Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

شناسایی ترکیبات شیمیایی، بررسی توانایی رادیکال گیرندگی و خواص ضد میکروبی عصاره بذر گیاه عدس الملک

علی بهنام نیک[1]، محسن وظیفه دوست[2*]، زهره دیدار[2]، بهاره حاجی رستم‌لو[2]

۱- دانشجو دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸ /۰٤/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۰۷)

چکیده

برخی از گیاهان دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و خواص ضد میکروبی بوده و از آن‌ها می‌توان به عنوان ترکیبات فراسودمند در صنعت استفاده نمود، هدف از این مطالعه بررسی قدرت رادیکال گیرندگی، ضد میکروبی و شناسایی ترکیبات عصاره بذر گیاه عدس‌الملک می‌باشد. در این مطالعه ابتدا عصاره‌گیری به روش ترکیبی خیساندن و اولتراسوند (۵۰ هرتز) انجام گردید. سپس شناسایی ترکیبات با دستگاه GC/MS انجام گردید و قدرت رادیکال گیرندگی به وسیله DPPH تعیین گردید. اثر ضد میکروبی عصاره در برابر سویه‌های *اشرشیا کلی*، *لیستریامونوسیتوژنز* و *کاندیدا آلبیکنس* به روش انتشار دیسک تعیین گردید. ١٤ نوع ترکیب شناسایی گردید که جمعا ۹۸/۵۸ درصد ترکیبات عصاره را شامل می‌شدند و بیش‌ترین ترکیبات را Mome Inositol (۳۰/۵۵ درصد)، cis-9-Octadecenoic acid (۲۰/٤٤ درصد) تشکیل دادند. بیشترین قدرت رادیکال گیرندگی مربوط به غلظت ٦۰۰ppm عصاره (۹۱/٦ درصد) بوده است. همه غلظت‌های مختلف عصاره به غیر از غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز قدرت مهارکنندگی داشته‌اند و تمام غلظت‌های عصاره بر باکتری اشرشیاکلی اثر مهارکنندگی داشته‌اند و بیش‌ترین اثر مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر(۱۲/۹۸ میلی‌متر) بود. همچنین هیچ یک از غلظت‌ها اثر مهارکنندگی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس نداشته‌اند. نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره اثر بازدارندگی آن در برابر سویه‌ها به شکل موثری افزایش می‌یابد. با توجه به قدرت آنتی‌اکسیدانی مناسب و خاصیت ضد میکروبی عصاره این گیاه می‌توان از آن در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

کلید واژگان: آنتی اکسیدان، ضد میکروبی، کروماتوگرافی، عدس الملک

*مسئول مکاتبات: m.vazifedoost@iau-neyshabur.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

۱- مقدمه

عدس الملک *Securigera securidaca L* گیاهی علفی، یک ساله، به ارتفاع ۱۰-٤۰ سانتی‌متر و دارای ٤تا ٦ زوج برگچه کمی ضخیم و گوشتی و کامل است. شکل گیاه شبیه به نخود است و دارای میوه‌ای به رنگ قهوه‌ای کم رنگ است که هر میوه حاوی چندین دانه چهار پهلو و مسطح قرمز مایل به قهوه‌ای می‌باشد. این گیاه در بسیاری از مناطق معتدل و مرطوب جهان و بیشتر در کنار باغ‌ها و جوی‌های آب و مزارع گندم قادر به رشد می‌باشد. پرکندگی این گیاه در ایران در استان‌های تهران،شمالی،شمال شرق و خوزستان خصوصا دزفول و رامهرمز می‌باشد [۲و۱]. تقاضای روز افزون آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به علت نگرانی‌های مربوط به مضرات آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، توجه مصرف کنندگان را به محصولات طبیعی جلب کرده است. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان به راحتی توسط بدن جذب می‌شوند. از طرف دیگر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی ممکن است منجر به اثرات نامطلوبی در سلامتی انسان شود و مزایای تغذیه‌ای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی را ندارند [۳]. فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاهان به احتمال زیاد به علت اثرات ترکیبی جذب پلی فنل‌ها به غشای باکتری‌ها همراه با تخریب غشا و به دنبال آن نشت محتوای سلولی و تولید هیدروپراکسیدها از پلی فنل‌ها می‌باشد. همچنین نشان داده شده که عصاره‌های گیاهی در برابر طیف وسیعی از قارچ‌ها، فعالیت ضد قارچی دارد [٤]. اگرچه مطالعات متعددی در شرایط آزمایشگاهی برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی انجام شده است، اما مطالعات بسیار کمی درباره محصولات غذایی انجام شده است. احتمالا به این دلیل است که عصاره‌های گیاهی به صورت خاص در غذاها تولید نمی‌شوند [٥]. همچنین گیاهان دارویی به طور سنتی به عنوان مکمل‌های غذایی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و برای بهبود ویژگی‌های حسی غذاها استفاده می‌شوند، همچنین با کاهش یا از بین بردن باکتری‌های بیماری زا سبب افزایش ماندگاری غذاها می‌شوند. بسیاری از عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از باکتری-ها، مخمرها، و کپک‌ها هستند [٦]. دانه‌های گیاه عدس الملک در طب سنتی ایران به عنوان پایین آورنده فشار خون و پایین آورنده قند خون و درمان دیابت و چربی خون بالا و داروی ضد تشنج مورد استفاده قرار می‌گیرد [۷]. عصاره‌ی آبی و اتانولی دانه‌های عدس الملک حاوی آلکالوئید، تانن و غنی از فلاونوئید می‌باشد [۲]. هدف از این تحقیق، شناسایی ترکیبات شیمیایی، اندازه‌گیری قدرت رادیکال گیرندگی و بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره بذر گیاه عدس الملک جهت کاربرد در صنایع غذایی و دارویی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه عصاره

