دراسة فعالية مستخلصات أوراق وثمار نبات *Tribulus terrestris* L. في تثبيط إنزيم α-غلوكوزيداز

خلود الخالدي* **د. منال داغستاني****

د. ثناء الحداد**

الملخص

طبقت طريقة الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية لأوراق وثمار نبات *Tribulus terrestris* L. باستعمال مذيبات متزايدة القطبية وهي الهكسان والأسيتون والإيتانول والماء. درست الفعالية الخافضة للسكر لتراكيز مختلفة من هذه المستخلصات مخبرياً عن طريق دراسة فعاليتها في تثبيط إنزيم α-غلوكوزيداز، إضافة إلى دراسة نمط التثبيط في المستخلص الأكثر فعالية. أظهرت جميع المستخلصات فعالية متفاوتة في تثبيط إنزيم α−غلوكوزيداز، لوحظت فعالية تثبيطية أعلى في مستخلصات الهكسان والأسيتون. تميز المستخلص الهكساني لثمار النبات بأعلى قدرة تثبيطية $IC_{50}=27.28\mu g/ml$، وكان التثبيط من النمط اللاتنافسي (Noncompetitive).

الكلمات المفتاحية: *Tribulus terrestris* L.، الفعالية الخافضة للسكر، إنزيم α−غلوكوزيداز.

* طالبة دكتوراه− قسم الكيمياء− كلية العلوم- جامعة دمشق− سورية.

** قسم الكيمياء− كلية العلوم- جامعة دمشق− سورية.

Studying the α-glucosidase inhibition activity of *Tribulus terrestris* L. leaves and fruits extracts

Kh. Alkhaldi[*] **Dr. M. Daghestani**[**]

Dr. Th. Al_Haddad[**]

Abstract

Tribulus terrestris L. leaves and fruits were extracted by means of ultrasonication using solvents of increasing polarity: hexane, acetone, ethanol, and water. The *in vitro* anti-diabetic activity of different concentrations of these extracts was evaluated by studying their inhibition activity against α-glucosidase enzyme, in addition to study the inhibition mode for the most effective extract. All extracts showed varying inhibition activity against α-glucosidase, The higher inhibition activity was observed in the non-polar or low polar extracts (hexane and acetone). The hexane extract of fruits had the highest inhibition activity IC_{50}=27.28µg/ml, and the inhibition mode was noncompetitive.

Key words: *Tribulus terrestris* L., antidiabetic activity, α-glucosidase enzyme.

[*] PhD student,

[**] Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

المقدمة Introduction

يعرّف مرض السكري Diabetes mellitus أنه اختلال في استقلاب الغلوكوز يؤدي إلى ارتفاع نسبة السكر في الدم بصورة غير طبيعية لأسباب مختلفة قد تكون نفسية أو عضوية أو بسبب الإفراط في تناول السكريات أو لأسباب وراثية، ويحدث نتيجة خلل في إفراز الأنسولين من البنكرياس (WHO, 1999). يعد إنزيم α–غلوكوزيداز (EC 3.2.1.20) الإنزيم الرئيس المسؤول عن حلمهة السكريات المتعددة في جسم الإنسان، إذ يعمل هذا الإنزيم على حلمهة الروابط α-الغلوكوزيدية في النهايات غير المرجعة للسكريات المتعددة وتحرير α–غلوكوز الذي يسبب ارتفاع معدل سكر الدم بعد تناول الوجبة الغذائية (Asgar, 2013). يرتبط علاج مرض السكر بتثبيط إنزيم α-غلوكوزيداز (Sheng *et al.*, 2014) ومن ثمَّ لتقييم فعالية أي مركب كيميائي أو مستخلص نباتي في خفض السكر مخبرياً (وقبل العمل على حيوانات التجربة) لابد من إثبات قدرته على تثبيط هذا الإنزيم.

