رقم الترتيب :

رقم التسلسلي :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الشهيد حمه لخضر – الوادي

كلية العلوم الدقيقة

قسم الكيمياء

مذكرة تخرج لنيل شهادة الماستر أكاديمي في الكيمياء

تخصص: كيمياء عضوية

من إعداد الطالبتين: العبيد بسمة

بوديسة اكرام

تحت عنوان:

Etude de la composition chimique (LC/MS/MS) et des activités antioxydantes de l'extrait éthanolique de l'espèce ruta graveolens (flore algérienne).

نوقشت يوم : ... / ..... / 2023 أمام اللجنة المكونة من :

حوات عمار	أستاذ مساعد (أ)	جامعة الشهيد حمه لخضر – بالوادي	مؤطر
بن شيخة نعيمة	أستاذة تعليم عالي	جامعة الشهيد حمه لخضر – بالوادي	رئيس
تامة نور الدين	أستاذ محاضر (أ)	جامعة الشهيد حمه لخضر – بالوادي	مناقش

السنة الجامعية: 2022 / 2023

إهــداء

الى من اوصانا بهم الرحمان حين قال:

﴿وَاخْفِضْ لَهُمَا جَنَاحَ الذُّلِّ مِنَ الرَّحْمَةِ وَقُل رَّبِّ ارْحَمْهُمَا كَمَا رَبَّيَانِي صَغِيرًا﴾

الى من زرعوا في قلبي بذور حب العلم والسعي نحو النجاح...

الى من سهرت ليال طويلة من اجل راحتي ومن استيقظت فجرا من اجل الدعاء لي ...امي الغالية سعدية.

الى نور عيني وبصيرتي في هذه الحياة من استمد من لينه الحنان ومن قسوته الحكمة... أبي الغالي العايش.

الى المساند والداعم والكتف الذي أتكئ عليه عندما تقرر الحياة ان تميل... أخي الوحيد

فايز.

جداتي الأعزاء وأرواح اجدادي الطاهرة

الى من أعطاني من ينابيع معرفته وخبرته ...أستاذي

تامة نور الدين

الى من شاركتني الألم والامل والنجاح والفشل ... صديقتي

اكرام

الى كل هؤلاء اهدي هذا العمل المتواضع وأسأل الله أن يجعل هذا العمل خالصا لوجهه

العيد بسمة

إهــداء

"وآخر دعواهم أن الحمد لله رب العالمين"

الحمد لله الذي ما تم جهد ولا ختم سعي إلا بفضله وما تخطى العبد عقبات وصعوبات إلا بتوفيقه

إلى سكان قلبي ....

إلى تلك الإنسانة العظيمة التي طالما تمنت أن تقر عينها برؤيتي في يوم كهذا......

أمي الحبيبة

إلى من كلل العرق جبينه وعلمني أن النجاح لا يأتي إلا بالصبر والإصرار......

أبي العزيز

إلى من يذكرهم القلب قبل أن يكتب القلم، إلى من قاسموني حلو الحياة ومرها تحت سقف واحد

أختي وإخوتي

إلى من صعدت أرواحهم في السماء وفارقونا بجسدهم ......

أجدادي

إلى جميع أقاربي وأصدقائي

إلى رفيقة الدرب والروح وزميلتي في هذا العمل

إلى سندي وأعز شخص على قلبي

إلى كل من أشرف على تعليمي منذ بداية دراستي إلى يومنا هذا

"فاللهم اجعله نهاية خير لبداية طريق أعظم"

بوديسة إكرام

شكر وعرفان

قال لله تعالى :"لئن شكرتم لأزيدنكم"

الحمد والشكر لله أولا وأخيرا على توفيقه لنا في إنجاز هذه المذكرة

نتقدم بجزيل الشكر إلى كل من ساهم في إنجاز هذا العمل من قريب أو من بعيد

ونخص بالذكر

الأستاذ الفاضل حوات عمار لقبوله الإشراف على هذا العمل والذي لم يبخل

علينا بإرشاداته

كما نتقدم بجزيل الشكر لكل من الأستاذة بن شيخة نعيمة والاستاذ تامة نورالدين لقبولهم عضوية لجنة المناقشة

كما لا ننسى أن نشكر الأستاذ الباحث بن سويسي شوقي

بمركز البحث البيوتكنولوجيCRBT(قسنطينة)

كما نشكر منهدسي مخبر كلية علوم الدقيقة بجامعة الشهيد حمه لخضر

على كل المساعدات

العبيد بسمة و بوديسة اكرام

الملخص:

استخدم الإنسان منذ القدم النبات الطبي في معالجة مختلف الامراض، وحتى يومنا هذا لا يزال الطب الحديث يعتمد على النباتات في صناعة مختلف الأدوية، وهو ما يهدف اليه بحثنا هذا حيث أخذنا نبتة *Ruta.graveolens* وقمنا باستخلاص ما تحتويه أوراقها ثم قمنا بدراسة المستخلص الايثانولي بواسطة LC/MS/MS من اجل معرفه مختلف مكونات النبتة ثم قمنا بدراسة فعالياتها البيولوجية، وقد ركزنا أكثر على الفعالية المضادة للأكسدة، المضادة للالتهابات والمضادة لداء السكري.

الكلمات المفتاحية: *Ruta.graveolens*، المنتجات الطبيعية الفعالة، مضادات الأكسدة، مضادات الالتهاب.

Résumé:

Les humains utilisent les plantes médicinales depuis l'Antiquité pour traiter diverses maladies, et à ce jour la médecine moderne repose encore sur les plantes dans la fabrication de divers médicaments, ce que notre recherche vise à faire, où nous avons pris la plante *Ruta.graveolens* et extraire ce que contiennent ses feuilles, puis nous avons étudié l'extrait éthanolique par Le LC/MS/MS afin de connaître les différents composants de la plante et ensuite nous avons étudié ses activités biologiques, et d'où notre forte concentration davantage sur l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et anti-diabétique.

Les mots clés : *Ruta.graveolens* ،produits naturels efficaces، antioxydants، Anti-inflammatoires.

قائمة الاختصارات

الرمز	المعنى
$COCH_3$	Acétyle
ROS	Les espèces réactives de l'oxygène
$OH^{\cdot}$	Hydroxyde
NOS	Les espèces réactives de nitrogen
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
SOD	Superoxyde dismutase
CAT	Catalyse
GPX	Glutathion peroxydase
BHA	L'hydroxyanisol butylé
BHT	le butylhydroxytoluène
TBHQ	tert–Butylhydroquinone
PG	Gallate de propyle
ET, C_2H_6O	Éthanol
DPPH	Le 2,2–diphényl 1–picrylhydrazyle
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
ABTS	L'acide 2,2'–azino–bis
$K_2S_2O_8$	Persulfate de potassium
BSA	Le bis(triméthylsilyl)acétamide
HCl	Acide chlorhydrique
ppm	Partie par million
pH	Potentiel hydrogène
$Na_2H_2PO_4$	Dihydrogénophosphate de sodium
Na_2HPO_4	Hydrogénophosphate de sodium
AChE	Acétylcholinestérase
BChE	Butyrylcholinestérase
mmol	un millième de mole
TPC	Total phenolic
TFC	Total flavonoid
MS	Spectrométrie de masse
UV-Vis	Spectroscopie ultraviolet–visible (Ultraviolet–visible spectroscopy)

قائمة الجداول

الجداول	العنوان	الصفحة
جدول 1	تصنيف نبات *Ruta graveolens*	04
جدول 2	الأسماء الشائعة لنبات الفيجل	04
جدول 3	أنواع جنس *Ruta*	05
جدول 4	الاستعمالات الطبية لـ*Ruta*	06
جدول 5	أقسام عديدات الفينول	09
جدول 6	بعض من أقسام القلويدات	12
جدول 7	تصنيف التربينات حسب وحدات الأيزوبرين	14
جدول 8	انواع الجذور الحرة	17
جدول 9	وقت الاستبقاء، أيون الجزيء الكاذب، أيونات شظية MS^2 الرئيسية، التحديد المؤقت، والتقدير الكمي للمركبات المحددة	40
جدول 10	نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط ABTS	43
جدول 11	نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط DPPH	43
جدول 12	نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة Phenanthroline	44
جدول 13	نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة B- carotine	44

قائمة الأشكال

الأشكال	العنوان	الصفحة
شكل01	صورة لنبات *Ruta.graveolens*	03
شكل02	الشكل العام للفلافونويدات	10
شكل03	هياكل بعض أصناف الفلافونويدات	10
شكل04	بنية وحدة الايزوبرين(Isoprene)	14
شكل05	اختلال في التوازن بين مضادات الاكسدة ومولدات الاكسدة	16
شكل06	بنية فيتامين C	20
شكل07	الصيغة الكيميائية لفيتامين E	21
شكل08	الصيغة الكيميائية لمضادات الاكسدة الاصطناعية	22
شكل09	مخطط العمل	25
شكل10	مكونات جهاز LC/MS/MS	26
شكل11	معادلة تثبيط الجذر الحر DPPH في وجود مضاد للجذور الحرة	32

الفهرس

الصفحة	المحتوى
I	الإهداء
III	الشكر والعرفان
IV	الملخص
V	الفهرس
IX	قائمة الجداول
IX	قائمة الأشكال
X	قائمة المختصرات
1	مقدمة عامة
	الجزء النظري
03	الفصل الأول: عموميات حول نبات *Ruta.graveolens*
04	1 التوزيع الجغرافي لنبات *Ruta.graveolens*
04	2 التصنيف النباتي لـ *Ruta.graveolens*
04	3 الأسماء الشائعة للجنس *Ruta*
05	4 الوصف النباتي لـ *Ruta.graveolens*
05	5 أنواع جنس *Ruta*
06	6 استعمالات *Ruta* في الطب التقليدي
	الفصل الثاني: المنتجات الطبيعية الفعالة (نواتج الأيض الثانوي)
08	1 تعريف المنتجات الطبيعية الفعالة
08	2 تصنيف المنتجات الطبيعية الفعالة الناتجة من الايض الثانوي
08	1.2 المركبات الفينولية
11	2.2 القلويدات
12	3.2 جلوكسيدات
13	4.2 التربينات
	الفصل الثالث: الاجهاد التأكسدي

1 تعريف الإجهاد التأكسدي	16
2 الجذور الحرة	16
1.2 إنتاج الجذور الحرة	17
2.2 مكافحة الجذور الحرة	18
3 مضادات الأكسدة	18
1.3 مضادات اكسدة طبيعية (انزيمية وغير انزيمية)	18
2.3 مضادات اكسدة معدنية	21
3.3 مضادات اكسدة اصطناعية	21
4 الأمراض البشرية المتعلقة بالإجهاد التأكسدي	22
الجزء التطبيقي	
1 المادة النباتية	24
2 دراسة عامة لجهاز LC/MS/MS	26
3 المسح الكيميائي	29
4 الدراسة البيولوجيا	29
1.4 اجمالي محتوى الفلافونويد TFC	29
2.4 اجمالي محتوى الفينول TPC	30
5 طرق المخبرية والوسائل المستعملة في تقدير نشاط مضاد لأكسدة	31
1.5 اختبار تثبيط الجدر الحر DPPH	32
2.5 اختبار إزاحة جدر ABTS	33
3.5 نشاط Phenanthroline	33
4.5 محتويات B-carotine والليكوبين	34
5.5 نشاط مضاد للالتهابات	35
6.5 نشاط مثبط للأنزيم	36
النتائج والمناقشة	

1 تقدير محتوى المركبات النشطة بيولوجيا	40
2 تقيم القدرة المضادة للأكسدة	41
3 اختبار تثبيط انزيم a-amylaseو a-glucosidase	45
خاتمة عامة	49
المراجع	

المقدمة العامة

المقدمة

منذ وجود الإنسان على هذه المعمورة وهو في صراع دائم مع مختلف الأمراض، وهذا ما قاده إلى استعمال عدة أشياء في التداوي أهمها الأعشاب، كونها كانت الملجأ الوحيد له، وقد تطور استعمال الأعشاب مع تطور البشرية. فقد عرفت الحضارات القديمة استعمالا واسعا للنباتات الطبية، فالصين كانت مهد التداوي بالأعشاب، ثم الهند واليونان وهكذا، وقد ازدهر استعمال الطب التقليدي في الحضارة الإسلامية وتطور تطورا ملفتا، فظهر العديد من علماء الطب ممن بزغوا في هذا المجال. وبقي الإنسان يبحث ويطور هذا المجال إلى يومنا هذا.

