

## بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های گیاه *Geum kokanicum*

حمیدرضا منصف اصفهانی<sup>۱</sup>، انسیه شریفی اقدم<sup>۲</sup>، محسن امینی<sup>۳</sup>، محمدعلی فرامرزی<sup>۴</sup>، احمد رضا شاهوردی<sup>۵</sup>  
رضا حاجی‌آقائی\*

۱ - استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۲ - دانشجوی داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۳ - استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۴ - استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۵ - مرتبی پژوهش، گروه فارماکوگنوزی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

\* آدرس مکاتبه: کرج، کیلومتر ۵۵ جاده تهران قزوین، مجتمع تحقیقاتی جهاددانشگاهی، پژوهشکده گیاهان

دارویی جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۱۴۴۶ - ۱۳۱۴۵

تلفن: ۰۲۶۱ (۴۷۶۴۰۲۱)، نمبر: ۰۲۶۱ (۴۷۶۴۰۲۱)

پست الکترونیک: rhamiaghahae@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸/۲/۷

تاریخ دریافت: ۱۷/۱۰/۸۷

### چکیده

مقدمه: گیاه علف مبارک کوهستان با نام علمی *Geum kokanicum* از خانواده Rosaceae، از جمله گیاهان با ریزوم دائمی ایران می‌باشد. این گیاه در درمان اسهال و سایر مشکلات گوارشی کاربرد دارد.

هدف: در این تحقیق اثرات ضدمیکروبی عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف تهیه شده از ریزوم *G. kokanicum* مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: گیاه *G. kokanicam* در خرداد ماه ۱۳۸۵ از منطقه بجنورد جمع‌آوری شد. سپس از ریزوم آن یک عصاره تام با اتانول ۸۰ درصد و چهار فراکسیون به روش استخراج متوالی به دست آمد و هریک از فراکسیون‌ها و عصاره تام به روش

Disc – diffusion مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: آزمون میکروبی اولیه عصاره تام و فراکسون‌های مختلف بر روی میکروب‌های استافیلوكوکوس اورئوس و اشرشیاکلی، نشان‌دهنده بیشترین هاله عدم رشد فراکسیون متابولی (۱۰ mg/disc) بر روی استافیلوكوکی اورئوس به میزان ۱۹ میلی‌متر می‌باشد. هم‌چنین حداقل غلظت مهاری عصاره تام اتانولی روی میکروب‌های مختلف گرم مثبت و منفی شامل: استافیلوكوکوس اپیدرمیتیس، سویه‌ای از استرپتوکوک نوع A، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی، پسودوموناس آئروژنیزا، سویه‌ای از شیگلا و سویه‌ای از کلبسیلا مورد بررسی قرار گرفت که کمترین حداقل غلظت مهاری مربوط به استافیلوكوکوس اپیدرمیدیس به میزان ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده هاله عدم رشد عصاره تام این گیاه بر روی استافیلوكوکوس اورئوسی به میزان ۱۸ میلی‌متر می‌باشد. با توجه به حضور تانن زیاد در آنالیز فیتوشیمیایی این عصاره حدس زده شد که این اثر ضدمیکروبی به دلیل حضور تانن بالا در گیاه باشد. به منظور اثبات این موضوع تانن گیاه، که در فراکسیون متابولی جمع شده بود به وسیله محلول ژلاتین ۱ درصد جدا شده و به وسیله بیواتوگرافی مورد بررسی قرار گرفت که تایید کننده حدس بالا می‌باشد.

گل واژگان: *Geum kokanicum*، تانن، فعالیت ضدمیکروبی



## مقدمه

هرباریومی این گیاه تهیه شده و در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری می‌شود. ریزوم گیاه، پس از جمع‌آوری، جداسده و سپس در سایه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و ریزوم‌ها توسط آسیاب به پودر مناسبی تبدیل شدند.

### مواد شیمیایی و محیط‌های کشت

کلیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت ذکر شده در این تحقیق از شرکت Merck (کشور آلمان) می‌باشد.

