

تقصي الفعالية الحيوية (الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية على بعض أنزيمات الهضم) لنوعين من نبات الزعرور

طالب الدكتوراه: هاني سكايف كلية الصيدلة - جامعة دمشق

اشرف الدكتور: عصام الشماع + د. عماد الحداد

الملخص:

تم في هذه الدراسة تقدير كمية الفينولات الكلية، والفعالية المضادة للأكسدة، والفعالية التثبيطية على الأنزيمات الهاضمة (الألفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز والليباز) للمستخلصات الميتانولية لأوراق نوعين من جنس الزعرور هما *Crataegus monogyna* و *Crataegus azarolus var aronia* المجنية في الربيع والخريف. بالنسبة للعينات المجنية في فصل الخريف، أعطى مستخلص النوع *C.azarolus* الذي احتوى أعلى كمية من الفينولات (223 mg(GAE)/g) أعلى فعالية مضادة للأكسدة ($IC_{50}=45$ $\mu\text{g/ml}$)، وأعلى فعالية تثبيطية على أنزيم الألفا أميلاز ($IC_{50}=103$ $\mu\text{g/ml}$)، وعلى أنزيم الليباز ($IC_{50}=80$ $\mu\text{g/ml}$)، بينما أظهر مستخلص النوع *C.monogyna* الذي احتوى كمية من الفينولات (189 mg/g) أعلى فعالية تثبيطية على أنزيم الألفا غلوكوزيداز ($IC_{50}=161$ $\mu\text{g/ml}$). أما العينات المجنية في فصل الربيع، فقد كان مستخلص النوع *C.azarolus* sp والذي احتوى كمية من الفينولات (180 mg/g) أكثر فعالية تثبيطية على أنزيم الألفا أميلاز ($IC_{50}=119$ $\mu\text{g/ml}$)، وعلى أنزيم الليباز ($IC_{50}=116$ $\mu\text{g/ml}$)، بينما أعطى مستخلص النوع *C.monogyna* sp والذي احتوى كمية من الفينولات (152 mg/g) فعالية مضادة للأكسدة أعلى ($IC_{50}=71$ $\mu\text{g/ml}$)، وفعالية أعلى على أنزيم الألفا غلوكوزيداز ($IC_{50}=211$ $\mu\text{g/ml}$).

الكلمات المفتاحية: الزعرور *Crataegus*، كمية الفينولات الكلية، الفعالية المضادة للأكسدة، ألفا أميلاز، ألفا غلوكوزيداز، ليباز.

Investigation of the bioactivity (antioxidant activity and activity on some digestive enzymes) of two species of *Crataegus*

Abstract:

In this study, phenolic content, antioxidant activity, and inhibitory activity on the digestive enzymes (α -amylase, α -glucosidase, and lipase) were determined for the methanolic extracts of two species of the genus *Crataegus*, *monogyna* and *azarolus var aronia* harvested in spring and autumn. The extract of *C.azarolus* au with the highest phenolic content of (223 mg(GAE)/g) revealed highest antioxidant activity ($IC_{50}=45 \mu\text{g/ml}$), and highest inhibitory activity against α -amylase and lipase with an IC_{50} values of 103, 80 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The extract of *C.monogyna* au with phenolic content of (189 mg/g) revealed highest inhibitory activity against α -glucosidase with an IC_{50} values of 161 $\mu\text{g/ml}$. The extract of *C.azarolus* sp with phenolic content of (180 mg/g) revealed higher inhibitory activity against α -amylase and lipase with an IC_{50} values of 119, 116 $\mu\text{g/ml}$ respectively, compared to the extract of *C.monogyna* sp with phenolic content of (152 mg/g) which revealed higher antioxidant activity ($IC_{50}=71 \mu\text{g/ml}$), and higher inhibitory activity against α -glucosidase with an IC_{50} values of 211 $\mu\text{g/ml}$.

Key words: *Crataegus*, hawthorn, Phenolic content, Antioxidant activity, α -amylase, α -glucosidase, lipase.

1- مقدمة Introduction:

مرض السكري من النمط الثاني هو اضطراب استقلابي لا متجانس يتجلى إما بخلل في إفراز الأنسولين، أو بحساسية الخلايا اتجاه الأنسولين. عوز الأنسولين الكلي أو الجزئي يؤدي إلى ارتفاع سكر الدم. يؤدي تأخر إفراز الأنسولين مباشرة بعد الوجبات إلى ارتفاع مفاجئ في مستوى سكر الدم، يستمر هذا الارتفاع في مستويات سكر الدم التالي للوجبات لمدة ساعتين ويتراوح بين (140-199) مغاد (مغاد تحمل الغلوكوز) ثم يرتفع لأكثر من 200 مغاد في حالة وجود مرض السكري. [1] تحولت مؤخراً حالة مرض السكري من اعتباره اضطراب متوسط عند كبار السن إلى واحد من أهم أسباب المرض والموت، وذلك بسبب المضاعفات المزمنة له مثل الأمراض القلبية الوعائية، والأمراض العصبية، والأمراض الكلوية، وأمراض شبكية العين. هذه المضاعفات المزمنة لمرض السكري حولته إلى عبء اقتصادي على الاقتصاد وعلى الأفراد وذلك لغلاء العلاج. [2] يمكن استعمال مثبطات أنزيمات الألفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز كصف جديد من الأدوية المضادة للسكري، تساعد هذه المثبطات على منع التفكيك السريع للسكريات المتعددة غير القابلة للامتصاص في الجهاز الهضمي، إلى سكريات بسيطة قابلة للامتصاص، تمكننا بذلك من التحكم بمستويات السكر الدموية [3] [4].

تعرف البدانة حالياً بأنها اضطراب مزمن في الاستقلاب، ينتج عن عدم الموازنة بين كمية الطعام المتناولة والطاقة المصروفة، وهي تزداد بسرعة مقلقة في دول العالم، بسبب تناول الوجبات السريعة والمصنعة وخفض النشاط البدني. وهي مرتبطة بعدد كبير من الأمراض المزمنة والإعاقات مثل التهاب المفاصل وآلام العمود الفقري، أمراض الكبد الدهنية، ارتفاع ضغط الدم، انقطاع النفس الانسدادي النومي، حصوات المرارة، السكري من النمط الثاني، سرطانات الجهاز الهضمي والأمراض القلبية. [5] [6] إن تثبيط امتصاص الدهون هو أحد الاستراتيجيات المتبعة لعلاج البدانة حيث يتم تقليل هضم وامتصاص العناصر الغذائية لتقليل الكمية المأخوذة من الطاقة، وبما أن الدهون تساهم بأكثر من البروتين أو السكريات في اكتساب السعرات الحرارية غير المرغوب فيها، لذلك

يمكن اعتبار تثبيط امتصاص الدهون عامل مهم في محاربة البدانة، حيث يمكن التركيز على تثبيط هضم وامتصاص الدهون وتطوير أدوية مضادة للبدانة من خلال تثبيط عمل أنزيم الليباز المسؤول عن هضم الشحوم. [6] [7] وقد أظهرت العديد من المستخلصات النباتية فعالية مثبتة للأنزيمات الهاضمة (الألفاأميلاز والألفاغلوكوزيداز والليباز) حيث أعطى المستخلص الميثانولي لأوراق نبات *Juniperus phoenicea* قيمة IC_{50} $53.76 \mu g/ml$ لتثبيط أنزيم الألفاأميلاز، وقيمة IC_{50} $60.22 \mu g/ml$ لتثبيط أنزيم الليباز. [8] وأعطى مستخلص أوراق نبات العليق *Rubus grandifolius* قيم IC_{50} لتثبيط أنزيم الألفاغلوكوزيداز تراوحت بين $110 \pm 0.01 \mu g/ml$ و $9.150 \pm 0.01 \mu g/ml$ وأعطى المستخلص الإيثانولي لنبات الحلبة *Trigonella foenum-graceum* قيمة IC_{50} $244.15 \pm 1.80 \mu g/ml$ لتثبيط أنزيم الليباز. [10] أما المستخلص الميثانولي لأوراق نبات الزعرور *Crataegus azarolus* فقد أعطى قيمة IC_{50} $410 \mu g/ml$ لتثبيط أنزيم الألفاأميلاز، وقيمة IC_{50} $360 \mu g/ml$ لتثبيط أنزيم الليباز. [11] وأعطى المستخلص الميثانولي لثمار نبات الزعرور *Crataegus pinnatifida* قيمة IC_{50} $122.11 \pm 1.19 \mu g/ml$ لتثبيط أنزيم الألفاغلوكوزيداز. [12]

الزعرور *Crataegus* هو نبات واسع الانتشار في نصف الكرة الشمالي (آسيا وأوروبا وأمريكا الشمالية)، تم استعماله كغذاء وفي الطب لمئات السنين في أوروبا والصين. [13] الاسم مشتق من الكلمة اليونانية Kratos والتي تعني صلابة الخشب. [14] استخدمت مستخلصات الأوراق والثمار لنبات الزعرور في الطب الشعبي العربي منذ القدم في علاج العديد من الأمراض منها الأمراض القلبية الوعائية، السرطان، السكري، والضعف الجنسي. وفي المكسيك تستعمل مستخلصات نبات الزعرور في علاج مرض السكري، وخاصة إذا استعمل في المراحل الأولى للمرض. [15] [16]

