کارآیی روش‌های استخراج و فعالیت ضدباکتریایی ساپونین‌ها در گونه *Silene bupleuroides* L. (Caryophyllaceae)

Efficiency of Extraction Methods and Antibacterial Activity of Saponins in *Silene bupleuroides* L. (Caryophyllaceae)

رویا کرمیان[۱*] و راحله جمالی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۲۷

چکیده

جنس *Silene* L. با بیش از ۲۲۰۰ گونه، بزرگ‌ترین جنس تیره Caryophyllaceae در دنیاست که بیشترین پراکنش آن در نیمکره شمالی، اروپا، آسیا و آفریقای شمالی می‌باشد. در حدود ۱۱۰ گونه از این جنس در ایران رویش دارند و تقریباً ۳۵ گونه با پراکنش جغرافیایی محدود بومی ایران هستند. از متابولیت‌های ثانویه فراوان در این گیاه می‌توان به ترکیبات ساپونینی اشاره کرد. در این تحقیق ساپونین موجود در بخش‌های هوایی گونه *Silene bupleuroides* L. با سه روش مختلف و سیستم‌های حلال متفاوت استخراج شد. نتایج نشان داد که قابلیت حلالیت و پایداری ساپونین‌ها تحت تأثیر ویژگی‌های حلال قرار می‌گیرد و استفاده از حلال‌های مختلف باعث حذف برخی ترکیبات زائد و نیز افزایش راندمان استخراج می‌شود. سنجش کمی ترکیبات ساپونینی به روش اسپکتروفتومتری و سنجش کیفی آن‌ها به روش کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد. نتایج کروماتوگرافی حاکی از وجود پنج نوع ساپونین در گونه *S. bupleuroides* بود و یک لکه با R_f =۰/۳۳، به‌عنوان اصلی‌ترین ترکیب ساپونینی آن شناسایی شد. فعالیت ضدباکتریایی ساپونین‌های این گونه گیاهی در برابر چهار سویه مختلف باکتری گرم مثبت و منفی شامل *Proteus vulgaris*، *Citrobacter amalonaticus*، *Bacillus cereus* و *Enterobacter aerogenes* به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های *Proteus vulgaris* و *Citrobacter amalonaticus* بیشترین حساسیت را نسبت به ترکیبات ساپونینی این گونه نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: اسپکتروفتومتری، ساپونین، ضدباکتری، کروماتوگرافی لایه نازک، *Silene bupleuroides*

۱. استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۲. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسئول Email: R_karamian@basu.ac.ir

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده دوم می‌باشد که در دانشگاه بوعلی‌سینا انجام شده است.

مقدمه

گیاهان دارویی اگرچه از دیرباز برای انسان آشنا و در بسیاری از مواقع مرهم دردهای بشر بوده‌اند، اما پیشرفت‌های علمی و فناوری طی دو دهه اخیر اهمیت و نقش سازنده گیاهان دارویی در تأمین نیازهای بشر به‌ویژه در حیطه دارو و درمان را دوچندان ساخته است. همچنین با توجه به عوارض جانبی ناشی از استفاده از داروهای شیمیایی، بیشتر کشورهای دنیا به گیاه‌درمانی روی آورده‌اند، تا آنجا که ۸۰ درصد داروهایی عرضه شده در برخی کشورها منشاء گیاهی و طبیعی دارند. ساپونین-ها از اجزاء تشکیل‌دهنده اغلب گیاهان دارویی و داروهای سنتی هستند و به همین دلیل توجه زیادی به آن‌ها معطوف شده-است. نام ساپونین از ریشه یونانی (صابون) گرفته شده و تعریف کلاسیک آن‌ها براساس فعالیت کشش سطحی آن‌هاست. بسیاری از آن‌ها دارای ویژگی‌های شویندگی بوده و در آب کف پایدار تشکیل می‌دهند. درحال حاضر ساپونین‌ها براساس ساختمان مولکولی خود به گلیکوزیدهای تری‌ترپنی یا استروئیدی تقسیم می‌شوند. ساپونین‌های استروئیدی اساساً در تک‌لپه‌ای‌ها و ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی در دولپه‌ای‌ها وجود دارند. شواهد فراوانی در مورد اثرات این ترکیبات در تحریک سیستم ایمنی، افزایش نفوذپذیری غشاء (*گورفاینکل و رائو*[1] ، 2003)، کاهش کلسترول (*هاروود*[2] و همکاران، 1993)، اختلال در هضم پروتئین و جذب ویتامین‌ها، تحریک هیپوگلیسمی (*الیزیک* و *بایالی*[3]، 2006)، تورم و همولیز گلبول‌های قرمز و تشکیل منافذ در غشاء سلول‌ها (*اودا*[4] و همکاران، 2000) در انسان وجود دارد. ساپونین‌های موجود در مواد غذایی و داروهای طبیعی دارای فعالیت ضدچاقی هستند. بعضی از آن‌ها نفوذپذیری روده را در شرایط آزمایشگاهی افزایش داده و از انتقال فعال موکوز ممانعت می‌کنند و نیز جذب موادی را که در حالت عادی به‌راحتی جذب نمی‌شوند تسهیل می‌نمایند (*ام سی آلاستر*[5]و همکاران، 2001). همچنین ساپونین‌های جدا شده از گیاهان مختلف رشد سلول‌های سرطانی (از جمله سرطان روده بزرگ) را در شرایط آزمایشگاهی متوقف می‌کنند. به‌علاوه مشخص شده است که ساپونین‌ها اثرات فراوانی روی رشد، تغذیه و تولیدمثل جانوران دارند. ترکیبات متنوع ساپونین دارای فعالیت نرم‌تن‌کشی و آنتی‌اکسیدانی و نیز فعالیت ضدقارچی و ضدویروسی هستند. بنابراین این ترکیبات برای جانوران هم مفید و هم مضر می‌باشند (*الیزیک* و *بایالی*، 2006). ساپونین‌ها بر روی عملکرد سیستم عصبی نیز تأثیرگذار هستند. مثلاً عصاره ساپونینی گیاه جینسنگ دارای اثرات نوروتروپیک و محافظت‌کننده اعصاب است (*چوی*[6] و همکاران، 2001). ساپونین‌ها در برخی مکانیسم‌های حفافظتی علیه رادیکال‌های آزاد شرکت می‌کنند (*هو*[7] و همکاران، 2002). ساپونین‌های حاصل از منابع مختلف بر روی پروتوزوآها اثرات مخربی داشته و آن‌ها را در معـــده نشخوارکنـــندگان از بین می‌برند. ساپونین‌ها به‌علت دارا بودن فعالیت کاهش کشش سطحی، سورفاکتانت‌های طبیعی غیریونی هستند و از آن‌ها به طور گسترده به‌عنوان مواد کف‌زا، امولسیون‌کننده و شوینده در محصولات پاک‌کننده مانند ژل‌های شوینده، شامپوها، نرم-کننده‌های مو، لوسیون‌ها، پاک‌کننده‌های حمام، صابون‌های مایع، محصولات محافظت‌کننده نوزادان، دهان‌شویه‌ها و خمیردندان‌ها استفاده می‌شود (*بالاندراین*[8]، 1996). همچنین آن‌ها به‌عنوان مواد فعال زیستی موجود در فرمولاسیون محصولات آرایشی، پیری پوست را به تأخیر انداخته (*بونت*[9] و همکاران، 1998)، و به‌عنوان ضدآکنه به‌کار می‌روند (*اولم استید*[10]، 2002).

