

مقاله پژوهشی

مطالعه فیتوشیمیایی و بررسی فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی دیوسپيروس والاچیا، گونه ای جالب از خانواده ایناسه

محمد رضا جلیلود^۱، سید علی وکیلی^۲، نوشین امینی مقدم فاروج^{۳*}

ا کارشناس ارشد علوم تغذیه، مرکز تحقیقات ایمنی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
دکتری حرفه ای داروسازی، مرکز تحقیقات ایمنی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
* نویسنده مسئول: بجنورد، خیابان شهید چمران، معاونت غذا و دارو، مرکز تحقیقات ایمنی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی
پست الکترونیک: noushin_aminimoghadamfarouj@yahoo.com

وصول: ۱۳۹۱/۸/۳ اصلاح: ۱۳۹۱/۸/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۷

چکیده

زمینه و اهداف: استفاده سنتی از گیاهان دارویی در سالیان اخیر افزایش یافته است. مردم درصدد هزینه کمتر، سلامت بیشتر و مصرف محصولات ایمن تر هستند. پر واضح است که محصولات ضد باکتریایی شیمیایی روز به روز در مقابل باکتری ها ضعیف تر عمل می کنند و از طرف دیگر عوامل ضد اکسیدانی گیاهی عوارض جانبی کمتری را به اثبات رسانیده اند. بنابراین مطالعات اولیه روی خواص درمانی عصاره میوه ها و برگ های حاصله از گیاه دیوسپيروس والاچیا در این مطالعه انجام شده است.

مواد و روش کار: در تحقیق حاضر، عصاره برگ و میوه این گیاه توسط حلال های هگزان، کلرفرم و اتانول تهیه شدند. فعالیت ضد باکتریایی آنها علیه باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس ارئوس، سودماناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی با روش دیسک دیفیوژن اندازه گیری شد و همچنین خاصیت ضد اکسیدانی عصاره های حاصل با استفاده از روش DPPH assay سنجیده شد. جهت کنترل و مقایسه و تکمیل مطالعات آزمون فیتوشیمیایی مقدماتی انجام پذیرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که عصاره هگزان و کلروفرم میوه دارای بیشترین درصد پلی فنول می باشند. این دو جزء به ترتیب بیشترین اثر را علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان دادند. همچنین عصاره کلروفرمی میوه، توانست بیشترین فعالیت حذف رادیکالی را نشان دهد و بعنوان دارنده ی بیشترین خصلت ضد اکسیدانی معرفی شد.

نتیجه گیری: نتایج حاکی از این بود که گیاه دیوسپيروس والاچیا می تواند در توسعه فرآورده های درمانی و سلامت مورد مصرف قرار بگیرد و این اثرات احتمالاً وابسته به حضور پلی فنول هایی همچون نفتوکینونها می باشند.

واژه های کلیدی: دیوسپيروس والاچیا، ایناسه، ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، فرآورده های طبیعی

مقدمه

از خانواده ایناسه در نواحی تروپیکال و ساب تروپیکال [حاره و نیمه حاره] رویش دارد و نام محلی گیاه دیوسپيروس والاچیا در این مناطق "دام تاکو" "dam tako" می باشد. بسیاری از اعضای جنس دیوسپيروس دارای خصلت درمانی هستند و مقادیر بالایی از نفتاکینون ها را شامل می شوند. از خاصیت های درمانی سنتی می توان به نقش مسهل بودن میوه گیاه دیوسپيروس والاچیا و کاربرد آن در درمان بیماری بواسیر در میان مردم بومی مناطق رشد این گیاه اشاره کرد، مردم محلی مصرف این گیاه را برای ماهی ها سمی و کشنده می دانند [۸،۹]. به

