

## اثر ضد آفاتوکسین اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه

محمدحسن مینوئیان حقیقی<sup>۱\*</sup>، علیرضا خسروی<sup>۲</sup> (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی گناباد، دانشکده پزشکی، گروه علوم پایه

۲- دانشگاه تهران، دانشکده دام‌پزشکی، گروه قارچ‌شناسی

### چکیده

سابقه و هدف: آفاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها (سموم قارچی) می‌باشند که به وسیله گونه‌های خاصی از جنس قارچ آسپرژیلوس شامل آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومیوس تولید می‌شوند. این گروه از سموم قارچی به عنوان سردسته تمامی مایکوتوکسین‌ها محسوب می‌شوند. به همین دلیل، کوشش‌های فراوانی در راستای حذف یا غیرفعال‌سازی این ترکیبات در زنجیره غذایی انسان و حیوان به عمل آمده است. اهداف این مطالعه تعیین اثر ضد آفاتوکسین و ضد قارچ روغن‌های اساسی زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه رویشیافته در استان خراسان رضوی بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی است و مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل زیره‌ی سبز، کاکوتی، و سیاه‌دانه، بر اساس اطلاعات حاصل از طب سنتی و با توجه به مناطق رویش آن‌ها انتخاب و جمع‌آوری گردیدند و به روش تقطیر با آب اسانس آن‌ها تهیه شد. سپس با استفاده از روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با بهره‌دهی عالی (RP-HPLC) و ۳ بار تکرار آزمایش غلظت انواع آفاتوکسین تولیدی (Total, G2, G1, B2, B1) توسط کپک آسپرژیلوس پارازیتیکوس، بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر (ppb) اندازه‌گیری شدند. این عمل پس از تاثیر اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه، به ترتیب با رقت‌های ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انجام شد. یافته‌ها: توانایی اسانس‌های مورد مطالعه در مهار تولید انواع آفاتوکسین به ترتیب به صورت اسانس زیره‌ی سبز، اسانس سیاه‌دانه و اسانس کاکوتی بود. هم‌چنین بین وزن خشک قارچ و مقدار آفاتوکسین تام، هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت ( $r=0/896$ ,  $p=0/0005$ )

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق نشان داد که اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه دارای توانایی مهار رشد و تولید آفاتوکسین توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس بودند. هم‌چنین این مطالعه کاربرد سنتی این گیاهان در برابر عفونت‌های میکروبی را تایید نمود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، زیره‌ی سبز، کاکوتی، سیاه‌دانه، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، آفاتوکسین، RP-HPLC

### مقدمه

داروئی متعددی مانند مسکن، آرام‌بخش، ضدالتهاب، ضد اسپاسم، بی‌حسی موضعی، ضد سرطان، آنتی‌اکسیدان و آنتی‌آفاتوکسین می‌باشند و هم‌چنین علیه طیف وسیعی از ارگانیزم‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، تک‌یاخته‌ها و

روغن‌های اساسی (اسانس‌ها)، محصولات معطر، فرار و متابولیت‌های ثانویه گیاه هستند که موارد استفاده وسیعی در طب سنتی و در صنایع غذایی دارند. این روغن‌ها دارای اثرات

سیاه‌دانه، دانه‌های خشک شده‌ی گیاه *Nigella sativa* از خانواده آلاله است و به نام‌های سیاه‌تخمه، شونیز، حبه‌البرکه، کمون‌اسود، حبه‌السوداء، شانوخ و کمون‌اکحل خوانده می‌شود. دانه‌ها بخش دارویی این گیاه را تشکیل می‌دهند. دانه‌ی گیاه حاوی ۰/۵ تا ۱/۵ درصد اسانس است [۱۱]. سیاه‌دانه دارای اثرات ضد باکتری، ضد پلاک دندان، ضد قارچی، ضد کرم، ضد تب، ضد مسمومیت، ضد سرطان و آنتی‌اکسیدان است. این گیاه یکی از داروهای طب نبوی است [۱۲، ۱۱]. اهداف این مطالعه تعیین اثر ضد آفلاتوکسین و ضد قارچ اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه رویش‌یافته در منطقه خراسان بود.

## مواد و روش‌ها

اسانس‌های مورد مطالعه: در این پژوهش از روغن‌های اساسی گیاهان زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه که توسط محقق در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد از گیاهان مزبور استحصال شده بودند بهره‌برداری شد.

قارچ مورد آزمایش: در این تحقیق از گونه آسپرژیلوس پارازیتیکوس (ATCC 115201) به عنوان میکروارگانیسم تحت آزمایش استفاده شد.

آماده‌سازی مواد گیاهی و اسانس‌ها: گیاهان مورد استفاده در این پژوهش از مناطق مختلف استان خراسان رضوی جمع‌آوری و به روش صحیح خشک شدند. برگ‌های کاکوتی، از کوه‌های بینالود شهرستان نیشابور، میوه‌های زیره‌ی سبز از شهرستان سبزوار و دانه‌های سیاه‌دانه از شهرستان تربت‌حیدریه تهیه گردیدند. سپس توسط کارشناس ارشد "سیستماتیک اکولوژی گیاهی" مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد کشاورزی مشهد و به طریقه علمی شناسایی و جنس و گونه آن‌ها مشخص گردید. این گیاهان بر اساس اطلاعات حاصل از طب سنتی و با توجه به مناطق رویش آنان انتخاب گردیدند [۱۵، ۱۴، ۱۳]. پس از آسیاب نمودن مواد گیاهی مذکور اسانس آن‌ها با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب تهیه شد و پس از آب‌گیری با سولفات سدیم (بدون آب) در

