

بررسی و مقایسه اثر روش‌های استخراج با تقطیر و سیال فوق بحرانی بر عملکرد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی اسانس گیاه دارویی *Artemisia persica* Boiss.

پروین رامک^{۱*}، وحید کریمیان^۲، اصغر سپهوند^۳

استادیار، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد، ایران

^۱باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران
^۲دانشیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۲

چکیده

در این مطالعه سرشاخه‌های گلدار گیاه درمنه ایرانی (*Artemisia persica* Boiss.) در فصل تابستان سال ۱۳۹۶، از مزرعه تحقیقاتی نورآباد لرستان برداشت و اسانس گیاهان به روش‌های تقطیر با آب و سیال فوق بحرانی استخراج شد. مهم‌ترین مواد موثره اسانس‌ها با استفاده از دستگاه GC/MS آنالیز گردید. اثر ضدقارچی آن با استفاده از روش برات میکرو دایلوژن اثر اسانس‌ها بر روی سویه‌های *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* و *Trichophyton mentagrophytes* و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها با دو آزمون مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و ۲ و ۲-آزینو بیس ۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS) ارزیابی گردید. نتایج نشان داد بازده اسانس در روش تقطیر با آب؛ ۱/۷ درصد و در روش سیال فوق بحرانی بین ۱/۷ تا ۵/۷ درصد متغیر بود. عمده‌ترین ترکیبات شناسایی شده در روش سیال فوق بحرانی عبارت بودند از: داوانون (۲۹ درصد)، لاسینیاتافوران H (۱۸/۱ درصد)، آرتدوگلاسیا اکسید C (۸/۵ درصد) و نوروداوانه (۷/۶ درصد) و در روش تقطیر با آب؛ داوانون (۲۲ درصد)، لاسینیاتافوران G (۷/۱ درصد) و آرتدوگلاسیا اکسید D (۶ درصد)، ترکیبات غالب بودند. اسانس استخراج شده به روش تقطیر با آب دارای بیشترین اثر ضدقارچی بر سویه‌های اپیدرموفایتون فلوکوزوم و تریکوفایتون متاگروفیتز با MFC و MIC معادل ۳۲ µg/mL بود. همچنین اسانس استخراج شده با آب، در آزمون‌های DPPH و ABTS به ترتیب با مقدار IC₅₀ (۲۰/۳۲ و ۱۴/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، از بیشترین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسانس، درمنه ایرانی، روش‌های استخراج، ضدقارچی

مقدمه

رشد می‌کنند (Hadian et al., 2007). بعضی از گونه‌های سرده *Artemisia* اسانس‌های ویژه‌ای با عملکرد خاص دارویی تولید می‌کنند که در صنایع دارویی استفاده می‌شوند (Turi et al., 2014). مواد مؤثره موجود در گونه‌های *Artemisia spp.* دارای خواص درمانی چون اثر ضد مالاریا، ضد ویروس و باکتری، ضد تومور، تب بر، ضدخونریزی، درمان هیپاتیت، التیام زخم‌ها، ضد اسپاسم و دردهای عصبی است. درمنه از دوران گذشته در طب سنتی ایران دارای اهمیت و مصارف گوناگون بوده و از آن به نام‌های درمنه، افسنتین، یوتان، برنجاسف، قيصوم و ترخون نام برده شده است (Mozaffarian, 2012). گیاه دارویی *A. persica* که در بیشتر نقاط ایران با نام درمنه ایرانی شناخته می‌شود، گیاهی است بومی که دارای رویشگاه‌های مختلفی در ارتفاعات ۳۶۰۰-۲۶۰۰ متری در استان‌های لرستان، کردستان، کرمانشاه، چهارمحال و بختیاری، فارس، یزد، کهگیلویه و بویراحمد، خراسان و اصفهان است. درمنه ایرانی گیاهی بوته‌ای و دارای کرک‌های نمدی خاکستری و متراکم است. ساقه‌ها متعدد یا بندرت منفرد، با ارتفاع ۷۵-۲۵ سانتی‌متر، راست یا برافراشته و دارای گل آذین پانیکول باریک است. گیاه دارویی *A. persica* یکی از گیاهان دارویی بسیار معطر بومی ایران است که دارای ترکیبات با ارزشی چون داوانون است (Sadeghpour et al., 2004; Ramak and Sefidkon, 2008). درمنه ایرانی یکی از قدیمی‌ترین و شناخته شده‌ترین گونه‌های گیاهی با کاربرد دارویی در ایران است. مردم ساکن در مرکز و جنوب تا حدودی از ریشه، ساقه و برگ گیاه برای درمان سرفه، سرماخوردگی، تب، کاهش اشتها، دردهای کولیکی، سردرد، گوش درد و بیماری‌های انگلی و مالاریا استفاده می‌کنند (Rasooli et al., 2003). محققان با مطالعه فعالیت بیولوژیکی اسانس *A. persica* بیان

اسانس‌ها ترکیباتی فرار هستند که از متابولیسم ثانوی گیاه حاصل می‌شوند (Liu et al., 2018). متابولیت‌های ثانوی با توجه به خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی که دارند، حاوی نقش‌های مهم بیولوژیکی هستند که برای دفاع گیاهان مهم می‌باشند (Tohidi et al., 2017). ترکیبات مؤثره گیاهی برای قرن‌ها در صنایع دارویی، کشاورزی و بهداشتی استفاده شده‌اند و به غذاها به‌عنوان ادویه یا سبزی اضافه شده‌اند (Zhang et al., 2015). این ترکیبات به‌علت ویژگی‌های زیستی و ضد میکروبی آنها شناخته شده هستند (Lang and Buchbauer, 2012; Raut and Karuppaiyil, 2014). اسانس‌ها می‌توانند در درمان ایدز و سرطان، به‌عنوان چاشنی و مواد نگهدارنده یا طعم دهنده در غذاها و نوشیدنی‌ها، به‌عنوان حشره‌کش‌ها در کشاورزی، به‌عنوان عطر در لوازم آرایشی و به‌عنوان ضد عفونی کننده در خمیر دندان استفاده شوند. همچنین اثرات ضد ویروسی، ضد باکتری، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدان، سیتوتوکسیک و ضدسرطانی نیز برای اسانس‌ها گزارش شده است (Bakkali et al., 2005). عوامل محیطی و شرایط آب و هوایی از جمله مهمترین متغیرهایی هستند که بر کمیت و کیفیت تولید اسانس در گیاهان دارویی اثر گذار هستند (Aboukhalid et al., 2017). همچنین فاکتورهای دیگری چون؛ گونه گیاهی، اندم گیاهی (برگ‌ها، گل‌ها، ساقه و ریشه‌ها)، سن گیاه، زمان برداشت، مرحله رشد، شرایط نگهداری و خشک کردن و روش استخراج از جمله عوامل مهم و تاثیر گذار بر کمیت و کیفیت روغن‌های ضروری گیاهان دارویی و صنعتی می‌باشد (Hajimehdipoor et al., 2010; Shekarchi et al., 2012). سرده درمنه (*Artemisia*) یکی از بزرگترین سرده‌های خانواده *Asteraceae* است. بیش از ۲۵۰ گونه از این سرده، در جهان وجود دارد که سی و چهار گونه آن در ایران

