Archive of SID

Journal of North Khorasan Medical Sciences
No 45, Volume 12, Issue 1

Research Article

Evaluation of Chemical Composition of Essential Oil and Antibacterial Effect of Different Extracts of *Arenaria hispanica* L

Sara Firuzeh [1], Parastoo Zarghami Moghaddam [2], Ameneh Mohammadi [3], Asma Asad Nejad [4], Mahsa Taheri Bazkhaneh [4], Jamal Kasaian [5], Peiman Alesheikh [6,*]

[1] Ms of Phytochemistery, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran
[2] PhD student of Microbiology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Ms of Phytochemistery, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] Bs of Laboratory Sciences, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[5] PhD of Biotechnology, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[6] PhD of Chinese medicine, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
*** Corresponding author:** Peiman Alesheikh, PhD of Chinese Medicine, Natural Products and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran. E-mail: arezoopayman@yahoo.com

DOI: 10.29252/nkjmd-12016

How to Cite this Article:
Firuzeh S, Zarghami Moghaddam P, Mohammadi A, Asad Nejad A, Taheri Bazkhaneh M, Kasaian J, et al. Evaluation of Chemical Composition of Essential Oil and Antibacterial Effect of Different Extracts of *Arenaria hispanica L*. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2020;**12**(1):40-47. DOI: 10.29252/nkjms-12016

Received: 03 Sep 2019
Accepted: 07 Mar 2020
Keywords:
Arenaria Hispanic
Antibacterial
Essential Oil
Extract
© 2020 North Khorasan Medical Sciences

Abstract

Introduction: With increasing resistance to overuse of synthetic chemical antibiotics, it is necessary to find alternative drugs that have both antibacterial and minimal side effects. The aim of this research is the effect of different types of solvents on the extraction of effective antibacterial agents of the plant and the identification of chemical compounds of *Arenaria hispanica* essential oil in North Khorasan province.

Methods: *Arenaria hispanica* with locally name 'Marjaneh', after collection and drying, was extracted using various solvents by maceration method. Essential oil distillation was performed by Clevenger apparatus and the compounds were analyzed by gas chromatography-coupled mass spectrometry (GC/MS). Disk and well diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were used to determine the antibacterial activity.

Results: The extracts had effect only on gram positive bacteria and the inhibitory effects of methanolic extract was more than others. *Escherichia coli* was the most resistant and *Bacillus cereus* was the most susceptible bacterium, which showed no statistically significant differences between groups ($P > 0.05$). The MIC / MBC results showed that none of the extracts were able to inhibit or remove the bacteria and higher concentrations are required. Nonadecane was the main compound identified in the essential oil.

Conclusions: Different extracts had less antibacterial effects than commercial antibiotics and small numbers of compounds were identified by the GC/MS analysis.

Copyright *© 2020 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و اثر ضد باکتریایی عصاره های مختلف گیاه دارویی مرجانه *Arenaria hispanica L.*

سارا فیروزه [۱]، پرستو ضرغامی مقدم [۲]، آمنه محمدی [۳]، اسما اسدنژاد [۴]، مهسا طاهری بازخانه [۴]، جمال کساییان [۵]، پیمان آل شیخ [۶،*]

[۱] کارشناسی ارشد فیتوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد، ایران
[۲] دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] کارشناسی ارشد فیتوشیمی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] کارشناسی علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۵] دکتری تخصصی بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۶] دکتری تخصصی طب چینی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** پیمان آل شیخ، دکتری تخصصی طب چینی، مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران. ایمیل: arezoopayman@yahoo.com

DOI: 10.29252/nkjms-12016

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۷

واژگان کلیدی:
Arenaria hispanica
ضد باکتریایی
اسانس
عصاره

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی محفوظ است.

چکیده

مقدمه: با افزایش مقاومت های ناشی از استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک های صناعی، یافتن داروهای جایگزین با خواص ضدباکتریایی و کمترین عوارض جانبی ضروری است. هدف از این بررسی تاثیر نوع حلال های مختلف در استخراج مواد موثره ضد باکتریایی گیاه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس *Arenaria hispanica L.* در استان خراسان شمالی می باشد.

روش کار: گیاه مرجانه (*Arenaria hispanica L.*) پس از جمع آوری و خشک نمودن، توسط حلالهای مختلف به روش خیساندن عصاره گیری گردید، اسانس‌گیری توسط دستگاه کلونجر انجام و ترکیبات اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی gas chromatography -mass spectrometry (GC/MS) مورد آنالیز قرار گرفت. بررسی خاصیت ضد باکتریایی به روش دیسک دیفیوژن، چاهک و تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی انجام شد.

