

شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن فرار دو گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) و مرزنگوش (*Origanum majorana* L.) و بررسی اثرات ضدویروسی آنها

مهناز خانوی^۱، مهدی نوروزی^۲، حمیده طباطبایی^۳، علیرضا صالحی نوده^۴، سهیلا برزگر صفوی^۵، عباس شفیعی^{۶*}

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 ۲- مربی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انیستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 ۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انیستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 ۴- ایمونولوژیست، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انیستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 ۵- داروساز، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 ۶- استاد، گروه شیمی دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 *آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، صندوق پستی: ۱۴۱۷۴، تلفن: ۶۶۴۰۶۷۵۷ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۴۶۱۱۷۸ (۰۲۱)
 پست الکترونیک: ashafiee@ams.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۸/۸/۳

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۳

چکیده

مقدمه: امروزه استقبال گسترده عامه مردم از داروهای گیاهی به دلیل عوارض خطرناک داروهای سنتتیک، پژوهشگران را به تلاش در راستای احیای طب سنتی و شناسایی ترکیبات موثره گیاهان دارویی و خواص احتمالی آنها واداشته است. هدف: از آنجایی که در میان گیاهان دارویی، اطلاعات منسجم و شناخته شده‌ای در خصوص اثرات احتمالی ضدویروسی روغن فرار دو گیاه آویشن شیرازی^۱ و مرزنگوش^۲ از تیره Labiatae و ارتباط آن با ترکیبات اصلی موجود در روغن فرار وجود نداشت، پس از شناسایی اجزای تشکیل دهنده روغن فرار این دو گیاه، اثرات ضدویروسی آنها به طور جداگانه بررسی شد. روش بررسی: گیاه *Zataria multiflora* از ارتفاعات شیراز و گیاه *Origanum majorana* از نمونه کاشته شده در توسکاستان گرگان جمع‌آوری و در سایه خشک شدند. از هر گیاه به صورت جداگانه به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر روغن فرارگیری شد. روغن فرار به دست آمده با دستگاه GC/MS بررسی شد. در مرحله بعد خواص ضدویروسی روغن فرار این دو گیاه به طور جداگانه بر هرپس سیمپلکس بررسی شد. نتایج: در روغن فرار سرشاخه هوایی *Zataria multiflora* ۲۴ ترکیب شامل تیمول (۳۸ درصد)، کارواکرول (۳۴/۹۶ درصد)، پارا-سایمن (۷/۱۷ درصد) و بتا-کاربوفیلن (۲/۷۱ درصد) شناسایی شد. در روغن فرار *Origanum majorana*، ۲۷ ماده شامل ترپنین -۴- ال (۳۶/۲ درصد)، پاراسایمن (۱۶/۳ درصد)، گاما-ترپنین (۷/۳۱ درصد) و سایرین (۵/۶۷ درصد) شناسایی شد. همچنین اثرات ضدویروسی روغن فرار این دو گیاه به طور جداگانه با غلظت ۱/۱۰۰۰۰ بر روی سلول‌های Hela آلوده به HSV-I بررسی شد، که نتیجه آن منفی بود. نتیجه‌گیری: در این تحقیق ۹۸/۶۲ درصد از ترکیبات موجود در روغن فرار آویشن شیرازی و ۹۶/۷۲ درصد از ترکیبات موجود در روغن فرار مرزنگوش شناسایی شد. نتایج بیانگر آن است که ۸۵/۳۳ درصد ترکیبات روغن فرار گیاه آویشن شیرازی و ۶۰/۳ درصد روغن فرار مرزنگوش را ترپنوییدهای اکسیژنه تشکیل داده است. به دلیل سمی بودن غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۰۰۱ ترکیبات موجود در روغن فرار دو گیاه برای سلول‌های Hela، نمی‌توان خواص ضدویروسی روغن فرار این دو گیاه را به طور کلی انکار کرد. این امر ضرورت به کارگیری روش‌های دقیق‌تر را در این بررسی به خوبی نشان می‌دهد. گل‌واژگان: *Organum majorana* *Zataria multiflora*، روغن فرار، ویروس، سلول Hela

¹ *Zataria multiflora*

² *Organum majorana*



مقدمه

جنس *Zataria* از خانواده نعنائیان^۱ در ایران با یک گونه درختچه‌ای به نام *Zataria multiflora* Boiss. شناخته می‌شود [۱].