می‌گذارند، لذا در مطالعه حاضر تأثیر دو روش تقطیر با آب و سیال فوق بحرانی بر عملکرد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص ضدباکتریایی اسانس گیاه *A. persica* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: سرشاخه‌های *A. persica* در سال ۹۶ و در فصل گلدهی از مزرعه تحقیقاتی نورآباد، استان لرستان برداشت شدند. این مزرعه در $48^{\circ}15' 19''$ طول و $34^{\circ} 00' 32''$ عرض جغرافیایی در ارتفاع ۲۹۳۰ متری از سطح دریا واقع شده است. متوسط حرارت سالانه در این منطقه $11/5$ درجه سانتی‌گراد و میزان بارندگی سالانه $393/3$ میلی‌متر است. خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه در جدول ۱ آمده است.

بهینه‌سازی استخراج اسانس: پس از جمع‌آوری گیاهان از مزرعه، به‌مدت پنج روز در سایه خشک شدند و تا زمان آنالیز دور از نور و درجای خشک و خنک نگهداری شدند.

کردند ترکیب‌های موجود در اسانس این گیاه دارای خاصیت میکروبی کشی و قارچ کشی است (Hakimi Meybody et al., 2003).

مطالعات گذشته حاکی از آن است که، روش‌های مختلف استخراج اسانس از گیاهان معطر، در کمیت و کیفیت اسانس اثرگذار می‌باشد. بررسی روش‌های تقطیر و سیال فوق بحرانی در استخراج اسانس از اندام‌های هوایی گیاه پونه ایرانی (*Nepeta persica*) نشان داد، بالاترین میزان عملکرد اسانس در استخراج به روش سیال فوق بحرانی حاصل می‌شود، به‌طوری‌که میزان عملکرد اسانس به بیش از ده برابر قابل افزایش است (Khajeh et al., 2010). استفاده از روش سیال فوق بحرانی برای استخراج اسانس‌های گیاهی سبب افزایش سرعت در اسانس‌گیری و نیز افزایش کیفیت اسانس‌ها می‌شود، ضمن آنکه تأثیری منفی بر خواص آنتی‌اکسیدانی و یا ضدباکتریایی اسانس‌ها ندارد (Yousefi et al., 2019).

نظر به اهمیت گونه *A. persica* در صنایع دارویی و طب سنتی و با توجه به اینکه روش‌های اسانس‌گیری بر کمیت و کیفیت اسانس تأثیر

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه

میزان	خصوصیات
۱۳	رس (%)
۴۲	سیلت (%)
۴۵	شن (%)
۰/۶۲	هدایت الکتریکی EC (dS.m-1)
۷/۲۲	اسیدیته خاک (pH)
۳/۱۸	درصد کربن آلی OC (%)
۰/۶۲	نیترژن کل (%)
۲۹/۶۷	فسفر قابل جذب (ppm)
۶۲۵	پتاسیم قابل جذب (ppm)
۵/۹۴	منگنز (ppm)
۱/۶۳	آهن (ppm)
۱/۶۰	مس (ppm)
۶/۶۰	روی (ppm)

روش‌های استخراج اسانس

تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر: مقدار ۱۰۰ گرم از نمونه خشک شده، یا دست پودر شده و در داخل بالون دو لیتری متصل به دستگاه کلونجر ریخته شد. حدود ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر به پودر گیاهی اضافه شد و از زمان به جوش آمدن آب درون بالون به مدت ۴ ساعت، عمل اسانس گیری ادامه داشت. با محاسبه درصد رطوبت، بازده اسانس بر حسب وزن خشک W/W محاسبه گردید. اسانس در شیشه‌ای کوچک جمع آوری و توسط سولفات سدیم آبیگری شد. اسانس به دست آمده تا زمان آزمایش، در تاریکی و دمای ۴

درجه سانتی‌گراد درون یخچال نگه‌داری شد (Sefidkon et al., 2007).

روش استخراج سیال فوق بحرانی: مواد الک شده گیاه دارویی *Artemisia persica* به قسمت‌های ۱۵۰ گرمی تقسیم شده و در چهار مرحله استخراج انجام شد. ریت جریان کربن دی‌اکسید برابر ۳ kg min⁻¹ × ۱۰ که بر اساس دانستیه CO₂ خروجی از جداکننده تحت شرایط محیطی مختلف تعیین شده است، انجام شد. اثر فشار، دما، درصد اصلاحگر و زمان دینامیک در سطوح مختلف (جدول ۲)، بر ترکیبات شیمیایی اسانس *Artemisia persica* با طراحی فاکتوریل مرتبه دو ارزیابی شد.

جدول ۲: چهار متغیر فشار، دما، درصد اصلاحگر و زمان دینامیک و سطوح مختلف آنها

زمان دینامیک (دقیقه)	فشار (اتمسفر)	دما (درجه سانتی‌گراد)	درصد اصلاح‌گر متانول (v/v)	متغیر	دفعات
۱۵	۱۰	۳۰۰	۰	۱	
۲۵	۱۰	۳۱۰	۵	۲	
۳۵	۱۰	۳۲۰	۱۰	۳	
۲۵	۲۰	۳۰۰	۱۰	۴	
۳۵	۲۰	۳۱۰	۰	۵	
۱۵	۲۰	۳۲۰	۵	۶	
۳۵	۳۰	۳۰۰	۵	۷	
۱۵	۳۰	۳۱۰	۱۰	۸	
۲۵	۳۰	۳۲۰	۱۰	۹	

جدول ۳: تأثیر روش‌های مختلف اسانس‌گیری بر عملکرد اسانس *Artemisia persica*

زمان دینامیک (دقیقه)	فشار (اتمسفر)	دما (درجه سانتی‌گراد)	درصد اصلاح‌گر متانول (v/v)	عملکرد اسانس (%)
۱۵	۱۰	۳۰۰	۰	۲/۲ ^f ± ۰/۱۲
۲۵	۱۰	۳۱۰	۵	۲/۱ ^f ± ۰/۱۹
۳۵	۱۰	۳۲۰	۱۰	۱/۷ ^g ± ۰/۲۴
۲۵	۲۰	۳۰۰	۱۰	۴/۵ ^c ± ۰/۱۸
۳۵	۲۰	۳۱۰	۰	۵/۳ ^b ± ۰/۳۲
۱۵	۲۰	۳۲۰	۵	۳/۷ ^d ± ۰/۲۳
۳۵	۳۰	۳۰۰	۵	۳/۴ ^e ± ۰/۴۱
۱۵	۳۰	۳۱۰	۱۰	۵/۷ ^a ± ۰/۳۳
۲۵	۳۰	۳۲۰	۱۰	۵/۳ ^b ± ۰/۳۶
کلونجر (روش تقطیر)	-	-	-	۱/۷ ^g ± ۰/۲۱

با (GC/MS) طیف سنج جرمی، ستون DB-1 و غیرقطبی به طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن با بر ۰/۲۵ میکرون است. دتکتور Ion trap گاز حامل هلیوم ۵۰ ml/min و انرژی یونیزاسیون در طیف سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت است. برنامه حرارتی ۲۲۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴/min درجه در دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود.

