مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره شانزدهم، شمارهٔ ۵، اردیبهشت۱۳۹۳، صفحه ۳۴-۲۵

مقایسه فیتوشیمیایی و اثر ضدویروسی عصاره متانولی با فرکسیون های اندام هوایی گیاه شیرمال (Euphorbia Spinidens)

مرضیه محمدی کمال آبادی(MSc)[۱]، علی کریمی(PhD)[۲]، محمود رفیعیان(PhD)[۲*]، لیلا امجد(PhD)[۳]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان اصفهان
۲- مرکز تحقیقات گیاهان داروئی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان اصفهان

دریافت: ۹۲/۶/۴، اصلاح: ۹۲/۸/۱۵، پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: برخی از گونه های جنس یوفوربیا (خانواده یوفوربیاسه) به عنوان عوامل ضد ویروس و ضد تومور، مورد بررسی قرار گرفته اند. اکثر داروهای ضد ویروس بر روی ویروس هرپس سیمپلکس یا تأثیر کم دارند و یا همراه با عوارض زیاد هستند. لذا این مطالعه با هدف مقایسه نتایج فیتوشیمیایی و اثر ضدویروسی عصاره متانولی با فرکسیون های اندام هوایی گیاه Euphorbia spinidens انجام شد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی عصاره متانولی بخش های هوایی گیاه E.Spinidens با روش خیساندن فرکسیون های کلروفرمی، بوتانولی و هگزانی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان فنول و فلاونوئید تام در عصاره متانولی و فرکسیون های این گیاه به ترتیب از روش بتاکاروتن لینولئات، فولین سیوکالتیو و روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده گردید. اثرات سیتوتوکسیک و ضد ویروسی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.spinidens بر تک لایه سلول های Vero (سلول کلیه میمون) با استفاده از روش MTS (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H-tetrazolium) تعیین شد و میزان غلظت کشندگی۵۰٪ CC50 50%Cytotoxic Concentration) و غلظت مؤثر۵۰٪ EC50 (50% Effectiveness Concentration) آن ها بر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ۱(HSV-1) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و بالاترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گیاه E.spinidens به ترتیب در فرکسیون بوتانولی (۵۹/۳۳±۰/۵۷۶، ۱±۹۹ و ۱±۷۰)، عصاره متانولی (۱±۴۴، ۱±۷۰ و ۰/۹۹۶±۴۹/۹۶)، فرکسیون کلروفرمی (۰/۹۹۶±۳۳/۳۳، ۰/۵۷۷±۳۵/۳۳، ۰/۹۹۶±۲۵/۳۳) و فرکسیون هگزانی (۱/۱۴۶±۱۹/۶۶، ۱±۲۷ و ۱/۶۲۸±۹/۳۳) از این گیاه دیده شد. بیشترین میزان CC50، در فرکسیون هگزانی با mg/ml ۰/۰۷۲±۹/۹۲ و کمترین میزان CC50 در عصاره متانولی با ۰/۰۶۳±۵/۰۷۲mg/ml اندازه گیری شد. همچنین بیشترین فعالیت ضد ویروسی به ترتیب در فرکسیون های بوتانولی (SI:۲۸/۱۲۵)، عصاره متانولی (SI:۱۵/۸۵)، فرکسیون کلروفرمی (SI:۸/۴۴) و فرکسیون هگزانی (SI:۲/۰۷) از گیاه E.spinidens مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که عصاره متانولی و فرکسیون های بوتانولی، کلروفرمی و هگزانی گیاه E.spinidens دارای اثر ضد ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ هستند، که اثر ضد ویروسی مشاهده شده، به حضور متابولیت های ثانویه مختلف از جمله پلی فنول ها، فلاونوئیدها، ترپن ها و ساپونین ها نسبت داده می شود.

واژه های کلیدی: ضدویروسی، عصاره متانولی، فرکسیون، فیتوشیمیایی، گیاه شیرمال.

مقدمه

جنس Euphorbia یکی از بزرگترین جنس های خانواده فرفیون است (۱) که در مناطق مختلف دنیا پراکنده شده و این پراکندگی و تنوع در گونه های این جنس، موجب شده تا گونه های مختلف این جنس از دیر باز، جهت رفع آلام بشری توسط اقوام مختلف مورد استفاده قرار گیرد. مصرف در درمان سرفه، برونشیت، اگزما، اسهال، دردهای مفصلی مانند روماتیسم و نقرس، برخی از مواردی است که در این رابطه می توان به آنها اشاره نمود (۲). در قرون اخیر، برخی از استفاده های سنتی از جنس Euphorbia، با پیشرفت علم پزشکی و جستجو برای یافتن دارو برای

این مقاله حاصل پایان نامه مرضیه محمدی کمال آبادی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۸۶-۷۵-۱-۹۱ دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمود رفیعیان
آدرس: شهرکرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، تلفن: ۳۳۴۶۶۶۹۲-۰۳۸۱
e-mail:Rafieian@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

درمان بیماری ها، اعم از بیماری های قدیمی و بیماری های نوظهور، همانند سایر گیاهان دارویی نیز مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شده و حتی در برخی موارد، اثرات درمانی جدیدی از آن ها شناسایی شده است (۳). علاوه بر این، شناسایی انواع متابولیت های ثانویه در این جنس اعم از ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، پروتئازها، و تانن ها زمینه های جدیدی را برای تحقیق و جستجوی ترکیبات دارویی از آن فراهم آورده است (۳). تحقیقات نشان می دهد که بسیاری از گونه های جنس Euphorbia، دارای فعالیت ضد تکثیر، سیتوتوکسیک، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد تب، ضد درد و مهارکننده ویروس هستند (۴). در مطالعه فیتوشیمیایی صورت گرفته در استان اصفهان، دو تری ترپن betulin و (3β,23E)-Cycloarta-23-ene-3,25-Ghannadian، برای اولین بار از گیاه E.spinidens با اثر تنظیم کنندگی سیستم ایمنی جداسازی و بررسی شدند (۵). همچنین وجود استروئیدها و تری ترپن هایی از گیاه E. denticulata Lam. برای اولین بار از استان اصفهان با فعالیت ضد ویروسی گزارش شده است (۶). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از جمله انواع متابولیت های ثانویه هستند که اثرات بیولوژیک متعددی چون محافظت عصبی، محافظت قلبی و آنتی اکسیدان و همچنین اثرات ضدویروسی از آن ها گزارش شده است (۷).

ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (Herpes Simplex Virus Type-1) از خانواده هرپس ویروس ها و یکی از شایع ترین ویروس های عفونت زا در انسان است. امروزه در درمان عفونت های هرپس ویروسی از داروهایی مانند آسیکلووير (ACV)، سیتارابین، ویدارا بین و غیره استفاده می شود (۸). مکانیسم عمل این داروها براساس مهار فعالیت آنزیم های ویروسی مانند DNA پلی مراز و تیمیدین کیناز است. داروهای فوق به دلیل سمیت و عوارض جانبی زیاد به طور گسترده استفاده نمی شوند، غیر از آسیکلوویرکه عوارض جانبی کمتری دارد و درمان انتخابی برای عفونت های هرپس ویروسی است (۹).

گسترش درمان شیمیایی ویروس ها همواره مدنظر محققان بوده است ولی محدودیت هایی در این زمینه وجود دارد که مانع پیشرفت شیمی درمانی علیه ویروس ها شده، از جمله این که ویروس ها به صورت داخل سلولی همانند سازی می کنند. بنابراین ترکیبات مفید ضد ویروسی باید بین فعالیت های ویروس و میزبان با درجه اختصاصیت بالایی، افتراق قائل شوند تا حداقل آسیب را به سلول های میزبان وارد کنند (۱۰). با این حال در چند سال اخیر نگرانی های درمان طولانی مدت همراه با محدودیت ها و هزینه بالای داروهای مرسوم ضد ویروسی، نظر محققین را به سوی استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عوارض کمتر و دسترسی بیشتر معطوف کرده است. بنابر اطلاعات موجود از منابع طبیعی، جنس فرفیون غنی از انواع فیتوکمیکال های مختلف است (۳)، لذا در این تحقیق با به کارگیری روش های مختلف به مطالعه فیتوشیمیایی اندام هوایی گیاه E.spinidens پرداخته، شد تا با مطالعه و ارزیابی دقیق اثر ضد ویروسی عصاره متانولی و فرکسیون های بوتانولی، کلروفرمی و هگزانی این گیاه، توانایی آنها در مهار ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ مقایسه گردد.

مواد و روشها

تهیه عصاره تام و فرکسیون های مختلف گیاهی: برای تهیه عصاره الکلی، با روش ماسراسیون با ۳ مرتبه تکرار، عمل عصاره گیری پودر گیاه انجام شد. در این روش از متانول به عنوان حلال استفاده گردید. بدین منظور، میزان ۲/۵kg از اندام هوایی گیاه E.spinidens خشک و آسیاب شده را با ۱۰ml متانول حل کرده و به مدت ۴۸h در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس عصاره استخراج شده را با کاغذ صافی فیلتر نموده و تحت فشار نزدیک به خلاء و دمای ۴۰°C توسط دستگاه روتاری تبخیر و تغلیظ به عمل آمد (۸). پس از تهیه عصاره تام گیاهی، فرکسیون های کلروفرمی، بوتانولی و هگزانی استخراج شده از عصاره تام این گیاه، از طریق روش جداسازی حلال در حلال و با بهره گیری از تفاوت در قطبیت متابولیت های ثانویه مختلف، که پلاریته آن ها با یکدیگر متفاوت بود و با استفاده از قیف جدا کننده تهیه شد (۱۲و۱۱).

مطالعه فیتوشیمیایی اندام هوایی گیاه E.spinidens: در این تحقیق، جهت مطالعه فیتوشیمیایی اندام هوایی گیاه E.spinidens و برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی، میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.spinidens به ترتیب براساس روش رنگ سنجی بتا کاروتن لینولئات و بر حسب BHT (Buthylated Hydroxytuloene) (۱۳)، روش رنگ سنجی فولین سیوکالیتو و بر حسب اسید گالیک (۱۴) و روش رنگ سنجی کلرید آلومنیوم و بر حسب استاندار روتین (۱۵) با استفاده از دستگاه اسپکترفوتومتر (UV-160A, Shimadzu; Japan) اندازه گیری شد. تمامی آزمایش ها ۳ بار تکرار و مقادیر متوسط حاصل از ۳ مرتبه تکرار، با استفاده از میانگین و انحراف معیار گزارش گردید.

سلول مورد مطالعه: در این پژوهش از سلول کلیه میمون سبز آفریقایی (Vero cell line, ATCC CT02) که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود استفاده گردید. به منظور ایجاد تک لایه سلولی از محیط کشت DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's growth Medium) حاوی ۱۰٪ سرم غیر فعال شده جنین گوساله با اسیدیته ۷/۴ و گاز کربنیک ۵٪ در دمای ۳۷°C استفاده شد.

تعیین سمیت عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.spinidens بر سلول: جهت تعیین سمیت عصاره و فرکسیون های گیاهی بر سلول های Vero از روش MTS (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H-tetrazolium) استفاده گردید. بدین صورت که بعد از تشکیل تک لایه سلولی در میکروپلیت ۹۶ خانه (۵۰۰۰ سلول در هر چاهک)، غلظت های مختلف عصاره و فرکسیون های گیاه E.spinidens (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰mg/ml) با استفاده از محیط کشت DMEM، تهیه گردید و به هر چاهک اضافه شد. برای هر غلظت، یک چاهک به عنوان کنترل سلول (فقط حاوی محیط کشت DMEM) در نظر گرفته شد.

سپس سلول ها در دمای ۳۷°C با CO۲ ۵٪ به مدت ۷۲h-۴۸ انکوبه گردید و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷°C، ۲۰µl از MTS به هر چاهک اضافه شد و برای ۲h مجدداً انکوبه گردید. در پایان، جذب نوری چاهک های پلیت در طول موج ۴۹۰nm توسط دستگاه الایزا ریدر (Stata Fax 2100, USA) خوانده شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

نتایج به صورت درصد مهار با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد مهار = ۱۰۰ – $(A_t/A_s)\times 100$

At = جذب نوری نمونه های تست شده

As = جذب نوری نمونه کنترل

در پایان پس از انجام آزمایش با ۳ مرتبه تکرار، غلظتی از ترکیبات گیاهی که در حضور آن ۵۰٪ سلولها مرده بودند بعنوان CC50 در نظر گرفته شد (۱۶).

