

بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره گیاه دارویی مامیران (*Chelidoniummajus* L.)

اکرم اسفندیار^{۱*}، سید کمال کاظمی تبار^۲، غفار کیانی^۳

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده

مامیران گیاهی دارویی با نام علمی *Chelidoniummajus* از تیره *Papaveraceae*، سرشار از مواد آلكالوئیدی و فنولی می‌باشد که اختصاصات ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد توموری، ضد التهابی و ... دارد. در این پژوهش برای بررسی خواص ضد باکتریایی گیاه مامیران، از عصاره متانولی قسمت هوایی گیاه (برگ و ساقه) در ۳ غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ (میلی‌گرم ماده خشک / میلی‌لیتر حلال) در برابر سویه‌های *Pseudomonas syringae*، *Pseudomonas syringae*، *Rathayibacter tritici* و *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* انجام گرفت. نتایج تجزیه واریانس تأثیر عصاره‌های متانولی بخش‌های هوایی گیاه بر روی سه سویه باکتری در روش انتشار دیسک نشان داد که اثر عصاره‌های متانولی معنی‌دار می‌باشد. غلظت ۱۵۰ mg/ml بیش‌ترین اثر بازدارندگی را روی سه سویه باکتری داشت. حساس‌ترین باکتری به عصاره مامیران باکتری *Rathayibacter tritici* با میانگین قطر هاله ۲/۵۸۱ میلی‌متر (بر اساس داده استاندارد) و مقاوم‌ترین باکتری *Pseudomonas syringae* با قطر هاله ۲/۴۴ میلی‌متر می‌باشد.

کلید واژه‌ها: آلكالوئید؛ خواص ضدباکتریایی؛ عصاره متانولی؛ مامیران؛

مقدمه

داروهای گیاهی به عنوان جای‌گزین داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مامیران گیاهی داروئی از تیره خشخاش *Papaveraceae* است که نام علمی آن *Chelidoniummajus* L. و نام لاتین آن *Celandine* می‌باشد. گیاهی علفی، دو یا چند ساله و دولپه است (Phillips & Rix, 1991). و به طور خودرو در قسمت‌های جنوبی و اروپای مرکزی، بخش‌های آسیا و شمال آمریکا رشد می‌کند (Tin Wa et al, 1972). گیاه مامیران سرشار از مواد متنوعی است که اختصاصات ضد میکروبی، ضد توموری و ضد التهابی دارد (Colombo & Bosisio, 1996). خاصیت مسکن بودن، مدر بودن، تحریک کردن ترشح صفرا و همچنین خاصیت ضداسپاسمی این دارو مشخص شده است (Benninger, 1999). دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان، ضد حساسیت و ضد سرطان می‌باشد (Williams, 2004). اهمیت دارویی و پزشکی موجود در این گیاه بر مبنای سنتز ترکیباتی می‌باشد که از نظر دارویی مهم تلقی می‌گردند. از جمله آن می‌توان به آلكالوئیدها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک اشاره کرد (Tome & Colombo, 1995). مامیران حاوی آلكالوئید چلیدونیناست که شبیه آلكالوئید پاپاورین خشخاش می‌باشد (Decker et al, 2000). گیاه محتوی مقدار زیادی متابولیت‌های ثانویه آلكالوئید ایزوکینولین از جمله

یکی از دغدغه‌ها و نگرانی‌ها در علوم زیستی و پزشکی، مقاومت باکتریایی و قارچی است تا جایی که میزان مقاومت برخی از این باکتری‌ها به داروهای شیمیایی بیش از ۹۰ درصد است (Khosravi & Melecan, 2004). طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به خصوص گیاهان داروئی اساس و حتی در برخی موارد تنها وسیله درمان محسوب می‌شدند و در عین حال مواد اولیه آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت (Fabrican, 2001; Weckesser et al, 2007). اوایل قرن بیستم پیشرفت علم شیمی و کشف سیستم‌های پیچیده سنتز آلی منجر به توسعه صنعت داروسازی و جای‌گزینی داروهای صناعی به جای داروهای گیاهی شد. اما همزمان با پیشرفت در تولید داروهای شیمیایی جدید و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، به تدریج اثرات مضر این داروها ظاهر شدند و از دهه ۱۹۵۰ باکتری‌های بیماری‌زای متعددی به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند که این مقاومت همچنان در حال گسترش است (Khoravi & Malecan, 2004). همچنین گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمان‌های گیاهی و به طور کلی فرآورده‌های طبیعی به ویژه در طی سال‌های اخیر روبه افزایش بوده و مهمترین علل آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی که کره زمین را تهدید می‌کند از سوی دیگر بوده است. لذا بهره‌گیری از

*نویسنده مسئول: sanru_esfandyar@yahoo.com

احتمال ۱٪ (> ۰/۰۱) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای آماری SAS نسخه ۹٫۱ و Excel انجام گرفت.

