بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی آنزیمی عصاره‌های مختلف گیاه دارویی *Salvia hypoleuca* Benth.

بهور اصغری[1*]، سودابه مفاخری[2]، مجید قربانی نهوجی[3]

[1]دانشیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

[2]استادیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

[3]استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۰/٤/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/٦/۱۰

چکیده

گونه‌های مختلف جنس مریم گلی (*Salvia*)، گیاهانی هستند که از اسانس‌ها و عصاره‌های آنها در صنایع مختلف دارویی، غذایی و آرایشی به شکل گسترده‌ای استفاده می‌شود. *Salvia hypoleuca* Benth. یک گونه بومی این جنس در ایران است که اندام هوایی آن در مرحله گلدهی در تابستان ۱۳۹۹ از اطراف شهرستان الموت استان قزوین جمع‌آوری شد. در مطالعه حاضر محتوای فنل کل، فلاونوئید، ساپونین و تانن، چهار عصاره هگزانی، اتیل‌استاتی، متانولی و آبی که با استفاده از روش ماسراسیون تهیه شده بودند، مورد بررسی قرار گرفته است. خواص آنتی‌اکسیدانتی این عصاره‌ها نیز با استفاده از روش‌های DPPH، ABTS، فسفومولیبدنیوم و کیلیت‌کنندگی آهن و قدرت مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و تیروزیناز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج به دست آمده عصاره اتیل‌استاتی به ترتیب با مقادیر ۸۷/۰۷ و ۱٦۳/۸٤ میلی‌گرم معادل گالیک اسید و ساپونین کوئیلاجا بر گرم عصاره دارای بالاترین مقدار محتوای فنلی و ساپونینی بود. عصاره آبی این گیاه نیز با دارا بودن به ترتیب ۳۳/۹۷ و ۵/۳٤ میلی‌گرم معادل کوئرستین و کتچین برگرم عصاره دارای بالاترین محتوای فلاونوئیدی و تاننی متراکم بود. عصاره اتیل‌استاتی بالاترین قدرت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد ABTS، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی تام، قدرت کلیت کنندگی یون فروس و قدرت بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و تیروزیناز را از خود نشان داد. پتانسیل بالای عصاره اتیل‌استاتی در خواص بیولوژیکی نظیر آنتی‌اکسیدانتی و ضدرادیکالی، می‌تواند به محتوای بالای متابولیتی آن به ویژه، ترکیبات فنولی و ساپونینی مربوط باشد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که این گیاه منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه فعال است که بهترین حلال استخراجی برای این ترکیبات اتیل‌استات می‌باشد. نتایج این تحقیق پتانسیل احتمالی گیاه *S. hypoleuca* را برای استفاده‌های دارویی، به ویژه برای مقابله با دیابت و بیماری‌های پوستی تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، فیتوشیمیایی، مریم گلی (*Salvia hypoleuca* Benth.)، مهار آنزیمی

*نویسنده مسئول: asghari@eng.ikiu.ac.ir

مقدمه

طی سالیان اخیر تحقیق بر روی گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مزمنی نظیر دیابت، آلزایمر و غیره گسترش یافته است. دلیل این امر پتانسیل‌های دارویی به اثبات رسیده از متابولیت‌های ثانویه موجود در این گیاهان است (Davies and Espley, 2013). برای مثال ترکیبات فنولی جزء معروف‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که خواص بیولوژیکی متفاوتی نظیر ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانتی و غیره از خود نشان داده‌اند. خواص آنتی‌اکسیدانتی متابولیت‌های ثانویه نقش اساسی در اثرات درمانی آنها بر بیماری‌های مرتبط با استرس‌های اکسیداتیو دارند (Craft et al., 2012). در حقیقت عدم تعادل بین میزان تولید و از بین رفتن رادیکال‌های آزاد توسط سیستم دفاعی بدن استرس اکسیداتیو گفته می‌شود (Sies, 2020). رادیکال‌های آزاد به شکل مؤثری در ایجاد و گسترش بیماری‌های مختلف نظیر سرطان، آلزایمر و دیابت نقش دارند (Forman and Zhang, 2021). ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی سنتزی نظیر بوتیلیتید هیدروکسی آنیزول[1] (BHA) و بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن[2] (BHT) مهم‌ترین ترکیباتی هستند که در صنایع غذایی استفاده می‌شوند. با این وجود استفاده از این مواد به علت دارا بودن اثرات جانبی سمی، رفته رفته محدودتر می‌گردد. به این ترتیب مطالعات اخیر بر روی جایگزین کردن آنتی‌اکسیدانت‌های سنتزی با ترکیبات طبیعی به دست آمده از منابع طبیعی مانند گیاهان دارویی، تمرکز کردند (Pérez-Torres et al., 2021). بسیاری از داروهایی که در حال حاضر جهت درمان بیماری‌های گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرند، بر اساس مکانیسم مهارکنندگی آنزیم‌های خاص و تنظیم میزان فعالیت آنها عمل می‌کنند (Ali et al., 2021). در توضیحی مشابه با آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توان گفت که وجود عوارض جانبی در مهارکننده‌های آنزیمی سنتزی باعث شده است که جستجو برای یافتن مهارکننده‌های آنزیمی طبیعی یکی از مهم‌ترین زمینه‌های تحقیقاتی پژوهشگران باشد. به همین دلیل بررسی عملکرد مهارکنندگی آنزیمی عصاره‌های گیاهی جهت مطالعه خواص مختلف دارویی آنها یکی از مرسوم‌ترین روش‌های مورد استفاده است (Jin et al., 2012).

جنس مریم گلی با دارا بودن بیش از ۹۰۰ گونه از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین اعضای خانواده Lamiaceae است که در فلور ایران حدود ٦١ گونه از این جنس وجود دارد (Jamzad, 2012). استفاده از گیاهان این جنس در طب سنتی کشورهای مختلف برای درمان انواع بیماری‌ها نظیر سرماخوردگی، مشکلات گوارشی، برونشیت، انواع دردها و عفونت‌ها و بیماری‌های التهابی سابقه طولانی دارد (Li et al., 2013; Lopresti, 2017). وجود متابولیت‌های ثانویه مختلف نظیر ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی با انواع خواص بیولوژیکی نظیر آنتی‌اکسیدانتی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و ضدویروسی در اعضای این جنس گزارش شده است (Uysal et al., 2021; Baghaenezhad et al., 2021). گونه‌های مختلف جنس مریم‌گلی، گیاهان معطری هستند که علاوه بر وجود تعداد زیادی مقالات علمی در مورد فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی و محتوای شیمیایی آنها، به واسطه استفاده‌های فراوانی که در صنایع مختلف غذایی دارویی و آرایشی بهداشتی دارند، از نظر اقتصادی نیز دارای اهمیت می‌باشند. گونه *Salvia hypoleuca* یکی از ۱۷ گونه بومی مریم گلی در ایران است که به صورت طبیعی در بخش‌های مختلف به ویژه در دامنه‌های رشته کوه‌های البرز در استان‌هایی نظیر تهران، البرز، مازندران، گیلان و قزوین رشد

1. Butylated hydroxy anisole
2. Butylated hydroxy toluene

می‌نمایند و به نام مریمی (Maryami) نیز مشهور است (Eidi et al., 2006). بر اساس مطالعات انجام شده خواص مختلف پزشکی و بیولوژیکی نظیر ضددردی، ضداسترسی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانتی عصاره‌ها و اسانس این گیاه گزارش شده است (Eidi et al., 2006; Javdan and Estakhr, 2012; Firuzi et al., 2013; Monsef Esfahani et al., 2020;). با توجه به اینکه گونه *S. hypelouca* یک گیاه معطر است ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آن نیز در مطالعات پیشین بررسی و شناسایی شده است. ترکیباتی نظیر کاریوفیلن اکسید، کاریوفیلن، بی سیکلو ژرماکرن، ژرماکرن-دی، ویریدیفلورول، اسپاتولنول و دلتا المن به عنوان اصلی‌ترین اجزای موجود در اسانس این گیاه شناسایی شده اند (Bigdeli et al., 2005; Nickavar et al., 2005; Habib et al., 2016). علاوه بر موارد فوق حضور ترکیبات دیگری نظیر رزمارینیک اسید (Shekarchi et al., 2012)، استرول‌ها، دی ترپن‌ها و تری ترپن‌ها (Saeidnia et al., 2012) در این گیاه به اثبات رسیده است. با توجه به مطالب ذکر شده، در این پژوهش به بررسی محتوای متابولیتی و خواص آنتی‌اکسیدانتی و مهارکنندگی آنزیمی عصاره‌های مختلف به دست آمده از گیاه *S. hypoleuca* پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه: نمونه گیاه *S. hypoleuca* در مرحله گلدهی در تابستان ۱۳۹۹ از اطراف شهرستان الموت واقع در استان قزوین جمع‌آوری شد. شناسایی گیاه در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی انجام گرفت (Hedge, 1982; Jamzad, 2012) و کد هرباریومی 7097-IMPH به آن اختصاص یافت. قبل از فرآیند عصاره‌گیری اندام هوایی گیاه مورد نظر در فضایی دور از نور مستقیم خورشید خشک گردید.