تعیین عیار ویروس: در این مطالعه از ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ (HSV-1, Strain KOS) تهیه شده از گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس ایران، استفاده گردید. برای انجام آزمون اصلی در این پژوهش لازم بود تا عیار ویروس تعیین شود که در این پژوهش از روش TCID50 (50% Tissue Culture Infectious Dose) برای مشخص کردن عفونت زایی ویروس استفاده شد (۱۷). نقطه پایان این ارزیابی، رقتی از سوسپانسیون ویروسی می باشد که قادر است ۵۰ درصد از سلول های سالم را آلوده نماید. در این روش ابتدا رقت های سریالی از یک لگاریتم در محیط کشت DMEM تهیه شد. به دنبال رقت سازی متوالی به مقدار ۱۰۰µl از هر رقت به ردیف های مختلف در داخل پلیت ۹۶ خانه ای حاوی تک لایه سلولی افزوده شد. در هر پلیت یک ردیف از چاهک ها به کنترل ویروس و یک ردیف به کنترل سلولی اختصاص داده شد و میکروپلیت به مدت ۲h در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس، به تمام چاهک ها ۱۰۰µl محیط کشت تازه حاوی ۲٪ سرم اضافه شد و نتایج عیار عفونت زایی پس از ۷۲h با استفاده از میکروسکوپ و با استفاده از روش CPE (Cytopatic Effect)ثبت و با استفاده از روش کربر بر طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$TCID50 = L - (\frac{S}{100} - 0/5)D$

L = منفی لگاریتم بالاترین رقت

S = مجموع درصد مرگ سلولی در رقت های مختلف

D = فاصله لگاریتمی رقت ها

بررسی اثر ضد ویروسی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.Spinidens: فعالیت ضد ویروسی عصاره و فرکسیون های گیاه E.Spinidens با استفاده از روش MTS بررسی شد (۱۷و۱۶). بدین صورت که پس از تشکیل تک لایه سلولی در میکرو پلیت ۹۶ خانه (۵۰۰۰ سلول در هر چاهک)، ۱۰۰µl از سوسپانسیون ویروسی HSV-1 با عیار ۱۰TCID50 تهیه و به هر چاهک اضافه شد و برای ۲h انکوبه گردید. پس از آن غلظتهای غیر سمی (غلظت های پایین تر از CC50) هر یک از گروه های مورد بررسی به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۷۲h در دمای ۳۷°C در مجاورت CO۲ ۵٪ قرار گرفته شد. جهت مخلوط کردن هر یک از ترکیبات گیاهی از غلظت ۰/۱٪ حلال DMSO استفاده شد. در هر مرحله نیز یکسری کنترل طراحی شد (کنترل منفی: بدون افزودن ویروس و ترکیبات گیاهی با ۰/۱٪ DMSO، کنترل ویروس: بدون افزودن ترکیبات گیاهی و کنترل مثبت دارویی: آسیکلووير (۲۵۰mg/ml). پس از انکوباسیون در دمای ۳۷°C با CO۲ ۵٪ به مدت ۷۲h، تست MTS مطابق با آنچه که بیان شد صورت گرفت و درصد مهار مطابق با فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد مهار = ۱۰۰ × [(A-B)/(C-B)]

A = جذب نوری نمونه های تست شده

B = جذب نوری کنترل ویروس

C = جذب نوری کنترل سلول

در پایان، پس از ۳ مرتبه تکرار، میزان 50% Concentration Effectiveness) EC50)، به عنوان غلظت مؤثری از عصاره و فرکسیونهای گیاهی که جذب سلول های عفونی شده را تا ۵۰٪ در مقایسه با گروه کنترل ویروس و سلول کاهش می دهد، تعیین گردید.

بررسی تأثیر زمان، در فعالیت ضد ویروسی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.spinidens: به دنبال مطالعه اثرضد ویروسی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.spinidens، جهت بررسی تأثیر زمان، غلظت های غیر سمی مختلف عصاره متانولی و فرکسیون های تست شده، مطابق با قبل، با سه مرتبه تکرار در زمان های مختلف، شامل قبل از عفونت (۱h-)، همزمان با عفونت (۰h) و بعد از عفونت (۲، ۴، ۸، ۲۴h) به تک لایه سلولی در میکروپلیت اضافه گردید. متناسب با هر زمان، سوسپانسیون ویروسی HSV-1 با عیار ۱۰TCID50 به سلول ها اضافه گردید و به مدت ۲h انکوبه شد. بعد از ۷۲h، اثرات ضد ویروسی آن ها با روش MTS، بررسی گردید (۱۶).

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 18 و با به کارگیری آزمون تحلیل واریانس و آزمون t زوجی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین، بر اساس آزمون t زوجی تفاوت بین زمان ها بستگی به غلظت مورد استفاده از هر کدام از گروه های مورد مطالعه دارد. بر همین اساس جهت بیان درصد مهار HSV-1 در غلظت های مختلف از هرکدام از گروه های مورد مطالعه در زمان های مختلف از آمار توصیفی استفاده گردید. در این آزمون ها P<۰/۰۰۱ معنی دار در نظر گرفته شد. همچنین با بدست آوردن حاصل تقسیم اعداد به دست آمده برای CC50 به EC50، معیاری به نام ملاک انتخاب SI (Selectivity Index) بدست می آید که می تواند معیاری جهت بررسی صلاحیت یک ترکیب برای معرفی شدن به عنوان کاندید دارویی باشد.

یافته ها

مطالعه فیتوشیمیایی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.Spinidens: بیشترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی و بالاترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره متانولی و فرکسیون های استخراج شده از عصاره تام گیاه E.spinidens به ترتیب در فرکسیون بوتانولی، عصاره متانولی، فرکسیون کلروفرمی و فرکسیون هگزانی از این گیاه دیده شد (جدول ۱).

سمیت عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.spinidens بر سلول های Vero: نتایج این بررسی، بر روی سلول هایی که رقت های مختلف عصاره متانولی و فرکسیون های کلروفرمی، هگزانی و بوتانولی با محیط کشت آن ها مخلوط شده بود در مقایسه با شاهد سلولی که تنها حاوی محیط کشت بود نشان داد که بیشترین میزان CC50 در فرکسیون هگزانی با ۹/۹۲±۰/۰۷۲mg/ml و کمترین میزان CC50 در عصاره متانولی با ۵/۰۷۲±۰/۰۶۳mg/ml اندازه گیری شد (جدول ۲).

بر اساس نتایج بدست آمده از میان تمام گروه ها از نظر میزان CC50، تفاوت معنی داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱) و تنها CC50 عصاره متانولی و فرکسیون کلروفرمی باهم تفاوت معنی داری را نشان ندادند.

