View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Simorgh Research Repository

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ‌سیزدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۱۰-۱۰۳، ۱۳۸۵

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثرات ضد باکتریایی چای مکّی (*Hibiscus sabdariffa* L.) به دو روش نفوذی و بیواتوگرافی تعلیقی

دکتر محمد حسن مصحفی[۱]، دکتر حمید فروتن[۲] و دکتر میترا مهربانی[۳*]

خلاصه

مقدمه: در این تحقیق اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی و اتیل‌استاتی کاسبرگ‌های گیاه *Hibiscus sabdariffa* L. از خانواده ختمی (Malvaceae) که به نام چای مکّی در طب سنتی مصرف می‌شود روی شش سوش استاندارد میکروبی شامل: استافیلوکوک اپیدرمیدیس، باسیلوس سابتیلیس، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کولی و استافیلوکوک طلایی به دو روش سیلندر پلیت و بیواتوگرافی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش: در روش سیلندر پلیت، ابتدا عصاره متانولی و اتیل‌استاتی کاسبرگ‌های خشک شده گیاه با روش خیساندن تهیه شد. بعد از خشک کردن عصاره، غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲ و ۳/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره با حل کردن آن در متانول تهیه شد. میکروب‌های استاندارد با غلظت معین مشابه استاندارد ۰/۵ مک فارلند به محیط کشت مولر - هینتون آگار تلقیح شدند. غلظت‌های آماده شده از عصاره داخل سیلندرهای کار گذاشته در محیط کشت وارد شد و ۲۴-۱۸ ساعت بعد از انکوباسیون و نفوذ عصاره به داخل محیط کشت، اثرات ضدباکتریایی به صورت قطر هاله عدم رشد بیان شد. در روش بیواتوگرافی، ابتدا عصاره اتیل‌استاتی که حاصل از دکانتاسیون عصاره متانولی با اتیل استات و تبخیر آن بود تهیه شد. سپس فراکسیون‌های این عصاره به کمک سیستم حلال اتیل استات - کلروفرم - متانول (۳۲:۵۳:۱۵) و با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) جداسازی شد. بعد از قراردادن صفحات TLC در محیط کشت میکروبی و طی زمان انکوباسیون، لکه عدم رشد میکروبی به کمک معرف تترازولیوم نمایان شد و به صورت R_f بیان گردید.

یافته‌ها: عصاره متانولی و اتیل‌استاتی گیاه در روش سیلندر پلیت روی هر ۶ سوش میکروبی در غلظت ۲۵ mg/ml با حداقل هاله عدم رشد ۱۲±۰/۳mm اثر ضد باکتری از خود نشان دادند. هم‌چنین در روش بیواتوگرافی عصاره فلاونوئیدی در دو R_f به ترتیب R_f=۰/۷۵ و R_f=۰/۱۵ روی چهار میکروب استافیلوکوک اپیدرمیدیس، باسیلوس سابتیلیس، اشرشیا کولی و کلبسیلا پنومونیه لکه عدم رشد از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: طیف سنجی ماوراء بنفش/مرئی در حضور معرف‌های معمول حاصل از این دو ماده پس از خالص‌سازی نشان داد دو ترکیب دارای فلاونوئیدهائی از دسته فلاون می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: بیواتوگرافی، سیلندر پلیت، اثرات ضد میکروبی، چای مکّی

۱- دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی –درمانی کرمان ۲- دکتر داروساز ۳- استادیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

* **نویسنده مسؤول:** گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک:** mmehrabani@hotmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۲/۱۹ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۵/۶/۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۵/۶/۱۱

مقدمه

امروزه بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان به خصوص گیاهانی که به صورت سنتی مصرف طبی دارند یکی از مباحث مورد علاقه محققین به شمار می‌رود. دو دلیل اصلی برای این علاقه‌مندی ذکر شده است. نخست این که ترکیبات موجود در گیاهان با توجه به سهولت دست‌یابی نسبت به سایر منابع، ذخیره های عظیم بالقوه‌ای از داروهای ضد میکروبی هستند که کم و بیش طی سال‌ها تجویز مکرر روی انسان آزمایش شده‌اند و اکنون از آن‌ها می‌توان به عنوان منابع کشف داروهای جدید استفاده کرد. دلیل دوّم بروز مقاومت میکروبی در اثر مصرف غیر اصولی داروهای ضد میکروبی فعلی توسط عامه مردم است که نیاز شدید دستیابی به داروهای جدید را خاطر نشان می‌سازد (۱۱).

