شناسایی اجزای متشکله روغنهای اسانسی و بررسی اثر ضد میکروبی گیاه *Consolida orientalis*

پروانه راهداری[1]، عباسعلی دهپور جویباری[2] و محمدعلی رودگر کوهپر[3]

تاریخ دریافت : 1389/7/5 تاریخ پذیرش :1389/8/28

چکیده

زبان درقفا با نام علمی *Consolida orientalis* گیاهی علفی یکساله و از خانواده آلاله (*Ranunculacea*) است. هدف از این مطالعه شناسایی ترکیب های شیمیایی، مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی گیاه است. برای انجام این تحقیق سر شاخه های گلدار گیاه از منطقه کجور با ارتفاع 1400متر از سطح دریا از توابع شهرستان نوشهر جمع‌آوری و پس از شناسایی توسط کارشناسان مربوطه جهت تهیه اسانس وعصاره متانولی بکار رفت.استخراج اسانس، با روش تقطیر با آب (Hydro-distillation) و با بکارگیری دستگاه کلونجر انجام شد. جداسازی و شناسایی ترکیبهای متشکله اسانس با استفاده از دستگاه های GC و GC/MS صورت گرفت که از مجموع 113 ترکیب شناسایی شده در اسانس این گیاه 17 ترکیب با 60/15درصد آدپیک اسید (هگزانو دیوئیکاسید) 0/012/74، فیتول با 011/48/ ، تریکوزان 6% و هگزا دکادین 5.1% گزارش شد. فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه با روش دیسک دیفیوژن بروی 4 سوش باکتری به نام های استافیلو کوکوس آرئوس (PTCC=1112) انتروباکترکلواک (PTCC=1003) کلبسیلا پنومونی (PTCC=1290) پروتئوس میرابیلیس (PTCC=1076) که از مراکز تحقیقات و پژوهشهای علمی صنعتی ایران تهیه شده بود ند با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره‌های متانولی مربوط به انتروباکترکلواک واستافیلوکوک به ترتیب 15و13میلی متر وکمترین اثر را بر باکتری کلبسلاپنومونی7میلی متربوده است. همچنین از حلال خالص به عنوان شاهد منفی و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضد میکروبی، اسانس، عصاره، GC/MS، *Consolida orientalis*، فیتول.

1- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن – گروه زیست شناسی
2- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر – گروه زیست شناسی
3- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن – گروه زیست شناسی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

از آنجایی که گیاهان دارویی در دنیا جهت تغذیه و درمان بیماریها بسیار موثر و از اهمیت خاصی برخوردار می باشند شناسایی ترکیب های موجود در گونه های دارویی و معطر به خصوص گونه های بومی کشور ،مورد توجه محققان و پژوهشگران این رشته قرار گرفته است کشور ما غنی از این گونه های مهم است (1). بسیاری از اسانسهای گیاهی دارای اثر بازدارندگی قابل توجهی بر میکروارگانیزم‌های عامل آلودگی در مواد غذایی هستند (9 و 12).

بنابراین با توجه به مقاومت روزافزونی که باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکهای مشتق از میکروارگانیسمها از خود نشان می دهند، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان نیز بعنوان ترکیبهای طبیعی که اثرهای کشندگی و بازدارندگی بر عوامل بیماریزا دارند، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. از آنجا یی که برخی از گیاهان با اثر ضدمیکروبی در فارماکوپه کشور ثبت شده‌اند از اسانس زبان درقفا (*Consolida orientalis*) هم می‌توان برای مقابله با برخی میکروبهای بیماریزای خاص استفاده کرد و جایگزین بی ضرر برای بعضی آنتی بیوتیک‌ها پیدا نمود. زبان درقفای شرقی معروف به بهار گلی با نام علمی*Consolida orientalis* دارای ساقه بدون انشعاب تا نسبتا منشعب به ارتفاع 70-20سانتی متر است. برگها دارای بریدگیهای عمیق بوده وگلهای بنفش رنگ به صورت نسبتا متراکم در گل آذین های خوشه‌ای قرار گرفته‌اند یکی از گلبرگها درازتر از بقیه است و مهمیز نامیده می شود. تکثیر به روش جنسی و از طریق بذر انجام می‌گیرد. این گیاه در مناطق مختلف جهان از جمله در افریقا در کشور های مراکش و الجزایر و در کشورهای اروپایی از جمله در اسپانیا و آسیای میانه در کشورهایی از جمله ترکیه، سوریه، افغانستان و ایران دیده شده است (6).

