بررسی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده و اثرات ضدمیکروبی اسانس و عصاره الکلی گیاه دارویی *Artemisia spicigera* C. Koch. از استان مازندران

فاطمه سفیدکن*[1]، المیرا طایفه هندی[2]، فرزانه فخاری[3]، مریم تیموری[4]

[1]استاد، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

[2]کارشناس‌ارشد دانشگاه پیام نور، واحد نجف آباد

[3]کارشناس‌ارشد، گروه فیتوشیمی، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران شرق

[4]مربی پژوهشی، بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

تاریخ دریافت:۹۲/٤/۱۰ تاریخ پذیرش:۹۲/٦/۱۷

چکیده

در این تحقیق به‌منظور شناسایی مواد مؤثره و بررسی اثرات ضدمیکروبی گیاه *Artemisia spicigera*، سرشاخه‌های هوایی و گلدار گیاه از منطقه رینه مازندران جمع‌آوری شد وضمن استخراج و بررسی کمی و کیفی اسانس، استخراج عصاره متانولی و تهیه فراکسیون‌های مختلف از آن صورت گرفت. پس از خشک شدن سرشاخه‌های سبز اسانس گیری به روش تقطیر با آب و آنالیز اسانس‌ها توسط دستگاه‌های GC و GC/MS صورت گرفت. در آنالیز اسانس مجموعاً ۲۰ ترکیب شناسایی شد که عمده‌ترین آنها شامل: کامفور (۳۹/٦ درصد)، ۸،۱-سینئول (۳٤/۳ درصد)، کامفن (۵/۷ درصد) و بورنئول (۵/۲ درصد) بودند. در نهایت اثر ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی، کلروفرمی، بوتانولی و آبی علیه ۸ نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی: *Yersinia entrocolitica*، *Escherchia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Kelebsiella penomonia*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus* *Micrococcus luteu* Staphylococcus aureus مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه اثر ضدمیکروبی اسانس نشان داد که به جز باکتری گرم منفی Pseudomonas *aeruginosa*، سایر باکتری‌ها نسبت به اسانس گیاه با قطرهاله‌های عدم رشد بیش از ۲۰ میلی‌متر حساسیت نشان دادند. به‌نحوی‌که میزان این اثر با اثر تتراسایکلین و اریترومایسین برابر یا بیشتر بوده است. نتایج به‌دست آمده از بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و فراکسیون‌های آن نشان داد که‌هاله‌های عدم رشد ایجاد شده بر علیه باکتری‌های مذکور یکسان نبوده است. بیشترین‌هاله عدم رشد ناشی از عصاره متانولی بر *Y. entrocolitica* و *S. aureus* ایجاد شد. فراکسیون بوتانولی نیز اثر بازدارنگی خوبی بر روی باکتری‌های *Y. entrocolitica*، *Escherchia coli* و *Bacillus subtilis* نشان داد. بر اساس نتایج این تحقیق از اسانس و عصاره *Artemisia spicigera* یا فراکسیون‌های خاصی از آن می‌توان برای درمان برخی از بیماری‌ها استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *Artemisia spicigera*، اسانس، عصاره متانولی، فراکسیون گیری، اثر ضد میکروبی.

*مسئول مکاتبه: sefidkon@rifr-ac.ir

مقدمه

درمنه (*Artemisia*) گیاهی علفی است که در ایران در مناطق مختلفی می‌روید (مظفریان، ۱۳۷۵). بیشتر گونه‌های آن بو و مزه مشخصی داشته که ناشی از ترکیبات مونوترپن و سزکوبی ترپن‌های موجود در آن‌ها است. درمنه در طب قدیم کاربرد دارویی داشته و به عنوان مقوی، اشتها آور، محرک، ضد عفونی کننده، گشادکننده رگها و درمان دردهای روماتیسمی استفاده می‌شده است (Dinani et al., 2010). این گیاه دارای ماده‌ای به نام سانتونین است که تا مدت‌ها معروف‌ترین داروی ضد کرم دستگاه گوارش محسوب می‌شده است (Teixeira da Silva, 2004). برای انواع درمنه علاوه بر فعالیت ضد کرمی، فعالیت‌های بیولوژیک فراوانی از جمله میکروب‌کشی، ضد قارچی، ویروس‌کشی، ضد انگلی و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی و بازکنندگی و اتساع عروق به اثبات رسیده است (Hakimi Maybodi et al., 2003؛ Heywood et al., 1997).

گونه *Artemisia spicigera* گیاهی است بوته‌ای به ارتفاع ۵۰-۲۵ سانتی‌متر که بیخ ساقه آن چوبی، منشعب، با ساقه‌های بارور (گل‌دهنده) متعدد و راست یا بر افراشته است که در ابتدا پوشیده از کرک‌های نمدی، سفید متراکم است. برگ‌های آن سبز، خاکستری، پوشیده از کرک‌های نمدی، خاکستری پراکنده، سرانجام تقریباً بدون کرک شونده، برگ‌های ساقه‌های خزنده مسقیم و پایین ساقه دارای دمبرگ بلند، برگ‌های میانی ساقه، دارای دمبرگ‌های کوتاه یا تقریباً بدون دمبرگ، بالایی‌ها شانه‌ای منقسم و یا بدون بریدگی با ۵-۲ میلی متر طول (مظفریان، ۱۳۷۵).

