وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمة لخضـــر – الوادي -
Université Elchahid Hamma Lakhdar -d'El Oued
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des sciences de la nature et de la vie
قسم البيولوجيا
Département de biologie

مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر أكاديمي

التخصص : التنوع الحيوي وفزيولوجيا النبات *Spécialité : Biodiversité et Physiologie Végétale*

الموضوع

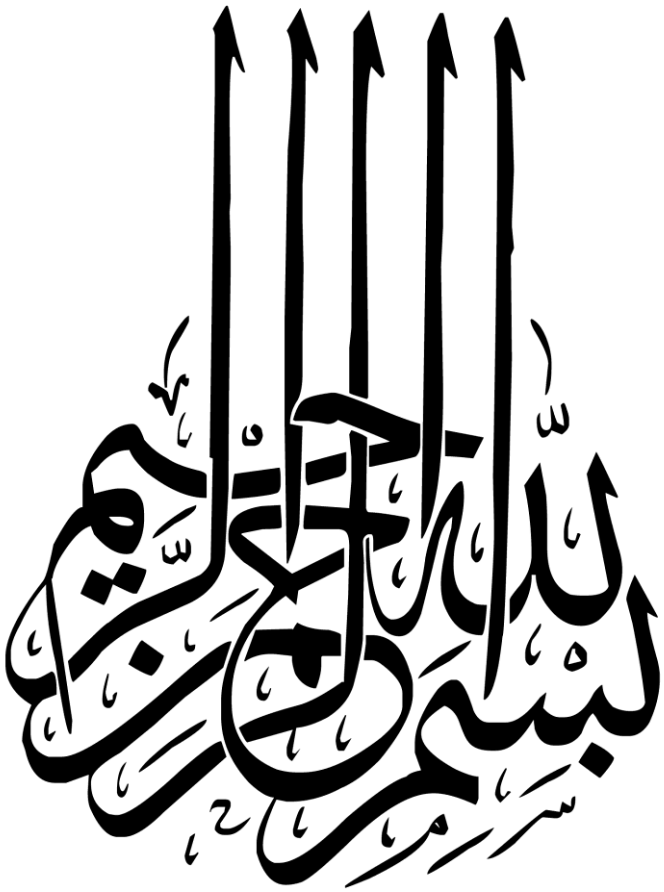
دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات نبات "القرطوفة" *Cotula cinerae*

إعداد الطالب :
أسامة عيجولي

لجنة المناقشة :

✓ أ.قادري منيرة	أستاذ مساعد "أ"	رئيسا	جامعة الوادي
✓ د.عسيلة إسماعيل	أستاذ محاضر "ب"	مناقشا	جامعة الوادي
✓ د.شمسة أحمد الخليفة	أستاذ محاضر قسم "أ"	مؤطرا	جامعة الوادي
✓ أ.حمدي عائشة	أستاذ مساعد "أ"	مساعدة مؤطر	ENS - الأغواط -

الموسم الجامعي 2018/2019


بسم الله الرحمن الرحيم

شكر وعرفان

الحمد لله على إنعامه والشكر له على توفيقه وامتنانه

نشكر الله العلي القدير فعليه توكلنا وبفضله وفقنا

عن أبي هريرة رضي الله عنه عن النبي صلى الله عليه وسلم قال:«لا يشكر الله من لا يشكر الناس» رواه الترمذي وصححه الألباني(1926)

نتقدم بالشكر الوافر والامتنان غير المنقطع للأستاذ المؤطر **د. شمسة أحمد الخليفة** وللأستاذة مساعدة المؤطر **أ . حمدي عائشة** على إشرافهما وتوجيهاتهما طوال مراحل إنجاز هذا العمل

و الشكر موصول للأساتذة أعضاء لجنة المناقشة **د.عسيلة إسماعيل** و **أ.قادري منيرة** لتشريفهم هذا العمل بالإطلاع عليه وتصحيح أخطائه مشاركة منهم في تصويبه

نتقدم بالشكر الخاص لمهندسات مخابر العلوم الطبيعية بالمدرسة العليا للأساتذة بالأغواط

وإلى كل من ساهم في إنجاز هذا العمل

وعن عبد الله بن عمر قال قال صلى الله عليه وسلم : «من صنع إليكم معروفا فكافئوه فإن لم تجدوا ما تكافئونه، فادعوا له حتى تروا أنكم قد كافأتموه » رواه أبو داوود(1672) وصححه الألباني

جزاؤكم هو الدعاء لكم منا إن شاء الله تعالى

إهداء

إلى الوالدين الكريمين

إلى جميع أفراد العائلة

إلى كل من علمنا و من له حق علينا

إلى جميع الأصدقاء والزملاء

الفهرس

الملخص بالعربية	**أ**
الملخص بالإنجليزية	**ب**
قائمة الاختصارات	**ج**
قائمة الأشكال	**د**
قائمة الجداول	**هـ**
مقدمة	**1**
الجانب النظري	
الفصل الأول: النباتات الطبية والمركبات الفعالة	
I 1.I.النباتات الطبية	**6**
1.1.I.تعريف النباتات الطبية	**6**
2.1.I. كيفية إدراج نبات في قائمة النباتات الطبية	**7**
3.1.I. تاريخ النباتات الطبية	**7**
4.1.I.الأجزاء المستعملة والعوامل المؤثرة على جنيها	**8**
2.I.المركبات الفعالة	**10**
1.2.I.الزيوت العطرية	**10**
1.1.2.I.تعريف الزيوت العطرية	**10**
2.1.2.I.الخواص الفيزيائية للزيوت العطرية	**11**
3.1.2.I.أهمية الزيوت العطرية	**11**
2.2.I.القلويدات	**12**
1.2.2.I.تعريف القلويدات	**12**
2.2.2.I.تقسيم القلويدات	**13**
3.2.2.I.خواص القلويدات	**13**
4.2.2.I.أهمية القلويدات	**14**
3.2.I.الفينولات	**14**
1.3.2.I.تعريف الفينولات	**14**
2.3.2.I.تقسيم الفينولات	**15**
3.3.2.I.الخواص الفيزيائية للفينولات	**16**
4.3.2.I.أهمية الفينولات	**16**

الفصل الثاني: الإجهاد التأكسدي ومضاداته	
1.II.الأكسدة البيولوجية	**18**
1.1.II.تعريف الأكسدة	**18**
2.1.II.تفاعلات الأكسدة البيولوجية	**19**
1.2.1.II.المصادر الداخلية	**19**
2.2.1.II.المصادر الخارجية	**21**
2.II.الجذور الحرة	**23**
1.2.II.تعريف الجذور الحرة	**23**
2.2.II.أنواع الجذور الحرة	**24**
1.2.2.II.التقسيم على أساس الإستقرار	**24**
2.2.2.II.التقسيم على أساس النوع	**25**
3.2.II.أضرار الجذور الحرة	**25**
3.II.الإجهاد التأكسدي	**26**
1.3.II.تعريف الإجهاد التأكسدي	**26**
2.3.II.مضادات الأكسدة	**28**
1.2.3.II.تعريف مضادات الأكسدة	**28**
2.2.3.II.أقسام مضادات الأكسدة	**29**
الجانب التطبيقي	
الفصل الثالث: النشاط المضاد للأكسدة	
1.III.المواد الكيميائية ودراسة النبات	**36**
1.1.III.المواد الكيميائية	**36**
2.1.III. الدراسة النظرية للنبات	**36**
2.III.تحضير العينة النباتية	**37**
1.2.III. الجني	**37**
2.2.III.منطقة الدراسة	**37**
3.2.III.تحضير العينة	**39**
4.2.III.الاستخلاص	**39**

3.III.فصل المركبات الفينولية	**40**
1.3.III.مناقشة النتائج	**43**
4.III.التقدير الكمي للمركبات الفينولية الإجمالية	**44**
1.4.III.مبدأ العمل	**44**
2.4.III.طريقة العمل	**44**
3.4.III.تقدير المركبات الفينولية في المستخلصات النباتية	**45**
4.4.III.مناقشة النتائج	**46**
5.III.النشاط المضاد للأكسدة	**48**
1.5.III.إختبار DPPH	**48**
1.1.5.III.مبدأ عمل	**48**
2.1.5.III.طريقة العمل	**49**
3.1.5.III.النتائج والمناقشة	**50**
❖ الدراسة الإحصائية	**54**
خـاتمة	**56**
قائمةالمصادر والمراجع	**58**
الملاحق	

ملخص

تشتهر النباتات الطبية بقدرتها على إنتاج المركبات الفعالة ذات البنى الكيميائية المختلفة والتي تؤدي دورا هاما في المجال الصيدلاني. من هذا المنطلق وبهدف إثراء قائمة النباتات الطبية في الجزائر ومعرفة وتثمين المركبات الفعالة والمنتجات الطبيعية النباتية قمنا بدراسة القدرة المضادة للأكسدة لبعض المستخلصات والمستخرجة من نبات "القرطوفة"_***Cotula cinerae*** وذلك بعد التقدير الكمي للمركبات الفينولية الإجمالية.

بعد استخلاص وفصل المركبات الفينولية قمنا بالتقدير الكمي لهذه الأخيرة باتباع طريقة **Folin-Ciocalteu**، حيث لاحظنا أن المحتوى من المركبات الفينولية تراوحت نسبته مابين 2.84 و 10.08 mgEAG/gMS، حيث أعطى مستخلص خلات الإيثيل مردودا عاليا مقارنة بمردود المستخلصات الإخرى ، عموما يمكن القول المحتوى من المركبات الفينولية عالي في مستخلصي خلات الإيثيل وثنائي كلور الميثان لكلا المذيبين **(Acetone /H_2O)** و **(MeOH/H_2O)** وهذا إذا ما قورنت بمستخلص الهكسان .

لدراسة القدرة المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات أجرينا اختبار الـ **DPPH** من أجل قياس قدرة المستخلصات على تثبيط الجذر الحر **DPPH** حيث أظهرت نتائجه المعبر عنها بقيم EC_{50} أنها تراوحت مابين104.7 و 590.31 g/l .

