

اثر عصاره دانه خاکشیر بر ممانعت از رشد سویه های استاندارد اشريشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس

زهرا شاهنده^{۱*}، زهرا مولانا^۱، طیبه فرزینوش^۳

۱- عضو هیئت علمی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- کارشناس آزمایشگاه

سابقه و هدف: دانه خاکشیر بصورت سنتی در دنیا جهت درمان برخی بیماریها استفاده می گردد. اشريشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نیز از جمله پاتوژنهای انسانی و از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی می باشند. این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره الکلی خاکشیر بر باکتری های فوق الذکر انجام شد.

مواد و روشها: پس از تهیه و تأیید دانه های خاکشیر، عصاره آنها توسط اتانول ۷۰^o استخراج و بعد از صاف کردن، به روش تقطیر در خلاء در ۵۰^o و نیز لیوفیلیزه، تغلیظ و سپس غلظت های مختلف در آب مقطر استریل و در Tween 80 تهیه و بر روی سویه های استاندارد E.coli PTCC 1222 و استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1113 به روش Nathan Agar Well Diffusion آزمایش شدند.

یافته ها: عصاره حاصله با غلظت های عصاره بترتیب ۵/۸، ۳/۱ و ۸/۸ گرم در ۱۰۰ سی سی با روش تقطیر در خلاء و ۳/۵، ۴/۳ و ۱/۶ گرم در ۱۰ سی سی با روش Freeze dryer، فاقد اثر باکتریسید و یا باکتریوستاتیک بر روی باکتریهای مذکور بوده است.

نتیجه گیری: با توجه به مطالعات قبلی و اثر مهاری عصاره بر روی برخی باکتریها، به نظر می رسد عدم تاثیر عصاره خاکشیر، به علت همراهی ترکیبات ضد باکتریایی با سایر ترکیبات در عصاره حاصله و اثر آنتاگونیسم، باشد.

واژه های کلیدی: خاکشیر، اشريشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، عصاره الکلی، اثر ضد میکروبی.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۵، مهر - آبان ۱۳۸۵، صفحه ۳۰-۲۶

مقدمه

گیاه درمانی دانشی کهنسال است که ریشه در اعماق تاریخ دارد و همواره یکی از پایه های اصلی مکاتب طبی مشهور در تمدن های باستانی مصر، هند، آشور، چین، یونان، ایران و نیز طب اسلامی بوده است(۱). با وجود آنکه امروزه درمان بیماری ها، بیشتر از طریق مصرف داروهای صنعتی است و با مصرف بعضی از آنها، زیان هایی نیز به بدن می رسد، روز بروز به گیاهان دارویی و فرآورده های آنها بیشتر توجه می شود(۲). خاکشیر sophia

Descurainia با نام قدیمی Sisymbrium sophia از خانواده Cruciferae (شب بو)، گیاهی علفی و دارای ساقه ای به ارتفاع متغیر ۰/۲ تا یک متر، یکساله و با دانه های ریز تقریباً به اندازه دانه خشخاش برنگ قرمز و دارای لعاب فراوان، در اواخر تابستان می رسند(۳و۲). این دانه ها دارای خواص درمانی بوده و در کشورهای مختلف از جمله ایران استفاده می گردد. در چین از تخم خاکشیر بعنوان ملین، تب بر و تسکین التهاب پوست از جمله کهیر

دیگر عوارض سوء جانی ترکیبات و داروهای شیمیایی و نیز گستردگی طیف عفونتهای حاصله از E.coli (از جمله اسهال در کودکان) و استافیلوکوکوس اورئوس، بر آن شدیم تا هم عصاره حاصله از دانه های خاکشیر و هم دم کرده آن را به شیوه سنتی بر روی باکتری های مذکور، بررسی نماییم (۱۰ و ۹ و ۷).

