فصلنامه علمی زیست شناسی کاربردی دانشگاه الزهراء (س)
دوره ۳۶، شماره ۱، پیاپی ۷۵، بهار ۱۴۰۲، ۲۰۶-۱۸۱
نوع مقاله: پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal Of Applied Biology
Vol.36, No.1, Sering. 75, Spring 2023, p.181-206
Article type: Research Paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
https://doi.org/10.22051/jab.2022.39932.1480

بررسی اسیدهای فنلی و برخی خواص زیستی گیاه *Nepeta macrosiphon*

سعید ملائی [۱*]، حدیثه عباسی هولاسو[۱]، بهور اصغری [۲]، مصطفی عبادی [۳] حسین هاشم‌پور[۱]

چکیده

مقدمه: *اسیدهای فنلی متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که خواص زیستی فراوانی داشته و در اندام‌های مختلف گیاهان یافت می‌شوند که نقش مهمی در سلامت موجودات دارند.*

روش کار: *در این کار تحقیقاتی، عصاره‌گیری از اندام‌های مختلف گیاه Nepeta macrosiphon با کمک حلال اتانول ۸۰ درصد انجام گرفت و در ادامه به فرکشن‌های اسیدهای فنلی آزاد و استری محلول تقسیم گردیدند. بعلاوه، محتوای کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار کننده‌گی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز عصاره تام به همراه فرکشن ها با روش های فولین سیکالتو، رنگ سنجی آلومینیم کلرید، DPPH و اسپکتروسکوپی ارزیابی شد و در نهایت ترکیبات آنها توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفت.*

نتایج: *عصاره اتانولی گل به ترتیب با مقادیر ۷۰/۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم نمونه و ۲۹/۲ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید کل را داشت. همچنین این عصاره با مقادیر IC_{50} معادل ۳۱۵/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. علاوه بر این، عصاره گل توانایی بیشتری در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز داشت. نتایج آنالیز اسیدهای فنلی نشان داد که در بین اندام‌های مورد مطالعه، گل بیشترین میزان اسیدهای فنلی را داشت و اسید رزمارینیک و اسید پارا-کوماریک به ترتیب با مقدار ۶۷۲/۷ و ۶۱۴/۳ میکروگرم بر گرم نمونه عمده ترین اسیدهای فنلی آزاد موجود در گل بودند و اسید کافئیک نیز عمده ترین ترکیب موجود در عصاره اسیدهای فنلی استری محلول گل بود. همچنین عصاره حاوی اسیدهای فنلی آزاد حاصل از گل، دارای بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در مقایسه با عصاره حاوی اسیدهای فنلی استری محلول و دیگر اندام ها بود.* ***نتیجه گیری:*** *بر اساس نتایج حاصل، گل گیاه پونه سا دارای بیشترین ترکیبات فنلی از جمله اسید رزمارینیک ، اسید پارا-کوماریک و اسید کافئیک است و با توجه به پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز می‌تواند در صنعت داروسازی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.*

واژه های کلیدی: Nepeta macrosiphon، آنتی‌اکسیدان، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، اسیدهای فنل.

۱. تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی. (*ایمیل نویسنده مسئول: s.mollaei@azaruniv.ac.ir)
۲. قزوین، دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی علوم باغبانی.
۳. تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی.

مقدمه

پونه‌سا (*Nepeta* L.) یکی از بزرگ‌ترین سرده‌های تیره نعناعیان (Lamiaceae) بوده با بالغ بر ۲۵۰ گونه‌ی مختلف یک‌ساله و چندساله در جهان است. اغلب گونه‌های پونه‌سا در مناطق معتدله اروپا، آسیا و شمال آفریقا انتشار دارند. بطورکلی، بیشترین گونه سرده پونه‌سا، در کشورهای ایران، پاکستان و هند (بیشتر غرب هیمالیا) یافت می‌شود. در ایران، بالغ بر ۶۷ گونه علفی یک‌ساله و چندساله از این سرده گزارش شده است و از این میان بیش از ۶۰٪ گونه‌ها انحصاری هستند. گونه‌های مختلف پونه‌سا دارای فرم‌های رویشی کامفیت، همی‌کریپتوفیت و تروفیت هستند و دارای برگ‌های ساده، در حاشیه دارای دندانه‌های هلالی و گل‌آذین گرزن متراکم یا فاصله‌دار می‌باشند (Mozaffarian, 1996; Jamzad *et al*., 2000).

برخی از گونه‌های پونه‌سا در ایران به عنوان گیاهان دارویی، کاربردهای گسترده‌ای دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به *N. binaloudensis* Jmzad.، *N. ispahanica* Bioss.، *N. bracteata* Benth.، *N. ponogosperma* Jamzad et Assadi. و *N. pungens* (Bunge) Benth. اشاره کرد. این گیاهان حاوی محتوای بالایی از متابولیت‌های ثانویه به ویژه ترکیبات فنلی هستند که خواص بیولوژیکی و دارویی مختلفی را از خود نشان داده‌اند. از جمله خواص گزارش شده پونه‌ساها در طب سنتی، می‌توان به اثرات ادرارآور، ضدسرفه، ضداسپاسم، ضدآسم، تب‌بر و ضددرد آن‌ها اشاره کرد. همچنین گیاهان سرده پونه‌سا بطور عمده به دلیل اثرات بالقوه ضدتوموری، ضدالتهابی و ضدمیکروبی مورد توجه محققین می‌باشند (Mozaffarian, 1996; Jamzad *et al*., 2000; Süntar *et al*., 2018).

اسیدهای فنلی زیر گروهی از دسته ترکیبات فنلی هستند که در گیاهان به صورت آزاد یا مشتق شده با سایر ترکیبات طبیعی از جمله فلاونوئیدها، الکل‌ها، هیدروکسی اسیدهای چرب، استرول‌ها و گلوکوزیدها یافت می‌شوند (Klick & Herrmann, 1998; Lam *et al*., 2001). اگرچه تاکنون اطلاعات زیادی در مورد نقش اسیدهای فنلی در گیاهان موجود نیست، ولی دارای عملکردهای مختلفی مانند جذب مواد مغذی، سنتز پروتئین، فعالیت آنزیمی و فتوسنتز هستند

(Shahidi & Nacsk, 1995). این ترکیبات موادی با یک حلقه فنلی و حداقل یک گروه عاملی کربوکسیلیک اسید هستند و می‌توان آنها را بسته به واحدهای کربنی زنجیره جانبی متصل به حلقه فنلی، به ترکیبات دارای ساختارهای C_6-C_3، C_6-C_2 و C_6-C_1 تقسیم‌بندی کرد که مهم‌ترین آن‌ها C_6-C_3 (مشتق شده از سینامیک اسید) و C_6-C_1 (مشتق شده از اسید بنزوئیک) می‌باشند (Goleniowski *et al*., 2013). بسیاری از اسیدهای فنلی مانند مشتقات سینامیک و بنزوئیک اسید در تمام گیاهان و گیاهانی که به عنوان غذا استفاده می‌شوند (مانند میوه‌ها، سبزیجات و غلات) وجود دارند. با این حال، فقط یک بخش جزئی از اسیدهای فنلی، به فرم اسید آزاد دیده می‌شوند. با توجه به نکات ذکر شده و اهمیتی که اسیدهای فنلی دارا می‌باشند این ترکیبات موضوع بسیاری از مطالعات شیمیایی، بیولوژیکی، کشاورزی و پزشکی بوده‌اند (Verpoorte *et al*., 2002; Shahidi & Naczk, 2004). نتایج این تحقیقات مشخص کرده‌اند که ترکیبات فنلی در مدیریت بیماری‌های مزمن مرتبط با استرس اکسیداتیو مانند دیابت، سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی دارای پتانسیل بالایی هستند (Shetty *et al*., 2004).

