

بررسی ترکیبات اسانس و اثرات ضد میکروبی گیاه *Thymus caucasicus*

رضا حاجی آقائی^۱، شمسعلی رضازاده^۱، یوسف اجنی^۲، نسرین صمدی^۳، نسیم آشوری^۴، سمیه آقامحمدزاده^۵،
سید حمیدرضا علوی^{۱*}

۱- استادیار پژوهشی، گروه فارماکوگنوزی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی
۲- مربی پژوهشی، گروه کشت و توسعه، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی
۳- استادیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- دکتری داروسازی، اداره کل آزمایشگاه‌های غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
۵- دکتری داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی
* آدرس مکاتبه: کرج، کیلومتر ۵۵ جاده تهران قزوین، مجتمع تحقیقاتی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده گیاهان دارویی، صندوق پستی: ۱۴۴۶ - ۱۳۱۴۵، تلفن: ۹ - ۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶۱)، نمابر: ۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶۱)
پست الکترونیک: shr.alavi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۶

تاریخ تصویب: ۸۸/۷/۹

چکیده

مقدمه: تیموس^۱ یکی از جنس‌های مهم خانواده نعنائیان^۲ می‌باشد و از زمان‌های دور تاکنون مورد استفاده سنتی و دارویی بوده است. گونه آویشن قفقازی از گونه‌های مهم تیموس است که از اطراف خلخال جمع‌آوری و شناسایی شد. هدف: در این تحقیق اجزای اسانس گیاه *Thymus caucasicus* مورد شناسایی قرار گرفته و اثرات ضد میکروبی آن و فراکسیون‌های اتردیپترولی، کلروفرمی و آن- بوتانولی بررسی شدند.

روش بررسی: آویشن قفقازی *Thymus caucasicus* از اطراف خلخال جمع‌آوری و شناسایی شد. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و تقطیر با بخار آب انجام شد و اجزای هر یک به کمک دستگاه GC/MS مورد شناسایی قرار گرفت. اثر ضد میکروبی اسانس‌های حاصل از روش تقطیر با آب و فراکسیون‌ها با استفاده از روش رقیق سازی در آگار در مقابل ۸ سویه باکتریایی سنجیده شد.

نتایج: در اسانس حاصل از تقطیر با آب و بخار آب به ترتیب، ۴۴ و ۵۷ ترکیب شناسایی شد. نتایج نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی قابل توجه این اسانس‌ها و فراکسیون‌ها در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، باسیلوس سوبتیلیس، پسودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیا کلی و سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد. نتیجه‌گیری: بخش اصلی اسانس حاصل از تقطیر با آب و بخار آب را Nerolidol تشکیل می‌دهد. بررسی‌های ضد میکروبی نشان‌دهنده کمترین غلظت مهاری برای اسانس و فراکسیون آن- بوتانولی در مقابل باکتری‌های مختلف می‌باشد.

گل‌واژگان: *Thymus caucasicus*، اسانس، فعالیت ضد میکروبی

¹ *Thymus* L.

² *Labiatae*



مقدمه

پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی واقع در هشتگرد کرج، به شماره ۴۱ نگهداری می‌شود.

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

کلیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت ذکر شده در این تحقیق از شرکت Merck (کشور آلمان) می‌باشد.

اسانس‌گیری و تهیه فراکسیون‌ها

گیاهان پس از جمع‌آوری در سایه خشک شده و به منظور استخراج بهتر اسانس گیاه، نمونه خشک شده از سرشاخه‌های هوایی گیاه به وسیله دستگاه آسیاب خرد و از ۲۰۰ گرم آن به دو روش تقطیر با آب^۱ و بخار آب^۲ اسانس تهیه شد.

جهت تهیه فراکسیون‌های اتردوپترولی، کلروفرمی و ان- بوتانولی یک کیلوگرم از پودر گیاه ابتدا توسط متانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره‌گیری شد. سپس عصاره حاصل به وسیله دستگاه تقطیر در خلع تغلیظ شده و در آب مقطر پراکنده شد. میزان عصاره خشک ۱۰۸ گرم بود. سپس از عصاره پراکنده شده در آب مقطر به روش جداسازی مایع- مایع و حلال اتردوپترولی، فراکسیون اتردوپترولی حاصل شد (۲۱، ۱۱ گرم). در مرحله بعد مجدداً فاز مایع به وسیله حلال کلروفرمی و روش مایع- مایع جداسازی شد (۶۶، ۱۳ گرم). فاز ان- بوتانولی نیز به روش مایع- مایع حاصل شد (۷۸، ۲۶ گرم).

