

بررسی فیتوشیمیایی دو گیاه کاسنی و کلپوره و سنجش اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی آنها

دکتر محمود مصدق^۱، دکتر آناهیتا دهموید شریف‌آبادی^۲، دکتر پریسا نصیری^۳، دکتر سمیه اسماعیلی^۴، دکتر فرزانه نقیبی^{۵*}

چکیده

مقدمه: بیماری‌های عفونی یکی از عوامل مهم مرگ و میر در جهان است. بعلت تقاضای وسیعی که جهت استفاده از عوامل فارماکولوژیکی جدید به خصوص ترکیبات ضد قارچ وجود دارد و با توجه به عوارض جانبی داروها به خصوص ترکیبات ضد میکروب، همچنین نیاز به موادی با سمیت کمتر، این بخش از علوم، یعنی جداسازی داروهای جدید از گیاهان در دهه‌های ۱۹۹۰ دارای اهمیت ویژه‌ای است.

مواد و روشها: در این تحقیق پس از جمع‌آوری و تأیید دو گیاه کاسنی و کلپوره از قسمت هوایی و ریشه کاسنی و قسمت هوایی کلپوره به طور جداگانه عصاره‌گیری به روش ماسیراسیون انجام شد. سپس عصاره‌ها از نظر فیتوشیمی و اثر بر روی تعدادی از باکتریها و قارچهای بیماریزا مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: در بررسیهای انجام شده بر روی گیاه کاسنی مشخص شد که این گیاه حاوی مقادیری تانن، ترپنوئید، لوکوآنتوسیانین، استرول و فلاونوئید بوده و تا حدودی بر روی اشرشیاکلی و پseudomonas آئروژینوزا مؤثر است ولی اثر ضد قارچی مناسبی ندارد و گیاه کلپوره حاوی مقادیری تانن، ترپنوئید، ساپونین، استرول، فلاونوئید و لوکوآنتوسیانین بوده و تقریباً بر روی تمام باکتریهای مورد آزمایش دارای اثر می‌باشد ولی دارای اثر ضد قارچی بارزی نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های دو گیاه مورد بررسی خصوصاً گیاه کلپوره دارای اثرات ضدباکتریایی مناسبی نسبت به اثرات ضدقارچی آنها می‌باشد از این رو خالص‌سازی عصاره گیاهان و ردیابی ماده یا مواد مؤثر آنها توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کلپوره، کاسنی، ضدقارچ، ضد باکتری

۱، ۲ - استادیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳، ۴ - دکترای داروسازی

۵* - استادیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، خیابان ولیعصر، تهران، نویسنده مسئول

مقدمه

با آنکه امروزه درمان بیماریها بیشتر از طریق مصرف داروهایی صورت می‌گیرد که منشاء صنعتی دارند ولی به دلیل آنکه بعضی از این داروها دارای عوارض جانبی زیادی هستند، اهمیت گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنها روز به روز بیشتر گردیده است و اعتقاد عمومی درباره استفاده از آنها پیوسته در حال تقویت است.

با توجه به شیوع بیماریهای عفونی و بوجود آمدن مقاومت میکروبهای مختلف به آنتی‌بیوتیکهای موجود جستجوی مواد فعال ضدباکتری و ضدقارچی از منابع گیاهی در اولویت قرار می‌گیرد لذا در این تحقیق دو گیاه کاسنی (*Cichorium intybus*) و کلیپوره (*Teucrium polium*) از لحاظ اثرات ضد باکتری و ضدقارچی مورد بررسی قرار گرفتند و علاوه بر آن آزمایشات مربوط به فیتوشیمی این گیاهان نیز انجام شد.

۶۰٪ از عوامل ضد میکروبی در سالهای ۱۹۹۵-۱۹۸۹ از منابع طبیعی تهیه شدند و از میان داروهای جدید آنتی‌بیوتیکی، برخی با منشاء طبیعی و تعدادی به صورت مشتقات نیمه صنعتی تهیه شده‌اند. سنتز بعضی از آنها نیز بر پایه مدل‌های بدست آمده از منابع طبیعی بوده است (۲،۱). در تحقیقاتی که در سال ۱۹۸۹ روی عصاره گیاه کلیپوره انجام گرفت ۳ دی‌ترپنوئید به دست آوردند که دارای اثرات ضد قارچی بودند (۳). این گیاه از نظر اثرات ضد پلاسمودیومی به صورت آزمایشگاهی و همچنین بالینی بررسی گردید ولی اثری مشاهده نگردید (۴). در بررسیهای دیگری که طی آن عصاره متانولی گیاه کلیپوره، مورد تجزیه قرار گرفت موادی بنام پولیوموزید، ورباسکوزید و یک گلیکوزید جدید بنام فنیل پروپانوئید و توپولیوزید دارای خاصیت آنتی‌باکتریایی بوده و بر باکتریهای شیگلا، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر مؤثر گردیده است. همچنین عصاره اتانولی این گیاه نیز فعالیت آنتی‌باکتریایی در مقابل میکروبهای گرم مثبت و گرم منفی، از خود نشان می‌دهد (۵).

