Archive of SID.ir

Journal of Applied Chemistry (18)**68** (2023) 289-302

Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: https://chemistry.semnan.ac.ir/

Research Article

Evaluation of Aantidiabetic Effects, Antioxidant Activities, and Phytochemical Components of Oleo-gum Resins from Three Iranian Plants

Seyedeh Maryam Seyednezhad[1], Hossein Dehghan[2,*], Mostafa Fazli[1,*]

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Semnan University, Semnan, Iran*

[2]*Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran*

PAPER INFO

Article history:
Received: 13/Feb/2023
Revised: 10/Apr/2023
Accepted: 17/Apr/2023

Keywords:
Dorema, Ferula, α-amylase, α-glycosidase, phenolic, flavonoid, gum

ABSTRACT

Ferula latisecta, Dorema kopetdaghense, and Dorema ammoniacum oleo-gum resins are among the most valuable Iranian herbal products and have great potential to be exported abroad. This study aims to phytochemically investigate the antioxidant and antidiabetic effects of the mentioned oleo-gum resins. The hexane, ethyl acetate, and methanolic extracts of gums were prepared through a "sequential extraction" method. The antidiabetic effects of the extracts were evaluated on the basis of α-amylase and α-glycosidase enzyme inhibition methods. In addition, the antioxidant effects of the extracts were analyzed against DPPH free radicals. Besides, the phenolic and flavonoid compounds of the extracts were measured. The results showed that the hexane extract of D. ammoniacum gum had the highest inhibitory activity against α-glucosidase (92.99%). Also, the methanolic extract of this plant showed the highest inhibitory activity against α-amylase (50.84%). The hexane extract of D. ammoniacum gum has high antioxidant properties with an IC_{50} value of 40.85 µg/mL. Moreover, the hexane extract of D. ammoniacum gum has the highest amount of phenolic compounds with 530.52 mg of gallic acid/g of extract, among the others. According to the results, the gum of D. ammoniacum is rich of phenolic compounds and has high antioxidant and antidiabetic effects in comparison to common standards. So, this herbal product can be worthy of further investigation.

DOI: https://doi.org/10.22075/CHEM.2023.29879.2154

© 2023 Semnan University.
This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license.(https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

[*] **.Corresponding authors:**[1] Assistant Professor of Chemistry. *E-mail address: h.dehghan@shahed.ac.ir*
[1] Professor of Physical Chemistry. *E-mail address: mfazli@semnan.ac.ir*

How to cite this article: Seyednezhad, S. M., Dehghan, H., & Fazli, M. (2023). Evaluation of Aantidiabetic Effects, Antioxidant Activities, and Phytochemical Components of Oleo-gum Resins from Three Iranian Plants, *Applied Chemistry*, 18(68), 289-302. (in persion)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

بررسی اثرات ضد دیابتی، آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فیتوشیمیایی صمغ سه گونه گیاهی در ایران

سیده مریم سیدنژاد[۱]، حسین دهقان*[۲]، مصطفی فضلی*[۱]

[۱]گروه شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

[۲]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۰۱/۱۱/۲۴ تاریخ تصحیح:۰۲/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش:۰۲/۰۱/۲۸

چکیده

صمغ‌های گیاهی گونه‌های باریجه، آنغوزه و کما، از مهمترین و ارزشمندترین فرآورده‌های گیاهی و عموماً صادراتی ایران هستند. در این مطالعه، به بررسی فیتوشیمیایی، اثرات ضد دیابتی و آنتی اکسیدانی صمغ سه گونه کمای هزارمسجدی (Ferula latisecta)، گند کما (Dorema kopetdaghense) و کمای کندل (Dorema ammoniacum) پرداخته شد. عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی صمغ‌ها به روش "عصاره‌گیری متوالی" تهیه گردید. سپس اثرات ضد دیابتی آن‌ها با بررسی قدرت مهار آنزیم‌های گوارشی آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز بررسی شد. در ادامه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های حاصل از صمغ‌ها علیه رادیکال آزاد DPPH بررسی و مقایسه گردید. در پایان ترکیبات فیتوشیمیایی صمغ‌ها، بر اساس میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوییدی سنجیده شد. نتایج تحقیقات نشان داد، عصاره هگزانی کمای کندل با ۹۹/۹۲٪ بیشترین میزان مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را دارا بود. عصاره متانولی صمغ این گیاه نیز با ۵۰/۸۴٪ بیشترین میزان مهار آنزیم آلفا-آمیلاز را دارا بود. عصاره هگزانی کمای کندل نیز با IC_{50} معادل ۴۰/۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی است. بعلاوه، عصاره هگزانی این صمغ با ۵۳۰/۵۲ میلی‌گرم گالیک اسید/گرم عصاره خشک بالاترین میزان ترکیبات فنولی را نیز دارا می‌باشد. در مجموع نتایج نشان می‌دهند صمغ بدست آمده از کمای کندل غنی از ترکیبات فنولی بوده و در مقایسه با استانداردهای رایج، دارای اثرات ضد دیابتی و آنتی اکسیدانی بسیار بالایی است. لذا این گیاه به عنوان یک گزینه مناسب در معرفی مکمل‌ها و داروهای ضد دیابت و آنتی اکسیدان می‌تواند معرفی گردد.

