دانشگاه آزاد اسلامی

واحد مرودشت

دانشکده علوم پایه-گروه شیمی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد.M.Sc

گرایش شیمی آلی

عنوان:

جداسازی و شناسایی ترکیبات فرار گیاه انجدان رومی

استاد راهنما :

دکتر محمد مهدی قنبری

استاد مشاور:

دکتر سهیلا قسامی پور

نگارش:

سید شهرام مصاحب

تابستان ۱۳۹۳

سپاس بیکران به درگاه ایزد یکتا

او که قطره ای از اقیانوس بیکران علم را بر من عنایت فرمود تا پیوسته مشتاق بهره گیری از قطره های دیگر باشم. بار الها، هدایت و راهنمایی خود را بر من بیفزا که بوسیله آن به توفیق در آنچه موافق رضای تو است، برسم.

سپاسگذار کسانی هستم که سرآغاز تولد منند...

از یکی زاده می شوم و با دیگری جاودانه...

پدر و مادری که تار مویی از آن ها به پای من سیاه نماند...

و استادی که سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشت...

با تشکر فراوان از استاد ارجمند جناب آقای دکتر قنبری و سرکار خانم دکتر قسامی پور واساتید محترم گروه شیمی دکترمهدوی نیا، دکترفدوی و دکتر زارع که افتخار شاگردیشان را به همراه دارم.

هدیه کوچکم را تقدیم می کنم به بزرگان زندگیم

همسر و فرزندانم رضا و رهام

که وجودشان شادی بخش لحظاتم است

وتقدیم به

تمامی آنان که دوستشان می دارم

چکیده

انجدان رومی گیاهی چند ساله از تیره چتریان می‌باشد که در بسیاری از کشورهای دنیا به منظور استفاده از مواد موثره آن جهت معالجه بیماری سنگ کلیه و مجاری ادرار به طور وسیع کشت می‌شود. به‌منظور بررسی اسانس موجود در میوه این گیاه، این آزمایش با گیاهان کشت شده در شهر شیراز انجام شد. نمونه‌های میوه در مرحله رسیدگی کامل جمع‌آوری شدند و پس از خشک‌شدن در سایه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، استخراج اسانس به روش تقطیر با آب (دستگاه کلونجر) به مدت سه ساعت انجام گردید. بازده متوسط تولید اسانس ٤ درصد حجمی – وزنی تعیین گردید. جهت شناسایی اجزای اسانس، از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل شده به طیف سنج جرمی استفاده گردید. نتایج آنالیز اسانس‌ها نشان داد که ۱۷ ترکیب فرار در میوه این گیاه وجود دارد که از بین آن‌ها، آلفاپینن با ۲۳/۷۰ درصد، بیشترین و ترکیب‌های هومولن و میلتایل –٤(۱۲)–ان با ۰/۹٦ درصد، کمترین ماده موجود در این گیاه بودند. در ادامه پژوهش خواص ضد باکتریایی این اسانس مورد مطالعه قرار گرفت. کمینه غلظت بازداری برای این اسانس در مقابل میکروارگانیسم‌های *B. subtilis* و *E. coli* به ترتیب برابر ٤/۵ و ۱۵/۵ مشاهده شد.

