DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2013.2880

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۷۳-۶۳ (۱۳۹۲)

تأثیر ضد میکروبی و خواص آنتی‌اکسیدانی و سمّیت سلولی اسانس شوید (*Anethum graveolens* L.)

مهدی داداش‌پور[۱]، ایرج رسولی[۲*]، فاطمه سفیدکن[۳]، مسعود تقی‌زاده[٤] و شکیبا درویش علیپور آستانه[٥]

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

۲*- نویسنده مسئول، استاد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، پست الکترونیک: rasooli@shahed.ac.ir

۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

٤- استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

٥- دانشجوی دکتری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۸۹

چکیده

روغن‌های اسانسی با خاصیت خوب آنتی‌اکسیدانی می‌توانند برای اهداف درمانی، تغذیه‌ای و نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به گسترش مصرف فرآورده‌های گیاهان دارویی، لازم است جوانب مختلف این محصولات به جهت کاربردهای مفید و ضررهای احتمالی آنها در سلامتی انسان مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه حاضر فعالیت‌های ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سمّیت سلولی اسانس خالص شوید (*Anethum graveolens* L.) تازه و شوید تجاری مورد آزمایش قرار گرفت. نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس شوید براساس حساسترین به مقاومترین به‌ترتیب *C. albicans*> *S. aureus*> *E. coli*> *P. aeruginosa* بود. حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس‌ها تعیین گردید. اسانس شوید خاصیت کشندگی و مهارکنندگی میکروبی خوبی بجز در خصوص *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بتا-کاروتین‌زدایی و رادیکال‌زدایی انجام و نتایج مقایسه‌ای آنها با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک BHT و BHA استاندارد انجام شد. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به‌وسیله اسانس‌ها با قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک قابل مقایسه بود. مقدار اسانس لازم برای ۵۰٪ رادیکال‌زدایی اسانس شوید تازه ٦/٧μg/ml با محتوای فنلی ۱۷٤/۹۱μg و اسانس شوید تجاری برابر ۱۰/۵۳μg/ml با محتوای فنلی ٤/۳٤μg بود. IC_{50} روغن‌های اسانسی شوید تازه و تجاری تأثیر سمّیت سلولی بر سلول‌های خون محیطی به‌ترتیب ۷μg/ml و ۳۰٤۲μg/ml و در خصوص سلول‌های سرطانی هلا برابر ۸/۵۱μg/ml و ۲۰۵/٦۵μg/ml بود. بنابراین نتایج نشان می‌دهند که روغن‌های اسانسی شوید با احتیاط و پس از تعیین دوز مورد مصرف قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: شوید (*Anethum graveolens* L.)، ضدمیکروبی، سیتوتوکسیسیته، آنتی‌اکسیدان، روغن‌های اسانسی.

مقدمه

استخراج ترکیب‌های شیمیایی روغن‌های اسانسی گونه‌های مختلف گیاهی و اثبات فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آنها با روشهای مختلف آزمایشگاهی با هدف جایگزینی با مواد شیمیایی سنتتیک در نگهداری مواد غذایی مورد توجه ویژه است. گیاهان

معمول آشپزخانه، گونه ها و گیاهان آروماتیکی دارای فعالیت‌های ذکر شده، می‌توانند منابع قابل استفاده‌ای به این منظور باشند. گرچه تناقض‌هایی در مورد نتایج طیف فعالیت و پتانسیل‌های عصاره‌ها در گزارشها وجود دارد (Yang *et al.*, 1996 ؛Deans & Ritchie, 1987)، اما مطالعات قبلی نشان داده‌است که برگ شوید خطر سرطان را کاهش می‌دهد (Hartmans *et al.*, 1995؛ Yang *et al.*, 1996). میزان روغن بذر شوید ۳/۵-۲/۳٪ است که ٦٠-٤٠٪ آن کاروون است، در حالی‌که در برگ‌های شوید، ۰/۸-۰/٤٪ روغن وجود دارد که متشکل از ٤٠٪ کاروون، ۳۲٪ لیمونن و ۲۰٪ فلاندرین است (Hartmans *et al.*, 1995). مهمترین جزء اسانس شوید (*Anethum graveolens*)، d-کاروون یا (4*S*) -(+)- کاروون است که ترکیب مفیدی با بوی زیره سیاه/شوید بوده و توسط روشهای شیمیایی و بیوتکنولوژیکی استخراج و خالص‌سازی می‌شود. این ماده در بذر زیره سیاه و نعنا هم جزء ترکیب‌های عمده است (de Carvalho & da Fonseca, 2006). کاروون دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی است. طبق یک تحقیق در بلغارستان، بذرهای شوید (*Anethum graveolens*) پس از ۳۵ سال نگهداری، اسانس‌گیری شدند و اسانس آنها بر علیه قارچ آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*) و مخمرهای ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) و کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند (Jirovetz *et al.*, 2003). برگ‌های شوید، بذر و روغن اسانسی آن می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را فراهم کنند (Delaquis *et al.*, 2002). روغن اسانسی شوید برای لنفوسیت های انسان سمّی بوده‌اند (Lazutka *et al.*, 2001). در زمینه سمّیت مزمن این ترکیب‌ها نظیر تراتوژنی، جهش‌زایی و سرطان‌زایی بالقوه نیز مقالات کمی وجود دارد (Yang *et al.*, 1996). به‌رغم این‌که برخی از روغن‌های اسانسی دارای اندکی اثر سمّی حاد هستند، اما استفاده از روغن های اسانسی در خیلی از کشورها تحت کنترل یا ضابطه‌مند نیست. با توجه به گسترش مصرف فرآورده‌های گیاهان دارویی در کشورمان لازم است که جوانب مختلف این محصولات به جهت کاربردهای مفید و احیاناً ضررهای آنها در سلامتی انسان مورد توجه قرار گیرد. ازاین‌رو، مطالعه حاضر طراحی گردید و اسانس شوید در دو شکل خالص و تجاری آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

