بررسی اثر عصاره‌های قطبی و غیرقطبی ژل برگ گیاه صبرزرد (*Aloe vera* L.)، بر فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در محیط برون‌تنی

حسن فلاح‌حسینی[۱]، بهور اصغری[۲]، ژینوس عسگرپناه[۳]، علی بابایی زارچ[٤]، طاهره اقبالی زارچ[٥]*

۱- استادیار پژوهش، گروه فارماکولوژی و طب کاربردی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
۲- استادیار، گروه تولید و اصلاح نباتات، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
۳- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
٤- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید صدوقی، یزد، ایران
٥- مربی، گروه فارماکوگنوزی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان شریعتی، قلهک، خیابان یخچال، دانشکده داروسازی واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تلفن و نمابر: ۲۲٦٤۰۰٥۱ (۰۲۱)
پست الکترونیک: eghbali.tahereh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۸ **تاریخ تصویب:** ۹۲/٥/۱٦

چکیده

مقدمه: آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در مجاری گوارشی نقش مهمی در فرآیند تبدیل پلی‌ساکاریدها به گلوکز ایفا می‌کنند. مهار فعالیت این دو آنزیم یکی از روش‌های پیشگیری از افزایش گلوکز خون بعد از غذا، در بیماران دیابتی می‌باشد.

هدف: در این مطالعه تأثیر عصاره‌های مختلف ژل برگ گیاه صبر زرد (*Aloe vera* L.)، بر مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در محیط برون‌تنی بررسی شد.

روش بررسی: از پودر ژل برگ صبرزرد توسط حلال‌های هگزان، کلروفرم، اتیل استات و متانول فراکسیون‌های مختلف تهیه شد. اثر بازدارندگی عصاره‌های به دست آمده بر فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز بررسی شد. در این آزمایش، غلظتی از هر عصاره که برای مهار ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم‌ها مورد نیاز است (IC_{50}) به دست آمد و با مقدار مورد نیاز از آکاربوز، به عنوان کنترل مثبت مقایسه شد.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان داد که درصد مهارکنندگی عصاره متانولی تام ژل گیاه صبرزرد بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در مقایسه با دیگر فراکسیون‌ها به صورت معنی‌داری بیشتر، ولی در مقایسه با آکاربوز کمتر بود. درصد مهاری عصاره متانولی و فراکسیون‌های اتیل استاتی و متانولی بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در مقایسه با دیگر فراکسیون‌ها و همچنین در مقایسه با آکاربوز به صورت معنی‌داری بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: عصاره تام متانولی ژل برگ گیاه صبرزرد اثر مهاری قوی‌تری روی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در مقایسه با فراکسیون‌های هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی داشت.

گل‌واژگان: صبرزرد، آلفا آمیلاز، آلفا گلوکوزیداز، دیابت، مهار آنزیم

مقدمه

دیابت، شایع‌ترین بیماری متابولیک، شامل گروهی از اختلالات متابولیسمی است که با درجات متفاوتی از فقدان ترشح انسولین، مقاومت به انسولین و اختلال در ترشح انسولین بروز می‌کند و اولین مشخصه آن افزایش سطح گلوکز در خون است. تقریباً شش درصد جمعیت دنیا مبتلا به دیابت هستند و ۹۰ تا ۹۵ درصد از این افراد از دیابت نوع ۲ رنج می‌برند [۲، ۱]. بی‌گوانیدها، سولفونیل اوره‌ها، تیازولیدین دیون‌ها و مهارکننده‌های آلفاگلوکزیداز از مهم‌ترین داروهای خوراکی ضد افزایش گلوکز خون هستند که جهت کنترل دیابت نوع ۲ مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگر چه داروهای نامبرده قادر به کنترل افزایش گلوکز خون هستند ولی بدن بسیاری از بیماران به استفاده از این داروها مقاومت نشان می‌دهد و حتی بعضی از مبتلایان قادر به تحمل این داروها نیستند و یا با عوارض نامطلوب مواجه می‌شوند [٤، ۳]. بسیاری از بیماران دیابتی علاوه بر داروهای رایج جهت کنترل بیماری، تمایل فراوانی به مصرف گیاهان دارویی از خود نشان می‌دهند حتی در مواردی بدون مشورت با پزشک از آنها استفاده می‌کنند [۵].

