

سنتیک مهار تیروزیناز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنالیز GC-MS عصاره هگزانی اندام‌های هوایی مجزای گیاهان گون (*Astragalus vegetus* Bunge) و کنگر (*Gundelia tournifortii* L.)

ابوطالب افراسیابی^۱، محمدعلی زارعی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران
۲- دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران
* آدرس مکاتبه: سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی
تلفن: ۰۹۱۸۸۷۱۰۶۳۲، نمابر: ۳۳۶۲۲۷۰۲ (۰۸۷)
پست الکترونیک: mazarei@uok.ac.ir

تاریخ تصویب: ۹۶/۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۷

چکیده

مقدمه: تیروزیناز یک پلی فنل اکسیداز حاوی مس است که در ملائوزوز دخالت داشته و در فرایند قهوه‌ای شدن آنزیمی، که موجب تغییر رنگ و از دست دادن ارزش غذایی در محصولات گیاهی می‌شود. تیروزیناز نقش با اهمیتی را به عنوان کاتالیزور آنزیمی بازی می‌کند. هدف: تعیین درصد مهار، تحلیل سنتیکی مهار تیروزیناز و تعیین اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره هگزانی اندام‌های هوایی گیاهان گون و کنگر. روش بررسی: عصاره هگزانی گیاهان به روش خیساندن در هگزان و تغلیظ حرارتی به دست آمد. اثر مهار عصاره‌ها در چهار غلظت ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر تعیین شد. از اسید کوجیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از DPPH انجام و از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در تعیین ترکیبات عصاره‌ها از دستگاه GC/MS استفاده شد. نتایج: فعالیت مهار عصاره هگزانی برگ گیاه گون برابر ۶۶/۶ درصد و برای برگ و گل گیاه کنگر به ترتیب برابر با ۷۱/۷ و ۶۸/۷ درصد بود. مقدار IC₅₀ برای برگ گیاه گون ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای برگ و گل گیاه کنگر به ترتیب برابر ۰/۵ و ۰/۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. برگ گیاه گون نیز میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان داد. آنالیز GC/MS نتایج معنی‌داری در زمینه معرفی ترکیبات بالقوه مهارکننده به دست نداد. نتیجه‌گیری: عصاره‌های هگزانی تهیه شده از اندام‌های گیاهانی که بیشترین اثر مهارکنندگی تیروزیناز را از خود نشان دادند جهت تهیه مهارکننده‌های جدید این آنزیم با هدف تولید داروهای با اثرات جانبی کمتر مناسب هستند.

کل‌واژگان: *Astragalus vegetus* Bunge، *Gundelia tournifortii* L.، تیروزیناز، عصاره هگزانی



مقدمه

پوست بزرگترین اندام بدن است که محیط داخلی را در برابر محیط خارجی حفظ می‌کند و همچنین تأثیر بیش از حدی در زیبایی بدن دارد. زیبایی یک صفت است که احساس خوشایندی را به شخص می‌دهد که خواسته هر انسانی است. به طور کلی بیماری‌های پوستی ۳۴ درصد از کل بیماری‌های سراسر جهان را در بر می‌گیرند [۱]. در حال حاضر بیماری‌های پوست در کشورهای توسعه یافته و توسعه نیافته یک معضل مهم بهداشتی است. راه‌های متفاوت زیادی برای محافظت از پوست ما وجود دارد. امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی برای مراقبت از پوست امری متداول می‌باشد. گیاهان دارویی شناخته شده نقش مهمی را در درمان انواعی از اختلالات پوستی بازی می‌کنند. این گونه از گیاهان در بسیاری از کشورهای جهان برای مراقبت از پوست به کار برده می‌شوند [۲].

تیروزیناز یک پلی فنل اکسیداز حاوی مس است که در ملانوزنر دخالت دارد. این آنزیم به طور گسترده‌ای در قارچ‌ها، گیاهان عالی و حیوانات توزیع شده است [۳]. آنزیم تیروزیناز دو مرحله متمایز از سنتز ملانین را کاتالیز می‌کند به این ترتیب که در ابتدا "L-تیروزین (L-tyrosine)" به "۳ و ۴ دی هیدروکسی فنیل آلانین (3,4-dihydroxyphenylalanine)" (فعالیت منو فنولازی (L-Monophenolase activity)) هیدروکسیله می‌شود و سپس ماده اخیر به "دوپا کوئینون (Dopaquinone)" اکسید می‌شود (فعالیت دی فنولازی (Diphenolase activity)) [۴]. قهوه‌ای شدن آنزیمی (Enzymatic browning) به طور گسترده در محصولات غذایی گیاهی اتفاق می‌افتد [۵] که موجب تغییر رنگ و از دست دادن ارزش غذایی در این محصولات می‌شود [۶]. در فرایند قهوه‌ای شدن آنزیمی، تیروزیناز نقش با اهمیتی را به عنوان کاتالیزور آنزیمی بازی می‌کند. از طرف دیگر آنزیم تیروزیناز فرایند تبدیل تیروزین به پیگمانت‌های ملانین در پستانداران را کاتالیز می‌کند.

ملانین برای محافظت از پوست انسان در برابر پرتوهای مضر ضروری است، اما تجمعات غیرعادی ملانین باعث تحریک اختلالات پیگمنتاسیون (Pigmentation) مانند ملازما

(Melasma)، فریکلس (Freckles)، افیلیدز (Freckles) و سنیل لنتیژنز (Senile lentiginos) می‌شود. ملانوزنر (Senile lentiginos)، رفتاری از ملانوسیت‌هایی است که جایگاه آنها در لایه بازال اپیدرم است و توسط آنزیم تیروزیناز (Tyrosinase enzyme) (EC 1.14.18.1) کنترل می‌شود [۴]. هایپرپیگمنتاسیون، مانند سنیل لنتیژنز، ملازما، فریکلس و پیگمان‌های جای زخم آکنه‌ها جزء نگرانی‌های خاص برای زنان است، درمان‌های معمولی شامل دارو و لوازم آرایشی و دارویی است که حاوی عوامل ضدپیگمنتاسیون یا عوامل سفیدکننده است [۷]. از کاربردهای بالینی مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز استفاده برای درمان اختلال‌های پوستی وابسته به تجمعات بیش از اندازه ملانین و همچنین وجود آنها در لوازم آرایشی برای جلوگیری از پیگمنتاسیون، است [۸].

مهار فعالیت تیروزیناز بسیار جالب توجه و با اهمیت است و در جلوگیری از قهوه‌ای شدن نامطلوب در سبزیجات و میوه میوه‌ها و همچنین ممانعت از تجمع بیش از اندازه پیگمانت‌های ملانین در پستانداران رویکرد نویدبخشی را می‌دهد. از این رو ترکیبات زیادی با منشأ طبیعی و یا سنتزی برای مهار فعالیت آنزیم تیروزیناز آزمایش شده‌اند [۹، ۱۰]. به هر حال، تعداد کمی از آنها به عنوان افزودنی در غذاها و مواد آرایشی به کار برده شده‌اند، زیرا فعالیت بازدارندگی تیروزینازی کمی داشته، همچنین دارای منابع محدود بوده و اثرات جانبی برای آنها نیز مورد توجه بوده است. از این رو، جستجو برای مهارکننده فاقد اثرات جانبی نامطلوب بر روی آنزیم تیروزیناز با امکان دسترسی آسان و فعالیت مهاری قوی، توسط صنایع غذایی و آرایشی مورد تقاضا می‌باشد [۱۱].

