

بررسی ترکیبات فنلی، روغن‌های ضروری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی گونه‌*سالویا اتیوپیس* (تیره نعنائیان)

*رؤیا کریمیان، مصطفی اسدبگی، مسعود رنجبر، رامتین پاکزاد، علی مالمیر؛
دانشگاه بو علی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

چکیده

جنس مریم‌گلی^۱ از جنس‌های مهم تیره نعنائیان^۲ است که اغلب گونه‌های آن ارزش غذایی و دارویی دارند. در این پژوهش محتوای فنل و فلاونوئید کل و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گونه *سالویا اتیوپیس*^۳ ارزیابی شد. اجزای موجود در روغن‌های ضروری این گونه به‌صورت کمی و کیفی با GC و GC-MS آنالیز شد. همچنین فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی روغن‌های ضروری گونه بررسی شده به‌ترتیب در برابر شش و دو سویه باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شد. نتایج نشان داد که گونه *سالویا اتیوپیس* دارای محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری است. در بررسی ترکیبات روغن‌های ضروری گونه بررسی شده ۱۱ ترکیب شناسایی شد که آلفا-کوپاين با مقدار ۳۳/۴۸٪ فراوان‌ترین ترکیب روغن‌های ضروری بود. عصاره گونه بررسی شده در زمینه فعالیت ضد باکتریایی پتانسیل مهاری بسیار زیادی را در برابر باکتری پروتئوس و لگاریس^۴ نشان داد؛ هرچند روغن‌های ضروری آن فاقد فعالیت ضد باکتریایی بود.

مقدمه

جنس مریم‌گلی (*سالویا*) از تیره نعنائیان با حدود ۹۰۰ گونه گسترش وسیعی در سرتاسر دنیا دارد. مراکز اصلی تنوع جنس مریم‌گلی نواحی مدیترانه‌ای آسیای مرکزی آمریکا و جنوب آفریقا است. این جنس دارای ۵۸ گونه علفی و پایا در ایران است که ۱۷ گونه آن انحصاری است [۱]. گونه‌های مختلف جنس مریم‌گلی دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد توموری و ضد التهابی هستند که از دیرباز در طب سنتی به‌منظور درمان سرماخوردگی، برونشیت، اختلالات گوارشی و سل استفاده شده‌اند [۲]. روغن‌های ضروری گل‌های برخی گیاهان این جنس همراه با روغن‌های ضروری گل‌هایی نظیر اسطوخودوس و یاس موارد استفاده متعدد و متفاوتی در صنایع مواد شیمیایی خانگی دارند. روغن‌های ضروری این گیاهان، خاصیت دارویی نیز دارند و به‌عنوان ماده ضد عفونی‌کننده و نیز التیام‌بخش برای معالجه بیماری‌های سیستم عصبی استفاده می‌شوند [۳].

واژه‌های کلیدی: مریم‌گلی، فنل، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد باکتریایی.

پذیرش ۹۱/۸/۳۰

دریافت ۹۰/۸/۸

karamian.roya@gmail.com

*نویسنده مسئول

۱. *Salvia L.*

۲. *Lamiaceae*

۳. *Salvia aethiopis*

۴. *Proteus vulgaris*

رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد بیش از صد بیماری در انسان مانند آترواسکلروزیز، دیابت، آرتریت، کم‌خونی، صدمات جبران‌ناپذیر بافتی، آسیب به سیستم عصبی مرکزی، گاستریت و سرطان می‌شوند [۴]، [۵]، [۶]. نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در زدودن رادیکال‌های آزاد مازاد و حفاظت از سلول در برابر اثرات سمی آن‌ها و بهبود بیماری‌ها ثابت شده است [۷]. آنتی‌اکسیدان‌ها به دو گروه عمده طبیعی و سنتزی طبقه‌بندی می‌شوند [۸]. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی اثرات سمی و کارسینوژنیکی از خود نشان داده‌اند. گرچه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مقادیر کم استفاده می‌شوند، لیکن نیاز به انواع آنتی‌اکسیدان‌های فاقد عوارض جانبی هنوز احساس می‌شود. بنا بر این جستجو برای جای‌گزینی فرآورده‌های طبیعی به‌جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی منجر به شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های متعدد از منابع گیاهی مانند میومجات، سبزیجات، گیاهان دارویی و ادویه‌جات، دانه‌های روغنی و دانه‌های غلات شده است. این مواد منافع چشم‌گیری در زمینه مواد غذایی، شیمی، داروسازی و پزشکی با توجه به طیف گسترده‌ای از اثرات مطلوب زیستی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی دارند [۹]، [۱۰]. انواع گسترده‌ای از مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی مانند ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلی، فلاونوئیدها، کونینون‌ها و تانن‌ها)، توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها و اسید آسکوربیک در گیاهان حضور دارند [۱۱]. ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدان ممکن است به‌عنوان اجزای مهار کننده رادیکال‌های آزاد یا کلات‌کننده یون‌های فلزی فعال در واکنش‌های ردوکس که قادر به کاتالیز پراکسیداسیون لیپیدها هستند، به‌کار روند [۱۲]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌ها و روغن‌های ضروری گیاهی، اساس کاربرد وسیع آن‌ها در داروسازی، پزشکی و درمان‌های طبیعی تشکیل می‌دهد [۱۳]. گزارش‌های زیادی از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره و روغن‌های ضروری برخی گونه‌های جنس مریم گلی وجود دارد. در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی عصاره و ترکیبات روغن‌های ضروری گونه *سالویا اتیوپیس* نیز چندین گزارش وجود دارد [۶]، [۱۴]، [۱۵]، [۱۶]، [۱۷].

