

بررسی اثر ضد التهابی عصاره آبی و هگزانی دانه کرفس (*Apium graveolens* L.) در موش سوری

مینا رمضانی^{۱*}، سیما نصری^۲ و نرگس یاسا^۳

*۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان، پست الکترونیک: Mina.ramezani@gmail.com

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران و آوج

۳- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۷

تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۸۷

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۸۶

چکیده

از آنجایی که در پزشکی سنتی اثر ضد التهابی به گیاه کرفس نسبت داده شده است، در این مطالعه به منظور یافتن فراکسیون مؤثر، اثر ضد التهابی عصاره آبی و هگزانی دانه کرفس مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی التهاب از روش ایجاد تورم در گوش موش توسط گزینن استفاده شد. موشهای نر نژاد NMRI به سه گروه کنترل مثبت (دگزا متازون ۱۵mg/kg)، کنترل منفی (نرمال سالین) و تجربی تقسیم شدند. به موشهای گروه تجربی دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی و هگزانی به صورت درون صفاقی تجویز شد. سپس برای یافتن ماده مؤثره عصاره، کروماتوگرافی TLC انجام شد. نتایج نشان داد که اثر ضد التهابی تمامی دوزهای ۵۰۰-۱۰۰ mg/kg عصاره آبی و هگزانی نسبت به کنترل معنی‌دار است و نسبت به دگزا متازون اختلاف معنی‌داری ندارد. عصاره آبی و هگزانی کرفس دارای اثرهای قوی ضد التهابی حتی در دوزهای پایین است که احتمالاً به دلیل وجود فلاونوئید، فتالید و کومارین در دانه کرفس است.

واژه‌های کلیدی: کرفس (*Apium graveolens*)، عصاره آبی، عصاره هگزانی، فعالیت ضد التهابی.

مقدمه

مشخصه بوی خوش کرفس است. دانه رسیده، شاخه، برگ و ریشه آن ملین، ضد نفخ، مدر، مقوی معده، ضد اسکوربوت، قاعده‌آور، شیرساز، محرک، مقوی، تب‌بر و ضد عفونت است و از آن هم به‌عنوان ماده غذایی و هم داروی گیاهی استفاده می‌شود. دانه کرفس در پزشکی سنتی ایران برای درمان نقرس، آرتریت روماتوئید و سنگ کلیه و مثانه بکار می‌رود (زرگری، ۱۳۷۵).

کرفس گیاه‌یست علفی، دوساله دارای ساقه منشعب و به ارتفاع ۲۰ تا ۶۰ سانتی‌متر است. این گیاه بومی جنوب اروپاست که حداقل از ۳۰۰۰ سال قبل کشت می‌شده است ولی امروزه در تمامی نقاط جهان از جمله ایران به‌عنوان سبزی کشت می‌شود (Duke, 2001). دانه آن کوچک، بیضی شکل و سبز تیره یا قهوه‌ای با

تهیه عصاره تام متانولی

میوه‌های گیاه *Apium graveolens* L. اوایل خرداد ۱۳۸۶ از بازار محلی در تهران خریداری شد و در هر بار یوم دانشکده داروسازی دانشگاه تهران شناسایی و تأیید شد. پس از آسیاب کردن میوه‌ها، مقدار ۱۰۰ گرم از پودر خشک گیاه وزن شده و جهت تهیه عصاره با روش پرکولاسیون بکار رفت. به این منظور از نسبت ۷۵ به ۲۵ الکل اتانول به آب مقطر استفاده شد. سپس محلول بدست آمده را از صافی عبور داده و دور از نور مستقیم، خشک کرده و در تهیه عصاره آبی و هگزانی از این عصاره تام استفاده شد. از هر ۱۰۰ گرم پودر خشک ۶/۲۶ گرم عصاره قهوه‌ای مایل به سیاه بدست آمد (۶/۲۶٪).