کلمات کلیدی: کما، آنغوزه، آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز، فنول، فلاونوئید، صمغ.

۱- مقدمه

دیابت، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دستگاه غدد درون‌ریز بدن محسوب می‌شود که عوارض آن افزایش قند خون، اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌هاست[۱]. دیابت غیر وابسته به انسولین یا دیابت نوع دو یکی از جدی‌ترین اختلالات متابولیک با سطح قند خون بالای غیر طبیعی به شمار می‌رود که به دلیل نقص در ترشح انسولین یا فعالیت آن به وجود می‌آید. سالانه بیش از ۱۰۰ میلیون نفر به دیابت نوع ۲ مبتلا می‌شوند[۲, ۳].

در سیستم گوارش انسان، آنزیم‌های گلیکوزیدازی نظیر آلفا-گلوکوزیداز و آلفا-آمیلاز، وظیفه هضم و تبدیل نشاسته به گلوکز، جهت ترشح در خون را دارند. لذا در بیماران دیابتی به دلیل عدم توانایی در کنترل میزان قند خون، این میزان بلافاصله پس از

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

صرف غذا به حد خطرناک می‌رسد. یکی از راه‌های کنترل قند خون در این بیماران مهار آنزیم‌های گلیکوزیدازی و به تاخیر انداختن هضم نشاسته موجود در غذا و به طبع آن ترشح آهسته تر گلوکوز از روده کوچک به درون خون است[۴]. برخی مهارکننده‌ها مانند آکاربوز، میگلیتول و ووگلی‌بوز به طور گسترده‌ای در ترکیب با رژیم غذایی برای کنترل سطح قند خون بیماران استفاده می‌شود[۵, ۶]. مهارکننده‌های آلفا-گلوکوزیداز می‌توانند آزادسازی گلوکز را از الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدهای حاصل از کربوهیدرات‌های پیچیده‌ی رژیم غذایی به تعویق انداخته و جذب گلوکز را به تأخیر بیندازند و سطح گلوکز را پس از غذا در سطح مطلوبی نگاه دارند. از عوارض جانبی این مهارکننده‌ها می‌توان به نفخ و اسهال اشاره نمود[۷].

داشتن حداقل میزان اثرات جانبی، کم هزینه بودن، در دسترس بودن و پذیرش بیشتر بیماران، سبب شده است که گیاهان دارویی به مرور جایگزین برخی داروهای شیمیایی و سنتزی گردند. در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی برای دستیابی به مهارکننده‌های آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و آلفا-آمیلاز از منابع طبیعی برای درمان دیابت انجام شده است[۸, ۹].

گونه‌های فعال اکسیژن نظیر سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل($OH^{\bullet}$) به دلیل فعالیت بالا، می‌توانند باعث آسیب‌های شدید به بافت‌های زنده و سلول‌ها شوند. گیاهان و جانوران از طریق مکانیسم‌های مختلف به کنترل استرس اکسایشی می‌پردازند. تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی یکی از راه های مقابله با این تهدید است. گیاهان منبعی غنی از این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که می‌توان با مصرف آن‌ها توانایی بدن را در راستای مقابله با رادیکال‌های آزاد بالا برد [۱۰].

در پژوهش حاضر به بررسی اثرات ضد دیابتی با مکانیزم مهار آنزیمی، ضد اکسایشی و همچنین بررسی فیتوشیمیایی صمغ استخراج شده از سه گونه دارویی آنغوزه هزارمسجدی (*Ferula latisecta*)، گند کما (*Dorema kopetdaghense*)، و کمای کندل (*Dorema ammoniacum*)، پرداخته شد.

جنس باریجه (*Ferula*) به عنوان بزرگ‌ترین خانواده چتریان در آسیا و سومین جنس از این تیره در دنیا محسوب می‌شود. گونه آنغوزه هزارمسجدی از جمله گونه‌های این جنس در ایران می‌باشد. یکی از کاربردهای سنتی این گیاه مربوط به اثرات ضدانگلی آن است. هم‌چنین به دلیل ترکیبات سولفیدی موجود در این گیاه، از آن برای درمان ناراحتی‌های گوارشی در حیوانات اهلی استفاده می‌شود [۱۱]. این گیاه بوی تند مشخصی دارد و به طور سنتی برای درمان قولنج نوزاد استفاده شده و دارای خواص ضد میکروبی نیز می‌باشد [۱۲]. جنس *Dorema* در مجموع شامل ۱۲ گونه پذیرفته شده در سراسر جهان است. هشت گونه از این تعداد در فلور ایران موجود هستند که از این میان می‌توان به *D.kopetdaghense* و *D.ammoniacum* اشاره کرد [۱۳]. *D.kopetdaghense*، یا گندکما، دارای خاصیت ضد التهابی قابل توجهی است [۱۴]. همچنین *D. ammoniacum*، با نام فارسی کمای کندل، دارای اثرات ضد باکتریایی و گشادکنندگی عروق بوده و در ترکیب با سایر داروها برای درمان سکته مغزی و فلج استفاده می‌شود [۱۵, ۱۶]. در جدول ۱ به کاربرد و خواص گیاهان منتخب، اشاره شده است.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

