Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Inhibitory Effect of Ziziphus Jujuba and Heracleum Persicum on the Activity of Partial Purified Rat Intestinal Alpha-Glucosidase Enzyme

Sahar Sadegh-Nejadi[1],
Mohammad Aberomand[2],
Mohammad Ali Ghaffari[3],
Ghorban Mohammadzadeh[2],
Amir Siahpoosh[4],
Reza Afrisham[1]

[1] MSc Student in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Herbal Medicine and Natural Product Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received September 5, 2015 ; Accepted November 23, 2015)

Abstract

Background and purpose: Alpha-glucosidase inhibitors are used in treatment of type 2 diabetes because they decrease postprandial hyperglycemia. Consistent use of these drugs has undesirable side effects such as liver toxicity and gastrointestinal symptoms. The purpose of this study was to investigate the inhibitory effect of *Ziziphus jujuba* and *Heracleum persicum* on the activity of partial purified rat intestinal alpha-glucosidase enzyme.

Materials and methods: Alpha-glucosidase enzyme was partially purified by gel filtration chromatography Sephadex G-200 from the rat intestine. The methanol extract of plants was prepared and IC_{50} value of extracts on alpha-glucosidase enzyme was obtained and compared with acarbose IC_{50}. The polyphenolic content and antioxidant capacity of extracts were determined by Folin-Ciocalteu test and DPPH test, respectively.

Results: The specific activity of the enzyme was 59.1 U/mg. The IC_{50} values of *Z. jujuba*, *H. persicum* and acarbose for alpha-glucosidase inhibition were 815, 258 and 104 µg/ml, respectively. For inhibition of DPPH radical, IC_{50} values of extracts were calculated as 721 and 243 µg/ml, respectively. Total phenolic content of methanol extracts were 36.06±2.1 and 68.2±2.6 µg tannic acid equivalent/mg extract, respectively.

Conclusion: *Z. jujuba* is used in traditional medicine to treat gastrointestinal disorders, liver pain, diabetes and *H. persicum* is used as anti-flatulence. Antioxidant properties, polyphenolic content, saponin and remarkable inhibition of the alpha-glucosidase make them appropriate candidates in treatment of diabetic patients.

Keywords: alpha-glucosidase, *Ziziphus jujuba*, *Heracleum persicum*, diabetes, enzyme inhibition

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(134): 135-146 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۴ اسفند سال ۱۳۹۴ (۱۴۶-۱۳۵)

اثر مهاری عناب و گلپر بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزیی از روده باریک موش

سحر صادق نژادی[۱]
محمد آبرومند[۲]
محمدعلی غفاری[۳]
قربان محمدزاده[۲]
امیر سیاهپوش[۴]
رضا افریشم[۱]

چکیده

سابقه و هدف: مهارکننده‌های آلفا-گلوکوزیداز جهت درمان دیابت نوع ۲، هیپرگلیسمی بعد از صرف غذا را کاهش می دهند. استفاده مداوم از این داروها اغلب با عوارض جانبی نامطلوب مانند سمیت کبدی و علایم سوء گوارشی مرتبط می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهاری عناب و گلپر بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزیی از روده باریک موش می باشد.

مواد و روش‌ها: آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-200 از روده باریک موش به‌طور جزئی تخلیص شد. سپس عصاره متانولی تام گیاهان تهیه گردید و IC_{50} اثر مهاری عصاره‌ها بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به دست آمد و با IC_{50} داروی آکاربوز مقایسه گردید. محتوای پلی فنلی عصاره‌ها با تست فولن سیوکالتو و ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره با تست DPPH مشخص شد.

یافته‌ها: میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پس از کروماتوگرافی برابر با ۵۹/۱ U/mg به دست آمد. IC_{50} عصاره‌های عناب و گلپر و آکاربوز برای مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، به ترتیب ۸۱۵، ۲۵۸ و ۱۰۴ µg/ml محاسبه شد. هم‌چنین IC_{50} عصاره‌های عناب و گلپر جهت مهار رادیکال DPPH، به ترتیب ۷۲۱ µg/ml و ۲۴۳ و محتوای پلی فنلی عصاره‌ها نیز به ترتیب ۲/۱±۳۶/۰۶ و ۲/۶±۶۸/۲ بر حسب میکروگرم معادل تانیک اسید در یک میلی‌گرم عصاره خام محاسبه گردید.

استنتاج: عناب در طب سنتی جهت درمان اختلالات گوارشی، دردهای کبدی و دیابت و گلپر به عنوان ضد نفخ مصرف می‌شود و با توجه به ظرفیت آنتی اکسیدانی، محتوای پلی‌فنلی و ساپونین بالای این گیاهان، و اثر مهاری قابل توجه این دو گیاه بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، می‌توان آن‌ها را به عنوان گیاهانی موثر در جهت بهبود حال بیماران دیابتی نوع ۲ پیشنهاد داد.