در این پژوهش بذر گیاه عدس‌الملک از استان خراسان رضوی در ایران به میزان مورد نیاز تهیه گردید و قسمت‌های زائد آن تمیز گردید و بلافاصله پس از شستشو به روش طبیعی خشک گردید. برای استخراج عصاره‌ها به روش ماسراسیون، بذر گیاه عدس‌الملک پاک گردید، سپس توسط آسیاب خرد گردید و پس از الک کردن بذر برای استخراج عصاره‌ها با حلال اتانول به نسبت ۱:۱۰ وزنی حجمی مخلوط گردید. سپس به صورت نیمه مداوم نمونه مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در فرکانس۵۰ هرتز و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه اولتراسوند (Euronda 4D) قرار گرفت. سپس در هات پلیت (Velp) با دور ۳۰۰ rpm به مدت ٢٤ساعت دردمای محیط قرار گرفت و پس از آن توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. حال به منظور حذف حلال و استخراج عصاره‌ها به وسیله تبخیرکننده چرخان (روتاری اواپراتور) مدل Stuart RE300B در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ دقیقه تغلیظ گردید. سپس در زیر هود (Lab Tech) خشک گردید و تا زمان استفاده در ظرف سربسته و غیر قابل نفوذ به هوا در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [۸].

۲-۲- شناسایی ترکیبات شیمیایی

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره متانولی از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی[1](Agilent مدل 7890A) استفاده شد. نام ستون HP5-MS با طول ۳۰ متر و

1. GC/MS

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

قطر داخلی ۰,۲۵ میلی‌متر بود. گاز حامل، هلیم ۹۹/۹۹۹ درصد و تزریق از نوع چند شاخه شدن[2] ،مقدار تزریق ۱ میکرولیتر و سرعت جریان گاز ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شده بود. بر اساس برنامه‌ریزی حرارتی تعریف شده ستون، درجه حرارت محل تزریق در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای ابتدایی آون در ٦۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم و سپس این دما به مدت ۸ دقیقه برای ستون تثبیت شد. سپس ، افزایش دما تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد با روند افزایش ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه انجام و ستون به مدت ۵ دقیقه تحت این دما قرار گرفت. نام دستگاه طیف سنجی جرمی Agilent مدل 5975C بود و از انرژی یونش ۷۰ الکترون‌ولت جهت ایجاد فراگمان‌های جرمی در آن بهره گرفته شد. شناسایی طیف‌ها با استفاده از پارامترهای مختلف از جمله زمان بازداری[3]، مطالعه طیف‌های جرمی نمونه و مقایسه این طیف‌ها با طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد موجود در کتابخانه wiley7n.l دستگاه GC/MS انجام شد [۹].

۲-۳- اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی

از ماده DPPH[4] (سیگما) به عنوان معرف استفاده گردید. بدین ترتیب که ۲ میلی لیتر از غلظت های مختلف عصاره (در دامنه ۱۰۰ تا ۷۰۰ppm) و شاهد به ۲ میلی لیتر محلول ۰/۰۰٤ درصد DPPH در اتانول اضافه گردید. بعداز ۹۰ دقیقه قرار گرفتن در محل تاریک در دمای محیط، جذب نوری نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر علیه بلانک قرائت شد. درصد مهار رادیکال های آزاد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$I\% = \left(\frac{ABlank - ASample}{ABlank}\right) \times 100$$

در این فرمول A_{Blank} جذب نوری شاهد منفی را که فاقد عصاره می باشد نشان می دهد و A_{Sample} میزان جذب نوری غلظت های مختلف عصاره را بیان می کند. در این آزمایش از آنتی اکسیدان سنتزی BHT به میزان ۲۰۰ppm برای مقایسه استفاده گردید [۱۰].

