خواص مهارکنندگی آلفاگلوکوزیداز و آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاهان سیلن‌حبابی ***Silene Ampullata*** **Bioss و گل‌استکانی‌برگه‌دار** ***Campanula involucrate*** **Auch.ex DC**

حسنا الماسی و محمدعلی زارعی*

ایران، سنندج، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، گروه علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۱۱

چکیده

افزایش قندخون پس از صرف غذا برای افراد دیابتی یک مشکل جدی می‌باشد که یکی از راه‌های مقابله با این مشکل، ممانعت از شکستن کربوهیدرات‌های پلی‌مری به گلوکز در روده، از طریق مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز بوده است. نظر به فعالیت مهار بالای گزارش شده برای عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاهان سیلن‌حبابی *Silene Ampullata* Bioss و گل‌استکانی‌برگه‌دار *Campanula involucrate* Auch.ex DC، تعیین مکان اندامی این فعالیت هدف این مطالعه قرارگرفت. عصاره متانولی (گل، برگ و ساقه) این گیاهان از نظر فعالیت مهارکنندگی بر روی آلفاگلوکوزیداز و توان احیاکنندگی مورد بررسی قرارگرفتند. بیشترین میزان فعالیت مهارکنندگی گیاه سیلن‌حبابی مربوط به غلظت ۲ mg/ml عصاره متانولی اندام‌های گل و برگ (۱۰۰ درصد) و بیشترین میزان فعالیت مهارکنندگی گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار مربوط به غلظت ۴۰ mg/ml عصاره متانولی برگ و گل (۱۰۰ درصد) بود. کمترین میزان IC_{50} مربوط به اندام‌های گل و برگ گیاه سیلن‌حبابی (۱۳/۰mg/ml) بود. عصاره متانولی اندام‌های گل و برگ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار به ترتیب الگوی مهار غیررقابتی و مرکب نارقابتی- غیررقابتی و عصاره اندام‌های گل و برگ سیلن‌حبابی به ترتیب الگوی مهار مرکب نارقابتی- غیررقابتی و نارقابتی از خود نشان دادند. عصاره متانولی گل گیاهان سیلن‌حبابی و گل‌استکانی‌برگه‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نسبت به سایر اندام‌های هوایی از خود نشان دادند. عصاره متانولی اندام‌های گل و برگ گیاه سیلن‌حبابی و گل‌استکانی‌برگه‌دار، دارای مواد مهارکننده مؤثری می‌باشند، لذا جداسازی و خالص‌سازی آنها و بررسی تأثیر آن‌ها بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز و مطالعه‌ی این اثرات در شرایط *invivo* می‌تواند به معرفی داروهای کم‌خطر و موثرتری در جلوگیری از افزایش قند خون منجر گردد.

واژه های کلیدی: آلفاگلوکوزیداز، گل‌استکانی‌برگه‌دار، سیلن‌حبابی، عصاره متانولی، مهار آنزیمی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۷۱۰۶۳۲، پست الکترونیکی: mazarei@uok.ac.ir

مقدمه

بیماری دیابت، در واقع به مجموعه اختلالاتی گفته می‌شود که با عدم تنظیم یا تنظیم ناقص در مسیرهای متابولیسمی کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و لیپیدها همراه است (۱۸). همچنین دیابت می‌تواند یک اختلال در تولید انسولین، عمل انسولین یا هر دو باشد (۲۸). اختلال در ترشح انسولین باعث افزایش در سطح گلوکز خون می‌شود که این افزایش قندخون می‌تواند منجر به عوارض میکروواسکولار رتینوپاتی (نابینایی)، نفروپاتی (آسیب‌های گلومرول و دفع آلبومین) و نوروپاتی (کاهش یا از دست دادن حس درد) است. دیابت همچنین با بیماری‌های ماکروواسکولار به خصوص بیماری عروق کرونر قلب مرتبط می‌باشد (۷). دیابت نوع یک در نتیجه تخریب خود ایمنی سلول بتا ایجاد می‌گردد، که معمولاً موجب کمبود انسولین خواهد شد. مشخصه دیابت نوع دو مقاومت

محیطی نسبت به عمل انسولین و به درجاتی کاهش ترشح انسولین است (۲۹). روش‌های بسیاری توسط مطالعات داروشناختی شامل تحریک آزاد شدن انسولین، مهار گلوکونئوژنز، افزایش تعداد انتقال دهنده‌های گلوکز و کاهش جذب گلوکز از روده به منظور بهبودی بیماری دیابت مورد استفاده قرار گرفته است. اولین قدم درمانی برای دیابت نوع II، رعایت رژیم غذایی، کاهش وزن و فعالیت‌های ورزشی است (۴). در برخی از موارد این اقدام‌ها نمی‌تواند بیماری را کنترل کند و نیاز به مصرف دارو پیدا می‌شود، که از جمله این داروها می‌توان به سولفونیل اوره‌آز، بی‌گوانیدها، تیازولیدین‌دیونزها، مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز اشاره کرد (۲۰). آنزیم آلفا گلوکوزیداز (EC 3.2.1.20) یک آنزیم کلیدی در هضم کربوهیدرات‌ها در انسان می‌باشد که باعث هیدرولیز پلی‌ساکاریدها می‌شود. روند هیدرولیز کربوهیدرات‌ها توسط این آنزیم به این صورت است که کربوهیدرات‌ها (الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها) در روده‌ی کوچک به آنزیم آلفا گلوکوزیداز متصل و با فعالیت‌های این آنزیم به واحدهای کوچک‌تر (مونوساکاریدها) تجزیه می‌شوند (۲۶). کنترل سطح گلوکز خون پس از صرف غذا می‌تواند یک فاکتور مهم برای درمان دیابت باشد. بنابراین امروزه استفاده از مهارکننده‌های آنزیم آلفا گلوکوزیداز نقش بسزایی در درمان دیابت دارند. این مهارکننده‌ها باعث تأخیر عمل آنزیم آلفاگلوکوزیداز برای شکستن کربوهیدرات‌های پیچیده به قندهای ساده می‌شوند. بنابراین ورود گلوکز به خون را کاهش می‌دهند (۶). در گذشته از داروهای ضددیابتی زیادی مانند آکاربوز، ووگلیبوز، میگلیتول و نوجیرومایسین برای درمان دیابت استفاده شده است اما این داروها باعث اثرات جانبی متعددی مانند سمیت کبدی، درد شکم، نفخ شکم، اسهال و هیپوگلیسمی شدید می‌شوند. همچنین پس از درمان طولانی مدت با این داروها، مقاومت انسولین در برابر این داروها گزارش شده است (۳۳).

از سوی دیگر تحقیقات نشان داده، استرس اکسیداتیو که حاصل عدم توازن میان تولید رادیکالهای آزاد و دفاع آنتی اکسیدانهای بدن می‌باشد، در بیماری دیابت افزایش یافته است، در واقع یکی از عواملی که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می‌گردد، هیپرگلیسمی است (۳). باتوجه به اثر استرس اکسیداتیو بر تسریع عوارض میکروواسکولر و ماکروواسکولر دیابت، مطالعات گستردهای جهت بررسی نحوه کاهش اکسیدانهای بدن و افزایش و استفاده بهینه از آنتی اکسیدان‌های سنتتیک و غیرسنتتیک صورت گرفته است (۲۲). در بدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، ماکرومولکول‌هایی مثل آلبومین، سرولوپلاسمین و سایر مولکول‌های کوچک مانند آسکوربیک‌اسید، آلفاتوکوفرول و بتاکاروتن وجود دارند که می‌توانند با رادیکال‌های آزاد مقابله کنند (۱۶). اگرچه آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن وجود دارند اما برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد در بدن باید از آنتی‌اکسیدان‌های اگزوژن هم که از طریق مواد غذایی به دست می‌آیند، استفاده شود (۱۱). اخیراً علاقه بسیاری در جهت یافتن آنتی اکسیدانهای طبیعی از مواد و عصاره‌های گیاهی برای جایگزینی آنتی اکسیدانهای سنتتیک ایجاد شده است. اطلاعات جمع آوری شده چه از مقالات علمی و چه از مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که گیاهان حاوی مقادیر زیاد و متنوعی از آنتی اکسیدانها می باشند. مواد آنتی اکسیدان در گیاهان شامل ترکیبات اسیدها سینامیک، کومارین‌ها، دی‌ترپن‌ها و فلاونوئیدها می‌باشند. فلاونوئیدهای موجود در گیاهان با داشتن گروه‌های هیدروکسیل و متوکسیل دارای خواص کاهنده استرس اکسیداتیوها هستند، که این اثرات احتمالاً مربوط به توانایی فلاونوئیدها در مهار پراکسیداسیون لیپیدها، کلاته کردن فلزات فعال، افزایش سطح گلوتاتیون احیا و یا افزایش بیان ژنهای آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می باشد (۱۴).

