بررسی مواد تشکیل دهنده و ویژگی‌های ضد باکتریایی روغن اسانسی برگ گیاه *Xanthogalum purpurascens* Ave-Lall رویشی در ایران

محبوبه طاهرخانی*+
گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تاکستان، تاکستان، ایران

شیوا مسعودی
گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

عبدالحسین روستائیان
گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

چکیده: در این کار پژوهشی اسانس برگ گیاه *Xanthogalum purpurascens Ave-Lall* جمع آوری شده از شمال ایران، به روش تقطیر با آب استخراج شد و توسط دستگاه‌های GC و GC/MS مورد تجزیه و بررسی قرار گرفت. ۶۲ ترکیب با درصد۹۱٫۲٪ شناسایی شدند، که از این میان (۱۷٫۵۹٪) 1,8-cineole بیشتر بوده است. سایر ترکیب‌هایی با درصد چشمگیر عبارتند از: (۵٫۷٪) cis-muurol-5-en-4-α-ol، (۵٫۳٪) neryl acetate و (۵٫۲٪) E-anethole. ویژگی‌های ضد باکتریایی اسانس برگ گیاه *X. purpurascens*، به دو روش سنجش قطر هاله مهار رشد بر روی محیط کشت مولر- هینتون آگار و روش غلظت بازدارندگی کمینه در مقابل شش باکتری گرم مثبت و منفی اندازه گیری شد. اسانس برگ گیاه *X. purpurascens*، اثر ضد باکتریایی به نسبت خوبی، در مقابل باکتری *Klebsiella pneumonia* از خود نشان داد. در صورتی که این اسانس در مقابل دو باکتریِ گرم مثبت و منفی *Bacillus anthracis* و *Pseudomonas aeruginosa* بی اثر بوده است.

واژه‌های کلیدی: روغن اسانسی، فعالیت ضد باکتریایی، *Xanthogalum purpurascens*، 1,8-cineole.

KEY WORDS: *Essential oil, Antibacterial activity, Xanthogalum purpurascens, 1,8-Cineole.*

مقدمه

جنس *Xanthogalum* از خانواده چتریان، در ایران یک گونه به نام *X. purpurascens* دارد. در بررسی فیتوشیمیایی بر روی عصاره گیاه *X. purpurascens*، ترکیب‌های کومارینی و لاکتونی شناسایی شده‌اند [۲ ، ۱] در سال ۱۳۸۴، اسانس اندام هوایی گیاه *X. purpurascens* توسط *روستائیان* و *همکاران* مورد بررسی قرار گرفت. که در بین آنها ترکیب‌های (۲۰٫۱٪) β-phellandrene و (۱۱٫۳٪) β-caryophyllene از درصد بالایی برخوردار بودند [۳]. *Baser* و *همکاران* در سال ۲۰۰۱ میلادی، به وجود ترکیب‌های

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: mahtaherkhani@yahoo.com

bicyclogermacrene (٪۱۲/۰) ، β-phellandrene(٪۷/۱) و spathulenol(٪۶/۹)، به عنوان ترکیب‌های غالب در اسانس میوه این گیاه اشاره نمودند [۴].

ویژگی‌های گیاه شناختی

گونه *Xanthogalum purpurascens* Ave. Lall. ، با نام‌های دیگر (syn.*Tommasinia kotschyi* Boiss., *Tommasinia purpurascens* (Ave. Lall) Boiss.) ، گیاهی است چند ساله، با ارتفاع ۱ تا ۴ متر، بدون کرک، با ساقه‌های ضخیم، شیار دار و لوله‌ای برگ‌ها با غلافی پهن و ۲ تا ۳ بار شانه‌ای دم‌برگ‌دار، پهنک با محیطی تخم مرغی به طول ۳۰ تا ۴۰ سانتی‌متر و عرض۲۰ تا۳۰ سانتی‌متر، با قطعه‌های اولیه دم‌برگچه دار با لب‌های دندانه‌ای درشت یا به صورت کنگره‌ای ـ دندانه‌ای، میوه‌ها بیضی شکل پهن، به طول۱۰ تا ۱۵ و عرض ۸ تا ۱۲ میلی‌متر، چترها با شعاع‌های ضخیم به تعداد۲۰ تا۳۰ تایی، نامساوی، پرزدار. کاسبرگ‌ها به طول حدود یک میلی‌متر. خامه‌ها دو برابر اندازه پایک خامه، به طرف خارج خمیده. گلها نر، ماده یا چند جنسی. گلبرگ‌ها زرد مایل به سبز، به تقریب دایره‌ای، با انتهای برگشته. فصل گل و میوه‌دهی اواخر بهار تا اواسط تابستان می‌باشد.

