بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره‌های الکلی و هیدروالکلی گیاه شیرسگ (Euphorbia Helioscopia L.) از منطقه قم

طاهره نصیری جهرودی، غلامرضا نجفی* ، زهرا حاجی آقاجانی

گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

چکیده: ساقه گیاه فرفیون هلیوسکوپیا (Ephorbia helioscopia L.) در بهار ۱۳۹۲ از روستای طینوج واقع دراستان قم جمع آوری شد. عصاره گیری بر روی گیاه Ephorbia helioscopia L. با حلال های مختلف و با استفاده از دستگاه سوکسله و همچنین روش خیساندن انجام شد. عصاره گیری توسط حلال های متانول- اتانول- هگزان- آب مقطر و اتانول و آب صورت گرفت. در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی عصاره های گیاهی موردنظر در مقابل ۴ باکتری و ۱ نوع قارچ اندازه گیری می شود که عبارتند از: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ ، اشرشیاکلی ATTCC۲۵۹۲۲ کاندیدا البیکنس ATCC۱۰۲۳۱، سالمونلاتیفی۴ ATCC ۱۹۴۳۰ سودموناس آئروژینوز۵ ATCC۲۷۸۵۳ . فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی برای عصاره های استخراج شده بوسیله روش انتشار چاهک در سطح محیط کشت مولرهینتون ارزیابی می شود.وهمچین با استفاده از روش لوله ای حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره ها تعیین شد.

با توجه به پژوهش انجام شده میتوان نتیجه گرفت عصاره های ساقه گیاه Ephorbia helioscopia L. فعالیت ضد میکروبی نسبتا"بالایی دارد.

کلید واژه: شیرسگ، ضد میکروبی، عصاره

مقدمه : خانواده فرفیون (Euphorbiaceae) خانواده بزرگی از گیاهان می‌باشند که شامل ۳۰۰ جنس و بیش از۸۰۰ گونه تشکیل شده است[۱]. فرفیون، گیاهی است یکساله از خانواده Euphorbiaceae که ساقه‌های آن متعدد و بلند و راست است که از طریق بذر تکثیر می‌یابند؛ گیاه دولپه می‌باشد. طول ساقه ۱۵ تا ۵۰ سانتی‌متر و رنگ آن سبز تیره است. برگ‌های متناوب و با آرایش مارپیچی روی ساقه قرار گرفته‌اند، یکی از علف‌های هرز محسوب می‌شود. از خصوصیات دیگر این گیاه، داشتن لاتکس یا شیرابه در ساقه و رگبرگ‌های آن است که بسیار سمی می‌باشد. گیاه فرفیون در فصل سرما بخش هوایی خشک، و از بین رفته و در شروع فصل بعد از محل ریشه گیاه فرفیون جدید رشد می‌نماید. گل دهی گیاه از اواسط بهار تا اواخر تابستان به طول می‌انجامد. حدود ۱۰۰ گونه از جنس افوربیا در سرتاسر ایران گسترش دارند. گیاه Euphorbia helioscopia L. بعنوان گیاه دارویی در نظر گرفته شده است و در بعضی از کشورهای مختلف در سراسر جهان بعنوان دارو مورد استفاده قرار گرفته است[۴-۲].

تعداد زیادی از مواد موثره متابولیت‌های ثانویه گیاه .Euphorbia helioscopia L شامل: تری ترپنوئیدها، دی‌ترپنویئدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها و چربی گزارش داده شده است[۷-۵]. گونه جنس فرفیون دارای مقادیر زیادی گلوکوزید سیانوژیک است. همچنین از شیره گیاه E.helioscopiao دو اسید آمینه به نام متاهیدروکسی فنیل گلیسین و ۳ و ۵- دی هیدروکسی فنیل گلیسین جدا شده‌اند[۸]. مواد تشکیل دهنده فعال برای استفاده در صنعت داروسازی، از آن استخراج شده است. گیاه .Euphorbia helioscopia L بعنوان ضد تومور[۹]، ضد ویروس[۱۰]، ضد قارچ[۱۱] و ضد باکتری[۱۲] مورد مطالعه قرار گرفته است. گونه فرفیون برای درمان بیماری‌های مختلف مانند سوزاک، میگرن، انگل‌های روده‌ای و زگیل استفاده می‌شود[۱۳]. برگ و ساقه این گیاه به عنوان تب‌بر و کرم‌زدا نیز استفاده می‌شود[۱۴و۱۵].

