

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

Sahar Sadegh-Nejadi¹,
Mohammad Aberomand²,
Mohammad Ali Ghaffari³,
Ghorban Mohammadzadeh²,
Amir Siahpoosh⁴,
Reza Afrisham¹

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 IC₅₀ value of extracts on alpha-glucosidase enzyme was obtained and compared with acarbose IC₅₀. 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 IC₅₀ 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, IC₅₀ 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).

اثر مهاری عنب و گلپر بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزئی 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 می‌دهند. استفاده مداوم از این داروها اغلب با عوارض جانبی نامطلوب مانند سمیت کبدی و علائم سوء گوارشی مرتبط می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهاری عنب و گلپر بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزئی از روده باریک موش می‌باشد.

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 IC₅₀ اثر مهاری عصاره‌ها بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به دست آمد و با IC₅₀ 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. IC₅₀ عصاره‌های عنب و گلپر و آکاربوز برای مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، به ترتیب ۸۱۵، ۲۵۸ و ۱۰۴ محاسبه شد. هم‌چنین IC₅₀ عصاره‌های عنب و گلپر جهت مهار رادیکال DPPH، به ترتیب ۷۲۱ و ۲۴۳ و محتوای پلی فنلی عصاره‌ها نیز به ترتیب ۳۶/۰۶±۲/۱ و ۶۸/۲±۲/۶ بر حسب میکروگرم معادل تانیک اسید در یک میلی گرم عصاره خام محاسبه گردید.

استنتاج: عنب 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 پلی فنلی 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

E-mail: aberumand@yahoo.com

مؤلف مسئول: محمد آبرومند - اهواز: گلستان، دانشگاه جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

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 فارماکوتوزی، 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

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 ($O_2^{\cdot-}$) و رادیکال هیدروکسیل (OH) است، نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های 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 miglitol، acarbose و voglibose، داروهای خوراکی ضد دیابتی هستند که در دیابت ملیتوس نوع ۲ استفاده می‌شوند و از طریق جلوگیری از هضم کربوهیدرات‌ها (مثل نشاسته) عمل می‌کنند. کربوهیدرات‌ها در حالت عادی به قندهای ساده (مونوساکاریدها) تبدیل می‌شوند که می‌توانند از طریق روده‌ی کوچک جذب شوند (۶).

آلفا-گلوکوزیداز (Glucoside glucohydrolase- α -D) آنزیمی است که در سلول‌های شانه‌ای حاشیه‌ی روده کوچک مستقر می‌باشند. این آنزیم که هم‌چنین مالتاز نامیده می‌شود، دی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدهای ناشی از هیدرولیز کربوهیدرات‌های 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 می‌دهد 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 علائم 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 می‌روند که نیمی از این گیاهان به صورت سنتی استفاده می‌شوند (۱۰). یکی از گیاهانی که در زمره گیاهان ضد دیابت قرار دارد، عنب است. عنب گیاهی درختچه‌ای، با نام علمی *ziziphus jujuba* و متعلق به خانواده عنب (*Rhamnaceae*) می‌باشد (۱۱). گونه‌های *ziziphus* به طور رایج در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف مانند اختلالات گوارشی، ضعف، دردهای کبدی، چاقی، مشکلات ادراری، دیابت، عفونت‌های پوستی، از دست دادن اشتها، تب، التهاب گلو، برونشیت، آئمی، اسهال و بی‌خوابی استفاده می‌شود (۱۲). به‌طور خاص، میوه عنب غنی از شکر، ویتامین C، بیوفلاونوئیدها،

فیبر خوراکی و مواد معدنی می باشد. عناصر دارویی مانند استرول ها، آلکالوئیدها، ساپونین ها، سروتونین، پلی فنول، فلاونوئید، تری ترپن ها و c-GMP در میوه عنب گزارش شده است. عصاره متانولی میوه عنب به طور فارماکولوژیکی دارای اثرات آنتی اکسیدان، سرکوب تکثیر سلول های سرطانی و حفاظت از کبد می باشد (۱۳). تا به حال هشت نوع فلاونوئید و نوع خاصی از پروتئوگلیکان ها از میوهی عنب استخراج گردیده است (۱۴). فلاونوئیدها متابولیت های ثانویه گیاهی هستند که گروه بزرگی از ترکیبات پلی فنلیک را نشان می دهند. این مواد طیف گسترده ای از فعالیت های بیولوژیکی مانند اثرات ضد التهابی، ضد تومور، آنتی اولسر، آنتی باکتریال و آنتی ترومبوتیک را دارند (۱۵). فلاونوئیدها نمی توانند در بدن انسان تولید شوند و از طریق رژیم غذایی روزانه جذب بدن می شوند، شواهد نشان می دهد که فلاونوئیدها نقش بیولوژیکی حیاتی، شامل پاکسازی گونه های فعال اکسیژن را ایفا می کنند (۱۶). بنابراین آن ها می توانند بدن انسان را از رادیکال های آزاد حفاظت کنند و پیشرفت تعدادی از بیماری های مزمن را مهار کنند. از نظر علمی، فعالیت آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها جهت توانایی درمانی، مورد توجه واقع شده است. به علاوه گزارش ها نشان دهنده وجود ترکیب اینولین در عنب می باشند (۱۷، ۱۸). کریستینین های A, B, C, D که نوع خاصی از ساپونین ها می باشند، نیز از دانه و میوه عنب جداسازی شده اند (۱۹). این گیاه با ترکیبات خاص خود، اثرات ضد دیابتی قابل قبولی داشته است، چنان که به طور 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 می رسد.