انتشار جغرافیایی

پراکندگی جغرافیایی گونه مورد مطالعه مربوط به ترکیه، ایران و قفقاز می‌باشد. پراکندگی این گیاه در شمال و غرب ایران مربوط به مناطق جاده چالوس به طرف جاده هراز و کوه‌های چهل چشمه کردستان می‌باشد [۶ ، ۵].

بخش تجربی

جمع آوری گیاه و استخراج

اندام‌های هوایی گیاه *X. purpurascens* ، در بهار سال ۱۳۸۷ از شمال ایران، منطقه جاده چالوس جمع آوری شد و در هوای آزاد و سایه خشک شد. نمونه هرباریومی آن توسط هرباریوم مؤسسه جنگل‌ها و مراتع مورد شناسایی قرار گرفت. سپس برگ‌های گیاه از کل اندام هوایی آن جدا شده و حدود ۴۰ گرم از برگ آن به روش تقطیر با آب و به مدت ۳ ساعت در دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد.

جداسازی و شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده

برای شناسایی ترکیب‌های اسانس از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. پس از تزریق اسانس به این دستگاه‌ها، اندیس بازداری کواتس (KI) برای تمام ترکیب‌ها محاسبه شد و با مقایسه این اندیس‌ها با شاخص‌های بازداری استاندارد و همچنین با استفاده از اطلاعات مربوط به ترکیب‌های استاندارد در کتابخانه، ترکیب‌های تشکیل دهنده روغن اسانسی شناسایی شد [۷].

ویژگی‌های دستگاه GC/MS

دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده در این پژوهش، از نوع Agilent 6890، با ستونی به طول۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و با ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر و از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون به این صورت تنظیم شد که دمای ابتدای آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، شیب دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه توقف در این دما. دمای اتاقک تزریق۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیم به عنوان گاز حامل با شدت جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود.

بررسی ویژگی‌های میکروبی

ویژگی‌های میکروبی اسانس برگ گیاه *X. purpurascens* ، به دو روش سنجش قطر هاله مهار رشد و روش غلظت بازدارندگی کمینه در مقابل سه باکتری گرم مثبت: *استروپتوکوکوس پایوژنز* (RITCC1949)، *باسیلوس آنتراسیس* (RITCC1036)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (RITCC1885)، و سه باکتری گرم منفی: *کلبسیلا پنومونیه* (RITCC1249)، *اشریشیا کلی* (RITCC1330)، *پزودوموناس آئروژینوزا* (RITCC1547)، اندازه‌گیری شد. در روش سنجش قطر هاله مهار رشد، باکتری‌های مورد بررسی در آب مقطر سترون حل شده و کدورت آن با شاهد ۰/۵ مک فارلند(۱۰ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر محلول) مقایسه شد. سپس با سواپ سترون از باکتری‌ها برداشته شد و بر روی محیط‌های کشت سترون مولر هینتون آگار کشت داده شد،

در مورد باکتری *استرپتوکوس پایوژنز* از محیط کشت بلاد آگار استفاده شد. سپس گودال‌هایی بر روی محیط حفر شد. در ابتدا ته چاهک‌ها با ۱۰ میکرولیتر محیط پر شد تا از نفوذ احتمالی اسانس‌ها به کف محیط جلوگیری شود و از بروز هر گونه خطا پیشگیری شود.۵۰ میکرولیتر از اسانس مورد نظر به طور جداگانه در چاهک‌ها ریخته شد و در هر ظرف کشت یک چاهک به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ظرف‌های کشت شده مربوط به باکتری‌ها در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۲۰ ساعت گرماگذاری شد و بعد از رشد، قطر هاله‌های مهار رشد مورد سنجش قرار گرفت. آزمایش‌ها سه بار تکرار شد. در روش غلظت بازدارندگی حداقل (MIC)، محیط کشت مولر هینتون براث تهیه و در ده لوله به مقدار مساوی ۱ میلی لیتر ریخته شد. پس از اتوکلاو و خنک شدن محیط‌ها، اسانس مورد بررسی با این باکتری‌ها تحت آزمایش قرار گرفت. بدین طریق ۱ میلی لیتر از اسانس در لوله شماره ۱ ریخته شده به طور پشت سر هم از لوله شماره۱ الی ۱۱ با پیپت‌های جداگانه رقت تهیه شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر که با شاهد مک فارلند مقایسه شده بود، به هر لوله افزوده شد. بدین ترتیب که لوله شماره ۱ با بیشترین غلظت اسانس و اثر بازدارندگی و لوله شماره ۱۱ با کمترین غلظت اسانس و اثر بازدارندگی بود. لوله‌های دارای اسانس و باکتری در انکوباتور ۳۷ سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شده و نتیجه‌ها پس از ۲۴ ساعت بررسی و مقایسه شد.

