



مقاله پژوهشی

بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال اسانس گیاه دارویی پنیرک (*Malva sylvestris*) جمع‌آوری شده از مشکین شهر بر روی باکتری‌های شایع عفونت دهانی و مقایسه آن با دهان‌شویه کلرهگزیدینحجت اقبال^۱، آرزو محمدی^۲، نیما محمدنژاد خیاوی^{۳*}، ندا جهانی^۴

۱- گروه فیتوشیمی، مرکز تحقیقات علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴- بخش تحقیق و توسعه، شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز، مشکین شهر، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۱۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۷/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: پنیرک بانام علمی *Malva sylvestris*، یکی از مهم‌ترین گیاهان مورد استفاده در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی در بیشتر کشورهای در حال توسعه بوده که دارای خاصیت ضد عفونی‌کنندگی است؛ بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس گیاه دارویی پنیرک (*Malva sylvestris*) جمع‌آوری شده از مشکین شهر و خاصیت آنتی‌باکتریال آن در مقایسه با دهان‌شویه کلرهگزیدین بر روی باکتری‌های شایع عفونت دهانی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق گیاه دارویی پنیرک از منطقه انزان مشکین شهر واقع در شمال غرب ایران جمع‌آوری گردید. اسانس گیری توسط دستگاه کلونجر انجام و جهت تجزیه نمونه‌های اسانس و اندازه‌گیری دقیق ترکیبات از دستگاه‌های GC/MS و GC استفاده شد. سپس تأثیر اسانس پنیرک بر باکتری‌های شایع عفونت دهانی به دو روش بررسی قطر هاله عدم رشد (Disk diffusion) و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) انجام شد.

نتایج: نتایج حاصل از آزمایش‌های ضد میکروبی اسانس گیاه دارویی پنیرک نشان داد که این گیاه، دارای اثرات مهارکنندگی قابل توجهی بر روی انواع باکتری‌های گرم منفی و مثبت است. همچنین در مقایسه قطر هاله عدم رشد پنیرک با کلرهگزین، مشخص شد که اسانس گیاه دارویی پنیرک نتایج نسبتاً مشابهی را نسبت به دهان‌شویه کلرهگزین از خود نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: طبق یافته‌ها اسانس گیاه دارویی پنیرک آثار ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری‌های شایع عفونت دهانی دارد. در نتیجه اسانس این گیاه با غلظت‌های مختلف، پس از انجام مطالعات تکمیل‌تر می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروها و دهان‌شویه‌های شیمیایی در درمان باکتری‌های شایع عفونت دهانی باشد.

کلمات کلیدی: پنیرک، آنتی‌باکتریال، عفونت دهانی، کلرهگزیدین**مقدمه**

گیاهان دارویی، یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که ارزش اقتصادی و درمانی آن‌ها، احساس نیاز به توسعه و مدیریت این گیاهان را بیش از پیش نمایان می‌کند (۱). پنیرک بانام علمی *Malva sylvestris* که در عربی خبازی نامیده می‌شود، گیاهی علفی، به ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر است. پنیرک به صورت خودرو، در بسیاری از نقاط می‌روید و برای مصارف کاربردی به‌عنوان گیاه دارویی نیز کشت می‌گردد. قسمت مورد استفاده پنیرک برگ و گل آن است که گل آن مصرف بیشتری دارد. برگ‌ها دارای حالت دایره‌ای و دندان‌دار و گل‌ها، بنفش‌رنگ و کوچک هستند. قسمت مورد استفاده پنیرک در ایران، گل‌های بنفش‌رنگ خشک‌شده آن است.

از نظر طب سنتی گیاه پنیرک را معتدل می‌دانند، مزاج غلیظ را رقیق و مزاج خیلی رقیق را معتدل می‌کند. سائیدن برگ آن

گیاهان دارویی، یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که ارزش اقتصادی و درمانی آن‌ها، احساس نیاز به توسعه و مدیریت این گیاهان را بیش از پیش نمایان می‌کند (۱). پنیرک بانام علمی *Malva sylvestris* که در عربی خبازی نامیده می‌شود، گیاهی علفی، به ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر است. پنیرک به صورت خودرو، در

*نویسنده مسئول: نیما محمدنژاد خیاوی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی،

Email: nimanejad7@yahoo.com

دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

https://orcid.org/0000-0003-4388-6692

آسیاب، الک و توزین کردن

بعد از خشک شدن، به وسیله دستگاه آسیاب مدل مولینکس ساخت کشور اسپانیا اقدام به خرد کردن اندام‌های گیاه مورد نظر در قطعات ریز گردید. پس از الک کردن به وسیله الک آزمایشگاهی پارس (Testsieve-Mesh No.) یک گرم از هر کدام با ترازوی دیجیتال مدل ساتریوس (*Sartorius*) ساخت کشور آلمان با دقت 0.001 g توزین شدند.

خصوصیات جغرافیایی

هنگام جمع‌آوری گیاه در محل، مختصات جغرافیایی شامل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع محل توسط دستگاه موقعیت سنج جغرافیایی مدل گارمین ویستا (*Garmin Vista*) (GPS) ثبت گردید.

روش تهیه اسانس

اسانس گیاه (۵۰ گرم) به روش تقطیر با آب به کمک دستگاه اسانس گیری تیپ کلونجر استخراج گردید (سه بار مجزا) و پس از آب‌گیری توسط سولفات سدیم بدون آب تا زمان آنالیز در ظرف شیشه‌ای تیره در دمای یخچال نگهداری شد (۶).

