

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های گیاه *Geum kokanicum*

حمیدرضا منصف اصفهانی^۱، انسیه شریفی اقدم^۲، محسن امینی^۳، محمدعلی فرامرزی^۴، احمدرضا شاهوردی^۵،
رضا حاجی آقائی^{۵*}

- ۱ - استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 - ۲ - دانشجوی داروسازی، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 - ۳ - استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 - ۴ - استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
 - ۵ - مربی پژوهش، گروه فارماکولوژی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج
- * آدرس مکاتبه: کرج، کیلومتر ۵۵ جاده تهران قزوین، مجتمع تحقیقاتی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، صندوق پستی: ۱۴۴۶ - ۱۳۱۴۵
تلفن: ۹ - ۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶۱)، نمابر: ۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶۱)
پست الکترونیک: rhajiaghadee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۷

تاریخ تصویب: ۸۸/۲/۷

چکیده

مقدمه: گیاه علف مبارک کوهستان با نام علمی *Geum kokanicum* از خانواده Rosaceae، از جمله گیاهان با ریزوم دایمی ایران می‌باشد. این گیاه در درمان اسهال و سایر مشکلات گوارشی کاربرد دارد. هدف: در این تحقیق اثرات ضد میکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف تهیه شده از ریزوم *G. kokanicum* مورد بررسی قرار گرفت. روش بررسی: گیاه *G. kokanicum* در خرداد ماه ۱۳۸۵ از منطقه بجنورد جمع‌آوری شد. سپس از ریزوم آن یک عصاره تام با اتانول ۸۰ درصد و چهار فراکسیون به روش استخراج متوالی به دست آمد و هریک از فراکسیون‌ها و عصاره تام به روش Disc - diffusion مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: آزمون میکروبی اولیه عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف بر روی میکروب‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی، نشان‌دهنده بیشترین هاله عدم رشد فراکسیون متانلی (۱۰ mg/disc) بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به میزان ۱۹ میلی‌متر می‌باشد. هم‌چنین حداقل غلظت مهاری عصاره تام اتانولی روی میکروب‌های مختلف گرم مثبت و منفی شامل: استافیلوکوکوس اپیدرمیتیس، سویه ای از استرپتوکوک نوع A، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی، پseudomonas آئروژینوزا، سویه ای از شیگلا و سویه ای از کلبسیلا مورد بررسی قرار گرفت که کمترین حداقل غلظت مهاری مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به میزان ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده هاله عدم رشد عصاره تام این گیاه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به میزان ۱۸ میلی‌متر می‌باشد. با توجه به حضور تانن زیاد در آنالیز فیتوشیمیایی این عصاره حدس زده شد که این اثر ضد میکروبی به دلیل حضور تانن بالا در گیاه باشد. به منظور اثبات این موضوع تانن گیاه، که در فراکسیون متانولی جمع شده بود به وسیله محلول ژلاتین ۱ درصد جدا شده و به وسیله بیواتوگرافی مورد بررسی قرار گرفت که تایید کننده حدس بالا می‌باشد.

کل واژگان: *Geum kokanicum*، تانن، فعالیت ضد میکروبی



مقدمه

در طول تاریخ بشری بسیاری از بیماری‌های عفونی به طور سنتی با داروهای گیاهی درمان شده‌اند. امروزه تلاش برای استخراج و شناسایی مواد موثر گیاهان که خاصیت ضد میکروبی دارند ادامه دارد [۱، ۲]. گیاه علف مبارک کوهستان یا میخک کوهی با نام علمی *Geum kokanicum* Regel & Schmalh (Rosaceae) از گیاهان بومی ایران می‌باشد که در مناطق البرز، نواحی اطراف تهران و کندوان انتشار جغرافیایی دارد [۳]. این گیاه علاوه بر ایران، در ترکمنستان، آسیای مرکزی، اروپای مرکزی، شمال آفریقا، سوریه، آناتولی و ارمنستان می‌روید [۴].

این گیاه در طب سنتی منطقه بجنورد، به منظور درمان اسهال و ناراحتی‌های گوارشی، رفع ترش کردن و در رنگ‌ریزی به کار می‌رود [۵].