نتیجه‌ها و بحث

اسانس به دست آمده از برگ گیاه *X. purpurascens* به صورت روغن زرد روشن بود و بازده نسبت به وزن خشک گیاه (W/W) ۰/۲۳٪ بود. پس از تزریق نمونه به دستگاه کروماتوگرافی GC و GC/MS ، با محاسبه و بررسی مؤلفه‌های گوناگون نظیر اندیس‌های بازداری کواتس و بررسی طیف‌های جرمی ترکیب‌های موجود در اسانس و مقایسه تمامی این مؤلفه‌ها با ویژگی‌های ترکیب‌های استاندارد اقدام به شناسایی اجزای موجود در اسانس‌ها شد. کلیه ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس‌ها به همراه درصد نسبی و شاخص بازداری در جدول ۱ قابل دیدن می‌باشد. در اسانس گیاه ۶۲ ترکیب شناسایی شد که در مجموع ۹۱/۲ درصد از اسانس را تشکیل می‌دهند. از میان ترکیب‌های شناسایی شده، (۱۷/۵۹٪) 1,8-cineole و (۵/۳۱٪) neryl acetate مونوترپن‌های عمده و (۵/۷٪) cis-muurol-5-en-4-α-ol، به‌عنوان سزکوئی‌ترپن بیشتر مورد شناسایی واقع شد. در میان ترکیب‌های غیر ترپنوئیدی (۵/۲۱٪) E-anethole بالاترین درصد را به خود اختصاص داده بود. از تجزیه اسانس به دست آمده از برگ گیاه *X. purpurascens* ، ۱۱ترکیب مونوترپنی هیدروکربنی با درصد (۸/۱۲٪)،۲۴ ترکیب مونوترپنی اکسیژن دار (۴۳/۷۰٪)، ۱۱ ترکیب سزکوئی‌ترپنی هیدروکربنی (۸/۲۲٪)، ۷ ترکیب سزکوئی‌ترپن اکسیژن‌دار (۱۶/۷۲٪) و ۹ ترکیب غیر ترپنوئیدی (۱۴/۴۸٪) شناسایی شد. در مجموع بیشترین درصد از روغن اسانسی به‌دست آمده از برگ گیاه *X. purpurascens* ، را ترکیب‌های مونوترپنی اکسیژن‌دار با درصد ۴۳/۷۰٪ تشکیل می‌دهند.

در اسانس مربوط به برگ گیاه *X. purpurascens* ، ۵۱/۸۲٪ را مونوترپن‌ها و ۲۴/۹٪ از آن را سزکوئی ترپن‌ها به خود اختصاص داده‌اند. از میان ترکیب‌ها شناسایی شده (۱۷/۵۹٪) 1,8-cineole و (۵/۳۱٪) neryl acetate به عنوان مونوترپن‌های بیشتر و ترکیب (۵/۷۰٪) cis-muurol-5-en-4-α-ol، سزکوئی ترپن بیشتر بود. در صورتی که از تجزیه روغن اسانسی به دست آمده از کل اندام هوایی آن، ۳۷٪ ترکیب‌های مونوترپنی و ۴۱/۵٪ را سزکوئی‌ترپن‌ها تشکیل می دادند، که از میان مونوترپن‌های آن (۲۰/۱٪)β-phellandrene و (۷/۴٪)α-pinene بیشتر و از میان سزکوئی ترپن‌های آن نیز (۱۱/۳٪) β-caryophyllene، (۷/۲٪) spathulenol و (۵/۲٪) bicyclogermacrene بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده بودند. بنابراین بیشترین درصد از اسانس کل اندام هوایی این گیاه را سزکوئی ترپن‌ها تشکیل می‌دهند، در صورتی که مونوترپن‌ها بخش بیشتر اسانس برگ انی گیاه را تشکیل می‌دادند.

مطابق با این اطلاعات، ترکیب اصلی در اسانس برگ گیاه *X. purpurascens* ، 1,8-cineole بوده که در اسانس به دست آمده از اندام هوایی این گیاه دیده نشده است.