در چند دهه اخیر مطالعه گیاهان دارویی بعنوان یک منبع مفید از ترکیبات فعال بیوشیمیایی و فارماکولوژیک افزایش نشان داده است. بسیاری از گیاهان و ترکیبات آن ها در طب سنتی در اکثر نقاط دنیا برای درمان بیماری مختلف مورد استفاده هستند [۱-۳]. بسیاری از این گیاهان در نواحی حاره و جنگل های پر باران رشد می کنند [۴]. این گیاهان پهنای وسیعی از فرآورده های طبیعی را تأمین می کنند که به موجب آنها، دارای خصلت قوی ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی نیز می گردند [۵-۷]. جنس دیوسپيروس

غربال گری فیتو شیمیایی: تمام عصاره های تهیه شده (۶ مورد) از برگ ها و میوه ها به سه حلال (هگزان، کلرفرم و اتانول) جهت حضور دسته های مختلف مواد شیمیایی ارزیابی شدند (جدول ۱).

روش های میکروبی: میکروب های استفاده شده در این مطالعه از چهار گونه زیر تشکیل شده بودند:

باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس ارئوس، سودمناس اثرورژینوزا و اشرشیاکلی. این باکتری ها در 37°C در روی محیط تریپتیکاز سوی آگار کشت شدند تا برای تست تازه باشند.

اندازه گیری خصلت ضد باکتری: این تست طبق روش دیسک دیفیوژن کمیته NCCLS سال ۲۰۰۲، با استفاده از سوسپانسیون باکتری تریپتیکاز سوی براس با غلظتی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند صورت گرفت. از سوسپانسیون هر باکتری روی محیط مولر هینتون آگار کشت تمام سطح صورت گرفت. دیسک های کاغذی ۶ میلی متری با ۱۰ میکرولیتر از عصاره حل شده در DMSO تلقیح شد تا غلظتی معادل ۲mg/disc را به دست بدهد. به دیسک ها یک شب زمان داده شد تا کاملاً خشک و عاری از DMSO گردند. دیسک تلقیح شده با DMSO بعنوان کنترل منفی و دیسک تلقیح شده با ۱۰ از استریپتومایسین بعنوان کنترل مثبت انتخاب شدند. پلیت ها برای ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند.

علت فقدان آنتی بیوتیک های سنتزی جدید و ضد اکسیدان های نوین، جستجو برای مواد جایگزین امری ضروری می باشد [۱۰-۱۲].

روش کار

مواد شیمیایی: اسکوربیک اسید و ۲ و ۲ دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) از کارخانه سیگما تهیه شد. تمام حلال ها از کارخانه Ussex، R&M تهیه گردیدند. محیط کشت مولر هینتون آگار و تریپتیکاز سوی از شرکت آزمایشگاهی هند تهیه گشت و تمامی واکنشگرها مورد استفاده از درجه برتر شیمیایی بوده اند.

مواد گیاهی: دیوسپیروس والاچیا، از ناحیه پراک در مالزی جمع آوری و در موسسه هرباریومی تحقیقات جنگل مالزی، تعیین هویت شده بود.

تهیه عصاره ها: مواد گیاهی (برگ و میوه) در سایه خشک شد و سپس به صورت مناسب خرد گشتند. میوه های پودر و خشک شده (۱/۱ کیلوگرم) و برگ (۲/۵ کیلوگرم) به صورت جداگانه و متناوب با حلال های افزایشنده قطبیت (هگزان، کلرفرم و اتانول) در طی زمان دو هفته عصار گیری شدند. عصاره گیری به روش ماسریشن (خیساندن) صورت گرفت و سپس حلال ها توسط خلاء چرخان حذف شد و عصاره خشک شده در 20°C تا زمان تست نگهداری گردید. راندمان عصاره ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: ترکیبات فیتوشیمیایی دیوسپیروس والاچیا و راندمان عصاره گیری

| ماده فیتو شیمی | فلاونوئید ها | تانن | استروئید | ساپونین | پلی فنل | % راندمان عصاره گیری |
|-------------------|--------------|------|----------|---------|---------|----------------------|
| عصاره هگزان برگ | - | - | - | - | + | ۳/۱ |
| عصاره کلرفرم برگ | - | - | - | - | + | ۲/۳ |
| عصاره اتانول برگ | - | - | - | + | ++ | ۱/۲ |
| عصاره هگزان میوه | - | - | + | - | ++++ | ۰/۱ |
| عصاره کلرفرم میوه | - | - | + | - | +++ | ۱/۷ |
| عصاره اتانول میوه | - | - | - | + | ++ | ۱/۱ |

