

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

Sahar Sadegh-Nejadi<sup>1</sup>,  
Mohammad Aberomand<sup>2</sup>,  
Mohammad Ali Ghaffari<sup>3</sup>,  
Ghorban Mohammadzadeh<sup>2</sup>,  
Amir Siahpoosh<sup>4</sup>,  
Reza Afrisham<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MSc Student in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

<sup>4</sup> 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<sub>50</sub> value of extracts on alpha-glucosidase enzyme was obtained and compared with acarbose IC<sub>50</sub>. 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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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).



آلفا-گلوکوزیداز (Glucoside glucohydrolase)-  
 $\alpha$ -D آنزیمی است که در سلول‌های شانه‌ای حاشیه‌ی  
 روده کوچک مستقر می‌باشند. این آنزیم که هم‌چنین  
 مالتاز نامیده می‌شود، دی ساکاریدها 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 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 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،  
 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 بیماری‌های  
 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،

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 ( $O^{2-}$ ) 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).

چتری بزرگ در انتهای شاخه هاست. این گیاه به‌عنوان 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 ایمنومدولاتوری (immunomodulatory) می‌باشد (۲۲). بررسی فیتوشیمیایی بخش‌های مختلف گیاه گلپر نشان داده که این گیاه حاوی ترپنوئیدها، تری‌ترین‌ها، فورانو کومارین‌ها، 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 کربوهیدرات‌ها به تاخیر می‌افتد و باعث کاهش قندخون بعد از صرف غذا می‌شود. از این رو، هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره متانولی تام گیاه عناب و گلپر بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز تخلیص شده جزئی از روده باریک موش بوده و از طرفی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای پلی‌فنلی این گیاهان نیز تعیین می‌گردد.

## مواد و روش‌ها

### مواد

آکاربوز از شرکت فلوکای آلمان، واکنش گر فولن سیوکالتو، ۲، ۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، سفادکس G-200، PNPG (پارا-نیتروفنیل- $\alpha$ -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 فروشگاه‌های 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

فیبر خوراکی و مواد معدنی می‌باشد. عناصر دارویی مانند استرول‌ها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، سروتونین، پلی‌فنول، فلاونوئید، تری‌ترین‌ها و c-GMP در میوه عناب گزارش شده است. عصاره متانولی میوه عناب به‌طور فارماکولوژیکی دارای اثرات آنتی‌اکسیدان، سرکوب تکثیر سلول‌های سرطانی و حفاظت از کبد می‌باشد (۱۳). تا به حال هشت نوع فلاونوئید و نوع خاصی از پروتوگلیکان‌ها 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، آنتی‌باکتریال و آنتی‌ترومبوتیک را دارند (۱۵). فلاونوئیدها نمی‌توانند 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 می‌کنند (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 (۱۷، ۱۸). 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

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  $7^{\circ}\text{C}$  - 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 همزرن شد. سپس بافت همزرن شده با دور 10000g (با دستگاه سانتریفیوژ سیگما، مدل 30KS-3، ساخت کشور آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه در  $4^{\circ}\text{C}$  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 پرستالتیک، جریان بافر A روی ستون

*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 ۱۵۰۰ ml متانول تام حل گردید و محلول مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵-۲۰ 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  $20^{\circ}\text{C}$  - 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) 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ۷/۵ درصد وزن در حجم اضافه شد. محلول حاصل ۲

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 فعالیت آنزیم سنجیده شد (۲۸).

#### سنجش غلظت پروتئین محلول

سنجش غلظت پروتئین 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 فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

در تمام مراحل خاص سازی، سنجش فعالیت آنزیم صورت گرفت، به طوری که ۱۰۰ μl از آنزیم آلفا-گلوکوزیداز استخراج شده در بافر A با ۵۰ μl pNPG به عنوان سوبسترا (5 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-نیتروفنول (زرد رنگ) و گلوکز هیدرولیز می شود. فعالیت آنزیمی با اندازه گیری میزان جذب پارا-نیتروفنول (زرد رنگ) اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت 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 فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

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-گلوکوزیداز 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 (5 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-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.

