

تأثير خلاصة أوراق الزيتون السوري في تثبيط فاعلية الأميلاز ألفا مخبرياً

شذى الشعال* د. فرانسوا قره بت** د. منال داغستاني***

الملخص

عينت بعض المركبات الموجودة في خلاصة أوراق الزيتون السوري، بتحليل الخلاصة بجهاز الكروماتوغرافية السائلة عالية الأداء المقترنة بمطيافية الكتلة. تبين أن المركب الأكثر وفرة في الخلاصات هو الأولروبين (Oleuropein). واختبرت أيضاً فاعلية الخلاصات الإيتانولية والمائية لأوراق الزيتون السوري، في تثبيط إنزيم الأميلاز ألفا من أجل استقصاء قدرة هذه الخلاصات على خفض سكر الدم مخبرياً (في الزجاج). وصلت النسبة المئوية للتثبيط إلى 77.74% عند تركيز خلاصات أوراق الزيتون المائية 6.14 مغ /مل. كما اختبر نمط تثبيط الأميلاز وحسبت قيم سرعة التفاعل العظمى V_{max} وثابت ميكائيليس-مينتين K_m من معادلة Lineweaver-Burk، وأظهرت النتيجة أن التثبيط هو من النمط اللاتنافسي.

الكلمات المفتاحية: أوراق الزيتون السوري، الأميلاز ألفا، تثبيط فاعلية الأميلاز ألفا.

*طالبة دكتوراه، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

**أستاذ دكتور، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

***أستاذة مساعدة، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

The Effect of Syrian Olive Leaf Extract in the Inhibition of α -Amylase Activity In vitro

Shaza AlShaal*

Dr. F.Karabet**

Dr. M.Daghestani***

Abstract

Some compounds of the Syrian olive leaves extract have been identified by high-performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometry. As expected oleuropein was found to be the most abundant compound in these extracts. The study also examined the effectiveness of ethanol and aqueous extracts of Syrian olive leaves in inhibiting the α -amylase enzyme in order to investigate the ability of these extracts to reduce blood sugar in vitro. Inhibition percentage reached 77.74% at 6.14 mg/ml concentration of olive leaves extracts. The amylase inhibition pattern was also tested, the max velocity V_{max} and Micheles - Menten constant K_m were calculated from the Lineweaver-Burk equation. The result showed that inhibition is uncompetitive type.

Key words: Syrian olive leaves, α - amylase, , α - amylase activity inhibition.

* PhD., StudentK, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

** Professor Dr, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

*** Assistant Professor , Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

المقدمة:

أضحت الأدوية العشبية مصدرًا رئيسًا في الطب بدلًا من الأدوية المصنعة (Kumar, 2014)؛ إذ سجلت منظمة الصحة العالمية نحو 21000 نباتًا مستعملًا طبيًا في أنحاء العالم. تتنوع استعمالات النباتات في معالجة الحالات المرضية البسيطة والشائعة مثل الصداع، والإسهال، والإمساك إلى الأمراض الأكثر جدية مثل ضغط الدم، والتهاب المفاصل، والقرحة، وحصى الكلى، والسكري (Al-Aboudi, Afifi, 2011). يعد مرض السكري المرض الأكثر خطورة في العالم لما له من مضاعفات على وظائف الجسم كافة، وهو اضطراب استقلابي يشخص بازدياد سكر الدم الناجم عن نقص إفراز الأنسولين مؤديًا إلى زيادة مستوى السكر في الدم (Ponnusamy *et al.*, 2011)، أو عن عدم فعالية الأنسولين أو كليهما (Mitra, 2008). ويبلغ عدد المصابين بالسكري نحو 371 مليون، ويتوقع أن يصل العدد إلى أكثر من 600 مليون شخص عام 2035 (Zimmet *et al.*; 2014). تعتمد فعالية الأعشاب المضادة للسكري على تنوع آلياتها، فقد تكون مثبطة لإنزيم الأميلاز ألفا (Kumar, 2014)، أو مثبطة لإنزيم غلوكوزيداز ألفا، أو تقوم بتزويد الجسم بعناصر مهمة مثل الكالسيوم والزنك والمغنيزيوم والمنغنيز والنحاس للخلايا بيتا، أو بتخفيض مقاومة الأنسولين، أو بتحفيز إفراز الأنسولين من خلايا بيتا (Mukherjee *et al.*, 2006; Bnouham *et al.*, 2006; Kumar, 2014). توجد أدوية كثيرة خافضة لسكر الدم تعمل على تثبيط إنزيم الأميلاز ألفا. وقد يكون ذلك مجديًا في تخفيض مستوى السكر في الدم لدى العديد من المرضى، إلا أن استمرار تناول هذه الأدوية قد يكون له تأثيرات جانبية غير مرغوبة مثل السمية الكبدية وأعراض هضمية مزعجة (Etxeberria *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2012). لذا تزداد الحاجة لمثبطات طبيعية لإنزيم الأميلاز ألفا لا تكون لها آثار جانبية ضارة.

