بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)

رضا کاظم‌الوندی[۱*]، انوشه شریفان[۲]، مهزاد آقازاده‌مشگی[۳]

چکیده

نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* یکی از گیاهان دارویی پر مصرف است که علاوه بر آثار درمانی به عنوان طعم دهنده در تولید محصولات غذایی مختلف بکار می‌رود. در این بررسی پس از جمع‌آوری و خشک کردن برگ‌های گیاه، به روش تقطیر با آب (Hydro distillation) توسط دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) اسانس گیاه استخراج شده و شناسایی ترکیبات اسانس به کمک دستگاه GC-MS صورت پذیرفت. اثرات ضد میکروبی اسانس نیز با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به روش رقیق‌سازی در محیط آگار (Agar dilution method) بررسی شد. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس عبارت بودند از: منتول(۳۹/۸۱٪)، منتون(۱۹/۵۵٪)، نئو منتول (۸/۸۳٪)، متیل استات (۸/٦٤٪) و ۱و۸-سینئول(۵/۸۱). میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس آرئوس، اشرشیا کولی و سالمونلا تیفی بترتیب ۱۵۰، ۳۰۰ و ۲۵۰ پی‌پی‌ام بدست آمد.

واژگان کلیدی: *نعناع فلفلی، اسانس، روش تقطیر با آب، حداقل غلظت بازدارندگی، رقیق‌سازی در محیط آگار*

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۸

Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil

Kazem Alvandi, R.[1,*], Sharifan. A.[2], Aghazadeh Meshghi. M.[3]

1- Member of food hygiene, Takestan Branch, Islamic Azad University, Ghazvin, Iran (Kazemalvandi@yahoo.com)*
2- Assistant professor of food hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Assistant professor of food hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Peppermint (menthe piperita) is a usable medicinal herb that has therapeutic effects. Therewith can use as flavoring agent in the manufacture of foods. In this study, pick up and drying of the leafs done at the first and then essential oil of the herb was collected by hydrodistillation method and Clevenger apparatus. Chemical composition of essential oil were identified with a GC-MS system. Antimicrobial effects of essence were studied with agar dilution method and specified with minimal inhibitory concentration. The most important components of peppermint essential oil were: menthol (39.81%), mentone (19.55%), neo menthol (8.83%), menthylacetate (8.64%), and 1, 8-cineole (5.81%). Minimmum imhibitory concentration (MIC) of peppermint oil on the staphylococcus aureus, E.coli and salmonella tiphy was 150, 300, and 250 ppm respectively.

Key words: *Mentha piperita, Essential oil, Hydrodistillation, Minimum inhibitory, Agar dilution*

مقدمه

امروزه با توجه به آثار جانبی و معایب استفاده از ترکیبات نگهدارنده شیمیایی، گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی را می‌توان به جای آنها برای حفظ و نگهداری مواد غذایی مختلف استفاده کرد. گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که اسانس‌ها دارای خواص ضد میکروبی و ضد قارچی هستند. تیره نعنائیان دارای ۱۸۷ جنس و ۳۰۰۰ گونه است. گونه‌های خاص این تیره تقریباً در سراسر جهان پراکنده‌اند. نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* و نام رایج Peppermint گیاهی است که از قدیم‌الأیام به عنوان یک گیاه معطر و اشتهاآور به کار می‌رفته است. از خواص دارویی نعناع می‌توان به خاصیت ضد اسپاسم، پیشگیری کننده از استفراغ، ضد نفخ و خنک‌کنندگی آن اشاره کرد(۱). نعناع فلفلی یکی از پُر مصرف‌ترین گیاهان دارویی است که مقدار مصرف سالانه اسانس آن در جهان به حدود ۷۰۰۰ تن می‌رسد. مقدار اسانس این گیاه بسته به شرایط کشت بین ۳-۱٪ متغیر است. اسانس پیرمینت دارای ماده‌ای بنام منتول می‌باشد که ایجاد احساس خنکی در دهان می‌کند. از این رو از اسانس نعناع فلفلی بعنوان طعم دهنده و معطر کننده در داروها، خمیردندان‌ها،

۱*- عضو هیأت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران. (Email: Kazemalvandi@yahoo.com)
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، عضو هیأت علمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استادیار دانشکده دامپزشکی، عضو هیأت علمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

