مطالعه اثر روش‌های مختلف انجماد و خشک کردن بر کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس و تعیین مقدار اسیدکافئیک در عصاره گیاه دارویی *Rosmarinus officinalis* L.

الهام تازیکه لمسکی[1*]، جواد مهدوی میقان[2]

[1و2] گروه شیمی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱٦

چکیده

در این تحقیق به‌منظور بررسی اثر انجماد و خشک کردن بر کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس، برگ‌های گیاه رزماری *Rosmarinus officinalis* L. در مرحله رویشی در تیرماه ۱۳۹۳ از محل مزرعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان جمع آوری ودر چهار مرحله: تازه، خشک، تازه منجمد و خشک منجمد برای اسانس گیری آماده گردید. اسانس نمونه‌ها بوسیله دستگاه تقطیر با بخار آب (طرح کلونجر) استخراج، آنالیز مواد موثره نمونه‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی (GC/MS) انجام گرفت و به‌منظور تعیین مقدار میزان اسید کافئیک در عصاره اتانولی گیاه از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC استفاده شد. نتایج نشان داد که در هر ٤ روش مورد بررسی به‌ترتیب ترکیبات مشترک : ایزو- بورنیل استات (۱۱/۵-۱٤/۳ درصد)، کامفور (۱۱/۳٤-۱۲/۷ درصد)، پولگون (۷/۸-۱۰/٦ درصد)، آلفا- فلاندرن (۰/۳-۹/۲ درصد)، بتا-کاریوفیلن (۲/۱-۸/۸۷ درصد)، آلفا- ترپینئول (۳/۳٤-۹/۸ درصد)، ۱و۸- سینئول (۰/۹۳-٦/۷ درصد) ولینالول (۰-٤/٤۵ درصد) و کامفن (۳/۳-۵/۷ درصد) از بالاترین مقدار در اسانس گیاه برخوردار بودند و حداکثر میزان اسید کافئیک در عصاره تازه گیاه به مقدار ۰/۰۱٦ میکروگرم بر گرم برگ تازه تعیین گردید و اینکه در هر دو حالت نمونه‌های تازه و خشک، اسانس‌ها از بالاترین کمیت و کیفیت مواد موثره برخوردار بودند، به‌طوری‌که ترکیبات: ترانس -پینوکاروئول (۵/۱ درصد)، سابینن (٤/۸۸ درصد)، ترانس- اوسیمن (٦/۳٤ درصد) و ژرانیل استات (۱۵/۲۲ درصد) فقط در دو روش تازه و خشک در اسانس نمونه‌ها گزارش گردیدند و از آنجایی که ترکیبات فوق از بیشترین عملکرد آنتی‌اکسیدانی، ضدپاتوزنی، ضدالتهابی و ضدعفونی کنندگی برخورداند، لذا پیشنهاد می‌گردد به‌منظور ارتقای کیفیت، فراوری گیاه بیشتر در دو حالت خشک و تازه انجام پذیرد.

واژه‌های کلیدی: اسید کافئیک، اسانس، انجماد، ایزوبورنیل استات، پولگون، خشک کردن، رزماری، کامفور

*مسئول مکاتبه: elham_tazike@yahoo.com

مقدمه

پدیده انجماد (یخ زدگی)، فرایندی است که از منجمد شدن آب مایع به‌وجود می‌آید (Fletcher, 1970). یخ نسبت به دما و فشارهای مختلف می‌تواند دانسیته‌ای از ۰/۹۱۷ تا ۲/۵۱ میلی‌گرم بر متر مکعب در دمای صفر درجه سانتی‌گراد داشته باشد (Kamb, 1973). آب از دمای ٤+ تا ۰ درجه سانتی‌گراد شروع به افزایش حجم می‌کند تا منجمد شود (Akyurt et al., 2002). انجماد با تشکیل کریستال‌هایی از بلورهای آب که به‌صورت منظم در کنار هم قرار می‌گیرند تشکیل می‌شود. بلورهای یخ در دمای صفر درجه سانتی گراد شروع به تشکیل می‌کنند. این بلورها می‌توانند دارای اشکال مختلفی باشند (Fletcher,1970). ممکن است نحوه ذوب شدن (عکس فرایند انجماد) که به پارامتراهای مختلفی چون دمای آب و محیط و شکاف‌های موجود در یخ و... بستگی دارد، در فرایند استخراج اثر بگذارد (Asaoka et al., 2013). با توجه به مطالعات بسیاری که در زمینه استخراج اسانس و عصاره از گیاهان معطر انجام گرفته، مشخص گردید، فرایند خشک کردن یکی از قدیمی‌ترین روش‌های نگه داری محصولات کشاورزی بعد از برداشت است. این فرآیند شامل حذف رطوبت با استفاده از عمل تبخیر است، تا بتوان محصول را برای مدت طولانی انبار کرد تا فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها و مخمرها در آن متوقف شود، بنابراین کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان نسبت به تغییرات شرایط محیطی، کشت و نحوه نگهداری، ماندگاری، طریقه خشک کردن و روشهای مختلف فراوری، اسانس گیری و حتی نحوه استخراج متفاوت می‌باشد(Zaouali et al., 2010).

رزماری (اکلیل کوهی)، گیاهی معطر بوته‌ای چندساله با نام علمی(*Rosmarinus officinalis* L.) متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) می‌باشد. این گیاه بومی مدیترانه و جنوب اروپا بوده و کشت آن در بسیاری از مناطق دنیا مرسوم است (Derwich et al., 2011; Celiktas et al., 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد که استفاده‌های دارویی، غذایی و صنعتی گیاه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی بیشتر به ترکیبات پلی فنلی و ترپنوییدی اسانس و عصاره گیاه مرتبط می‌شود که بیشتر شامل: رزمارینیک اسید، کارنوسول، رزمارینید، کامفور، پولگون، ۱و۸- سینئول و ایزوبورنیل استات در مهار رادیکال‌های آزاد به‌عنوان آنتی‌اکسیدان مطرح می‌باشد (Terpinc et al., 2009; Roomiani et al., 2013).