جمع آوری و آماده سازی گیاه: ساقه گیاه فرفیون هلیوسکوپیا (.Ephorbia helioscopia L) در بهار ۱۳۹۲ از روستای طینوج واقع دراستان قم جمع آوری شد، برای بهینه کردن روند پژوهش، تمام آلودگی ها، پوسیدگی ها، قسمت های تغییر رنگ یافته و چوب های اضافی جدا گردید و گیاه در سایه به دور از نور خور خشک شد. سپس گیاه خشک شده آسیاب و عصاره گیری بر روی وزن مشخص از گیاه انجام شد.

عصاره گیری: عصاره گیری بر روی گیاه .Ephorbia helioscopia L با حلال های مختلف و با استفاده از دستگاه سوکسله و همچنین روش خیساندن انجام شد. عصاره گیری توسط حلال های متانول- اتانول- هگزان- آب مقطر و اتانول و آب صورت گرفت. در هر عصاره گیری توسط سوکسله گیاه با پودر شده، توزین و داخل کارتوش ریخته شده سپس به دستگاه سوکسله انتقال یافت در تمام مراحل عصاره گیری حلال به مقدار ۶۰۰cc اضافه نموده. عمل عصاره گیری تا بی رنگ شدن کامل محلول موجود در محفظه سوکسله ادامه یافت و بدین صورت با حلال های دیگر این عمل را انجام دادیم. و در روش خیساندن نیز گیاه پودر شده توزین کرده و در یک ارلن ریخته و به مقدار ۳۰۰cc حلال متانل به آن اضافه نموده و آن را در یک محفظه تاریک قرار داده و سپس بعد از ۴۸ ساعت آن را با کاغذ صافی ،صاف کرده و بدین صورت عصاره گیری توسط روش خیساندن با حلال های مختلف نیز صورت گرفت.

محلول های بدست آمده با دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شد تا بحالت عسلی در آید. یک پتری دیش را وزن شده سپس عصاره های غلیظ شده به داخل پتری دیش منتقل شد و در آون معمولی با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا کاملاً خشک شود. سپس پتری دیش و عصاره توزین شده عصاره‌های حاصل از گیاه .Ephorbia helioscopia L توسط اسپاتول تراشیده و به ظرف درب‌دار منتقل و تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگه داری شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی: اصول کار عبارتست از سنجیدن قدرت غلظت معینی از عصاره ها گیاهی در مهار کردن رشد میکروارگانیسم های مورد آزمایش. در این پژوهش فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی موردنظر در مقابل ۴ باکتری و ۱ نوع قارچ اندازه گیری می‌شود که عبارتند از: استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ ، اشرشیاکلی ATTCC۲۵۹۲۲ کاندیدا

البیکنس ATCC۱۰۲۳۱، سالمونلاتیفی ATCC ۱۹۴۳۰ سودموناس آئروژینوز ATCC۲۷۸۵۳ فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی برای عصاره های استخراج شده بوسیله روش انتشار چاهک در سطح محیط کشت مولرهینتون ارزیابی می شود. از چند آنتی بیوتیک بعنوان مرجع استاندارد برای کنترل حساسیت باکتری های تست شده استفاده شده که شامل آمپی سیلین و جنتامایسین برای باکتری ها و فلوکونازول برای قارچ می باشد قطر هاله ممانعت از رشد با استفاده از کولیس محاسبه و برحسب میلی متر ثبت گردید.

