مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و آنتی همولیتیک عصاره الکلی برگ گیاه کرفس سفید (*Haussknechtia Elymatica*)

مهدی غلامی بهنمیری [۱]، معصومه کاووسی جاجی آبادی [۲]، فاطمه توحیدی [۳]، علی طراوتی [۴،*]، امیر حسین اسماعیلی [۲]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی-بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران
[۳] استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
[۴] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** علی طراوتی، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. ایمیل: a.taravati@umz.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-09037

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۰۳

واژگان کلیدی:
فعالیت آنتی اکسیدانی
فعالیت آنتی همولیتیک
کرفس سفید

چکیده

مقدمه: اثرات زیان بخش رادیکال‌های آزاد بر بدن را می‌توان با یک منبع غنی از آنتی اکسیدان ها کاهش داد. در این تحقیق برای اولین بار فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی همولیتیکی برگ گیاه کرفس سفید، یکی از گونه‌های خانواده چتریان، مطالعه گردید.

روش کار: نمونه‌ها از مناطق کوهستانی شهرستان یاسوج جمع آوری شدند. عصاره اتانولی برگ با روش خیساندن تهیه گردید. ترکیبات فیتوشیمیایی با دستگاه GC/MS سنجیده شد. محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره به ترتیب با روش‌های فولین-سیوکالتئو و رنگ سنجی اندازه گیری شدند. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره با روش‌های (FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power) به دام اندازی رادیکال‌های آزاد ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و نیتریک اکساید و همچنین فعالیت آنتی همولیتیکی آن در برابر H2O2 در محیط برون تن ارزیابی شدند.

یافته‌ها: آنالیز عصاره اتانولی برگ با دستگاه GC/MS نشان داد که آسارون با ۴۹،۴۰ درصد مهم‌ترین ترکیب سازنده فنولیک این گیاه می‌باشد. از طرفی، میزان ترکیبات فنولی عصاره 6,39 ± 5,0 mg/g بیشتر از ترکیبات فلاونوئیدی (۱/۱ ± ۱۷/۳ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره) آن بود. میزان IC50 عصاره در مهار رادیکال DPPH و نیتریک اکساید به ترتیب، 19/62 µg/mL و90/223 µg/mL, بود. فعالیت آنتی اکسیدانی تام و در نتیجه قدرت احیاءکنندگی عصاره متناسب با غلظت آن افزایش یافت. ولی، عصاره فعالیت آنتی همولیتیک ضعیفی را نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد عصاره اتانولی برگ کرفس سفید دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی می‌باشد. بنابراین، مطالعه بخش‌های مختلف این گیاه ضروری به نظر می‌رسد.

مقدمه

موضوع رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) و اثرات آنها بر سیستم بیولوژیک، یکی از مباحث مهم در دانش پزشکی است. ROS ها اغلب به رادیکال‌های آزاد و دیگر ترکیبات اکسیژن فعال از جمله رادیکال اکسیژن (O_2)، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و هیدروپراکسیدها (ROOH) اطلاق می‌شود که قادرند الکترون را از سوبسترای مختلف به سادگی دریافت کنند و آنها را به رادیکال آزاد تبدیل نمایند. مهم‌ترین رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های زنده، آنیون سوپراکسید (O_2^{-})، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$)، نیتریک اکساید (NO)، مشتقات رادیکالی پراکسیل لیپید (ROO) و رادیکال‌های الکوکسی (RO) هستند [۱، ۲]. خوشبختانه تکامل نه تنها با ایجاد ساز و کارهای دفاعی آنتی اکسیدان ها توانسته است از جانداران در مقابل اثرات بالقوه زیانبار این رادیکال‌ها محافظت نماید، بلکه امکان بهره گیری از رادیکال‌های آزاد جهت حفظ حیات را فراهم ساخته است [۳]. اثرات مفید رادیکال‌های آزاد شامل نقش‌های فیزیولوژیک در عملکرد تعدادی از سیستمهای پیام رسانی سلول، پاسخ‌های سلولی به منظور مقابله با عوامل مهاجم زنده و دفاع علیه عوامل عفونی می‌باشد. بنابراین تولید متعادل رادیکال‌های آزاد برای تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیکی ضروری بوده اما تولید نامتعادل و مازاد آن به خصوص ROS ها باعث آسیب اکسایشی به DNA، RNA، پروتئین، لیپید و کربوهیدرات‌ها می‌گردد

