دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و دوم، شماره ۴، صفحه ۱۹۹ - ۱۹۱ (مهر و آبان ۱۳۹۸)

Iran South Med J 2019; 22(4): 191-199

بررسی محتوای تام فنولی، اثرات آنتی اکسیدانت و مهار آنزیم تیروزیناز عصاره‌های تهیه شده از گونه‌های *Stachys* در ایران

نجمه ادراکی (PhD)[1*]، مجتبی اسداللهی (PhD)[1]، هاجر همتیان (Pharm D)[2]،
مهدی خوشنویس‌زاده (PhD)[1و2]، امیدرضا فیروزی (PhD)[1]، امیرحسین ساختمان (PhD)[2]،
امیررضا جاسبی (PhD)[1**]

[1] مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
[2] گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

(دریافت مقاله: ۹۷/۵/۸ - پذیرش مقاله: ۹۸/۳/۱۲)

چکیده

زمینه: با توجه به اهمیت گونه‌های جنس ***Stachys*** در ایران و اثرات بیولوژیک مهم آن، در این مطالعه سه گونه مختلف آن شامل ***Stachys benthamiana*** **Boiss**، ***St. aucheri*** **Benth** و ***St. inflata*** **Benth** از نواحی مختلف ایران جمع‌آوری گردیدند و عصاره‌های متانولی، متانول ۸۰ درصد و دی کلرومتانی جهت ارزیابی میزان فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد، محتوای تام فنولی و مهار آنزیم تیروزیناز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: فعالیت آنتی اکسیدانتی با استفاده از آزمون بازداری رادیکال آزاد با استفاده از معرف ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، مقدار تام فنول با روش رنگ سنجی فولین سیو کالتو و اثر مهاری عصاره‌ها بر آنزیم تیروزیناز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی محتوای فنولی این عصاره‌ها بیانگر محتوای بالای ترکیبات فنولی (میلی‌گرم اکی والان گالیک اسید/ ۱ گرم گیاه خشک) به ترتیب کاهش در عصاره متانول ۸۰ درصد (۱۳۹/۷-۹۸/۵) عصاره متانولی (۵۴/۷-۳۶/۸) و در عصاره دی کلرومتانی (۴۴/۹-۱۷/۹) می‌باشد. به‌علاوه قدرت فعالیت آنتی اکسیدانی با میزان محتوای تام فنولی در ارتباط مستقیم می‌باشد و عصاره‌های متانول ۸۰ درصد بیشترین محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانت را دارا می‌باشند. بررسی فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز نشان دهنده قدرت مهاری قابل توجه عصاره‌های دی کلرومتانی گونه ***St .inflata*** می باشد (IC_{50} معادل ۰/۶±۵/۴ میکرو مولار است).

نتیجه‌گیری: با توجه به مطالعات پیشین فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز این گیاهان عمدتاً به واسطه حضور ترکیبات کمتر قطبی می باشند و احتمالاً این ترکیبات با میزان بیشتری در عصاره دی کلرومتانی ***St. inflatai*** نسبت به دو گونه دیگر، یافت می‌شود.

واژگان کلیدی: تیروزیناز، مهار کننده تیروزیناز، ***Stachys***، آنتی اکسیدانت، محتوای تام فنولی، **DPPH**

** مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران،

Email: jassbiar@sums.ac.ir
***ORCID: 0000-0001-8306-2642**
****ORCID: 0000-0003-3918-361X**

مقدمه

تیروزیناز آنزیمی کلیدی در مسیر بیوسنتز رنگدانه‌های بیولوژیک و ملانین است که در جایگاه فعال خود دارای دو اتم مس است. این آنزیم، کاتالیزر مرحله اول سنتز ملانین در پستانداران و مسئول واکنش‌هایی است که در میوه‌ها باعث تخریب و قهوه‌ای شدن آن‌ها پس از برداشت محصول می‌شود. به علاوه در پستانداران و انسان این آنزیم در ارتباط با بسیاری از بیماری‌های مرتبط با تیرگی پوست از جمله هایپرپیگمنتاسیون و لک‌های پوستی می‌باشد. از این رو محققین به دنبال مهارکنندگان قدرتمند این آنزیم به منظور استفاده در صنایع غذایی و آرایشی بهداشتی می‌باشند و در این خصوص منابع و ترکیبات طبیعی و سنتزی متعددی مورد توجه قرار گرفته است.

