شناسایی ترکیبات موجود در عصاره و اسانس گیاه میخک Syzygiumaromaticum

زهرا خوشدونی فراهانی[1*]، فاطمه خوشدنی فراهانی[2]

۱. دانشجوی دکترای دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی کشاورزی - علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی - علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۹)

چکیده

میخک یکی از منابع مهم گیاهی از ترکیبات فنلی، آنتی اکسیدانی ، ضد سرطان، ضد درد می باشد که از دیر باز مورد استفاده قرار میگرفته است.با توجه به اهمیت عصاره ها و اسانس ها و کاربرد آن ها در صنایع مختلف به دلیل ویژگی های منحصر به فرد آنها، عصاره و اسانس گیاه میخک استخراج شد و تحت تجزیه شیمیایی قرار گرفت تا ترکیبات شیمیایی عصاره و اسانس آن شناسایی و ارزیابی گردد.استخراج عصاره توسط روش خیساندن انجام گرفت و استخراج اسانس با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد. عصاره و اسانس استخراج شده با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) مورد آنالیز قرار گرفتند.هشت ترکیب شیمیایی در عصاره میخک تشخیص داده شد که ترکیبات اصلی آن شامل اوژنول(۸۵/۵٪)، اوژنول استات (۳/۲٪) و هپتاکوزان (۱/۸٪) بودند. هفت ترکیب شیمیایی در اسانس میخک نیز تشخیص داده شد که اصلی ترین آن ها شامل اوژنول(۸۶/۳۶٪) و بتاکاریوفیلن (۷/۶۶٪) بودند. اوژنول ترکیب اصلی در هر دو عصاره و اسانس بود و بیشترین غلظت از این ترکیب را در میان آنها نشان داد.

کلیدواژگان

اسانس، عصاره، میخک.

* نویسنده مسئول، رایانامه: z.farahani69@yahoo.com

مقدمه

عصاره های گیاهی محلولی حاوی تمامی مواد مفید موجود در گیاه نظیر اسانس ها، فلاونوییدها، آلکالوئیدها، موسیلاژها، تانن ها ، ساپونین ها، ویتامین ها، املاح و یا سایر مواد بوده که خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد قارچی و ضد باکتریایی داشته و مانع از انجام واکنش های ناخواسته در محیط های مورد نظر می شوند.در واقع عصاره یکی از اشکال دارویی است و به سه شکل جامد، نیمه جامد و مایع وجود دارد. عصاره ها به کمک حلال مناسب طی عملیات ماسراسیون ، پرکولاسیون و یا عملیات مناسب دیگر تهیه می شوند. به طور کلی تهیه عصاره مبنی بر استخراج مواد موثره و فعال به وسیله یک حلال مناسب می باشد. حلال ها معمولاً عبارتند از الکل اتیلیک با درجه های الکلی مختلف، آب، اتر و مخلوطی از آن ها ، اتیلن در کلراید، کلرو اتیل اتر، دی ایزوپروپیل اتر می باشند(۲،۱) .

