الجمهورية الجزائرية الدمقراطية الشعبية
وزارة التعـليـم العالـي والـبحث الـعلـمي
جامـعة الشهيد حمه لخضر الوادي
كلية العلوم الدقيقة
قسم الكيمياء

N° of order:

N° of series:

مذكرة تخرج لنيل شهادة الماستر أكاديمي في الكيمياء
تخصص : كيمياء عضوية
من إعداد الطالبتين : معمري فاطمة
شتحونة فاطمة الزهرة

تحت عنوان :

الدراسة الفيتوكميائية بواسطة(LC/MS/MS)

وكذا تقييم الفعالية البيولوجية لمستخلص إيثانولي لنبتة طبية

" Matricaria pubescens " من واد سوف

نوقشت يوم : 03 /06/ 2024 أمـــام اللجنة المكونة من :

الأستاذ	الرتبة	الصفة	الجامعة
وهراني محمد رضا	أستاذ التعليم العالي	رئيسا	جامعة الشهيد حمه لخضر- الوادي
تامة نور الدين	أستاذ محاضر (أ)	عضو مناقش	جامعة الشهيد حمه لخضر- الوادي
حوات عمار	أستاذ مساعد قسم (أ)	مؤطر	جامعة الشهيد حمه لخضر- الوادي

السنة الجامعية : 2024/2023

التشكرات

نشكر كل من ساعدنا في هذا العمل المتواضع من قريب أو بعيد ونخصص منهم :

عميد كلية علوم الطبيعة والحياة الاستاذ : زعتر عبد المالك

مهندسي المخابر الفيتوكمياء والفعالية البيولوجية (CRBT).

مهندسي المخابر بالبرتغال.

مدير كلية الطب : الاستاذ درويش سمير

مهندسة المخابر : قوبي سناء

مهندسي وملحقي المخابر بكلية علوم الطبيعة والحياة كل بإسمه.

مسؤول مكتبة علوم الطبيعة والحياة : مساك حسان.

طالبة الدكتوراه : إيناس شرفي .

إهداء

الحمدلله الذي بنعمته تتم الصالحات منتها الدرب ولا ختم الجهد ولا تم السعي إلا بفضلك يارب الحمدلله

قول وفعل وشكرا تم بحمد الله

تم تخرجي ،إلى سكان قلبي :

إلى القلب النابض ،إلى من أفضلها على نفسي ولما لا فلقد ضحت من أجلي ،ولم تدخر جهد في سبيل إسعادي على الدوام إلى من

كانت دعواتها صادقة في سر نجاحي أمي غاليتي (زهية)

إلى رجل الكفاح ، قدوتي ونبراسي ،النور الذي ينير عتمتي ،إلى اليد حصدت الأشواك لي تمهد لي طريق العلم والمعرفة أبي الغالي (عمر)

إلى عضدي وحزام ظهري ، إلى بهجة حياتي إلى من وهبني الله نعمة وجودهم في حياتي إلى العقد المتين من كانوا عونا لي في رحلة بحثي : نصيحة ،حنان ،كاميليا ،داليا ،منال .

إلى المساند والداعم والكتف الذي اتكئ عليه عندما تقرر الحياة ان تميل .....أخي الوحيد عبد القادر

إلى من صعدت ارواحهم في السماء وفراقونا بجسدهم..... أجدادي

لاغلى الأشخاص في حياتي ،من أضائو دروبي وملئو قلبي بالامل أبناء أختي ،شكرا لكم على كل لحظة ساهمتم في جعلها خاصة ومميزة رائد و ريتال

إلى رفيقتي وزميلتي في هدا العمل فاطمة

إلى أصدقائي وجميع من وقف بجواري وساعدوني بكل ما يملكوه

إلى الأستاد الفاضل المشرف ذو الفضل على هده الشرة العلمية حوات عمار

إلى روحي الغالية الأولى قبل كل شيء

فاللهم اجعله بداية لمستقبل مشرق وناجح ونهاية خير

إهداء

الحمدلله حمدا يليق بجلال وجهه وعظيم سلطانه أما بعد ...

أهدي هذا العمل المتواضع إلى الوالدين الكريمين

إلى إخوتي : زكرياء وعيد اللطيف

إلى أخواتي : منال وسعاد

إلى خالتي : زكية

إلى الاستاذ الكريم نور الله دربه : حوات عمار

إلى كل من دعمني بكلمة طيبة

الملخص :

إن الاعتماد على النباتات في الطب يعود إلى آلاف السنين ، ولا يزال الطب الحديث يستخدم النباتات ومشتقاتها في صناعة العديد من الأدوية نظرا لفوائدها الطبية المتعددة والفعالية في علاج العديد من الأمراض، ويرتكز هدف بحثنا على دراسة نبتة " *Matricaria pubescens* " التي تم جمعها صباحا من منطقة الدميثة بقمار واستخلاصها بشكل شامل ، ومن ثم دراسة التحليل الكيفي للمستخلص الايثانولي الناتج بواسطة LC/MS/MS لهدف استخراج وتحليل مكونات النبتة من الأيض الأولي والثانوي وركزنا في دراستنا على مكونات الايض الثانوي منها الفينولات والفلافانويدات وغيرها ودراسة فعاليتها البيولوجية مع بالتركيز بشكل أكبر على الفعالية المضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية : الاستخلاص صلب سائل، التحليل الكيفي، مضادات الأكسدة .

Research:

The reliance on plants in medicine dates back thousands of years, and modern medicine continues to use plants and their derivatives in manufacturing many medicines due to their multiple medicinal benefits and effectiveness in treating various diseases. Our research focuses on studying the plant *"Matricaria pubescens,"* which was collected in the morning from the Damietta region in Egypt and comprehensively extracted. Subsequently, we conducted qualitative analysis of the ethanol extract using LC/MS/MS to extract and analyze the primary and secondary metabolites of the plant. Our study particularly emphasizes secondary metabolites such as phenols, flavonoids, and others, and investigates their biological activity, with a greater emphasis on antioxidant activity

Keywords :

Solid-Liquid Extraction , Qualitative Analysis , Antioxidants

- **جدول الأشكال :**

الأشكال	العنوان	الصفحة
شكل 01	صورة لنبات القرطوفة	**03**
شكل 02	الشكل المورفولوجي للنبتة	**04**
شكل 03	منطقة الدميثة	**06**
شكل 04	جهاز LC/MS/MS	**10**
شكل 05	الصيغة الكيمائية للفينول	**15**
شكل 06	بعض الأحماض الفينولية	**17**
شكل 07	تشكل quinone	**21**
شكل 08	الشكل العام للفلافانويد	**23**
شكل 09	مخطط العمل	**29**
شكل 10	شكل التفصيلي لـ DPPH	**32**

- **قائمة الجداول :**

الجدول	العنوان	الصفحة
جدول 01	تصنيف نبات القرطوفة	**05**
جدول 02	أقسام عديدات الفينول	**18**
جدول 03	أقسام الفلافانويد	**27**
جدول 04	جدول المركبات الكيمائية	**35**
جدول 05	نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط ABTS	**37**
جدول 06	نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط DPPH	**38**
جدول 07	نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط B- carotine	**38**

- **قائمة الاختصارات :**

الرمز	المعنى
$COCH_3$	Acétyle
ROS	Les espéces réactives de l′oxygéne
BHA	L′hydroxyanisolbutylé
BHT	Le butylhyroxytoluéne
DPPH	Le 2.2-diphnyl 1-picrylhydrazyle
ABTS	L′acide 2,2′-azino-bis
IC_{50}	Concentration inhibitricemédiane
TPC	Total phenolic
TFC	Total flavonoid
PH	Dihydrogénophosphate de sodium
MS	Spectrométrie de masse
UV-Vis	Spectrométrie ultravioleet-visible (Ultraviolet-visible spectroscopy
$ET.C_2H_6O$	Éthanol
OH^-	Hydroxyde

الفهرس

المحتوى	الصفحة
الاهداء	I
الشكر والعرفان	II
الملخص	III
قائمة الاختصارات	IV
قائمة الجداول	V
قائمة الاشكال	VI
الفهرس	VII
مقدمة عامة	01
الجزء النظري : الفصل الأول عموميات حول النبات	
تعريف نبات القرطوفة	03
نباتات العائلة المركبة	04
الاستخدامات	05
الجزء النظري : الفصل الثاني دراسة حول جهاز LC/MS/MS	
مبدأ عمل الجهاز	07
أنواع الاستشراب	07
مطياف الكتلة	09
المسح الكيمائي	11

الجزء النظري : الفصل الثالث عموميات حول المنتجات الطبيعية الفعالة	
مدخل إلى المنتجات الطبيعة الفعالة	12
تعريف الأيض الأولي	12
تعريف الايض الثانوي	12
تعريف الفينولات	14
تعريف المركبات الفينولية	14
التركيب الحيوي للمركبات الفينولية	15
الهياكل البنوية للمركبات الفينولية	16
الأحماض الفينولية	17
أقسام عديدات الفينول	18
وظيفة عديدات الفينول	18
الاستعمالات العلاجية	19
النشاطية البيولوجية لعديدات الفينول	20
النشاطية المضادة لأكسدة الفلافانويد	20
آلية عمل المركبات الفينولية لمضادات الاكسدة	22
تعريف الفلافانويد	23
تصنيف الفلافانويد	24
الفعالية البيولوجية للفلافانويدات	25

خواص الفلافانويد	25
الكشف عن الفلافانويد	26
الجزء العملي : الأجهزة والطرق	
تحضير المادة النباتية	28
الدراسة البيولوجية	30
إجمالي محتوى الفلافانويدTFC	31
إجمالي محتوى الفينول TPC	31
الطرق المخبرية والوسائل المستخدمة في تقدير نشاط المضاد للأكسدة	32
إختبار تثبيط الجذور DPPH	32
إختبار إزاحة الجذور ABTS	33
محتويات B-carotine	34
مناقشة النتائج	
تحضير محتوى المركبات النشطة بيولوجيا	35
تقدير القدرة المضادة للأكسدة	36
الخلاصة	VIII
قائمة المراجع	IX

المقدمة

مقدمة :

لطالما كان الإنسان في صراع دائم مع المرض منذ بداية خلقه حيث قادته فطرته وقوة عقله التي ميزه الله بها عن سائر مخلوقاته إلى استعمال الأعشاب والتداوي بها [1].

طب الأعشاب يعتبر تقليدياً أحد أقدم أنواع الطب المعروفة للبشرية، ويعود تاريخ ظهوره إلى نحو 6000 سنة قبل الميلاد، حيث كان الفراعنة المصريون من بين أوائل الشعوب التي أظهرت اهتماماً بالنباتات الطبية. كما أن الصينيين كانوا يقومون بجمع النباتات الطبية واستخدامها في علاج الأمراض منذ 4000 إلى 5000 سنة قبل الميلاد.

في القرن العشرين، تم اكتشاف قبر في مغارة بشمال العراق في عام 1960، وقد أظهرت التحاليل التي أُجريت على التربة المحيطة بالهيكل العظمي وجود حبوب طلع لثمانية نباتات. ومن بين هذه النباتات، وُجد أن سبعة منها ذات فوائد طبية، والتي ما زالت تُستخدم في علاج الأمراض في مختلف أنحاء العالم.

هذه النقاط تبرز الأهمية التاريخية لطب الأعشاب واستخدامه عبر العصور في مختلف الثقافات، وتظهر أنه مصدر قديم وموثوق به لعلاج الأمراض وتعزيز الصحة. [2].

بعد اكتشاف المضادات الحيوية في القرن الماضي واستعمالها الواسع اخذ استعمال النباتات والأعشاب الطبية و العطرية بالًت ارجع، لكن بالنظر لمحدودية استعمال هذه المضادات الحيوية فضلا عن تأثيراتها الجانبية ومقاومة بعض سلالات الأحياء المجهرية للبعض فقد استعادة النباتات والأعشاب الطبية والعطرية مكانتها باعتبارها من أهم مصادر الأدوية، إضافة إلى استعمالها كمواد منكهة وحافظة في بعض دول العالم وذلك لتوفرها في الطبيعة واحتوائها على مجاميع فعالة متعددة ذات فعالية عالية واستعمال واسع، فضلا عن محدودية الآثار الجانبية التي تسببها [2].

في الجزائر ، ازدادت الاهتمامات بأساليب الطب البديل والعودة إلى الطبيعة لمعالجة الكثير من الأمراض فلأدوية الحديثة تم صناعتها في عصرنا الحالي فقط ، بينما تعامل أجدادنا على مدى أزمنة كثيرة مع الأعشاب الطبية وغيرها من العلاجات التقليدية ، فلا يوجد منزل في الجزائر يخلو من وجود الأعشاب الطبية كالزعتر والنعناع ، حلبة وغيرها [4]. ومن هنا نتسائل ماهي المركبات الكميائية الموجودة في هذا النبات وما مدى فعاليتها البيولوجيا المضادة للأكسدة .

تطرقنا في بحثا هذا على ثلاث محاور رئيسية للجزء النظري وهي :

- ✓ دراسة نظرية عامة لنبات "*Matricaria pubescens*"
- ✓ دراسة عامة لجهاز : LC/MS/MS.
- ✓ دراسة نظرية عامة للمواد الفعالة في النبات ومنتجات الايض الأولي والثانوي.

في الجزء العملي تطرقنا إلى :

- ✓ دراسة المستخلص الايثانولي للنبتة من اجل الوصول إلى اهم المركبات المكونة لهذه النبتة .
- ✓ بعدها قمنا بإجراء عدة إختبارات بيولوجية للمستخلص الإيثانولي لنبات من أجل التعرف على فعاليتها المضادة للأكسدة ومدى فعاليتها البيولوجية لبعض الأمراض .

