

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس های پونه، نعنا و آویشن و بررسی فعالیت ضد میکروبی آنها

ندا عزیزی تبریززاد^۱، سید مهدی سیدین اردبیلی^{۲*}، محمد حجتی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ایران

چکیده

امروزه با توجه به اثبات اثرات نامطلوب مواد ضد میکروبی شیمیایی بر سلامتی انسان و نیز به دلیل تمایل روزافزون مصرف‌کنندگان به مصرف ترکیبات طبیعی، تلاش برای جایگزینی نگه‌دارنده‌های سنتزی با انواع طبیعی رو به افزایش است. با توجه به این واقعیت که یکی از بهترین منابع ترکیبات ضد میکروبی، ترکیبات موجود در گیاهان است، در تحقیق حاضر ضمن شناسایی ترکیبات موثره سه اسانس پونه، نعنا و آویشن خواص ضد میکروبی آن‌ها نیز بررسی شد. جهت تجزیه و شناسایی اسانس‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف سنجی جرمی (GC/MS) استفاده شد. خواص ضد باکتریایی اسانس‌های مذکور بر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های رایج نظیر کلرامفنیکل و تتراسایکلین به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی، ۴۰ ترکیب فرار در اسانس آویشن شناسایی گردید که تیمول (۳۰/۶۱٪)، کارواکرول (۲۲/۱۸٪)، پاراسیمن (۷/۳۴٪)، گاماتریپنین (۶/۶۶٪) و لینالول (۵/۲۶٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن بودند، ۳۱ ترکیب شیمیایی در اسانس پونه شناسایی شد که پیریتون (۳۲/۱۶٪)، پیریتون (۲۹/۶۲٪) و آلفاتریپتول (۶/۴۰٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس پونه بودند. همچنین ۲۷ ترکیب در اسانس نعنا شناسایی گردید که کارون (۵۱/۰۳٪) و لیمونن (۲۱/۱۲٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس نعنا بودند. نتایج این پژوهش نشان داد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های منفی حساسیت بیشتری به اسانس‌های مورد مطالعه داشتند. همچنین اسانس گیاه آویشن اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به پونه و نعنا دارد، که این امر احتمالاً به دلیل وجود مقادیر بیشتر تیمول و کارواکرول در برگ‌های این گیاه می‌باشد.

کلید واژگان: فعالیت ضد میکروبی، اسانس، لامیاسه، گاز کروماتوگرافی

* مسئول مکاتبات: mahdi_sayedain@yahoo.com

۱- مقدمه

بودن اثرات جانبی مصرف آنها نسبت به سایر ترکیبات است و از آنجا که باکتری ها نیز هم در عفونت ها و هم مسمومیت های غذایی اهمیت دارند، از این اسانس ها به طور کامل برای بررسی اثرات ضد میکروبی آنها استفاده شد.

