 و TA100 باکتری سالمونلا تیغی‌موریوم در حضور و غیاب S9 تعیین شد.
نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که اسانس اسطوخدوس مورد مطالعه در این تحقیق نمی‌تواند بدون تعیین دوز مورد مصرف قرار گیرد.

کلیدواژگان: ضد میکروبی، سیتوتوکسیسته، آنتی‌اکسیدان، روغن‌های اسانس‌ی، اسطوخدوس

۱- مقدمه

روغن اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*)، روغن اسانسی به‌دست آمده از قسمت هوایی آن است که غالباً در رایحه درمانی به‌عنوان ملین و آرامبخش، ضد نفخ و مسکن استفاده می‌شود [۹]. به همین دلیل این گیاه به‌عنوان ماده ضد عفونی کننده در زخم‌ها، سوختگی‌ها، نیش حشرات و در دامپزشکی برای کشتن شپش‌ها و دیگر حیوانات انگل استفاده می‌شود. با این حال در تحقیقی گزارش شده که روغن اسطوخودوس دارای فعالیت سمیت سلولی روی پوست انسان است و ترکیبات اصلی آن لینالول (Linalol) و لینالیل استات (Linalyl acetate) است [۱۰]. در تحقیق مشابهی مشخص شده است که لینالیل استات اثر سمیت سلولی بیشتری نسبت به همه ترکیبات روغن دارد؛ در عین حال روغن اسطوخودوس دارای خصوصیات آنتی اکسیدانی است [۱۱]. با توجه به گسترش روزافزون مصرف فرآورده‌های گیاهان دارویی در دنیا و نیز با توجه به تصور غلط عمومی از سالم و بی‌ضرر بودن این فرآورده‌ها، در این تحقیق ترکیبات شیمیایی، خصوصیات سیتوتوکسیک، جهش‌زایی و ضد جهش‌زایی روغن اسانسی اسطوخودوس که در داخل کشور به‌صورت تجاری در داروخانه‌ها عرضه می‌شود، بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- اسانس اسطوخودوس

اسانس اسطوخودوس از منابع تولیدی داخل کشور (شرکت زردبند) که در داروخانه‌ها به فروش می‌رسد، تهیه شد.

۲-۲- سویه‌های میکروبی

میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه به شرح زیر بودند:

اشرش‌شیاکلی (*Escherichia coli*) (ATCC25922)،
استرپتوکوکوس فکالیس (*Streptococcus faecalis*)
(PTCC33186)، کلبسیلا پنومونیا (*Klebsiella pneumonia*)

جهان در حال آزمایش کردن یک روند «مصرف سبز» است [۱]. اگر میزان نمک در غذاها کاهش پیدا کند، این امکان وجود دارد که دیگر افزودنی‌های سالم و معطر برای غذاها مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین دامنه وسیعی برای روش‌های تهیه غذاها سالمی که دارای مواد طبیعی و سبز باشند وجود دارد. یکی از این روش‌ها استفاده از روغن‌های اسانسی به‌عنوان ترکیب ضد باکتریایی و افزودنی معطر است. به‌منظور طولانی کردن پایداری غذاها، آنتی اکسیدان‌های سنتتیک به‌عنوان مثال بوتیلات هیدروکسی تولوئن (Butylated Hydroxytoluene: BHT) و بوتیلات هیدروکسی آنیزول (Butylated Hydroxyanisole: BHA) برای فرآورده‌های صنعتی استفاده می‌شوند. این مواد می‌توانند تأثیر سرطان‌زایی داشته باشند [۲]. روغن‌های اسانسی و ترکیبات مهم آن‌ها دارای طیف وسیعی از فعالیت زیستی است که ممکن است اهمیت زیادی در زمینه‌های شیمی غذایی، فارماکولوژی و آرایشی و بهداشتی داشته باشد. فایده اصلی روغن‌های اسانسی اینست که، این روغن‌ها می‌توانند در خیلی از غذاها استفاده شوند و به‌عنوان GRAS (Generally recognized as safe) بررسی شوند [۳]. تأثیرات درون‌بدنی (In vivo) عوامل سمیت سلولی روی گونه‌های حیوانی مختلف [۴] و در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)، روی یک‌سری از رده‌های سلولی بررسی شده است [۵]. تعداد کمی از مقالات شامل اطلاعاتی در مورد سمیت نهفته (Latent toxicity) روغن‌های اسانسی مانند جهش‌زایی است. خصوصیات ضد جهش‌زایی برخی از گونه‌های گیاهی دست‌آوردی را برای درمان انسان اریه می‌دهد. استفاده از روغن‌های اسانسی همراه با تأثیرات سمی و واکنش‌های مضر سیستمیک است. روغن‌های به‌دست آمده از درمنه و زوفا می‌تواند باعث مسمومیت همراه با تشنج شود [۶]. روغن لیمو می‌تواند باعث فتوتوکسیسیته (Photoxicity) شود [۷] که به روغن‌های فرار و ترکیبات خالص آن‌ها نسبت داده می‌شود [۸].

میکروبی محتوی 10^7 میکروارگانیزم ریخته و پس از هم‌زدن در انکوباتور به مدت ۱۸-۲۴ ساعت قرار داده شد و سپس به وسیله اسپکتروفتومتر جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه MIC مشخص شد سپس از هر کدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بودند $0/1$ میلی‌لیتر روی پلیت حاوی نوترینت آگار (Nutrient agar) کشت داده شد تا MBC مشخص شود [۱۲].

۲-۵- آزمایش تأثیر حلال‌ها بر میکروارگانیزم‌های

مورد مطالعه

حلال‌های مختلف که در اسانس‌گیری یا رقیق‌سازی اسانس استفاده می‌شوند، قبلاً در غلظت‌های مختلف تهیه و تأثیر آن‌ها را روی میکروب‌های مورد مطالعه با روش‌های انتشار و رقت، آزمایش شد. متانول و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) که تأثیر ضد میکروبی نداشتند برای رقیق‌سازی استفاده شدند.

۲-۶- گروه شاهد

در کلیه مراحل آزمایش‌های از DMSO به‌عنوان شاهد مواد ضد میکروبی استفاده شد.