اسانس شوید

گیاه *Anethum graveolens* در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور اسانس‌گیری شد و اسانس تجاری شوید از منابع تولیدی داخل کشور (شرکت باریج اسانس) که در داروخانه‌ها به فروش می‌رسد تهیه گردید.

سویه‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به شرح زیر بودند:

E. coli (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC8830), *C. albicans* (ATCC 5027).

بررسی اثر ضدمیکروبی

اثر ضدمیکروبی با روش Yadegarinia و همکاران (۲۰۰٦) انجام شد. برای مطالعه اثر ضدمیکروبی 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. مقدار ۱۰µl اسانس با رقت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی ریخته و پس از هم‌زدن به مدت ۲٤–۱۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و بعد به‌وسیله اسپکتروفتومتر جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory Concentration) مشخص گردید. سپس از هر کدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بودند ۰/۱ میلی‌لیتر روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داده شد و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal Concentration) ماده ضدمیکروبی تعیین گردید. برای مطالعه سینتیک میکرب‌کشی اسانس پس از تعیین MBC از سوسپانسیون‌های میکروبی محتوی 10^6 سلول میکروبی تهیه و مقدار ۵۰µl اسانس در ۵ml سوسپانسیون ریخته شد. در فواصل زمانی معین، مقدار ۱۰µl از هر لوله برداشته، پس از رقیق‌سازی بر سطح محیط نوترینت آگار به‌طور یکنواخت گسترده و به مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور گذاشته شد. بعد تعداد کلنی‌ها با کلنی کانتر شمارش و با ضرب عکس رقت در تعداد کلنی‌ها تعداد باکتریهای زنده در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تعیین گردید. با استفاده از سینتیک مرگ میکروبی ارزش D (Decimal Reduction Value) براساس زمان لازم برای کاهش ۹۰٪ جمعیت میکروبی در نمونه محاسبه شد.

حلال‌های مختلف که در اسانس‌گیری یا رقیق‌سازی اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرند قبلاً در رقت‌های مختلف تهیه و تأثیر آنها را روی میکروب‌های مورد مطالعه با روشهای انتشار و رقت آزمایش شد. متانول و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) تأثیر ضدمیکروبی نداشتند و مورد استفاده رقیق‌سازی قرار گرفتند. در کلیه مراحل آزمایش از DMSO به‌عنوان شاهد مواد ضدمیکروبی استفاده شد.

تعیین محتوای کل فنل (Total phenolic content (TPC))

با استفاده از روش Kahkonen و همکاران (۱۹۹۹) فنل اسانس‌ها به شرح زیر سنجیده شد: ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه در لوله آزمایش ریخته شده و ۱/۵ میلی‌لیتر Folin-Ciocalteau's reagent (10x dilution) و ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۷/۵٪ ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و جذب در 765nm سنجیده شد. فنل کل براساس معادل میکروگرم گالیک‌اسید در هر میلی‌گرم نمونه بیان شد ($y= 0.001x+0.0335$; $r^2= 0.9986$).

تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس

خواص آنتی‌اکسیدانی با سه روش بتا-کاروتین‌زدایی، تعیین قدرت رادیکال‌زدایی DPPH و سنجش قدرت احیاء فریک (FRAP) با روشهای استاندارد انجام شد.