این گیاه بومی مناطق جنوبی ایران بوده که علاوه بر مصرف خوراکی به عنوان عطر و طعم‌دهنده، در درمان اختلالات گوارشی، زخم‌های موضعی و همچنین به دلیل اثرات ضداحتقان و خلط‌آور در اختلالات تنفسی و سرماخوردگی استفاده می‌شود [۲،۳،۴]. بررسی‌های فیتوشیمیایی بر روی این گونه نشانگر حضور ترکیبات فلاونوئیدی از جمله لوتئولین [۵]، و کورستین [۶]، اسیدهای فنلی مانند رزمارینیک اسید [۷] و مشتقات بنزوئیک اسید [۸]، توکوفرول کینون [۵] و ترپنوئیدها از جمله مشتقات پارا-سایمن [۸] و خصوصاً روغن فراری سرشار از ترکیبات اکسیژنه مانند تیمول و کارواکرول می‌باشد [۹،۱۰،۱۱]. در مقالات متعدد به اثرات این گیاه به عنوان ضدکاندیدا [۱۲]، ضد درد و التهاب [۱۳،۱۴]، درمان و کنترل‌کننده آفت‌های عودکننده دهانی [۱۵]، اثرات آنتی‌اکسیدان [۱۶] و اثر بر اختلالات گوارشی و قلبی [۱۷] آن اشاره شده است. همچنین در مقالات متعدد اثرات ضدباکتری، ضدویروس، آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب رزمارینیک اسید به عنوان یکی از ترکیبات *Z. multiflora* گزارش شده است [۳، ۲۱-۱۸].

گیاه *Origanum majorana* L. از خانواده نعنائیان نیز یک گیاه علفی چند ساله است که موطن اصلی آن کشورهای اروپای جنوبی و حوزه مدیترانه بوده و از آنجا به سایر نواحی از جمله ایران آورده شده است [۱، ۲۲] و به صورت روزمره به عنوان طعم‌دهنده گوشت، سالاد و سوپ‌ها مورد استفاده می‌باشد [۲۳]. این گیاه در درمان اختلالات گوارشی و نفخ، به عنوان ضداسپاسم، ضدآسم، آرام‌بخش، تونیک [۲۴]، ضدباکتری، ضدویروس هرپس سیمپلکس و ویروس نیوکاسل [۲۵] در طب سنتی کشورهای مختلف جهان استفاده می‌شود. همچنین مقالات متعددی به اثرات

^۱ Lamiaceae

آنتی‌اکسیدان [۲۴]، ضد میکروبی و سایتوتوکسیک [۲۶، ۲۷]، کنترل‌کننده مسمومیت‌های فلزات [۲۸] و اثر ضداسپاسم این گیاه اشاره کرده‌اند [۲۹]. ترکیبات اصلی این گیاه شامل فلاونوئید گلی کوزید، تانن، استروئیدهایی مانند سیتواسترول، تری‌ترپنوئیدها از جمله اولئانولیک اسید و اورسولیک اسید [۲۹، ۳۰، ۳۱] و روغن فراری سرشار از ترکیبات مونوترپنی [۳۲، ۳۳] می‌باشند. روغن فرار حاصل از رویشگاه‌های مختلف در مطالعات متعددی بررسی شده است که ترکیبات ترپینن - ۴-ال، سابینن هیدرات، لینالول، سابینول، کامفر، کارواکرول و اوژنول در اکثر مطالعات به عنوان اجزای اصلی روغن فرار معرفی شده‌اند [۳۱، ۳۲، ۳۳].

در این مطالعه ترکیبات روغن فرار گیاه کاشته شده مرزنگوش در توسکاستان گرگان برای اولین مورد مطالعه قرار می‌گیرد. همچنین ترکیبات روغن فرار *Z. multiflora* جمع‌آوری شده از ارتفاعات شیراز آنالیز شده است. از سوی دیگر هر چند اثر ضدویروس *Origanum acutidense* [۳۴] در مقالات گزارش شده است و در طب سنتی ملل مختلف به اثرات آنتی‌سپتیک و ضدویروس *Z. multiflora* و *O. majorana* اشاره می‌شود، اطلاعات منسجم و مشخصی در باب اثر ضدویروسی آنها در مقالات و منابع بین‌المللی به چشم نمی‌خورد. لذا در ادامه این تحقیق اثرات ضدویروسی این دو روغن فرار بر روی ویروس هرپس سیمپلکس کشت داده شده در سلول‌های Hela بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و روغن فرار گیری

گیاه آویشن شیرازی از ارتفاع ۲۱۰۰ متری خان گل آباد شیراز در اواخر خرداد ماه سال ۱۳۸۵ جمع‌آوری شد و بذر گیاه مرزنگوش از ایتالیا وارد و در ارتفاع ۳۶۰ متری توسکاستان گرگان کاشته شده و سرشاخه‌هایی به عمل آمده در اواخر خرداد ماه ۱۳۸۵ جمع‌آوری شد. نمونه‌های هرباریومی هر دو گیاه در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران شناسایی و نگهداری شده است.



به منظور جداسازی روغن فرار از گیاهان مذکور، ۱۰۰ گرم از هر گونه به روش تقطیر با آب و توسط کلونجر استخراج شد [۳۵]. وزن روغن فرار به دست آمده پس از آبگیری با سولفات سدیم بدون آب اندازه‌گیری و بازده محاسبه شد. روغن فرار حاصل در شیشه تیره تحت گاز نیتروژن بسته‌بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد.