فهرست مطالب

صفحه

فهرست جدول ها ..... د

فهرست شکل ها ..... ه

علایم اختصاری ..... و

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- هدف تحقیق ۴

۱-۳- پیشینه تحقیق ۴

۱-۳-۱- خصوصیت های اسانس ها ۵

۱-۳-۲- شیمی اسانس ها ۵

۱-۳-۳- ترپنوییدها ۹

۱-۴- روش تقطیر جهت اسانس گیری ۹

۱-۵- اصول کلی رده بندی گیاهان ۹

۱-۶- معرفی تیره چتریان ۱۰

۱-۶-۱- معرفی گیاه انجدان رومی ۱۲

۱-۶-۱-۱- شرح گیاه ۱۲

۱-۶-۱-۲- نیاز اکولوژیکی ۱۳

۱-۶-۱-۳- پراکندگی جغرافیایی ۱۶

۱-۶-۱-۴- آماده سازی خاک ۱۶

۱-۶-۱-۵- کاشت ۱۶

۱-۶-۱-۶- داشت ۱۷

۱-۶-۱-۷- برداشت ۱۷

۱-۶-۱-۸- شناسنامه علمی گیاه ۱۸

۱-۶-۲- جایگاه گیاه انجدان رومی در درمان بیماری ها ۱۹

۱-۷- مروری بر تحقیق های انجام شده در زمینه گیاه انجدان رومی ۱۹

۱-۸- خواص ضد باکتریایی گیاه انجدان رومی ۲۲

۱-۸-۱- عوامل مهم در ارزیابی ۲۲

۱-۸-۱-۱- میکروارگانیسم‌ها ۲۲
۱-۸-۱-۲- خلوص و سن کشت میکروبی ۲۳
۱-۸-۱-۳- مقدار میکروب ۲۴
۱-۸-۱-۴- شرایط گرم خانه گذاری ۲۴
۱-۸-۱-۵- نمونه آزمایشی ۲۴
۱-۸-۱-۶- محیط کشت ۲۵
۱-۸-۲- روش‌های ارزیابی ترکیب های ضدمیکروبی ۲۵
۱-۸-۲-۱- روش‌های انتشار ۲۵
۱-۸-۳- روش‌های ترقیق در محیط کشت ۲۸
۱-۸-۳-۱- ترقیق در محیط کشت جامد ۲۸
۱-۸-۳-۲- ترقیق در محیط کشت مایع ۲۹
۱-۹- روش های کروماتوگرافی ۲۹
۱-۹-۱- ستون کروماتوگرافی جذب سطحی ۳۲
۱-۹-۲- کروماتوگرافی تبادل یونی ۳۳
۱-۹-۲-۱- کروماتوگرافی نمک زنی ۳۳
۱-۹-۳- کروماتوگرافی ژلی ۳۴
۱-۹-۴- کروماتوگرافی تقسیمی ۳۵
۱-۹-۴-۱- کروماتوگرافی کاغذی ۳۵
۱-۹-۵- کروماتوگرافی ستون مویین ۳۶
۱-۹-۶- کروماتوگرافی گازی ۳۶
۱-۹-۶-۱- جداسازی در کروماتوگرافی گازی ۳۷
۱-۹-۶-۲- کروماتوگرافی گازی با طیف سنجی جرمی ۳۸
۲-۱- مواد ۴۰
۲-۲- دستگاه ها ۴۰
۲-۳- تهیه و آماده سازی نمونه گیاهی ۴۰
۲-۴- جداسازی ترکیب های فرار در گیاه ۴۱
۲-۵- تست آنتی باکتریال ۴۵

۲-۵-۱- سترون کردن مواد و وسایل ۴۵
۲-۵-۲- تهیه سوسپانسیون‌های باکتریایی با غلظت مشخص ۴۵
۲-۵-۳- بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس های گیاهی ۴۶
۲-۵-۳-۱- غربالگری اثر ضدباکتریایی ۴۶
۲-۵-۳-۲- تعیین حداقل غلظت مهاری رشد باکتری ۴۷
۳-۱- جداسازی ترکیب های فرار در میوه گیاه انجدان رومی به روش کلونجر ۵۱
۳-۱-۱- معرفی ترکیب های فرار موجود در میوه گیاه انجدان رومی ۵۲
۳-۲- بررسی اثر ضد باکتریایی ۶۶
منابع ۶۷

فهرست جدول ها

صفحه

فصل اول

جدول ۱- ۱: ترکیب های شیمیایی مختلف در اسانس ها ۷
جدول ۱- ۲: مشخصات علمی گیاه انجدان رومی ۱۸
جدول ۱- ۳: درصد ترکیب های جداشده به دو روش کلونجر و سیال فوق بحرانی ۲۰
جدول ۱- ۴: درصد ترکیبات جداشده در مراحل مختلف رشد گیاه ۲۱
جدول ۱- ۵: درصد ترکیبات جداشده از گیاه انجدان رومی در مراحل مختلف رشد ۲۱

