Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 2, Page 352-366 (2024)

DOI:10.22092/ijmapr.2023.363324.3362

Alkaloid profiling and antimicrobial activities of some Papaver species from Kurdistan province, Iran

Sima Mohamadi[1], Bahman Bahramnejad[2*], Mohammad Majdi[3] and Jalal Soltani[4]

1- Ph.D. student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj Iran, E-mail: b.bahramnejad@uok.ac.ir
3- Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
4- Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: August 2023 Revised: October 2023 Accepted: December 2023

Abstract

Background and Objectives: *Papaver* plants from the poppy family are among the famous medicinal plants that have always been the focus of the pharmaceutical and medical industries due to the production of morphine alkaloids and isoquinoline alkaloids with antimicrobial effects. A wide variety of *Papaver* species can be seen in the pastures and mountains of Kurdistan province. In this research, the methanolic extracts prepared from four *Papaver* species were investigated about the amount of morphinan alkaloids produced and the antimicrobial effects on the growth of microorganisms in laboratory conditions.

Methodology: Four *Papver* species including *P. glaucum*, *P. fugax*, *P. argemone*, and *P. bracteatum* were collected twice from their natural habitats in Kurdistan province in spring and were identified based on morphological characteristics under the supervision of a botanist of the province's agricultural and natural resources research center. In order to extract alkaloids, aerial parts, and roots were dried and powdered in the shade. Extracts were prepared by adding methanol and chloroform solvents in a ratio of 1 to 4 to the resulting powders of plants. The amount of morphine, codeine, thebaine, and papaverine alkaloids present in each of the samples was measured separately using high performance liquid chromatography (HPLC). Also, the antimicrobial effects of extracts against Gram-positive bacteria, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* were investigated. The pathogenicity was evaluated by measuring the growth halo, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (MBC), using the tube dilution method.

Results: The production of morphine alkaloids in all of the studied species was confirmed by HPLC. The amount of morphine as the dominant alkaloid among the four studied species varied from 4.21 to 21.33 mg/g dry weight. The highest amount of morphine (21.33 mg/g) was observed in *P. bracteatum* extract and the highest amount of thebaine and codeine (8.67 and 1.8 mg/g) was observed in *P. fugax* extract. The observation of non-growth aura against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacteria confirmed the antimicrobial effects of the investigated plant extracts. The detected amounts of minimum inhibitory concentration against the gram-positive and gram negative bacteria varied from 25 to 100 mg/ml and minimum lethal concentration was just observed against *Escherichia coli*. *P. bracteatum* plant extract showed the highest inhibitory effect against *E. coli* bacteria with a minimum inhibitory concentration of 25 mg/ml and a minimum lethal concentration of 50 mg/ml.

Conclusion: By examining the results, it was found that the studied *Papaver* species produce significant amounts and ranges of morphine alkaloids, which designates these natural species'

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

genetic and medicinal value for further studies. In addition, the extract of these plants showed antimicrobial effects against the reference strains of gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria used in this research. Therefore, it is suggested that more studies be conducted in the field of separation and separation of the metabolites of these plants and the investigation of their antimicrobial effects in subsequent studies to achieve effective and novel antimicrobial compounds and drugs.

Keywords: Alkaloids, *Papaver*, minimum bactericidal concentration, minimum inhibitory concentration, morphinan, HPLC.

بررسی میزان آلکالوییدهای گروه مورفین و اثرهای ضدمیکروبی عصاره‌های گونه‌های مختلف خشخاش (*Papaver*) از رویشگاه‌های طبیعی استان کردستان

سیما محمدی[۱]، بهمن بهمن‌نژاد[۲*]، محمد مجدی[۳] و جلال سلطانی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

پست الکترونیک: b.bahramnejad@uok.ac.ir

۳- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۴- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و اهداف: گیاهان جنس *Papaver* از تیره خشخاش، ازجمله گیاهان دارویی مشهور به‌شمار می‌آیند که به‌دلیل تولید آلکالوییدهای مورفینان و آلکالوییدهای ایزوکینولینی با اثرهای ضدمیکروبی همواره مورد توجه صنایع داروسازی و پزشکی قرار گرفته است. در استان کردستان به‌عنوان یکی از مناطق کوهستانی غرب کشور تنوع زیادی از گیاهان جنس *Papaver* مشاهده می‌شود. در این پژوهش عصاره‌های متانولی تهیه شده از چهار گونه *Papaver* از لحاظ میزان تولید آلکالوییدهای مورفینان و اثرهای ضدمیکروبی بر رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط آزمایشگاهی بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: گونه‌های *Papaver glaucum*، *P. fugax*، *P. argemone* و *P. bracteatum* با دو بار تکرار از رویشگاه‌های طبیعی آنها در استان کردستان در فصل بهار جمع‌آوری شده و زیر نظر گیاه‌شناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان براساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی گردیدند. برای استخراج آلکالوییدها، اندام‌های هوایی و ریشه‌ها در سایه خشک و پودر شدند. با استفاده از پودرهای حاصل و حلال‌های متانول و کلروفرم به نسبت ۱ به ۴، عصاره‌ها تهیه گردیدند. میزان آلکالوییدهای مورفین، کدئین، تبائین و پاپاورین موجود در هر یک از نمونه‌ها به‌صورت مجزا با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) سنجش شد. همچنین اثرهای ضدمیکروبی عصاره‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* و باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* بیماری‌زا به روش سنجش هاله عدم رشد، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، با استفاده از روش رقّت لوله‌ای ارزیابی گردید.

نتایج: تولید آلکالوییدهای مورفینان در گونه‌های مورد بررسی توسط HPLC تأیید شد. میزان مورفین به‌عنوان آلکالوییدِ غالب در بین چهار گونه مورد بررسی از ۴/۲۱ تا ۲۱/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متغیر بود. بیشترین میزان مورفین (۲۱/۳۳ میلی‌گرم بر گرم) در عصاره *P. bracteatum* و بیشترین میزان تبائین و کدئین (۸/۶۷ و ۱/۸ میلی‌گرم بر گرم) در عصاره *P. fugax* مشاهده گردید. مشاهده هاله عدم رشد بر علیه باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* تأییدکننده اثرهای ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی مورد بررسی بود. دامنه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌ها بر علیه باکتری‌های مورد بررسی بین ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود و حداقل غلظت کشندگی فقط بر علیه باکتری *Escherichia coli* مشاهده شد. عصاره گیاه *P. bracteatum* با حداقل غلظت مهارکنندگی ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر علیه باکتری *E. coli* بیشترین اثر مهارکنندگی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که گونه‌های *Papaver* مورد بررسی مقادیر و دامنه قابل‌توجهی از آلکالوییدهای مورفینان را تولید

می‌کنند که ارزش ژنتیکی و دارویی این گونه‌های طبیعی را برای مطالعات بعدی مشخص می‌کند. به‌علاوه اثرهای ضدمیکروبی عصاره‌های این گیاهان بر علیه سویه‌های مرجع باکتری بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی استفاده شده در این پژوهش بیانگر جنبه دیگری از اهمیت متابولیت‌های ثانویه این گیاهان می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری در زمینه تفکیک، جداسازی و شناسایی متابولیت‌های با ارزش گیاهان تیره خشخاش انجام شود و بررسی اثرهای ضدمیکروبی این ترکیبات می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید داروهای ضدمیکروبی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوییدها، *Papaver*، حداقل غلظت کشندگی، حداقل غلظت مهارکنندگی، مورفینان، HPLC.

