جستجوی فعالیت مهارکنندگی تیروزیناز قارچی در عصاره‌ی متانولی ۷۰ گیاهان استان کردستان

اسرین حسنی[۱]، محمدعلی زارعی[۲]*

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

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۰ **تاریخ پذیرش:** ۹۷/۱۰/۲ DOI: 10.29252/jmp.4.72.S12.247

چکیده

مقدمه: آنزیم تیروزیناز دو مرحله‌ی اول ملانوژنز را در پستانداران کاتالیز می‌کند و مسئول واکنش سیاه‌شدگی آنزیمی میوه‌های آسیب دیده و سبزیجات می‌باشد. با مهار آنزیم تیروزیناز می‌توان این بیماری‌ها را تا حد زیادی درمان کرد.

هدف: یافتن مهارکننده‌های قوی، جدید و دارای عوارض کمتر برای آنزیم تیروزیناز در عصاره‌های گیاهی.

روش بررسی: در این پژوهش اثر مهاری عصاره‌ی متانولی ۷۰ گونه‌ی گیاهی بر روی تیروزیناز قارچی سنجیده شده است. اثر مهاری عصاره‌ها در غلظت‌های نهایی ۴۰۰، ۱۰۰، ۲۵ و ۶/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد سنجش قرار گرفت. از کوجیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است. سنجش‌ها در سه تکرار با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر انجام شد.

نتایج: عصاره‌ی نه گیاه با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل ***Bongardia chrysogonum*** ،***Heptaptera anatolica*** ،***Hyoscyamus kurdicus*** ،***Hypericum scabrum*** ،***Marrubium cuneatum*** ،***Nonea hypoleia*** ،***Salvia suffruticosa*** ،***Scrophularia pruinosa*** و ***Verbascum phoenicum*** و دو گیاه با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل ***Asperugo procumbens*** و ***Astragalus siliquosus*** **subsp.** ***siliquosus*** دارای مهار بالای ۶۰ درصد می‌باشند. میزان مهار آنزیم توسط عصاره‌ی گیاه مریم‌گلی بوته‌ای ***Saliva suffruticosa***، ۹۲/۶۲ درصد و IC_{50} آن ۹۴/۷۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و نوع مهار نارقابتی بود.

نتیجه‌گیری: عصاره هگزانی گیاه مریم‌گلی بوته‌ای (***Saliva suffruticosa***) به دلیل درصد مهار بالا و IC_{50} پایین می‌تواند با هدف جداسازی و تعیین ماهیت عامل مهارکننده آنزیم تیروزیناز قارچی، مورد استفاده قرار گیرد.

گل‌واژگان: تیروزیناز، مریم‌گلی بوته‌ای، مهار آنزیمی، هایپرپیگمانتاسیون

مقدمه

تیروزیناز (Tyrosinase) (مونوفنل، ال-دوپا: اکسیژن اکسیدوردوکتاز، EC۱.۱۴.۱۸.۱) متالوآنزیمی حاوی عنصر مس و دارای چندین عملکرد است. تیروزیناز در ارتباط با یکی از سوبستراهای آن که اسیدآمینه‌ی تیروزین (Tyrosine) می‌باشد، نامگذاری شده است. این آنزیم تمایل بیشتری برای پیش ماده های ال-ایزومر تا دی-ایزومر دارد. اولین بررسی‌های بیوشیمیایی آنزیم تیروزیناز روی قارچ *Russula nigricans* در سال ۱۹۸۵ انجام شد که با آسیب‌دیدگی ساقه‌ی قارچ هنگامی که در معرض هوا قرار گرفت، رنگ آن به قرمز و سپس سیاه تغییرکرد. بعد از این مطالعه، آنزیم به طور وسیعی در بسیاری از موجودات از باکتری‌ها تا پستانداران یافت شد. شناخته شده‌ترین آنزیم‌ها از *Streptomyces glausescens*، *Neurospora crassa*، *Agaricus bisporus* استخراج شدند و از دو دیدگاه عملکردی و ساختاری مورد مطالعه‌ی فراوان قرار گرفته‌اند [۱]. بسیاری از تیروزینازها از جمله تیروزیناز انسانی، تیروزیناز قارچ خوراکی (Mushroom tyrosinase) و نوروسپورا کراسا تعیین توالی شده‌اند. در قارچ‌ها و بی‌مهرگان، تیروزیناز مرحله‌ی اول تشکیل رنگدانه‌ی ملانین از تیروزین را کاتالیز می‌کند. در گیاهان سوبسترای فیزیولوژیک آنزیم تیروزیناز انواعی از فنول ها هستند که آنزیم آنها را اکسید کرده و در بافت‌های آسیب دیده قرار می‌دهد و باعث سیاه شدن ناحیه‌ی آسیب دیده می‌شود. درنهایت این آنزیم باعث تیره شدن میوه‌ها و سبزیجات آسیب دیده، در طول حمل و نقل و برداشت می شود. در پستانداران این آنزیم مسئول تشکیل رنگدانه‌های پوست، مو و چشم است [۴۶، ۷، ۲]. تیروزیناز اعمال دیگری غیر از تولید ملانین انجام می‌دهد از جمله سم‌زدایی از گیاهان، سنتز آنتی‌بیوتیک از اسیدآمینه و در حشرات نقش تدافعی، بهبود زخم و اسکلت‌سازی را ایفا می‌کند [۳۵، ۵].

تیروزیناز استخراج شده از قارچ *Agaricus bisporus* با آنزیم استخراج شده از پستانداران از لحاظ ساختاری شبیه هستند و به عنوان مدل مناسب برای مطالعات ملانوژنز (Melanogenesis) مورد استفاده قرار گرفته است [۳، ۱]. در واقع اغلب مطالعات روی مهار این آنزیم تاکنون روی تیروزیناز قارچی انجام شده است، زیرا این آنزیم از لحاظ تجاری بیشتر در دسترس می‌باشد [۴].

تیروزیناز را می‌توان از منابع ارزانی مثل قارچ خوراکی استخراج کرد. تیروزیناز قارچ خوراکی ویژگی جالب توجهی نشان داده است. تحقیقات تمایل زیاد این آنزیم برای سوبستراهای مختلف را نشان داده است. به علاوه تیروزیناز قارچ خوراکی یک پلی‌پپتید تترامری است که از جهاتی مشابه با آنزیم تیروزیناز در پستانداران است. ویژگی قابل ملاحظه در تیروزینازهای منابع مختلف این است که به بخش مرکزی آنها دو عنصر مس متصل می‌باشند [۱].

رنگ پوست و موی پستانداران توسط تعدادی فاکتور تعیین می‌شود که مهمترین آنها میزان و نحوه‌ی پراکندگی تولید ملانین می‌باشد. اگرچه عمدتاً تولید ملانین در پوست انسان باعث حفاظت پوست در برابر اشعه‌ی فرابنفش می‌شود اما تولید بیش ازحد یا تجمع غیرطبیعی ملانین در نقاط مختلف پوست باعث ایجاد لکه‌هایی در پوست می‌شود [۳۸]. به این دلیل اختلالات متعدد پوستی ناشی از افزایش سطح پیگمانتاسیون اپیدرمی ایجاد می‌شود. از انواع این اختلالات می توان به ملازما، لکه‌های پوستی، اگزما، خال، آکنه و آسیب‌های پوستی اشاره کرد که از جمله مشکلات بزرگ زیبایی محسوب می‌شوند [۴۰، ۳۴، ۱۳]. عواملی از جمله قرار گرفتن در معرض نور خورشید، عوامل ژنتیکی، بارداری و بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون و همچنین استفاده از داروهای شیمیایی، از جمله شرایطی است که منجر به ایجاد لکه‌های پوستی و مشکلات زیبایی می‌شوند [۱۴، ۱۰].

فعالیت بالای آنزیم تیروزیناز منجر به هایپرپیگمانتاسیون (hyperpigmentation) می‌شود و کاهش فعالیت آنزیم باعث ایجاد هیپوپیگمانتاسیون (hypopigmentation) مو می‌شود [۳۰، ۷]. از طرفی فرایند سیاه‌شدگی مواد غذایی که در اثر اکسیداسیون‌های آنزیمی و غیر آنزیمی ایجاد می‌شود، باعث کم ارزش شدن مواد غذایی و نوشیدنی‌های مشتق از گیاهان می-شود [۱۵]. می‌توان از اکسیداسیون غیرآنزیمی مواد غذایی

توسط افزودنی‌های آنتی‌اکسیدانی، و از اکسیداسیون آنزیمی از طریق مهار آنزیم تیروزیناز جلوگیری نمود [۱۶]. آنزیم تیروزیناز با اکسیداسیون ترکیبات فنلی، مسئول سیاه‌شدگی آنزیمی میوه‌ها، سبزیجات و قارچ‌ها است و این سیاه‌شدگی اثر نامطلوب ظاهری دارد و به همین دلیل در صنایع غذایی، تیروزیناز در کنترل کیفی و اقتصادی میوه‌ها و سبزیجات نقش مهمی دارد [۴۴، ۳۷]. پس هایپرپیگمانتاسیون در پوست انسان و سیاه‌شدگی آنزیمی در میوه‌ها و قارچ‌ها مطلوب نیست و این اثرات نامطلوب باعث تشویق محققان، برای یافتن مهارکننده‌های تیروزیناز شده است، تا بتوان از سیاه‌شدگی میوه‌ها و قارچ‌ها جلوگیری کرده و برای سفید کردن پوست از آنها استفاده نمود [۲۶، ۱]. کاهش فعالیت تیروزیناز به عنوان روشی برای مهار ملانوژنز گزارش شده است. هایپرپیگمانتاسیون یک مشکل جدی زیبایی محسوب می‌شود و به دلیل اهمیت فراوان زیبایی، نیاز شدیدی به مهارکننده‌های تیروزیناز به منظور توسعه‌ی روش‌های درمانی و پیشگیری از اختلالات هایپرپیگمانتاسیون وجود دارد تا بتوانند ملانوژنز را مهار کنند [۴۴، ۳۰، ۱۰]. درنتیجه محققان به دنبال مهارکننده‌های قوی ملانوژنز از منابع طبیعی برای استفاده در لوازم آرایش و بهداشتی هستند [۱۵، ۱۰].

درمیان عوامل روشن‌کننده‌ی پوست و عوامل برطرف‌کننده‌ی لکه‌های پوستی منیزیم-ال-آسکوربیل-۲-فسفات، هیدروکسی‌آنیزول، ان-استیل-۴-اس-سیستمینیل‌فنول، آربوتین، سالیسیل هیدروکزامیک اسید، دیوئیک اسید، کوجیک-اسید، هیدروکوئینون، آلئوزین، نیاسینامید که به طور گسترده در صنایع آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شوند و در حال تجویز در سراسر جهان هستند [۲۰، ۱۹، ۱۴].

