مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

تعیین ترکیبات اسانس میخک (*Eugenia caryophyllata*) و مقایسه خاصیت ضد باکتریایی آن با برخی آنتی بیوتیک های متداول

عبداله دده زاده[1]، حسن نورافکن[2]*

۱-دانشجوی دکتری، گیاهان دارویی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران.

۲-استادیار، گروه گیاهان دارویی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات ارگانیک، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۲

کلمات کلیدی:

آنتی باکتریال،

اسانس،

میخک، یوژنول،

مقاومت آنتی بیوتیکی.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.47

* مسئول مکاتبات:

nourafcan@m-iau.ac.ir

چکیده

میخک به عنوان یک گیاه دارویی از گذشته های دور برای درمان عفونت ها و ممانعت کننده از فساد مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، با سه روش تقطیر با آب، تقطیر با بخار و تقطیر با آب - بخار، غنچه های میخک اسانس گیری شد که بازده این روش ها به ترتیب ۱۰/۹ ، ۹/۹ و ۸/۱ درصد بود که روش استخراج با آب، بیشترین راندمان را داشت. اسانس های حاصل از روش های مختلف با GC/MS آنالیز و ۱۷ جز اسانسی شناسایی شد که در بین این اجزاء، استیک اسید، یوژنول، یوژنول استات، m- یوژنول، کاریوفیلن، هگزادکانوئیک اسید، اجزاء غالب بودند، که مقدار آنها در هر سه نوع اسانس با یکدیگر تفاوت معناداری داشتند. همچنین اثر ضد باکتریایی اسانس ها همراه با ۱۲ نوع آنتی بیوتیک رایج بر سه نوع باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوک آرئوس، استرپتوکوک موتانس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس*) و سه باکتری گرم منفی (*اشریشیاکلی، سالمونلا تایفی موریوم، سودوموناس آئروژینوزا*) مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد اسانس استخراج شده با آب - بخار، نسبت به روش های دیگر استخراج، اثر ضد باکتریایی قابل توجهی دارد به طوریکه اثر آن بر استافیلوکوک آرئوس از اریترومایسین، پنی سیلین، گلوکزاسین، وانکومایسین، تتراسایکلین، سیپرو فلوکساسین، سفتریاکسون، سفالکسین، آمیکاسین و جنتامایسین قویتر، و اثری برابر با آمپی سیلین، توبرامایسین دارد. به طور کلی، نتایج به دست آمده نشان داد که می‌توان از اسانس میخک برای کاربردهای مختلف از جمله بعنوان نگهدارنده مواد غذایی و دارویی استفاده کرد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]

[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

۱- مقدمه

استفاده بی رویه‌ی آنتی بیوتیک ها در صنعت غذا و پزشکی، مشکلات عدیده ای را به وجود آورده است. ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از مشکلات بسیار جدی است، که نگرانی های جهانی را در پی داشته است. به طوری که سازمان جهانی بهداشت سال ۲۰۱۱ را، سال "مقاومت میکروبی، تهدید جدی برای حیات" اعلام کرده است[۱]. استفاده بی رویه آنتی بیوتیک ها در صنعت غذا اعم از کشاورزی و دامپروری و همچنین در پزشکی برای درمان بیماری‌های عفونی، حجم عمده ای را به خود اختصاص داده است. به طور مثال طبق مطالعاتی که در سال ۲۰۱۱ در آلمان انجام شده است، نشان می‌دهد که ۸۵ درصد آنتی بیوتیک های تولید شده برای حیواناتی مورد استفاده قرار گرفته است که خود آن حیوانات یا فرآورده‌هایشان به عنوان غذا، به مصرف انسان می‌رسند[۲]. همچنین در سال ۲۰۰۰ در ایالات متحده آمریکا، در دامپزشکی استفاده سهوی بی رویه ای از آنتی بیوتیک ها وجود داشته است به طوری که در همان سال ، ۲۰۰۰ پوند آنتی بیوتیک برای درمان حیوانات به کار رفته است[۳]. در کشاورزی و صنایع تبدیلی نیز حجم بسیار زیادی از آنتی‌بیوتیک ها استفاده می شود. طبق آمار سال ۱۹۹۶ در ایالات متحده آمریکا ۳۰۰۰۰۰ پوند استرپتومایسین و اکسی تتراسایکلین برای جلوگیری از فساد میکروبی و افزایش ماندگاری میوه ها، بر روی محصولات کشاورزی مانند سیب و گلابی پاشیده شده است[۳]. همچنین آنتی بیوتیک ها به عنوان نگهدارنده در صنایع غذایی به ویژه در مواد غذایی خام و عمدتاً برای انواع غذاهای پروتئینی مانند گوشت دام ها، ماهی، طیور و کنسروها مورد استفاده قرار می‌گیرند[٤].کلروتتراسایکلین به خاطر وسیع بودن طیف فعالیتش نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها بیشترین کاربرد را دارد و اکسی تتراسایکلین و کلرامفنیکل نیز از نظر کاربرد اهمیت زیادی داشته است. [٤, ٥].

نکته پر اهمیت دیگری که در این مصارف بی رویه آنتی بیوتیک ها در کشاورزی، دامپروری و صنایع تبدیلی وجود دارد این است که تتراسایکلین ها، به راحتی در طبیعت تجزیه نمی شوند و می توانند به مدت طولانی در خاک باقی مانده و سبب آلودگی خاک و آب های سطحی و زیرزمینی شده و در نتیجه افزایش مقاومت میکروبی را به دنبال داشته باشند[۲]. اکنون ۳۰ درصد از مرگ و میر در ایالات متحده آمریکا مربوط به مقاومت باکتریایی است که در بیماری های عفونی رخ داده است[۳]. این بدان معنی است که با ظهور مقاومت باکتریایی روز به روز به دوران قبل از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها نزدیک‌تر می‌شویم که این پدیده خطرناک به نوعی به خلع سلاح پزشکی در مقابل بیماری های عفونی و توسعه آنها می انجامد. گذشته از این ها، عوارض جانبی آنتی بیوتیک ها نیز چالش‌های جدیدی را درباره آنها مطرح می کند، به ویژه اینکه در مصارف پزشکی، برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها عوارض جانبی بسیار جدی را می تواند به همراه داشته باشد. به طور مثال تتراسایکلین و آنتی بیوتیک های مشابه آن می توانند عوارضی مانند واکنش به نور و آنسفالوپاتی ایجاد نمایند و همچنین سایر آنتی‌بیوتیک ها مانند کلرامفنیکل عوارض خطرناک تری مانند پان سیتوپنی، آنمی آپلاستیک، سرکوب شدید مغز استخوان و کم‌خونی های مگالوبلاستیک را در پی دارند. آنتی بیوتیک پرمصرفی دیگری مانند پنی سیلین نیز می تواند موجب واکنش آنافیلاکتیک و اختلال در عملکرد پلاکت ها گردد و همچنین فلوکساسین نیز می تواند خونریزی های بالینی، افت فشار خون، اختلال در عملکرد پلاکت ها و تداخل در سنتز ویتامین k را به همراه داشته باشد. آنتی بیوتیک های رایج دیگری مانند آمپی سیلین که به سهولت مورد استفاده قرار می گیرند، می توانند عارضه جدی مانند نوتروپنی یا کم خونی غیر همولیتیک را به ارمغان بیاورند. در این میان برخی از آنتی بیوتیک هاآثار سوء حادتری ایجاد می کنند به طور مثال نیتروفورانتئین، سبب نارسایی کلیوی، واکنش های حاد و مزمن ریوی، لوپوس اریتماتوز سیستمیک و فیبروز غیر قابل برگشت ریه می شود و حتی برخی از آنتی بیوتیک ها مانند اتامبوتول به علت سمیت چشمی، سبب نابینایی یا اریترومایسین و آمینوگلیکوزیدها به علت سمیت بر حلزون گوش، سبب ناشنوایی می شوند[٦]. با وجود مشکلات و مسائلی نظیر بروز مقاومت باکتریایی و عوارض جدی آنتی بیوتیک ها، این پژوهش با هدف توسعه و شناخت موادی طبیعی انجام گرفت که بتوان در آینده نزدیک از ترکیبات طبیعی و با عوارض جانبی کمتر با باکتری های عامل عفونت فرصت طلب و عامل فساد محصولات غذایی به مقابله پرداخت. در این مطالعه غنچه های میخک (*Eugenia caryophyllata*) با توجه به قراین و شواهد تجربی که در آثار پیشینیان در طب سنتی ایران که برای درمان و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