در رابطه با فیتوشیمیایی، عملکرد آنتی‌اکسیدانی، اثرات دارویی و فارماکوگنوزی اسانس گیاه رزماری تحقیقات بسیاری انجام گرفته که با توجه به تغییرات کمی و کیفی مواد موثره آن در رویشگاه‌ها و روش‌های مختلف فراوری، نتایج متفاوت گزارش شده است ولی همگی به اثرات آنتی‌اکسیدانی (Wang et al., 2008 ; Khorshidi et al., 2009)، ضدباکتریایی (Rozman and Jersek, 2004; Moghtader and Afzali, 2009)، آنتی‌پاتوژنی، ضدالتهابی، ضددردی و ضدقارچی اسانس و عصاره آن به‌دلیل کثرت ترکیبات فنلی و ترپنوییدی آن نسبت داده شده است (Takaki et al., 2008). در بررسی‌های مختلف از ترکیبات پلی فنلی، ترپنوییدی، دی ترپنی (کارنوسیک اسید، کافئیک اسید و کارنوسول) و استروییدهای گیاه به‌عنوان مهمترین مواد موثره دارویی در گیاه رزماری و از همه مهمتر اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی گیاه را به ترکیبات: آلفا-پینن، بورنیل استات، کامفور، پولگون و ۱و۸-سینیول اسانس نسبت دادند که به‌دلیل توانایی در مهار رادیکالهای آزاد به‌عنوان مواد موثره آنتی اکسیدان نیز مطرح می باشند (Genena et al., 2008). در تحقیقی مشابه که در آمریکا، مراکش، فرانسه، ترکیه، تونس،

کوبا، آرژانتین، ایتالیا، یوگسلاوی، پرتقال، یونان و ایران انجام گرفت، مشخص گردید که کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس گیاه رزماری بسته به نوع رویشگاه، شرایط اکولوژیکی، زمان ماندگاری و نحوه استخراج متفاوت بوده و اینکه از مواد موثره آلفا-پینن، کامفور، ۱و۸-سینئول، ترپینولن، پولگون و بورنیل استات به عنوان مهمترین مواد موثره ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد پاتوزنیک گیاه گزارش کردند (Jamshidi and Afzali, 2009).

در طب سنتی از گیاه رزماری خواص زیادی گزارش شده از جمله خواص ضد التهابی و ضد دردی آن در تسکین دردهای روماتیسمی (Zargari, 1995)، آنتی باکتریایی (Weerakkody et al., 2010)، آنتی میکروبی (Celiktas et al., 2007 ; Weerakkody et al., 2010) آنتی‌اکسیدانی (Hernández-Hernández et al., 2009)، آنتی‌تومور (Singletary et al., 1996; Celiktas et al., 2007;)، ضدالتهابی (Benincá et al., 2011) و همچنین ضدافسردگی (Machado et al., 2013) می‌باشد. این خواص به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی زیادی هست که در عصاره این گیاه گزارش شده است .ترکیباتی چون کارنوسول،کارنوسوئیک اسید، رزماریک اسید (Frankel et al., 1996) بتولینیک اسید،اروسوئیک اسید (Benincá et al., 2011)، اسید متیل کارنوسوئیک (Terpinc et al., 2009)، رزمارنیک واسید کافئیک (Vicente et al., 2013) می‌باشد. در مجموع طبق گزارش‌های صورت گرفته ترکیبات فنلی این گیاه از نظر کمی و خواص آنتی‌اکسیدانی آن از بسیاری از گیاهان دیگر بیشتر است (Trouillas et al., 2003; Tawaha et al., 2007; Wojdylo et al., 2007). در تحقیقی بیشترین مقادیر ترکیبات فنلی گزارش شده برای این گیاه شامل اسید کافئیک،کارنوسوئیک، رزماریک و رزمارینیک اسید می‌باشد (Erkan et al., 2008). برخی از تحقیقات نشان می دهند که خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی ترکیبات فنلی گیاه بسیار بالاست (Erkan et al., 2008; Benincá et al., 2011; Jalali-Heravi et al., 2011).

در بررسی‌های مشابه از ترکیباتی چون ۱و۸-سینئول[1]، الفا و بتا-پینن[2]، کامفور[3]، لینالول، بتا-لینالول، پی سیمن، کامفن[4]، بورنئول، ٤-ترپینئول، الفا-ترپینئول و پولگون نام برده شده که علاوه بر خواص مختلف آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدالتهابی و ضددردی نسبت به تغییرات موقعیت جغرافیایی رویشگاه‌های گیاه از کمیت و عملکردهای متفاوت دارویی نیز برخوردارند (Dimitrijević et al., 2007; Gachkar et al., 2007; Okoh et al., 2010; Jalali-Heravi et al., 2011 Machado et al., 2013; Wang et al., 2008).

لذا از آنجایی که روش‌های مختلف نگهداری نمونه‌های گیاهی می‌تواند در کمیت و کیفیت مواد موثره آنها و احتمالاً عملکرد دارویی نیز موثر باشد، این تحقیق برای نخستین بار با هدف بررسی اثر روش‌های مختلف نگهداری نمونه در تغییرات فیتوشیمیایی اسانس و عصاره گیاه رزماری در استان گلستان اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق سرشاخه‌های هوایی گیاه رزماری در مرحله رویشی از موقعیت 36°51'40.9"N 54°26'53.9"E کشت شده در مزرعه تحقیقاتی گیاهان دارویی دانشگاه آزاد گرگان در فصل رویشی تیر ماه سال ۱۳۹۳ برداشت و در شرایط آزمایشگاه خشک شدند. نمونه‌های گیاهی به روش تقطیر با آب (توسط

1. 1,8-Cineole
2. Alpha and Beta-pinene
3. Camphor
4. Camphene

دستگاه کلونجر) اسانس‌گیری شدند. بازده اسانس بر حسب درصد وزنی/وزنی برآورد شد. پس از مرحله آب‌گیری توسط سدیم سولفات، تا زمان تزریق به‌دستگاه در شیشه تیره و در یخچال نگهداری شد. مدت زمان اسانس‌گیری برای گیاه، بین۳ تا ٤ ساعت انتخاب شد.

روش انجماد: برای منجمد کردن مقدار ۱۰۰ گرم برگ در یک بطری۵۰۰ میلی‌لیتری قرار داده شد و سپس مقداری آب روی آنها ریخته شد تا جایی که هیچ گونه هوای در بطری باقی نماند. عملیات هواگیری با تکان دادن بطری انجام گرفت. به‌صورت میانگین مقدار ۳۱۵ میلی‌لیتر برای گیاه تازه و ۳٤۵ میلی‌لیتر برای گیاه خشک، آب مقطر مورد استفاده قرار گرفت. بعد ازآن درب بطریهای هواگیری بسته شده در فریز با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ ساعت قرار داده شدند. بطری‌ها از فریزر بیرون آورده شده، آنها را برش داده و برگ‌های منجمد درون یک ظرف دهن گشاد پلاستیکی تخلیه شدند.