دلت هذه النتائج على أن الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات ضعيفة إذا ما قورنت بالمركبات المرجعية ، لكن تبقى لها فعالية معتبرة في التراكيز الكبيرة والتي تفوقg/l 100

الكلمات المفتاحية : المركبات الفينولية، "القرطوفة"_***Cotula cinerae*** ، القدرة المضادة للأكسدة، **DPPH.**

Abstract

Medicinal plants are famous for their ability to produce compounds of different chemical structures. These compounds have a major and vital role in the field of pharmacology. Accordingly, we carried out a study about the antioxidation activity for some extracts taken out of three distinct samples which are ***Cotula cinerae*** in order to enrich the list of the medicinal plants in Algeria and to valorize these effective compounds and the natural vegetal products; after the total quantitative estimation of phenolic compounds.

After having them extracted and purified by following Folin-Ciocalteu method; we did the quantitative estimation of the phenolic compounds. We noticed that the percentage of phenolic compounds content ranged between 2.84 and 10.08 mgEAG/gMS. Compared to the yield of the other extracts the ethyl acetate extract gave a high return. In general, the content of the phenolic compounds is high in the ethyl acetate and dichloromethane extracts of both solvents **(Acetone /H_2O)**and**(MeOH/H_2O)**. This is compared with the hexane extract.

We aimed at studying the ability of antioxidation activity for these extracts. We carried out DPPH test in order to measure the extracts ability in inhibiting the free radical DPPH. The results has shown that EC_{50} values fluctuated between 104.7 and 590.31g/l

These results indicate that the antioxidant efficacy of these extracts is weak when compared to the reference compounds, but they remain significant in large concentrations that exceed 100 g / l .

Key words: phenolic compounds, Antioxidation ability, DPPH, ***Cotula cinerae***

قائمة المختصرات

µL : Microlitre

ATP : Adenosine Tri Phosphate

BHA :Butylhdroxyanisol

BHT : Butylhdroxytoluene

CAEAC : Concentration Antioxydant Equivalent to Acide Caffeic

DNA : Disoxyribonucleic Acid

DPPH : 1,1- diphényl- 2- picrylhydrazyl

EAG\gMS : Equivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche

EC_{50} : Efficiency concentration

GP_X : Glutathion peroxidase

I% : Inhibition Percentage

L : Linné

nm : Nanometer

NOS : Nitric oxide synthase

PG : Gallate Propylée

ROS : Reactive oxygen species

SOD : Superoxide dismutase

TBHQ : Tetre Butylhydroquinon

XOR : Xanthine Oxido Reductase

Hex : Hexane

DCM : Dichloromethane

قائمة الأشكال

الشكل 1.II:أهم المصادر الداخلية لأنواع الأكسجينية النشطة	21
الشكل 2.II:بعض العوامل المحددة لحالة الإجهاد التأكسدي للأنظمة البيولوجية	27
الشكل 3.II:الصيغة الكيميائية لفيتامينC	31
الشكل 4.II:الصيغة الكيميائية لفيتامينE	31
الشكل 1.III:صورة جهاز التبخير الدوراني	الملحق II
الشكل 2.III:صورة جهاز مقياس الطيف الضوئي	الملحق II
الشكل 3.III:صورة لنبات *Cotula cinerae*	36
الشكل 4.III: خريطة منطقة الدراسة	38
الشكل 5.III: مخطط عام لاستخلاص المركبات الفينولية	41
الشكل 6.III:أعمدة بيانية للمردود بالنسبة المئوية لكل05غ من الوزن الجاف	42
الشكل 7.III:المنحنى القياسي لحمض الغاليك	45
الشكل 8.III:أعمدة بيانية لمحتوى المركبات الفينولية الإجمالي للمستخلصات النباتية	46
الشكل 9.III:التفاعل الجذري للـDPPHمع الفينول	48
الشكل 10.III:المنحنيات القياسية لاختبار الـ DPPH	50
الشكل 11.III: منحنيات اختبار الـDPPH لمستخلص الهكسان	51
الشكل 12.III: منحنيات اختبار الـDPPH لمستخلص ثنائي كلور الميثان	51
الشكلIII.13: منحنيات اختبار الـDPPH لمستخلص خلات الإثيل	51

قائمة الجداول

جدول 1.I: الأقسام الرئيسية للمركبات الفينولية	15
جدول 1.II: بعض الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي والجذور الحرة	27
جدول 1.III: خريطة وخصائص منطقة الدراسة	38
جدول 2.III: المردود بالنسبة المئوية لكل 05غ من الوزن الجاف	42
جدول 3.III: محتوى المركبات الفينولية الإجمالي للمستخلصات النباتية	45
جدول 4.III. أنواع أخرى تمت دراستها في مختبر العلوم الأساسية .	47
جدول 5.III : قيم معامل EC_{50} للمركبات المرجعية والمستخلصات النباتية	52

مقدمة

مقدمة

طب الأعشاب طريقة قديمة لعلاج الأمراض التي تصيب الإنسان، تعود هذه الطريقة في المعالجة إلى أزمنة بعيدة ضاربة في القدم، وربما صاحبت تاريخ الإنسان منذ بداية وجوده على الأرض، وكان الإنسان يهتدي في كشف الخواص العلاجية للأعشاب بالصدفة أحيانا، وبالتجربة التي لاتخلوا من المخاطر في أحيان أخرى.

فلطالما اعتبرت النباتات الطبية مصدرا أساسيا لصحة الإنسان، ولاتزال العديد من الثقافات التقليدية تثمن الوصفات الطبية النباتية وأهميتها الوقائية والعلاجية ومنافعها الأخرى.

يتقدم علم التداوي بالأعشاب بمفهومه الحديث تقدما كبيرا في مختلف أرجاء العالم ويزداد الاهتمام بدراسة النباتات الطبية في مجال البحث الصيدلاني نظرا لخصائصها العلاجية وكلفتها المنخفضة وسهولة الحصول عليها، وحاليا يتم استخدام حوالي 20000 نوع من النباتات الطبية سواءا في مجال الصناعات الدوائية أو الطب الشعبي **(Ashutosh. k, 2007).**

لهذا الغرض تعكف شركات الأدوية منذ سنوات قليلة في البحث عن المواد الطبيعية والمركبات الفعالة المستخرجة من النباتات وتسعى لتحديد مكوناتها وبناها الجزيئية وقياس فعالياتها بغرض تصنيع أدوية وعقاقير جديدة منها، ومن هذه المركبات والتي تنتج عن عمليات الأيض الثانوي هي المركبات الفينولية والتي تستخدم على نطاق واسع في العلاج كمضادات الأكسدة لمكافحة خطر الأنواع الأكسجينية النشطة التي تنتج داخل الجسم خلال الميتابوليزم العادي أوعند التعرض للإصابة، والتي تعتبر مصدر للعديد من الأمراض المزمنة والفتاكة، كالسرطان، أمراض القلب والأوعية الدموية **(Kaliora A.C. et al., 2006; Jalil E. C. et al., 2003; Modovan L. et al., 2006).**

تنطلق دراستنا من هذا الهدف وهو إثراء قائمة النباتات الطبية في الجزائر ومعرفة وتثمين المركبات الفعالة والنشطة بيولوجيا لإمكانية استخدامها في صناعة الأدوية، ولتحقيق هذا الهدف ارتأينا إلى أن توجه دراستنا نحو نبات محلي كانت الدراسات حوله قليلة جدا وهو نبات القرطوفة ***Cotula cinerae*** ، لدراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المستخرجة منه وذلك بعد التقدير الكمي للمركبات الفينولية الإجمالية.

قسمنا هذا العمل إلى فصلين في الجانب النظري وفصل ثالث في التطبيقي، محتوى الفصل الأول كان تعريفا للنباتات الطبية والمركبات الفعالة فيها ، أما الفصل الثاني فكان لماهية الأكسدة البيولوجية وآليات تفاعلاتها إضافة إلى الجذور الحرة والأضرار الناجمة عنها وصولا إلى الإجهاد التأكسدي ومضاداته، وفي الجانب التطبيقي والذي بينا من خلاله إضافة إلى الدراسة النظرية للعينة النباتية الطريقة العملية لدراسة النشاط المضاد للأكسدة بدءا بالتقدير الكمي للمركبات الفينولية الإجمالية وإجراء إختبار **DPPH** ، ومتضمنا للنتائج المتحصل عليها ومناقشتها.

الجانب النظري

الفصل الأول

النباتات الطبية

والمركبات الفعالة

1.I. النباتات الطبية

إن كل نبتة أو عشبة هي في الواقع صيدلية كاملة تحتوي على مواد فعالة بنسب وضعها الله سبحانه وتعالى بحكمته وتقديره، ولتثمين هذه المواد الفعالة فقد أتجه العلماء إلى استخلاصها والتعرف على تركيبها إما لاستعمالها المباشر في علاج بعض الأمراض أو لتحضير مركبات كيميائية اصطناعية لها نفس التركيب الكيميائي لما لها من أهمية حيوية(**هيكل .م و عمر.ع ، 1993**).

1.1.I. تعريف النباتات الطبية

يعرف النبات الطبي على أنه النبات الذي يحتوي في عضو أو أكثر من أعضائه المختلفة أو تحوراتها على مادة كيميائية واحدة أو أكثر بصرف النظر عن الطبيعة الكيميائية لهذه المادة أو تلك بتركيز منخفض أو مرتفع، ولتي تستعمل لأغراض علاجية(**هيكل .م و عمر.ع ، 1993**).

وقد عرف العالم Dargendroff النبات الطبي على أنه " كل شيء من أصل نباتي ويستعمل طبيا فهو نبات طبي" وطبقا لهذا التعريف أو المفهوم فنجد أنه يضم المملكة النباتية بأسرها ولا يستثنى من ذلك أكثر النباتات رقيا إلى أدناها وأبسطها تركيبا وتطورا، هذا المفهوم الشامل للنبات الطبي يهيء فرصا عديدة لاكتشاف المزيد والجديد من المواد الكيميائية العلاجية وغير العلاجية ذات الأصل النباتي مثل المضادات الحيوية والمبيدات الحشرية أو الحشائشية (**هيكل .م و عمر.ع ، 1993**).

بعبارة أخرى هي كل النباتات التي تستعمل طبيا وتتراوح في الحجم من الكبيرة مثل الأشجار كالكافور والصنوبر وتتدرج في حجمها حتى الصغيرة التي تتمثل في الفطريات مثل الخميرة، ويحتوي النبات الطبي على المادة الفعالة Active Substance في أحد أعضائه أو أكثر أو في جميع أجزائه وهذه المواد الفعالة قد

تكون مادة واحدة أو أكثر ولها تأثيرات فيزيولوجية في علاج الأمراض في صورتها النقية بعد استخلاصها أو في صورتها الطبيعية (طازج، جاف أو مستخلص جزئيا) (**علي منصور.ح، 2006**).