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه ترکیبات آلی متنوعی هستند که توسط موجودات زیادی ازجمله گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند (Chiocchio *et al.*, 2021). این ترکیبات در رشد و نمو یا تولیدمثل یک ارگانیسم به‌صورت مستقیم شرکت نمی‌کنند بلکه اغلب نقش مهمی را در سیستم دفاعی ایفاء می‌کنند (Hashim *et al.*, 2021). متابولیت‌های ثانویه در صنعت بسیار پرکاربرد هستند و همواره شناسایی ساختار شیمیایی غیرمعمول و عملکردهای متنوع و جدید آنها، هدف اصلی صنعت بهره‌برداری از ترکیبات طبیعی بوده است (Ancheeva *et al.*, 2020).

گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از منابع تجاری مهم، انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه آلکالوییدها، فنولیک‌ها، استروئیدها، لیگنین‌ها، تانن‌ها و فلاوونوییدها را در یک دوره نموی خاص تولید می‌کنند (Petrovska, 2012). مطالعات در زمینه ترکیبات طبیعی در سال ۱۸۰۳، توسط شخصی که برای بار نخست موفق به جداسازی مورفین از گیاه خشخاش شد، آغاز گردید (Butnariu *et al.*, 2022). این رویداد منجر به کشف تعداد فراوانی از داروها از میان محصولات طبیعی سنتز شده توسط گیاهان شد. چون پتانسیل گیاهان برای تولید این مواد در شرایط طبیعی بسیار محدود است، با استفاده از شیوه‌های بیوتکنولوژی ازجمله کشت درون شیشه‌ای، انتقال ژن، مهندسی متابولیک و زراعت مولکولی، تولید آنها در گیاهان افزایش داده شده است (Riaz *et al.*, 2021)، اما هنوز چالش‌های زیادی در مسیر انتخاب متابولیت‌های ثانویه با ارزش تا ارزیابی هویت ژنتیکی گیاهان دارویی، شناسایی مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، بهینه‌سازی شرایط کشت‌های کنترل شده و در نهایت تولید تجاری آنها وجود دارد (Zahra *et al.*, 2019).

گیاه خشخاش مربوط به خانواده Papaveraceae از زمان‌های بسیار قدیم، به‌عنوان منبع تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه، که بیشتر آنها متعلق به گروه آلکالوییدها هستند، مورد توجه بوده است. خانواده Papaveraceae با ۵۰ جنس و نزدیک به ۸۳۰ گونه، دارای گسترش وسیعی در بیشتر اکوسیستم‌های جهان است و بیشتر در نواحی معتدله نیمکره شمالی، جنوب آفریقا و آمریکای جنوبی یافت می‌شود (Butnariu *et al.*, 2022؛ Oh *et al.*, 2018). تاکنون ۲۷ گونه این جنس از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (Shaghaghi *et al.*, 2019). جنس *Papaver* با بیش از ۸۰ گونه بزرگترین و مهمترین جنس خانواده Papaveraceae می‌باشد. تقریباً همه آنها صمغ‌دار و منبع یک یا چند آلکالوییدی هستند که در کل ۱۷۰ نوع آلکالوییدی از ۱۳ گروه آلکالوییدی را شامل می‌شود (Muthukumaran *et al.*, 2019).

آلکالوییدها از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند و در صنعت داروسازی نیز اهمیت فراوانی دارند. آلکالوییدی به ترکیباتی گفته می‌شود که در حلقه هتروسایکلیک حداقل دارای یک اتم نیتروژن است (Deng *et al.*, 2021). آلکالوییدها بسیار متنوع هستند و برحسب خصوصیات بیوشیمیایی در گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند. شش نوع آلکالوییدی مورفین (Morphine)، کدئین (Codeine)، نوسکاپین (Noscapine)، تبائین (Thebaine)، پاپاورین (Papaverin) و نارسئین (Narceine) فراوان‌ترین آنها هستند و در گروه آلکالوییدهای بنزیل ایزوکینولین قرار

می‌گیرند که بر سیستم عصبی انسان تأثیر دارند (Pei *et al.*, 2021). ایزوکینولین‌ها از مشتقات تیروزین هستند که پس از طی واکنش‌هایی به نقطه انشعابی اس-رتیکولین (S-reticuline) می‌رسند که در یک مسیر آلکالوییدهای مؤثر در واکنش‌های دفاعی گیاه و در مسیر دیگر تبائین تولید می‌شود که ماده اولیه برای تولید مورفین و کدئین می‌باشد (Desgagné-Penix & Facchini, 2012). مورفینان‌ها (مورفین، کدئین و تبائین) رده‌ای از آلکالوییدهای ایزوکوئینولین با عملکرد متنوع دارویی هستند (Langlois *et al.*, 2004).

در سال‌های اخیر چندین مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی گسترس یافته است که به‌دلیل استفاده از داروهای ضدمیکروبی تجاری است که عموماً در درمان بیماری های عفونی استفاده می‌شود (Wang *et al.*, 2020). این وضعیت دانشمندان را مجبور به تحقیق و تفحص برای کشف مواد ضدباکتریایی از منابع گوناگون کرده است (Keita *et al.*, 2022). هر چند تاکنون ترکیبات طبیعی بی‌شماری با اثرهای ضدباکتریایی معرفی شده‌اند؛ اما به‌دلیل سمّیت آنها در انسان یا جانوران، فقدان اثر مطلوب و یا هزینه زیاد تولید، اهمیت تجاری نیافته‌اند (Karim *et al.*, 2022). آلکالوییدهای ایزوکوئینولین گروهی از متابولیت‌های ثانویه طبیعی است که توسط گیاهان خانواده Papaveraceae تولید می‌شوند و محققان با استفاده از انواع باکتری‌های بیماری‌زا به اثرهای ضدمیکروبی این آلکالوییدها در عصاره‌های برخی از گونه‌های *Papaver* پی بردند (Bernáth *et al.*, 1988؛ Butnariu *et al.*, 2022). در نتیجه مشخص کردن اثرهای ضدمیکروبی گونه‌های مورد بررسی از خانواده Papaveraceae و کشف پتانسیل این ترکیبات دارویی می‌تواند به غربالگری و شناسایی ترکیبات مؤثر و حل معضل جهانی مقاومت دارویی کمک شایانی بکند.