در این پژوهش اثرات ضد دیابتی (مهار آنزیم‌های گوارشی گلیکوزیداز) عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی صمغ استخراج شده از این گیاهان مورد بررسی قرار گرفته و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نیز با مهار رادیکال آزاد DPPH بررسی و مقایسه شد. بعلاوه، میزان ترکیبات فنولی و فلاونوییدی این عصاره‌ها سنجیده شد.

جدول ۱: نام و کاربرد گیاهان مورد مطالعه

نام گیاه	نام علمی	خانواده	شماره هرباریومی*	خواص دارویی
کمای هزارمسجدی، کمای صخره روی	*Ferula latisecta*	Apiaceae	۴۷۷	ضد انگل، ضدمیکروب، درمان ناراحتی گوارشی[۱۱]، درمان قولنج [۱۲]
گندکما	*Dorema kopetdaghense*	Apiaceae	۴۵۹	ضد التهاب [۱۴]
کمای کندل، وشق، وشا	*Dorema ammoniacum*	Apiaceae	۴۲۳	ضد باکتری، گشاد کننده عروق، درمان سکته مغزی و فلج [۱۵، ۱۶]

* شماره‌های هرباریومی در هرباریوم دانشگاه پیام نور درگز، واقع در استان خراسان رضوی به ثبت رسیدند.

۲-بخش تجربی

۲-۱-جمع‌آوری گیاهان

گیاهان موردنظر در فصل تابستان از منطقه درگز در استان خراسان رضوی، توسط آقای دکتر محمد صادق امیری، جمع‌آوری و شناسایی شدند. شماره‌های هرباریومی در هرباریوم دانشگاه پیام نور درگز، واقع در استان خراسان رضوی به ثبت رسیدند. در ادامه صمغ‌های گیاهی از منطقه جمع آوری شدند.

۲-۲-عصاره‌گیری

عصاره‌گیری از صمغ‌های گیاهان مورد مطالعه در این پژوهش، به روش "عصاره‌گیری متوالی" انجام شد[۱۷]. بدین منظور صمغ-های جمع‌آوری شده به خوبی شسته و در دمای محیط خشک شده و با آسیاب پودر شدند. سپس ۱۵۰ میلی‌لیتر حلال هگزان به ۲۰ گرم از صمغ موردنظر اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر-انکوباتور و در دمای $25^{o}C$ هم زده شد. عصاره حاصله پس از صاف شدن با کاغذ صافی واتمن به وسیله دستگاه تبخیرکن دوار در دمای $40^{o}C$ و تحت خلاء خشک شد. باقیمانده صمغ مجددا در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد در آون خشک گردیده و مانند مراحل قبل از آن عصاره اتیل استاتی و متانولی استخراج گردید [۱۸]. عصاره‌های بدست آمده برای انجام آزمون‌های مهار آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز، آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل در دمای ۴ درجه سانتیگراد در محیط تاریک نگهداری شدند.

۲-۳-آزمون آلفا-آمیلاز

آنزیم آلفا-آمیلاز یک آنزیم گوارشی است که با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی آلفا-۱و۴، نشاسته را به اولیگوساکاریدهایی نظیر مالتوز هیدرولیز می‌کند. طبیعتاً مهار این آنزیم می‌تواند موجب کاهش تولید مالتوز به عنوان محصول واکنش شود. از آنجا که

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مالتوز در طول موج های UV-Vis بی رنگ است، برای سنجش میزان مالتوز تولیدی در محیط، واکنشگری به نام ۵،۳-دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) افزوده می شود که سبب اکسایش مالتوز و ایجاد رنگ می‌شود. تغییر رنگ مشاهده شده رابطه مستقیم با میزان مالتوز تولیدی و در نتیجه قدرت مهاری نمونه ها دارد [۱۹]. به منظور انجام آزمون آلفا-آمیلاز محلول یک میلی‌گرم/میلی‌لیتر از هر عصاره هگزانی، اتیل استاتی و متانولی در حلال DMSO ساخته شد. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول نشاسته ۱ درصد به ۵۰ میکرولیتر محلول نمونه ساخته شده در غلظت‌های مختلف از مرحله قبل اضافه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیم آلفا-آمیلاز ۲۵ یونیت/میلی‌لیتر در بافر فسفات ۰/۱۱ مولار اضافه گردید. پلیت مربوطه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در دستگاه انکوباتورشیکردار به مدت سی دقیقه قرار گرفت. پس از آن ۲۰ میکرولیتر محلول سود ۲ مولار اضافه شده و در مرحله آخر ۲۰ میکرولیتر محلول ۵،۳-دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید اضافه شد. سپس پلیت مربوطه در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه بن‌ماری قرار گرفته و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر[1]خوانده شد. همه اندازه‌گیری‌ها در چهار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها ثبت گردید. از آکاربوز نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. طول موج ۵۴۰ نانومتر مربوط به ترکیب مالتوز به عنوان محصول تولیدی توسط آنزیم است. لذا برای رسم منحنی کالیبراسیون، جذب شش غلظت (۲/۵ تا ۸۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) از مالتوز اندازه گیری شد[۴]. در انتها درصد مهار آنزیم آلفا- آمیلاز توسط معادلات زیر بدست می‌آید:

$$\text{٪ واکنش} = \frac{\text{میزان مالتوز تولیدی در نمونه}}{\text{میزان مالتوز تولیدی در کنترل}} \times ۱۰۰$$

$$\text{٪ مهار آنزیم} = ۱۰۰ - \text{٪ واکنش}$$

۲-۴-آزمون آلفا-گلوکوزیداز

آنزیم آلفا-گلوگوزیداز یکی دیگر از آنزیم‌های گوارشی است که اولیگوساکاریدهایی نظیر مالتوز، حاصل از هیدرولیز نشاسته را در روده کوچک به گلوکز هیدرولیز کرده و امکان جذب آن را فراهم می‌کند. در این آزمون به جای مالتوز از ترکیب ۴- نیتروفنیل- آلفا- دی- گلوکوپیرانوزید (PNPG) به عنوان سوبسترای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز استفاده می شود. این ترکیب در حضور آنزیم، به دو بخش گلوکز و پارا- نیتروفنول تجزیه می شود که زرد رنگ است. میزان تغییر رنگ رابطه مستقیم با قدرت مهاری نمونه ها دارد [۲۰]. بدین منظور ۱۷۱ میکرولیتر بافر به چاهک حاوی ۴ میکرولیتر عصاره ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز ۲ یونیت/میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه شیکر انکوباتور قرار گرفت. در نهایت ۲۰ میکرولیتر محلول سوبسترای ۴-نیتروفنیل بتا-دی-گلوکوپیرانوساید ۱۰

[1] BioTek Power wave XS2

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

میکرومولار در بافرفسفات ۰/۱۱+ مولار به چاهک‌ها اضافه گردید جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. همه اندازه‌گیری‌ها در چهار تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها ثبت گردید[۲۱]. در این آزمون از آکاربوز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. میزان مهار آنزیم آلفا- گلوکوزیداز توسط معادله زیر محاسبه گردید.

$$\text{مهار آنزیم } \% = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

۲-۵-آزمون آنتی‌اکسیدانی حذف رادیکال‌های DPPH

در این آزمون گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، با دادن هیدروژن به رادیکال‌های آزاد DPPH[۲] منجر به کاهش مولکول‌های DPPH می‌گردند که باعث تغییر رنگ محلول واکنش از رنگ بنفش به زرد می‌شود. در نتیجه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر کاهش پیدا می‌کند [۲۲]. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، آزمون حذف رادیکال‌های آزاد DPPH انجام گرفت[۱۷]. در این آزمون پنج غلظت مختلف (۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) از عصاره‌ها استفاده گردید. ۲۰۰ میکرولیتر محلول DPPH ۱۰۰ میکرومولار در متانول به ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه اضافه شده و سپس به مدت سی دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک قرار گرفته شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. همه اندازه‌گیری‌ها در چهار تکرار انجام گرفته و میانگین آن ها ثبت گردید. در این آزمون از BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر پایه خنثی کردن رادیکال DPPH (RSC ٪) به‌وسیله فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%\text{RSD} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

جهت مقایسه بهتر، با رسم نمودار درصد مهار در برابر غلظت عصاره، میزان IC_{50} (غلظتی که سبب ۵۰ درصد مهار می‌شود) هر عصاره، محاسبه شد.

۲-۶- آزمون تعیین محتوای فنول کل

محتوای تام فنولی عصاره‌ها با استفاده از رنگ‌سنجی به روش فولین-سیوکالتیو به دست آمد[۲۳]. واکنشگر فولین سیوکالتو مخلوطی از فسفومولیبدات و فسفو تنگستات است که برای سنجش آنتی‌اکسیدان‌های فنولی و پلی فنولی به روش رنگ سنجی استفاده می‌شود. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۵ نانومتر نشان می‌دهد [۲۴, ۲۵]. بدین منظور به ۲/۵ میکرولیتر از هر عصاره‌ی ۱

[2] 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۷۵ میلی‌مولار در هر چاهک اضافه شده سپس ۲۰ میکرولیتر واکنشگر فولین‌سیوکالتیو ۲ مولار افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه ۵۰ میکرولیتر محلول ۷٪ سدیم کربنات اضافه شد. نمونه‌ها پس از هم‌زدن ۲ ساعت در محیط تاریک قرار گرفتند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. آزمایش‌ها چهار بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش گردید. لازم به ذکر است که از محلول ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیترگالیک اسید نیز به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد و میزان کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک (mgGAE/gE) محاسبه گردید.