در این تحقیق اثر عصاره کاسنی و کلیپوره روی گونه‌هایی از باکتریها و قارچها که در ایجاد عفونتها نقش به سزایی دارند مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

پس از تهیه و تأیید دو گیاه کاسنی و کلیپوره، جهت انجام آزمایشات فیتوشیمیایی و ضد میکروبی عصاره‌گیری از اندامهای گیاهان، توسط اتانول ۹۶ درجه و آب مقطر (۲۰:۸۰)، به روش ماسیراسیون و به مدت ۵ روز انجام گرفت، به این ترتیب که در مورد کاسنی سرشاخه هوایی و ریشه گیاه و در مورد کلیپوره از سرشاخه هوایی استفاده شد.

عصاره‌های حاصل به طور جداگانه صاف شدند، سپس توسط دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۵۵°C تغلیظ شده آنگاه جهت خشک کردن کامل، عصاره تغلیظ شده به کریستالیزور منتقل گردید.

جهت بررسی اثرات ضد میکروبی (۶)، عصاره‌های گیاهان مورد نظر در غلظتهای ۲۰، ۱۰ و ۳۰ درصد توسط حلال DMSO تهیه گردید. سپس عصاره‌ها بر روی دیسکهای کاغذی (به روش ماسیراسیون) قرار داده شدند برای تهیه دیسکهای شاهد منفی از حلال DMSO و برای تهیه دیسکهای شاهد مثبت از دیسکهای آموکسی‌سیلین و کانامایسین استفاده شد. دیسکهای مورد ارزیابی بر روی محیط کشت‌های مولر هینتون آگار برای رشد باکتریهای مورد نظر که مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است و قبلاً به وسیله سوسپانسیون میکروبی آلوده شده بودند قرار گرفتند جهت تعیین اثر ضدقارچی، عصاره‌های گیاهان (غلظت ۱۰٪) با محیط کشت ساپرو دکستروز آگار که دمای آن به حدود ۵۰°C رسیده بود مخلوط شده سپس ۱/۱۰ μl از سوسپانسیون قارچ‌هایی که مشخصات آنها در جدول ۲ آمده، به صورت لکه‌گذاری روی محیط کشت و محتوی عصاره گیاهی قرار داده شد. شاهد منفی، محیط کشت حاوی DMSO و شاهد مثبت، محیط کشت حاوی فلوکونازول بود.

جدول شماره ۱: مشخصات باکتریهای مورد آزمایش

| شماره | میکروارگانیزم | کد میکروارگانیزم | طبقه بندی |
|-------|----------------------|------------------|-----------|
| ۱ | استافیلوکوکوس اورئوس | PTCC ۶۵۳۸ | گرم مثبت |
| ۲ | سودوموناس آئروژینوزا | PTCC ۱۰۷۱ | گرم منفی |
| ۳ | اشرشیا کلی | PTCC ۳۵۲۱۸ | گرم منفی |
| ۴ | میکروکوکوس لوتئوس | PTCC ۱۱۶۹ | گرم مثبت |

جدول شماره ۲: مشخصات قارچهای مورد آزمایش

| شماره | میکروارگانیزم | کد میکروارگانیزم | طبقه بندی |
|-------|-----------------------|------------------|-----------|
| ۱ | آسپرژیلوس نیچر | Plm ۱۱۴۰ | کپک |
| ۲ | کاندیدا آلبیکنس | ATCC ۱۴۰۵۳ | مخمر |
| ۳ | آسپرژیلوس فومیگاتوس | Plm ۷۱۲ | کپک |
| ۴ | کاندیدا کفیر | ATCC ۳۸۲۹۶ | مخمر |
| ۵ | کاندیدا گونیلیرموندی | IF ۰۰۸۳۸ | مخمر |
| ۶ | کریپتوکوکوس نئوفورمنس | KI ۳۳ | مخمر |
| ۷ | ساکارومیسس سرویزیه | ۴۵۴ | مخمر |

نتایج

در آزمایشات فیتوشیمی، با کمک یکسری معرفهای شیمیایی خاص و از روی تغییر رنگ، ایجاد رسوب و یا پارامترهای دیگر می‌توان به وجود دستجات مختلف متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره پی برد. نتایج این آزمایشات در جدول شماره ۳ آورده شده است.

با توجه به اینکه برای تعیین اثر ضد میکروبی یک ماده روشهای مختلفی از جمله روشهای انتشار و کدورت سنجی وجود دارد در این تحقیق از روش انتشار استفاده گردید.