باتوجه به موارد ذکر شده، در این تحقیق محتوای کلی آلکالوییدهای مورفینان و فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های چهار گونه *Papaver glaucum*، *Papaver fugax*، *Papaver argemone* و *Papaver bracteatum* از رویشگاه‌های طبیعی استان کردستان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این پژوهش به‌دلیل گستردگی دامنه پراکنش رویشی این گیاه در کردستان، مناطق مختلفی از این استان مورد نمونه‌برداری قرار گرفت. نمونه‌برداری در فصل گلدهی انجام شد و هر یک از نمونه‌ها زیر نظر گیاه‌شناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان براساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی گردید و در پاکت‌های مخصوص نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شد (جدول ۱). سپس ریشه‌ها و اندام‌های هوایی (ساقه، برگ، گل و کپسول) هر یک به‌طور جداگانه به‌مدت یک هفته تا ۱۰ روز در سایه خشک و آسیاب شد. گیاهان پودر شده تا زمان آنالیز در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- اطلاعات نمونه‌های گونه‌های مختلف جنس *Papaver* جمع‌آوری شده از برخی مناطق ایران

Table 1. Information on *Papaver* spp. samples gathered from some Iran regions

Species	Origin (City, Province, Country)	Longitude (°-'-'')	Latitude (°-'-'')	HKS herbarium number
Papaver argemone	Sanandaj, Kurdistan, Iran	46°58' 42	35°18' 22	11713
Papaver bracteatum	Divandarreh, Kurdistan, Iran	46°48'47	35°33'57	8931
Papaver fugax	Sanandaj, Kurdistan, Iran	46°58' 42	35°18' 22	6259
Papaver glaucum	Salavat Abad, Kurdistan, Iran	47°07' 24	35°16' 43	10086

HKS herbarium in Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری از نمونه‌ها به روش Facchini و De Luca (۱۹۹۵) با اندکی تغییر انجام شد. بر این اساس، در ابتدا به‌صورت مجزا ۴۰۰ میلی‌گرم از پودر هر یک از اندام‌های مختلف (ریشه، ساقه، برگ، گل و کپسول) مربوط به هر یک از چهار گونه *Papaver* با هم مخلوط شد. آنگاه ۲ گرم از پودر حاصل با حلال استخراجی، شامل ۲۰ میلی‌لیتر متانول و ۸۰ میلی‌لیتر کلروفرم ترکیب شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. سپس به‌مدت ۱۰ روز در مکانی تاریک بر روی شیکر قرار گرفت. در مرحله بعد به کمک ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم کل محتویات ارلن از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده، در یک بالن ۲۰۰ میلی‌لیتری به دستگاه روتاری متصل شد تا حلال‌های آن تبخیر و خارج شود. رسوب حاصل، در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

سنجش میزان آلکالوییدها

پودر عصاره حاصل از هر گونه گیاهی در ۵ میلی‌لیتر متانول ویژه HPLC حل گردید و برای انحلال کامل در متانول، به‌مدت چند دقیقه در اولتراسونیک قرار داده شد. به این ترتیب عصاره چهار گونه *P. glaucum*، *P. fugax*، *P. argemone* و *P .bracteatum* برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شد.

برای اندازه‌گیری کمّی آلکالوییدها، ابتدا غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از استانداردهای هر یک از آلکالوییدهای مورفین، کدئین، پاپاورین و تبائین (خریداری شده از شرکت Aldrich-Sigma آمریکا) در متانول تهیه شد و هر یک در ۳ تکرار به دستگاه HPLC تزریق و سطح زیر منحنی در مقابل مقدار تزریق ترسیم شد و سیستم در گستره غلظت نمونه‌های استاندارد تنظیم شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های عصاره‌گیری شده، به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام آنها ثبت شد.

ارزیابی خواص ضدباکتریایی

برای بررسی اثرهای ضدمیکروبی، ۶ باکتری از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری گردید (جدول ۲). ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش کشت خطی از هر باکتری بر روی محیط جامد مولر هینتون آگار (Mueller hinton agar) (ساخت شرکت Merck آلمان) انجام شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس با استفاده کلونی‌های حاصل از کشت بر روی این محیط، سوسپانسیونی از هر باکتری با غلظتی معادل نیم مک‌فارلند (میزان کدورت این محلول برابر $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی (Colony Forming Units: CFU) باکتری است) در محیط کشت نوترینت براث (NB) (ساخت شرکت Merck آلمان) تهیه گردید. تمام آزمایش‌های ارزیابی خواص ضدباکتریایی در ۳ تکرار انجام شد.

روش انتشار دیسک

۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استاندارد باکتری‌ها به‌طور کامل روی محیط کشت مولر هینتون آگار پخش شد. سپس دیسک‌های کاغذی بلانک یا دیسک خام آنتی‌بیوگرام (ساخت شرکت پادتن طب ایران) در شرایط استریل بر سطح آگار آلوده به باکتری قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌ها با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دیسک‌های سترون با قطر ۶ میلی‌متر اضافه شد. از کشت بدون دیسک به‌عنوان کنترل استفاده شد. پلیت‌های حاوی باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. قطر هاله‌های تشکیل شده در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و برحسب میلی‌متر گزارش شد (Barry *et al.*, 1979).

جدول ۲- باکتری‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 2. Bacteria used in the present study

Species	Standard number	Reaction GRAM
Bacillus subtilis	PTCC1159	Gram-positive
Escherichia coli	PTCC1399	Gram-negative
Pseudomonas aeruginosa	PTCC1181	Gram-negative
Salmonella typhi	PTCC1609	Gram-negative
Staphylococcus aureus	PTCC118	Gram-positive
Streptococcus pyogenes	PTCC1447	Gram-positive

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC)

به‌منظور بررسی حداقل غلظتی که در آن هیچ کدورتی ناشی از رشد باکتری وجود ندارد حداکثر غلظت برای عصاره‌ها برابر ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد و بعد به‌ترتیب از این رقّت چهار رقّت سریالی که شامل ۵۰، ۲۵، ۱۵، ۵ (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه گردید. از محیط نوترینت براث ۹۵ میکرولیتر داخل هر یک از ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد و بعد به خانه‌های ردیف اول ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره اضافه شد و به‌ترتیب سایر رقّت‌های عصاره‌ها به خانه‌های ردیف‌های بعدی میکروپلیت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. در نهایت ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند به خانه‌های هر ستون اضافه گردید و آخرین خانه هر ردیف به‌عنوان کنترل منفی شامل ۹۵ میکرولیتر محیط نوترینت براث بدون عصاره و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به‌عنوان کنترل مثبت بود. سپس میکروپلیت به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از انکوباسیون، با بررسی کدورت حاصل از رشد باکتری، حداقل غلظتی که در آن هیچ کدورتی ناشی از رشد باکتری وجود نداشت به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد (Sokmen *et al.*, 1999).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MBC)