۲-٤- بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره

۲-٤-۱- تهیه کشت میکروبی

غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/٤ و ۰,۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بذر گیاه عدس‌الملک به طور جداگانه تهیه گردید. سویه‌های استاندارد *شامل اشرشیا کلی*[5] (ATCC 25922) ، *لیستریامونوسیتوژنز*[6] (ATCC 13932) و *کاندیدا آلبیکنس*[7] (ATCC 10231) بودند که این سویه‌ها از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدندگردیدند. جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی از عصاره بذر گیاه عدس‌الملک به روش انتشار دیسک استفاده گردید. ابتدا از میکروارگانیسم‌ها سوسپانسیون تهیه شد. سپس درون لوله‌های آزمایش به تعداد میکروارگانیسم‌ها، محیط کشت مولر هینتون براث[8] (مرک) ریخته و سترون شدند، سپس با یک سواپ استریل از پتری دیش‌های دارای میکروارگانیسم‌های مورد پژوهش، تعدادی میکروارگانیسم به لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت مولر هینتون براث منتقل گردید و سوسپانسیون اولیه تهیه گردید. لوله‌های آزمایش حدود ۲٤ ساعت در شیکر انکوباتور (IKA KS 4000) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا باکتری‌ها رشد کنند. پس از تهیه سوسپانسیون، در شرایط سترون و توسط سواپ استریل به طور یکنواخت در تمام سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک) در سه جهت کشت داده شدند [۱۱].

۲-٤-۲- روش انتشار دیسک[9]

در زیر دستگاه لامینار، محیط کشت مولر هینتون آگاری که از قبل تهیه شده به پتری دیش‌های انتخابی استریل اضافه گردید. از باکتری‌های فعال شده سوسپانسیونی معادل با کدورت نیم‌مک-فارلند(۱/۵×۱۰^{۸} cfu/ml) تهیه گردید. سپس توسط سوآپ استریل از لوله حاوی سوسپانسیون باکتری مقداری برداشته شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت خطی کشت شد (لازم به ذکر است کشت خطی برای باکتری اشرشیا کلی بر روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو[10] (مرک) صورت گرفت). سپس دیسک‌های خالی (۷ میلی‌متر) که قبلا توسط اتوکلاو استریل شده‌اند بر روی محیط‌های کشت که قبلا بر روی آن‌ها باکتری کشت داده شده بود توسط پنس استریل قرار داده شدند و

2. Split
3. Retention time
4. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

5. Escherichia coli
6. Listeria monocytogenes
7. Candida albicans
8. Mueller Hinton Broth
9. Disk diffusion
10. Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

غلظت‌های مختلف عصاره به مقدار ۳۰ میکرولیتر (هر بار ۱۰ میکرولیتر) بر روی دیسک‌های خالی توسط سمپلر اضافه گردیدند. فعالیت ضد میکروبی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین[11] (μ۱۰g)، استرپتومایسین[12] (μ۱۰g)، آمپی سیلین[13] (μ۱۰g)، تتراسایکلین[14] (μ۳۰g) و اگزاسیلین[15] (μ۱g) شرکت پادتن طب نیز در پتری دیش‌های جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت ظروف پتری دیش به مدت ۲٤ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۲۷ درجه سانتی‌گراد برای کاندیدا آلبیکنس) نگهداری شدند و پس از آن قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها توسط کولیس دیجیتال اندازه گیری شد [۱۱].

۲-۵- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملا تصادفی با نرم افزار SPSS انجام شد. مقاسیه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد صورت گرفت و رسم نمودارها با نرم افزار Excel 2019 انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی ترکیبات شیمیایی