تعدادی از مهارکننده‌های قوی و متوسط آنزیم تیروزیناز، از منابع طبیعی و سنتزی در دهه گذشته گزارش شده‌اند. از جمله مهارکننده مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز مانند آرپوتین (Tyrosinase enzyme)، کوجیک اسید (Kojic acid) و هیدروکوئینون (Hydroquinones) به عنوان سفیدکننده یا ضد پیگمنتاسیون قوی استفاده شده‌اند زیرا آنها توانایی بازدارندگی تولید ملانین در پوست را دارا می‌باشند [۱۲]. به هر حال آرپوتین و کوجیک اسید به شدت فعالیت مهاری در برابر پیگمنتاسیون در ملانوسیت



مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

مواد استفاده شده در این تحقیق شامل آنزیم تیروزیناز قارچی، کوجیک اسید، و سوبسترای پیرو کتکول از شرکت سیگما-آلدریچ (Sigma-Aldrich) خریداری شدند. ان-هگزان (n-Hexane)، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، دی‌فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH)، ویتامین C و سایر مواد شیمیایی دیگر از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شدند.

جمع‌آوری گیاهان

اندام‌های هوایی گیاهان کنگر GT و گون AV از مناطق مختلف استان کردستان توسط مهندس معروفی کارشناس ارشد سیستماتیک گیاهی جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات کشاورزی سنندج منتقل شد. در این مرکز گیاهان شناسایی و رده‌بندی و اندام‌های هوایی شامل گل، برگ و ساقه از همدیگر تفکیک شدند. آنگاه به محل نگهداری آزمایشگاه گروه علوم زیستی منتقل شدند، و در شرایطی امن از نظر آلودگی میکروبی، قارچی و به دور از نور آفتاب، به مدت چندین روز به طور کامل خشک شدند. پس از خشک شدن کامل هر کدام از اندام‌ها به وسیله قیچی باغبانی به قطعات کوچکتر خرد شدند و به وسیله آسیاب الکتریکی خانگی، به صورت پودر کاملاً نرم درآمده و در ظروف پلاستیکی درب‌دار تمیز تا زمان عصاره‌گیری در دمای اتاق نگهداری شدند (جدول شماره ۱).

ملانوسیت‌های سالم یا آزمایش‌های کلینیکی را نشان می‌دهد [۱۳]. سمیت هیدروکوئینون برای ملانوسیت‌ها و قابلیت القاء جهش آن در سلول‌های پرستانداران مطرح شده است [۱۲]. تعداد کمی از مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز به عنوان افزودنی در غذاها و مواد آرایشی به کاربرد شده زیرا دارای فعالیت مهارتی کم، دسترسی محدود و امنیت پایین بودند، از این رو جستجو برای مهارکننده‌ای با دسترسی آسان و امکان تهیه، قدرت مهارتی بالا و امنیت زیاد لازم و ضروری است [۱۴].

فلور گیاهی استان کردستان بسیار غنی است و تعداد زیادی از گیاهان این منطقه به طور سنتی کاربردهای دارویی فراوانی دارند. طی تحقیقی بر روی تعدادی از گونه‌های گیاهی این منطقه، عصاره هگزانی ۶۰ نمونه گیاهی مختلف از لحاظ توانایی در زمینه بازدارندگی فعالیت آنزیم تیروزیناز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که عصاره هگزانی چندین گونه گیاهی از جمله گون، *Astragalus vegetus Bunge* (AV) و کنگر *Gundelia tournifortii L.* (GT) که به ترتیب به خانواده‌های Papilionaceae و Compositae، تعلق دارند، مهارکنندگی بالای ۶۰ درصد برای این آنزیم از خود نشان می‌دهند [۱۵]. با توجه به اینکه در پژوهش‌های پیشین، ترکیب تام عصاره‌های مختلف شیمیایی اندام‌ها و بخش‌های گیاهان برای خاصیت مهارکنندگی آنزیم تیروزیناز بررسی شده است، ضرورت ایجاب نمود که برای به دست آوردن عصاره خالص‌تر با خاصیت مهارکنندگی قوی‌تر، اندام‌ها و بخش‌های مختلف گیاهان مورد بررسی قرار گیرند، تا اجزای فعال با خاصیت مهارکنندگی این آنزیم برای استفاده‌های درمانی مؤثرتر و کم‌خطرتر شناسایی و جداسازی شوند.

جدول شماره ۱- مشخصات هرباریومی نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این مطالعه

کد هرباریومی	خانواده	گونه	تاریخ	ارتفاع محل	جمع‌آوری‌کننده	موقعیت جغرافیایی
۶۴۵۴	پاپیلیوناسه	آستراگالوس و جتوس (گون)	۱۳۹۳/۲/۲۵	۱۷۰۰ متر	مهندس حسین معروفی	کوه آبدر- سنندج - کردستان - ایران
۴۱۸۶	کمپوزیته	گاندلیا ترنی فورتی (کنگر)	۱۳۹۴/۳/۳	۱۴۲۰ متر	مهندس حسین معروفی	روستای کانی مشکان- جنوب سنندج- کردستان - ایران



عصاره گیری

مرتب، قرائت شد. سنجش‌ها هر کدام در سه تکرار انجام شد و چاهک بلانک با تمام اجزاء مواد چاهک تست، بدون آنزیم (به جای آن مقدار ۳۰ میکرولیتر بافر اضافه شد) برای حذف کردن عوامل مزاحم در آزمایش برای تمامی سنجش‌ها قرار داده شد و در نهایت جذب نهایی فقط در اثر فعالیت آنزیم خواهد بود. از کنترل منفی و بلانک آن و همچنین کنترل مثبت و بلانک آن در تمامی سنجش‌ها استفاده شد. در کنترل منفی به جای عصاره از بافر و در کنترل مثبت از اسید کوچیک استفاده شد.

تحلیل داده‌ها

پس از پایان سنجش‌ها جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظر کم شد و همچنین جذب بلانک چاهک‌های تست از جذب بلانک تست کم شد در نتیجه جذب نهایی فقط در اثر فعالیت آنزیم بوده است. برای کنترل منفی نیز به همین طریق جذب نهایی محاسبه شد. جذب به دست آمده برای نمونه تست و کنترل منفی در مقابل زمان ترسیم شد و در نهایت نموداری با یک خط راست به دست آمد. برای تعیین میزان مهار، از معادله (۱) استفاده شد. درصد مهار برای هر سه تکرار محاسبه و در نهایت از آنها میانگین گرفته شد و انحراف استاندارد نیز برای هر مورد محاسبه شد.

معادله (۱)

$$100 \times \frac{\text{شیب نمودار عصاره} - \text{شیب نمودار کنترل منفی}}{\text{شیب نمودار کنترل منفی}} = \text{درصد مهار}$$

تمام مراحل برای چهار غلظت عصاره انجام شد و درصد مهار میانگین محاسبه شد. با استفاده از نمودار درصد مهار علیه غلظت مهار کننده، IC_{50} محاسبه شد که معادل غلظتی از عصاره می‌باشد که موجب ۵۰ درصد مهار آنزیم می‌شود.

