

(مقاله کوتاه علمی)

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و فعالیت ضد میکروبی سرشاخه‌های هوایی
گیاه به لیمو (*Lippia citriodora* H.B.K.) کاشته شده در خوزستان در
دو فاز قبل و بعد از گلدهی

زهرا زارع*

استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۰

چکیده

گیاه به لیمو *Lippia citriodora* H.B.K برای مصارف غذایی، آرایشی و بهداشتی به ایران وارد شده است و امروزه در مناطق مختلف کشور کشت می‌شود. هدف از این پژوهش شناسایی و مقایسه ترکیب‌های شیمیایی موجود در اسانس سرشاخه‌های هوایی گیاه در دو فاز قبل و بعد گلدهی و مقایسه فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره متانلی اندام‌های ذکر شده بود. بدین منظور سرشاخه‌های گیاه در دو مرحله: رویشی و زایشی از محل مزرعه در خوزستان در خردادماه ۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری و بازده اسانس محاسبه گردید. ترکیب‌های تشکیل دهنده نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی و محاسبه شاخص بازداری و مقایسه آن با ترکیب‌های موجود شناسایی شدند. برای سنجش فعالیت ضد میکروبی، عصاره‌های متانلی بخش‌های مذکور به روش پرکولاسیون تهیه شد و علیه ۴ سویه باکتری گرم مثبت، ۴ سویه باکتری گرم منفی و ۲ سویه قارچ به روش دیسک دیفیوژن و اندازه‌گیری قطراله عدم رشد، بررسی شد. محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. اجزای عمده اسانس اندام رویشی ژرانیول (۳۵,۷۸ درصد) و زینجیرین (۱۹,۹ درصد) و اجزای عمده اسانس اندام زایشی شامل داوانون (۳۶,۴ درصد) و پی-سیمن (۱۶,۵ درصد) است. نتایج برای هر دو عصاره فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی نشان داد. در بین باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه، فعالیت ضد قارچی عصاره‌ها از فعالیت ضد باکتریایی بیشتر مشاهده شد. در میان باکتری‌ها، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌ها گرم منفی حساسیت بیشتری به غلظت‌های عصاره‌ها نشان دادند. به علاوه در تمامی سویه‌های به کار رفته با افزایش غلظت عصاره‌ها اثرات ضد میکروبی افزایش یافت. میزان فعالیت‌های ضد میکروبی بین عصاره‌های رویشی و زایشی تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: اسانس به لیمو، *Lippia citriodora* H.B.K، ژرانیول، داوانون، ضد باکتریایی و اثرات ضدقارچی.

مقدمه

عمده ترین ترکیبات شیمیایی این گیاه را اسانس‌ها و فلاونوئیدها تشکیل می‌دهند. تا کنون شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس برگ‌ها و سرشاخه‌های رویشی این گیاه توسط برخی پژوهشگران صورت گرفته است و به‌طور عمده لیمونن، سینئول و ژرانیول، گزارش شده‌اند (Mojab et al., 2002; Khani et al., 2012). همچنین کاربوفیلین اکساید، ۱ و ۸ سینئول و نرول نیز به‌عنوان عمده ترین ترکیبات شیمیایی اسانس بخش‌های هوایی گیاه به لیموی کاشته شده در ایران در منطقه ی کرج گزارش شده است (Nazari et al., 2009).

برگ به‌لیمو علاوه بر اسانس حاوی آلکالوئید، فلاونوئید، موسیلاژ، تانن و اسیدهای فنلی می‌باشد (Roodbaraky, 2017) چندین فلاونوئید، فنلیک اسید و فینیل پروپانوئید نیز به‌عنوان ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه گزارش شده است (Kiran Kumar et al., 2008).

مواد و ترکیبات مؤثره گیاهان در ابعاد وسیعی از زندگی انسانها کاربرد دارند. از جمله، دارای اثرات ضد میکروبی، ضدقارچی، ضدسرطانی و... هستند که به عنوان یک عامل درمانی در فیتوتراپی مطرح می‌باشد (Bassole et al., 2003). اثرات ضد باکتریایی *Lippa citriodora* علیه باکتری‌های مختلف و از جمله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنیسیلین گزارش شده است (Ansari et al., 2012).

استفاده از داروهای گیاهی و فراورده‌های طبیعی در سال‌های اخیر رو به افزایش بوده و مهمترین دلیل آن اثبات اثرات مخرب داروهای شیمیایی و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی تهدید کننده کره زمین بوده است (Akhbari, 2015).

با توجه به موارد فوق، و از آنجا که ترکیبات شیمیایی گیاه رابطه مستقیمی با بیوسنتز، متابولیسم و

جنس *Lippia* از خانواده شاه پسند به تقریب ۲۰۰ گونه علفی، بوته‌ای و درختچه‌ای را شامل است که اهمیت زیادی در طب سنتی و درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند. گونه *Lippia citriodora* H.B.K. از این جنس اهمیت زیادی از این نظر دارد و در این پژوهش به آن پرداخته شده است (Pascual et al., 2001).