یافته‌ها: عصاره های مورد آزمایش فقط بر روی باکتری های گرم مثبت تاثیر داشته و اثر مهاری عصاره متانولی بیشتر از سایرین بود. *اشرشیا کلی* مقاوم ترین و *باسیلوس سرئوس* حساس ترین باکتری شناخته شدند و هیچگونه تفاوت آماری معنی داری در بین گروه های مختلف مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). نتایج minimum inhibitory concentration (MIC)/ minimum bactericidal concentration (MBC) نشان داد که هیچ کدام از عصاره های تست شده قادر به مهار یا حذف باکتری های مورد آزمایش نبوده و نیاز به غلظت های بالاتر می باشد. عمده ترین ترکیب در اسانس Nonadecane شناسایی شد.

نتیجه گیری: عصاره های مختلف در مقایسه با آنتی بیوتیک های تجاری اثر ضد باکتریایی کمتری داشته و در آنالیز نتایج GC/MS نیز تعداد ترکیبات کمی شناسایی گردید.

مقدمه

میکروارگانیسم ها نقش مهمی در ایجاد بیماری های انسان ایفا می کنند. مرگ و میر ناشی از این عوامل همواره بشر را بر آن داشته تا به دنبال مقابله با میکروارگانیسم ها باشد. از مهمترین روش های درمانی، استفاده از آنتی بیوتیک ها می باشد که مصرف بی رویه و نادرست آنها منجر به بروز مقاومت در میان آنها گشته است [۱]. یکی از نگرانی ها و دغدغه های علوم زیستی و پزشکی، مقاومت باکتریایی است تا جایی که میـزان مقـاومت برخـی از این باکتری ها به داروهای شیمیایی بـیش از ۹۰ درصـد گزارش شده است. همزمان با پیشرفت در تولید

Copyright *© 2020 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

www.SID.ir

Archive of SID

داروهای صناعی جدید، به تدریج اثرات مضر این داروها ظاهر شدند [۱]. در طی سالیان، گیاهان دارویی به عنوان منابع طبیعی ارزشمندی شناخته شده اند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان منبع مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می شوند. در این زمینه، ایران یکی از غنی ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که دارای تنوع بالای شرایط زیستگاهی برای انواع این گیاهان می‌باشد [۲]. گیاهان دارویی و ادویه‌ها حاوی ترکیبات مفید فراوانی هستند و به این دلیل از عوارض جانبی به مراتب کم تری نسبت به داروهای شیمیایی برخوردارند، از آن جایی که گیاهان به سبب سرشت خاص خود ناگزیر به داشتن مکانیسم های دفاعی خاص و ترکیبات ضد میکروبی به صورت درون زاد می باشند، لذا می توانند منبع بالقوه و عظیمی از ترکیبات ضد میکروبی به حساب آیند. ترکیبات ضد میکروبی بدست آمده از گیاهان می توانند با مکانیسم های متفاوتی نسبت به آنتی بیوتیک ها، باکتری ها را حذف نمایند. این مسئله از نظر بالینی در درمان عفونت های ناشی از سویه های مقاوم میکروبی بسیار حائز اهمیت می باشد [۱]. داروهای گیاهی بطور گسترده‌ای برای درمان اختلالات متعدد استفاده می شوند و عملکرد آن ها مبتنی بر ترکیبات طبیعی با اثرات فیزیولوژیکی بر بدن انسان است [۳, ۴]. گیاهان دارویی دارای ترکیبات شیمیایی متفاوتی هستند که موثرترین و کاربردی ترین آنها متابولیت های ثانویه هستند. متابولیت های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیما در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده تری نسبت به متابولیت های اولیه (مثل اسیدهای آمینه) که برای بقاء زندگی سلولها ضروری اند، می باشند. آلکالوئیدها (مورفین، کدئین، آتروپین)، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگیزه ها و تانن ها از جمله مهم ترین این ترکیبات هستند. سلول های گیاهی مقادیر متنوعی از این فرآورده ها را تولید می کنند [۵]. عصاره های گیاهی، محلولی حاوی تمامی مواد مفید موجود در گیاه نظیر اسانس ها، فلاوونوئیدها ، آلکالوئیدها، تانن ها، ساپونین ها، ویتامین ها و یا سایر مواد می باشند 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 [۶, ۷]. تیره میخک (Caryophyllaceae Juss.) از راسته میخکسانان (Caryophyllales) دارای حدود ۸۵ جنس (سرده) و ۲۶۳۰ گونه پراکنده در کره زمین به خصوص نواحی حاره ای و گرم نیمکره شمالی است [۸]. گیاه مرجانه *Arenaria hispanica* متعلق به گونه مرجانی، گیاهی دو لپه‌ای متعلق به این خانواده بومی اروپا و آسیا است و در سراسر آمریکای شمالی و بطور عمده در مکان‌های با پوشش گیاهی کم یافت می‌شود. مرجانه گیاه کوچکی است که دارای گل‌هایی با گلبرگ سفید و برگ‌های ساده و متقابل است، لبه برگ‌ها صاف و بدون دندانه است [۱]. در شکل ۱ تصویر گیاه نشان داده شده است. *Arenaria montana* یک گیاه علفی از مناطق جنوب غربی اروپا است که شامل مشتقات اپی ژنین می باشد. اپی ژنین با توجه به خواص زیستی مانند ضد التهاب، ضد جهش زایی و ضد سرطان آن توجه زیادی به خود جلب کرده است [۹]. اطلاعات بدست آمده از درمانگران محلی منطقه جمع آوری گیاه *A. hispanica* حاکی از کاربرد آن در تسکین سرفه، مدر بودن، کاهش تب و درمان اسهال می باشد (جدول ۱). هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نوع حلال (آبی، متانولی، دی کلرومتان و اتیل استات) در استخراج مواد موثره ضد باکتریایی گیاه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس *Arenaria hispanica* در استان خراسان شمالی می باشد که تاکنون هیچ مطالعه ای بر روی آن گزارش نشده است.