استعملت النباتات منذ زمن بعيد في علاج الكثير من الأمراض ومنها مرض السكري، حيث أظهرت العديد من النباتات الغنية بالمنتجات الطبيعية فعاليتها كمثبطات لإنزيم α-غلوكوزيداز (Nair *et al.*, 2013). ينتمي نبات. *Tribulus terrestris* L إلى الفصيلة الرطراطية Zygophyllaceae، ويُعرف بعدة أسماء شائعة مثل نبات القرطب والحسك والقطب، ويُعرف باللغة الإنكليزية بـ Maltese cross وباللغة الفرنسية بـ Croix de Malte (الحكيم وآخرون، 2012). أظهرت الدراسات السابقة غنى هذا النبات بالمنتجات الطبيعية المختلفة كعديدات الفينول والسابونينات والقلويدات وغيرها (Lokhande *et al.*, 2014). استخدم نبات *T. terrestris* في علاج أمراض الجهاز البولي وخاصة الحصيات البولية (Kamboj *et al.*, 2011)، كما استعمل في خفض ضغط الدم والكوليسترول (Phillips *et al.*, 2006)، وأسهم في علاج مرض الزهايمر (Orhan *et al.*, 2004).

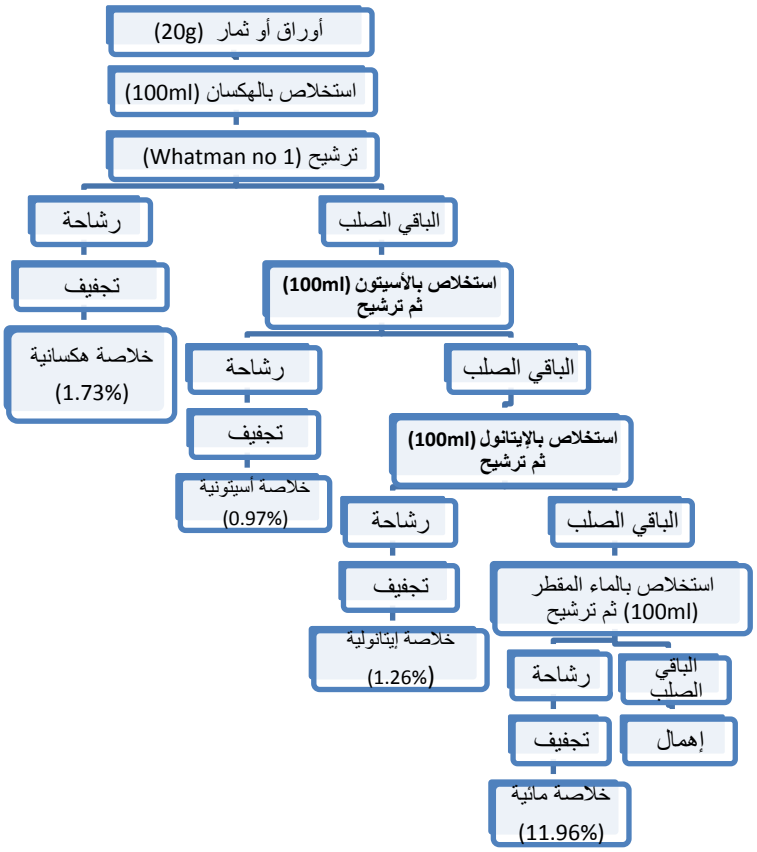
هدف البحث The aim of the search:

دراسة فعالية مستخلصات نبات *T. terrestris* الخافضة للسكر مخبرياً عن طريق دراسة فعاليتها المثبطة لإنزيم α–غلوكوزيداز، إضافة إلى دراسة نمط التثبيط في المستخلص الأكثر فعالية.

المواد والطرائق Materials and Methods

جمع النبات: جُمع نبات *T. terrestris* خلال شهري تشرين الأول والثاني عام 2016 في طور الإثمار من مدينة دمشق – حديقة كلية العلوم، حيث لوحظ انتشار النبات على شكل مجموعات متفرقة تبلغ مساحة كل منها حوالي $2m^2$ في أطراف الحديقة وفي المناطق الجرداء منها. جرى الاعتيان لمرة واحدة لتلافي اختلاف الظروف البيئية والمناخية والتي تؤثر في محتوى النبات من المنتجات الطبيعية. صُنف النبات وجُففت أوراقه وثماره في الظلّ عند درجة حرارة الغرفة.

