مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.351732.2859
جلد ۳۷، شماره ۳، صفحه ۴۱۱-۴۰۳ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.3.2.7

بررسی سمیت و LC_{50} برخی گیاهان دارویی با استفاده از آزمون *Artemia salina*

مرضیه حجازی[1*] و رقیه نوروزی[2]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، پست الکترونیک: mhejazy@ut.ac.ir

۲- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۹ | تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۹ | تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۰

چکیده

از گذشته تاکنون گیاهان و فرآورده‌های آنها به‌عنوان غذا و گیاه دارویی در تغذیه و درمان بیماری‌ها در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال در تصور عامه گیاهی بودن یک فرآورده دارویی و یا غذایی با عدم‌سمّیت و ایمنی آن برابر بوده است و اثرهای جانبی و سمّیت گیاهان و فرآورده‌های آنها کمتر مطالعه شده است. ازاین‌رو استفاده از سیستمی که دربردارنده ملاحظات اخلاقی زیستی، سرعت، سادگی و در عین حال ملاحظات اقتصادی باشد، برای برآورد میزان سمّیت و تعیین LC_{50} گیاهان دارویی قبل از مصرف ضروریست. هدف این مطالعه بکارگیری آرتمیا سالینا به‌عنوان ارگانیسمی در ارزیابی سمّیت گیاهان دارویی و فرآورده‌های گیاهی و تعیین LC_{50} می‌باشد. هدف این مطالعه به کارگیری ارگانیسم *Artemia salina* در ارزیابی سمیت و LC_{50} برخی گیاهان دارویی بود. در این مطالعه میزان سمیت عصاره گیاهان دارویی گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.)، خاکشیر (*Descurainia sophia* (L.) Schur)، آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.)، گل حسرت (*Colchicum autumnale* L.)، سیر (*Allium sativum* L.) و سرخدار (*Taxus baccata* L.) با تعیین شاخص LC_{50} با استفاده از آزمون *Artemia salina* مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌ها به روش ماسراسیون تهیه شدند. سیست‌های *A. salina* در آب دریای مصنوعی و در ۲۷ درجه سانتی‌گراد تفریخ گردید و سپس لاروها در معرض عصاره گیاهان در غلظت‌های مختلف (۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. میزان غلظتی که نیاز است تا نیمی از لاروها را از بین ببرد (LC_{50}) محاسبه گردید. میزان LC_{50} گیاهان خاکشیر، سیر، گل‌محمدی، سرخدار، گل حسرت و آنغوزه به‌ترتیب ۴۸۱۲، ۳۳۱۶، ۹۹۷، ۴۴/۰۷، ۱۰/۴۴ و ۲/۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. به‌طور کل نتایج نشان داد که تست *A. salina* می‌تواند به‌عنوان الگویی در تعیین شاخص LC_{50} برای آزمایش‌های سم‌شناسی فرآورده‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، تست سمیت، *Artemia salina*، LC_{50}.

مقدمه

طبق گزارش‌های رسمی سازمان بهداشت جهانی از دیرباز استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های انسانی و دامی معمول بوده است. علاوه‌بر استفاده خوراکی و درمانی، می‌توان از گیاهان ترکیب‌های مختلف دارویی و آرایشی و خوراکی استخراج نمود (Hartl & Humpf, 2000). با وجود پیشرفت تکنیک‌های فرآوری و استحصال گیاهان دارویی و استفاده بیش از پیش از آنها در درمان بیماری‌ها و استفاده خوراکی از آنها، متأسفانه سمّیت و اثر سوء گیاهان کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته است. طبق استاندارد سازمان بهداشت جهانی گیاهان دارویی مورد استفاده در درمان باید غیرسمّی باشند (Krishnaraju *et al*., 2005). در بسیاری از کشورهای پیشرفته جهان، یکی از الزامات صدور مجوز تولید و عرضه هر نوع ماده شیمیایی به بازار، انجام آزمایش‌های بسیار دقیق برای سنجش مخاطرات زیستی و زیست‌محیطی و درج نتایج حاصل به‌صورت برچسب (طبقه‌بندی خطر Hazard classification) بر روی بسته‌بندی آن ماده است (Truhaut, 1977). ایران از تنوع گیاهی بالایی برخوردار است و شناسایی گیاهان دارویی و گیاهان سمّی و تعیین دوز سمّی گیاهان اولین قدم در پیشگیری ناشی از مسمومیت مصرف این گیاهان می‌باشد.