روش‌کار

گیاه بومی مورد مطالعه در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶ از منطقه فیروزه واقع در استان خراسان شمالی جمع آوری گردید. این منطقه دارای عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۹ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۷ درجه و ۱۰ دقیقه شرقی است. شماره هرباریوم گیاه NP۲۳/۲-۱ می باشد. پس از تهیه، جمع آوری و خشک نمودن در سایه، اندام هوایی گیاه مذکور پودر گردید. سپس، مقدار ۵۰۰ گرم از پودر گیاه توسط ۷۰۰سی سی حلال های آب، متانول، دی کلرومتان و اتیل استات به روش ماسراسیون جداگانه به مدت ۴۸ ساعت خیسانده و با استفاده از تبخیرکننده چرخان (روتاری- هایدولف آلمان) تغلیظ شده و پودر عصاره حاصله تا زمان آزمایش در یخچال (۴+ °C) نگهداری گردید. بازده عصاره ها در محدوده ی ۱۵ - ۱۱ درصد محاسبه شد، تمامی تست های آزمایشگاهی انجام شده در سال ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی انجام شد.

جدول ۱. مشخصات گیاه *Arenaria hispanica* جمع آوری شده در مطالعه

نام علمی گیاه	نام فارسی	مرحله رشد گیاه	کاربرد گیاه در طب سنتی منطقه
Arenaria hispanica	مرجانه	گلدهی	تسکین سرفه، مدر، کاهش تب، درمان اسهال

اسانس‌گیری از اندام هوایی گیاه به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر (آلمان) طی مدت ۲ ساعت انجام شد. اسانس حاصل (به رنگ سبز کمرنگ به میزان ۰,۰۵ درصد) بوسیله‌ی سولفات سدیم بی آب، خشک و تا زمان انجام مراحل بعدی در ظرف شیشه ای تیره رنگ و غیر قابل نفوذ نسبت به هوا در یخچال (دمای ۴+ درجه سانتی گراد) نگهداری شد.

در مرحله بعدی، ترکیبات اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی GC/MS مورد آنالیز قرار گرفتند. شناسایی ترکیبات اسانس با توجه به الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری و اندیس کواتس و تطبیق آن‌ها با الگوهای کتابخانه‌ای صورت گرفت و سپس طیف های مربوط به هر نمونه تفسیر و ترکیبات عمده‌ی تشکیل دهنده‌ی اسانس‌ها شناسایی شدند.

مشخصات دستگاه مورد استفاده به این شرح است: کروماتوگرافی گازی مدل Shimdzu-QP۲۰۱۰SE مجهز به ستون Rtx-5MS (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) بوده که برنامه دمایی ستون آن به این نحو تنظیم گردید:

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ابتدایی آون ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و دمای دستگاه در هر دقیقه ۵ درجه سانتی گراد افزایش یافت تا رسیدن به دمای ۲۶۰ درجه سانتی گراد، در این دما به مدت ۱۰ دقیقه باقی ماند. از گاز هلیم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۹ میلی لیتر بر دقیقه و طیف سنج جرمی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. شناسایی طیف های حاصل با رسم کروماتوگرام یک سری از پارافین های نرمال (C_5-C_{30}) تحت شرایط یکسان با تزریق نمونه انجام شد و با توجه به زمان بازداری این ترکیب ها اندیس کواتز برای هر جزء موجود در کروماتوگرام نمونه محاسبه شد.