[۲, ۴]. بیشترین اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد متوجه غشای سلولی و غشاء ارگانل های داخل سلولی نظیر غشای میتوکندری ها می‌گردد [۴]. اثرات سمی رادیکال‌های آزاد اکسیژن که به نام استرس اکسیداتیو معروف است می‌تواند باعث بروز بیماری‌های مختلفی از جمله بیماری‌های التهابی، قلبی-عروقی، سرطان، آلزایمر، پارکینسون، آترواسکلروز، آرتریت، دیابت ملیتوس، کاتاراکت، آسم، هپاتیت، آسیب کبدی و بیماری‌های نقص ایمنی، پیری و همولیز اریتروسیت ها شوند [۴-۹]. برای مبارزه با اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد و ROS ها، انسان‌ها و سایر ارگانیسم‌های زنده از سیستم کامل و قدرتمند آنتی اکسیدان بهره مند می‌باشند [۵, ۱۰]. تأثیرات مضر ROS ها و نیتروژن به واسطه عملکرد آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیرآنزیمی متعادل می‌گردد. موثرترین آنتی اکسیدان های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، گلوتاتیون S–ترانسفراز (GST)، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز (G6PD) است. آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی شامل ویتامین C، ویتامین E، کاروتنوئیدها، آنتی اکسیدان های تیولی (گلوتاتیون، تیوردوکسین، لیپوئیک اسید)، فلاونوئیدهای طبیعی، ملاتونین، مس، روی، سلنیوم و ترکیبات دیگر می‌باشند [۲, ۱۱-۱۶]. آنتی اکسیدان ها، واکنش‌های اکسایشی متنوعی را که به صورت طبیعی در سلول‌ها و بافت‌ها رخ می‌دهد تنظیم می‌کنند و می‌توانند اکسیداسیون را با جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن فلزات سمی و با عمل الکترون دهی متوقف یا کند کنند [۱۷]. امروزه محققان و دانشمندان توجه زیادی نسبت به حضور ترکیبات فیتوشیمیایی فنولیک طبیعی در گیاهان دارند. این امر به خاطر فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات است که تأثیرات سودمندی بر سلامتی، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان‌ها دارند [۵, ۶, ۱۸]. فلاونوئیدها به شکل آزاد و گلیکوزیدی یافت می‌شوند و بزرگ‌ترین گروه فنل های موجود در طبیعت را تشکیل می‌دهند [۲, ۵]. این ترکیبات در شیره گیاهان عالی و شیره سلولی بافت‌های جوان یافت می‌شوند. فلاونوئیدها در اکثر خانواده‌های گیاهی از جمله leguminose (نخود)، umbelliferae (چتریان)، polyganaceae و غیره وجود دارند. گروهی از فلاونوئیدها با کاهش اکسیداسیون لیپوپروتئین‌هایی مانند LDL باعث پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی می‌گردند. همچنین با مهار فعالیت آنزیم‌هایی از جمله گزانتین اکسیداز، لیپواکسیژناز و سیکلواکسیژناز اثر ضد التهابی دارند [۱۰]. استفاده از داروهای سنتی در سال‌های اخیر بسیار رواج یافته است و از آنجائی که گیاهان یک منبع غنی از آنتی اکسیدان طبیعی به شمار می‌آیند، می‌توان برای تهیه داروهای نوین از آنها استفاده کرد [۱۹-۲۱]. استفاده از آنتی اکسیدان های سنتزی یک روش قدیمی بوده و امنیت آن نیز مورد سؤال مشتریان می‌باشد. از این رو بررسی گونه‌های گیاهی جدید و شناسایی نشده در جهت ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی و درمانی آنها بسیار ارزشمند می‌باشد. گونه کرفس سفید (*Haussknechtia Elymatica*) از تیره چتریان و بومی مناطق کوهستانی نواحی سردسیری شهرستان یاسوج می‌باشد که به زبان محلی به نام کهپر معروف بوده و به طور سنتی استفاده غذایی می‌شود. کرفس سفید گیاهی با ساقه رنگ پریده است که ارتفاع آن ۲ تا ۳ متر می‌باشد. این گیاه بیشتر در شیب‌های جنوبی رویش می‌یابد و با توجه به خوش خوراک بودن، اکثراً در مناطق صعب العبور که دام کمتری تردد دارند، رویش پیدا می‌کند [۲۱]. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند گیاهان خانواده چتریان خاصیت آنتی اکسیدانی و دارویی دارند [۲۲, ۲۳]. تأثیر پوست گیاه کرفس سفید در تحریک پاسخ‌های ایمونولوژیکی (سلولی و هومورال) نیز مورد مطالعه قرار گرفت [۲۴]. بر اساس نقش مهم آنتی اکسیدان ها در سلامت انسان و درمان بسیاری از بیماری‌ها، در تحقیق حاضر، برای اولین بار خواص آنتی اکسیدانی و آنتی همولیتیکی عصاره الکلی برگ گیاه کرفس سفید با تست‌های شیمیایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

۱- جمع آوری گیاه کرفس سفید و نحوه خشک کردن

آن: گیاه کرفس سفید از منطقه کوهستانی شهر یاسوج (با شیب بالای ۷۰ درصد) جمع آوری گردید. سپس برگ‌ها از دیگر بخش‌های گیاه جداسازی شد و به دور از نور خورشید و در مقابل جریان باد خشک شدند.

۲- استخراج عصاره اتانولی برگ کرفس سفید: عصاره اتانولی برگ‌های کرفس سفید با روش خیساندن تهیه گردید. در این روش ۲۰۰ گرم از پودر برگ‌های آسیاب شده گیاه با ۸۰۰ میلی لیتر از اتانول مخلوط شد. عصاره صاف شده سبز رنگ حاصل (عصاره + حلال اتانول) جهت خروج حلال به وسیله روتاری تحت خلأ (در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۴ ساعت تبخیر شده و سپس در آون خشک شد. در این مرحله عصاره غلیظ سبز رنگی بدست آمد که جهت مطالعات بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۳- جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره:

جداسازی و شناسی ترکیبات موجود درعصاره با استفاده از کروماتوگافی گازی- طیف سنجی جرمی (با دستگاه Hewlett-pakard 6890، ساخت آمریکا) انجام شد. بطور خلاصه ۰.۰۵ گرم از عصاره استخراج شده را با ۱ میلی لیتر اتانول رقیق و بعد از صاف کردن با فیلتر (میلی‌پور، امریکا) به ستون دستگاه GC/MS تزریق گردید. برای جداسازی از گاز هلیوم با سرعت ml/min ۱ استفاده شد. چرخه حرارتی ستون بدین صورت انجام شد که در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه ثابت شد و سپس با سرعت ml/min ۴ به دمای ۲۲۰ درجه سانتی گراد رسید و در این دما نیز به مدت ۲۰ دقیقه ثابت ماند. برای شناسایی ترکیبات، از مقایسه طیف جرمی آنها با طیف‌های موجود در داده‌های کتابخانه‌های WILEY و NIST استفاده شد.

۴- روش‌های بررسی توانایی آنتی اکسیدانی در عصاره:

خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی برگ کرفس سفید با بررسی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام، قدرت خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد مانند DPPH، نیتریک اکساید و میزان قدرت احیاء کنندگی آن انجام شد.

۴-۱- اندازه گیری ترکیبات فنولی تام عصاره: میزان ترکیبات فنولی تام موجود در عصاره برگ کرفس سفید با روش متداول فولین سیوکالتئو (Folin ciocalteu) انجام شد و نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد [۲۵] اساس کار روش فولین سیوکالتئو شامل احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط

قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ می‌باشد که در طول موج ۷۲۵ نانومتر جذب نوری دارد. به طور خلاصه در این روش ۰,۵ میلی لیتر از عصاره با غلظت ۱۰ mg/ml در لوله آزمایش با ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر ۰,۲ نرمال فولین سیوکالتئو مخلوط شدند. بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم بر لیتر به لوله آزمایش اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, Sp-2100UV, China) در طول موج ۷۶۰ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. از غلظت‌های مختلف گالیک اسید در محدوده غلظتی (۰، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۲، ۰/۱۶، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

۴-۲- اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی تام عصاره: میزان ترکیبات فلاونوئیدی به روش رنگ سنجی و با استفاده از معرف آلومینیوم کلراید بررسی شد [۲۶]. اصول روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید، تشکیل کمپلکس‌های اسیدی آلومینیوم کلراید با گروه کتو و یا گروه هیدروکسیل فلاونوئید ها است که این کمپلکس‌های رنگی بیشترین جذب را در طول موج ۴۱۵ نانومتر دارند [۲۶]. به طور خلاصه در این روش ۵۰ میلی لیتر از عصاره (با غلظت ۱۰ mg/ml) در لوله آزمایش با ۱,۵ میلی لیتر اتانول مخلوط شدند. سپس، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ به لوله آزمایش اضافه شد. سپس ۰,۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. از غلظت‌های مختلف کوئرسیتین (Quercetin) در محدوده غلظتی (۰، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۲، ۰/۱۶، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد. در نهایت، داده‌ها بر اساس میلی گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره بیان گردید.

