

## مطالعه ترکیبات شیمیایی، خواص ضدقارچی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی اسانس گیاه دارویی (*Thymus daenensis* Celak.)

عبدالناصر محمدی<sup>۱\*</sup>، سیما شیراوند<sup>۲</sup>، کاترین ابراهیمی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۳</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۰۶

### چکیده

آویشن دنايي با نام علمی، *Thymus daenensis* Celak متعلق به تیره نعنائیان است. اسانس گیاه دارای متابولیت‌های ثانوی با ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی قوی برخوردار است. در این تحقیق به منظور بررسی فیتوشیمیایی اسانس، فعالیت ضد قارچی، خواص آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی، سر شاخه‌های گلدار گیاه در خردادماه سال ۱۳۹۶ از منطقه زاغه استان لرستان برداشت گردید. ترکیبات شیمیایی اسانس به روش تقطیر با آب استخراج و توسط دستگاه کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) آنالیز شد. خواص ضد قارچی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی به ترتیب با استفاده از روش‌های میکرودايلوشن برات، DPPH و MTT انجام شد. عمده‌ترین ترکیبات اسانس گیاه شامل تیمول (۲۴/۷ درصد) و کارواکول (۳۸/۰۵ درصد) بوده و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد اسانس علیه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. اثر مهارکنندگی رادیکالی با افزایش غلظت اسانس، افزایش یافته و  $IC_{50}=63/23$  میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. روش رنگ‌سنجی MTT نشان داد که سمیت اسانس بر روی سلول‌های نفوسیت انسانی ناچیز می‌باشد. با توجه به نتایج مطالعه انجام شده، اسانس آویشن دنايي دارای اثرات قابل توجه ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی بوده، بنابراین می‌تواند به‌عنوان یکی از گیاهان بومی کشور پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را داشته باشد و به عنوان یک کاندیدای خوب در درمان بیماری‌های قارچ‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** آویشن دنايي، آنتی‌اکسیدان، اسانس، سمیت سلولی، فعالیت ضدقارچی

## مقدمه

ضدمیکروبی و ضدقارچی قوی دارد ( Karimi et al., 2010; Nikavar et al., 2004). علاوه بر این اسانس گونه‌های آویشن از جمله آویشن دنیایی به خاطر ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خود قوی بروز می‌دهند. پلی فنول‌ها انواعی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که در پیشگیری بیماری‌ها از جمله سرطان نقش دارند، این ترکیبات تنوع بالایی داشته و اثرات متفاوتی دارند. ترکیبات فنولی شامل ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و فلاونوئیدها، ویژگی‌های ضد جهشی داشته و می‌توانند فعالیت ضدسرطانی و همچنین کاهش قند خون را از خود بروز دهند ( Haghroalsadat et al., 2011 ; Ajith and Janardhanan, 2007).

جنس اسپرژیلوس با بیش از ۱۸۵ گونه، قارچ‌هایی هستند که در همه جا بخصوص در خاک و سبزیجات در حال فساد حضور دارند. حدود ۲۰ گونه از آنها در انسان بیماری ایجاد می‌کند که شایع‌ترین آنها گونه اسپرژیلوس فومیگاتوس و به دنبال آن اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس نایجر می‌باشد ( Khan and Ahmad, 2011; Chakraborty et al., 2006; Dubey et al., 2006). اسپرژیلوزیس یک عفونت فرصت طلب بوده که قارچ‌های عامل آن می‌توانند به اندام‌های داخلی مانند ریه، گوش، چشم، دستگاه گوارش، کلیه و مغز حمله کرده و در این ارگان‌ها آسیب ایجاد نمایند ( Khan and Ahmad, 2011; Chakraborty et al., 2006; Dubey et al., 2006). در مطالعات متعددی که در گذشته انجام شده، خاصیت ضدمیکروبی آویشن دنیایی بر علیه کاندیدا آلبیکنس، لیستریا مونوسایتوزنز، کمپلیوباکتر، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، پseudomonas آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه و ساپروولگنیا پاراسیتیکا به اثبات رسیده است ( Karimi et al., 2010; Ghasemi Pirbalouti et al., 2009a; Ghasemi Pirbalouti et al., 2009c).

آویشن دنیایی (*Thymus daenensis* Celak) گیاهی است متعلق به تیره نعناعیان و دارای دو زیر گونه *T. daenensis* subsp. *daenensis* و *T. daenensis* subsp. *Lancifolius* می‌باشد. زیرگونه *T. daenensis* subsp. *Daenensis* بومی‌زاد (اندمیک) ایران بوده، در مناطق گسترده‌ای از ایران به‌ویژه در مناطق غربی و مرکزی و در ارتفاعات کوه‌های زاگرس رویش دارد ( Khoshokhan et al., 2015; Rustaiee et al., 2009b; Rahimmalek et al., 2011). این گیاه ساقه کوتاه دارد که در پایین کاملاً چوبی است و ارتفاع ساقه گل دهنده آن حداکثر ۳۰ سانتی‌متر است. برگ‌ها ممکن است به‌صورت همپوش یا کوتاه‌تر از میانگره‌ها باشند (Safaei et al., 2017). قسمت دارویی، مورد استفاده در این گیاه سرشاخه‌های گلدار آن بوده و مواد مؤثره تشکیل دهنده آن از سرشاخه‌های گل دار و برگ‌های خشک شده گیاه به دست می‌آید (Amin et al., 2002). جنس آویشن در مناطق وسیعی از جهان به‌عنوان نوشیدنی، طعم دهنده غذا و داروی گیاهی استفاده می‌شود (Nikavar et al., 2004).