حشرات عمل می‌کنند. اسانس‌ها توسط تقطیر آبی یا بخار به وسیله عمل فشردن و یا سایر روش‌ها به دست می‌آیند. آن‌ها ترکیبات طبیعی بسیار پیچیده متشکل از اجزاء مختلف با غلظت‌های متفاوت می‌باشند [۱]. قارچ کپکی آسپرژیلوس جنس بزرگی را با بیش از ۲۰۰ گونه تشکیل می‌دهد که انسان و محصولات مورد استفاده او به طوردائم در مواجهه با آن‌ها قرار دارند. آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از سموم قارچی می‌باشند که به وسیله گونه‌های خاصی از جنس قارچ آسپرژیلوس شامل آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومیوس، تولید می‌شوند. این گروه به عنوان سردسته تمامی مایکوتوکسین‌ها محسوب می‌شوند به همین دلیل بیش از سایر سموم قارچی مورد توجه محققین و مراجع بهداشتی قرار گرفته‌اند. این سموم می‌توانند سبب بروز اثراتی مانند سمیت حاد و مزمن، سمیت عصبی، اثرات سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، ناقص‌الخلقه‌زایی، جهش‌زایی و سرطان‌زایی بشوند که به نام مایکوتوکسیکوزیس خوانده می‌شوند [۲]. به همین دلیل، کوشش‌های فراوانی در راستای حذف یا غیرفعال‌سازی این ترکیبات در زنجیره غذایی انسان و حیوان به عمل آمده است. تاکنون حدود ۲۰ نوع آفلاتوکسین مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که از این میان انواع G1, B1 و M1 بیش‌ترین اهمیت را دارند [۳].

زیره‌ی سبز میوه‌ی خشک‌شده‌ی گیاه *Cuminum cyminum* از خانواده‌ی چتریان است که واجد حد اقل ۲/۵ درصد اسانس می‌باشد. این گیاه دارای خواص مختلف ضد کرم، ضد سم حشرات، درمان اسهال (آمیبی)، ضد باکتریایی و ضدقارچی است. اندام دارویی گیاه زیره سبز میوه آن می‌باشد [۴، ۵، ۶].

کاکوتی (*Ziziphora clinopodioeides*) جزو خانواده نعناعیان می‌باشد و به نام آنوخ یا آویشن برگ باریک ودر بعضی جوامع به پونه کوهی معروف است. حد اقل دارای ۱/۲ درصد اسانس است. اندام دارویی گیاه شامل قسمت‌های هوایی آن و به طورعمده برگ‌ها می‌باشد [۷]. کاکوتی دارای اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی است [۸، ۹، ۱۰].

مهارکنندگی (MIC90) آن که پیش از این توسط پژوهشگر و در یک مطالعه آزمایشی (Pilot study) مشخص شده بود، تعیین گردید. بر این اساس از رقت‌های ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای هر یک از اسانس‌های زیره سبز و کاکوتی و از رقت ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای اسانس سیاه‌دانه در محیط کشت YES استفاده شد. به طور معمول، غلظت محلول استاندارد اسانس مورد نظر دو برابر اولین غلظت مورد آزمایش ساخته می‌شود. برای این منظور ابتدا از حلال دی‌متیل سولفوکساید که با محیط کشت RPMI-1640 مایع به میزان ۰/۱ رقیق شده بود استفاده شد به عنوان مثال برای ساخت استوک ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس مورد نظر ۱۰ میکرولیتر از اسانس خالص حاصل از تقطیر را به ۰/۵ میلی‌لیتر از DMSO رقیق شده افزوده و سپس ۴/۵ میلی‌لیتر RPMI-1640 مایع را به آن اضافه نموده تا حجم استوک به ۵ میلی‌لیتر برسد زیرا غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مساوی با ۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر و برابر با ۱۰ میکرولیتر در ۵ میلی‌لیتر است. پس از رقیق‌سازی اسانس‌ها به میزان مورد نظر که با توجه به غلظت اسانس مورد آزمایش و حجم محیط کشت محاسبه می‌شد مقدار لازم از آن به ارلن حاوی محیط کشت YES اضافه می‌گردید پس با درج و ثبت مشخصات مربوطه ارلن‌ها به گرم‌خانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد مجهز به هم‌زن با حرکت آرام منتقل گردیده و به مدت ده روز گرم‌خانه‌گذاری می‌شدند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها و به منظور سنجش مقدار سم تولیدی پس از صاف کردن عصاره کشت قارچ به وسیله صافی‌های واتمن شماره ۱ به ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره مزبور ۱۰۰ میلی‌لیتر از متانول ۸۰ درصد (MERK) افزوده و به مدت ۲ تا ۳ دقیقه با دستگاه هم‌زن به خوبی مخلوط می‌شدند سپس به لوله‌های فالتون ۵۰ میلی‌لیتری استریل منتقل شده و جهت تعیین میزان آفلاتوکسین تولیدی به روش RP-HPLC مورد آزمایش قرار می‌گرفتند [۱۷]. به دلیل عدم ایجاد تورش در نتایج، نمونه‌های مورد آزمایش قبل از عصاره‌گیری و سنجش میزان سم تولیدی اتوکلاو نشدند ولی در حین و پس از پایان آزمایشات به دلیل خطرات بهداشتی ناشی از مایکوتوکسین‌ها

ویال‌های قهوه‌ای با حجم ۱۰ میلی‌لیتر جمع‌آوری گردیدند. پس از اندود درب ویال‌ها و ذکر مشخصات اسانس مربوطه (نام اسانس، تاریخ تهیه و مقدار اسانس حاصل بر مبنای نسبت وزنی، حجمی) تا هنگام استفاده در یخچال نگه‌داری می‌شدند.

