Archive of SID

تحقیقی

اثر ضدمیکروبی عصاره‌های کلروفرمی، اتیل‌استاتی و هیدروالکلی پیاز گیاه سنبل کوهی در شرایط آزمایشگاهی

سالار حافظ‌قرآن[۱]، دکتر حسین میقانی[۲]، دکتر پونه ابراهیمی*[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی گرایش فیتوشیمی، دانشگاه گلستان، گرگان. ۲- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان.

۳- استادیار، شیمی تجزیه (گرایش جداسازی و کروماتوگرافی)، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان.

چکیده

زمینه و هدف : *با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماریزای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، جایگزین کردن آنها با داروهای ضدباکتریایی با منشاء گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره‌های کلروفرمی، اتیل‌استاتی و هیدروالکلی پیاز گیاه سنبل کوهی بر روی دو باکتری گرم مثبت و یک باکتری گرم منفی به روش دیسک دیفیوژن و روش رقت لوله‌ای انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه آزمایشگاهی عصاره کلروفرومی، اتیل‌استاتی و هیدروالکلی پیاز گیاه سنبل کوهی تهیه و خواص ضدمیکروبی و نیز حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری (MIC) و میکروب‌کشی (MBC)، با روش دیسک دیفیوژن (تعیین هاله عدم رشد) و نیز رقت لوله‌ای (Macro-dilution)، بر باکتری‌های اشریشیاکلی (گرم منفی)، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) مورد سنجش قرار گرفت. از دی‌متیل‌سولفوکسید به‌عنوان شاهد منفی و از آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک‌اسید به‌عنوان شاهدهای مثبت استفاده شد.*

یافته‌ها : *هاله عدم رشد عصاره اتیل‌استاتی به ترتیب روی استافیلوکوکوس ۰/۱±۲۶/۳ میلی‌متر، اشریشیاکلی ۰/۳±۲۳/۷ میلی‌متر و باسیلوس ۰/٤±۱۹/۵ میلی‌متر تعیین شد. هاله عدم رشد عصاره کلروفرمی به‌ترتیب روی استافیلوکوکوس ۰/۲±۱٦/٤ میلی‌متر و باسیلوس ۰/۳±۱٤/۹ میلی‌متر مشاهده گردید.*

نتیجه‌گیری : *اثر ضدمیکروبی عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی پیاز گیاه سنبل کوهی بر روی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس و باسیلوس بیشتر از نالیدیکسیک‌اسید و مشابه آمپی‌سیلین در شرایط آزمایشگاهی بود.*

کلید واژه‌ها : *سنبل کوهی ، حداقل غلظت مهار کنندگی ، اشریشیاکلی ، باسیلوس سرئوس ، استافیلوکوکوس اورئوس*

* نویسنده مسؤول : دکتر پونه ابراهیمی ، پست الکترونیکی epouneh@yahoo.com و p.ebrahimi@gu.ac.ir

نشانی : گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، کدپستی ٤٩١٣٨١٥٧٥٩ ، تلفن و نمابر ۰۱۷۱-۲۲٤٥٩٦٤

وصول مقاله : ۹۱/۳/۲۳ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۲/۱۷ ، پذیرش مقاله : ۹۲/۵/۱٦

مقدمه

طی سالیان متمادی داروهای طبیعی، به خصوص گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها درمان محسوب می‌شدند. در عین حال مواد اولیه موجود در این گیاهان در صنعت داروسازی با خاصیت ضدعفونی کنندگی مورد استفاده قرار می‌گرفتند (۱و۲). سنبل کوهی با نام علمی *Scilla persica* Hausskn. یک گیاه چندساله است که متعلق به خانواده لاله است. از این گیاه به‌عنوان ماده غذایی و یک داروی سنتی برای افزایش گردش خون، ضدالتهاب و ضددرد استفاده می‌شود (۳). این گیاه دارای برگک کوچک، سفید و غشائی، شامل یک یا دو محور پُر گل (۱۰ تا ۱۲ گل)، ۲ الی ۴ برگ غلافدار، گلپوش مایل به آبی با قطعات ایستاده، گل‌آذین خوشه‌ای، محور گل منفرد و به ندرت دوتایی است. از رویشگاه‌های این گیاه می‌توان آذربایجان‌غربی، خرم‌آباد، الوند، همدان، قصر شیرین، سنندج و کوه رزآب را نام برد (۱).