آنالیز سنتیک مهار آنزیمی

به منظور تعیین نوع مهار اعمال شده توسط عصاره‌های داری بیشترین درصد بازدارندگی، نمودار معکوس مضاعف لینویور-برک بر اساس واکنش آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده و بدون حضور عصاره (کنترل) در هشت غلظت

برای تهیه عصاره هر کدام از اندام‌ها، میزان ۴۰ گرم از پودر آنها توزین و در یک ظرف شیشه‌ای کاملاً تیره ریخته شد و سپس مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر از آن-هگزان به آن افزوده شد. مخلوط اخیر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف و سپس برای تغلیظ عصاره از دستگاه روتاری اوپراتور استفاده شد. جهت تغلیظ بیشتر، عصاره‌ها بر روی شیشه ساعت به قطر ۱۵ سانتی متر پخش شده و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در زیر هود، تا خشک شدن کامل نگهداری شدند. سپس عصاره‌های حاصل جمع‌آوری و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری در فریزر ۲۰- درجه، جهت مراحل بعدی آزمایش، نگهداری شدند.

سنجش مهار آنزیم تیروزیناز

در این مطالعه جهت سنجش اثر مهارتی فعالیت آنزیم تیروزیناز توسط عصاره از روش خطی و همکاران با مختصر تغییراتی استفاده شد [۱۶]. تمامی عصاره‌ها در چهار غلظت ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تست شدند. از کوچیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. از پیروکتیکول ۲ میلی‌مولار به عنوان سوپسترا استفاده شد و همچنین برای ثابت نگه داشتن pH از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد.

تمامی سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Tekan مدل Sunrise) و به ترتیب زیر انجام شد. ۱۱۰ میکرولیتر از بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار، $pH = 6.5$)، ۳۰ میکرولیتر از آنزیم تیروزیناز (۲۵ U/ml در بافر فسفات) و ۱۰ میکرولیتر از عصاره به چاهک تست افزوده شد. سپس برای مخلوط شدن کامل، میکروپلیت به مدت ۵ ثانیه در درون دستگاه میکروپلیت ریدر مرتعش شد، سپس ۵۰ میکرولیتر از سوپسترا (پیروکتیکول) به هر چاهک تست افزوده شد و پس از ۵ دقیقه آنکوبه شدن در دمای اتاق برای اندازه‌گیری میزان جذب، میکروپلیت به دستگاه میکروپلیت ریدر منتقل شد. میزان جذب ۱۵ مرتبه با فواصل یک دقیقه‌ای و در طول موج ۴۹۲ نانومتر و ۲ ثانیه هم‌زدن در هر



معادله (۲)

$$100 \times \frac{\text{جذب عصاره-جذب کنترل منفی}}{\text{جذب کنترل منفی}} = \text{درصد فعالیت آنتی اکسیدانی}$$

تعیین ترکیبات عصاره‌ها به روش GC/MS

GC-MS یکی از روش‌های کروماتوگرافی است که برای بررسی و جداسازی مواد فرار بدون تجزیه شدن آنها به کار می‌رود. به طور کلی، کروماتوگرافی گازی برای جداسازی و شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده یک مخلوط و تجزیه کمی آنها نیز کاربرد دارد. نظر به اینکه در صورت وجود خاصیت مهارکنندگی در عصاره متانولی اندام‌های گیاهان، باید بدانیم که این خاصیت مربوط به کدامیک از اجزای تشکیل‌دهنده عصاره است، لذا شناسایی ترکیبات نیز صورت گرفت. جهت شناسایی ترکیبات عصاره‌های مختلف گیاهان از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی GC/MS استفاده می‌شود (جدول شماره ۲). پس از تزریق نمونه‌ها به دستگاه کروماتوگرافی GC/MS با محاسبه و بررسی مولفه‌های مختلف، طیف‌های جرمی ترکیبات موجود در عصاره‌ها و مقایسه تمامی این مؤلفه‌ها با مشخصات ترکیب‌های استاندارد اقدام به شناسایی اجزای موجود در عصاره‌ها شد.

مختلف سوپسترا رسم شد. غلظت‌های تهیه شده سوپسترا بر اساس ضرایب تصحیح‌کننده نمودار لینیور-برک انتخاب، و عملاً سوپسترا در هشت غلظت ۳/۳۳، ۲/۵، ۲، ۱/۶۷، ۱/۳۳، ۱/۲۵، ۱/۱۱ و ۱ میلی‌مولار تهیه شد. برای کنترل و هر یک از غلظت‌های مهارکننده، سرعت بیشینه واکنش آنزیمی (Vmax) و ثابت میکائیلیس (Km) تعیین شد و بر اساس اطلاعات اخیر، ثابت مهارکنندگی (Ki) و دیگر پارامترهای ظاهری با استفاده از نمودارهای ثانویه در غلظت‌های مختلف مهارکننده به دست آمد.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌هایی که بالاترین درصد فعالیت مهارتی تیروزیناز را نشان داده‌اند از روش فو و همکارانش استفاده شد [۱۷]. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH (حل شده در متانول) به چاهک‌ها افزوده شد و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به آن افزوده می‌شد. آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شد. از محلول DPPH به عنوان کنترل منفی نیز استفاده شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری می‌شد. از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطابق معادله (۲) محاسبه شد.

جدول شماره ۲- مشخصات دستگاه GC/MS

مدل A-7890، شرکت Agilent، ساخت کشور آمریکا	دستگاه GC
N-5	نوع ستون
طول ۳۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر	ابعاد ستون
دمای اولیه ۴۵ °C، گرادیان دمایی ۲ °C/min، دمای نهایی ۲۵۰ °C	برنامه‌ریزی دمایی ستون
Split/split less (نسبت ۱ به ۱۰)	محل تزریق
هلیوم	گاز حامل
مدل A-5973، شرکت Agilent، ساخت کشور آمریکا	دستگاه Mass
۲۳۰ °C	دمای محفظه یونش
کوادرپل (Quadrupole)	تجزیه‌گر جرمی
۱۵۰ °C	دمای تجزیه‌گر جرمی



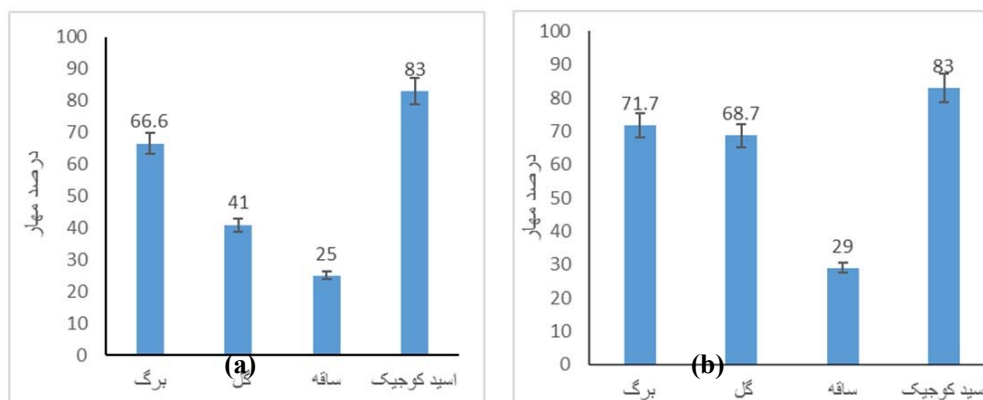
بررسی سنتیکی مهار آنزیم تیروزیناز

نتایج مطالعه سنتیکی عصاره هگزانی اندام برگ گیاه الگوی مهار نارقابتی را نشان می‌دهد (شکل شماره ۲a). همچنین اندام گل گیاه الگوی مهار نارقابتی را نشان می‌دهد (شکل شماره ۲b). در حالی که عصاره اندام برگ الگوی مهار ترکیبی (رقابتی - غیررقابتی) از خود نشان می‌دهد (شکل شماره ۲c).

