ارزیابی اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های حلال مختلف *Achillea oxyodonta*

لیلا شفیعی دستجردی*[۱]

[۱]گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: Shafiee_l@yahoo.com

چکیده

بومادران گیاهی است از تیره گل‌ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) از جنس *Achillea* که به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم به‌طور سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مطالعه جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و تعیین میزان ترکیبات فنلی کل گیاه بومادران جهت استفاده‌های درمانی و تحقیقی بیشتر انجام می‌شود. برای این منظور اندام‌های هوایی گونه *Achillea oxyodonta* از منطقه جغرافیایی سولقان- امامزاده داوود در استان تهران جمع‌آوری گردید. اسانس گیاه با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج، سپس با استفاده از روش ریزرقت خاصیت ضدباکتریایی اسانس گیاه با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در مقابل ۶ سویه باکتریایی سنجیده شد. خواص آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره های متانول، متانول- آب ۱:۱ و آبی گیاه از طریق روش تخریب رادیکال های آزاد به کمک ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) و مقدار کل ترکیبات فنلی با روش فولین- سیکالتو تعیین گردید. اسانس اندام‌های هوایی گونه مطالعه شده اثرات قابل‌توجهی علیه باکتری‌های گرم‌مثبت داشته و بر باکتری‌های گرم‌منفی این تأثیر ضعیف‌تر بوده است. ارزیابی فعالیت آنتی رادیکالی نمونه‌ها با استفاده از آزمون DPPH نشان داد عصاره متانولی دارای بیشترین ظرفیت آنتی‌رادیکالی نسبت به عصاره‌های دیگر می‌باشد که می‌توان آن را به میزان بالای پلی‌فنول‌ها در این عصاره نسبت داد. مقدار IC_{50} عصاره متانولی معادل ۱۷۲/۰۶±۲/۵۱ µg/mL به دست آمد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در حدود ۳۳٪ بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) به عنوان شاهد مثبت می‌باشد (IC_{50} =۵۶/۲۵±۰/۴۲ µg/mL). در این مطالعه، اسانس گونه موردنظر در مقایسه با عصاره‌های آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه‌ای نشان نداد. میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های مختلف نیز در محدوده ۱۲/۴۵ تا ۳۵/۵۷ میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره خشک قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، عصاره‌های مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، *Achillea oxyodonta*

مقدمه

کشور ایران از نظر پوشش و تنوع گیاهی دارای منابع بی‌نظیری است و طب سنتی ایران نیز یکی از غنی‌ترین و پرسابقه‌ترین طب‌های سنتی دنیا به شمار می‌رود. مطالعه گیاهان دارویی که در مناطق مختلف ایران برای درمان استفاده می‌شود و بررسی‌های آزمایشگاهی و بالینی خصوصیات درمانی آن‌ها یکی از کارهای مهمی است که در این راستا می‌توان انجام داد. توسعه داروهای ضدمیکروبی یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در درمان می‌باشد. در سال‌های اخیر کوشش‌های فراوانی جهت یافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید که از نظر بالینی مفید باشند، صورت گرفته و این امر موجب تولید بیش از هزار نوع آنتی‌بیوتیک گردیده است. متابولیت‌های ثانویه اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی بررسی شده اند و مشخص شده است که اغلب اسانس و عصاره های استخراج شده از گیاهان دارای خواص ضدباکتری، ضدقارچی، ضدانگل، ضدویروس و آنتی اکسیدانی می باشند (Kordali *et al.*, 2005, Fazelinasab *et al.*, 2017). یکی از مهم ترین انواع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، مواد پلی‌فنولی هستند که خصوصیات ضدموتاسیون، ضدسرطان و کاهش قند خون دارند که به میزان ترکیبات پلی‌فنولی آن‌ها بستگی دارد (Ames *et al.*, 1993; Wiseman *et al.*, 1996; Shun *et al.*, 2003). بنابراین گیاهان را می‌توان به عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. این مواد شیمیایی بالقوه مفید را می‌توان نه تنها به عنوان دارو

بلکه به عنوان الگویی بی‌نظیر برای ساخت آنالوگ‌های دارویی به کار برده و هم‌چنین به عنوان مدلی سودمند به منظور فهم و درک بیشتر و بهتر پدیده‌های زیست‌شناختی به کار گرفت (Semnani *et al.*, 2007).

