

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

از اطلاعات آذربایجان  
تیمب آذربایجان

دانشگاه شهید بهشتی

دانشکده علوم

گروه شیمی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ، شیمی ( شیمی آلی )

عنوان پایان نامه

جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس پنج گونه آویشن

و تعیین اثرات ضد میکروبی اسانس

دانشجو :

014693

سید اکبر میر مصطفی

استاد راهنما :

سرکار خانم دکتر مینو دبیری

014370

استاد مشاور :

سرکار خانم دکتر فاطمه سفیدکن

۳۷۹۰۳

تاریخ دفاع :

مهرماه ۱۳۷۹

۳۷۹۰۳



دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ:

شماره:

پیوست:

صورتنجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

\*\*\*\*\*

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای سید اکبر میر مصطفی رشته شیمی تحت عنوان:   
 «جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس پنج گونه آویشن و تعیین اثرات ضد میکروبی اسانس.»

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین

تلفن: ۲۹۹۰۱

که در تاریخ ۲۹/۱۱/۲۴ با حضور هیات محترم داوران در دانشگاه شهید بهشتی برگزار گردید به شرح زیر است.

قبول (با درجه: صالی امتیاز: ۱۹/۴)  دفاع مجدد  مردود

رتبه علمی	نام و نام خانوادگی	امضاء
۱- عالی (۱۸-۲۰)	۲- بسیار خوب (۱۶-۱۷/۹۹)	
۳- خوب (۱۴-۱۵/۹۹)	۴- قابل قبول (۱۲-۱۳/۹۹)	
۵- غیر قابل قبول (کمتر از ۱۲)		

۱- استاد راهنما	دکتر مینو دبیری	استاد یار
۲- استاد مشاور	دکتر فاطمه سفید کن	استاد یار
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر منصور زاهدی	دانشیار
۴- استاد ممتحن	دکتر پیمان صالحی	استاد یار
۵- استاد ممتحن	دکتر خسرو جدیدی	استاد یار

محمد مهدی طهرانچی

معاون تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم

تقدیم به:

دست‌های پینه بسته پدرم،

مادرم که دست تقدیر در پرتو خاکش کشید

و خواهر و برادران عزیزتر از جانم.

## تشکر و قدردانی

منت و سپاس فراوان خداوند مهربانی را که همواره مرا مورد لطف و کرامات بیکرانش قرار داده و توفیق کسب دانش را نصیبم کرد، حال که با استعانت آن یگانه معبود هستی موفق به طی دوره کارشناسی ارشد شده‌ام عاجزانه از او می‌خواهم که لحظه لحظه زندگیم را با هدف قرب به درگاهش توأم فرماید.

بدون شک این مجموعه حاصل راهنمایی و مساعدت اساتید و بزرگوارانی است که بدون فراهم شدن این همکاری همه جانبه، رسیدن به این نتیجه غیر ممکن بوده و به مصداق حدیث شریف «من لم یشکر مخلوق لم یشکر الخالق» برخوردارم می‌دانم که از زحمات ارزشمند استاد راهنمای عزیزم سرکار خانم دکتر مینو دبیری که تحقیق حاضر به راهنمایی ایشان صورت گرفته کمال سپاسگذاری را بنمایم.

همچنین از اساتید مشاورم، سرکار خانم دکتر فاطمه سفیدکن که مشاوره این پروژه برعهده ایشان بود، جناب آقای دکتر رسولی مدیر گروه زیست‌شناسی دانشگاه شاهد و مشاور میکروبیولوژیست این پروژه و سرکار خانم دکتر فرشته افتخار به خاطر راهنمایی‌هایشان کمال تشکر را دارم و همچنین از دکتر میرزا بخاطر طیف‌های GC-MS و مهندس برانزنده بخاطر طیف‌های GC کمال تشکر را دارم.