نتایج

درصد مهار تیروزیناز و تعیین ارزش IC_{50}

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که، درخصوص گیاه گون بیشترین درصد مهار مربوط به غلظت ۱ mg/ml عصاره اندام برگ (شکل شماره ۱، a) این گیاه می‌باشد. همچنین در خصوص گیاه کنگر بیشترین درصد مهار مربوط به غلظت ۱ mg/ml عصاره اندام برگ (شکل شماره ۱، b) آن بود. نتایج مربوط به IC_{50} در جدول شماره ۲ آمده است که نشان می‌دهد کمترین مقدار IC_{50} متعلق به اندام گل از گیاه کنگر می‌باشد.

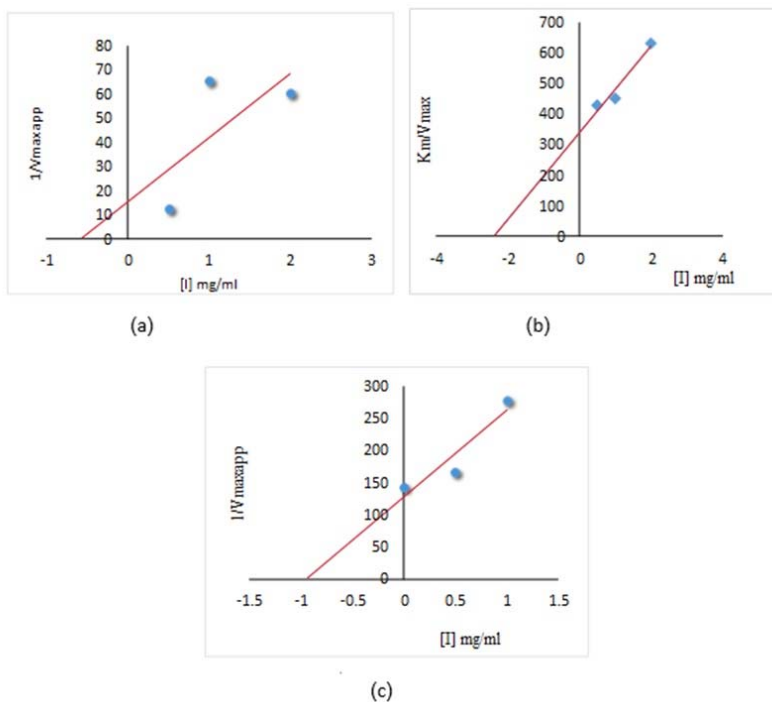


شکل شماره ۱- درصد مهار فعالیت تیروزیناز توسط اندام‌های مختلف گیاهان (a) *Astragalus vegetus* Bunge (b) *Gundelia tournifortii* L.

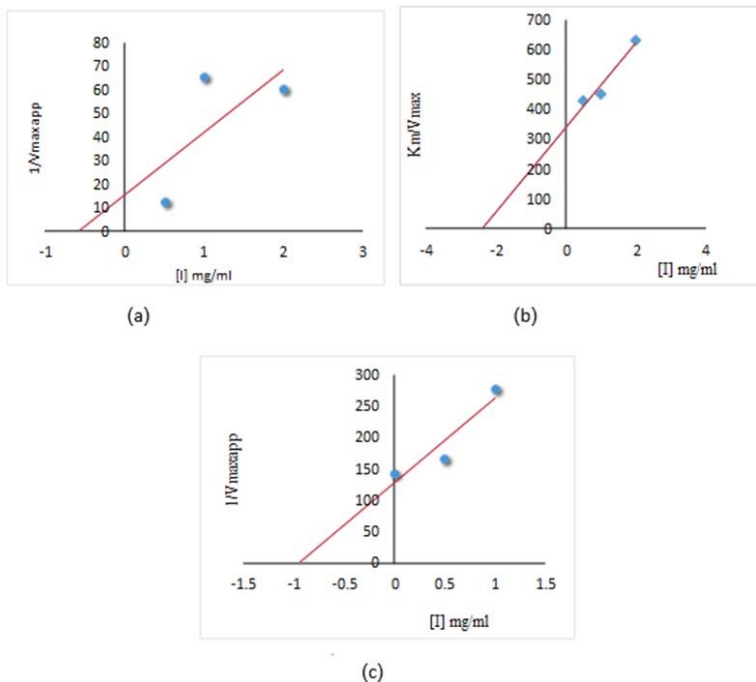
جدول شماره ۲- میزان IC_{50} عصاره هگزانی اندام‌های گیاهان در مقایسه با اسید کوچیک

نام علمی گیاه	نوع اندام	IC_{50} (mg/ml)
<i>Astragalus vegetus</i> Bunge	برگ	۰/۵۰
<i>Gundelia tournifortii</i> L.	برگ	۰/۵۰
<i>Gundelia tournifortii</i> L.	گل	۰/۳۲
Kojic acid		۰/۱۵۱۳۵





شکل شماره ۲- نمودار مضاعف معکوس، عصاره هگزانی (a) اندام برگ گیاه *Astragalus vegetus Bunge*؛ (b) اندام گل گیاه *Astragalus vegetus Bunge*؛ و (c) اندام برگ گیاه *Gundelia tournifortii L.*، در غلظت‌های ۳/۳۳، ۲/۵، ۲، ۱/۶۷، ۱/۳۳، ۱/۲۵، ۱/۱۱ و ۱ میلی مولار از سوبسترا (پیروکتکول) و غلظت ۱ mg/ml عصاره



شکل شماره ۳- نمودارهای ثانویه برای محاسبه میزان ثابت‌های مهار، (a) اندام گل *Gundelia tournifortii L.* (b) اندام برگ *Gundelia tournifortii L.* و (c) اندام برگ *Astragalus vegetus Bunge*



کروماتوگرام در شکل شماره‌های ۴ و ۵ و جزئیات آن در جدول شماره ۵ آمده است. بر اساس این نتایج، ۳،۲،۲-تری‌متیل پنتان (۲۴/۳۲ درصد)، ۲-متیل - بوتن (۲۲/۶ درصد) و تتراهیدرو-۳-متیل هگزان (۱۷/۹۲ درصد) بیشترین ترکیبات موجود در عصاره هگزانی اندام گل گیاه کنگر هستند. ترکیبات، ۳-اتیل-۲،۲-دی‌متیل دکان (۳۰/۰۱ درصد)، ۲-متیل-۲-پنتن (۲۷/۸ درصد)، ۳-متیل هگزان (۱۴/۹ درصد) و سیکلو هگزان (۹/۹۶ درصد) بیشترین ترکیبات موجود در عصاره هگزانی اندام برگ گیاه کنگر هستند. همچنین ترکیبات، ۳-اتیل-۲،۲-دی‌متیل دکان (۳۱/۷۹ درصد)، ۳-متیل-۲-پنتن (۲۲/۴ درصد)، تترا هیدرو ۳-متیل پنتان (۱۷/۹ درصد)، سیکلو هگزان (۸/۶ درصد)، ۲-متیل فوران (۸/۰۴ درصد) و ۴،۲-دی‌متیل اکتان (۵/۹۵ درصد) که عمدتاً آلکان و الکن شاخه‌دار یا حلقوی هستند، بیشترین سهم را در مجموع ترکیبات عصاره هگزانی اندام برگ گون دارند.