جنس *Silene* L. بزرگ‌ترین جنس از تیره Caryophyllaceae است که دارای حدود۱۱۰ گونه در ایران است (قهرمان، ۱۳۷۳). گیاهان این جنس به‌دلیل دارابودن اکدی‌استروئیدها، فیتواکدی‌استروئیدها، ساپونین‌ها و تری-ترپنوئیدها حائز اهمیت هستند. اغلب این ترکیبات به‌ویژه ساپونین‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل-توجهی بوده و به مقدار فراوان در گیاهان سالم یافت می‌شوند (*اوسبورن*[11]، 1996؛ منگ[12] و همکاران، 2002). در مورد استخراج و شناسایی ساپونین‌های گیاهان جنس *Silene* اطلاعات زیادی در دسترس نیست. مطالعات انجام شده روی ترکیبات ساپونینی برخی گونه‌های *Silene* و جنس نزدیک آن *Dianthus* حاکی از آن است که عصاره‌گیری در شرایط مختلف

1. Gurfinkel and Rao
2. Harwood
3. Oleszek and Bialy
4. Oda
5. Mc Allister
6. Choi
7. Hu
8. Balandrin
9. Bonte
10. Olmstead
11. Osbourn
12. Meng

pH و دما و با استفاده از حلال‌های مختلف، در میزان ساپونین استخراج شده و پایداری آن مؤثر است. هدف از این مطالعه بررسی کمی و کیفی محتوای ساپونین‌ها در بخش‌های هوایی گونه *Silene bupleuroides* L. و نیز ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی این ترکیبات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

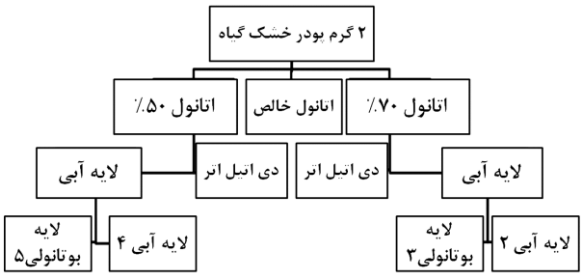
گونه *Silene bupleuroides* L. از استان زنجان (۱۱۳ کیلومتری بیجار، طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۱ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۵ دقیقه شمالی، ارتفاع از سطح دریا ۲۰۰۰ متر، میانگین بارندگی سالانه ۳۳۵ میلی‌متر) جمع-آوری شد و پس از شناسایی در هرباریوم دانشگاه بوعلی‌سینا (BASU) نگهداری گردید. مواد گیاهی به‌منظور آماده‌سازی جهت استخراج ساپونین، در تاریکی به‌مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۰°C خشک و سپس پودر شدند (ابراهیم‌زاده و نیکنام[1]، 1998).

تعیین شاخص اندیس کف‌کنندگی

به‌منظور تعیین شاخص اندیس کف‌کنندگی ساپونین‌ها، ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی پودر شده در ۱۰ میلی‌لیتر آب‌جوش سوسپانسیون شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب‌جوش حرارت داده شد. پس از سردشدن مخلوط حاصل صاف شد و از آن محلول‌هایی با رقت‌های مختلف ۱۰-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در سه تکرار تهیه شد. سپس لوله‌ها به‌مدت ۱۵ ثانیه در جهت طولی ورتکس شد و در نهایت ارتفاع کف حاصل اندازه‌گیری گردید (سازمان جهانی سلامت[2]، 1998).

