

## استخراج اسانس و عصاره گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) و بررسی اثرات بیهوش کنندگی آن بر ماهیان جوئل (*Hemichormis bimaculatus*)

زینب باوی<sup>۱\*</sup>، رباب ناطق زاده<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر.

### چکیده

در پژوهش حاضر، اثر غلظت های مختلف اسانس و عصاره میخک (*Eugenia caryophyllata*) استخراج شده توسط دستگاه کلونجر بر مراحل بیهوشی و بازگشت از آن در ماهیان جوئل (*Hemichormis bimaculatus*) مورد بررسی قرار گرفت. مواد استخراج شده پس از خلص سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) تزریق گردید، مقدار و نوع ترکیبات آن ها مشخص شد. در مرحله بعد ماهیان (۳±۳۵ گرم و ۲۰ سانتی متر) با غلظت های ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم در لیتر اسانس و ۸، ۱۰ و ۱۰ میلی گرم در لیتر عصاره میخک در شرایط معمول آب کارگاه شامل  $PH = 7/65 \pm 0/08$  و دمای  $19/59 \pm 2/27$  درجه سانتی گراد، تحت بیهوشی قرار گرفتند. با تحلیل نمونه ها جزء عمده و اصلی اسانس میخک، اوژنول تشخیص داده شد و دو جزء دیگر استیل اوژنول Eugenol Acetyl و کاریوفیل Caryophyllene است. با تاثیر دهی اسانس و عصاره تهیه شده بر ماهیان جوئل و بررسی اثرات بیهوش کنندگی آن و بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش بین تیمارهای مختلف اسانس و عصاره در ارتباط با فاکتورهای بیهوشی مورد سنجش تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

کلید واژه: اسانس میخک، بیهوشی، عصاره میخک، ماهی جوئل

### مقدمه

پژوهشهای بیولوژیکی و بیوشیمیایی فراوانی درباره قسمت های مختلف درخت میخک به خصوص غنچه های آن و در مورد اوژنول انجام شده است و خاصیت ضد اکسیدان و غیرسمی بودن آن بر روی حیوانات به اثبات رسیده است. از غنچه میخک به عنوان داروی تقویت کننده، مسکن اعصاب و درد، ضد التهاب، ضد کرم و قارچ، محرک اشتها، ضد عفونی کننده قوی، ترمیم کننده جراحت و به عنوان چاشنی غذایی و از اسانس آن برای مطبوع کردن انواع اغذیه استفاده می شود. گیاه میخک حاوی اسانسی است که به طور عمده از اوژنول تشکیل شده است به طور کمی ثابت شده است مقدار اسانس در غنچه درخت میخک بیشتر از قسمت های دیگر گیاه است. این مقدار حدود ۱۵٪ وزنی گزارش شده است. ارزش اسانس تهیه شده به مقدار درصد اوژنول بستگی دارد. در مراکز تکثیر و پرورش ماهی از مواد بیهوش کننده گوناگون مانند MS۲۲۲، بنزوکائین، ۲- فنوکسیاتانل، کینالدین، گازدی اکسید کربن و داروهای متنوع دیگر به منظور بیهوشی ماهی ها در عملیات تکثیر، علامت گذاری، رقم بندی، حمل و نقل و غیره استفاده می گردد (Stoskopf, ۱۹۹۳). اخیراً میخک که دارای اثرات آرام کنندگی، تسکین درد و برطرف کننده بعضی امراض در انسان است، برای بیهوشی و آرام کردن انواع ماهیان در کشورهایی مانند اندونزی (Soto & Burhanuddin, ۱۹۹۵) استرالیا (Anderson et al., ۱۹۹۷) و امریکا (Keene et al., ۱۹۹۸) استفاده می شود.