یافته ها

طبق جدول ۱، تمام عصاره های مورد تست حضور پررنگ ترکیبات پلی فنلی را در گیاه دیوسپیروس والاچیا نشان داده اند. اثرات ضد رشد باکتریایی عصاره های گیاه مذکور از روش دیسک کاغذی بر روی آگار دیفیوژن کنترل و به دقت اندازه گیری شد. طی آزمایشات عصاره هگزانی میوه، بیشترین اثر ضد میکروبی بر علیه استافیلوکوکوس ارئوس (++++) را در غلظت ۲ mg/disc نشان داد، همچنین این نمونه توانست اثرات مهاری قابل توجهی روی باسیلوس سرئوس نیز نشان بدهد (+++). (جدول ۲). این نتایج نشان داد که عصاره هگزانی و کلرفرمی از میوه دیوسپیروس والاچیا، حاوی ترکیباتی است که بطور قابل توجهی توانسته اند رشد استافیلوکوکوس ارئوس و باسیلوس سرئوس را مهار کنند. علاوه بر اینها هاله عدم رشد در نمونه حاوی اشرشیاکلی نیز قابل ملاحظه می باشد. فعالیت دیده شده روی عصاره ی میوه گیاه دیوسپیروس، احتمال استفاده صنعتی از این گیاه بعنوان مولد آنتی بیوتیک ها با منشأ طبیعی را بالا می برد.

نواحی شفاف عدم رشد در اطراف هر دیسک بعد از زمان انکوباسیون به دقت اندازه گیری شدند. تست به صورت سه تایی و تکرار پذیر انجام شد. شدت های رشد باکتری ها به صورت زیر طبقه بندی شدند:

هاله عدم رشد بزرگتر از ۲۵ mm = [+++] بسیار قوی
 هاله عدم رشد بین ۱۵-۲۴ mm = [++] قوی
 هاله عدم رشد بین ۱۱-۱۴ mm = [++] متوسط
 هاله عدم رشد بین ۸-۱۰ mm = [+] ضعیف

ظرفیت آنی اکسیدانی: تست DPPH بر اساس استفاده از پلیت ۹۶ چاهکی طبق روش هابته ماریام (سال ۲۰۰۷) انجام گرفت. رقت های نمونه ها توسط متانول و DMSO بعنوان حلال های مصرفی تهیه گشت. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه زمان انکوباسیون در محیط تاریک در دمای اتاق، جذب در ۵۵۰ nm اندازه گیری و درصد مهار رادیکال آزاد و DPPH و نمونه ها محاسبه شد [۱۳].

محاسبات آماری: تمام آزمایشات حداقل در سه نمونه صورت گرفت. محاسبات توسط نرم افزار اکسل-MS EXCEL انجام گردید.

جدول ۲: هاله عدم رشد بدست آمده از فرکشن های متعدد تهیه شده از گیاه دیوسپیروس والاچیا

| گونه های باکتریایی ^۲ | | | | فرکشن ^۱ |
|---------------------------------|--------------|----------|----------------|-------------------------|
| E.coli | P.aeruginosa | S.aureus | B.cereus | |
| - | - | - | - ^۳ | عصاره هگزان برگ |
| - | - | + | - | عصاره کلرفرم برگ |
| - | - | ++ | ++ | عصاره اتانول برگ |
| ++ | - | ++++ | +++ | عصاره هگزان میوه |
| - | - | +++ | ++ | عصاره کلرفرم میوه |
| - | - | + | + | عصاره اتانول میوه |
| ++ | ++ | ++ | ++ | استرپتومایسی [۱۰ μg/di] |
| رشد کامل | | | | استاندارد منفی DMSO |