کشت قارچ اسپرژیلوس پارازیتیکوس سم‌زا: به منظور تحریک و تشدید اسپورزایی قارچ مذکور به این ترتیب عمل می‌شد که در شرایط استریل و درکنار شعله و توسط انس استریل اسپورهای قارچ اسپرژیلوس پارازیتیکوس توکسیژنیک به محیط کشت ژلوزسب زمینی پوتیتو دکستروز آگار (PDA) که داخل لوله به صورت شیب‌دار تهیه شده بود کشت داده شد و به مدت ۱۲ روز در گرم‌خانه و در درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت که پس از این مدت اسپورهای قارچ به تعداد فراوان تشکیل شده بودند. ساخت محیط PDA مطابق دستور کارخانه سازنده (MERK-Germany) و در شرایط استریل انجام شد.

تهیه محیط کشت عصاره مخمر ۲ درصد هم‌راه با ساکارز ۱۵ درصد (YES): به منظور حفظ و تشدید قابلیت کونیدی‌زایی قارچ و برای ساخت ۱۰۰ میلی‌لیتر از این محیط ابتدا ۲ گرم از محیطیست اکستراکت گرانوله با ۱۵ گرم ساکارز داخل ارلن ریخته می‌شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده می‌گردید و پس از دادن حرارت توسط اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه استریل می‌شد. اسپورهای قارچ تحت آزمایش در  $10^6 \times 1$  اسپور در هر میلی‌لیتر استاندارد گردید. سپس یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به هر کدام از ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YES افزوده شد [۱۶].

انتخاب غلظت اسانس‌های مورد آزمایش: به منظور تعیین میزان توکسین‌زایی قارچ مزبور در هنگام مواجهه با اسانس‌های تحت آزمایش و هم‌چنین سنجش میزان آفلاتوکسین تولیدی توسط این قارچ و بررسی فعالیت مهار رشد و تولید توکسین توسط این اسانس‌ها در ابتدا رقت‌های انتخابی برای هر اسانس بر مبنای حداقل غلظت

قابل ذکر این که کاغذهای صافی به کار برده شده هم‌وزن بودند.

ارزیابی مهار تولید آفلاتوکسین: اثر ضد آفلاتوکسین اسانس‌های گیاهی زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه مورد آزمایش به روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی (RP-HPLC) و خالص‌سازی با ستون ایمونوآفینیتهی و برابر استاندارد ملی ایران شماره ۶۸۷۲ (سال ۱۳۷۱) انجامیافت. در انتخاب نوع توکسین هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش معتبر برای تعیین مقدار مهم‌ترین آفلاتوکسین‌های گروه‌های B و G شامل B1, B2, G1 و G2 است. منظور از مجموع آفلاتوکسین‌ها، تمام انواع B1, B2, G1 و G2 می‌باشد [۱۷]. این آزمایشات برای هر یک از نمونه‌ها سه بار تکرار شد.

محاسبه درصد مهار رشد قارچ، درصد مهار آفلاتوکسین و مقدار آفلاتوکسین: درصد مهار رشد قارچ، درصد مهار آفلاتوکسین و مقدار آفلاتوکسین به ترتیب با استفاده از فرمول‌های زیر تعیین شدند [۲۴].

$$\text{الف) درصد مهار رشد قارچ} = \frac{W_c - W_s}{W_c} \times 100$$

$$\text{ب) درصد مهار آفلاتوکسین} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Wc = وزن توده قارچی در نمونه کنترل

Ws = وزن توده قارچی در نمونه مورد آزمایش

Ac = مقدار آفلاتوکسین در نمونه کنترل

As = مقدار آفلاتوکسین در نمونه مورد آزمایش

$$\text{ج) } Da_{ngr/mgr} = \frac{D_s}{W_s} \times 100 \text{ mlit}$$

Da<sub>ngr/mg</sub> = مقدار آفلاتوکسین تولیدی بر حسب نانوگرم

در میلی‌گرم وزن قارچ

Ds = مقدار آفلاتوکسین در نمونه بر حسب نانوگرم

میلی‌لیتر

Ws = وزن میسلیم خالص قارچ بر حسب میلی‌گرم

نکات ایمنی از جمله پوشیدن دستکش و ماسک هنگام کار، انجام آزمایشات در زیر هود، اتوکلاو نمودن وسایل و مواد پس از پایان کار، قراردادن وسایل و مواد مورد استفاده در محلول هیپوکلریت سدیم غلیظ به مدت حداقل ۱ تا ۲ ساعت و گندزدایی سطوح آلوده آزمایشگاه با این محلول به دقت رعایت می‌شد.

نمونه‌های مورد آزمایش RP-HPLC: این نمونه‌ها که سنجش سم درمورد آن‌ها انجام شد شامل ۱- ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه شاهد منفی (۱) (محیط کشت YES) ۲- ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه شاهد منفی ۲ (محیط کشت YES که به آن ۱۲۵ میکرولیتر از سم AFLA-Mssss-032, 1000 ng/ml MeOH به عنوان سم استاندارد آفلاتوکسین برای کروماتوگرافی مایع و مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۶۸۷۲، اضافه شده بود [۱۷]). ۳- ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه شاهد مثبت (محیط کشت YES و قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس سم‌زا). ۴- ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه حاوی اسانس گیاه زیره‌ی سبز به غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر. ۵- ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه حاوی اسانس گیاه کاکوتی به غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر. ۶- ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه حاوی اسانس گیاه سیاه‌دانه به غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بودند که در تمامی نمونه‌های حاوی اسانس رشد قارچ مشهود بود ولی کند یا متوقف شده بود.