يعد شاي ورق الزيتون من العلاجات الشعبية الشائعة لمرض السكري؛ لغناه بالمركبات الفعالة حيويًا، والتي تعد موادًا مضادة للتأكسد كالمركبات الفينولية (Visioli & Gall, 2002). تحتل أوراق الزيتون المركز الأعلى بنسبة 35% من حيث الاستعمال من قبل المعالجين التقليديين لمرض السكري، تليها البذور 20% ثم الثمار 15% وبعدها الجذور 10% والأزهار 5% (Amal & Massarrat, 2016). أظهرت الدراسات فعالية خلاصة أوراق الزيتون في تثبيط إنزيم الأميلاز البنكرياسي (Komaki et al., 2003)، حيث تقوم بإطالة زمن الهضم الكلي للكربوهيدرات، ما يؤدي إلى انخفاض معدل امتصاص الغلوكوز، ومن ثمّ إقلال نسبة ارتفاعه في الدم بعد الأكل (Kazem et al., 2013). وتبين في دراسة أخرى قدرة أوراق الزيتون على منع ارتفاع مستوى الغلوكوز في الدم بعد تناول النشاء لمتطوعين، ومن ثمّ قد تكون مكملًا غذائيًا مفيدًا لعلاج مرض السكري (Komaki et al., 2003).

يملك الأولروبين (المركب الأكثر وفرة في أوراق الزيتون) تأثيرًا خافضًا لسكر الدم عند الجرذان المصابة بالسكري (Gonzalez et al., 1992; Jemai et al., 2009). يتباين تركيز الأولروبين باختلاف البيئة والمناخ (Ryan et al., 2002)، وتجدر الإشارة إلى احتواء أوراق الزيتون السوري على تركيز مرتفع يصل إلى 88.50 ± 9.67 mg/g في الخلاصات الإيثانولية (AlShaal et al., 2019)، وهي قيمة عالية مقارنة مع الدراسات المرجعية الأخرى. (Afaneh & Yateem, 2015; Tayoub et al., 2012; Yateem et al., 2014).

هدف البحث:

يهدف هذا البحث إلى تعيين المركبات الأكثر وفرة في خلاصة أوراق الزيتون السوري، ودراسة مدى تأثير هذه الخلاصات في تثبيط أنزيم الأميلاز ألفا مخبريًا (في الزجاج)، وذلك بحساب قيم التثبيط وتعيين قيم IC_{50} لكل منها، مع تبيان نوع التثبيط الحاصل للخلاصة ذات قيمة الـ IC_{50}

الأفضل، بهدف الاستفادة من أوراق الزيتون السوري، المتوفر في البيئة المحلية بكثرة ، بوصفه مثبثًا طبيعيًا لارتفاع سكر الدم.

مواد البحث وطرقه:

العينات النباتية: جُمعت أوراق الزيتون من مدينة خان أرنية، محافظة القنيطرة، سورية، وذلك في شهر حزيران 2017 ، وهو من نوع الزيتون الصوراني (المسمى أبو شوكة). صنفت أ.د. جورجيت بابوجيان النبات بالاعتماد على صفات النبات الواردة في الفلورا السورية وأطلس النباتات الطبية والعطرية في الوطن العربي (الحكيم وزملائه، 2012).

معالجة العينات: جففت أوراق الزيتون في الظل بعيدًا عن الشمس مدة 10 أيام لإزالة الماء من الأوراق بهدف حمايتها من التلف والتخمر، ولتخفيض تحلل الأولوبين بفعل الإنزيمات، ولتحسين كفاءة الاستخلاص (Tayoub *et al.*, 2012)، حفظت بعد طحنها بمطحنة كهربائية، في مكان مظلم وجاف محكم الإغلاق بدرجة حرارة الغرفة إلى حين استعمالها.

الأجهزة: هزازة أنابيب (KAI) MS1 Minishaker (Vortex)، حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية نموذج (Elma) Transsonic 460/H، مبخر دوار، جهاز مطيافية UV-VIS طراز (JASCO). جهاز الكروماتوغرافية السائلة عالية الأداء مقترنة بمطيافية الكتلة طراز (HPLC-) (MS) (Shimadzu.) من اليابان: المكشاف UV، عمود الفصل (C₁₈, 250 mm × 4.5 mm ، ID, 5 μm) المضخة LC-20ADXR،

المواد الكيميائية: يبين الجدول 1 المواد الكيميائية المستعملة في القسم العملي.