روش بتا-کاروتین‌زدایی

در روش بتا-کاروتین‌زدایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از مهار ترکیب‌های آلی فرّار و conjugated diene hydroperoxides به روش توصیف شده Miraliakbari و Shahidi (2008) با اصلاح جزئی استفاده شد. محلول استوک بتا-کاروتن و لینولئیک‌اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بتا-کاروتن در ۱ میلی‌لیتر کلروفرم، ۲۵ میکرولیتر لینولئیک‌اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین ٤۰ آماده شد و کلروفرم در خلأ تبخیر شد و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب هوادهی شده اضافه شد. نمونه‌ها (۲گرم/ لیتر) حل شد و ۳۵۰ میکرولیتر از آن به ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط بالا موجود در لوله‌ها افزوده شد. لوله‌های آزمایش به مدت

۲ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد همرا با دو تا بلانک گذاشته شدند که یکی از آنها دارای آنتی‌اکسیدان BHT به‌عنوان کنترل مثبت و دیگری حاوی DMSO به جای اسانس به‌عنوان کنترل منفی بودند. لوله های دارای BHT در طول انکوباسیون رنگ خودشان را حفظ کردند. جذب در طول موج ٤٧٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها (درصد ممانعت‌کنندگی) با استفاده از فرمول زیر بدست آمد:

$$I\% = (A_{\beta\text{-carotene after 90min assay}} / A_{\text{initial } \beta\text{-carotene}}) \times 100$$

$A_{\beta\text{-carotene after 90min assay}}$، جذب بتا-کاروتن بعد از ۹۰ دقیقه باقی ماندن در نمونه‌ها و $A_{\text{initial } \beta\text{-carotene}}$، جذب بتا-کاروتن در شروع آزمایش می‌باشد. تمام تست‌ها سه بار تکرار شده و درصد ممانعت‌کنندگی با انحراف معیار سه‌تایی گزارش شد.

تعیین فعالیت رادیکال‌زدایی با تست DPPH

۱۰µl اسانس را با ۹۰۰µl میکرولیتر (pH 7.4) 100mM Tris-HCl؛ ٤٠ میکرولیتر اتانول و۵۰ میکرولیتر TWEEN 20 (0.5% w/w) مخلوط کرده و مخلوط فوق به یک میکرولیتر DPPH (0.5mM = 0.2mg/ml) در اتانول اضافه گردید. مخلوط را به شدت هم زده و جذب فوراً با طول موج ۵۱۷nm ثبت گردید. ثبت تا ۷۰ دقیقه ادامه یافت و نوسانها یادداشت گردید تا جایی که دیگر نوسانی دیده نشد. برای شاهد به جای اسانس از آب مقطر استفاده شد و Trolox (1mM) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان پایدار استفاده شد.

فعالیت رادیکال‌زدایی اسانس با فرمول زیر و براساس درصد ممانعت DPPH محاسبه گردید:

$$\text{Inhibition percentage (IP)} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

A_B = Absorbance value of blank checked after 70 minutes

A_A = Absorbance value of sample checked after 70 minutes

سنجش قدرت احیاء فریک Ferric-reducing power (FRAP) assay

یک میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف اسانس به ۲/۵ میلی‌لیتر بافر ۰/۲M فسفات‌پتاسیم با pH ٦/٦ و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱٪ اضافه شده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به آن اضافه شد. این ترکیب به چند بخش ۲/۵ میلی‌لیتری تقسیم و با ۲/۵ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه مخلوط گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر FeCl3 ۰/۱٪ (وزن/حجم) به هر کدام اضافه شده و پس از ۳۰ دقیقه جذب در 700nm سنجیده شد (Lim *et al.,* 2009). FRAP به‌صورت معادل گالیک‌اسید (GAE) در mg/g نمونه محاسبه شد ($y= 16.66x + 0.0038$; $r^2= 0.999$).