استفاده‌ی طولانی مدت از هیدروکوئینون در لوازم آرایشی منجر به ایجاد عوارض جانبی از جمله تحریک پوستی و ایجاد جهش می‌شود. به همین دلیل استفاده از هیدروکوئینون در لوازم آرایشی در اتحادیه‌ی اروپا ممنوع شده است و به شدت در ایالات متحده توسط سازمان غذا ودارو (FDA) کنترل می-شود [۸]. همچنین دیوئیک اسید برای درمان هایپرپیگمانتاسیون اثرات خوبی داشته اما عوارض جانبی مشابهی با هیدروکوئینون دارد به همین دلیل انگیزه‌ی روزافزون برای پیدا کردن جایگزین های مهاری گیاهی و مصنوعی با عوارض جانبی حداقل برای درمان لکه‌های پوستی بیشتر شده است [۴۵، ۱۴، ۷].

رویکرد جهانی برای استفاده از گیاهان دارویی و ترکیب-های طبیعی در صنایع دارویی و بهداشتی، نیاز ضروری به تحقیقات پایه‌ای و کاربردی وسیعی در زمینه‌ی مهارکننده‌های گیاهی را نشان می‌دهد.

تاکنون تحقیقات انجام شده بر روی گیاهان در مناطق مختلف جهان منجر به معرفی مهارکننده‌های جدیدی شده است. بنابراین پژوهش برای یافتن مهارکننده‌های جدید تیروزیناز در میان گیاهان، به صورت انتخابی بسیار مهم است، زیرا منجر به شناسایی مهارکننده‌های جدید و قوی می‌شود.

فلور گیاهی استان کردستان بسیار غنی و متنوع است و از بسیاری از گونه‌های گیاهی این منطقه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. هدف اصلی پروژه ی حاضر، غربالگری بخشی از گیاهان بومی استان کردستان از لحاظ میزان درصد مهار آنزیم تیروزیناز است. بدین‌منظور هفتاد گونه‌ی گیاهی از مناطق مختلف استان کردستان جمع آوری و شناسایی شده و پس از عصاره‌گیری در محلول متانول، از لحاظ توانایی مهار آنزیم مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در این پروژه از کوجیک اسید و آربوتین به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و بیوشیمیایی

آنزیم تیروزیناز قارچی، اسید کوجیک از شرکت سیگما و مابقی مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان با واسطه نمایندگی‌های مربوطه در ایران خریداری شدند.

جمع‌آوری، تهیه پودر و تهیه عصاره هگزانی از نمونه‌های گیاهی

گیاهان تحت نظارت آقای مهندس حسین معروفی از مرکز تحقیقات کشاورزی استان کردستان جمع‌آوری و شناسایی شدند و برای هریک از نمونه‌ها شماره‌ی سند در هرباریوم

مرکز تحقیقات کشاورزی استان کردستان موجود است. گیاهان جمع‌آوری شده در مرکز تحقیقات کشاورزی بوسیله قیچی باغبانی، به صورت قطعات بزرگ برش داده می‌شدند. قطعات گیاهی حاصل بر روی کاغذ قرار داده می‌شدند و برای جلوگیری از قرار گرفتن در معرض نور روی آنها با کاغذ پوشیده می‌شد. هر روز یک بار قطعات گیاهی، به منظور تهویه و خشک شدن بهتر و همچنین کنترل کیفیت روند خشک شدن جابه‌جا می‌شدند. طول مدت خشک شدن در گیاهان مختلف، متفاوت بود اما به طور متوسط در دمای آزمایشگاه طی سه تا چهار روز فرآیند خشک شدن کامل می‌شد. ابتدا نمونه‌ها از لحاظ عدم آلودگی به خاک و یا سایر گیاهان بررسی می‌شدند. آنگاه بوسیله قیچی باغبانی به صورت قطعات کوچکی خرد شده و سپس بوسیله آسیاب خانگی طی سه تا پنج پالس ۳۰ ثانیه‌ای، پودر می‌شدند. پودرهای به دست آمده پس از توزین در ظروف تیره پلاستیکی و دربدار تا زمان عصاره‌گیری، در دمای اتاق نگهداری می‌شدند۱۰ گرم پودر گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص، به مدت ۲۴ ساعت، در ظروف تیره و به دور از نور خیسانده شده، طی این مدت چندین بار در فواصل زمانی مختلف، پودر گیاهی با متانول، بوسیله همزن شیشه‌ای کاملاً مخلوط می‌شد. مخلوط حاصل پس از ۲۴ ساعت توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف می‌شد. مایع صاف شده با استفاده از دستگاه روتاری اواپراتور با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ می‌شد و پس از تخلیه از مخزن دستگاه، جهت خشک شدن کامل، روی ظروف شیشه‌ای مسطح پخش می‌شد و در زیر هود، به دور از نور و در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت قرار می‌گرفت. عصاره‌ی خشک شده از روی سطح ظروف شیشه‌ای جمع‌آوری شده و در میکروتیوب ریخته می‌شد. عصاره‌ها تا انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

سنجش مهار فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر

در این پروژه برای سنجش تأثیرات عصاره‌های متانولی بر روی آنزیم تیروزیناز از روش ممتاز و همکاران با مختصر تغییراتی استفاده شد [۸]. بافر مورد استفاده در این سنجش‌ها بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۶/۵ بود، که در مابقی این متن از آن تنها به عنوان بافر یاد خواهد شد. سنجش ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی مطابق جدول شماره ۱ و در حجم کل ۲۱۰ µl با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر انجام شد. در هر چاهک به ترتیب عصاره‌ی متانولی (در یکی از غلظت‌های ۶/۲، ۲۵، ۱۰۰ یا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر) و آنزیم تیروزیناز (۳۳۳ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر بافر) ریخته شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، سپس سوبسترای کتکول (۲ میلی‌مولار) را به

جدول شماره ۱ - تعریف ترکیبات یا محتوای چاهک‌های آزمایش

	تست مهاری	تست بلانک مهاری	کنترل منفی	تست بلانک کنترل منفی	کنترل مثبت	تست بلانک کنترل مثبت
عصاره	۷۰ µl	۷۰ µl	-	–	-	-
آنزیم	۳۰ µl	-	۳۰ µl	–	۳۰ µl	-
سوبسترا	۱۱۰ µl	۱۱۰ µl	۱۱۰ µl	۱۱۰ µl	۱۱۰ µl	۱۱۰ µl
بافر	-	۳۰ µl	۷۰ µl	۱۰۰ µl	-	۳۰ µl
کوجیک اسید	-	-	-	-	۷۰	۷۰ µl

چاهک‌ها اضافه کرده و به منظور همزمانی شروع واکنش‌ها، از سمپلر ۱۲ کاناله استفاده شد. سپس میکروپلیت پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق درون دستگاه قرار گرفته و پس از ۲ ثانیه هم‌زدن توسط دستگاه، جذب آن به مدت ۱۰ دقیقه با فواصل ۱ دقیقه‌ای در طول موج ۴۹۲ نانومتر ثبت شد. سنجش ها در۳ تکرار انجام شد. جذب میکروپلیت‌های خالی، در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شده و از جذب نهایی کم شد. به دلیل احتمال وجود عواملی از جمله هیدرولیز خودبخودی سوبسترا و امکان حضور ترکیباتی در عصاره که ممکن است در طول موج ۴۹۲ نانومتر دارای جذب باشند، چاهک بلانک به صورت جداگانه تعریف شد. چاهک بلانک حاوی تمام مواد غیر از آنزیم بوده و در واقع جذب عوامل مزاحم سنجیده می شد و از جذب چاهک تست کسر شد. به این دلیل برای هر کدام از عصاره‌ها یک چاهک تست و یک چاهک بلانک در نظر گرفته شد. همه‌ی این تدابیر باعث می‌شود که جذب نهایی فقط در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم باشد. همچنین، برای سنجش‌های هر روز از کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد. در چاهک تست کنترل مثبت به جای عصاره از مهارکننده شناخته شده‌ی کوجیک اسید (در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر) و در چاهک تست کنترل منفی به جای عصاره از بافر استفاده شد (جدول شماره ۱).

تحلیل داده‌ها

پس از پایان سنجش، همان‌طور که گفته شد جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظرش کسر شده و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از جذب چاهک تست، جذب نهایی محاسبه شد. شیب نمودار جذب نهایی چاهک‌ها برعلیه زمان محاسبه شد. با مقایسه شیب نمودار مربوط به عصاره و شیب نمودار کنترل منفی و استفاده از فرمول شماره ۱، درصد مهار آنزیم تیروزیناز بوسیله عصاره به دست آمد. درصد مهار برای سه تکرار هر عصاره محاسبه و در پایان میانگین گرفته شد و انحراف استاندارد محاسبه شد. تمامی این مراحل با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شده است.

تمام مراحل گفته شده برای چهار غلظت عصاره انجام شده و میانگین درصد مهار به دست آمد. از طریق رسم نمودار درصد مهار بر علیه لگاریتم غلظت عصاره، IC_{50} (مقدار غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم تیروزیناز را مهار می کند) تعیین شد.

بررسی سنتیکی مهار آنزیم تیروزیناز در حضور عصاره‌ی گیاهی با بالاترین درصد مهار

برای تعیین نوع مهار و محاسبه‌ی مقادیر K_m، K_m´، V_{max}´، V_{max} و K_i، نمودار لاینویوربرک برای آنزیم تیروزیناز، در حضور عصاره‌ی گیاهی و بدون حضور عصاره (کنترل) در چهار غلظت متفاوت سوبسترا رسم شد. محلول های سوبسترا در چهار غلظت ۱۰، ۵، ۲، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند. برای سنجش فعالیت آنزیم، مقادیر تست و بلانک مطابق جدول شماره ۱، انتخاب شدند و تمام سنجش‌ها در سه تکرار انجام شدند. جذب در طول موج ۴۹۲ نانومتر بعد از گذشتن زمان انکوباسیون ثبت شد. تمام محاسبات با استفاده از معادله‌ی خط نمودار لینویوربرک در نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

فرمول شماره ۱

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{شیب منحنی جذب علیه زمان عصاره} - \text{شیب منحنی جذب علیه زمان فعالیت}}{\text{شیب منحنی جذب علیه زمان نمونه فعالیت}} \times ۱۰۰$$

نتایج

سنجش درصد مهار آنزیم تیروزیناز

پس از انجام سنجش‌ها، تحلیل داده‌های هر سنجش که در سه تکرار انجام شده بود، با استفاده از نرم‌افزار Excel درصد مهار و انحراف استاندارد به دست آمده در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۲ – درصد مهار فعالیت تیروزیناز توسط عصاره

