Archive of SID

بررسی اثر ضدباکتری عصاره‌های برگ جعفری کوهی انبوه علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی و تفکیک جزءهای مؤثر

یعقوب صرافی[1]*، حدیث توحدی[2]، حسین دهقان[3]

۱- دکتری شیمی آلی، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲- کارشناسی ارشد شیمی آلی، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۳- دکتری شیمی آلی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
* آدرس مکاتبه: بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده شیمی، گروه شیمی آلی، کدپستی: ۱۳۵۳۴ – ۴۷۴۱۶
تلفن و نمابر: ۳۵۳۰۲۳۵۰ (۰۱۱)
پست الکترونیک: ysarrafi@umz.ac.ir ،h.dehghan@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۲/۲

چکیده

مقدمه: جعفری کوهی انبوه (***Pimpinella affinis***) از خانواده چتریان و یکی از سبزی‌های مصرفی مناطق شمالی ایران است.

هدف: پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر ضدباکتری عصاره‌های برگ جعفری کوهی انبوه علیه دو سویه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی و جداسازی اجزای موثرآن انجام شد.

روش بررسی: حداقل غلظت بازداری (**MIC**) عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی به دست آمده از برگ جعفری کوهی انبوه علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به روش براث میکرودایلوشن بررسی شد. با توجه به نتایج حاصل، عصاره اتیل‌استاتی جهت جداسازی اجزای فعال آن انتخاب و سپس با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی ستونی و لایه نازک (**TLC**) به ۲۹ جزء تفکیک شد. اثر ضد باکتریایی اجزای به دست آمده نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: عصاره اتیل‌استاتی (با **MIC=۱/۰ mg/ml** علیه استافیلوکوکوس اورئوس و **MIC=۲/۰ mg/ml** علیه اشرشیاکلی) نسبت به دو عصاره دیگر نتایج بهتری را نشان داد. از میان ۲۹ جزء به دست آمده از عصاره اتیل‌استاتی، جزءهای **F۵-F۳**، **F۸** و **F۹** علیه استافیلوکوکوس اورئوس (با **MIC=۵/۰ µg/ml** و **P<۰/۰۵**) دارای بالاترین قدرت مهارکنندگی بودند. حداقل غلظت بازداری کلرامفنیکل به عنوان استاندارد علیه استافیلوکوکوس اورئوس برابر با **MIC=۱/۰ µg/ml** (**P<۰/۰۱**) می‌باشد. تمامی نتایج گزارش شده دارای **p-value** کمتر از ۰/۰۵ می‌باشند و دارای سطح معنی‌داری مناسبی هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که اثر مهارکنندگی هر سه عصاره هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از اشرشیاکلی است. همچنین جزءبندی عصاره اتیل‌استاتی منجر به بدست آوردن جزءهایی (**F۵-F۳**، **F۸** و **F۹**) تا ۲۰۰ برابر فعال‌تر از خود عصاره اتیل‌استاتی شد.

گل‌واژگان: جعفری کوهی انبوه، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، کروماتوگرافی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

طی ۳۰ سال گذشته که از آن به عنوان عصر طلایی آنتی‌بیوتیک‌ها یاد می‌کنند، دانشمندان توانستند به گستره وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی دست یابند و در نتیجه آن پزشکان به حق انتخاب بیشتری در درمان بیماری‌های عفونی دست یافتند. هم‌اکنون تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار منشأ طبیعی دارند. به طوری که از ۹۰ آنتی‌بیوتیک موجود در بازار در سال‌های ۱۹۸۲ تا ۲۰۰۰، ۷۰ آنتی‌بیوتیک دارای منشأ طبیعی بودند. کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها به انسان ختم نمی‌شود و از آنها به صورت مکمل غذایی برای حفظ سلامتی و افزایش رشد در احشام نیز استفاده می‌شود [۲، ۱]. انعطاف‌پذیری ژنومی و توانایی تغییر در اطلاعات ژنتیکی، باکتری‌ها را نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم کرده است. از طرفی استفاده زیاد، طولانی مدت و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در داروهای انسانی، حیوانی و کشاورزی منجر به مقاومت این عوامل بیماری‌زا می‌شود و دانشمندان را بر این می‌دارد تا به کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید با اثربخشی بیشتر و عوارض جانبی کمتر بپردازند [۴، ۳].