فصل دوم

جدول ۲- ۱: نتایج مربوط به جداسازی ترکیب های موجود در میوه گیاه انجدان رومی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی. ۴۲
جدول ۲- ۲: قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های آزمایشی(بر حسب میلی‌متر)، ناشی از اسانس گیاه به روش دیسک پلیت(دفعات تکرار= ۲ بار) ۴۹
جدول ۲- ۳: نتایج بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس ۴۹

فهرست شکل ها

صفحه

فصل اول

شکل ۱- ۱: تصویر گیاه انجدان رومی ۱۴
شکل ۱- ۲: جایگاه رده بندی گیاه انجدان رومی در بین بقیه گیاهان ۱۵

فصل دوم

شکل ۲- ۱: کرماتوگرام به دست آمده از اسانس ۴۱
شکل ۲- ۲: درصد ترکیب های موجود در نمونه بر اساس شماره پیک ۴۳
شکل ۲- ۳: درصد ترکیب های موجود در نمونه بر اساس نام هر ترکیب ۴۴

فصل سوم

شکل ۳- ۱: ساختار مولکولی و طیف جرمی آلفا پینن..... ۵۳
شکل ۳- ۲: ساختار مولکولی و طیف جرمی بتا پینن ۵۳
شکل ۳- ۳: ساختار مولکولی و طیف جرمی میرسن ۵۴
شکل ۳- ۴: ساختار مولکولی و طیف جرمی سیمن ۵۵
شکل ۳- ۵: ساختار مولکولی و طیف جرمی هومولن..... ۵۶
شکل ۳- ۶: ساختار مولکولی و طیف جرمی اوسیمن ۵۷
شکل ۳- ۷: ساختار مولکولی و طیف جرمی فنیل آزاریدین کربوکسیلات ۵۸
شکل ۳- ۸: ساختار مولکولی و طیف جرمی میلتایل-۴(۱۲)-ان ۵۹
شکل ۳- ۹: ساختار مولکولی و طیف جرمی دی هیدروآگاروفوران ۶۰
شکل ۳- ۱۰: ساختار مولکولی و طیف جرمی گایول ۶۱
شکل ۳- ۱۱: ساختار مولکولی و طیف جرمی بتا ادزمول ۶۲
شکل ۳- ۱۲: ساختار مولکولی و طیف جرمی گاما ادزمول..... ۶۲
شکل ۳- ۱۳: ساختار مولکولی و طیف جرمی ارمولیجنول ۶۳
شکل ۳- ۱۴: ساختار مولکولی و طیف جرمی ادزمول ۶۳
شکل ۳- ۱۵: ساختار مولکولی و طیف جرمی والریانول ۶۴

علایم اختصاری

GC: Gas Chromatography

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectroscopy

FT-IR: Fourier Transform Infrared

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

TLC: Thin Layer Chromatography

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MHB : Mueller-Hinton Agar

SCDA: Soybean-Casein Digest Agar

مقدمه

فصل اول

۱-۱- مقدمه

خدای متعال را شاکریم که داروی هر بیماری را قبل از وقوع آن آفریده است تا انسان با تفکر و تعقل و تحقیق، آن روش‌های درمانی را کشف کند. ماموریت اصلی دانش پزشکی، بکارگیری هر روش درمانی است که بتواند به هر مقدار از آلام و دردهای بیماری بکاهد. در چند دهه‌ی اخیر که پزشکی نو متولد شده و در سایه فناوری به دستاوردهای عظیم و شگرف نایل آمده است، توانسته بسیاری از امراض را که قربانی‌های زیادی از بشر گرفته، درمان و بعضی را ریشه کن کند و ما هر روز شاهد تکامل بیشتر این روش‌های درمانی نو هستیم.

فناوری با این همه خدمات خود، عوارضی را نیز به بیماران تحمیل کرده است و همین عوارض، پزشکان و دانشمندان را به فکر استفاده از روش‌های درمانی سنتی که در سایه پزشکی جدید کم‌رنگ شده بود و می‌رفت که به کلی فراموش شود، انداخته است.

