بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره ریشه زرشک بی‌دانه حاصل از استخراج توسط آب مادون بحرانی

نرگس رحیمی[1*]، سید علی مرتضوی[2]، عبدالمجید مسکوکی[3]، امیر حسین الهامی راد[4]، قدیر رجب زاده [5]

[1] دانش آموخته دکترای علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

[2] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ، ایران

[3] گروه فراوری موادغذائی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد ، ایران

[4] گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

[5] گروه نانو فناوری موادغذائی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 93/3/13 تاریخ پذیرش: 93/11/11

چکیده

افزایش مقاومت به انواع آنتی بیوتیک‌ها از مهمترین چالش هائیست که در زمان مصرف این داروها مطرح می‌باشد. در همین راستا علاقه به استفاده از داروهای با منشاء گیاهی در سطح جهان رو به افزایش است .در این پژوهش به منظور ارزیابی تاثیرروش استخراج بربرین توسط آب مادون بحرانی ، در مقایسه با بربرین استاندارد، بر فعالیت ضد میکروبی عصاره از پودرریشه زرشک، استفاده گردید و اثرات ضدمیکروبی این پودر بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و مخمر کاندیدا آلبیکنس بررسی و با بربرین خالص مقایسه گردید. نتایج نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی این ماده بر علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از انواع گرم منفیست و میزان MBC برای اشرشیاکلی ومیزان لازم برای کشندگی کاندیدا آلبیکنس بیش از80میلی‌گرم/میلی‌لیتر در حالیکه برای استافیلوکوکوس اورئوس حدود 70mg/ml تعیین گردید. فعالیت ضد میکروبی بربرین نیز در غلظت‌های مشابه با عصاره نتایج مشابهی داشت. در واقع ترکیبات همراه با بربرین در عصاره، تاثیری بر میزان فعالیت بربرین موجودر عصاره نداشت.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، ریشه زرشک بی دانه، استخراج توسط آب مادون بحرانی، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، کاندیدا آلبیکنس

*مسوول مکاتبه: n.rahimi@iaubir.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

1- مقدمه

مواد گیاهی را می توان منابع نا محدود و باارزشی برای تامین انواع افزودنی‌های غذائی، انواع موادمعطره و داروئی، رنگ ها ویا برای کاربرد مستقیم در پزشکی دانست . کاربردهای متعدد منابع متنوع گیاهی در سراسر جهان ودر اغلب کشورهای دنیا سابقه ای طولانی دارد و بتدریج بشر روش‌های نوینی را برای استفاده از این مواد گیاهی توسعه می‌دهد (2). امروزه استفاده ازترکیبات طبیعی دردرمان بیماری ها در حال افزایش می‌باشد که این امررا می‌توان تاحدودی بدلیل عدم کفایت طب نوین در درمان کامل برخی از بیماریها ویا بروز عوارض جانبی استفاده از داروها ودرمان‌های شیمیائی دانست (2و 5).

عصاره های گیاهی اساسا بصورت مخلوطی از ترکیبات متعدد می‌باشند که از بخش‌های مختلف گیاه خشک یا تازه مانندگل، دانه، برگ‌ها، ریشه و پوست ساقه توسط تکنیک های مختلف استخراج حاصل می‌گردد. کاملا مشهود است که حین استخراج، ترکیبات فعال موجود درگیاه همراه با سایر موادگیاهی استخراج می‌گردد. می‌توان استخراج مواد زیست فعال از مواد گیاهی را در گروه تکنولوژی مواد غذائی و داروهای گیاهی[1] دانست(5). به همین علت روش‌های مختلف مورد استفاده در آماده سازی مواد گیاهی در فارماکوپه های کشورهای متعددی مورد توجه قرار گرفته است .

زرشک بی دانه[2] بعنوان یکی ازگیاهان مورد استفاده در طب سنتی به ثبت رسیده ودر فارماکوپه های مختلف جهان نیز بعنوان گیاه داروئی موثر درج شده است(1و2). این گیاه متعلق به خانواده بربریداسه[3] بوده و بومی اروپا و آسیااست. لذا در ایران غالبا در نواحی شمالی ایران، ارتفاعات البرز، جنگل های مازندران و نواحی وسیعی از خراسان می روید. ریشه ها وپوست ساقه این گیاه از داروهای تلخ بشمار می آید و دارای اثرات مقوی صفرابری و مسهل است .میوه زرشک دارای مقادیر زیادی ویتامین C است که از لیموترش بیشتراست. بهمین جهت در درمان آسکوربوت ازآن استفاده می شود. از ریشه ها و پوست زرشک بصورت سنتی برای ناراحتی های گوارشی، ناراحتی های کبد ودرمان بیماریهای کلیوی و مجاری ادراری مصرف می شده است(1و2).