شکل ۱. گیاه *Arenaria hispanica*

برای سنجش اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه مرجانه *A. hispanica* از روش انتشار دیسک کربی بائر Kirby Bauer استفاده شد. بدین منظور، از کلنی ۲۴ ساعته هر کدام از باکتری های کشت شده در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به کمک لوپ برداشته شده و در لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل کاملا مخلوط گردید؛ سپس، سوسپانسیون یکنواختی از باکتری های مورد آزمایش (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی*) مشابه کدورت لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و توسط سوآپ بر روی محیط های مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. جهت تهیه دیسک های حاوی عصاره های مختلف، ۵۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها بر روی دیسک های بلانک استریل اضافه و به مدت یک ساعت زمان داده شد تا عصاره کاملاً جذب دیسک های کاغذی شوند. سپس، دیسک ها روی پلیت به فواصل مناسب قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. در این مطالعه، از جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت و از Dimethyl sulfoxide (DMSO) به عنوان کنترل منفی استفاده شد و آزمون ها به صورت سه بار تکرار انجام گردید [۱۰].

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره به روش چاهک پلیت انجام شد. در این روش هم از پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که آغشته به میکروارگانیسم بودند استفاده شد. بدین جهت، توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، حفره در محیط کشت ایجاد کرده و داخل هر چاهک به کمک سمپلر ۵۰ میکرولیتر از غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ها به طور جداگانه قرار داده شد. سپس، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. عملیات مذکور در مورد هر نمونه سه بار تکرار گردید، پس از آن میزان مناطق مهاری مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس میلی متر محاسبه گردید [۱۰].

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش میکروبراث دایلوشن ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از عصاره مورد آزمایش را در دو سی سی (۰/۵ سی سی DMSO و ۱/۵ سی سی محیط مولر هینتون براث) حل نموده که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره بدست می آید. سپس، در ۹ لوله بعدی که هرکدام حاوی یک سی سی محیط مولر هینتون براث می باشند رقت سازی لوله ای را انجام نموده که به ترتیب غلظت هر شیشه نصف غلظت شیشه قبلی می گردد (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲،۵، ۶،۲۵، ۳،۱۲۵، ۱،۵۶۲،۰،۷۸۱، ۰،۱۹۵،۰،۳۹۰). در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف تهیه شده هر یک از عصاره ها به خانه های یک پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. سپس، سوسپانسیون میکروبی به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر یک از خانه ها اضافه گردید. به عنوان کنترل مثبت، در تعدادی از خانه های پلیت ۱۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، ۵۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک اضافه شد. از خانه های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت به تمام خانه های هر پلیت ۵۰ میکرولیتر از معرف Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) اضافه شد و مجدداً به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از خروج از گرمخانه، در هر ردیف مربوط به غلظت های مختلف یک عصاره، اولین غلظتی که در آن رنگ قرمز تشکیل نشده باشد، به عنوانMIC در نظر گرفته شد. برای به دست آوردن مقادیر MBC از کلیه خانه هایی که رنگ قرمز در آن ها تشکیل نشده باشد، ۱۰ میکرولیتر یا یک لوپ به پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. اولین غلظتی از هر عصاره که در پلیت مربوط به آن رشد مشاهده نشود به عنوانMBC در نظر گرفته شد [۱۰].

آزمون آماری: برای بررسی تفاوت اثر ضد باکتریایی بین عصاره های مختلف به علت کمبودن تعداد جامعه ی آماری از آزمون کروسکال والیس استفاده گردید که به مقایسه ی میانگین و بررسی انحراف معیار می پردازد.