۲-۷- تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس

۲-۷-۱- روش بتا- کاروتن‌زدایی (B-Carotene)

Bleaching Method)

$0/1$ میلی‌گرم بتا- کاروتن به همراه 20 میلی‌گرم لینولئیک اسید (Linoleic acid) و 100 میلی‌گرم تویین 40 (Tween 40) در کلروفورم حل و به داخل ارلن جوش ریخته شد. پس از خشک شدن تبخیری، تحت خلاء و دمای 50 درجه سانتی‌گراد با روتاری، 50 میلی‌لیتر آب اکسیژن‌دار اضافه شده و با دستگاه امولسیون‌ساز، به مدت یک دقیقه

(ATCC13883)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) (ATCC 25923)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC8830)

۲-۳- روش‌های بررسی آثار ضد میکروبی

برای مطالعه آثار ضد میکروبی از دو روش انتشار (Diffusion test) و رقت (Dilution test) استفاده شد که از میان روش‌های انتشار از روش دیسک پلیت (Disk-plate method) و از میان روش‌های رقت از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. در روش انتشار از دیسک‌های بلانک به قطر 6 میلی‌متر و محیط کشت مولر هینتون آگار (Mueller hinton agar) استفاده شد که با روش استاندارد و به مقدار مناسب در پلیت‌ها تهیه شده بود. غلظت سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و بر همان اساس رقت‌های مختلف تهیه شد. بعد از کشت میکروب مورد نظر به صورت چمنی با غلظت نیم مک فارلند در سطح پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار دیسک‌های استریل تهیه شده توسط پنس استریل روی سطح پلیت آلوده به میکروب قرار داده شد و بعد از تماس کامل با محیط کشت، با فاصله مناسب از یکدیگر و از لبه پلیت با میکروپیت استریل مقدار مشخص اسانس گیاهی روی دیسک‌ها ریخته شد. بعد از انجام مراحل فوق پلیت‌ها را در داخل انکوباتور و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از 18 تا 24 ساعت، قطر مناطق عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شد [۱۲].

۲-۴- روش رقت لوله‌ای

با کمک این روش می‌توان حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal Concentration: MBC)، ماده ضد میکروبی تعیین کرد. مقدار 50 میکرولیتر اسانس با رقت‌های $1/8$ ، $1/4$ ، $1/2$ و 1 در 5 میلی‌لیتر سوسپانسیون

فعالیت رادیکال‌زدایی اسانس با فرمول زیر و براساس درصد ممانعت (DPPH (Inhibition percentage) محاسبه شد:

$$IP = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \times 100$$

شاهد در زمان ۷۰ دقیقه ($t=70$) و $A_A =$ جذب نمونه در زمان ۷۰ دقیقه ($t=70$) است.

۸-۲- تعیین فنل کل اسانس (Total phenolic Content: TPC)

فنل کل اسانس با استفاده از سنجش فولین سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu assay) انجام شد [۱۴]. ۳۰۰ میکرولیتر نمونه در لوله آزمایش ریخته و ۱/۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو با رقت ۱۰ برابر و ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷/۵ درصد وزنی/حجمی) به آن افزوده شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و سپس جذب در طیف نوری ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. گالیک اسید (Gallic acid) (۱-۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (Sigma Co.) به‌عنوان استاندارد استفاده شد (۰/۱۴۸- $y=0.111x$; $r^2=0.9998$). فنل کل معادل میلی‌گرم گالیک اسید (Gallic acid equivalent: GAE) در ۱۰۰ گرم نمونه تعیین شد.

۹-۲- تعیین قدرت احیای فریک آنتی‌اکسیدان (Ferric Reducing Antioxidative Power: FRAP) اسانس اسطوخودوس در سرم موش

این سنجش براساس روش بنزین (Benzie) و استرین (Strain) [۱۵] انجام شد. نمونه‌ها (۱۰-۴۰ میکرولیتر) با ۳ میلی‌لیتر ferric-TPTZ (Tripyridyl-s-triazine) مخلوط شد. تغییر جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر در زمان صفر و تا ۹۰ دقیقه اندازه‌گیری شد تا ثابت شد. غلظت‌های مختلف محلول (Fe(II) از $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ برای کالیبراسیون سنجش احیای FRAP اسانس اسطوخودوس در سرم موش استفاده شد.

امولسیون تهیه شد. این امولسیون، امولسیون A نامیده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر کدام از آنتی‌اکسیدان‌ها با ۵ میلی‌لیتر از امولسیون A در کووت مخلوط شد. آزمون شاهد به‌جای اسانس، آب مقطر داشت. امولسیون B مرکب از ۲۰ میلی‌گرم لینولئیک اسید، ۱۰۰ میلی‌گرم توین ۴۰ و ۵۰ میلی‌لیتر آب اکسیژن‌دار است. ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر امولسیون B اضافه شده و به‌عنوان شاهد (صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر) استفاده شد. همه نمونه‌ها فوراً با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد (زمان صفر یا $t=0$) و سپس در هر ۱۵ دقیقه تا ۱۲۰ دقیقه با طول موج ۴۷۰ نانومتر یادداشت شد. کووت‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در فواصل اندازه‌گیری‌های اسپکتروفوتومتری قرار داده شد [۱۳]. همه اندازه‌گیری‌ها سه بار تکرار شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Antioxidant Activity Coefficient: AAC) با فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$AAC = \frac{A_{A(120)} - A_{C(120)}}{A_{C(0)} - A_{C(120)}} \times 1000$$

در این فرمول $A_{A(120)} =$ جذب آنتی‌اکسیدان در زمان ۱۲۰ دقیقه ($t=120$)، $A_{C(120)} =$ جذب شاهد در زمان ۱۲۰ دقیقه ($t=120$) و $A_{C(0)} =$ جذب شاهد در زمان ۰ دقیقه ($t=0$) است.

۲-۷-۲- فعالیت رادیکال‌زدایی با آزمون DPPH (Diphenylpicryl hydrazyl)

۱۰ میکرولیتر اسانس با ۹۰۰ میکرولیتر Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار ($pH=7.4$)، ۴۰ میکرولیتر اتانول و ۵۰ میکرولیتر توین ۲۰ (۰/۵ درصد وزنی/وزنی) مخلوط شده و مخلوط فوق به یک میکرولیتر DPPH (۰/۵ میلی‌مولار) = ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) در اتانول اضافه شد. مخلوط را به شدت هم‌زده و جذب فوراً با طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. ثبت تا ۷۰ دقیقه ادامه یافت و نوسانات تا جایی‌که دیگر نوسانی دیده نشد، یادداشت شد. برای شاهد به‌جای اسانس آب مقطر و ترولوکس (Trolox) (۱ میلی‌مولار) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان پایدار استفاده شد.