شکلات‌های نعناعی و آدامس‌ها استفاده می‌شود. مقدار منتول در اسانس نعناع بسته به نوع آن و شرایط محیطی از ۵۵-۳۵٪ متغیر است(۲). فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاهان بر روی میکروارگانسیم‌ها از دیرباز شناخته شده و مطالعات زیادی درباره گونه‌های مختلف گیاهی و تأثیر اسانس یا عصاره آنها روی میکروارگانسیم‌ها انجام شده است. در سال ۱۹۹۳ Tylor نعناع فلفلی از خانواده نعناع را یک منبع غنی از روغن‌های اسانسی معرفی کرد که مصارف غذایی عمده‌ای دارد و از نظر مصارف داروئی نیز به عنوان اسپاسمولیتیک، ضد باکتری و کمک کننده هضم غذا می‌باشد (۱۹). اجزاء و تر کیبات اصلی نعناع فلفلی و اجزاء برگ‌های آن توسط TLC، در سال ۱۹۹٤ توسط Guedon و Pasquier بررسی شده است (۸). در سال ۱۹۸٤ Shelef (١٦) طی آزمایشات و تحقیقات خود در بررسی فعالیت ضد میکروبی موثرترین گونه‌ها را آویشن، مرزنجوش، مریم گلی و نعناع معرفی کرد و در سال ۱۹۹٤ Pandit (۱۵) بیـان کـرد که فعالیت این گونه‌ها بستگی به نوع، ترکیب، غلظت اسانس‌های روغنی، نوع و غلظت میکروارگانیسم موردنظر، ترکیب ماده و.... دارد. از خانواده نعناع جنس‌های *Mentha longifolia*، *Mentha pulegium*، *Mentha piperita* و *Mentha spicata* از نظر ترکیبات شیمیایی آنالیز شده‌اند که *M.villoso-nervata* ، *M.spicata* و *M.longifolia* به عنوان گیاهان غنی از کارون معرفی شده‌اند (۱۲). در سال ۱۹۹٦ Sivropoulou (۱۷) و در سال ۱۹۹۹ Marino (۱۳) و در سال ۲۰۰۰ Tassou (۱۸) نشان دادند که بسیاری از گونه‌های آروماتیک علاوه بر معطر بودن و موثر بودن در طعم غذا خاصیت ضد میکروبی بالایی نیز از خود نشان دادند که از مهمترین این گونه‌ها به تیموس، مرزنجوش، نعناع، مریم گلی، رزماری، مرزه و... اشاره کردند. در سال ۱۹۸۷ Janssen (۱۱) و در سال ۲۰۰۰ Dorman و Deans (۷)در طی مطالعات خود بیان کردند که اسانس‌های روغنی مرزنجوش، تیموس، نعناع و پونه در رابطه با زنجیره‌های E.coli بسیار فعال هستند. در سال۲۰۰۰ Tassou وهمکارانش اثر اسانس نعناع فلفلی را در مقادیر 0-1.2%v/v بر روی *S.enteritidis* و*S.aureus* در محیط کشت nutrient broth بررسی کردند. بر این اساس پس از افزودن اسانس پپرمینت به محیط کشت مذکور، شمارش کلی کولونی‌های *S.aureus* در حدود۷-٦ سیکل لگاریتمی و *S.enteritidis* در حدود ۳ سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کرد. و همچنین در این مطالعه نشان داده شده که در مقادیر کمتر اسانس (کمتر از۰,۱٪) افزودن گلوکز به محیط کشت باعث جلوگیری از ترشح *staphylococcal enteratoxin B* میشود در حالیکه تعداد کولونی‌ها تنها ۲ سیکل لوگاریتمی کاهش می‌یابد. تاثیر گلوکز بر روی نمونه‌های *S.enteritidis* چندان مشهود نبود(۱۸). در سال ۲۰۰۵ در آرژانتین ,Moreira و همکارانش اثر ضد میکروبی اسانس چند گیاه از جمله اکالیپتوس، رزماری، نعناع فلفلی، میخک، لیمو، اریگانو(پونه کوهی)، ریحان و... را بر روی گونه‌های مختلف*E.coli 0157:H7* بررسی کردند. حساسیت گونه‌های مختلف *E.coli* نسبت به اسانس‌های به کار رفته تقریبا شبیه بود. اثر ضد میکروبی اسانس میخک در بین تمامی اسانس‌های مورد استفاده شدیدتر بود. پس از میخک، اسانس اوکالیپتوس و اسانس نعناع فلفلی اثرات ضد میکروبی قابل توجهی از خود نشان دادند(١٤). Sivropoulou و همکاران (۱۹۹۵) وIscan و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که اسانس نعناع تاثیر بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد(۱۰و۱۷). Delaquis و همکارانش (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند که باکتری‌های گرم مثبت در برابر اسانس‌های شوید، گشنیز و اکالیپتوس نسبت به باکتری‌های گرم منفی بسیار حساس‌ترند(٦). بسیاری از محققین تاکید کرده‌اند که خاصیت آنتی باکتریال اجزاء اصلی اسانس‌ها به خاصیت هیدروفوبیک آنها و دیواره غشاء پلاسمایی میکروب بستگی دارد. افزایش مقدار برخی یون‌های ویژه بر روی/ و یا داخل غشاء پلاسمایی تاثیر وسیعی بر روی نیروی محرکه پروتون‌ها، میزان ATP درون سلولی و فعالیت کلی سلول‌های میکروبی (شامل کنترل فشار ورم سلول‌های زنده، انتقال مواد حل شونده و تنظیم متابولیسم) دارد. نتیجه اینکه اسانس‌ها مکانیزم عمل یکسانی نداشته و ممکن است از طرق مختلف باعث جلوگیری از رشد باکتری‌ها شوند. در اغلب تحقیقاتی که بر روی مکانیزم