گونه‌های آویشن از گیاهان دارویی بسیار مهمی بوده که به طور فراوان مورد استفاده قرار می‌گیرند. کارواکرول و تیمول از ترکیبات عمده انواع آویشن بوده و منشا خواص آن به شمار می‌روند. ترکیب اصلی و عمده آویشن دنیایی تیمول و کارواکرول می‌باشد که مقدار تیمول آن بیش از ۷۰ درصد گزارش شده است (Nikavar et al., 2004). تحقیقات نشان می‌دهد که مواد تشکیل‌دهنده اسانس تحت تاثیر ژنوتیپ مرحله تکوینی، تکاملی و همچنین شرایط محیط و رشد و نمو گیاه قرار می‌گیرد. دم کرده و جوشانده اسانس گل و برگ آویشن دنیایی به‌عنوان مطبوع کننده، طعم دهنده، ضد سرفه، ضداسپاسم، خلط‌آور، ضدنفخ استفاده می‌شود و خاصیت

اسانس‌گیری تا ۳ ساعت بعد از زمان به جوش آمدن آب ادامه یافت و در پایان به اسانس‌های به دست آمده مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از n-هگزان نرمال جهت جداکردن فاز آلی از آبی اضافه گردید. اسانس را در ظرف‌های شیشه‌ای درب‌دار تا زمان آنالیز دستگاهی و انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**آنالیز اسانس:** آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) ساخت شرکت Shimadzu ژاپن، در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه لرستان انجام شد. پس از تزریق اسانس، شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان بازداری ترکیب‌ها (RT)، اندیس بازداری (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه آنها با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی در کروماتوگرام GC با نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Zarin Abaadi et al., 2017).

#### بررسی خواص ضد قارچی

**تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی<sup>۱</sup> MIC و حداقل غلظت کشندگی<sup>۲</sup> MFC:** تعیین MIC در میکروپلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکرودایلوشن برات انجام شد (CLSI document M38-A2, 2008). ابتدا سریال دایلوشن‌هایی (با حجم ۶۴ میکرولیتر) از اسانس (با رقت‌های ۶۴ اسانس + ۹۳۶ میکرولیتر DMS) در

امروزه تعداد زیادی از داروهای ضدقارچی و ضدباکتریایی موثر برای درمان این عوامل عفونی به کارگرفته می‌شوند، اما با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماری‌زای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف این داروها، جایگزین کردن آنها توسط داروهای ضد میکروبی با منشاء گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و سبب تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی شده است. بنابراین با توجه به تنوع آب و هوایی و تنوع فلور گیاهی در ایران، شناسایی مواد موثر گیاهان بومی کشور و استخراج آنها به منظور تولید انبوه و در سطح صنعتی آنها اهمیت زیادی پیدا کرده است. بنابراین هدف این مطالعه شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن دناپی و همچنین بررسی خواص ضد اسپرژیلوسی (قارچی) و خواص آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد. از طرفی به منظور دستیابی و تکامل داروهای ضدسرطان از منابع طبیعی سمیت سلولی اسانس آویشن دناپی علیه گلبول‌های سفید انسانی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری گیاه:** گل و برگ آویشن دناپی در اوایل خرداد ماه سال ۱۳۹۶ از منطقه زاغه لرستان جمع‌آوری شد و پس از شناسایی نمونه‌های جمع‌آوری شده در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک و سپس به کمک آسیاب پودر و برای استفاده‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

**اسانس‌گیری:** اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر صورت گرفت. به این منظور ۵۰ گرم از نمونه خشک و پودر شده آویشن دناپی به بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل و مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر آب تقطیر شده به آن افزوده شد.

1. Minimum Inhibition Concentration  
2. Minimum Fungicidal Concentration

می‌باشد و ۴۵۰ میکرولیتر متانول اضافه و توسط شیکر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و جذب آن توسط دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت و در نهایت با استفاده از فرمول زیر، به دام‌اندازی رادیکیال‌های آزاد DPPH اندازه‌گیری شد.  $RSC\% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$  در این فرمول  $A_0$  و  $A_1$  به ترتیب میزان جذب نوری کنترل منفی (فاقد اسانس) و اسانس (نمونه) را بیان می‌کند. %RSC درصد مهار رادیکیال‌های آزاد DPPH را نشان می‌دهد. **سمیت سلولی:** به منظور بررسی اثر اسانس گیاه آویشن بر رشد و تکثیر سلول‌های لئوسیت، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد (Chang et al., 2007; Kim et al., 2003). این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک ترازولیوم توسط سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است. ۳ میلی‌لیتر خون از یک فرد دهنده سالم در یک لوله آزمایش حاوی (سیرات سدیم ۰.۴٪) ریخته و با ۵ میلی‌لیتر از نمک بافر فسفات (PBS) مخلوط گردید. سپس با دقت ۳ میلی‌لیتر فایکول اضافه، به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور و دمای اتاق سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ سه لایه شامل پلاسما، گلبول سفید، گلبول قرمز تشکیل شد، لایه سفید (کدر) متشکل از گلبول‌های سفید (سلول‌های تک هسته‌ای) با سمپلر جمع‌آوری شده با ۵ میلی‌لیتر PBS مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. این عمل برای شست و شوی لئوسیت‌ها سه بار تکرار شد. سپس به پلیت حاوی سلول، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال بود اضافه گردید (سرم جنین گاوی در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت در بن ماری غیر فعال می‌شود) و سپس با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش سلولی انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از

پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهکی با استفاده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI 1640 تهیه گردید. بعد از کشت عوامل قارچی مورد آزمایش در محیط SDA (سابورو دکستروز آگار) و ایجاد کلنی‌های تازه و خالص اسپور قارچ‌های رشته‌ای و سوسپانسیون سلولی با تعداد سلول‌های قارچی  $3 \times 10^4$  Cell/mL تهیه شد. ۱۰۰  $\mu$ l از محلول تلقیحی کاری سوسپانسیون سلول قارچی به چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر (حاوی رقت‌های اسانس و محیط کشت RPMI 1640 اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. از کنترل استریل (چاهک حاوی محیط RPMI 1640 بدون سوسپانسیون قارچی) و کنترل رشد (چاهک حاوی محیط RPMI 1640 و سوسپانسیون سلول قارچی بدون عوامل ضدقارچی یا اسانس) نیز استفاده گردید. رشد در هر چاهک، با چاهک کنترل رشد مقایسه و هر آزمایش به شکل ۳ گانه انجام شد. برای تعیین حداقل غلظت کشنده‌ی قارچی اسانس‌ها، ۱۰  $\mu$ L از محیط‌های کشت مایع موجود در چاهک‌هایی که عدم رشد چشمی عوامل قارچی رشته‌ای را نشان دادند، بر روی محیط جامد SDA پاساژ داده و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کمترین غلظتی که مانع تشکیل بیش از ۴ کلنی شود، به‌عنوان MFC تعیین شد. تمامی مراحل فوق با داروی استاندارد آمفوتریسین B جهت مقایسه با اثر اسانس انجام شد. **ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** در این روش از DPPH، ترکیب پایدار چربی دوست با جذب بیشینه ۵۱۸ نانومتر استفاده شد (Ayoghi et al., 2009). غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم از اسانس آویشن دنايي با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر تهیه و در لوله‌های جداگانه ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۰۰۰۶ گرم در ۲۵ میلی‌لیتر متانول) که به‌عنوان منبع تولید رادیکیال آزاد

صد مهار رشد سلول‌های در معرض محلول نانوذرات مس با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

= درصد مهار رشد

$$100 - \left( \frac{\text{میانگین جذب سلول‌های در معرض نمونه قرار گرفته}}{\text{میانگین جذب سلول‌های کنترل}} \right) \times 100$$

غلظتی از نمونه که رشد سلول‌ها را به میزان ۵۰ درصد مهار می‌کند به عنوان یک پارامتر برای سمیت سلولی استفاده می‌شود.

### نتایج

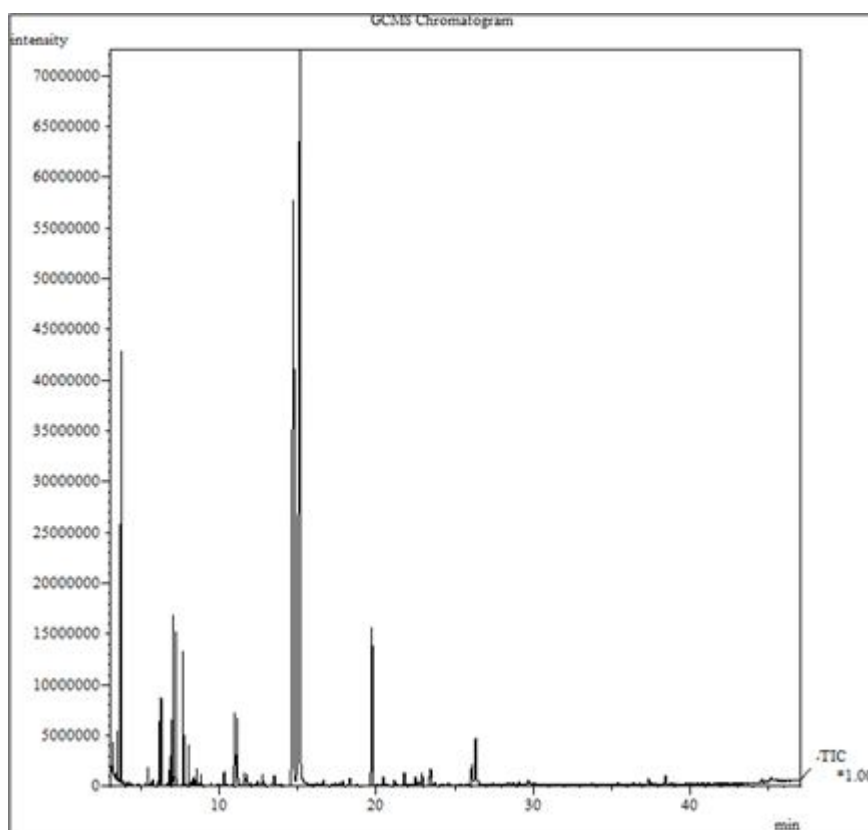
**ترکیبات اسانس:** عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس تیمول متیل اتر (۲۴/۷ درصد)، کارواکرول (۳۸/۰۵ درصد)، ترانس-آلفا-برگاموتن (۵/۰۴ درصد) و ان اکتان (۷/۴۶ درصد) بودند. حدود ۴ درصد ترکیبات اسانس گیاه شناسایی نگردید (جدول ۱ و شکل ۱).