بومادران از جمله گیاهان دارویی متعلق به خانواده کاسنی است. از جمله خواص دارویی آن استفاده از سرشاخه‌های گل‌دار گیاه جهت درمان سرماخوردگی می‌باشد و گونه‌های مختلفی دارد که به صورت وحشی در مناطق مختلف ایران رویش دارند و به علت مقاومت به تنش‌های کمبود آب و خشکی می‌توانند به عنوان گیاهانی کم توقع در فضای سبز مناطق خشک مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به وجود مواد فیتوشیمیایی گوناگون با پتانسیل ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه در گیاه بومادران نیاز به انجام مطالعات در تعیین کیفیت و گستره تأثیر مواد مذکور بر روی انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها احساس می‌شود (Candan *et al.*, 2003; Saeidnia *et al.*, 2004; Stojanovic *et al.*, 2005; Nemeth *et al.*, 2008).

پژوهش حاضر تلاشی در جهت ارزیابی آزمایشگاهی تاثیر آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های مختلف گونه *Achillea oxyodonta* می‌باشد. قابل ذکر است تاکنون تحقیقی در این زمینه بر روی گونه گیاهی مورد نظر انجام نشده است و با توجه به بومی بودن (اندمیک) این گونه، مطالعه حاضر می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از این گیاه به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در صنایع غذایی و دارویی باشد.

مواد و روش‌ها

اندام‌های مختلف گیاه اندمیک *Achillea oxyodonta* طی مرحله گل‌دهی از منطقه سولقان–امامزاده داوود واقع در استان تهران جمع‌آوری شد و در هرباریوم وزارت جهاد کشاورزی با کد ۶۳۰۶۱ مورد شناسایی قرار گرفت. اسانس‌گیری از بخش‌های هوایی گیاه پس از خشک کردن در سایه با روش تقطیر با آب و توسط کلونجر به مدت ۲ ساعت انجام شد. عصاره‌گیری نیز از تمام قسمت‌های گیاه با استفاده از حلال‌های متانول خالص، متانول–آب ۱:۱ و آب به روش ماسراسیون انجام شد.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. در این تحقیق از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538، استافیلوکوکوس اپیدرمیس ATCC 12228، باسیلوس سوبتیلیس ATCC 6633، اشرشیاکلی ATCC 8739، کلبسیلا پنومونیه ATCC 10031، پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 9027 استفاده شد. خاصیت ضدمیکروبی اسانس توسط روش ریز رقت مورد مطالعه قرار گرفت (NCCLS, 2006). کمترین غلظتی که مانع از رشد یک سویه باکتری می‌شود به عنوان حداقل غلظت مهاری (MIC) گزارش شد.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های مختلف با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک ۲،۲–دی فنیل–۱–پیکریل هیدرازیل (DPPH) مطابق با روش برند–ویلیامز و همکاران (Brand-Williams *et al.*, 1995) مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان فنول کل به روش فولین سیکالتو اندازه‌گیری شد (Singelton *et al.*, 1999). میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک اسید (GAE) در گرم عصاره خشک (mg/g) گزارش گردید.

نتایج و بحث

اثر ضدمیکروبی اسانس حاصل از روش تقطیر با آب با استفاده از روش رقتی در مقابل ۶ سویه باکتریایی سنجیده شد. نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی اسانس گونه مورد نظر برروی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد اسانس دارای سطوح متفاوتی از فعالیت ضدمیکروبی علیه نمونه‌های باکتریایی می‌باشد. حساس‌ترین میکروارگانیسم (کمترین MIC) در بین میکروارگانیسم‌های مورد بررسی، باسیلوس سوبتیلیس بوده و پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم ترین سویه گزارش شد. نتایج بیان‌گر این است اسانس اندام‌های هوایی گونه مطالعه شده اثرات قابل‌توجهی علیه باکتری‌های گرم مثبت داشته و بر باکتری‌های گرم منفی این تأثیر ضعیف‌تر بوده است.