www.SID.ir

عمل ترکیبات فنولیک انجام شده است اکثراً صحبت از تاثیر اسانس‌ها بر غشاء سلولی می‌باشد. در حقیقت ترکیبات فنولی نه تنها به غشاء سیتوپلاسمی حمله می‌کنند، حتی بموجب آن باعث تخریب قابلیت نفوذپذیری غشاء شده و نیز باعث آزاد شدن اجزای اصلی داخل سلول (مثل ریبوز و گلوتامات سدیم و...) می‌شوند و نیز می‌توانند تخریب عملکرد در زمینه انتقال الکترون، جذب مواد مغذی، سنتز نوکلئیک اسید و همچنین فعالیت آنزیم ATPase را به همراه داشته باشند.

علی‌رغم تمام مطالعات انجام شده از آنجاییکه نعناع فلفلی یکی از گیاهان بومی ایران بوده و هر ساله مقادیر هنگفتی از آن به کشورهای خارجی صادر می شود، می‌توان از این گیاه با ارزش استفاده‌های فراوان کرد. همچنین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی بسیار وابسته به شرایط آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی محل، نحوه استخراج، شرایط بسته‌بندی و نگهداری و... می‌باشند و از آنجا که اثر ضد میکروبی اسانس بسته به ترکیبات تشکیل دهنده آن است می‌توان انتظار داشت که اسانس تهیه شده از گیاه نعناع فلفلی ایران ویژگی‌های متفاوتی داشته باشد. فعالیت بیولوژیک و کاربرد اسانس در صنایع مختلف به ترکیبات شیمیایی موجود در آن بستگی دارد که خود تحت تأثیر عوامل محیطی، زمان برداشت، شرایط کشت، روش‌های زراعت و اندام مورد اسانس‌گیری است. در این تحقیق هدف مطالعه بررسی تأثیر اسانس گیاه نعناع فلفلی بر روی شایع‌ترین باکتری‌های مولد فساد غذاهاست. در بین ۲۵۰ نوع بیماری ناشی از مصرف غذا که ۲/۳ آن باکتریایی می‌باشد، مسمومیت‌های ناشی از سالمونلا، اشرشیا کولی و استافیلوکوکوس آرئوس از مهمترین این بیماری‌ها بوده که در بسیاری از کشورها جایگاه‌های اصلی را به خود اختصاص داده‌اند. به عنوان مثال در کشور فرانسه بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۰ سالمونلا رتبه اول و استافیلوکوکوس آرئوس رتبه دوم را به خود اختصاص داده‌اند. همچنین در امریکا سالمونلا و استافیلوکوکوس آرئوس بترتیب دومین و سومین عوامل بیماری و مسمومیت‌های ناشی از غذا شناخته می‌شوند. آمارها نشان می‌دهد که در امریکا بطور سالیانه تقریباً ۱،۹۰۰،۰۰۰ مورد سالمونلوزیس مشاهده می‌شود که هزینه‌ای معادل ۹۸۳ میلیون تا ۱/٤ بیلیون دلار را در بر می‌گیرد. و یا در ژاپن در سال‌های ۱۹۹٤–۱۹۹۸، ۱۱/۲ تا ۳/۲٪ مسمومیت‌های غذایی مربوط به مسمومیت‌های استافیلوکوکی بوده‌اند(١٤). اگر چه در ایران آمار دقیقی از شیوع مسمومیت با باکتری‌های فوق در دسترس نیست، اما با توجه شواهد می‌توان نتیجه گرفت که مسمومیت ناشی از آلودگی مواد غذایی با این باکتری‌ها گستردگی وسیعی داشته باشد(۲۱). گونه‌های سالمونلا بوجود آورنده بیماری‌های مختلفی شامل ورم‌های معده ـ روده‌ای (**gastroenteritis**) و حصبه (**enteric fever**) می‌باشد. **Salmonellosis** یکی از رایج‌ترین بیماری‌های مربوط به غذاست که به سبب خوردن مقادیر زیادی از سلول‌های زنده جنس سالمونلا بوجود می‌آید. گزارش شده است که در بین غذاها، تخم مرغ، ماکیان، گوشت و فراورده‌های مربوط به آنها مهمترین راه انتقال این بیماری به بدن انسان می‌باشد. همچنین مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی که در اثر رشد گونه‌های مولد انتروتوکسین استافیلوکوک و ترشح این سم در غذاها بوجود می‌آید، دیگر بیماری شایع غذایی است که تقریباً در تمامی نواحی جهان مشاهده گردیده است. استافیلوکوکوس آرئوس بطور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده است و معمولاً در داخل بینی، گلو، پوست و مو انسان و حیوانات یافت می‌شود. غذاهایی شامل فراورده‌های قنادی، همبرگر، ماکیان، شیر، تخم مرغ و فراورده‌های مربوط به آنها و بخصوص غذاهایی که انسان مستقیماً در تولید آنها دخالت دارد می‌توانند مورد حمله این باکتری قرار گیرند. (۲۱).