تحضير المستخلصات: طبقت طريقة الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية (نموذج Elma, Transsonic 460/H) لأوراق وثمار النبات باستعمال مذيبات متدرجة القطبية وهي الهكسان والأسيتون والإيتانول والماء وفق المخطط الموضح بالشكل (1). أجريت كل مرحلة استخلاص عند درجة حرارة الغرفة ولمدة 30min. بخرت المستخلصات باستعمال المبخّر الدوار (نموذج IKA® RV10 digital) وحسب المردود الجاف لكل مستخلص وأدرجت النسب الوزنية المئوية للمستخلصات الجافة ضمن المخطط. حُفظت المستخلصات الجافة عند درجة الحرارة 4°C- لحين استعمالها.



الشكل (1): مخطط استخلاص أوراق وثمار نبات *T. terrestris*، (المردود %)

دراسة فعالية المستخلصات في تثبيط إنزيم α-غلوكوزيداز:

استخدم المركب بارا نترو فينيل α-d-غلوكوبيرانوزيد (pNPG) من شركة Sigma كركيزة نوعية للإنزيم α-غلوكوزيداز المستخلص من خميرة الخباز *Saccharomyces cerevisiae* من شركة Sigma، وهو مصنف من النوع الأول

Type I، حيث يقوم الإنزيم بحلمهة هذا المركب محرراً المركب بارا نترو الفينول الذي تقاس امتصاصيته عند طول الموجة 405nm باستعمال جهاز الامتصاص في مجال الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-VIS نموذج Optizen 2120UV PLUS.

أضيف 100µl من المستخلصات النباتية بعد تحضيرها بثنائي ميتيل السلفوكسيد (DMSO) وبتراكيز مختلفة إلى 700µl من المحلول الموقي الفوسفاتي (pH=6.9, 20mM) ثم أضيف إليها 100µl من محلول إنزيم α–غلوكوزيداز (0.4U/ml) المحضر بالمحلول الموقي ذاته. حضنت العينات مدة 10min في درجة الحرارة 25°C، ثم أضيف إليها 100µl من الركيزة pNPG المحضرة في الموقي الفوسفاتي نفسه بتركيز 10mM ليصبح الحجم التفاعلي النهائي 1ml. مزجت العينات جيداً ثم حضنت في حمام مائي عند درجة الحرارة 45°C مدة 10min. أوقف التفاعل الإنزيمي بإضافة 250µl من محلول كربونات الصوديوم 1M، ثم بردت العينات حتى درجة حرارة الغرفة وقيست امتصاصية نترو الفينول المتحرر عند طول الموجة 405nm (Ramu *et al.*, 2014). كررت التجربة ثلاث مرات من أجل الدراسة الإحصائية، وحسبت الفعالية التثبيطية للمستخلصات بالاعتماد على العلاقة الآتية:

$$\textbf{Inhibition (\%)} = (A_{control} - A_{sample}) / A_{control} * 100.$$

حيث $A_{control}$ هي امتصاصية العينة الحاوية على 100µl من المحلول الموقي عوضاً عن المستخلص النباتي. حسبت قيم IC_{50} (التركيز المثبط لإنزيم إنزيم α–غلوكوزيداز بنسبة 50%) من معادلة المستقيم لكل مستخلص.

دراسة نمط التثبيط تجاه إنزيم α–غلوكوزيداز:

درس نمط التثبيط للمستخلص الأعلى فعالية في تثبيط إنزيم α–غلوكوزيداز وذلك باستعمال تراكيز مختلفة من الركيزة pNPG. حضرت سلسلتان من التفاعلات في آن واحد تحوي السلسلة الأولى 700µl من المحلول الموقي الفوسفاتي إضافة إلى

100µl من المستخلص الهكساني للثمار بتركيز 50µg/ml و 100µl من المحلول الإنزيمي ثم أضيف إليها 100µl من الركيزة بتراكيز (0.125, 0.167, 0.25, 0.5, 1mM). بينما تحوي السلسلة الثانية على الإضافات السابقة نفسها باستبدال المحلول الموقي بالمستخلص النباتي (Ramu *et al.*, 2014). رسم المنحني البياني المعبر عن علاقة لينوفر–بارك Lineweaver-Burk حيث V سرعة التفاعل، [S] تركيز الركيزة.

