مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال ششم، شماره دوم، پیاپی بیست و دوم، پاییز ۱۳۹۶ (۱۵-۹)

تعیین محتوای فلاونوئیدی کل و سمیت سلولی عصارهٔ گیاه *Jurinea leptoloba* جمع‌آوری‌شده از جنوب شیراز بر روی سلول‌های سرطانی و سالم

محبوبه طاهرخانی*
استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، تاکستان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/٤ – تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۸/۱)

چکیده

سرطان دهانه رحم دومین سرطان شایع خانم‌ها در سراسر جهان است. تاکنون گیاهان زیادی با خاصیت ضد سرطانی شناسایی شده اند. جنس *Jurinea* (قبیلهٔ Cynareae، زیر شاخهٔ Carduinae) دارای ۲۵۰ گونه می‌باشد. در این تحقیق گیاه *Jurinea leptoloba* DC. از خانوادهCompositae در مرداد ماه سال ۱۳۹۱ از جنوب شیراز جمع‌آوری و عصارهٔ چربی‌زدایی شدهٔ آن از نظر محتوای فلاونوئیدی کل و خواص سمیت سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان محتوای فلاونوئیدی عصاره از طریق اسپکتروفوتومتری و معادل با کاتچین به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. محتوای فلاونوئیدی عصاره برابر با مقدار ۷/۷٤ ± ۹۸/۸۱ میلی‌گرم معادل کاتچین بر گرم عصارهٔ خشک به دست آمد. سمیت سلولی عصاره نیز به روش MTT بر روی دو رده سلول‌های سرطانی هلا و سلول‌های تک هسته‌ای لنفوسیت خون مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان سمیت برای هر دو نوع سلول وابسته به دوز عصاره می‌باشد. غلظت ۵۰٪ کشندهٔ (LD_{50}) عصارهٔ مذکور بر علیه سلول‌های هلا و خون محیطی توسط دستگاه قرائت گر الایزا ارزیابی و به ترتیب برابر با ۱۱/۱۲ و ٦۰٦۸/٦٤ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج حاصل از آزمایش سمیت نشان داد که مقدار عصارهٔ مورد نیاز برای اثر کشندگی بر روی سلول‌های طبیعی بسیار بیشتر از سلول‌های سرطانی می‌باشد. این نتیجه نشان دهندهٔ این است که عصارهٔ گیاه *J. leptoloba* در برابر سلول‌های سرطانی از سمیت بیشتری برخوردار است در صورتی که به سلول‌های طبیعی و سالم آسیب چندانی وارد نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: *Jurinea leptoloba*، محتوای فلاونوئیدی کل، سمیت سلولی، سلول‌های سرطانی هلا و لنفوسیت.

Total flavonoid content and cytotoxicity of *Jurinea leptoloba* extract collected from south of Shiraz on human lymphocytes and tumor HeLa cells

Mahboubeh Taherkhani*
Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran
(Received: Jun. 24, 2016 - Accepted: Oct. 23, 2017)

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common cancer in women in the world. So far, many natural products have been identified as potent anti-cancer agents. The large Eurasion genus *Jurinea* (tribe Cynareae, subtribe Carduinae) has 250 species. In this study, the aerial parts of *Jurinea leptoloba* DC., from Compositae were collected from south of Shiraz in August 2012. Defatted extract of *J. leptoloba* was investigated for total flavonoid content and cytotoxic properties. Total flavonoid content was determined as mg catechin equivalents (CE) / g dried extract using spectrophotometer methods. Total flavonoid content (TFC) of the extract of *J. leptoloba* was determined to be 98.81±7.74 mg catechin equivalent/g sample. Cytotoxicity was measured using a modified MTT assay on normal human lymphocytes and tumor HeLa cells. The results indicated that the extract of *J. leptoloba* exhibited a dose-dependent cytotoxicity against HeLa and lymphocyte cells. The LD_{50} values for HeLa and lymphocyte cells were obtained to be 11.12 µg/ml and 6068.64 µg/ml, respectively The LD_{50} shows that the cytotoxicity of the extract of *J. leptoloba* on human cancer cell lines is much higher than that observed in normal lymphocytes. The results obtained suggest that *J. leptoloba* extract may be exploited as a natural anti-oxidant and anti-cancer agent with low adverse side effects.

