

بررسی اجزای تشکیل دهنده و اثرات ضد میکروبی اسانس حاصل از برگ گیاه *Peucedanum ruthenicum* (M. Bieb.) Rochel جمع آوری شده از کلاردشت

سیدحمیدرضا علوی^۱، نرگس یاسا^{۲*}، محمدرضا فاضلی^۳، فاطمه فولادی^۴، لادن سلیمی^۵، یوسف اجنی^۶

۱- استادیار، گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشیار، گروه فارماکونوزی دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دانشیار، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- داروساز، محقق، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- داروساز، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶- مربی پژوهش، گروه کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاددانشگاهی

*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکونوزی

تلفن: ۶۶۹۵۹۰۹۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۴۶۱۱۷۸ (۰۲۱)

پست الکترونیک: yasa@sina.tums.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۵/۵/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۴/۶/۱۵

چکیده

مقدمه: در طول تاریخ بشریت بسیاری از بیماری‌های عفونی با گیاهان دارویی درمان شده‌اند به طوری که امروزه در بسیاری از کشورهای در حال توسعه داروهای گیاهی نقش اصلی را در درمان‌های اولیه ایفا می‌کنند و در بسیاری از کشورها گیاهان به عنوان منبع منحصر به فردی در تهیه داروها محسوب می‌شوند.

هدف: تجزیه و شناسایی مواد موجود در اسانس و بررسی اثرات ضد میکروبی آن، که در صورت داشتن اثرات مطلوب بعد از بررسی‌های تکمیلی بتوان از آن فرم‌های دارویی تهیه نمود.

روش بررسی: گیاه *Peucedanum ruthenicum* M. Bieb از ناحیه کلاردشت در مردادماه سال ۱۳۸۳ بعد از زمان گل‌دهی و قبل از زمان میوه‌دهی جمع‌آوری شده و بعد از خشک شدن در سایه، برگ آن آسیاب و با روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. اسانس به دست آمده پس از آب‌گیری بر روی سولفات سدیم انیدر، با متد GC/MS و GC آنالیز شد. اثرات ضد میکروبی این اسانس بر روی چند میکروب گرم مثبت و گرم منفی (استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، باسیلوس سرئوس، ایشریشیا کولی، سودوموناس آئروجینوزا، سالمونلا تیفی) با روش‌های **Disk-diffusion** و **Agar-dilution** مطالعه شد.

نتایج: تعداد ۱۷ ترکیب (۱۰۰ درصد مواد) از اسانس گیاه شناسایی شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ترکیب اصلی شناسایی شده، تیمول (۵۷/۷۹ درصد) است. یافته‌های آزمایش آنتی‌باکتریال نشان دادند که این اسانس اثر ضد میکروبی خوبی روی میکروب‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد.

نتیجه‌گیری: قطر هاله بازدارندگی و میزان MIC آن در مقایسه با آنتی‌بیوتیک نئومایسین نتایج قابل توجهی را نشان می‌دهد از جمله میزان MIC آن برای باکتری‌های استاف اپیدرمیدیس، استاف اورئوس، ایشریشیا کولی و سالمونلا تیفی تقریباً معادل با نئومایسین است.

کل واژگان: *Peucedanum ruthenicum* M. Bieb، چتریان، اسانس، اثرات ضدباکتریایی



مقدمه

در طول تاریخ بشریت بسیاری از بیماری‌های عفونی با گیاهان دارویی درمان شده‌اند به طوری که امروزه در بسیاری از کشورهای در حال توسعه داروهای گیاهی نقش اصلی را در درمان‌های اولیه ایفا می‌کنند [۱،۲]. در اکثر کشورها گیاهان به عنوان منبع منحصر به فردی در تهیه داروها محسوب می‌شوند [۳،۴،۵]. جنس *Peucedanum* شامل حدود ۱۲۰-۱۰۰ گونه است که بیشتر آنها در اروپا و آسیا گسترش یافته‌اند.