2- تصنيف نبات الزعرور *Crataegus*: Classification of *Crataegus*

جدول (1): تصنيف نبات الزعرور

Kingdom	Plantae-النباتية
Subkingdom	Tracheobionta-النباتات الوعائية
Superdivision	Spermatophyta-النباتات البذرية
Division	Magnoliophyta-النباتات الزهرية
Class	Magnoliopsida-ثنائيات الفلقة
Subclass	Rosidae-الوردانيات
Order	Rosales-الورديات
Family	Rosaceae-الوردية
Genus	<i>Crataegus</i> L-الزعرور

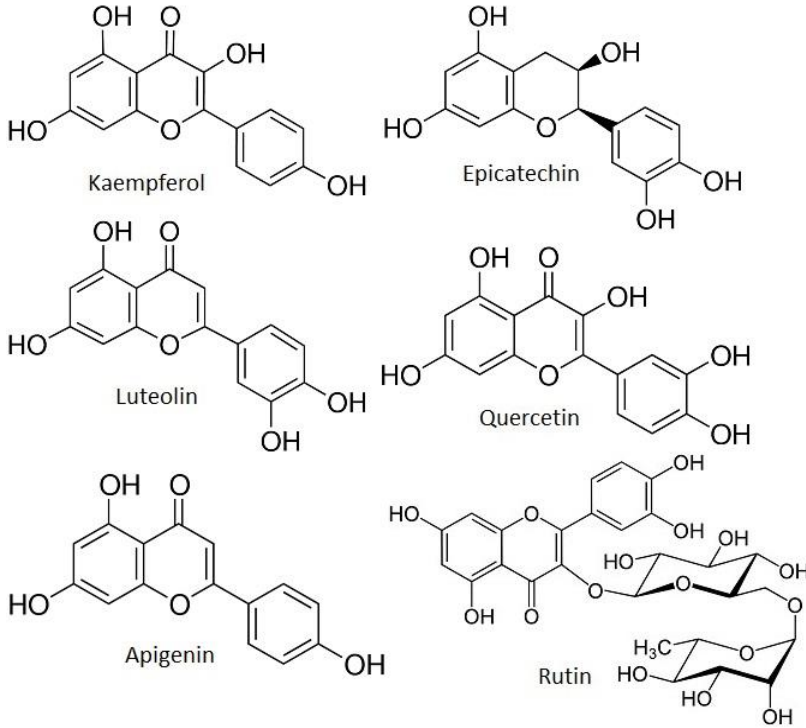
3- وصف النبات *Plant description*:

هو عبارة عن أشجار صغيرة أو شجيرات، متساقطة الأوراق، تملك أشواك بشكل عام، أوراقها بسيطة، متبادلة، مفصصة بثلاثة حتى سبعة فصوص، طول الأوراق حوالي 1.5-5 سم. الكأس 5 سبلات ملتحمة، التويج 5 بتلات حرة شبه مدورة، المأنث 1-3 كرابل، المبيض سفلي، ينتهي ب 1-3 أقلام. تنمو الأزهار في عناقيد من 5-15 زهرة مع ألوان تتدرج من الأبيض حتى الزهري والأحمر للزهرة حوالي 5-25 سداة. الثمار شبه كروية كاذبة، تعرف باسم توت الزعرور لونها أحمر أو أصفر أو أسود، وهي تملك محتوى أبيض لحمي يحتوي على 1-3 بذور حجرية. [14] [17]

4- التركيب الكيميائي *Chemical composition*:

(الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية على بعض أنزيمات الهضم) لنوعين من تقصي الفعالية الحيوية
نبات الزعرور

يحتوي نبات الزعرور على العديد من المركبات الفينولية تتضمن البروسيانيدين، والفلافونويدات، والأحماض الفينولية، والليغنانات، والسابونينات، والأمينات. وجد أن المحتوى الفينولي الرئيسي في أوراق نبات الزعرور هو الأحماض الفينولية وأهمها حمض الكلوروجينيك، وحمض الغاليك، وحمض الهيدروكسي بنزويك. والفلافونويدات وأهمها الكويرسيتين، والكامفيرول، والفانكسين، وسيكسانغولارتين، والهيريوزيد، والأيزوكويرسيتين، والروتين، والأيجنين، واللوتيولين. والأحماض ثلاثية التربين وأهمها حمض الأوليانوليك. [19] [18] [14] [13]



شكل(1): البنية الكيميائية لبعض المركبات الفعالة حيويًا الموجودة في نبات
الزعرور [13]

5- هدف البحث Aim of the study:

إجراء دراسة لجنس الزعرور *Crataegus* الموجود في سوريا وتشمل:

- الكشف عن كمية الفينولات الكلية الموجودة في المستخلصات المحضرة من الأوراق في فصلي الربيع والخريف لأنواع النباتية.
- تقصي الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات المحضرة من الأوراق في فصلي الربيع والخريف.
- دراسة فعالية المستخلصات المحضرة من الأوراق في فصلي الربيع والخريف لأنواع النباتية على الأنزيمات الهاضمة (الألفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز والليباز) في الزجاج.

6- مواد وطرق البحث **Materials and Methods**:

- المواد **Materials**:

Santa Cruz شركة DPPH) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-
فولين-سيوكالتو Folin-Ciocalteu شركة Sigma-Aldrich
Titan biotech شركة BHT) Butylated hydroxytoluene-
حمض الغاليك Gallic acid شركة Titan biotech
ميثانول Methanol شركة Fluka chemika
Merck شركة DMSO) Dimethyl sulfoxide-
أورليستات Orlistat شركة Sigma-Aldrich
أكاربوز Acarbose شركة Tokyo chemical industry
أنزيم ألفا أميلاز α -Amylase enzyme شركة Sigma-Aldrich
أنزيم ألفا غلوكوزيداز α -Glucosidase enzyme شركة Sigma-Aldrich
أنزيم ليباز Lipase enzyme شركة Sigma-Aldrich
دي نيترو ساليساليك أسيد Di nitro salicylic acid (DNS) شركة Sigma-
Aldrich
بارا-نيتروفينيل-ألفا-غلوكوبيرانوسيد P-nitrophenyl-a-glucopyranoside
شركة Tokyo chemical industry (pNPG)

بارا-نتروفينيل أوكتانوات (pNPO) شركة Sigma-Aldrich

• الأجهزة Equipments:

- 1- مطحنة لتتعيم النباتات Moulinex.
- 2- براد لحفظ المستخلصات النباتية Kelvinator.
- 3- جهاز المطياف الضوئي uv/vis Spectrophotometer من نوع SP-3000 Plus OPTIMA TOKYO, JAPAN.
- 4- جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator من نوع BuchiRotavapor R-205.

7- جمع العينات النباتية :Collection of Plant material

تم جمع أوراق نباتات جنس الزعرور *Crataegus* في فصل الربيع في شهر نيسان، وفي فصل الخريف في شهر تشرين الأول، من عدة مناطق في الصباح الباكر وهذه المناطق هي: ريف حمص، ريف طرطوس، ريف اللاذقية. حيث تم جمع عينات من نوعين من جنس الزعرور هي:

1- *Crataegus monogyna* (Cm)



شكل (2): ثمار وأزهار وأوراق وأشواك نبات *Crataegus monogyna*

2- *Crataegus azarolus* var. *aronia* (Caa)



شكل (3): ثمار وأزهار وأوراق وأشواك نبات *Crataegus azarolus var. aronia*

وقد تم تصنيف النوعين من قبل أ.د. عماد القاضي، كلية العلوم، جامعة دمشق.

