

مقاله تحقیقی

بررسی ترکیبات شیمیایی و اثر ضد باکتریایی اسانس حاصل از گیاه *Salvia limbata* C. A. Mey. در منطقه آهوان - استان سمنان

سمیرا جمالی^۱، بستان رودی^{۲*}

۱. گروه کشاورزی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

*مسئول مکاتبات: پست الکترونیک: dayankor@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۳

چکیده

جنس مریم گلی در ایران حدود ۵۸ گونه گیاه علفی یک ساله و چند ساله دارد که از این تعداد ۱۷ گونه آن انحصاری می باشند. گونه های مریم گلی به عنوان گیاهان دارویی شناخته شده اند. هدف از این مطالعه تعیین ترکیبات شیمیایی و بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس است. اندام هوایی گیاه در زمان گلدهی از منطقه آهوان در استان سمنان جمع آوری و اسانس گیری به روش تقطیر با آب انجام شد. ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS آنالیز و شناسایی شد. بررسی اثر ضد باکتریایی به روش انتشار روی دیسک انجام شد. از ۱۹ ترکیب ترکیب شناسایی شده از اسانس مریم گلی، ترکیبات اصلی آلفا پینن (۹۹/۴۸ درصد)، بتاپینن با (۱۳/۹ درصد)، سینئول (۹/۶ درصد)، ساینن (۳۸/۵ درصد) و ترانس کاریوفیلین (۸۸/۷ درصد) بودند. اسانس آزمایش شده روی باکتری *Xanthomonas campestris* فعالیت ضد باکتریایی متوسط و روی باکتری *Pectobacterium cartovororum subsp cartovororum* بی اثر بود.

واژه های کلیدی: *Salvia limbata*، ترکیبات شیمیایی اسانس، اثرات ضد باکتریایی، استان سمنان

مقدمه

ضخیم، در پایین غالباً کمی زبر به پایین برگشته، در بالا پوشیده با کرک های غده ای بدون پایک متعدد، به ندرت بی کرک. برگ ها بدون بریدگی، تخم مرغی پهن، به طول (۳۰-) ۱۵-۱۰، به عرض (۳۰-) ۱۶-۶ سانتی متر، چریده، قلبی، اصولاً در امتداد رگبرگ ها پوشیده با کرک های موئی و غده دار بدون پایک متعدد؛ دمبرگ به طول ۱۸-۶ سانتی متر. گل آذین پانیکولی پهن؛ چرخه ها ۱۸-۲ گلی، با فاصله از یکدیگر برگه ها به طول ۷-۲ میلی متر، سریعاً

گیاهان تیره نعناع دارای پراکندگی وسیعی در سراسر جهان بوده و شامل ۱۸۷ جنس و حدود ۳۰۰۰ گونه می باشند. جنس مریم گلی در ایران ۵۸ گونه علفی یک ساله و چند ساله دارد که در سراسر ایران پراکنده اند و بعضی از آنها نیز علف هرز مزارع هستند (۵). گونه *Salvia limbata* C.A.Mey با نام فارسی مریم گلی لبه دار گیاهی است چند ساله، قوی. ساقه به ارتفاع ۱۸۰-۳۰ سانتی متر، ایستاده،

های بیماری زای گیاهان زراعی می باشند. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس و ارزیابی کارایی بالقوه اسانس گیاه برای مهار این باکتری های بیماری زای گیاهی انجام شد.

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه و اسانس گیری

جمع آوری گیاه در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰ از گردنه آهوان در استان سمنان انجام شد. نمونه های جمع آوری شده در هرباریوم دانشگاه آزاد واحد دامغان شناسایی و نگهداری شدند. اسانس گیری از سرشاخه های هوایی گیاهان در مرحله گل دهی به روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام گرفت (۹). بازده وزنی - وزنی نسبت به وزن خشک گیاه تعیین شد و سپس اسانس ها تا قبل از آنالیز در شیشه های تیره رنگ سربسته در فریزر نگهداری شدند.

