

مقایسه میزان هیپریسین و اثر ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی گیاه گل راعی جمع آوری شده از سه منطقه جغرافیایی ایران

دکتر مریم اخباری*، محسن ابراهیمیان^۲

۱- استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده اسانس‌های طبیعی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران. ۲- کارشناس ارشد شیمی آلی، واحد شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: هیپریسین به عنوان ماده اصلی در گونه‌های مختلف گیاه هیپریکوم دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد ویروسی، مهارکنندگی غیراختصاصی کیناز و مهارکنندگی آنزیم دوپامین بتا هیدروکسیلاز است. این مطالعه به منظور مقایسه میزان هیپریسین و اثر ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی ایران شامل سه استان قم، گلستان و کردستان انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی میزان محتوی هیپریسین عصاره متانولی از اندام‌های هوایی گیاه گل راعی با روش UV-Vis تعیین شد. فعالیت ضد اکسیدانی عصاره‌ها از طریق اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار پراکسیداسیون لیپید مشخص گردید. فعالیت سمیت سلولی از طریق آزمون تعیین میزان مرگ و میر میگوی آب شور مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی با بررسی قطر هاله عدم رشد در آزمون دیسک دیفیوژن و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی شد.

یافته‌ها: میزان هیپریسین موجود در نمونه‌های قم، گلستان و کردستان به ترتیب 673 ppm ، 1223 ppm و 1568 ppm تعیین شد. میزان فعالیت ضد اکسیدانی و سمیت سلولی در نمونه‌های کردستان بیشتر از نمونه‌های قم و گلستان بود. در بررسی خواص ضد میکروبی، از نظر تعداد میکروارگانیسم‌های حساس به عصاره، روند کلی قم > کردستان > گلستان مشاهده شد. با این وجود در مورد دو سویه از جنس استافیلوکوکوس، عصاره گیاه کردستان با هاله‌ای برابر با ۱۹ و ۱۷ میلی‌متر به ترتیب برای استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس و میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برابر با $250 \mu\text{g/mL}$ برای هر دو سویه نام برده فعالیت بیشتری از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: غنای هیپریسین در نمونه گیاهی گیاه منطقه سردسیر کردستان بیشتر بود. فعالیت ضد میکروبی، ضد اکسیدانی و سمیت سلولی در عصاره‌های مورد مطالعه قابل توجه بوده و روند تغییرات این فعالیت‌ها با روند تفاوت میزان هیپریسین در آنها هماهنگ است.

کلید واژه‌ها: گیاه گل راعی، هیپریسین، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت سمیت سلولی، فعالیت ضد میکروبی

* نویسنده مسؤول: دکتر مریم اخباری، پست الکترونیکی m_akhbari@kashanu.ac.ir

نشانی: کاشان، بلوار قطب کاشانی، دانشگاه کاشان، پژوهشکده اسانس‌های طبیعی، کدپستی ۸۷۳۱۷-۵۱۱۶۷، تلفن و نمابر ۰۳۱-۵۵۶۴۳۲۹۲-۰۳۱
وصول مقاله: ۱۳۹۴/۳/۲، اصلاح نهایی: ۱۳۹۴/۵/۱۱، پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۳۱

مقدمه

بازکننده مخاط بینی و کاهش آن، درمان کزاز و باز کردن گرفتگی‌های معده و کبد و ازدیاد ترشح ادرار، تسکین سردردهای میگرنی و سردردهای عصبی و تاخیر در عادت ماهیانه زنان، آسم، صرع و تسکین اعصاب نقش اساسی ایفا می‌کند. هم‌اکنون نیز این گیاه به صورت مصرف خارجی برای درمان زخم‌ها و به صورت مصرف داخلی برای سیاتیک، بی‌خوابی، گرفتگی عادت ماهیانه، سردرد، سرما خوردگی، ناراحتی‌های سینه‌ای و نیز به عنوان آرام‌بخش مفید دانسته شده است. مهم‌ترین ترکیبات گیاه گل راعی، هیپریسین و سودوهیپریسین بوده که خواص ضدافسردگی و ضدویروسی دارند (۱-۴). هیپریسین جزء اصلی عصاره گیاه گل راعی، یک ماده کینونی است و در اکثر منابع علمی به عنوان