روش تهیه اسانس: در این مرحله با استفاده از تقطیر با بخار به وسیله دستگاه کلونجر در چهار حالت مختلف (شامل برگهای تازه، تازه منجمد شده، برگ‌های خشک و خشک منجمد شده) اسانس‌گیری انجام گرفت. برگ‌ها بدون اینکه خرد و پودر شوند درون بالن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری دستگاه کلونجر قرار داده شدند. برای گیاه تازه و تازه منجمد شده مقدار ٦/۱۵۰ گرم و برای گیاه خشک و خشک منجمد شده مقدار ۵۰ گرم درون بالن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر ریخته شدند و تا ٦۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بالن به حجم رسانیده شد. در هر چهار حالت فوق، آزمایش سه بار تکرار شد. مدت زمان (اسانس‌گیری ۳ ساعت (۱۸۰ دقیقه) و دمای هیتر ۲۵۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. در هر مرحله ۹ میلی‌لیتر و در مجموع ۲۷ میلی‌لیتر معادل ۳۱/۲ گرم اسانس بدست آمد. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

عصاره اتانولی: به منظورتهیه عصاره اتانولی، از اتانول ۷۰ درجه وروش پرکولاسیون استفاده شد. میزان ٦۰ گرم از پودر گیاه را در داخل دکانتور ریخته، سپس مرحله به مرحله به آن ۷۰ درجه می‌افزاییم. برای افزودن اتانول ابتدا آن را گرم کرده و سپس به داخل دکانتور انتقال می‌دهیم. افزودن اتانول را تاجایی ادامه می‌دهیم که حلال تمامی حجم نمونه‌ها را پوشش دهد و علاوه برآن مقداری از اتانول نیز روی سطح نمونه داخل دکانتور را کاملاً بپوشاند وجداسازی عصاره ازحلال توسط دستگاه روتاری با کمک پمپ خلاء انجام گرفت (Mazandarani et al., 2013).

روش شناسایی ترکیبات: به‌منظور شناسایی ترکیبات اسانس، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به دتکتور طیف نگار جرمی GC – MASS مدل Varian CP-3800 و دتکتورمدل Varian Saturn 2200با نوع ستون Varian factor 4، VF-SMS، 30 M، 0.25mm، 0.000125mm و با حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و دمای اینکتور ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد و دمای کارکرد ۸۰-۲٤۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش ۵ درجه در هر دقیقه و جریان گاز هلیوم ۵/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد.

برای سنجش مقدار ترکیب اسید کافییک موجود در عصاره، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل Agilent xdb – c18 استفاده شد. برنامه داده شده به دستگاه برای سنجش ترکیبات شامل دو حلال و همچنین یک روش گرادیانی است که در زیر پارامترهای سنجش آورده می‌شود. فشار پمپ ۲۰۰بار، مقدار جریال ستون ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، زمان آزمایش ۲۵ دقیقه، دمای ستون دمای محیط ۲۰ درجه سانتی‌گراد بوده است. طول موج سنجش ۲۸٤ نانومتر، پهنای سنجش پیک ۰/۱ دقیقه بوده است. از دو حلال آب واسید ارتو فسفات و مقدار تزریق۲۰ میکرولیتر در هر تزریق بوده است. لازم به ذکراست که به‌منظور تهیه اسانس از دستگاه کلونجر شرکت Alpha-Lab

استفاده شد و همچنین استاندارد اسید کافیک از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شده است.

نتایج

نتایج نشان داد که در هر ٤ روش مورد بررسی به‌ترتیب ترکیبات مشترک: ایزو- بورنیل استات (١١/٥-١٤/٣ درصد)، کامفور (١١/٣٤-١٢/٧ درصد)، پولگون (٧/٨-١٠/٦ درصد)، آلفا- فلاندرن (٠/٣-٩/٢ درصد)، بتا-کاریوفیلن (٢/١-٨/٨٧ درصد)، آلفا-ترپینئول (٣/٣٤-٩/٨ درصد)، ١و٨- سینئول (٠/٩٣-٦/٧ درصد) ولینالول (٠-٤/٤٥ درصد) و کامفن (٣/٣-٥/٧ درصد) از بالاترین مقدار در اسانس گیاه برخوردار بودند. بررسی یافته‌ها نشان داد که در دو روش اسانس‌گیری (تازه و خشک) اسانس‌ها از بالاترین کمیت و کیفیت مواد موثره برخوردار بودند، به‌طوری‌که ترکیبات: ترانس -پینوکاروئول (٥/١ درصد)، سابینن (٤/٨٨ درصد)، ترانس- اوسیمن (٦/٣٤ درصد) و ژرانیل استات (١٥/٢٢ درصد) فقط در دو روش تازه و خشک در اسانس نمونه‌ها گزارش گردیدند و مقدار اسید کافئیک در عصاره تازه گیاه از بیشترین مقدار خود (٠/٠١٦ میکروگرم بر گرم برگ تازه) برخوردار بود (شکل ١).

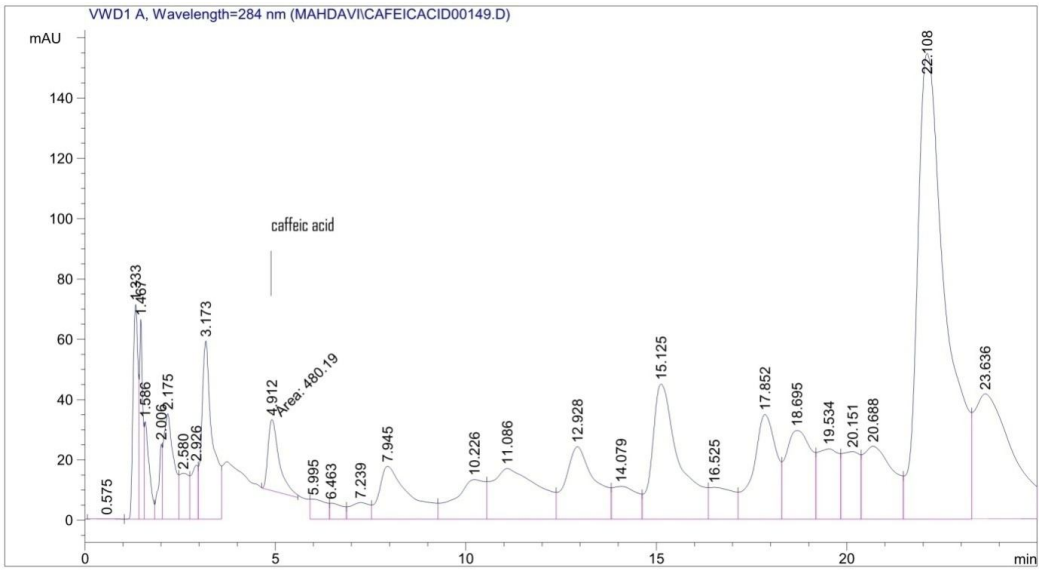
جدول ١: مقایسه ترکیبات متشکله اسانس گیاه رزماری در شرایط مختلف: تازه، تازه منجمد، خشک و خشک منجمد