گیاهان منبع عظیمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که تا کنون تنها درصد بسیار ناچیزی از آن‌ها شناسایی شده است و خواص بیولوژیکی تعداد بسیار کمتری نیز مورد بررسی قرار گرفته است. از این رو بررسی خواص بیولوژیکی این منبع عظیم خدادادی جهت کشف داروهای جدید یکی از مهمترین چالش‌های داروسازان، بخصوص در زمینه گیاهان دارویی می‌باشد [۵].

جعفری کوهی انبوه یا اناریجه (*Pimpinella affinis*) گیاهی دو ساله از خانواده چتریان (Apiaceae) و جنس *Pimpinella* می‌باشد. پراکندگی جغرافیایی این گونه در آناتولی، ایران، ترکمنستان، افغانستان، قفقاز و عراق است. در ایران در شمال، شمال غرب، مرکز، شرق و شمال شرق پراکنده است. مردم مناطق شمالی ایران و به خصوص منطقه هیرکانی (استان‌های مازندران، گلستان و گیلان) از برگ‌های تازه این گیاه به عنوان یک سبزی معطر در رژیم غذایی خود استفاده می‌کنند. جنس *Pimpinella* در ایران حدود ۲۳ گونه دارد [۸-۶]. گونه‌های این جنس در مناطق مختلف اروپا، آسیا و از جمله ایران کاربردهای مختلفی دارند. برای مثال از گونه *P. anisum* به عنوان عامل خلط‌آور، ضداسپاسم، افزایش‌دهنده شیر، ضدعفونی‌کننده، ضدنفخ و مدر در داروخانه‌ها و به عنوان افزودنی در صنایع نوشیدنی استفاده می‌شود [۱۰، ۹]. در فارماکوپه آلمان از *P. saxifraga* در داروهای خلط‌آور و افزایش‌دهنده ترشحات برونش استفاده می‌شود و در ترکیه از آن به عنوان یک داروی تسکین‌دهنده، خلط‌آور، ضدنفخ و مقوی نام می‌برند [۱۱]. همچنین گونه *P. major* در استرالیا به عنوان یک داروی ضد باکتری به فروش می‌رسد [۹].

تاکنون مطالعات معدودی بر روی جعفری کوهی انبوه (*Pimpinella affinis*) صورت گرفته است. در تمامی آنها تنها ترکیبات موجود در اسانس (ترکیبات فرار) این گیاه بررسی شده است. با توجه به مطالعات انجام شده، ترکیبات اصلی اسانس این گیاه بسته به محل رویش آن متفاوت است. برای مثال، ترکیب trans-alpha-bergamotene به عنوان ترکیب شاخص اسانس ساقه و برگ، گل‌آذین و بذر نمونه نوشهر (بیش از ۹۰ درصد) شناخته شده است. trans-alpha-bergamotene ترکیب معطری است که در سنتز بسیاری از ترکیبات معطر دیگر کاربرد دارد [۱۲]. در نمونه خوجیر، دو ترکیب γ –terpinen-7-al (۳۷/۶ تا ۷۲/۸ درصد) و limonene (۴۷/۹ تا ۹۰/۵ درصد) ترکیبات اصلی اسانس اندام‌های مختلف جعفری کوهی انبوه را تشکیل داده‌اند. در نمونه چالوس نیز γ –terpinen-7-al (۴۹/۱ تا ۷۲/۸ درصد) و limonene (۳۷/۸ تا ۷۰/۸ درصد) بیشترین مقدار را در اسانس اندام مختلف این گونه به خود اختصاص دادند [۷]. همچنین در تحقیقی دیگر ۱۴ ترکیب در اسانس میوه گیاه اناریجه شناسایی شد که از میان آنها geijerene (۱۷/۷ درصد) و limonene (۱۲/۹ درصد) بیشترین درصد را به خود اختصاص دادند [۱۳]. تنها یک گزارش از خاصیت ضدمیکروبی این گیاه وجود دارد که در آن خاصیت ضدقارچی (MIC=۲ mg/ml علیه *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida albicans*) از اسانس میوه آن گزارش شده است [۱۳]. اما در رابطه با اثر ضدمیکروبی عصاره آن گزارشی ارائه نشده است.