I.2.1. كيفية إدراج نبات في قائمة النباتات الطبية

يدرج النبات في قائمة النباتات الطبية بعد سلسلة من الأبحاث الطويلة فعندما نعلم أن نبات ما يستخدم في علاج مرض معين وذلك من خلال شيوع استخدامه في مجال الطب الشعبي ، فإن أول ما ينبغي القيام به هو استخلاص وفصل جميع المكونات الكيميائية الفعالة المعروفة من أعضاء النبات المختلفة. ثم بعد ذلك تدرس خواص المادة وصفاتها الكيميائية ويعين تركيبها الكيميائي، ثم تجرى التجارب والبحوث لدراسة التأثيرات الناجمة عن استخلاص المستخلصات الكيميائية من هذا النبات، كذلك يمكن إدراج نبات ما بقائمة النباتات الطبية إذا ما أمكن فصل بعض المكونات الطبيعية منه والتي ليس لها أثر علاجي وهي على صورتها المفصولة، إلا أنه يمكن استخدامها كمواد أولية في تحضير المواد الطبية (**هيكل .م و عمر.ع ، 1993**).

I.3.1. تاريخ النباتات الطبية

لقد أدت النباتات والأعشاب الطبية والوصفات العلاجية الشعبية منذ خلق الله تعالى سيدنا ادم عليه السلام دورا فعالا في علاج وصحة ووقاية البشرية من الأوبئة والأمراض، وظل هذا الأسلوب من العلاج الشعبي هو الوسيلة الوحيدة أمام البشرية لفترة طويلة (**ماهر حسن. م، 2007**).

مع نمو الحضارات منذ 3000 سنة قبل الميلاد في مصر والشرق الأوسط والهند والصين، صار استعمال الأعشاب أكثر تعقيدا وتم تدوين التقارير الأولى عن النباتات الطبية وتعتبر بردية إيبر المصرية التي ترجع إلى نحو1500 سنة ق م أقدم الأمثلة المتبقية. تسرد هذه الوثيقة عشرات النباتات الطبية

واستعمالاتها وبعد فجر الإسلام كان لعلماء المسلمين الفضل الكبير في إعادة إحياء هذا العلم وتدوينه، ومن أشهر مؤلفاتهم : (**شوفالييه.أ، 2003**).

- القانون في الطب، كتاب الشفاء (ابن سينا)؛
- صيدلية الطب، من لا يحضره الطبيب (محمد أبو بكر الرازي)؛
- الجامع لمفردات الأدوية والأغذية (ابن البيطار).

مع أوائل القرن الـ 19، بدأ العلماء بتطوير وصناعة أدوية جديدة في المختبر إما مستخرجة من نباتات طبية وإما مصنعة، حيث استطاع الكيميائيون عزل مكونات المورفين من الخشخاش المنوم ***Papaver somniferum***، ومنذ ذلك التاريخ حقق العلماء تقدما هائلا في فهم كيفية تأثير المواد الكيميائية المعزولة عن الجسم (**شوفالييه.أ، 2003**).

I.4.1. الأجزاء المستعملة والعوامل المؤثرة على جنيها

من الأعشاب والنباتات الطبية ما يستعمل منه جزء واحد فقط للتداوي، كالأزهار أو الأوراق أو الجذور أو البذور، ومنها ما يستعمل كله. وعلى كل فإن جمع هذه الأجزاء، منفردة أو مجتمعة، يجب أن يتقيد بأوقات محددة من أيام السنة وفصولها، وبشروط معينة أيضا حيث يكون الجزء المطلوب من العشبة أو النبتة في أوج حيويته، وأن لا يساء لهذه الحيوية بأساليب الجمع أو التجفيف الخاطئة فتفقد العشبة أو النبتة البعض من خواصها الطبية المفيدة أو كل خواصها (**رويحة. أ، 1983**).

ومن بين الأجزاء المستعملة نذكر:

- الأزهار : مثالها في نبات البابونج ***Marticaria chamomilla*** تحتوي أزهاره على زيت طيار مفيد للمعدة ويعمل على طرد الغازات من الجهاز الهضمي (**خلف الله. ع، 1988**).

- الأوراق : مثالها في نبات الأوكاليبتوس ***Ecalyptus glabulus*** أوراقه غنية بزيت طيار، يستعمل كمطهر ومبيد للجراثيم وفي حالات السعال والتهاب القصبات الهوائية (**لاكوست. ص، 2013**).
- الجذور : مثالها في نبات الجنسنغ ***Panax ginseng*** جذوره المجففة غنية بالصابونيات والتربينات والتي تقوي المناعة وتقاوم العدوى وتحسن عمل الكبد (**شوفالييه. أ، 2003**).
- البذور : مثالها في نبات الحلبة ***Trigonella foenum*** تحتوي بذوره على زيت ثابت وصابونيات وبروتينات تساعد على الهضم وتفتح الشهية (**محمد سيد. ع، 2004**).
- النبات بأكمله : مثالها نبات عروق الصباغين ***Curcantinctoria*** يستخدم هذا النبات بأكمله لاحتوائه على أحماض عضوية ويستعمل لعلاج أمراض الجهاز الهضمي.

أما فيما يخص العوامل المؤثرة على جنيها فيجب مراعاة : (**رويحة. أ، 1983**)

- أن يتم الجمع بصورة منظمة، فلا يكون الجمع على دفعات عفوية؛
- أن لا تنزع النبتة كليا، بل يترك جزء منها لتعويض ما فقد من جديد؛
- أن تقطف الأزهار في الصباح بعد جفافها بكل دقة وأن تجمع بدون ضغط لتفادي تخمرها؛
- أن تجمع الأوراق وباقي أجزاء النبتة دائما بعد الظهر، حيث تكون قد تشبعت من شعاع الشمس وازدادت محتوياتها من المواد الفعالة؛
- أن تجمع الجذور في بداية فصل الربيع أو في الخريف حيث تكون غنية بالمواد الفعالة ؛
- أن يكون مكان القطف بعيدا عن الحقول لأن تربتها تكون غنية بالأسمدة، وكذلك أن تكون بعيدة عن حواف الطرق (**لاكوست. ص، 2013**).

2.I. المركبات الفعالة في النباتات

كيمياء النواتج الطبيعية هي جزء خاص وكبير من الكيمياء العضوية يهتم بعزل، تحليل، تحضير وكذا معرفة الخواص الكيميائية لمكونات الكائنات الحية نباتية، حيوانية أو ميكروبية، ونحاول في هذا الجزء أن نركز على أهم المركبات الطبيعية ذات الأصل النباتي وتصنيفها(**محمود جبر**. ر، **2009**).

1.2.I. الزيوت العطرية

1.1.2.I. تعريف الزيوت العطرية

الزيوت الطيارة عبارة عن خلائط من المركبات العطرية ذات المصدر النباتي والتي تنجم عن عملية التحول الأيضي في النبات وتتجمع داخل تراكيب خاصة مثل الشعيرات الغدية Glandular hairs كما في العائلة الشفوية ***"Labiatae"*** أو القنوات الزيتية Oil Vittae كما في العائلة الخيمية ***"Umbelliferae"*** أو الغدد الزيتية Oil gland كما في العائلة السذبية ***"Rutaceae"*** ، وهي مواد زيتية ذات روائح عطرية مميزة تتبخر أو تتطاير عند درجات الحرارة العادية دون أن تتحلل على عكس الزيوت الثابتة والتي لا تتطاير ولكنها تتحلل إذا عرضت للتبخير أو التسخين، تسمى الزيوت الطيارة بعدة أسماء منها : الزيوت العطرية Aromatic Oils، الزيوت الأثيرية Ethereal Oils والزيوت الأساسية Essential Oils (**محمود جبر**. ر، **2009**).

2.1.2.I. الخواص الفيزيائية للزيوت العطرية

برغم اختلاف مكونات الزيوت العطرية في تراكيبها الكيميائية، إلا أنها تشترك في بعض الصفات العامة مثل : (**محمود جبر**. ر، **2009**).

- عديمة اللون وهي طازجة أي قبل تحللها أو تأكسدها، ولو أن بعضها ذات لون أصفر فاتح أو أحمر خفيف؛

- سائلة عند درجة الحرارة العادية عدا زيت الورد والينسون فهما يتجمدان عند درجة حرارة أقل؛
- لها رائحة عطرية مميزة ولكل زيت رائحة خاصة به؛
- لا تذوب في الماء، ولكنها تذوب في المركبات العضوية كالإيثر، الكحول، الأسيتون والكلوروفورم؛
- لها معامل انكسار ضوئي عالي ولها خاصية الدوران الضوئي والذي يعد أهم اختبار لمعرفة نوعية الزيت ونقاوته؛
- أخف من الماء عدا زيت القرفة والقرنفل.

3.1.2.I. أهمية الزيوت العطرية

للزيوت الطيارة أو النباتات الحاوية لها استخدامات طبية وغير طبية منها : (**محمود جبر**. ر، **2009**).

- تستخدم كمطهرات ومضادات للفطريات والطفيليات والبكتيريا؛
- تستخدم في مجال تصنيع العقاقير؛
- كمحسنات للطعم والنكهة والرائحة للأطعمة والمستحضرات الطبية؛
- تدخل في مستحضرات التجميل ومواد الزينة.

أما بالنسبة لاستخداماتها أو فوائدها للنبات فهي تعمل كالأتي : (**محمود جبر**. ر، **2009**).

- جذب الحشرات لإتمام عملية التلقيح في النبات؛
- تساعد في التئام الجروح النباتية بعد ذوبان الراتنج منها؛
- تعمل كعامل دفاعي للنبات ضد الحشرات وبعض الحيوانات .

I.2.2. القلويدات

I.2.2.1. تعريف القلويدات

مركبات نتروجينية عضوية قاعدية، وتعتبر أحد المجاميع المشتقة أو الناتجة عن عمليات الأيض الثانوي وقد عرفها العالم Pelletier (1983) " القلويدات مركبات حلقية محتوية على ذرة نتروجين أو أكثر تنتج عن تفاعلات داخل أجسام الكائنات الحية"، وهي مجموعة واسعة وغير متجانسة من حيث أنواع هياكلها**(Roberts M.F., 1998)**، ويعرف إلى الآن حوالي 3 الاف قلويد موجودة في حوالي 40 ألف نوع نباتي وعادة تكثر في العائلة الوردية **"Rosaceae"** والعائلة المركبة **"Compositeae"**.