ردیف	نام ترکیب	RI اندیس کواتس	زمان بازداری	گیاه تازه (٪)	گیاه تازه منجمد(٪)	گیاه خشک(٪)	گیاه‌خشک منجمد(٪)
١	α-Pinene	٩٢۴	٣/٠٩۶	-	-		-
٢	tricyclene	٩٢۶	٣/٠٩٧	-	-	-	-
٣	β-pinene	٩٣٩	٣/٠٩٩	-	-	-	-
۴	α-Phellandrene	٩۴٥	٣/٢٠٧	٨/۶	٩/٢	-	-
٥	β-phelanderene	٩٥٣	٣/٢٠٨	-	-	-	٨/١
۶	camphene	٩٥٧	٣/۴٣	-	٣/٨	٥/٧	٣/٣
٧	trans-pinocarveol	٩۶١	٣/٧۶٥	٥/١	-	-	-
٨	sabinene	٩۶٣	٣/٧۶٧	۴/٩	-	-	-
٩	fenchon	٩۶٧	٣/٧۶٩	-	٥/٥	-	
١٠	3-octanone	٩٧٠	٣/٨٩۶	-	-	-	-
١١	terpineol	٩٧٣	۴/٢۶٨	-	-	-	-
١٢	p-ocymene	٩٨٣	۴/٣٩٧	-	-	٧/١	-
١٣	γ-terpinene	٩٩٥	۴/۴٧	-	١/٠	-	-
١۴	α-terpinene	١٠٠٧	۴/۴٧١	٥/٨	-	٢/٨	-
١٥	1,8- cineol	١٠٣٠	۴/٥۶٨	۶/٨	-	۶/٧	
١۶	trans-ocimene	١٠٣٣	۴/٥۶٧	-	-	-	۶/٣
١٧	α-Terpinene	١٠۴٠	۴/٩٢٨	-	-	١/٣	-
١٨	sabinene hydrate	١٠٥٧	٥/١٩۴	-	-	-	-
١٩	terpinolene	١٠۶۶	٥/۴٣۴	-	١/٢	-	١/٢
٢٠	fenchylalchohl	١٠٧۴	٥/۶۴٩	-	-	۴/١	-
٢١	linalool	١٠٨۴	٥/۶٥٢	۴/۴٥	۴/۴	-	۴/٣
٢٢	chrystenone	١٠٩٣	۶/٢٢٥	-	١/۴	-	-
٢٣	cis-verbenol	١٠٩٨	۶/٢٢٥	-	-	١/٧	-
٢۴	borneol	١١۴٢	۶/۶٥٨	-	-	-	-
٢٥	camphor	١١٥۶	۶/٨۴	١١/۴	١١/٨	١٢/٧	١١/٣
٢۶	trans pinocamphene	١١٥٩	۶/٩٨٩	-	-	-	-
٢٧	pulegone	١١٩۴	٧/٣۶	٧/٨	١٠/۶	-	٩/۴
٢٨	trans-(+)-5-caranol	-	٧/۴۶١	۴/٠	-		٣/۶
٢٩	terpinene 4-ol	١٢٣٧	٧/۴۶٥	-	٣/٩	-	-
٣٠	α-Terpineol	١٢٥۴	٧/٧٩٣	-	٣/٣	٩/٨	-
٣١	bornyl acetate	١٢٨١	٨/٠١١	-	٢/١	٣/٩	٢/٣
٣٢	isobornyl acetate	١٣۶١	٨/٢١٣	١۴/٢	١١/٥	-	١۴/٣

ادامه جدول ۱-

۳۳	piperitone	۱۳۸۴	۸/۸۹۲	-	-	۳/۷	۱/۷
۳۴	trans pinocarveol	۱۳۸۹	۹/۰۵۹	-	۱/۸	۲/۴	-
۳۵	geranyl acetate	۱۳۹۵	۹/۲۸۷	-	-	۱۵/۲	-
۳۶	β-caryophyllene	۱۴۲۲	۹/۸۰۷	۸/۸۷	۷/۶	۲/۱	۸/۷
۳۷	α-cadinene	۱۴۳۷	۱۰/۸۷	-		-	-
۳۸	methyleugenol	۱۴۵۴	۱۲/۵۲۵	-	-	-	-
۳۹	α-humulene	۱۴۶۷	۱۳/۸۹۷	-	-	-	-
۴۰	trans beta farnezene	۱۴۹۶	۱۶/۹۰۷	-	-	۲/۰	-
	Total identified compound	-	-	۸۱/۹	۷۹/۱	۸۱/۲	۷۴/۵

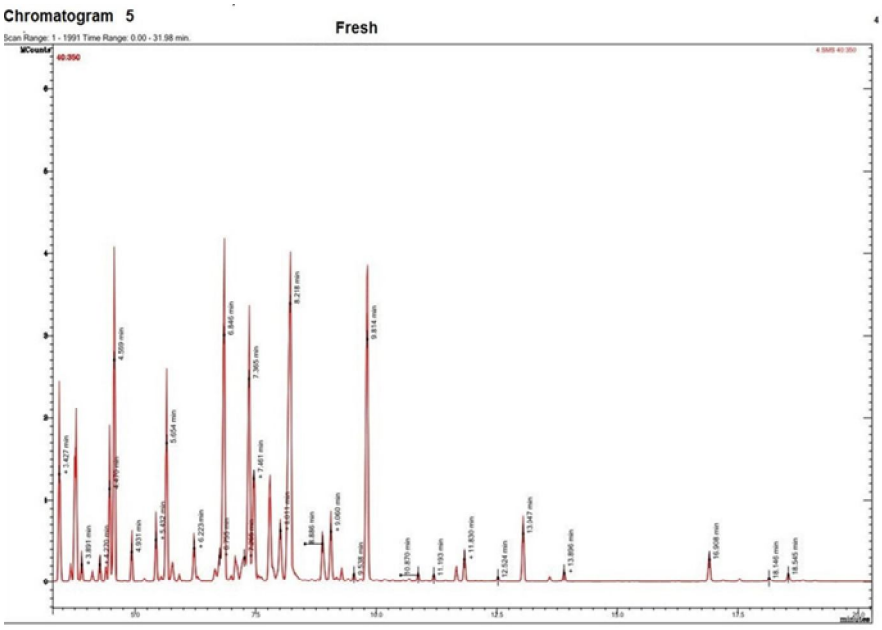
(ترکیبات کمتر از یک درصد در نظر گرفته نشده‌اند)