www.SID.ir

Archive of SID

از جمله راه‌های رسیدن هدفمند به ترکیبات دارویی، روش «جزءبندی با هدف بیولوژیکی» است. پائول ارلیچ از این روش به میزان اندکی در مفاهیم اساسی کتاب خود (داروها اثر نمی‌کنند مگر آنکه محدود شوند) به کار گرفته است. بر اساس این اصول مولکول‌های زیستی باید با استفاده از روش‌های تجزیه‌ای جدا شوند تا به یک انتخاب‌پذیری زیستی دست یافته و بتوان روی ترکیب مورد نظر تمرکز کرد [۱۴].

هدف از نگارش مقاله موجود، بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره جعفری کوهی انبوه (علیه دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی) به همراه روش جزءبندی بیولوژیکی است. بر این اساس جداسازی (بر اساس اختلاف قطبیت) و شناسایی جزءهای فعال عصاره برگ جعفری کوهی انبوه از سایر اجزاء به کمک جزءبندی اولیه توسط روش عصاره گیری متوالی (sequential extraction) [۱۵] و در پی آن جزءبندی نهایی توسط روش‌های کروماتوگرافی ستونی (column chromatogaphy) و کروماتوگرافی لایه نازک (thin layer chromatography) انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

برگ‌های تازه جعفری کوهی انبوه (*Pimpinella affinis*) در فروردین ماه سال ۱۳۹۱ از منطقه دودانگه ساری (مازندران) جمع‌آوری شد. سپس توسط بخش گیاه‌شناسی باغ گیاه‌شناسی نوشهر با شماره هرباریومی ۳۱۴۸ مورد تأیید قرار گرفت. پس از شستشو، گیاه توسط جریان هوای خشک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور خورشید خشک و جهت انجام فرایند عصاره‌گیری به صورت پودر درآورده شد.

در این پژوهش از روش عصاره‌گیری متوالی (sequential extraction) جهت به دست آوردن عصاره‌های هگزانی (غیرقطبی)، اتیل‌استاتی (نیمه‌قطبی) و متانولی (قطبی) برگ جعفری کوهی انبوه (*P. affinis*) استفاده شده است. بر اساس این روش ابتدا به ۲/۵ کیلوگرم از برگ گیاه خشک شده ۲۰ لیتر حلال هگزان اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. سپس عصاره حاصل به کمک کاغذ صافی صاف و توسط تبخیرکننده دوار تحت فشار ۳۳۵ میلی‌بار تغلیظ و خشک شد. برای افزایش بازده عصاره‌گیری با حلال هگزان ۳ بار تکرار شد. سپس جهت استحصال عصاره اتیل‌استاتی، باقی‌مانده گیاه از مرحله قبل را خشک و ۲۰ لیتر حلال اتیل استات به آن اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت خیساندن، عصاره اتیل استاتی صاف و توسط تبخیرکننده دوار تحت فشار ۲۴۰ میلی‌بار تغلیظ و خشک شد. عملیات عصاره‌گیری در این مرحله نیز ۳ بار تکرار شد. در مرحله آخر نیز پس از خشک کردن بقایای گیاه ۲۰ لیتر حلال متانول به آن اضافه شد. عصاره حاصل صاف و تحت فشار ۲۵۳ میلی‌بار توسط تبخیرکننده دوار تغلیظ و خشک شد [۱۶]. در پایان این مرحله ۳۰/۹ گرم عصاره هگزانی (وزنی/وزنی ۱/۲ درصد)، ۴۰ گرم عصاره اتیل‌استاتی (وزنی/وزنی ۱/۶ درصد) و ۱۴۲/۵ گرم عصاره متانولی (وزنی/وزنی ۵/۷ درصد) به دست آمد.

