

مقاله پژوهشی

بررسی خواص ضد اکسیدانی و ضد میکروبی و انجام مطالعات فیتوشیمیایی اولیه بر روی یک گونه نادر گیاهی از خانواده آنوناسه

بهرام بیباک^۱، علی خاکشور^۲، حسین کمالی^۳، ریحانه احمد زاده قویدل^۴، نوشین امینی مقدم فاروج^{۵*}

^۱استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات ایمنی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۲استادیار، متخصص اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۳کارشناس ارشد مهندسی شیمی، مرکز تحقیقات ایمنی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
^۴دکتری تخصص علوم غذایی و تغذیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، ایران
^۵دکتری 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: ۱۳۹۱/۴/۲۶ اصلاح: ۱۳۹۱/۵/۵ پذیرش: ۱۳۹۱/۵/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی در یافتن ترکیبات نوین با خواص ضد میکروبی و ضد اکسیدانی مورد توجه می باشد. با نظر به این موضوع در این مطالعه اثرات ضد میکروبی و ضد اکسیدانی گیاه دارویی اواریا گراندی فلورا مورد بررسی قرار گرفته اند.

مواد و روش کار: اثر ضد میکروبی فراکسیون های هگزانی، کلروفرمی و اتانولی گیاه اواریا گراندی فلورا با به کارگیری روش *Disc Diffusion* مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین در این مطالعه از روش *DPPH assay* جهت سنجش ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد فراکسیون های مختلف بهره گرفته شد و جهت کنترل و مقایسه و تکمیل مطالعات آزمون فیتوشیمیایی مقدماتی انجام پذیرفت. **یافته ها:** نتایج این بررسی نشان داد که جزء های اتانولی پوست ساقه و برگ گیاه اواریا گراندی فلورا دارای بیشترین درصد پلی فنول و فلاوونوئید می باشند. همچنین این دو جزء در غلظت 2 mg/disc دارای بالاترین خلصت مهارتی علیه باسیلوس سرئوس و استاف ائروس می باشند. این فراکسیون ها در میان تمامی نمونه های تست شده در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ بالاترین درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد به ترتیب با مقادیر $95/32\%$ و $86/38\%$ از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی در گیاه اواریا گراندی فلورا نقش عمده ای را بر عهده دارند که این امر مطالعات بیشتری جهت جداسازی و خالص سازی ترکیبات موثره این گیاه را می طلبد.

واژه های کلیدی: ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، اواریا گراندی فلورا، آزمون فیتوشیمیایی، *DPPH assay*

باشد. استفاده درمانی از گیاهان از نظر تاریخی به دوره

سومریان باز می گردد و همچنین در منابع تاریخی ثبت

مقدمه

گردیده است که بقراط حکیم حدود ۴۰۰ گونه گیاهی را برای اهداف درمانی و پزشکی را به کار برده است. می توان ادعا کرد که فرآورده های طبیعی در سیستم درمانی سنتی کهن نقش مهمی را برعهده دارد، همانند طب

مطالعه گیاهان دارویی به عنوان منبعی برای تأمین ترکیبات فعال بیولوژیکی در دهه های اخیر رو به افزایش بوده است. استفاده از منابع طبیعی به طور ویژه گیاهان برای درمان، از نظر قدمت هم عصر خود علم پزشکی می

های عصاره ی حاصله از گیاه اواریاگرانندی فلورا، یک گیاه نایاب از خانواده آنوناسه می باشد.

روش کار

موادشیمیایی مورد استفاده: اسکوربیک اسید و ماده ۲ و ۲ دی فنیل یک پیکریل هیدرازیل (DPPH) از کارخانه مواد شیمیایی سیگما خریداری شدند. تمام حلال مورد مصرف در این مطالعه از کارخانه Essex انگلستان تهیه گشت. محیط کشت مولر هینتون و برات تریپتکاز سئی از مدیا لایبراتورری، خریداری شدند. سایر مواد استفاده شده در این تست از گرید بالای مواد شیمیایی بودند.

مواد گیاهی: اواریاگرانندی فلورا از منطقه ایپوه در پراک (مالزی) در سپتامبر ۲۰۱۰ جمع آوری شد و در موسسه (FRIM) تحقیقات جنگلی مالزی شناسایی گردید و با نمونه هرباریومی مقایسه و ثبت شد.