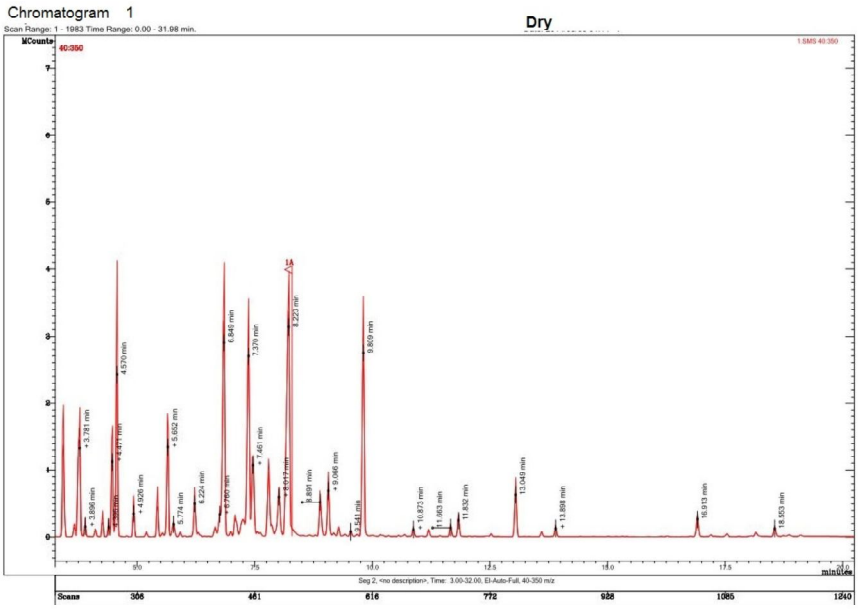
شکل ۱: کروماتو گرام مربوط به مقدار اسید کافئیک در عصاره اتانولی برگهای گیاه تازه رزماری (HPLC)

بحث

همانطور که نتایج جدول (۱) نشان می دهد در هر ٤ روش مورد بررسی، به ترتیب ترکیبات مشترک ایزو- بورنیل استات (۱۱/۵-۱٤/۳ درصد)، کامفور (۱۱/۳٤-۱۲/۷ درصد)، پولگون (۷/۸-۱۰/٦ درصد)، آلفا- فلاندرن (۰/۳-۹/۲ درصد)، بتا-کاریوفیلن (۲/۱-۸/۸۷ درصد)، آلفا- ترپینئول (۳/۳٤-۹/۸ درصد)، ۱و۸- سینئول (۰/۹۳-٦/۷ درصد) ولینالول (۰-٤/٤٥ درصد) و کامفن (۳/۳-۵/۷ درصد) از بالاترین مقدار در اسانس گیاه برخوردار بودند. بررسی یافته‌ها نیز نشان داد که در دو روش اسانس گیری (تازه و خشک) اسانس‌ها از بالاترین کمیت و کیفیت مواد موثره برخوردار بودند، به‌طوری‌که ترکیبات: ترانس - پینوکاروئول (۵/۱ درصد)، سابینن (٤/۸۸ درصد)، ترانس- اوسیمن (٦/۳٤درصد) و ژرانیل استات (۱۵/۲۲درصد) فقط در دو روش تازه (کروماتوگرام شکل ۲) و خشک (کروماتوگرام شکل ۳) در اسانس نمونه‌ها گزارش گردیدند، و از آنجاییکه بررسی منابع نشان داد که ترکیبات فوق از بیشترین عملکرد آنتی اکسیدانی، ضدپاتوزنی، ضد التهابی و ضدعفونی‌کنندگی برخورداند. لذا پیشنهاد می‌گردد به‌منظور ارتقای کمی و کیفی محصولات، فراوری گیاه بیشتر در دو مرحله خشک و تازه انجام پذیرد.

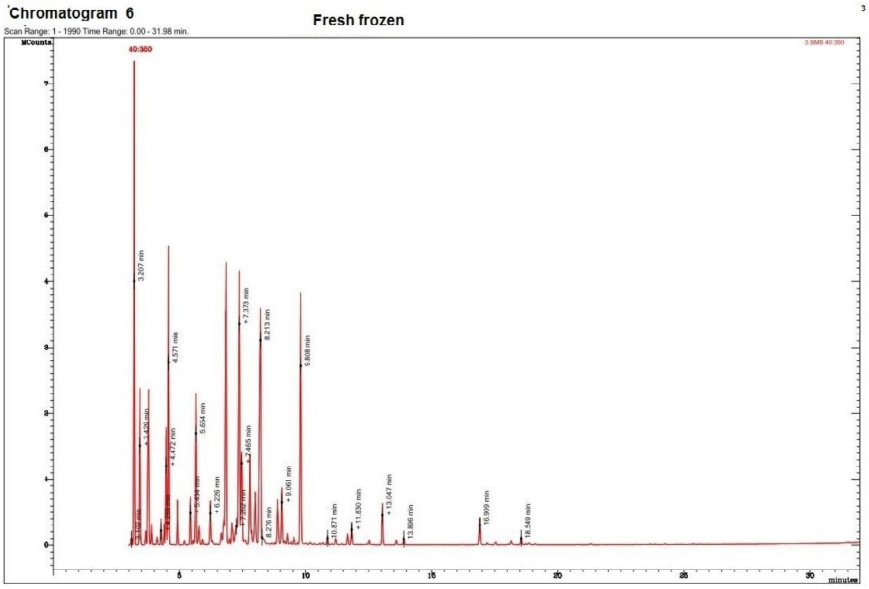


شکل ۲: کروماتوگرام آنالیز اسانس نمونه تازه گیاه



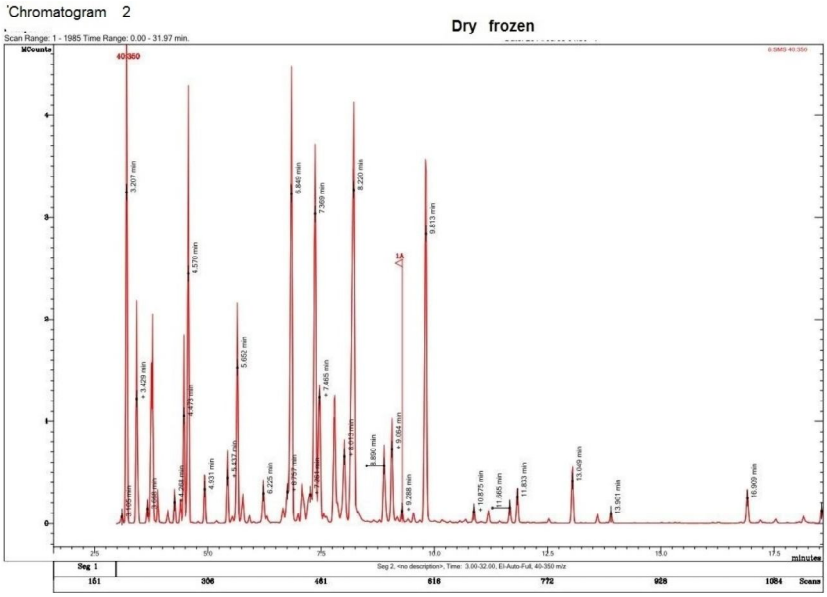
شکل ۳: کروماتو گرام اسانس نمونه خشک گیاه رزماری