عیار ویروس: عیار ویروس HSV-1 کشت داده شده در سلول های Vero با استفاده از روش CPE و فرمول کربر 10^{-7} TCID50/ml تعیین شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

اثر ضدویروسی عصاره متانولی و فرکسیونهای گیاه E.spinidens:

بر اساس نتایج بدست آمده، بیشترین اثر ضد ویروسی از نظر میزان SI به ترتیب در فرکسیون بوتانولی، عصاره متانولی، فرکسیون کلروفرمی و فرکسیون هگزانی از گیاه E.spinidens دیده شد (جدول ۲). بر همین اساس بیشترین اثر ضد ویروسی از نظر میزان غلظت مؤثر، در زمان های مختلف قبل از عفونت، همزمان با عفونت و بعد از عفونت، از فرکسیون بوتانولی، عصاره متانولی، فرکسیون کلروفرمی و فرکسیون هگزانی گیاه E.spinidens به ترتیب در غلظت های ۶mg/ml، ۵mg/ml و ۵mg/ml و ۹mg/ml و در زمان های ۲h، ۲h، ۸h و ۲h پس از آلوده شدن با ویروس دیده شد (نمودار ۱). بر اساس نتایج حاصل از آمار توصیفی، فرکسیون بوتانولی در زمان ۱h- قبل از آلوده شدن با ویروس و در غلظت ۰/۱۵mg/ml (جدول ۳)، عصاره متانولی، در غلظت ۰/۰۷mg/ml و در زمان ۱h-، قبل از آلوده شدن با ویروس (جدول ۴)، فرکسیون کلروفرمی در زمان ۱h-، قبل از آلوده شدن با ویروس در غلظت ۰/۰۳mg/ml (جدول ۵) و فرکسیون هگزانی نیز در زمان ۴h، پس از آلوده شدن با ویروس و در غلظت ۰/۱۵mg/ml پایین ترین درصد مهار HSV-1 را نشان داد (جدول ۶).

جدول ۱. تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه یوفوربیا

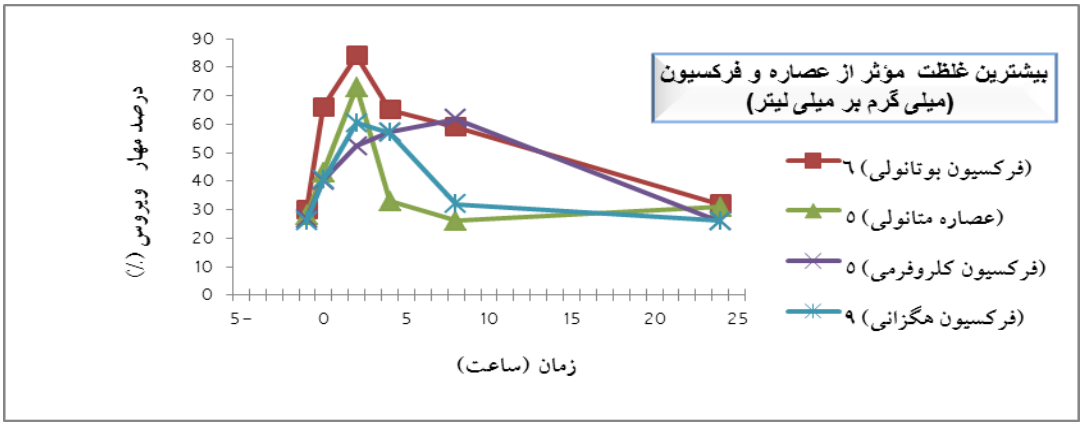
نمونه ها (عصاره و فرکسیون)	فعالیت آنتی اکسیدانی (٪)	فنول کل (میلی گرم گالیک اسید/گرم ترکیب گیاهی)	فلاونوئید کل (میلی گرم روتین /گرم تر کیب گیاهی)
عصاره متانولی	۴۴±۱	۷۰±۱	۴۹/۹۶±۰/۹۹۶
فرکسیون بوتانولی	۵۹/۳۳±۰/۵۷۶	۹۹±۱	۷۰±۱
فرکسیون کلروفرمی	۳۳/۳۳±۰/۹۹۶	۳۵/۳۳±۰/۵۷۷	۲۵/۳۳±۰/۹۹۶
فرکسیون هگزانی	۱۹/۶۶±۱/۱۴۶	۲۷±۱	۹/۳۳±۱/۶۲۸

نتایج به صورت میانگین از ۳ مرتبه آزمایش می‌باشد.
نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شده است.
میزان فعالیت آنتی اکسیدانی BHT برابر با ۹۰±۰/۰۱ است.
در بین گروه های مختلف میزان P<۰/۰۰۱ است.

جدول ۲. اثر سمیت سلولی و اثر ضد ویروسی عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه یوفوربیا

نمونه	میزان غلظت کشندگی ۵۰٪ (میلی گرم/ میلی لیتر)*	میزان غلظت مؤثر ۵۰٪ (میلی گرم / میلی لیتر) **	معیار انتخاب***
عصاره متانولی	۵/۰۷۲±۰/۰۶۳	۰/۳۲±۰/۰۰۳	۱۵/۸۵
فرکسیون بوتانولی	۶/۷۵±۰/۳۰۵	۰/۲۴±۰/۰۱۹	۲۸/۱۲۵
فرکسیون کلروفرمی	۵/۷۴±۰/۲۵۰	۰/۶۸±۰/۰۷۰	۸/۴۴
فرکسیون هگزانی	۹/۹۲±۰/۰۷۲	۴/۷۹±۰/۰۱۸	۲/۰۷۰
داروی آسیکلوویر(گروه کنترل)	>۵	۰/۰۲۸±۰/۰۰۱	>۱۷۸/۵۷۱

معناداری در سطح خطای ۵٪ نتایج به صورت میانگین از ۳ مرتبه آزمایش می‌باشد.
*CC50: غلظتی از ترکیبات گیاهی که در حضور آن ۵۰٪ سلول های از بین می روند.
** EC50: غلظتی از ترکیبات گیاهی که مانع مرگ ۵۰ درصد سلول های Vero توسط HSV-1 می شود. ***SI: CC50/EC50



نمودار ۱. نمودار درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱، در زمان های مختلف قبل از عفونت (- ۱ ساعت)، همزمان با عفونت (۰ ساعت) و بعد از عفونت (۲، ۴، ۸ و۲۴ ساعت) در بیشترین غلظت مؤثر از عصاره و فرکسیون های گیاه یوفوربیا

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

جدول ۳. نتایج آمار توصیفی درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱، در غلظت های مختلف فرکسیون بوتانولی گیاه یوفوربیا در زمان های مختلف