توزین توده قارچی: بعد از ۱۰ روز که از کشت محتویات ارلن‌های حاوی نمونه قارچی و اسانس سپری شد و رشد قارچ انجام گرفت توده حاصل از رشد هر یک از محتویات ارلن‌ها روی کاغذ صافی واتمن شماره ۱ قرار می‌گرفت سپس کاغذهای صافی حاوی توده قارچی و کاغذ صافی خالی (به عنوان شاهد) جهت خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت داخل گرم‌خانه ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شدند. این عمل برای هر کدام از نمونه‌ها ۳ بار تکرار شد که در هر بار کاغذ صافی خالی و کاغذهای صافی حاوی توده قارچی با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین می‌شد و نتایج یادداشت می‌گردید.

## نتایج

با استفاده از روش RP-HPLC غلظت آفلاتوکسین تولیدی (Total, G2, G1, B2, B1) کپک اسپرژیلوس پارازیتیکوس بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر (part per billion=ppb) به دست آمد. هم‌چنین غلظت نهایی آفلاتوکسین پس از تاثير اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه به ترتیب با رقت‌های ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شدند (جدول ۱).

مقایسه اثر اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه روی رشد میسیلیوم و تولید آفلاتوکسین توسط اسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط کشت YES broth در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۳ اثر اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه به ترتیب با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را بر مهار انواع آفلاتوکسین (ngr/mgr) و مهار رشد اسپرژیلوس پارازیتیکوس با ۳ بار تکرار (درصد) مقایسه می‌نماید. شکل ۱ مقدار آفلاتوکسین‌های تولیدی توسط اسپرژیلوس پارازیتیکوس را پس از مواجهه با اسانس‌های مذکور مشخص می‌کند.

جدول ۱- میانگین غلظت نهایی انواع آفلاتوکسین تولیدی توسط اسپرژیلوس پارازیتیکوس در نمونه‌های مورد آزمایش به روش Reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)، بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر (ppb) با ۳ بار تکرار.

نام نمونه	نوع و غلظت نهایی آفلاتوکسین (ppb)				
	Total	G2	G1	B2	B1
*شاهد منفی ۲	۱۲	۱	۵	۱	۵
شاهد مثبت	۱۶۵/۶۶	۳/۳۸	۱۰۹/۹۶	۲/۹۴	۴۹/۳۷
زیره سبز	۴/۰۷	ND	۱/۲۲	ND	۲/۸۵
کاکوتی	۸/۴۷	۲/۰۷	۱/۸۰	ND	۴/۶۰
سیاه دانه	۶/۳۶	۰/۴۳	۱/۶۹	ND	۴/۲۵

\* ۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر از سم AFLA-Mssss-032, 1000ng/ml MeOH به عنوان سم استاندارد آفلاتوکسین برای کروماتوگرافی مایع به محیط کشت Yeast extract sucrose (YES) اضافه شده بود. ND=شناسایی نشد

شکل ۲ درصد مهار رشد کپک اسپرژیلوس پارازیتیکوس و مهار تولید آفلاتوکسین توسط اسانس‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از اقدامات مذکور با نرم‌افزار SPSS-16 و آزمون‌های آماری "کروسکا ل-والیس" و "من-ویتنی"، با سطح معنی‌داری  $p \leq 0.05$ ، مورد تجزیه و تحلیل، قرار گرفت.

جدول ۲-مقایسه اثر اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه، روی رشد میسیلیوم و تولید آفلاتوکسین توسط اسپرژیلوس پارازیتیکوس، در محیط کشت Yeast extract sucrose broth.

نام نمونه	غلظت اسانس mg/ml	* نوع و غلظت آفلاتوکسین (ppb)				
		Total	G2	G1	B2	B1
شاهد مثبت	۰	a	a	A	a	a
زیره سبز	۰/۲۵	۱۶۵±۰/۰۴	۳/۳۸±۰/۰۵	۱۱۰±۰/۰۴	۲/۹۴±۰/۰۴	۴۹/۳۷±۰/۰۲
کاکوتی	۰/۲۵	۴±۰/۰۵	ND	۱/۲۲±۰/۰۴	ND	۲/۸۵±۰/۰۲
سیاه دانه	۱/۵	۰/۵±۰/۱۱	۲±۰/۰۳	۱/۸±۰/۰۶	B ND	۴/۶±۰/۰۷
		d	d	D	B ND	d
		۶/۴±۰/۰۴	۰/۴۳±۰/۰۳	۱/۶۹±۰/۰۲	B ND	۴/۲۵±۰/۰۲

۱- \* میانگین ± انحراف معیار حاصل از ۳ بار تکرار آزمایش.