در اروپا *Peucedanum* شامل ۲۹ گونه است [۶]. چهار گونه آن در ایران که شامل *P. glaucopruinosum*، *P. Ruthenicum* [۷]، *P. Knappii*، *P. translucen* [۸] است در شمال ایران و استان مرکزی پراکنده‌اند. هنوز بعضی از گونه‌های این جنس به طور سنتی در درمان سرماخوردگی [۹]، سرفه خلط دار، مشکلات تنفسی [۱۰] ضدسرفه، ضدآسم و در درمان آئزین [۱۱] استفاده می‌شوند.

مطالعات فیتوشیمیایی قبلی روی این گونه وجود فورانوکومارین و مشتقات گلیکوزیده آنها و کومارین‌های ساده گلیکوزیده [۱۲،۱۳] را نشان داده است.

در این بررسی فیتوشیمیایی روی *P. ruthenicum*، (از چتریان بومی بلغارستان) پسودانین (فورانوکومارین) و کومارینی جدید^۱ در ریشه و روتین (فلاونوئید گلیکوزیده) در میوه گیاه شناسایی شده است [۱۴].

چندین گزارش در مورد تجزیه شیمیایی اسانس این جنس وجود دارد. موارد گزارش شده از اسانس سرشاخه گیاه *P. ostruthicum* شامل: سابی نن (۳۵/۲ درصد)، ۴-تریپتول (۲۶/۶ درصد) بتاکاریوفیلین (۱۶/۱ درصد) و آلفا هومولن (۵/۸ درصد) است، [۱۵] و در گیاه *P. verticillare* مهم‌ترین مواد شناسایی شده از سرشاخه‌ها سابی نن و ترانس آنتول است [۱۶].

مواد و روش‌ها

گیاه مورد بررسی در مرداد ۱۳۸۳ جمع‌آوری گردید و نمونه آن در هرباریوم آقای دکتر حسین آخانی در دانشکده

علوم دانشگاه تهران با کد (سلیمیان ۳۹) نگهداری می‌شود. گیاه جمع‌آوری شده در سایه خشک گردید و ۲۰۰ گرم پودر برگ آن جهت اسانس‌گیری استفاده شد. استخراج اسانس برگ گیاه با روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد که راندمان آن $v/w = 0.3$ درصد بود. اسانس توسط سولفات سدیم انیدر آگیری شد و در ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال (دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد) تا زمان آنالیز و انجام آزمایش ضد میکروبی نگهداری گردید. جهت آنالیز از روش

GC/MS و GC/MS استفاده شد. در روش GC/MS دستگاه GC مدل Hewlett Packard 6890 با ستون موئین HP-5 MS (به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) و اسپکترومتر جرمی مدل 5973 از همان شرکت و برای ردیابی از سیستم یونیزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ eV استفاده شد، دمای محل تزریق دستگاه ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و بخش ردیاب ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بوده و برنامه حرارتی طوری تنظیم شد که ابتدا حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس به ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت که سرعت این افزایش دما ۶ درجه سانتی‌گراد در دقیقه بوده است. در روش GC، از مدل دستگاه ذکر شده و ستون تحت شرایط مشابه استفاده گردید.

اندیس بازداری اجسام حاصل از اسانس با استفاده از زمان بازداری نرمال آلکان‌های تزریق شده به دستگاه در شرایط مشابه با اسانس محاسبه گردید [۱۷]. شناسایی اجسام از طریق مقایسه زمان‌های بازداری مواد که از ستون HP-5 به دست آمده و رفتارهای موجود و یا مقایسه طیف جرمی آنها و اطلاعات کتابخانه Wiley صورت گرفت (جدول شماره ۱). برای بررسی اثر ضد میکروبی دو روش مورد استفاده قرار گرفت:

۱- روش **Disk-diffusion**: [۱۸]