ترکیبات شیمیایی از قبیل هوموایزوفلاوانون‌ها (Homoisoflavanones)، آلکالوئیدها (Alkaloides)، استیلبن‌ها (Stilbenes) و گلیکوزیدهای قلبی (Cardiac Glycosides) از سنبل کوهی گزارش شده است (۷-۳). در پرتغال از Scilla در درمان تومورهای داخلی، ناراحتی ریه در چهارپایان و همچنین گشاد کردن رگ‌ها و ضدآلرژی استفاده شده و خواص ضد جهش‌زا

www.SID.ir

Archive of SID

بودن این گیاه نیز به ثبت رسیده است (۸). در هندوستان پیاز Scilla در درمان آسم، سرفه، برونشیت، امراض قلبی (تنظیم ضربان قلب)، روماتیسم و پوست مورد استفاده قرار گرفته و دارای خاصیت کرم‌کشی (انگل روده)، ادرارآور، قاعده‌آور و نیز خلط‌آور است (۹). درطب سنتی چین از Scilla به عنوان پادزهر، فعال‌ساز گردش خون، درمان ورم و دمل چرکی استفاده می‌شود (۱۰). درآفریقای جنوبی بررسی‌ها نشان داد که پیاز Scilla natalensis خاصیت ضدسرطانی، آنتی‌باکتریالی، کرم‌کشی (انگل روده) و همچنین جلوگیری از تبدیل تومورهای داخلی به عوامل سرطانی دارد. از جوشانده پیاز برای درمان دُمل چرکی و اگزما استفاده کرده‌اند (۱۱).

باکتری‌هایی نظیر استافیلوکوکوس‌ها، اشریشیاکلی، استرپتوکوکوس‌ها و باسیلوس‌ها از جمله عوامل عفونی بیماری‌زا در انسان هستند که امروزه مشکلات زیادی برای انسان به‌وجود آورده‌اند (۱۲). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، فلور نرمال بینی و پوست است و سبب ایجاد عفونت‌های بیمارستانی (۱۳) و مهم‌ترین عامل عفونت‌های پوست و بافت‌های زیرین آن در انسان است (۱۴). اشریشیاکلی یک باکتری گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه است و عامل عفونت در مجاری ادراری است و حدود ۹۰ درصد از باکتریوری را در زنان تشکیل می‌دهد (۱۵). باسیلوس سرئوس باسیل گرم مثبت و اسپوردار از خانواده باسیلاسه است که به صورت گسترده‌ای در طبیعت، آب و خاک پراکنده شده است. به‌طوری‌که می‌توان آن را از مواد غذایی جدا نمود. این باکتری قادر به ایجاد انتروتوکسین‌های اسهال و تهوع است(۱۶و۱۷).

با توجه به تنوع ژنتیکی ایجاد شده در عوامل بیماری‌زای میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم و همچنین عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، جایگزین کردن داروهای ضدباکتریایی توسط داروهای ضدمیکروبی با منشأ گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و انگیزه‌ای برای تحقیقات در زمینه یافتن داروهای گیاهی بدون عوارض جانبی شده است (۱۸).

استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل قدرت بیماری‌زایی بالقوه و مقاومت روزافزون در برابر داروهای ضد باکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم جهان تبدیل شده است. توکسین این باکتری باعث ایجاد سرگیجه، اسهال و تهوع می‌شود (۱۹). همواره امکان آلودگی شیر خشک نوزادان به اسپور باسیلوس سرئوس وجود دارد و این باکتری قادر به ایجاد مسمومیت غذایی و حتی سپتی‌سمی و مننژیت در نوزادان است. انتروتوکسین تولید شده توسط اشریشیاکلی مسؤول مسمومیت دستگاه گوارش و بروز علایم گوارشی ناشی از آن است (۲۰).

تاکنون هیچ گزارش مستندی دال بر انجام بررسی اثر ضدمیکروبی سیلا پرسیکا مشاهده نشده است و این نوع بررسی صرفاً بر روی گیاه سیلا ناتالنسیس انجام یافته است (۱۱). لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های کلروفرمی، اتیل‌استاتی و هیدروالکلی پیاز گیاه سنبل کوهی بر سه میکروارگانیسم اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی میکروارگانیسم‌های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس از دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه گردید. این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی فیتوشیمی دانشگاه گلستان در سال ۱۳۹۰ انجام شد.

گیاه سنبل کوهی در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ساری (شماره هرباریوم ۶۳۳۴) شناسایی گردید.