7- الاستخلاص Extraction:

- تم تحضير مستخلصات ميتانولية من أوراق النباتات وفق الخطوات التالية:
- نُظفت العينات بغية التخلص من الشوائب العالقة، وجففت في مكان مظلم جيد التهوية، ثم تم طحنها ونخلها حتى تصبح مسحوق متجانس.
 - وُزن مقدار 50 غرام من مساحيق العينات الجافة.
 - نُقع بالميتانول 99% لمدة 72 ساعة مع التحريك. [20]
 - رُشحت المستخلصات وتم تركيز الراشح باستخدام المبخر الدوار عند درجة حرارة 40 درجة مئوية.
 - تم إعادة العملية ثلاث مرات. حيث حصلنا على 4 مستخلصات ميتانولية هي -مستخلصين من النوع Cm، المجني في فصل الربيع سمي Cm.sp، والمجني في فصل الخريف سمي Cm.au
 - مستخلصين من النوع Caa، المجني في فصل الربيع سمي Caa.sp، والمجني في فصل الخريف سمي Caa.au
- تم تحضير سلسلة تراكيز لكل مستخلص ($400-200-100-50-25$) $\mu\text{g/ml}$ بعد جفاف العينات، باستخدام الميتانول كمحل لتقدير كمية الفينولات الكلية وتقدير الفعالية المضادة للأوكسدة وباستخدام DMSO 10% كمحل لتقدير الفعالية التثبيطية على الأنزيمات الهاضمة. [21]

8- تقدير كمية الفينولات الكلية Determination of total phenolic

:Content

تشكل الفينولات أحد أهم نواتج الاستقلاب الثانوي في النبات، وهي مركبات تحوي حلقة عطرية أو أكثر يرتبط بها مجموعة هيدروكسيل واحدة أو أكثر. تنتشر بشكل واسع في المملكة النباتية، حيث تم التعرف على أكثر من ثمانية آلاف بنية فينولية تتراوح بين الجزيئات البسيطة مثل الأحماض الفينولية، وبين المتماثرات مثل التانينات. الفينولات النباتية تفيد في الحماية من الإشعاعات فوق البنفسجية وتأثير العوامل الممرضة كما تلعب دور في تلون النباتات. [22]

طريقة العمل: تم تقدير كمية الفينولات الكلية بالاعتماد على طريقة إرجاع كاشف فولين-سيوكالتو Folin-Ciocalteu (فوسفو موليبيدات وفوسفو تنغستات) إلى معقد أزرق اللون بوجود المركبات الفينولية. إجراء التفاعل على السلسلة المعيارية لحمض الغاليك:

- أخذ 0.5 مل من كل تركيز من تراكيز سلسلة حمض الغاليك المحضرة باستخدام

الميتانول كمحل $(10,20,30,40,50) \mu\text{g/ml}$

- 2.5 مل من كاشف الفولين المدد 10 مرات.

- 2 مل من كربونات الصوديوم (75 g/l)

- تركت الانابيب لمدة 30 دقيقة.

تشكل لون أزرق تمت قراءة شدة امتصاصه عند طول الموجة 765 نانومتر وهي طول موجة الامتصاص الأعظمي حيث حددت من خلال المسح الطيفي للمركب الملون الناتج باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

- تم إعادة العملية لكل تركيز ثلاث مرات.

إجراء التفاعل على العينات:

أخذ 0.5 مل من المحلول الميتانولي لكل مستخلص من المستخلصات النباتية ذوات

التركيز $400 \mu\text{g/ml}$ (حيث تم اختيار هذا التركيز بعد إجراء عدة اختبارات على عدة

تراكيز للعينات وكانت امتصاصيات العينات عند هذا التركيز ضمن المنحني البياني لسلسلة المعيارى حمض الغاليك) وأضيف لها ما يلي:

- 2.5 مل من كاشف الفولين المدد 10 مرات.

- 2 مل من كربونات الصوديوم (75 g/l)

- تركت الانابيب لمدة 30 دقيقة.

تكوّن لون أزرق تمت قراءته بطول موجة 765 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

- تم إعادة العملية لكل عينة ثلاث مرات.

بعد معرفة النتائج تم رسم منحني بياني بين الامتصاصية والتركيز $\mu\text{g/ml}$ لسلسلة المعيارى ثم عيّن تركيز الفينولات الكلية بالنسبة لحمض الغاليك لكل العينات. [23] [24] [25]

9- تقدير الفعالية المضادة للأكسدة Determination of Antioxidant

:activity

ينتج عن استقلاب الأوكسجين في الجسم جزيئات غير مستقرة تدعى الجذور الحرة Free radicals، وتعرف على أنها جزيئات غير مستقرة وشديدة التفاعل لاحتوائها على الكترون مفرد في مدارها، كما أنها قادرة على التواجد بشكل مستقل. [26] إنّ التخریب الحاصل بسبب العدد الكبير من الجذور الحرة لمدّة طويلة يحدث بشكل غير عكوس، ويقود لحدوث أمراض عديدة. [27] تعتبر المركبات الفينولية والفلافونويدية، والتي توجد في العديد من الفواكه والخضروات والشايات، المركبات الرئيسية المسؤولة عن الفعالية المضادة للأكسدة. [28]

طريقة العمل: تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال كاشف (DPPH).

- أخذ 2 مل من محلول DPPH ذو التركيز 0.02mM وأضيفت إلى 2 مل من كل تركيز من تراكيز السلسلة المختلفة ($\mu\text{g/ml}$ 400-200-100-50-25) المحضرة من المستخلصات باستخدام الميتانول كمحل ولكل العينات وللمعيارى (BHT) مضاد الأكسدة للمقارنة

- حرّك المحلول بلطف ومن ثم حضن في الظلام وبحرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة
- تم قراءة تناقص الامتصاص بطول موجة 520 نانومتر مقابل الشاهد
(DPPH + Methanol)
- تم إعادة كل تفاعل ثلاث مرات.

- تم حساب النسبة المئوية المضادة للأكسدة اعتماداً على العلاقة الآتية

$$(DPPH)_{inhibition\%} = ((A_{Blank} - A_{Sample}) / A_{Blank}) * 100$$

حيث $DPPH_{inhibition\%}$: النسبة المئوية للجذر الحر DPPH التي تم تثبيطها

A_{Blank} : شدة امتصاص الشاهد

A_{Sample} : شدة امتصاص العينة

تم رسم منحنيات بيانية بين التركيز ($\mu g/ml$) و ($DPPH_{inhibition\%}$) لجميع العينات باستخدام برنامج Excel 2016، ومنها تم حساب قيم التنشيط النصفية IC_{50} لمعرفة تركيز المستخلص القادر على تثبيط 50% من جذر DPPH. [29] [30]

10- تقدير الفعالية التثبيطية على أنزيم الألفا أميلاز :alpha-amylase inhibitory activity

أنزيم الألفا أميلاز α -1,4-glucan-4-glucanohydrolases هو أحد المركبات الرئيسية التي يفرزها البنكرياس والغدد اللعابية، يلعب دوراً هاماً في هضم النشاء والجليكوجين. يمكن أن يتواجد لدى الأحياء الدقيقة والنباتات والكائنات العليا. [31] يقوم أنزيم الألفا أميلاز بتحطيم الروابط الغليكوزيدية (1-4) α أما الروابط الفرعية (1-6) α فلا يستطيع تحطيمها وهذا يتطلب أنواعاً أخرى من الأنزيمات. [32] [33]

طريقة العمل: يحضن 0.5 مل من كل من المستخلص والأكاربوز ضمن التراكيز المختلفة المحضرة ($\mu g/ml$) (400-200-100-50-25) باستخدام 10% DMSO كمحل، مع 0.5 مل مع أنزيم الألفا أميلاز بتركيز 0.5 ملغم/مل في محلول موقى فوسفاتي (0.02M)، pH=6.9 لمدة 10 دقائق في حمام مائي، وبدرجة حرارة 25 درجة مئوية. بعدها يضاف 0.5 مل من محلول النشاء بتركيز 1%، ويستمر الحضن بعدها

لمدة 10 دقائق أخرى. بعد الحضان يتم إنهاء التفاعل بإضافة 1 مل من الركازة -3,5 Dinitrosalicylic acid (DNS) بتركيز 10 ملغم/مل إلى وسط التفاعل وهي العامل اللوني، بعدها تحضن الأنابيب في الماء الغالي لمدة 5 دقائق ثم تبرد إلى درجة حرارة الغرفة. يمدد مزيج التفاعل بإضافة 5 مل ماء مقطر. ثم تقاس امتصاصية مركب 3-amino,5-nitrosalicylic acid المتحرر من التفاعل بمقياس الطيف الضوئي spectrophotometer عند طول موجة 540 نانومتر. تم تحضير الناصع من جميع الكواشف الداخلة في التفاعل الكلي ما عدا الأنزيم استبدل بالمحلول الموقى، واستخدم الأكاربوز (مثبط معروف لأنزيم الألفا أميلاز) كشاهد إيجابي. [29] تم إعادة كل تفاعل ثلاث مرات وحساب النسبة المئوية للتثبيط لكل من المستخلصات والأكاربوز من العلاقة التالية: النسبة المئوية للتثبيط:

$$(I_{\text{amylase}\%}) = 100 - ((A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleB}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{controlB}})) \times 100$$

A_{sample} : شدة امتصاص العينة

A_{sampleB} : شدة امتصاص الناصع للعينة

A_{control} : شدة امتصاص الشاهد السلبي

A_{controlB} : شدة امتصاص الناصع للشاهد السلبي

تم رسم منحنيات بيانية بين التركيز ($\mu\text{g/ml}$) و ($I_{\text{amylase}\%}$) لجميع العينات باستخدام برنامج Excel 2016، ومنها تم حساب قيم التثبيط النصفية IC_{50} لمعرفة تركيز المستخلص القادر على تثبيط 50% من أنزيم الألفا أميلاز. [34][4] [35] [36]

11- تقدير الفعالية التثبيطية على أنزيم الألفا غلوكوزيداز Determination of α -glucosidase inhibitory activity

يتواجد أنزيم الألفا غلوكوزيداز في بطانة الأمعاء الدقيقة، حيث يقوم بحلمهة قليلات السكريات ليحولها إلى غلوكوز وسكريات بسيطة أخرى تكون قابلة للامتصاص من قبل الأمعاء. يقوم بتفكيك الرابطة ألفا-غلوكوبيرانوسيد α -glucopyranoside بشكل خاص، يُنتج عن الحلمهة ألفا-دي-غلوكوز α -D-glucose من الجهة غير المرجعة