استخراج ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی

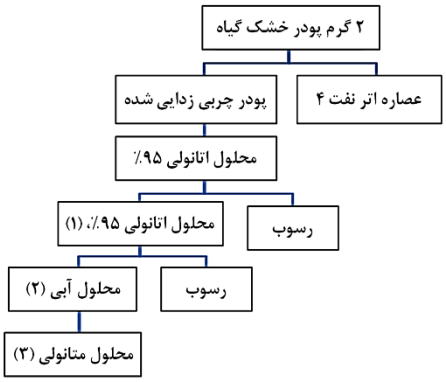
استخراج ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی با سه روش مختلف انجام شد. در روش اول، ۲ گرم پودر خشک در دستگاه سوکسله با ۱۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد به‌مدت ۲ ساعت عصاره‌گیری شد و عصاره‌های حاصل تحت خلاء در دمای ۸۰°C تغلیظ شدند. سپس مواد ساپونینی و غیرساپونینی عصاره‌های اتانولی ۵۰ و ۷۰ درصد در یک قیف جداکننده توسط ۱۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر و ۱۰ میلی‌لیتر *n*- بوتانول جدا شدند (شکل ۱). در نهایت بخش‌های آبی و بوتانولی و نیز عصاره اتانولی ۱۰۰ درصد تحت خلاء تغلیظ شده و در نهایت مورد سنجش قرار گرفتند (*سان* و *پان*[3]، 2006).



شکل ۱: روش اول استخراج ساپونین از گونه *Silene bupleuroides* و بخش‌های مختلف استخراج شده

Fig. 1: The first method of saponin extraction from *Silene bupleuroides* and different extracted parts

در روش دوم، ابتدا ۲ گرم پودر خشک در دستگاه سوکسله با اترنفت چربی‌زدایی و سپس با اتانول ۹۵ درصد عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۸ ساعت در یخچال قرار داده شد و سپس رسوبات آن جدا گردید. آن‌گاه بخش محلول تحت خلاء تغلیظ و به‌مدت یک شب در آب حل شد. دو بخش محلول و غیرمحلول در آب حاصل گردید (شکل ۲). در نهایت بخش محلول تغلیظ و در متانول حل شد (عسگری، ۱۳۶۴).



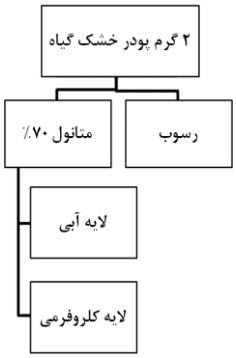
شکل ۲: روش دوم استخراج ساپونین *Silene bupleuroides* و بخش‌های مختلف استخراج شده

Fig. 2: The second method of saponin extraction from *Silene bupleuroides* and different extracted parts

در روش سوم، ۲ گرم پودر خشک توسط متانول ۷۰ درصد (سه بار به نسبت w/v ۲:۱۲۰) عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۸ ساعت در یخچال قرار داده شد و سپس رسوبات آن

1. Ebrahimzade and Niknam
2. Oganization-World-Health
3. Sun and Pan

جدا گردید (شکل ۳). آن‌گاه بخش محلول تحت خلاء تغلیظ شد و مواد غیرساپونینی آن به‌کمک روش بخش‌سازی با کلروفرم حذف گردید (*یایلی*[1] و همکاران، 1998).



شکل ۳: روش سوم استخراج ساپونین از گونه *Silene bupleuroides* و بخش‌های مختلف استخراج شده

Fig 3: The third method of saponin extraction from *Silene bupleuroides* and different extracted parts

سنجش کمی محتوای ساپونین

سنجش کمی محتوای ساپونین براساس روش ابراهیم‌زاده و نیکنام (۱۹۹۸) انجام شد (ابراهیم‌زاده و نیکنام، 1998). مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌ها در یک لوله آزمایش به‌طور کامل تبخیر و به آن‌ها ۵ میلی‌لیتر معرف وانیلین ۰/۷ درصد در اسیدسولفوریک ۶۵ درصد اضافه و سپس ورتکس شد. این معرف ناپایدار است و باید تازه تهیه شود. نمونه‌ها در حمام آب گرم (۶۰°C) به‌مدت یک ساعت تیمار و واکنش در حمام آب یخ متوقف گردید و سپس جذب آن‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV/Visible) Spectrophotometer, Perkin Elmer, USA) در ۴۷۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای ساپونین موجود در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد ساپونین برآورد شد و بر حسب درصد وزن خشک محاسبه گردید.

کروماتوگرافی لایه نازک ساپونین

ساپونین‌های حاصل از گونه *Silene bupleuroides* روی صفحات آلومینیومی (۲۰×۲۰ سانتی‌متر) سیلیکاژل به‌عنوان فاز ثابت لکه‌گذاری و با مخلوط آمونیاک، اتانول و *n*- بوتانول (۷/۵: ۲/۵: ۱۰/۵) به‌عنوان فاز متحرک جداسازی شدند (*وگنر و بلادت*[2]، 1998). لکه‌های ساپونینی با اسپری محلول اسیدسولفوریک ۱۵ درصد و انکوباسیون در دمای ۱۱۰°C تا ظهور رنگ آبی- بنفش در نور مرئی آشکار گردیده و سپس R_f آن‌ها تعیین شد.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی ساپونین