استفاده از گیاهان دارویی از دیرباز در درمان عفونت های میکروبی مرسوم بوده است. گیاهان دارویی به علت داشتن برخی ترکیبات شیمیایی موسوم به ماده موثره مورد توجه پزشکان و کادر درمانی قرار گرفته اند. در میان گیاهان دارویی پونه (Pennyroyal)، نعنا (Mentha یا Spearmint) و آویشن (Thyme) از پر مصرف ترین گیاهان دارویی است که از گذشته تا کنون به عنوان گیاه دارویی با ارزش مصرف شده و در تمام فارماکوپه های معتبر ثبت شده است [۱ و ۲]. ترکیبات ضد میکروبی به دست آمده از گیاهان با مکانیسم های متفاوت از آنتی بیوتیک ها، باکتری ها را حذف می کنند که این مسئله در درمان عفونت های ناشی از سویه های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است [۳]. اسانس های گیاهی ترکیباتی فرار و معطر هستند که در اندام های مختلف گیاه وجود دارند و یکی از نقش هایی که در گیاهان به عهده دارند، محافظت از گیاه در برابر عفونت می باشد [۴]. این ترکیبات دارای اجزاء مختلفی در ترکیب خود می باشند که باعث می شود مقاومت باکتری ها در برابر اسانس های گیاهی که به طور کامل استفاده شده است کاهش یابد. اسانس های گیاهی به طور همزمان به بخش های مختلفی از باکتری ها اثر کرده که این امر باعث اهمیت آنها در درمان و عدم بروز مقاومت های زیاد و چشم گیر در آنها گشته است [۵ و ۶]. اسانس های پونه، نعنا و آویشن حاوی ترکیباتی ترپنی مانند تیمول و کارواکرول هستند که خواص ضد میکروبی اسانس کامل بیشتر از هریک از ترکیبات آنهاست که نشان دهنده سینرژیستی هر کدام از ترکیبات درون اسانس با یکدیگر می باشد [۵ و ۷]. باکتریها از طریق بیماری های عفونی و همچنین ایجاد مسمومیت های غذایی سلامت افراد را تهدید می کنند. از طرف دیگر به سرعت در برابر آنتی بیوتیک مقاومت از خود نشان می دهند. علاوه بر مقاوم شدن سریع قابلیت این را دارد که به طور همزمان در برابر چندین آنتی بیوتیک از خود مقاومت نشان دهد [۸ و ۹]. این ویژگی ها باعث شده تا روش ها و ترکیبات جدیدی برای درمان آن ها مورد مطالعه قرار گیرد. ترکیباتی که علاوه بر اثر میکروب کشی مناسب، روند تولید سویه های مقاوم در آن کاهش یابد و اثرات جانبی کمتری را دارا باشد. اسانس گیاهان پونه، نعنا و آویشن علاوه بر دارا بودن اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی گسترده، دارای مصارف خوراکی نیز هستند که نشان دهنده کم

۲- مواد و روش ها

۲-۱- استخراج اسانس

گیاهان آویشن، نعناع و پونه که به خانواده نعناعیان تعلق دارند از منطقه ملائانی و از مزرعه تحقیقاتی و زمین های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در کیلومتر ۳۰ جاده اهواز-مسجد سلیمان جمع آوری گردیدند. شناسایی جنس و گونه گیاهان توسط دکتر ابدالی در دانشکده کشاورزی انجام پذیرفت. استخراج اسانس گیاهان جمع آوری شده به روش تقطیر آبی انجام پذیرفت و بدین منظور ابتدا گیاهان تهیه شده جهت رفع گردوغبار موجود اندکی با آب شستشو شده و سپس در محیط آزمایشگاه و به مدت یک هفته خشک شدند. مقدار ۳۰۰ گرم از نمونه گیاه خشک شده به درون بالن دستگاه کلونجر منتقل شده و با ۱ لیتر آب به مدت ۳ ساعت تقطیر گردید. اسانس جمع آوری شده با سدیم سولفات بی آب، خشک و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

۲-۲- شناسایی ترکیبات اسانس

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده با تزریق ۰/۵ میکرو لیتر اسانس رقیق شده با سیکلو هگزان به دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890A حاوی ستون HP-5 (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر) متصل به طیف سنج جرمی مدل Agilent 5975 انجام پذیرفت. برنامه دمایی ستون به این طریق تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن ۴۰ درجه سانتی گراد بود و دما با سرعت ۵ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت و در این دما یک دقیقه باقی ماند و سپس دما با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۵۰ درجه افزایش یافت و پس از ۵ دقیقه توقف در این دما در نهایت با سرعت ۲۵ درجه در دقیقه به دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد بود رسانده شد. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل به کار گرفته شد و

1. Hydrodistillation

درصد ترکیبات موجود در اسانس مورد بررسی با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890A مجهز به آشکارساز FID با شرایط فوق و با استفاده از سطح زیر منحنی پیک‌ها محاسبه گردید.

۲-۳-آزمون سنجش فعالیت میکروبی اسانس

در این تحقیق باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و شرکت تهران داروش طب تهیه شدند. نام و مشخصات باکتری‌های مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است.

دمای محفظه تزریق ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. طیف‌سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت به کار گرفته شد.

شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها (C8-C24) و به دست آوردن شاخص بازداری آن‌ها (شاخص کوآتر) و مقایسه با شاخص کوآتر (KI) گزارش شده ترکیبات در نرم‌افزار NIST05 و مقایسه طیف جرمی هر یک از اجزای ترکیبات اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه wiley7n.1 موجود در دستگاه GC/MS صورت پذیرفت. همچنین میزان

Table 1 Characteristics of gram positive and negative bacteria

Place of delivery	Standard type	gram	standard number	Bacteria name
Iranian Scientific and Industrial Research Organization	P.T.C.C	Positive	1154	<i>Bacillus cereus</i>
Iranian Scientific and Industrial Research Organization	A.T.C.C	Positive	10541	<i>Enterococcus faecium</i>
Tehran Darush Medical Co.	A.T.C.C	Positive	29212	<i>Enterococcus faecalis</i>
Tehran Darush Medical Co.	A.T.C.C	Positive	25923	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tehran Darush Medical Co.	A.T.C.C	Positive	11115	<i>Listeria monocytogenes</i>
Iranian Scientific and Industrial Research Organization	P.T.C.C	Negative	1609	<i>Salmonella typhi</i>
Iranian Scientific and Industrial Research Organization	A.T.C.C	Negative	25922	<i>Escherichia coli</i>
Iranian Scientific and Industrial Research Organization	P.T.C.C	Negative	1399	
Iranian Scientific and Industrial Research Organization	P.T.C.C	Negative	1188	<i>Shigella dysenteria</i>

مقادیر ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرو لیتر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک، اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد [۱۰].

۲-۳-۴-تجزیه و تحلیل آماری نتایج میکروبی

این تحقیق در قالب یک طرح کامل تصادفی انجام پذیرفت و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ صورت پذیرفت. کلیه آزمون‌ها با سه تکرار انجام پذیرفت.

۲-۳-۵-نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی ترکیبات

شناسایی موجود در اسانس‌ها

نتایج حاصل از تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه آویشن در جدول ۲ نشان داده شده است. در این تحقیق ۴۰ ترکیب فرار در اسانس آویشن شناسایی گردید که حدود ۹۹/۵۱ درصد از ترکیبات اسانس را شامل می‌گردد. همان‌طور که جدول نشان می‌دهد تیمول (۳۰/۶۱٪)، کارواکرول (۲۲/۱۸٪)، پاراسیمین (۷/۳۴٪)، گاماترینین (۶/۶۶٪) و لینالول (۵/۲۶٪) عمده ترکیبات موجود در اسانس آویشن می‌باشند.

۲-۳-۱-محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها

کیت‌های حاوی دیسک‌های شاهد با قطر ۶/۴ میلی‌متر و ویال‌های استریل حاوی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و تتراسایکلین از شرکت پادتن طب خریداری شدند. محیط کشت مولر هیتون آگار، تریپتیکاز سویا آگار، برین هارت اینفوژن آگار و برین هارت اینفوژن برات از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

۲-۳-۲-روش انجام

برای این تحقیق از روش آنتی‌بیوگرام جهت بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده شد. این روش با عنوان روش "آنتی بیوگرام" معروف بوده و روش اجرایی این پژوهش بر مبنای روش دیسک دیفیوژن بود.

۲-۳-۳-مراحل انجام

خارج نمودن سوش‌های لیوفیلیزه خریداری شده از حالت فریزری، پاساژ دادن سوش‌های مورد نظر، مقایسه با مایع ۵/۰ مک فارلند، بررسی خواص آنتی‌باکتریایی اسانس‌ها در

Table 2 Volatile compounds detected from thyme essential oil by gas chromatography connected to mass spectroscopy *