در مطالعات اتنوبوتانیک، بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی با اثرات ضددیابت گزارش شده است [٦]. گیاه صبر زرد متعلق به تیره *Aloaceae* است که بیش از ٤٥٠ گونه از آن در جهان وجود دارد و نوع دارویی آن *Aloe vera* L. می‌باشد که بومی مناطق حاره‌ای است. صبرزرد دارای برگ‌های کلفت، ستبر و گوشتی بوده و درون برگ‌ها ژل شفافی وجود دارد که کلیه خواص دارویی این گیاه مربوط به آن می‌باشد [۷] ژل برگ این گیاه دارای ترکیبات فعال زیادی از جمله پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها، آنتراکینین‌ها، فلاونوییدها، استرول‌ها و ساپونین‌ها است [۹، ۸]. اثر ضددیابتی برگ این گیاه در مطالعات متعددی روی حیوانات آزمایشگاهی دیابتی گزارش شده است [۱۲ – ۱۰].

یکی از مشکلات تجویز گیاهان دارویی با اثرات ضددیابت، نامشخص بودن مکانیسم اثر اغلب آنها در کاهش سطح گلوکز خون است که شناسایی مکانیسم اثر آنها در پیشگیری از تداخلات دارویی با داروهای رایج حیاتی است. مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در مجاری گوارشی یکی از مکانیسم‌های تأثیر گروهی از داروهای رایج مورد استفاده در کنترل بیماری دیابت است [۱۳]. این آنزیم‌ها نقش مهمی در هیدرولیز کردن پلی‌ساکاریدهای مواد غذای در مجاری گوارشی و تبدیل آنها به قندهای ساده قابل جذب دارند که این امر در حقیقت عامل اصلی افزایش سطح گلوکز خون بعد از غذا می‌باشد. مهار فعالیت این دو آنزیم بخصوص در بیماران دیابتی در جذب گلوکز از دستگاه گوارش و در نتیجه پیشگیری از افزایش سطح گلوکز خون بعد از غذا مؤثر است [١٤]. در حال حاضر داروهایی مانند آکاربوز، میگلیتول و وگلیبوز جهت مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز استفاده می‌شوند. اما استفاده از این داروها به واسطه عوارض جانبی نظیر نفخ و مشکلات گوارشی در بسیاری از بیماران می‌شود [۱۵]. جهت مقابله با این مشکل تحقیقات برای یافتن مهارکننده‌های جدیدتر که از یک طرف توانایی بالاتری در زمینه بازدارندگی آنزیم‌های مذکور داشته باشند و از طرف دیگر عوارض جانبی داروهای فعلی را نداشته باشند در جریان است. گیاهان دارویی و به ویژه عصاره‌های به دست آمده از آنها از مهم‌ترین منابعی هستند که به نظر می‌رسد می‌توانند جایگزین مناسبی برای داروهای موجود باشند [١٦] به همین دلیل در این پژوهش قدرت مهارکنندگی عصاره‌هایی با قطبیت‌های مختلف از گیاه *Aloe vera* L. بر روی دو آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. تهیه عصاره‌های مختلف از این گیاه به این دلیل انجام شد که بتوان به این طریق یک جداسازی اولیه بین ترکیبات مختلف موجود در گیاه انجام داد.

مواد و روش‌ها

مواد: ۵،۳- دی نیتروسالیسیلیک اسید، سدیم پتاسیم تارتارات، آکاربوز، DMSO و آلفا گلوکوزیداز مخمر، آنزیم آلفا آمیلاز پانکراس خوکی که از شرکت سیگما خریداری شدند. متانول، اتیل استات، کلروفرم، هگزان، کلرید سدیم،

هیدروکسید سدیم، نشاسته سیب زمینی، *p*- (pNPG) nitrophenyl-α-D-glucopyranoside و فسفات سدیم از شرکت مرک خریداری شدند.

پودر ژل برگ گیاه صبرزرد: پودر ژل برگ صبرزرد از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی خریداری شد. طبق ادعای این مرکز پودر گیاه از روش بدون اعمال حرارت تهیه شده است.

فرآیند عصاره‌گیری: حلال‌های مورد استفاده جهت تهیه فراکسیون‌های مورد نظر به ترتیب شامل هگزان، کلروفرم، اتیل استات و متانول بود. عمل عصاره‌گیری از پودر ژل گیاه صبرزرد به روش پرکولاسیون انجام گرفت. ابتدا یک تکه پنبه در انتهای دستگاه پرکولاتور قرار داده شد و سپس پودر ژل گیاه صبرزرد به طور یکنواخت در پرکولاتور ریخته شد و سپس حلال مورد نظر بر روی گیاه اضافه شد. برای تهیه فراکسیون‌ها ابتدا از حلال هگزان استفاده شد. پس از جمع‌آوری عصاره‌ی هگزانی که ۳ روز به طول انجامید (در ۳ مرحله‌ی یک روزه)، پودر ژل گیاه کاملاً خشک و سپس حلال بعدی که کلروفرم بود بر روی آن اضافه شد و این کار به همین ترتیب تا حلال‌های بعدی (اتیل استات و متانول) نیز ادامه پیدا کرد. لازم به ذکر است در این بررسی از متانول جهت تهیه عصاره تام استفاده شد.