برای گرفتن عصاره تام پیاز گیاه سنبل کوهی از روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. ارلن حاوی گیاه خرد و له شده با مقدار لازم از حلال کلروفرم (شرکت Merck آلمان) پر شد و روی تکان‌دهنده قرار گرفت تا عمل استخراج مواد مؤثره به‌خوبی صورت پذیرد (۲۱). پس از چندبار تعویض حلال، کنترل پایان عصاره‌گیری با کلروفرم با استفاده از صفحات TLC انجام شد. سپس گیاه را خشک کرده و عمل عصاره‌گیری با حلال اتیل‌استات (شرکت Merck آلمان) دنبال شد. پس از اتمام عصاره‌گیری که کنترل آن با صفحات TLC انجام شد و خشک شدن گیاه، عصاره‌گیری با حلال هیدروالکلی (شرکت Merck آلمان) انجام شد. سه عصاره را با صافی کتانی و بعد با صافی کاغذی صاف کرده و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء (IKA werke- ژاپن) تغلیظ نموده و عصاره خشک آن به ازای مقدار معینی از گیاه تعیین گردید. سپس مقدار یک گرم از هر نوع عصاره (کلروفرمی، اتیل‌استاتی و هیدروالکلی) در یک میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید حل شد و با استفاده از فیلترهای سرسرنگی میلی‌پور به قطر ۰/۲۲ میکرومتر صاف و استریل شدند. ابتدا محلول‌ها در غلظت ۱۰۰ درصد و سپس با حل کردن مقادیر مختلف، در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ درصد (وزنی - حجمی) رقیق شدند.

با استفاده از روش انتشار دیسکی (Disk diffusion method) از طریق دیسک کاغذی، حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد ضدمیکروبی بر طبق روش متداول کربی –بائر تعیین شد. ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند بر اساس روش استاندارد تهیه شد (۲۲). سپس با استفاده از یک سوآب استریل اشباع شده از سوسپانسیون میکروبی، کشت سفره‌ای فشرده‌ای در تمام سطح پلیت مولر هینتون آگار (شرکت Merck آلمان) ایجاد

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. سپس دیسک‌های (شرکت پادتن طب) اشباع شده از ماده ضدمیکروبی و نیز بعضی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نظیر آمپی‌سیلین، نالیدیکسیک اسید به منظور مقایسه با عصاره ضدمیکروبی مورد آزمایش بر سطح محیط کشت باکتری قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان دوره انکوباسیون هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک با یک خط‌کش میلی‌متری به دقت اندازه‌گیری شد (۲۳). این کار برای هر رقت و هر باکتری به‌طور جداگانه، حداقل ۳ بار انجام پذیرفت. از دیسک‌های استریل فاقد هرگونه ماده ضدمیکروبی و آغشته به دی‌متیل‌سولفوکسید نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

با استفاده از روش رقت لوله‌ای (Tube dilution method) حداقل غلظت مهارکنندگی ماده ضدمیکروبی (MIC) (Minimal Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی ماده ضدمیکروبی (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) تعیین گردید. در این روش، از محیط کشت آبگوشتی مولرهینتون (شرکت Merck آلمان) استفاده شد. ابتدا از عصاره‌ها، رقت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تهیه شد و سپس به هریک ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند افزوده شد (۲۲). این لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. آخرین لوله‌ای که فاقد کدورت بود؛ به عنوان MIC در نظر گرفته شد. ولی برای سنجش MBC، کشت مجددی از لوله‌های MIC و یک رقت پایین‌تر و بالاتر از آن بر روی محیط مولر هینتون آگار صورت گرفت. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آخرین لوله‌ای که هیچ‌گونه رشدی از باکتری بر روی پلیت مربوطه نداشت؛ به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۲۴و۲۵).

آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی: عصاره به‌وسیله روش خیساندن از ۵۰ گرم پیاز در ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰درصد به‌مدت ۲۴ ساعت تهیه و با کاغذ واتمن صاف گردید و به منظور وجود یا عدم وجود متابولیت‌های ثانویه، آزمایشات فیتوشیمیایی متعددی بر روی این گیاه انجام گرفت که شامل موارد زیر بود.

آلکالوئیدها: با افزودن چند قطره واکنشگر مایر به محلول حاوی آلکالوئید، رسوب سفید زرد مانندی تشکیل شد (۲۶و۲۷). در واقع بسیاری از آلکالوئیدها در محلول‌های خنثی یا کمی اسیدی به وسیله واکنشگر مایر رسوب می‌کنند. ابتدا حلال عصاره پرانده شد و باقی‌مانده آن با اسید کلریدریک ۲درصد در حمام آب جوش، گرما داده شد. بعد از سرد شدن، مخلوط فیلتر شد و به آن چند قطره واکنشگر مایر اضافه گردید. کدر شدن نمونه یا تشکیل رسوب زردرنگ نشان‌دهنده وجود آلکالوئیدها بود.