بررسی خاصیت قارچ کشی اسانس *Artemisia persica*

تهیه سوبه‌های میکروبی: سوبه‌های قارچی استفاده شده در این تحقیق شامل *Microsporum canis* (PTCC 50695069)، *Trichophyton rubrum* (PFCC 51431)، *Epidermophyton floccosum* (PFCC 89-1573) و *Trichophyton mentagrophytes* (PFCC 50541) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

تعیین خواص ضدقارچی: برای انجام این آزمایش از پلیت ۹۶ خانه استریل به روش برات میکرو دایلوژن و طبق استاندارد استفاده گردید (CLSI, 2012). ابتدا ۵۰ میکرولیتر محیط کشت سابرو دکسترو برات (مرک، آلمان) به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید، سپس به چاهک‌های اول و دوم هر ردیف میزان ۵۰ میکرولیتر از استوک اسانس‌های استخراج شده به دو روش سیال فوق بحرانی و تقطیر با آب با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید، در ردیف‌های دیگر پلیت از محلول DMSO به‌عنوان کنترل منفی، و برای کنترل مثبت از بنزوات سدیم یک درصد استفاده شد. عمل رقیق‌سازی از چاهک دوم تا چاهک دهم صورت گرفت، سپس از سوسپانسیون قارچی مورد نظر معادل نیمه مک‌فارلند که حاوی ۱/۵×۱۰^۸ قارچ در هر میلی‌لیتر بود اضافه شد (از چاهک دوم تا دهم، چاهک یازده را اضافه نکرده ولی به چاهک شماره

دستگاه استخراج گر سیال فوق بحرانی مدل SUPREX MPS/225MULTIPURPOSE SYSTEM که دارای محفظه استخراج گر به حجم ۸ میلی‌لیتر است، استفاده شد. گاز کربنیک (CO₂) در حالت فوق بحرانی بعنوان حلال بکار رفت. در استخراج اثر چهار فاکتور و هر فاکتور در سه سطح شامل فشار (۱۰، ۲۰ و ۳۰ اتمسفر)، دما (۳۰۰، ۳۱۰ و ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان دینامیک استخراج (۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه) و میزان درصد حجمی اصلاحگر (متانول) (۰، ۵ و ۱۰ v/v) با طرح آماری تاگوشی، بر میزان درصد ترکیبات استخراجی بررسی شد. در تمام ۹ آرایه، زمان استاتیک استخراج ۲۰ دقیقه بود. از حلال دی کلرومتان خالص جهت جمع‌آوری نمونه‌ها استفاده شد.

سنجش ترکیبات اسانس با GC/MS: پس از بهینه‌سازی استخراج حداکثر اسانس از بافت گیاه دارویی *Artemisia persica* با دستگاه سیال فوق بحرانی (جدول ۵)، ترکیبات موجود در اسانس‌های استحصال شده توسط دو روش سیال فوق بحرانی و تقطیر با آب توسط دستگاه GC/MS سنجش و مقایسه شدند.

مشخصات گاز کروماتوگرافی (GC): کروماتوگراف گازی مدل Shimadzu-9A مجهز به دتکتور F.I.D (یونیزاسیون شعله هیدرژن) و داده پرداز Chromatepac، ستون DB-1 و غیر قطبی به طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن حامل ۲۲/۷ cm/s و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت است. برنامه حرارتی ۲۲۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود.

مشخصات گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی: کروماتوگراف گازی Varin-3400 متصل شده

جذب محلول خوانده شد. قدرت خنثی سازی رادیکال آزاد DPPH (RSA) را طبق فرمول زیر محاسبه نمودیم:

$$RSC (\%) = 100 \times (\text{Ablank} - \text{Asample} / \text{Ablank})$$

در این فرمول Ablank میزان جذب نوری کنترل منفی (نمونه بدون اسانس) و Asample بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس‌ها است. در این آزمایش از بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن (BHT; Sigma, W218405) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. میزان IC₅₀ (غلظتی از اسانس که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌های DPPH را مهار کند) برای اسانس‌ها تعیین شد.

سنجش قدرت مهار کنندگی رادیکال ABTS:

رادیکال کاتیون ABTS دارای رنگ سبز-آبی با بیشینه جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر بوده و کاهش میزان این رادیکال کاتیون به عنوان شاخصی از فعالیت آنتی رادیکالی ترکیبات مورد نظر می‌باشد. در این آزمایش ابتدا یک محلول ۱:۱ از اختلاط محلول ۷ میلی مولار ABTS و ۲/۴۵ میلی مولار پرسولفات تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق و یک مکان تاریک قرار گرفت. سپس محلول حاصل با متانول به نسبت ۱:۲۵ رقیق و پس از آن میزان ۲۰ میکرو لیتر از غلظت‌های مختلف اسانس به ۲ میلی لیتر محلول ABTS رقیق شده افزوده شد سپس در لحظه اول و پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر قرائت و درصد بازدارندگی نمونه از طریق رابطه زیر محاسبه و در نهایت به صورت ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل ترولکس گزارش و میزان IC₅₀ محاسبه گردید (Ré et al., 2011):

$$I (\%) = 100 \times (\text{Ablank} - \text{Asample} / \text{Ablank})$$

در این فرمول Ablank میزان جذب نوری کنترل منفی (نمونه بدون اسانس) و Asample بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس‌های استخراج شده به دو روش سیال فوق بحرانی و تقطیر با آب بود.

دوازده اضافه می‌کنیم). سپس پلیت مورد نظر را به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه (انکوباتور شیکردار) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری کرده، و پس از گذشت زمان مورد نظر با استفاده از محلول رنگ TTC (۲، ۳ و ۵ تری فنیل تترازولیوم)، میزان رشد قارچ‌ها را اندازه می‌گیریم، به این شکل که به تمامی چاهک‌ها، میزان ۱۰ میکرولیتر از این حلال اضافه کرده و پس گذشت زمان ۳ ساعت در گرمخانه تغییرات رنگ چاهک‌ها را مورد بررسی قرار دادیم، به این شکل که در چاهک‌هایی که میکروارگانیزم رشد کرده بود تغییر رنگ مشاهده شد و در چاهک‌های که رشد صورت نگرفته بود عدم تغییر رنگ ملاحظه شد، اولین چاهکی را در پلیت که تغییر رنگ داده بود، چاهک قبل از آن را تحت عنوان MIC یادداشت نمودیم. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC) از تمامی چاهک‌های فاقد رنگ به میزان ۵ میکرولیتر بر روی محیط کشت ساپروکستروآگار کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه نگه‌داری شدند. حداقل غلظتی که قارچ در آن رشد نکرده بود به عنوان MFC گزارش گردید.