مطابق نتایج یک مطالعه غربالگری برای فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز در میان عصاره متانولی ۶۰ گیاه بومی استان کردستان، چندین گیاه با فعالیت بالا معرفی شدند، که دو گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار (*Campanula involucrate*) و سیلن‌حبابی (*Silene Ampullata*) از آن جمله‌اند (۳۲). در مطالعه اخیر اندامی از گیاهان فوق‌الذکر که دارای فعالیت مهارکنندگی بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز باشند، مشخص نشده است، همچنین باتوجه به اینکه توان بالقوه آنتی‌اکسیدانی برای هر دو گیاه گزارش شده است اما هیچ گزارشی برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بخش‌های هوایی دو گیاه صورت نگرفته است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین اندامی از دو گیاه مذکور که دارای بیشترین فعالیت مهارکنندگی آلفاگلوکوزیداز هستند و مطالعه سنتیک مهار جهت تعیین نوع مهار برای عصاره‌های دارای درصد مهار بالا، صورت گرفت. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی اندام‌های هوایی دو گیاه فوق نیز به عنوان بخش تکمیلی مطالعات، مورد سنجش قرارگرفت.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و بیوشیمیایی: متانول، KH_2PO_4 و $K_2HPO_4.3H_2O$ (نمک‌های خریداری شده برای تهیه بافر فسفات ۰/۱ میلی مولار pH=۶/۶)، آنزیم آلفاگلوکوزیداز مخمری استخراج شده از *Saccharomyces cerevisiae* (خریداری شده از شرکت سیگما)، HCL، KOH، DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل)، آکاربوز، اسید آسکوربیک، کوئرستین، استات پتاسیم، کلرید آلومینیوم، فولین سیوکالتو، اسید گالیک، کربنات‌سدیم، فری‌سیانید پتاسیم، اسید تری‌کلرو استیک، کلرید آهن (III) از شرکت مرک خریداری شدند.

جمع‌آوری گیاهان و تهیه پودر: در اواخر فصل بهار گیاهان گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی از نواحی معینی از مراتع استان کردستان گردآوری و ضمن ثبت سیستماتیک به آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل گردیدند. سپس اندام‌های هوایی هر دو گیاه فوق‌الذکر شامل گل، برگ و ساقه از همدیگر تفکیک شدند. این اندام‌های تفکیک شده در شرایطی امن از نظر آلودگی میکروبی، قارچی و در سایه، به مدت چندین روز به طور کامل خشک گردیدند. سپس به وسیله قیچی باغبانی به قطعات کوچکی خرد شدند و بوسیله آسیاب خانگی به صورت پودر نرم درآورده شدند. پودرهای به دست آمده از اندام‌های هوایی گیاه پس از توزین در بانکه های شیشه‌ای و به دور از نور تا زمان عصاره‌گیری، در دمای اتاق نگه‌داری شدند.

تهیه عصاره متانولی از نمونه‌های گیاهی: به منظور تهیه‌ی عصاره متانولی، ۶۰ گرم پودر تهیه شده از هریک از اندام‌های هوایی گیاه در ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد در این مدت به فواصلی هم‌زده می‌شدند. پس از زمان طی شده مخلوط حلال و پودر توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد. مایع صاف شده توسط دستگاه روتاری اواپریتور در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و پس از تخلیه از مخزن دستگاه، جهت خشک شدن کامل، روی شیشه ساعت به قطر ۱۵ سانتی‌متر، پخش شده و در زیر هود شیمیایی و در دمای محیط قرارگرفت. عصاره‌های خشک شده از روی سطح شیشه ساعت جمع‌آوری و در میکروتیوب ۵/۱ میلی‌لیتری تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

اصول و دستور کار سنجش فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز: در اثر هیدرولیز سوبسترای پارانیتروفنیل‌آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید (p-NPG) و آزاد شدن عامل فسفات توسط آنزیم آلفاگلوکوزیداز، ماده‌ی رنگی پارا-نیتروفنل تولید می‌شود که زرد رنگ 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. در حضور

عصاره گیاهی به دلیل کاهش فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز مقدار کم‌تری سوبسترا تجزیه شده و در نتیجه ماده رنگی کم‌تری تولید شود، که منجر به کاهش جذب نوری می‌شود.

دراین مطالعه جهت سنجش قدرت مهارکنندگی عصاره‌های اندام‌های هوایی گیاه بر روی فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز، از روش اصلاح شده‌ی پیستیا-براگمن با مختصر تغییراتی استفاده شد (۲۱). سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۱۵۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان (Tecan sunrise) به ترتیب زیر انجام شد. ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۲۰ میکرولیتر از عصاره محلول در متانول و۱۰میکرولیترآنزیم آلفاگلوکوزیداز ساکارومایسس سرویزیه (۱U/mlمحلول در بافر فسفات) وارد چاهک شده، به منظور مخلوط شدن این اجزا با هم میکروپلیت در درون دستگاه به مدت ۳ ثانیه مرتعش شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای اتاق، برای شروع واکنش ۲۰ میکرولیتر سوبسترا به مخلوط فوق اضافه شد. آنگاه پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جهت توقف واکنش، ۵۰ میکرولیتر هیدروکسیدسدیم (NaOH) به آن اضافه شد. سپس میکروپلیت در داخل دستگاه میکروپلیت قرارگرفته و پس از ۳ ثانیه هم‌زدن، جذب آن به مدت ۳ دقیقه و هریک دقیقه یکبار در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سنجش عصاره‌های گیاهی در سه 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 بلانک نیز تعریف شد. چاهک بلانک حاوی تمام مواد به غیر از آنزیم بود. همچنین در چاهک کنترل مثبت به جای عصاره از آکاربوز و در چاهک کنترل منفی به جای عصاره از بافر فسفات استفاده شد.

آنالیز سنتیکی برای عصاره‌های دارای بیشترین درصد مهار: به منظور تعیین نوع مهار اعمال شده توسط عصاره‌های دارای بیش‌ترین درصد مهار بر روی آنزیم، نمودار معکوس مضاعف لینویور- برک براساس واکنش آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف عصاره و بدون حضور عصاره (کنترل) در غلظت‌های مختلف سوبسترا، رسم شد. غلظت‌های تهیه شده سوبسترا براساس ضرایب تصحیح کننده معادله لینویور- برک ($1/V_0 = K_m/V_{max}[S_0]$ + $1/V_{max}$) انتخاب، و عملاً سوبسترا در شش غلظت ۱۱/۳، ۴۸/۲، ۸۷/۱، ۲۴/۱، ۶۲۲/۰ و ۳۱۱/۰ میلی‌مولار تهیه گردید (۲۳). برای رسم این نمودارها از یکی از غلظت‌های عصاره متانولی اندام مربوطه استفاده شد. برای کنترل و هریک از غلظت‌های مهارکننده V_{max} و K_m تعیین، و K_i با استفاده از نمودارهای ثانویه در غلظت‌های مختلف مهارکننده به دست آمد.

روش محاسبات: پس از پایان سنجش، جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظرش کسر شده و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از جذب چاهک تست، جذب نهایی محاسبه شد. با استفاده از فرمول مهار، درصد مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز به وسیله عصاره به دست آمد (معادله ۱). درصد مهار برای سه تکرار هر عصاره محاسبه و در پایان میانگین گرفته شده و انحراف استاندارد محاسبه شد. تمام این مراحل با استفاده از نرم‌افزار Excel، نسخه‌ی ۲۰۱۰ انجام شده است.

معادله (۱) $$\%\text{مهار} = \frac{\text{شیب نمودار عصاره} - \text{شیب نمودار کنترل منفی}}{\text{شیب نمودار کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

تمام مراحل گفته شده برای غلظت‌های مختلف عصاره انجام شده و میانگین درصد مهار به دست آمد. از طریق رسم نمودار درصد مهار بر علیه غلظت نهایی عصاره، IC_{50} که بیان کننده مقدار غلظتی از عصاره‌ها است که ۵۰ درصد مهار می‌دهد، تعیین شد. فعالیت مهارکنندگی نسبی (RIA) نشان دهنده نسبت IC_{50} مهارکننده استاندارد (آکاربوز) به IC_{50} مهارکننده مورد نظر (عصاره‌ها) می‌باشد. از فعالیت مهارکنندگی نسبی می‌توان جهت مقایسه قدرت بازدارندگی

مهارکننده‌های مختلف آنزیم مورد نظر استفاده نمود و جهت محاسبه RIA از معادله زیر استفاده شد (۵).

$$RIA = \frac{(IC50 \text{ مهارکننده استاندارد})}{(IC50 \text{ مهارکننده تست})}$$

ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها: برای ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از دو روش معمول شامل به دام انداختن رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاء آهن استفاده شد. مبنای روش اول، به دام انداختن رادیکال‌های DPPH طبق توانایی اهداء هیدروژن است (۱۹). دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل به عنوان یک رادیکال آزاد پایدار به رنگ بنفش می‌باشد که در صورت احیاء شدن توسط عوامل دهنده الکترون (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مثل اسید آسکوربیک) به دی‌فنیل پیکریل هیدرازین (غیر رادیکالی) زرد رنگ تبدیل می‌شود. در جریان این آزمایش قدرت احیاء-کنندگی عصاره‌ها با کم‌رنگ شدن یا بی‌رنگ شدن DPPH توسط ترکیبات عصاره مورد سنجش قرارگرفت و هرچه محلول واکنش کم‌رنگ‌تر شود، جذب آن کاهش می‌یابد و این نشان می‌دهد که عصاره دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه می‌باشد (۱۷). در روش دوم، قدرت احیاءکنندگی مواد موجود در عصاره با احیا شدن آهن III به آهن II ارزیابی می‌شود. احیا شدن آهن اکثراً تحت عنوان سنجش الکترون‌دهی استفاده می‌شود که روش مناسبی در بررسی کارکرد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد فنولی می‌باشد (۱۲).