برخی از تحقیقات اخیر نشان داده اند که ترکیبات پلی‌فنلی قادر به تنظیم گلوکز خون پس از غذا و مهار عدم تحمل گلوکز با تقویت پاسخ به انسولین و کاهش ترشح پلی‌پپتید انسولینوتروپیک وابسته به گلوکز و پلی‌پپتید-۱ شبه گلوکاگون هستند (Johnston *et al*., 2005; Dao *et al*., 2011). پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده‌اند که ترکیبات فنلی قادر به مهار آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز هستند. این دو آنزیم نقش کلیدی در هیدرولیز نشاسته در سیستم گوارش دارند و به این ترتیب کاستن شدت فعالیت آن‌ها می‌تواند کمک شایانی به کنترل سطح قند خون، به ویژه در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نماید (Mccue *et al*., 2004). استفاده از مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز موجود در گیاهان دارویی، میوه‌ها و سبزیجات می‌تواند یک استراتژی خوب برای کنترل قند خون پس از صرف غذا، ارائه دهد که تا حد امکان عوارض جانبی موجود در اکثر داروهای موجود، مانند اتساع شکم، نفخ و احتمالاً اسهال و غیره را نداشته باشد (Gao *et al*., 2007; Kotowaroo *et al*., 2006).

گونه *N. macrosiphon* Boiss. با نام فارسی پونه‌سای سی سختی یا لوله بلند یکی از گیاهان انحصاری فلات ایران است که بطور عمده در دامنه‌های سنگلاخی، صخره‌ای و حاشیه مزارع مناطق ایرانی تورانی و خزری یافت می‌شود. در طب سنتی این گیاه بعنوان مقوی معده، ضدآسم، ضدنفخ و قاعده آور مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jamzad, 2012) و تابحال مطالعه جامعی بر روی متابولیت‌ها و خواص زیستی این گیاه انجام نگرفته است. لذا، در این مطالعه برای اولین بار اسیدهای فنلی آزاد و استری محلول موجود در اندام‌های گل، برگ، ساقه و ریشه گیاه *N. macrosiphon* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، خواص زیستی (آنتی اکسیدانی و مهار فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز) عصاره‌ها و فرکشن‌های هر اندام نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و خشک کردن گیاه

گیاه *N. macrosiphon* از استان آذربایجان شرقی، منطقه زنوز در فصل گلدهی جمع‌آوری گردید و در هرباریوم دانشگاه شهید مدنی آذربایجان (با شماره هرباریوم ASMU980808) نگهداری شد. در ادامه، بعد از جداکردن اندام‌های مختلف گیاه، این نمونه‌ها در یک مکان تاریک و دور از نور خورشید خشک گردید.

مواد شیمیایی مورد استفاده

مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده برای فرآیند عصاره‌گیری و انجام تست‌های بیولوژیکی از شرکت مرک خریداری شدند. همچنین در آنالیزهای HPLC، استاندارد اسیدهای فنلی (بنام های اسید گالیک، اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک، اسید وانیلیک، اسید کافئیک، اسید رزمارینیک، اسید پارا-کوماریک، اسید فرولیک، اسید سینامیک، اسید متا-کوماریک و اسید سالیسیک) و تمام حلال‌های مورد استفاده، HPLC grade بودند.

چربی‌زدایی

۴ گرم از اندام‌های مختلف گیاه (گل، برگ، ساقه و ریشه) به صورت جداگانه با ۴۰ میلی‌لیتر حلال n-هگزان مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه داخل حمام اولتراسونیک قرار گرفت و سپس، توسط کاغذ صافی صاف گردید. این فرآیند ۳ بار تکرار شد تا اکثر ترکیبات چربی دوست حذف گردند.

عصاره‌گیری

عصاره تام اتانولی

تفاله‌ی به دست آمده از فرآیند چربی‌زدایی با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۸۰ درصد مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و با استفاده از کاغذ صافی واتمن، صاف گردید. عصاره‌های به دست آمده با کمک دستگاه تبخیرکننده دوارخشک شدند.

جزبندی عصاره تام اتانولی

۳۰ میلی‌لیتر متانول به عصاره تام اتانولی به دست آمده اضافه گردید و با کمک HCl (۰/۱ مولار)، pH آن در ۲ **تنظیم** گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی به دست آمده جدا گردید. با استفاده از قیف جدا کننده، این محلول ۳ مرتبه توسط حلال n-هگزان مورد استخراج قرار گرفت تا فاز آبی آن جدا گردد. سپس به نسبت حجمی ۱:۱ به فاز آبی حلال‌های دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات (به اندازه‌ی حجم فاز آبی موجود) اضافه گردید که این فرآیند نیز در ۳ مرتبه تکرار شد. در نهایت، فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا شدند و فاز آلی حاصل که حاوی اسیدهای فنلی آزاد است، خشک گردید و برای انجام مطالعات بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

به فاز آبی باقی مانده ۸۰ میلی‌لیتر NaOH، ۲ مولار اضافه گردید و محلول به مدت ۴ ساعت باقی ماند. در ادامه با تنظیم pH آن در مقدار ۳ الی ۴، با کمک HCl ۰/۱ مولار،

محلول داخل سانتریفیوژ قرار گرفت. با استفاده از حلال n-هگزان، محلول ۳ مرتبه توسط قیف جدا کننده استخراج گردید. سپس با اضافه کردن حلال‌های دی‌اتیل‌اتر و اتیل‌استات به نسبت ۱:۱ روی فاز آبی جدا شده، ۳ مرتبه استخراج انجام گرفت. عصاره به دست آمده که حاوی اسیدهای فنلی استری حل شده است، خشک گردید و برای انجام مطالعات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Krygier *et al*., 1982).

آنالیز کمی و کیفی اسیدهای فنلی

برای جداسازی و شناسایی اسیدهای فنلی عصاره‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (ساخت شرکت Knauer، برلین، آلمان) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره (با غلظت ppm ۱۰۰۰) به دستگاه HPLC تزریق شد تا اسیدهای فنلی شناسایی گردد. ستون مورد استفاده از نوع فاز معکوس Welch Ultisil XB-C18 بوده که حاوی خلل و فرج ۵ میکرومتر با قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌لیتر بود. برای جداسازی اسیدهای فنلی از شویش گرادیانی متانول (حلال A) و آب اسیدی (آب HPLC گرید دارای ۰/۱ درصد حجمی-حجمی استیک اسید) (حلال B) با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده گردید. جداسازی در دمای اتاق و طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام گرفت و کل زمان آنالیز برای هر عصاره ۵۵ دقیقه بود (Hazrati *et al*., 2020).

اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی عصاره

محتوای کل ترکیبات فنل نمونه‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتو مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ها (با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱۰۰ میکرولیتر محلول فولین سیوکالتو (۱۰٪) مخلوط گردید و به هم زده شد و به مدت ۶ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفتند. سپس ۸۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به هر کدام اضافه گردید و به مدت ۹۰ دقیقه هم زده شد. در آخر، مقدار جذب نمونه‌ها به همراه محلول شاهد در طول موج ۷۴۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به دست آمده بر حسب میلی-

گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک عصاره محاسبه و ارائه گردید (Hazrati *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره

برای اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فلاونوئیدی، از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید استفاده شد. محلول عصاره‌ها با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توسط حلال متانول آماده گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از این عصاره‌ها با ۱۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید ($AlCl_3$) مخلوط شد. در ادامه به محلول تهیه شده، ۶۰ میکرولیتر متانول، ۱۰ میکرولیتر سدیم استات ۰/۵ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفته و در آخر جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. نتایج به دست آمده بر حسب میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم خشک عصاره محاسبه و ارائه گردید (Hazrati *et al.*, 2020).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش DPPH مورد بررسی قرار گرفت (Hazrati *et al.*, 2020). ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره با ۱۸۰ میکرولیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۱ میلی مولار مخلوط شد و با محلول شاهد (۲۰ میکرولیتر متانول و ۱۸۰ میکرولیتر محلول DPPH) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. جذب مخلوط‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج UV، خوانده شدند. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100$$

تست آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

۲۰ میکرولیتر از آنزیم آلفا-گلوکوزیداز (۰/۵ unit/ml) با ۱۲۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۹) و ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده در غلظت‌های مختلف (pH برابر با ۷/۰)، مخلوط گردیدند. این مخلوط‌های آماده شده داخل انکوباتور در تاریکی، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه همزده شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranose اضافه گردید و مخلوط واکنش دوباره داخل انکوباتور، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه همزده شد. سپس ۸۰ میکرولیتر محلول ۰/۲ مولار کربنات سدیم اضافه گردید و به همراه شاهد (روش ذکر شده بدون عصاره)، میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Moradi-Afrapoli *et al.*, 2012). برای محاسبه درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز از رابطه زیر استفاده می‌شود:

$$\text{Enzyme inhibitin (\%)} = \frac{\mathrm{A}_{control} - \mathrm{A}_{sample}}{\mathrm{A}_{control}} \times 100$$

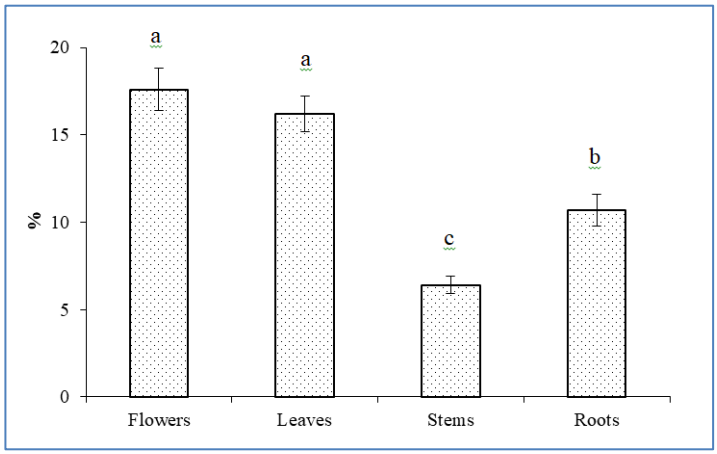
آنالیز آماری

جهت انجام آنالیز آماری، مقایسه میانگین ها با روش آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون پس تجربی Tukey به کمک نرم افزار SPSS ورژن ۱۹ انجام گردید.

نتایج

مطالعات فیتوشیمیایی

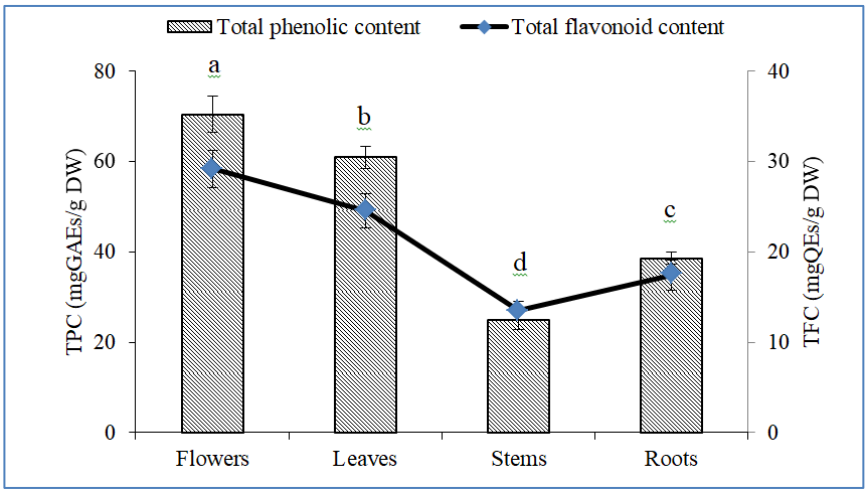
شکل ۱ میانگین بازده عصاره اتانولی اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، عصاره گل و برگ گیاه به ترتیب با مقادیر ۱۷/۶ و ۱۶/۲ درصد بیشترین بازده را داشتند و کمترین بازده نیز متعلق به عصاره ساقه (۶/۴ درصد) بود.



شکل۱- میانگین بازده عصاره اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند.

Figure 1: Average yield of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions and the columns with the same letters had no significant difference at the 5% probability level

شکل ۲ میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل عصاره اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه N. macrosiphon را نشان می‌دهد. برای محاسبه محتوای کل ترکیبات فنل و فلاونوئیدی به ترتیب از منحنی استاندارد اسید گالیک و کوئرستین استفاده گردید. همانطور که از نتایج قابل مشاهده هست بیشترین مقدار فنل مربوط به عصاره گل (۷۰/۵ میلی گرم معادل اسید گالیک بر گرم خشک عصاره) است و عصاره به دست آمده از ساقه نیز دارای کمترین میزان فنل بود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فلاونوئیدی کل عصاره‌های اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف نیز نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به عصاره‌ی گل (۲۹/۲ میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم خشک عصاره) است.

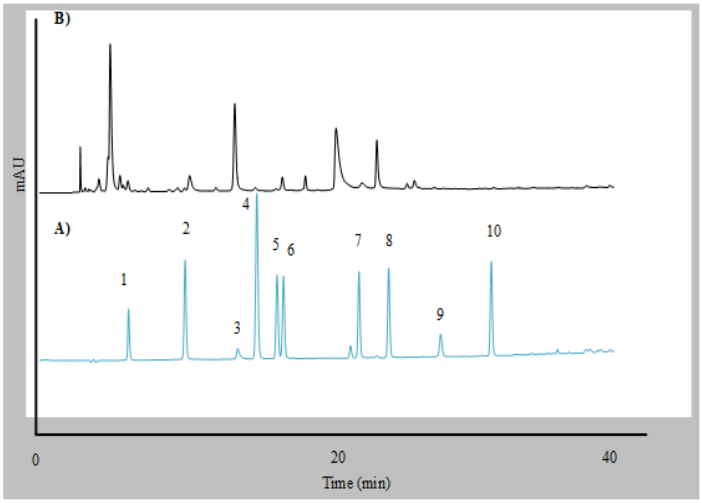


شکل ۲- میانگین میزان کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند.