۱: تماس یافته با غلظت ۲ mg/disc

۲: رشد داده شده روی مولی هینتون آگار در ۳۷°C برای یک روز

۳: [++++] > ۲۵ mm [قطر هاله عدم رشد]، [+++] ۲۴-۱۵ mm [قطر هاله عدم رشد]، [++] ۱۴-۱۱ mm [قطر هاله عدم رشد]،

قطر هاله عدم رشد < ۸ mm ۸-۱۰ [قطر هاله عدم رشد]، [-] mm [+

جدول ۳: درصد خصلت آنتی اکسیدانی عصاره های حاصل از دیوسپيروس، اندازه گیری شده با تست DPPH

| غلظت $\mu\text{g/ml}$ | عصاره هگزان میوه | عصاره کلرفوم میوه | اکسوربیک اسید |
|-----------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| ۱۰۰ | $78/15 \pm 3/66^1$ | $95/50 \pm 4/17$ | $93/02 \pm 2/85$ |
| ۵۰ | $51/72 \pm 3/27$ | $86/25 \pm 2/56$ | $89/38 \pm 5/71$ |
| ۲۵ | $29/16 \pm 4/05$ | $66/57 \pm 2/04$ | $75/76 \pm 4/60$ |
| ۱۲/۵ | $24/54 \pm 3/06$ | $50/39 \pm 1/93$ | $44/15 \pm 2/70$ |
| ۶/۲۵ | $14/20 \pm 3/03$ | $33/03 \pm 1/97$ | $23/43 \pm 3/23$ |
| ۳/۱۲۵ | $9/11 \pm 3/00$ | $30/10 \pm 2/03$ | $21/91 \pm 4/08$ |

۱: میانگین \pm انحراف معیار استاندارد

اثر میکروبی بروز دهد که قابل قیاس با آنتی بیوتیک استرپتومایسین [$0/1 \text{ mg/ml}$] بوده است. اکثر فرآورده های طبیعی می توانند روی باکتری های گرم مثبت اثر مهاری یا کشنده بگذارند در حالی که عصاره میوه هگزانی گیاه دیوسپيروس والاچیا، توانست رشد باکتری گرم منفی اشرشیاکلی را مهار سازد. اگرچه عده ای ممکن است ادعا کنند که غلظت 2 mg/disc غلظت بالایی به شمار می رود ولی، این آزمایش نشان داده که این گیاه در شرایط برون تنی می تواند اثرات آنتی باکتریایی قوی داشته باشد. پلی فنل ها بیشترین ترکیبات موجود در گیاه هستند که می توانند خصلت آنتی اکسیدانی بروز دهند این فعالیت احتمالاً به خاصیت اکسیداسیون-احیای آنها وابسته است [۲۲]. نتایج مطالعه ی حاضر نشان می دهد که سطح قابل توجهی از ترکیبات فنلی در عصاره هگزانی و کلرفومی میوه گیاه دیوسپيروس والاچیا موجود است (جدول ۱) بطوری که به ترتیب خصلت آنتی اکسیدانی متوسط و قوی را در آزمایش بروز داده اند.

نتیجه گیری

امروزه گیاهان دارویی نقش حیاتی در درمان بسیاری از بیماری ها دارند. گیاهان نه تنها دیگر فقط در طب سنتی مطرح نیستند بلکه آنها توانسته اند، یک خط صنعتی از فرآورده های طبیعی را نیز به خود اختصاص دهند. بنابراین این مطالعه بیانگر این مطلب است که گیاه دیوسپيروس والاچیا می تواند بعنوان منبع عظیمی از مواد ضدباکتریایی، مواد آنتی اکسیدانی و مواد محافظ و نگهدارنده غذا معرفی گردد.