۱۰-۲- تعیین سمیت حاد و تحت مزمن اسانس (Acute and Subchronic toxicity)

برای تعیین سمیت حاد، روغن‌های اسانسی با دوز ۱۰۰-۳۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به‌طریق خوراکی توسط موش‌های ویستار (Wistar rats) (*Rattus norvegicus*) (۱۰۰-۲۰۰ گرم) مصرف شد. نتایج با گروه شاهد (۳ درصد (حجمی/حجمی) تویین ۲۰ در سالیان) مقایسه شد. LD₅₀ با استفاده از نرم‌افزار Excel سنجیده شد. حیوانات به‌مدت ۱ ساعت مشاهده و سپس مشاهدات ثبت شد. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در روزهای صفر و ۳۰ برای آنالیز گلبول‌های قرمز (Red blood cells: RBCs) و گلبول‌های سفید (White blood cells: WBCs) و هماتوکریت (Hematocrit: HCT) هموگلوبین استفاده شد. برای سنجش سمیت تحت حاد ۳۰ روز پس از مصرف خوراکی اسانس توسط موش‌های ویستار پارامترهای زیر مطالعه شد: هماتولوژیک و بیوشیمی سرم (اوره، کراتینین، گلوتامیک اگزالواسیتیک ترانس‌آمیناز (Glutamic-oxaloacetic transaminase: GOT) و گلوتامیک پیروویک ترانس‌آمیناز (Glutamic-pyruvic transaminase: GPT) [۱۶].

۱۱-۲- تعیین سمیت سلولی اسانس

دو رده سلول سرطانی و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) مطالعه شدند [۱۶]. در این روش، احیای MTT به‌وسیله دی‌هیدروژناز میتوکندری‌ها به محصول آبی فرمازان (Formazan)، انجام می‌شود که نشان‌دهنده عملکرد طبیعی میتوکندری و حیات سلول است [۱۷]. پس از برداشت از فلاسک‌های کشت، سلول‌ها به تعداد 1×10^4 تا 5×10^5 (براساس برنامه کشت هر سلول سرطانی) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک انکوبه شدند. سلول‌ها برای چسبیدن ۲۴ ساعت زمان نیاز دارند و پس از آن با غلظت‌های مختلف اسانس

به‌مدت ۴۸ ساعت مواجه می‌شوند. ۲۰ میکرولیتر از ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT در سالیان بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن محیط تخلیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب شاهد (مواجه شده با ۰/۱ درصد DMSO) و نمونه‌های مواجه شده با اسانس در دستگاه قرائت‌گر الیزا (ELISA reader) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد. منحنی بقا (سلول‌های زنده) با توجه به سلول‌های انکوبه شده شاهد ترسیم شد. سمیت سلولی عبارت از غلظت ماده مانع رشد به میزان ۵۰ درصد (IC₅₀) است. همه آزمون‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شدند.

۱۲-۲- تعیین خاصیت جهش‌زایی یا ضد

جهش‌زایی

آزمون آمس (Ames) با استفاده از سویه‌های TA100، TA98 باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم (*Salmonella typhimurium*) و بدون پری‌انکوباسیون انجام شد [۱۸]. در این روش کشت‌های باکتریایی با مواد مورد آزمایش در حضور و غیاب سیستم فعال‌کننده متابولیکی مواجهه داده شدند. سویه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم با انکوباسیون روی محیط آمپی‌سیلین (Ampicillin) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت فعال شد. غلظت‌های مختلف اسانس تهیه شد. شاهد مثبت عبارت بود از: ۲- نیتروفلورن (2-nitrofluorene) به میزان ۲ میکروگرم در هر پلیت برای TA98 بدون S9 و ۲- آمینوآنتراسین (2-aminoanthracene) به میزان یک میکروگرم در هر پلیت برای TA98 و TA100 با S9 و سدیم آزید (Sodium Azide) به میزان یک میکروگرم در هر پلیت برای TA100 بدون S9. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۸ ساعته باکتریایی، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط S9 یا بافر فسفات ۰/۱

تزریق شد. بدین ترتیب دو نوع سیتوکروم (سیتوکروم p-450 و سیتوکروم p-448) با این دو ماده شیمیایی در بدن موش‌ها فعال شد. موش‌ها بعد از ۵ روز کشته شده و بلافاصله کبد آن‌ها در شرایط بدون آلودگی (Aseptic) جدا و پس از یکنواخت نمودن مایع رویی کبدی [liver supernatant (S9)] حاصل از سانتریفوژ $9000 \times g$ در مقادیر ۱ میلی‌لیتری تقسیم‌بندی و در دمای $-80^\circ C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مراحل در $4^\circ C$ درجه سانتی‌گراد با محلول‌ها و شیشه‌آلات استریل و سرد انجام شد. مخلوط S9 درست قبل از استفاده با مخلوط کردن مواد زیر (روی یخ) تهیه شد: ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار)، ۱۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱۰۰ میکرولیتر KCl (۰/۳۳ مولار)، ۸۰ میکرولیتر $MgCl_2$ (۰/۱ مولار)، ۱۰۰ میکرولیتر اجزای S9، ۵۰ میکرولیتر گلوکز ۶-فسفات (۰/۱ مولار)، و ۴۰ میکرولیتر NADP.