کنترل بیماری های عفونی[۷] و همچنین به عنوان یک ماده نگهدارنده و معطر و ادویه ای نیز سالیان متمادی کاربرد داشته، انتخاب و مورد مطالعه قرار گرفت[۸].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد گیاهی

غنچه درخت میخک به صورت خشک از بازار گیاهان دارویی تبریز تهیه و در هرباریوم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی مورد تایید قرار گرفت و کد هرباریومی ۷۲۵۱ به آن اختصاص یافت. غنچه ها ابتدا تمیز و بوجاری شد برای استخراج کامل اسانس، خرد شدند و سپس اسانس گیری انجام شد.

(a) **(b)**

Fig 1 (a) *Eugenia caryophyllata* Tree. (b) *Eugenia caryophyllata* Bud

۲-۲- مواد شیمیایی

هگزان، حلال DMSO (دی متیل سولفوکساید)، سولفات سدیم با علامت تجاری مرک آلمان و الکل ۹۶ درصد با علامت تجاری کیمیا الکل زنجان خریداری شد.

۲-۳- مواد میکروبی

سوش‌های میکروبی کددار استاندارد لیوفیلیزه، استافیلوکوک آرئوس (ATCC 25923)، استرپتوکوک موتانس(ATCC 35668)، استافیلوکوک اپیدرمیدیس (ATCC 12228)، اشریشیاکلی (ATCC 25922)، سالمونلا تایفی موریوم (ATCC 14028)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، از شرکت بهار افشان و دیسک های بلانک و آنتی بیوگرام ۱۲ نوع آنتی بیوتیک از شرکت پادتن طب خریداری گردید. محیط کشت تریپتون سوی براث (TSB) و مولر هینتون آگار (MHA) با برند شارلو اسپانیا و محیط کشت برین هارت اینفیوژن براث (BHI) با برند ایبرسکو و قرص رینگر با برند مرک آلمان خریداری شد.

۲-٤- روش ها

غنچه میخک به سه روش تقطیر با آب، تقطیر با بخار و تقطیر با آب - بخار اسانس گیری شد و اثر روش‌های مختلف در بازدهی میزان اسانس مشخص گردید، سپس اسانس بدست آمده توسط هر یک از روش های اسانس گیری با GC/MS آنالیز شد و ترکیبات اجزاء اسانس میخک تعیین و سپس کمیت و کیفیت این ترکیبات با یکدیگر مقایسه شدند. همچنین اثر ضد باکتریایی هر سه اسانس بر سه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوک اورئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *استرپتوکوک موتانس*) و سه باکتری گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تایفی موریوم*) مورد بررسی قرار گرفت و با نتایج مطالعه آنتی بیوگرام دوازده آنتی بیوتیک متداول بررسی و مقایسه شد.

۲-٤-۱- اسانس گیری با آب

اسانس گیری با آب طبق روش خلیل و همکاران (۲۰۱۱)، [۹] با اندکی تغییرات انجام شد، ۲۰۰ گرم گیاه خشک خرد شده را در ۲۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با نسبت وزنی/ حجمی ۱:۱۰ درکلونجر مخصوص تقطیر با آب ریخته و با حرارت متعادل به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. اسانس به دست آمده با سولفات سدیم، عاری از آب شد[۱۰, ۱۱]، سپس اسانس را در ظرف شیشه ای تیره ریخته و در دمای ٤ درجه سانتیگراد در یخچال تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد[۱۲, ۱۳].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

۲-٤-۲- اسانس گیری با بخار

اسانس گیری با بخار طبق روش خلیل و همکاران (۲۰۱۱)، [۹] با اندکی تغییرات انجام شد، ۲۰۰ گرم گیاه خشک خرد شده را در ۲۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با نسبت وزنی/ حجمی ۱:۱۰ در کلونجر مخصوص تقطیر با بخار ریخته و با حرارت متعادل به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. اسانس به دست آمده با سولفات سدیم، عاری از آب شد[۱۰, ۱۱]، سپس اسانس را در ظرف شیشه ای تیره ریخته و در دمای ٤ درجه سانتیگراد در یخچال تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد[۱۲, ۱۳].

۲-٤-۳- اسانس گیری با آب و بخار

اسانس گیری با آب و بخار طبق روش خلیل و همکاران (۲۰۱۱)، [۹] با اندکی تغییرات انجام شد، ۲۰۰ گرم گیاه خشک خرد شده را در ۲۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با نسبت وزنی/ حجمی ۱:۱۰ درکلونجر مخصوص تقطیر با آب و بخار ریخته و با حرارت متعادل به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. اسانس به دست آمده با سولفات سدیم، عاری از آب شد[۱۰, ۱۱]، سپس اسانس را در ظرف شیشه ای تیره ریخته و در دمای ٤ درجه سانتیگراد در یخچال تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد[۱۲, ۱۳].

۲-٤-٤- آنالیز با گاز کروماتوگرافی - اسپکتروفتومتری جرمی

برای شناسایی ترکیبات و مقدار اجزای اسانس های حاصل از روش‌های مختلف تقطیر از روش خلیل و همکاران (۲۰۱۱)،[۹] با اندکی تغییرات توسط دستگاه (GC USA 6890 N, MS GC/MS Agilent USA 5973 N) که نوع ستون آن HP 5MS 19091 S-433 به عنوان فاز ثابت با طول۳۰ متر و قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلیمتر و اندازه ذرات تشکیل دهنده فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر بود و گاز هلیوم به عنوان فاز متحرک و حامل با نرخ افزایشی ۱ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد[۱۰] اسانس میخک ۱۰ برابر با حلال هگزان رقیق شد[۱۱] و سپس به مقدار 1µL به دستگاه تزریق شد. دستگاه از نظر دمایی بین ٦۰ تا ۲٤۰ درجه سانتیگراد برنامه‌ریزی شد، دمای ابتدای ستون ٦۰ درجه سانتیگراد بود که طول توقف این دما یک دقیقه و افزایش دما تا ۱٤۰درجه سانتیگراد با نرخ افزایش ۲/۳۰ درجه سانتی گراد بر دقیقه ادامه یافت و از دمای ۱٤۰ درجه سانتیگراد تا ۲٤۰ درجه سانتی گراد با نرخ افزایشی ۲۵ درجه سانتیگراد برنامه‌ریزی شد و به مدت یک دقیقه در دمای ۲٤۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد[۱۰]. قدرت منبع الکتریکی دستگاه جهت یونیزاسیون۷۰ev بود و جهت تحلیل پردازش داده ها از نرم افزار Chemstation puls willey 7.1 استفاده شد[۹]. جهت تعیین شاخص بازداری نمونه اسانس از آلکان نرمال شرکت سیگما آلداریچ که مخلوطی از هیدروکربن های آلیفاتیک C8-C28 حل شده در هگزان بود، استفاده شد و برای شاخص بازداریLiterature از وب سایت مرجع NIST و نتایج تحقیقات گودنر (۲۰۰۸)، بابوشک و همکاران (۲۰۱۱)، استفاده شد[۱٤, ۱۵].