تعیین سمّیت سلولی اسانس

دو رده سلول سرطانی و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با روش MTT مورد مطالعه قرار گرفتند (Plumb *et al.,* 1989). در این روش احیاء MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] به‌وسیله دی‌هیدروژناز میتوکندری‌ها به محصول آبی فرمازان انجام می‌شود که نشان‌دهنده عملکرد طبیعی

میتوکندری و حیات سلول است (Lau *et al*., 2004). پس از برداشت از فلاسک‌های کشت، سلول‌ها به تعداد 1×10^{4} تا 5×10^{5} (براساس پروتکل کشت هر سلول سرطانی) در پلیت‌های ۹٦ چاهکی محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک انکوبه شدند. سلول‌ها برای چسبیدن ۲٤ ساعت زمان نیاز دارند و پس از آن با رقت‌های مختلف اسانس به مدت ٤۸ ساعت مواجه شدند. ۲۰ میکرولیتر از 5mg/ml MTT در سالین بافر فسفاته (PBS) به هر چاهک اضافه شده و به مدت ٤ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. محیط تخلیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب شاهد (مواجهه شده با ۰/۱٪ DMSO) و نمونه های مواجه شده با اسانس در دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده و ثبت شد. منحنی بقا (سلول های زنده) با توجه به سلول های انکوبه شده شاهد ترسیم و سمّیت سلولی عبارت از غلظت ماده مانع رشد به میزان ۵۰٪ (IC_{50}) است. همه تست‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام می‌شوند.

نتایج

نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس شوید و شوید تجاری براساس حساسترین به مقاومترین *Candida albicans> S. aureus> E. coli> P. aeruginosa* بود. اسانس‌ها خاصیت کشندگی و مهارکنندگی میکروبی خوبی بجز در خصوص *Pseudomonas aeruginosa* نشان دادند (جدول ۱).

به منظور تعیین حداقل غلظت های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس تازه را در رقت‌های مختلف در برابر سوسپانسیون‌های میکروبی محتوی 10^{7} میکروارگانیسم در میلی‌لیتر قرار دادیم. رقت‌های تعیین‌شده در آزمایش MBC در برابر سوسپانسیون میکروبی قرار داده شدند تا سینتیک مرگ میکروبی و ارزش D (Decimal Reduction Value) بدست آید (جدول ۱).

فنل کل اسانس‌های شوید و شوید تجاری به‌ترتیب معادل ۲ ± ۱۷٤/۹۱ و ۰/۹٤ ± ٤/۳٤ میکروگرم گالیک‌اسید در هر میلی‌گرم نمونه تعیین شد (جدول ۲). خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با روش بتا-کاروتن‌زدایی نیز انجام و نتایج مقایسه‌ای آنها با آنتی‌اکسیدانهای سنتتیک استاندارد در جدول ۲ نشان داده شده‌است. بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید به‌وسیله اسانس شوید قابل مقایسه با قدرت آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بود (جدول ۲). مقدار اسانس لازم برای ۵۰٪ رادیکال‌زدایی اسانس شوید خالص و شوید تجاری به‌ترتیب ٦/۷ و ۱۰/۵۳ µg/ml بود. قدرت احیاء فریک (FRAP) اسانس شوید به‌مراتب بیش از اسانس شوید تجاری بود (جدول ۲).

سمّیت سلولی رقت‌های مختلف اسانس بر سلول‌های طبیعی انسان، شوید خالص و شوید تجاری به‌صورت ۵۰٪ غلظت ممانعت (IC_{50}) به‌ترتیب ۷µg و ۳۰٤۲µg (جدول ۳) و در خصوص سلول‌های سرطانی به‌ترتیب ۸/۵۱µg و ۲۰۵/٦۵µg بود (جدول ٤).

جدول ۱- میانگین هاله ممانعت رشد میکروبی (میلی‌متر)، کمترین غلظت‌های مهارکننده و کشنده و ارزش D ناشی از تأثیر اسانس‌های خالص و تجاری شوید

غلظت اسانس (mg/ml)	*E. coli*		*S. aureus*		*Pseudomonas aeruginosa*		*Candida albicans*	
	اسانس خالص	اسانس تجاری	اسانس خالص	اسانس تجاری	اسانس خالص	اسانس تجاری	اسانس خالص	اسانس تجاری
۱۰	۱۵ ± ۱	۱۰±۱	۱۶/۳۳ ± ۱/۵	۱۴/۳۳ ± ۱	۱۲ ± ۱	۸/۳۳ ± ۰/۵	۲۶ ± ۱	۱۶ ± ۱
۵	۹/۶۷ ± ۰/۵۸	۰	۱۳/۶۷ ± ۱/۵	۱۱/۳۳ ± ۱/۵	۹ ± ۱	۰	۲۱/۷ ± ۰/۶	۱۲/۷ ± ۰/۶
۲/۵	۰	۰	۹ ± ۱	۷/۷ ± ۱	۰	۰	۱۶/۳۳ ± ۱/۵	۱۰/۷ ± ۰/۶
MIC/MBC (mg/ml)	۱۰/۵	۱۰/۱۰	۱۰/۵	۱۰/۵	۱۰/۵	–	۵/۲/۵	۱۰/۵
ارزش D (دقیقه)	۱۲/۸۶	۱۷/۱۴	۱۲/۸۶	۱۷/۱۴	–	–	۸/۵۷	۱۷/۱۴