آنالیز اسانس

برای شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس از روش‌های تجزیه‌ای GC/MS و GC/FID استفاده شد. برای آنالیز GC/FID از دستگاه گاز کروماتوگراف HP-6890 با ستون موئین DB-5 (به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) مجهز به دتکتور FID استفاده گردید. حرارت اجاق از ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با گرادیان حرارتی $2/5$ °C/ml برنامه‌ریزی شد. سایر شرایط آنالیز عبارت بود از: گاز حامل N_2 با سرعت $1/5$ °C/ml، دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای دتکتور ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت اسپیلیت ۱:۱۰ و حجم تزریق ۰/۱ میکرولیتر، جهت آنالیز GC/MS از دستگاه GC مدل *Thermoquest 2000 GC* متصل به طیف نگار جرمی مدل *Thermo Finnigan Mass* مجهز به ستون موئین DB-1 (به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. شرایط آنالیز مشابه شرایط آنالیز GC/FID بود با این تفاوت که از گاز حامل He به‌عنوان حامل استفاده گردید. ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ eV بود و محدوده جرمی جهت ردیابی ۳۵-۳۵۰ amu تنظیم گردید.

درصد نسبی هر یک از ترکیبات با توجه به سطح زیر منحنی هر ترکیب در طیف کروماتوگراف گازی (GC/FID) محاسبه

و ترکیب آن با روغن‌زیتون برای شکستگی اعضاء و همچنین برای سوختگی و عقرب‌گزیدگی مفید است. دم‌کرده ساقه و برگ آن با شکر، گرفتگی صدا را برطرف می‌سازد (۲). همچنین پنیرک در درمان التهاب‌های تنفسی و جوش‌های پوستی کاربرد داشته و برای درمان سرفه نیز مناسب است. این گیاه دارای ویتامین A ، B و C بوده و برای درمان بیماری‌های کلیه و مثانه نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲).

مقاومت‌های دارویی روزافزون و بنابراین افزایش دز مصرفی داروهای متداول و به دنبال آن افزایش عوارض جانبی اثر داروها، موجب شده است تا امروزه بیشترین توجه به گیاهان دارویی با منشأ طبیعی و با عوارض جانبی بسیار کمتر معطوف شود (۵-۳). بنابراین در تحقیق حاضر، نقش اسانس پنیرک به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم علیه باکتری‌های عامل عفونت دهان، مورد بررسی قرار گرفت تا مقدمه‌ای جهت مطالعات بعدی و زیربنایی برای امکان کاربرد آن به‌عنوان یک داروی ضد میکروب مستقل یا همراه با دیگر ترکیبات ضد میکروبی باشد. در این مطالعه از کلرگزیدین که به‌عنوان دهان‌شویه استفاده می‌شود، برای مقایسه عملکرد ضد میکروبی اسانس استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

پس از انتخاب انزان در بخش مشکین غربی شهرستان مشکین‌شهر که در شمال غرب ایران واقع شده است و در فصل بهار که زمان رویش و گل‌دهی است، جهت جمع‌آوری گیاه به محل مورد نظر مراجعه شد. تعداد سه جمعیت ۵۰۰ گرمی به‌طور تصادفی از محل جمع‌آوری گردید. در هنگام جمع‌آوری اندام مورد مصرف که شامل سرشاخه‌ها با گل همراه برگ بود، از بقیه قسمت‌های گیاه توسط دست جدا گردید و شماره‌گذاری شد. پس از انتقال نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به آزمایشگاه تحقیقات گیاهان دارویی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل و با استناد به کلیدهای گیاه‌شناسی و فلور ایران و منابع موجود و تأیید متخصصین گیاه‌شناسی شناسایی شد.

تمیز و خشک کردن

پس از جمع‌آوری و شناسایی گیاه مورد نظر، اندام‌های هوایی گیاه تمیز شده و در شرایط سایه در گرمخانه مجهز به تهویه، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، خشک شدند.



تعیین غلظت اسانس پنیرک

برای تعیین غلظت اسانس، به مقدار یک میلی‌لیتر از اسانس در داخل ظرفی از قبل توزین شده ریخته و پس از طی ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و خشک شدن اسانس، وزن آن مجدداً تعیین شد. میانگین سه بار تکرار آزمایش به‌عنوان وزن خشک اسانس در نظر گرفته شد و غلظت آن در میلی‌لیتر محاسبه شد.

سویه‌های باکتریایی

در این مطالعه تأثیر اسانس گیاه دارویی پنیرک بر باکتری‌های شایع عفونت دهانی که از مجموعه باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی و عفونی ایران تهیه‌شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری‌ها شامل: *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سانگویس*، *استرپتوکوکوس سالیواریس*، *استرپتوکوکوس سوبرینوس*، *کلبسیلا نمونیه*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *ایکنلا کوردنس* می‌باشند.

تهیه دیسک‌های حاوی اسانس

در این آزمایش دیسک‌های استریل با غلظت ۱۰۰ mg/ml از اسانس تهیه شد، جهت تهیه دیسک‌های حاوی اسانس، از دیسک‌های بلانک ساخت پادتن‌طب استفاده شد. بدین ترتیب که دیسک‌های بلانک را در لوله‌های حاوی رقت‌های تعیین‌شده اسانس قرار داده شد. سپس ۵ تا ۳ دقیقه پس از جذب کامل، دیسک‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً خشک‌شده و جهت دیسک‌گذاری آماده شوند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی

جهت بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی اسانس گیاه دارویی پنیرک از روش بررسی قطر هاله عدم رشد (Disk diffusion) و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. جهت انجام این آزمایش باکتری‌های مورد مطالعه روی محیط کشت Tryptic Soy Broth جهت تکثیر اولیه کشت داده شدند، از محیط کشت مولر هینتون آگار برای داشتن تک کلنی و از روش‌های انتشار دیسک و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) جهت تعیین حساسیت باکتریایی استفاده شد. در روش Disk diffusion از باکتری‌هایی که در محیط کشت رشد کرده‌اند، سوسپانسیونی در سرم فیزیولوژیک به تعداد 3×10^8 باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را روی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۵ درصد خون تلقیح گردید.