استفاده از حیوانات در تعیین سمّیت گیاه و تعیین دوز کشنده و به‌ویژه LC_{50} علاوه‌بر هزینه بالا ملاحظات اخلاقی خاصی دارد. برخی دیگر از روش‌های تعیین LC_{50} مستلزم استفاده از دستگاه‌ها و روش‌های دستگاهی خاص، گران و وقت‌گیر و بعضاً غیرقابل دسترس و پرسنل کارآزموده هستند. ازاین‌رو تعبیه روش‌های ساده در کلیه آزمایشگاه‌ها بهترین نتیجه را به‌دنبال خواهد داشت. روش‌های متعددی برای سنجش سمّیت مواد تدوین شده است که یکی از این آزمون‌ها، آزمون تعیین سمّیت آرتمیا سالینا (*Artemia salina*) برای تعیین سمّیت اکولوژیکی مواد می‌باشد (Nunes *et al*., 2006). آزمون آرتمیا سالینا قابل اطمینان، سریع و اقتصادی است و نتایج حاصل از آن همبستگی بالای نتایج حاصل از این آزمون را با نتایج in vivo نشان می‌دهد (Tajik *et al*., 2008؛ Silva *et al*., 2007). اگرچه آزمون آرتمیا سالینا برای تفسیر سازوکارهای سمّیت کافی نیست اما یک روش مفید در ارزیابی مقدماتی و تعیین سمّیت ترکیب‌های مختلف است و از سویی این روش نیازمند ترکیب‌های پیچیده نمی‌باشد (Hartl & Humpf, 2000). از این آزمون می‌توان در برآورد میزان سمّیت کلیه فرآورده‌های گیاهی، نوساخته و داروها بهره برد. این آزمون در ارزیابی سمّیت ناشی از فلزات سنگین، آفت‌کش‌ها، دترجنت‌ها و شناسایی مواد غذایی آلوده به مایکوتوکسین‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Kanwar, 2007؛ Krishnaraju *et al*., 2005). از گونه‌های مختلف آرتمیا در زمینه‌های مختلف علوم مانند اکولوژی، فیزیولوژی، اکوتوکسیولوژی، پرورش آبزیان و ژنتیک استفاده می‌شود. آرتمیاها به شش گونه تقسیم می‌شوند و تعداد زیادی از جمعیت آنها دوجنسی هستند ولی تعدادی از آنها نیز پارتوژنتیک می‌باشند، به‌طوری که با ویژگی‌های متداول مانند سازگاری با دامنه‌های وسیع شوری، چرخه عمر کوتاه، سازگاری با شرایط نامساعد محیطی، باروری بالا (nauplii یا کیست)، اندازه بدن کوچک و قابلیت سازگاری با منابع غذایی متنوع شناخته می‌شوند. از سوی دیگر، ویژگی‌های ذاتی این جنس آن را به یک ارگانیسم مناسب برای استفاده در مطالعات اکوتوکسیکولوژی تبدیل می‌کند (Nunes *et al*., 2006).

خاکشیر، گیاهی یک‌ساله یا دوساله از خانواده (Cruciferae) و از تیره شب‌بویان با نام‌های علمی (*Descurainia sophia*)، (*Sisymbrium Sophia*) و (*Sisymbrium irio*) است (Al-Jaber *et al*., 2011) و از نظر طب سنتی، گیاهی گرم و دارای خواص زیادی ازجمله التیام‌بخش زخم‌ها و جراح‌ها، تب‌بر، رفع اسهال، دفع کرم و سنگ‌کلیه، رفع کمبود ویتامین ث و خاصیت ضدعفونی کنندگی می‌باشد (Shakeri *et al*.,

2017). آنغوزه با نام علمی *Ferula assa-foetida* گیاه علفی و بومی استپ‌های ایران و افغانستان است. آنغوزه شیره گیاهی است که از تیغ زدن ریشه یا پایین ساقه و یا قطع ساقه گیاهان مولد آنغوزه از ناحیه یقه گیاه خارج می‌شود. مهمترین اثرهای این گیاه شامل ضددرد، ضدعفونی‌کننده، ضدنفخ، تقویت‌کننده قوای‌جنسی، تقویت‌کننده معده، محرک‌تنفسی، کاهش‌دهنده پرفشاری‌خون، مسهل، ضدانگل، ضدقارچ و تقویت‌کننده رحم می‌باشد (Iranshahy & Iranshahi, 2011). گل‌محمدی (*Rosa damascene* Mill.) از مهمترین گونه‌های معطر خانواده Rosaceae می‌باشد که به‌علت رایحه فوق‌العاده و تنوع ارقام در بسیاری از مناطق دنیا کشت می‌شود. گلبرگ‌ها و نهنج آن به‌عنوان منبع غنی ویتامین ث، گلاب آن خاصیت آرام‌بخشی و اسانس آن اثرهای ضدویروسی و باکتریایی دارد (Shamsizade & Novruzov, 2005).