۴-۳- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی تام با روش FRAP: فعالیت آنتی اکسیدانهای تام عصاره به روش FRAP (Ferric Reducing Of Antioxidants Power) اندازه گیری شد [۲۷]. برای اندازه گیری TAC، محلول استاندارد سولفات آهن ($FeCl_2$, 4H2O: با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) و محلول کارFRAP (شامل ۳۰۰ mM بافر استات سدیم با pH = ۳/۶، ۱۰ mM محلول TPTZ (2,4,6-Tri-Pyridyl-S-Triazine) و ۲۰ mM کلرید فریک به ترتیب با نسبت ۱:۱:۱۰) تهیه شد. محلول FRAP برای هر آزمایش به صورت تازه تهیه گردید. این متد توانایی آنتی اکسیدانهای عصاره را در احیاء ۲ یون فریک (Fe^{3+}) به یون فرو (Fe^{2+}) نشان می‌دهد. بعد از آماده سازی محلول‌ها، داخل هر لوله آزمایش حدود ۱/۵ میلی لیتر محلول FRAP اضافه شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه عصاره گیاهی با غلظت‌های مختلف، ۲۵ میکرولیتر از محلول استاندارد با غلظت‌های مشخص و ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر به هر یک از لوله‌های آزمایش مربوطه اضافه گردید. سپس نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و در نهایت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و بر حسب میکرومولار بر لیتر بیان گردید.

۴-۴- ارزیابی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH (Diphenyl-Z-Picryl-Hydrazyl): رادیکال DPPH یک رادیکال کروموژن (رنگزا) است که خاصیت چربی دوستی دارد و می‌تواند آغازگر بسیاری از واکنش‌های زنجیره‌ای لیپید پراکسیداسیون و اتواکسیداسیون باشد. رادیکال DPPH دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌باشد. اما پس از واکنش آنتی اکسیدان ها با رادیکال DPPH به طور قابل ملاحظه‌ای جذب آن کاهش می‌یابد. قدرت آنتی اکسیدانی به درصد کاهش رنگ ارغوانی تیره اولیه به زرد بستگی دارد. هر چه تعداد گروه‌های هیدروکسیل حلقه آنتی اکسیدان بیشتر باشد تعداد اتم هیدروژن بیشتری برای واکنش با رادیکال DPPH و پایدار کردن آن وجود دارد [۲۸]. جذب در طول موج ۵۱۷ بیانگر مقادیر باقی مانده رادیکال DPPH است. در این روش، حدود ۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو لیتر بر میلی لیتر) با ۱ میلی لیتر از محلول متانولی DPPH با غلظت ۱۰۰ میکرومولار مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. سپس جذب مخلوط‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل بلانک اتانول قرائت شد. اسید آسکوربیک، بوتیل هیدروکسی آنیزیل (BHA) و کوئرستین با همان نسبت فوق به عنوان استاندارد (کنترل مثبت) استفاده شدند. سپس مقادیر IC_{50} "غلظتی از هر عصاره که مورد نیاز است تا ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH مهار گردد." مورد محاسبه قرار گرفت [۲۱]. در نهایت درصد مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره گیاهی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

درصد مهار رادیکال آزاد $(IC_{50}) = (A_C-A_S)/A_C \times ۱۰۰$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل مثبت و جذب نمونه می‌باشند [۲۹].

۴-۵- اندازه گیری میزان به دام اندازی نیتریک اکساید: به این منظور سدیم نیترو پروساید (SNP) ۱۰ میلی مولار در بافر فسفات نمکی (PBS) با pH = ۷/۴ تهیه گردید. سپس حدود ۱ میلی لیتر از محلول SNP با ۱ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو لیتر بر میلی لیتر) مخلوط گشت. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، ۰.۵ میلی لیتر از واکنشگر گریس (شامل: سولفانیل آمید ۱٪ + نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱٪ در اسید فسفریک ۳٪) به مخلوط اضافه شد. در نهایت جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۵۶ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. از کوئرستین به عنوان استاندارد (کنترل مثبت) استفاده شد. جهت محاسبه فعالیت مهارکنندگی رادیکال NO توسط عصاره گیاهی در مقایسه با استاندارد کوئرستین میزان IC_{50} تعیین گردید [۳۰].

$IC_{50} = (A_C-A_S)/A_C \times ۱۰۰$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل مثبت و جذب نمونه می‌باشند [۲۹].

۴-۶- اندازه گیری قدرت احیاء کنندگی عصاره: ارزیابی قدرت احیاء کنندگی عصاره که نشانگر توانایی آنتی اکسیدانی آن به عنوان یک الکترون دهنده است، با احیاء یون فریک Fe (III) به یون فرو Fe (II) انجام شد [۳۱]. در این روش، حدود ۰.۵ میلی لیتر از غلظت‌های

مختلف عصاره گیاهی (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرو لیتر بر میلی لیتر) در آب با ۱,۲۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۰,۲ مولار با pH = ۶/۶ و پتاسیم فری سیانید ۱ درصد ($K_3Fe(CN)_6$; 1%) مخلوط شدند. نمونه‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از افزودن ۱/۲۵ میلی لیتر از محلول‌تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (TAC, ٪۱۰) به عنوان عامل متوقف کننده واکنش، مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس ۱/۲۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۱/۲۵ میلی لیتر از آب مقطر و ۲۵۰ میکرو لیتر محلول ۰/۱ درصد $FeCl_3$ مخلوط شدند. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. افزایش جذب در مخلوط واکنش به مفهوم افزایش قدرت احیاء کنندگی (آنتی اکسیدانی) می‌باشد. در این آزمایش از اسید آسکوربیک (ویتامین C) به عنوان کنترل مثبت در حد غلظت عصاره گیاهی استفاده شد.