سوسپانسیون حاوی ( $1 \times 10^6$  cell/ml) به چهار ردیف چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه با کف مسطح کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵ درصد  $CO_2$  قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکرو لیتر از اسانس به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه شدن به هر چاهک ۲۰ میکرو لیتر MTT (با غلظت ۵mg/ml) اضافه و به آرامی مخلوط، به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شد. پس از طی زمان لازم مقداری از محلول رویی هر چاهک به آرامی خارج و به هر خانه ۱۰۰ میکرو لیتر محلول DMSO جهت حل کردن فورمازان ارغوانی رنگ اضافه گردید. پس از ۲ ساعت انکوبه شدن جذب نوری با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر Biotek در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. در

جدول ۱: معرفی ترکیبات اسانس گیاه *Th. daenensis* جمع‌آوری شده از منطقه زاغه استان لرستان در مرحله گلدهی

ردیف	نام ترکیب	درصد	KI
1	n- Octane	4.67	800
2	alpha-Pinene	0.27	939
3	Camphen	0.1	953
4	3-Octanone	1.3	986
5	n-Decane	1.36	999
6	alpha-Terpinene	0.5	1018
7	para-Cymene	3.07	1026
8	Limonene	0.11	1031
9	1,8-Cineol	2.78	1033
10	gamma- Terpinene	2.49	1062
11	Linalool	0.8	1095
12	Terpinolene	0.23	1088
13	Camphor	0.46	1143
14	Borneol	1.92	1165
15	Dihydrocarvone	0.37	1200
16	Thymoquinone	0.35	1294
17	Thymol Methyl ether	24.74	1290
18	Carvacrol	38.05	1298
19	Thymol acetate	0.14	1355
20	Copaen	0.15	1376
21	Tetradecane	0.25	1399
22	trans-alpha-Bergamoten	5.08	1436
23	Aromadendren	0.27	1439
24	alpha-Humulene	0.15	1454
25	Germacren D	0.39	1480

26	Viridiflorene	0.33	1495
27	alpha-Murolene	0.16	1499
28	beta-Bisabolene	0.38	1509
29	gamma- Cadinene	0.28	1513
30	delta- Cadinene	0.52	1524
31	Calamenene	0.14	1528
32	Caryophyllene oxide	1.9	1581
33	Carotol	0.72	1596



شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC/MS مربوط به اسانس *Th. Daenensis*

در میلی‌لیتر و MFC ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۳ نشان می‌دهد که بین میانگین MIC و MFC اسانس *Th. Daenensis* در غلظت‌های مختلف بر روی گونه‌های آسپرژیلوس در مقایسه با شاهد آمفوتریسین B (شاهد) در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دنت استفاده شد ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲).

نتایج حاصل از اثرات ضد قارچی اسانس *Th. daenensis* بر روی گونه‌های آسپرژیلوس: بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ۶۴ تا ۰/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از روش میکرودايلوشن براث بر رشد دو گونه آسپرژیلوس نشان داد که اسانس این گیاه قادر به مهار رشد تا غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین MIC اسانس این گیاه به‌ترتیب برای گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس و نایجر ۰/۵ و ۱ میکروگرم

جدول ۲: نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثرات ضدقارچی اسانس *Th. Daenensis* بر روی گونه‌های آسپرژیلوس

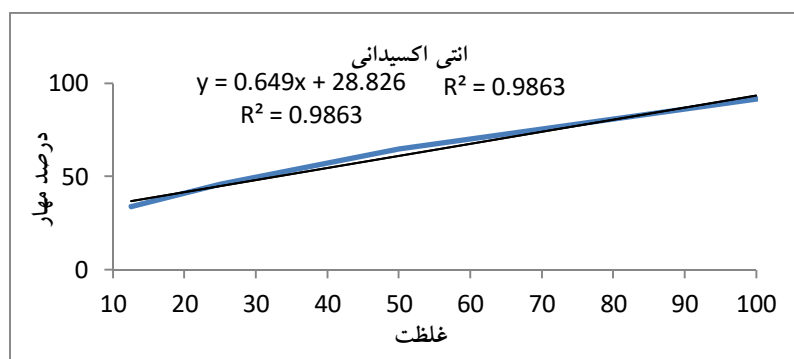
میانگین MFC	میانگین MIC	محدوده غلظت (میکروگرم/ میلی لیتر)	اسانس	گونه قارچی
1 ± 0/1	0/5 ± 0/05 <sup>B</sup>	۱۲۸ - ۰/۰۳	زمان گلدهی	آسپرژیلوس فومیگاتوس
2 ± 0/1	1 ± 0/1 <sup>A</sup>	۱۲۸ - ۰/۰۳	آمفوتریسین (شاهد) B	
2 ± 0/1	1 ± 0/1 <sup>A</sup>	۱۲۸ - ۰/۰۳	زمان گلدهی	آسپرژیلوس نایجر
2 ± 0/1	1 ± 0/1 <sup>A</sup>	۱۲۸ - ۰/۰۳	آمفوتریسین (شاهد) B	

اسانس، اثر مهار کنندگی رادیکالی آن افزایش می‌یابد بالاترین درصد تخریب رادیکال‌های آزاد، برای غلظت ۱۰۰ میکرولیتر و پایین ترین درصد برای ۱۲/۵ میکرولیتر می‌باشد. در این تحقیق میزان IC50 آویشن دناپی ۳۲/۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر تشخیص داده شد (نمودار ۲). IC50 به‌طور معکوس با فعالیت آنتی‌رادیکالی ترکیب‌ها در ارتباط می‌باشد. هرچه IC50 کمتر باشد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است. نتایج بدست آمده با اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت (استاندارد) مقایسه گردید (جدول ۳، شکل ۲).

**فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس:** بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش رنگ ارغوانی رادیکال آزاد DPPH در طول موج ۵۱۸ نانومتر توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان کاهش یافته و به رنگ زرد تبدیل می‌شود. قدرت اسانس آویشن دناپی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طوری که مشخص است رابطه مستقینی بین غلظت اسانس و اثرم هار کنندگی رادیکالی آن برقرار می‌باشد و با افزایش میزان غلظت

جدول ۳: توانایی مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد اسانس *Th. daenensis*

مهار رادیکال آزاد (%)	اسانس	غلظت (μg/ml)
۹۳	۹۲	۱۰۰
۸۳	۶۵	۵۰
۷۸	۴۶	۲۵
۷۷	۳۴	۱۲/۵



شکل ۲: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دناپی در آزمایش تخریب رادیکال‌های DPPH

در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر موجب اندکی لیز سلولی گردید، هرچه غلظت اسانس کمتر باشد لیز سلولی آن کم خواهد بود بطوریکه با افزایش غلظت لیز سلولی افزایش می یابد (جدول ۴).

سمیت سلولی: سمیت سلولی اسانس در غلظت ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم بعد از ۲۴ ساعت بر روی لئوسیت های سالم انسان به روش MTT تخمین زده شد. همچنان که در جدول ۴ نشان داده شده، اسانس

جدول ۴: نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک اسانس *Th. Daenensis*

مهار رادیکال آزاد (%)	غلظت اسانس ( $\mu\text{l}$ )
IC50	سمیت سلولی (%)
۲۳۱ $\mu\text{l}$	۲۱
	۷
	۴
	۱
	۱۰۰
	۵۰
	۲۵
	۱۲/۵

استخراج و نحوه خشک شدن نمونه ها در دمای مناسب باشد (Rahimmalek and Goli, 2013). ترکیبات فنل و فلاونوئیدی دارای خواص بیولوژیکی متعددی مانند خاصیت آنتی اکسیدانی به دام انداختن رادیکال های آزاد و خاصیت ضد التهاب هستند. این ترکیبات همچنین با به تاخیر انداختن آسیب های اکسیداتیو در چربی ها و دیگر مولکول های مهم مانع بوجود آمدن سرطان و بیماری های کرونر قلب می شوند (Kris- Etherton et al., 2002). تیمول یک ضد عفونی کننده موضعی بوده از آن در ساخت کرم ها، لوسیون ها، پمادها استفاده می شود و در درمان بیماری های پوستی بخصوص زونا موثر می باشد. این ترکیب خاصیت قارچ کشی و کرم کشی دارد (Ahmad et al., 2010). تیمول از ادامه حیات و تشکیل هیف های قارچ ها تداخل ایجاد کرده و در غشاء سلول کاندیدا آلبیکنس و متابولیسم آن اثر گذاشته و احتمالاً بر دیواره سلول قارچی نیز موثر است (Braga et al., 2007). کارواکرویل و تیمول دارای طیف وسیعی از اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی بوده، این مواد فعالیت ATPase را مهار کرده و نفوذپذیری غیراختصاصی غشای سلول قارچی را افزایش می دهند علاوه بر این

آنالیز آماری: پس از گردآوری اطلاعات بر پایه اصول آماری، جهت بررسی اثر غلظت های مختلف اسانس بر روی گونه های آسپرژیلوس از تکنیک های آماری شامل آزمون آنالیز واریانس ANOVA (با استفاده از نرم افزار Minitab 16) و تست دنت (Dunnett) استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی اختلاف میانگین اسانس ها محاسبه گردید.

#### بحث

در مطالعه حاضر ترکیبات شیمیایی، خواص ضد قارچی، قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و سمیت سلولی آویشن دناپی ارزیابی گردید. در این پژوهش عمده ترین ترکیبات موجود در اسانس تیمول متیل اتر (۲۴/۷ درصد) و کارواکرویل (۳۸/۰۵ درصد) بودند که با مطالعات انجام شده توسط دیگر محققین مطابقت دارد ( Talebi et al., 2017; Mehran et al., 2015; Saidi, 2014). مقایسه ترکیب های اصلی اسانس مورد آزمایش این مطالعه با مطالعات قبلی نشان می دهد مقدار آنها در نمونه های مختلف متفاوت می باشد. این تفاوت می تواند ناشی از تاثیر عملکرد عوامل بیرونی و درونی مانند تنوع ژنتیکی، وضعیت کشت، روش های



متانولی این گیاه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتری بوده و می‌تواند به‌عنوان محافظ در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد

در مقاله مروری زرشناس و کرینن ( Zarshenas and Krenn, 2015). IC50 (غلظتی از اسانس که ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند) اسانس گونه‌های مختلف آویشن با هم مقایسه شد که برای آویشن دناپی ۹۹/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید در مطالعه نیک‌آورواتباتی ( Nickavar and Esbati, 2012) C50 عصاره‌های هیدروالکلیک آویشن دناپی با روش‌های DPPH، ABTS و بتا کاروتن به‌ترتیب ۴۸/۶۸، ۲۱۰/۹۰ و ۲۳/۶۸ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. در مطالعه حاضر میزان IC50 اسانس آویشن دناپی ۳۲/۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تشخیص داده شد. از آنجائی که IC50 رابطه معکوسی با فعالیت ضدرادیکالی ترکیب‌ها دارد، لذا هرچه IC50 کمتر باشد، فعالیت ضد رادیکالی آن بیشتر خواهد بود، که مطالعه حاضر خواص آنتی‌اکسیدانی بهتری در مقایسه مطالعات انجام سایر محققین دارد ( Borra et al., 2013). از طرفی هرچه میزان تیمول و کارواکول ترکیبی بیشتر باشد، آن ترکیب درصد بیشتری از رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود بروز می‌دهد که در مطالعه حاضر نیز بیشترین میزان ترکیبات تشکیل دهنده این گیاه تیمول و کارواکول می‌باشد به همین خاطر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار بود ( Zarin Abaadi et al., 2017).

در بررسی سمیت سلولی آویشن دناپی و آویشن شیرازی بر ناپلئوس توسط مشجور و همکاران (Mashjur et al., 2016)، این دوگونه فاقد سمیت سلولی بر روی ناپلئوس بود. نتایج تحقیقات صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016)، نشان داد که عصاره هیدروالکلی آویشن دناپی با اثر ضدسرطانی

کارواکول با افزایش نفوذپذیری غشاء، قارچ‌ها را نسبت به سایر مواد ضدقارچی حساس و آسیب پذیر می‌سازد (Mohammadi et al., 2015). اثر قارچ کشی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه مربوط به محتوای تیمول آن است که در مطالعه ما و دیگر محققین اثر خود را نشان داده است (Zamboneli et al., 2004). تیمول و کارواکول از نظر شیمیایی ایزومر هم هستند کارواکول از رشد برخی باکتری‌ها از جمله اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس جلوگیری می‌کند (Mehran et al., 2015).

در مطالعه تیموری اسانس آویشن دناپی فعالیت ضد قارچی قابل توجهی بر علیه اسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس و ساکارومیسس سرویسیه از خود نشان داده است (Teimouri et al., 2012). در مطالعه دیگری که توسط داداش پور و همکاران (Dadashpour et al., 2011) انجام شد، فعالیت ضد باکتریایی اسانس آویشن دناپی بر علیه کاندیدا آلبیکنس، اشریشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس بررسی شد و MIC آنها به‌ترتیب ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. محمدی و همکاران فعالیت اسانس *Thymus eriocaly* علیه اسپرژیلوس نایجر را مورد مطالعه قرار دادند نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس این گونه گیاهی در غلظت ۱۲۵PPM مانع رشد اسپرژیلوس نایجر گردید (Mohammadi et al., 2015). در مطالعه حاضر مقایسه میانگین اسانس آویشن دناپی با داروی ضدقارچی آمفوتریسین B نشان‌دهنده اثرات ضد اسپرژیلوسی گونه مورد مطالعه بوده که در مقایسه با مطالعات گذشته اثرات ضد قارچی قوی تری را از خود نشان داده است (جدول ۳). مضافی و همکاران (Moshafi, 2007) اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره آویشن دناپی را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که اسانس و عصاره

وابسته به دوز و زمان، روی سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود، به طوری که به تدریج و با افزایش زمان و در دوزهای بالاتر رشد سلول‌های سرطانی بیشتر مهار می‌شود و این عصاره سمیت قابل توجهی را روی سلول‌های فیبروبلاست طبیعی از خود نشان نداد. داداش‌پور و همکاران (Dadashpouret al., 2011). سمیت سلولی اسانس آویشن دناپی را بر روی لئوسیت‌های طبیعی انسان و سلول‌های سرطانی Hela مورد بررسی قرار دادند. اسانس آویشن دناپی فعالیت سیتوتوکسیک بسیار خوبی روی رده سلول‌های سرطانی هلا IC50 (۴/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با سلول‌های طبیعی انسان (۱۴۴۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) از خود نشان داد در مطالعه حاضر سمیت سلولی لئوسیت‌های انسانی جزئی بوده و IC50 آن ۲۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد (جدول ۴).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس آویشن دناپی (*Th. daenensis*) دارای پتانسیل بالایی از فعالیت‌های ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و اثرات سمیت سلولی بر روی سلول‌های انسانی و سرطانی می‌باشد. این پتانسیل ناشی از ترکیبات مانند تیمول و کارواکرول بوده که از خاصیت ضد میکروبی و ضدقارچی خوبی برخوردار می‌باشند. کارواکرول و تیمول ترکیبات اصلی اسانس آویشن دناپی (*Th.*

### نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان از اسانس این گیاه و فرآورده‌های آن برای درمان برخی از عفونت‌های قارچی و سرطانی استفاده نمود که این مسئله نیاز به تحقیقات گسترده‌تر اسانس آویشن دناپی بر روی نمونه‌های حیوانات آزمایشگاهی دارد. با توجه به محدودیت‌های روز افزون استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروبی نظیر عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی، نیاز به جایگزینی این مواد با مواد طبیعی از جمله اسانس‌های این گیاهان دارد و می‌تواند در کنترل بیماری‌های سرطانی و میکروبی مفید باشد. از طرفی با توجه به نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی، می‌توان با جایگزین کردن اسانس آن به جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در مواد غذایی خطرات ناشی از مصرف این غذاها را نیز کاهش داد.