گردید. شناسایی اجزا با کمک پارامتراندیس بازداری و طیف‌های جرمی و مقایسه آن‌ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در بانک اطلاعات جرمی و مقایسه آن‌ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در بانک اطلاعات جرمی Wiley275.L صورت گرفت (۷).

به‌منظور تعیین میزان اسانس در گیاه، مقدار ۵۰ گرم از سرشاخه خشک‌شده به‌صورت تصادفی انتخاب شد. هر نمونه بعد از آسیاب شدن، به درون یک بالن یک لیتری ریخته شد و مقدار ۳۰۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد. سپس به مدت ۴ ساعت، با استفاده از روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر (Clevenger)، اسانس‌گیری صورت گرفت. اسانس به‌دست‌آمده توسط سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد و در نهایت، درصد و عملکرد اسانس تعیین شد. اسانس مورد نظر پس از آماده‌سازی به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها و به دست آوردن شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص بازداری گزارش‌شده در کتاب Adams و مقایسه طیف جرمی هر یک از اجزای اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه Willy نرم‌افزار GC/MS انجام پذیرفت. هم‌چنین با استفاده از دستگاه GC درصد ترکیبات اسانس تعیین شد (۷-۸).

مشخصات دستگاه GC/MS

دستگاه GC از مدل Agilent 6890 و دستگاه MS از مدل Agilent 5973 با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی بود و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از مدل HP-5MS بود. برنامه دمایی آن به این صورت تنظیم شد که دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، دمای انتهایی ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و سه دقیقه توقف در این دما بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به‌عنوان حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent ۵۹۷۳ با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود.

تکان‌دهنده باهم مخلوط شده و در زمان صفر عمل طیف‌سنجی با طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌داری شدند و کدورت و یا عدم کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. اولین رقتی که توانست کمترین میزان کدورت را نشان دهد به عنوان حداقل غلظت کشنده تعیین گردید (۶). این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام و میانگین سه تکرار برای هر چاهک برای تعیین کمترین غلظت بازدارنده مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نسخه بیست و چهارم نرم‌افزار SPSS و آزمون تحلیل واریانس داده‌ها (ANOVA) انجام گرفت. سطح معنی‌داری در $P < 0/05$ قرار داده شد.

نتایج

اسانس حاصل از پنیرک، به رنگ زرد کم‌رنگ (مایل به نارنجی) و با بوی مشخص و تند، به میزان ۰/۶ درصد بود. در اسانس گیاه دارویی پنیرک برداشت‌شده از منطقه انزان مشکین‌شهر، مواد عمده زیر شناسایی شدند (جدول ۱). با توجه به جدول ۱، اسانس گیاه دارویی پنیرک دارای ترکیبات فنلی و ضد میکروبی

سپس دیسک‌های تهیه‌شده را روی پلیت قرار داده شد و به مدت دو روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس پلیت‌ها را از نظر وجود هاله عدم رشد بررسی گردید. از دیسک‌های استاندارد آموکسی‌سیلین به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها به وسیله خط‌کش میلی‌متری انجام شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر روش دیسک‌گذاری، حساسیت هر سویه از باکتری‌های مورد نظر نسبت به اسانس به دست‌آمده از گیاه پنیرک با استفاده از روش رقیق‌سازی در محیط مایع در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد مورد بررسی قرار گرفت. به خانه‌های ردیف اول پلیت فقط محیط کشت و سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در ردیف بعدی به ۶ خانه از پلیت‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس گیاه به غلظت ۱۰ میلی-گرم در میلی‌لیتر اضافه‌شده و تا چاهک ششم به ترتیب غلظت-های ۲-۶-۹-۱۲-۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس که با روش رقیق‌سازی تهیه‌شده بود اضافه گردید. به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک‌فارلند اضافه شد. از داروی آموکسی‌سیلین برای کنترل استفاده شد محتویات هر چاهک ۲ دقیقه به وسیله دستگاه Plate Reader مجهز به

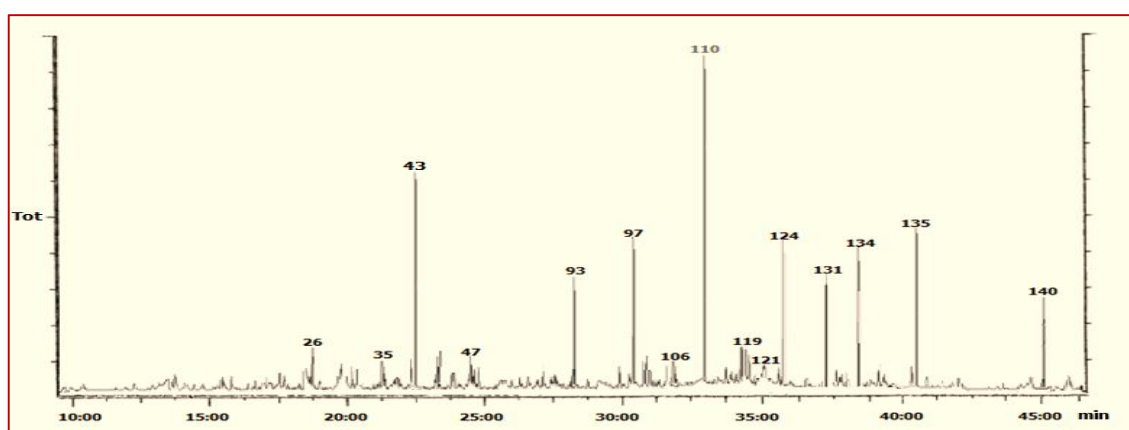
جدول ۱- ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه دارویی پنیرک *Malva sylvestris*