۲-۷- آزمون تعیین محتوای فلاونوئیدی کل

فلاونوئیدها بزرگترین دسته پلی فنول‌ها هستند که به طور گسترده در رژیم غذایی انسان وجود دارند و دارای ساختار بنزوپیرنی هستند. مکانیسم عمل فلاونوئیدها برای بروز اثر آنتی اکسیدانی به صورت جمع آوری رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید، آنیون‌ها، رادیکال‌های پراکسید چربی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشد. برای سنجش میزان فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده می‌شود. اصول روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید، تشکیل کمپلکس‌های اسیدی آلومینیوم کلرید با گروه کتو و یا گروه هیدروکسیل فلاونوئیدها است که این ترکیبات بیشترین جذب را در طول موج ۴۱۵ نانومتر دارند [۲۶]. جهت بررسی محتوای فلاونوئیدی عصاره‌ها به چاهک‌های حاوی ۱۰ میکرولیتر از هر عصاره، ۱۹۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید ۰/۵٪ در اتانول اضافه شد. سپس میکروپلیت به مدت یک ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در دستگاه انکوباتور قرار گرفت و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. آزمایش‌ها چهار بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش گردید. لازم به ذکر است که از محلول ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیترکوئرستین نیز به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد و میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک (mgQE/gE) محاسبه گردید [۲۷].

۳-نتایج و بحث

نتایج آزمون‌های آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز، آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل به دست آمده از عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی صمغ‌های کمای هزارمسجدی (*F. latisecta*)، گندکما (*D. kopetdaghense*) و کمای کندل (*D. ammoniacum*) در جدول ۲ ارائه شده است.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۲: نتایج آزمون‌های آلفا–آمیلاز، آلفا–گلوکوزیداز، آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل به دست آمده از عصاره‌های صمغ‌های گیاهان مورد مطالعه

نام گیاه	عصاره	راندمان (٪ وزنی/وزنی)	مهار آلفا–آمیلاز (٪)	مهار آلفا–گلوکوزیداز (٪)	فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH (IC_{50}, µg/mL)	فنول کل (mg GAE/g E)	فلاونوئید کل (mg QE /g E)
	هگزانی	۱/۲۰	۳۲/۲۹±۲/۲۱	۳۰/۴۱±۱/۴۷	.	۶۴/۲۳±۳/۱۵	۷/۴۲±۱/۶۱
کمای هزارمسجدی	اتیل استاتی	۴۰/۷۸	۳۳/۳۲±۵/۳۶	۱۶/۱۱±۴/۳۲	۳۳۵/۶۹±۷/۵	۹۲/۹۷±۴/۱۰	۳/۴۷±۰/۸۳
	متانولی	۶/۳۰	۱۹/۲۵±۴/۲۹	.	۳۸۱/۵۵±۶/۲	۸۹/۷۸±۹/۴۴	۱۱/۵۱±۰/۸۸
	هگزانی	۱/۹۵	۳۶/۵۹±۴/۴۴	.	.	۱۳۹/۴۶±۲/۹۳	۶/۶۹±۲/۰۰
گند کما	اتیل استاتی	۳۶/۸۱	۳۲/۸۱±۱/۸	.	.	۱۸/۸۱±۳/۱۵	۴/۳۵±۰/۷۵
	متانولی	۱/۶۷	۴۶/۲۶±۳/۹۶	.	.	۳۲/۶۴±۷/۳۸	۳/۶۲±۱/۶۸
	هگزانی	۵/۲۴	۲۸/۸۴±۵/۵۰	۹۹/۹۲±۲/۸۹	۴۰/۸۵±۰/۳۳	۵۳۰/۵۲±۸/۱۴	۹/۰۳±۱/۱۲
کمای کندل	اتیل استاتی	۲۱/۳۸	۴۰/۷۱±۵/۰۱	۴۵/۱۷±۱/۴۵	۶۸/۳۶±۰/۱۶	۱۲۵/۶۲±۶/۲۹	۳/۰۳±۱/۱۱
	متانولی	۳/۳۲	۵۰/۲۵±۳/۲۸	۰/۹۶±۴/۸۱	۱۲۴/۷۰±۰/۹۲	۹۸/۶۵±۴/۹۸	۲/۷۴±۱/۵۴
آکاربوز	–	–	۵۵/۹۸±۳/۱۲	۳۰/۹۲±۱/۲۰	–	–	–
BHT	–	–	–	–	۲۳/۷۰±۰/۲۵	–	–