### عصاره‌گیری

عصاره تام ریزوم این گیاه توسط اتانل ۸۰ درصد به روش پرکولاسیون تهیه شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ گرم از پودر ریزوم به روش فوق عصاره‌گیری شد و عصاره هیدروالکلی به دست آمده توسط دستگاه تقطیر در خلاء خشک شد (۶/۱۲ گرم معادل ۶/۱۲ درصد وزنی - وزنی).

۵۰۰ گرم از پودر ریزوم گیاه *G. kokanicum* به روش استخراج متوالی<sup>۱</sup> با حلال‌های فوق عصاره‌گیری شد. چهار نوع فراکسیون تهیه شده با دستگاه تقطیر در خلاء مجدداً خشک و به ترتیب ۳/۳، ۵/۷، ۶/۴ و ۸/۲ گرم عصاره خشک معادل ۰/۶۶، ۱/۲۸، ۱/۱۴ و ۱/۶۴ درصد وزنی - وزنی حاصل شد.

### آنالیز فیتوشیمیایی

آزمایش‌های فیتوشیمیایی اولیه جهت تعیین مقدار کیفی مواد مختلف شامل تانن، فلاونوئید، آلکالوئید و ساپونین انجام شد.

### بررسی فعالیت ضد میکروبی میکرووارگانیسم‌ها

در این تحقیق از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروژینوزا، سویه‌ای از شیگلا، باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیاکلی، سالمونلایتیفی، سویه‌ای از کلبسیلا و استرپتوکوکوس نوع A استفاده شد. این

در طول تاریخ بشری بسیاری از بیماری‌های عفونی به طور سنتی با داروهای گیاهی درمان شده‌اند. امروزه تلاش برای استخراج و شناسایی مواد موثر گیاهان که خاصیت ضد میکروبی دارند ادامه دارد [۱، ۲]. گیاه علف مبارک کوهستان *Geum kokanicum* Regel & Schmalh (Rosaceae) از گیاهان بومی ایران می‌باشد که در مناطق البرز، نواحی اطراف تهران و کندوان انتشار جغرافیایی دارد [۳]. این گیاه علاوه بر ایران، در ترکمنستان، آسیای مرکزی، اروپای مرکزی، شمال آفریقا، سوریه، آناتولی و ارمنستان می‌روید [۴].

این گیاه در طب سنتی منطقه بجنورد، به منظور درمان اسهال و ناراحتی‌های گوارشی، رفع ترش کردن و در رنگرزی به کار می‌رود [۵].

مطالعه‌ای که روی ترکیبات فرار *G. kokanicum* انجام شده، نشان‌دهنده وجود هفت نوع ترکیب در انسان آن می‌باشد که از میان آنها، اوژنول و میرتنول ترکیبات اصلی انسان را تشکیل می‌دهند، همچنین در بررسی اثرات ضد میکروبی انسان مشخص شد که انسان گیاه، اثرات ضد باکتری و ضد قارچ دارد [۶].

روی بعضی از گونه‌های این گیاه از جمله *G. rivale* و *G. japonicum* مطالعات فیتوشیمیایی و بیولوژیک انجام شده است. این مطالعات نشان‌دهنده وجود خاصیت ضد باکتری و ضد انعقادی در گونه‌های فوق الذکر است [۷، ۸].

هدف از این تحقیق بررسی اثرات ضد میکروبی ریزوم علف مبارک کوهستان است که برای اولین بار گزارش می‌شود.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

*G. kokanicum* از خانواده Rosaceae که در ایران به علف مبارک کوهستان مشهور است، در خردادماه ۱۳۸۱ از منطقه بجنورد در استان خراسان جمع‌آوری شد. نمونه

<sup>۱</sup> Successive extraction

است که توسط حلال جدا شده است. به کمک این روش می‌توان  $R_f$  مواد فعال موجود در عصاره گیاهی را تعیین نمود.