فرآیند عصاره‌گیری: عصاره‌گیری از نمونه گیاهی در این تحقیق به روش خیساندن انجام گرفت. برای این منظور ۱۰ گرم از پودر گیاه، وزن شده و در ظروف عصاره‌گیری به همراه ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال به مدت ۲٤ ساعت به هم زده شد (Asghari et al., 2019). حلال‌های مورد استفاده عبارت بودند از هگزان، اتیل‌استات، متانول و آب. ظروف عصاره‌گیری توسط ورقه‌های آلومینیومی پوشیده شد تا محتویات آن در معرض نور قرار نگیرند. فرآیند مذکور سه مرتبه بر روی هر نمونه تکرار گردید. عصاره‌های به دست آمده توسط حلال‌های آلی، بعد از صاف شدن، توسط تبخیرکننده دوار، در فشار کاهش یافته و در دمای ٤٠ درجه سانتیگراد، تغلیظ و خشک گردید. عصاره‌ی آبی تهیه شده نیز پس از صاف شدن با استفاده از فریز درایر خشک شد.

بررسی محتوای فیتوشیمیایی

تعیین محتوای فنلی کل: برای تعیین محتوای فنلی کل نمونه‌های گیاهی مورد بررسی، از روش رنگ سنجی فولین-سیکالتیو استفاده گردید (Gheshlaghpour et al., 2021). برای این منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول نمونه با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد حجمی از معرف فولین-سیکالتیو اضافه شد. پس از اینکه مخلوط حاصل به مدت ٦ دقیقه در تاریکی تکان داده شد، ۸۰ میکرولیتر از محلول ۷/۵ درصد سدیم کربنات به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق باقی ماند و در نهایت جذب آن در طول موج ۷٤۰ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از محلول‌های

با غلظت بین ۱ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گالیک اسید استفاده شد. نتایج مربوط به محتوای فنلی تام نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره خشک (mg GAEs/g) بیان گردیده است (جدول ۱).

جدول ۱: میزان محتوای فنلی (TPC)، فلاونوئیدی (TFC)، ساپونینی (TSC) و تاننی متراکم (TTC) عصاره‌های گیاه *S. hypoleuca*

نمونه	TPC (mg GAEs/g)	TFC (mg QEs/g)	TSC (mg QAEs/g)	TTC (mg TAEs/g)
عصاره هگزانی	۲۹/۸۳ ± ۱/٦۷ d	۱۰/۹۳ ± ۱/۷٤ c	۱۲٤/۲٦ ± ۲/٦٦ b	-
عصاره اتیل‌استاتی	۸۷/۰۷ ± ۳/۰۸ a	۱٦/۱٤ ± ۱/۹٤ b	۱٦۳/۸٤ ± ۳/٤٦ a	-
عصاره متانولی	٦٤/٤۳ ± ۲/۵۵ c	۳۲/۷٦ ± ۲/۳۹ a	۷۰/۷۵ ± ۳/۵۹ c	۳/٤۱ ± ۰/٤٦ b
عصاره آبی	۷۱/۹۷ ± ۲/۵۸ b	۳۳/۹۷ ± ۲/۷۳ a	٤۱/۵۳ ± ۲/۷٤ d	۵/۳٤ ± ۰/۷۷ a

نتایج دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۲: قدرت به دام اندازی رادیکال‌های DPPH و ABTS عصاره‌های گیاه *S. hypoleuca*

نمونه	DPPH (IC_{50} µg/ml)	ABTS (IC_{50} µg/ml)
عصاره هگزانی	≤ ۵۰۰	≤ ۵۰۰
عصاره اتیل‌استاتی	۸۰/۷۳ ± ۳/۳۱ b	۳۸/۰۹ ± ۱/۸۹ a
عصاره متانولی	٦۵/۷۳ ± ۲/۱۷ a	٤۸/۸۵ ± ۱/۱۲ b
عصاره آبی	٦۸/۵٤ ± ۲/٤۵ a	٤۹/۲۳ ± ۲/۱٤ b

تعیین محتوای ساپونینی کل: محتوای ساپونینی نمونه‌های تهیه شده در این تحقیق با استفاده از روش وانیلین–سولفوریک اسید تعیین گردید (Asghari et al., 2019). به این ترتیب که محلول ۸ درصد وانیلین و سولفوریک اسید (۷۲ درصد) به ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ها با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. مخلوط حاصل در دمای ٦۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. پس از اینکه محلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه سرد شدند جذب آنها در ۵۳۸ نانومتر قرائت گردید. در این روش ساپونین کوئیلاجا به عنوان ماده رفرنس استفاده شد و محتوای ساپونینی کل نمونه‌ها به صورت معادل میلی‌گرم ساپونین کوئیلاجا بر گرم عصاره (mg QAEs/g) بیان گردید (جدول ۱).

تعیین محتوای تانن متراکم: محتوای تانن متراکم عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش وانیلین که پیشتر نیز گزارش شده است، تعیین گردید (Bekir et al., 2013). برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ها و یا کتچین به عنوان استاندارد، با ۱۵۰ میکرولیتر از واکنش‌گر وانیلی (محلول ۱ درصد وانیلین در اسید سولفوریک ۷ مولار) مخلوط گردید و پس از گذشت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق جذب نمونه در ۵۰۰ نانومتر قرائت گردید. برای تهیه نمونه بلانک، عصاره‌ها و استاندارد کتچین در محلول ۷ مولار اسید سولفوریک حل گردید و جذب آن از میزان جذب نمونه‌ها کسر گردید.

در نهایت محتوای تانن متراکم نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم معادل کتچین بر گرم عصاره (mg CEs/g) محاسبه و گزارش گردید (جدول ۱).

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانتی

تعیین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH: در

این تحقیق از روش رنگ‌سنجی جهت تعیین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط نمونه‌های به دست آمده از گیاه *S. hypoleuca* استفاده شد (Mafakheri and Asghari, 2018). به این منظور ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از نمونه‌های گیاهی تهیه شد و ٤٠ میکرولیتر از این محلول با ١٦٠ میکرولیتر از محلول ٠/١ میلی‌مولار DPPH در متانول مخلوط گردید. جذب مخلوط حاصل پس از آنکه ٣٠ دقیقه در دمای اتاق در فضای تاریک قرار داده شد در طول موج ٥١٧ نانومتر خوانده شد.