جدول ۲- محتوای فنلی و فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های شوید و آنتی‌اکسیدان‌های استاندارد

اسانس	درصد بازدارندگی DPPH و (مقدار اسانس)	IC_{50} (µg)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٪) با روش بتا-کاروتین و (مقدار اسانس)	قدرت احیاء فریک (FRAP) معادل گالیک‌اسید (میلی‌گرم در گرم نمونه)	محتوای فنلی (µg/ml GAE)
شوید خالص	۳۸/۰۲ ± ۲/۷ (۵mg/ml)	۶/۷	۹۲/۱۳ + ۳/۶ (۰/۶۲۵mg/ml)	۹/۴۳ ± ۱/۴	۱۷۴/۹۱ ± ۲
شوید تجاری	۲۵/۴۲ ± ۰/۱۸ (۵mg/ml)	۱۰/۵۳	۶۸ ± ۳/۳ (۰/۶۲۵mg/ml)	۰/۱۲ ± ۰/۰۸	۴/۳۴ ± ۰/۹۴
BHT 1mM	۳۵/۹ ± ۰/۴۷				
BHA 1mM	۴۷/۷ ± ۰/۵				
Trolox 1mM	۳۴/۵ ± ۰/۴				

جدول ۳- سمّیت سلولی رقت‌های مختلف اسانس بر سلول‌های طبیعی انسان

رقت اسانس شوید تجاری (µg/ml)	درصد لنفوسیت‌های زنده	درصد مرگ لنفوسیت‌ها	رقت اسانس شوید (µg/ml)	درصد لنفوسیت‌های زنده	درصد مرگ لنفوسیت‌ها
شاهد	۱۰۰ ± ۳	۰	شاهد	۱۰۰ ± ۱/۲	۰
۴۰۰۰	۴۲/۸۳ ± ۳	۵۷/۱۷	۴	۵۵/۶۹ + ۱/۵	۴۴/۳۱
۲۰۰۰	۵۲/۹۶ + ۴/۱۹	۴۷/۰۴	۲	۶۰/۸۹ + ۱	۳۹/۱۱
۲۰۰	۶۴/۰۲ ± ۳/۰۵	۳۵/۹۸	۱	۶۱/۸۵ + ۳	۳۸/۱۵
۱۰۰	۱۰۰ ± ۱/۴	۰	۰/۵	۷۵/۸۸ + ۱/۸	۲۴/۱۲
۵۰	۱۰۰ ± ۱/۱	۰	۰/۲۵	۷۷/۱۵ + ۷	۲۲/۸۵
۲۵	۱۰۰ ± ۱/۳	۰			
IC_{50}	۳۰۴۲ µg			۷ µg	

جدول ٤- سمّیت سلولی رقت‌های مختلف اسانس بر سلول‌های سرطانی انسان

رقت اسانس شوید تجاری (µg/ml)	درصد سلول‌های زنده Hela	درصد مرگ سلول‌های Hela	رقت اسانس شوید (µg/ml)	درصد سلول‌های زنده Hela	درصد مرگ سلول‌های Hela
شاهد	۱۰۰ ± ۱/۹	۰	شاهد	۱۰۰ ± ۰/۰۹	۰
۱۰۰۰	۳۱/۳٦ ± ٤	٦۸/٦٤	۲۰	٤٥/۳۸ ± ۰/٥	٥٤/٦۲
٥۰۰	۳٦/۷٤ + ۷	٦۳/۲٦	۱۰	٤۷/۹٥ ± ۱/٦	٥۲/۰٥
۲٥۰	٤٥/۷٦ ± ۷	٥٤/۲٤	٤	٥٥/۸٥ ± ۱	٤٤/۱٥
۱۰۰	٥٥/۷۲ ± ٤	٤٤/۲۸	۲	٥۹/۳٤ ± ۲/۲	٤۰/٦٦
٥۰	۷۷/۷۹ ± ۱/٥	۲۲/۲۱	۱	٦٥/۷۱ ± ۰/٥	۳٤/۲۹
۲۰	۸۳/۹۸ ± ٥	۱٦/۰۲	۰/٥	٦۹/۷۱ ± ۰/۳	۳۰/۲۹
IC_{50}	۲۰٥/٦٥ µg			۸/٥۱ µg	