Keywords: Cytotoxicity, *Jurinea leptoloba*, HeLa and Lymphocyte cells, Total flavonoid content.

* نویسندهٔ مسئول: محبوبه طاهرخانی
E-mail: mah.taherkhani@tiau.ac.ir, mahtaherkhani@yahoo.com

مقدمه

گیاه *Jurinea* از خانواده Compositae، از قبیلهٔ *Cynareae* و از زیر قبیله *Carduinae* با حدود ۲۵۰ گونه می‌باشد (Rustaiyan & Ganji, 1988). تاکنون چندین گونه از جنس *Jurinea* از نظر فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته و وجود سزکوئی‌ترپن‌ها به ویژه المانولیدها و ملامپولیدها در آن‌ها به اثبات رسیده است (Rustaiyan *et al*., 1991a). از عصارهٔ گیاه *Jurinea leptoloba* DC. چندین ژرمکرانولید و مشتقاتی نظیر albicolide، pectorolide، salonitenolide و jurinelloide و همچنین چهار ملامپولید، دو المانولید، گلوکوپیرانوزید و دی هیدروسیرین ژنین استخراج، جداسازی و توسط تکنیک‌های طیف‌سنجی NMR شناسایی شده است (Rustaiyan *et al*., 1991b). علاوه بر آن از فراکسیون‌های نیمه قطبی عصارهٔ گیاه *J. leptoloba* یک المانولید به نام شیرازولید استخراج و شناسایی شده است (Rustaiyan *et al*., 1991a). از این رو مطالعات صورت گرفته وجود ترکیبات ترپنی و به ویژه سزکوئی ترپنی را در این جنس به اثبات رسانده است ولی تاکنون مطالعه ای بر روی محتوای ترکیبات فلاونوئیدی آن و همچنین اثرات بیولوژیکی این گیاه صورت نگرفته است. از آنجایی که ترکیب‌های طبیعی موجود در این جنس نظیر شیرازولید به دلیل داشتن اسکلت خاص کربنی با چندین باند غیر اشباع مستعد بروز خاصیت سمیت می‌باشند، از این رو هدف از این تحقیق بررسی محتوای فلاونوئیدی کل و میزان سمیت سلولی عصارهٔ گیاه *J. leptoloba* بر روی سلول‌های سرطانی و سالم انسانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ نمونهٔ گیاهی و مواد مورد نیاز

اندام‌های هوایی گیاه *J. leptoloba* در مرداد ماه سال ۱۳۹۱ از۴۰ کیلومتریِ جنوب شیراز، ایران توسط دکتر ولی‌الله مظفریان در مؤسسهٔ جنگل‌ها و مراتع ایران جمع‌آوری گردید. نمونهٔ هرباریومی این گیاه (Voucher number 324R) در هرباریوم دانشگاه شهید بهشتی نگهداری شده است. مواد مورد نیاز برای تهیهٔ محیط کشت سلولی، محیط کشت RPMI، تهیهٔ بافر PBS، تمامی مواد آزمایشگاهی مورد نیاز نظیر MTT، FBS،DMSO ، تریپسین و سایر مواد مصرفی از شرکت Merck آلمان خریداری شده بودند. سلول لنفوسیت انسانی (NCBI Code: C124) و سلول هلا (NCBI Code: C115) از مؤسسه پاستور ایران تهیه شد.

تجهیزات مورد نیاز

عمده‌ترین تجهیزات مورد نیاز، دستگاه اسپکتروفتومتر UV-2501PC (Shimadzu, Japan) و دستگاه خواننده الایزا DNM-9602G (Perlong Group, Beijing, China) بودند.