به لیمو درختچه‌ای است خزان پذیر، ارتفاع این گیاه به ۳ تا ۵ متر می‌رسد. برگ‌های این گیاه به صورت کشیده و به رنگ سبز کم‌رنگ دیده می‌شوند و به صورت دسته‌های سه تایی بر روی ساقه قرار می‌گیرند. گل‌های این گیاه به رنگ بنفش کم‌رنگ بصورت گل آذین پانیکول در انتهای ساقه وجود دارند. به لیمو بومی کشورهای آمریکای جنوبی (شیلی و پرو) است و جهت مصارف دارویی و معطر به ایران وارد و در مناطق مختلف کشت می‌گردد و کشت و کار آن به‌منظور استفاده از خواص دارویی آن می‌باشد. در طب گیاه درمانی ایران برگ‌های این گیاه به‌صورت دم‌کردنی، به‌منظور آرام بخشی، ضد تشنج و برطرف کننده ی تپش قلب و سرگیجه مصرف دارد (Babaei, 2014). در بسیاری از نقاط جهان نیز، چای این گیاه برای درمان آسم، سرماخوردگی، تب، اسهال و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود و همچنین اثرات ضدالتهاب و ضد درد و درمان نیش حشرات دارد (Kiran Kumar et al., 2008). اسانس این گیاه نیز دارای اثرات ضد میکروبی علیه میکرو فلور دندان است (Roodbaraky et al., 2017). همچنین اسانس این گیاه در صنایع غذایی و تهیه عطر و ادکلن بسیار کاربرد دارد. برگ‌ها و پیکر رویشی تازه به لیمو حاوی اسانسی می‌باشند که بوی لیمو می‌دهد و عطر دلنشینی دارد (Ghaemi et al., 2006).

بخش زایشی ۰/۵ v/w و وزن مخصوص آن ۰/۹۷۸ گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. هر دو اسانس به رنگ زرد کم رنگ و بسیار معطر بود. اسانس‌ها در ظروف شیشه‌ای کوچک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌های GC/MS نگهداری شدند.

تجزیه و شناسایی اسانس: بدین منظور ۱ میکرولیتر از اسانس تهیه شده را به دستگاه GC/MS تزریق نموده و با استفاده از تفسیر آن‌ها ترکیبات اسانس‌ها شناسایی شد (Vicuna, 2009).

اسانس به وسیله دستگاه GC/MS با مشخصات گاز کروماتوگرافی مدل HP- (Hewlett Packard) 6890 و طیف سنجی جرمی مدل HP-5973 (Hewlett Packard) مورد تجزیه کیفی قرار گرفت. ستون به طول ۳۰ متر، قطر ستون ۰,۲۵ میلی‌متر و نوع ستون HP-5MS و گاز حامل هلیوم و سرعت جریان گاز ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. برنامه‌ریزی دمایی ستون از ۴۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. طیف‌های جرمی در ۷۰ الکترون ولت و با مدل یونیزاسیون Electron impact تهیه شدند. شناسایی ترکیبات اصلی متشکله اسانس با مقایسه طیف جرمی این ترکیبات با طیف جرمی ترکیبات استاندارد صورت گرفت.

عصاره گیری: ۳۰ گرم از پودر خشک شده هر کدام از بخش‌های رویشی و زایشی گیاه به‌طور جداگانه توزین شد و با استفاده از حلال متانل ۸۰ درصد و به روش پراکولاسیون عصاره‌گیری شد و توسط دستگاه روتاری و به روش تقطیر در خلا تغلیظ گردید. این عصاره به‌عنوان خالص در نظر گرفته شد و از آن غلظت‌های ۵۰ درصد، ۲۵ درصد، ۱۲,۵ درصد و ۶,۲۵ درصد با استفاده از دی‌متیل سولفوکسید ۱۰ درصد (DMSO) تهیه گردید (Kunle et al., 2003).

سنجش میزان فعالیت ضد میکروبی: میزان فعالیت ضد میکروبی از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد بر

فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه و نیز مراحل نموی گیاه دارند، که تابع شرایط اقلیمی و محیط زیست گیاه می‌باشند در این پژوهش بر آن شدیم که ترکیبات اسانس برگ‌ها و سرشاخه‌های رویشی گیاه و نیز ترکیبات اسانس گل‌ها و مریستم‌های زایشی گیاه را که از منطقه‌ی هفت تپه خوزستان جمع‌آوری گشته است، به‌طور جداگانه بررسی و با یکدیگر مقایسه کرده و همچنین با توجه به این که امروزه مسئله مقاومت دارویی و عوارض ناشی از آن در درمان آنتی‌بیوتیکی، اهمیت استفاده از گیاهان دارویی را بیشتر کرده است به بررسی مقایسه‌ای فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های متانلی دو بخش رویشی و زایشی این گیاه دارویی پردازیم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه: گیاه *Lippia citriodora* از استان خوزستان در منطقه هفت تپه در خرداد ماه ۹۰ جمع‌آوری گردید و پس از شناسایی توسط محققین هر بار یوم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، بخش‌های هوایی آنها شامل اندام‌های رویشی و زایشی در سایه خشک شدند و سپس با آسیاب پودر گشتند.