به‌دلیل اهمیت آنزیم تیروزیناز در صنایع آرایشی، غذایی به ویژه در ارتباط با فراورده‌های دارویی مرتبط با بسیاری از بیماری‌های پوستی (از جمله هایپرپیگمنتاسیون و ویتیلگو) و نورودژنراتیو، مهار کنندگان آنزیم تیروزیناز بسیار مورد توجه هستند. دسته‌های مختلفی از مهار کنندگان صناعی و طبیعی این آنزیم توسط محققین مختلف معرفی شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱). از میان دسته‌های مهار کننده‌های مختلف آنزیم تیروزیناز، مشتقات فنولی مختلف از جمله مشتقات هیدروکینون، آربوتین، کاتچین، کوجیک اسید و فلاونوییدها را می‌توان نام برد که در منابع گیاهی مختلف یافت می‌شوند (۶-۲).

گیاهان جنس سنبله‌ای *Stachys* (از خانواده Lamiaceae) متشکل از ۳۰۰ گونه مختلف می‌باشند که در مناطق گرم و معتدل سراسر دنیا یافت می‌گردند و به ویژه در نقاط کوهستانی و مرطوب گسترش یافته‌اند. گونه‌های سنبله‌ای در طب گیاهی و سنتی بسیاری از مناطق ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. گونه‌های *S. aucheri* (سنبله فارسی) و *S. benthamiana* (سنبله صخره‌ای) از جمله گیاهان بومی ایران می‌باشند (۷). مطالعات مختلف اثرات ضدمیکروبی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانت و مهار کننده رشد و تکثیر سلولی این گیاه را نشان داده است (۱۱-۸). در حدود ۳۸ گونه از این جنس در فلور ایران وجود دارد که ۱۳ گونه آن از جمله *St. aucheri* به‌صورت اندمیک در ایران یافت می‌شوند. دیگر گونه‌های آن علاوه بر ایران، در افغانستان، عراق، آسیای مرکزی و آمریکا نیز وجود دارند. اسامی فارسی این جنس شاطرا، صور اسرافیل و سنبله می‌باشد (۹). مطالعات مختلف اثرات آنتی اکسیدانت قابل توجه *St. aucheri* را به اثبات رسانده است (۱۲). بررسی عصاره اتیل استاتی *St. annua* نیز اثرات آنتی اکسیدانت و مهار کنندگی تیروزیناز این گیاه را به اثبات رسانده است (۱۳).

در این مطالعه سه گونه مختلف *Stachys* شامل *St. aucheri St. benthamian* و *St. inflata* از نواحی مختلف ایران جمع‌آوری گردیدند و عصاره‌های مختلف جهت ارزیابی میزان فعالیت آنتی اکسیدانت، محتوای تام فنولی و مهار آنزیم تیروزیناز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر، یک مطالعه تجربی می‌باشد که به شرح زیر انجام پذیرفت.

جمع‌آوری گیاه و و تهیه عصاره

سه گونه مختلف *Stachys* شامل *St. Aucheri*، *St. benthamian* و *St. inflata* به ترتیب از نواحی جنوب غرب و شمال غرب ایران، جمع‌آوری گردید (جدول ۱) و توسط اسداللهی (گیاه‌شناس) شناسایی گردیدند.