زمان (ساعت)	درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱(٪) غلظت های مختلف فرکسیون بوتانولی (میلی گرم برمیلی لیتر)						
	۶	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶	۰/۳	۰/۱۵
-۱	۳۰±۰/۶۷	۲۷±۰/۶۳	۱۸±۰/۸۰	۱۵±۰/۸۱	۸±۰/۹۲	۵±۰/۹۰	۲±۰/۸۷
۰	۶۶±۰/۲۵	۵۹±۰/۳۴	۴۵±۰/۳۰	۳۰±۰/۳۰	۲۰±۰/۵۴	۱۵±۰/۳۰	۹±۰/۲۹
۲	۸۴±۰/۳۶	۷۹±۰/۳۵	۶۵±۰/۲۰	۶۳±۰/۲۴	۵۶±۰/۱۶	۵۲±۰/۱۹	۴۲±۰/۲۰
۴	۶۵±۰/۶۱	۵۹±۰/۳۶	۴۱±۰/۱۰	۳۲±۰/۳۱	۳۰±۱/۱۰	۱۶±۰/۳۴	۱۳±۰/۱۳
۸	۵۹±۰/۲۲	۵۱±۰/۲۱	۳۱±۰/۳۲	۲۶±۰/۲۰	۲۱±۰/۱۵	۱۴±۲۱	۷±۰/۳۶
۲۴	۳۲±۱/۳۵	۳۰±۰/۹۶	۲۵±۰/۳۴	۲۵±۰/۶۰	۲۲±۰/۸۲	۸±۱	۲/۲±۰/۶۸

مقادیر به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده اند. نتایج به صورت میانگین از ۳ مرتبه آزمایش می‌باشد.

جدول ۴. نتایج آمار توصیفی درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱، در غلظت های مختلف عصاره متانولی گیاه یوفوربیا در زمان های مختلف

زمان (ساعت)	درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱(٪) غلظت های مختلف عصاره متانولی (میلی گرم برمیلی لیتر)						
	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶	۰/۳	۰/۱۵	۰/۰۷
-۱	۲۶±۰/۶۶	۲۰±۰/۶۶	۱۵±۰/۸۳	۱۰±۰/۸۳	۸±۰/۹۹	۵±۰/۹۹	۱±۰/۹۷
۰	۴۳±۰/۲۸	۳۲±۰/۳۳	۲۸±۰/۳۹	۱۸±۰/۳۹	۱۵±۰/۵	۱۲±۰/۳۹	۵±۰/۳۹
۲	۷۳±۰/۳۹	۶۶±۰/۳۳	۶۳±۰/۲۲	۵۸±۰/۲۲	۴۹±۰/۱۳	۴۳±۰/۱۱	۲۵/۱۶±۰/۲۲
۴	۳۳±۰/۶۵	۳۲±۰/۳۱	۲۷±۰/۱۵	۲۶±۰/۳۳	۲۴±۱/۱	۱۰±۰/۳۹	۸±۰/۱۱
۸	۲۶±۰/۲۸	۲۶±۰/۲۸	۲۴±۰/۳۳	۲۲±۰/۲۸	۱۴±۰/۱۱	۶±۰/۲۸	۶±۰/۳۳
۲۴	۳۱±۱/۳۲	۳۰±۰/۹۹	۲۵±۰/۳۸	۹±۰/۶۶	۷±۰/۸۳	۴±۱/۱	۳±۰/۶۶

مقادیر به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده اند. نتایج به صورت میانگین از ۳ مرتبه آزمایش می‌باشد

جدول ۵. نتایج آمار توصیفی درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱، در غلظت های مختلف فرکسیون کلروفرمی گیاه یوفوربیا در زمان های مختلف

زمان (ساعت)	درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱(٪) غلظت های مختلف عصاره متانولی (میلی گرم برمیلی لیتر)							
	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶	۰/۳	۰/۱۵	۰/۰۷	۰/۰۳
-۱	۲۶/۸۷±۰/۵۶	۲۴/۸۹±۰/۲۹	۱۹/۴۲±۰/۴۰	۱۴±۰/۲۹	۱۰/۸۹±۰/۲۱	۸/۴۹±۰/۷۰	۶/۵۲±۰/۲۵	۲/۴±۰/۵۰
۰	۴۰/۱۴±۰/۴	۳۸/۲۲±۰/۴۳	۳۶/۰۹±۰/۲۴	۳۱/۱۸±۰/۲۳	۲۸/۴±۰/۲۴	۱۶/۶۶±۰/۳۲	۱۴/۲۸±۰/۲۷	۱۳/۳۳±۰/۶۲
۲	۵۲/۳۷±۰/۳۴	۴۷/۱۴±۰/۶۲	۴۱/۹±۰/۴۳	۳۸/۰۹±۰/۶۸	۳۳/۳۳±۰/۵۰	۲۸/۵۲±۰/۲۳	۲۳/۸±۰/۶۵	۱۴/۲۸±۰/۳۱
۴	۵۷/۱۴±۰/۲۵	۴۹/۰۴±۰/۲۰	۴۷/۶۱±۰/۲۱	۴۶/۳۴±۰/۳۰	۴۲/۸۵±۰/۳۲	۳۳/۳۲±۰/۲۰	۲۸/۵۶±۰/۲۱	۱۶/۶۶±۰/۱۲
۸	۶۱/۹±۰/۲۵	۵۹/۶۷±۰/۱۰	۵۲/۳۷±۰/۱۲	۴۹/۷۶±۰/۱۲	۴۶/۶۶±۰/۲۰	۳۸/۰۹±۰/۱۲	۳۴/۸۵±۰/۱۲	۱۸/۷۵±۰/۱۳
۲۴	۲۵/۸±۰/۲۳	۲۵/۱۲±۰/۱۳	۲۰±۰/۲۴	۱۵±۰/۱۴	۱۰±۰/۳۴	۹±۰/۲۴	۷±۰/۳۴	۵±۰/۳۰

مقادیر به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده اند. نتایج به صورت میانگین از ۳ مرتبه آزمایش می‌باشد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

جدول ۶. نتایج آمار توصیفی درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱، در غلظت های مختلف فرکسیون هگزانی گیاه یوفوربیا در زمان های مختلف