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریومی	خانواده	۴۰۰ µg/ml		۱۰۰ µg/ml		۲۵ µg/ml		۶/۲ µg/ml	
				I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD
۱	*Astragalus siliquosus* Boiss. subsp. *siliquosus*	۸۶۱۲	Papilionaceae	۵۹/۰۰۵	۰/۹۵	۵۲/۳۰۱	۱۵/۲۰۶	۷۹/۸۲۸	۱۵/۲۰۶	۵۶/۹۸۹	۱۱/۴۸۳
۲	*Astragalus vegetus* Bunge	۵۶۷۷	Papilionaceae	۳۳/۴۶۷	۱۸/۰۵	۴۷/۵۸۰	۱/۹۰۰	۳۹/۵۱۶	۱۲/۸۲۱	۱۷/۱۱۴	۱۰/۰۸۸
۳	*Astragalus macronurus* F. & M.	۶۱۹۹	Papilionaceae	۳۹/۴۰۸	۹/۶۹۰	۰/۲۴۶	۱/۰۴۴	۵/۴۱۸	۱/۴۷۷	۱۶/۵۰۲	۱۳/۵۸۴
۴	*Aristolochia bottae* Jaub.& Spach	۱۱۵۹۵	Aristolochiaceae	۵۷/۲۲۷	۱۰/۳۲۴	۲/۶۵۴	۶/۲۵۷	۱۷/۴۰۴	۸/۳۴۳	-۲/۷۵۳	۴/۲۵۷
۵	*Astragalus caraganae* Hohen.	۱۲۵۵۶	Papilionaceae	۵۰/۵۸۹	۱/۰۴۲	۶/۳۴۲	۷/۳۰۰	۲/۱۶۳	۰/۸۵۱	۱۳/۷۱۶	۵/۲۱۴
۶	*Astragalus caryolobus* Bge	۵۷۴۴	Papilionaceae	-۱۶/۷۴۲	۱۱/۵۱۸	۲/۹۴۱	۱۴/۳۹۸	۱۷/۸۷۳	۶/۷۱۹	۴۰/۹۵۰	۴/۷۹۹
۷	*Asperugo procumbens* L.	۷۰۳۴	Boraginaceae	-۲۷/۶۰۱	۱۴/۴۷۹	۰/۷۸۳	۶۰/۶۳۳	۹/۵۹۸	۳۱/۴۴۷	۶/۷۱۹	
۸	*Astrodaucus orientalis* (L.) Drude var.*eriocarpus* (Boiss.) Woron.	۱۲۹۰۹	Apiaceae	-۹۹/۲۷۵	۱۰/۲۴۷	-۶/۸۸۴	۰/۸۵۳	۱۱/۸۳۵	۲۸/۱۴۰	۷/۶۸۵	
۹	*Astragalus cyclophyllon* G. Beck	۸۶۶۴	Papilionaceae	-۰/۸۲۵	۴/۲۶۹	-۶/۸۸۴	۰/۸۵۳	۲۲/۷۰۵	۲۹/۹۵۱	۸/۵۳۹	
۱۰	*Astragalus jessenii* Bunge	۲۶۰۸	Papilionaceae	-۲/۰۳۰	۶/۴۶۰	-۳/۵۵۳	۶/۴۶۰	۰/۲۵۳	۷/۵۲۷	۱۰/۹۱۳	۱/۰۷۶
۱۱	*Allium stipitatum* Boiss.	۸۶۴۸	Alliaceae	-۰/۰۳۲	۴/۳۱۶	-۲۸/۹۶۸	۵/۳۹۶	۷/۶۶۱	۷/۵۵۴	۱۶/۰۵۶	۴/۳۱۶
۱۲	*Bongardia chrysogonum* (L.) Spach	۷۰۵۴	Podophyllaceae	۶۱/۴۶۹	۱۰/۱۷۷	۱۹/۳۵۴	۱/۹۰۰	۱۹/۳۵۴	۵/۷۰۲	۱۲/۶۳۴	۱۱/۴۰۴
۱۳	*Ballota nigra* L. subsp. *Kurdica* P.H.Davis	۱۱۳۱۰	Lamiaceae	۴۱/۰۲۵	۹/۰۶۵	۱۶/۲۳۹	۳/۲۲۶	۱۵/۳۸۴	۵/۴۳۹	۱۳/۴۶۱	۸/۱۵۸
۱۴	*Bellevalia glauca* (Lindl.) *kunth.*	۵۳۵۳	Liliaceae	-۷/۶۱۴	۰/۸۷۹	-۲/۷۹۱	۳/۲۳۰	۱۷/۰۰۵	۹/۶۹۱	۴۱/۳۷۰	۱۱/۸۳۴

ادامه جدول شماره ۲ -

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریومی	خانواده	۴۰۰ µg/ml		۱۰۰ µg/ml		۲۵ µg/ml		۶/۲ µg/ml	
				I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD
۱۵	*Centaurea nemecii* Nab.	۱۱۳۹۹	Asteraceae	۵۵/۶۴۵	۲/۳۲۸	۵۸/۳۳۳	۱/۹۰۰	۴۴/۴۴۴	۴/۳۲۰	۳۹/۵۱۶	۷/۶۰۳
۱۶	*Campanula involucrata* Auch. ex DC.	۱۱۱۳۲	Campanulaceae	۵۶/۶۳۹	۱۵/۳۳	-۲/۹۸۱	۱/۹۱۶	-۵/۰۱۳	۲/۸۷۴	-۹/۰۷۸	۱۰/۵۳۹
۱۷	*Centaurea behen* L.	۵۴۷۵	Asteraceae	۲۰/۱۳۸	۹/۶۸	-۹۵/۶۸۴	۱۳/۶۷۹	۶/۲۵	۸/۹۲۸	-۴/۹۱۰	۳/۱۵۶
۱۸	*Conium maculatum* L.	۶۷۵۵	Apiaceae	۴۳/۵۸	۵/۴۳۹	۱۸/۵۸۹	۸/۱۵۸	۱۴/۱۰۲	۳/۹۱۶	۱۷/۹۴۸	۴/۵۰۲
۱۹	*Crambe orientalis* L.	۱۱۰۶۰	Brassicaceae	-۹۴/۸۵۲	۷/۲۷۹	-۴۱/۹۱۱	۱/۰۳۹	-۲۳/۵۲۹	۲/۰۷۹	-۱۳/۲۳۵	۴/۴۱۱
۲۰	*Chaerophyllum macropodum* Boiss.	۶۵۵۸	Apiaceae	۱۳/۹۷۰	۷/۲۷۹	-۱۶/۹۱۱	۵/۱۹۹	۱۱/۲۷۴	۱۳/۵۱۸	۲۱/۵۶۸	۴/۷۲۷
۲۱	*Clastopus erubescens* Hausskn.	۱۵۶۵	Brassicaceae	-۳۰/۹۶۴	۰	-۲۷/۱۵۷	۱۶/۱۵۲	-۲۳/۳۵۰	۶/۶۳۷	-۲۵/۶۳۴	۵/۳۸۴
۲۲	*Cruciata taurica* (Pall.ex Willd) *Ehrend* subsp. *Persica* (DC.) *Ehrend.*	۱۲۰۱۷	Rubiaceae	-۹/۱۵۴	۶/۹۷۱	-۲۶/۷۶۰	۷/۷۹۱	۲/۸۱۶	۸/۴۵۰	۱۰/۷۹۸	۱۶/۳۲۴
۲۳	*Colchicum kotschyi* Boiss.	۱۰۸۶۱	Colchicaceae	۷/۴۸۸	۱۱/۲۱۴	۴/۸۴۵	۱/۸۶۹	-۴/۴۰۵	۵/۶۰۷	۱۲/۳۳۴	۱۲/۲۷۹
۲۴	*Descurainia sophia* (L.) Webb & Berth.	۱۲۶۹۸	Brassicaceae	۳۰/۵۴۱	۱۰/۶۵۶	-۴۴/۸۲۷	۳۲/۷۹۱	-۲۱/۱۸۲	۱۴/۶۲۹	-۱۵/۲۷۰	۲/۰۸۹
۲۵	*Eremurus spectabilis* M.B. subsp. *Spectabilis*	۶۸۴۹	Liliaceae	۲۷/۰۸۳	۶/۴۸۶	۳/۲۷۳	۰	۴/۷۶۱	۴/۲۰۵	۱۳/۱۹۴	۵/۲۲۶
۲۶	*Eremostachys laevigata* Bunge	۴۸۴۳	Lamiaceae	۱۴/۸۷۶	۳/۵۰۶	-۱۴/۸۷۶	۳/۵۰۶	۷/۴۳۸	۲/۳۳۷	۳/۳۰۵	۳/۵۰۶
۲۷	*Eremostachys macrophylla* Montbr. & Auch	۹۴۳۶	Lamiaceae	۸/۸۱۰	۷/۴۷۶	۵/۲۸۶	۷/۷۴۳	-۳/۵۲۴	۲/۰۱۸	۹/۴۷۱	۰/۹۳۴
۲۸	*Euphorbia denticulate* Lam.	۶۹۱۶	Euphorbiaceae	-۵/۶۳۳	۷/۸۴۱	۷/۷۴۶	۸/۹۶۳	-۴/۹۲۹	۶/۹۷۱	۵/۱۶۴	۹/۳۷۷
۲۹	*Ferula haussknechtii* Wolff ex Rech.	۲۷۴۱	Apiaceae	۳۳/۰۳۵	۳/۹۲۷	۴/۷۶۱	۲/۱۰۴	-۸/۶۳۰	۲/۱۰۴	-۷/۸۸۶	۱/۰۵۲
۳۰	*Fumaria vaillantii* Loisel.	۶۹۹۶	Fumariaceae	۳۷/۳۱۵	۱۵/۶۴۳	۵/۶۰۴	۲/۰۸۵	-۱۱/۱۱۱	۳/۷۱۱	-۱۹/۴۶۹	۸/۳۴۳
۳۱	*Glaucium grandiflorum* Boiss. & Huet	۱۲۰۲۵	Papaveraceae	۱۴/۵۴۸	۰/۹۹۸	۳۰/۷۹۰	۱۱/۹۸۴	۱۵/۹۶۰	۴/۹۹۳	۱۱/۰۱۶	۱/۹۹۷