تعیین خواص پاد اکسایشی

سنجش قدرت مهار کنندگی رادیکال DPPH (2,2-)

(diphenyl-1-picrylhydrazyl): برای انجام این آزمایش از روش کلوا و همکاران (Koleva et al., 2002) با اندکی تغییرات استفاده شد. میزان ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های متفاوت اسانس‌های استخراج شده به دو روش سیال فوق بحرانی و تقطیر با آب، در لوله‌های آزمایش ریخته شد و به هر کدام از آن‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محلول متانولی ۰/۲ میلی مول DPPH (Sigma, D9132) اضافه گردید. محلول ساخته شده را به مدت زمان ۳۰ دقیقه در تاریکی تکان داده شد و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS در طول موج ۵۱۷ نانومتر

سنجش میزان سمیت سلولی: سنجش خواص سمیت سلولی به روش MTT بر روی رده سلول سرطانی HeLa و سلول‌های نرمال لنفوسیت انجام گرفت. سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱۰۴ سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه استریل حاوی محیط کشت سلولی RPMI-1640 تهیه شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد گاز CO₂ غلظت‌های ۵۰۰۰ تا ۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس‌ها تهیه شد و به چاهک‌ها اضافه شد، برای کنترل مثبت از داروی ضدسرطان سیس پلاتین و برای کنترل منفی از حلال آب مقطر استفاده شد، پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون سلولی در دمای ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد گاز CO₂ به هر یک از چاهک‌ها ۲۰ μl نمک زرد MTT به هر چاهک اضافه گردید و پس از گذشت ۴ ساعت میزان ۱۵۰ μl از مایع رویی کشیده شد و به هر یک از چاهک‌ها ۱۰۰ μl DMSO اضافه گردید و توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ nm میزان جذب هر چاهک خوانده شد. پس از رسم نمودار مربوط به درصد مهار رشد، غلظتی از اسانس یا عصاره که سبب مهار رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها شد (IC₅₀) بر حسب μg ml⁻¹ گزارش شد (Sadeghi et al., 2013).

آنالیز آماری

آنالیز واریانس یکطرفه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18، برای روش‌های استخراج اسانس و نیز دزهای مختلف اسانس در تست‌های سنجش آنتی‌اکسیدان (DPPH و ABTS) انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن (p<0.05) انجام شد و نتایج بر حسب میانگین‌ها و استاندارد دیویژن (SD) در جداول گزارش شدند. اثر قارچ کشی اسانس‌ها به روش استاندارد کلینیکی (CLSI, 2012)، انجام و نتایج گزارش شد.

نتایج

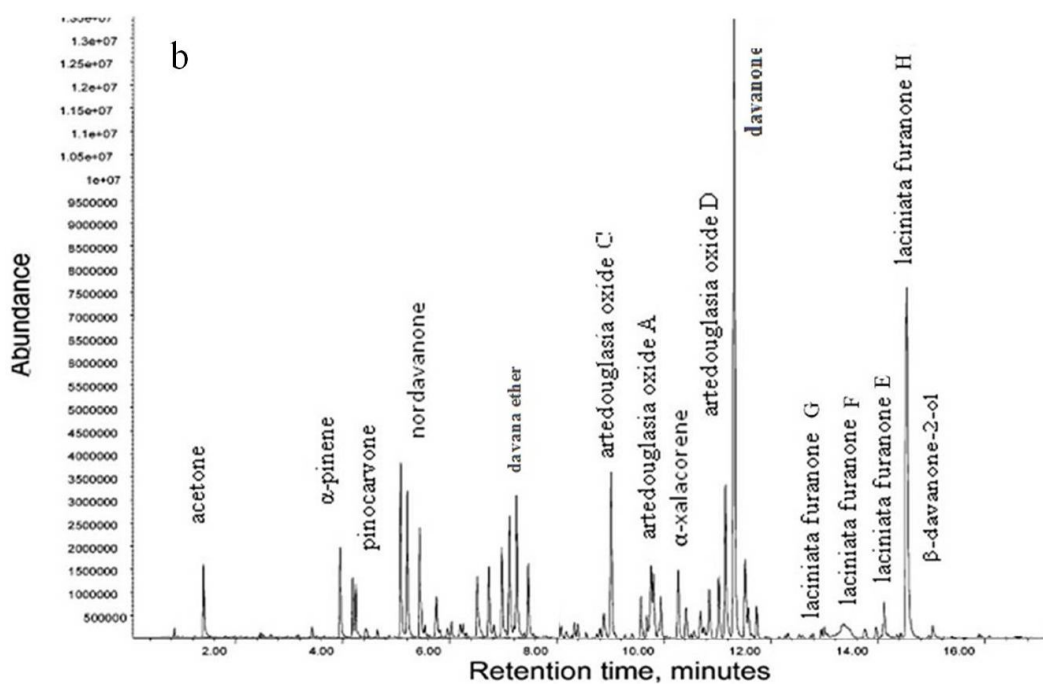
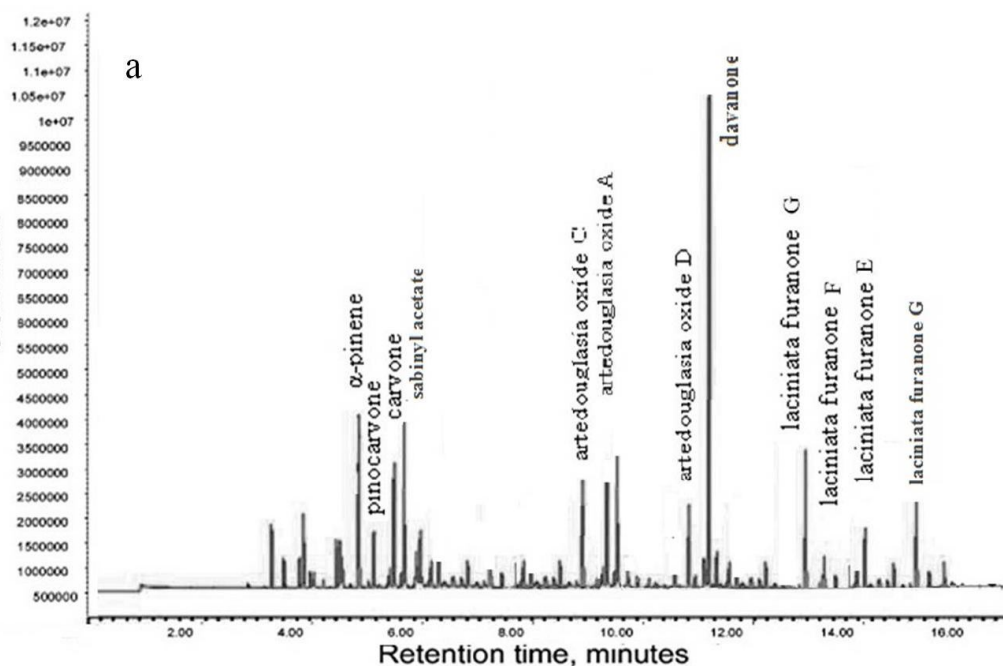
عملکرد اسانس: بر اساس نتایج بدست آمده اختلاف معنی‌داری بین عملکرد اسانس در زمان‌ها و روش‌های مختلف وجود دارد. همانگونه که در جدول ۳ قابل مشاهده است، در روش استخراج اسانس با استفاده از سیال فوق بحرانی، بازده استخراج اسانس به بیش از ۳ برابر روش سنتی تقطیر با آب رسید. متغیرهای فشار، دما و زمان دینامیک بر کمیت استخراج اسانس تأثیر داشتند و بهترین نتیجه در فشار ۳۰ اتمسفر، دمای ۳۱۰ درجه سانتی‌گراد و زمان دینامیک ۱۵ دقیقه (۵/۷ درصد) و کمترین عملکرد در فشار ۱۰ اتمسفر، دمای ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد و زمان دینامیک ۳۵ دقیقه و روش تقطیر (۱/۷ درصد) بدست آمد (جدول ۳).