همچنین از عزیزانی که در این راه صمیمانه مرا همراهی نمودند، سپاس‌گزاری می‌نمایم: آقای حمید مهرکنان، خانم شمسی امانی، مهندس فروغی، آقای گلی‌پور، مهندس محمد صادق تدین، مهندس باقری، آقای حسین نامی، دکتر فرزاد بهادران، دکتر عباس جدیدی، دکتر رادمقدم، مهندس علی شیخی‌زاد، آقای امیر پازوکی، آقای مهدی تقی‌نژاد، مهندس موسوی، مهندس کیوان آقایی، مهندس محمد رضا سعادت‌فر، دکتر جایمند، دکتر جلیلی.

سید اکبر میر مصطفی

صفحه	فهرست مطالب	عنوان
۱		چکیده
۲		مقدمه
		(۱) بخش اول: جداسازی و شناسائی اسانس
۳		(۱-۱) فصل اول: مقدمه و تئوری
۴		(۱-۱-۱) آویشن
۴		(۱-۱-۱-۱) مشخصات گیاه آویشن
۴		(۱-۱-۱-۱-۱) <i>Zataria</i>
۵۱		(۲-۱-۱-۱-۱) <i>Ziziphora</i> با گونه چند ساله <i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam.
۵		(۳-۱-۱-۱-۱) جنس <i>Tymus</i>
۱۱		(۲-۱-۱) خواص دارویی گیاه آویشن ( <i>Thymus</i> )
۱۲		(۳-۱-۱-۱) سابقه تحقیق
۱۵		(۲-۱-۱) اسانس ها (Volatile oils , Essential oils)
۱۶		(۱-۲-۱-۱) مقدمه
۱۷		(۲-۲-۱-۱) وجود و میزان توزیع روغنهای فرار ( اسانس ها ) در طبیعت
۱۸		(۳-۲-۱-۱) اهمیت فیزیولوژیکی روغنهای فرار ( اسانس ) در گیاهان
۱۸		(۴-۲-۱-۱) خصوصیات فیزیکی اسانس ها
۱۹		(۵-۲-۱-۱) خصوصیات شیمیایی اسانس ها
۲۰		(۶-۲-۱-۱) بیوستنز اسانس ها
۲۱		(۳-۱-۱) روشهای استخراج روغنهای اسانسی
۲۲		(۱-۳-۱-۱) روش های تقطیر (Distillation)
۲۲		(۱-۱-۳-۱-۱) تقطیر با آب (Hydro distillation)
۲۳		(۲-۱-۳-۱-۱) تقطیر با آب و بخار آب (Water & Steam distillation)
۲۳		(۳-۱-۳-۱-۱) تقطیر با بخار آب (Steam distillation)

۲۳	۴-۱-۳-۱-۱) تقطیر در خلاء (Vaccum distillation)
۲۳	۵-۱-۳-۱-۱) تقطیر مولکولی (Molecular distillation)
۲۳	۲-۳-۱-۱) روشهای عصاره‌گیری (Extraction methods)
۲۴	۱-۲-۳-۱-۱) استخراج با حلال غیر فرار در دمای محیط (Enfleurage)
۲۴	۲-۲-۳-۱-۱) استخراج با حلال غیر فرار با استفاده از حرارت (maceration)
۲۴	۳-۲-۳-۱-۱) استخراج با استفاده از حلالهای آلی فرار
۲۴	۳-۳-۱-۱) روش فشردن (Expression)
۲۵	۱-۳-۳-۱-۱) روش اسفنجی
۲۵	۲-۳-۳-۱-۱) روش Ecuelle
۲۵	۴-۳-۱-۱) استخراج با سیال فوق بحرانی (Supercritical fluid extraction)
۲۶	۴-۱-۱) روشهای جدا سازی و شناسائی ترکیبات روغنهای اسانس
۲۶	۱-۴-۱) روش تقطیر جزء به جزء (Fractional Distillation)
۲۶	۲-۴-۱-۱) کروماتوگرافی (Cromatography)
۲۷	۱-۲-۴-۱-۱) کروماتوگرافی گازی (GC)
۲۷	۲-۲-۴-۱-۱) گاز حامل
۲۷	۳-۲-۴-۱-۱) ستونهای کروماتوگرافی
۲۸	۴-۲-۴-۱) فاز ساکن
۲۸	۵-۲-۴-۱-۱) برنامه ریزی دمائی (Programmed Temperature Gas Chromatography)
۲۸	۶-۲-۴-۱-۱) محفظه تزریق نمونه
۲۹	۷-۲-۴-۱-۱) آشکارسازها
۲۹	۸-۲-۴-۱-۱) شناسائی توسط کروماتوگرافی گازی
۳۰	۹-۲-۴-۱-۱) اندیس بازدارى کواتس (Kovats Index)
۳۱	۱۰-۲-۴-۱-۱) استفاده توأم از گاز کروماتوگراف و طیف سنج جرمی
۳۱	۱۱-۲-۴-۱-۱) طیف سنج جرمی
۳۲	۱۲-۲-۴-۱-۱) کروماتوگرافی ستونی تحت فشار (Flash column chromatography (FCC)