وفي عصرنا هذا ظهرت موجة كبرى من الاهتمام أو العودة لمثل هذا الطب، وهذا راجع لعدة أسباب أهمها التكلفة والآثار الجانبية للأدوية المصنعة، فخلال فترة زمنية قصيرة تمت مراجعة نصف الأدوية التي أنجزتها إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) بسبب أعراضها الجانبية.

الجزائر كغيرها من البلدان تحتوي على عدة أنواع من النباتات، بل تعتبر من البلدان الأكثر تنوعا، وهذا بسبب موقعها الجغرافي ومساحتها الشاسعة وتنوع تربتها الخاصة. ومن هنا تبادر الى أذهاننا العديد من الأسئلة من بينها ماهي المركبات الكيميائية الموجودة في هذا النبات وما مدى فعاليتها البيولوجيا المضادة للأكسدة، المضادة للالتهاب والداء السكري؟

ولمعرفة كل هذا أجرينا هذا البحث والذي يعتمد أساسا على ثلاثة محاور رئيسية:

أولا: دراسة نظرية لنبات "*Ruta graveolens*" مكان تواجده، نوعه ،أهم مميزاته وخصائصه.

ثانيا: دراسة كيميائية لمستخلص الإيثانولي للنبتة حيث استعملناه من اجل الوصول لأهم الجزيئات المكونة لهذه النبتة.

وأخيرا أجرينا عدة اختبارات بيولوجية للمستخلص الإيثانولي لهذه النبتة من أجل التعرف على مدى فعاليتها المضادة للأكسدة، المضادة للالتهابات وأخيرا، الفعالية البيولوجية فيما يخص مرض السكري وأنهينا بحثنا بتحليل النتائج ومقارنتها بنتائج بحوث سابقة أجريت على نفس هذه النبتة.

الجزء النظري

عموميات حول النبات

عموميات حول نبات (*Ruta graveolens*) :

تعرف الإنسان منذ القديم على الكثير من النباتات والأعشاب الطبية التي تنمو بريا في بيئته المترامية الأطراف حيث وجد الكثير يفيد في الغذاء والقليل منها يصلح كدواء وأمكن استغلال هذه الأعشاب في عملية التطبيب الشعبي لعلاج الأمراض وإزالة العلل[1]. ومن بين أهم النباتات الطبية المتوفرة هي نباتات العائلة السدبية، والتي تتكون أساسا من أشجار و شجيرات وفي بعض الحالات نباتات شوكية، ونادرا نباتات عشبية مميزة بجيوب إفرازية ، وغالبا لها رائحة نفاثة ، وهي عديمة الأذينات، أوزهارها ثنائية الجنس و أحيانا أحادية الجنس مرتبة في نورات مختلفة، هذه العائلة ممثلة ب 350 جنس و 3500 نوع، والعائلة السدبية لها قيمة اقتصادية كبيرة جدا فهي تضم نباتات الفواكه و الزينة و النباتات الطبية [2].

تدعى هذه العائلة بالإسم العلمي (*Ruta graveolens L*)، وهو شجيرة عطرية صغيرة شديدة التحمل تمت زراعتها لقرون في الحدائق كنبات طبي[3]. تم اكتشافه من طرف العالم C. Von Linné والذي يعرف أيضا بواسطة الاسم الفرنسي أو اليوناني « Pΰτη»[4].

الشكل 1: صورة لنبات *Ruta graveolens L*

1 التوزيع الجغرافي لنبات *Ruta graveolens*:

وهو معروف عند الأهالي في الجزائر حيث تتواجد في المناطق الجبلية والمناطق التي تحتوي على الحصى وكذلك التلال، أما الموطن الأصلي للنبتة هو أوروبا الجنوبية والغربية وافريقيا الجنوبية[5]، تنمو طبيعيا في منطقة البحر الأبيض المتوسط وهي الأن تزرع في عدة مناطق من العالم.

2 التصنيف النباتي لـ *Ruta graveolens*:

جدول 1: تصنيف نبات *Ruta graveolens*

تصنيف النبات	
المملكة	نبات
شعبة	البذريات
تحت الشعبة	مغطاة البذور
صف	ثنائية الفلقة
رتبة	منفصلة البتلات
العائلة	السدبية
جنس	الفيجل
النوع	*Ruta.graveolens*

3 الأسماء الشائعة للجنس *Ruta*:

جدول 2: الأسماء الشائعة لنبات *Ruta graveolens* [6]

الأسماء الشائعة	
الطب التقليدي اليوناني واللاتيني	*Réuo*
كتاب العرب	السذاب ،الفيجن
فرنسا	*Ruta*
ألمانيا	*Rauta*
إيطاليا	*Ruta*
إنجلترا	*Rue*
إسبانيا	*Ruda*

4 الوصف النباتي لـ *Ruta graveolens*:

Ruta graveolens عبارة عن شجيرة صغيرة دائمة الخضار تزهر من شهر مايو الى أغسطس وهي شجيرة شبه خشبية معمرة بطول 0.6-0.9 متر، متفرعة للغاية ذو أوراق خضراء باهته مستطيلة او على شكل ملعقة طولها من 7.6-12.7 سم [7].تتميز *Ruta graveolens* برائحة قوية ونفاذة تنبعث من الزيوت الموجودة في الجيوب في سطح الأوراق[8] .تحتوي على ازهار صغيرة صفراء اللون لها نفس عدد الكؤوس والبتلات التي تتراوح من 4-5 او من 8-10 ازهار [9]. ثمارها جافة وصلبة ومدورة يتراوح عددها من 4 او 5 ثمرات مفصصة ذات سطح بني رمادي وخشن البذور بيضاوية الشكل ، مدورة على الظهر ، مفطحة من الأمام[10].

5 أنواع جنس *Ruta*:

هناك عدة أنواع منها[11]:

الجدول 3: أنواع جنس *Ruta*

أنواع جنس **Ruta**
Ruta montana : الفيجل الجبلي
Ruta graveolens : السذاب المنزلي، سذاب الحدائق
Ruta chalpensis : سذاب حلب
Ruta bracteosa : سذاب الشتاء
Ruta latifolia

6 استعمالات *Ruta* في الطب التقليـدي:

هي عشبة طبية استعملت لفترة طويلة ضد السم، كحرز ضد الشعوذة عند الإغريق ولتحسين الرؤيـة عند الرومان، وهي تستعمل حاليا لعدة أغراض علاجية، أمكن تلخيصها في الجدول الآتي:

الجدول 4: الاستعمالات الطبية لـ *Ruta*[13]

الجنس	طريقة الاستعمال	العلاج
Ruta	استعمال عن طريق الفم	– ضد التهاب المعدة وتسهيل الهضم. – ضد ارتفاع الضغط الدموي. – ضد الإسهال. – يحفز الطمث. – طارد للديدان. – يسبب الإجهاض. – توسيع الأوردة. – ضد مشاكل الرحم. – في حالات الإضطرابات العصبية. – ضد السم. – عند الإلتهاب الوريدي – مضاد للتشنج.
	استعمال خارجي (موضعي)	– ضد الروماتيزم. – ضد الحمى – ضد ألام الأذن وألام الرأس.

الفصل الثانــي

المنتجات الطبيعية الفعالة (نواتج الأيض الثانوي)

1 تعريف المنتجات الطبيعية الفعالة:

المركبات الطبيعية الفعالة هي مركبات عضوية ذات اصل طبيعي، وهي عبارة عن مواد انتجتها الكائنات الحية ، اكثر هذه المكونات اهمية هي التي تلعب دورا فعالا في التفاعلات الأيضية وهي جزيئات تنتج انطلاقا من عمليات الأيض الاولي او الثانوي[15].

2 تصنيف المنتجات الطبيعية الناتجة من الأيض الثانوي:

تصنف المنتجات الثانوية إلى أصناف مختلفة وفق المصادر الطبيعية وتأثيرها الفيزيولوجي بعضها مضادات حيوية، مضادات جرثومية ومسكنة لألم، وتصنف حسب تركيبها الكيميائي:

- المركبات الفينولية ومشتقاتها.
- القلويدات ومشتقاتها.
- جلوكوسيدات.
- التربينات.

1.2 المركبات الفينولية:

تشكل المركبات الفينولية حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية، نضرا لكثرة عددها وتباين هيكلها البنائي لها، وقد تم عزل والتعرف على أكثر من 8000 مركب فينولي و توزيعها في مختلف الأقسام بدلالة هيكلها الكربوني[14] والاختلاف في عدد ونوع المجاميع المرتبطة بها وعدد الحلقات مما يجعلها تنقسم إلى عدة مجاميع أهمها الأحماض الفينولية، الفلافونويدات، الدباغ، حيث تمثل الفلافونويدات القسم الأكبر منها[16] و تعرف المركبات الفينولية على أنها مستقبلات ثانوية في النباتات، تتميز بنيتها المرتبطة بمجاميع أخرى مثل : الايثر والأستر و ميثيل[17].

1.1.2 تصنيف المركبات الفينولية:

عديدات الفينول هي جزئيات تتكون من حلقة بنزين على الأقل تحوي مجموعة هيدروكسيل حرة أو مستبدلة يشترط فيها أن تكون مشتقة غير أزوتية، وتصطنع الحلقة أو الحلقات من حمض الشيكيميك أو عديد الأسيتات [18].
تصنف الفينولات وفقا لعدد ذرات الكربون في الهيكل الأساسي إلى عدة أقسام:

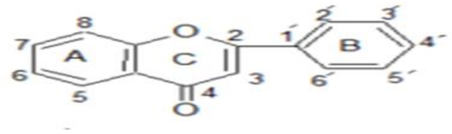
جدول 5:أقسام عديدات الفينول [14]

مثـال	التصـنيف	الهيكل الكربوني الأساسي	عدد من الكربون
Acide galligue	حمض الفينول	C_6-C_1	7
Gallacetophénone	الاسيتوفينون	C_6-C_1	8
Acide p-hydroxyphényhl acétique	حمض فينيل أستيك	C_6-C_2	8
Acide p-Coumarique	حمض هيدروكسي سيناميك	C_6-C_3	9
Esculitine	الكومارين	C_6-C_3	9
Juglone	النفثوكينون	C_6-C_4	10
Mangiferine	Xanthones	C_6-C_1-C_6	13
Resveratrol	الستلبينات	C_6-C_2-C_6	14
Naringénine	الفلافونويدات	C_6-C_3-C_6	15

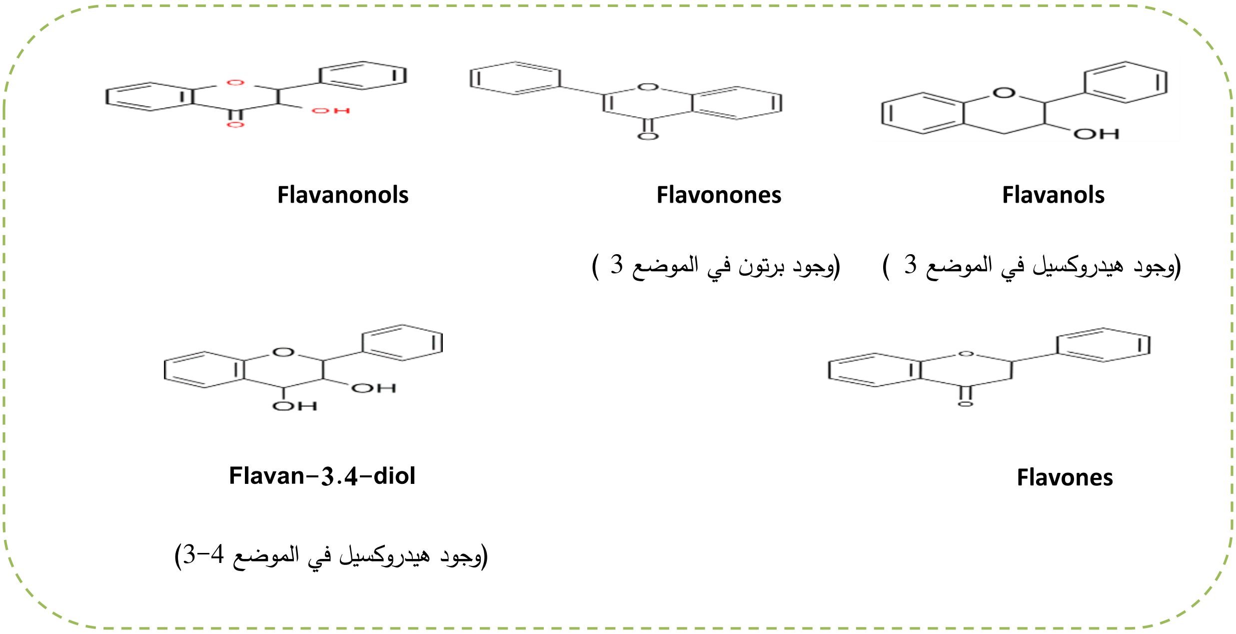
2.1.2 الفلافونويدات :

