

فعالیت مهارکنندگی آلفا گلوکوزیداز در عصاره‌ی هگزانی برخی گیاهان استان کردستان

میناسادات پورشریفی^۱، محمدعلی زارعی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
 ۲- استادیار بیوشیمی، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
 * آدرس مکاتبه: سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی
 تلفن: ۳۳۶۶۴۶۰۰ (۰۸۷)، نمابر: ۳۳۶۲۲۷۰۲ (۰۸۷)
 پست الکترونیک: mazarei@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۳۰

تاریخ تصویب: ۹۴/۴/۲۴

چکیده

مقدمه: به تأخیر انداختن جذب گلوکز از طریق مهار آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی کربوهیدرات‌ها، یک روش درمانی برای کاهش هیپرگلیسمی پس از صرف غذا است. آلفاگلوکوزیداز باعث تسریع آزاد شدن آلفاگلوکز از کربوهیدرات‌ها می‌شود. گیاهان منابعی غنی از ترکیبات فعال زیستی هستند، امروزه تحقیقات بسیاری بر روی عصاره‌های گیاهی با هدف یافتن مهارکننده‌های جدیدی برای این آنزیم در حال انجام است.

هدف: یافتن مهارکننده‌های قوی، جدید و دارای عوارض کمتر برای آنزیم آلفاگلوکوزیداز در عصاره‌های گیاهی.

روش بررسی: عصاره هگزانی ۶۰ گونه گیاهی به منظور بررسی فعالیت مهاری آنها بر روی آلفاگلوکوزیداز، در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ mg/ml مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۵ نانومتر و از طریق سنجش مقدار پارانیتروفنل رها شده از پارانیتروفنل گلوکوزیداز ارزیابی شد. از آکاربوز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. همه‌ی سنجش‌ها با سه تکرار انجام شد.

نتایج: در میان ۶۰ گونه گیاهی، عصاره گیاهان *Descurania sophia* (L.) Webb & Berth, *Fumaria vailantii* Loisel, *Ferula haussknechti* Wolf & Rech, *Haplophyllum acutifolium* (DC.) G. Don, *Isatis cappadociaca* Desv., *Eremostachys laevigata* Bunge, *Silene aucheriana* Boiss فعالیت مهارکنندگی بالای ۶۰ درصد بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز نشان دادند. در این میان فعالیت مهارکنندگی عصاره هگزانی گیاهان خاکشیر (*D. sophia*)، شاهتره (*F. vailantii*) و کمای غلاف‌دار (*F. haussknechti*)، به طور چشم‌گیری بالا و مقادیر IC_{50} آنها به ترتیب ۰/۹، ۲۴/۵۵ و ۲/۷۱ mg/ml بود.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی هگزانی گیاه خاکشیر (*D. sophia*) به دلیل درصد مهار بالا و IC_{50} پایین می‌تواند با هدف جداسازی و تعیین ماهیت عامل مهارکننده آنزیم آلفاگلوکوزیداز، مورد استفاده قرار گیرد.

کل واژگان: آلفاگلوکوزیداز، خاکشیر، دیابت، عصاره‌های گیاهی، مهارکننده



مقدمه

درمان اولیه‌ی دیابت و کاهش احتمال بیماری‌های عروقی دارد [۶]. تحقیقات بسیار نشان داده است که، غذاهایی که میزان گلوکز بالایی دارند باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان قند خون پس از صرف غذا شده و همچنین غذاهایی که شامل مقدار زیادی فیبر هستند سرعت افزایش گلوکز خون پس از صرف غذا را کاهش می‌دهند. بنابراین استفاده زیاد از غذاهایی که میزان گلوکز بالا و فیبر کم دارند احتمال ابتلا به دیابت را در افراد کاهش می‌دهند [۷]. یکی از راه‌های کاهش هیپرگلیسمی پس از صرف غذا، به تأخیر انداختن و یا جلوگیری از جذب کربوهیدرات‌ها پس از صرف غذا می‌باشد [۸]. جهت جذب پلی‌ساکاریدهای پیچیده توسط روده و انتقال به جریان خون، آنزیم‌های هضم‌کننده‌ی روده مانند آلفا آمیلاز و آلفاگلوکوزیداز آن‌ها را به واحدهای کوچکتر تقسیم می‌کنند [۶]. بنابراین از مهارکننده‌های آنزیم آلفاگلوکوزیداز به طور گسترده‌ای همراه با تزریق انسولین و یا به تنهایی به عنوان دارو برای درمان بیماری دیابت استفاده می‌شود [۹]. انواع مختلفی از آنزیم آلفا گلوکوزیداز در گیاهان، بافت‌های حیوانی و میکروارگانیسم‌ها وجود دارند، که سوبسترای اختصاصی آنها بسیار متنوع است. بسیاری از آنها علاوه بر توانایی هیدرولیز آلفا گلوکوزیدها و الیگوساکاریدها، توانایی هیدرولیز گلیکوژن (glycogen) و آلفا گلوکان (Alpha glucan) را نیز دارند [۱۰].

در گذشته از مهارکننده‌های متداول آنزیم آلفاگلوکوزیداز مانند آکاربوز (acarbose) و ووگلیبوز (voglibose) برای درمان دیابت استفاده شده است، اما از آنجایی که این مهارکننده‌ها دارای اثرات جانبی بسیاری از جمله اختلالات کبدی، نفخ، دردهای شکمی و استفراغ هستند تحقیقات برای یافتن دارویی با کمترین اثرات جانبی در حال انجام است [۴]. در حال حاضر به عصاره‌های طبیعی مهارکننده آلفا گلوکوزیداز به دلیل حداقل تأثیرات جانبی بر روی بدن توجهات بسیاری شده است [۱۱]. لذا هدف از این مطالعه بررسی فعالیت مهارکنندگی عصاره هگزانی ۶۰ گیاه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان کردستان، بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز، به منظور یافتن گیاهانی است که عصاره آنها بر روی فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز اثر مهارکنندگی قابل توجهی داشته و