الجدول (1) المواد الكيميائية المستعملة في البحث

الشركة	النقاوة	المادة
Riedel-de Haën	% 99.8	إيثانول
Sigma-Aldrich	%98.0	معياري الألوروبين
Panreac	%99.5	حمض الخل
IITAN BIOTECH LTD		نشاء بطاطا
Sigma-Aldrich	13 وحدة في المغ الصلب	إنزيم الأميلاز ألفا
Riedel-de Haën		D(+ مالتوز
Sigma-Aldrich		5,3 ثنائي نثرو حمض السالسيك (DNSA)
Sigma-Aldrich	%99.0	طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم
Panreac	%99.5	ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO)
MERCK	%89.0-100.5	فسفات أحادية الصوديوم، 2 جزيئة ماء
MERCK	%99.0	فسفات ثنائية الصوديوم، 12 جزيئة ماء
Riedel-de Haën		فينول
Panreac	%99.0	كلوريد الصوديوم وهيدروكسيد الصوديوم
Sigma for HPLC	%99.9	أسيونتريل

تحضير الخلاصات:

وزن 1.00 غ من مسحوق الأوراق الجافة، وأضيف إليها 20 مل إيثانول (70%) أو ماء مقطر حسب نوع الخلاصة إيثانولية أم مائية، تعد هذه النسبة بين المادة الصلبة والمحل هي النسبة الأمثل للاستخلاص وفق المرجعية (Sahin and Samli., 2013)، حُركت جيدًا بواسطة هزازة الأنابيب للتجانس مدة دقيقة واحدة، ثم وضعت في جهاز الأمواج فوق الصوتية في درجة الحرارة $(75 \pm 2)^\circ$ لمدة 30 دقيقة، رشحت الخلاصات بمراشح $0.45\mu\text{m}$ ، وحفظت في الثلاجة إلى حين استعمالها. كررت عملية الاستخلاص ثلاث مرات. اعتمدت طريقة الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية باعتبارها

من الطرائق المتبعة حديثاً وشائعة الاستعمال، نظراً لقدرتها على تحسين الاستخلاص بتسريع تحرر المواد الفعالة حيويًا من جدر الخلايا وسهولة استخلاصها (Achat *et al.*, 2012).
بُخرت الخلاصات في المبخر الدوار حتى الجفاف، ومن ثم حلت بأقل كمية من ثنائي ميثيل سلفوكسيد لدراسة فعاليتها في تثبيط إنزيم الأميلاز ألفا، وحُسب تركيز الخلاصة بالاعتماد على وزن الخلاصة المبخرة وكمية المحل المضافة.

تحليل الخلاصات بتقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المقترنة بمطيافية الكتلة (HPLC-MS) استعملت تقانة (HPLC- MS) لتعيين بعض المركبات الفعالة في أوراق الزيتون المستخلصة (إيثانولية ، مائية). أجري الفصل وفق الشروط التحليلية المعتمدة في المرجعية (AlShaal *et al.*, 2019)، وهي شروط الفصل الكروماتوغرافي: عبارة عن برنامج مندرج للفصل (الجدول 2)، الطور الأول (A): ماء محمض بحمض الخل بنسبة 2.5% والطور الثاني (B): أسيتونتريل، سرعة التدفق: 1 مل/دقيقة. طول الموجة: 280 nm، حجم الحقنة 20 ميكرو لتر، درجة الحرارة: 25 م°. شروط مطيافية الكتلة: وفق النمط السالب للأيونات $[M-H]^-$ ، سرعة تدفق غاز النتروجين: 1.5 لتر في الدقيقة، درجة حرارة التبخير 450 م°.