تاریخ پیشینیان نشان می‌دهد که بابلی‌ها و مصریان قدیم در ۵۵۰ سال قبل از میلاد مسیح از اثرات دارویی تعدادی از گیاهان دارویی با اطلاع بوده و در طول تاریخ، دانشمندان صاحب نام بسیاری همچون بقراط، ارسطو، جالینوس و غیره خدمات شایانی به تاریخ طبیعی نموده‌اند. سرزمین دانش‌پرور ایران نیز دارای فرهنگ پزشکی و درمانی بسیار غنی بوده و دانشمندان بلند پایه آن همچون شیخ‌الریس ابوعلی سینا،

محمدبن‌زکریای رازی، علی‌بن عباس مجوزی، ابومنصور موفق هروی، سیداسماعیل جرجانی و حکیم مومن و غیره، قرن‌های متمادی علوم پزشکی و دارویی جهان را مورد تایید قرار داده‌اند و آثار آن‌ها مورد تدریس و تحقیق بزرگترین مراکز علمی جهان بوده است.

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی، خصوصا گیاهان دارویی، اساس و حتی در برخی موارد تنها راه درمان محسوب می‌شدند و مواد اولیه حاصل از گیاهان نیز در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. درسال های اخیر، پیشرفت علم شیمی و کشف سیستم‌های پیچیده سنتز آلی منجر به توسعه صنعت داروسازی شد و جایگزین شیمی درمانی گردید. البته به دلیل مشکلات به وجود آمده مانند: مشاهده عوارض جانبی خطرناک، بروز مقاومت‌ها، حساسیت‌ها و اثرات تحریکی، اهمیت گیاهان دارویی مجددا مورد توجه قرار گرفته است. (آئینه چی، ی. ۱۳۷۰)

امروزه ضمن گسترش روز افزون تحقیقات در زمینه داروهای گیاهی، تجویز و کاربرد آن‌ها روز به روز در کشورهای مختلف جهان رو به افزایش است. علت عمده این توجه آن است که گیاهان از قرن‌های پیش مورد مصرف دارویی بوده‌اند و اثرات درمانی و بی ضرر بودن آن‌ها در طول سالیان متمادی تجربه شده و به اثبات رسیده است. از طرف دیگر اهمیت گیاهان در این است که همراه با مواد موثره اصلی، مواد دیگری نیز در آن‌ها وجود دارد که در بیشتر موارد اثر درمانی گیاه را تشدید نموده و حتی در بسیاری موارد، از سمیت و اثرات ناخواسته آن جلوگیری می‌نماید. از این رو، امتیاز قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند. (آئینه چی، ی. ۱۳۷۰)

۱-۲- هدف تحقیق

الف- بررسی ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه انجدان رومی تهیه شده به روش تقطیر با آب (کلونجر).

ب- جمع‌آوری میوه گیاه انجدان رومی.

ج- اسانس‌گیری از نمونه میوه گیاه به روش تقطیر باآب.

د- بررسی و یافتن ترکیب های موجود در اسانس‌ها به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی[1]

ه- تعیین حداقل غلظت مهاری رشد باکتری‌ها برای اسانس.

۱-۳- پیشینه تحقیق

اسانس‌ها مایع‌هایی فرار، معطر و بی‌رنگ با منشا ترپنی، الکلی و غیره می‌باشند (Sertel et al., 2011). اسانس‌ها مخلوطی از مواد مختلف با ترکیب‌های شیمیایی بسیار متفاوت از یکدیگر بوده که باعث بوی خوش یا مزه در گیاه می‌شوند. اسانس‌ها در بسیاری از گیاهان وجود دارند که از مهمترین تیره‌های دارای اسانس می‌توان به تیره های نعناییان، چتریان، کاج، برگ‌بو، و بعضی از گیاهان خانواده روزاسه، کاسنی و غیره اشاره کرد. اسانس‌ها در برخی بافت‌های گیاهی مانند: مرکز سلول یا در محل ذخیره اسانس زیر پوشش کرکی، غده‌های کوچک یا در فضای میان سلولی جمع می‌شوند. به عنوان مثال در گیاهان خانوده نعناییان اسانس‌ها در تارهای ترشح‌کننده، در خانواده روزاسه به ویژه گل سرخ در گل‌برگ‌ها، در تیره کاج در مجرا های لیزیژن و شیزوژن و در تیره فلفل در سلول‌های پارانشیمی وجود دارند. (زرگری، ع. ۱۳۷۵)

[1] GC-Mass

۱-۳-۱- خصوصیت‌های اسانس‌ها

بو، و طعم این مواد بی‌نهایت متفاوت است و این به علت وجود ترکیب‌های ویژه در این گیاهان می‌باشد. آن‌ها دارای طعم‌های شیرین، تلخ، ملایم، گس ، تند و سوزاننده می‌باشند.