تغلیظ عصاره های تهیه شده: پس از جمع‌آوری عصاره‌ها، حلال آنها توسط دستگاه روتاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد و با قرار دادن عصاره‌های تغلیظ شده در هوای آزاد، عصاره‌ها بسته به میزان فرار بودن حلال بین ۱ الی ۱۵ روز کاملاً حلال خود را از دست داده و خشک شدند. عصاره تام تهیه شده و فراکسیون‌های ژل برگ گیاه در ویال‌هایی که از قبل توزین شده بودند، ریخته شد و درب آنها با فویل آلومینیومی بسته و برای مرحله‌ی بعد، یعنی اندازه‌گیری میزان مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز نگهداری شد. غلظت‌های آنزیم‌ها و عصاره‌های گیاهان به کار رفته بر اساس مطالعات قبلی روی گیاهان دارویی [۱۷] و بر اساس انجام تست‌های اولیه به صورت پایلوت در آزمایشگاه به دست آمد.

روش کار

تست مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز

با توجه به روش گزارش شده توسط مکیو (McCue) و همکارانش و با اندکی تغییر در آن، مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز توسط عصاره‌های گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۹، ۱۸]. در این بررسی از ماده pNPG به عنوان سوبسترا استفاده شد که توسط آنزیم آلفا گلوکوزیداز، به پارا – نیتروفنول (زرد رنگ) و گلوکز هیدرولیز می‌شود. فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری میزان جذب پارا– نیتروفنول تولید شده در محلول تعیین می‌شود. در صورتی که عصاره‌ی گیاهی دارای اثر مهارکنندگی آنزیم آلفا گلوکوزیداز باشد شاهد جذب پایین‌تری در مقایسه با کنترل (واکنش بدون مهارکننده) خواهیم بود.

مخلوط واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر آلفا گلوکوزیداز (۰/۲۵ unit/ml)، ۱۳۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ mM (pH ٦/٨) و ۱۰ میکرولیتر از نمونه آزمایش در غلظت‌های مختلف بود. این مخلوط در میکروپلیت‌های ۹٦ چاهکی تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از خارج کردن پلیت از انکوباتور، واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر ازمحلول ۵ mM، pNPG آغاز شد. مخلوط واکنش مجدداً در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. در نهایت با اضافه کردن ۸۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۰/۲ M واکنش متوقف شد. جذب محیط در طول موج ٤٠٥ نانومتر توسط دستگاه microplate reader (BioTek XS2) خوانده شد. از مخلوط واکنش بدون عصاره‌ی گیاهی به عنوان کنترل و مخلوط واکنش بدون آنزیم آلفا گلوکوزیداز به عنوان بلانک استفاده شد. این آزمایش برای هر یک از غلظت‌ها سه مرتبه تکرار شد.

درصد مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز توسط نمونه‌ها با کمک فرمول زیر محاسبه شد [۱۹]:

$$\text{درصد مهار} = \left(\frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}}\right) \times 100$$

لازم به ذکر است که در این تست از آکاربوز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تست مهار آنزیم آلفا آمیلاز