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد ماده موجود	ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد ماده موجود
۱	Hexanol	۷۹۹	۰/۱۳	۷۳	Caryophyllene oxide	۱۵۸۲	۰/۱۲
۲	Furfural	۸۳۰	۰/۱۰	۷۴	1-Hexadecene	۱۵۸۸	۰/۰۷
۳	(2E)- Hexanol	۸۵۳	۰/۰۹	۷۵	Globulol	۱۵۹۱	۰/۲۲
۴	Benzaldehyde	۹۵۸	۰/۰۵	۷۶	Hexadecene	۱۶۰۰	۰/۲۰
۵	2-Pentyl furan	۹۸۹	۰/۹۳	۷۷	α -Humulene epoxide II	۱۶۰۸	۰/۱۲
۶	Hexanoic acid	۱۰۱۵	۱/۲۴	۷۸	β -Atlantol	۱۶۱۱	۰/۲۳
۷	p-Cymene	۱۰۲۱	۰/۱۷	۷۹	Megastigmatrienone	۱۶۲۴	۰/۲۱
۸	Limonene	۱۰۲۶	۰/۳۶	۸۰	Benzophenone	۱۶۲۷	۰/۰۸
۹	Phenylacetaldehyde	۱۰۴۲	۰/۷۴	۸۱	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	۱۶۳۷	۰/۰۶
۱۰	(E)- β -ocimene	۱۰۵۶	۰/۱۰	۸۲	epi - α - cadinol	۱۶۴۱	۰/۱۸
۱۱	2-Acetylpyrrole	۱۰۶۷	۰/۱۹	۸۳	Eudesmal	۱۶۵۰	۰/۱۶
۱۲	(3E,5E)-Octadien-2-one	۱۰۹۲	۰/۱۷	۸۴	t - Muurolol	۱۶۵۴	۰/۰۷
۱۳	1-Adamantanol	۱۰۹۵	۰/۳۰	۸۵	Cyclo tetradecane	۱۶۶۹	۰/۰۸



۰/۰۹	۱۶۷۷	(E)- 1,2,3-trimethyl-4-propenyl-naphthalene	۸۶	۰/۱۲	۱۱۰۰	Linalool	۱۴
۰/۲۵	۱۶۸۸	Acorenone	۸۷	۰/۱۷	۱۱۰۲	Nonanal	۱۵
۰/۳۶	۱۷۰۷	2,2,5,5-tetramethylbiphenyl	۸۸	۰/۱۸	۱۱۰۶	2,6-Dimethyl-cyclohexanol	۱۶
۰/۰۶	۱۷۰۹	1-methylcyclododecene	۸۹	۰/۲۶	۱۱۱۴	Phenylethyl alcohol	۱۷
۰/۱۴	۱۷۲۰	Methyl tetradecanoate	۹۰	۰/۴۱	۱۱۱۹	Isophorone	۱۸
۰/۴۰	۱۷۳۴	9H-fluoren-9-one	۹۱	۰/۱۹	۱۱۲۴	3,3-dimethyl-1-butene	۱۹
۰/۶۱	۱۷۴۵	α -Bisabolol oxide A	۹۲	۰/۱۶	۱۱۴۷	Camphor	۲۰
۳/۱	۱۷۷۲	Phenanthrene	۹۳	۰/۳۷	۱۱۴۹	Lilac aldehyde	۲۱
۰/۱۴	۱۷۹۱	Tridecanoic acid	۹۴	۰/۰۷	۱۱۵۲	Menthone	۲۲
۰/۳۵	۱۸۱۱	Hexadecanal	۹۵	۰/۰۶	۱۱۵۸	(E)-pinocamphone	۲۳
۰/۲۰	۱۸۲۰	Methyl pentadecanoat	۹۶	۰/۲۱	۱۱۶۳	Iso- Menthone	۲۴
۴/۲۳	۱۸۴۲	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	۹۷	۰/۴۵	۱۱۶۵	Borneol	۲۵
۰/۷۶	۱۸۶۵	Diisobutyl phthalate	۹۸	۱/۰۳	۱۱۷۲	Menthol	۲۶
۰/۲۶	۱۸۶۹	Tetradecanoic acid	۹۹	۰/۲۴	۱۱۷۶	Terpinen-4-ol	۲۷
۰/۱۰	۱۸۷۶	Hexadecanol	۱۰۰	۰/۰۹	۱۱۸۲	3-Decanone	۲۸
۰/۲۰	۱۸۸۳	Methyl isopalmitate	۱۰۱	۰/۱۲	۱۱۸۵	Cymen-8-ol	۲۹
۰/۳۷	۱۸۹۳	Nonadecane	۱۰۲	۰/۵۵	۱۱۹۰	α -terpineol	۳۰
۰/۶۱	۱۸۹۹	11-hexadecenoic acid methyl ester	۱۰۳	۰/۳۴	۱۱۹۷	Estragole	۳۱
۰/۵۰	۱۹۱۰	4,5 methylenephenanthrene	۱۰۴	۰/۰۹	۱۲۰۳	Decanal	۳۲
۰/۴۳	۱۹۱۴	3- methyl-2-(3,7,11-trimethyldodecyl) furan	۱۰۵	۰/۱۸	۱۲۱۹	β -Cyclocitral	۳۳
۱/۵۰	۱۹۲۱	Methyl hexadecanoate	۱۰۶	۰/۰۹	۱۲۲۲	Methyl nonanoate	۳۴
۰/۱۷	۱۹۴۳	1-methylcycloheptonal	۱۰۷	۱/۳۸	۱۲۲۹	2,3-Dihydro benzo furan	۳۵
۰/۱۵	۱۹۴۸	Cyclohexadecane	۱۰۸	۰/۳۸	۱۲۳۸	Cumin aldehyde	۳۶
۰/۵۵	۱۹۵۹	Dibutyl phthalate	۱۰۹	۰/۷۷	۱۲۴۳	Carvone	۳۷
۱۰/۷۳	۱۹۸۴	Hexadecanoic acid	۱۱۰	۰/۲۵	۱۲۵۴	Linalool acetate	۳۸
۰/۷۰	۱۹۹۳	Methyl heptadecanoatr	۱۱۱	۰/۹۱	۱۲۸۴	(E)-Anethole	۳۹
۰/۱۰	۲۰۱۵	16-octadecenal	۱۱۲	۰/۸۴	۱۲۹۲	Nonanoic acid	۴۰
۰/۵۹	۲۰۲۱	14-methyl-methyl ester-hexadecanoic acid	۱۱۳	۱/۶۳	۱۲۹۸	Ethylcarvacrol	۴۱
۰/۱۴	۲۰۲۶	(E,E)-Geranyl linalool	۱۱۴	۰/۴۷	۱۳۰۷	Carvacrol	۴۲
۰/۲۲	۲۰۳۵	14-methyl-8-hexadecyn-1-ol	۱۱۵	۵/۹۳	۱۳۱۵	2-methoxy-4-vinylphenol	۴۳
۰/۱۳	۲۰۵۴	Fluranthene	۱۱۶	۰/۱۰	۱۳۴۷	α -Terpinyl acetate	۴۵
۰/۰۸	۲۰۶۶	Manool	۱۱۷	۰/۱۶	۱۳۵۱	2,6-Dimethoxy-phenol	۴۶
۰/۴۱	۲۰۷۸	1-(2-Methylene-3-buenyl)-1-(methylenepropyl)-cyclopropane	۱۱۸	۱/۵۶	۱۳۵۸	Eugenol	۴۷
۳/۶۱	۲۰۹۰	(9z,12z)-octadecadienoic acid methyl ester	۱۱۹	۰/۲۴	۱۳۶۲	γ -Nonalactone	۴۸
۱/۱۷	۲۰۹۷	9,12,15- octadecadienoic acid methyl ester	۱۲۰	۰/۰۹	۱۳۷۳	α -Copaene	۴۹