E.coli انتروتوکسیژنیک (**Enterotoxigenic E.coli**) نیز یکی از عوامل عمده اسهال مسافرتی است که در اثر مصرف انواع غذاهای آلوده ایجاد می‌گردد (۱). Ingham و همکاران (۲۰۰۰) وجود E.coli را در شیر خام و پنیر نشان داده‌اند (۹). Weagant و همکاران نیز در سال ۱۹۹٤ فساد محصولاتی نظیر سس مایونز و فراورده‌هایی که از سس مایونز در آنها استفاده شده است را با E.coli گزارش کرده‌اند(۲۰). اداره استاندارد ایران هم محدودیت‌هایی برای وجود این باکتری در بسیاری از مواد غذایی قائل شده که خود نشان از وجود این میکروب در اغلب غذاهای آلوده است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه مورد نظر: گیاه نعناع فلفلی از گلخانه‌ای واقع در حوالی کرج چیده شد. بطوریکه سعی شد گیاههای سالم و کامل و بدون آسیب دیدگی جمع‌آوری گردد. نمونه‌ای از گیاه تازه در پژوهشکده گیاهان داروئی جهاد دانشگاهی و با مقایسه با نمونه هرباریومی، تایید نام علمی گردید. سپس گیاه تازه در محل آزمایشگاه طی مدت ۵ روز خشک شد.

استخراج اسانس‌ها: جهت استخراج اسانس گیاه نعناع فلفلی از روش تقطیر با آب (Hydrodistilation) و دستگاه اسانس‌گیری کلونجر(Clevenger apparatus) استفاده گردید. بدین ترتیب که ۱۰۰ گرم از برگ خشک گیاه ابتدا خرد و به بالن ۲ لیتری کلونجر منتقل شد و مقدار ۱ لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. عملیات اسانس‌گیری بمدت ٤ ساعت ادامه یافت. در خلال عملیات اسانس گیاه بعلت فرار بودن همراه بخار آب تقطیر شد و در لوله جمع‌آوری کننده کلونجر جمع‌آوری شد. با توجه به اینکه چگالی اسانس از چگالی آب کمتر است، بنابر این اسانس استخراج شده روی فاز آبی قرار گرفته و براحتی توسط شیر تخلیه جداسازی شد. عمل آبگیری از اسانس حاصل توسط سولفات سدیم بدون آب ($Na_2 So_4$) صورت پذیرفت. از آنجائیکه اسانس‌ها نسبت به نور، اکسیژن و دما حساسند و در چنین شرایطی ترکیبات آنها دچار تغییر و تحول می‌گردد، لذا بلافاصله اسانس استخراج شده به یک شیشه تیره در بسته منتقل و تا زمان تزریق، در یخچال نگهداری گردید. سپس جهت تزریق به دستگاه GC-MS و شناسایی ترکیبات، به آزمایشگاه تخصصی انتقال داده شد.

شناسایی ترکیبات اسانس: نظر به اینکه در صورت وجود خاصیت ضد میکروبی در اسانس گیاه نعناع فلفلی باید بدانیم که این خاصیت مربوط به کدامیک از اجزاء تشکیل دهندهٔ اسانس است، لذا شناسایی ترکیبات نیز صورت گرفت. پس از آبگیری اسانس استحصال شده، جهت تجزیه کمی و کیفی اسانس مذکور توسط حلال هگزان نرمال (Merck) رقیق گردید (نسبت ۱ به ۱۰). نمونه آماده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) تزریق گردید از آنجاییکه ترکیبات موجود در اسانس‌هابه لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخته میشوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله اسانس بدست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) انجام گردید. برای این منظور طیف‌های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در منابع (AdamsR.P.;2004) مقایسه گردید. برای تایید شناسایی‌های انجام شده توسط طیف‌های جرمی، از شاخص بازداری کواتس استفاده شد. شرایط دستگاه GC-MS مطابق جدول۱ بود:

جدول ۱- مشخصات دستگاه GC-MS

دستگاه ***GC***	مدل ***HP-6890*** شرکت ***HEWLETT PACKARD*** امریکا
نوع ستون	HP-5MS (5%phenyl di methyl siloxan)
ابعاد ستون	طول ۳۰ متر، قطر ۰,۲۵ میلی متر و ضخامت فیلم ۰,۳۲ میکرون
برنامه ریزی دمایی ستون	دمای اولیه ۶۰ °c(۳ دقیقه)، گرادیان دمایی ۵ °c/min،دمای نهایی ۲۲۰ °c
محل تزریق	Split/split less (نسبت ۱ به ۲۰)
دمای محل تزریق	۲۵۰ °c
گاز حامل	هلیوم ۹۹,۹۹۹٪ با شدت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه
دستگاه ***Mass***	مدل ***HP-5973*** شرکت ***HEWLETT PACKARTD*** امریکا
انرژی یونش(EI)	۷۰ الکترون ولت
دمای محفظه یونش	۲۳۰ °c
تجزیه گر جرمی	کوادروپل
دمای تجزیه گر جرمی	۱۵۰ °c