الجدول (2) برنامج الفصل الكروماتوغرافي

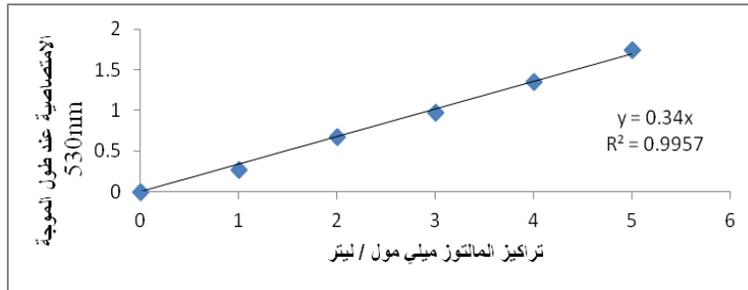
Time/min	A	B
0	90	10
10	80	20
35	60	40
40	0	100
45	0	100
46	90	10
50	90	10

تحضير الكواشف:

كاشف الـ DNSA (1%) : حضر وفق طريقة (Miller., 1959) بإذابة 1.0 غ من 3، 5 ثنائي نيترو حمض الساليسيليك في 50 مل من الماء المقطر، ثم إضافة 1.0 غ من هيدروكسيد الصوديوم بغرض الإذابة، و 0.05 غ كبريتيت الصوديوم و 0.2 غ فينول. ثم مدد الحجم إلى 100 مل ماء مقطر وحفظ في مكان بارد ومظلم.

المحلول الموقى الفسفاتي (0.02 M) pH=6.9: حلت كمية معينة من فسفات أحادية الصوديوم، 2 جزيئة ماء وفسفات ثنائية الصوديوم، 12 جزيئة ماء، كلوريد الصوديوم، مزجت معًا وتمم الحجم إلى 250 مل من الماء المقطر. مع التحقق من قيمة pH للمحلول المحضر.

تحضير سلسلة معيارية من المالتوز: لمعرفة كمية المالتوز المتحرر حضرت سلسلة معيارية من المالتوز من تراكيز مختلفة (1- 5) ميلي مول / لتر، (الشكل 1). سجلت امتصاصية المحاليل عند طول الموجة 530 nm.



الشكل (1) السلسلة المعيارية المالتوز عند طول الموجة 530 nm

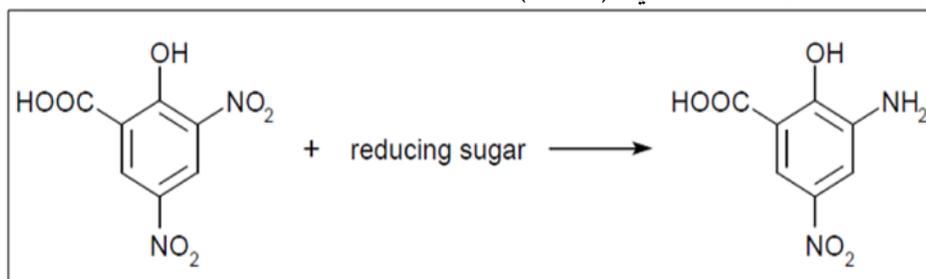
محلول النشاء (0.5%) : حل 0.25 غ من نشاء البطاطا في 50 مل من المحلول الموقى الفسفاتي، ووضع على سخان مزود بمحرك مغناطيسي حتى القرب من درجة الغليان، مع ضبط حجم المحلول للحفاظ على التركيز المطلوب.

محلول الإنزيم: وزن 0.154 غ من إنزيم الأميلاز ألفا، وحل في 10 مل من المحلول الموقفي الفسفاتي.

محلول طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (40% وزناً): وزن 40 غ من الطرطرات، وحلت في 60 مل من الماء.

تحري فعالية تثبيط الخلاصات المحضرة لإنزيم الأميلاز ألفا:

يُعمد تعيين فعالية إنزيم الأميلاز ألفا حسب الطريقة اللونية باستعمال كاشف 5,3-ثنائي نترو حمض السالسليك DNSA، وفق طريقة Berfeld (1955, Berfeld)؛ إذ يعمل هذا الإنزيم على تحطيم الروابط 1 و4 - الغليكوزيدية، معطيًا سكاكر مرجعة مثل المالتوز. يكشف عن السكاكر المرجعة بالاعتماد على إرجاع زمرة النترو في الكاشف إلى الزمرة الأمينية، أي إرجاع المركب DNSA ذي اللون الأصفر إلى المركب 3- أمينو، 5- نترو حمض السالسليك ANSA ذي اللون الأحمر وفق التفاعل التالي، (الشكل 2):



الشكل (2) تفاعل إرجاع DNSA ذي اللون الأصفر إلى ANSA ذي اللون الأحمر بوجود السكاكر المرجعة

طريقة العمل: حضرت تراكيز مختلفة من الخلاصات المدروسة (1.64-6.14) مغ/مل. أخذ 100 مكرو لتر من كل منها، أضيف إليها 100 مكرو لتر من الإنزيم المحضر، مزج المحلول جيداً، ثم حضن لمدة 10 دقائق في درجة حرارة المخبر 25 °م. أضيف إليها بعد الحضن 100 ميكرو لتر