تمثل الفلافونويدات مجموعة واسعة من المركبات الفينولية الموجودة في النبات، حيث شخص حوالي 8000 مركبا فالفونويديا تختلف فيما بينها في عدد وتوزع المجاميع الهيدروكسيلية وكذلك إضافة المجاميع السكرية والمثيلية. تملك الفلافونويدات بنية موحدة ممثلة في C6–C3–C6 و تمثل الوحدتين C6 الحلقة A وB أما C3 فتمثل حلقة pyrane وحسب درجة إضافة المجاميع الهيدروكسيلية والتغيرات الحاصلة على مستوى الحلقة C تقسم الفلافونويدات إلى مختلف المجاميع: flavone، flavanols، flavonols،flavanones، anthocyanins وتتكون أغلب

الفلافونويدات بارتباط الحلقة B بالكربون رقم 2 للحلقة C، غير أن في بعض الفلافونويدات مثل isoflavonoids و neoflavonoids ترتبط الحلقة B بالكربون رقم 3و 4 على الترتيب[19]. كما موضحة في الشكل 9 وبعض الأصناف موضحة في الشكل 3:



الشكل 2: الشكل العام للفلافونويدات



الشكل3: هياكل بعض أصناف الفلافونويدات

- **العلاقة بين بنية الفلافونويد والنشاط المضاد للأكسدة:**

أدت الأبحاث التي أجريت على النماذج المخبرية والتي اهتمت بالعلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونويد و نشاطه المضاد للأكسدة للتوصل إلى التعرف على المجاميع و المواقع الأنشطة في الآلية المضادة للأكسدة و المتمثلة في[20]:

- مجموعة أرثو ثنائي هيدروكسيل 4' ،3' على الحلقة dihydroxy Ortho– B.
- الرابطة غير المشبعة بين الموقعين (C2–C3) و المترافقة مع مجموعة الكربونيل C4 للحلقةC.
- مجموعة الهيدروكسيل في والموقع للحلقةC .
- مجموعة الهيدروكسيل في الموضعين 7،5 للحلقة A .

ويعد Quercétine بامتلاكه لكل هذه المجاميع من أحسن الفلافونويدات فعالية.

2.2 القلويدات :

عبارة عن مواد عضوية أزوتية معقدة التركيب يكون الأزوت في حلقة غير متجانسة، تحتوي على وظيفة أمينية أو أكثر، وتتنوع هذه الأمنيات في الطبيعة بشكل كبير جدا. توجد القلويدات في النباتات في الحالة الحرة أو في حالة أملاح لبعض الأحماض النباتية. وتوجد القلويدات في كثير من النباتات الزهرية و خاصة ذات الفلقتين، و أغلبها تتواجد في أنسجة البشرة للأوراق أو الجذور و قليل منها يوجد في العصير الخلوي ، وقد تنتشر في جميع أنحاء النبات . و قد تم عزل الكثير من هذه المركبات من مصادر مختلفة مثل الحشرات، الكائنات البحرية الدقيقة.... ، و تم التعرف على أكثر من34000 قلويد موجود في حوالي 40 % من الأنواع المختلفة في فصائل نباتية كثيرة، حيث أن نسبته تتراوح مابين 3 % إلى 1 %من الوزن الجاف لنبات[21].

1.2.2 تصنيف القلويدات:

تصنف القلويدات إلى ثلاث مجموعات[22]:

- قلويدات حقيقية alcaloïde vrai:

هي قلويدات تحتوي على ذرة نيتروجين واحدة أو أكثر في حلقات متباينة، وهي مشتقات من الأحماض الأمينية ومن أمثلتها: Colchicine .

- قلويدات الأولية alcaloïde proto:

عبارة عن قلويدات تكون ذرة النيتروجين فيها ليست في حلقة متباينة ومن الأمثلة الأفدرين والمسكالين.

- القلويدات الكاذبة alcaloïde Pseudo:

قاعدية التأثير ولا يتم داخل الأنسجة النباتية من الأحماض الأمينية ومن أمثلتها الكافيين والسولانين.

وتقسم القلويدات عادة إلى مجموعات على أساس التركيب الكيمائي للحلقة الأساسية في جزيء القلويد.وفيما يلي بعض هذه المجموعة ومميزاتها.

جدول 6: بعض من أقسام القلويدات

القسم	المميزات	النوع
مجموعة القلويدات متجانسة الحلقة Homocyclic	-لا تحتوي علي مجموعة حلقية. - بها ذرة نتروجين. - عبارة عن مركبات مشتقة من فينيل إيثيل أمين.Phenyl Ethyl Amine	القلويدات الأمينية Amino Alkaloids
مجموعة القلويدات غير متجانسة الحلقة Hétérocyclic	-عبارة عن مركبات حلقية بداخلها ذرة نتروجين N أو أكثر تبعا لنوع القلويد. -تحتوي قلويداتها على عدة مجموعتها حلقية أساسية غير متجانسة.	بيريدين pyridine نيكوتين nicotine بيبريدينPipéridine

3.2 جلوكسيدات:

الجلوكسيدات مركبات عضوية ينتج عن تحللها بواسطة الأحماض أو الإنزيمات نوع أو أكثر من السكريات عادة ما تكون (سكريات مختزلة) ومادة أو أكثر غير سكرية تسمى أجليكون[23].

وتعرف على أنها مركبات عضوية متفاوتة التركيب ، فقد تكون ألدهيدات أو كيتونات أو كحولات أو أسترات أو ستروئيدات ... الخ ، وفي معظم الجلوكسيدات فإن الرابطة بين الشق السكري وغير السكري تنتج عن إزالة جزئي الماء[22].

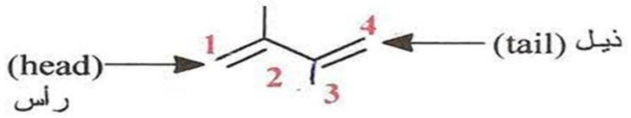
1.3.2 تصنيف جلوكسيدات:

قسمها العالم [24] إلى كل من :

- جلوكسيدات الفلافونويدات.
- جلوكسيدات الأنتوسيانيك.
- جلوكسيدات ستيرويدية أو ثلاثية التربينات.
- جلوكسيدات قلبية وقلويدية.
- جلوكسيدات كبريتية.
- Cyarogènètiques.
- Iridoides.
- Bètalaines.

4.2 التربينات:

تؤلف التربينات المجموعة العظمى من منتجات المملكة النباتية. فالكثير من الزيوت الطيارة في النباتات العطرية تحتوي مركبات هيدروكربونية ذات صيغ كيميائية يدخل في هياكلها مضاعفات من 5 ذرات كربون أي مضاعفات وحدة الأيزوبرين ،الشكل5 يوضح بنيته ويعرف كيميائيا باسم(2-مثيل -1,3 -البيوتادين) [25].



الشكل 4: بنية وحدة الأيزوبرين (Isoprene)

1.4.2 تصنيف التربينات:

تصنف التربينات حسب عدد وحدات الأيزوبرين الداخلة في تشكيل المركب كما موضح في الجدول التالي:

الجدول 7: تصنيف التربينات حسب وحدات الأيزوبرين.

مثال	عدد وحدات الأيزوبرين	عدد ذرات الكربون	نوع التربين
Limonene	2	10	تربينات أحادية
Artemisinin	3	15	سيسكويتربينات
Forskolin	4	20	تربينات ثنائية
α-amyrin	6	30	تربينات ثلاثية
β-carotene	8	40	تربينات رباعية
Rubber	N>8	N>8	تربينات متعددة

الفصل الثالث

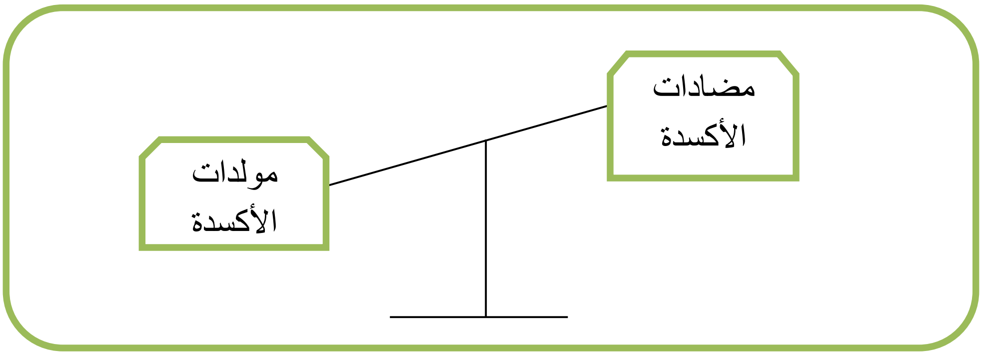
الإجهاد التأكسدي

1 تعريف الاجهاد التأكسدي:

يعرف الاجهاد التأكسدي على أنه اختلال في التوازن ما بين الآليات التي تؤدي الى إنتاج الجذور الحرة ويقصد بها (مولدات الأكسدة، جزيئات الأوكسيجنية النشطة ROS) والأليات التي تعمل على التخلص منها أي (مضادات الأكسدة) ويكون هذا الاختلال نتيجة:

- ضعف آلية الجسم لإزالة مولدات الأكسدة.
- الزيادة في تكوين مولدات الأكسدة.
- زيادة تحفيز الخلايا على الجذور الحرة بصفة فيزيولوجية من جسر أكسيد النتريك.
- زيادة العناصر الانتقالية الحرة خاصة الحديد والنحاس.

ومن هنا يصبح عمل الجذور الحرة غير قابل للسيطرة، مما يؤدي إلى تلف على مستوى الجزيئات، الخلايا، الأعضاء، كما يحتمل أيضا موت العضوية[26].



الشكل 5: اختلال في التوازن بين مضادات الأكسدة ومولدات الأكسدة

2 الجذور الحرة[27]:

يطلق عليها أيضا اسم العوامل المؤكسدة وهي عبارة عن أصناف كيميائية فقدت إلكترون é أو أكثر من مدارها الخارجي، اذ تكون الالكترونات في الحالة العادية مزدوجة وعند فقدان أحدها فإن المركب يفقد استقراره ويصبح مؤذيا للجزيئات المجاورة.

حيث ان الإلكترون المنفرد في المدار الخارجي يبقى نشط يبحث عن الالكترونات المفقودة ليكون زوجا مستقرا ويرمز له بنقطة والتي تشير إلى مكان تواجد إلكترون حر مثلا: $OH^{\bullet}$ ، وهذا ما يجعله ينتزعه من أحد الجزيئات المجاورة مما يسبب أتلاف جزيئات الخلية الطبيعية، وبالرغم من قصر مدة حياة الجذور الحرة والتي لا تتجاوز أجزاء من الثانية الا ان جذرا حرا واحدا قد يسبب حالة فوضى وعدم استقرار وبالتالي نشوء المرض.

هناك عدة أنواع من الجذور الحرة، ولكن اهم الجذور الحرة موجودة في الأنظمة البيولوجية (أي الكائن الحي)، مصدرها الأكسجين او مشتقة منه، وتعرف باسم المركبات الأوكسيجنية النشطة *reactive oxygen species*، يرمز لها باختصار بالرمز ROS او نيتروجينية تكون مشتقة من نيتروجين يرمز لها بـ NOS.