استخراج اسانس: به منظور استخراج اسانس ۲۰۰ گرم از سرشاخه‌های رویشی (برگ‌ها) و ۲۰۰ گرم از سر شاخه‌های زایشی (گل‌ها و جوانه‌های زایشی) به‌طور جداگانه در بالن یک لیتری متصل به دستگاه کلونجر، قرار داده شد و تا حدود نصف حجم بالن به آن آب اضافه شد و تا مرحله جوش حرارت داده شد. جهت اسانس‌گیری تا زمان ثابت ماندن مقدار اسانس استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت ادامه داشت و مایع حاصل از تقطیر در لوله مدرج جمع‌آوری و حجم اسانس خوانده شد. درصد اسانس به دست آمده برای گیاه مذکور از بخش رویشی ۰,۷ v/w و وزن مخصوص آن ۰/۹۹۹ گرم در میلی‌لیتر و برای

سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند (Andrews, 2001) تهیه و به وسیله سوپ بر سطح محیط کشت مولر هیلتون آگار و سابرو دکستروز آگار کشت یکنواختی تهیه شد و دیسک‌های حاوی عصاره را بر سطح آگار قرار داده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) در اطراف دیسک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها و قارچ‌های مورد نظر به عصاره‌ها تعیین شد. از DMSO به‌عنوان شاهد منفی و جنتامایسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد (Kunle et al., 2003; Vanden et al., 1991).

محاسبه آماری این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS، آنالیز واریانس و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Duncan استفاده شد.

روی ۸ سویه باکتری شامل ۴ سویه باکتری گرم مثبت (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*)، *Bacillus Subtilis* و *Bacillus cereus* و ۴ سویه باکتری گرم منفی (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) و دو سویه قارچ (*Klebsiella oxytoca* و *Candida albicans*) که از آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تهیه شدند (جدول ۱) و به روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک‌های استاندارد به قطر ۶ میلی‌متر در محیط‌های کشت آگار انجام شد. در این روش دیسک‌های بلانک استریل در عصاره‌های مورد نظر قرار داده شد تا عصاره‌ها کاملاً جذب دیسک شوند (۵ دقیقه). سپس دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه خشک شدند. از کشت ۲۴ ساعته هر یک از ۸ میکروارگانیزم تهیه شده مورد استفاده

جدول ۱: میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در بخش میکروبی PTCC: Persian Type collection culture

میکرو ارگانیزم	PTCC	گروه
<i>Staphylococcus aureus</i>	PTCC1112	باکتری‌های گرم مثبت
<i>Micrococcus luteus</i>	PTCC1114	باکتری‌های گرم مثبت
<i>Bacillus cereus</i>	PTCC1274	باکتری‌های گرم مثبت
<i>Bacillus Subtilis</i>	PTCC1024	باکتری‌های گرم مثبت
<i>Escherichia coli</i>	PTCC1330	باکتری‌های گرم منفی
<i>klebsiella Pnumonea</i>	PTCC1639	باکتری‌های گرم منفی
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PTCC1074	باکتری‌های گرم منفی
<i>Klebsiella oxytoca</i>	PTCC1059	باکتری‌های گرم منفی
<i>Aspergillus niger</i>	PTCC16404	مخمر
<i>Candida albicans</i>	PTCC10231	مخمر

نتایج

درصد، سیترال (۹،۴ درصد) و بتا داونون ۲ اول (۷،۹ درصد) است و سایر ترکیبات مهم آن ژرانیل استات (۵،۸ درصد) و تیمول (۳،۹ درصد) است. در اسانس بخش زایشی (گل‌ها و سر شاخه‌های زایشی) گیاه *Lippia citriodora* ۳۳ ترکیب شامل ۹۴،۵ درصد کل اجزا شناسایی شدند (جدول ۳). این اسانس

الف- نتایج سنجش ترکیبات اسانس: در اسانس بخش رویشی (برگ‌ها و سر شاخه‌های رویشی) گیاه *Lippia citriodora* ۲۶ ترکیب شامل ۹۶،۰۹ درصد کل اجزا شناسایی شدند (جدول ۲). این اسانس دارای مواد عمده ژرانیول (۳۵،۷۸ درصد)، زینجیرین (۱۹،۹

یابد به طوریکه عمده ترین ترکیبات شیمیایی در مرحله ی رویشی (ژرانیول ۳۵,۷۸ درصد و زینجیبرین ۱۹,۹ درصد) با میزان بسیار کمتری در مرحله ی زایشی تولید می شود (ژرانیول ۰,۴ درصد و زینجیبرین ۱,۸ درصد) و به عکس داوانون و p سیمن که از عمده ترین ترکیبات مرحله ی زایشی گیاه هستند در مرحله ی رویشی بسیار کمتر تولید می شوند.

دارای مواد عمده ی داوانون (۳۶,۴درصد)، p سیمن (۱۶,۵درصد) و سیترال (۸ درصد) است و سایر ترکیبات مهم آن تیمول (۳,۷ درصد) است. بتا آسکاریدول (۵,۹ درصد)، z جاسمون (۳,۸درصد) و لینالول (۲,۵ درصد) و او ۸ سینئول (۲ درصد) می باشد. همان گونه که در جداول مشاهده می شود ترکیبات اسانس بخش زایشی تنوع بیشتری نسبت به بخش رویشی نشان می دهد همچنین مقدار تولید ترکیبات اسانس با تغییر مرحله ی نموی گیاه تغییر می