تاکنون از عصاره ریشه زرشک بعنوان عامل ضد روماتیسمی[4] وعامل ضد التهاب در طب سنتی استفاده شده است که این خاصیت بحضور ترکیبات آلکالوئیدی در آن نسبت داده می شود .عصاره الکلی این گیاه دارای آلکالوئیدهای بیس بنزیل ایزوکوئینولین[5] و پروتوبربرین[6] می باشد (2و9). تقریبا تمام گونه های جنس بربریس حاوی آلکالوئیدهای دارای فعالیت زیستی بوده ودر پزشکی مورد استفاده قرار می گیرند (9) .

در سالهای اخیر علاقه به استفاده از داروهای با منشاء گیاهی در سطح جهان رو به افزایش می‌باشد. بهمین دلیل گیاهان سنتی بمنظور کاربرد داروئی و ضد میکروبی فوق العاده مورد توجه می‌باشند که این امرتاکنون منجر به شناسائی ترکیبات زیست فعال متعددی در گیاهان شده است . در سال 1998 سازمان بهداشت جهانی اعلام کرد که 80% از جمعیت ساکن در کشورهای در حال توسعه غالبا به منظور درمان از داروهای سنتی استفاده می-کنند(12و13) .

نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین فعالیت های بیولوژیکی مختلفی مانند فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریائی و آنتی اکسیدانی را در انواع ترکیبات زیست فعال گیاهی اثبات کرده اند (11-20). آلکالوئیدها گروه بزرگی از متابولیت های ثانویه با ساختاری متنوع می‌باشند، که در طبیعت بمیزان وسیعی پراکنده شده و دارای فعالیتهای زیستی گوناگونی می باشند. آلکالوئید از موضوعات مورد توجه محققین از نظر علمی و فرهنگی می باشد و مخصوصا در طب سنتی بدان توجه زیادی شده است. آلکالوئید برای اولین بار در سال 1983 توسط Pelletier معرفی شد وتدریجا بدین گونه تعریف گردید: " آلکالوئیدها تمام ترکیبات طبیعی نیتروژنداری می‌باشندکه جزء گروه پپتیدها، آنتی بیوتیک ها ، آمینواسیدهای فاقد پروتئین، آمین ها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک ، گلوکوزینولات‌ها، کوفاکتورها و کلیه متابولیت‌های اولیه قرار نمی گیرند". آلکالوئیدها در 15% از گیاهان، باکتری‌ها ، قارچ‌ها و تعدادی از حیوانات یافت می شوند. در سلسله های گیاهی نیز هم در گیاهان بسیار قدیمی و هم در گیاهان عالی تر ازجمله نهاندانگان و بازدانگان یافت شده اند. بربریداسه از جمله خانواده های نهاندانگان است که نسبتا آلکالوئید بیشتری دارد (2و8).

[1]- *Phytopharmaceutical*
[2]- *Berberis Vulgaris*
[3]-*Berberidaceae*
[4]- *Anti rheumatic*
[5]-*Bisbenzylisoquinoline*
[6]-*Quaternary protoberberine*

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج پژوهش‌های متعدد نشان داده است که آلکالوئید بربرین از گیاهان خانواده آنوناسه، بربریداسه، لوراسه، منیزپرمه آسه، پاپاوراسه وروتاسه جدا شده است. آلکالوئیدهای تیره بربریداسه دارای هسته ایزوکینولین هستند و به سه گروه آپورفین، پروتوبربرین و بیس بنزیل ایزوکینولین تقسیم می شوند. بربرین نوعی آلکالوئید چهاروجهی از انواع ایزوکوئینولین‌هاست که از تعداد زیادی از گونه های متعلق به خانواده بربریداسه مانند *Berberis aristate* و *Coptis chinensis* جداشده است(8).

بررسی‌هائی که در سالهای 1987 و1997 در مورد فعالیت آنتی باکتریائی ، ضد قارچی و ضدویروسی آلکالوئیدهای گیاهی انجام شد، مبین توانائی ضدمیکروبی عصاره آلکالوئیدی گیاهان می باشند. همچنین مطالعات تائید کردند بربرین در کاهش کلسترول خون نیز (مخصوصا نوع مضر LDL) موثراست (7، 13- 15). البته نتایج مشابهی در مورد فعالیت ضدمیکروبی تعداد زیادی از گونه های مرتبط با جنس ماهونیا (خانواده بربریداسه) درسال های 2004 (Livia و همکاران) و 2007 (توسط Li وهمکاران) ثبت شده است (6،10،11، 12). این خاصیت بربرین بعلت توانائی آن در تداخل با ساختار DNA می باشد که متعاقبا منجر به ایجاد تداخل در بیوسنتز پروتئین های ضروری در سلول زنده می‌گردد. همچنین مطالعات نشان می دهند که بربرین می تواند از سنتز DNA و سنتزآنزیم Reverse transcriptase در سلول زنده ممانعت کند(7). علاوه براین مطالعات پیشین نشان داده است که بربرین می‌تواند فعالیت ضد قارچی قابل ملاحظه ای داشته باشد(4، 5).