۲-۱۴- سنجش خاصیت جهش‌زایی و ضد

جهش‌زایی اسانس

برای اطمینان از عدم تأثیر خاصیت کشندگی اسانس‌ها، محدوده بالای رقت مانع رشد اسانس استفاده شد. در همه آزمایش‌ها محدوده بالای رقت مانع رشد اسانس‌ها یا بالاترین غلظت کشنده نبودن اسانس یا پایین‌ترین غلظت سمی اسانس‌ها بوده که قبلاً در آزمایش تعیین سمیت اسانس‌ها مشخص شده بود. غلظت‌های مختلف اسانس‌ها به‌صورت سریالی با DMSO تهیه شد. شاهد‌های مثبت برای سویه TA100 بدون S9 و با S9 به‌ترتیب سدیم آزید و ۲-آمینوآنتراسین به مقدار ۱ میکروگرم در هر پلیت بود. شاهد‌های مثبت برای سویه TA98 بدون S9 و با S9 به‌ترتیب ۲-نیتروفلورن (۱/۵ میکروگرم در هر پلیت) و ۲-آمینوآنتراسین (۰/۵ میکروگرم در هر پلیت) بود. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازه ۱۲ ساعته، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف ماده مورد آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط S9 یا بافر فسفات ۰/۱ مولار به ۲ میلی‌لیتر آگار رویی (Top agar) محتوی ۱۰ درصد هیستیدین/بیوتین (۰/۵ میلی‌مولار) اضافه

مولار (برای شاهد) به ۲ میلی‌لیتر آگار رویی محتوی ۱۰ درصد هیستیدین/بیوتین (۰/۵ میلی‌مولار) اضافه شد. کلونی‌های برگشت‌پذیر مستقل از هیستیدین و سلول‌های زنده روی پلیت‌ها پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد شمارش شدند.

۲-۱۳- تعیین خاصیت جهش‌زایی اسانس

۲-۱۳-۱- آزمایش تعیین سمیت اسانس (Toxicity test)

قبل از انجام این آزمایش لازم است از خاصیت سمیت اسانس‌ها اطلاع دقیقی حاصل شود. زیرا در صورت کشنده بودن (فعالیت ضد میکروبی) اسانس‌ها نتایج غلطی به‌دست خواهد آمد و نتیجه‌گیری را با مشکل مواجه خواهد کرد. نمونه‌ها با ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت ۱۰ ساعته میکروارگانیسم با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر، ۰/۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و در خصوص شاهد ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با $pH=7/4$ و ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط S9 یا بافر فسفات (برای شاهد) تهیه شد. رقت‌های سریالی با بافر فسفات تهیه و ۱ میلی‌لیتر آن با ۱۲ میلی‌لیتر نوترینت آگار مخلوط شد. خاصیت سمیت زمانی معین می‌شود که تعداد کلونی‌های پلیت‌های واجد اسانس از تعداد کلونی‌های پلیت‌های فاقد اسانس کمتر باشد.

۲-۱۳-۲- تهیه اجزای S9 کبد

اجزای سیتوسولیک کبدی (Liver cytosolic fractions) از موش‌های نر جوان و بالغ اسپاراگو داوولی (Sprague Dawley rats) تهیه شد. موش‌ها به‌مدت ۵ روز متوالی از طریق درون صفاقی (Intraperitoneal: ip) به میزان ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روز اول و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روزهای ۲-۵، سدیم فنوباریتال (Sodium phenobarbital) دریافت کردند. در روز سوم نیز یک دوز ۵، ۶، بی-نافتوفلاون (5,6,b-naphthoflavone) معادل ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم

ممانعت از جهش (خاصیت ضد جهش‌زایی) با فرمول $[(T/M) \times 100] - 100$ محاسبه شد که در این فرمول $T =$ تعداد کلونی‌های برگشت‌پذیر در حضور جهش‌زا و $M =$ تعداد کلونی‌های برگشت‌پذیر در حضور جهش‌زا بدون اسانس است. تعداد کلونی‌هایی که خود به‌خودی رشد کرده بودند از صورت و مخرج فرمول فوق کسر می‌شود. ۲۵ تا ۴۰ درصد خاصیت متوسط، ۴۰ درصد و بیشتر خاصیت قوی و کمتر از ۲۵ درصد به معنای عدم خاصیت جهش‌زایی/ضد جهش‌زایی تعریف می‌شود [۱۹، ۲۰].

۳- نتایج

نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس اسطوخدوس براساس حساس‌ترین به مقاوم‌ترین به ترتیب زیر بود (جدول ۱).

سودوموناس آئروژیناز > استرپتوکوکوس فکالیس > کلبسیلا پنومونیا > اشرشیاکلی > استافیلوکوکوس اورئوس

شد. کلونی‌های غیروابسته به هیستیدین و سلول‌های زنده پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد شمارش شد. تعیین خاصیت ضد جهش‌زایی به اختصار به این شرح انجام شد: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازه ۱۲ ساعته، ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف ماده مورد آزمایش، ۵۰ میکرولیتر جهش‌زای استاندارد، ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط S9 یا بافر فسفات ۰/۱ مولار به ۲ میلی‌لیتر آگار رویی محتوی ۱۰ درصد هیستیدین/بیوتین (۰/۵ میلی‌مولار) اضافه شد. لوله‌ها به آرامی هم زده (Vortex) شده و روی پلیت‌های گلوکز مینیمال آگار (Glucose minimal agar) ریخته شدند. کلونی‌های غیروابسته به هیستیدین و سلول‌های زنده پس از ۷۲ ساعت قرار داشتن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شمارش شد. تعداد کلونی‌های برگشت‌پذیر در پلیت‌های شاهد مثبت دارای جهش‌زا به‌عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. درصد جهش (خاصیت جهش‌زایی) با فرمول $[(T/M) \times 100]$ و درصد

جدول ۱ تأثیر ضد میکروبی اسانس اسطوخدوس براساس ایجاد هاله عدم رشد

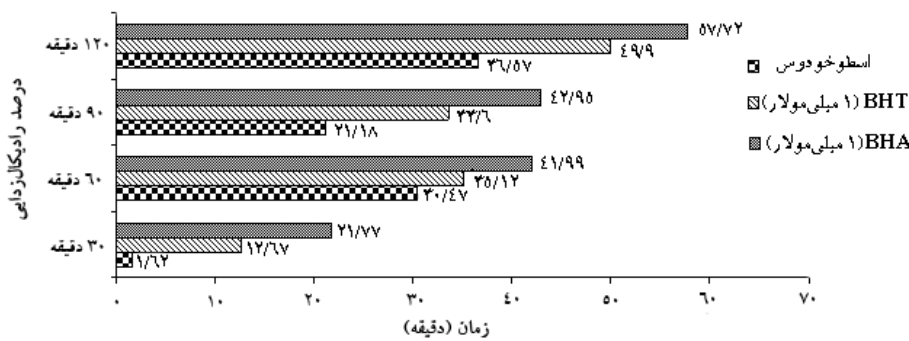
نام ارگانیسم	میانگین هاله ممانعت رشد (میلی‌لیتر)	MIC (میکرولیتر اسانس در میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی)	MBC (میکرولیتر اسانس در میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی)
اشرشیاکلی	۲۴/۵۰±۰/۵۸	۵	۱۰
استرپتوکوکوس فکالیس	۱۵/۷۵±۰/۹۶	۲/۵	۵
کلبسیلا پنومونیا	۱۷/۲۵±۰/۹۶	۲/۵	۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۶/۵۰±۲/۰۸	۱/۲۵	۲/۵
سودوموناس آئروژیناز	۱۲/۲۵±۰/۹۶	۲/۵	۵