۲-٤-۵- تست دیسک دیفیوژن

برای تعیین قدرت ضد باکتریایی از تست دیسک دیفیوژن از روش توصیه شده توسط CLSI 2011 به شرح ذیل استفاده شد. طبق دستورالعملCLSI 2011 ابتدا محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس سوسپانسیون باکتری ها آماده شد. جهت تهیه سوسپانسیون باکتری ها ۲ میلی لیتر از محیط کشت BHI استریل شده به سوش باکتری که در آمپول لیوفیلیزه قرار داشت تزریق شد و جهت فعال شدن باکتری‌ها به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد بعد از فعال سازی در محیط کشت جامد BHI آگار کشت داده شد. سپس ۳ تا ۵ کلنی برداشته و در محلول سرم رینگر استریل در داخل لوله آزمایش اضافه کرده و کدورتی برابر با نیم مک فارلند ($1-2\times10^{8}$ cfu/mL) تهیه شد. جهت افزایش دقت مقایسه غلظت سوسپانسیون باکتری با محلول ۰/۵ مک فارلند در مقابل کاغذ سیاه و سفید انجام شد[۱٦].

۲-٤-٦- تلقیح و کشت باکتری ها در محیط کشت مولر هینتون آگار

برای تلقیح و کشت باکتری ها در محیط کشت مولر هینتون آگار، سواپ را در لوله حاوی سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک فارلند خیسانده و سپس از طریق فشردن سر آن به جداره لوله، رطوبت اضافی آن گرفته شد، سواپ آغشته به سوسپانسیون باکتری را روی سطوح محیط کشت به صورت زیگزاکی کشیده و سپس با چرخاندن ٦۰ درجه پلیت، کشت داده شد و جهت تبخیر رطوبت زائد اندکی درب پلیت نیمه باز گذاشته شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

۲-٤-۷- دیسک گذاری و انکوباسیون و گزارش نتایج

حلال DMSO برای رقیق سازی اسانس ها در غلظت های مورد نظر به کار رفت. برای استریل کردن حلال DMSO از صافی باکتریولوژیک عبور داده شد. اسانس ها در حلال DMSO در غلظت μL/mL ۸۰، ٤۰، ۲۰، ۱۰، ۵ رقیق شدند. دیسک های بلانک در غلظت های مختلف اسانس ها خیسانده و روی محیط کشت تلقیح شده چیده شدند. برای جلوگیری از تبخیر اسانس جذب شده به دیسک ها، پلیت ها به مدت یک ساعت در ٤ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شدند و پس از جذب اسانس به محیط کشت و تثبیت آن، به انکوباتور منتقل و به مدت ۲٤ ساعت در دمای۲±۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس نتایج با اندازه گیری هاله عدم رشد گزارش گردید[۹].

۸-٤-۲-تعیین حداقل غلظت مهاری

تعیین MIC اسانس میخک برای باکتری های مورد مطالعه طبق گایدلاین CLSI2012 با اندکی تغییر طبق روش واگالس و همکاران (۲۰۰۷)، انجام شد[۱۷]. میکروتیترپلیت ۹٦ تایی جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، از محیط کشت مایع مولرهینتون براث (MHB) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به داخل همه حفره ها ریخته شد. سپس اسانس رقیق شده به دستور زیر به حفره ها اضافه شد، نحوه ی رقیق سازی و افزودن به حفره ها به این صورت بود که ٤ میکرولیتر از اسانس های میخک در یک میلی لیتر حلال DMSO 10% حل شد و از غلظت به دست آمده ۱۰۰ میکرولیتر در لوله اول میکروتیترپلیت ریخته شد، سپس از لوله اول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به لوله دوم ریخته شد و از لوله دوم به سوم و این کار تا لوله نهم ادامه یافت و از لوله نهم به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد، شیب غلظت لوله ها بین μL/mL ۰/۰۰۷۸ تا μL/mL ۲ ایجاد شد. در ادامه ۵ μL از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند (cfu/mL ۱۰^۸×۲-۱) به داخل هر یک از لوله ها به جز لوله نهم، دهم و یازدهم که شاهد بودند اضافه شد. لوله دهم (شاهد منفی) که فقط حاوی محیط کشت بود، لوله یازدهم (شاهد منفی) که حاوی محیط کشت و حلال DMSO بود و لوله دوازدهم (شاهد مثبت) حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری بود. پس از تلقیح سوسپانسیون باکتری ها، میکروتیترپلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳٦ درجه سانتیگراد انکوبه شد و سپس لوله ها از نظر میزان کدورت بررسی شدند. لوله های شفاف به عنوان نتایج MIC ثبت و قبول شدند و لوله‌های کدر مردود شناخته شده و رد شدند[۱۷, ۱۸]. قابل ذکر اینکه جهت تهیه DMSO 10% از نرمال سالین استفاده شد[۱۹].

۲-٤-۹-تعیین حداقل دوز کشندگی

لوله های شفاف مرحله MIC وارد مرحله آزمایش MBC شدند ۱۰۰ μL از محتویات لوله های شفاف برداشته و به طور جداگانه در محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پلیت فاقد باکتری که حداقل غلظت اسانس را داشت به عنوان نتایج آزمایشMBC گزارش شد [۱۸, ۲۰, ۲۱].

۲-۵- آنالیز آماری

در این مطالعه از طرح کاملا تصادفی استفاده شد و آزمایشات سه بار تکرار شدند. داده‌های حاصل از سه بار تکرار، با نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ آنالیز شد و جهت مقایسه میانگین داده ها از آزمون دانکن در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ و یا ۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- راندمان اسانس گیری با روش های تقطیر مختلف

این بررسی نشان داد که روش‌های مختلف اسانس گیری راندمان متفاوتی دارند. برای شناخت یک روش بهینه که بیشینه مقدار اسانس از آن حاصل شود، این مطالعه انجام شد و میزان راندمان اسانس گیری به روش های مختلف برای میخک در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

Table 1 Efficiency of *Eugenia caryophyllata* essential oil extraction via different methods.

Extract method	Dry plant (g)	Essential oil content (ml)	Essential oil yield (%)
Hydro distillation	80	8.7[a]	10.87
Steam distillation	80	7.92[c]	9.90
Hydro-steam distillation	80	6.64[b]	8.30

بهینه ترین روش استخراج اسانس میخک، روش تقطیر با آب است که با راندمان ۸/۷ درصد، بیشترین مقدار اسانس حاصل شد که از نظر کمی تفاوت معناداری با هر دو روش دیگر دارد. در یک مطالعه دیگر میزان بازدهی روش تقطیر با آب را ۱۱/۵ درصد و روش تقطیر با بخار را ۱۰/۱ درصد گزارش کردند[۲۲].