از کاسبرگ‌های قرمز رنگ گیاه *Hibiscus sabdariffa* L. از خانواده ختمی (Malvaceae) با نام فارسی چای مکّی که گیاهی بومی مناطق گرم است و در بلوچستان و جیرفت نیز کشت می‌شود، در طب سنتی ایران و سایر نقاط جهان استفاده‌های گوناگونی می‌شود (۱،۳). از دم کردهٔ این داروی گیاهی به عنوان پایین‌آورنده فشارخون ضد اسپاسم، مدر، ضد سرطان و ضد باکتری در طب سنتی مناطق مختلف جهان استفاده می‌شود (۸). اثرات پایین‌آورندگی فشار خون (۱۳)، ضد اسپاسم و شل‌کنندگی عضلات صاف (۶)، کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید (۱۰،۱۵)، ضد رادیکال آزاد (۱۲)، خاصیت آنتی اکسیدانی و محافظت‌کنندگی ازسلول‌های کبدی (۵،۱۴،۱۶) و ضد میکروبی عصاره آبی این کاسبرگ‌ها (۷) تاکنون اثبات شده است. ترکیباتی که تاکنون در این کاسبرگ‌ها گزارش شده عبارتند از: موسیلاژ، آنتوسیانین به عنوان رنگدانه قرمز کاسبرگ‌ها، فلاونوئیدهایی مانند گوسیپیتین ۳- گلوکوزید و مقادیر قابل توجهی از اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، هیبیسکیک، مالیک و تارتاریک که اثرات ضد میکروبی عصاره آبی آن نیز به سبب همین مواد است (۴،۱۹).

بر اساس بررسی‌های انجام شده تاکنون اثرات ضد میکروبی برای عصاره حاوی فلاونوئیدهای این گیاه گزارش نشده است. فراکسیون اتیل‌استاتی عصاره متانولی، توانایی استخراج ترکیبات فنلی به خصوص فلاونوئیدهای کم محلول در آب گیاهی را که اثرات ضد میکروبی مناسبی از آنها گزارش شده است (۱۱)، دارد. فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنلی با خواص متعدد درمانی از جمله اثرات ضد میکروبی می‌باشند. پایه اصلی ساختمان این ترکیبات نسبتاً ثابت است(شکل ۱) و تغییرات گروه‌های روی حلقه‌ها گاه باعث تغییرات قابل توجهی در اثرات درمانی‌شان می‌گردد (۱۱).

در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی چای مکّی و فراکسیون اتیل‌استاتی این عصاره، با استفاده از دو روش سیلندر پلیت و بیواتوگرافی تعلیقی جهت شناسایی مقدماتی ساختمان ترکیبات مؤثر، مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

۱-گیاه مورد استفاده:

کاسبرگ‌های گیاه *Hibiscus sabdariffa* از منطقه کاشت آن در استان سیستان و بلوچستان در خرداد ماه ۱۳۸۳ جمع آوری گردید و نمونه هرباریومی آن به شماره ۱۰۱۲ پس از تایید نام علمی توسط گیاه‌شناس در هرباریوم دانشکده داروسازی کرمان ثبت شد. کاسبرگ‌های قرمز رنگ بعد از جمع‌آوری به منظور جلوگیری از فساد، خشک شدند. کاسبرگ‌های خشک شده آسیاب شدند و حاصل آسیاب برای عصاره‌گیری از گیاه استفاده شد.

۲-عصاره‌گیری:

- عصاره متانولی

پودر گیاهی با متانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت برای دو بار خیسانده شد. عصاره صاف شده به کمک دستگاه تقطیر در خلأ چرخان در حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید. سپس در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شد (۲).

- عصاره اتیل‌استاتی حاوی فلاونوئیدهای کم محلول در آب

به عصاره متانولی خشک شده مرحله قبل متانول ۲۰ درصد اضافه شد و عصاره در آن کاملاً حل گردید. با استفاده از قیف جداکننده با اتیل استات دکانته شد. عصاره به کمک دستگاه تقطیر در خلأ چرخان در حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید و برای خشک شدن کامل در حرارت آون ۴۰ درجه در یک پتری دیش ریخته شد (۱۸،۱۹).

۳-تهیه عصاره با غلظت‌های مختلف جهت آزمایش‌های ضد باکتری:

بعد از تهیه عصاره متانولی و اتیل‌استاتی به صورت خشک شده، به ترتیب غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲ و ۳/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از دو عصاره تهیه گشت. غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌ها بعداً در روش سیلندر پلیت به کار برده شد (۲).

٤-بررسی اثرات ضدباکتریایی

- میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق از مرکز پژوهش‌های علمی - صنعتی ایران خریداری شدند. در جدول ۱ نام علمی و شماره PTCC سوش‌های میکروبی مورد آزمایش آورده شده است. ۳ سوش گرم مثبت و ۳ سوش گرم منفی در این تحقیق استفاده شدند.

- تهیه تلقیح باکتری

از سوسپانسیون کشت تازه میکروب به محیط کشت آبگوشت مغذی اضافه شد تا کدروتی مشابه استاندارد ۰/۵ مک فارلند حاصل شود. این سوسپانسیون حاوی $1/5 \times 10^8$ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر است (۲).