للسكر. [37] [38] [39] تستعمل الوحدة الأنزيمية للتعبير عن فعالية الأنزيم وهي كمية الأنزيم القادرة على تفكيك (M) 10^{-6} (1 μ M) من الركازة في دقيقة واحدة. [40] طريقة العمل: يحضن 400 ميكرو لتر من كل من المستخلص والأكاربوز ضمن التراكيز المختلفة المحضرة (25-50-100-200-400) μ g/ml باستخدام 10% DMSO كمحل، مع 200 ميكرو لتر من أنزيم الألفاغلوكوزيداز بتركيز 1 وحدة/ملي في محلول موقى فوسفاتي (0.05M)، pH=6.8 لمدة 5 دقائق في حمام مائي بدرجة حرارة 30 درجة مئوية ضمن وسط pH=6.8 حيث تم إضافة 1 مل من محلول موقى فوسفاتي (0.05M)، pH=6.8. بعدها يضاف 400 ميكرو لتر من الركازة -paranitrophenyl- α -glucopyranoside (pNPG) بتركيز 0.002M إلى وسط التفاعل ويعاد إلى الحمام المائي وينتظر لمدة 30 دقيقة، ثم يتم إيقاف التفاعل بإضافة 1 مل من كربونات الصوديوم بتركيز 0.2M، ثم تقاس امتصاصية مركب (p-nitrophenol) المتحرر من التفاعل بمقياس الطيف الضوئي spectrophotometer عند طول موجة 410 نانومتر. تم تحضير الناصع من جميع الكواشف الداخلة في التفاعل الكلي ما عدا الأنزيم استبدل بالمحلول الموقى، واستخدم الأكاربوز (مثبط معروف لأنزيم الألفاغلوكوزيداز) كشاهد إيجابي. [41] تم إعادة كل تفاعل ثلاث مرات وحساب النسبة المئوية للتنشيط لكل من المستخلصات والأكاربوز من العلاقة التالية النسبة المئوية للتنشيط:

$$(I_{\text{Glucosidase}}\%) = 100 - ((A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleB}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{controlB}})) \times 100$$

A_{sample} : شدة امتصاص العينة

A_{sampleB} : شدة امتصاص الناصع للعينة

A_{control} : شدة امتصاص الشاهد السلبي

A_{controlB} : شدة امتصاص الناصع للشاهد السلبي

تم رسم منحنيات بيانية بين التركيز (μ g/ml) و ($I_{\text{Glucosidase}}\%$) لجميع العينات باستخدام برنامج Excel 2016، ومنها تم حساب قيم التنشيط النصفى IC_{50} لمعرفة تركيز المستخلص القادر على تثبيط 50% من أنزيم الألفاغلوكوزيداز. [1] [38] [42]

12- تقدير الفعالية التثبيطية على أنزيم الليباز Determination of lipase inhibitory activity:

الليباز هو الأنزيم الرئيسي الذي يقوم بهضم الدسم حيث يقوم بإزالة الأحماض الشحمية من المواقع α و α' في الشحوم الثلاثية triglyceride ليتشكل مركب شحمي هو β -أحادي الغليسريد وحموض دسمة طويلة السلسلة مشبعة وغير مشبعة [5].

طريقة العمل: يحضن 0.5 مل من كل من المستخلصات والأورليستات ضمن التراكيز المختلفة المحضرة (25-50-100-200-400) $\mu\text{g/ml}$ باستخدام 10% DMSO كمحل، مع 0.5 مل من أنزيم ليباز البنكرياس بتركيز 1 مغامل في محلول موقى فوسفاتي (0.1M)، pH=6.0 لمدة ساعة في حمام مائي بدرجة حرارة 30 درجة مئوية، ضمن وسط محلول موقى فوسفاتي (0.1 mM, pH 7.2, 0.1% Tween) ميكرو لتر من الركازة p-nitrophenyl octanoate (pNPO) بتركيز 0.01M في DMSO إلى وسط التفاعل، و ينتظر لمدة 5 دقائق، ثم تقاس فعالية الأنزيم بقياس امتصاصية مركب بارانتروفينول (p-nitrophenol) ذو اللون الأصفر المتحرر من التفاعل ببواسطة مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer عند طول موجة 410 نانومتر. تم تحضير الناصع من جميع الكواشف الداخلة في التفاعل الكلي ما عدا الأنزيم استبدل بالمحلول الموقى، واستخدم الأورليستات (مثبط معروف لأنزيم الليباز) كشاهد إيجابي.

تم إعادة كل تفاعل ثلاث مرات وحساب النسبة المئوية للتثبيط لكل من المستخلصات والأورليستات من العلاقة التالية:

النسبة المئوية للتثبيط:

$$(I_{\text{Lipase}\%}) = 100 - ((A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleB}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{controlB}}) \times 100)$$

A_{sample} : شدة امتصاص العينة

A_{sampleB} : شدة امتصاص الناصع للعينة

A_{control} : شدة امتصاص الشاهد السلبي

$A_{control}$: شدة امتصاص الناصع للشاهد السلبي

تم رسم منحنيات بيانية بين التركيز ($\mu\text{g/ml}$) و ($I_{Lipase}\%$) لجميع العينات باستخدام برنامج Excel 2016، ومنها تم حساب قيم التثبيط النصفية IC_{50} لمعرفة تركيز المستخلص القادر على تثبيط 50% من أنزيم الليباز. [5] [43] [44]

13- التحليل الإحصائي Statistical analysis:

تم حساب المتوسط والانحراف المعياري للنتائج باستخدام برنامج Excel 2016. وتم إجراء الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج SPSS-19 لتحليل التباين ولمعرفة أقل فرق معنوي عند مستوى احتمالية $P \geq$ ولمعرفة الفروقات المعنوية بين مستويات المعاملات المختلفة ولتبيان وجود علاقة بين كمية الفينولات الكلية مع قيم IC_{50} الفعالية المضادة للأكسدة وقيم IC_{50} لتثبيط أنزيمات الألفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز والليباز.

14- النتائج والمناقشة Results and discussion:

1- تحضير المستخلصات:

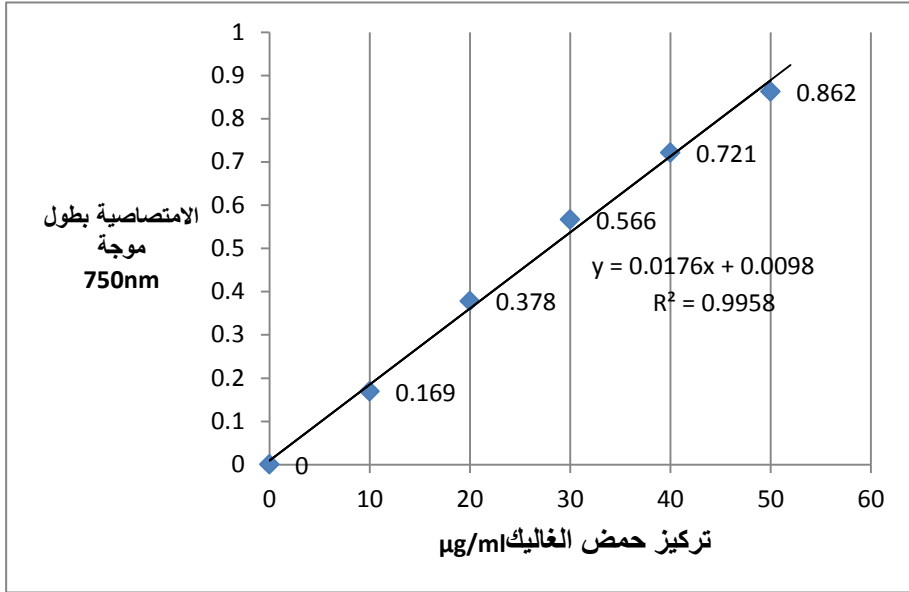
تراوحت النسب المئوية لوزن المستخلصات الميثانولية بعد التجفيف من 3.8 إلى 6.6%.