Figure 2: Total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions and the columns with the same letters had no significant difference at the 5% probability level

اسیدهای فنلی آزاد و استری

اسیدهای فنلی آزاد و استری موجود در عصاره‌های گل، برگ، ساقه و ریشه گیاه *Nepeta macrosiphon* استخراج گردیدند و با کمک دستگاه HPLC جداسازی شدند و به کمک استاندارد، مورد شناسایی قرار گرفتند (شکل ۳). مقادیر کمی اسیدهای فنلی استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاه به کمک سطح زیر پیک آنها و معادله کالیبراسیون حاصل از استاندارد آنها محاسبه گردید و نتایج در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است.



شکل ۳- کروماتوگرام A) استاندارد اسیدهای فنلی و B) اسیدهای فنلی آزاد عصاره گل. استاندارد اسیدهای فنلی به ترتیب ۱- اسید گالیک، ۲- اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک، ۳- اسید وانیلیک، ۴- اسید کافئیک، ۵- اسید رزمارینیک، ۶- اسید پارا-کوماریک، ۷- اسید فرولیک، ۸- اسید سینامیک، ۹- اسید متا-کوماریک و ۱۰- اسید سالیسیک می باشند.

Figure 3: Chromatograms of A) Phenolic acid standards, and B) Free phenolic acids obtained from leave extract. The standard of phenolic acids are 1- gallic acid, 2- para-hydroxybenzoic acid, 3- vanillic acid, 4- caffeic acid, 5- rosmarinic acid, 6- para-coumaric acid, 7- ferulic acid, 8- cinnamic acid, 9- meta-coumaric acid and 10- salicic acid, respectively.

بر اساس نتایج حاصل، بیشترین مقدار اسیدهای فنلی آزاد (۱۵۱۵/۹ میکروگرم بر گرم نمونه) مربوط به گل بود. اسید رزمارینیک با مقدار ۶۷۲/۷ میکروگرم بر گرم نمونه عمده‌ترین اسید فنلی موجود در گل بود و به دنبال آن اسید پارا-کوماریک با مقدار ۶۱۴/۳ میکروگرم بر گرم نمونه در رتبه دوم قرار داشت. در برگ گیاه نیز اسید پارا-کوماریک و اسید رزمارینیک به ترتیب با مقادیر برابر با ۴۵۵/۶ و ۳۱۳/۵ میکروگرم بر گرم نمونه، اسیدهای فنلی عمده موجود در این اندام بودند. ریشه گیاه نیز دارای کمترین میزان اسیدهای فنلی مورد مطالعه بود بطوریکه شش اسید فنلی دارای مقدار زیر حد تشخیص (Trace) بوده و یا در این اندام وجود نداشتند.

جدول ۱- مقادیر کمی اسیدهای فنلی آزاد استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* (میکروگرم بر گرم وزن خشک ± انحراف معیار)

Table 1: Quantities of free phenolic acids extracted from different organs of *N. macrosiphon* (microgram/gram of dry weight ± standard deviation)

ترکیبات	گل	برگ	ساقه	ریشه
اسید گالیک	۱۴/۳±۰/۸	۵/۶±۰/۳	۵/۷±۰/۲	۶/۹±۰/۳
اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک	۲۹/۶±۲/۱	۳/۵±۰/۱	۱۱/۴±۰/۳	۱۴/۸±۰/۴
اسید وانیلیک	N.D	Trace	Trace	Trace
اسید کافئیک	N.D	۱۴۴/۲±۵/۴	۳۵/۷±۳/۰	۳۵/۵±۲/۲
اسید رزمارینیک	۶۷۲/۷±۱۲/۵	۳۱۳/۵±۷/۸	۲۷/۱±۱/۱	Trace
اسید پارا-کوماریک	۶۱۴/۳±۷/۰	۴۵۵/۶±۹/۹	۴۵/۹±۲/۰	Trace
اسید فرولیک	۶۶/۶±۳/۹	N.D	N.D	Trace
اسید سینامیک	Trace	Trace	N.D	N.D
اسید متا-کوماریک	۱۱۸/۴±۵/۰	۳۷/۸±۳/۸	۲۰/۴±۱/۴	N.D
اسید سالیسیلیک	Trace	۵۲/۲±۴/۱	۲۱/۶±۲/۳	N.D
مجموع	**۱۵۱۵/۹±۳۱/۳**	**۵۴۵/۶±۳۱/۴**	**۱۶۷/۸±۱۰/۳**	**۵۷/۲±۲/۹**

N.D: شناسایی نشده، Trace: کمترین حدممکن

با بررسی اسیدهای فنلی استری محلول موجود در اندام‌های مختلف (جدول ۲) مشخص شد که بیشترین مقدار این ترکیبات) نیز در گل این گیاه (۸۶۲/۴ میکروگرم بر گرم نمونه) وجود دارد. کمترین مقدار نیز با مقدار برابر با ۲۹/۴ میکروگرم بر گرم نمونه، مربوط به ساقه است که در این اندام فقط ترکیب اسید کافئیک مورد شناسایی قرار گرفت. در ریشه نیز تنها اسید وانیلیک وجود داشت. بر اساس نتایج، اسید گالیک و اسید رزمارینیک و اسید متا-کوماریک در هیچ یک از اندام های گیاه یافت نشدند. کافئیک اسید با مقدار برابر با ۶۹۸/۱ میکروگرم بر گرم نمونه که در گل موجود بود، بیشترین مقدار را در بین دیگر اسیدهای فنلی استری محلول تمام اندام‌ها داشت. همچین، اسید کافئیک با مقدار ۳۱۱/۷ میکروگرم بر گرم خشک نمونه، ترکیب عمده موجود در برگ بود.

جدول ۲- مقادیر کمی اسیدهای فنلی استری محلول استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* (میکروگرم بر گرم وزن خشک ± انحراف معیار)

Table 2: Quantities of esterified phenolic acids extracted from different organs of N. macrosiphon (microgram/gram of dry weight ± standard deviation)

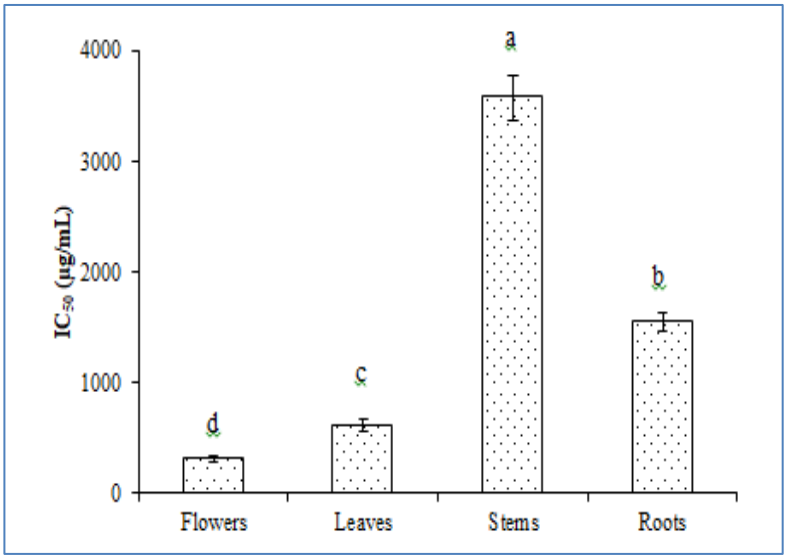
ترکیبات	گل	برگ	ساقه	ریشه
اسید گالیک	N.D	N.D	N.D	N.D
اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک	۵/۷±۰/۵	۷/۹±۰/۸	N.D	N.D
اسید وانیلیک	Trace	۶۳/۷±۲/۰	N.D	۱۳۰/۱±۴/۴
اسید کافئیک	۶۹۸/۱±۷/۲	۳۱۱/۷±۶/۱	۲۹/۴±۲/۶	N.D
اسید رزمارینیک	N.D	N.D	N.D	N.D
اسید پارا-کوماریک	N.D	۱۷۱/۶±۵/۷	N.D	N.D
اسید فرولیک	۱۵۸/۶±۶/۰	۱۰۷/۰±۵/۳	N.D	N.D
اسید سینامیک	N.D	Trace	N.D	N.D
اسید متا-کوماریک	N.D	N.D	N.D	N.D
اسید سالیسیلیک	N.D	۳۹/۰±۱/۰	N.D	N.D
مجموع	**۸۶۲/۴±۱۳/۹**	**۶۶۱/۹±۲۰/۹**	**۲۹/۴±۲/۶**	**۱۳۰/۱±۴/۴**