۳- کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی

برای شناسایی ترکیبات، عصاره گیاه مامیران تحت (GC- MS) قرار گرفت ولی به دلیل نبود برخی استانداردهای گیاه مامیران پیک‌ها نامشخص بود. به همین دلیل از اسانس گیاه که توسط دستگاه کلونجر گرفته شد برای شناسایی ترکیبات استفاده شد.

دستگاه کروماتوگرافی گازی می‌تواند ترکیبات فرار و نیمه فرار را با حد تشخیص بالا جداسازی کند اما نمی‌تواند آنها را شناسایی نماید. طیف سنج جرمی می‌تواند اطلاعات جزئی ساختمانی بیشتر ترکیبات را تهیه کند به طوری که آنها به طور دقیق شناسایی شوند اما نمی‌تواند به آسانی آنها را از هم جدا سازی کند. در این حالت کروماتوگرافی گازی با طیف سنج جرمی جفت شده است. در این وضعیت طیف سنج جرمی نقش آشکار کننده را ایفا می‌کند. در این تکنیک که کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC- MS) خوانده می‌شود، جریان گاز خارج شده از کروماتوگراف گازی پس از عبور از یک شیر، از لوله حاوی روزنه مولکولی گذر می‌کند سپس مقداری از جریان گاز وارد محفظه یونیزاسیون دستگاه طیف سنج جرمی می‌گردد. بدین طریق حصول طیف جرمی هر جزء موجود در یک مخلوط تزریق شده به کروماتوگراف گازی ممکن می‌گردد.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی:

مدل technologiesAgilent7890A , ستون کروماتوگراف

thickness 0.25µm Film mm 30M×0.25 dimethyl siloxane .95% Phenyle)
(5%)

Hp- 5ms

گاز حامل: هلیوم،

برنامه حرارتی از ۶۰ تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه شد. دمای محفظه تزریق: ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز: ۱ mL/min بود.

شناسایی ترکیبات به کمک طیف‌های جرمی استاندارد، مقایسه شاخص بازدارندگی کوآتس ترکیبات با نمونه‌های استاندارد و نرم افزار کامپیوتری Willey ۷٫۱ صورت گرفت (Adams, 1995).

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس تأثیر عصاره‌های متانولی بخش‌های هوایی گیاه بر روی سه سویه باکتری در روش انتشار دیسک را در زیر نشان می‌دهد (جدول ۱). همان‌گونه که ملاحظه می‌شود اثر عصاره‌های متانولی معنی‌دار می‌باشد که این بدان مفهوم است که عصاره‌های متانولی بخش‌های هوایی گیاه مامیران روی سه باکتری *Rathayibactertritici*، *Xanthomonascampestrispv* و *Pseudomonas syringaepvsyringae* اثر بازدارندگی دارد. حلال مورد استفاده (متانول) اثر ضد میکروبی را نشان نداد.

این اثر بازدارندگی با افزایش غلظت عصاره متانولی بر روی سه باکتری اخیر افزایش یافته است که به صورت افزایش هاله عدم رشد مشاهده شد (جدول ۲). گروه بندی اثر غلظت‌های عصاره بخش‌های هوایی مامیران با آزمون دانکن نشان داد که غلظت ۱۵۰ mg/ml با میانگین قطر هاله ۳/۵۶۱ میلی‌متر نسبت به دو غلظت دیگر بیش‌ترین اثر بازدارندگی را دارد.