ادامه جدول شماره ۲ -

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریومی	خانواده	۴۰۰ µg/ml		۱۰۰ µg/ml		۲۵ µg/ml		۶/۲ µg/ml	
				I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD
۳۲	*Gundelia tournefortii* L.	۴۱۸۶	Asteraceae	-۷۸/۱۴۰	۱۹/۶۴۱	-۱۲/۳۱۸	۵/۱۲۳	۱۹/۸۸۷	۳/۶۸۹	۱۶/۰۶۲	۰/۸۵۳
۳۳	*Hyoscyamus kurdicus* Bornm.	۳۸۳۴	Solanaceae	۵۸/۵۷۳	۶/۶۳	۵۱/۱۶۴	۸/۹۴۹	۸۶/۵۵۹	۵/۷۰۲	۴۵/۷۸۸	۳/۳۸۲
۳۴	*Heptaptera anatolica* (Boiss.) Tutin	۳۲۷۷	Apiaceae	۶۶/۵۷۶	۶/۸۲۰	۲۹/۵۳۹	۷/۶۶۵	-۷/۴۹۷	۵/۴۷۶	-۰/۹۴۸	۲/۸۷۴
۳۵	*Hordeum bulbosum* L.	۶۸۲۰	Poaceae	۵۶/۴۱	۱/۸۱۳	۳۵/۲۵۶	۴/۵۳۲	۱۶/۰۲۵	۴/۵۳۲	۱۹/۲۳۰	۱۲/۶۹۱
۳۶	*Haplophyllum acutifolium* (DC.) G.Don	۲۹۶۴	Rutaceae	-۳۶/۰۸۸	۳/۵۰۶	-۶۰/۳۳۰	۲/۳۳۷	-۲۲/۸۶۵	۱/۱۶۸	-۱۹/۰۰۸	۱/۷۷۶
۳۷	*Hypericum scabrum* L.	۵۴۱۶	Guttiferae	۶۲/۹۷۶	۰	-۳۷/۲۹۴	۱/۲۳۰	-۹/۰۱۳	۳/۲۱۱	۲۳/۶۳۹	۳/۲۷۲
۳۸	*Isatis cappadocica* Desv.	۶۱۶۳	Brassicaceae	-۲۵/۶۱۹	۷/۲۸۹	-۴۱/۰۴۶	۳/۴۴۰	-۱۱/۲۹۴	۴/۱۵۹	-۹/۶۴۱	۱/۹۰۸
۳۹	*Leontice leontopetalum* L.	۷۴۳۷	Podophyllaceae	۲۵/۰۹۹	۹/۴۵۰	۳۸/۲۴۴	۹/۴۷۰	۳/۷۶۹	۶/۳۱۳	۳/۷۹۳	۵/۲۲۶
۴۰	*Linum glaucum* Boiss.& Noe	۹۵۰۸	Linaceae	-۴۶/۶۰۶	۱۹/۱۹۷	-۱۸/۰۹۹	۱/۹۱۹	-۴/۵۲۴	۴/۷۰۲	۱۵/۱۵۸	۴/۷۹۹
۴۱	*Linum album* Ky. ex Boiss.	۱۱۷۶۸	Linaceae	-۶/۸۳۷	۴/۰۳۸	-۱۰۱/۴۶۵	۱۰/۷۹۲	۱/۳۰۲	۳/۵۲۴	-۹/۸۹۰	۳/۵۱۷
۴۲	*Marrubium cuneatum* Russell	۴۶۷۴	Lamiaceae	۶۶/۱۲۴	۷/۶۶۵	۲۱/۴۰۹	۵/۷۴۸	۲۲/۷۶۴	۱۳/۴۱۳	-۹/۷۵۶	۷/۶۶۵
۴۳	*Nonea hypoleia* Bornm.	۷۶۷۵	Boraginaceae	۶۸/۷۵	۸/۴۱۷	۴/۲۶۵	۳/۰۹۷	۶/۲۵	۲/۹۷۶	-۱/۹۳۴	۱/۰۵۲
۴۴	*Nepeta heliotropifolia* Lam.	۵۴۴۲	Lamiaceae	۷/۰۵۱	۴/۵۳۲	۰/۶۴۱	۴/۵۳۲	۳۰/۱۲۸	۴/۵۳۲	۸/۳۳۳	۲۰/۸۵۰
۴۵	*Onobrychis megataphros* Boiss.	۵۴۳۲	Papilionaceae	۴۶/۷۹۴	۲/۷۱۹	۲۱/۷۹۴	۳/۶۲۶	-۱۰/۲۵۶	۱/۸۱۳	۲/۵۶۴	۵/۴۳۹
۴۶	*Oxytropis kotschyana* Boiss. & Hohen.	۳۷۴۶	Papilionaceae	-۲۴/۳۲۴	۳/۸۲۲	-۱۱/۴۸۶	۶/۶۸۴	-۱/۳۵۱	۲/۷۰۲	۱۰/۳۶۰	۸/۱۴۵
۴۷	*Phlomis persica* Boiss.	۱۰۹۹۱	Lamiaceae	۴۸/۴۱۲	۳/۷۴۴	۲۳/۳۶۳	۱۹/۹۹۲	-۱/۱۹۰	۵/۳۶۵	۱/۷۸۵	۱۴/۷۳۱
۴۸	*Peganum harmala* L.var. harmala	۵۲۱۴	Zygophyllaceae	-۴۱/۲۰۳	۱/۰۹۱	-۳۸/۱۱۷	۵/۴۵۶	-۲۳/۴۵۶	۱۰/۹۱۲	-۷/۲۵۳	۵/۴۵۶

ادامه جدول شماره ۲ -

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریومی	خانواده	۴۰۰ µg/ml		۱۰۰ µg/ml		۲۵ µg/ml		۶/۲ µg/ml	
				I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD
۴۹	*Pedicularis sibthorpii* Boiss	۸۱۶۷	Scrophulariaceae	۳۷/۱۴	۶/۹۹۱	۳۹/۹۷۱	۲/۹۹۶	۲۸/۶۷	۴/۹۹	۰/۴۲۳	۴/۹۹۳
۵۰	*Rindera lanata* (Lam.) Bge.	۱۱۱۴۱	Boraginaceae	۷/۷۴۶	۰/۹۹۵	۹/۸۵۹	۵/۹۷۵	۱۷/۶۰	۱۰/۹	۲۱/۸۳۰	۱۲/۹۴
۵۱	*Sanguisorba minor Scop.* (Boiss & Hausskn)	۳۴۰۵	Rosaceae	۳۸/۱۷	۰	۱/۲۰۹	۱۰/۴۵	-۰/۸	۳/۸۰	-۸/۸۷۰	۳/۸۰۱
۵۲	*Stroganowia persica* Busch	۷۳۶۰	Brassicaceae	-۲۵	۲/۹۹۶	۲۷/۹۶۶	۱۷/۹۷	۱۴/۵۴	۴/۹۹	۱۰/۳۱۰	۶/۹۹۱
۵۳	*Silene latifolia* Poir.	۱۱۶۷۹	Caryophyllaceae	۳۲/۷۵	۱/۰۴۴	-۵۸/۱۲۸	۲۹/۲۵۹	۱۳/۵۴۶	۹/۴۰۴	-۱۶/۰۰۹	۵/۲۲۴
۵۴	*Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch.	۱۲۰۵۵	Lamiaceae	۹۲/۶۲۵	۸/۷۷۲	۳/۲۴۴	۲/۰۸۵	-۹/۱۴۴	۴/۱۷۱	۶/۳۴۲	۵/۲۱۴
۵۵	*Scrophularia pruinosa* Boiss.	۷۷۶۳	Scrophulariaceae	۶۰/۶۸۳	۱۲/۴۵۱	۱۹/۲۳۰	۱۴/۵۰۴	۲۳/۰۷۶	۰	۱۱/۱۱۱	۵/۹۲۱
۵۶	*Salvia poculata* Nab.	۷۶۳۳	Lamiaceae	۴/۸۲۲	۳/۲۳۰	-۱۲/۶۹۰	۱۲/۹۲۱	۵۲/۰۳۰	۱/۰۷۶	۵۵/۸۳۷	۸/۶۱۴
۵۷	*Salvia multicaulis* Vahl.	۶۸۹۷	Lamiaceae	-۲/۶۲۳	۱/۰۹۱	۸/۹۵۰	۲/۱۸۲	-۲/۶۲۳	۳/۲۷۳	۳۶/۲۱۳	۷/۹۱۹
۵۸	*Silene aucheriana* Boiss.	۱۱۰۰۹	Caryophyllaceae	۰/۷۲۰	۱/۷۸۱	-۱۲/۶۵۴	۸/۷۲۹	۱۲/۰۳۷	۲/۱۸۲	۲۸/۲۴۰	۱۶/۳۶۸
۵۹	*Solenanthus circinatus* Lèdeb.	۶۴۹۸	Boraginaceae	۳۸/۲۹۴	۴/۳۶۳	-۰/۲۷۱	۴/۳۶۳	۱۳/۶۱۲	۴/۳۶۳	۱/۲۷۱	۶/۵۴۴
۶۰	*Stachys lavandulifolia* Vahl	۵۴۳۰	Lamiaceae	۱۵/۲۹۳	۳/۲۳۷	-۱۹/۸۱۰	۳/۲۳۷	۱۲/۲۴۰	۵/۳۹۶	۷۹۳۰	۵/۲۸۷
۶۱	*Scrophularia nervosa* Benth.in C.*subsp.boissierana* (Jaub. & Spach) Grau.	۹۱۷۹	Scrophulariaceae	۲۴/۲۶۴	۷/۲۷۹	۱۹/۱۱۷	۱۰/۳۹۸	-۵/۸۸۲	۲/۰۷۹	۱۱/۰۲۹	۱/۰۳۹
۶۲	*Scorzonera calyculata* Boiss.	۷۳۵۰	Asteraceae	-۸۹/۵۹۳	۵/۳۸۴	-۲۷/۹۱۸	۴/۳۰۷	-۲۲/۵۸۸	۷/۵۳۷	-۸/۱۲۱	۴/۳۰۷
۶۳	*Silene commelinifolia* Boiss.	۱۱۳۸۲	Caryophyllaceae	۴۱/۸۹۱	۲۲/۹۳۳	-۲۰/۹۴۵	۶/۶۸۸	-۹/۴۵۵	۱/۹۱۱	-۱۰/۸۱۰	۴/۶۸۱
۶۴	*Salvia svriaca* L.	۵۴۷۰	Lamiaceae	-۱۳/۵۱۳	۷/۶۴۴	-۹/۴۵۹	۸/۸۶۰	-۳/۱۵۳	۵/۶۲۶	۷/۶۵۷	۶/۳۸۶