روغن‌های معطر فاقد ترکیب‌های اسیدهای چرب هستند در حالی که روغن‌های ثابت و معمولی در ساختمان خود حاوی استرهای گلیسرین و اسیدهای‌چرب می‌باشند. این روغن‌ها بر خلاف روغن‌های معمولی بر روی کاغذ یا پارچه لکه بر جای نمی‌گذارند. روغن‌های معطر بر خلاف روغن‌های معمولی قابل تقطیر می‌باشند و در مجاورت هوا اکسید می‌شوند. (رابینسون، ت. ۱۳۶۳)

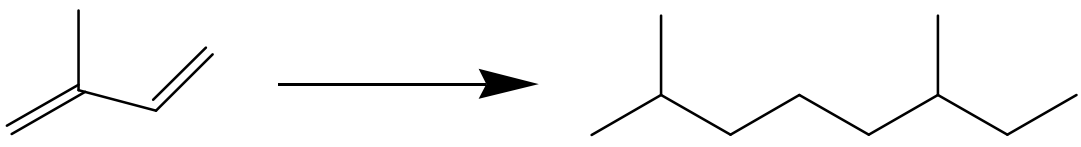
۱-۳-۲- شیمی اسانس‌ها

اسانس‌ها با توجه به ترکیب‌های شیمیایی که دارند به چند گروه طبقه‌بندی می‌شود:

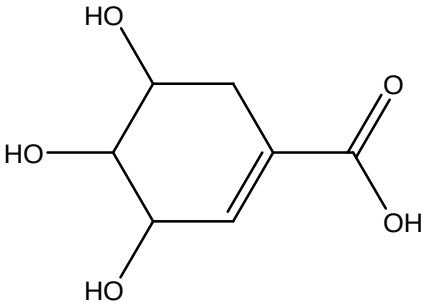
هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، آلدییدها، کتون‌ها، استرها، فنل‌ها، اترهای فنلی، اکسیدها، پراکسیدها و ترکیب‌های ازت‌دار.

ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌ها را ممکن است بر اساس مبدا بیوسنتز آن‌ها به دو طبقه تقسیم نمود:

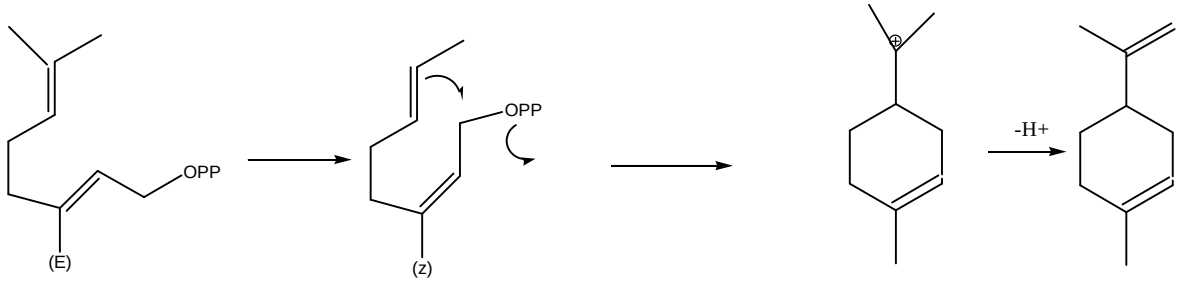
۱- مشتقات ترپن‌ها، که از طریقه واکنش استات- اسید موالیک به وجود می‌آیند. ترپن‌ها هیدروکربن-هایی هستند که قسمت عمده ساختمان شیمیایی اسانس‌ها را تشکیل داده اند، واژه ترپن از یک کلمه آلمانی به معنی تربانتین مشتق شده است ودارای فرمول مولکولی $C_{۱۰}H_{۱۶}$ می باشد.