N.D: شناسایی نشده، Trace: کمترین حدممکن

بررسی فعالیت زیستی عصاره اتانولی

خاصیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده با روش DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۴). نتایج نشان داد که بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با IC_{50} برابر با ۳۱۵/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر مربوط به عصاره گل است و به دنبال آن، عصاره اتانولی برگ گیاه با IC_{50} برابر با ۶۱۶/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بود. عصاره‌های اتانولی ساقه و ریشه نیز قدرت بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH از خود نشان ندادند.



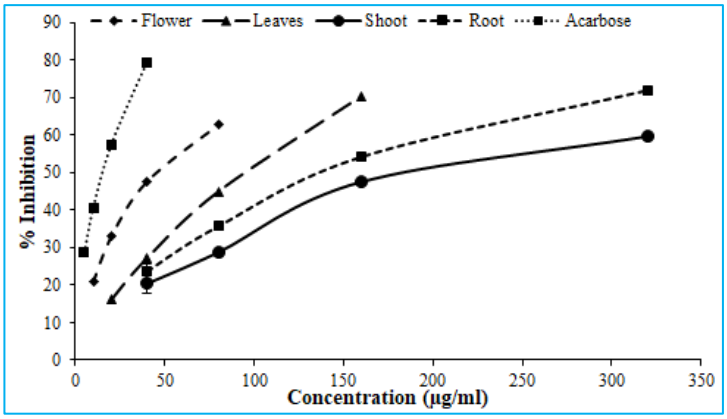
شکل ۴- خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند.

Figure 4: Antioxidant activity of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions and the columns with the same letters had no significant difference at the 5% probability level

مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

میزان مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در اثر عصاره‌های اتانولی که از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* به دست آمده بود، مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵ درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را در غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی اندام‌های مختلف نشان می‌دهد. با توجه به نتایج، عصاره‌ی گل در کم‌ترین غلظت نسبت به عصاره‌های دیگر، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را مهار نمود (۴۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر). این در حالی است که IC_{50} مربوط به آکاربوز به عنوان یک مهارکننده‌ی استاندارد آنزیم آلفا-گلوکوزیداز ۲۹/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در بین عصاره‌های دیگر اندام‌های گیاهی، عصاره‌ی برگ در گستره‌ی غلظتی پائین‌تری (۱۶۰-۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) توان مهار فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را از خود نشان داد. IC_{50} مربوط به مهار این آنزیم توسط عصاره‌ی برگ،

۹۸/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود در حالیکه عصاره‌های ریشه و ساقه با IC_{50} معادل ۱۵۲/۹ و ۲۱۳/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای پائین‌ترین قدرت بازدارندگی بودند.



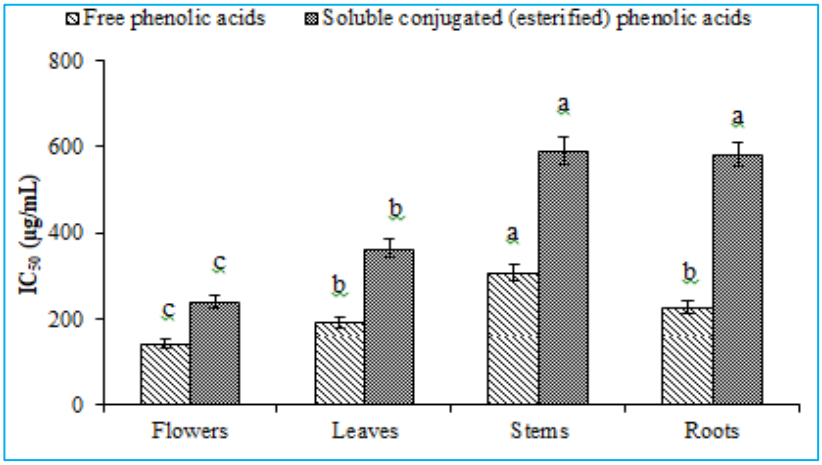
شکل ۵: مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز عصاره اتانولی حاصل از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت.

Figure 5: Inhibition of alpha-glucosidase enzyme of ethanol extract obtained from different organs of *N. macrosiphon*. The experiment was performed in three repetitions.

بررسی خواص زیستی فرکشن‌های عصاره‌ی اتانولی

خاصیت آنتی اکسیدانی

شکل ۶ میزان IC_{50} فرکشن‌های به دست آمده از عصاره‌ی اتانولی را در مقابله با رادیکال‌های آزاد DPPH نشان می‌دهد. همانطور که از نتایج قابل مشاهده است عصاره‌ی حاوی اسیدهای فنلی آزاد گل با مقدار IC_{50} معادل ۱۸۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت و به دنبال آن عصاره‌ی حاوی اسیدهای فنلی آزاد برگ با IC_{50} برابر با ۱۹۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بود. همچنین عصاره ساقه و ریشه حاوی اسیدهای فنلی استری محلول به ترتیب با مقادیر IC_{50} برابر با ۵۹۲/۱ و ۵۸۴/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای کمترین فعالیت بودند. لازم به ذکر است که از بین عصاره‌های حاوی اسیدهای فنلی استری محلول، عصاره‌ی گل با IC_{50} معادل ۲۴۲/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت را داشت.

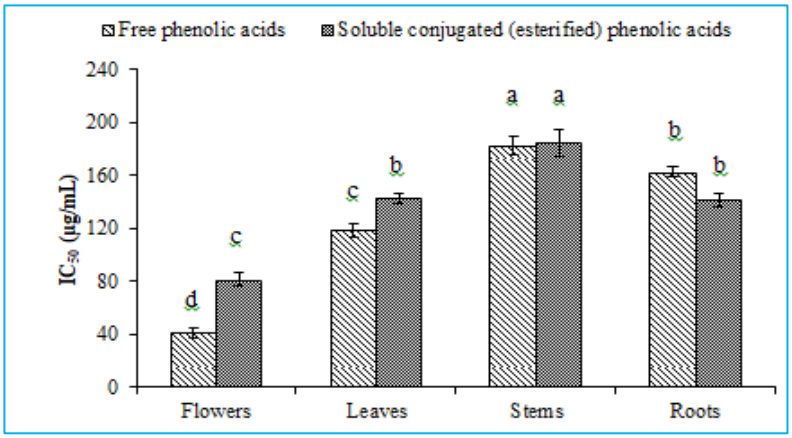


شکل ۶- خاصیت آنتی اکسیدانی جزهای عصاره اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت.