همچنین انجام آزمون مهارکنندگی رادیکالی آزاد (DPPH) بیانگر این بود که عصاره کلرفومی میوه دارای بیشترین خصلت آنتی اکسیدانی در بین تمام نمونه های مورد تست می باشد (جدول ۳). نتایج نشان می دهد که عصاره میوه هگزانی و کلرفومی هر دو دارای خصلت مهارکنندگی روی رادیکال آزاد هستند و می توانند بعنوان آنتی اکسیدانت معرفی شوند. این نتایج تاییدی بر مطالعات قبلی روی سایر گونه های دیوسپيروس نیز می باشد [۱۳-۱۶]. نتایج نشان می دهد که خصلت آنتی اکسیدانی عصاره کلرفومی میوه گیاه دیوسپيروس والاچیا قابل قیاس با این خصلت در اسکوربیک اسید می باشد. همین طور مشاهده گردید که عصاره ی کلرفومی میوه گیاه از عصاره هگزانی میوه اثر مهارکنندگی بیشتری روی رادیکال های آزاد دارد. بطوری که در غلظت $\mu\text{g/disc}$ ۱۰۰ فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد عصاره کلرفومی میوه به $95/50\%$ رسید در حالی که در تمام غلظت عصاره هگزانی میوه فقط عدد $78/15\%$ را نشان داد.

بحث

این مطالعه خصلت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی شش عصاره [فرکشن] بدست آمده از برگ و میوه گیاه دیوسپيروس والاچیا را اندازه گیری و ثبت کرده است. شواهد قابل استنادی مبتنی بر حضور نفتاکینون ها در گیاه گونه دیوسپيروس موجود می باشد [۱۷-۲۱]، بنابراین می توان نتیجه گرفت که این عوامل احتمالاً در بروز خصلت ضد میکروبی این گیاه مسئول هستند. نکته دیگر حایز اهمیت این است که گیاه دیوسپيروس توانست

References

1. Hertog M, Kromhout D, Aravanis D, Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart diseases and cancer in seven countries study, *Arch Intern Med* 1995; 155: 381–386.
2. Langley-Evans SC, Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay, *Int J Food Sci Nutr* 2000; 51: 181–188.
3. Lie C, Xie B, Evaluation of the antioxidant pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers, *J Agric Food Chem* 2000; 48: 6362–6366.
4. Burkill HM, A review of Delziel's the useful plants of West Africa, 1985, p2.
5. Cao YH, Cao RH, Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature* 1999; 6726: 381–398.
6. Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols H, Witteman JCM, Tea flavonoids may protect against atherosclerosis -The Rotterdam study, *Arch Intern Med* 1999; 159: 2170–2174.
7. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela H, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TSI, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *J Agric Food Chem* 1999; 47: 3954–3962.
8. Jain N, Yadava R. Peregrinol, a lupane type triterpene from the fruits of *Diospyros peregrina*, *Phytochemistry* 1994; 35: 1070- 1072.
9. Kuo YH, Chang CI, Kuo YH, Triterpenes from *Diospyros maritime*, *Phytochemistry* 1997; 46: 1135- 1137.
10. Balandrin MF, Klocke JA, Wutule ES, Bollinger WH, Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials, *Science* 1965; 228: 1154–1160.
11. Satish S, Raveesha KA, Janardhana GR, Antibacterial activity of plant extracts of phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars, *Lett Appl Microbiol* 1999; 28: 145–147.
12. Jones FA, Herbs-useful plants, Their role in history and today, *Eur J Gastroenterology Hepatol* 1996; 8: 1227–1231.
13. Habtemariam S, Antioxidant activity of Knipholone anthrone, *Food Chem* 2007; 102: 1042–1047.
14. Okonkwo TJN, Okonkwo CJO, Antioxidant properties of *Diospyros preussi* (Ebenaceae Gurke) seed oil, *Trop J Pharmaceut Res* 2009; 8(6): 551-555.
15. Mondal SK, Chakraborty G, Gupta M, Mazumder UK, In vitro antioxidant activity of *Diospyros malabarica* Kostel bark, *Indian J Exp Biol* 2006; 44(1): 39-44.
16. Baravalia Y, Kaneria M, Vaghasiya Y, Parekh J, Chanda S, Antioxidant and antibacterial activity of *Diospyros ebenum* Roxb, leaf extracts, *Turk J Biol* 2009; 33(2): 159-164.
17. Zakir Hossain KM, Sarwaruddin Chowdhury AM, Haque ME, Dafader NC, Akhtar F, Effect of Natural Antioxidant (*Diospyros peregrina*) on the Aging Properties of Radiation Vulcanized (γ -Radiation) Natural Rubber Latex Film, *Polymer Plast Tech Eng* 2010; 49(2): 136 – 140.
18. Tangmouo JG, Meli AL, Komguem J, Kuete V, Ngounou FN, Lontsi D, Beng VP, a new naphthoquinone from *Diospyros crassiflora* (Hien), *Tetrahedron Lett*, 47(18) 2006; 3067-3070.
19. Zakaria MB, Jeffreys JAD, Waterman PG, Zhong SM, Naphthoquinones and triterpenes from some asian *Diospyros* species, *Phytochemistry* 1984; 23(7): 1481-1484.
20. Tezuka M, Takahashi C, Kuroyanagi M, Satake M, Yoshihira K, Natori S, New naphthoquinones from *Diospyros*, *Phytochemistry* 1973; 12 (1): 175-183.
21. Higa M, Noha N, Yokaryo H, Ogihara K, Yogi S, Three new naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume, *Chem Pharm Bull* 2002; 50(5): 590-593.
22. Chang CI, Huan SL, Kuo YH, Two new naphthoquinones from the stem of *Diospyros maritime*, *J Asian Nat Prod Res* 2007; 9(2): 153-158.