اثر ضدمیکروبی یا ممانعت از رشد هاله: برای بررسی اثر ضد میکروبی از بین روشهای انتشار از روش چاهک پلیت استفاده می شود. در روش انتشار چاهک ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ $^{cfu}/_{ml}$ در سطح محیط کشت مولرهینتون۸ بصورت یکنواخت گسترش داده شده. سپس در سطح پلیت چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر و به فاصله ۲ سانتی متر از هم ایجاد گردید. هر یک از چاهک ها با ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظتها تهیه شده عصاره ها پر شد. شاهد منفی آزمایش حلال های اتانول، متانل، هگزان، آب،اتانول وآب؛ جنتاماسپین ،آمپلی سیلین و فلوکونازول به منزله شاهد مثبت استفاده گردید. تمام محیط های کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از مدت یعنی کشت های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد در اطراف چاهک مورد بررسی قرار گرفت و قطر هاله عدم رشد برحسب میلی متر اندازه گیری گردید.

تعیینMIC: با استفاده از روش لوله ای حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره ها تعیین شد. جهت تعیین MIC، از عصاره های تهیه شده سری رقت ۵۰۰، ۲۵۰ ، ۱۲۵ ، ۶۴/۵، ۳۱/۲۵ ، ۱۵/۶۲ ، ۷/۸۱ ، ۳/۹ ، ۱/۹ ، ۰/۹۷ میلی گرم در هر میلی متر در محیط مولرهینتون برات تهیه شد. سپس به هر کدام از رقت ها یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ $^{cfu}/_{ml}$ اضافه گردید. لوله های کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) نیز تهیه شدند. در نهایت لوله تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی گردیدند. کمترین رقت از عصاره که در آن کدورتی مشاهده نگردید «عدم رشد» بعنوان MIC در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری

بازده عصاره گیری: در این پژوهش ،استخراج عصاره ساقه گیاه .Ephorbia helioscopia L با حلال های متانول ، اتانول ، هگزان ، آب و آب و اتانول انجام شد نتایج و بازده عصاره گیری در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول (۱): بازده حاصل از استخراج عصاره های ساقه گیاه .Ephorbia helioscopia L

نوع عصاره	نوع روش	میزان نمونه گیاهی بر حسب گرم	میزان حلال مصرفی برحسب میلی لیتر	زمان	بازده عصاره
متانولی	سوکسله	۳۳	۶۰۰	۸	۱۳/۰۶
	خیساندن	۲۵	۳۰۰	۴۸	۱/۴۰
اتانولی	سوکسله	۴۲	۶۰۰	۸	۷/۳۰
	خیساندن	۴۳	۴۰۰	۴۸	۲/۲۴
هگزانی	سوکسله	۶۰	۶۰۰	۴۸	۱/۸۲
	خیساندن	۴۵	۳۰۰	۸	۱/۶۱
آبی و اتانول	سوکسله	۴۹	۶۰ آب ۲۴۰ اتانول	۸	۲/۵۹
آبی	سوکسله	۳۲	۳۰۰	۸	۲۲,۲۵

طبق نتایج بدست آمده، نوع حلال ونوع روش استخراج دو عامل موثر بر میزان بازده استخراج شناخته شدند .در این پژوهش حلال های استفاده شده قطبیت های مختلفی داشتند عصاره آبی حاصل در روش سوکسله بیشترین راندمان استخراج را داشت وبعد از آن نیز عصاره متانولی سوکسله ،بعد عصاره اتانولی سوکسله ودر آخر عصاره هگزان سوکسله بازده استخراج کمتری داشت .این نکته نشان می دهد که، حلال قطبی تر،بازده استخراجی بالاتری دارد؛ضمن آنکه بکار گیری حرارت در روش سوکسله نیز می تواند در راندمان بالاتر این روش نسبت به روش سرد موثر باشد. البته، باید توجه داشت که بازده بالاتر استخراج به تنهایی نمی تواند یک عامل مثبت در زمینه داشتن همه ترکیبات فنلی وفلاونویید وترکیباتی تلقی شود که خاصیت آنتی اکسیدانی دارد.

نتایج بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره ها: فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها ساقه گیاه .Ephorbia helioscopia L در برابر ۴ باکتری و ۱ قارچ در مقایسه با آنتی بوتیک‌های اندازه‌گیری شده است و نتایج بدست آمده در جداول(۲) ، (۳) و (۴) نشان داده شده است.