سنتتیک BHT و BHA بود. مقدار اسانس لازم برای ۵۰ درصد رادیکال‌زدایی DPPH اسانس اسطوخدوس، ۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۲). پس از ترسیم نمودار استاندارد فنل براساس میکروگرم گالیک اسید، محتوای فنلی و ظرفیت DPPH زدایی برای اسانس مشخص و سپس نسبت بین محتوای فنلی و ظرفیت DPPH زدایی تعیین شد. فنل کل

اسانس خاصیت کشندگی و مهارکنندگی میکروبی خوبی به‌جز در خصوص سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بتا-کاروتن‌زدایی نیز انجام و نتایج مقایسه‌ای آن‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک استاندارد در نمودار ۱ نشان داده شده است. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به‌وسیله اسانس اسطوخدوس کمتر از قدرت آنتی‌اکسیدان‌های

۵۰ درصد کشندگی (IC_{50}) اسانس اسطوخودوس علیه سلول‌های هلا (Hela) و خون محیطی به ترتیب ۲۶ و ۲۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر ارزیابی شد (جدول ۵). درصد جهش‌زایی و ضد جهش‌زایی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر سویه‌های TA98 و TA100 باکتری سالمونلا تی‌فی‌موریوم در حضور و غیاب S9 تعیین شد (جدول ۶).

اسانس خالص اسطوخودوس، ۸۵/۴۳ میکروگرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم بود (جدول ۳). FRAP در سرم خون موش‌هایی که به مدت یک ماه و روزانه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسانس، گاواژ (Gavage) شده بودند، به میزان ۱۶۷/۵۷ درصد افزایش نشان داد (جدول ۳). تأثیرات درمانی در نتیجه تغذیه اسانس توسط موش‌ها در خون آن‌ها دیده شد (جدول ۴). غلظت



نمودار ۱ مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اسطوخودوس با آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد با روش بتا-کاروتین

جدول ۲ محتوای فنلی معادل گالیک اسید و تعیین قدرت رادیکال‌زدایی (درصد) و غلظت ۵۰ درصد رادیکال‌زدایی (IC_{50}) اسطوخودوس در آزمایش DPPH و مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد

مقدار اسانس (میکروگرم)	درصد ممانعت DPPH	معادل میکروگرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم نمونه	نسبت محتوای گالیک اسید به قدرت آنتی‌اکسیدانی	IC_{50} (میکروگرم)
۱۰ میکروگرم	۱۳/۵۸±۰/۰۵	۸۵/۴۳±۱/۵۳	۶/۳	۵۶
۵ میکروگرم	۸/۶۷±۰/۴۱	۳۷/۴۳±۰/۵۸	۴/۳	-
۲/۵ میکروگرم	۷/۸۲±۰/۲۵	۱۳/۴۳±۱/۱۵	۱/۷	-
۱ میلی‌مولار BHT	۱۲/۶۶	-	-	-
۱ میلی‌مولار BHA	۱۸/۱۲	-	-	-
ترولوکس ۱ میلی‌مولار	۹۹/۶۴	-	-	-

جدول ۳ قدرت احیای FRAP اسانس اسطوخودوس در سرم موش

اسانس خالص اسطوخودوس	معادل $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (میکروگرم در میلی‌لیتر)	نسبت اسانس به شاهد (درصد)
شاهد	۲۲۶/۲۵±۵/۸	۱۰۰
اسانس خالص اسطوخودوس	۳۷۹/۱۳±۳/۱۱	۱۶۷/۵۷

جدول ۴ نتایج هماتولوژیک و شیمی بالینی نمونه‌های سرم خون موش‌هایی که به مدت یک ماه اسانس اسطوخودوس ۱۰۰ میکرولیتر در روز مصرف کردند.