نظر به این که میزان متابولیت ثانویه گیاهان از جمله ترکیبات فنلی و روغن‌های ضروری در شرایط مختلف آب و هوایی و در بخش‌های مختلف گیاه متفاوت است، لازم است طی آزمایش‌های متعدد میزان این ترکیبات در مناطق مختلف جغرافیایی بررسی شوند. از همین رو، با توجه به انجام یافتن برخی تحقیقات بر روی گونه *سالویا اتیوپیس* در ترکیه و صربستان و نیز نظر به اهمیت دارویی ترکیبات موجود در گیاهان جنس مریم گلی، در این پژوهش ترکیبات فنلی و روغن‌های ضروری گونه *سالویا اتیوپیس* از ایران بررسی شد. ترکیبات موجود در روغن‌های ضروری گونه بررسی شده به‌صورت کمی و کیفی با GC و GC-MS آنالیز شد. محتوای فنل و فلاونوئید کل^۱ و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با استفاده از پروتوکول‌های مختلف به‌روش اسپکتروفوتومتری بررسی شد. همچنین اثرات ضد باکتریایی عصاره و روغن‌های ضروری گونه فوق با استفاده از روش انتشار دیسک^۲ به‌ترتیب در برابر شش و دو گونه باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شد.

۱. Total phenol and flavonoid content

۲. Disc diffusion

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های گونه *سالویا اتیوپیس* از زیستگاه طبیعی آن در روستای سقاوا از استان اردبیل (ارتفاع ۱۸۰۰ متر) در خرداد ۱۳۸۹ جمع‌آوری شده و در هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا نگهداری شدند.

مواد شیمیایی

تمام مواد شیمیایی و حلال‌های استفاده شده در این پژوهش از شرکت مرک^۱ (آلمان) و ۲ و ۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل^۲ (DPPH) از شرکت سیگما^۳ (آمریکا) با درصد خلوص بالا تهیه شده است.

سویه‌های باکتری بررسی شده

باکتری‌های بررسی شده پروتئوس ولگاریس^۴ (PTCC ۱۰۷۹)، باسیلوس مگاتریا^۵ (PTCC ۱۰۱۷)، سراتیا مارسیسنس^۶ (PTCC ۱۱۱۱)، اشرشیا کلی^۷، استافیلوکوکوس ائرنوس^۸، باسیلوس سرئوس^۹ (PTCC ۱۲۴۷) هستند.

روش عصاره‌گیری

گیاهان جمع‌آوری شده از طبیعت در تاریکی و در دمای اتاق خشک شدند. به‌منظور تهیه عصاره، ۲۵ گرم پودر گیاه خشک شده با ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول به‌روش سوکسله عصاره‌گیری شد. آن‌گاه حلال عصاره‌ها تحت شرایط خلأ با دستگاه روتاری لب تیچ^{۱۰} مدل Ev311 ساخت ایتالیا خارج شده و سپس خشک شدند.

سنجش محتوای فنل کل

محتوای فنل کل در عصاره‌ها با شناساگر فولین-سیوکالتیو^{۱۱} سنجش شد. بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره رقیق شده (۱:۱۰ g/mL) از عصاره گیاهی یا گالیک اسید^{۱۲} (استاندارد فنل) با ۵ میلی‌لیتر شناساگر فولین-سیوکالتیو مخلوط شد. سپس ۴ میلی‌لیتر سدیم‌کربنات ۱ مولار به مخلوط اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. در پایان جذب نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر پرکین المر مدل ۴۵ ویزیل لامبدا^{۱۳} UV ساخت آمریکا در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. محتوای فنل کل در عصاره‌های بررسی شده به‌صورت معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید (GAE) بر گرم وزن خشک ارائه شد [۱۸].

۱. Merck	۲. 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	۳. Sigma	۴. <i>Proteus vulgaris</i>
۵. <i>Bacillus megaterium</i>	۶. <i>Serratia marcescens</i>	۷. <i>Escherichia coli</i>	
۸. <i>Staphylococcus aureus</i>	۹. <i>Bacillus cereus</i>	۱۰. Lab Tech	
۱۱. Folin-Ciocalteu Reagent	۱۲. Gallic acid	۱۳. Visible Lambda	

سنجش محتوای فلاونوئید کل

سنجش محتوای فلاونوئید کل به روش کلرید آلومینیوم انجام شد. بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره (۱:۱۰ g/mL) با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪، ۰/۱ میلی‌لیتر اسنات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب مخلوط واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر پرکین المر مدل ۴۵ ویزیل لامبدا/UV ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد. محتوای فلاونوئید کل به صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین^۱ (QE) بر گرم وزن خشک بیان گردید [۱۸].

ارزیابی پتانسیل مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با بررسی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH با عصاره گیاه بررسی شده سنجیده شد [۱۹]. بدین منظور محلول متانولی عصاره در غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. آن‌گاه ۲/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH با غلظت $10^{-4} \times 3$ مولار مخلوط و پس از هم زدن شدید به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب مخلوط واکنشی در ۵۱۷ نانومتر با اسپکتروفتومتر پرکین المر مدل ۴۵ ویزیل لامبدا/UV ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد و از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل استاندارد استفاده شد. سپس غلظتی از عصاره یا اسید آسکوربیک که به وسیله آن‌ها ۵۰٪ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مشاهده می‌شود (IC_{50}) عصاره گیاه و اسید آسکوربیک محاسبه شد. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد:

$$DPPH \text{ آزاد رادیکال آزاد} = 100 [1 - (A_S - A_B / A_C)] \quad (1)$$

که در این رابطه A_S ، جذب مخلوط واکنشی (DPPH و عصاره)، A_B ، جذب محلول واجد عصاره و فاقد DPPH و A_C ، جذب محلول واجد DPPH و فاقد عصاره است.