تعیین قدرت مهار رادیکال‌های آزاد ABTS: اندازه‌گیری قدرت به دام‌اندازی رادیکال کاتیون‌های ABTS با استفاده از روش Zengin و همکاران (٢٠١٤) با اندکی تغییر انجام شد. به طور خلاصه جهت تهیه رادیکال کاتیون‌های ABTS، محلول ٧ میلی‌مولار از این ترکیب با محلول ٢/٤٥ میلی‌مولار از پتاسیم پرسولفات وارد واکنش گردید و مخلوط واکنش به مدت ١٥ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت. قبل از شروع تست محلول ABTS با اضافه کردن متانول در حدی رقیق گردید که جذب آن در طول موج ٧٣٤ نانومتر در حد ٠/٠٢ ± ٠/٧٠ باشد. برای انجام تست ١٠٠ میکرولیتر از محلول نمونه با غلظت‌های مختلف با ٢٠٠ میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط گردید و پس از ٣٠ دقیقه که در دمای اتاق قرار گرفت، جذب نمونه در ٧٣٤ نانومتر قرائت گردید.

درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS با استفاده از رابطه ١ محاسبه گردید:

رابطه (١).

$$\text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد} = \left(\frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}}\right) \times 100$$

محلول کنترل محلولی است که در آن به جای نمونه فقط حلال متانول وجود دارد. در نهایت نتایج مربوط به هر دو تست مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بر حسب IC_{50} محاسبه گردید (جدول ٢).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی کل: اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی کل عصاره‌های گیاه *S. hypoleuca* با استفاده از روش فسفومولیبدنیوم انجام گرفت (Zengin et al., 2014). در این روش احیاء Mo (VI) به Mo (V) و تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفات از یون Mo (V) پایه و اساس تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانتی نمونه به حساب می‌آید. به این منظور حجم ٣٠٠ میکرولیتر از محلول عصاره با غلظت معین و یا محلول آسکوربیک اسید با ٣ میلی‌لیتر از معرفی حاوی ٠/٦ مولار سولفوریک اسید، ٢٨ میلی‌مولار فسفات سدیم و ٤ میلی‌مولار مولیبدات آمونیوم ترکیب گردید. محلول به دست آمده به مدت ٩٠ دقیقه در دمای ٩٥ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سرد شدن و رسیدن دمای آن به دمای اتاق جذب آن در طول موج ٦٩٥ نانومتر ثبت شد. قدرت آنتی اکسیدانتی عصاره بر حسب معادل آسکوربیک اسید در هر گرم عصاره (mg AAEs/g) به دست آمد (شکل ١).

تعیین فعالیت کیلیت‌کنندگی یون فروس: برای اندازه‌گیری قدرت کیلت‌کنندگی یون فروس (Asghari et al., 2019) عصاره‌های گیاه *S. hypoleuca* به ١/٢ میلی‌لیتر از محلول نمونه ٢٠٠ میکرولیتر از محلول $FeCl_2$ با غلظت ٠/٧ میلی‌مولار اضافه گردید. پس از گذشت ٥ دقیقه واکنش با اضافه کردن محلول ١/٤ میلی مولار فروزین[1] شروع شد و بعد از اینکه مخلوط به‌مدت ١٠ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند جذب آن در ٥٦٢ نانومتر اندازه‌گیری شد.

1. Ferrozine

به عنوان واکنش کنترل از مخلوطی که فقط حاوی $FeCl_2$ و فروزین بود استفاده شد. در این تست ترکیب اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ماده رفرنس بود و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل EDTA بر گرم عصاره (mg EDTAEs/g) بیان گردید (شکل ۱) .

قدرت مهارکنندگی آنزیمی

تست مهار آنزیم آلفا-آمیلاز: ۵۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱۰ میکرولیتر از محلول آنزیم آلفا-آمیلاز با غلظت ۲۵ واحد بر میلی‌لیتر و ۱۵۰ میکرولیتر از محلول نشاسته ۱ درصد (w/v) با هم مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول سود به آن اضافه شد و ۲۰ میکرولیتر نیز معرف DNS به واکنش اضافه گردید. معرف DNS شامل ٤/٤ میلی‌مولار از ۳ و ۵-دی‌نیتروسالیسیلیک اسید، ۱۰٦ میکرومولار از پتاسیم سدیم تارتارات و سود بود. پس از اینکه مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت، جذب محلول در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در این تست از روی مقدار مالتوز تولید شده از هیدرولیز نشاسته محاسبه گردید (Asghari et al., 2019). نتایج به دست آمده به صورت میلی‌مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره (mmol ACEs/g) گزارش شد (شکل ۲).

تست مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز: در ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محلول نمونه مورد نظر به همراه ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیم آلفا-گلوکوزیداز (۰/۵ واحد بر میلی‌لیتر) و ۱۲۰ میکرولیتر از بافر فسفات با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار و pH=٦/٨، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون شیکرانکوباتور قرار گرفت. پس از افزودن۲۰ میکرولیتر محلول سوبسترای پارا-نیتروفنیل-α-D-گلوکوپیرانوز (PNPG) به هر چاهک واکنش آنزیمی آغاز شد. مخلوط واکنش دوباره به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس واکنش با اضافه کردن ۸۰ میکرولیتر از محلول ۰/۲ میلی‌مولار سدیم کربنات متوقف گردید. پس از این مرحله جذب محلول در طول موج ٤۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای هر آزمایش یک واکنش کنترل قرار داده شد که در آن به جای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، محلول بافر به مخلوط واکنش اضافه گردید. همچنین در نمونه شاهد، به جای عصاره، حلال متانول استفاده شد (Bahadori et al., 2016). نتایج به دست آمده بر حسب میلی‌مول آکاربوز بر گرم عصاره (mmol ACEs/g) گزارش گردید (شکل ۲).

تست مهار آنزیم تیروزیناز: بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌های مختلف گیاه *S. hypoleuca* بر روی آنزیم تیروزیناز بر اساس روشی که قبلاً گزارش شده انجام شد (Asghari et al., 2020). برای این منظور ٤۰ میکرولیتر از محلول L-تیروزین با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار و ۱٤۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=٦/٨) مخلوط گردید. پس از گذشت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق واکنش با اضافه شدن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نمونه و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم تیروزیناز در بافر فسفات (pH=٦/٨)، شروع شد و پس از ۱۵ دقیقه جذب مخلوط در ٤۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. واکنش بلانک نیز با اضافه کردن تمام واکنش‌گرها به جز آنزیم تیروزیناز انجام گرفت. در نهایت قدرت مهارکنندگی آنزیمی نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم معادل کوجیک اسید بر گرم عصاره (mg CAEs/g) گزارش گردید (شکل ۳).

آنالیز آماری

داده‌های آزمایشی مربوط به صفات اندازه‌گیری شده، با محاسبه میانگین سه تکرار به دست آمده است.

مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد ($P<0/05$) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد.

نتایج

میزان محتوای متابولیت‌های ثانویه، شامل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، ساپونینی و تاننی عصاره‌های به دست آمده از گیاه *S. hypoleuca* که با استفاده از حلال‌های مختلف (هگزان، اتیل استات، متانول و آب) تهیه شده، در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در مقدار محتوای متابولیتی این عصاره‌هاست. عصاره اتیل استاتی این گیاه با مقدار ۸۷/۰۷ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره دارای بالاترین محتوای فنلی تام بود. این در حالی است که عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب با مقادیر ۷۱/۹۷ و ٦٤/٤٣ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره در رتبه‌های بعدی از نظر میزان محتوای فنولی قرار دارند. عصاره هگزانی گیاه *S. hypoleuca* با دارا بودن ۲۹/۸۳ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره کمترین مقدار محتوای فنولی را از خود نشان داد. بر اساس نتایج مربوط به اندازه‌گیری محتوای فلاونوئیدی عصاره‌های به دست آمده از این گیاه دارای محتوای فلاونوئیدی در گستره ۱۰/۹۳ (عصاره هگزانی) تا ۳۳/۹۷ (عصاره آبی) میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم عصاره می‌باشند. عصاره متانولی این گونه از مریم گلی نیز با ۳۲/۷٦ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم عصاره به همراه عصاره اتیل‌استاتی از نظر آماری دارای بالاترین محتوای فلاونوئیدی بود. تعیین محتوای تانن‌های متراکم موجود در عصاره‌های تهیه شده از گیاه *S. hypoleuca* که با استفاده از یک روش رنگ‌سنجی انجام گرفت، نشان داد که فقط عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب با مقادیر ٥/٣٤ و ۳/٤۱ میلی‌گرم معادل کتچین بر گرم عصاره دارای این ترکیبات می‌باشند. بر اساس نتایج به دست آمده عصاره‌های هگزانی و اتیل‌استاتی حاوی مقادیر قابل سنجشی از تانن‌های متراکم نبودند. علاوه بر موارد فوق محتوای ساپونینی کل عصاره‌های مختلف تهیه شده از گیاه *S. hypoleuca* نیز تعیین گردید. بر اساس اندازه‌گیری انجام شده عصاره اتیل‌استاتی این گیاه با ١٦٣/٨٤ میلی‌گرم معادل ساپونین کوئیلاجا بر گرم عصاره دارای بالاترین مقدار ساپونین بود. همچنین عصاره هگزانی این گیاه نیز با دارا بودن ١٢٤/٢٦ میلی‌گرم معادل ساپونین کوئیلاجا بر گرم عصاره محتوای ساپونینی قابل توجهی از خود نشان داد.

خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد عصاره‌های مختلف به دست آمده از گیاه *S. hypoleuca* توسط روش‌های DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج دو روش فوق برحسب IC_{50} در جدول ۲ نشان داده شده است. IC_{50} غلظتی از عصاره گیاهی است که می‌تواند ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد. بر اساس نتایج به دست آمده عصاره‌های متانولی و آبی گیاه *S. hypoleuca* به‌ترتیب با IC_{50} معادل ٦٥/٧٣ و ٦٨/٥٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH را از خود نشان دادند. اگرچه عصاره اتیل‌استاتی این گیاه با IC_{50} معادل ۸۰/۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر قدرت ضد رادیکالی نسبی از خود نشان داد اما این عصاره از نظر آماری به شکل معنی‌داری ضعیف‌تر از عصاره‌های متانولی و آبی بود. این در حالی است که عصاره هگزانی با IC_{50} بیش از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قدرت چندانی در به دام اندازی رادیکال‌های DPPH از خود نشان نداد.

در تست به دام‌اندازی رادیکال های ABTS توسط عصاره‌های گیاه *S. hypoleuca* مشخص

گردید که نمونه‌ی اتیل استاتی این گیاه با IC_{50} معادل ۳۸/۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین پتانسیل می‌باشد. در رده‌های بعد عصاره‌های متانولی و آبی به ترتیب با مقادیر IC_{50} معادل ٤٨/٨٥ و ٤٩/٢٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داشتند که قدرت ضد رادیکالی تقریباً یکسانی از خود نشان داده‌اند و بر طبق آنالیز آماری انجام شده قدرت ضدرادیکالی این دو عصاره اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند. عصاره هگزانی این گیاه در این تست نیز قابلیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد را از خود نشان نداد.

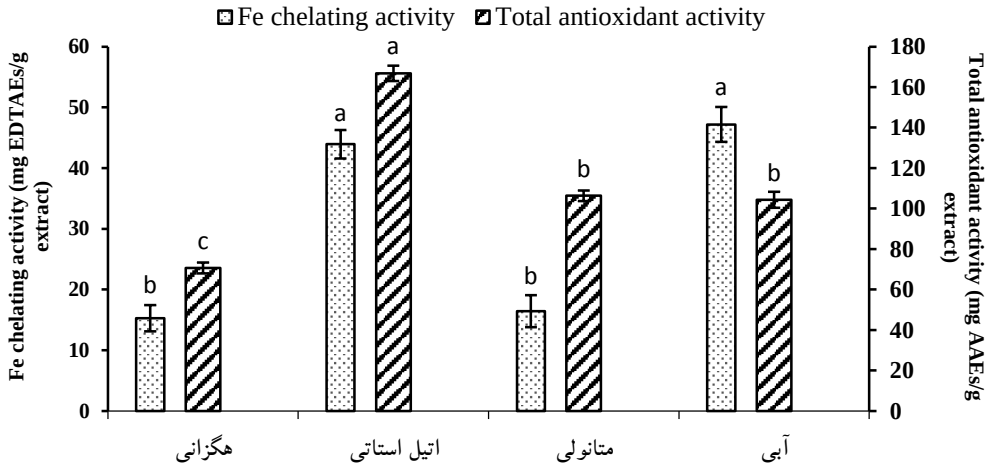
فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌های این گیاه همچنین از طریق اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل با روش فسفومولیبدنیوم و توانایی کیلیت‌کنندگی یون فروس نیز ارزیابی گردید. نتایج این تست‌ها نیز به ترتیب بر حسب میلی‌گرم معادل آسکوربیک اسید و EDTA بر گرم عصاره در شکل ۱ آورده شده است. تست آنتی اکسیدانتی کل نشان داد که عصاره اتیل-استاتی با ١٦٦/٨٣ میلی‌گرم معادل آسکوربیک اسید بر گرم عصاره بالاترین توان آنتی‌اکسیدانتی را دارا می باشد. این عدد برای عصاره‌های متانولی و آبی به ترتیب برابر ١٠٦/٣٣ و ١٠٤/٣٦ میلی‌گرم معادل آسکوربیک اسید بر گرم عصاره بود که توان آنتی‌اکسیدانتی تقریباً یکسان این دو عصاره را نشان می‌دهد.

تمامی عصاره‌های تهیه شده از گیاه *S. hypoleuca* قابلیت کیلیت‌کنندگی یون فروس را از خود نشان دادند. همانگونه که در شکل ۱ قابل مشاهده است، عصاره آبی و اتیل استاتی به دست آمده از این گیاه قدرت کیلیت‌کنندگی بالاتری در مقایسه با سایر عصاره‌ها از خود بروز دادند (به ترتیب ٤٧/١٩ و ٤٣/٩٣ میلی‌گرم معادل EDTA در گرم عصاره). این در حالی است که عصاره متانولی و هگزانی به ترتیب با ١٦/٤٣ و ١٥/٢٩ میلی‌گرم معادل EDTA برگرم عصاره پایین‌ترین قدرت کیلیت‌کنندگی یون فروس را دارا بود.

در این مطالعه تأثیر مهارکنندگی عصاره‌های گیاه *S. hypoleuca* که با استفاده از حلال‌های مختلف استخراجی تهیه شده‌اند، بر روی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بر حسب میلی مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده عصاره هگزانی این گیاه (٥/٢٤ میلی‌مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره) به شکل قابل توجهی در مقایسه با عصاره‌های متانولی (٣/٨٩ میلی‌مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره) و آبی (٣/١٤ میلی‌مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره) دارای اثر بازدارندگی قوی‌تری بر آنزیم آلفا-آمیلاز می باشد. این در حالی است که قدرت مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز برای عصاره اتیل‌استاتی این گیاه با ٦/٨٥ میلی مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره بالاترین مقدار بود. این عصاره بر روی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز نیز با ١٩/٢٣ میلی‌مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره دارای قوی‌ترین پتانسیل مهارکنندگی بود و پس از آن عصاره هگزانی این گیاه با ١٤/٥٤ میلی مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره اثر بازدارندگی قابل قبولی از خود نشان داد. دو عصاره متانولی و آبی با مقادیر پایین‌تر از ۹ میلی مول معادل آکاربوز بر گرم عصاره در مقایسه با عصاره‌های اتیل استاتی و هگزانی قدرت مهار ضعیف‌تری بر روی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز داشتند.

