

مقایسه اثر میکروبی اسانس گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus - castus*) با آنتی بیوتیک‌های رایج در شرایط *In vitro*

محمد دخیلی^۱، حمیده آفرین^{۲*}، محمد رضا ذوالفقاری^۳

۱- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

* پست الکترونیک: hafarin1359@yahoo. Com

چکیده

گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus - castus*) یک گیاه دارویی شناخته شده از قرن‌ها پیش است. پنج‌انگشت یک گیاه فیتواستروژن بومی خاورمیانه و جنوب اروپا است و در بسیاری از کشورها مصرف پزشکی دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثرات ضد میکروبی اسانس پنج‌انگشت بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، کاندیدا آلبیکنس و مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین و نیستاتین انجام گرفت.

اسانس این گیاه به روش تقطیر با بخار آب استخراج و آنالیز اسانس با دستگاه گاز کروماتوگرافی/ طیف سنج جرمی GC/MS انجام شد. برای ارزیابی اثر ضد میکروبی از روش‌های ماکرودایلوژن و دیسک دیفیوژن استفاده گردید.

اسانس پنج‌انگشت به ترتیب در غلظت‌های $56/25 \mu\text{g/ml}$ و $112/5 \mu\text{g/ml}$ از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس ممانعت کرد. در روش دیسک دیفیوژن قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس 10 mm و کاندیدا آلبیکنس 11 mm بود.

اسانس پنج‌انگشت در غلظت $450 \mu\text{g/ml}$ از رشد سودوموناس آئروژینوزا و اشریشیاکلی ممانعت نمود. ولی با روش دیسک دیفیوژن این دو باکتری هاله ممانعت از رشد نشان ندادند.

این مطالعه نشان داد که اسانس پنج‌انگشت دارای اثر ضد میکروبی بوده که در مقایسه با اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و جنتامایسین دارای اختلاف معنی دار می‌باشد. ($p < 0/001$). اثر ضد قارچی این اسانس در مقایسه با نیستاتین دارای اختلاف معنی داری نمی‌باشد ($p > 0/05$). ترکیبات اصلی اسانس پنج‌انگشت را ایزوترپینولن، کاریوفیلین و آلفاپینن تشکیل می‌دهند.

کلید واژه: گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus - castus*)، اسانس، اثر ضد میکروبی.

مقدمه

انسان از دیرباز با گیاهان دارویی و طب سنتی قرابت خاصی داشته است. در عصر حاضر به دلیل آثار جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی رواج بیشتری یافته است.

ایران از لحاظ آب و هوا و موقعیت جغرافیایی در زمینه رشد گیاهان دارویی از بهترین مناطق جهان محسوب می‌شود. گیاه دارویی پنج‌انگشت (*Vitex agnus - castus*) از خانواده شاه‌پسند (*Verbenaceae*) به صورت درختچه‌ای پایا با شاخه‌های قهوه‌ای به ارتفاع ۰/۵ تا ۳ متر و گاهی به ۵ متر می‌رسد. برگ‌ها زود افت، پنجه‌ای و منقسم به ۵ تا ۷ برگچه به رنگ سبز تیره است. سطح تحتانی پهنک پوشیده از کرک‌های پنبه‌ای است. گل‌های آن به رنگ آبی مایل به بنفش و مجتمع به صورت سنبله دراز با ظاهر مطبق، بر روی یک پایه مشترک است. میوه آن شفت و دارای درون بر سخت و مقاوم است. از کلیه قسمت‌های این گیاه مخصوصاً برگ و میوه آن بوی فلفل استشمام می‌شود، بنابراین به فلفل نیز موسوم است. فصل شکوفه دادن این گیاه از اردیبهشت ماه آغاز می‌شود و تا شهریور ادامه دارد (۱ و ۲).

این گیاه به طور عمده در آسیای مرکزی و نقاط استوایی، اروپای مدیترانه‌ای و شمال آمریکا می‌روید (۳).

در ایران در نواحی مختلف رشته کوه البرز، تهران، کرج، قم، خراسان، جنوب غربی ایران، بندرعباس و نواحی مختلف خلیج فارس می‌روید (۴).

