مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الهندسية المجلد (5) العدد(3) 2021
Tartous University Journal for Research and Scientific Studies - engineering Sciences Series Vol. (5) No. (3) 2021

تقدير قدرة المستخلص المائي لنبات *Centaurium erythraea* في تثبيط نشاط أنزيم α–أميلاز

أ.د. علي محمد علي*

د. وسام زم**

م. ديمة سمير سليم*

(تاريخ الإيداع 9 /2 /2021 . قُبِل للنشر في 25 /4 /2021)

□ ملخّص □

تقوم مثبطات أنزيم (alpha amylase) بدورٍ مهمٍ في تدبير فرط سكر الدم بعد الأكل وعلاج مرض السكري من النوع الثاني. تعد المثبطات الطبيعية أكثر أماناً من المثبطات الاصطناعية. لذلك، هناك اهتمام متزايد في الآونة الأخيرة لصناعة الأغذية والأدوية باستخدام المركبات الطبيعية النشطة بيولوجيا كمغذيات مضادة لمرض السكري. يعد نبات(*Centaurium erythraea*) مصدر غني للمركبات ذات القيمة الصيدلانية، وأحد أهم النباتات الطبية التي تنمو في الجبال الساحلية السورية.

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقدير قدرة المستخلص المائي لنبات (*C. erythraea*) في تثبيط نشاط أنزيم (α-amylase). تم تحضين المستخلص بتراكيز مختلفة مع محلول الركيزة والأنزيم وتم قياس النشاط المثبط بطريقة طيفية. تم استخدام دواء acarbose كمثبط قياسي(شاهد ايجابي). تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن المستخلص المائي ل *Centaurium erythraea* يظهر أنشطة جيدة مثبطة لأنزيم الأميلاز (حيث كانت قيمة IC كانت 618.81 µg/mL) عند مقارنتها مع أكاربوز (قيمة IC 50 كانت 116.31 µg/mL).

الكلمات المفتاحية: *Centaurium erythraea* – الأميلاز – مستخلص مائي– داء السكري.

*أستاذ في قسم تقانة الأغذية – كلية الهندسة التقنية – جامعة طرطوس – سورية.

**مدرس في قسم الكيمياء الغذائية والتحليلية – كلية الصيدلة – جامعة طرطوس – سورية.

*** طالبة دراسات عليا (ماجستير) في قسم تقانة الأغذية – كلية الهندسة التقنية – جامعة طرطوس – سورية.

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الهندسية المجلد (5) العدد(3) 2021
Tartous University Journal for Research and Scientific Studies - engineering Sciences Series Vol. (5) No. (3) 2021

Evaluation of alpha amylase inhibitory activity of *Centaurium erythraea* infusion

Prof.Dr. Ali Mohammad Ali*
Dr. Wissam Zam**
Eng. Dimah Sameer Saleem*

(Received 9/ 2 / 2021 . Accepted 25 / 4 / 2021)

□ ABSTRACT □

Inhibitors of alpha amylase play a critical role in the clinical management of postprandial hyperglycemia and the treatment of type-2 diabetes. natural inhibitors are potentially safer than synthetic inhibitors. Therefore, there is recently a growing interest of food and pharmaceutical industry in using natural bioactive compounds as anti-diabetic nutrients. *Centaurium erythraea* is a rich source of pharmaceutically valuable compounds and one of the most important pharmacological species growing in the coastal mountains of Syria.

The aim of the present study was to provide in vitro evidence for potential inhibition of alpha-amylase enzyme by the aqueous extract of *C. erythraea*. Different concentrations of extract were incubated with enzyme substrate solution and the inhibitory activities was measured. Acarbose was used as the standard inhibitor. This study supports that *C. erythraea* infusion exhibit significant a-amylase inhibitory activities, the IC50 value was 618.81 µg/mL, when compared with acarbose (IC 50 value µg/mL 116.31).

Keywords: Centaurium erythraea – amylase – infusion – Diabetes Mellitus

* professor_ Department of Food Technology, Faculty of Technical Engineering, Tartous University. Syria.
** Assistant professor _ Department of Analytical and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tartous University, Syria.
*** Postgraduate Student_ Department of Food Technology, Faculty of Technical Engineering, Tartous University. Syria.

1. المقدمة:

أصبحت في العقود الماضية الأمراض غير المعدية مثل داء السكري وفرط شحوم الدم والسمنة مصدر قلق كبير، بسبب مضاعفاتها الخطيرة المختلفة، لاسيما ارتباطها بأمراض القلب والأوعية الدموية. ومن المتوقع أن يزداد انتشارها في جميع أنحاء العالم في العقود القادمة [1]. حيث يتسبب داء السكري ، وهو اضطراب في استقلاب الكربوهيدرات، في حدوث العديد من المضاعفات عن طريق زيادة خطر الإصابة بالاعتلال العصبي واعتلال الشبكية وأمراض القلب والأوعية الدموية إذا تُرك دون علاج [3,2]. ورد في تقرير لمنظمة الصحة العالمية أن هذه الأمراض والمضاعفات تسبب تكاليف طبية مباشرة ، وخسائر اقتصادية كبيرة [4].

يعد مرض السكري من النوع 2 أكثر شيوعًا بين حالات مرض السكري، ويحدث بشكل رئيس عند البالغين. ومع ذلك ، فقد أصبح شائعًا بشكل متزايد بين المراهقين، و ينتج عن مقاومة الأنسولين أو خلل في وظائف خلايا البنكرياس [5]. هناك العديد من العوامل المسببة لهذا الاضطراب الاستقلابي متمثلة في العوامل الداخلية، مثل التشوهات الوراثية والأيضية، والعوامل الخارجية، مثل السلوك والبيئة وطبيعة الحياة [6].