گونه‌های مختلف این جنس در طب سنتی اروپا جهت رفع سودا و جلوگیری از خونریزی بکار می‌رفته‌اند (Teixeira da Silva, 2004). مواد مؤثره موجود در گونه‌های جنس درمنه دارای خواص درمانی چون اثر ضد مالاریا، ضد ویروس و باکتری، ضد تومور، تب‌بر، ضد خونریزی، درمان هپاتیت، التیام زخمها، ضد اسپاسم و دردهای عصبی است (Tan et al., 1998). خواص آنتی باکتریال گونه‌های جنس درمنه بیشتر مربوط به ماده مؤثره ۸،۱- سینئول و آلفا-توجون است (Mozaffarian, 2007؛ Hold et al., 2000).گونه‌های درمنه از دیرباز به عنوان منبع روغن‌های اتری شناخته شده است (Ermah, 1980). بررسی‌های مختلف نشان داده است که از گونه مورد (*Artemisia annua* L.) به‌طور سنتی در درمان عفونت‌های باکتریایی و انگلی استفاده شده است (Ghahreman, 1984؛ Fabien et al., 2002). همچنین نقش مواد مؤثره موجود در عصاره سرشاخه‌های هوایی این گیاه (آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و فنل‌ها) در تنظیم رشد گیاهان، مقابله با تومور و بیماری‌های باکتریایی در انسان و گیاه به اثبات رسیده است (Heywood et al., 1997). گونه‌های مختلف این جنس، طیف گسترده‌ای از ترکیبات فعال بیولوژیکی که سمیت آن‌ها بر روی گیاهان به اثبات رسیده است تولید می‌کنند از این ترکیبات می‌توان به آرتمیزینین، کومارین، کامفور، برونول استات و ۸،۱- سینئول اشاره نمود (Klayman, 1985؛ Macro and Barbera, 1990؛ Fabien et al., 2002).

بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که عصاره اتانولی و کلروفرمی *Artemisia annua* توانسته است از رشد باکتریهای اشرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس جلوگیری نماید. عصاره کلروفرمی این گیاه اثر مهاری قابل توجهی بر رشد قارچ *Mucro himatis* نشان داده است. در مطالعات مختلف بر اثر بخشی ضد قارچی اسانس این گیاه در مقایسه با فعالیت ضد میکروبی آن تأکید شده است (Fabien et al., 2002).

نتایج حاصل از اثر ضدمیکروبی اسانس درمنه صخره‌ای *Artemisia hausskenechtii* نشان می‌دهد که اسانس این گیاه از رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماریزا جلوگیری می‌کند به‌طوری‌که در بعضی از موارد فعالیت ضدمیکروبی آن از آنتی‌بیوتیک‌های مانند نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، سفالوتین، آموکسی سیلین و کلرامنفنیکل بیشتر است. اسانس این گیاه دارای ترکیبات اصلی سینئول، کامفور، آرتمیزیا کتون[1]، فراگراند[2] و بورنئول است (وندیوسفی و همکاران، ۱۳۷٤).

اثر ضدمیکروبی اسانس درمنه کوهی بر باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر است که احتمالاً به‌دلیل لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی است (Nikaido and Vaara, 1985). مطالعه فوق نشان می‌دهد که اسانس گیاه درمنه کوهی، یک منبع بسیار قوی از ترکیب‌های فعال بیولوژیکی می‌باشد که به‌عنوان یک منبع مفید از عوامل ضد باکتریایی و ضدقارچی جدید می‌تواند به کار گرفته شود (Dupont et al., 1996).

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی اسانس، عصاره و فراکسیون‌های مختلف تهیه شده از عصاره *Artemisia spicigera* بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه

اندام‌های هوایی گیاه *Artemisia spicigera* در مرحله گل‌دهی کامل از منطقه رینه مازندران (۱۹ کیلومتر از پلور به آب گرم) از ارتفاع ۱۱۸۰ متری جمع آوری شد. شیب این منطقه ۳۰ درصد و محل جمع آوری نمونه دامنه شمالی بوده است. گیاهان در سایه و در محیط آزمایشگاه خشک شدند.

اسانس‌گیری

برای اسانس‌گیری نمونه خشک شده آسیاب گردید و به‌صورت پودر درآمد. سپس به روش تقطیر با آب (طبق فارماکوپه اروپا) اسانس گیری شد. دستگاه مورد استفاده، یک دستگاه تمام شیشه‌ای طرح کلونجر بود. برای هر اسانس‌گیری، ۸۰ گرم از اندام هوایی خشک شده گیاهان مورد بررسی آسیاب شده و مورد تقطیر قرار گرفت. اسانس حاصله با سولفات سدیم رطوبت‌زدایی شد. برای تعیین بازده اسانس نسبت به وزن خشک، رطوبت نمونه در زمان اسانس-گیری نیز تعیین شد.