سُرخدار (*Taxus baccata*) گونه‌ای درخت سوزنی‌برگ است از تیره سرخداریان است. برگ‌های سرخدار *T. baccata* در طب سنتی به‌عنوان بی‌حسی، ضدمالاریا، ضدویروس، آسم، برونشیت، ضدقارچ و فعالیت قابل توجه در برابر برخی باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Erdemoglu & Sener, 2001). سرخدار و سایر گونه‌های تاکسوس از سمّی‌ترین درختان شناخته شده هستند و از آن به‌عنوان درخت مرگ یادشده است. تمامی قسمت‌های گیاه بجز دانه سمّی هستند. خشک کردن گیاه سمّیت آن را کاهش نمی‌دهد. همه دام‌ها و به‌ویژه اسب به مسمومیت با سرخدار بسیار حساس هستند. سموم تاکسین A و تاکسین B موجود در گیاه موجب کاهش هدایت‌الکتریکی میوکارد قلب از طریق مهار جریان سدیم و کلسیم در سلول‌های قلبی و درنتیجه برادیکاردی و وقفه قلبی (cardiac arrest) در مرحله دیاستول قلبی می‌شوند (Aslani, 2004).

گیاه کلشی‌سین (*Colchicine autumnale*) که با عناوین زعفران‌وحشی و بانوی‌برهنه شناخته می‌شود حاوی کلشی‌سین آلکالوئید است که ضدباکتری است و با جلوگیری از سنتز DNA و پلیمریزاسیون توبولین میتوز را مسدود می‌کند. کلشی‌سین در مدیریت آرتریت نقرس حاد استفاده می‌شود. خودکشی ناشی از مصرف بیش از حد قرص کلشی‌سین شایع‌ترین علت مسمومیت با کلشی‌سین است (Brvar *et al.*, 2004). برخی از دامداران روستایی در شمال‌غربی ایران از *C. autumnale* به‌عنوان ضدانگل‌های خارجی در درمان بیماری‌های انگلی دام‌ها استفاده می‌کنند (Mullins *et al.*, 2000).

سیر (*Alium sativum*) یک گیاه شناخته شده و دارویی است که دارای چندین خاصیت مفید است. اثرهای آنتی‌اکسیدان و ضدویروسی، ضدقارچ، ضدباکتریایی، ضدمیکروبی و ضدانگلی سیر گزارش شده است (Eskandarian, 2012).

هدف از این مطالعه، بررسی میزان سمّیت بر مبنای LC_{50} شش گیاه گل‌محمدی، خاکشیر، آنغوزه، سیر، سرخدار و کلشی‌سین به‌عنوان الگویی در تعیین LC_{50} و ارزیابی سمّیت گیاهان دارویی و فرآورده‌های گیاهی توسط آرتمیا سالینا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گیاهان خاکشیر، گل‌محمدی و سیر توسط بخش گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه و شناسایی شد. شیره آنغوزه از شهر طبس استان خراسان‌جنوبی و گیاه سرخدار از ارتفاعات جنگلی افراتخته علی‌آباد کتول و کلشی‌سین از شهرستان خلخال جمع‌آوری شد و توسط بخش گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز مورد تأیید قرار گرفت.

همه گیاهان قبل از استفاده خشک و بعد آسیاب شدند. برای تهیه عصاره آبی الکلی به روش ماسراسیون (خیس کردن)، ۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه را با ۳۰۰CC الکل ۷۰٪ در ارلن حل کرده و بعد به انکوباتور ۳۷ درجه انتقال داده و پس از ۲۴ ساعت از صافی رد کرده و مایع

بدست‌آمده را در ظرف دهان‌گشاد ریخته تا تبخیر کامل انجام شود؛ این کار سه مرتبه تکرار شد و در نهایت عصاره در ته ظرف به‌صورت خشک رسوب کرده و با کمی تراشیدن عصاره بدست آمد.

برای انجام آزمون آرتمیا سالینا از روش‌های معتبر که قبلاً توضیح و تفسیر شده بود، استفاده شد. به‌طور خلاصه آرتمیا سالینا در آکواریوم حاوی یک لیتر آب دریای مصنوعی (pH=۸/۵) با هوادهی مداوم در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. سپس گیاهان در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محلول آرتمیاها اضافه شد. آزمایش به‌صورت گروه‌های ده‌تایی برای هر غلظت انجام شد (با سه تکرار) و میزان مرگ و میر پس از ۲۴ ساعت زیر لوپ بررسی شد. پس از انجام آزمایش آرتمیاها با سوزن تحریک شده آرتمیاهای بدون هیچ حرکت، مرده در نظر گرفته شدند و برای اطمینان از اینکه میزان مرگ و میر فقط ناشی از تأثیر گیاهان می‌باشد، تعداد آرتمیاهای مرده در گروه‌های مورد مطالعه با تعداد آرتمیاهای مرده گروه کنترل مقایسه شد. میزان مرگ و میر در گروه کنترل نزدیک صفر بود. از سرم فیزیولوژی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و میانگین درصد مرگ و میر و انحراف معیار آن مورد محاسبه قرار گرفت (Carballo *et al*., 2002 ؛Cáceres *et al*., 1998).