- روش سیلندر پلیت

یک میلی‌لیتر از تلقیح باکتری آماده شده که با ۰/۵ مک فارلند استاندارد شده بود به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر - هینتون آگار که استریل و تا دمای ۴۵°C-۴۲ سرد شده بود اضافه شد تا باکتری به نسبت ۱/۲۰۰ رقیق شود. از این محیط کشت حاوی میکروارگانیسم به پتری دیش‌هایی که از قبل استریل شدند، ۲۰ میلی‌لیتر اضافه گردید. بعد از سرد و جامد شدن محیط کشت، پتری دیش‌ها برای سیلندرگذاری آماده شدند. سیلندرها از جنس استیل زنگ نزن با قطر داخلی ۶ میلی‌متر، قطرخارجی ۸ میلی‌متر و ارتفاع ۱۰ میلی‌متر قبل از استفاده در آون و با حرارت خشک استریل شدند. در اطراف هر پلیت ۵ سیلندر مربوط به غلظت‌های پنج‌گانه عصاره متانولی واتیل‌استاتی و در مرکز پلیت هم یک سیلندر مربوط به حلال نهایی عصاره یعنی متانول، قرار داده شد. جهت اطمینان از صحت کار از غلظت ۱/۲۵µg/ml جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت نیز استفاده گردید. بعد از پر کردن سیلندرها از غلظت‌های مختلف عصاره، پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. نتایج اثرات ضدباکتری به صورت قطر هاله عدم رشد برای هر باکتری به صورت جداگانه بیان شد (۲).

قابل ذکر است که اثر ضدباکتریایی هر عصاره روی هر سوش باکتری به روش فوق ۳ بار تکرار شد.

- بیواتوگرافی تعلیقی

انتخاب سیستم حلال مناسب برای بیواتوگرافی تعلیقی: اولین مرحله بیواتوگرافی تعلیقی پیدا کردن یک سیستم حلال مناسب برای جدا کردن فراکسیون‌های موجود در عصاره اتیل‌استاتی روی ورق‌های آماده سیلیکاژل جهت انجام کروماتوگرافی لایه نارک (TLC) بود. پنج نوع سیستم حلال زیر برای جداسازی فلاونوئیدهای کم محلول در آب عصاره به کار رفت که عبارتند از:

۱) سیستم حلال اتیل استات : اسید فرمیک : اسید استیک گلاسیال : آب (۲۷ : ۱۱: ۱۱: ۱۰۰)

۲) سیستم حلال کلروفرم : متانول : اسید فرمیک (۸/۵ : ۱۶/۵: ۷۵)

۳) سیستم حلال بوتانل: اسید استیک : آب (۵: ۱: ۴) (فاز رویی)

۴) سیستم حلال اتیل استات : کلروفرم (۶۰: ۴۰)

۵) سیستم حلال اتیل استات_ کلروفرم _ متانول (۱۵: ۵۳: ۳۲)، به دلیل تجزای کافی لکه‌های مواد موجود در عصاره، به عنوان سیستم حلال مناسب برای روش بیواتوگرافی تعلیقی انتخاب شد (۱۸).

بررسی اثرات ضدباکتری با استفاده از بیواتوگرافی تعلیقی: بعد از انتخاب سیستم حلال مناسب مرحله بررسی اثرات ضدباکتری مربوط به فراکسیون‌های عصاره اتیل‌استاتی بود. مانند روش سیلندر پلیت، بعد از این که رشد اولیه‌ای از هر کدام ازباکتری‌ها معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید، ۱۰۰ میکرولیتر از این استاندارد باکتری برداشته شد و با ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار مخلوط گشت، دمای محیط کشت حدوداً ۴۵°C-۴۲ بود. مقدار کمی محیط کشت از قبل داخل پتری‌دیش‌های استریل ریخته و جامد شد. هر کدام از صفحات TLC که اجزای عصاره اتیل‌استاتی به کمک سیستم حلال روی آن جداسازی شده بود در تلقیح میکروبی آماده شده غوطه‌ور شده و بعد از خیس شدن، در پلیت حاوی محیط کشت جامد شده گذاشته شد. به این ترتیب یک لایه نازک از محیط کشت تلقیح شده با باکتری روی صفحه TLC قرار گرفته شد که در عین حال به دلیل داشتن محیط کشت بدون باکتری زیر صفحه TLC از خشک شدن آن لایه نازک جلوگیری شد. این پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شد. بعد از این مدت معرف دهیدروژناز (محلول آبی ۲ درصد نمک تترازولیوم با نام INH از کمپانی MERCK) داخل پتری‌دیش‌ها اسپری شد و به مدت ۴-۳ ساعت مجدداً در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شد. در خاتمه، حضور ترکیب با اثر ضد باکتری به صورت لکه‌های بی رنگ در زمینه ارغوانی مشخص شد. R_f) R_f در TLC عبارت است از نسبت فاصله خط مبدأ تا جایی که لکه قرارگرفته به فاصله خط مبدأ تا جایی که سیستم حلال بالا رفته است) مربوط به هر لکه با اثر ضدباکتری اندازه‌گیری شد (۲).