عصاره‌گیری

جهت عصاره‌گیری ابتدا سرشاخه‌های سبز گیاه مورد نظر بعد از خشک شدن در سایه و دمای محیط توسط آسیاب به صورت پودر درآمد. ۱۰۰ گرم از پودر گیاه وزن شده در داخل یک بشر قرار گرفت. سپس مقداری متانول به آن اضافه کرده تا حدی که روی گیاه را بپوشاند پس از ۲٤ ساعت نمونه موجود در داخل بالن به کمک کاغذ صافی و قیف صاف شد. سپس توسط دستگاه روتاری متانول تبخیر شده و عصاره جدا گردید.

فراکسیون‌گیری از عصاره متانولی

۵ گرم از عصاره متانولی ابتدا در ۷۵ میلی-لیتر آب مقطر حل شد، سپس محلول مورد نظر در داخل دکانتور ریخته شد. جهت تهیه فراکسیون کلروفرمی ۱۵ میلی‌لیتر کلروفرم به محلول مورد نظر اضافه شد و پس از هم زدن و جدا دو فاز، فاز کلروفرمی جدا شد. این عمل پنج مرتبه تکرار شد و در نهایت فاز کلروفرمی جدا شده، توسط دستگاه روتاری تغلیظ گردید. بدین‌ترتیب فراکسیون کلروفرمی از عصاره جدا شد. سپس با اضافه کردن

[1]- Artemisia keton
[2]- Fragtand

بوتانول به روش مشابه، فراکسیون بوتانولی به‌دست آمد باقیمانده محلول پس از تبخیر آب به نام فراکسیون آبی نگهداری شد.

بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی

در این تحقیق جهت انجام فعالیت‌های میکروبی از دو محیط کشت و استفاده شد. برای انجام عمل ضد عفونی از دو دستگاه فور و اتوکلاو استفاده گردید. باکتری‌های به کار رفته طی این تحقیق شامل: *Bcillus subtilis* ،*Bacillus cereus* (1247) (10233)، *neumonia* (1053), 3) *seudomonas aeruginosa* (1430), ،*Kbsiella nia entrocolitica* ،*cherichia coli* (1399) 9) ،0) (1151)،(1، *ococcus aureus* (1431) و *Mic*, 1) *Micrococcus*(1169) بودند ۹) باز کلکسیون میکروبی مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی، از روش انتشار در آگار (Disk diffusion method) استفاده شد. از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌ها مایه تلقیح با غلظت ۱ استاندارد مک فارلند معادل cfu/ $ml3 \times 10^8$ در محیط کشت تریپتوکیس سوی برات (شرکت مرک) تهیه گردید و ۵۰۰ میکرولیتر به سطح محیط کشت تریپتوکیس سوی آگار (شرکت مرک) تلقیح و با استفاده از سواپ پنبه‌ای استریل به شکل یکنواخت در سطح محیط پخش شد. بر روی محیط کشت دیسک‌های بلانک با قطر ٦ میلی‌متر (شرکت پادتن طب) حاوی ۳۰ میکرولیتر از عصاره‌های مختلف رقیق شده توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) بر روی پلیت قرار گرفت. از دیسک بلانک حاوی ۳۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. برای مقایسه اثرات ضد میکروبی از دیسک‌های جنتامایسین و کربنی سیلین استفاده شد. پس از ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطرهاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد.

جداسازی و شناسایی ترکیب‌های اسانس توسط GC و GC/MS

برای شناسایی ترکیب‌های اسانس‌ها از دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده گردید.

مشخصات گاز کروماتوگرافی (GC)

کروماتوگراف گازی مدل Shimadzu –9A مجهز به دتکتور F.I.D (یونیزاسیون شعله هیدروژن) و داده پرداز Chromatepac استفاده شد. ستون دستگاه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون بود. سرعت جریان گاز حامل هلیم ۲۲/۷ cm/s بود. دمای محفظه تزریق ۲٦۵ درجه سانتی‌گراد، برنامه‌ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا دمای نهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد که در هر دقیقه ٤ درجه سانتی‌گراد به آن افزوده شد.

مشخصات گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS)

کروماتوگراف گازی Varian – 3400 متصل شده با طیف سنج جرمی، ستون مشابه با ستون مورد استفاده در دستگاه GC بود. دتکتور "Ion Trap" گاز هلیم، سرعت جریان گاز حامل ۵۰ml/min و انرژی یونیزاسیون در طیف سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت بود. برنامه حرارتی ستون از ٤۰ تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد باسرعت ٤°C /min(٤ درجه در دقیقه) تنظیم شد. دمای محفظه تزریق ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود.

محاسبه شاخص بازداری و شناسایی ترکیب‌ها

برای محاسبه اندیس‌های بازداری ترکیبات، آلکان‌های نرمال C9-C22 به‌دستگاه GC تزریق گردید. شناسایی ترکیب‌ها با مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه با طیف جرمی ترکیب‌های استاندارد، با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه ترپنوئیدها در کامپیوتر و به کمک شاخص‌های بازداری استاندارد که در منابع مختلف منتشر گردیده، انجام شد. محاسبات کمی (تعیین درصد هر ترکیب) به کمک داده‌پرداز R3A-Chromatepac به روش نرمال کردن سطح (Area normalization method) و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ (Response factors) مربوط به طیف‌ها انجام شد.