در این روش از دیسک‌های آغشته به اسانس استفاده شد که هاله عدم رشد ناشی از آن^۱ روی میکروب‌های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29737، استافیلوکوکوس اپیدرمیس ATCC 14990، باسیلوس سرئوس

^۱ (IZD: Inhibition Zone Diameter mm)

^۱ Peuruthenicin



بحث و نتیجه گیری

اسانس به دست آمده از برگ‌های گیاه *P. ruthenicum* به رنگ سبز کم‌رنگ بوده و میزان آن برابر ۰/۳ میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم پودر خشک برآورده شد که مواد حاصل از تجزیه اسانس در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود. در این اسانس تمامی اجسام که ۱۷ مورد بود شناسایی شدند. اسانس فاقد مواد مونوترپن هیدروکربنه بوده ولی مواد مونوترپن اکسیژنه آن ۵۸/۴۷ درصد بود که قسمت اعظم آن را ماده فنلی تیمول به میزان ۵۷/۷۹ درصد تشکیل می‌دهد، دیگر ماده مونوترپن اکسیژنه بورنتول به میزان ۰/۶۸ درصد در اسانس موجود است. مقدار مواد سزکویی‌ترینی در اسانس ۳۸/۷۴ درصد بود که ۱۵/۹۱ درصد آن را سزکویی‌ترین‌های اکسیژنه و ۲۲/۸۳ درصد آن را سزکویی‌ترین‌های هیدروکربنه تشکیل می‌دهد، که بتا - بیسابولن (۶/۱ درصد)، آلفا- آمورفن (۴/۷۵ درصد)، کاریوفیلن (۴/۶۳ درصد) و بتا- فارنزن (۳/۰۵ درصد) بیشترین مواد سزکویی‌ترینه هیدروکربنه و لانسئول (۵/۴۱ درصد)، کاریوفیلن اکساید (۴/۶۳ درصد) و هگزها هیدروفارنزیل استون (۳/۹ درصد) بیشترین مواد سزکویی‌ترین اکسیژنه را در اسانس تشکیل می‌دهند.

در مقایسه با گونه‌های دیگر جنس پوسه دانوم: از گیاه *P. ostruthium* در کشور لهستان ۳۹ ماده شناسایی شده است که بیشترین ماده آن را دو سزکویی‌ترین هیدروکربنه به نام کاریوفیلن (۱۶/۱ درصد) و آلفا- هومولن (۱۵/۸ درصد) تشکیل می‌دهد و مونوترپن‌های هیدروکربنه ساینین (۴/۷ درصد)، لیمونن (۴/۴ درصد) و بتا- پینن (۰/۴ درصد) در آن تشخیص داده شده است [۱۵] که در مقایسه با گیاه پوسه دانوم روتینکوم فاقد فنلی است ولی سزکویی‌ترین‌های هیدروکربنه آن قابل توجه است. اسانس حاصل از برگ و شاخه‌های گیاه *P. verticillare* در کشور ایتالیا حاوی دو ماده ساینین و آنتول است که یک فنیل پروپانویید است و بیشترین ماده را در این اسانس تشکیل می‌دادند [۱۶]. گیاه *P. scoparium* از ایران حاوی ۷۳ درصد مونوترپن هیدروکربنه است که عبارتند از: آلفا- پینن (۳۹/۶ درصد)، بتا - پینن (۲۳/۹ درصد) و بتا- فلاندرن (۹/۵ درصد) [۲۱]، که مونوترپن هیدروکربنه در *P. ruthenicum* وجود ندارد. اسانس گیاه

ATCC 1247، ایشریشیا کولی ATCC 8739، سودوموناس آروجینوزا ATCC 9027 و سالمونلا تیفی ATCC 19430، که از بخش کنترل دارو و غذای دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تهیه شده بود بررسی شد.