مقادیر پارامترهای سینتیکی برای عصاره اندام برگ و اندام‌های برگ و گل به ترتیب در جدول شماره ۳ آمده است. جهت تعیین مقدار K_i و K_I از نمودارهای ثانویه استفاده شد (شکل شماره ۳).

تعیین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره برگ در غلظت ۱ mg/ml بسیار قابل توجه بود. همچنین عصاره هگزانی اندام گل گیاه دارای میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به اندام برگ آن می‌باشد. جدول شماره ۴ میزان EC_{50} برای عصاره‌های هگزانی و ویتامین C را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از آنالیز GC/MS عصاره‌های گیاهی

نتایج حاصل از آنالیز عصاره‌های هگزانی، توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) به صورت

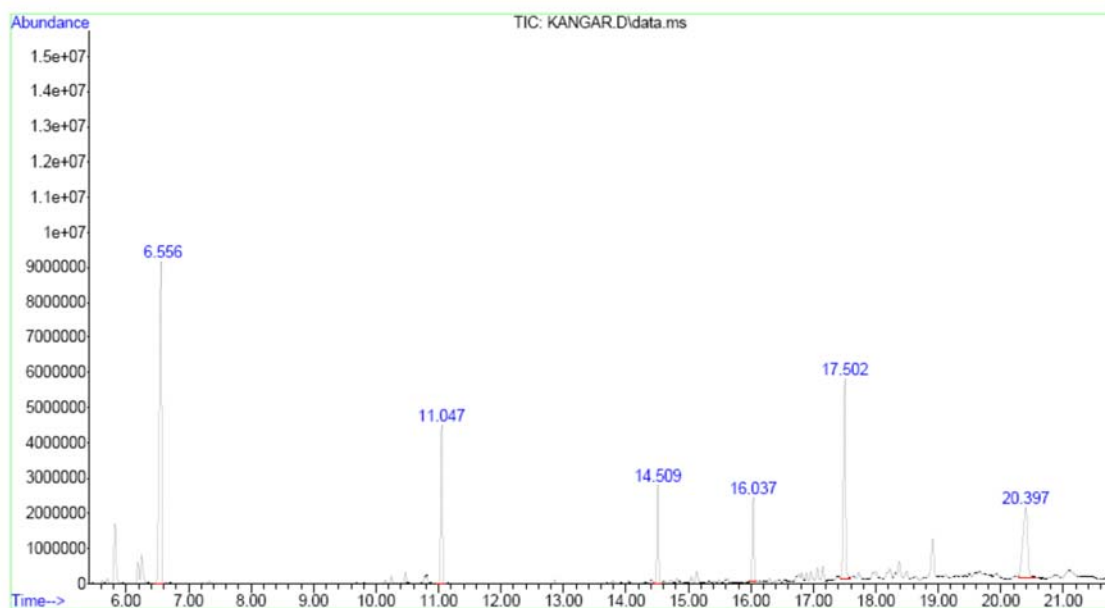
جدول شماره ۳- مقادیر پارامترهای سینتیکی، برای عصاره اندام‌های مختلف گیاهان مورد مطالعه

KI (mg/ml)	Ki (mg/ml)	Vmaxapp (ΔOD/min)	Vmax (ΔOD/min)	Kmapp (mM)	Km (mM)	پارامتر سینتیکی	
						اندام	نام علمی گیاه
-	۰/۹۵	۰/۰۱۰۴۷۸	۰/۰۲۴	۴/۲۵	۷/۷	برگ	<i>Astragalus vegetus</i> Bunge
۲/۸	۲/۴	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳	۱۱/۵۶	۹/۱۴	برگ	<i>Gundelia tournifortii</i> L.
-	۰/۵۸	۰/۰۱۴	۰/۰۲۴	۴/۹۹	۷/۷	گل	<i>Gundelia tournifortii</i> L.

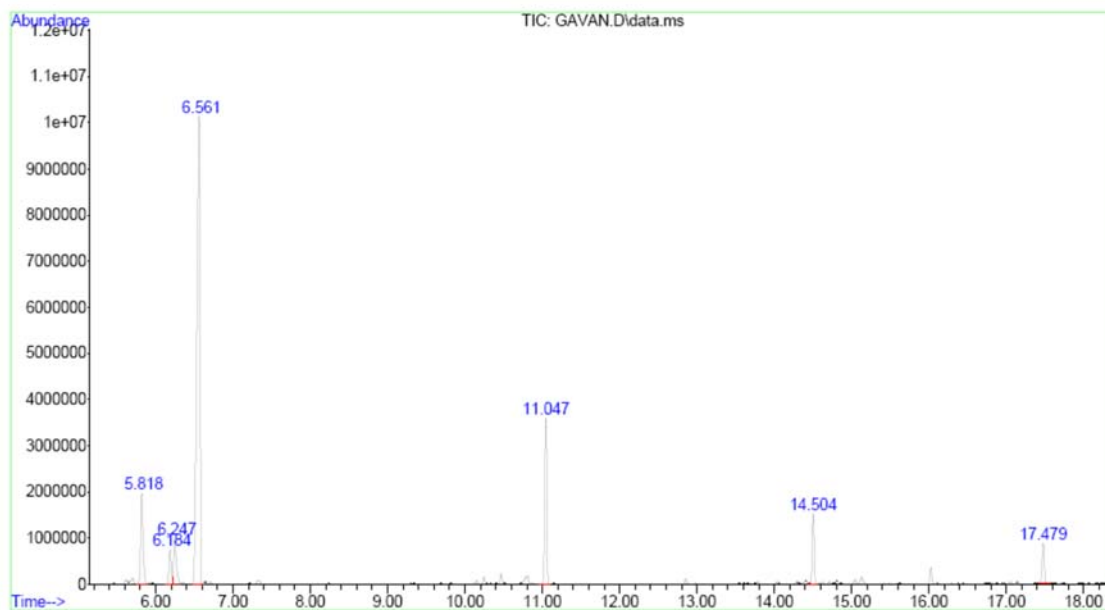
جدول شماره ۴ - مقدار IC_{50} فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای عصاره‌ها و ویتامین C به عنوان کنترل مثبت

اسم علمی گیاه	اندام	EC_{50} (mg/ml)
<i>Astragalus vegetus</i> Bunge	برگ	۰/۲
<i>Gundelia tournifortii</i> L.	برگ	۳/۳
<i>Gundelia tournifortii</i> L.	گل	۷
ویتامین C	-	۰/۰۰۲۲۵





شکل شماره ۴- کروماتوگرام عصاره هگزانی اندام برگ گیاه کنگر *Gundelia tournifortii* L.