واژه های کلیدی: آلفا-گلوکوزیداز، گیاهان سنتی، دیابت، مهار آنزیم

مقدمه

دیابت شیرین (Diabetes mellitus)، یک اختلال متابولیسمی بدن ناشی از علل چندگانه است که با افزایش مزمن قندخون به همراه اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین نمایان می‌شود که این

مولف مسئول: محمد آبرومند- اهواز: گلستان، دانشگاه جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی E-mail: aberumand@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴. استادیار، گروه فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۵/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۶/۱۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۹/۲

www.SID.ir

Archive of SID

اختلال ناشی از نقص در ترشح انسولین (دیابت نوع ۱) و یا نقص در عملکرد انسولین (دیابت نوع ۲) یا هر دو می‌باشد. در نتیجه قندخون بالای ناشی از دیابت کنترل نشده، منجر به آسیب‌های جدی به بسیاری از سیستم‌های بدن، به خصوص اعصاب و عروق خونی می‌شود. دیابت نوع ۲ (T2DM) حدود ۸۰-۹۰ درصد از موارد تشخیص دیابت را شامل می‌شود(۱). از آن‌جایی که دیابت نوع ۲، یک بیماری قابل پیشگیری است، بیش‌تر از دیابت نوع ۱ مورد توجه قرار گرفته است. دیابت نوع ۲ به علت عدم تعادل بین جذب قندخون و ترشح انسولین ایجاد می‌گردد. هیپرگلیسمی بعد از صرف غذا، نقش مهمی در گسترش دیابت نوع ۲ ایفا می‌کند(۲). هیپرگلیسمی بعد از صرف غذا به وسیله افزایش سریع و بالای سطوح گلوکز خون مشخص می‌شود و احتمال دارد که این افزایش قند بعد از صرف غذا، مرتبط با عوارض پاتوفیزیولوژی دیابتی اخیر باشد که امروزه توجه زیادی به آن شده است(۳). از طرفی استرس اکسیداتیو، که ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپر اکسید ($O^{\cdot 2-}$) و رادیکال هیدروکسیل (OH) است، نقش مهمی در پاتوژنز بیماری های متنوع فرساینده، مانند دیابت، بیماری مزمن کبدی، چاقی و پیری (aging) ایفا می‌کند(۴). استرس اکسیداتیو بعد از صرف غذا، با خطرات بالاتری برای دیابت، چاقی، فشارخون بالا و آترواسکلروز مرتبط می‌باشد. بنابراین، استفاده از مواد یا عواملی که افزایش قند بعد از صرف غذا و استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند، ممکن است درمانی برای بیماران دیابتی باشد(۵). مهارکننده‌های آلفا-گلوکوزیداز از قبیل acarbose، miglitol و voglibose، داروهای خوراکی ضد دیابتی هستند که در دیابت ملیتوس نوع ۲ استفاده می شوند و از طریق جلوگیری از هضم کربوهیدرات‌ها (مثل نشاسته) عمل می کنند. کربوهیدرات‌ها در حالت عادی به قندهای ساده (مونوساکاریدها) تبدیل می‌شوند که می توانند از طریق روده‌ی کوچک جذب شوند(۶).

آلفا-گلوکوزیداز (Glucoside glucohydrolase-α-D) آنزیمی است که در سلول‌های شانه‌ای حاشیه ی روده کوچک مستقر می باشند. این آنزیم که هم‌چنین مالتاز نامیده می‌شود، دی ساکاریدها و الیگوساکاریدهای ناشی از هیدرولیز کربوهیدرات های غذا توسط آنزیم آلفا-آمیلاز بزاقی و پانکراسی را در روده باریک به مونوساکاریدهای قابل جذب تبدیل می‌کند(۷). مهم‌ترین کربوهیدرات‌های غذا، مثل نشاسته و سوکروز، توسط این آنزیم به مونوساکاریدها از جمله گلوکز و فروکتوز شکسته و سپس جذب خون می‌شوند و از این راه موجب افزایش گلوکز خون می‌گردند. این فرایندها معمولاً در قسمت‌های بالایی روده کوچک روی می دهد و گلوکز خون را به میزان زیادی، خصوصاً در بیماران دیابتی می‌افزاید(۸). از این رو، مهارکننده‌های آلفا-گلوکوزیداز، اضافه شدن کربوهیدرات‌ها به قندخون را می‌کاهد، استفاده مداوم از این داروها اغلب با عوارض جانبی نامطلوب مانند سمیت کبدی و علایم سوء گوارشی مرتبط می‌باشد(۶).

یکی از مهم‌ترین حوزه‌های طب سنتی در سراسر جهان، حوزه مربوط به گیاه درمانی است و عصاره‌های تهیه شده از گیاهان برای تعیین یک منبع درمانی مورد آزمایش قرار می‌گیرند(۹). امروزه بیش از ۱۲۰۰ نوع گیاه برای درمان دیابت به کار می روند که نیمی از این گیاهان به صورت سنتی استفاده می‌شوند(۱۰). یکی از گیاهانی که در زمره گیاهان ضد دیابت قرار دارد، عناب است. عناب گیاهی درختچه‌ای، با نام علمی *ziziphus jujuba* و متعلق به خانواده عناب (*Rhamnaceae*) می‌باشد(۱۱). گونه‌های ziziphus به طور رایج در طب سنتی برای درمان بیماری های مختلف مانند اختلالات گوارشی، ضعف، دردهای کبدی، چاقی، مشکلات ادراری، دیابت، عفونت‌های پوستی، از دست دادن اشتها، تب، التهاب گلو، برونشیت، آنمی، اسهال و بی‌خوابی استفاده می‌شود(۱۲). به‌طور خاص، میوه عناب غنی از شکر، ویتامین C، بیوفلاونوئیدها،