ادامه جدول شماره ۲ -

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریومی	خانواده	۴۰۰ µg/ml		۱۰۰ µg/ml		۲۵ µg/ml		۶/۲ µg/ml	
				I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD
۶۵	*Silene ampullata* Boiss.	۴۱۹۸	Caryophyllaceae	۴۸/۹۲۴	۳/۸۰۱	۱۸/۶۸۲	۰/۹۵۰	-۳/۹۴۲	۶/۷۶۵	-۱۴/۲۴۷	۵/۸۵۸
۶۶	*Tragopogon vaginatus* M.Ownbey & Rech. F.	۹۸۴۴	Asteraceae	۱۱/۴۵۳	۳/۷۳۸	-۳۵/۲۴۲	۶/۵۴۱	-۴/۸۴۵	۲/۰۱۸	۱/۷۶۲	۰/۷۶۳
۶۷	*Vicia variabilis* Freyn & Sint	۹۰۹۴	Papilionaceae	-۵/۶۴۵	۸/۲۸۵	-۵۳/۲۷۳	۲۱/۰۴۴	-۳/۴۲۲	۳/۱۵۶	۱۰/۷۱۴	۳/۳۹۳
۶۸	*Verbascum phoenicum* L.	۱۰۳۳۳	Scrophulariaceae	۸۱/۴۱	۰/۹۰۶	۲۹/۰۵۹	۲/۷۱۹	۱۳/۲۴۷	۳/۲۲۶	۳۳/۹۷۴	۰۳/۹۰۶
۶۹	*Vicia hyrcanica* Fisch. & C. A. Mey.	۹۲۹۵	Papilionaceae	-۳۹/۵۹۳	۱/۷۵۸	-۸/۱۲۱	۲/۱۵۳	۱۳/۴۵۱	۹/۶۹۱	-۲/۷۹۱	۳/۲۳۰
۷۰	*Valeriana sisymbriifolia* Vahl	۱۱۹۴۸	Valerianaceae	۳۳/۳۸۲	۱۰/۲۷۱	۱۳/۰۹۸	۱/۷۸۱	۳۰/۵۸۱	۲/۱۸۱	۲۲/۶۸۸	۴/۳۶۳

دسته‌بندی گیاهان بر اساس درصد مهار

پس از محاسبه‌ی درصد مهارکنندگی عصاره‌ی متانولی ۷۰ گیاه، بر اساس فعالیت مهاری آنها به سه گروه تقسیم شدند:

۱- مهارکننده قوی: گیاهان با درصد مهارکنندگی بالای ۶۰ درصد

۲- مهارکننده متوسط: گیاهان با درصد مهارکنندگی ۶۰-۱۵ درصد

۳- مهارکننده ضعیف: گیاهان با درصد مهارکنندگی پایین‌تر از ۱۵ درصد (جدول شماره ۳)

توجه به نتایج مندرج در جداول فوق، از میان ۷۰ عصاره گیاهی بررسی شده در این مطالعه، عصاره متانولی ۹ گیاه دارای فعالیت مهاری بالای ۶۰ درصد بودند که مشخصات کلی آنها در جدول شماره ۴ آمده است. این گیاهان جهت مراحل بعدی مطالعه یعنی تعیین شاخص IC_{50} انتخاب شدند (جدول شماره ۵).

جدول شماره ۳- فراوانی و درصد فراوانی چهار غلظت عصاره‌ی گیاهی در سه گروه مهاری

≥٪۶۰		٪ ۶۰-۱۵		≤٪۱۵		درصد مهار
درصد فراوانی	فراوانی	درصد فراوانی	فراوانی	درصد فراوانی	فراوانی	غلظت عصاره (µg/ml)
۱۲/۹	۹	۳۸/۶	۲۷	۴۸/۶	۳۴	۴۰۰
۰	۰	۲۸/۶	۲۰	۷۱/۴	۵۰	۱۰۰
۴/۳	۳	۲۵/۷	۱۸	۷۰	۴۹	۲۵
۰	۰	۳۲/۹	۲۳	۶۷/۱	۴۷	۶/۲

جدول شماره ۴ - فهرست گیاهان دارای فعالیت مهاری قوی

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریومی	خانواده	SD ± درصد مهار	غلظت µg/ml
۱	*Astragalus siliquosus* Boiss. *subsp. siliquosus*	۸۶۱۴	Papilionaceae	۷۹/۸۳±۱۵/۲۰	۲۵
۲	*Asperugo procumbens* L.	۷۰۳۴	Boraginaceae	۶۰/۶۳±۹/۵۹	۲۵
۳	*Bongardia chrysogonum* (L.) Spach	۷۰۵۴	Podophyllaceae	۶۱/۴۶±۱۰/۱۷	۴۰۰
۴	*Hyoscyamus kurdicus* Bornm.	۳۸۳۴	Solanaceae	۸۶/۵۵±۵/۷۰	۲۵
۵	*Heptaptera anatolica* (Boiss.) Tutin	۳۲۷۷	Apiaceae	۶۶/۵۷±۶/۸۲	۴۰۰
۶	*Hypericum scabrum* L.	۵۴۱۶	Guttiferae	۶۲/۹۷±۰	۴۰۰
۷	*Marrubium cuneatum* Russell	۴۶۷۴	Lamiaceae	۶۶/۱۲±۷/۶۶	۴۰۰
۸	*Nonea hypoleia* Bornm.	۷۶۷۵	Boraginaceae	۶۸/۷۵±۸/۴۱	۴۰۰
۹	*Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch.	۱۲۰۵۵	Lamiaceae	۹۲/۶۲±۸/۷۷	۴۰۰
۱۰	*Scrophularia pruinosa* Boiss.	۹۱۷۹	Scrophulariaceae	۶۰/۶۸±۱۲/۴۵	۴۰۰
۱۱	*Verbascum phoenicum* L.	۱۰۳۳۳	Scrophulariaceae	۸۱/۴۱±۰/۹۰	۴۰۰

جدول شماره ۵ – نتایج IC_{50} گیاهان دارای فعالیت مهاری قوی

ردیف	نام علمی گیاه	کد هرباریومی	خانواده	IC_{50} (µg/ml)
۱	*Astragalus siliquosus* Boiss. subsp. *siliquosus*	۸۶۱۴	Papilionaceae	۲/۱۵
۲	*Asperugo procumbens* L.	۷۰۳۴	Boraginaceae	۲۵/۲۳
۳	*Bongardia chrysogonum* (L.) Spach	۷۰۵۴	Podophyllaceae	۳۵۸/۷۵
۴	*Hyoscyamus kurdicus* Bornm.	۳۸۳۴	Solanaceae	۲۹/۴۸
۵	*Heptaptera anatolica* (Boiss.) Tutin	۳۲۷۷	Apiaceae	۲۰۵/۰۲
۶	*Hypericum scabrum* L.	۵۴۱۶	Guttiferae	۲۴۲/۶۷
۷	*Marrubium cuneatum* Russell	۴۶۷۴	Lamiaceae	۱۴۸/۶۹
۸	*Nonea hypoleia* Bornm.	۷۶۷۵	Boraginaceae	۱۶۷/۸۰
۹	*Salvia suffruticosa* Montbr. & Auch.	۱۲۰۵۵	Lamiaceae	۹۴/۷۷
۱۰	*Scrophularia pruinosa* Boiss.	۹۱۷۹	Scrophulariaceae	۱۷۹/۹۷
۱۱	*Verbascum phoenicum* L.	۱۰۳۳۳	Scrophulariaceae	۱۴۲/۸۰

تعیین مقدار IC_{50}

مقدار IC_{50} یک ثابت برای تعیین میزان مهار می‌باشد که نشان‌دهنده غلظت بازدارنده موردنیاز برای ۵۰ درصد مهار آنزیم می‌باشد. IC_{50} گیاهان دارای فعالیت مهاری قوی، از طریق رسم نمودار درصد مهار بر علیه لگاریتم غلظت و بدست آوردن معادله‌ی خط محاسبه شد. نتایج بدست آمده جزئیات در جدول شماره ۵ آمده است. نظر به فعالیت مهاری چشمگیر و همچنین شاخص نسبتاً پایین عصاره گیاه مریم‌گلی بوته‌ای، مطالعات سنتیک مهار آنزیمی بر روی عصاره این گیاه انجام شد.

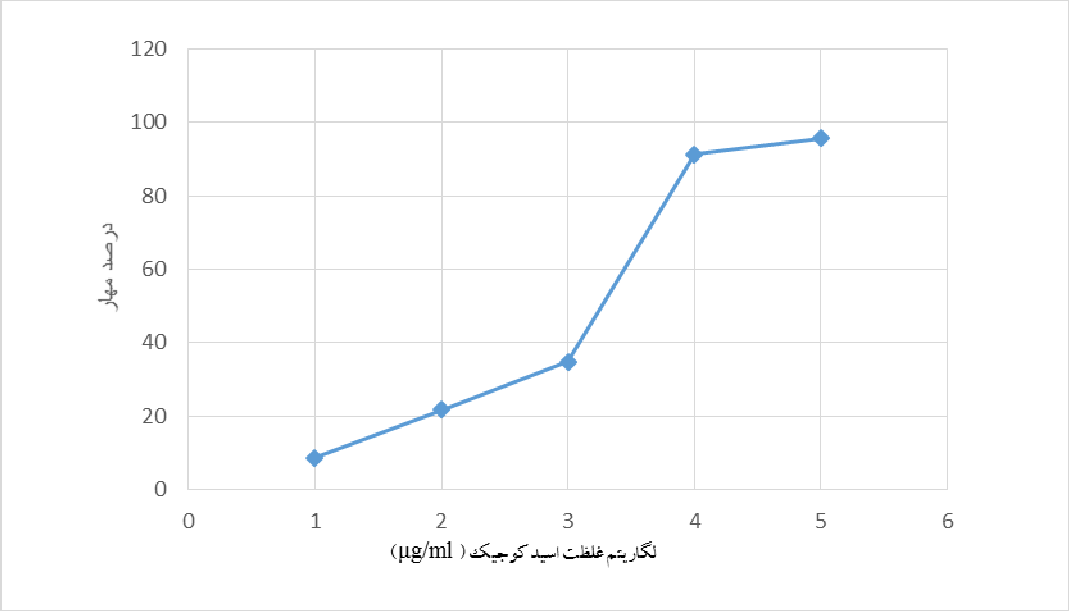
جهت فراهم شدن امکان مقایسه نتایج مهار توسط عصاره‌های گیاهی، فعالیت مهاری کوجیک‌اسید به عنوان یک مهارکننده شناخته شده تیروزیناز در پنج غلظت تعیین شد که نتایج آن در جدول شماره ۶ آمده است. سپس مقدار IC_{50} آن به کمک رسم نمودار مطابق شکل شماره ۱ محاسبه شد.