۳-۲-آنالیز اسانس های حاصل از روش‌های مختلف تقطیر با GC/MS

درآنالیز اسانس های حاصل از روش‌های مختلف ۱۷ جزء اسانسی شناسایی شد، که در مجموع بالای ۹۶ درصد اسانس میخک را تشکیل می‌دهند (جدول شماره ۲). اجزا غالب اسانس میخک در روش های مختلف m-یوژنول، کاریوفیلن، استیک اسید، یوژنول استات، یوژنول، هگزادکانوئیک اسید بود که ساختار شیمیایی آنها در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. در روش تقطیر با آب به ترتیب غالب ترین اجزاء اسانس میخک کاریوفیلن(۳۲/۹۶ درصد)، یوژنول استات (۲۸/۲۵ درصد) و یوژنول (۲٤/۲۱ درصد) بود که در مجموع (۸٤/٤۲ درصد) از اسانس را تشکیل می‌دهند. در روش تقطیر با بخار غالب ترین اجزای اسانسی به ترتیب یوژنول استات (۲۸/۲ درصد) و استیک اسید (۲۷/۳۸ درصد)، هگزادکانوئیک اسید (۱۷/۵۱ درصد) و یوژنول (۱٦/۱٤ درصد) بود که این چهار جزء در ۸۹/۲۳ درصد ترکیب اسانس را به خود اختصاص می‌دهند.

Table 2 Components of *Eugenia caryophyllata.* via various distillation methods

No.	Component	RI[a]	RI[b]	HD	SD	HSD
1	**Acetic acid**	622	625	**0[b]**	**27.38[a]**	**0[b]**
2	Decan	1003	1004	**0[b]**	1.18[a]	0[b]
3	Carvacrol	1300	1301	**0[b]**	0.42[a]	**0[b]**
4	α-Cubebin	1351	1349	1.06[a]	0[b]	0[b]
5	**Eugenol**	1357	1356	**24.21[a]**	**16.14[b]**	**10.1[c]**
6	**m-Eugenol**	1373	1375	**1.057[b]**	**0[c]**	**76.45[a]**
7	trans-Caryophyllene	1407	1409	1.62[a]	0.2[b]	0[c]
8	Cis-caryophyllene	1418	1418	0[b]	1.06[a]	0[b]
9	**Caryophyllene**	1420	1421	**31.96[a]**	**0[c]**	**2.51[b]**
10	trans-Isoeugenol	1449	1448	1.62[a]	0.26[b]	0[c]
11	Isoeugenol	1451	1452	1.85[a]	0.22[b]	0[c]
12	α-Humulene	1462	1464	2.81[a]	0[b]	0[b]
13	**Eugenol acetate**	1523	1524	**28.25[a]**	**28.2[a]**	**10.78[b]**
14	Caryophyllene oxide	1580	1483	4.23[a]	3.46[b]	0[c]
15	**Hexadecenoic acid**	**1968**	1970	**0[b]**	**17.51[a]**	**0[b]**
16	Eicosane	2000	2003	0[b]	0.22[a]	0[b]
17	Benzotriazole	2629	2632	1.06[a]	0[b]	0[b]
18	Total	-	-	**99.73[a]**	**97.09[b]**	**99.84[a]**
19	Not indentified	-	-	0.27	2.91	0.16

*The bold items are the dominant compounds found in each method.
RI[a], sample Retention indices
RI[b], literature retention index reported in the literature on HP-5MS column taken from NISTand of the computer mass libraries Adams
HD: Hydro distillation method, SD: Steam distillation method, HSD: Hydro-Steam distillation method

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

در روش تقطیر با آب و بخار غالب ترین اجزای اسانسی به ترتیب m-یوژنول(۷٦/٤٥درصد)، یوژنول استات (۱۰/۸۷ درصد) و یوژنول (۱۰/۱ درصد) بود که ۹۷/٤۲ درصد اسانس را در مجموع تشکیل می دهند.

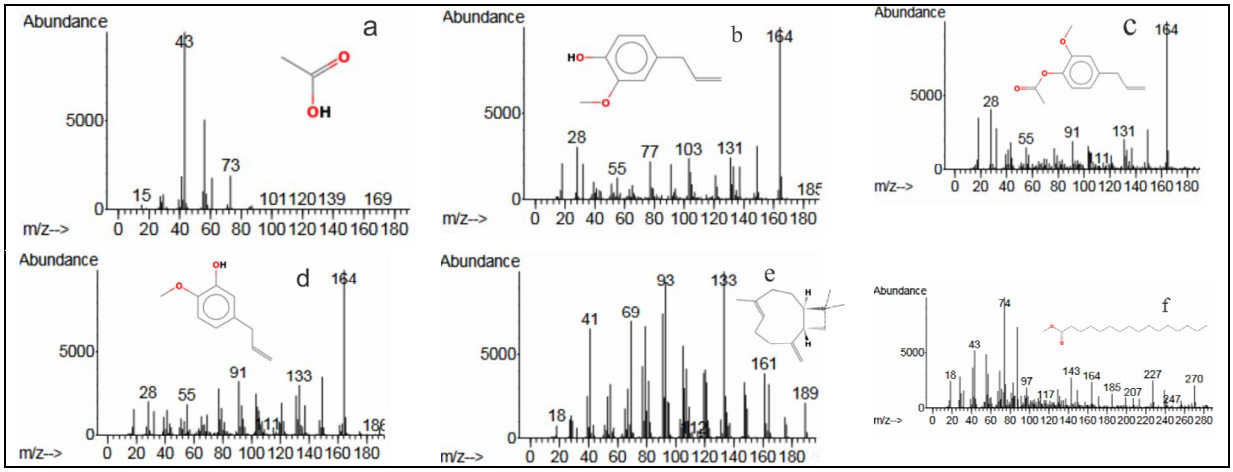

Fig 2 Spectrum and molecular structure (Courtesy of NIST Chemistry WebBook) of essential oil components: (a) Acetic acid, (b) Eugenol, (c) Eugenol acetate L, (d) m-Eugenol, (e) Caryophyllene, (f) Hexadecannoic acid

جیرووتز و همکاران (۲۰۰٦)، بدون توجه به روش استخراج اسانس گیری با تهیه اسانس از شرکت والرشتاین آلمانی آن را تجزیه و مورد مطالعه قرار دادند که این اسانس حاوی ۲۳ جزء اسانسی بوده و غالب ترین اجزای اسانس به ترتیب شامل یوژونول (۷٦/۸ درصد)، کاریوفیلن (۱۷/٤ درصد)، R-هومولن (۲/۱ درصد) و یوژنول استات (۱/۲ درصد) بود که در مجموع ۹۷/۵ درصد اسانس را با این چهار ترکیب به خود اختصاص دادند[۲۳]. ترکیبات شیمیایی اسانس میخک که گیاه آن از کشورهای مختلف اطراف منطقه خلیج فارس جمع آوری و با روش تقطیر با آب اسانس گیری شده بود، نتایج مختلفی داشت. اسانس حاصل از میخک عربستان سعودی که ۹۲/٦۵ درصد آن شناسایی شد، اجزاء غالب آن یوژنول (۵۷/۷ درصد)، β-کاریوفیلن (۲۹/۹٤ درصد) و استیل یوژنول (۵/۲۹ درصد) گزارش شده است. این در حالی است که در همان مطالعه با شرایط و روش اسانس گیری یکسان میخک رشد یافته در کشور امارات متحده عربی به ترتیب ترکیبات غالب یوژنول (۵/۲۹ درصد)، β-کاریوفیلن (۲۳/۰٤ درصد)، استیل یوزنول (٤/٦۰ درصد) و α- هومولن(۲/۹۷ درصد) می باشد، به طوری که اسانس گیری باز با همان شرایط یکسان در میخک رشد یافته در کشور اردن که ۹٤/۱۸ درصد از ترکیبات اسانس شناسایی شد، ترکیبات غالب به ترتیب یوژنول (۵٤/۹۷ درصد)، β-کاریوفیلن (۳۱/٤۵ درصد)، استیل یوزنول (٤/۲۵ درصد) و α-هومولن (۲/٤٤ درصد) بود[۲٤]. در تطبیق این پژوهش با سایر پژوهش های مشابه مشخص گردید که در روش استخراج با آب میزان کاریوفیلن معمولاً بالای ۲۰ درصد می باشد که می تواند شاخص اسانس میخک استخراج شده با روش تقطیر با آب باشد. از طرف دیگر α-هومولن شاخص دیگری است که می‌تواند به همراه با بنزوتیازول مشخص کننده اسانس جداسازی شده میخک با آب باشد. ون کیانگ و همکاران (۲۰۰۷)، اثر روش های استخراج بر ترکیبات اجزاء اسانس میخک را بررسی نموده اند. در این مطالعه میزان کل یوژنول (با تمامی ایزومرها) و یوژنول استات را در روش استخراج با آب ۵۰/۳ درصد و در روش استخراج با بخار ٦۱/۲ درصد و در روش سوکسله ۳۰/۸ درصد و در روش استخراج با سیال فوق بحرانی ۵۸/۸ درصد گزارش نموده اند[۲۲]. این در حالی است که یافته های این پژوهش در روش استخراج با آب ۵۷/٤ درصد و روش استخراج با بخار ٤۷/۸ درصد و در روش استخراج با آب و بخار ۹۷/٤ درصد بوده است. بنابراین می توان نتیجه گرفت که روش استخراج با آب و بخار برای دست یافتن به بیشترین مقدار و خالص ترین ترکیب یوژنول بهترین روش است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