۲- ترکیب‌های عطری که از طریق اسیدشیکمیک[1] و فنیل پروپانویید ساخته می‌شوند. هیدروکربن‌های معطر شامل مونوترپن‌ها، سزکویی‌ترپن‌ها و دی‌ترپن‌های غیراکسیژنه می‌باشند.



الف – مونوترپن‌ها به فرمول $C_{۱۰}H_{۱۶}$ ترکیب‌هایی که دارای ۱۰ اتم کربن می‌باشند و به صورت خطی یا حلقوی وجود دارند و جسم اولیه به وجود آمده ژرانیل پیروفسفات است که با توجه به نوع گیاه می‌تواند به اقسام مختلف ترکیب‌های ترپنی تبدیل شود، به عنوان مثال لیمونن.



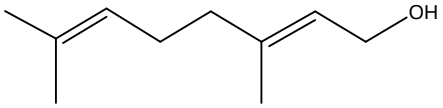
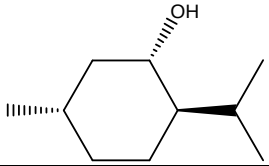
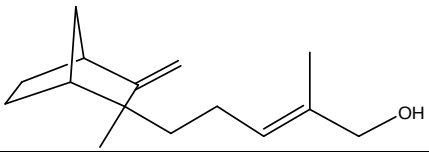
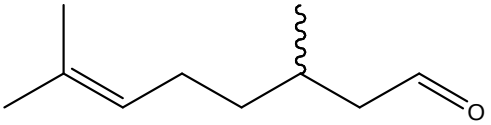
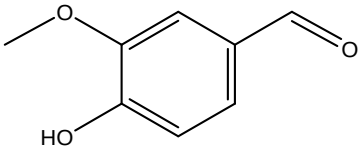
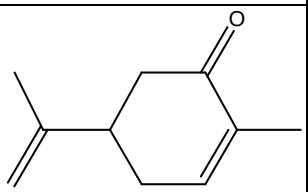
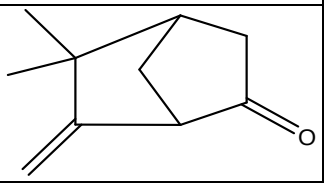
ب – سزکویی‌ترپن‌ها به فرمول $C_{۱۵}H_{۲۴}$ ترکیب‌هایی که دارای ۱۵ اتم کربن می‌باشند و از ترکیب ژرانیل پیروفسفات و ملکول ۵ کربنی مانند ایزوپنتیل پیروفسفات بوجود می‌آیند. سزکویی‌ترپن‌ها می‌توانند به صورت خطی و یا حلقوی باشند مانند کادینن در اسانس کوکب. سزکویی‌ترپن‌ها در اکثر مواقع تلخ مزه می‌باشند. سزکویی‌ترپن لاکتون‌ها ترکیب‌های دیگری هستند که در گیاهان خانواده کمپوزیت‌ها مثل گل‌مینا یافت می‌شوند و در بیشتر موارد دارای خاصیت درمانی ضدتومور هستند.

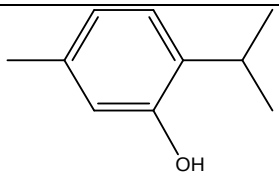
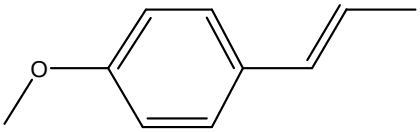
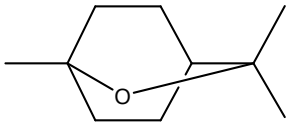
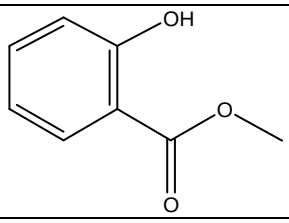
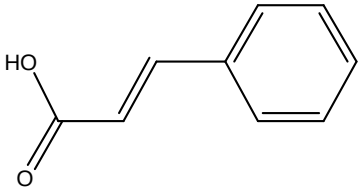
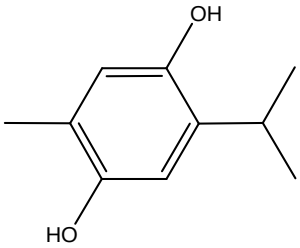
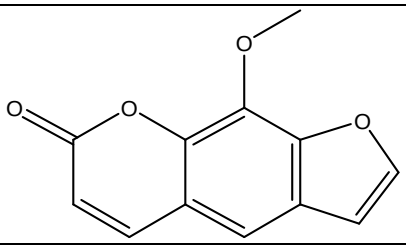
[1] Shikimic acid