۵- جداسازی لکه‌های واجد اثر ضدباکتری و شناسایی مقدماتی ساختمان آنها به کمک روش طیف سنجی UV/Vis

با استفاده از TLC تهیه‌ای (Preparative Thin Layer Chromatography) از روی سه پلیت تهیه‌ای سیلیکاژل GF_{254} (MERCK)، R_fهای دارای بیشترین اثرات ضد باکتری جدا شده و طیف ماورا بنفش / مرئی آن در حضور معرف‌های شیفت‌دهنده (جهت شناسایی الگوی هیدروکسیلاسیون ساختمان ترکیب) شامل: متوکسید سدیم، استات سدیم، استات سدیم/اسید بوریک،آلومینیم کلراید و آلومینیم کلراید/ HCL، تهیه و مورد تفسیر قرار گرفت (۱۷).

نتایج

۱- بررسی اثرات ضدباکتری عصاره متانولی و اتیل‌استاتی گیاه چای مکّی

با توجه به این که وزن خشک عصاره متانولی ۵٪ w/w و وزن خشک عصاره اتیل‌استاتی ۱٪ w/w تعیین گردید می‌توان وزن کاسبرگ‌های گیاه راکه اثر ضد میکروبی نشان داده است محاسبه نمود.

۱-۱- نتایج روش سیلندر پلیت

۱-۱-۱- نتایج روش سیلندر پلیت عصاره متانولی

بعد از انجام آزمایش‌های مربوطه مشاهده گردید که عصاره متانولی روی تمامی سوش‌های باکتریایی دارای اثر مهار کنندگی می‌باشد. بیشترین غلظت به کار رفته ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کمترین غلظت به کار رفته ۳/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. قطر هاله عدم رشد در مورد هر غلظت از عصاره متانولی اندازه‌گیری شد که در جدول ۱ آمده است.

۱-۱-۲- نتایج روش سیلندر پلیت عصاره اتیل‌استاتی

این عصاره نیز مثل عصاره متانولی روی همه سوش‌های باکتریایی اثر داشت و در مواردی حتی قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به عصاره متانولی ایجاد شد. در این مورد هم بیشترین غلظت به کار رفته ۵۰ و کمترین غلظت به کار رفته ۳/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۱).

جدول ۱: *میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) عصاره متانولی و اتیل‌استاتی گیاه چای مکّی بر روی میکروارگانیسم های مورد آزمایش به روش سیلندرپلیت بعد از سه بار آزمایش و مقایسه با جنتامایسین*

عصاره و غلظت (mg/ml) / نام میکروارگانیسم (شماره PTCC)	۵۰		۲۵		۱۲/۵		۶/۲		۳/۱		جنتامایسین ۱/۲۵µg/ml
	متانولی	اتیل‌استاتی	متانولی	اتیل‌استاتی	متانولی	اتیل‌استاتی	متانولی	اتیل‌استاتی	متانولی	اتیل‌استاتی	
استافیلوکوک اپیدرمیدیس (۱۱۱۴)	۲۰±۰/۷	۲۳±۰/۴	۱۳±۰/۵	۱۵±۰/۳	-	۱۲±۰/۶	-	-	-	-	۲۲/۳±۰/۵۹
باسیلوس‌ساب تیلیس (۱۰۲۳)	۱۹±۰/۴	۲۶±۰/۴	۱۷±۰/۴	۲۳±۰/۷	-	۱۶±۰/۵	-	۱۲±۰/۳	-	-	۳۴/۱±۰/۶۱
کلبسیلا پنومونیه (۱۰۵۳)	۱۵±۰/۶	۲۴±۰/۶	۱۲±۰/۷	۲۰±۰/۵	-	۱۳±۰/۶	-	-	-	-	۲۷/۸±۰/۶۲
سودوموناس آئروژینوزا (۱۰۷۴)	۱۹±۰/۴	۲۱±۰/۵	۱۶±۰/۵	۱۷±۰/۴	۱۳±۰/۸	-	-	-	-	-	۱۷/۱±۰/۵۴
اشرشیا کولی (۱۳۳۰)	۱۴±۰/۵	۲۴±۰/۷	۱۲±۰/۳	۲۰±۰/۶	-	۱۵±۰/۴	-	۱۲±۰/۵	-	-	۲۷/۶±۰/۶۲
استافیلوکوک طلایی (۱۱۱۲)	۲۱±۰/۷	۲۵±۰/۴	۱۷±۰/۶	۲۱±۰/۳	۱۲±۰/۴	۱۷±۰/۶	۱۱±۰/۳	۱۲±۰/۵	-	-	۲۶/۶±۰/۴۲

نتایج به صورت میانگین همراه با خطای معیار (Mean±SEM) محاسبه شده است.

