DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106137

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۱، صفحه ۷۰-۶۰ (۱۳۹۵)

تأثیر نگهداری طولانی‌مدت اسانس ترخون (*Artemisia dracunculus* L.) بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و LD_{50} آن

قادر جلیل‌زاده امین[1*]، نجمه شمشیری[2] و جواد علی‌اکبرلو[3]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران، پست الکترونیک: g.jalilzadeh@urmia.ac.ir

۲- دانش‌آموخته دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

۳- استادیار، بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۳

چکیده

داروهای گیاهی به‌دلیل طبیعی بودن ترکیب‌های سالمی هستند ولی عوارض سوئی به دنبال استفاده بی‌رویه از آنها اتفاق می‌افتد. هدف این پژوهش ارزیابی سمّیت حاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ترخون (*Artemisia dracunculus* L.) می‌باشد. اسانس ترخون توسط دستگاه کلونجر با روش تقطیر با آب استخراج شد. تمام پروتکل‌های آزمایش برای اسانس تازه و اسانس کهنه که به مدت سه ماه در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده بود، انجام گردید. میزان LD_{50} براساس روش لورک و با روش آنالیز احتمال و Maximum Likelihood با استفاده از نرم‌افزار MINITAB تعیین شد. برای بررسی مسمومیت حاد و تغییرات رفتاری ایجاد شده از دوزهای (mg/kg) ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰،۱۶۰۰،۲۹۰۰ و ۵۰۰۰ اسانس (به روش خوراکی و تزریق داخل صفاقی) استفاده گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس دوزهای مختلف (۱-۳۲mg/ml)، با بهره‌گیری از دو روش DPPH و ABTS ارزیابی شد. مقدار LD_{50} برای اسانس ترخون تازه و کهنه در روش خوراکی به‌ترتیب بیشتر از ۵g/kg و ۳۸۰۱/۳۳mg/kg وزن بدن بود. با تزریق داخل صفاقی مقدار LD_{50} برای اسانس تازه و اسانس کهنه به‌ترتیب ۴۸۱۰/۰۶ و ۳۰۱۳/۳۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد. اسانس تازه فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری را در مقایسه با اسانس کهنه در هر دو روش ارزیابی نشان داد. یافته‌های اولیه این تحقیق نشان می‌دهد که اسانس این گیاه غیر سمّی بوده و دارای ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانتی است که مؤید استفاده از این گیاه در طب سنتی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سمّیت حاد، زمان نگهداری، ترخون (*Artemisia dracunculus* L.)، آنتی‌اکسیدان.

مقدمه

یکی از بزرگترین جنس‌های خانواده آستراسه (Asteraceae) گیاهان جنس ترخون (*Artemisia*) می‌باشند که به‌طور وسیعی در نیمکره شمالی کره زمین گسترش پیدا کرده‌اند (Deans & Simpson, 2002)، به‌طوری‌که ۳۴ گونه از گیاهان به‌صورت بومی در ایران شناسایی شده‌اند. گونه گیاهی *Artemisia dracunculus* در ایران به نام ترخون شناخته شده‌است. عصاره اتانولی تهیه شده از ترخون برای درمان هیپرگلیسمی ناشی از دیابت استفاده می‌شود، به‌نحوی که با داشتن اثر ضد

هیپرلیپیدمی بر موش صحرایی، مصرف عصاره ترخون باعث کاهش ۱۵ درصدی کلسترول سرم و ۲۰ درصدی تری‌گلیسریدهای خون شده است (Ribnicky *et al*., 2004). ویژگی ضدمیکروبی گونه‌های مختلفی از ترخون ثابت شده‌است، به‌طوری که مانع از رشد تعداد زیادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌گردد (Mehrotra *et al*., 1993). گزارش‌های علمی وجود اثرات ضدقارچی (Mehrotra *et al*., 1993؛ Kordali *et al*., 2005) اسانس گیاه مذکور را تأیید کرده‌اند. همچنین از این گیاه در درمان مشکلات گوارشی و اختلالات هضمی، تهوع، نفخ و سکسکه استفاده می‌شود (Mehrotra *et al*., 1993).

خاصیت دورکنندگی اسانس ترخون نسبت به حشرات و آفات گیاهی (نوری قنبلانی و همکاران، ۱۳۸۹) فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Sharafati Chaleshtori *et al*., 2013؛ Ayoughi *et al*., 2011)، تأثیر ضدباکتریایی (Raeisi *et al*., 2012؛ Sharafati Chaleshtori *et al*., 2013) و اثرات ضددردی و ضداسپاسمی (Maham *et al*., 2014) اسانس ترخون مورد ارزیابی قرار گرفته است.

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامتی جوامع به لحاظ درمان و پیشگیری از بیماریها برخوردار هستند. استفاده از خاصیت آنتی‌اکسیدانتی گیاهان دارویی یکی از این موارد می‌باشد. فرایند استرس اکسیداتیو در اثر فعالیت رادیکال‌های آزاد عامل ایجاد بیماری‌های زیادی ازجمله انواع سرطان‌ها، بیمارهای قلبی عروقی، دیابت، آلزایمر و همچنین روند پیری محسوب می‌گردد که آنتی‌اکسیدان‌ها باعث مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش سرعت واکنش‌های اکسیداتیو می‌شوند (Jang *et al*., 2010). آنتی‌اکسیدانت‌ها با هدف جلوگیری از اثرات مضر رادیکال‌های آزاد بیشتر مورد توجه هستند و این در حالیست که آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی به‌دلیل اثرات جانبی کمتر، نسبت به انواع سنتتیک در اولویت می‌باشند (Abdalla & Roozen., 1999) و به همین دلیل مطالعات گسترده‌ای برای شناسایی خواص آنتی‌اکسیدانتی گیاهان انجام شده‌است.