۱/۹۸	۲۱۰۸	Phytol	۱۲۱	۰/۳۸	۱۳۷۹	Decanoic acid	۵۰
۰/۲۵	۲۱۲۱	Methyl octadecanoate	۱۲۲	۰/۰۵	۱۳۸۳	β -Damascenone	۵۱
۰/۴۷	۲۰۲۹	(E)-Isoeugenyl benzyl ether	۱۲۳	۰/۰۶	۱۴۰۳	Methyl eugenol	۵۲
۳/۳۶	۲۱۴۸	Linoleic acid	۱۲۴	۰/۴۳	۱۴۱۵	endo-Arbozol	۵۳
۰/۳۲	۲۱۵۶	Linoleic acid ethyl ester	۱۲۵	۰/۰۵	۱۴۱۷	β -Caryophyllene	۵۴
۰/۵۰	۲۱۵۲	Mandenol	۱۲۶	۰/۲۲	۱۴۲۷	β -Cobebene	۵۵
۰/۳۰	۲۱۸۴	Methyl maleate	۱۲۷	۰/۰۶	۱۴۳۳	(E)- α -Bergamotene	۵۶
۰/۱۹	۲۲۰۰	Docosane	۱۲۸	۰/۰۹	۱۴۴۳	α -Humulene	۵۷
۰/۷۴	۲۲۱۳	Oleic acide	۱۲۹	۰/۶۲	۱۴۵۴	(E)- β -Farnesene	۵۸
۰/۰۹	۲۲۶۴	1-Nonadecene	۱۳۰	۰/۱۱	۱۴۵۸	Aromadendrene	۵۹
۳/۱۷	۲۳۰۰	Tricosane	۱۳۱	۰/۰۵	۱۴۶۱	epi- β -Caryophyllene	۶۰
۰/۰۵	۲۳۲۱	Methyl eicosanoate	۱۳۲	۰/۰۷	۱۴۷۴	(Z)-Muuroala-4 (14),5-diene	۶۱
۰/۳۵	۲۳۴۶	4,8,12-Trimethyltridecan-4-olide	۱۳۳	۰/۴۴	۱۴۸۰	ar-Curcumene	۶۲
۴/۲۳	۲۳۶۶	3,8-dimethyldecane	۱۳۴	۰/۶۵	۱۴۸۴	(E)- β -Ionone	۶۳
۵/۱۸	۲۴۹۴	Pentacosane	۱۳۵	۰/۰۶	۱۴۹۳	β -Selinene	۶۴
۰/۰۷	۲۵۴۱	Octyl isodecyl phthalate	۱۳۶	۰/۴۰	۱۴۹۳	Pentadecane	۶۵
۰/۱۰	۲۵۴۶	1-Nonadecanol	۱۳۷	۰/۱۸	۱۴۹۸	α -Muurolene	۶۶
۰/۲۳	۲۵۶۳	6-propyltridecane	۱۳۸	۰/۲۷	۱۵۰۶	β -Bisabolene	۶۷
۰/۲۷	۲۶۲۴	1,21-Docosadiene	۱۳۹	۰/۱۴	۱۵۲۱	α -Cadinene	۶۸
۳/۱۲	۲۷۰۰	Heptacosane	۱۴۰	۰/۲۷	۱۵۲۹	Dihydroactinolide	۶۹
۰/۴۳	۲۷۳۹	(12Z)-pentacosane	۱۴۱	۰/۰۷	۱۵۴۲	α -Calacorene	۷۰
۰/۱۰	۲۸۰۰	Octacosane	۱۴۲	۰/۱۳	۱۵۶۱	Geranyl butanoate	۷۱
۰/۱۵	۲۹۰۰	nonacosane	۱۴۳	۰/۱۶	۱۵۷۲	Dodecanoic acid	۷۲

