بررسی مقایسه‌ای خواص فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی عصاره گیاهان شوید، زیره سیاه، بومادران و میخک

روح‌اله فرامرزی‌دوزین[1]، افشین کریمی[2]، احسان کریمی[3]*، احسان اسکوئیان[4]، محسن قاسمی[5]

[1]دانشجوی دکتری، شعبه مشهد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

[2]کارشناسی ارشد، واحد کنترل کیفیت شرکت صنایع قهوه پارت سازان، مشهد، ایران

[3]استادیار، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[4]استادیار، شعبه مشهد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

[5]استادیار، گروه کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۵/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/۶/۲۷

چکیده

این آزمایش به منظور مقایسه و ارزیابی خاصیت فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی عصاره‌های شوید[1]، زیره سیاه[2]، بومادران[3]، و میخک[4] در قالب یک طرح کامل تصادفی در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مشهد در سال ۱۴۰۰ انجام شد. عصاره متانولی گیاهان به روش رفلاکس استخراج و با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ترکیبات شیمیایی آنها آنالیز شد. فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به ترتیب از طریق فولین–سیکالتو و رادیکال‌های آزاد DPPH و نیتریک اکسید (NO) بررسی و سپس پتانسیل عصاره‌ها در مهار آنزیم‌های زانتین اکسیداز، هیالورونیداز، استیل کولین استراز، الاستاز و تیروزیناز بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیشترین میزان فنل کل (۴۰/۹ mg GAE/g.DW) و ساپونین (۹۴/۸ mg diosgenin /g.DW) در عصاره میخک و کمترین میزان فنل کل (۷/۲ mg GAE/g.DW) و ساپونین (mg diosgenin /g.DW ۷۲/۷) در عصاره بومادران مشاهد شد. نتایج ارزیابی HPLC نشان داد که غلظت ترکیبات فنولیکی در عصاره گیاه میخک در مقایسه با بقیه عصاره‌های گیاهی بیشتر بود. عصاره گیاه میخک در مقایسه با بقیه عصاره‌های مورد بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی قویتری داشت به طوری که مقادیر IC_{50} بدست آمده برای عصاره میخک از دو روش DPPH و NO به‌ترتیب برابر ۸۲/۹۵ µg/ml و۱۰۴/۳۴ µg/ml بود. سه عصاره میخک، بومادران و زیره سیاه به‌ترتیب در غلظت‌های ۵۵/۳ µg/ml، ۹۸/۵ µg/ml و ۱۹۸ µg/ml بیشترین اثر گذاری را بر روی مهار آنزیم زانتین‌اکسیداز داشتند. نتایج حاصل از خاصیت ضدالتهابی نشان داد که که عصاره گیاه میخک با بیش از ۶۱ درصد، بالاترین مهار نیتریت اکساید را نشان داد. به نظر می‌رسد عصاره میخک این پتانسیل را دارد که به عنوان ماده ضدالتهاب، روشن‌کننده پوست و جلوگیری کننده از چروک پوست مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تیروزیناز، ضدالتهاب، کوئرستین، گونه‌های معطر، ملانین.

1. *Anethum graveolens* L.
2. *Bunium persicum* L.
3. *Achillea millefolium* L.
4. *Syzygium aromaticum* L.

*نویسنده مسئول: ehsankarimi@mshdiau.ac.ir

مقدمه

امروزه بسیاری از کرم‌ها و داروها بر پایه علوم غربالگری ترکیبات گیاهان دارویی شناخته و تولید می‌شوند (Kaur and Arora., 2010; Nguyen et al., 2004; Mathew and Subramanian, 2014; Meena et al., 2019). آنزیم‌های تیروزیناز، الاستاز، هیالورونیداز، استیل کولین استراز و زانتین اکسیداز از آنزیم‌های مهم هستند که در بدن انسان به ترتیب در تولید رنگدانه پوست، چین و چروک پوست، درد مفاصل، آلزایمر و زوال مغز و نقرس نقش مهمی دارند (Khatib et al., 2005; Oskoueian et al., 2011; Liyanaarachchi et al., 2018; Butterfield and Halliwell, 2019; Özek et al., 2019; Zolghadri et al., 2019; Win Win Yee et al., 2021). این آنزیم‌ها در بافت‌های هدف به طور طبیعی تولید می‌شوند و در اثر استرس‌های محیطی و یا افزایش سن تولید این آنزیم‌ها از حد طبیعی خارج شده و در نتیجه بدن دچار عوارض مختلف خواهد شد (Zolghadri et al., 2019). ترکیبات موثره موجود در گیاهان دارویی از جمله فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و یا آلکالوئیدها می‌توانند بر اساس تعداد و یا محل قرارگیری گروه‌های فعال در ساختار شیمیایی آن‌ها، به طور مستقیم بر فعالیت این آنزیم‌ها اثرگذار باشند (Oskoueian et al., 2011; Dahibhate et al., 2019, Tripathi and Saini, 2019). مهار آنزیم‌های تیروزیناز می‌تواند به کاهش تولید ملانین و روشن نمودن رنگ پوست کمک نماید (Arung et al., 2011; Win Yee et al., 2021). مهار آنزیم الاستاز بر کاهش چین و چروک و روند پیری پوست موثر است (Liyanaarachchi et al., 2018). مهار آنزیم هیالورنیداز منجر به کاهش تجزیه هیالورونیک اسید شده و درد مفاصل ناشی از کاهش هیالورونیک اسید را بهبود خواهد داد (Morikawa et al., 2020). آنزیم استیل کولین استراز از آنزیم‌های مهمی است که با پیری و زوال مغز ارتباط مستقیم دارد. با افزایش سن انسان، میزان استیل کولین استراز در مغز افزایش یافته که نقش موثری در ایجاد آلزایمر دارد. در صورتی که بتوان با استفاده از ترکیبات موثره گیاهان دارویی، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را مهار نمود روند زوال مغز به تاخیر افتاده و سرعت پیشرفت آلزایمر کاهش خواهد یافت (Ajayi et al., 2019). زانتین اکسیداز یکی دیگر از آنزیم‌های مهم بدن بوده که در سوخت و ساز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نقش ایفا نموده و با تولید اسید اوریک در بدن آنزیم مهمی در آسیب شناسی بیماری نقرس محسوب می‌شود (Nguyen et al., 2004; Tran et al., 2019).