بیماری دیابت یک بیماری مزمن است که در اثر نقص اثری و یا اکتسابی در ترشح انسولین و یا کاهش پاسخ‌دهی اندام‌ها نسبت به انسولین ترشح شده ایجاد می‌شود. چنین نقصی باعث افزایش سطح گلوکز خون می‌شود که این وضعیت می‌تواند بسیاری از سیستم‌های بدن شامل عروق خونی و اعصاب را تخریب کند. در حال حاضر حدود ۱۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به بیماری دیابت هستند و تخمین زده شده که این میزان تا سال ۲۰۲۵ به ۳۰۰ میلیون برسد. تأخیر در ترشح انسولین پس از صرف غذا باعث افزایش ناگهانی سطح گلوکز خون (Hyperglycemic spike) می‌شود [۱]. نوسانات قند خون در افراد سالم ناچیز است به طوری که از افزایش بسیار زیاد گلوکز پس از صرف غذا و کاهش شدید آن در حالت ناشتایی جلوگیری می‌شود. اولین نشانه‌ی ایجاد بیماری دیابت نوع ۲، مقاومت به انسولین می‌باشد، که در این حالت میزان انسولین بیشتری برای جبران این مقاومت ترشح می‌شود تا تحمل گلوکز در حد طبیعی خود باقی بماند. فرایندی که در این مرحله باعث ایجاد حالت عدم تحمل گلوکز (Impaired glucose tolerance) می‌شود به درستی مشخص نیست، اما تحقیقات پیشنهاد می‌کند که این فرایند در ارتباط با عدم عملکرد صحیح سلول‌های بتا در پانکراس می‌باشد. بدون شک عدم عملکرد صحیح این سلول‌ها در اثر عوامل ژنتیکی و یا اکتسابی مانند سمیت گلوکز (Glucose toxicity) است [۲]. دو ساعت پس از صرف غذا میزان گلوکز خون در افرادی که دچار عدم تحمل گلوکز هستند از 140 mg/dl به 199 mg/dl افزایش می‌یابد و این میزان در افراد مبتلا به دیابت به بیش از 200 mg/dl نیز خواهد رسید [۳]. از آنجایی که هیپرگلیسمی پس از صرف غذا بسیار خطرناک‌تر از هیپرگلیسمی در حالت ناشتایی است، کنترل سطح گلوکز خون پس از طرف غذا بسیار اهمیت دارد [۴]. افزایش بیش از حد گلوکز خون پس از صرف غذا اولین تغییر غیرعادی در ایجاد بیماری دیابت است. همچنین این فرایند احتمال ابتلا به بیماری‌های عروقی را نیز افزایش می‌دهد [۵]. بنابراین کنترل سطح گلوکز خون پس از صرف غذا نقش بسیار مهمی در



موضوع مناسبی برای مطالعات دقیق‌تر بعدی باشند.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و بیوشیمیایی

آنزیم آلفاگلوکوزیداز و پارانیترفنل فسفات (pNPG) از شرکت سیگما و مابقی مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان با واسطه نمایندگی‌های مربوطه در ایران خریداری شدند.

جمع‌آوری، تهیه پودر و تهیه عصاره هگزانی از نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی در ماه‌های خرداد و تیر ۱۳۹۱ از نواحی مختلف استان کردستان جمع‌آوری شده و توسط کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی جناب آقای مهندس معروفی شناسایی و برای هر نمونه یک نسخه تحت شماره ثبت رسمی در هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی استان بایگانی شد. در مرحله‌ی بعدی برای تهیه‌ی پودر از نمونه‌ها، گیاهان خشک شده توسط دستگاه آسیاب خانگی مولینکس به صورت پودر نرم درآمدند. سپس به منظور تهیه عصاره هگزانی ۳۵ گرم پودر گیاهی در ۱۵۰ میلی‌لیتر حلال هگزان به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. در مرحله‌ی بعدی، در دستگاه روتاری اوپریتر هایدولف با دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و پس از تخلیه از مخزن دستگاه بر روی شیشه ساعت با قطر ۲۰ سانتی‌متر پخش شدند. شیشه‌های ساعت حاوی عصاره به منظور خشک شدن کامل، به مدت ۷۲ ساعت در زیر هود شیمیایی و دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. عصاره‌های خشک شده از روی شیشه ساعت جمع‌آوری شده و تا زمان انجام مراحل بعدی آزمایش در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌ی هگزانی به دست آمده، ابتدا باید آنها را در حلال مناسب حل کرد. علت انتخاب دی‌متیل سولفواکساید قدرت حلالیت بالای آن و ارائه مواد غیر قطبی به محیط قطبی توسط آن بوده است. بدین منظور ۱۰ میلی‌گرم از عصاره‌ی گیاهی در ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفواکساید حل شد. از این محلول به عنوان استوک در مراحل بعدی استفاده شد.

سنجش مهار فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز

در اثر هیدرولیز سوبسترای پارانیترفنل آلفا گلوکو پیرانوزید (pNPG) توسط آنزیم آلفاگلوکوزیداز، ماده‌ی رنگی پارا-نیتروفنل تولید می‌شود که زرد رنگ است و دارای جذب حداکثری در طول موج ۴۰۵ نانومتر است. هرچه فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز بیشتر باشد، شدت رنگ تولیدی و به دنبال آن جذب نوری نیز بیشتر خواهد بود. حضور عصاره‌ی گیاهی به علت کاهش فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز باعث می‌شود که مقدار کمتری سوبسترا تجزیه شده و در نتیجه ماده رنگی کمتری تولید شود، که منجر به کاهش جذب نوری می‌شود.

پروتکل سنجش

در این پروژه به منظور سنجش تأثیرات عصاره‌های گوناگون بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز از روش اصلاح شده‌ی پیستیبا- براگمن استفاده شده است [۳]. سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۱۵۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر تکن مدل سانرایز (Tecan sunrise) ساخت سوئیس انجام شد. در هر چاهک به ترتیب بافر فسفات، آنزیم آلفاگلوکوزیداز و عصاره‌ی گیاهی ریخته و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوبسترا (pNPG) اضافه شد. آنگاه پس از ۳۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت توقف واکنش، سدیم کربنات به آن اضافه شد. به منظور همزمانی شروع واکنش‌ها، از سمپلر ۱۲ کاناله برای اضافه کردن سوبسترا و سدیم کربنات استفاده شد. سپس میکروپلیت در داخل دستگاه میکروپلیت ریدر قرار گرفته و پس از ۱ ثانیه هم زدن، جذب آن به مدت ۵ دقیقه هر یک دقیقه یک بار در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب میکروپلیت‌های خالی، در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شده و از جذب نهایی کم شد. سنجش عصاره‌های گیاهی در ۳ تکرار انجام شد. به دلیل امکان حضور برخی عوامل دیگر غیر از محصول واکنش، که دارای جذب در ۴۰۵ نانومتر بودند و یا هیدرولیز خودبه‌خودی سوبسترا، برای هر کدام از عصاره‌ها یک چاهک



موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شدند. محاسبات نهایی با استفاده از معادله‌ی خط نمودار لاینیوربرک و نمودارهای ثانویه در نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده، از میان شصت گیاه مورد مطالعه، عصاره‌های گیاهان دسکورانیا سوفیا (*Descurainia sophia* (L.) Webb & Berth.)، فوماریا وایلانته (*Fumaria vaillantii* Loisel.)، فرولا هاسنچتی (*Ferula haussknechtii* Wolff ex Rech.)، آپوفیلوم (*Haplophyllum acutifolium* (DC.) G. Don.)، ایساتیس کاپادوسیا (*Isatis cappadocica* Desv.)، ارومستاپسیس لویگاتا (*Eremostachys laevigata* Bunge) و سایلن آچریانا (*Silene aucheriana* Boiss) مهار بالای ۶۰ درصد را بر روی آلفاگلوکوزیداز نشان دادند (شکل شماره ۱). IC₅₀ عصاره گیاهان فوق، از طریق رسم نمودار غلظت بر علیه درصد مهار محاسبه شد، که نتایج در جدول شماره ۱ آورده شده است.

درصد مهار آنزیم توسط عصاره گیاهان خاکشیر (*D. sophia*)، شاه‌تره (*F. vaillantii*) و کمای غلاف‌دار (*F. haussknechtii*)، به طور چشم‌گیری بالا و مقادیر IC₅₀ آنها به ترتیب ۰/۹، ۲۴/۵۵ و ۲/۷۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ضمن مطالعه تغییرات سرعت اولیه واکنش در مقابل تغییرات غلظت سوبسترا، نمودار لاین ویور-برک برای عصاره گیاهان فوق در مقابل کنترل رسم شد.

نتایج بررسی سنتیکی آنزیم آلفاگلوکوزیداز در حضور عصاره

خاکشیر *Descurania sophia*

نتایج نشان داده بود که عصاره خاکشیر *Descurania Sophia* در غلظت ۰/۱ mg/ml بیشترین درصد مهار را دارد. از طریق رسم نمودار لاین ویور برک، نوع مهار عصاره‌ی فوق در چهار غلظت بر اساس مقایسه‌ی شیب نمودار کنترل و شیب نمودار عصاره، تعیین شد (شکل شماره‌های ۲، ۳، ۴، ۵). مقادیر K_m ، K_{mapp} ، V_{max} و V_{maxapp} از طریق رسم نمودار $1/[V]$ بر علیه

بلانک نیز تعریف شد. چاهک بلانک حاوی تمام مواد به غیر از آنزیم بود، یعنی در واقع از طریق چاهک بلانک جذب عوامل مزاحم سنجیده و از جذب چاهک تست کسر می‌شد. بدین صورت جذب نهایی فقط در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم بود.

تحلیل داده‌ها

پس از اتمام سنجش، جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظرش کسر شده و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از چاهک تست، جذب نهایی محاسبه می‌شد. سپس نمودار جذب نهایی چاهک‌ها بر علیه زمان رسم شده و شیب نمودار محاسبه می‌شد. با مقایسه‌ی شیب نمودار عصاره و کنترل منفی با استفاده از فرمول (۱) درصد مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز محاسبه می‌شد. درصد مهار برای سه تکرار هر عصاره محاسبه و در نهایت میانگین گرفته شده و انحراف استاندارد محاسبه شد. تمامی مراحل مذکور با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام شده است.

$$\text{فرمول (۱)} \times 100 = \frac{\text{شیب نمودار عصاره} - \text{شیب نمودار کنترل منفی}}{\text{شیب نمودار کنترل منفی}} \times 100 = \% \text{ مهار}$$

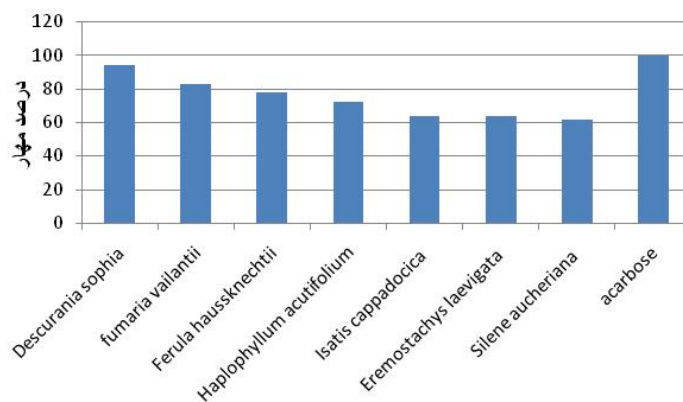
تمام مراحل فوق‌الذکر برای ۴ غلظت مختلف عصاره انجام گرفت و میانگین درصد مهار به دست آمد. از طریق رسم نمودار درصد مهار بر علیه غلظت عصاره شاخص IC₅₀، که بیان‌کننده غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد مهار می‌دهد، تعیین شد.

بررسی سنتیکی فعالیت آلفاگلوکوزیداز در حضور

عصاره‌های گیاهی دارای درصد مهار بالا و IC₅₀ پایین

برای تعیین نوع مهار و محاسبه‌ی مقادیر K_m ، K_{mapp} ، V_{max} ، V_{maxapp} نمودار لاینیوربرک برای آنزیم آلفاگلوکوزیداز، در حضور عصاره‌ی گیاهی و بدون حضور عصاره (کنترل) در چهار غلظت متفاوت سوبسترا رسم شد. غلظت‌های تهیه شده‌ی سوبسترا بر اساس ضرایب نمودار لاینیوربرک انتخاب و در چهار غلظت ۱، ۲، ۵، ۲۵ میلی‌مولار تهیه شدند. سپس نوع مهار برای هر یک از چهار غلظت عصاره مورد بررسی قرار گرفت. تمام جذب‌ها در طول

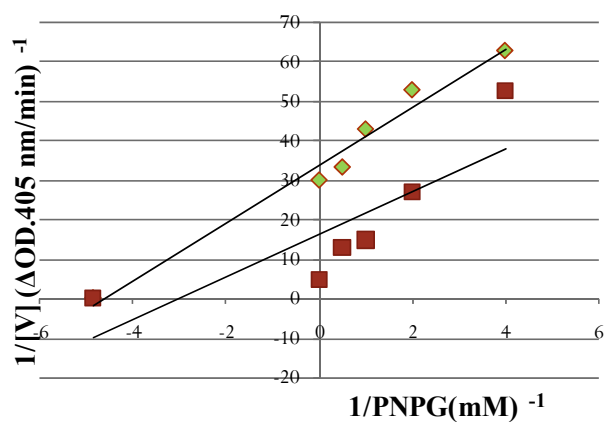




شکل شماره ۱- نمودار درصد مهار گیاهان دارای فعالیت مهارکنندگی بالاتر از ۶۰ درصد و آکاربوز که به عنوان کنترل مثبت و مقایسه آمده است.