روغن های اسانسی ترکیبات معطری هستند که به طور وسیعی در صنایع عطر سازی، دارویی و غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. اسانس ها مخلوطی از بیش از ۲۰۰ نوع ترکیب مختلف می باشند. این ترکیبات عمدتا از هیدروکربن های مونوترپنی، سزکوئی ترپنی و مشتقات اکسیژن دار از قبیل الکل ها، استرها، آلدهیدها و کتون های آلفاتیک تشکیل شده اند. مهمترین گیاهان تولید کننده اسانس های روغنی متعلق به تیره نعنائیان، مرکبات و چتریان می باشد. این ترکیبات عموما در اغلب حلال های آلی مانند در اتیل اتر، هگزان، متیل الکل و اتیل الکل قابلیت انحلال دارند. اسانس ها به دلیل تبخیر در اثر مجاورت با هوا و در درجه حرارت های معمولی اتاق، روغن های فرار یا روغن های اتری نیز نامیده می شوند. بطور کلی این مواد از ترکیبات ترپنوئید تشکیل شده اند اما در ترکیب بسیاری از اسانس ها، موادی وجود دارد که از مسیرهای سنتزی دیگری منشأ گرفته اند (۳). اسانس ها کاملا از روغن های تری گلیسیرید معمولی و چربی ها متمایزند زیرا ترکیبات اخیر غیر فرار بوده و نقطه جوش بالایی دارند.وزن مخصوص اغلب اسانس ها معمولا کمتر از آب می باشد تنها تعداد محدودی از آن ها دارای وزن مخصوص بیشتری نسبت به آب هستند. بطور کلی اسانس ها با آب غیر قابل اختلاط می باشند ولی می توانند بوی خود را به آب انتقال دهند. این ترکیبات عموما در اغلب حلال های آلی مانند دی اتیل اتر و غیره، قابلیت انحلال دارند(۴).

میخک با نام علمی *Syzygiumaromaticum* و با نام انگلیسی clove گیاهی است که برگ های آن همیشه سبز و دائمی بوده. درختی با اندازه متوسط ۸ تا ۱۲ متر از خانواده بومی *Mirtaceae* از جزیره مالاکا[1] در شرق اندونزی است. میخک نشاندهنده یکی از منابع مهم گیاهی از ترکیبات فنلی همچون فلاوونوئیدها، اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک، اسید هیدروکسی سینامیک و پروپن هیدروکسی فنیل است .از اسیدهای فنلی گالیک اسید و کافئیک اسید بیشترین مقدار را دارند، از میان فلاونوئیدها کوئرستین، کاتچین و کامفرول بیشترین مقادیر را به خود اختصاص می دهند و از روغن های فرار ترکیبات اوژنول، کارواکرول، تیمول، و منتول را میتوان نام برد(۵،۶،۷.)

امروزه، گزارش های بسیاری از تایید خواص ضد باکتریایی ، ضد قارچی، ضد ویروسی میخک به دلیل قدرت حفاظتی آن از تثبیت رادیکال های آزاد وجود دارد (۸). از میخک به عنوان ضد نفخ و برای افزایش اسید کلریدریک در معده و دارای خواص ادرارآور و اشتهاآور یاد کرده اند. روغن میخک دارای خواص ضد

1. Malaka

باکتری، ضد استفراغ، ضد اسپاسم، ضد قارچ، حشره کشی و آنتی اکسیدانی است و به طور سنتی به عنوان طعم دهنده و نگهدارنده مواد غذایی استفاده می شود. همچنین از اسانس میخک در دندانپزشکی به عنوان ضدعفونی کننده استفاده می شود. علاوه بر این، میخک آنتی موتاژنیک و ضد التهاب است و اثر ضد انعقادی و ضد انگلی قابل توجهی نیز از آن گزارش کرده اند**(۸)**.تحقیقاتی درمورد اثرات عصاره و اسانس این گیاه و شناسایی ترکیبات موجود در آن ها انجام گرفته است از جمله درتحقیقی درباره ترکیبات شیمیایی و ویژگی های آنتی اکسیدانی اسانس برگ میخک انجام شد، این اسانس شامل ۲۳ ترکیب شناسایی شده است که در میان آن ها ترکیب اصلی آن اوژنول۷۶/۸ ٪ و سپس بتا کاریوفیلین۱۷/۴٪، آلفا هومولین ۲/۱ ٪ و اوژنول استات ۱/۲ ٪ به عنوان ترکیبات آن هستند (۹). در مطالعه ای دیگرکه توسط Hosseini و همکارانش (۲۰۱۱) انجام شد،۱۶ترکیب فرار ازعصاره هگزانی جوانه های میخک با استفاده از گازکروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی مشخص شد. ترکیبات اصلی اوژنول (۷۱/۵۶٪) واوژنول استات (۸/۹۹ ٪) بودند (۵). عصاره دی کلرومتان جوانه ها، لیمونین و فرولیک آلدهید و اوژنول را به همراه داشت. فلاوونوئیدهای تاماریکستین -D-b-O-۳- گلوکوپیرانوزید، اومبوین-D-b-O-۳ گلوکوپیرانوزید وکوئرستین از عصاره اتانولی جدا شدند. Diego Francisco Cortes Rojus و همکارانش (۲۰۱۴) تحقیقی دررابطه با میخک بعنوان ادویه ای گرانبها انجام دادند که در آن این ادویه بعنوان منبعی غنی از ترکیبات فنلی اوژنول، اوژنول استات و اسیدگالیک شناخته شده است(۶). از این رو به منظورشناسایی ترکیبات موثره و موجود در عصاره و اسانس این گیاه در ایران، مورد تجزیه شیمیایی توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی قرار گرفت.