اگرچه بسیاری از مصرف‌کنندگان اعتقاد دارند که داروهای گیاهی به‌دلیل طبیعی بودنشان داروهای بسیار مناسب و سالمی هستند ولی مشکلات عدیده‌ای به‌دنبال استفاده بی‌رویه از منابع داروهای گیاهی اتفاق می‌افتد، به‌طوری که کاهش ۳۰ درصدی در ادامه بارداری در اثر مصرف برخی از گیاهان دارویی گزارش شده‌است (Boivin & Schmidt, 2009) و یا برخی گیاهان با سیتوکروم P_{450} که یک آنزیم مهم برای متابولیسم دارویی است، تداخل دارند (Elvin-Lewis, 2001). بنابراین کسب اطلاعات جامع در مورد اثرات مفید و مضر اسانس‌ها، ضروری می‌باشد که هدف اصلی استاندارد کردن و اطمینان بخشیدن برای بی‌خطر بودن این دسته از ترکیب‌های طبیعی می‌باشد. تعیین LD_{50} روشی برای اندازه‌گیری قابلیت سمّیت‌زایی کوتاه‌مدت یک ماده می‌باشد و به‌عنوان یک ابزار ساده برای طبقه‌بندی مواد شیمیایی در لیست مواد سمّی استفاده می‌گردد (Lorke, 1983؛ Loomis & Hayes, 1996).

در مورد سمّیت اسانس در پستانداران گزارش‌های فراوانی وجود دارد. به‌طوری که در سگ‌ها و گربه‌های تحت درمان با اسانس درخت چای (*Melaleuca*) اثرات سمّی مانند دپرسیون، ضعف و ترمور عضلانی مشاهده شده است (Vigan, 2010). اسانس گیاه *Saliva officinalis* دارای اثرات سمّی می‌باشد که مربوط به حضور کامفور و آلفا و بتا-توجون می‌باشد (Millet *et al*., 1981). البته تأثیر سرطان‌زایی یا آسیب رساندن به DNA توسط استراگول و متابولیت‌های آن (ترکیب‌های داخل اسانس) مشخص شده است (Vigan, 2010). همچنین در موش سوری اسانس *Mentha pulegium* که غنی از ترکیب (+)-pulegone می‌باشد اثرات سمّی بر روی کبد ایجاد می‌کند (Gordon *et al*., 1982). در این مطالعه، علاوه‌بر ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی، سمّیت حاد اسانس تازه و کهنه ترخون (*A. dracunculus*) تعیین شده‌است.

مواد و روشها

حیوانات مورد مطالعه

۷۰ سر موش سوری با محدوده وزنی ۲۳-۲۰ گرم از هر دو جنس نر و ماده از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد.

آماده‌سازی گیاه و تهیه اسانس

گیاه تازه ترخون (*A. dracunculus*) از بازار تره‌بار خریداری شد، سپس در معرض هوا و در محل سایه خشک گردید. گیاه مورد استفاده در این مطالعه در واحد تاکسونومی بخش بیولوژی گیاهی در دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس شناسایی شد.

برای اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در داخل دستگاه کلونجر به مدت ۳/۵ ساعت قرار داده شد (Sharma & Tripathi, 2008). در راستای محافظت اسانس در برابر نور، روغن فرّار تهیه شده در بطری‌های شیشه‌ای سیاه رنگ در داخل یخچال ۴°C نگهداری شد. نمونه‌ای از اسانس که در روز بعد از اسانس‌گیری مورد آزمایش قرارگرفت به‌عنوان اسانس تازه و نمونه بعدی که ۳ ماه بعد از نگهداری در داخل محیط آزمایشگاه استفاده شد، به‌عنوان اسانس کهنه مطالعه گردید.

آماده‌سازی موش‌های سوری

حیوانات در شرایط محیطی استاندارد و با دسترسی آزاد (ad libitum) به آب و غذا (دان مخصوص از شرکت دان پارس-تهران) و با ۱۲ ساعت چرخه روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. حیوانات مورد آزمایش به مدت دو هفته برای سازش (acclimatization) با محیط کار به محل آزمایشگاه حمل شده و مراحل آزمایش را به شکل نمایشی تجربه کردند. روش کار این تحقیق توسط کمیته اخلاقی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده دامپزشکی ارومیه مورد تأیید قرار گرفته است.

روش تعیین مقدار LD50 و بررسی مسمومیت حاد برای اسانس ترخون

در تمام مراحل اثرسنجی، اسانس گیاه در محلول ۲٪ توین ۸۰ رقیق شد. مقدار LD_{50} با استفاده از روش لورک محاسبه گردید (Lorke, 1983). تعیین LD_{50} در این روش در دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول محدوده دوز سمی که اثرات مسمومیت را ایجاد می‌کند محاسبه می‌گردد و در مرحله دوم دوزهای اختصاصی برای محاسبه LD_{50} تجویز می‌گردد. براساس توصیه مقاله مذکور سه حیوان برای هر گروه در نظر گرفته شد. تغییرات رفتاری یا نشانه‌های بالینی و نیز مرگ و میر مشاهده شده ثبت گردید. حیوانات در این بررسی به مدت چهارده روز پیاپی تحت مراقبت بودند. وزن بدنی حیوانات در روز اول بررسی و نیز در چهاردهمین روز اندازه‌گیری شده و ثبت گردید. تعیین مقدار LD_{50} با دو روش خوراکی و داخل صفاقی در مورد اسانس تازه و اسانس کهنه انجام شد.