بررسی اثر ضدباکتریایی ساپونین‌ها به روش انتشار دیسک انجام شد (*آنونی موس*[3]، 1996). برای کشت باکتری از محیط مولر هینتون استفاده شد و پس از تلقیح نمونه‌های باکتـــری، دیسک‌های بلانک به بخش‌های مختلف استخراج شده آغشته و در پلیت حاوی باکتری قرار داده شدند. پس از سپری‌شدن دوره انکوباسیون (۲۴ تا ۴۸ ساعت)، قطر هاله مهاری احاطه‌کننده هر دیسک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

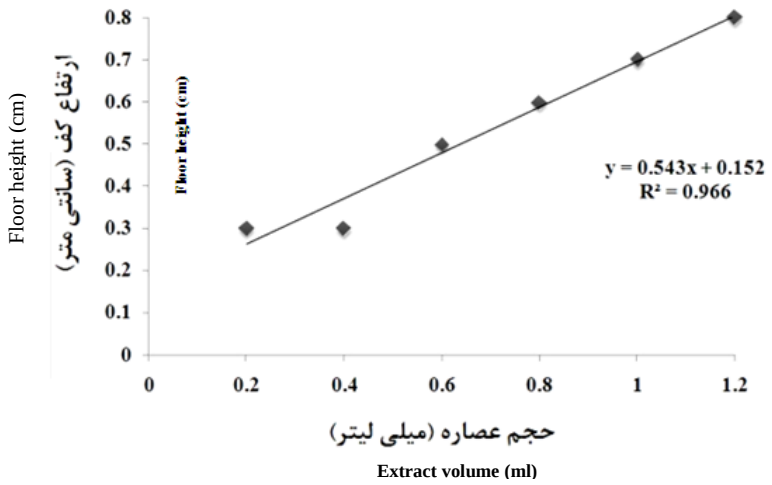
سنجش‌های کمی در سه تکرار انجام شد. پس از اثبات وجود اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها به‌روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA)، گروه‌بندی آن‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال $P < 0.05$ اجرا شد.

نتایج

شاخص اندیس کف‌کنندگی

ارتفاع کف پایدار ایجاد شده حاصل از ساپونین در گونه *Silene bupleuroides* کمتر از ۱ سانتی‌متر بود و با افزایش حجم عصاره (غلظت عصاره)، ارتفاع کف ایجاد شده در لوله‌ها نیز افزایش یافت (شکل ۴).

1. Yayli
2. Wagner and Bladt
3. Anonymous



شکل ۴: مقدار کف ساپونین بر حسب حجم عصاره در گونه *Silene bupleuroides*

Fig 4: The amount of saponin foam to extract volume in *Silene bupleuroides*

محتوای ساپونین استخراج شده

در این پژوهش حلال‌های گوناگونی برای افزایش کارآیی روش عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت و مقدار ساپونین استخراج شده با یکدیگر مقایسه شد. درحالی‌که آب، الکل و الکل‌های آبی معمول‌ترین حلال‌ها جهت استخراج ساپونین‌ها هستند، قابلیت انحلال برخی از ساپونین‌ها در اتر، کلروفرم، بنزن، *n*-بوتانول، دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات نیز گزارش شده است. در گونه مورد بررسی بیشترین مقدار ساپونین استخراج شده مربوط به روش اول و کمترین مقدار مربوط به روش سوم می‌باشد. درصد ساپونین کل گیاه طی روش‌های اول تا سوم به‌ترتیب ۱/۵۳، ۱/۲ و ۰/۱۴۱ درصد وزن خشک بخش‌های هوایی گزارش شده است (جدول ۱).

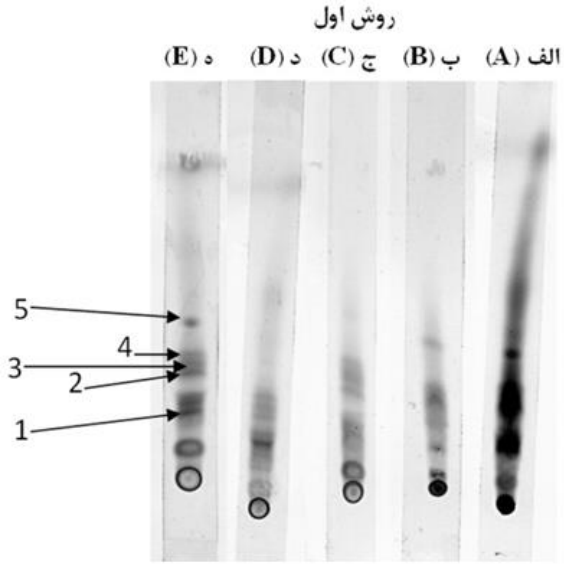
جدول ۱: محتوای ساپونین گونه *Silene bupleuroides* حاصل از روش‌های مختلف استخراج

Table 1: Saponin content of *Silene bupleuroides* resulted from different extraction methods