ارزیابی توان احیاء رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌ها: جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال آزاد DPPH در این تحقیق از روش فو (Rao-Fu) و همکارانش استفاده شد (۱۲). تمامی سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم نهایی ۲۰۰میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت-خوان (Tecan sunrise) و به ترتیب زیر انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱/۰ میلی‌مولار DPPH (حل شده در متانول) به چاهکها افزوده شد و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره به آن افزوده می‌شد. آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. از محلول DPPH به عنوان کنترل منفی نیز استفاده گردید. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری می‌شد. از محلول متانولی آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

پس از پایان سنجش، جذب پلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظرش کسر شده و سپس با تفریق جذب چاهک بلانک از جذب چاهک تست، جذب نهایی محاسبه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای سه تکرار هر عصاره محاسبه و در پایان میانگین گرفته شد. درنهایت مقدار پاکسازی رادیکال DPPH با فرمول (۱) محاسبه شد.

فرمول(۱) $$\text{فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد} = \frac{\text{جذب عصاره} - \text{جذب کنترل منفی}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰$$

ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی احیا آهن: میزان قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها توسط روش ین و چن با کمی تغییرات انجام شد (۳۱). بدین ترتیب که عصاره با غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آماده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانیدپتاسیم ۱ درصد به آن‌ها اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به خاطر توقف واکنش به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌های حاوی مواد به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شدند پس از اتمام سانتریفیوژ ۲/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی محلول برداشته شد و با ۰/۵ میلی‌لیتر آهن (III) کلراید ۱ درصد مخلوط شد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. از اسید آسکوربیک با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و

۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوی فنل تام عصاره‌ها: میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالچیو و مطابق پروتوکول توسط شهیدی و ناچک با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد (۲۴). یک میلی‌گرم از هریک از اندام‌های هوایی گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل شد تا نمونه کشت ۱۰۰ppm ایجاد شود. فراکسیون‌های ۰/۵ میلی‌لیتر (سه گانه) در لوله آزمایش ریخته شد و بعد ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکاچیو به لوله‌ها اضافه و به مدت ۲ دقیقه هم‌زده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷ درصد اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت قرار دادن آن‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و آزمایشات برای عصاره و استاندارد سه بار تکرار شد. برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک، محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد سپس از این غلظت، رقت‌های مختلف (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. پس از طی کردن مراحل مختلف طبق روش مذکور جذب نمونه‌ها قرائت شد. براساس یک نمودار کالیبراسیون اسید گالیک، با به دست آوردن معادله خطی منحنی استاندارد و قرار دادن جذب عصاره در آن، مقدار فنول عصاره تام اندازه‌گیری شد. روش فولین سیوکالچیو یک روش مهم برای اندازه‌گیری مقدار فنول موجود در عصاره می‌باشد که اساس این روش احیاء معرف فولین سیوکالچیو توسط ترکیبات فنولی موجود در عصاره و تشکیل کمپلکس آبی رنگ می¬باشد که ماکزیمم جذب را در ۷۶۵ نانومتر دارد.

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید تام عصاره‌ها: فلاونوئید تام با روش ایجاد رنگ کلریدآلومینیوم و مطابق پروتوکول چانگ- یانگ، با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد (۸). طبق این روش، محلول ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هریک از اندام‌های هوایی دو گیاه تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرارگرفت و جذب خوانده شد. جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. از کوئرستین به عنوان رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج براساس میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره بیان شد. بدین صورت که ابتدا یک محلول از کوئرستین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس غلظت‌های دیگر (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. براساس یک نمودار کالیبراسیون کوئرستین، با به دست آوردن معادله خط و قرار دادن جذب عصاره در آن، مقدار فلاونوئید عصاره تام ارزیابی شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین این تکرارها گزارش شد. اساس این روش رنگ ایجاد شده توسط کمپلکس اسیدی ایجاد شده آلومینیوم کلراید با گروه هیدروکسیل فلاونوئیدها است و در صورت وجود فلاونوئید در عصاره این کمپلکس ایجاد می‌شود که بیش‌ترین جذب را در طول موج ۴۱۵ نانومتر دارد.

کروماتوگرافی‌گازی متصل به طیف‌سنج‌جرمی (GC/MS): نظر به اینکه درصورت وجود خاصیت مهارکنندگی در عصاره متانولی اندام‌های گیاهان، لازم است تعیین گردد که این خاصیت مربوط به کدام یک از اجزاء تشکیل دهنده عصاره است، شناسایی ترکیبات نیز صورت گرفت. جهت شناسایی ترکیبات عصاره‌های مختلف گیاهان از (GC/MS) استفاده شد. در این تکنیک پس از تزریق نمونه‌ها به دستگاه (GC/MS) با محاسبه و بررسی مولفه‌های مختلف طیف‌های جرمی ترکیبات موجود در عصاره‌ها و مقایسه تمامی این مولفه‌ها با مشخصات ترکیب‌های استاندارد اقدام به شناسایی اجزای موجود در نمونه می‌گردد. در این پژوهش جهت انجام این آنالیز، عصاره استخراج شده از گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار و

سیلن‌حبابی، در ۱۰۰ میکرولیتر به آزمایشگاه تخصصی (آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کردستان) تحویل گردید، سپس نتایج آنالیز (GC/MS) نمونه از آزمایشگاه فوق‌الذکر تحویل گرفته شد. مشخصات دستگاه GC-MS و جزئیات روش کار مورد استفاده جهت آنالیز نمونه‌های عصاره درجدول ۱ آمده است.

تحلیل‌ها و آنالیزهای آماری: داده‌ها و نتایج حاصل از آزمایش‌ها در این تحقیق، با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای بررسی و مقایسه میانگین عصاره‌های هگزانی از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد و تمام داده‌های حاصل از آزمایش با سه بار تکرار و مقدار آن‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزار شد.

جدول ۱- مشخصات دستگاه GC-MS و جزئیات روش‌کار مورد استفاده جهت آنالیز نمونه‌های عصاره اندام‌های گیاهان مورد تحقیق

دستگاه GC	مدل A-7890، شرکت Agilent ، ساخت کشور آمریکا
نوع ستون	N-5
ابعاد ستون	طول ۳۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر
برنامه ریزی دمایی ستون	دمای اولیه c˚ ۴۵، گرادیان دمایی ċ/min ۲ ، دمای نهایی۲۵۰˚c
محل تزریق	Split/split less
گاز حامل	هلیوم
دستگاه Mass	مدل A-5973، شرکت Agilent ، ساخت کشور آمریکا
دمای محفظه یونش	۲۳۰˚C
تجزیه‌گر جرمی	Quadrupole
دمای تجزیه‌گر جرمی	۱۵۰˚C

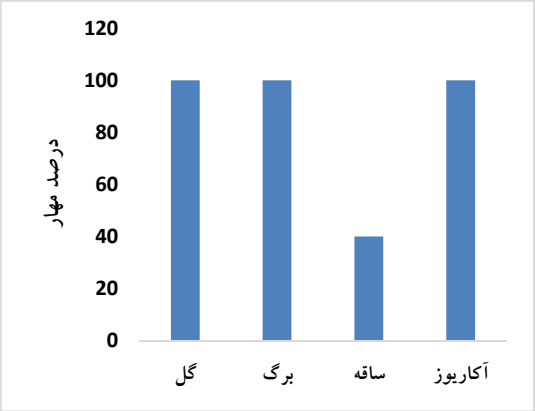
نتایج

درصد مهار و IC_{50} : نتایج حاصل از مهارکنندگی عصاره متانولی اندام‌های هوایی این گیاهان نشان داد که در گیاه سیلن‌حبابی بیش‌ترین درصد مهار (۱۰۰ درصد) مربوط به اندام‌های گل و برگ (شکل ۱) در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار بیشترین درصد مهار (۱۰۰ درصد) مربوط به اندام‌های گل و برگ (شکل ۲) در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