در این مطالعه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC۲۵۹۲۳) به عنوان باکتری گرم مثبت و اشرشیاکلی (ATCC۲۵۹۲۲) به عنوان باکتری گرم منفی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و جهت سنجش فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها استفاده شد. در اینجا از روش براث میکرودایلوشن که توسط موسسه CLSI برای اندازه‌گیری MIC (حداقل غلظت موردنیاز نمونه برای بازداری رشد باکتری) پیشنهاد شده است، استفاده شد [۱۷]. برای این منظور از میکروپلیت ۹۶ چاهکی استفاده شد. دوز مصرفی استوک نمونه‌ها (عصاره‌ها و جزءهای عصاره اتیل استاتی) ۳۰ mg/ml (در DMSO) بود و رقت‌های متوالی تا (۱۰ رقت برای عصاره‌ها: ۱۰، ۵، ۲/۵، ۲/۰، ۱/۲۵، ۱/۰، ۰/۶۳، ۰/۵، ۰/۳۱ و ۰/۲۵ mg/ml و ۱۳ رقت برای جزءهای عصاره اتیل استات: ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹، ۰/۰۲، ۰/۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۲ mg/ml) تهیه شدند. برای رقت‌سازی در چاهک اول ۲۰۰ µl محیط کشت و نمونه و در بقیه چاهک‌ها ۱۰۰ µl از محیط کشت استریل (مولر – هینتون براث) ریخته شد. در ادامه ۱۰۰ µl از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد. چند بار چاهک دوم را پر و خالی کرده تا نمونه با محیط کشت مخلوط شود. پس از آن ۱۰۰ µl از

www.SID.ir

Archive of SID

چاهک دوم توسط سمپلر برداشته و به چاهک سوم اضافه شد. این کار تا چاهک ۱۱ ادامه یافت. ۱۰۰ µl از استوک باکتری به غلظت ۱×۱۰^{۶}CFU به همه چاهک‌ها به استثنای چاهک شماره ۱۱ اضافه شد. از چاهک‌هایی که حاوی محیط کشت و عصاره بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از ۱۰ چاهک که فقط حاوی باکتری بودند، جهت تعیین کدورت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۰ ثانیه با هم‌زن ارتعاشی با دور ۳۰۰ rpm هم زده شد و سپس به مدت ۲۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد. بعد از این مدت کم‌ترین غلظتی که در آن عدم رشد باکتری یا کدورت دیده شد به عنوان MIC گزارش شد. همه آزمایش‌ها دو بار تکرار شد و از کلرامفنیکل (chloramphenicol) به عنوان آنتی‌بیوتیک استاندارد استفاده شد. در این آزمایش از ۱۱ رقت برای کلرامفنیکل: ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۳۱۲، ۰/۰۱۵۶، ۰/۰۰۷۸، ۰/۰۰۳۹، ۰/۰۰۱۹، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۵ mg/ml استفاده شد.

جهت جزءبندی عصاره اتیل‌استاتی به روش کروماتوگرافی، ابتدا یک ستون کروماتوگرافی شیشه‌ای (به قطر ۵ سانتی‌متر و طول ۹۰ سانتی‌متر) با ۸۵۰ گرم سیلیکاژل (مش ۲۳۰-۷۰) پر شد و طی ۴۸ ساعت توسط حلال هگزان شسته شد تا ذرات سیلیکاژل در طول ستون کاملاً در کنار هم قرار بگیرند و فواصل بین آنها یکنواخت شود. سپس ۴۰ گرم از عصاره اتیل‌استاتی خشک شده در ورودی ستون بارگذاری و توسط سیستم حلالی هگزان: اتیل‌استات به روش گرادیانی، شسته شد. شستشوی ستون با هگزان ۱۰۰ درصد آغاز و با افزودن تدریجی اتیل‌استات به آن (در طول یک ماه) به اتیل‌استات ۱۰۰ درصد ختم شد. سرانجام برای خروج کامل باقی‌مانده عصاره در ستون از حلال متانول استفاده شد. توسط این روش ترکیبات موجود در عصاره بر اساس قطبیت در طول ستون تفکیک و به حجم‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری در انتهای ستون به همراه حلال خارج شدند (ترکیبات کمتر قطبی سریع‌تر از ترکیبات قطبی از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شوند). سپس جزءهای به دست آمده توسط دستگاه تبخیرکننده دوار تغلیظ و خشک شدند. در ادامه جزءهای مشابه (از لحاظ وجود ترکیبات شیمیایی یکسان) توسط تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) شناسایی و با هم ادغام شدند. در این قسمت در حدود ۰/۱ میلی‌گرم از هر یک از اجزای به دست آمده بر روی صفحه TLC قرار داده شد و توسط حلال مناسب شسته شد و ترکیبات آنها به صورت لکه‌های مجزا (بر اساس قطبیت) تفکیک شدند. سپس جهت شناسایی تمامی لکه‌ها، بخصوص لکه‌هایی که در نور معمولی قابل روئیت نبودند، صفحات TLC زیر طول موج‌های ۲۵۴ و ۳۶۶ نانومتر اسکن و پس از آن با معرف فسفومولیبدیک اسید ظاهر شدند. در پایان از طریق مقایسه لکه‌های ظاهر شده‌ی مربوط به هر جزء، جزءهایی که بیشترین شباهت را با هم داشتند ادغام شدند [۱۸].