جدول (2): متوسط النسب المئوية لوزن المستخلصات الميثانولية بعد التجفيف

العينة	Cm.au	Cm.sp	Caa.au	Caa.sp
متوسط النسب المئوية لمردود الاستخلاص %	4.8±0.21	3.8±0.15	6.6±0.32	5.4±0.18

2- تقدير كمية الفينولات الكلية:

تم رسم منحنى بياني بين الامتصاصية والتركيز $\mu\text{g/ml}$ لسلسلة المعيارى حمض الغاليك



شكل(4): رسم بياني بين الامتصاصية والتركيز $\mu\text{g/ml}$ لسلسلة المعيارى (حمض الغاليك)

ثم تم إيجاد كمية الفينولات في العينات مقدرة بالمليغرامات المكافئة لحمض الغاليك في كل 1 غرام من المستخلص الجاف بالمقارنة مع المنحنى المعيارى لحمض الغاليك. احتوى مستخلص النوع Caa.au أعلى قيمة من كمية الفينولات $223 \pm 0.8 \text{ mg/g}$ ، بينما احتوى مستخلص النوع Cm.sp أقل كمية منها $152 \pm 0.3 \text{ mg/g}$. تتقارب هذه النتائج مع دراسة على مستخلص للنوع *Crataegus monogyna* عند استعمال الإيثانول كمحل حيث كانت كمية الفينولات 188.21 mg/g وذلك قد يعود لاستخدام محل كحولي في الاستخلاص كما في دراستنا. [45] وبالمقارنة مع دراسة على مستخلص ميتانولي للنوع *Crataegus azarolus var. aronia* وجد أن كمية الفينولات كانت 37.76 mg/g وقد يعود هذا الاختلاف مع دراستنا إلى اختلاف المنطقة الجغرافية والمناخ حيث أن النبات موجود في إيران على ارتفاع 1607م، مما يؤدي إلى اختلاف المحتوى الكيميائي للنبات. [46]

جدول(3): متوسط التراكيز المكافئة من حمض الغاليك للمستخلصات الميتانولية للعينات

(الفعالية المضادة للأوكسدة والفعالية على بعض أنزيمات الهضم) لنوعين من تقصي الفعالية الحيوية
نبات الزعرور

العينات بتركيز 400 µg/ml	Cm.au	Cm.sp	Caa.au	Caa.sp
كمية الفينولات الكلية مغاغ مكافئ من حمض الغاليك	189±0.4	152±0.3	223±0.8	180±0.4

3- تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة:

أعطى مستخلص Caa.au أعلى فعالية مضادة للأوكسدة $IC_{50}=45\pm1.3$ µg/ml، وأعطى مستخلص Caa.sp أقل فعالية $IC_{50}=82\pm1.9$ µg/ml، بينما أعطى الشاهد BHT $IC_{50}=17\pm0.2$ µg/ml. وتتقارب هذه النتائج مع دراسة على مستخلصات مائية وميتانولية وإيتانولية لأوراق النوع *Crataegus azarolus* حيث وجد أن قيم IC_{50} الفعالية المضادة للأوكسدة كانت 50 ± 5.207 ، 55 ± 2.886 ، 60 ± 2.28 بالترتيب. [47] وفي دراسة أخرى على مستخلصات للنوع *Crataegus monogyna* باستعمال محلات الكلوروفورم والإيتانول وخلات الإيثيل كانت قيم IC_{50} الفعالية المضادة للأوكسدة 197.85 ± 0.19 ، 33.19 ± 0.16 ، 5.53 ± 0.08 µg/ml بالترتيب، حيث نلاحظ تقارب نتائج دراستنا باستعمال الميتانول كمحل للاستخلاص مع نتيجة هذه الدراسة عند استعمال الإيتانول كونهما محلين كحوليين متشابهين، واختلافها عند استعمال الكلوروفورم وخلات الإيثيل نتيجة لاختلاف تراكيز المركبات المستخلصة تبعاً لاختلاف قطبية وطبيعة المحل المستخدم مما يؤثر على الفعالية الحيوية. [45]

جدول(4): النسب المئوية للفعالية المضادة للأوكسدة باستخدام DPPH لسلسلة التراكيز

للعينات والشاهد BHT وقيم التثبيط النصفى IC_{50}

سلسلة التراكيز لكل عينة µg/ml	النسب المئوية للفعالية المضادة للأوكسدة للعينات والشاهد BHT				
	Cm.au	Cm.sp	Caa.au	Caa.sp	BHT

25	44±0.17	43±0.17	45±0.19	42±0.14	46±0.16
50	48±0.22	47±0.28	50±0.17	47±0.18	53±0.25
100	55±0.19	54±0.27	57±0.19	52±0.25	62±0.24
200	68±0.30	66±0.36	71±0.42	65±0.22	77±0.48
400	79±0.59	77±0.46	85±0.67	77±0.52	90±0.64
قيم التثبيط النصفي IC ₅₀	58±1.6	71±1.8	45±1.3	82±1.9	17±0.3

4- تقدير الفعالية التثبيطية على أنزيم الألفا أميلاز:

تراوحت قيم IC₅₀ للعينات بين 103±1.7 و 148±2.3 µg/ml، وتم تعيين الفعالية المثبطة لأنزيم الألفا أميلاز لكل المستخلصات ومقارنتها مع الشاهد الأكاربوز. كانت أعلى فعالية تثبيط لمستخلص Caa.au، أما أقل فعالية تثبيط فقد كانت لمستخلص Cm.sp، بينما أعطى الشاهد Acarbose IC₅₀=61±0.3 µg/ml، وبالمقارنة مع كمية الفينولات الكلية للمستخلصات وجد أن المستخلص التي احتوى كمية أعلى من الفينولات هو الذي أعطى فعالية مثبطة أعلى لأنزيم الألفا أميلاز بمعامل ارتباط قوي ومستوى دلالة sig 0.04. وبالمقارنة مع دراسة على مستخلص ميتانولي للنوع *Crataegus oxyacantha* وجد أن قيمة IC₅₀ كانت حوالي 62 µg/ml وقد يعود هذا الاختلاف إلى اختلاف النوع النباتي والمنطقة الجغرافية مما يؤدي إلى اختلاف في التركيب الكيميائي للنبات. [48] وفي دراسة أخرى أجريت على مستخلص مائي للنوع *Crataegus azarolus var aronia* وجد أن قيم IC₅₀ تراوحت بين 1810-3010) وقد يعود هذا الاختلاف عن نتائج دراستنا إلى استعمال الماء كمحل للاستخلاص وهذا يؤدي إلى استخلاص المكونات عالية القطبية بشكل أساسي. [49] وبالمقارنة بين المركبات المثبطة لأنزيم الألفا أميلاز في الدراسات المرجعية والمركبات الموجودة في نبات الزعرور، تم تحديد بعض المركبات التي قد يعزى التأثير المثبط لها

(الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية على بعض أنزيمات الهضم) لنوعين من تقصي الفعالية الحيوية نبات الزعرور

وهي: الكويرسيتين، والكامفيرول، والروتين، واللوتيولوين، وحمض الكلوروجينيك، وحمض الأوليانوليك. [31]

جدول(5): النسب المئوية للفعالية التثبيطية على أنزيم الألفا أميلاز لسلسلة التراكيز للعينات والشاهد Acarbose وقيم التثبيط النصفى IC_{50}

سلسلة التراكيز لكل عينة $\mu\text{g/ml}$	النسب المئوية للفعالية التثبيطية على أنزيم الألفا أميلاز للعينات والشاهد Acarbose				
	Cm.au	Cm.sp	Caa.au	Caa.sp	Acarbose
25	35±0.28	34±0.33	36±0.39	35±0.36	41±0.37
50	44±0.26	41±0.38	46±0.41	45±0.47	48±0.43
100	52±0.56	49±0.47	53±0.52	52±0.37	62±0.44
200	60±0.63	57±0.51	63±0.56	60±0.66	78±0.59
400	75±0.49	72±0.71	80±0.68	76±0.61	91±0.74
قيم التثبيط النصفى IC_{50}	125±1.4	148±2.3	103±1.7	119±1.8	61±0.3

5- تقدير الفعالية التثبيطية على أنزيم الألفا غلوكوزيداز:

تراوحت قيم IC_{50} للعينات بين 161 ± 1.6 و 275 ± 1.9 $\mu\text{g/ml}$. وقد تم تعيين الفعالية المثبطة لأنزيم الألفا غلوكوزيداز لكل المستخلصات ومقارنتها مع الشاهد الأكاربوز. كانت أعلى فعالية تثبيط لمستخلص Cm.au، أما أقل فعالية تثبيط فقد كانت لمستخلص Caa.sp، بينما أعطى الشاهد Acarbose $IC_{50} = 79 \pm 0.3$ $\mu\text{g/ml}$. تقاربت نتائج دراستنا مع دراسة أجريت على مستخلص ميتانولي للنوع *Crataegus pinnatifida* حيث وجد أن قيمة IC_{50} كانت $122 \mu\text{g/ml}$ [12]. وبالمقارنة مع دراسة

أجريت على مستخلص ميتانولي للنوع *Crataegus oxyacantha* وجد أن قيمة IC_{50} كانت $1.5 \pm 0.5 \mu g/ml$ وقد يعود هذا الاختلاف عن دراستنا إلى اختلاف في التركيب الكيميائي للنبات بسبب اختلاف النوع النباتي والمنطقة الجغرافية. [48] وبالمقارنة بين المركبات المثبطة لأنزيم الألفاغلوكوزيداز في الدراسات المرجعية والمركبات الموجودة في نبات الزعرور، تم تحديد بعض المركبات التي قد يعزى التأثير المثبط لها وهي: الكويرسيتين، والإيزوكويرسيتين، واللوتينولين. [50]

جدول (6): النسب المئوية للفعالية التثبيطية على أنزيم الألفاغلوكوزيداز لسلسلة التراكيز