### References

- Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L.A. and Manzoor, N. 2010. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, 81: 1157-62.
- Ajith, T.A. and Janardhanan, K.K. 2007. Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. *Journal Clin. Biochem. Nutr.*, 40(3): 157-62.
- Amin, Gh.R. 2002. The most common traditional medicinal plants of Iran. Tehran: Tehran University of Medical Sciences and Health Services.
- Ayoghi, F., Bazgarfaravi, M, Sahari, M.A. and Naghdibody, H.A. 2009. Antioxidant activity of essential oil *Anethum graveolens* in soybean oil and its comparison with chemical antioxidants. *Iranian Journal of Medicinal Plants*, 2(30): 71-83.
- Borra, S.K., Gurumurthy, P., Mahendra, J., Jayamathi, K.M., Cherian, C.N. and Chand, R. 2013. Antioxidant and free radical scavenging activity of curcumin

- determined by using different in vitro and ex vivo models. Journal of Medicinal Plants Research, 7(36): 2680-2690.
6. Braga, P.C., Alfieri, M., Culici, M. and Dal Sasso, M. 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. Mycoses, 50(6): 502-506.
  7. Chakraborty, A., Marak, R.S.K., Sing, S., Gupta, S.O., Hurst, S.F. and Padhye, A.A. 2006. Brain abscess due to *Aspergillus nidulans*. Journal of Medical Mycology, 16: 100-104.
  8. Chang, K.H., Park, J.S., Choi, J.H., Kim, C.J. and Paik, H.D. 2007. Cytotoxic effects of partially purified substances from *Bacillus polyfermenticus* SCD supernatant toward a variety of tumor cell lines. Food Sci. Biotechnol, 16:163-6.
  9. CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2 .Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
  10. Dadashpour, M., Rasooli, I., Sefidkon, F., Taghizadeh, M. and Darvish Alipour Astaneh, S. 2011. Comparison of Ferrous Ion Chelating, Free Radical Scavenging and Anti Tyrosinase Properties of *Thymus daenensis* Essential Oil with Commercial Thyme Oil and Thymol. Journal of Zanjan University of Medical Sciences, 19(77): 41-52.
  11. Dadashpour, M., Rasooli, I., Sorouri, Z.R., Sefidkon, F., Taghizadeh, M. and Darvish, S.A.A. 2011. Antimicrobial, nitric oxide radical scavenging and cytotoxic properties of *Thymus daenensis* essential oil. Modarres Journal Medical Sciences, 14(1): 37-47.
  12. Dubey, A., Patwardhan, R.V., Sampth, S., Santoshi, V., Kolluri, S. and Nanda, A. 2006. Intracranial fungal granuloma: analysis of 40 patients and review of the literature. *Surgical Neurology*, 63: 254-260.
  13. Ghasemi Pirbalouti, A., Bahmani, M. and Avijgan, M. 2009a. Anti-candida activity of Iranian medicinal plants. Electric Journal Biotechnology, 5: 85-88.
  14. Ghasemi Pirbalouti, A., Taheri, M., Raisee, M., Bahrami, H.R. and Abdizadeh, R. 2009c. *In vitro* antifungal activity of plant extracts on *Saprolegnia parasitica* from cutaneous lesion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Journal Food Agric Environ, 7: 94-96.
  15. Haghroalsadat, F., Vahidi, A., Sabor, M.H. Azimzadeh, M., Kalantar, S.M. and Faldini, M.S. 2011. *Bunium persicum* (Green Caraway) native of Yazd province: chemical assessment and Evaluation of its antioxidant effects. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 19(4): 472-481.
  16. Karimi, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Yousefi, M. and Golparvar, A.R. 2010. Evaluation of ecotype and chemotype diversity of *Thymus daenensis* Celak. on Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs), 1(3): 1-10.
  17. Khan, M.S.A. and Ahmad, I. 2011. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. Applied microbiology and biotechnology, 90(3): 1083-1094.
  18. Khoshokhan, F., Babalar, M., Pourmeidani, A. and Fatahi, M. 2015. antioxidant activity, total phenolics and oil content of some *Thymus kotschyanus* and *thymus daenensis* populations. Plant Production Technology, 15(1): 153-162.
  19. Kim, J., Woo, H.J., Kim, Y.S., Kim, K.H. and Lee, H.J. 2003. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasmic of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr Cancer, 46:197-201.
  20. Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. and Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and