ایران به دلیل موقعیت مناسب از نظر ذخایر فیلوژنتیکی و شرایط آب و هوایی خاص، جایگاه با ارزشی در تولید گیاهان دارویی دارد. از همین رو با توسعه سطح زیر کشت و بکارگیری متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی علاوه بر افزایش درآمدهای غیرنفتی، باعث توسعه پایدار در بخش‌های مختلف کشاورزی و پزشکی در کشور خواهیم شد. هرچند پیشرفت‌های زیادی در زمینه تحقیقات داروهای شیمیایی صورت گرفته، اما در دهه‌های اخیر استفاده از فرآورده‌های دارویی و مکمل‌های گیاهی به طرز چشمگیری افزایش یافته است (Chaieb et al., 2007). استفاده از گیاهان دارویی به علت سهولت دسترسی، اثرگذاری در پیشگیری، کاهش عوارض جانبی درمان و هزینه نسبتاً کم با محبوبیت زیادی از سوی محققین همراه شده است. تیره چتریان (Apiaceae) معمولاً به‌عنوان خانواده هویج یا جعفری شناخته می‌شود و یکی از بزرگترین تیره‌های گیاهی نهان‌دانگان (Angiosperm) در جهان است. این تیره از ۳۰۰-۴۶۲ جنس و به‌طور تقریبی از ۲۵۰۰-۳۷۵۰ گونه تشکیل شده است (Kaur and Arora, 2010). شوید (*Anethumgra veolens*) و زیره سیاه (*Bunium persicum*) دو گونه گیاهی متعلق به تیره چتریان بوده

که نه تنها به دلیل خواص دارویی (Al-Snafi., 2014, Al-Sheddi et al., 2019) و ارزش تغذیه‌ای آن‌ها، بلکه به علت کاربردهای گسترده‌ای که در صنایع آرایشی و بهداشتی و سایر فراورده‌های صنعتی دارند از اهمیت اقتصادی فراوانی برخوردار هستند (Meena et al., 2019). ترکیبات اصلی اسانس شوید حاوی ۳۰-۶۰ درصد کارون[1]، ۳۳ درصد لیمونن[2] و ۲۰ درصد آلفا-فلاندرن[3] است (Radulescu et al., 2010). اسانس زیره سیاه نیز دارای ترکیبات موثره گیاهی عمده از قبیل کومین آلدهید، آلفاپینن و گاما ترپنین و بسیاری مواد موثر دیگر می‌باشد (Meena et al., 2019; Gani et al., 2019; Al-Snafi, 2014; Radulescu et al., 2010). گیاه بومادران با نام علمی *Achillea millefolium* از خانواده کاسنی (Asteraceae) در مناطق مختلف دنیا از جمله در ایران رشد می‌کند (Amini Navaie et al., 2015). از عمده‌ترین ترکیبات موثره موجود در اسانس بومادران می‌توان به کامازولن، کامفور، ۱-۸ سینئول، لیمونن، لینالول، بتا- اسیمن و گاما-ترپینن اشاره نمود (Santoro et al., 2007; Dias et al., 2013). میخک (*Syzygium aromaticum*) از خانواده مورد[4] است (Santoro et al., 2007). عمده ترکیبات موثره موجود در اسانس میخک هندی اوژنول، کاریوفیلن، آلفا هومولن، کادینن و آلفا-کوپائن می‌باشد (Chaieb et al., 2007; Arung et al., 2011; Dwivedi et al., 2011).

تاکنون اثرات دارویی فراوانی از این گیاهان به اثبات رسیده است. از جمله این اثرات می‌توان به اثرات ضد دیابت، ضد تشنج، التیام زخم، افزایش اشتها و تقویت معده، ضد افسردگی، ضد فشار خون، ضد التهاب، ضد اسپاسم، مهار چسبندگی پلاکت‌های خون، تقویت سیستم ایمنی بدن، ضد سرفه و سرماخوردگی، کاهش کلسترول، کاهش ترشح اسید معده، رفع سنگ کلیه، و کمک به شیمی درمانی و پیشگیری از سرطان اشاره نمود (Eftekhar et al., 2019; Gani et al., 2019; Rita and Animesh, 2011, Sestili et al., 2018). بر اساس ضرورت پتانسیل بکارگیری گیاهان دارویی که کم‌ترین عوارض سوء را در مقایسه با داروهای شیمیایی دارند و همچنین انجام تحقیقات گسترده به منظور بررسی ابعاد گوناگون پتانسیل گیاهان دارویی در پیشگیری و درمان بیماری‌ها، این تحقیق انجام گرفت تا ترکیبات فنولیکی و فلاونوئیدی موجود در گیاهان شوید، زیره سیاه، بومادران و میخک را تعیین نموده و اثر عصاره این گیاهان را علیه آنزیم‌های تیروزیناز، الاستاز، هیالورونیداز، استیل کولین استراز، زانتین اکسیداز و خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی مورد ارزیابی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری: در این تحقیق اندام‌های مختلف نظیر گل میخک، بذر زیره سیاه، برگ بومادران و برگ و ساقه شوید تهیه و عصاره متانولی از اندام های ذکر شده به روش هیندرا و همکاران (Hendra et al., 2011) استخراج شد. ابتدا قسمت‌های مختلف گیاه با کمک خردکن برقی پودر شدند. یک گرم از پودر به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و سپس ۴۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. در ادامه ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۶ میلی‌مولاری HCL اضافه شد. این مخلوط با همزن مغناطیسی هم زده شد و در دستگاه تقطیر به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و در ادامه به وسیله کاغذ واتمن شماره یک فیلتر شد. در پایان عصاره با استفاده از یک تبخیر کننده چرخشی در شرایط خلاء خشک شد و عصاره خشک

1. Carvone
2. Limonene
3. α-Phellandrene
4. Myrtaceae

شده تا زمان آزمایشات بعدی در یخچال ۴ درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری محتوای فنل کل: مقدار فنل کل موجود در عصاره هر یک از گیاهان این تحقیق با اندکی تغییرات به روش اسکوئیان و همکاران (Oskoueian et al., 2011) انجام شد. در ابتدا به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره میزان ۲/۵ میلی‌لیتر فولین اضافه و سپس ۲ میلی‌لیتر از بیکربنات سدیم ۷/۵ درصد (Na_2CO_3) اضافه شد. در این مرحله برای نمونه شاهد از متانول خالص به جای عصاره استفاده شد. در ادامه پس از ورتکس (vortex)، مخلوط به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد، سپس میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. در نهایت منحنی استاندارد بر حسب گالیک اسید با غلظت‌های متفاوت رسم و میزان فنل کل معادل گالیک اسید به صورت میلی‌گرم در هر گرم پودر خشک گیاه گزارش شد.

بررسی ساپونین به روش طیف سنجی نوری: عصاره با حجم ۰/۱ میلی‌لیتر در لوله آزمایش ریخته شد و به دنبال آن به هر یک از لوله‌ها ۵ میلی‌لیتر معرف وانیلین (۸ درصد) در اسید سولفوریک (۶۵ درصد) اضافه شد. مخلوط موجود در لوله‌ها با استفاده از ورتکس بشدت هم زده شد و به مدت یک ساعت، در حمام آب گرم با دمای (۱ ± ۶۰ سانتی‌گراد) قرار گرفت. سپس واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب یخ متوقف و در نهایت جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۷۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از دیوسژنین استفاده شد (شکل۱) . محتوای ساپونین موجود در عصاره با استفاده از منحنی استاندارد برآورد شد و بر حسب درصد وزن خشک عصاره محاسبه و گزارش گردید (Oskoueian et al., 2011).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) جهت شناسایی و بررسی کمی و تعیین تنوع ترکیبات فعال زیستی موجود در عصاره ها به کار برده شد. دستگاه HPLC (Agilent 1100) و ستون C18 در این ارزیابی مورد استفاده قرار گرفت (Govindarajan et al., 2019). فاز متحرک شامل نسبت ۸۰ به ۲۰ استونیتریل به آب بود که با شدت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و با دتکتور فرابنفش مرئی (UV/Vis) با طول موج ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر صورت گرفت. ترکیبات فنولیکی موجود در عصاره جداسازی و سپس از طریق مقایسه با استانداردهای داخلی شناسایی و تعیین غلظت شد (Oskoueian et al., 2011).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش DPPH و NO: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از طریق مهار رادیکال‌های آزاد (۲ و ۲ دی فینیل ۱-پیکریل هیدرازیل) (DPPH) و نیتریت اکساید (NO) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت (Tripathi and Saini, 2019). برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش DPPH ابتدا یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره گیاهان میخک، بومادران، شوید و زیره سیاه با ۳ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول مخلوط شد. محلول به مدت نیم ساعت در دمای اتاق در شرایط تاریک نگهداری و سپس میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش از اسیداسکوربیک به عنوان استاندارد استفاده شد. سپس میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر یک از عصاره‌ها (۰، ۲۵، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو گرم بر لیتر) با توجه به میزان جذب کنترل منفی (فاقد عصاره) محاسبه و بر اساس آن IC_{50} برای تمامی عصاره‌ها گزارش شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش NO ابتدا میزان ۶۰ میکرولیتر از عصاره‌های رقیق شده (۱۰۰