هدف ما در این پژوهش بررسی خاصیت ضد میکروبی پودر حاصل ازعصاره ریشه زرشک (استخراج شده توسط آب مادون بحرانی) می‌باشد . این شرایط استخراج بر مبنای استفاده از آب (حلال) در شرایط فشار بالا و دمائی بین نقطه جوش و دمای بحرانی آب می‌باشد(°C 374-100). در این شرایط میزان حلالیت و انتشار آب بدرون بافت ماده افزایش می‌یابد .علاوه براین با افزایش دمای آب در این شرایط تدریجا قطبیت ملکول‌های آب کاهش می‌یابد. این عوامل در مجموع منجر به افزایش توانائی آب در غلبه بر پیوندهای بین ملکولی ماده - ماتریکس و انحلال ترکیباتی با قطبیت کمتر نیز می‌گردد. تکنولوژی استخراج توسط آب مادون بحرانی[1]، تکنولوژی سبز، نامیده می‌شود . چون بدون استفاده از انواع حلال‌های آلی وشیمیائی قادر به استخراج ترکیباتی متنوع از منابع گوناگون می‌باشد .

2- مواد وروش‌ها

2-1- جمع آوری و آماده سازی ریشه گیاه زرشک

ریشه زرشک در پایان فصل برداشت، از باغات زرشک بی دانه در اطراف شهرستان بیرجند جمع آوری شد. حدود دو الی سه روز در اطاق تاریک ودارای تهویه مناسب پهن گردید تا رطوبت سطحی آن به حداقل برسد و پس از انتقال به آزمایشگاه، در آون 30 درجه سانتیگراد به مدت 15 تا 18 ساعت قرار گرفت تا کاملا خشک شد. در مرحله بعد ریشه ها در آسیاب چکشی خورد و سپس در آسیاب آزمایشگاهی کاملا پودر گردید و برای گروه بندی دقیق نمونه پودری نمونه های آسیاب شده توسط سه نوع الک (الک با شماره مش 24، الک با شماره مش 35 و الک با شماره مش 45) به سه گروه تقسیم شدند :

گروه اول: ذراتی که بین دو الک با شماره مش های 24 و 35 باقی ماندند(از مش 24 کوچکترند اما از مش 35 عبور نکردند).

گروه دوم: ذراتی که بین دو الک با شماره مش های 35 و45 باقی ماندند(از مش 35 (با اندازه ذره 0/5 میلیمتر) کوچکترند اما از مش 45 (با اندازه ذره 0/354 میلیمتر) عبور نکردند).

گروه سوم : ذراتی که از الک با شماره مش های 45 عبور می کنند یعنی اندازه ذرات آنها کمتر از 0/354 میلیمتر است.

2-2- عصاره گیری توسط تکنیک آب مادون بحرانی وتهیه پودر از عصاره

این روش استخراج در راکتوری از جنس استیل ضدزنگ 316 انجام شد، این مخزن استخراج در آزمایشگاه فناوری های نوین پژوهشکده علوم و صنایع غذائی مشهد ساخته شده است. شرایط استخراج، توسط بهینه سازی با تکنیک سطح پاسخ [2] تعیین شد. (شکل 1) طبق این بهینه سازی بیشترین غلظت بربرین(میکروگرم / گرم نمونه اولیه) در دمای حدود 170 درجه سانتی گراد (آب مادون بحرانی)، زمان 30 تا 35 دقیقه و نسبت (ماده اولیه به حلال) 0/01 حاصل می‌گردد. بعد از تنظیم نسبت مناسب از نمونه (پودر ریشه زرشک) به آب مقطر آزمایشگاهی، درب راکتور کاملا