تجزیه دستگاهی

تجزیه به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)

روغن فرار تهیه شده از هر دو گیاه به کمک دستگاه GC با مشخصات زیر آنالیز شد. دستگاه گاز کروماتوگراف از نوع Thermoquest 2000 با ستون موئی HP - 5 MS، به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر متصل به دتکتور FID مورد استفاده قرار گرفت. نوع گاز حامل هلیوم و سرعت گاز برابر یک میلی‌لیتر در دقیقه گزارش شد. دمای ابتدایی ستون ۵۰ درجه سانتی‌گراد، توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه و افزایش دما تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲/۵ درجه در دقیقه برنامه‌ریزی شد. درجه حرارت آشکارساز ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد و دمای محل تزریق ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد بود.

تجزیه به وسیله دستگاه کروماتوگرافی جرمی (GC/MS)

برای شناسایی ترکیبات موجود در روغن فرار دو گیاه آویشن شیرازی و مرزنگوش، از دستگاه گاز کروماتوگراف مدل Thermoquest 2000 متصل به دتکتور طیف‌سنج جرمی Quadropole استفاده شد. مشخصات ستون، گاز حامل، سرعت جریان گاز و برنامه دمایی مطابق شرایط استفاده شده در GC طراحی شد. انرژی یونیزاسیون برابر ۷۰ eV گزارش شد. اندیس بازداری کواتس ترکیبات روغن فرار با استفاده از زمان بازداری سری آلکان‌های نرمال C₈ - C₃₀ تزریق شده تحت شرایط فوق محاسبه و شناسایی ترکیبات به کمک طیف‌های جرمی استاندارد، مقایسه شاخص بازداری کواتس ترکیبات با نمونه‌های استاندارد [۳۶،۳۷] و نرم‌افزار کامپیوتری 275.L Wiley صورت گرفت.

بررسی اثرات ضدویروسی

برای بررسی اثرات ضدویروسی روغن‌های فرار گیاهان مذکور بر اساس تحقیقات انجام شده از خانواده هرپس سیمپلکس، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انتخاب شد. این ویروس‌ها به راحتی می‌توانند بر روی سلول‌های سرطانی Hela یا Hep2 رشد کرده و اثرات تخریب سلولی^۱ مخصوص به خود را ایجاد نمایند.

به این منظور ابتدا از روغن فرار آویشن شیرازی و مرزنگوش رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ در محیط کشت سلولی (MEM)^۲ تهیه کرده و برای بررسی اثرات کشنده آنها روی سلول‌های Hela از هر رقت به ۴ خانه کشت سلولی تزریق می‌کنیم و مدت هفت روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و مورد مطالعه روزانه قرار می‌دهیم. نتایج این بررسی نشان داد که تنها رقت ۰/۰۰۰۱ از هر روغن فرار روی سلول‌های Hela اثر کشنده ندارد و برای بررسی اثرات ضدویروسی روغن‌های فرار در محیط کشت سلولی قابل استفاده هستند. پس از آزمایش فوق رقت ۰/۰۰۰۱ از روغن فرار گیاهان مرزنگوش و آویشن شیرازی انتخاب و به طور جداگانه‌ای اثرات ضدویروسی آنها در محیط کشت سلولی با سه روش زیر بررسی شد:

۱- ویروس را با رقت TCID₅₀ ۱۰۰ (دوزی از ویروس که بتواند ۵۰ درصد کشت‌های تلقیح شده را آلوده نماید. % TCID₅₀: Tissue culture infections dose 50) تهیه و به دو لوله کشت سلولی تزریق می‌کنیم. بلافاصله رقت ۰/۰۰۰۱ از هر روغن فرار را به طور جداگانه به لوله‌های حاوی ویروس و کشت سلولی اضافه می‌کنیم.

۲- ویروس را با رقت TCID₅₀ ۱۰۰ تهیه و به دو لوله کشت سلولی تزریق می‌کنیم و بعد از یک ساعت انکوباسیون، رقت ۰/۰۰۰۱ از هر روغن فرار را به طور جداگانه به لوله‌های حاوی ویروس و کشت سلولی اضافه می‌کنیم.

۳- ویروس را با رقت TCID₅₀ ۱۰۰ تهیه و با رقت ۰/۰۰۰۱ از روغن‌های فرار مذکور به طور جداگانه مجاور کرده

^۱ Cytopathic effect ^۲ Minimum Essential Medium



و بعد از یک ساعت انکوباسیون به دو لوله کشت سلولی تزریق می‌کنیم.

تمامی لوله‌ها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و تا سه روز بعد از مثبت شدن کنترل ویروس‌ها، هر روز لوله‌ها را با میکروسکوپ Inverted مورد مطالعه قرار داده سپس لوله‌ها را در صورت مثبت یا منفی بودن از نظر تغییرات سلولی در اثر رشد ویروس جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم. در ادامه برای پاساژ دوم ویروس لوله‌ها را از فریزر خارج کرده و بعد از ذوب شدن، محتویات آنها را دوباره به هر لوله کشت سلولی جدید تلقیح می‌کنیم. برای هر یک از سه حالت بالا دو لوله کنترل ویروس و دو لوله کنترل برای روغن فرارهای گیاهان موردنظر به طور جداگانه با رقت ۰/۰۰۰۱ قرار می‌دهیم. همچنین در آزمایش‌های انجام شده برای اطمینان از صحیح بودن اثرات موردنظر، آزمایش سه بار تکرار شد.