تهیه عصارهٔ گیاه

اندام‌های هوایی گیاه *J. leptoloba* در مکانی تاریک خشک و سپس توسط دستگاه خردکن، خرد گردید. سپس ۵۰ گرم از آن توسط حلال‌های دی اتیل اتر- متانول- پترولیوم اتر به نسبت ۱:۱:۱ و به روش خیساندن در حلال به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و در دمای محیط عصاره‌گیری شد (Praveen *et al*., 2009). به منظور چربی زدایی، عصارهٔ گیاه در متانول داغ (۱۰ میلی لیتر بر گرم عصاره) حل گردید و سپس به مدت سه ساعت در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد در سرما نگهداری شد. سپس لایهٔ چربی توسط کاغذ صافی فیلتر جداسازی و عصارهٔ حاصل در خلأ تغلیظ گردید (Marco *et al*., 1993). عصارهٔ حاصل جهت تهیهٔ رقت‌های متفاوت مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین محتوای فلاونوئید کل

تعیین محتوای کل فلاونوئیدهای موجود در عصارهٔ گیاه بر اساس روش Zhishen *et al*. (1999) انجام شد. ۰/۲۵ میلی‌لیتر از نمونهٔ رقیق‌شده به یک لولهٔ

حاوی یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیرشده اضافه شد. سپس ۰/۷۵ میلی‌لیتر از محلول ۵٪ $NaNO_2$ و ۰/۰۷۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۰٪ $AlCl_3$ و ۰/۵ میلی‌لیتر از NaOH یک مولار در زمان صفر و پنج و شش دقیقه پشت‌سرهم اضافه شدند. نهایتاً حجم محلول واکنش به‌همراه آب دوبار تقطیرشده به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر تنظیم گردید. جذب محلول توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای کل فلاونوئیدی موجود در عصارهٔ گیاه به صورت معادل میلی‌گرم کاتچین هم‌ارز (CE: Catechin Equivalent) در هر گرم عصارهٔ گیاه بیان گردید.

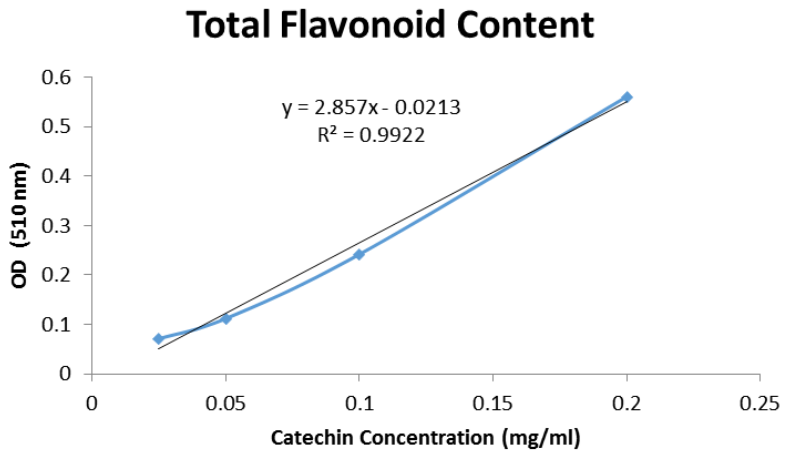
تعیین سمیت سلولی عصاره

دو رده سلول‌های سرطانی هلا و سلول‌های تک هسته‌ای لنفوسیت خون به روش MTT مورد بررسی قرار گرفتند (Plumb *et al.*, 1989). پس از برداشت سلول‌ها از فلاسک‌های کشت، مطابق با پروتوکل کشت هر سلول سرطانی، سلول‌ها به تعداد $۱×۱۰^{۴}$ تا $۵×۱۰^{۵}$ در پلیت‌های ۹۶ چاهکی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در هر چاهک انکوبه شدند. به سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت جهت چسبیدن زمان داده شد. پس از آن به مدت ۴۸ ساعت با رقت‌های مختلف عصاره مواجه گردیدند. سپس به میزان ۲۰ میکرولیتر از ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT در بافر فسفاته سالین به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از اتمام این مدت محلول رویی با احتیاط خارج شد و به هر چاهک به میزان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO افزوده شد تا کریستال‌های آبی رنگ حاصل از احیاء MTT در آن حل شود و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. سپس جذب شاهد (مواجه شده با ۰/۱ درصد DMSO) و نمونه‌های مواجه شده با عصاره توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا با طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Allahghadri *et al.*, 2010). منحنی مرگ سلولی رسم گردید. در این صورت، سمیت سلولی به غلظتی از عصاره گفته می‌شود که مانع از رشد ۵۰ درصد سلول‌ها می‌گردد. تمامی تست‌ها سه بار تکرار گردید.