جدول ۱) مشخصات گیاهان جمع‌آوری شده در این مطالعه				
نام گیاه	محل جمع‌آوری	طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع	شماره هرباریومی	زمان جمع‌آوری
Stachys benthamiana Boiss	فارس؛ دشت ارژن	۳۷°, ۲۹N ۵۶°, ۵۱E ۲۰۷۰ متر	PC-96-3-8-16	خرداد ۹۵
Stachys aucheri Benth	کوه دنا؛ گردنه بیژن	۵۱°, ۳۰N ۳۰°, ۵۱E ۲۵۶۰ متر	PC-96-3-8-11	خرداد ۹۵
Stachys inflata Benth.	آذربایجان غربی؛ سلماس	۰۸°, ۳۸N ۵۴°, ۴۴E ۱۴۰۰ متر	PC-96-3-8-8	تیر ۹۵

گیاهان جمع‌آوری شده پس از خشک کردن در سایه، آسیاب شده و با استفاده از روش خیساندن در حلال‌های متانول و دی کلرومتان عصاره‌گیری شدند. طی فرایند عصاره‌گیری، از هر نمونه‌ی پودر گیاهی، ۳۰ گرم توزین شده و هر کدام را به ۳ بخش ۱۰ گرمی تقسیم کرده و هر بخش در ۱۰۰ سی‌سی متانول خالص، ۱۰۰ سی‌سی متانول ۸۰ درصد و ۱۰۰ سی‌سی دی کلرومتان به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و تاریکی خیسانده شد. پس از ۲۴ ساعت، محلول رویی هر یک از حلال‌ها صاف شده و تغلیظ گردیده و از باقیمانده گیاه مجدداً عصاره‌گیری شد عصاره‌های تغلیظ شده و خشک شده، در فریزر $^{\circ}C$ ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بلافاصله پیش از انجام هر ارزیابی عصاره‌ها در حلال مناسب، حل گردیده و پس از تهیه محلول با غلظت مشخص، به منظور ارزیابی آنتی‌اکسیدانت، فنل تام و مهار آنزیم تیروزیناز مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز

این ارزیابی با استفاده از ال- دوپا به عنوان سوبسترا، کوجیک اسید به‌عنوان کنترل مثبت و آنزیم تیروزیناز قارچی صورت گرفت و تولید دوپاکروم در طول موج ۴۷۵ نانومتر با استفاده از بررسی‌های اسپکتروفوتومتری، مورد بررسی قرار گرفت. تمام نمونه‌های مورد بررسی با غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر در دی متیل سولفوکساید تهیه شده و جهت تهیه غلظت‌های مختلف در دی متیل اکساید رقیق‌سازی گردید. در ابتدای تست، مقدار ۱۰ میکرولیتر آنزیم تیروزیناز (۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) در ۱۶۰ میکرولیتر از بافر فسفات (pH=۶/۸) حل گردیده و در ادامه ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های مورد بررسی با غلظت مشخص در چاهک مربوطه پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. پس از مخلوط شدن و انکوبه شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه، ۲۰ میکرولیتر از محلول ال-دوپا (با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار) اضافه می‌گردد. نمونه کنترل شامل دی متیل سولفوکساید بدون ترکیبات مورد بررسی بوده و کوجیک اسید به‌عنوان نمونه استاندارد کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. هر یک از ارزیابی‌ها سه بار تکرار گردید (غلظت نهایی دی متیل سولفوکساید در چاهک نمونه‌ها و کنترل ۲ درصد می‌باشد). میزان اثر مهاری ترکیبات مورد آزمون، به صورت غلظت مورد نیاز جهت مهار ۵۰ درصد فعالیت آنزیم (IC_{50}) محاسبه و گزارش شد. نسبت درصد مهاری فعالیت آنزیم توسط نمونه‌ها (به صورت درصد) بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{جذب نمونه گیاهی} - \text{جذب نمونه کنترل Sample}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانت (روبش رادیکال‌های آزاد) با استفاده از معرف DPPH

سنجش فعالیت روبش رادیکال‌های آزاد توسط عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش ارایه شده توسط Blois (۱۴) با تغییر مختصری در روش آزمون و در پلیت‌های ۹۶ خانه صورت گرفت.