Peak	Compound	RT (min)	KI _{exp}	%
1	alpha thujene	5.245	927	0.65
2	alpha pinene	5.423	934	3.32
3	Camphene	5.734	947	0.25
4	beta pinene	6.367	972	0.66
5	beta myrcene	6.656	984	1.74
6	3- octanol	6.80	993	0.19
7	alpha phellandrene	7.0	997	0.24
8	delta 3 carne	7.145	1005	0.07
9	alpha terpinene	7.311	1011	2.28
10	para-cymene	7.567	1019	7.34
11	Limonene	7.634	1022	0.83
12	1,8 cineole	7.767	1026	0.68
13	beta ocimene	8.078	1037	0.07
14	gamma terpinene	8.445	1050	6.66
15	(z) sabinene hydrate	8.689	1058	0.21
16	cis linalool oxide	8.845	1072	0.10
17	alpha terpinolene	9.156	1081	0.25
18	trans linalool oxide	9.267	1088	0.08
19	Linalool	9.578	1090	5.26
20	Hotrienol	9.825	1098	0.18
21	Borneol	11.333	1168	0.25
22	terpinene 4 ol	11.633	1176	1.13
23	alpha terpineol	12.289	1184	1.01
24	cis dihydrocarvone	12.555	1200	0.07
25	thymyl methyl ether	13.111	1224	1.27
26	carvacrol methyl ether	13.377	1227	1.88
27	Thymol	14.888	1279	30.61
28	Carvacrol	15.233	1300	22.18
29	thymol acetate	16.377	1324	1.23
30	carvacryl acetate	16.844	1380	1.13
31	caryophyllene	18.066	1420	2.56
32	beta Gurjenene	18.232	1432	0.07
33	aromadendrene	18.521	1449	1.17
34	alpha Humulene	18.777	1481	0.17
35	alloaromadendrene	19.054	1490	0.11
36	Ledene	19.888	1500	0.83
37	spathulenol	21.899	1570	1.03
38	caryophyllene oxide	22.054	1579	1.06
39	isospathulenol	23.243	1640	0.14
40	bisabolene epoxide	23.965	1699	0.14
	Total			99.15

RT: Retarding time, KI_{exp}: Kovats index of test, %: amount of chemical composition based on the area under curve

ترکیبات فرار شناسایی شده در اسانس گیاه پونه در جدول ۳ نشان داده شده است. در این تحقیق ۳۱ ترکیب شیمیایی در اسانس پونه که در مجموع ۹۵/۷۹ درصد از کل ترکیبات را تشکیل می‌داد شناسایی گردید. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد پیریتون (۳۲/۱۶)٪، پیریتون (۲۹/۶۲)٪ و آلفا ترپینول (۶/۴۰)٪ عمده ترکیبات موجود در اسانس پونه می‌باشند.

Table 3 Volatile compounds detected from pennyroyal essential oil by gas chromatography connected to mass spectroscopy*

Peak	Compound	RT (min)	KI _{exp}	%
1	alpha pinene	5.398	934	0.09
2	sabinene	6.264	968	0.03
3	beta pinene	6.353	972	0.12
4	p cymene	7.497	1019	0.12
5	limonene	7.597	1021	0.54
6	1,8 cineole	7.764	1025	4.37
7	gamma terpinene	8.364	1049	0.04
8	linalool	9.475	1090	0.26
9	p mentha 2, 8 diene 1 ol	10.597	1120	0.10
10	camphor	10.986	1144	0.07
11	L-menthone	11.13	1154	3.75
12	Borneol	11.375	1168	4.77
13	terpinene 4 ol	11.641	1176	0.79
14	alpha terpineol	12.064	1184	6.40
15	beta citronellol	13.186	1218	0.34
16	pulegone	13.386	1231	2.83
17	Carvone	13.486	1242	0.98
18	piperitone	14.097	1256	32.16
19	bomyl acetate	14.608	1270	1.20
20	carvacrol	15.452	1300	0.12
21	piperitenone	16.407	1339	29.62
22	neryl acetate	16.63	1357	0.21
23	piperitenone oxide	16.83	1363	4.74
24	geranyl acetate	17.074	1381	0.25
25	beta bourbonene	17.163	1400	0.14
26	(E)caryophyllene	18.029	1420	0.20
27	alpha Humulene	18.463	1481	0.10
28	alpha amorphene	20.318	1516	0.03
29	caryophyllene oxide	22.051	1579	1.14
30	geranyl pentanoate	22.34	1592	0.20
31	alpha cadinol	23.284	1636	0.08
	Total			95.79

RT: Retarding time, KI_{exp}: Kovats index of test, %: amount of chemical composition based on the area under curve

نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات فرار موجود در اسانس نعناع در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود ۲۷ درصد ترکیبات موجود در آن می‌باشند شناسایی گردیدند. کارون ترکیب از مواد موجود در اسانس نعناع که تشکیل دهنده ۹۸/۳۵

فرار موجود در اسانس را فقط این دو ماده تشکیل می دادند.