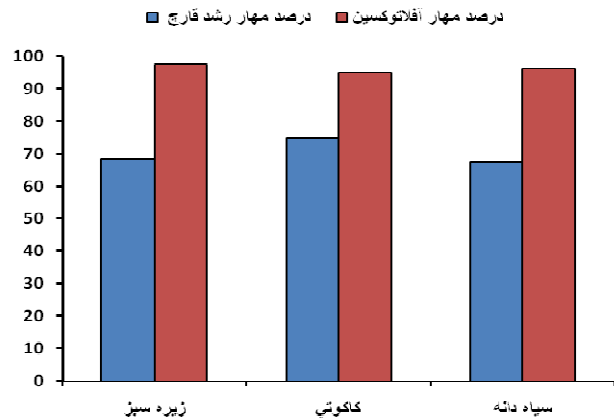
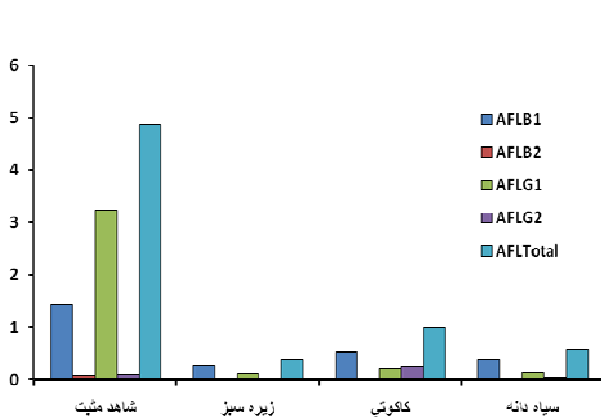
۲- مقادیر مشخص شده با حروف لاتین مختلف (a, b, c, d)، در هر ستون، بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

۳- شناسایی نشد (ND).

جدول ۳. مقایسه اثر اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه، به ترتیب با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بر مهار انواع آفلاتوکسین (ngr/mgr) و مهار رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس، با ۳ بار تکرار (درصد).

درصد مهارشدارچ	Total		G2		G1		B2		B1		آفلاتوکسین نام نمونه
	درصد مهارسم	مقدارسم ng/mg	درصد مهارسم	مقدارسم ng/mg	درصد مهارسم	مقدارسم ng/mg	درصد مهارسم	مقدارسم ng/mg	درصد مهارسم	مقدارسم ng/mg	
۰	۰	۴/۸۶۳	۰	۰/۰۹۹	۰	۳/۲۲۸	۰	۰/۰۸۶	۰	۱/۴۴۹	شاهد مثبت
۶۸/۳۲	۹۷/۵۴	۰/۳۷۷	۱۰۰	ND	۹۸/۸۹	۰/۱۱۳	۱۰۰	ND	۹۴/۲۲	۰/۲۶۴	اسانس زیره سبز
۷۴/۸۹	۹۴/۸۸	۰/۹۹۰	۳۸/۷۵	۰/۲۴۲	۹۸/۳۶	۰/۲۱۰	۱۰۰	ND	۹۰/۶۸	۰/۵۳۷	اسانس کاکوتی
۶۷/۴۳	۹۶/۱۶	۰/۵۷۳	۸۷/۲۷	۰/۰۳۸	۹۸/۴۶	۰/۱۵۲	۱۰۰	ND	۹۱/۳۹	۰/۳۸۳	اسانس سیاه‌دانه
۷۰/۲۱	۹۶/۱۹	۰/۶۴۶	۷۵/۳۴	۰/۰۹۳	۹۸/۵۷	۰/۱۵۸	۱۰۰	ND	۹۲/۰۹	۰/۳۹۴	مجموع اسانس‌ها

ND = شناخته نشد



شکل ۲. مقایسه درصد مهار رشد کپک آسپرژیلوس پارازیتیکوس و مهار تولید آفلاتوکسین توسط اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه به ترتیب در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ۳ بار تکرار.

شکل ۱. مقدار آفلاتوکسین‌های تولیدی (ng/mg)، توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط Yeast extract sucrose broth، پس از مواجهه با اسانس‌های زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه، به ترتیب در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ۳ بار تکرار.

و مقدار صفر را به خود اختصاص داده است. توانایی اسانس‌های مورد مطالعه در مهار تولید انواع آفلاتوکسین به ترتیب به صورت اسانس زیره‌ی سبز، اسانس سیاه‌دانه و اسانس کاکوتی، می‌باشد.

قدرت مهار G1 توسط هر سه اسانس تقریباً مشابه است. همچنین با مقایسه دو به دو هر کدام از آفلاتوکسین‌ها مشخص شد که بین آن‌ها رابطه آماری معنی‌دار برقرار است و هر یک از اسانس‌های مورد مطالعه در مقایسه با شاهد مثبت به طور قابل توجهی تولید انواع آفلاتوکسین‌ها

## بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش با توجه به نتایج حاصل از مقایسه دو به دو اسانس‌های مورد آزمایش با یکدیگر مشخص گردید که اسانس‌های زیره‌ی سبز و کاکوتی، زیره‌ی سبز و سیاه‌دانه، کاکوتی و سیاه‌دانه، در جلوگیری از تولید آفلاتوکسین‌های Total, G2, G1, B1 به وسیله آسپرژیلوس پارازیتیکوس دارای قدرت مهار متفاوتی می‌باشند ولی در مهار آفلاتوکسین B2 اختلافی نداشتند که آن هم به علت این است که B2 در آزمایشات مربوط مورد شناسایی قرار نگرفت