آنالیز و شناسایی ترکیب های اسانس

اسانس حاصل توسط دستگاه GC-MS مورد آنالیز و شناسایی قرار گرفت. در این تحقیق مدل (N ۷۸۹۰) GC و MS (C ۵۹۷۵) و ستون کروماتوگرافی آن از نوع 5MS - HP دارای ستونی به طول ۳۰ سانتی متر با قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و دارای فاز ساکن ۲۵٪ میکرومتر بود. برنامه دمایی این دستگاه از ۶۰ تا ۲۷۰ درجه سانتیگراد با سرعت افزایش ۲/۵ درجه سانتیگراد در دقیقه و گاز هلیوم با سرعت جریان گاز حامل ۱ میلیمتر در دقیقه بود. در تمامی طیف های داده شده GC/MS از روی الگوی خروج الکان های نرمال و شاخص بازداری طیف ها، اندیس کوتس برای تک تک پیک ها محاسبه شد که با تطبیق آنها با کتاب و مراجع مقایسه چهره به چهره طیف ها با اطلاعات کتابخانه ای کامپیوتری Wiley275 و کتاب آدامز (۲۰۰۴) و دیگر منابع، طیف های مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیب های تشکیل دهنده اسانس و فرمول شیمیایی آنها شناسایی شد (۷).

بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاه

ریزان.دمگلها به طول ۱۶-۴ میلی متر. کاسه گلدار به طول ۸-۱۰ میلی متر، لوله ای - استکانی، پوشیده با کرک های زبر؛ لب فوقانی به کوتاهی سه دندان ای، کم و بیش راست یا خمیده. جام گل سفید، با لب پائینی زرد کم رنگ اغلب با لبه قهوه ای. کیسه های بساک پائینی عقیم، بهم پیوسته. فندقه تخم مرغی، به ابعاد ۲×۲/۵ میلی متر (۶). در این پژوهش، اسانس مریم گلی از گیاهان منطقه آهوان در استان سمنان مورد استخراج و بررسی قرار گرفت. برگ های مریم گلی به عنوان یک داروی گیاهی اثرات ضد التهابی، ضد اسپاسمی، ضد تشنجی و تسکینی نشان می دهند (۲۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۲۱). Nickavar و همکاران ترکیب های فرار اسانس *Salvia hypoleuca* را ۳۹ ترکیب گزارش کرده اند. ترکیب های عمده بی سیلکو جرماکرن (۱۵/۳ درصد)، ترانس کاروفیلین (۱۴/۶ درصد) و پریدیفلورول (۱۳/۳ درصد) بوده اند (۱۸).

در اسانس گونه *Salvia xathochelia* ۲۷ ترکیب شناسایی شده که جرماکرن D (۴۴ درصد)، آلفا کوپائین (۱۱/۹ درصد) و بتاکاریوفیلین (۶/۷ درصد) اجزای عمده بوده اند (۲۰).

در اسانس اندام های هوایی *Salvia santolinifolia* ۱۹ ترکیب شناسایی شده که آلفا و بتاپینین (۸۵/۵ درصد) بخش عمده اسانس را تشکیل دادند (۳). سجادی و همکاران در اسانس اندام های هوایی گونه *Salvia limbata* ۴۲ ترکیب معرفی کرده اند، بی سیلکوژرماکرن (۲۱/۱ درصد)، آلفا - پینین (۱۵/۵ درصد)، بتاپینین (۱۰/۶ درصد)، ۱ و ۸ سینئول (۱۱/۵ درصد) بخش عمده اسانس را تشکیل می دادند (۱۹).

با استفاده از ترکیبات طبیعی در گیاهان می توان با کنترل آفات و بیماری های گیاهی، مخاطرات زیست محیطی را به حداقل رساند (۸). اسانس ها و بسیاری از متابولیت های ثانوی و عصاره های گیاهی دارای فعالیت زیست محیطی متفاوت از جمله خواص ضد میکروبی می باشند که این موضوع باعث شده تا جایگزینی سموم شیمیایی با مواد طبیعی امن و دوستدار محیط زیست در مجامع علمی دنیا مطرح شود (۱۵). باکتری های جنس *Xanthomonas* و *Pectobacterium* از مهمترین باکتری

فعالیت ضد باکتریایی

نتایج به دست آمده از بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس مریم گلی بر باکتری *Xanthomonas campestris* در شکل ۱ نشان داده شده است. اسانس مذکور هاله عدم رشدی به قطر تقریبی $0/91 \pm 18/7$ میلیمتر ایجاد کرد که تفاوت چشمگیر و معنی داری با شاهد منفی داشت و البته در مقایسه با تأثیر آنتی بیوتیک تتراسایکلین کمتر بود. آنتی بیوتیک تتراسایکلین هاله عدم رشدی به قطر تقریبی $(1 \pm 33/41)$ میلیمتر ایجاد کرد.