میکرولیتر عصاره بعلاوه۹۰۰ میکرولیتر بافر PBS) با ۶۰ میکرولیتر سدیم نیتروپروساید مخلوط شد (در این مرحله جهت تهیه نمونه شاهد به جای عصاره از آب مقطر استفاده شد). سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵۰ دقیقه در شرایط اتاق (نور و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. در ادامه به اندازه مساوی از حجم مخلوط نمونه‌ها واکنشگر گریس (اسیدفسفریک ۲ درصد، سولفانیل‌آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن‌دی‌آمین در هیدروکلرید ۰/۱درصد) اضافه شد. جذب نمونه‌ها در ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. در این تست از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد نیتریک اکسید بر طبق فرمول محاسبه و بر اساس آن IC_{50} برای تمامی عصاره‌ها (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو گرم بر لیتر) گزارش شد.

سنجش پتانسیل مهار آنزیم تیروزیناز: اثر مهارکنندگی عصاره های گیاهان شوید، زیره سیاه، بومادران و میخک بر روی فعالیت آنزیم تیروزیناز به روش کدورت سنجی با اندکی تغییرات به روش خطیب و همکاران و اسکوئیان و همکاران (Khatib et al., 2005, Oskoueian et al., 2011) انجام شد. ابتدا۷۰ میکرولیتر بافر ۵۰ میلی‌مولاری فسفات پتاسیم (PBS, PH=6.5) به چاهک‌ها ۹۶ تایی اضافه شد، سپس۳۰ میکرولیترآنزیم تیروزیناز (۳۳۳ واحد در میلی‌لیتر) و۲ میکرولیتر عصاره به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. چاهک‌ها به مدت ۵ دقیقه در شرایط اتاق نگهداری شدند. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از ماده ال- تیروزین ۲ میلی‌مولاری یا ال- دوپا ۱۲ میلی‌مولاری (L-DOPA) اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد و سپس میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۹۲ نانومتر نسبت به نمونه شاهد حاوی متانول و بدون مهار کننده اندازه‌گیری شد. کوجیک اسید به عنوان کنترل مثبت در آزمایش مهار آنزیم تیروزیناز مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی پتانسیل مهار آنزیم الاستاز: در این آزمایش اثر عصاره‌های مرزه، بومادران، شوید و زیره سیاه بر روی مهار آنزیم الاستاز در شرایط آزمایشگاهی بر طبق روش زیر بررسی شد (Liyanaarachchi et al., 2018). به طور خلاصه بافر Tris-HCL با غلظت ۲ مولار و pH ۸ تهیه گردید. سوبسترای N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide در بافر حل شده و سپس عصاره‌های گیاهی در مجاورت آنزیم به مدت ۲۵ دقیقه قرار داده شد. مخلوط واکنش نهایی (۲۵۰ میکرولیتر) حاوی بافر، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سوبسترا (AAAPVN)، ۵۰۰۰ واحد آنزیم و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بود که به مدت ۲۵ دقیقه در فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۱۰ نانومتر میزان جذب نمونه ها اندازه گیری شد. تانیک اسید به‌عنوان استاندارد در آزمایش مهار آنزیم الاستاز مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنجش پتانسیل مهار آنزیم هیالورونیداز: ابتدا ۰/۴ واحد از آنزیم هیالورونیداز با ۲/۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم ($CaCl_2$) در بافر ۰/۱ مولار بافر استات (pH=۵/۳) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ میلی‌متر آماده شد. در ادامه ۰/۶ میلی‌گرم پتاسیم هیالورونات و غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی در پلیت‌های ۹۶ تایی در مجاورت هم قرار داده شد (بافر استات به جای عصاره‌های گیاهی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد). برای توقف واکنش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از NaOH (هیدرواکسید سدیم ۰/۴ نرمال) و ۰/۱ میلی‌لیتر ازPotassium borate (بورات پتاسیم ۰/۴ نرمال) اضافه و مخلوط واکنش در دمای جوش بن‌ماری به مدت ۳ دقیقه نگهداری شد. سپس۳ میلی‌لیتر از پی- دی میتیل آمینوبنزآلدهید (۶۷ میلی‌مولاری) به واکنش اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. در انتها میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۸۵ نانومتر

خوانده شد. تانیک اسید به عنوان استاندارد در آزمایش مهار آنزیم هیالورونیداز مورد ارزیابی قرار گرفت (Piwowarski et al., 2011).

سنجش پتانسیل مهار آنزیم زانتین اکسیداز: فعالیت مهاری زانیتین اکسیداز با روش اسپکتوفتومتری تحت شرایط هوازی بر پایه روش نگوین و همکاران (Nguyen et al., 2004) البته با کمی تغییرات با پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام گرفت. به طور خلاصه مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر ازعصاره گیاهان، ۳۵ ماکرولیتر از بافر فسفات ۷۰ میلی‌مولاری (۷/۵ =pH)و ۳۰ میکرولیتر از آنزیم زانتین اکسیداز (۰/۰۱ واحد در میلی‌لیتر) آماده شد. سپس در دمای ۲۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. واکنش با ۶۰ میکرولیتر از سوبسترای محلول (۱۵۰ میکرومولار زانتین در بافر فسفات) شروع شد و مخلوط جدید واکنش در ۲۵ درجه‌سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در ادامه واکنش به وسیله ۲۵ میکرولیتر اسید کلرید (HCl) یک نرمال متوقف و سپس در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری انجام شد. میزان فعالیت مهاری زانیتن‌اکسیداز به وسیله درصد مهار آنزیم محاسبه شد. آلوپورینول به عنوان استاندارد در آزمایش مهار آنزیم تیروزیناز مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنجش پتانسیل مهار آنزیم استیل کولین استراز: فعالیت مهاری استیل کولین استراز توسط عصاره‌های گیاهی در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به روش مت و سبرامانیان (Mathew and Subramanian, 2014) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه آنزیم استیل کولین استراز باعث هیدرولیز واکنش سوبسترای استیل کولین با واکنشگر((5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) DTNBمنجر به تولید دو محصول ۲-نیتروبنزوات-۵-مرکاپتوتیوکولین و ۵- تیو-۲-نیتروبنزوات شده که در طول موج ۴۱۲ نانومتر قابل مشاهده است. ابتدا در پلیت‌های ۹۶تایی،۱۰۰میکرولیتر از واکنشگر ۳ میلی‌مولاری DTNB، ۲۰ میکرولیتر از واکنشگر ۱۵ میلی‌مولاری استیل تیوکولین یدید (ATCI)، ۲۰ میکرولیتر از آنزیم استیل کولین استراز (۰/۲۶ واحد در میلی‌لیتر)، ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مجاورت هم قرار داده شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در نهایت میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر هر ۵ دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. از مهارکننده‌های گالانتامین (Galanthamine) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی فعالیت ضدالتهابی عصاره‌ها: ابتدا سلول‌های مامروفاژ موش (RAW 264.7) (غلظت 1×10^{6} سلول در میلی‌لیتر) در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها (۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر در محیط کشت رقیق‌سازی شد. در ادامه به محیط کشت ترکیبات ایجاد کننده التهاب مانند اینترفرون گاما (۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و لیپوپلی‌ساکارید حاصل از ایکولای۱۰ (میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه و به مدت ۱۷ ساعت در ۳۷ درجه در مجاورت هم قرار داده شد. میزان تولید نیتریت اکسید در محیط کشت با استفاده از معرف گریس[1] (اسیدفسفریک ۲ درصد، سولفانیل‌آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن‌دی‌آمین در هیدروکلرید ۰/۱درصد) تعیین و میزان زنده ماندن سلول‌ها با استفاده ازآزمون MTT ارزیابی شد. در این آزمایش (L-NG-nitro-L-arginine methyl ester (NAME با غلظت ۲۵۰ میکرومولار به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (Oskoueian et al., 2011).