جدول ۲: ترکیبات اسانس بخش رویشی (برگ‌ها) گیاه *Lippia citriodora*

ردیف	نام ترکیبات	ضریب بازداری (RF)	مقدار (درصد)
۱	Camphene	۹۵۸	۰/۷
۲	β -pinene	۹۸۰	۰/۲
۳	α -Phellandrene	۱۰۰۱	۰/۱
۴	α -Terpinene	۱۰۱۴	۰/۵۷
۵	p-Cymene	۱۰۱۷	۱/۶۳
۶	1,8-Cineol	۱۰۲۷	۰/۴۵
۷	γ -Terpinene	۱۰۵۳	۰/۲
۸	trans-Linalool oxide	۱۰۷۶	۰/۳
۹	Linalool	۱۰۹۸	۰/۱۷
۱۰	α -Thujone	۱۰۹۶	۰/۸
۱۱	β -caryophyllene	۱۱۸۹	۱/۳۶
۱۲	caryophyllene	۱۲۰۸	۰/۳۳
۱۳	(Z)-Citral	۱۲۲۵	۹/۴
۱۴	Geraniol	۱۲۳۵	۳۵/۷۸
۱۵	Thymol	۱۲۷۳	۳/۹
۱۶	Carvacrol	۱۲۸۳	۰/۲۴
۱۷	β -Ascaridol	۱۲۹۰	۰/۴
۱۸	Geranyl acetate	۱۳۶۲	۵/۸
۱۹	(E)-Jasmone	۱۳۶۵	۰/۶
۲۰	(Z)-Jasmone	۱۳۷۷	۱/۸
۲۱	Davanaether	۱۴۷۱	۰/۴
۲۲	Zingiberene	۱۴۹۰	۱۹/۹
۲۳	Davanone	۱۵۶۹	۰/۶
۲۴	Caryophyllene oxide	۱۵۸۴	۰/۹
۲۵	4-Hydroxy-3,5-dimethyl acetophenone	۱۶۴۶	۱/۹
۲۶	β -Davanone-2-ol	۱۷۳۰	۷/۹
۲۷	Total		۹۶/۰۹

جدول ۳: ترکیبات اسانس بخش زایشی (گل‌ها) گیاه *Lippia citriodora*

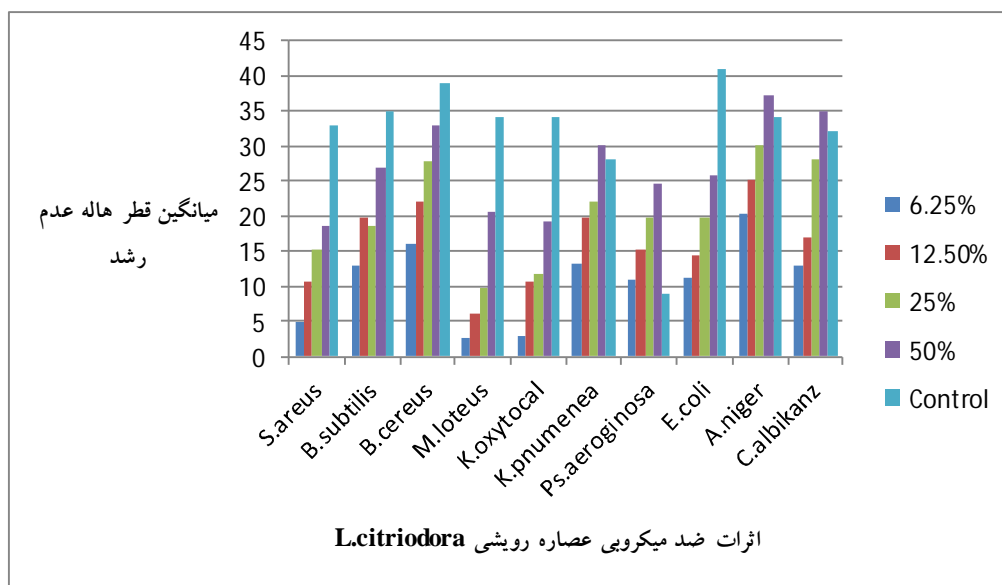
ردیف	نام ترکیبات	ضریب بازداری (RF)	مقدار (درصد)
۱	α - Pinene	۹۳۶	۱/۷
۲	Sabinene	۹۷۱	۰/۲
۳	α -Phellandrene	۱۰۰۱	۰/۴
۴	α -Terpinene	۱۰۱۴	۰/۲
۵	p-Cymene	۱۰۱۷	۱۶/۵
۶	1,8-Cineol	۱۰۲۷	۲
۷	γ -Terpinene	۱۰۵۳	۰/۲
۸	trans-Linalool oxide	۱۰۷۶	۰/۳
۹	Linalool	۱۰۹۸	۲/۵
۱۰	α -Thujone	۱۰۹۶	۰/۸
۱۱	β -Thujone	۱۱۰۸	۰/۶
۱۲	cis-p-Menth-1-ol	۱۱۱۳	۰/۲
۱۳	Camphor	۱۱۳۳	۰/۹
۱۴	p-Cymene-8-ol	۱۱۶۷	۰/۵
۱۵	4-Terpineol	۱۱۷۰	۰/۷
۱۶	Nordavanone	۱۲۱۱	۰/۵
۱۷	(Z)-Citral	۱۲۲۵	۸
۱۸	Geraniol	۱۲۳۵	۰/۴
۱۹	(E)-Citral	۱۲۴۸	۰/۷
۲۰	Thymol	۱۲۷۳	۳/۷
۲۱	carvacrol	۱۲۸۳	۰/۹
۲۲	β -Ascaridol	۱۲۹۰	۵/۹
۲۳	(E)-Methyl cinnamate	۱۳۵۹	۰/۲
۲۴	Geranyl acetate	۱۳۶۲	۰/۵
۲۵	(E)-Jasmone	۱۳۶۵	۰/۲
۲۶	(Z)-Jasmone	۱۳۷۷	۳/۸
۲۷	Davanaether	۱۴۷۱	۰/۶
۲۸	zingiberene	۱۴۹۰	۱/۸
۲۹	β -Sesquiphellandrene	۱۵۱۹	۰/۴
۳۰	Davanone	۱۵۶۹	۳۶/۴
۳۱	Caryophyllene oxide	۱۵۸۴	۰/۴
۳۲	4-Hydroxy-3,5-dimethyl acetophenone	۱۶۴۶	۱/۴
۳۳	β -Davanone-2-ol	۱۷۳۰	۰/۹
Total			۹۴/۵