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmax}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$

ثم حسب ثابت ميكائيلس–منتن (K_m) –وهو يعبر عن قيمة تركيز الركيزة التي تبلغ عندها سرعة التفاعل نصف سرعتها العظمى– والسرعة العظمى للتفاعل الإنزيمي (V_{max}).

الدراسة الإحصائية Statistical study:

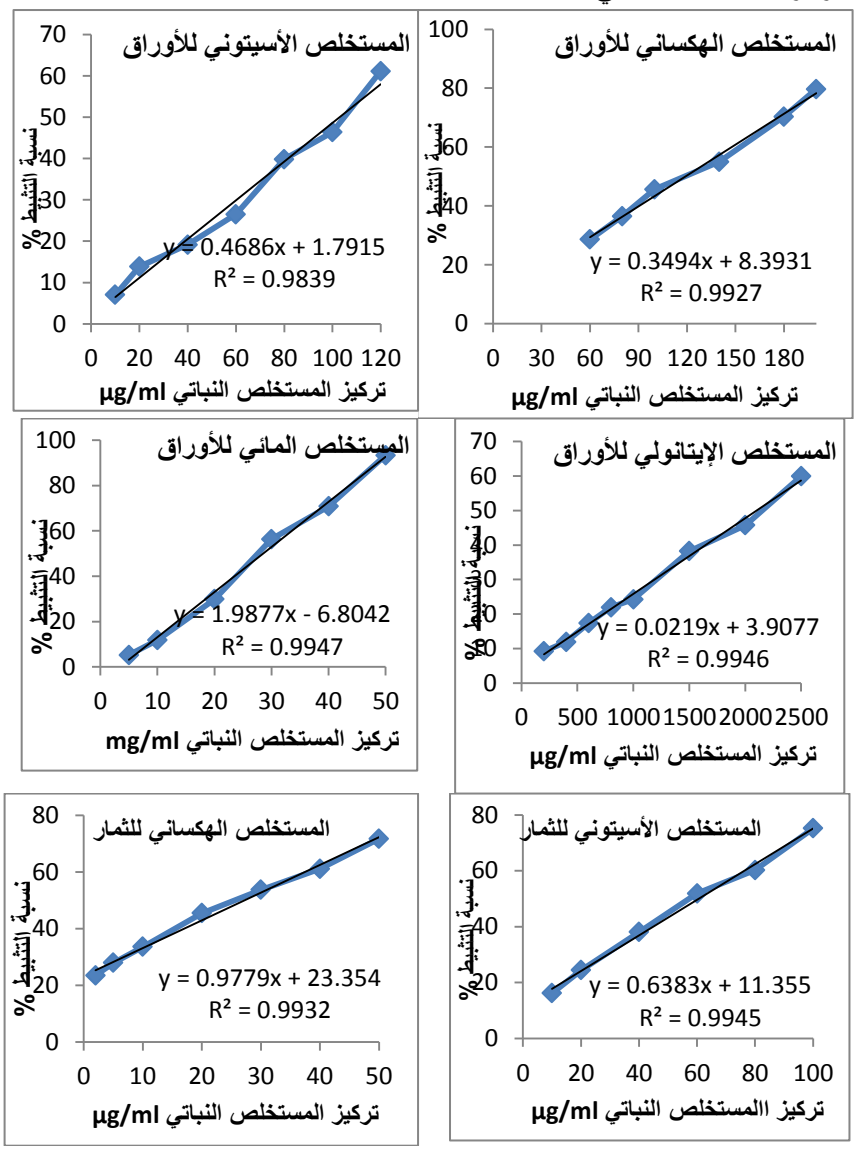
حللت النتائج باستخدام برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics 20.0)، أجري اختبار One-way ANOVA لدراسة تأثير العامل المدروس في القيمة المقاسة، واختبار Bonferroni لتعيين القيم التي تختلف عن بعضها بفروق معنوية. كررت جميع التجارب ثلاث مرات (n=3) وبمستوى ثقة 95% (α=0.05)، وتم التعبير عن النتائج بالشكل mean±SD (حيث: mean المتوسط الحسابي وSD الانحراف المعياري).