شکل ۲ بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس روی باکتری *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum* را نشان می دهد که در مقایسه با آنتی بیوتیک تتراسایکلین $(0/95 \pm 28/7)$ میلیمتر هیچ تأثیری روی رشد باکتری مذکور نداشت.

جدول ۲ نشان می دهد تأثیر اسانس نسبت به آنتی بیوتیک در باکتری زانتوموناس اثر متوسط داشته و در مورد پکتوباکتری بی اثر است.

بحث

در تجزیه مریم گلی ایرانی، ترکیبات الف - پینن، ۱ و ۸ سینئول، سابینن، بتا - پینن، بتا - کاریوفیلن و اسپاتولنول گزارش شده است، سجادی و همکاران (۵۵/۹ درصد) از اسانس رامونوترپن ها و $(42/8)$ درصد) راسزکوئی ترپن ها گزارش کرده اند (۱۹).

نتایج حاصل از GC-MS اسانس مریم گلی بومی سمنان کاملاً با نتایج سجادی و همکاران مطابقت نشان می دهد. در این مطالعه مشخص گردید که الف - پینن ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس مریم گلی است که در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده از درصد بالاتری برخوردار است. تجزیه اسانس های گیاهان مختلف به وسیله کروماتوگرافی نشان داده که ترکیبات مختلفی در اسانس گیاهان وجود دارد. این ترکیبات اکثراً شامل مونوترپن ها، سزکوئی ترپن ها و سایر مشتقات اکسیژن دار (الکل ها، آلدید ها، استرها، اترها، کتون ها، فنول ها) است. ترکیب شیمیایی اسانس در گیاهان متنوع بوده با این وجود عموماً در هر اسانس یک ترکیب غالبیت دارد (۱۲). در گروه مونوترپنها

در این پژوهش از سویه استاندارد باکتری های *Xanthomonas campestris* (ptcc 1437) و *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum* (ptcc1675) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران استفاده شد. ابتدا سویه استاندارد روی پلیت حاوی محیط آگار مغذی کشت داده شد. پلیت های مذکور به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. بعد از آماده سازی باکتری خواص ضد باکتریایی اسانس براساس آزمون زیست سنجی به روش انتشار در آگار توصیف شده انجام شد. بدین منظور سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. سپس $0/1$ میلیمتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط آگار مغذی و محیط مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar, Merck) کشت داده و به طور کامل روی محیط پخش شد. سپس مقدار 20 میکرومتر از اسانس بر روی دیسک های کاغذی استریل به قطر 6 میلی متر (Whatman filter paper) تزریق شد. دیسک آنتی بیوتیک از تتراسایکلین 10 میکروگرمی ساخت شرکت پادتن طب به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی 20 میکرولیتر آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. شش دیسک برای دو باکتری در سه تکرار به کار رفتند. پلیت ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس در گرمخانه نگهداری و پس از خروج پلیت ها قطر هاله عدم رشد برحسب میلی متر اندازه گیری می شود (۹).

نتایج

آنالیز اسانس

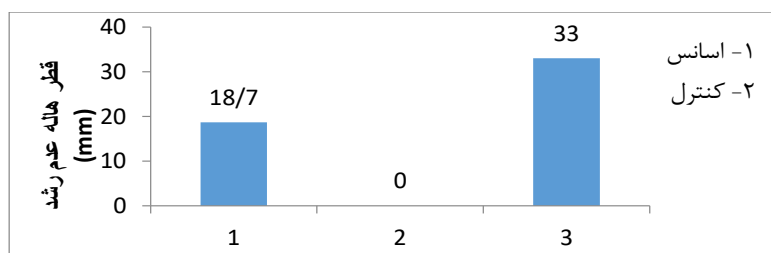
نتایج حاصل از GC-MS اسانس مریم گلی در جدول ۱ آمده است. از بین ترکیب های به دست آمده به ترتیب آلفاپینن با $(48/99)$ درصد، بتاپینن با $(9/13)$ درصد، سینئول با $(6/09)$ درصد، ترانس کاریوفیلن با $(7/88)$ درصد و سابینن با $(5/38)$ درصد بیشترین درصد اجزاء تشکیل دهنده اسانس بودند.