مواد و روش کار

جمع آوری وآماده سازی گیاه میخک

غنچه های گیاه میخک از بازار بزرگ گیاهان دارویی تهران تهیه شد. جهت حصول اطمینان از رسیدن رطوبت به حداقل ممکن، گیاه خشک شده میخک در آون تحت خلاء به مدت ۲ ساعت و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. جهت استخراج عصاره، نمونه های خشک شده با استفاده ازدستگاه آسیاب بامش۴۰به پودرتبدیل شد.

عصاره گیری گیاه میخک

عصاره اتانولی گیاه مورد مطالعه به روش خیساندن بدست آمد. دراین روش پودر میخک بانسبت۱:۱۰با اتانول۷۰درصد در یک ارلن با در پوش با پوشش آلومینیوم دردمای اتاق مخلوط شدونمونه به مدت ۴۸ساعت برروی شیکربادور۱۳۰قرار گرفت وپس از آن با عبورمخلوط ازکاغذ صافی(واتمن شماره ۴)، عصاره اتانولی حاصل گردید. سپس عمل تغلیظ عصاره با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلا در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت و حلال جدا گردید. جهت خشک کردن عصاره با کمک آون تحت خلاء در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و فشار ۲۵ میلی لیتر جیوه حلال تبخیر شد. جهت آزمون های میکروبی عصاره به دست آمده به وسیله صافی های ۰/۴۵ میکرونی جهت عاری شدن از میکروارگانیسم ها صاف گردید. عصاره تا زمان استفاده در ظرف شیشه ای استریل و در بسته، در تاریکی و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد.

اسانس گیری از گیاه

ابتدا میخک خشک شده و حلال را داخل بالن

ریخته و بالن روی هیتر قرار داده می شود. پس از مدتی آب داخل بالن به جوش آمده و همراه اسانس تبخیر شده و وارد مبرد می گردد، در آنجا به مایع تبدیل شده و وارد بورت می شوند. دوازده ساعت مجموعه را در این حالت قرار می دهیم تا اطمینان حاصل شودکه همه اسانس استخراج شده است، آنگاه هیتر را خاموش می کنیم. داخل بورت مجموعه آب و اسانس جمع می شود، چون اسانس ها در آب ناحلول اند، اسانس و آب با یکدیگر مخلوط نشده و دو فاز تشکیل می دهند. اسانس میخک در یک ساعت اول اسانس گیری بر روی آب می ایستد ولی پس از گذشت چند ساعت که همه اسانس بطور کامل استخراج می شود، اسانس میخک سنگین تر از آب شده و در انتهای بورت قرار می گیرد. پس از ۱۲ ساعت شیر بورت را باز نموده و اسانس در ظرفی جداگانه جمع آوری می شود(۱۰).