زمان به‌کارگیری اسانس در کارآیی مهار رشد و مهار تولید توکسین توسط آن می‌باشد. در بررسی وی و نیز مطالعات دیگر مشاهده شد که هر چه از مدت زمان تماس اسانس با قارچ سپری شود به تدریج از کارآیی آن در ممانعت از رشد و تولید سموم قارچی کاسته می‌شود [۲۲]. در مطالعات مختلف از روش‌های TLC، فلورومتري، آگار پلاگ و غیره برای سنجش توکسین استفاده شده است ولی بر اساس منابع موجود آزمایش HPLC از حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برخوردار است و قادر به تفکیک میکروگرم در لیتر از توکسین مورد سنجش می‌باشد. بنابراین تفاوت در نتایج مطالعات مختلف می‌تواند تا حد زیادی معطوف به تفاوت‌های موجود در روش سنجش و آنالیز توکسین باشد [۲۲]. در مطالعه ما تفاوت در درصد مهار آفلاتوکسین G2 به وسیله اسانس‌های مورد آزمایش قابل توجه است به گونه‌ای که درصد مهار این آفلاتوکسین توسط اسانس کاکوتی ۳۸/۷۵ درصد است در حالی که اسانس‌های زیره سبز و سیاه‌دانه آفلاتوکسین G2 را به ترتیب به میزان ۱۰۰ و ۸۷/۲۷ درصد مهار کرده‌اند از طرفی اسانس کاکوتی سایر آفلاتوکسین‌ها از جمله Total, G1, B2, B1 را به ترتیب به میزان ۹۰/۶۸، ۱۰۰، ۹۸/۳۶ و ۹۴/۸۸ درصد مهار نمود. هم‌چنین، سایر آفلاتوکسین‌ها (Total, G1, B2, B1) به طور متوسط به ترتیب به میزان ۹۲/۰۹، ۱۰۰، ۹۸/۵۷، ۹۶/۱۹ درصد توسط مجموع اسانس‌های مورد مطالعه مهار شدند. با توجه به این که شرایط آزمایش و شرایط مهار تولید توکسین توسط اسانس‌های مورد بررسی برای تمامی آفلاتوکسین‌ها مشابه بوده است دلیل تاثیر کم‌تر اسانس کاکوتی در مهار آفلاتوکسین G2 را می‌توان به ترکیبات این اسانس که در مهار این سم موثرند مربوط دانست به طوری که این اجزاء قادر به مهار مناسب مسیر بیوسنتزی ژن‌های تولیدکننده این آفلاتوکسین نمی‌باشند. در مطالعه دیگری روغن اساسی سیاه‌دانه در ۳ درصد حجمی / حجمی، تولید انواع چهار گانه آفلاتوکسین تولیدی توسط اسپریلوس فلاووس را مهار نمود [۲۳]. از دیگر تفاوت‌های مشاهده شده در تحقیق ما اختلاف در درصد مهار سم و درصد مهار رشد

(Total, G2, G1, B2, B1) را مهار می‌کنند (جدول ۲). بسیاری از مواد مختلف از قبیل روغن‌های اساسی و فلاوونوئیدها می‌توانند تولید آفلاتوکسین و رشد اسپریلوس را مهار نمایند [۱۸]. ابراهیم‌زاده و همکاران در بررسی خود روی روغن اساسی زاتاریا مولتی‌فلورا ترکیباتی را که سبب کاهش ۵۰ درصدی آفلاتوکسین شوند به عنوان مهارکننده مثبت آفلاتوکسین در نظر گرفتند [۱۹]. فرگ (Farag) و همکاران اثر اسانس‌های چندین گیاه و مواد موثره آن‌ها را بر روی رشد و تولید آفلاتوکسین در اسپریلوس پارازیتیکوس بررسی نمودند که در نتیجه آن مشخص شد اسانس آویشن در مقایسه با اسانس‌های زیره، میخک، رزماری و مریم‌گلی اثر ممانعت‌کنندگی قوی‌تری داشت و اثر اجزاء موثر تمامی اسانس‌های مورد مطالعه با اثر اسانس مربوطه مشابهت کامل داشت [۲۰]. در مطالعه دیگری که بر روی تیموکینون به عنوان یک ماده فعال موجود در سیاه‌دانه انجام شده است تاثیر مهار صد درصدی این ماده روی اسپریلوس نیجر در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمده است [۲۱]. در بررسی ما اسانس‌های زیره سبز و سیاه‌دانه به ترتیب از نظر مهار تولید آفلاتوکسین تام قوی‌تر از کاکوتی بودند. در این پژوهش بین وزن توده قارچی، مهار رشد قارچ و مقدار آفلاتوکسین تام هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار وجود داشت ( $t=0/896$ ,  $p=0/0005$ ) هم‌چنین بین مقدار وزن توده قارچی و مقدار آفلاتوکسین‌های G2, G1, B2, B1 نیز رابطه معنی‌داری وجود داشت. در مجموع می‌شود اظهار نمود که اثر اسانس‌های مورد مطالعه بر قارچ‌های مذکور را می‌توان از روی کاهش توده میسیلیومی قارچ و کاهش مقدار تولید سم به وسیله قارچ ارزیابی کرد. یحیی رعیت، در سال ۱۳۸۷ شمسی با ارزیابی اثرات اسانس‌های آویشن شیرازی و گل شمع‌دانی عطری بر روی برخی ژن‌های ساختمانی و تنظیم‌کننده مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین‌ها و بر اساس نتایج حاصل از سنجش وزن توده قارچی و تولید توکسین مشاهده نمود که اثر اسانس روی کاهش رشد و ساخت توکسین همیشه هم گام پیش نمی‌رود و نتایج حاصل حاکی از اهمیت غلظت، نحوه و مدت