فنول ها و الکل ها از خود خاصیت ضد میکروبی نشان داده و مونوترپن های غیراکسیژنه از قبیل آلدهیدها، کتون ها، اترها و استرها خاصیت ضد میکروبی ضعیف تری دارند. سزکوئی ترین ها هیچ گونه خاصیت ضد باکتریایی حتی در غلظت های بالا ندارند (۱۹).

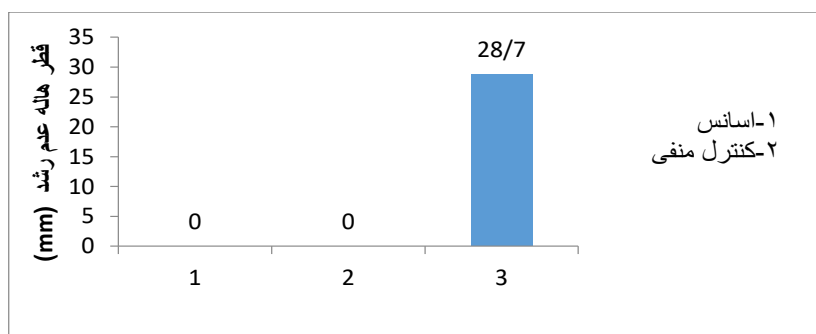
جدول ۱- نتایج حاصل از تجزیه اسانس مریم گلی بومی دامغان (*Salvia limbata*) با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS).

شماره ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری
1	ALPHA PINENEN	48.99	9.324
2	CAMPHENE	1.08	9.913
3	SABINENE	5.38	11.052
4	2-BETA-PINENE	9.13	11.149
5	BETA-MYRCEN	1.20	11.899
6	LIMONENE	1.25	13.501
7	CINEOLE	6.09	13.604
8	GAMMA-TERPINENE	0.65	14.874
9	ALPHA-TERPINOLENE	1.09	16.167
10	BICYCLO(2.2.1)HEPTAN	0.76	19.515
11	GAMMA-TERPINENE	1.06	20.012
12	GAMMA-ELEMENE	0.70	22.227
13	BICYCLOHEPTAN	1.42	24.453
14	TRANS-CARYOPHYLLENS	7.88	29.459
15	GRMACERENE	1.05	31.651
16	GRMACERENE	7.41	32.200
17	DEHYDROARROMADEN DERNS	2.26	34.930
18	NEOISOLONGIFOLENE	0.57	35.130
19	ALPHA-AMORPHENE	1.66	38.552

* زمان بازداری بر حسب دقیقه می باشد.



شکل ۱- فعالیت ضد باکتریایی اسانس مریم گلی بر باکتری *Xanthomonas campestris*



شکل ۲- فعالیت ضد باکتریایی اسانس مریم گلی بر باکتری *Pectobacterium carotovorum sub sp carotovorum*

جدول ۲- اثر ضد باکتریایی اسانس مریم گلی بر باکتری *xanthomons campestris* و *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*

<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Pectobacterium.carotovorum subsp. Carotovorum</i>	گروه
0 ^c	0 ^b	کنترل منفی
33 ^a ±1.417	28.7 ^a ±1.267	تتراسایکلین
18.7 ^b ±0.916	0 ^b	اسانس مریم گلی

داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. مقادیری که با حروف یکسان نشان داده شده اند در سطح $p < 0.05$ معنی دار نبودند.

های انسانی افزایش یافته و بشر استفاده از ترکیبات گیاهی را در بسیاری از مواقع به ترکیبات شیمیایی ترجیح می دهند استفاده از ترکیبات مختلف گیاهی علیه بیماری های گیاهی که به نوعی با سلامتی انسان نیز در ارتباط می باشد امری ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

از مسئولین آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان برای همکاری در این کار پژوهشی قدردانی می گردد.

