تحقیقی

مقایسه میزان هیپریسین و اثر ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی گیاه *گل راعی* جمع‌آوری شده از سه منطقه جغرافیایی ایران

دکتر مریم اخباری*[1]، محسن ابراهیمیان[2]

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 ضدمیکروبی، ضدویروسی، مهارکنندگی غیراختصاصی کیناز و مهارکنندگی آنزیم دوپامین بتا هیدروکسیلاز است. این مطالعه به منظور مقایسه میزان هیپریسین و اثر ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی 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 ضداکسیدانی عصاره ها 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 ضدمیکروبی 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 ۶۷۳ppm، ۱۲۲۳ppm و ۱۵۶۸ppm تعیین شد. میزان فعالیت ضداکسیدانی و سمیت سلولی در نمونه‌های کردستان بیشتر از نمونه‌های قم و گلستان بود. در بررسی خواص ضدمیکروبی، 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 ۲۵۰ µg/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 ضدمیکروبی، ضداکسیدانی 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 ضدمیکروبی*

* 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

وصول مقاله : ۱۳۹۴/۳/۲ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۴/۵/۱۱ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۴/۵/۳۱

مقدمه

گیاه *گل راعی* (علف چای یا هوفاریقون) با نام علمی *Hypericum perforatum* L. به دلیل داشتن ترکیب‌های مهم شیمیایی و متابولیسم های 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، خشک کننده و بازکننده مخاط بینی و کاهش آن، درمان کزاز و باز کردن گرفتگی های 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. هم اکنون نیز این گیاه به صورت مصرف خارجی برای درمان زخم‌ها و به صورت مصرف داخلی برای سیاتیک، بی خوابی، گرفتگی عادت ماهیانه، سردرد، سرما خوردگی، ناراحتی‌های سینه‌ای و نیز به عنوان آرام‌بخش مفید دانسته شده است. مهم‌ترین ترکیبات گیاه *گل راعی*، هیپرسین و سودوهیپرسین بوده که خواص ضدافسردگی و ضدویروسی دارند (۴-۱). هیپریسین جزء اصلی عصاره گیاه *گل راعی*، یک ماده کینونی است و در اکثر منابع علمی به عنوان

مهم‌ترین ماده موثر این گیاه ذکر شده است. این ماده در نقطه‌های سیاه رنگ که روی اندام‌های مختلف گیاه تشکیل می‌شوند؛ وجود دارد. عصاره غنی از این ترکیب از دیرباز به‌عنوان یک داروی گیاهی و بدون عارضه جانبی مصارف درمانی متعددی داشته است. جدیدترین پژوهش ها و کاربردها در مورد هیپریسین شامل اثرات ضدمیکروب، ضد قارچ، ضد ویروس (به خصوص ویروس عامل ایدز و هپاتیت) و ترمیم کننده موضعی، درمان زخم‌ها، سوختگی‌ها، آفتاب سوختگی و نیش حشرات است (۱و۳و۴). 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 (۵و۶). میزان هیپریسین موجود در گونه‌های مختلف هیپریکوم تاثیر به سزایی در خواص مشاهده شده از آن دارد (۴). میزان هیپرسین استخراج شده از گیاه تحت تاثیر عوامل متعددی از جمله زمان برداشت گیاه، میزان نور، موقعیت جغرافیایی و نوع حلال مورد استفاده است. تعداد غده‌های روی اندام‌های مختلف گیاه که دارای هیپرسین و دیگر ترکیبات مهم هستند؛ با افزایش شدت نور فتوسنتزی افزایش می یابند. هیپریسین بر روی بسیاری از باکتری‌های 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 ضدویروس ایدز هیپرسین یکی از مهم‌ترین اثرات شناخته شده این ماده ارزشمند است (۱۰-۷). اجزاء اصلی عصاره گیاه با خواص دارویی شناخته شده به غیر از هیپریسین، شامل سودوهیپریسین و هیپرفورین است که خاصیت ضدالتهابی، ضدویروسی و ضدافسردگی آنها به اثبات رسیده است (۸). گونه‌های مختلف گیاه *گل راعی* در ایران دارای پراکنش جغرافیایی خوبی بوده و به فراوانی در چندین منطقه آب و هوایی ایران یافت می‌شوند. نوع اقلیم و خاک استان‌های 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 جلگه‌ای و کوهپایه‌ای و آب و هوای گرم و خشک با خاک شور و قلیایی هستند. این مطالعه به منظور مقایسه میزان هیپریسین و اثر ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی 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: اندام‌های هوایی گیاه *گل راعی* از کوهپایه‌های البرز در منطقه گرگان (استان گلستان)، مراتع اطراف سنندج (استان کردستان) و منطقه فردو (استان قم) در تابستان ۱۳۹۱ جمع‌آوری شد. از هر دسته گیاه سه نمونه هرباریومی شامل کلیه اندام‌های گیاه (بدون تفکیک اندام‌ها، 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 آلودگی‌ها، پوسیدگی‌ها، قسمت‌های تغییر رنگ یافته و چوب‌های اضافی جدا و گیاه در سایه به دور از نور آفتاب خشک شد و در ظرف در بسته مناسب در محل خنک و دور از نور تا زمان انجام آزمایش‌ها 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 عصاره‌گیری توسط متانول انجام گردید.