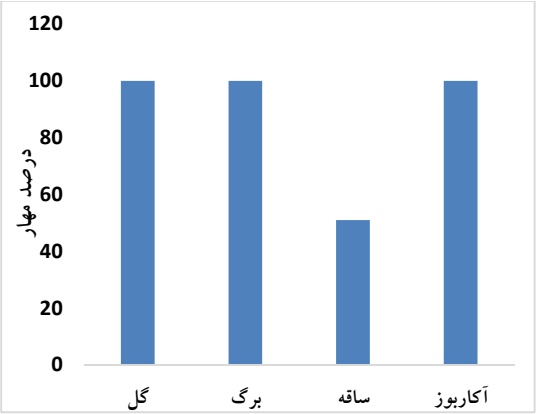
میزان IC_{50} در غلظت نهایی مهارکننده‌ها در محیط واکنش برای آکاربوز و هم‌چنین برای سایر عصاره‌های متانولی در جدول ۲ آورده شده است مطابق آن میزان IC_{50} به دست آمده برای عصاره متانولی اندام برگ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار و اندام‌های برگ و گل در گیاه سیلن‌حبابی نسبتاً پایین و لذا قابل توجه است. هم‌چنین شاخص RIA برای عصاره متانولی اندام-های دارای بالاترین درصد مهار بر آنزیم آلفاگلوکوزیداز در جدول ۳ آورده شده است.

نتایج بررسی سنتیکی واکنش آنزیم آلفاگلوکوزیداز در حضور عصاره گیاهان با استفاده از رویکرد لینویور-برک: نتایج حاصل از بررسی سنتیکی اثر عصاره متانولی

برای اندام‌های گل و برگ هر دو گیاه بر روی فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز نشان داد که، گل و برگ گیاه گل‌استکانی برگه‌دار به ترتیب الگوی مهارکنندگی غیررقابتی و مرکب نارقابتی- غیررقابتی (نمودارهای ۱ و ۲) و عصاره اندام گل و برگ سیلن‌حبابی به ترتیب الگوی مهار مرکب نارقابتی- غیررقابتی و نارقابتی از خود نشان می‌دهند (نمودارهای ۳ و ۴). جهت مقایسه، آکاربوز که در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد، با الگوی مهار رقابتی باعث مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز شد.



شکل ۱- نمایش درصد مهار آلفاگلوکوزیداز توسط عصاره متانولی اندام‌های هوایی سیلن‌حبابی و آکاربوز (غلظت‌های عصاره گل، برگ، ساقه و آکاربوز به ترتیب ۲، ۲، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند).



شکل ۲- نمایش درصد مهار آلفاگلوکوزیداز توسط عصاره متانولی اندام‌های هوایی گل‌استکانی‌برگه‌دار با آکاربوز (غلظت‌های عصاره گل، برگ، ساقه و آکاربوز به ترتیب ۴۰، ۴۰، ۸ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند).

مقادیر پارامترهای سنتیکی:

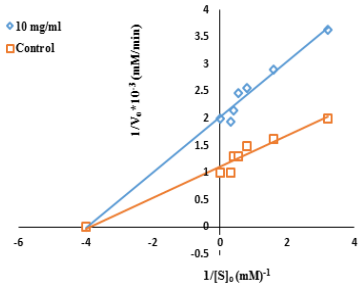
مقادیر K_m، V_{max}، K_m^{app} و V_{max}^{app} از طریق رسم نمودار $1/V_o$ علیه $1/[S]_o$ و به دست آوردن معادله‌ی خط، محاسبه شد. برای تعیین مقدار ثابت مهارکنندگی (K_i)، نمودار ثانویه رسم گردید (نمودارهای ۵-۸).

جدول ۲- مقادیر IC_{50} برای عصاره متانولی اندام‌های دارای بالاترین درصد مهار در مقایسه با آکاربوز(۰/۰۰۰۱ mg/ml).

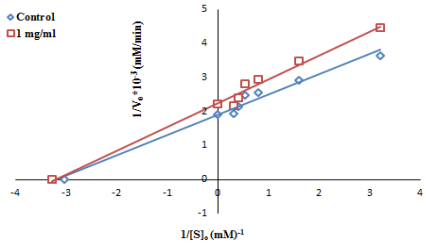
نام علمی گیاه	نام فارسی گیاه	اندام	IC_{50} (mg/ml)
Silene Ampullata Bioss	سیلن‌حبابی	برگ	۰/۱۳
		گل	۰/۱۳
Campanula involucrate Auch.ex DC	گل‌استکانی‌برگه‌دار	برگ	۰/۱۵
		گل	۰/۴۷

جدول ۳- مقادیر فعالیت مهارکنندگی نسبی(Relative inhibitory Activity=RA) برای عصاره متانولی اندام‌های دارای بالاترین درصد مهار.

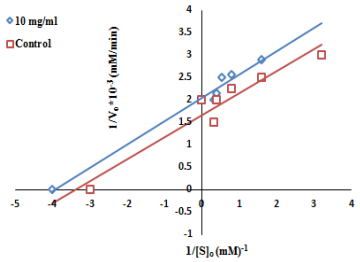
نام علمی گیاه	نام فارسی گیاه	اندام	فعالیت مهارکنندگی نسبی
Silene Ampullata Bioss	سیلن‌حبابی	برگ	۰/۰۰۱
		گل	۰/۰۰۱
Campanula involucrate Auch.ex DC	گل‌استکانی‌برگه‌دار	برگ	۰/۰۰۰۹
		گل	۰/۰۰۰۳



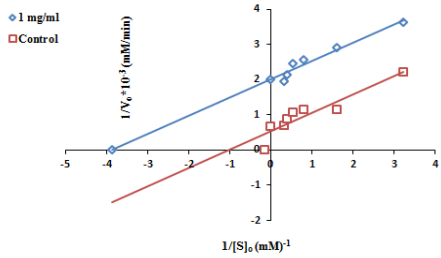
نمودار ۱- نمودار لینویور-برک تغییرات V_o^{-1} در مقابل $[S]_o^{-1}$ (نمودار معکوس مضاعف) با استفاده از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اندام گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار، الگوی مهار غیررقابتی می‌باشد.



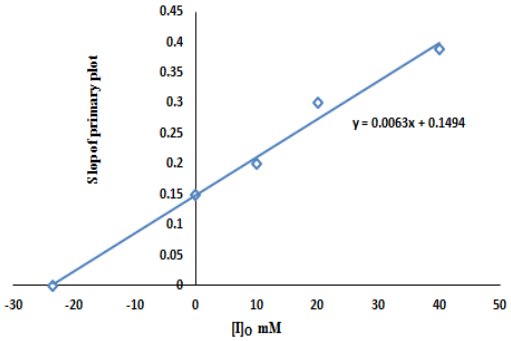
نمودار ۳- نمودار لینویور-برک تغییرات V_o^{-1} در مقابل $[S]_o^{-1}$ (نمودار معکوس مضاعف) با استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اندام گل گیاه سیلن‌حبابی، الگوی مهار مرکب نارقابتی- غیررقابتی می‌باشد.



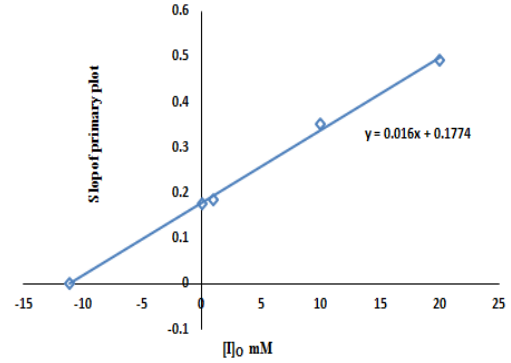
نمودار ۲- نمودار لینویور-برک تغییرات V_o^{-1} در مقابل $[S]_o^{-1}$ (نمودار معکوس مضاعف) با استفاده از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اندام برگ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار، الگوی مرکب نارقابتی- غیررقابتی می‌باشد.



نمودار ۴- نمودار لینویور-برک تغییرات V_o^{-1} در مقابل $[S]_o^{-1}$ (نمودار معکوس مضاعف) با استفاده از غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی اندام برگ گیاه سیلن‌حبابی، الگوی مهار نارقابتی می‌باشد.



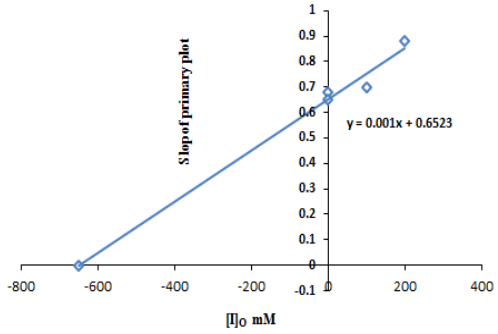
نمودار ۵- نمودار ثانویه تغییرات شیب نمودار اولیه در مقابل غلظت‌های مختلف مهارکننده جهت تعیین ثابت مهارکنندگی عصاره متانولی گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار.