شکل شماره ۵- کروماتوگرام عصاره هگزانی اندام برگ گیاه گون *Astragalus vegetus* Bunge



جدول شماره ۵ - ترکیبات عصاره‌های هگزانی حاصل از آنالیز GC/MS

ردیف	گل کنگر	درصد	برگ کنگر	درصد	برگ گون	درصد
۱	۳،۲،۲- تری متیل پنتان	۲۴/۳۲	۳-اتیل-۲،۲-دی متیل دکان	۳۰/۰۱	۳-اتیل-۲،۲-دی متیل دکان	۳۱/۷۹
۲	۲-متیل-بیوتن	۲۲/۶	۲-متیل-۲-پنتن	۲۷/۸	متیل-۲-پنتن	۲۲/۴
۳	تتراهیدرو-۳-متیل هگزان	۱۷/۹۲	۳-متیل هگزان	۱۴/۹	تتراهیدرو-۳-متیل پنتان	۱۷/۹
۴	سیکلو هگزان	۸/۶۹	سیکلو هگزان	۹/۹۶	سیکلو هگزان	۸/۶
۵	۲-متیل-۲-بیوتن-۱-ال	۸/۴۲	۲-متیل-۲-بیوتن-۱-ال	۳/۶	۲-متیل فوران	۸/۰۴
۶	اوکتان	۵/۵۶	۲،۲-دی متیل پنتان	۲/۴	۴،۲-دی متیل اکتان	۵/۹۵
۷	تترادکان	۲/۹۷	۳-متیل هگزان	۱/۸۹	۲،۲-دی متیل پنتان	۱/۴
۸	هگزادکان	۳/۴۵	۲-متیل هگزان	۱/۶۸	دکان	۱/۳۲
۹	دکان	۲/۹۴	اکتان	۱/۶۵	۳-متیل هپتان	۰/۹
۱۰	دودکان	۲/۱	۳،۲-دی متیل پنتان	۱/۵۵	دودکان	۰/۵۳
۱۱	تری دکان	۱	ایزو پروپیل سیکلوتان	۱/۴۸	سیکلوپنتان	۰/۴۸
۱۲	-	-	تترا دکان	۱/۳۳	تترادکان	۰/۳۷
۱۳	-	-	دودکان	۰/۸	۱-اتیل-۳-متیل سیکلوپنتان	۰/۳۲
۱۴	-	-	۳،۱-دی متیل سیکلو پنتان	۰/۵۷	-	-
۱۵	-	-	هپتان	۰/۲۳	-	-
۱۶	مجموع	۹۹/۹۷	مجموع	۹۹/۸۵	مجموع	۱۰۰

بحث

در سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری در زمینه یافتن مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز صورت گرفته است که در اینجا به مواردی از آنها اشاره می‌شود. در سال ۲۰۰۹ دانگ و همکارانش اثر مهارتی ترکیبات استخراج شده از قسمت‌های مختلف *Lonicera japonica* Thumb را که شامل برگ‌ها، گل‌ها و شاخه‌ها بود بر روی آنزیم تیروزیناز آزمایش کردند و نشان دادند که اثر مهارتی در عصاره‌های گرفته شده از گل‌ها در مقایسه با سایر عصاره‌ها بیشتر است و همچنین میزان ترکیبات فنولیک موجود در عصاره گل‌ها از سایر قسمت‌ها بیشتر بود [۱۸]. در سال ۲۰۱۰ جان یانگ و همکارانش سه چالکون و دو فلاونون را از دانه *Psoralea corylifolia* استخراج کردند و فعالیت مهارتی آنزیم تیروزیناز را در دانه این گیاه نشان دادند که چالکون‌ها مهارتی از نوع رقابتی از خود

نشان دادند. از پنج ترکیب استخراج شده دو مورد دارای مقدار IC_{50} کمتر، و سه مورد دیگر دارای مقادیر IC_{50} بیشتری از کوچیک اسید بودند [۱۹]. در حالی که، عصاره‌های مورد آزمایش در این پژوهش الگوهای مهارت رقابتی و ترکیبی را از خود نشان می‌دادند و یکی از عصاره‌ها (عصاره گل کنگر GT) دارای مقدار IC_{50} بسیار نزدیکی به کوچیک اسید است.

همچنین در این پژوهش اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها نیز بررسی و معلوم شد که عصاره برگ گون علاوه بر خاصیت مهارتی تیروزیناز دارای اثر آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد. سال ۲۰۱۱ می و همکارانش از شش ترکیب استخراج شده از پوست گیاه *Peltophrum dasyrachis* اثر مهارتی دو ترکیب از آنها را بر روی آنزیم تیروزیناز ثابت کردند [۲۰].



سودمند هستند و در سیگنال‌های انتقالی و تنظیم بیان ژن کاربرد دارند اما در غلظت‌های بالا این رادیکال‌ها برای DNA و سایر ماکرومولکول‌ها بسیار مضرند. با شروع زندگی تولید غیرکنترل شده رادیکال‌های آزاد منجر به بروز بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان، آترواسکروز و آرتریت روماتوئید می‌شود. از این رو، حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم‌های غذایی کمک مؤثری به کاهش اثرات این خسارت‌های اکسیداتیو می‌کند.

از زمان‌های قدیم قارچ به عنوان یک ترکیب ضروری در رژیم‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گرفت. تعدادی از مطالعات نشان دادند که قارچ‌ها می‌توانند از آسیب‌های اکسیداتیو به DNA سلول‌ها جلوگیری کنند که در نهایت مشخص شد که این عامل بازدارندگی مربوط به تیروزیناز می‌باشد. تیروزیناز با هیدروکسیله کردن تیروزین آن را به ال-دوپا و سپس با اکسیداسیون ال-دوپا آن را تبدیل به دوپاکوئینون می‌کند. این نکته بسیار جالب توجه است، زیرا ال-دوپا به صورت عادی به ترکیبات پیش-اکسیدان سمی متصل می‌شود و تولید دوپا کوئینون الکترون دوست بسیار ناپایدار می‌کند. در چرخه اکسیداسیون و احیا (ردوکس) این کوئینون‌ها می‌توانند تولید اکسی رادیکال‌های مضر، پراکسیدها و سمی کوئینون‌ها کنند [۱۷]. گونه‌های اکسیژن و اکشنگر (ROS) شامل آنیون سوپر اکساید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشند. تجمع ROS می‌تواند در نتیجه تنش‌های اکسیداتیو باشد که وابسته به بیماری‌های انسانی مانند قلبی-عروقی، سرطان، سالخوردگی، دیابت و آترواسکلروز می‌باشد [۱۷]. استفاده از DPPH یک تکنیک عمومی جهت تست فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی می‌باشد.

در این پژوهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای عصاره‌های دارای بیشترین فعالیت مهارتی تیروزیناز اندازه‌گیری شد. عصاره هگزانی برگ AV قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدانی زیادی از خود نشان می‌دهد. در غلظت‌های ۱ و ۱۰ mg/ml قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشابه ویتامین C از خود نشان می‌دهد ولی دارای EC50 پایین‌تری نسبت به ویتامین C می‌باشد.

با توجه به خاصیت مهارت فعالیت تیروزینازی و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هگزانی برگ AV پیشنهاد می‌شود که از آن به عنوان تولید مکمل‌های آنتی‌اکسیدان طبیعی، در رژیم

در سال ۲۰۱۲ چان و همکارانش اثر مهارتی ترکیبات استخراج شده از ریشه گیاه *Smilax china* را به روی آنزیم تیروزیناز قارچی به اثبات رساندند [۲۱]. در سال ۲۰۱۳ توماس و همکاران، عصاره ۶۰ گیاه را بر روی فعالیت آنزیم تیروزیناز قارچی و تیروزیناز سیب زمینی آزمایش کردند. عصاره‌ها حاوی ترکیبات فنولی و ساپونین‌ها بودند که این ترکیبات جداسازی شده و مشخص شد که عمدتاً ترکیبات فنولی موجود، باعث مهار آنزیم تیروزیناز قارچی و فعال شدن آنزیم تیروزیناز سیب زمینی می‌شود.

همچنین از لم و همکارانش اثر بازدارندگی ترکیبات استخراج شده از گیاه *Trifolium nigrescens* Subsp. *Petrivasi* را بر روی آنزیم تیروزیناز اثبات کردند [۲۲، ۲۳].