ارزیابی فعالیت کلات‌کنندگی فلزات

فعالیت کلات‌کنندگی آهن با عصاره گیاه بررسی شده با استفاده از تشکیل کمپلکس قرمز رنگ Fe^{2+} -فروزین^۲ انجام شد [۲۰]. محلول متانولی در غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این عصاره به محلولی که شامل ۱/۶ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول $FeCl_2^{+2}$ ۲ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه شد. سپس این مخلوط به شدت هم زده شد، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب مخلوط واکنشی در ۵۶۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر پرکین المر مدل ۴۵ ویزیل لامبدا/UV ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد و جذب نمونه (A_S) به دست آمد. سپس جذب مخلوط با غلظت صفر (بدون عصاره) در طول موج فوق به دست آمد (A_C). درصد فعالیت کلات‌کنندگی آهن مربوط به هر عصاره با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد:

۱. Quercetin ۲. Ferrozine

$$(2) \quad \text{درصد فعالیت کلات‌کنندگی} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

که در این رابطه A_{control} جذب مربوط به مخلوط واکنشی در غیاب عصاره گیاه و A_{sample} جذب مربوط به مخلوط واکنشی در حضور عصاره است. در این سنجش از اسیدآسکوربیک به‌عنوان کنترل استاندارد استفاده شد. در نهایت فعالیت کلات‌کنندگی عصاره بررسی شده با میزان فعالیت کلات‌کنندگی اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت مقایسه شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار بی‌رنگ‌شدگی بتاکاروتن- لینولنیک‌اسید^۱

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه بررسی شده با استفاده از روش سنجش مهار بی‌رنگ‌شدگی بتاکاروتن‌لینولنیک اسید ارزیابی شد [۲۱]، [۲۲]. محلولی از ۰/۲ میلی‌گرم بتاکاروتن در ۱ میلی‌لیتر کلروفرم تهیه شد. سپس ۲۰ میلی‌گرم لینولنیک اسید و ۲۰۰ میلی‌گرم توئین^۲ ۴۰ به این محلول اضافه شد و به خوبی هم زده شد. کلروفرم محلول با دستگاه روتاری لب تیچ مدل Ev311 ساخت ایتالیا در خلأ جدا شد. بعد از جداسازی کلروفرم از محلول، ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اشباع شده از اکسیژن (۳۰ دقیقه تحت فشار ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه) همراه با تکان شدید به محلول اضافه شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده در لوله آزمایش ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر از عصاره (غلظت ۲ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر توئین ۴٪) به لوله آزمایش اضافه شد. تمام این مراحل در مورد بوتیلیدهیدروکسی تولوئن^۳ (BHT) به‌عنوان شاهد مثبت و آب (۱ میلی‌لیتر توئین ۴٪ فاقد عصاره) به‌عنوان شاهد منفی نیز انجام شد. عصاره گیاه به غلظت ۲ میلی‌گرم در ۶ میلی‌لیتر توئین ۴٪ به‌عنوان بلانک استفاده شد. در ابتدا جذب نمونه‌ها فوراً در زمان صفر ($t=0$) در طول موج ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر پراکین المر مدل ۴۵ ویزیل لامبدا/UV ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد. لوله‌های آزمایش حاوی مخلوط واکنشی به‌مدت ۲ ساعت در آب ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در این فاصله جذب نمونه‌ها هر ۱۵ دقیقه طبق روش فوق اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، با مقایسه جذب نمونه‌ها در زمان صفر و از روی میزان پایداری رنگ زرد بتاکاروتن به‌صورت درصد سنجش شد. سپس درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از تغییرات مستقل جذب نمونه‌ها در زمان‌های $t=60$ و $t=120$ دقیقه و با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد [۱۹].

$$(3) \quad \text{درصد مهار بی‌رنگ‌شدگی بتاکاروتن- لینولنیک اسید} = 1 - [(A_E^{t=0} - A_E^{t=t}) / (A_W^{t=0} - A_W^{t=t}) + (A_{BHT}^{t=0} - A_{BHT}^{t=t})] \times 100$$

که در این رابطه $A_E^{t=0}$ جذب عصاره در زمان $t=0$ دقیقه، $A_E^{t=t}$ جذب عصاره در زمان $t=60$ یا $t=120$ دقیقه، $A_W^{t=0}$ جذب کنترل آب در زمان $t=0$ دقیقه، $A_W^{t=t}$ جذب کنترل آب در زمان $t=60$ یا $t=120$ دقیقه، $A_{BHT}^{t=0}$ جذب بوتیلیدهیدروکسی تولوئن در زمان $t=0$ دقیقه، $A_{BHT}^{t=t}$ جذب بوتیلیدهیدروکسی تولوئن در زمان $t=60$ یا $t=120$ دقیقه است.

ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید با استفاده از سیستم NBT/NADH/PMS انجام شد [۲۳]. محلول متانولی با غلظت‌های مختلف ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره تهیه

شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از این عصاره به محلولی که شامل ۱ میلی‌لیتر نیتروبلوتترازولیم^۱ (NBT) (۱۵۶) میکرومولار در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، pH=۷/۴ و ۱ میلی‌لیتر نیکوتین آمید دی نوکلئوتید^۲ (NADH) (۴۶۸) میکرومولار در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، pH = ۷/۴ اضافه شد. پس از این که این مخلوط به خوبی حل شد، برای شروع واکنش ۰/۱ میلی لیتر فنازین متیل سولفات^۳ (PMS) (۶۰) میکرومولار در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، pH = ۷/۴ به مخلوط اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه قرار داده شد. جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر پراکین المر مدل ۴۵ ویزیبیل لامبدا/UV ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد و جذب نمونه (A_s) به دست آمد. جذب مخلوط با غلظت صفر (بدون عصاره) در طول موج فوق به دست آمد (A_c). سپس درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به هر عصاره با استفاده از رابطه^۴ (۴) محاسبه شد:

$$(4) \quad \text{درصد مهار رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

که در این رابطه A_{control} جذب مربوط به مخلوط واکنشی در غیاب عصاره گیاه و A_{sample} جذب مربوط به مخلوط واکنشی در حضور عصاره است. در این سنجش از بوتیلیدهیدروکسی‌تولون (BHT) به عنوان استاندارد استفاده شد و در فعالیت مهارکنندگی عصاره گیاه بررسی شده با مهارکنندگی بوتیلیدهیدروکس تولون به عنوان کنترل مثبت مقایسه شد.

جداسازی و شناسایی ترکیبات روغن‌های ضروری به روش GC و GC-MS

برای شناسایی اجزای روغن‌های ضروری گیاه بررسی شده در این تحقیق از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مدل آگیلنت^۴ ۶۸۹۰، N نتورک GC سیستم^۵ مجهز به مس سلکتیو دکتور ۹۷۳ نت ورک^۶ با ستون کپی لاری^۷ به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون استفاده شد. میزان تزریق ۱ میکرولیتر و دمای ورودی ۲۷۵ سانتی‌گراد و دمای خروجی ۲۸۵ سانتی‌گراد بود. نمونه‌ها با نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شدند.