(۵۱/۰۳٪) و لیمونن (۲۱/۱۲٪) عمده ترکیبات موجود در

اسانس نعناع بودند که در مجموع بیش از ۷۲ درصد از ترکیبات

Table 4 Volatile Compounds detected from mint essential oil by gas chromatography connected to mass spectroscopy *

peak	Compound	RT (min)	KI _{exp}	%
1	alpha pinene	5.409	934	1.63
2	sabinene	6.287	968	0.71
3	beta pinene	6.375	972	1.73
4	beta myrcene	6.653	984	1.05
5	3- octanol	6.809	993	1.42
6	limonene	7.731	1022	21.12
7	1,8 cineole	7.831	1026	2.90
8	(z)-sabinene hydrate	8.675	1058	0.37
9	alpha terpinolene	9.153	1081	0.26
10	linalool	9.486	1090	0.20
11	L-menthone	10.997	1154	0.53
12	isomenthone	11.308	1164	0.52
13	L- menthol	11.508	1166	1.71
14	terpinene 4 ol	11.641	1176	1.03
15	cis dihydrocarvone	12.208	1191	3.23
16	trans dihydrocarvone	12.408	1200	0.48
17	carveol	13.086	1217	0.83
18	carvone	13.797	1242	51.03
19	piperitone	13.963	1256	0.45
20	dihydrocarvyl acetate	15.663	1305	0.22
21	piperitenone	16.108	1339	0.16
22	alpha copaene	16.885	1377	0.22
23	carvyl acetate	16.552	1380	0.28
24	beta bourbonene	17.152	1400	2.37
25	caryophyllene	18.029	1420	2.36
26	germacrene D	18.629	1479	0.46
27	caryophyllene oxide	22.029	1579	0.63
	total			98.35

*RT: Retarding time, KI_{exp}: Kovats index of test, %: amount of chemical composition based on the area under curve

۲-۳-۶- نتایج آزمون های فعالیت ضد میکروبی اسانس ها

نتایج آزمون های میکروبی سه اسانس پونه، آویشن و نعناع بر سه باکتری گرم منفی و چهار باکتری گرم مثبت در مقایسه با دو آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل و تتراسایکلین در جدول های ۵ الی ۱۰ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت در مقایسه با اسانس های نعنا و پونه بیشتر است که نشان دهنده فعالیت میکروبی بالا این اسانس در مقایسه با دو اسانس دیگر هست.

مقایسه ترکیب های اصلی اسانس های مورد آزمایش با تحقیق های قبلی نشان می دهد، میزان آن ها در نمونه های مختلف متفاوت است. صادق زاده و همکاران در سال ۱۳۸۵، گزارش کردند، ترکیب های عمده تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی: تیمول (۵۲/۴ درصد)، گاماترینین (۱۷/۶ درصد)، پاراسیمن (۱۳/۲ درصد) و کارواکرول (۶/۱ درصد) است [۱۱]. شریفی فر و همکاران در سال ۲۰۰۷ ترکیب های عمده اسانس آویشن شیرازی را تیمول (۳۷/۵۹ درصد)، کارواکرول (۳۳/۶۵ درصد)، پاراسیمن (۷/۷۲ درصد) و گاماترینین (۳/۰۸۸ درصد) گزارش کردند [۱۲].

Table 5 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of Pennyroyal essential oil on Gram-Negative bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μ l)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	15	20
<i>Salmonella typhi</i>	12.27 \pm 0.45aB	21.06 \pm 1.05cB	12.71 \pm 0.5aB	13.05 \pm 1.22aA	16.15 \pm 2.04bB
<i>Escherichia coli</i>	13.48 \pm 2.14bC	21.17 \pm 0.76cB	11.65 \pm 0.01aA	13.9 \pm 1.02bA	14.3 \pm 0.01bA
<i>Shigella dysenteria</i>	11.75 \pm 0.2aA	16.9 \pm 3.05dA	12.1 \pm 2.04bA	13.43 \pm 0.93cA	16.8 \pm 0.2dB

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 6 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of thyme essential oil on Gram-Negative bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μ l)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	15	20
<i>Salmonella typhi</i>	17.42 \pm 2.02aB	25.44 \pm 3.44bB	22.46 \pm 1.45bA	23.89 \pm 3.44bA	46.01 \pm 1.01cA
<i>Escherichia coli</i>	18.16 \pm 2.3aB	26.93 \pm 3.11bC	32.65 \pm 1.45cB	44.87 \pm 3.03dC	48.44 \pm 1.45dB
<i>Shigella dysenteria</i>	13.29 \pm 1.1aA	22.67 \pm 1.19bA	22.03 \pm 3.03bA	40.23 \pm 4.12cB	46.87 \pm 0.91dA