پیک‌های مربوط به کروماتوگرام GC/MS عصاره متانولی بذر گیاه عدس الملک به همراه ترکیبات شناسایی شده در نمودار ۱ نشان داده شده است. همچنین کلیه ترکیب‌های تشکیل دهنده عصاره همراه با نام شیمیایی ترکیب، زمان بازداری و درصد نسبی آنها در جدول ۱ آورده شده است. ۱٤ ترکیب از عصاره شناسایی گردید که مجموعا ۹۸/۵۸ درصد از ترکیبات عصاره را شامل شده است. بیش‌ترین درصد را Mome Inositol (۳۰/۵۵ درصد)، cis-9-Octadecenoic acid (۲۰/٤٤ درصد)، Dihydrobenzofuran (۱٤/٤۳ درصد)، Palmitinic acid (۱۰/٦۱ درصد) و 2-Methoxy-4-Vinylphenol (۷/۸ درصد) تشکیل داده‌اند. Mome inositolبا فرمول شیمیایی $C_{16}H_{32}O_2$ به عنوان اصلی‌ترین ترکیب عصاره بذر گیاه دارای خاصیت ضد آلوپسیک[16]، ضد سیروز[17]، ضد نوروپاتیک، کلسترولیتیک، لیپوتروپیک و شیرین کننده می‌باشد (۱۲). دومین ترکیب که بیشترین مقدار عصاره را تشکیل می‌دهد، cis-9-Octadecenoic acid می‌باشد که یک اسید چرب اشباع نشده است و به طور گسترده و فراوان در طبیعت توزیع و دارای فعالیت ضد تومور و ضد التهاب می‌باشد [۱۳]. در پژوهشی که توسط موئیترا و همکاران (۱۹٦۹) انجام شد پنج نوع مشتق دی هیدروبنزوفوران از عصاره آبی بذر گیاه استخراج شد و اثرات کاهندگی قند خون، اثرات دیورتیک، هیپوکالمیک و کرونوتروپیک از این مواد نشان داده شد [۱٤]. 2-Methoxy-4-Vinylphenol ماده‌ای معطر است که به عنوان طعم دهنده استفاده می‌شود و یکی از ترکیبات مسئول عطر طبیعی گندم سیاه است. ساکارومایسس سرویزیه (مخمر آبجو) و سودوموناس فلورسانس قادر به تبدیل اسید ترانس فرولیک به ۲-متوکسی-٤-وینیل فنول هستند و به طور کلی در صنایع آبجوسازی کاربرد دارد [۱۵]. Cannabidiol یک فیتوکانابینوئید[18] است که در سال ۱۹٤۰ کشف شد و یکی از ۱۱۳ کانابینوئید شناخته شده در گیاهان شاهدانه است و در برابر باکتری‌های مسئول بسیاری از عفونت‌های جدی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوک پنومونیه* دارای قدرتی مشابه آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین[19] یا دپتومایسین[20] می‌باشد [۱٦]. Octadecane یک آلکان با زنجیره مستقیم است که دارای ۱۸ اتم کربن است. این ماده به عنوان یک متابولیت باکتریایی و یک متابولیت گیاهی نقش دارد (۱۷). Palmitic acid یک اسید چرب با زنجیره بلند اشباع شده با ستون ۱٦

11. Gentamicin
12. Streptomycin
13. Ampicillin
14. Tetracycline
15. Oxacillin

16. Anti-alopecic
17. Anti-cirrhotic
18. phytocannabinoid
19. vancomycin
20. daptomycin

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

کربن است و شکل ظاهری این ترکیب، بلورهای سفید است. اسید پالمیتیک به طور طبیعی در روغن نخل و روغن هسته خرما و همچنین در کره، پنیر، شیر و گوشت یافت می‌شود [۱۸]. trans-9-Octadecenoic acid اسید الائیدیک یک اسید 9-Octadecenoic می‌باشد و ایزومر ترانس اسید اولئیک است و به عنوان یک ماده غذایی نقش دارد. یک اسید چرب اشباع نشده که گسترده‌ترین و فراوان‌ترین اسید چرب در طبیعت است. از آن برای تهیه روغن، لوسیون و به عنوان یک حلال دارویی به صورت تجاری استفاده می‌شود [۱۹].