بحث

در مطالعه حاضر فعالیت‌های ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی و سمّیت سلولی اسانس خالص و تجاری شوید مورد آزمایش قرار گرفت. حساسیت میکروبی در مواجهه با اسانس متفاوت بود و کاندیدا آلبیکنس (*C. albicans*) حساسترین میکروارگانیسم در برابر هر دو اسانس بود. کاندیدا آلبیکنس یکی از معمول‌ترین پاتوژن‌های انسانی است که باعث عفونت‌های وسیعی می‌شود و ممکن است سلامتی افراد دارای ضعف سیستم ایمنی، خصوصاً افراد مبتلا به ایدز را تهدید کند. معدودی از داروها بر علیه عفونت‌های کاندیدایی مؤثر هستند، اما اکثراً محدودیت‌هایی هم از نظر سودمندی و هم از نظر اثرهای جانبی دارند (Raphael & Kuttan, 2003). ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌ها مانند کاروون و پریل‌آلدهید مانع از تغییر شکل کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) از فرم کروی به رشته‌ای می‌شوند. با توجه به ارتباط این تغییر با بیماری‌زایی کاندیدا آلبیکنس (*C. albicans*)، این ترکیب‌ها عوامل درمانی بالقوه خوبی در برابر عفونت‌های ناشی از این قارچ هستند (McGeady *et al.*, 2002). در مطالعه انجام شده توسط Naigre و همکاران (۱۹۹٦) نشان داده شده‌است که در غلظت‌های بالای ۱۰µg/ml، (4R)-کاروون فعالیت خوبی بر علیه اشرشیاکولی (*Escherichia coli*)، انتروکوکوس فاسیوم (*Enterococcus faecium*) و آسپرژیلوس نایجر (*A. niger*) دارد. تبدیل (4S)-(+)- کاروون به سولفون در سمّیت سلولی بخش سمت چپ این سزکویی‌ترپن دخیل است. در مطالعه‌ای، یک سری از ترکیب‌های مرتبط با کاروون، برای توانایی‌شان در القاء افزایش فعالیت گلوتاتیون S- ترانسفراز، در چند بافت از موش A/J، بررسی شده‌اند (Zheng *et al.*, 1992) و مشخص شده‌است که (4S)-(+)- کاروون بیشترین فعالیت را به‌عنوان القاءکننده در همه بافت‌های آزمایش شده دارد.

یک نگهدارنده غذایی ایده‌آل باید اثر بازدارندگی مداومی روی میکروارگانیسم هدف داشته باشد. از آنجا که نیمه عمر و سلامت مواد غذایی به کارایی مواد نگهدارنده آن بستگی دارد؛ بنابراین تغییرپذیری ذاتی ترکیب و فعالیت روغن‌های اسانسی خام، کاربردهای آنها را در صنایع غذایی با تردید مواجه می‌سازد. چندین عامل

ممکن است در ناهمخوانی نتایج پتانسیل ضدمیکروبی روغن‌های اسانسی نقش داشته باشد که برخی از آنها به شرح زیر است:

گاهی تفاوت در کیفیت و کمّیت فعالیت روغن‌های اسانسی، به اختلاف تکنیک‌های آنالیزی نسبت داده می‌شود (Mann & Markham, 1998).

قابلیت تبخیر و محلولیت بسیار کم، در بیشتر روغن‌های اسانسی مشکل‌آفرین است، به‌ویژه در روشهایی که براساس انتشار و رقت ماده مورد آزمایش در محیط میکروبیولوژیکی است.

تفاوت در ترکیب مربوطه به علت تنوع عملیات و فرآوری‌های کشاورزی در ویژگی‌های ضدمیکروبی تأثیرگذار است؛ زیرا این فاکتورها در غلظت اجزاء فعال نقش دارند.

روغن‌های اسانسی خاصی ممکن است حاوی ترکیب‌های پیچیده‌ای باشند ولی واکنش بین ترکیب‌های ضدمیکروبی کمتر شناخته شده و ممکن است منجر به تأثیرات آنتاگونیستیک و هم‌افزایی شود (Davidson & Parish, 1989)؛ به‌طوری که Didry و همکاران (۱۹۹۳) فعالیت هم‌افزایی را بین کارواکرول و تیمول گزارش کرده‌اند. اگرچه مقالات مرتبط با سمّیت ژنتیکی بسیار فراوان هستند (حدود ۳۰ جزء از روغن‌های اسانسی به‌خصوص مونوترپن‌ها و آلکنیل‌بنزن‌ها آزمایش شده‌اند)، به‌نظر می‌رسد حدود یک سوم موارد آزمایش شده در یک یا چندین تست سمّیت ژنتیکی این اثر منفی را نشان داده باشند. مثال‌هایی از این دسته عبارتند از: آنتول (Sekizawa & Shibamoto, 1982)، آنتول‌اکسید (Kim *et al.*, 1999). با وجود این، ترکیب‌های دیگری نظیر بتامیرسین، d-لیمونیل و کاروون که بیشترین اهمیت تجاری را دارند، در یک سری از باکتریها و نمونه‌های یوکاریوتیک دارای سمّیت ژنتیکی نبوده‌اند (Franzios *et al.*, 1997؛ Stammati *et al.*, 1999؛ Whysner & Williams, 1996).