گلیکوزیدها: به منظور انحلال عصاره در اسید استیک گلاسیال، چند قطره کلرید آهن و چند قطره اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. به طوری که محلول دولایه تشکیل گردید. رنگ قهوه‌ای قرمزگون در تقاطع لایه‌ها و رنگ سبز آبی‌گون در لایه بالا نشان‌دهنده وجود گلیکوزیدها بود (۲۷).

ترپنوئیدها و استروئیدها: به ۴ میلی‌گرم از عصاره ۰/۵ میلی‌لیتر انیدریداستیک و ۰/۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد. سپس اسیدسولفوریک غلیظ به‌آرامی افزوده شد. رنگ بنفش قرمزگون نشان‌دهنده ترپنوئید و رنگ سبز آبی‌گون نشان‌دهنده استروئیدها بود (۲۶و۲۷).

فلاونوئیدها: به ۴ میلی‌لیتر از عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۵۰درصد اضافه شد. سپس محلول گرما داده شد و فلز منیزیم به آن اضافه گردید. به این محلول ۶-۵ قطره اسیدکلریدریک غلیظ اضافه شد. رنگ قرمز مربوط به فلاونوئیدها و رنگ نارنجی مربوط به فلاون‌ها بود (۲۶و۲۷).

تانن‌ها: به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول عصاره یک میلی‌لیتر آب و ۲-۱ قطره کلرید آهن اضافه شد. رنگ آبی نشان‌دهنده گالیک تانن‌ها و رنگ سبز تیره نشان‌دهنده کاتچول تانن‌ها بود (۲۶).

آنتراکینون‌ها: ۰/۵ گرم عصاره با اسیدکلریدریک ۱۰درصد برای چند دقیقه در حمام آب گرم جوشید و سپس صاف شد. بعد از سرد شدن هم حجم با محلول فیلتر شده کلروفرم اضافه شد. سپس چند قطره آمونیاک ۱۰درصد به مخلوط اضافه و گرما داده شد. رنگ صورتی نشان‌دهنده وجود آنتراکینون‌ها بود (۲۶و۲۷).

ساپونین‌ها: حدود ۰/۲ گرم از عصاره با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر تکان داده شد. سپس به محلول گرما داده شد تا به جوش آمد. تولید کف ماندگار نشان‌دهنده وجود ساپونین‌ها بود (۲۶و۲۷).

قندهای احیایی: به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره یک میلی‌لیتر آب و ۸-۵ قطره محلول فهلینگ در گرما اضافه شد. رسوب قرمز آجری نشان‌دهنده وجود قند احیایی بود (۲۷و۲۸).

آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند و میانگین نتایج آزمایش‌ها، استانداردها و نیز میزان انحراف معیار محاسبه گردید. قطر ناحیه عدم رشد از رابطه انحراف معیار±میانگین به‌دست آمد. انحراف معیار (SD) از رابطه زیر محاسبه شد.

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{N-1}}$$

در این رابطه x قطر ناحیه عدم رشد در یکبار، $\bar{x}$ میانگین قطر ناحیه عدم رشد و N تعداد آزمایشات است (۲۹). داده‌های جمع‌آوری شده با نرم افزار SPSS-16 و آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ : نتایج حاصل از بررسی آزمایشات فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی پیازگیاه سنبل کوهی

نوع متابولیت ثانویه	روش بررسی	مشاهدات	نتیجه
آلکالوئیدها	تست مایر	ایجاد رسوب سفید مایل به زرد	–
آنتراکینون‌ها	واکنش بورن تراگر	عدم ایجاد رنگ زرد	–
فلاونوئیدها	تست شینودا	ایجاد محلول قرمز رنگ	+
گلیکوزیدها	تست کیلر کیلیانی	ایجاد محلول قرمز- قهوه‌ای	+
قندها	تست فهلینگ	ایجاد محلول سبز رنگ با فهلینگ A ایجاد محلول قهوه‌ای رنگ با فهلینگ B	+ +
ساپونین‌ها	تست فورث	ایجاد کف ماندگار	+
تانن‌ها	واکنش با فریک کلرید	ایجاد محلول آبی‌رنگ برای گالیک تانن‌ها ایجاد محلول سبز تیره برای کاتچولیک تانن‌ها	– +
ترپنوئیدها استروئیدها	تست لیبرمن- بوشارد	ایجاد محلول قرمز- بنفش ایجاد محلول سبز- آبی	– –

جدول ۲ : حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی باکتری عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی گیاه سنبل کوهی در برابر باکتری‌های اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس

میکروارگانیسم	عصاره کلروفرمی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		عصاره اتیل‌استاتی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
اشریشیاکلی	۱۰۰	–	٦/۲۵	۱۲/۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۵	۵۰	٦/۲۵	٦/۲۵
باسیلوس سرئوس	۵۰	۱۰۰	۱۲/۵	۲۵

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی آزمایش‌های فیتوشیمیایی مقدماتی با استفاده از عصاره متانولی بر روی پیاز گیاه سنبل کوهی به منظور تعیین وجود یا عدم وجود مهم‌ترین مواد تشکیل دهنده گیاهی (متابولیت ثانویه) در جدول یک آمده است. نتایج نشان دادند که این گیاه حاوی فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، قندها، ساپونین‌ها و تانن‌ها به‌خصوص کاتچولیک تانن‌ها است.