زمان (ساعت)	درصد مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱(٪) غلظت های مختلف فرکسیون هگزانی (میلی گرم برمیلی لیتر)									
	۹	۸	۷	۶	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶	۰/۳	۰/۱۵
-۱	۲۶±۰/۴۳	۲۲±۰/۱۳	۲۰±۰/۴۳	۱۴±۰/۴۳	۱۳±۰/۴۳	۹±۰/۴۴	۴/۳۲±۰/۳۳	۱±.۰/۴۴	۱/۲۳±۰/۴۴	۰/۷۵±۰/۴۳
۰	۴۰/۳۲±۰/۲۲	۳۵/۳۴±۰/۴۳	۳۰/۴۳±۰/۴۳	۲۵/۳۲±۰/۴۳	۲۰/۳۲±۰/۴۳	۱۲/۳۲±۰/۲۲	۷/۴۳±۰/۴۴	۴/۵۴±۰/۳۳	۲/۳۴±۰/۲۲	۱/۳۲±۰/۳۳
۲	۶۰/۴۷±۰/۴۳	۵۸/۳۱±۰/۴۳	۵۷/۲۳±۰/۴۳	۵۳/۹۹±۰/۴۳	۵۱/۸۳±۰/۴۳	۳۳±۰/۴۳	۳۰±.۰/۴۳	۲۱±۰/۶۵	۹±۰/۴۴	۵±۰/۶۴
۴	۵۷±۰/۴۳	۵۴±۰/۶۵	۴۳±۰/۶۵	۳۲±۰/۲۲	۲۱±۰/۴۴	۱۳±۰/۲۲	۱۲±۰/۲۲	۹±۰/۲۲	۴±۰/۴۴	۰/۷±۰/۲۲
۸	۳۲±۰/۴۳	۳۱±.۰/۴۳	۱۸±./۴۳	۱۷±۰/۴۳	۱۵±./۴۴	۱۳±۰/۴۳	۷±۰/۴۴	۶±۰/۲۲	۲±۰/۴۴	۲/۹۹±۰/۲۱
۲۴	۲۶±۰/۵۴	۲۴±./۴۳	۲۲±./۲۲	۱۸±۰/۴۴	۶±۰/۴۴	۴±۰/۴۴	۲±۰/۴۴	۲±۰/۴۴	۱±۰/۲۲	۱±۰/۴۳

مقادیر به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده اند. نتایج به صورت میانگین از ۳ مرتبه آزمایش می‌باشد

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، نتایج حاصل از بررسی اثر سمیت سلولی هر کدام از گروه های مورد آزمایش بر روی سلول های Vero نشان داد که میزان CC50 در بین این گروه ها متفاوت می باشد، این تفاوت ممکن است ناشی از غلظت های مختلف ترکیبات فعال در هر کدام از گرو ه ها و نیز استفاده از حلال های قطبی یا غیر قطبی در آن ها باشد (۵). همچنین نشان داده شد که کلیه گروه های مورد آزمایش اعم از عصاره متانولی، فرکسیون بوتانولی، فرکسیون کلروفرمی و فرکسیون هگزانی در مهار عفونت HSV-1 توانا هستند و از بین این چهار گروه به ترتیب فرکسیون بوتانولی (SI:۲۸/۱۲۵)، عصاره متانولی (SI:۱۵/۸۵)، فرکسیون کلروفرمی (SI:۸/۴۴) و فرکسیون هگزانی (SI:۲/۰۷۰)، فعالیت ضد ویروسی بالاتری را نشان دادند. در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدویروسی وابسته به زمان، نشان داد که بیشترین مهار، علیه عفونت HSV-1 در عصاره متانولی، فرکسیون بوتانولی، فرکسیون کلروفرمی و فرکسیون هگزانی گیاه E.spinidens به ترتیب در ۲h، ۲h، ۸h و ۲h بعد از عفونت ویروسی دیده می شود.

در این مطالعه بیشترین و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی به ترتیب در فرکسیون بوتانولی و فرکسیون هگزانی این گیاه دیده شد. همچنین میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی تام موجود در این گیاه به ترتیب در فرکسیون بوتانولی، عصاره متانولی، فرکسیون کلروفرمی وفرکسیون هگزانی آن دیده شد. با توجه به این نکته که غلظت هایی از عصاره متانولی و فرکسیون های گیاه E.spinidens، که در آن ها اثر ضد ویروسی مشاهده گردید پایین تر از غلظت های توکسیک آن ها قرار داشت، می توان گفت غلظتی از این ترکیبات که اثر ضدویروسی دارند هیچگونه اثر مخربی بر روی سلول های Vero کشت داده شده، ندارند. همچنین، با توجه به نتایج حاصل از تحقیقات Amoros و همکاران که ترکیبات با ضریب انتخاب پذیری بیشتر از ۴، گزینه مناسبی برای عوامل ضدویروسی، گزارش شده است، نتایج این پژوهش، نشان می دهد که تمام ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه دارای اثر ضد ویروسی می باشند که از میان آنها عصاره متانولی، فرکسیون بوتانولی و فرکسیون کلروفرمی گزینه های مناسبی به عنوان عوامل ضد ویروسی هستند (۱۷). Muller و همکاران نشان دادند که از ۷ فرکسیون مورد بررسی، فرکسیون اتیل استات گیاه Sloanea guianensis وLafoensia pacari، فعالیت ضدهرپتیک قابل قبولی به ترتیب با SI برابر با ۷/۸ و۱۰/۳ نشان می دهند و نیز مشابه با نتایج پژوهش حاضر، فرکسیون بوتانولی گیاه Rubus imperialis، فعالیت ضد هرپسی قوی تری با SI برابر با ۲۶/۶، به دلیل حضور مواد قطبی به عنوان اجزاء اصلی فعال نشان می دهد و فرکسیون هگزانی در تمام گیاهان، پایین ترین فعالیت ضد هرپسی را دارد (۱۸).

اولین پلی پپتیدهای ویروسی یا آلفاپپتیدها که در کاهش سنتز پروتئین سلولی دخیل هستند، طی ۴-۲ ساعت بعد از عفونت در سلول آشکار می گردند و پلی پپتیدهای بتا که اغلب پروتئین های غیرساختمانی، از قبیل DNA پلی مراز، تیمیدین کیناز، پرایمراز و هلیکاز که در تکثیر DNA دخیل هستند، می باشند، ۵ تا ۸ ساعت بعد از عفونت و پلی پپتیدهای گاما که پروتئین های ساختمانی هستند ۱۲ تا ۱۵ ساعت پس از عفونت ظاهر می شوند (۱۹)، با توجه به اینکه بیشترین زمان اثر عصاره متانولی و فرکسیون بوتانولی و فرکسیون هگزانی در این مطالعه، ۲h پس از عفونت است، به نظر می رسد این عصاره و فرکسیون ها بر آلفاپپتیدها که طی ۲ تا ۴ ساعت پس از عفونت آشکار می شوند، اثر می نمایند و نیز با توجه به اینکه بیشترین زمان اثر فرکسیون کلروفرمی ۸ ساعت پس از عفونت است، به نظر می رسد این فرکسیون بر روی پلی پپتیدهای بتا اثر می گذارد.