يعد النشا هو المصدر الرئيس للكربوهيدرات في معظم الأنظمة الغذائية، و بدور مهم في إمداد الجسم بالطاقة. يتم تفكيك الكربوهيدرات الغذائية أولاً إلى السكريات الأحادية بواسطة بعض إنزيمات الجهاز الهضمي، حيث يمكن امتصاص السكريات الأحادية فقط من تجويف الأمعاء[8,7]. (α−Glucosidase) و (α−amylase) هما الإنزيمات الرئيسة المشاركة في هضم الكربوهيدرات [9]. (α−Amylase) هو الإنزيم المسؤول عن المرحلة الأولية من التحلل المائي للكربوهيدرات المعقدة إلى خليط من السكريات قليلة التعدد والسكريات الثنائية في الغشاء المخاطي المعوي، ثم يتم تفكيك هذه السكريات إلى سكريات أحادية بتأثير (α−glucosidase) [10].

على الرغم من أن هذه الإنزيمات ضرورية للعديد من العمليات الكيميائية الحيوية في نظام الجسم، إلا أن الأنشطة المفرطة للإنزيمات قد تؤدي إلى زيادة إنتاج وتراكم المستقلبات التي تسبب الأمراض، مثل المتلازمة الاستقلابية. لذلك ، فإن تثبيط الإنزيمات هو اجراء ضروري للوقاية من اضطرابات التمثيل الغذائي وعلاجها، مثل داء السكري وفرط حمض يوريك الدم والسمنة. حالياً، إحدى الطرائق العلاجية المستخدمة في علاج مرض السكري من النوع 2 هي تثبيط (α−amylase) و (α−glucosidase) لتقليل وتأخير امتصاص الغلوكوز في الأمعاء[11].

تعمل بعض الأدوية المضادة لمرض السكري المتوفرة حالياً مثل (acarbose ، miglitol و voglibose)، على تثبيط أنشطة ألفا غلوكوزيداز [12] وأنشطة ألفا أميلاز [13]. ومع ذلك، فهي مرتبطة بآثار جانبية معدية معوية، مثل آلام البطن ، وانتفاخ البطن، والإسهال [14،12]. وبالتالي، يتم تكثيف الجهود البحثية لاكتشاف أدوية جديدة من المنتجات الطبيعية التي تم التأكيد على أنها مورد رئيس للمركبات الفعالة واختبار فعاليتها في مكافحة اضطرابات التمثيل الغذائي [15] نظرًا لتكلفتها المنخفضة، وأمان استخدامها، وفعاليتها العالية، وقلة الآثار الجانبية غير المرغوب فيها [16]. تعد النباتات الطبية من الموارد الطبيعية المهمة للغاية لاكتشاف جزيئات دوائية جديدة كمثبطات الإنزيمات الرئيسة للأمراض المرتبطة بالتمثيل الغذائي، مثل (α-glucosidase و α-amylase) [17].

نبات (*C. erythraea*) من أهم الأنواع النباتية الطبية التي تنتمي إلى عائلة (*Gentianaceae*) [18] . إنه نبات واسع الانتشار في مناطق مختلفة من العالم. ينمو في أوروبا وشمال إفريقيا وجنوب غرب آسيا [19]. لطالما استخدمت في الطب التقليدي ، وأدرجت في دستور الأدوية في العديد من البلدان[21,20]. في الصناعات الغذائية ، تُستخدم مستخلصات(*C. erythraea*) كمصادر طبيعية لنكهات الطعام بسبب نكهتها المرة ويوصى بها أيضًا كمواد

حافظة قوية للأغذية [22] . تمّ من خلال فحوصات كيميائية نباتية لمستخلصات (*C. erythraea*)عزل وتحديد مجموعة متنوعة من المستقلبات الثانوية، بما في ذلك التربينويدات [24,23]، الأحماض الفينولية [25]، الفلافون [26]، الفلافونول [27,26] والزانثونات [28] ذات الفعالية المضادة للأكسدة. كما تشكل (Secoiridoids) مجموعة مهمة من المستقلبات، وهي غليكوزيدات تتصف بالطعم المرّ موجودة في *C. erythraea*) [29].

قام الباحث (Stefkov *et al.*) بدراسة التوصيف الكيميائي لنبات (*C. erythrea*) وتأثيرها على استقلاب الدهون والسكريات في الفئران المصابة بالسكري. أشارت النتائج المتحصل عليها إلى أن المعالجة بمستخلص الـ(CE) في الجرذان المصابة بداء السكري (STZ) ينظم المستوى المرتفع من اضطرابات الغلوكوز في الدم، والاضطرابات المرتبطة بالكربوهيدرات أفضل بقليل من تأثير دواء الغليبينكلاميد. كان هناك أيضا تنظيم حالة الدهون في الدم في الجرذان المصابة بداء السكري. وبينت الدراسة أنّ مجموعة المركبات التي تم الكشف عنها (flavonoides, iridoids and xanthones) لها تأثير خافض لمستوى سكر الدم المرتفع[27].