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 7 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of mint essential oil on Gram-Negative bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μ l)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	15	20
<i>Salmonella typhi</i>	16.33 \pm 0.56bC	24.01 \pm 0.67dB	14.45 \pm 0.45aA	19.02 \pm 1.71cB	20.43 \pm 0.98cA
<i>Escherichia coli</i>	14.98 \pm 0.89aB	19.02 \pm 0.93bA	14.41 \pm 1.02aA	15.12 \pm 1.34abA	18.76 \pm 1.54bA
<i>Shigella dysenteria</i>	11.98 \pm .71aA	22.62 \pm 1.03cB	14.01 \pm 0.88bA	14.69 \pm 1.88bA	21.22 \pm 1.45cA

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 8 Mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of Pennyroyal essential oil on Gram-Positive bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μ l)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.35 \pm 0.09cC	20.67 \pm 0.22 bC	18.1 \pm 0.43 aC	38.11 \pm 0.12 dD	23.16 \pm 0.01 cA
<i>Enterococcus faecalis</i>	12.65 \pm 0.0757bA	11.85 \pm 0.02bA	6.52 \pm 0.21A	15.15 \pm 0.01cA	25.16 \pm 0.01dB
<i>Enterococcus faecium</i>	19.165 \pm 0.49cB	17.34 \pm 0.76 bB	14.23 \pm 1.01 aB	29.01 \pm 1.0 2eC	23.33 \pm 0.76 dA
<i>Listeria monocytogenes</i>	27.35 \pm 0.47bD	26.11 \pm 0.94 bD	22.5 \pm 0.04aD	38.65 \pm 0.29dD	33.66 \pm 0.29cD
<i>Bacillus cereus</i>	22.17 \pm 0.13 dC	19.5 \pm 0.47cC	17.65 \pm 0.08bC	23.33 \pm 0.56 dB	28.83 \pm 0.01 eC

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 9 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of thyme essential oil on Gram-Positive bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (μ l)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	38.76 \pm 0.66 bD	23.44 \pm 0.35 aA	69.34 \pm 1.33dC	62.11 \pm 1.16 dC	48.12 \pm 0.67cC
<i>Enterococcus faecalis</i>	15.33 \pm 0.15 aA	25.33 \pm 0.98 bB	46.83 \pm 0.67eA	40.01 \pm 0.44 dA	28.5 \pm 0.32cA
<i>Enterococcus faecium</i>	28.02 \pm 0.92 bC	24.03 \pm 1.04aA	74.5 \pm 0.67 eD	59.12 \pm 0.27dC	51.31 \pm 1.01cD
<i>Listeria monocytogenes</i>	38.12 \pm 0.32bD	33.77 \pm 0.47aD	70.35 \pm 0.15eC	61.21 \pm 1.26 dC	54.01 \pm 0.78 cD
<i>Bacillus cereus</i>	22.93 \pm 1.11 bB	28.01 \pm 0.15 cC	57.5 \pm 0.17 fB	45.44 \pm 0.07 eB	35.30 \pm 0.23 dB

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

Table 10 The mean diameter of the inhibition zone (mm) obtained from the effect of mint essential oil on Gram-Positive bacteria compared to chloramphenicol and tetracycline antibiotics

Bacteria	Antibiotics		Essential oil amount (µl)		
	Chloramphenicol	Tetracycline	10	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.89±1.14cA	10.23±1.54bA	6.76±0.54aA	38.23±1.54eD	23.25±0.34dA
<i>Enterococcus faecalis</i>	18.65±0.87cB	14.76±0.98 bB	10.11±1.23 aB	14.94±0.85 bA	24.87±1.03 dB
<i>Enterococcus faecium</i>	20.89±0.94cC	13.67±1.28bB	9.13±0.16aB	28.34±1.12 fC	23.45±1.23dA
<i>Listeria monocytogenes</i>	20.25±1.36cC	17.81±1.12 bC	12.65±1.78aC	38.22±1.22eD	33.76±0.43dD
<i>Bacillus cereus</i>	25.05±1.32cD	23.25±1.66 cD	18.23±1.07aD	22.94±1.46bB	29.03±0.56dC