[1]-Subcritical Water Extraction

[1]- Response Surface Methodology

Archive of SID

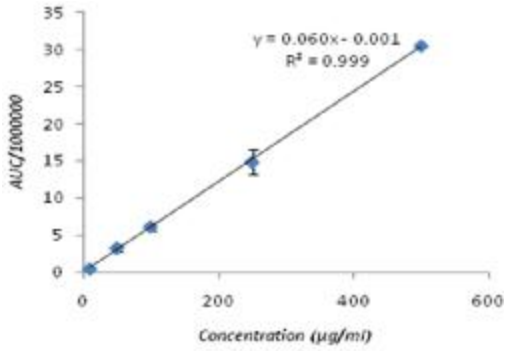
www.SID.ir

بسته و این مخزن در حمام گلیسرول قرارگرفت. حمام گلیسرول توسط المنت الکتریکی (که با جریان 220 ولت الکتریکی تغذیه می‌شد) گرم می‌گردد و روی همزنی مجهز به هیتر قرار داشت که در کنترل دمای سیستم خیلی موثر بود. در این راکتور درجه حرارت توسط ترمومتر دیجیتالی کنترل و ثبت شده و میزان فشار درون راکتور توسط بارومتر(با دقت دو بار)مشخص می‌گردید. بعد از اتمام زمان استخراج، جریان برق کاملا قطع شده و بعد از رسیدن فشار راکتور به فشار محیط، درب راکتور باز و عصاره درون آن توسط کاغذ صافی، صاف گردید. اکنون این عصاره صاف شده در روتاری اواپراتور به یک سوم حجم اولیه رسید و عصاره تغلیظ شده برای تولید پودر توسط فریز درایر (خشک کن انجمادی تحت خلاء) آماده شد و تقریبا بعد از 48 ساعت پودر حاصل از عصاره جمع آوری گردید .

دراین مطالعه ابتدا شرایط بهینه استخراج از ریشه زرشک توسط تکنیک آب مادون بحرانی بررسی و تعیین شد (بر مبنای حدکثر غلظت بربرین در عصاره) سپس عصاره حاصل در دستگاه خشک کن تحت خلاء به پودر تبدیل شده و بعد از تعیین مقدار میزان بربرین توسطHPLC، محلول استوک 80 میلی گرم / میلی لیتر، توسط حلال اتانول تهیه و برای آزمون میکروبی استفاده گردید.

2-3- آزمون HPLC

بعد از تهیه پودر بمنظور تعیین مقدار بربرین، از روش کروماتوگرافی مایع استفاده گردید. دستگاه HPLC مورد استفاده از مدل Kanuer و شامل اجزائی مانند پمپ HPLC مدل k-1001، ستون کروماتوگرافی C_{18} ،حلال مورد استفاده مخلوط متانول/ آب و دتکتور ماوراءبنفش k-2600 است که اندازه گیری‌ها در طول موج 330 نانومتر انجام می‌شدند. حجم هر تزریق به دستگاه 20 میکرولیتر بود. منحنی استاندارد رسم شده توسط محلول حاصل از غلظت های مختلف از بربرین استاندارد در شکل 2 ارائه شده است .



شکل 2- منحنی استاندارد بربرین بمنظور تعیین میزان بربرین توسط HPLC در پودر حاصل از عصاره

2-4- بررسی فعالیت ضدمیکروبی

2-4-1- آماده سازی غلظت‌های مختلف عصاره

بعد از تهیه پودر و تعیین محتوی بربرین آن بمنظور تهیه محلول های با غلظت‌های گوناگون بربرین از اتانول(مرک) بعنوان حلال استفاده شد. با توجه به میزان محدود انحلال کامل این پودر در اتانول، بالاترین غلظت تهیه شده از این پودر 80 میلی گرم در هر میلی لیتر می‌باشد. بعد از تهیه محلول استوک این محلول در محیطی استریل، توسط فیلتر سرنگی 0/45 میکرومتر، کاملا استریل شد وبعد از انتقال به لوله استریل شیشه ای و مات ، تا زمان آزمون در یخچال نگهداری گردید. همین روش استریل کردن برای اتانول نیز استفاده شد .

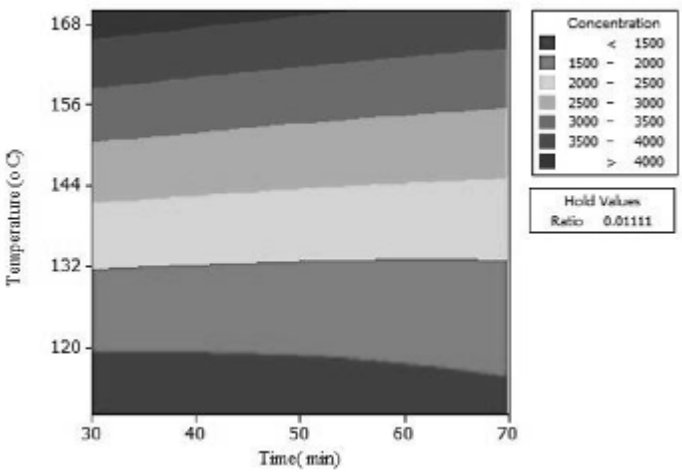
2-4-2- میکروب ها ومحیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون

میکروب های مورد استفاده برای بررسی خاصیت ضدمیکروبی پودر حاصل از عصاره، شامل باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس PTTC:1764)، باکتری گرم منفی (اشرشیاکلیPTTC:1330) ومخمر کاندیدیا آلبیکنس (PTTC:5025) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتریهای ایران بود .

محیط کشت مورد استفاده برای مرحله فعالسازی باکتری‌هاو محیط کشت لازم برای بررسی فعالیت ضد باکتریائی پودر عصاره ، Müeller-Hinton Broth و محیط مورد استفاده برای مرحله

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1- منحنی کانتور حاصل از بهینه سازی غلظت بربرین استخراج شده توسط SCW

فعالسازی مخمرو برای بررسی فعالیت ضد مخمری، محیط Yeast Mold Broth می باشد .