### جدازای تانز از فراسیون متانلی

به منظور رسوب دادن و جدازای تانز از فراسیون متانلی، محلول ژلاتین ۱ درصد به کار برده شد. بدین‌منظور ابتدا فراسیون متانلی را در آب حل کرده سپس محلول ژلاتین تا تکمیل عمل رسوب‌گیری اضافه شد و رسوب حاصله با سانتریفوژ جدازای و توسط اتانول، تانز از ژلاتین جدا شد. روی فراسیون تانز دار و محلول باقی‌مانده TLC با سیستم بوتائل - آب - اسید استیک (۱:۱/۵) و سپس آزمون بیواتوگرافی روی کروماتوگرام حاصل انجام گرفت.

### نتایج

#### فعالیت ضد میکروبی

نتایج آزمایش اولیه Disc diffusion عصاره تام و فراسیون‌های تهیه شده به روش انتشار در جدول شماره ۱ آورده شده است. عصاره تام و فراسیون‌های دی کلرومتان، متانل و آبی تهیه شده از ریزوم گیاه مورد آزمایش در غلظت ۱۰ mg/disc روی استافیلوكوکوس اورئوس هاله عدم رشد نشان داد، در مقابل نمونه‌های مذکور با همین غلظت روی اشريشياکلى، اثري نشان نمی‌دهند و فراسیون اتردوپترولى علاوه بر اشريشياکلى روی استافیلوكوکوس اورئوس نيز اشري نشان نداد (جدول شماره ۱).

نتایج آزمایش‌های تکمیلی ضد میکروبی فراسیون متانلی روی میکروارگانیسم‌های مختلف دیگر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد نشان دهنده این است که بیشترین تاثیر این فراسیون روی سویه‌های میکروبی شیگلا، استافیلوكوکوس اورئوس، استافیلوكوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد. این فراسیون روی میکروب‌های سودوموناس آئروژینوزا و استرپتوكوک A اثر کمتر و روی سالمونلا و کلیسیلا و اشريشياکلى بی‌اثر می‌باشد (جدول شماره ۲).



سویه‌ها از بیمارستان شریعتی تهیه و طبق روش‌های متداول شناسایی و تعیین هویت شد.

اثرات ضد میکروبی عصاره تام و فراسیون‌های مختلف ریزوم گیاه *G. kokanicum*<sup>۱</sup> به روش انتشار<sup>۲</sup> مطالعه شد. دیسک حاوی ۱۰ میلی‌گرم از مواد مورد آزمایش روی پلیت‌های تلقیح شده با سویه‌های میکروبی (که در جدول شماره ۱ لیست شده است) قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌های مورد آزمایش اندازه‌گیری و ثبت شد. خاصیت ضد میکروبی فعلی ترین فراسیون تهیه شده توسط روش رقتی<sup>۳</sup> مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت.

غلظت‌های متساوی از فراسیون (۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در محیط جامد تهیه شد. آنگاه سویه‌های مختلف میکروبی به صورت نقطه‌ای روی محیط جامد کشت داده شدند. میزان تلقیح باکتری‌ها  $10^5$  -  $10^4$  باکتری در هر نقطه بود. بعد از گرمانه‌گذاری طبق شرایط فوق الذکر، نتایج جمع‌آوری شد. کمترین غلظتی که مانع از رشد یک سویه باکتری می‌شود به عنوان حداقل غلظت مهاری<sup>۳</sup> گزارش می‌شود.

### روش بیواتوگرافی

جهت تعیین  $R_f$  ماده فعال ضد میکروبی از روش بیواتوگرافی استفاده شد.

کروماتوگرافی لایه نازک روی فراسیون فعال با حلال بوتائل - آب - اسید استیک (۱:۱/۵) انجام شد. پس از خشک شدن کروماتوگرام، پلیت روی محیط کشت جامد مولرهیتون به مدت ۱۵ دقیقه گذاشته شد، تا مواد موجود روی کروماتوگرام به محیط کشت منتقل شود، سپس از سویه شیگلا سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه و به کمک سواب روی پلیت‌های مورد آزمایش کشت داده شد.