مقادیر مربوط به میانگین قطر هاله عدم رشد سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس در غلظت‌های مختلف عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی پیاز گیاه سنبل کوهی (۱۰۰-۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در نمودارهای ۱ و ۲ و نیز مقادیر مربوط به مقادیر MIC و MBC سه باکتری در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان دادند که اثر عصاره اتیل استاتی بر قطر عدم هاله رشد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از این عصاره، بیشترین هاله عدم رشد برای سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس به ترتیب ۰/۱±۲۶/۳، ۰/۳±۲۳/۷ و ۰/۴±۱۹/۵ میلی‌متر بود. MIC و MBC عصاره اتیل استاتی برای استافیلوکوکوس ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

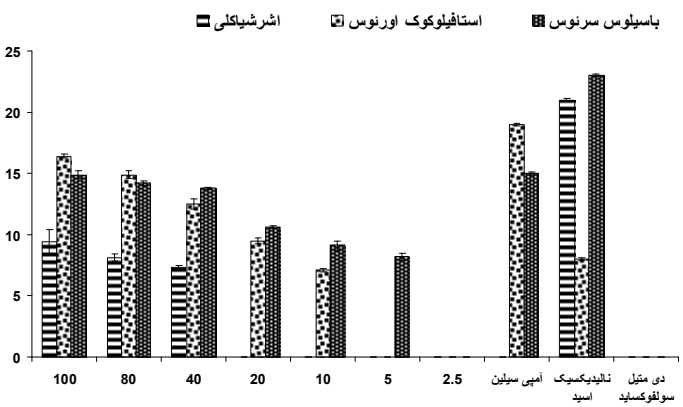
بررسی اثر عصاره کلروفرمی بر روی این باکتری‌ها نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین هاله عدم رشد بر روی استافیلوکوکوس (۰/۲±۱۶/۴ میلی‌متر) بوده و حداقل غلظت قابل اثر بر روی هاله عدم رشد دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس به‌ترتیب ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. مقدار MIC و MBC باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برای عصاره کلروفرمی معادل ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. میزان قدرت مهارکنندگی باکتری برای عصاره کلروفرمی گیاه سیلا پرسیکا تقریباً ۵۰mg/ml و برای عصاره اتیل‌استاتی حدود ۶/۲۵mg/ml بود.

همچنین نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بر روی سه باکتری نشان داد که این عصاره به جز بر روی باکتری باسیلوس سرئوس (در بالای غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) هیچ اثری بر روی دو باکتری دیگر ندارد و میزان اثر این عصاره در حداکثر غلظت به‌کار رفته (غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر روی هاله عدم رشد باسیلوس سرئوس برابر با ۰/۳±۹/۷ میلی‌متر است.

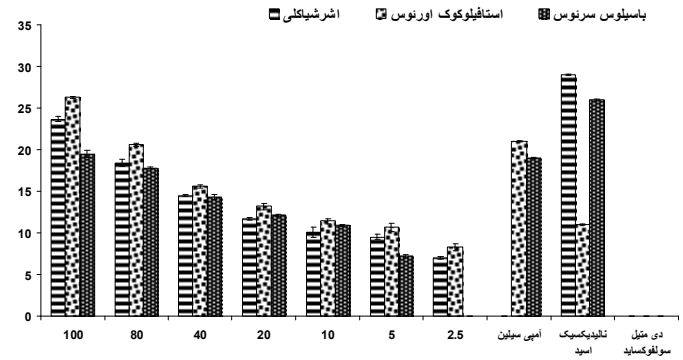
مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی گیاه سنبل کوهی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان‌دهنده آن است که تفاوت معنی‌داری بین پنج غلظت عصاره (۱۰۰-۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و در مورد باکتری اشریشیاکلی بین سه غلظت ۱۰۰، ۸۰ و ۴۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر وجود دارد (P<۰/۰۵). در مورد باکتری باسیلوس سرئوس بین دو غلظت ۱۰۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱ : میانگین قطر هاله ایجاد شده علیه سه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس توسط غلظت‌های مختلف عصاره کلروفرمی گیاه سنبل کوهی در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک اسید به‌روش دیسک دیفیوژن