تهیه عصاره ها: از گیاه اواریاگرانندی فلورا، بخش برگ ها و پوسته های ساقه جمع آوری و در سایه خشک شد و سپس خرد گردید. این دو نمونه پودر پوسته ساقه (۲/۱ کیلوگرم) و پودر برگ (۰/۹ کیلوگرم) بطور جداگانه و پیوسته با حلال هایی با قطبیت در حال افزایش (هگزان، کلرفرم و اتانول) در طی دو هفته با روش خیساندن عصاره گیری شدند. حلال ها تحت دستگاه خلاء چرخان خارج شدند و نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان تست نگهداری شدند. راندمان عصاره گیری در جدول ۱ نشان داده شده است.

آزمون های فیتوشیمیایی: تمام ۶ نمونه عصاره (هگزان، کلرفرم و اتانول) حاصله از پوسته ساقه و برگ های گیاه برای تعیین خصلت فیتوشیمیایی مختلف پیرو پروتکل دکتر مجاب و همکاران (۲۰۰۳) بررسی شدند که نتایج در جدول شماره ۱ آورده شده است.

تهیه ارگانسیم های مورد آزمایش: در این تحقیق ۴ گونه باسیلوس سرئوس (ATCC 10876)، استافیلوکوکوس /رئوس (ATCC 11632) سودموناس /ثروژنیوز/ (ATCC 10145) و /شرشیاکلی (ATCC 10536) استفاده گردیدند، بطوریکه در طول ۱۸-۲۴ ساعت قبل تست بطور تازه در محیط TSA تهیه و کشت داده شدند.

سنتی چینی و یا مصری که امروزه نیز محبوب می باشند. بر اساس آمار منتشر شده از سوی سازمان بهداشت جهانی، ۷۵ درصد مردم هنوز جهت مداوای اولیه بر روی درمان گیاهی - سنتی تکیه دارند. بسیاری از گیاهان و ترکیباتشان در بخش های مختلف جهان برای درمان بیماری های مختلف مورد مصرف قرار گرفته اند [۱-۳]. گیاهان از گذشته های دور منبعی برای یافتن دارو و درمان بیماری ها بوده که با تولید داروهای صناعی برای مدت ها به ورطه فراموشی سپرده شده و امروزه به دلیل عوارض جانبی زیاد داروهای صناعی مجدداً نظر جستجوگران پژوهشگران متوجه این منبع سرشار و با ارزش شده است. یکی از بیماری های مهم که همواره انسان با آن دست به گریبان بوده بیماری های باکتریایی است و مقاومت باکتریایی در برابر عوامل ضد باکتریایی از موضوعات مهمی است در امر درمان بیماری های عفونی، که رو به افزایش است. علاوه بر مقاومت میکروبی، عوارض جانبی عوامل ضد باکتریایی را نیز می توان به آنها اضافه کرد که عبارتند از: سمیت و عوارض جانبی مثل: بثورات جلدی، کهیر، درد مفاصل، ضعف و بی حالی، شوک آنافیلاکسی شدید، آمی همولیتیک. وجود این مشکلات باعث تداوم تحقیقات در جهت یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید موثر علیه عفونت های بالینی ناشی از باکتری ها گردیده است. علاوه بر این که برای تهیه آنتی بیوتیک ها از قارچ ها، باکتری ها، اکتینومیسیت ها و گل سنگ ها استفاده می شود، گیاهان در حدود ۱۰٪ آنتی بیوتیک های شناخته شده را می سازند [۴، ۵]. با توجه به مطالب پیش گفته لزوم جستجو برای یافتن داروهای ضد میکروبی جدید احساس می شود. علاوه بر مطالب پیش گفته، آنتی اکسیدانها از یک طرف باعث کاهش خطر ابتدا به بیماریهای قلبی عروقی و سکت می شوند و از طرف دیگر از پیشرفت سرطانها که موجب آسیب به DNA میشوند جلوگیری می کنند. نظر به این که فرآورده های طبیعی یکی از منابع مهم آنتی اکسیدانها می باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می باشد. متابولیت های ثانویه مشتق مانند فنول و فلاونوئید تام مشتق از گیاهان دارای پتانسیل قوی برای پاکسازی رادیکالهای آزاد میباشند [۶-۱۰]. لذا هدف مطالعه حاضر اندازه گیری خصلت ضدباکتریایی و ضد اکسیدانی نمونه