PTCC=Persian Type culture collection

۲-۱- نتایج روش بیواتوگرافی عصاره اتیل‌استاتی

بعد از انجام آزمایش‌های مربوطه در مورد عصاره اتیل‌استاتی به روش بیواتوگرافی نتایج زیر در مورد این عصاره به دست آمد. باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوک طلایی در هیچ منطقه‌ای از صفحه TLC لکه عدم رشد از خود نشان ندادند. به این معنی که سرتاسر صفحه TLC در مورد این دو باکتری بعد از پاشیدن معرف تترازولیوم به رنگ ارغوانی درآمد و لکه بی‌رنگ مبنی بر وجود اثر ضد باکتریایی ایجاد نشد.

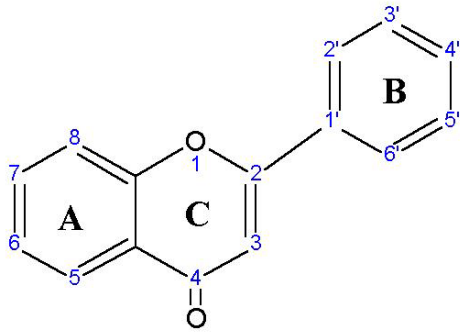
باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس در R_f=۰/۷۵ و R_f=۰/۱۵ دو لکه بی‌رنگ عدم رشد از خود نشان داد. در R_f=۰/۷۵ باکتری باسیلوس سابتیلیس یک لکه بی‌رنگ عدم رشد در زمینه ارغوانی از خود نشان داد. باکتری کلبسیلا پنومونیه در R_f=۰/۱۵ لکه عدم رشد از خود نشان داد. هم‌چنین باکتری اشرشیا کولی در دو R_f به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۷۵ لکه عدم رشد باکتری از خود نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲: *نتایج حاصل از اثرات ضد باکتری در روش بیواتوگرافی عصاره اتیل‌استاتی چای مکّی*

نام میکروارگانیسم	R_f واجد اثر ضدباکتری
استافیلوکوک اپیدرمیدیس	۰/۱۵ و ۰/۷۵
باسیلوس سابتیلیس	۰/۷۵
کلبسیلا پنومونیه	۰/۱۵
سودوموناس آئروژینوزا	-
اشرشیاکلی	۰/۱۵ و ۰/۷۵
استافیلوکوک طلایی	-

۲- نتایج حاصل از طیف سنجی UV/Vis ترکیبات با اثر ضدمیکروبی عصاره اتیل‌استاتی

دو لکه با R_f های ۰/۱۵ و ۰/۷۵ جداسازی شد و طیف‌های



شکل ۱: *ساختمان کلی فلاونوئیدها*

آن‌ها با استفاده از اطلاعات مراجع (۱۷) بر اساس ساختمان کلّی فلاونوئیدها (شکل ۱) تفسیر گردید. با استفاده از طیف متانولی مشخص شد به دلیل وجود دو باند جذبی در محدودهٔ ۳۵۰-۳۱۰ نانومتر(باند I) و ۳۰۰-۲۵۰ نانومتر (باند II) ترکیب از دسته فلاونوئیدهای نوع فلاون می‌باشد (۱۷).

۲-۱- لکه با R_f=۰/۱۵

۲-۱-۱- نتایج حاصل از طیف متانولی

طیف متانولی ترکیب با R_f=۰/۱۵ دارای طول موج‌های ماکزیمم ۲۸۱ (باند II) و ۳۲۸ نانومتر(باند I) می‌باشد. این موضوع نشان‌دهندهٔ فلاون بودن این ترکیب است.

۲-۱-۲- نتایج حاصل از طیف متانولی در حضور متوکسیدسدیم

هیچ‌گونه شیفتی نسبت به طیف متانولی دیده نشد که نشان‌هنده عدم وجود گروه‌های OH آزاد است. همچنین طیف متوکسید سدیم بعد از ۵ دقیقه نیز تغییر نداشت .

۲-۱-۳- نتایج حاصل از طیف متانولی در حضور $AlCl_3$ و $AlCl_3$ / HCl

هیچ تغییری نسبت به طیف متانولی در حضور معرف‌های $AlCl_3$ و $AlCl_3$ / HCl دیده نشد. بنابراین گروه OH آزاد وجود نداشت.

۲-۱-۴- نتایج حاصل از طیف متانولی در حضور استات سدیم و استات سدیم / اسید بوریک

تغییر قابل توجهی نسبت به طیف متانولی بعد از افزودن استات سدیم و استات سدیم / اسید بوریک حاصل نگردید، بنابراین گروه‌های OH آزاد در ناحیه ۷ یا OHهای ارتو آزاد وجود ندارد .