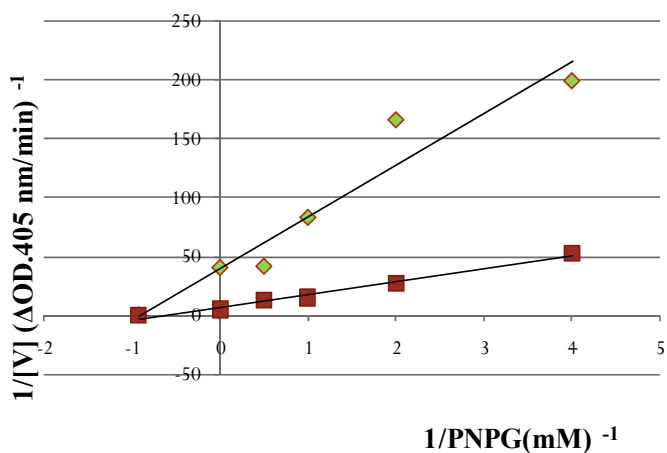
جدول شماره ۱- نتایج تعیین IC_{50} عصاره گیاهان دارای فعالیت مهارکنندگی بالاتر از ۶۰ درصد

ردیف	نام علمی گیاه	خانواده	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
۱	<i>Descurainia sophia</i> (L.) Webb & Berth.	<i>Brassicaceae</i>	۰/۹۰
۲	<i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.	<i>Fumariaceae</i>	۲۴/۵۵
۳	<i>Ferula haussknechtii</i> Wolff ex Rech.	<i>Apiaceae</i>	۲/۷۱
۴	<i>Haplophyllum acutifolium</i> (DC.) G.Don.	<i>Rutaceae</i>	۳۰۶/۵۸
۵	<i>Isatis cappadocica</i> Desv.	<i>Brassicaceae</i>	۵/۹۶
۶	<i>Eremostachys laevigata</i> Bunge.	<i>Lamiaceae</i>	۹۶۹۶/۳۰
۷	<i>Silene aucheriana</i> Boiss.	<i>Caryophyllaceae</i>	۸/۱۹

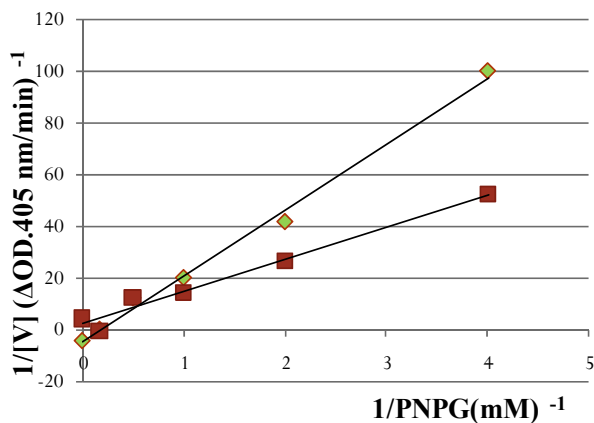


شکل شماره ۲- نمودار $1/[V]_i$ بر علیه $1/[S]$ ، عصاره *Descurainia sophia* در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر

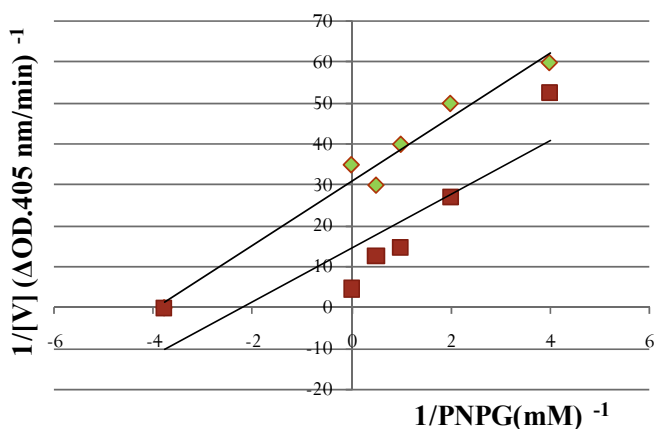




شکل شماره ۳- نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S]، عصاره *Descurania sophia* در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر



شکل شماره ۴- نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S]، عصاره *Descurania sophia* در غلظت ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر



شکل شماره ۵- نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S]، عصاره *Descurania sophia* در غلظت ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر



1/[S] و به دست آوردن معادله‌ی خط، محاسبه شد (جدول شماره ۲).

نتایج بررسی سنتیکی آنزیم آلفاگلوکزیداز در حضور عصاره

کمای غلاف دار *Ferula haussknechti*

با توجه به نتایج، مشخص شد که عصاره *Ferula haussknechti* در غلظت ۰/۰۰۱ درصد مهار قابل توجهی دارد. نوع مهار عصاره‌ی فوق در چهار غلظت بر اساس مقایسه‌ی شیب نمودار کنترل و شیب نمودار عصاره، تعیین شد. مقادیر K_m app، V_{max} ، K_m ، V_{max} app و K_i از طریق رسم نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ و به دست آوردن معادله‌ی خط، محاسبه شد. (شکل شماره‌های ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). مقادیر K_m ، K_m app، V_{max} ، V_{max} app و K_i از طریق رسم نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ و به دست آوردن معادله‌ی خط، مطابق جدول شماره ۴ محاسبه شد.