یافته‌ها

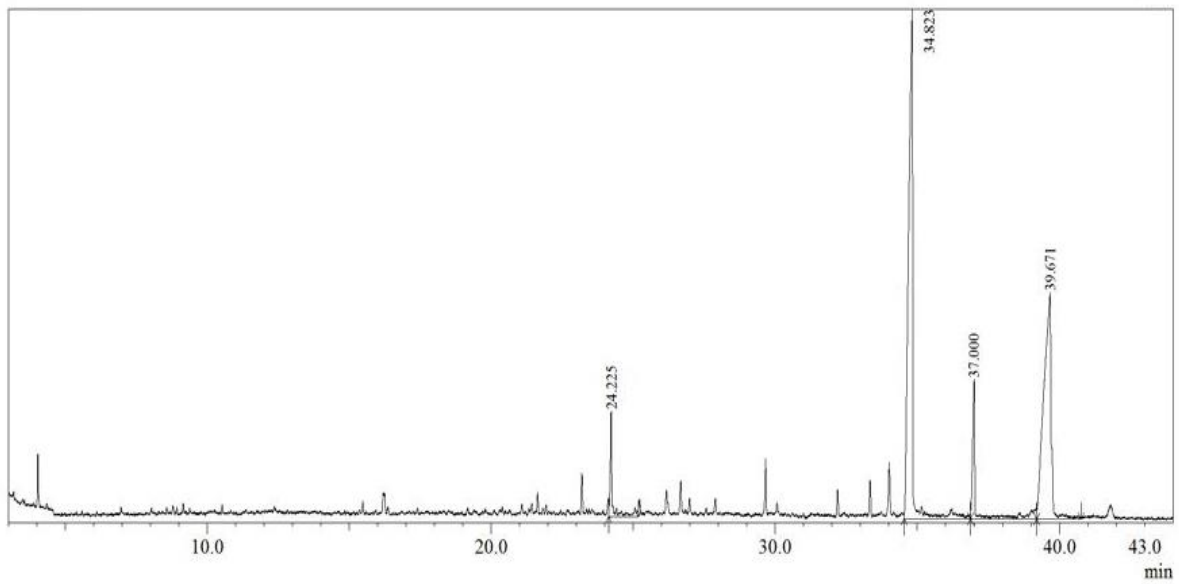
از اسانس گیاه *A. hispanica* چهار ترکیب جدا شد که عمده ترین ترکیب آن Nonadecane می باشد که ۴۸،۱۷٪ از کل اسانس را تشکیل می دهد، که این ترکیب یک آلکان هیدروکربنه است. همچنین، دومین ترکیب شناسایی شده که اختلاف ۱۰٪ با ترکیب اولیه داشت Octacosane بود. به طور کلی، تعداد ترکیبات موثره شناسایی شده این گیاه در مقایسه با سایر گیاهان دارویی کمتر بود (جدول ۲ و شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. شناسایی ترکیبات اسانس *Arenaria Hispanina L*

ردیف	نام ترکیب	درصد ترکیب
۱	Beta-ionone	۴٪/۶۷
۲	Nonadecane	۴۸٪/۱۷
۳	Naphtalenone-8a-chlorooctahydro-cis	٪۸/۵۶
۴	Octacosane	۳۸٪/۶۱



شکل ۲. کروماتوگرام GC/MS گیاه *Arenaria hispanica*

جدول ۳. نتایج قطر هاله عدم رشد عصاره های مختلف گیاه *Arenaria hispanica* در روش دیسک دیفیوژن

باکتری عصاره	*Staphylococcus aureus* ATCC(۶۵۳۸)	*Bacillus cereus* PTCC (1247)	*Escherichia coli* ATCC (۸۷۳۹)
متانول	۷/۶۶± ۰/۵۷	۸/۶۶ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰۰
آب	۶/۳۳ ± ۰/۵۷	۷/۳۳ ± ./۵۷	۶ ± ۰۰
دی کلرومتان	۶/۶۶ ± ۰/۵۷	۸/۶۶ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰۰
اتیل استات	۶/۶۶ ± ۰/۵۷	۷/۳۳ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰۰
جنتامایسین (کنترل مثبت)	۳۳ ± ۱	۳۴/۳۳ ± ۰/۵۷	۳۲ ± ۱
DMSO (کنترل منفی)	-	-	-

در روش دیسک دیفیوژن قطر هاله عدم رشد برای باکتری های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) بیشتر از گرم منفی ها (*اشرشیا کلی*) بوده و تمامی عصاره ها همانگونه که از نتایج جدول ۳ مشاهده می گردد، هیچگونه اثر مهاری بر باکتری *اشرشیا کلی* نداشته است. که علت این موضوع را میتوان ضعیف بودن باکتری گرم مثبت نسبت به گرم منفی به علت حساس بودن ساختار دیواره سلولی در نفوذ به مواد خارجی دانست. در بین باکتری های گرم مثبت، *باسیلوس سرئوس* نسبت به همه عصاره ها حساس تر بود و در مقایسه بین تمامی عصاره ها، عصاره متانولی اثر مهاری نسبتا بیشتری بر روی دو سویه گرم مثبت داشت (جدول ۳). با توجه به نتایج به دست آمده از عصاره های مختلف بر روی حذف باکتری های گرم مثبت و منفی در روش دیسک دیفیوژن، تفاوت معنی داری بین میزان اثر مهاری آنها مشاهده نشد و هیچ کدام از عصاره ها تاثیر مثبت معنی داری بر روی سویه های مورد آزمایش به صورت جداگانه نداشتند ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۴. نتایج قطر هاله عدم رشد عصاره های مختلف گیاه *Arenaria hispanica* در روش چاهک