2-4-3- آماده سازی میکروب

دو باکتری استافیلوکوکوس کوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مورد استفاده برای تستهای ضدمیکروبی از کشت استوک ،خالص آزمایشگاهی تهیه شدند. ابتدا از کشت خالص آزمایشگاهی، برای مرحله فعال سازی (بمدت 18 تا 24 ساعت)[1]، توسط سمپلر حدود 20 میکرولیتر به محیط مایع و استریل مولرهینتون منتقل شد وحدود 24 ساعت در $37\ ^{\circ}C$ گرمخانه گذاری شد. سپس با توجه به کدورت محلول استاندارد مک فارلند 0/5% (معادل است با غلظت میکروبی $1/5\times10^{8}$ Cfu/ml) ،کدورت این سوسپانسیون میکروبی در طول موج 630 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(معادل محلول مک فارلند 0/5%) و بارقیق کردن توسط نرمال سالین، تنظیم شد. برای آماده سازی مخمر کاندیدا آلبیکنس مورد استفاده، ازپودرخالص لیوفیلیزه کاندیدا آلبیکنس استفاده شد. پس از تهیه این کپسول کیکروبی و طبق دستورالعمل موجود در وبگاه این مرکز، ابتدا در محیط کاملا استریل کپسول حاوی پودر مخمر باز شد و حدود 0/3 تا 0/4 میلی لیتر از محیط ییست مولد براث استریل به ماده خشک درون آمپول اضافه گردید وکاملا با آن مخلوط شد تا به شکل سوسپانسیون یکنواختی درآمد. سپس کل سوسپانسیون تهیه شده به لوله حاوی 20 سی سی محیط مایع ییست مولد استریل منتقل شده و بمدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتیگراد، گرمخانه گذاری انجام شد. لازم به ذکر است که برای اطمینان از خلوص کشت انجام شده، در مرحله انتقال سوسپانسیون پودر از کپسول به محیط مایع، قطرات آخر این سوسپانسیون را به پلیت حاوی محیط کشت Yeast Mold Agar منتقل کرده وکشت خطی انجام شد. این پلیت نیز بمدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتیگراد ، گرمخانه گذاری شد. بعد از اتمام زمان گرمخانه گذاری روی محیط جامد کلنی های گرد و کرمی رنگ صاف و براقی بود که بعد از رنگ آمیزی نمونه برداشته شده از این کلنی ها، توسط بلودومتیلن ، حضور این مخمر در کشت خالص تائید گردید.

اکنون مشابه روش تنظیم غلظت سوسپانسیون باکتریائی، مطابق با محلول مک فارلند 0/5% ، کدورت در سوسپانسیون این مخمر در طول موج630 نانومتر تنظیم شد.

2-4-4- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی [2] و حداقل غلظت کشندگی[3]

در این پژوهش، برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی پودر عصاره درمقابل میکروب‌های مورد آزمون، از روش Microdilution استفاده شد(13،9، 19). میکروپلیت های 96 چاهکی و محیط کشت استریل مایع (مولر هینتون براث برای باکتری‌ها و Yeast Mold برای مخمر) از قبل آماده وتوسط اتوکلاو(دمای 121/1درجه سانتیگراد وزمان 20 دقیقه) استریل شده بود . بعد از آماده سازی و کشت میکروپلیت‌ها و تلقیح آن

[1]-Over night

[2]-Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

[3]-Minimum Bacteriostatic Concentration (MBC)

Archive of SID

www.SID.ir

توسط سوسپانسیون باکتریائی(تنظیم با محلول 0/5 % مک فارلند) میزان کدورت اولیه را در الیزاریدر در طول موج 630 نانومتر ثبت کرده و سپس میکروپلیت حاوی سوسپانسیون باکتری گرم مثبت و گرم منفی را در 37 درجه سانتیگراد و میکروپیت حاوی سوسپانسیون مخمری را در 25 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری و بعد از گذشت 24 ساعت دوباره جذب در630 نانومتروبزان کدورت خوانده شد . البته در مورد مخمر کاندیدا توصیه می شود جذب در 48 و 72 ساعت بعد از شروع گرمخانه گذاری نیز خوانده شد .

بعد از گذشت 24 ساعت از زمان گرمخانه گذاری وبرای تعیین حداقل غلظت لازم برای کشندگی میکروب (MBC) و با توجه به میزان MIC ، محیط کشت حاوی باکتری گرم مثبت و گرم منفی رادر 37 درجه سانتیگراد و پلیت حاوی سوسپانسیون مخمری، در 25 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید . با گذشت 24 ساعت از زمان گرمخانه‌گذاری می‌توان حداقل غلظتی از محلول(ساخته شده از پودر) که در این غلظت هیچ کلنی (ویا رشد میکروبی) ملاحظه نشد ، بعنوان حداقل غلظت کشندگی میکروب (MBC) گزارش نمود .