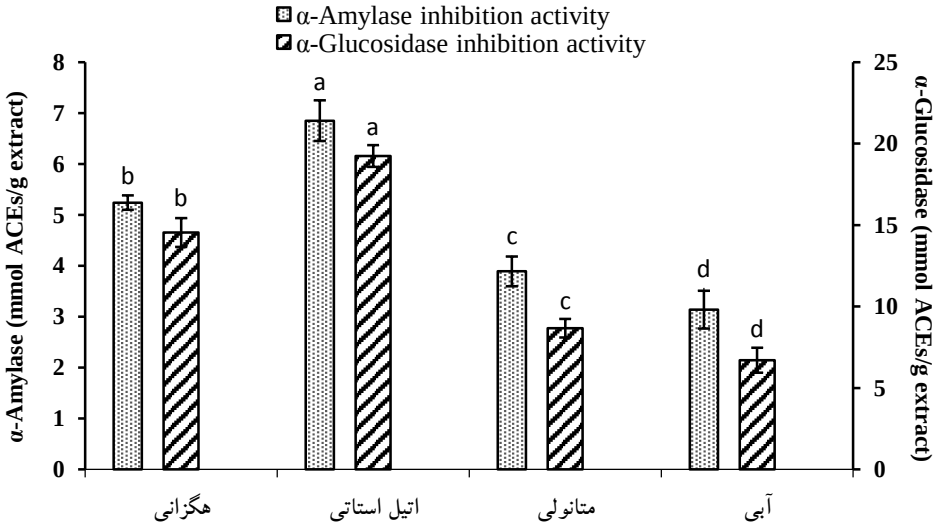
در خصوص بررسی پتانسیل بازدارندگی فعالیت آنزیم تیروزیناز (شکل ۳)، توسط عصاره‌های مختلف گیاه *S. hypoleuca* عصاره اتیل‌استاتی با ٤٨/٠٨ میلی‌گرم معادل کوجیک اسید بر گرم عصاره بالاترین قدرت مهارکنندگی را داشت. دو عصاره متانولی و آبی با ٣٥/٢٢ و ٣٤/٨١ میلی‌گرم معادل کوجیک اسید بر گرم عصاره دارای قدرت مهاری

نسبتاً خوبی بر روی آنـزیم تیروزینـاز اسـت. ایـن در حالی است که عصـاره هگزانـی بـا ۱۷/۲۱ میلـی‌گـرم معادل کوجیک اسید بر گرم عصاره در مقایسه با دیگر عصاره‌ها ضعیف‌ترین پتانسـیل مهـار ایـن آنـزیم را از خود نشان داد.



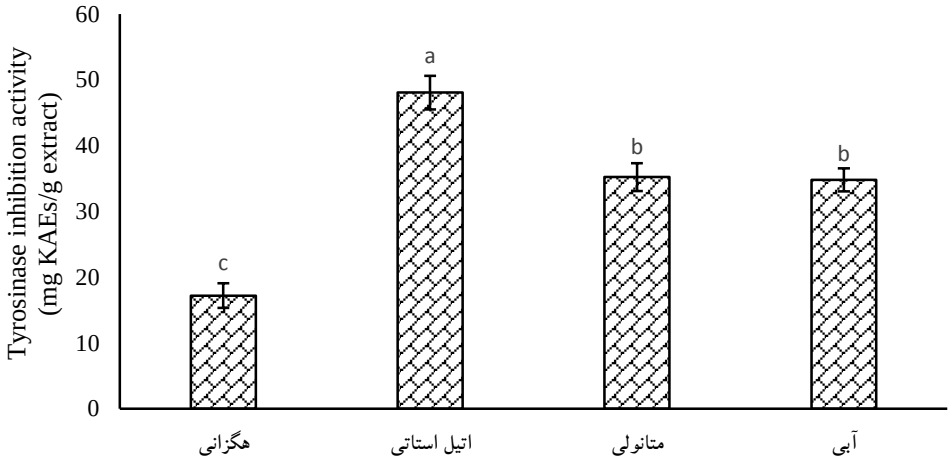
شکل ۱: قدرت کیلیت‌کنندگی یون فروس و آنتی‌اکسیدانتی تام عصاره‌های مختلف گیاه *S. hypoleuca*

(نتایج دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند)



شکل ۲: قدرت مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز توسط عصارهای مختلف گیاه *S. hypoleuca*

(نتایج دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند)



شکل ۳: قدرت مهارکنندگی آنزیم تیروزیناز توسط عصاره‌های مختلف گیاه *S. hypoleuca*

(نتایج دارای حروف متفاوت، از لحاظ آماری در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند)

بحث

اگرچه مصرف گیاهان دارویی گوناگون برای مقابله با بیماری‌ها، سابقه‌ای طولانی دارد، اما در حال حاضر به مانند گذشته این استفاده فقط بر پایه تجربه و آزمون و خطا نیست، بلکه نیازمند داشتن داده‌های علمی معتبر در خصوص انواع خواص بیولوژیکی و دارویی و تعیین ترکیبات مسئول ایجاد این خواص در گیاه است. به همین دلیل انجام بررسی‌های دقیق بر روی گیاهان مختلف جهت تعیین خواص بیولوژیکی احتمالی آنها در طی سال‌های اخیر گسترش فراوانی یافته است. در این تحقیق به بررسی محتوای متابولیتی و خواص بیولوژیکی عصاره‌های مختلف گونه بومی *S. hypoleuca* پرداخته شده است. بررسی محتوای فنولی عصاره‌های مختلف این گیاه نشان‌دهنده این بود که نوع حلال مصرفی در میزان محتوای فنولی استخراج شده در عصاره تأثیر معنی‌داری داشته است و عصاره اتیل‌استاتی دارای بالاترین مقدار این ترکیبات بود (جدول ۱). در مطالعات دیگری نیز میزان محتوای فنولی تام عصاره اتیل‌استاتی در مقایسه با سایر عصاره‌ها بالاتر بوده است. از آن جمله در پژوهشی که به بررسی توانایی حلال‌های مختلف در استخراج ترکیبات فنولی از اندام هوایی گیاه *Rumex japonicus* پرداخته است؛ عصاره اتیل‌استاتی در مقایسه با عصاره‌های هگزانی، کلروفرمی، اتانولی و آبی دارای بالاترین مقدار بود (Elzaawely et al., 2005). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، اتیل‌استات در مقایسه با هگزان و اتانول قدرت بالاتری در استخراج ترکیبات فنولی از قسمت‌های مختلف میوه موز از خود نشان داد (Jain et al., 2011).

نتایج به دست آمده (جدول ۱) در خصوص محتوای فلاونوئیدی عصاره‌های مورد بررسی در این تحقیق به خوبی اثبات نمود که نوع حلال مورد استفاده برای استخراج عصاره و قطبیت حلال‌ها تأثیر بسزایی در محتوای فلاونوئیدی آنها دارد. نتایج نشان داد که حلال‌های دارای قطبیت بالا مقدار بالاتری از فلاونوئیدهای موجود در گیاه *S. hypoleuca* را استخراج می‌نمایند در حالیکه حلال‌های غیرقطبی نظیر هگزان از توانایی قابل توجهی در این زمینه برخوردار نیستند. پژوهش‌های دیگری نیز در تأیید اثر نوع حلال مورد استفاده در میزان استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از گیاهان وجود دارد. در تحقیقی که بر روی گیاه *Thymus persicus* انجام گرفت،

نشان داده شد که جوشانده تهیه شده با آب و همچنین عصاره هیدروالکلی تهیه شده از این گیاه در مقایسه با عصاره‌های هگزانی و اتیل‌استاتی دارای محتوای فلاونوئیدی بالاتری هستند (Asghari et al., 2019). همچنین در پژوهشی که به بررسی استفاده از حلال‌های مختلف برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از فلفل سیاه پرداخته به خوبی تأثیر استفاده از حلال‌های با قطبیت متفاوت بر میزان استخراج این ترکیبات نشان داده شده است (Zarai et al., 2013). بر اساس نتایج به دست آمده تأثیر قطبیت حلال‌های استخراجی بر میزان محتوای تانن‌های متراکم عصاره‌های مورد بررسی نیز قابل مشاهده است. این نتایج نشان دادند که فقط در عصاره‌های تهیه شده با استفاده از حلال‌های قطبی نظیر آب و متانول تانن‌های متراکم وجود دارد. ضرورت استفاده از حلال‌های قطبی به ویژه آب جهت استخراج تانن‌های متراکم در پژوهش‌های دیگر نیز به اثبات رسیده است. برای مثال استفاده از حلال‌های آلی مانند استون، متانول و اتانول که دارای مقادیری آب هستند، برای استخراج تانن‌های متراکم از گیاهان مختلف گزارش شده است (Victor et al., 2012). اگرچه تحقیقات انجام شده تاکنون اثر قطبیت حلال بر میزان ساپونین عصاره‌های تهیه شده را به اثبات رسانده، ولی روند تغییر مقدار ترکیبات با تغییر قطبیت حلال مورد استفاده برای تهیه عصاره، همیشه مشابه نیست. Omoruyi و همکاران (۲۰۱۲) برخلاف نتایج به دست آمده در این تحقیق، قدرت استخراج ترکیبات ساپونینی را برای حلال‌های مختلف به صورت اتانول> آب> استون> هگزان، گزارش کردند. در مطالعات دیگر نیز نتایج مشابهی گزارش شده است که بر اساس آنها مقدار محتوای ساپونینی در عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های قطبی‌تر بالاتر می باشد (Doughari et al., 2012; Mendez et al., 2012). این در حالی است که در پژوهش‌هایی دیگر، مشابه با نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داده شده که حلال‌های غیرقطبی قابلیت بالاتری در استخراج ترکیبات ساپونینی دارند (Zengin et al., 2014; Asghari et al., 2019).

