بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و فعالیت ضدمیکروبی 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 به‌لیمو *Lippia citriodora* H.B.K برای مصارف غذایی، آرایشی و بهداشتی به ایران وارد شده است و امروزه در مناطق مختلف کشور کشت می شود. 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 ضدمیکروبی، عصاره‌های متانلی بخش‌های مذکور به روش پرکولاسیون تهیه شد و علیه ٤ سویه باکتری گرم مثبت، ٤ سویه باکتری گرم منفی و ۲ سویه قارچ به روش دیسک دیفیوژن و اندازه‌گیری قطرهاله عدم رشد، بررسی شد. محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS صورت گرفت. اجزای عمده اسانس اندام رویشی ژرانیول (۳۵,۷۸ درصد) و زینجیبرین (۱۹,۹ درصد) و اجزای عمده اسانس اندام زایشی شامل داوانون (۳٦,٤ درصد) و پی- سیمن (۱٦,٥ 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 به‌لیمو، *Lippia citriodora* H.B.K.، ژرانیول، داوانون، ضد باکتریایی و اثرات ضدقارچی.

*نویسنده مسئول: zahrazarebio@gmail.com

مقدمه

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 می شوند و به صورت دسته‌های سه تایی بر روی ساقه قرار می گیرند. 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 می گردد و کشت و کار آن به‌منظور استفاده ازخواص دارویی آن می باشد. در طب گیاه درمانی ایران برگ‌های این گیاه به‌صورت دم کردنی، به‌منظور آرام بخشی، ضد تشنج و برطرف کننده ی تپش قلب و سرگیجه مصرف دارد (Babaei Abrak and Zhiani, 2014). در بسیاری از نقاط جهان نیز، چای این گیاه برای درمان آسم، سرماخوردگی، تب، اسهال و بیماری‌های پوستی استفاده می شود و همچنین اثرات ضدالتهاب وضد درد و درمان نیش حشرات دارد (Kiran Kumar et al., 2008). اسانس این گیاه نیزدارای اثرات ضدمیکروبی 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 می باشند که بوی لیمو می‌دهد و عطر دلنشینی دارد (Ghaemi et al., 2006)

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 کاریوفیلن اکساید، ۱و 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 فنیل 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 ضدمیکروبی، 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

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 سر شاخه‌های رویشی گیاه و نیز ترکیبات اسانس گل‌ها و مریستم‌های زایشی گیاه را که از منطقه ی 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 آنتی بیوتیکی، اهمیت استفاده از گیاهان دارویی را بیشتر کرده است به بررسی مقایسه ای فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های متانلی دو بخش رویشی و زایشی این گیاه دارویی بپردازیم.

مواد و روش‌ها

جمع آوری گیاه: گیاه *Lippia citriodora* از استان خوزستان در منطقه هفت تپه در خرداد ماه ۹۰ جمع آوری گردید و پس از شناسایی توسط محققین هرباریوم 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) به طور 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 ٤ 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 میلی لیتر و برای بخش زایشی ۰/۵ v/w و وزن مخصوص آن ۰/۹۷۸ گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. هر دو اسانس به رنگ زرد کم رنگ و بسیار معطر بود. اسانس‌ها در ظروف شیشه ی کوچک و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌های GC/MS نگهداری شدند.

تجزیه و شناسایی اسانس: بدین‌منظور 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 ٤۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه در دقیقه و به‌مدت 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 پرکولاسیون 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 ٦٫۲۵ درصد با استفاده از دی متیل سولفوکسید۱۰ درصد (DMSO) تهیه گردید(Kunle et al., 2003).