۳۳	۲-۱) فصل دوم: خصوصیات و کاربرد تعدادی از ترکیبات شناسائی شده
۳۵	۱-۲-۱) کارواکرول ( Carvacrol )
۳۶	۲-۲-۱) تیمول (Thymol)
۳۷	۳-۲-۱) آلفا - توجن ( $\alpha$ - Thujene )
۳۸	۴-۲-۱) آلفا - پینن ( $\alpha$ - pinene )
۳۹	۵-۲-۱) کامفن ( Camphene )
۴۰	۶-۲-۱) سابینن ( Sabinene )
۴۱	۷-۲-۱) بتا - پینن ( $\beta$ - Pinene )
۴۲	۸-۲-۱) پاراسیمن ( p-Cymene )
۴۳	۹-۲-۱) آلفا - ترپینن ( $\alpha$ - Terpinene )
۴۴	۱۰-۲-۱) ترپینن - ۴ - ال ( Terpinene - 4 - ol )
۴۵	۱۱-۲-۱) کامفر ( Camphor )
۴۶	۱۲-۲-۱) بورنئول ( Borneol )
۴۶	۱۳-۲-۱) آلفا - ترپینئول ( $\alpha$ - Terpineol )
۴۷	۱۴-۲-۱) لیمونن ( Limonene )
۴۸	۱۵-۲-۱) او ۸ - سینئول ( 1,8 - Cineole )
۴۹	۱۶-۲-۱) (E) - بتا - اوسیمن [ (E) - $\beta$ - Ocimene ]
۵۰	۱۷-۲-۱) گاما - ترپینن ( $\gamma$ - Terpinene )
۵۱	۱۸-۲-۱) لینالول ( Linalool )
۵۲	۱۹-۲-۱) ترپینولن ( Terpinolene )
۵۳	۲۰-۲-۱) ترانس - سابینن هیدرات ( trance - Sabinene hydrate )
۵۴	۲۱-۲-۱) ژرمکرن - دی ( Germacrene - D )
۵۵	۲۲-۲-۱) بتا - بوربونن ( $\beta$ - Bourbonene )
۵۶	۲۳-۲-۱) گاما - کادینن ( $\gamma$ - Cadinen )
۵۷	۳-۱) فصل سوم: روش کار و آنالیز طیف‌های GC - MS