نتایج

تعیین محتوای فلاونوئید کل عصاره

ابتدا منحنی استاندارد مربوط به محتوای فلاونوئیدهای کل برای ترکیب کاتچین به عنوان فلاونوئید استاندارد اندازه‌گیری و سپس ترسیم گردید ($y = 2.857x - 0.0213$, $r^2 = 0.99$) (شکل ۱).



شکل ۱. منحنی استاندارد محتوای فلاونوئید

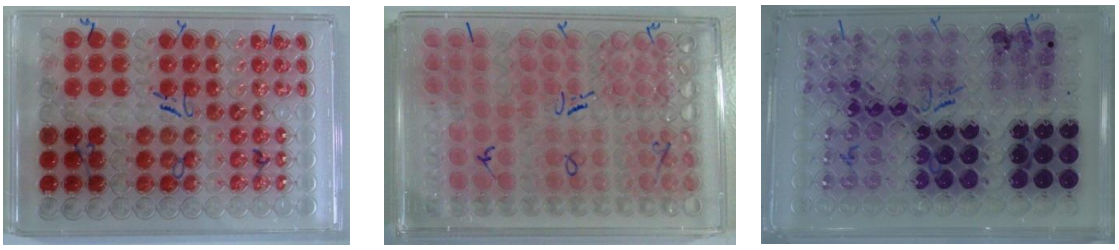
جذب نمونه به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و میزان محتوای فلاونوئیدی کل عصارهٔ گیاه *J. leptoloba* معادل کاتچین (mg/g CE) برابر با ۹۸/۸۱ ± ۷/۷۴ میلی‌گرم کاتچین به دست آمد.

تعیین سمیت سلولی عصاره

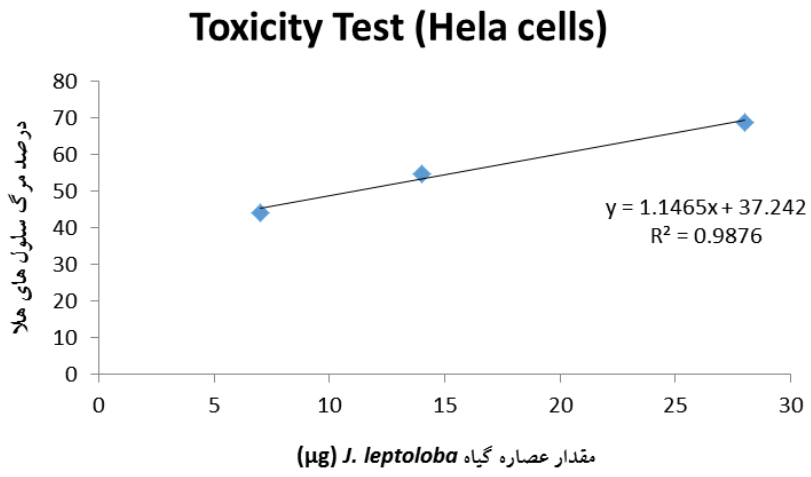
سمیت سلولی عصارهٔ گیاه *J. leptoloba* بر روی سلول‌های لنفوسیت خون محیطی و سلول‌های سرطانی هلای دهانهٔ رحم به روش MTT مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۲). سمیت سلولی رقت‌های مختلف عصاره *J. leptoloba* بر سلول‌های سرطانی به صورت ۵۰٪ غلظت ممانعت (LD_{50}) برابر با ۱۱/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($y = 1.1465x + 37.242$, $r^2 = 0.98$) (شکل ۳) و این سمیت در خصوص سلول‌های طبیعی انسان ۶۰۶۸/۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($y = 0.0037x + 27.546$, $r^2 = 0.90$) (شکل ۴) به‌دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱. سمیت سلولی عصاره گیاه *J. leptoloba* بر رده سلول‌های سرطانی هلا و لنفوسیت‌های خون