Figure 6: Antioxidant activity of the ethanol extract fraction obtained from different organs of *N. macrosiphon*. Each experiment was performed in three replicates.

مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

شکل ۷ مقادیر IC_{50} عصاره‌ی اندام‌های مختلف برای مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده، مقادیر آن برای عصاره گل، برگ، ساقه و ریشه حاوی اسیدهای فنلی آزاد به ترتیب برابر با ۴۱/۳، ۱۱۸/۴، ۱۸۲/۹ و ۱۶۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و بر اساس این نتایج، توان مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در بین نمونه‌های مورد مطالعه، با توالی گل> برگ> ریشه > ساقه کاهش نشان داد. همین ترتیب در مورد عصاره حاوی اسیدهای فنلی استری محلول نیز صادق بود و در بین این عصاره‌ها، گل بیشترین فعالیت مهار آنزیم را از خود نشان داد. در مقایسه‌ی بین قدرت بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط فرکشن‌های حاوی ترکیبات فنل آزاد و اسیدهای فنلی استری محلول، می‌توان مشاهده کرد که فقط در فرکشن‌های به دست آمده از ریشه، نمونه حاوی اسیدهای فنلی استری قدرت بالاتری از نمونه حاوی ترکیبات فنل آزاد دارند. این در حالی است که در سایر اندام ها روند معکوسی حاکم بود.



شکل ۷- مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز فرکشن های عصاره تام اتانولی به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon*. هر آزمایش در سه تکرار انجام گرفت.

Figure 7: Inhibition of alpha-glucosidase enzyme of the ethanol extract fraction obtained from different organs of *N. macrosiphon*. Each experiment was performed in three replicates.

بحث

اسیدهای فنلی متابولیت های گیاهی هستند که چندین عملکرد مهم دارند و در سلول‌های گیاهی به فرم‌های آزاد و استری محلول یافت می‌شوند. این ترکیبات در انواع مختلف میوه‌ها، سبزیجات و گیاهان داروئی یافت می‌شوند. در سال‌های اخیر، مطالعات وسیعی در مورد آن‌ها انجام شده و نشان داده اند که این پلی فنل‌های گیاهی خواص زیستی فراوانی در هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* دارند (Dos Santos *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). همچنین، این ترکیبات علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضددیابت، دارای خواص دیگری چون ضدمیکروبی، ضدسرطانی و ضدالتهابی هستند (Kumar & Goel, 2019). در این تحقیق محتوای و ترکیبات فنل عصاره‌های اتانولی اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین مقدار اسیدهای فنلی آزاد، مربوط به گل بود و رزمارینیک اسید و پاراکوماریک اسید عمده‌ترین اسیدهای فنلی موجود در آن بودند. در برگ گیاه نیز اسید رزمارینیک ، اسید پارا-کوماریک و اسید کافئیک اسیدهای فنلی عمده موجود در این اندام

هستند. همچنین، اسید کافئیک ترکیب غالب اسیدهای فنل استری محلول در گل و برگ است. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی فرکشن‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف نیز نشان داد که عصاره حاوی اسیدهای فنلی آزاد گل بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارد و به دنبال آن عصاره حاوی اسیدهای فنلی آزاد برگ دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بود. علاوه بر این، از بین عصاره‌های حاوی اسیدهای فنلی استری محلول، عصاره‌ی گل بیشترین فعالیت را داشت. بر اساس مطالعات انجام گرفته، محتوای بالای رزمارینیک اسید در گیاهان نقش مهمی در فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی آن‌ها دارد (Berhow *et al*., 2012; Lee *et al*., 2013; Lima *et al*., 2006). همچنین، خواص آنتی اکسیدانی گیاهان نپتا بطور عمده مربوط به حضور اسیدهای فنل، به ویژه اسیدهای رزمارینیک و کافئیک است (Lee *et al*., 2010). Nestorović-Živković و همکاران (۲۰۱۸) متابولیت‌های موجود در عصاره‌ی متانولی سه گونه پونه‌سا به نام‌های *N. rtanjensis*، *N. sibirica* و *N. nervosa* را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج، در تمام گونه‌های مورد بررسی، رزمارینیک اسید ترکیب فنل غالب بود، در حالی که سایر اسیدهای فنلی شناسایی شده (کلروژنیک، نئوکلروژنیک و کافئیک) از مقادیر کمتری برخوردار بودند. سنجش‌های ABTS، DPPH و FRAP نشان داد که عصاره‌های متانولی *N. rtanjensis*، *N. sibirica* و به ویژه *N. nervosa* دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قوی، می‌تواند به اسیدهای فنلی و در وهله اول به اسید رزمارینیک نسبت داده شود. در پژوهشی که توسط Aras و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، ترکیبات فنل عصاره‌ی متانولی گیاه *N. nuda* که به روش خیساندن تهیه شده بود، با استفاده از UHPLC-ESI-MS/MS شناسایی شدند. اسید کلروژنیک، اسید رزمارینیک و اسید کوئینیک به عنوان فراوان‌ترین ترکیبات در این گیاه یافت شدند. همچنین، مقادیر کمتری از کامفرول، اسید پارا-کوماریک، اسید کافئیک، آپیجنین و لوتئولین به طور کمی شناسایی شدند. در نتیجه، برگ‌های *N. nuda* دارای پتانسیل بالایی از محتوای فنلی است که بطور عمده به فعالیت‌های زیستی نسبت داده

می‌شود. در مطالعه دیگری، Dienaitė و همکاران (۲۰۱۸)، متابولیت‌ها و خواص زیستی شش گونه نپتا را مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی این گیاهان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و ارتباط مستقیمی بین میزان فنل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها برقرار است و کلروژنیک، فرولیک و رزمارینیک اسید به عنوان ترکیبات عمده آن‌ها هستند. Kraujalis و همکاران (۲۰۱۱) خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استونی، اتانولی، متانولی و آبی حاصل از گونه‌های *N. cataria*، *N. transcaucasica* و *N. bulgaricum* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌ی متانولی گونه *N. cataria* دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و ارتباط مستقیمی بین محتوای فنل کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. همچنین، نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات موجود در آن نشان داد که رزمارینیک اسید به عنوان ترکیب عمده است و به دنبال آن کافئیک اسید دارای بیشترین مقدار است. در مطالعه‌ای که به بررسی متابولیت‌های دو گونه‌ی *N. heliotropifolia* و *N. congesta* پرداخته شده است، در بین اندام های مورد مطالعه، عصاره‌ی گل‌های آن‌ها غنی از ترکیبات فنل بود و فراوان‌ترین اسیدهای فنلی آن‌ها اسید رزمارینیک (به ترتیب با مقادیر ۸۹۰۹/۹ و ۴۳۱۷/۲ میکروگرم بر گرم) بود. همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آن‌ها با استفاده از روش‌های DPPH، ABTS و UPRAC مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج، عصاره‌های گل هر دو گیاه که دارای محتوای فنل و فلاونوئیدی بیشتری در بین عصاره‌ها بودند، بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند (Akdeniz *et al.*, 2020). در تحقیقی که Siddiqui و همکاران (۲۰۱۷) انجام دادند دریافتند که به دلیل بالا بودن محتوای فنل کل گل *N. bracteata*، این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است. در پژوهشی دیگر بر روی گونه *N. rtanjensis*، گل و برگ دارای محتوای فنل، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود (Jasna *et al.*, 2017). مطالعات انجام گرفته بر روی اسید پاراکوماریک، اسید فنلی مشتق شده از سینامیک اسید، نشان داد که این ترکیب به عنوان دهنده هیدروژن یا الکترون عمل کرده و در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث مهار

۵۵/۶ درصد از رادیکال های آزاد DPPH شد و خاصیت آنتی اکسیدانی قابل مقایسه با BHT را داشت (Kiliç & Yeşiloğlu, 2013). طبق نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات قبلی، شاید بتوان حدس زد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای فرکشن گل و برگ، مربوط به اسیدهای فنلی موجود در آن‌ها است و بالا بودن میزان رزمارینیک، پارا-کوماریک و کافئیک اسید موجود در آن‌ها می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها را توجیه نماید.