در مرحله بعدی برای سنجش MBC، ۵ میکرولیتر از خانه‌هایی که در آنها کدورتی ناشی از رشد باکتری مشاهده نشده بود و به‌عنوان MIC گزارش شدند در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترین آگار کشت داده شد و کلیه پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان پلیت‌ها از نظر رشد باکتری ارزیابی شدند. حداقل غلظتی که در آن هیچ باکتری بر روی پلیت رشد نکرده بود به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (Celiktas *et al.*, 2007).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS var 9.4 و ترسیم نمودارها با استفاده از Excel انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی میزان مورفین، کدئین، تبائین و پاپاورین با محاسبه سطح زیر منحنی‌های HPLC و مقایسه آنها با منحنی‌های استاندارد برای هر نمونه بدست آمد. مقادیر آلکالوییدها در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- میزان آلکالوئیدهای عصاره متانولی-کلروفرمی حاصل از ترکیب بخش‌های مختلف گیاهی خشک (ریشه + ساقه + برگ + گل + کپسول) چهار گونه ***Papaver***

Table 3. Alkaloids content of methanol-chloroform extracts obtained from combined different dry plant parts (root + stem + leaf + flower + capsule) of four *Papaver* species

***Papaver* species**	**Morphine**	**Codeine**	**Papaverine**	**Thebaine**
	mg.g^{-1} DW			
P. argemone	4.28	0.16	-	0.06
P. bracteatum	21.33	1.49	0.80	0.72
P. fugax	10.41	1.80	1.26	8.67
P. glaucum	6.09	-	1.67	-

اولین نکته مورد توجه در نتایج بدست آمده، حضور هر چهار نوع آلکالوییید مورد بررسی در دو گونه *P. bracteatum* و *P. fugax* است. این دو گونه گیاهی در نتایج بدست آمده از جهات دیگری نیز مورد توجه قرار گرفتند، زیرا عصاره گونه *P. bracteatum* بیشترین میزان مورفین (۲۱/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و عصاره گونه *P. fugax* بیشترین میزان تبائین و کدئین (۸/۶۷ و ۱/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را نشان دادند. به‌طور کلی در بین آلکالوییدهای اندازه‌گیری شده، مورفین از لحاظ کمّیت در درجه اول قرار گرفته است و در هر چهار گونه مقادیر متفاوتی از آن در بازه ۴/۲۱ تا ۲۱/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده گردید. عصاره گیاه *P. argemone* کمترین میزان تبائین، کدئین و مورفین را در مقایسه با سایر گیاهان مورد بررسی نشان داد. در کروماتوگرام‌های حاصل از نتایج HPLC (شکل ۱) و جدول مقایسه میزان آلکالوییدهای مورفینان در عصاره‌های چهار گونه *Papaver*، برتری عصاره گونه *P. bracteatam* با بیشترین میزان مورفین اندازه‌گیری‌شده ۲۱/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به‌خوبی قابل مشاهده است.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

در مرحله اول فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های تهیه شده از هر چهار گونه *Papaver* از طریق ارزیابی هاله بازدارندگی از رشد باکتری *P. aeruginosa* تأیید شد (شکل ۲).

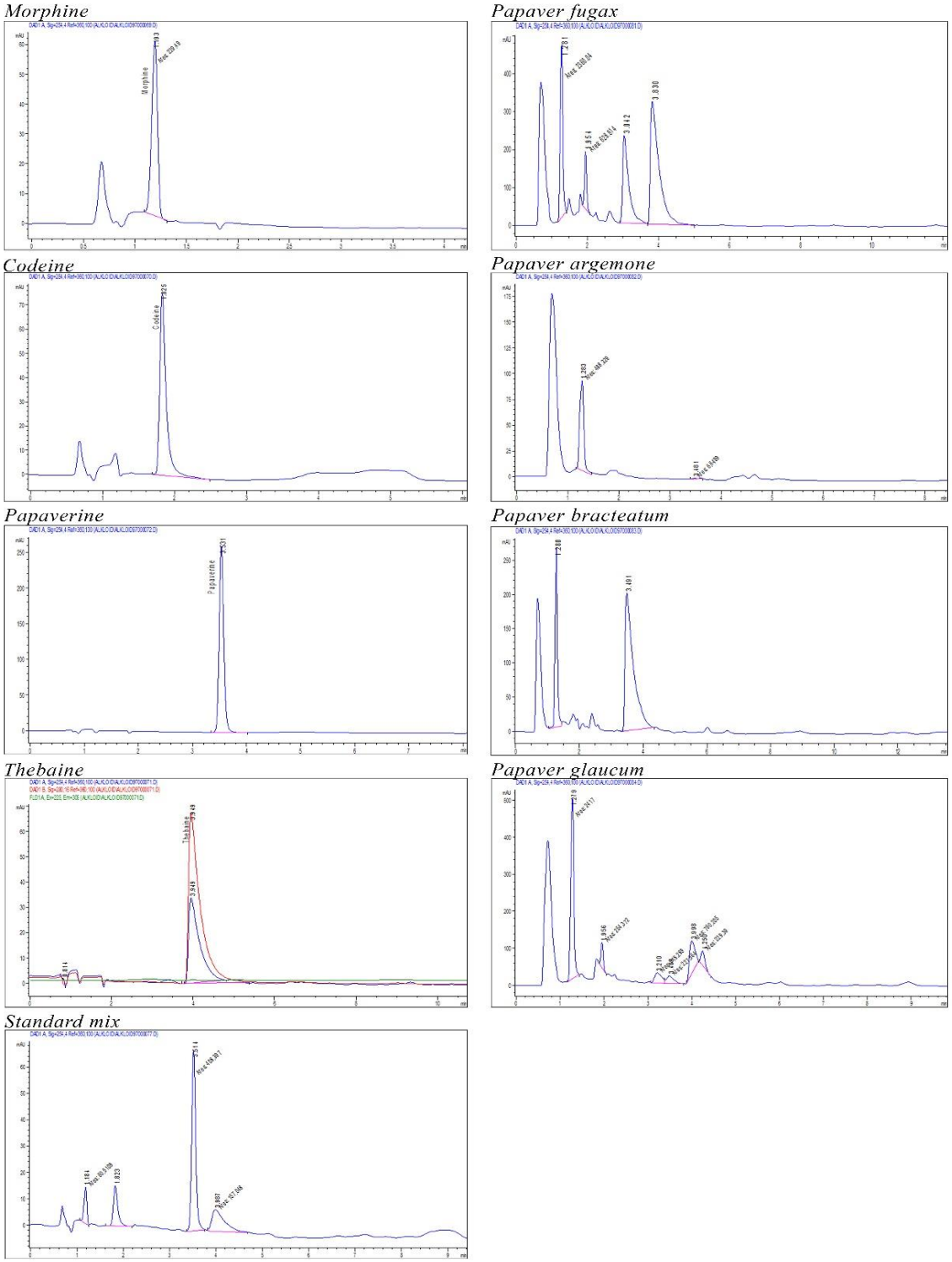
جدول ۴ نشان می‌دهد که در نتایج حاصل از انجام این آزمایش اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان بازدارندگی از رشد بین تیمارها و نمونه کنترل وجود دارد و میزان بازدارندگی از رشد تیمارهای مختلف متفاوت است.