تعیین میزان هیپریسین: ۰/۰۱ گرم از عصاره‌های 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 ۱-۰/۲، رقیق شد. برای اطمینان بیشتر سه مرتبه این عمل تکرار شد و میانگین جذب مورد بررسی قرار گرفت.

میزان هیپرسین از طریق اندازه‌گیری جذب محلول‌های عصاره در ۵۹۰ نانومتر به کمک فرمول $mg\ hypericin = 1000AK^{-1}m^{-1}$ برحسب ppm (میلی‌گرم 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 (۴و۷و۸).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در آزمون مهار رادیکال آزاد ۱،۱-دی‌فنیل -۲-پیکریل هیدرازیل DPPH، میزان ۴/۷ میلی‌گرم از DPPH (خلوص ۱۰۰ درصد) با ترازوی آنالیتیک توزین و در بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری تیره رنگ (به منظور محافظت از نور) ریخته شد و با متانول در بالن به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس میزان ۱۰ میلی‌گرم از نمونه (عصاره و BHT) داخل بالن ژوژه ۱۰میلی‌لیتری ریخته و با متانول مرک به حجم رسانده شد. سپس سری غلظت از این محلول‌های مادر نمونه شامل غلظت‌های ۲ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیترساخته شد. درون بالن‌های تیره یک میلی‌لیتر از نمونه عصاره و یک میلی‌لیتر از DPPH ریخته شد و در اثر هم زدن پیوسته به وسیله دستگاه تکان‌دهنده دوار همگن گردید. جذب محلول‌های شاهد و نمونه بعد از ۳۰ دقیقه در طول موج ۵۱۷ نانومتر به‌وسیله 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 ۹۵درصد گزارش شدند.

در آزمون بیرنگ شدن بتاکاروتن مقدار ۲۰ میلی‌گرم از هر یک از نمونه‌ها (عصاره و BHT) به طور جداگانه در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد. میزان یک میلی‌لیتر از

این محلول‌ها با ۲/۵ میلی‌لیتر محلولی شامل ۵/۶ گرم بر میلی‌لیتر لینولئیک 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 به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis خوانده شد (۱۳-۱۱). کلیه عملیات دو بار تکرار و نتایج به صورت میانگین بعد از محاسبه انحراف معیار با ضریب اطمینان ۹۵درصد 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، ۷۰۰و 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 ۹۵درصد محاسبه گردید (۱۴).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی: برای ارزیابی آزمون ضدمیکروبی، 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 (ATTC 29737)
Klebsiella pneumonia (PTCC 1053)
Candidia albicans (ATTC 10231)
Proteus aeruginosa (PTCC 1182)