۲-۲- لکه با R_f= ۰/۷۵

۲-۲-۱- نتایج حاصل از طیف متانولی

طیف متانولی ترکیب با R_f=۰/۷۵ دارای طول موج‌های ماکزیمم ۲۹۵(باند II) و ۳۲۸(باند I) نانومتر بود. این موضوع نشان‌دهندهٔ فلاون بودن این ترکیب است.

۲-۲-۲- نتایج حاصل از طیف متانولی در حضور متوکسید سدیم

شیفت باتوکروم نسبت به طیف متانولی یعنی از ۲۹۵ به ۳۲۸ و از ۳۲۸ به ۳۸۴ نشان‌هنده وجود گروه‌های OH آزاد روی ساختمان بود. عدم تخریب طیف بعد از پنج دقیقه نمایانگر عدم وجود گروه‌های OH حساس مانند گروه ۴′ OH و ۳ به طور

هم‌زمان بود.

۲-۲-۳- نتایج حاصل از طیف متانولی در حضور $AlCl_3$ و $AlCl_3$ / HCl

تغییر طیف $AlCl_3$ در مقایسه با طیف متانولی و شیفت باتوکروم آن نمایانگر وجود OH های ارتو یا OH در ناحیه ۳ یا ۵ می‌باشد. بعد از افزودن HCl به محلول دارای $AlCl_3$ طیف تقریباً به وضعیت طیف متانولی درآمد، بنابراین می‌توان گفت در ساختمان گروه‌های OH ارتو وجود دارد.

۲-۲-۴- نتایج حاصل از طیف متانولی در حضور استات سدیم و استات سدیم / اسید بوریک

افزودن استات سدیم به محلول متانولی باعث شیفت باتوکروم باند II و هم‌پوشانی آن با باند I شده است. با توجه به این که بعداز افزودن اسید بوریک نیز طیف در مقایسه با استات سدیم تغییر نکرده است بنابراین گروه OH در ناحیه ۷ به عنوان گروه OH بسیار اسیدی و در حلقه A گروه‌های ارتوهیدروکسی وجود دارند.

در بررسی طیف‌های UV/Vis ترکیبات با R_f=۰/۱۵ و R_f=۰/۷۵ با توجه به شیفت‌های انجام گرفته، به ترتیب ترکیب اول احتمالاً از دسته فلاون‌ها بدون OH آزاد و ترکیب دوم احتمالا از دسته فلاون‌ها با گروه OH ناحیه ۷ و گروه OH ارتوهیدروکسی در حلقه A می‌باشند (۱۷).

بحث

میکروب‌ها از عوامل مهم ایجاد بیماری‌های عفونی مختلف و بسیاری از بیماری‌های زمینه‌ای دیگر هستند. در این تحقیق بعد از این که در یک آزمایش مقدماتی وجود اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی گیاه چای مکّی اثبات گشت، سعی شد فراکسیون‌هایی که این اثر را از خود نشان دادند جداسازی و مورد شناسایی مقدماتی ساختمان قرار گیرند. اثر ضدباکتری دو عصاره متانولی واتیل‌استاتی که ترکیبات فنلی به خصوص فلاونوئیدهای کم محلول در آب را که اثرات ضد میکروبی قابل توجهی از خود نشان داده‌اند را جدا می‌کند (۱۱)، به کمک روش سیلندر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. از آن جایی که اثر ضد باکتری عصاره اتیل‌استاتی مشابه و تا حدودی بیشتر از عصاره متانولی بود تصمیم گرفته شد از روش بیواتوگرافی نیز برای شناسایی بهتر فراکسیون‌های دارای اثر ضد باکتری استفاده شود. در نهایت هر کدام از لکه‌های واجد اثر ضد باکتری بعد از جدا کردن از روی پلیت‌های TLC تهیه‌ای به کمک معرف‌های شیفت‌دهنده در طیف سنجی UV/Vis مورد شناسایی مقدماتی ساختمان قرار گرفتند.

در روش بیواتوگرافی دو باکتری استافیلوکوک طلایی و سودوموناس آئروژینوزا که به ترتیب اولی یک میکروارگانیسم گرم مثبت و نسبتاً مقاوم و دومی باسیل گرم منفی و مقاوم است هیچ مهار رشدی از خود نشان ندادند و عصاره اتیل‌استاتی روی این دو میکروب هیچ اثری از خود نشان نداد. از آن جایی که این دو باکتری در روش سیلندر پلیت تا حدودی هاله عدم رشد از خود نشان دادند، می‌توان گفت کم شدن غلظت هرکدام از فراکسیون‌ها و جدا شدن آنها از هم روی صفحه TLC دلیل عدم مشاهده لکه واجد اثر ضد باکتری روی این دو میکروارگانیسم است. دو باکتری اشرشیا کولی و استافیلوکوک اپیدرمیدیس در دو ناحیه یکی پایین و یکی بالای صفحه TLC از خود مهار رشد نشان دادند. دو باکتری باسیلوس ساب تیلیس و کلبسیلا پنومونیه که اولی گرم مثبت و دومی گرم منفی است به ترتیب در بالای صفحه TLC و دومی در پایین صفحه TLC مهار رشد از خود نشان دادند.