آماده سازی عصاره جهت شناسایی ترکیبات توسط GC/MS

قسمتی از عصاره اتانولی حاصله را پس از تغلیظ ، جهت شناسایی ترکیبات آن توسط GC/MS به روش زیر مورد آماده سازی قرار دادیم.عصاره را ۴۸ ساعت در دمای ۲۰- (فریزر) قراردادیم تا موم و چربی آن جدا شود. سپس درهمان فریزر با کاغذ صافی فاز عصاره اتانولی را جدا کردیم . فازعصاره اتانولی را در یک ارلن با در پوش ریخته و به نسبت مساوی به آن هگزان افزودیم و ۲ ساعت آن را روی شیکر با دور ۲۸۶ قرار دادیم تا یکنواخت و همزده شود. سپس آن را در یک جداکننده ریخته و ۱۵ دقیقه آن را ثابت گذاشته تا دوفاز شود. سپس فاز هگزانی راجهت تزریق بهGC/MS مورد جدا سازی قرار دادیم.

آنالیز ترکیبات فرار عصاره و اسانس میخک

شناسایی و بررسی ترکیبات عصاره و اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی با طیف سنج جرمی (GC/MS) با مشخصات ذیل انجامشد.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به دستگاه کروماتوگرافی گازی همراه با طیف سنج جرمی

مدل دستگاه کروماتوگرافی گازی	مدل HP-6890 شرکت HewlletPachard آمریکا
نوع ستون	(methyl silicon-cross link)HP-1MS
ابعاد ستون	۶۰ متر طول، ۰/۲۰ میلی لیتر قطر، ۰/۲۵ میکرون ضخامت فیلم
برنامه دمایی ستون	دمای اولیه: ۱۶۰ درجه سلسیوس دمای نهایی: ۲۳۰ درجه سیسیوس، گرادیان دمایی: ۷ c/min
محل تزریق	Split/split less (نسبت ۱ به ۲۰)
دمای محل تزریق	۲۵۰ درجه سلسیوس
گاز حامل	هلیوم ۹۹/۹۹۹۹٪ با شدت جریان ۱ میلی متر در دقیقه
مدل دستگاه طیف سنج	**مدل HP-5970 شرکت Hewllet Packard آمریکا**
انرژی یونیزاسیون	۷۰ الکترون ولت
دمای محفظه یونش	۱۵۰ درجه سلسیوس
تجزیه گر جرمی	کوادرویل
دمای تجزیه گر جرمی	۲۳۰ درجه سلسیوس

اندیس بازداری کوآتس[1]

اندیس کوآتس[2] اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط اروین کوآتس بعنوان یک پارامتر برای شناسایی مواد حل شده با استفاده از کروماتوگرام ها تعریف گردید. اندیس بازداری کوآتس هر ترکیب را می توان از کروماتوگرام مخلوطی از چند جسم مورد نظر با حداقل ۲ آلکان نرمال که زمان بازداری آن ها در ۲ طرف زمان بازداری ماده مورد نظر قرار دارد، محاسبه

1. Kovats retention index
2. Kovats Index

نمود. آلکان های نرمال استاندارد هایی هستند که درجه بندی اندیس کوآتس بر آن ها نهاده شده است و بنابر تعریف اندیس بازداری کوآتس یک آلکان نرمال، ۱۰۰ برابر تعداد کربن های موجود در آن است. اندیس کوآتس مستقل از دما و ابعاد ستون می باشد. اندیس بازداری کوآتس به طریقه زیر محاسبه شد:

$$KI=100n+100(Tx-Tn/Tn+1-Tn)$$

Tx: زمان بازداری نمونه مجهول
Tn: زمان بازداری آلکان نرمال قبلی
Tn+1: زمان بازداری آلکان نرمال بعدی
KI: شاخص بازداری کوآتس
n: تعداد اتم کربن آلکان نرمال قبلی