گلپر با نام علمی (*Heracleum persicum*)، گیاهی علفی، پایا از تیره چتریان (*Umbelliferae*)، و دارای اعضای معطر، برگ های منقسم و دندانه دار است. از مشخصات ظاهری آن گل های سفید و مجتمع به شکل

چتری بزرگ در انتهای شاخه هاست. این گیاه به عنوان ضد عفونی کننده، ضد نفخ، هضم کننده، و خوش بو کننده 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، ضد قارچ و اثرات ایمنومودولاتوری (immunomodulatory) می باشد (۲۲). بررسی فیتوشیمیایی بخش های مختلف گیاه گلپر نشان داده که این گیاه حاوی ترپنوئیدها، تری ترپن ها، فورانو کومارین ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و مواد فرار می باشد (۲۳). یکی از مکانیسم های اثرات ضد دیابتی گیاهان، مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز است که طی مهار این آنزیم، جذب کربوهیدرات ها به تاخیر می افتد و باعث کاهش قندخون بعد از صرف غذا می شود. از این رو، هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره متانولی تام گیاه عنب و گلپر بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزئی از روده باریک موش بوده و از طرفی ظرفیت آنتی اکسیدانی و محتوای پلی فنلی این گیاهان نیز تعیین می گردد.

مواد و روش ها

مواد

آکاربوز از شرکت فلوکای آلمان، واکنش گر فولن سیو کالتو، ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، سفادکس G-200، PNPG (پارا-نیترو فنیل-D-α-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 عنب 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

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 عنب)، میوه خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب الکتریکی پودر شد. سپس به میزان ۲۰۰ گرم پودر گیاه، در ۱۵۰۰ ml متانول تام حل گردید و محلول مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد تغلیظ شد. عصاره به دست آمده تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C - 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 میلی لیتر از عصاره‌ها (با غلظت‌های مختلف ۱۲۵۰-۱۵۶ μg/ml) 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 میلی لیتر از عصاره‌ها با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر، ۲/۵ میلی لیتر واکنشگر (رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱۰) و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی لیتر 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 ۷۰ °C - ذخیره شد. سپس ۳۶ گرم روده باریک به ۳۶۰ میلی لیتر بافر A (200 mM فسفات، EDTA 1 mM، pH=7، تریسین کریستالیزه 1mg/ml) اضافه شد و توسط دستگاه همزنایزر به مدت ۱۰ دقیقه همزّن شد. سپس بافت همزّن شده با دور 10000g (با دستگاه سانتریفیوژ سیگما، مدل 30KS-3، ساخت کشور آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ °C سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ 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 می گردید. 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 پی پت 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

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

سنجش غلظت پروتئين محلول

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

اندازه گیری فعاليت آنزیم آلفا-گلوکوزيداز

در تمام مراحل خاص سازی، سنجش فعاليت آنزیم صورت گرفت، به طوری که ۱۰۰ µl از آنزیم آلفا-گلوکوزيداز استخراج شده در بافر A با ۵۰ µl pNPG به عنوان سوبسترا (۵ mM، در بافر A) در چاهک های میکروپلیت ۹۶ چاهکی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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-نیترو فنول (زرد رنگ) و گلوکز هیدرولیز می شود. فعاليت آنزیمی با اندازه گیری میزان جذب پارا-نیترو فنول (زرد رنگ) اندازه گیری شد. یک واحد فعاليت آنزیم عبارتست از مقدار آنزیمی که باعث رهاسازی ۱ میکرومول PNP در مدت ۱ دقیقه تحت شرایط تعیین شده می شود (۳۰).