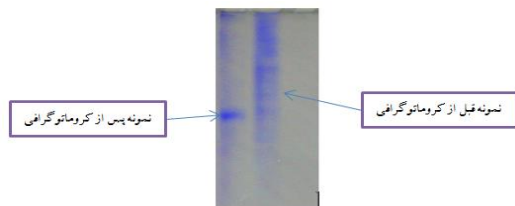
#### آنالیز آماری

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.

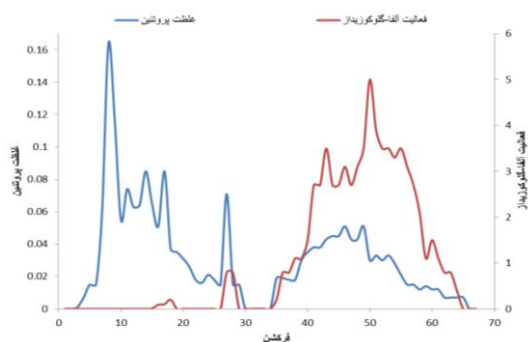
## یافته ها

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 سیوکالتو برای عصاره های عناب و گلپر نیز به ترتیب  $۳۶/۰۶ \pm ۲/۱$  و  $۶۸/۲ \pm ۲/۶$  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 جزئی از روده باریک موش



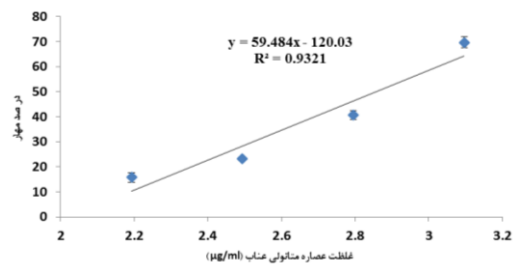
نمودار شماره ۳: بررسی میزان غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز روده باریک موش حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-200

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	۴۳۷	۵۶۴۰	۱۳	۱۰۰	۱
رسوب با آمونیم سولفات	۱۰۵۰	۲۷۸۵	۱۷	۴۹/۴	۲/۷
کروماتوگرافی سفادکس G-200	۲۳	۱۳۶	۵۹/۱	۲/۴	۴۵/۴

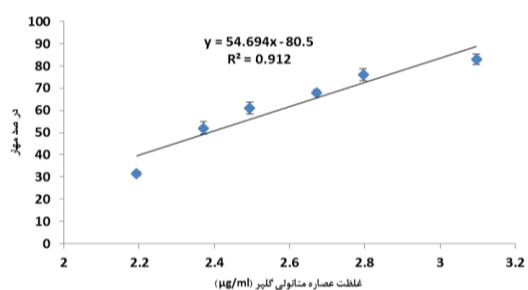
نمودارهای شماره ۴ و ۵، به ترتیب نمودارهای خطی درصد مهار آلفا-گلوکوزیداز در مقابل لگاریتم غلظت عصاره متانولی میوه عناب و گلپر را می‌دهد. IC<sub>50</sub> (غلظتی از نمونه که باعث مهار ۵۰ درصد فعالیت آنزیم می‌شود) عصاره گیاهی با استفاده از نمودار خطی

مهار رادیکال DPPH



نمودار شماره ۱: نمودار خطی درصد مهار رادیکال DPPH در مقابل لگاریتم غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه عناب، IC<sub>50</sub> به دست آمده برابر با ۷۲۱ µg/ml می‌باشد تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت ± 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<sub>50</sub> به دست آمده برابر با ۲۴۳ µg/ml می‌باشد. تست‌ها ۳ بار تکرار گردیده و نتایج به صورت ± انحراف معیار گزارش شده است.

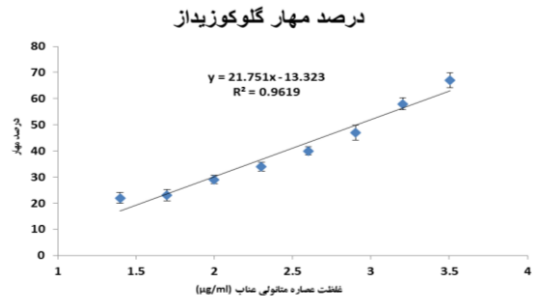
نتایج مربوط به سنجش فعالیت و پروتئین آنزیم آلفا-گلوکوزیداز روده باریک موش در مراحل مختلف تخلیص، در جدول شماره ۱ آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده در آخرین مرحله تخلیص و پس از عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، میزان فعالیت کل آنزیم در این مرحله ۱۳۶ واحد و میزان فعالیت اختصاصی آنزیم برابر با ۵۹/۱ واحد در 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 عناب و گلپر به ترتیب  $258 \mu\text{g/ml}$  و  $815 \mu\text{g/ml}$  می باشد.