نتایج

بعد از تزریق عصاره آماده شده توسط هگزان و اسانس آن دستگاه GC/MS، کروماتوگرام حاصل از اسانس و عصاره *Syzygiumaromaticum* را ایجاد کرد که بر اساس انذیس کواتس و با بررسی و مطالعه کروماتوگرام و طیف های جرمی حاصل از دستگاه ها کروماتوگرافی گازی دارای طیف سنج جرمی، ترکیبات موجود در عصاره و اسانس میخک بدست آمد. با مطالعه این داده ها و بررسی درصد ترکیبات حاصل از عصاره میخک می توان گفت که به ترتیب بیشترین درصد را اوژنول(۸۵/۵٪)، اوژنول استات (۳/۲٪) و هپتاکوزان (۱/۸٪) دارند. مقادیر سایر ترکیبات موجود نیز بدین شکل می باشد:

چاویکول (۱/۲٪)، دکان (۱٪)، ، فنول-۲-متوکسی (۰/۵٪) ،ترانس-بتا کاریوفیلن (۰/۵٪) و نفتالن-دکاهیدرو-۱و۵-دی متیل (۰/۵٪) که در جدول۲ همراه با اندیس های کواتس نشان داده شده است. در بررسی درصد ترکیبات حاصل از اسانس میخک می توان گفت که به ترتیب بیشترین درصد را اوژنول (۸۶/۳۶٪)، بتاکاریوفیلن (۷/۶۶٪)، آلفا همولن (۱/۸۷٪) و اوژنول استات (۱/۲۴٪) دارند. مقادیر سایر ترکیبات موجود در اسانس نیز شامل کاریوفیلن اکسید (۰/۳۸٪)، چاویکول (۰/۳۴٪) و متیل سالسیلات (۰/۳۱٪) می باشد که در جدول ۳ به همراه اندیس های کواتس نشان داده شده است.

جدول ۲- ترکیبات تشکیل دهنده عصاره، میزان آن و اندیس کواتس

شماره (ترتیب خروج)	نام ترکیب	مقدار (درصد)	اندیس کواتس
۱	Decane	۱/۰	۹۹۰
۲	Phenol,2-methoxy	۰/۵	۱۰۵۰
۳	Naphthalene,decahydro-1,5-dimethyl	۰/۵	۱۲۲۰
۴	Chavicol	۱/۲	۱۲۴۳
۵	Eugenol	۸۵/۵	۱۳۴۰
۶	Beta-Caryophyllenetrans	۰/۵	۱۴۱۰
۷	Eugenyl Acetate	۳/۲	۱۴۸۷
۸	Heptacosane	۱/۸	۱۷۳۰

جدول ۳- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ، میزان آن و اندیس کواتس

شماره (ترتیب خروج)	نام ترکیب	مقدار (درصد)	اندیس کواتس
۱	Eugenyl Acetate	۱/۲۴	۷۹۵
۲	α-humulene	۱/۸۷	۱۶۲۰
۳	Chavicol	۰/۳۴	۱۸۱۰
۴	ethyl Salicylate	۰/۳۱	۲۰۵۰
۵	Eugenol	۸۶/۳۶	۲۳۵۰
۶	Beta-Caryophyllene	۷/۶۶	۲۴۶۰
۷	Caryophyllene oxide	۰/۳۸	۲۵۸۰

بحث

نتایج حاصل از بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره میخک کشت شده در مناطق مختلف و عصاره های حاصل از حلال های مختلف، متفاوت

گزارش شده است (۱۱) . بعنوان مثال Myint و همکاران (۱۹۹۶) در تحقیق خود اوژنول، کاریوفیلن و اوژنول استات را بعنوان بیشترین درصد ترکیبات در عصاره اتانولی حاصل از میخک مالزیایی بیان داشتند(۱۲). نتایج حاصل از پژوهشی دیگر توسط Nassar و همکاران(۲۰۰۷) بیان داشت که، ۱۶ ترکیب فرار از عصاره هگزانی میخک توسط دستگاهGC/MS دریافت گردید که بیشترین درصد ترکیبات آن ها اوژنول(۷۱/۵۶٪)، اوژنول استات(۸/۹۹٪) و کاریوفیلن اکسید(۱/۶۷٪) بود(۱۳).

در بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس میخک کشت شده در ماداگاسکار و اندونزی به ترتیب از بیشترین به کمترین ترکیب اوژنول(۷۷/۵۰٪)، اوژنول استات(۱۶/۰۱٪)، بتا کاریوفیلن(۴/۰۶٪)، آلفا همولین(۰/۵۵٪)، کاریوفیلن اکسید(۰/۲۲٪)، چاویکول(۰/۱۷٪) و متیل سالسیلات(۰/۱۵٪) را در اسانس میخک ماداگاسکار بیان داشتند و اوژنول(۷۹/۸۷٪)، اوژنول استات(۹/۵۶٪)، بتا کاریوفیلن(۶/۹۱٪)، آلفا همولین(۰/۸۳٪)، آلفا کوپان (۰/۲۱٪)، کاریوفیلن اکسید(۰/۱۹٪) و چاویکول (۰/۱۵٪) را نیز در اسانس حاصله از میخک اندونزی بیان کردند(۱۴). G. Fichi و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی که اسانس میخک را مورد بررسی قرار دادند، مقدار اوژنول را ۵۹/۳٪ و بتاکاریوفیلن و اوژنول استات را به ترتیب ۲۴/۹ ٪ و ۴/۲ ٪ اعلام کردند(۱۵).

ترکیب اسانس و عصاره در مناطق مختلف اکولوژیکی یکسان نیست. مواد تشکیل دهنده اندام های یک گیاه در زمان های مختلف بسیار متفاوت می باشد و باید در زمان مناسب اندامی که دارای بیشترین میزان ماده مؤثره است را جمع آوری کرد(۹،۱۱). از جمله عوامل مهمی که در میزان مواد مؤثره گیاهان نقش دارد و می بایستی در هنگام جمع آوری گیاهان بویژه دارویی و معطر مورد توجه قرار گیرند، زمان برداشت مناسب است (۱۶).

نتیجه گیری

هشت ترکیب شیمیایی در عصاره میخک تشخیص داده شد که عمده ترین آنها شامل اوژنول(۸۵/۵٪)، اوژنول استات (۳/۲٪) و هپتاکوزان (۱/۸٪) بودندو هفت ترکیب شیمیایی در اسانس میخک نیز تشخیص داده شد که عمده ترین آن ها شامل اوژنول (۸۶/۳۶٪) و بتاکاریوفیلن (۷/۶۶٪) بودند. سه ترکیب اوژنول، کاریوفیلن و اوژنول استات را بعنوان بیشترین درصد ترکیبات در عصاره اتانولی حاصل از میخک نوع مالزیایی شناخته شد(۱۲). در نمونه های میخک ماداگاسکار ترکیبات عمده به ترتیب اوژنول(۷۷/۵۰٪)، اوژنول استات(۱۶/۰۱٪)، بتا کاریوفیلن(۴/۰۶٪) را در اسانس میخک ماداگاسکار بیان داشتند و و اوژنول(۷۹/۸۷٪)، اوژنول استات(۹/۵۶٪)، بتا کاریوفیلن(۶/۹۱٪) را نیز در اسانس حاصله از میخک اندونزی بیان کردند(۱۴). به طور کلی می توان گفت، اسانس و عصاره های گیاهی هم از نظر مقدار و هم از نظر ترکیب های سازنده تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی و درونی هستند که اوژنول ترکیب اصلی در هر دو عصاره و اسانس بود و بیشترین غلظت از این ترکیب را در میان آنها نشان داد. همچنین می توان پس از آزمایشات تکمیلی از این ترکیبات به عنوان ترکیب نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی استفاده کرد.