I.2.2.2. تقسيم القلويدات

تقسم القلويدات إلى : **(Attou. A, 2011)**.

- الأمينات الثانوية أو الثالثية : محبة للماء في درجة حموضة $PH > 8$.
- الأمينات الرباعية : ذات قطبية عالية ومشحونة عند أي درجة حموضة ويتم عزلها كما الأملاح.
- المركبات الأمينية المتعادلة : وتشمل قلويدات أميد قياسية مثل الكولشسين.
- أكاسيد النتروجين (N-oxides) : عادة ما تكون قابلة للذوبان جدا في الماء.

ليست كل القلويدات قواعد فهناك استثناء في بعضها مثل الكولشسين Colchicine والنيكوتين Nicotine.

وفيما يلي نبذة مختصرة عن أهم القلويدات : **(السيد يوسف. م و التارقي . ز، 2005)**.

القلويدات الجليكوسيدية : عبارة عن سموم طبيعية توجد في البطاطس والطماطم والباذنجان، ففي حالة البطاطس التي يشوبها اللون الأخضر يوجد بها مواد سامة طبيعيا عبارة عن قلويدات جليكوسيدية يطلق عليها سولانين Solanine.

قلويدات البيورين : عبارة عن مشتقات لمركبات الزانثين Xanlhine ولعل أهمها هو الكافيين Caffeine المتواجد في المشروبات مثل القهوة والشاي.

قلويدات الاتروبين والكوكايين والأفيون : يوجد الاتروبين في أفراد العائلة الباذنجانية "**Solanaceae**"، أما الكوكايين فيوجد في أوراق نبات الكوكا ***Irythroxyline coca*** ويوجد الأفيون في عصير نبات الخشخاش ***Papaver somniferum*** وأهمها المورفين .

I.3.2.2. خواص القلويدات

من بين خواصها ما يلي : **(عثمان الحاج. س، 2014).**

- معظمها توجد على هيئة نقية وهي مركبات متبلورة صلبة مثل النيكوتين والهيوسين والبلوكاربين؛
- معظمها عديمة اللون والرائحة ومرة الطعم، لكن بعضها ذات رائحة مثل النيكوتين، ولون أصفر مثل الكولشيسين؛
- معظمها لاتذوب في الماء أو تذوب جزئيا، إلا أنها تذوب جيدا في المذيبات العضوية مثل الكحول أو الكلوروفورم والايثر؛
- تتكون القلويدات كيميائيا من عناصر N وC وH وأحيانا O

I.4.2.2. أهمية القلويدات

تكمن أهمية القلويدات للإنسان في تأثير العلاجي للأمراض التي تصيبه فهي تعمل على الاتي : **(عثمان الحاج. س، 2014).**

- مسكنة للآلام مثل المورفين Morphine؛
- رافعة للضغط مثل Ephedrine، أو خافضة له مثل Reserpin؛

- مضادة للملاريا مثل Quinine؛
- مضادة للسرطان مثل Laukocristine؛
- منشطة للجهاز العصبي المركزي مثل Strchaine

I.3.2. الفينولات

I.3.2.1. تعريف الفينولات

تعرف الفينولات على أنها مشتقات الهيدروكربونات الأروماتية التي استبدلت فيها ذرة هيدروجين الحلقة بمجموعة هيدروكسيل (OH-) ولها الصيغة العامة Ar-OH حيث Ar مجموعة فينيل أو مشتقات الفينيل **(عباسي. م، 2009).**

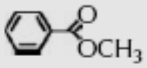
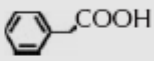
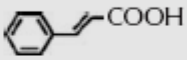
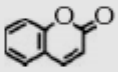
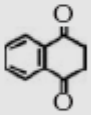
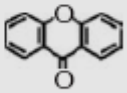
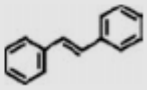
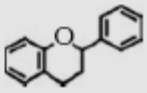
تختلف الفينولات عن الكحولات في أن مجموعة الهيدروكسيل (OH) أو المجاميع المتعددة منها تكون متصلة اتصالا مباشرا بالحلقة العطرية، تكون مجموعة الهيدروكسيل الفينولية متأثرة بوجود حلقة عطرية وبسببها تصبح غير مستقرة وهذا ما يجعل الفينولات أحماض ضعيفة

.(Vermerris .W et Nicholson .R, 2009)

I.3.2.2. تقسيم الفينولات

تتميز الفينولات بأن لها على الأقل حلقة أروماتية ترتبط بها مجموعة هيدروكسيل واحدة أو أكثر، وقد تم التعرف على أكثر من 8000 بنية فينولية وهي منتشرة بشكل واسع في المملكة النباتية، وتمتد من الفينولات البسيطة ذات الوزن الجزيئي المنخفض وحلقة أروماتية عطرية واحدة إلى التانينات المعقدة، ويمكن أن تقسم الفينولات على حسب عدد وترتيب ذرات الكربون وأيضا بالروابط المحتملة من سكريات، دهون وبروتينات **.(Crozier .A et al., 2006)**

جدول I.1. الأقسام الرئيسية للمركبات الفينولية (Crozier .A et al., 2006).

Number of carbons	Skeleton	Classication	Example	Basic structure
7	C_6–C_1	Phenolic acids	Gallic acid	
8	C_6–C_2	Acetophenones	Gallacetophenone	
8	C_6–C_2	Phenylacetic acid	*p*-Hydroxyphenyl-acetic acid	
9	C_6–C_3	Hydroxycinnamic acids	*p*-Coumaric acid	
9	C_6–C_3	Coumarins	Esculetin	
10	C_6–C_4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C_6–C_1–C_6	Xanthones	Mangiferin	
14	C_6–C_2–C_6	Stilbenes	Resveratol	
15	C_6–C_3–C_6	Flavonoids	Naringenin	

I.3.3.2. الخواص الفيزيائية للفينولات (عباسي . م، 2009).

- تذوب مباشرة في الايثر والايثانول وتتطاير ببخار الماء؛
- لها درجة غليان عالية لوجود الروابط الهيدروجينية؛
- مواد عديمة اللون
- تعتبر الفينولات مركبات حامضية؛(**شرف. م، 2011**)
- ذات درجة إنصهار منخفضة وروائح مميزة .

I.4.3.2. أهمية الفينولات

تتواجد المركبات الفينولية في أغلب النباتات خاصة ذات الاستهلاك اليومي، واستعمالها من طرف الانسان لدواعي غذائية أو علاجية لا تنحصر هنا فقط، فعلى مستوى مخابر البحث والإنتاج الصناعي تمر غالبا بمراحل متتابعة ومكلفة : استخراج، تصفية، تصنيف وبشروط تتلائم مع غاية استعمالها (مكملات غذائية، أدوية أو مستحضرات تجميلية) **(Macheix .J. J et al., 2005).**

نخص بالذكر الأنشطة البيولوجية لها : **(Hamdi .A, 2011)**.

1. **تأثيرات مسكنة** : حيث تعمل على تثبيط تحرير الهستامين عن طريق تثبيط بعض الإنزيمات مثل AMPcycliquephos phodiesterase، و $ATPase\ Ca^{+2}$.
2. **تأثيرات مضادة للسرطان** : وهي نشطة ضد العديد من أنواع السرطان (القولون، المعدة، الكبد...) حيث تعتبر المركبات الفينولية حاجز يمنع تشكل الخلايا السرطانية وحمايتها من الموت المبرمج.
3. **تأثيرات وقائية للأوعية الدموية** : وذلك من خلال حماية البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة من الأكسدة والتي هي أحد العوامل الرئيسية المسببة لمرض تصلب الشرايين.
4. **تأثيرات مضادة للفيروسات والجراثيم والفطريات** : وقد أظهرت العديد من الدراسات فعالية المركبات الفينولية المضادة لها.
5. **تأثيرات مضادة للالتهاب** : تتمثل في منعها للإنزيمات أن تشارك في رد الفعل الالتهابي.
6. **النشاط المضاد للأكسدة** : ويتجلى الطابع المضاد للأكسدة للمركبات الفينولية في مستويات مختلفة فهي تعمل على اعتراض وتحييد الأجسام السامة من الأكسجين وأشكال الدهون الجذرية

الفصل الثاني

الإجهاد التأكسدي

ومضاداته

II.1. الأكسدة البيولوجية

II.1.1. تعريف الأكسدة البيولوجية

الأكسدة هي انتقال الإلكترونات من مادة إلى العامل المؤكسد هذا الأخير هو المادة القادرة على أن تختزل أي تستقبل الإلكترونات وتؤكسد غيرها أي تفقد غيرها الإلكترونات(**Nelson .D et Michael .M, 2004**).

تعتبر الأكسدة البيولوجية أحد التفاعلات الأساسية المهمة في جسم الإنسان، فمن خلالها يحصل على الطاقة اللازمة للنمو وإتمام كافة العمليات الحيوية وذلك عن طريق أكسدة المواد الغذائية وتحرير الطاقة الكامنة في تلك المواد وحبسها في مركبات ATP وهو من المركبات الغنية بالطاقة وكذلك تخزن الطاقة في بعض المرافقات الإنزيمية مثل $NADPH_2$، ولا تتم عملية الأكسدة إلا في وجود O_2.

إن تحرر الطاقة في المادة الغذائية لا يكون دفعة واحدة بل تتحرر في خطوات متسلسلة من التفاعلات التي تتحكم بها الإنزيمات والمواد الغذائية التي تستخدم في تحرير الطاقة هي المواد الكربوهيدراتية والدهون والبروتينات (**طه صقر. م، بدون سنة**).

أثناء هذه التفاعلات تظهر بعض الجزيئات _ الجذور الحرة _ التي تمتاز بالنشاط وعدم الاستقرار ولذلك فإن هذه المركبات تحتاج إلى مركبات أخرى تمدها بالإلكترونات لتصبح أكثر استقرارا فإذا لم تجد تقوم بأكسدة الجزيئات الحيوية للخلية من خلال سلسلة من التفاعلات، مما يجعل أجسامنا عرضة للعديد من الأمراض (**Tsimogiannis. D. I et Oreopoulou. V, 2004**).