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ترخون با روش DPPH

محلول DPPH با حل کردن پودر آن در متانول تهیه شد. غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس ترخون با حل کردن آن در متانول تهیه گردید. این روش برای ارزیابی اسانس تازه و کهنه به‌کار برده شد.

دو میلی‌لیتر از محلول DPPH۰/۰۰۴٪ به ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس اضافه شد. پس از یک ساعت در دمای اتاق و تاریکی جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Espin *et al*., 2000). از هر غلظت سه تکرار گذاشته شد، BHT هم با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان کنترل مثبت تهیه و استفاده گردید.

درصد پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$RSA\ \% = [(A\ blank - A\ sample)/A\ blank] \times 100$$

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ترخون با روش ABTS

برای تهیه رادیکال ABTS (3-) azinobis (ethylbenzothiazolin-6sulfonic acid) ابتدا یک محلول آبی از ABTS به غلظت ۷ میلی‌مول تهیه و به این محلول پتاسیم پرسولفات اضافه شد تا غلظت نهایی آن به ۲/۴۵ میلی‌مول در محلول برسد. محلول حاصل در شرایط دمای اتاق و تاریکی به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. در این مدت از اکسیداسیون مولکول ABTS با پتاسیم پرسولفات، رادیکال کاتیون ABTS تولید شد که در حضور آنتی‌اکسیدان احیا می‌شود. غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با حل کردن اسانس در اتانول تهیه شد.

محلول ABTS با اتانول رقیق شد تا در طول موج ۷۳۴ نانومتر به طیف جذبی ۰/۷±۰/۰۲ برسد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها (غلظت‌های مختلف اسانس) با ۲ میلی‌لیتر از محلول +ABTS مخلوط شد، آنگاه جذب آن در ۷۳۴ نانومتر در زمان ۶ دقیقه بعد از مخلوط کردن خوانده شد (Miller *et al.*, 1993).

تجزیه و تحلیل آماری

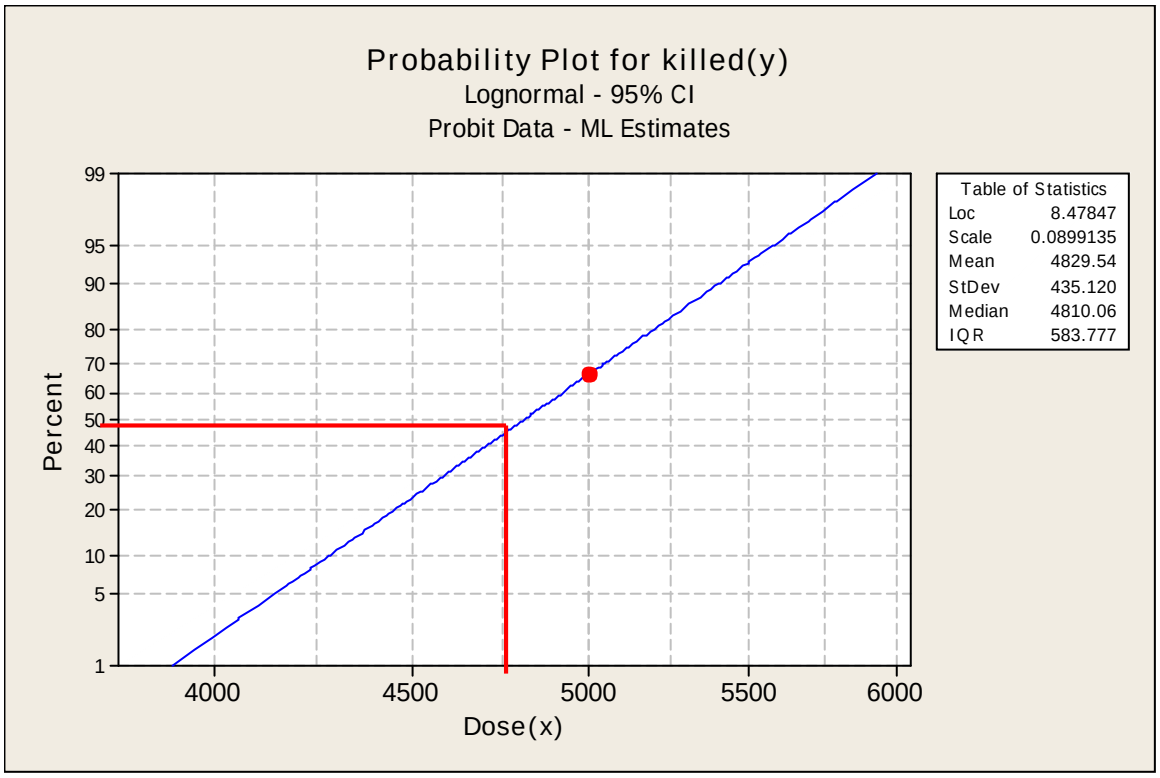
نتایج آزمایش‌های سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت Mean±SEM گزارش شده است. مقدار $p<0.05$ بین گروه‌های مورد آزمایش از نظر آماری معنی‌دار تلقی شده‌است. تحلیل آماری برای تعیین مقدار LD_{50} با استفاده از نرم‌افزار MINITAB statistic ver.15.0 انجام شده‌است. با وارد کردن نتایج بدست‌آمده از آزمایش‌های سنجش مسمومیت حاد مقدار دوز کشنده متوسط (LD_{50}) برای اسانس کهنه و تازه ترخون در روش خوراکی و داخل صفاقی با استفاده از Probit Analysis و روش تخمینی Maximum Likelihood محاسبه شد. مقدار دقیق دوز LD_{50} با رجوع به جدولهای صدک‌ها (Table of Percentiles) ثبت گردید.