متانلی بخش‌های رویشی و زایشی گیاه مورد آزمایش،
بر روی ۸ سویه باکتری (گرم مثبت و گرم منفی) و ۲

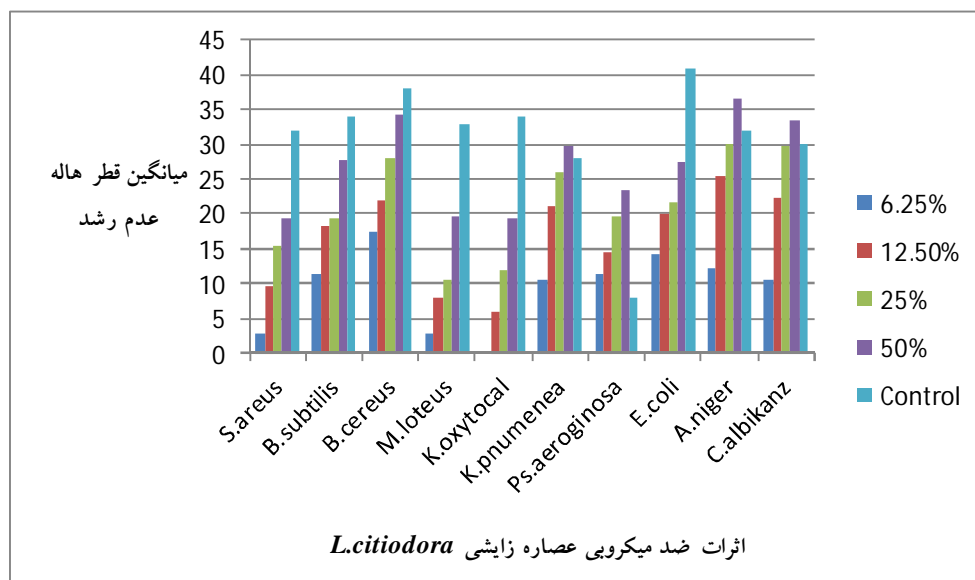
ب- نتایج سنجش میزان فعالیت ضد میکروبی: نتایج
حاصل از بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های

نشان دادند $p < 0.05$ به علاوه در تمامی سویه‌های به کار رفته با افزایش غلظت عصاره میانگین‌هاله عدم رشد افزایش معنی‌داری می‌یابد. بنابراین با افزایش غلظت ماده مؤثر عصاره این گیاه اثرات ضد میکروبی افزایش می‌یابد.

سویه قارچ (شکل‌های ۱ و ۲)، نشان داد که برای تمام میکروارگانیسم‌ها اختلاف میانگین‌ها در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار شده است. بنابراین هر یک از میکروارگانیسم‌ها به غلظت‌های مختلف عصاره موردنظر حساسیت نشان داده و اثرات ضد میکروبی



شکل ۱: نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدباکتری و ضد قارچی عصاره رویشی



شکل ۲: نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدباکتری و ضد قارچی عصاره زایشی

آمده از برگ این گیاه قبلا توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است. مجاب و همکاران (Mojab et al., 2002) اسانس برگ‌های به لیموی کاشته شده در نواحی شمالی ایران را به روش تقطیر با آب استخراج و با GC/MS شناسایی نموده اند و میزان بالای ژرانیول در اسانس برگ‌های آن را گزارش کرده‌اند که پژوهش حاضر نیز از نظر میزان بالای ژرانیول در برگ‌ها، با آن همسویی نشان می‌دهد.

دیگر ترکیب عمده اسانس بخش‌های رویشی در پژوهش حاضر سیترال (۹,۴) است که با عمده ترین ترکیب اسانس استخراج شده از برگ‌های به لیمو به همین روش در پژوهش‌های خانی و همکاران (Khani et al., 2012) که سیترال (۱۱,۳ درصد) می‌باشد، مشابهت نشان می‌دهد. آرژوپولوو همکاران (Argyropoulou et al., 2007)، ترکیبات شیمیایی اسانس برگ‌های این گیاه را در دو مرحله ی نموی قبل و بعد از گلدهی استخراج و شناسایی نمودند که در هر دو مرحله ترکیب ژرانیال و لیمونن بیشترین درصد ترکیبات اسانس را به خود اختصاص دادند، که از نظر نوع ترکیبات و مقدار آن‌ها، با پژوهش حاضر مغایرت نشان می‌دهد.