به طور کلی روش ۱ و ۲ برای بررسی اثرات ضدویروسی موادی که به عنوان دارو مطرح می‌باشند و روش ۳ برای بررسی اثرات ضدویروسی موادی که به عنوان ضدعفونی‌کننده مطرح هستند، به کار گرفته می‌شود [۳۸].

مطالعات آماری

میانگین مقدار درصد ترکیبات شناسایی شده روغن فرار، به کمک نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

نتایج

نتایج کمی و کیفی حاصل از بررسی اجزای موجود در روغن فرار آویشن شیرازی منجر به شناسایی ۲۴ ماده شامل ۹۸/۶۲ درصد از ترکیبات موجود در روغن فرار گیاه فوق‌الذکر شد (جدول شماره ۱). میزان استخراج روغن فرار سرشاخه هوایی گیاه آویشن شیرازی با بوی تند گیاهی و رنگ زرد تیره ۴ درصد گزارش شد. به طور کلی منوترپنوئیدها ۹۲/۱۱ درصد از ترکیبات موجود در روغن فرار را به خود اختصاص داده‌اند که از این مقدار ۸/۵۱ درصد منوترپنوئیدهای هیدروکربنی و ۸۳/۶ درصد اکسیژنه می‌باشند. این روغن فرار همچنین

۶/۵۱ درصد سزکویی ترپنوئید دارد که ۴/۷۸ درصد آن سزکویی ترپنوئیدهای هیدروکربنی و ۱/۷۳ درصد اکسیژنه بوده و به طور کلی غنی از ترکیبات اکسیژنه می‌باشد. تیمول (۳۸ درصد)، کاروکول (۳۴/۹۶ درصد)، پاراسایمن (۷/۱۷ درصد) و بتا - کاریوفیلین (۲/۷۱ درصد) مهم‌ترین اجسام موجود در روغن فرار آویشن شیرازی می‌باشند (جدول شماره ۱).

درصد استخراج روغن فرار مرزنگوش برابر ۰/۳ درصد محاسبه شد. این روغن فرار با رنگ زرد روشن و بوی تند شناخته می‌شود. این مطالعه در گیاه مرزنگوش منجر به شناسایی ۲۷ ماده شامل ۹۶/۷۲ درصد ترکیبات روغن فرار گیاه مذکور شد (جدول شماره ۱). منوترپنوئیدها ۹۰/۹۴ درصد اجزای تشکیل‌دهنده روغن فرار را شامل می‌شوند که از این مقدار ۳۳/۹۳ درصد منوترپنوئیدهای هیدروکربنی و ۵۷/۰۱ درصد اکسیژنه می‌باشند. این روغن فرار ۵/۷۸ درصد سزکویی ترپنوئید دارد که ۱/۴۹ درصد آن سزکویی ترپنوئیدهای هیدروکربنی و ۳/۲۹ درصد اکسیژنه بوده و غنی از ترکیبات اکسیژنه می‌باشد. ترکیبات اصلی شناسایی شده در روغن فرار سرشاخه هوایی مرزنگوش در این مطالعه عبارتند از: ترپینن - ۴ - ال (۳۶/۲ درصد)، پارا - سایمن (۱۶/۳ درصد)، گاما ترپنین (۷/۳۱ درصد)، سابین (۵/۶۷ درصد)، آلفا - ترینئول (۵/۳۶ درصد) و لینالول (۳/۶۱ درصد). نتایج بیانگر آن است که به طور کلی ۸۵/۳۳ درصد ترکیبات روغن فرار گیاه آویشن شیرازی و ۶۰/۳ درصد روغن فرار مرزنگوش را ترپنوئیدهای اکسیژنه تشکیل داده است.

نتایج به دست آمده از مطالعه روغن‌های فرار فوق بر روی محیط‌های کشت آلوده به ویروس HSV-I در جدول شماره ۲ قابل مشاهده می‌باشد.