از محیط کشت مولر هیتتون آگار (M-H) به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در پتری دیش استریل ۹ سانتی‌متری ریخته و صبر شد تا دما به ۴۸ درجه سانتی‌گراد برسد و محیط کشت قوام یابد. هر بار از سوسپانسیون میکروبی به غلظت 1×10^8 cfu/ml به طور یکنواخت در سطح محیط کشت، کشت داده شد. مقدار ۲/۵ میکرولیتر معادل ۲ میلی‌گرم اسانس ($d=0/8$) روی هر دیسک‌های کاغذ صافی (واتمن شماره ۳ به قطر ۶ میلی‌متر) گذاشته شد تا کاملاً جذب کاغذ صافی شود. ۴ عدد دیسک در هر پتری دیش قرار گرفت و از نئومایسین به غلظت $200 \mu\text{g}/\text{disc}$ به عنوان کنترل استفاده شد.

پتری دیش‌ها به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و فعالیت ضد میکروبی اسانس برای هر میکروب با اندازه‌گیری هاله عدم رشد متوسط ۴ دیسک برحسب mm در برابر استاندارد نئومایسین تعیین گردید [۱۹] (جدول شماره ۲).

۲- روش Agar-dilution [۲۰]

در این روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد^۱ اسانس برای میکروب‌های حساس به اسانس با متد رقیق‌سازی محیط کشت به دست می‌آید که ۲ سری رقت‌سازی از محیط کشت (۰/۵ تا ۰/۰۰۱) تهیه گردید که برای رقیق‌سازی از DMSO استفاده شد؛ مقدار MIC معادل حداقل غلظت اسانس به کار رفته بود که باعث مهار رشد باکتری به طور کامل می‌شد؛ محیط کشت ۱۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (جدول شماره ۳). از نئومایسین به عنوان شاهد مثبت و از DMSO به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

^۱ (MICs: Minimum Inhibition Concentrations mg/ml)



جدول شماره ۱ - مواد شناسایی شده از برگ *P. ruthenicum*

^a RRI	Leaves%	Compounds Name	ردیف
۱۰۱۱	۰/۵۸	n-decane	۱
۱۱۵۰	۲/۲۱	E-Nonenal	۲
۱۱۶۰	۰/۶۸	Borneol	۳
۱۲۹۴	۵۷/۷۹	Thymol	۴
۱۳۶۸	۰/۷۴	α -Ylangene	۵
۱۴۲۵	۳/۶	Trans-Caryophyllene	۶
۱۴۳۸	۱/۳۹	β -Gurjunene	۷
۱۴۵۹	۳/۰۵	Trans- β -farnesene	۸
۱۴۷۶	۴/۷۵	α -Amorphene	۹
۱۴۸۰	۰/۳۵	Germacrene D	۱۰
۱۵۰۳	۶/۱	β -Bisabolene	۱۱
۱۵۰۸	۰/۷	Gamma-cadinene	۱۲
۱۵۲۸	۲/۱۵	Delta-cadinene	۱۳
۱۵۸۴	۴/۶۳	Caryophyllene oxide	۱۴
۱۵۸۹	۱/۹۷	Salvial-4(14)-en-1-one	۱۵
۱۷۷۰	۵/۴۱	Lanceol	۱۶
۱۸۲۰	۳/۹	Hexahydrofarnesyl acetone	۱۷
	-	Hydrocarbon monoterpenes	
	۵۸/۴۷	Oxygenated monoterpenes	
	۲۲/۸۳	Hydrocarbon sesquiterpenes	
	۱۵/۹۱	Oxygenated sesquiterpenes	
	۲/۷۹	Nonterpenes	
	-	Unknown	
	۱۰۰	Total identified	

^a RRI: relative retention indices as determined on a HP-5 column using the homologous series of n-alkan

جدول شماره ۲ - اثر ضد میکروبی اسانس برگ *P. ruthenicum* با استفاده از روش انتشار دیسک

(Disk-diffusion) در مقایسه با نتومايسين

Inhibition Zone Diameter (IZD) mm		Strains
Neomycin (200 μ g)	Essential oil (2 mg/disc)	
۲۱	۳۱ ^a	<i>S. aureus</i>
۱۶	۲۳	<i>S. epidermidis</i>
۱۳	۳۴	<i>B. cereus</i>
۱۷	۱۶	<i>E. coli</i>
۱۱	۶	<i>P. aeruginosa</i>
۱۹	۸	<i>S. typhi</i>