مواد و روشها

مطالعه بصورت آزمایشگاهی بر روی دانه های خاکشیر انجام شد یعنی پس از تهیه دانه های خاکشیر از ۳ منطقه مشهد، مراغه، لارستان و تایید آنها توسط دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، عصاره آنها به دو روش زیر استخراج گردید:

۱- مخلوط کردن دانه های خاکشیر با اتانول 70° بعنوان حلال و سپس حذف حلال با دستگاه تقطیر در خلاء (10) . بدین منظور ابتدا ۲۵ گرم از هر سه نوع خاکشیر را توسط آسیاب برقی جداگانه، پودر کرده با 500°C اتانول 70° مخلوط نموده، ۲۴ ساعت به ملایمت توسط شیکر به هم زده و پس از عبور محلول از یک پارچه تصفیه تمیز، محلول صاف شده به کمک دستگاه تقطیر در خلاء در حرارت 50°C تغلیظ و عصاره حاصله استخراج گردید. سپس عصاره از فیلتر $0/2$ میلی پور، به منظور حذف میکروبیها، عبور داده شد و در دمای 0°C صفر نگهداری گردید. میزان عصاره حاصله از این روش از خاکشیر مشهد $5/8$ گرم، لارستان $3/1$ گرم، مراغه $8/8$ گرم بود. پس از حل کردن هر کدام از مقادیر فوق در 100°C آب مقطر استریل، محلول هایی با غلظت $5/8$ 100°C از نمونه مشهد، $3/1$ 100°C از نمونه لارستان و $8/8$ 100°C از نمونه مراغه آماده گردید.

۲- استفاده از دستگاه Freeze dryer به منظور تصعید آب موجود در نمونه ها و سپس کاربرد حلال پترولیوم اتر و استون جهت استخراج عصاره و بعد جداسازی حلال با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء چرخان (11) و (12) . در این روش ۲۵ گرم از هر سه نوع خاکشیر آسیاب شده، جداگانه در بالن ته گرد به دستگاه Freeze dryer وصل و با کاهش فشار هوای درونی دستگاه تا $0/004$ تور، آب موجود در نمونه منجمد و سپس تصعید گردید بطوریکه، نمونه بدون هیچگونه تغییر شیمیایی، کاملاً خشک شد. در مرحله بعد جهت استخراج مواد آلی در عصاره، از روش مداوم با دستگاه سوکسله

استفاده می شود. در هندوستان نیز از تخم آن برای نرم کردن سینه و در موارد برونشیت بعنوان تب بر و در موارد اسهال خونی برای دفع \square هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۸۰۳۹ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تامین شده است.

کرم معده استفاده می کنند. حکمای طب سنتی ایران معتقدند که خاکشیر برای تقویت معده و هاضمه و برای کاهش حدت سرخچه، سرخک، آبله و مخملک مفید است (۴). شهرت درمانی آن به حدی است که همه ساله مقادیر زیادی از دانه آن، از مناطقی که این گیاه به حالت وحشی میروید بدست آمده و به بازارها عرضه می شود. جوشانده آن جهت رفع اسهال های ساده، دفع خلط سینه، بهبود برونشیت مزمن و... بکار می رود (۵ و ۶). ترکیبات شیمیایی دانه خاکشیر شامل اسیدهای چربی چون لینولئیک اسید، اولئیک اسید، پالمیتیک اسید و ... می باشد. در اسانس روغنی که از تقطیر تخم، با بخار تهیه می شود موادی مانند بنزیل، آلیل، پروپنیل ایزوتیوسیانات و آلیل دی سولفید یافت می گردد (۴).

در مطالعه Ono و همکاران در ژاپن، از گیاهان خانواده Cruciferae، موز و گشنیز را انتخاب نموده و ماده موثره ۶- متیل سولفینیل هگزیل ایزوتیوسیانات را از عصاره آنها جدا و اثر ضد باکتریایی آن را بر روی E.Coli و استافیلوکوکوس اورئوس مشخص نمودند (۷). اثرشیاکلی از خانواده انتروباکتریاسه، باسیل گرم منفی، فاقد اسپور که در حالت طبیعی در روده انسان ساکن بوده و بخشی از فلور طبیعی آن را تشکیل می دهد. نژادهایی از این باکتری که موجب اسهال در سراسر دنیا می شوند می توان از EPEC (عامل عمده اسهال در نوزادان بویژه در کشورهای در حال توسعه)، ETEC (عامل شایع اسهال مسافرتی و نیز از جمله عوامل اسهال نوزادان در کشورهای در حال توسعه)، EAEC و EIEC نام برد. استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت از خانواده میکروکوکاسیه، پاتوژن عمده انسانی، عامل طیف گسترده ای از بیماریها، از عفونت های خفیف پوستی تا عفونت های شدید تهدید کننده حیات، همچنین عامل مسمومیت غذایی و نیز یکی از عوامل بسیار مهم عفونت های بیمارستانی می باشد (۸). با توجه به مواد ضد میکروبی جدا شده از برخی اعضاء خانواده cruciferae و از سوی