به طور خلاصه عصاره‌های متانولی در حجم مناسب متانول خالص و عصاره‌های متانول ۸۰ درصد در مخلوط متشکل از متانول/آب (۸۰ درصد) حل شده و محلول‌هایی با غلظت معادل ۲۵۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر تهیه گردید. از محلول تهیه شده، غلظت‌هایی حد واسط معادل ۱۰۰۰۰، ۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰ و ۶۲۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر تهیه گردید. مقدار ۵ میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده عصاره‌ها در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ چاهک به ۱۹۵ میکرولیتر محلول ۱۰۰ میکرومولار DPPH (در متانول) در چاهک‌های مجزا اضافه شد (غلظت‌های نهایی عصاره‌ها در هر چاهک ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲ و ۱۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است). پس از سی دقیقه مخلوط شدن در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. درصد احیای DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. چاهک‌های جداگانه‌ای برای نمونه کنترل (نمونه بدون دارو) در نظر گرفته شد. ترکیب آنتی‌اکسیدانتً Quercetine به‌عنوان نمونه استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{جذب نمونه گیاهی} - \text{جذب نمونه کنترل Sample}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

ارزیابی فوق سه بار تکرار گردید و مقادیر IC_{50} از طریق رگرسیون خطی و با استفاده از میانگین درصد مهار DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ها توسط نرم‌افزار Curve expert محاسبه گردید و به صورت میکروگرم عصاره/ میلی‌لیتر DPPH (۴-۱۰ مولار) گزارش گردید.

تعیین مقدار فنول تام

مقدار فنول تام عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش ارایه شده فولین- سیو کالتو با مقداری تغییر تعیین گردید (۱۵). به طور خلاصه، مقدار ۵ میکرولیتر از محلول عصاره متانولی، ۱۵۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰ میکرولیتر واکنشگر فولین به هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط گردید. سپس به نمونه‌های درون چاهک‌ها مقدار ۳۰ میکرولیتر محلول سدیم بی‌کربنات (۰/۲۵ درصد) به مخلوط واکنش اضافه گردیده و مخلوط مجدداً به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. جذب مخلوط در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. غلظت فنولی تام در برابر غلظت‌های متوالی استاندارد گالیک اسید اندازه‌گیری شده و به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در ۱ گرم گیاه خشک گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ آنالیز شدند. داده‌های کمی حاصل به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شدند و مقایسه آماری میان گروه‌ها توسط آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و به دنبال آن تست Tukey انجام گردید. سطح معنی‌داری آزمون های آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شده

است. بررسی ارتباط بین فعالیت آنتی اکسیدانت و محتوای تام فنولی با استفاده از روش رگرسیون خطی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

یافته‌ها

عصاره‌گیری از گونه‌های مختلف *stachys* شامل *St. aucheri, St. benthamiana* و *St. inflata* در حلال‌های متانول خالص، متانول ۸۰ درصد و دی‌کلرومتان با استفاده از روش خیساندن صورت گرفت. نتایج مربوط به راندمان عصاره‌های خشک تهیه شده از از حلال‌های مورد آزمون در جدول ۲ آورده شده است. به طور کلی راندمان عصاره‌های متانولی و متانول ۸۰ درصد بیشتر از عصاره‌های دی‌کلرومتانی است و راندمان عصاره‌ی متانولی و متانول ۸۰ درصد تقریباً یکسان هستند و تفاوت چندانی با هم ندارند.

جدول ۲) راندمان عصاره‌های متانولی، متانول ۸۰ درصد و دی کلرومتانی ۳ گونه *Stachys*

نام گیاه	نوع عصاره	راندمان عصاره (٪)
Stachys aucheri	متانولی	۱۹
	متانول ۸۰ درصد	۲۰
	دی کلرومتانی	۸
Stachys benthamiana	متانولی	۱۳
	متانول ۸۰ درصد	۱۲
	دی کلرومتانی	۳
Stachys inflata	متانولی	۱۰
	متانول ۸۰ درصد	۱۳
	دی کلرومتانی	۵

ارزیابی میزان فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز توسط عصاره‌های تهیه شده