بعد از گرمانه‌گذاری در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت هاله‌های عدم رشد روی پلیت، نشانگر وجود ماده یا مواد ضد میکروبی روی کروماتوگرام

<sup>1</sup> Disc – diffusion

<sup>2</sup> Agar dilution

<sup>3</sup> Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

جدول شماره ۱ - فعالیت ضد میکروبی عصاره تام و فرaksیون های گیاه *Geum kokanicum* به روش انتشار

عصاره آبی	عصاره متانی	عصاره اتر دپترولی	عصاره کلرو متانی	عصاره تام اتانلی	عصاره mg/disc ۱۰	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29737
۱۵/۵ میلی متر	۱۹ میلی متر	۱۵/۵ میلی متر	-	-	۱۸ میلی متر	اشریشیاکلی ATCC 8739
-	-	-	-	-	-	-

جدول شماره ۲ - نتایج فعالیت ضد میکروبی فرaksیون متانلی *Geum kokanicum* به روش انتشار

میکروارگانیسم	فرaksیون متانلی	سپیروفلوکسازین	جستامايسین	قطر هاله عدم رشد به میلی متر
	mg/disc ۱۰	µg/disc ۵	µg/disc ۱۰	mg/disc ۱۰
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۲۰/۵	۲۹	۱۸	
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۹	۲۶/۵	۱۹	
سویه ای از استرپتوکوک نوع A	۱۳	۲۰	۱۱	
asherishiaakli	۱۶	۲۸	-	
باسیلوس سوتیلیس	۲۶	۳۰	۱۸	
سالمونلا تیفی	۱۹	۳۳	-	
پسودوموناس آنروژینوزا	۱۶	۲۹	۱۴	
سویه ای از شیگلا	۱۹	۳۱	۲۰	
سویه ای از کلبسیلا	۲۱	۳۸	-	

### آزمون حداقل غلظت مهاری

با انجام آزمایش حداقل غلظت مهاری<sup>۱</sup>، حداقل غلظتی از عصاره گیاه که به طور کامل باعث مهار رشد میکروارگانیسمها بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد می شود، تعیین شد. نتایج آزمون MIC عصاره تام روی میکروب های مختلف در جدول شماره ۳ آورده شده است. حداقل غلظت مهاری عصاره اتانلی از ۲ - ۰/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تغییر می کند. کمترین آن مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمیس ۰/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و حداقل آن برای سویه های میکروبی است که در آزمون انتشار، حساسیتی به وجود ۱۰ mg/disc از فرaksیون اتانلی نشان ندادند.

**خاصیت ضد میکروبی فرaksیون تاننی تغليظ شده**  
 محلول تانن دار و محلول باقیمانده حاصل از فرaksیون متانلی برای انجام آزمایش ضد میکروبی بر شیگلا استفاده شد. در این کار از روش چاهک استفاده شد. محلول حاوی تانن خاصیت ضد میکروبی قوی تری از نمونه فاقد تانن نشان داد. هاله عدم رشد ۲۱ میلی متر برای محلول باقیمانده و ۲۶ میلی متر برای محلول تانن دار بود. در کروماتوگرافی فرaksیون تغليظ شده حاوی تانن و محلول باقیمانده با استفاده از سیستم حلal بوتanol - آب - اسید استنیک (۶ : ۱/۵ : ۱)، دو لکه برای فرaksیون تغليظ شده با ۰/۸۲ و ۰/۷۳ Rf و یک لکه با ۰/۷۳ Rf برای محلول باقیمانده قابل مشاهده بود. سپس آزمون بیواتوگرافی روی محلول باقیمانده و فرaksیون تانن دار انجام شد که در نتیجه آن یک هاله عدم رشد در منطقه