www.SID.ir

Archive of SID

فیبر خوراکی و مواد معدنی می‌باشد. عناصر دارویی مانند استرول‌ها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، سروتونین، پلی‌فنول، فلاونویید، تری‌ترپن‌ها و c-GMP در میوه عناب گزارش شده است. عصاره متانولی میوه عناب به‌طور فارماکولوژیکی دارای اثرات آنتی اکسیدان، سرکوب تکثیر سلول های سرطانی و حفاظت از کبد می‌باشد(۱۳). تا به حال هشت نوع فلاوونوئید و نوع خاصی از پروتئوگلیکان‌ها از میوه‌ی عناب استخراج گردیده است(۱۴). فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که گروه بزرگی از ترکیبات پلی‌فنلیک را نشان می‌دهند. این مواد طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند اثرات ضد التهابی، ضد تومور، آنتی‌اولسر، آنتی باکتریال و آنتی‌ترومبوتیک را دارند(۱۵). فلاونوئیدها نمی توانند در بدن انسان تولید شوند و از طریق رژیم غذایی روزانه جذب بدن می‌شوند، شواهد نشان می‌دهد که فلاونوئیدها نقش بیولوژیکی حیاتی، شامل پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن را ایفا می کنند(۱۶). بنابراین آن‌ها می‌توانند بدن انسان را از رادیکال‌های آزاد حفاظت کنند و پیشرفت تعدادی از بیماری‌های مزمن را مهار کنند. از نظر علمی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها جهت توانایی درمانی، مورد توجه واقع شده است. به علاوه گزارش‌ها نشان‌دهنده وجود ترکیب اینولین در عناب می‌باشند(۱۸،۱۷). کریستینین‌های A,B,C,D که نوع خاصی از ساپونین‌ها می‌باشند، نیز از دانه و میوه عناب جداسازی شده‌اند(۱۹). این گیاه با ترکیبات خاص خود، اثرات ضد دیابتی قابل قبولی داشته است، چنان‌که به‌طور سنتی در درمان دیابت کاربرد دارد. از این رو بررسی و تحقیق در مورد اثرات ضد دیابتی آن، برای تبدیل استفاده سنتی به مصرف مطمئن دارویی، ضروری به نظر می‌رسد.

گلپر با نام علمی (*Heracleum persicum*)، گیاهی علفی، پایا از تیره چتریان (*Umbelliferae*)، و دارای اعضای معطر، برگ‌های منقسم و دندانه دار است. از مشخصات ظاهری آن گل‌های سفید و مجتمع به شکل چتری بزرگ در انتهای شاخه هاست. این گیاه به‌عنوان ضدعفونی کننده، ضد نفخ، هضم‌کننده، و خوش‌بوکننده غذا مصرف سنتی دارد(۲۰). این گیاه کاهنده کلسترول و LDL (۲۱)، دارای اثرات ضد التهابی قوی، ضد درد (analgesic)، ضد تشنج (anticonvulsant)، ضد باکتری، ضدقارچ و اثرات ایمنومدولاتوری (immunomodulatory) می‌باشد(۲۲). بررسی فیتوشیمیایی بخش‌های مختلف گیاه گلپر نشان داده که این گیاه حاوی ترپنوئیدها، تری‌ترپن‌ها، فورانوکومارین‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و مواد فرار می‌باشد(۲۳). یکی از مکانیسم‌های اثرات ضد دیابتی گیاهان، مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز است که طی مهار این آنزیم، جذب کربوهیدرات ها به تاخیر می‌افتد و باعث کاهش قندخون بعد از صرف غذا می‌شود. از این‌رو، هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره متانولی تام گیاه عناب و گلپر بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزیی از روده باریک موش بوده و از طرفی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی این گیاهان نیز تعیین می گردد.

مواد و روش ها

مواد

آکاربوز از شرکت فلوکای آلمان، واکنش‌گر فولن سیوکالتو، ۲، ۲- دی‌فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، سفادکس G-200، PNPG (پارا-نیتروفنیل-α-D-گلوکوپیرانوزید) و ساکارز از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شد و مابقی مواد مانند، تانیک اسید، متانول، کربنات سدیم، پتاسیم منو فسفات، پتاسیم دی فسفات، آمونیوم سولفات، از شرکت مرک تهیه گردید.

تهیه عصاره متانولی گیاه

میوه عناب و گلپر توسط یکی از فروشگاه های معتبر در اهواز خریداری شد و سپس به وسیله مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی اهواز به ترتیب به عنوان گونه *ziziphus jujuba* از خانواده

www.SID.ir

Archive of SID

Rhamnaceae با کد A142430301FP و گونه *Heracleum persicum* از خانواده *Apiaceae* با کد A140100301FP شناسایی و تایید گردید. برای تهیه عصاره متانولی، ابتدا میوه‌ها در سایه خشک شده و بعد از جداسازی هسته‌ها (برای عناب)، میوه خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب الکتریکی پودر شد. سپس به میزان ۲۰۰ گرم پودر گیاه، در ml ۱۵۰۰ متانول تام حل گردید و محلول مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از شیکر مخلوط شد. پس از ۴۸ ساعت، مخلوط را از کاغذ صافی واتمن عبور داده و محلول صاف شده توسط روتاری در دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در دمای C° 20- نگهداری گردید(۲۴).

تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره گیاه با تست DPPH

در روش DPPH، ۳/۹ میلی لیتر از DPPH استوک ساخته شده داخل کووت ریخته و جذب توسط Uv-Vis Shimadzu spectrophotometer در طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها (با غلظت‌های مختلف µg/ml ۱۲۵۰-۱۵۶) اضافه و جذب آن در ۵۱۵ نانومتر، ابتدا هر ۱ دقیقه تا دقیقه ۱۰، سپس هر ۳ دقیقه تا دقیقه ۳۰ خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله $I\ (\%) = 100\times (A_0 - A_s)/A_0$ محاسبه گردید که A_0 جذب کنترل (حاوی همه اجزا واکنشگر بدون نمونه) و A_s جذب نمونه بود. نتایج به صورت IC_{50} (مقداری از آنتی اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید(۲۵).