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد و $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

اثر ضد باکتریایی عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی برگ جعفری کوهی انبوه (*P. affinis*) علیه باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشرشیا کلی بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده، عصاره اتیل‌استاتی و متانولی با MIC=۱/۰mg/ml بهترین نتیجه را علیه استافیلوکوکوس اورئوس داشتند. همچنین عصاره اتیل‌استاتی با MIC=۲/۰mg/ml فعالیت بهتری علیه اشرشیاکلی نسبت به عصاره‌های دیگر نشان داد (جدول شماره ۱). همچنین اثر ضدباکتریایی هر سه عصاره وابسته به غلظت بود.

با توجه به جدول شماره ۱، در مجموع عصاره اتیل‌استاتی فعالیت ضدباکتریایی بهتری نسبت به دو عصاره دیگر داشت و از این رو به عنوان مناسب‌ترین عصاره جهت جداسازی اجزای فعال از غیرفعال آن توسط روش کروماتوگرافی انتخاب شد. توسط این روش عصاره‌ای که حاوی صدها ترکیب با فعالیت-های ضدباکتریایی مختلف است به چند جزء حاوی تعداد محدودی ترکیب (بر اساس قطبیت) تفکیک می‌شود. بنابراین با استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی ۴۰ گرم از جزء

www.SID.ir

Archive of SID

اتیل‌استاتی به ۱۴۹ جزء تفکیک شد. با مقایسه ۱۴۹جزء به دست آمده توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و ادغام اجزای مشابه، در نهایت ۲۹ جزء نهایی (F۱ تا F۲۹) حاصل شد. به طوری که قطبیت ترکیبات موجود در اجزاء از جزء F۱ به تدریج افزایش می‌یابد و در جزء F۲۹ به بیشترین حد می‌رسد.

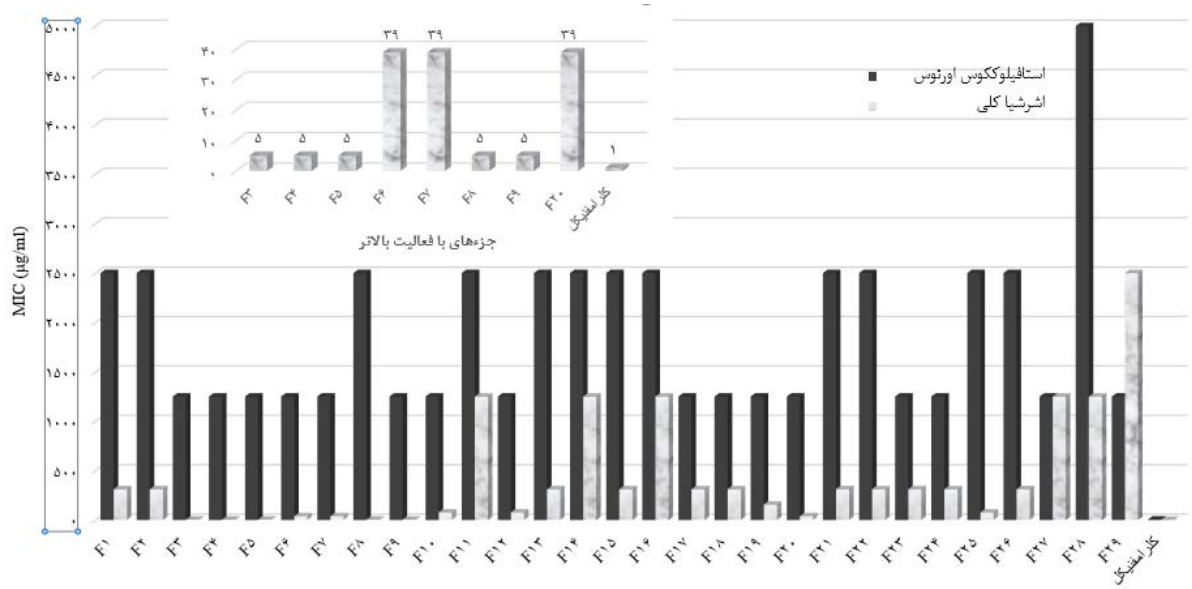
در ادامه اثر ضدباکتریایی ۲۹ جزء نهایی حاصل از عصاره اتیل‌استاتی علیه دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که به طور کلی فعالیت اجزاء علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از باکتری گرم منفی اشرشیاکلی است (شکل شماره ۱). تمامی نتایج گزارش شده دارای p-value کمتر از ۰/۰۵ می‌باشند و دارای سطح معنی‌داری مناسبی هستند.