اندازه گیری مهار فعاليت آنزیم آلفا-گلوکوزيداز

غلظت های متفاوت نمونه عصاره گیاهی (۲۵-۳۲۰۰ µg/ml) پس از حل در DMSO، تهیه شد. ۵۰ µl محلول عصاره گیاهی با ۱۰۰ µl آلفا-گلوکوزيداز روده باریک موش موجود در بافر A، در چاهک های

میکروپلیت ۹۶ چاهکی به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. حجمی معادل ۵۰ µl از pNPG محلول (۵ mM در بافر A) به هر چاهک اضافه شد و نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه Microplate Reader (BIOTEK، مدل ELX800، USA) خوانده شد. برای هر نمونه، بلانک معجزا گذاشته شد و از آکاربوز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۳۱). این آزمایش برای هر یک از غلظت ها سه مرتبه تکرار شد. درصد مهار آنزیم آلفا-گلوکوزيداز 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 فعاليت آنزیم آلفا-گلوکوزيداز به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید.

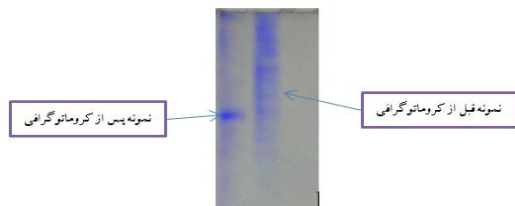
آنالیز آماری

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

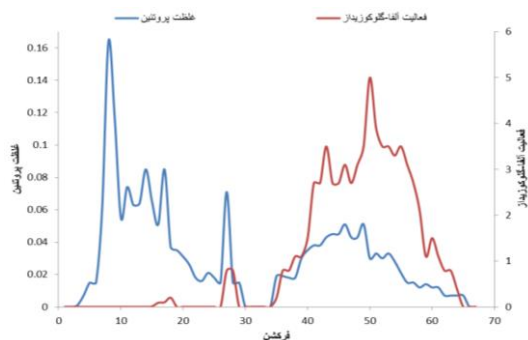
یافته ها

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 و ۲۴۳ µg/ml محاسبه گردید. میزان ترکیبات پلی فنلی توسط تست فولین سیو کالتو برای عصاره های عناب و گلپر نیز به ترتیب $36/06 \pm 2/1$ و $68/2 \pm 2/6$ برحسب میکروگرم معادل تانیک اسید در یک میلی گرم عصاره خام محاسبه شد.

(PAGE) انجام شد (تصویر شماره ۱). نمونه قبل از کروماتوگرافی (نمونه دیالیز) چندین باند را نشان داد، اما پس از کروماتوگرافی 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



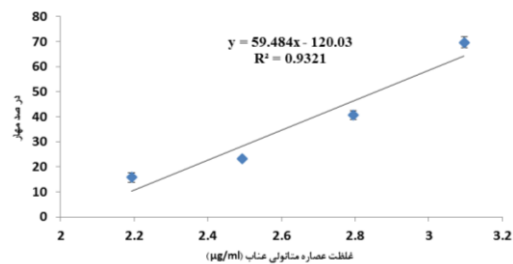
نمودار شماره ۳: بررسی میزان غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز روده باریک موش حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-200

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	۴۳۲۷	۵۶۴۰	۱/۳	۱۰۰	۱
رسوب با آمونیم سولفات	۱۰۵۰	۲۷۸۵	۱/۷	۴۹/۴	۲/۷
کروماتوگرافی سفادکس G-200	۲/۳	۱۳۶	۵۹/۱	۲/۴	۴۵/۴

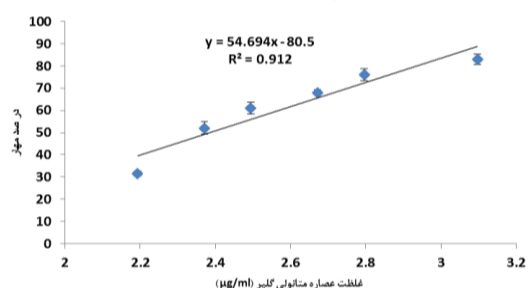
نمودارهای شماره ۴ و ۵، به ترتیب نمودارهای خطی درصد مهار آلفا-گلوکوزیداز در مقابل لگاریتم غلظت عصاره متانولی میوه عناب و گلپر را نشان می‌دهد. IC_{50} (غلظتی از نمونه که باعث مهار ۵۰ درصد فعالیت آنزیم می‌شود) عصاره گیاهی با استفاده از نمودار خطی

مهار رادیکال DPPH



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 $721 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

مهار رادیکال DPPH



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 $243 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

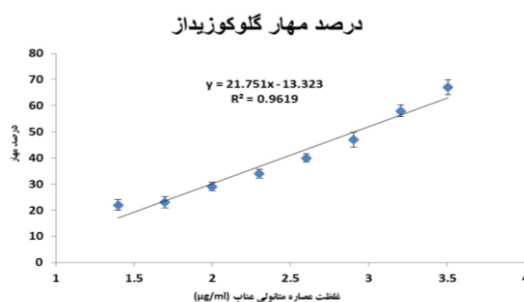
نتایج مربوط به سنجش فعالیت و پروتئین آنزیم آلفا-گلوکوزیداز روده باریک موش در مراحل مختلف تخلیص، در جدول شماره ۱ آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده در آخرین مرحله تخلیص و پس از عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، میزان فعالیت کل آنزیم در این مرحله ۱۳۶ واحد و میزان فعالیت اختصاصی آنزیم برابر با ۵۹/۱ واحد در میلی گرم 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، به منظور بررسی خلوص آنزیم آلفا-گلوکوزیداز استخراج شده از روده باریک موش، الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید

آکاربوز، بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز. IC_{50} به دست آمده برای آکاربوز برابر با $104 \mu\text{g/ml}$ و برای عنباب و گلپر به ترتیب $258 \mu\text{g/ml}$ و $815 \mu\text{g/ml}$ می باشد.

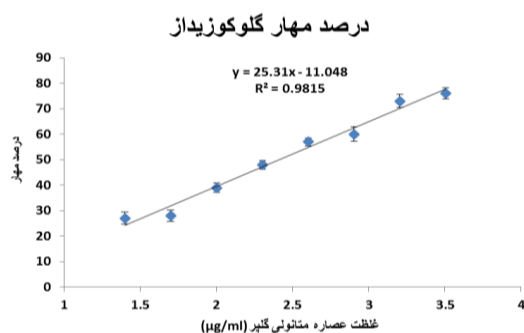
بحث

در این مطالعه اثر مهاری عصاره متانولی تام میوه عنباب 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 258 g/mL و 815 g/mL 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 میلی لیتر، 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 می کرد (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 پلی فنل‌ها و اسیدهای فنلی بودند که اثر مهاری قوی علیه هر دو آنزیم نشان دادند و میزان IC_{50} به ترتیب برابر با $16/9$ و $23/5$ میکروگرم بر میلی لیتر 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 عنباب و گلپر مورد سنجش قرار گرفت. نتایج بررسی محتوای پلی فنلی نشان داد که این دو گیاه به ترتیب حاوی $36/06 \pm 2/1$ و $68/2 \pm 2/6$ میکروگرم

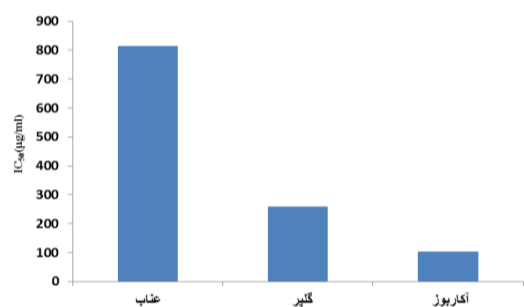
به دست آمده، برای عنباب برابر با $815 \mu\text{g/ml}$ و برای گلپر $258 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. نمودار شماره ۶، مقایسه IC_{50} عصاره متانولی میوه عنباب و گلپر با IC_{50} آکاربوز، بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را نشان می دهد. IC_{50} اثر آکاربوز به عنوان کنترل مثبت بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز برابر با $104 \mu\text{g/ml}$ محاسبه گردید.



نمودار شماره ۴: نمودار خطی درصد مهار آلفا-گلوکوزیداز در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه عنباب. IC_{50} به دست آمده برابر با $815 \mu\text{g/ml}$ می باشد. تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.



نمودار شماره ۵: نمودار خطی درصد مهار آلفا-گلوکوزیداز در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه گلپر. IC_{50} به دست آمده برابر با $258 \mu\text{g/ml}$ می باشد. تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.