مصرف گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus - castus*) در طب سنتی قدمتی دیرینه داشته، اولین گزارشات از استفاده دارویی آن به ۴ قرن پیش از میلاد بر می‌گردد و در نوشته‌های بقراط به آن اشاره شده است (۵).

برای کاهش میل جنسی افراد عصاره این گیاه توسط پزشکان یونانی تجویز می‌شد. در دست نوشته‌های پیلای مورخ یونانی اشاره شده است که همسران سربازانی که به جنگ می‌رفته‌اند برای اثبات وفاداری خود میوه این گیاه را بر رختخواب خود می‌پاشیدند (۶).

در مصر باستان و در طب سنتی اروپا از این گیاه برای درمان سندرم پیش از قاعدگی، قاعدگی دردناک، رفع عوارض یائسگی و افزایش شیر مادران استفاده می‌شده است (۷ و ۸). سرخپوستان آمریکا در قرن نهم آن را برای تشدید خونریزی قاعدگی توصیه می‌کردند (۹).

ابوعلی سینا در کتاب قانون جلد (۱) آن را بنجنکشت نامیده است که مصرف آن جهت تسکین درد و ورم رحم توصیه گردیده است (۱۰).

این گیاه یکی از مهم‌ترین گیاهانی است که در طب گیاهی برای درمان بیماریهای هورمونی زنان به کار رفته و تنظیم‌کننده هورمونی است (۱۱).

این گیاه ترکیبات دوپامینرژیک دارد که به رسپتورهای دوپامین در بخش پیشین هیپوفیز متصل شده و آزادی پرولاکتین را مهار می‌کند و به این صورت علائم سندرم قبل از قاعدگی را کاهش می‌دهد (۱۲). اسیدهای چرب غیراشباع در گیاه پنج انگشت می‌تواند از طریق کاهش تعداد رسپتورهای LH موجود در سطح سلولهای لایدیگ و متعاقب آن کاهش ترشح تستوسترون اثر منفی بر باروری مردان داشته باشد (۱۳).

ترکیبات پلی فنلی گرفته شده از این گیاه از قبیل فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات ضدسرطانی عمل می‌کنند و فعالیت القاکنندگی آپوپتوز در سلولهای سرطانی دارند (۱۴).

عصاره این گیاه پایین‌آورنده سطح کلسترول خون است (۱۵).

با توجه به اینکه در زمینه فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه پنج‌انگشت بومی ایران اطلاعات مدونی در دسترس نیست، در این بررسی برای اولین بار فعالیت ضد میکروبی این گیاه بر روی تعدادی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی و قارچ کاندیدا آلبیکنس مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش ها

تهیه اسانس و آنالیز

جمع‌آوری گیاه پنج‌انگشت در تیر ماه سال ۱۳۹۰ از حاشیه رودخانه طغرود شهر جعفریه استان قم در مرحله گل‌دهی انجام شد و توسط هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سازمان جهاد کشاورزی مورد شناسایی علمی قرار گرفت و پس از خشک کردن در سایه، اندام هوایی گیاه که شامل ساقه برگ، گل و میوه می‌باشد توسط آسیاب‌برقی پودر شد. جهت تهیه اسانس به روش Steam distillation، ۵۰ گرم از اندام هوایی خشک و پودر شده گیاه را همراه با ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر در یک بالن ریخته و به مدت ۳ ساعت در دستگاه کلونجر با سرعت تقطیر یک میلی لیتر در دقیقه اسانس‌گیری شد.

آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) در دانشگاه صنعتی شریف انجام شد.

تهیه سویه‌های میکروبی

سویه‌های استاندارد میکروبی شامل *P.aeruginosa* (ATCC 9027) ، *E.coli* (ATCC 8739) ، *St.aureus* (ATCC 6583) ، *C.albicans* (PTCC 5027) از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مؤسسه سرم‌سازی حصارک کرج تهیه گردید و برای بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند از سویه‌های میکروبی

از کشت ۲۴ ساعته میکروب‌ها جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی استفاده شد. به این ترتیب که با اضافه کردن میکروب موردنظر (باکتری یا قارچ) به سرم فیزیولوژی استریل، کدورت حاصله با کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند مقایسه گردید تا غلظت میکروبی معادل $1/5 \times 10^8$ CFU/ml حاصل گردد (۱۶).