من محلول النشاء 0.5%، حضنت عند الدرجة 37 م⁰ لمدة 10 دقائق. أخيرًا أضيف 200 ميكرو لتر من كاشف الـ DNSA. أوقف التفاعل بالغلي في حمام مائي مدة 15 دقيقة، أضيف بعدئذ 100 ميكرو لتر من محلول طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم، ثم مدد محلول التفاعل بـ 1400 ميكرو لتر من الماء المقطر. سجلت امتصاصية محاليل الأنابيب المحضرة عند طول الموجة 530 nm. بالإضافة إلى أنابيب الخلاصات (المثبط)، حُضرت أنابيب شاهدة باستبدال الإنزيم بالموقي، وأنابيب من دون مثبط باستبدال المستخلص بالموقي، وأنابيب شاهدة لكل عينة (لكل تركيز من تراكيز الخلاصات) باستبدال الإنزيم بالمستخلص لمعرفة كمية السكر المتحررة من العينة النباتية الأصلية من دون تأثير الإنزيم.

حسبت فعالية التثبيط المئوية من العلاقة (1):

نسبة التثبيط % = $\left[\frac{\text{الامتصاصية دون مثبط} - \text{الامتصاصية مع المثبط}}{\text{الامتصاصية بدون مثبط}} \right] \times 100$
حسبت قيمة IC₅₀ للخلاصات من بياني نسبة التثبيط المئوية بدلالة تركيز المستخلص.

تحري نمط تثبيط المستخلص لإنزيم الأميلاز ألفا:

لمعرفة نوع التثبيط لخلاصة أوراق الزيتون، استعمل تركيز المثبط ذي قيمة الـ IC₅₀ الأقل، بوجود تراكيز مختلفة من الركازة (النشاء)، سجلت الامتصاصية عند طول الموجة 530nm، استقرئ تركيز المالتوز المتحرر من سلسلة المالتوز المعيارية. حسبت قيم سرعة التفاعل عند كل تركيز من معرفة زمن التفاعل الحاصل. يمكن حساب قيم V_{max} و K_m من معادلة Lineweaver–Burk (العلاقة 2):

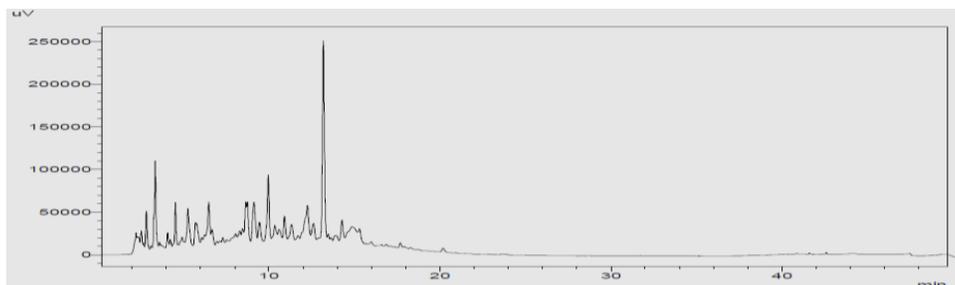
$$(2) \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

حيث V سرعة التفاعل، K_m ثابت ميكائيليس- مينتين، V_{max} سرعة التفاعل القصوى، [S] تركيز ركازة النشاء.

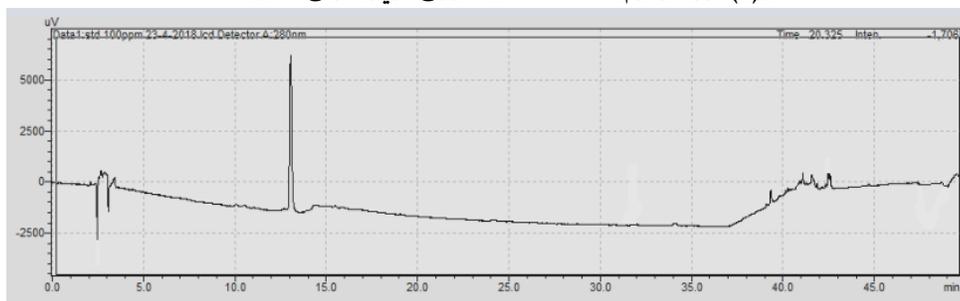
طريقة العمل: حدد نمط تثبيط المستخلص وفق المرجعية (Ali *et al.*, 2006) مع بعض التعديلات. حُضرت مجموعتان من الأنابيب، المجموعة الأولى حُضن فيها 100 مكرو لتر من المستخلص مع 100 مكرو لتر من محلول الإنزيم، لمدة 10 دقائق في درجة حرارة المختبر. في المجموعة الثانية من الأنابيب حُضن فيها 100 مكرو لتر من المحلول الموقى الفسفاتي مع 100 مكرو لتر من محلول الإنزيم في المدة نفسها. أُضيفت 100 ميكرو لتر من محلول النشاء بتركيز مختلفة (5-0.5) مغ /مل، إلى مجموعتي الأنابيب لبدء التفاعل، وحُضنت بالدرجة 37⁰م لمدة عشر دقائق. أُضيف 200 مكرو لتر من كاشف DNSA، ترك على حمام مائي ليغلي مدة 15 دقيقة. بعدها أُضيف 100 ميكرو لتر من محلول طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم، ومدد بـ 1400 مكرو لتر من الماء المقطر. حددت كمية السكريات المتحررة باستعمال مقياس الطيف الضوئي اعتمادًا على سلسلة المالتوز المعيارية. حسبت سرعة التفاعل V من معرفة التراكيز الناتجة وزمن الحُضن. ومنه رسم البياني الدال على مقلوب سرعة التفاعل (1/V) بدلالة مقلوب تركيز الركازة المستعملة في التفاعل وهي النشاء (1/[S]).