قام الباحث (Sefi *et al.*) بدراسة تأثير مستخلص أوراق نبات(*C. erythrea*) في تخفيف الإجهاد التأكسدي، و تلف خلايا (β) في بنكرياس الجرذان الناجم عن معالجتها بالستربتوزوتوسين. أشارت النتائج إلى أن إعطاء مستخلص (*C.erythrea*) بتركيز (200 mg/kg) للجرذان المصابة بداء السكري الذي يسببه الستربتوزوتوسين و لمدة 30 يوم أدى إلى انخفاض كبير ($P < 0.001$) في نسبة السكر في الدم (63%−) وزيادة مستويات الأنسولين في الدم (78%+) ، بالمقارنة مع مجموعة مرضى السكري الشاهد. كما أظهر العلاج بمستخلص أوراق(*C. erythraea*) تضخماً طفيفاً في جزر لانغرهانس في البنكرياس مقارنة بالجرذان المعالجة بالستربتوزوتوسين، مما يكشف عن التأثير الوقائي والعلاجي للمستخلص، بالإضافة الى تقليل الإجهاد التأكسدي وتلف خلايا البنكرياس الذي قد يعزى إلى قدرته المضادة للأكسدة [30] .

قام الباحث (Hamza *et al.*) بتقييم التأثير الوقائي للمستخلصات المائية الكحولية للنباتين: -*herba) alba Asso*) و(*C. erythraea*) لدى نماذج حيوانية مصابة بالسكري النوع 2 المستحث بحمية معيارية عالية الدهون (HFD) . حيث أثبتت النتائج وجود تأثير قوي مضاد لفرط سكر الدم ومضاد لفرط شحميات الدم لمستخلص(*C. erythraea*)، وأدّت المستخلصات النباتية الى انخفاض كبير في متوسط السكر في الدم بالمقارنة مع مجموعات الشاهد، كما خفضت أيضا بشكل ملحوظ مقاومة الأنسولين [31].

2. أهمية البحث:

يعد ارتفاع السكر في الدم بعد الوجبات عامل خطر رئيس لمضاعفات مرض السكري ويعود ذلك إلى التحلل المائي للكربوهيدرات عن طريق إنزيمات الجهاز الهضمي في الأمعاء الدقيقة. غالباً ما تسبب بعض مثبطات الأنزيمات الهاضمة التجارية، مثل (voglibose وacarbose)، آثاراً جانبية شديدة في الجهاز الهضمي، مثل انتفاخ البطن و الإسهال. حظي عدد قليل من النباتات الطبية المستخدمة في الطب التقليدي بتدقيق علمي أو طبي على الرغم من توصيات منظمة الصحة العالمية في ذلك. إضافة إلى الاستخدام

العشوائي لها في المجتمع دون فهم الآليات البيوكيميائية لتأثيراتها في الجسم، والتي قد تسبب اضطرابات وتداخلات خطيرة.

لذلك، يستهدف البحث السيطرة على مستوى الغلوكوز بعد الأكل وهو أمر بالغ الأهمية خلال العلاج المبكر لمرض السكري مما يقلل من مضاعفات المرض المزمنة.

3. هدف البحث:

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم فعالية المستخلص المائي لنبات (*C. erythraea*) في تثبيط أنزيم α− الأميلاز في المختبر، بالتالي معرفة مدى فعاليته في ضبط ارتفاع سكر الدم بعد الوجبات وما يترتب عليه من مضاعفات قد تتطور لاضطرابات صحية خطيرة.

4. مواد البحث وطرائقه:

1.4. المواد الكيميائية:

نشا قابل للذوبان، كلوريد الصوديوم، فوسفات أحادية الصوديوم، فوسفات ثنائية الصوديوم، أنزيم الأميلاز، طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم رباعية الماء، هيدروكسيد الصوديوم، 3,5-dinitrosalicylic ، الأكاربوز.

كاشف Folin-Ciocalteau (2N)، وكربونات الصوديوم.

2.4. جمع العينات وتحضيرها:

تم جمع العينات من نبات (*C. erythraea*) من الجبال الساحلية السورية، في منطقة شرق المتوسط، في مرحلة الإزهار (أيار، 2020). جففت الأجزاء الهوائية من نبات (*C. erythraea*) في الظل حتى ثبات الوزن واستغرق ذلك حوالي (72) ساعة، ثم خزنت في أكياس ورقية عند درجة حرارة الغرفة في مكان جاف ومظلم حتى استخدامها. قبل إجراء الاختبارات، طحنت النباتات المجففة في مطحنة كهربائية للحصول على مسحوق نباتي ناعم. قيس محتوى الرطوبة للمسحوق النباتي باستخدام جهاز قياس الرطوبة بالأشعة تحت الحمراء من نوع (XM-60) المزوّد من شركة(Precisa Gravimetrics AG) وذلك قبل إجراء التجارب مباشرةً وبلغ (7.1%).

3.4. تحضير المستخلص المائي :

تم تحضير المستخلص المائي بالنقع (infusion) وفقاً للإجراءات الموصوفة من قبل الباحث(Mihaylova *et al.*) [32]، حيث أضيفت كمية مقدارها (7.5 g) من المادة النباتية المجففة والمطحونة الى (150 mL) من الماء المقطر المغلي مع التحريك وترك المزيج مدة (20min) لإتمام عملية النقع. بعد ذلك رشّح المزيج وقيس المحتوى الفينولي للمستخلص المائي الناتج.

ثم تم تحضير سلسلة تراكيز للمستخلص المائي تتراوح بين (25 µg/mL) و (5000 µg/mL).