مطالعه‌ای که روی ترکیبات فرار *G. kokanicum* انجام شده، نشان‌دهنده وجود هفت نوع ترکیب در اسانس آن می‌باشد که از میان آنها، اوژنول و میرتنول ترکیبات اصلی اسانس را تشکیل می‌دهند، هم‌چنین در بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس مشخص شد که اسانس گیاه، اثرات ضدباکتری و ضدقارچ دارد [۶].

روی بعضی از گونه‌های این گیاه از جمله *G. rivale* و *G. japonicum* مطالعات فیتوشیمیایی و بیولوژیک انجام شده است. این مطالعات نشان‌دهنده وجود خاصیت ضدباکتری و ضدانقادی در گونه‌های فوق‌الذکر است [۷، ۸].

هدف از این تحقیق بررسی اثرات ضد میکروبی ریزوم علف مبارک کوهستان است که برای اولین بار گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

G. kokanicum از خانواده Rosaceae که در ایران به علف مبارک کوهستان مشهور است، در خردادماه ۱۳۸۱ از منطقه بجنورد در استان خراسان جمع‌آوری شد. نمونه

هرباریومی این گیاه تهیه شده و در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری می‌شود. ریزوم گیاه، پس از جمع‌آوری، جدا شده و سپس در سایه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و ریزوم‌ها توسط آسیاب به پودر مناسبی تبدیل شدند.

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

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

عصاره‌گیری

عصاره تام ریزوم این گیاه توسط اتانل ۸۰ درصد به روش پرکولاسیون تهیه شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ گرم از پودر ریزوم به روش فوق عصاره‌گیری شد و عصاره هیدروالکلی به دست آمده توسط دستگاه تقطیر در خلأ خشک شد (۶/۱۲ گرم معادل ۶/۱۲ درصد وزنی - وزنی).

۵۰۰ گرم از پودر ریزوم گیاه *G. kokanicum* به روش استخراج متوالی^۱ با حلال‌های فوق عصاره‌گیری شد. چهار نوع فراکسیون تهیه شده با دستگاه تقطیر در خلأ مجدداً خشک و به ترتیب ۳/۳، ۵/۷، ۶/۴ و ۸/۲ گرم عصاره خشک معادل ۰/۶۶، ۱/۱۴، ۱/۲۸ و ۱/۶۴ درصد وزنی - وزنی حاصل شد.

آنالیز فیتوشیمیایی

آزمایش‌های فیتوشیمیایی اولیه جهت تعیین مقدار کیفی مواد مختلف شامل تانن، فلاونوئید، آلکالوئید و ساپونین انجام شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی

میکروارگانیزم‌ها

در این تحقیق از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروژینوزا، سویه‌ای از شیگلا، باسیلوس سوبتیلیس، اشیریشیاکلی، سالمونلاتیفی، سویه‌ای از کلبسیلا و استرپتوکوکوس نوع A استفاده شد. این

¹ Successive extraction



سویه‌ها از بیمارستان شریعتی تهیه و طبق روش‌های متداول شناسایی و تعیین هویت شد.

اثرات ضد میکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف ریزوم گیاه *G. kokanicum* به روش انتشار^۱ مطالعه شد. دیسک حاوی ۱۰ میلی گرم از مواد مورد آزمایش روی پلیت‌های تلقیح شده با سویه‌های میکروبی (که در جدول شماره ۱ لیست شده است) قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌های مورد آزمایش اندازه‌گیری و ثبت شد. خاصیت ضد میکروبی فعال‌ترین فراکسیون تهیه شده توسط روش رقتی^۲ مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت. غلظت‌های متوالی از فراکسیون (۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط جامد تهیه شد. آنگاه سویه‌های مختلف میکروبی به صورت نقطه‌ای روی محیط جامد کشت داده شدند. میزان تلقیح باکتری‌ها $10^0 - 10^4$ باکتری در هر نقطه بود. بعد از گرمخانه‌گذاری طبق شرایط فوق‌الذکر، نتایج جمع‌آوری شد. کمترین غلظتی که مانع از رشد یک سویه باکتری می‌شود به عنوان حداقل غلظت مهاری^۳ گزارش می‌شود.