نتیجه‌های به دست آمده از بررسی ویژگی‌های میکروبی اسانس برگ گیاه *X. purpurascens* ، در مقایسه با جنتامایسین به عنوان استاندارد و به دو روش سنجش قطر هاله مهار رشد بر روی محیط کشت مولر- هینتون آگار و روش غلظت بازدارندگی کمینه، در جدول ۲ آورده شده است. بررسی اثرهای ضد باکتریایی در مقابل شش باکتری گرم مثبت و منفی اندازه گیری شد. مطابق با نتیجه‌های به دست آمده، اسانس برگ گیاه *X. purpurascens* ، اثر ضد باکتریایی به نسبت خوبی را در مقایسه با جنتامایسین به عنوان استاندارد، در مقابل باکتری *Klebsiella pneumonia*

جدول ۱ـ ترکیب‌های شناسایی شده اسانس برگ گیاه *X. purpurascens*.

Compound	RI	Percentage	Compound	RI	Percentage
Octane	۸۰۰	۲/۳۹	Cumin aldehyde	۱۲۳۹	۰/۷۹
Santene	۸۸۸	۰/۲۴	Carvone	۱۲۴۲	۰/۵۸
α–Pinene	۹۳۹	۱/۶	Geranial	۱۲۷۰	۰/۲۲
Camphene	۹۵۳	۰/۸	E-Anethole	۱۲۸۳	۵/۲۱
Sabinene	۹۷۶	۰/۱۴	Lavandulyl acetate	۱۲۸۹	۰/۳۸
β–Pinene	۹۸۰	۱/۶۷	Perilla alcohol	۱۲۹۵	۰/۳
Myrcene	۹۹۱	۰/۵۶	Citronellyl acetate	۱۳۵۴	۰/۵۹
n-Decane	۹۹۹	۰/۸۰	Eugenol	۱۳۵۶	۳/۱۸
α-Phellandrene	۱۰۰۵	۰/۳۵	Neryl acetate	۱۳۶۵	۵/۳۱
α-Terpinene	۱۰۱۸	۰/۳۴	α–Copaene	۱۳۷۶	۰/۳
p-Cymene	۱۰۲۶	۱/۲۹	Geranyl acetate	۱۳۸۳	۰/۵۱
1,8-Cineole	۱۰۳۳	۱۷/۵۹	β-Caryophyllene	۱۴۱۸	۲/۸
(Z)-β-Ocimene	۱۰۴۰	۰/۴۹	γ-Elemene	۱۴۳۳	۰/۹۳
γ-Terpinene	۱۰۶۲	۰/۵۱	α–Humulene	۱۴۵۴	۰/۳۴
Fenchone	۱۰۸۷	۰/۴۹	γ-Muurolene	۱۴۷۷	۰/۵۴
Terpinolene	۱۰۸۸	۰/۳۷	Germacrene D	۱۴۸۰	۰/۵۲
Linalool	۱۰۹۸	۰/۵۹	Viridiflorene	۱۴۹۳	۰/۴۱
trans-Thujone	۱۱۱۴	۱/۰۷	Bicyclogermacrene	۱۴۹۴	۱/۱۴
α–Campholenal	۱۱۲۵	۰/۶۳	(Z)-γ-Bisabolene	۱۵۱۵	۰/۴۱
Nopinone	۱۱۳۷	۱/۲	δ-Cadinene	۱۵۲۴	۰/۵۱
trans-Pinocarveol	۱۱۳۹	۲/۳۸	Liguloxide	۱۵۳۱	۰/۵۶
Cis-Verbenol	۱۱۴۰	۱/۳	Cis-Muurol-5-en-4-α-ol	۱۵۵۴	۵/۷۰
Camphor	۱۱۴۳	۰/۵۸	Germacrene B	۱۵۵۶	۰/۳۲
Pinocarvone	۱۱۶۲	۱/۱	(E)-Nerolidol	۱۵۶۴	۰/۵
Teroin-4-ol	۱۱۷۷	۱/۴۷	Spathulenol	۱۵۷۶	۳/۱
α–Terpineol	۱۱۸۹	۰/۷۶	Carryophyllene oxide	۱۵۸۱	۳/۰۴
Myrtenal	۱۱۹۳	۱/۶۷	Dillapiole	۱۶۲۲	۰/۳۳
Myrtenol	۱۱۹۴	۱/۲۲	β-Eudesmole	۱۶۴۹	۳/۲۷
Verbenone	۱۲۰۴	۰/۶۶	α-Eudesmole	۱۶۵۲	۰/۵۵
Trans-Carveol	۱۲۱۷	۰/۵۶	Apiol	۱۶۸۰	۰/۳۱
Nerol	۱۲۲۸	۱/۵۵	Hexadecanoic acid	۱۹۷۳	۰/۸۲
Total of percentage = ۹۱/۲۴%					

جدول ۲ـ نتیجه‌های ویژگی‌های آنتی میکروبی اسانس برگ گیاه *X. purpurascens*.