باکتری عصاره	*Staphylococcus aureus* ATCC(۶۵۳۸)	*Bacillus cereus* PTCC (۱۲۴۷)	*Escherichia coli* ATCC (۸۷۳۹)
متانول	۸/۳۳ ± ۰/۵۷	۸/۶۶ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰۰
آب	۷/۳۳ ± ۰/۵۷	۷/۶۶ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰۰
دی کلرومتان	۷/۶۶ ± ۰/۵۷	۸/۳۳ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰۰
اتیل استات	۷/۳۳ ± ۰/۵۷	۷/۳۳ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰۰
جنتامایسین (کنترل مثبت)	۳۲/۳۳ ± ۰/۵۷	۳۴/۶۶ ± ۰/۵۷	۳۳ ± ۱
DMSO (کنترل منفی)	-	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

از نتایج روش چاهک پلیت نیز می توان نتیجه گرفت که عصاره های مورد آزمایش تاثیر قابل توجهی بر روی باکتری های مورد آزمایش نداشته و اثر مهاری عصاره متانولی همانند روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری های گرم مثبت بیشتر از سایر عصاره ها بود. در اینجا نیز باکتری *اشرشیاکلی* مقاوم ترین باکتری و *باسیلوس سرئوس* حساس ترین باکتری شناخته شدند (جدول ۴). بررسی های آماری هیچگونه تفاوت معنی داری را در بین گروه های مختلف نشان نداد (P < ۰/۰۵).

جدول ۵. نتایج MIC/ MBC عصاره های مختلف گیاه *Arenaria hispanica*

باکتری ترکیب	*Staphylococcus a ureus*		*Bacillus cereus*		*Escherichia coli*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
متانول	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰
آب	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰
دی کلرومتان	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰
اتیل استات	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰	> ۱۰۰

نتایج مشابه بدست آمده در تست تعیین MIC/MBC نشان داد که هیچ کدام از عصاره ها در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و غلظت های کمتر از آن قادر به مهار یا حذف باکتری های مورد آزمایش نبوده و نیاز به غلظت های بالاتر از ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد که با توجه به عدم انحلال عصاره ها و ایجاد رسوب در غلظت های بالاتر امکان ادامه آزمایش میسر نبوده (جدول ۵) و نتایج مشابه سایر مطالعات به صورت >۱۰۰ گزارش گردید و نتایج آماری معنی داری مشاهده نشد (P > ۰/۰۵).

بحث

به دلیل اینکه تاکنون در رابطه با بررسی های فیتوشیمیایی و ضد میکروبی جنس *Arenaria* تحقیقات زیادی صورت نگرفته است ما در این بررسی به مطالعه گونه *hispanica* پرداختیم. در مطالعه ای، عصاره های مختلف اندام های هوایی جنس دیگر خانواده میخک (*drymaria cordata* willd) اثرات ضد باکتریایی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، باسیلوس ها و سودوموناس ها داشت که عصاره متانولی موثرتر از بقیه گزارش گردید [۱۱]. در بررسی ما عصاره متانولی بهترین فعالیت ضدباکتریایی را از خود نشان داد، با این تفاوت که باکتری های گرم منفی به تمامی عصاره ها مقاوم بودند. در تحقیقی دیگر، عصاره های مختلف *Dianthus caryophyllus* دارای اثر ضد باکتریایی بر روی *کلبسیلا پنومونیه*، *بردتلا برون و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بودند [۱۲]. دو ترکیب Thymol و Eugenol جدا شده از جوانه های خشک *Dianthus caryophyllus* اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری های گرم منفی پروتئوس میرابیلیس و اشرشیا کلی (MIC ۷،۸ گرم بر میلی لیتر داشتند در حالیکه MIC باکتری های گرم مثبت نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* ۱۵،۶ گرم بر میلی لیتر گزارش گردید [۱۳]. علاوه بر فعالیت ضد باکتریایی خانواده میخک، در برخی مطالعات اثر ضدقارچی *Arenaria rubra* در برابر *Penicillium digitatum*، *Penicillium italicum* و *Geotrichum candidum* گزارش گردید [۱۴]. عصاره های متانولی گونه های S. (*S. gynodioca*, *S. spergulifolia* *swertiifolia*) به کمک روش دیسک دیفیوژن بررسی شدند. نتایج نشان داد که *S. swertiifolia* فعالیت آنتی باکتریال قوی بر علیه *haemophilus influenzae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* داشته و *S. spergulifolia* اثر مهاری قوی بر روی *Bacillus cereus* نشان داد [۱۵, ۱۶].