سنجش میزان فعالیت ضدمیکروبی: میزان فعالیت ضدمیکروبی از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد بر

روی ۸ سویه باکتری شامل ٤ سویه باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*، *Micrococcus luteus*، *Bacillus cereus*، *Bacillus Subtilis*) و ٤ سویه باکتری گرم منفی (*Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella oxytoca*) و دو سویه قارچ (*Aspergillus niger* 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 ٦ 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 ۲٤ ساعته هر یک از ۸ میکروارگانیسم تهیه شده مورد استفاده سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند (Andrews, 2001) تهیه و به وسیله سواپ بر سطح محیط کشت مولر هیلتون آگار و سابرودکستروز آگار کشت یکنواختی تهیه شد و دیسک‌های حاوی عصاره را بر سطح آگار قرار داده و پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. با اندازه‌گیری قطرهاله 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.

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

گروه	PTCC	میکرو ارگانیسم
باکتری‌های گرم مثبت	PTCC1112	*Staphylococcus aureus*
باکتری‌های گرم مثبت	PTCC1114	*Micrococcus loteus*
باکتری‌های گرم مثبت	PTCC1274	*Bacillus cereus*
باکتری‌های گرم مثبت	PTCC1024	*Bacillus Subtilis*
باکتری‌های گرم منفی	PTCC1330	*Escherichia coli*
باکتری‌های گرم منفی	PTCC1639	*klebsiella Pnumonea*
باکتری‌های گرم منفی	PTCC1074	*Pseudomonas aeraginosa*
باکتری‌های گرم منفی	PTCC1059	*Klebsiella oxytoca*
مخمر	PTCC16404	*Aspergillus niger*
مخمر	PTCC10231	*Candida albicans*

نتایج

الف- نتایج سنجش ترکیبات اسانس: در اسانس بخش رویشی (برگ‌ها و سر شاخه‌های رویشی) گیاه *Lippia citriodora*، ۲٦ ترکیب شامل ۹٦,۰۹ درصد کل اجزا شناسایی شدند (جدول ۲). این اسانس دارای مواد عمده ژرانیول (۳۵,۷۸ درصد)، زینجیبرین (۱۹,۹ درصد)، سیترال (۹,٤ درصد) و بتا داوانون ۲ اول (۷,۹ درصد) است وسایر 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 ۹٤,۵ درصد کل اجزا شناسایی شدند (جدول ۳). این اسانس

دارای مـــواد عمـــده ی داوانـــون (۳٦,٤درصـــد)، p سیمن(۱٦,٥درصد) و سیترال (۸ درصـد) اسـت و سـایر ترکیبـات مهـم آن تیمـول (۳,۷ درصـد) اسـت. بتـا آسـکاریدول (٥,۹ درصـد)، z جاسـمون (۳,۸درصـد) و لینالول (۲,٥ درصد) و ۱و۸ سینئول (۲ درصد) می باشد.

همـان گونـه کـه در جـداول مشـاهده مـی شـود ترکیبات اسانس بخش زایشی تنوع بیشتری نسبت بـه بخش رویشی نشان می دهـد همچنـین مقـدار تولیـد ترکیبات اسانس با تغییر مرحله ی نموی گیاه تغییر می یابد بـه طوریکـه عمـده تـرین ترکیبـات شـیمیایی در مرحلـــه ی رویشـــی (ژرانیـــول ۳٥,۷۸ درصـــد و زینجیبرین۱۹,۹ درصـد) بـا میـزان بسـیار کمتـری در مرحله ی زایشی تولید می شود (ژرانیول ۰,٤ درصد و زینجیبرین ۱,۸درصد) و به عکس داوانون و p سـیمن که از عمـده تـرین ترکیبـات مرحلـه ی زایشـی گیـاه هسـتند در مرحلـه ی رویشـی بسـیار کمتـر تولیـد می‌شوند.