در روش سیلندر پلیت هر دو عصاره متانولی و اتیل‌استاتی روی هر ۶ سوش باکتریایی اثر ضد باکتری و هاله عدم رشد نشان دادند، اما عصاره اتیل‌استاتی این اثر را بیشتر نمایان کرد و هاله‌های عدم رشد با قطر بالاتر از خود نشان داد. بیشترین هاله عدم رشد متعلق به عصاره اتیل‌استاتی روی باکتری باسیلوس سابتیلیس در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کمترین آن متعلق به عصاره متانولی در غلظت ۶/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی باکتری استافیلوکوک طلایی بود. بیشترین غلظت به کار رفته از عصاره ۵۰ و کمترین غلظت به کار رفته ۳/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد بیشتر می‌شد.

بر اساس طیف‌های UV/Vis ترکیبات با R_f=۰/۱۵ و R_f=۰/۷۵ که اثرات ضدمیکروبی روی بیشتر سوش‌های باکتریایی استفاده شده نشان دادند، با توجه به شیفت‌های انجام گرفته، به ترتیب احتمالاً از دسته فلاون‌ها بدون OH آزاد و فلاون‌ها با گروه OH ناحیه ۷ و گروه OH ارتوهیدروکسی در حلقه A می‌باشند (۱۷).

ولی با توجه به این که در TLC فلاونوئیدها تنها از یک سیستم حلال استفاده شده احتمال جداسازی یک فلاونوئید به صورت خالص خیلی کم می‌باشد، بنابراین جهت اظهارنظر در مورد دسته فلاونوئیدی ترکیبات با اثر ضد باکتری این گیاه، احتیاج به تحقیقات بیشتر با حلال‌های دیگر است. هرچند که با

توجه به احتمال داده شده در زمینه فلاون بودن ترکیبات جداشده و اثرات ضد باکتری گزارش شده از این دسته ترکیبات (۹)، می‌توان احتمال فلاون بودن ترکیبات را قوت بخشید.

اثرات ضدمیکروبی تاکنون تنها از عصاره آبی کاسبرگ‌های این گیاه که مقادیر زیادی اسیدهای آلی در آن وجود دارد گزارش شده است (۹) ولی در مورد عصاره اتیل‌استاتی و فلاونوئیدی، تحقیق اخیر اولین گزارش می‌باشد.

فلاون‌ها از جمله ترکیبات گیاهی هستند که اثرات قابل توجه میکروبی نشان داده‌اند. Galangin یک فلاون تری‌هیدروکسیله می‌باشد که از گیاه *Helichrysum aureonitens* جدا شده، روی باکتری‌های گرم مثبت، قارچ‌ها و ویروس‌ها به خصوص ویروس HIV اثر داشته است. Chrysin به عنوان یک فلاون، که در گیاه *Chrysanthemum morifolium* یافت می‌شود با تداخل در اعمال دیواره سلولی اثر ضد میکروبی و ضد HIV نشان داده است (۱۱). *Geum japonicum* فلاون‌هایی دارد که با تأثیر بر پروتئازهای سلولی اثر ضد میکروبی نشان می‌دهند. Swertifrancheside در گیاه *Swertia franchetiana* نیز یک فلاون با اثر ضد میکروبی است. Amentoflavone و Scutellarein دو فلاون گیاهی هستند که اثرات قابل توجه ضد میکروبی و ضد HIV داشته اند (۱۱).

با توجه به این که عصاره متانولی و اتیل‌استاتی گیاه مورد بررسی اثرضد باکتری روی سه سوش گرم مثبت و منفی شایع از خود نشان دادند، بنابراین پیشنهاد می‌شود که اولاً تحقیقات بیشتری برای جداسازی و خالص‌سازی هر کدام از فراکسیون‌ها انجام شود و ثانیاً اثر ضدمیکروبی روی گونه‌های بیماری‌زایی که از نمونه‌های انسانی جدا شدند انجام گیرد تا بعد از مقایسه اثر ضدمیکروبی با میکروب‌های استاندارد احتمال استفاده از این ترکیبات بررسی گردد.

Summary

Investigation of Antibacterial Effects of *Hibiscus Sabdariffa* L. Dried Calyx by Agar Diffusion and Bioautographic Methods

Moshafi M.H, PhD.[1], Forutan H., Pharm D.[2], Mehrabani M., PhD.[3]

1. Associate Professor of Microbiology, School of Pharmacy, Kerman Univesity of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran. 2. Pharmacist 3.Assistant Professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Science and Health Services, Kerman, Iran.