تهیه ترکیب رقیق شده اسانس پنج‌انگشت

در بررسی اثرات ضد میکروبی مواد برای رقیق نمودن یک ترکیب باید از ماده‌ای به عنوان امولسیون فایر استفاده شود که علاوه بر همگن کردن فازهای مختلف، خاصیت ضد میکروبی نیز نداشته باشد. حل نشدن اسانس در محیط کشت نیز دلیلی بر استفاده از امولسیون فایر می‌باشد که در این مطالعه ماده دی متیل سولفوکساید (DMSO) به عنوان ماده امولسیون فایر انتخاب شد و براساس آزمایش از رقتی از این ماده استفاده گردید که خاصیت ضد میکروبی نداشته باشد (۱۷).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

Minimum Inhibitory Concentration

این آزمایش به روش Macro dilution انجام شد (۱۸). در این روش یک سی‌سی از اسانس رقیق شده با امولسیون فایر را به روش سریالی درون یک سی‌سی محیط مولر هینتون براث (مرک آلمان) برای باکتریها و سابورودکستروز براث (مرک آلمان) برای قارچ مخلوط نموده (از رقت ۰/۸۸۵ - ۴۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر) و در نهایت ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیونهای معادل نیم مک فارلند از میکروب‌های تهیه شده را به هر سری از رقت‌های تهیه شده اضافه نموده انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت انجام دادیم.

بعد از گذشت مدت زمان موردنظر لوله‌ها را از لحاظ رشد و ایجاد کدورت بررسی نموده و کمترین غلظتی از اسانس که مانع رشد میکروب‌های مورد آزمایش گردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی

(MBC) Minimum Bacteriocidal Concentration

(MFC) Minimum Fungicidal Concentration

برای آزمایش MBC از همه لوله‌های فاقد کدورت ۰/۱ سی سی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد برای آزمایش MFC از همه لوله‌های فاقد کدورت ۰/۱ سی سی بر روی محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شد پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون آخرین رقتی که توانسته بود ۹۹/۹ درصد از باکتریها را بکشد به عنوان MBC و آخرین رقتی که توانسته بود ۹۹/۹ درصد از قارچ مورد بررسی را بکشد به عنوان MFC در نظر گرفته شد (۱۸ و ۱۹).

به منظور مقایسه اثر ضد میکروبی اسانس و آنتی‌بیوتیک‌های رایج، از آنتی‌بیوتیک‌های شرکت‌های موجود مقداری به صورت پودر تهیه شد و با تعیین میزان پودر مصرفی و حجم مایع رقیق‌کننده مورد نیاز محلول ذخیره آنتی‌بیوتیکی تهیه شد و برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی از روش‌های فوق استفاده گردید.

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

برای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد میکروب‌های مورد بررسی از روش انتشار دیسک (Disk diffusion) استفاده گردید (۱۹ و ۱۸). از سوسپانسیون‌های میکروبی معادل نیم‌مک‌فارلند توسط سواب استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار (باکتری) و سابورودکستروز آگار (قارچ) کشت یکنواخت داده و سپس ۲۰ میکرولیتر از استوک اسانس به دیسک‌های ۶mm بلانک استریل تلقیح نموده و در شرایط استریل بر روی محیط کشت قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و بر حسب میلی متر گزارش گردید.

برای تعیین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های رایج از روش انتشار دیسک براساس استاندارد Kirby-Baure استفاده شد و نتایج حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها را با جدول استاندارد NCCLS مقایسه کردیم.

نتایج

نتایج بیانگر این است که کمترین غلظت مهارکنندگی اسانس در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) با میزان $56/25 \mu\text{g/ml}$ مشاهده گردید. در قارچ کاندیدا آلبیکنس (PTCC 5027) غلظت مهارکنندگی $112/5 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد باکتریهای گرم منفی اش‌ریشیاکلی (ATCC 8739) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 9027) دارای بالاترین غلظت مهارکنندگی با میزان $450 \mu\text{g/ml}$ شناسایی شدند (جدول ۱)

جدول ۱: نتایج MIC و میانگین قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد بررسی در برابر اسانس گیاه دارویی