1. Griess

تحلیل داده‌ها

پس از پایان سنجش، جذب پلیت خالی از جذب پلیت متناظر کم شد و همچنین جذب بلانک خانه‌های تست از جذب بلانک تست کم شد در نتیجه جذب نهایی در اثر فعالیت آنزیم بدست آمد. برای تعیین میزان درصد مهار آنزیم، ابتدا شیب نمودار عصاره منفی را از مقدار شیب نمودار کنترل منفی کم و سپس حاصل را بر شیب نمودار کنترل منفی تقسیم کرده و در پایان در ۱۰۰ ضرب شد.

نتایج

مقدار فنل کل موجود در عصاره هر یک از گیاهان مورد بررسی در این تحقیق بر اساس میزان جذب ناشی از واکنش بین عصاره و واکنشگر فولین و بر اساس مقایسه با محلول استاندارد گالیک اسید تعیین شد (جدول۱). میزان فنل کل چهار عصاره بین ۷/۲ تا ۴۰/۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم پودر خشک عصاره متغیر بود. همچنین بیشترین میزان فنل کل در عصاره میخک (۴۰/۹) و کمترین میزان فنل کل در عصاره بومادران (۷/۲) مشاهد شد. نتایج حاصل از جدول۱ نشان داد که میزان ساپونین نیز مانند فنل کل در همه عصاره‌ها به میزان قابل توجهی یافت شد به طوری که بیشترین مقدار در عصاره میخک (۹۴/۸ میلی‌گرم دیوسژنین بر گرم پودر خشک) و کمترین مقدار آن در عصاره گیاه بومادران (۷۲/۷ میلی‌گرم دیوزجنین بر گرم پودر خشک) وجود داشت.

جدول ۱: بررسی میزان فنل کل و ساپونین موجود در عصاره‌های گیاهی

نام علمی	نام فارسی	خانواده	بافت گیاه	فنل کل (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم پودر خشک عصاره)	ساپونین (میلی‌گرم دیوسژنین بر گرم پودر خشک عصاره)
A. millefolium	بومادران	کاسنی	برگ گیاه	۷/۲±۰/۶۶	۷۲/۷±۲/۸۴
S. aromaticum	میخک	میرتاسه	گل	۴۰/۹±۲/۱۸	۹۴/۸±۴/۷۳
A. graveolens	شوید	چتریان	اندام هوایی	۱۴/۷±۱/۳۹	۹۰/۵±۳/۵۹
B. persicum	زیره سیاه	چتریان	بذر	۱۲/۵±۰/۹۷	۹۲/۲±۱/۲۲

نتایج ارزیابی ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی و ایزوفلاونوئیدی با استفاده از HPLC: نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در مورد ترکیبات فنولیکی موجود در عصاره شوید، زیره سیاه، بومادران و میخک نشان داد که برخی ترکیبات فنولی در این عصاره‌ها وجود دارد (جدول ۲). عصاره گیاه میخک در مقایسه با بقیه عصاره‌های گیاهی ترکیبات فنولیکی بیشتری داشت. دو ماده موثره فنولیکی پیروگالول و کافئیک اسید نیز در تمام عصاره‌های مورد بررسی به میزان قابل توجه‌ای وجود داشتند، در حالی که ترکیبات فنولیکی وانیلیک اسید، سالیسیلیک اسید و سیرینجیک اسید در هیچ یک از عصاره‌های مورد مطالعه یافت نشدند. نمودار کروماتوگراف ترکیبات فنولیکی عصاره‌های گیاهی ذکر شده در شکل ۲ نشان داده شده است.

علاوه بر ترکیبات فنولیکی موجود در عصاره‌ها، میزان فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدهای آپیژنین، کامفرول، میریستین، نارنجین، کوئرستین، روتین، دایدزین و جنیستئین در عصاره گیاهان مورد بررسی قرار گرفت. نمونه شوید با وجود شش ترکیب آپیژنین (۲۸۷/۱±۴/۷۶)، کامفرول (۵۸۵/۹±۵/۱۰)، میریستین (۴۰۸/۵±۶/۴۷)، روتین (۴۰۱/۷±۹/۱۲)، دایدزین (۶۵۲/۱±۷/۶۳) و جنیستئین (۴۸۶/۱±۸/۵۹) در عصاره خود دارای بیشترین تعداد ترکیبات فلاونوئیدی بود

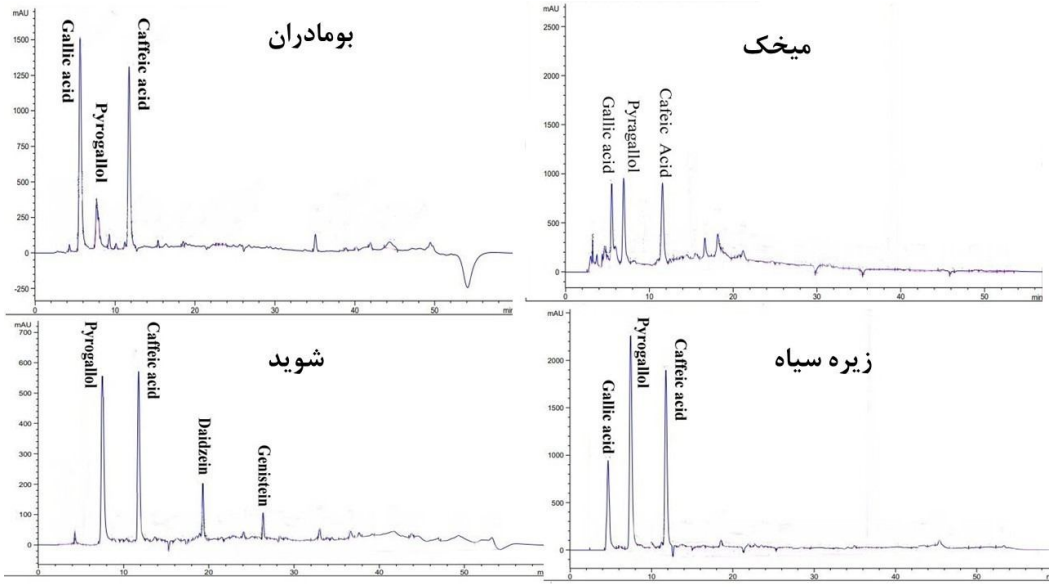
(جـــدول ۳). نمـــودار کرومـــاتوگراف ترکیبـــات فلاونوئیدی عصاره‌های گیاهی ذکر شـده در شـکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: ارزیابی ترکیبات فنولیکی عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