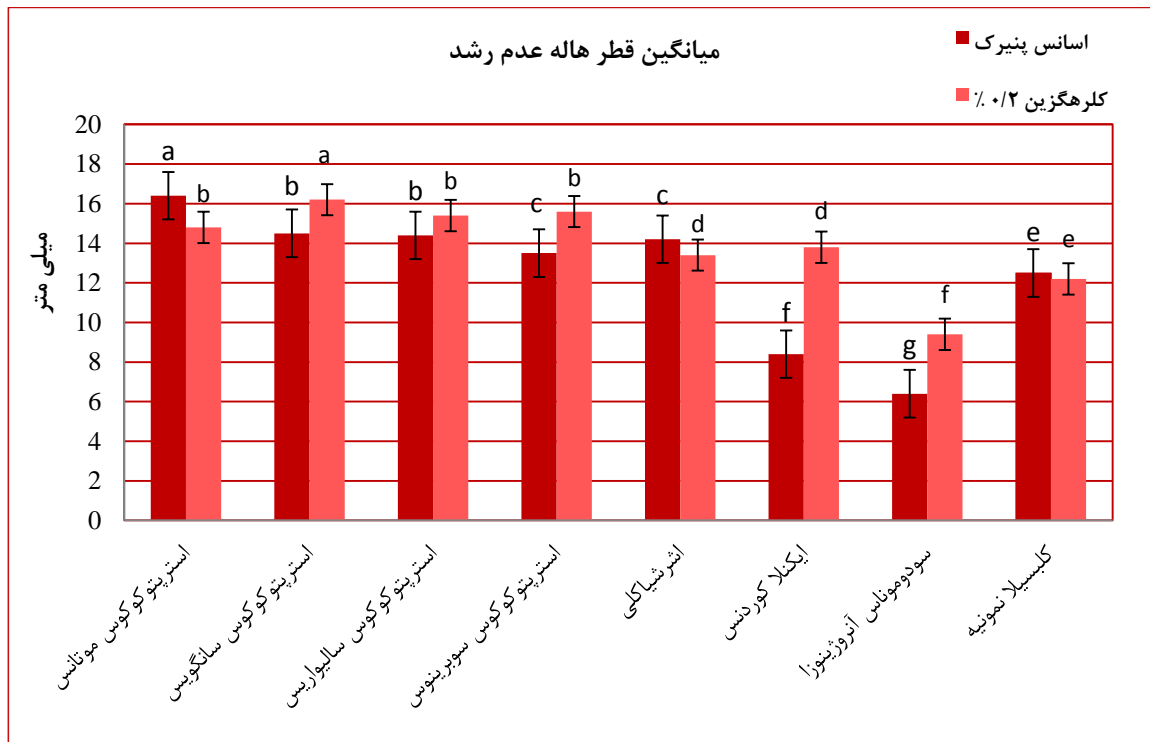

 شکل ۱- کروماتوگرام GC اسانس گیاه دارویی پنیرک *Malva sylvestris*

زیادی است که از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به ۲- متوکسیل-۴-وینیل فنول (ترکیب فنلی) و اوژنول (ترکیب ضد میکروبی) اشاره کرد.

نتایج حاصل از آنالیز GC برای اسانس گیاه دارویی پنیرک نیز در شکل ۱ آورده شده است.

عدم رشد در باکتری‌های مورد مطالعه مشاهده گردید ($P < 0.05$) که نشان‌دهنده این است که اسانس گیاه پنیرک بر روی باکتری‌های مختلف اثر مهارکنندگی متفاوتی دارد. در بررسی اثر اسانس گیاهی بر قطر ممانعت از رشد باکتری‌ها مشخص شد که

نتایج حاصل از آزمایش‌های ضد میکروبی در نمودار ۱ و مقادیر MIC اسانس گیاه دارویی پنیرک بر باکتری‌های عامل عفونت دهانی در جدول ۲ نمایش داده شده است. پس از انجام آزمون آنتی‌باکتریال مشخص گردید که اسانس گیاه دارویی پنیرک



نمودار ۱- نتایج حاصل از میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس پنیرک علیه باکتری‌های جدا شده از بیماران بر حسب میلی‌متر در سه تکرار.

جدول ۲- مقادیر MIC اسانس گیاه دارویی پنیرک بر باکتری‌های عامل عفونت دهانی.

ردیف	میکروب‌های مورد آزمایش	Mg/ml
۱	استرپتوکوکوس موتانس	۲
۲	استرپتوکوکوس سانگویس	۲
۳	استرپتوکوکوس سالیواریس	۶
۴	استرپتوکوکوس سوپرینوس	۶
۵	اشرشیاکلی	۲
۶	ایکنلا کوردنس	۶
۷	سودوموناس آنروژینوزا	۹
۸	کلبسیلا پنومونیه	۲

بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد توسط اسانس گیاه دارویی پنیرک مربوط به استرپتوکوکوس موتانس با قطر هاله‌ی ۱۶/۴ میلی‌متر و پس از آن استرپتوکوکوس سانگویس با قطر هاله‌ی

دارای اثرات مهارکنندگی قابل توجهی بر روی انواع باکتری‌های گرم منفی و مثبت است. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد در مورد اسانس گیاه پنیرک، اختلاف معناداری در میزان هاله