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

برای تعیین حساسیت سویه‌های باکتریایی نسبت به عصاره متانولی گیاه بررسی شده از روش انتشار دیسک استفاده شد [۲۴]. بدین منظور ابتدا از تمام سویه‌ها، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند^۸ ($10^8 \times 1/5$) تهیه شد و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر سطح محیط مولر هینتون آگار^۹ کشت یک‌خواخت انجام شد. آن‌گاه دیسک‌های بلانک استریل (ساخت پادتن طب ایران) در غلظت‌های مختلفی از عصاره متانولی (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) غوطه‌ور شد و در نهایت، دیسک‌های تهیه شده با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری

۱. Nitro blue tetrazolium ۲. Nicotinamide adenine dinucleotide ۳. Phenazine methosulphate solution

۴. Agilent ۵. N Network GC System ۶. Mass Selective Detector S973 Network

۷. Capillary ۸. Mc Farland ۹. Mueller hinton agar

شد و سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی عصاره اندازه‌گیری شد. قطر هاله ۷ میلی‌متری به‌عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. همچنین از دیسک حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید^۱ (DMSO)، (رقیق‌کننده عصاره‌ها) به‌عنوان کنترل منفی و از دیسک حاوی ۳۰ میکروگرم جنتامایسین و پنی‌سیلین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای حصول اطمینان، این آزمایش برای هر سوبه باکتری سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله‌ها در سه تکرار به‌عنوان قطر نهایی ثبت شد.

طرح آماری

تمام آزمایش‌ها در قالب سه تکرار انجام شد. رسم نمودارها و آنالیز داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزارهای اکسل و SPSS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) بیان شد.

نتایج

محتوای فنل و فلاونوئید کل

ترکیبات فنلی گیاهان دارای پتانسیل مهار رادیکال‌های آزاد، ممانعت از فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو و هیدرولیتیک و نیز فعالیت ضد التهابی هستند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان اغلب با در نظر گرفتن محتوای ترکیبات فنلی آن‌ها ارزیابی می‌شود و با فعالیت زیستی این ترکیبات در ارتباط است [۲۵]، [۲۶]، [۲۷]. نتایج حاصل از سنجش محتوای فنل و فلاونوئید کل به‌روش اسپکتروفوتومتری نشان داد که محتوای فنل در گونه بررسی شده 10.30 ± 0.07 میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و محتوای فلاونوئید کل 1.74 ± 0.28 میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است که حاکی از محتوای چشمگیر ترکیبات فنلی و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی زیاد آن‌ها در گیاه بررسی شده است.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که قادرند از اکسیداسیون لیپیدها یا مولکول‌های دیگر از آغاز یا گسترش زنجیره واکنش اکسیداتیو ممانعت کنند یا آن را به تأخیر بیندازند [۲۸]. نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه بررسی شده با استفاده از روش پتانسیل مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، حاکی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیر عصاره این گونه است. همچنین عصاره گونه بررسی شده در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی اسیدآسکوربیک دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری برای مهار رادیکال آزاد DPPH است (جدول ۱).

۱. Dimethyl sulfoxide

جدول ۱. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH به‌وسیله عصاره گونه سالویا انتیپوس

	IC ₅₀ value				
	غلظت (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)				
	۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱
<i>S. aethiopsis</i>	۹۲/۲۴ ± ۲/۴ ^a	۹۳/۲۱ ± ۲/۲ ^a	۹۶/۴۲ ± ۲/۸ ^{ab}	۹۵/۶۴ ± ۱/۸ ^{ab}	۹۹/۱۸ ± ۳/۳ ^b
اسید آسکوربیک	۸۰/۰۰ ± ۰/۸ ^a	۸۰/۸۴ ± ۱/۷ ^a	۸۱/۲۱ ± ۱/۴ ^a	۸۰/۸۴ ± ۲/۳ ^a	۸۰/۱۶ ± ۱/۹ ^a

* تفاوت میان اعداد با حروف غیرمشابه در ستون در سطح ($P \leq 0.05$) معنی‌دار است.

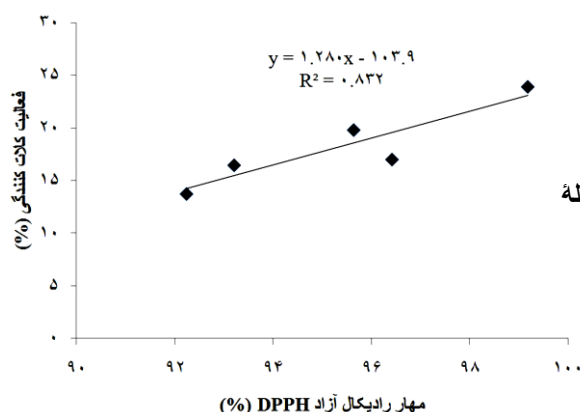
ارزیابی فعالیت کلات‌کنندگی فلزات

تبادل فلزات به‌صورت یون می‌تواند پرکسیداسیون لیپید را به‌وسیله تولید رادیکال هیدروکسیل به‌واسطه واکنش فنتون^۱ و شتاب دادن به پراکسیداسیون لیپید از طریق تجزیه هیدروپراکسیداز لیپید به رادیکال‌های پرواکسیل و آلوکسیل تحریک کند و بنا بر این باعث راه‌اندازی زنجیره واکنش پراکسیداسیون لیپید شود. آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند با کلات‌کردن فلزات سنگین مانع چنین رخدادی شوند. نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه بررسی شده با استفاده از روش پتانسیل کلات‌کنندگی فلزات نشان‌دهنده فعالیت کلات‌کنندگی چشمگیر عصاره این گونه است. همچنین عصاره گونه بررسی شده در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی اسید آسکوربیک دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری برای فعالیت کلات‌کنندگی است (جدول ۲). در شکل ۱ رابطه موجود میان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش کلات‌کنندگی فلزات و مهار رادیکال آزاد DPPH به‌وسیله عصاره سالویا انتیپوس نشان داده شده است.