الجدول 8:أنواع الجذور الحرة[28]

O_2	الاكسجين
$^1O_2$	اكسجين احادي
$O_2^{\cdot-}$	أنيون فوق أكسيد
OH	جذور الهيدروكسيل
HOO	جذور الهيدروبيروكسيل
ROO	جذور البيروكسيد
ROOH	هيدروبيروكسيد
$RO^{\cdot}$	الكوكسى الجذري
H_2O_2	بيروكسيد الهيدروجين

1.2 انتاج الجذور الحرة:

المسار الرئيسي لإنتاج الجذور الحرة عبارة عن عدة تفاعلات مستهلكة للطاقة، والمتمثلة في الكسر المتجانس للرابطة التكافؤية إلى وحدتين لكل منهما إلكترون واحد، أو قد تكون بإزالة أو إضافة إلكترون للرابطة، وتكون هذه

الجذور غير مستقرة. حيث أن أبسط الجذور الحرة هو ذرة الهيدروجين مع بروتون وإلكترون واحد. كما توجد جذور أخرى يمكن أن تتشكل من أ وكسجين، النتروجين أو الكربون وهي التي تسبب الضرر للنظام البيولوجي وخاصة منها الجذور الحرة الأوكسيجنية المعروفة باسم الجزيئات الأوكسيجنية الناشطة ROS، وهي أهم المنتجات الرئيسية التي تتشكل في الخلايا الهوائية خلال الإجهاد التأكسدي[29].

2.2 مكافحة الجذور الحرة:

ان جسمنا يستعين ببعض من المركبات الجزيئية مضادة للأكسدة لها القدرة على التفاعل مع الجذور الحرة لمكافحتها وبذلك توضع حد للجذور الحرة دون اتلاف خلايا المادة الحية، حيث ان كل جزيء من مضادات التأكسد يمكن ان يتفاعل مع جذر واحد فقط، ولذا يجب توفر أكبر عدد من مصادر مضادات الاكسدة حيث يملك الجسم نظامين من هذه الأخيرة لتسمح بتعديل انتاج الجذور الحرة والحد من اخطارها.

3 مضادات الاكسدة:

تنقسم مضادات الاكسدة الى ثلاث انواع:

1.3 مضادات اكسدة طبيعية (انزيمية، غير انزيمية).

2.3 مضادات اكسدة معدنية.

3.3 مضادات اكسدة اصطناعية.

1.3 مضادات اكسدة طبيعية (انزيمية وغير انزيمية):

- ✓ **مضادات اكسدة انزيمية:**

إن العضوية مجهزة بمجموعة أنظمة دفاعية فعالة للغاية ويطلق مصطلح مضادات الأكسدة على كل المركبات التي تتواجد بتركيز ضعيف مقارنة بالمادة المؤكسدة، والتي تعمل على تأخير أو الوقاية من أكسدة هذه الأخيرة[30].

مضادات الاكسدة الانزيمية قادرة على القضاء على الجذور الحرة الاولية بشكل دائم وفعال، عن طريق تحويل °OHو H_2O_2 الى منتجات غير سامه: ماء واكسجين جزيئي.

مضادات الاكسدة الانزيمية هي اساسا ثلاثة انزيمات :(Superoxyde dismutase (SOD، la catalase(CAT) و les peroxydases(GPx).

- **:Superoxyde dismutase(SOD)**

يعتبر انزيم SOD من الانزيمات التي تدخل في تحليل نواتج السامة للميتابوليزم الخلوي ، فهو يقوم بإزالة الجذر $O_2^{-\circ}$ وذالك بتسريع تحوله الى H_2O_2 بمساعدة بعض المعادن مثل السيلينيوم ،الزنك و النحاس وذالك حسب المعادلة التالية [31]:

$$2H^+ + O_2^{-\circ} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

- **:Catalase (CAT)**

يحلل هذا الانزيم جزئيين من بيروكسيد الهيدروجين الى جزيء واحد من الاكسيجين وجزيئيين من الماء تبعا للمعادة التالية:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

- **Glutathion peroxydase (GPx):**

يعتبر من أهم مضادات الاكسدة الانزيمية وذلك راجع الى قدرته على ازالة عدد من الجذور الحرة والهيدروبيروكسيدات الناتجة من اكسدة الكولسترول والاحماض الدهنية، حيث يعمل بالتعاون مع الغوتاثيون على تحفيز تحويل بيروكسيد الهيدروجين او البيروكسيدات العضوية الى ماء وكحول حسب التفاعلين التاليين وهذا حسب الابحاث :

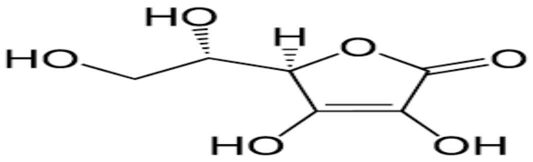
$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} 2H_2O + GSSG$$

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} ROH + H_2O + GSSG$$

✓ **مضادات الاكسدة غير الانزيمية:**

- **حمض الاسكوربيك اوفيتامين C:**

وهو حمض يملك عدة خصائص الى جانب قدرته الكبيرة المضادة للتأكسد فهو مضاد للزكام و قابل للذوبان في الماء[32]، يساعد في تحفيز تفاعلات مثل تخليق الكولاجين وهو عبارة عن عنصر اساسي للتحكم في معدل استقلاب الطاقة ،وله القدرة على تعديل الجذور الحرة وتكوين النيتروز امين[33].

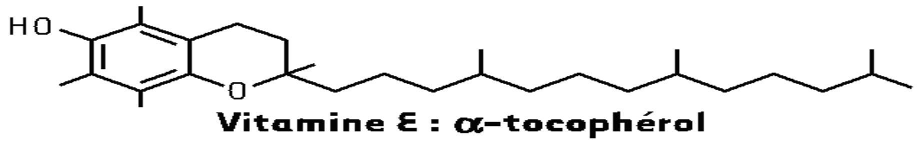


الشكل 6: بنية فيتامين C

- **فيتامين E :**

فيتامين E هو من بين اكثر مضادات الاكسدة المحبة للدهون الموجودة في جلد الانسان ،يستعمل كثيرا في مواد التجميل لما له من خصائص مضادة للتأكسد ،ويعتبر من اهم مضادات الاكسدة الذي يحمي الخلايا من التخريب

الناتج عن الجذور الحرة حيث ينتج عنه تمديد حياة الخلوية وتبطئ عملية الشيخوخة ،ويتواجد بكثرة في القمح والخضر والمواد الدسمة[34] .



الشكل 7: الصيغة الكيميائية لفيتامين E

- **بيتا كاروتانβ-carotene :**

الذي يملك تسع روابط مضاعفة و متفرقة فله امكانية تحفيز الوظيفة المناعية في الجسم ، وذالك بتثبيط عمل الجذور الحرة وهذا بتعطيل عملية الاكسدة الضوئية [35].

2.3 مضادات اكسدة معدنية :

تضم الحديد ،الزنك و السيلينيوم حيث يكمن دور هذه المعادن كعوامل مساعدة اومرافقة لأنزيمات المضادة للتأكسد[36].

3.3 مضادات الاكسدة الاصطناعية:

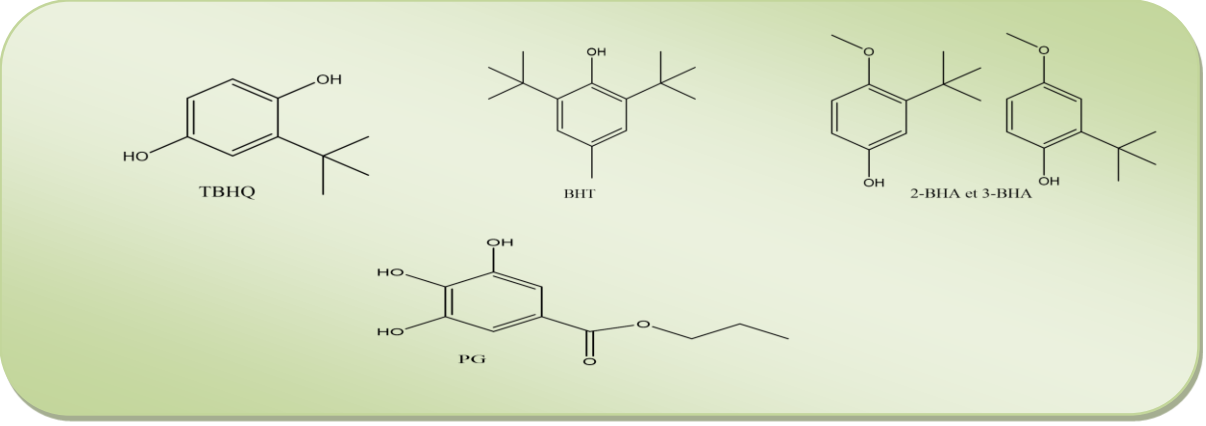
تحمل مضادات الاكسدة مكانة هامة كمضافات غذائية نظرا لدورها العالي ، حيث ازداد الاهتمام بها لأنها تملك قدرة علاجية وقائية تدخل في صناعة الغذاء والادوية ومستحضرات التجميل ،وتوجد اربع مضادات اكسدة اصطناعية المستخدمة بكثرة في الاطعمة هي [37]:

-Buthyl hydroxyl anisole le (BHA)

-Buthyl hydroxyl toluéne(BHT)

-Tert-Buthyl hydroquinone(TBHQ)

-Propyl Gallate(PG)



الشكل 8:الصيغ الكيميائية لمضادات الاكسدة الاصطناعية

4 الامراض البشرية المتعلقة بالإجهاد التأكسدي:

الاجهاد التأكسدي يشبه ظاهرة الالتهاب ، والذي يتعلق بالأنواع الجذرية المختلفة وهو ظاهرة مرتبطة بالعديد من الأمراض الخطيرة كمرض الزهيمر، مرض القلب والاوعية الدموية،مرض السكري ومرض السرطان وغيرها من التشوهات الوراثية وهذا من خلال تكوين جزيئات بيولوجية كيميائية غير طبيعية [38].

الفصل التطبيقي

الأجهزة والطرق

1المادة النباتية:

نستعمل في هذه الدراسة مسحوق نبات *Ruta graveolens*، والتي تم جمعها من ولاية جيجل من طرف الاستاذ المشرف.