ترکیب های اصلی در اسانس مریم گلی بومی دامغان، آلفا و بتاپینن، ترانس کاریوفیلین، سینئول و سابینن گزارش شده است. کاریوفیلین ترکیبی است که از تعدادی گیاهان معطر از جمله برخی گونه های سالویا به دست می آید. اسانس مریم گلی به دلیل داشتن ترکیبات مونوتراپن در مورد برخی باکتری ها می تواند به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی طبیعی استفاده شود. (۴).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس مریم گلی در ممانعت از رشد باکتری *Xanthomonas campestris* می تواند مؤثر باشد. با توجه به این که در سال های اخیر استفاده از ترکیبات گیاهی در مبارزه با بیماری

منابع مورد استفاده

- ۱ خسروی پور، س.، ۱۳۹۳. فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاه زنیان بر باکتری های *Pectobacterium carotovorum* و *Escherichia Coli* در محیط کشت آگار مغذی. فصل نامه تحقیقات بیماری های گیاهی، سال سوم، شماره ۲، صفحات ۴۳-۵۶.
- ۲ زرگری، ع.، ۱۳۶۹. گیاهان داروئی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۹۲۳.
- ۳ سفیدکن، ف.، ۱۳۷۶. بررسی کمی و کیفی اسانس *Salvia santolinifolia* and *Salvia verticillata* چکیده مقالات اولین سمینار گیاهان داروئی و صنعت، ۲۳ تا ۲۵ اردیبهشت، شیراز، ص ۲۵۷.
- ۴ محمودی، ه.، رهنما، ک.، ۱۳۸۹. بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهان داروئی بر باکتری های عامل شانکر و لکه برگگی درختان میوه هسته دار. فصل نامه گیاهان داروئی، جلد ۳۶، شماره ۴، ص ۴۲-۳۴.
- ۵ مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ گیاهان ایران، انتشارات فرهنگ معاصر.
- ۶ مظفریان، و.، ۱۳۸۳. فلور استان ایلام، انتشارات فرهنگ معاصر.
- 7 Adams, R. P., 2005. Identification of essential oil components by gas chromatography – quadrupole mass spectroscopy. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 16: 1902-1903.
- 8 8. Afzal, A. M., Rahber Bhatti, M. H., Aslam, M., 1997. Antibacterial activity of plant diffusive against *Xanthomonas campestris pv. citri*. International Journal of Pest Management 43: 149-153.
- 9 9. Andrews, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of antimicrobial chemotherapy 48: 5-16.
- 10 10. Azizi, M., Davarenejad, G. R., Woerdenbag, H. J., Kayser, O., 2009. Essential oil content and constituents of black zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) From Iran during field Cultivation. Journal of Essential Oil Research 21: 78-82.
- 11 11. Chiej, R., 1988. The Macdonald encyclopedia of medicinal plants London: Macdonald and Co-publishers Ltd: p. 272.
- 12 12. Cowan, M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin J Mic Rev 12: 564-82.
- 13 13. Duke, J. A., 1989. CRC Handbook of medicinal herbs. Boca Raton: CRC Press Inc, p. 420.
- 14 14. Ebadi, M., 2002. Pharmacodynamics basis of herbal medicine. Boca Raton: CRC press; p. 45.
- 15 15. Hassanzadeh, N., 2005. Technology of natural plant materials, emphasizing on five blight disease. Agricultural Science 11: 53-58.
- 16 16. Hooker, W. J., 1981. Composition of potato disease. Minnesota: APS press, p. 125.
- 17 17. Jaymand M., Rezaee, M., 2007. Essential oil, distillations apparatuses, test method of essential oil and retention indices in essential oil analysis. Iranian Society of Medicinal Plants 11: 8-106.
- 18 18. Nickavar, B., Majob, F., Asgar Panah, J., 2005. Volatile composition of the essential oil of *Salvia hypoleuca* Benth. International Journal of Aromatherapy 15: 51-53.
- 19 19. Sajjadi, S., Shahpir, Z., 2004. Chemical composition of the essential oil of *Salvia limbata* C. A. Mey. Journal of DARU 12: 94-96.
- 20 20. Saleh, P., Bazzaz Tolami, L., 2005. Essential composition of *Salvia xantocheila* Bioss. EX Benth. from Iran. Journal of Essential Oil Research 17: 442-443.
- 21 21. Wichtl, M., 1994. Herbal drugs and phytopharmaceutical. Stuttgart: Medpharm Scientific publishers, p. 441.