جدول ۲. درصد فعالیت کلات‌کنندگی فلزات به‌وسیله عصاره گونه سالویا انتیپوس

	غلظت (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)					میانگین
	۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱	
<i>S. aethiopsis</i>	۱۳/۷۴ ± ۰/۹ ^a	۱۶/۴۶ ± ۱/۱ ^a	۱۷/۰۰ ± ۱/۶ ^a	۱۹/۸۰ ± ۱/۴ ^{ab}	۲۳/۹۰ ± ۰/۸ ^b	۱۸/۱۸ ^a
اسید آسکوربیک	۴/۰۲ ± ۰/۶ ^a	۷/۴۸ ± ۰/۴ ^{ab}	۱۰/۷۰ ± ۱/۲ ^b	۱۷/۴۰ ± ۰/۸ ^c	۲۱/۸۰ ± ۱/۳ ^c	۱۲/۲۸ ^b

* تفاوت میان اعداد با حروف غیرمشابه در ستون در سطح ($P \leq 0.05$) معنی‌دار است.



۱. Fenton Reaction

میزان مهار بی‌رنگ‌شدگی بتاکاروتن-لینولئیک اسید

نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه بررسی شده با استفاده از روش سنجش بتاکاروتن-لینولئیک اسید در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل از بررسی درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از تغییرات مستقل جذب نمونه‌ها در وقفه‌های زمانی $t = 60$ و $t = 120$ دقیقه نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه بررسی شده در این روش چشمگیر است.

جدول ۳. درصد مهار بی‌رنگ‌شدگی بتاکاروتن-لینولئیک اسید به وسیله عصاره گونه سالویا اتیوپیس

گونه مورد مطالعه	درصد آیشویی بتاکاروتن-لینولئیک اسید	
	میانگین	
	زمان (دقیقه)	
	۶۰	۱۲۰
<i>S. aethiopsis</i>	$52/53 \pm 2/3^a$	$50/17 \pm 1/8^a$

* تفاوت میان اعداد با حروف غیر مشابه در ستون در سطح ($P \leq 0/05$) معنی‌دار است.

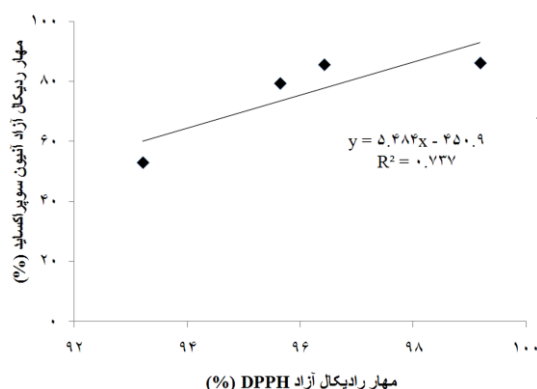
ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آنیون سوپراکساید

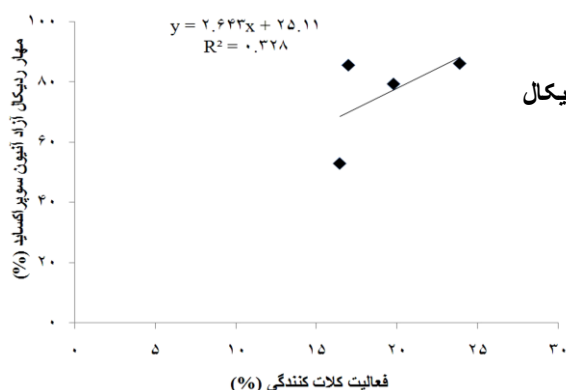
آنیون سوپراکساید به‌طور غیرمستقیم اکسیداسیون لیپید را آغاز می‌کند که نتیجه آن تولید سوپراکسید و هیدروژن پراکسید است که خود ذخیره‌ای برای تولید رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن هستند [۲۹]. نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه بررسی شده با استفاده از روش سنجش فعالیت مهار رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید در جدول ۴ ارائه شده است. گونه بررسی شده فعالیت مهارکنندگی خوبی در برابر رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید نشان داد. در شکل ۲ رابطه میان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH و مهار رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید و در شکل ۳ رابطه میان فعالیت کلات‌کنندگی فلزات و مهار رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید ارائه شده است.

جدول ۴. درصد فعالیت مهار رادیکال آنیون سوپراکساید به وسیله عصاره گونه سالویا اتیوپیس

	غلظت (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)				میانگین
	۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱	
<i>S. aethiopsis</i>	$53/00 \pm 1/2^a$	$85/70 \pm 2/3^b$	$79/46 \pm 3/4^c$	$86/15 \pm 2/9^b$	$76/83^a$
تولون هیدروکسی بوتیلین	$46/18 \pm 1/5^a$	$45/05 \pm 1/2^a$	$45/67 \pm 2/6^a$	$45/10 \pm 2/9^b$	$55/19^b$

* تفاوت میان اعداد با حروف غیر مشابه در ستون در سطح ($P \leq 0/05$) معنی‌دار است.





شکل ۳. رابطه میان فعالیت کلات‌کنندگی فلزات و مهار رادیکال آزاد آنیون سوپراکساید در عصاره گونه سالویا اتیوپیس

ترکیبات روغن‌های ضروری

ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن‌های ضروری این گونه به‌همراه زمان بازداری و درصد مربوط به هر ترکیب در جدول ۵ ارائه شده است. در این گونه ۱۱ ترکیب شناخته شد که ۱۰۰ درصد ترکیب روغن‌های ضروری را شامل می‌شوند. آلفا-کوپاین (۳۳/۴۷۹ درصد)، ترانس-کاریوفیلن (۲۰/۰۸ درصد) و جرماکرن D (۱۹/۰۸۵ درصد) فراوان‌ترین ترکیبات روغن‌های ضروری این گونه را تشکیل می‌دهند. در مجموع بیش از ۵۰ درصد ترکیبات روغن‌های ضروری گونه بررسی شده را سزکویی‌ترین‌ها تشکیل می‌دهند.