نتایج

تعیین مقدار LD50 و بررسی مسمومیت حاد با اسانس ترخون

مقدار LD_{50} برای اسانس ترخون تازه و اسانس کهنه در روش خوراکی به‌ترتیب بیشتر از ۵g/kg و ۳۸۰۱/۳۳mg/kg وزن بدن تعیین شد. در تزریق داخل صفاقی اسانس ترخون (شکل ۱) مقدار LD_{50} برای اسانس تازه و اسانس کهنه به‌ترتیب ۴۸۱۰/۰۶ و ۳۰۱۳/۳۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد. چون اسانس تازه ترخون در روش خوراکی، هیچگونه تلفاتی در گروه‌های تحت بررسی نشان نداد، بنابراین نتایج مربوط به تعیین مقدار LD_{50} با نرم‌افزار قابل پیگیری نبود.

نتایج مربوط به بررسی تغییرات رفتاری یا نشانه‌های بالینی و نیز مرگ و میر مربوط به اثرات سمّی هر دو نوع اسانس تازه و اسانس کهنه ثبت گردید. مشاهدات نشان داد که تزریق محلول ۲٪ توین ۸۰ هیچ نوع تغییر رفتاری را ایجاد نکرد. تمامی موش‌های مسموم شده با دوزهای بالا یعنی ۲۹۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در فاصله زمانی ۷۲-۲ ساعت بعد از تزریق اسانس تلف شدند. تغییرات رفتاری مشاهده شده در این دسته از حیوانات شامل عدم تعادل، کاهش فعالیت حرکتی یا جابجایی، عدم تحرک، تنفس سطحی و سریع و زمین‌گیری جانبی بود که در نهایت با عدم پاسخ به رفلکس (Righting) دنبال می‌شد. در گروه مسموم شده با دوز ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به جای تنفس سطحی و سریع، تنفس عمیق مشاهده گردید. هیچ‌یک از حیوانات گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای پایین‌تر اسانس در طی آزمایش تلف نشدند و نشانه‌های بالینی همانند بروز اسهال، کاهش فعالیت و تنفس سطحی دیده شد که البته این نشانه‌ها در همان چند ساعت اول خودبه‌خود از بین رفتند. البته مقایسه وزن بدنی موش‌ها تفاوت معنی‌داری را نسبت به روز اول مطالعه نشان نداد. تمامی موش‌ها در پایان دوره مطالعه کالبدگشایی شدند که بررسی‌ها تغییرات مشهود بالینی (ماکروسکوپیک) را نشان نداد.



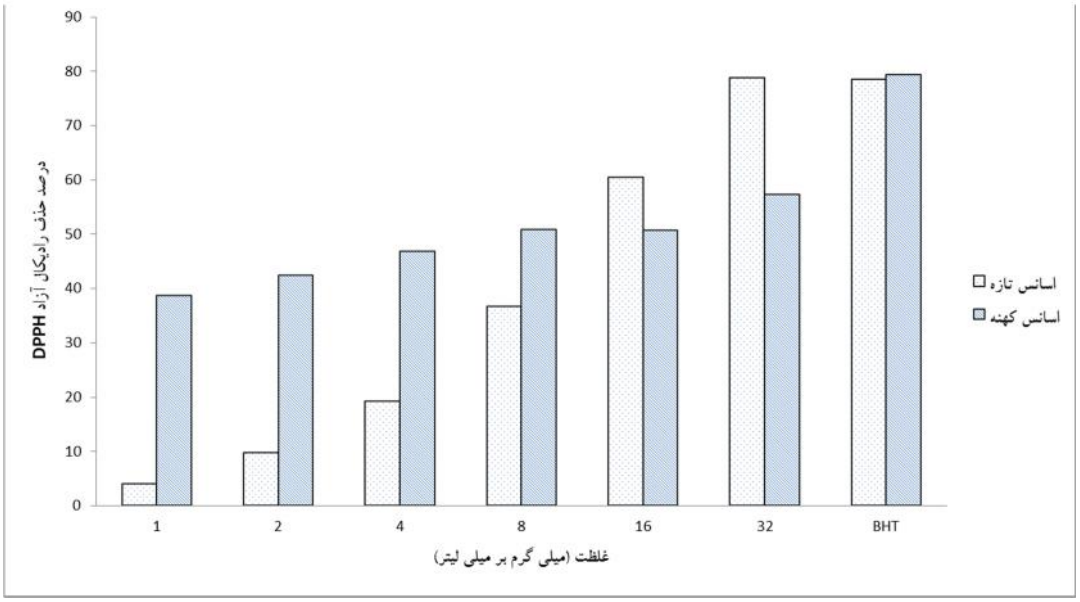
شکل ۱- تعیین مقدار دوز کشنده متوسط (LD_{50}) برای اسانس تازه ترخون (***Artemisia dranunculus***) در روش داخل صفاقی با استفاده از **Probit Analysis** و روش تخمینی (**Maximum Likelihood**)