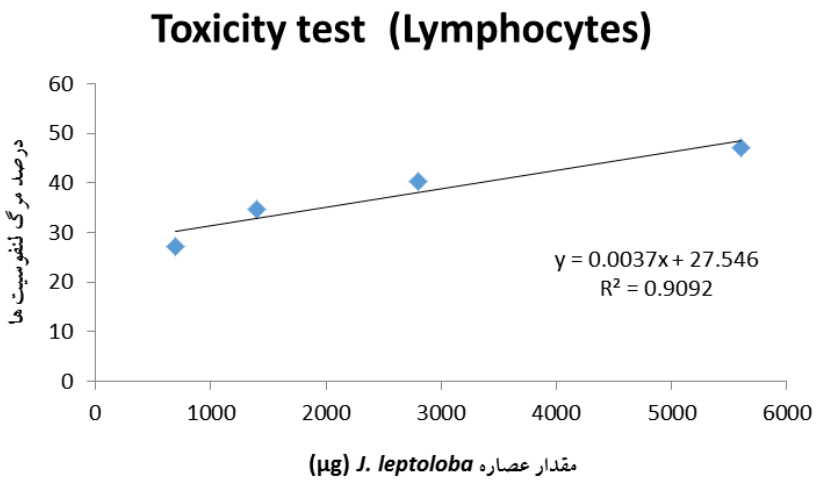
رقت‌های عصاره (µg/ml)	درصد سلول‌های هلای زنده	درصد مرگ سلول‌های هلا
کنترل	۱۰۰	۰
۷	۵۵/۷۶ ± ۱/۰۹	۴۴/۲۳
۱۴	۴۵/۱۵ ± ۱/۴۸	۵۴/۸۴
۲۸	۳۱/۱۷ ± ۰/۵۸	۶۸/۸۲
LD_{50} (µg/ml)	۱۱/۱۲	
رقت‌های عصاره (µg/ml)	**درصد لنفوسیت‌های زنده**	**درصد مرگ لنفوسیت‌ها**
کنترل	۱۰۰	۰
۷۰۰	۷۲/۸۳ ± ۲/۳۵	۲۷/۱۶
۱۴۰۰	۶۵/۲۳ ± ۲/۱۰	۳۴/۷۶
۲۸۰۰	۵۹/۷۰ ± ۱/۹۸	۴۰/۲۹
۵۶۰۰	۵۲/۷۶ ± ۲/۵۲	۴۷/۲۳
LD_{50} (µg/ml)	۶۰۶۸/۶۴	



شکل ۲. روش MTT در تعیین سمیت سلولی



شکل ۳. سمیت سلولی عصاره گیاه *J. leptoloba* بر رده سلول‌های سرطانی هلا



شکل ٤. سمیت سلولی عصاره گیاه *J. leptoloba* بر سلول‌های لنفوسیت

بحث و نتیجه‌گیری

سنجش محتوای فلاونوئید کل عصاره نشان می‌دهد که عصارۀ گیاه مذکور شامل میزانی از ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان بیشتر مربوط به ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی موجود در آنها می‌باشد (Torel *et al.*, 1986). فنول‌ها و فلاونوئیدهای گیاهان از طریق دفع رادیکال‌های آزاد، احیاء و یا کلاته کردن فلزات از خود خاصیت آنتی اکسیدانی نشان می‌دهند، به طوری‌که خاصیت آنتی اکسیدانی این ترکیب‌ها بیشتر به دلیل خواص اکسیداسیون و احیا آن‌ها است که به آنها امکان عملکرد به عنوان مواد احیاکننده و اهداکننده هیدروژن را داده است (Torel *et al.*, 1986).