<sup>1</sup> MIC



جدول شماره ۳ - نتایج آزمون حداقل غلظت مهاری عصاره تام *Geum kokanicum*

MIC میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۰۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۱۲۵ میلی گرم بر بر میلی لیتر	۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۱ میلی گرم بر میلی لیتر	۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۴ میلی گرم بر میلی لیتر	غلظت (mg/ml) میکروارگانیسم
۰/۱۲۵	++	-	-	-	-	-	-	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
۱	++	++	++	++	-	-	-	استافیلوکوکوس اورئوس
۲	++	++	++	++	++	-	-	سویه ای از استرپتوکوک نوع A
۲	++	++	++	++	++	-	-	اشریشیاکلی
۰/۲۵	++	++	-	-	-	-	-	باسیلوس سوبتیلیس
۲	++	++	++	++	++	-	-	سالمونلا تیفی
۲	++	++	++	++	++	-	-	پسودوموناس آئروژینوزا
۰/۲۵	++	++	-	-	-	-	-	سویه ای از شیگلا
۲	++	++	++	++	++	-	-	سویه ای از کلبسیلا

هیچ کدام از میکروب‌ها تاثیر ندارند.

فراکسیون متنالی روی استافیلوکوکوس اورئوس بزرگ‌ترین هاله عدم رشد و در نتیجه بیشترین اثر ضد میکروبی را دارا می‌باشد. پس مراحل بعدی مطالعات ضد میکروبی را با فراکسیون متنالی ادامه دادیم.

در مقایسه اثر ضد میکروبی فراکسیون متنالی با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مشخص شد که این فراکسیون روی سویه شیگلا از بقیه موثرتر است. به منظور جداسازی مواد موجود در فراکسیون متنالی، سیستم‌های حلال مختلف برای کروماتوگرافی امتحان شد و سیستم بوتائل - آب - اسیداستیک (۶: ۱/۵ : ۱) به عنوان بهترین سیستم حلال انتخاب شد.

با این سیستم حلال دو لکه با  $۰/۹۱$  و  $۰/۷۳$  مشاهده شد که با انجام آزمون بیوآتوگرافی لکه با  $۰/۷۳$  دارای اثر ضد میکروبی می‌باشد. نتایج آزمون MIC عصاره تام نشان داد که حساس‌ترین میکروب استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و بعد از آن سویه شیگلا و باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد.

به منظور بررسی بیشتر فراکسیون فعال متنالی، این فراکسیون با روش رسوب دادن تانن‌ها با ژلاتین، به دو بخش فراکسیون سرشار از تانن و محلول باقی‌مانده تقسیم شد. در مقایسه اثر ضد میکروبی فراکسیون تانن دار و محلول باقی‌مانده

با  $R_f = ۰/۷۳$  در هر دو محلول مشاهده شد که در مورد فراکسیون تانن دار قطر بزرگ‌تری داشت.

## بحث

گیاهان جنس *Geum* دارای اثرات گسترده در طب سنتی کشورهای مختلف می‌باشند. گیاه *Geum japonicum* در طب سنتی چین و ژاپن به عنوان قابض و مدر کاربرد دارد [۹] و عصاره تام و فراکسیون تاننی این گیاه دارای اثر ضد تجمعی پلاکتی می‌باشد [۸]. گیاه *Geum quellyon* در طب سنتی شیلی برای درمان التهاب، مشکلات پروستات، درد دندان و ... کاربرد دارد [۱۰]. مطالعات فیتوشیمیابی چندانی بر روی آن انجام نشده و تنها ترکیباتی از دسته تانن‌ها در آن شناسایی شده‌اند که این ترکیبات دارای اثرات ضد ویروس [۱۱]، ضد باکتری [۱۲] و ضد سرطان [۱۳] می‌باشند.

براساس این مطالعه مشخص شد که عصاره تام این گیاه حاوی مقادیر زیاد تانن می‌باشد و خاصیت قابض بودن ریزوم گیاه به دلیل تانن فراوان آن است. نتایج ضد میکروبی عصاره تام و فراکسیون‌ها روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی نشان داد که عصاره تام و فراکسیون‌های دی‌کلرومتان، متنال، متنال و آبی روی استافیلوکوکوس اورئوس اثر دارند. این نمونه‌ها روی اشریشیاکلی و فراکسیون اتردوپترول روی



محلول باقیمانده هاله عدم رشد در همین منطقه تشکیل شد که در مورد فراکسیون تانن دار بزرگتر از محلول باقیمانده بود. در نتیجه ماده اصلی مسؤول اثر ضد میکروبی که در فراکسیون اولیه موجود بوده و در فراکسیون تاننی کاملاً تغییر شده، دارای ساختمان مربوط به ترکیبات تاننی می باشد و باقیمانده این مواد در محلول باقیمانده مسؤول اثرات ضد میکروبی جزئی محلول می باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری آقای جمالی فر در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده داروسازی تشکر و قدردانی می شود.