عصاره‌های گیاهی تهیه شده و کوجیک اسید (به‌عنوان کنترل مثبت) به منظور ارزیابی میزان فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است در میان گونه‌های مختلف *Stachys* مورد ارزیابی، عصاره دی کلرومتانی *St. inflata* بیشترین میزان فعالیت مهار آنزیم تیروزیناز را نشان داده است (IC_{50}=۵/۴ میکروگرم/میلی‌لیتر). در حالی‌که عصاره‌های متانولی (IC_{50}=۴۷/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و متانول ۸۰ درصد(IC_{50}=۲۱/۹ میکروگرم/ میلی‌لیتر) این گونه میزان فعالیت مهاری کمتری در برابر آنزیم تیروزیناز اعمال نموده‌اند. عصاره‌های دی کلرومتانی گونه‌های *St. aucheri* و *St. benthamiana* با میزان IC_{50} (به‌ترتیب) ۱۳/۸ و ۲۱/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر نیز اثرات مهاری قابل توجهی را دارند. اما عصاره متانول ۸۰ درصد این دو گونه دارای اثرات مهاری ناچیزی در برابر آنزیم تیروزیناز می‌باشند (میزان IC_{50} محاسبه شده به ترتیب ۶۱/۱ و ۸۷/۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر بوده است). عصاره‌های متانولی هر سه گونه مورد بررسی نیز اثرات مهارکنندگی کمی در برابر آنزیم تیروزیناز نشان داده‌اند؛ عصاره متانولی گونه *St. aucheri* در غلظت‌های مورد بررسی غیر فعالی بوده و عصاره متانولی گونه‌های *St. benthamiana* (IC_{50}=۱۵۰/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و *St inflata.* (IC_{50}=۴۷/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر). به‌ترتیب فعالیت مهاری اندک و متوسطی در برابر آنزیم تیروزیناز دارند.

جدول ۳) فعالیت مهاری ۵۰ درصد آنزیم تیروزیناز توسط عصاره‌های دی کلرومتانی، متانولی و متانول ۸۰ درصد سه گونه ***Stachys***

نام گیاه		IC_{50} *میکروگرم/ میلی‌لیتر	
نوع عصاره	متانولی	متانول ۸۰ درصد	دی کلرو متان
Stachys aucheri	>۲۰۰	۶۱/۱±۱/۰	۱۳/۸±۰/۶
Stachys benthamiana	۱۵۰/۵±۰/۵	۸۷/۰±۱/۱	۲۱/۵±۰/۸
Stachys inflata	۴۷/۵±۰/۷	۲۱/۹±۰/۶	۵/۴±۰/۶
Kojic acid		۹/۲±۱/۱ میکرومولار	

مقادیر به صورت میانگین ± S.E.M سه الی چهار آزمون مختلف گزارش شده است.

* غلظت لازم برای مهار فعالیت آنزیم به میزان ۵۰ درصد

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانت و محتوای تام فنولی عصاره‌های مختلف سه گونه *Stachys*

فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای تام فنولی عصاره دی کلرومتانی، متانولی و متانول ۸۰ درصد سه گونه مختلف *Stachys* به ترتیب با استفاده از آزمون روبش رادیکال‌های DPPH و ارزیابی فولین – سیو کالتو مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴).

جدول ۴) فعالیت بازدارنگی ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH و محتوای تام فنولی عصاره‌های متانولی و دی کلرومتانی گونه‌های ***Stachys***

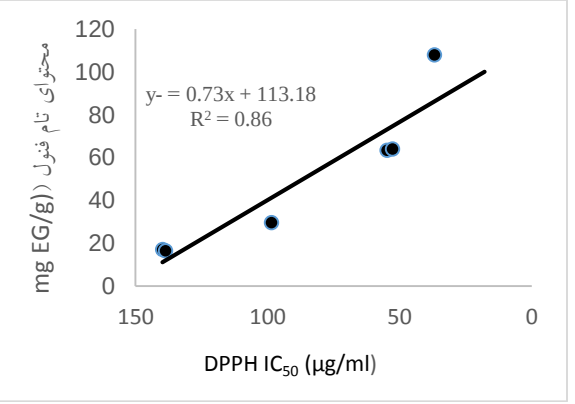
نام گیاه	نوع عصاره	DPPH IC_{50} (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	محتوای تام فنولی (میلی‌گرم اکی والان/گرم)**
Stachys aucheri	متانول	۱/۳±۶۳/۴	۰/۹±۵۴/۷
	متانول ۸۰٪	۰/۳±۱۷/۰	۲/۲±۱۳۹/۷
	دی کلرومتان	غیرفعال	۰/۷±۴۴/۹
Stachys benthamiana	متانول	۰/۵±۶۴/۰	۰/۴±۵۲/۷
	متانول ۸۰٪	۱۶/۴ ±۰/۲	۱/۸±۱۳۸/۶
	دی کلرومتان	غیرفعال	۰/۶±۱۷/۹
Stachys inflata	متانول	۰/۴±۱۰۸/۰	۰/۸±۳۶/۸
	متانول ۸۰٪	۰/۲±۲۹/۵	۲/۱±۹۸/۵
	دی کلرومتان	غیرفعال	۱/۲±۲۴/۰
Quercetin		۰/۱±۱۲/۰	