گیاه گل راعی (علف چای یا هوفاریقون) با نام علمی *Hypericum perforatum* L. به دلیل داشتن ترکیب‌های مهم شیمیایی و متابولیسم‌های ثانویه از ارزش بسیاری برخوردار است (۱). گونه‌های مختلف این گیاه در اروپا، نیمه‌شمالی ایران، آسیای صغیر، شمال آفریقا، کانادا، جنوب آمریکا و استرالیا به‌طور طبیعی رشد می‌کنند. گیاه گل راعی گیاهی آفتاب‌دوست و تا حدودی رطوبت پسند است. در استان‌های شمالی ایران از ارتفاع صفر تا بیش از ۲۰۰۰ متر از سطح دریا پراکنش دارد. این گیاه در ایران حدود ۱۷ گونه دارد که با ارزش‌ترین گونه آن *Perforatum* است. این گیاه در طب سنتی به عنوان داروی ضدافسردگی، خشک‌کننده و

مهم ترین ماده موثر این گیاه ذکر شده است. این ماده در نقطه های سیاه رنگ که روی اندام های مختلف گیاه تشکیل می شوند؛ وجود دارد. عصاره غنی از این ترکیب از دیرباز به عنوان یک داروی گیاهی و بدون عارضه جانبی مصارف درمانی متعددی داشته است. جدیدترین پژوهش ها و کاربردها در مورد هیپرسیسین شامل اثرات ضد میکروب، ضد قارچ، ضد ویروس (به خصوص ویروس عامل ایدز و هپاتیت) و ترمیم کننده موضعی، درمان زخم ها، سوختگی ها، آفتاب سوختگی و نیش حشرات است (۳۰ و ۳۱). در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۷۸ از عصاره این گیاه دارویی به شکل قطره و با نام هایپیران با مصارف متعدد درمانی منطبق با استاندارد جهانی و با کیفیتی برابر با انواع خارجی تهیه و به عنوان داروی رسمی ایران شناخته شد (۶۵). میزان هیپرسیسین موجود در گونه های مختلف هیپریکوم تاثیر به سزایی در خواص مشاهده شده از آن دارد (۴). میزان هیپرسیسین استخراج شده از گیاه تحت تاثیر عوامل متعددی از جمله زمان برداشت گیاه، میزان نور، موقعیت جغرافیایی و نوع حلال مورد استفاده است. تعداد غده های روی اندام های مختلف گیاه که دارای هیپرسیسین و دیگر ترکیبات مهم هستند؛ با افزایش شدت نور فتوسنتزی افزایش می یابند. هیپرسیسین بر روی بسیاری از باکتری های گرم مثبت و منفی (به خصوص دسته استافیلوکوک) موثر بوده و به همین دلیل فرآورده هایی از آن با اثرات بهبوددهندگی زخم وجود دارند. اثر ضد ویروس ایدز هیپرسیسین یکی از مهم ترین اثرات شناخته شده این ماده ارزشمند است (۱۰-۷). اجزاء اصلی عصاره گیاه با خواص دارویی شناخته شده به غیر از هیپرسیسین، شامل سودو هیپرسیسین و هیپرفورین است که خاصیت ضد التهابی، ضد ویروسی و ضد آفسردگی آنها به اثبات رسیده است (۸). گونه های مختلف گیاه گل راعی در ایران دارای پراکنش جغرافیایی خوبی بوده و به فراوانی در چندین منطقه آب و هوایی ایران یافت می شوند. نوع اقلیم و خاک استان های کردستان، گلستان و قم تفاوت بسیاری دارند و به ترتیب دارای آب و هوای سرد کوهستانی با خاک کوهستانی، آب و هوای معتدل و مرطوب با خاک جلگه ای و کوهپایه ای و آب و هوای گرم و خشک با خاک شور و قلیایی هستند. این مطالعه به منظور مقایسه میزان هیپرسیسین و اثر ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی گیاه گل راعی جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی ایران شامل سه استان قم، گلستان و کردستان انجام شد.