Different small and capital letters at each row and column show significant difference in 95% of confidence level, respectively

وجود در حال حاضر حدود ۲۵-۵۰ درصد از داروهای رایج با منشای گیاهی در دنیا مصرف می شوند. از آنجایی که روز به روز بر تعداد باکتری های بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک ها ی رایج افزوده می شود، لذا جهت کنترل و از بین بردن عفونت های میکروبی مقاوم خصوصا عفونت های بیمارستانی، کشف عوامل درمانی جدید یک نیاز ضروری می باشد [۱۵].

مطالعات زیادی با استفاده از اسانس و عصاره های آبی و الکلی گیاه آویشن بر روی باکتری های مختلف انجام گرفته است. این تحقیقات نشان داده اند که تیمول و کارواکرول جزء اصلی ترین ترکیبات موثره آویشن بوده و بر روی باکتری های گرم مثبت و منفی اثر دارند [۱۶ و ۱۷].

در سال ۲۰۰۳ عثمان سانگلیک نشان داد که اسانس گیاه آویشن بر روی باکتری های اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس اثرات بازدارندگی دارد. همچنین در سال ۲۰۰۲ طی تحقیقی ان ساینگ به بررسی خواص بازدارندگی اسانس آویشن بر روی انتروهموراژیک اشریشیا کلی پرداخت [۱۸].

طی تحقیق حاضر نیز اثرات اسانس های گیاهان پونه، نعنا و آویشن بر روی باکتری ها به اثبات رسید. نتایج این پژوهش نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت در مقایسه با اسانس های نعنا و پونه بیشتر است که نشان دهنده فعالیت میکروبی بالا این اسانس در مقایسه با دو اسانس دیگر هست، که این امر احتمالا به دلیل وجود مقادیر بیشتر تیمول و کارواکرول در برگ های جوان این گیاه می باشد. همچنین با آنالیز کروماتوگرام ها نشان داده شد که تیمول و

چنانچه مشاهده می شود میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری های گرم منفی (سالمونلا، اشریشیاکلی و شیگلا) در غلظت ۲۰ میکرولیتر حدود ۴۷ میلیتر و در مورد اسانس نعنا ۲۰ میلیتر و برای اسانس پونه ۱۶ میلیتر است. میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم، لیستریامونوسیتوژنز و باسیلوس سرئوس) در غلظت ۲۰ میکرولیتر حدود ۴۵ میلیتر و در مورد اسانس نعنا ۲۷ میلیتر و برای اسانس پونه ۲۶ میلیتر است. در مجموع میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس آویشن بر باکتری های گرم مثبت و منفی در مقایسه با اسانس های نعنا و پونه بیشتر است که نشان دهنده فعالیت میکروبی بالاتر این اسانس در مقایسه با دو اسانس دیگر هست.

۳- بحث و نتیجه گیری

طب سنتی از هزاران سال پیش جهت اهداف درمانی استفاده شده است که در این میان استفاده از اسانس و عصاره های گیاهان دارویی جایگاه قابل ملاحظه ای را به خود اختصاص داده است. اخیرا استفاده از ترکیباتی که به طور کلی بی ضرر تلقی می شوند و به GRAS² معروف اند، توجه زیادی را به خود معطوف کرده اند. ترکیبات طبیعی فعال بیولوژیکی مشتق از گیاهان از جمله مهم ترین ترکیبات GRAS می باشند زیرا مواد حاصل از اسانس و عصاره های گیاهان را می توان جهت حفظ و نگهداری مواد غذایی و در داروسازی و به عنوان عوامل درمانی جدید علیه بیماری ها و عفونت های میکروبی به کار برد [۱۳ و ۱۴]. با این