مطالعات نشان می دهد که ترکیبات فنولی بالا می تواند دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی بعضی از عصاره های قطبی باشد. زیرا بر اساس شواهد موجود، ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنولی و قدرت آنتی اکسیدانی گیاهان وجود دارد (۲۱و۲۰). از طرف دیگر به نظر می رسد که ترکیبات فنولی که به صورت گسترده در گیاهان یافت می شوند و قدرت آنتی اکسیدانی بالایی دارند (۲۳و۲۲)، بیشتر از طریق عصاره های گیاهی آن ها قابل استخراج می باشند (۲۴). بنابراین با توجه به اینکه، این جنس غنی از سزکوئی ترپن ها، سربروزیدها، گلیسرول ها، فلاونوئیدها، استروئیدها، پلی فنول ها است (۴) و نیز باتوجه به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

پژوهش های قبلی که متانول بهترین حلال برای استخراج فلاونوئیدها گزارش شده است (۲۵) و از طرفی با توجه به اینکه عصاره متانولی علاوه بر فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ساپونین ها، تانن ها، آنتراکینون ها، ترپن ها را نیز استخراج می کند (۲۵)، به نظر می رسد که خواص ضدویروسی عصاره متانولی گیاه E.spinidens را می توان به طور کلی به حضور متابولیت های ثانویه به خصوص در درجه اول فلاونوئیدها، در درجه دوم ترپن ها و در درجه سوم ساپونین ها نسبت داد (۲۶).

در خصوص فرکسیون های گیاه E.spinidens نیز باید اینگونه توجیه کرد که با توجه به مطالعات قبلی، مبنی بر حضور ترپنوئیدها و رزین ها در فرکسیون هگزانی، ترپنوئید، رزین و ساپونین در فرکسیون کلروفرمی و فنول ها، فلاونوئید، و تانین در فرکسیون بوتانولی (۲۷) و همچنین با توجه به اینکه ترپنوئیدها به عنوان ترکیبات اصلی موجود در جنس یوفوربیا شناسایی شده اند (۴) و نیز از آنجایی که انواع وسیعی از فیتوچمیکال های فعال شامل تانین، لیگنان، سولفید، کومارین، ساپونین، پلی ساکارید، فوریل کامپوند، آلکالوئید، پولین، تیوفن ها، پروتئین ها و پپتیدها به خصوص پلی فنول ها، فلاونوئید و ترپن ها سطح بالایی از فعالیت ضدویروسی را نشان می دهند (۲۸)، بنابراین اثر ضد ویروسی مشاهده شده در هر یک از فرکسیون های گیاه E.spinidens به خصوص فرکسیون بوتانولی و کلروفرمی را می توان به حضور این ترکیبات به خصوص ترپنوئیدها، پلی فنول ها و فلاونوئیدها نسبت داد.

نتایج این پژوهش نشان می دهد که عصاره متانولی و فرکسیون های بوتانولی، کلروفرمی و هگزانی گیاه E.spinidens دارای اثر ضد HSV-1، هستند. بالاترین فعالیت ضد ویروسی به ترتیب در فرکسیون بوتانولی، عصاره متانولی، فرکسیون کلروفرمی و فرکسیون هگزانی از این گیاه دیده می شود. با بررسی مکانیسم اثر این ترکیبات، به صورت بررسی تأثیر زمان این ترکیبات بر فعالیت ضد ویروسی آن ها، مشخص گردید که که احتمالاً این اثرات ناشی از مهار مرحله تکثیر ویروس می باشد. همچنین، مطالعه فیتوشیمیایی در این پژوهش نشان می دهد، که بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان فنول و فلاونوئید تام گیاه E.spinidens به ترتیب در فرکسیون بوتانولی، عصاره متانولی، فرکسیون کلروفرمی و فرکسیون هگزانی در این گیاه وجود دارد. بنابراین، با توجه به تحقیق حاضر و نیز حضور فیتوچمیکال های مختلف در این گونه از گیاه، اثر ضد ویروسی مشاهده شده، ممکن است به حضور متابولیت های ثانویه مختلف به خصوص پلی فنول ها، فلاونوئیدها، ترپن ها و ساپونین ها نسبت داده شود. بنابراین با توجه به مشخص شدن خواص ضدیروسی گیاه E.spinidens در این تحقیق، پیشنهاد می شود در تحقیقات بعدی به مطالعه دقیق تر فیتوشیمیایی و تعیین ساختار مولکولی ترکیبات فنولی و ترپنی موجود در گیاه E.spinidens و بررسی اثر ضدویروسی ترکیبات خالص شده آن ها پرداخته شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل تأمین بودجه و همچنین از پرسنل مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه به دلیل همکاری در اجرای طرح، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

Phytochemical Study and Anti Viral Effect Evaluation of Methanolic Extract with Fractions of Aerial Parts of Euphorbia Spinidens

M. Mohammadi-Kamalabadi (MSc) [1], A. Karimi (PhD) [2], M. Rafieian (PhD) [2*], L. Amjad (PhD) [3]

1. Young Researchers and Elite Club, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
3. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(5); May 2014; pp: 25-34

Received: Aug 26th 2013, Revised: Nov 6th 2013, Accepted: Jan 5th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Several species of the genus Euphorbia (Euphorbiaceae) have been tested for their efficiency as anti-viral and anti-tumor agents. Herpes Simplex Viruses (HSV) are pathogenic to human. Antiviral drugs are mostly weak or are associated with side effects. Medicinal plant products have been used as folk remedies for different kinds of ailments including viral diseases. The objective of this study was to compare the phytochemical study and anti-viral effect evaluation of methanolic extract with fractions of aerial parts of euphorbia spinidens.

METHODS: In this experimental and laboratory research the methanolic extract of aerial parts of E. spinidens with maceration method was subjected to solvent partitioning and afforded chloroform, butanol and hexane fractions. β-carotene-linoleate model system, folin-Ciocalteu method and aluminum chloride colorimetric method, respectively, were employed for evaluation of antioxidant activity, total phenolic, flavonoid and flavonol contents of the extract and fractions of this plant. The cytotoxic and anti-viral effects of methanolic extract and fractions were determined using MTS assay and the CC50 (50% cytotoxic concentration) and EC50 (50% effectiveness concentration) were evaluated on Herpes Simplex Virus Type-1.

FINDINGS: The highest antioxidant activity and phenolic and flavonoid and contents were in buthanol fraction (59.33±0.576, 99±1, 70±1), methanolic extract (44±1, 70±1, 49.96±0.996), chloroform fraction (33.33±0.996, 35.33±0.577, 25.33±0.996) and hexane fraction (19.66±1.146, 27±1, 9.33±1.628) respectively. The highest CC50 was in hexan fraction with 9.92± 0.072 mg/ml and the lowest CC50 was in methanolic extract with 5.072±0.063 mg/ml. Also, the highest anti viral activity revealed in the butanol fraction (SI: 28.125), methanolic extract (SI: 15.85), chloroform fraction (SI: 8.44) and hexane fraction (SI: 2.07), respectively.