اسانس های دو گونه *S. vulgaris* و *S. cserei* در روش میکرودایلوشن دارای اثر ضد میکروبی در برابر باکتری ها و مخمر کاندیدا داشت. هر دو این نمونه ها فعالیت ضد میکروبی قابل توجه در مقابل باکتری گرم منفی *Klebsiella pneumonia* در غلظت ۴ گرم بر میلی لیتر و فعالیت ضد قارچی در برابر *Candida albicans* با ۱۶ گرم بر میلی لیتر دارند [۱۷]. مقایسه نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که شرایط جغرافیایی، نوع عصاره گیری، نوع حلال و شرایط خشک نمودن نمونه های گیاهی نقش مهمی در میزان استخراج مواد موثره ی موجود در عصاره و اسانس گیاهان مورد مطالعه دارد که منجر به مشاهده اثرات ضد میکروبی متفاوت در تحقیقات گوناگون می شود. پریرا و همکاران (۲۰۱۶) تاثیر اشعه گاما و پرتو یونی را بر روی ترکیبات شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گونه *Arenaria montana* L. مورد بررسی قرار دادند. بطور کلی، پارامترهای اندازه گیری شده تغییرات معنی‌داری در پاسخ به تیمار تابش نشان داد [۱۸]. همچنین، این پژوهشگر در سال ۲۰۱۵ مقدار فنل کل فلاوونوئید و تانن ریشه *Arenaria scabiosa* و *Arenaria forssk* را به روش رنگ سنجی اندازه گیری کرد و فعالیت آنتی اکسیدانی با سه روش مختلف سنجیده و فعالیت ضد استیل کولین استراز مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات اصلی فنل عصاره بوتانول توسط Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) شناسایی گردیده و ترکیبات P-کوماریک اسید، N-پروپیل گالات، میریستین، متیل۴- هیدروکسی بنزوات مشاهده شدند [۱۸]. الیورا و همکاران (۲۰۱۷) عصاره هیدرو اتانولی گونه مونتانا را به عنوان عنصر شیمیایی بر روی یک محصول لبنی (ماست) مورد مطالعه قرار دادند. بطور کلی، مطالعات عصاره هیدرو اتانولی گونه مونتانا غنی از مشتقات اپی ژنین و توانایی مهار فسفوریلاسیون Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) - را نشان داد [۸]. اعظم قوی اندام و همکاران (۱۳۹۶) مطالعاتی را بر روی گونه آراناریا سرپلیفولیا انجام دادند و خواص دارویی مختلفی از جمله تسکین سرفه، مدر بودن، کاهش تب، درمان اسهال خونی و دیسانتری، ضد تومور و ضد باکتری را مشاهده نمودند [۱۹]. در انتها بعد از آنالیز نتایج در این تحقیق می توان اینگونه بیان نمود که هرچند اثر ضد باکتریایی عصاره های مختلف گیاه *A. hispanica* در مقایسه با آنتی بیوتیک تجاری