۳-۳-تست آگار دیسک دیفیوژن

اسانس های حاصل از روش‌های مختلف، اثر ضد باکتریایی معنادار متفاوتی از خود نشان دادند (جدول شماره ۳). خواص ضد باکتریایی اسانس میخک به یوژنول (و سایر ایزومرهای آن مانند m-یوژنول، o-یوژنول) و همچنین به کاریوفیلن بستگی دارد[۲۵, ۲٦]. که این ترکیبات زیست فعال، فنلی می‌توانند با پروتئین‌ها و فسفولیپیدهای غشاء میکروارگانیسم واکنش دهند و نفوذپذیری غشای آنها را دچار آسیب عملکردی و ساختاری نمایند و نهایتاً سبب مرگ آنها شوند[۲۵, ۲۷]. با افزایش میزان یوژنول به ویژه خالص شدن میزان یوژنول در استخراج اسانس تقطیر با آب میزان اثر ضد باکتریایی اسانس میخک افزایش می یابد و به طور کلی اثر ضد باکتریایی اسانس میخک بر باکتری های گرم مثبت بیش از باکتری های گرم منفی بوده است.

۳-۳-۱-تست آنتی بیوگرام اسانس حاصل از سه روش تقطیر بر استافیلوکوک اورئوس

اسانس های حاصل از هر سه روش تقطیر بر باکتری استافیلوکوک اورئوس دارای اثر ضد باکتریایی بوده و در برخی موارد اثر مشابهی به برخی از آنتی بیوتیک های متداول را داشتند. قویترین اثر ضد باکتریایی مربوط به اسانس حاصل از تقطیر با آب و بخار در غلظت ۸۰ µL/mL با هاله عدم mm (Inhibition Zone Diameter IZD) ۳۹,٦ بود که در مقایسه با هاله عدم رشد آنتی بیوگرام ۱۲ نوع آنتی بیوتیک بدین صورت بود که نسبت به سفالکسین (IZD= 27 mm) و جنتامایسین (IZD= 3.5 mm)، و سفتریاکسون (IZD= 29.7 mm)، سیپروفلوکساسین (IZD= 31.3 mm) ونکومایسین (IZD= 37.5 mm)، کلوگزاسیلین (IZD= 27 mm) ، اریترومایسین (IZD= 27 mm) و آمیکاسین (IZD= 27 mm) بوده و تنها از آمپی سیلین نه با اختلاف زیاد (IZD= 27 mm) ضعیف تر بوده است. در یک مطالعه مشابه اسانس میخک در غلظت ۲۰ µL/mL بر استافیلوکوکوس اورئوس (IZD= 24 mm) را نشان داده است این در حالی است که آنتی بیوتیک استاندارد ونکومایسین (IZD= 24 mm) را گزارش نمودند[۲۸]. همچنین اثر غلظت اسانس میخک در غلظت ۵ µL/mL ، IZD= 16.3 mm را نشان داده است[۲۹].

۳-۳-۲-تست آنتی بیوگرام اسانس های حاصل از سه روش تقطیر بر استافیلوکوک اپیدرمیدیس

اسانس های بدست آمده با هر سه روش تقطیر در غلظت‌های ۸۰ µL/mL و در ٤۰ µL/mL تا حدی دارای اثر ضد میکروبی بر علیه استافیلوکوک اپیدرمیدیس بوده و اسانس حاصل از روش تقطیر با آب در غلظت ۸۰µL/mL IZD= 16.3 mm بیشترین اثر ضد باکتریایی را داشت، که در قیاس با آنتی بیوتیک ها نسبت به هیچ کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها ارجح نبود. این در حالی است که یوجی و همکاران (۲۰۰۷)، IZD اسانس میخک در غلظت ۵ µL/mL را ۱٦/۸ mm گزارش نمودند که تفاوت زیادی با این پژوهش دارد[۲۹].

۳-۳-۳-تست آنتی بیوگرام اسانس های حاصل از سه روش تقطیر بر استرپتوکوک موتانس

بررسی ها نشان داد که کلیه اسانس ها در غلظت‌های ۱۰ µL/mL و ۵ اثر ضد میکروبی چندانی ندارند و تنها در غلظت ۸۰µL/mL اثر ضد میکروبی قابل توجهی دارند و از بین روش های مختلف اسانس حاصل از روش تقطیر با آب با IZD= 20 mm نسبت به سایر روش ها قویترین اثر ضد باکتریایی را داشت که در قیاس با آنتی بیوتیک ها نسبت به گلوکزاسیلین (IZD= 0 mm) و ونکومایسین (IZD= 19 mm) قویتر و اثر مشابه با اریترومایسین (IZD= 19 mm)، سفتریاکسون (IZD= 21.7 mm) و توبرامایسین (IZD= 21.7 mm) را دارد.

۳-۳-٤-تست آنتی بیوگرام اسانس های حاصل از هر سه روش تقطیر بر سودوموناس آئروژینوزا

اسانس حاصل از روش تقطیر با آب و بخار در غلظت۸۰ µL/mL با IZD= 14.6 mm بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر سودوموناس آئروژینوزا داشت که در قیاس با آنتی بیوتیک ها نسبت به سفالکسین، آمپی سیلین، تتراسایکلین، ونکومایسین، گلوکزاسیلین، پنی سیلین و اریترومایسین قویتر بود. در یک مطالعه مشابه اسانس میخک در غلظت ۵ µL/mL ، IZD= 9.5 mm را گزارش نموده اند[۲۹]. و همچنین پی گونی و همکاران (۲۰۰۹)، در ترکیب با اسانس میخک و دارچین برعلیه سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۱۰µL/mL هیچ هاله عدم رشدی را گزارش نکرده اند[۳۰]. محبوبی و همکاران(۲۰۱۵)، در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

غلظت ۲۰ µL/mL IZD= 11.7 mm را ثبت نموده اند[۲۸]. که مشابه اثر غلظت ۲۰ µL/mL روش استخراج تقطیر با آب و بخار می باشد.