دانه گیاه *Consolida regalis* دارای آلکالوییدهای سمی دل‌سولین، دلکوزین و همچنین ماده‌ای به نام کمفرول است. از برگ و گل گیاه مذکور سابقا به عنوان مدر، اشتهاآور و ضد کرم بکار میرفته است. از دم کرده رقیق برگ و گل آنها سابقا در موارد آب آوردن، بیماریهای مزمن کلیه و مثانه، نقرس و سنگ کلیه استفاده می‌شده است در استعمال خارجی از دانه گیاه مذکور در رفع کچلی و دفع شپش استفاده می شده است (4). مقدار و اسانس علاوه بر اینکه به صورت ژنتیکی کنترل می شود به شرایط اقلیمی در زمان شکل گیری و رسیدن بذر نیز بستگی دارد. در بررسی انجام شده توسط والکر[1] و همکاران (1973) با روش کروماتوگرافی گاز مایع برروی گیاه زبان درقفا به وجود ترکیب‌های شیمیایی از جمله آلکالوییدد دلکوسین، استیل دلکوسین و دلوسلین پی بردند.

در تحقیق دیگری سایتو و توکی[2](1998) بروی گیاه (*Consolida Armenia*) مطالعه نمودند و ترکیبی جدید به نام گلیکوزید 3و7 دلفنیدیل را گزارش نمودند که از گروه دی ترپنوییدها می-باشد. در بررسی دیگر بلیژسنر[3] و همکاران(2007) که بروی گونه *Consolida* انجام گرفت مشخص شد که این گیاه میتواند به علت وجود آلکالوییدهای دلوسین و لیکوتنین میتواند دارای خواص ضد میکروبی باشد. در این خصوص، در بررسی حاضر سعی شده است ضمن بررسی دقیق ویژگیهای کمی و کیفی اسانس گیاه

1 - Waller
2 - Saito & Toki
3 - Bilge sener

Archive of SID

www.SID.ir

Consolida orientalis در شرایط اقلیمی استان مازندران و خواص ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی آن نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

اندامهای هوایی گیاه *Consolida orientalis* در مرحله کامل گلدهی در خرداد ماه 1388 از منطقه کجور در استان مازندران جمع آوری گردید، پس از خشک کردن گیاه در سایه و خرد کردن آن به قطعات کوچک از اندام هوایی گیاه به روش تقطیر با آب به مدت 3 ساعت با دستگاه کلونجر[1] اسانس گیری به عمل آمد وپس از جدا سازی اسانس از سطح آب توسط سولفات سدیم آب گیری وسپس به دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی(GC/MS) تزریق شد و طیفهای جرمی و کروماتوگرامهای مربوطه بدست آمد. در این تحقیق از گاز کروماتوگراف مدل6890 -Agilent مجهز به ستونDB-5 طول 40 متر، قطر داخلی 0/18 میلی متر که ضخامت لایه فاز ساکن در آن 0/25 میکرومتر می‌باشد استفاده شد برنامه حرارتی ستون از 60 تا 210 درجه سانتیگراد با شیب 5 درجه سانتیگراد بر دقیقه تنظیم شد دمای محفظه تزریق 280 درجه سانتیگراد و دمای دتکتور مورد استفاده (FID)270 درجه سانتی گراد تنظیم شد و از گاز هلیم به عنوان گاز حامل استفاده شد. جهت آنالیز و شناسایی ترکیبهای تشکیل دهنده اسانس از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی مدل Shimadzu- QP5050A استفاده شد. شرایط آنالیز مشخصات دستگاه GC/MS به صورت زیر بود:

ستون مویینه DB5–MS به طول 40 متر قطر داخلی 0/18 میلی متر ضخامت لایه 0/18 میکرومتر بکار رفت. برنامه حرارتی آون 5 دقیقه در 60 درجه سانتی گراد با شیب 5 درجه سانتیگراد بر دقیقه و سپس 10 دقیقه در 275 درجه سانتیگراد بود. دمای محل تزریق 280 درجه سانتیگراد تنظیم شد گاز حامل هلیم و سرعت حرکت آن 0/9 میلی متر بر دقیقه بود نسبت شکافت 1به 43 و مقدار تزریق 0/1میکرولیتر از نمونه بود دمای منبع یونیزاسیون 230 درجه سانتیگراد، مد یونیزاسیون EI و انرژی یونیزاسیون 70eV بود. سری آلکانهای نرمال 28-C-8C- نیز تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس، برای محاسبه اندیس بازداری (RI) اجزاء اسانس به دستگاه تزریق شد. اندیس بازداری اجزاء نمونه با استفاده از برنامه رایانه‌ای محاسبه شد در نهایت اجزاء اسانس با استفاده از مقایسه طیفهای جرمی بدست آمده با طیفهای جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیک Wiley2000 موجود در نرم افزار Labsolution دستگاه GC/MS و محاسبه اندیس بازداری استاندارد بر اساس سری آلکانهای C-8-C28- و مقایسه آنها با اعداد استاندارد موجود در مراجع شناسایی شدند (10،7و 11).