در نگاه اول به جدول شماره ۱ و شکل شماره ۱، می‌توان دریافت که با تفکیک ترکیبات موجود در عصاره اتیل‌استاتی، برخی از اجزاء فعالیت بیشتری از خود نشان دادند و در برخی کاهش قدرت بازدارندگی نسبت به جزء اصلی مشاهده شد. نکته قابل‌توجه قدرت ضدباکتریایی بسیار بالای جزءهای غیرقطبی‌تر (F۳–F۹) می‌باشد. قدرت مهارکنندگی جزءهای F۳–F۵، F۸ و F۹ علیه استافیلوکوکوس اورئوس (MIC=۵/۰µg/ml) بسیار نزدیک به قدرت کلرامفنیکل (MIC=۱/۰µg/ml) که یک آنتی‌بیوتیک قوی می‌باشد، است. نتایج حاصل نشان‌دهنده اثر ضدباکتریایی وابسته به غلظت این اجزاء می‌باشد.

جدول شماره ۱– میزان فعالیت ضدباکتریایی (بر اساس MIC) عصاره‌های جعفری کوهی انبوه

عصاره	اشرشیاکلی (mg/ml)	استافیلوکوکوس اورئوس (mg/ml)
هگزانی	۵/۰*	۲/۵**
اتیل‌استاتی	۲/۰**	۱/۰*
متانولی	۲/۵**	۱/۰*
کلرامفنیکل	۰/۰۰۴**	۰/۰۰۱*

* P<۰/۰۵ در مقایسه با کنترل ** P<۰/۰۱ در مقایسه با کنترل



شکل شماره ۱– میزان فعالیت ضدباکتریایی جزءهای به دست آمده از عصاره اتیل‌استاتی *Pimpinella affinis* بر اساس MIC (µg/ml)

*** P<۰/۰۵، ** P<۰/۰۱ و *** P<۰/۰۰۱ در مقایسه با کنترل**

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این پژوهش قابلیت بالای جزءهای به دست آمده از عصاره اتیل‌استاتی برگ‌های گیاه جعفری کوهی انبوه (F۵-F۳، F۸ و F۹) در مهار باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس به اثبات رسید و مشخص شد پس از عصاره گیری، جزءبندی مناسب ترکیبات موجود در عصاره (به روش کروماتوگرافی) باعث افزایش چشمگیر خاصیت مهاری خواهد شد.

تاکنون مطالعه‌ای بر روی خاصیت ضدباکتریایی گیاه جعفری کوهی انبوه (*Pimpinella affinis*) انجام نگرفته است و این مقاله اولین پژوهش در این مورد می‌باشد. مقایسه نتایج این پژوهش با نتایج مطالعات صورت گرفته بر روی سایر گونه‌های جنس *Pimpinella* نشان می‌دهد که این گونه در مهار سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی در مقایسه با سایر گونه‌ها دارای فعالیت قابل توجهی می‌باشد. برای مثال در سایر مطالعات، فعالیت ضد باکتری قابل قبولی (بخصوص علیه دو سویه مذکور) از گونه *Pimpinella anisum* که معروف‌ترین و پرکاربردترین گونه این جنس می‌باشد، گزارش نشده است [۲۲-۲۰].