بحث

گیاه *Zataria multiflora* با نام فارسی آویشن شیرازی بومی ایران بوده و به دلیل وسعت رویشگاه‌های آن مصارف متعدد در طب سنتی نقاط مختلف کشور دارد. مطالعات انجام



روی سرشاخه هوایی گیاه *Z. multiflora* انجام شده است ترکیبات اصلی روغن فرار این گیاه لینالول (۶۲/۲۲ درصد) و لینالیل استات (۱۱/۵۲ درصد) گزارش شده‌اند [۴۱] که احتمالاً تاثیر محل و زمان جمع‌آوری گیاه باعث چنین تفاوت شاخصی گردیده است. با توجه به سمیت کارواکرول نسبت به تیمول [۴۲، ۴۳] به نظر می‌رسد که برای مصارف خوراکی و دارویی روغن فرار گونه نواحی شیراز مناسب‌تر باشد. از طرفی اثرات درمانی کارواکرول در فرآورده‌های دهان و دندان [۴۲] می‌تواند نشانگر ارزش گیاه رویش یافته در یزد برای مصارف دندان پزشکی باشد. نکته قابل توجه اینکه سایر ترکیبات شناسایی شده در مطالعات فوق نسبتاً مشابه بوده و تفاوت واضحی را نشان نمی‌دهد.

شده در این تحقیق و سایر فعالیت‌ها، بیانگر تاثیر محل رویش و احتمالاً فصل رویش بر ترکیبات اصلی روغن فرار می‌باشد به شکلی که ترکیبات جدا شده از روغن فرار این گیاه در مطالعه جاویدنیا و همکاران [۳۹، ۴۰] نشانگر حضور کارواکرول (۶۱/۲۹ درصد) به عنوان ترکیب اصلی و تیمول (۲۵/۱۸ درصد) به عنوان ترکیب دوم گیاه در گونه رویش یافته در یزد بوده در حالی که در مطالعه کنونی درصد کارواکرول ۳۴/۹۶ و تیمول ۳۸ درصد گزارش می‌شود. همچنین در مطالعات انجام شده در کشور پاکستان میزان تیمول و کارواکرول به ترتیب برابر ۱۵/۵۹ و ۵۷/۴۰ درصد گزارش شده است [۹]. در این مطالعه نیز بتا- کاریوفیلن و پارا - سایمن جزء ترکیبات اصلی شناسایی شده در روغن فرار می‌باشند. در مطالعه دیگری که توسط محقق‌زاده و همکاران بر

جدول شماره ۱- ترکیب‌های تشکیل دهنده روغن فرار سرشاخه هوایی گیاه *Zataria multiflora & Origanum majorana*

<i>Origanum majorana</i> درصد	<i>Zataria multiflora</i> درصد	اندیس بازداری	نام ترکیب	ردیف
۰/۳۱	۰/۲۲	۹۲۰	α -Tujene	۱
۰/۶۳	۰/۲۴	۹۳۰	α -Pinene	۲
۵/۶۷	--	۹۶۳	Sabinene	۳
۱/۵۱	۰/۴۵	۹۸۰	Myrcene	۴
۲/۲۰	--	۱۰۰۹	α -Terpinene	۵
۱۶/۳۰	۷/۱۷	۱۰۱۶	Para-Cymene	۶
--	۰/۴۹	۱۰۲۲	1,8-Cineole	۷
۷/۳۱	۰/۳۳	۱۰۴۹	γ -Terpinene	۸
۰/۳۶	--	۱۰۶۲	Cis-Sabinene hydrate	۹
--	۰/۱۰	۱۰۷۶	Meta-Cymene	۱۰
۲/۳۳	--	۱۰۷۸	Terpinolene	۱۱
۲/۶۱	۱/۶۷	۱۰۹۰	Linalool	۱۲
۱/۳۰	--	۱۱۳۵	Cis-Pinene hydrate	۱۳
۱/۳۶	--	۱۱۳۷	Cis- β -Terpineol	۱۴
--	۰/۲۹	۱۱۶۰	Borneol	۱۵
۳۶/۲۰	۰/۹۵	۱۱۶۹	Terpinen-4-ol	۱۶
۵/۳۶	۱/۱۰	۱۱۸۰	α -Terpineol	۱۷
۰/۷۲	--	۱۱۸۶	Cis-Piperitol	۱۸
۰/۳۴	--	۱۱۹۵	Trans-Dihydro carvone	۱۹
۰/۶۵	--	۱۱۹۹	Trans-Piperitol	۲۰
--	۱/۰۰	۱۲۲۸	Thymol methyl ether	۲۱



ادامه جدول شماره ۱- ترکیب‌های تشکیل‌دهنده روغن فرار سرشاخه هوایی گیاه *Zataria multiflora* & *Origanum majorana*