نتایج

تعیین بازده اسانس گیاه *(Artemisia spicigera)*

درصد رطوبت و وزن خشک گیاه، بعد از طی زمان ٢٤ ساعت از قرار گرفتن نمونه ۵ گرمی گیاه در زمان اسانس‌گیری در آون، تعیین شد. درصد رطوبت گیاه در زمان اسانس‌گیری ۲۰/۸ درصد بود. سپس بازده اسانس بر حسب وزن خشک محاسبه شد. میانگین بازده اسانس (حاصل از سه تکرار) گیاه ۱/۳٤ درصد بود.

شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس گیاه

در اسانس حاصل از اندام هوایی ۲۰ ترکیب شناسایی شد که در مجموع ۹۹/۹ درصد از اسانس را تشکیل می‌دادند. مهم‌ترین ترکیب‌های تشکیل دهنده آن ۱،۸–سینول (۳٤/۳ درصد)، کامفور (۳۹/٦ درصد)، بورنئول (۵/۲ درصد) و کامفن (۵/۷ درصد) بودند. سایر ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس به همراه شاخص بازداری و درصد هر ترکیب در جدول ۱ آورده شده‌اند.

تعیین بازده عصاره و فراکسیون‌های آن

بازده عصاره‌های آبی، متانولی و فراکسیون-های حاصل از آن برای ۱۰۰ گرم از گیاه *A.spicigera* در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. قابل ذکر است که برای تعیین بازده عصاره‌ها نیز درصد رطوبت گیاه در زمان

عصاره‌گیری (مشابه با عملیات انجام شده در اسانس‌گیری) تعیین شده و بازده عصاره نسبت به وزن خشک محاسبه گردید.

تعیین اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره

نتایج حاصل از ارزیابی اثرضد باکتریایی اسانس، عصاره و فراکسیون‌های کلروفرمی، بوتانولی و آبی گونه *A.spicigera*، علیه ۸ گونه از باکتری‌های *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Kelebsiella penomonia*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherchia coli*، *Yersinia entrocolitica*، *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* در جدول‌های ۳ الی ٦ نشان داده شده‌اند. در بیشتر مواقع هاله‌های مشخص و واضحی از اثر اسانس رویت گردید. هاله‌های بزرگی که حد مشخصی نداشتند و بزرگی آنها در حدی بود که درهاله کناری ادغام شده بود به‌صورت بزرگتر از ۲۰ در جدول مشخص شده‌است. تعداد آزمون‌ها و تکرارها برای هر نمونه ۳ عدد بود که میانگین این ۳ رقم در جداول ذکر شده است.

اولین رقتی که برای فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره و فراکسیون‌های به کار برده شد، رقت ۰/۱ در محلول دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) بود که نتایج و اندازه‌هاله‌های مشاهده شده جدول ۵ ارائه شده‌اند.

از عصاره‌ها یا فراکسیون‌هایی که با اثرات ضد میکروبی خود توانسته بودندهاله‌های قابل‌قبولی ایجاد کنند، رقت ۰/۰۵ نیز تهیه و اثرات ضد میکروبی آن‌ها بررسی شد. نتایج بدست آمده از اثر عصاره و فراکسیون‌های گیاه *A. spicigera* با رقت ۰/۰۵ به‌دست آمده در جدول ٦ مشاهده می‌شوند. لازم به ذکر است که در غلظت ۰/۰۵ علیه باکتری *K. pneumonia* هاله واضحی رویت نگردید و در مورد باکتری‌های *B. subtilis* و *Y. entrocolitica* هاله غیر واضح ٦ میلی‌متری مشاهده شد.

بحث

مقایسه بازده اسانس گیاه مورد مطالعه (*A.spicigera*–۱/۳٤٪) در این تحقیق، با برخی گونه-های دیگر این جنس نشان داد که بازده اسانس نمونه مورد بررسی در این تحقیق نسبت به برخی گونه‌های دیگر درمنه بالاست، به‌طوری‌که بازده اسانس گونه‌های *A. aucheri*، *A. santolina* ۰/۸۳–۰/۸٤ درصد گزارش شده است (Sefidkon et al., 2002). تحقیقات قبلی نشان داده که بازده اسانس *A. sieberi* منطقه سمنان– دامغان (۱/۰۲٪)، *A. aucheri* سمنان– گرمسار (۰/۸٤ درصد) و *A. santolina* از منطقه احمدآباد (۰/۸۳ درصد) کمتر از بازده اسانس گونه مورد بررسی در این تحقیق یوده است (۲۷). بازده اسانس اندام هوایی *A. annua* (۰/۵۱ درصد)، *A. scoparia* (۰/۸٤ درصد)، *A. spicigera* از منطقه احمدآباد سمنان (۰/٤٦درصد)، *A. vulgaris* (۰/۱۷ درصد) و *A. absinthinum* (۰/۹۲درصد) نیز کمتر از بازده اسانس گونه مورد بررسی در این تحقیق یوده است (Sefidkon et al., 2002 and 2003).