ایجاد چاهک و تلقیح با سمپلر ۱۰۰ μ l در well، بر روی باکتریهای مذکور، به صورت مجزا آزمایش شد. در مجموع ۱۵ جوشانده (برای هر نوع خاکشیر ۵ وزن مختلف)، بر روی E.coli و استافیلوکوکوس اورئوس جداگانه آزمایش گردید (۳و۲). در آخرین مرحله نیز، آنتی بیوگرام با روش Disk Diffusion با آنتی بیوتیک های رایج در درمان بر روی باکتریهای مذکور انجام شد (۸).

یافته ها

در بررسی تاثیر عصاره های حاصله از خاکشیر با روش تقطیر در خلا با غلظت ۵/۸، ۳/۱، ۸/۸ گرم در ۱۰۰ سی سی و نیز به روش Freeze dryer با غلظت های ۳/۵، ۴/۳ و ۱/۶ گرم در ۱۰ سی سی آب مقطر و توین ۸۰ بر روی باکتری های استاندارد E.coli و استافیلوکوکوس اورئوس هیچگونه هاله عدم رشدی در اطراف چاهک ها مشاهده نگردید. در واقع عصاره ها قادر به مهار رشد و یا کشتن باکتری های مذکور نبوده و اثر باکتریسید و یا حتی باکتریوستاتیک بر روی باکتریها نداشته اند. در روش سنتی نیز جوشانده های حاصله از غلظت های مختلف انواع خاکشیر بر روی باکتری های مذکور اثر داده شد و هیچگونه هاله عدم رشدی که نشانه اثر باکتریسید و یا باکتریوستاتیک باشد، مشاهده نگردید.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق عصاره های هیدروالکلی حاصله از روش تقطیر در خلا و نیز روش لیوفیلیزه سبب مرگ و یا حتی مهار رشد باکتری E.coli و استافیلوکوکوس اورئوس نشده است. در حالیکه در

مطالعه ای توسط lin و همکاران در دانشگاه فلوریدای آمریکا، اثر ضد باکتریایی آلایل ایزوتیوسیانات استخراج شده از خانواده Cruciferae را بر روی سالمونلاموتته ویدئو و سویه خاصی از E.coli و لیستریامونوسیتوژنز مورد بررسی قرار دادند و اثر باکتری کشی عصاره مایع این ترکیب و هم فرم بخار آن معادل پلی میکسین B معرفی شد (۹). همچنین در مطالعه Ono و همکاران در ژاپن، ماده ۶ متیل سولفینیل هگزیل ایزوتیوسیانات موجود در عصاره برخی از اعضاء خانواده Cruciferae اثر ضد باکتریایی بر روی E.coli و استافیلوکوکوس اورئوس داشته است (۷). در بررسی که

استفاده گردید که مواد موثره موجود در نمونه را با حلال مناسب کاملاً جدا می نماید.

پس از استخراج، حلال با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا چرخان جدا شد. از مزایای این روش، می توان به فقدان آب در اسانس های استخراج شده، امکان نگهداری آن در زمان طولانی تر، پیشگیری از آلودگی میکروبی و جدا شدن کلیه اسانس های قطبی و غیر قطبی اشاره نمود (۱۳و۱۲). میزان عصاره حاصله در این روش از خاکشیر مشهد ۷/۱ گرم، لارستان ۸/۷ گرم، مراغه ۳/۳ گرم بود. نیمی از هریک از عصاره های فوق با آب مقطر استریل و نیمی دیگر با Tween 80 مخلوط و نهایتاً غلظت عصاره های حاصله از این روش در ۱۰^{cc} از حلال آب مقطر و توین ۸۰ به ترتیب ۳/۵ گرم مشهد، ۴/۳ گرم لارستان و ۱/۶ گرم مراغه بوده است.