۵۸	۱-۳-۱) منابع گیاهی مورد استفاده
۵۹	۲-۳-۱) آماده سازی نمونه‌های گیاهی
۵۹	۳-۳-۱) روش استخراج اسانس
۶۰	۴-۳-۱) تعیین مقدار بازده اسانس
۶۰	۵-۳-۱) تعیین درصد رطوبت
۶۱	۶-۳-۱) شناسائی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس
۶۲	۷-۳-۱) آنالیز طیف‌های GC و GC/MS
۷۸	۴-۱) فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری
	۲) بخش دوم: بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس
۸۴	۱-۲) فصل اول: مقدمه و تئوری
۸۵	۱-۱-۲) مقدمه
۸۵	۲-۱-۲) سابقه مختصری از بررسی تاثیرات ضد میکروبی اسانس‌ها و اهداف تحقیق
۸۷	۳-۱-۲) اهداف تحقیق
۸۸	۴-۱-۲) معرفی باکتریهای مورد استفاده (سویه های میکروبی)
۸۹	۱-۴-۱-۲) استافیلوکوک ( <i>Staphylococcus</i> )
۸۹	۲-۴-۱-۲) سودوموناس آئروجینوزا ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )
۹۰	۳-۴-۱-۲) آنتروباکتریاسه
۹۱	۱-۳-۴-۱-۲) اشریشیا کلی ( <i>Escherichia coli</i> )
۹۱	۲-۳-۴-۱-۲) کلبسیلا پنومی ( <i>Klebsiella pneumonia</i> )
۹۲	۴-۴-۱-۲) باسیلوس سوبتیلیس ( <i>Bacillus subtilis</i> )
۹۳	۵-۱-۲) روش‌های بررسی اثرات ضد میکروبی
۹۵	۲-۲) فصل دوم: روش کار و آنالیز نتایج
۹۵	۱-۲-۲) مواد مصرفی
۹۵	۲-۲-۲) وسایل مورد استفاده

۹۵	۳-۲-۲ سوبه‌های میکروبی
۹۶	۴-۲-۲ نگهداری نمونه‌های اسانس
۹۷	۵-۲-۲ روش بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های مورد مطالعه
۹۷	۱-۵-۲-۲ روش دیسک پلیت
۹۸	۲-۵-۲-۲ روش رقت لوله ای
۹۸	۶-۲-۲ آزمایش تاثیر حلال‌ها بر میکرو ارگانسیم‌ها
۹۹	۷-۲-۲ تهیه رقت‌های مختلف اسانس‌ها
۹۹	۸-۲-۲ گروه شاهد
۹۹	۹-۲-۲ روش آماری برای بررسی نتایج
۱۰۰	۳-۲ فصل سوم: جداول و نمودارها
۱۱۸	۴-۲ فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری
۱۲۴	۳ بخش سوم: منابع و پیوست‌ها
۱۲۵	۱-۳ منابع
۱۳۲	۲-۳ پیوست‌ها

## چکیده

در این طرح استخراج و جداسازی اسانس پنج گونه آویشن (*Thymus*) و بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس ابتدا پنج نوع گیاه آویشن (*Thymus*) در دو مرحله قبل از گلدهی و گلدهی کامل، از مناطق مختلف رویشگاهی خودجمع آوری شده و سپس اسانس (Essential Oil) این گیاهان به روش تقطیر با بخار آب جداسازی گردید.

لازم به ذکر است که سه گونه از این گیاهان (*T. persicus*, *T. kotschyanus*, *T. pubescens*) مختص طبیعت ایران بوده و از مناطق مختلف ایران جمع آوری گردید و دو گونه دیگر (*T. serpyllum*, *T. carnosus*) خارجی می باشد که به طور آزمایشی در باغ گیاه شناسی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کاشته شده است.

آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس حاصل توسط دستگاه GC MS صورت گرفت که نتایج آن وجود درصد بالائی از ترکیبات ضد میکروبی مثل تیمول و کارواکرول را در اسانس این گیاهان نشان می داد.

در مرحله دوم کار برای مطالعه اثرات ضد میکروبی از دو روش انتشار (Diffusion Test) و رقت (Dilution Test) استفاده شد که از میان روشهای انتشار از روش دیسک پلیت و از میان روشهای رقت از روش رقت لوله ای استفاده شد.

بررسی اثرات ضد میکروبی این اسانس ها بر روی پنج نوع باکتری بیماری زا صورت گرفت که نتایج حاصل نشان از قدرت مهارکنندگی و میکروب کشی بالای این ترکیبات داشت.

در نقل قدما آمده است که " خداوند هیچ قوم و ملتی را نیافرید، مگر اینکه درمان دردهای آنها را در رستنی‌ها و گیاهان اطراف آنها خلق کرده باشد " .