تجزیه واریانس برای عصاره اندام‌های هوایی مامیران در سطح ثابتی از باکتری نشان داد که موثرترین غلظت برای مقابله با سه باکتری، غلظت ۱۵۰ mg/ml باشد (جدول ۳). حساس‌ترین باکتری به عصاره مامیران باکتری *Rathayibactertritici* با میانگین قطر هاله ۲/۵۸۱ میلی‌متر و مقاوم‌ترین باکتری *Pseudomonas syringaepvsyringae* با قطر هاله ۲/۴۴ میلی‌متر می‌باشد. همچنین نتایج مربوط به طیف کروماتوگرام گازی اسانس گیاه مامیران نشان

این آلکالوئیدها دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند (Kupeli, 2002).

اشراقی و همکاران (۱۳۸۶)، اثرات ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ۱۲ گونه از گیاهان بومی ایران بر سوش‌های بیماری زای نوکاردیا را مورد بررسی قرار دادند. هدف اصلی از این مطالعه اثرات ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی چند گونه گیاهی بومی ایران بر علیه باکتری عامل بیماری نوکاردیوز بود. نتایج حاصله حاکی از آن است که عصاره الکلی شش گونه گیاهی مورد مطالعه شامل مامیران، شقایق کوهی، شیرین بیان، گلپر، پونه بینالود و گل مورو اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر نوکاردیا نشان می‌دهند.

منوری و همکاران (۲۰۱۱)، ارزیابی فعالیت ضدویروسی گیاه *Chelidoniummajus L.* در برابر ویروس بیماری تبخال نوع ۱ در محیط آزمایشگاه را مورد مطالعه قرار دادند. با بررسی فعالیت ضدویروسی آن بر علیه ویروس بیماری تبخال نوع ۱ (HSV-1) در عصاره *C. majus L.* بدست آمده از کشت سلولی، از رشد و تکثیر HSV-1 جلوگیری کرده است. آنالیز شیمیایی و فعالیت آنتی میکروبیال عصاره متانولی گیاه مامیران در طبیعت و در شرایط این ویتر و مورد بررسی قرار داد. هدف اصلی از این مطالعه بررسی محتوای کلی آلکالوئید و فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه در طبیعت و در شرایط این ویتر و بود. عصاره‌های متانولی از تمام نمونه‌ها (برگ، دمبرگ، جنین و ساقه) فعالیت‌های قابل توجهی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد.

مارکل پارویو (۲۰۱۳)، استخراج ترکیب شیمیایی مامیران و اثرات آن بر قارچ *Botrytis tulipae* را مورد مطالعه قرار داد. در این مطالعه، محتوای آلکالوئیدهای چلیدونین و بربرین، و استرول و فنل‌ها در عصاره مامیران مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه مواد گیاهی برای عصاره

در این پژوهش از گیاهان خودرو جمع‌آوری شده در استان مازندران استفاده شد. ابتدا اندام‌های هوایی (برگ و ساقه) گیاه مامیران در محیط سایه به دور از آفتاب خشک گردید، سپس به وسیله میکسر پودر شد و به نسبت ۱۰ گرم پودر به ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول ۸۰٪ (شرکت مرک) به مدت ۲ روز با استفاده از شیکر مخلوط و خیس‌انده شد. سپس از کاغذ صافی عبور داده شد و با دستگاه روتاری متانول تخییر شد و عصاره خشک شده برای سنجش خاصیت آنتی‌باکتریال گیاه مامیران جهت تهیه رقت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. این رقت‌ها در ۳ غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ (میلی‌گرم ماده خشک/ میلی‌لیتر حلال) انجام گرفت.

۲- سنجش فعالیت ضد باکتریایی

برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌ها از روش دیسک کاغذی (Disc fusion assay) با استفاده از اندازه‌گیری هاله عدم رشد، استفاده شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط *NAS (Nutrient AgarSocurose)* کشت داده شد. دیسک‌ها (به قطر ۶ میلی‌متر) با ۴۰ میکرو لیتر از هر کدام از عصاره‌ها آغشته گردید و روی محیط مورد نظر قرار داده شدند. آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (به صورت دیسک آماده با ۳۰) به عنوان کنترل مثبت برای تعیین هر گونه میکروب مورد آزمایش، قرار گرفته شدند؛ و همچنین دیسک‌های آغشته به حلال به عنوان کنترل منفی روی محیط قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۲۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد را از پشت پلئیت باکولیس دیجیتال اندازه‌گیری کرده و نتایج حاصله به منظور مقایسه رقت‌های مختلف ثبت گردید. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد و نتایج با مقایسه میانگین آزمون‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح

از خود نشان داده است که با نتایج به دست آمده بر روی باکتری گرم منفی و مثبت و هاله عدم رشد هماهنگی دارد. همچنین طبق گزارشات آنا کی ریک و همکاران (۲۰۰۸) عصاره متانولی مامیران موجب بازدارندگی رشد بسیاری از باکتری‌ها می‌شود که با نتایج به دست آمده مطابقت دارد. بنابراین طبق نتایج ما گیاه مامیران دارای فعالیت آنتی‌باکتریال قوی می‌باشد که می‌تواند رشد بسیاری از باکتری‌ها را متوقف کند و به عنوان یک گیاه دارویی با بازدارندگی رشد بسیاری از باکتری‌ها، موثر واقع شود.

می‌دهد که، فیتول (Phytol) به میزان ۶۰/۲۷ درصد بیش‌ترین ترکیب اسانس بخش‌های هوایی (برگ و ساقه) و پنتاکوسان (Pentacosane) به میزان ۰/۹۵ درصد کمترین ترکیب را به خود اختصاص داده است. (جدول ۴). طبق گزارشات اشراقی و همکاران (۱۳۸۶)، آزمایشات انجام شده در سراسر دنیا روی عصاره گیاه مامیران نشان می‌دهد که این گیاه اثرات مهارکنندگی قابل توجهی بر بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و منفی مانند Pseudomonas, Bacillus, Streptococcus mutans, Escherichiacoli, Staphylococcus aureus و نیز قارچ‌های Candidaalbicans و حتی بر ویروس‌ها نظیر ویروس آنفولانزا

جدول ۲- مقایسه اثر غلظت‌های عصاره

غلظت عصاره (mg/ml)	میانگین قطر هاله بر اساس داده استاندارد (mm)
۵۰	c۰/۷۱
۱۰۰	b۳/۲۱۳
۱۵۰	a۳/۵۶۱

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به عصاره بخش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۲	xx۰/۱۲۹۸۵۷۲
غلظت	۴	xx۲۶/۸۴۷۸۸۷۳
غلظت * باکتری	۸	xx۰/۲۹۸۱۳۴۰
خطای آزمایش	۲۹	xx۰/۰۰۹۴۷۵۹

* معنی دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۳- اثر عصاره اندام‌های هوایی مامیران روی ۳ سویه باکتری

باکتری	میانگین قطر هاله بر اساس داده استاندارد (mm)
<i>Rathayibactertritic</i>	a۲/۵۸۱
<i>Xanthomonascampestrispv</i>	b۲/۵۳۶
<i>Pseudomonas syringaepvsyringae</i>	c۲/۴۴

جدول ۴- نوع و درصد ترکیبات شیمیایی اسانس بخش‌های هوایی گیاه مامیران

درصد	ترکیب	درصد	ترکیب
۴/۷۴	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethy...	۱/۵۰	۹,۱۲-Octadecadienoic acid (Z,Z,...-
۱/۶۵	Tetradecane	۸/۴۲	۹,۱۲,۱۵-Octadecatrienoic acid, m...
۱/۱۴	Heptacosane	۶۰/۲۷	Phytol
۱/۵۸	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethy...	۱/۹۳	Oxirane, heptadecyl-
۱/۹۹	Hexadecane	۲/۲۵	Docosane
۰/۹۵	Pentacosane	۱/۴۶	Tricosane
۱/۱۸	Octadecane	۱/۱۵	Tetracosane
۱/۳۳	Nonadecane	۱/۵۱	۱,۲-Benzenedicarboxylic acid, 3...-
۳/۵۵	Pentadecanoic acid, 14-methyl... -	۱/۷۳	۲,۶,۱۰,۱۴,۱۸,۲۲-Tetracosahexaene...
		۱/۶۷	Hexadecane

parative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species, *Life Sciences* 72, pp. 645- 657

Monavari H, ShamsiShahrabadi M, Keyvani H and Farah bokharaei S. (2011). Evaluation of in vitro antiviral activity of *Chelidoniummajus*L. against herpes simplex virus type. *African Journal of Microbiology Research*. Department of Virology and Antimicrobial Resistance Research Center, Tehran University of Medical Sciences. Vol 6(20): 4360-4364