* در آزمون آلفا- آمیلاز و آلفا- گلوکوزیداز به ترتیب از عصاره‌های با غلظت ۰/۲ و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۳-۱-راندمان عصاره گیری

همانطور که در جدول ۲ مشخص است، عصاره اتیل استاتی صمغ‌های هر سه گیاه کمای هزارمسجدی، گندکما و کمای کندل با ۴۰/۷۸٪، ۳۶/۸۱٪ و ۲۱/۳۱٪ به ترتیب بیشترین و عصاره هگزانی صمغ کمای هزارمسجدی، متانولی و هگزانی گندکما با ۱٪/۲۰، ۱٪/۶۷ و ۱/۹۵٪ کمترین راندمان عصاره‌گیری را داشتند. به طور کلی در هر سه صمغ گیاهی عصاره‌های اتیل استاتی به ترتیب نسبت به عصاره‌های متانولی و هگزانی راندمان بیشتری داشتند. مجموع راندمان عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی گیاه کمای هزارمسجدی (۴۸/۲۸٪) از گیاه گندکما (۴۰/۴۳٪) و کمای کندل (۲۹/۹۴٪) بیشتر بوده است.

۳-۲- پتانسیل مهار آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز عصاره‌ها

عصاره هگزانی کمای کندل با ۵۰/۲۵٪ عصاره متانولی گندکما با ۴۶/۲۶٪ به ترتیب بیشترین میزان درصد مهار آنزیم آلفا-آمیلاز را دارا بود. عصاره متانولی کمای هزارمسجدی با ۱۹/۲۵٪ کمترین میزان درصد مهار آنزیم آلفا-آمیلاز را از خود نشان داد.

به طور کلی با محاسبه میانگین مهار آنزیم آلفا-آمیلاز توسط هر سه عصاره هگزانی، اتیل استاتی و متانولی هر صمغ، مشخص می‌شود که صمغ کمای کندل با میانگین ۳۹/۹۳٪، از صمغ‌های گندکما و کمای هزارمسجدی به ترتیب با میانگین ۳۸/۵۵٪ و ۲۸٪/۲۹ میزان مهار آتزیمی بیشتری را داراست. بدین ترتیب، در مجموع، صمغ کمای کندل، عملکرد بهتری در مهار آنزیم آلفا-آمیلاز داشته است. قدرت مهار آکاربوز به عنوان استاندارد رایج در صنعت ۵۵/۹۸٪ به دست آمد که به درصد مهار عصاره هگزانی کمای کندل با ۵۰/۲۵٪ بسیار نزدیک بوده است.

همچنین عصاره هگزانی کمای کندل با ۹۹/۹۲٪ بیشترین میزان مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را از خود نشان داد. اما عصاره هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی گندکما و عصاره هگزانی کمای هزارمسجدی هیچ‌گونه فعالیتی در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز از خود نشان ندادند. با محاسبه میانگین مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط هر سه عصاره هگزانی، اتیل استاتی و متانولی هر صمغ، مشخص می‌شود که میزان مهار آنزیمی صمغ کمای کندل (۴۸/۶۸٪) از گیاه کمای هزارمسجدی (۱۵/۵۱٪) و گند کما (۰٪) بیشتر بوده است.

مقایسه‌ها نشان می‌دهد که صمغ کمای کندل در هر دو آزمون مهار آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز عملکرد بهتری دارد. درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز آکاربوز به عنوان استاندارد رایج در صنعت ۳۰/۹۲٪ به دست آمد که در مقایسه با درصد مهار عصاره هگزانی کمای کندل با ۹۹/۹۲٪ بسیار کمتر بوده و حاکی از عملکرد بسیار عالی صمغ کمای کندل در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز می‌باشد.

۳-۳- اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

با توجه به اینکه میزان IC_{50} پایین‌تر نشان از اثربخشی بهتر عصاره‌ها دارد، لذا نتایج نشان می‌دهد که عصاره هگزانی و اتیل استاتی کمای کندل با میزان IC_{50} معادل ۴۰/۸۵ میکروگرم/میلی‌لیتر و ۶۸/۳۶ میکروگرم/میلی‌لیتر به‌ترتیب بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارند. اما عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی گندکما و عصاره هگزانی کمای هزارمسجدی هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان ندادند. با محاسبه میانگین حذف رادیکال‌های DPPH عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی هر سه صمغ، مشخص می‌شود که صمغ کمای کندل با میانگین IC_{50} برابر با ۷۴/۵۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از گیاه کمای هزارمسجدی (۲۳۹/۰۸ میکروگرم/میلی‌لیتر) و گند کما (۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) بیشتر بوده است. ترکیب BHT به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد رایج در صنعت با IC_{50} معادل ۲۳/۷۰ به فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هگزانی کمای کندل با IC_{50} معادل ۴۰/۸۵ نزدیک است. با توجه به اینکه هرچقدر میزان IC_{50} کمتر باشد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد، میزان اثربخشی بالای عصاره هگزانی کمای کندل در حذف رادیکال‌های DPPH نتیجه می‌گردد.