در روش MTT احیا MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] به‌وسیلۀ دی هیدروژناز میتوکندری‌ها به محصول آبی فرمازان انجام می‌گیرد که نشان‌دهندۀ عملکرد طبیعی میتوکندری و حیات سلول می‌باشد (Ultee *et al.*, 1999). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که مقدار عصارۀ لازم برای کشتن سلول‌های سرطانی هلا بسیار کمتر از مقدار لازم برای کشتن لنفوسیت‌های خون است، به‌عبارت دیگر عصارۀ گیاه *J. leptoloba* در برابر سلول‌های سرطانی از سمیت بیشتری برخوردار است، در صورتی که به سلول‌های سالم آسیب چندانی نمی‌رساند. در هر دو آزمون، میزان سمیت سلولی با غلظت عصاره نسبت مستقیم داشته و میزان کشندگی (درصد مرگ سلولی) با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد. پیش از این مطالعه‌ای بر روی محتوای فلاونوئیدی کل و اثر سمیت سلولی عصارۀ گیاه *J. leptoloba* صورت نگرفته است.

یک عصاره و یا یک دارو زمانی می‌توانند به عنوان آنتی اکسیدان و یا به عنوان داروی شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار بگیرند، که اثرات سمی بر روی سلول‌های طبیعی نداشته باشند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با توجه به تأثیر منفی مقدار کم عصاره بر سلول‌های سالم خون محیطی و با مد نظر قرار دادن خاصیت کشندگی سلول‌های سرطانی در مقادیر کمِ عصاره، می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره در مبارزه با سلول‌های سرطانی، آسیبی بر سلول‌های طبیعی نمی‌رساند. به بیان دیگر بکارگیری این عصاره، تا جایی سودمند است که تنها سلول‌های سرطانی را از بین برده و آسیبی به سلول‌های سالم نزند. مکانیسم سمیت اسانس و عصاره‌های گیاهی، احتمالاً به خاطر داشتن طبیعت چربی دوست، در داخل

غشاء تجمع یافته و باعث نفوذ پذیر شدن غشاء و در نتیجه تراوش و آزاد شدن آنزیم‌ها و متابولیت‌های سلولی می‌شوند (Sikkema *et al*., 1995).

مطالعات بسیاری نشان داده اند که ترکیبات αوβ- غیر اشباع کربونیل دار به ویژه سزکوئی ترپن لاکتون‌ها دارای فعالیت سمیت هستند (Fernandes *et al*., 2008; Fischedick *et al*., 2013). از این رو با توجه به وجود انواع مختلفی از این سزکوئی‌ترپن لاکتون‌ها به ویژه المانولیدها، ملامپولیدها، چندین ژرمکرانولید و مشتقاتش در عصارهٔ گیاه مذکور (Rustaiyan *et al*., 1991a,b)، احتمال می‌رود که اثرات سمیت عصارهٔ گیاه *J. leptoloba* به دلیل وجود این عوامل باشد. به‌ویژه وجود یک ترکیب طبیعی به نام شیرازولید که علاوه بر داشتن گروه αوβ- غیر اشباع کربونیلی در حلقهٔ لاکتونی خود که می‌تواند وارد بسیاری از واکنش های هسته دوستی شود، یک واحد ۱و ۵- دی اِنی نیز دارد که قادر به انجام نوآرایی کوپ می‌باشد. بنابراین، هدف بعدی پس از این مطالعه، تعیین خاصیت ضد سرطانی، جهش زایی و ضد جهش زایی ترکیبات موثرهٔ این گیاه در شرایط *in vitro* می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که عصارهٔ گیاه *J. leptoloba* قدرت بالایی در کشندگی سلول‌های سرطانی هلا دارد که با توجه به تأثیر منفی بسیار کم این عصاره بر سلول‌های سالم خون محیطی و با مد نظر قرار دادن خاصیت کشندگی سلول‌های سرطانی توسط مقادیر کم عصاره می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره در مبارزه با سلول‌های سرطانی، آسیبی بر سلول‌های طبیعی نمی‌رساند. در واقع مقدار عصارهٔ مورد نیاز نیز برای اثر کشندگی بر روی سلول‌های طبیعی بسیار بیشتر از سلول‌های سرطانی می‌باشد. از این رو این مطالعه ارزش توجه از دریچه خاصیت آنتی اکسیدانی و شیمی درمانی ضد نئوپلاستی پیدا می‌کند که می‌تواند پایه تحقیقات بعدی قرار گیرد. علاوه بر آن با توجه به اینکه در عصارهٔ این گیاه حضور ترکیب‌های طبیعی از نوع ترپنی و همچنین محتوای فلاونوئیدی کل به اثبات رسیده است، بنابراین می‌توان اثرات آنتی اکسیدانی و بیولوژیکی بیشتری را از آن پیش بینی نمود.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر ولی‌الله مظفریان جهت جمع‌آوری گیاه *J. leptoloba* و از راهنمایی جناب آقای پروفسور ایرج رسولی در بخش بیولوژیکی و پروفسور عبدالحسین روستائیان در بخش فیتوشیمی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Allahghadri, T.; Rsooli, I.; Owlia, P.; Jalali nadooshan, M.; Ghazanfari, T.; Taghizadeh, M.; Darvish Alipoor Astaneh. S.; (2010). Antimicrobial property, Antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from Cumin produced in Iran. Journal of Food Science; 75(2): H54-H61.