II.2.1. تفاعلات الأكسدة البيولوجية

يتحول الأكسجين في الحالة العادية إلى جزيئة ماء على مستوى السلسلة التنفسية للميتوكوندري، يعتبر هذا التفاعل مهما لأنه يوفر للخلية الطاقة الضرورية في شكل **ATP** لضمان مختلف وظائفها الحيوية **(Pincemail. Jet al., 2003).**

بالرغم من أن الأكسجين ضروري إلا أنه يجسد حقيقة متناقضة حيث يعد رفيقا سيئا حسب Packer و Cadenas (2006) " Oxygen is adangrous Friend " باعتباره ضروري للحياة من جهة وقادر على تحريض أضرار عضوية كبيرة من جهة أخرى، فحوالي 98% منه يستعمل في الناحية الإيجابية أما الجزء المتبقي فيتمرد على الطريق الميتابوليزمي الكلاسيكي مؤديا إلى تشكيل ما يسمى بالأنواع الأكسجينية النشطة ***ROS*** التي تضم الجذور الحرة (Free Radical) والجزيئات المماثلة لهذه الأخيرة **(Palazzetti .S, 2005).**

تنتج الأنواع الأكسجينية النشطة ***ROS*** داخل العضوية كآلية للحماية ضد الجزيئات الغريبة أو كجزء من نواتج العملية عبر العديد من الآليات الموجودة داخل الجسم **(Valko .M et al., 2007).**

II.2.1.1. المصادر الداخلية

تنتج الجذور الحرة في العضوية عن طريق آليتين: إنزيمية وغير إنزيمية

أ. آليات إنزيمية

- **الأغشية الميتوكوندرية**

تمثل الميتوكوندري المصدر الرئيسي لل ***ROS*** في الفيزيولوجيا حيث يختزل أكثر من 95% من الأكسجين المستهلك خلال الميتابوليزم الخلوي العادي إلى ماء في السلسلة التنفسية الميتوكوندرية حسب

عملية رباعية التكافؤ يتوسطها إنزيم Cytochrom Oxydase، إذ يؤمن نقل 4 إلكترونات على جزيئة الأكسجين التي تختزل إلى ماء (**عمراني .أ، 2013**).

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$$

بالمقابل يتم فقد 2 إلى 5% من الإلكترونات التي تتفاعل مع الأكسجين وتختزله تبعا لسلسلة وحيدة الإلكترونات مؤدية إلى تكوين جذر فوق الأكسيد (**عمراني .أ، 2013**).

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$$

- **إنزيم NADPH oxidase**

يتواجد هذا الإنزيم في العديد من الخلايا على مستوى الغشاء البلازمي، حيث يؤدي دورا أساسيا في الاستجابة المناعية ضد العضيات الدقيقة وذلك بإنتاج كميات عالية من جذر $O_2^{\cdot -}$ وفق التفاعل التالي: (**بن سلامة. ع ، 2012**).

$$NADPH + O_2 \longrightarrow NADP^+ + O_2^{\cdot -} + H^+$$

ب. آليات غير إنزيمية

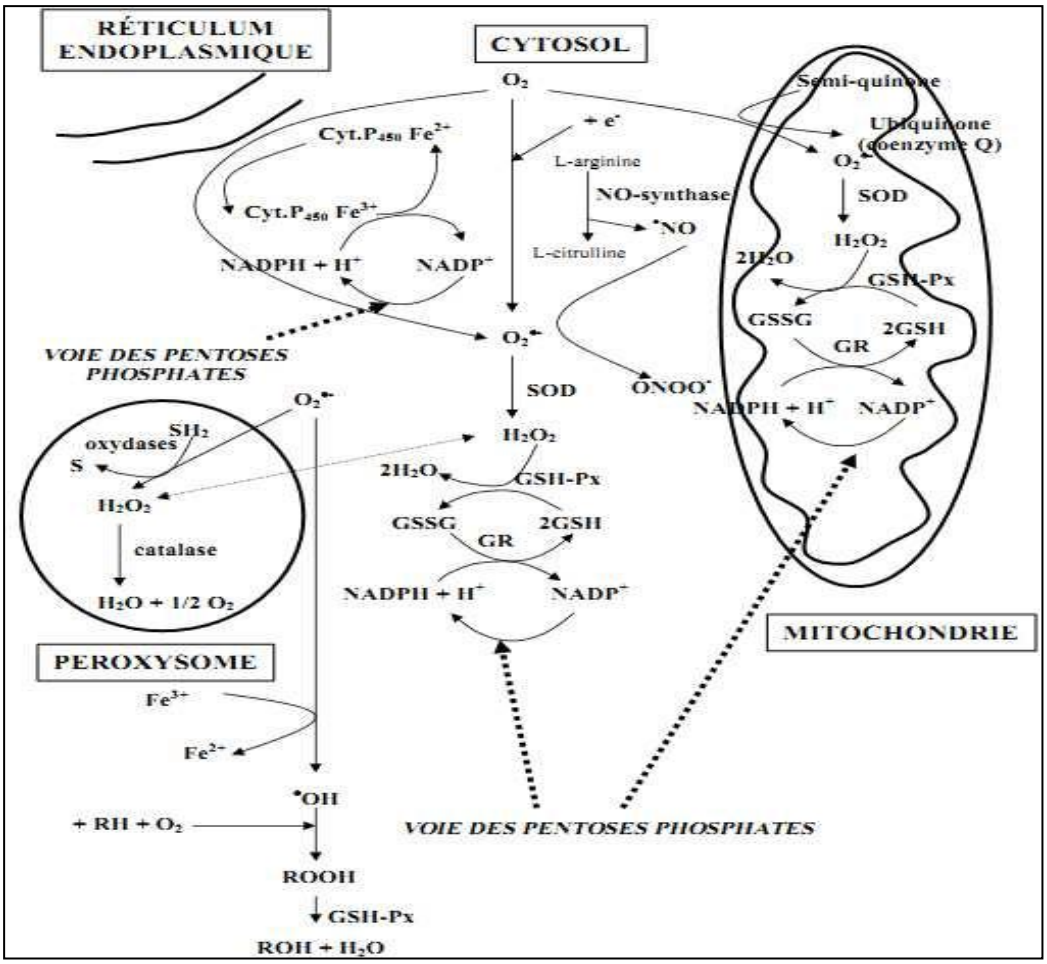
- **الأكسدة الذاتية للعديد من الجزيئات الداخل خلوية**

مثل الهيموغلوبين المؤكسج، الجلوتاثيون، حمض الأسكوربيك والكاتيوكولامينات كالأدرينالين.

- **تفاعل Fenton**

يتحول الأكسجين في وجود معادن الانتقال (الحديد، النحاس...) إلى جذر هيدروكسيلي ويعتبر الحديدوز أهم كاتيون مسؤول عن تشكل جذور الهيدروكسيل وحدوث فوق الأكسدة اللبيدية وفق المعادلة:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$$



الشكل II.1. أهم المصادر الداخلية للأنواع الأكسيجينية النشطة (بن سلامة. ع، 2012)

II.2.2.1. المصادر الخارجية

يتعرض الجسم لمختلف العوامل الخارجية التي يمكن أن تؤدي إلى تكوين الجذور الحرة، حيث تتسبب الأشعة فوق البنفسجية في إنتاج الـ $O_2^{\bullet-}$ و $OH^{\bullet}$، كما تؤدي أكسدة الأدوية والكحولات على مستوى الكبد إلى زيادة إنتاج الجذور الحرة، تدخل عدة سموم منتشرة في الغذاء والمحيط (التبغ، المبيدات، الإضافات الغذائية) في إنتاج الجذور الحرة عبر تنشيط الإنزيمات.

تعتبر المعادن السامة مثل الكروم Cr، النحاس Cu، محفزات قوية لتفاعلات الأكسدة وإنتاج الجذور الحرة، كما يمكن للمخدرات مثل الكوكايين أن تسبب أضرارا تأكسدية على مستوى الجلد وذلك بتنشيطها لإنزيمي XOR و NOS (بن سلامة. ع، 2012).

وهناك الكثير من العوامل الخارجية الأخرى التي تعمل على أكسدة خلايا الجسم والتي يمكن تلخيصها فيما يلي :

- **المضافات الغذائية** : إن زيادة استهلاك المواد المضافة للأغذية سواء كانت هذه المواد تستخدم للتلوين أو التثبيت أو النكهة فإنها تساهم بزيادة الجذور الحرة؛
- **طرق إعداد الطعام** : إن رفع درجة الحرارة عند الطهي وخاصة القلي له تأثيرات في زيادة الجذور الحرة لذلك ينصح بالحد من الأغذية المقلية والحرص على تناول الأغذية الطازجة؛
- **الرياضة** : إن زيادة استهلاك الأكسجين خلال الرياضة العنيفة سوف يزيد من إنتاج الجذور الحرة؛
- **المبيدات الحشرية** : إن لاستخدام المبيدات والأسمدة الكيميائية تأثيرا مباشرا في إنتاج الجذور الحرة لذلك لابد من الحرص على استهلاك الأغذية العضوية؛
- **الإشعاع** : تكمن خطورة العناصر المشعة فيما تصدره من جسيمات عند تفككها وهذه الجسيمات عالية الطاقة تؤثر على الخلايا عن طريق تكوين الجذور الحرة التي هي مواد مسرطنة **(عابد. ع، 2004)**.

2.II. الجذور الحرة

من المعروف أن أهم ما يحدد صفات أي ذرات عنصر كيميائي هو عدد الإلكترونات في المدار الأخير وتطمح هذه الذرات الوصول إلى بنية ذرية مستقرة وتدخل في تفاعلات كيميائية تؤدي إلى كسب أو خسارة أو مشاركة الإلكترونات لتحقيق هذا الغرض، ومن المعروف أيضا أن الإلكترونات توجد بشكل مزدوج Paired Electrons لتكوين الرابطة الثنائية المستقرة Two Electron Bond، وعندما تفقد ذرة أو جزيء أحد هذين الإلكترونين يتحولان إلى جذور حرة شديدة الفعالية تبحث عن جزيئات أخرى كي تنتزع منها إلكترونا لتحقيق الازدواج المنشود، وتعرف هذه العملية بالأكسدة Oxidation، أما في أجسامنا فإن هذه الجذور بمثابة رصاصات بيولوجية تقوم بتدمير كل ما يصادفها من أغشية الخلايا الدهنية والمواد الجينية **DNA** أو البروتينات نتيجة انتزاعها للإلكترونات التي هي في أمس الحاجة إليها(**عابد. ع، 2004**).