ارزش P	درصد تغییر	آزمون	شاهد	پارامترها
۰/۰۰۴۷	۱۰۶/۴۳	۱۵۸/۳۳±۵/۷۷	۱۴۲/۵۰±۲/۸۹	وزن ابتدایی بدن (گرم)
۰/۰۰۱۷	۱۴۲/۸۶	۲۰۸/۳۳±۱۶/۰۷	۱۵۷/۵۰±۵	وزن نهایی بدن (گرم)
۰/۰۰۴۷	۳۷/۶۱	۱۳۱/۵۴±۸/۲۱	۱۱۰/۵۳±۲/۹۲	وزن افزوده (درصد)
۰/۰۷۲۷	۸۳/۱۰	۶۷۴±۱/۸۶	۸/۸۱±۰/۲۷	RBC (×۱۰ ^۶ در هر لیتر)
۰/۵۴۱۰	۸۶/۵۲	۸۶۰۰±۲۳۸۹/۵۶	۹۴۰۰±۶۶۸/۳۳	کسل WBC و تعداد لکوسیت‌های افتراقی (×۱۰ ^۳) در هر میکرولیتر
۰/۰۱۹۲	۷۸/۳۶	۱۲/۶۰±۱/۹۵	۱۵/۸۳±۰/۱۷	غلظت هموگلوبین (HGB) (گرم در هر دسی لیتر)
۰/۰۰۴۳	۷۶/۳۹	۳۵/۶۳±۵	۴۸/۱۸±۱/۳۱	HCT (درصد)
۰/۱۷۸۸	۸۱/۹۰	۱۹۹۰۰±۴۸۲/۱۸	۲۳۸۵۰±۱۶۵۸۳/۱۲	تعداد پلاکت (PLT) (×۱۰ ^۳) در هر میکرولیتر
۰/۰۰۳۶	۸۹/۹۰	۱۰/۱۳±۰/۳۱	۱۳/۱۳±۰/۸۸	RDW (درصد)
۰/۸۳۰۴	۹۶/۷۶	۷/۳۳±۰/۵۹	۸/۲۰±۰/۳۹	میانگین حجم پلاکت (MPV)
۰/۸۴۶۳	۹۹/۱۵	۵۴/۳۰±۳/۶۴	۵۴/۷۰±۱/۴۶	میانگین حجم گویچه‌ای (MCV) (فمتولیتر)
۰/۲۱۴۲	۱۰۱/۵۵	۱۹/۲۳±۱/۲۵	۱۸/۲۵±۰/۵۷	میانگین هموگلوبین گویچه‌ای (MCH) (پیکوگرم)
۰/۰۱۹۲	۱۰۲/۹۹	۳۵/۸۷±۰/۳۵	۳۳/۴۰±۱/۱۹	میانگین غلظت هموگلوبین گویچه‌ای (MCHC) (گرم در هر دسی لیتر)
۰/۲۸۶۴	۱۱۰/۸۶	۲۰۰±۳۵/۱۷	۲۲۱±۷/۷۹	گلوکز پایدار (GLUC) (میلی گرم در هر دسی لیتر)
۰/۴۳۳۳	۷۵/۰۹	۵۰/۷۷±۱۴/۱۵	۴۵/۳۳±۲/۶۸	نیترژن اوره خون (BUN) (میلی گرم در هر دسی لیتر)
۰/۷۱۹۹	۹۸/۶۹	۰/۶۱±۰/۰۹	۰/۶۴±۰/۱	کراتینین خون (CREA) (میلی گرم در هر دسی لیتر)
۰/۰۱۶۱	۷۶/۸۲	۵/۵۷±۰/۱۲	۶/۰۸±۰/۲۲	اسید اوریک
۰/۱۲۹۲	۱۱۳/۵۳	۸۳±۸/۱۹	۷۵/۷۵±۰/۹۶	کلسترول کل (CHOL) (میلی گرم در هر دسی لیتر)
۰/۰۵۴	۱۱۶/۳۰	۷۵±۷	۴۵±۹/۲۰	تری‌گلیسریدها (TRIG) (میلی گرم در هر دسی لیتر)
۰/۵۱۳۶	۷۱/۰۶	۳۷/۶۷±۲۲/۵۵	۴۵/۵۰±۴۵/۰۱	HDL
۰/۱۴۴۹	۲۸۱/۹۵	۳۸/۷۷±۲۸/۳۴	۱۵/۰۵±۱/۹۲	LDL
۰/۱۹۸۶	۱۵۸/۹۴	۲/۷۲±۱/۴۵	۱/۶۸±۰/۱۶	نسبت کلسترول به HDL
۰/۰۹۳۱	۳۹۶/۹۵	۱/۴۲±۱/۰۹	۰/۳۳±۰/۰۳	نسبت LDL به HDL
۰/۰۰۰۵	۳۶/۰۵	۱۸۸/۶۷±۲۵/۶۶	۵۳۰/۷۵±۶۸/۶۴	SGOT
۰/۰۰۴۲	۲۹/۸۵	۹۰/۳۳±۳/۵۱	۲۳۶/۷۵±۴۹/۷۳	SGPT
۰/۰۰۰۱	۱۹۴/۲۷	۳۹۱/۳۳±۱۶/۴۴	۱۳۶/۷۵±۳۳/۴۲	آلکالین فسفاتاز (ALKP) (واحد در هر لیتر)

جدول ۵ نتایج تأثیر سمیت رقت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس بر سلول‌های سرطانی و طبیعی انسان

رقت اسطوخودوس (میکروگرم در میلی‌لیتر)	درصد سلول زنده هلا	درصد مرگ سلول هلا	رقت اسطوخودوس (میکروگرم در میلی‌لیتر)	درصد لنفوسیت‌های زنده	درصد مرگ لنفوسیت‌ها
۰	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	۰
۵۰	۵/۱۴	۹۴/۸۶	۲۰	۴۸/۶۴	۵۱/۳۶
۲۵	۴۴/۹۶	۵۵/۰۴	۱۰	۶۹/۲۳	۳۰/۷۷
۱۸	۸۲/۸۴	۱۷/۱۶	۱	۹۲/۳	۷/۷۰
۱۲	۹۵/۲۴	۴/۷۶	۰/۵	۱۰۰	۰
IC ₅₀	۲۶ میکروگرم	-	-	۲۱ میکروگرم	-

جدول ۶ درصد جهش‌زایی و ضد جهش‌زایی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر سوبه‌های TA100 و TA98 باکتری سالمونلا تیفی موریم در حضور (+S9) و غیاب (-S9)

رقت اسانس	TA98 +S9 درصد	TA98 +S9 جهش‌زایی	TA98 -S9 درصد	TA98 -S9 جهش‌زایی	TA100 +S9 درصد	TA100 +S9 جهش‌زایی	TA100 -S9 درصد	TA100 -S9 جهش‌زایی
۱:۱۶	۴۰	۹۷/۷۲	۰	۱۰۰	۱۰	۶۵/۲۸	۰	۱۰۰
۱:۳۲	۳۰	۸۸/۶۳	۰	۱۰۰	۶/۳۸	۳۸/۸۹	۰	۱۰۰
۱:۶۴	۹	۶۸/۱۸	۰	۱۰۰	۲/۶۱	۱۲/۵	۰	۱۰۰

۴- بحث

که در این مطالعه نشان داده شد هرچند قدرت ضد میکروبی اسانس بیشتر بود ولی در آزمون انتشار، گاهی هاله‌هایی با قطر کمتر ولی قدرت میکروب‌کشی بیشتر دیده می‌شد که این موضوع با نظر محققان دیگر [۲۳] مطابقت دارد. ممکن است اسانس با ایجاد هاله بزرگ، زمان بیشتری نیز برای میکروب‌کشی لازم داشته باشد. بنابراین می‌توان استنباط نمود که اندازه قطر هاله‌های عدم رشد دقیقاً نمی‌تواند بیانگر MIC یا MBC باشد و برای تعیین میزان حساسیت هر میکروارگانیسم به هر ماده ضد میکروبی تعیین قطر هاله و MIC و MBC لازم است. این اختلاف تأثیر روغن‌های فرار بر عوامل بیماری‌زا، نشان‌دهنده ترکیبات شیمیایی مؤثر متفاوت و خاص آن‌ها نسبت به یکدیگر و نسبت به عوامل بیماری‌زاست و این اختلاف با گیاهان مختلف و گونه‌های متفاوت بیشتر می‌شود که نشان‌دهنده وابستگی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها از گونه‌های مختلف گیاهی و شرایط اقلیمی آن‌ها [۲۴] و حتی