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ترخون با روش DPPH

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند (شکل ۲) تأثیر اسانس تازه ترخون در دوزهای پایین‌تر به شکل غیرمعنی‌دار نمایان شده‌است، به‌طوری که دوزهای ۱-۴mg/ml اسانس در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتزی یعنی BHT باعث پاک‌سازی کمتر از بیست درصدی می‌گردد. البته با افزایش غلظت اسانس میزان تأثیر دوزهای اشاره شده به لحاظ آماری $p<0.05$ معنی‌دار بود. این روند افزایشی به شکل وابسته به دوز ادامه دارد تا اینکه در دوز ۳۲mg/kg مشاهده می‌کنیم که اثر مهاری در مقابل رادیکال های آزاد تقریباً مشابه اثر مهاری BHT می‌باشد ($p<0.05$). اسانس کهنه ترخون اثرات مهاری در مقابله با رادیکال های آزاد نشان نداد، به‌طوری که بالاترین دوز اسانس فقط تا ۵۰٪ می‌تواند رادیکال های آزاد را پاک‌سازی کند (شکل ۲).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس ترخون با روش ABTS

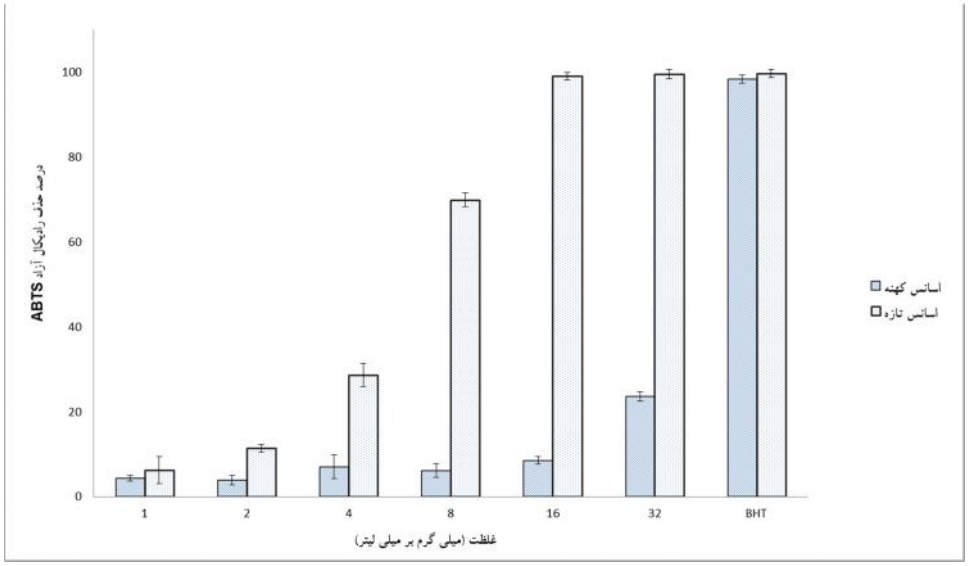
در شکل ۳، نتایج به حذف رایکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف اسانس ترخون تازه و ABTS نمایش داده شده‌است. تأثیر اسانس تازه ترخون در دوزهای پایین‌تر به شکل ناچیز و غیرمعنی‌دار نمایان شده است، به‌طوری که دوزهای ۱-۴mg/ml اسانس ترخون در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی یعنی BHT باعث پاک‌سازی کمتر از ۳۰ درصدی شده‌است. با افزایش غلظت اسانس میزان تأثیر دوزهای اشاره شده به لحاظ آماری ($p<0.05$) معنی‌دار بود. این روند افزایشی به شکل وابسته به دوز ادامه دارد تا اینکه در دوز ۳۲mg/kg و ۱۶ اثر مهاری در مقابل رادیکال‌های آزاد معنی‌دار ($p<0.05$) و تقریباً مشابه اثر مهاری BHT می‌باشد. همانطور که شکل ۳ نشان می‌دهد اسانس کهنه ترخون اثرات آنتی‌اکسیدانی معنی‌داری ($p<0.05$) در این روش بروز نداده و بیشترین مقدار اسانس هم توانایی پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد ABTS را ندارد.



شکل ۲- نتایج به‌دام‌اندازی رایکال‌های آزاد غلظت‌های مختلف اسانس ترخون تازه و کهنه و DPPH با غلظت ۱۰۰µg/ml در طول موج ۵۱۷ نانومتر

درصد کاهش رادیکال‌های آزاد طبق فرمول در مقایسه با گروه کنترل مثبت یا BHT با غلظت ۱mg/ml محاسبه گردید.

نتایج براساس means±SD و سه بار تکرار می‌باشد.



شکل ۳- نتایج حذف رادیکال‌های آزاد توسط غلظت‌های مختلف اسانس ترخون تازه، کهنه و ABTS با غلظت ۲/۴۵µg/ml در طول موج ۷۳۴ نانومتر

درصد کاهش رادیکال‌های آزاد طبق فرمول در مقایسه با گروه کنترل مثبت یا BHT با غلظت ۱mg/ml محاسبه گردید. نتایج براساس means±SD و سه بار تکرار می‌باشد.