۵- اندازه گیری فعالیت آنتی همولیتیک عصاره: فعالیت آنتی همولیتیک عصاره گیاهی برطبق روش Naim و همکاران با اندکی تغییر انجام شد [۳۲]. در این روش در ابتدا گلبول قرمز خون انسان تهیه شد. بدین منظور خون کامل درون لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد. در مرحله بعد با استفاده از سانتریفیوژ، پلاسما از سلول‌های خونی جدا و سلول‌های فشرده RBC سه مرتبه با بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با pH = ۷/۴ مورد شستشو قرار گرفت و پس از هر مرحله شستشو با دور g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. گلبول‌های قرمز تهیه شده طی حداکثر ۶ ساعت مورد استفاده قرار گرفت. از H_2O_2 به عنوان یک عامل تولید کننده رادیکال آزاد و مخرب غشای لیپیدی RBC جهت همولیز گلبول قرمز شستشو داده شده، استفاده شد. ابتدا به ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ۵ درصد RBC در بافر فسفات نمکی (PBS) با pH = ۷/۴ حدود ۰,۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره برگ گیاه کرفس سفید که در PBS با pH = ۷/۴ تهیه شده بودند، اضافه شد. مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و سپس به آن حدود ۱ میلی لیتر از محلول ۱ مولار H_2O_2 در بافر فسفات نمکی اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۸۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و در نهایت به آنها حدود ۰.۸ میلی لیتر از بافر فسفات نمکی با pH = ۷/۴ اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، نمونه‌ها در دور g ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس جذب محلول رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر در مقابل بلانک (حلال عصاره + بافر فسفات) قرائت شد. از اسد آسکوربیک به عنوان استاندارد در حد غلظت‌های عصاره (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) استفاده شد.

میزان ۵۰ درصد مهار همولیز، با کمک فرمول زیر محاسبه شد:

$IC_{50} = (A_c - A_S)/A_C \times ۱۰۰$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل مثبت و جذب نمونه می‌باشند [۲۹].

۶- آنالیز آماری: کلیه آزمون‌های آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شده و کلیه میانگین‌ها به صورت mean ± S.D با سطوح اطمینان (CI) ٪۹۵ بیان شد. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

یافته‌ها

۱- ترکیبات اصلی تشکیل دهنده عصاره برگ کرفس

سفید: آنالیز GC-MS عصاره جمع آوری شده گیاه کرفس سفید نشان داد که در این عصاره ۲۱ ترکیب وجود دارد که ترکیبات اصلی آن شامل آسارون (Asarone)، هگزا دکانوئیک اسید، پالمیتیک اسید (Palmitic acid)، لینولنیک اسید (Linolenic acid)، لینولئیک اسید متیل استر (Linoleic acid, methylester)، نئوفیتادین (neophytadiene)،۲-متیل-۵-متوکسی-۶-هیدروکسی بنزوفوران (2-Methyl-5-methoxy-6-hydroxybenzofuran) است (تصویر ۱) که در این میان فراوان‌ترین اجزای تشکیل دهنده عصاره، آسارون می‌باشد که ۴۰/۴۹ درصد است.

۲-فعالیت آنتی اکسیدانی

۲-۱- میزان محتوای تام فنولی: جهت ارزیابی میزان محتوای تام فنولی موجود در عصاره اتانولی برگ کرفس سفید، از روش فولین سیوکالتئو استفاده شد. بر اساس مقایسه مقادیر جذب نمونه با محلول‌های استاندارد گالیک اسید بر طبق معادله خطی (۰/۹۸۹۶ = R^2:۰,۰۶۶۸ + ۱۱/۷۰۵X = y) حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون محتوای تام فنولی عصاره برگ برابر با ۰/۵ ± ۳۹/۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره محاسبه شد (جدول ۱).

۲-۲. میزان محتوای تام فلاونوئیدی: میزان محتوای تام فلاونوئیدی موجود در عصاره طبق روش رنگ سنجی ارزیابی شد. محتوای تام فلاونوئیدی عصاره اتانولی برگ کرفس سفید بر طبق معادله خطی (۰/۹۹۹۷ = R^2:۰/۰۰۶۴- × ۵/۳۳۵ = y) حاصل از رسم منحنی کالیبراسون کوئرسیتین، برابر با ۱/۱ ± ۱۷/۳ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره محاسبه شد (جدول ۱).

۲-۳- فعالیت آنتی اکسیدانتی به کمک روش FRAP: تعیین قدرت آنتی اکسیدانی توتال در نمونه در جهت احیاء فریک به فرو استفاده می‌شود. در این روش از نمودار استاندارد $FeCl2, 4H_2O$ استفاده شده و بر اساس معادله خطی (۰/۹۹۹۳ = R^2:۰/۰۰۴۸ + ۰/۰۰۰۴۲۷× = y)، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ۲۵۰/۵ میکرو مولار محاسبه شد (جدول ۱).

۲-۴- میزان توانایی مهار رادیکال DPPH توسط عصاره: نتایج درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در حضور غلظت‌های مختلف عصاره برگ کرفس سفید و همچنین آنتی اکسیدان های سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزیل (BHA)، اسید آسکوربیک و کوئرستین نشان داد که نمونه‌ها بطور مؤثری توانایی مهار رادیکال‌های DPPH دارد میزان IC_{50} آنتی اکسیدان های BHA، اسید آسکوربیک، کوئرستین و عصاره برگ کرفس سفید به ترتیب ۲۷/۱۰، ۲/۴۵، ۲/۶۷ و ۶۲/۱۹ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد (جدول ۱).

۲-۵- میزان توانایی مهار رادیکال نیتریک اکساید توسط عصاره: برای بررسی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید از سدیم نیتروپروساید (SNP) استفاده گردید. SNP در محیط آبی و PH فیزیولوژیک تولید نیتریک اکساید می‌کند که در واکنش با اکسیژن باعث تولید نیتریت می‌گردد. نیتریت تولید شده در واکنش با واکنشگر

گریس، تولید رنگ غلیظ دی آزو می‌نماید. مهارکننده‌های نیتریک اکساید با اکسیژن محیط رقابت کرده و تولید یون نیتریت را کاهش می‌دهند. بنابراین هرچه به دام اندازی بیشتر باشد، نیتریت کمتری تولید می‌شود و به دنبال آن رنگ کمتر و جذب کمتری خواهیم داشت [۲۱]. مطابق با این روش، میزان مهار رادیکال نیتریک اکساید با غلظت‌های مختلف عصاره در مقایسه با استاندارد کوئرستین، با ۳ بار تکرار آزمایش برای هر مورد محاسبه شد. میزان IC_{50} استاندارد کوئرستین و عصاره برگ کرفس سفید به ترتیب ۸/۴۵، ۲۲۳/۹۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد (جدول ۱).

۲-۶- میزان قدرت احیاکنندگی عصاره: قدرت احیاکنندگی عصاره با توانایی آن در احیا آهن III (فریک) به آهن II (فروس) و نمایان شدن رنگ آبی کمرنگ سنجیده شد. بر این اساس، میزان قدرت احیاکنندگی با غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ کرفس سفید در مقایسه با استاندارد آسکوربیک اسید با ۳ بار تکرار آزمایش برای هر مورد سنجیده شد (جدول ۲، تصویر ۴). نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت عصاره قدرت احیاکنندگی آن نیز افزایش می‌یابد.