۳-۳-۵-تست آنتی بیوگرام اسانس های حاصل از سه روش تقطیر بر اشریشیاکلی

در بین اسانس های استخراج شده، اسانس حاصل از تقطیر با آب با غلظت ۸۰ µL/mL با ایجاد IZD= 22.3 mm به طور معناداری نسبت به سایر روش های استخراج در همان غلظت، اثر ضد باکتریایی خوبی بر اشریشیاکلی داشت که در قیاس با آنتی بیوتیک ها نسبت به سفالکسین، جنتامایسین، سفتریاکسون، آمپی سیلین، ونکومایسین ،گلوکزاسیلین، پنی سیلین، اریترومایسین و آمیکاسین قوی‌تر و فقط نسبت به توبرامایسین و سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین ضعیف تر بود[٦]. محبوبی و همکاران(۲۰۱۵)، برای اسانس میخک استخراج شده با آب در غلظت ۲۰ µL/mL ، IZD= 17.6 mm را گزارش نموده اند[۲۸]. پی گونی و همکاران (۲۰۰۹)، برای اسانس میخک در غلظت ۱:۱ اتیل اتر IZD= 22 mm ثبت نموده اند[۳۰].

Table 3 Antibiogram test results (mm) of *Eugenia caryophyllata* essential oil extracted by different methods

Bacterium	Concentration of the essential oils (µL/mL) obtained by different methods														
	Hydro Distillation					Steam Distillation					Hydro-Steam Distillation				
	5	10	20	40	80	5	10	20	40	80	5	10	20	40	80
Gram-Positive															
Staphylococcus aureus	$11.3^{i}\pm0.4$	$17.6^{g}\pm0.4$	$27^{d}\pm1.6$	$28.6^{d}\pm0.4$	$31.3^{c}\pm0.9$	$12^{i}\pm0$	$15.3^{h}\pm0.4$	$20^{f}\pm0.8$	$24.3^{e}\pm0.9$	$27.6^{d}\pm0.4$	$11.6^{i}\pm0.9$	$23.6^{e}\pm1.2$	$30.6^{c}\pm0.4$	$35.3^{b}\pm0.9$	$39.6^{a}\pm0.9$
Staphylococcus epidermidis	$6.6^{fg}\pm0.5$	$8.3^{e}\pm0.5$	$11.3^{d}\pm0.4$	$14^{bc}\pm0.8$	$14.3^{b}\pm0.9$	$7.3^{efg}\pm0.4$	$8^{ef}\pm0$	$12.3^{d}\pm0.4$	$14.6^{b}\pm1.2$	$15^{ab}\pm0.8$	$6.3^{g}\pm0.4$	$11.3^{d}\pm0.4$	$12.6^{cd}\pm0.9$	$14.6^{b}\pm0.4$	$16.3^{a}\pm0.4$
Streptococcus mutans	$6.6^{h}\pm0.5$	$8^{fg}\pm0.8$	$13.3^{d}\pm0.4$	$15.3^{c}\pm0.4$	$20^{a}\pm0.8$	$6.3^{h}\pm0.4$	$7^{gh}\pm0$	$8.6^{f}\pm0.4$	$13^{d}\pm0.8$	$17.6^{b}\pm04$	$6.6^{h}\pm0.4$	$9.3^{e}\pm0.4$	$13.3^{d}\pm0.4$	$15^{c}\pm0$	$18.3^{b}\pm0.4$
Gram-Negative															
Pseudomonas aeruginosa	0^{e}	0^{e}	0^{e}	$7.3^{d}\pm0.4$	$12.3^{b}\pm0.4$	0^{e}	0^{e}	$6.6^{d}\pm0.4$	$10.3^{c}\pm0.4$	$12.3^{b}\pm0.4$	0^{e}	$7.3^{d}\pm0.4$	$10.3^{c}\pm0.4$	$12.3^{b}\pm0.4$	$14.6^{a}\pm0.4$
E. coli	0^{d}	$6.6^{h}\pm0.4$	$10.3^{f}\pm0.4$	$15.3^{c}\pm0.4$	$22.3^{a}\pm0.4$	0^{i}	$7.3^{h}\pm0.4$	$10.3^{f}\pm0.4$	$14^{d}\pm0.8$	$19.6^{b}\pm09$	0^{i}	$8.6^{g}\pm0.4$	$10.3^{f}\pm0.4$	$12.6^{e}\pm0.9$	$15.3^{c}\pm0.4$
Salmonella typhi	0^{h}	$6.3^{g}\pm0.4$	$7.7^{f}\pm0.5$	$10^{e}\pm0$	$11.3^{cd}\pm0.4$	0^{h}	$8^{f}\pm0.8$	$10.3^{de}\pm0.4$	$12.3^{abc}\pm0.4$	$13^{ab}\pm0$	0^{h}	$8.6^{f}\pm0.4$	$12^{bc}\pm0.8$	$12.6^{ab}\pm0.9$	$13.3^{a}\pm1.2$

Table 4 Antibiogram test results (mm) of different antibiotics

Bacterium	Antibiotics											
	Tobramycin	Cefalexin	Gentamicin	Ceftriaxone	Ampicillin	Ciprofloxacin	Tetracycline	Vancomycin	Cloxacillin	Penicillin	Erythromycin	Amikacin
Gram-Positive												
Staphylococcus aureus	$39.8^{a}\pm0.2$	$27^{e}\pm0.4$	$33.5^{c}\pm0.4$	$29.7^{d}\pm0.5$	$40.8^{a}\pm1.3$	$31.3^{d}\pm06$	$37.5^{b}\pm0.4$	$27.8^{e}\pm0.2$	$34.8^{c}\pm1.3$	$29.1^{d}\pm0.6$	$37.5^{b}\pm0.4$	$27.5^{e}\pm0.4$
Staphylococcus epidermidis	$34.7^{a}\pm0.2$	$35.8^{a}\pm0.2$	$35^{a}\pm0.4$	$29.7^{c}\pm0.8$	$29.7^{c}\pm0.5$	$34.5^{a}\pm0.4$	$31.3^{b}\pm0.9$	$24.3^{d}\pm0.2$	$23.7^{d}\pm1.2$	$23.7^{d}\pm1$	$29.3^{c}\pm0.6$	$29.8^{bc}\pm0.6$
Streptococcus mutans	$21.7^{f}\pm0.7$	$30.2^{c}\pm0.6$	$31.2^{bc}\pm0.8$	$21.7^{f}\pm0.8$	$31.3^{bc}\pm0.6$	$31.8^{b}\pm0.2$	$26^{e}\pm0.4$	$19^{g}\pm0.8$	0^{h}	$34.5^{a}\pm0.4$	$20.2^{fg}\pm1$	$28^{d}\pm0.4$
Gram-Negative												
Pseudomonas aeruginosa	$23.2^{b}\pm0.2$	0^{g}	$20.8^{c}\pm0.6$	$20^{c}\pm0.4$	$10.2^{e}\pm0.6$	$26.8^{a}\pm1$	$10^{e}\pm0.4$	$7.2^{f}\pm0.2$	0^{g}	0^{g}	$12^{d}\pm0.4$	$20.8^{c}\pm0.2$
E. coli	$15^{d}\pm0.4$	$20^{c}\pm0.4$	$19.7^{c}\pm1.2$	$29.7^{a}\pm0.5$	$13.5^{d}\pm0.4$	$24.2^{b}\pm0.6$	$23.8^{b}\pm0.2$	0^{f}	0^{f}	$8.2^{e}\pm0.2$	0^{f}	$19.8^{c}\pm0.6$
Salmonella typhi	$10.7^{g}\pm0.2$	$16.2^{d}\pm0.2$	$12^{f}\pm1$	$22.8^{a}\pm0.6$	$16.5^{d}\pm0.4$	$13.8^{e}\pm0.2$	$17.8^{c}\pm0.6$	$19.5^{b}\pm0.4$	0^{h}	$20^{b}\pm0.4$	0^{h}	$22.3^{a}\pm0.5$