مقایسه ترکیبات شناسایی شده در اسانس با مطالعات انجام شده توسط سفیدکن و همکاران (۲۰۰۳) انطباق دارد. در اسانس نمونه جمع‌آوری شده از احمدآباد سمنان ٤۰ ترکیب شناسایی شده بود که ٤۰ درصد کامفور، ۳۱ درصد ۱،۸–سینئول و ۵/۵ درصد کامفن گزارش شد. در اسانس مورد بررسی در این تحقیق ۲۰ ترکیب شناسایی شد که کامفور (۳۹/٦ درصد)، ۱،۸–سینئول (۳٤/۳درصد)، کامفن (۵/۷ درصد) و بورنئول (۵/۲ درصد) به‌ترتیب ترکیب‌های عمده اسانس بوده‌اند که مقدار سه ترکیب اول بسیار نزدیک به تحقیق قبلی بود. Nematollahi و همکاران (۲۰۰٦) نیز کامفور را به‌عنوان ترکیب عمده اسانس

A. spicigera معرفی کرده بودند (Nematollahi et al., 2006).

جدول ۲ نشان می‌دهد که بازده عصاره‌های تهیه شده از این گیاه بسیار بیشتر از بازده اسانس است. توزیع عصاره متانولی در فراکسیون‌های مختلف کلروفرمی، بوتانولی و آبی نشان می‌دهد که بخش اعظم عصاره را ترکیب‌های نیمه قطبی تشکیل می‌دهند که وارد فراکسیون بوتانولی (۱۱/۵۵ درصد) شده‌اند. همچنین میزان ترکیب‌های با قطبیت کم که وارد فاز کلروفرمی شده‌اند (٦/٥٧ درصد) بیشتر از ترکیب‌های کاملاً قطبی است که وارد فاز آبی (۳/۲۰ درصد) شده‌اند.

بررسی قطرهاله‌های عدم رشد حاصل از اثر اسانس درمنه بر باکتری‌های گرم مثبت و مقایسه آن با آنتی بیوتیک سنتزی تتراسیکلین و اریترومایسین (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثر اسانس بر روی همه باکتری‌های گرم مثبت قوی و معادل آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی بوده است. بنابراین با توجه به عوارض منفی و شناخته شده آنتی بیوتیک‌های سنتزی اسانس *A.spicigera* می‌تواند جایگزین خوبی برای تتراسایکلین و اریترومایسین باشد.

بررسی قطرهاله‌های عدم رشد حاصل از اثر اسانس گیاه بر باکتری‌های گرم منفی و مقایسه با آنتی بیوتیک سنتزی جنتامایسین و کربنیسیلین (جدول ٤) نشان می‌دهد که در حالی که اسانس *A.spicigera* بر *Pseudomonas aeruginosa* اثر نداشته است، اثر بازدارندگی آن بر رشد Yersinia *entrocolitica* از جنتامایسین بیشتر و از کربنیسلین کمتر بوده است. همچنین اسانس برروی Escherchia*coli* و *Klebsiella pneumonia* اثر بازدارندگی قویتری از جنتامایسین و کربنیسیلین داشته است.

اسانس *Artemisia spicigera* از اجزای مختلفی تشکیل شده که هر یک از اجزاء دارای اثرهای ضدمیکروبی مختلفی می‌باشند (Burt, 2004)، به‌عنوان مثال ترکیب ژرانیول دارای اثرات ضد باکتریایی (Jirovetz et al., 2007) به‌ویژه علیه سالمونلا تیفی موریوم (Kim et al., 2006) و دارای اثرات ضد قارچی (Subramanyam et al., 1997) می‌باشد. ژرانیل استات یک ترکیب آلی طبیعی از گروه مونوترپنها و دارای فعالیت ضدقارچی ضعیفی می‌باشد (Nakahara et al., 2003). لینالول دارای اثر ضد مایتی (mite)، ضد باکتریایی (Subramanyam et al., 1997)، ضدقارچ (Nakahara et al., 2003) و ضد کک (Hink et al., 1998) می‌باشد. آلفا-بیزابولول دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی است (Mitova et al., 2003). حضور این ترکیبات در اسانس این گونه باعث خواص قوی ضدمیکروبی اسانس شده است.

مقایسه اثر عصاره متانولی و فراکسیون‌های مختلف تهیه شده از آن در رقت ۱۰ درصد (جدول ۵) نشان می‌دهد که اثر فراکسیون کلروفرمی A.*spicigera* علیه E. *coli* کمی بیشتر از عصاره متانولی بوده و بر روی سایر باکتری‌ها اثری مشابه با عصاره متانولی داشته است. فراکسیون بوتانولی بر روی *Y. entrocolitica*، *E. coli*، *B. subtilis* و *P. aeruginosa* بیشتر از عصاره متانولی بوده و بر روی سایر باکتری‌ها اثری مشابه داشته است. اثر قوی فراکسیون بوتانولی بر روی *Y. entrocolitica* امکان فرمولاسیون و ساخت داروهایی از این فراکسیون خاص از عصاره *A. spicigera* قابل بررسی می‌سازد.