نمودار ۲ : میانگین قطر هاله ایجاد شده علیه سه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس توسط غلظت‌های مختلف عصارهی اتیل‌استاتی گیاه سنبل کوهی در مقایسه با دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و نالیدیکسیک اسید به‌روش دیسک دیفیوژن

صورتی‌که بین این دو غلظت و سایر غلظت‌ها (۲۰-۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج این بررسی در مورد غلظت‌های مختلف عصاره اتیل‌استاتی بر هر سه باکتری مورد مطالعه نیز نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مورد هفت غلظت مورد مطالعه بود (P<۰/۰۵). در مورد عصاره اتیل‌استاتی، بیشترین اثر مهار روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد که از این میان غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتیل‌استاتی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تفاوت معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) و نسبت به آن موثرتر بود. بین غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آمپی‌سیلین تفاوت معنی‌داری دیده نشد. غلظت‌های ۱۰۰-۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره نیز در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نالیدیکسیک اسید موثرتر بود. در مورد غلظت ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید همچنین غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره در برابر باکتری باسیلوس سرئوس و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز تفاوت معنی‌داری دیده نشد. عصاره کلروفرمی گیاه سیلاپرسیکا بر روی باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی) اثر خیلی کمتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) دارد و این درحالی است که عصاره اتیل‌استاتی بر روی همه باکتری‌ها اعم ازگرم منفی و گرم مثبت اثر بیشتری داشت. براساس نتایج حاصله عصاره هیدروالکلی فاقد قدرت مهارکنندگی این باکتری‌ها بود.

بحث

مقایسه بین شاهدهای مثبت (نالیدیکسیک‌اسید و آمپی‌سیلین) و سه نوع عصاره بر روی میکروارگانیسم‌های مطالعه شده نشان داد که عصاره اتیل‌استاتی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس به ترتیب دارای هاله عدم رشدی معادل ۲۶، ۲۳ و ۱۹ میلی‌متر است. در حالی که نالیدیکسیک‌اسید دارای هاله عدم رشدی برابر ۱۱، ۲۹ و ۲۶ بود. بنابراین، عصاره‌های اتیل‌استاتی و کلروفرمی نسبت به نالیدیکسیک‌اسید بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تقریباً به میزان دو برابر یا بیشتر مؤثرتر بودند. همچنین نتایج نشان دادند که عصاره کلروفرمی و اتیل‌استاتی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با داشتن هاله عدم رشدی بر باسیلوس به میزان تقریباً ۱۵ و ۱۹/۵ میلی‌متر دارای اثر مشابهی با آمپی‌سیلین (هاله عدم رشد ۱۵ و ۱۹ میلی‌متر) هستند. Sparg و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش نمودند که عصاره هگزان نرمال گیاه Scilla natalensis قدرت مهارکنندگی باکتری‌ها را ندارد (۱۲/۵mg/ml <)؛ در حالی که عصاره‌های دی‌کلرومتانی و آبی دارای قدرت مهارکنندگی ضعیف (۶/۳ mg/ml≈) و عصاره اتانولی این گیاه دارای قدرت مهارکنندگی بالا (۱/۶mg/ml) است (۳۰).

همچنین در مطالعه حاضر، نتایج مطالعات فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی این گیاه، وجود مقادیر قابل ملاحظه‌ای از فلاونوئید، گلیکوزید، تانن و ساپونین را نشان داد که احتمالاً فلاونوئیدها مسؤول اثر ضدباکتریایی در این گیاه هستند. اثبات اثر ضدمیکروبی فلاونوئیدها نتیجه تحقیقاتی است که Harsh و Nag بر روی این گروه از ترکیبات طبیعی انجام داده‌اند (۳۱). باتوجه به این که در این مطالعه، عمل عصاره‌گیری به صورت پی‌درپی و به روش خیساندن انجام شد؛ قاعدتاً بایستی کلروفرم ترکیباتی از قبیل ترپنوئیدها، استروئیدها و ایزوفلاون‌ها را استخراج نماید. لذا می‌توان خاصیت ضدباکتریایی این عصاره را تا حدی به وجود ایزوفلاون‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت داد. همان‌طور که از تست‌های فیتوشیمیایی مقدماتی مشخص گردید؛ گیاه فاقد ترپنوئید و استروئید است. همچنین عصاره اتیل‌استاتی به‌دلیل مقادیر بالائی از فلاونوئیدها و ترکیبات نسبتاً قطبی، دارای خاصیت قوی ضدباکتریایی است که در این صورت می‌توان گفت که فلاونوئیدها مسؤول اثر ضدباکتریایی در این گیاه هستند.