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.1.19.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.45]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]

[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

۳-۳-٦-تست آنتی بیوگرام اسانس حاصل از سه روش تقطیر بر سالمونلا تیفی موریوم

اسانس حاصل از روش تقطیر با آب و بخار در غلظت µL/mL ۸۰ با IZD= 13.3 mm قوی ترین اثر ضد باکتریایی را بر سالمونلا تیفی موریوم داشت که در قیاس با آنتی بیوتیک ها نسبت به توبرامایسین، جنتامایسین، گلوکزاسیلین، اریترومایسین قوی تر بود. محبوبی و همکاران (۲۰۱۵)، اسانس میخک حاصل از روش استخراج با آب در غلظت µL/mL ۲۰ IZD= 17.7 mm را گزارش نموده اند[۲۸].

۳-٤-تعیین غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

نتایج میزان MIC و MBC اسانس های حاصل از روش‌های مختلف تقطیر در جدول ۵ نشان داده شده است.

Table 5. The MIC and MBC results (mL/mL) of essential oils of *Eugenia caryophyllata* obtained by different extraction methods

	Bacterium	HD		SD		HSD	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram-Positive	*Staphylococcus aureus*	0.25	0.5	0. 25	0.5	0.125	0.25
	Staphylococcus epidermidis	0.5	0.5	0.5	0.5	0.125	0.25
	Streptococcus mutans	0.5	1	1	2	1	2
Gram-Negative	*Pseudomonas aeruginosa*	-	-	-	-	2	-
	E. coli	0.5	1	1	2	0.5	1
	Salmonella typhi	-	2	-	-	2	-

MIC اسانس حاصل از تقطیر با آب و بخار µL/mL ۱ و حداقل غلظت کشندگی mL/mL ۰/۵ بود که نسبت به هر دو روش تقطیر اثر پایین تر و بهتری را داشت. در یک مطالعه مشابه محبوبی و همکاران MIC و MBC اسانس میخک حاصل از روش تقطیر با آب را به ترتیب mL/mL ۲ گزارش نموده اند[۳۱].

MIC اسانس حاصل از تقطیر با آب و بخار mL/mL ۱ و MBC آن mL/mL ۰/۵ بر استافیلوکوک اپیدرمیدیس بود که نسبت به هر دو روش اسانس تهیه شده از دو روش دیگر بهتر بود. MIC اسانس حاصل از تقطیر با آب بر استرپتوکوک موتانس برابر با mL/mL ۱ و MBC آن mL/mL ۰/۵ بود که اثر ضد باکتریایی آن نسبت به اسانس های حاصل از هر دو روش تقطیر بهتر بود تنها اسانس تقطیر شده با آب و بخار در غلظت mL/mL ۲ فقط اثر مهاری بر سودوموناس آئروژینوزا داشت و اثر کشندگی MBC در غلظت محدوده مورد مطالعه ما مشاهده نگردید. بررسی های پی گونی و همکاران (۲۰۰۹)، نیز هیچ اثر مهاری در غلظت های پایین بر سودوموناس آئروژینوزا نشان نداده است[۳۰]. ولیکن محبوبی و همکاران (۲۰۱۵) ، MIC را mL/mL ٤ و MBC را mL/mL ۸ گزارش نموده اند[۲۸, ۳۲]. از محدوده دوز مطالعه ما خارج بود. MIC و MBC اسانس های حاصل از هر دو روش تقطیر با آب و تقطیر با بخار بر *E. coli* مشابه هم بوده و به ترتیب mL/mL ۱ ،۰/۵ بود که پایین‌تر از اسانس حاصل از تقطیر با آب و بخار بوده که این یافته کمی نسبت به مطالعه دیگر MIC وMBC را در روش تقطیر با آب به ترتیب mL/mL ۲ ،۲ گزارش کرده اند، پایین تر و بهتر است [۳۱]. MIC و MBC اسانس حاصل از روش تقطیر با آب و بخار بر سالمونلا تیفی موریوم به ترتیب mL/mL ۲ ،۲ بود که بهتر از هر دو روش دیگر بود. دیوی و همکاران (۲۰۱۰)، MIC اسانس میخک بر سالمونلا تیفی موریوم در شرایط قلیایی٪ ۰/۰۱۲۵ MBC آن را ۰/۰۲۵ گزارش نموده اند[۳۲]. در یک بررسی دیگر میزان MIC اسانس میخک را در سالمونلا تیفی موریوم mg/mL ۳,۱۲ گزارش کرده اند. کاممون و همکاران (۲۰۲۰)، محبوبی و همکاران (۲۰۱۵)، MIC و MBC

اسانس حاصل از تقطیر با بخار را هر دو به ترتیب mL/mL ۲ و ۲ کرده اند که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد[۳۱, ۳۲].

٤- نتیجه گیری

بیشترین راندمان اسانس میخک مربوط به روش تقطیر با آب بود. اسانس های حاصل از روش های مختلف تقطیر از نظر کیفی (اجزا اسانس) بایکدیگر متفاوت بودند. بررسی اثر ضد باکتریایی نشان داد با اینکه اسانس میخک بر هردو گروه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اثر گذار است ولی بر باکتری های گرم مثبت اثر بیشتری دارد. همچنین اسانس استخراج شده با آب – بخار نسبت به روش های دیگر استخراج، اثر ضد باکتریایی قابل توجهی دارد به طوریکه اثر آن بر استافیلوکوک آرئوس از ۱۰ آنتی بیوتیک (پنی سیلین، اریترومایسین، گلوکزاسین، وانکومایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون، سفالکسین، آمیکاسین و جنتامایسین) قویتر، و اثری برابر با آمپی سیلین و توبرامایسین دارد.

٥- منابع

[1] E. Leung, D. E. Weil, M. Raviglione, and H. Nakatani, "The WHO policy package to combat antimicrobial resistance," *Bulletin of the World Health Organization,* vol. 89, pp. 390-392, 2011.

[2] E. Meyer, P. Gastmeier, M. Deja, and F. Schwab, "Antibiotic consumption and resistance: data from Europe and Germany," *International Journal of Medical Microbiology,* vol. 303, no. 6-7, pp. 388-395, 2013.

[3] R. J. Fair and Y. Tor, "Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century," *Perspectives in medicinal chemistry,* vol. 6, p. PMC. S14459, 2014.

[4] J. M. DeMan, J. W. Finley, W. J. Hurst, and C. Y. Lee, *Principles of food chemistry*. Springer, 1999.

[5] W. C. Frazier and D. C. Westhoff, *Food Microbiology*. McGraw-Hill, 1978.

[6] B. A. Cunha, "Antibiotic side effects," *Medical Clinics of North America,* vol. 85, no. 1, pp. 149-185, 2001.

[7] S. Lee, M. Najiah, W. Wendy, and M. Nadirah, "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Syzygium aromaticum flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites," *Frontiers of Agriculture in China,* vol. 3, no. 3, pp. 332-336, 2009.