<i>Origanum majorana</i> درصد	<i>Zataria multiflora</i> درصد	اندیس بازداری	نام ترکیب	ردیف
۰/۴۴	--	۱۲۳۰	Ascaridole	۲۲
--	۱/۶۵	۱۲۳۸	Carvacrol methyl ether	۲۳
۱/۷۳	--	۱۲۴۸	Linalyl acetate	۲۴
۰/۳۵	--	۱۲۶۸	Di hydro linalyl acetate	۲۵
۰/۳۶	--	۱۲۷۶	E-Anethole	۲۶
--	۰/۳۶	۱۲۷۹	Iso bornyl acetate	۲۷
--	۳۸/۰۰	۱۲۸۱	Thymol	۲۸
۰/۴۴	۳۴/۹۶	۱۲۹۱	Carvacrol	۲۹
--	۱/۶۳	۱۳۴۸	Thymol acetate	۳۰
۰/۹۱	--	۱۳۵۴	Neryl acetate	۳۱
--	۱/۵۰	۱۳۶۷	Carvacrol acetate	۳۲
۰/۵۵	--	۱۳۷۶	Geranyl acetate	۳۳
۲/۴۹	۲/۷۱	۱۴۱۰	β -Caryophyllene	۳۴
--	۱/۳۰	۱۴۲۹	β -Humulene	۳۵
--	۰/۱۷	۱۴۴۷	α -Humulene	۳۶
--	۰/۶۰	۱۴۸۹	Valencene	۳۷
۱/۵۳	۰/۴۳	۱۵۷۰	Spathulenole	۳۸
۱/۷۶	۱/۳۰	۱۵۷۵	Caryophyllene oxide	۳۹
۹۶/۷۲	۹۸/۶۲		جمع کل	
۳۳/۹۳	۸/۵۱		منوترپنویید هیدروکربنی	
۵۷/۰۱	۸۳/۶۰		منوترپنویید اکسیژنه	
۱/۴۹	۴/۷۸		سزکویی ترپنویید هیدروکربنی	
۳/۲۹	۱/۷۳		سزکویی ترپنویید اکسیژنه	

جدول شماره ۲- اثرات روغن فرار سرشاخه هوایی گیاه *Zataria multiflora* & *Origanum majorana*

بر روی ویروس HSVI در محیط کشت سلولی

روغن فرار O	روغن فرار Z	نوع ماده	روش
+	+		تلقیح ویروس و روغن فرار همزمان ^(۱)
+	+		روغن فرار بعد از یک ساعت تلقیح ویروس ^(۲)
+	+		تلقیح مخلوط ویروس و روغن فرار ^(۳)
+	+		ویروس کنترل
-	-		سلول کنترل

(Z): روغن فرار *Z. multiflora* (O): روغن فرار *O. majorana*

(-): عدم رشد ویروس (+): رشد ویروس

(۱) ویروس به محیط کشت سلولی تزریق و بلافاصله روغن فرار اضافه شد.

(۲) ویروس به محیط کشت تزریق و یک ساعت بعد روغن فرار اضافه شد.

(۳) ویروس با روغن فرار مجاور شده و بعد از یک ساعت به محیط کشت سلولی تزریق شد.



بالاتر از ۰/۰۰۰۱ بر روی سلول‌های *Hela* سمی بوده و البته با این غلظت هم بر روی ویروس *HSV-I* بدون اثر بود. به همین دلیل نمی‌توان خواص ضدویروسی روغن فرار این دو گیاه را به طور کلی انکار کرد. برای بررسی چگونگی مکانیسم اثر ضدویروسی این روغن فرار ابتدا لازم است که تمام ترکیبات آن را به تفکیک با حفظ شرایط کشت سلولی مناسب بر روی ویروس اثر داد و همچنین این روغن فرار را طوری فراوری نمود تا بتوان با غلظت‌های بالاتری بدون اثرات سمی برای سلول، کشت سلولی مناسبی ایجاد کرد. از سوی دیگر با توجه به تغییرات عمده در ترکیبات اصلی روغن فرار این دو گیاه در مطالعات متعدد، می‌توان اینگونه استنباط نمود که گزارش اثر ضدویروسی این دو گونه در سایر مطالعات [۱۹،۲۰،۲۵] احتمالاً به تفاوت شاخص ترکیبات موثره روغن فرار آنها مربوط بوده که بدین‌منظور می‌توان روغن فرار گیاهان جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران و جهان را تهیه و مورد مطالعه مجدد قرار داد. در ضمن این روغن فرار به عنوان یک ترکیب ضدویروس مورد بررسی و آزمون قرار گرفت، بنابراین برای مشاهده طیف وسیع‌تر اثرات ضدویروسی باید این روغن بر روی خانواده‌های ویروسی دیگر نیز اثر داده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از آقای دکتر محمد سلیمانی و کشت و صنعت گیاه اسانس گرگان که در زمینه جمع‌آوری گونه‌های مورد نظر همکاری نموده‌اند، اعلام می‌دارد.