میکروارگانیسم	MIC (µg/ml)	میانگین قطر هاله عدم رشد برحسب میلیمتر
St.aureus (ATCC 6538)	۵۶/۲۵	۹/۳± ۱/۱۵
P.aeruginosa (ATCC 9027)	۴۵۰	-
E.coli (ATCC 8739)	۴۵۰	-
C.albicans (PTCC 5027)	۱۱۲/۵	۱۰/۳± ۰/۵۷

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قطر هاله عدم رشد ۱۰ میلی متر و قارچ کاندیدا آلبیکنس قطر هاله عدم رشد ۱۱ میلی متر در برابر اسانس گیاه پنج‌انگشت نشان دادند و باکتریهای استریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا هاله عدم رشدی نشان ندادند (جدول ۱).

بحث

در بررسی‌های انجام گرفته تاکنون گزارشی از مقایسه اثر ضد میکروبی اسانس اندام هوایی گیاه پنج‌انگشت (*vitex agnus castus*) با آنتی‌بیوتیک‌های رایج آمپی‌سیلین، جنتامایسین و نیستاتین در شرایط *invitro* در ایران انجام نگرفته است.

این مطالعه نشان داد که اسانس اندام هوایی گیاه پنج‌انگشت دارای اثرات ضد میکروبی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. این یافته با نتایج مطالعه Stojkovic مطابقت دارد (۲۰). نتایج این بررسی بیانگر این بود که اسانس اندام هوایی پنج‌انگشت دارای اثر مهاری قوی تر بر روی استافیلوکوکوس اورئوس با MIC = ۵۶/۲۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر در مقایسه با اسانس میوه نارس این گیاه می‌باشد.

مقایسه نتایج نشان دهنده عملکرد ضد باکتریایی قوی تر اسانس میوه نارس پنج‌انگشت نسبت به اسانس اندام هوایی بر روی اشتریشیاکلی با MIC=219 میکروگرم/ میلی لیتر می‌باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی آمپی سیلین بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از جنتامایسین و فعالیت این دو آنتی بیوتیک بیشتر از اسانس پنج‌انگشت می‌باشد که در سطح $p < 0/001$ دارای اختلاف معنی داری می‌باشد. فعالیت ضد میکروبی نیستاتین و اسانس پنج‌انگشت بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس در سطح $p < 0/05$ دارای اختلاف معنی داری نمی‌باشد.

سودوموناس آنروژنیوزا و اشیشیاکلی هاله ممانعت از رشد در برابر اسانس پنج‌انگشت نشان ندادند و فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و جنتامایسین بیشتر از فعالیت ضد میکروبی اسانس مورد مطالعه و در سطح $p < 0/001$ دارای اختلاف معنی داری می‌باشند.

اثرات ضد میکروبی این اسانس را می‌توان به ترکیبات ایزوترپینوئل، کاریوفیلین و آلفاپنین مربوط دانست که بیشترین درصد ترکیبات شیمیایی را به خود اختصاص داده اند.

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و محدودیت‌های روز افزون استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروبی نظیر عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی نیاز به جایگزینی این مواد با مواد طبیعی و اسانس‌های گیاهی احساس می‌شود که این مساله می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات برای جایگزینی مواد فوق در جهت حفظ مواد خوراکی و کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قم و دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شریف به خاطر همکاری هایشان در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Akhondzadeh, SH., Iran's encyclopedia of medicinal plants. 1st ed.
Iran: Arjomand press; 2000; 1:51
2. Daniele, C., Thompson Coon, J., Pittler, MH., Ernst, E., Vitex agnus – castus: asystematic review of advers events. Drua Saf 2005; 28 (4): 319 – 32
3. Arokiyaraj, S., Perinbam, k., Phytochemical analysis and antibacterial activity of vitex agnus - castus, Int J Green Pharm, 2009, 3:162-164
4. Ghahraman, A., Iranian cryophytes, Tehran: Tehran Univ Pub; 2003, 315