روش بررسی

آماده سازی نمونه گیاه: اندام های هوایی گیاه گل راعی از کوهپایه های البرز در منطقه گرگان (استان گلستان)، مراتع اطراف سندانج (استان کردستان) و منطقه فردو (استان قم) در تابستان ۱۳۹۱ جمع آوری شد. از هر دسته گیاه سه نمونه هرباریومی شامل کلیه اندام های گیاه (بدون تفکیک اندام ها، به صورت پرس شده) تهیه و

پس از شناسایی جنس و گونه گیاه در ایستگاه تحقیقاتی مناطق خشک و بیابانی شهرستان کاشان (هرباریوم KHBG198) به آزمایشگاه منتقل گردید. برای بهینه کردن روند پژوهش، تمام آلودگی ها، پوسیدگی ها، قسمت های تغییر رنگ یافته و چوب های اضافی جدا و گیاه در سایه به دور از نور آفتاب خشک شد و در ظرف در بسته مناسب در محل خشک و دور از نور تا زمان انجام آزمایش ها نگهداری گردید.

استخراج عصاره: برگ و ساقه گیاه خشک شده پس از انتقال به آزمایشگاه آسیاب و کاملاً مخلوط شد. برای حذف مزاحمت مربوط به مرحله جذب سنجی UV-Vis، ابتدا کلروفیل موجود در گیاه توسط کلروفرم با استفاده از سوکسیله جدا و سپس عمل عصاره گیری توسط متانول انجام گردید.

تعیین میزان هیپرسیسین: ۰/۰۱ گرم از عصاره های تهیه شده با متانول به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و جذب این محلول در ۵۹۰ نانومتر خوانده شد. این محلول تا زمان قرارگیری جذب ۰/۲-۱، رقیق شد. برای اطمینان بیشتر سه مرتبه این عمل تکرار شد و میانگین جذب مورد بررسی قرار گرفت.

میزان هیپرسیسین از طریق اندازه گیری جذب محلول های عصاره در ۵۹۰ نانومتر به کمک فرمول $1000AK^{-1}m^{-1}$ mg hypericin = برحسب ppm (میلی گرم بر کیلوگرم گیاه خشک) تعیین شد. در این فرمول A میزان جذب و K برابر با ۷۸۰ و m میزان گیاه خشک بر حسب گرم است (۴ و ۷ و ۸).

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: در آزمون مهار رادیکال آزاد ۱،۱-دی فنیل ۲-پیکریل هیدرازیل DPPH، میزان ۴/۷ میلی گرم از DPPH (خلوص ۱۰۰ درصد) با ترازوی آنالیتیک توزین و در بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری تیره رنگ (به منظور محافظت از نور) ریخته شد و با متانول در بالن به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس میزان ۱۰ میلی گرم از نمونه (عصاره و BHT) داخل بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری ریخته و با متانول مرکب به حجم رسانده شد. سپس سری غلظت از این محلول های مادر نمونه شامل غلظت های ۲ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ساخته شد. درون بالن های تیره یک میلی لیتر از نمونه عصاره و یک میلی لیتر از DPPH ریخته شد و در اثر هم زدن پیوسته به وسیله دستگاه تکان دهنده دوار همگن گردید. جذب محلول های شاهد و نمونه بعد از ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۱۷ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis (مدل Cintra 6، شرکت GBC استرالیا) خوانده شد (۱۳-۱۱). کلیه عملیات دو بار تکرار و نتایج به صورت میانگین بعد از محاسبه انحراف معیار با ضریب اطمینان ۹۵ درصد گزارش شدند.

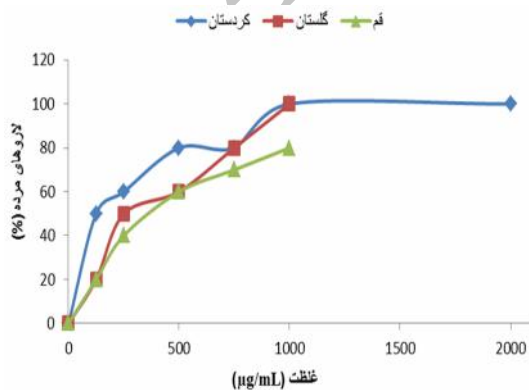
در آزمون بیرنگ شدن بتاکاروتن مقدار ۲۰ میلی گرم از هر یک از نمونه ها (عصاره و BHT) به طور جداگانه در بالن ۱۰ میلی لیتری با دی متیل سولفو کساید (DMSO) حل شد. میزان یک میلی لیتر از

(۱۳ و ۱۵ و ۱۶). کلیه عملیات فوق دوبار تکرار شد و حاصل محاسبات در نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش گردید.