النتائج والمناقشة:

نتائج تحليل خلاصات أوراق الزيتون بتقانة الكروماتوغرافيا (HPLC-MS): يوضح (الشكل 3) كروماتوغرام تحليل الخلاصة المائية لأوراق الزيتون بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء عند طول الموجة 280 nm. تبين لدى المقارنة مع معياري الأولروبين (الشكل 4)، أن زمن استبقائه في الزمن 13.6 دقيقة، وكان المركب الأكثر وفرة مقارنة مع باقي المركبات الموجودة في الخلاصة المدروسة؛ إذ بلغت وفرته القيمة 39.8% وفق المساحات المئوية للمركبات الأخرى. كما حُددت بعض المركبات الفعالة الأخرى بمقارنة أوزانها الجزيئية الناتجة من مطيافية الكتلة مع مثيلاتها المذكورة في المرجعيات (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013) (الجدول 3):



الشكل (3) كروماتوغرام الخلاصة المائية لأوراق الزيتون وفق تحليل الـ LC



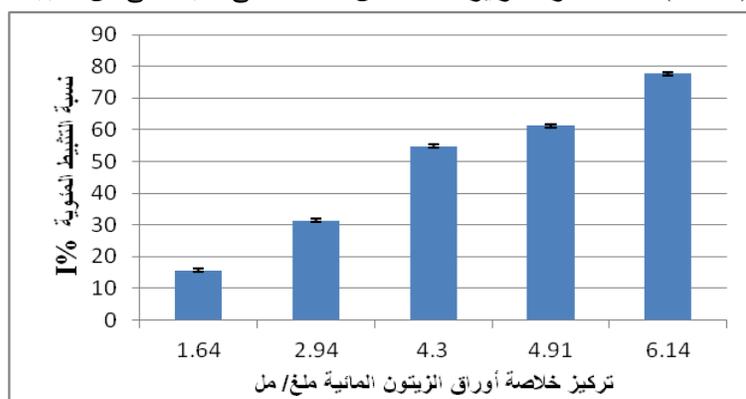
الشكل (4) كروماتوغرام عياري الأولوروبين وفق تحليل الـ LC

الجدول (3) المركبات الموجودة في أوراق الزيتون وفق تحليل LC-MS

[M-H] ⁻	زمن الاستبقاء/دقيقة	اسم المركب
595	10.033	Apigenin-6,8-di glucoside
447	10.218	Unknown
493	10.367	Unknown
701	10.583	Oleuropein glucoside
447	12.800	Luteolin-7-glucoside
539	13.667	Oleuropein
558	14.768	Unknown
137	16.133	Tyrozol
569	16.627	2,Methoxyoleuropein isomer
285	19.449	Leuteolin

استقصاء تأثير تثبيط الخلاصات المحضرة في تثبيط فاعلية الأميلاز ألفا:

درست فعالية التثبيط لخلاصات أوراق الزيتون الإيثانولية والمائية، باستعمال تراكيز مختلفة منها، لوحظ أن الخلاصات المائية أعطت قيم تثبيط أعلى من الخلاصات الإيثانولية دون وجود فروق يعتد بها. إذ وصلت نسبة التثبيط إلى 77.74% عند تركيز الخلاصة المائية لأوراق الزيتون 6.14 مغ /مل. ويبين (الشكل 5) أنه كلما ازداد تركيز المستخلص حصلنا على نسبة أعلى من التثبيط.