در مطالعه حاضر فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی اسانس اسطوخودوس آزمایش شد. حساسیت میکروبی در مواجهه با اسانس متفاوت بود. مطالعه تأثیر ضد میکروبی اسانس تفاوت عمده‌ای را نسبت به هر میکروارگانیسم در غلظت‌های مختلف نشان داد. باگسی (Bagci) و دیگران (Digrak) [۲۱] روغن‌های اسانسی را از نظر قدرت میکروب‌کشی به سه دسته غیرفعال، تقریباً فعال و بسیار فعال تقسیم‌بندی نموده‌اند. ضمن تأیید این مطلب می‌توان اضافه کرد که این تقسیم‌بندی در خصوص میزان تأثیرپذیری میکروارگانیسم‌های متنوع از یک نوع اسانس نیز صحیح است. تأثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف روغن‌های اسانسی بر رشد میکروارگانیسم‌ها نشان داده که باکتری‌ها و مخمرها حساس‌تر از سایر میکروارگانیسم‌ها هستند [۲۲]. همان‌طوری

هیدروکسیل در بدن است [۳۳]. نتایجی مانند وفور نسبی ترکیبات فنلی و ارتباط معنی‌دار با خاصیت آنتی‌کسیدانی براساس روش‌های سنجشی بتا- کاروتن یا DPPH می‌تواند تأیید کننده تحقیقات گذشته باشد [۳۴، ۳۵]. FRAP در سرم خون موش‌هایی که به‌مدت یک ماه و روزانه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسانس گاوآذ شده بودند افزایش نشان داد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به محتوای فنلی اسانس مربوط باشد. محتوای فنلی ادویه‌جات مختلف ظاهراً با تأثیر محافظتی در برابر پراکسیداسیون لیپید نسبت مستقیمی دارد [۳۶]. تأثیرات درمانی در نتیجه تغذیه اسانس‌ها توسط موش‌ها در خون آن‌ها دیده شد. همچنین افزایش وزن در موش‌ها دیده شد که درباره مصرف اسطوخودوس معنی‌دار بود. مصرف اسانس اسطوخودوس میزان HCT و RDW (Red Cell Distribution Width) را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. کاهش آنزیم‌های کبدی و آلکالن فسفاتاز دلیل نگرانی درباره مصرف بی‌رویه این اسانس است که اهمیت و ضرورت تعیین دوز مصرفی را نشان می‌دهد تا مانع از آثار سوء مصرف اسانس شود. اسانس‌ها و عصاره‌های محتوی فنل زیاد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوب برای مصارف غذایی مناسب هستند. اخیراً دراگلند (Dragland) و همکارانش [۳۴] نشان دادند که مصرف یک گرم از ادویه‌هایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر به‌سزایی در سلامتی دارد. غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC₅₀) اسانس اسطوخودوس علیه سلول‌های هلا و خون محیطی به‌ترتیب ۲۶ و ۲۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر ارزیابی شد. با توجه به تأثیر منفی اسانس اسطوخودوس در مقیاس کم بر سلول‌های سالم خون محیطی، می‌توان تأثیرات منفی خوراکی این اسانس را با توجه به نتایج هماتولوژیک و شیمی بالینی نمونه‌های سرم خون قابل تأمل دانست. تأثیر اسانس فوق بر سلول‌های سرطانی با توجه به تأثیر یکسان بر سلول‌های سالم امیدوارکننده نیست. پیشگیری شیمیایی سرطان عبارت است از استفاده ترکیبات شیمیایی یا غذایی برای بازداری، ممانعت یا جلوگیری از برگشت سرطان در بافت طبیعی یا پری‌نئوپلاستیک (Perineoplastic) [۳۶].

احتمال موارد استفاده دارویی گوناگون یک گونه گیاهی است. چون روغن‌های اسانسی محتوی ترین‌ها (طبیعتاً فنلی) هستند، تصور شباهت مکانیسم اثر ضد میکروبی آن‌ها با ترکیبات فنلی، منطقی است [۲۵]. فنل کل اسانس خالص اسطوخودوس، ۸۵/۴۳ میکروگرم گالیک اسید در هر میلی‌گرم بود. فنل‌ها و فلاونوئیدهای گیاهی ممانعت پراکسیداسیون لیپید را با فرونشانی رادیکال‌های پروکسی و احیا یا کلاته کردن آهن در آنزیم لیپواکسیژناز و در نهایت ممانعت از شروع واکنش پراکسیداسیون لیپید، انجام می‌دهند [۲۶]. روش‌های زیادی برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های زیستی وجود دارد که همگی در دو مجموعه براساس نوع واکنش طبقه‌بندی می‌شوند [۲۷]. روش‌های در برگ‌برنده واکنش انتقال الکترون شامل سنجش فنل کل با استفاده از واکنش گر فولین سیوکالتیو، TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) و آزمایش رادیکال‌زدایی DPPH (DPPH radical-scavenging assay) هستند. آزمایش سنجش رادیکال‌زدایی DPPH، روش حساس و مستقل از قطبیت سوبستراست [۲۸]. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که می‌تواند با گرفتن یک الکترون یا رادیکال هیدروژن به یک مولکول دیامگناطیس پایدار تبدیل شود. نسبت معنی‌داری بین محتوای فنلی و ظرفیت DPPH زدایی برای هر ادویه‌ای گزارش شده است [۲۹]. در این مطالعه ظرفیت DPPH زدایی اسانس با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک استاندارد مقایسه شد. تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مربوط به توانایی زدودن رادیکال‌های پروکسی، رادیکال‌های آزاد DPPH و رادیکال‌های هیدروکسی باشد [۳۰]. بنابراین اسانس‌ها با محتوای فنلی بالا و خاصیت خوب آنتی‌اکسیدانی می‌تواند برای اهداف تغذیه‌ای و نگهداری غذایی استفاده شود [۳۱]. نسبت مثبت بین محتوای فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌ها گزارش شده [۳۲] و مطالعه حاضر تأیید کننده آن است. تحقیقات قبلی سایر محققین مبنی بر تأثیر خوراکی ادویه‌ها بر سلامتی، به دلیل وجود گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی مانند سوپراکسید، پروکسید هیدروژن و رادیکال