الجزء النظري

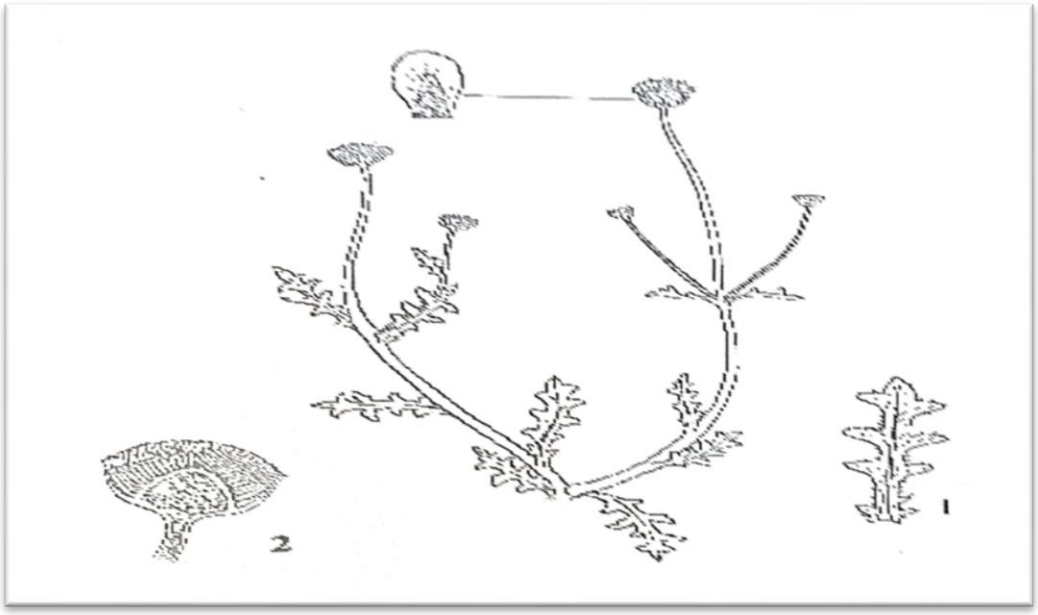
الفصل الأول : عموميات حول النبتة

I- نبات القرطوفة:

المعروف علمياً باسم *Matricaria pubescens*، هو عشب حولي يتبع الفصيلة النجمية *Asteraceae*. تتضمن هذه الفصيلة أكثر من 1000 جنس و23000 نوع نباتي [1]. ومنها يوجد 109 أجناس و408 أنواع في الجزائر. توجد القرطوفة في شمال إفريقيا، ويصل ارتفاعها إلى حوالي 25 سم. لها سوق متفرعة، وأوراق متبادلة شديدة الخضرة محملة بالشعيرات المتفرقة، ومفصصة بفصوص مسننة. وتتميز أزهار القرطوفة بأنها صغيرة جداً ولونها أصفر، يبلغ قطرها بين 5-8 ملم، وتحمل على أعناق رقيقة. الأزهار أنبوبية الشكل، والعقيات مصفرة وملساء. أما قناباتها فتحوافها علوية مسننة بأسنان صغيرة. تنمو القرطوفة في فصل الشتاء المتأخر،[2] وتزهر في فصل الربيع، تحديداً في مارس وأبريل. ويتناقص عدد النباتات كلما اتجهنا جنوباً من المنطقة [3].

الشكل رقم 01 لنبات *Matricaria pubescens*:

الشكل المرفولجي لنبات القرطوفة : [3]



II- نباتات العائلة المركبة *(Asteraceae)*:

تمتلك هذه العائلة تنوعاً كبيراً وانتشاراً واسعاً في المملكة النباتية. يعود ذلك جزئياً إلى الطريقة التي تنمو بها في مختلف البيئات، بما في ذلك المناطق الجافة والمعتدلة. على الرغم من أن العديد من هذه النباتات تكون عشبية، فإنها تشمل أيضاً النباتات المعمرة [4].

الجنس *Artemisia* يمثل حالة بارزة من هذه العائلة، مع ما يقرب من 200–400 نوع معروف. تنتشر هذه النباتات في معظم أنحاء العالم، وتعتبر زيوتها الطيارة جزءاً هاماً من تركيبها الكيميائي. ولقد أظهرت الدراسات الحديثة أن لهذه النباتات قيمة طبية ودوائية هامة [5].

تتكاثر العديد من نباتات العائلة المركبة بشكل خضري عن طريق الدرنات أو السيقان الجارية. هذه الطريقة الفعالة من الانتشار تعزز انتشار هذه النباتات وتجعلها أكثر قدرة على التكيف مع مختلف البيئات. [6]

نبات القرطوفة أو مايعرف بـ: *Matricaria pubescens*، ينمو في أواخر الشتاء ويزهر في فصل الربيع، وعادةً يجف ويموت عند اقتراب فصل الصيف.

أما بالنسبة للتصنيف النباتي، فيُعرف النبات باسم *Matricaria pubescens*، وله عدة أسماء محلية تختلف حسب المنطقة، ومنها:

– في منطقة الطاسيلي: يُعرف باسم "أيناسنيس".

– في وادي سوف وورقلة: يُعرف باسم "قرطوفة".[6]

– في منطقة بشار: يُعرف باسم "القرطوفة الخضراء" أو "الوزوازة" [7] .

والتصنيف النباتي لها هو :

المملكة	*PIante*
الشعبة	*Phanérogames*
تحت الشعبة	*Angiospermes*
القسم	*Eudicotylédonnee*
الرتبة	*Astérales*
العائلة	*Astéracées*
الجنس	*Matricaia*
النوع	*Matricaia pubescens (DESF)*

II- استخدامات نبات القرطوفة (***Matricaria pubescens***):

✓ الاستخدام في التغذية:

– **مشروب الوزوازة:** يستخدم القرطوفة بشكل كبير في مشروب الوزوازة، وهو خليط من الأعشاب الطبية يُستهلك كمشروب في فصل الصيف، كما يُعطي نكهة مميزة للشاي [8].

– **إضافة للأطعمة:** يستخدم سكان الجنوب الشرقي لإعطاء نكهة مميزة للطعام.

✓ الاستخدام العلاجي:

– **مضاد للحساسية والجراثيم:** يُستخدم كمضاد للحساسية ولمكافحة الجراثيم.

– **علاج لروماتيزم والسعال الحاد:** يُستخدم لعلاج حالات الروماتيزم والسعال الحاد.[8]

– **خافض للحرارة:** له خصائص خافضة للحرارة.

– **مضاد للتشنج:** يستخدم كمضاد للتشنج.

– **علاج أمراض الجهاز الهضمي والأمعاء:** يُستخدم لعلاج أمراض الجهاز الهضمي والأمعاء.

- **مضاد للالتهابات الجلدية والمخاطية:** يُستخدم خارجياً كمضاد للالتهابات في الجلد والأغشية المخاطية، ويُستخدم زيته لعلاج حالات الروماتيزم.Schultz (.Desf).

- **استخدام في مستحضرات الشعر والتجميل:** يُستخدم في مستحضرات الشعر التي تهدف إلى لمعان لون الشعر وتحفيز نموه، ويُضاف أيضاً إلى مستحضرات التجميل والمرطبات، كما يضفي نكهة للحساء وزبدة الماعز [9].

- **مضاد لالتهابات الفم والأذنين والعينين:** يُستخدم كمضاد للالتهابات في الفم والأذنين والعينين.

- **مساعد لعسر الطمث:** يستخدم كمساعد لعسر الطمث.

تُظهر هذه الاستخدامات العديدة لنبات القرطوفة أهميتها في المجالات الغذائية والعلاجية والتجميلية[10].

- تم قطف نبات القرطوفة من منطقة الدميثة، التي تعتبر منطقة ريفية في بلدية قمار، يعكس الاعتماد الرئيسي لسكان المنطقة على الفلاحة [11] . بالإضافة إلى ذلك، من الملاحظ أن الفلاحة في هذه المنطقة تركز بشكل خاص على زراعة التبغ والبطاطا والخضراوات بجميع أنواعها. قد يشير هذا إلى أهمية الزراعة كمصدر رئيسي للدخل في هذه المنطقة، وكذلك إلى تنوع المحاصيل التي يعتمد عليها السكان لتلبية احتياجاتهم الغذائية والاقتصادية [11].

الشكل رقم 03 : منطقة الدميثة بالوادي [11]

الفصل الثاني : دراسة عامة حول جهاز :

LC/MS/MS

I- المبدأ:

تعتبر أنظمة الكروماتوغرافيا السائلة المتصلة بجهاز مطيافية الكتلة (LC–MS) أو الكروماتوغرافيا السائلة المتصلة بالكروماتوغرافيا الغازية المتصلة بجهاز مطيافية الكتلة (GC–MS) أساليب فعالة لفصل وتحديد الجزيئات والبنية الكيميائية بدقة عالية في الخلطات الكيميائية [1] [2]. هذه الطريقة مفيدة جدًا في تحليل ودراسة مختلف أنواع المواد الكيميائية المتواجدة في البيئة، وفي المجالات الغذائية والطبية. يمكن استخدامها في تحليل المواد العضوية والمعادن والمركبات العضوية الصغيرة والكبيرة، والعديد من المركبات الأخرى[2]. تجعل دقة هذه التقنيات وقدرتها على تحديد الجزيئات الكيميائية المعقدة مناسبة للاستخدام في مجموعة واسعة من الصناعات مثل التكنولوجيا الحيوية وصناعة مستحضرات التجميل وتجهيز الأغذية.[2][3].

نظام LC/MS يعمل على فصل المكونات المنفصلة بكفاءة من عمود الكروماتوغرافيا السائلة ونقلها إلى مصدر الأيونات في مطيافية الكتلة عن طريق واجهة البينية. الطور المتحرك في نظام LC هو السائل المضغوط، بينما يعتمد الجهاز MS عادة على ضغط عالي حوالي 10^–6 إلى 10^–7 تور[3] وبالتالي ليس من الممكن ضخ المادة المنفصلة والوسط الحامل مباشرة من عمود الكروماتوغرافيا السائلة إلى مصدر الأيونات في مطيافية الكتلة.

الواجهة البينية هي الجزء الأساسي الذي ينقل أكبر قدر ممكن من المادة المنفصلة بين الجهازين. واحدة من أهم الشروط التي يجب توافرها في الواجهة هي أن يكون عملها من دون تداخل مع كفاءة التأين وظروف الفراغ لنظام مطيافية الكتلة [2].

غالبًا ما تعتمد واجهات جهاز LC/MS/MS على استراتيجيات تأين الضغط الجوي API مثل التأين بالترديد الإلكتروني EI، أو التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي AP.[4]

الكروماتوغرافيا السائلة (LC) هي تقنية تستخدم لفصل وتحليل مكونات السوائل. يتم ذلك عن طريق توزيع مكونات السائل بين الطور الثابت (المحطة) والطور المتحرك (المذيب)، وهذا الفصل يعتمد على التفاعل بين المكونات والمحطة والمذيب.[5]

تقسم كروماتوغرافيا السائلة إلى عدة فئات، ومن أشهر هذه الفئات:

- ✓ **استشراب الانجذاب (الجاذبية):**

– يستخدم في هذا النوع القوى الجاذبية بين المركبات والمحطة للفصل بينها.[6]

✓ **استشراب التبادل الأيوني:**

– يستخدم في هذا النوع التفاعل بين الشحنات الكهربائية لفصل المركبات.[6]

✓ **استشراب الاستبعاد الحجمي:**

– يعتمد على فرق حجم المركبات لفصلها.[6]

✓ **استشراب الامتصاص:**

– استشراب الامتصاص هو عملية تعتمد على قوة امتصاص المركبات بالمادة الامتصاصية لفصلها. في هذه العملية، يتم تمرير العينة عبر مادة امتصاصية معينة تتفاعل مع المركبات المستهدفة وتمتصها، في حين تمر المركبات الأخرى دون تفاعل. تعتمد كفاءة هذه العملية على الانتقائية والقوة الامتصاصية للمادة الامتصاصية المستخدمة، والتي تؤثر على قدرتها على فصل المركبات بشكل فعال. تُستخدم هذه العملية في العديد من التطبيقات مثل الكيمياء الحيوية والطب والكيمياء البيئية لفصل وتركيز المركبات المهمة قبل إجراء التحليل الكيميائي أو البيولوجي.[6]

✓ **استشراب التقاسمي:**

يستخدم فيها قوى التقسيم بين المذيب والمحطة لفصل المركبات.

الوضع الطوري العكسي RP هو من أكثر أنماط كروماتوغرافيا السائل استخداماً لفئة الاستشراب التقاسمي. في هذا الوضع، يتم استخدام طور ثابت غير قطبي (مثل C18) كمادة محطة، بينما يتم استخدام طور متحرك يحتوي على ماء مع مذيبات أخرى مثل الميثانول وكحول الإيزوبروبيل.

طور ثابت (Ps): يتألف عادةً من مادة C18 (التي تعني وجود سلسلة كربونية طويلة تحتوي على 18 ذرة كربون) وترتبط بسطح جزيئات السيليكا بقطر يبلغ حوالي 2 ميكرون.

طور متحرك (Pm): يتألف عادةً من ماء بالإضافة إلى مذيبات أخرى مثل الميثانول وكحول الإيزوبروبيل.