الشكل (5) النسبة المئوية لتثبيط خلاصة أوراق الزيتون المائية لفاعلية إنزيم الأميلاز ألفا بدلالة تراكيز الخلاصة المختلفة

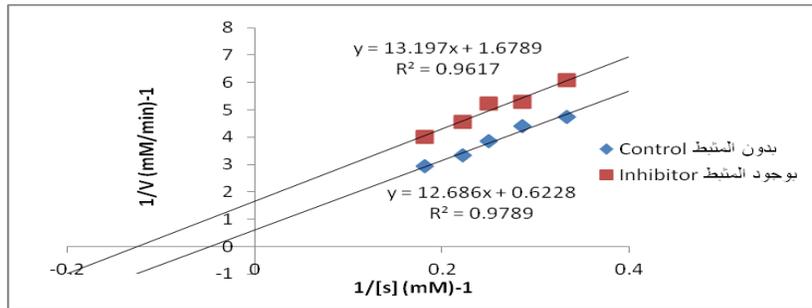
حُسبت قيمة IC_{50} للخلاصات المدروسة من معادلة المستقيم المرسوم من علاقة نسبة التثبيط المئوية بدلالة تركيز الخلاصة المدروسة، (الجدول 4):

الجدول (4) قيم IC_{50} لخلاصات أوراق الزيتون المائية والإيثانولية لتثبيط إنزيم الأميلاز ألفا

نوع خلاصة أوراق الزيتون	IC_{50} مغ/مل
خلاصة مائية	0.18 ± 4.29
خلاصة كحولية	0.57 ± 4.85

تحري نمط تثبيط المستخلص لفاعلية الأميلاز ألفا

أجريت دراسة حركية لمعرفة تأثير تغيير تراكيز الركازة (النشاء) على نشاط الإنزيم، اعتمد تركيز قيمة IC_{50} لهذه الدراسة. وحسبت قيم ثابتة ميكائيليس مينتين K_m والسرعة القصوى V_{max} بالاعتماد على معادلتى المستقيمين من مقلوب سرعة التفاعل بدلالة مقلوب تركيز الركازة، (الشكل 6 والعلاقة 2).



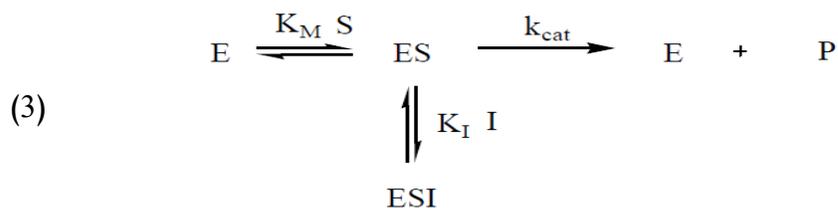
الشكل (6) نوع تثبيط فاعلية الأميلاز ألفا من قبل خلاصة أوراق الزيتون المائية

يلاحظ من قيم (الجدول 5) تغير قيم كل من K_m و V_{max} ؛ إذ نقصت قيمة كل منهما، ما يدل على أن نمط التثبيط هو النمط اللاتنافسي un competitive.

الجدول (5) قيم K_m و V_{max} دون وبوجود المثبط بالاعتماد على معادلة Lineweaver-Burk

	$1/K_m$ (mM) ⁻¹	K_m (mM)	$1/V_{max}$ (mM/min) ⁻¹	V_{max} (mM/min)
بدون وجود مثبط	0.05	20.42	0.62	1.61
بوجود مثبط	0.13	7.86	1.67	0.60

في هذا النوع من التثبيط لا يرتبط المثبط مع الإنزيم الحر، وإنما يرتبط بصورة عكسية مع المعقد E-S مكوناً المعقد ESI غير النشط الذي لا يؤدي إلى تكوين ناتج (Alsamarrai, 2011)، وفق المعادلة 3:



حيث E: الإنزيم، S: الركازة، I: المثبط، P: المنتج.

الاستنتاجات:

عُينت هوية بعض المركبات الموجودة في خلاصة أوراق الزيتون السوري، مع تحديد المركب ذي الوفرة الأعلى وهو الأولروبين. دُرست فعالية مستخلصات أوراق الزيتون السوري الإيتانولية والمائية في تثبيط فاعلية إنزيم الأميلاز ألفا، ولوحظ قدرتها العالية على تثبيط فاعلية الإنزيم بتركيز منخفضة من الخلاصة. كما درس نمط التثبيط الحاصل ووجد أنه من النمط اللاتنافسي، ومن ثمّ يمكن الاستفادة من خلاصات أوراق الزيتون السوري بوصفه مصدرًا طبيعيًا لتثبيط فاعلية الأميلاز.