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی

تهیه میکروارگانسیم‌های مورد نظر

اشرشیا کولی: میکروارگانیسم اشرشیا کولی (ATCC8739/PTCC 1330) بصورت کشت داده شده خطی چهار منطقه‌ای روی محیط Nutrient agar از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی ـ واحد علوم و تحقیقات تهیه شد، ضمن نگهداری در یخچال، هر سه روز یکبار دوباره روی محیط Nutrient agar تازه، کشت خطی چهار منطقه‌ای داده شد.

استافیلوکوکوس آرئوس(ATCC 6538P /PTCC 1112): تهیه این میکروارگانیسم از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران بصورت ویال مایع یخ زده صورت گرفت. پس از انتقال به آزمایشگاه، ابتدا در دمای ۳۷ °c ذوب شد و سپس عملیات غنی سازی در محیط کشت مایع Brain heart infusion broth استریل شده بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °c انجام شد. پس از گرمخانه گذاری، روی محیط Baird parker agar کشت خطی چهار منطقه‌ای داده و بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °c انکوبه شد.

سالمونلا تیفی (PTCC 1639): این میکروب نیز بصورت مایع منجمد از دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تحویل گرفته شد و سپس در آزمایشگاه میکروبیولوژی ابتدا در انکوباتور ۳۷ درجه ذوب گشته و در محیط BHI Broth غنی سازی شد. پس از رشد میکروب بعد از ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °c، این میکروارگانیسم روی محیط Salmonella shigella agarکشت خطی چهار منطقه‌ای داده شد.

تعیین MIC با روش رقیق سازی بر روی محیط آگار(Agar dilution method): با توجه به عدم حلالیت اسانس‌ها در محیط کشت محتوی آب لازم است به کمک حلال آلی مناسب اسانس را در محیط کشت تثبیت و یکنواخت نمود.بدین منظور از حلال آلی اتانول(۹٦ درجه) استفاده شد.اسانس گیاه نعناع فلفلی که با روش تقطیر با آب بدست آمده بود، در اتانول رقیق شده، غلظت‌های ۵۰ ، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ٤۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام از آنها تهیه شد و به محیط کشت Mueller hinton agar (بصورت مذاب) انتقال یافته و بخوبی در تمام قسمتهای محیط کشت یکنواخت گردید. لازم به توضیح است که بعلت فرار بودن اسانس، پس از سرد شدن و بستن محیط های کشت حاوی اسانس، بلافاصله عمل تلقیح میکروارگانسیم‌های مورد نظر صورت گرفت. به منظور نشان دادن اینکه اتانول ۹٦ درجه باعث جلوگیری از رشد میکروارگانسیم‌ها نمی‌شود، علاوه بر نمونه‌های مذکور و نمونه شاهد، یک نمونه دارای اتانول نیز در نظر گرفته شد.

تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی و تلقیح میکروارگانسیم‌ها: بمنظور دستیابی به کشت تازه و فعال، میکروب‌های مورد نظر در مجاورت شعله و زیر هود لامینار فلو توسط لوپ سترون کشت داده شدند. پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ °c بمدت ۲٤ ساعت، جهت هر باکتری، دو کلونی برداشته و به ml 10 محیط BHI اضافه و بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °c انکوبه گردیدند. سپس جهت تعیین تعداد باکتری‌ها در هر میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، عملیات رقیق‌سازی با ml ۱ از سوسپانسیون تهیه شده تا رقت (10^{-8}) انجام شد. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر با سمپلر استریل برداشته و روی محیط Plate count agar کشت سطحی داده شد و بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °c گرمخانه‌گذاری انجام شد. سرانجام تعداد کلونی‌های هر رقت شمارش و توسط فرمول (۱۰*عکس رقت*تعداد کلونی)تعداد کلونی در هر میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه تعیین شد(۳). از رقت اولیه از این سوسپانسیون که حاوی 10^{7} باکتری در هر ml بود در سطح محیط کشت حاوی اسانس تلقیح شد (برای هر میکروارگانیسم دو لکه ۳ میکرولیتری). پس از تلقیح میکروارگانیسم‌های مورد نظر، محیط های کشت به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ °c