للعينات والشاهد Acarbose وقيم التثبيط النصفية IC_{50}

سلسلة التراكيز لكل عينة $\mu g/ml$	النسب المئوية للفعالية التثبيطية على أنزيم الألفاغلوكوزيداز للعينات والشاهد Acarbose				
	Cm.au	Cm.sp	Caa.au	Caa.sp	Acarbose
25	30 ± 0.28	24 ± 0.22	26 ± 0.17	18 ± 0.18	39 ± 0.25
50	35 ± 0.32	27 ± 0.27	30 ± 0.35	21 ± 0.26	46 ± 0.31
100	44 ± 0.48	37 ± 0.39	38 ± 0.44	30 ± 0.34	53 ± 0.45
200	57 ± 0.53	52 ± 0.43	54 ± 0.57	41 ± 0.50	73 ± 0.59
400	80 ± 0.63	73 ± 0.67	76 ± 0.62	65 ± 0.54	89 ± 0.68
قيم التثبيط النصفية IC_{50}	161 ± 1.6	211 ± 2.3	193 ± 1.7	275 ± 1.9	79 ± 0.3

6- تقدير الفعالية التثبيطية على أنزيم الليباز:

تراوحت قيم IC_{50} للعينات بين 80 ± 1.4 و 132 ± 2.1 $\mu g/ml$. وقد تم تعيين الفعالية المثبطة لأنزيم الليباز لكل المستخلصات ومقارنتها مع الشاهد الأورليستات. كانت أعلى

فعالية تثبيط لمستخلص Caa.au ، أما أقل فعالية تثبيط فقد كانت لمستخلص Cm.sp ، بينما أعطى الشاهد Orlistat $IC_{50}=14\pm0.2 \mu\text{g/ml}$ ، وبالمقارنة مع كمية الفينولات الكلية للمستخلصات وجد أن المستخلصات التي احتوت كمية أعلى من الفينولات هي التي أعطت فعالية مثبطة أعلى لأنزيم الليباز بمعامل ارتباط قوي ومستوى دلالة 0.04 sig. وبالمقارنة مع دراسة أجريت على مستخلص مائي للنوع *Crataegus aronia* وجد أن قيمة IC_{50} كانت حوالي $225 \mu\text{g/ml}$ وقد يعود هذا الاختلاف إلى استعمال الماء كمحل للاستخلاص وهذا يؤدي غالباً إلى استخلاص المكونات عالية القطبية. [51] وفي دراسة أخرى أجريت على مستخلص إيتانولي للنوع *C.azarolus var.eu azarolus* وجد أن قيمة IC_{50} كانت حوالي $252 \mu\text{g/ml}$ وقد يعود هذا الاختلاف إلى اختلاف النوع النباتي والمنطقة الجغرافية مما يؤدي إلى اختلاف في التركيب الكيميائي للنبات. [52] وبالمقارنة بين المركبات المثبطة لأنزيم الليباز في الدراسات المرجعية والمركبات الموجودة في نبات الزعرور، تم تحديد بعض المركبات التي قد يعزى التأثير المثبط لها وهي: الكويرسيتين والروتين وحمض الكلوروجينيك. [53]

جدول (7): النسب المئوية للفعالية التثبيطية على أنزيم الليباز لسلسلة التراكيز للعينات

والشاهد Orlistat وقيم التثبيط النصفية IC_{50}

سلسلة التراكيز لكل عينة $\mu\text{g/ml}$	النسب المئوية للفعالية التثبيطية على أنزيم الليباز للعينات والشاهد Orlistat				
	Cm.au	Cm.sp	Caa.au	Caa.sp	Orlistate
25	38 ± 0.30	35 ± 0.27	39 ± 0.32	37 ± 0.37	43 ± 0.38
50	46 ± 0.35	42 ± 0.38	47 ± 0.43	44 ± 0.40	56 ± 0.45
100	52 ± 0.48	49 ± 0.53	54 ± 0.58	50 ± 0.45	64 ± 0.53
200	67 ± 0.59	61 ± 0.63	69 ± 0.59	62 ± 0.68	79 ± 0.71
400	79 ± 0.74	74 ± 0.69	80 ± 0.77	75 ± 0.65	92 ± 0.78
قيم التثبيط	93 ± 1.5	132 ± 2.1	80 ± 1.4	116 ± 1.8	14 ± 0.2

النصفي IC ₅₀					
----------------------------	--	--	--	--	--

7- التحليل الإحصائي:

تبيّن بعد إجراء الدراسة الإحصائية وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين زيادة كمية الفينولات الكلية وزيادة الفعالية التثبيطية على أنزيمي الألفأميلاز والليباز.

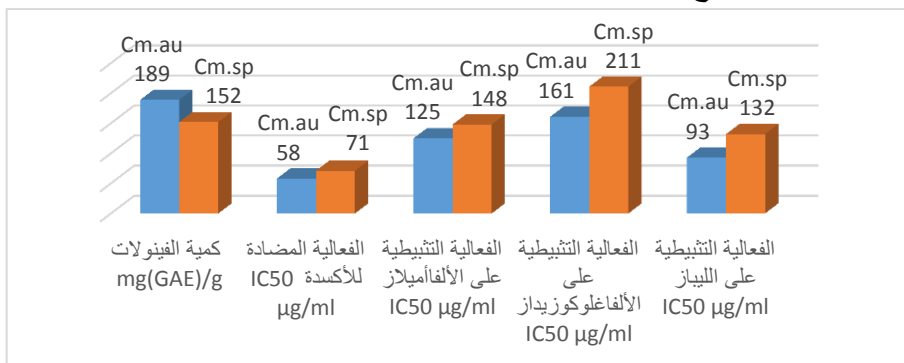
جدول(8): دراسة إحصائية للعلاقة بين كمية الفينولات الكلية في المستخلصات مع الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية التثبيطية على أنزيمات الألفأميلاز والألفاغلوكوزيداز والليباز

الفعالية التثبيطية على الليباز	الفعالية التثبيطية على الألفاغلوكوزيداز	الفعالية التثبيطية على الألفأميلاز	الفعالية المضادة للأكسدة	البعد	كمية الفينولات
0.04	0.7	0.04	0.24	مستوى الدلالة sig	
دال (يوجد ارتباط) عند مستوى 0.05	غير دال (لا يوجد ارتباط)	دال (يوجد ارتباط) عند مستوى 0.05	غير دال (لا يوجد ارتباط)	القرار	
0.95		0.95		معامل الارتباط pearson	
قوي		قوي		نوعه	

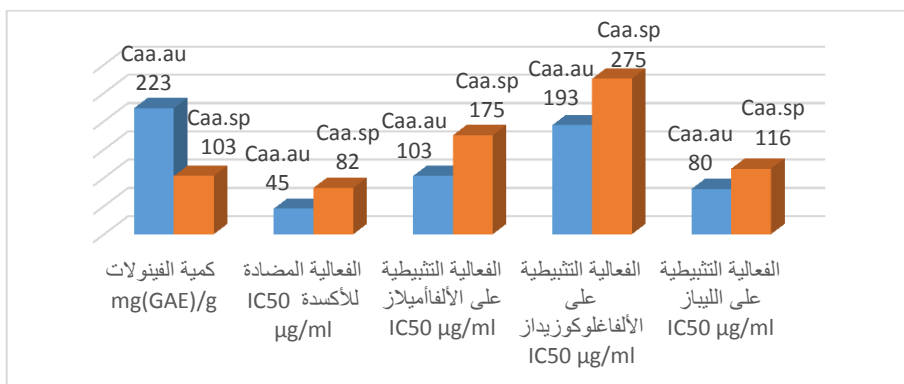
وقد تمت المقارنة بين مستخلصات كل نوع باختلاف وقت الجني بين فصلي الربيع والخريف، حيث لوحظ أن المستخلصات التي جنت في فصل الخريف احتوت كمية أعلى من الفينولات وكان لها فعالية مضادة للأكسدة وفعالية تثبيطية أعلى من

(الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية على بعض أنزيمات الهضم) لتوعين من تقصي الفعالية الحيوية نبات الزعرور

المستخلصات التي جنت في فصل الربيع، وذلك قد يعود إلى اختلاف المحتوى الكيميائي ونوع وتركيز المركبات المسؤولة عن الفعالية باختلاف فصل جني النبات، وقد جاء ذلك موافقاً للدراسات التي بينت أن المحتوى الفينولي في النبات يزداد في الصيف والخريف مقارنة بالربيع. [54] [55] [56]



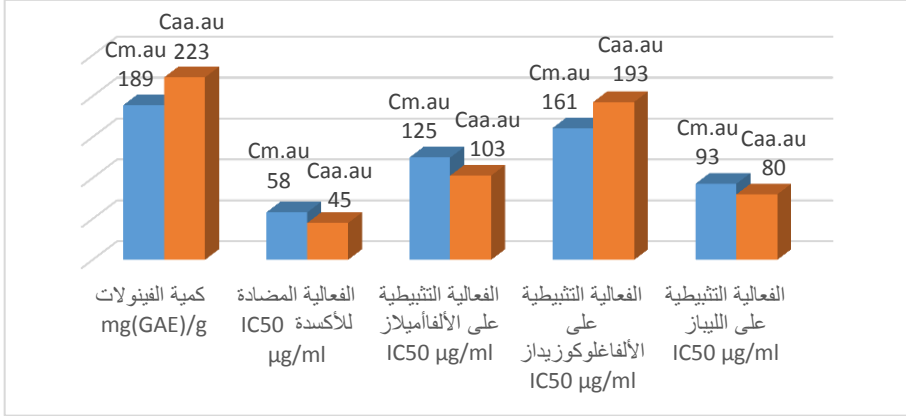
شكل (5): مقارنة متوسط كمية الفينولات الكلية مع متوسط قيم IC₅₀ الفعالية المضادة للأكسدة ومتوسط قيم IC₅₀ لتثبيط أنزيمات الألفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز والليباز للمستخلصين Cm.au و Cm.sp