	بخش Section		محتوای ساپونین (µg/ml DW%) Saponin content(µg/ml DW%)
روش اول First method	اتانولی	Ethanol	0.1 ±0.02
	اتانولی ۷۰٪- آبی	Ethanol 70%-Blue	0.45 ±0.06
	اتانولی ۷۰٪- بوتانولی	Ethanol 70%- Butanol	0.05 ± 0.01
	اتانولی ۵۰٪- آبی	Ethanol 50%-blue	0.5 ±0.03
	اتانولی ۵۰٪- بوتانولی	Ethanol 50%- Butanol	0.43 ± 0.06
	جمع کل	Total	1.53
روش دوم Second method	اتانولی	Ethanol	0.66 ± 0.09
	آبی	Blue	0.44 ± 0.03
	متانولی	Methanol	0.01 ± 0.01
	جمع کل	Total	1.2 ±0.02
روش سوم Third method	اتانولی ۹۵٪	Ethanol 95%	0.14 ± 0.04
	کلروفرمی	Chloroform	0.001 ± 0.09
	جمع کل	Total	0.141

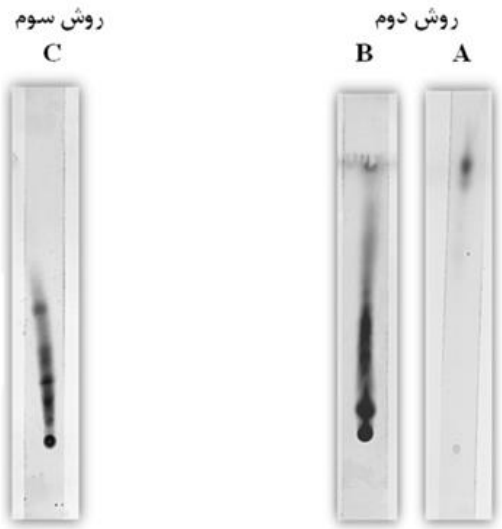
کروماتوگرافی لایه نازک ساپونین

کروماتوگرافی لایه نازک این عصاره‌ها پنج لکه ساپونینی را در محدوده ۰/۵-۰/۲ = R_f به رنگ‌های صورتی تا ارغوانی آشکار کرد که لکه شماره ۲ با ۰/۳۳ = R_f اصلی‌ترین ترکیب ساپونینی این گونه بود، زیرا علاوه‌بر شـــدت رنگ بیشـــتر، در تمام بخش‌های استخراج‌شده حضور داشت (شکل‌های ۵ و ۶، جدول ۲).



شکل ۵: کروماتوگرام‌های حاصل از ساپونین گونه *Silene bupleuroides* در بخش‌های مختلف روش اول استخراج: (A) بخش اتانولی (B) بخش آبی ۵۰ درصد (C) بخش بوتانولی ۵۰ درصد (D) بخش آبی ۷۰ درصد (E) بخش بوتانولی ۷۰ درصد

Fig 5: Chromatograms resulted from the first method of saponin extraction from *Silene bupleuroides*: (A) Ethanol (B) Water 50% (C) Butanol 50% (D) Water 70% (E) Butanol 70%



شکل ۶: کروماتوگرام‌های حاصل از ساپونین گونه *Silene bupleuroides* در بخش‌های مختلف روش‌های دوم و سوم استخراج: (A) بخش اترنفتی در روش دوم (B) بخش متانولی در روش دوم (C) بخش متانولی ۷۰ درصد در روش سوم

Fig 6: Chromatograms resulted from the second and third methods of saponin extraction from *Silene bupleuroides*: (A) Petroleum ether in the second method (B) Methanol in the second method (C) Methanol 70% in the third method

جدول ۲: ویژگی‌های لکه‌های ساپونین گونه *Silene bupleuroides* بر روی صفحات TLC

Table 2: Saponin dots characteristics of *Silene bupleuroides* on TLC plates

شماره لکه Number of Spots	R_f	رنگ لکه Color Spots	شدت رنگ Accent
1	0.21	صورتی روشن Bright pink	+
2	0.33	ارغوانی Purple	+++++
3	0.38	بنفش Violet	++++
4	0.40	بنفش روشن Violet light	++
5	0.50	بنفش تیره Dark purple	+++

فعالیت ضدباکتریایی ساپونین‌ها

بخش‌های۱ و ۵ حاصل از روش اول، اثر ضدباکتریایی مشابهی نشان دادند. بیشترین اثر ضدباکتریایی به‌ترتیب در برابر باکتری‌های *Citrobacter amalonaticus* و *Proteus vulgaris* مشاهده شد ولی در برابر باکتری‌های *Bacillus cereus* و *Enterobacter aerogenes* هیچ فعالیتی مشاهده نشد. بخش‌های ۲، ۳ و ۴ بیشترین اثر ضدباکتریایی را در برابر هر چهار باکتری نشان دادند. بخش‌های ۱ و ۳ حاصل از روش دوم بر روی سه باکتری *Bacillus cereus*، *Proteus vulgaris* و *Citrobacter amalonaticus* مؤثر بوده، ولی بر روی *Enterobacte raerogenes* اثری نداشت. بخش ۲ بر روی باکتری *Bacillus cereus* بی‌تأثیر و بر روی سایر باکتری‌ها موثر بود. بخش ۴ نیز هیچ اثر ضدباکتریایی بر روی چهار سویه باکتری مورد بررسی نشان نداد (جداول ۳ و ۴، شکل ۷).