3- نتایج و بحث

3-1- خاصیت ضد باکتریائی پودر حاصل از عصاره ریشه زرشک

در این پژوهش برای تعیین MIC پودر برای باکتری از روش Microdilution استفاده شد. جذب (انواع میکروپلیت تلقیح شده با استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی) در الیزاریدرقبل از گرمخانه‌گذاری و بترتیب 18 ، 24 ساعت بعد از گرمخانه-گذاری ثبت گردید. نتایج حاصل مبین این بود غلیظ ترین محلولهای حاصل عصاره می‌تواند از رشد استافیلوکوکوس اورئوس تا حد قابل توجهی ممانعت کند . اما غلظت های کمتر از 35 میلیگرم/میلی لیتر تاثیری بر رشد این میکروب نشان نداد. نتایج حاصل از آزمون تعیین MBC نشان داد که غلظت 70 میلیگرم/میلی لیتر عصاره بیشترین تاثیر ممانعت کنندگی را بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشت اما در مورد باکتری اشرشیاکلی مقدارMBC بیش از 70 میلیگرم/میلی لیتر بود که این نتیجه نشان می‌دهد پودر حاصل از این عصاره تاثیر ضد میکروبی بیشتری بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) در مقایسه با باکتری اشرشیاکلی (گرم منفی) دارد.

نتایج حاصل از پژوهشی در سال 2003 نشان دادکه عصاره آبی حاصل از برگ، ریشه وساقه *Berberis heterophylla* حتی در غلظت 1000 میکروگرم/ میلی لیتر بر میکروب‌های اشرشیاکلی ، استافیلوکوکوس اورئوس ، انتروکوکوس فکالیس ، سودوموناس آئروجینوزا و کاندیدا آلبیکنس تا ثیر ممانعت کنندگی ندارد در حلیکه بربرین خالص در سه غلظت 50 ، 100 و200 میکروگرم /میلی لیتر مخصوصا بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس (همراه با افزایش غلظت)، بمیزان قابل توجهی تاثیر ضد میکروبی داشت (10).

کاندیدا آلبیکنس شایع ترین عامل اتیولوژیک ناشی از مخمرهای جنس کاندیدا می‌باشد . با توجه به اینکه مقاومت قارچ‌ها نسبت به تعدادی از داروهای ضد قارچی افزایش یافته است و بسیاری از این داروها گران می‌باشد، بررسی فراورده‌های طبیعی گیاهی موثر بر قارچ‌ها ضروریست(3). به‌منظور تعیین MIC پودر بر علیه مخمر کاندیدا آلبیکنس مانند روش ذکر شده برای باکتری از روش Microdilution استفاده شد . جذب (انواع میکروپلیت تلقیح شده با سوسپانسیون حاوی کاندیدا آلبیکنس) در الیزاریدرقبل از گرمخانه‌گذاری و بترتیب 24 و48 ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری ثبت گردید. کمترین غلظتی که بر رشد کاندیدا آلبیکنس تاثیر ممانعت کنندگی داشت حدود 40 میلیگرم/ میلی لیتر و میزان MBC بیش از 70 میلیگرم/میلی لیتر بود. این نتیجه تا حد زیادی با نتیجه (2001) تحقیقی که بیان می‌کرد فعالیت ضد میکروبی بربرین ایزوله شده از *Mahoni aquifolium* بر علیه گونه های کلینیکی *Candida tropicalis* و *Candida glabrata* در مقایسه با فعالیت بر علیه گونه های *Candida albicans* موثرترست، مشابهت دارد (6).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1-نتایج فعالیت ضد میکروبی محلول حاوی غلظت‌های مختلف پودر عصاره ریشه زرشک

میکروب ها	اتانول استریل(کنترل منفی)	قطر هاله بازدارندگی (mm) غلظت عصاره در دیسک بلانک mgr/ml 80	70	40	کنترل ثبت AMO	GM	STR	Pen	MIC mgr/ml	MBC mgr/ml
S.aureus PTTC:1764	ندارد	5	4	1/5	18	23	-	ندارد	40	70
E.coli PTTC:1330	ندارد	ندارد	ندارد	ندارد	15	26	20	ندارد	>80	>80
C.albicans PTTC:5025	ندارد	6/5	5/5	ندارد	-	-	-	ندارد	40	>80

راهنمای جدول : قطر هاله بازدارندگی ارائه شده برای هر غلظت میانگین حاصل از سه اندازه گیری است.