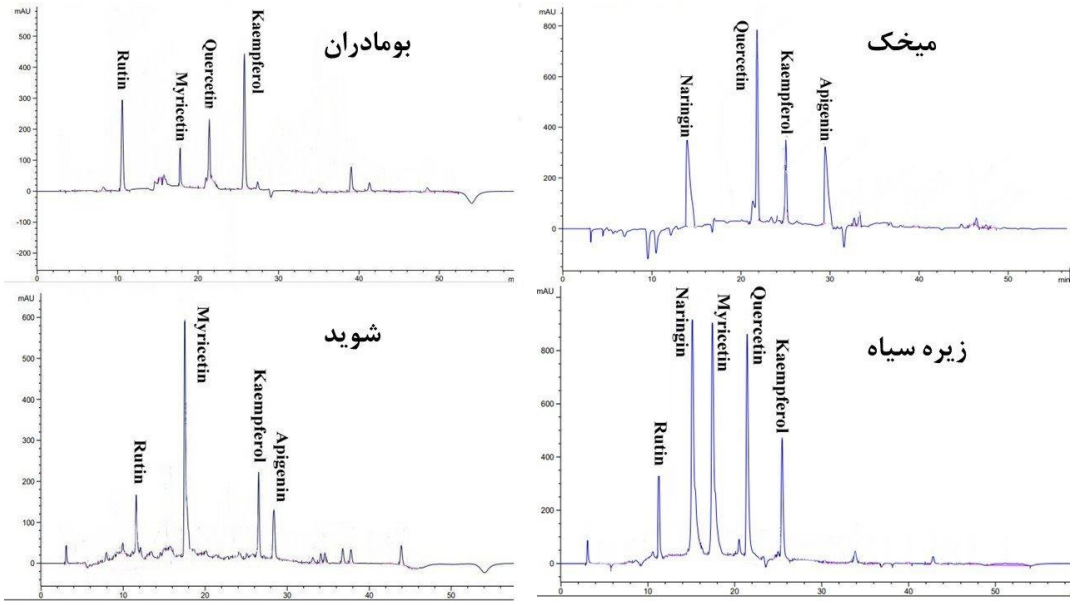
عصاره	ترکیبات فنولیک (میکروگرم بر گرم وزن خشک نمونه)						
	گالیک اسید	پیروگالول	سالیسیلیک اسید	کافئیک اسید	وانیلیک اسید	سیرینجیک اسید
بومادران	۲۰/۵±۴/۱۹	۳۶۹۸/۲±۷/۵۹	–	۴۵۷/۱±۳/۲۸	–	–
میخک	۳۶۸/۷±۵/۰۳	۳۵۱۲/۹±۹/۴۴	–	۳۴۸/۸±۴/۲۸	–	–
شوید	–	۲۸۱۹/۸±۵/۳۸	–	۲۹۸۵/۵±۳/۶۲	–	–
زیره	۹۳/۳±۷/۳۶	۲۷۲۸/۲±۳/۷۱	–	۸۸۹/۷±۹/۳۷	–	–

جدول ۳: ارزیابی ترکیبات فلاونوئیدی و ایزوفلاونوئیدی عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

عصاره	**ترکیبات فلاونوئیدی و ایزوفلاونوئیدی (میکروگرم بر گرم نمونه خشک)**							
	آپیژنین	کامفرول	میریستین	نارنجین	کوئرستین	روتین	دایدزین	جنیستئین
	–	–	–	–	–	–	–	–
بومادران	–	۶۸۱/۶۵±۴/۷۶	۲۵۳۳/۱±۵/۶۷	–	۵۲۹/۱±۶/۷۱	۲۵۳۳/۱±۳/۷۶	–	–
میخک	۴۰۱/۶±۴/۱۷	۷۸۵/۲±۶/۵۷	–	۲۷۹۸/۲±۹/۹۳	۱۴۸۶/۶±۵/۴۶	–	–	–
شوید	۲۸۷/۱±۴/۷۶	۵۸۵/۹±۵/۱۰	۴۰۸/۵±۶/۴۷	–	–	۴۰۱/۷±۹/۱۲	۶۵۲/۱±۷/۶۳	۴۸۶/۱±۸/۵۹
زیره سیاه	–	۱۵۷۰/۵±۶/۳۳	۸۰۲/۸±۲/۹۵	۱۹۷۴/۶±۶/۳۱	۵۰۴/۵±۴/۶۸	۸۰۲/۸±۷/۹۲	–	–



شکل ۱: مقایسه نمودار کروماتوگراف ترکیبات فنولیکی عصاره‌های بومادران، میخک، شوید و زیره سیاه.



شکل ۲: مقایسه نمودار کروماتوگراف ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌های بومادران ، میخک ، شوید و زیره سیاه

نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی: افزایش بیش از حد رادیکال‌های آزاد سبب استرس اکسیداتیو و بروز بیماری‌هایی نظیر بیماری‌های پوستی، قلبی، کلیوی و آلزایمر می‌شود (Butterfield and Halliwell, 2019). از این رو شناسایی ترکیبات موثره گیاهی با توان آنتی اکسیدانی میتواند به جلوگیری از بروز بیماری های ناشی از استرس اکسیداتیو کمک نماید. ترکیبات فنولیکی موجود در گیاهان دارویی نقش محافظتی بالقوه‌ای را در برابر بیماری‌های تحت تاثیر استرس اکسیداتیو دارند. نتایج حاصل از بکارگیری غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌های مورد مطالعه که توانایی روبش ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH و NO را دارا بودند (IC_{50}) در جدول ۴ آورده شده است. ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های هیدروالکلی شوید، زیره سیاه، بومادران و میخک در این آزمایش نشان داد که عصاره این گیاهان ظرفیت کمی در مهار رادیکال‌های آزاد نسبت به اسید اسکوربیک (ویتامین C) داشتند. بر اساس جدول ۴ عصاره گیاه میخک در مقایسه با بقیه عصاره‌های مورد بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی قویتری داشت. مقادیر IC_{50} بدست آمده برای عصاره میخک از دو روش DPPH و NO به ترتیب برابر ۸۲/۹۵ و ۱۰۴/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (هر چه مقدار IC_{50} کوچکتر باشد، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر خواهد بود).