Fernandes, M.B.; Scotti, M.T.; Ferreira, M.J.P.; Emerenciano, V.P.; (2008). Use of self-organizing maps and molecular descriptors to predict the cytotoxic activity of sesquiterpene lactones. European Journal of Medicinal Chemistry; 43(10): 2197-2205.

Fischedick, J.T.; Pesic, M.; Podolski-Renic, A.; Bankovic, J.; de *Vos*, R.C.H.; Peric, M.; Todorovic, S.; Tanic, N.; (2013). Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from *Inula britannica* on human cancer cell lines. Phytochemistry Letters; 6: 246-252.

Marco, J.A.; Sanz, J.F.; Albiach, R.; Rustaiyan, A.; Habibi, Z.; (1993). Bisabolene derivatives and sesquiterpene lactones from *Cousinia* species.

Phytochemistry; 32(2): 395-400.

Plumb, J.A.; Milroy, R.; Kaye, S.B.; (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide-formazanabsorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Research; 49(16): 4435-4440.

Praveen, T.K.; Dharmaraj, S.; Bajaj, J.; Dhanabal, S.P.; Manimaran, S.; Nanjan, M.J.; Razdan, R.; (2009). Hepatoprotective activity of petroleum ether, diethyl ether, and methanol extract of *Scoparia dulcis* L. against CCl4 induced acute liver injury in mice. Indian Journal of Pharmacology; 41(3): 110-114.

Rustaiyan, A.; Ganji, M.; (1988). Germacranolides from *Jurinea* eriobasis, Phytochemistry; 27(9): 2991-2992.

Rustaiyan, A.; Habibi, Z.; Saberi, M.; (1991a). Shirazolide and 14α-O-dihydroShirazolide two new elemanolides from *Jurinea leptoloba*, Journal of Sciences Islamic Republic of Iran; 2(1,2): 25-27.

Rustaiyan, A.; Saberi, M.; Habibi, Z.; Jakupovic J.; (1991b). Melampolides and other constituents from *Jurinea leptoloba*. Phytochemistry; 30(6): 1929-1932.

Sikkema, J.; de Boont, J.A.; and Poolman, B.; (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hygrocarbons. Microbiol Reviews; 59(2): 201-222.

Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P.; (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochemistry; 25(2): 383-385.

Ultee, A.; Kets, E.P.W.; Smid, E.J.; (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology; 65(10): 4606-4610.

Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W.; (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry; 64(4): 555-559.