4.4. تحديد المحتوى الفينولي الكلي (اختبار Folin-Ciocalteau):

تم تحديد كمية المركبات الفينولية الكلية في المستخلص المائي لنبات (*C.erythraea*) باستخدام طريقة (Folin-Ciocalteau) اللونية والإجراءات الموصوفة من قبل الباحث(Skerget) [33]، وهي طريقة شائعة الاستخدام في تحديد المحتوى الفينولي للعديد من المستخلصات النباتية، وتعتمد على تفاعلات أكسدة وإرجاع لونية يتم بنتيجتها تشكيل معقد أزرق اللون يمكن تحديده طيفياً ناتج عن إرجاع مزيج البولي(فوسفومولبيدات–فوسفوتنغستات)

المكون لكاشف الفولين سيوكالتو بواسطة المركبات الفينولية في ظل ظروف قلوية يوفرها محلول كربونات الصوديوم [34].

حيث خفّفت المستخلصات الخام التي تم الحصول عليها للنباتات، حيث أخذ (1 mL) من كل مستخلص في بالون معايرة ومدّد بالماء المقطر إلى (100 mL). أضيف (0.5 mL) من كاشف (Folin-Ciocalteu) (2N) و(4.5 mL) من الماء المقطر إلى (1 mL) من المستخلصات المخففة في أنبوب اختبار. وترك المزيج عند درجة حرارة الغرفة لمدة (5 min). بعد ذلك أضيف (4 mL) من (Na_2CO_3) (7.5%، وحضّنت العينات في حمام مائي عند (45°C) لمدة (30 min). وقيست الامتصاصية باستخدام جهاز السبيكتروفوتومتر من النوع (UV-VIS Spectrophotometer V-630) المزوّد من قبل شركة (JASCO) للمحاليل الناتجة الملونة باللون الأزرق عند طول موجة (734 nm). وتم التعبير عن النتائج كمكافئات حمض غاليك (GAE) بالـ (mg) لكل (g) (1) من الوزن الجاف(DW).

5.4. تقييم القدرة المثبطة لأنزيم الأميلاز:

استخدمت طريقة (DNS) الطيفية في اختبار قدرة محاليل المستخلص النباتي ومقارنتها بمحاليل الأكاربوز في تثبيط أنزيم الأميلاز، وهي إحدى طرائق التحديد الكمي للسكريات المرجعة التي تنتج عن عملية التحلل الأنزيمي للنشا بفعل أنزيم الأميلاز. حيث يتم إرجاع الكاشف اللوني (3,5 -dinitrosalicylic acid) بفعل المالتوز الناتج عن نشاط الأنزيم إلى (3-amino-5-nitrosalicylic) والذي يمكن تحديده طيفياً. تم إجراء الاختبار وفقًا للإجراءات المتبعة في الدراسة التي قام بها الباحث(Sharma *et al.*) [35]. حيث تم تحضير محلول النشا ذو التركيز (0.5%)، عن طريق تقليب (0.125 g) من نشا البطاطا في (25 mL) من محلول فوسفات الصوديوم المنظّم (20 mM) مع (6.7 mL) كلوريد الصوديوم، وضبط درجة الحموضة على (PH= 6.9)، ودرجة حرارة (65 °c) لمدة (15min). ثم تم تحضير محلول الأنزيم حيث أخذ (1mL) من الأنزيم السائل ذو التركيز (200 CEIP/mL) ومدد بالماء المقطر حتى (200 mL) للحصول على محلول الانزيم بتركيز (1CEIP/mL). تم تحضير الكاشف اللوني كما في الشكل (3–13) وذلك بخلط محلول طرطرات بوتاسيوم الصوديوم الذي تم تحضيره بإضافة(12 g) من طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم رباعية الماء إلى (8 mL) من محلول هيدروكسيد الصوديوم (2M) و (96 mM) من محلول حمض(3,5– dinitrosalicylic) (المحضر بإذابة 0.88 g من 3,5–dinitrosalicylic acid في 46 mL من ماء منزوع الشوارد) بنسبة 1:1(v /v). وحضرت محاليل الأكاربوز بتراكيز تتراوح بين (5 µg/mL) و (100 µg/mL).

مزج في أنبوب اختبار (1 mL) من المستخلص النباتي و (1 mL) من محلول الإنزيم مع (1 mL) من محلول النشا وحضّنت الانابيب عند (25°c) لمدة (30min). بعد ذلك، تمت إضافة(1 mL) من الكاشف اللوني (3,5–dinitrosalicylic acid) وتم تحضين خليط التفاعل في حمام مائي عند (85°c) لمدة (15min). تم تسجيل الامتصاصية عند (540nm). استبدلت المستخلصات النباتية في أنابيب الشاهد بالماء المقطر. استخدم الأكاربوز كشاهد إيجابي. في حالة وجود مثبطات الأميلاز، سيتم إنتاج كمية أقل من المالتوز وستزيد قيمة الامتصاصية بشكل أقل. تم حساب نسبة التثبيط على النحو الآتي:

$$\text{نسبة التثبيط (\%)} = [(A_{540\ \text{شاهد}}/A_{540\ \text{عينة}}) - A_{540\ \text{شاهد}}].100 \qquad (4)$$

حيث (A): امتصاصية المحلول عند طول موجة (540 nm).

4.6. تحليل GC-MS للمستخلص المائي لنبات (*C.erythraea*):

تم إجراء تحليل (GC-MS) للكشف الكمي والنوعي عن المركبات الفعالة حيوياً في المستخلص المائي لنبات (*C.erythraea*) .