بررسی سنتیکی فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور و عدم حضور عصاره‌ی گیاهی مریم‌گلی بوته‌ای *Salvia suffruticosa*

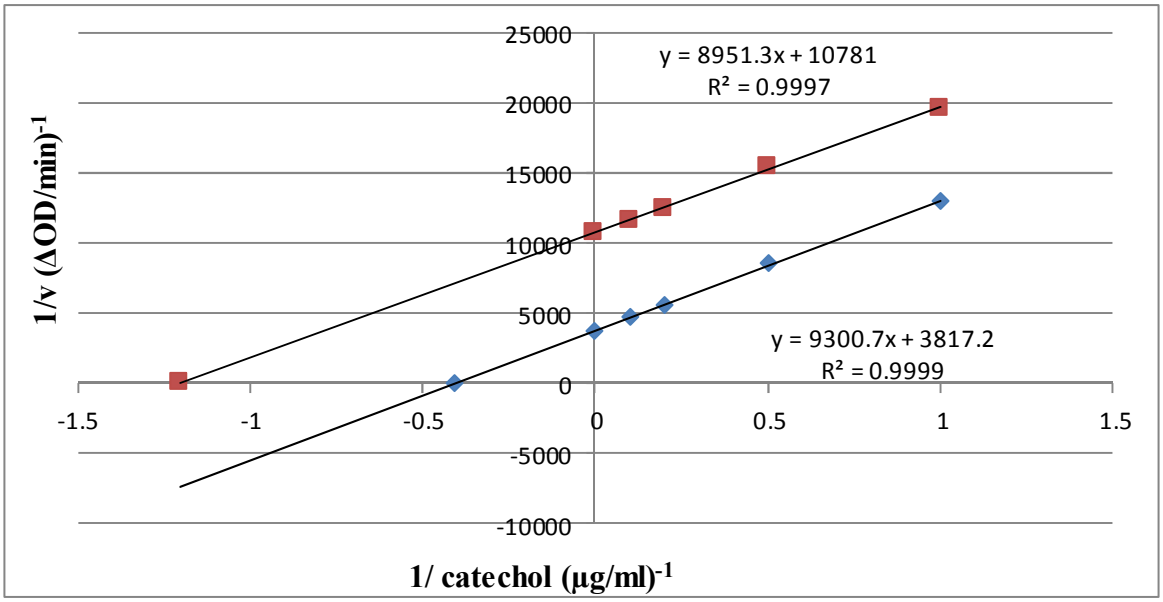
با توجه به نتایج فوق، مشخص شد که عصاره‌ی *Salvia suffruticosa* در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بالاترین درصد مهار است. به منظور تعیین نوع مهار اعمال شده توسط عصاره‌های دارای بیشترین درصد مهار، نمودار معکوس مضاعف لینویور- برک بر اساس واکنش آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده در چهار غلظت مختلف سوبسترا رسم شد. بر اساس مقایسه‌ی شیب نمودار کنترل و شیب نمودار عصاره مشخص شد که مهار آنزیم توسط عصاره از نوع مهار نارقابتی است. مقادیر K_m، K_m'، V_{max}، V_{max}' و K_i از طریق رسم نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ و به دست آوردن معادله‌ی خط (شکل شماره ۲)، محاسبه شد و نتایج در جدول شماره ۷ آمده است.

جدول شماره ۶- درصد مهار تیروزیناز بوسیله‌ی کوجیک اسید

مهارکننده	درصد مهار آنزیم در غلظت‌های مختلف اسید کوجیک										IC_{50} µg/ml
	۰/۰۱ µg/ml		۰/۱ µg/ml		۱ µg/ml		۱۰ µg/ml		۱۰۰ µg/ml		
	I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD	I%	SD	
اسید کوجیک	۸/۶۹	۰/۸۳	۲۱/۷۳	۰/۲۲	۳۴/۷۸	۰/۲۱	۹۱/۳	۱/۱۸	۹۵/۶۵	۱/۲۵	۰/۱۵



شکل شماره ۱- نمودار تعیین IC_{50} کنترل مثبت (اسید کوجیک)



شکل شماره ۲- نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S] برای آنزیم تیروزیناز قارچی بدون حضور و در حضور عصاره‌ی مریم‌گلی بوته‌ای، ***Salvia suffruticosa***

کنترل (♦) تست (■)

جدول شماره ۷ – نتایج محاسبه‌ی مقادیر Km، Km´، Vmax، Vmax´ و Ki آنزیم بدون حضور و در حضور عصاره‌ی *Salvia suffruticosa*

K_m(µg/ml)	K_m´(µg/ml)	V_{max} $(\Delta OD/min)^{-1}$	Vmax´ $(\Delta OD/min)^{-1}$	K_i(µg/ml)
۲/۴۴	۰/۸۳	۰/۰۰۰۲۶	۰/۰۰۰۰۹۳	۲۰۶/۷۶

بحث

ملانوژنز یک فرایند فیزیولوژیک مهم در ملانوسیت‌ها می باشد. ملانین توسط فرایند ملانوژنز، از طریق واکنش‌های آنزیمی و شیمیایی سنتز می‌شود. تیروزیناز آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ملانین محسوب می‌شود [۴۶، ۳۰]. وجود رنگدانه‌ی ملانین در پوست، باعث حفاظت پوست در برابر اشعه‌ی فرابنفش و سرطان پوست می‌شود. تغییر در فرایند ملانوژنز، باعث ایجاد اختلالات پوستی مرتبط با هایپر-پیگمانتاسیون می‌شود از جمله ایجاد لکه‌های پوستی، تیره شدن پوست، اگزما و ملازما [۳۵].

به دلیل اهمیت زیبایی و سلامت پوست، مهار آنزیم تیروزیناز برای درمان اختلالات پوستی بسیار مورد توجه قرارگرفته است. از مهارکننده‌های تیرزیناز علاوه بر استفاده‌های دارویی، در لوازم آرایشی و بهداشتی برای سفیدکردن پوست استفاده می‌شود [۴۳]. در بسیاری از کشورهای جهان، نگهداری و سلامت پوست، سفید کردن پوست و محافظت از آن در برابر اشعه‌ی فرابنفش بسیار اهمیت دارد و از اهداف مهم صنایع آرایشی و بهداشتی محسوب می‌شود. در کشورهای آسیایی مانند هندوستان برای سفیدکردن پوست از گیاهان به طور سنتی استفاده می‌کنند [۳۰].

در صنایع آرایشی و بهداشتی و صنایع داروسازی به دلیل عوارض جانبی ترکیبات شیمیایی و مصنوعی، به دنبال یافتن ترکیباتی با منشاء گیاهی می‌باشند زیرا استفاده از عصاره‌های گیاهی برای مهار ملانوژنز و همچنین اهداف صنایع آرایشی و بهداشتی، عوارض جانبی بسیار پایینی نسبت به ترکیبات مصنوعی دارند [۳۸]. به طور مثال هیدروکوئینون استفاده شده در لوازم آرایشی برای سفید کردن پوست، سمیت بسیار بالایی دارد. پس به تحقیقات بیشتری برای یافتن مهارکننده‌های جدید با عوارض جانبی پایین نیاز است [۳۴]. به دلیل افزایش تقاضا برای تهیه‌ی لوازم آرایشی و سفیدکننده‌ی پوست، شرکت‌های سازنده‌ی لوازم آرایشی به دنبال مهارکننده‌های جدید و مؤثر برای فرایند ملانوژنز با منشاء گیاهی هستند [۳۸].

چندین ماده‌ی شیمیایی با منشاء گیاهی امروزه در مواد آرایشی و دارویی به عنوان سفیدکننده‌ی پوست استفاده می‌شود تا از تولید بیش ازحد ملانین در لایه‌های اپیدرمی جلوگیری کند [۴۶، ۴۳]. بر اساس مطالعات و پژوهش‌های چندین ساله استفاده از عصاره‌های گیاهی در لوازم آرایشی و بهداشتی توسعه یافته است مثلاً از عصاره‌های گیاهی *Areca catechu* و *Morus alba* به عنوان سفیدکننده و ضدچین و چروک استفاده شده است [۳۸].

در این پژوهش، در جستجوی ترکیبات فعال طبیعی برای مهار آنزیم تیروزیناز، عصاره‌ی متانولی ۷۰ گونه‌ی گیاهی بررسی شد. نتایج فعالیت مهاری آنزیم تیروزیناز قارچی بر روی ۷۰ عصاره‌ی گیاهی استان کردستان در چهار غلظت و سه تکرار در جدول شماره ۱ ارائه شده است. محاسبه‌ی فعالیت مهاری عصاره‌ها بر اساس مقایسه با کنترل منفی انجام شد و نتایج به صورت درصد مهار بیان شده است. کوجیک اسید و آربوتین به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، در میان ۷۰ عصاره‌ی گیاهی که مورد سنجش قرار گرفتند، عصاره‌ی متانولی گیاهان *Heptaptera anatolica*، *Bongardia chrysogonum*، *Hypericum scabrum*، *Hyoscyamus kurdicus*، *Nonea hypoleia*، *Marrubium cuneatum*، *Scrophularia pruinosa*، *Salvia suffruticosa*، *Asperugo procumbens*، *Verbascum phoenicum* و *Astragalus siliquosus* subsp. *siliquosus* فعالیت مهارکنندگی بالای ۶۰ درصد را برای آنزیم تیروزیناز از خود

نشان دادند. این گیاهان می‌توانند منبع بالقوه‌ی جدیدی برای مهارکننده‌های تیروزیناز قارچی باشند.

با توجه به نتایج، بیشترین درصد مهار، مربوط به *Saliva suffruticosa* (۸/۷۷٪ ± ۹۲/۶۲) در غلظت ۴۰۰ µg/ml بود. علت مهار بالای این عصاره می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات مهارکنندگی قوی از پلی فنول‌ها و بنزوئیک اسیدها باشد. اختلاف درصد مهار غلظت‌های این عصاره می تواند به دلیل وجود عوامل مداخله‌گر از جمله وجود فاکتورهای فعال‌کننده در عصاره باشد. جنس *Salvia* (مریم گلی) بزرگترین جنس از خانواده‌ی *Lamiaceae* (نعناع) می باشد که در قسمت مرکزی و غرب آسیا به فراوانی یافت می شود. از چندین گونه‌ی این جنس برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله التهاب، ضدعفونی کردن زخم‌های عفونی، مالاریا، سرطان، از دست دادن حافظه و درمان بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود. در طب سنتی ترکیه از بعضی گونه‌های مریم‌گلی برای درمان بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود. مثلاً از ریشه‌ی گیاه *Salvia aethiopis* به همراه موم و رزین پمادی درست شده است که برای درمان التهاب پوستی استفاده می‌شود. از سایر گیاهان این جنس مانند *Salvia tomentosa*، *Salvia nemorosa* و *Salvia cryptantha* برای درمان درد روماتیسمی، بهبود زخم و ناراحتی‌های معده استفاده شده است [۴۸].

گیاه *Hyoscyamus kurdicus* Bornm از خانواده‌ی Solanaceae (تیره‌ی سیب‌زمینی) در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای قدرت مهاری ۸۶/۵۵±۵/۷۰٪ است. بسیاری از اعضای خانواده‌ی Solanaceae دارای اهمیت درمانی هستند، بخصوص به عنوان آرام‌بخش از آنها استفاده می‌شود. گونه‌های جنس *Hyoscyamus* دارای مقدار زیادی آلکالوئید هستند و اهمیت درمانی بالایی دارند اما بعضی از آنها سمی هستند و برای درمان نباید به مقدار زیاد از آنها استفاده کرد. بر اساس تحقیقات صورت گرفته، تاکنون اثر مهاری این جنس بر روی آنزیم تیروزیناز گزارش نشده است [۵۱].