www.SID.ir

Archive of SID

مورد مطالعه کمتر بوده، ولی قادر به مهار باکتری های گرم مثبت مورد آزمایش می باشد و بر روی باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بی تاثیر بوده و عصاره متانولی در مقایسه با سایر حلال ها اثر ضد باکتریایی بهتری از خود نشان داد. در ادامه، کار بر روی سایر حلال ها و میکروارگانیسم ها در مطالعات آینده پیشنهاد می گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی ها نشان داد که عصاره های مورد آزمایش فقط بر روی باکتری های گرم مثبت تاثیر داشته و *اشرشیاکلی* مقاوم ترین و *باسیلوس سرئوس* حساس ترین باکتری شناخته شدند و اثر مهاری عصاره متانولی بیشتر از سایر عصاره ها بود. عصاره متانولی در مقایسه با آنتی بیوتیک های تجاری اثر ضد باکتریایی کمتری داشته که عصاره گیری گیاه با سایر حلال ها جهت بررسی فعالیت های ضد میکروبی و فیتوشیمی در تحقیقات آتی پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی بخاطر تصویب این طرح با کد پژوهشی ۹۶/پ/۱۰۵۲و کد اخلاق IR.NKUMS.REC.۱۳۹۶,۳۸۴ و تأمین منابع مالی توسط این معاونت و همچنین از مرکز تحقیقات فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Jebelli Javan A, Ahmadi Hamedani M, Bayan M, Keykhosravy K, Abdollahi Z, Kanani M. Antioxidant and antimicrobial effects of different mints, the most widely used in Caspian Sea areas. Iran J Veterinar Laborator Res. 2014;6:93-102.
2. Azimzadeh M. Genetic assessment of Iranian Bunium persicum Boiss using ITS. (Persian). Tehran: University of Tehran; 2009.
3. Adebayo SA, Dzoyem JP, Shai LJ, Eloff JN. The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. BMC Complement Altern Med. 2015;15:159. **doi:** 10.1186/s12906-015-0669-5 **pmid:** 26014115
4. Ibrahim MA, Mohammed A, Isah MB, Aliyu AB. Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: a review update. J Ethnopharmacol. 2014;154(1):26-54. **doi:** 10.1016/j.jep.2014.04.012 **pmid:** 24742753
5. Zargari A. Medicinal plants book.: University of Tehran press; 2011.
6. Ozcan M, Unver A, Ucar T, Arslan D. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. Food Chemistr. 2008;106(3):1120-7. **doi:** 10.1016/j.foodchem.2007.07.042
7. Yen GC, Duh PD, Tsai HL. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food Chemistr. 2002;79(3):307-3. **doi:** 10.1016/S0308-8146(02)00145-0
8. Oliveirat FS, Ribeiro A, Barros L, Calhelha RC, Barreira JCM, Junior BD, et al. Evaluation of Arenaria montana L. hydroethanolic extract as achemopreventive food ingredient: A case study focusing a dairy product (yogurt). J Function Foods. 2017;2:215-20. **doi:** 10.1016/j.jff.2017.09.027
9. Timite G, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Tanaka C, Mirjolet JF, Duchamp O, et al. Unusual oleanane-type saponins from Arenaria montana. Phytochemistry. 2011;72(6):503-7. **doi:** 10.1016/j.phytochem.2011.01.011 **pmid:** 21371724
10. Zarghami Moghaddam P, Mohammadi A, Feyzi P, Alesheikh P. In vitro antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. Pak J Pharm Sci. 2017;30(5):1725-31.
11. Pulok K, Mukherjee S, Bhattacharya KS, S. N., Giri M, Pal BP. Saha Antibacterial evaluation of drymaria cordata willd (fam. caryophyllaceae) extract. Phototherap Res. 1997;11(3):249-50. **doi:** 10.1002/(SICI)1099-1573(199705)11:3<249::AID-PTR69>3.0.CO;2-W
12. Bonjar S. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. J Ethnopharmacol. 2004;94(2-3):301-5. **doi:** 10.1016/j.jep.2004.06.007 **pmid:** 15325735
13. Mohammed MJ, Al-Bayati FA. Isolation and identification of antibacterial compounds from Thymus kotschyanus aerial parts and Dianthus caryophyllus flower buds. Phytomedicine. 2009;16(6-7):632-7. **doi:** 10.1016/j.phymed.2008.12.026 **pmid:** 19200700
14. Galeotti F, Barile E, Curir P, Dolci M, Lanzotti V. Flavonoids from carnation Dianthus caryophyllus and their antifungalactivity. Phytochem Lett. 2008;1:44-8. **doi:** 10.1016/j.phytol.2007.10.001
15. Karamian R, Ghasemlou F. Screening of total phenol and flavonoid content, antioxidant andantibacterial activities of the methanolic extracts of three Silene species from Iran. Int J Agric Crop Sci. 2013;5:305-12.
16. Bajpai V, Dung N, Kwon O, Kang S. Analysis and the potential applications of essential oil and leaf extracts of Silene armeria L. to control food spoilage and food-borne pathogens. Eur Food Res Technol. 2008;227:1613-20. **doi:** 10.1007/s00217-008-0885-z
17. Kucukboyaci N, Ozcelik B, Adiguzel N, Goren A. Fatty-acid compositions of silene vulgaris and S. cserei subsp. aeoniopsis seeds and their antimicrobial activities. Chem Nat Compd. 2010;46:88-91. **doi:** 10.1007/s10600-010-9533-5
18. Pereira E, Barros L, Barreira J, Carvalho AM, Antonio AL, Ferreira ICFR. Electron beam and gamma irradiation as feasible conservation technologies for wild Arenaria montana L.: Effects on chemical and antioxidant parameters. Innovative Food Sci Emerg Technol. 2016;36:269-76. **doi:** 10.1016/j.ifset.2016.07.012
19. Ghavi andam Bovanloo A, Mazandarani M. Aut ecology and phytochemical survey of Ziziphora clinopodioides Lam. with ethnopharmacology and floristic spectrum of medicinal plants in Bovanlou region (Northern Khorasan province). ECO Phytochemistr Medicin Plant. 2017;5(3):63-74.

www.SID.ir