در رقت ۰/۰۵ درصد از عصاره‌های مورد بررسی نیز فراکسیون‌های بوتانولی و کلروفرمی *A.spicigera*هاله‌های عدم رشد مناسبی را بر روی باکتری *E. coli* و *Y. entrocolitica* ایجاد نمودند. که نشان از اثر قوی این فراکسیون‌ها و ترکیبات غیر قطبی و نیمه قطبی موجود در عصاره این

گونه از درمنه دارد. به‌طور قطع اثر این فراکسیون‌ها در غلظت‌های بالاتر، بیشتر خواهد بود که لازم است تحقیقات بیشتری برای فرمولاسیون و تهیه داروهای آنتی‌بیوتیک طبیعی از این عصاره و فراکسیون‌های آن انجام شود.

طایفه‌هندی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی اثر عصاره *A. sieberi* بر روی همین باکتری‌ها نشان دادند که فراکسیون آبی عصاره جز بر روی *Y. entrocolitica* بر هیچ یک از باکتری‌های دیگر اثر نداشته است. عصاره متانولی و دو فراکسیون کلروفرمی و بوتانولی *A. sieberi* بر روی *K. pneumonia* و *S. aureus* اثر یکسان داشته‌اند. این عصاره و همه فراکسیون‌های آن بر روی *E. coli* هیچ اثری نداشته است. عصاره و فراکسیون‌های کلروفرمی و بوتانولی بر روی بقیه باکتری‌های مورد بررسی اثرات یکسانی نداشتند. برای مثال اثر فراکسیون بوتانولی (حاوی ترکیب‌های نیمه قطبی) بر *B. cereus* بیشتر از فراکسیون کلروفرمی (حاوی ترکیب‌های غیرقطبی تا کمی قطبی) و بیشتر از عصاره متانولی (حاوی همه ترکیب‌های عصاره) بوده است (طایفه هندی و همکاران، ۱۳۹۱). تفاوت ناشی از اثر اسانس و عصاره گونه آرتمیزیای مورد بررسی در این تحقیق با تحقیق قبلی (طایفه‌هندی و همکاران، ۱۳۹۱) مربوط به ترکیبات متفاوت موجود در اسانس و عصاره آنها می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس اندام هوایی گیاه *Artemisia spicigera* شامل کامفور (۳۹/٦ درصد)، ۸،۱-سینئول (۳٤/۳ درصد)، کامفن (۵/۷ درصد) و بورنئول (۵/۲ درصد) بودند. بررسی اثر ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های متانولی، کلروفرمی، بوتانولی و آبی علیه باکتری‌های *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Kelebsiella penomonia*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherchia coli*، *Yersinia entrocolitica*، *Micrococcus luteu* و *Staphylococcus aureus* نشان داد که به جز باکتری گرم منفی Pseudomonas *aeruginosa*، سایر باکتری‌ها نسبت به اسانس گیاه با قطرهاله‌های عدم رشد بیش از ۲۰ میلی‌متر حساسیت نشان دادند. به‌نحوی که میزان این اثر با اثر تتراسایکلین و اریترومایسین برابر یا بیشتر بود. همچنین‌هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در اثر عصاره گیاه بر علیه باکتری‌های مذکور یکسان نبود. بیشترین‌هاله عدم رشد ناشی از عصاره متانولی بر *Y. entrocolitica* و *S. aureus* ایجاد شد. فراکسیون بوتانولی نیز اثر بازدارنگی خوبی بر روی باکتری‌های *Y. entrocolitica*، *Escherchia coli* و *Bacillus subtilis* نشان داد. براساس نتایج این تحقیق از اسانس و عصاره *Artemisia spicigera* و برخی فراکسیون‌های آن می‌توان در فرمولاسیون دارو برای درمان برخی از بیماری‌های عفونی استفاده کرد که مراحل بعدی برای انجام این کار نیاز به مطالعات بالینی دارد.

منابع

۱. مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۷۵۰ صفحه.

۲. وندیوسفی، ج. نصیراحمدی، ا.، و جاسبی، ا.ر.، ۱۳۷٤. فعالیت بیولوژیکی اسانس گیاه *Artemisia hausskenechtii*، پژوهش و سازندگی، ۲۹: ۲۸-۳۰.

۳. طایفه‌هندی، ا. سفیدکن، ف. یوسفی، م.، و تیموری، م. ۱۳۹۱. بررسی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس و اثرات ضدمیکروبی اسانس و عصاره الکلی *Artemisia sieberi* از منطقه فیروزکوه. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۵ (۳): ۱۱-۱.

4. Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. International Journal of Food and Microbiology, 94(3): 223-253.

culture medium and fish cubes. Journal of Food Science, 60(6): 1364-1368.

16. Klayman, D.L., 1985. Qingbaosu (artemisinin): An antimalarial durg from China. Science 228: 1049-1055.

17. Macro, J.A. and Barbera, O., 1990. Natural products from the genus *Artemisia* L. Stud Nat Prod Chem 7: 201-264.

18. Mozaffarian, V., 2007. Dictionary of Iranian plant names.Farhang-e-Moaser,Theran, 56-58.

19. Mitova, M., Taskova, R., Popov, S., Burger, R.G., Krings, U. and Handjieva, N., 2003. GC/MS analysis of some bioactive constituents from *Carthamus lanatus* L.*Z.* Naturforsch 58c: 697-703.