7.4. التحليل الاحصائي:

تم إجراء التجربة بثلاث مكررات وحللت البيانات الناتجة احصائياً باستخدام تحليل التباين (ANOVA) عند مستوى معنوية (0.05)، تم اعتبار الفروق مهمة عند ($P < 0.05$) باستخدام برنامج (SAS). ومن ثم اجراء اختبار (DUNCAN´S LSD) لتحديد أقل فرق معنوي (LSD)، كما حدد معامل الاختلاف الذي يشير إلى الخطأ القياسي (CV). وتم حساب التركيز المثبط50% (IC50) باستخدام دالة (forecast).

5 . النتائج والمناقشة:

1.5. تحديد المحتوى الفينولي:

قيس المحتوى الفينولي للمستخلص المائي للقنطارية وكان(21.23 mgGAE/g DW)، وهو ما يتوافق مع الدراسة التي أجراها الباحث (Guedes) والتي من خلالها تم تحديد المحتوى الفينولي في المستخلص المائي لنبات(*C. erythraea*) وبلغت قيمته(22.37 ±0.36 mgGAE/g DW) [36].

2.5. تحليل GC/MS للمستخلص المائي:

يظهر في الجدول(4−1) ملخص نتائج تحليل GC/MS للمستخلصات المائي.

الجدول (4-1): نتائج تحليل GC/MS للمستخلصات المائية والكحولية

التسلسل	اسم المركب	التركيز (%)
1	2-Methoxy -4- Vinylphenol	0.15
2	Erythrocentauren	1
3	Phthalic acid –hex-2-yn-4-ylundecylester	0.05
4	7H- Furo[3,2,g][1]benzopyran-7-one	12.13
5	Pentadecanoic acid	0.02
6	Methoxsalen	1.23
7	9,12 Ocatadecadieonic acid	2.96
8	Furo[3,2,b][1]quinolone 4,7,8 tri methoxy-	11.23
9	H- Furo[3,2,H][1]benzopyran-2-one2	0.32
10	Eicosane	3.23
11	Heneicosane	2
12	2-Pentadecanone 6,10,14, trimethyl	0.09
13	Pentadecanoic acid, 14methyl, methyl ester	0.02
14	4-(3,4 Methelendioxyphenyl) -2 butanone	0.42

يظهر في الجدول(4−1) ملخص نتائج تحليل (GC/MS) للعينات والتي تظهر المركبات الفعالة في نبات (*C. erythraea*) وتراكيزها في المستخلص، ومنها مشتقات (swertiamarin) (وتشمل المركبات:14,2) ذات الفعالية الحيوية في خفض سكر الدم وعلاج مرض السكري [37]. كذلك مشتقات الكيومارين المعروفة بالاسم (Coumarins ,α−Pyrones)، ومشتقات (Angelicin)، (مثل المركب: 9). (Angelicin) هو المركب الأم في

عائلة من المركبات العضوية المعروفة باسم فورانوكومارين (Furanocoumarins). من الناحية الهيكلية، يمكن اعتباره (benzapyra–2–one) مدمج بشق (furan). وفقًا لتسمية (IUPAC) الحالية، يستخدم اسم (chromene) لوصفه. وتملك هذه العائلة أنشطة بيولوجية هامة[38] .

المركب (4) (furo[3,2-g]chromen-7-one) ويعرف أيضاً بالاسم (Psoralen) تبرز فعاليته الحيوية بقدرته على تثبيط أنشطة الأميلاز والأستيل كولين استيراز (AchE) [39].

ومن المركبات الهامة أيضاً مشتقات (Quinolines) (قلويدات الفيروكينولين)، (منها المركب8:المعروف أيضاً بأسماء Skimmianine،Chloroxylonine). تعتبر الكينولينات واحدة من أكثر فئات مضادات البكتيريا شيوعاً التي يتم وصفها في العالم وتستخدم لعلاج مجموعة متنوعة من الالتهابات البكتيرية لدى البشر[40] . كذلك (Methoxsalen) (المعروف أيضاً باسم Xanthotoxin، المركب 6)، الذي يباع تحت الاسم التجاري (Oxsoralen) هو دواء يستخدم لعلاج الصدفية والأكزيما والبهاق وبعض الأورام اللمفاوية الجلدية[41] .

3.5. تقييم القدرة المثبطة لأنزيم الأميلاز:

اختُبرت الفعالية المثبطة لأنزيم الأميلاز للمستخلص المائي لنبات (*C.erythraea*) الذي جمع في مرحلة الإزهار، وسجّلت النتائج في الجدول (4–2).

الجدول (4–2): فعالية كل من المستخلص المائي لنبات C.erythraea و الأكاربوز في تثبيط أنزيم الأميلاز

نسبة التثبيط %	تركيز Acarbose µg/mL	نسبة التثبيط %	تركيز المستخلص النباتي µg/mL
6.671e	5	34.712e	25
11.793de	15	35.466e	100
15.731d	30	40.47d	250
25.873c	60	48.002c	500
35.198b	80	52.412b	1000
44.763a	100	74.248a	5000
0.0018	P	0.0016	P
5.35	LSD0.05	1.48	LSD0.05
5.66	C.V	1.75	C.V
0.912**	R	0.949**	R
116.31	IC50	618.81	IC50

تشير النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة إلى نشاط جيد مثبط لأنزيم α–amylase للمستخلص المائي من *C. erythraea* مقارنة مع الأكاربوز كشاهد ايجابي. وبينت النتائج كما هو موضح في الجدول (4–2) أن زيادة في النسبة المئوية لتثبيط إنزيم α–amylase تعتمد على زيادة التركيز لكل من مستخلص *C. erythraea* والأكاربوز.