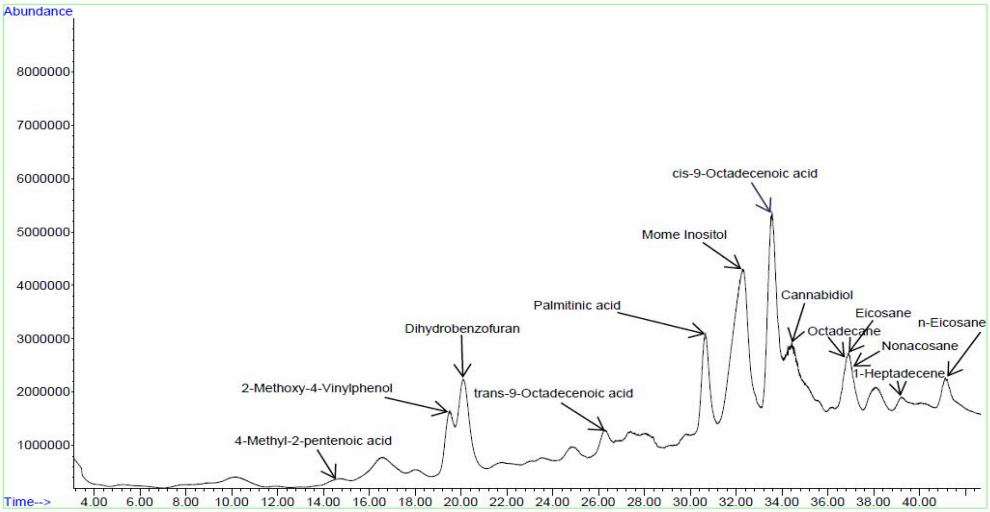

Fig 1 GC/MS chromatogram for the methanolic extract of *S. securidaca*

Table 1 Identified chemical compounds

Number	COMPONENT	Peak area (%)	Retention time
1	4-Methyl-2-pentenoic acid	0.16	14.715
2	2-Methoxy-4-Vinylphenol	7.8	19.465
3	2,3 Dihydrobenzofuran	14.43	20.112
5	trans-9-Octadecenoic acid	2.2	26.331
6	Palmitinic acid	10.61	30.656
7	Mome Inositol	30.55	32.317
8	cis-9-Octadecenoic acid	20.44	33.594
9	Cannabidiol	1.06	34.305
10	Octadecane	2.66	36.823
11	Eicosane	1.65	36.887
12	Nonacosane	3.21	37.044
13	1-Heptadecene	0.23	39.195
14	n-Eicosane	3.58	41.206
Total		98.58	

۳-۲- قدرت آنتی‌اکسیدانی

جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره و مقایسه آن با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT[21] از روش مهار رادیکال آزاد (DPPH) استفاده گردید که نتایج آن در نمودار ۲ نشان داده شده است. بین غلظت‌های مختلف عصاره با یکدیگر و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت($P<0.05$). با افزایش میزان غلظت عصاره میزان قدرت

21. Butylated hydroxytoluene

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

رادیکال گیرندگی و به دنبال آن قدرت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. همچنین غلظت‌های ppm ۱۰۰،۲۰۰،۲۵۰ مقدار قدرت رادیکال گیرندگی کم‌تری نسبت به BHT نشان دادند ولی غلظت‌های ppm۳۰۰ و بیشتر از آن دارای قدرت رادیکال گیرندگی بیشتری نسبت به BHT بودند. در غلظت‌های بالاتر به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیلی ترکیبات فنلی، احتمال دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و به دنبال آن بر قدرت مهارکنندگی و آنتی‌اکسیدانی عصاره افزوده می‌شود [۲۰]. عصاره بذر گیاه عدس‌الملک در غلظت‌های مختلف دارای قدرت مهارکنندگی می‌باشد که با افزایش غلظت عصاره قدرت مهارکنندگی افزایش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های باغبانی و شیرازی نژاد (۲۰۱۹)، که بیان کردند با افزایش غلظت عصاره هسته خرما مقدار ترکیبات فنولی و قدرت رادیکال گیرندگی و به دنبال آن خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد، مطابقت داشت [۲۱]. محمدی و عربشاهی دلویی(۲۰۱۷)، ترکیبات موثره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اولئوگم‌رزین را اندازه گیری کردند و گزارش نمودند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در همه روش-ها وابسته به غلظت بوده است. بیش‌ترین میزان قدرت رادیکال گیرندگی مربوط به بالاترین غلظت (۱۰۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر) به میزان ۲۲/۲۳ درصد می‌باشد. آن‌ها وزن مولکولی بالا، حلقه‌های آروماتیک بیشتر و همچنین گروه‌های هیدروکسیل زیادتر را از شاخص‌های اصلی در میزان توانایی ترکیبات فعال زیستی جهت مهار رادیکال‌های آزاد معرفی نمودند [۲۲].