آزمون ضدباکتریایی: روش تست اثر ضدباکتریایی براساس روش کمیته (NCCLS ۲۰۰۲) روش دیسک دیفوزن انتخاب شد. از محیط TSB برای تهیه سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده گشت. سپس نمونه باکتری روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و بعد دیسک های کاغذی استریل (که هر یک با محلول ۱۰ µl از هر نمونه عصاره‌ی حل شده در حلال DMSO تلقیح شده بودند) به پلیت‌های حاوی باکتری اضافه گشتند. به این ترتیب غلظت ۲ mg/disc برای هر دیسک در نظر گرفته شده بود و به آن ها زمان کافی داده شد تا قبل از جاگذاری عاری از حلال و کاملاً خشک باشند. دیسک حاوی حلال DMSO به عنوان شاهد منفی و دیسک حاوی ۱۰ µg آنتی بیوتیک استرپتومایسین بعنوان شاهد مثبت مصرف شد. پلیت ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباتور قرار داده شدند. هاله های شفاف عدم رشد در اطراف دیسک ها نشان گر فعالیت ضدباکتریایی می باشد. بعد از گذشت زمان انکوباسیون این هاله های عدم رشد دقیقاً اندازه گیری شدند. آزمون به صورت سه تایی و تکرارپذیر انجام شد و هاله های عدم رشد به دقت ثبت گشت. قدرت فعالیت به صورت زیر تفسیر شده است: (+++) برای قطر هاله عدم رشد بیشتر از ۱۲ mm، (++) متوسط برای قطرهای ۱۰-۱۲ mm و (+) برای قطر های ۸-۹/۵ mm (جدول ۲).

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی: روش DPPH assay که براساس مصرف پلیت های ۹۶ چاهکی می باشد، طبق پروتکل Habtemariam و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد. نمونه های رقتی آزمایش توسط متانول و DMSO بعنوان حلال ضروری تهیه گشت. بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون مواد در تاریکی و دمای اتاق جذب نمونه ها در ۵۵۰ nm خوانده و درصد فعالیت آنتی اکسیدانی ثبت و محاسبه شد [۱۱].

نهایتاً تمام آزمایشات حداقل سه مرتبه تکرار شدند و برای محاسبه از برنامه Excel software استفاده گردید.

یافته ها

آزمون های فیتوشیمیایی اولیه انجام گرفته روی عصاره ی پوسته ساقه و برگ های گیاه اوریا گراندی فلورا حضور آلکالوئید ها، فلاونوئیدها و استروئید ها را در نمونه های عصاره تایید کردند. اطلاعات حاصل از مطالعات فیتوشیمیایی در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج آزمون آنتی باکتریال نیز نشان داد که نمونه عصاره اتانولی پوسته ساقه در غلظت ۲ mg/disc دارای خصلت مهارکنندگی بالایی علیه باسیلوس سرئوس و/استاف/رئوس می باشد (جدول ۲).

نتایج نشان داد که عصاره اتانولی پوسته ساقه گیاه حاوی ترکیب های بسیار فعال بر علیه باسیلوس سرئوس و/استافیلوکوکوس/رئوس می باشد. بعلت فعالیت قوی عصاره اتانولی پوسته ساقه و اطلاعات حاصله از تست های فیتوشیمیایی اولیه، این مطلب قابل استنتاج است که

جدول ۱: محتویات فیتوشیمیایی گیاه اواریاگراندی فلورا و بازده عصاره گیری.

مواد مورد تست	آلکالوئید	فلاونوئید	تانن	استروئید	ساپونین	گلیکوزید قلبی	راندمن عصاره گیری
عصاره هگزان برگ	-	-	-	+++	-	-	۴/۱٪
عصاره کلرفرم برگ	-	-	-	+++	-	-	۷/۸٪
عصاره اتانول برگ	+	+	-	+	-	-	۴/۲٪
عصاره هگزان پوسته ساقه	+	-	-	+++	-	-	۲/۵٪
عصاره کلرفرم پوسته ساقه	-	-	-	+++	-	-	۵/۸٪
عصاره اتانول پوسته ساقه	++++	+++	-	+	-	-	۳/۷٪

احتمالاً فلاونوئید ها نقش کلیدی را در این بین دارا هستند. از تست DPPH برای اندازه گیری خصلت آنتی اکسیدانی عصاره های پلی فنلی استفاده شد [۱۳، ۱۲]. در این تحقیق با قیاس نمونه های مختلف، نمونه عصاره اتانولی

ویتامین C بیشتر بوده است. در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد پوسته ساقه به $95/32\%$ رسید بطوریکه در همان غلظت نمونه حاصله از برگ تنها $86/38\%$ فعالیت از خود بروز داد.