نتایج

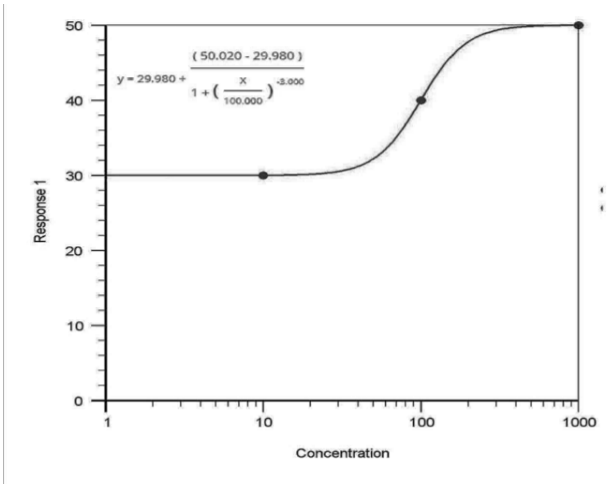
نتایج مقایسه حاصل از میزان توکسیسیتی و درصد مرگ و میر آرتمیا سالینا توسط شش گیاه گل‌محمدی، خاکشیر، آنغوزه، سیر، سرخدار و کلشی‌سین در سه غلظت در جدول ۱ در مواجهه با این گیاهان نشان داده شده است. شکل ۲ تصاویر آرتمیا در زیر میکروسکوپ را نشان می‌دهد.

جدول ۱- درصد مرگ و میر آرتمیا (متوسط± انحراف معیار) در دوزهای mg/kg ۱۰، mg/kg ۱۰۰ و mg/kg ۱۰۰۰ از عصاره‌های خاکشیر، سیر، گل‌محمدی، سرخدار، آنغوزه و کلشی‌سین

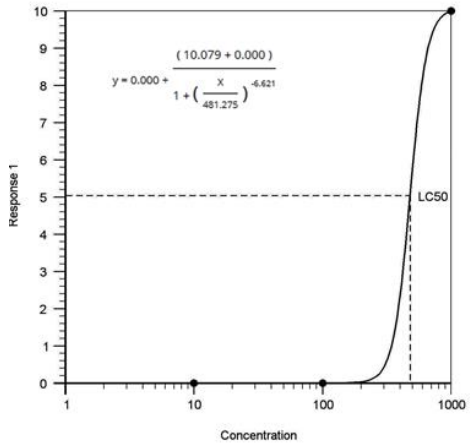
دوزهای مورد مطالعه (mg/kg)	خاکشیر	سیر	گل‌محمدی	سرخدار	آنغوزه	کلشی‌سین
۱۰	۰	۴±۲	۳/۳۱±۶	۲/۳۶±۶	۵/۶۲±۲۹	۴/۴۶±۵۸
۱۰۰	۰	۳/۱۲±۴۶	۴۲±۳	۵۸±۶	۴/۷۰±۳۵	۸۷±۷
۱۰۰۰	۲/۱۰±۶۴	۸/۶۲±۱۸	۴/۵۰±۵۸	۷/۷۸±۵۵	۶/۹۱±۲۴	۴/۹۳±۳۵

میزان غلظتی که نیاز است تا نیمی از لاروها را از بین ببرد (LC_{50}) محاسبه گردید. برای محاسبه میزان LC_{50}، نمودارهای مربوطه رسم و رابطه رگرسیون آن محاسبه شد (شکل ۱). میزان LC_{50} گیاهان خاکشیر، سیر، گل‌محمدی، سرخدار، کلشی‌سین، سرخدار و آنغوزه به‌ترتیب ۴۸۱۲، ۳۳۱۶، ۹۹۷، ۴۴/۰۷، ۱۰/۴۴ و ۲/۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