### مواد و روش ها

برای تهیه اسانس پس از خشک کردن نمونه گیاهی، به آسیاب نمودن نمونه ها اقدام شد. اسانس گیری با استفاده از روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر به روش فارماکوپه مجارستان (Hungarian pharmacopoeia Gnotot plant Medicina Budapest) دردمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت و از مایع بازمانده در دستگاه پس از جداسازی اسانس روغنی از فاز آبی، به عنوان عصاره

استفاده شد. برای جلوگیری از اثر دما و نور، مواد حاصله درون ظروف تیره و در بسته درون یخچال تا بررسی های بعدی و زمان استفاده نگهداری شدند. جداسازی و شناسایی ترکیب اسانس با استفاده از دستگاه GC یک میکرو لیتر اسانس رقیق شده با حلال دی کلرومتان به دستگاه های GC تزریق شد. شناسایی طیف ها به کمک شاخص های بازداری آنها با تزریق هیدرو کربن های نرمال (C<sub>7</sub>-C<sub>25</sub>) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس صورت گرفت و با مقادیری که در منابع مختلف منتشر گردیده بود مقایسه شد. در این مطالعه، اثر اسانس و عصاره میخک (*Eugenia caryophyllata*) بر مراحل بیهوشی و بازگشت از آن در ماهیان جونل (*Hemichormis bimaculatus*) مورد بررسی قرار گرفت. ماهی ها با میانگین وزن 3±35 گرم و سایز 20 سانتی متر در مخازن ده لیتری به صورت کاملاً تصادفی در 6 تیمار (6، 8 و 10 میلی گرم در لیتر اسانس و 6، 8 و 10 میلی گرم در لیتر عصاره میخک) و هر تیمار شامل 3 تکرار جمعاً در 18 مخزن ذخیره سازی شدند کنترل مراحل بیهوشی و بازگشت بر اساس تعریف Keene و همکاران (1998) انجام گرفت. تا یک هفته پس از آزمایش رفتار ماهیها مورد مشاهده قرار گرفت تا امکان ایجاد اثرات جانبی در آنها مورد بررسی قرار گیرد و میزان تلفات و بازماندگی ماهیان ثبت شد.

### نتایج و بحث

با تحلیل نمونه های اسانس، جزء عمده و اصلی آن اوژنول تشخیص داده شد. دو جزء دیگر استیل اوژنول Eugenol Acetyl و کاریوفیل Caryophyllene است. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش بین تیمارهای مختلف اسانس و عصاره در ارتباط با سه فاکتور مورد سنجش بیهوشی T.L.E، T.I.A و T.R.R تفاوت معنی داری مشاهده نشد و تنها در ارتباط با فاکتور T.E.R تفاوت معنی دار مشاهده شد که این ممکن است ناشی از خطا در آزمایش باشد. با توجه به اینکه روند استحصال اسانس در مقایسه با عصاره، فعالیتی طولانی و پرهزینه است، همچنین بر اساس داده های حاصل از این پژوهش که نشان داد نتایج استفاده از این مواد (اسانس و عصاره) تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند، به نظر می رسد کاربرد عصاره نسبت به اسانس در آبیاری و استفاده از اثرات آن، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است. نتایج مطالعه ظریف کار و همکارانش نیز نشان داد که اثرات تزریق اوژنول وابسته به مقدار است

جدول ۱: تجزیه واریانس چهار متغیر زمان ازدست دادن تعادل، زمان ایجاد بیهوشی، زمان بازگشت تعادل

و زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی در ماهیان جونل تحت تاثیر دوز های مختلف اسانس میخک (n=3)(mean±S. D.)

T.R.R	T.E.R	T.I.A	T.E.L	تیمار اسانس میخک (Mg/l)
۴۸۹/۳۳C	۲۹۹/۳۳C	۳۷۹/۰۰a	۳۴۹/۰۰a	۶/۰۰
۵۷۳/۰۰b	۳۶۲/۶۶b	۲۶۸/۳۳b	۲۲۴/۰۰b	۸/۰۰
۶۶۸/۳۳a	۳۹۲/۰۰a	۱۹۲/۶۶C	۱۷۱/۰۰C	۱۰/۰۰

میانگین و انحراف از معیار (Mean ± S.D) با حروف متفاوت در ردیف های یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار در تیمارها می باشند (P>0/05).