در آزمون تعیین MIC در محیط مایع، عصاره اتیل‌استاتی این گیاه نسبت به عصاره‌های هگزانی و متانولی آن خاصیت ضدباکتریایی بهتری را از خود نشان داد. با توجه به اینکه عصاره‌های اتیل‌استاتی شامل ترکیبات نیمه قطبی می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات نیمه قطبی برگ جعفری کوهی انبوه دارای اثر ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به سایر ترکیبات آن هستند. جزءبندی عصاره اتیل‌استاتی با روش کروماتوگرافی ستونی و لایه نازک، منجر به تفکیک اجزای فعال و غیرفعال این عصاره و به دست آمدن جزءهای فعال‌تر در برابر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی شد. در اینجا نیز باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی اشرشیاکلی نشان داده است. قدرت مهارکنندگی جزءهای F۵-F۳، F۸ و F۹ علیه استافیلوکوکوس اورئوس ۲۰۰ برابر فعال‌تر از عصاره اتیل‌استاتی و مشابه اثر کلرامفنیکل که یک آنتی بیوتیک قوی است می‌باشد. این نتایج نشان‌دهنده وجود ترکیب یا ترکیبات ضدباکتریِ بسیار قوی در این اجزاء می‌باشد. گزارش‌ها نشان‌دهنده خاصیت ضدباکتریایی بالای بسیاری از ترپنوئیدهای گلیکوزیدی است که برخی از آنها از جمله ethane-1,2-diol 1-O-*β*-D-glucopyranoside، *β*-3-hydroxyestragole D-glucopyranoside و *β*-(E)-3-hydroxyanethole glucopyranoside از جنس *Pinmpinella* گزارش شده‌اند [۱۹]. نتایج این پژوهش می‌تواند دارای اطلاعات مفیدی برای محققان علوم تغذیه و همچنین داروسازان باشد.

نتیجه گیری

به دست آوردن جزءهایی از برگ‌های گیاه جعفری کوهی انبوه (*Pimpinella affinis*) با فعالیت ضدباکتریایی نزدیک به کلرامفنیکل (یک آنتی‌بیوتیک قوی) از مهم‌ترین یافته‌های این تحقیق می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد اثر مهارکنندگی هر سه عصاره هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از باکتری گرم منفی اشرشیاکلی است. همچنین از میان این سه عصاره، عصاره اتیل‌استاتی دارای بالاترین اثر ضد باکتریایی بود.

منابع

1. Peláez F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? *Biochem Pharmacol*. 2006; 71 (7): 981-90.

2. Nosrati M and Behbahani M. The effects of the methanolic extracts of Prangos uloptera and crossoptera on the growth, mutagenicity and proliferation of human lymphocytes, based on ames test. *J. Babol Univ. Med. Sci*. 2015; 17 (6): 64-73.

3. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2013; 12 (5): 371 - 87.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Clardy J, Fischbach MA and Walsh CT. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat. Biotech*. 2006; 24 (12): 1541 - 50.

5. Rezayan A and Ehsani A. Evaluation of the chemical compounds and antibacterial properties of the aerial parts of persian *Heracleum persicum* essence. *J. Babol Univ. Med. Sci.* 2015; 17 (6): 26-32.

6. Mozaffarian V. Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. 1, editor. Iran: Farhang Moaser. 2012.

7. Askari F and Sefidkon F. Essential oil composition of Pimpinella affinis Ledeb. from two localities in Iran. *Flavour Frag. J*. 2006; 21 (5): 754-6.

8. Heidari M, Asadi Pour A, Sepehri G, Atapour N and Esmaeili. Study of the analgesic effect of Pimpinella Anisun extract by Tail-Flick and Formalin test in mice. *J. Babol Univ. Med. Sci*. 1999; 1 (3): 42-51.

9. Tabanca N, Bedir E, Ferreira D, Slade D, Wedge DE, Jacob MR and et al. Bioactive Constituents from Turkish Pimpinella Species. *Chem. Biodivers* 2005; 2 (2): 221-32.