Introduction: *In this study, the antibacterial activities of methanolic and ethyl acetate extracts of calyx of* ***Hibiscus sabdariffa*** *L. (Malvaceae) traditionally used as Chai-Makii, against* ***Staphylococus aureus***, ***Staphylococus epidermidis***, ***Escherichia coli***, ***Bacillus subtilis***, ***Klebsiella pneumonia*** *and* ***Pseudomonas aeroginosa*** *were investigated by cylinder –plate and bioauthography methods separately.*

Method: *In cylinder – plate method methanolic extract of the calyces were prepared by maceration and after concentrating the extracts, they were dried. Then the concentrations of 50, 25, 12.5, 6.2 and 3.1mg/ml of the methanolic solutions were used for searching antibacterial effects. The standard bacteria with certain concentration (0.5 Mac Far land) were inoculated on to the Muller – Hinton agar medium. Prepared extracts were dropped in cylinders and 18-24 hours after incubation and penetration of extract into the culture medium the antibacterial effects and inhibitory zone were observed.*

In bioauthography method, the ethyl acetate extract was prepared by decantation of methanolic extract and evaporating to dryness. Then this extract was separated by ethyl acetate: Chloroform: Methanol (32:53:15) by thin layer chromatography method. After placing TLC papers in culture medium with certain concentration of bacteria and incubation, spot of inhibitory zone appeared by using tetrazolium salts and indicated as R_f.

Results: *Methanolic and ethyl acetate extracts in cylinder – plate method showed antibacterial effects on all six bacteria. The minimum and maximum applied concentrations were respectively 3.1 and 50mg/ml. In bioauthography*

method, ethyl acetate extract showedantibacterial effect on ***Staphylococus epidermidis***, ***Klebsiella pneumonia***, ***Bacillus subtilis*** *and* ***Echerichia coli*** *in R_f=0.15 and R_f=0.75.*

Conclusion: *According to ultra violet spectroscopy of these two components, they could be flavones.*

Key words : *Bioautography, Cylinder plate, Antibacterial effect, Hibiscus sabdariffa*

Journal of Kerman University of Medical Sciences,2006; 13(2): 103-110

منابع

۱. قهرمان، احمد: فلور رنگی ایران. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ۱۳۷۸ (ج ۱۹)، شماره ۲۳۲۰.

۲. مصحفی، محمدحسن؛ مهربانی، میترا و ذوالحسب حکیمه: بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مریم گلی ایرانی و مریم گلی آذربایجانی بر شش سوش میکروبی گرم مثبت و گرم منفی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۸۳، دوره یازدهم، شماره ۲، ص ۱۸-۱۰۹ .

۳. مظفریان، ولی الله:. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. فرهنگ معاصر، تهران، ۱۳۷۵، ص ۶-۲۷۵.

4. Ali BH, Al Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytother Res* 2005; 19(5): 369-75.
5. Ali BH, Mousa HM, EL- Mougy S. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus Sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 2003; 17(1): 56-9.
6. Ali MB, Salih WM, Mohamed AH, Homeida AM. Investigation of the antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *J Ethnopharmacol* 1991; 31(2): 249-57.
7. Beutler JA and Dermarderosian A(Editors). The review of natural products. 2nd ed., USA, Facts and Comparisons, 2002; p325.
8. Blumental M(senior editor). Therapeutic guide to herbal medicines. New york Cooperation with integrative medicine communications: 1998; p 336.
9. Bremness L. Herbs. London, Dorling Kindersley Ltd, 1994; p107.
10. Chen CC, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, *et al*. . *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholestrol-fed rabbits. *J Agric Food Chem* 2003; 51(18): 5472-7.
11. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 564-82.
12. Farombi EO, Fakoya A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(12): 1120-8.
13. Haji Faraji M, Haji Tarkhani A. The effect of sour tea *(Hibiscus sabdariffa)* on essential hypertension. *J Ethnopharmacol* 1999; 65(3): 231-6.
14. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsalee A, et al. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) *in vitro* using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biol Pharm Bull* 2005;28(3):481-4.
15. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsale A, *et al.* Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 103(2): 252-60.
16. Liu JY, Chen CC, Wang WH, Hsu JD, Yang MY, Wang CJ. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl(4)-induced liver fibrosis in rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(3): 336-43.
17. Mabry T, Markham KR, Thomas MB. The systematic Identification of flavonoids. Berlin, Springer-Verlag, 1970; pp37-74.
18. Wagner H, Bladt S: Plant drug analysis: A thin layer chromatography Atlas. 2nd ed., Berlin, Springer verlag, 1996; p195-209.
19. Wichtl M, Bisset N.G(Editors). Herbal drugs and Phytopharmaceuticals. London, CRC Press, 1994; PP266-7.