بابایی أبراک و ژبانی (Babaei Abrak and Zhiyani, 2014) نیز مقادیر و نوع ترکیبات شیمیایی اسانس برگ‌های گیاه به لیمو کاشته شده در خراسان را استخراج و شناسایی کردند و سیترال، لیمونن و کاریوفیلن اکساید را به عنوان مهمترین ترکیبات گیاه معرفی نمودند که از نظر میزان تقریبا بالای سیترال با پژوهش حاضر، همسویی نشان می‌دهد.

میرزایی و همکاران (Mirzaie et al., 2012) در عصاره هگزانی گیاه به لیمو ترکیبات کاریوفیلن و اسپانتول را فراوان ترین ترکیبات معرفی کردند که در اسانس استخراج شده در این پژوهش به میزان کمی کاریوفیلن (۰,۳۳ درصد) موجود است.

نتایج همچنین نشان داد که در بین باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه، فعالیت‌های ضد قارچی از باکتریایی بیشتر است که در این میان نیز قارچ اسپرژیلوس نایجر نسبت به کاندیدا آلبیکنز، به این عصاره حساس تر است. در میان باکتری‌ها نیز باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌ها گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به غلظت‌های عصاره‌های رویشی و زایشی نشان دادند. به طور کلی عصاره‌های رویشی و زایشی گیاه در غلظت‌های مورد مطالعه، اثرات بازدارندگی بالایی در هر دو نوع میکروارگانیزم نشان می‌دهد و بین بخش رویشی و زایشی تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

بحث

امروزه در طب سنتی ایران از گیاهان زیادی برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود تعداد بسیاری از این گیاهان بومی کشور ما بوده و تعدادی نیز از سایر کشورها به ایران وارد شده است. یکی از گیاهانی که در سال‌های اخیر به ایران وارد شده است گیاه به لیمو است. از آنجا که برگ‌های این گیاه بویی شبیه به لیمو دارند به آن به لیمو گفته اند (Babaei Abrak and Zhiyani 2014). در طب سنتی از این گیاه در درمان سوءهاضمه، نفخ، سردردهای یک طرفه، دردهای عصبی سرگیجه و علائم سرما خوردگی استفاده می‌شود. به علاوه در تقویت حافظه و ایجاد آرامش نیز مفید است (Argyropoulou et al., 2007).

در پژوهش کنونی عمده ترین ترکیب اسانس بخش‌های رویشی گیاه ژرانیول (۳۵,۷۸ درصد)، زینجیبیرین (۱۹,۹ درصد)، سیترال (۹,۴ درصد) و بتا داوانون ۲ اول (۷,۹ درصد) است (جدول ۲). و عمده ترین ترکیب بخش‌های زایشی داوانون (۳۶,۴ درصد)، p سیمن (۱۶,۵ درصد) و سیترال (۸ درصد) است (جدول ۳). ترکیبات شیمیایی اسانس به دست

جنس گزارش شده است. برخی پژوهش‌ها اثرات ضد میکروبی این ترکیب را نشان داده‌اند (Linde et al., 2010). اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های متانلی در این پژوهش نشان داد که اثر ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است که این نتایج با پژوهش‌های موتانا و همکاران (Mothana et al., 2011) که بر روی به لیمو کاشته شده در یمن صورت گرفته و اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر است، همسویی دارد. همچنین پژوهش‌های فیتسو و همکاران (Fitsiou et al., 2018)، در بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه به لیمو نشان داد که اسانس این گیاه بر رشد باکتری‌های گرم مثبت اثر بازدارندگی داشته در حالی که بر روی باکتری‌های گرم منفی از جمله ای کلای تاثیری نداشته است این پژوهشگران اثر ضد باکتریایی را به ترکیب سیترال موجود در اسانس نسبت داده اند که این نتایج با کمتر بودن اثر بازدارندگی عصاره گیاه به لیمو علیه باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت در پژوهش حاضر هم سویی دارد. همچنین از آنجا که سیترال هم در ترکیبات اسانس بخش‌های رویشی و هم بخش‌های زایشی موجود است، شاید بتوان این اثر را به سیترال نسبت داد.

کومار و همکاران (Kiran Kumar et al., 2008)، فلاونوئیدها را در عصاره گیاه به لیمو کاشته شده در هندوستان شناسایی نموده و اثرات آنتی باکتریال آن را علیه سویه‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس، باسیلوس) و گرم منفی (ای کلای و کلبسیلا) ارزیابی کردند و اثرات ضد باکتریایی عصاره گیاه را علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی گزارش کردند که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد.

در ارتباط با ترکیبات اسانس استخراج شده از بخش‌های زایشی (گل‌ها و مریستم‌های زایشی) گیاه به لیمو گزارشات زیادی یافت نشد. مواردی از گزارش‌های یافت شده نیز از نظر نوع ترکیبات شیمیایی اسانس با ترکیبات عمده اسانس استخراج و شناسایی شده در این پژوهش (داوانون، P-سایمن و سیترال) تفاوت نشان دادند (Rezaie and Jaymand, 2001; Shahhossini et al., 2014).