کشور ایران سرزمینی است که به لحاظ وجود گیاهان مختلف رشد یافته در آن به عنوان "جهانی در یک مرز" یاد می‌شود.

گیاهان دارویی و مشتقات آنها امروزه ۲۰٪ تجویزات دارویی در کشورهای صنعتی پیشرفته و ۸۰٪ در کشورهای در حال توسعه را به خود اختصاص می‌دهد. {۷}

از آنجایی که گیاهان مفید دارویی در کشور ما فراوان می‌روید، بررسی ترکیبات موثره این گیاهان می‌تواند گامی مثبت در شناسایی و استفاده بهینه از این ثروت ملی با ارزش باشد .

همچنین عفونت‌های میکروبی تهدید جدی برای سلامتی انسان‌ها بوده و در طول تاریخ همواره باعث به مخاطره افتادن جان افراد شده است. لذا انسان همواره به دنبال مواد و داروهائی بوده که باعث بهبود بیماری و کاهش اثرات آن شود. در همین راستا استفاده از داروهای گیاهی از دیرباز مورد توجه بوده و به طور سنتی در بین اقوام و ملل مختلف دیده می‌شود.

شناخت و مطالعه علمی بر روی ترکیبات موجود در گیاهان و بررسی چگونگی تاثیر این مواد بر روی میکروب‌ها و باکتری‌ها می‌تواند کمک شایانی به استفاده صحیح از این ترکیبات و مصرف درست و بجای آنها برای درمان امراض و بیماری‌ها نماید .

# بخش اول

جداسازی و شناسایی

اسانس

اوپین

## ۱-۱-۱) آویشن

آویشن نامی آشنا برای همه است . گیاه‌شناسان و یا افرادی که به نحوی با گیاهان در ارتباط هستند و یا افرادی عادی به دلیل موارد مصرف این گیاه در زندگی روزمره با آن آشنا هستند . گیاهی است که به فارسی «آویشن» و در کتب سنتی با نامهای (حاشا) و (اوشن) نام برده شده است . در مناطق مختلف ایران با اسامی با اسامی محلی مختلفی شناخته می‌شود از جمله در همدان آن را ، آذربه ، در اطراف تهران ، آویشن ، در آذربایجان و مناطق ترکی زبان کلکیک اوتی ، یا کالکه اوتی و در سایر مناطق اشمه کوهی ، سی سنبرو سوسنبر نامیده میشود . گیاهی است از خانواده نعنا یا *Labiatae* که شامل سه جنس مختلف از این خانواده به شرح زیر می باشد .

۱- جنس *Zataria* و ۲- جنس *Ziziphora* و ۳- جنس *Thymus*

### ۱-۱-۱-۱) مشخصات گیاه آویشن.

در مورد هر یک از این سه جنس توضیحاتی ارائه می‌کنیم که شامل مشخصات تاکسونومیکی ، پراکنندگی جغرافیایی و تعداد گونه‌هاست .

### ۱-۱-۱-۱-۱) *Zataria*

که دارای گونه‌ای به نام *Zataria multiflora* Boiss است . این گیاه در جنوب ایران تحت نام آویشن شیرازی یا آویشن برگ پهن شناخته شده است و درختچه‌ای است کوچک با برگ‌های کوچک تقریباً گرد که در سطح پوشیده از تعداد زیادی غده ترش‌حی است . ساقه‌ها تقریباً سفید رنگ هستند . کاسه گل تخم مرغی لوله ای ، دارای پنج دندانه مساوی کوچک و به طول حدود  $2\text{ mm}$  است . مجموعه گل‌ها به صورت برجستگی‌های کروی در محور برگ‌ها قرار دارند و گاهی نیز مجموعه‌ها به هم نزدیک شده حالت گل آذین سنبله را پیدا می‌کنند . این گیاه پراکنندگی محدودی در جهان دارد و منحصرأ در ایران ، افغانستان و پاکستان می‌روید . پراکنندگی آن در ایران نیز محدود به مناطق اصفهان ، فارس ، کرمان ، بندرعباس ، بلوچستان و خراسان است . شکل (۱-۱-۱)