تست مهار آنزیم آلفا آمیلاز با اندکی تغییر در روش میلر و با اندازه‌گیری میزان کاهش قدرت آزادسازی اولیگوساکارید از محلول نشاسته انجام شد [۲۱، ۲۰]. در این بررسی از میکروپلیت ۹۶ چاهکی استفاده شد که حجم کل مواد موجود در هر چاهک ۲۵۰ میکرولیتر بود. واکنش حاوی بافر فسفات ۱۰۰ mM (pH 6.8)، کلرید سدیم ۱۷ mM، ۱/۵ میلی‌گرم نشاسته محلول، ۵۰ میکرولیتر محلول مهارکننده در DMSO با غلظت‌های مختلف و ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیم (۲۵ unit/ml) بود. پس از اینکه میکروپلیت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد، واکنش با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر سود (N ۲) و ۲۰ میکرولیتر معرف رنگی (۳ و ۵- دی- نیترو سالیسیلیک اسید ٤/٤ µM، سدیم پتاسیم تارتارات تتراهیدرات ۱۰٦ µM و سود ٤۰ µM) متوقف شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با اندازه‌گیری جذب مخلوط در طول موج ٥٤۰ نانومتر با کمک دستگاه microplate reader (BioTek XS2) مشخص شد. مخلوط بلانک برای تصحیح جذب نمونه مورد استفاده قرار گرفت که در آن آنزیم با محلول بافر جایگزین شده بود. همچنین با استفاده از واکنش کنترل که در آن DMSO جایگزین عصاره گیاهی شده بود، حداکثر فعالیت آنزیم تعیین شد. میزان مالتوز تولید شده از فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز با استفاده از منحنی کالیبراسیون مالتوز که در محدوده (W/V) ۰/۲۵- ۰ درصد رسم شده بود، محاسبه شد.

تمام آزمایش‌ها با سه مرتبه تکرار انجام شد و آکاربوز به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. درصد مهار آنزیم آلفا آمیلاز از طریق معادلات زیر محاسبه شد [۲۱]:

$$\text{درصد واکنش} = \frac{\text{میانگین مالتوز در نمونه}}{\text{میانگین مالتوز در کنترل}} \times 100$$

$$\text{درصد مهار} = 100 - \text{درصد واکنش}$$

برای به دست آوردن IC_{50} برای آکاربوز و عصاره‌های مختلف ژل برگ گیاه صبرزرد در مهار دو آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز غلظت‌های مختلف از آنها تهیه شد و میزان بازدارندگی هر کدام از این محلول‌ها بر اساس روش‌های فوق‌الذکر به دست آمد.

غلظت‌های به کار رفته از آکاربوز برای هر کدام از تست‌ها به شرح زیر می‌باشند:

آنزیم آلفا آمیلاز: ۸۰ و ٤۰، ۲۰، ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر

آنزیم آلفا گلوکوزیداز: ۱۰ و ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر

به منظور بررسی اثر مهاری عصاره‌های مختلف صبرزرد بر فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز محدوده‌های غلظتی مختلفی از عصاره‌ها ابتدا مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت غلظت‌های مناسب از عصاره‌ها انتخاب شد.

در بررسی مربوط به آنزیم آلفا آمیلاز، غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌های مختلف به شرح زیر می‌باشد:

عصاره تام متانولی و فراکسیون متانولی: ۸۰ و ٤۰، ۲۰، ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر

فراکسیون‌های اتیل‌استات، کلروفرم و هگزان: ۱۰۰ و ۷۵، ۵۰، ۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر

اثر مهاری هر عصاره در هر غلظت با سه مرتبه تکرار اندازه‌گیری شد.

در بررسی مربوط به آنزیم آلفا گلوکوزیداز غلظت‌های تهیه شده از عصاره‌های مختلف به شرح زیر می‌باشند:

عصاره تام متانولی و فراکسیون‌های اتیل‌استات، کلروفرم و متانول: ۱۰ و ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر

فراکسیون هگزان: ٤۰ و ۲۰، ۱۰، ۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر

در این تست نیز اثر مهاری هر عصاره در هر غلظت با سه مرتبه تکرار اندازه‌گیری شد.

محاسبات آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش داده شده است. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون One-Way Anova/ Tukey-

test و با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism 5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

میزان مهارکنندگی آکاربوز، عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف ژل برگ گیاه صبرزرد بر آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز به ترتیب در جدول شماره‌های ۱ و ۲ و نمودار شماره ۱ خلاصه شده است.

IC_{50} آکاربوز و عصاره‌های مختلف حاصل از پودر ژل گیاه صبر زرد، با رسم نمودار درصد بازدارندگی بر حسب غلظت نمونه، به دست آمد. IC_{50} آکاربوز برای آنزیم آلفا آمیلاز برابر ۱/۹ ± ۲۵/٤ میکرولیتر در میلی‌لیتر و برای آنزیم آلفا گلوکوزیداز برابر ۰/٦ ± ۸/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. به عبارت دیگر ۲۵/٤ میکروگرم در میلی‌لیتر غلظتی است که در آن آکاربوز می‌تواند موجب مهار ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز شود و نیز ۸/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر غلظتی است که در آن آکاربوز می‌تواند ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز را مهار کند.