تهیه عصاره آبی و هگزانی

جهت تهیه عصاره هگزانی، عصاره تام تدریجاً در هگزان نرمال حل شده و از صافی عبور داده شد. ماده باقی مانده روی صافی در واقع همان عصاره آبی است (بخشی که در حلال هگزان حل نشده است). عصاره حل شده در هگزان حرارت داده شد و عصاره روغنی بدست آمده به عنوان عصاره هگزانی در آزمایشها استفاده شد. جهت تزریق، عصاره‌ها در نسبت ۱ به ۵ DMSO به نرمال سالیین حل شد.

کروماتوگرافی به روش TLC

به منظور شناسایی اجزاء مؤثر عصاره، کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer chromatography) TLC برای هر دو عصاره آبی و هگزانی انجام شد.

در روغن کرفس ترپنها به‌ویژه لیمونن (۷۰ تا ۸۰٪) زیاد است و ترکیبهای سسکوئی‌ترپنی مثل بتا-سلیین و هومولن حدود ۱۰٪ آن را تشکیل می‌دهند اما بوی خوش آن از مشتقات فتالید ایجاد می‌شود. بررسی فیتوشیمی دانه‌های کرفس حضور آپی‌ژنین را به‌عنوان جزء اصلی آشکار کرده است. عصاره دانه گیاه حاوی روغنهای فرار، فلاونوئیدها و رزین است (Perry et al., 1980). همچنین گزارش شده که دانه‌ها دارای خواص ضد التهابی (Al-Hindawi, Atta & Alkofahi, 1998; Momin & Nair, et al., 1989) و آنتی‌اکسیدان هستند (2002) و برای بالا بردن مقاومت کبد و طحال استفاده می‌شوند و همچنین خاصیت ضد سرطان و ضد تکثیر سلولی دارند (Sultana et al., 2005).

در پژوهش قبلی مشخص شد که عصاره تام دانه کرفس اثر ضد التهابی دارد (نصری و همکاران، ۱۳۸۶)، بنابراین برای تعیین این که ماده مؤثره در کدام بخش عصاره قرار دارد (بخش حلال در آب یا بخش حلال در چربی)، پژوهش حاضر اثر ضد التهابی عصاره آبی و هگزانی دانه کرفس را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روشها

حیوانات

در این پژوهش از موشهای کوچک نر نژاد NMRI با وزن ۲۵-۳۰ گرم که از مؤسسه پاستور خریداری شده بود استفاده شد. حیوانات در قفسهای ده‌تایی با دوره شبانه‌روزی طبیعی و در دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، با آب و غذای کافی نگهداری شدند. در هر سری آزمایش ۸ سر موش مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و در صورت معنی‌دار بودن از آزمون Tukey-Kramer استفاده شد. جهت بررسی نتایج $P < 0.05$ به‌عنوان مرز استنتاج آماری بوده و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است.

نتایج

تزریق عصاره آبی دانه کرفس در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موشهای سوری نرسب کاهش معنی‌دار التهاب در مقایسه با گروه شاهد که تنها نرمال سالیین دریافت کرده بودند، شد ($P < 0.001$) (جدول ۱). تزریق عصاره هگزانی دانه کرفس در دوزهای ۱۰۰-۵۰۰ mg/kg نیز سبب کاهش معنی‌دار التهاب در مقایسه با گروه شاهد شد. به‌طوری‌که درصد مهار ایجاد شده توسط دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هگزانی شبیه به دگزا متازون بود (به‌ترتیب ۰.۷۰/۰۶٪ در برابر ۰.۷۶/۷۴٪) (جدول ۱).

نتایج کروماتوگرافی در مورد عصاره آبی، لکه‌هایی به رنگ بنفش و زرد با طول موج ۳۶۵ نانومتر را نشان داد که از جمله ترکیبهای فلاونوئیدی و لکه‌های آبی، اسید فنولیک تشخیص داده شدند. در مورد عصاره هگزانی نیز لکه‌های تیره‌ای با طول موج ۲۵۴ نانومتر مشاهده شد که با طول موج ۳۶۵ نانومتر آبی براق بودند. این لکه‌ها نشان‌دهنده وجود کومارین است. همچنین این لکه‌ها پس از قرار گرفتن بر روی بخار غلیظ آمونیاک در نور مرئی به رنگ زرد مشاهده می‌شوند که وجود کومارین را تأیید می‌کند.