اندازه گیری محتوای پلی فنلی تام با تست فولن سیوکالتو

به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر (رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱۰) و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر Na_2Co_3 ۷/۵ درصد وزن در حجم اضافه شد. محلول حاصل ۲ ساعت در شرایط تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. در این تست از اسید تانیک به عنوان استاندارد استفاده شد(۲۶).

استخراج جزئی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

ابتدا ۶ عدد رت کشته و پس از جداسازی روده باریک، با سدیم کلرید ۰/۹ درصد شستشو داده و تا موقع استخراج در C°۷۰- ذخیره شد. سپس ۳۶ گرم روده باریک به ۳۶۰ میلی‌لیتر بافر A (200 mM فسفات، pH=7، EDTA 1 mM، تریپسین کریستالیزه 1mg/ml) اضافه شد و توسط دستگاه همژنایزر به مدت ۱۰ دقیقه هموژن شد. سپس بافت هموژن شده با دور 10000g (با دستگاه سانتریفیوز سیگما، مدل 3-30KS، ساخت کشور آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه در C° ۴ سانتریفوژ گردید. بعد از جداسازی سوپرناتانت، به آن آمونیوم سولفات ۳۰ درصد، به آرامی و در حال چرخش اضافه شد. مجدداً با همان شرایط قبلی، سانتریفیوژ صورت گرفت. در این مرحله، رسوب دور ریخته شد و سوپرناتانت جدا شده و به آن آمونیوم سولفات ۷۰ درصد اضافه شد و مجدداً سانتریفیوز تحت شرایط قبلی انجام گردید. بعد از سانتریفیوژ، رسوب جدا شده و در حجم کمی از بافر A حل گردید. سپس این محلول در برابر دو لیتر از همان بافر به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد و هر ۱۲ ساعت بافر تعویض می‌گردید. بعد از دیالیز، آنزیم در مقابل ساکارز تغلیظ گردید و در نهایت ساکارز و آمونیوم سولفات با استفاده از کروماتوگرافی ستونی با سفادکس G-200 حذف شد(۲۷). جهت کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-200، شستشوی ستون کروماتوگرافی با بافر A جهت رسیدن pH خروجی به ۷ انجام شد. در مرحله بعد، نمونه دیالیز شده حاصل از رسوب با آمونیوم سولفات توسط پی‌پت پاستور به آرامی از جدار ستون روی ژل ریخته شد و پس از نفوذ نمونه به داخل ژل، با استفاده از پمپ پریستالتیک، جریان بافر A روی ستون

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی ژل برقرار گردید. میزان سرعت جریان بافر (Flow rate) از ستون در هر دقیقه یک میلی‌لیتر تنظیم شد. پس از جمع‌آوری فراکسیون‌ها (در هر فراکسیون ۳ میلی‌لیتر) جذب نوری آن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد و سپس فعالیت آنزیم سنجیده شد(۲۸).

سنجش غلظت پروتئین محلول

سنجش غلظت پروتئین محلول در هر مرحله از خالص‌سازی انجام شد. جهت سنجش از روش برادفورد استفاده شد و از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد(۲۹).

اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

در تمام مراحل خاص‌سازی، سنجش فعالیت آنزیم صورت گرفت، به‌طوری‌که ۱۰۰µl از آنزیم آلفا-گلوکوزیداز استخراج شده در بافر A با ۵۰ µl pNPG به عنوان سوبسترا (5 mM، در بافر A) در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ چاهکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه Microplate Reader (BIOTEK، مدل ELX800، USA) خوانده شد. جهت این سنجش از ماده pNPG به عنوان سوبسترا استفاده شد که توسط آنزیم به پارا-نیتروفنول (زرد رنگ) و گلوکز هیدرولیز می‌شود. فعالیت آنزیمی با اندازه‌گیری میزان جذب پارا- نیتروفنول (زرد رنگ) اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم عبارتست از مقدار آنزیمی که باعث رهاسازی ۱ میکرومول PNP در مدت ۱ دقیقه تحت شرایط تعیین شده می‌شود(۳۰).

اندازه گیری مهار فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

غلظت‌های متفاوت نمونه عصاره گیاهی (۳۲۰۰-۲۵ µg/ml) پس از حل در DMSO، تهیه شد. ۵۰ µl محلول عصاره گیاهی با ۱۰۰ µl آلفا- گلوکوزیداز روده باریک موش موجود در بافر A، در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. حجمی معادل ۵۰µl از (pNPG محلول ۵ mM در بافر A) به هر چاهک اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه Microplate Reader (BIOTEK، مدل ELX800، USA) خوانده شد. برای هر نمونه، بلانک مجزا گذاشته شد و از آکاربوز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید(۳۱). این آزمایش برای هر یک از غلظت‌ها سه مرتبه تکرار شد. درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز با استفاده از معادله $I\ (\%)= 100\times (A_0-A_s)/A_0$ محاسبه گردید که A_0 جذب کنترل (حاوی همه اجزا واکنشگر و DMSO بدون عصاره گیاهی) و A_s جذب نمونه (حاوی عصاره گیاهی) بود. نتایج به صورت IC_{50} (مقداری از عصاره که لازم است تا فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید.

آنالیز آماری

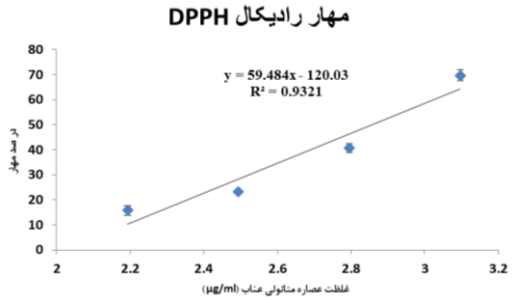
تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت± انحراف معیار گزارش شده و IC_{50} ها از نمودار خطی با ضریب رگرسیون بالای ۰/۹ تهیه گردید.