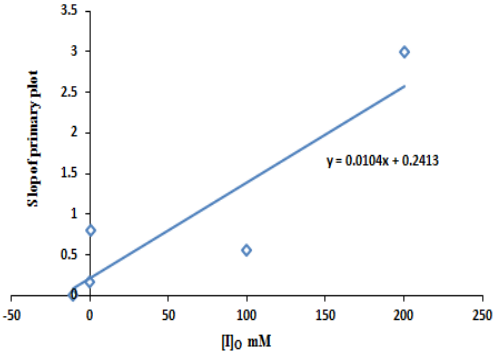
نمودار ۶- نمودار ثانویه تغییرات شیب نمودار اولیه در مقابل غلظت‌های مختلف مهارکننده جهت تعیین ثابت مهارکنندگی عصاره متانولی برگ گل‌استکانی‌برگه‌دار.

این نمودار از رسم تغییرات شیب نمودارهای اولیه لاین ویور برک در برابر غلظت‌های مختلف مهارکننده به دست آمدند. پارامترهای سنتیکی محاسبه شده برای عصاره متانولی اندام‌های دارای بالاترین درصد مهار در جدول (۴) آمده اند.

توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH توسط اندام‌های هوایی گیاهان مورد مطالعه: فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد عصاره متانولی اندام‌های هوایی دو گیاه توسط معرف DPPH صورت گرفت.



نمودار ۷- نمودار ثانویه تغییرات شیب نمودار اولیه در مقابل غلظت‌های مختلف مهارکننده جهت تعیین ثابت مهارکنندگی عصاره متانولی گل سیلن‌حبابی.

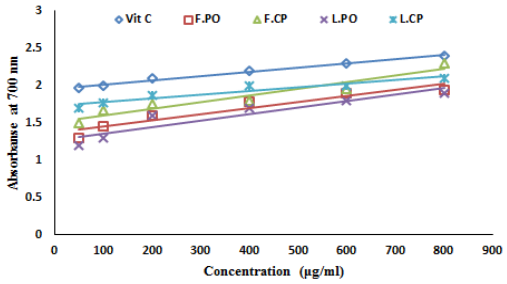


نمودار ۸- نمودار ثانویه تغییرات شیب نمودار اولیه در مقابل غلظت‌های مختلف مهارکننده جهت تعیین ثابت مهارکنندگی عصاره متانولی برگ سیلن‌حبابی.

درصد مهار DPPH و EC_{50} (بیان کننده مقدار غلظتی از عصاره که باعث مهار ۵۰ درصد از رادیکال آزاد می‌شود) توسط عصاره متانولی هریک از اندام‌های هوایی در گیاه سیلن‌حبابی و گل‌استکانی‌برگه‌دار (جدول ۵) نشان داده شده است. هم‌چنین مقدار RSA نیز در عصاره متانولی هر یک از اندام‌های هوایی دو گیاه (جدول ۶) آورده شده است.

توانایی احیاءکنندگی آهن توسط عصاره متانولی اندام¬های هوایی دو گیاه: توان احیاءکنندگی، قدرت الکترون‌دهی آنتی‌اکسیدان را نشان می‌دهد. در این روش قدرت احیایی عصاره متانولی اندام‌های هوایی براساس احیاء آهن III به آهن II ارزیابی می‌شود و محلول عصاره

هر اندامی که قدرت احیای بالایی داشته باشد، جذب بیش‌تری دارد، شکل ۳ منحنی غلظت- جذب عصاره متانولیی اندام‌های هوایی دو گیاه را نشان می‌دهد و مشاهده می‌شود که قدرت احیاءکنندگی تمام اندام‌ها با افزایش غلظت زیاد می‌شود.



شکل ۳- مقایسه درصد احیاء آهن برای عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاهان گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی، معنی علایم (گل سیلن‌حبابی=Po.F، برگِ سیلن‌حبابی=Po.L، گلِ گل‌استکانی‌برگه‌دار =Cp.F، برگِ گل‌استکانی‌برگه‌دار=Cp.L، ویتامین ث =Vit C)

مقدار فنل تام موجود در اندام‌های هوایی: مقدار ترکیبات فنلی تام عصاره متانولی گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلنحبابی براساس مقدار جذب حاصل از واکنش عصاره با معرف فولین‌سیوکالتو و بر مبنای مقایسه آن با نمودار استاندارد اسید گالیک و با استفاده از معادله خط حاصل از منحنی اسیدگالیک (y =۰/۰۱۱۴x + ۰/۶۸۲۹) محاسبه گردید (جدول۷).

مقدار فلاونوئید تام موجود در اندام‌های هوایی: مقدار فلاونوئید تام عصاره متانولی دو گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی بر مبنای روش رنگ‌سنجی کمپلکس آلومینیوم کلراید صورت گرفت. با قرار دادن میزان جذب عصاره اندام‌های هوایی در معادله خط منحنی استاندارد محلول کوئرستین (y =۰/۰۱۱۴x + ۰/۶۸۲۹) محاسبه میزان ترکیبات فلاونوئیدی صورت گرفت مقدار فلاونوئید محاسبه شده برای اندامهای هوایی هر دو گیاه در (جدول۸) آمده است.

جدول ۴- پارامترهای سنتیکی کنترل و مهار در حضور عصاره متانولی اندام‌های گیاهی دارای بیشترین درصد مهار آلفاگلوکوزیداز

پارامتر سنتیکی								نوع مهار
نام علمی گیاه	نام فارسی گیاه	اندام	غلظت (mg/ml)	K_m (mM)	V_{max} (mM/min)	K_m^{app} (mM)	V_{max}^{app} (mM/min)	K_i (mg/ml)	
Campanula involucrate Auch. ex DC	گل‌استکانی‌برگه‌دار	گل	۱۰	۰/۲۵	۰/۴۸	۰/۲۵	۰/۸۳	۲۳/۴۳	غیررقابتی
		برگ	۱۰	۰/۲۵	۰/۴۹	۰/۲۰	۰/۵۸	۱۱/۰۸	مرکب نارقابتی- غیررقابتی
Silene Ampullata Bioss	سیلن‌حبابی	گل	۱	۰/۲۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۴۴	۶۵۰	مرکب نارقابتی- غیررقابتی
		برگ	۰/۱	۰/۲۸	۰/۴۸	۰/۲۵	۰/۴۹	۱۰/۵۵	نارقابتی

جدول ۵- درصد مهار DPPH و EC_{50} نشان داده شده برای عصاره متانولی هریک از اندام¬های هوایی گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی، اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (EC_{50}=۰/۳۵ mg/ml).

اسم علمی گیاه	اندام	EC_{50} (mg/ml)	درصد احیا DPPH در غلظت ۱۰۰mg/ml
***Campanula involucrate* Auch.ex DC**	گل	۴/۵	۱۰۰
	برگ	۵/۵	۱۰۰
Silene Ampullata Bioss	گل	1	۱۰۰
	برگ	۵	۳۶/۶۵

جدول ۶- مقدار فعالیت به دام اندازی رادیکال نسبی (RSA=Relative Scavenging Activity) برای عصاره متانولی اندام‌های هوایی گیاهان

نام علمی گیاه	اندام	RSA
***Campanula involucrate* Auch.ex DC**	گل	۰/۰۷
	برگ	۰/۰۶
***Silene Ampullata* Bioss**	گل	۰/۳۵
	برگ	۰/۰۷

جدول ۷-محتوای فنلی محاسبه شده برای اندام‌های هوایی گیاهان مورد مطالعه

نام علمی گیاه	اندام‌های هوایی	محتوای فنلی (µg/ml)
***Campanula involucrate* Auch.ex DC**	گل	۱۰۸/۲۲
	برگ	۱۹/۹۲
***Silene Ampullata* Bioss**	گل	۱۲۰/۵۴
	برگ	۹۲/۱۴

نتایج طیف‌سنجی‌جرمی (GC/MS) : جهت کسب اطلاعاتی در خصوص ترکیبات موجود در عصاره‌های فعال، با استفاده از دستگاه (GC/MS)ترکیبات موجود در عصاره‌های متانولی دارای بیشترین درصد مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز مشخص شد. این عصاره‌ها شامل عصاره گل گیاه سیلن‌حبابی و عصاره گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار بود.