مشخص شد که هر دو موثر هستند و اثر فراکسیون تانن دار بیشتر است.

با مقایسه  $R_f$  لکه های مشاهده شده از دو محلول مذکور روی TLC، احتمال می رود علاوه بر تانن ها که مسؤول اثر ضد میکروبی فراکسیون متانلی هستند، مواد دیگری هم اثر ضد میکروبی داشته باشند که در محلول باقیمانده اثرات خود را اعمال می نمایند.

برای بررسی بیشتر این موضوع کروماتوگرافی با سیستم بوتانل - آب - اسید استیک (۱:۶:۱) روی فراکسیون متانلی، فراکسیون تانن دار و محلول باقیمانده انجام شد و مشخص شد یک لکه مشترک با  $R_f = 0.73$  در هر سه وجود دارد که به دنبال آزمایش بیو اتوگرافی روی فراکسیون تانن دار و

### منابع

1. Zakaria M. Isolation and characterization of active compounds from medicinal plants. *Asia pacific J. Pharmacol.* 1991; 6 (1): 15 - 20.
2. Mitscher LA, Drake S, Gollopudi SR and Okwute SK. A modern look at folkloric use of anti - infective agents. *J. Nat. Prod.* 1987; 50: 1025 – 40.
3. Zargari A. Medicinal Plants. 6st ed. Tehran University Press. Iran. 1997, Vol. II, pp: 134 - 5.
4. Fariborz M, Samsamshariat H and Afsharipoor S. Plant Therapy. Mashal Press. Iran. 1987, pp: 136 - 7.
5. Abutorabi H. Ethnobotany and Phytochemical Studies of Rouin Region Plants. Pharm. D. dissertation No. 4247. Faculty Tehran University of Medical Sciences. 2001, pp: 134 - 5.
6. Monsef HR, Faramarzi MA, Moghimi M. and Shahverdi AR. Essential oil compositions of the roots, rhizomes and the aerial parts of *Geum kokanicum*. 35th International Symposium on Essential Oils. 2004, Messina, Italy.
7. L Panizzi S, Catalano C, Miarelli PLC and Campeol E. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Geum rivale*. *Phytother. Res.* 2000; 14: 561 – 3.
8. Hui D, Shao XC, Manjunatha KR and Hong X. Effect of tannins from *Geum japonicum* on the catalytic activity of thrombin and factor X<sub>a</sub> of blood coagulation cascade. *J. Nat. Prod.* 1998; 61 (11): 1356 – 60.
9. Yoshida T, Okuda T, Memon MU and Shingu T. Tannins of rosaceous medicinal plants Part 2. Gemins A, B and C, new dimeric ellagitannins from *Geum japonicum*. *J. Chem. Sci.* 1985; 1: 315 – 21.
10. Munoz O, Montes M and Wilkomirsky T. Quimicay Farmacología In: Maldonado S. *Plantas Medicinales de uso en Chile*. Editorial Universitaria, S.A. Santiago. Chile. 2004, pp: 129 – 32.
11. Nakashima H, Murakami T, Yamamoto N, Sakagami S, Tanuma SI, Hatano T, Yoshida T and Okuda T. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Research*. 1992; 18: 91 – 103.
12. Chung KT, Lu Z and Chou MW. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chem. Toxicol.* 1998; 36: 1053 – 60.

**13.** Gali-Muhtasib HU, Younes IH, Karchesy JJ and Sabban ME. Plant tannins inhibit the induction of aberrant crypt foci and colonic tumors by 1, 2-

dimethylhydrazine in mice. *Nutr. Can.* 2001; 39: 108 – 16.