[8] K. A. K. Mohammed, H. M. Abdulkadhim, and S. I. Noori, "Chemical composition and anti-bacterial effects of clove (Syzygium aromaticum) flowers," *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci,* vol. 5, no. 2, pp. 483-489, 2016.

[9] R. Khalil and Z.-G. Li, "Antimicrobial activity of essential oil of Salvia officinalis L. collected in Syria," *African Journal of Biotechnology,* vol. 10, no. 42, pp. 8 , 2011, 8402-397.

[10] M. Mahboubi and F. G. Bidgoli, "Antistaphylococcal activity of Zataria multiflora essential oil and its synergy with vancomycin," *Phytomedicine,* vol. 17, no. 7, pp. 548-550, 2010.

[11] B. Berka-Zougali, M.-A. Ferhat, A. Hassani, F. Chemat, and K. S. Allaf, "Comparative study of essential oils extracted from Algerian Myrtus communis L. leaves using microwaves and hydrodistillation," *International journal of molecular sciences,* vol. 13, no. 4, pp. 4673-4695, 2012.

[12] S. Chemat, R. Cherfouh, B. Y. Meklati, and K. Belanteur, "Composition and microbial activity of thyme (Thymus algeriensis genuinus) essential oil," *Journal of Essential Oil Research,* vol. 24, no. 1, pp. 5-11, 2012.

[13] A. Ghasemi Pirbalouti, H. Nourafcan, and E. Solyamani-Babadi, "Variation in chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Bakhtiari Savory (Satureja bachtiarica Bunge.)," *Journal of Essential Oil Bearing Plants,* vol. 20, no. 2, pp. 474-484, 2017.

[14] K. Goodner, "Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds," *LWT-Food Science and Technology,* vol. 41, no. 6, pp. 951-958, 2008.

[15] V. Babushok, P. Linstrom, and I. Zenkevich, "Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils," *Journal of Physical and Chemical Reference Data,* vol. 40, no. 4, p. 043101, 2011.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

[16] E. Sagun, H. Durmaz, Z. Tarakci, and O. Sagdic, "Antibacterial activities of the extracts of some herbs used in Turkish herby cheese against Listeria monocytogenes serovars," *International Journal of Food Properties,* vol. 9, no. 2, pp. 255-260, 2006.

[17] C. Valgas, S. M. d. Souza, E. F. Smânia, and A. Smânia Jr, "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products," *Brazilian journal of microbiology,* vol. 38, no. 2, pp. 369-380, 2007.

[18] K. B. Waites *et al.*, "Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; Approved guideline," 2019.

[19] M. Cavas, D. Beltrán, and J. F. Navarro, "Behavioural effects of dimethyl sulfoxide (DMSO): changes in sleep architecture in rats," *Toxicology letters,* vol. 157, no. 3, pp. 221-232, 2005.

[20] C. I. Owuama, "Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method," *African journal of microbiology research,* vol. 11, no. 23, pp. 977-980, 2017.

[21] H. M. Salama and N. Marraiki, "Antimicrobial activity and phytochemical analyses of Polygonum aviculare L.(Polygonaceae), naturally growing in Egypt," *Saudi journal of biological sciences,* vol. 17, no. 1, pp. 57-63, 2010.

[22] W. Guan, S. Li, R. Yan, S. Tang, and C. Quan, "Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods," *Food Chemistry,* vol. 101, no. 4, pp. 1558-1564, 2007.

[23] L. Jirovetz, G. Buchbauer, I. Stoilova, A. Stoyanova, A. Krastanov, and E. Schmidt, "Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil," *Journal of agricultural and food chemistry,* vol. 54, no. 17, pp. 6303-6307, 2006.

[24] M. A. Hossain, S. R. A. Harbi, A. M. Weli, Q. Al-Riyami, and J. N. Al-Sabahi, "Comparison of chemical constituents and antimicrobial activities of three essential oils from three different brands' clove samples collected from Gulf region," *Asian Pacific Journal of Tropical Disease,* vol. 4, no. 4, pp. 262-268, 2014.

[25] J. Briozzo, L. Núncez, J. Chirife, L. Herszage, and M. D'aquino, "Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution," *Journal of Applied Bacteriology,* vol. 66, no. 1, pp. 69-75, 1989.

[26] M. Rezaei and K. Jaymand, "Essential oils, distillations apparatuses, test methods of essential oils and retention indices in essential oil analysis," *Tehran, Iran: Iranian Society of Medicinal Plants,* 2006.

[27] P. S. X. Yap, K. Yusoff, S.-H. E. Lim, C.-M. Chong, and K.-S. Lai, "Membrane Disruption Properties of Essential Oils—A Double-Edged Sword?," *Processes,* vol. 9, no. 4, p. 595, 2021.

[28] M. Mahboubi and M. Mahboubi, "Chemical Composition, Antimicrobial andAntioxidant Activities of Eugenia caryophyllata Essential Oil," *Journal of Essential Oil Bearing Plants,* vol. 18, no. 4, pp. 967-975, 2015.

[29] Y. Fu *et al.*, "Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination," *Phytotherapy research,* vol. 21, no. 10, pp. 989-994, 2007.

[30] P. Goñi, P. López, C. Sánchez, R. Gómez-Lus, R. Becerril, and C. Nerín, "Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils," *Food chemistry,* vol. 116, no. 4, pp. 982-989, 2009.

[31] K. P. Devi, S. A. Nisha, R. Sakthivel, and S. K. Pandian, "Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane," *Journal of ethnopharmacology,* vol. 130, no. 1, pp. 107-115, 2010.

[32] A. Kammon, A. Almaeyoufi, and A. Asheg, "In Vitro Antimicrobial Activity of Clove Oil against Gram Negative Bacteria Isolated from Chickens," 2019.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Determination of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil and comparison of its antibacterial properties with some conventional antibiotics

Dadazadeh, A. [1], Nourafcan, H. [2]*

1. PhD Student, Department of Medicinal Plants, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Medicinal Plants and Organic Products Research Center, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 04/ 29
Accepted 2021/ 07/ 03

Keywords:

Antibacterial,
Essential oil,
Eugenia caryophyllata,
Eugenol,
Antibiotic Resistance.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.47

*Corresponding Author E-Mail:
nourafcan@m-iau.ac.ir

ABSTRACT

Eugenia caryophyllata (Clove) has long been used as a medicinal plant to treat infections and prevent food spoilage. In this study, with three methods of hydro distillation, steam distillation and hydro-steam distillation, clove buds were extracted and the yields of these methods were 10.9, 9.9 and 8.3%, respectively, which had the highest efficiency for water extraction method. Essential oils obtained by different methods were analyzed by GC/MS and 17 essential oil components were identified. Among these components, acetic acid, eugenol, eugenol acetate, m-eugenol, caryophyllene, hexadecanoic acid were the predominant components, the amount of which in all three types of essential oils were significantly different from each other. Also, the antibacterial effect of essential oils along with 12 common antibiotics on three types of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative (*Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa*) were studied and compared. The results showed that the essential oil extracted with hydro-steam, compared to other extraction methods, has a significant antibacterial effect so that its effect on *Staphylococcus aureus* from Erythromycin, penicillin, glucosacin, vancomycin, tetracycline, ciprofloxacin, ceftriaxone, ceftriaxone Amikacin and gentamicin were stronger, and the effect was similar to that of ampicillin, tobramycin. In conclusion, obtained results showed that clove essential oil can be used as antimicrobial compenent for different appliactions as well as for food and drag applications.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2022-01-24]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.119.13.3]
[DOI: 10.52547/fsct.18.119.47]