بررسی قدرت به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد یکی از مهم‌ترین و مرسوم‌ترین روش‌های بررسی خواص آنتی‌اکسیدانتی عصاره‌های گیاهی است. نتایج تست‌های DPPH و ABTS انجام شده بر روی عصاره‌های مختلف گیاه *S. hypoleuca* تطابق کاملی با هم نداشتند. عصاره‌های متانولی و آبی که از نظر محتوای متابولیتی دارای بالاترین سطح ترکیبات فلاونوئیدی و تانن متراکم هستند، بالاترین قدرت مهار رادیکال‌های DPPH را از خود نشان دادند. بر اساس گزارش‌های موجود فلاونوئیدها جزء مهم‌ترین ترکیبات طبیعی هستند که می‌توانند رادیکال‌های DPPH را خنثی کنند (Okawa et al., 2001; Seyoum et al., 2006). همچنین تانن‌های متراکم نیز از نظر مهار رادیکال‌های DPPH جزء فعالترین ترکیبات به شمار می‌روند (Khattab et al., 2010). پس می‌توان قدرت بالای عصاره‌های متانولی و آبی را به این نوع متابولیت‌ها مرتبط دانست. اما در مورد به دام‌اندازی رادیکال‌های ABTS که توسط عصاره اتیل‌استاتی به بهترین شکل انجام گرفت باید ترکیبات فنلی و ساپونینی را مسئول دانست که این امر با مطالعات پیشین در تطابق است (Nenadis et al., 2004; Pan et al., 2017).

کیلیت شدن[1] فلزات واسطه انجام واکنش فنتون را کاهش می‌دهد. این واکنش در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها و در اکسیداسیون لیپیدها دخیل می‌باشد و از این رو کیلیت شدن فلزاتی نظیر آهن می‌تواند در مقابله با استرس اکسیداتیو کمک کننده باشد

1. Chelation

(Winterbourn, 1995). بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش با وجود اینکه تمامی عصاره‌های به دست آمده از گیاه *S. hypoleuca* به نسبتی از قدرت کیلیت‌کنندگی یون‌های آهن برخوردارند، اما نوع حلال مورد استفاده در تهیه عصاره، در قدرت کیلیت‌کنندگی آنها تأثیرگذار است و این اثرگذاری بر اساس گزارشات موجود به محتوای فنولی عصاره مرتبط می باشد (Craft et al., 2012). نتایج حاصل به‌خوبی تأییدکننده این مطلب است و عصاره‌های اتیل‌استاتی و آبی که دارای بالاترین محتوای فنولی هستند، بیشترین قدرت کیلیت‌کنندگی را نیز از خود نشان داده‌اند. این دو نوع عصاره همچنین قوی‌ترین قدرت آنتی‌اکسیدانتی تام را دارا می‌باشند که این امر نیز به میزان محتوای فنولی بالای آنها باز می گردد. در ارائه دلیل توجیهی برای قدرت بالاتر آنتی‌اکسیدانتی دو عصاره اتیل‌استاتی و آبی گیاه *S. hypoleuca* بر اساس منابع موجود باید به وجود مقادیر بالای ترکیبات ساپونینی و تاننی در این عصاره‌ها اشاره کرد (Han et al., 2019; Gourlay and Constabel, 2019).

در این تحقیق جهت بررسی خاصیت ضددیابتی عصاره‌های مختلف گیاه *S. hypoleuca* اثر مهارکنندگی آنها بر روی دو آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز که آنزیم‌های کلیدی دخیل در ایجاد دیابت نوع دوم هستند، مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). این دو آنزیم مسئولیت هیدرولیز کربوهیدرات‌هایی نظیر نشاسته را در روده برعهده دارند. ترکیبات مهارکننده آلفا-گلوکوزیداز از مهم‌ترین گروه‌های کنترل دیابت نوع دو به شمار می‌روند (Mobinikhaledi et al., 2015). در عمل این ترکیبات با کاهش فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز از افزایش سطح قند خون پس از خوردن غذا جلوگیری می‌کنند و به این ترتیب اثر ضددیابتی خود را نشان می‌دهند (Asghari et al., 2015). بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق عصاره‌های اتیل استاتی و هگزانی گیاه *S. hypoleuca* قدرت مهارکنندگی بالاتری بر روی هر دو آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز از خود نشان دادند. عصاره اتیل‌استاتی این گیاه دارای بالاترین مقدار محتوای فنولی می‌باشد و گزارش‌های فراوانی از توان مهارکنندگی ترکیبات فنولی بر روی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز وجود دارد (Moradi-Afrapoli et al., 2012; Fallah Huseini et al., 2013; Brown et al., 2017). یکی از مهم‌ترین ترکیبات فنولی که در اکثر گونه‌های مریم گلی وجود دارد رزمارینیک اسید است (Shekarchi et al., 2012; Kocak et al., 2016). این ترکیب استری از کافئیک اسید و ۳و٤-دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید می‌باشد. بر اساس گزارش‌های موجود قدرت آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی آلفا-گلوکوزیداز رزمارنیک اسید اثبات شده است (Lin et al., 2011; Zhu et al., 2014).

تیروزیناز یک آنزیم محتوی مس است که سنتز ملانین را کاتالیز می‌کند. ملانین اصلی‌ترین رنگدانه موجود در پوست پستانداران است که در مقابله با اثرات مخرب تابش‌های ماوراءبنفش، استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ایجاد شده به DNA نقش ایفا می‌کند. اما تجمع بیش از حد ملانین می‌تواند منجر به مشکلات ظاهری در پوست گردد و یکی از مهم‌ترین روش‌های جلوگیری از این امر مهار فعالیت آنزیم تیروزیناز است (Yamauchi and Mitsunaga, 2016). به واسطه عوارض جانبی ترکیباتی نظیر کوجیک اسید، آربوتین یا تروپولون که مهم‌ترین مهارکننده‌های سنتزی تیروزیناز هستند، انجام پژوهش‌ها برای یافتن مهارکننده‌های جدید، به ویژه از منابع طبیعی نظیر گیاهان دارویی در طی سال‌های اخیر گسترش یافته

است (Masum et al., 2019). بر اساس یافته‌های به دست آمده ترکیبات فنلی که از مهم‌ترین و متداول‌ترین ترکیبات موجود در گیاهان هستند می‌توانند به عنوان مهارکننده‌های مؤثری در مقابل فعالیت آنزیم تیروزیناز عمل کنند (Nguen et al., 2016; Chaita et al., 2017). نتایج تحقیق ما نیز در تطابق با مطالب ذکر شده است. در بین عصاره‌های مورد بررسی عصاره اتیل‌استاتی که دارای بالاترین مقدار محتوای فنلی است قوی‌ترین پتانسیل مهارکنندگی تیروزیناز را نشان داد. دو عصاره متانولی و آبی گیاه *S. hypoleuca* نیز دارای خاصیت مهارکنندگی قابل قبولی بر فعالیت این آنزیم بودند. این فعالیت عصاره‌های مذکور را علاوه بر ترکیبات فنلی می‌توان به محتوای تانن‌های متراکم آنها نیز مرتبط دانست. بر اساس گزارشات موجود تانن‌های متراکم می‌توانند اثر مهاری قابل توجهی بر فعالیت آنزیم تیروزیناز داشته باشند (Chen et al., 2014).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به اینکه در طی مطالعات صورت گرفته بر روی گونه‌های مختلف مریم‌گلی وجود مقادیر بالای متابولیت‌های ثانویه فعال از نظر دارویی در این گونه‌ها به اثبات رسیده است، این مطالعه نیز به بررسی یکی از گونه‌های بومی این جنس (*S. hypoleuca*) در ایران پرداخته و بر اساس نتایج به دست آمده این گونه نیز از نظر خواص آنتی‌اکسیدانتی و مهارکنندگی آنزیم‌های دخیل در ایجاد دیابت نوع دوم و بیماری‌های پوستی، پتانسیل بالایی از خود نشان داد. مسلماً برای بررسی دقیق‌تر این نکات نیاز به انجام آزمایشات بالینی بیشتری وجود دارد.