نتیجه سنجش مهار آنزیم‌ها و تعیین ارزش IC_{50}: پتانسیل مهار آنزیم‌های زانتین اکسیداز، هیالورونیداز، استیل کولین استراز، الاستاز و تیروزیناز تحت تاثیر مهارکننده‌های عصاره شوید، زیره سیاه،بومادران و میخک در جدول ۵گزارش شده است. فعالیت این عصاره‌ها در مهار آنزیم‌های مذکور از داروهایی خالصی که به عنوان استاندارد استفاده شده بودند، کمتر بود. بر اساس این جدول سه عصاره میخک (۵۵/۳±۶/۱۲)، بومادران (۹۸/۵±۵/۷۵) و زیره سیاه (۱۹۸±۸/۴۳) بیشترین اثر گذاری را بر روی مهار آنزیم زانتین‌اکسیداز داشتند. هر چند که عصاره میخک علاوه بر مهار آنزیم زانتین اکسیداز باعث مهار آنزیم تیروزیناز (۱۰۴/۳±۳/۴۳) شده است. با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۵ عصاره میخک در مقایسه با بقیه عصاره‌ها اثر قویتری در مهاراین آنزیم‌ها داشته است.

جدول ٤: بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی

عصاره	IC_{50} (µg/ml)	
	DPPH	NO
بومادران	۲۰۰ >	۲۰۰ >
میخک	۸۲/۹±۶/۷۳	۱۰۴/۳±۷/۳۶
شوید	۲۰۰ >	۲۰۰ >
زیره سیاه	۲۰۰ >	۲۰۰ >
اسید اسکوربیک	۲۲/۶±۲/۴۷	۵۴/۷±۳/۱۱

جدول ۵: نتیجه بررسی پتانسیل مهار آنزیم‌های زانتین اکسیداز، هیالورونیداز، استیل کولین استراز، الاستاز و تیروزیناز تحت تاثیر عصاره‌های گیاهی

نام فارسی	IC_{50} (µg/ml)				
	زانتین اکسیداز	هیالورونیداز	استیل کولین استراز	الاستاز	تیروزیناز
بومادران	۷۸/۵±۹۸/۵	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >
میخک	۱۲/۶±۵۵/۳	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۴۳/۳±۱۰۴/۳
شوید	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >
زیره سیاه	۱۹۸±۸/۴۳	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >	۲۰۰ >
کوجیک اسید[1]	–	–	–	–	۴۳/۸±۲/۰۷
گالانتامین[2]	–	–	۹۳/۳±۵/۱۶	–	–
تانیک اسید[3]	–	۷۷/۲±۲/۷۹	–	۶۵/۳±۴/۱۲	–
آلوپورینول[4]	۴/۵±۰/۲۳	–	–	–	–

[1]Kojic acid, [2]gallantamin, [3]tannic acid, [4]allopurinol

جدول ٦: نتایج حاصل از خاصیت ضدالتهابی عصاره‌های مورد مطالعه

عصاره	درصد مهار نیتریک اکساید	درصد زنده مانی
بومادران	۲۵/۱±۴/۲۹	۱۱/۷۳±۱۰۵/۴
میخک	۷/۳۶±۶۱/۲	۵/۰۷±۹۸/۱
شوید	۴/۲۱±۳۳/۶	۷/۴۷±۱۱۲/۲
زیره سیاه	۶/۴۹±۵۱/۵	۹/۷۶±۹۹/۱
L-NAME	۴/۱۷±۸۵/۴	۲/۳۱±۱۱۸/۶

نتایج **بررسی فعالیت ضدالتهابی عصاره‌ها:** التهاب یک سیستم دفاعی است که محرک‌های مضر یا عفونت‌های میکروبی را از بین می‌برد. هنگامی که پاسخ‌های التهابی آغاز می‌شود، بافت آسیب دیده به سرعت توسط ارسال پیامهایی، التهاب را به دیگر بافتهای بدن گزارش می‌دهد. تولید نیتریک اکسید به عنوان یک نشانگر زیستی التهاب در سلول‌ها محسوب می‌شود. رادیکال آزاد نیتریک اکسید توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز از سوخت و ساز ال-آرژنین تولید می‌شود. التهاب به بیماری‌های بی‌شماری از جمله روماتیسم مفاصل، برونشیت مزمن، آسم و سرطان ارتباط دارد. نتایج حاصل از خاصیت ضد التهابی نشان داد که همه عصاره‌های گیاهی اثر معنی داری بر مهار نیتریت اکساید دارند به طوری که عصاره گیاه میخک با بیش از ۶۱ درصد، بالاترین مهار

نیتریت اکساید و خاصیت ضد التهابی را نشان می‌دهد (جدول ۶).

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی و ساپونین‌ها قسمت اعظم ترکیبات موثره موجود در گیاهان مورد بررسی را به خود اختصاص می‌دهد(جدول ۱) .عمده خواص دارویی گیاهان به تنوع ترکیبات شیمیایی و غلظت ترکیبات موثره موجود در گیاهان ارتباط مستقیم دارد. از میان ترکیبات موثره گیاهان، فنولیک ها و فلاونوئیدها به دلیل وفور آنها در گیاهان از جایگاه ویژه ای برخوردارند. جالب توجه است که عمدتا فنولیک ها و فلاونوئیدها بسته به نوع ترکیب، حضور تعداد گروه های فعال شیمیایی، حضور قندها یا اسیدهای آمینه در ساختار آنها و شکل فضایی گروه های فعال موجود در ساختار ترکیبات فنولیکی و فلاونوئیدی میتوانند خواص دارویی متفاوتی در گیاهان ایجاد کنند. در این تحقیق در بین گیاهان مورد بررسی، عصاره گل میخک از پتانسیل بالایی از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (جدول ۴)، مهار آنزیم زانتین اکسیداز، مهار آنزیم تیروزیناز (جدول ۵) و خواص ضد التهابی (جدول۶) نسبت به گیاهان بومادران، شوید و زیره سیاه برخوردار بود. این خواص دارویی عصاره میخک را می‌توان به وجود ترکیبات فنولیکی و فلاونوئیدی نظیر آپیژنین، کامفرول، نارنجین و کوئرستین نسبت داد.

محققان زیادی گزارش کردند که وجود ترکیبات فنولیکی باعث مهار آنزیم تیروزیناز شده است (Win Yee et al., 2021). از جمله در مطالعه آرنگ و همکاران (Arung et al., 2011) گزارش شد که مهار آنزیم تیروزیناز می‌تواند به کاهش تولید ملانین و روشن نمودن رنگ پوست کمک نماید به طوریکه ترکیبات ذکر شده در عصاره میخک توانسته بود تولید ملانین را در سلول‌های ملانوما B16 به میزان ۶۰ درصد مهار کند. مهار تولید ملانین توسط عصاره میخک نشان از پتانسیل این عصاره در تولید کرم‌های روشن کننده پوست می‌باشد (Arung et al., 2011; Win Win Yee et al., 2020). نتایج آزمایش حاضر حاکی از آن بود که بیشترین ترکیبات فنولیکی مربوط به عصاره میخک است که این یافته‌ها با گزارش ارائه شده توسط آرنگ و همکاران (Arung et al., 2011) همخوانی دارد. مطالعه دویودی و همکاران (Dwivedi et al., 2011) نشان داد که عصاره میخک با مهار رشد سلول‌های سرطانی HeLa (سرطان دهانه رحم)، سرطان پستان و سرطان پروستات باعث کاهش رشد آن‌ها شد که با یافته‌های تحقیق (درصد زنده‌مانی سلول‌ها و درصد مهار نیتریک اکساید) حاضر مطابقت داشت (Dwivedi et al., 2011). اوزیک و همکاران (Özek et al., 2019) اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره بابونه را بررسی نمودند که ارزش IC_{50} این عصاره با روش DPPH برابر ۱۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که از ارزش IC_{50} عصاره میخک (۸۹/۲) تحقیق حاضر بیشتر بود (هر چه درصد IC_{50} کمتر باشد میزان مهار رادیکال‌های آزاد بیشتر خواهد شد).