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی رشد: در این روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای میکروارگانیسم‌های حساس به عصاره‌های گیاهی با روش میکرودیولوشن (micro-Well dilution assay) محاسبه گردید. برای این منظور میکروصفحه‌های ۹۶ خانه‌ای استریل تهیه شد. به هریک از صفحه‌ها ۹۵ میکرولیتر محیط کشت برین‌هات اینفیوژن برات (Brain heart Infusion Broth)، ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با رقت ۰/۵ مک‌فارلند و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره (۰/۷۸ - ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و یا اسانس (۰/۹۴ - ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزوده شد و سپس صفحه‌ها به مدت ۲۰ ثانیه با همزن ارتعاشی با دور ۳۰۰ rpm هم زده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. رشد میکروبی با حضور کدورت در ته چاهک مشخص شد و مقدار MIC برای کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نشد به دست آمد (۱۳ و ۱۵ و ۱۶).

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی میزان هیپرسیسین و سنهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی در جدول یک آمده است. میزان هیپرسیسین در گیاه گل راعی از منطقه کردستان دارای بیشترین مقدار بود. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها از طریق تعیین دو خاصیت مهار پراکسیداسیون لیپید (درصد پایداری بتاکاروتن) و مهار رادیکال آزاد DPPH، مشخص نمود که بالاترین و موثرترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز مربوط به گیاه هیپریکوم از منطقه کردستان است. نتایج آزمون مهار رادیکال DPPH حاکی از فعالیت بالای هر سه نمونه عصاره بود. به طوری که تقریباً فعالیت معادل ترکیب سنتزی BHT از خود نشان دادند.



شکل ۱: نمودار تعیین LC50 (حداقل غلظت کشندگی ۵۰ درصد از لاروها) در آزمون میگوی آب شور برای عصاره گیاه گل راعی

این محلول‌ها با ۲/۵ میلی‌لیتر محلولی شامل ۵/۶ گرم بر میلی‌لیتر لینولینیک اسید و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بتاکاروتن و مقدار لازم توئین (به حد امکان حلالیت مواد) در آب اشباع از اکسیژن، همگن شدند و پس از دو ساعت گرماگذاری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد جذب آنها در طول موج ۴۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis خوانده شد (۱۱-۱۳). کلیه عملیات دو بار تکرار و نتایج به صورت میانگین بعد از محاسبه انحراف معیار با ضریب اطمینان ۹۵ درصد گزارش شد.

ارزیابی فعالیت سمیت سلولی: برای تهیه آب شور به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب بدون املاح، ۲۳ گرم NaCl، ۱۱ گرم MgCl2، ۴ گرم Na2SO4، ۱/۳ گرم CaCl2 و ۰/۷ گرم KCl اضافه و به مدت ۵ دقیقه جوشیده و استریل شد.

عصاره‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر آب شور و ۱۰ عدد میگوی آب شور در حمام ۳۰ درجه و در حضور نور به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت لاروهای زنده با کمک ذره‌بین شمارش شد و نمودار درصد مرده‌ها بر حسب غلظت (µg/mL) رسم و کلیه عملیات دوبار تکرار شد. سپس از روی نمودار میانگین (شکل یک) کمترین غلظتی که سبب ۵۰ درصد (LC50) کشندگی در لاروها گردید؛ با ضریب اطمینان ۹۵ درصد محاسبه گردید (۱۴).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی: برای ارزیابی آزمون ضد میکروبی، از دو آزمون تعیین قطر هاله عدم رشد و سپس تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (minimum inhibitory concentration: MIC) استفاده گردید.

تعیین قطر هاله عدم رشد: این روش طبق استانداردهای CLSI سال ۲۰۱۲ انجام شد (۱۵). بدین منظور صفحه‌های حاوی محیط کشت Muller Hinton Agar تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های باکتریایی زیر با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند در شرایط یکنواخت در سطح محیط مناسب کشت داده شد.

- Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)
- Staphylococcus aureus (ATCC 29737)
- Klebsiella pneumonia (PTCC 1053)
- Candidia albicans (ATCC 10231)
- Proteus aeruginosa (PTCC 1182)

عصاره‌های گیاهی با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دی‌متیل سولفو کساید حل شد و به کمک فیلتر میلی‌پور سرنگی (۰/۴۵ میکرومتر) استریل گردید. مقدار ۱۰ میکرولیتر معادل ۳۰۰ میکروگرم از عصاره روی دیسک‌های سلولزی به قطر شش میلی‌متر گذاشته شد تا به طور کامل جذب کاغذ صافی شود. صفحه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها برای هر میکروارگانیسم با اندازه‌گیری هاله عدم رشد تعیین گردید

جدول ۱: میزان هیپریسین، فعالیت آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره گیاه گل راعی

| سمیت سلولی LC50 (µg/ml) | فعالیت آنتی اکسیدانی | | میزان هیپریسین (ppm) | منطقه جمع آوری |
|----------------------------|--|--|-------------------------|-----------------|
| | میانگین و انحراف معیار درصد مهار رادیکال DPPH | میانگین و انحراف معیار درصد پایداری بتاکاروتن | | |
| ۱۵۰ | ۹۷/۳±۱/۵ | ۹۱/۶±۰/۶ | ۱۵۶۱ | کردستان |
| ۲۵۰ | ۹۱/۲±۱/۳ | ۸۴/۷±۱/۸ | ۱۲۲۳ | گلستان |
| ۳۷۵ | ۸۷/۳±۱/۲ | ۵۷/۵±۰/۵ | ۶۷۳ | قم |
| - | ۹۸/۹±۰/۵ | ۹۴/۴±۰/۵ | - | شاهد مثبت (BHT) |

* مقدار هیپریسین بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم گیاه خشک

جدول ۲: میزان هیپریسین و فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه گل راعی بر اساس قطر هاله عدم رشد (میلی متر) و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (میکروگرم بر میلی لیتر)

| منطقه جمع آوری | منطقه جمع آوری | | | هیپریسین (mg/100g) | کاندیدا آلبیکانس |
|----------------|----------------|--------|----|--------------------|------------------|
| | کردستان | گلستان | قم | | |
| ۰/۳۹۷۵ | ۰/۷۱۹۱ | ۰/۷۸۷۵ | - | ۱۰۰۰ | ۰ |
| - | ۱۰۰۰ | - | ۰ | ۱۰ | ۰ |
| ۱۰۰۰ | ۵۰۰ | ۲۵۰ | ۹ | ۱۳ | ۱۷ |
| ۵۰۰ | ۲۵۰ | ۲۵۰ | ۱۲ | ۱۴ | ۱۹ |
| ۱۵۰۰ | ۲۰۰۰ | ۱۰۰۰ | - | ۷۵۰ | ۷۵۰ |
| ۱۱ | ۹ | ۱۰ | ۰ | ۱۱ | ۱۱ |

آنتی بیوتیک های استاندارد ریفامپین و جنتامایسین (با قطر هاله ۳۵-۲۰ میلی متر) به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شدند و نتیجه not applicable بود.

شده در مورد میزان هیپریسین موجود در گیاه گل راعی رویش یافته در مناطق مختلف ایران (۳)؛ به نظر می رسد گیاه منطقه کردستان جزء غنی ترین نمونه ها از نظر میزان هیپریسین و در نتیجه خواص بیولوژیکی و درمانی مورد انتظار باشد.

خاصیت آنتی اکسیدانی در هر سه نمونه بسیار بالا بوده و از نظر مهار رادیکال آزاد با استاندارد BHT برابری می کند؛ اما در مجموع روند کلی قم > گلستان > کردستان برای خاصیت آنتی اکسیدانی گیاه جمع آوری شده از سه منطقه رویشی طبیعی مشاهده می شود. با توجه به پایین تر بودن میزان هیپریسین و کمتر بودن نسبی میزان فعالیت مهار پراکسایش لیپید (از طریق ارزیابی میزان پایداری بتاکاروتن در حضور لینولئیک اسید هیدروپراکسید) برای نمونه گیاه جمع آوری شده از منطقه قم؛ می توان حدس زد ترکیب مذکور با دارا بودن هیدروژن های فعال فنلی و بنزینی نقش مهمی در مهار اکسایش لیپید ایفا می کند (۱۳-۱۱). به طور کلی فعالیت آنتی اکسیدانی بالای مشاهده شده در هر سه نمونه مورد مطالعه، با مقادیر گزارش شده در منابع علمی در تطابق است (۱۱ و ۱۷).