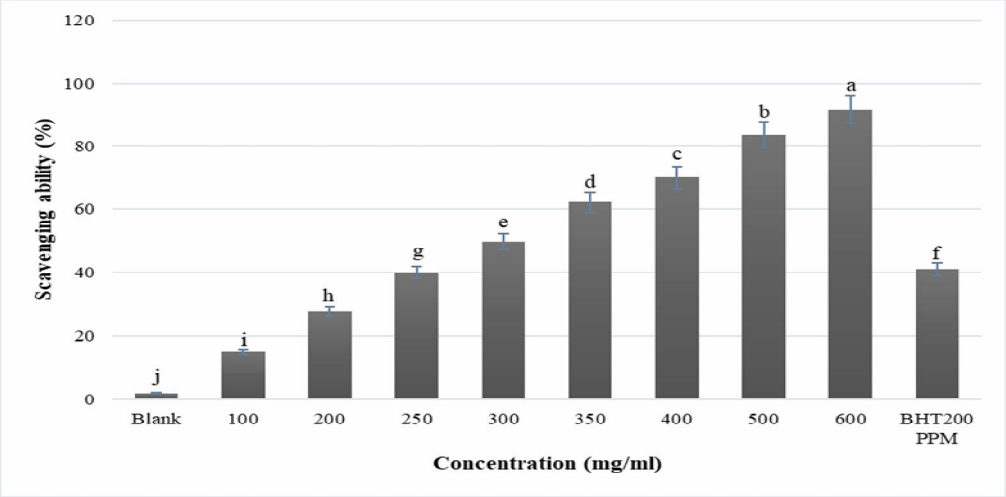

Fig 2 DPPH radical scavenging activities of different concentrations of extracts

۳-۳- فعالیت ضد میکروبی

نتایج بدست آمده از آزمون انتشار دیسک شامل غلظت‌های مختلف عصاره بذر گیاه عدس‌الملک در برابر سویه‌های مورد آزمایش و مقایسه آن‌ها با دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استاندارد در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که کم‌ترین هاله عدک رشد مربوط به غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با میانگین قطر ۰ و ۱۰/۷۶ میلی‌متر به ترتیب برای باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی* می‌باشد. بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۰,۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با مقادیر ۱۲/۶۱ و ۱۲/۹۸ میلی‌متر به ترتیب مربوط به باکتری‌های باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی* می‌باشد. هیچ یک از غلظت‌های مختلف عصاره بذر گیاه قادر به مهار رشد قارچ *کاندیدا آلبیکانس* نبودند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده موثر موجود در عصاره نسبت داد. ارتباط مستقیمی بین افزایش غلظت عصاره و افزایش اثر مهارکنندگی وجود دارد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد به طور

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<0.05$). متوسط قطر هاله عدم رشد برای دیسک‌های آنتی‌بیوگرام استرپتومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین و آمپی‌سیلین برای باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب ١٨/١٦، ٢٣/٤٩، ٢٥/٢٧ و ٢٢/٩٦ میلی‌متر و برای باکتری *اشرشیا کلی* به ترتیب ١٤/٣٣، ٢٩/٢٥، ٢٦/٤ و ١٥ میلی‌متر می‌باشد و هیچ یک از این باکتری‌ها بر روی دیسک آنتی بیوگرام اگزاسیلین اثر مهارکنندگی نداشتند. همچنین هیچ یک از دیسک‌های آنتی‌بیوگرام قادر به مهار رشد *کاندیدا آلبیکنس* نبودند و فقط اگزاسیلین با میانگین قطر ١٦/٨٥ میلی‌متر قادر به مهار رشد بود. فراهانی و همکاران (٢٠١٩)، گزارش نمودند که وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده موثر موجود در اسانس و عصاره نسبت داد و ارتباط مستقیمی بین افزایش غلظت و افزایش اثر مهارکنندگی وجود دارد که به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری افزایش می‌یابد [٢٣]. علی نژاد و همکاران(١٣٩٥)، به بررسی اثرات ضد میکروبی دانه سویا به روش انتشار دیسک پرداختند و نتایج نشان داد که غلظت ٠,٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بر روی باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*(١٨/٥ میلی‌متر)، *استافیلوکوکوس اورئوس*(٢٥ میلی‌متر)، *اشرشیا کلی*(٩/٦ میلی‌متر) اثر مهار کنندگی داشته است [٢٤]. فاضلی نسب و همکاران (٢٠١٧) به ارزیابی ارتباط بین خواص آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد میکروبی عصاره حاصل از ٩ نوع گیاه دارویی به روش انتشار دیسک پرداختند. عصاره رزماری موثرترین عصاره بر باکتری اشرشیا کلی ، عصاره مورد موثرترین عصاره بر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. نتایج نشان داد گیاهانی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند خاصیت ضد میکروبی بالایی نیز دارند به طوری که عصاره مورد و سپس رزماری که دارای بالاترین میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده‌اند، موثرترین عصاره‌ها بر باکتری‌های مورد آزمایش بودند [٢٥]. مطالعه‌ای که توسط احمدی و همکاران (٢٠١١)، به بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاه بومادران پرداختند و قطر هاله مهار رشد را بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس*، *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس*، *سودوموناس آیروژینوزا* و *کاندیدیا آلبیکنس* با روش انتشار دیسک در محیط کشت مایع تعیین کردند و هیچ یک از قسمت-های گیاه بومادران قادر به مهار رشد قارچ *کاندیدیا آلبیکنس* نشدند و تنها آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین (١٨ میلی‌متر) قادر به مهار رشد بود، همچنین اسانس این گیاه در مقایسه با عصاره، اثرات ضد میکروبی قابل توجهی نداشت. [٢٦]. یاسا و همکاران (٢٠١١)، فعالیت ضد میکروبی گیاه عدس‌الملک به روش چاهک گذاری بررسی کردند و نتایج نشان داد که عصاره اتری و کلروفرمی گیاه بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و سودوموناس آئروژینوزا دارای اثر مهار کنندگی می‌باشد ولی عصاره متانولی هیچ خاصیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه نداشت [٢٧]. چاندا و همکاران (٢٠١١)، به بررسی فعالیت ضد میکروبی ٦ گیاه (شاهدانه، نخود فرنگی، باقلا، ماش سیاه، ماش و لوبیا چشم بلبلی) مربوط به خانواده فاباسه[22] بر روی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سودوموناس پیکتوریوم* و *کلبسیلا آئروژنز* به روش انتشار از چاهک در آگار پرداختند. نتایج نشان داد تمام عصاره‌ها دارای حداقل غلظت مهارکنندگی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه بودند و شاهدانه بهترین فعالیت ضد میکروبی را نشان داد [٢٨].