هاله بازدارندگی از رشد باکتری *P. aeruginosa* (گرم منفی) تحت تأثیر هر چهار عصاره مورد بررسی مشاهده شد. بیشترین و کمترین قطر بازدارندگی از رشد به‌ترتیب ۱۵/۶ و ۱۱/۲۳ میلی‌متر مربوط به تأثیر تیمار با عصاره‌های *P. bracteatam* و *P. fugax* است (شکل ۳).

نتایج متفاوتی در مورد باکتری *S. aureus* به‌عنوان یک باکتری گرم مثبت مشاهده شد و هاله بازدارندگی از رشد تنها در اطراف دیسک حاوی عصاره *P. glaucum* و *P. argemone* به میزان ۷/۶۳ و ۶/۴ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (شکل ۴). به‌طور کلی در این بررسی باکتری *P. aeruginosa* حساسیت بیشتری در مقابل عصاره‌های آزمون شده نشان داد.

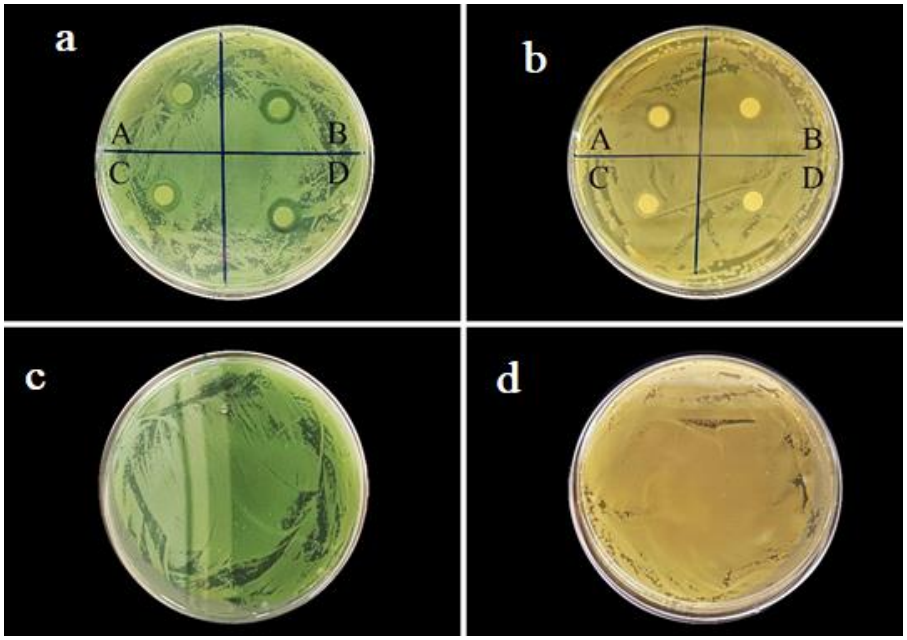
در ارزیابی خواص ضد باکتریایی عصاره‌ها به روش رقّت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها بررسی شد (جدول ۵). مشابه نتایج بدست آمده از آزمایش‌های قبلی، عصاره گونه *P. bracteatam* در مقایسه با سایر گونه‌های *Papaver* خواص ضدباکتریایی با حداقل غلظت بازدارندگی ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشتری را نشان داد و در مقابل عصاره *P. fugax* فقط در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر علیه دو باکتری گرم منفی اثر بازدارندگی داشت. یافته‌های حاصل نشان می‌دهد که عصاره‌های دو گونه *P. glaucum* و *P. bracteatam* خاصیت ضدباکتریایی قابل‌توجهی دارند و سبب مهار رشد همه

باکتری‌های مورد بررسی شدند. عصاره *P. bracteatam* در غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کشندگی بر روی باکتری *E. coli* داشت و این گونه با پتانسیل بالای تولید مواد ضد باکتریایی مورد توجه قرار گرفت.



شکل ۱- نمودار کروماتوگراف استانداردهای مورد استفاده و آلکالوئیدهای مختلف در چهار گونه ***Papaver***

Figure 1. Chromatograph diagram of used standards and different alkaloids in four *Papaver* species



شکل ۲- اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی-کلروفرمی حاصل از ترکیب بخش‌های مختلف گیاهی خشک (ریشه + ساقه + برگ + گل + کپسول) چهار گونه ***Papaver*** از طریق هاله بازدارندگی از رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (**a**) و استافیلوکوکوس اورئوس (**b**)؛ **c** و **d**: محیط رشد فاقد عصاره

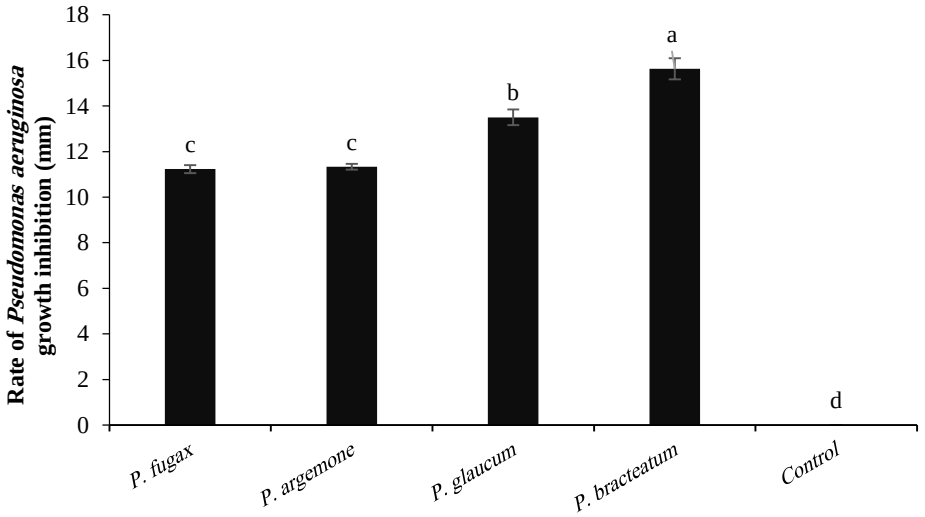
Figure 2. Antibacterial effects of methanol-chloroform extracts obtained from combined different dry plant parts (root + stem + leaf + flower + capsule) of four *Papaver* species through growth inhibition halo of *Pseudomonas aeruginosa* (a) and *Staphylococcus aureus* (b); c and d: growth medium without extract
On petri dishes: *Papaver glaucum* (D), *P. argemone* (C), *P. bracteatum* (B), *P. fugax* (A)

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات ضدباکتریایی عصاره متانولی-کلروفرمی حاصل از ترکیب بخش‌های مختلف گیاهی خشک (ریشه + ساقه + برگ + گل + کپسول) چهار گونه ***Papaver*** از طریق هاله بازدارندگی از رشد باکتری