بسته به محل کاشت، زمان برداشت، شیوه نمونه‌برداری و استخراج، مقدار و نوع مواد موجود در برگ به لیمو می‌تواند با نوسانات و تفاوت‌هایی همراه باشد (Azadbakht et al., 2012). بنابراین یکی از دلایلی که ممکن است ترکیبات شیمیایی عصاره‌های گیاهی یک گونه دارای تفاوت‌هایی باشد می‌تواند به دلیل نوع منطقه‌ی جغرافیایی و محل رشد این گیاه باشد (Mirzaie et al., 2017).

امروزه متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی، مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی، از نظر اثرات بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته اند و مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی، نقش مهمی در برخی اثرات بیولوژیک آن‌ها نظیر اثرات ضد باکتری و ضد قارچی، ضد انگلی، ضد ویروسی، ضد درد و ضد التهاب و... دارند (Tatsadjieu et al., Argyropoulou et al., 2007; 2009).

گزارش‌های فراوانی در منابع علمی در مورد خاصیت ضد میکروبی اسانس و یا عصاره‌های گونه‌های جنس *Lippia* آمده است که با توجه به مشابهت آن‌ها با ترکیبات موثره ی *Lippia citriodora* می‌توان وجود اثرات بالای ضد میکروبی را به همان ترکیبات در گیاه به لیمو از همین جنس تعمیم داد (Bassole et al., 2003). به‌عنوان مثال ژرانیول ترکیبی است که در ترکیبات شیمیایی اسانس گونه‌هایی از این

مختلف دارای ترکیبات موثره ی اسانس تقریباً متفاوتی است که تاحدی متأثر از شرایط اقلیمی گیاه و نیز مراحل رشد ونمو گیاه است. نوع و میزان ترکیبات موثره ی اسانس گیاه به لیمو ضمن تکوین میستم‌های زایشی و تشکیل گل‌ها تغییر می کند. به طوری که در بخش‌های زایشی تنوع ترکیبات موثره اسانس از بخش‌های رویشی بیشتر است. همچنین عصاره‌های بخش‌های رویشی و زایشی این گیاه اثرات ضد میکروبی علیه انواعی از باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها نشان دادند که در این میان اثرات ضد قارچی از باکتریایی بالاتر و نیز در میان باکتری‌ها باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی حساسیت بیشتری نشان دادند.

سپاسگزاری

نگارنده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک و واحد علوم و تحقیقات تهران برای همکاری در این پژوهش سپاسگزاری می‌کند.

اثرات ضد قارچی گیاه به لیموی کاشته شده در مراکش، علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس و باسیلوس و همچنین اثرات ضد قارچی آن علیه قارچ‌های *Candida* و *Phanerochaete chysosporium*، *albicans*، *Tricoderma reesei* توسط علی و همکاران (Ali et al., 2008) گزارش شده است.

همچنین خواص ضد قارچی گیاه دیگری از جنس لیبیا (*Lippia rugosa*) علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر اثر وجود ترکیب ژراینول از ترکیبات چرب این گیاه توسط تاتساجو و همکاران (Tatsadjeu et al., 2009) گزارش شده است که با نتایج ضد قارچی حاصل از این پژوهش همسویی دارد. همچنین ویولن و چامونت (Chaumont et al., 1994)، فعالیت شدید ضد قارچی بر اثر ترکیبات ترپنوئیدی را در گروهی از گیاهان جنس *Lippia* گزارش نموده‌اند که با درصد بالای ترپنوئیدها در گیاه به لیمو و اثرات ضد قارچی بالای آن مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

به طور کلی گیاه به لیمو کاشته شده در مناطق

References

1. Akhbari, M., Aghajani, Z. and Mazoji, A. 2015. The essential oils composition antioxidant activity and antimicrobial compounds vegetable oil *Mentha loniflora*. Molecular Biotechnology News, 6(21): 59-66. (In Persian).
2. Ali, H.F.M., EL-beltagi, H.S. and Naser, N.F., 2008. Assessment of volatile components, free radical-scavenging capacity and antimicrobial activity of *Lemon verbena* Leaves. Research Journal of phytochemistry, 2(2): 84-92.
3. Andrews, J.M. 2001. determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotraphy, 48:5-16.
4. Ansari, M., Larijani, K., and Tehrani, M.S. 2012. Antibacterial activity of *Lippia citriodora* herb essence against MRSA *Staphylococcus aureus*. African journal of microbiology Research, 6(1): 16-19.
5. Argyropoulou, C., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Fasseas, C. 2007. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 831-837.
6. Azadbakht, N., Khosravi Nejad, K. and Nazari, H. 2012. Botanical and applied *Lippia citriodora* medical plant. Zeytoon, 222: 38-45. (In Persian).
7. Babaei Abrak, S., Zhiani, R., 2014. Investigation of chemical composition of *Lippia citriodora*: essential oil of *Lippia citriodora* promote survival of PC12 Cells Following Treatment with H2O2. Shafayekhatam, 2(1):31-39. (In Persian).
8. Bassole, I.H.N., Ouattara, A.S., Nebie, R.B., Ouattara, C.A.T., Kaborec, Z.I.,