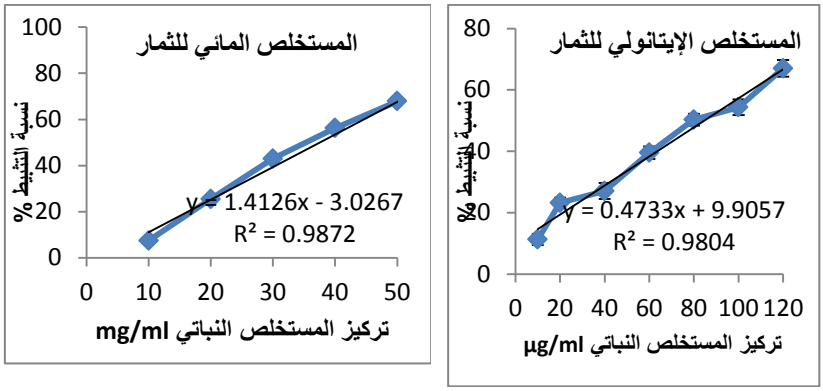
النتائج والمناقشة Results and Discussion

فعالية المستخلصات في تثبيط إنزيم α–غلوكوزيداز:

درست فعالية المستخلصات الهكسانية والأسيتونية والإيتانولية والمائية (بتراكيز مختلفة) لأوراق وثمار نبات *T. terrestris* في تثبيط إنزيم α–غلوكوزيداز. يبين

الشكل (2) المنحنيات البيانية الناتجة من رسم العلاقة بين نسبة التثبيط المئوية وتركيز المستخلص النباتي.





الشكل (2): نسبة تثبيط إنزيم α-غلوكوزيداز بتراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية

حسبت قيم IC_{50} من معادلة المستقيم لكل مستخلص وأدرجت قيمها في الجدول الآتي.

الجدول (1): قيم IC_{50} للمستخلصات النباتية

الجزء النباتي	المحل	IC_{50}
أوراق	الهكسان	119.22^{a}µg/ml
	الأسيتون	103.01^{a}µg/ml
	الإيتانول	2194.90^{b}µg/ml
	الماء	28.59^{c}mg/ml
ثمار	الهكسان	27.28^{d}µg/ml
	الأسيتون	60.60^{e}µg/ml
	الإيتانول	84.77^{f}µg/ml
	الماء	37.55^{g}mg/ml

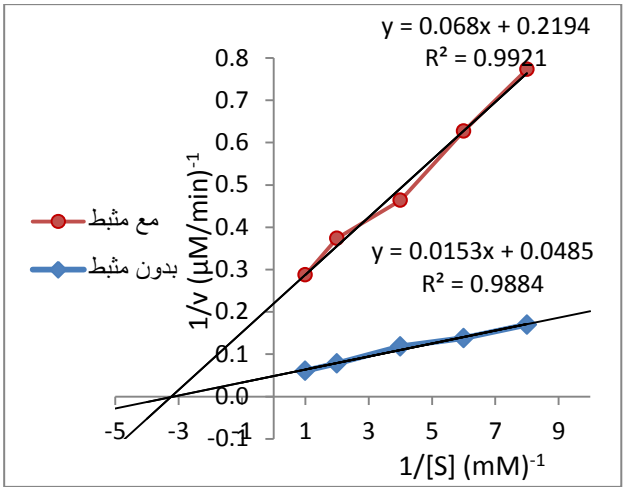
تدل الأحرف المختلفة $^{a,b,c,...}$ على وجود فروق معنوية في نسبة التثبيط بين التراكيز المختلفة استناداً إلى برنامج SPSS.