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

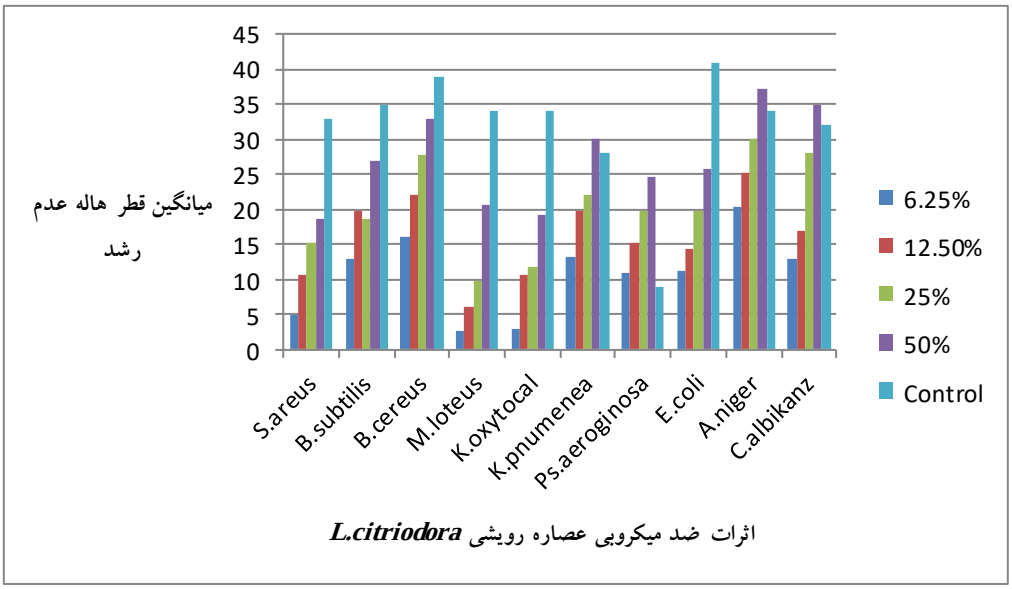
ردیف	نام ترکیبات	ضریب بازداری (RF)	مقدار (درصد)
۱	Camphene	۹٥۸	۰/۷
۲	ß-pinene	۹۸۰	۰/۲
۳	α-Phellandrene	۱۰۰۱	۰/۱
٤	α-Terpinene	۱۰۱٤	۰/٥۷
٥	p-Cymene	۱۰۱۷	۱/٦۳
٦	1,8-Cineol	۱۰۲۷	۰/٤٥
۷	γ-Terpinene	۱۰٥۳	۰/۲
۸	*trans*-Linalool oxide	۱۰۷٦	۰/۳
۹	Linalool	۱۰۹۸	۰/۱۷
۱۰	α-Thujone	۱۰۹٦	۰/۸
۱۱	ß-caryophyllene	۱۱۸۹	۱/۳٦
۱۲	caryophyllene	۱۲۰۸	۰/۳۳
۱۳	(Z)-Citral	۱۲۲٥	۹/٤
۱٤	Geraniol	۱۲۳٥	۳٥/۷۸
۱٥	Thymol	۱۲۷۳	۳/۹
۱٦	Carvacrol	۱۲۸۳	۰/۲٤
۱۷	ß-Ascaridol	۱۲۹۰	۰/٤
۱۸	Geranyl acetate	۱۳٦۲	٥/۸
۱۹	(*E*)-Jasmone	۱۳٦٥	۰/٦
۲۰	(*Z*)-Jasmone	۱۳۷۷	۱/۸
۲۱	Davanaether	۱٤۷۱	۰/٤
۲۲	Zingiberene	۱٤۹۰	۱۹/۹
۲۳	Davanone	۱٥٦۹	۰/٦
۲٤	Caryophyllene oxide	۱٥۸٤	۰/۹
۲٥	4-Hydroxy-3,5-dimethyl acethophenone	۱٦٤٦	۱/۹
۲٦	ß-Davanone-2-ol	۱۷۳۰	۷/۹
۲۷	Total		۹٦/۰۹