نتایج حاصل از اثر عصاره‌ها بر باکتریهای مورد استفاده به صورت قطر هاله‌های عدم رشد و در مورد قارچها براساس رشد و یا عدم رشد، به ترتیب در جداول ۴ و ۵ آورده شده است.

بحث

استفاده از گیاهان دارویی، تاریخی به قدمت عمر انسان دارد. انسانها از دیرباز از گیاهان هم بعنوان مواد غذایی و هم جهت درمان بیماریهایشان کمک می‌گرفتند. در حال حاضر در سراسر جهان سالانه گیاهان زیادی از نظر دارا بودن خواص درمانی مورد بررسی قرار می‌گیرند، بخشی از این تحقیقات بر روی تعیین اثر ضد میکروبی گیاهان دارویی متمرکز است، این امر با توجه به بروز مشکلاتی از جمله مقاومت‌های

میکروبی و عوارض آنتی‌بیوتیک‌ها، مورد تأیید قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه آنتی‌بیوتیکها در مقادیر میکروگرم بر روی باکتریهای بیماریزا مؤثر می‌باشد و هر چه مقدار فرآورده ضد میکروبی مورد استفاده کمتر باشد، فرآورده اثر بخشی مطلوبتری دارد، در مورد گیاهان نیز سعی می‌گردد که با غربالگری آنها، گیاهانی که دارای اثر ضد میکروبی قوی‌تری هستند، مشخص گردد لذا در این تحقیق غلظتهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰٪ برای باکتریها و ۱۰٪ برای قارچها از عصاره خالص نشده استفاده گردید. در مورد گیاه کاسنی هیچکدام از عصاره‌های اولیه تهیه شده بر روی استافیلوکوک مؤثر نبودند. در مطالعات قبلی هم فقط در یک مورد اثر گیاه بر روی استافیلوکوک مشاهده شده بود که از عصاره تام گیاه استفاده نگردیده بود و اثر ماده فعال پس از جاسازی عصاره سنجیده شده بود که نشان دهنده اثر بسیار بسیار ضعیف می‌باشد (۷) این اثر بر روی سایر باکتریها به صورت ضعیف مشاهده گردید ولی در مقایسه بر روی باکتریهای گرم منفی اثر بیشتری داشت. عصاره‌ها بر روی دو قارچ ساکارومیسس سرویزیه و کریپتوکوکوس نئوفورمنس مؤثر می‌باشند، ولی با توجه به اینکه این دو قارچ بسیار حساس می‌باشند می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که این عصاره‌ها دارای اثر ضد قارچی مناسبی نمی‌باشند. عصاره گیاه کلپوره نیز بر روی باکتریهای مورد بررسی دارای اثر بخشی متوسط تا قوی می‌باشد. بطوری که بر روی استافیلوکوک اثر بخشی ضعیف کلپوره مشاهده شد البته این اثر ضد استافیلوکوکی گیاه در سال ۱۹۹۱ توسط اوگانزیان نیز گزارش شده بود (۸). اثر این گیاه بر روی میکروکوکوس لوتئوس و اشرشیا کلی نیز ضعیف بود ولی میزان اثربخشی گیاه بر روی سودوموناس آئروژینوزا قوی بود و جای آن دارد که در بررسیهای آتی ماده یا مواد مؤثره گیاه شناسایی شوند. عصاره گیاه کلپوره بر روی دو قارچ ساکارومیسس سرویزیه و کریپتوکوکوس نئوفورمنس اثری مشابه با اثر فلوکونازول داشته ولی بر سایر قارچها مؤثر نبوده است ولی با توجه به حساس بودن این دو قارچ ارزش بازبینی و خالص‌سازی ماده مؤثره ضد قارچ را ندارد.

References:

1. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11 (4): 287-291.
2. Gragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997; 60 (1): 52-60.
3. Carreiras MC, Rodrig V. A chlorin containing and two 17 Beta-Neo-Clerodan diterpenoids from *teucrium polium* subspvine *centrium*. *Phytochemistry* 1989; 28 (1): 1453-1461.
4. Caldes G, Prescott B, King J. Potential antileukemic substance present in *globularia alypum*. *Planta Medica* 1975; 27 (1): 72-75.
5. Autore G, Capasso F, Defusco MP. Antipyretic and antibacterial action of *Teucrium polium*. *Int J Tissue React* 1984; 16 (1): 27-9.
6. Chand S, Lusuzi I, Veal DA, Williams LR, Karuso P. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. *The Journal of Antibiotics* 1994; 47(1): 1295-1304.
7. Gradzinska Z, Zachwiejakahi W, Pasek W. Bacteriostatic action of chicory. *Bull Acad Polon Sci Ser Sci Biol.* 1992; 10: 513-517.
8. Ogenesian GB, Galstyan AM, Mantsatanyan VA, Shashakov AS, Agababjan PV. Phenyl propanoid glycosided of *Teucrium polium*. *Chemistry of Natural compounds* 1991; 27(5). 556-559.