References

1. Ali, L., Khan, S., Nazir, M., Raiz, N., Naz, S., Zengin, G., Mukhtar, M., Parveen, S., Shazmeen, N., Saleem, M. and Tareen, R.B., 2021. Chemical profiling, *in vitro* biological activities and Pearson correlation between phenolic contents and antioxidant activities of *Caragana brachyantha* Rech. f. South African Journal of Botany, 140: 189-193.
2. Asghari, B., Habibzadeh, F., Ghorbani Nohooji, M., 2019. Persian Thyme (*Thymus persicus*): a plant containing active metabolites with antioxidant, anti-diabetic and anti-Alzheimer effects. Journal of Medicinal Plants, 18(70): 97-109.
3. Asghari, B., Mafakheri, S., Zengin, G., Dinparast, L. and Bahadori, M.B., 2020. In-depth study of phytochemical composition, antioxidant activity, enzyme inhibitory and antiproliferative properties of *Achillea filipendulina*: a good candidate for designing biologically-active food products. Journal of Food Measurement and Characterization, 14: 2196-2208.
4. Asghari, B., Salehi, P., Farimani, M.M. and Ebrahimi, S.N., 2015. α-glucosidase inhibitors from fruits of *Rosa canina* L. Records of natural products, 9(3): 276-283.
5. Bahadori, M.B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Bahadori, S. and Moridi Farimani, M., 2016. Biological activities of *Salvia santolinifolia* Boiss. a multifunctional medicinal plant. Current Bioactive Compounds, 12(4): 297-305.
6. Baghaenezhad, M., Mollania, N. and Kazemi-Noreini, S., 2021. Antioxidant capacities, antimicrobial activity, phenolic contents and α-amylase inhibitory of *Salvia leriifolia* extracts from Sabzevar. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 1-9.
7. Bekir, J., Mars, M., Souchard, J.P. and Bouajila, J., 2013. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. Food and chemical toxicology, 55: 470-475.
8. Bigdeli, M., Rustaiyan, A., Nadimi, M. and Masoudi, S., 2005. Composition of the essential oil from roots of *Salvia hypoleuca* Benth. from Iran. Journal of Essential Oil Research, 17(1): 82-83.

9. Brown, A., Anderson, D., Racicot, K., Pilkenton, S.J. and Apostolidis, E., 2017. Evaluation of phenolic phytochemical enriched commercial plant extracts on the *in vitro* inhibition of α-glucosidase. Frontiers in nutrition, 4, Article. 56.
10. Chaita, E., Lambrinidis, G., Cheimonidi, C., Agalou, A., Beis, D., Trougakos, I., Mikros, E., Skaltsounis, A.L. and Aligiannis, N., 2017. Anti-melanogenic properties of Greek plants. A novel depigmenting agent from *Morus alba* wood. Molecules, 22(4): 514.
11. Chen, X.X., Shi, Y., Chai, W.M., Feng, H.L., Zhuang, J.X. and Chen, Q.X., 2014. Condensed tannins from *Ficus virens* as tyrosinase inhibitors: structure, inhibitory activity and molecular mechanism. PLoS One, 9(3): e91809.
12. Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R. and Pegg, R.B., 2012. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11(2): 148-173.
13. Davies, K.M. and Espley, R.V., 2013. Opportunities and challenges for metabolic engineering of secondary metabolite pathways for improved human health characters in fruit and vegetable crops. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 41(3): 154-177.
14. Doughari, J.H., Ndakidemi, P.A., Human, I.S. and Benade, S., 2012. Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentata*. Journal of Ethnopharmacology, 141(3): 1041-1050.
15. Eidi A, Parivar K, Mazouji A, Akhtari Z., 2006. Antinociceptive effects of essential oil of *Salvia hypoleuca* L. in mice. Medical Sciences, 16(3): 165-169.
16. Elzaawely, A.A., Xuan, T.D. and Tawata, S., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* H OUTT. aerial parts. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 28(12): 2225-2230.
17. Fallah Huseini, H., Asghari, B., Asgarpanah, J., Babai Zarch, A. and Eghbali Zarch, T., 2013. Effect of polar and nom-polar *Aloe vera* L. leaf extracts on α-amylase and α-glucosidases inhibitory activity *In vitro*. Journal of Medicinal Plants, 12(48): 160-169.
18. Firuzi, O., Miri, R., Asadollahi, M., Eslami, S. and Jassbi, A.R., 2013. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven *Salvia* species from Iran. Iranian journal of pharmaceutical research: Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 12(4): 801-810.
19. Forman, H.J. and Zhang, H., 2021. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. Nature Reviews Drug Discovery, 1-21.
20. Gheshlaghpour, J., Asghari, B., Khademian, R. and Sedaghati, B., 2021. Silicon alleviates cadmium stress in basil (*Ocimum basilicum* L.) through alteration of phytochemical and physiological characteristics. Industrial Crops and Products, 163: 113338.
21. Gourlay, G. and Constabel, C.P., 2019. Condensed tannins are inducible antioxidants and protect hybrid poplar against oxidative stress. Tree Physiology, 39(3): 345-355.
22. Habib, K.D., Giti, B. and Ali, M., 2016. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Salvia hypoleuca* at different growth stages. Nusantara Bioscience, 8(2): 145-149.
23. Han, Y., Chi, J., Zhang, M., Zhang, R., Fan, S., Huang, F., Xue, K. and Liu, L., 2019. Characterization of saponins and phenolic compounds: antioxidant activity and inhibitory effects on α-glucosidase in different varieties of colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 83(11): 2128-2139.
24. Hedge, I.C., 1982. *Salvia* L. in: K. H. Rechinger, Ed., flora Iranica. Academische Druck-U. Verlagsantalt, Graze, Vol. 150: 403-476.
25. Jain, P., Bhuiyan, M.H., Hossain, K.R. and Bachar, S.C., 2011. Antibacterial and antioxidant activities of local seeded banana fruits. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(11): 1398-1403.
26. Jamzad, Z. 2012. Lamiaceae in flora of Iran. (1st ed.). Tehran. Research Institute of Forests and Rangelands Press, 1074.