جدول ۲: تجزیه واریانس چهار متغیر زمان ازدست دادن تعادل، زمان ایجاد بیهوشی، زمان بازگشت تعادل و زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی در ماهیان جونل تحت تاثیر دوز های مختلف عصاره میخک (mean±S. D.)(n=۳)

T.R.R	T.E.R	T.I.A	T.E.L	تیمار عصاره میخک (Mg/l)
۴۶۱/۶۶C	۳۶۷/۶۶C	۳۷۹/۰۰a	۳۳۶/۳۳a	۶/۰۰
۵۹۷/۰۰b	۴۰۰/۶۶b	۳۰۷/۶۶b	۲۸۲/۰۰b	۸/۰۰
۶۳۶/۳۳a	۴۴۴/۰C	۲۰۲/۶۶C	۱۸۸/۶۶C	۱۰/۰۰

میانگین و انحراف از معیار (Mean ± S.D) با حروف متفاوت در ردیف های یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار در تیمارها می باشد (P>۰/۰۵).

جدول ۳: تجزیه واریانس چهار متغیر زمان ازدست دادن تعادل T.E.L، زمان ایجاد بیهوشی T.I.A، زمان بازگشت تعادل T.E.R و زمان بازگشت واکنش به محرک خارجی T.R.R، در ماهیان جونل تحت تاثیر دوز های مختلف اسانس و عصاره میخک (mean±S.D.)(n=۳)

T.R.R	T.E.R	T.I.A	T.E.L	تیمارها
۵۶۵/۶a	۳۵۱/۳۳b	۲۸۰/۰۰a	۲۴۸/۰۰a	
۵۷۶/۸۹a	۴۰۴/۱۱a	۲۹۲/۰۰a	۲۶۹/۰۰a	

میانگین و انحراف از معیار (Mean ± S.D) با حروف متفاوت در ردیف های یکسان نشان دهنده اختلاف معنی دار در تیمارها می باشد (P>۰/۰۵).

در آزمایش حاضر هیچگونه تلفات و یا رفتار غیرعادی در ماهیان مورد مطالعه در طول مدت یک هفته پس از آزمایش مشاهده نگردید، از این رو به نظر می رسد که اسانس میخک دارای اثر سوء دائمی و یا پنهان بر رفتار و یا فیزیولوژی ماهی نیست و به دلیل اینکه یک ترکیب گیاهی است، این انتظار وجود دارد که به آسانی در محیط تجزیه شده و آثار مخرب زیست محیطی نداشته باشد. غلظت های ماده بیهوشی مصرفی، نوع ماهی های مورد آزمایش و شرایط حاکم بر آزمایش در این تحقیق با سایر پژوهش های انجام شده متفاوت بود، در عین حال نتایج حاصل از آن موید این است که اسانس میخک حتی در غلظت های پایین ایجاد بیهوشی می کند، ایجاد بیهوشی و بازگشت از آن توسط اسانس میخک به صورت آرام و بدون هیجان صورت می گیرد. زمان بازگشت از بیهوشی با اسانس میخک نسبتا طولانی است و پس از بازگشت از بیهوشی، تلفات یا رفتار غیرطبیعی در ماهی ها مشاهده نشد. تهیه و استفاده اسانس میخک از دیگر مواد بیهوش کننده مخصوصا MS۲۲۲، ارزانتر است، که با آزمایشات انجام شده است مطابقت دارد. مطالعه حاضر نیز بیانگر این مطلب است که اسانس میخک بسیاری از خصوصیات یک بیهوش کننده خوب را در آبروی پروری دارد که زمان ایجاد بیهوشی کمتر از ۳ دقیقه، زمان بازگشت از بیهوشی (در غلظت های پیشنهاد شده در تحقیقات) کمتر از ۵ دقیقه و بدون مشکل، بی حسی در برابر درد، عدم تحرک و شلی عضلات، نداشتن اثرات مداوم بر رفتار و فیزیولوژی ماهی، دفع سمیت مقادیر مصرفی برای ماهی، دفع سریع از بدن، تجزیه به مواد بی خطر در محیط، در دسترس بودن، ارزان بودن از جمله آن است.