نمودار شماره ۶: مقایسه IC_{50} عصاره متانولی گیاهان با IC_{50}

تانیک اسید به ازای هر میلی گرم عصاره خام می باشند و از طرفی بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی عنب و گلپر با تست DPPH نشان داد که این گیاهان به ترتیب دارای IC_{50} برابر با $721 \mu g/ml$ و $243 \mu g/ml$ می باشند که دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بالایی می باشند. در سال ۲۰۰۷ نیز، Coruh و همکاران محتوای پلی فنلی عصاره متانولی گیاه گلپر و ظرفیت آنتی اکسیدانی آن را با تست DPPH اندازه گیری کردند که محتوای پلی فنلی آن حدود $59/6$ میکروگرم گالیک اسید به ازای هر میلی گرم عصاره خام بود و IC_{50} تست DPPH برای این گیاه معادل $438 \mu g/ml$ گزارش شد (۳۴). از آنجایی که گزارش شده است که ترکیباتی که دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند، با مهار گونه های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپر اکسید ($O_2^{\cdot -}$) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) موجب مهار آنزیم آلفا-گلوکزیداز می شوند (۳۵) و با توجه به این که Shobana و همکاران، پلی فنل ها را و Kim و همکارانش فلاونوئیدها را به عنوان مهارکننده قوی آنزیم آلفا-گلوکزیداز معرفی کردند، می توان یکی از علل مهار این آنزیم توسط عصاره متانولی عنب و گلپر را به ظرفیت آنتی اکسیدانی و محتوای پلی فنلی و فلاونوئیدی آنها نسبت داد. هم چنین مطالعات نشان داده اند که عنب دارای عناصر دارویی مانند استرول ها، آلکالوئیدها، ساپونین ها، سروتونین، پلی فنول، فلاونوئید، تری ترین هاو تانن ها می باشد (۱۱، ۱۳) و از طرفی Luo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثر مهاري قابل توجه ساپونین ها بر مهار آلفا گلوکزیداز را نشان داده بودند (۳۶). پس می توان یکی دیگر از علل مهار این آنزیم توسط عصاره متانولی عنب 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 هم چنین ساپونین، اثر مهاري قابل توجهی بر روی آنزیم آلفا-گلوکزیداز دارند و به علت وجود این ترکیبات در گیاه عنب و گلپر انتظار می رود که این گیاهان اثر مهاري قابل توجهی بر این آنزیم داشته باشد و می توان

یکی از مکانیسم های اثر ضد دیابتی گیاه عنب را با مهار آنزیم آلفا-گلوکزیداز و کاهش قندخون بعد از صرف غذا توجیه کرد.

استفاده مداوم از آکاربوز و دیگر داروهای مهارکننده آنزیم آلفا-گلوکزیداز با عوارض جانبی نامطلوب مانند سمیت کبدی و علائم سوء گوارشی مرتبط می باشد (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 آنزیم های کبدی (ALT و AST) در سرم موش ایجاد نمی کند (۳۷). بنابراین از آنجایی که این گیاه فاقد اثرات مسمومیت کبدی و هم چنین دارای اثرات ضد نفخ است و به طور سنتی جهت درمان ناراحتی های گوارشی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۰) و از آنجایی که گیاه عنب و خانواده گیاهان ziziphus در طب سنتی برای درمان بیماری های مختلف مانند اختلالات گوارشی، اسهال، دردهای کبدی، چاقی و دیابت استفاده می شود (۱۲) و با توجه به ظرفیت آنتی اکسیدانی، محتوای پلی فنلی عنب و گلپر و ساپونین بالای عنب، و اثر مهاري قابل توجه این گیاهان بر آنزیم آلفا-گلوکزیداز، 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 مهاري بیش تر و یا دارای محتوای پلی فنلی، ساپونین و ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتر است. از این رو پیشنهاد می شود در مطالعات آینده، جهت شناسایی بخش موثره میوه عنب و گلپر، فرکشن های مختلف این عصاره گیاهی جداسازی شده و اثرات مهاري فرکشن های مختلف بر روی آنزیم آلفا-گلوکزیداز مورد سنجش قرار گیرد و از طرفی محتوای پلی فنولی، ساپونین و ظرفیت آنتی اکسیدانی 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.

سپاسگزاری

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.

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

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 for cardiovascular 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. Ettxeberria U, de la Garza AL, Campion J, Martinez JA, Milagro FI. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis 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 lanciafolia*. *J Food 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, Kesari AN, 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, Lee SP. Enhancing the organoleptic and functional properties of jujube by a quick aging process. *Prev Nutr Food Sci* 2013; 18(1): 50-59.
14. Ebrahimim S, Ashkani-Esfahani S, Poormahmud A. Investigating the efficacy

- 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 *Zizyphus 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 *Zizyphus 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, Jamalani M. Inhibitory Effect of *Heracleum persicum* and *Zizyphus 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-inflammatory 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, Ahangarpour 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 archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature 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.

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, Kwon CS, 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 α -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 macropodium* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. 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 α -glucosidase 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).