خاصیت دارویی گلیکوزیدها، مربوط به قسمت غیرقندی مولکول است و هیدرولیز این ماده (گلیکوزیدها) به وسیله آنزیم‌ها، اسیدهای رقیق، قلیاها (تحت تاثیر حرارت) منجر به آزاد شدن ترکیبات قندی می‌گردد (۳۲). از نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین استنباط کرد که عصاره‌های اتیل‌استاتی و کلروفرمی این گیاه فقط دارای خاصیت ضدمیکروبی هستند و عصاره متانولی به‌دلیل وجود گلیکوزیدها، خاصیت ضدمیکروبی ندارد. به نظر می‌رسد با انجام هیدرولیز بر روی این دسته از ترکیبات، خواص ضدمیکروبی آگلیکون‌ها مشاهده می‌گردد.

با توجه به اثرات قابل ملاحظه عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی سنبل‌کوهی بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و اثرات کمتر بر روی باسیلوس سرئوس به نظر می‌رسد، پس از بررسی‌های گسترده و آزمایشات لازم از نظر بالینی، استفاده از آنها به صورت یک فرآورده دارویی می‌تواند برای درمان عفونت‌ها و زخم‌های چرکی و برخی از بیماری‌های عفونی نظیر اسهال و همچنین جلوگیری از مسمومیت‌های دستگاه گوارشی حائز اهمیت و قابل توجه باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اثر ضدمیکروبی عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی پیاز گیاه سنبل کوهی بر روی اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس و باسیلوس بیشتر از نالیدیکسیک‌اسید و مشابه آمپی‌سیلین بود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از گروه زیست‌شناسی دانشگاه گلستان، خانم منیژه میان‌آبادی و گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر همکاری در انجام مطالعه قدردانی و سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Amin Gh. [Traditional pharmaceutical plants of Iran]. 1st. Tehran: Farhang Edition. 1991; pp:1-3, 105-20. [Persian]

2. Volak J, Stodola J. [Pharmaceutical Plants. Culturing and taking methods and explanation of 256 plant color slides]. Translated by: Saed Z. 2nd. Tehran: Ghoghnus Publication. 1995; pp: 4-10. [Persian]

3. Crouch NR, Bangani V, Mulholland DA. Homoisoflavanones from three South African: Scilla species. Phytochemistry. 1999 Aug; 51(7): 943-6.

4. Bangani V, Crouch NR, Mulholland DA. Homoisoflavanones and stilbenoids from Scilla nervosa. Phytochemistry. 1999 Aug; 51(7): 947-51.

5. Kato A, Kato N, Adachi I, Hollinshead J, Fleet GW, Kuriyama C,et al. Isolation of glycosidase-inhibiting hyacinthacines and related alkaloids from Scilla socialis. J Nat Prod. 2007 Jun;70(6):993-7.

6. Nishida Y, Eto M, Miyashita H, Ikeda T, Yamaguchi K, Yoshimitsu H, et al. A new homostilbene and two new homoisoflavones from the bulbs of Scilla scilloides. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2008 Jul;56(7):1022-5.

7. Silayo A, Ngadjui BT, Abegaz BM. Homoisoflavonoids and stilbenes from the bulbs of Scilla nervosa subsp. Rigidifolia. Phytochemistry. 1999; 52(5): 947-55.

8. Dias C, Borralho Graça JA, Lurdes Gonçalves M. Scilla maderensis, TLC screening and positive inotropic effect of bulb extracts. J Ethnopharmacol. 2000 Aug;71(3):487-92.

9. Tripathi YB, Singh AV, Dubey GP. Antioxidant property of the bulb of Scilla indica. Current Ccience. 2001 May; 80(10): 1267-9.

10. Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. Acta Pol Pharm. 2006 Mar-Apr;63(2):109-15.

11. Koorbanally C, Sewjee S, Mulholland DA, Crouch NR, Dold A. Homoisoflavanones from Pseudoprospero firmifolium of the monotypic tribe Pseudoprospereae (Hyacinthaceae: Hyacinthoideae). Phytochemistry. 2007 Nov-Dec;68(22-24):2753-6.

12. Davies J, Webb V. Antibiotic resistance in bacteria. In: Krause RM, ed. Emerging Infections. Chap 8. San Diego: Academic Press. 1998; pp:229-72.

13. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5614-9.

14. Monniri R, Mosayebi Z, Movahedian AH, Mossavi GhA, Increasing Trend of Antimicrobial Drug Resistance in Pseudomonas aeruginosa Causing Septicemina. Iran J Public Health. 2006; 35(1): 58-62.