مقادیر به صورت میانگین ± S.E.M سه الی چهار آزمون مختلف گزارش شده است.

*میکروگرم گرم عصاره گیاه/میلی‌لیتر DPPH (10^{-4} مولار)

**میلی‌گرم اکی والان گالیک اسید/ ۱ گرم گیاه خشک

همان‌طور که مشاهده می‌گردد محتوای تام فنولی عصاره‌های متانول ۸۰ درصد هر سه گونه مورد بررسی بسیار بالاتر از عصاره‌های متانولی می‌باشد (محتوای تام فنولی عصاره متانول ۸۰ درصد سه گونه در محدوده ۹۸/۵–۱۳۹/۸ و عصاره متانولی ۳۶/۸–۵۴/۷ (میلی‌گرم اکی والان گالیک اسید/۱ گرم گیاه خشک) می‌باشد). همان‌طور که انتظار می‌رود میزان فعالیت آنتی اکسیدانت این گونه‌ها در ارتباط مستقیم با میزان محتوای فنولی این ترکیبات بوده و رابطه خطی بین این دو متغیر معنی‌دار می‌باشد ($P<0/05$ و ضریب تعیین رگرسیون ۰/۸۶) (نمودار ۱).



نمودار ۱) بررسی ارتباط میان محتوای تام فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانت عصاره‌های مختلف گونه‌های مختلف استاخیس مورد ارزیابی

Fig. 1) Assesment of the relationship between total phenol content and anti-oxidant activity of different *stachys* extract under evaluation.

فعالیت آنتی اکسیدانت عصاره‌های متانول ۸۰ درصد سه گونه *Stachys* در روش ارزیابی روبش رادیکال‌های آزاد DPPH (۲۹/۰-۱۶/۴=IC_{50} میکروگرم/میلی‌لیتر) قابل توجه و بیشتر از عصاره‌های متانول (۱۰۸/۰-۶۳/۴=IC_{50} میکروگرم/میلی لیتر) سه گونه مورد بررسی می‌باشد. عصاره‌های دی کلرومتانی این گونه‌ها در غلظت‌های مورد بررسی محتوای فنولی (۴۴/۹-۱۷/۹ (میلی‌گرم اکی والان/گرم) و فعالیت آنتی‌اکسیدانت ناچیزی دارند.