آنتی بیوتیک‌ها AMO : آموکسی سیلین، GM : جنتامایسین،STR : استرپتومایسین ، Pen :پنی سیلین بعنوان کنترل مثبت در آزمون ها می‌باشند .علامت منفی (-) در جدول مبین عدم استفاده از آنتی بیوتیک می‌باشد . میزان عصاره و اتانول استریل در هر دیسک بلانک 20 میکرولیتراست.

جدول 2-نتایج فعالیت ضد میکروبی محلول حاوی غلظت‌های مختلف از بربرین استاندارد

میکروب ها	اتانول استریل(کنترل منفی)	قطر هاله بازدارندگی (mm) غلظت عصاره در دیسک بلانک mgr/ml 80	70	40	کنترل مثبت AMO	GM	STR	Pen	MIC mgr/ml	MBC mgr/ml
S.aureus PTTC:1764	ندارد	5	3	2	18	25	-	ندارد	40	70
E.coli PTTC:1330	ندارد	ندارد	ندارد	ندارد	15	22	20	ندارد	80	>80
C.albicans PTTC:5025	ندارد	6	2	ندارد	-	-	-	ندارد	40	>80

راهنمای جدول : قطر هاله بازدارندگی ارائه شده برای هر غلظت میانگین حاصل از سه اندازه گیری است.

آنتی بیوتیک‌ها AMO : آموکسی سیلین ،GM : جنتامایسین ،STR :استرپتومایسین ، Pen :پنی سیلین بعنوان کنترل مثبت در آزمون ها می‌باشند .علامت منفی (-) در جدول مبین عدم استفاده از آنتی بیوتیک می‌باشد . میزان عصاره و اتانول استریل در هر دیسک بلانک 20 میکرولیتراست

در سال 1997 Schmeller و همکارانش اعلام کردند که بربرین می‌تواند از سنتز DNA و آنزیم Reverse Transcriptase ممانعت کند همچنین گزارش شده که بربرین از فعالیت آنزیم توپوایزومراز 1و2 جلوگیری می کند .

درسال 2003، تاثیر ضد میکروبی بربرین خالص در غلظت‌های 50 ، 100 و200 میکروگرم /میلی لیتر در برابر مخمر کاندیدا آلبیکنس نیز به اثبات رسید البته در همین پژوهش بمنظور مقایسه با فعالیت ضدمیکروبی بربرین خالص ، از عصاره آبی ریشه، ساقه و برگ گیاه *Berberis heterophylla* بمنظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی استفاده و مشخص گردید که در غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم/میلی‌لیتر ، عصاره‌های آبی استخراج شده برعلیه باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، سودوموناس آئروجینوزا ومخمر کاندیدا آلبیکنس، تاثیر ضدمیکروبی ندارد(10).

در سال 2002 نیز محققین اعلام کردند که به حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) بربرین بر علیه رشد گونه‌هائی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و انواعی از قارچ‌ها دست یافته‌اند. در این تحقیق بعنوان کنترل مثبت از آنتی بیوتیک آموکسی سیلین بر علیه گونه‌های باکتریائی و بعنوان کنترل مثبت بر علیه انواع قارچ و مخمر از بیفینازول استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از این پژوهش مبین این بود که فعالیت ضد میکروبی بربرین ایزوله شده از *Mahonia aquifolium* بر علیه انواع باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از انواع گرم منفی می‌باشد. همچنین فعالیت ضد قارچی این ماده (با توجه به MIC) مبین این موضوع بود که کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با آسپرژیلوس نیجر نسبت به این ماده مقاومت بیشتری دارد. البته مقاومت ساکارومایسس سرویزیه نسبت به هردو قارچ ذکر شده فوق بیشتر بود (6).

اینگونه تاثیرهای متفاوت بربرین خالص و عصاره آلکالوئیدی، در مقابل گروه‌های میکروبی مختلف را می‌توان ناشی از حضور موثر ترکیبات مختلف(علاوه بر بربرین) در عصاره های استخراج شده دانست که علاوه بر تاثیر بر فعالیت ضد میکروبی بربرین، غلظت موثر این ماده را کاهش می‌دهد. با توجه بهر نتیجه این پژوهش، پودر حاصله از عصاره ریشه زرشک تا حد قابل ملاحظه ای می‌تواند باعث ممانعت از رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر کاندیدا آلبیکنس در محیط گردد و با توجه به شرایط مورد استفاده در تولید این پودر (کاملا سالم وعاری از هر نوع ماده سمی و تاحد زیادی محلول در آب)، می‌توان امیدوار بود که بتوان از این ماده بعنوان ترکیبی ضد میکروب و سالم وبعنوان افزودنی طبیعی در گروهی از مواد غذائی از جمله نوشیدنی‌ها بهره جست .قطعا استفاده توام از این ماده با ترکیبات ضد قارچ، علاوه برکاهش غلظت مورد نیاز از افزودنی‌های سنتزی، تاثیر ضد میکروب این ترکیب را افزایش می‌دهد.