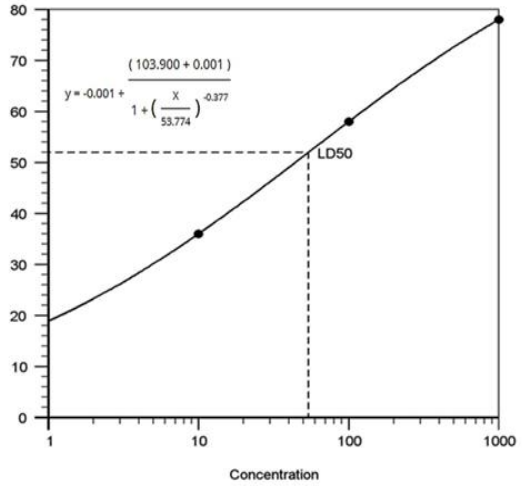
نتایج این مطالعه نشان داد که میزان LC_{50} گیاهان خاکشیر نسبت به سایر گونه‌ها دارای سمّیت کمتری است و گیاه آنغوزه دارای بالاترین میزان سمّیت می‌باشد.



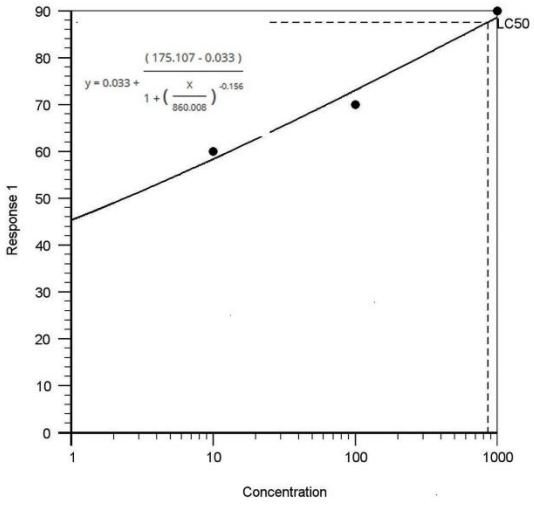
گل‌محمدی



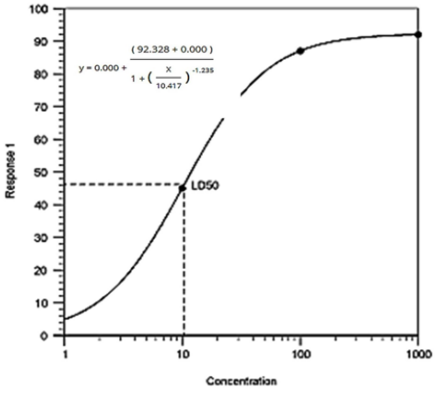
خاکشیر



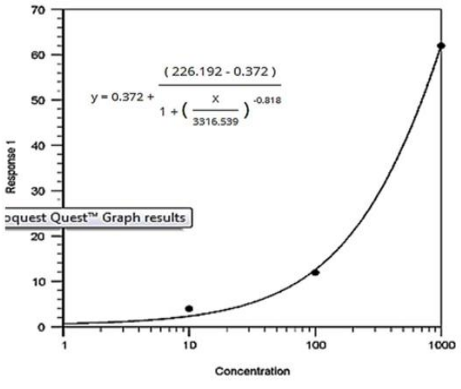
سرخدار



شیره آنغوزه



کلشی‌سین



سیر

شکل ۱- دوز (محور افقی) و پاسخ (محور عمودی) برای تعیین LC_{50} عصاره‌های گیاهی در آرتمیا

شکل ۲- ارگانیسم مرده آرتمیا سالینا در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی (×۴۰) با فازکنتراست

بحث

این مطالعه به‌عنوان الگویی در تعیین LC_{50} گیاهان و فرآورده‌های گیاهی با استفاده از آرتمیا سالینا انجام شد. ارزیابی سمّیت و تعیین میزان ایمنی گیاهان دارویی، علاوه‌بر استحصال و تعیین خواص درمانی آنها، امری لازم و ضروریست. به‌ویژه آنکه در تصور عامه جامعه گیاهی بودن یک فرآورده و یا دارو برابر با ایمن بودن و عدم سمّیت آن است. از سویی در مطالعات تجربی گاه ناچار به تعیین دوز درمانی و سمّی یک ترکیب هستیم. به‌طوری که استفاده از آرتمیا سالینا کمک شایانی در این زمینه خواهد کرد.