بحث

براساس بررسی‌های سازمان بهداشت جهانی در حدود ۸۰–۷۰ درصد از جمعیت دنیا از عواید طب سنتی و عمدتاً از منابع گیاهان دارویی برای حفظ یا بدست آوردن سلامتی خود بهره‌مند می‌شوند. گرچه ممکن است عوارض نامطلوبی نیز توسط همین منابع دارویی ایجاد گردد ولی اثرات سمّی آنها کمتر بررسی شده‌اند. در راستای درمان بیماران و انتخاب دارو با منشأ گیاهی، موضوع بی‌خطر بودن آنها باید مورد توجه باشد، این اطلاعات در کنار منابع طب سنتی می‌تواند مفید تلقی شود (Tomlinson, 1998). یکی از این منابع گیاهی، ترخون (*A. dracunculus*) می‌باشد. بنابراین بررسی علمی اثرات سم‌شناسی استفاده از ترخون به شکل خوراکی که خیلی نزدیک با واقعیت می‌باشد برای تعیین یا تأکید بر بی‌خطر بودن آن به‌عنوان دارو خیلی کمک‌کننده خواهد بود.

در این پژوهش مشخص شد که اسانس ترخون (*A. dracunculus*) به روش خوراکی و داخل صفاقی حتی در دوزهای بالای ۱۰۰۰ mg/kg و ۲۰۰۰ غیرسمّی می‌باشد. مرگ و میر و نشانه‌های بالینی مسمومیت نیز در دوزهای بالای تجویز اسانس اتفاق می‌افتد. به‌طوری که درباره اسانس تازه تهیه شده ترخون، مقادیر LD_{50} برای روش خوراکی و روش تجویز داخل صفاقی به‌ترتیب ۵۰۰۰< و ۴۸۱۰ mg/kg تعیین شد و برای اسانس کهنه میزان LD_{50} به‌ترتیب در روش خوراکی و روش داخل صفاقی ۳۸۰۱/۳۳mg/kg و ۳۰۱۳/۳۳ محاسبه گردید. براساس طبقه‌بندی Loomis و Hayes (۱۹۹۶) موادی که میزان LD_{50} آنها بین ۵۰۰۰–۵۰۰mg/kg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باشد به‌عنوان مواد مختصر سمّی و یا غیرسمّی دسته‌بندی می‌شوند، بنابراین اسانس ترخون در این ردیف قرار می‌گیرد (Loomis & Hayes, 1996). به‌طور کلی تغییرات در وزن‌گیری بدنی در موش‌های درمان شده با هر ماده سمّی به‌عنوان یک معیار برای ارزیابی اثرات سوء آن ماده و یا دارو به حساب می‌آید، به‌ویژه اگر مقدار کاهش وزن بیشتر از ۱۰٪ وزن اولیه موش‌ها باشد (Jothy *et al.*, 2011). اسانس ترخون بعد از دو هفته، تغییرات وزنی در جهت کاهش وزن در موش‌ها ایجاد نکرد، در واقع دلیل دیگری مبنی بر بی‌خطر بودن این ماده می‌باشد.

عصاره آبی گونه *Artemisia afra* اثر سمّی بسیار پایین داشته و میزان LD_{50} در روش خوراکی و داخل صفاقی به‌ترتیب به میزان ۲/۴۵ و ۸/۹۶g/kg تعیین شده است. البته خوراندن طولانی‌مدت عصاره *A. afra* (1g/kg/day یا 0.1) به مدت سه ماه متوالی تغییرات رفتاری و یا هماتولوژیکی و بیوشیمیایی را در موش صحرایی ایجاد نکرد (Vigan, 2010؛ Mukinda & Syce, 2007). این در حالیست که مصرف خوراکی اسانس *A. afra* باعث نفریت هموراژیک و تغییرات دژنراتیو در کبد و ریه‌ها شده و در برخی مواقع باعث سقط جنین می‌گردد (Mukinda & Syce, 2007). عصاره اتانولی تهیه شده از ترخون روسیه‌ای با نام تجاری TARRALIN™ برای درمان هیپرگلیسمی ناشی از دیابت استفاده می‌شود و در مقادیر ۵۰۰۰mg/kg در موش رت سمّی نمی‌باشد، حتی مصرف طولانی‌مدت (۹۰ روز) آن با دوزهای بالا به خوبی توسط حیوانات تحمل می‌گردد. براساس اطلاعات موجود اثرات ناخواسته بر روی سلامتی انسان‌ها در دوزهای پایین حتی با دریافت روزانه هم نمی‌تواند مورد انتظار باشد (Ribnicky *et al.*, 2004). اسانس گیاهان *A. abyssinica* و *A. absinthium* اثرات سمّی بر روی سلول‌های لکومی مونوسیتیک (THP-1) و اریتروسیت‌های انسانی داشته است (Tariku *et al.*, 2010). تأثیر سرطان‌زایی یا آسیب رساندن به DNA توسط استراگول و متیل ایزواگونول (Millet *et al.*, 1981) و هپاتوتوکسیک بودن ترکیب پولگون (Gordon *et al.*, 1982) در مطالعات قبل اثبات شده‌است، با توجه به تجزیه اسانس (Jalilzadeh-Amin *et al.*, 2012) مشخص می‌گردد که مقدار هر دو ترکیب در اسانس ترخون مورد بررسی، بسیار بالا می‌باشد که می‌توان بخشی از اثرات سمّی گیاه را به این اجزاء مربوط دانست.