میزان سمیت سلولی مشاهده شده بر اساس نتایج حاصل از آزمون میگوی آب شور، نتایجی مشابه با خواص آنتی اکسیدانی (قم > گلستان > کردستان) را نشان داد. لذا ترتیب فعالیت سمیت

نتایج مربوط به ارزیابی سمیت سلولی (جدول یک) که بر اساس داده های شکل یک به دست آمده است؛ نشان می دهد عصاره مربوط به گیاه از منطقه کردستان، با دارا بودن بیشترین میزان هیپریسین دارای کمترین مقدار LC50 (۱۵۰ µg/mL) و در نتیجه بالاترین میزان سمیت سلولی است و روند مشاهده شده در مورد این فعالیت، مشابه با خاصیت آنتی اکسیدانی است.

رشد باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس توسط هر سه نمونه مهار شدند و بیشترین فعالیت در هر دو مورد مربوط به گیاه از منطقه کردستان بود. در مورد باکتری های گرم منفی نیز عصاره های مربوط به منطقه گلستان و کردستان به میزان برابری نسبت به باکتری کلبسیلا پونومونیه فعالیت ضد میکروبی نشان دادند (جدول ۲). در مورد مخمر کاندیدا آلبیکانس فقط عصاره گیاه از منطقه گلستان فعالیت ضد میکروبی (کمی) از خود نشان داد.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه میزان ماده مؤثر هیپریسین در گیاه گل راعی منطقه کردستان بیش از سایر مناطق بود. گزارش های موجود در منابع علمی نشان دهنده اثر چشمگیر عوامل محیطی و اقلیم بر میزان این ماده مؤثره است (۳ و ۴). همچنین با توجه به گزارش منتشر

نشان داد.

با توجه به اثبات وجود خواص ضد میکروبی هیپریسین، به خصوص در مورد باکتری‌های گرم مثبت و نیز گزارش اثر ضد میکروبی قوی این ماده در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و با توجه به خاصیت ضد ویروسی قوی هیپریسین (۹ و ۱۰)؛ به نظر می‌رسد بتوان این ماده را به عنوان یکی از مهم‌ترین مواد موثر ضد میکروبی عصاره گیاه گل راعی برشمرد. کاهش خاصیت ضد میکروبی به صورت هماهنگ با کاهش میزان هیپریسین در نمونه‌های مورد بررسی، این فرضیه را تقویت می‌کند.

نتیجه‌گیری

وجود تفاوت میزان هیپریسین در گیاه گل راعی مناطقی با آب و هوای متفاوت در ایران، لزوم بررسی‌های بیشتر بر روی عصاره این گیاه دارویی ارزشمند را آشکار می‌سازد. تعیین میزان هیپریسین در گیاهان با جنس هیپریکوم، می‌تواند به عنوان یک معیار مناسب در تشخیص کیفیت و ارزش دارویی این گیاه به کار گرفته شود. همچنین وجود تفاوت میان مقادیر هیپریسین در گیاه گل راعی و فعالیت بیولوژیکی نمونه عصاره‌های بررسی شده به خصوص از نظر دارا بودن فعالیت ضد میکروبی و ضد سرطانی مشخص گردید و روند این تغییرات تا حدی با میزان محتوی هیپریسین عصاره‌ها همخوانی داشت؛ اما با توجه به وجود بسیاری مواد موثره دیگر در عصاره غنی از هیپریسین، اثبات وجود این ارتباط به صورت قطعی، تنها پس از انجام تحقیقات تکمیلی و استفاده از استانداردهای هیپریسین به عنوان شاهد و انجام آنالیزهای آماری مناسب امکان‌پذیر خواهد بود.