علاوه بر این هیکاسا و همکاران، کینه و همکاران، موندی و ویلسون اظهار داشتند که، اسانس میخک زمان بازگشت ماهی از بیهوشی را طولانی می کند که در آزمایشهای حاضر نیز این امر مشاهده گردید که بنا به نظر کینه و همکاران این امر به علت تأثیری است که اسانس میخک و ماده مؤثر آن یعنی اوژنول بر سیستم عصبی ماهی می گذارد و موجب می شود که ماهی فعالیت تنفسی خود را به کندی انجام دهد و در نتیجه ترکیب های اسانس دیرتر از بدن ماهی خارج می گردد.

### منابع

- مخیر، بابا. ۱۳۷۲. بیهوشی و جراحی در تاس ماهیان ایران. بولتن علمی شیلات ایران. ۳: ۲ - ۱۰.
- مهرابی، یداله. ۱۳۷۸. مطالعه مقدماتی اثر بی هوشی پودر گل درخت میخک (*Syzygium aromaticum*) بر روی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان. مجله پژوهش و سازندگی. ۴۰، ۴۱، ۴۲: ۱۶۰ - ۱۶۲.
- ظریف کار، اسداله، ح. اسکندریان، م. مختاری و ج. آ. ۱۳۸۲. ارزیابی اثرات ضد درد اوژنول با استفاده از تست فرمالین در موش صحرائی. مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تهران. ۱۶: ۶۷ - ۶۱.

- ۳- Anderson, W.G., R.S. Mckinley and M. Colavecchia, ۱۹۹۷, The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. North Journal of Fisheries Management. ۱۷: ۳۰۱ - ۳۰۷.
- ۴ - Hikasa, y., K. Takase, T. Ogasawara and S. Ogasawara. ۱۹۸۵, Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp. *Cyprinus carpio*. Jpn. J. Vet SCI. ۴۸(۲): ۳۵۱ - ۳۵۱.
- ۵ - Keene, J.L., O.L.G. Noakes, R.D. Moccia & C.G. Soto. ۱۹۹۸. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture. Research*. ۲۹: ۸۹ - ۱۰۱.
- ۶ - Lawrence, B.M., ۱۹۹۵, Progress in essential oils. RJ Reynolds Tobacco companies. *Perfumer & Flavorist* ۲۰: ۹۵ - ۱۰۳.
- ۷ - Munday, P.L & S.K. Wilson. ۱۹۹۷. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anesthetization of pomacentrus amboinensis, coral reefs fish. *Journal of Fish Biology* ۵۱: ۹۳۱-۹۳۸.
- ۸- Peake, S. ۱۹۹۸. Sodium bicarbonate and clove oil as potential anesthetics for non-salmonids fishes. *North American Journal of Fisheries Management* ۱۸: ۹۱۹-۹۲۴.
- ۹- Soto, C.G. & Burhanuddin. ۱۹۹۵. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbit fish (*siguanus lineatus*). *Aquaculture*. ۱۳۶: ۱۴۹-۱۵۲.

### The extraction of essential oil and extract of clove (*Eugenia caryophyllata*) and its anesthetic effects studied on Joel fish (*Hemichormis bimaculatus*)

Z. Bavi<sup>۱\*</sup>, R. Nateghzadeh<sup>۲</sup>

۱- Dept. of Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr- Iran ۲- Dept. of Horticultural Sciences, Persian Gulf University, Bushehr- Iran.

#### Abstract

In this study the effect of clove (*Eugenia caryophyllata*) oil and extract concentration that extracted by Clevenger on anesthetic stage on Joel Fish (*Hemichormis bimaculatus*) were studied. Extracted material after purification was injected in Gas Chromatography (GC), and the compounds were identified. Then the fish ( $3 \pm 30$  g and ۲۰ cm) affected by ۶, ۸ and ۱۰ mg per liter of oil, ۶, ۸ and ۱۰ mg per liter of extract concentration, the water including  $7.65 \pm 0.08$  PH and at  $19.59 \pm 2.27$  °C. The sample analysis of clove oil detected the main component of clove oil was eugenol, and the other was Eugenol Acetyl and Caryophyllene. With effectiveness of essential oil and extract on Joel Fish and studied the anesthetized of that and according to the results, between the different treatments of oil and extract, the anesthetic factors that associated with anesthesia measuring was not significant.

Keywords: Anesthesia, clove extract, clove oil, Joel fish.