

بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره گیاه دارویی مامیران (*Chelidonium majus* L.)

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

چکیده

مامیران (*Chelidonium majus*) گیاهی دارویی از تیره Papaveraceae، سرشار از مواد آکالوئیدی و فنولی می باشد که اثرات ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد توموری و ضد التهابی 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 (میلی گرم ماده خشک/ میلی لیتر حلال) در برابر سویه ها *Rathayi* و *Xanthomonas campestris pv. Campestris Pseudomonas Syringae pv. syringae bactertritici* استفاده شد. فعالیت ضد باکتریایی بر اساس قطر هاله ممانعت کننده از رشد با روش سنجش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس تأثیر عصاره های متانولی بخش های هوایی گیاه بر روی سه سویه باکتری در روش انتشار دیسک نشان داد که اثر عصاره های متانولی معنی دار می باشد. غلظت ۱۵۰ mg/ml بیشترین اثر بازدارندگی را روی سه سویه باکتری داشت. حساس ترین باکتری به عصاره مامیران باکتری *Rathayi bactertritici* با میانگین قطر هاله ۲/۵۸۱ میلی متر (براساس داده استاندارد) و مقاوم ترین باکتری *Pseudomonas syringae pv. syring* با قطر هاله ۲/۴۴ تشخیص داده شد.

واژه های کلیدی: مامیران، آکالوئید، خواص ضدباکتریایی، عصاره متانولی

۱- * کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
sanru_esfandyar@yahoo.com

۲- دانشیار اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

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 & Malecan, 2004). طی سالیان متمادی داروهای طبیعی به خصوص گیاهان دارویی، رایج و حتی در برخی موارد تنها وسیله درمان محسوب می‌شد 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 سنتزی 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 (Khosravi & 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 رو به 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. مامیران (*Chelidonium majus L.*) گیاهی دارویی از تیره خشخاش *Papaveraceae* است. گیاهی علفی، دو یا چند ساله و دولپه است (Phillips & Rix, 1991) و به طور خودرو در قسمت‌های جنوبی 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 ضد اسپاسمی 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 تولید ترکیباتی می‌باشد که از نظر دارویی مهم تلقی می‌گردند. از جمله آن می‌توان به آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها یا اسیدهای فنولیک اشاره کرد (Tome & Colombo, 1995). مامیران حاوی آلکالوئید چلیدونین است که شبیه آلکالوئید پاپاورین خشخاش می‌باشد (Decker et al, 2000). این گیاه محتوی مقدار زیادی متابولیت‌های ثانویه آلکالوئید ایزوکینولین از جمله Berberine, Chelirithrine, Sanguinarine, Chelidone و Coptisine می‌باشد. 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 بیماری‌زای 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 بود 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 *C. majus 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 شد.

آنا کی‌ریکو همکاران (۲۰۰۸) آنالیز شیمیایی و فعالیت آنتی میکروبیال عصاره متانولی گیاه مامیران را در طبیعت و در شرایط این ویترو مورد بررسی قرار دادند. هدف اصلی از این مطالعه بررسی محتوای کلی

($P > 0.01$) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای آماری SAS نسخه 1,9 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.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی: مدل technologiesAgilent ۷۸۹۰A، ستون کروماتوگراف

thickness 0.25 μ m Film mm 30M \times 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 اجرا شد. دمای محفظه تزریق: ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز: 1mL/min بود.

شناسایی ترکیبات به کمک طیف‌های جرمی استاندارد، مقایسه شاخص بازداری کوآنس ترکیبات با نمونه‌های استاندارد و نرم افزار کامپیوتری Willey 7.1 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 در زیر نشان داده شده است (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 *Rathayi bactertritici*، *Pseudomonas* و *Xanthomonascam pestriscopv* اثر بازدارندگی دارد.

آلکالوئید و فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه در طبیعت و در شرایط این ویترو بود.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه مواد گیاهی

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 شد، 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 تبخیر شد و عصاره خشک شده برای سنجش خاصیت آنتی‌باکتریال گیاه مامیران جهت تهیه رقت‌های مختلف استفاده شد. این رقت‌ها در ۳ غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ (میلی‌گرم ماده خشک/ میلی‌لیتر حلال) تهیه شد.

۲- سنجش فعالیت ضد باکتریایی

برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌ها از روش دیسک کاغذی (Disc fusion assay) با استفاده از اندازه گیری هاله عدم رشد، استفاده شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط NAS (Nutrient Agar Socrurose) 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 دوز ۳۰) به عنوان کنترل مثبت برای تعیین هر گونه میکروب مورد آزمایش، قرار گرفته شد و همچنین دیسک‌های آغشته به حلال به عنوان کنترل منفی روی محیط قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۲۷ درجه سانتی‌گراد قطره‌هاله عدم رشد را از پشت پلیت با کولیس دیجیتال اندازه گیری کرده و نتایج حاصله به منظور مقایسه رقت‌های مختلف ثبت شد. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد و نتایج با مقایسه ۱٪ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به عصاره بخش‌های هوایی گیاه مامیران

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۲	۰/۱۲۹۸۵۷۲ **
غلظت	۴	۲۶/۸۴۷۸۸۷۳ **
باکتری * غلظت	۸	۰/۲۹۸۱۳۴۰ **
خطای آزمایش	۲۹	۰/۰۰۹۴۷۵۹ **

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

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.