۳-۴-آزمون محتوای فنولی کل

عصاره هگزانی کمای کندل و گندکما و اتیل استاتی کمای کندل با ۵۳۰/۵۲، ۱۳۹/۴۶ و ۱۲۵/۶۲میلی‌گرم گالیک‌اسید/گرم عصاره خشک بیشترین میزان ترکیبات فنولی و عصاره‌های اتیل استاتی گندکما با ۱۸/۸۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید/گرم عصاره خشک کمترین میزان ترکیبات فنولی را دارا بودند. به طور کلی، مجموع محتوای فنولی کل عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی گیاه کمای کندل (۷۵۴/۷۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید/گرم عصاره خشک) از گیاه کمای هزارمسجدی (۲۴۶/۹۸ میلی‌گرم گالیک‌اسید/گرم عصاره خشک) و گند کما (۱۹۰/۹۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید/گرم عصاره خشک) بیشتر بوده است. عصاره‌های هگزانی دو صمغ کمای کندل و گندکما نسبت به عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی میزان ترکیبات فنولی بیشتری داشته و از عملکرد بهتری برخوردار بودند.

۳-۵-آزمون محتوای فلاونوئیدی کل

عصاره متانولی کمای هزار مسجدی و عصاره‌های هگزانی کمای کندل و کمای هزار مسجدی با ۱۱/۵۱، ۹/۰۳ و ۷/۴۲ میلی‌گرم کوئرستین/گرم عصاره خشک به ترتیب بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را دارا بودند. عصاره متانولی کمای کندل با ۲/۷۴ میلی‌گرم کوئرستین/گرم عصاره خشک کمترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را داشت. با محاسبه مجموع محتوای فلاونوئیدی کل عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی هر صمغ مشخص شد که میزان ترکیبات فلاونوئیدی صمغ کمای هزارمسجدی (۲۲/۴۰ میلی‌گرم کوئرستین/گرم عصاره خشک) از صمغ‌های کمای کندل (۱۴/۸۰ میلی‌گرم کوئرستین/گرم عصاره خشک) و گند کما (۱۴/۶۶ میلی‌گرم کوئرستین/گرم عصاره خشک) بیشتر می‌باشد. در مجموع عصاره‌های هگزانی دو صمغ کمای کندل و گندکما نسبت به عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی میزان ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری داشته و از عملکرد بهتری برخوردار بودند.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۴-نتیجه گیری

با توجه به نتایج دو آزمون ضد دیابتی مهار آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز، مشخص شد که صمغ کمای کندل در هر دو آزمون مهار آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز عملکرد بهتری برخوردار است. همچنین عصاره هگزانی و اتیل استاتی این گیاه با IC_{50} معادل ۴۰/۸۵ و ۶۸/۶۶ میکروگرم/میلی‌لیتر دارای خاصیت آنتی اکسیدانی مناسبی است و عصاره هگزانی کمای کندل با ۵۳۰/۵۲ میلی‌گرم گالیک اسید/گرم عصاره خشک بالاترین میزان ترکیبات فنولی را نیز داراست. درصد مهار آکاربوز به عنوان استاندارد رایج در صنعت ۵۵/۹۸٪ به دست آمد که به درصد مهار عصاره هگزانی کمای کندل با ۵۰/۲۵٪ بسیار نزدیک بوده است. همچنین، درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز آکاربوز به عنوان استاندارد رایج در صنعت ۳۰/۹۲٪ به دست آمد که در مقایسه با درصد مهار عصاره هگزانی کمای کندل با ۹۹/۹۲٪ بسیار کمتر بوده و حاکی از عملکرد بسیار عالی صمغ کمای کندل در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز می‌باشد.

در مجموع نتایج نشان می‌دهد صمغ بدست آمده از کمای کندل غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد و در مقایسه با استانداردهای رایج، دارای اثرات ضد دیابتی و آنتی اکسیدانی بسیار بالایی می‌باشد. لذا این گیاه به عنوان یک گزینه مناسب در راستای تحقیقات بیشتر و معرفی مکمل‌ها و داروهای ضد دیابت و آنتی اکسیدان معرفی می‌گردد.

۵-فهرست منابع و ماخذ

[1] Asgary, S., Rahimi, P. A. R. I. V. A. S. H., Mahzoni, P., & Kabiri, N. A. J. M. E. H. (2010). Hypoglycemic effect of extract of Juglans regia L. leaves on alloxan-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *26*(1), 30-39.

[2] El-Kaissi, S., & Sherbeeni, S. (2011). Pharmacological management of type 2 diabetes mellitus: an update. *Current diabetes reviews*, *7*(6), 392-405.