بالاخره در سال ۲۰۱۴ جیان چن و همکارانش اثر ترکیبات پلی فنولی موجود در سیب را بر روی آنزیم تیروزیناز آزمایش کردند و به این نتیجه رسیدند که این ترکیبات می‌توانند اثر مهارتی بر فعالیت تیروزیناز داشته باشند [۲۴]. همچنین آروموگام آبیرومی و همکارانش با تحقیق بر روی آبمیوه تازه از میوه‌های *Citrus maxima* و *Citrus hystrix* به این نتیجه رسیدند که آبمیوه تازه گرفته شده از این میوه‌ها می‌تواند اثر مهارتی ۸۰ درصدی بر روی آنزیم تیروزیناز داشته باشند [۲۵].

در راستای تحقیقات فوق، نتایج این پژوهش نشان دادند که در گیاه گون بیشترین اثر مهارتی در اندام برگ این گیاه (۶۶/۶ درصد) و در غلظت ۱ mg/ml عصاره هگزانی می‌باشد. این گیاه به خانواده پایلیوناسه تعلق دارد که در غرب ایران و استان کردستان پرانندگی بالایی دارد. ترکیبات پلی‌ساکاریدی موجود در گون باعث افزایش اثرات در مانی و ایمنی در مانی می‌شوند [۲۶]. همچنین برخی از ترکیبات موجود در گون تأثیر محافظتی در برابر فیروز کبدی [۲۷] و اثرات ضدسرطانی دارند [۲۸]. ترکیبات ساپونینی موجود در گون، باعث القای مسمومیت سلولی و ترویج آپوپتوز در سلول‌های HepG2 می‌شوند [۲۹]. از جمله ترکیبات شناخته شده در گونه‌های این خانواده فلاونوئیدها، آمینواسیدهای غیرپروتئینی، ساپونین‌ها، کالوئیدها، ترکیبات نیتروژنی، موسیلاژها و استرول‌ها می‌باشند [۳۰].

تقریباً در همه بافت‌های زنده، فرایند اکسیداسیون سوخت‌های زیستی، نقش مهمی در تولید انرژی بر عهده دارد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن در متابولیسم عادی تولید می‌شوند و در غلظت‌های پایین



آنتی‌اکسیدانی مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص شد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گل از عصاره برگ این گیاه بیشتر است ولی در مقایسه با ویتامین C خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار ناچیزی دارد. تفاوت میان نتیجه این دو پژوهش ممکن است به خاطر شرایط اقلیمی متفاوت میان رویشگاه‌های این گیاه باشد که منجر به ایجاد محتوای سلولی با غلظت متفاوت می‌شود.

به عنوان بخش نهایی این مطالعه، ترکیبات اصلی عصاره‌های متانولی برگ و گل در گیاه کنگر و برگ در گیاه گون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) تعیین شدند. در مجموع ۱۱ ترکیب مختلف و ایزومر برای عصاره متانولی گل در گیاه کنگر شناسایی شدند. در مجموع ۱۵ ترکیب مختلف و ایزومر برای عصاره متانولی برگ در گیاه کنگر شناسایی شدند. در مجموع ۱۳ ترکیب مختلف و ایزومر برای عصاره متانولی برگ در گیاه گون شناسایی شدند. اما ساختار شیمیایی هیچیک از ترکیبات فوق تشابه خاصی با مهارکننده‌های شناخته شده تیروزیناز ندا شدند. لذا با توجه به نتایج مهارتی مؤثر به نظر می‌رسد که باید در مطالعات بعدی از تکنیک‌های دیگری مانند HPLC برای شناسایی یا جداسازی ترکیبات مؤثر استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر مهارتی فعالیت تیروزیناز توسط عصاره هگزانی اندام برگ گون و اندام برگ و گل کنگر شاید بتوان در درمان بیماری‌های ناشی از پرکاری آنزیم تیروزیناز به عنوان منابع بالقوه تهیه‌ی داروهای جدید از این عصاره‌ها بهره جست. همچنین به خاطر دارا بودن اثر آنتی‌اکسیدانی می‌توان به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی با فراوانی مطلوب در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند. حال که جایگاه اندامی این فعالیت در گیاهان فوق مشخص شده است پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های بعدی در راستای جداسازی و خالص‌کردن ترکیب مهارتی و آنتی‌اکسیدانی موجود در این عصاره‌ها صورت پذیرد.

غذایی و یا اضافه کردن آن در محصولات غذایی سالم برای جلوگیری از بیماری‌های مزمن و یا به عنوان عامل ضدقهوه‌ای شدن استفاده شود. در محصولات آرایشی می‌توان از این عصاره به عنوان یک ترکیب فعال آنتی‌اکسیدان و عامل طبیعی سفیدکننده پوست استفاده شود. با این حال، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات دیگر در راستای جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهارتی تیروزیناز صورت پذیرد و از ترکیبات خالص شده در صنایع مختلف استفاده شود.

در عصاره گیاه کنگر GT بیشترین در صد مهار مربوط به اندام برگ (۷۱/۷ درصد) و در غلظت ۱ mg/ml بود. همچنین در اندام گل این گیاه میزان درصد مهار بالا و برابر ۶۸/۷ درصد بوده است. به علاوه، IC₅₀ عصاره هگزانی گل به طور قابل توجهی پایین‌تر از IC₅₀ عصاره هگزانی برگ بود، که می‌تواند حاکی از وجود یک مهارکننده قوی‌تر در عصاره گل باشد. کنگر گیاهی چند ساله، مقاوم و شیرابه‌دار پوشیده از کرک و با تیغ‌های فراوان است. موسم گل‌دهی این گیاه اردیبهشت و خرداد ماه است و انتشار جغرافیایی و سیعی دارد که شامل مناطق غرب، شمال غرب، جنوب و جنوب شرق ایران می‌شود. برای ساقه این گیاه در طب سنتی خواص محافظتی برای کبد و تصفیه خون ذکر شده است.

در طب سنتی ترکیه از دانه خشک شده این گیاه برای درمان بیماری پسی استفاده می‌شود حال آنکه برگ‌های تازه آن ادرارآور است [۲۸]. همچنین در کشور ترکیه به صورت سنتی از ساقه آن برای درمان اسهال، درد معده، برونشیت، سنگ کلیه، آماس گردن و التهاب استفاده می‌شود [۲۹]. پژوهش دیگری در ترکیه نشان داده است که عصاره متانولی قسمت‌های هوایی و دانه این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نسبت به آلفا توکوفرول دارد. آنها نشان دادند که محتوی پلی‌فنولیک دانه گیاه بیشتر از قسمت‌های هوایی آن است و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی دانه از سایر قسمت‌ها بیشتر است [۳۰]. خاصیت ضد باکتری آن نیز بر روی گونه هلیکوباکتریلوری به اثبات رسیده است. در این پژوهش نیز عصاره هگزانی اندام برگ و گل گیاه کنگر جهت بررسی خاصیت