References

- Kamkar J, Rezaee MB, Mozaffarian V, Azadi R, Naderi HBN, Meshkizadeh S, et al. [Determination of hypericin content in flowers and leaves of eight hypericum species]. *Journal of Medical Plants*. 2008; 7(25): 49-55. [Article in Persian]
- Davari M. [Investigation of antioxidant activity of essential oil and extract from *Hypericum perforatum* L. and application of it in the reduction of chemical compounds]. M.Sc Thesis. Department of Chemistry, Shahr-e-Ray Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 2009. [Persian]
- Esmaili S, Abdollahi P, Mahmoodpur H, Naghibi F. Identification and determination of hypericin in *Hypericum perforatum*'s products in Iran's market. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2004; 3(2): 87.
- GÎTEA D, IPO M, MIRCEA T, PA CA B. The analysis of alcoholic extracts of hypericum species by UV/VIS spectrophotometry. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*. 2010; 17(1): 111-15.
- Sirvent TM, Walker L, Vance N, Gibson DM. Variation in hypericins from wild populations of *Hypericum perforatum* L. in the Pacific Northwest of the U.S.A. *Economic Botany*. 2002; 56(1): 41-8.
- Bais HP, Walker TS, McGrew JJ, Vivanco JM. Factors affecting growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) and production of Hypericin.

سلولی نیز هماهنگ با میزان هیپریسین موجود در نمونه‌ها بود. از آنجا که آزمون میگوی آب شور، یک آزمون غربالگری مناسب برای سنجش فعالیت ضد سرطانی است (۱۴) و گزارش‌های کمی در خصوص ارزیابی سمیت سلولی و یا خواص ضد سرطانی گیاه گل راعی در منابع علمی موجود است (۱۸)؛ نتایج این مطالعه می‌تواند آغازی برای انجام تحقیقات بیشتر بر روی عصاره این گیاه به عنوان کاندید مناسب برای تهیه داروهای ضد سرطان با منشأ طبیعی باشد. از نظر فعالیت ضد میکروبی، همه نمونه‌ها فعالیت زیادی در برابر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* نشان دادند. اگرچه نمونه مربوط به گیاه منطقه گلستان نسبت به محدوده وسیع‌تری از میکروارگانیسم‌ها فعالیت نشان داد؛ اما به نظر می‌رسد در مورد باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی، روند فعالیت ضد میکروبی با میزان محتوای هیپریسین گیاه هماهنگ و به صورت قم > گلستان > کردستان است. صرف نظر از برخی تناقض‌ها در مجموع می‌توان گفت نمونه‌های مربوط به کردستان با دارا بودن بیشترین میزان هیپریسین و نمونه مربوط به گیاه از منطقه قم با کمترین مقدار هیپریسین، به ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت را در هر سه آزمون آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و ضد میکروبی از خود نشان دادند. از طرفی به نظر می‌رسد هیچ‌یک از عصاره‌ها فعالیت ضد میکروبی بالایی در برابر باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکانس* (با هاله رشد کمتر از ۱۲) ندارند؛ اما در مورد باکتری گرم منفی *کلبسیلا پنومونیه* هر چند قطر هاله عدم رشد چندان بالا نبود؛ ولی مقادیر MIC برای نمونه کردستان و گلستان وجود فعالیت ضد میکروبی ضعیفی را در برابر این باکتری

In Vitro Cell Devel Biol Plant. 2002; 38(1): 58-65.

- Smelcerovic A, Spitteller M, Zuehlke S. Comparison of methods for the exhaustive extraction of hypericins, flavonoids, and hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *J Agric Food Chem*. 2006 Apr; 54(7): 2750-3.
- Ebrahimian M. [Evaluation of hypericin in two *Hypericum* species from Kashan]. M.Sc Thesis. Department of Chemistry, Shahr-e-Ray Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 2011. [Persian]
- Feyzio lu B, Demircili MM, Özdemiş M, Do an M, Baykan M, Baysal B. Antibacterial effect of hypericin. *African Journal of Microbiology Research*. 2013 Mar; 7(11): 979-82. doi: 10.5897/AJMR2012.2497
- García I, Ballesta S, Gilaberte Y, Rezusta A, Pascual Á. Antimicrobial photodynamic activity of hypericin against methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future Microbiol*. 2015; 10(3): 347-56. doi: 10.2217/fmb.14.114
- Akhbari M, Batooli H, Mozdianfar M. Comparative study of composition and biological activities of SDE prepared essential oils from flowers and fruits of two *Hypericum* species from central Iran. *Nat Prod Res*. 2012; 26(3): 193-202. doi: 10.1080/14786419.2010.534994
- Mozdianfar M, Akhbari M, Batooli H. Comparative study on the antioxidant activities of the different extracts and the