4- سپاس گزاری

نویسندگان این مقاله از همکاران آزمایشگاه فناوری های نوین غذائی و میکروبیولوژی عمومی واقع در پژوهشکده علوم وصنایع غذائی مشهد وآزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد کمال سپاس گزاری را دارند .

5- منابع

1- پویان، م. 1385. راهنمای گیاهان داروئی، وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات وآموزش کشاورزی، معاونت آموزش وتجهیز نیروی انسانی.

2- صفائی خرم، م. جعفرنیا، س. و خسرو شاهی، س. 1387. مهمترین گیاهان داروئی جهان. انتشارات آموزشگاه کشاورزی سبز ایران، چاپ دوم. صفحات 236 -239.

3- ضیاء، م.ع. بیات، منصور و خلخالی، حسین.1390. تاثیر اسانس آویشن بر کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهانی در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره 13، شماره 3 ، 44-52.

4- Abeytunga, B.T.U. Pathirante, B.N. and Ratnayaka, W.M.S.R. 2000. Characterisation and assessment of antifungal activity of chemically modified Berberine. J.Nath.Sci Foundation Sri Lanka, 28(3):215-225.

5- Anis, K.V., Kuttan, G., Kuttan, R.1999. Role of berberine as an adjuvant response modifier during tumor therapy in mice. Pharm. Pharmacol. Commun. 5,697-700

6-Cernakova, M and Kostalova, D. 2002. Antimicrobial activity of Berberine –a constituent of Mahonia aquifolium . Folia microbial, 47(4),375 -378

7- Choi, B.H. Ahn, I.S. Kim, Y.H. Park, J.W. Lee, S.Y.Hyun, C.K. and Do, M.S. 2006. berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3–L1 adipocyte.Exprimental and Molecular Medicine. 38(6):599-60.

8 - Fatehi ,M. Saleh, Tarek M. Fatehi-Hassanabad, Z. Farrokhfal, KH. Jafarzadeh, M. Davodi, S . 2005. A pharmacological study on Berberis vulgaris fruit extract . Journal of Ethnopharmacology 102 : 46–52

9-Fernandez, L. Daruliza, K. Sudhakaran, S. and Jegathambigai, R. 2012. Antimicrobial activity of Piper sarmentosum against methicilin- resistant Staphylococcus aureus(MRSA), Escherchia coli, Vibrio Cholerea and Streptococcus pneumoniae. Europaean Review for Medicinal and Pharmacological Sciences. 16(3):105-111.

10-Freila, M.L.Giannini, F. Pucci, G.Sturniolo, A. Rodero, L.Pucci, O. Balzareti, V. and Enriz, R. D. 2003. Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from Berberis Heterophylla.Fitoterapia , 74:702-705.

11- Li, A. Zhu, Y. Li, X. Tian ,X. 2007. Antimicrobial activity of four species of Berberidaceae. Fitoterapia, 78: 379–381

12- Livia, S. Daniela, K. Darina, L. Daniela, K. and Victor, K. 2004. Antimicrobial activity of Mahonia aquifolium crude extract and its major isolated alkaloids. Phytoth.Res, 18:674-676

13- Pfoze ,N.L. Kumar, Y.Myrbon, B.Bhagobaty ,R. K. and Joshi, S.R. 2011 .In Vitro antibacterial activity of alkaloid extract from stem bark of

Archive of SID

www.SID.ir

principles from herbs . Ultrasound Sonochemistry, 8:303-313.
18-Yoga Latha , L. darah, I.Jain, K. Sasidharan, S. 2011.Effect of avernonia cinerea Less methanol extract on growth and morphogenesis of Candida albicans.European review For Medical and Pharmacological Sciences, 15:543-549.
19-Zhang, D. Li, A. Xie, J. and Ji, C. 2010.In vitro antibacterial effect of berberine hydrochloride and enrofloxacin to fish pathogenic bacteria. Agriculture Research. 41, 1095-1100
20- Zhank, R.X., Dougherty, D.V. and Rosenblum, M.L. 1990. Laboratory studies of berberine used alone and in combination with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea to treat malignant brain tumors.Brit.Med .J.103, 658-665.
Mahonia manipurensis Takeda. Journal of medicinal Plant Research. 5(5), 859-861.
14- Schiff, Pl.1987.Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives (Pelletier SW ed) ,5, Willy, New York.
15- Schmeller, T.Latz-Bruning, B.and Wink, M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores.Phytochemistry 44,257-266.
16-Supeetha, S. Sharadadevi, M. Sequeira, P. S. Jithesh , J.Shreyas Tikare,T. and Amit, M. 2012 . Antifungal activity of Ginger Extract on Candidia Albicans: An In-Vitro Study. Journal of Dental Sciences and Research,2 (2): 1-5
17-Vinatoru, M. 2001 An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive

Archive of SID

www.SID.ir