ابتدا مقادیر بسیار کمی از عصاره هگزانی را در نسبت ۱ به ۳ اتیل استات به هگزان و مقدار بسیار کمی از عصاره آبی را در متانول حل کرده، سپس با استفاده از لوله موئین لکه‌گذاری بر روی کاغذ TLC انجام شد و کاغذها در تانک حاوی حلالهای مختلف قرار گرفت. در مورد عصاره آبی از نسبت ۳۰ به ۷۰ متانول به کلروفرم استفاده شد و برای عصاره هگزانی دی‌اتیل اتر و تولوئن به نسبت یک به یک اشباع شده با اسید استیک ۱۰٪ به‌عنوان حلال بکار رفت.

پس از خشک‌شدن لکه‌ها، لکه‌ها در دستگاه UV کابینت با دو طول موج ۲۵۴ و ۳۶۵ نانومتر مشاهده شد.

آزمایش التهاب

موشهای نر در آزمون التهاب به ۳ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل منفی (دریافت‌کننده نرمال سالیین)، گروه کنترل مثبت (دریافت‌کننده دگزا متازون ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تجربی که عصاره آبی و هگزانی میوه کرفس را با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان، به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. جهت ایجاد التهاب از گزین استفاده شد (Atta & Alkohafi, 1998). ۱۵ دقیقه بعد از تزریق عصاره، ۰/۰۳ میکرولیتر از گزین در سطح قدامی و پشتی لاله گوش راست حیوانات مالیده شد و دو ساعت بعد حیوانات کشته شدند. سپس با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن برشهای ۷ میلی‌متری از دو گوش چپ و راست گرفته شده و وزن گردید. اختلاف وزن گوش چپ و راست نشان‌دهنده میزان التهاب می‌باشد.

جدول ۱- اثر تجویز درون صفاتی دوزهای مختلف عصاره آبی و هگزانی دانه کرفس بر التهاب ایجاد شده توسط گزین در گوش موشهای کوچک آزمایشگاهی

درصد مهار التهاب	میزان التهاب گوش (mg)	تیمار (mg/kg)
	۱۳/۲ ± ۱/۵۶	شاهد
۷۶/۷۴	۳/۰۷ ± ۰/۷۳***	دگزا متازون (۱۵)
۵۳/۶۳	۶/۱۲ ± ۱/۱۳***	عصاره آبی (۱۰۰)
۵۷/۰۴	۵/۶۷ ± ۰/۹۲***	عصاره آبی (۲۰۰)
۶۹/۴۶	۴/۰۳ ± ۱/۱۱***	عصاره آبی (۳۰۰)
۶۷/۳۴	۴/۳۱ ± ۱/۱۸***	عصاره آبی (۴۰۰)
۵۸/۱۸	۵/۵۲ ± ۱/۰۷***	عصاره آبی (۵۰۰)
۷۵/۶	۳/۲۲ ± ۰/۷۷***	عصاره هگزانی (۱۰۰)
۷۶/۰۶	۳/۱۶ ± ۰/۸۳***	عصاره هگزانی (۲۰۰)
۵۴/۸۴	۵/۹۶ ± ۰/۷۴***	عصاره هگزانی (۳۰۰)
۶۶/۸۱	۴/۳۸ ± ۱/۲۱***	عصاره هگزانی (۴۰۰)
۶۲/۲۷	۴/۹۸ ± ۱/۰۵***	عصاره هگزانی (۵۰۰)

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۸ سر موش بیان شده است (P<۰/۰۰۱).
*** تفاوت از گروه شاهد را نشان می دهد.

بحث

ثابت شده جزء ترکیبهای ضد التهابی بسیاری از گیاهان هستند (Silvan et al., 1998; O'Leary et al., 2004).
بررسیها نشان داده که کرفس، دو فلاونوئید اصلی بنام آپی ژنین و آپینین دارد که خاصیت ضد التهابی بسیاری از گیاهان مربوط به این مواد است (Perry, 1980; Mencherini et al., 2007).
تحقیقات نشان داده که آپی ژنین یک آنتی اکسیدان است و تولید پراکسید هیدروژن و همچنین ایمونوگلوبین E را که القاءکننده تمایز هیستامین است، مهار می کند (Sultana et al., 2005).
همچنین اثر مهار روی سیکلواکسیژناز و لیپوکسیژناز دارد و مکانیسم عمل ضد التهابی آن از طریق مهار متابولیسم اسید آراشیدونیک است (Silvan et al., 1998).