گیاه پنیرک به سبب وجود ترکیبات فنلی گوناگون به خصوص فلاونوئیدها و ترکیباتی همچون اوزنول از لحاظ اثرات ضد میکروبی بسیار مورد توجه است. تاکنون مطالعات مختلف و متعددی در خصوص بررسی و تجزیه اسانس گونه‌های مختلف پنیرک و ارزیابی خاصیت ضد میکروب آن در نقاط مختلف جهان و ایران صورت گرفته است. در بررسی حسن پور و همکاران (۹) مشخص گردید که عصاره غیر قطبی اندام‌های هوایی گیاه پنیرک منطقه ارسباران اثرات مهارکنندگی رشد قابل توجهی روی باکتری‌های مورد آزمایش دارند و در این بین اثرات مهارتی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی است که کاملاً با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. والتر و همکاران (۱۰) در سال ۲۰۱۱ فعالیت‌های ضد باکتریایی چندین گیاه از جمله پنیرک را بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بررسی نمودند. مطالعات آن‌ها نشان داد که این گیاهان دارای خواص آنتی‌باکتریال به‌ویژه در برابر باکتری اشیرشیا کلی می‌باشند. این یافته‌ها نیز با نتایج به‌دست‌آمده از در مطالعه حاضر همخوانی دارد. رضوی و همکاران (۱۱) فعالیت زیستی گیاه پنیرک را ارزیابی کردند و نشان دادند که عصاره متانولی برگ‌ها و گل‌های این گیاه دارای خواص ضد باکتریایی قوی می‌باشند. در مطالعه‌ای که Ferrazzano و همکاران (۱۲) درباره بررسی خواص ترکیبات پلی فنلی و ضد میکروبی مواد گیاهی از جمله پنیرک انجام دادند، مشخص شد که پلی فنل‌ها فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها از طریق کاهش رشد باکتری و اختلال در چسبندگی باکتری به سطح دندان و تأثیر در فعالیت آنزیمی باکتری‌هایی نظیر *استرپتوکوکوس موتانس*، اثرات ضدپوسیدگی خود را اعمال می‌کنند.

در این مطالعه خواص ضد باکتریایی گیاه پنیرک در شرایط آزمایشگاهی روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سانگویس*، *سودوموناس آنروژینوزا*، *اشیرشیا کلی* و غیره بررسی و اثبات شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، اثرات مهارکنندگی اسانس گیاه پنیرک بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سانگویس*) بیشتر از باکتری‌های گرم منفی (*سودوموناس آنروژینوزا*) بود که با نتایج حاصل از حسن پور و همکاران (۱۳) کاملاً مطابقت داشت. علت این تفاوت در اثرات مهارکنندگی اسانس بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله تفاوت ساختاری موجود بین دیواره این دو گروه از باکتری‌ها وابسته باشد. وجود

۱۴/۵ میلی‌متر و کم‌ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *سودوموناس آنروژینوزا* با ایجاد هاله‌ی ۶/۴ میلی‌متری است. در مقایسه خاصیت آنتی‌باکتریال اسانس پنیرک و دهان‌شویه کلرگزیدین (نمودار ۱)، نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که در میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس پنیرک و دهان‌شویه کلرگزیدین بر روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس سالیواریس* و *کلبسیلا نمونیه* اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ($P < 0.05$). همچنین این نتیجه به دست آمد که خاصیت آنتی‌باکتریال اسانس پنیرک بر روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* از دهان‌شویه کلرگزیدین بیشتر است و این اختلاف معنی‌دار است. از سوی دیگر، افزایش نسبی در میانگین قطر هاله عدم رشد توسط اسانس پنیرک بر روی باکتری *کلبسیلا نمونیه* نسبت به دهان‌شویه کلرگزیدین مشاهده شد، اما این اختلاف معنی‌دار نبود. بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد پنیرک با کلرگزین بر روی باکتری‌های شایع عفونت دهانی، مشخص شد که اسانس گیاه دارویی پنیرک نتایج نسبتاً مشابهی را نسبت به دهان‌شویه کلرگزین از خود نشان می‌دهد. نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه دارویی پنیرک (جدول ۲) نشان داد که باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سانگویس*، *اشیرشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* بیشترین حساسیت را نسبت به اسانس پنیرک از خود نشان دارند. همچنین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اثرات مهارکنندگی اسانس این گیاه بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*استرپتوکوکوس موتانس* و *استرپتوکوکوس سانگویس*) بیشتر از باکتری‌های گرم منفی (*سودوموناس آنروژینوزا*) است.

بحث

به‌طور کلی گیاهان دارویی طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های دیگر را از خود نشان می‌دهند. مواد شیمیایی استخراج‌شده از گیاهان به‌عنوان ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی به دلیل عوارض جانبی کمتر می‌توانند جایگزین داروهای ساختگی مطرح شوند. گیاهان دارای اثرات ضد میکروبی با مکانیسم‌های مختلف و حتی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند و این امر لزوم تحقیقات جامع‌تر در حیطه گیاهان دارویی را گوشزد می‌نماید (۱).



گیاه دارویی پنیرک نشان داد که دارای اثرات مهاری قابل توجهی بر روی انواع باکتری‌های گرم منفی و مثبت است. هم‌چنین در مقایسه قطر هاله عدم رشد پنیرک با کلرهگزین، مشخص شد که اسانس گیاه دارویی پنیرک نتایج نسبتاً مشابهی را نسبت به دهان‌شویه کلرهگزین از خود نشان می‌دهد. در نتیجه اسانس این گیاه با غلظت‌های مختلف، پس از انجام مطالعات تکمیل‌تر می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروها و دهان‌شویه‌های شیمیایی در درمان عفونت‌های دهانی باشد.