در این مطالعه میزان سمّیت شش گیاه گل‌محمدی، خاکشیر، سیر، سرخدار، کلشی‌سین و آنغوزه بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه آنغوزه سمّی‌تر از سایر گیاهان می‌باشد. آنغوزه در اقصی نقاط دنیا ازجمله در هند، نپال و ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد و مردم هند و نپال به‌طور مرتب آن را در رژیم غذایی روزانه خود مصرف می‌کنند. این گیاه به‌طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلفی ازجمله آسم، صرع، معده، نفخ شکم، انگل‌های روده، سوءهاضمه و آنفولانزا استفاده می‌شود (Kavoosi & Rowshan, 2013). این گیاه به‌طور وحشی در کوه‌های مرکزی و جنوبی ایران رشد می‌کند و در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد و طیف گسترده‌ای از ترکیب‌های شیمیایی شامل قندها، سسکواترپن کومارین‌ها و پلی‌سولفیدها از این گیاه جدا شده‌اند. این گیاه دارای ترکیب‌های سمی می‌باشد (Iranshahy & Iranshahi, 2011).

اخیراً مطالعات فارماکولوژیکی و بیولوژیکی زیادی روی این گیاه انجام شده است و فعالیت‌های مختلفی از قبیل آنتی‌اکسیدانی (Dehpour *et al*., 2009)، ضدویروسی (Lee *et al*., 2009)، ضدقارچی (Sitara *et al*., 2008)، پیشگیری از سرطان (Saleem *et al*., 2001)، ضددیابتی (Abu-Zaiton, 2010)، ضداسپاسمی (Fatehi *et al*., 2004) و حلزون‌کشی (Kumar & Singh, 2006) برای آن پیدا کرده‌اند ولی در مورد سمّیت آن تحقیق چندانی انجام نشده است. میزان کشندگی گیاه خاکشیر بسیار کم است و از این گیاه برای تهیه شربت استفاده می‌شود.

آزمون آرتمیا سالینا یک روش کاربردی در ارزیابی‌های غربالگری و شناسایی ترکیب‌های سمّی می‌باشد و در حدود سه دهه است که از آن در سم‌شناسی محیطی استفاده می‌گردد (Costello *et al*., 1993)، این روش نیازمند تجهیزات پیچیده و تکنیک‌های پیچیده نیست.

در بررسی دیگری، میزان سمّیت حاصل از تزریق عصاره آبی و الکلی گیاه *Solanium americanum* به‌صورت داخل صفاقی در موش با میزان کشندگی لارو آرتمیا تطابق داشت (Cáceres *et al*., 1998). Parra و همکاران (۲۰۰۱) میزان LC_{50} گیاهان آلوئه‌ورا، خاراگوش (*Artemisia absinthium* L.)، نارنج (*Citrus aurantium* L.)، علف‌لیمو (*Cymbopogon citratus*)، تاتوره (*Datura stramonium*)،

ریحان (*Ocimum basilicum*)، فلفل‌فرنگی (*Pimenta dioica*)، بارهنگ (Plantago major L)، سداب (*Ruta graveolens* L.) و سنا را با استفاده از آرتمیا سالینا اندازه‌گیری نموده و براساس نتایج حاصل میزان LD_{50} خوراکی این گیاهان را در موش تخمین زدند. Bussmann و همکاران (۲۰۱۱) با این روش میزان سمّیت عصاره‌های آبی و الکلی ۳۴۱ گونه گیاهی را در پرو مورد ارزیابی قرار داده و به این نتیجه رسیدند که شیوه عصاره‌گیری اعم از آبی یا الکلی می‌تواند در میزان LD_{50} و سمّیت یک عصاره گیاهی مؤثر باشد. Krishnaraju و همکاران (۲۰۰۵) میزان سمّیت ۱۲۰ گیاه مورد استفاده را در طب سنتی هند به‌عنوان داروهای گیاهی بررسی کردند و حدود ۵٪ از این گیاهان سمّیت بالایی را نشان دادند. Nguta و همکاران (۲۰۱۲) میزان سمّیت ۴۵ گیاه مورد استفاده در درمان مالاریا را با این روش ارزیابی کردند و نشان دادند که ۷۶٪ این گیاهان اثرهای سایتوتوکسیک دارند و پیشنهاد کردند به‌منظور بهره‌وری از خاصیت ضدانگلی آنها در مقابل مالاریا باید جزء مؤثر این گیاهان در برابر مالاریا شناسایی و مورد استخراج و استفاده قرار گیرد. Pimenta و همکاران (۲۰۰۳) گیاهان دارویی برزیل را با این آزمون مورد ارزیابی قرار دادند. Sadighara و همکاران (۲۰۱۰) میزان سمّیت سه گیاه تاج‌خروس، بندواش و باباآدم را با استفاده از آزمون آرتمیا سالینا ارزیابی کردند و به این نتیجه رسیدند که گیاه باباآدم نسبت به دو گیاه دیگر سمّی‌تر می‌باشد.

با توجه به افزایش روزافزون استفاده از ترکیب‌های گیاهی در ایران، در زمینه بررسی سمّیت گیاهان تحقیقات زیادی انجام نشده است.