یافته ها

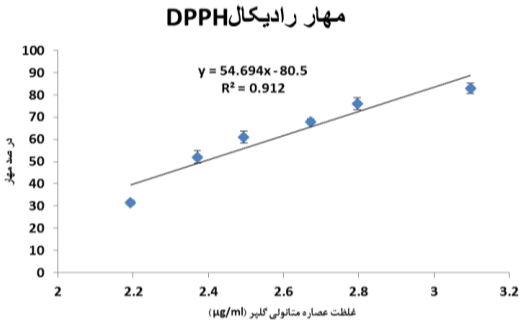
نمودار خطی درصد مهار رادیکال DPPH در مقابل لگاریتم غلظت عصاره متانولی میوه عناب و گلپر به ترتیب در نمودار شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. در تست DPPH جذب در دقیقه ۳۰ بررسی شد و IC_{50} به دست آمده برای عصاره متانولی گیاه عناب و گلپر به ترتیب برابر با ۷۲۱ µg/ml و ۲۴۳ محاسبه گردید. میزان ترکیبات پلی فنلی توسط تست فولین سیوکالتو برای عصاره‌های عناب و گلپر نیز به ترتیب ۲/۱±۳۶/۰۶ و ۲/۶±۶۸/۲ برحسب میکروگرم معادل تانیک اسید در یک میلی‌گرم عصاره خام محاسبه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

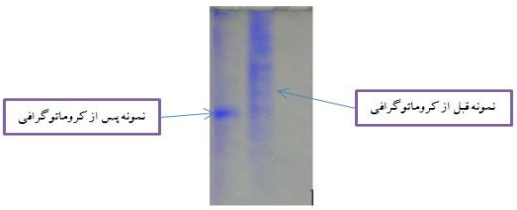


نمودار شماره ۱: نمودار خطی درصد مهار رادیکال DPPH در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه عناب، IC_{50} به دست آمده برابر با ۷۲۱ µg/ml می‌باشد تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت ± انحراف معیار گزارش شده است.

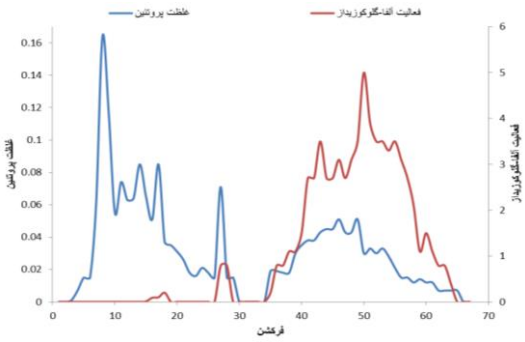


نمودار شماره ۲: نمودار خطی درصد مهار رادیکال DPPH در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه گلپر، IC_{50} به دست آمده برابر با ۲۴۳ µg/ml می‌باشد. تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت ± انحراف معیار گزارش شده است.

نتایج مربوط به سنجش فعالیت و پروتئین آنزیم آلفا-گلوکوزیداز روده باریک موش در مراحل مختلف تخلیص، در جدول شماره ۱ آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده در آخرین مرحله تخلیص و پس از عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، میزان فعالیت کل آنزیم در این مرحله ۱۳۶ واحد و میزان فعالیت اختصاصی آنزیم برابر با ۵۹/۱ واحد در میلی‌گرم بود. هم‌چنین در این جدول، بازده و میزان تخلیص آنزیم در مراحل مختلف نشان داده شده است، به طوری که بازده ۲/۴ و میزان تخلیص آنزیم برابر با ۴۵/۴ پس از کروماتوگرافی می‌باشد. در این مطالعه، به‌منظور بررسی خلوص آنزیم آلفا-گلوکوزیداز استخراج شده از روده باریک موش، الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید (PAGE) انجام شد (تصویر شماره ۱). نمونه قبل از کروماتوگرافی (نمونه دیالیز) چندین باند را نشان داد، اما پس ازکروماتوگرافی باند مشخصی مشاهده شد. بررسی میزان غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز استخراج شده حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-200 در نمودار شماره ۳ آمده است.



تصویر شماره ۱: پروفایل الکتروفورز آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزیی از روده باریک موش



نمودار شماره ۳: بررسی میزان غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز روده باریک موش حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-200

جدول شماره ۱: میزان فعالیت و پروتئین آنزیم آلفا-گلوکوزیداز روده باریک موش در مراحل مختلف تخلیص

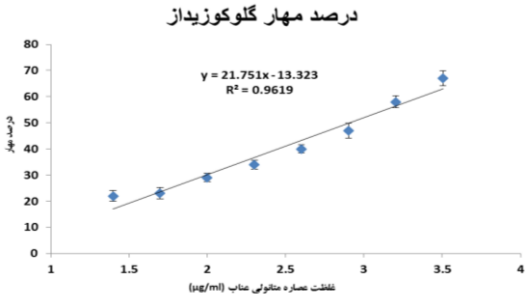
مرحله تخلیص	پروتئین کل (mg)	فعالیت کل آنزیم (unit)	فعالیت اختصاصی (U/mg)	بازده (درصد)	تخلیص
عصاره خام	۴۲۳۷	۵۶۴۰	۱/۳	۱۰۰	۱
رسوب با آمونیوم سولفات	۱۰۵۰	۲۷۸۵	۱/۷	۴۹/۴	۲/۷
کروماتوگرافی سفادکس G-200	۲/۳	۱۳۶	۵۹/۱	۲/۴	۴۵/۴