15. Pollack M. Pseudomonas aerogina. In: Mandell CL, Bennett JE, Dolin R. Principal and practice of infectious Diseases. 5th. New York: Churchill livingstone. 2000; pp: 231-70.

16. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th. St. Louis: Mosby. 2002; p: 351.

17. Murray PR, Rosental KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4th. St. Louis: Mosby. 2002; pp: 202-16.

18. Feyzi MT. [Introduction of the Stureja bakhtiarica and its ecological characteristic in Esfahan provice]. Proceeding of National Iranian Congress of Medical Plants, Tehran, Iran. 2002; p:179.

19. Orrett FA, Land M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. BMC Infect Dis. 2006 May 5;6:83.

20. Kotze M, Eloff JN. Extraction of antibacterial compounds from Combretum microphyllum (Combretaceae). S Afr J Bot. 2002; 68(1): 62-7.

21. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural Products Isolation. 2nd.

www.SID.ir

Archive of SID

New Jersey: Humana Press Inc. 2006; pp: 7,32,328.

22. Baron EJ, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 8th. St Louis: Mosby. 1990; pp: 508-28.

23. Block JH, Beale JM. Wilson and Gisvold's Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 11st. Baltimor: Lippincott Williams & Wilkins. 2004; pp: 663-57.

24. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul; 48 (Suppl 1): 5-16.

25. Rahman M, Kühn I, Rahman M, Olsson-Liljequist B, Möllby R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. Appl Environ Microbiol. 2004 Apr;70(4):2398-403.

26. Harborne JB. Phytochemical Methods. 3rd. London: Chapman and Hall Ltd. 1973; pp:135-203.

27. Iyengar MA. Study of Crude Drugs. 8th. Manipal, India: Power Press. 1995; p:2.

28. Siddiqui AA, Ali M. Practical Pharmaceutical Chemistry. 1st. New Delhi: CBS Publisher and Distributors. 1997; pp: 126-131.

29. Maxwell EA. Introduction to statistical thinking. New Jersey: Prentice-Hall. 1993; pp: 397.

30. Sparg SG, van Staden J, Jäger AK. Pharmacological and phytochemical screening of two Hyacinthaceae species: Scilla natalensis and Ledebouria ovatifolia. J Ethnopharmacol. 2002 Apr;80(1):95-101.

31. Harsh ML, Nag TN. Antimicrobial principles from in vitro tissue culture of Peganum harmala. J Nat Prod. 1984 Mar-Apr;47(2):365-7.

32. Martin AR. Antibiotics. In: Doerge RF. Wilson and Gisvold's text book of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 8th. Toronto: JB Lippincott Co. 1982; p: 225.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Paper

In-Vitro anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of *Scilla persica* Hausskn.

Hafez Ghoran S (M.Sc)[1], Mighani H (Ph.D)[2], Ebrahimi P (Ph.D)*[2]

[1]MSc in Phytochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Golestan Univertisy, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: The generated genetic diversity in the microbial pathogens and drug resistant led to a growing interest to use herbal medicine. This study was carried out to determine the in vitro anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of *Scilla persica* Hausskn.

Methods: In this laboratory study, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts were obtained from bulb of *Scilla persica*. The anti-microbial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts were evaluated on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus and Escherichia coli using the disk diffusion (growth inhibition zone) and macro-dilution methods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a negative control while nalidixic acid and ampicillin were used as positive control.

Results: The maximum inhibition zone for ethyl acetate extract was 26.3±0.1 milimetre, 23.7±0.3 milimetre and 19.5±0.4 milimetre for Staphylococcus, Escherichia coli and Bacillus, respectively. The maximum inhibition zone of chloroform extract was found to be 16.4±0.2 milimetre and 14.9±0.3 milimetre for Staphylococcus and Bacillus, respectively.

Conclusion: Antimicrobial activity of the chloroform and ethyl acetate extracts of bulb of *Scilla persica* on Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus are more effective compared to nalidixic acid and it is similar to ampicillin in in-vitro condition.

Keywords: *Scilla persica* Hausskn, MIC, Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus

*** Corresponding Author: Ebrahimi P (Ph.D), E-mail: epouneh@yahoo.com , p.ebrahimi@gu.ac.ir**

Received 12 June 2012 **Revised** 7 May 2013 **Accepted** 7 August 2013

This paper should be cited as: Hafez Ghoran S, Mighani H, Ebrahimi P. [In-Vitro anti-bacterial activity of chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts of *Scilla persica* Hausskn.]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 16(1): 106-113. [Article in Persian]
www.SID.ir