نتایج آنالیز GC/MSعصاره متانولی گلِ گیاه گل‌استکانی برگه‌دار: نمودار ۹ کروماتوگرام حاصل ازGC/MS مربوط به عصاره متانولی اندام گلِ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار می‌باشد. جدول۹ ترکیبات موجود در عصاره و مقدار آن‌ها را نشان می‌دهد. در میان پیک‌ها، ۵ پیک قابل توجه بودند که در مقایسه با ترکیبات استاندارد اقدام به شناسایی ترکیبات آن‌ها شد.

مطابق جدول ۹ و نمودار ۹، عصاره متانولی گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار دارای ۵ پیک قابل تشخیص است و در کل دارای ۱۳ ترکیب می‌باشد.

نتایج آنالیز GC/MSعصاره متانولی گلِ گیاه سیلن‌حبابی:

نمودار ۱۰ کروماتوگرام حاصل از GC/MS مربوط به

عصاره متانولی اندام گل گیاه سیلن‌حبابی می‌باشد. همچنین جدول۱۰ ترکیبات موجود در عصاره و مقدار آن‌ها را نیز نشان می‌دهد. در میان پیک‌ها ۷ پیک قابل توجه بودند که در مقایسه با ترکیبات استاندارد اقدام به شناسایی ترکیبات آن‌ها شد.

مطابق جدول۱۰ و نمودار ۱۰، عصاره متانولی گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار دارای ۵ پیک قابل تشخیص است و در کل دارای ۱۴ ترکیب می‌باشد.

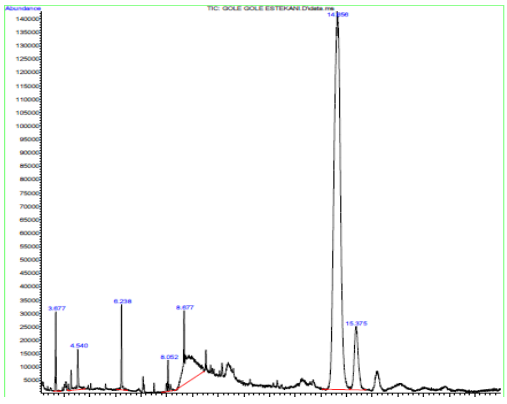
بحث و نتیجه گیری

گیاه سیلن حبابی (*Silene Ampullata* Bioss) از خانواده Caryophyllaceae و گیاهی یکساله است که اغلب در مکان‌های علفی و خشک می‌روید و مقاوم به خشکسالی و تنش گرمایی است (۳۰). گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار (*Campanula involucrate*) از خانواده *Campanulaceae* گیاهی علفی، یکساله، دوساله یا پایا هستند. مهمترین جنس تیره گل‌استکانی، کامپانولا می‌باشد که حدود ۲۵۰ گونه دارد و مرکز انتشار آن تقریباً نواحی مدیترانه‌ای است (۲۷). هردو گیاه در معرفی فلور، شکل زیستی و کورولوژی گیاهان منطقه سارال کردستان (زیر حوزه فرهاد آباد) مورد اشاره قرار گرفته‌اند (۲).

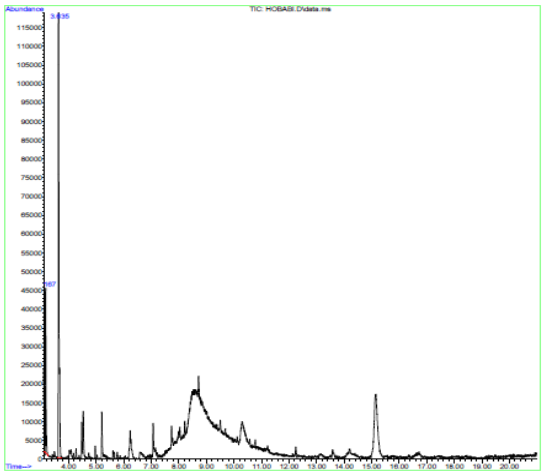
شای و همکاران در سال (۲۰۱۰)، تاثیر مهارکنندگی شش گیاه دارویی را بر روی فعالیت آلفاگلوکوزیداز مورد بررسی قرار دادند.

جدول ۸– محتوای فلاونوئید محاسبه شده برای اندام‌های هوایی گیاهان مورد مطالعه

نام علمی گیاه	**اندام‌های هوایی**	**محتوای فلاونوئیدی (µg/ml)**
***Campanula involucrate* Auch.ex DC**	گل	۳۰/۴۶
	برگ	۲۴/۵۸
***Silene Ampullata* Bioss**	گل	۵۶/۴۴
	برگ	۱۶/۲۵



نمودار ۹ – کروماتوگرام حاصل از GC/MS مربوط به عصاره متانولی اندام گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار (زمان بر حسب دقیقه است)



نمودار ۱۰- کروماتوگرام حاصل از GC/MS مربوط به عصاره اندام گل گیاه سیلن‌حبابی (واحد محور افقی زمان دقیقه است).

جدول ۹- ترکیبات شناسایی شده در عصاره متانولی اندام گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار توسط دستگاه GC/MS

شماره پیک	نام ترکیب	RT[a] (min)	درصد نسبی
۱	Trimethyl [4-(1,1,3,3,-tetramethylbutyl) phenoxy] silane	۳/۶۷۷	۱/۹۶٪
	2,4,6-Cycloheptatrien-1-one, 3,5-bis-trimethylsilyl		
۲	Benzene, 1-methyl-2,3-dinitroAllyl (dimethyl) benzyloxysilane	۴/۵۴	۲/۵۵٪
	Silane, trimethyl (phenylmethoxy)		
	Benzene, 1-methyl-2,3-dinitro		
۳	Benzaldehyde, 2,5-bis [(trimethylsilyl) oxy]	۸/۰۵۲	۱/۱۴٪
	Benzaldehyde, 2,4-bis (trimethylsiloxy)		
	Benzeneacetic acid, .alpha.,4-bis [(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester		
	4-Hydroxymandelic acid, ethyl ester, di-TMS		

۴	Diethyl Phthalate	۱۴/۶۵۶	۱۰۰٪
	Phthalic acid, ethyl isoporpyl ester		
۵	Diethyl Phthalate	۱۵/۳۷۵	۱۰/۷۲٪
	Phthalic acid, ethyl 2-pentyl ester		

جدول ۹- ترکیبات شناسایی شده در عصاره متانولی اندام گل گیاه سیلن‌حبابی توسط دستگاه GC/MS

شماره پیک	نام ترکیب	RT[a] (min)	درصد نسبی
۱	Acetic acid, 2-methylpropyl ester	۳/۱۶۷	۳۷/۱۷٪
	Acetic acid, butyl ester		
۲	Acetic acid, butyl ester	۳/۶۳۵	٪۱۲
۳	trans-(2- Chlorovinyl) methyldiethoxysilane	۵/۲۰۴	۲۱/۷٪
	Oxime-, methoxy-phenyl		
	[2-(4-Methoxy-phenyl)-[1,3]dioxolan-2- yl]-acetic acid		
	1-Buten-3-one, 1-(2-carboxy-4,4-dimethylcyclobutenyl)		
	5-Nitrobenzofuran-2-one		
۴	Silane, diethoxydimethyl	۶/۲۵۱	۱۰/۹۸٪
	dl-Glyceraldehyde diethylacetal		
	2,2-Diethoxyacetophenone		
۵	1,2,3-Propanetriol, monoacetate	۸/۶۱۴	۱۸/۱۵٪
	D-Mannitol		
	Xylitol		

نتایج نشان داد که عصاره گیاه *Cassia Abbreviata* بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی آلفا گلوکوزیداز دارد (۲۵). لاواگ و همکارانش در سال (۲۰۱۲)، ۶ گیاه بومی فیلیپین را برای وجود مهارکننده آلفاگلوکوریداز بررسی کردند (۱۵). گوردوبان و همکاران در سال (۲۰۱۲)، اثر مهارکنندگی ۱۰ گیاه دارویی ساحلی را بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز مخمر مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که *Citrullus colocynthis* بیشترین تاثیر مهارکنندگی را بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشته‌اند (۱۲).