هذا الوضع يستخدم عموماً لفصل مجموعات متعددة من المركبات العضوية، ويعتبر فعالاً في فصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة والتي تتفاعل بطرق مختلفة مع المادة المحطة. .[2]

عندما يتم حقن 10 ميكرو لتر من العينة داخل جهاز LC، فإن هذه العينة تنقل بواسطة الطور المتحرك، والذي يتم ضخه بواسطة مضخة ذات ضغط عالي.[2] يتم فصل مكونات العينة بواسطة الالتصاق (adsorption) والاختزال (absorption) بين الطور المتحرك (Pm) والطور الثابت

(Ps)، ومن ثم يحدث الانفصال بعد التكرار الدوري للالتصاق والاختزال يتم ضخ السائل بضغط عالي يصل إلى 400 بار في العمود المعبأ، ويتم استخدام هذا الضغط العالي لتحقيق فصل فعال للمركبات المختلفة داخل العمود.

الطور الثابت (Ps) هو المكون الذي يلعب دوراً رئيسياً في عملية فصل العينة في جهاز LC. يتم تدفق مكونات العينة في العمود بأوقات مختلفة وذلك بسبب التقاسم بين الطور الثابت والطور المتحرك. يُعتبر عمود الفصل هو العنصر الأكثر أهمية في جهاز LC، حيث يتم تصميمه لتحمل الضغوط العالية للسوائل.

أبعاد العمود تتراوح عادة بين 300 إلى 200 ملم في الطول، وقطره الخارجي يكون حوالي 2.4 مليمتر، بينما قطره الداخلي يتراوح بين 4.2 إلى 3 مليمتر. يمكن أيضا أن يكون العمود أقصر من ذلك بحوالي 20–30 مليمتر، ويتم تعبئته بجزيئات قطرها يتراوح بين 2–3 ميكرون.

لتحسين كفاءة الفصل، يمكن استخدام تقنية UPLC بدلاً من HPLC. تقنية UPLC تعتمد على أعمدة معبأة بجزيئات أصغر من السيليكا، مما يتطلب ضغطاً أعلى يتراوح بين 320,000 إلى 772,000 تور، وهذا يساعد في تحسين كفاءة وسرعة الفصل.[2]

II – مطياف الكتلة :

الوصف الذي قدمته يشير إلى تقنية مطيافية الكتلة (MS)، وهي تقنية تحليلية تستخدم لفصل وتحديد مكونات العينة وفقاً لكتلتها وشحنتها الكهربائية. على الرغم من وجود عدة تقنيات في مجال مطيافية الكتلة، فإن جميعها تعتمد على الحقول الكهربائية أو المغناطيسية لدراسة حركة الأيونات التي تنتج عن المادة المستهدفة في التحليل وتحديد النسبة بين الكتلة والشحنة لها (z/m).[8]

مكونات أساسية لجهاز مطيافية الكتلة تشمل:

- **مصدر الأيونات:** حيث يتم تأيين جزيئات العينة بواسطة مصادر مختلفة مثل الإشعاع الساقط ، الأشعة فوق البنفسجية، أو حزم الليزر.
- **محلل الكتلة:** يقوم بفصل الأيونات وفقاً لنسبة الكتلة/الشحنة لها.[9]
- **الكاشف:** يقوم بتحويل الإشارات الكهرومغناطيسية إلى إشارات كهربائية قابلة للقياس.
- **أنظمة البيانات:** تقوم بتسجيل وتحليل البيانات المتولدة عن الكاشف.
- **نظام تفريغ الضغط:** يستخدم لضمان وجود ضغط منخفض داخل الجهاز.[9]

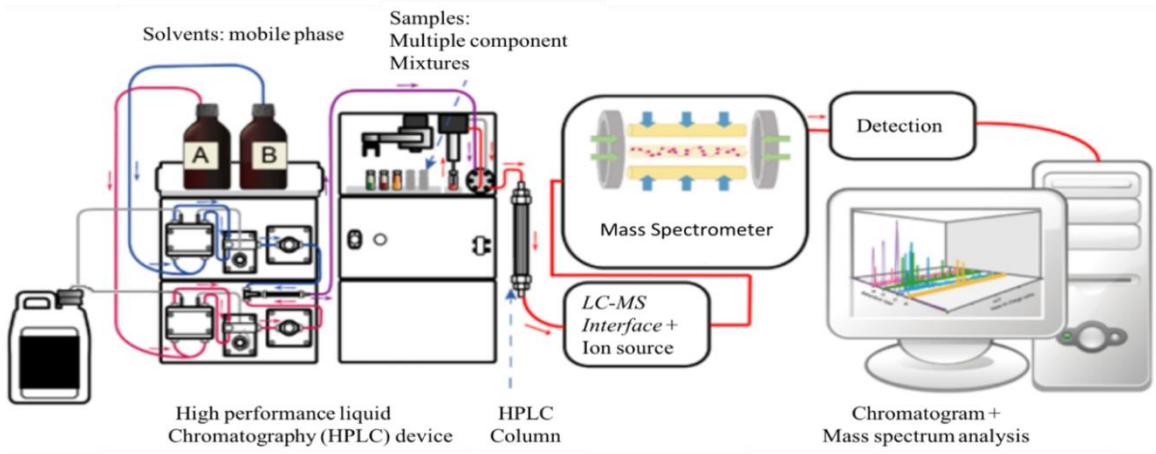
يقوم مصدر الأيونات بتحويل الأيونات المتولدة من العينة من الحالة السائلة إلى الحالة الغازية، وذلك عند التأيين الإلكتروني. يقوم بتحويل الجزيئات المتعادلة في العينة إلى أيونات غازية، ومن ثم يتم إرسالها إلى محلل الكتلة للفصل والتحليل الدقيق.[6]

المكشاف في جهاز مطيافية الكتلة يقوم بتضخيم وقياس التيارات الأيونية لحساب وفرة كل أيون، بينما يمكن رؤية الطيف الكتلي بالعين المجردة. يعمل أنظمة البيانات على تسجيل هذه الأطياف ومعالجتها وعرضها على أجهزة الكمبيوتر [6] .

يتم استخدام الطيف الكتلي لتحديد كتلة المادة المطلوب تحليلها، وأيضا لتحليل نظائرها، وتحديد التركيب الكيميائي لعناصرها. يعتمد هذا على أن الأيونات التي تتولد من العينة يمكن تحديد كتلتها باستخدام تقنيات التحليل الكتلي، وهذه الكتل يتم تسجيلها على شكل طيف يمكن مراقبته وتحليله لتحديد العناصر المكونة للعينة وكمياتها المختلفة.[2]

لقياس الطيف الكتلي، يجب أن تتم التجربة في الحالة الغازية وفي حيز مفرغ تحت ضغط منخفض، عادة ما يكون بين (1.33 × 10^−2 و 1.33 × 10^−1 باسكال). هذا يسمح بنقل العينات من مرحلة الضغط العالي إلى الحالة المناسبة للقياس بشكل سلس.[7]

لذلك، يعتبر تطوير أدوات تحليل الطيف الكتلي التي تعمل في ظروف فراغ تحت ضغط منخفض ضرورياً لتحديد وتقدير المركبات العضوية والببتيدات. [7] يستخدم مقياس الطيف الكتلي حاليا في المختبرات التحليلية التي تدرس الخصائص الفيزيائية أو الكيميائية أو البيولوجية لمجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات.[8]



الشكل رقم 04: مكونات جهاز LC/MS/MS [9]

III-المسح الكيميائي :

المسح الكيميائي أو التحليل الكيميائي هو تقنية تحليلية فيزيوكيميائية تعتمد أساساً على جهاز LC/MS/MS. تتضمن العملية تحضير العينة حيث يُأخذ مستخلص بكمية تتراوح بين 2 إلى 10 ملغ من المادة المراد تحليلها، ويُذاب في 2 مل من الإيثانول. بعد ذلك، يتم حقن كل 2 مل من العينة المُحضرة في جهاز LC/MS/MS، وهو جهاز يستخدم للتحليل الكروماتوغرافي السائل المتصلب مع التكرار الكتلي (LC/MS/MS).

يتيح هذا الجهاز الحصول على نتائج من خلال إجراء تحليل كروماتوغرافي للعينات، حيث يُحدد التركيب الكيميائي والتركيز للمركبات الموجودة في العينة.

الفصل الثالث : المنتجات الطبيعة الفعالة ومنتجات الأيض الثانوي

I- مدخل إلى المنتجات الطبيعية الفعالة :

هي مركبات عضوية من أصل طبيعي ، تنتجها الكائنات الحية أكثر هذه المكونات لها أهمية تلك التي تؤدي دورا في التفاعلات الأيضية [1]. والتي يتم فصلها من النباتات والكائنات الحية الدقيقة [2] . وهي جزئيات تنتج إنطلاقا من عمليات الأيض تنقسم المركبات الطبيعية المستخرجة من النباتات الطبية الي قسمين :

- مركبات الأيض الأولي .
- مركبات الأيض الثانوي [3].

I-1- تعريف مركبات الأيض الأولي :

تعرف مركبات الأيض الأولي على أنها المركبات الأساسية في النبات والتي تشارك بشكل مباشر في عمليات النمو والتطور والتكاثر الطبيعي لأعضاء وخلايا النبات . كما تعرف بكونها مركبات ضرورية لاستمرار حياة النبات والتي لها أدوار أساسية تتعلق بعملية التمثيل الضوئي والتنفس والنمو والتطور وهي تشمل: الكربوهيدرات، الدهون، البروتينات [4].

I-2 - مركبات الايض الثانوي :

الأيض الثانوي في النباتات يشير إلى العمليات الحيوية التي تؤدي إلى إنتاج مركبات عضوية متنوعة غير ضرورية مباشرة للنمو أو الانقسام الخلوي، ولكنها تلعب دورًا هامًا في التكيف مع البيئة وفي الدفاع عن النبات ضد الآفات والأمراض والتحفيز الجنسي وغير ذلك. تنتج هذه المركبات نتيجة لتفاعلات كيميائية معينة داخل النبات [5].

من أمثلة المركبات التي تُنتج كنتيجة للأيض الثانوي في النباتات

I-2- **1- الفينوليات:** وهي مجموعة متنوعة من المركبات تشمل الفلافونويدات والفينولات الأخرى، وتعمل على حماية النباتات من الإجهاد البيئي مثل الجفاف والأمراض والآفات[6].

I-2-2- التربينات: وهي مركبات هيدروكربونية تشمل الزيوت العطرية والصمغ والراتنجات، وتلعب دورًا في دفاع النبات عن طريق تثبيط نمو البكتيريا والفطريات والحشرات [7].

I-2-3- القلويدات: وهي مركبات تحتوي على النيتروجين وتشمل القلويدات البسيطة مثل النيكوتين والكافيين، وتعمل على دفاع النبات ضد الحشرات. [8].

I-2 -4- المركبات الفيتوكيميائية: المركبات الفيتوكيميائية هي المركبات الكيميائية التي تنتجها النباتات كجزء من استجابتها للظروف البيئية وكوسيلة للتفاعل مع البيئة المحيطة بها. تشمل هذه المركبات مجموعة متنوعة من المركبات الثانوية مثل السيانيدات والغليكوسيدات السيانوجينية والتانينات والفينولات والتربينويدات وغيرها. تلعب هذه المركبات دورًا هامًا في تحديد خصائص النباتات وتفاعلها مع بيئتها. تُنتج هذه المركبات بوفرة في الأجزاء المختلفة من النبات، مثل الأوراق والجذور والثمار والأزهار، وتؤدي وظائف متنوعة منها التنظيم الداخلي للنمو والتطور، وجذب الحشرات المفيدة كما يُمكن أن تكون مفيدة في الطب والصناعة. توجد المركبات الثانوية في النباتات بكميات قليلة مقارنة بالمركبات الأساسية التي تحتاجها النباتات للنمو والتطور. يتوقف إنتاج هذه المركبات على عدة عوامل مثل العائلة النباتية والجنس والنوع [10]. تتمثل أهمية المركبات الثانوية في توفير وسيلة للنباتات للتكيف مع بيئتها المتغيرة وللدفاع ضد الآفات والإجهادات البيئية فعلى سبيل المثال:

- ✓ **مقاومة الإجهادات البيئية:** تلعب المركبات الثانوية دورًا هامًا في حماية النباتات ضد العوامل البيئية المؤثرة مثل الجفاف والحرارة الشديدة والتأثيرات الضارة لأشعة الشمس فوق البنفسجية [11].
- ✓ **الدفاع ضد الآفات:** تحتوي المركبات الثانوية على مواد تساهم في دفاع النباتات ضد الآفات مثل البكتيريا والفطريات ، حيث تعمل هذه المركبات كمركبات سامة أو كمثبطات للتغذية [12].

(نقصد بالآفات وصف الكائنات الحية الدقيقة التي تهاجم النباتات وتسبب لها الأمراض، وتؤدي إلى خسائر في المحاصيل الزراعية والغابات) [13].

- ✓ **تفاعل النباتات مع بيئتها:** تلعب المركبات الثانوية دورًا في تفاعل النباتات مع بيئتها، حيث يمكن أن تؤثر على التفاعلات البيولوجية بين النباتات والمنظمات الحية الأخرى في البيئة. [11].

عموما تعتبر المركبات الثانوية جزءًا هامًا من استراتيجية البقاء للنباتات وتساهم في تعزيز قدرتها على التكيف مع بيئتها والبقاء في ظروف بيئية متغيرة [13].

المركبات الثانوية التي توجد في النباتات تمثل مصدرًا هامًا لمختلف العوامل الدوائية والمركبات النشطة التي يمكن استخدامها في الطب المعاصر. فعلى سبيل المثال العديد من الأدوية الحديثة مستمدة من مركبات ثانوية توجد في النباتات وتشمل ذلك مضادات الأكسدة، ومضادات الالتهاب، ومضادات السرطان، ومضادات الحساسية، ومضادات الجراثيم، والمضادات الفيروسية، والمسكنات، ومنظمات الضغط، والمضادات الحيوية، وغيرها الكثير[14].