فعالیت ضد میکروبی

روش بیواتوگرافی

جهت تعیین R_f ماده فعال ضد میکروبی از روش سیواتوگ افه استفاده شد.

کروماتوگرافی لایه نازک روی فراکسیون فعال با حلال بوتانل - آب - اسیداستیک (۱: ۱/۵: ۶) انجام شد. پس از خشک شدن کروماتوگرام، پلٹ روی محیط کشت جامد مولر هیتون به مدت ۱۵ دقیقه گذاشته شد، تا مواد موجود روی کروماتوگرام به محیط کشت منتقل شود، سپس از سویه شیگلا سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه و به کمک سواب روی پلٹ های مورد آزمایش کشت داده شد.

بعد از گرمخانه‌گذاری در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت هاله‌های عدم رشد روی پلیت، نشانگر وجود ماده با مواد ضد میکروبی روی کروماتوگرام

² Agar dilution³ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

جدول شماره ۱- فعالیت ضد میکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های گیاه *Geum kokanicum* به روش انتشار

عصاره ۱۰ mg/disc	عصاره تام اتانلی	عصاره اتردوپترولی	عصاره دی کلرومتانی	عصاره متانلی	عصاره آبی
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29737	۱۸ میلی‌متر	-	۱۵/۵ میلی‌متر	۱۹ میلی‌متر	۱۵/۵ میلی‌متر
اشریشیاکلی ATCC 8739	-	-	-	-	-

جدول شماره ۲- نتایج فعالیت ضد میکروبی فراکسیون متانلی *Geum kokanicum* به روش انتشار

قطر هاله عدم رشد به میلی‌متر			میکروارگانیزم
جنتاماسین ۱۰ µg/disc	سیپروفلوکساسین ۵ µg/disc	فراکسیون متانلی ۱۰ mg/disc	
۲۰/۵	۲۹	۱۸	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
۱۹	۲۶/۵	۱۹	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۳	۲۰	۱۱	سویه ای از استرپتوکوک نوع A
۱۶	۲۸	-	اشریشیاکلی
۲۶	۳۰	۱۸	باسیلوس سوبتیلیس
۱۹	۳۳	-	سالمونلا تیفی
۱۶	۲۹	۱۴	پسودوموناس آئروژینوزا
۱۹	۳۱	۲۰	سویه ای از شیگلا
۲۱	۳۸	-	سویه ای از کلبسیلا

آزمون حداقل غلظت مهاري

با انجام آزمایش حداقل غلظت مهاري^۱، حداقل غلظتی از عصاره گیاه که به طور کامل باعث رشد میکروارگانیزم‌ها بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌شود، تعیین شد. نتایج آزمون MIC عصاره تام روی میکروب‌های مختلف در جدول شماره ۳ آورده شده است. حداقل غلظت مهاري عصاره اتانلی از ۲ - ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تغییر می‌کند. کمترین آن مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمیس ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداکثر آن برای سویه‌های میکروبی است که در آزمون انتشار، حساسیتی به وجود ۱۰ mg/disc از فراکسیون اتانلی نشان ندادند.

خاصیت ضد میکروبی فراکسیون تاننی تغلیظ شده

محلول تانن‌دار و محلول باقیمانده حاصل از فراکسیون متانلی برای انجام آزمایش ضد میکروبی بر شیگلا استفاده شد. در این کار از روش چاهک استفاده شد. محلول حاوی تانن خاصیت ضد میکروبی قوی‌تری از نمونه فاقد تانن نشان داد. هاله عدم رشد ۲۱ میلی‌متر برای محلول باقیمانده و ۲۶ میلی‌متر برای محلول تانن‌دار بود. در کروماتوگرافی فراکسیون تغلیظ شده حاوی تانن و محلول باقی‌مانده با استفاده از سیستم حلال بوتانل - آب - اسید استیک (۶ : ۱/۵ : ۱)، دو لکه برای فراکسیون تغلیظ شده با $R_f = ۰/۸۲$ و $R_f = ۰/۷۳$ و یک لکه با $R_f = ۰/۷۳$ برای محلول باقی‌مانده قابل مشاهده بود. سپس آزمون بیواتوگرافی روی محلول باقی‌مانده و فراکسیون تانن‌دار انجام شد که در نتیجه آن یک هاله عدم رشد در منطقه