شكل (6): مقارنة متوسط كمية الفينولات الكلية مع متوسط قيم IC₅₀ الفعالية المضادة للأكسدة ومتوسط قيم IC₅₀ لتثبيط أنزيمات الألفا أميلاز والألفا غلوكوزيداز والليباز للمستخلصين Caa.au و Caa.sp

وتمت المقارنة بين مستخلصي النوعين المجننين في فصل الخريف حيث لوحظ أن مستخلص النوع Caa.au احتوى كمية من الفينولات أعلى، وأعطى فعالية مضادة

للأكسدة وفعالية تثبيطية على أنزيمي الألفاأميلاز والليباز أعلى، أما بالنسبة لأنزيم الألفاغلوكوزيداز فقد كان مستخلص النوع Cm.au ذو فعالية تثبيطية أعلى، وذلك قد يعود إلى اختلاف نوع المركبات المسؤولة عن الفعالية بين النوعين واختلاف تراكيدها. [46]



شكل (7): مقارنة متوسط كمية الفينولات الكلية مع متوسط قيم IC₅₀ الفعالية المضادة للأوكسدة ومتوسط قيم IC₅₀ لتثبيط أنزيمات الألفاأميلاز والألفاغلوكوزيداز والليباز للمستخلصين Cm.au و Caa.au

15- الاستنتاجات والتوصيات **Conclusions and recommendations:**

- 1- أظهرت نتائج الدراسة أن النسب المئوية لوزن المستخلصات الميثانولية للعينات بعد التجفيف تراوحت من 3.8 إلى 6.6 %.
- 2- احتوى مستخلص النوع Caa.au أعلى كمية من الفينولات الكلية مقارنة ببقية المستخلصات.
- 3- أعطى مستخلص النوع Caa.au أعلى فعالية مضادة للأوكسدة.
- 4- أظهر مستخلص النوع Caa.au والذي احتوى أعلى كمية من الفينولات الكلية أعلى فعالية تثبيطية على أنزيم الألفاأميلاز.
- 5- أعطى مستخلص النوع Cm.au أعلى فعالية تثبيطية على أنزيم الألفاغلوكوزيداز.
- 6- كان مستخلص النوع Caa.au والذي احتوى أعلى كمية من الفينولات الكلية الأكثر فعالية تثبيطية على أنزيم الليباز.

7- تبين وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين كمية الفينولات الكلية والفعالية التثبيطية على أنزيمي الألفأميلاز والليباز، حيث تؤدي زيادة كمية الفينولات الكلية إلى زيادة الفعالية التثبيطية على كل من الأنزيمين. وقد كانت كمية الفينولات الكلية أكبر، والفعالية المضادة للأكسدة أعلى، والفعالية التثبيطية على الأنزيمات الهاضمة الألفأميلاز والألفاغلوكوزيداز والليباز أعلى، للعينات المجنية في فصل الخريف مقارنة مع تلك المجنية في فصل الربيع لنفس النوع النباتي. واحتوى النوع Caa كمية أكبر من الفينولات مقارنة بالنوع Cm وكذلك أعطى فعالية مضادة للأكسدة أعلى، وفعالية تثبيطية على الأنزيمات الهاضمة الألفأميلاز والليباز أعلى، بينما أعطى النوع Cm فعالية تثبيطية أعلى على أنزيم الألفاغلوكوزيداز.

➤ التوصيات:

- 1- إجراء دراسة كيميائية ومجهرية على نبات الزعرور الموجود في سورية بمختلف أجزائه النباتية ودراسة تأثيراته العلاجية المختلفة وتوثيقها.
- 2- استخدام مُحَلَّات وطرق أخرى في استخلاص الفينولات ومقارنة الوزن بعد التجفيف والفعالية المضادة للأكسدة والفعالية التثبيطية على الأنزيمات الهاضمة الألفأميلاز والألفاغلوكوزيداز والليباز مع النتائج في الدراسة الحالية للوصول للطريقة المثلى.
- 3- دراسة الفعالية الحيوية سريرياً (*in vivo*) لخلاصات الزعرور وتقدير الجرعة المثالية والتأثيرات السمية في الجرعات العالية.
- 4- إجراء تحليل بواسطة تقنيات الاستشراب السائل لمستخلصات نبات الزعرور والتعرف على تركيبها ثم تحديد فعالية كل مركب على حدى للوصول إلى مركبات قد تستخدم في عملية تطوير أدوية حديثة.

16- المراجع References:

- [1] Bachhawat A, Shihabudeen J M sham, Thirumurugan K. Screening of fifteen indian ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. Int J Pharm Pharm Sci 2011;3:8.
- [2] Rege AAA, Chowdhary AS. Research Article Evaluation of Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activities of Ocimum sanctum Linn. Int J Pharm Sci Rev Res 2014;25:130-3.
- [3] Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. Food Sci Hum Wellness 2014;3:136-74.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>.
- [4] Hanh TTH, Dang NH, Dat NT. α -Amylase and α - Glucosidase Inhibitory Saponins from Polyscias fruticosa Leaves. J Chem 2016;2016:3-8.
<https://doi.org/10.1155/2016/2082946>.
- [5] Roh C, Jung U. Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. Int J Mol Sci 2012;13:1710-9.
<https://doi.org/10.3390/ijms13021710>.
- [6] Seyedan A, Alshawsh MA, Alshagga MA, Koosha S, Mohamed Z. Medicinal Plants and Their Inhibitory Activities against Pancreatic Lipase: A Review. Evidence-Based

Complement Altern Med 2015;2015:13.

<https://doi.org/10.1155/2015/973143>.

- [7] Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the Regulation Review of Energy Balance total fast of approximately 150 days! This impressive energy reserve is due both to the high energy content of triglycerides versus polysaccharides, and the fact. Cell 2001;104:531–43.
- [8] Keskes H, Mnafigui K, Hamden K, Damak M, El Feki A, Allouche N. In vitro anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea* L. leaves from Tunisia. Asian Pac J Trop Biomed 2014;4:S649–55. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B114>.
- [9] Spínola V, Pinto J, Llorent–Martínez EJ, Tomás H, Castilho PC. Evaluation of *Rubus grandifolius* L. (wild blackberries) activities targeting management of type–2 diabetes and obesity using in vitro models. Food Chem Toxicol 2018;123:443–52. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.006>.
- [10] Elbashir SMI, Devkota HP, Wada M, Kishimoto N, Moriuchi M, Shuto T, et al. Free radical scavenging, α -glucosidase inhibitory and lipase inhibitory activities of eighteen Sudanese medicinal plants. BMC Complement Altern Med 2018;18:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2346->

y.

- [11] Samah S, Abdullah K, Ream N. Phytochemical Screening of *Alchemilla Vulgaris* , *Sophora Japonica* , *Crataegus* Phytochemical Screening of *Alchemilla Vulgaris* , *Sophora Japonica* , *Crataegus Azarolus* , and Their Inhibitory Activity on Lipase and α -Amylase. *Int J Acad Sci Res* 2018;6:01–21.
- [12] Chowdhury SS, Islam MN, Jung HA, Choi JS. In vitro antidiabetic potential of the fruits of *Crataegus pinnatifida*. *Res Pharm Sci* 2014;9:11–22.
- [13] Liu P. Composition of hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits and leaves and emblic leafflower (*Phyllanthus emblica*) fruits. 2012.
- [14] Kumar D, Arya V, Bhat Z qar A, Khan NA, Prasad DN. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Rev Bras Farmacogn Brazilian J Pharmacogn* 2012;22(5):1187–200.
- [15] Diane A, Borthwick F, Wu S, Lee J, Brown PN, Dickinson TA, et al. Hypolipidemic and cardioprotective benefits of a novel fireberry hawthorn fruit extract in the JCR:LA–cp rodent model of dyslipidemia and cardiac dysfunction. *Food Funct* 2016;7:3943–52.
<https://doi.org/10.1039/c6fo01023g>.