همچنین اینکه انجماد نمونه تازه گیاه (کروماتوگرام شکل ٤)، باعث افزایش جزئی در میزان کامفور و پولگون شده است که زیاد محسوس نیست. با توجه به نتایج مندرج در جدول (۱) می توان چنین نتیجه گیری نمود که برای افزایش کمیت مقدار مواد موثره‌ای همچون کامفور، ۱و۸-سینئول، کامفن، و آلفا-ترپینئول در اسانس گیاه رزماری بایستی نمونه را خشک کرد و بالعکس برای افزایش میزان استخراج مواد موثره پولگون و آلفا- فلاندرن پیشنهاد می‌گردد از روش انجماد نمونه تازه گیاه استفاده کرد.



شکل ٤: کروماتو گرام اسانس نمونه تازه منجمد گیاه رزماری

از آنجایی که ترکیباتی چون کامفور، ۱و۸-سینئول، آلفا-ترپینئول و کامفن به‌ترتیب در اسانس نمونه خشک و تازه گیاه بیشتر مشاهده شده‌اند، در نتیجه می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که فرایند خشک کردن باعث افزایش بهینه‌ای در کمیت این مواد موثره دارویی در گیاه رزماری خواهد شد در این رابطه بررسی‌های مشابه نشان داده است که ماندگاری بیش از دو سال گیاه در انبار باعث افزایش میزان رزمارینیک اسید در نمونه عصاره گیاه شده است (Jamshidi and Afzali, 2009). همچنین اثر انجماد بر نمونه خشک این گیاه نیز در کروماتوگرام شکل (۵) قابل مشاهده است.



شکل ۵: کروماتو گرام مربوط به اسانس نمونه خشک منجمد گیاه رزماری

در بررسی‌های مختلف از ترکیبات پلی فنلی، ترپنوییدی، دی ترپنی، کارنوسیک اسید و کارنوسول و استروییدها در گیاه اشاره شده که به همراه ترکیبات آلفا-پینن، بورنیل استات، کامفور، پولگون و ۱و ۸-سیتنول در اسانس دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی است که طبعاً به‌دلیل امکان مهار رادیکالهای آزاد به‌عنوان مواد موثره آنتی‌اکسیدان نیز مطرح می‌باشند. در تحقیقی مشابه که در آمریکا، مراکش، فرانسه، ترکیه، تونس، کوبا، آرژانتین، ایتالیا، یوگسلاوی، پرتقال، یونان و ایران انجام گرفته کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس گیاه رزماری، بسته به نوع رویشگاه، شرایط اکولوژیکی، زمان ماندگاری و نحوه استخراج متفاوت گزارش شده ولی همگی از مواد موثره آلفا-پینن، کامفور، ۱و۸-سینئول، ترپینولن، پولگون و بورنیل استات به‌عنوان مهمترین مواد موثره ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدپاتوزنیک آن گزارش کردند (Jamshidi and Afzali, 2009).

در تایید یافته‌های این تحقیق بررسی منابع نشان می‌دهد که مواد موثره کامفور، آلفا-پینن، بورنیل استات و ۱و۸-سینئول دارای خاصیت ضدعفونی کننده‌گی، ضدباکتریایی و ضدقارچی است (Pavlovic et al., 2012)، همچنین به‌عنوان ضدخارش، ضددرد، ضد التهاب، ضد سرفه است که در بهبود مشکلات ریوی مثل آسم و برونشیت موثر است (Chen et al., 2013; Kirsch and Buettner, 2013)، کامفن به‌عنوان ضدقارچ (Yamaguchi et al., 2009) و بورنئول و بورنیل استات با خاصیت تسکین‌دهنده درد و آنتی‌اکسیدان قوی و ضدسرطان گزارش شده است (Granger et al., 2005;Asghari et al., 2012)

در مطالعات پیشین معلوم شده که مهمترین ترکیبات گیاه رزماری؛ آلفا پینن، ۱و۸-سینئول و کامفور بوده است (Wang et al., 2008; Zaouali and Boussaid, 2008; Liu et al., 2011) و میزان این مواد در رویشگاه‌های مختلف، متفاوت گزارش شده است که حاکی از نقش عوامل محیطی در تغییرات کمی و کیفی مواد موثره گیاهان و سپس تغییرات اثرات بیولوژیکی و دارویی آنها می‌باشد (Jalali-Heravi et al., 2011). در تحقیقات مختلف نیز از ترکیبات کامفور، بورنئول، بورنیل استات و ۱و۸-سینئول در نمونه اسانس‌های تازه گیاه به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با اثر ضدسرطانی، ضدمالاریایی و آنتی‌باکتریال گزارش شده (Asghari et al., 2012)، لذا می‌توان جهت دست‌یابی به چنین اهدافی این گیاه را هم در حالت تازه (جهت استفاده از مواد موثره بورنیل استات و ۱و۸-سینئول) و هم در حالت خشک (جهت استفاده از مواد موثره کامفور و بورنئول) استفاده نمود. در نتیجه با توجه به بالا بودن میزان این ترکیبات مخصوصا در نمونه اسانس‌های خشک و تازه گیاه می‌توان گفت اگر این گیاه به این صورت فرآوری و مصرف شود دارای اثرات فوق‌الذکر بوده و در تایید عملکرد دارویی این نمونه‌ها به‌عنوان ضددرد، ضدقارچ، ضدالتهاب و ضدعفونی کننده قابل بحث خواهد بود. قبلا خواص آنتی‌بیوتیکی آنها نیز بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس (Dhar et al., 2014) گزارش شده است