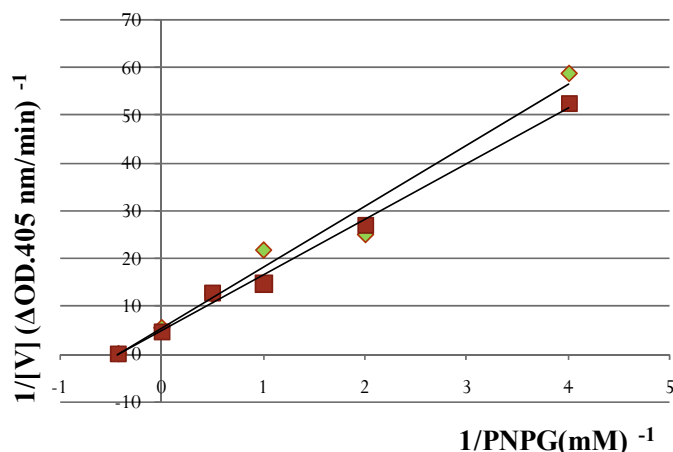
نتایج بررسی سنتیکی آنزیم آلفاگلوکزیداز در حضور عصاره

شاهتره *Fumaria vailantii*

نتایج بالا نشان داد که عصاره شاهتره *Fumaria vailantii* در غلظت ۰/۱ mg/ml، درصد مهار قابل توجهی دارد. نوع مهار عصاره‌ی فوق در چهار غلظت بر اساس مقایسه‌ی شیب نمودار کنترل و شیب نمودار عصاره، تعیین شد (شکل شماره‌های ۶، ۷، ۸، ۹). مقادیر K_m ، K_m app، V_{max} ، V_{max} app و K_i از طریق رسم نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ و به دست آوردن معادله‌ی خط، محاسبه شد (جدول شماره ۳).

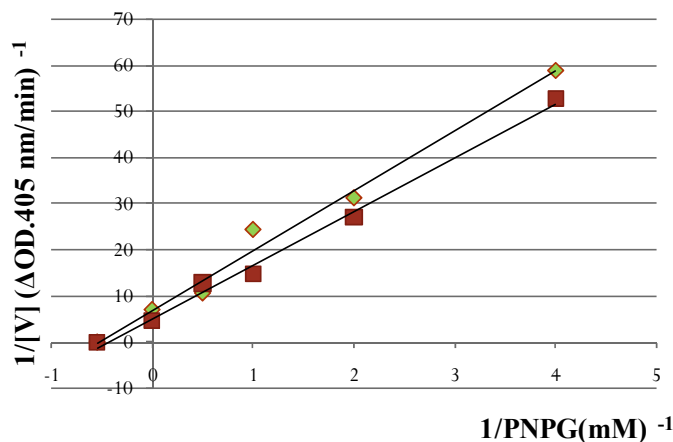
جدول شماره ۲- مقادیر K_m ، K_m app، V_{max} ، V_{max} app و K_i برای عصاره *Descurania sophia*

غلظت	K_m (mM)	K_m app (mM)	V_{max} ($\Delta OD.405$ nm/min) ⁻¹	V_{max} app ($\Delta OD.405$ nm/min) ⁻¹	K_i (mM)
مهار نارقابتی					
۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۰/۲۰۵	۰/۲۱۲	۰/۰۲۳	۰/۰۸۹
مهار نارقابتی-غیرنارقابتی					
۰/۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۱/۰۸	۰/۲۱۲	۰/۰۲۴۶	۰/۰۳
تعریف نشده					
۰/۰۱ mg/ml	۲/۴۹۷	تعریف نشده	۰/۲۱۲	تعریف نشده	تعریف نشده
مهار نارقابتی					
۰/۰۰۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۰/۲۶۴	۰/۲۱۲	۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۱۱۸

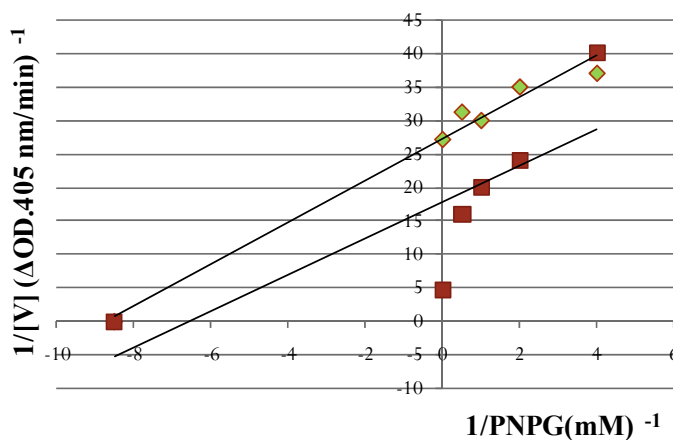


شکل شماره ۶- نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ ، عصاره *Fumaria vailantii* در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر

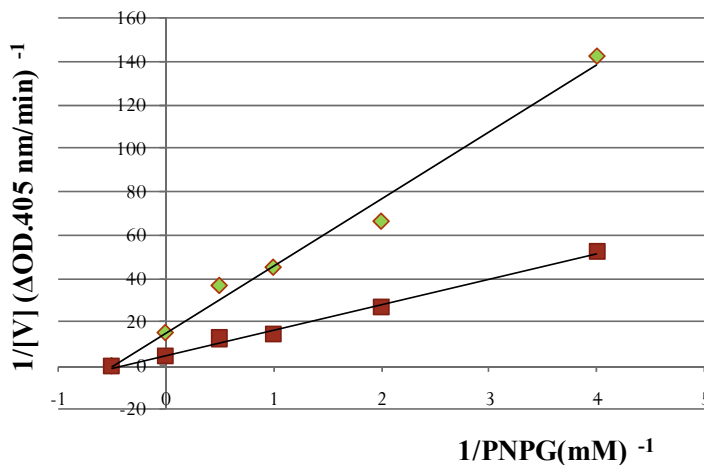




شکل شماره ۷- نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S]، عصاره *Fumaria vailantii*، در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر



شکل شماره ۸- نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S]، عصاره *Fumaria vailantii*، در غلظت ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر

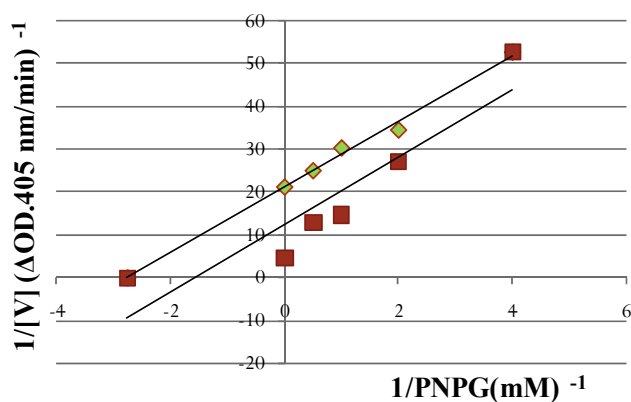
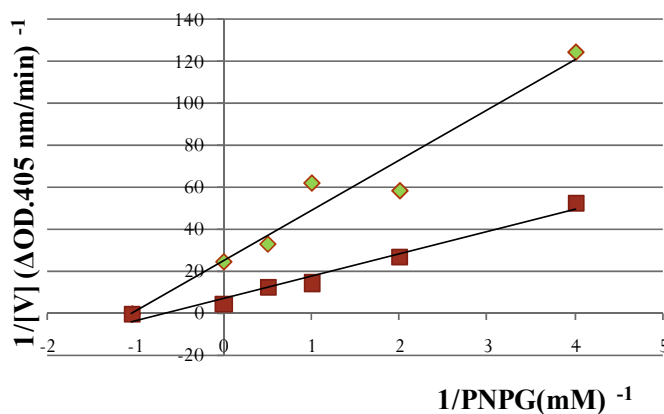


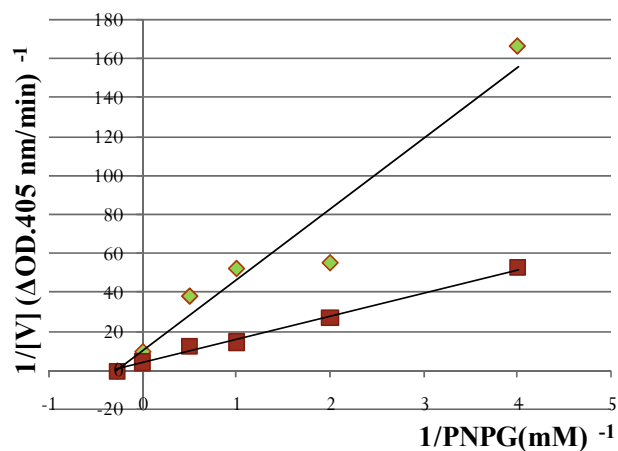
شکل شماره ۹- نمودار 1/[V] بر علیه 1/[S]، عصاره *Fumaria vailantii*، در غلظت ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر



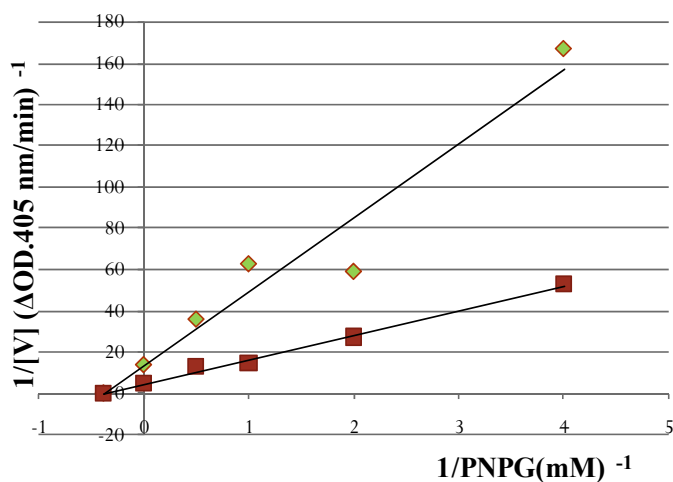
جدول شماره ۳- مقادیر K_m , K_m , V_{max} , V_{maxapp} و K_i برای عصاره *Fumaria vailantii*

غلظت	K_m (mM)	K_m app (mM)	V_{max} ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	V_{maxapp} ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	K_i (mM)
غیر رقابتی					
۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۲/۲۵۳	۰/۲۱۲	۰/۱۸۳	۱۶/۳۴
غیر رقابتی					
۰/۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۱/۸۳۸	۰/۲۱۲	۰/۱۴۲۲	۰/۲۷۸
مهار نارقابتی					
۰/۰۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۰/۱۱۴	۰/۲۱۲	۰/۰۳	۰/۰۰۰۴۵
غیر رقابتی					
۰/۰۰۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۲/۰۰۰۰۵	۰/۲۱۲	۰/۰۶۵	۰/۰۰۴

شکل شماره ۱۰- نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ ، عصاره *Ferula haussknechti*، در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیترشکل شماره ۱۱- نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ ، عصاره *Ferula haussknechti*، در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر



شکل شماره ۱۲- نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ ، عصاره *Ferula haussknechtii*، در غلظت ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر



شکل شماره ۱۳- نمودار $1/[V]$ بر علیه $1/[S]$ ، عصاره *Ferula haussknechtii*، در غلظت ۰/۰۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر

جدول شماره ۴- مقادیر K_m ، $K_{m app}$ ، V_{max} ، $V_{max app}$ و K_i برای عصاره *Ferula haussknechtii*

غلظت	K_m (mM)	$K_{m app}$ (mM)	V_{max} ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	$V_{max app}$ ($\Delta OD.405 \text{ nm/min}$) ⁻¹	K_i (mM)
مهار نارقابتی					
۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۰/۳۶۳	۰/۲۱۲	۰/۰۴۷۲	۰/۱۷
مهار مرکب					
۰/۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۰/۹۶۲	۰/۲۱۲	۰/۰۴۰۱	۰/۰۶۲۶
مهار غیرقابتی					
۰/۰۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۱/۵۸	۰/۲۱۲	۰/۰۳	۰/۰۱۷
مهار غیرقابتی					
۰/۰۰۱ mg/ml	۲/۴۹۷	۲/۴۰	۰/۲۱۲	۰/۰۷۳	۰/۰۲