Parvu M, VlaselFodorpataki L, Parvu O, Roscacasian O, Bartha C, Barbu L and Elena Parvu A. (2013). Chemical Composition of Celandine (*Chelidoniummajus* L.) Extract and its Effects on *Botrytis tulipae* (Lib.) Lind Fungus and the Tulip. *Not Bot HortiAgrobo*. 48(2):414-426

Phillips R and Rix M. (1991). *Perennials Volumes1 and 2*. Pan Books. ISBN0-330-30936-9

Tin Wa M, Kim H. K, Fong H. H and Farnsworth N. R. (1972). The structure of chelidimerine, a new alkaloid from *Chelidoniummajus*, *Lloydia* 35, 8789

Tome F and Colombo M. L. (1995). Distribution of alkaloids in *Chelidoniummajus* and factors affecting their accumulation, *Phytochemistry* 40, 3739

Weckesser S, Engel E, Simon B, Wittmer A, Pelz K, Schmepp C. M. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine*. 14: 508-16

Williams R. J, Spenser J. P. E and Rice Evans C. (2004). Flavonoids: 16-antioxidants or signalling molecules, *Free Radic Biology Med* 36: 838-49

منابع

۱- اشراقی س. امین غ. و فخری س. (۱۳۸۸). مطالعه اثرات ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ۱۲ گونه از گیاهان بومی ایران بر سوش های بیماری زای نوکاردیا. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ش ۸۲.

Adams P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Carol Stearm, USA: Allured Publishing Corp

Benninger J, Schneider H. T, Schuppan D, Kirchner T and Hahn E.G. (1999). Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidoniummajus*). *Gastroenterology* 117: 1234-1237

Ciric A, Vinterhalter B, SavikinFodulovic K, Sokovic M and Vinterhalter D. (2008). Chemical analysis and antimicrobial activity of methanol extracts of celandine (*Chelidoniummajus* L.). plants growing in nature and cultured in vitro. *Arch Biology Science*. Belgrade. 60 (1): 7-8

Colombo M. L and Bosisio E. (1996). Pharmacological activities of *Chelidoniummajus* L. (*Papaveraceae*). *Pharmacologi Research*. 33: 127-134

Decker G, Wanner G, Zenk M. H and Lottspeich F. (2000). Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing, *Electrophoresis* 21 (2000), pp. 3500 3516

Fabrican D. S, Farnsworth N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect (EHP)*; 109: S69-75

Khosravi A, Malecan M. (2004). Effects of *Lavandulastoechas* extracts on *staphylococcus aureus* and other gram negative bacteria. *The Journal [of Qazvin University of Medical Sciences]*; 29: 3-9. [In Persian

Kupeli E, Kosar M.Y, esilada E, Husnu K and Baser C. (2002). A com-

Evaluation antibacterial properties of medicinal plant extracts Celandine (*Chelidoniummajus* L.)

AkramEsfandiar^{*1}, SeyedKamalKazemitabar² and Ghaffar Kiani³

1-Student plant Breeding and Biotechnology Dept., Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Mazandaran

2-Professor of plant breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Mazandaran

3-Assistant professor of plant breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Mazandaran

Abstract

Celandine medicinal plant with the scientific name *Chelidoniummajus* L of the family Papaveraceae, which is full of alkaloids and phenolic anti-microbial characteristics , and anti- viral , anti- tumor , anti- inflammatory and so on

In this study, to investigate the antibacterial properties Celandine plant , the methanol extract of the aerial parts of the plant (leaves and stems) 3 concentration in 50, 100 and 150 mg / ml (mg DM / mL solvent) against *Pseudomonas syringae*pv*syringae*. *Xanthomonas campestris*pv. *campestris*. *Rathayibacter*triticici strains were selected. Antibacterial activity of the inhibitory zone diameter of a disk diffusion assay was evaluated

Methanol extracts of the aerial parts of the plant impact analysis of variance on three strains of bacteria in the disk diffusion method showed that the methanol extracts was significant . Concentration in 150 mg/ml maximum inhibitory effect on the three strains of bacteria. Sensitive bacteria to extract bacteria Celandine *Rathayibacter*triticici with a mean diameter of 2/581 mm (based on the standard) and resistant bacteria *Pseudomonas syringae*pv*syring* with a diameter of 2/44 mm professionalism

Keywords: Alkaloid; Anti bacterial properties; Methanol extracts; Celandine;