جدول (۲): نتایج حاصل از اثرات ضد میکروبی عدم هاله رشد عصاره های ساقه گیاه Ephorbia helioscopia L.

باکتری	عصاره متانولی خیساندن	عصاره هگزانی سوکسله	عصاره هگزانی خیساندن	عصاره متانولی سوکسله	عصاره آبی اتانولی	عصاره اتانولی خیساندن	عصاره آبی سوکسله	عصاره اتانولی سوکسله
ATCC 25922 Escherichia coli	N	11	12	10	15	N	N	N
Staphylococcus aureus ATCC 25923	14	N	N	N	N	N	13	N
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	16	12	N	N	N	N	N	18
ATCC Salmonella typhi 19430	N	N	N	N	N	N	N	N
Candida albicans ATCC 10231	13	N	N	N	N	12	N	N

جدول (۳): نتایج حاصل از آنتی بیوتیک ها بعنوان مرجع استاندارد کنترل مثبت

	Gentamycin	Ampicillin	Fluconazole
E.coli ATCC 25922	**14**	**19**	-
Staphylococcus aureusATCC 25923	**17**	**0**	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	**10**	**0**	-
ATCC 19430Salmonella typhi	**0**	**18**	-
Candida albicans ATCC 10231	-	-	**38**

جدول (۴): نتایج حاصل از اثرات ضد میکروبی MIC عصاره های ساقه گیاه Ephorbia helioscopia L.

	لوله / باکتری	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	MIC	شماره عصاره
۱	Staphylococcus aureus	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	۲۵۰	متانولی خیساندن
	Staphylococcus aureus	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	۱۲۵	آبی سوکسله
۲	Candida albicans	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	۲۵۰	متانولی خیساندن
	Candida albicans	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	۱۲۵	اتانولی خیساندن
۳	E.coli ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	۲۵۰	هگزانی سوکسله
	E.coli ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	۲۵۰	هگزانی خیساندن
	E.coli ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	۵۰۰	متانولی سوکسله
	E.coli ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	۵/۶۲	آبی اتانولی
۴	Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	۵/۶۲	متانولی خیساندن
	Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	۲۵۰	هگزانی سوکسله
	Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	۵/۶۲	اتانولی سوکسله

عصاره متانولی خیساندن: عصاره متانلی خیساندن در برابر باکتری Stahphylococcus aureus و Pseudomonas aeruginosa و قارچ Candida albicans فعال می‌باشند و نسبت به دو باکتری دیگر فعالیتی از خود نشان نداد. همچنین در برابر باکتری Staphylococcus aureus در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین فعالیت کمتری نشان داد (رشدهاله ۱۴ در برابر۱۷) ولی در برابر باکتری Pseudomonas aeruginasa در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتامایسین فعالیت بیشتری نشان داد (رشد هاله ۱۶ در برابر ۱۰) و در برابر قارچ Candidaalbicans فعالیت کمتری نسبت به فلکونازول از خود نشان داد (رشد هاله ۱۳ در برابر ۳۸).

کمترین غلظت لازم برای ممانعت از رشد میکروارگانیسم (MIC) عصاره‌های این گیاه در برابر ۴ نوع باکتری و۱ نوع قارچ اندازه‌گیری شد و نتایج MIC که در جدول آورده شده نشان دهنده این است که، عصاره متانولی خیساندن در برابر باکتری Pseudomonas aeruginosa(۶۲/۵) نسبت به باکتری Staphylococcus aureus (۲۵۰) و قارچ Candida albicans (۲۵۰) به غلظت کمتری برای ممانعت از رشد نیاز دارد.

عصاره متانولی سوکسله: عصاره متانولی سوکسله فقط در برابر باکتری Escherichia coli فعال می‌باشد و نسبت به ۳ باکتری و۱ قارچ دیگر فعالیتی از خود نشان نداد و همچنین در برابر باکتری Escherichia coli در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتا مایسین و آمپیسیلین فعالیت کمتری را نشان داد (رشد هاله ۱۰ در برابر۱۴) و (رشد هاله۱۰ در برابر۱۹).