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

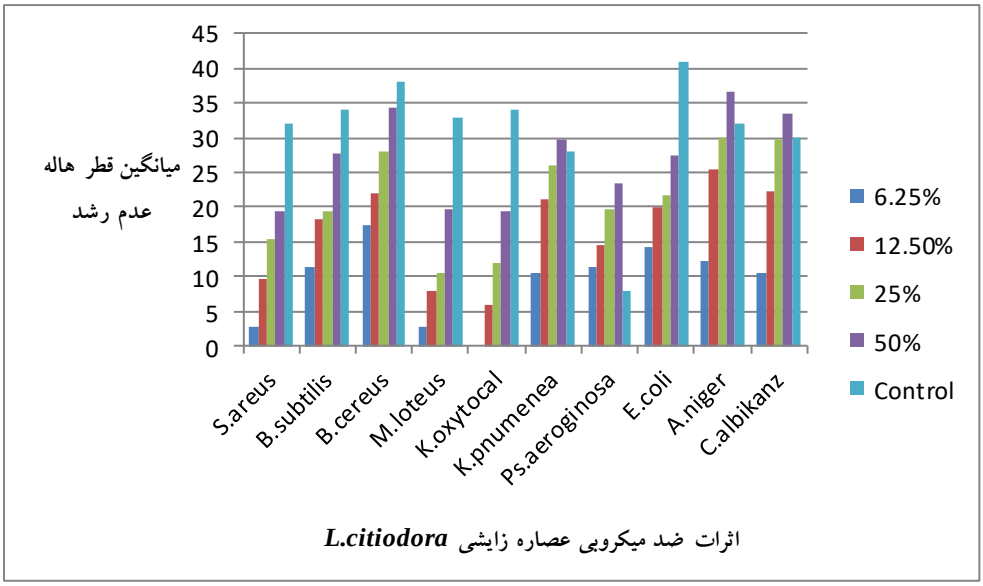
ردیف	نام ترکیبات	ضریب بازداری (RF)	مقدار(درصد)
۱	α - Pinene	۹۳٦	۱/۷
۲	Sabinene	۹۷۱	۰/۲
۳	α-Phellandrene	۱۰۰۱	۰/٤
٤	α-Terpinene	۱۰۱٤	۰/۲
۵	p-Cymene	۱۰۱۷	۱٦/۵
٦	1,8-Cineol	۱۰۲۷	۲
۷	γ-Terpinene	۱۰۵۳	۰/۲
۸	*trans*-Linalool oxide	۱۰۷٦	۰/۳
۹	Linalool	۱۰۹۸	۲/۵
۱۰	α-Thujone	۱۰۹٦	۰/۸
۱۱	ß-Thujone	۱۱۰۸	۰/٦
۱۲	cis-p-Menth-1-ol	۱۱۱۳	۰/۲
۱۳	Camphor	۱۱۳۳	۰/۹
۱٤	p-Cymene-8-ol	۱۱٦۷	۰/۵
۱۵	4-Terpineol	۱۱۷۰	۰/۷
۱٦	Nordavanone	۱۲۱۱	۰/۵
۱۷	(*Z*)-Citral	۱۲۲۵	۸
۱۸	Geraniol	۱۲۳۵	۰/٤
۱۹	(*E*)-Citral	۱۲٤۸	۰/۷
۲۰	Thymol	۱۲۷۳	۳/۷
۲۱	carvacrol	۱۲۸۳	۰/۹
۲۲	ß-Ascaridol	۱۲۹۰	۵/۹
۲۳	(*E*)-Methyl cinnamate	۱۳۵۹	۰/۲
۲٤	Geranyl acetate	۱۳٦۲	۰/۵
۲۵	(*E*)-Jasmone	۱۳٦۵	۰/۲
۲٦	(*Z*)-Jasmone	۱۳۷۷	۳/۸
۲۷	Davanaether	۱٤۷۱	۰/٦
۲۸	zingiberene	۱٤۹۰	۱/۸
۲۹	ß-Sesquiphellandrene	۱۵۱۹	۰/٤
۳۰	Davanone	۱۵٦۹	۳٦/٤
۳۱	Caryophyllene oxide	۱۵۸٤	۰/٤
۳۲	4-Hydroxy-3,5-dimethyl acethophenone	۱٦٤٦	۱/٤
۳۳	ß-Davanone-2-ol	۱۷۳۰	۰/۹
	Total		۹٤/۵

ب- نتایج سنجش میزان فعالیت ضد میکروبی: نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های متانلی بخش‌های رویشی و زایشی گیاه مورد آزمایش، بر روی ۸ سویه باکتری (گرم مثبت و گرم منفی) و ۲

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 نشان دادند $p<۰/۰۵$ 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.