20. Nakahara, K., Alzoreky, N.S., Yoshihashi, T., Nguyen, H.T.T., and Trakoontivakorn, G., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). Japan Agricultural Research Quaterly, 37(4): 249-252

21. Nematollahi, F., Rustaiyan, A., Larijani, K.,Nadimi, M. and Masoudi, S., 2006. Essential oil composition of *Artemisia biennis* Willd. and *Publicaria undulate* (L.) C.A. Mey., two Compositae herbs growing wild in Iran. Journal of Essential Oil Research,18: 101-105.

22. Nikaido, H. and Vaara, M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.Microbiological Reviews, 49: 1-23.

5. Dinani, N.J., Asgary, A., Madani, H., Naderi, G., Mahzoni, P.,2010.Hypo cholesterolemic and antiatherosclerotic effect of *Artemisia aucheri*in hyper cholesterolemic rabbits. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 23(3): 321-325.

6. Dupont, B.F., Dromer, F. and Improvisi, L., 1996. The problem of resistance to azoles inCandida sp. Journal of Medical Microbiology, 6(2): 12-19.

7. Ermah, P.P.J.H., 1980. Some observations on the anatomy of *Artemisia afra*, South African Journal of Botany, 46(2): 197-206.

8. Fabien, J., Masottia, V., Marie Bessie, J., 2002. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. Fitoterapia, 73(6): 532–535.

9. Ghahreman A. 1984. Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 15: 18-19

10. Hakimi Maybodi, M,H,, Afkhami Aghdaee M., and Mijalili, B,F., 2003. An investigation into biological activities of Artemisia Persia's essential oil. Pajoohesh and Sazandegi 16 (61): 2-5.

11. Heywood, V.H., Harborn, J.B., and Turner, B.L., editors. 1997. The biology and chemistry of the composited. Academic Press, London, 868p.

12. Hink, W., Liberati, T. and Collart, M.G. 1988. Toxicity of linalool to life stages of cat flea, *Ctenocephalides felis* and its efficacy in carpet and on animals. Journal of Medical Entomology 25(1): 1-4.

13. Hold, K.M., Sirisoma, N.S., Ikeda, T., Narahashi, T. and Casida, J.E. 2000. α-Thujone (the active component of absinthe): γ-aminobutyric acid type Areceptor moduclation and metabolic detoxification. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America. 124-131.

14. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmid, E., Stoyanova, A.S., Denkova, Z., Nikolova, R. and Geissle, M., 2007. Purity, Antimicrobial activities and olfactoric evaluations of geraniol/nerol and various of derivatives. Journal of Essential Oil Research,19(3): 288-299.

15. Kim, J.M., Marsh, M.R., Cornell, J.A., Preston, I.I.I. and Wei, C.I., 2006. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in

23. Sefidkon, F., Jalili, A. and Mirhaji, T., 2002. Essential oil composition of three *Artemisia* spp. from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 17: 150-152.

24. Sefidkon, F., Jalili, A., Rabie, M., Hamzehee, B. and Asri, Y., 2003. Chemical composition of the essential oil of five *Artemisia* species from Iran, Journal of Essential Oil, Bearing Plants, 6(1) : 41-45.

25. Subramanyam, P.S., Bapaji, V.R. and Cole, M.C.R., 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89(358): 39-46.

26. Tan, R.X., Zheng, W.F. and Tang, H.Q., 1998. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Medica* 64: 295-302.

27. Teixeira da Silva, J.A., 2004. Mining the essential oils of the Anthemideae. African Journal of Biotechnology, 3(12): 706-720.

28. Zargari A., 1999. Herbal plants. 6th ed, Tehran University Publisher, Tehran, P 63.

جدول ۱: ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه *Artemisia spicigera*

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری (RI)	درصد
۱	tricyclene	۹۲٤	۰/۲
۲	α-pinene	۹۳٦	۱/٤
۳	camphene	۹۵۱	۵/۷
٤	sabinene	۹۷۲	۱/۰
۵	β-pinene	۹۷٦	۰/۷
٦	α-terpinene	۱۰۱٤	۰/۳
۷	1,8-cineole	۱۰۲۸	۳٤/۳
۸	γ-terpinene	۱۰۵۷	۰/۵
۹	*cis* sabinene hydrate	۱۰٦۷	۰/٤
۱۰	camphor	۱۱٤۳	۳۹/٦
۱۱	pinocarvone	۱۱٦۲	۱/۹
۱۲	borneol	۱۱٦٦	۵/۲
۱۳	terpinen-4-ol	۱۱۷٤	۱/٤
۱٤	α-terpineol	۱۱۸٦	۰/۷
۱۵	myrtenol	۱۱۹۳	۰/۵
۱٦	myrtenal	۱۱۹۳	جزئی
۱۷	bornyl acetate	۱۲۸۵	۱/۹
۱۸	e-caryophyllene	۱٤۱۵	۰/۵
۱۹	germacrene D	۱٤۸۱	۲/۲
۲۰	bicyclogermacrene	۱٤۹٦	۱/۵

جدول ۲: وزن و بازده عصاره متانولی و فراکسیون‌های گونه *A.spicigera*

ردیف	نوع عصاره	وزن (گرم)	بازده (٪)
۱	عصاره متانولی	۱۳/۳۱	۲۱/۳۳
۲	فراکسیون کلروفرمی	٤/۱۰	٦/۵۷
۳	فراکسیون بوتانولی	۷/۲۱	۱۱/۵۵
٤	فراکسیون آبی	۲/۰۰	۳/۲۰