جدول ۵. نوع و درصد ترکیبات موجود در روغن‌های ضروری سالویا اتیوپیس

شماره	ترکیب	زمان بازداری	درصد
۱	α -Cubebene	۱۸/۸۲۱	۱/۲۴۳
۲	α -Copaene	۱۹/۳۷۲	۳۳/۷۴۹
۳	β -Bourbonene	۱۹/۴۹۸	۰/۹۱۲
۴	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	۱۹/۵۸۴	۸/۹۹۱
۵	Isolongifolene, 9,10-dehydro-	۱۹/۸۶۷	۰/۵۳۵
۶	trans-Caryophyllene	۲۰/۱۲۴	۲۰/۰۸۰
۷	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	۲۰/۲۷۰	۱/۰۸۴
۸	α -Humulene	۲۰/۶۷۳	۷/۷۶۰
۹	Germacrene-D	۲۱/۰۸۵	۱۹/۰۸۵
۱۰	δ -Cadinene	۲۱/۶۹۳	۳/۸۸۰
۱۱	(-)-Caryophyllene oxide	۲۲/۵۷۶	۲/۲۳۲
۱۲	1-H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-, 4a...	۲۶/۱۱۸	۰/۶۲۸

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره گونه سالویا اتیوپیس در برابر ۶ سویه باکتری گرم مثبت و منفی در جدول ۶ ارائه شده است. عصاره مذکور بر روی باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *باسیلوس مگاتریوم*، *باسیلوس سرئوس*، *سراشیا مارسیننس* و *به‌ویژه پروتئوس و لگاریس* مؤثر بوده است. گرچه روغن‌های ضروری گونه بررسی شده هیچ‌گونه فعالیت مهاری در برابر باکتری‌های بررسی شده نشان نداد.

جدول ۶. فعالیت ضد باکتریایی عصاره سالویا اتیوپیس در برابر ۶ سویه باکتری گرم مثبت و منفی

ناحیه ممانعت بر حسب (میلی‌متر) در غلظت‌های مختلف عصاره (میلی‌گرم / میلی‌لیتر)	باکتری			
کنترل منفی (DMSO)	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰
<i>Proteus vulgaris</i> (-)	Na	۸ ± ۰/۱۸ ^c	۱۱ ± ۰/۲۳ ^b	۱۹ ± ۰/۸۴ ^a
<i>Escherichia coli</i> (-)	Na	Na	۷ ± ۰/۰۰ ^b	۱۱ ± ۰/۳۳ ^a
<i>Bacillus cereus</i> (+)	Na	Na	۷ ± ۰/۰۰ ^b	۱۱ ± ۰/۱۶ ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	Na	Na	Na	Na
<i>Bacillus megaterium</i> (+)	Na	Na	Na	۷ ± ۰/۱۸
<i>Serratia marcescens</i> (-)	Na	Na	Na	۷ ± ۰/۰۰

* تفاوت میان اعداد با حروف غیرمشابه برای هر باکتری در غلظت‌های مختلف در سطح ($P \leq 0.05$) معنی‌دار است.
Na = غیرفعال در برابر باکتری بررسی شده.

بحث

نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که ترکیبات فنلی موجود در گیاهان یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند [۳۰]. آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی گروه ویژه‌ای از متابولیت‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند که نقش مهمی در حفاظت بافت‌ها در مقابل اثرات اکسیدکنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر گونه‌های فعال ایفا می‌کنند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به مقدار ترکیبات پلی‌فنلی آن‌ها بستگی دارد و مهم‌ترین پلی‌فنل‌ها به گروه فلاونوئیدها تعلق دارند [۳۱]، [۳۲]، [۳۳]. فلاونوئیدها به لحاظ ساختار فنلی خود پتانسیل آنتی‌اکسیدانی دارند [۳۴]. گونه بررسی شده در این تحقیق دارای محتوای چشمگیری از ترکیبات فنلی است که می‌تواند مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیاد این گیاه در سنجش‌های آنتی‌اکسیدانی به روش‌های مختلف انجام شده در این پژوهش باشد. توسن^۱ و همکاران (۲۰۰۹) محتوای فنل سالویا اتیوپیس را بررسی کردند و میزان آن را ۸۲/۱ میلی‌گرم بر گرم گزارش کردند که بیش‌تر از محتوای فنل گونه بررسی شده (10.30 ± 0.57 میلی‌گرم بر گرم) در این تحقیق است. این تفاوت ممکن است حاکی از شرایط جغرافیای متفاوت حاکم بر زیستگاه گونه بررسی شده باشد که بر میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه مؤثر است [۱۵]. در سیستم DPPH، آنتی‌اکسیدان‌ها با رادیکال آزاد DPPH واکنش داده و آن را کم‌رنگ یا بی‌رنگ می‌کنند. مقدار کاهش رنگ با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی نمونه رابطه مستقیمی دارد. چندین تحقیق در مورد پتانسیل آنتی‌اکسیدانی سالویا اتیوپیس به روش مهار رادیکال آزاد DPPH صورت گرفته است که نتایج این تحقیقات با یک‌دیگر و با این تحقیق متفاوت است [۱۴]، [۱۵]، [۱۶]. این تفاوت ممکن است منعکس کننده تفاوت‌های جمعیتی است و حاکی از اثر شرایط زیستگاهی متفاوت بر میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه باشد. در سیستم کلات‌کنندگی فلزات، فلز موجود در مخلوط با فروزین وارد واکنش شده و رنگ قرمز را تولید می‌کند، در این سیستم آنتی‌اکسیدان‌ها فلز موجود در مخلوط واکنش را کلات کرده و آن را از فروزین جدا می‌کنند این امر باعث می‌شود که رنگ ایجاد شده زایل