1.2.II. تعريف الجذور الحرة

تجتمع الذرات في الجزيئات بروابط قوية بواسطة إلكترونات حلزونية متعاكسة، تكون حاملة لطاقة كافية قادرة على أن تؤدي إلى تخريب هذه الروابط وبهذا تؤدي إلى ظهور وحدات كيميائية تمتلك إلكترون غير مرتبط على المدار الخارجي، تسمى هذه الوحدات الكيميائية الجذور الحرة **(Milane. H, 2004).**

الجذور الحرة هي أصناف كيميائية ذرية أو جزيئية متعادلة موجبة أو سالبة تمتلك إلكترون أو أكثر غير مزدوج تتولد أثناء التفاعلات الكيميائية كمركبات وسطية أو مرحلية من أمثلتها, $NH^{\cdot -}$,CH_3 $OH^{\cdot}$, $NH_3^+O_2^{\cdot -}$, $H_2O^{\cdot}$ **(بن عاشور. ص، 2007).**

هي كما عرفها Halliwell و Gutteridge " ...أي نوع قادر على التواجد مستقل يحتوي على إلكترون أو عدة إلكترونات مرتبطة " **(Hallewell. B, 2001)**، وتكون في حالة عدم استقرار مؤقت يتم تعديله إما عن

طريق استقبال إلكترون آخر أو عن طريق نقل الإلكترون الحر إلى جزيئة أخرى (**بوبلوطة .ح، 2009**)، تنتج هذه الأنواع الجذرية غير المستقرة والنشطة جدا بشكل مستقر في العضوية نتيجة العديد من الظواهر البيولوجية (**Marfak. A, 2003**)، وبسبب قدرتها على تخريب الخلايا، الأنسجة والأعضاء تدخل في العديد من الأمراض الحادة منها والمزمنة (**بوبلوطة .ح، 2009**).

II.2.2. أنواع الجذور الحرة

II.2.2.1. التقسيم على أساس الاستقرار

أ. الجذور النشطة أو غير المستقرة

هي التي لها أعمار قصيرة جدا أي غير مستقرة في الظروف الاعتيادية لها أوزان جزيئية صغيرة مثل جذر الهيدروجين، الفلور، الكلور، $I_2^{-\cdot}$ ، $H_2O^{+\cdot}$، CH_5^+، NO^-، $OH^\cdot$، $CH_3^\cdot$، وما شابه ذلك، طاقة تنشيطها تقترب من الصفر أثناء التفاعل.

ب. الجذور المستقرة أو الصامدة

هي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو بالساعات أو حتي بالأيام مثل جذور ثلاثي المثيل فينيل (**TP_3 M**) وجذور ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (**DPPH**) وجذور ثنائي فينيل وأكسيد النيتريك (**Ph_2NO**) ومشتقاته (**العابد .إ، 2008**).

- **الجذر *DPPH***

يبقى هذا الجذر مستقرا لعدة أيام وذلك لوجود الحلقات الأروماتية والتي تحمل أشكالا رنينية متعددة وهذا يعني عدم تمركز الإلكترونات بموقع واحد، والـ **DPPH** هو إختصار 2،2 ثنائي فينيل−1−بكريل هيدرازيل 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl، وهو مادة صلبة ذات لون بنفسجي مسود يشبه لونه لون محلول

$KMnO_4$ ويعطي لونا برتقاليا مصفرا عند استقراره **(Ionita. P, 2005)**، ويتحول **DPPH** إلى الشكل المصغر (غير جذري) عند تواجده مع جزيء مانح أو مرجع .

II.2.2.2. التقسيم على أساس النوع

تقسم إلى : **(حوة .إ، 2013).**

- **الجذور الحرة الأكسجينية** : أهمها شق الهيدروكسيل الحر قد يكون أخطرها، غير أن الجذر الحر له لا يدوم فهو مرحلة انتقالية عمرها قصير.
- **الجذور الحرة النتروجينية** : تشمل أكسيد النتريك وثنائي أكسيد النتروجين وبيروكسيد النتروجين الهيدروجيني وبيروكسيد النتريت وهو الأكثر خطورة.
- **الجذور الحرة الدهنية** : تتميز الدهون بكونها أعلى درجة اختزال من عناصر الجسم وبالتالي فهي عرضة أكثر من غيرها لتأكسد بجذور الأكسجين والنتروجين خاصة منها الدهون غير المشبعة وهي أطول عمرا لذى تعتبر خطيرة.
- **جذور السموم الحرة** : وهي معظم المواد السامة والمطفرات والمسرطنات الكيميائية .

II.2.2.3. أضرار الجذور الحرة

تستهدف الجذور الحرة العضوية على ثلاثة أوجه أساسية :

- **ضرر واقع على الحامض النووي DNA** : قدرت الهجمات التي يتعرض لها جزيء الـ **DNA** في كل خلية من أجسامنا في اليوم الواحد بنحو 10000 هجوم مما يؤدي إلى تكوين نحو 20 نوع من جزيئات الحمض النووي المؤكسد Oxidative DNA Lesions وهذه تؤدي إلى حدوث طفرات وتدمير في الحامض النووي المسؤول عن إعطاء جميع التعليمات في الخلايا **(عابد . ع، 2004)**.

- **ضرر واقع على البروتينات :** والذي يؤدي إلى تغيير طبيعة البروتينات ومن ثم تحويل وظيفتها مؤديا بذلك إلى حدوث أمراض المناعة الذاتية(**حوة. إ، 2013**).
- **ضرر واقع على الدهون :** الأكسدة الفوقية للدهون هي الأخطر إذ تنتج عنها جذور لها شراهة تكسبها عمرا أطول وانتشارا أوسع مسببة عموما خلايا سرطانية (**حوة. إ، 2013**).

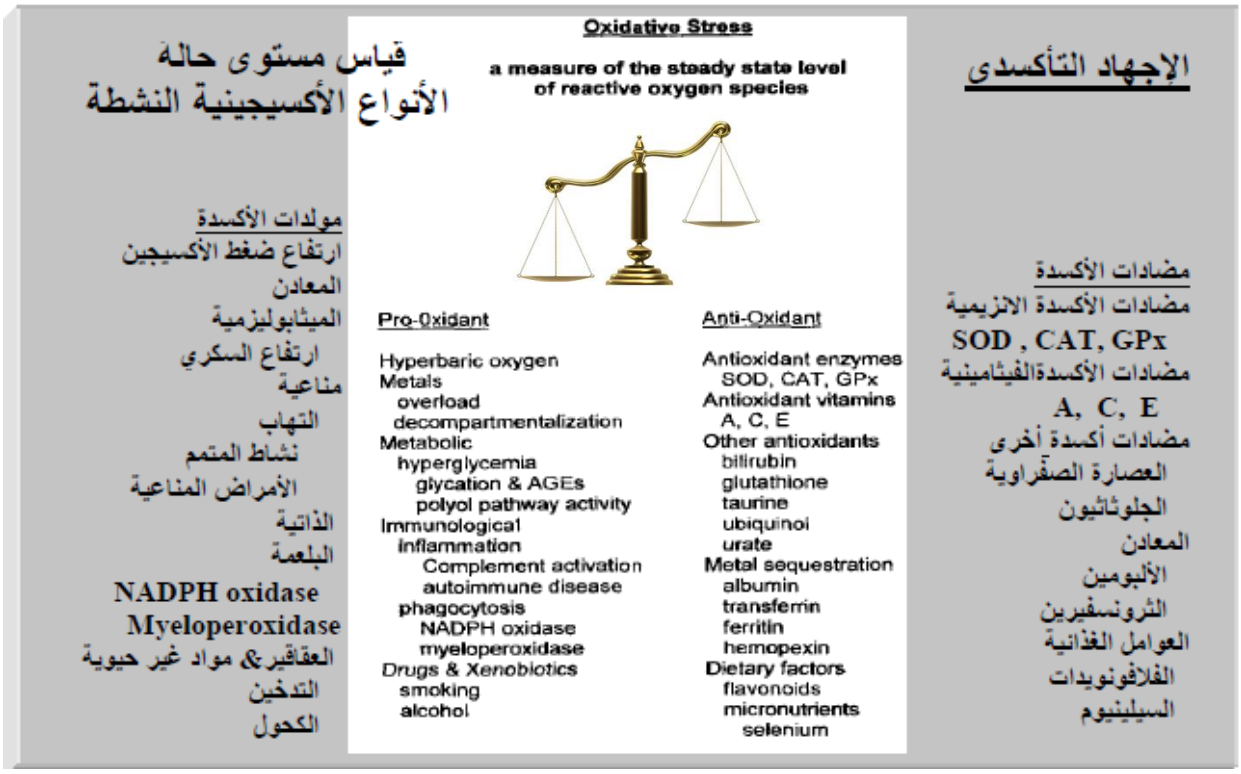
II.3. الإجهاد التأكسدي

II.1.3. تعريف الإجهاد التأكسدي

الإجهاد التأكسدي حالة ناتجة عن عدم التوازن مع السيادة في الأنواع المولدة للأكسدة بالنسبة لمضادات التأكسد، فيؤدي عدم التوازن هذا إلى ظهور أضرار خلوية غالبا ما تكون غير عكسية (**بوبلوطة .ح، 2009**).

ويعرف الإجهاد التأكسدي Oxidative Stress في النظام البيولوجي على أنه اختلال في التوازن بين مضادات الأكسدة ومولدات الأكسدة، هذا الاختلال راجع للإنتاج المفرط لمولدات الأكسدة وأو نقص في مضادات الأكسدة فتسبب الجزيئات المؤكسدة أضرار خلوية ونسيجية (**بن سلامة. ع، 2012**).

تمتلك الخلايا أنظمة دفاعية مضادة للأكسدة قادرة على مواجهة الـ ROS ومضادات الأكسدة الدفاعية يحدد قانون الأكسدة الخلوية، في حالة إختلال هذا التوازن، أثناء زيادة الـ ROS أو فشل المضادات الأكسدة تجد الخلية نفسها أمام حالة إجهاد تأكسدي (**عابد. ه، 2011**).



الشكل II.2. بعض العوامل المحددة لحالة الإجهاد التأكسدي للأنظمة البيولوجية(عابد. هـ، 2011).