نتایج تأثیر عصاره تام متانولی و فراکسیون‌های پودر ژل برگ گیاه صبرزرد بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز حاکی از آن است که بهترین IC_{50} مربوط است به تأثیر عصاره تام متانولی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ۱/۳ ± ۲۸/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر است ولی این اثر در مقایسه با آکاربوز ضعیف‌تر است. اثر بازدارندگی مربوط به فراکسیون‌های اتیل استاتی، هگزانی، کلروفرمی و متانولی ژل برگ گیاه صبرزرد بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز به صورت معنی‌داری ضعیف‌تر از اثر عصاره تام متانولی و آکاربوز است. نتایج تأثیر عصاره تام متانولی و فراکسیون‌های پودر ژل برگ گیاه صبرزرد بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز حاکی از آن است که بهترین IC_{50} ناشی از تأثیر عصاره تام متانولی (۰/۱ ± ۲/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. میزان IC_{50} مربوط به فراکسیون‌های اتیل استاتی(۰/۱ ± ۳/٤) و متانولی(۰/۱ ± ۲/۷) از قدرت بالاتری در مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز نسبت به آکاربوز (۰/٦ ± ۸/۵) به عنوان ماده استاندارد و فراکسیون‌های هگزانی (۱/۲ ± ۹/۱) و کلروفرمی (۰/۸ ± ۸/۷) ژل برگ گیاه صبرزرد داشتند.

بحث

در این پژوهش تأثیر عصاره‌های مختلف ژل خشک شده گیاه صبرزرد که توسط چندین حلال مختلف تهیه شده بود بر مهار آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز آزمایش شد. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره متانولی تام پودر ژل برگ گیاه صبرزرد اثر مهاری بالایی روی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز داشت که نسبت به اثر مهاری فراکسیوهای اتیل استاتی، هگزانی، کلروفرمی و متانولی قوی‌تر بود. به علاوه این اثر با آکاربوز که جزء داروهای کاهنده گلوکز خون در بیماران دیابتی می‌باشد، قابل مقایسه بود. این مطالعه در راستای مطالعات قبلی است که مدعی شده بودند حلال قطبی بیشترین ترکیبات را از ژل صبر زرد جدا سازی می‌کند [۹].

آنزیم‌های آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز دو آنزیم مهم در مجاری گوارشی انسان هستند که پلی‌ساکاریدهای موجود در غذا را هیدرولیز و تبدیل به قندهای ساده قابل جذب به بدن می‌کنند [۱۳]. مهار این دو آنزیم نقش مهمی در کاهش جذب قند غذایی موجود در مجاری گوارشی انسان دارد [١٤]. دلیل مهار این دو آنزیم توسط ژل گیاه صبرزرد هنوز مشخص نیست. ولی گزارش شده است که ترکیباتی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند با مهار رادیکال آزاد اکسیژن موجب مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز می‌شوند [۲۲]. خواص آنتی‌اکسیدانی از ژل برگ گیاه صبرزرد در چند گزارش منتشر شده است. در دو گزارش تجویز ژل برگ گیاه صبرزرد به موش‌های دیابتی موجب بهبود در سطح گلوکز خون شده است و محققان مدعی هستند که ژل برگ گیاه صبرزرد با مهار استرس اکسیداسیون باعث این اثرات شده است [٢٤، ۲۳]. در راستای این ادعا در مطالعه دیگر اثر ضد دیابتی ۵ نوع ترکیبات فیتوسترولی استخراج شده از ژل صبرزرد در موش سوری دیابتی تأیید شد [۲۵]. همچنین ترکیب دیگری به نام آلورزین A با خواص

مهار آنزیم آلفا آمیلاز از ژل صبرزرد چینی استخراج شده است [۲۶]. لذا در مطالعه حاضر جهت توجیه مکانیسم مهاری ژل صبرزرد روی آنزیم‌های آلفا گلوکوزیداز و آلفاآمیلاز این احتمال وجود دارد که ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی با درصد بالاتری توسط عصاره متانولی استخراج شدند و این اثر آنتی‌اکسیدانی باعث مهار این دو آنزیم شده است [۱۶]. از طرف دیگر ماده مؤثره شاخص موجود در ژل صبرزرد پلی‌ساکاریدی است به نام آسمانان با درجه حلالیت بالا در حلال‌های قطبی که **تأثیر** آن در مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز گزارش شده است [۲۸، ۲۷، ۹]. احتمالاً غلظت بالای این پلی‌ساکارید در ژل صبرزرد و عصاره متانولی که در مطالعه قبلی ما نیز تأیید شد موجب مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز شده است [۲۹]. در این تحقیق با توجه به آنکه اثرات مهاری عصاره متانولی تام از دیگر حلال‌ها بیشتر بوده است احتمالاً ترکیبات قطبی موجود در ژل صبرزرد بیشترین اثر روی مهار دو آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکزیداز داشته‌اند.