براساس نتایج حاصل از این تحقیق بیشترین میزان فعالیت مهارکنندگی گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار مربوط به غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی برگ (۱۰۰٪) و عصاره متانولی گل (۱۰۰٪) بود، همچنین بیشترین میزان فعالیت مهارکنندگی گیاه سیلن‌حبابی مربوط به غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی برگ (۱۰۰٪) و عصاره متانولی گل (۱۰۰٪) بود. طبق نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که از میان اندام‌های هوایی دو گیاه فوق‌الذکر گل و برگ هر دو گیاه دارای اثر مهارکنندگی بالایی می‌باشند و جهت پژوهش‌های بعدی می‌توان بر روی این اندام‌ها تمرکز کرد. براساس مطالعات مربوط به محاسبه IC_{50} برای اندام‌های گیاهی مورد نظر عصاره اندام برگ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار (۱/۴ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر) و اندام‌های گل و برگ سیلن‌حبابی دارای کمترین مقدارِ IC_{50} (۱/۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بودند. همچنین شاخص RA هم برای این اندام‌ها، در مقایسه با سایر اندام‌ها، بیشترین مقدار (۰/۰۰۱) محاسبه گردید. اگر شاخص RA برابر ۱ باشد به این معنا است که مهارکننده مورد نظر ما دارای قدرت مهارکنندگی معادل قدرت مهارکنندگی آکاربوز است. اگر شاخص RA بیشتر از ۱ باشد یعنی مهارکننده دارای قدرت مهارکنندگی بیشتری نسبت به آکاربوز است و اگر کمتر از ۱ باشد بیانگر این است که مهارکننده دارای قدرت مهارکنندگی کمتری نسبت به آکاربوز (که یک مهارکننده قوی و استاندارد برای فعالیت آلفاگلوکوزیداز می‌باشد) است. این خصوصیات می‌تواند نشان‌دهنده وجود یک مهارکننده قوی‌تر در عصاره‌ی اندام‌های گل و برگ گیاه سیلن‌حبابی باشد، بنابراین در مطالعات بعدی با در نظر داشتن این موضوع می‌توان جهت یافتن ترکیباتی با فعالیت مهارکنندگی آلفاگلوکوزیداز، بیشتر بر روی این اندام از گیاه تحقیق کرد. مطابق نتایج حاصل از بررسی سنتیکی با استفاده از رویکرد لینویو – برک، عصاره متانولی اندام‌های گل و برگ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار به ترتیب الگوی مهار غیررقابتی و مرکب نارقابتی–غیررقابتی و عصاره متانولی اندام‌های گل و برگ گیاه سیلن‌حبابی به ترتیب الگوی مهارکنندگی مرکب نارقابتی–غیررقابتی و نارقابتی را از خود نشان دادند. در مورد گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار به دلیل وجود مهار غیررقابتی می‌توان این گونه برداشت نمود که مهارکننده موجود در عصاره به آنزیم و به مجموعه‌ی آنزیم– سوبسترا وصل می‌شود. همچنین در مورد برگ گیاه سیلن‌حبابی به دلیل وجود مهار نارقابتی می‌توان گفت که مهارکننده به مجموعه آنزیم– سوبسترا متصل می‌شود، که احتمالاً اتصال قبلی سوبسترا به آنزیم برای شکل‌گیری جایگاه اتصال مهارکننده برروی آنزیم لازم است.

نتایج حاصل از آزمایش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط اندام‌های هوایی گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی نسبت به کنترل مثبت) آسکوربیک اسید (نشان داد که خاصیت ضد رادیکالی در اندام‌های هوایی همانند آسکوربیک اسید وابسته به غلظت بود. به طوری که با زیاد شدن غلظت در هریک از اندام‌ها، عصاره متانولی اندام مربوطه، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد بیش‌تری نشان می‌دادند و همان‌طور که مشاهده شد، فعالیت مهارکنندگی در گل و برگ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار (غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و گل گیاه سیلن‌حبابی (غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (۱۰۰ درصد مهار) در مقایسه با آسکوربیک اسید با غلظت ۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۱۰۰ درصد مهار) برابر بودند و از این نظر قابل مقایسه با آسکوربیک اسید بودند. افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در

اندام‌های هوایی با افزایش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مرتبط می‌شود و در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، به دلیل زیاد شدن عوامل هیدروکسیل در واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال آزاد و در نتیجه توانایی مهارکنندگی عصاره مربوط به اندام هوایی زیاد می‌شود. باتوجه به نتایج به دست آمده، عصاره متانولی گل گیاه سیلن‌حبابی و گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار دارای میزان بالاتری از فنول و فلاونوئید تام در مقایسه با دیگر اندام‌های این دو گیاه بودند، البته باید توجه داشت که برگ گل‌استکانی‌برگه‌دار دارای مقدار قابل توجهی فنول و فلاونوئید است، که با نتایج صبورا و همکاران در خصوص پوست پسته قابل مقایسه است (۱). از آنجایی که ترکیبات فنولی و فلاونوئید دارای اثرات آنتی اکسیدانی هستند، بنابراین می‌توان گفت وجود چنین ترکیباتی عامل اصلی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان فوق‌الذکر می‌باشد، همچنین وجود این ترکیبات در انسان باعث جلوگیری بسیاری از بیماری‌ها به‌خصوص بیماری‌های قلبی- عروقی می‌شوند (۱۰). با توجه به نتایج به دست آمده از انجام آزمایش‌ها و طبق آنالیز واریانس مشاهده می‌شود که در دو تست آنتی‌اکسیدانی (DPPH و قدرت احیا) انجام شده، اختلاف کنترل و تست معنی‌دار بودند ($P<۰/۰۵$). در تمام تست‌ها مشاهده شد که گل و برگ گل‌استکانی‌برگه‌دار و گل سیلن‌حبابی فعالیت مهارکنندگی DPPH بالا و هم‌چنین خاصیت احیاکنندگی بالایی داشتند.

جهت کسب شناخت بیشتر از کم و کیف ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت مهاری آلفاگلوکوزیدازی با استفاده از دستگاه (GC/MS) ترکیبات موجود در عصاره‌های متانولی با بیشترین درصد مهار آلفاگلوکوزیدازی مشخص شدند. این عصاره‌ها شامل عصاره‌ی گلِ گیاهان گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی بود. نتایج حاصل از تعیین ترکیبات عصاره‌های گل گیاهان گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی حاکی از آن است که این عصاره‌ها حاوی گروه هیدروکسیل، فنیل و عنصر سیلیسیم می‌باشند. از این ترکیبات شناسایی شده می‌توان به ۲ (۴ – متوکسی‌فنیل) ۱و ۳ دیوکلان استیک‌اسید، ۵ – نیتروبنزوفوران، گلیسرآلدهید دی‌اتیل‌استال، ۳،۲،۱ – پروپانتریول مونوفسفات، مانیتول و زایلیتول اشاره کرد که دارای گروه هیدروکسیل می‌باشند، این ترکیبات دارای شباهت ساختاری با سوبسترای آنزیم آلفاگلوکوزیداز هستند. ترکیبات دیگری مانند بنزن – ۱–متیل–۳،۲–دینی ترو آلللیل (دی متیل) بنزیلوسی سیلان، سیلان، تری متیل (فنیل متیل)، ۲(۴ – متوکسی‌فنیل) – ۳،۱ دیوکلان استیک– اسید و اکسیم – متوکسی – فنیل دارای فنیل می‌باشند که این نشان دهنده تأثیر متیل در مهار آنزیم توسط این ترکیبات است. ترکیباتی از جمله ترانس – (۲– کلروونیل) متیل‌دی‌اتیل‌اکسیلانی، سیکلوتری‌سیلکسان– تری‌متیل (۴– ۳،۳،۱،۱) تترامتیل‌بوتیل) فنوکسی) سیلان، بنزن – ۱– متیل–۳،۲–دینی ترو آلللیل (دی متیل) بنزیلوسی سیلان، بنزالدئید–۵،۲–بیس‌تری متیل‌سایلیل‌اکسی، بنزالدئید– ۴،۲ – تری‌متیل– سیلوکسی، بنزنیک‌استیک‌اسید – آلفا.۴ بیس‌تری‌متیل‌سایلیل اکسی – تری‌متیل‌سیل‌استر، ۴ – هیدروکسی‌ماندلیک‌اسید–اتیل‌استر دارای عنصر سیلیسیم هستند، به علت وجود این عنصر در بسیاری از ترکیبات عصاره‌ی این دو گیاه این گونه برداشت می‌شود که این عنصر در مهار آنزیم ممکن است نقش بسزایی داشته باشد. باتوجه به ترکیبات موجود درعصاره متانولی دو اندام و همچنین مشخص شدن نوع مهار در دو اندام، انتظار میرود که این ترکیبات موجب مهار غیررقابتی در گلِ گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار و برگ سیلن‌حبابی شوند. همچنین به نظر می‌رسد که با توجه به مهار غیررقابتی در گل گیاهان گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی، این ترکیبات با تمایل متفاوت به آنزیم (E) و مجموعه آنزیم– سوبسترا (ES) متصل شوند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره متانولی

اندام‌های گل و برگ هر دو گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار و سیلن‌حبابی به صورت قابل توجهی دارای اثر مهارکنندگی بر روی فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز هستند. بنابراین شاید بتوان در مطالعات بعدی از این عصاره‌ها با هدف شناسایی منابع بالقوه جهت تهیه داروهای جدید در جلوگیری از پیشرفت بیماری دیابت و درمان این بیماری استفاده کرد. همان گونه که مشاهده شد گل گیاه سیلن‌حبابی و گل گیاه گل‌استکانی‌برگه‌دار دارای میزان بالاتری از فنول و فلاونوئید تام بودند که همین باعث می‌شود این اندام‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته باشند. عصاره متانولی گل و برگ گل‌استکانی‌برگه‌دار و گل سیلن‌حبابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان دادند، باتوجه به اینکه در سال‌های اخیر به دلایل مربوط به سلامتی توجه زیادی به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معطوف گردیده است و تحقیقات گسترده‌ای به منظور به کارگیری این ترکیبات در مواد غذایی به جای آنتی اکسیدان‌های سنتزی در دست اجرا است، شاید بتوان از این منابع جهت دسترسی به ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهره جست.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی همکاران و مسئولین دانشکده علوم دانشگاه کردستان به جهت فراهم نمودن شرایط و امکانات انجام این پژوهش ابراز می نمایند.