گزارشات دو دهه اخیر (Santoro et al., 2007; Oskouian et al., 2011. Liyanaarachchi et al., 2018) نشان داده است که داروهای سنتتیک با وجود کارآیی غیر قابل انکار، عوارض نامطلوب زیادی نشان داده که منجر به افزایش تمایل بیماران به استفاده از داروهای با منشا گیاهی شده است. همچنین در دسترس و ارزان بودن داروها با منشا گیاهی از دیگر عوامل موثر در ترجیح بیمار به استفاده از اینگونه داروهاست. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه میخک در کنار ترکیبات ساپونین‌ها دارای ترکیبات فنولیکی گالیک اسید، پیروگالول،

کافئیک اسید، و ترکیبات فلاونوئیدی آپیژنین، کامفرول، نارنجین و کوئرستین بوده که این ترکیبات به نظر می‌رسد باعث فعالیت آنتی اکسیدانی، مهار آنزیم زانتین اکسیداز، مهار آنزیم تیروزیناز و خواص ضد التهابی عصاره هیدروالکلی میخک شده است که با نتایج لیانارچکی و همکاران (Liyanaarachchi et al., 2018) در مورد آنزیم تیروزیناز تطابق داشت.

نتیجه بررسی مهار آنزیم زانتین اکسیداز پژوهش حاضر همسو با نتیجه نگویان و همکاران (Nguyen et al., 2004) بود که بیان نمودند که از بین ۲۸۸ عصاره مورد بررسی بر روی مهار زانتین اکسیداز، همه عصاره‌ها با افزایش غلظت باعث مهار آنزیم زانتین اکسیداز شدند. اگرچه نتیجه این پژوهش همسو با گزارشات متیو و سابرامانیان (Mathew and Subramanian, 2014) و اجایی و همکاران (Ajayi et al., 2019) در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها همسو بود اما نتایج ضعیف تری در تحقیق حاضر درخصوص مهار استیل کولین استراز (IC_{50}>200) بدست آمد. هیندرا و همکاران (Hendra et al., 2011) اثر آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب و سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit بررسی و گزارش کردند که نتایج آن‌ها مشابه نتایج عصاره هیدروالکلی میخک در تحقیق حاضر بود.

با توجه به ارزیابی‌های صورت گرفته عصاره هیدروالکلی میخک از پتانسیل بالایی به عنوان ترکیب ضد التهاب، روشن کننده پوست و جلوگیری کننده از چین و چروک و پیری پوست برخوردار است. این عصاره همچنین به نظر می‌رسد به عنوان یک ترکیب کاهنده عوارض بیماری نقرس نیز موثر باشد. ترکیبات موثره گیاهان دارویی منابع ارزشمند طبیعی هستند که امروزه جزء اصلی ترکیبات تشکیل دهنده بسیاری از داروها را در صنعت داروسازی تشکیل می‌دهند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تمایل مصرف کننده‌ها به استفاده از داروهای بر پایه ترکیبات گیاهی بیشتر است از این رو غربالگری و معرفی پتانسیل‌های دارویی گیاهان بومی مناطق مختلف جز اولویت‌ها است.

نتیجه‌گیری نهایی

ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی و ساپونین‌ها قسمت اعظم ترکیبات موثره موجود در گیاهان مورد بررسی را به خود اختصاص می‌دهد. در بین گیاهان مورد بررسی عصاره گل میخک از پتانسیل بالایی از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی، مهار آنزیم زانتین اکسیداز، مهار آنزیم تیروزیناز و خواص ضد التهابی نسبت به عصاره گیاهان بومادران، شوید و زیره سیاه برخوردار بود. این خواص دارویی عصاره میخک را می‌توان به وجود ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی (آپیژنین، کامفرول، نارنجین و کوئرستین) و ساپونین‌ها مربوط دانست. به نظر می‌رسد که از عصاره هیدروالکلی گل میخک می‌توان به‌عنوان یک ماده ضد التهاب، **روشن** کننده پوست و جلوگیری کننده از چین و چروک پوست استفاده نمود. همچنین عصاره گل میخک به عنوان یک عامل کاهنده عوارض بیماری نقرس نیز پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (شعبه مشهد)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و دانشگاه پوترا مالزی جهت تامین تجهیزات آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌شود. هزینه‌های انجام این پروژه توسط نویسندگان مقاله تامین گردید.

References

1. Ajayi, O., Aderogba, M., Obuotor, E. and Majinda, R. 2019. Acetylcholinesterase inhibitor from *Anthocleista vogelii* leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology, 231: 503-506.
2. Al-Sheddi, E. S., Al-Zaid, N. A., Al-Oqail, M. M., Al-Massarani, S. M., El-Gamal, A. A. and Farshori, N. 2019. Evaluation of cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis induced by *Anethum graveolens* L. essential oil in human hepatocellular carcinoma cell line. Saudi Pharmatical Journal, 27(7): 1053-106.
3. Al-Snafi, A.E. 2014. The pharmacological importance of *Anethum graveolens*–a review. International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences, 6(4): 11-13.
4. Amini Navaie, B., Kavoosian, S., Fattahi, S., Hajian-Tilaki, K., Asouri, M., Bishekolaie, R. and Akhavan-Niaki, H. 2015. Antioxidant and cytotoxic effect of aqueous and hydroalcoholic extracts of the *Achillea millefolium* L. On MCF-7 breast cancer cell line. International Biological Biomedical Journal, 1(3): 119-125.
5. Arung, E. T., Matsubara, E., Kusuma, I. W., Sukaton, E., Shimizu, K. and Kondo, R. 2011. Inhibitory components from the buds of Clove (*Syzygium aromaticum*) on melanin formation in B16 melanoma cells. Fitoterapia, 82(2): 198-202.
6. Butterfield, D.A. and Halliwell, B. 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and alzheimer disease. Journal of Nature Reviews Neuroscience, 20(3): 148-160.
7. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. (Myrtaceae): A short review. Phytotherapy Research, 21(6): 501-506.
8. Dahibhate, N.L., Saddhe, A.A. and Kumar, K. 2019. Mangrove plants as a source of bioactive compounds: A review. The Natural Products Journal, 9(2): 86-97.
9. Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A. M., Alves, R. C., Oliveira, M. B., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I. C. 2013. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. Food chemistry, 141(4): 4152-4160.
10. Dwivedi, V., Shrivastava, R., Hussain, S., Ganguly, C. and Bharadwaj, M. 2011. Comparative anticancer potential of Clove (*Syzygium aromaticum*)—an Indian spice—against cancer cell lines of various anatomical origin. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 12(8): 1989-1993.
11. Eftekhar, N., Moghimi, A., Roshan, N. M., Saadat, S. and Boskabady, M. H. 2019. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of hydro-ethanolic extract of *Ocimum basilicum* leaves and its effect on lung pathological changes in an ovalbumin-induced rat model of asthma. BMC Complementary Medicine and Therapies, 19(1): 1-11.
12. Gani, R., Bhat, Z.A., Dar, M.A., Dar, M.A. and ul yousuf Rather, J. 2019. Pharmacognostic and phytochemical characteristics of the fruits of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch, growing wild in Kashmir valley, India. Journal of Pharmaceutical Methods, 10(1): 1-16.
13. Govindarajan, R., Tejas, V. and Pushpangadan, P. 2019. High-performance liquid chromatography (HPLC) as a tool for standardization of complex herbal drugs. Journal of AOAC International, 102(4): 986-992.
14. Hendra, R., Ahmad, S., Oskoueian, E., Sukari, A. and Shukor, M. Y. 2011. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (boerl.) scheff fruit. BMC Complementary Medicine and Therapies, 11(1): 110.
15. Kaur, G.J. and Arora, D.S. 2010. Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the