- Traorea, S.A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*, 62: 209–212.
9. Fitsiou, E., Mitropoulou, G., Spyridopoulou, K., Vamvakias, M., Bardouki, H., Galanis, A., Chlichlia, K., Kourkoutas, Y., Panayiotidis M.I., and Pappa, A. 2018. chemical composition and evaluation of the biological properties of the essential oil of the dietary phytochemical *Lippia citriodora*. *Molecules*, 23(123): 1-13.
 10. Ghaemi, E., Khorshidi, D., Moradi, A., Seifi, A., Mazandarani, M., Bazoori, M. 2006. The effect of ethanol extract of *Lemon verbena* on the skin infection due to *Staphylococcus aureus* in a animal model. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 22(3):242- 249. (In Persian).
 11. Haji Mahdipour, H., KHanavi, M., SHokrchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M. 2009. The best method of extraction of phenolic compounds in plant purple coneflower. *Journal of Medicinal Plants*, 8(4):152-145. (In Persian).
 12. Khani, A., Basavand, F. and Rakhshani, E. 2012. Chemical composition and insecticide activiry of *Lemon verbena*, essential oil. *Journal of Crop Protection*, 1(4): 313-320.
 13. Kiran Kumar, N., Siva Kumar, K., Raman, B.V., Bhaskar Reddy, I., Ramarao, M. and Rajcopal, S.V. 2008. Antibacterial activity, of *Lippia citriodora* a Folklore plant. *Journal of pure and applied Microbiology*, 2(1): 249-251.
 14. Kunle, O., Okogun, J., Egamana, E., Emojevwe, E. and Shok, M. 2003. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, 10: 59–61.
 15. Linde, J.H., Combrinck, E.S. Regnie, T.J.C. and Virijevic, R.S. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa *Journal of Botany*, 76: 37–42.
 16. Mirzaie, A., Sadat Shandiz, S.A., Noorbazargan, H. and Ali Asgari, E. 2016. Evaluation of chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxic and apoptotic effects of *Aloysia citriodora* on colon cancer cell line. *Tehran University Medical Journal*, 74(3): 168-176. (In Persian).
 17. Mojab, F., javidnia, K., Zarghi, A. and Yamohamadi, M. 2002. The study of essential oil composition of *Lippia citriodora*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 4(1):41-46. (In Persian).
 18. Mothana, R.A., Abdo, S.A., Hasson, S., Althawab, F.M., Alghabari S.A. and Lindequist, U. 2010. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical, screening of some Yemeni medical plants. *Evid Based complement Alternate Med*, 7(3): 323-330.
 19. Nazari, F., Shabani, SH. and Nejad Ebrahimi, S. 2009. Chemical composition of essential oil from *Lippia citriodora* H.B.K of Iran. Conference: *Planta Medica*.
 20. Pascual, M.E., Slowing, K. Carretero, E., Sanchez Mata, D., Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 201–214.
 21. Rezaie, M.B. and Jaymand, K. 2001. Study of chemical constituent oil of *Lippia citriodora* H.B.K. Pajouhesh-va-Sazandegi in *Agronomy and Horticulture*, 53: 13-15. (In Persian).
 22. Roodbaraky, M., Mehrafarin, A., Khalighi Sigaroodi, F. and Naghdi Badi, H. 2017. *Medical Plants*, 2(62): 18-29. (In Persian).
 23. Shahhoseini, R., Ghorbani, H., Saleh, R., and Omidbagi, R. 2012. Identificatin of essential oil content and composition of *Lippia citriodora* seed. *Journal of Plant protection*, 18(4): 91-96.(In Persian).
 24. Siddiqui, B.S., Ahmad, F., Sattar, F.A. and Begum, S. 2007. Chemical constituents from the aerial parts of *Lippia nodiflora* Linn. *Arch Pharm Res*. 30(12): 1507-1510.
 25. Tatsadjieu, N.L., JazetDongmo, P.M., Ngassoum, M.B., Etoa F-XC. and Mbofung, M.F. 2009. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex Fries. *Food Control*, 20:161-170.

26. Vicuna, G.C. 2009. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 3: 129-136.
27. Viollon, C. and Chaumont, J.P. 1994. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 128:151-153.

(Short paper)
**Essential oil composition and antimicrobial activity of *Lippia citriodora*
H.B.K. cultivated in Khuzestan, at two phases: before and after
flowering stages**

Zare, Z.

Assistant Professor, Biology Department, Farhangian University, Tehran, Iran.

Received: 10-11-2017 ; Accepted: 11-11-2018

Abstract

Lippia citriodora H.B.K. was imported in Iran for food and medical industry. In this research due to essential oil composition and antifungal activity, the aerial parts of plant in before and after flowering stages were collected from the field in Khuzestan in June 2011. The Essential oils were obtained by hydro distillation (Clevenger apparatus) and were analyzed by (GC) and (GC - MS). To measure antimicrobial activity, the methanolic extracts of these organs were prepared by percolation method and antimicrobial activity were measured against four gram-positive and negative strains of bacteria and two fungi *starins* by disk diffusion method in inhibition zone diameter. Results were showed that the geraniol (35.78%) and zingiberene (19.9%) were the main compounds of essential oil in before flowering, although the davanone (36.4%) and p-cymene (16.5%) were predominant components in after flowering stage. The tested fungi and gram-positive bacteria were showed higher sensitivity to the concentrations of plant extracts than gram-negative bacteria. In addition, the antimicrobial effects increased with increasing concentrations of the extracts. There was no significant difference between the degree of antimicrobial activity of vegetative and reproductive extracts.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Essential oil, Geraniol, Davanone, *Lippia citriodora*

*Corresponding author; zahrazarebio@gmail.com