^۱ MIC



جدول شماره ۳ - نتایج آزمون حداقل غلظت مهاري عصاره تام *Geum kokanicum*

MIC	۰/۰۶۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲۵	۰/۵	۱ میلی گرم بر میلی لیتر	۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۴ میلی گرم بر میلی لیتر	غلظت (mg/ml)	میکروارگانیزم
میلی گرم بر میلی لیتر	میلی گرم بر میلی لیتر	میلی گرم بر میلی لیتر	میلی گرم بر میلی لیتر	میلی گرم بر میلی لیتر					
۰/۱۲۵	++	-	-	-	-	-	-		استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
۱	++	++	++	++	-	-	-		استافیلوکوکوس اورئوس
۲	++	++	++	++	++	-	-		سویه ای از استرپتوکوک نوع A
۲	++	++	++	++	++	-	-		اشریشیاکلی
۰/۲۵	++	++	-	-	-	-	-		باسیلوس سوبتیلیس
۲	++	++	++	++	++	-	-		سالمونلا تیفی
۲	++	++	++	++	++	-	-		پسودوموناس آئروژینوزا
۰/۲۵	++	++	-	-	-	-	-		سویه ای از شیگلا
۲	++	++	++	++	++	-	-		سویه ای از کلبسیلا

با $R_f = 0.73$ در هر دو محلول مشاهده شد که در مورد فراکسیون تانن دار قطر بزرگ تری داشت.

بحث

گیاهان جنس *Geum* دارای اثرات گسترده در طب سنتی کشورهای مختلف می باشند. گیاه *Geum japonicum* در طب سنتی چین و ژاپن به عنوان قابض و مدر کاربرد دارد [۹] و عصاره تام و فراکسیون تاننی این گیاه دارای اثر ضدتجمعی پلاکتی می باشد [۸]. گیاه *Geum quellyon* در طب سنتی شیلی برای درمان التهاب، مشکلات پروستات، درد دندان و ... کاربرد دارد [۱۰]. مطالعات فیتوشیمیایی چندانی بر روی آن انجام نشده و تنها ترکیباتی از دسته تاننها در آن شناسایی شده اند که این ترکیبات دارای اثرات ضدویروس [۱۱]، ضدباکتری [۱۲] و ضدسرطان [۱۳] می باشند.

براساس این مطالعه مشخص شد که عصاره تام این گیاه حاوی مقادیر زیاد تانن می باشد و خاصیت قابض بودن ریزوم گیاه به دلیل تانن فراوان آن است. نتایج ضدمیکروبی عصاره تام و فراکسیون ها روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی نشان داد که عصاره تام و فراکسیون های دی کلرومتان، متانل و آبی روی استافیلوکوکوس اورئوس اثر دارند. این نمونه ها روی اشریشیاکلی و فراکسیون اتردوپترول روی

هیچ کدام از میکروب ها تاثیر ندارند.

فراکسیون متانلی روی استافیلوکوکوس اورئوس بزرگ ترین هاله عدم رشد و در نتیجه بیشترین اثر ضدمیکروبی را دارا می باشد. پس مراحل بعدی مطالعات ضدمیکروبی را با فراکسیون متانلی ادامه دادیم.

در مقایسه اثر ضدمیکروبی فراکسیون متانلی با آنتی بیوتیک های استاندارد مشخص شد که این فراکسیون روی سویه شیگلا از بقیه موثرتر است.

به منظور جداسازی مواد موجود در فراکسیون متانلی، سیستم های حلال مختلف برای کروماتوگرافی امتحان شد و سیستم بوتانل - آب - اسیداستیک (۶: ۱/۵ : ۱) به عنوان بهترین سیستم حلال انتخاب شد.

با این سیستم حلال دو لکه با $R_f = 0.91$ و $R_f = 0.73$ مشاهده شد که با انجام آزمون بیواتوگرافی لکه با $R_f = 0.73$ دارای اثر ضدمیکروبی می باشد. نتایج آزمون MIC عصاره تام نشان داد که حساس ترین میکروب استافیلوکوکوس اپیدرمیس و بعد از آن سویه شیگلا و باسیلوس سوبتیلیس می باشد.