family umbelliferae-current status. Journal of Medicinal Plants Research, 4(2): 087-094.
16. Khatib, S., Nerya, O., Musa, R., Shmuel, M., Tamir, S. and Vaya, J. 2005. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2, 4-substituted resorcinol moiety. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13(2): 433-441.
17. Liyanaarachchi, G. D., Samarasekera, J. K. R. R., Mahanama, K. R. R. and Hemalal, K. D. P. 2018. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. Industrial Crops and Products, 111: 597-605.
18. Mathew, M. and Subramanian, S. 2014. In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. Public Library of Science (PLOS), 9(1): 1-7.
19. Meena, S. S., Lal, G., Dubey, P. and Meena, M. D. 2019. Medicinal and therapeutic uses of dill (*Anethum graveolens* l.)-a review. Indian Society of Seed Spices, 9(1): 14-20.
20. Morikawa, T., Nakanishi, Y., Inoue, N., Manse, Y., Matsuura, H., Hamasaki, S., Yoshikawa, M., Muraoka, O. and Ninomiya, K. 2020. Acylated iridoid glycosides with hyaluronidase inhibitory activity from the rhizomes of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. Phytochemistry, 169: 112185.
21. Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Le Tran, Q., Watanabe, H. and Kadota, S. 2004. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27(9), 1414-1421.
22. Oskoueian, E., Abdullah, N., Ahmad, S., Saad, W. Z., Omar, A. R. and Ho, Y. W. 2011. Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* L. Kernel meal extract. International Journal of Molecular Sciences, 12(9): 5955-5970.
23. Oskoueian, E., Abdullah, N., Hendra, R. and Karimi, E. 2011. Bioactive compounds, antioxidant, xanthine oxidase inhibitory, tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory activities of selected agro-industrial by-products. International Journal of Molecular Sciences, 12(12): 8610-8625.
24. Özek, G., Özbek, M. U., Yur, S., Göger, F., Arslan, M. and Özek, T. 2019. Assessment of endemic *Cotafulvida* (Asteraceae) for phytochemical composition and inhibitory activities against oxidation, α-amylase, lipoxygenase, xanthine oxidase and tyrosinase enzymes. Records of Natural Products, 13(4): 333-345.
25. Piwowarski, J. P., Kiss, A. K. and Kozłowska-Wojciechowska, M. 2011. Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. Journal of Ethnopharmacology, 137(1): 937-941.
26. Radulescu, V., Popescu, M. L. and Ilies, D.-C. 2010. Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L.(Umbelliferae) cultivated in Romania. Farmacia, 58(5): 594-600.
27. Rita, P. and Animesh, D. K. 2011. An updated overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). International Research Journal of Pharmacy, 2(8): 1-10.
28. Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L., Mendonça, L.Z. and Soares, M. 2007. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. On epimastigotes and trypomastigotes. Journal of Experimental Parasitology, 116(3): 283-290.
29. Sestili, P., Ismail, T., Calcabrini, C., Guescini, M., Catanzaro, E., Turrini, E., Kayla, A., Akhtar, S. and Fimognari, C. 2018. The potential effects of *Ocimum basilicum* on health: A review of pharmacological and toxicological studies. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 14(7): 679-692.

30. Tran, H., Le, N., Trinh, A. and Huynh, T. 2019. Xanthine oxidase inhibitory activities of some Vietnamese medicinal plants. Planta Medica, 85(18): P-403.
31. Tripathi, Y.C. and Saini, N. 2019. Total phenolic, total flavonoid content and antioxidant efficacy of leaves of *Eupatorium adenophorum*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 10(2): 157-166.
32. Win Yee, L., Eric Wei Chiang, CH., Chia Wei, P. and Chen Wai, W. 2021. Tyrosinase Inhibiting Extracts from Coastal Plants as Potential Additives in Skin Whitening Formulations. Current Applied Science and Technology. 21(3): 25-50.
33. Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F. and Saboury, A. A. 2019. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 34(1): 279-309.

Comparative study of phytochemical, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Anethum graveolens* L. , *Bunium persicum* L., *Achillea millefolium* L. and *Syzygium aromaticum* extracts

Faramarzi Dozein, R.[1], Karimi, A.[2], Karimi, E.[3*], Oskoueian, E.[4], Ghasemi, M.[5]

[1]PhD student, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

[2]MSc, Quality Department of Partsazan Coffee Industrial, Mashhad, Iran

[3]Assistant Professor, Department of Biology, Mashhad branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

[4]Assistant Professor, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

[5]Assistant Professor, Department of Agriculture, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 25-7-2021; Accepted: 18-9-2021

Abstract

This study was performed to compare and evaluate the phytochemical, antioxidant and anti-inflammatory properties of extracts of *Anethum graveolens* seeds, *Bunium persicum* L. , *Achillea millefolium* L. flower and *Syzygium aromaticum* L. buds in a completely randomized design at the agricultural research and training center of Mashhad and natural resources in 2021. Methanolic extracts of the plants were extracted by reflux method and their chemical compositions were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). Total phenol and antioxidant capacity of the extracts were evaluated by Folin-Ciocalteu and free radicals DPPH and nitric oxide, respectively. Then, the potential of the extracts to inhibit xanthine oxidase, hyaluronidase, acetylcholinesterase, elastase and tyrosinase was investigated. The results showed that the highest amount of total phenol (40.9 mg GAE/g.DW) and saponin (94.8 mg diosgenin /g.DW) was observed in clove bud extract and the lowest amount of total phenol (7.2 mg GAE/g.DW) and saponin (72.7 mg diosgenin /g.DW) was detected in yarrow flower extract. The HPLC results showed that the concentration of phenolic compounds in the clove extract was higher compared to other plant extracts. The clove bud extract had stronger antioxidant properties than other extracts, so that the IC_{50} values obtained for clove extract by DPPH and NO methods were equal to 82.95 and 104.34 µg/ml, respectively. Three extracts of clove (55.3±12.6 µg/ml) yarrow (98±5.78 µg/ml) and cumin (198±8.34 µg/ml) had the greatest effect on inhibition of xanthine oxidase enzyme. The results of anti-inflammatory properties showed that clove extract with more than 61%, caused the highest inhibition of nitric oxide. It seems that the clove extract has the potential to be used as an anti-inflammatory, skin lightening and anti-wrinkle agent.

Keywords: Antioxidant, Anti-inflammatory, Aromatic plants, Quercetin. Melanin, Tyrosinase

*Corresponding author; ehsankarimi@mshdiau.ac.ir