تشکر و قدردانی

از بخش تحقیق و توسعه شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز به دلیل تأمین هزینه و امکانات این طرح و هم‌چنین از مسئولین مرکز تحقیقات علوم پایه دانشگاه تبریز به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب‌گریز ممانعت می‌کنند. از آنجایی که اکثر ترکیبات مؤثر موجود در عصاره‌ها و اسانس‌ها ماهیت آب‌گریزی دارند، لذا می‌توان چنین نتیجه گرفت که این مواد امکان نفوذ و دسترسی به نقاط فعال داخل باکتری‌های گرم منفی را ندارند و به همین دلیل، معمولاً باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات گیاه نشان می‌دهند (۱۳).

نتیجه‌گیری

پس از تجزیه شیمیایی اسانس پنیرک منطقه انزان مشکین-شهر، شناسایی دو ترکیب اوژنول و ۲-متوکسیل-۴-وینیل فنول به کمک زمان بازداری و مقایسه آن‌ها با منحنی استاندارد و هم-چنین مقدار آن‌ها با توجه به سطح زیر منحنی هر ترکیب در طیف کروماتوگراف گازی مشخص گردید. بیشترین میزان اوژنول (۱/۵۶٪) و بیشترین میزان ۲-متوکسیل-۴-وینیل فنول (۵/۹۳٪) است. نتایج حاصل از آزمایش‌های ضد میکروبی اسانس

References

- Attard E, Pacioni P. The phytochemical and in vitro pharmacological testing of Maltese Medicinal Plants. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. 2011; 14(3): 93-112.
- Razavi SM, Zarrini Gh, Molavi Gh, Ghasemi Gh. Bioactivity of *Malva Sylvestris* L, a Medicinal Plant from Iran, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2011; 14(6): 574-579.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*. 2015;40(4):277.
- Cortés JA, Corrales IF. Invasive candidiasis: epidemiology and risk factors. *InFungal Infection*. 2018 Nov 10. IntechOpen.
- Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(7):a019752.
- Azizi Alidoust F, Anvari M, Atayi Jaliseh S. Antimicrobial Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of Chamomile, Fleawort, Aquatic Pennyroyal and Nettle Plants on *Klebsiella pneumoniae* and Comparing Their Effects with Common Antibiotics. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2020;14(4):361-73.
- Amirmohammadi FZ, Azizi M, Nemati SH, Iriti M, Vitalini S. Analysis of the essential oil composition of three cultivated *Nepeta* species from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2020;75(7-8):247-54.
- Souri N, Monsef-Esfehani MR, Vazirian M, Samadi N, Lamardi SN. Analysis of Essential Oil Composition and Antimicrobial Effect of *Stachys discolor* subsp. *mazandarana*. *Traditional and Integrative Medicine*. 2020; 16:8-13.



9. Taha Nezhad M, Barzegar M, Sahari MA, Naghdi Badi HA. Evaluating antiradical activity of Mallow (*Malva sylvestris* L.) extracts and its application in the oil system. *Iranian J of Med Plants*. 2012; 11 (42):86-97. [In Persian]
10. Walter C, Zabta K, Wari S, Afzal I, Malik RN. Antibacterial activity in herbal products used in Pakistan. *Pak J Bot*. 2011; 43: 155-162.
11. Razavi SM, Zarrini Gh, Molavi Gh, Ghasemi Gh. Bioactivity of *Malva Sylvestris* L, a Medicinal Plant from Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2011; 14(6): 574-579.
12. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*. 2011; 16(2):1486-507.
13. Hassanpour A, Zakhireh S, Ebadi A. The study of antibacterial activity of non-polar extract of *Malva silvestris* L., using well diffusion and tube dilution method. *Veterinary Clinic Pathology*. 2013; 8(32): 645-651. (In Persian)



Original Article

Evaluation of Antibacterial Properties of Essential Oil of *Malva Sylvestris* Collected from Meshkinshahr on Common Bacteria of Oral Infection and Comparison with Chlorhexidine Mouthwash

Eghbal H¹, Mohammadi A², Mohammad Nejad Khiavi N^{3*}, Jahani N⁴

1. Department of Phytochemistry, Basic Sciences Research Center, Tabriz University, Tabriz, Iran
2. Department of Oral and Maxillofacial Medicine, Faculty of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4. Department of Research & Development, Green Drug Reserchers Company, Meshkinshahr, Iran

Received: 07 Oct 2020

Accepted: 01 Dec 2021

Abstract

Background & Objective: *Malva sylvestris*, one of the most important plants used in the pharmaceutical, cosmetic and health industries in most developing countries, has antiseptic properties. Therefore, this research aimed to study essential oil components of *Malva sylvestris* juice collected from Meshkinshahr and its anti-bacterial property compared to chlorhexidine mouthwash on common bacteria of oral infection.

Materials & Methods: In this research, *Malva sylvestris* was collected from the Anzan Meshkin-Shahr area in the northwest of Iran. The essential oil was extracted by Clevenger's apparatus, GC and GC/MS devices were used for the analysis of essential oil compounds and accurate measurements of the compounds. Then, the effect of the essential oil of the *Malva sylvestris* and control on the common bacteria of the oral infection was evaluated in two ways: Disc diffusion And minimum inhibitory concentration(MIC).

Results: According to the results, the essential oil of the herb has a significant inhibitory effect on the types of gram-negative and positive bacteria. Also, comparing the diameter of the non-growth of the plant with chlorhexidine , it was found that the essence of the herb medicine showed relatively similar results to that of the chlorhexidine.

Conclusion: According to the findings, the essential oil of the herb has a good anti-microbial effect against the common bacteria of oral infections. As a result, the essential oil of this plant with different concentrations, after completing studies, can be an appropriate alternative for chemical drugs and chemical mouthwashes in the treatment of oral bacterial infections.

Keywords: *Malva sylvestris*, Antibacterial, Oral infection, Chlorhexidine

*Corresponding Author: Mohammad Nejad Khiavi Nima, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran Email: nimanejad7@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0003-4388-6692>