جدول ۱. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/mL) اسانس حاصل از گونه *Achillea oxyodonta*

K. پنومونیه	P. آئروژینوزا	اشرشیاکلی	B. سوبتیلیس	S. اپیدرمیس	S. اورئوس
۲۵	>۲ ۵	۲۵	/۲۵ ۶	۱/۵ ۲	۲ ۵

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره‌های متانول، متانول- آب ۱:۱ و آبی نیز در سیستم مدل حاوی DPPH ارزیابی گردید. گستره غلظت‌های مورد استفاده در این آزمون از ۰/۰۵ تا ۰/۸ mg/mL بود. تمامی عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش فعالیت مهارکنندگی نشان دادند. به جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی از فاکتور IC_{50} استفاده شد که بیان‌گر مقدار میلی‌گرم عصاره است که قادر می‌باشد ۵۰ درصد از رادیکال آزاد $DPPH^{\cdot}$ اولیه موجود در محیط را خنثی کند. نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از افزودن BHA (به عنوان شاهد مثبت) بر روی DPPH مقایسه گردید. میزان IC_{50} عصاره‌های مختلف گونه *Achillea oxyodonta* در جدول ۲ آورده شده است. IC_{50} به طور معکوس با فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره‌ها ارتباط دارد، هرچه این مقدار کمتر باشد فعالیت آنتی‌رادیکالی بیشتر است. در این بررسی، اسانس گونه مورد نظر در مقایسه با عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه‌ای نشان نداد.

جدول ۲. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های مختلف گونه *Achillea oxyodonta*

	BHA	عصاره متانولی	عصاره متانول- آب ۱:۱	عصاره آبی
IC_{50} (µg/mL)	۵۶/۲۵ ± ۰/۴۲	۱۷۲/۰۶ ± ۲/۵۱	۲۲۰/۴۱ ± ۳/۷۵	۱۸۵۳/۰۷ ± ۲۴/۱۱

نتایج بصورت میانگین ± انحراف استاندارد (سه تکرار) می باشد. BHA: بوتیل هیدروکسی آنیزول (شاهد مثبت)

میزان فنول تام عصاره‌ها به روش اسپکتروفوتومتری فولین-سیکالتو تعیین و بر حسب گالیک اسید که یک ترکیب فنولی خالص می‌باشد محاسبه شد. در جدول ۳ میزان فنول تام موجود در عصاره‌های مختلف مقایسه شده است. نتایج به دست آمده نشان داد عصاره‌های مختلف دارای میزان قابل‌توجهی ترکیبات فنولی بوده که در محدوده ۱۲/۴۵ تا ۳۵/۵۷ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک قرار می‌گیرد.

جدول ۳. میزان فنول عصاره‌های مختلف گونه *Achillea oxyodonta*

عصاره متانولی	عصاره متانول- آب ۱:۱	عصاره آبی	
۳۵/۵۷ ± ۰/۸۳	۲۳/۳۷ ± ۰/۹۴	۱۲/۴۵ ± ۰/۶۵	میزان فنول تام (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک)

نتایج به صورت میانگین±انحراف استاندارد (سه تکرار) می‌باشد. تمامی عصاره‌ها با غلظت ۲ mg/mL تهیه گردید.

میزان مهار رادیکال آزاد و مقدار فنول تام عصاره‌های مختلف گونه گیاهی مورد نظر بترتیب در جداول ۲ و ۳ نشان‌دهنده این است که عصاره متانولی دارای فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد بالاتر و میزان فنول تام بیشتری در مقایسه با سایر عصاره‌های مطالعه شده گونه *Achillea oxyodonta* می‌باشد، لذا مؤثرترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی از گونه گیاهی مورد نظر متانول است.