جدول ۲: مهارکنندگی رشد نمونه های مختلف تهیه شده از گیاه اواریاگرانندی فلورا.

فرکشن (نمونه)	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس ارئوس	سودمناس اثرورینوزا	اشرشیاکلی
فرکشن هگزان برگ	+	+	+	-
فرکشن کلرفرم برگ	-	-	-	-
فرکشن اتانولی برگ	+	+	-	-
فرکشن هگزان پوسته ساقه	++	+	+	-
فرکشن کلرفرم پوسته ساقه	-	-	-	-
فرکشن اتانول پوسته ساقه	+++	+++	-	-
استرپتومایسین ($10 \mu\text{g/disc}$)	+++	+++	++	+++
DMSO شاهد منفی	رشد کامل	رشد کامل	رشد کامل	رشد کامل

جدول ۳: درصد فعالیت آنتی اکسیدانی روی DPPH برای عصاره های اواریاگرانندی فلورا.

فرکشن (نمونه) غلظت $\mu\text{g/ml}$	عصاره اتانولی برگ	عصاره اتانولی پوسته ساقه	اکسوربیک اسید (استاندارد +)
۱۰۰	$86/38 \pm 2/57$	$95/32 \pm 3/07$	$94/09 \pm 3/17$
۵۰	$65/41 \pm 3/07$	$90/30 \pm 2/25$	$86/93 \pm 2/96$
۲۵	$48/43 \pm 1/88$	$79/40 \pm 1/96$	$78/92 \pm 3/55$
۱۲/۵	$33/27 \pm 1/99$	$59/65 \pm 2/19$	$37/92 \pm 4/23$
۶/۲۵	$17/76 \pm 2/18$	$54/01 \pm 1/97$	$12/77 \pm 2/58$
۳/۱۲۵	$6/59 \pm 1/90$	$22/90 \pm 1/85$	$7/59 \pm 3/02$

بحث

این مطالعه جهت اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی ۶ نمونه تهیه شده از گیاه *Uvaria grandiflora* Roxb. انجام گشت. در گیاهان ترکیبات پلی فنلی نقش زیادی در فعالیت آنتی اکسیدانی

پوست ساقه حاصل از گیاه اواریاگرانندی فلورا، حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی را در بین نمونه های مورد آزمایش به خود اختصاص داد. (جدول ۳)

طبق اعداد بدست آمده فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد در نمونه عصاره اتانولی پوست ساقه گیاه از فعالیت

دارند. که این فعالیت به نظر مربوط به خاصیت اکسایش و کاهش آنها می باشد [۱۴]. طبق مطالعات مقدماتی فیتوشیمیایی، سطح این ترکیبات پلی فنلی در عصاره های اتانولی برگ و پوسته ساقه گیاه اواریاگراندی فلورا قابل توجه بوده است. بنابراین این نتایج ارزشمند می تواند حاکی از نقش بیولوژیکی (زیستی) پراهمیت مواد پلی فنلی موجود در نمونه های این گیاه باشد. دانشمندان بر این باورند که فعالیت آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها به علت قابلیت در اختیار گذاشتن هیدروژن آنها می باشد. (Hydrogen donation) [۱۵].

علاوه بر این ها با مدنظر گرفتن فعالیت ضدباکتریایی نمونه عصاره اتانولی پوسته ساقه گیاه که بیشتر از فعالیت نمونه های حاصله از برگ آن می باشد، می توان این

احتمال را تقویت کرد که همچنان فلاونوئیدها مسئول این اثرات می باشند. علاوه بر این دیده شد که اواریاگراندی فلورا فعالیت آنتی باکتریایی قوی که قابل مقایسه با استاندارد (+) آزمایش یعنی استرپتومایسین است، از خود بروز می دهد. اگرچه برخی ممکن است ادعا کنند که غلظت ۲ mg/disc غلظت انبوهی است اما این آزمایش توانست گیاه اواریاگراندی فلورا را بعنوان منبعی برای فعالیت *In vitro* ضدباکتریایی معرفی کند.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده نشان داد که ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی در گیاه اواریا گراندی فلورا نقش عمده ای را بر عهده دارند که این امر مطالعات بیشتری جهت جداسازی و خالص سازی ترکیبات موثره این گیاه را می طلبد.