آنالیز و شناسایی اجزای اسانس‌ها

اسانس حاصل، با استفاده از دستگاه GC/MS آنالیز شد. برای شناسایی اجزای اسانس، از روش مقایسه طیف جرمی و اندیس کوانتر ترکیبات با موارد استاندارد در منابع و شباهت طیف جرمی ترکیبات با طیف جرمی مواد استاندارد موجود در بانک اطلاعاتی دستگاه (Wiley 7.0) استفاده شد.

از دستگاه GC/MS کروماتوگراف گازی Agilent technology مجهز به ستون DB-1 غیرقطبی، به

در طول تاریخ بشری بسیاری از بیماری‌های عفونی به طور سنتی با داروهای گیاهی درمان شده‌اند. امروزه تلاش برای استخراج و شناسایی مواد مؤثر گیاهان که خاصیت ضد میکروبی دارند ادامه دارد [۱، ۲]. *Thymus* یکی از اسامی عمومی آویشن می‌باشد که از کلمه یونانی به معنی بخور دادن اقتباس شده است زیرا یونانی‌ها از تیموس به عنوان بخور خوشبو کننده استفاده می‌کردند. همچنین ممکن است که از کلمه یونانی *Thumus* به معنی شجاعت و جرات مشتق شده باشد زیرا در قرون وسطی به عنوان گیاه شجاعت دهنده مورد توجه بوده است [۳].

گیاه *Thymus caucasicus* به صورت توده‌های کوچک، طول گیاه در زمان گل‌دهی ۸ - ۲ سانتی‌متر، انشعابات گیاه بلند، در قاعده چوبی، شاخه‌های رونده بدون گل بوده یا گل آذین در انتهای شاخه، جام گل به طول ۷ - ۵ میلی‌متر و صورتی رنگ می‌باشد [۴]. اسانس آویشن به عنوان یک داروی ضد حساسیت در روماتیسم و دردهای عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵]. پمادی از این گیاه ساخته شده که یک درمان سنتی برای پینه، زگیل و آبله است. عصاره آویشن مو را تیره، نرم و براق می‌کند و مانع شوره سر می‌شود [۶]. از اثر شل‌کنندگی آویشن به عنوان یک درمان انتخاب شده برای سیاه‌سرفه استفاده می‌شود. به دلیل آنکه سیاه‌سرفه بیماری دوران کودکی است غالباً آویشن را داروی کودکان می‌نامند [۷]. پماد حاصل از این اسانس در بعضی بیماری‌های ویروسی خصوصاً زونا و سرخجه مفید می‌باشد [۸]. آویشن مدر است و به عنوان یک ضد عفونی کننده در درمان عفونت‌های ادراری - تناسلی استفاده می‌شود. بعضی از متخصصین عقیده دارند که آویشن قاعده‌آور و مقوی است لذا چای آویشن را برای دیس منوره و دوران نقاهت بیماری‌های سخت تجویز می‌نمایند [۹].

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

گیاه *Thymus caucasicus* از اطراف خلخال در خرداد ماه سال ۱۳۸۵ جمع‌آوری و شناسایی شد و در هرباریوم

^۱ Hydro distillation^۲ Steam distillation

طول ۶۰ متر و قطر ۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون، گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۲ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد. دمای محل تزریق و دتکتور ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. دمای آن از ۴۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۵ درجه سانتی گراد بر دقیقه افزایش یافت و تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد بالا رفت.

بررسی فعالیت ضد میکروبی

در این تحقیق از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، کلبسیلا پنومونیه، پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی استفاده شد. باکتری های مورد آزمایش از آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند.

خاصیت ضد میکروبی اسانس ها و فراکسیون های تهیه شده توسط روش رقیق^۱ مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت های

متوالی از اسانس ها و فراکسیون ها (۲۰ و ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱، ۰/۱۶ میکروگرم در میلی لیتر) در محیط جامد تهیه شد. آنگاه سویه های مختلف میکروبی به صورت نقطه ای روی محیط جامد کشت داده شدند. میزان تلقیح باکتری ها ۱۰۵ - ۱۰۴ باکتری در هر نقطه بود. بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، نتایج جمع آوری شد. کمترین غلظتی که مانع از رشد یک سویه باکتری می شود به عنوان حداقل غلظت مهاری^۲ گزارش شد.

نتایج

بازده وزنی - وزنی اسانس های حاصل از تقطیر با آب و بخار آب از گیاه *Thymus caucasicus* به ترتیب ۰/۲۶ و ۰/۲۸ درصد بود. جدول شماره ۱ ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، درصد کمی هر یک از آن ها و شاخص بازداری مربوطه را نشان می دهد.