Table 4. ANOVA of antibacterial effects of methanol-chloroform extracts obtained from combined different dry plant parts (root + stem + leaf + flower + capsule) of four *Papaver* species through bacterium growth inhibition halo

S.O.V.	d.f.	M.S.	
		Rate of *Staphylococcus aureus* growth inhibition	Rate of *Pseudomonas aeruginosa* growth inhibition
Papaver species	4	44.8806**	110.029**
Experimental error	10	0.0526	0.230
C.V. (%)	-	8.176	4.638

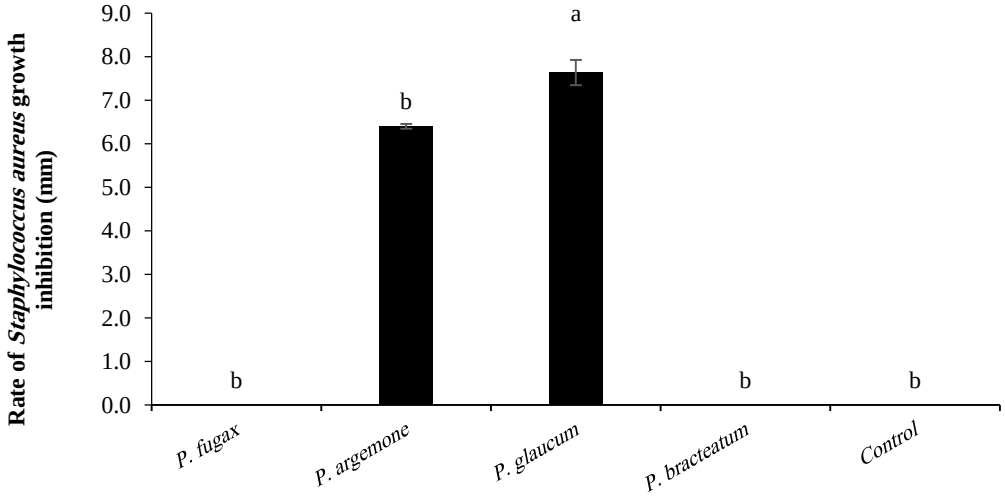
**: significant at 1% probability level



شکل ۳- فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی-کلروفرمی حاصل از ترکیب بخش‌های مختلف گیاهی خشک (ریشه + ساقه + برگ + گل + کپسول) چهار گونه ***Papaver*** علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا

Figure 3. Antibacterial activity of methanol-chloroform extracts obtained from combined different dry plant parts (root + stem + leaf + flower + capsule) of four *Papaver* species against *Pseudomonas aeruginosa*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).
Control: without extract



شکل ۴- فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی-کلروفرمی حاصل از ترکیب بخش‌های مختلف گیاهی خشک (ریشه + ساقه + برگ + گل + کپسول) چهار گونه ***Papaver*** علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

Figure 4. Antibacterial activity of methanol-chloroform extracts obtained from combined different dry plant parts (root + stem + leaf + flower + capsule) of four *Papaver* species against *Staphylococcus aureus*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).
Control: without extract

جدول ۵- مقادیرMIC و MBC عصاره متانولی-کلروفرمی حاصل از ترکیب بخش‌های مختلف گیاهی خشک (ریشه + ساقه + برگ + گل + کپسول) چهار گونه ***Papaver*** در روش رقّت لوله‌ای روی باکتری‌های هدف

Table 5. MIC and MBC values of methanol-chloroform extracts obtained from combined different dry plant parts (root + stem + leaf + flower + capsule) of four *Papaver* species in tube dilution method on target bacteria

Bacterium	*P. argemone*		*P. bracteatum*		*P. fugax*		*P. glaucum*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	mg ml^{-1}		mg ml^{-1}		mg ml^{-1}		mg ml^{-1}	
Bacillus subtilis	100	-	50	-	-	-	100	-
Escherichia coli	100	-	25	50	100	-	50	-
Pseudomonas aeruginosa	100	-	50	-	100	-	100	-
Salmonella typhi	−	-	100	-	-	-	50	-
Staphylococcus aureus	100	-	100	-	-	-	100	-
Streptococcus pyogenes	−	-	50	-	100	-	100	-

MIC: Minimum inhibitory concentration, MBC: Minimum bactericidal concentration

بحث

به‌طور قطع شناسایی و بررسی ترکیبات تولید شده توسط گیاهان دارویی یکی از مهمترین مراحل مطالعه آنها می‌باشد. در این پژوهش میزان قابل‌توجهی از مورفین در عصاره هر چهار گیاه اندازه‌گیری شده است، در حالی‌که در مطالعات انجام شده در رابطه با بررسی حضور آلکالوییدهای مورفینان در ۱۶ گونه مختلف گیاه *Papaver* مربوط به نقاط مختلف ایران، حضور مورفین در بسیاری از گونه‌های مورد بررسی تأیید نگردید و بیشترین میزان مورفین اندازه‌گیری شده ۰/۴۸ میلی‌گرم بر گرم بود (Shaghaghi *et al.*, 2019). همچنین در مطالعات دیگری در زمینه سنجش میزان آلکالوییدها در چهار گونه *Papaver* مربوط به استان تهران و کردستان، در عصاره کپسول گیاه *P. fugax* هیچ مقداری از مورفین شناسایی نشد و بیشترین میزان مورفین اندازه‌گیری شده (۰/۹۸ میلی‌گرم بر گرم) به عصاره کپسول *P. glaucum* مربوط می‌شد (Salehi *et al.*, 2007). با وجود اینکه در این تحقیق نیز دو گونه ذکر شده از نقاط متفاوتی از استان کردستان جمع‌آوری شدند ولی در عصاره حاصل از تمام اندام‌های *P. fugax* و *P. glaucum* به‌ترتیب ۱۰/۴۱ و ۶/۰۹ مورفین برحسب میلی‌گرم بر گرم اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این مطالعه فقط از لحاظ میزان مورفین اندازه‌گیری شده قابل‌توجه نمی‌باشد بلکه در تحقیقاتی که بر روی ۱۵ گیاه برگزیده از گونه *P. somniferam* انجام شد میانگین مورفین، کدئین، پاپاورین و تبائین در مراحل مختلف رشد به‌ترتیب ۶/۶۴، ۰/۷۶، ۰/۱۹ و ۱/۴۳ میلی‌گرم بر گرم بود (Stranska *et al.*, 2013)؛ به‌طوری که با داده‌های بدست آمده از این پژوهش مطابقت دارد و اهمیت تحقیق و بررسی بیشتر در مورد گونه‌های مختلف این گیاه را در استان کردستان به‌خوبی نشان می‌دهد. پژوهشگران تأثیر مهم عوامل اقلیمی را بر تجمع آلکالوییدهای مورفینان و بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی آنها تأیید کرده‌اند (Bernáth *et al.*, 1988). براساس یافته‌های پیشین بیشترین تجمع آلکالوییدهای مورد بررسی در گیاهان این جنس در مرحله گلدهی است (Omidi *et al.*, 2012). به همین منظور در این پژوهش نمونه‌برداری در فصل گلدهی انجام شد. بدون شک، بررسی گونه‌های مختلف این گیاه در زیستگاه‌های مختلف در فصل گلدهی منجر به شناسایی گونه‌های با

پتانسیل بالا به‌عنوان منبع غنی‌تر و بهتر برای استخراج این ترکیبات محسوب می‌شود.