ج – دی‌ترپن‌ها به فرمول$C_{۲۰}.H_{۳۲}$ که دارای ۲۰ اتم کربن می‌باشند که ممکن است خطی و یا یک، دو و سه حلقه‌ای باشند، مانند آلفا- کامفورن در اسانس کامفور. (رابینسون، ت. ۱۳۶۳)

اسانس‌ها مخلوطی از ترکیب‌های مختلف می‌باشند که با یکدیگر تفاوت بسیاری دارند. این ترکیب‌ها در گیاهان مختلف در(جدول۱-۱) آمده است.

جدول ۱- ۱: ترکیب های شیمیایی مختلف در اسانس ها

خانواده	مثال	ساختار
الکلی	الکل‌های غیر حلقوی مانند ژرانیول در اسانس گلسرخ	
	الکل‌های ترپنی مانند منتول در اسانس نعناع فلفلی	
	الکل‌های سزکویی ترپن مانند سانتالول در اسانس چوب صندلی	
آلدهیدی	آلدهیدهای خطی سیترونلال موجود در اسانس اکالیپتوس	
	آلدهیدی عطر مانند وانیلین در اسانس حاصل از وانیل	
کتونی	کتون‌های ترپنی یک حلقه کاروون در اسانس پونه سنبله ای ورازیانه	
	کتون‌های دو حلقه‌ای کامفنون در اسانس کامفر	

فنلی	تیمول در اسانس آویشن	
اترهای فنلی	آنتول در رازیانه	
اکسیدی	۸،۱ - سینیول موجود در اوکالیپتوس	
استری	متیل سالیسسیلات در اسانس وینترگرین	
اسیدی	اسید سینامیک در بالسام پرو	
کیتون ها	تیمو هیدروکینون در اسانس دانه زیره	
لاکتون ها، کومارین ها و کومارون ها	گزانتوتوکسین در اسانس آلنجلیکا	

۱-۳-۳- ترپنوییدها

تعداد زیادی از ترکیب‌های موجود در گیاهان را تحت نام ترپنوییدها می‌نامند و این واژه مبین ترکیب‌هایی است که منشا بیوستنزی آن‌ها یکسان می‌باشد. اسکلت کربنی ترپن‌ها شامل واحدهای ساختمانی تکراری از ترکیب‌های پنج کربنی به نام ایزوپرن(C_5H_8) است.

۱-٤- روش تقطیر جهت اسانس گیری

روش استخراج اسانس با توجه به گونه و اندام گیاه ونوع ماده موثره و سرانجام درجه خلوص محصول نهایی در نظر گرفته می‌شود. معمولا اسانس‌ها را با استفاده از روش تقطیر از گیاهان تهیه می‌کنند ولی اخیرا علاوه بر روش تقطیر روش‌های دیگری مانند استخراج با حلال نیز بکار برده می‌شود.

۱-۵- اصول کلی رده‌بندی گیاهان

به طور کلی گیاهان روی زمین به ٤ گروه بزرگ که به اصطلاح شاخه‌های گیاهی نام گرفته‌اند، تقسیم می‌شوند، که عبارتند از:

۱- ریسه‌داران[1]

۲- خزه‌ای‌ها[2]

۳- نهانزادان آوندی[3]

٤- پیدازادان[4]

[1] Thallophyta
[2] Bryophyta
[3] Pteridophyta
[۳] Spermatophyta
[٤] Apiaceae