22. Fabaceae

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

Table 2 Mean inhibition zone diameters (mm) of *Securigera securidaca* seed extract on some pathogens by disk diffusion method

Different concentrations of	Inhibition zones (mm)		
plant seed extract	Listeria monocytogenes	Escherichia coli	Candida albicans
0.25 mg/ml	0 ± 0^{d}	10.76 ± 0.65^{c}	-
0.3 mg/ml	9.07 ± 0.1^{c}	11.44 ± 0.84^{bc}	-
0.4 mg/ml	11.23 ± 0.14^{b}	12.49 ± 0.38^{ab}	-
0.5 mg/ml	12.61 ± 0.25^{a}	12.98 ± 0.34^{a}	-
Antibiogram Disk			
Streptomycin	18.16 ± 0.33^{b}	14.33 ± 0.24^{c}	-
Tetracycline	23.49 ± 2.5^{a}	29.25 ± 0.75^{a}	-
Ampicillin	25.27 ± 1.08^{a}	26.4 ± 0.28^{b}	-
Gentamicin	22.96 ± 0.62^{a}	15 ± 0.42^{c}	-
Oxacillin	-	-	16.85 ± 0.37^{a}

*Values are means of three determinations ± SD. Similar letters within a column indicate no significant differences ($P < 0.05$).

٤- نتیجه گیری

از مشکلات مهم امروزه صنعت غذا استفاده از ترکیبات سنتزی و همچنین آلودگی پس از فرایند مواد غذایی می‌باشد. با توجه به اینکه عصاره بذر گیاه عدس‌الملک دارای قدرت رادیکال گیرندگی مناسبی بود می‌تواند به عنوان یک منبع طبیعی آنتی-اکسیدانی مناسب جهت جایگزینی ترکیبات مصنوعی و شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین مشخص شد که عصاره بذر گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد و با بررسی بر روی میکروارگانسیم‌های بیش‌تر از آن می‌توان به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

٥- منابع

[1] Ghahraman, A., 1993. Flore de Iranien Couleurs Naturelle. Tehran, Tehran University Press, 12, 1478.

[2] Ghosh, B.K., and Dutta, A. 1950. Constituents of the seeds of Securigera securidacea. Indian Journal of Pharmacy, 12, 233-235.

[3] De Araujo, T.A., Barbosa, A.M.J., Viana, L. H., and Ferreira, V.S. 2011. Electroanalytical determination of TBHQ, a synthetic antioxidant, in soybean biodiesel samples. Fuel, 90(2), 707-712.

[4] Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology, 94(3), 223-253.

[5] Kapoor, N., Narain, U., and Misra, K. 2007. Bio-active conjugates of curcumin having ester, peptide, thiol and disulfide links. Journal of Scientific and Industrial Research (JSIR), 66(8), 647-650.

[6] Negi, P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International journal of food microbiology, 156(1), 7-17.

[7] Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., and Danaei, A.R. 2002. Antihyperglycaemic effect and acute toxicity of Securigera Securidaca L. seed extracts in mice. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 16(8), 745-747.

[8] Behnam Nik, A., Vazifedoost, M., Didar, Z., and Hajirostamloo, B. 2019. The antioxidant and physicochemical properties of microencapsulated bioactive compounds in Securigera securidaca (L.) seed extract by co-crystallization. Food Quality and Safety, fyz022.

[9] Ghassemi, N., Sajjadi, S.E., Ghannadi, A., Shams-Ardakani, M., and Mehrabani, M. 2003. Volatile constituents of amedicinal plant

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

of Iran, Echium amoenim Fisch. and CA Mey. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 11(1), 32-33.

[10] Burits, M., and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy research, 14(5), 323-328.

[11] Iranbakhsh, A., Ebadi, M., and Bayat, M. 2010. The inhibitory effects of plant methanolic extract of Datura stramonium L. and leaf explant callus against bacteria and fungi. Global Veterinaria, 4(2), 149-155.

[12] Das, S., Vasudeva, N., and Sharma, S. 2014. Chemical composition of ethanol extract of Macrotyloma uniflorum (Lam.) Verdc. using GC-MS spectroscopy. Organic and medicinal chemistry letters, 4(1), 13.

[13] Gideon, V.A. 2015. GC-MS analysis of phytochemical components of Pseudoglochidion anamalayanum Gamble: An endangered medicinal tree. Asian Journal of Plant Science and Research, 5(12), 36-41.

[14] Moitra, S.K., Ganguly, A.N., Chakravarti, N.N., and Adhya, R.N. 1969. Chemical investigation of the constituents of the seeds of Securigera securidaca Linn. Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine, 17(3), 80.