بحث

طی این مطالعه عصاره‌های متانولی، متانول ۸۰ درصد و دی کلرومتانی سه گونه مختلف *Stachys* که از نواحی مختلف ایران جمع‌آوری گردیده بود، مورد ارزیابی‌های مهاری آنزیم تیروزیناز و روبش رادیکال‌های آزاد قرار گرفت. مطالعات مختلف بیانگر اثرات آنتی اکسیدانت و تیروزیناز قابل توجه این گونه می‌باشند. بررسی‌های مختلف اثرات مهار کنندگی آنزیم تیروزیناز توسط عصاره اتانولی اندام‌های هوایی *St. lavandulifolia* را نشان داده است (IC_{50}=۳۳/۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر) (۱۳). بررسی محتوای فنولی این ترکیبات بیانگر حضور بالای ترکیبات فنولی در عصاره متانول ۸۰ درصد و با میزان کمتر در عصاره متانولی و با درصد ناچیز در عصاره دی‌کلرومتانی این دسته از ترکیبات است. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانت با استفاده از روش فولین-سیکالتو (۱۶) نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانت با میزان محتوای تام فنولی در ارتباط مستقیم می‌باشد و عصاره‌های متانول ۸۰ درصد بیشترین محتوای فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانت را دارا می‌باشند. بررسی فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز نشان دهنده قدرت مهاری قابل توجه عصاره‌های دی کلرومتانی می‌باشد و در این میان عصاره دی کلرومتانی گونه *St. inflata* بیشترین فعالیت مهاری این آنزیم را نشان داده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات پیشین که بیانگر حضور ترکیباتی مشابه ترکیبات ترپنی در عصاره دی‌کلرومتانی این گونه می‌باشند (۸) می‌توان پیشنهاد گرد که فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز این گیاهان عمدتاً به واسطه حضور ترکیبات شبه ترپنی یا سایر ترکیبات غیرقطبی می‌باشند و احتمالاً این ترکیبات با میزان بیشتری در عصاره دی کلرومتانی *St. inflata* نسبت به دو گونه دیگر، یافت می‌شود. ولی برای مشخص شدن نوع ترکیبات مؤثره و تعیین ساختار مولکولی آن‌ها می‌بایست عصاره مذکور با روش‌های کروماتوگرافی و با راهنمایی آزمون‌های زیستی مناسب خالص‌سازی شده و سپس با روش‌های طیف سنجی این ترکیبات تعیین ساختار شیمیایی گردند.

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این واقعیت است که گیاه سنبله‌ای به ویژه گونه *St. inflata* در کنار سایر فعالیت بیولوژیک قابل توجه خود، می‌تواند به‌عنوان گونه گیاهی مهمی جهت فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار کننده آنزیم تیروزیناز مورد توجه قرار گیرد و در صنایع آرایشی بهداشتی و غذایی و به ویژه در صنایع دارویی به‌عنوان درمان کمکی در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند پارکینسون مورد استفاده قرار گیرد.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل حمایت‌های همه جانبه خود سپاسگزاری می‌گردد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Ullah S, Son S, Yun HY, et al. Tyrosinase Inhibitors: A Patent Review (2011-2015). Expert Opin Ther Pat 2016; 26(3): 347-62.
2.Chai W-M, Wei M-K, Wang R, et al. Avocado Proanthocyanidins as a Source of Tyrosinase Inhibitors: Structure Characterization, Inhibitory Activity, and Mechanism. J Agric Food Chem 2015; 63(33): 7381-7.
3.Karim AA, Azlan A, Ismail A, et al. Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Wrinkles and Tyrosinase Inhibitory Activities of Cocoa Pod Extract. BMC Complement Altern Med 2014; 14(1): 381.
4.Orhan IE, Khan MT. Flavonoid Derivatives as Potent Tyrosinase Inhibitors–A Survey of Recent Findings Between 2008-2013. Curr Top Med Chem 2014; 14(12): 1486-93.
5.Yang YF, Lai XY, Lai GY, et al. Purification and Characterization of a Tyrosinase Inhibitor from Camellia Pollen. J Func Foods 2016; 27: 140-9.
6.Hseu YC, Cheng KC, Lin YC, et al. Synergistic Effects of Linderanolide B Combined with Arbutin, PTU or Kojic Acid on Tyrosinase Inhibition. Curr Pharm Biotechnol 2015; 16(12): 1120-6.
7.Jamzad Z. Florestic of Iran (Lamiaceae). 1st ed. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands, 2012, 1066. (Persian)
8.Tundis R, Peruzzi L, Menichini F. Phytochemical and Biological Studies of Stachys Species in Relation to Chemotaxonomy: A Review. Phytochemistry 2014; 102:7-39.
9.Salmaki Y, Zarre S, Govaerts R, et al. A Taxonomic Revision of the Genus Stachys (Lamiaceae: Lamioideae) in Iran. Bot J Linn Soc 2012; 170(4): 573-617.
10.Jassbi AR, Miri R, Asadollahi M, et al. Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Nine Species of Woundwort (Stachys) Plants. Pharm Biol 2014; 52(1): 62-7.
11.Tavakkoli M, Miri R, Jassbi AR, et al. Carthamus, Salvia and Stachys Species Protect Neuronal Cells Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis. Pharm Biol 2014; 52(12): 1550-7.
12.Namjooyan F, Azemi M, Hejazi H, et al. Antioxidant capacity and total phenolic content of Stachys aucheri endemic plant to Persia. Planta Medica 2011; 77(12): PL95.
13.Kocak MS, Uren MC, Calapoglu M, et al. Phenolic Profile, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of Stachys Annua Subsp. Annua Var. Annua. S Afr J Bot 2017; 113: 128-32.
14.Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature 1958; 181(4617): 1199-200.
15.Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Viticul 1965; 16(3): 144-58.
16.Zarrabi MM, Asghari B, Maryamabadi A, et al. Phytochemical Properties and Inhibitory and Antioxidant Effects of the Decoction, Infusion and Hydro-Alcoholic Extract of Nepeta Racemosa on α-Amylase and α-Glucosidase. Iran South Med J 2019; 22(2): 90-105. (Persian)