هذه المركبات تستخرج وتعزز من قيمتها الدوائية من خلال تقنيات مختلفة مثل استخراج المذيبات، والتركيز، والتقطير، والتحليل الكيميائي، والاختبارات الدوائية. ومن ثم يتم تطوير الأدوية الجديدة أو تحسين الأدوية القائمة باستخدام هذه المركبات النشطة [15].

توجد مجموعة واسعة من الأبحاث التي تركز على استخدام المركبات الثانوية من النباتات في صناعة الأدوية، وهذه الأبحاث تهدف إلى فهم الخصائص الدوائية لهذه المركبات وكيفية استخدامها بشكل فعال في علاج مجموعة متنوعة من الأمراض والحالات الصحية [16].

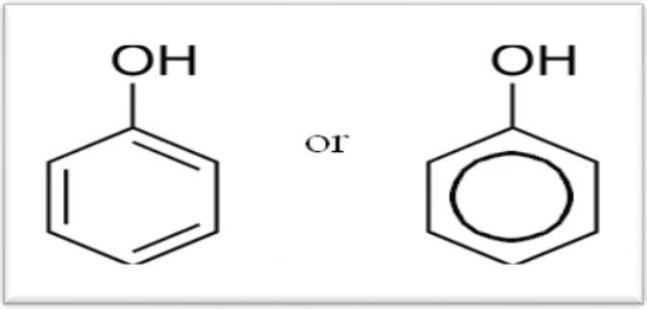
وتنقسم وفقا لتركيبها الكميائي إلى الزيوت الطيارة ، القلويدات ، الستيرودات ، الصابونيات ، الفلافانويدات ، التانينات [17].

I-2- 1- تعريف المركبات الفينولية :

تلعب الفينوليات دورًا هامًا في النباتات كمستقلبات ثانوية، حيث تشمل مجموعة واسعة من المركبات التي تحتوي على هيكل فحوم هيدروكربوني مع حلقة عطرية تحتوي على واحدة أو أكثر من مجموعات هيدروكسيل. تعتبر الفينوليات من أهم المركبات الثانوية في النباتات، حيث تشمل على العديد من الوظائف الحيوية مثل الدفاع ضد الآفات والميكروبات، والتكيف مع الظروف البيئية المتغيرة، وتحمل الإجهادات البيئية. تتواجد الفينوليات بكثرة في الطبيعة، وتمتاز بتنوعها الهائل وانتشارها في مختلف أنواع النباتات [18].

تتواجد الفينوليات غالبًا في النباتات على شكل أسترات أو غليكوزيدات. تتوضع هذه المركبات عادة في الفجوات الخلوية، مما يعني أنها منحلة في الماء. يتراوح تنوع بنية الفينوليات من البنى البسيطة ذات الحلقة العطرية الواحدة مثل الحموض الفينولية، إلى معقدات مرتبطة مثل التانينات. يعتقد أن الفينوليات الموجودة على شكل غليكوزيدات غالبًا تكون أكثر فعالية في النباتات [19].

يمكن تصنيف الفينولات كمركبات كيميائية عضوية تتألف من ارتباط مجموعة هيدروكسيل مباشرة بالهيدروكربون العطري. يعود تسمية "الفينولات" إلى أبسط هذه المركبات وهو الفينول (C_6H_5OH). يمكن أن تكون الفينولات بسيطة مثل الفينول نفسه، ويمكن أن تكون مركبات متعددة حسب عدد وحدات الفينول في الجزيء [20].



الشكل رقم 05: يوضح الصيغة الكميائية للفينول [19]

I-2-2- التركيب الحيوي للمركبات الفينولية :

تلعب المركبات الفينولية أدوارًا هامة في النباتات بخصوص وظائف مثل الدفاع عنها من الآفات والأمراض والطفيليات، وحمايتها من التأثيرات الضارة للأشعة فوق البنفسجية، وتحسين اللون[21]. تقوم المركبات الفينولية بدور مضاد للأكسدة في النباتات، مما يعزز من مقاومتها للإجهاد البيئي ويحسن نموها وتطورها. كما يعتبر لون النباتات مرتبطًا بوجود المركبات الفينولية، حيث تساعد هذه المركبات في تحديد اللون النهائي للأوراق والثمار والزهور، مما يؤثر على جاذبيتها للحشرات الملقحة وتوجهها [22].

التفاعلات الحيوية لتركيب المركبات الفينولية في النباتات تنتج مجموعة واسعة من المنتجات التي تحتوي على هياكل فينولية. هذه الهياكل الفينولية غالباً ما تكون مشتقة من حلقات حلقية وهناك طريقتان رئيسيتان لتخليق هذه المركبات:

1. **مسار اختزال الاستات:** هذا المسار يشير إلى تحويل مركبات مشتقة من الأستات إلى مركبات فينولية متعددة الحلقات من خلال التحول الحلقي [23].

2. مسار حمض الشيكيميك: يقوم هذا المسار بإنتاج السلسلة الأروماتية والأمينية المشتقة من حمض الشيكيميك، وتعتبر هذه السلسلة الأروماتية مبدأ أساسياً لتخليق المركبات العطرية[24].

من خلال هذين المسارين، يتم توليد مجموعة واسعة من المركبات الفينولية، وتكون المركبات العطرية من ضمن المنتجات التي تنشأ من مسار حمض الشيكيميك، ويتم إزالة المجموعة الأمينية (الديامينة) من المركبات الأروماتية العطرية لإنتاج المركبات العطرية [25].

I-2-3- الهياكل البنيوية للمركبات :

الهياكل البنوية للمركبات الفينولية متنوعة وتشمل جزيئات عضوية واسعة الانتشار في المواد النباتية والأطعمة، وتُعرف بخصائصها المضادة للأكسدة. من بين هذه المركبات:

- **الفينولات البسيطة (Simple Phenols):** تشمل الفينولات البسيطة مثل الفينول نفسه ومشتقاته مثل الكريزول (الميثيل فينول) والإيثيل فينول والميثوكسي- فينول. توجد هذه المركبات بشكل طبيعي في النباتات وتوجد حرة أو مرتبطة بالجزيئات الأخرى، وهي موجودة في العديد من الأطعمة مثل الفواكه والخضروات والمشروبات مثل الشاي والقهوة [24].
- **الفينولات المعقدة :** هي مجموعة من المركبات الكيميائية التي تتضمن عدة أصناف مثل الفلافانويدات والأنثوسيانينات والكوماغينات والأحماض الفينولية والعفص (التانينات) واليجنان واليجنين ، توجد هذه المركبات بشكل طبيعي في النباتات وتلعب ادورا متعددة في الحماية واللون والنكهة والرائحة والتأثيلات الصحية الايجابية [24]. هذه المركبات توجد في مجموعة واسعة من الأطعمة مثل العصائر، والقهوة، والشاي، والكاكاو، والخضروات، والفواكه، والمكسرات [25]. حيث تلعب دورًا هامًا في تحديد الخصائص العضوية والذوق والرائحة وكمقارنة تحتوي الفينولات المعقدة على هياكل أكثر

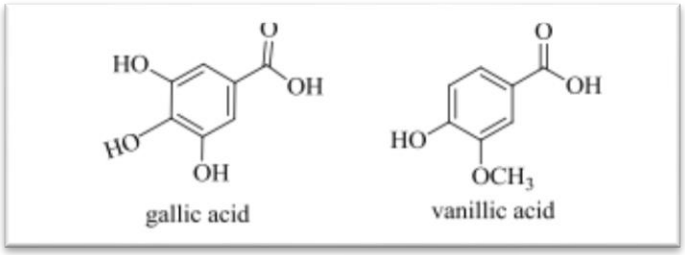
تعقيدًا وتنوعًا مقارنة بالفينولات البسيطة، وتظهر تأثيرات أكثر تعقيدًا وتنوعًا في النباتات وفي الاستخدامات الصناعية والطبية والغذائية [25].

I-2-4 - الأحماض الفينولية :

مركبات الفينول تشمل مجموعة واسعة من المركبات، بما في ذلك المركبات الفينولية المحضة. هذه المركبات تحتوي عادة على وظيفة فينولية واحدة أو أكثر. من بين هذه المركبات:

1. **حمض البنزويك (Acid Benzoic):** يعد حمض البنزويك مثالاً على المركبات الفينولية المحضة، وهو معروف بخصائصه الحفظية والمضادة للميكروبات. يمكن أن يتواجد حمض البنزويك بشكل طبيعي في النباتات أو يضاف كمادة حافظة في الأغذية[26].
2. **حمض الغاليك (Acid Gallic):** هو مركب فينولي محض يتواجد في العديد من النباتات والفواكه، ويعرف بخصائصه المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات [26].
3. **حمض الفانيليك (Acid Vanillic):** يعتبر حمض الفانيليك مركب فينولي محض آخر، ويتواجد في العديد من النباتات والأطعمة مثل الفواكه والخضروات والأعشاب، وله خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للبكتيريا[27].

تعتبر هذه المركبات موجودة في النباتات وتتواجد بشكل حر أو مرتبط بالأحماض الأخرى أو مرتبطة بالسكريات. تلعب دورًا هامًا في تحديد اللون والنكهة والرائحة للأطعمة وتمتلك خصائص صحية مهمة [28] .



الشكل رقم 06: لبعض الاحماض الفينولية

I-2-5- أقسام عديدات الفينول :

عديدات الفينول تشكل فئة من المركبات العضوية التي تحتوي على حلقة بنزينية (حلقة بنزين على الأقل) مع مجموعة هيدروكسيل (–OH) متصلة بها. وتشترط خصائص الفينول أن تكون غير أزوتية، وهي تتكون عادةً من حمض الشيكيميك أو عديد الأسيتات.[29]

تصنف الفينولات وفقاً لعدد ذرات الكربون في الهيكل الأساسي إلى عدة أقسام مختلفة، مثل الفلافونويدات والفينوليات والستيلبينات والكومارينات وغيرها، وتختلف في الخواص والوظائف حسب تركيبها الكيميائي. تتواجد هذه المركبات في مجموعة واسعة من الأغذية النباتية مثل الفواكه والخضروات والمشروبات مثل الشاي والقهوة، وتُعتبر أهمية كبيرة لصحة الإنسان بفضل فوائدها العديدة كمضادات للأكسدة ولعلاج العديد من الأمراض[29].

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
-	C6-C1	Acides phenols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénones	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acides-phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl-acétique	
9	C6-C3	Acide hydroxycinamiques	Acide p-coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	
14	C6-C2-C6	Stilbénes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

الجدول رقم 02: أقسام عديدات الفينول[30]

I-2-6 - وظيفة عديدات الفينول :

صحيح، الفينولات تعتبر من الأصباغ والمركبات العطرية التي تُعطي النباتات لونًا ورائحة مميزة، مما يساهم في جذب الحشرات والطيور الملقحة. ولكن وظيفة الفينولات لا تقتصر فقط على الجذب، بل لها أهمية كبيرة في حماية النباتات والمساهمة في صحتها [30].

- **من بين وظائف العديدات الفينولية:**

1. الحماية من الأشعة فوق البنفسجية: تعمل الفينولات على حماية الأنسجة النباتية من تأثيرات الأشعة فوق البنفسجية فوق البنفسجية الضارة [29].

2. الخصائص المضادة للفطريات والجراثيم: تُظهر الفينولات فعالية في مكافحة الفطريات والجراثيم، مما يساعد في حماية النباتات من الإصابات الفطرية والجرثومية[27].

3. المقاومة للأمراض: تساهم الفينولات في مقاومة النباتات للأمراض، مثل القطن الذي يظهر مقاومة لأمراض الذبول [27].

4. ظاهرة تراكم المواد الفينولية: تظهر الفينولات ظاهرة تراكم المواد الفينولية في الأنسجة النباتية المصابة أو في المناطق المجاورة لها مما يساهم في الدفاع عن النبات ضد الضرر والإصابات.

يُلاحظ تأثير الفينولات في تعزيز قوة النباتات ومقاومتها للظروف البيئية القاسية والهجمات الخارجية [29].

كما تشير الأبحاث التي أجريتها Nitsch و Nitsch و Alibert وغيرهم إلى أن الفينولات تلعب دوراً هاماً في العديد من العمليات الفسيولوجية للنباتات. فهي تشمل على وجه الخصوص:

1. نمو الخلايا: تؤثر الفينولات على نمو الخلايا النباتية وعمليات التقسيم الخلوي، مما يؤثر في نمو النبات بشكل عام.[30]

2. تمايز الأعضاء: تلعب الفينولات دوراً في تمايز الأعضاء النباتية، مثل تمايز الأوراق والجذور والسيقان والزهور.[29]

3. الإزهار والإثمار: يظهر أن الفينولات لها تأثير على عمليات الإزهار والإثمار في النباتات، مما يؤثر على عملية التكاثر وتكوين الثمار.[29]

I-2-7- الاستعمالات العلاجية لعديدات الفينول :

باعتبارها مركبات مهمة في النباتات، تلعب الفينولات دوراً رئيسياً في تنظيم العديد من العمليات الحيوية والفسيولوجية التي تحدث داخل النباتات، وتسهم في تنظيم نموها وتطورها وتكاثرها.[31]

تعتبر الفينولات مركبات مهمة جداً في الطب النباتي والطب البديل بسبب خصائصها العديدة التي تُظهر فوائد صحية محتملة. وهي مشهورة بكونها:

✓مضادة للسرطان.

✓مضادة للالتهابات.