بحث

پوشیده شده است و طولی در حدود ۶۰ - ۲۰ سانتی متر دارد. کاسبرگ‌ها نیز دارای غده‌های مویی در سطح پشتی خود می‌باشند و طولی در حدود ۳/۵ - ۲ میلی‌متر دارند [۱۵]. دسکورانیا سوفیا که متعلق به جنوب اروپا و شمال آفریقا است به طور گسترده‌ای در شمال شرقی چین پخش شده است [۱۶]. در کشور چین از دانه‌ی این گیاه به منظور درمان بیماری‌های مربوط به گلو، جلوگیری از تنگی نفس و افزایش دفع ادرار استفاده می‌شود. تحقیقات نشان داده است این گیاه دارای تعداد بسیار زیادی از متابولیت‌های ثانویه مانند کاردیاک گلیکوزید (Cardiacglycosides)، فلاونوئیدها، لاکتون‌ها، لیپیدها، سولفورگلیکوزیدها (Sulfur glycoside) و کومارین‌ها با اثرات زیستی هستند. تحقیقات نشان داده است دانه‌ی این گیاه باعث مهار رشد انواعی از سلول‌های سرطانی می‌شود و می‌توان از این گیاه در درمان سرطان استفاده کرد. همچنین براساس تحقیقی که در سال ۲۰۱۳ توسط لی (Lee) و همکاران انجام گرفت فعالیت سیتوتوکسیک دانه‌ی این گیاه در مقابل بسیاری از سلول‌های سرطانی به اثبات رسید. از عصاره‌ی بخش‌های هوایی این گیاه جهت درمان بیماری‌های گلو، سرخک، آبله و همچنین به عنوان داروی تب‌بر استفاده می‌شود [۱۷]. بر اساس تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ توسط امیری و همکاران در ایران انجام گرفت مشخص شد که، دانه‌ی خاکشیر دارای فعالیت‌های ضدیبوست، درمان جوش، ضدتشنجی، درمان زردی، تب‌بر و پاک‌کننده‌ی خون و کبد می‌باشد [۱۸]. با توجه به IC₅₀ به دست آمده برای عصاره این گونه ۰/۹ μg/ml در مقایسه با IC₅₀ به دست آمده برای آکاربوز (۰/۷۱۵ μg/ml)، می‌توان نتیجه گرفت که مهارکنندگی گیاه مورد مطالعه نسبت به آنزیم آلفا گلوکزیداز بسیار مناسب است. برای مطالعه این گونه از عصاره خام استفاده شده، که مقدار جز فعال در آن خیلی کم است. همچنین وجود همه‌ی عوامل مداخله‌گر از جمله وجود فاکتورهای بی‌رنگ کننده‌ی ماده رنگی تولید شده طی واکنش و فاکتورهای فعال‌کننده در عصاره، باعث کاهش درصد مهار و در نتیجه افزایش مقدار IC₅₀ می‌شود.

بیماری دیابت یک اختلال متابولیکی است که در اثر اختلال در ترشح انسولین، فعالیت انسولین و یا هر دو ایجاد می‌شود [۱۲]. این اختلال متابولیکی پیشرونده در متابولیسم گلوکز در نهایت به بیماری‌های عروقی منجر می‌شود [۱۳]. به دنبال تجزیه غذا، کربوهیدرات‌ها از طریق آنزیم‌های مختلف به گلوکز و سایر منوساکاریدها تجزیه می‌شوند. در این میان آنزیم آلفاگلوکزیداز، در آخرین مرحله‌ی هیدرولیز کربوهیدرات‌ها، پیوند گلیکوزیدی را در الیگوساکاریدها می‌شکند. از آنجایی که گلوکز، جزء اصلی قند خون است، بنابراین آلفاگلوکزیداز به عنوان یک هدف ایده‌آل برای درمان دیابت می‌باشد [۱۴]. آنزیم آلفا گلوکزیداز از طریق هیدرولیز کربوهیدرات‌ها باعث افزایش هیپرگلیسمی پس از صرف غذا می‌شود. بنابراین شناسایی مهارکننده‌های آنزیم آلفاگلوکزیداز می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مهم دیابت مورد استفاده قرار گیرد. از آنجایی که مهارکننده‌های متداول آلفا گلوکزیداز مانند آکاربوز و ووگلیبوز که برای درمان دیابت استفاده شده‌اند، دارای اثرات جانبی مانند نفخ، دردهای شکمی، اختلالات کبدی و استفراغ هستند، امروزه تحقیقات بسیاری جهت یافتن فعالیت مهارکنندگی در عصاره‌های طبیعی جهت حداقل اثرات جانبی در حال انجام است [۱۲].

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، در میان شصت گیاهی که مورد سنجش قرار گرفتند، عصاره هگزانی گیاهان *Fumaria Vailantii*, *Descurania sophia*, *Haplophyllum acutifolium*, *Feula haussknechti* و *Eremostachys laevigata*, *Isatis cappadocica* و *Silene aucheriana* فعالیت مهار کنندگی بالای ۶۰ درصد برای آنزیم آلفاگلوکزیداز از خود نشان دادند.

بیشترین درصد مهار مربوط به *Descurania sophia* (۱/۶۱ ± ۹۴/۴۴) در غلظت ۰/۱ mg/ml می‌باشد. تاکنون گزارشی از فعالیت مهاری *Descurania sophia* (نام فارسی: خاکشیر) بر روی آنزیم آلفاگلوکزیداز ارائه نشده است. این گیاه از خانواده‌ی براسیکاسه بوده و جزئی از گیاهان یکساله است. ساقه‌ی این گیاه به میزان کمی توسط غده‌های مویی



روغن فرار این گیاه دارای اثرات ضدقارچی است و یک مخلوط گیاهی شامل برگ *Tylophora hirsuta* (شنبليله)، دانه‌ی *Trigonella foenum* و بخش‌های هوایی *Fumaria indica* باعث کاهش قابل توجه گلوکز خون در بیماری دیابت می‌شود [۲۱].

گیاه کمای غلاف‌دار *Ferula haussknechti*، عضوی از خانواده‌ی آپیاسه (*Apiaceae*) است. این گیاه منبع غنی از سسکوئیتراپن (*Sesquiterpenes*) می‌باشد [۲۲].

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه سنتیکی مشخص شده است که هر یک از گیاهان خاکشیر (*D. sophia*) و شاهتره (*F. vailantii*) و کمای غلاف‌دار (*F. haussknechti*)، بسته به غلظت عصاره مورد استفاده الگوهای مهارتی مختلفی در مقابل آنزیم مورد مطالعه از خود نشان دادند. لذا نمی‌توان در مورد مکانیسم بخصوصی از مهار برای هیچیک از عصاره‌ها بحث نمود. این موضوع در مورد عصاره‌های ناخالص گیاهی امری رایج است و یک علت احتمالی آن می‌تواند تغییر میزان اثر مهارکنندگی عوامل مهارکننده بالقوه‌ی موجود در هر عصاره در غلظت‌های مختلف عصاره باشد [۲۳]. بدین معنی که احتمالاً در هر غلظت از یک عصاره‌ی خاص یک نوع از مهار کننده غالب بوده و مکانیسم متفاوتی از مهار را در نمودار لاین ویور برک از خود بروز می‌دهد.