بلغت قيمة IC50 للأكاربوز (116.31 µg/mL)، وهذا يتوافق مع دراسة سابقة أجراها (*Ononamadu et al.*) حيث كانت قيمة IC50 للأكاربوز (116.1 + 1.3 µg/mL) [42] . وكانت قريبة من القيم المسجلة في الدراسة التي أجراها الباحث (*Afrisham et al.*) والتي بلغت فيها IC50% للأكاربوز (113 µg/mL) [43].

وبلغت قيمة IC50 للمستخلص المائي لنبات*C. erythraea* (618.81 µg/mL)، فعلى الرغم من الفعالية الجيدة للمستخلص المائي والتي وصلت إلى كفاءة تعادل (79.22 %) مقارنة بالعقار الدوائي الأكاربوز عند التركيز (100 µg/mL)، فقد أظهرت المستخلصات العضوية فعالية أكبر في الدراسات السابقة، حيث أظهر المستخلص الكلوروفورم للقمم المزهرة لنبات *C. erythraea* في دراسة قام بها الباحث (Loizzo *et al.*) نشاطاً مثبطاً جيداً لإنزيم amylase مع IC50 بلغ (64.9 µg/mL) [44]. كما أنه في دراسة أخرى للباحث (Bouyahya *et al.*) تم إثبات فعالية الزيت الاساسي المستخلص بالتقطير من *C. erythrae*a في تثبيط انزيم الأميلاز حيث بلغت IC50 (168.62 µg/mL) [45].

يمكن أن يعزى النشاط المثبط لـ α–amylase لمستخلص *C. erythrae*a إلى مجموعة متنوعة من المركبات الفعالة، مثل مركب (Psoralen) وهو أحد مركبات(benzopyran) التي أثبت تحليل GC-MS وجودها في المستخلص المائي للنبات بتركيز (12.13%)، حيث يمكنه أن يثبط أنشطة الأميلاز بقيمة (IC50) تبلغ 1072.82 (µg/mL)[39] .

بالإضافة إلى المركب(Erythrocentaurin)، وقد أثبتت نتائج إحدى الدراسات التي تم من خلالها عزل (Erythrocentaurin) من نبات (*Enicostemma littorale*) تأثيره المثبط على نشاط إنزيم الأميلاز حيث كان له قيمة IC50 تعادل (1600µg/mL) [46] .

من المركبات التي أثبتت فعاليتها في تثبيط الأميلاز والتي تتواجد في المستخلص المائي لنبات *C. erythrae*a مركب Swertiamarin، وهو أحد المركبات الرئيسة لغليكوزيدات سيكوريدويد secoiridoid glycosides، والتي تُكسب المستخلص نكهته المرة وفعاليته الحيوية في الوقاية، وعلاج الكثير من الاضطرابات في الجسم [47,37]. كما أظهرت الدراسة التي قام بها الباحثان (Jaishreea و Narsimha) أنه عند تركيز (600µg/mL) من Swertiamarin كانت النسبة المئوية لتثبيط الأميلاز (50.13 %) [48].

كما عزت دراسات مماثلة في المختبر النشاط المثبط لـ α–amylase لبعض المستخلصات النباتية إلى وجود التانينات ، والفلافونويدات، والبوليفينولات ومشتقاتها من الغليكوزيدات [50,49].

6. الاستنتاجات:

- بيّنت نتائج الدراسة أن المستخلص المائي لنبات (*C. erythraea*) يعتبر مصدر جيد للمواد الفينولية والمركبات المتنوعة الفعالة حيوياً.
- أثبتت الدراسة أنّ المستخلص المائي لنبات(*C. erythraea*) ذو فاعلية جيدة في تثبيط أنزيم الأميلاز ويعطي كفاءة تعادل (79.22 %) من فعالية المستحضر الدوائي المستخدم للتثبيط (الأكاربوز) وذلك عند تركيز (100 µg/mL)، وبالتالي المساهمة في ضبط سكر الدم بعد الوجبات.

7. التوصيات:

- استكمال الدراسات البحثية واختبار طريقة الاستخلاص المتتابع لتحديد الأطوار الأكثر فعالية.
- اختبار فعالية نبات (C. erythraea) في تثبيط أنزيم (α–glucosidase).
- اختبار فعالية نبات (C. erythraea) في تثبيط أنزيم (ACE) المرتبط بتطور مضاعفات القلب والأوعية الدموية لمرض السكري.

8. المراجع:

1. Saklayen, M. G. (2018). *The global epidemic of the metabolic syndrome*. *Curr Hypertens Rep.*20(2). P 12.
2. Cheng, AYY. Fantus, IG. (2005). *Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus*, Can Med Assoc J.172. PP 213-26.
3. deSales, PM. deSouza, PM. Simeoni, LA. Magalhaes, PDA. Silveira, D.(2012*). α-Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source*. J Pharm Sci. 15. PP 141-83.
4. World Health Organization. (2016). *Global report on diabetes*; World Health Organization: Geneva, Switzerland. pp1-88.
5. Quan, NV. Xuan, TD. Tran, HD. Thuy, NTD. Trang, LT. Huong, CT. et al.(2019). *Antioxidant، α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities and potential constituents of Canarium tramdenum Bark*. Molecules. 24. p 605.
6. Wu, J. Fang, X. Yuan, Y. Dong, Y. Liang, Y. Xie, Q. et al. (2017). *UPLC/Q-TOF-MS profiling of phenolics from Canarium pimela leaves and its vasorelaxant and antioxidant activities*. Braz J Pharmacog. 27.PP 716-23.
7. Kwon, YI. Jang, HD. Shetty, K. (2006). *Evaluation of Rhodiola crenulata and Rhodiola rosea for management of type II diabetes and hypertension*. Asia Pac J Clin Nutr. 15. pp 425–432.