Original Article

Anti-bacterial, Antioxidant activity and Phytochemical study of *Diospyros wallichii* — an Interesting species of Ebenaceae

Jalilvand M¹, Vakili A², Aminimoghadamfarouj N^{2*}

¹ M.Sc of Nutrition and Food Science, Natural Products Safety and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

² Pharm.D, Natural Products Safety and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

***Correspondence Author:**
Natural Products Safety and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences
Email:
noushin_aminimoghadamfarouj@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: The traditional use of herbal medicine has increased significantly in these recent years. People are looking for less charge, healthier and safer products. It is obvious that the chemical antibacterial products are creating more bacterial resistant day by day, on the other hand herbal less side effects of antioxidant agents have been proven. Therefore, the first studies on the therapeutic properties of the fruits and leaves extracts obtained from *Diospyros wallichii* King & Gamble are reported.

Material and Methods: In the present research the hexane, chloroform and ethanol extracts of *Diospyros wallichii* (fruits and leaves) are screened for antimicrobial and antioxidant activities. Antibacterial activity was determined against *Bacillus cereus* ATCC10876, *Staphylococcus aureus* ATCC11632, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 and *Escherichia coli* ATCC10536 using the disk diffusion method. Moreover, the DPPH radical scavenging test was performed to evaluate the antioxidant properties of the fractions. In order to compare the results the phytochemical assay was done.

Results: the results showed hexane and chloroform extracts of the fruit, have high amounts poly-phenols. These two fractions were active against both Gram negative and Gram positive bacteria. The chloroform extract of fruits had the highest free radical scavenging activity.

Conclusion: The results obtained suggest that *Diospyros wallichii* King & Gamble could be used in the development of therapeutic medicines and health care products. In addition to, it was concluded that the poly-phenols, exclusively Naphthoquinones, play crucial roles in the properties of this plant.

Keywords: *Diospyros wallichii*, Ebenaceae, Anti-bacterial, Anti-oxidant, Natural products

Submitted: 24 Oct 2012

Revised: 5 Nov 2012

Accepted: 27 Nov 2012