منابع و مآخذ

1. Özcan, M. Űnver, A. Ucar, T. and Arslan, D. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. Food Chemistry. 2008.106(3), 1120-1127.
2. Yen, G. C. Duh, P.D. and Tsai, H.L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food Chemistry. 2002. 79(3), 307-313.
3. Sharifi Rad, J. Sureda, A. Carlo Tenore, G. Daglia, M. Sharifi Rad, M. Valussi, M. Tundis, R. Sharifi Rad, M.R. Loizzo, M. Oluwaseun, Ademiluyi, A. Sharifi Rad, R. Ayatollahi, SAM. and Iriti, M. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. Molecules. 2017. 22(1), 70.
4. Juncioni de Arauz, L. Faustino Jozala, A. GavaMazzola, P. and VessoniPenna, T. Nisin biotechnological production and application. Science and Technology. 2009. 20, 146-154.
5. Hosseini, M. KamkarAsl, M. and Rakhshandeh, H. Analgesic effect of clove essential oil in mice. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2011. 1(1), 1-6.
6. Elslimani, FA. Elmhdwi, MF. Elabbar, F. and Dakhil, O .Estimation of antioxidant activities of fixed and volatile oils extracted from Syzygiumaromaticum (clove) . *Der ChemicaSinica.* 2013. 4(3), 120-125.
7. Francisco Cortés Rojas, D. Regina Fernandes de Souza, C. and Pereira Oliveira, W. Clove (*Syzygiumaromaticum*): a precious spice.*Asian Pac J Trop Biomed*, .2014. 4(2), 90-96.
8. Merchan Arenas, DR. Munoz Acevedo, AY. Vargas Mendez, L. and Kouznetsov, V. Scavenger activity evaluation of the Clove Bud Essential Oil (*Eugenia caryophyllus*) and Eugenol Derivatives Employing ABTS+• Decolorization. *ScientiaPharmaceutica*. 2011. 79, 779–791.
9. Raina, VK. SrivastavaS, K. AggarwalK, K. SyamasundarK, V. Kumar, S. Essential oil composition of *Syzygiumaromaticum* leaf from Little Andaman, India. Flavour and Fragrance Journal. 2001. 16(5), 334–336.
10. Taherkhani, P. Noori, N. AkhondzadehBasti, A. Gandomi, H. Alimohammadi M. Antimicrobial effects of Kermanian Black Cumin (BuniumpersicumBoiss.) Essential Oil in Gouda Cheese Matrix. J. Med. Plants. 2014. 54 (2), 76 - 86.
11. Hakk Alma, M. Ertaş, M. Nitz, S. and Kollmannsberger, H. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (Syzygiumaromaticum L.). Bioresources. 2007. 2(2), 265-269.
12. Myint, S. WanDaud, WR. Mohamad, AB. and Kadhum, HAA. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. Journal of Chromatography B. 1996. 679, 193-195.
13. Nassar, MI. Gaara, AH. El-Ghorab, AH. H Farrag, AR. Shen, H. Huq, E. and Mabry, TJ. ChemiCal Constituents of Clove (*Syzygiumaromaticum, fam Myrtaceae*) and their antioxidant a Ctivity. Rev. Latinoamer. Quím. 2007. 35(3), 47-57.
14. Razafimamonjison, G. Jahiel, M. Duclose, T. Ramanoelina, P. Fawbush, F. and Danthu, P. Bud, leaf and stem essential oil composition of clove (*Syzygiumaromaticum L.)* from Indonesia, Madagascar and Zanzibar. 2012. 29(3), 1-10.
15. Fichi, G. Flamini, G. Giovanelli, F. Otranto, D. Perrucci, S. *Expe. Para*. 2007. 115, 168.
16. Smeti, S. Atti, N. Mahouachi, M. and Munoz, F. Use of dietary rosemary essential oils to increase the shelf life of barbarine light lamp meat. Small ruminant research. 2013. 113, 340-345.