^۱ Agar dilution

^۲ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

جدول شماره ۱- ترکیبات موجود در اسانس گیاه آویشن قفقازی

شماره جسم	نام جسم	اسانس حاصل از تقطیر با		اندیس کواتز محاسبه شده
		آب (درصد)	بخار آب (درصد)	
1	Isooctane	0.216	-	667
2	α - Pinene	0.173	1.309	936
3	Comphen	-	0.311	948
4	β - Myrcene	0.996	1.670	989
5	α - Terpinene	0.148	-	1009
6	o- Cymene	-	0.403	1018
7	Limonene	0.913	1.213	1027
8	1,8-Cineol	0.928	1.556	1028
9	trans- O- cymene	2.758	3.249	1046
10	- Terpineney	0.372	0.169	1056
11	cis- Sabinene hydrate	-	0.773	1062
12	α - Terpinolene	-	0.624	1082
13	α - Pinene oxide	-	0.330	1089
14	trans- Sabinene hydrate	0.203	-	1094
15	Linalool	0.761	-	1096
16	Nonanal	0.123	-	1099
17	Nonanol	0.123	-	2001
18	Comphor	0.370	0.046	1138
19	trans- Verbenol	0.176	-	1140
20	Borneol	1.886	1.985	1159



ادامه جدول شماره ۱ - ترکیبات موجود در اسانس گیاه آویشن قفقازی

شماره جسم	نام جسم	اسانس حاصل از تقطیر با		اندیس کواتز محاسبه شده
		بخار آب (درصد)	آب (درصد)	
21	4- Terpineol	0.236	0.688	1173
22	α - Terpineol	0.452	0.425	1181
23	Nerol	-	0.098	1223
24	2,3,3- Trimethyl- 3-cyclopentane acetaldehyde	-	0.295	1227
25	NI	0.420	0.210	1231
26	Carvone	-	-	1239
27	Bornyl formate	-	0.200	1242
28	NI	0.388	0.375	1246
29	Geraniol	7.023	4.818	1250
30	Decanol	-	0.131	1266
31	Thymol	1.101	1.175	1285
32	Carvacrol	0.319	-	1294
33	Octadecanal	-	0.435	1352
34	α - Copaene	0.860	-	1372
35	Geranyl acetone	5.638	6.578	1380
36	β -Bourbonene	0.372	0.349	1382
37	cis- Caryophyllene	1.388	2.267	1399
38	trans- β - Farnesene	0.684	1.164	1449
39	α - Amorphene	0.452	-	1463
40	Germacrene D	01.664	2.028	1476
41	Bicyclogermacrene	0.466	0.638	1488
42	cis- α - Bisabolene	0.686	1.364	1501
43	α - Farnesene	0.372	0.460	1504
44	β - Bisabolene	-	0.278	1504
45	Vianol	-	0.300	1507
46	- Cadineney	0.482	0.414	1510
47	trans- Calamenene	0.277	0.295	1516
48	Δ - Cadinene	-	0.533	1521
49	Elemol	0.301	0.594	1543
50	E- Nerolidol	52.305	53.589	1560
51	1-hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene	0.945	-	1566
52	Spathlenol	2.079	1.336	1571
53	Caryophyllene oxide	2.345	1.627	1577
54	t-Cadinol	0.815	-	1648
55	alpha-Cadinol	1.170	0.817	1652
56	Cyclotetradecane	-	0.308	1673
57	n-Heptadecane	-	0.745	1696
58	5,7 dihydroxy-8-methoxyl-1,4-Naphthoquinone	0.557	-	1757
59	n-Octadecane	-	0.559	1797
60	Phytane	-	0.370	1824
61	6,10,14-Trimethylpentadecane	-	0.352	1836
62	Isobutyl phthalate	0.642	0.423	1859
63	n-Nonadecane	-	0.445	1869
64	Pentadecanoic acid,14 methyl ester	-	0.282	1884
65	Phytol	0.444	0.566	1943
66	Hexadecanoic acid	0.852	-	1958
67	Dibutyl phthalate	-	0.641	1974
68	Phthalic acid butyl ester	0.899	-	1981
69	5-Eicosene	-	0.721	1989
70	n-Eicosane	-	0.355	1998
71	n-Heneicosane	-	0.294	2094
72	Osthol	-	0.308	2131



در اسانس حاصل از تقطیر با آب، ۴۴ ترکیب شناسایی شد. اجزای اصلی اسانس را (۵۲/۳۰ درصد) Nerolidol، (۷/۰۲ درصد) Geraniol و (۵/۶۴ درصد) Geranyl acetone تشکیل می‌دهند. در اسانس حاصل از تقطیر با بخار آب، ۵۷ ترکیب شناسایی شد. اجزای اصلی اسانس (۵۳/۵۸ درصد) Nerolidol، (۶/۵۷ درصد) Geranyl acetone و (۷/۰۲ درصد) Geraniol تشکیل می‌دهند.