المراجع:

1. Achat, S., Tomao, V., Madani, K., Chibane, M., Elmaataoui, M., Dangles, O., & Chemat, F. (2012). Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(4), 777-786.
2. Afaneh, I., Yateem, H., & Al-Rimawi, F. (2015). Effect of olive leaves drying on the content of oleuropein. *American Journal of Analytical Chemistry*, 6(03), 246.
3. Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Cárcel, J. A., & García-Pérez, J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 120-129.
4. Al-Aboudi, A., & Afifi, F. U. (2011). Plants used for the treatment of diabetes in Jordan: a review of scientific evidence. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 221-239.
5. Al-Aboudi, A., & Afifi, F. U. (2011). Plants used for the treatment of diabetes in Jordan: a review of scientific evidence. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 221-239.
6. Ali, H., Houghton, P. J., & Soumyanath, A. (2006). α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of ethnopharmacology*, 107(3), 449-455.
7. Alsamarrai, O. R. H. (2011). EFFECT OF PARACETAMOL ON SALIVA α -AMYLASE. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences* Number 2,201.257-263.
8. AlShaal, S., Karabet, F., & Daghestani, M. (2019). Determination of the Antioxidant Properties of the Syrian Olive Leaves Extracts and Isolation

- Oleuropein by HPLC Techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research*, 6(1), 97-110.
9. Amal, M. Fakhry, and M. M. Masarrat. (2016) "Ethnobotanical Survey of Plants Used in the Treatment of Diabetes Mellitus in Tabuk Region, Saudi Arabia." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 5.6: 258-270.
 10. Bernfeld, Peter. (1955)"[17] Amylases, α and β ." : 149-158.
 11. Bnouham, M., Ziyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., & Legssyer, A. (2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity-A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 14(1), 1.
 12. Etxeberria, U., de la Garza, A. L., Campión, J., Martinez, J. A., & Milagro, F. I. (2012). Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(3), 269-297.
 13. Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M. J., Utrilla, M. P., Jimenez, J., & Osuna, I. (1992). Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta medica*, 58(06), 513-515
 14. Hung, H. Y., Qian, K., Morris-Natschke, S. L., Hsu, C. S., & Lee, K. H. (2012). Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Natural Product Reports*, 29(5), 580-606.
 15. Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 8798-8804
 16. Kazeem, M. I., Ogunbiyi, J. V., & Ashafa, A. O. (2013). In vitro Studies on the Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase by Leaf Extracts of *Picralima nitida* (Stapf). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(5), 719-725.
 17. KOMAKI, E., YAMAGUCHI, S., MARU, I., KINOSHITA, M., KAKEHI, K., OHTA, Y., & TSUKADA, Y. (2003). Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 35-39.

18. Kumar, K., Fateh, V., Verma, B., & Pandey, S. (2014). Some herbal drugs used for treatment of diabetes. *Int J Res Develop Pharm Life Sci*, 3(5), 1116-1120.
19. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
20. Mitra, A. (2008). Some salient points in dietary and life-style survey of rural Bengal particularly tribal populace in relation to rural diabetes prevalence. *Studies on Ethno-Medicine*, 2: 51-56.
21. Mukherjee, P. K., Maiti, K., Mukherjee, K., & Houghton, P. J. (2006). Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 1-28.
22. Ponnusamy, S., Ravindran, R., Zinjarde, S., Bhargava, S., & Ravi Kumar, A. (2011). Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
23. Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.
24. Şahin, S., & Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595-602.
25. Tayoub, G., Sulaiman, H., Hassan, A. H., & Alorfi, M. (2012). Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2, 428-433.
26. Visioli, F., Poli, A., & Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*, 22(1), 65-75.

27. Yateem, H., Afaneh, I., & Al-Rimawi, F. (2014). Optimum conditions for oleuropein extraction from olive leaves. *Int. J. Appl*, 4, 153-157.
28. Zimmet, P. Z., Magliano, D. J., Herman, W. H., & Shaw, J. E. (2014). Diabetes: a 21st century challenge. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 2(1), 56-64.
29. وسيم الحكيم، بدوي السعدي، عصام آغا، عماد القاضي، أحمد دركلت، زهير الشاطر، ثروات إبراهيم، محمد قريصة. (2012). أطلس النباتات الطبية والعطرية في الوطن العربي، الفصائل والأنواع النباتية (2)، المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة، دمشق،