^۱. Tuson

گشته و مخلوط واکنشی کم‌رنگ یا بی‌رنگ شود. میزان کاهش رنگ با قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه رابطه مستقیمی دارد. تا کنون گزارشی از فعالیت کلات‌کنندگی فلز در گونه بررسی شده وجود ندارد. در مجموع گونه سالویا *اتیوپیس* دارای فعالیت کلات‌کنندگی بیش‌تری نسبت به اسیدآسکوربیک به عنوان کنترل مثبت است. از طرفی رابطه معنی‌داری میان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره گونه بررسی شده به روش کلات‌کنندگی فلزات و روش مهار رادیکال آزاد DPPH وجود دارد که نشان می‌دهد ترکیباتی که در عصاره با افزایش رقت باعث افزایش فعالیت کلات‌کنندگی شدند، ممکن است همان ترکیباتی باشند که باعث مهار رادیکال آزاد DPPH در این تحقیق شدند. تپ^۱ و همکاران (۲۰۰۶) و همچنین توسن و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره سالویا *اتیوپیس* را با استفاده از روش سنجش مهار بی‌رنگ‌شدگی بتاکاروتن-لینولئیک‌اسید بررسی کردند و به‌ترتیب مقدار آن را $2/5 \pm 0/29\%$ و $70/4\%$ گزارش کردند که تفاوت با یک‌دیگر و با گونه بررسی شده (با مقدار $51/96\%$) از ایران است. همچنین گونه سالویا *اتیوپیس* فعالیت مهارکنندگی خوبی در برابر رادیکال آزاد آنیون‌سوپراکساید نشان داد و پتانسیل مهاری بیش‌تری نسبت به بوتیل‌تد‌هیدروکس تولوئن (BHT) به‌عنوان کنترل مثبت داشت. تا کنون گزارشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال آزاد آنیون‌سوپراکساید بر روی گونه بررسی شده وجود ندارد. رابطه معنی‌داری میان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره به مهار رادیکال آزاد DPPH و روش مهار رادیکال آزاد آنیون‌سوپراکساید وجود نداشت. این در حالی است که رابطه معنی‌داری میان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به روش کلات‌کنندگی و روش مهار رادیکال آزاد آنیون‌سوپراکساید وجود دارد. در بررسی ترکیبات روغن‌های ضروری گونه بررسی شده ۱۱ ترکیب شناسایی شد که آلفا-کوپاین با فراوانی $33/48\%$ بیش‌ترین ترکیب روغن‌های ضروری را تشکیل می‌دهد. ترکیبات شاخص دیگر با میزان فراوانی بیش از ۱۰ درصد شامل آلفا-کوپاین ($33/479\%$)، ترانس-کاریوفیلین ($20/080\%$)، جرماکرن D ($19/085\%$) و (+)-اپی-بی سیکلو سزکوئی فیلاندرن ($10/075\%$) هستند. ویل کوویک^۲ و همکاران (۲۰۰۳) ترکیبات روغن‌های ضروری گونه سالویا *اتیوپیس* از صربستان را بررسی و گزارش کردند که در بین ترکیبات شناسایی شده روغن‌های ضروری این گونه بتا-کاریوفیلین ترکیب عمده را تشکیل می‌دهد که با نتایج این پژوهش تطابق ندارد [۶]. این تفاوت نیز می‌تواند ناشی از شرایط متفاوت جغرافیایی و فصلی و زیست‌گاهی این گونه در ایران و صربستان باشد.

گیاهان واجد خواص ضد میکروبی با مکانیسم‌هایی مختلف و متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند. این امر لزوم تحقیقات جامع‌تر در زمینه گیاهان دارویی را نشان داده است و افزایش روزافزون مقالات منتشر شده در زمینه خواص ضد میکروبی گیاهان را توجیه می‌کند [۳۵]. گزارش‌هایی در مورد اثرات متوسط تا زیاد عصاره گونه‌های مریم گلی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی وجود دارد [۳۶]. در این پژوهش عصاره گونه بررسی شده بر روی اکثر باکتری‌ها دارای اثر مهاری کم تا متوسط بود، ولی دارای اثر

۱. Tape

۲. Velickovic

مهارت بسیار چشمگیری در برابر باکتری پروتئوس و لگاریس نشان داد. بررسی خواص ضد باکتریایی با مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری را در رقت‌های مختلف به‌کار برده شده از عصاره برای هر باکتری نشان داد که حاکی از آن است که با افزایش غلظت عصاره، غلظت ماده مؤثر در ممانعت از رشد باکتری نیز افزایش می‌یابد. گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان‌دهنده خواص ضد میکروبی و ضد قارچی روغن‌های ضروری است. ترکیباتی مانند سبینول، کامفور، لینالول، آلفا پینن، بتا پینن، برنئول، کارون، لیمونن، کارواکرول، سیمن، کامفن و آلفا ترپینئول که در روغن‌های ضروری اندام‌های مختلف گیاهی وجود دارند از عوامل اصلی مؤثر در خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی گیاهان است [۳۷]. روغن‌های ضروری گونه بررسی شده فاقد ترکیبات یاد شده است که احتمالاً فعالیت ضد باکتریایی نداشتن آن به همین دلیل است، که این خود تأییدی بر تحقیقات انجام شده قبلی است. به هر حال کاربرد بالینی این گیاه در آینده نیازمند پژوهش‌های بیشتر و وسیع‌تر است که در صورت موفقیت‌آمیز بودن و استانداردسازی نتایج حاصل می‌توان از این گیاه به عنوان جایگزین برای داروهای آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی کم‌اثر فعلی استفاده کرد.

منابع

۱. احمد قهرمان، کروموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی)، چاپ اول، مرکز نشر دانشگاهی، تهران (۱۳۷۳).
2. M. Kelen, B. Tepe, "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora", *Bioresource Technol.*, 99 (2008) 4096-4104.
۳. رضا امیدبیگی، تولید و فراوری گیاهان دارویی، جلد اول، انتشارات آستان قدس رضوی (۱۳۸۴) ۳۴۶.
4. N. C. Cook, S. Samman, "Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources", *Nutritional Biochemistry*, 7 (1996) 66-76.
5. J. T. Kumpulainen, T. J. Salonen, "Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease", *The Royal Society of Chemistry*, 3 (1999) 178-187.
6. D. Velickovic, M. Ristic and A. J. Velickovic, "Chemical composition of the essential oils obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia aethiopis* L. and *Salvia glutinosa* L. originating from the southeast region of Serbia", *Journal of Essential Oil Research*, 14 (2003) 453-458.
7. L. Pham-Huy, H. He and C. Pham-Huy, "Free Radicals, antioxidants in disease and health", *Nutr. Int. J. Biomed. Sci.*, 4 (2008) 89-96.