[15] Janeš, D., Kantar, D., Kreft, S., and Prosen, H. 2009. Identification of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) aroma compounds with GC–MS. Food chemistry, 112(1), 120-124.

[16] Campos, A.C., Moreira, F.A., Gomes, F.V., Del Bel, E.A., and Guimaraes, F.S. 2012. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 367(1607), 3364-3378.

[17] Walsh, K., Jones, G.J., and Dunstan, R.H. 1998. Effect of high irradiance and iron on volatile odour compounds in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. Phytochemistry, 49(5), 1227-1239.

[18] Beare-Rogers, J.L., Dieffenbacher, A., and Holm, J.V. 2001. Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 73(4), 685-744.

[19] Tardy, A.L., Morio, B., Chardigny, J.M., and Malpuech-Brugere, C. 2011. Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. Nutrition research reviews, 24(1), 111-117.

[20] Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., and Wang, Z. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (Juglans regia L.). Food Chemistry, 113(1), 160-165.

[21] Baghbani, F., and Shirazinejad, A. 2019. Study of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Date Seed Extract and itsEffects on Physicochemical, Microbial and Sensory Properties of Cupcake. Journal of Food Science and Technology (JFST), 88(16), 327-339.

[22] Mohammadi, A., and Arabshahi- Delouee, S. 2017. Evaluation of active components and antioxidant activity of essential oil of Boswellia serrata. Journal of Food Science and Technology (JFST), 63(14), 107-116.

[23] Farahani, M., Shahidi, F., and Tabatabaei yazdi, F. 2019. Evaluation of Antimicrobial Activites of Satureja hortensis L. Essential Oil Against Some Food Born Pathogenic and Spoilage Microorganism. Journal of Food Science and Technology (JFST), 85(15), 393-404.

[24] Alinezhad, H., Ghahari, S., Nematzadeh, G., Tajbakhsh, M., and Baharfar, R. 2016. Chemical composition and antimicrobial effects of methanol extract of soybean seed. Biotechnology of medicinal plants, 2(3), 37-46.

[25] Fazeli-Nasab, B., Rahnama, M., and Mazarei, A. 2017. Correlation between antioxidant activity and antibacterial activity of nine medicinal plant extracts. J Mazandaran Univ Med Sci, 27(149), 63-78.

[26] Ahmadi, Z., Sattari, M., Tabaraee, B., and Bigdeli, M. 2011. Identification of the constituents of Achillea santolina essential oil and evaluation of the anti-microbial effects of its extract and essential oil. Arak Medical University Journal, 14(56), 1-10.

[27] Yassa, N., Tofighi, Z., Molazem, M., Aliaslmamghany, F., Shahverdi, A., and Samadi, N. 2011. Evaluation of antimicrobial effects of three traditional medicinal plants from Iran. Planta Medica, 77(12), 62.

[28] Chanda, S., Dudhatra, S., and Kaneria, M. 2010. Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit rind of nutraceutical plants belonging to the Fabaceae family. Food & function, 1(3), 308-315.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:01 IRST on Sunday February 16th 2020

Identification of Chemical Compounds, radical scavenging activity and Antimicrobial Properties of Seed Extract of Securigera securidaca L

Behnam Nik, A. [1], Vazifedoost, M. [2*], Didar, Z. [2], Hajirostamloo, B. [2]

1. PhD. Candidate of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran
2. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

(Received: 2019/07/21 Accepted:2019/12/28)

Some plants have antioxidant compounds and antimicrobial properties and can be used as fractional compositions in the industry. This study aimed to investigate the radical scavenging and antimicrobial properties as well as the determination of the compounds in the seed extract of Securigera securidaca. The plant seeds were extracted by maceration method using ultrasound (50 Hz) and dried extract in this study. Then, the compounds were identified by GC/MS device and the radical scavenging capacity was determined by DPPH. The antimicrobial properties of the extract were determined by disc-diffusion method against Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Candida albicans strains. Fourteen (14) compounds were identified, containing 98.58% of total extract compositions, and the highest percentage was related to Mome Inositol (30.55%) and cis-9-Octadecenoic acid (20.44%). The highest radical scavenging capacity was observed at the concentration of 600 ppm of extract (91.6%). Different concentrations of the extract rather than the concentration of 0.25 mg/ml inhibited L. monocytogenes and all concentrations of extract had inhibitory effect on E. coli and the most effect was related to the concentration of 0.5 mg/ml (12.98 mm). None of the concentrations had an inhibitory effect on C. albicans. The results showed that the extract inhibitory effect increased on the strains effectively by increasing the concentration of extract. The plant extract can be used in the nutraceutical industries due to its appropriate antioxidant activity and antimicrobial properties.

Keywords: Antioxidants, Antibacterial, Chromatography, Securigera securidaca

* Corresponding Author E-Mail Address: m.vazifedoost@iau-neyshabur.ac.ir

www.SID.ir