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی وزارت بهداشت و نیز جناب آقای محمدعلی رضایی مدیر عامل شرکت ایمان مهر که با تأمین هزینه‌های این طرح امکان عملی شدن آن را فراهم آوردند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از پروفیسور بی‌ان آمس (B.N.Ames) از دانشگاه کالیفرنیا- آمریکا و خانم دکتر هولیا سیواس (Hulya Sivas) از دانشگاه آنادولو (Anadolu)- ترکیه برای اهدای سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

گزارش‌هایی در خصوص عدم تأثیر منفی اسانس اسطوخدوس بر سلول‌های خون محیطی [۳۷] نشان از تفاوت در ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها دارد. مطالعه خواص جهش‌زایی و ضد جهش‌زایی اسانس اسطوخدوس نشان داد که این اسانس در غیاب S9 فاقد خاصیت جهش‌زایی است ولی در حضور S9، سویه TA98 تحت تأثیر جهش‌زایی آن قرار گرفت. اسانس اسطوخدوس دارای خاصیت ضد جهش‌زایی بسیار قوی بوده و در غیاب S9 این خاصیت بیشتر بود. نتایج نشان می‌دهد که اسانس اسطوخدوس مورد مطالعه در این تحقیق نمی‌تواند بدون تعیین دوز، مصرف شود.

۶- منابع

- [1] Smid EJ, Gorris LGM. Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman MS (Ed.), Handbook of Food Preservation. Marcel Dekker, New York, 1999; p: 285-308.
- [2] Jeong SH, Kim BY, Kang HG, Ku HO, Cho JH. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. Toxicology 2005; 208(1): 49-62.
- [3] Kabara JJ. Phenols and chelators. In: Russell NJ, Gould GW (Ed), Food preservatives. Blackie, Glasgow, 1991; p: 200-14.
- [4] Orafidiya LO, Agbani EO, Iwalewa EO, Adelusola KA, Oyedapo OO. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. Phytomedicine 2004; 11(1): 71-6.
- [5] Hayes AJ, Markovic B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. Food Chem Toxicol 2002; 40(4): 535-43.
- [6] Millet Y, Jouglard J, Steinmetz MD, Tognetti P, Joanny P, Arditti J. Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. Clin Toxicol 1981; 18(12): 1485-98.
- [7] Naganuma M, Hirose S, Nakayama Y, Nakajima K, Someya T. A study of the phototoxicity of lemon oil. Arch Dermatol Res 1985; 278: 31-6.
- [8] Hallström H, Thuvander A. Toxicological evaluation of myristicin. Nat Toxins 1997 5(5): 186-92.
- [9] Cavanagh HM, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. Phytother Res 2002; 61(4): 301-8.
- [10] Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. Cell Prolif 2004; 37(3): 221-9.
- [11] Hohmann J, Zupkó I, Rédei D, Csányi M, Falkay G, Máthé I, Janicsák G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa Officinalis* and *Lavandula angustifolia*

- and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Med* 1999; 65(6): 576-8.
- [12] Rasooli I, Mirmostafa SA. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *J Agric Food Chem* 2003; 51(8): 2200-5.
- [13] Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry* 2006; 67(12): 1249-55.
- [14] Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 1999; 47(10): 3954-62.
- [15] Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-6.
- [16] Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res* 1989; 49(16): 4435-40.
- [17] Lau CB, Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan HH, Chow MS. Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sci* 2004; 75(7): 797-808.
- [18] Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113(3-4): 173-215.
- [19] Ikken Y, Morales P, Martínez A, Marín ML, Haza AI, Cambero MI. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *J Agric Food Chem* 1999; 47(8): 3257-64.
- [20] Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 2003; 80(3): 393-7.
- [21] Bağcı E, Digrak M. Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* (Fir) species from Turkey. *Flavour Fragr J* 1996; 11(4): 251-6.
- [22] Kivanc M, Akgul A. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. *Flavour Fragr J* 1986; 1(4): 175-9.
- [23] Pandey MC, Sharma JR, Anupam D. Antifungal evaluation of the essential oil of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex St. eud) wats. CV. Prama. *Flavour Fragr J* 1996; 11: 257-60.
- [24] Shu C, Brian M. Lawrence. Reasons for the variation in composition of some commercial essential oils. In: Sara J. Risch (Ed.) and Chi-Tang Ho (Ed.). *Spices, Flavor Chemistry and Antioxidant Properties* 1997; pp: 138-159, ACS Symposium series 660.
- [25] Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas GJE. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res International*, 2000; 30(3-4): 273-80.

- [26] Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem* 1986; 25: 383-5.
- [27] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53(6): 1841-56.
- [28] Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62(6): 1201-4.
- [29] Ho SC, Tsai TH, Tsai PJ, Lin CC. Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(3): 920-8.
- [30] Singh G, Marimuthu P, Murali HS, Bawa AS. Antioxidative and antibacterial potentials of essential oils and extracts isolated from various spice materials. *J Food Safety* 2005; 25(2): 130-45.
- [31] Thippeswamy NB, Naidu KA. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *Eur Food Res Technol* 2005; 220: 472-6.
- [32] Tsai TH, ChienYC, Lee CW, Tsai PJ. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chem* 2008; 110(4): 859-64.
- [33] Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J Food Composition Analysis* 2006; 19(6-7): 531-7.
- [34] Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants *J Nutr* 2003; 133(5): 1286-90.
- [35] Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* 2005; 53(20): 7749-59.
- [36] Samarth RM, Panwar M, Kumar M, Kumar A. Protective effects of *Mentha piperita* Linn on benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenicity and mutagenicity in Swiss albino mice. *Mutagenesis* 2006; 21(1): 61-6.
- [37] Standen MD, Connellan PA, Leach DN. Natural killer cell activity and lymphocyte activation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components in vitro. *International J Aromatherapy* 2006; 16(3-4): 133-9.