27. Javdan, N. and Estakhr, J., 2012. Anti-ocular-inflammatory effects of *Salvia hypoleuca* extract on rat endotoxin-Induced uveitis. Current Research Journal of Biological Sciences, 4(1): 33-39.
28. Jin, Q., Han, X.H., Hong, S.S., Lee, C., Choe, S., Lee, D., Kim, Y., Hong, J.T., Lee, M.K. and Hwang, B.Y., 2012. Antioxidative oligostilbenes from *Caragana sinica*. bioorganic & medicinal chemistry letters, 22(2): 973-976.
29. Khattab, R., Goldberg, E., Lin, L. and Thiyam, U., 2010. Quantitative analysis and free-radical-scavenging activity of chlorophyll, phytic acid, and condensed tannins in canola. Food chemistry, 122(4): 1266-1272.
30. Kocak, M.S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M.C. and Tepe, B., 2016. *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. Industrial Crops and Products, 85: 204-212.
31. Li, M., Li, Q., Zhang, C., Zhang, N., Cui, Z., Huang, L. and Xiao, P., 2013. An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China. Acta Pharmaceutica Sinica B, 3(4): 273-280.
32. Lin, L., Dong, Y., Zhao, H., Wen, L., Yang, B. and Zhao, M., 2011. Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedalitin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA as inhibitors of tyrosinase and α-glucosidase. Food chemistry, 129(3): 884-889.
33. Lopresti, A.L., 2017. *Salvia* (sage): a review of its potential cognitive-enhancing and protective effects. Drugs in R&D, 17(1): 53-64.
34. Lu, Y. and Foo, L.Y., 2002. Polyphenolics of *Salvia*-a review. Phytochemistry, 59(2): 117-140.
35. Mafakheri, S. and Asghari, B., 2018. Effect of seaweed extract, humic acid and chemical fertilizers on morphological, physiological and biochemical characteristics of *Trigonella foenum-graecum* L. Journal of Agricultural Science and Technology, 20(7): 1505-1516.
36. Masum, M.N., Yamauchi, K. and Mitsunaga, T., 2019. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents. Reviews in Agricultural Science, 7: 41-58.
37. Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F.D. and Aguilar, C.N., 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. Industrial Crops and Products, 37(1): 445-450.
38. Mobinikhaledi, A., Asghari, B. and Jabbarpour, M., 2015. Design and synthesis of new benzimidazole and pyrimidine derivatives as α-glucosidase inhibitor. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 14(3): 723-731.
39. Monsef Esfahani, H.R., Amirshahrokhi, K., Babaei Boroujeni, H. and Dehpour, A., 2020. Anti-anxiety effect of *Salvia hypoleuca*. Research Journal of Pharmacognosy, 7(2): 1-4.
40. Moradi-Afrapoli, F., Asghari, B., Saeidnia, S., Ajani, Y., Mirjani, M., Malmir, M., Bazaz, R.D., Hadjiakhoondi, A., Salehi, P., Hamburger, M. and Yassa, N., 2012. In vitro α-glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 20(1): 1-6.
41. Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M. and Zhang, H.Y., 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the $ABTS^{\bullet+}$ assay. Journal of agricultural and food chemistry, 52(15): 4669-4674.
42. Nguyen, H.X., Nguyen, N.T., Nguyen, M.H.K., Le, T.H., Van Do, T.N., Hung, T.M. and Nguyen, M.T.T., 2016. Tyrosinase inhibitory activity of flavonoids from *Artocarpus heterophyllous*. Chemistry Central Journal, 10(1): 1-6.
43. Nickavar, B., Mojab, F. and Asgarpanah, J., 2005. Volatile composition of the essential oil of *Salvia hypoleuca* Benth. International Journal of Aromatherapy, 15(1): 51-53.

44. Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T. and ONO, M., 2001. DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 24(10): 1202-1205.
45. Omoruyi, B.E., Bradley, G. and Afolayan, A.J., 2012. Antioxidant and phytochemical properties of *Carpobrotus edulis* (L.) bolus leaf used for the management of common infections in HIV/AIDS patients in Eastern Cape Province. BMC Complementary and Alternative Medicine, 12(1): 1-9.
46. Pan, F., Su, T.J., Cai, S.M. and Wu, W., 2017. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: diversity, antioxidant capacities in vitro and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds. Scientific Reports, 7(1): 1-14.
47. Pérez-Torres, I., Castrejón-Téllez, V., Soto, M.E., Rubio-Ruiz, M.E., Manzano-Pech, L. and Guarner-Lans, V., 2021. Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity. International Journal of Molecular Sciences, 22(4): 1786.
48. Saeidnia, S., Ghamarinia, M., Gohari, A.R. and Shakeri, A., 2012. Terpenes from the root of *Salvia hypoleuca* Benth. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 20(1): 1-6.
49. Seyoum, A., Asres, K. and El-Fiky, F.K., 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry, 67(18): 2058-2070.
50. Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A.R. and Hamedani, M.P., 2012. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. Pharmacognosy magazine, 8(29): 37-41.
51. Sies, H., 2020. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. Antioxidants, 9(9): 852.
52. Ulubelen, A., 2003. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. Phytochemistry, 64(2): 395-399.
53. Uysal, S., Zengin, G., Sinan, K.I., Ak, G., Ceylan, R., Mahomoodally, M.F., Uysal, A., Sadeer, N.B., Jekő, J., Cziáky, Z. and Rodrigues, M.J., 2021. Chemical characterization, cytotoxic, antioxidant, antimicrobial, and enzyme inhibitory effects of different extracts from one sage (*Salvia ceratophylla* L.) from Turkey: open a new window on industrial purposes. RSC Advances, 11(10): 5295-5310.
54. Victor N, E., Justina Y, T., Sunday A, M. and Aderonke I, O., 2012. DPPH radical scavenging capacity of phenolic extracts from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*). Food and nutrition sciences, 2012.
55. Winterbourn, C.C., 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. Toxicology letters, 82: 969-974.
56. Yamauchi, K. and Mitsunaga, T., 2016. Melanogenesis and melanosome transportation modulators from medicinal plants. Letters in Drug Design & Discovery, 13(8): 742-751.
57. Zarai, Z., Boujelbene, E., Salem, N.B., Gargouri, Y. and Sayari, A., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. Lwt-Food science and technology, 50(2): 634-641.
58. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R. and Ceylan, O., 2014. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. Industrial Crops and Products, 53: 244-251.
59. Zhu, F., Asada, T., Sato, A., Koi, Y., Nishiwaki, H. and Tamura, H., 2014. Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α-glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from *Perilla* leaves. Journal of agricultural and food chemistry, 62(4): 885-892.

Evaluation of phytochemical, antioxidant and enzymatic inhibitory content of extracts obtained with different solvents from *Salvia hypoleuca* Benth.

Asghari, B.[1*], Mafakheri, S.[2], Majid Ghorbani Nohooji, M.[3]

[1]Associate Professor, Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

[2]Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

[3]Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.

Received: 9-9-2021; Accepted: 29-9-2021

Abstract

Various species of *Salvia* has been used in the pharmaceutical, food and cosmetic industries.In this study, aerial parts of *Salvia hypoleuca* L. which is an endemic plant to Iran were collected during the flowering stage in the summer of 2020 from Alamut city of Qazvin province. In the present study, the total content of phenolic, flavonoid, saponin and tannins, four hexane, ethyl acetate, methanolic and aqueous extracts prepared by maceration method were investigated. The antioxidant properties of these extracts were measured by DPPH, ABTS, phosphomolybdenum and iron chelating methods. In addition, α-amylase, α-glucosidase and tyrosinase enzyme inhibitory effects of the plant were measured by spectrophotometry. Based on the results, ethyl acetate extract of the plant had the highest phenolic and saponin content with values of 87.07 mg gallic acid g^{-1} and 163.84 mg quillaja saponin g^{-1}, respectively. The aqueous extract of the plant exhibited the highest amounts of flavonoids and condensed tannins content with 33.97 and 5.34 mg quercetin and catechin g^{-1} in the extract, respectively. Ethyl acetate extract indicated the highest ABTS radical scavenging, total antioxidant, ferrous ion chelating activities, as well as inhibitory effects of α-amylase, α-glucosidase and tyrosinase inhibition properties. The high potential of ethyl acetate extract in biological properties, like antioxidant and antiradical activities could be attributed to its high metabolite contents especially, phenolic and saponin compounds. Thus, it could be concluded that this plant is a rich source of functional secondary metabolites and ethyl acetate is the best extractant solvent. The results of this study confirmed the potential of *Salvia hypoleuca* for medicinal uses, especially for diabetes and skin diseases.

***Keywords*:** Antioxidant, Extract, Enzyme inhibition, Metabolite content, *Salvia hypoleuca* Benth

[*]Corresponding author; asghari@eng.ikiu.ac.ir