- [16] Rigelsky JM, Sweet B V. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *Am J Heal Pharm* 2002;59:417–22.
<https://doi.org/10.1093/ajhp/59.5.417>.
- [17] Al-Hakim W, Al-Kadi I AE. Atlas of medicinal and aromatic plants 2012:195–6.
- [18] Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 2012;79:5–26.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.006>.
- [19] Wu J, Peng W, Qin R, Zhou H. *Crataegus pinnatifida*: Chemical Constituents, Pharmacology, and Potential Applications. *Molecules* 2014;19:1685–712.
<https://doi.org/10.3390/molecules19021685>.
- [20] Adam OAO, Abadi RSM, Ayoub SMH. Effect of Extraction method and Solvents on yield and Antioxidant Activity of Certain Sudanese Medicinal Plant Extracts. *J Phytopharm* 2019;8:248–52. <https://doi.org/10.31254/phyto.2019.8507>.
- [21] Misuri L, Cappiello M, Balestri F, Moschini R, Barracco V, Mura U, et al. The use of dimethylsulfoxide as a solvent in enzyme inhibition studies: the case of aldose reductase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017;32:1152–8.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1363744>.
- [22] Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and

- their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010;15:7313–52.
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- [23] Song FL, Gan RY, Zhang Y, Xiao Q, Kuang L, Li H Bin. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants. *Int J Mol Sci* 2010;11:2362–72. <https://doi.org/10.3390/ijms11062362>.
- [24] Martono Y, Yanuarsih FF, Aminu NR, Muningggar J. Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound from *Moringa oleifera* leaves. *J Phys Conf Ser* 2019;1307. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1307/1/012014>.
- [25] A Agbor G, Vinson JA, Donnelly PE. Folin–Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet* 2014;147–56. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>.
- [26] Pérez JAM, Aguilar TAF. Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico. *Oxidative Stress Chronic Degener. Dis. – A Role Antioxidants*, 2013. <https://doi.org/10.5772/52247>.
- [27] Acimovic M, Tesevic V, Todosijevec M, Djisalov J, Oljaca S. Compositional characteristics of the essential oil of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* grown in Serbia. *Bot Serbica* 2015;39:9–14.

- [28] Angelov G. Extraction of Fennel (*Foeniculum vulgare*) Seeds: Process Optimization and Antioxidant Capacity of the Extracts. *Chem Biochem Eng Q* 2016;30:245–53. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2281>.
- [29] Oboh G, Ogunsuyi OB, Ogunbadejo MD, Adefegha SA. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *J Food Drug Anal* 2016;24:627–34. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.03.003>.
- [30] Büyükbacı A, El SN. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods Hum Nutr* 2008;63:27–33. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0065-5>.
- [31] de Sales PM, de Souza PM, Simeoni LA, Magalhães P de O, Silveira D. α -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharm Sci* 2012;15:141–83. <https://doi.org/10.18433/J35S3K>.
- [32] Boivin M, Zinsmeister AR, Go VLW, Dimagno EP. Effect of a Purified Amylase Inhibitor on Carbohydrate Metabolism After a Mixed Meal in Healthy Humans. *Mayo Clin Proc* 1987;62:249–55. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)61900-4](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)61900-4).
- [33] Madeswaran A, Asokkumar K, Umamaheswari M,

- Sivashanmugam T, Subhadradevi V, Jagannath P. In silico docking evaluation of α -Amylase inhibitory activity of Butein and Tricetin. *J Comput Methods Mol Des* 2014;4:51–6.
- [34] Subramanian R, Asmawi MZ, Sadikun A. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochim Pol* 2008;55:391–8. https://doi.org/10.18388/abp.2008_3087.
- [35] Thilagam E, Parimaladevi B, Kumarappan C, Chandra Mandal S. α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity of *Senna surattensis*. *JAMS J Acupunct Meridian Stud* 2013;6:24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.10.005>.
- [36] Kazeem MI, Mayaki AM, Ogungbe BF, Ojekale AB. In-vitro studies on *Calotropis procera* leaf extracts as inhibitors of key enzymes linked to diabetes mellitus. *Iran J Pharm Res* 2016;15:37–44. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2016.1804>.
- [37] Zhang J, Liu Y, Lv J, Li G. A colorimetric method for α -glucosidase activity assay and its inhibitor screening based on aggregation of gold nanoparticles induced by specific recognition between phenylenediboronic acid and 4-aminophenyl- α -d-glucopyranoside. *Nano Res* 2015;8:920–30. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0573-1>.
- [38] Abbas G, Al-Harrasi AS, Hussain H. α -Glucosidase Enzyme Inhibitors from Natural Products. *Discov. Dev.*

- Antidiabetic Agents from Nat. Prod. Nat. Prod. Drug Discov., Elsevier Inc.; 2017, p. 251–69.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809450-1.00009-0>.
- [39] Oliveira RF, Gonçalves GA, Inácio FD, Koehnlein EA, de Souza CGM, Bracht A, et al. Inhibition of pancreatic lipase and triacylglycerol intestinal absorption by a Pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Nutrients* 2015;7:5601–14.
<https://doi.org/10.3390/nu7075242>.
- [40] Kazlou AY. Units of measurement , calculation and expression of enzymatic activity 2020.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31363.04646>.
- [41] Hayakawa T, Noda A, Kondo T, Okumura N. Effects of acarbose, an alpha–glucosidase inhibitor (Bay G 5421), on orally loaded glucose, maltose and sucrose and on blood glucose control in non–insulin–dependent diabetics. *Nagoya J Med Sci* 1985;47:35–41.
<https://doi.org/10.18999/nagjms.47.1-2.35>.
- [42] Kazeem MI, Adamson JO, Ogunwande IA. Modes of inhibition of α –amylase and α –glucosidase by aqueous extract of morinda lucida benth leaf. *Biomed Res Int* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/527570>.
- [43] Gil–Rodríguez AM, Beresford TP. Lipase inhibitory activity

- assay for fermented milk. *MethodsX* 2020;7:100999.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100999>.
- [44] Marmouzi I, Ezzat SM, Mostafa ES, El Jemli M, Radwan RA, Faouzi MEA, et al. Isolation of secondary metabolites from the mediterranean sponge species; *Hemimycale columella* and its biological properties. *SN Appl Sci* 2021;3.
<https://doi.org/10.1007/s42452-020-04052-8>.
- [45] Dekić V, Ristić N, Dekić B, Ristić M. Phenolic and flavonoid content and antioxidant evaluation of hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits and leaves extracts. *Univ Thought – Publ Nat Sci* 2020;10:20–5.
<https://doi.org/10.5937/univtho10-25574>.
- [46] Alirezalu A, Salehi P, Ahmadi N, Sonboli A, Aceto S, Maleki HH, et al. Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus* spp.) from different regions of iran. *Int J Food Prop* 2018;21:452–70. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1446146>.
- [47] Kallassy H, Fayyad–Kazan M, Makki R, EL–Makhour Y, Hamade E, Rammal H, et al. Chemical Composition, Antioxidant, Anti– Inflammatory, and Antiproliferative Activities of the Plant Lebanese *Crataegus Azarolus* L. *Med Biochem* 2017;23:14.
<https://doi.org/10.12659/msmbr.905066>.
- [48] Salehi P, Asghari B, Esmaeili MA, Dehghan H, Ghazi I. a–

- 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.
<https://doi.org/10.5897/JMPR11.1320>.
- [49] Rjeibi I, Zaabi R, Jouida W. Characterization of Polysaccharides Extracted from Pulps and Seeds of *Crataegus azarolus* L. var. *aronia*: Preliminary Structure, Antioxidant, Antibacterial, α -Amylase, and Acetylcholinesterase Inhibition Properties. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:11.
<https://doi.org/10.1155/2020/1903056>.
- [50] Assefa ST, Yang EY, Chae SY, Song M, Lee J, Cho MC, et al. Alpha glucosidase inhibitory activities of plants with focus on common vegetables. *Plants* 2020;9:1–16.
<https://doi.org/10.3390/plants9010002>.
- [51] Al-Hallaq EK, Kasabri V, Abdalla SS, Bustanji YK, Afifi FU. Anti-Obesity and Antihyperglycemic Effects of *Crataegus aronia* Extracts: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluations. *Food Nutr Sci* 2013;04:972–83.
<https://doi.org/10.4236/fns.2013.49126>.
- [52] Abu-Gharbieh E, Shehab NG. Therapeutic potentials of *Crataegus azarolus* var. *eu-azarolus* Maire leaves and its isolated compounds. *BMC Complement Altern Med*

- 2017;17:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1729-9>.
- [53] De La Garza AL, Milagro FI, Boque N, Campión J, Martínez JA. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Med* 2011;77:773–85. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270924>.
- [54] Pavlovic J, Mitic S, Mitic M, Kocic G, Pavlovic A, Tosic S. Variation in the phenolic compounds profile and antioxidant activity in different parts of hawthorn (*Crataegus pentagyna* Willd.) during harvest periods. *Polish J Food Nutr Sci* 2019;69:367–78. <https://doi.org/10.31883/pjfn/112019>.
- [55] Liu P, Kallio H, Yang B. Phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruit ripening. *J Agric Food Chem* 2011;59:11141–9. <https://doi.org/10.1021/jf202465u>.
- [56] Gori A, Nascimento LB, Ferrini F, Centritto M, Brunetti C. Seasonal and diurnal variation in leaf phenolics of three medicinal mediterranean wild species: What is the best harvesting moment to obtain the richest and the most antioxidant extracts? *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25040956>.

(الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية على بعض أنزيمات الهضم) لنوعين من تقصي الفعالية الحيوية
نبات الزعرور