Archive of SID

www.SID.ir

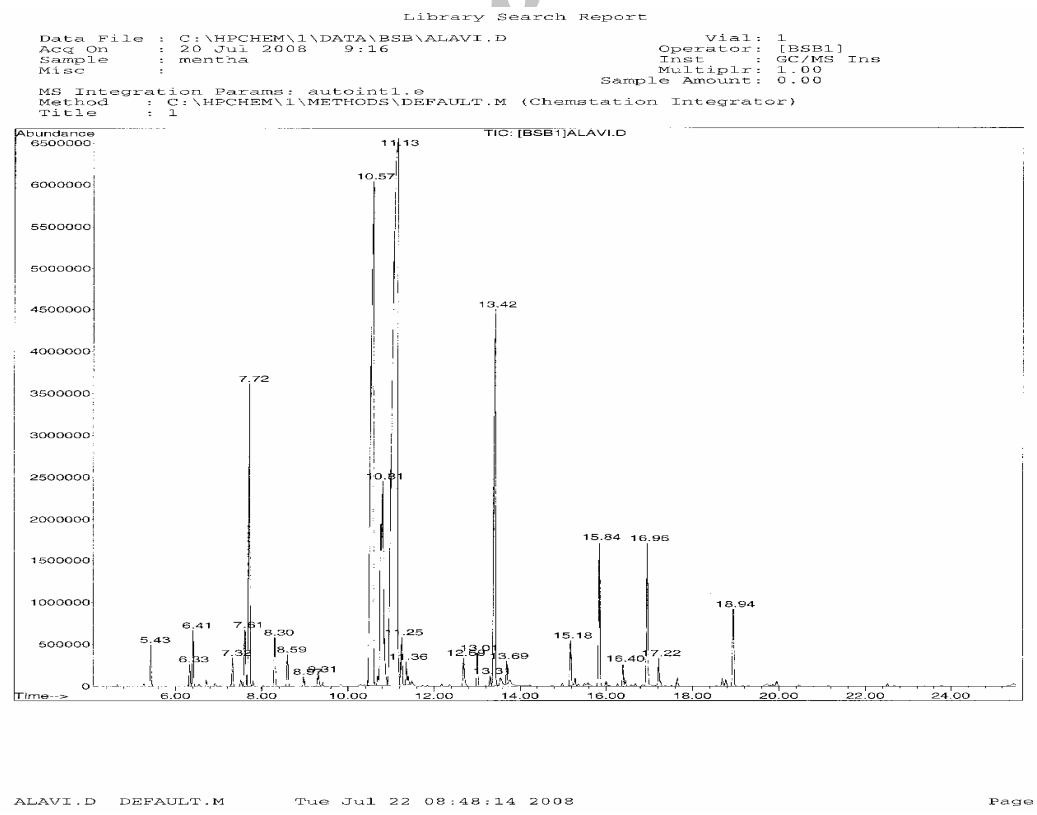
گرمخانه‌گذاری شدند تا اسانس استخراج شده از نظر خاصیت ضد میکروبی مورد بررسی قرار گیرد(۵).

نتایج

محاسبه راندمان استخراج اسانس: مقدار ۱۰۰ گرم از برگ خشک شده و خرد شده نعناع فلفلی توسط دستگاه کلونجر و با روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شده و پس از گذشت مدت زمان ٤ ساعت، مقدار ۱/۲ میلی لیتر اسانس بدست آمد که راندمان حجمی ـ وزنی آن معادل ۱/۲ درصد می‌باشد. اسانس حاصله دارای بوی تند نعناع و رنگ سفید مایل به زرد بود.

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده و بررسی اثرات ضد میکروبی آن: اسانس استخراج شده از گیاه نعناع فلفلی به آزمایشگاه تخصصی انتقال و در آنجا حجم ۱ میکرولیتر از اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شد. با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری و اندیس کواتس و تطبیق آنها با الگوهای کتابخانه‌ای، طیف‌های مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. شکل۱ کروماتوگرام حاصل از GC-MS می‌باشد. جدول۲ ترکیبات موجود در اسانس گیاه نعناع فلفلی و مقدار آنها در اسانس را نشان می‌دهد. جدول۳ نشان دهنده وجود اثر ضد میکروبی یا بی اثر بودن اسانس در غلظت‌های مختلف بر روی میکروارگانیسم‌های مذکور می‌باشد. شکل ۲ نیز مبین آن است که اتانول ۹٦ درجه که به محیط اضافه شده، نتوانسته از رشد میکروب‌ها جلوگیری کند.

شکل ۲- نمونه دارای اتانول، همانطور که پیداست، میکروب‌ها در محیط حاوی الکل کاملاً رشد کرده‌اند