ترکیبات اسانس در دو روش استخراج: اسانس به‌دست آمده با روش‌های سیال فوق بحرانی و تقطیر توسط دستگاه GC/MS مورد تجزیه قرار گرفت و ترکیبات شیمیایی آنها شناسایی شدند که اطلاعات آن در شکل ۱ و جدول ۴ آمده است. به‌طور کلی ۲۵ ترکیب در اسانس گیاه *A. persica* شناسایی شد.

ترکیبات عمده اسانس در روش تقطیر به‌ترتیب شامل؛ داوانون (۲۲ درصد)، لاسینیاتافوران G (۷/۱ درصد)، آرتدوگلاسیا اکسید D (۶ درصد)، سابینیل استات (۶ درصد)، آلفا ترپینن (۵/۶ درصد) و کارون (۴/۸ درصد) بود. همچنین ترکیبات عمده اسانس در روش سیال فوق بحرانی به‌ترتیب شامل؛ داوانون (۲۹ درصد)، لاسینیاتافوران H (۱۸/۱ درصد)، آرتدوگلاسیا اکسید C (۸/۵ درصد)، نوروداوان (۷/۶

- 1Laciniata furanone G
- 2Artedouglasia oxide D
- 3Sabinyl acetate
- 4α-terpinene
- 5Carvone

درصد)، آرتدوگلاسیا اکسید B (۶ درصد) و داوانا اتر (۵/۶ درصد) بود.



شکل ۱: طیف‌های کروماتوگرام حاصل از آنالیز اسانس گیاه *A. persica* به دو روش استخراج با تقطیر (a) و سیال فوق بحرانی GC/MS با دستگاه (b)

جدول ۴: ترکیبات شیمیایی شناسایی شده از اسانس *A. persica* با دستگاه GC/MS با روش‌های مختلف استخراج

شماره	نام ترکیب	شاخص کوتاهس	درصد ترکیب‌ها
-------	-----------	-------------	---------------

ترکیب	روش تقطیر	سیال فوق بحرانی
۱	α -pinene	۹۳۵
۲	camphene	۹۵۰
۳	β -pinene	۹۷۵
۴	camphene	۱۰۱۳
۵	α-terpinene	۱۰۵۶
۶	pinocarvone	۱۱۶۱
۷	trans -carveol	۱۲۱۳
۸	norodavane	۱۲۲۷
۹	carvone	۱۲۳۹
۱۰	sabinyl acetate	۱۲۹۷
۱۱	α -Copaene	۱۳۷۶
۱۲	Jasmone	۱۳۹۴
۱۳	cis-Davanafuran	۱۴۱۴
۱۴	davana ether	۱۴۹۱
۱۵	α -muurolene	۱۴۹۵
۱۶	artedouglasia oxide C	۱۵۲۰
۱۷	artedouglasia oxide A	۱۵۳۷
۱۸	artedouglasia oxide D	۱۵۵۷
۱۹	artedouglasia oxide B	۱۵۷۸
۲۰	davanone	۱۵۸۰
۲۱	laciniata furanone G	۱۶۲۵
۲۲	laciniata furanone F	۱۶۲۹
۲۳	laciniata furanone E	۱۶۳۸
۲۴	laciniata furanone H	۱۶۴۶
۲۵	β -davana-2-ol	۱۶۶۸
	Total	۹۸/۴

عملکرد ضد قارچی نمونه اسانس‌ها: جدول ۵ تاثیر اسانس *A. persica* به دو روش استخراج شده بر قارچ‌های *M. canis* (PTCC 50695069)، *T. rubrum* (PFCC 89-1573)، *E. floccosum* (PFCC 51431) و *T. mentagrophytes* (PFCC 50541) را نشان می‌دهد. براساس نتایج حاصله حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و کشندگی (MFC) برای قارچ *M. canis* در روش تقطیر به ترتیب ۳۲۰ و ۶۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، و در روش سیال فوق بحرانی، ۳۲۰ و ۱۲۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. MIC و MFC قارچ *T. rubrum* در روش تقطیر ۶۴۰ و ۱۲۸۰ و روش سیال فوق بحرانی ۶۴۰ و ۱۲۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است (جدول ۵).

جدول ۵: تاثیرات ضدقارچی اسانس *A. persica* در روش‌های مختلف استخراج حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) برای هر یک از قارچ‌های مختلف برحسب

جدول ۵: تاثیرات ضدقارچی اسانس *A. persica* در روش‌های مختلف استخراج

حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) برای هر یک از قارچ‌های مختلف برحسب

µg/mL								روش استخراج
<i>Microsporum canis</i> PTCC 5069		<i>Trichophyton rubrum</i> PFCC 51431		<i>Epidermophyton floccosum</i> PFCC 89-1573		<i>Trichophyton mentagrophytes</i> PFCC 50541		اسانس
MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	
۳۲۰	۶۴۰	۶۴۰	۶۴۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰	۳۲۰	تقطیر
۳۲۰	۱۲۸۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۶۴۰	۶۴۰	۳۲۰	۶۴۰	سیال فوق بحرانی

عملکرد آنتی‌اکسیدانی

سمیت سلولی اسانس‌های استخراج شده: نتایج نشان داد، بین اثرات سیتوتوکسیستی در روش‌های مختلف استخراج اسانس اختلاف معنی‌داری وجود دارد. اثر اسانس گیاه *A. persica* به دو روش استخراج با تقطیر و سیال فوق بحرانی بر سلول‌های سرطانی *Hela* به ترتیب ۱۳۳ و ۱۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. همچنین اثر اسانس استخراج شده بر سلول‌های نرمال *Lymphocyte* به دو روش تقطیر و سیال فوق بحرانی به ترتیب ۶۱۶ و ۵۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های مختلف استخراج شده به دو روش *ABST* و *DPPH* در جدول ۶ آمده است. بر اساس نتایج بدست آمده اختلاف معنی‌داری بین درصد مهار رادیکال‌های آزاد وجود دارد. در هر دو روش *DPPH* و *ABTS* بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان برای اسانس استخراج شده به روش تقطیر با آب به ترتیب ۲۰/۳۲ و ۱۴/۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر ثبت شد.