جدول ۲- مقایسه اثر غلظت‌های عصاره

غلظت عصاره (mg/ml)	میانگین قطر هاله بر اساس داده استاندارد (mm)
۵۰	۰/۷۱ ^c
۱۰۰	۳/۲۱۳ ^b
۱۵۰	۳/۵۶۱ ^a

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 می‌باشد (جدول ۳). حساس‌ترین باکتری به عصاره مامیران باکتری *Rathayi bacteritrici* با میانگین قطر هاله ۲/۵۸۱ میلی‌متر و مقاوم‌ترین باکتری *Pseudomonas Syringae pv. syring* با قطر هاله ۲/۴۴ میلی‌متر می‌باشد.

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

میانگین قطر هاله بر اساس داده استاندارد (mm)	باکتری
۲/۵۸۱a	<i>Rathayi bacteritrici</i>
۲/۵۳۶b	<i>Xanthomonas campestrispv</i>
۲/۴۴c	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>

همچنین نتایج مربوط به طیف کروماتوگرام گازی اسانس گیاه مامیران نشان 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).

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

درصد	ترکیب
۴/۷۴	-methylethy...۱-(۲-methyl-۵Phenol,
۱/۶۵	Tetradecane
۱/۱۴	Heptacosane
۱/۵۸	-dimethylethy...۱,۱-bis(۴,۲Phenol,
۱/۹۹	Hexadecane
۰/۹۵	Pentacosane
۱/۱۸	Octadecane
۱/۳۳	Nonadecane
۳/۵۵	...-methyl۱۴Pentadecanoic acid,
۱/۶۷	Hexadecane
۱/۵۰	...-Octadecadienoic acid (Z,Z۹.۱۲
۸/۴۲	...-Octadecatrienoic acid, m۹.۱۲,۱۵
۶۰/۲۷	Phytol
۱/۹۳	-Oxirane, heptadecyl
۲/۲۵	Docosane
۱/۴۶	Tricosane
۱/۱۵	Tetracosane
۱/۵۱	...-Benzenedicarboxylic acid, ۳۱.۲
۱/۷۳	...-Tetracosahexaene۲,۶,۱۰,۱۴,۱۸,۲۲

عدم رشد هماهنگی دارد. همچنین طبق گزارشات آنا کی‌ریک 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 کرده و به عنوان یک گیاه دارویی با بازدارندگی رشد بسیاری از باکتری‌ها، مورد استفاده واقع شود.

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 *Streptococcus mutans*, *Bacillus*, *Pseudomonas* و نیز *Staphylococcus aureus* و *Escherichiacoli* قارچ‌های *Candida albicans* و حتی بر ویروس‌ها نظیر ویروس آنفولانزا از خود نشان داده است که با نتایج به دست آمده بر روی باکتری گرم منفی و مثبت و هاله

منابع

- Kupeli, E., Kosar M.Y., esilada, E., Husnu, K. and Baser, C. (2002). A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species. *Life Sciences*. 72 (6): 645- 657.
- Monavari, H., Shamsi-Shahrabadi, M., Keyvani, H. and Farah bokharaei, S. (2011). Evaluation of in vitro antiviral activity of *Chelidonium majus* L. against herpes simplex virus type. *African Journal of Microbiology Research*. Department of Virology and Antimicrobial Resistance Research Center, Tehran University of Medical Sciences. 6(20): 4360-4364.
- Parvu, M., Vlase, L., Fodorpataki, L., Parvu, O., Roscacasian, O., Bartha, C., Barbu, L. and Elena-Parvu, A. (2013). Chemical Composition of Celandine (*Chelidonium majus* L.) Extract and its Effects on *Botrytis tulipae* (Lib.) Lind Fungus and the Tulip. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*. 48(2):414-426.
- Phillips, R. and Rix, M. (1991). *Perennials Volumes 1 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 *Chelidonium majus* L. *loydia*. 35 (1): 87-89.
- Tome, F. and Colombo, M. L. (1995). Distribution of alkaloids in *Chelidonium majus* and factors affecting their accumulation. *Phytochemistry*. 40: 37-39.
- Weckesser, S., Engel, E., Simon, B., Wittmer, A., Pelz, K. and Schmepp, C. M. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine*. 14 (7-8): 508-516.
- Williams, R. J., Spenser, J. P. E. and Rice Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules, *Free Radical Biology Medicine*. 36 (7): 838-849.
- اشراقی س. امین غ. و فخری س. (۱۳۸۸). مطالعه اثرات ضد باکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ۱۲ گونه از گیاهان بومی ایران بر سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ش ۸۲.
- Adams, P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Carol Stearn, USA: Allured Publishing Corp.
- Benninger, J., Schneider, H. T., Schuppan, D., Kirchner, T. and Hahn, E.G. (1999). Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus*). *Gastroenterology*, 117 (5): 1234-1237.
- Ciric, A., Vinterhalter, B., Savikin-Fodulovic, K., Sokovic, M. and Vinterhalter, D. (2008). Chemical analysis and antimicrobial activity of methanol extracts of celandine (*Chelidonium majus* 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 *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). *Pharmacology 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 (16): 3500-3516.
- Fabrican, D. S. and Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives (EHP)*; 109: S69-75.
- Khosravi, A. and Malecan, M. (2004). Effects of *Lavandula stoechas* extracts on *staphylococcus aureus* and other gram negative bacteria. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences*; 29: 3-9.