وهذه بعض الأمراض التي يعد الإجهاد التأكسدي محفزا رئيسيا لها موضحة في الجدول رقم **II.1**

الجدول II.1. بعض الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي والجذور الحرة (بن سلامة. ع، 2012)

الأمراض	المرجع
السرطان	(Martinez-Outschoorn *et al*., 2010)
أمراض القلب والأوعية	(Lakshmi *et al*., 2009)
السكري	(Kashihara *et al*., 2010)
Alzheimer, Parkinson	(Filosto *et al*., 2011)
الإلتهاب	(Syrkina *et al*., 2008)
التهاب المفاصل	(Wruck *et al*., 2011)
الشيخوخة	(Romano *et al*., 2010)
الحساسية	(Li *et al*., 2010)

II.2.3. مضادات الأكسدة

من المعروف أن الجذور الحرة يتم التغلب عليها بما يسمى بالمواد المضادة للأكسدة والتي تقوم بمعادلة الجذور الحرة في الخلايا الحيوانية والأنسجة النباتية، ولكن هذه المواد يقل محتواها تدريجيا وذلك بزيادة ظروف الإجهاد أو التقدم في العمر (**طه صقر. م، بدون سنة**).

II.1.2.3. تعريف مضادات الأكسدة

يطلق مصطلح مضادات الأكسدة على كل مادة أو مركب يؤثر بتراكيز ضعيفة وله فاعلية ضد الأضرار التأكسدية ويعمل على تأخير أو الوقاية من فعل الجذور الحرة (**بوبلوطة. ح ، 2009 و بن سلامة. ع، 2012**). فهي إما أن ترتبط بالجذور الحرة فتعمل على تقويضها لتستقر وتمنع بذلك التأثير الضار الذي تلحقه بالجسم إذ تعتبر نظاما دفاعيا ضد الضغط الذي تسببه ذرات الأكسجين الشاردية لحماية خلايا الجسم، وإما لأنها تمنع تكوين الجذور الحرة أو أن تصلح الضرر الناتج عنها (**حوة. إ، 2013**).

إذا هي عبارة عن مواد مانحة لذرات الهيدروجين، أو أنها تتحد مع الجذر وتحوله إلى مركب مستقر كما هو موضح في المعادلة التالية :

$$ROO^{\cdot} + AH_2 \longrightarrow ROOH + AH^{\cdot}$$

$$AH^{\cdot} + AH \longrightarrow AH_2 + A^{\cdot}$$

والدور الأساسي لمضادات الأكسدة هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة من الأكسدة (**العابد. إ ، 2008**).

إذا من المهم وجود مضادات الأكسدة داخل الكائن الحي للحد من خطورة الجذور الحرة وذلك بتناول واستهلاك مجموعة كبيرة من الأطعمة الغنية بمضادات الأكسدة **(Prakash. A, 2001)**، وتقسم مضادات الأكسدة من حيث مصادرها إلى قسمين رئيسيين هما :

الطبيعية وتضم الإنزيمية وغير الإنزيمية

المصنعة مخبريا **(العابد. إ، 2008).**

II.2.2.3. أقسام مضادات الأكسدة

يمكن تقسيم مضادات الأكسدة إلى نوعين :

أ. مضادات أكسدة طبيعية : وتحوي الإنزيمية وغير الإنزيمية.

- **مضادات الأكسدة الإنزيمية : Enzymatic anti Oxidants**

تؤدي دورا هاما وأساسيا في حماية الخلية من الإجهاد التأكسدي وتنقسم هذه المجموعة إلى ثلاث فئات : **(بوالقندول. ر، 2011).**

- **فوق أكسيد الدسموتاز *SOD* Super Oxide dismutase**

فصل الأمريكيان Fridovich و Mc.Cord عام 1969 انطلاقا من الكريات الدموية الحمراء البشرية نظام إنزيمي مضاد للأكسدة لأول مرة، إنها إنزيمات فوق أكسيد الدسموتاز ***SOD*** **(Pincemail .J et Defraigne. J, 2004).**

يعتبر هذا الإنزيم أحد أهم الإنزيمات الفاعلة كمضاد للأكسدة، فهو يقوم بإزالة جذور فوق الأكسجين وذلك بتسريع معدل إزالته بحوالي أربع مرات بمساعدة بعض المعادن مثل السيلينيوم والنحاس والزنك كما يوضحه التفاعل التالي :

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O + O_2$$

ولأنه يعتبر عامل مؤكسد ومختزل في آن واحد فإن إنزيم **SOD** يقي الكائنات الحية الهوائية من التأثيرات الضارة لهذه الجذور(غير موجودة في اللاهوائية إجباريا) وهو يوجد في كل الأنسجة الهوائية في الميتوكوندري والسيتوزول (**بوالقندول**. ر، **2011**).

- **الكاتلاز *Catalase***

يوجد في الأجسام البيروكسية في خلايا أنسجة الكائنات الراقية كالدم ونخاع العظم والأنسجة المخاطية والكلى والكبد كما أن هذه الأجسام غنية بإنزيم آخر هو الأكسيداز Oxidase، فبينما يعمل الأكسيداز على تكوين H_2O_2 في هذه الأنسجة يعمل الكاتلاز على التخلص من جزيئتي بيروكسيد الأكسجين في شكل جزيئتي ماء وجزيئة أكسجين حسب المعادلة التالية : (**بوالقندول**. ر، **2011** و **عمراني**. أ، **2013**)

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

- **جلوتاثيون بيروكسيداز Glutathione Peroxidase GPx**

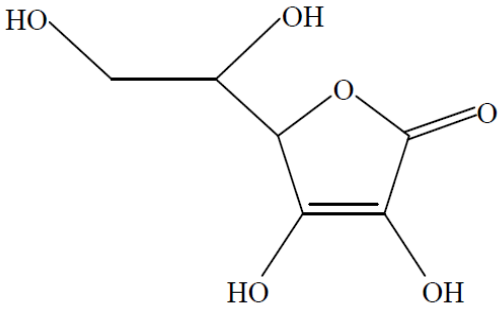
يوجد هذا الإنزيم في خلايا الدم الحمراء والأنسجة الأخرى، ويقوم هذا الإنزيم بتحفيز تكسير H_2O_2 وHydroperoxidase الليبيدات (هيدروبيروكسيدات ناتجة عن أكسدة الليبيدات) بواسطة الجلوتاثيون المختزل GSH و H_2O_2 ليعطي الغلوتاثيون المؤكسد $2GS$ والماء، حسب المعادلة التالية : (**بوالقندول**. ر، **2011**).

$$2GS + H_2O_2 \xrightarrow{GP_X} GS - SG + 2H_2O$$

- **مضادات الأكسدة غير الإنزيمية Non-enzymatic anti Oxidante**

➢ **فيتامين ج : Vitamin C**

يعتبر فيتامين **C** من المركبات القابلة للذوبان في الماء، ذو تركيب مشابه للكاربوهيدرات سداسية الكربون **(عمراني. أ، 2013)**.

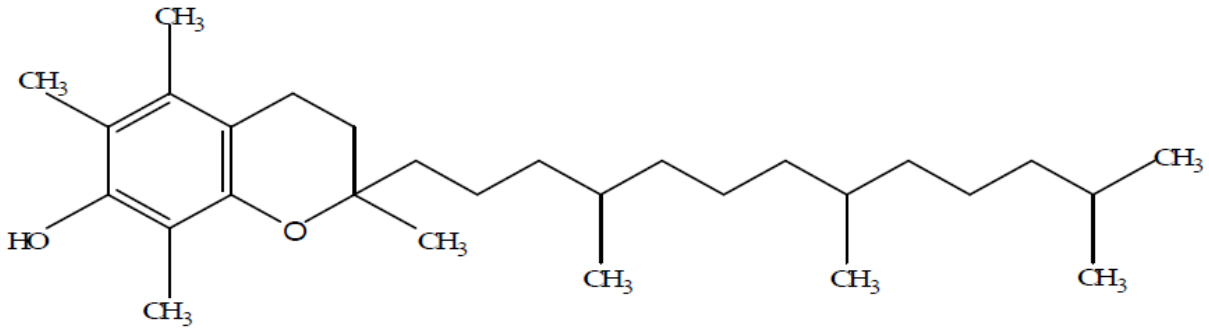


الشكل II.3. الصيغة الكيميائية لفيتامين C (عمراني. أ، 2013)

يستطيع هذا الحمض اختزال الجذور الحرة من معظم مصادرها، كما يعمل على مساندة النظام الدفاعي للجسم، كما له دور مضاد للموت الخلوي المبرمج، ولأن الجسم لا يستطيع إنتاج هذا الفيتامين يجب تناول الأطعمة المحتوية عليه كالحمضيات **(بوالقندول. ر، 2011)**.

➢ **فيتامين هـ : Vitamin E**

هي مواد قابلة للذوبان في الدهون، تتواجد بتراكيز مختلفة في الأغذية النباتية والحيوانية، وأهم مصادرها الطبيعية هي الزيوت النباتية **(عمراني. أ، 2013)**.



الشكل II.4. الصيغة الكيميائية لفيتامين E (عمراني. أ، 2013)

تؤدي هذه المركبات دورا حيويا في حماية الأغشية الخلوية من التلف التأكسدي وبالتالي منع الكوليسترول من الالتصاق بجدران الشرايين، فهو يعالج عدد من الأمراض كالتقليل من نسبة حدوث الإصابة بالجلطات القلبية، وتصلب الشرايين، ومن المصادر الغنية بهذا الفيتامين زيت النخيل، الذرة والفول السوداني **(بوالقندول. ر، 2011)**.

توجد العديد من مضادات الأكسدة غير الإنزيمية الأخرى مثل الفينولات، الفلافونويدات والكاروتينات وهي مضادات أكسدة فعالة خصوصا في عمليات الأكسدة الخاصة ببعض المعادن، وسنخص بالذكر مجموعة الفينولات لأنها موضوع الدراسة.

- **الفينولات**

تمتلك الجزيئات الطبيعية النباتية فوائد متعددة تستعمل في الصناعة، من بين هذه المركبات نجد في المقياس الأول المواد الأيضية الثانوية التي تستعمل خاصة في العلاج، نجد منها متعددات الفينول، تمثل هذه الأخيرة مجموعة من المواد الأيضية الثانوية المتميزة باحتوائها على مجموعة أو عدة مجموعات هيدروكسيل، متغيرة أو غير متغيرة ومرتبطة بأنوية حلقية.

تشكل متعددات الفينول مجموعة جزيئات متنوعة ومنتشرة الوجود، وتملك تركيبات كيميائية جد متنوعة حيث تم تحديد عدة آلاف من الجزيئات في العديد من النباتات، وتم توزيعها في مختلف الأقسام بدلالة طبيعة هيكلها الكربوني والمجموعات الكيميائية المرتبطة بها (**بوبلوطة. ح، 2009**).