جدول ۶: فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس *A. persica* در روش‌های مختلف استخراج

IC ₅₀ (µg/mL)		روش استخراج اسانس
<i>DPPH</i>	<i>ABST</i>	تقطیر
20.32±2.21 ^b	14.23±2.34 ^b	سیال فوق بحرانی
26.11±2.97 ^c	26.42±3.45 ^c	<i>BHT</i>
16.45±0.63 ^a	-	<i>Trolox</i>
-	1.89±0.20 ^a	

جدول ۷: اثرات سیتوتوکسیستی اسانس *A. persica* در روش‌های مختلف استخراج

IC ₅₀ (µg/ml)		روش استخراج اسانس
<i>Lymphocyte</i>	<i>Hela</i>	تقطیر
4616±135 ^c	133±3 ^a	سیال فوق بحرانی
5346±169 ^d	164±5 ^b	

بحث

روش تقطیر شامل؛ داوانون، لاسینیاتافوران G، آرتدوگلاسیا اکسید D، ساینیل استات، آلفا تریپنین و کارونه بود و در روش سیال فوق بحرانی شامل؛ داوانون، لاسینیاتافوران H، آرتدوگلاسیا اکسید C، نوروداوان، آرتدوگلاسیا اکسید B و داوانا اثر بود. تا

نتایج این پژوهش نشان داد که کمیت و کیفیت ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌های استخراج شده به روش تقطیر با آب و سیال فوق بحرانی با یکدیگر متفاوت است. ترکیبات عمده اسانس در

روش سیال فوق بحرانی میزان مونو ترپن‌های موجود در اسانس، ۱۷ درصد بود (جدول ۴). داوانون و ترکیبات هم خانواده آن مثل لاسینیاتافوران و آرتدوگلاسیا اکسید، عمده ترکیبات موجود در اسانس *A. persica* در هر دو روش استخراج بودند با این تفاوت که درصد این ترکیبات در روش تقطیر ۵۲ درصد و در روش سیال فوق بحرانی ۷۸ درصد بود.

داوانون، لاسینیاتافوران و آرتدوگلاسیا اکسید در ساخت عطرهای با ماندگاری بالا (Long-lasting perfume) به کار برده می‌شوند و در صنعت جهانی عطرسازی دارای ارزش اقتصادی فراوانی هستند (Shah, 2014). در حال حاضر گونه‌های *Artemisia pallens* و *Artemisia indica* به‌عنوان منشأ استخراج داوانون طبیعی محسوب می‌شوند و در کشورهای چون هندوستان و اندونزی به‌منظور استخراج داوانون و مشتقات آن، کشت می‌شوند (Haider et al., 2014; Bhagavathy et al., 2015). گیاه بومی *A. persica* این قابلیت را دارد که به‌عنوان منشأ استخراج داوانون و مشتقات آن با گونه‌های *A. pallens* و *A. indica* رقابت کند.

نتایج این مطالعه نشان داد استخراج اسانس به روش سیال فوق بحرانی می‌تواند سبب افزایش چشمگیر (تا ۳ برابر) بازده اسانس در گیاه دارویی *A. persica* شود. تحقیقات کلیمان و همکاران (Coleman et al., 2007) نشان داد که استخراج داوانون از گیاه *A. pallens* به روش سیال فوق بحرانی نتایج کمی و کیفی بهتری دارد. مطالعه در زمینه اثر روش‌های مختلف اسانس‌گیری بر کمیت و کیفیت اسانس پونه ایرانی (*Nepeta persica*)، نشان داد، بازده اسانس و میزان نپتالاکتون‌ها در روش سیال فوق بحرانی بیشتر از روش استخراج با تقطیر با آب می‌باشد (Khajeh et al., 2010). نتایج مطالعه بر روی گیاه کاملیا (*Camellia japonica*) نشان داد، روش

کنون گزارش‌های متعددی در خصوص آنالیز اسانس *A. persica* ارائه شده است، از جمله آنکه رامک و سفیدکن (Ramak and Sefidkon, 2008) با مقایسه کمی و کیفی اسانس *A. persica* در مزرعه و رویشگاه گزارش کردند که میزان اسانس در مکان‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارد. لاسینیاتافوران E، آرتدوگلاسیا اکسید C، ترانس پینوکاروئول^۶، پینوکاروون^۷، آلفاترپینن،^۸ و سینتول^۹ عمده‌ترین ترکیب‌های موجود این گیاه در رویشگاه بود. احمدوند و همکاران (Ahmadvand et al., 2015)، ۵۴ ترکیب را از اندام‌های هوایی *A. persica* استخراج و شناسایی کردند. آلفاترپینن، تیمول، ۳-برومواتیل-۳-اگزتانومتانول^۴، ۴-توکسی-تری سیکل دکا-۳ و ۸ دی آن^۵، نرولیدول^{۱۰} و فنل بیشترین ترکیبات موجود در اندام‌های هوایی این گیاه بودند.

شبهات‌ها و اختلافاتی بین خصوصیات کمی و کیفی اسانس *A. persica* در مطالعه حاضر و تحقیقات گذشته وجود دارد که به نظر می‌رسد شرایط اکولوژیکی مکان رویش گیاهان، زمان برداشت، مرحله رشد، شرایط نگهداری و خشک کردن و روش استخراج اسانس از جمله دلایل این تغییرات است (Shekarchi et al., 2012; Morshedloo et al., 2018). در این مطالعه مشخص شد، روش‌های مختلف استخراج اسانس بر کمیت و کیفیت اسانس نیز تاثیر گذار می‌باشد. در روش اسانس‌گیری به روش سیال فوق بحرانی بازده استخراج اسانس می‌تواند به بیش از ۳ برابر روش سنتی تقطیر با آب برسد. در روش تقطیر، مونوترپن‌ها حدود ۳۵ درصد از ترکیبات اسانس را تشکیل دادند در حالی که در

6Trans-Pinocarveol

7Pinocarpone

83-bromomethyl- 3- oxetanemethanol

94- ethoxy- tricycle deca- 3,8 diene

10Erolidol

سیال فوق بحرانی از نظر بازده و تولید اسانس نسبت به روش تقطیر با بخار آب، بهتر می‌باشد (Zhou et al., 2019).

روش سیال فوق بحرانی در استخراج اسانس‌های گیاهی تأثیری منفی بر کیفیت و خواص بیولوژیک اسانس‌ها ندارد اگرچه سبب افزایش سرعت در اسانس‌گیری و عملکرد می‌شود (Yousefi et al., 2019).