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس گیاه نعناع فلفلی بدست آمده از دستگاه GC-MS

www.SID.ir

جدول۲- ترکیبات شناسایی شده در اسانس نعناع فلفلی و درصد آنها در اسانس

Components	RT(min)	KI(calculated)	KI(standard)	Percentage
Alpha-pinene	5.43	931.03	939	0.66
Sabinene	6.33	969.83	975	0.36
Beta-pinene	6.41	973.27	979	0.92
Alpha-terpinene	7.32	102.29	1017	0.48
Limonene	7.61	1024.57	1029	1.12
1,8-Cineole	7.72	1029.23	1031	5.81
Gamma-terpinene	8.30	1053.81	1060	0.83
Cis-sabinene hydrate	8.59	1066.1	1070	0.57
Terpinolene	8.98	1082.63	1089	0.16
Linalool	9.32	1097.03	1097	0.27
Mentone	10.57	1153.34	1153	19.55
Neomenthol	10.81	1164.25	1166	8.83
Menthol	11.13	1178.73	1172	39.81
Isomenthol	11.25	1184.16	1183	0.96
Neo iso menthol	11.35	1188.69	1187	0.48
Piperitone	12.69	1259.9	1253	0.61
Neo menthyl acetate	13.01	1277.47	1274	0.55
Menthyl acetate	13.42	1299.45	1295	8.64
Iso menthyl acetate	13.69	1312.73	1305	0.33
Beta-bourbonene	15.18	1401.88	1388	0.82
Trance-beta-caryophyllene	15.84	1416.57	1419	2.76
(z)-beta-farnesen	16.40	1447.51	1443	0.48
Germacrene-d	16.96	1478.45	1485	2.73
Bicyclogermacrene	17.22	1492.82	1500	0.59
Viridiflorol	18.94	1595.2	1593	1.49

جدول۳- تاثیر اسانس بر روی میکرو ارگانیسم‌های اشرشیا کولی، استافیلوکوکوس آرئوس و سالمونلا تیفی. علامت (+) نشان‌دهنده تاثیر گذاربودن اسانس و علامت (-) نشان دهنده عدم تاثیر اسانس در غلظت‌های مشخص می‌باشد.

غلظت اسانس (ppm) / باکتری	۱۰۰۰	۵۰۰	٤۰۰	۳۰۰	۲۵۰	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰
اشرشیا کولی	+	+	+	+	-	-	-	-	-
استافیلوکوکوس آرئوس	+	+	+	+	+	+	+	-	-
سالمونلا تیفی	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

اعداد مندرج در ستون عمودی کروماتوگرام (شکل ۱) مقدار فراوانی ترکیبات تشکیل دهندهٔ اسانس را نشان می‌دهد و ستون افقی زمان جداسازی و شناسایی هر یک از ترکیبات اسانس در ستون کروماتوگرافی را بیان می‌کند. با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال و مقایسهٔ طیف‌های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در منابع (Adams R.P.;2004) مشخص شد که هر یک از طیف‌های جرمی دقیقاً مربوط به چه ترکیبی هستند. برای تائید شناسایی‌های انجام شده توسط طیف‌های جرمی، از شاخص بازداری کواتس استفاده شد که نتایج آن در جدول ۲ بیان گردیده است.همانطور که مشخص است مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس عبارت بودند از: منتول (۳۹/۸۱٪)، منتون (۱۹/۵۵٪)، نئو منتول (۸/۸۳٪)، متیل استات(۸/٦٤٪) و ۱ و ۸– سینئول (۵/۸۱). بطور کلی ترکیبات فعال ضد میکروبی اسانس‌ها، ترپن‌ها نظیر اوژنول، تیمول و کارواکرول می‌باشند که ماهیت فنولی دارند. بویژه خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع که در محیط براث و مدل سیستم‌های غذایی توسط Sivropoulou و همکاران و Tassou و همکاران در سال ۱۹۹۵ بررسی شد و نشان داده شد که این خاصیت بعلت وجود منتول (menthol) و کتون‌ها نظیر پولگون (pulegone)، ایزومنتون (isomenthone)، پیپریتون (piperitone)، کاروون (carvone) و دهیدروکاروون (dehydrocarvone) می‌باشد. بررسی‌های پیشین نشان داده‌اند که در مورد بسیاری از اسانس‌های گیاهان تیره نعناع از جمله گیاه مورد بررسی در این تحقیق، تیمول، کارواکرول، منتول و در مواردی پاراسیمن مهمترین اجزاء موثر در فعالیت ضد میکروبی اسانس می‌باشند(٤) و همچنین مشخص شده است که با افزایش درصد این ترکیبات در اسانس، میزان فعالیت ضد میکروبی نیز افزایش می‌یابد(٤). اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس‌های گیاهی بر روی میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن‌های غذایی مثل انواع سالمونلا و استافیلوکوکوس آرئوس نشان می‌دهند که اثر اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت قدری بیشتر از تاثیر آنها بر روی باکتری‌های گرم منفی است. یافته‌های Deans و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۷ موید این مطلب می‌باشند که نتایج آنها با نتایج گرفته شده در این تحقیق مطابقت دارد. همانطور که در جدول ۳ مشخص است MIC استافیلوکوکوس که یک باکتری گرم مثبت است در مقایسه با دو باکتری گرم منفی دیگر پایین‌تر است. به عبارت دیگر گرم مثبت‌ها نسبت به عمل آنتی باکتریال اسانس‌ها حساس ترند. علت حساسیت کمترگرم منفی‌ها شاید بعلت وجود غشاء خارجی (outer membrane) در باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپوپلی ساکارید می‌شود(۵). Moreira و همکاران در سال ۲۰۰۵ میزان MIC اسانس نعناع فلفلی در ارتباط با *E.coli*(ATCC 25158) را 2ML/100ML گزارش کردند(۱۳). این نتایج با نتایج گرفته شده در این تحقیق مطابقت ندارد. این یافته‌های متفاوت ممکن است ناشی از خصوصیات ذاتی اسانس‌ها از قبیل فاکتورهای قبل از برداشت (pre-harvest) مانندواریته، شرایط محیطی، عوامل اکولوژیکی و... و تفاوت‌هایی در روش‌های استخراج اسانس، تفاوت در سوش میکروبی مورد آزمون یا شرایط آزمایش باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه اسانس گیاه نعناع فلفلی بعلت وجود ترکیباتی نظیر منتول در اسانس گیاه در غلظت‌های نسبتا پایین روی رشد باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی بسیار موثر است، لذا استفاده از این اسانس در مواد غذایی بعنوان یک ترکیب ضد میکروب طبیعی به جای مواد نگهدارنده مصنوعی که اثرات سوء آنها مشخص شده است یک امر مفید و مؤثر به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسؤولین محترم آزمایشگاه تخصصی ۲ مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات و نیز مدیریت محترم شرکت گیاهان سبز زندگی بواسطهٔ همکاریشان در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