10. Kermanshah H, Hashemi Kamangar, S, Arami S, Mirsalehian, A, Kamalinegad M, Karimi, M and et al. Comparison of Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of Four Plants against Cariogenic Microorganisms by two in Vitro Methods. *J. Babol Univ. Med. Sci*. 2011; 13 (6): 21-9.

11. Kisiel W, Janeczko Z and Zgud-Walaszek M. A germacradiene glycoside from roots of Pimpinella saxifraga. *Phytochem*. 1998; 49 (7): 2031-3.

12. Askari F, Sefidkon F and Ahmadi S. Introduction of one Iranian *Pimpinella* species as a natural source for trans-α-bergamotene production. *Iran. J. Med. Arom. Plant*. 2006; 22 (2): 98-104.

13. Verdian-rizi M. Chemical composition and antimicrobial activity of Pimpinella affinis Ledeb. essential oil growing in Iran. *Int. J. Green Pharm.* 2008; 2: 138-40.

14. Weller MG. A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors* 2012; 12 (7): 9181-209.

15. Jeyaseelan EC, Jenothiny S, Pathmanathan MK and Jeyadevan JP. Antibacterial activity of sequentially extracted organic solvent extracts of fruits, flowers and leaves of *Lawsonia inermis* L. from Jaffna. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2012; 2 (10): 798-802.

16. Dehghan H, Sarrafi Y and Salehi P. Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. *Journal of Food and Drug Analysis* 2016; 24 (1): 179-88.

17. Versalovic J. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology 2011.

18. Ode OJ, Asuzu IU and Ajayi I. Bioassay-Guided Fractionation of the Crude Methanol Extract of Cassia singueana Leaves. *Journal of Advanced Scientific Res*. 2011; 2 (4): 81-6.

19. Fujimatu E, Ishikawa T and Kitajima J. Aromatic compound glucosides, alkyl glucoside and glucide from the fruit of anise. *Phytochem*. 2003; 63 (5): 609-16.

20. Essawi T and Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 70 (3): 343-9.

21. Sokmen A, Jones BM, Erturk M. The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*. 1999; 67 (1): 79-86.

22. Sağdıç O and Özcan M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control* 2003; 14 (3): 141-3.

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of Antibacterial Activity of *Pimpinella affinis* Leaves Against *E. coli* and *S. aureus* and Separation of Active Fractions

Sarrafi Y (Ph.D.)[1]*, Tavahodi H (M.Sc.)[1], Dehghan H (Ph.D.)[2]

1- Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar 47416, Iran
2- Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran 3319118651, Iran
*Corresponding author: Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar 47416, Iran
Tel & Fax: +98- 11 - 35302352
Email: ysarrafi@umz.ac.ir, h.dehghan@shahed.ac.ir

Abstract

Background: ***Pimpinella affinis*** **(Apiaceae family) is a vegetable in the north of Iran.**

Objective: **This study was conducted to investigate antibacterial activity of *Pimpinella affinis* (against *E. coli* and *S. aureus*) and separate its active fractions.**

Methods: **Antibacterial activities of *n*-hexane, ethyl acetate and methanol extracts of leaves of *P. affinis* (against *E. coli* and *S. aureus*) were measured using broth microdilution method in MIC. Subsequently, the ethyl acetate extract was separated in to 29 fractions using column chromatography and thin layer chromatography (TLC). Also, antibacterial activities of the fractions have been measured.**

Results: **According to the results, among the extracts, ethyl acetate extract showed the best activities against *E. coli* and *S. aureus* (MICs=1.0 and 2.0 mg/ml, respectively). Also, among the obtained fractions from ethyl acetate extract, F3-F5, F8 and F9 showed best inhibitory activities (MIC=5.0µg/ml, P<0.05) compared with that of the chloramphenicol (MIC=1.0µg/ml, P<0.01). All of the results have p-values less than 0.05.**

Conclusion: **The results showed that the Gram positive *S. aureus* is more sensitive to the extracts than the Gram negative *E. coli*. Also, partitioning of the ethyl acetate extract leaded to obtain antibacterial fractions (F3-F5, F8 and F9) with 200-fold more active than the ethyl acetate extract.**

Keywords: ***Pimpinella affinis*****,** ***Escherichia coli*****,** ***Staphylococcus aureus*****, Chromatography**

www.SID.ir