- cancer. The American journal of medicine, 113(9): 71-88.
21. Mashjur, S., Azan, Z., Kazemian, E. and BiniAZE, M. 2016. Evaluation of cytotoxic effects of Medicinal plant extracts of Thyme and *Satureja* on *Artemia salina*. Scientific Journal of Aquatic Ecology, 5(3): 145-150.
  22. Mehran, M., Hosseini, H., Hatami, A., Taghizade, M. and Safaei, A. 2015. Evaluation of essential oil compounds of seven species of Thyme and comparing their antioxidant properties. Journal of Medicinal Plants Research, 15(2): 135-140.
  23. Mohammadi, A., Amiri, H., Khodayari, H., Zarei, A., Eghbali, D. and Azarbani, F. 2015. Study of Phytochemical and anti-Candidiasis of essential oil of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas against Candida species in three growth steps. Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants, 3(2): 8-17.
  24. Moshafi, M.H. Mansouri, S., Sharififar, F. and Khoshnoodi, M. 2007. Antibacterial and antioxidant effect of the essential oil and extract of *Zataria multiflora* Bioss. Journal Food Science and Technology. 14: 33-43.
  25. Nickavar, B. and Esbati, N. 2012. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. Journal of acupuncture and meridian studies, 5(3): 119-125.
  26. Nikavar, B., Mojab, F. and Doolatabadi, R. 2004. Study of component of *Thymus daenensis* flowering branches. Iranian Journal of Medicinal Plants, 4(13): 45-49.
  27. Rahimmalek, M. and Goli, S.A.H. 2013. Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. Industrial Crops and Products, 42: 613-619.
  28. Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M. and Sayed Tabatabaei, B.E. 2009b. Genetic variability and geographical differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Cleak, an endangered aromatic and medicinal plant as revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Biochem Genet, 47: 831-842.
  29. Rustaiee, A., Sefidkon, F., Tabatabaei, S.M.F., Omidbaigi, R. and Mirahmadi, S.F. 2011. Chemical polymorphism of essential oils from five populations of *Thymus daenensis* Celak. subsp. *Daenensis* endemic to Iran. Journal Essent Oil Research, 23(3): 6-11.
  30. Sadeghi, S.F., Sazegar, H. and Ghasemi, P.A. 2016. Cytotoxic effect of hydroalcoholic extracts of *Kelussia odoratissm*. Pars Journal of Medical Sciences, 14(2): 59-67.
  31. Safaei, L., Sharifi Ashoorabadi, E and Afuni, D. 2017. Effect of application of chemical fertilizers, livestock and their integration on the performance of compounds Phytochemical Essential Oil of Medicinal Herbs *Thymus daenensis* Celak. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5(2): 13-24.
  32. Saidi, M. 2014. Antioxidant activities and chemical composition of essential oils from *Satureja khuzestanica*, *Oliveria decumbens* and *Thymus daenensis*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(3) :513-521.
  33. Talebi, E., I. Nasrollahi, I., Khosravinezhad, M., Shivakumar, S. and Nemati, Z. 2017. A comparative analysis of some essential oil plant species, composition, antimicrobial properties and their applicability in the field of drug discovery - a review. International Journal of Bioorganic Chemistry, 2(2):77-82.
  34. Teimouri, M., 2012. Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. J Med Plants Res, 6(4): 631-635.
  35. Zambonelli, A., D'Aulerio, A.Z., Severi, A., Benvenuti, S., Maggi, L. and Bianchi, A. 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. Journal of Essential Oil Research, 16(1): 69-74.
  36. Zarin Abaadi, M.M., Seidi, M. and Mohammadi, Y. 2017. Essential oil Screening and antioxidant activity of *Satureja bachtiarica* Bunge. population

in Ilam Province for Isolation of Promising Chemotypes. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5(2): 13-24.

37. Zarshenas, M.M. and Krenn, L. 2015. A critical overview on *Thymus daenensis* Celak.: phytochemical and pharmacological investigations. Journal of integrative medicine, 13(2): 91-98.

## Chemical composition, anti-fungal properties, anti-oxidant activity and cytotoxicity of *Thymus daenensis* Celak. essential oil

Mohammadi Gholami, A.N.<sup>1\*</sup>, Shiravand, S.<sup>2</sup>, Ebrahimi, K.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor of Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>3</sup>Department of Biology, Payam-e-Noor University (PNU), Tehran, Iran

Received Time: 21-10-2017

Accepted Time: 25-2-2018

### Abstract

*Thyme daenensis*, scientifically known as *Thymus daenensis* Celak belongs to the Lamiaceae family. The aerial part of *Thymus daenensis* encompasses phenolic compounds and has powerful antifungal and antioxidant properties. Due to its potential to produce the secondary metabolites, it also has anti-mutation and anti-cancer properties. In this study, in order to investigate the phytochemicals, antioxidant, antifungal properties and also the cell cytotoxicity, the aerial parts of *Thymus daenensis* were collected from Zagheh area in Lorestan province Khorramabad, in June 2017. The chemical compounds of the essential oil were extracted using water distillation and analyzed using Chromatography (GC) and Gass Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS). Broth microdilution, MTT, and DPPH methods were utilized to determine the antifungal and antioxidant properties and cell cytotoxicity, respectively. In the essential oil, the most significant compounds were thymol (24.7%) and carvacrol (38.5%) and the Minimum inhibitory concentration against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* were respectively 0.5 and 1 µg/ml. The radical inhibitory effect increased as the density of the essential oil increased (IC<sub>50</sub>=63/23). The MTT assay indicated that the impact of the essential oil cytotoxicity on human lymphocyte cells was insignificant. According to the results obtained, it can be concluded that the essential oil of *Thymus daenensis*, as one of Iran's indigenous plants, has considerable antioxidant properties that have potential to be used in pharmaceutical industries and act as a good candidate in the fungal diseases' treatment.

**Keywords:** Antifungal activity, Antioxidant, Cytotoxicity, Essential oil, *Thymus daenensis*

\* Corresponding author; Mohammadi.ab@lu.ac.ir