اگر غلظت‌های نسبی ترکیب‌های ضدمیکروبی در سطوحی تنظیم شوند که به‌طور مداوم قدرت و طیف مهارکنندگی مورد نیاز را فراهم کنند، ممکن است روغن‌های اسانسی تأثیر قابل اطمینانی داشته باشند. این امر توسط تقطیر روغن خام (به‌منظور تولید محصولاتی که ترکیب ثابت و تجدیدپذیر دارند و یا توسط مخلوط کردن بخش‌های منفرد) برای بدست آوردن سطح فعالیت مورد نظر، انجام‌شدنی است. فنل‌ها و فلاونوئیدهای گیاهی ممانعت از شروع واکنش پراکسیداسیون لیپید را با فرونشانی رادیکال‌های پروکسی و احیاء یا کلاته‌کردن آهن در آنزیم لیپوکسیژناز، انجام می‌دهند. در این مطالعه ظرفیت DPPHزدایی اسانس با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک استاندارد مقایسه شد (جدول ۲). تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مربوط به توانایی زدودن رادیکال‌های پروکسی، رادیکال‌های آزاد DPPH، و رادیکال‌های هیدروکسی باشد (Singh *et al.*, 2005). بنابراین اسانس‌ها با محتوای فنلی بالا و خاصیت خوب آنتی‌اکسیدانی می‌توانند برای اهداف تغذیه‌ای و نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. البته نقش مفید دی‌ترپن‌ها، مونوترپن‌ها و تتراترپن‌ها در سلامتی بررسی و بحث شده‌است (Wagner & Elmadfa, 2003). در مطالعه فوق به روشهای مختلف عمل ترپن‌ها به خصوص مسیری که مانع استرس اکسیداتیو، بیماریهای سرطان و قلبی- عروقی می‌شوند، توجه شده‌است. غلظت ۵۰٪ کشنده (IC_{50}) اسانس‌های شوید بر علیه سلول‌های Hela

و خون محیطی ارزیابی گردید (جدولهای ۳ و ٤). نتایج این مطالعه ارزش توجه از دریچه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و کموتراپی ضدنئوپلاستی (anti-neoplastic chemotherapy) پیدا می‌کنند که می‌تواند پایه یک تحقیق ارزشمند دیگر قرار گیرد. نتایج نشان می‌دهد که اسانس شوید با احتیاط و فقط پس از تعیین دوز مورد مصرف قرار گیرد. با توجه به تأثیر منفی مقدار کم اسانس شوید خالص بر سلول‌های سالم خون محیطی (جدول ۳) می‌توان تأثیرات منفی خوراکی این اسانس را مورد توجه قرار داد و فقط نباید خاصیت کشندگی قوی آن در مورد سلول‌های سرطانی (جدول ٤) را مبنای استفاده دانست.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولان مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد که با تأمین هزینه‌های این طرح امکان عملی‌شدن آن را فراهم آوردند، اعلام می‌کنیم.

منابع مورد استفاده

- Davidson, P.M. and Parish, M.E., 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technology, 52: 148-155.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology, 74: 101-109.
- Didry, N., Dubreuil, L. and Pinkas, M., 1993. Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. Pharmazie, 48(4): 301-304.
- Kim, S.G., Liem, A., Stewart, B.C. and Miller, J.A., 1999. New studies on trans-anethole oxide and trans-asarone oxide. Carcinogenesis, 20(7): 1303-1307.
- Wagner, K.H. and Elmadfa, I., 2003. Biological relevance of terpenoids: Overview focusing on mono-, di-and tetraterpenes. Annals of Nutrition and Metabolism, 47(3-4): 95-106.
- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. and Rasooli, I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry, 67(12): 1249-1255.
- de Carvalho, C.C.C.R. and da Fonseca, M.M., 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. Food Chemistry, 95(3): 413-422.
- Deans, S.G. and Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal of Food Microbiology, 5(2): 165-180.
- Franzios, G., Mirotsou, M., Hatziapostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G. and Mavragani-Tsipidou, P., 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(7): 2690-2694.
- Hartmans, K.J., Diepenhorst, P., Bakker, W. and Gorris, L.G.M., 1995. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. Industrial Crops and Products, 4: 3-13.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A.S., Georgiev, E.V. and Damianova, S.T., 2003. Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(13): 3854-3857.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10): 3954-3962.
- Lau, C.B.S., Ho, C.Y., Kim, C.F., Leung, K.N., Fung, K.P., Tse, T.F., Chan, H.H.L. and Chow, M.S.S., 2004. Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. Life Sciences, 75(7): 797-808.
- Lazutka, J.R., Mierauskiene, J., Slapsyte, G. and Dedonyte, V., 2001. Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, 39(5): 485-492.
- Lim, T.Y., Lim, Y.Y. and Yule, C.M., 2009. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. Food Chemistry, 114(2): 594-599.
- Mann, C.M. and Markham, J.L., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of Applied Microbiology, 84: 538-544.