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس *A. persica* که به دو روش مختلف استخراج شده بودند، قابلیت مهار و کشندگی قارچ‌های *T. rubrum*، *M. canis* و *E. floccosum* را دارند، اگر چه اسانس استخراج شده به روش تقطیر با آب نسبت به روش سیال فوق بحرانی از اثرات ضدقارچی بالاتری برخوردار بود. مقتدر و همکاران (Moghtader et al., 2018) نیز اثر ضد قارچی اسانس *A. persica* را بر سویه *Aspergillus niger* گزارش کرده‌اند. همانگونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترین‌ها به ویژه سزکوئی‌ترین‌های اکسیژنه عمده ترکیبات موجود در اسانس *A. persica* هستند. مطالعات متعددی اثر قارچ‌کشی مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترین‌های اکسیژنه را تأیید می‌کنند (Adekenov, 2017; Petrović et al., 2019).

به نظر می‌رسد که درصد بالای ترکیبات ترپنی موجود در اسانس گیاهان جنس *Artemisia* سبب افزایش چشمگیر قابلیت قارچ‌کشی و ارزش دارویی گونه‌های این جنس گیاهی شده است (Li et al., 2019).

قدرت مهارکنندگی بیشتر اسانس استخراج شده به روش تقطیر بر روی قارچ‌های مورد آزمایش، می‌تواند ناشی از درصد بالای ترکیبات مونوترپن در این اسانس باشد. تا کنون اثر ضدقارچی دیگر گونه‌های سرده *Artemisia* از جمله؛ *Artemisia annua* (Li et al., 2019)، *Artemisia absinthium* (Liu et al., 2019) و *Artemisia sieberi* (Liu et al., 2019) گزارش شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد، اسانس گیاه *A. persica* است که این نتایج با گزارش احمدوند و همکاران (Ahmadvand et al., 2015) همخوانی دارد. اسانس استخراج شده به روش تقطیر قابلیت بالاتری در مهار رادیکال‌های آزاد داشت. درصد و نوع ترکیبات ترپنی و آروماتیک موجود در اسانس گیاهان، بر خواص آنتی‌اکسیدانت اسانس‌ها مؤثر است (Bhavaniramya et al., 2019). حضور توأم ترکیبات مونو و سزکوئی‌ترین، اثر هم افزایی (Synergy) بر قابلیت آنتی‌اکسیدان اسانس‌ها دارد اگرچه مونوترپن‌ها مولکول‌های فعال‌تری در مهار اکسیژن‌های آزاد هستند و از قابلیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری برخوردار هستند (Lange and Ahkami, 2013). گزارش‌هایی موجود است که بین میزان قدرت آنتی‌اکسیدان و میزان قارچ‌کشی اسانس‌های گیاهی همبستگی مثبتی وجود دارد (Bartikova et al., 2014)، در این مطالعه نیز قدرت آنتی‌اکسیدان اسانس استخراج شده به روش تقطیر بیشتر از اسانس استخراج شده به روش سیال فوق بحرانی بود، بنابراین قدرت قارچ‌کشی اسانس استخراج شده به روش تقطیر می‌تواند ناشی از قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتر این نوع اسانس باشد.

اثر اسانس گیاه *A. persica* بر سلول‌های سرطانی Hela در دو روش استخراج تقطیر و سیال فوق بحرانی به ترتیب ۱۳۳ و ۱۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود در حالیکه اثر این اسانس‌ها بر سلول‌های نرمال Lymphocyte، به ترتیب ۴۶۱۶ و ۵۳۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، یعنی با اینکه اسانس گیاه دارویی *A. persica* قادر است در غلظت‌های بسیار کم سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی Hela شود، اما تنها در دوزهای بسیار بالا سلول‌های نرمال Lymphocyte را

در مجموع می‌توان گفت که استخراج اسانس گیاه *A. persica* با استفاده از روش سیال فوق بحرانی، به‌دلیل عملکرد بالای اسانس و نیز غالبیت ماده موثر داوانون و ترکیبات هم‌خانواده آن، جهت تهیه مواد معطره داوانون برای مصرف در صنایع عطرسازی، پیشنهاد می‌شود. از طرفی اگر چه خواص قارچ‌کشی اسانس *A. persica* در روش تقطیر با آب قوی‌تر از روش استخراج سیال فوق بحرانی بود، اما با توجه به افزایش ۳ برابری عملکرد اسانس در روش سیال فوق بحرانی، برای مصارف ضد قارچی نیز روش سیال فوق بحرانی، اقتصادی‌تر از روش تقطیر با آب خواهد بود.

نتیجه‌گیری نهایی

References

1. Aboukhalid, K., Al Faiz, C., Douaik, A., Bakha, M., Kursa, K., Agacka-Moldoch, M., Machon, N., Tomi, F., and Lamiri, A. 2017. Influence of environmental factors on essential oil variability in *Origanum compactum* benth. growing wild in Morocco. *Chemistry & Biodiversity*, 14(9): 158-164.
2. Adekenov, S.M. 2017. Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. *Fitoterapia*, 121: 16-30.
3. Ahmadvand, H., Amiri, H., Dalvand, H., Bagheri, Sh., GhasemiDehnoo, M., Moghadam, S., and HadipourMoradi, F. 2015. Chemical composition and antioxidant properties of Lorestan province *Artemisia persica*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7:16-22.
4. Bagheri, S.M., Asl, A.A., Shams, A., Mirghanizadeh-Bafghi, S.A., and Hafizibarjin, Z. 2017. Evaluation of cytotoxicity effects of oleo-gum-resin and its essential oil of *Ferula assa-foetida* and ferulic acid on 4t1 breast cancer cells. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 38: 116-120.
5. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., and Idaomar, M. 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 1-13.
6. Bhagavathy, GV., VelazquezNieves, GM., Webb, MZ., and Chauhan, KR. 2015. Arthropod deterrents from *Artemisia pallens* (davana oil) components. *Natural Product Communications*, 10: 1335-6.
7. Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M.S., Vijayakumar, R., and Baskaran, D. 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001> (In Press)
8. CLSI. 2012. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*, 8th Edition, Wayne Pennsylvania.
9. Coleman, W.M., Dube, M., Ashraf-Khorasani, M., and Taylor, L.T. 2007. someric Enhancement of Davanone from Natural Davana Oil Aided by Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3037-43.
10. Hadian, J., Farzaneh, M., Mirjalili, M.H., Nejad-Ebrahimi, S., and Ghorbani, M.