8. Abesundara KJ, Matsui T, Matsumoto K. (2004). *α-Glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, Cassia auriculata, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose*. J Agric Food Chem. 52. pp 2541–2545.

9. Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A. (2006). *α-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus*. J Ethnopharmacol. 107.pp 449–455.

10. Ecemis CG, Atmaca H. (2012). *Oral antidiabetic agents*. J Exp Clin Med. 29. pp 23-9.

11. Deveci E , Tel-Cayan G , Duru ME. (2020). *In vitro Antidiabetic Activity of Seven Medicinal Plants Naturally Growing in Turkey*. Eur J Biol. 79(1). pp 23-28.

12. Guo LP, Jiang TF, Lv ZH, Wang YH. (2010). *Screening α-glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis*, J. Pharm. Biomed Anal. 53. pp 1250-1253.

13. Lordan S, Smyth TJ, Soler-Vila A, Stanton C, Ross P. (2013). *The α-amylase and α- glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts*. Food Chem. 141. pp 2170-2176.

14. Apostolidis E, Lee CM. (2010) *In vitro potential of Ascophyllum nodosum phenolic antioxidant-mediated α-glucosidase and α-amylase inhibition*, J. Food Sci. 75. pp 97-102.

15. Li DQ, Zhao J, Xie J, Li S. (2014). *A novel simple preparation and on-line HPLC-DADMS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts: Case study of α-glucosidase*. J. Pharm. Biomed Anal. 88. pp 130-135.

16. Yilmazer-Musa M, Griffith A, Michels AJ, Schneider E, Frei B. (2012) *Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α-amylase and α-glucosidase activity*. J. Agric. Food Chem. 60. pp 8924-8929.

17. Choudhury H., Pandey M., Hua C. K., Mun C. S., Jing J. K., Kong L., *et al.*, (2018). *An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus: a systematic review*. *J Tradit Complement Med.* 8(3). pp 361-76.

18. Grieve M. A Modern Herbal. Vol 1. Dover Publications, New York. 1971: p. 443.

19. Cunha AP, Silva AP and O. Roque. Plantas e Produtos Vegetais em *Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 2003: p. 216–334.

20. Council of Europe, European Pharmacopoeia. 2008. 6th Edition: p.4074.

21. Grünwald J, Brendler T and Jaenicke C. PDR (Physicians' Desk Reference) for Herbal Medicines. Medical Economics Company, Montvale. 2000: p. 174–175.

22. Šiler B, ivkovic´S.Zˇ, Banjanac T, Cvetkovic´J, ivkovic JN, Ćirić A, Soković M and Mišić D. (2014). *Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential*. Food Chem.147. pp 367–376.

23. Jovanoviš O, Raduloviš N, Stojanoviš G, Palić R, Zlatković B and Gudžić B. (2009). *Chemical Composition of the Essential Oil of Centaurium erythraea Rafn (Gentianaceae) From Serbia*. J Essent Oil Res. 21(4). pp 317–322.

24. Jerkoviš I, Gašo-Sokač D, Pavloviš H, Marijanović Z, Gugić M, Petrović I and Kovač S. (2012). *Volatile Organic Compounds from Centaurium erythraea Rafn (Croatia) and the Antimicrobial Potential of Its Essential Oil*. Molecules.17(2). pp 2058–2072.

25. Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM and Bastos ML. (2001). *Antioxidant activity of Centaurium erythraea infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity*. Food Chem. 49(7). pp3476–3479.

26. Valentão P, Andrade PB, Silva AMS, Moreira MM and Seabra RM, (2003) *Isolation and structural elucidation of 5-formyl-2,3-dihydroisocoumarin from Centaurium erythraea aerial parts.* Nat Prod Res.17(5). pp 361–364.

27. Stefkov G, Miova B, Dinevska-Kjovkarovska S, Stanoeva JP, Stefova M, Petrusevska G and Kulevanova S. (2014). *Chemical characterization of Centaurium erythrea L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes*. J Ethnopharmacol.152(1). pp71–77.

28. Aberham A. Pieri V, Croom EM, Ellmerer E and Stuppner H. (2011). *Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthones in Centaurium erythraea, Frasera caroliniensis and Gentiana lutea using LC-MS and RP-HPLC*. J Pharm Biomed Anal.54(3). pp517–525.

29. Božunović J, Živković S, Gašić U, Glamočlija J, Ćirić A, Matekalo D, Šiler B, Soković M, Tešić Ž and Mišić D. (2018). *In vitro and in vivo transformations of Centaurium erythraea secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity*. Ind Crops Prod.111. pp 705–721.

30. Sefi M, Fetoui H, Lachkar N, Tahraoui A, Lyoussi B, Boudawara T, Zeghal N. (2011). *Centaurium erythrea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and -cell damage in rat pancreas*. Journal of Ethnopharmacology 135. pp 243–250.

31. Hamza N, Berke B, Cheze C, Agli A, Robinson P, Gin H, Moore N. (2010). *Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria*. Journal of Ethnopharmacology.128. pp 513–518.