گیاه مرزنگوش^۱ نیز یک گیاه علفی چند ساله است که به ایران آورده شده و علاوه بر اثرات متعدد گزارش شده در طب سنتی، به عنوان طعم‌دهنده مواد خوراکی مورد استفاده روزمره می‌باشد. در تحقیقات انجام شده توسط تابانکا^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۴، سیس-سایبین هیدرات (۴۴ - ۳۰ درصد) و ترپین-۴-ال (۱۴ - ۸ درصد) به عنوان ترکیبات اصلی روغن فرار وریت‌های رویش یافته در غرب ترکیه گزارش شده‌اند [۳۲]. در حالی که روغن فرار سرشاخه هوایی وریت‌های نواحی جنوب غربی این کشور حاوی مقادیر متنابهی کارواکرول می‌باشد [۴۴]. در تحقیق کنونی، ترکیبات اصلی روغن فرار گیاه ترپین-۴-ال (۳۶/۲ درصد)، پارا-سایمن (۱۶/۳ درصد) و گاما ترپین (۷/۳۱ درصد) شناسایی شده و سیس-سایبین هیدرات (۰/۳۶) به عنوان یکی از ترکیبات فرعی روغن فرار گزارش شده است. مطالعه دیگری که در فرانسه بر روی روغن فرار این گیاه صورت گرفته است بیانگر حضور ترپین-۴-ال، سیس-سایبین هیدرات و پارا-سایمن به عنوان اصلی‌ترین ترکیبات روغن فرار می‌باشد [۴۵] که می‌توان تفاوت‌های فوق را به اقلیم رویش و زمان جمع‌آوری گیاهان مربوط دانست. مطالعه کنونی بیانگر آن است که کاشت این گیاه در شمال ایران باعث کاهش درصد سیس-سایبین هیدرات و برخی ترکیبات فنلی مانند کارواکرول می‌شود.

در ادامه این تحقیق، روغن فرار گیاهان آویشن شیرازی و مرزنگوش در بررسی‌های ضدویروسی انجام شده با غلظت ۰/۰۰۰۱ روی ویروس *HSV-I* در محیط کشت سلولی *Hela* مورد مطالعه قرار گرفت. این سلول‌ها قادر به پاساژ دادن و تکثیر می‌باشند و سهولت کار با آنها این امکان را می‌دهد تا بتوان ویروس‌هایی که در محیط به طور اختصاصی رشد می‌کنند، مورد بررسی قرار داد. البته باید متذکر شد به علت اینکه این سلول‌ها به تغییرات pH و مواد شیمیایی حساس هستند و با کوچکترین تغییراتی از بین می‌روند، باید غلظت مناسب از ماده مورد بررسی که بر روی سلول‌ها سمی نباشد را به دست آورد و سپس تحقیق را ادامه داد. نکته قابل توجه آنکه روغن فرار گیاهان موردنظر در بررسی‌های جداگانه، در غلظت

¹ *Origanum majorana*

² Tabanca



1. Mozafarian VA. Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moasser. Iran. 1996, pp: 381, 589.
2. Zargari A. Medicinal Plants. Tehran University Press. Iran. 1989, 4: pp: 26 – 42.
3. Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M, Ghannadi A and Minaeian M. Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and in vitro cultures. *Fitoterapia* 2004; 75: 315 – 21.
4. Hosseinzadeh H, Ramezani M and Salmani GA. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 73: 379 – 85.
5. Ali MS, Saleem M, Ali Z and Ahmad VU. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochem.* 2000; 55: 933 - 6.
6. Murray MT, Pizzorno JE, Pizzorno JE and Murray MT. Aphthous stomatitis: *Textbook of Natural Medicine*. 2nd ed. Churchill Livingstone, U.K. 1999, 2: 1085 - 7.
7. Javidnia K, Tabatabai M and Shafiee A. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Zataria multiflora* population Iran. *Irr. J. Chem Chem Eng.* 1999; 18: 1 - 5.
8. Shaiq AM, Saleema M, Akhtara F, Jahangira M, Parvezb M and Uddin AV. Three p-cymene derivatives from *Zataria multiflora*. *Phytochem.* 1999; 52: 685 - 8.
9. Malik MS, Iqbal MJ and Hamid S. Essential oils resources of Pakistan studies on the essential oils of the species of Labiatae: Part-1. *Pakistan J. Sci.* 2003; 55: 34 - 6.
10. Mohagheghzadeh A, Shams-Ardakani M and Ghannadi A. Volatile constituents of callus and flower-bearing tops of *Zataria multiflora* Boiss (Lamiaceae). *Flavour Fragr. J.* 2000; 15: 373 - 6.
11. Saleem M, Nazli R, Afza N, Sami A and Ali MS. Biological significance of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. *Nat. Prod. Res.* 2004; 18: 493 - 7.
12. Zarei MA, Dabbagh MA and Fouladi Z. In Vitro Anti-Candida Activity of *Zataria multiflora* Boiss. *eCAM.* 2007; 4: 351 - 3.
13. Ramezani M, Hosseinzadeh H and Samizadeh Sh. Antinociceptive effects of *Zataria multiflora* Boiss fractions in mice. *J. Ethnopharm.* 2004; 91: 167 - 70.
14. Ashtaral NL, Mohammadirad A, Yasa N, Minaie B, Nikfar SH, Ghazanfari GH, Zamani MJ, Dehghan GH, Jamshidi HR, Shetab BV, Khorasani R and Abdollahi M. Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in Experimental Model of Mouse Inflammatory Bowel Disease. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2007; 4: 43 - 50.
15. Jafari S, Amanlou M, Borhan-Mohabi K and Farsam H. Comparative study of *Zataria multiflora* and *Anthemis nobelis* extracts with *Myrthus communis* preparation in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Daru.* 2003; 11: 1 – 5.
16. Babaie M, Yasa N, Mohammadirad A, Khorasani R and Abdollahi M. On the anti oxidative stress potential of *Zataria multiflora* Boiss (Avishan shirazi) in Rats. *Int. J. Pharmacol.* 2007; 3: 510 - 4.
17. Mokhberi M, Shams Lahijani M, Monsefi M and Kamalinejad M. The study of effects of aqueous extracts of *Zataria multiflora* (ZM) and *Elaeagnus angostifolia* (EA) on the volume of stomach of mouse fetus. *Iranian J. Pharm. Res.* 2004; 2: 58.
18. Sanbongi Ch, Takano H, Osakabe N, Sasa N, Natsume M, Yanagisawa R, Inoue K, Kato Y, Osawa T and Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34: 1060 - 9.
19. Parnham MJ and Kesselring K. Rosmarinic acid. *Drugs of Future.* 1985; 10: 756 - 7.
20. Petersen M. *Coleus* spp: in vitro culture and the production of forskolin and rosmarinic acid. Biotechnology in agriculture and forestry.