- **التجفيف:**

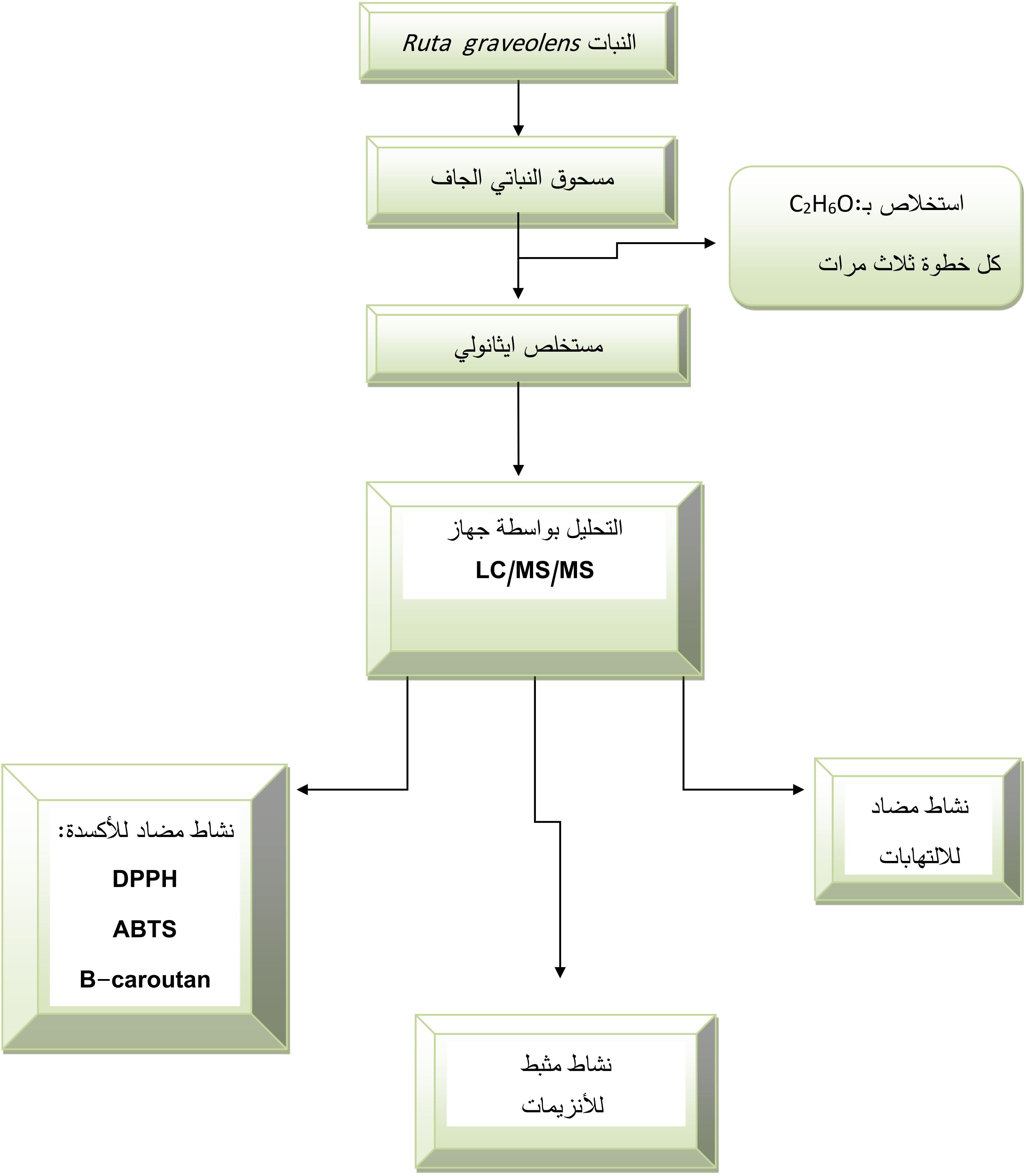
بعد قطف النبات يتم التجفيف في مكان خال من الرطوبة وبعيد عن الشمس.

- **الطحن:**

تم طحن النبتة يدويا ويحتفظ بها في مكان محكم الاغلاق وخال من الرطوبة الى حين استعمالها.

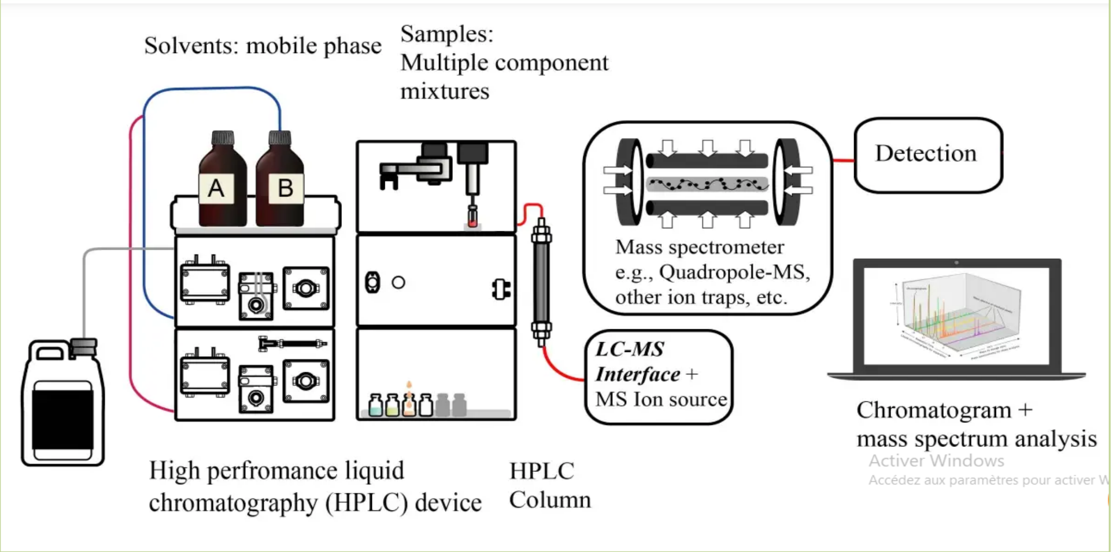
- **تحضير المستخلص:**

تم الاستخلاص باستخدام طريقة النقع. حيث يعرض المسحوق الجاف للاستخلاص متسلسل باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة. تم نقع 50 غرام من مسحوق *Ruta graveolens* في 350 مل لتر من الايثانول عند درجة حرارة الغرفة لمدة 48 ساعة مع الرج المستمر. ثم تمت إزالة الراشح واستخلاص الراسب المتبقي من المسحوق بالتتابع باستخدام الايثانول. تم 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 الايثانول (ETOH).



الشكل 9: مخطط العمل

2.دراسة عامة لجهاز LC/MS/MS[39]:



الشكل 10: مكونات جهاز LC/MS/MS

يعتبر جهاز LCMS/MS او كروماتوغرافيا السائل المدمجة مع جهاز مطيافيه الكتلة طريقه لفصل وتحديد المواد والبنى الكيميائية الموجودة في الخلائط بدقة عالية، هذه الطريقة مفيدة في دراسة انواع مختلفة المواد الكيميائية الموجودة في البيئة، الغذاء والطب. يتم استخدامه في العديد من الصناعات بما في ذلك التكنولوجيا الحيوية، مستحضرات التجميل وتجهيز الأغذية[40, 41].

يعمل نظام LCMS/MS على نقل المكونات المنفصلة بكفاءة من عمود الكروماتوغرافيا السائلة الى مصدر الايونات وهذا عن طريق واجهة البينية[41, 42].الطور المتحرك في نظام LCهو عبارة عن سائل مضغوط اما جهاز MS يعتمد عادة على الضغط العالي (حوالي 10^{-6} / 10^{-7} تور) وبالتالي فانه ليس من الممكن ضخ مباشره المادة المدمصة والوسط الحامل من العمود الكروماتوغرافي الى مصدر ايونات مطيافيه الكتلة. اما من الناحية الميكانيكية فتعتبر هذه الواجهة ابسط جزء في الجهاز التي تقوم بنقل أكبر قدر ممكن من المادة المدمصة ومن أهم الشروط التي يجب توافرها في الواجهة ألا يتداخل عملها مع كفاءة التأين وظروف الفراغ لنظام مطيافية الكتلة.

اما الان تعتمد معظم واجهات جهاز LCMS/MS على استراتيجية تأين الضغط الجوي API مثل التأين بالترديد الالكتروني EI ،التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي APCI. [43] تعمل كوماتوغرافيا السائلة على الفصل المادي لمكونات السوائل ويتم فيها توزيع مكونات السائل بين الطور الثابت والطور المتحرك.

تقسم كروماتوغرافيا السائلة لخمسه فئات:

- الاستشراب الانجذابي
- استشراب التبادل الايوني
- استشراب الاستبعاد الحجمي
- استشراب الادمصاص
- استشراب تقاسمي

وأكثر الانواع شيوعا وهو وضع الطور العكسي RPلفئة الاستشراب التقاسمي. يستعمل طور ثابت غير قطبي Ps وطور ثاني متحركPm.

Ps : عبارة عن مجموعة الكيل طويل السلسلة مثل:C_{18}،n-octadecyl تربط بسطح جزيئات السيليكا وقطرها 5 ميكرون بشكل غير منتظم كروي[41].

Pm : مكون من الماء مع مذيبات اخرى مثل :methanol،alcool isopropylique،acetonitrile .

في الأغلبية يتم حقن 20 ميكرو لتر من العين داخل جهاز LC، تنقل هذه العينة بواسطة الطور المتحرك والذي تضخه مضخة ذو ضغط عالي[44]. يتم فصل مكونات العين عن طريق الألفة التي بينها وبين الطور المتحرك Pmوالطور الثابتPs، ثم يحدث انفصال بعد تكرار الامتصاص و الامتزاز اي تحدث عند تفاعل السائل مع الطور الثابت Pm[43]بعدها يتم ضخ الطور المتحرك تحت ضغط عالي400 بار في عمود معبأ يحتوي على

الطور الثابتPs ، تتدفق مكونات العينة في العمود بأوقات مختلفة وهذا راجع الى التقاسم بين الطور الثابت والطور المتحرك. يعتبر عمود الفصل هو العنصر الاكثر اهميه في جهاز LC، وهو مخصص لتحمل الضغوط العالية للسوائل، يبلغ طول العمود (100–300 ملم) أما قطره الخارجي يصل الى (6.4 مليمتر) اما عن قطره الداخلي (3–4.6 ملي متر). يمكن ان يكون طول العمود أقصر (30–50 مليمتر) وذو جزيئات تعبئه قطرها (3–5 ميكرون) [43]. من اجل تحسين كفاءة الفصل نستطيع استخدامUPLC بدلا منHPLC والذي يعتمد على اعمده معبأة بجزيئات أصغر من السيليكا وتتطلب ضغط اعلى وذلك في حدود (310.000 الى775.000 تور) [41].

مطيافية الكتلة MS:

هي تقنيه تحليليه لفصل مكونات العينة طبقا لكتلتها وشحنتها الكهربائية. وبالرغم من وجود انواع كثيرة من مطيافية الكتلة إلا ان جميعها تستخدم المجالات الكهربائية او المغناطيسية لدراسة حركة الايونات الناتجة من المادة المستهدفة بالتحليل وتحديد الكتلة الى الشحنةm/z لها[45]، ومن مكونات الأساسية لمطيافيه الكتلة هي:

- مصدر الأيونات يتم فيه تأين جزيئات العينة الداخلة للجهاز بواسطة الأشعة المهبطي، الأشعة فوق البنفسجية، حزم اشعه الليزر.
- محلل الكتلة
- الكاشف
- انظمه البيانات
- نظام تفريغ الضغط

يقوم مصدر الايونات بتحويل الايونات الناتجة من العينة من الحالة السائلة الى الغازية وهذا في حاله التأين بالإرذاذ الالكتروني. حيث يقوم مصدر الايونات بتحويل وشطر الجزيئات المتعادلة الداخلة في العينة الى ايونات غازيه الطور ثم يتم ارسالها الى محلل الكتلة.

يعمل المكشاف على تضخيم وقياس التيارات الأيونية لحساب وفره كل أيون اما عن الطيف الكتلي فيمكن مشاهدته بالعين المجردة، ثم تقوم انظمه البيانات بتسجيل هذه الاطياف ومعالجتها وعرضها على اجهزه الكمبيوتر[41].

يستخدم الطيف الكتلي لتحديد كتله المادة المطلوب تحليلها ،تحليل نظائرها، التركيب الكيميائي لعناصرها[41].

ليتم قياس الطيف الكتلي يجب ان تكون التجربة في الحالة الغازية وفي حيزي مفرغ تحت ضغط $1.33 * 10^{-2}$ إلى $1.33*10^{-6}$ باسكال) ،لذلك فإن تطوير الأجهزة التي تُسهل نقل العينات من مرحلة الضغط العالي والحالة المكثفة (الصلبة أو السائلة) إلى نظام الفراغ تحت الضغط أمراً ضرورياً لتطوير مقياس طيف الكتلة كأداة فعالة لتحديد وتقدير المركبات العضوية والببتيدات [46]،يُستخدم مقياس طيف الكتلة حالياً في المختبرات التحليلية التي تدرس الخصائص الفيزيائية أو الكيميائية أو البيولوجية لمجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات[47].

3 المسح الكيميائي:

هو عبارة عن تقنية تحليلية فيزيوكيميائية تعتمد أساسا على جهاز LC/MS/MS ،حيث يتم تحضير العينة أولا كالتالي:

نأخذ كمية من المستخلص مابين 5الى20 ملغ نذيبه في 1مل من الإثانول (ثلاثة عينات) ثم نحقن كل1مل في جهاز LC/MS/MS.

نتحصل بعدها على ثلاثة كروماتوغرافي،تحلل بعدها في النتائج .