✓مضادة للفيروسات والجراثيم.[31]

I-2-8 - النشاطية البيولوجية لعديدات الفينول:

- **النشاطية المضادة للأكسدة للفلافانويدات :**

تظهر الفلافونيدات، وهي مجموعة من المركبات الفينولية الموجودة في النباتات، كمضادات للأكسدة بأليات متعددة ومن بين هذه الآليات:

1. الإزاحة المباشرة للجزيئات النشطة الحرة (ROS): تعمل الفلافونيدات على مباشرة إزاحة الجزيئات النشطة الحرة مثل الأكسجين النشط والهيدروكسيل راديكال، مما يقلل من تأثيراتها الضارة على الخلايا والأنسجة.

2. تثبيط الأنزيمات.

3. استخلاب الأيونات المعدنية.

4. حماية الأنظمة الدفاعية المضادة للأكسدة. [32]

بهذه الطرق، تساهم الفلافونيدات كمضادات للأكسدة في الحفاظ على صحة الخلايا وتقليل خطر الإصابة بالعديد من الأمراض المرتبطة بالتأكسد، مثل أمراض القلب والأوعية الدموية وبعض أنواع السرطان.[33]

5. مكافحة تصلب الشرايين.

6. مضادة للحساسية .

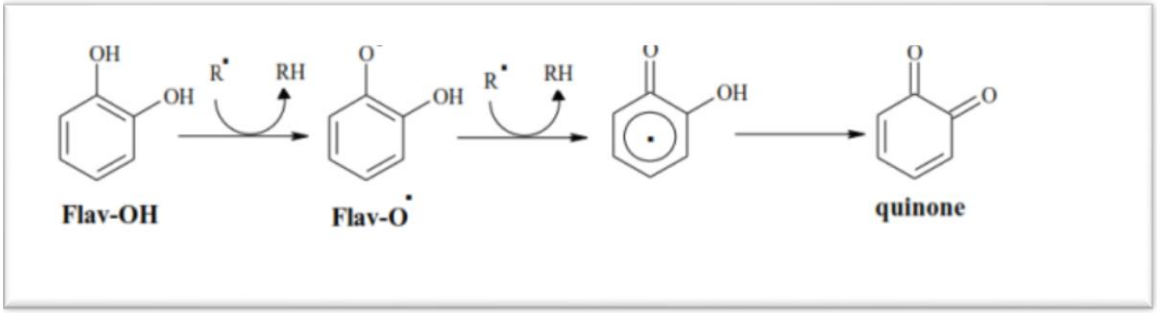
7. مضادات للأكسدة .

- **ازاحة الجذور الحرة :** الفلافونيدات في النباتات تُعتبر أحد أنواع المضادات للأكسدة ولها القدرة على التفاعل مع الجذور الحرة الأكسجينية مثل الجذور الهيدروكسيلية (OH•) والجذور الببيدية

(•LOO) والجذور النتروكسيدية (•NO) حيث تعمل الفلافونيدات على إعادة الجذور الحرة إلى حالة مستقرة عن طريق منحها هيدروجيناً أو إلكتروناً [34].

1- على سبيل المثال، تعمل الفلافونيدات كمستقبلات للإلكترونات، حيث تمتص الفلافونيدات الإلكترونات من الجذور الحرة الأكسجينية وبالتالي تُخفف من فعاليتها التأكسدية. هذا العمل يساهم في الحفاظ على توازن الأكسدة والاختزال في الخلايا ويسهم في حمايتها من التأكسد غير المرغوب فيه [35].

2- عندما تتفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة، يتم تشكيل بنية مستقرة مثل الكينون (quinone)، وهي مركبات تُعتبر أيضًا مضادة للأكسدة وتلعب دورًا في مكافحة التأكسد والحفاظ على صحة الخلايا [35]



الشكل رقم 07: يمثل الكينون (quinone) [35]

ما ذكرناه يشير إلى بعض السمات الهيكلية التي تؤثر على نشاطية الفلافونيدات كمضادات للأكسدة وقدرتها على مزح الجذور الحرة [34].

1. البنية diphenolic-ortho للحلقة C: هذه البنية ضرورية لنشاطية الفلافونيدات كمضادات للأكسدة، حيث تمنح الفلافونيدات القدرة على تفاعل مع الجذور الحرة [34].

2. الرابطة المزدوجة بين C2-C3 مع الوظيفة oxo4-: وجود هذه الرابطة المزدوجة يسهل انتقال الإلكترونات، مما يعمل على استقرار الجذر aroxyl النشط [34].

3. **اتحاد مجاميع OH في الوضع 3 و 5 مع وظيفة الكربونيل في C4:** هذا التركيب يزيد من نشاطية الفلافونيدات كمضادات للأكسدة، حيث يزيد من قدرتها على مزج الجذور الحرة [34].

4. **استبدال مجاميع الهيدروكسيل في الحلقة B بمجاميع ميثيلية:** يمكن أن يؤثر هذا التغيير على نشاطية الفلافونيدات كمضادات للأكسدة، حيث قد يؤدي إلى تغير في التفاعل مع الجذور الحرة وبالتالي تأثير على فعاليتها [34]

عموما تشير هذه الخصائص الهيكلية إلى الأهمية التي تلعبها البنية الكيميائية للفلافونيدات في تحديد نشاطيتها كمضادات للأكسدة وقدرتها على مكافحة التأكسد والحفاظ على صحة الخلايا [34].

- **آلية عمل المركبات الفينولية كمضادات للأكسدة :**

المركبات الفينولية تعمل كمضادات أكسدة بفضل هياكلها الكيميائية التي تسمح لها بالتفاعل مع الجذور الحرة والمركبات الأخرى التي تسبب التأكسد. تشتهر المركبات الفينولية بخصائصها المضادة للأكسدة بفضل وجود المجموعات الهيدروكسيل (–OH) في هياكلها [34].

1. **تحييد الجذور الحرة :** المركبات الفينولية قادرة على التفاعل مع الجذور الحرة التي تتكون في الخلايا نتيجة للتأكسد، وتحييدها بشكل فعال. يقوم الهيدروكسيل (–OH) المتواجد في هياكل المركبات الفينولية بالتفاعل مع الجذور الحرة، وبالتالي يمنع تلك الجذور الحرة من الإلحاق الضرر بالخلايا [34].

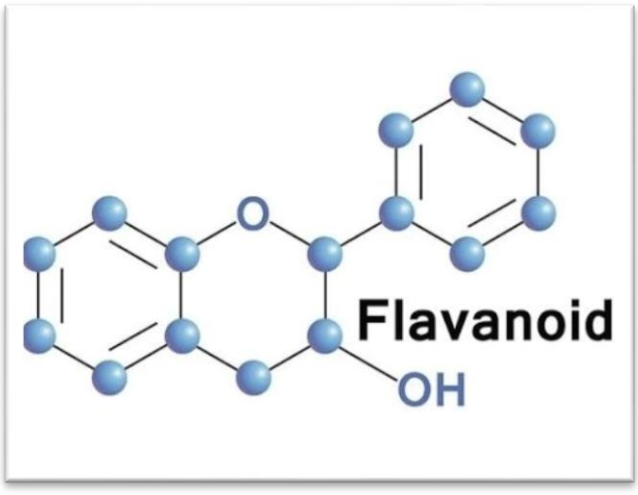
2. **منع التأكسد:** تعمل المركبات الفينولية على منع التأكسد من خلال التفاعل مع المركبات التي تسبب التأكسد. فعندما تتفاعل المركبات الفينولية مع هذه المركبات، تتكون مركبات أكثر استقرارًا وتمنع عملية التأكسد [35].

3. تجديد الأنزيمات المضادة للأكسدة: تعمل المركبات الفينولية على تجديد وتعزيز الأنزيمات المضادة للأكسدة في الجسم، مما يعزز نظام الدفاع الذاتي للجسم ضد الضرر الناجم عن التأكسد [35].

بشكل عام، فإن مركبات الفينولية تساهم في الحفاظ على صحة الخلايا وتأخير عمليات الشيخوخة وتقليل خطر الإصابة بالأمراض المزمنة من خلال تحييد الجذور الحرة ومنع التأكسد في الجسم [36].

I-2-9 - تعريف الفلافانويدات :

الفلافونيدات هي مركبات طبيعية تنتمي إلى عائلة الفينولات، وهي تتواجد بشكل رئيسي في النباتات. تعتبر الفلافونيدات صبغات نباتية تعطي الأجزاء الهوائية من النباتات، مثل الأوراق والأزهار ألوانًا مميزة [35] . بالإضافة إلى تلوين الأجزاء النباتية، حيث لها دورا في حماية النباتات من الإجهاد البيئي مثل الأشعة فوق البنفسجية، وتشكيل جزء من نظام الدفاع ضد الآفات والأمراض [36]. تشمل الفلافونيدات عدة فئات مثل الفلافونات والأنثوسيانين والفلافونونات، ولها فوائد صحية محتملة للإنسان أيضًا، مثل تأثيرات مضادة للأكسدة والتأثيرات المضادة للالتهابات [36].



الشكل رقم 08: الشكل العام للفلافانويد [36]

تحتوي الفلافونيدات على هياكل متنوعة ويمكن أن تتواجد في النباتات على شكل إيثيروزيدات (Hétérosides)، وهي مركبات تتكون من جزيئات السكر مرتبطة بالفلافونيد. كما يمكن أن تكون

جزءًا من البلاستيدات الخاصة بالنباتات، وتتمركز في المناطق الليبوفيلية، أي المناطق التي تحتوي على الدهون [37].

يُعتقد لأول مرة أن الفلافونيدات تم تحديدها كفيتامين ب من قبل العالم Györgyi–Szent Albert. ولكن فيما بعد تم تبنيها باعتبارها جزءًا من عائلة الفيتامينات بالرغم من ذلك، فإن الآراء حول ما إذا كانت الفلافونيدات فعلًا فيتامينات لا تزال موضوع جدلي بين العلماء.[37]

الفلافونيدات هي مركبات بولي فينولية تتكون من حلقات فينولية متصلة. تحتوي هذه المركبات على مجموعات بديلة غالبًا مثل مجموعات الهيدروكسي أو الميثوكسي. و يمكن أن تتواجد الفلافونيدات في شكل جليكوزيدات، حيث يكون بناؤها يحتوي على وحدات سكرية [38] . وتُعد الوحدات السكرية جزءًا مهمًا من بناء الفلافونيدات، حيث يمكن أن تكون هذه الوحدات سكرًا أحاديًا أو ثنائيًا، وقد تحتوي على أكثر من وحدتين في بعض الحالات. هذه التركيبة المتنوعة تمنح الفلافونيدات تنوعًا هيكليًا ووظائف متعددة في النباتات والكائنات الحية الأخرى [37–38]

الفلافونيدات تظهر بتنوع كبير في النباتات، وتم التعرف على أكثر من 9000 فلافونيد. جميعها تشترك في الهيكل القاعدي الذي يتكون من 15 ذرة كربون، يتوزعون على حلقتين عطريتين تُعرف عادة بالحلقتين A و B [38]. وبالإضافة إلى ذلك، تحتوي الفلافونيدات عادة على سلسلة تحتوي على ثلاث ذرات كربون، تربط الحلقتين معًا. وفي كثير من الأحيان، يكون الجسر الرابط بين الحلقتين A و B عبارة عن حلقة بيرانية. هذا الهيكل الأساسي يمنح الفلافونيدات خصائصها الكيميائية والفيزيائية المميزة، وتتفاوت الوظائف والتأثيرات البيولوجية للفلافونيدات باختلاف التركيب الدقيق لهذه الجزيئات.[39]

I–2– 10 – تصنيف الفلافانويدات :

الفلافونيدات تصنف إلى عدة مجموعات بناءً على درجة تأكسد الحلقة C ونوع التحلق، بالإضافة إلى المستبدلات على الحلقتين A و B. هذه التصنيفات تسهل فهم الاختلافات في التركيب والوظائف بين مختلف أنواع الفلافونيدات.[39] فمن الممكن أن تكون الفلافونيدات في مجموعة واحدة تحتوي على نفس الهيكل الأساسي، لكن تختلف في المستبدلات على الحلقتين A و B، مما يؤدي إلى اختلاف في الخواص والتأثيرات البيولوجية[39].

- **الفلافون (Flavone):**

إذا تواجدت الحلقة B في الموضع 2 وكانت الرابطة C2–C3 غير مشبعة، يُسمى المركب فلافون [40]

- **الفلافونول (Flavonol):**

إذا وُجدت في الموضع 3 مجموعة هيدروكسيل (OH) حرة أو مستبدلة (OR) لمركب الفلافون، يُسمى المركب الفلافونول [40] .

يُشكل الفلافونول نواة أساسية للعديد من المركبات الطبيعية.

- **الفلافانون (Flavanone):**

هي المركبات التي تكون فيها الرابطة C2–C3 في هيكل الفلافون مشبعة [40].

-**النيوفلافون (Flavanon):**

إذا وُجدت الحلقة B في الموضع 4 ومجموعة الكربوكسيل في الموضع 2 وكانت الرابطة C2–C3 غير مشبعة، يُسمى المركب نيوفلافون[40].

هو قليل الانتشار في الطبيعة بالمقارنة مع الفلافونات والفلافونولات.

- **إيزوفلافون:** تختلف في بنائها عن الفلافونات في موضع ارتباط الحلقة B إذ ترتبط هذه الأخيرة في الموضع رقم 3 لا من الموضع 2[40].

I-2-11- الفعالية البيولوجية للفلافونيدات :

زاد الإهتمام في السنوات الأخيرة بالمركبات الفلافونيدية بحيث بينت نتائج أبحاث مكثفة في ميدان الطب و البيولوجيا فعاليتها المضادة للسرطان، المضادة للحساسية، المضادة للفيروسات و البكتيريا و المضادة للأكسدة وفعاليات أخرى [40].

I-2 – 12- خواص الفلافونيدات :

تتواجد الفلافونيدات كمركبات هيدروكسيلية تتمتع بخواص مشابهة للفينولات. نذكرمنها بعض الخصائص الرئيسية للفلافونيدات:

1. **صفة حمضية ضعيفة:** نظرًا لوجود مجموعات هيدروكسيل، فإن الفلافونيدات تكون لها صفة حمضية ضعيفة. وعادةً ما تكون ذائبة في القواعد القوية مثل هيدروكسيد الصوديوم **[41]**.

2. **ذوبانية في المذيبات القطبية:** تتصف الفلافونيدات التي تحتوي على عدد كبير من مجموعات الهيدروكسيل الحرة، أو التي تحتوي على بقايا السكر، بالصفة القطبية [41]. وعلى هذا الأساس، فإنها غالبًا ما تكون ذوبابة في المذيبات القطبية مثل الميثانول والإيثانول وثنائي ميثيل سلفوكسيد والأسيتون والماء. ووجود بقايا السكر يزيد من قابلية المركب للذوبان في الماء [41].

3. **ذوبانية في المذيبات غير القطبية:** بالنسبة للفلافونيدات التي تحتوي على عدد كبير من مجموعات الميتوكسيل، فإنها غالبًا ما تكون ذوبانة في المذيبات غير القطبية مثل الكلوروفورم والإيثر.

✓ **الكشف عن الفلافونيدات :**

الكشف عن المركبات الفلافونيدية غالبًا يتم بواسطة الألوان المميزة التي تعطيها هذه المركبات عند التفاعل مع بعض الكواشف المعروفة. من بين هذه الكواشف:

- **كلوريد الألومنيوم (5٪):**

– يعطي ألوانًا مميزة عند تفاعله مع الفلافونيدات. يمكن استخدامه لتحديد الفلافونيدات وتمييزها عن المركبات الأخرى. [41]

- **حمض الكبريت المركز:**

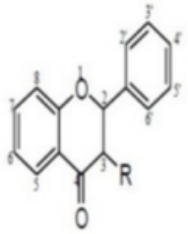
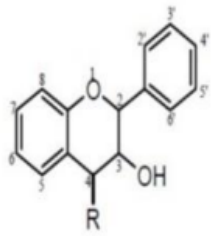
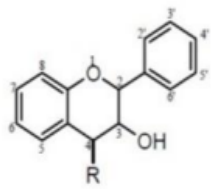
– يعطي ألوانًا مميزة في وجود جميع الفلافونيدات. يمكن استخدامه للكشف السريع عن وجود الفلافونيدات. [41]

- **Vanilline (فانيلين):**

– يعطي ألوانًا مميزة للفلافونيدات في وجود الحموض القوية مثل حمض الكبريت المركز.

هذه الكواشف تساعد في تحديد وتمييز الفلافونيدات من بين مختلف المركبات الأخرى وتسهم في دراسة وتحليل تركيبها وتواجدها في النباتات والمواد الطبيعية الأخرى [41]

جدول رقم 03: يوضح أقسام الفلافانويد [40]

المشتقات	البنية	اسم العائلة	توزيع OH	الاسم
phenyl		**R=H** Flavone	5, 7, 4', 5', 7', 3', 4'	Apigenin Luteolin
		R=OH Flavonol	5,7,4', 5' ,7' ,3' , 4	Kaempferol Quercetin
		R=H Flavanone (Dihydroflavone)	7,4,5 7,3 ,5 ', 4	Naringenin Rutin
		R=OH Flavanonol (Dihydroflavonol)	7,3,4 5,7,3 4	Fustin Taxifolin
2-Phenyl Chromanes		**R=H Catechin (lavonol-3)**	5,7,3 4,5 5,7,3	Gallocatechin Catechin
2-Phenyl Chromanes		**R=OH Leucoanthocyanidin (lavandiol-3,4)**	5,7,3 4,5,7 3,4	Leucocyanidin Leucodelphini-din

الجزء العملي

✓ **تحضير المادة النباتية :**

- **مرحلة القطف :** قطفت نبتة " *Matricaia pubscens*" من منطقة الدميثة بقمار
- **مرحلة التجفيف :** جففت نبتة " *Matricaia pubscens*" في منطقة ظل في حرارة الغرفة لعدة أسابيع.
- **مرحلة الطحن :** عملية طحن الأجزاء النباتية بعد جفاف النبات بكامله، يتم تحضير مسحوق النبات بطحن مادة النباتية بواسطة الهاون من اجل حصول على مادة نباتية مسحوقة جزئيا، ثم توضع في قارورات محكمة الغلق او في اكياس ورقية نظيفة وجافة وبعيدا عن الرطوبة واشعة الشمس مباشرة للمحافظة عليها من تعفن وتخمر الى حين انتظار العمل المخبري.

✓ **المواد والاجهزة المستعملة :**

1. إيثانول.
2. ماء مقطر .
3. هكسان.
4. إرلينة ماير بحجم 2000مل.
5. جهاز الضخ.
6. ورق الترشيح.
7. جهاز التبخير الدوراني.
8. ميزان.
9. مهراس.
10. قمع بخنر.
11. مخلاط كهربائي.

- **عملية الاستخلاص :** تم إستخلاص " *Matricaia pubscens*" بطريقة النقع المتسلسل بواسطة مذيبات ذات قطبية متزايدة، حيث تم نقع 300 غ من نبتة بنسبة (80%) إيثانول و(20%) ماء مقطر أي لكل 100 غ من النبة 160 ملل إيثانول و40

ملل ماء لمدة 72 ساعة مع الرج المستمر. ثم تمت إزالة الراشح واستخلاص الراسب المتبقي من المسحوق بالتتابع باستخدام الإيثانول والماء.

تمت اعادة كل خطوة ثلاث مرات، بعدها تم تركيز الرشاحة عند 37 درجة مئوية باستخدام مبخر دوار وتخزينها عند 4 درجات مئوية حتى الاستخدام المستقبلي. تحصلنا على مستخلص واحد: مستخلص الإيثانول (ETOH) .

الشكل رقم 09: مخطط العمل

- تم إجراء تحاليل LC/MS/MS بمخبر البحث الفيتوكيمياء والفعالية البيولوجية (CRBT) ومخبر Aveiro بالبرتغال.

I- الدراسة البيولوجية:

I-1- إجمالي محتوى الفلافونويد (TFC):

كمية الفلافونويد في المستخلصات تتغير حسب تركيب المركب AL^{3+} بين والفلافونويد .تم إستعمال طريقة (Türkoğlu et al. 2007) [1].

- **طريقة العمل :**

تم حل 9,80 غرام من أسيتات البوتاسيوم (CH_3COOK) في 100مل من الماء المقطر للحصول على محلول (S_1) بتركيز 1مول .

تم قياس 10 غرامات من نترات الألمنيوم ($Al(NO_3)_3,9H_2O$) بنسبة 10% وإذابتها في 100 مل من الماء المقطر

- **تحضير المستخلصات النباتية:**

يتم ذوبان كتلة تقدر ب 1 ملغ من المستخلص في 1مل من الإيثانول لإعداد المحلول (S_2).

نأخذ 10 ميكرولتر ETOH+10 ميكرولتر S_2+10 ميكرولتر ($Al(NO_3)_3,9H_2O$)،بعد إنتظار 40 دقيقة ،نقيس الإمتصاصية عند طول الموجة 415 نانومتر للحصول على النتيجة المطلوبة ،تم تحضير الشاهد بإستبدال الموافق بالإيثانول (50 ميكرولتر من المستخلص +150 ميكرولتر إيثانول).

مجموعة كيريستين القياسية تحضر بأخذ 1ملغ من الكيريسيتين وتذويبه في 5مل من الإيثانول للحصول على تركيز 0,2 ملغ/مل مما يعطينا محلول S_M. نقوم بتحضير 8مخففات كيريستين في أنابيب eppendorfs ،ننقل في كل مخفف 50 ميكرولتر إلى صفيحة ميكروسكوبية +10 ميكرولتر من S_1+10 ميكرولتر من ($Al(NO_3)_3,9H_2O$)،بعد مرور 40 دقيقة نقرأ الإمتصاصية عند 415 نانومتر [2].

I-2-إجمالي محتوى الفينول (TPC):

يتم تقدير إجمالي البولي فينول بإستعمال كاشف Folin-Ciocalteu وفقا لطريقة فحص الصفيحة الدقيقة التي وصفها (Singleton et al., 1999) [3].

- **طريقة العمل :**
- **تحضير كربونات الصديوم Na_2CO_3 بنسبة 7,5 %:**

نقوم بإذابة 7,5غرام من Na_2CO_3 في 100مل من الماء المقطر.

- **تحضير المستخلصات النباتية:**

نقوم بإذابة 1ملغ من المستخلص في حجم 1مل من الماء المقطر أو الإيثانول.

- **تحضير FCR مخفف 10 مرات:**

نكمل 1مل من المحلول FCRالمركز 2مول حتى 10 مل من الماء المقطر (9مل)

نأخذ 20 ميكرولتر من المستخلص النباتي +100FCR ميكرولتر مخفف+75 ميكرولتر من $7,5Na_2CO_3$%،نضع الخليط في الظلام لمدة ساعتين ثم نقرأ الإمتصاصية عند 765 نانومتر .

- **تحضير8 محاليل قياسية لحمض الغاليك :**

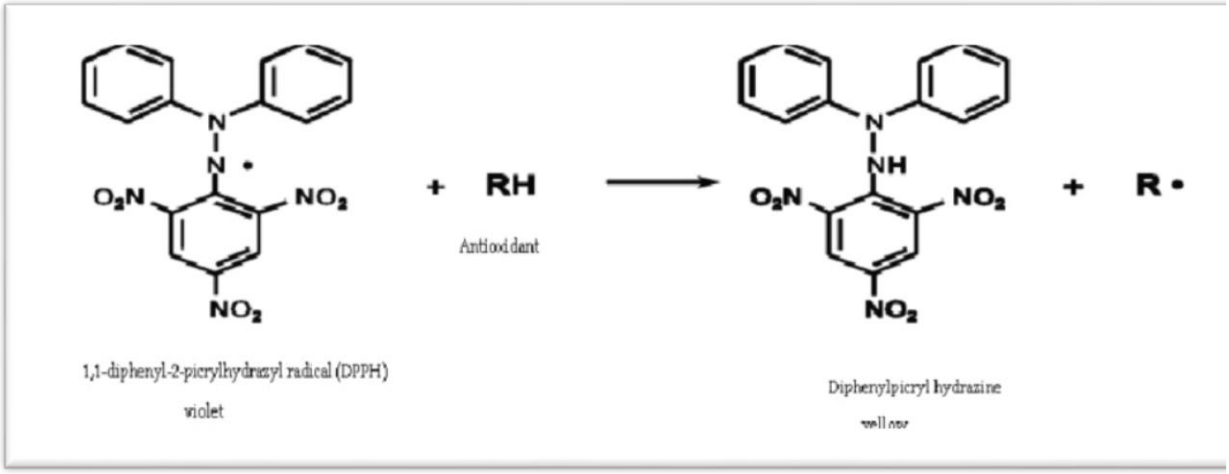
نأخذ 0,5 ملغ من حمض الغاليك نذيبه في 5مل من الإيثانول لنتحصل على $0,2S_1$ ملغ/مل ، نخفف هذه المحاليل ونضعها في eppendorfs ثم ننقل20 ميكرولتر من محلول المخفف إلى الصحيفة الميكروسكوبية +100 ميكرولتر FCR+75 ميكرولتر Na_2CO_3 تحضن لمدة ساعتين ثم نقرأ الامتصاصية عند 765 نانو متر.

II- طرق المخبرية والوسائل المستخدمة في تقدير نشاط مضاد للأكسدة :

تتمثل أهمية الفعالية المضادة للأكسدة في قياس قدرة المستخلص في تثبيط الجذور الحرة إيقاف عملية الأكسدة ،وتتوفر هناك عدة اختبارات لمعرفة نشاط مضادات الأكسدة :

II-1- اختبار تثبيط الجذور الحر DPPH:

يعتبر المركب الكيميائي 2—2diphenyl—1—picrylhydrazyle أول جذر حر يستعمل لدراسة العلاقة بين البنية والنشاط المضاد للأكسدة للمركبات الفينولية . تعتمد هذه الطريقة على تغير لن الجذر الحر DPPH من اللون البنفسجي إلى اللون الأصفر بعد ان يحدث له ارجاع بواسطة مركبات مضادة للأكسدة إلى DPPH—H حسب الشكل التالي:



الشكل رقم 10 : (DPPH) jaune

يتم تحديد النشاط المضاد للجذور الحرة عن طريق قياس الطيف الضوئي وعن طريق قياس DPPH [4] وتستعمل α—tocoherol و BHT و BHA كمضادات أكسدة قياسية .

- **طريقة العمل:**

نقوم بتحضير عدة تراكيز مختلفة من المستخلص النباتي المراد اختباره نقول بإذابة 6 ملغ من DPPH بحجم 100مل من الميثانول يتم تخزينه عند20 C^0 — بعيدا عن الضوء تمت قراءة الامتصاصية

عند طول موجة 517 نانومتر في مقياس الطيف الضوئي وذلك بعد 30 د ، تم إستخدام BHA،BHTكمضادات أكسدة قياسية ،تم حساب معدل التثبيط بالعلاقة التالية :

$$I(\%) = \frac{\mathrm{Ac} - \mathrm{As}}{Ac} * 100$$

حيث:

I(%): هو النسبة المئوية للتثبيت أو الاحتفاظ، وهو المتغير الذي نريد حسابه.

Ac: يمثل القراءة الأولية أو القيمة الأولية، وهي القيمة التي تُقاس قبل إجراء عملية التثبيت أو الاحتفاظ.

As: يمثل القراءة الثانية أو القيمة الثانية، وهي القيمة التي تُقاس بعد إجراء عملية التثبيت أو الاحتفاظ بعد 30د.

IC_{50} : قيمة مقابلة لتركيز العينة الذي تثبط 50% من DPPHالجذري.

II-2-اختبار إزاحة جذر ABTS :

نستخدم هذا الاختبار لقياس قدرة المركبات المضادة للأكسدة على إزاحة جذر

(2.2—azinobis3—ethylbenzothiazoline—6—sulfonate) $ABTS^{+}$ حيث يتأكسد جزيء ABTS عديم اللون إلى جذر كاتيوني $ABTS^{+}$أزرق مخضر عند طول الموجة 734 نانومتر، حيث تستعمل هذه الطريقة للمواد المضادة للأكسدة التي تذوب في الماء، يتم تحديد نشاط ABTS بواسطة طريقة [5]

- **طريقة العمل:**

يتم تحضير أولا ABTS (19,2) ذو 7ملمول مع 2,45ل/ملمول من $k_2S_2O_8$ يتم خلط المنتجين في محلول مائي وحمايتها من الضوء وتخزينهم لمدة 12—16 ساعة ، يتم امتصاص المحلول الناتج عن طريق (الإيثانول أو H_2O) إلى 0.020 ± 0.700عند 734 نانومتر قبل الإستعمال .

نبدأ التفاعل بمزج 160 ميكرولتر من ABTS مع 40 ميكرولتر من المستخلص النباتي المراد دراسته ،بعد 10 دقائق نقيس الإمتصاصية عند 734 نانومتر .

II-3- محتويات β—Carotene والليكوبين:

يتم تحديد محتوى β—Carotene والليكوبين بطريقة (Marco, G.J., (1968 ،تعتمد الطريقة على حساب امتصاص المستخلص الإيثانولي المذاب في خليط الأسيتون —الهكسان عند A663.663,A505.505,A453.453 نانومتر ،يتم حساب المحتوى الكلي β—Carotene والليكوبين بالمعادلة التالية :

Lycopene (mg/100ml)=—0.0458×A663+0372×A505 —0.0806×A453

B—Carotene (mg/100ml)=0.216 ×A663—0.304×A505+0.452×A453

مناقشة النتائج

- **تقدير محتوى المركبات النشطة البيولوجيا:**

تعتبر المركبات الفينولية من بين المجموعات الرئيسية للمركبات النباتية ، حيث تتميز بخصائص مضادة للأكسدة بالإضافة إلى خواص بيولوجية أخرى متعددة ،لذا كان من الضروري تقدير الكميات الإجمالية للفينولات والفلافونويدات في المستخلص الإيثانولي للنبات المدروس حيث تمت في هذه الدراسة بتقدير المحتوى الإجمالي للمركبات البيولوجية النشطة بعد استخلاصها وتطبيق اختبارات التلوين الخاصة بكل صنف، تم قياس المحتوى الإجمالي للمركبات البيولوجية (TPC) للمستخلص الإيثانولي لنبات *Matricaria pubescens (Desf.)* بطريقة Folin.ciacalten(وهي عبارة عن طريقة تستخدم لتقدير تركيز المواد الكيميائية القابلة للأكسدة، مثل الفلافونويدات والفينولات في العينات البيولوجية أو المواد الغذائية.

تعتمد هذه الطريقة على تفاعل الفينولات والبوليفينولات بمحلول فولين سيوكالتيو الخاص بتخفيض الفوسفومولبات. تتشكل نتيجة هذا التفاعل مركبات ملونة، يمكن قياسها بواسطة الطيف الضوئي أو بأدوات أخرى، ومن ثم تحويلها إلى معلومات حول تركيز المواد الكيميائية القابلة للأكسدة في العينة). بينما تم تحديد المحتوى الكلي للفلافونيد بطريقة كلرويد الألمنيوم ($ALCl_3$) تم إجراء توصيف المركبات الفينولية الموجودة في مستخلص الإيثانول *Matricaria pubescens (Desf.)* بواسطة تحليل LC/MS/MS.

الجدول رقم 04:المركبات الكيميائية (الناتجة منLC/MS/MS) [6]

peak	RT	MOLECULES	M–H
1	3.76	Gentisoyl hexoiside	315
2	8.07	5 -0-Caffeoylquinic acid	353
3	8.88	Caffeic acid	179
4	11.88	Quercetin-galactopyranoside	463
5	11.96	Quercetin-glycoside	463
6	12.67	1.5-Dlcaffeoylquinic acid	515
7	13.39	Rosemarinic acid	359
8	15.09	Myricetin-O-rhamnoside-O-hexoside M-RUTINOSIDE	625
9	18.98	Rhamnetin	315
10	16.16	Quercetin	301
11	20.32	Pinocembrin	255

تم تقدير مركبات TPCو TFCبالإعتماد على المعادلات التي تم الحصول عليها من المنحنيات لحمض الغاليك (acid gallic) والكريستين (Quercetin) على التوالي.

قدر المحتوى الإجمالي في هذه النبتة للمركبات الفينولية (TPC) 73.23±0.78 ug GAE/mg (extr)

بينما قدر المحتوى الإجمالي للفلافونويد ب(exer) 97.78±1.0ug QE /mg .

يمكن تفسير الفروقات بين النتائج الحالية والدراسات السابقة بالعوال البيئية المتغيرة مثل الموقع الجغرافي للنبتة وعوامل المناخ ، ارتفاع المنطقة وخصائص التربة التي تؤثر بشكل كبير على تركيب المركبات البيولولوجة في النباتات .

استخدام مذيبات مختلفة في عمليات الاستخلاص يمكن ان يؤذي الى تباين كبير في تركيب النباتات من حيث الكمية والنوعية ،نظرا لتأثير قطبية المذيب على قدرته على استخراج المركبات النشطة بيولوجيا .

II – تقدير القدرة المضادة للأكسدة:

تاثير الجذور الحرة على الجسم هدف للبحث بسبب دورها في الإصابة بأمراض خطيرة مثل أمراض القلب والأوعية الدموية ،سرطانات مختلفة ،التهاب المفاصل ،وأمراض الشيخوخة المبكرة.

تؤكد الأبحاث الحديثة أن المضادات الأكسدة تعمل على تأخير أو منع تلف الدهون وغيرها من الجزيئات عن طريق تثبيط بداية أو انتشار سلاسل تفاعل الأكسدة (peroxidation chain reaction) بالإضافة إلى ذلك تقوم المضادات الأكسدة بإصلاح الضرر الذي يسببه الجذور الحرة ROS في الجسم

المركبات الفينولية مثل الفلافونويدات والأحماض الفينولية تعد جوهرية بوظيفتها كمضادات أكسدة ،حيث تحدد وتنظم التفاعلات الأكسدة والتحكم في تأثيرها على استهداف الأكسجين المفعل ROS بإضافة إلى قدرتها على تثبيط نشاط الأيونات الحديدية المسببة لأكسدة الدهون(Lipid peroxidation) .

يعتبر استخدام مضادات الأكسدة الإصطناعية شائعا في الصناعات الغذائية والصيدلانية نظرا لفعاليتها وتكلفتها المنخفضة لكن يترتب على ذلك مخاطر صحية جسمية بسبب سميتها وتأثيرها المحتمل في زيادة احتمالية الإصابة بأمراض مثل السرطان ، لذا يشهد الاهتمام المتزايد من قبل الباحثين والعلماء لاكتشاف مركبات طبيعية مشتقة من النباتات كبديل امن وفعال لمضادات الأكسدة الإصطناعية ، وهذا يندرج ضمن جهودنا الحالية في هذا المجال حيث نسعى إلى إيجاد حلول مستدامة لتحسين جودة الحياة.

تم تقدير القدرة المضادة للأكسدة لمستخلص الإيثانولي لنبات *Matricaria pubescens (Desf.)*.

وتمكنا من دراسة كل من (β-carotene ,ABTS, DPPH) ، وبتأكيد قمنا بقياس قيمة الفينولات والفلافونويدات وقد استخدمنا كل من BHAو BHT كمركبات مرجعية .

قمنا بإجراء عدة اختبارات نظرا لتفاوت استجابة مضادات الأكسدة في الأنظمة التجريبية المختلفة هدفنا من ذلك الحصول على تحليل شامل لألية عمل المواد المضادة للأكسدة في المستخلص المدروس ، تم عرض النتائج المتحصل على شكل قيم IC_{50} كما هو موضح في الجدول .

الجدول رقم 05: نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط ABTS [7]

Extracts	%Inhibition in ABTS assay							
	3.125ug	6.25ug	12.5ug	25ug	50ug	100ug	200ug	IC_{50} ug/ml
Extr ETOH	12.49±0.99	21.37±0.63	29.91±0.96	50.92±1.23	55.95±0.43	60.96±0.78	69.97±1.23	**18.38±0.22**
BHT	59.22±0.59	78.55±3.43	90.58±0.00	92.18±1.27	93.37±0.86	94.87±0.87	96.68±0.39	**1.29±0.30**
BHA	83.42±4.09	93.52±0.09	93.58±0.09	93.63±0.16	93.63±0.95	94.20±0.90	95.39±2.62	**1.81±0.10**

الجدول رقم 06: نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط DPPH [8]

Extracts	%Inhibition in DPPH assay							
	3.15 ug	6.25 ug	12.5ug	25 ug	50 ug	100 ug	200 ug	IC_{50} ug/mL
ETOH	11.89±0.98	15.98±1.08	22.01±1.09	29.98±1.09	39.81±0.79	48.13±0.99	61.29±1.09	29.79±1.0
HT	11.69±1.88	22.21±1.30	37.12±1.80	52.63±2.70	56.02±0.53	83.60±0.23	87.28±0.26	22.32 ±1.19
HA	28.95±1.16	54.33±1.59	76.76±1.65	84.09±0.35	87.53±0.82	87.73±0.15	88.43±0.23	5.73±0.41

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول ان المستخلص الإيثانولي لنبات *Matricaria pubescens* (Desf.) يمتلك تأثير في تثبيط جذور DPPH و ABTS بقيم IC_{50} مساوية ل 29.79 و18.38 ميكروغرام /مل على التوالي وهو ما يعادل حوالي 6 مرات و14 مرة على التوالي عند استخدام BHT كمركب معياري وعند استخدام BHA كمركب معياري وجدنا ما يعادل حوالي 4 مرات و10 مرات على التوالي .

عندما نقارن نتائج مضادات الأكسدة مثل DPPH IC50 ug/Ml=1.01±29.79 مع مضادات أكسدة الصناعية BHA التي تساوي IC_{50} = 5.73±0.41 نجد أن مضادات الاكسدة الصناعية BHA تعطي تفاعل افضل من IC_{50}DPPH التي تحصلنا عليها حيث أنه كلما كانت IC_{50} صغيرة كانت فعالية المضادات الجذرية كبيرة [9].

الجدول رقم 07 :نشاط مضادات الأكسدة بمقايسة B—Carotene [10]

Extracts	% Inhibition in B-carotene assay							
	3.125 ug	6.25 ug	12.5 ug	25 ug	50 ug	100 ug	200 ug	IC□□ ug/mL
Extr ETOH	10.45±0.98	19.45±1.22	27.98±0.82	40.01±0.78	43.64±0.97	50.91±1.09	57.89±0.74	16.99±0.91
BHT	81.14±0.84	86.09±1.04	87.52±4.24	91.67±0.52	94.11±0.42	94.41±0.32	95.28±3.25	1.05±0.01
BHA	84.23±1.14	90.11±0.68	94.59±0.77	96.09±0.02	97.35±1.08	99.59±0.14	99.76±	0.90±0.02

من ناحية أخرى ،لوحظ أن القدرة المختزلة للمستخلص الإيثانولي *Matricaria pubescens (Desf.)* كانت اقل بحوالي 19 و16 مرة من قدرة المستخلص عليها عند استخدام BHA وBHT كمركبات مرجعية على التوالي كما هيا موضحة في الجدول السابق .

يمكن ربط قوة نشاط المستخلص (*Matricaria pubescens (Desf.*) بتركيباته الغنية TPC وTFC والتي تظهر الدراسات أنها تشمل الفلافونويدات qurecitine و ruten إضافة إلى ذلك أحماض هيدروكسي سيناميك ،مما يؤكد فعاليتها كمضاد للأكسدة بشكل كبير التي أظهرها المستخلص المدروس ،وفقا للدراسات السابقة ،فإن هذه المركبات جميعها تظهر نشاطا مضادا للأكسدة قويا للغاية .

النتائج التي تم الحصول عليها من اختبارات تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة للمستخلص في هذه الدراسة متماشية جزئيا مع تلك المشابهة في الدراسات السابقة ،حيث قام كل من [11] بدراسة قدرة المستخلص الإيثانولي لـ :(*Matricaria pubescens (Desf.*) عل تثبيط جذري DPPHو ABTS وتبين من النتائج المتحصل عليها أن قدرة مضادة للأكسدة اتي يمتلكلها المستخلص المدروس تعادل ما يقارب تلك المتحصل عليها عند استعمال BHA كمركب مرجعي وتشير النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة إلى توافق جزئي مع النتائج السابقة كما ينبغي التنويه إلى عدم إجراء أي دراسات سابقة على نشاط المستخلص *Matricaria pubescens (Desf.*) كمضاد للأكسدة بإستخدام B-carotene .

الخلاصة

- **الخلاصة :**

يهدف هذا العمل في دراسة بعض المكونات الكميائية المتواجدة في نبات" *Matricaria pubescens* " المنتشر في صحراء الجزائر والمستعمل في الطب الشعبي.