5. Cossuta, D., Simndi, E., Vagi, J., Hohmann, A., Prech, I., Supercritical fluid extraction of Vitex agnus - costus fruit, *J Supper critical Fluid*, 2008; 47: 188-94
6. Blumenthal, M., *Herbal Medicine*, 2nd ed, London, Integrative Medicine Communications, 2000, 435 – 439
7. Newall, C., Anderson, L., Philipson, J., *Herbal Medicine* , 3rd ed , London, The Pharmaceutical Press, 1996, 19-20
8. Reomheld, H., Chasteberry, *Am FAM Physicion*, 2005, 72 (5): 821-24
9. Felter, H., Lioyld, J., *King's American dispensatory*, 1st ed , Portland, Eclectic Medical Publications, 1985, 435-9
10. Ansarishirazi, A., Ekhtiarat Badiie. 1st ed. Iran: The drug distributing company of Razi; 1996, 70-73
11. Berger, D., Schaefer, W., Schrade, E. , Meier, B., Bratt storm, A. , Efficacy of vitex agnus- castus extract ze 440 in patients with pre – menstrall syndrome (PMS), *Arch Gynecol Obstet*, 2000; 264 (3): 150-153
12. Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., Seidlova, wuttke, D., Chaste tree (vitex agnus - castus) pharmacology and clinical indications, *Phytomedicine*, 2003; 10(4): 348-57
13. Ramezani, M., Nasri, S., Bahadoran, H., The effect of vitex agnus- Castas total extract on spermatogenesis of Balb/C mice. *Armaghan Danesh (J kashan of univ Med)*. 2008; 52 (4): 35-44
14. Ohyama, K., Cytotoxicity and apoptotic inducibility of VAC frait extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth, *Biol Pharm Bull*, 2003; 26: 10-8
15. Nasri, S., Ebrahimi, S., Medical effect of VAC, *J Babol Univ of Med Sci*, 2006; 7:49-53
16. Good win, R., Sallavin, L., Soleyman, M., Adriano, C., *Antimicrobial susceptibility testing protocols*, CRC Press, 4 ed, 2007
17. Kalemba, D., Kunicka, A., Antibacterial and anti fungal properties of essential oils, *Current Medicinal Chemistry*, 2003; 10:813-29.
18. Forbers, B., Sahmalices, D., Weissfeld, A., *Diagnostic Microbiology*, 2007
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2007

20.Stojkovic, D., Stokovic, M., Glamoclija, J., Dzomic, A., Crici, A., Ristic, M., Chemical composition and antibacterial activity of vitex agnus - castus fruits and leaves essential oil, J Food Chemistry, 2011, 128: 1017-1022

Comparison of antimicrobial effect of essential oil of Vitex agnus – castus with common antibiotics in vitro.

M. Dakhili¹, H.Afarin^{*2}, M.R.Zolfaghari³

¹ Experimental science Department, Medicine College, Islamic Azad University, Qom, Qom, Iran.

² M.Sc. Student, Microbiology Department, Science College, Islamic Azad University, Qom, Qom, Iran.

³ Microbiology Department, Science College,, Islamic Azad University, Qom, Qom, Iran.

* E-mail: hafarin1359@yahoo.com

Abstract

Vitex agnus – castus (VAC) as a plant in herbal medicine has been since centuries ago. It is a phytoestrogenic herb native to the Middle East and southern Europe. It has clinical usage in so many countries. In this research, the antimicrobial effect of essential oil of VAC was investigated on Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans and was compared with Ampicilin, Gentamicin, Nystatin.

Essential Oil of VAC was extracted by steam distillation, Chemical constituents was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. for evaluation of antimicrobial effect Disk diffusion and Macrodilution methods were used.

Essential oil of VAC inhibited the growth of Staphylococcus aureus and Candida albicans at Concentrations 56/25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 112/5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. by Disk diffusion method The inhibitory zones were 10 mm and 11 mm respectively This essential oil inhibited the growth of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli at concentration 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$. by Disk diffusion method They didn't show inhibitory zone.

The results of this research indicated that the essential oil of VAC has antimicrobial effect, in comparison with antibacterial effect of Ampicilin and Gentamicin has significant difference ($P < 0/001$) antifungal effect of this essential oil in comparison with Nystatin doesn't have significant difference ($P > 0/05$). The major constituents of oil were: Terpinolene, Caryophyllene, α -pinene.

Keywords: Vitex agnus-castus, Essential oil, Antimicrobial effect.