يبين الشكل السابق الفعالية التثبيطية لمستخلصات أوراق وثمار النبات حيث ازدادت نسبة التثبيط بازدياد تركيز المستخلص النباتي، أظهر المستخلصين الهكساني والأسيتوني لأوراق النبات أعلى نسبة تثبيط تجاه إنزيم α–غلوكوزيداز دون فروق معنوية بينهما، تلاهما المستخلص الإيتانولي ثم المستخلص المائي. بينما أبدى المستخلص الهكساني لثمار النبات أعلى فعالية تثبيطية تجاه إنزيم α–غلوكوزيداز تلاه المستخلصين الأسيتوني والإيتانولي وأخيراً المستخلص المائي. تشير هذه النتائج إلى امتلاك مثبطات إنزيم α–غلوكوزيداز طبيعة تميل لأن تكون لا قطبية أو منخفضة القطبية بشكل رئيس. عزيت الفعالية التثبيطية في إحدى الدراسات السابقة التي أجريت على ثمار نبات *T. terrestris* في كوريا إلى وجود مركبات أميدات حمض السينامك (Song *et al.*, 2016)، حيث عزلت بعض هذه المركبات وعينت قيم IC_{50} لها. أظهرت دراسة أخرى (Lamba *et al.*, 2011) فعالية المستخلص الإيتانولي لثمار النبات حيث بلغت قيمة IC_{50} له (IC_{50} =250µg/ml) وهي أكبر من القيمة المحسوبة في هذه الدراسة قد يكون السبب في ذلك اختلاف مصدر النبات وطريقة الاستخلاص. بينت إحدى الدراسات فعالية تثبيطية كبيرة للمستخلص الإيتانولي لجذور نبات *T. terrestris* (IC_{50} =10.5µg/ml) (Ghareeb *et al.*, 2014) وعزى الباحثون هذه الفعالية للمحتوى المرتفع من الفلافونويدات ومتعددات الفينول في جذور النبات. كما أظهر منقوع أوراق النبات (المستخلص المائي) فعالية بلغت (IC_{50}= 6967µg/ml) عزيت لمحتواه من السابونينات. في دراسات أخرى تحرت الفعالية التثبيطية تجاه إنزيم α–غلوكوزيداز لمستخلصات نباتية مختلفة عزيت هذه الفعالية لمحتوى النباتات من الألكالويدات والتربينات والتانينات.

دراسة نمط التثبيط تجاه إنزيم α–غلوكوزيداز:

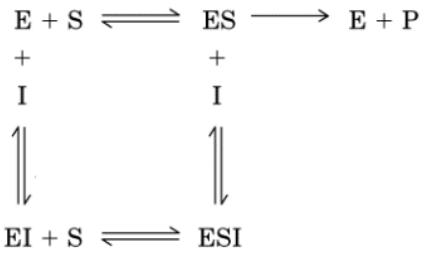
أظهرت الدراسة الحالية الفعالية العظمى للمستخلص الهكساني لثمار النبات في تثبيط إنزيم α-غلوكوزيداز مقارنةً بالمستخلصات الأخرى لذلك أجريت دراسة لمعرفة

نمط التثبيط في هذا المستخلص. استعملت تراكيز مختلفة من الركيزة pNPG مع المثبط (المستخلص الهكساني للثمار) ومن دونه. حسبت قيمة كل من Km وVmax بالاعتماد على معادلة لينوفر–بارك، ويوضح الشكل الآتي التمثيل البياني للنتائج التي تم الحصول عليها.

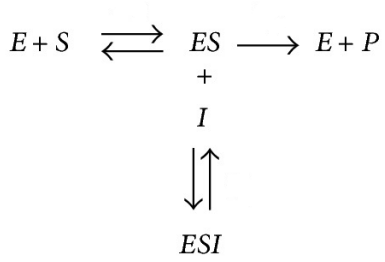


الشكل (3): التمثيل البياني لمعادلة لينوفر–بارك لإنزيم α–غلوكوزيداز مع المثبط و من دونه

أدت إضافة المثبط إلى انخفاض قيمة V_{max} من 20.8µM/min إلى 4.57µM/min، بينما بقيت قيمة K_m ثابتة 0.31mM. تشير هذه النتائج إلى أن التثبيط هو من النمط العكوس اللاتنافسي (noncompetitive) وهذا يتوافق مع بعض الدراسات السابقة على إنزيم α-غلوكوزيداز وركيزته pNPG بوجود مثبطات مختلفة (Ramu *et al.*, 2014)، (Ibrahim *et al.*, 2014)، وفي هذا النمط من التثبيط يرتبط المثبط I بمركز خاص به في الإنزيم مغاير للمركز الفعال الذي ترتبط فيه الركيزة S ويمكن أن يرتبط فيه المثبط على نحو متعادل مع الإنزيم الحر E أو مع المعقد إنزيم–ركيزة ES الأمر الذي يقلل من نسبة المعقد الفعال ES الذي يؤدي إلى ناتج التفاعل P على النحو الآتي:



بينما تخالف هذه النتيجة إحدى الدراسات السابقة التي أجريت على مشتقات أميدات حمض السينامك المعزولة من ثمار النبات (Song *et al.*, 2016) التي تشير إلى أن التثبيط هو من النمط العكوس اللاتنافسي (uncompetitive) الذي يتم على النحو الآتي:



الاستنتاجات Conclusions

أظهرت مستخلصات أوراق وثمار نبات *T. terrestris* بمختلف المذيبات (الهكسان، والأسيتون، والإيتانول، والماء) فعالية خافضة للسكر تم إثباتها مخبرياً عن طريق دراسة فعالية هذه المستخلصات في تثبيط إنزيم α–غلوكوزيداز. لوحظت فعالية تثبيطية أعلى تجاه إنزيم α-غلوكوزيداز في المستخلصات ذات الطبيعة اللاقطبية أو القطبية المنخفضة (الهكسان والأسيتون). امتاز المستخلص الهكساني لثمار النبات بأعلى قدرة تثبيطية IC_{50}=27.28µg/ml، وكان التثبيط من النمط اللاتنافسي (noncompetitive).

المراجع References

1. الحكيم، و.، بدوي، ا.، آغا، ع.، القاضي، ع.، دركلت، أ.، الشاطر، ز.، إبراهيم، ث.، قربيصة، م. (2012). أطلس النباتات الطبية والعطرية في الوطن العربي، الفصائل والأنواع النباتية (2)، *المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة*، دمشق، سورية: 563–565.

2. Asgar A. (2013). Anti-Diabetic Potential of Phenolic Compounds: A Review. *InternationalJournal of Food Properties* , 16 (1), 91-103.
3. Ghareeb D., ElAhwany A., El-mallawany S., Saif A. (2014). In vitro screening for anti-acetylcholiesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, antiinflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* , 28 (6), 1155-1164.
4. Ibrahim M., Koorbanally N., Islam S. (2014). Antioxidative activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes (a-glucosidase and a-amylase) by Khaya senegalensis. *Acta Pharm*. 64, 311–324.
5. Kamboj P., Aggarwal M., Puri S., Singla S. K. (2011). Effect of aqueous extract of Tribulus terrestris on oxalate-induced oxidative stress in rats. *Indian J Nephrol* , 21 (3), 154–159.
6. Lamba H., Bhargava C., Thakur M., Bhargava S. (2011). α-glucosidase and aldose reductase inhibitory activity in vitro and antidiabetic activity in vivo of *Tribulus terrestris* L. (dunal). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3 (3), 270-272.
7. Lokhande K.D., Kulkarni C.G., Shinkar M.C., Jadhav S.T., Salunkhe S.S. (2014). Evaluation of antioxidant potential of Indian wild leafy vegetable Tribulus terrestris. *IJAPBC* , 3 (3), 703-708.
8. Nair S., Kavrekar V., Mishra A. (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology* , 3 (1), 128-132.
9. Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M., Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 57–60.
10. Phillips O., Mathew K., Oriowo M. (2006). Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* , 104, 351–355.
11. Ramu R., Shirahatti P., Zameer F., Ranganatha L., Prasad N. (2014). Inhibitory effect of banana (Musa sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents Umbelliferone and Lupeol on α-glucosidase,

aldose reductase and glycation at multiple stages. *South African Journal of Botany* , 95, 54–63.
12. Sheng Z., Dai H., Pan S., Wang H., Hu Y., Ma W. (2014). Isolation and Characterization of an α-Glucosidase Inhibitor from Musa spp. (Baxijiao) Flowers. *Molecules* , 19, 10563-10573.
13. Song Y.H., Kim D.W., Curtis-Long M.J. , Park C., Son M., Kim J.Y., Yuk H. J., Lee K. W., Par K. H. (2016). Cinnamic acid amides from Tribulus terrestris displaying uncompetitive α-glucosidase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 114, 201-208.
14. World Health Organization (WHO): Definition, Diagnosis and classification of diabetes mellitus and complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Department of Non-communicable Disease Surveillance, Geneva, 1999.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2018/10/21.
تاريخ قبوله للنشر 2019/01/20 .