composition of the oil extracted by n-hexane from Iranian *Vitex pseudo-negundo*. *Nat Prod Res.* 2012; 26(23): 2162-7. doi: 10.1080/14786419.2011.643308

13. Akhbari M, Batooli H, Kashi FJ. Composition of essential oil and biological activity of extracts of *Viola odorata* L. from central Iran. *Nat Prod Res.* 2012; 26(9): 802-9. doi: 10.1080/14786419.2011.558013

14. Akpemi Audu M. Cytotoxicity and phytochemical screening of *Cochlospermum tinctorium* Perr Ex A. rich rhizome. *J App Pharm Sci.* 2012; 2(7): 155-59. doi: 10.7324/JAPS.2012.2723

15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard: ninth edition, M07-A9, CLSI,

Wayne, PA. 2012.

16. Safaei-Ghomi J, Ahmadi T, Batooli H, Jookar Kashi F. Antioxidant and antimicrobial activity of *Artemisia fragrans* Willd essential oil and methanol extracts. *Chemija.* 2012; 23(2): 100-107.

17. Fathi H, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Hypericum perforatum* L. (st. John's wort). *International Journal of Forest, Soil and Erosion.* 2013; 3(2): 68-72.

18. Roscetti G, Franzese O, Comandini A, Bonmassar E. Cytotoxic activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 erythroleukemic cells: differential effects between methanolic extract and hypericin. *Phytother Res.* 2004 Jan; 18(1): 66-72.

Archive of SID

Original Paper

Comparison of hypericin content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Hypericum perforatum* L. from three geographic regions of Iran

Akhbari M (Ph.D)*¹, Ebrahimian M (M.Sc)²

¹Assistant Professor, Department of Phytochemistry, Essential Oil Research Institute, University of Kashan, Kashan, Iran. ²M.Sc in Organic Chemistry, Department of Chemistry, Shahr-e-Ray Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Hypericin is found in different species of *Hypericum* genus, as a main compound with antimicrobial, antiviral, nonspecific kinases inhibition and dopamin -hydroxylase inhibiting effects. This study was done to compare the hypericin content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Hypericum perforatum* L. from three geographic regions of Iran.

Methods: In this descriptive study, Hypericin content of aerial parts of *H. perforatum* L. was assessed using UV-Vis spectrometric method. Antioxidant activity was measured using DPPH and β -carotene bleaching assay. Cytotoxicity was evaluated via brine shrimp lethality assay. Antimicrobial activity was determined using inhibition zone diameter evaluation via disc diffusion method and measuring minimum inhibitory concentration (MIC) value.

Results: Hypericin content of aerial parts of *H. perforatum* L. from Qom, Golestan and Kurdistan provinces were 673, 1223 and 1568 ppm, respectively. Antioxidant and cytotoxic activities in samples from Kurdistan was more than samples from Qom and Golestan. Antimicrobial activity, as far as the number of sensitive microorganisms was evaluated. In this way the order of Golestan>Kurdistan>Qom was exhibited, however the extract of the plant from Kurdistan had the highest activity for two staphylococcus species with the inhibition zone diameter of 17 and 19 mm for *S. aureus* and *S. epidermidis*, respectively and MIC value of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Conclusion: Hypericin content was more from samples of Kurdistan province with cold climate. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of aerial parts of all samples were high. There is a relationship between hypericin content of aerial parts of *H. perforatum* L. and biological activities.

Keywords: *Hypericum perforatum* L., Hypericin, Antioxidant activity, Cytotoxic activity, Antimicrobial activity

* Corresponding Author: Akhbari M (Ph.D), E-mail: m_akhbari@kashanu.ac.ir

Received 23 May 2015

Revised 2 Aug 2015

Accepted 22 Aug 2015