بررسی سمّیت و تعیین LC_{50} گیاهان دارویی و خوراکی لازم و ضروریست. با این حال این مطالعه دربرگیرنده سازوکارهای سمّیت، سمّیت ارگانی و سمّیت اختصاصی در گونه‌های خاص حیوانی و انسان نمی‌باشد. بلکه می‌تواند به‌عنوان یک آزمون غربالگری و آزمون سریع در تعیین LC_{50} برای مطالعات تجربی استفاده شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه خاکشیر نسبت به دو گونه دیگر دارای سمّیت کمتری بوده و گیاه آنغوزه دارای سمّیت بالایی می‌باشد. نتایج حاصل از این آزمون در مقایسه با سایر آزمون‌های تعیین LC_{50} در گونه‌های دیگر و in vivo همبستگی بالایی را نشان داده است (Parra *et al*., 2001). ازاین‌رو این آزمون به‌عنوان یک آزمایش سریع در مطالعات اولیه سم‌شناسی فرآورده‌های گیاهی دارویی توصیه می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abu-Zaiton, A.S., 2010. Anti-diabetic activity of *Ferula assafoetida* extract in normal and alloxan-induced diabetic rats. Pakistan Journal of Biological Sciences, 13: 97-100.
- Al-Jaber, N.A., 2011. Phytochemical and biological studies of *Sisymbrium irio* L. growing in Saudi Arabia. Journal of Saudi Chemical Society, 15(4): 345-350.
- Aslani, M.R., 2004. Iranian Toxic Plants and Intoxication in Livestock. Ferdowsi university of Mashhad Press, 390p.
- Brvar, M., Ploj, T., Kozelj, G., Mozina, M., Noc, M. and Bunc, M., 2004. Case report: fatal poisoning with *Colchicum autumnale*. Critical Care, 8(1): R56-R59.
- Bussmann, R.W., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., Dubose, D., Ruiz, D., Saleda, J., Martinez, M. and Carillo, L., 2011. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. Journal of Ethnopharmacology, 137(1): 121-140.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I. and Maki, J., 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. Journal of Ethnopharmacology, 62(3): 195-202.
- Carballo, J.L., Hernández-Inda, Z.L., Pérez, P. and García-Grávalos, M.D., 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology, 2(1): 17.
- Costello, M.J., Fretwell, K. and Read, P., 1993. Toxicity of sewage sludge to *Crangon crangon* and *Artemia salina*, with reference to other marine Crustacea. Aquatic Living Resources, 6(4): 351-356.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A., Fazel, N.S. and Mohammad, N.S., 2009. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. Grasas y Aceites, 60(4): 405-412.