1. Abbasi A.M, Khan M.A, Ahmad M, Zafar M, Jahan S and Sultana S. Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province. *J. Ethnopharmacol.* 2010; 128: 322-335.
2. DeWet H, Nciki S and vanVuuren S.F. Medicinal plants used for the treatment of various skin disorders by a rural community in northern Maputaland. *South African Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2013; 9: 51.
3. van Gelder CW, Flurkey WH and Wichers HJ, Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phyto Chem.* 1997; 45: 1309-23.
4. Hearing VJ, Determination of melanin synthetic pathways. *J. Invest. Dermatol.* 2011; 131: 8 - 11.
5. Mayer AM, Polyphenol oxidases in plants: recent progress. *Phyto Chem.* 1987; 26: 11 - 20.
6. Rigal D, Cerny M, Richard-Forget F and Varoquaux P. Polyphenol oxidase by a *Carica papaya* latex preparation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2001; 36: 677-84.
7. Tripathi R.K, Hearing VJ, Urabe K, Aroca P, and Spritz R.A. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J. Biological.* 1992; 267: 23707-23712.
8. Schallreuter K U, Hasse S, Rokos H, Chavan B, Shalhaf M and Spencer JD. Cholesterol regulates melanogenesis in human epidermal melanocytes and melanoma cells. *Experimental Dermatol.* 2009; 18: 680-688.
9. Kim YJ and Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the futur. *Cell Mol. Life Sci.* 2005; 62: 1707-23.
10. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 2440-75.
11. Zong-Ping Z, Hui-Yuan T, Jie Ch and Mingfu W. Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure-activity relationship study *Fitoterapia* 2013; 84: 224 - 42.
12. Jimbow K, Obata H, Pathak MA and Fitzpatrick TB. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J. Invest. Dermatol.* 1974; 62: 436-49.
13. Curto EV, Kwong C, Hermersdörfer H, Glatt H, Santis C and Virador V. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57: 663-72.
14. Zhu Y. J, Zhou H. T, Hu Y. H, Tang J. Y, Su M. X and Guo Y. J. Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid. *Food Chem.* 2011; 124: 298-302.
15. Hashemi F and Zarei MA. Tyrosinase Inhibitory Activity Within Hexane Extract of Ten Screened Plants From Kurdistan Province of Iran. *International Journal of Advanced Res.* 2014; 2 (11): 2795-2799.
16. Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamira S and Vayaa J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13: 433-441.
17. Fu R, Zhang Y, Guo Y and Chen F. Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of the ethanol-insoluble fraction of water extract of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves. *South African Journal of Botany* 2014; 93: 98-104.
18. Dung NT, Ajpai VK, Rahman A, Yoon JI and Kang SC. Phenolic contents, antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of *Loonier japonica* thumb. *Journal of Food Biochemistry* 2011; 35: 148-160.
19. Jun Young K, Kyeong Yeol Oh, Ji Young K, Hyung Won R, Sook J and Ki Hun P. Polyphenols Displaying Tyrosinase Inhibition from the Seed of



- Psoralea corylifolia. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2010; 534: 427-432.
- 20.** Mai F, Nobuo Y and Mitsuo M. Tyrosinase inhibitory constituents from the bark of *Peltophorum dasyrachis* (yellow batai). *Natural Product Res.* 2011; 25: 1540-1548.
- 21.** Chun L, Ju-Hwan L, Seung-Hyung K and Dong-Seon K, Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. *Food Chem.* 2012; 134: 1146-1148.
- 22.** Tomas FM K, Teunie van H, Jean-Paul Vi, Renske H J, Deborah L N, Willem v.B and Harry G. Potato and Mushroom Polyphenol Oxidase Activities Are Differently Modulated by Natural Plant Extracts *J. Agric Food Chem.* 2013; 62: 214-221.
- 23.** Ozlem D, Temine S, Mehmet O and Gulacti T. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Flavonoids from *Trifolium nigrescens* Subsp. *Petrisavi*. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61: 12598-12603.
- 24.** Yang Y, Yang S, Chen M, Zhang X, Zou Y, and Zhang X. Compound Astragalus and *Salvia miltiorrhiza* extract exerts anti-fibrosis by mediating TGF-beta/Smad signaling in myofibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 118: 264-270.
- 25.** Cho W and Leung K. Invitro and in vivo anti-tumor effects of *Astragalus membranaceus*. *Cancer Letters* 2007; 252: 43-54.
- 26.** Auyeung K, Law P and Ko J. Astragalus saponins induce apoptosis via an ERK- independent NF-κB signaling pathway in the human hepatocellular HepG2 cell line. *International Journal of Molecular Medicine* 2009; 23: 189-196.
- 27.** Ebrahimzadeh H, Niknam V and Maassoumi A. A. The sterols of *Astragalus* species from Iran: GLC separation and quantification. *Biochemical Systematics and Ecol.* 2001; 9: 393-404.
- 28.** Asgary S, Movahedian A, Badiei A, Naderi GA, Amini F and Hmidzadeh Z. Effect of *Gundelia tournefortii* on some cardiovascular risk factors in animal model. *Journal of Medicinal Plants Res.* 2009; 7 (28): 112-119.
- 29.** Sarper F, Akadin G, Simsek I and Yesildad E. An ethnobotanical field survey in the haymana district of Ankara Province in Turkey. *Turkish J. Biol.* 2009; 33: 79-88.
- 30.** Coruh N, Saghdicoglu Celep AG, Ozgokce F and Iscan M. Antioxidant capacities of *Gundelia tournefortii* L. extract and inhibition on glutathione-S-transferase activity. *Food Chem.* 2007; 100: 1249-53.



Tyrosinase Inhibition, Antioxidant Activity and GC-MS Analysis of the Hexane Extracts of the Aerial Parts of *Astragalus vegetus* Bungi. and *Gundelia turnifortii* L.

Afrasiabi AT (M.Sc.)¹, Zarei MA (Ph.D.)^{2*}

1- M.Sc. in Cellular and Molecular Biology, Department of Biological Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran

2- Associate Professor in Biochemistry, Department of Biological Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran

*Corresponding author: Department of Biological sciences, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran

Tel: +98-918-8710632, Fax: +98-87-33622702

E-mail: mazarei@uok.ac.ir

Abstract

Background: The enzyme tyrosinase is a copper-containing polyphenol oxidase, which is involved in melanogenesis. It catalyzes the conversion of tyrosine to melanin pigments in mammals. Tyrosinase plays an important role in enzymatic browning, which causes discoloration and loss economic value of many plant food products. This enzyme is widely distributed in fungi, higher plants and animals.

Objective: The aim of this study was to determine the tyrosinase inhibitory effect of hexane extracts of different aerial parts of *Astragalus vegetus* Bungi and *Gundelia turnifortii* L. Later the kinetics and antioxidant activities of the extracts with the highest inhibitory properties were assessed.

Methods: Aerial parts of the plants were divided to stems, leaves and flowers and air-dried. Hexane extract of each part has obtained by maceration in n-hexane. Inhibitory effects assayed at four different concentrations, using a microplate reader at 492 nm. Kojic acid used as positive control. DPPH method used to determine the antioxidant activities of the extracts and ascorbic acid (positive control). GC/MS device utilized to determine the composition of the extracts.

Results: Main inhibitory activity detected at 1 mg/ml concentration of hexane extract of leaves of *Astragalus vegetus* Bunge (66.6%), and the leaves and flowers of *Gundelia turnifortii* L. (71.7 and 68.7 percent respectively). IC₅₀ values for *Astragalus vegetus* Bungi leaves was 0.5 mg/ml. and for *Gundelia turnifortii* L. leaves and flowers, were 0.5 and 0.32 mg/ml respectively. *Astragalus vegetus* Bungi. plant leaves also showed a considerable antioxidant activity. GC/MS analysis of extracts didn't show any reliable result.

Conclusion: These results suggest that some of the most effective extracts from analyzed plants in this study, may be worthy for further investigation to obtain some new tyrosinase inhibitors with pharmacological applications.

Keywords: *Astragalus vegetus* Bungi, *Gundelia turnifortii* L., Hexane extract, Tyrosinase