Microorganisms	Gram +/-	IZ	MIC	Gentamicin
Bacillus anthracis RITCC1036	+	–	–	۳۲
Klebsiella pneumonia RITCC1249	–	۳۰	۱۲٫۵	۲۰
Escherichia coli RITCC1330	–	۱۸	۲۵	۱۳
Pseudomonas aeruginosa RITCC1574	–	–	–	۱۶
Stereptococcus pyogenes RITCC1949	+	۲۰	۲۵	۱۳
Staphylococcus aureus RITCC1885	+	۱۷	۲۵	۱۳

IZ - Inhibition Zone(mm); MIC- Minimum Inhibitory Concentration as mg/ml; Gentamicin(mm).

از خود نشان داد. قطر هاله مهار رشد برای این باکتری ۳۰ میلی متر و کمترین غلظت بازدارندگیِ آن، ۱۲٫۵ mg/mL به دست آمد. درصورتی‌که قطر هاله مهار رشدِ جنتامایسین برای این باکتری ۲۰ میلی متر به دست آمد. همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، اسانس برگ این گیاه ویژگی‌های ضد باکتریایی ضعیفی را در مقابل دو باکتریِ گرم مثبت *Stereptococcus pyogenes* و *Staphylococcus aureus* و یک باکتریِ گرم منفی *Escherichia coli* از خود نشان می دهد. در صورتی که این اسانس در برابر دو باکتریِ گرم مثبت و منفی *Bacillus anthracis* و *Pseudomonas aeruginosa* بی‌اثر بوده است.

نتیجه گیری

از تجزیه روغن اسانسی برگ گیاه *X. purpurascens* نتیجه شد که بیشترین غلظت را مونوترپن‌ها به خود اختصاص داده بودند که از این میان 1,8-cineole با ویژگی‌های ضد عفونی کنندگی، ضد سرفه و برونشیت، خلط آور، آرام‌بخش و درمان التهاب گلو به عنوان ترکیب بیشتر در اسانس برگ این گیاه شناسایی شد.

این اسانس اثر به نسبت خوبی را در مقابل باکتری *K. pneumonia* از خود نشان داد، درصورتی که در مقابل دو باکتری *B. anthracis* و *P. aeruginosa* بی اثر بود.

قدردانی

از دکتر ولی ا... مظفریان به خاطر جمع آوری و نامگذاری گیاه تشکر می‌شود.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۸

مراجع

[1] Sokolova A.I., Perelson M.E., Nikonov G.K., Tomazin, A New Coumarin from *Xanthogalum purpurascens*. *Khim. Prir. Soedin*., **5**(5), p. 359-361 (1969).

[2] Sokolova A.I., Nikonov G.K., Lactones in *Xanthogalum purpurascens* Fruit, *Khim. Prir. Soedin*., **5**(4), p. 317-318 (1969).

[3] Assadian F., Masoudi S., Nematollahi F., Rustaiyan A., Larijani K., Mazloomifar H., Volatile Constituents of *Xanthogalum purpurascens* Ave-Lall., *Eryngium caeruleum* M.B. and *Pimpinella aurea* DC. Three Umbelliferae Herbs Growing in Iran., *J. Essent. Oil Res*., **17**(3), p. 243-245 (2005).

[4] Baser K.H.C., Ozek T., Kurkcuoglu M., Duman H., Aytac Z., Composition of Essential Oil of *Xanthogalum purpurascens* Lallem. *J. Essent. Oil Res*, **13**(3), p. 206-207 (2001).

[5] Rechinger K.H., *Xanthogalum*. In: "Flora Iranica", Umbelliferae, No. 162. Edits., Rechinger, K.H., Hedge, I.C., Akademische Druck and Verlagsanstalt, Graz, Austria, p. 524, Respectively (1987).

[6] Mozaffarian V., "A Dictionary of Plant Names". Farhang Moaser Publishers, Tehran (1996).

[7] Adams R.P., "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy". Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL (1995).