۳- ارزیابی فعالیت آنتی همولیتیک عصاره: در این روش، فعالیت ضد همولیزی عصاره برگ کرفس سفید در مقابل خصوصیت لیز کنندگی H_2O_2 مورد ارزیابی قرار گرفت. عمل همولیز گلبول قرمز شستشو داده شده توسط H_2O_2 (به عنوان یک عامل تولید کننده رادیکال آزاد) و تخریب غشای لیپیدی RBC صورت گرفت. بر این اساس، میزان فعالیت آنتی همولیتیکی با غلظت‌های مختلف عصاره الکلی برگ کرفس سفید در مقایسه با استاندارد آسکوربیک اسید با ۳ بار تکرار آزمایش برای هر مورد سنجیده شد (تصویر ۵). میزان IC_{50} آسکوربیک اسید و عصاره به ترتیب ۲۰۵/۹۷، ۴۳۵/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد (جدول ۱).

بحث

اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد و ROS ها بر سیستم بیولوژیک، یکی از مباحث مهم و مطرح در علم پزشکی است. آنتی اکسیدان ها قادرند از سیستم‌های بیولوژیک در برابر این عوامل مخرب محافظت کنند. از آنجائی که گیاهان یک منبع بزرگ آنتی اکسیدان طبیعی به شمار می‌آیند، می‌توان برای تهیه داروهای سنتی از آنها استفاده کرد [۱۹-۲۱]. استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی و صناعی در غذاها و به خصوص روغن‌ها و چربی‌ها امری شناخته شده است. ترکیبات فیتوشیمیایی طبیعی در گیاهان علاقه روزافزونی را در بین محققین علوم پزشکی و تغذیه کسب کرده است که به دلیل اثرات مفید آنها در درمان و معالجه بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان‌ها به واسطه عملکرد آنتی اکسیدانی این ترکیبات می‌باشد [۶]. از این رو بررسی گونه‌های گیاهی جدید و شناسایی نشده در جهت ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی و درمانی آنها بسیار ارزشمند می‌باشد. لذا در این مطالعه به شناسایی خواص آنتی اکسیدانی و آنتی همولیتیکی عصاره برگ کرفس سفید از خانواده چتریان (Apiaceae) جمع آوری شده از مناطق کوهستانی شهرستان یاسوج که تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته بود، پرداخته شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این گیاه محتوی فنلی و فلاونوئیدی بالایی برخوردار است. به علاوه قدرت آنتی اکسیدانی توتال، توانایی به دام اندازی رادیکالهای آزاد DPPH، توانایی مهار رادیکال نیتریک اکساید نیز در عصاره بدست آمده از این گیاه بالا بود. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که گیاهان خانواده چتریان، از ارزش خوراکی و دارویی بالایی برخوردارند [۲۴, ۳۳-۴۰]. مطالعه صادقی و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان می‌دهد که گیاهان بیهلر (*Dorema aucheri*) تا حد زیادی سبب کاهش قند خون در بیماران دیابتی نوع ۲ می‌گردد [۳۳]. تحقیقات نشان دادند که ترکیبات متیل استری یا همان فلاونوئیدها در شیرابه بیلهر وجود دارند که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشند [۳۴]. مطالعاتی نیز به اثرات درمانی بیلهر در برابر آسیب‌های کبدی اشاره داشتند [۳۵, ۳۶]. بر اساس نتایج یک تحقیق گونه Apium *graveolens* اثر ضد باکتریایی دارد و در درمان عفونت‌های مجاری ادراری مفید می‌باشد [۳۷]. در مطالعه Corush و همکاران به اثرات آنتی اکسیدانی سه گیاه از خانواده چتریان *Heracleum persicum*، *Prangos ferulacea*، *Chaerophyllum macropodum* اشاره شد [۳۸]. در یک مطالعه اثرات ضد میکروبی *Prangos ferulacea* گزارش شد [۳۹]. پناهی و همکاران به نقش آنتی اکسیدانی عصاره میوه *Heracleum persicum* و اثر بخشی مکمل‌های خوراکی آن بر بیمارانی با CAD (minimal coronary artery disease) اشاره کردند [۴۰]. امیرغفران و همکاران در مطاله خود نشان دادند که گیاه کرفس سفید از طریق عمل کردن بر روی ازدیاد لنفوسیت و ترشح IL-2 پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی را تحریک می‌کند [۲۴].در مطالعه حاضر، آنالیز GC-MS عصاره جمع آوری شده گیاه کرفس سفید نشان داد که در این عصاره ۲۱ ترکیب وجود دارد که ترکیبات اصلی آن شامل آسارون (Asarone) (۴۰/۴۹٪)، هگزا دکانوئیک اسید (۲۴/۳۱٪)، لینولنیک اسید (۵/۵۰٪)، لینولئیک اسید متیل استر (۴/۹۶٪)، نئوفیتادین (۳/۷۰٪)، ۲-متیل-۵-متوکسی-۶-هیدروکسی بنزوفوران (۳/۱۵٪) می‌باشند. در این میان، مهم‌ترین جزء تشکیل دهنده عصاره آسارون می‌باشد. محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی اجزا اصلی تشکیل دهنده اندام هوایی گیاه کرفس سفید با دستگاه طیف نگار جرمی GC-MS پرداختند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که میزان درصد اصلی ترکیبات شامل: ترانس آسارون (۵۹/۹٪)، ترانس متیل ایزو گنول (۲۲/۴٪)، آلفازینگیبرن (۷/۹۶٪)، بتاسسکویفلاندرن (۴/۷٪)، بتا بیسابولن (۴/۳٪) می‌باشد [۴۱]. نتایج بدست آمده از هر دو آزمایش میزان بالای ترکیب آسارون را نشان می‌دهد. در مطالعه *Bamoniri* و همکاران ترکیبات سازنده عصاره برگ و میوه گیاه *ferula assafoetida L* از خانواده چتریان با دستگاه طیف نگار جرمی GC-MS بررسی شد. در این تحقیق ۲۳ ترکیب از برگ و ۲۵ ترکیب اصلی از میوه یافت شد که ترکیبات عصاره برگ آن شامل: ۲-آندسنول (۱۷/۲۶٪)، تیمول (۱۰/۸۹٪)، دودکانال (۹/۷۰٪) و اسپاتونول (۸/۵۴٪) بوده است [۴۲]. این نتایج نشان می‌دهد این ترکیبات سهم بسیار ناچیز و یا حتی گاهی هیچ سهمی در اجزای تشکیل دهنده عصاره گیاه کرفس سفید به خود اختصاص نداده‌اند. مطالعه عصاره برگ گیاه *Heracleum persicum* از شمال ایران با کمک دستگاه‌های GLC و NMR ترکیبات متفاوتی را نشان داد به طوریکه ترانس آنتول با ۴۷/۵٪ فراوان‌ترین ترکیب موجود در عصاره گزارش شد [۴۳]. در مقایسه با تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد

تفاوت در روش استخراج و نوع گونه گیاهی باعث تفاوت در نوع ترکیبات سازنده باشد. گزارش‌های متعدد نشان داده است که فلاونوئیدهای گیاهی دارای خواص آنتی اکسیدانی بالقوه‌ای هستند [۴۵-۴۳]. مکانیسم عمل فلاونوئیدها برای بروز اثر آنتی اکسیدانی به صورت جمع آوری رادیکال‌های آزادی مثل آنیون سوپراکسید، رادیکال‌های پراکسید چربی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد. علاوه بر این توانایی به دام اندازی اکسیژن منفرد و شلاته کردن فلزات را نیز دارند. فلاونوئیدهایی که گروه هیدروکسیل آزاد بیشتری دارند عمل جمع آوری رادیکال را بهتر انجام می‌دهند [۱۰]. کوئرستین (Quercetin) یکی از مهم‌ترین فلاونوئیدها در گروه فلاونول ها می‌باشد که در اکثر جنس‌های گیاهی یافت می‌گردد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در عصاره برگ گیاه کرفس سفید میزان فنول تام (۰/۵ ± ۳۹/۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره) بیشتر از فلاونوئید (۱/۱ ± ۱۷/۳ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره) است. ابراهیم زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی را در گیاه *Physospermum cornobiense* گزارش کردند، به طوریکه سطح بالای ترکیبات فنولی ۱/۴۴ ± ۳۶/۱۷ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره و میزان ترکیبات فلاونوئیدی ۰/۶۲ ± ۱۶/۵۶ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره بوده است [۴۶]. نبوی و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی فعالیت اکسیدانی ریشه، گل و برگ گیاه *Ferula foetida regel* پرداختند، تحقیقات آن‌ها نشان داد که این گیاه نیز از فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی برخوردار است. به طوری که سطح ترکیبات فنولی ۴۹/۴ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره نسبت به تر کیبات فلاونوئیدی ۲۰,۹ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره بوده است [۲۱]. در مطالعه Corush و همکاران میزان ترکیبات فنولی تام در گیاهان Prangos *ferulace*، *Heracleum persicum* و *Chaerophyllum macropodum* به ترتیب، ۶/۴ ± ۶۵/۱، ۲/۸ ± ۵۹/۶ و ۷/۰ ± ۳۴/۰ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گیاه گزارش شد [۳۸]. واکنش سوبستراهای آنتی اکسیدانی موجود در عصاره اتانولی برگ کرفس سفید با دام اندازی رادیکال DPPH تغییر رنگ زرد را نشان داد به طوری که میزان IC_{50} برای عصاره اتانولی در به دام اندازی DPPH، (µg/mL) ۶۲/۱۹ اندازه گیری شد. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در این عصاره در غلظت (µg/mL) ۲۵ در مقایسه با استانداردهای BHA، اسید آسکوربیک و کوئرستین به ترتیب به میزان ۴۵/۰۳، ۴۵/۲۱، ۹۳/۲۴ و ۹۲/۹۸ درصد تعیین گردید. طبق مطالعه ابراهیم زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ روی گیاه *Physospermum cornobiense* میزان IC_{50} در به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، (µg/mL) ۶۵۵/۹ بوده است [۴۶]. از طرفی، نتایج آزمایش نبوی و همکاران نشان داد که میزان IC_{50} گیاه *Ferula foetida regel* در مهار DPPH، (µg/mL) ۱۹۲/۵ می‌باشد [۲۱]. در مطالعه Corush و همکاران اثرات آنتی اکسیدانی سه گیاه از خانواده چتریان (*Apiaceae*) مورد مقایسه قرار گرفت. میزان IC_{50} در مهار رادیکال آزاد DPPH در گیاهان Prangos *ferulace*، *Heracleum persicum* و *Chaerophyllum macropodum*، به ترتیب (mg/mL) ۰/۲۴۲، ۰/۴۳۸/ و ۰/۶۲۳ بوده است[۳۸] (. نتایج آنها همچنین نشان می‌دهد که اثرات آنتی اکسیدانی *Prangos ferulacea* با توجه به اثر مهار کنندگی DPPH (دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل) و مهار پراکسیداسیون لیپیدی به ترتیب با ارزش IC_{50}، ۰/۲۴۲ و ۰/۱۵۲ میلی گرم بر میلی لیتر از دو گیاه *Heracleum persicum* و Chaerophyllum *macropodum* بیشتر است [۳۸]. با توجه به این نتایج، عصاره این گیاهان نسبت به عصاره گیاه کرفس سفید در مهار رادیکال آزاد DPPH ضعیف‌تر عمل نموده‌اند. میزان IC_{50} عصاره اتانولی برگ کرفس سفید در به دام اندازی نیتریک اکساید در مقایسه با کوئرستین به ترتیب: ۲۲۳/۹۰ µg/mL و ۸/۴۵ µg/mL می‌باشد که این گیاه به میزان ۳۰/۱۹ درصد ضعیف‌تر عمل نموده است. میزان IC_{50} به دست آمده از آزمایشات ابراهیم زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مهار نیتریک اکسید بر روی عصاره گیاه *Physospermum cornobiense*، ۱۵۶/۴ µg/mL بوده است [۴۶]. بنابراین، گیاه کرفس سفید در مهار نیتریک اکساید ضعیف‌تر عمل کرده است. نبوی و همکاران نیز به بررسی فعالیت مهار نیتریک اکساید در گیاه *Ferula foetida regel* پرداختند. IC_{50} به دست آمده از عصاره ساقه فعالیت مهارکنندگی (µg/mL ۲۱/۹ ± ۸۹۶/۹) بهتری را در مقایسه با عصاره گل و برگ آن نشان داد [۲۱]. بنابراین عصاره این گیاه در مهار نیتریک اکساید بسیار ضعیف‌تر از عصاره برگ گیاه کرفس سفید می‌باشد. اگر چه کوئرستین قدرت مهارکنندگی بالایی دارد ولی فعالیت کارسینوژنیک نیز نشان می‌دهد [۴۷]. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که قدرت احیاکنندگی عصاره اتانولی برگ کرفس سفید با افزایش غلظت آن، افزایش می‌یابد. این نتایج در مقایسه با قدرت احیاکنندگی اسید آسکوربیک بوده است، به طوریکه نسبت به اسید آسکوربیک حدود ۲۱٪ ضعیف‌تر عمل نموده است. میزان آنتی اکسیدان تام این گیاه، ۲۵۰/۵ µM می‌باشد که این میزان می‌تواند بیانگر فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی همولیتیکی گیاه باشد. در بررسی‌های به عمل آمده توسط ابراهیم زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی عصاره برگ گیاه *Physospermum cornobiense* مشخص نمود که عصاره برگ این گیاه نیز همانند عصاره کرفس سفید از قدرت احیاکنندگی بالایی برخوردار است [۴۶]. همچنین، آزمایشات نبوی و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی عصاره گیاه *Ferula foetida regel* نشان داد که قدرت احیاکنندگی عصاره *Ferula* ضعیف است. در حالی که با افزایش غلظت عصاره کرفس سفید، قدرت احیا کنندگی آن افزایش می‌یافت و قدرت احیاکنندگی خوبی را نشان داده است [۴۸]. نتایج تحقیق ما نشان داده است که عصاره برگ گیاه کرفس سفید دارای فعالیت آنتی همولیتیک بوده است به طوری که فعالیت آنتی همولیتیک این گیاه در غلظت ۱۰۰ µg/mL حدود ۲۷/۵۶٪ بوده است که در مقایسه با اسید آسکوربیک (۲۹/۴۱٪) در همین غلظت، حدود ۱/۸۳٪ ضعیف‌تر عمل نموده است. در بررسی به عمل آمده توسط ابراهیم زاده و همکاران در مورد فعالیت آنتی همولیتیکی گیاه *Physospermum cornobiense*، میزان IC_{50} آن معادل با ۳۴۷/۳ µg/mL گزارش شد که در مقایسه با گیاه کرفس سفید (IC_{50} = ۴۳۵/۲۵ µg/mL) فعالیت آنتی همولیتیکی بهتری را از خود نشان داده است [۴۶]. در مقایسه با بررسی فعالیت آنتی همولیتیک گیاه *Ferula foetida regel* (IC_{50} = ۵۲۳ µg/mL) توسط نبوی و همکاران در سال