4.الدراسة البيولوجية:

1.4 إجمالي محتوى الفلافونويد (TFC):

تعتمد جرعة الفلافونويد في المستخلصات على تكوين مركب بين Al^{+3} و الفلافونويد . تم استخدام طريقة [48]

- **طريقة العمل:**

للحصول على 1 مول من أسيتات البوتاسيوم (CH_3COOK) ، قمنا بإذابة 9.80 غرام منه في 100مل من الماء المقطر للحصول على محلول(S_1).

بالنسبة إلى 10٪ من نترات الألمونيوم ($Al(NO_3)_3, 9H_2O$) نزن 10غرام من هذا المنتج ونذيبه في 100مل من الماء المقطر.

تحضير المستخلصات النباتية:

يتم إذابة كتلة مقدارها 1ملغ من المستخلص في حجم 1مل من الايثانول للحصول على محلول (S_2).

نأخذ 130ميكرولتر ETOH+10 ميكرولتر S_2 +10ميكرولتر ($Al(NO_3)_3, 9H_2O$)،ننتضر 40 دقيقة ،نقرأ الامتصاصية عند 415 نانومتر ،من اجل المحلول الشاهد يحضر بإستبدال الكواشف بإيثانول (50ميكرولتر من المستخلص+150ميكرولتر إيثانول).

تحضر مجموعة كيريستين القياسية بأخذ 1ملغ من الكيريستين ونذيبه في 5 مل من الإيثانول للحصول على 0.2 ملغ/مل نتحصل بذالك على محلول S_M.نقوم بتحضير 8 مخففات كيريستين في eppendorfs،ينقل 50ميكرولتر من كل مخفف الى صفيحة ميكروسكوبية +10ميكرولتر من S_1 +10ميكرولتر من ($Al(NO_3)_3, 9H_2O$)، ننتظر 40 دقيقة ،نقرأ الامتصاصية عند 415 نانومتر.[48]

2.4 إجمالي محتوى الفينول (TPC):

يتم تحديد إجمالي محتوى البوليفينول باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu[49] وفقًا لطريقة فحص الصفيحة الدقيقة التي وصفها[50].

- **طريقة العمل:**

تحضير كربونات الصوديوم Na_2CO_3 بنسبه 7.5%:

نقوم بإذابة 7.5 غرام من Na_2CO_3 في 100 مل من الماء المقطر

تحضير المستخلصات النباتية:

نقوم بإذابة 1 ملغ من المستخلص في حجم 1 مل من الماء المقطر او الايثانول

تحضير FCR مخفف 10 مرات:

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

نأخذ 20 ميكرولتر من المستخلص النباتي+100 FCR ميكرولتر مخفف+75 ميكرولتر من Na_2CO_3 7.5%، نضع الخليط في الظلام لمده ساعتين ثم نقرا الامتصاصية عند 765 نانومتر.

نقوم بتحضير المحلول للشاهد بنفس الطريقة السابقة مع استبدال المستخلص بالمذيب المستخدم الايثانول.

تحضير 8 محاليل قياسيه لحمض الغاليك:

نأخذ 0.5 ملغ من حمض الغاليك نذيبه في 5 مل من الايثانول لنتحصل على S_1 0.2 ملغ/ مل، نخفف هذه المحاليل ونضعها في eppendorfs ثم ننقل 20 ميكرولتر من محلول المخفف الى الصفيحة الميكروسكوبية +100 ميكرولتر FCR+75 ميكرولتر Na_2CO_3 تحضن لمده ساعتين ثم نقرا الامتصاصية عند 765 نانومتر.

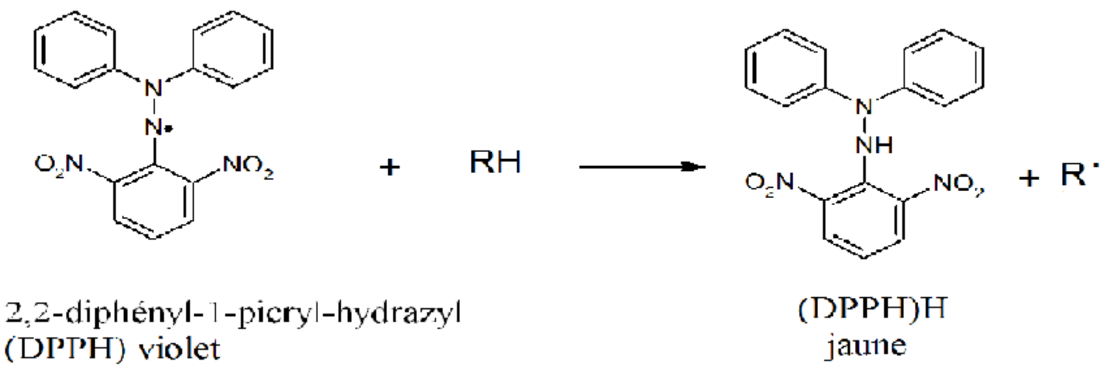
5 طرق المخبرية والوسائل المستعملة في تقدير نشاط مضاد للأكسدة:

تمكن الاهمية الفعالية المضادة للأكسدة في قياس قدرة المستخلص في تثبيط الجذور الحرة او توقيف عملية الأكسدة

وتوجد هناك عدة اختبارات لمعرفة نشاط مضادات الاكسدة:

1.5 اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH:

يعتبر المركب الكيميائي 2-2 'diphenyl-1-picrylhydrazyle اول جذر حر يستخدم لدراسة العلاقة بين البنية والنشاط المضاد للأكسدة للمركبات الفينولية. تعتمد هذه الطريقة على تغير لون الجذر الحر DPPH من اللون البنفسجي الى اللون الاصفر بعد ان يحدث له ارجاع بواسطة مركبات مضادة للأكسدة الى DPPH-H حسب الشكل التالي:



الشكل 11:معادلة تثبيط الجذر الحر DPPH في وجود مضاد للجذور الحرة

يتم تحديد النشاط المضاد للجذور الحرة عن طريق قياس الطيف الضوئي وعن طريق قياسDPPH [51]، وتستخدم α- tocopherol و BHT و BHA كمضادات أكسدة قياسية.

- **طريقة العمل:**

نقوم بتحضير عدة تراكيز مختلفة من المستخلص النباتي المراد اختباره، نقوم بإذابة 6ملغ من DPPH بحجم 100مل من الميثانول، يتم تخزينه عند20 °C- بعيدًا عن الضوء .تمت قراءة الامتصاصية عند طول

موجة 517 نانومتر في مقياس الطيف الضوئي وذلك بعد 30د ،تم استخدام BHA، BHTكمضادات اكسدة قياسية .تم حساب معدل التثبيط بالعلاقة التالية :

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

حيث:

I: النسبة المئوية للتثبيط ، Ac As: امتصاصية لعينة التحكم وعينة بعد 30د .

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

2.5 اختبار ازاحة جذر ABTS:

نستعمل هذا الاختبار لقياس قدرة المركبات المضادة للأكسدة على ازاحة جذر

$ABTS^{\cdot+}$(2,2–azinobis3–ethylbenzothiazoline–6–sulfonate) حيث يتأكسد جزى ABTS عديم اللون الى جذر كاتيوني $ABTS^{+}$ ازرق مخضر عند طول الموجة 734 نانومتر ،حيث تستخدم هذه الطريقة للمواد المضادة للأكسدة التي تذوب في الماء. يتم تحديد نشاط ABTS بواسطة طريقة[52].

- **طريقة العمل :**

يتم تحضير اولا ABTS(19.2ملغ) ذو 7ملمول مع 2.45 ل/ملمول من $K_2S_2O_8$ ويتم خلط المنتجين في محلول مائي وحمايتهما من الضوء وتخزينهم لمدة 12–16 ساعة. يتم ضبط امتصاص المحلول الناتج عن طريق (الإيثانول أو H_2O) إلى 0.700 ± 0.020 عند 734 نانومتر قبل الاستخدام.

نبدأ التفاعل بمزج 160 ميكرولتر من ABTS مع 40 ميكرولتر من المستخلص النباتي المراد دراسته ننتظر 10 دقائق ثم نقيس الامتصاصية عند 734 نانومتر.

3.5 نشاط Phenanthroline:

يتم تحديد نشاط phenanthroline بواسطة طريقةSzydlowska-Czerniaka (2008) [53].

- **طريقة العمل:**

تحضير Phenanthroline (0.5٪):

0.05 غ من Phenanthroline في 10 مل من ETOH.

تحضير كلوريد الحديديك $FeCl_3$ (0.2٪):

0.02 غ $FeCl_3$ في 10 مل من H_2O.

نحضر 10 ميكرولتر من المستخلص +50 ميكرولتر من $FeCl_3$ (0.2%) +30 ميكرولتر من Phenanthroline (0.5%) + 110 ميكرولتر من الميثانول ، تحضن في الضلام لمدة 20 د عند 30 درجة مئوية وتقرأ الإمتصاصية عند 510 نانومتر. يستخدم BHT و BHA كمركبات مرجعية.

4.5 محتويات β–Carotene والليكوبين:

يتم تحديد محتوى **β–Carotene** والليكوبين بطريقة[54].تعتمد الطريقة على حساب امتصاص المستخلص الايثانولي المذاب في خليط الأسيتون – الهكسان عندA453.453، A505.505،A663.663 نانومتر.

يتم حساب المحتوى الكلي **B–carotene** والليكوبين بالمعادلة التالية:

$$\text{Lycopene (mg/100 mL)} = -0.0458 \times A663 + 0.372 \times A505 - 0.0806 \times A453$$

$$\beta\text{–Carotene (mg/100 mL)} = 0.216 \times A663 - 0.304 \times A505 + 0.452 \times A453$$

5.5 نشاط مضاد للالتهابات:

الالتهاب هو مجموعة من ردود الفعل التي يولدها الجسم ردا على هجوم ما تعرض له ،او من داخل الجسم نفسه كما هو الحال في امراض المناعة الذاتية ،تتم التفاعلات الالتهابية لغرض وحيد وهو الدفاع عن الجسم.

يتم تحديد نشاط مضاد للالتهاب في المختبر بواسطة [55]مع تعديلات طفيفة.يتمثل المبدأ في تثبيط BSA الناجم عن الحرارة 72 درجة مئوية بواسطة المستخلصات.

✓ **طريقة العمل:**

- **التحضير:**

تحضير(Tris-HCl 0.05M(PH=6.6 :

يذاب 1.2144غ في 200 مل من الماء المقطر . ثم يتم تعديل الاس الهيدروجيني الى 6.6 مع HCl.

تحضير المستخلصات:

يتم تحضير تركيزات مختلفة من المستخلصات النباتية من محلول مخزون يبلغ ppm10000.

التحضير القياسي :

يتم تحضير تراكيز مختلفة من ديكلوفيناك الصوديوم(شكل قابل للحقن) في الماء المقطر من محلول مخزون ppm 500 .

تحضير الشواهد:

لكل تركيز من المستخلصات النباتية ، يتم تحضير مستخلص فارغ فيه 1 مل من المستخلص الى1مل من Tris-HCl (الغرض من هذا الفراغ هو طرح امتصاص المستخلص من النتائج التي تم الحصول عليها).

المحلول الشاهد لـ BSA يحتوي على 1 مل من محلول BSA مضافا الى 1 مل من المذيب المستعمل في المستخلصات (النتيجة المتحصل عليها يتم الحصول عليها تقابل الافساد الكلي لـBSA في حالة عدم وجود مادة مثبطة).

تحضير محلول 0.2% BSA :

يتم اذابة 0.2 غ من BSA في 100 مل من محلول Tris-HCl.

- **التطبيق:**

نأخذ1 مل من كل تركيز من المستخلص اومن الشواهد +1مل من 0.2 % من محلول BSA المحضر في

(Tris-HCl 0.05mol(PH=6.6 تحضن عند 37 درجة مئوية لمدة 15د .ثم في حمام مائي عند72 درجة مئوية لمدة 5د.بعد التبريد يتم قياس المطيافية عند660 nm في قياس مطيافية الضوئية.

6.4 نشاط مثبط للانزيم:

مثبطات الانزيم هي مركبات تعمل على تعديل الخصائص التحفيزية للانزيم، وبالتالي تبطىء معدل التفاعل او في بعض الحالات توقيف التحفيز.