www.SID.ir

فهرست منابع

۱. زرگری، علی. ۱۳۷۱. *گیاهان دارویی*. انتشارات دانشگاه تهران ۱٤–۵.

۲. درویشی، ش. ۱۳۷٤. استخراج اسانس نعناع تبریز و مقایسه آن با ترکیبات شیمیایی اسپیرمینت و پیپرمینت. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی، ۹۸.

3. Alexander O.Gill & Richard A.Holley, (2003): interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysosyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°c, International journal of food microbiology, 80: 251-259.

4. Beuchat, L. R. and Golden, D. A. (1998): Antimicrobials naturally in foods. Food technology 11:134-142.

5. Deans, S. G. and Ritchi, G. (1997): Antibacterial properties of plant essential oils. International journal of food microbiology, 5: 165-180.

6. Delaquis, D. J. & Stanich, K. & Girard, M. & Mazza, G. (2002): Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology, 74: 101-109.

7. Dorman, H.J. and Deans, S.G. (2000): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activities of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, vol, 88, p: 308-316.

8. Guedon, D.J. and Pasguier, B.P. (1994): Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 Mentha x piperita clones. LAgric .Food chern, vol.42, p: 679-684.

9. Ingham, S. C., Su, Y. C., & Spangenberg, D. S. (2000): Survival of Salmonella typhimurium and Escherichia coli 0157:H7 in cheese brines. International Journal of Food Microbiology, 61: 73–79.

10. Iscan, G. & Kirimer, N. & Kurkcouglu, M. & Husnu Canbaser, K. & Demirci, F. (2002): Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of Agricultural food chemistry, 50: 3943-3946.

11. Janssen, A.M. Scheffer, J.J.C. and Baerheim, A. (1987): Antimicrobial activity of essential oil: a 1976-86 Literature review. Aspects of the test methods. Planta medica, vol. 53, p: 395-398.

12. Kokkini, S. Karousou, R. and Lanaras, T. (1995): Essential oils of spearmint (carvone> rich) plants from the Island of Crete I (Greece). Biochemical systematics and Ecology, Vol. 23, *NA,* p: 425-430.

13. Marino, M. Bersani, C. and Comi, G. (1999): Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* measured using a bioimpedometric method. J. Food Prot. Vol. 62, p: 1017-1023.

14. Moreira, M. R. & Ponce, A. G. & Dell vella, C. E & Roura, S. I. (2005): Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, 38: 565-570.

15. Pandit V. A. & Shelef. L. A. (1994): Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosimarinus officinalis L.*). Food Microbiology, 11: 57-63.

16. Shelef, L.A. 1990: Antimicrobial effects of spices. J. Food safety, vol. G, p: 29-44.

17. Sivropoulou, A. Kokkini, S. Lanaras, T. Arsenakis, M. Papaniko laou, E. and Nikolaou, C. (1996): Antimicrobial and cytotixic activities of Origanum essential oil concentration. J. Agric . Food chem, vol. 44, p: l202-1205.

18. Tassou, C. Koutsoumaris, K. and Nychas, G.J.E. (2000): Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus Aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Res, Int.33, p: 273-280.

19. Tylor, V.E. (1993): The honest herbal. Binghamton. Pharmaceatrial Products press.

20. Weagant, S. D., Bryant, J. L. and Bark, D. H. (1994): Survival of Escherichia coli O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures . J. Food Prot. 57: 629-631.

21. Yang S. & Yu R. & Chou C. (2001): Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. And *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. *International journal of Food Microbiology*, 63: 99-107.

Archive of SID

www.SID.ir