قارچ می‌باشد. مطابق جدول ۳ درصد مهار آفاتوکسین تام (Total) توسط اسانس زیره‌ی سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه به ترتیب ۹۷/۵۴، ۹۴/۸۸ و ۹۶/۱۶ درصد است در صورتی که درصد مهار رشد قارچ توسط این اسانس‌ها به ترتیب ۶۸/۳۲، ۷۴/۸۹ و ۶۷/۴۳ می‌باشد. هم‌چنین طبق نمودار ۲ با مقایسه درصد مهار سم و درصد مهار رشد قارچ می‌توان نتیجه گرفت که درصد مهار تولید سم بیش‌تر از درصد مهار رشد قارچ می‌باشد. این حالت شاید ناشی از تاثیر اسانس بر متابولیت‌های اولیه قارچ باشد که می‌تواند به صورت مستقیم باعث مهار رشد قارچ و به طور غیر مستقیم مانع تولید سموم قارچی بشود. چنان‌چه اسانس فقط از طریق مهار رشد بر قارچ تاثیر می‌گذاشت می‌بایست درصد مهار رشد و درصد مهار سم قارچ یکسان بود و از الگویمشابهی پیروی می‌کرد. ولی در این‌جا می‌توان حدس زد که متابولیت ثانویه گیاه (اسانس) از مسیر دیگری روی متابولیت ثانویه قارچ (آفاتوکسین) تاثیر دارد و باعث مهار آن می‌شود و ژن‌های رشد قارچ با ژن‌های تولید آفاتوکسین متفاوت است. در این‌جا تاثیر متابولیت ثانویه گیاه بر متابولیت ثانویه قارچ نیز آشکار می‌شود. گرچه مطابق نتایج حاصل از این پژوهش هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری بین وزن توده قارچی و مهار رشد قارچ با انواع آفاتوکسین‌های تولیدی وجود داشت (جدول ۳). از این خصوصیت اسانس‌ها می‌توان علاوه بر مهار سموم قارچی، به عنوان ضد میکروب، ضد حشرات، ضد کرم، ضد آفات گیاهی، نگه‌دارنده‌های مواد غذایی، ضد پلاک دندانی و در امور درمانی، بهداشتی و آرایشی استفاده نمود. گندمی نصرآبادی در سال ۱۳۸۶ شمسبیه مطالعه اثر اسانس آویشن شیرازی روی رشد اسپرژیلوسفلاووس و تولید آفاتوکسین در محیط کشت و پنی‌پرداخت. در این بررسی علاوه بر تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس مزبور مشخص نمود که در محیط کشت مایع اثر بازدارندگی اسانس روی تولید آفاتوکسین توسط کپک مورد مطالعه بالاتر از اثر آن روی رشد میسیلیوم بود. هم‌چنین اسانس آویشن شیرازی اثر مهاری معنی‌داری روی رشد

کپک و تولید آفاتوکسین در پنی‌ر داشت و این اثر از الگوی وابسته به مقدار پیروی می‌کرد و اثر بازدارندگی اسانس روی تولید آفاتوکسین در پنی‌ر بالاتر از اثر آن روی رشد کپک بود [۲۴]. این نتایج تا حدود زیادی با یافته‌های پژوهش ما هماهنگی داشت. در سایر پژوهش‌های انجام شده تولید آفاتوکسین B1 به عنوان مهم‌ترین سرطان‌زای آفاتوکسین‌ها به طور کامل توسط ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از روغن‌های لیمون‌گرس و شمعدانی عطریمتوقف گردید. روغن آویشن، در ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، روغن‌های میخک و زیره‌ی سبز در ۰/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از تولید آفاتوکسین به وسیله اسپرژیلوس پارازیتیکوس جلوگیری کردند [۲۵]. به نظر می‌رسد که مکانیسم اصلی اثر یک مایکوتوکسین تغییر DNA الگو، مختل‌سازی فرایند نسخه‌برداری و یا مهار مرحله ترجمه در تولید پروتئین باشد [۵،۴]. سوبه‌های مولد سم معمولاً در شرایط خاص دو یا سه نوع آفاتوکسین تولید می‌کنند که هم‌واره یکی از آن‌ها نوع B1 می‌باشد. آفاتوکسین‌های گروه G به طور معمول به میزان کم‌تری از انواع گروه B تولید می‌شوند [۳]. ولی مطابق نتایج این پژوهش، آفاتوکسین G1 به مقدار زیاد و بیش از سایر آفاتوکسین‌ها تولید شده بود (جدول ۲ و ۳). آفاتوکسین‌های B2 و G2 که متابولیت‌های دی‌هیدروی آفاتوکسین می‌باشند به طور معمول هم‌راه با آفاتوکسین‌های B1 و G1 حضور دارند و هم‌واره میزان آن‌ها کم‌تر است که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد. بنابراین می‌توان اظهار نمود که اسانس‌ها با تاثیر بر ژن‌ها و یا آنزیم‌های مسیر بیوسنتز این سموم موجب مهار آفاتوکسین‌ها می‌شوند. به منظور ارزیابی ناهماهنگی در مهار سنتز اجزای آفاتوکسین و بررسی تفاوت آن‌ها بهتر است تحقیقاتی در سطح ژنتیکی انجام شود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان نهایت تشکر و سپاس خود را از کلیه اساتید و همکاران محترم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی و مرکزی دانشکده



[13] FazlyBazzaz S, Haririzadeh G, Imami SA, Rashed MH. (1990): Survey of Iranian plants for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins [Khorasan province] pharmaceutical. 1997; 35.

[14] Aynehchi Y, Salehi Sormaghi MH, Farrohi KH. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Acta Pharm Suec 1980; 17: 341-346.

[15] bin Jantan I, Mohd Yassin MS, Bee Chin C, Lee Chen L, Sim NL. Anti fungal activity of the essential oils of nine zingiberaceae species. pharm Biol 2003; 41: 392-397.

[16] CLSI/ Clinical and Laboratory Standards Institute-Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Wayne, 2002 (Approved standard M38-A).

[17] Iran national standard, NO: 6872. measurement of group B and G aflatoxins by HPLC and purified by immunoaffinity column, Iran standard and industrial research institute (1993).

[18] Alpsy L. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. African J Biotechnol 2010; 9: 2474-2481.

[19] Ebrahimzadeh H, Yamini Y, Sefidkon F, Chalosi M, Pourmortazavi SM. Chemical composition of the essential oil and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of Zataria multiflora Boiss. Food Chemistry 2003; 83: 357-361.