از آنجاکه اسانس و عصاره گونه مورد مطالعه سطوح مختلفی از فعالیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد بنابراین می‌تواند به عنوان منبع امیدبخشی جهت تأمین مواد طبیعی آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با امکانات آزمایشگاه‌های شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن انجام شده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 7915-7922.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT — Food Science and Technology, 28: 25–30.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen A. and et al. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). Journal of ethnopharmacology, 87(2-3): 215-220.

Fazelinasab, B., Rahnama, M. and Mazarei, A. 2017. Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts. Journal of Mazandaran University Medicine Science, 27(149): 63-78 (In Persian).

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. and Yildirim, A. 2005. Determination of thechemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum and Artemisia spicigera essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9452-9458.

NCCLS, 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7-A7, 7th ed, Wayne, Pennsylvania.

Nemeth, E. and Bernath J. 2008. Biological activities of yarrow species (Achillea spp.). Current Pharmaceutical Design, 14(29): 3151- 3167.

Saeidnia, S., Yassa, N., Rezaeipoor, R. and Shafiee, A. 2004. Comparative investigation of the essential oils of Achillea talagonica Boiss. and A. millefolium, chemical composition and immunological studies. Journal of Essential Oil Research, 16(3): 262-265.

Semnani, K.M., Saeedi, M., Mahdavi, M.R. and Rahimi, F. 2007. Study and comparison of the antimicrobial activity of methanolic extracts of several species of Stachys and Phlomis. Mazandaran University Medicine Science, 57: 57-66.

Shun, Y.M., Wen, Y.H., Yong, C.Y. and Jian, G.S. 2003. Two benzyl dihydroflavones from phellinus igniarius. Journal Chinese Chemical Letters, 14(8): 810-813.

Singelton, V.R., Orthifer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymology, 299: 152-178.

Stojanovic, G., Radulovic, N., Hashimoto, T. and Palic, R. 2005. In vitro antimicrobial activity of extracts of four Achillea species: The composition of Achillea clavennae L. (Asteraceae) extract. Journal of ethnopharmacology, 101(1-3): 185-190.

Wiseman, H. and Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical journal, 313: 17–29.

Evaluation of the anti-microbial and antioxidant effects of essential oil and different solvent extracts of *Achillea oxyodonta*

Leila Shafiee Dastjerdi*[1]
[1]Department of Chemistry, Basic sciences faculty, Roudehen branch Islamic Azad university, Tehran, Iran
*Corresponding Author: Shafiee_l@yahoo.com

Abstract

Achillea is one of the most important genera of the Asteraceae family. Different species of *Achillea* is known for many years in the traditional medicine. This study is performed to evaluate the antimicrobial, antioxidant activity and determine the phenolic content of the yarrow plant for further therapeutic and research uses. The aerial parts of species of *Achillea oxyodonta* were collected from Sulqan-Emamzadeh Davod area in Tehran province. The essential oil of the plant was extracted using a Clevenger apparatus, then the antibacterial properties of the plant essential oil were examined using a microdilution method by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against 6 bacterial strains. Antioxidant activities of essential oil and methanolic, aqueous methanolic (1:1) and aqueous extracts of *Achillea oxyodonta* species were evaluated with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The total phenolic content of the *Achillea oxyodonta* extracts was determined using the Folin-Ciocalteu reagent. The essential oil of the studied species had significant effects against gram-positive bacteria and this effect was weaker on gram-negative bacteria. In the DPPH test, methanolic extract showed the best radical scavenging activity with an IC_{50} value of 172.06 ± 2.51 µg/mL, about 33% of the potency of synthetic standard butylated hydroxyanizole (BHA) as positive control (IC_{50} = 56.25 ± 0.42 µg/mL). Essential oil of *Achillea oxyodonta* species did not demonstrated considerable antioxidant activity compared to its extracts. The phenolic content of different extracts was in the range of 12.45 to 35.57 mg of gallic acid per gram of dry extract.

Keywords**:** *Achillea oxyodonta*, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Different extracts, Essential oil