جدول ۳: فعالیت ضدباکتریایی ساپونین *Silene bupleuroides* حاصل از روش اول استخراج

Table 3: Antibacterial activity of *Silene bupleuroides* saponin resulted from the first extraction method

سویه‌های باکتریایی Bacterial strains	بخش‌های مختلف حاصل از روش اول Different parts of the first method				
	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5
Enterobacter aerogenes	0	$6^c \pm 3.59$	$0.5^b \pm 4.19$	$6^c \pm 4.01$	0
Bacillus cereus	0	$4.5^b \pm 2.12$	$5^c \pm 2.69$	$3.5^a \pm 3.34$	0
Proteus vulgaris	$0.5^b \pm 5.04$	$4^a \pm 2.57$	$0.5^b \pm 5.04$	$4^a \pm 2.57$	$0.5^b \pm 5.04$
Citrobacter amalonaticus	$4^a \pm 5.92$	$6^c \pm 4.04$	$4^a \pm 5.92$	$5.2^b \pm 4.17$	$4^a \pm 5.92$

اعداد با حروف مشابه در هر ردیف در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

Numbers with the same letters in each row are not significantly different at the 0.05 level

بحث

نام ساپونین‌ها براساس فعالیت سطحی آن‌ها انتخاب شده است، زیرا بسیاری از آن‌ها دارای خاصیت کف‌کنندگی هستند و در آب کف پایدار تولید می‌کنند (*هلس*[1]، 1998). قابلیت ایجاد کف یکی از ویژگی‌های ساپونین‌هاست که با استفاده از آن می‌توان به احتمال حضور این ترکیبات در گیاه پی برد. مشاهده کف پایدار در آزمون تعیین شاخص کف‌کنندگی وجود ساپونین در بخش‌های هوایی گونه مورد مطالعه را به اثبات رساند. براساس نتایج تحقیقاتی که روی استخراج ساپونین گیاهان مختلف حاصل شده است، انتخاب حلال روی مقدار، خلوص و غلظت اجزاء ساپونین استخراج شده مؤثر است (*گوکلو- اوستوندا* و *مازا*[2]، 2007). به همین دلیل در این پژوهش از حلال‌های

1. Health

2. Guclu-Ustunda and Mazza

مختلف به‌منظور افزایش کارآیی روش عصاره‌گیری استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از مطالعه سه روش مختلف استخراج ساپونین روی این گونه حاکی از آن است که اگرچه تفاوت میان مقدار ساپونین استخراج شده از روش‌های اول و دوم چندان زیاد نیست، لیکن بیشترین مقدار ساپونین مربوط به روش اول و کمترین مقدار، مربوط به روش سوم می‌باشد. از سوی دیگر بررسی نتایج کمی و کیفی محتوای ساپونین‌ها طی استخراج به روش‌های مختلف نشان داد که در روش اول ناخالصی‌ها به مقدار قابل‌توجهی با دی‌اتیل‌اتر حذف شده و ساپونین خالص‌تری جدا می‌شود. لکه‌های غیرساپونینی با رنگ خاکستری در روش‌های مختلف عصاره‌گیری، با توجه به نوع حلال به‌صورت همراه و یا به‌صورت جدا از لکه‌های ساپونینی در کروماتوگرام‌ها مشاهده شدند. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از سه روش مختلف، اثر هر یک از حلال‌های مورد استفاده در مراحل عصاره‌گیری و خالص‌سازی ساپونین‌های گیاه مورد بررسی را مشخص نمود. عصاره خام حاصل از مرحله اول در هر سه روش عصاره‌گیری، واجد لکه‌های غیرساپونینی بود، اما این لکه‌ها طی بخش‌سازی در حلال‌های مختلف مرحله آخر در روش اول عصاره‌گیری حذف شدند. از سوی دیگر این لکه‌ها با پیشرفت مراحل عصاره‌گیری طی روش‌های دوم و سوم باقی ماندند و همراه با لکه‌های ساپونینی ظاهر شدند. کروماتوگرام مرحله آخر (فاز بوتانولی) حاصل از عصاره‌گیری با روش اول نیز عاری از ناخالصی بود که برتری این روش را تأیید می‌کند. همچنین مقدار ساپونین استخراج شده از روش سوم عصاره-گیری برای این گیاه مناسب نیست، زیرا علاوه‌بر کاهش مقدار ساپونین استخراج شده، مواد غیرساپونینی مزاحم نیز در کروماتوگرام آن رویت می‌شود. همچنین در روش دوم، بالا بودن مقدار ساپونین استخراج شده به‌علت تداخل ترکیبات غیرساپونینی است. تصاویر کروماتوگرام حاصل از عصاره‌گیری با این روش حضور ترکیبات غیرساپونینی را به‌صورت لکه‌های خاکستری رنگ نشان می‌دهد. روش‌های مورد بررسی در این پژوهش قبلاً برای جداسازی ساپونین‌ها از گونه‌های *Cyclamen coum* و *Acanthophyllum squarrosum* نیز به‌کار رفته، لیکن نتایج متفاوتی را حاصل نموده‌است. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت اسکلت ساختمانی ترکیبات ساپونینی در گیاهان مختلف باشد (*ویست و گریگیر*[1]، 1978). بنابر گزارش‌های موجود، روش دوم مناسب‌ترین روش برای استخراج ساپونین از گیاه *Acanthophyllum squarrosum* بوده (عسگری، ۱۳۶۴) و در گیاه *Cyclamen coum*، بهترین روش جهت دستیابی به محتوای ساپونین بالاتر و مواد مزاحم و غیرساپونینی کمتر، روش اول است. اگرچه بیشترین مقدار ساپونین استخراج شده مربوط به روش دوم است که احتمالاً به علت تداخل ترکیبات ساپونینی و غیرساپونینی می‌باشد (احمدبیگی، ۱۳۸۸). بنابراین در روش اول استخراج مواد موثره از بخش‌های هوایی گونه *Silene bupleuroides* با محلول‌های مختلف اتانول انجام شد، سپس با کاربرد دی‌اتیل‌اتر پس از چربی‌زدایی عصاره، ساپونین خالص‌تری توسط بوتانول نرمال جداسازی شد. در تحقیق حاضر شناسایی دقیق ساختار شیمیایی ساپونین‌ها صورت نگرفت، اما R_f و شدت رنگ لکه‌ها مشخص شد. کروماتوگرافی لایه نازک این عصاره‌ها پنج لکه ساپونینی را در محدوده R_f = ۰/۲-۰/۵ به رنگ‌های صورتی تا بنفش آشکار کرد. ساپونین‌ها دارای اثرات مخربی بر روی پروتوزوآها می‌باشند که این اثر را از طریق اتصال به استرول‌های سطحی پروتوزوآ اعمال می‌کنند. استرول‌ها در غشاهای باکتریایی وجود ندارند و شاید به همین دلیل اثر آن‌ها بر روی باکتری‌ها زیاد نیست. ساپونین حاصل از بخش‌های حاصل از روش‌های اول و دوم در گونه مورد بررسی، اثرات ضدباکتریایی متفاوتی را بر روی باکتری‌ها داشته و ساپونین حاصل از روش اول، خاصیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به روش دوم نشان داد.