[3] Aghasi, M., Ghazi-Zahedi, S., Koohdani, F., Siassi, F., Nasli-Esfahani, E., Keshavarz, A., ... & Sotoudeh, G. (2018). The effects of green cardamom supplementation on blood glucose, lipids profile, oxidative stress, sirtuin-1 and irisin in type 2 diabetic patients: a study protocol for a randomized placebo-controlled clinical trial. *BMC complementary and alternative medicine*, *18*(1), 1-6.

[4] Dehghan, H., Salehi, P., & Amiri, M. S. (2018). Bioassay-guided purification of α-amylase, α-glucosidase inhibitors and DPPH radical scavengers from roots of Rheum turkestanicum. *Industrial Crops and Products*, *117*, 303-309.

[5] Asano, N. (2009). Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*, 1479-1492.

[6] Standl, E., & Schnell, O. (2012). Alpha-glucosidase inhibitors 2012–cardiovascular considerations and trial evaluation. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *9*(3), 163-169.

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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

[8] Jin, H., Zhang, Y. J., Jiang, J. X., Zhu, L. Y., Chen, P., Li, J., & Yao, H. Y. (2013). Studies on the extraction of pumpkin components and their biological effects on blood glucose of diabetic mice. *Journal of food and drug analysis*, *21*(2), 184-189.

[9] Jung, M., Park, M., Lee, H. C., Kang, Y. H., Kang, E. S., & Kim, S. K. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current medicinal chemistry*, *13*(10), 1203-1218.

[10] de Torre, M. P., Cavero, R. Y., Calvo, M. I., & Vizmanos, J. L. (2019). A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. *Antioxidants*, *8*(5), 142.

[11] Iranshahi, M., Amanolahi, F., & Schneider, B. (2012). New sesquiterpene coumarin from the roots of Ferula latisecta. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *2*(3), 133.

[12] Iranshahi, M., Hassanzadeh-Khayat, M., Bazzaz, B. S. F., Sabeti, Z., & Enayati, F. (2008). High content of polysulphides in the volatile oil of Ferula latisecta Rech. F. et Aell. fruits and antimicrobial activity of the oil. *Journal of Essential Oil Research*, *20*(2), 183-185.

[13] Iranshahi, M., Shaki, F., Mashlab, A., Porzel, A., & Wessjohann, L. A. (2007). Kopetdaghins a– E, sesquiterpene derivatives from the aerial parts and the roots of Dorema kopetdaghense. *Journal of natural products*, *70*(8), 1240-1243.

[14] Zamani Taghizadeh Rabe, S., Iranshahi, M., Rastin, M., Zamani Taghizadeh Rabe, S., & Mahmoudi, M. (2015). Anti-inflammatory effect of new kopetdaghins A, C and E from Dorema kopetdaghense. *Food and Agricultural Immunology*, *26*(3), 430-439.

[15] Mehrpour, M., Yousefi, M., AfzalAghaee, M., Rakhshandeh, H., Azizi, H., Hadianfar, A., ... & Bahrami-Taghanaki, H. (2020). Evaluation of Dorema Ammoniacum and Acupuncture's Therapeutic Effects in Patients With Ischemic Stroke: A Randomized Controlled Clinical Trial.

[16] Zibaee, E., Amiri, M. S., Boghrati, Z., Farhadi, F., Ramezani, M., Emami, S. A., & Sahebkar, A. (2020). Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of Dorema species (Apiaceae): a review. *Journal of Pharmacopuncture*, *23*(3), 91.

[17] Dehghan, H., Sarrafi, Y., & Salehi, P. (2016). Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. *Journal of food and drug analysis*, *24*(1), 179-188.

[18] Bahrami Samani, L., Fooladgar, M., & Amjad, L. (2015) Investigation of storage time effect on phytochemical properties of Artemisia deserti, *Applied Chemistry*, 10(35), 111-130. (in persion)

[19] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, *31*(3), 426-428.

[20] McCue, P., KWON, Y. I., & Shetty, K. (2005). Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin i-converting enzyme potential of selected foods. *Journal of food biochemistry*, *29*(3), 278-294.

[21] Dehghan, H., Sarrafi, Y., Salehi, P., & Nejad Ebrahimi, S. (2017). α-Glucosidase inhibitory and antioxidant activity of furanocoumarins from Heracleum persicum. *Medicinal Chemistry Research*, *26*, 849-855.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

[22] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, *40*(6), 945-948.

[23] Dehghan, H., & Sadani, S. (2018). Antioxidant activity and phenolic content of the fractions from some Iranian antidiabetic plants. *ASAG*, *2*, 73-77.

[24] Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.

[25] Mohadjerani, M., & Pakzad, K. (2013). Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of Nelumbo nucifera seed from north of Iran. *Applied Chemistry*, *7*(25), 45-49.

[26] Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, *10*(3).

[27] Ordonez, A. A. L., Gomez, J. D., & Vattuone, M. A. (2006). Antioxidant activities of Sechium edule (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*, *97*(3), 452-458.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir