# Pharmacognostical Investigation of some *Yucca* Species (Asparagaceae)

## A Thesis submitted

## By

**M.Sc. Samar Mohamed Bassam Moaz**

For The Degree of Doctor of Philosophy in Pharmaceutical Sciences
(Pharmacognosy)

## Under the Supervision of

**Prof. Dr. Seham Salah El Din El-Hawary**

Professor of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy,
Cairo University

**Assistant Prof. Dr. Abeer Mohamed Ali El-Sayed**

Assisstant Professor of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy,
Cairo University

**Assistant Prof. Dr. El-Moataz Bellah Ali El-Naggar**

Assisstant Professor of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy,
Damnhour University

**Dr. Hanan Samir Marzouk**

Lecturer of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy,
Pharos University in Alexandria

**Pharmacognosy Department**
**Faculty of Pharmacy**
**Cairo University**

**A.R.E**

**2019**

P.U.A. Library
Library C
Faculty of : Ph. D.m
Serial No : 239
Classification : 615.3

# Abstract

*Yucca* is a genus of woody perennial shrubs and trees, native to Central America northward to southernmost Canada. This genus is highly reputed for its economic importance as a source of fibers and saponins for rope and soap industries, respectively.

*Yucca aloifolia* L., and its variety *Yucca aloifolia variegata* L., *Yucca filamentosa* L. and *Yucca elephantipes* Regel leaves were collected from Orman Botanical Garden, to investigate their biological activities and to carry on phytochemical investigation of the most active species.
The plants were first subjected to thorough botanical study and DNA fingerprinting to aid their authentication and identification in any future study.

Biological investigation of the total alcoholic extracts of the leaves of the 4 plants, lead to the conclusion of the excellent hepatoprotective effect of the 4 plants using *in-vivo* $CCl_4$-induced hepatotoxicity model. *In-vitro* cytotoxicity investigation proved the outstanding cytotoxic activity of *Y. aloifolia variegata* L., especially against hepatocellular carcinoma and breast cancer cell lines. However, antimicrobial activity screening showed the lack of activity in both water and alcoholic extracts of the 4 plants.

As a result, *Y. aloifolia variegata* L. was considered the most active and was subjected to further phytochemical investigation. This included preliminary phytochemical screening, determination of total phenolic content, quantitative and qualitative determination of flavonoids and phenolic acids in fraction using HPLC, investigation of lipoid content using GC-MS for both saponifibale and unsaponifiable fractions, and finally LC-MS/MS of the total extract and some fractions. LC-MS/MS was used to for identification of 10 isolated compounds.

These investigations lead to the identification of 129 compounds in *Y. aloifolia variegata* L., among which saponins, flavonoids, phenolic acids, stilbenes, hydrocarbons and fatty acids.

This study is the first to investigate *Y. aloifolia variegata* L. botanically, genetically and phytochemically.

Molecular docking *in-silico* experiments were done for some of the major compounds against possible protein targets in cytotoxic activity. The docking scores were good for all the investigated compounds, indicating the holistic action of the alcoholic extract.



**Keywords:** *Yucca aloifolia*, *Yucca aloifolia variegata*, *Yucca filamentosa*, *Yucca elephantipes*, LC-MS, HPLC, saponins, flavonoids, phenolics, DNA fingerprinting, molecular docking, hepatoprotective, cytotoxic

# الملخص العربي


يعتبر نبات اليوكا من النباتات التي تنتمي للعائلة الفرعية اجافويديا المتفرعة من العائلة الاسبارجية. جنس اليوكا يضم ٣٥-٤٠ نوع في موطنه الاصلي في وسط أمريكا وشمالا حتى جنوب كندا. وهو من النباتات المزهرة الصحراوية التي تتحمل ظروف الجفاف وقلة المياه في جنوب امريكا والمكسيك. وتتم زراعته في مصر بغرض الزينة.

ولهذا الجنس شهرة في الطب الشعبي, حيث أن مستخلصات النبات كانت تستخدم لتهدئة الام المفاصل والنزيف والتهابات البروستاتا والاحليل. وحاليا احد انواع اليوكا تم تصنيفه من هيئة الغذاء والدواء الامريكية كأحد اضافات الغذاء الامنة وتم منحه ملصق " يعتبر عموما آمنا".
يوجد عدد قليل جدا من الابحاث التي تناولت انواع اليوكا المقدمة الى مصر, ولذا تهدف هذه الدراسة الى تفصي المحتوي الكيميائي والفاعلية البيولوجية لثلاثة أنواع من اليوكا المزروعة في مصر, يوكا الوفوليا وردف الفصيلة خاصته يوكا الوفوليا فاريجاتا ويوكا فيلامنتوسا ويوكا اليفانتيبس.

واشتملت هذه الدراسة على الاتي:

هذه الدراسة تمت علي اربعة فصائل: يوكا الوفوليا, يوكا الوفوليا فاريجاتا, يوكا فيلامنتوسا ويوكا اليفانتيبس

**الجزء الاول:** التوصيف الجيني لاربعه من فصائل نبات اليوكا والدراسة النباتية لاوراق النباتات

**الجزء الثاني:** تقييم الفاعلية البيولوجية للخلاصة الكحولية للاوراق

**الجزء الثالث:** دراسة كيميائية لمستخلصات اوراق اليوكا فاريجاتا

- الفصل الاول: الفحص الكيميائي الاولي
- الفصل الثاني: الفحص الكمي للمحتوي الفينولي الكلي
- الفصل الثالث: الفحص النوعي والكمي للفلافونيدات والاحماض الفينولية
- الفصل الرابع: فحص المحتوى الدهني
- الفصل الخامس: فحص المركبات باستخدام التحليل الكروماتوغرافي عالي الاداء المقترن بمطياف الكتلة

**الجزء الرابع:** دراسة الالتحام الجزيئي لمركبات اساسية في النبات


## الجزء الاول: التوصيف الجيني لاربعة من فصائل نبات اليوكا والدراسة النباتية لاوراق النباتات.

### الفصل الاول: البصمة الوراثية للحمض النووي

تم تكبير الحمض النووي المستخلص من النبات باستعمال بوادئ امامية وخلفية عديدة النيكلوتيدات لتقييم المحتوي الجيني للنباتات.

تم عمل تحليل تكبير عشوائي باستعمال عشر دلائل من الدلائل عديدة النيكلوتيدات واوضحت الدراسة وجود اربعة من الدلائل يمكن استعمالها للتمييز الجيني كما اثبتت التقارب ما بين اليوكا الوفوليا واليوكا الوفوليا فاريجاتا.

**الفصل الثاني: أ- دراسة عيانية لاوراق الاربعة نباتات**

وقد هدفت هذه الدراسة الي توفير معلومات تؤدي الى التعرف والتفرقة ما بين انواع اليوكا تحت الدراسة.

تتواجد الاربعة نباتات من اليوكا كنباتات خشبية دائمة على هيئة أشجار او شجيرات. اليوكا نبات ارضي حيث ان الساق صغيرة جدا أو غير موجودة في النبات صغير السن اما في النبات البالغ فيتحول الي ساق خشبية تحمل اوراقا.

يختلف الاربعة نباتات في شكل الورقة من حيث الطول واللون ووجود سن في اخر الورقة وقد تم المقارنة ما بينهم وتوضيح الفروق.

ورقة اليوكا الوفوليا: الورقة بسيطة, جالسة ولونها اخضر داكن. شكل الورقة طولي وسيفي (الطول حوالي ٦٠ سم والعرض حوالي ٤,٤ سم في أعرض جزء) مع شوكة طرفية طولها ٥ مم تبرز من القمة مستدقة الطرف. اما الحافة فهي محززة والورقة سميكة وعصارية.

ورقة اليوكا الوفوليا فاريجاتا: تشبه ورقة اليوكا الوفوليا في ما عدا اللون الابيض القشدي عند الحافة. وهي ايضا بسيطة, جالسة , طولية وسيفية الشكل مع شوكة طرفية وحافة محززة والورقة سميكة وعصارية. والورقة البالغة لها نفس ابعاد ورقة اليوكا الوفوليا.

ورقة اليوكا فيلامنتوسا: بسيطة وجالسة وطويلة جدا, وشكل الورقة طولي رمحي (الطول حوالي ٧٧ سم والعرض حوالي ٦,٤ سم في أعرض جزء). لون الورقة اخضر زاهي مع ملاحظة ان السطح السفلي افتح في اللون. الحافة محززة و القمة مستدقة الطرف.

ورقة اليوكا اليفانتيبس: الورقة بسيطة, جالسة طولية ولونها اخضر داكن. يبلغ طولها ٤٣ سم عرضها ٤,٨ سم. الحافة محززة و القمة مستدقة الطرف.

**ب- دراسة مجهرية لاوراق النباتات**

- القطاع العرضي

يتشابه القطاع العرضي في الاربعة نباتات : حيث يتكون من بشره داخلية وبشره خارجية بينهما نسيج وسطي متجانس يتخلله بعض الحزم الوعائية.

أ- البشرة الخارجية العلوية والسفلية : تتكون من خلايا مضلعة ممطوله ذات جدر مستقيمة مغطاه بادمة سميكة. تتشابه البشرة في الاربعة أوراق في ما عدا أن اوراق اليوكا اليفانتيبس يغطي بشرتها طبقة أقل سمكا من الادمة. الثغور غائرة ولها دهليز مؤدي الى السطح ولها حجرات تحت سطحية.

ب- النسيج الوسطي:يتكون من طبقة واحدة من الخلايا السياجية و طبقات عديدة من النسيج الاسفنجي بينما هو متجانس في اليوكا فيلامنتوسا واليوكا اليفانتيبس وبه بلورات منشوريه وابرية من اكسالات الكالسيوم.

ويعترض النسيج الاسفنجي حزم وعائية جانبية وحزم من الالياف. ويلاحظ ان الحزم الوعائية محاطة بغطاء من الالياف ووتتميز الاوراق بما يسمى تعرق ثلاثي الابعاد.

ج- النسيج الوعائي ويتكون من اللحاء والخشب الذي يتكون من اوعية ملجننة ذات تغلظ حلزوني وحلقي مصحوبه بالياف في اتجاهات مختلفة

- العناصر الاساسية المجهرية للنبات المطحون

الفحص المجهري للاربعة نباتات مطحونة يوضح التشابه في تكوينهم مع اختلافات بسيطة خاصة في اليوكا اليفانتيبس التي تظهر عدد اكبر من البللورات المنشورية ويوجد لديها الياف مسننة.

**الجزء الثاني: تقييم الفاعلية البيولوجية للخلاصة الكحولية للاوراق**

**الفصل الاول : دراسة النشاط الحامي للكبد في الجسم الحي**

- دراسة السمية الحادة

تم دراسة التأثير السمي الحاد علي ٤٥ فار امهق بالغ. وتم اعطاء كل فأر جرعة ١٠٠ مجم /لكل كيلو وزن لمدة ١٥ يوم متتاليين وتم تسجيل اكثر من معامل كيميائي حيوي.

وقد أوضحت النتيجة أن المستخلصات الكحولية للاربعة نباتات لم تؤدي الي اي وفاه او تؤثر على اي معامل كيميائي حيوي ومن ذلك تم استنتاج ان النباتات امنة للاستخدام.

- دراسة النشاط الحامي للكبد في الجسم الحي

تم تقييم فاعلية المستخلصات بجرعات مختلفة ضد التسمم الكبدي المتعمد عن طريق اعطاء الفئران رباعي كلوريد الكربون لمدة ١٥ يوم. وقد اعطيت مجموعة الضبط السلبية محلول ملح فقط اما مجموعة ضبط التسمم الكبدي فقد اعطيت ا مل /لكل كيلو وزن من رباعي كلوريد الكربون.

اثبتت الدراسه فاعلية الاربعة نباتات في حماية الكبد من تسمم رباعي كلوريد الكربون,خاصة اليوكا الوفوليا فاريجاتا بجرعة ٤٠ مجم /لكل كيلو وزن.

**الفصل الثاني : دراسة النشاط المضاد للسرطان في المختبر**

تم دراسة التأثير المضاد للسرطان للمستخلص الكحولي للاوراق بطريقة الMTT علي اربعة انواع من خطوط الخلايا السرطانية البشرية, سرطان الكبد و سرطان الرئة وسرطان الثدي وسرطان القولون وقد اظهرت الدراسة تفوق نبات اليوكا الوفوليا فاريجاتا.

**الفصل الثالث: تحري النشاط المضاد للميكروبات**

تم دراسة فاعلية النباتات لكلا من المستخلص الكحولي والمستخلص المائي ضد ٥ انواع من الكائنات الحية الدقيقة القياسية بطريقة الانتشار القرصي وقد تم استخدام مجموعة ضابطة سلبية بها المذيب فقط و كانت النتيجة ان لم يبد اي منهما اي فاعلية ضد الخمس انواع من الميكروبات.

بناء علي نتائج الدراسة البيولوجية تم اختيار اوراق اليوكا الوفوليا فاريجاتا علي انها الاكثر فعالية والاجدر بالدراسة الكيميائية.

**الجزء الثالث: دراسة كيميائية للمواد الفعالة في اوراق اليوكا الوفوليا فاريجاتا**

**الفصل الاول: المسح الكيميائي الأولي**

تم اختبار اوراق وسيقان وجذور الاربعة نباتات كل علي حدة من حيث وجود المكونات الاتية:

المكونات المتسامية والمواد الطيارة والمواد الكربوهيدراتية والجلوكوزيدات والفلافونيدات الحرة والمقترنة و الصابونينات والقلويدات او القواعد النيتروجينية والاستيرولات والتربينات الثلاثية والعفصيات والانثراكينونات والجلوكوزيدات القلبية والانزيمات المؤكسدة ومن هذه الدراسة تبين ما يلي:

١-وجود المواد الكربوهيدراتية او الجلوكوزيدات ووالفلافونيدات الحرة او المقترنة والاستيرولات او التربينات الثلاثية والصابونينات.

٢- تركز المواد الفعالة في اوراق اليوكا الوفوليا فاريجاتا

٣- لم يتم العثور علي اي من المكونات المتسامية او الطيارة الانثراكينونات والجلوكوزيدات القلبية والانزيمات المؤكسدة او القلويدات

**الاستخلاص واختبار الخلاصات**

تم استخلاص اوراق اليوكا الوفوليا فاريجاتا باستعمال النقع في الكحوا الاثيلي ٩٠% ثم تعليق الخلاصة الجافة في الماء ثم استخلاصها باستعمال الهكسان والكلوروفورم وخلات الايثيل والبيوتانول. تم وزن الخلاصات الخالية من المذيب وتحديد نسبها وتسجيل الخواص الظاهرية لها واختبارها من حيث وجود الفينولات والفلافونيدات

**الفصل الثاني: التحديد الكمي للمحتوى الفينولي الكلي في المستخلصات الكحولية لاوراق اليوكا الوفوليا و اليوكا الوفوليا فاريجاتا واليوكا فيلامنتوسا واليوكا اليفانتيبس**

تم تعيين محتوى الفينولات الكلي في مستخلصات الاوراق باستخدام المقايسة اللونية وكانت اعلي نتيجة لليوكا الوفوليا ثم اليوكا الوفوليا فاريجاتا.

**الفصل الثالث: التحديد الكمي والكيفي لمحتوي الفلافونيدات و الاحماض الفينولية للمستخلصات الكحولية لاوراق اليوكا الوفوليا فاريجاتا باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الفصل عالي الكفائة**

ادى تحليل الخلاصات الاربعة, خلاصة الهكسان و الكلوروفورم وخلات الاثيل والبيوتانول استخدام تقنية كروماتوغرافيا الفصل عالي الكفائة وفي وجود مركبات فياسية , تم التوصل الي ان خلاصة خلات الاثيل كانت الاغنى وتم التعرف بها على ١٤ من الفلافونيدات و ١٨ من الاحماض الفينولية. اما خلاصة البيوتانول تم التعرف بها على ١٨ من الفلافونيدات و ١٨ من الاحماض الفينولية وخلاصة الكلوروفورم تم التعرف بها على ١٦ من الفلافونيدات و ١٨ من الاحماض الفينولية .واخيرا خلاصة الهكسان تم التعرف بها على ١٧ من الفلافونيدات و١٩ من الاحماض الفينولية.

**الفصل الرابع: فحص المحتوى الدهني لاوراق اليوكا الوفوليا فاريجاتا باستخدام كروماتوغرافيا الغاز المقترن بمطياف الكتلة**

- تم تحليل المواد الغير المتصبنه وقد تم التعرف علي ٨٢% من المحتوي ويمثل المحتوي المتعرف عليه ٢١ هيدروكربون بنسبة ٣٩% و ٣ ستيرولات بنسبة ٤٢%
- تحليل الاسترات الميثيلية للاحماض الدهنية باستعمال كروماتوغرافيا الغاز المقترن بمطياف الكتلة وقد تم التعرف علي ٢٦ مركب. وتمثل الاحماض الدهنية المشبعة ٦٤% والغير مشبعة ٣٢%.

**الفصل الخامس: فحص المستخلصات الكحولية لاوراق النباتات باستخدام التحليل الكروماتوغرافي عالي الاداء المقترن بمطياف الكتلة**

تم التعرف على المركبات باستخدام التحليل الكروماتوغرافي عالي الاداء المقترن بمطياف الكتلة باستخدام ٣ تحاليل بتقنيات مختلفة

**التحليل الاول: فحص المستخلصات الكحولية لاوراق النباتات باستخدام التحليل الكروماتوغرافي عالي الاداء المقترن بمطياف الكتلة (١٣٥ فولت)**

تم التعرف على ١٤ مركب منهم ١٠ صابونينات , حيث ان الصابونينات هي المركبات الغالبة في المستخلص.

**التحليل الثاني: فحص المستخلصات الكحولية لاوراق النباتات باستخدام التحليل الكروماتوغرافي عالي الاداء المقترن بمطياف الكتلة (٣٥ فولت)**

تم استخدام قوة تكسير اقل في هذه التجربة. وقد ادي ذلك الى التعرف على عدد اكبر من المركبات حيث تم التعرف على ٤٤ مركب في الوضع السلبي و ٢٦ مركب في الوضع الايجابي. وكانت هذه المركبات ما بين فلافونيدات واحماض فينولية وصابونينات وغيرهم.

في النهاية, استطاعت هذه الدراسة التعرف على ١٢٩ مركب باستخدام تقنيات مختلفة وقد تم التعرف علي مجموعة من الفينولات والفلافونيدات والستيرولات والاحماض الدهنية و الصابونينات.

كما تم عمل مقارنه لمحتوي المستخلصات الكحولية للاربعة نباتات باستخدام التحليل الكروماتوغرافي عالي الاداء المقترن بمطياف الكتلة (١٣٥ فولت).

**الفصل السادس: فحص خلاصة البيوتانول**

بعد ترسيب الصابونينات من خلاصة البيوتانول باستخدام الاسيتون تم تجزئته علي عمود من السيليكا ثم تم اختيار بعض الخلاصات الناتجة من العمود لفحصها باستخدام التحليل الكروماتوغرافي عالي الاداء المقترن بمطياف الكتلة مما ادى الى التعرف على ١٠ مركبات.

**تحليل خلاصة الصابونينات بمساعدة مصفوفة الليزر الامتزاز / التأين وقت الرحلة**

تم ترسيب الصابونينات من خلاصة البيوتانول باستخدام الاسيتون ثم تم تحليله باستخدام الفصل بمساعدة مصفوفة الليزر الامتزاز / التأين وقت الرحلة مما ادي الي التعرف على ٤ مركبات.

**الجزء الخامس: دراسة الالتحام الجزيئي لمركبات اساسية في النبات**

يعتبر مركب الهسبردين ومركب حمض الجاليك ومركب الهيكوجنين من المركبات الغالبة في مستخلص اليوكا الوفوليا فاريجاتا وقد تم دراسة الالتحام الجزيئي لهم مع انزيم PIM-1 Kinase وEGFR الذين قد يكونا هدف للمركبات في نشاطها المضاد للسرطان.