همان‌طور که از شکل (۱) مشخص است، عصاره تازه گیاه از بیشترین مقدار اسیدکافئیک برخوردار بود (۰/۰۱٦ گرم بر گرم برگ تازه گیاه). در بررسی‌های مختلف از اسید کافئیک علاوه بر مکمل غذایی و مقوی به‌عنوان آنتی اکسیدان و آنتی‌تومور در درمان بیماری‌های سرطان، ایدز و تب خال قابل بحث می‌باشد (Zhang et al., 2014). در تحقیق کاورو و همکاران (Cavero et al., 2005) گزارش گردید که بین عملکرد آنتی اکسیدانی گیاه با مواد موثره ثانوی آن رابطه مستقیم وجود دارد و اینکه کمیت و کیفیت مواد موثره نیز وابسته به ژنوتیپ، شرایط رویشگاهی،

منشا جغرافیایی، زمان برداشت، اندام مصرفی، شرایط انبار داری، نحوه فراوری، روش استخراج و بعضاً نوع حلال از مهمترین عواملی است که در عملکرد دارویی گیاه اثر بخش است (Cavero et al., 2005; Jiao et al., 2005). در این رابطه بررسیهای مختلفی انجام گرفته و مشخص گردیده که یک رابطه مستقیم میان میزان ترکیبات فنلی، فلاونوییدی و ترپنوییدی اسانس و عصاره گیاه رزماری با عملکرد آنتی‌اکسیدانی (Moreira et al., 2005; Dorman et al., 2004; Zheng et al., 2001)، ضد میکروبی (Gachkar et al., 2007; Celiktas et al., 2007). و ضد التهابی آن دارد. در تایید یافته‌های این تحقیق گزارش‌های دیگر نیز از کامفور (۹-۱۸ درصد)، ۱و۸-سینئول (۱۱-۱۵ درصد)، ترپینئول (۵-۱۳درصد)، بورنیل استات (۶-۱۷درصد) و اسیدهای فنلی به‌عنوان مهمترین ترکیبات موثره آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب و ضدباکتری در اسانس و عصاره گیاه رزماری نام برده شده که مقادیر آنها در گزارش‌های مختلف نیز متفاوت آمده است و احتمالاً بر میزان کیفیت عملکرد دارویی آنها نیز تاثیر می‌گذارد که ناشی از تغییرات مکان و زمان برداشت، زمان ماندگاری و روش‌های استخراج بوده است.

همسو با این تحقیق در چندین بررسی مشابه که به مطالعه و مقایسه کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس برگ‌های گیاه رزماری در روش‌های مختلف استخراج و ماندگاری انجام گردیده، نشان دادند که میزان درصد اسانس و مواد موثره متشکله آن متفاوت گزارش شده است، به‌طوری‌که اسانس نمونه‌های تازه گیاه در ترکیه بیشترین مواد موثره اسانس متعلق به پی-سیمن (۴۴/۲ درصد)، لینالول (۲۰/۵ درصد)، گاما-ترپینن (۱۶/۶ درصد) و بقیه متعلق به تیمول، ۱و۸-سینئول و آلفا- و بتا-پینن بود، در اسپانیا بیشترین مواد موثره اسانس نمونه‌های خشک شده گیاه به‌ترتیب شامل: کامفور، آلفا-پینن، ۱و۸-سینئول، مربنون و بونئول بود. در تایید نهایی یافته‌های این تحقیق، نمونه تازه گیاه رزماری در کشور مصر استخراج گردید، نیز مهمترین مواد موثره اسانس شامل را شامل: وربنون (۱۲/۳ درصد)، کامفور (۱۱/۳ درصد)، بورنیل استات (۷/۶ درصد) و لیمونن (۷/۱ درصد) گزارش شده است، در حالی که در نمونه‌های خشک همین گیاه مهمترین مواد موثره اسانس شامل: کامفور (۱۴/۹ درصد)، پینن (۹/۳ درصد) و ۱و۸- سینئول (۹ درصد) گزارش شد که حاکی از تغییرات کمی و کیفی مواد موثره اسانس در روش‌ها، رویشگاه‌های مختلف و احتمالاً متعاقب آن تغییر اثرات بیولوژیکی و دارویی گیاه خواهد بود (Derwich et al., 2011).

نتیجه‌گیری نهایی

یافته‌های این تحقیق و بررسی منابع نشان داد مواد موثره: کامفور، ۱و۸-سینئول، ایزو-بورنیل استات، پولگون، بتا-کاریوفیلن، آلفا-ترپینئول و لینالول در نمونه اسانس‌های گیاه رزماری غالب بوده و کمیت و کیفیت آنها متاثر از روش‌های مختلف استخراج و زمان ماندگاری و رویشگاه‌های مختلف، متفاوت گزارش شده است. در تحقیقات مختلف از کثرت این ترکیبات در عصاره‌های تازه و خشک گیاه عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان با اثر ضدسرطانی، ضدالتهابی و آنتی باکتریال گزارش شده، لذا می‌توان جهت دست یابی به چنین اهدافی این گیاه را هم در حالت تازه (کثرت مواد موثره بورنیل استات و ۱و۸-سینئول) و هم در حالت خشک (کثرت کامفور و بورنئول) استفاده نمود. نتایج بررسیها نشان داد که بین عملکرد دارویی، کیفیت مواد موثره ثانوی گیاه و روش‌های مختلف استخراج رابطه مستقیم وجود دارد و اینکه کمیت و کیفیت مواد موثره نیز وابسته به ژنوتیپ، شرایط رویشگاهی، منشاء جغرافیایی، زمان برداشت،

اندام مصرفی، انبار داری، نگهداری و نحوه فراوری، روش استخراج و بعضا نوع حلال از مهمترین عواملی است که در عملکرد دارویی گیاه اثربخش است و همچنین به علت افزایش راندمان استخراج اسید کافئیک موجود در عصاره، می توان از گیاه تازه رزماری بعنوان یک آنتی اکسیدان و آنتی تومور مناسب یاد نمود.

سپاسگزاری

با سپاس از مرکز آنالیز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان که در زمینه استفاده از امکانات دستگاهی و آزمایشگاهی به ما یاری رساندند.