بررسی اثر ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه بروی 4 سوش باکتری به نام های استافیلو کوکوس آرئوس (PTCC=1112) انتروباکتر کلواک (PTCC=1003) کلبسیلا پنومونی (PTCC=1290) پروتئوس موریلیس (PTCC=1076) که از مراکز تحقیقات و

1 - Clevenger apparatus

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشهای علمی صنعتی ایران تهیه شده بود بررسی شد. بدین منظور از روش انتشار در آگار[1] استفاده شد (5). سپس عصاره گیری از اندام هوایی گیاه با استفاده از حلال متانول با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد از باکتری های کشت داده شده به مدت 24 ساعت بر روی محیط مولر هینتون آگار سوسپانسیونی با رقت 0/5 مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد.

سپس1میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر کدام از باکتری‌ها به روش Pure plate کشت داده شد و دیسک‌های استریل بلانک حاوی30 میکرولیتر از رقت 1/5 اسانس که با دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) رقیق شده بود بر روی محیط کشت قرلر گرفت. سپس قطر هاله ممانعت کننده از رشد پس از 24 ساعت انکوباسیون پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد. همچنین اثر ضد میکروبی این عصاره در مقایسه با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و جنتامایسین به عنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

ترکیبهای شیمیایی شناسایی شده در اسانس و درصد کمی ترکیبها در جدول شماره 1 آورده شده است. نتایج نشان می دهد که از مجموع 113 ترکیب شناسایی شده در اسانس این گیاه 17 ترکیب با 60/15 درصد هگزانو دیوئیک اسید 0/012/74 و فیتول با 011/48/ تریکوزان 6% و هگزا دکادین 5.1% بالاترین درصد اسانس را تشکیل می دهند.

جدول 1: ترکیبهای اسانس سرشاخه های گلدار گیاه *Consolida orientalis*

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد
1	Benzoxazole	1010	2/24
2	Tetradecane	1484	1/30
3	Heneicosane	1541	1/26
4	ocosane	1709	1/56
5	Pentadecano	1845	3/29
6	Cyclohexadecane	1879	1
7	Heneicosane	1923	1/94
8	Hexadecanoic acid (Palmitinic acid)	1965	3/50
9	1,15-Hexadecadiene	2062	5/01
10	Heptadecyl alcohol	2082	1/17
11	*Octadecane*	2100	1/27
12	Phytol	2115	11/48
13	Tricosane	2303	5/60
14	Adipic acid (Hexanedioic acid)	2319	12/74
15	Nonadecane	2504	3/31
16	Heptacosane	2705	1/03
17	Squalene	2811	2/45

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه*Consolida orientalis* نشان داد که:

عصاره متانولی این گیاه بر روی باکتری *Enterobacter cloacae* بیشترین اثر و بر روی *Klebsiella pneumonia* کمترین اثر را با قطر هاله بازدارندگی رشد به ترتیب 15و7 میلی متر را ایجاد کرده است.

1 - Disk diffusion metod

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 2 : نتایج اثر ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه *Consolida orientalis*

ردیف	نام باکتری وشماره استاندارد	قطر هاله بازدارندگی عصاره متانولی(mm)	قطر هاله بازدارندگی شاهد حلال متانولی(mm)	قطر هاله بازدارندگی کلرامفنیکل (mm)	قطر هاله بازدارندگی جنتامایسین (mm)	قطر هاله بازدارندگی والینومایسین (mm)
1	Enterobacter cloacae (PTCC1003)	15	0	25	26	20
2	Staphylococus aureUS (PTCC1112)	13	0	25	16	15
3	Klebsiella pneumonia (PTCC1290)	7	1	22	20	12
4	Proteus mirabilis (PTCC1076)	12	2	30	17	13

بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که گیاهان دارویی در دنیا جهت تغذیه ودرمان بیماریها بسیار موثر واز اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند شناسایی ترکیب‌های موجود در گونه های دارویی و معطر به خصوص گونه‌های بومی کشور مورد توجه محققان و پژوهشگران این رشته قرار گرفته است کشور ما غنی از این گونه های مهم است (1). به هر حال با وجود بررسی های صورت گرفته روی گونه های معطر ویا دارویی کشور ، هنوز زمینه های فراوانی جهت شناسایی گونه ها ویا ترکیب های مهم وجود دارد : که در این تحقیق نسبت به شناسایی ترکیب های موجود واهمیت آنها در گونه *Consolida orientalis* اقدام گردید. مطالعه تجزیه اسانس گیاه *Consolida orientalis* از منطقه کجور از توابع شهرستان نوشهر نشان داد که از مجموع 113 ترکیب شناسایی شده در اسانس این گیاه 17 ترکیب با 60/15 درصد آدپیک اسید (هگزانو دیوئیک اسید) 0/012/74، فیتول با 011/48، تریکوزان 6% و هگزا دکادین 5.1% است که با موارد گزارش شده توسط سایتو و همکاران (1998) بروی گیاه *Consolida Armenia* شباهتهایی دارد اما با موارد گزارش شده توسط والر و همکاران (1973) بر روی گیاه *Consolida*که اصلی‌ترین ترکیبات را آلکالویید دلکوسین، استیل دلکوسین و دلوسلین معرفی نمودند تفاوتهایی دارد که می تواند به علت شرایط اقلیمی و جغرافیایی منطقه باشد. نتایج بررسی اثر های ضد میکروبی گیاه *Consolida orientalis* نشان داد که عصاره متانولی این گیاه بر روی باکتری‌های انتروباکتر کلواک و استافیلوکوک اورئوس بیشترین اثر مهار کنندگی به ترتیب 15و 13 میلیمتر و کمترین اثر را بر روی باکتری کلبسلا پنومونیا با قطر هاله بازدارندگی 7 میلی متر را ایجاد کرده است. در مورد اثر ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه *Consolida orientalis* گزارش‌هایی شده است. در پژوهشهای انجام شده(SBEl, 2009) در کشور ترکیه بروی گونه(*orientalis*) اثرهای ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و حلال خالص بروی باکتری-های گرم مثبت و منفی مورد بررسی و ثابت شده است. در بررسی دیگر (8) که بروی گونه *Consolida* انجام گرفت اثر ضد میکروبی علیه باکتری های گرم مثبت و منفی بررسی واثبات شد. نتایج حاصل نشان از قدرت مهارکنندگی و میکروب کشی بالای عصاره زبان درقفا دارد. اثر ضد میکروبی این گونه را می توان به ترکیبات آدپیک اسید ،تریکوزان، پنتادکان نسبت دادکه اثر ضد میکروبی آنها به اثبات رسیده است (4). در عین حال نباید از اثر سینرژیستی سایر ترکیب های اسانس در بروز خواص ضد میکروبی غافل بود. در رابطه با نحوه عمل عصاره‌ها در مرگ

Archive of SID

www.SID.ir

باکتریها چنین اظهار شده است: یکی از ویژگیهای مهم این مواد خاصیت آبگریزی است که سبب می شود دربخشهای لیپید دیواره و میتوکندری باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آنها می‌گردد .سپس بخش زیادی از محتویات حیاتی و یونها به بیرون تراوش ودر نهایت منجر به مرگ باکتری می‌شوند (3). بنابراین با توجه به اثر ضد میکروبی عصاره گیاه *Consolida orientalis* در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه می توان از این گیاه بعنوان ترکیبی با اثرهای ضد میکروبی وبا منشاء طبیعی استفاده کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

81. رضایی، م، و ک. جایمند، 1387. بررسی ترکیب های شیمیایی گیاه *Anthemis coelopoda*. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، 24(3): 277-271.

82. زرگری، ع.، 1381. گیاهان دارویی. جلد سوم، چاپ پنجم، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، 925 ص.

83. سحر خیز، م.، م. ستاری، غ. گودرزی و ر. امید بیگی، 1387. تعیین اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه *Tanacetum parthenium* L. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، 24(1): 55-43.

84. سمنانی ،م. و م. سعیدی، 1385. بررسی و مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره های متانولی چند گونه گیاه از جنسهای *Stachys* و*Phlomis*. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، 57 : 57-66.

85. سفید کن ، ف.، ل. صادق زاده، م. تیموری، ف. عسگری و ش. احمدی، 1386. بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس دو گونه مرزه در دو مرحله برداشت. فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، 23: 182-174

86. مبین، ص.، 1364. رستنی‌های ایران، فلور گیاهان آوندی. انتشارات دانشگاه تهران. جلد سوم، 350ص.

87. Adams, R., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mmass Spectroscopy. Illiois. Allured Publication Corporation , 456p.

88. Burt, S., 2004. Essential Oils their Antibacteriyal properties and potential applications in foods –a review . International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.

89. Bilge, S., I. Orhan & B. Ozçelik, 2007. Diterpenoid alkaloids from someTurkish Consolida species and their antivirals. Arkivoc, 7: 265-272.

90. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial l properties and potential applications in foods-areview. International journal of food Microbiology, 94: 223-253.

91. Davies, N.W. J., 1990. Chromatohr, 503: 1-2.

92. Shibamoto, T., 1987. Retention Idices in essential oil Analysis., 259-274.

93. Marilena, C., C. Bersani & G. Comi, 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology, 67: 187–195

94. Saito, N. & K. Toki, 1998. Acylated delohynidin glicosides in the blue–violet flowers of Consolida armeniaca. Plant chemistry.

Archive of SID

www.SID.ir