جدول شماره ۱- میزان مهارکنندگی غلظت‌های مختلف آکاربوز، عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف پودر ژل برگ گیاه صبرزرد بر آنزیم آلفا آمیلاز (میانگین ± انحراف معیار)

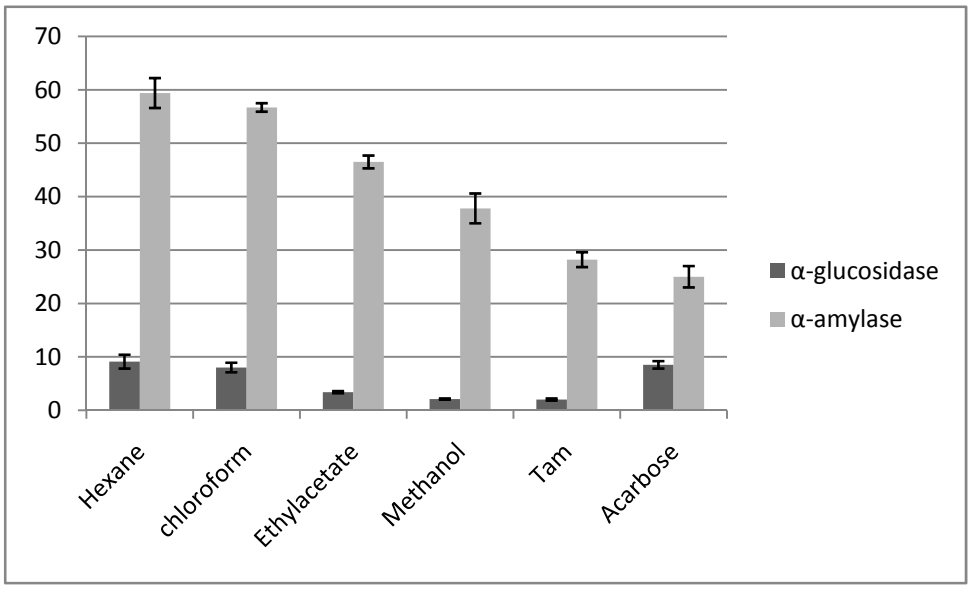
مواد	میانگین درصد مهار آنزیم آلفاآمیلاز	غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر	IC_{50} بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر
آکاربوز	۳۰/۱ ± ۱/۹	۱۰	۲۵/٤ ± ۱/۹
	٤۰/۲ ± ۲/۲	۲۰	
	٦۲/٤ ± ۱/۹	٤۰	
	۷۹/۷ ± ۳/۷	۸۰	
عصاره تام متانولی	۲٦/۱ ± ۱/۸	۱۰	۲۸/۲ ± ۱/۳
	۳۷/۸ ± ۱/۲	۲۰	
	۵۹/۱ ± ۲/۳	٤۰	
	۷۷/٤ ± ۳/٤	۸۰	
فراکسیون هگزانی	۲٦/۳ ± ۱/٤	۲۵	۵۹/۳ ± ۲/۷*
	۳۳/۷ ± ۱/۲	۵۰	
	۵۹/۳ ± ۲/۷	۷۵	
	۷۱/۵ ± ۳/۸	۱۰۰	
فراکسیون کلروفرمی	۲۳/۳ ± ۱/۷	۲۵	۵٦/۷ ± ۰/۷*
	۳۷/۵ ± ۲/۱	۵۰	
	٦۱/۷ ± ۱/۳	۷۵	
	۷٤/٤ ± ۱/۷	۱۰۰	
فراکسیون اتیل‌استاتی	۳۱/۳ ± ۱/۱	۲۵	٤٦/۵ ± ۱/۱*
	٤۹/۷ ± ۱/٤	۵۰	
	٦۵/۷ ± ۱/٦	۷۵	
	۷٦/۵ ± ۲/۵	۱۰۰	
فراکسیون متانولی	۲۳/۳ ± ۳/٤	۱۰	۳۷/۷ ± ۲/۸*
	۳۰/۵ ± ۲/۷	۲۰	
	۵۳/۲ ± ٤/۱	٤۰	
	٦۷/۷ ± ۲/۷	۸۰	

* دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با آکاربوز $p < ۰/۰۰۱$

جدول شماره ۲- میزان مهارکنندگی غلظت‌های مختلف آکاربوز، عصاره تام متانولی و فراکسیون‌های مختلف پودر ژل برگ گیاه صبرزرد بر آنزیم آلفا گلوکوزیداز (میانگین ± انحراف معیار)

مواد	میانگین درصد مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز	غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر	IC_{50} بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر
آکاربوز	۱۱/۸ ± ۱/۰	۱/۲۵	۸/۵ ± ۰/۶
	۲۱/۰ ± ۲/۶	۲/۵	
	۳۲/٤ ± ۱/۸	۵	
	۵۸/۲ ± ۱/۲	۱۰	
عصاره تام متانولی	٤۲/۲ ± ۱/٤	۱/۲۵	۲/۳ ± ۰/۱*
	۵۱/۱ ± ۲/۲	۲/۵	
	٦۹/۳ ± ۳/۸	۵	
	۸۰/۲ ± ۳/۷	۱۰	
فراکسیون هگزانی	۳۹/٦ ± ۲/۱	۵	۹/۱ ± ۱/۲
	۵۲/۹ ± ۳/۱	۱۰	
	٦۱/۹ ± ۲/۷	۲۰	
	۷۷/۵ ± ۲/۷	٤۰	
فراکسیون کلروفرمی	۱۵/٤ ± ۱/٦	۱/۲۵	۸/۷ ± ۰/۸
	۲۳/۷ ± ۱/٤	۲/۵	
	۳۸/۱ ± ۱/۹	۵	
	۵۷/٤ ± ۲/۷	۱۰	
فراکسیون اتیل‌استاتی	۲۹/۸ ± ۱/۵	۱/۲۵	۳/٤ ± ۰/۱*
	٤٤/٤ ± ۱/۵	۲/۵	
	۵۹/۳ ± ۱/۷	۵	
	۷۰/٦ ± ۳/۷	۱۰	
فراکسیون متانولی	۳۹/۱ ± ۱/۱	۱/۲۵	۲/۷ ± ۰/۱*
	۵۳/٦ ± ۱/٦	۲/۵	
	٦۹/٤ ± ۲/۱	۵	
	۸۱/۷ ± ۲/۷	۱۰	

* دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با آکاربوز با $p < ۰/۰۰۱$



نمودار شماره ۱- مقایسه IC_{50} حاصل از مهار دو آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز توسط عصاره‌های مختلف گیاه صبرزرد. محور X نشان‌دهنده نوع عصاره و محور Y نشان‌دهنده IC_{50} است.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری آنکه عصاره تام متانولی ژل برگ گیاه صبرزرد احتمالاً حاوی بیشترین ترکیبات با خواص مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آنزیم آلفا گلوکوزیداز است و تحقیقات بیشتری لازم است تا این اثر در شرایط درون‌تنی در حیوانات آزمایشگاهی و انسان به اثبات رسد. به علاوه با توجه به آنکه سودمندی عصاره ژل برگ آلوئه‌ورا در کاهش سطح گلوکز خون بیماران دیابتی بررسی و نتایج رضایت‌بخشی گزارش شده است [۲۹] و با توجه به ترکیبات متعدد موجود در ژل برگ این گیاه دارویی جهت پیشگیری از تداخلات دارویی آزمایشات برون‌تنی و درون‌تنی جهت شناسایی دیگر مکانیسم‌های اثر احتمالی در کاهش گلوکز خون ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی جهت پرداخت هزینه‌های این پژوهش که در قالب پایان‌نامه دانشجویی انجام شد و از دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران که ما را در انجام امور آزمایشگاهی یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Shane-McWhorter L. Botanical dietary supplements and the treatment of diabetes: What is the evidence? *Curr. Diab. Rep.* 2005; 5: 391 - 8.

2. Kasper DL, Braunwald EAB and Fauci AS. Harrison's principles of internal medicine. 16th Edn. Mcgraw Hill Companes/Mcgraw-Hill. 2005, pp: 2152 - 80.

3. Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC and Marinopoulos S. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med*. 2007; 147: 386 - 99.

4. Wiener RS, Wiener DC and Larson RJ. Benefits and risks of tight glucose control in

critically ill adults: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 300: 933 - 44.

5. Zareba G, Serradell R, Castaner R, Davies SL,Prous J and Mealy N. Phytotherapies for diabetes. *Drugs Future* 2005; 30: 1253 - 82.