Mutation Research/Genetic Toxicology, 101(2): 127-140.
- Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M.P. and Catalan, C., 2005. Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: Part 52. Journal of Food Science, 70(4): M208-M215.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L. and Von Wright, A., 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food and Chemical Toxicology, 37(8): 813-823.
- Whysner, J. and Williams, G.M., 1996. d-Limonene mechanistic data and risk assessment: Absolute species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. Pharmacology and Therapeutics, 71: 127-136.
- Yang, Y., Huang, C.Y., Peng, S.S. and Li, J., 1996. Carotenoid analysis of several dark-green leafy vegetables associated with a lower risk of cancers. Biomedical and Environmental Sciences, 9(4): 386-392.
- Zheng, G.Q., Kenney, P.M. and Lam, L.K.T., 1992. Effects of carvone compounds on glutathione S-transferase activity in A/J mice. Journal of agricultural and food chemistry, 40: 751-755.
- McGeady, P., Wansley, D.L. and Logan, D.A., 2002. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in Candida albicans at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. Journal of Natural Products, 65(7): 953-955.
- Miraliakbari, H. and Shahidi, F., 2008. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. Food Chemistry, 111(2): 421-427.
- Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I. and Michel, G., 1996. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. Planta Medica, 62(3): 275-277.
- Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B., 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Research, 49(16): 4435-4440.
- Raphael, T.J. and Kuttan, G., 2003. Immunomodulatory activity of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene, and perillic acid. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 25(2): 285-294.
- Sekizawa, J. and Shibamoto, T., 1982. Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems.

Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of essential oil of *Anethum graveolens* L.

M. Dadashpour[1], I. Rasooli[2*], F. Sefidkon[3], M. Taghizadeh[4] and S. Darvish Alipour Astaneh[1]

1- MSc. Student, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
E-mail: rasooli@shahed.ac.ir
3- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran
4- Department of Chemistry, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

Received: August 2010 Revised: December 2010 Accepted: December 2011

Abstract

Essential oils with good antioxidant properties could be used for therapeutic, nutritional and food preservation purposes. With the increasing use of medicinal plant products, different aspects need to be considered in terms of useful applications and their potential harm to human health. In the present study, antimicrobial, antioxidative and cytotoxic properties of fresh and commercial essential oils of *Anethum graveolens* L. were studied. The bacterial strains sensitive to *Anethum graveolens* oils were in the following order: *Candida albicans*> *S. aureus*> *E. coli*> *P. aeruginosa*. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of the oils were determined. The essential oils had good bactericidal and bacteriostatic properties except for *Pseudomonas aeruginosa*. Antioxidative properties of the oils were studied using DPPH free radical scavenging and beta-carotene bleaching tests and the results were compared with standard synthetic antioxidants. Lipid peroxidation inhibitions were comparable to the synthetic antioxidants of BHT and BHA. The oil concentration required for 50% free radical scavenging (IC_{50}) was 6.7 µg/ml with total phenol contents of 174.91 µg GAE/mg for fresh oil of *A. graveolens*, while they were 10.53 µg/ml and 4.34 GAE/mg respectively for the commercial oil. The volatile oils from fresh and commercial *A. graveolens* displayed cytotoxic effects on human peripheral blood cells (lymphocytes) with IC_{50} of 7 and 3042µg/ml and on human tumor cell line (HeLa cells) with IC_{50} of 8.51 µg/ml and 205.65 µg/ml respectively. The results show that essential oils of *A. graveolens* could be used with caution and after determining the dose.

Key words: *Anethum graveolens* L., antimicrobial, antioxidant, cytotoxcicity, essential oils.