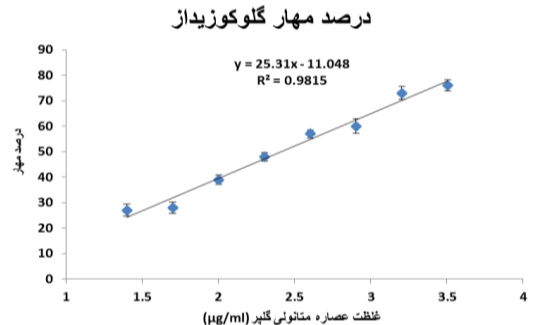
## بحث

در این مطالعه اثر مهاری عصاره متانولی تام میوه 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  $258$  و  $815 \mu\text{g/ml}$  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  $0.5$  میلی گرم در میلی لیتر، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را  $36$  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 عناب 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

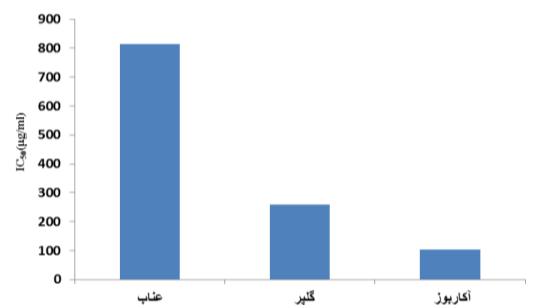
به دست آمده، برای عناب برابر با  $815 \mu\text{g/ml}$  و برای گلپر  $258 \mu\text{g/ml}$  محاسبه شد. نمودار شماره ۶، مقایسه  $IC_{50}$  عصاره متانولی میوه عناب و گلپر با  $IC_{50}$  آکاربوز، بر فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را نشان می دهد.  $IC_{50}$  اثر آکاربوز به عنوان کنترل مثبت بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز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

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 علائم 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 هم چنین 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 مهارتی قابل توجه این گیاهان بر آنزیم آلفا-گلوکوزیداز، می‌توان 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 مهارتی بیش تر 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 مهارتی فرکشن‌های 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.

تانیک اسید به ازای هر میلی گرم 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  $243$  و  $721 \mu g/ml$  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  $59/6$  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 آنتی‌اکسیدانی هستند، با مهار گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، سوپراکسید ( $O_2^-$ ) و رادیکال هیدروکسیل (OH) موجب مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز می‌شوند (۳۵) و با توجه به این که Shobana و همکاران، پلی‌فنل‌ها 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 پلی‌فنلی و فلاونوئیدی آنها نسبت داد. هم چنین مطالعات نشان داده‌اند که عناب دارای عناصر دارویی مانند استرول‌ها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، سروتونین، پلی‌فنول، فلاونوئید، تری‌ترین‌هاو تانن‌ها می‌باشد (۱۱، ۱۳) و از طرفی Luo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثر مهارتی 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، پلی‌فنل و فلاونوئیدها و هم چنین ساپونین، اثر مهارتی 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 مهارتی قابل توجهی بر این آنزیم داشته باشد و می‌توان

## 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

- King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. *Diabetes Care* 1993; 16(1): 157-177.
- Baron AD. Postprandial hyperglycaemia and alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 40(Suppl): S51-55.
- 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.
- Murugan P, Pari L. Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* 2006; 79(18): 1720-1728.
- O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/ hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 2007; 100(5): 899-904.
- 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.
- Kim KY, Nguyen TH, Kurihara H, Kim SM. a-Glucosidase inhibitory activity of bromophenol purified from the red alga *Polyopes lancifolia*. *J Food Sci* 2010; 75(5): 145-150.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ebrahimim S, Ashkani-Esfahani S, Poormahmudibs 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*, 2<sup>th</sup> ed. Bishen Singh Mahendra, Pal Singh. 1918.
  20. Afrisham R, Aberomand M, Ghaffari MA, Siahpoosh A, Jamalana 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  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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-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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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).