گیاه *Fumaria vailantii* (نام فارسی: شاهتره) عضوی از خانواده فوماریاسه (*Fumaria vailantii*) است. این گیاه از انواع گیاهان یک ساله بوده و طولی در حدود ۸ تا ۲۴ اینچ دارد. ساقه‌ی آن شاخه‌های بسیاری دارد و طول برگ آن در حدود ۱۰-۳ سانتی‌متر است. این گیاه دارای گل‌های سفید یا صورتی کم‌رنگ با طول حدودی ۶ - ۵ میلی‌متر می‌باشد. همچنین اندازه‌ی میوه‌ی این گیاه در حدود ۲ میلی‌متر است. گیاه *Fumaria vailantii* در هند، افغانستان، پاکستان، نواحی مرکزی آسیا، شمال داکوتا (*Dakota*) و کلرادو (*Colorado*) یافت می‌شود. از گیاه کامل فوماریا وایلانته جهت درمان استفراغ، یبوست و مشکلات کبدی استفاده می‌شود. در درمان‌های سنتی از این گیاه جهت درمان بیماری‌های گوارشی استفاده می‌شود [۱۹]. حضور پروتوپین (*protopine*) در عصاره‌های الکلی این گیاه تأیید شده است. علاوه بر این، حضور بتا سیترواسترول (*Beta-sitrostrol*) در عصاره‌ی اتری این گیاه به اثبات رسیده است. همچنین حضور کولین در بخش محلول در آب این گیاه تأیید شده است [۲۰]. بر اساس تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ توسط امیری و همکاران در ایران انجام گرفت مشخص شد که تمام قسمت‌های *Fumaria vailantii* دارای اثرات تب‌بر و اشتهاآور می‌باشد، همچنین در درمان پسروریازیس و زردی نقش دارد [۱۸]. همچنین مطالعات نشان داده است که بخش‌های هوایی این گیاه در درمان سرخک، و تمام قسمت‌های این گیاه به عنوان آنتی هیپرکلریدریک در درمان بیماری‌های گوارشی نقش دارند.

منابع

1. Lawag IL, Aguinaldo AM, Naheed S and Mosihuzzaman M. α -Glucosidase inhibitory activity of selected Philippine plants. *Journal of Ethnopharmacol.* 2012; 144: 217 - 9.
2. Alain DB. Postprandial hyperglycaemia alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1998; 40: S51 – S55.
3. Ankita BJ, Shihabudeen MS and Thirumurugan K. Screening of fifteen indian ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sci.* 2011; 3: 267 - 74.
4. Zhang J, Zhao S, Yin P, Yan L, Han J, Shi L and et al. α -Glucosidase Inhibitory Activity of



Polyphenols from the Burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules* 2014; 19 (6): 8373 - 86.

5. Kim KY, Nguyen TH, Kurihara H and Kim SM. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Bromophenol Purified from the Red Alga *Polyopes lancifolia*. *Journal of Food Sci.* 2010; 75 (5): 145 - 50.

6. Shim YJ, Doo HK, Ahn SY, Kim YS, Seong JK, Park IS and Min BH. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 85 (2): 283 - 87.

7. O'Keefe JH and Bell DS. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Cardiol.* 2007; 100 (5): 899 - 904.

8. Kim MY, Wang MH and Rhee HI. A novel α -glucosidase inhibitor from pine. *Carbohydrate Res.* 2004; 339 (3): 715 - 17.

9. Asano N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiol.* 2003; 13 (10): 93 - 104.

10. Chiba S. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1997; 61 (8): 1233 - 9.

11. Shu Wang, Meng Fang, Yong-Lei Ma and Yu-Qing Zhang. Preparation of the Branch Bark Ethanol Extract in Mulberry *Morus alba*, Its Antioxidation, and Antihyperglycemic Activity In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014; 2014: Article ID 569652, 7 pages.

12. Zhang J, Zhao S, Yin P, Yan L, Han J, Shi L and et al. α -Glucosidase Inhibitory Activity of

Polyphenols from the Burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules* 2014; 19 (6): 8373 - 86.

13. Picot C, Subratty AH and Mahomoodally MF. Inhibitory Potential of Five Traditionally Used Native Antidiabetic Medicinal Plants on α -Amylase, α -Glucosidase, Glucose Entrapment, and Amylolysis Kinetics In Vitro. *Advances in Pharmacological Sciences* Volume 2014, Article ID 739834, 7 pages.

14. Son HU and Lee SH. Comparison of α -glucosidase inhibition by *Cudrania tricuspidata* according to harvesting time. *Biomedical Reports* 2013; 1 (4): 624 - 8.

15. Vural C. A new combination in *Descurainia* (Brassicaceae) from Turkey. *Annales Botanici Fennici* 2009; 46 (1): 65 - 6.

16. Li J, Liu X, Dong F, Xu J, Zheng Y and Shan W. Determination of the volatile composition in essential oil of *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl (Flixweed) by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Molecules* 2010; 15 (1): 233 - 40.

17. Lee YJ, Kim NS, Kim H, Yi JM, Oh SM, Bang OS and Lee J. Cytotoxic and anti-inflammatory constituents from the seeds of *Descurainia sophia*. *Archives of Pharmacol Res.* 2013; 36 (5): 536 - 41.

18. Amiri MS, Joharchi MR and Taghavizadeh Yazdi ME. Ethno-medicinal plants used to cure jaundice by traditional healers of Mashhad, Iran. *Iranian J. Pharmaceutical Res.* 2014; 13 (1): 157.

19. Mandal U, Nandi D, Chatterjee K, Biswas A and Ghosh D. Remedial effect of aqueous extract of whole plant of *Fumaria vaillantii* Loisel and ripe fruit of *Benincasa hispida* Thunb in ranitidine induced-hypochlorhydric male rat. *International*



Journal of Applied Research in Natural Products 2010; 3 (1): 37 - 47.

20. Lamba SS and Trottier RW. Preliminary Phytochemical and Pharmacological Investigation of *Fumaria vaillantii*. *Pharmaceutical Biol.* 1977; 15 (1): 25 - 9.

21. Srivastava S and Choudhary GP. Pharmacognostic and pharmacological study of *Fumaria vaillantii* Loisel: a review. *Journal of*

Pharmacognosy and Phytochem. 2014; 3 (1): 194 - 7.

22. Miski M, Mabry TJ and Saya Ö. Apiene esters from *Ferula haussknechtii*. *Phytochem.* 1987; 26 (6): 1733 - 7.

23. Mills S and Bone K. Principles and Practice of Phytotherapy: Modern herbal medicine. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier. USA. 2000, pp: 119 - 121.