یافته های این مطالعه اثر ضد التهابی فراکسیونهای جدا شده از دانه کرفس را در التهاب حاد نشان داد که موافق با یافته های AL-Hindawi و همکاران (۱۹۸۹) در مورد عصاره هیدروالکلی کرفس می باشد. اما بررسیهای Atta و Alkohafi (۱۹۹۸) بر روی اثر ضد التهابی دانه کرفس اردنی، تنها اثر ضد التهابی عصاره هیدروالکلی را در التهاب مزمن نشان داد. این اختلاف، احتمالاً به دلیل تفاوت در مواد مؤثره گیاه کرفس به دلیل شرایط متفاوت آب و هوایی است که گیاه در آن پرورش یافته است. همان طور که نتایج کروماتوگرافی TLC نشان داد، بخش حلال در آب عصاره دارای فلاونوئید و اسید فنولیک است که

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان که بودجه مورد نیاز این تحقیق را فراهم کردند و همچنین از رئیس و کلیه پرسنل محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی - واحد پرند، به ویژه سرکار خانم مریم تندخیز که در اجرای هر چه بهتر این تحقیق، ما را یاری رساندند، کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع مورد استفاده

- زرگری، ع.، ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، ۶۵۰ صفحه.
- نصری، س.، رضانی، م. و یاسا، ن.، ۱۳۸۶. تأثیر عصاره تام میوه کرفس بر التهاب در موش. هیجدهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد، ۴-۸ شهریور: ۱۱۲.
- Al-Hindawi, M.K., Al-Deen, I.H., Nabi, M.H. and Islami, M.A., 1989. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 26: 163-168.
- Atta, A.H. and Alkofahi, A., 1998. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 117-124.
- Chen, Y.F., Tsai, H.Y. and Wu, T.S., 1995. Anti-inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, 61: 2-8.
- Duke, J.A., 2001. *Handbook of Medicinal Herbs*. 2nd Ed CRC press LLG. USA, 670p.
- Hoult, J.R.S., Morney, M.A. and Puya, M., 1994. Action of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Method in Enzymology*, 234: 443-454.
- Kontogiorgis, C., Savvoglou, K. and Hadjipavlou-Litina, D., 2006. Antiinflammatory and antioxidant evaluation of novel coumarin derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21: 21-29.
- Kurobayashi, y., Kouno, E., Fujita, A., Morimitsu, Y. and Kubota, K., 2006. Potent odorants characterize the aroma quality leaves and stalks in raw and boiled celery. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70: 958-965.
- Liu, L., Ning, Z.q., Zhang, K., Deng, T., lu, X.P. and Cheng, Y.Y., 2005. Phthalid lactones from *ligusticum chuanxiong* inhibit lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production and TNF-alpha

اخیراً مشخص شده که آپیتین به عنوان یکی از اجزای اصلی عصاره کرفس اثر مهاری معنی داری بر تولید نیتريت در *in vitro* نشان می دهد (Mencherini *et al.*, 2007).

کروماتوگرافی TLC عصاره هگزانی وجود موادی مانند فتالید و کومارینها را در آن نشان داد. بررسیها نشان داده که بوتیل فتالیدها اثرهای فیزیولوژیک متفاوت مثل ضد التهاب، ضد سرطان و حشره کشی دارند که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است (Kurobayashi *et al.*, 2006). گزارش شده که دو ترکیب شناسایی شده از بوتیل فتالیدهای کرفس به نام سدانولید و سدانولید، دارای اثر ضد التهابی هستند (Liu *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2001). همچنین برخی فروکومارینها (مانند زانتوتوکسین، استول و ایزوایمپریشن) می توانند اثر پیشگیری از التهاب داشته باشند (Kontogiorgis *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 1995). مشخص شده که پلی فنلهایی مانند کومارین و فلاونوئیدها مثل داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی (-Non-steroidal-anti-inflammatory drugs) در آزمونهای التهابی حاد (مانند تست کاراجینان) عمل می کنند (Hoult *et al.*, 1994).