نکته قابل‌توجه دیگر در نتایج این بررسی، تفاوت میزان مورفین با میزان سایر آلکالوییدهای دیگر در عصاره‌های این گیاهان می‌باشد. تحقیقاتی که تاکنون به‌منظور شناسایی مسیر بیوسنتزی مورفین انجام شده است علت این موضوع را به‌خوبی تفسیر می‌کند. مشخص شده است که تبائین یکی از ترکیبات ناپایدار و میانی مسیر سنتز این آلکالوییدها می‌باشد که در طی مراحل مختلف رشدی به کدئین و مورفین که ترکیبات پایدارتری هستند تبدیل می‌گردد. با این حال، به‌دلیل تجمع مورفین در مرحله گلدهی میزان کدئین کاهش می‌یابد و به همین دلیل در گذشته مورفین محصول نهایی این مسیر محسوب می‌شد (Singh *et al.*, 2019). بنابراین احتمالاً تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای که در میزان آلکالوییدهای استخراج شده از هر یک از چهار گونه مورد بررسی مشاهده می‌گردد، از این مسئله ناشی می‌شود.

اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی بر رشد میکروب‌های بیماری‌زا و به‌ویژه باکتری‌های گرم منفی جالب و درخور توجه هستند. بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های چهار گونه *P. glaucum*، *P. fugax*، *P. argemone* و *P. bracteatum* تأییدکننده نتایج بررسی‌های گذشته در زمینه خواص ضدمیکروبی آلکالوییدهای گیاهان خانواده *Papaveraceae* می‌باشد (Butnariu *et al.*, 2022). آلکالوییدها عمدتاً با تخریب دیواره سلولی، تغییر ساختار مولکولی DNA و مهار رونویسی فعالیت ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کنند (Raji *et al.*, 2019؛ Gaber *et al.*, 2020). از بین چهار گونه مورد بررسی، در این مطالعه *P. glaucum* و *P. bracteatum* در هر دو شیوه سنجش قطر هاله مهار رشد و حداقل غلظت بازدارندگی بیشترین اثر مهارکنندگی را بر باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند که مطابق با نتایج پیشین، نتایج حکایت از برتری عصاره گونه *P. bracteatum* با بیشترین میزان مورفین اندازه‌گیری شده با اثر مهاری و کشندگی بر علیه باکتری‌های مورد بررسی دارد (Chalabian *et al.*, 2010). اثر بازدارندگی عصاره‌های بررسی شده بر باکتری *P. aeruginosa* به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای رایج و مقاوم به دارو مشهود است و قبلاً نیز اثر بازدارندگی آلکالوییدهای استخراج شده از گیاه*P. glaucum* جمع‌آوری شده از شمال عراق بر رشد این باکتری با غلظت ۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثبات شده است (Jafaar *et al.*, 2021). تاکنون عملکرد ضدمیکروبی آلکالوییدهای تولید شده توسط برخی از گیاهان خانواده *Papaveraceae* توسط محققان مختلفی مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (Çoban *et al.*, 2017؛ Raji *et al.*, 2019؛ Hmamou *et al.*, 2022)، اما مطالعات اندکی در این زمینه در مورد گیاهان جنس *Papaver* موجود در ایران انجام شده است.

از آنجایی که در حال حاضر استفاده مستقیم از گیاهان اصلی‌ترین منبع در دسترس برای تولید آلکالوییدهای با ارزش به‌شمار می‌رود (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018)، شناسایی و مطالعه گیاهانی از این جنس که مقادیر بیشتری از این ترکیبات دارویی را در خود تولید می‌کنند هم از لحاظ صرف‌جویی اقتصادی و هم از جهت رسیدن به درک بیشتری از مسیر بیوسنتزی این ترکیبات، دارای اهمیت می‌باشد. تحقیق انجام شده به‌عنوان یک گام مؤثر در زمینه شناسایی گونه‌های مستعد و یافتن راهبردهای هدف‌دار برای افزایش تولید آلکالوییدهای مورفینان به‌شمار می‌رود. همچنین با شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان و مشکلات بالینی زیادی که به همراه دارد، شناخت جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک در ترکیبات تولید شده توسط گیاهان این جنس امری ضروریست.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از جناب آقای مهندس حسین معروفی و جناب آقای دکتر عرفان شاهمنصوری، به‌دلیل کمک در جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌های گیاهی برای انجام این پژوهش ابراز می‌دارند.