Original Article

Phenolic Content, Antioxidant Effects and Tyrosinase Inhibitory Activity of Extract of Some *Stachys* Species from Iran

N. Edraki (PhD)[1*] M. Asadollahi (PhD)[1], H. Hemmatian (PharmD)[2], M. Khoshneviszadeh (PhD)[1,2], OR. Firuzi (PhD)[1], AH. Sakhteman (PhD)[2], AR. Jasbi (PhD)[1**]

[1] Medicinal and Natural Products Chemistry Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

[2] Medicinal chemistry department, School of pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

(Received 30 Jul, 2018 Accepted 2 Jun, 2019)

Abstract

Background: Given the importance of *Stachys* genus in Iran and their significant biological activity, we collected three species of this plant: *St. aucheri* Benth., *Stachys benthamiana* Boiss and *St. inflata* Benth. from different regions of Iran. We examined the free radical scavenging potential, total phenol content and tyrosinase inhibitory activity of their methanol, methanol 80% and dichloromethane extracts.

Materials and Methods: Antioxidant activity and total phenol content of the mentioned extracts were assessed using DPPH and FolinCiocalteu reagent, respectively. The inhibitory activity of the extracts on tyrosinase was also investigated.

Results: Total phenol content of different extracts was high in the extracts as 98.5-139.7 mg eq. gallic acid/g in methanol 80% extract, 36.8-54.7 mg eq. gallic acid/g in methanol extract and 17.9-44.9 mg eq. gallic acid/g in dichloromethane extract. Furthermore, their antioxidant activity was correlated with total phenol content of the extracts. Methanol 80% extract had the highest total phenol content and antioxidant activity. Evaluation of the tyrosinase inhibitory potential of the extracts revealed that *St.inflata* exhibited a considerable inhibitory potential (IC_{50}= 5.4 ± 0.6 µM).

Conclusion: It can be concluded that tyrosinase inhibitory activity of *Stachys* genus might be due to the less polar compounds and these compounds are mostly present in the dichloromethane extract of *St. inflatai* over *St. aucheri and St. benthamiana*

Keywords: Tyrosinase, tyrosinase inhibition, total phenol, DPPH, antioxidant activity, *Stachys*

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Edraki N, Asadollahi M, Hemmatian H, Khoshneviszadeh M, Firuzi OR, Sakhteman AH, Jasbi AR. Phenolic Content, Antioxidant Effects and Tyrosinase Inhibitory Activity of Extract of Some Stachys Species from Iran. Iran South Med J 2019;22(4):191-199

Copyright © 2019 Edraki, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*]*Address for correspondence:* Medicinal and Natural Products Chemistry Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, Email: jassbiar@sums.ac.ir
Email: jassbiar@sums.ac.ir
*ORCID: 0000-0001-8306-2642
**ORCID: 0000-0003-3918-361X