CONCLUSION: Based on the results, methanolic extract and buthanol, chloroform and hexane fractions of E. spinidens show anti HSV-1 activity. Antiviral effect observed can be attributed the presence of various secondary metabolites, particularly polyphenols, flavonoids, terpenes and saponins.

KEY WORDS: *Antiviral, Methanolic extract, Phytochemical, Fraction, Euphorbia spinidens.*

Please cite this article as follows:

Mohammadi-Kamalabadi M, Karimi A, Rafieian M, Amjad L. Phytochemical study and anti viral effect evaluation of methanolic extract with fractions of aerial parts of euphorbia spinidens. J Babol Univ Med Sci 2014;16(5):25-34.

* **Corresponding Author; M. Rafieian (PhD)**

Address: Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Tel: + 98 381 3346692

E-mail: Rafieian@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

References

1.Zargari A. Medical plants. 4th ed. Tehran, Iran: Tehran University publication 1993; p: 401. [in Persian]

2. Natarajan D, Britto SJ, Srinivasan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G. Anti-bacterial activity of Euphorbia fusiformis a rare medicinal herb. J Ethnopharmacol 2005;102(1):123-6.

3.Tanaka R, Kasubuchi K, Kita S, Tokuda H, Nishino H, Matsunaga S. Bioactive steroids from the whole herb of Euphorbia chamaesyce. J Nat Prod 1999;63(1):99-103.

4.Shi QW, Su XH, Kiyota H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus euphorbia. Chem Rev 2008;108(10):4295-327.

5.Ghannadian M, Akhavan A, Abdalla OM, Ayatollahi AM, Mohammadi-Kamalabadi M, Ghazanfari H. Triterpenes from Euphorbia spinidens with their immounomodulatry activity. Res Pharm Sci 2013;8(3):205-10.

6.Shamsabadipour S, Ghanadian M, Saeedi H, et al. Triterpenes and steroids from euphorbia denticulata Lam. with anti-herpes symplex virus activity. Iran J Pharm Res 2013;12(4):759-67.

7.Vlietinck AJ, Van L, Totte J, et al. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and anti- viral properties. J Ethnopharmacol 1995;46(1):31-47.

8.Khan MT, Ather A, Thompson KD, Gambari R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. Antiviral Res 2005;67(2):101-19.

9.Che CT. Plants as a source of potential antiviral agents. In: Wagner H, Farnsworth NR (eds). Economic and medicinal plant research. 5th ed. London: Academic Press 1991; pp: 167-251.

10. Monavari H, Shahrabadi M, Mortazkar P. Effects of glycyrrhiz glabra on HSV-1. J Planata Media 2008;7(4): 137-44. Available from: http://www.medlib.ir/fa-ir/article/ 28549925. Accessed Sep 2013. [in Persian]

11. Jafarzadeh L, Rafieian-Kopaei M, Ansari-Samani R, Asgari A. The effect of hydroalcoholic extract of Stachys lavandulifolia vahl on pregnant mice. EXCLI J 2012;11:357-62.

12. Shirzad H, Shahrani M, Rafieian-Kopaei M. Comparison of morphine and tramadol effects on phagocytic activity of mice peritoneal phagocytes in vivo. Int Immunopharmacol 2009;9(7-8):968-70.

13. Sharafati-Chaleshtori R, Sherafati Chaleshtori F, Rafieian-Kopaei M. Biological characterization of Iranian walnut (Juglans regia) leaves. Turk J Biol 2011;35:635-9.

14. Sharafati-Chaleshtori R, Rafieian-Kopaei M, Mortezaei S, Sharafati-Chaleshtori A, Amini E. Antioxidant and antibacterial activity of the extracts of Echinophora platyloba D.C. Afr J Pharm Pharmacol 2012;6(37):2692-5.

15.Motamedifar M, Ghafari N, Talezadeh-Shirazi P. The effect of Cumin seed extracts against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. Int J Mol Sci 2010;35(4):304-9.

16. Chiang LC, Chiang W, Liu MC, Lin CC. In vitro antiviral activities of Caesalpinia pulcherrima and its related flavonoids. J Antimicrob Chemother 2003;52(2):194-8.

17. Amoros M, Simos C, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture Comparison with the antiviral activity of propolis. J Nat Product 1992;55(12):1732-40.

18.Müller V, Chávez JH, Reginatto FH, et al. Evaluation of antiviral activity of south american plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. Phytother Res 2007;21(10):970-6.

19.Hook EW, Cannon RO, Nahimas AJ, et al. Herpes simplex virus infections as a risk Factor for HIV infection in hetero sexual. J Infect Dis 1992;165(2):251-5.

20.Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. J Med Food 2011;14(9):969-74.

21.Baradaran A, Rabiei Z, Rafieian M, Shirzad H. A review study on medicinal plants affecting amnesia through cholinergic system. J Herb Med Pharmacol 2012;1(1):3-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]

22.Rafieian-Kopaie M, Baradaran A, Rafieian M. Plants antioxidants: from laboratory to clinic. J Nephropathol 2013;2(2):152-3.

23.Rafieian-Kopaie M, Baradaran A. Teucrium polium and kidney. J Renal Injury Prev 2013; 2(1):3-4.

24.Shirani M, Alibabaei Z, Kheiri S, et al. Effect of euphorbia helioscopia extract on acute and chronic pain in mice. J Babol Univ Med Sci 2011;13(4):14-18. [in Persian]

25.Sokmen A, Sokmen M, Daferera D, et al. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extract of Achillea biebersteini Afan (Asteraceae). Phytother Res 2004;18(6):451-6.

26.Mothana RA, Lindequist U, Geraenert R, Bednarski PJ. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinial plants from the island Soqotra. BMC Complement Altern Med 2009;9:7.

27. Riazi A, Abbasi MA, Rehman A, Shahzadi T, Ajaib M, Mohammed Khah K. Phytochemical screening free radical scavenging, antioxidant activity and phenolic content of Dodonaea viscose Jacq. J Serb Chem Soc 2013;77(4):423-35.

28.Jassim SAA. In vitro evaluation of the antiviral activity of an extract of date plam (phoenix dactyliferal) Pits on a Pseudomonas phage. Evidence Bassed Complement Alternat Med 2010;7(1):57-62.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.5.4.2]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.5.25]