رادیکال‌های آزاد نقش عمده‌ای را در ایجاد تعداد زیادی از شرایط پاتولوژیکی مزمن همانند انواع سرطان‌ها و

بیماری‌های قلبی عروقی و غیره بازی می‌کنند. نتایج نشان داد که دوز پایین اسانس ترخون اثر آنتی‌اکسیدانی ضعیفی دارد. به‌طوری که نتیجه مشابهی از همین گونه گیاهی گزارش شده است (Kordali *et al*., 2005). همچنین اسانس ترخون توانایی آنتی‌اکسیدانی ضعیفی را در مقابله با اکسیداسیون لیولئیک اسید و رادیکال‌های DPPH نشان داده‌است (Lopes-Lutz *et al*., 2008). نظر بر این است که ترکیب‌های فنولی مثل تیمول و کارواکرول در سایر اسانس‌ها به مقدار کافی وجود دارند و اثر آنتی‌اکسیدانی خیلی قوی را مربوط به حضور این اجزاء می‌دانند (Ruberto & Baratta, 2000). در مقابل اسانس ترخون غنی از ترکیب‌های غیرفنولی می‌باشد که به احتمال زیاد باعث بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف این گیاه می‌گردد (Lopes-Lutz *et al*., 2008). در مطالعه Ayoughi و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از دو آزمون DPPH و سامانه بتا-کاروتن/لینولئیک اسید، مشخص شد که اسانس ترخون قدرت آنتی‌اکسیدانی قوی را در پاکسازی رادیکال‌های DPPH اعمال می‌کند و سرعت اکسیداسیون روغن سویای خام را کاهش می‌دهد (Ayoughi *et al*., 2011). اسانس‌های گیاهان *A. santonicum*، *A. scoparia* و *A. vulgaris* در بحث پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد نقشی برابر با آنتی‌اکسیدانت استاندارد یعنی BHT داشته است. عصاره‌های متانولی *A. absinthium* L.، *A. arborescens* L.، *A. campestris* L. و *A. santonicum* L.، *A. scoparia* L.، *A. vulgaris* L. نیز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بودند که البته در مقایسه با فعالیت اسانس همان گیاه این میزان خیلی پایین می‌باشد (Erel *et al*., 2010). گونه‌های مختلف گیاهان درمنه *Artemisia* حاوی مقادیر فراوانی از ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی می‌باشند که مسئول بروز خصوصیات قوی آنتی‌اکسیدانی در این دسته از گیاهان محسوب می‌شوند (Shi *et al*., 2010).

همان‌طور که از نتایج بر می‌آید با گذشت زمان و نگهداری اسانس در شرایط آزمایشگاهی کاهش بسیار فاحش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس به‌وجود می‌آید. البته در منابع علمی کمتر به این مسئله پرداخته شده است و فقط در دو مطالعه که در روسیه انجام شده ارزیابی مشابهی وجود دارد. بدین‌ترتیب که نگهداری اسانس گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) در شرایط تاریکی نیز تغییرات بسیار جزئی در ترکیب‌ها و خصوصیات ارگانولپتیکی آن ایجاد می‌کند. اما نظر بر این است زمانی که اسانس‌ها تحت شرایط تابش نور قرار می‌گیرند تغییرات معنی‌داری در تبدیل شکلهای مختلف مونوترپن‌ها به‌وجود می‌آید (Misharina, 2001). محققان در سال‌های بعد اثرات مشابهی را در مورد اسانس گیاه مرزنگوش (*Majorana hortensis*) گزارش کردند (Misharina *et al*., 2003). بنابراین کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با گذشت زمان به فعل و انفعالات ترکیب‌های آن مربوط می‌گردد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که براساس این پژوهش اسانس ترخون یک ترکیب بی‌خطر می‌باشد و اسانس تازه اثرات آنتی‌اکسیدانی زیادی دارد که از فواید مصرف این گیاه بشمار می‌آید. باوجوداین، مطالعات بیشتر در راستای بررسی تأثیر نامطلوب اسانس ترخون به شکل مصرف طولانی‌مدت (مسمومیت تحت حاد و مزمن) قابل پیگیری است.

منابع مورد استفاده

- نوری قنبلانی، ق.، فتحی، س.ع.ا. و برمکی، م.، ۱۳۸۹. تأثیر برخی از اسانس‌های گیاهی روی رفتارهای تخمگذاری و تغذیه‌ای سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col.: Chrysomelidae). گیاه‌پزشکی (مجله علوم کشاورزی)، ۲۳(۲): ۹-۱.
- Abdalla, A.E. and Roozen, J.P., 1999. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. Food Chemistry, 64(3): 323-329.
- Ayoughi, F.M., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Naghdibadi, H., 2011. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. Journal of Agricultural Science and Technology, 13: 79-88.
- Boivin, J. and Schmidt, L., 2009. Use of complementary and alternative medicines associated

composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. Phytochemistry, 69(8): 1732-1738.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. Archive of Toxicology, 54(4): 275-287.
- Maham, M., Moslemzadeh, H. and Jalilzadeh-Amin, G., 2014. Antinociceptive effect of the essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*). Pharmaceutical Biology, 52(2): 208-212.
- Mehrotra, S., Rawat, A.K.S. and Shome, U., 1993. Antimicrobial activity of the essential oils of some Indian *Artemisia* species. Fitoterapia, 64: 65-68.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application tomonitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 84: 407-412.
- Millet, Y., Jouglard, J., Steinmetz, M.D., Tognetti, P., Joanny, P. and Arditti, J., 1981. Toxicity of some essential plant oils-clinical and experimental study. Clinical Toxicology, 18(12): 1485-1498.
- Misharina, T.A., Polshkov, A.N., Ruchkina, E.L. and Medvedeva, I.B. 2003. Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. Applied Biochemistry and Microbiology, 39(3): 353-358.
- Misharina, T.A., 2001. Effect of conditions and duration of storage on composition of essential oil from coriander seeds. Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologiia, 37(6): 726-732.
- Mukinda, J.T. and Syce, J.A., 2007. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. Journal of Ethnopharmacology, 112: 138-144.
- Raeisi, M., Tajik, H., Razavi Roohani, S.M., Maham, M., Moradi, M., Hajimohammadi, B., Naghili, H., Hashemi, M. and Mehdizadeh, T., 2012. Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. Iranian Journal of Microbiology, 4(1): 30-34.
- Ribnicky, D.M., Poulev, A., O'Neal, J., Wnorowski, G., Malek, D.E., Jäger, R. and Raskin, I., 2004. Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods. Food and Chemical Toxicology, 42(4): 585-598.
- Ruberto, G. and Baratta, M.M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry, 69(2): 167-171.
with a 30% lower onging pregnancy, live birth rate during 12 months of fertility treatment. Human Reproduction, 24(7): 1626-1631.
- Deans, S.G. and Simpson, E.J.M., 2002. *Artemisia dracunculus* industrial profiles: 91-97. In: Wright, C.W., (Ed.). *Artemisia*: Medicinal and Aromatic Plants. Taylor & Francis, London, 358p.
- Elvin-Lewis, M., 2001. Should we be concerned about herbal remedies. Journal of Ethnopharmacology, 75: 141-167.
- Erel, B.S., Reznicek, G., Şenol, S.G., Se, N., Yavasogulu, U.K., Konyalioglu, S. and Zeybek, A.U., 2010. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. Turkish Journal of Biology, 36: 75-84.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C. and Wichers, H.J., 2000. Characterisation of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(3): 648-656.
- Gordon, W.P., Forte, A.J., Mac-Murtry, R.J., Gal, J. and Nelson, S.D., 1982. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. Toxicology and Applied Pharmacology, 65(3): 413-424.
- Jalilzadeh-Amin, G., Maham, M., Dalir-Naghadeh, B. and Kheiri, F., 2012. In vitro effects of *Artemisia dracunculus* essential oil on ruminal and abomasal smooth muscle in sheep. Comparative Clinical Pathology, 21: 673-680.
- Jang, I.C., Jo, E.K., Bae, M.S., Lee, H.J., Jeon, G.I., Park, E., Yuk, H.G., Ahn, G.H. and Lee, S.C., 2010. Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv. fuyu) fruit. Journal of Medicinal Plant Research, 4: 155-160.
- Jothy, S.L., Zakaria, Z., Chen, Y., Lau, Y.L., Latha, L.Y. and Sasidharan, S., 2011. Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. Molecules, 16(6): 5268-5282.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. and Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(24): 9452-9458.
- Loomis, T.A. and Hayes, A.W., 1996. Loomis's Essentials of Toxicology. Academic Press, California, 282p.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S. and Kolodziejczyk, P.P., 2008. Screening of chemical

- Sharafati Chaleshtori, R., Rokni, N., Razavilar, V. and Rafieian, M., 2013. The evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) essential oil and its chemical composition. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(9): e7877.
- Sharma, N. and Tripathi, A., 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiological Research, 163(3): 337-344.
- Shi, F., Jia, X., Zhao, C. and Chen, Y., 2010. Antioxidant activities of various extracts from *Artemisia selengensis* Turcz (LuHao). Molecules, 15(7): 4934-4946.
- Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A. and Rohloff, J., 2010. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. Chemistry and Biodiversity; 8(4): 614-623.
- Tomlinson, T.R., 1998. Medicinal Plants: Their Role in Health and Biodiversity. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, 221p.
- Vigan, M., 2010. Essential oils: renewal of interest and toxicity. European Journal of Dermatology, 20(6): 685-692.

Effect of long-term storage of *Artemisia dracunculus* L. essential oil on antioxidant capacity and LD_{50} value

Gh. Jalilzadeh-Amin[1*], N. Shamshiri[2] and J. Aliakbarlu[3]

1*- Corresponding author, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, E-mail: g.jalilzadeh@urmia.ac.ir
2- Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3- Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran

Received: July 2014 Revised: July 2014 Accepted: October 2014

Abstract

Herbal medicines are natural and safe; however, side effects can occur following excessive use of them. This research was aimed to investigate the acute toxicity and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* L. The essential oil of *A. dracunculus* (EOAD) was extracted by Clevenger apparatus using hydrodistillation. Two types of essential oil were studied including fresh and old oil (kept in laboratory conditions for three months). All protocols were tested for both fresh and old oil. The LD_{50} was calculated based on Lorke's method using Probit Analysis and maximum Likelihood method with MINITAB software. To induce acute toxicity, appropriate concentrations of essential oil (10, 100, 1000, 1600, 2900 and 5000mg/kg of EOAD) were given orally and intraperitoneally. The antioxidant activity of EOAD (1-32mg/ml) was measured by two methods: DPPH and ABTS assays. The oral LD_{50} values were greater than 5000 mg/kg and 3801.33mg/kg for fresh and old EO, respectively. When fresh and old EO administered intraperitoneally, the LD_{50} values were calculated to be 4810.06mg/kg and 3013.33mg/kg, respectively. The fresh essential oil showed higher antioxidant activity as compared with the old essential oil in both DPPH and ABTS methods. Our results clearly indicate that the essential oil of this plant is non-toxic and contains antioxidant compounds that support the use of tarragon in traditional medicine.

Keywords: Acute toxicity, storage, *Artemisia dracunculus* L., antioxidant.