- Medicinal and aromatic plants VI. Springer-Verlag. Germany. 1994, pp: 69 - 92.
21. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M and Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 549 - 57.
 22. Ghahreman A. Persian Chromophytes. University Center Press. 1994; 3: 237 - 49.
 23. Novak J, Christina B, Langbehn J, Pank F, Skoula M, Gotsiou Y and Franz CM. Ratios of cis- and trans-sabinene hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Bentham) vogel. *Biochem. Syst. Ecol.* 2000; 28: 697 - 704.
 24. Jun WJ, Han BK, Yu KW, Kim MS, Chang IS, Kim HY and Cho HY. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxid anion radicals. *Food Chem.* 2001; 75: 439 - 44.
 25. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/045598en.pdf>. Committee for veterinary medicinal products, Majorana Herba, Summary Report. The European for the evaluation of medicinal products veterinary medicines evaluation unit EMEA/MRL/455/98-Final. June 1998.
 26. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T and Arsenakis M. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 1202 - 5.
 27. Vagi E, Simandi B, Suhajda A and Hethelyi E. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Res. Int.* 2005; 38: 51 - 7.
 28. Ashmawy IM, Nahas AF and Salama OM. Protective effect of volatile oil, alcoholic and aqueous extracts of *Origanum majorana* on lead acetate toxicity in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 97: 238 - 43.
 29. Vagi E, Rapvi E, Hadolin M, Vasarhelyine PK, Balazs A, Blazovics A and Simandi B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 17 - 21.
 30. Leung Y and Foster S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. John Wiley & Sons Inc. Press. Netherlands. 1996, 364 - 6.
 31. Price Sh. The aromatherapy workbook. Thorsons. U.K. 1993, pp: 54 - 5.
 32. Tabanca N, Özek T, Baser KHC and Tümen G. Comparison of the Essential Oils of *Origanum majorana* L. and *Origanum x majoricum* Cambess.a. *JEOR*. 2004; 3: 248 - 9.
 33. Werker E., Putievsky E and Ravid U. The Essential Oils and Glandular Hairs in Different Chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Ann. Bot.* 1985; 55: 793 - 801.
 34. Sökmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, Akpulat HA, Sahin F and Sokmen A. In vitro antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 3309 - 12.
 35. Mann J, Davidson RS, Hobbs JB, Banthorpe DV and Harborne Jb. Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance. Longman Group UK Limited. U.K. 1994, pp: 289 - 359.
 36. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publ. Co. USA. 2005, pp: 59 - 320.
 37. Massada Y. In Analysis of Essential oil by Gas Chromatography and Spectrometry. Wiley. USA. 1976, pp: 157-180.
 38. Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, and Arsenakis M. Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of saliva frictiosa essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 4: 3197 - 201.
 39. Shafiee A and Javidnia K. Composition of Essential Oil of *Zataria multiflora*. *Planta Med.* 1997; 63: 371 - 2.



40. Javidnia K. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of *Zataria*, *Ziziphora* and *Matricaria*. Ph.D. Thesis No. 22, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences. Tehran. Iran. 1997, pp: 42 - 98.
41. Abdollali M, Shams-Ardakani M and Ghannadi A. Linalol-rich essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae) *Flavour Fragr. J.* 2000; 15: 119 - 22.
42. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2004019802&IA=WO2004019802&DISPLAY=DES>
- C9, Breath freshening and oral cleansing product using carvacrol (April 2008).
43. Stamatii A, Bonsi P, Zucc F and Moezelaar R. *Food and Chemical Toxicol. J.* 1999; 37: 813 - 23.
44. Baser KHC, Kirimer N and Tümen G. Composition of the essential oil of *Origanum majorana* L. from Turkey. *JEOR* 1993; 5: 577 - 9.
45. Vera RR and Chane-Ming J. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chem.* 1999; 66: 143 - 5.