مثبط نشاط α -glucosidase:

تم اجراء اختبار a-glucosidase وفقا للطريقة الموصوفة في [56] ،مع اجراء بعض التعديلات الطفيفة تم تحديد تركيز العينة القادرة على تثبيط 50% IC_{50} وقورنت بالنتائج المعيار التجاري acarbose.

✓ **طريقة العمل:**

- **محلول إنزيمي:**

في أنبوب eppendorf خفف 9.8مل من محلول الفوسفات 100 مولاري Ph=6.9. ثم وضع 50ميكرولتر في كل صفيحة + 100 ميكرولتر من المحلول الإنزيمي + 50 ميكرولتر من محلول الركيزة.توضع في الحاضنة لمدة 10د عند 37درجة مئوية. تتم القراءة بواسطة مقياس الطيف الضوئي عند 405 نانومتر عند 37 درجة مئوية ، لكل 10د لمدة 30د (0د ،10د، 20د، 30د).

$$I\% = \frac{(Aextrait - Ablanc)}{Acontrol} * 100$$

Control: الانزيم+الركيزة+مذيب المستخلص.

Blanc: الركيزة +المستخلص+عازلةالانزيم.

مثبط نشاط α −amylase:

تم اجراء مقياسية تثبيط α −amylase وفقا للطريقة الموصوفة في المرجع [57, 58]، مع تعديلات طفيفة .ثم تحديد تركيز العينة القادرة على التثبيط ل 50% IC_{50} .

✓ **طريقة العمل:**

- **التحضير:**

محلول α −amylase1U :

1 مل من الانزيم α −amylase +محلول 9مل من كلوريد الصوديوم(6 PH=6.9 مولاري)

1%محلول نشاء :

0.1غ من النشاء +100مل ماء(يسخن بالميكرويف) +التقليب حتى الحصول على محلول متجانس.

1 مول (HCl) :

45.83 مل ماء+4.17 مل حمض الهيدروكلوريك النقي .

:IKI

3غ KI+100 مل ماء +0.125 غ ثنائي اليود . عازل الفوسفات،(pH=6.9مولاري من كلوريد الصوديوم).

3.5 ملغ كلوريد الصوديوم +100 مل عازل (pH=6.9).

- **التطبيق :**

25 ميكرولتر من المستخلص+ 50ميكرولتر من solution α −amylase 1U يترك في حاضنة لمدة 10 د عند درجة حرارة 37درجة مئوية +50 ميكرولتر +0.1 % نشاء ويترك في حاضنة لمدة 10 د تحت درجة حرارة 37 درجة مئوية +25 ميكرولتر من حمض هيدروكلوريك 100+ HCl 1molميكرولتر من IKI ثم القراءة عند 630 نانومتر ويستخدم acarbose كمعيار .

ثم حساب نسبة المئوية للمثبط بالعلاقة التالية :

$$I\% = \frac{(\text{Aextrait} - \text{Ablanc})}{((\text{IKI} + \text{amidon}) - \text{Acontrol})} * 100$$

Control:مذيب المستخلص+الانزيم+نشاء+HCl+IKI.

Blanc:مذيب المستخلص+HCl+IKI.

مناقشة النتائج

1 تقدير محتوى المركبات النشطة بيولوجيا:

تعد المركبات الفينولية واحدة من المجموعات الرئيسية للمركبات النباتية ذات الخواص المضادة للأكسدة بالإضافة الى عدة خواص بيولوجية اخرى. لذلك كان من الضروري تحديد اجمالي كميات الفينولات و الفلافونويدات في المستخلص الإيثانولي للنبات قيد الدراسة حيث تمت في هذه الدراسة تقدير المحتوى الاجمالي للمركبات البيولوجية النشطة بعد استخلاصها وتطبيق اختبارات التلوين الخاصة بكل صنف، و تم تقدير المحتوى الاجمالي للمركبات الفينولية(TPC) للمستخلص الإيثانولي لنبات *Ruta graveolens* بطريقة Folin.ciacalten بينما تم تحديد المحتوى الكلي للفلافونويد بطريقه كلوريد الالمنيوم($AlCl_3$). تم إجراء توصيف المركبات الفينولية الموجودة في مستخلص الايثانول Ruta G بواسطة تحليل LC/MS/MS.

الجدول 9: المركبات الكيميائية (الناتجة من LC/MS/MS)

Peak	RT	MOLECULES	M-H
1	7.61	UNK	189
2	8.01	5 -0- Caffeoylquinic acid	353
3	8.79	Caffeic acid	179
4	11.46	Rutin	609
5	12.03	Quercetin - glycoside	463
6	12.92	1.5- DIcaffeoylquinic acid	515
7	13.59	4.5- DIcaffeoylquinic acid	515
8	13.81	Rosemarinic acid	359
9	15.99	Luteolin	285
10	16.07	Quercetin	301
11	20.10	UNK	853

تم تقدير مركبات TPC وTFC بالاعتماد على المعادلات التي تم الحصول عليها من المنحنيات القياسية لحمض الغاليك(gallic acid)والكريستين(Quercetin) على التوالي.

قدر المحتوى الاجمالي في هذه النبتة للمركبات الفينولية(TPC) بـ98.71 ± 1.32 mg GAE/g(extr)

بينما قدر المحتوى الاجمالي للفلافونويد بـ69.89 ± 0.90 mg GAE/g(extr) تختلف هذه النتائج عن نتائج الدراسات السابقة تراوحت فيها نسبTPC بين37%و41.63% ونسبTFC بين0.4%و13.97%.

يمكن ان تفسر الفروق المسجلة بين النتائج السابقة ونتائج الدراسة الحالية باختلاف الموقع الجغرافي للنبتة، حيث انه من المعروف جدا ان العوامل البيئية مثل المناخ، الارتفاع وخصائص التربة لها تأثير كبير على محتوى النباتات من حيث المركبات البيولوجية.

كما يمكن لاستخدام المذيبات المختلفة في الاستخلاص الى تباين كبير في تركيبة النباتات من حيث الكمية والنوعية، وإذ يعتمد استخراج الجزيئات النشطة بيولوجيا على قطبية المذيب.

2 تقييم القدرة المضادة للأكسدة:

أصبح تأثير الجذور الحرة على جسم الانسان هدفا للبحث العلمي المكثف، حيث ان للجذور الحرة دور مهما في الإصابة بعدة امراض خطيرة، مثل الاضطرابات التنفسية والعصبية كالزهيمر بإضافة لمختلف أنواع السرطانات، تلف الكبد، مرض السكري وامراض الشرين.

كما اثبت العلم الحديث ان مضادات الأكسدة هي مواد تأخر او تمنع أكسدة الدهون والجزئيات الأخرة عن طريق تثبيط بدء او حتى انتشار سلسلة تفاعل أكسدة (peroxidation chain reaction)بإضافة لذلك تقوم مضادات الأكسدة بإصلاح التلف الذي تسببه الجذور الحرة ROS في الجسم.

ومن المعلوم ان المركبات الفينولية مثل الفلافونويدات والأحماض الفينولية لها أهمية خاصة كمضادات الاكسدة لأنها تعمل على تحديد أنواع الأوكسيجنية التفاعلية ROS بإضافة الى قدرتها على تحديد ايونات الحديد التي تلعب دورا خطيرا في أكسدة الدهون (Lipid peroxidation).

تستعمل مضادات الأكسدة الاصطناعية على نطاق واسع في الصناعات الغذائية والصيدلانية نظرا لفعليتها وتكلفتها المنخفضة، رغم ذلك يعتبر الاستعمال المفرط لهذه المواد خطرا جدا، بسبب سميتها وتسببها في مختلف الأورام السرطانية لذلك لطالما كان البحث عن مركبات طبيعية مستخلصة من النباتات بديلا لمضادات الاكسدة الاصطناعية محل الاهتمام لدا الباحثين والعلماء منذ فترة طويلة في هذا المجال وهو ما يندرج ضمنه عملنا هذا.

حيث تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة للمستخلص الإيثانولي لنبات *Ruta graveolens*. وقد تمكنا من دراسة كل من DPPH، ABTS، B-carotene، phenanthroline وطبعا قمنا بقياس مقدار الفينولينات والفلافونويدات وقد استعملنا كل من حمض الأسكوربيك و BHA كمركبات مرجعية .

ولقد لجأنا لعدة اختبارات بسبب الاستجابة المتغيرة التي تمارسها مضادات الأكسدة في انظمة الاختبارات المختلفة، وهذا بهدف الحصول على معلومات واسعة حول الية عمل المواد المضادة للأكسدة في المستخلص المراد دراسته. وقد تم عرض مختلف النتائج المتحصل عليها على شكل قيم IC_{50} من خلال الجدول 10 و11 .

الجدول 10: نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط ABTS

Extracts	% Inhibition in ABTS assay							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC_{50} µg/mL
EtOH extrait	16,48±1,01	22,01±0,88	32,10±0,61	51,98±1,01	61,09±1,27	73,97±1,01	76,81±0,94	15,99±1,09
BHT	59.22±0.59	78.55±3.43	90.36±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 11: نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسة تثبيط DPPH

Extracts	% Inhibition in DPPH assay							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC_{50} µg/mL
EtOH extrait	1,49±1,41	5,46±1,00	8,11±0,43	21,80±1,02	39,25±0,26	51,93±1,22	58,02±0,91	44,72±1,42
BHT	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
BHA	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

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول 10و11 ان المستخلص الايثانولي لنبات *Ruta graveolens* يمتلك تأثير في تثبيط جذور ABTS،DPPH بقيم IC_{50} مساوية لـ 44.72 و15.99 ميكروغرام/مل على التوالي وهو ما يعادل حوالي 9 مرات و 15 مرة على التوالي عند استعمال BHT كمركب معياري وعند استعمال BHA كمركب معياري وجدنا ما يعادل حوالي 8مرات و 9 مرات على التوالي .

الجدول 12: نشاط مضادات الأكسدة عن طريق مقايسةphenanthroline

Extracts	% Inhibition in β-carotene assay							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC_{50} µg/mL
EtOH extrait	13,07±0,80	40,79±1,03	42,90±1,34	46,11±0,40	67,89±1,94	71,02±1,16	75,90±1,22	19,39±0.57
BHT	81.14±0.84	86.0.9±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

لوحظت هذه القدرة العالية ايضا كمضادات للأكسدة لمستخلص *Ruta graveolens* عند تحليل نتائج اختبار phenanthroline، حيث اظهر هذا المستخلص قيم $A_{0.5}$ المساوية لـ 13.72 ميكروغرام/مل والتي تعادل15 مرة تلك المتحصل عليها عند استعمالBHA كمركب معياري و6 مرات تلك المتحصل عليها عند استعمالBHT كمركب معياري الجدول 12.

الجدول 13: نشاط مضادات الأكسدة بمقايسة β–Carotene

Extracts	Absorbances in phenanthroline assay							
	3.125 µg	**6.25 µg**	**12.5 µg**	**25 µg**	**50 µg**	**100µg**	**200µg**	**$A_{0.5}$ µg/mL**
EtOH extrait	0,14±0,01	0,28±0,88	0,39±0,19	0,52±0,76	0,59±0,81	1,11±0,29	2,38±1,05	13,72±1,71
	0.78125	**1.5625**	**3.125 µg**	**6.25 µg**	**12.5 µg**	**25 µg**	**50 µg**	**$A_{0.5}$ µg/mL**
BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
BHT	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17

من ناحية اخرى كانت القدرة المختزلة للمستخلص الاثانولي لـ *Ruta graveolens* اقل بحوالي 21 و18 مرة من قدره المتحصل عليها عند استعمال BHA وBHT كمركبات مرجعية على التوالي وموضحة في الجدول 13 لاختبار β–Carotene .

يمكن ربط هذا النشاط القوي المضاد للأكسدة لمستخلص *Ruta graveolens* لثرائه بـ TPCو TFC حيث يمكن ان تفسر وفرة الفلافونويدات مثلqurectine و ruten بالإضافة الى احماض هيدروكسي سيناميك لإمكانات مضادات الأكسدة الكبيرة التي اظهرها المستخلص المدروس، حيث افادت الدراسات السابقة ان هذه المركبات كلها انشطة مضادة للأكسدة جد قوية.