تا به حال مطالعه‌ای بر روی مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط عصاره‌ی گیاه *N. macrosiphon* انجام نگرفته است. مطالعه بر روی سایر گونه‌های نپتا از جمله *N. cadmea* و *N. nuda* subsp نشان داده است که عصاره‌های متانولی حاصل از اندام هوایی این دو گیاه فعالیت ضعیفی در مهار آنزیم آلفا-آمیلاز داشتند (Sarikurkcu *et al.*, 2019). لذا، پتانسیل ضددیابتی اسیدهای فنلی آزاد و استری محلول موجود در اندام‌های مختلف گیاه *N. macrosiphon* از طریق مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم آمیلاز کربوهیدرات‌های پیچیده‌ی موجود در رژیم غذایی را به الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها تجزیه می‌کند که در نهایت توسط آلفا-گلوکوزیداز به مونوساکارید تبدیل می‌شوند (Ortiz-Andrade *et al.*, 2007). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فرکشن حاوی اسیدهای فنلی آزاد توانایی بیشتری در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز دارند. این توان مشاهده شده در مهار فعالیت آلفا-گلوکوزیداز توسط اسیدهای فنلی موجود در عصاره‌های این گیاه با مطالعات قبلی روی ترکیبات پلی فنل مطابقت دارد (Matsui *et al.*, 2007; Ranilla *et al.*, 2010). Apostolidis و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که ترکیب زغال اخته با پونه کوهی که دارای محتوای اسید رزمارینیک بالاتری بود، باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنل کل در عصاره‌ها شد و نشان دهنده ارتباط بالقوه برای درمان دیابت نوع ۲ است. گزارش Oboh و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که اسید کافئیک و اسید کلروژنیک موجود در *Corchorus olitorius* مسئول پتانسیل ضددیابتی آن است. اسید رزمارینیک که اسید فنلی متداول موجود در خانواده نعناعیان است در بهبود دیابت و چاقی با مهار آنزیم‌های گوارشی پتانسیل بالایی دارد. بر اساس گزارش‌های موجود عصاره‌ی بادرنجبویه که حاوی اسید رزمارینیک به عنوان یک جزء عمده است، فعالیت

آلفا-گلوکوزیداز را مهار می‌کند و قدرت بازدارندگی آن نسبت به کاتکول و کوئرستین بیشتر است (Kwon *et al.*, 2006). در مطالعه‌ای دیگر، فرکشن غنی از اسید رزمارینیک به دست آمده از *Orthosiphon stamineus* پنج برابر بیشتر از داروی ضد دیابت acarbose در مهار آلفا-گلوکوزیداز فعال بود و می‌تواند یک داروی بالقوه برای تنظیم و مدیریت دیابت نوع ۲ باشد (Ngo & Chua, 2018). مطالعات نشان داده‌اند که مهار این آنزیم توسط ترکیبات فنل تابعی از الگوی خاصی از گروه‌های هیدروکسی آن‌ها است که پیوندهای هیدروژنی را با اسیدهای آمینه خاص در مکان‌های فعال آنزیم‌ها تشکیل می‌دهد (De Sales *et al.*, 2012). در نتیجه، طبق نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات قبلی انجام شده، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات فنل موجود در فرکشن حاوی اسیدهای فنلی آزاد گل، مسئول ایجاد خاصیت بازدارندگی بالای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز است و بر اساس مطالعات پیشین رزمارنیک اسید موجود در این فرکشن اصلی‌ترین عامل ایجاد این خاصیت است.

بنابراین، بر اساس نتایج به دست آمده، گل گیاه *N. macrosiphon* دارای بیشترین ترکیبات فنل از جمله اسید رزمارینیک و اسید پارا-کوماریک است و با توجه به اینکه فرکشن حاوی اسیدهای فنلی آزاد این اندام از پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی و مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز برخوردار است، لذا گل این گیاه می‌تواند در صنایع داروئی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به دلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

تعارض منافع

تعارض منافعی در این مقاله وجود ندارد.

منابع

Akdeniz, M., Ertas, A., Yener, I., Firat, M., and Kolak, U. (2020). Phytochemical and biological investigations on two Nepeta species: *Nepeta heliotropifolia* and *N. congesta* subsp. *cryptantha*. Journal of Food Biochemistry, 44(2): e13124.

Apostolidis, E., Kwon, Y.I., Shetty, K., Apostolidis, E., and Kwon, Y.I. (2006). Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 15(3), 433–441.

Aras, A., Bursal, E., and Dogru, M. (2016). UHPLC-ESI-MS/MS analyses for quantification of phenolic compounds of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 6(11): 9-13.

Berhow, M.A., Affum, A.O., and Gyan, B.A. (2012). Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum* Sims grown in Ghana. Journal of Medicinal Food, 15(7): 611-620.

Dao, T.M.A., Waget, A., Klopp, P., Serino, M., Vachoux, C., Pechere, L., and Sérée, E. (2011). Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. PloS One, 6(6): e20700.

Dienaitė, L., Pukalskienė, M., Matias, A.A., Pereira, C.V., Pukalskas, A., and Venskutonis, P.R. (2018). Valorization of six *Nepeta* species by assessing the antioxidant potential, phytochemical composition and bioactivity of their extracts in cell cultures. Journal of Functional Foods, 45: 512-522.

Dos Santos, M.D., Almeida, M.C., Lopes, N.P., and De Souza, G.E.P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29(11): 2236-2240.

Gao, H., Huang, Y.N., Xu, P.Y., and Kawabata, J. (2007). Inhibitory effect on α-glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. Food Chemistry, 105(2): 628-634.

Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. and Palazo´n, J. (2013). Phenolic Acids. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) Natural Products. Springer, Berlin, Heidelberg.

Hazrati, S., Mollaei, S., Rabbi Angourani, H., Hosseini, S. J., Sedaghat, M., and Nicola, S. (2020). How do essential oil composition and phenolic acid profile of *Heracleum persicum* fluctuate at different phenological stages?. Food Science and Nutrition, 8(11): 6192-6206.

Jamzad, Z. (2012). Flora of Iran, vol. 76. Lamiaceae. Research Institute of Forests and Rangelands, 1066 pp. Tehran.

Jamzad, Z., Harley, M.M., Ingrouille, M., Simmonds, M.S.J., and Jalili, A., (2000). Pollen exine and nutlet surface morphology of the annual species of *Nepeta* L.(Lamiaceae) in Iran. Pollen and Spores: Morphology and Biology, 385-397.