گیاه *Verbascum phoenicum* L از خانواده‌ی Scrophulariaceae (تیره‌ی گل میمون) در غلظت ۴۰۰ µg/ml دارای قدرت مهاری ۸۱/۴۱±۰/۹۰ درصد است. از برگ و گل بعضی از گونه‌های جنس *Verbascum* به عنوان دارو برای درمان بیماری‌هایی از جمله تشنج، سرماخوردگی، آسم و همچنین از عصاره‌ی آنها برای رفع خارش و نرم کردن پوست و تقویت مو استفاده شده است. از گونه‌ی *Verbascum thapsus* به عنوان سفیدکننده‌ی پوست استفاده شده است [۵۱].

اثر مهاری گونه‌ی *Astragalus siliquosus* Boiss از خانواده‌ی Papilionaceae (باقلایان) بر روی تیروزیناز قارچی هنوز گزارش نشده است اما اثر مهاری گونه‌ی دیگر این جنس، *Astragalus membranacous* در سال ۲۰۰۹ توسط کیم (Kim) و همکاران بررسی شد و نشان داده شد که مهارکننده‌ی قوی برای تیروزیناز قارچی است [۴۹].

فعالیت مهاری چندین گونه از جنس *Marrubium* بر روی تیروزیناز قارچی گزارش شده است، اثر مهاری تیروزیناز قارچی روی عصاره متانولی *Marrubium velutinum* و *Marrubium cylleneum* در سال ۲۰۰۷ توسط کاریوتی (Karioti) و همکارانش بررسی شد. این گیاهان دارای ترکیبات مهارکننده‌ی فلاونوئیدی بودند و اثر مهاری قوی بر روی تیروزیناز داشتند [۵۰].

اثر مهاری سایر گونه‌های گیاهی ذکر شده در این مطالعه با درصد مهار بالاتر از ۶۰، بر روی تیروزیناز قارچی برای اولین بار بررسی شده و مطالعه مشابهی تاکنون روی گونه‌های این جنس‌ها صورت نگرفته است.

تعدادی از گیاهان نیز درصد مهار متوسط و تعدادی نیز درصد مهار ضعیف دارند که در فصل نتایج به آنها پرداخته شد. تعدادی از گیاهان نیز دارای درصد مهار منفی بودند. در واقع عصاره گیاهان با درصد مهار منفی در چاهک تست، ظاهراً باعث فعال‌تر شدن آنزیم شده‌اند که چگونگی این امر کاملاً مشخص نشده است اما می‌توان با جداسازی و شناسایی اجزای موجود در عصاره تا حدودی به چگونگی فعال شدن آنزیم پی برد.

از گیاه *Aloe vera* در طب سنتی برای سفید کردن پوست استفاده می‌شود در مطالعات انجام گرفته با استفاده از عصاره‌ی متانولی این گیاه، برای مهار کردن آنزیم تیروزیناز قارچی

مشخص شد که این عصاره بر روی تیروزیناز قارچی اثر مهاری ندارد اما در کشت سلول‌های ملانوسیت باعث کاهش تولید ملانین شده است. دلیل آن می‌تواند چنین باشد که بیوسنتز ملانین دارای چندین مرحله است پس عصاره‌ها می‌توانند آنزیم را در مسیر سنتز به طور غیرمستقیم مهار کنند [۷].

در این پژوهش از آنزیم تیروزیناز قارچی خریداری شده از شرکت سیگما استفاده شده است. با وجود برخی از محدودیت های استفاده از مهارکننده‌های تیروزیناز قارچی بر روی تیروزیناز انسانی، به دلیل در دسترس بودن تجاری آنزیم تیروزیناز قارچی و فقدان آنزیم تیروزیناز انسانی، این آنزیم نقش بسیار مهمی در مطالعات مهاری تیروزیناز داشته است. بیشتر تحقیقات انجام گرفته در این زمینه بر روی آنزیم خالص شده از *A. bisporus* انجام شده است [۳۳]. تیروزیناز قارچی آنزیمی سیتوزولی است اما تیروزیناز انسانی آنزیمی متصل به غشا است. تیروزیناز قارچی تترامر است و در مقایسه با آن تیروزیناز انسانی مونومر است و همچنین در میزان گلیکوزیله شدن آنها نیز تفاوت وجود دارد. تفاوت‌های تیروزیناز قارچی با تیروزیناز انسانی موجب شده است که محدودیت‌هایی در استفاده از اطلاعات حاصل از پژوهش‌های مهاری وجود داشته باشد [۲۱]. در برخی از مطالعات، از عصاره‌ی خام ملانوسیت‌های انسان به عنوان منبع آنزیم استفاده شده است اما مقدار آنزیم موجود در عصاره کم است و دارای ناخالصی می‌باشد. بنابراین مهندسان ژنتیک به دنبال تولید تیروزیناز نوترکیب انسانی با خواص مناسب برای یافتن مهارکننده‌های جدید هستند [۹].

در طول بیست سال گذشته انواع متفاوتی از مهارکننده‌های تیروزیناز قارچی از منابع مختلف کشف شده‌اند. این موفقیت در مطالعات اساسی در زمینه‌های مختلف از جمله نقش آنزیم تیروزیناز در مسیر بیوسنتز ملانین، بررسی جنبه‌های بیوشیمیایی و ساختاری آنزیم به دست آمده است. با وجود این موفقیت کارهای زیادی هنوز در این زمینه مورد نیاز است [۲۳، ۹].

انتظار می‌رود که وجود ترکیبات آلدئیدهای آروماتیک، اسیدهای آروماتیک و پلی‌فنل‌ها که شامل قسمت‌های آبگریز هستند، مهارکننده‌های رقابتی برای سنتز ملانین باشند. شناسایی و بررسی ساختار این ترکیبات در توسعه‌ی عوامل سفیدکننده‌ی پوست مفید هستند و باید تحقیقات بیولوژیکی برای تأیید فعالیت این ترکیبات در مسیر ملانوژنز صورت گیرد [۴۲]. از آنجا که مطالعه‌ی ما ممکن بود یک محدودیت رنگ داشته باشد، به این دلیل که سنجش بیولوژیکی عصاره‌ی گیاهان می‌تواند با رنگ عصاره دخالت داشته باشد و رنگ سبز شدید کلروفیل در طول موج آبی و قرمز جذب دارد، لذا با تعریف بلانک ویژه برای هریک از چاهک‌های تست، جذب نوری عصاره، گروه‌های فرعی در عصاره‌ها و هیدرولیز خود به خودی سوبسترا رد می‌شود [۱۳].

مهار عصاره‌ها در حلال متانول سنجیده شد. متانول حلالی قطبی است که می‌تواند پودر گیاهان را با بیشترین ترکیبات موجود حل کند و استخراج مؤثری داشته باشد. در طی مطالعات انجام شده ثابت شده است که متانول نسبت به حلال‌هایی مانند آب، هگزان و اتیل استات حلال مناسب‌تری برای استخراج ترکیبات فنولی عصاره‌ها است زیرا قدرت نفوذ متانول به سلول‌ها برای استخراج ترکیبات مهارکننده‌ی تیروزیناز زیاد است [۲۹].

در پژوهش حاضر میان درصد مهار چهار غلظت بعضی از عصاره‌ها همبستگی وجود نداشت همان طور که در مطالعات انجام شده بر روی سنجش مهاری عصاره‌های چای سبز در سال ۲۰۱۰ توسط سانگ سریکن (Sangsrichan) و تینگ (Ting) انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که این همبستگی ناچیز، ممکن است نتیجه‌ی حضور یا عدم حضور و یا مقدار ترکیبات مختلف باشد. اثر مهاری ترکیبات موجود در عصاره‌های استخراج شده، متفاوت بوده است. پس از بررسی ثابت شد که در چای سبز ترکیبات مختلفی با قدرت مهاری متفاوت مانند گلوکاتچین-۳-اکسی‌گالات (galocatechin-3-o-gallate)، اپی گلوکاتچین (epigallocatechin) و کاتچین (Catechin) وجود دارد که گالوکاتچین-۳-اکسی‌گالات مهار بالاتری داشته پس کار درست و پس از این مرحله، شناسایی و جداسازی ترکیبات مهاری در عصاره‌های خام می‌باشد [۲۹، ۲۵]. در مطالعات مهاری عصاره‌های گیاهی که در سال ۲۰۰۹ توسط ماکرینی (Macrini) و همکارانش صورت گرفت، مشخص شد که

محلول عصاره‌های *Ruprechtia* sp و *Rapanea parriflora* برای آنزیم تیروزیناز مهارکننده‌های قوی هستند با این حال رابطه‌ی معنی‌داری بین غلظت‌های عصاره و درصد مهار وجود نداشت، که ممکن است نتیجه‌ی وجود ترکیبات مختلف مهاری با غلظت متفاوت در عصاره‌ها باشد [۳۴].

در پژوهش‌های متعدد بر روی قدرت مهار عصاره‌های گیاهی، ترکیبات مختلفی با قدرت مهار متفاوت جداسازی شده اند. همچنین روش مهار ترکیبات نیز متفاوت بوده است. اکثر ترکیبات مهار رقابتی ایجاد می‌کنند اما بعضی از آنها باعث ایجاد مهارهای دیگر و همچنین تخریب آنزیم تیروزیناز می‌شوند [۳۴، ۲۹]. بر اساس نتایج سنتیکی آنزیم و مقایسه‌ی شیب نمودار کنترل با شیب نمودار عصاره‌ی *Saliva suffruticosa* با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص شد که مهار آنزیم از نوع مهار نارقابتی می‌باشد. ترکیبات مهاری استخراج شده از عصاره‌های گیاهی در طی پژوهش‌های مختلف شامل: دی‌هیدروفلاونول، فلاونول، فلاوانول، فلاون، ایزوفلاون، تانن، کوئرستین، کمفرول، روتین، راکموفوران و انواع دیگر می‌باشند. این ترکیبات با توجه به تعداد استخلافات متنوع و موقعیت متفاوت آنها قدرت مهاری متفاوتی دارند. با توجه به میزان غلظت این ترکیبات در عصاره‌های گیاهی و قدرت مهاری متفاوت آنها، ممکن است درصد مهار متفاوتی بر روی آنزیم تیروزیناز ایجاد کنند. همچنین وجود اجزای آزاد مداخله‌گر در عصاره‌های ناخالص می‌تواند، باعث شود که میان داده‌های حاصل از مهار یک عصاره با چند غلظت همبستگی وجود نداشته باشد [۴۱، ۴۰، ۳۴، ۲۹].