نمودارهای شماره ۴ و ۵، به ترتیب نمودارهای خطی درصد مهار آلفا-گلوکوزیداز در مقابل لگاریتم غلظت عصاره متانولی میوه عناب و گلپر را نشان می‌دهد. IC_{50} (غلظتی از نمونه که باعث مهار ۵۰ درصد فعالیت آنزیم می‌شود) عصاره گیاهی با استفاده از نمودار خطی

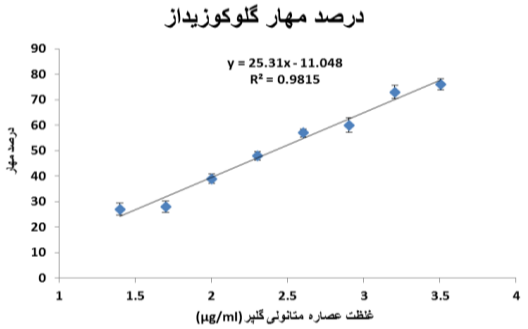
www.SID.ir

Archive of SID

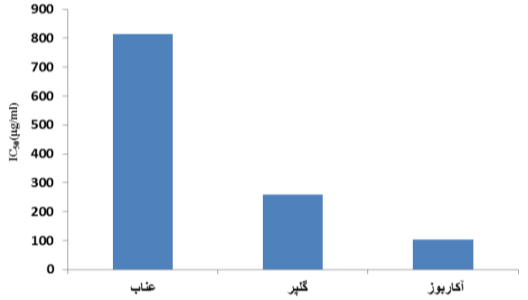
به دست آمده، برای عناب برابر با µg/ml ۸۱۵ و برای گلپر µg/ml ۲۵۸ محاسبه شد. نمودار شماره ۶، مقایسه IC_{50} عصاره متانولی میوه عناب و گلپر با IC_{50} آکاربوز، بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را نشان می‌دهد. IC_{50} اثر آکاربوز به‌عنوان کنترل مثبت بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز برابر با µg/ml ۱۰۴ محاسبه گردید.



نمودار شماره ۴: نمودار خطی درصد مهار آلفا-گلوکوزیداز در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه عناب. IC_{50} به دست آمده برابر با µg/ml ۸۱۵ می باشد. تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت ± انحراف معیار گزارش شده است.



نمودار شماره ۵: نمودار خطی درصد مهار آلفا-گلوکوزیداز در مقابل لگاریتم غلظت های مختلف عصاره متانولی گیاه گلپر. IC50 به دست آمده برابر با µg/ml ۲۵۸ می باشد. تست ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت ± انحراف معیار گزارش شده است.



نمودار شماره ۶: مقایسه IC50 عصاره متانولی گیاهان با IC50 آکاربوز، بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز. IC50 به دست آمده برای آکاربوز برابر با µg/ml ۱۰۴ و برای عناب و گلپر به ترتیب µg/ml۸۱۵ و ۲۵۸ می باشد.

بحث

در این مطالعه اثر مهاری عصاره متانولی تام میوه عناب و گلپر بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز روده باریک موش بررسی شد. نتایج این پژوهش حاکی از آن است که عصاره این دو گیاه به ترتیب اثر مهاری با IC_{50} برابر با µg/mL ۸۱۵ و ۲۵۸ روی فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز دارد. نتایج این مطالعه در راستای مطالعات قبلی است. در مطالعه‌ای که توسط Kim و همکارانش در سال ۲۰۰۰ صورت گرفت، اثر مهاری چند فلاونوئید از جمله Luteolin، Amentoflavone و Luteolin-7-o-glucoside بر روی آنزیم آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز بررسی شد که مشخص شد Luteolin در غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را ۳۶ درصد مهار می کرد که این اثر از آکاربوز قوی تر بود. هم چنین این فلاونوئید آنزیم آلفا-آمیلاز را با قدرتی بالا ولی کم تر از آکاربوز مهار می‌کرد(۳۲). هم چنین در یک مطالعه، که توسط Shobana و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، اثر مهاری ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ی متانولی پوست دانه‌ی گیاه *Eleusine coracana L* بر آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و آلفا-آمیلاز پانکراس بررسی شد. این فنل‌ها شامل پلی‌فنل ها و اسیدهای فنلی بودند که اثر مهاری قوی علیه هر دو آنزیم نشان دادند و میزان IC_{50} به ترتیب برابر با ۱۶/۹ و ۲۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از مقدار فنل بود. این مطالعه پتانسیل درمانی محتوای فنلی این گیاه را در درمان هایپرگلیسمی بعد از غذا نشان داد(۳۳). به همین علت در این پژوهش محتوای پلی فنلی گیاه عناب و گلپر مورد سنجش قرار گرفت. نتایج بررسی محتوای پلی فنلی نشان داد که این دو گیاه به ترتیب حاوی ۲/۱±۳۶/۰۶ و ۲/۶±۶۸/۲ میکروگرم