یافته های این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و هگزانی دانه کرفس اثر قوی ضد التهابی دارند. گرچه بیشتر مطالعات تمرکز اصلی را بر روی مواد هیدروفیلیک کرفس (فلاونوئیدها) قرار داده اند، اما این یافته ها نشان می دهد که مواد هیدروفوبیک کرفس نیز اثر ضد التهابی معنی داری دارند. واضح است که شناخت دقیق مواد مؤثره کرفس و مکانیسم عمل آنها مطالعات بیشتری را می طلبد.

- Peroutka, R., Schulzova, V., Botek, P. and Hajslova, J., 2007. Analysis of furanocoumarins in vegetables (Apiaceae) and citrus fruits (Rutaceae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 2152-2163.
- Silvan, A.M., Abad, M.J., Bermejo, P. and Villar, A., 1998. Effect of compounds extracted from *santolina oblongifolia* on TBX (2) release in human platelets. *Inflammopharmacology*, 6(3): 255-263.
- Sultana-S., Ahmed-S., Jahangir-T. and Sharma-S., 2005. Inhibitory effect of celery seeds extract on chemically induced hepatocarcinogenesis: modulation of cell proliferation, metabolism and altered hepatic foci development. *Cancer Letters*, 221: 11-20.
- Woods, J.A., Jewell, C. and O'Brien, N.M., 2001. Sedanolide, a natural phthalide from celery seed oil: effect on hydrogenperoxide and tert-butyl hydroperoxide induced toxicity in HEPG2 and CaCo-2 human cell lines. *In Vitro and Molecular Toxicology*, 14(3): 233-240.
- mediated NF-kappaB activation. *Planta Medica*, 71(9): 808-813.
- Mencherini, T., Cau, A., Bianco, G., Della Loggia, R., Aquino, R.P. and Autore, G., 2007. An extract of *Apium graveolens* var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(7): 891-897.
- Momin, R. and Nair, M., 2002. Antioxidant, cyclooxygenase and topoisomerase inhibitory compounds from *Apium graveolens* L. seeds. *Phytomedicine*, 9(4), 312-318.
- O'Leary, K.A., Pascual-Treasa, S.D., Needs, P.W., Bao, Y.P., O'Brien, N.M. and Williamson, G., 2004. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research*, 551: 245-254.
- Perry, L.M., 1980. *Medicinal plants of east and sought-east Asia*. MIT press, London, 413p.

Study of anti-inflammatory effect of aqueous and hexane extract of *Apium graveolens* L. in mice

M. Ramezani^{1*}, S. Nasri² and N. Yassa³

1*- Corresponding author, Department of Biology, Islamic Azad University, Ashtian Branch, Ashtian, Iran,
E-mail: Mina.ramezani@gmail.com

2- Department of Biology, Payam Noor University, Tehran and Avaj Centere, Iran

3- Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences and Medicinal Plant Research Center, Tehran, Iran

Received: May 2007

Revised: October 2008

Accepted: October 2008

Abstract

On the basis of anti-inflammatory effect of *Apium graveolens* L. in traditionally herbal medicine, in present study aqueous and hexane extracts were evaluated to find effective fractions. For induction of inflammation xylene-induced ear edema were used. Male NMRI mice were divided into three groups: positive control (dexamethason 15mg/kg), negative control (normal saline), and experimental groups. Experimental groups were injected by 100, 200, 300, 400 and 500mg/kg of aqueous and hexane extracts intraperitoneally. To find effective constituents of extract, TLC (thin layer chromatography) was performed. Results have shown significant anti-inflammatory effects of both extracts (100-500mg/kg doses) with control, and there was not significant difference with dexamethason. Data show potent anti-inflammatory effects of aqueous and hexane extracts even with low doses which may be due to existence of flavonoid, phthalid and coumarins in *Apium graveolens* seeds.

Key words: *Apium graveolens* L., aqueous extract, hexane extract, anti-inflammatory.