8. R. S. Farag, A. Z. M. A. Badei, F. M. Hewedi and G. S. A. El-Baroty, "Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media", *JAOCS.*, 66 (6) (1989) 92-799.
9. U. Bracco, J. Loliger and J. L. Virret, "Production and use of natural antioxidants", *JAOCS.*, 54 (1981) 686-690.
10. H. Raghavendra, B. Vijayananda, G. Madhumathi and A. Hiremath, "*In vitro* antioxidant activity of *Vitex negundo* L. leaf extracts", *Chiang Mai J Sci.*, 37 (3) (2010) 489-497.
11. A. Chanwitheesuk, A. Teerawutgularg and N. Rakariyatham, "Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand", *Food Chemistry*, 92 (2005) 491-497.
12. H. Schroeter, C. Boyd, J. P. E. Spencer, R. J. Williams, E. Cadenas and C. M. A. P. K. Rice-Evans, "Signaling in neurodegeneration: Influence of flavonoids and of nitric oxide", *Neurobiol. Aging.*, 23 (2002) 861-880.
13. Y. Abiy, D. Solomon, O. M. Jacob, C. B. Christine, H. Matthias and G. P. Martin, "Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burti*", *Fitoterapia*, 96 (2005) 496-499.
14. B. Tape, M. Sokmen, H. A. Akpulat and A. Sokmen, "Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey", *Food Chemistry*, 95 (2006) 200-204.
15. M. Tosun, S. Ercisli, M. Sengul, H. Ozer, T. Polat and E. Ozturk, "Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey", *Biological Research*, 42 (2009) 175-181.
16. F. S. Senol, I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman, M. Dogan, G. Yilmaz and B. Sener, "Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities", *Food Chemistry*, 120 (2010) 34-4.
17. M. Hernandez-Perez, R. M. Rabanal, A. Arias, M. C. de La Torre and B. Rodriguez, "Aethiopinone, an antibacterial and cytotoxic agent from *Salvia aethiopsis* roots", *Pharmaceutical Biology*, 37 (1999) 17-21.
18. S. Mc Donald, P. D. Prenzler, M. Autolovich and K. Robards, "Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts", *Food Chemistry*, 73 (2001) 73-84.

19. S. Stojicevic, I. Stanisavljevic, D. Velickovic, V. Veljkovic and M. Lazic, "Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques", African Journal of the Serbian Chemical Society, 73 (2008) 597-607.
20. T. C. P. Dinis, V. M. C. Madeira and M. L. M. Almeida, "Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers", Arch. Biochem. Biophys, 315 (1994) 161-169.
21. R. Amarowicz, R. B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl and J. A. Weil, "Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies", Food Chemistry, 84 (2004) 551-562.
22. H. E. Miller, "A simplified method for the evaluation of antioxidants", J. Am. Oil Chem. Soc., 48 (1971) 91.
23. M. Nishimiki, N. A. Rao and K. Yagi, "The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen", Biochemical and Biophysical Research Communication, 46 (1972) 849-853.
24. O. A. Awoyinka, I. O. Balogun and A. A. Ogunnowo, "Phytochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae)", Journal of Medicinal Plants Research, (2007) 63-65.
25. R. J. Gryglewski, R. Korbut and J. Robak, "On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids", Biochemical Pharmacology, 32 (1987) 661-667.
26. A. Wojdyło, J. Oszmian'ski and R. Czemerys, "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs", Food Chemistry, 105 (2008) 940-949.
27. E. Frankel, Nutritional benefits of flavonoids, "International Conference on Food Factors: Chemistry and Cancer Prevention", Hamatsu, Japan (1995) Abstract C6-2.
28. M. R. Mc Call and B. Frei, "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?", Free Radical Biology Medicine, 26 (1999) 1034-1053.
29. T. Okuda, Y. Kimura, T. Yoshida, T. Hatano, H. Okuda and S. Arichi, "Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs, I. Inhibitory effects on lipid peroxidation on mitochondria and microsomes of liver", Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 31 (1983) 1625-1631.

30. F. Shahidi, "Antioxidants in food and food antioxidants", Mol. Nutr. Food Res., 44 (2000) 158-163.
 31. E. R. Stadtman, "Protein oxidation and aging", Science, 257 (1992) 1220-1224.
 32. B. M. Ames, M. K. Shigena and T. M. Hagen, "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging", Proc. Natl. Acad. Sci., 90 (1993) 7915-7922.
 31. E. Pichersky and D. R. Gong, "Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective", Trends Plants Science, 5 (2000) 439-445.
 32. P. Marja and M. Heinonen, "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47 (1999) 3954-3962.
 33. S. Bahramikia and R. Yazdanparast, "Antioxidant and free radical scavenging activities of different-fractions of *Anethum graveolens* leaves use *in vitro* models", Pharmacol., 2 (2008) 233-239.
 34. T. Ceechini, "Encyclopedie des Plantes Medicinalis", Paris (1979).
 35. F. Shahidi and P. K. J. P. D. Wanasundara, "Phenolic antioxidants, Critical Reviews in Food Science and Nutrition", 32 (1992) 67-103.
 36. 21. D. Miti., B. Vukovi-Gai, J. Knezevi-Vukevi, S. Stankovi and D. Simi, "Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.)", Arch. Biol. Sci., Belgrade, 57 (2005) 173-178.
۳۷. محمدامین سلطانی‌پور، مقایسه ترکیب‌های اسانس برگ گیاه مورخوش جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان هرمزگان در مراحل مختلف رشد و بررسی پتانسیل آلوپاتینک و خواص ضد میکروبی اسانس استخراج شده، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، رشته علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز (۱۳۸۱).