قمنا بدراسة المستخلص الايثانولي لنبات *Matricaria pubescens* " بواسطة جهاز : LC/MS/MS وهذا مايسمى بالتحليل الكيفي لمستخلص إيثانولي لنبتة ، وقد تحصلنا على أهم مكونات المستخلص ثم أجرينا عده اختبارات بيولوجية كان أهمها الاختبارات المضادة للأكسدة مثلABTS و DPPH وغيرهما، وقد أعطى الاختبار نتائج مقبولة إلى حد ما ويمكن تأكيد النتائج المتحصل عليها باللجوء إلى دراسات علمية أكثر تعمقا ودقة وأثبتت أن للنبتة فعالية مضادة للأكسدة جيدة قد تساعد في علاجات الدوائية ضد بعض الامراض كارواماتيزم والتشجنات المعوية . تعتبر النتائج المتحصل عليها في هذه المذكرة حلقة مهمة وتتمة واعدة لسلسلة الأعمال المؤطرة في مخبر البحث البيو تكنولوجي (CRBT) بقسنطينة حول هذه النبتة سواءا في المجال الكميائي أو البيولوجي ، ومواصلة العمل على هذا النوع وأنواع أخرى فهو يعتبر مجالا واسعا للبحث في المستقبل عن البدائل الطبيعة النافعة.

قائمة المراجع :

مراجع المقدمة :

1. الطب الشعبي والأعشاب الطبية" لمحمد مفتاح الطنطاوي.
2. لطرش، أمينة. (2012). "زيادة الاهتمام بالطب البديل في الجزائر: دراسة حول استخدام الأعشاب الطبية والعلاجات التقليدية".

3.Smith, John. "De Historia Medicinae Herbarum: Ab Origine Ad Haec Tempora." Editio Secunda. Academia Scientiarum, 2000.

مراجع الفصل الأول :

- **المراجع بالعربية :**

1. تومسون، هيلاري، وجون فاغنر. (2009). "تصنيف النباتات: دليل مفصل". الطبعة الثالثة. الولايات المتحدة : رابطة النباتيين البريطانيين .

2. شمسه أحمد الخليفة 2005 إستخلاص المواد الحيوية الفعالة من بعض النباتات الطبية ودراسة النشاطية المضادة Matricarea pubescensو Cotula cinere a .الجزائرية مثل لبعض الأحياء الدقيقة الممرضة (مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير إختصاص منتجات طبيعية ذات أصل نباتي مواد حيوية فعالة بعنوان) .

3. حليس .، ي – 2005 موسوعة النباتات لمنطقة سوف. دار النشر المنطقة الصناعية كونين ولاية الوادي ، مطبعة الوليد ، ص : 193.

7. مخدمي نور الهدى استعمال المستخلصات المائية لنبتتي pubscens Matricaria و chloranthos Pituranthosكمعطرات طبيعية للجبن " أمير"، ودراسة النشاطية ضد البكتيريا لزيوتهما العطرية ص 18.

11. ملاحظات الميدان في منطقة الدميثة، بلدية قمار.

- **المراجع بالاتينية :**

4. Raven, P.H., Evert, R.F., & Eichhorn, S.E. (2005). Biology of Plants (7th ed.). New York: W.H. Freeman and Company.

5.Bora, K.S., Sharma, A. (2011). "Phytochemical and pharmacological potential of Artemisia absinthium Linn". Journal of Pharmacy and Pharmacology, 63(2), 163-176.

6. Maiza, K., & Hammiche, V. (1993). Etude ethnobotanique et pharmacologique de deux plantes médicinales de la flore Algerienne: Artemisia campestris L et Matricaria pubescens .(Desf) Wild. Alger: Université de Batna

8. Makhloufi Ahmed. (2010)- Etude des activités antimicrobienne et antioxydante

de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar(Matricaria pubescens (Desf.) et Rosmarinus officinalis L) et leur impact sconservation des dattes et du beurre cru. Thése de DOCTORAT .Faculté des cur lasciences, Laboratoire Produits Naturels .L'universite Aboubaker Belkaid Bechar.

9 . BEZANGER-BEAUQUESNE L., PENKAS M., TORCK M., TROTIN F., 1990, Plante

Médicinales des Régions Tempérées, 2éme Ed. Maloine, Paris.p: 364.(Melle Benkiki.N;2005)

10. PARIS R. R., MOYSE H., 1971, Précis de matière Médicale, Tome III. Paris,397.

- **مراجع الفصل الثاني :**

1.Chaimbault, P., The Modern art of identification of natural substances in whole plants. Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine and Agriculture, 2014: p. 31-94.

2.Dass, C., Fundamentals of contemporary mass spectrometry. 2007: John Wiley & Sons.

3.Pitt, J.J., Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. The Clinical Biochemist Reviews, 2009. 30(1): p. 19.

4. Niessen, W.M., Liquid chromatography-mass spectrometry. 2006: CRC press.

5. Ezra, E. and T. Rowden, Transnational cinema: the film reader. 2006: Taylor & Francis.

6. Roberts, G. and A .Watts, Encyclopedia of biophysics. 2019: Springer.

7.Kumar, P., et al., LC–Tof-Ms an Influential Hyphenated Technique and its Application. Asian Journal of Pharmaceutical Analysis, 2023. 13(1): p. 35-41.

8. Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 1958. 181: p. 1199-1200.

wiki/org.wikipedia.ar://https.

9.استشراب سائل مع مطيافية الكتلة. فبراير.

- **مراجع الفصل الثالث :**
- **المراجع باللغة العربية :**

9. سعد، ع. م. (2014). المركبات الثانوية للنباتات. المجلة العربية للعلوم ونشر الأبحاث، 5(2).

10. الجمل، ع. (2012). المركبات الثانوية في النباتات: هيكل، وظيفة، وتطبيقات. مجلة البحوث الزراعية والبيئية، 9(2).

11. الحربي، م. (2017). أهمية المركبات الثانوية في النباتات ودورها في التكيف والدفاع. مجلة البحوث الزراعية والبيئية، 14(2).

12. المصري، م. (2016). المركبات الثانوية في النباتات: تأثيراتها ودورها في التكيف مع الظروف البيئية. مجلة العلوم الزراعية، 20(3).

13. الداود، ع. (2015). تأثير المركبات الثانوية في التكيف والدفاع للنباتات. مجلة البحوث الزراعية والبيئية، 12(1).

14. الشويخ، ف.، والحسن، م. (2018). المركبات الثانوية في النباتات وأهميتها الدوائية. مجلة العلوم الطبيعية والتكنولوجيا، 6(2).

15. المالكي، ع.، والغامدي، ن. (2017). دور المركبات الثانوية في تطوير الأدوية النباتية. مجلة الأدوية والعلوم الصيدلانية، 12(3).

16. السعدون، ي. (2016). استخدام المركبات الثانوية في صناعة الأدوية: تحديات وفرص. مجلة الصيدلة والعلوم الصيدلانية، 8(4).

17 .الحاج، م.، والعطوي، م. (2019). المركبات الثانوية في النباتات: تصنيف وتطبيقات. مجلة العلوم الزراعية، 7(1).

18. جلال، س.، والمصراطي، و. (2020). دور الفينولات في النباتات وتطبيقاتها الحيوية. مجلة العلوم الزراعية، 12(1).

19. حميد، ع.، والعمادي، ع. (2019). دور الفينوليات في النباتات وتطبيقاتها الحيوية. مجلة الكيمياء الحيوية والجزيئية، 7(2).

20. عبد الجبار، ن.، والجندي، ع. (2018). الفينوليات في النباتات: هيكل، وظيفة، وتطبيقات طبية. مجلة البحوث الزراعية، 5(3).

21. سلامة، ي.، والطري، ح. (2020). دراسة شاملة للفينوليات في النباتات ودورها البيولوجي. مجلة العلوم الطبية البيولوجية، 8(1).

22. الشرنوبي، وليد. (2015). "الأدوار البيولوجية للمركبات الفينولية في النباتات". المجلة العربية لعلوم الأحياء، العدد 6، الصفحات 45-60.

23. سواري، علي. (2018). "تحليل مسار اختزال الاستات ودراسة تكوين المركبات الفينولية في النباتات". مجلة الكيمياء الحيوية، المجلد 25، العدد 2، الصفحات 145-162.

24. عبد الله، نور. (2019). "تأثير مسار حمض الشيكيميك على إنتاج المركبات العطرية في النباتات". مجلة الكيمياء النباتية، المجلد 36، العدد 4، الصفحات 321-335.

25. حسين، أمجد. (2020). "التفاعلات الحيوية لتركيب المركبات الفينولية في النباتات". مجلة الكيمياء الزراعية، المجلد 42، العدد 3، الصفحات 201-218.

26. صالح، محمد وآخرون. (2020). "الأحماض الفينولية ودورها في النباتات والأغذية: نظرة شاملة". مجلة الكيمياء العضوية والطبيعية، المجلد 28، العدد 1، الصفحات 45-62.

27. علي، أحمد. (2021). "الأحماض الفينولية وتأثيرها على الصحة والتغذية". مجلة العلوم البيولوجية، المجلد 12، العدد 2، الصفحات 123-138.

28. يوسف، سارة. (2019). "تطبيقات الأحماض الفينولية في تحسين جودة وسلامة الأغذية". مجلة العلوم الزراعية، المجلد 18، العدد 3، الصفحات 215-230.

29. بن خناثة، فاروق. (2014). "الكيمياء العضوية العامة". الجزء الثاني. الطبعة الثانية. دار الكتب العلمية.

30. بن خناثة، ر. (2014). استخدام مركبات الفينول في التغذية البشرية: نظرة عامة. مجلة العلوم الطبية والأبحاث، 8(2)، 103-115.

32 ديفيس، ج.، وميشيلي، ب.، وكونتوز، إ.، ووو، ج. (2016). الفوائد الصحية للفلافونويدات: مراجعة نظرية. النشاط البدني والتغذية وعلم الأغذية، 16(3)، 117-123.

33. مانغيان، ل.، وكيهل، إ.، ولين، ج.، وهوكان، ف.، ووو، ج. (2010). التأثيرات الصحية للفلافونويدات: مراجعة منهجية. الغذاء والتغذية العلوم والبحوث، 54(6)، 733-749.

Gershenzon.7، J.، Dudareva & N. (2007). وظيفة مركبات الزيوت الطيارة الطبيعية في العالم الطبيعي. الأحياء الكيميائية الطبيعية، 3(7)، 408-414

- **المراجع باللاتينية :**

1.Dewick, P. M. (2009). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach (3rd ed.). John Wiley & Sons.

2. Mann, J. (2002). Secondary Metabolism (2nd ed.). Oxford University Press.

3. Wink, M. (2010). Introduction: Biochemistry, Physiology, and Ecological Functions of Secondary Metabolites. In Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (pp. 3-19). John Wiley & Sons.

4. Dewick, P. M. (2009). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach (3rd ed.). John Wiley & Sons.

5.Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The Function of Terpene Natural Products in .the Natural World. Nature Chemical Biology, 3(7), 408-414

6.H. Z. (2014). Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Used for ،Mohammedi Treatment of Malaria in the Highlands of Western Cameroon. Journal of .Ethnopharmacology, 155(1), 450-461.

8.Kutchan, T. M. (1996). Alkaloid biosynthesis—the basis for metabolic engineering of medicinal plants. Plant and Cell Physiology, 37(6), 701-71

31. Nitsch, J. P., Nitsch, C., & Alibert, G. (1970). Physiological aspects of tissue .culture. Annals of the New York Academy of Sciences, 88(4), 781-795

34. Middleton Jr, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and .cancer. Pharmacological reviews, 52(4), 673-751

35. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food chemistry, :66(4), 401-436

36 .Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. International journal of antimicrobial agents, 26(5), 343-356.

37. Harborne, J. B. (1998). Flavonoids: advances in research since 1986. Springer Science & Business Media

38. Moubasher, M. H. (2000). Antifungal activity of 5 Convolvulaceae plant extracts against Fusarium oxysporum, F. sp lycopersici, and some saprobic, phytopathogenic and dermatophytic fungi. Microbiology. 49, 128-137.

39. Quezel, H., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algerie et des régions désertiques, eds du centre national de la recherche scientifique. Paris. 755-759.

40. Basu, N. K., Dandiya, P. C. (1948). Chemical investigation of Convolvulus pluricaulis. Am. Pharm. Assoc. 37, 27-28.

41. Lounasmaa, M. (1988). Tropane Alkaloids, in The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology. Arnold Brossi ed. New York: Academic Press

مراجع الجزء العملي :

1. Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical
2. Nature, 4617 (181): 1119−1200.3-Apak, R., et al., Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing

capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. 52(26): p. 7970-7981

3. Kandikattu, K., et al., Evaluation of anti-inflammatory activity of Canthium parviflorum by in-vitro method. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, 2013. 1(5): p. 729-731.
4. Lordan, S., et al., The α-amylase and α-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food chemistry, 2013. 141(3): p. 2170-2176.
5. Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventos, 1999. Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Met. Enzym, 299, 152-178 : ص
6. Turkoglu A., Emin Duru M., Mercan N., Kivrak I.,Gezer K., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus*(Bull.) Murrill. Food Chemistry 101: 267–273. :ص
7. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307–315. : ص
8. Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 594–598.
9. Uchiyama, M., Suzuki, Y., & Fukuzawa, K. (1968). Etude biochimiques de la fonction physiologique du tocopherolactome. Yakugaku Zasshi, 88(5), 680.
10. Szydlowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. Talanta 2008;76:899-905

11. هناء حريف، صفية رقيبي. "بحث الفيتوكميائي والبيولوجي لمستخلصات بيوتانولية متحصل عليها من نباتات برية صحراوية." 2017.