متانول سوکسله در برابر باکتری Escherichia coli کمترین غلظتی که برای ممانعت از رشد نشان داد ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

عصاره اتانولی خیساندن: عصاره اتانولی خیساندن فقط در برابر قارچ Candida albicans فعال می‌باشد و نسبت به چهار باکتری دیگر فعالیتی از خود نشان نمی‌دهد. همچنین در برابر قارچ Candida albicans درمقایسه با فلوکونازول فعالیت مکتری از خود نشان داد(رشد هاله ۱۲ در برابر۳۸).

عصاره اتانولی خیساندن در برابر Candida albiacans کمترین غلظتی که برای ممانعت از رشد نشان داد ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود.

عصاره اتانولی سوکسله: عصاره اتانولی سوکسله فقط در برابر باکتری Pseudomonas aeruginosa فعال می‌باشد و نسبت به ۳ باکتری و ۱ قارچ دیگر از خود فعالیت نشان نمی‌دهد. همچنین در برابر باکتری Pseudomonas aeruginosa در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتامایسین فعالیت بیشتری نشان داد (رشد هاله ۱۸ در برابر۱۰).

عصاره اتانولی سوکسله در برابر باکتری Pseudomonas aeruginosa کمترین غلظتی که برای ممانعت از رشد نشان داد ۶۲/۵ میل‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

عصاره هگزانی خیساندن: عصاره هگزان خیساندن فقط در برابر باکتری Escherichia coil فعال می‌باشد و در برابر ۳ باکتری و قارچ فعالیتی از خود نشان نمی‌دهد. همچنین در برابر باکتری Escherichia coil در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتامایسین و آمپیسیلین فعالیت کمتری از خود نشان داد (رشد هاله ۱۲ در برابر۱۴) (رشد هاله ۱۲ در برابر۱۹).

عصاره هگزان خسیاندن در برابر باکتری Esherichia coil کمترین غلظتی که برای ممانعت از رشد نشان داد ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

عصاره هگزانی سوکسله: عصاره هگزان سوکسله در برابر ۲ باکتری Escherichia coil و Pseudomonas aeruginosa فعال می‌باشد و نسبت به ۲ باکتری و ۱ قارچ دیگر فعالیتی از خود نشان نمی‌دهد. همچنین در برابر باکتری Escherichia coil در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتا مایسین و آمپی‌سیلین فعالیت کمتری نشان داد (رشد هاله ۱۱ در برابر ۱۴) (رشد هاله ۱۱ در برابر۱۹) ولی در برابر باکتری Pseudomonas aeruginosa در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتا مایسین فعالیت بیشتری ازخود نشان داد (رشد هاله ۱۲ در برابر۱۰)

عصاره هگزان سوکسله در برابر باکتری Escherichia coil و Pseudomonas aeruginosa کمترین غلظتی که برای ممانعت از رشد نشان دادند برای هر دو ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

عصاره آبی سوکسله: عصاره آبی سوکسله فقط در برابر باکتری Staphiylococcus aureus فعال می‌باشد و نسبت به ۳ باکتری و ۱ قارچ دیگر فعالیتی از خود نشان نمی‌دهد. همچنین در برابر باکتری Staphiylococcus aureus درمقایسه با آنتی بیئتیک جنتامایسین فعالیت کمتری از خود نشان داد. (رشد هاله ۱۳ در برابر ۱۷)

عصاره آبی سوکسله در برابر باکتری Staphiylococcus aureus کمترین غلظتی که برای ممانعت از رشد نشان داد ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

عصاره آبی اتانولی سوکسله: عصاره آبی اتانولی سوکسله فقط در برابر باکتری Escherichia coil فعال می‌باشد و در برابر ۳ باکتری و ۱ قارچ دیگر فعالیتی از خود نشان نمی‌دهد. همچنین در برابر باکتری Escherichia coil در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین فعالیت بیشتری از خود نشان داد ولی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین فعالیت کمتری از خود نشان می‌دهند (رشد هاله ۱۵ در برابر ۱۴)(رشد هاله ۱۵ در برابر ۱۹)

عصاره آبی ـ اتانولی سوکسله در برابر باکتری Escherichia coil کمترین غلظتی که برای ممانعت از رشد نشان داد ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