جدول شماره ۲- دسته‌بندی مواد موجود در اسانس آویشن قفقازی

ترکیبات	اسانس حاصل از تقطیر با آب	اسانس حاصل از تقطیر با بخار آب
مونوترپن‌های هیدروکربنه	۶/۴۷۲ درصد	۲/۸۰۵ درصد
مونوترپن‌های اکسیژنه	۱۷/۱۰۵ درصد	۱۴/۸۶۸ درصد
سزکویی‌ترین‌های هیدروکربنه	۷/۷۰۳ درصد	۹/۷۹ درصد
سزکویی‌ترین‌های اکسیژنه	۵۹/۰۱۵ درصد	۵۸۳/۲۶ درصد
غیرترین‌ها	۹/۹۷۷ درصد	۱۴/۲۷۴ درصد

جدول شماره ۳- تعیین حداقل غلظت مهاری اسانس حاصل از تقطیر با آب و فراکسیون‌های گیاه آویشن قفقازی به روش رقیق‌سازی در آگار

میکروارگانیزم	MIC (µg/ml)				
	اسانس	فراکسیون ان- بوتانول	فراکسیون کلروفرمی	فراکسیون اتردوپترولی	سیپروفلوکساسین
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.31	0.625	2.5	1.25	0.16
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.25	0.625	5	2.5	0.16
<i>Bacillus subtilis</i>	0.16	0.625	5	1.25	0.16
<i>Escherichia coli</i>	2.5	1.25	10	5	0.16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.31	1.25	5	2.5	0.16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	>20	>20	0.31
MRS ₃	2.5	0.625	10	2.5	0.31

با بخار آب Nerolidol می‌باشد که یک سزکویی ترین اکسیژنه است و بیش از ۵۰ درصد اسانس را شامل می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهند سزکویی ترین‌های اکسیژنه عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن قفقازی می‌باشند (جدول شماره ۲).

مطالعات نشان می‌دهد ترکیبات اصلی در جنس آویشن را تیمول و کارواکرول تشکیل می‌دهند و احتمالاً اثرات ضد میکروبی به علت وجود آن‌ها می‌باشد. نکته جالب در مورد آویشن قفقازی درصد بالای نرولیدول و درصد بسیار کم تیمول و کارواکرول در اسانس این گیاه می‌باشد. با توجه به اثرات ضد میکروبی که این اسانس‌ها نشان داده، نتیجه می‌گیریم که مجموعه اجزای اسانس دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند و اثر تنها مربوط به تیمول و کارواکرول نیست.

اثر ضد میکروبی اسانس حاصل از روش تقطیر با آب و فراکسیون‌ها با استفاده از روش رقیق‌سازی در آگار در مقابل ۸ سویه باکتریایی سنجیده شد. نتایج نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی قابل توجه این اسانس‌ها و فراکسیون‌ها در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، باسیلوس سوبتیلیس، پسودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیاکلی و سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد. پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم‌ترین سویه گزارش شد. در نهایت میزان MIC در رقت‌های مختلف به دست آمد که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

ماده اصلی اسانس به دست آمده از روش تقطیر با آب و تقطیر

منابع

1. Zakaria M. Isolation and characterization of active compounds from medicinal plants. *Asia Pacific J. Pharmacol.* 1991; 6 (1): 15 - 20.
2. Mitscher LA, Drake S, Golloapudi SR and Okwute SK. A modern look at folkloric use of anti - infective agents. *J. Nat. Prod.* 1987; 50: 1025 - 40.
3. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckman J. Herbal medicine expanded commission E monographs. 1st ed. Integrative Medicine Communication. America. 2000, pp: 376 - 8.
4. Jalas J. *Thymus caucasicus* In: Rechinger KH. *Flora Iranica*. Akademische Druck und Verlagsanstalt. Austria. 1982, pp: 550 - 1.
5. Pnelope O. The Herb Society's Complete Medicinal Herbal. 1st ed. Dorling Kindosley. London. 1993, pp: 104 - 5.
6. Amelio F. Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference. 1st ed. CRC Press. London. 1999, pp: 226 - 7.
7. Weiss RF, Fintelmann V. Herbal Medicine. 2nd ed. AB Arcanum. New York. 2000, pp: 197 - 9.
8. Zeina B, Othman O, al-Assad S. Effect of Honey Versus Thyme on Rubella Virus Survival *In vitro*. *J. Altern Comp. Med.* 1996; 2 (3): 34 - 8.
9. Millis S, Bone K. Principals and Practice of Phytotherapy. 1st ed. Churchill Livingstone. New York. 2000, pp: 563 - 7.