References

1. M.G.L, Hertog D, Kromhout and D, Aravanis (1995), Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in seven countries study, *Archives of Internal Medicine*, 155, 381–386.
2. S.C, Langley-Evans (2000), Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 51, 181–188.
3. C. Lie and B, Xie (2000), Evaluation of the antioxidant pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6362–6366.
4. H.J.D, Dorman and S.G, Deans (2000), Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
5. O. Sagdic (2003), Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols, *Lebensm, Wissu Technol*, 36, 467–473.
6. Y.H, Cao and R.H, Cao (1999), Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature*, 6726, 381–398.
7. J.M. Geleijnse, L.J. Launer, A, Hofman, H.A.P. Pols and J.C.M. Witteman (1999), Tea Flavonoids may protect against atherosclerosis – The Rotterdam study, *Archives of Internal Medicine*, 159, 2170–2174.
8. M.P. Kahkonen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja and T.S. Kujala “et al”, (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962.
9. G.C, Yen and P.D. Duh (1994), Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active-oxygen species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629–632.
10. Madsen, H.L. and Bertelsen, G. (1995), Spices as antioxidants, *Trends in Food Science and Technology*, 6, 271–277.
11. S. Habtemariam (2007), *Food Chem*, 102, 1042–1047.
12. Miliaskas, G, Venskutonis, P.R, and Beek, T. A.V. (2004), Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, 85, 231–237.
13. Hanmugam Puvanendran “et al” (2008), Antioxidant constituents from *Xylopia championii*, *Pharmaceutical Biology*, 46, 352–355.
14. Zheng W, Wang SY (2001), Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J Agr Food Chem*, 49, 5165–5170.
15. Baumann J, Wurn G, Bruchlausen FV (1979), Prostaglandin synthetase inhibiting O-2 radical scavenging properties of some flavonoids and related phenolic compounds, *Arch Pharmacol*, 307, R1–R77.

Original Article

Evaluation of Antibacterial Properties, Phytochemical Contents and Antioxidant Capacities of leaf and stem barks of *Uvaria grandiflora* Roxb

Bibak B¹, Khakshor A², Kamali H³, Ahmadzadeh Ghavidel R⁴, Aminimoghadamfarouj N^{5*}

¹Assistant professor of Physiology, Natural Products Safety and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences

²Assistant professor of Pediatrics, School of medicine, North Khorasan University of Medical Sciences

³M.Sc of Chemical Engineering, Natural Products Safety and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences

⁴Assistant professor of Nutrition and Food Science, Islamic Azad University, Ghuchan Branch

⁵Pharm.D, Natural Products Safety and Medicinal Plants Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences

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

Abstract

Background & Objectives: Nowadays it is very desirable to investigate and discover new antibacterial and anticancer agents from natural products and medicinal plants. In this regard, the current study is conducted in order to explore the antibacterial and antioxidant properties of a rare plant named *Uvaria grandiflora* Roxb.

Material & Methods: The antibacterial disc diffusion method, the DPPH radical scavenging test and the preliminary phytochemical screening were performed for six different extracts obtained by hexane, chloroform and ethanol.

Results: Data exhibited the stem bark and leaves ethanolic extract of the plant, have high amounts of flavonoids and poly-phenols and therefore they have strongly inhibited *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* growth at the concentration of 2mg/disc. These samples illustrated the highest radical scavenging activity with the percentages of 95.32% and 86.38% at the concentration of 100µg/ml, respectively.

Conclusion: Following the results, it was concluded that the flavonoids and poly-phenols play crucial roles in the properties of *Uvaria grandiflora* Roxb., thus more investigations and isolations are recommended.

Keywords: antibacterial, antioxidant, *Uvaria grandiflora* Roxb phytochemical test, DPPH assay

Submitted: 2012 Jul 16

Revised: 2012 Jul 28

Accepted: 2012 Jul 31