1. West and Greger

جدول ۴: فعالیت ضدباکتریایی ساپونین *Silene bupleuroides* حاصل از روش دوم استخراج

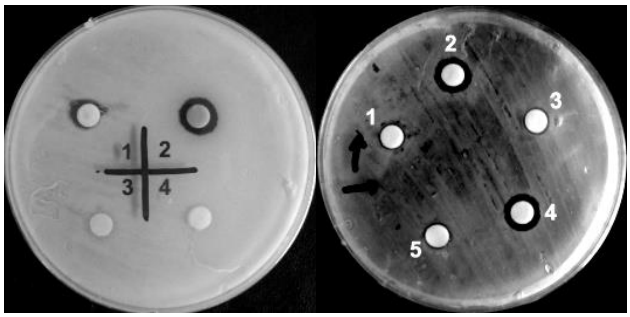
Table 4: Antibacterial activity of *Silene bupleuroides* saponin resulted from the second extraction method

سویه‌های باکتریایی Bacterial strains	بخش‌های مختلف حاصل از روش دوم Different parts of the second method			
	F_1	F_2	F_3	F_4
E. aerogenes	0	$3^a \pm 3.31$	0	0
B. cereus	$3^a \pm 3.39$	0	$3^a \pm 3.39$	0
P. vulgaris	$2^a \pm 2.88$	$5^c \pm 4.05$	$3^b \pm 3.39$	0
C. amalonaticus	$1^a \pm 4.69$	$4^b \pm 2.49$	$1^a \pm 4.69$	0

اعداد با حروف مشابه در هر ردیف در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری ندارند.

Numbers with the same letters in each row are not significantly different at the 0.05 level

ب (**B**) الف (**A**)



شکل ۷: (A) قطر هاله (mm) حاصل از اثر ساپونین گونه *Silene bupleuroides* در بخش‌های مختلف روش اول روی باکتری *Proteus vulgaris* (B) قطر هاله (mm) حاصل از اثر ساپونین *Silene bupleuroides* در بخش‌های مختلف روش دوم روی باکتری *Enterobacter aerogenes*

Fig 7: (A) Inhibition zone diameter (mm) resulted from *Silene bupleuroides* saponin against *Proteus vulgaris* (different fractions of the first method) (B) Inhibition zone diameter (mm) resulted from *Silene bupleuroides* saponin (different fractions of the second method) against *Enterobacter aerogenes*

منابع

احمدبیگی، ز. ۱۳۸۸. مقایسه کارایی سه روش استخراج ساپونین از ساقه غده‌ای گیاه نگونسار (*Cyclamen coum*)، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه الزهرا، تهران. ۱۴۵صفحه.

عسگری، ژ. ۱۳۶۴. شناسایی ساپونین گیاه چوبک (*Acanthophyllum squarrosum*) و بررسی فیتوشیمیایی گیاه، پایان‌نامه دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی دانشگاه تهران. ۱۸۰ صفحه.

قهرمان، ا. ۱۳۷۳. کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). مرکز نشر دانشگاهی، تهران. ۳۵۰ صفحه

Anonymous, A. 1996. Pharmacopiea of India (The Indian Pharmacopiea), 3rd Ed., Govt. of India, New Delhi, Ministry of Health and Family Welfare.

Balandrin, M. F. 1996. Commercial utilization of plant-derived saponins: an overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. Advances in Experimental Medicine and Biology, 404: 1-14.

Bonte, F., Massiot, G. and Meybeck, A. 1998. Method of treatment for combating the effects of aging on the condition of skin and hair. United States Patent, 5: 770-223.

Choi, S., Jung, S. Y., Kim, C. H., Kim, H. S., Rhim, H., Kim, S. C. and Nah, S. Y. 2001. Effect of ginsenosides on voltage-dependent Ca^{2+} channel subtypes in bovine chromaffin cells. Journal of Ethnopharmacology, 74(1): 75-81.

Dorsaz, A. C., Hostettmann, M. and Hostettmann, K. 1988. Molluscicidal saponins from *Sesbania sesban*. Planta Medica, 54: 225-227.