- Erdemoglu, N. and Sener, B., 2001. Chemical constituents of *Taxus baccata* L. from Turkey. ACTA Pharmaceutica Sciencia, 43(1): 23-27.
- Eskandarian, A.A., 2012. Scolicidal effects of squash (*Corylus* spp.) seeds, hazel (*Cucurbita* spp.) nut and garlic (*Allium sativum*) extracts on hydatid cyst protoscolices. Journal of Research in Medical Sciences, 17(11): 1011-1014.
- Fatehi, M., Farifteh, F. and Fatehi-Hassanabad, Z., 2004. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula assa-foetida* gum extract. Journal of Ethnopharmacology, 91(2): 321-324.
- Hartl, M. and Humpf, H.U., 2000. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. Food and Chemical Toxicology, 38(12): 1097-1102.
- Iranshahy, M. and Iranshahi, M., 2011. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin): A review. Journal of Ethnopharmacology, 134(1): 1-10.
- Kanwar, A.S., 2007. Brine shrimp (*Artemia salina*)- a marine animal for simple and rapid biological assays. CJMED, 2(4): 236-240.
- Kavoosi, G. and Rowshan, V., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: effect of collection time. Food chemistry, 138(4): 2180-2187.
- Krishnaraju, A.V., Rao, V.N., Sundararju, D., Vanisree, M., Tsay, H. and Subbaraju, G.V., 2005. Assessment of bioactivity of indian medicinal plants using brine shrimp lethality assay. International Journal of Applied Science and Engineering, 3(2): 125-134.
- Kumar, P. and Singh, D.K., 2006. Molluscicidal activity of *Ferula asafoetida*, *Syzygium aromaticum* and *Carum carvi* and their active components against the snail *Lymnaea acuminata*. Chemosphere, 63(9): 1568-1574.
- Lee, C.L., Chiang, L.C., Cheng, L.H., Liaw, C.C., Abd El-Razek, M.H., Chang, F.R. and Wu, Y.C., 2009. Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. Journal of Natural Products, 72(9): 1568-1572.
- Mullins, M.E., Mullins, M., Carrico, E.A. and Horowitz, B.Z., 2000. Fatal cardiovascular collapse following acute colchicine ingestion. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 38(1): 51-54.
- Nguta, J.M., Mbaria, J.M., Gakuya, D.W., Gathumbi, P.K., Kabasa, J.D. and Kiama, S.G., 2012. Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from Kenyan biodi-versity using brine shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). The Open Conference Proceedings Journal, 3: 30-34.
- Nunes, B.S., Carvalho, F.D., Guilhermino, L.M. and Van Stappen, G., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. Environmental Pollution, 144(2): 453-462.
- Parra, A.L., Yhebra, R.S., Sardiñas, I.G. and Buela, L.I., 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine, 8(5): 395-400.
- Pimenta, L.P.S., Pinto, G.B., Takahashi, J.A., e Silva, L.G.F. and Boaventura, M.A.D., 2003. Biological screening of annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine shrimp test). Phytomedicine, 10(2-3): 209-212.
- Sadighara, P., Esfahani, T.A., Jafari, A. and Farkhondeh, T., 2010. Assessment of cytotoxic activity of three plants of Pigweed, *Bermuda grass* and *Burdock via Artemia salina* test. Knowledge and Health, 5(2-3): 1-4.
- Saleem, M., Alam, A. and Sultana, S., 2001. Asafoetida inhibits early events of carcinogenesis: a chemopreventive study. Life Sciences, 68(16): 1913-1921.
- Shakeri, T., Yousofpour, M. and Azadbakht, M., 2017. Comparative study of flixweed properties from the perspective of traditional medicine scientists. Complementary Medicine Journal, 7(3): 2014-2024.
- Shamsizade, L.A. and Novruzov, E.N., 2005. Distribution, fruit properties and productivity of *Rosa* species in Great Caucasus, Azerbaijan. Acta Horticulturae, 690: 101-106.
- Silva, T.M.S., Nascimento, R.J.B., Batista, M.M., Agra, M.F. and Camara, C.A., 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northestern Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(1): 35-38.
- Sitara, U., Niaz, I., Naseem, J. and Sultana, N., 2008. Antifungal effect of essential oils on in vitro growth of pathogenic fungi. Pakistan Journal of Botany, 40: 409-414.
- Tajik, H., Moradi, M., Razavi Rohani, S.M., Erfani, A. and Shokouhi Sabet Jalali, F., 2008. Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia urmiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties of the product. Molecules, 13(6): 1263-1274.
- Truhaut, R., 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1(2): 151-173.

Study on toxicity and LC_{50} of some medicinal plants using *Artemia salina* test

M. Hejazy[1*] and R. Norouzi[2]

1*- Corresponding author, Department of Basic science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
E-mail: mhejazy@ut.ac.ir
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: April 2020 Revised: March 2021 Accepted: April 2021

Abstract

From the past until now, the plants and their products have been used as food and medicine in the nutrition and treatment of diseases in humans and animals. However, in the popular perception, the herbal nature of a medicinal or food product was equivalent to its lack of toxicity and safety, and the side effects and toxicity of the plants and their products have been less studied. Therefore, the use of a system that incorporates the bioethical considerations, speed, simplicity, and at the same time economic considerations is necessary to estimate the toxicity and determine the LC_{50} of medicinal plants before consumption. The aim of this study was to use the organism *Artemia salina* in the evaluation of toxicity and LC_{50} of some medicinal plants. In this study, the extract toxicity of medicinal plants *Rosa damascena* Mill., *Descurainia sophia* (L.) Schur, *Ferula assa-foetida* L., *Colchicum autumnale* L., *Allium sativum* L., and *Taxus baccata* L. was assessed by determining the LC_{50} index using the *Artemia salina* test. The extracts were prepared by the maceration technique. The *Artemia salina* cysts were hatched out in the artificial seawater at 27 °C and the larvae were then exposed to the plant extracts at the different concentrations (10, 100, and 1000 $mg.ml^{-1}$) for 24 hours. The concentration needed to kill half of the larvae (LC_{50}) was calculated. The LC_{50} levels of *D. sophia*, *A. sativum*, *R. damascena*, *T. baccata*, *C. autumnale*, and *F. assa-foetida* were obtained 4812, 3316, 997, 44.07, 10.44, and 2.37 $mg.ml^{-1}$, respectively. Overall, the results showed that *A. salina* test could be used as a model in determining the LC_{50} index for the toxicological tests of herbal products.

Keywords: Medicinal plants, toxicity test, *Artemia salina*, LC_{50}.