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، در میان ۷۰ عصاره‌ی گیاهی که مورد سنجش قرار گرفتند، عصاره‌ی متانولی گیاهان *Heptaptera anatolica*، *Bongardia chrysogonum*، *Hyoscyamus kurdicus*، *Hypericum scabrum*، *Marrubium cuneatum*، *Nonea hypoleia*، *Salvia suffruticosa*، *Scrophularia pruinosa*، *Verbascum phoenicum*، *Asperugo procumbens* و *Astragalus siliquosus* subsp. *siliquosus* فعالیت مهارکنندگی بالای ۶۰ درصد را برای آنزیم تیروزیناز از خود نشان دادند. هر یک از این گیاهان به نوبه خود می‌توانند در مطالعات بعدی منبع بالقوه‌ی جدیدی برای مهارکننده‌های تیروزیناز قارچی باشند. اما به هر حال عصاره هگزانی گیاه مریم‌گلی بوته‌ای (*Saliva suffruticosa*) به دلیل درصد مهار بالا و IC_{50} پایین می‌تواند با هدف جداسازی و تعیین ماهیت عامل مهارکننده آنزیم تیروزیناز قارچی، مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Chang T. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 2009; 10: 2440-2475.

2. Garcia-Borron J. C. and Solano F. Molecular Anatomy of Tyrosinase and its Related Proteins: Beyond the Histidine-Bound Metal Catalytic Center. *Pigment Cell Res.* 2002; 15: 162-173.

3. Chang, T. Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors. *Journal of Biocatalysis & Biotransformation* 2012; 1: 1-2.

4. Kim M., Park J., Song K., Kim H. G., Koh J. S and Boo Y. C. Screening of plant extracts for human tyrosinase inhibiting effects. *International Journal of Cosmetic Science* 2012; 34: 202-208.

5. Ismaya W. T., Rozeboom H. J, Weijn A., Mes J. J., Fusetti F., Wichers H. J. and Dijkstra B. W. Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochem.* 2011; 50: 5477-5486.

6. Mason H. S. Tyrosinase dihydroxyphenylalanine by mechanism of the oxidation of the chemistry of melanin: iii. *J. Biological Chem.* 1984; 172: 83-99.

7. Mapunya M. B., Nikolova R. V. and Lall N. Melanogenesis and Antityrosinase Activity of Selected South African Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012; 10: 1-6.

8. Momtaz S., Mapunya B. M., Houghton P. J., Edgerly C., Hussein A., Naidoo A. and Lall N. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *J. Ethnopharmacol*. 2008; 119: 507–512.

9. Halaban R., Patton R. S., Cheng E., Svedine S., Trombetta E. S., Wahl M. L., Ariyan S. and Hebert D. N. Abnormal Acidification of Melanoma Cells Induces Tyrosinase Retention in the Early Secretory Pathway. *The Journal of Biological Chem.* 2002; 277: 14821-14828.

10. Chang T. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials* 2012; 5: 1661-1685.

11. Brighnti S., Camera E. and Picardo. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* 2003; 16: 101-110.

12. Zho W. and Gao J. The Use of Botanical Extracts as Topical Skin-Lightening Agents for the Improvement of Skin Pigmentation Disorders. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2008; 13: 20–24.

13. Kamkaen N., Mulsri N. and Treesak C. Screening of Some Tropical Vegetables for Anti-tyrosinase Activity. *Thai Pharmaceutical and Health Science J.* 2007; 2: 15-19.

14. Lima L. L., Lima R. M., da Silva A. F., deCarmo A. M., da Silva A. D. and Raposo N. R. B. Azastilbene Analogs as Tyrosinase Inhibitors: New Molecules with Depigmenting Potential. *Hindawi Publishing Corporation the Scientific World J.* 2013; 10: 1-7.

15. Sariri R., Sabbaghzadeh R. and Poumohamad F. In-Vitro Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activity of Methanol Extracts from Crocus Sativus Flowers. *Pharmacologyonline* 2011; 3: 1-11.

16. Masuda T., Yamashita T., Takeda Y. and Yonemori S. Screening for Tyrosinase Inhibitors among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochem.* 2005; 69: 197-201.

17. Vuthy T.Y. Screening of anti-tyrosinase activity of Cambodian plants. Ekong Health Congress. 2011, 24-27.

18. Harborne, J. B. and Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* 2000; 55: 481-504.

19. Rendon M. I. and Gaviri J. I. Review of Skin-Lightening Agents. *Dematol. Surg*. 2005; 31: 886-889.

20. Gillbro J. M. and Olsson M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin lightening agents - existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Sci.* 2011; 33: 210–221.

21. An S. M., Lee S. I., Choi S. W., Moon S. M. and Boo Y. C. p-Coumaric acid, a constituent of Sasa quelpaertensis Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by a melanocyte stimulating hormone. *British Journal of Dermatol.* 2008; 159: 292-299.

22. Xie L. P., Chen Q. X., Huang H., Wang H. Z. and Zang R. Q. Inhibitory Effects of Some Flavonoids on the Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochemistry (Moscow),* 2003; 68: 487-491.

23. Nitoda T., Isao T. and Kubo I. Effect of Phenolic Compounds Isolated from Rabdosia Japonica on B16-F10 Melanoma Cells. *Phytotherapy Res.* 2008; 22: 867-872.

24. Nagata H., Takekoshi S., Takeyama R., Homma T. and Osamura Y. Quercetin Enhances Melanogenesis by Increasing the Activity and Synthesis of Tyrosinase in Human Melanoma Cells and in Normal Human Melanocytes. *Pigment Cell Res*. 2004; 17: 66-73.

25. No J. K., Soung D. Y., Kim Y. J., Shim K. H., Jun Y. S., Rhee S. H., Yokozawa T. and Chung H. Y. Inhibition of tyrosinase by Green Tea Components. *Life Sci.* 1999; 65: 241-246.

26. Ioannou I. and Ghoul M. Prevention of Enzymatic Browning in Fruit and Vegetables. *European Scientific J.* 2013; 9: 310-341.

27. Leu Y. L., Hwang T. L., Hu J. W. and Fang J. Y. Anthraquinonea from *Polygonum cuspidatum* as Tyrosinase Inhibitors for dermal Use. *Phytotherapy Res.* 2008; 22: 552-556.

28. Tief K., Hahne M., Schmidt A. and Beermann F. Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain. *European J. Biochem.* 1996; 241: 12-16.

29. Sangsrichan S. and Ting R. Antioxidation and Radical Scavenging Activities and Tyrosinase Inhibition of Fresh Tea Leaves, (*Camellia Sinensis*). *Science Journal Unon Ratchathani University* 2010; 1: 76-81.

30. Vaibhav S. and Lakshaman K. Tyrosinase Enzyme Inhibitory Activity of selected Indian Herbs. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sci.* 2012; 3: 977-982.

31. Sahu R. K., Roy A., Matlam M., Deshmukh V. K., Dwivedi J. and Jha A. K. Review on Skin Aging and Compilation of Scientific validated medicinal Plants, Prominence to Flourish a Better Research reconnoiters in Herbal Cosmetic. *Research J. Medicinal* 2013; 7: 1-22.

32. Kim H., Choi J., Cho J. K., Kim S. Y. and Lee Y. S. Solid-phase synthesis of kojic acid-tripeptides and their tyrosinase inhibitory activity, storage stability, and toxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004, 14: 2843–2846.

33. Sato K. and Toriyama M. Depigmenting Effect of Catechins. *Molecules* 2009; 14: 4425-4432.

34. Macrini D. J., Suffredini I. B., Varella A. D., Younes R. N. and Ohara M. T. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. *Brazilian J. Pharmaceutical Sci.* 2009; 45: 715-721.

35. Miyazawa M., Oshima T., Koshio K., Itsuzaki Y. and Anzai J. Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. *J. Agricultural Food Chem.* 2003; 5: 6953-6956.

36. Tel G., Ozturk M., Duru M. E., Dogan B. and Harmandar M. Fatty Acid Composition, Antioxidant, Anticholinesterase and Tyrosinase Inhibitory Activities of Four *Serratula* Species from Anatolia. *Records of Natural Products* 2013; 7: 86-95.

37. Ha T. J., Tamura S. and Kubo I. Effects of Mushroom Tyrosinase on Anisaldehyde. *J. Agricultural Food Chem.* 2005; 7: 7024-7028.

38. Moon J. Y., Yim E. Y., Song G., Lee N. H. and Hyun C. G. Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *Eur. Asian J. BioSci.* 2010; 4 (6): 41-53.

39. Saewan N., Koysomboon S. and Chantrapromma K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from Blumea balsamifera DC**.** *J. Medicinal Plants Res.* 2011; 5: 1018-1025.

40. Ding H. Y., Lin H. C. and Chang T. S. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Paeonia suffruticosa. J. Cosmetic Sci.* 2008; 60: 347-352.

41. Li H. T., Ruan S. W., Huang J. C., Chen H. L. and Chen C. Y. Antioxidant and tyrosinase inhibitor from *Leucaena leucocephala. African J. Biotechnol.* 2012; 11: 14182-14185.

42. Therdphapiyanak N., Jaturanpinyo M., Waranuch N., Kongkaneramit L. and Sarisuta N. Development and assessment of tyrosinase inhibitory activity of liposomes of *Asparagus racemosus* extracts. *Asian J. Pharmaceutical Sci.* 2013; 8: 134-142.

43. Souza P. M., Elias S. T., Simeoni L. A., de Paula J. E., Gomes S. M., Guerra E. N., Fonseca Y. M., Silva E. C., Silveira D. and Damaris M. P. O. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. *PLoS ONE* 2012; 7: e48589. doi: 10.1371/journal.pone.0048589.

44. Loizzo M. R., Tundis R. and Menichini F. Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2012; 11: 378-398.

45. Lim T. Y., Lim Y. Y. and Yule C. M. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chem.* 2009; 114: 594-599.

46. Kubo I., Chen Q. X., Nihei K. I., Calderon J. S. and Cespedes C. L. Tyrosinase Inhibition Kinetics of Anisic Acid. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 2003; 58: 713-718.

47. Seo S. Y., Sharma V. K. and Sharma A. T. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *J. Agricultural and Food Chem.* 2003, 51: 2837-2853.

48. Suntar I., Akkol E. K., Senol F. S. Keles H. and Orhan I. E. Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using in vivo and in vitro experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 135: 71-77.

49. Kim J. H., Kim M. R., Lee E. S. and Lee C. H. Inhibitory Effects of Calycosin Isolated from the Root of Astragalus membranaceus on Melanin Biosynthesis. *Biological Pharmacology Bulletin* 2009; 32: 264-268.

50. Karioti A., Protopappa A., Megoulas N. and Skaltsa H. Identification of tyrosinase inhibitors from Marrubium velutinum and Marrubium cylleneum. *Bioorganic & Medical Chem.* 2007; 15: 2708-2714.

51. Zargari A., Medicinal Plants. (7th edition). Vol. 3. Tehran University Publications. IRAN. 1997, pp: 675-679.