Jasna, B.N., Milena, R., Ninoslav, D., Branka, V.G., Zora Dajic, S., Stoimir, K., and Zoran, S. (2017). < The> Balkan endemic plant Nepta rtanjensis [Lamiaceae]: phenolic composition, antioxidant activity and antigenotoxic effects on human lymphocytes treated with triiodothyronine *in vitro*. 929-938.

Johnston, K., Sharp, P., Clifford, M., and Morgan, L. (2005). Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. FEBS Letters, 579(7): 1653-1657.

Kiliç, I., and Yeşiloğlu, Y. (2013). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 115: 719-724.

Klick, S., and Herrmann, K. (1988). Glucosides and glucose esters of hydroxybenzoic acids in plants. Phytochemistry, 27(7): 2177-2180.

Kotowaroo, M.I., Mahomoodally, M.F., Gurib-Fakim, A., and Subratty, A.H. (2006). Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of mauritius for possible α-amylase inhibitory effects *in vitro*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 20(3): 228-231.

Kraujalis, P., Venskutonis, P.R., and Ragazinskiene, O. (2011, May). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Nepeta plant species. In Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology (pp. 5-6).

Krygier, K., Sosulski, F., and Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30(2): 330-334.

Kumar, N., and Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnology Reports, 24: e00370.

Kwon, Y.I.I., Vattem, D.A., and Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 15(1): 107.

Lam, T. B. T., Kadoya, K., and Iiyama, K. (2001). Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β-position, in grass cell walls. Phytochemistry, 57(6), 987-992.

Lee, J.H., Park, K.H., Lee, M.H., Kim, H.T., Seo, W.D., Kim, J.Y., and Ha, T.J. (2013). Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the

antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. Food Chemistry, 136(2): 843-852.

Lee, S.Y., Lee, C.Y., Eom, S.H., Kim, Y.K., Park, N.I., and Park, S.U. (2010). Rosmarinic acid production from transformed root cultures of *Nepeta cataria* L. Scientific Research and Essays, 5(10): 1122-1126.

Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., and Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. Life Sciences, 79(21): 2056-2068.

Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A., Tamaya, K., Miyata, Y., and Matsumoto, K. (2007). α-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(1): 99-105.

McCue, P.P., and Shetty, K. (2004). Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 13(1): 101-106.

Moradi-Afrapoli, F., Asghari, B., Saeidnia, S., Ajani, Y., Mirjani, M., Malmir, M., Yassa, N. (2012). In vitro α-glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 20(1): 1-6.

Mozaffarian, V. (1996). Dictionary of Iranian plant names (Latin, English, Persian). Farhang Moaser Publlishers. Search in.

Nestorović Živković, J., Živković, S., Šiler, B., Aničić, N., Dmitrović, S., Divac-Rankov, A., and Mišić, D. (2018). Differences in bioactivity of three endemic Nepeta species arising from main terpenoid and phenolic constituents. Archives of Biological Sciences, 70(1), 63-76.

Ngo, Y.L., and Chua, L.S. (2018). Anti-diabetic activity of rosmarinic acid rich fractions from *Orthosiphon stamineus*. Current Enzyme Inhibition, 14(2), 97-103.

Oboh, G., Ademiluyi, A.O., Akinyemi, A.J., Henle, T., Saliu, J.A., and Schwarzenbolz, U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α-amylase and α-glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) *in vitro*. Journal of Functional Foods, 4(2): 450-458.

Ortiz-Andrade, R.R., Garcia-Jimenez, S., Castillo-Espana, P., Ramirez-Avila, G., Villalobos-Molina, R., and Estrada-Soto, S. (2007). α-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from Tournefortia hartwegiana: an anti-hyperglycemic agent. Journal of Ethnopharmacology, 109(1): 48-53.

Ranilla, L.G., Kwon, Y.I., Apostolidis, E., and Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for

hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresource Technology, 101(12): 4676-4689.

Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., and Silveira, D. (2012). α-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 15(1): 141-183.

Sarikurkcu, C., Eskici, M., Karanfil, A., and Tepe, B. (2019). Phenolic profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of two endemic Nepeta species: Nepeta nuda subsp. glandulifera and N. cadmea. South African Journal of Botany, 120: 298-301.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., and Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. International Journal of Pharmaceutics, 403(1-2): 136-138.

Shahidi, F., and Nacsk, M. (1995). Food phenolics: sources, chemistry, effects and application. Technomic Publ, Lancaster

Shahidi, F., Naczk, M. (2004). Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects. CRC Press, Boca Raton, FL

Shetty, K., and Wahlqvist, M. (2004). A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 13(1): 1–24.

Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., and Mahmood, Z. (2017). Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (Nepeta bracteata Benth). Journal of Taibah University Medical Sciences, 12(4): 360-363.

Süntar, I., Nabavi, S. M., Barreca, D., Fischer, N., and Efferth, T. (2018). Pharmacological and chemical features of Nepeta L. genus: Its importance as a therapeutic agent. Phytotherapy Research, 32(2): 185-198.

Verpoorte, R., Contin, A., and Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochemistry reviews, 1(1): 13-25.

Wang, M., Jiang, N., Wang, Y., Jiang, D., and Feng, X. (2017). Characterization of phenolic compounds from early and late ripening sweet cherries and their antioxidant and antifungal activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(26): 5413-5420.

Investigation of phenolic acids and some biological activities of *Nepeta macrosiphon*

S. Mollaei[1*], H. Abbasi Holasu[1], B. Asghari[2], M. Ebadi[3], H. Hashempour[1]

Received: 2022.6.19
Accepted:2023.1.21

Abstract

Introduction: Phenolic acids are secondary metabolites which have many biological activates, which are found at different organs of plants and have an important role in human health.**Methods**: In this study, the extraction from different organs of Nepeta macrosiphon was done by using ethanol 80% as solvent, and divided into free and esterified phenolic acids. Then, the total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity and inhibition of alpha-glucosidase enzyme of the extracts and also their fractions were evaluated by using Folin-Ciocalteu, aluminum chloride, DPPH, spectrophotometric methods, and finally their compounds were analyzed by HPLC. **Results**: The results indicated that the ethanolic extract of flower with the amount of 70.5 mg GAE/g of dry sample, and 29.2 mg QE/g of dry sample had the highest total phenolic and flavonoid, respectively. Also, this extract with the IC_{50} value of 315.2 showed the highest antioxidant activity. Moreover, the flower extract had a greater ability to inhibit the alpha-glucosidase enzyme. The results of phenolic acids analysis showed that among the studied organs, flower had the highest amount of phenolic acids, rosmarinic acid, para-coumaric acid with the amounts of 672.7 and 614.3 µg/g of sample were the main free phenolic acid, respectively, and caffeic acid was the main compound in the flower extract of esterified phenolic acids. Also, the flower extract containing free phenolic acids had the highest antioxidant activity and inhibition of alpha-glucosidase enzyme in comparison with the extracts containing esterified phenolic acids and other organs. **Conclusion**: Based on the results, the flower has the highest phenolic compounds, including rosmarinic, para-coumaric, and caffeic acids and due to its high antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase enzyme, it can be used in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: *Alpha-glucosidase enzyme; Antioxidant; Nepeta macrosiphon; Phenolic acid..*

1. Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of chemistry**(***Corresponding author:: s.mollaei@azaruniv.ac.ir**)**
2.Qazvin, Imam Khomeini International University, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Horticultural Sciences Engeneering.
3.Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of Biology.