2007. Chemical compositions of essential oil of *Artemisia khorasanica* podl. and its antifungal activity on soil-Born phytopathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10: 53-59.
11. Haider, S.Z., Sharma, M.M., and Andola, H. 2014. Constituents of *Artemisia indica* Willd. from Uttarakhand Himalaya: A source of davanone. *Pharmacognosy Research*, 6: 257-9.
 12. Hajimehdipoor, H., Khanavi, M., Shekarchi, M., Abedi, Z., and Pirali Hamedani, M. 2010. Investigation of the best method for extraction of phenolic compounds from *Echinaceae purpurea* L. (Moench). *Journal of Medicinal Plants*, 8: 145-52. (In Persian)
 13. Hakimi Meybody, MH., Afkhami aghdaei, M., and Mirjalili, F. 2003. Investigation of biological activity essential oil of *Artemisia persica*. *Journal of Pajouhesh and Sazandegi*. 61: 2-5. (In Persian)
 14. Khajeh, M., Yamini, Y., and Shariati, S. 2010. Comparison of essential oils compositions of *Nepeta persica* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation methods. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3): 227-232.
 15. Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A.D., and Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.
 16. Lang, G., and Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27: 13-39.
 17. Lange, B.M., and Ahkami, A. 2013. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal*, 11: 169-196.
 18. Li, K.M., Dong, X., Ma, Y.N., Wu, Z.H., Yan, Y.M., and Cheng, Y.X. 2019. Antifungal coumarins and lignans from *Artemisia annua*. *Fitoterapia*, 134: 323-328.
 19. Liu, T., Linb, P., Bao, T., Ding, Y., Lha, O., Nan, P., Huang, Y., Gu, Zh., and Zhong, Y. 2018. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia dracunculus* L. var. *qinghaiensis* Y.R. Ling (Asteraceae) from Qinghai-Tibet Plateau. *Industrial Crops and Products*, 125: 1-4.
 20. Liu, T., ting, Wu, H., bin, Wu, H., and Zhang, J. 2019. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) as a promising nematicidal and antifungal agent: Chemical composition, comparison of extraction techniques and bioassay-guided isolation. In *Industrial Crops and Products*, 133: 295-303.
 21. Mahboubi, M., and Kazempour, N. 2015. The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. *Journal of Medical Mycology*, 25(2): 65-71.
 22. Meepagala, K.M., Sturtz, G., and Wedge, D.E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6989-6992.
 23. Moghtader, M., Salari, H., Mozafari, H., and Farahmand, A. 2018. Essential oil composition and Antifungal activity of *Artemisia Persica* Boiss. in compare to synthetic Borneol against the *Aspergillus niger*. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 6(3): 47-61. (In Persian)
 24. Morshedloo, M.R., Salami, S.A., Nazeri, V., Maggi, F., and Craker, L. 2018. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops and Products*, 119: 183-190.
 25. Mozaffarian, V. 2012. Identification of Medicinal and aromatic plants of Iran. Farhang moaser publishers, Tehran, 1444p. (In Persian)
 26. Petrović, J., Stojković, D., and Soković, M. 2019. Terpene core in selected aromatic and edible plants: Natural health improving agents, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.009>.

27. Ramak, P., and Sefidkon, F. 2008. Investigating the quality and quantity of essential oil of *Artemisia persica* Boiss. In field and provenance. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24: 189-197. (In Persian)
28. Rasooli, I., Rezaee, M.B., Moosavi, M.L., and Jaimand, K. 2003. Microbial sensitivity and chemical properties of the essential oil of *Artemisia Annual*. Journal of Essential Oil Research, 15: 59-62.
29. Raut, J.S., and Karuppayil, S.M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products, 62: 250-264.
30. Ré, D., Vieira, P., and Jorge, N. 2011. Antioxidant potential of oregano (*Oreganum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins in vegetable oil. Food Science and Technology, 31(4): 955-959.
31. Sadeghi, I., Yousefzadi, M., Behmanesh, M., Sharifi, M., and Moradi, A. 2013. In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja intermedia*. Iranian Red Crescent Medical Journal, 15 (1): 70-74.
32. Sadehpour, O., Asghari, G., and Shams, M.R. 2004. Composition of essential oil of *Artemisia persica* Boiss. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3: 65-67.
33. Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., and Ahmadi, S. 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *satureja rechinger jamzad*. Food Chemistry, 100: 1054-8.
34. Shah, N.C. 2014. The Economic and Medicinal *Artemisia* species in India. A Review Article. The Scitech Journal, 1: 29-38.
35. Shekarchi, M., Hajimehdipoor, M., Khanavid, M., and Roostaied, A. 2012. The Effects of plant age and harvesting time on chicoric and caftaric acids content of *E. purpurea* (L.) Moench. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 8: 203-208.
36. Tohidi, B., Rahimmalek, M., and Arzani, A. 2017. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. Food Chemistry, 220: 153-161
37. Turi, C.E., Shipley, P.R., and Murch, S.J. 2014. North American *Artemisia* species from the subgenus *Tridentatae* (Sagebrush): a phytochemical, botanical and pharmacological review. Phytochemistry, 98: 9-26.
38. Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S.M., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., and Mirsadeghi, S. 2019. Supercritical fluid extraction of essential oils. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 118: 182-193.
39. Zhang, D.Y., Yao, X. H., Duan, M.H., Wei, F.Y., Wu, G.H., and Li, L. 2015. Variation of essential oil content and antioxidant activity of *Lonicera* species in different sites of China. Industrial Crops and Products, 77: 772-779.
40. Zhou, D., Shi, Q., Pan, J., Liu, M., Long, Y., and Ge, F. 2019. Effectively improve the quality of Camellia oil by the combination of supercritical fluid extraction and molecular distillation (SFE-MD). LWT, 110:175-181.

**Comparison of supercritical fluid and distillation extraction methods
on yield, antioxidant and antifungal activities of *Artemisia
persica* Boiss. essential oil**

Ramak, P.^{1*}, Karimian, V.², Sepahvand, A.³

¹Assistant Prof., Research Division of Natural Resources, Lorestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Khorramabad, Iran

²Young Researchers and Elite Club, Yasooj Branch, Islamic Azad University, Yasooj, Iran.

³Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

Received: 2019-5-8 ; Accepted: 2019-7-24

Abstract

In this study, aerial parts of *Artemisia persica* in blooming satage were collected from Noor Abad Research Farm (Lorestan province, Iran) in the summer of 2017. Essential oils of plants were extracted by water distillation and supercritical fluid extraction (SFE) methods and were analyzed by using GC/MS device. Antifungal properties of essential oils were evaluated on *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, and *Trichophyton mentagrophytes* strains by broth micro dilution method. Antioxidant activity was also evaluated by two free radical scavenging tests, viz. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). Essential oil yields were 1.7% and 1.7-5.7% in water distillation and SFE methods, respectively. Major compounds identified in the SFE method were Davanone (29%), lacintafuran H (18.1%), C-artedoglocia oxide (8.5%), and neurodevnet (7.6%). Davanone (22%), lacintaphoran G (7.1%), and D-artedoglocia oxide (6%) were the predominant compounds detected in water distillation method. The essential oil extracted by water distillation had the highest antifungal effects on *E. floccosum* and *T. mentagrophytes* strains with MFC and MIC of 32 µg/mL. Water extracted essential oil presented the highest free radical scavenging capacity in DPPH and ABTS tests with IC50 values of 20.32 and 14.23 µg/ml, respectively.

Keywords: Antifungal, Antioxidant, *Artemisia persica*, Essential oil, Supercritical extraction.

*Corresponding author: ramak@rifr-ac.ir