منابع

۱. آزاده‌دل، ش.، حناچی، پ.، و صبورا، ع.، ۱۳۹۶. بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی در عصاره پوست پسته (Pista)، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد۳۰، شماره ۴، صفحات ۸۲۷-۸۳۵ .

۲. گرگین کرجی، م.، کرمی، پ.، و معروفی، ح.، ۱۳۹۲. معرفی فلور، شکل زیستی و کورولوژی گیاهان منطقه سارال کردستان (زیر حوزه فرهاد آباد)، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد۲۶، شماره ۴، صفحات ۵۱۰-۵۲۵.

3. Almroth, B. C., Albertsson, E., Sturve, J., and Förlin, L., 2008. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant, Ecotoxicology and Environmental Safety, 70(3), PP: 370-378.

4. Asano, N., 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. Glycobiology, 13(10), PP: 93R-104R.

5. Bachhawat, J. A., Shihabudeen, M. S., and Thirumurugan, K., 2011. Screening of fifteen Indian ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics, Int Journal Pharm Pharm Sci, 3(4), PP: 267-74.

6. Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, Nature, 414(6865), 813 p.

7. Chang, T. S., 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors, International Journal of molecular sciences, 10(6), PP: 2440-2475.

8. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis, 10(3), PP.178-182..

9. Chung, Y. C., Chien, C. T., Teng, K. Y., and Chou, S. T., 2006. Antioxidative and mutagenic properties of Zanthoxylum ailanthoides Sieb & zucc. Food Chemistry, 97(3), PP: 418-425.

10. Dillard, C. J., and German, J. B., 2000. Phytochemicals, nutraceuticals and human health, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(12), PP: 1744-1756.

11. Frankel, E. N., 1991. Recent advances in lipid oxidation, Journal of the Science of Food and Agriculture, 54(4), PP: 495-511.

12. Fu, R., Zhang, Y., Guo, Y., and Chen, F., 2014. Antioxidant and tyrosinase inhibition activities of the ethanol-insoluble fraction of water extract of Sapium sebiferum (L.) Roxb, leaves, South African Journal of Botany, 93, PP: 98-104.

13. Gurudeeban, S., Satyavani, K., and Ramanathan, T., 2012. Alpha glucosidase inhibitory effect and enzyme kinetics of coastal medicinal plants, Bangladesh Journal of Pharmacology, 7(3), PP: 186-191.

14. Hinneburg, I., Dorman, H. D., and Hiltunen, R., 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food chemistry, 97(1), PP: 122-129.

15. Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays, Journal of agricultural and food chemistry, 53(6), PP: 1841-1856.

16. Ieyama, T., Gunawan-Puteri, M. D., and Kawabata, J., 2011. α-Glucosidase inhibitors from the bulb of Eleutherine americana. Food chemistry, 128(2), PP: 308-311.

17. Jayaprakasha, G. K., and Patil, B. S., 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange, Food Chemistry, 101(1), PP: 410-418.

18. Kazeem, M. I., Adamson, J. O., and Ogunwande, I. A., 2013. Modes of inhibition of α-amylase and α-glucosidase by aqueous extract of Morinda lucida Benth leaf. BioMed research international Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International , Article ID 527570, 6 pages http://dx.doi.org/10.1155/2013/527570.

19. Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin Journal Sci, Technol, 26(2), PP: 211-219.

20. Nyenwe, E. A., Jerkins, T. W., Umpierrez, G. E., and Kitabchi, A. E., 2011. Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes, Metabolism, 60(1), PP: 1-23.

21. Pistia-Brueggeman, G., and Hollingsworth, R. I., 2003. The use of the o-nitrophenyl group as a protecting/activating group for 2-acetamido-2-deoxyglucose. Carbohydrate research, 338(5), PP: 455-458.

22. Sayyah, M., Mandgary, A., and Kamalinejad, M., 2002. Evaluation of the anticonvulsant activity of the seed acetone extract of Ferula gummosa Boiss. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice, Journal of ethnopharmacology, 82(2-3), PP: 105-109.

23. Segel, I. H., 1976. Biochemical Calculations: How to Solve Mathematical Problems in General Biochemisrems in General Biochemistry.

24. Shahidi, F., and Naczk, M., 1995. Food Phenolics, Technomic pub. Co. Inc. Lancester-Basel.

25. Shai, L. J., and Masoko, P., et al. 2010. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa, South African Journal of Botany, 76(3), PP: 465-470.

26. Shim, Y. J., Doo, H. K., Ahn, S. Y., Kim, Y. S., Seong, J. K., Park, I. S., and Min, B. H., 2003. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of Rhus chinensis on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose Journal of ethnopharmacology, 85(2-3), PP: 283-287.

27. Shulkina, T. V., Gaskin, J. F., and Eddie, W. M. M., 2003. Morphological studies toward an improved classification of Campanulaceae s. str, Annals of the Missouri Botanical Garden, PP: 576-591.

28. Singh, P., Jayaramaiah, R. H., Agawane, S. B., Vannuruswamy, G., Korwar, A. M., Anand, A., and Kulkarni, M. J., 2016. Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights. Scientific reports, 6, 18798 p.

29. Vetrichelvan, Thangarasu, Maniappan Jegadeesan, and Bangaru Adigalar Uma Devi, 2002. "Anti-diabetic activity of alcoholic extract of Celosia argentea Linn, seeds in rats." Biological and pharmaceutical bulletin, 25, 4, PP: 526-528.

30. Viorela, Ţ., Elena, G. C., and Radu, S., 2012. Researches on the preparation and characterization of some tinctures from Silene Alba herba and Silene pendulae herba, Current health sciences journal, 38(20), PP. 80-83.

31. Yen, G. C., and Chen, H. Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1), PP: 27-32.

32. Zarei, M. A., and Tahazadeh, H., 2019, "Searching for Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity in Metanol Extracts by some Plants Kurdistan Province", Journal of Medicinal Plants, 18(72 And S12): 227-235.

33. Zhang, J., Zhao, S., Yin, P., Yan, L., Han, J., Shi, L., and Ma, C., 2014. α-Glucosidase inhibitory activity of polyphenols from the burs of Castanea mollissima Blume. Molecules, 19(6), PP: 8373-8386.

α-glycosidase inhibition activity and antioxidant properties of aerial parts methanol extract from *Silene Ampullata* Bioss and *Campanula Involucrate* Auch.ex Dc.

Almasi, H., and Zarei, M. A.,*

Dept. of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran.

Abstract

An increase in blood glucose after a meal for diabetics is a serious problem. One of the ways to cope with this problem is to inhibit the intestinal α-glucosidase. The inhibitory effect of methanol extract from aerial parts of Silene Ampullata Bioss and Campanula Involucrate Auch.ex Dc. previously has been reported, so the purpose of this study was to determine the location of the organs of this activity. The maximum inhibitory activity of Silene Ampullata Bioss, was related to the 2 mg/ml concentration of the leaf organ and flower organ's methanol extract (100%), and again the 40 mg/ml concentration of the leaf organ and flower organ methanol extract produced the maximum inhibitory activity for Campanula involucrate Auch.ex Dc. (100%). The minimum amount of IC50 (0.13 mg/ml) was achieved for the flower and leaf of Silene Ampullata Bioss. According to the results of kinetic studies, the methanol extracts from flower and leaf organs of Campanula involucrate showed non-competitive and mixed uncompetitive – non-competitive pattern of inhibitory activity on alpha-glucosidase, respectively. While the extracts from flower and leaf of Silene Ampullata Bioss showed a mixed and uncompetitive inhibition pattern of inhibitory activity on alpha-glucosidase, respectively. The methanol extract of Silene Ampullata and Campanula Involucrate flower organs had a significant antioxidant activity in comparison with other aerial organs.The methanol extract of the leaf and flower organs of Campanula involucrate and Silene Ampullata possesses effective inhibitors, therefore isolation and purification of active components and in vivo study of their effects on alpha-glucosidase could be the subject of further studies.

Key words: α-glucosidase, *Campanula involucrate* Auch.ex DC, Inhibitor, Methanol extract, *Silene Ampullata* Bioss