میکروارگانیسم های مورد آزمایش نیز سوش های استاندارد لیوفیلیزه E.coli PTCC 1222 و Staphylococcus aureus PTCC 1113 بوده که پس از باز نمودن آمپولهای مذکور و آماده شدن بر روی محیط هولر هینتون آگار (MH)، به محیط BH برات منتقل و در ۳۷^{cc} بین ۲ تا ۸ ساعت اینکوبه گردید تا کدورت آن معادل با محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند شود (۱۴). سوسپانسیون مذکور روی محیط MH آگار استریل در تمامی جهات کشت داده شد و سپس ۳ چاهک (well) به قطر ۶mm با فاصله مناسب و کافی در روی ژلوز، ایجاد گردید (در مجموع ۹ پلیت برای هر سوش استاندارد). سپس با استفاده از سمپلر ۱۰۰ μ l از هر کدام از غلظت های حاصله از روش های ۱ و ۲، در چاهک های یک پلیت، تخلیه شد. بعنوان مثال در یک پلیت حاوی E.coli که سه چاهک در ژلوز آن تعبیه شده بود، در هر چاهک ۱۰۰ μ l از غلظت ۵/۸^{gr}/۱ نمونه مشهد (حاصل از روش ۱) تخلیه شد (۱۵). در انتها همه پلیت ها در ۳۷^{cc} بمدت ۲۴ ساعت اینکوبه گردید و سپس از نظر هاله عدم رشد، مورد مطالعه قرار گرفت. قابل ذکر است که هر کدام از آزمایش ها ۳ بار تکرار شد.

جهت بررسی اثر روش سنتی نیز، اوزان مختلف ۲۰ و ۱۵ و ۱۰ و ۸ و ۶ گرم از هر یک از انواع دانه های خاکشیر مشهد، لارستان، مراغه در ۷۵^{cc} آب مقطر جوش تهیه شده و بعد از ۲۰ دقیقه دم کشیدن، صاف نموده و هر یک از آنها به همان روش

باکتریسید و یا حداقل باکتریوستاتیک ممکن می شد. علت عدم تاثیر جوشانده خاکشیر بر روی باکتری ها در روش سنتی نیز احتمالاً از طریق افزایش حرکات دودی دستگاه گوارش (تاثیر مکانیکی) و خارج کردن باکتریهای مولد اسهال و یا توکسین آنها از مجرای روده، می باشد (۱۹).

لذا با توجه به اثر ضد میکروبی ترکیب ایزوتیوسیانات و نیز ترکیبات گوگردار، پیشنهاد می گردد که در تحقیقات دیگری ترکیبات مذکور در عصاره خاکشیر جدا و تخلیص گشته و اثر ضد باکتریایی آنها جداگانه مورد بررسی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی واحد پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل و آقای دکتر مقدم نیا، آقای دکتر امین، آقای تقی پور و خانم وفایی تشکر و قدردانی می شود.

توسط مشرقی و همکاران در مشهد بر روی اثر ممانعت کنندگی خاکشیر بر مراحل مختلف رشد باکتری E.coli 0157 انجام شد، غلظت های مختلف عصاره در مرحله رشد لگاریتمی، اثر مهار کنندگی مشابه داشته است و نیز باکتری رشد مشابهی در حضور غلظت های مختلف عصاره الکلی نشان داده است (۱۶). در عصاره حاصله از دانه خاکشیر در این تحقیق، ترکیبات ضد میکروبی مختلفی از جمله ایزوتیوسیانات، آلیل دی سولفید همچنین ترکیب گلیکوزید سولفور دسکورینوزید و ترکیبات فنلی، همراه با ترکیبات فاقد اثر ضد میکروبی (مثل انواع اسیدهای چرب همچون اسید لینولئیک، اسید استتاریک و ...)، در مجاورت هم بوده و احتمالاً ممکن است بر روی یکدیگر اثر آنتاگونیسم دارویی باشند (۱۸ و ۱۷ و ۷ و ۴). در نتیجه با توجه به عدم تخلیص و جدا سازی ترکیبات ضد باکتریایی، اثر ضد میکروبی از عصاره مشاهده نگردید. غلظت ترکیبات مورد نظر نیز در اثر آنها دخالت دارند و احتمالاً با غلظت بالاتری از این ترکیبات در عصاره، دستیابی به اثر