www.SID.ir

Archive of SID

تانیک اسید به ازای هر میلی‌گرم عصاره خام می‌باشند و از طرفی بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عناب و گلپر با تست DPPH نشان داد که این گیاهان به ترتیب دارای IC_{50} برابر با ۷۲۱ µg/ml و ۲۴۳ می‌باشند که دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. در سال ۲۰۰۷ نیز، Coruh و همکاران محتوای پلی‌فنلی عصاره متانولی گیاه گلپر و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن را با تست DPPH اندازه‌گیری کردند که محتوای پلی‌فنلی آن حدود ۵۹/۶ میکروگرم گالیک اسید به ازای هر میلی گرم عصاره خام بود و IC50 تست DPPH برای این گیاه معادل ۴۳۸ µg/ml گزارش شد(۳۴). از آن‌جایی که گزارش شده است که ترکیباتی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند، با مهار گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپر اکسید ($O^{\cdot -2}$) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) موجب مهار آنزیم آلفا-گلوکزیداز می‌شوند(۳۵) و با توجه به این که Shobana و همکاران، پلی فنل‌ها را و Kim و همکارانش فلاونوئیدها را به عنوان مهارکننده قوی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز معرفی کردند، می‌توان یکی از علل مهار این آنزیم توسط عصاره متانولی عناب و گلپر را به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای پلی فنلی و فلاونوئیدی آ ها نسبت داد. هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که عناب دارای عناصر دارویی مانند استرول‌ها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، سروتونین، پلی‌فنول، فلاونویید، تری‌ترپن هاو تانن‌ها می‌باشد(۱۳،۱۱) و از طرفی Luo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثر مهاری قابل توجه ساپونین‌ها بر مهار آلفا گلوکوزیداز را نشان داده بودند(۳۶). پس می‌توان یکی دیگر از علل مهار این آنزیم توسط عصاره متانولی عناب را به محتوای ساپونین آن نسبت داد. بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده که در فوق به آن‌ها اشاره شد، پلی فنل و فلاونوئیدها و هم‌چنین ساپونین، اثر مهاری قابل توجهی بر روی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز دارند و به علت وجود این ترکیبات در گیاه عناب و گلپر انتظار می‌رود که این گیاهان اثر مهاری قابل توجهی بر این آنزیم داشته باشد و می‌توان یکی از مکانیسم‌های اثر ضد دیابتی گیاه عناب را با مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز و کاهش قندخون بعد از صرف غذا توجیه کرد.

استفاده مداوم از آکاربوز و دیگر داروهای مهارکننده آنزیم آلفا-گلوکوزیداز با عوارض جانبی نامطلوب مانند سمیت کبدی و علایم سوء گوارشی مرتبط می‌باشد(۶). در تحقیقی دیگر، Sharififar در سال ۲۰۰۹، اثر گیاه گلپر را بر روی موش انجام داد و نشان داد که مصرف این گیاه هیچ افزایشی در آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) در سرم موش ایجاد نمی‌کند(۳۷). بنابراین از آن‌جایی که این گیاه فاقد اثرات مسمومیت کبدی و هم‌چنین دارای اثرات ضد نفخ است و به طور سنتی جهت درمان ناراحتی‌های گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲۰) و از آن‌جایی که گیاه عناب و خانواده گیاهان ziziphus در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف مانند اختلالات گوارشی، اسهال، دردهای کبدی، چاقی و دیابت استفاده می‌شود(۱۲) و با توجه به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای پلی‌فنلی عناب و گلپر و ساپونین بالای عناب، و اثر مهاری قابل توجه این گیاهان بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، می توان این گیاهان را به عنوان گیاهی موثر در جهت بهبود حال بیماران دیابتی نوع ۲ پیشنهاد داد. ما در این پژوهش از عصاره متانولی تام جهت انجام آزمایشات استفاده کردیم و مشخص نیست که کدام فرکشن گیاه دارای اثرات مهاری بیش‌تر و یا دارای محتوای پلی‌فنلی، ساپونین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر است. از این رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، جهت شناسایی بخش موثره میوه عناب و گلپر، فرکشن‌های مختلف این عصاره گیاهی جداسازی شده و اثرات مهاری فرکشن های مختلف بر روی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز مورد سنجش قرار گیرد و از طرفی محتوای پلی‌فنولی، ساپونین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن فرکشن مورد ارزیابی قرار گیرد، تا بتوان فرکشن موثره بر مهار این آنزیم را شناسایی و جداسازی کرد و از آن در جهت اهداف دارویی استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز جهت پرداخت هزینه‌های این پژوهش که در قالب پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی با کد MPRC-61 انجام شد و از گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه جندی شاپور اهواز، که ما را در انجام امور آزمایشگاهی یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. Diabetes Care 1993; 16(1): 157-177.
2. Baron AD. Postprandial hyperglycaemia and alpha-glucosidase inhibitors. Diabetes Res Clin Pract 1998; 40(Suppl): S51-55.
3. Bonora E, Muggeo M. Postprandial blood glucose as a risk factor forcardiovascular disease in type II diabetes: the epidemiological evidence. Diabetologia 2001; 44(12): 2107-2114.
4. Murugan P, Pari L. Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. Life Sci 2006; 79(18): 1720-1728.
5. O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/ hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. Am J Cardiol 2007; 100(5): 899-904.
6. Etxeberria U, de la Garza AL, Campion J, Martinez JA, Milagro FI. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydratehydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. Expert Opin Ther Targets 2012; 16(3): 269-297.
7. Kim KY, Nguyen TH, Kurihara H, Kim SM. a-Glucosidase inhibitory activity of bromophenol purified from the red alga Polyopes lancifolia. JFood Sci 2010; 75(5): 145-150.
8. Ye F1, Shen Z, Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb (Ramulus mori) in normal and diabetic rats and mice. Phytomedicine 2002; 9(2): 161-166.
9. Mansouri E, Kooti W, Bazvand M, Boroon MG, Amirzargar A, Afrisham R, Afzalzadeh MR, Ashtary-Larky D, Jalali N. The Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Foeniculum vulgare Mill on Leukocytes and Hematological Tests in Male Rats. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2015; 10(1): e18396.
10. Gupta KR, Park J, KesariAN, Watal G, Murthy PS, Chandra R, et al Hypoglycemic and antidiabetic effect of aqueous extract of leaves of Annona squamosa. Current Science 2005; 88(8): 1244-1254.
11. San B, Yildirim AN, Polat M, Yildirim F. Mineral composition of leaves and fruits of some promising Jujube (Zizyphus jujuba miller) genotypes. Asian J Chem 2009; 21(4): 2898-2902.
12. Pawlowska AM, Camangi F, Bader A, Braca A. Flavonoids of Zizyphus jujuba L. and Zizyphus spina-christi (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. Food Chemistry 2009; 112(4): 858-862.
13. Kim JE, Kim MA, Kim JS, Park DC, LeeSP. Enhancing the organoleptic and functional properties of jujube by a quick aging process. Prev Nutr Food Sci 2013; 18(1): 50-59.
14. Ebrahimimd S, Ashkani-Esfahani S, Poormahmudibs A. Investigating the efficacy