6. Marles R and Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995; 2: 137 - 46.

7. Sartavi K. Cultivation of *Alo vera* medicinal plant, management of progress and public participation along with coporation of agricultural research centre, Bushehr. 1385.

8. Dagne E, Bisrat D, Viljoen A and Van Wyk B. Chemistry of Aloe species. *Curr. Org. Chem*. 2000; 4: 1055 - 78.

9. Femenia A, Sanchez ES, Simal S and Rossello C. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers* 1999; 39: 109 - 117.

10. Ajabnoor MA. Effect of Aloes on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* 1990; 28: 215 - 20.

11. Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G and Sütlüpinar NE. Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in type 1 and type 2 diabetic rat models. *Phytother. Res*. 2001; 15 (2): 157 - 61.

12. Rajasekaran S, Sivagnanam K, Ravi K and Subramanian S. Hypoglycemic effect of *Aloe vera* gel on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. *J. Med. Food* 2004; 7: 61 - 6.

13. Rhabasa-Lhoret R and Chiasson JL. Alphaglucosidase inhibitors (3rd ed.). In Defronzo R A, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P. International textbook of diabetes mellitus (Vol. 1). UK: John Wiley, 2004.

14. Yee HS and Fong NT. A review of the safety and efficacy of acarbose in diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 1996; 16: 792 - 805.

15. Salehi P, Asghari B, Esmaeili MA, Dehghan H and Ghazi I. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes, *J. Med. Plants Res.* 2013; 7: 257 - 66.

16. Marston A and Hostettmann K: Separation and quantification of flavonoids. In: flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications, Andersen RM, Markham KR (Eds.), CRC Press, Boca Raton, New York, 2006, pp: 1 - 36.

17. Ghosh S, Ahire M, Patil S, Jabgunde A, Bhat Dusane M, Joshi BN, Pardesi K, Jachak S, Dhavale DD and Chopade BA. Antidiabetic Activity of Gnidia glauca and Dioscorea bulbifera: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2012; 10: 17 - 25.

18. McCue P, Kwon YI and Shetty K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. *J. Food Biochem.* 2005; 29: 278 - 94.

19. Ganiyu O, Adedayo O, Ademiluy I and Yetunde M. Effect of combination on the antioxidant and inhibitory properties of tropical pepper varieties against α-amylase and α-glucosidase activities In Vitro. *J. Medicinal Food* 2011; 14: 1152 - 8.

20. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* 1959; 31: 426 - 8.

21. Bernfeld P. Amylases, alpha and beta. In: Colowick SP, Kaplan NO. Methods in Enzymology, vol. 1. Academic Press, New York, 1955, pp: 149 - 58.

22. Jo SH, Ka EH, Lee HS, Apostolidis E, Jang HD and Kwon YI. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α-glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. Int. J. Applied Res. *Natural Products* 2010; 2: 52 - 60.

23. Rajasekaran S, Sivagnanam K and Subramanian S. Modulatory effects of *Aloe vera* leaf gel extract on oxidative stress in rats treated with streptozotocin. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57 (2): 241 - 246.

24. Botes L, Van der Westhuizen FH, Loots du T. Phytochemical contents and (antioxidant capacities of two Aloe) greatheadii var. davyana extract. *Molecules* 2008; 13: 2169 - 80.

25. Tanaka M, Misawae and Yousuke I. Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as anti-diabetic compounds. *Biol. Pharm. Bull* 2006; 29: 1418 - 22.

26. Jong-Anurakkun N, Bhandari MR, Hong G and Kawabata J. α-Glucosidase inhibitor from Chinese aloes. *Fitoterapia* 2008; 79: 456 - 7.

27. Liu G. *Chemical compositions, α-glucosidase and α-amylase inhibitory activities of crude polysaccharides* from the *endodermis of shaddock* (Citrus Maxima). *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 2012; 64: 71 - 6.

28. Wang Y, Yang Z and Wei X. Sugar compositions, α-glucosidase inhibitory and amylase inhibitory activities of polysaccharides from leaves and flowers of Camellia sinensis obtained by different extraction methods. *International Journal of Biological Macromolecules* 2010; 47: 534 - 9.

29. Fallah Huseini H, Kianbakht S, Hajiaghaee R, Afkhami-Ardekani M, Bonakdaran A and Hashem Dabaghian F. *Aloe vera* Leaf Gel in treatment of advanced type 2 diabetes mellitus needing insulin therapy: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Journal of Medicinal Plants* 2012; 11: 19 - 27.