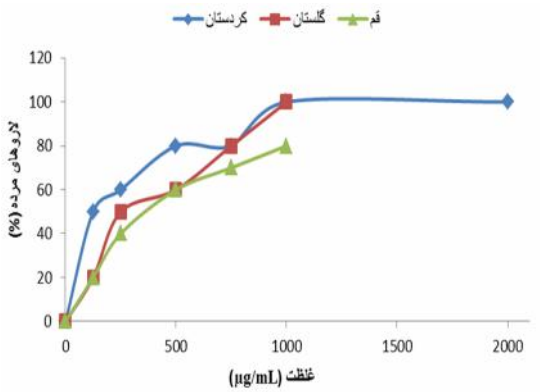
عصاره‌های گیاهی با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دی‌متیل سولفوکساید حل شد و به کمک فیلتر میلی‌پور سرنگی (۰/۴۵ میکرومتر) استریل گردید. مقدار ۱۰ میکرولیتر معادل ۳۰۰ میکروگرم از عصاره روی دیسک‌های سلولزی به قطر شش میلی‌متر گذاشته شد تا به طور کامل جذب کاغذ صافی شود. صفحه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و فعالیت ضدمیکروبی نمونه‌ها برای هر میکروارگانیسم با اندازه‌گیری هاله عدم رشد تعیین گردید (۱۳و۱۵و۱۶). 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 میکرودیلوشن(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 براث (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 (۱۳و۱۵و۱۶).

یافته‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی میزان هیپریسین و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی در جدول یک آمده است.

میزان هیپرسین 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. به‌طوری که تقریباً فعالیتی 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

جدول ۱ : میزان هیپرسین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی عصاره گیاه گل راعی

منطقه جمع‌آوری	* میزان هیپرسین (ppm)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی: میانگین و انحراف معیار درصد پایداری بتاکاروتن	فعالیت آنتی‌اکسیدانی: میانگین و انحراف معیار درصد مهار رادیکال DPPH	سمیت سلولی LC50 (µg/ml)
کردستان	۱۵۶۸	۹۱/۶± ۰/۶	۹۷/۳± ۱/۵	۱۵۰
گلستان	۱۲۲۳	۸۴/۷± ۱/۸	۹۱/۲± ۱/۳	۲۵۰
قم	۶۷۳	۵۷/۵± ۰/۵	۸۷/۳± ۱/۲	۳۷۵
شاهد مثبت (BHT)	–	۹۴/۴± ۰/۵	۹۸/۹± ۰/۵	–

** مقدار هیپریسین بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم گیاه خشک*

جدول ۲ : میزان هیپریسین و فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاه گل راعی
براساس قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

		منطقه جمع‌آوری: کردستان	گلستان	قم
	هیپرسین (mg/۱۰۰ g)	۰/۷۸۷۵	۰/۶۱۹۱	۰/۳۹۷۵
کاندیدا آلبیکانس	حداقل غلظت مهارکنندگی رشد	–	۱۰۰۰	–
	قطر هاله عدم رشد	۰	۱۰	۰
استافیلوکوکوس اپیدرمیس	حداقل غلظت مهارکنندگی رشد	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
	قطر هاله عدم رشد	۱۷	۱۳	۹
استافیلوکوکوس اورئوس	حداقل غلظت مهارکنندگی رشد	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰
	قطر هاله عدم رشد	۱۹	۱۴	۱۲
سودوموناس آئروژینوزا	حداقل غلظت مهارکنندگی رشد	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۱۵۰۰
	قطر هاله عدم رشد	۱۰	۹	۱۱
کلبسیلا پنومونیه	حداقل غلظت مهارکنندگی رشد	۷۵۰	۷۵۰	–
	قطر هاله عدم رشد	۱۱	۱۱	۰

آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد ریفامپین و جنتامایسین (با قطر هاله ۳۵- ۲۰ میلی‌متر) به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شدند و نتیجه ***not applicable*** *بود.*

نتایج مربوط به ارزیابی سمیت سلولی (جدول یک) که بر اساس داده‌های شکل یک به دست آمده است؛ نشان می‌دهد 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 آنتی‌اکسیدانی است.

رشد باکتری‌های 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 باکتری‌های گرم منفی نیز عصاره‌های مربوط به منطقه گلستان و کردستان به میزان برابری نسبت به باکتری *کلبسیلا پنومونیه* فعالیت ضدمیکروبی 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 هیپرسین در گیاه *گل راعی* منطقه کردستان بیش از سایر مناطق بود. گزارش های موجود در منابع علمی نشان‌دهنده اثر چشمگیر عوامل محیطی و اقلیم بر میزان این ماده موثره است (۳و۴). همچنین با توجه به گزارش منتشر شده در مورد میزان هیپریسین موجود در گیاه *گل راعی* رویش یافته در مناطق مختلف ایران (۳)؛ به‌نظر می‌رسد گیاه منطقه کردستان جزء غنی‌ترین نمونه ها از نظر میزان هیپریسین و در نتیجه خواص بیولوژیکی و درمانی مورد انتظار باشد.

خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی گیاه جمع‌آوری شده از سه منطقه رویشی طبیعی مشاهده می‌شود. با توجه به پایین‌تر 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 جمع‌آوری شده از منطقه قم؛ می توان حدس زد ترکیب مذکور با دارا بودن هیدروژن های فعال فنلی و بنزیلی نقش مهمی در مهار اکسایش لیپید ایفا می کند (۱۳-۱۱). به طور کلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای مشاهده شده در هر سه نمونه مورد مطالعه، با مقادیر گزارش شده در منابع علمی در تطابق است (۱۱و۱۷).

میزان سمیت سلولی مشاهده شده براساس نتایج حاصل از آزمون میگوی آب شور، نتایجی مشابه با خواص آنتی‌اکسیدانی (قم < گلستان < کردستان) را نشان داد. لذا ترتیب فعالیت سمیت

سلولی نیز هماهنگ با میزان هیپریسین موجود در نمونه‌ها بود. از آنجا که آزمون میگوی آب شور، یک آزمون غربالگری مناسب برای سنجش فعالیت ضدسرطانی است (۱۴) و گزارش‌های کمی در خصوص ارزیابی سمیت سلولی و یا خواص ضدسرطانی 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 ضدسرطان با منشاء طبیعی باشد.

از نظر فعالیت ضدمیکروبی، 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی از خود نشان دادند. از طرفی به نظر می‌رسد هیچیک از عصاره‌ها فعالیت ضدمیکروبی 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* هرچند قطر هاله عدم رشد چندان بالا نبود؛ ولی مقادیر MIC برای نمونه کردستان و گلستان وجود فعالیت ضدمیکروبی ضعیفی را در برابر این باکتری نشان داد.

با توجه به اثبات وجود خواص ضدمیکروبی هیپریسین، به خصوص در مورد باکتری‌های گرم مثبت و نیز گزارش اثر ضدمیکروبی قوی این ماده در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و باتوجه به خاصیت ضدویروسی قوی هیپریسین (۹و۱۰)؛ به نظر می‌رسد بتوان این ماده را به عنوان یکی از مهم‌ترین مواد موثر ضدمیکروبی عصاره گیاه *گل راعی* برشمرد. کاهش خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی و ضدسرطانی 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 استاندارد هیپریسین به عنوان شاهد و انجام آنالیزهای آماری مناسب امکان‌پذیر خواهد بود.

References

1. Kamkar J, Rezaee MB, Mozaffrian 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]

2. 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]

3. Esmaeili 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.

4. GÎTEA D, ŞIPOŞ M, MIRCEA T, PAŞCA B. The analysis of alcoholic extracts of hypericum species by UV/VIS spectrophotometry. Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie. 2010; 17(1): 111-15.

5. 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.

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

7. Smelcerovic A, Spiteller 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.

8. 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]

9. Feyzioğlu B, Demircili MM, Özdemir M, Doğan 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

10. 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

11. Akhbari M, Batooli H, Mozdianfard 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

12. Mozdianfard 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.

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]

[1]Assistant Professor, Department of Phytochemistry, Essential Oil Research Institute, University of Kashan, Kashan, Iran. [2]M.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 kinas inhibition and dopamin β-hydroxilase inhibitoring 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 Kurdestan provinces were 673, 1223 and 1568 ppm, respectively. Antioxidant and cytotoxic activities in samples from Kurdestan 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>Kurdestan>Qom was exhibited, however the extract of the plant from Kurdestan 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 µg/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

Cite this article as: Akhbari M, Ebrahimian M. [Comparison of hypericin content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Hypericum perforatum* L. from three geographic regions of Iran]. J Gorgan Uni Med Sci. Spring 2017; 19(1): 89-95. [Article in Persian]