www.SID.ir

Archive of SID

of Zizyphus jujuba on neonatal jaundice. Iran J Pediatr 2011; 21(3): 320-324.

15. Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000; 52(4): 673-751.
16. Pietta PG, Simonetti P. Dietary flavonoids and interaction with endogenous antioxidant. IUBMB Life 1998; 44(5): 1069-1074.
17. Cheng G, Bai Y, Zhao Y, Tao J, Liu Y, Tu G, et al. Flavonoids from Ziziphus jujuba Mill var. spinosa. Tetrahedron 2000; 56(45): 8915-8920.
18. Zhao J, Li S, Yang F, Li P, Wang Y. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in Ziziphus jujuba (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. J Chromatogr A 2006; 1108(2): 188-194.
19. Kirtikar KR, Basu BD. Indian medicinal plants: Plates, 2th ed. Bishen Singh Mahendra, Pal Singh. 1918.
20. Afrisham R, Aberomand M, Ghaffari MA, Siahpoosh A, Jamalan M. Inhibitory Effect of Heracleum persicum and Ziziphus jujuba on Activity of Alpha-Amylase. Journal of Botany 2015; 2015: 1-8.
21. Panahi Y, Pishgoo B, Beiraghdar F, Araghi ZM, Sahebkar A, Abolhasani E. Results of a randomized, open-label, clinical trial investigating the effects of supplementation with Heracleum persicum extract as an adjunctive therapy for dyslipidemia. Scientific World Journal 2011; 11: 592-601.
22. Hajhashemi V, Heshmati M, Heshmati M. Anti-in flammatory and analgesic properties of Heracleum persicum essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. J Ethnopharmacol 2009; 124(3): 475-480.
23. Hemati A, Angaji AH, Azarnia M. Medicinal effects of Heracleum persicum (Golpar). Middle-East J Sci Res 2010; 5(3): 174-176.
24. Kooti W, Ghasemiboroon M, Asadi-Samani M, Ahangarpoor A, Abadi A, Afrisham R, et al. The Effects of hydro-alcoholic extract of celery on lipid profile of rats fed a high fat diet. Advances in Environmental Biology 2014; 8(9): 325-330.
25. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology 1995; 28(1): 25-30.
26. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16(3): 144-158.
27. Costantino HR, Brown SH, Kelly R. Purification and characterization of an alpha-glucosidase from a hyperthermophilic archaebacterium, Pyrococcus furiosus, exhibiting atemperature optimum of 105 to 115 degrees C. J Bacteriol 1990; 172(7): 3654-3660.
28. Elyaderani MK, Askar AMM, Rostami M, Aberomand M, Khirollah A. Kinetic Activity of Isolated Nitric-oxide Synthase Enzyme from Sheep Kidney. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 22(96): 59-69.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1): 248-254.
30. Smith KA, Salyers AA. Characterization of a neopullulanase and an alpha-glucosidase from Bacteroides thetaiotaomicron 95-1. J Bacteriol 1991; 173(9): 2962-2968.

www.SID.ir

Archive of SID

31. Lordan S, Smyth TJ, Soler-Vila A, Stanton C, Ross RP. The α-amylase and α-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food Chem 2013; 141(3): 2170-2176.
32. Kim JS. KwonCS, Son KH. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by leuteolin, a flavanoid. Biosci Biotechnol Biochem 2000; 64(11): 2458-2461.
33. Shobana S, Sreerama YN, Mallesh NG. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (Eleusine coracana L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of a-glucosidase and pancreatic amylase. Food Chem 2009; 115(4): 1268-1273.
34. Coruh N, Celep A, Özgökçe F. Antioxidant properties of Prangos ferulacea (L.) Lindl, Chaerophyllum macropodum Boiss. and Heracleum persicum Desf. from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-Stransferase. Food Chem 2007; 100(3): 1237-1242.
35. Jo S, Ka E, Lee H, Apostolidis E, Jang H, Kwon Y. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal a-glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. International Journal of Applied Research in Natural Products. 2009;2(4):52-60.
36. Luo JG, Ma L, Kong LY. New triterpenoid saponins with strong α-glucosidase inhibitory activity from the roots of Gypsophila oldhamiana. Bioorg Med Chem. 2008; 16(6): 2912-2920.
37. Sharififar F, Pournourmohammadi S, Rastegarianzadeh R, Ranjbaran O, Pourhemmaty A. Immunomodulatory activity of aqueous extract of Heracleum persicum Desf. in mice. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2009; 8(4): 287-292 (Persian).

www.SID.ir