[20] Farag RS, Daw ZY, Abo-Raya SH. Influence of some species essential oils on Aspergillus parasiticus growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. J food Sci 1989; 54: 74-76.

[21] Al-Jaber S, Al-Akloby OM, Al-Qurashi AR, Akhtar N, Al-Dossary A, Randhawa MA. Tymoquinone, an active principle of Nigella sativa, inhibited Aspergillus niger. Pakistan J Med Res 2003; 42.

[22] Yahyaraeyat R, Khosravi AR. The effect of oil extracted from zataria multiflora on aflatoxin genes expression in aspergillus parasiticus. Tehran Univ Med J 2009. (Persian).

[23] Maraqa A, AL-Sharouf NF, Farah H, Elbjeirami WM, Shakya AK, Sallal AK. Effect of nigella sativa extract and oil on aflatoxin production by aspergillus flavus. Turk J Biol 2007; 31: 155-159.

[24] Gandomi H, Misaghi A, Basti AA, Bokaei S, Khosravi A, Abbasifar A, Javan AJ. Effect of zataria multiflora boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by Aspergillus flavus in culture media and cheese. Food Chem Toxicol 2009; 47: 2397-2400.

[25] Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils (A review article). Curr Med Chem 2003; 10: 813-829.

دام پزشکی دانشگاه تهران، آزمایشگاه پژوهشی فاروق تهران و دانشگاه علوم پزشکی گناباد اعلام می نمایند.

## منابع

[1] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. Food Chem Toxicol 2008; 46: 446-475.

[2] Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yashinari T, Rezaee MB, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S. Inhibitory effects of Satureja hortensis L. essential oil on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. Int J Food Microbiol 2008; 123: 228-233.

[3] Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Mycotoxins. Tehran, Imam Hossein Univ 2003; 40. (Persian).

[4] Kafi M, Rashed Mohassel MH, Koocheki A. Cuminum cyminum: production and processing. First edition. Center of excellence for Agronomy Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashad 2003: 165-182.

[5] Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. essential oils. J Agric Food Chem 2005; 53: 57-61.

[6] Bansod S, Rai M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic Aspergillus fumigatus and Aspergillus niger. World J Med Sci 2008; 3: 81-88.

[7] Ghasemi-Dehkordi N, et al. Iranian herbal pharmacope. Ministry of Health; Tehran, Iran: 1998.

[8] Ozturc S, Ercisly S. Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides. Food Control 2007; 18: 535-540.

[9] Unal EL, Mavi A, Aydan-Kara A, Cakir A, Sengul M, Yildirim A. Antimicrobial and antioxidant activities of some plants used as remedies in Turkish traditional medicine. Pharm Biol 2008; 46: 207-224.

[10] Kursat M, Erecevit P. The antimicrobial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae members collected from Turkey. Turkish J Sciencechnology 2008; 4: 81-85.

[11] Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa (Review Article). Phytother Res 2003; 17: 299-305.

[12] Khan N, Sultana S. Inhibition of two stage renal carcinogenesis, oxidative damage and hyperresponse by Nigella sativa. Eur J Cancer Prev 2005; 14: 159-168.

## Effects of anti-aflatoxin of essential oils of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa*

Mohammad Hassan Minooeian Haghghi (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Alireza Khosravi (Ph.D)<sup>2</sup>  
1 – Dept. of Basic Sciences, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran  
2 – Dept. of Mycology, Faculty of Veterinary, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received: 3 Feb 2013; Accepted: 24 Nov 2013)

**Introduction:** Aflatoxins are a large group of mycotoxins, which are produced by certain species of *Aspergillus*, including *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. numius*. This group of fungal toxins is considered as a leader of all mycotoxins. Therefore, many efforts have been performed for elimination or neutralization of these compositions in foods and feeds. The aims of this study were to survey the effects of anti-aflatoxin and anti-fungal essential oils of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* growth in Khorasan-e- Razavi province (Northeastern of Iran).

**Materials and Methods:** In this experimental study, herbal substances which included *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* were selected and collected on the basis of traditional medicine and their growing region. Then, their essential oils (essences) were extracted by hydro-distillation procedure. The concentration of each *Aspergillus parasiticus* aflatoxin (B1, B2, G1, G2, and Total) was measured three times by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) technique in ng/ml (ppb). Also, the final concentration of each aflatoxin was measured following the impact of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essences in concentrations of 0.25, 0.25, and 1.5 mg/ml, respectively.

**Results:** The inhibitory effect of above mentioned essential oils on producing of different aflatoxins was the essences of *Cuminum cyminum*, *Nigella sativa* and *Ziziphora clinopodioides*, respectively. Also, there was a significant and positive correlation between fungus dry weight and amount of total aflatoxin ( $P = 0.0005$ ,  $r = 0.896$ ).

**Conclusion:** The findings of this study showed that *Cuminum cyminum*, *Nigella sativa* and *Ziziphora clinopodioides* has an inhibitory effect on aflatoxin producing by *Aspergillus parasiticus*. In addition, this study confirmed the traditional use of these herbs against microbial infections.

**Keywords:** Essences, *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides*, *Nigella sativa*, *Aspergillus parasiticus*, RP-HPLC, Aflatoxins

\* Corresponding author: Fax: +98 533 7223814; Tel: +98 533 7225027  
drminoeian@gmu.ac.ir

### How to cite this article:

Minooeian Haghghi M, Khosravi A. Effects of anti-aflatoxin of essential oils of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa*. koomesh. 2014; 15 (3) :396-404

URL [http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a\\_code=A-10-1891-1&slc\\_lang=fa&sid=1](http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-1891-1&slc_lang=fa&sid=1)