منابع

۱. امامی ا، شمس اردکانی م، نکویی نائینی ن. گیاه درمانی درمان بیماریها توسط گیاهان (دکتر ژان ولنه)، جلد اول، چاپ اول، انتشارات راه کمال ۱۳۸۱؛ ص: ۱۱.
۲. زرگری ع. گیاهان دارویی، جلد اول، چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه تهران ۱۳۷۶؛ ص: ۱۴-۲۱۴.
۳. امیر احمدی م. خاکشیر های شیرین و تلخ و مطالعه در خواص دارویی آنها برحسب دستورالعمل علمی وضحت و سقم آنها، پایان نامه دکترای داروسازی، دانشگاه تهران ۱۳۴۱.
۴. میر حیدر ح. معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماریها، جلد سوم، دفتر نشر فرهنگ اسلامی ۱۳۷۵؛ ص: ۱۷۳ و ۱۷۵.
۵. امینی ا. فرهنگ گیاهان دارویی و کاربرد سنتی آنها در کردستان، انتشارات طاق بستان ۱۳۷۴؛ ص: ۱۷۶ و ۱۹۲ و ۲۱۳ و ۲۱۴.
۶. رجحان م. ص. درمان بوسیله گیاهان دارویی، انتشارات آبا ۱۳۷۴؛ ص: ۵۴.
7. Ono H, Tesaki S, Tanabe S, Watanabe M. 6-methyl sulfinyl -hexyl isothiocyanate and its homologues as food-originated compounds with antibacterial activity against E.coli and S. aureus. Biosci, Biotech and Biochemi 1998; 62(2): 363-5.
۸. نوروزی ج. میکروبیولوژی جاوتز ۲۰۰۱، انتشارات حیان ۱۳۸۱؛ ص: ۱۹۳ و ۲۷۲ و ۲۷۳ و ۲۷۴ و ۲۷۷ و ۲۸۱.
9. Lin CM, Preston JF, Wei Cl. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. J Food Prot 2000; 63(6): 727-34.

۱۰. مراغی ش، طرفی جبرپور ن. بررسی اثرات آزمایشگاهی و بالینی عصاره دانه خاکشیر بر هیمنولپیس نانا و مقایسه آن با نیکوزاماید، مجله حکیم ۱۳۸۱؛ ۵ (۱): ۵۷ و ۵۸ و ۵۹ و ۶۱.
۱۱. مومنی ت. عصاره های گیاهی، انتشارات شهید فرهاد رضا ۱۳۷۹؛ ص: ۳۵.
۱۲. پیرالهی ه. شیمی آلی تجربی نوین (رابرتس، گلبرت، ردوالد)، جلد اول، مرکز نشر دانشگاهی ۱۳۶۶؛ ص: ۷۴-۸۰.
۱۳. غیائی م. شناسایی سیستماتیک ترکیبات آلی (شراینر، فیوسان)، انتشارات دانشگاه اصفهان ۱۳۷۱؛ ص: ۶۰۵.
14. Baron EJ, Finegold SM. Baily and Scotts diagnostic microbiology, 8th ed , Mosby 1990; p: 173.
15. De wet PM, Rode H, Sidler D, Lastovica AJ. Allicin: a possible answer to antibiotic resistant campylobacter diarrhoeal infection. Arch Dis Child 1999; 81(3): 278.
۱۶. مشرقی م، ملائی ص، رضایی آ. بررسی اثر ممانعت کنندگی گیاه دارویی خاکشیر *Descurainia Sophia* بر مراحل مختلف رشد باکتری *E.coli* 0157. هفتمین کنگره سراسری میکروبیشناسی ایران، ۱۳ الی ۱۵ بهمن ۸۳؛ ص: ۲۸۰-۱.
17. Sun K, Li X, Liu JM, et al. A novel sulphur glycoside from the seeds of *descurainia sophia*. J Asian Nat Prod Res 2005; 7(6): 853-6.
18. Sun K, Li X, Li W, et al. Two new lactones and one new aryl-8-oxa- bicycl. [3,2,1] oct-3-en-2-one from *descurainia sophia*. Chem. Pharm Bull 2004; 52(12): 1483-6.
۱۹. امیریگی ر. رهیافت های تولید و فرآوری گیاهان دارویی، جلد اول، طراحان نشر ۱۳۷۹؛ ص: ۷۸.

Archive of SID

* آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشکده پیزاپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۳۴۲۷۴.

Shahandeh_za@yahoo.com

Archive of SID