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

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 آسپرژیلوس 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 میکروارگانیسم 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 می شود 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 Zhiani 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 (Argyropouloe et al., 2007).

در پژوهش کنونی عمده ترین ترکیب اسانس بخش‌های رویشی گیاه ژرانیول (۳۵,۷۸ درصد)، زینجیبرین (۱۹,۹ درصد)،سیترال (۹,٤ درصد) و بتا داوانون ۲ اول(۷,۹درصد) است (جدول ۲). و عمده ترین ترکیب بخش‌های زایشی داوانون (۳٦,٤ درصد)، p سیمن (۱٦,۵ درصد) و سیترال (۸ درصد) است(جدول ۳). ترکیبات شیمیایی اسانس به دست 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 می دهد.

دیگر ترکیب عمده اسانس بخش‌های رویشی در پژوهش حاضر سیترال (۹,٤) 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. آرژیوپولوو همکاران (Argyropouloe 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 آبراک و ژیانی (Babaei Abrak and Zhiani, 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) درعصاره هگزانی گیاه به لیمو ترکیبات کاریوفیلن و اسپانتنول را فراوان ترین ترکیبات معرفی کردند که در اسانس استخراج شده در این پژوهش به میزان کمی کاریوفیلن (۰,۳۳ درصد) موجود است.

در ارتباط با ترکیبات اسانس استخراج شده از بخش‌های زایشی (گل‌ها و مریستم‌های زایشی) گیاه به لیموگزارشات 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، Pسیمن و سیترال) تفاوت نشان دادند (Rezaie and Jaymand, 2001; Shahhossini et al., 2014).

بسته به محل‌کاشت، 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 می تواند به دلیل نوع منطقه ی 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 اندو 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،ضدویروسی، ضد درد و ضد التهاب و...دارند (Argyropouloe et al., 2007; Tatsadjieu et al., 2009).

گزارش‌های فراوانی در منابع علمی در مورد خاصیت ضدمیکروبی اسانس و یا عصاره‌های گونه‌های جنس *Lippia* آمده است که با توجه به مشابهت آن‌ها با ترکیبات موثره ی *Lippia citriodora* می توان 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 جنس گزارش شده است. برخی پژوهش‌ها اثرات ضدمیکروبی 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 لیموی 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.

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

همچنین خواص ضد قارچی گیاه دیگری از جنس لیپیا (*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

به‌طورکلی گیاه به لیمو کاشته شده در مناطق مختلف دارای ترکیبات موثره ی اسانس تقریبا متفاوتی است که تاحدی متاثر از شرایط اقلیمی گیاه و نیز مراحل رشد ونمو گیاه است. نوع و میزان ترکیبات موثره ی اسانس گیاه به لیمو ضمن تکوین مریستم‌های زایشی و تشکیل گل‌ها تغییر می کند. به‌طوری‌که در بخش‌های زایشی تنوع ترکیبات موثره اسانس از بخش‌های رویشی بیشتر است. همچنین عصاره‌های بخش‌های رویشی و زایشی این گیاه اثرات ضدمیکروبی 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.

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. Assesssment of volatile components, free radical-scavenging capacity and antimicrobal 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 *Staphyloccus aureaus*. 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 *Staphilococcus 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 ciriodora*. 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. Antimicribial, 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 theirmain components upon *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia, 128:151–153.

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 satages 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, althought 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