^a (n = ۴)



جدول شماره ۳ - اثر ضد میکروبی اسانس برگ *P. ruthenicum* با استفاده از روش رقت سازی محیط

کشت مایع (Agar dilution) در مقایسه با نئومایسین

Minimum Inhibition Concentrations (MICs) mg/ml		Strains
Neomycin mg/ml	Essential oil mg/ml	
$4/0 \times 10^{-3}$	$2/0 \times 10^{-1}$	<i>S. aureus</i>
$1/2 \times 10^{-3}$	$1/8 \times 10^{-1}$	<i>S. epidermidis</i>
$1/2 \times 10^{-3}$	$9/0 \times 10^{-2}$	<i>B. cereus</i>
$2/4 \times 10^{-3}$	$2/1 \times 10^{-1}$	<i>E. coli</i>
$2/3 \times 10^{-3}$	$4/8 \times 10^{-1}$	<i>P. aeruginosa</i>
$4/0 \times 10^{-3}$	$3/6 \times 10^{-1}$	<i>S. typhi</i>

تقریباً مساوی و در بقیه موارد نیز با توجه به اینکه نئومایسین یک آنتی بیوتیک سنتتیک است، قابل اهمیت است. با توجه به نتایج به دست آمده اسانس این گیاه که درصد بالایی (۵۷/۷۹ درصد) تیمول دارد می تواند به عنوان جانشین آنتی بیوتیک ها و فراورده های جنس تیموس و زاتاریا که حاوی مقادیر بالای تیمول بوده و کاربردهای درمانی دارند [۲۳، ۲۴] حداقل به صورت موضعی پس از بررسی های لازم استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کمک های ارزشمند آقای جمالی فر کارشناس محترم آزمایشگاه کنترل میکروبی شناسی دانشکده داروسازی تشکر می گردد.

P. cervariifolium از ایران حاوی ۷۳/۹ درصد سزکویی ترین هیدروکربنه است که باز با اسانس گیاه *P. ruthenicum* تفاوت دارد و بیشترین مواد آن عبارتند از آلفا - گوآین، گاما - مورولن، ویریدی فلورن، آلفا و بتا - سلینن [۲۲]. مقایسه این گیاهان که همه از گونه های یک جنس هستند و از قسمت های هوایی گیاه به دست آمده اند نشان می دهد که در برخی موارد نمی توان ماده شاخصی که بتواند گونه های یک جنس را به هم ربط دهد پیدا نمود.

در بررسی اثر ضد میکروبی اسانس برگ گیاه *P. ruthenicum* نتایج به دست آمده نشان داد که هاله عدم رشد حاصل از اسانس برگ گیاه *P. ruthenicum* در مقایسه با نئومایسین در برخی موارد مثلاً اثر روی باکتری های استاف ایدرمیدیس و باسیلوس سرئوس و باکتری ایشریشیا کولی

منابع

1. Czygan FC. Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes. *Zeitschrift für phytotherapie* 1993; 5: 276-282.
2. Ody P. *The complete medicinal herbal*. New York. Dorling Kindersley limited 1993, pp. 170-171.
3. Hölzl j. Inhaltstoffe und wirkmechanismen des Johanniskrautes. *Z. Phytotherapie* 1993; 5: 255-264.
4. Öztürk Y, Aydın S, Başer KHC, Öztürk N. *Hypericum perforatum* L. bitkisinin siçanlarda koleretik aktivitesi. IX. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı*. Anadolu Üniversitesi. Eskişehir 1992, p. 216.
5. Maisenbacher J, Schmidt U, Schenk N. Therapie mit *Hypericum beiangstzustanden*. *TW. Neurol. Psychiatrie* 1995; 9: 65-70.
6. Tutin TG, Heiwood VH, Barges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaen*. The University Press, Cambridge 1968;