تمام عصاره نسبت به باکتری Salmoella typhi هیچ فعالیتی از خود نشان ندادند و این باکتری کاملاً به تمام عصاره‌ها مقاوم بوده و دراین مطالعه مشخص شد عصاره‌ها ساقه بیشترین تأثیر بر Pseudomonas aeruginosa نشان دادند که اختلاف معنی‌دار با آنتی بیوتیک‌های استاندارد داشت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره‌های ساقه گیاه Euphorbia

helioscopia با درجه غلظت متفاوتی، از رشد برخی از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند. عصاره متانولی خیساندن بیشترین اثر عامل ضد میکروبی را دارد. با توجه به پژوهش انجام شده میتوان نتیجه گرفت عصاره های ساقه گیاه Euphorbia helioscopia فعالیت ضد میکروبی نسبتا"بالایی دارد.

منابع:

[1] Al-Younis, N.K. and Abdullah, A.F. 2009. Isolation and antibacterial evaluation of plant extracts from some medicinal plants in Kurdistan region. J. Duhok Univ. 12(1): 250-255 (Special issue).

[2] Barla, A., Birman, H. Kultur, S. and Oksuz, S. 2006. Secondary metabolites from Euphorbia helioscopia and their vasodepressor activity. Turk. J. Chem. 30: 325-332.

[3] Cai, Z.Y., Wang, J. and Liang, B. 1999. Antitumor activity of the root of Euphorbia helioscopia in vitro. Journal of Chinese Medicinal Materials 22(2):85-87(Abstract).

[4] Lai, X. Z., Yang, Y.B. and Shan, X. L. 2004. The investigation of Euphorbiaceous medicinal plants in Southern China. Economic Botany 58 (1): 307-320.

[5] Lee, S.H., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. 1990. Tannins and related compounds. XCV. Isolation and characterization of helioscopinins and helioscopins, four new hydrolyzable tannins from Euphorbia helioscopia L. (1). Chem. Pharm. Bull. 38(6), 1518-1523.

[6] Müller P and Schütte HR, Z Naturforsch B., 1968. m-Hydroxyphenylglycine and 3,5-dihydroxyphenylglycine, 2 new amino acids from the latex of Euphorbia helioscopia L., 23(5), pages 659-663, PubMed (Article in German).

[7] Pieroni, A., C.L., Quave, Santorio, R.F. 2004. Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. Journal of Ethnopharmacology 95: 373-384.

[8] Punchard, N.A., Kelly , F. J ., 1996. Free Raddical Approach, Oxford University press Inc , New York.

[9] Qureshi, R.A., Ahmed, M. and Ghufran, M. A. 2007. Indigenous knowledge of some important wild plants as folk medicines in the area of Chhachh (Disst.Attock) Punijab, Pakistan. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food chemistry. 6 (11): 2500-2511.

[10] Ramezani, M., Behravan, J., Arab, M., and Amel Farzad, S. 2008. Antiviral activity of Euphorbia helioscopia extracts. Journal of Biological Sciences 8 (4): 809-813.

[11] Storz, G., Imlay, J. A., 1999. Curr. Opini. In Microb, 29,188-194.

[12] Uzair, M., Loothar, B.A. and Choudhary, B. A. 2009. Biological screening of Euphorbia helioscopia, L. Pak. J. Pharm. Sci. 22(2): 184-186.

[13] Wen. Z., and Yue-Wei, G., 2006. Chemical Studies on the Constituents of the Chinese Medicinal Herb Euphorbia helioscopia L. Chem. Pharm. Bull. 54(7): 1037-1039.

[14] Wu, Q.C, Tang, Y.P., Ding, A.W., You, F.Q. Zhang, L. and Duan, J.A. 2009. 13C-NMR Data of Three Important Diterpenes Isolated from Euphorbia Species. Molecules 14: 4454-4475.

[15] Yamamura, S., Shizljri, Y., Kosemura, S., Ohtsuka, J., Tayama, T., Ohba, S., Ito, M., Saito, Y. and Terada,Y. 1989. Diterpens from Euphorbia helioscopia. Phytochemistry 28(12): 3421-3436.