References

- Ancheeva, E., Daletos, G. and Proksch, P., 2020. Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi. Current Medicinal Chemistry, 27(11): 1836-1854.
- Barry, A.L., Coyle, M.B., Thornsberry, C., Gerlach, E.H. and Hawkinson, R.W., 1979. Methods of Measuring Zones of Inhibition with the Bauer-Kirby Disk Susceptibility Test. Journal of Clinical Microbiology, 10(6): 885-889.
- Bernáth, J., Dános, B., Veres, T., Szantó, J. and Tétényi, P., 1988. Variation in Alkaloid Production in Poppy Ecotypes: Responses to Different Environments. Biochemical Systematics and Ecology, 16(2): 171-178.
- Butnariu, M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Pentea, M., Sarac, I., Küşümler, A.S., Özçelik, B., Painuli, S., Semwal, P., Imran, M., Gondal, T.A., Emamzadeh-Yazdi, S., Lapava, N., Yousaf, Z., Kumar, M., Eid, A.H., Al-Dhaheri, Y., Suleria, H.A.R., del Mar Contreras, M., Sharifi-Rad, J. and Cho, W.C., 2022. Papaver Plants: Current Insights on Phytochemical and Nutritional Composition Along with Biotechnological Applications. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022, 2041769
- Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T. and Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial Activities of Methanol Extracts and Essential Oils of *Rosmarinus officinalis*, Depending on Location and Seasonal Variations. Food Chemistry, 100(2): 553-559.
- Chalabian, F., Sharifnia, F. and Katouzian, F., 2010. Study Antimicrobial Effects of Methanolic Extracts of Six Iranian Papaver Spices on Some Bacteria. Journal of Sciences Islamic Azad University (JSIAU), 19(74/1): 41-60.
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L. and Poli, F., 2021. Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy. Molecules, 26(2): 495.
- Çoban, İ., Toplan, G.G., Özbek, B., Gürer, Ç.U. and Sarıyar, G., 2017. Variation of Alkaloid Contents and Antimicrobial Activities of Papaver Rhoeas l. Growing in Turkey and Northern Cyprus. Pharmaceutical Biology, 55(1): 1894-1898.
- Deng, A.P., Zhang, Y., Zhou, L., Kang, C.Z., Lv, C.G., Kang, L.P., Nan, T.G., Zhan, Z.L., Guo, L.P. and Huang, L.Q., 2021. Systematic Review of the Alkaloid Constituents in Several Important Medicinal Plants of the Genus Corydalis. Phytochemistry, 183: 112624.
- Desgagné-Penix, I. and Facchini, P.J., 2012. Systematic Silencing of Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthetic Genes Reveals the Major Route to Papaverine in Opium Poppy. Plant Journal, 72(2): 331-344.
- Facchini, P.J. and De Luca, V., 1995. Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase Genes and the Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in Opium Poppy. Plant Cell, 7(11): 1811-1821.
- Gaber, A., Alsanie, W.F., Kumar, D.N., Refat, M.S. and Saied, E.M., 2020. Novel Papaverine Metal Complexes with Potential Anticancer Activities. Molecules, 25(22): 5447.
- Hashim, M., Ahmad, B., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B.H. and Anjum, S., 2021. Comparative Effects of Different Light Sources on the Production of Key Secondary Metabolites in Plants in Vitro Cultures. Plants, 10(8):.
- Hmamou, A., Eloutassi, N., Alshawwa, S.Z., Al Kamaly, O., Kara, M., Bendaoud, A., El-Assri, E.M., Tlemcani, S., El Khomsi, M. and Lahkimi, A., 2022. Total Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Papaver Rhoeas* L. Organ Extracts Growing in Taounate Region, Morocco. Molecules, 27(3): 854.
- Jafaar, H.J., Isbilen, O., Volkan, E. and Sariyar, G., 2021. Alkaloid Profiling and Antimicrobial Activities of *Papaver Glaucum* and *P. Decaisnei*. BMC Research Notes, 14(1): 348.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z. and Amini-Khoei, H., 2018. Medicinal Plants: Past History and Future Perspective. Journal of HerbMed Pharmacology, 7(1): 1-7.
- Karim, M.B., Kanaya, S. and Altaf-Ul-Amin, M., 2022. Antibacterial Activity Prediction of Plant Secondary Metabolites Based on a Combined Approach of Graph Clustering and Deep Neural Network. Molecular Informatics, 41(7): 2100247.
- Keita, K., Darkoh, C. and Okafor, F., 2022. Secondary Plant Metabolites as Potent Drug Candidates against Antimicrobial-Resistant Pathogens. SN Applied Sciences, 4(8): 209.
- Langlois, A., Mulholland, D.A., Crouch, N.R. and Grace, O.M., 2004. Aporphine Alkaloid from *Papaver Aculeatum* (Sect. *Horrida*; Papaveraceae) of Southern Africa. Biochemical Systematics and Ecology, 32(11): 1087-1090.
- Muthukumaran, P., Kumaravel, S. and Nimia, N., 2019. Phytochemical, GC-MS and FT-IR Analysis of *Papaver Somniferum* L. Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences, 7(1): 1-8.
- Oh, J., Shin, Y., Ha, I.J., Lee, M.Y., Lee, S.G., Kang, B.C., Kyeong, D. and Kim, D., 2018. Transcriptome Profiling of Two Ornamental and Medicinal Papaver Herbs. International Journal of Molecular Sciences, 19(10): 3192.
- Omidi, M., Koohzadi, F., Solouki, M., Taghizad Farid, R. and Alizadeh, H., 2012. Comparison of Morphinan Alkaloids during Different Stages of

Growth in the Medicinal Plant Opium Poppy (*Papaver Somniferum* L.). Journal of Medicinal Plants, 11(44): 140-148.
- Pei, L., Wang, B., Ye, J., Hu, X., Fu, L., Li, K., Ni, Z., Wang, Z., Wei, Y., Shi, L., Zhang, Y., Bai, X., Jiang, M., Wang, S., Ma, C., Li, S., Liu, K., Li, W. and Cong, B., 2021. Genome and Transcriptome of *Papaver Somniferum* Chinese Landrace CHM Indicates That Massive Genome Expansion Contributes to High Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis. Horticulture Research, 8(5): 1-13.
- Petrovska, B.B., 2012. Historical Review of Medicinal Plants' Usage. Pharmacognosy Reviews, 6(11): 1-5.
- Raji, P., Samrot, A.V., Keerthana, D. and Karishma, S., 2019. Antibacterial Activity of Alkaloids, Flavonoids, Saponins and Tannins Mediated Green Synthesised Silver Nanoparticles Against Pseudomonas Aeruginosa and Bacillus Subtilis. Journal of Cluster Science, 30: 881-895.
- Riaz, U., Iqbal, S., Sohail, M.I., Samreen, T., Ashraf, M., Akmal, F., Siddiqui, A., Ahmad, I., Naveed, M., Khan, N.I. and Akhter, R.M., 2021. A Comprehensive Review on Emerging Importance and Economical Potential of Medicinal and Aromatic Plants (MAPs) in Current Scenario. Pakistan Journal of Agricultural Research, 34(2): 381-392.
- Salehi, P., Sonboli, A., Zavareh, A.F., Sefidkon, F., Dayeni, M. and Cheraghi, B., 2007. Narcotic Alkaloids of Four Papaver Species from Iran. Zeitschrift Fur Naturforschung- Section C Journal of Biosciences, 62(1-2): 16-18.
- Shaghaghi, A., Alirezalu, A., Nazarianpour, E., Sonboli, A. and Nejad-Ebrahimi, S., 2019. Opioid Alkaloids Profiling and Antioxidant Capacity of Papaver Species from Iran. Industrial Crops and Products, 142: 111870.
- Singh, A., Menéndez-Perdomo, I.M. and Facchini, P.J., 2019. Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis in Opium Poppy: An Update. Phytochemistry Reviews, 18: 1457-1482.
- Sokmen, A., Jones, B.M. and Erturk, M., 1999. The in Vitro Antibacterial Activity of Turkish Medicinal Plants. Journal of Ethnopharmacology, 67(1): 79-86.
- Stranska, I., Skalicky, M., Novak, J., Matyasova, E. and Hejnak, V., 2013. Analysis of Selected Poppy (*Papaver Somniferum* L.) Cultivars: Pharmaceutically Important Alkaloids. Industrial Crops and Products, 41(1): 120-126.
- Wang, J., Chu, L., Wojnárovits, L. and Takács, E., 2020. Occurrence and Fate of Antibiotics, Antibiotic Resistant Genes (ARGs) and Antibiotic Resistant Bacteria (ARB) in Municipal Wastewater Treatment Plant: An Overview. Science of the Total Environment, 744.
- Zahra, W., Rai, S.N., Birla, H., Singh, S., Rathore, A.S., Dilnashin, H., Keswani, C. and Singh, S.P., 2019. Economic Importance of Medicinal Plants in Asian Countries. 359-377, In: Keswani, C., (ed.), Bioeconomy for Sustainable Development, Springer Nature Singapore , 388p.