به منظور بررسی بیشتر فراکسیون فعال متانلی، این فراکسیون با روش رسوب دادن تاننها با ژلاتین، به دو بخش فراکسیون سرشار از تانن و محلول باقی مانده تقسیم شد. در مقایسه اثر ضدمیکروبی فراکسیون تانن دار و محلول باقی مانده



محلول باقی مانده هاله عدم رشد در همین منطقه تشکیل شد که در مورد فراکسیون تانن دار بزرگ تر از محلول باقی مانده بود. در نتیجه ماده اصلی مسؤول اثر ضد میکروبی که در فراکسیون اولیه موجود بوده و در فراکسیون تاننی کاملاً تغلیظ شده، دارای ساختمان مربوط به ترکیبات تاننی می باشد و باقی مانده این مواد در محلول باقی مانده مسؤول اثرات ضد میکروبی جزئی محلول می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری آقای جمالی فر در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده داروسازی تشکر و قدردانی می شود.

مشخص شد که هر دو موثر هستند و اثر فراکسیون تانن دار بیشتر است.

با مقایسه R_f لکه های مشاهده شده از دو محلول مذکور روی TLC، احتمال می رود علاوه بر تانن ها که مسؤول اثر ضد میکروبی فراکسیون متانلی هستند، مواد دیگری هم اثر ضد میکروبی داشته باشند که در محلول باقی مانده اثرات خود را اعمال می نمایند.

برای بررسی بیشتر این موضوع کروماتوگرافی با سیستم بوتانل - آب - اسید استیک (۶: ۱/۵ : ۱) روی فراکسیون متانلی، فراکسیون تانن دار و محلول باقی مانده انجام شد و مشخص شد یک لکه مشترک با $R_f = ۰/۷۳$ در هر سه وجود دارد که به دنبال آزمایش بیواتوگرافی روی فراکسیون تانن دار و

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. Zargari A. Medicinal Plants. 6st ed. Tehran University Press. Iran. 1997, Vol. II, pp: 134 - 5.
4. Fariborz M, Samsamshariat H and Afsharipoor S. Plant Therapy. Mashal Press. Iran. 1987, pp: 136 - 7.
5. Abutorabi H. Ethnobotany and Phytochemical Studies of Rouin Region Plants. Pharm. D. dissertation No. 4247. Faculty Tehran University of Medical Sciences. 2001, pp: 134 - 5.
6. Monsef HR, Faramarzi MA, Moghimi M. and Shahverdi AR. Essential oil compositions of the roots, rhizomes and the aerial parts of *Geum kokanicum*. 35th International Symposium on Essential Oils. 2004, Messina, Italy.
7. L Panizzi S, Catalano C, Miarelli PLC and Campeol E. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Geum rivale*. *Phytother. Res.* 2000; 14: 561 - 3.
8. Hui D, Shao XC, Manjunatha KR and Hong X. Effect of tannins from *Geum japonicum* on the catalytic activity of thrombin and factor X_a of blood coagulation cascade. *J. Nat. Prod.* 1998; 61 (11): 1356 - 60.
9. Yoshida T, Okuda T, Memon MU and Shingu T. Tannins of rosaceous medicinal plants Part 2. Gemins A, B and C, new dimeric ellagitannins from *Geum japonicum*. *J. Chem. Sci.* 1985; 1: 315 - 21.
10. Munoz O, Montes M and Wilkomirsky T. Quimicay Farmacologia In: Maldonado S. *Plantas Medicinales de uso en Chile*. Editorial Universitaria, S.A. Santiago. Chile. 2004, pp: 129 - 32.
11. Nakashima H, Murakami T, Yamamoto N, Sakagami S, Tanuma SI, Hatano T, Yoshida T and Okuda T. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Research.* 1992; 18: 91 - 103.
12. Chung KT, Lu Z and Chou MW. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chem. Toxicol.* 1998; 36: 1053 - 60.

13. Gali-Muhtasib HU, Younes IH, Karchesy JJ and Sabban ME. Plant tannins inhibit the induction of aberrant crypt foci and colonic tumors by 1, 2-

dimethylhydrazine in mice. *Nutr. Can.* 2001; 39: 108 – 16.