32. Mihaylova, D.; Vrancheva, R.; Popova, A. (2019). *Phytochemical profile and in vitro antioxidant activity of Centaurium erythraea Rafn.* Bulgarian Chemical Communications. 51(A) : 95-100.

33. Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hraš, A.R.; Simonič, M.; Knez, Z. (2005). *Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities*. Food Chem.89(2): 191–198.

34. Zam,W.; Ali,A.; Hsan, R. (2020). *Determination of Phenolic Compounds' Extraction Conditions from Pistacia palaestina Leaves at Two Different Stages of Maturity*. Current Nutrition & Food Science. 16(5):808-814.

35. Sharma N, Gupta PC , Rao CH. (2013). *In-vitro antiradical and inhibitory potential of Pentapetes phoenicea Linn. leaves against digestive enzymes related to diabetes*. journal of pharmacy research.6. pp 569-572.

36. Guedes,L.; Reis, P.B.P.S.; Machuqueiro,M.; Ressaissi,A.; Pacheco,R.; Serralheiro,M.L. (2019). *Bioactivities of Centaurium erythraea (Gentianaceae) Decoctions: Antioxidant Activity, Enzyme Inhibition and Docking Studies*. Molecules.24: 3795. doi:10.3390/molecules24203795.

37. Kachmar, M.R.; Oliveira, A.P.; Valentão, P.; Gil-Izquierdo, A.; Domínguez-Perles, R.; Ouahbi, A.; Badaoui, K.E.; Andrade, P.B.; Ferreres, F. (2019). *HPLC-DAD-ESI/MSn phenolic profile and in vitro biological potential of Centaurium erythraea Rafn aqueous extract*. Food Chemistry. 278:424-433.

38. Bordin, F.; Dall'Acqua, F.; Guiotto, A. (1991). *Angelicins, angular analogs of psoralens: chemistry, photochemical, photobiological and phototherapeutic properties. Pharmacology & Therapeutics*. 52 (3): 331–363. doi:10.1016/0163-7258(91)90031-G. ISSN 0163-7258.

39. Guo,Q.; Du,G.; He,H.; Xu,H.; Guo, D.; Li, R. (2016). *Two nematicidal furocoumarins from Ficus carica L. leaves and their physiological effects on pine wood nematode (Bursaphelenchus xylophilus)*, Natural Product Research. Natural Product Research. 30(17): 1969-1973.

40. Aldred,K.J.; Kerns,R.J.; Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. Biochemistry. 53(10):1565–1574.

41. Daniels,F.; Hopkins,C.E.; Fitzpatrick, T.B. (1958). *Effects of Oral Methoxsalen (8-Methoxypsoralen) on Sunburn and Suntan A Blind Clinical Trial*. Western University.

42. Ononamadu CJ, Alhassan AJ, Ibrahim A, Imam AA, Ihegboro GO, Owolarafe TA and Sule MS. (2019) *Methanol-Extract/Fractions of Dacryodes edulis Leaves Ameliorate Hyperglycemia and Associated Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats*. Journal of Evidence-Based Integrative Medicine.24. pp 1-12.

43. Afrisham R, Aberomand M, Ghaffari MA, Siahpoosh A and Jamalan M. (2015). *Inhibitory Effect of Heracleum persicum and Ziziphus jujube on Activity of Alpha-Amylase*. Journal of Botany.ID 824683. P 8.

44. Loizzo, M.R.; Saab, A.M.; Tundis, R.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Piccolo, V.; Statti, G.A.; de Cindio, B.; Houghton, P.J. (2008). *In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes*. J. Ethnopharmacol.119: 109–116.

45. Bouyahya,A.; Belmehdi,O.; El Jemli,M.; Marmouzi,I.; Bourais,I.; Abrini,J.; El Abbes Faouzi,M.; Dakka,N.; Bakri,Y. (2019). *Chemical variability of Centaurium erythraea essential oils at three developmental stages and investigation of their in vitro antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective and antibacterial activities*. Industrial Crops & Products 132:111–117.

46. Hassan N, Ahamad J, Amin S, Mujeeb M, Showkat R.M. (2015). *Rapid preparative isolation of erythrocentaurin from Enicostemma littorale by medium-pressure liquid chromatography, its estimation by high-pressure thin-layer chromatography, and its -amylase inhibitory activity*. J. Sep. Sci.00. pp1–7. https://doi.org/10.1002/jssc.201401030.

47. Svitlana M. Gubar, Anna S. Materiienko, Nataliia M. Smielova, Liana G. Budanova, Victoriya A. Georgiyants. (2020). *Development of a New Approach for Standardization of the Herb Centaurium erythraea Rafn. by High Performance Liquid Chromatography*. Turk J Pharm Sci.17(6). pp593-598.

48. Jaishreea V, Narsimha S. (2020). *Swertiamarin and quercetin combination ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in wistar rats*. Biomedicine & Pharmacotherapy.130. p 110561.

49. Bhandari MR, Jong-Anurakkun N, Hong G, Kwabata J. (2008). *Alpha glucosidase and alpha amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (Bergenia ciliate, Haw)*. Food Chemistry.106. pp247-252.

50. Campos KE, Diniz YS, Cataneo AC, Faine LA, Alves MJ, Novelli ELB. (2003). *Hypoglycaemic and antioxidant effects of onion, Allium cepa: dietary onion addition, antioxidant activity and hypoglycaemic effects on diabetic rats*. International Journal of Food Sciences and Nutrition.54. pp 241-246.