References

1. Akyurt, M., Zaki, G., Habeebullah, B. 2002. Freezing phenomena in ice–water systems. Energy conversion and management, 43(14): 1773-1789.
2. Asaoka, T., Kumano, H., Okada, M., Yajima, T., Nakajima, T. 2013. Fundamental study on melting of the ice particle bed due toinflow of warm water: Effect of the initial shape of the ice particle bed on melting behavior. International Journal of Refrigeration, 36(3): 852-861.
3. Asghari, G., Jalali, M., Sadoughi, E. 2012. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from the seeds of *Artemisia aucheri* Boiss. Pharmaceutical Products, 7(1): 11-15.
4. Benincá, J.P., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Fröde, T.S. 2011. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. Food Chemistry, 124(2): 468-475.
5. Cavero, S., Jaime, L., J. Martin-Alvarez, P., Javir Senorans, F., Reglero, G., Ibanez, E. 2005. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). European Food Research and Technology, Madrid, 221(3-4): 478-486.
6. Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., Baser, K. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry, 100(2): 553-559.
7. Chen, W., Vermaak, I., Viljoen, A. 2013. Camphor-A fumigant during the black death and a coveted fragrant wood in ancient egypt and Babylon. Molecules, 18: 5434-5454.
8. Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R. 2011. Aromatic and medical plants of Morocco: Chemical composition of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Juniperus Phoenicea*. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 2(1): 145-153.
9. Dorman, H., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. 2004. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Helsinki, 52(4): 762-770.
10. Dhar, P., Chan, P., Cohen, D.T., Khawam, F., Gibbons, S., Snyder-Leiby, T., Dickstein, E., Rai, P.K., Watal, G. 2014. Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure-activity relationship of α-pinene derivatives. Journal of Agricultural Food Chemistry, 62(16): 3548-3552.
11. Dimitrijević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., Mijin, D.Ž. 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lacticacid and essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. Food Chemistry, 104(2): 774-782.
12. Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry, 110 (1): 76-82.
13. Fletcher, N.H. 1970. The chemical physics of ice, cambridge University Press, New York, 272pp.-13.
14. Frankel, E.N., Huang, S.W., Aeschbach, R., Prior, E. 1996. Antioxidant activity

of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1): 131-135.

15. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry, 102(3): 898-904.
16. Genena, A.K., Hense, H., Junior, A., De Souza, S.M. 2008. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(2): 463-469.
17. Granger, R.E., Campbell, E.L., Johnston, G.A.R. 2005. (+) And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant a1b2g2L GABAA receptors. Biochemical Pharmacology, 69: 1101–1111.
18. Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M., Legarreta, I.G. 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. Meat Science, 81(2): 410-417.
19. Jalali-Heravi, M., Moazeni, R.S., Sereshti, H. 2011. Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. Journal of chromatography A, 1218(18): 2569-2576.
20. Jamshidi, R., Afzali, D. 2009. Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in iran and comparison with other countries. American-Eurasian Journal of Agricultural Environmet Sciences, 5(1): 78-81.
21. Jiao, Z., Liu, J., Wang, S. 2005. Antioxidant activities of blackberry pigment extract. Food Technology and Biotechnology. Zhengzhou, 43(1): 97-102.
22. Kamb, B. 1973. Experimental recrystallization of ice under stress. Flow and fracture of rocks, Geophys. Monogr. Ser, 16: 211-241
23. Khorshidi, J., Mohammadi, R., Fakhr. M.T., Nourbakhsh, H. 2009. Influence of drying methods, extraction time and organ type on essential oil content of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Nature and Science, 7(11): 42-44
24. Kirsch, F., Buettner, A. 2013. Characterization of the metabolites of 1,8-cineole transferred into human milk: concentrations and ratio of enantiomers. Metabolites, 3: 47-71.
25. Liu, T., Sui, X., Zhang, R., Yang, L., Zu, Y., Zhang, L., Zhang, Z. 2011. Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. Journal of chromatography A, 1218(47): 8480-8489
26. Machado, D.G., Cunha, M.P., Neis, V.B., Balen, G.O., Colla, A., Bettio, L.E., Simionatto, E.L. 2013. Antidepressant-like effects of fractions, essentialoil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. Food Chemistry, 136(2): 999-1005
27. Mazandarani, M., Mirdeilami, S.Z., Pessarakli, M. 2013. Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in North east of Iran. Journal of Medicinal Plants Research, 7(16):1063-1069.
28. Moghtader, M., Afzali, D. 2009. Study of the antibacterial properties of the essential oil of Rosemary. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 5(3): 393-397.
29. Moreira, M.R., Ponce, A.G., de Valle, C.E., Roura, S. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Food Science and Technology, Mar del Plata, 38(5):565-570.
30. Okoh, O., Sadimenko, A., Afolayan, A. 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential

oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry, 120(1): 308-312.

31. Pavlovic, I., Petrovic, S., Radenkovic, M., Milenkovic, M., Couladis, M., Brankovic S., PavlovicDrobac, M., Niketic, M. 2012. Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. exHeuffel (*Apiaceae*) essential oil. Food Chemistry, 130: 310-315.
32. Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh Basti, A., Mahmoodi, A., Taheri Mirghaed, A., Yadollahi, F. 2013. Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis, Zataria multiflora, Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae*; the cause of zoonotic disease in farmed fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(3): 702-716.
33. Rozman, T., Jersek, B. 2004. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of Listeria. Acta Agriculturae Slovenica, 93(1): 51-58.
34. Singletary, K., MacDonald, C., Wallig, M. 1996. Inhibition by rosemary and carnosol of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. Cancer letters, 104(1): 43-48
35. Takaki, I., Bersani-Amado, L.E., Vendruscolo, A., Sartoretto, S.M., Diniz, S.P., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K. 2008. Anti-Inflammatory and antinociceptive affects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. Journal Med Food, 11(4): 741–746.
36. Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elimat, T. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plantspecies. Food Chemistry, 104(4): 1372-1378.
37. Terpinc, P., Bezjak, M., Abramovič, H. 2009. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. Food Chemistry, 115(2): 740-744
38. Trouillas, P., Calliste, C., Allais, A. 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative37-properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. Food Chemistry, 80(3): 399-407
39. Vicente de Molina A.R.G., Molina, S., González-Vallinas, M., García-Risco, M.R., Fornari, T., Reglero, G. 2013. Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. The Journal of Supercritical Fluids, 79:101-108
40. Wang, W., Wu, N., Zu, Y., Fu, Y. 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. Food Chemistry, 108(3): 1019-1022.
41. Weerakkody, N.S., Caffin, N., Turner, M.S., Dykes, G.A. 2010. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control, 21(10):1408-1414.
42. Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 105(3):940-949.
43. Yamaguchi, M.U., Barbosa da Silva, A.P., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Conceição da Silva, Cleuza., Nakamura, C. 2009. Effects of a thiosemicarbazide Camphene derivative on trichophyton mentagrophyte. Molecules, 14: 1796-1807.
44. Zaouali, Y., Boussaid, M. 2008. Isozyme markers and volatiles in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae): a comparative analysis of population structure. Biochemical systematics and Ecology, 36(1): 11-21
45. Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology, 48(11): 3144-3152.
46. Zhang, P., Tang, Y., Li, N., Zhu, Y., Duan, J. 2014. Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester

and its derivatives. Molecules, 19:16458-16476.

47. Zheng, W., Wang, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Beltsville, 49(11): 5165-5170.

48. Zargari, A. 1995. Medical Plants. 5th Edition, Tehran University Press.