3. Shingh N

4. EHEC

2. Generally regarded as safe

- [9] Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A and et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol. 2007; 115:290-296.
- [10] Alzoreky, N.S. and Nakahara, K. (2003) Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int J Food Microbiol. 80:223-230.
- [11] Sadeghzadeh, I., Whitening, f. And Olia, p. (2006) Antimicrobial composition and antimicrobial properties of essential oil of Sh. Research and development, 56-52,71.
- [12] Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. (2007) In vitro evaluation of antioxidant activities of the oil and methanol extract of endemic *Zataria Boiss.* Food Control, 18: 800-805.
- [13] Jobling J. Essential Oils: A new idea for postharvest disease control. Good Fruit and Vegetables Magazine. 2000; 11(30):50
- [14] Benli M, Guney K, Bingol U, Geven F, Yigit N. Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. Afr. J. Biotechnol. 2007; 6(15):1774-8.
- [15] Duarte M.C.T, Leme E.E, Delarmelina C, Soares A.A, Figueira G.M, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J. Ethnopharmacol. 2007; 111:197-201.
- [16] Dorman H.J.D, Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 2000; 88:308-14.
- [17] Sanglic O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano. Wissenschaft Und. Technologic. 2003; 36(5):467-73.
- [18] Singh N, Singh R.K. Efficient of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *E.coli* O157:H7 on lettuce. Food Microbiol. 2002; 19:183-93

کارواکرول در ترکیبات اصلی آویشن وجود دارد. اگرچه کاربرد بالینی عصاره ها و اسانس های درمانی گیاهی به دلیل عوارض کم و هزینه تولید کمترشان، مفید و مقرون به صرفه می باشد، اما به نظر می رسد که جهت کاربرد بالینی عصاره ها ی آویشن بایستی مطالعات و تحقیقات بیشتری در زمینه مکانیسم عمل ترکیبات موثره این گیاه بر روی عوامل میکروبی و فعالیت فارماکوکینتیک آن انجام شود.

۴-منابع

- [1] Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed S, Ghorbani A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethno botany to Pharmacology. Iranian J Pharm Res. 2005;2:63-79
- [2] Jam Zad M. Avishan. Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran. 1994, pp: 1-7.
- [3] Eloff JN. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. J Ethnopharmacol, 1999;67(3):355-60.
- [4] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol. 1999;86:985-990
- [5] Aghel N, Moghimipour E, Ameri A. Characterization of an antidermatophyte cream from *Zataria multiflora boiss.* Iranian J pharm Sci. 2007;3:77-84
- [6] Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine. 2008;15:639-652
- [7] Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun and et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytother Res. 2007;21:989-994
- [8] Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estrol, linalool and p-Cymene towards *Shigella sovei* and *S. Flexneri*. Food Microbiol. 2004;21:33-42

Identification of chemical compounds of pennyroyal, mint and thyme essential oils and investigate their antimicrobial activities

Azizi Tabrizad, N. ¹, Seyedin Ardebili, S. M. ^{2*}, Hojjati, M. ³

1. MSc Graduated, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Khuzestan Agricultural and Natural Resources University, Iran

Nowadays, considering the undesirable effects of chemical antimicrobials on human health and the growing willingness of consumers to consume natural ingredients, efforts to replace synthetic preservatives with naturally occurring forms are increasing. Due to the fact that one of the best sources of antimicrobial compounds is the plant compounds, in the present study, the three essential oils of pennyroyal, mint and thyme were identified as an effective antimicrobial compound. GC / MS was used for the analysis and identification of essential oils of pennyroyal, mint and thyme. The antibacterial properties of these essential oils were investigated on some Gram-Negative and Gram-Positive bacteria compared with the common antibiotics. Such as chloramphenicol and tetracycline using disc diffusion method. In this study, 40 compounds were identified in thyme essential oil which thymol (30.61%), carvacrol (22.18%), para-cymene (37.34%), gama-terpinene (66.6%), and linalool (5.26%) were the major components. 31 chemical compounds were identified in pennyroyal essential oil that piperitone (32.16%), piperitenone (29.62%) and alpha-terpineol (6.40%) were the main constituents. In addition, 27 compounds were identified in the mint essential oil that carvon (51.03%) and limonene (21.12%) were the major oil compounds. The results of this study showed that Gram-Positive bacteria were more susceptible to the essential oils than Gram-Negative bacteria. Also, thyme essential oil has a more inhibitory effect compared to pennyroyal and mint oil, which is probably due to the presence of more thymol and carvacrol in leaves of this plant.

Key words: Antimicrobial activity, Essential oil, Lamiacea, Gas chromatography

* Corresponding Author E-Mail Address: mahdi_seyedain@yahoo.com