Ebrahimzade, H. and Niknam, V. 1998. A revised spectrophotometric method for determination of triterpenoid saponins. Indian Drug, 35(6): 379-381.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems. British Journal of Nutrition, 88: 587-605.

Guclu-Ustunda, O. and Mazza, G. 2007. Saponin: properties, applications and processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47: 231-258.

Gurfinkel, D. M. and Rao, A. V. 2003. Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. Nutrition and Cancer, 47: 24-33.

Harwood, H. J. Jr., Chandler, C. E., Pellarin, L. D., Bangerter, F. W., Wilkins, R. W., Long, C. A., Cosgrove, P. G., Malinow, M. R., Marzetta, C. A., Pettini, J. L., Savoy, Y. E. and Mayn, J. T. 1993. Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin beta-tigogenin cellobioside (CP-88818; tiqueside). Journal of Lipid Research, 34(3): 377-395.

Health, O. W. 1998. World Health Organization, Quality Control. Methods for Medicinal Plant Materials 46.

Hu, J., Lee, S. O., Hendrich, S. and Murphy, P. A. 2002. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50(9): 2587-2594.

Lee, H. K., Koh, H. L., Ong, E. S. and Woo, S. O. 2002. Determination of ginsenosides in medicinal plants and health supplements by pressurized liquid extraction (PLE) with reversed phase high performance liquid chromatography. Journal of Separation Science, 25(3): 160-166.

Lee, K. T., Sohn, I. C., Park, H. J., Kim, D. W., Jung, G. O. and Park, K. Y. 2000. Essential moiety for antimutagenic and cytotoxic activity of hederagenin monodesmosides and bisdesmosides isolated from the stem bark of *Kalopanax pictus*. Planta Medica, 66(4): 329-332.

Liu, W. K., Xu, S. X. and Che, C. T. 2000. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. Life Science, 67(11): 1297-1306.

Meng, Y., Whiting, P., Zibareva, L., Bertho, G., Girault, G. P., Lafont, R. and Dinan, L. 2002. Identification and quantitative analysis of the phyto-ecdysteroids from *S. pseudotites*. Journal Chromatography, 935: 309-319.

McAllister, T. A., Annett, C. B., Cockwill, C. L., Olson, M. E., Wang, Y. and Cheeke, P. R. 2001. Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiosis. Veterinary Parasitology, 97(2): 85-99.

Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T. and Yoshikawa, M. 2000. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. The Journal of Biological Chemistry, 381(1): 67-74.

Oleszek, W. A. 2002. Chromatographic determination of plant saponins. Journal of Chromatography A, 967(1): 147-162.

Oleszek, W. and Bialy, Z. 2006. Chromatographic determination of plant saponins: an update (2002-2005). Journal of Chromatography A, 1112(1-2): 78-91.

Olmstead, M. J. 2002. Organic toothpaste containing saponin. US Patent, 6: 485-711.

Organization-World-Health, 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO.

Osbourn, A. E. 1996. Saponins and plant defense- a soap story. Trends in Plant Science, 1: 4-9.

Spoerke, D. G., Spoerke, S. E., Hall, A. and Rumack, B. H. 1987. Toxicity of *Cyclamen persicum* Mill. Veterinary and Human Toxicology, 29: 250-251.

Sun, H. K. and Pan, H. J. 2006. Immunological adjuvant effect of *Glycyrrhiza uralensis* saponins on the immune responses to ovalbumin inmice. Vaccine, 24(11): 1914-1920.

Wagner, H. and Bladt, S. 1998. Plant drug analysis (Atlas of Thin Layer Choromatography). Springer, 306.

West, L. G. and Greger, J. L. 1978. *In vitro* studies on saponin mineral complexation. Journal of Food Science, 43: 1342-1343.

Yayli, N., Baltaci, C., Zengin, A., Kukislamoglu, M. and Gen, H. 1998. A triterpenoid saponin from *Cyclamen coum*. Phytochemistry, 48(5): 881-884.

Efficiency of Extraction Methods and Antibacterial Activity of Saponins in *Silene bupleuroides* L. (Caryophyllaceae)

Karamian[1*], R. and Jamali, R.[2]

Abstract

The genus *Silene* L. with more than 2200 species is the largest genera of the family Caryophyllaceae in the world mostly distributed in north hemisphere, Europe, Asia and North Africa. About 110 species of this genus grow in Iran, of which 35 are endemic with narrow geographical distribution. Saponins are one of the important secondary metabolites that are found among members of the genus *Silene*. In this research, saponins from aerial parts of *Silene bupleuroides* L. were extracted by three different methods. Quantitative and qualitative measurements of saponins were done by spectrophotometery and Thin Layer Chromatography methods, respectively. Results showed that solubility and stability of saponins were affected by features of solvents and special solvents can remove undesirable compounds and increasing extraction efficiency. Five dotswere obtained from *S. bupleuroides*, of which a dot with R_f = 0.33 is the major components. In addition, antibacterial activity of the saponins was investigated against 4 different Gram negative and positive bacteria including *Proteus vulgaris*, *Citrobacter amalonaticus*, *Bscillus cereus* and *Enterobacter aerogenes* by disc diffusion method. *Proteus vulgaris* and *Citrobacter amalonaticus* are the most sensitive bacteria treated bysaponins of different parts.

Keywords: Antibacterial, Saponins, Spectrophotometry, Thin Layer Chromatography, *Silene bupleuroides* L.

1. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan
2. Graguated Student, Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan
*: Corresponding author Email: R_karamian@basu.ac.ir