۲۰۱۱، عصاره این گیاه فعالیت آنتی همولیتیکی ضعیف‌تری نسبت به گیاه کرفس سفید داشته است [۴۸].

نتیجه‌گیری

در این تحقیق گیاه بومی جنوب ایران به نام کرفس سفید از منطقه کوهستانی یاسوج برای بررسی ترکیبات سازنده عصاره، فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت آنتی همولیتیک جمع آوری شد. بررسی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره این گیاه نشان داد که فنول ها بخش عمده عصاره برگ را تشکیل می‌دهند. آسارون یک ترکیب فنول اتری و یکی از مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده عصاره برگ گیاه کرفس سفید می‌باشد. علاوه بر این، نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره برگ فعالیت مهارکنندگی DPPH خوبی دارد و قدرت احیاکنندگی آن با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد. از طرفی توانایی عصاره برگ این گیاه در مهار نیتریک اکساید و فعالیت آنتی همولیتیک آن نسبت به بعضی از گونه‌های هم خانواده خود بهتر بوده است. بنابراین، نیاز برای شناسایی و بررسی ترکیبات سازنده سایر بخش‌های این گیاه از قبیل گل، میوه، ساقه و ریشه به عنوان منابع سالم و طبیعی آنتی اکسیدان‌های خوراکی در این مطالعه احساس می‌شود. لذا انجام مطالعات تکمیلی با روش‌های مختلف عصاره گیری جهت درجه خلوص بهتر و دقیق‌تر ترکیبات عصاره کرفس سفید و بررسی کاربرد این عصاره در سیستم‌های بیولوژیکی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه دوستان در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه مازندران که ما را یاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 2004;9(10):490-8. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.08.009 PMID: 15465684
2. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem. 2010;48(12):909-30. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016 PMID: 20870416
3. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem. 2004;266(1-2):37-56. PMID: 15646026
4. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? Science. 1992;256(5057):628-32. PMID: 1533953
5. Papas A. Antioxidant status, diet, nutrition, and health: CRC press; 1998.
6. Lee KW, Kang NJ, Heo YS, Rogozin EA, Pugliese A, Hwang MK, et al. Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. Cancer Res. 2008;68(3):946-55. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3140 PMID: 18245498
7. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. Curr Med Chem. 2010;17(28):3262-88. PMID: 20666718
8. Rizzo AM, Corsetto PA, Montorfano G, Milani S, Zava S, Tavella S, et al. Effects of long-term space flight on erythrocytes and oxidative stress of rodents. PLoS One. 2012;7(3):e32361. DOI: 10.1371/journal.pone.0032361 PMID: 22412864
9. Ginter E, Simko V, Panakova V. Antioxidants in health and disease. Bratisl Lek Listy. 2014;115(10):603-6. PMID: 25573724
10. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidants in food: practical applications: CRC press; 2001.
11. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 2002;7(9):405-10. PMID: 12234732
12. White E, Shannon JS, Patterson RE. Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6(10):769-74. PMID: 9332757
13. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem. 2005;16(10):577-86. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013 PMID: 16111877
14. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem. 2005;12(10):1161-208. PMID: 15892631
15. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 2006;160(1):1-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009 PMID: 16430879
16. Forceville X, Laviolle B, Annane D, Vitoux D, Bleichner G, Korach JM, et al. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. Crit Care. 2007;11(4):R73. DOI: 10.1186/cc5960 PMID: 17617901
17. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell Signal. 2012;24(5):981-90. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008 PMID: 22286106
18. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? Am J Clin Nutr. 2005;81(1 Suppl):268S-76S. PMID: 15640490
19. Huang D-J, Chun-Der L, Hsien-Jung C, Yaw-Huei L. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (Ipomoea batatas [L.] LamTainong 57') constituents. Botan Bull Acad Sinica. 2004;45.
20. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak J Pharm Sci. 2009;22(3):277-81. PMID: 19553174
21. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Fazelian M, Eslami B. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of Diospyros lotus and Pyrus boissieriana growing in Iran. Pharmacogn Mag. 2009;5(18):122.
22. Kooti W, Ali-Akbari S, Asadi-Samani M, Ghadery H, Ashtary-Larky D. A review on medicinal plant of Apium graveolens. Adv Herb Med. 2015;1(1):48-59.
23. Saini N, Singh GK, Nagori BP. Spasmolytic Potential of Some Medicinal Plants Belonging to Family Umbelliferae: A Review. Int J Res Ayurveda Pharm. 2014;5(1):74-83. DOI: 10.7897/2277-4343.05116
24. Amirghofran Z, Azadmehr A, Javidnia K. Haussknechtia elymatica: a plant with immunomodulatory effects. Iran J Immunol. 2007;4(1):26-32.
25. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999;299:152-78. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)99017-1
26. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal. 2002;10(3).
27. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239(1):70-6. DOI: 10.1006/abio.1996.0292 PMID: 8660627
28. de Pinedo AT, Penalver P, Pérez-Victoria I, Rondón D, Morales J. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. Food Chem. 2007;105(2):657-65.

29. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J Agricult Food Chem. 1992;40(6):945-8. DOI: 10.1021/jf00018a005
30. Sreejayan, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. J Pharm Pharmacol. 1997;49(1):105-7. PMID: 9120760
31. Yen G-C, Chen H-Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. J Agricult Food Chem. 1995;43(1):27-32. DOI: 10.1021/jf00049a007
32. Naim M, Gestetner B, Bondi A, Birk Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. J Agricult Food Chem. 1976;24(6):1174-7. DOI: 10.1021/jf60208a029
33. Ahangarpour A, Zamaneh HT, Jabari A, Nia HM, Heidari H. Antidiabetic and hypolipidemic effects of Dorema aucheri hydroalcoholic leave extract in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes in male rats. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(10):808-14. PMID: 25729552
34. Wollenweber E, Dörr M, Rustiyan A. Dorema aucheri, the first umbelliferous plant found to produce exudate flavonoids. Phytochem. 1995;38(6):1417. DOI: 10.1016/0031-9422(94)00840-p
35. Sadeghi H, Ghiasi I, Mazroughi N, Sabzali S. The hepatoprotective effects of Dorema auchri on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2007;9(1):38-42.
36. Azarneoshan F, Khatam Saz S, Sadeghi H. The effects of hydro alcoholic extract of Dorema Aucheri on blood concentration of gonadotropin and androgen hormones in adult male rats. Armaghan J. 2009;14(3):63-70.
37. Rusdiana T, Sriwidodo S, Solahudin J, Halimah E, Irwan AW, Amin S, et al. In Vitro Test of Anticalculi Effect from Celery herb (Apium graveolens L.). Indonesian J Pharmac Sci Technol. 2015;2(2):63-7. DOI: 10.15416/ijpst.v2i2.7812
38. Coruh N, Sagdicoglu-Celep A, Özgökce F. Chaerophyllum macropodum Boiss. and Heracleum persicum Desf. from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. Food Chem. 2007;100:1237-42.
39. Massumi MA, Fazeli MR, Alavi SHR, Ajani Y. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of Prangos ferulacea (L.) Lindl. fruits. Iranian J Pharmac Sci. 2007;3(3):171-6.
40. Panahi Y, Dadjou Y, Pishgoo B, Akbari A, Sahebkar A. Antioxidant Activity of Heracleum persicum Fruit Extract: Evidence from a Randomized Controlled Trial. J Diet Suppl. 2016;13(5):530-7. DOI: 10.3109/19390211.2015.1120842 PMID: 26820395
41. Mohammadi M, Ghavidel M, Habibi Z, As'habi MA. Chemical composition of the essential oil of aerial parts of Haussknechtia elymaitica Boiss. from Iran: a good natural source for trans-asaron. Nat Prod Res. 2012;26(13):1229-33. DOI: 10.1080/14786419.2011.560848 PMID: 22053735
42. Bamoniri A, Mazoochi A. Determination of bioactive and fragrant molecules from leaves and fruits of Ferula assa-foetida L. growing in central Iran by nanoscal injection. Digest J Nanomater Biostruct. 2009;4(2):323-8.
43. Mojab F, Nickavar B. Composition of the Essential Oil of the Root of Heracleum persicum from Iran. Iranian J Pharmac Res. 2010:245-7.
44. Read MA. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. Am J Pathol. 1995;147(2):235-7. PMID: 7639322
45. Middleton E, Jr., Kandaswami C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochem Pharmacol. 1992;43(6):1167-79. PMID: 1562270
46. Ebrahimzadeh M, Nabavi S, Eslami B, Nabavi S. Antioxidant and antihemolytic potentials of Physosperum cornubiense (L.) DC. Pharmacol. 2009;3:394-403.
47. Dunnick JK, Hailey JR. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. Fundam Appl Toxicol. 1992;19(3):423-31. PMID: 1459373
48. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Eslami B, Dehpour AA. Antioxidant and antihaemolytic activities of Ferula foetida regel (Umbelliferae). Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011;15(2):157-64. PMID: 21434482

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Volume 9, Issue 3, Autumn 2017

Research Article

Investigation of Antioxidant and Antihemolytic Activities of Leaf Hydroalcoholic Extracts of *Haussknechtia elymatica*

Mehdi Gholami Bahnemiri [1], Masomeh Kavosi Hajiabadi [2], Fatemeh Tohidi [3], Ali Taravati [4,*], Amir Hossein Esmaeili [2]

[1] PhD Candidate, Deparment of Biochemistry-Biophysics, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[2] MSc, Department of Laboratory Science, Babol-Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology. Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
*** Corresponding author:** Ali Taravati, Assistant Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. E-mail:a.travati@umz.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-09037

How to Cite this Article:
Gholami Bahnemiri M, Kavosi Hajiabadi M, Tohidi F, Taravati A, Esmaeili A H. Investigation of Antioxidant and Antihemolytic Activities of Leaf Hydroalcoholic Extracts of Haussknechtia elymatica. JNKUMS. 2018; 9 (3) :336-344
URL: http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1283-fa.html

Received: 07 Dec 2016
Accepted: 23 May 2017

Keywords:
Antioxidant Activity
Antihemolytic Activity
Haussknechtia Elymatica

Abstract

Introduction: Detrimental effect of free radicals in the body could be reduced using rich source of antioxidants. In this research, for the first time, antioxidant and antihemolytic activities of Haussknechtia elymatica leaf extract, as a strain of the Apiaceae family, were studied.

Methods: Samples were collected from mountain areas of Yasooj city. Leaf ethanolic extract was prepared by the soaking method. Phytochemical compounds was evaluated by GC/MS. Total phenolic and flavonoid contents were measured by folin-ciocalteu and colorimetric methods, respectively. The methods of Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP), scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, and nitric oxide were used to evaluate antioxidant activity of the extract, and in vitro antihemolytic activity against H2O2 was also measured.

Results: The analysis of ethanolic extract by GC/MS showed that asarone at 49.40% is the most important phenolic component of this plant. In addition, the phenolic content of extract (39.6 ± 0.5 mg/g) was higher than the flavonoid content (17.3 ± 1.1 mg/g). The IC50 value of the extract in scavenging of DPPH and Nitric oxide radicals was 62.19 µg/mL and 223.90 µg/mL, respectively. The total antioxidant activity and consequently reducing power of extract increased proportional to its concentration. However, the extract showed weak antihemolytic activity.

Conclusions: The results showed that ethanolic leaf extract of Haussknechtia elymatica had strong antioxidant activity. Thus, it seems necessary to study different parts of this plant.