نتائج اختبارات تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة للمستخلص المتحصل عليه في هاته الدراسة تتفق جزئيا مع تلك المتحصل عليها في الدراسات السابقة، حيث قام كل من (S.Mohammadi et al.2013 وD. Boudaba et al 2022) بدراسة قدره المستخلص الايثانولي لـ *Ruta graveolens* على تثبيط جذريDPPH و ABTS وقد اظهرت النتائج المتحصل عليها قدرة مضادة للأكسدة التي يملكها المستخلص المدروس تعادل حوالي10 تلك المتحصل عليها عند استخدام BHA كمركب مرجعي وهو ما يتفق نوعا ما مع النتائج التي تحصلنا عليها في الدراسات الحالية وفي الاخير تجدر الإشارة الى انه لم يتم اجراء اي دراسات سابقه على النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص *Ruta graveolens* باستعمال اختبار phenanthroline و β-Carotene .

3 اختبار تثبيط انزيمي α -amylase وα -glucosidase :

يتميز داء السكري بارتفاع السكر في الدم وهو مرض مزمن غير معدي، يعاني منه العديد من الاشخاص في العالم، بسبب الأنظمة الغذائية الضارة ونظام العيش الذي يتبعه الفرد في العصر الحديث.

توجد العديد من الأدوية المستعملة للتحكم في سكر الدم مثلacarbose،miglitol و voglibose حيث تعمل هذه الأدوية على تثبيط انزيمα -amylase وα -glucosidase ومن المعلوم ان للأنزيم المذكورين دورا كبير في تفكيك السكريات المعقدة الى سكريات بسيطة يسهل امتصاصها من طرف الامعاء الدقيقة، ولذلك فان تثبيط نشاط هذين الانزيمين من بين الاليات الفعالة للتحكم في السكر الدم بعد الوجبة(postprandial glycemia) .

ينتج عن تناول المثبطات الاصطناعية لأنزيم α –glucosidase والمستعملة في التحكم في سكر الدم اثار جانبيه ضاره مثل الاسهال، انتفاخ البطن...الخ وذلك بعد البحث عن مركبات جديده ذات مصدر نباتي قادره على تثبيط هذه الانزيمات من بين أفضل الطرق الواعدة للسيطرة على مرض السكري يلجا اليها العلماء في النهاية وتعتبر البيانات الطبية قليله السمية وذات اثار جانبيه اقل عند استعمالها في التداوي من الامراض

تعد نبات*Ruta graveolens* واحده من هذه النباتات التي استعملها الانسان لعلاج مرض السكري في الطب الشعبي. في هذا السياق تمت دراسة النشاط المثبت للأنزيم α –amylase وα –glucosidase للمستخلص الإيثانول لهذه النبتة. وقد تمت نتائج الاختبارات على شكلIC_{50} ملغ/ مل او على شكل نسبه تثبيط 50%.

اظهرت النتائج ان المستخلص الايثانولي لنبته *Ruta graveolens* قدرة كبيرة على تثبيط انزيم

α –glucosidase بقيمةIC_{50} تساوي 1.57± 812 ملغ/مل. وهو ما يعادل تقريبا ثلاث مرات قيمه IC_{50} IC_{50}= 275.43± 1.59 acarbose المستعمل كمرجع.

في حين كان النشاط المثبط للأنزيم α –amylase ضعيف جدا، اذ اظهر المستخلص نسبه تثبيط جدا ضعيفة تساوي15.21% فقط عند اعلى تركيز تمت دراسته5 ملغ/مل، تتفق النتائج المتحصل عليها في هاته الدراسة مع نتائج الدراسات السابقة. حيث اثبت Melendez وزملائه2011 في دراسة سابقه على مستخلص الميثانولي لنبته

Ruta graveolens، انه قادر على تقليل تركيز السكر في الدم عند الفئران مصابه بارتفاع السكر الدم بشكل تجريبي. تدعم هذه النتائج استعمال نبته *Ruta graveolens* كوسيلة للتحكم في الدم في الطب التقليدي.

يمكن ربط نشاط مثبت للأنزيم α –glucosidase الذي يمتلكه المستخلص الإيثانولي لـ *Ruta graveolens* بثرائه بالمركبات الفينولية وخاصة مركبات الفلافونويد التي تعتبر مثبطات قويه لهذا الانزيم والتي تم الكشف عنها

بنسبه كبيره بمستخلص المدروس. يمكن ربط هذا النشاط ايضا بالتركيبة الغنية للمستخلص من حيث احماض هيدروكسي سيناميك الذي يمتلك نشاط مثبط كبير ضد انزيم α −glucosidase وهو ما اثبتته الدراسة السابقة.

خاتمة عامة

اندرج عملنا هذا تحت ما يسمى علميا فيتو كيمياء النبات ، حيث قمنا بدراسة المستخلص الإيثانولي لنبات "*Ruta graveolens*" بواسطة LC/MS/MS ، وقد تحصلنا على أهم مكونات هذا المستخلص، ثم أجرينا عده اختبارات بيولوجية كان أهمها الاختبارات المضادة للأكسدة مثل : ABTSوDPPH وغيرهما، وقد أعطى الاختبار نتائج جيدة وأثبتت أن للنبتة فعالية مضادة للأكسدة لا بأس بها. كما أجرينا اختبارات الفعالية المثبطة للإنزيم α -amylase وα -glucosidase ، من اجل التأكد من فعالية النبتة ضد داء السكري، وقد تحصلنا على نتائج مشجعة أكثر للاستمرار في دراسة هذه النبتة، ومع ذلك يمكن الإشارة إلى أن هذا العمل يعتبر بداية الطريق فقط، وننصح بالعمل أكثر على هذا الموضوع خاصتا في فصل المركبات وكذلك دراسة الفاعلية البيولوجية على الأحياء كالفئران أو الأرانب.

قائمة المراجع

المراجع الأجنبية:

.2 Bruneton, J., *Plantes toxiques et végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 3e édn.* Paris, France, Lavoisier, 2005.

.3 Kouri, F.C., *Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine: Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. Fagara zanthoxyloides L.)(Rutaceae)*. 2004, éditeur non identifié.

.4 François, C., *Dictionnaire étymologique de botanique: comprendre facilement tous les noms scientifiques*. 2000, Delachaux & Niestlé, Lausanne & Paris.

.5 Baba Aissa, F., *Les plantes médicinales en Algérie.* coédition Bouchene et ad. Diwan, Alger, 1991: p. 29.

.6 Baba Aissa, F., *Encyclopédie des plantes utiles.* Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident", Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger, 1999.

.7 Asgarpanah, J. and R. Khoshkam, *Phytochemistry and pharmacological properties of Ruta graveolens L.* J Med Plants Res, 2012. **6**(23): p.3949-3942 .

.8 Doerper, S., *Modification de la synthèse des furocoumarines chez Ruta graveolens L. par une approche de génie métabolique*. 2008, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.

.9 Malik, S., et al., *Pharmacology, and Biotechnology.* Transgenesis and secondary metabolism, 2017. **4**: p. 177.

.10 Parray, S.A., et al., *Ruta graveolens: from traditional system of medicine to modern pharmacology: an overview.* Am J Pharm Tech Res, 2012. **2**(2): p. 239-52.

.11 Kennaz, N.E.H., C. Laadouli, and N. Touba, *Activité adulticide d'huile essentielle de Ruta montana chez l'espèce Drosophila melanogaster*. 2022, Université Larbi Tébessi-Tébessa.

.12 Fredj, M.B.H., et al., *Analysis of Tunisian Ruta graveolens L. oils from Jemmel.* Journal of Food Agriculture and Environment, 2007. **5**(1 :(p. 52.

.13 Rivera, J.O., et al., *Guide for herbal product use by Mexican Americans in the largest Texas-Mexico border community.* Journal of Texas Medicine, 2006. **102**(2): p. 45-56.

.14 Defraigne, J.-O. and J. Pincemail, *Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités.* Revue médicale de Liège, 2008. **63**.

.15 Soobrattee, M.A., et al., *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions.* Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis, 2005. **579**(1-2): p. 200.213-

.16 Bankova, V., *Determining quality in propolis samples.* J Am Apither Soc, 2000. **7**(2): p. 50-55.

.18 Gueye, P.M., *Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge*. 2007, Strasbourg 1.

.19 Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases.* Antioxidants & redox signaling, 2011. **15** :(6)p. 1583-1606.

.20 Amite K. Jaiswal., N.c.a.A.P.o.F.a. and w.b.d. Vegetables.

.22 Meydani, M., *Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly.* The American journal of clinical nutrition, 2000. **71**(6): p. 1665S-1668S.

.23 YIN, M.C. and W.S. CHENG, *Oxymyoglobin and lipid oxidation in phosphatidylcholine liposomes retarded by α-tocopherol and β-carotene.* Journal of food science, 1997. **62**(6): p. 1095-109.7

.24 Roussel, A. and I. Hininger-Favier, *Éléments-trace essentiels en nutrition humaine: chrome, sélénium, zinc et fer.* Endocrinologie Nutrition, 2009. **10**.

.26 Favier, A., *Le stress oxydant.* L'actualité chimique, 2003. **108**(10): p. 863-832.

.27 BENHAMMOU, N., *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien*. 2012.

.28 Vase, K.H., et al., *Immobilization of aryl and alkynyl groups onto glassy carbon surfaces by electrochemical reduction of iodonium salts.* Langmuir, 2005. **21**(18): p. 8085-8089.

.29 Beta, T., et al., *Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions.* Cereal chemistry, 2005. **82**(4): p. 390-393.

.30 KANOUN, K., *Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de Myrtus communis L.(Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine).* 2011.

.32 Tsao, R., *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols.* Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1231-1246.

.33 Milane, H., *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques*. 2004, Strasbourg 1.

.37 Reynaud, J., *Comprendre la botanique: histoire, évolution, systématique* :2011 .Ellipses.

.40 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.

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

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

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

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

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

.46 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.

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

.49 Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.* Free radical biology and medicine, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.

.50 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.

.51 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.

.52 Lordan, S., et al., *The α-amylase and α-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts.* Food chemistry, 2013. **141**(3): p. 2170-2176.

.53 Zengin, G., et al., *A comprehensive study on phytochemical characterization of Haplophyllum myrtifolium Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes.* Industrial Crops and Products, 2014. **53**: p. 244-251.

.54 Randhir, R. and K. Shetty ,*Improved α-amylase and Helicobacter pylori inhibition by fenugreek extracts derived via solid-state bioconversion using Rhizopus oligosporus.* Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2007. **16**.(3)

.55 Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.* Biochemical pharmacology, 1961. **7**(2): p. 88-95.

المراجع العربية:

1. بلقاسم and ع.ا.ز. عمار, تأثير عوامل المناخ على أحد الأيوض الثانوية في نبات طبي *.Ruta montana L Rutaceae* .2009

.17 زيدي, et al., تقييم الفعالية البيولوجية لنبات الفيجل 2019 *.Ruta montana L*.

.21 والطباعة, ا.ا.ي.ا.ا.ا.د.ا.ل.و.

.25 بلفار and آسيا, دراسة القدرة المضادة للأكسدة وللبكتيريا وللتآكل للمستخلصات *Limoniastrum guyonianum)* *Dur.*(الفينولية لنبات. جامعة قاصدي مرباح ورقلة.

.31 خناثة, ب. and مباركة, المساهمة في دراسة مستخلصات نبتة الكلخة. جامعة قاصدي مرباح ورقلة.

.34 زمالي and جعفر, دراسة فيتوكيميائية وبيولوجية لنبتة الصحراوية *Solanum Nigrum*. 2007, Université de Ouargla-Kasdi Merbah.

.35 عمر, م.ا.هـ.ع.هـ.ع.ا., النباتات الطبية والعطرية كيمياؤها .إنتاجها وفوائدها النباتات الطبية والعطرية كيمياؤها .إنتاجها وفوائدها .2003

.36 حمزة, م., النباتات الطبية العالمية. 2006.

.38 الحازم, ح.م., المنتجات الطبيعية. 2001.

.39 https://ar.wikipedia.org/wiki. استشراب سائل مع مطيافية الكتلة. فبراير 20239.

.47 A ,Troy burning flees., الأساطير اليونانية.