- 2: 360-361.
7. Pimenov M G. *Peucedanum* L. in: *Flora Iranica* Rechinger K. H, ed. Akademische Druck-U. Verlagsanstalt, Graz 1987, 162: 442-444.
8. Salimian M. *Thaxonomic revision of Peucedanum complex in Iran*. Thesis for MS degree, Department of Biology, Faculty of Sciences, Tehran University, Tehran, Iran 2003; pp. 97-99.
9. Gan WS. *Manual of medicinal plants in Taiwan*. Notional Research Institute of Chinese Medicine, Taiwan. 1965, 3: 675.
10. Kong LY, Li Y, Min ZD, Li X, Zhu TR. Qianhu coumarin I from *Peucedanum praeruptorum*. *Phytochem*. 1996; 42: 1689 -1691.
11. Tang W, Einsehbrand C, *Chinese drugs of plant origin*. Springer, New York .1992, pp. 753 - 757.
12. Ahn KS, Sim WS. Kim IH. Decursin: a cytotoxic and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigasi*. *Plant Med*. 1996; 62: 7-9.
13. Lu M, Nicoletti M, Battinelli L, Mazzanti G. Isolation of Praeruptorins A and B from *peucedanum praeruptorum* Dunn. and their general pharmacological evaluation in comparison with extracts of the drug. *IL Farmaco*. 2001; 56: 417-420.
14. Soine TO, Zheleva A, Mahandru MM, Erhardt P, Bubeva-Ivanova L. Natural coumarins VII: Isolation and structure of a new coumarin, Peuruthenicin, from *Peucedanum ruthenicum* M.B. *J. Pharm. Sci*. 1973; 62 (11): 1879-1880.
15. Cisowskia d W, Sawickaa U, Mardarowiczb M, Asztemborskac M and Luczkiewizd M. Essential Oil from Herb and Rhizome of *Peucedanum ostruthium* (L.Koch). ex DC. *Z. Naturforsch*. 56c, 2001; pp: 930-932.
16. Fraternali D, Giamperi L, Ricci D, Manunta A. Composition of the essential oil of *Peucedanum verticillare*. *Biochemical Systematics and Echology*, 2002; 28 (2): 143-147.
17. Adams RP. *Identification of essential oils components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation. Illinois. USA. 2001.
18. NNCLS, Performance standards for antimicrobial disk suscepibility tests, *Approved standard. NCCLS document M2-A6*, 1th ed. Wayne Pennsylvania 1999a.
19. Vlietinck AJ, Van Hoof L, Totté J, Lasure A, Vanden Berghe D, Rwangabo PC and Mrukiyumwam, J. Screening of a hundered Rwandese medicinal plants for anti-microbial and antiviral properties. *J. Ethnopharmacol*. 1995; 46: 31 - 47.
20. Martin G. J. *Ethnobotany: A methods manual*. Chapman and Hall. London. 1995, p. 80.
21. Masoudi S. Akhgar MR. Rustaiyan A. Essential Oils of *Peucedanum scoparium* (Boiss.) Boiss. and *Serotinocarpum insignis* Mozaffarian. from Iran. *J. Essent. Oil Res*. 2004; 16 (2): 117-119.
22. Bazgir A. Shaabani A. Sefidkon F. Composition of the Essential Oil of *Peucedanum cervariifolium* C.A. Mey. from Iran. *J. Essent. Oil Res*. 2005; 17 (4): 380-381.
23. De Feo V, Bruno M, Bochra Tahiri B, Napolitano F and Senatore F. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae). *Agric. Food Chem*. 2003; (13): 3849 -3853.
24. Amanlou M, Momen Beitollahi J, Abdollahzadeh S, Tohidast-Ekhrad Z. Miconazole gel compared with *Zataria multiflora* Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis. *Phytotherapy Research* 20 (11): 966-969.