جدول ۳: قطرهاله عدم رشد ناشی از اثر اسانس *A.spicigera* بر باکتری گرم مثبت

ردیف	باکتری	اسانس (میلی‌متر)	تتراسایکلین (میلی‌متر)	اریترومایسین(میلی‌متر)
۱	*Staphylococcus aureus*	>20	>20	>20
۲	*Micrococcus loteus*	>20	>20	>20
۳	*Bacillus subtilis*	>20	>20	>20
٤	*Bacillus cereus*	>20	>20	>20

جدول ٤: قطرهاله عدم رشد ناشی از اثر اسانس *A.spicigera* بر باکتری گرم منفی

ردیف	باکتری	اسانس (میلی‌متر)	جنتامایسین (میلی‌متر)	کربنیسیلین (میلی‌متر)
۱	*Escherchia coli*	۲۸	۲۰	۲۰
۲	*Yersinia entrocolitica*	۲٤	۲۲	۲۷
۳	*Pseudomonas aeruginosa*	–	۱٤	۱۷
٤	*Klebsiella pneumonia*	>۲۰	۲۱	۱۷

جدول ۵: قطرهاله عدم رشد ناشی از اثر عصاره و فراکسیون‌های *Artemisia spicigera* بر باکتری‌ها (غلظت ۰/۱)

ردیف	باکتری	عصاره متانولی (میلی‌متر)	فراکسیون کلروفرمی (میلی‌متر)	فراکسیون‌بوتانولی (میلی‌متر)	فراکسیون آبی (میلی‌متر)
۱	*M. luteus*	۱۲	۱۳	۱۲	۱۳
۲	*Y. entrocolitica*	۱٤	۱٤	۲۰	۱۳
۳	*S. aureus*	۱٤	۱۳	۱۰	۱٤
٤	*E. coli*	۱۲	۱۵	۱۵	۱۲
۵	*B. subtilis*	۱۱	۱٤	۱۵	۱۳
٦	*P. aeruginosa*	۱۰	۱۰	۱۳	۱۲
۷	*B. cereus*	۱۰	۱۲	۱۰	۱۰
۸	*K. pneumonia*	۱۲	۱۱	۱۱	۱۰

جدول ٦: فعالیت‌های میکروبی بر روی گونه *A. spicigera* تحت رقت ۰/۰۵

ردیف	باکتری	عصاره متانولی (میلی‌متر)	فراکسیون کلروفرمی (میلی‌متر)	فراکسیون‌بوتانولی (میلی‌متر)	فراکسیون آبی (میلی‌متر)
۱	*Y. entrocolitica*	۱۰	۹	۱۰	–
۲	*S. aureus*	۱۰	۹	–	۱۰
۳	*E. coli*	–	۹	۸	–
٤	*B. subtilis*	–	٦	٦	٦

Eco-phytochemical Journal of Medical Plants, 1th Year. Number 2. Summer 2013

Essential oil composition and antimicrobial activities of oil and alcoholic extract of *Artemisia spicigera* C. Koch. from Mazandaran province

Sefidkon, F*[1]., Tayefeh Hendi, E[2]., Fakhari, F[3]. Teimouri, M[4].

[1] Professor, Research Division of Medicinal Plants, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran

[2] Payam-e-Noor University, Najaf Abad Unit, Isfahan

[3] Payam-e-Noor University, Tehran Center

[4] Research Institute of Forests and Rangelands

Abstract

In this research, essential oil content and composition of *Artemisia spicigera* was investigated. In addition, the antimicrobial effects of the essential oil, methanol extract and it's different fractions were studied. The aerial parts of *A. spicigera* in blooming were collected from Ribeh (Mazandaran Province). The plant materials were dried in shade and powdered for extraction. The essential oil was obtained by hydro-distillation and analyzed by GC and GC/MS. The results showed presence of 20 components. The main constituents were camphor (39.6%), 1,8-cineole (34.3%), camphene (5.7%) and borneol (5.2%). The methanol extract was prepared by maceration, then the butanol, chloroform and water fractions were prepared from methanol extract. Finally the antimicrobial effects of the essential oil, methanol extract and the fractions were studied against *Escherchia coli, Pseudomonas aeruginosa, Kelebsiell penomonia, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica*. The antimicrobial effect of the essential oil of *Artemisia spicigera* against Gram positive and Gram negative bacteria showed the oil produced inhibition zone more than 20 mm on all bacteria except *Pseudomonas aeruginosa*. So the essential oil showed strong effects against these bacteria equal to or higher than tetracycline and erythromycin. The results of antimicrobial study of the extracts and fractions showed different effects. For each bacterium some fractions with special polarity showed larger inhibition zones. Methanol extract produced the biggest inhibition zone on *Y. entrocolitica* and *s. aureus.* Butanol fraction had strong effect on *Y. entrocolitica, Escherchia coli* and *Bacillus subtilis.* So it seems the essential oil and extract of *Artemisia spicigera* and special fraction can be used in drug formulation for treatment of some diseases.

Keywords: *Artemisia spicigera*, Essential oil, Methanol extract, Fractionation, Antimicrobial effect