ويمكن تلخيص الخصائص البيولوجية لهذه المجموعة في : **(بوالقندول. ر ، 2011)**.

* أسر الجذور الأكسجينية النشطة ***ROS***.

* التثبيط الإنزيمي ومخلبة الآثار المعدنية المولدة للـ ***ROS***.

* حماية الأنظمة المضادة للأكسدة الداخل خلوية .

وقد أثبتت العديد من الأبحاث أن مختلف المشروبات الغنية بمتعددات الفينول مثل الشاي وعصير الفواكه تزيد من القدرة الارجاعية في البلازما.

ب. مضادات الأكسدة المصنعة

تعتبر عنصرا اساسيا يجب إضافته للأطعمة المعلبة لتقليل من إفسادها إلى أقصى حد وذلك لتأكسدها قبل غيرها منها BHA، BHT، PG، TBHQ، هذه المركبات واسعة الاستعمال في الصناعات الغذائية لأنها فعالة وقليلة التكلفة بالمقارنة مع مضادات الأكسدة الطبيعية وغير السامة، ولكن لها أضرار جانبية على المدى البعيد لذلك تم الخلي عنها في دول الإتحاد الأوربي مؤخرا. **(بوالقندول**. ر ، **2011)**.

الجانب التطبيقي

الفصل الثالث

النشاط المضاد للأكسدة

1.III. المواد الكيميائية ودراسة النبات

1.1.III. المواد الكيميائية

الميثانول Méthanol (CH_3OH)، أسيتونAcetone (C_3H_6O) الهكسان Hexane (C_6H_{14})، ثنائي كلور الميثانDichloromethane(CH_2Cl_2)، خلات الإيثيل Ethel Acétate($C_4H_8O_2$)، كاشف Réactif de phénol de Folin_Ciocalteu ($H_3PM_{12}O_4$ ،$H_3PW_{12}O_{40}$)، حمض الغاليك Gallic Acid ($C_7H_6O_5$)، كربونات الصوديوم Carbonate de sodium (Na_2CO_3)، حمض الأسكوربيكAscorbic Acid ($C_6H_8O_6$)، الروتين Rutin ($C_{27}H_{30}O_{16}$)، مركب DPPH -diphenyl- 1, 1- 2- picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) .

2.1.III. الدراسة النظرية للنبات(Chehma. A, 2006 ; Quezel. P et Santa. S, 1992 ; Ozenda .P, 1977).

Cotula cinerae Del

التصنيف العلمي

المملكة : النباتية Végétal

الشعبة : النباتات البذرية Spermaphytes

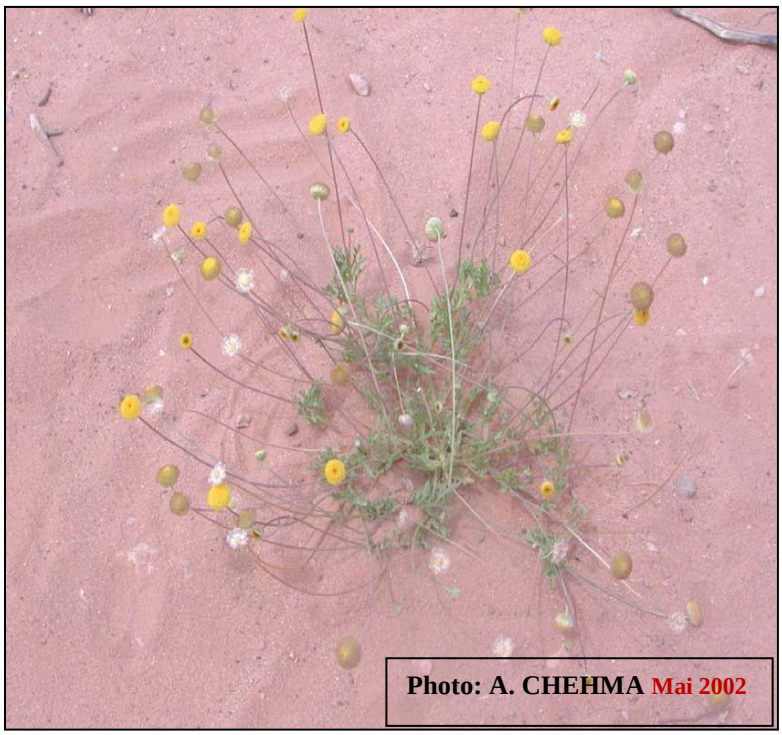
القسم : ذوات الفلقتين Dicotyledones

الفصيلة : نجمية Asteraceae

العائلة : الأرباناوية Anthemideae

الجنس : الكوتولا Cotula

النوع : ***Cotula cinerae***



الشكل III.3. صورة لنبات *Cotula cinerae*

الوصف : عشبي سنوي ،عطري للغاية ، يتراوح ارتفاعها بين 10 إلى20 سم.

الأوراق خضراء صوفية وسميكة ،الأزهار أنبوبية في البثور وتصبح صفراء عند تفتحها .

الموطن والتوزيع : نصادف هذا النوع في الصحراء العربية ينمو في مستعمرات كبيرة بعد هطول الأمطار كما تنبت في المنخفضات الطينية الرملية وعلى ضفاف الوديان.

فترة النمو الخضري : تكون فترة الازهار خلال أشهر مارس إلى مايو.

استعمالاتها : وهي مشهورة جدا لصفاتها العطرية

الغذاء : يستخدم لإضفاء نكهة في الحساء خاصة خلال شهر رمضان

الدواء : لتسهيل عملية الهضم

الرعي : يرعى عليها الماعز في الغالب .

2.III. تحضير العينة النباتية

قبل أن نتطرق إلى العمل التطبيقي نشير إلى أن الدراسات حول نبات ***Cotula cinerae*** كانت قليلة جدا لكن تم التطرق إليه من طرف الدكتور شحمة عبد المجيد (2006) المختص في دراسات الأعشاب والنباتات الصحراوية بجامعة قاصدي مرباح بورقلة .

1.2.III. الجني

تم قطف الجزء الخضري من العينة النباتية في شهر نوفمبر 2018 صباحا من منطقة تاجموت بولاية الأغواط .

2.2.III. منطقة الدراسة

منطقة تاجموت هي إحدى بلديات ولاية الأغواط، تقع على بعد 38 كلم غرب مدينة الأغواط ، يحدها شمالا ولاية الجلفة وجنوبا الحويطة والخنق وغربا وادي مزي وعين ماضي وسيدي بوزيد والبيضاء وشرقا سيدي مخلوف والأغواط .

الشكل III.4.خريطة منطقة الدراسة

المصدر : من الموقع الإلكتروني (https://www.bing.com/maps) تاريخ الإطلاع 2019/07/02

جدول III.1. خصائص منطقة الدراسة (Monographie de la wilaya de Laghouat 2013)

المساحة	620 كلم^2
عدد السكان	أكثر من30 ألف نسمة
خطوط الطول	2 شرقا
دوائر العرض	33 شمالا
الارتفاع	750 م عن سطح البحر
معدل الرطوبة	% 50
معدل تساقط الأمطار	173 مم
معدل الحرارة	19° م

III.3.2. تحضير العينة

قبل البدء في عملية التجفيف تجزأ الأعضاء ثم تنقى من الحشرات والأجزاء الخشنة مثل الجذع والجذور، ويتم تقسيمها إلى أجزاء صغيرة حتى تسهل عملية التجفيف، ثم ننشر مختلف الأعضاء في الظل والهواء الطلق على قماش سميك على شكل طبقة رقيقة لتسهيل عملية التقليب، مع مراعاة عدم تعرض النبات للعوامل التي تؤدي إلى فقدان المادة الفعالة مثل التعرض لأشعة الشمس لمدة طويلة، وتنتهي مدة التجفيف بعدما نتأكد من عدم وجود الماء في النبات والتجفيف يسهل عملية السحق ويمنع النبات من التعفن، بعد ذلك تطحن العينات النباتية يدويا وتخزن في أكياس ورقية إلى حين البدء بعملية الاستخلاص.

III.4.2. الاستخلاص

هناك عدة طرق لاستخلاص المركبات الفينولية، والطريقة التي اخترناها هي الاستخلاص بالنقع على البارد "طريقة Markham 1982" والتي ترتكز أساسا على درجة ذوبانية هذه المركبات في المذيبات العضوية **(بن سلامة. ع، 2012)**.

اعتمدنا استخلاص المركبات الفينولية من 5غ من مسحوق المادة النباتية الجافة بمذيبين مختلفين:

- إضافة 100مل من محلول (ميثانول/ماء) (2/8) إلى 5 غ مادة نباتية جافة .
- إضافة 100مل من محلول (أسيتون/ماء) (3/7) إلى 5 غ مادة نباتية جافة .

في إناء زجاجي محكم الإغلاق ويرج ثم يحفظ في مكان جاف وبعيدا عن أشعة الشمس وفي درجة حرارة المخبر لمدة 24 ساعة بعد انقضاء المدة نقوم بترشيح محلولي النقع باستعمال قمع وورق الترشيح ونحتفظ بالراشح الأول ونكرر عملية النقع بنفس الحجوم السابقة للرشاحة المتبقية وتحفظ في نفس الشروط ولمدة 24 ساعة وبعد انقضاء المدة نقوم بترشيح محلول النقع ومزج الراشح الثاني مع الأول لنحصل على حوالي (أقل) 200 مل في كل زجاجة**(Hamdi .A, 2011)**.

بعد ذلك نقوم بتبخير الراشح باستعمال جهاز التبخير الدوراني(Rotavapor) **الملحق II** ، تحت درجة حرارة 45°م من أجل التخلص من الجزء الكحولي الميثانول والأسيتون لنتحصل في النهاية على ناتج عبارة عن مستخلص خام Extrait bruts (الماء + المركبات العضوية).

3.III. فصل المركبات الفينولية

المستخلصات الخام عادة ما تكون خليط معقد للغاية، والإستراتيجية الأساسية لفصل هذه المركبات تعتمد على الخواص الفيزيوكيميائية التي تسمح بفصلها إلى مجموعات كيميائية مختلفة، ويتم من اجل ذلك اعتماد طريقة الغسل باستعمال مذيبات عضوية متزايدة القطبية **(Otsuka. H, 2006)**.

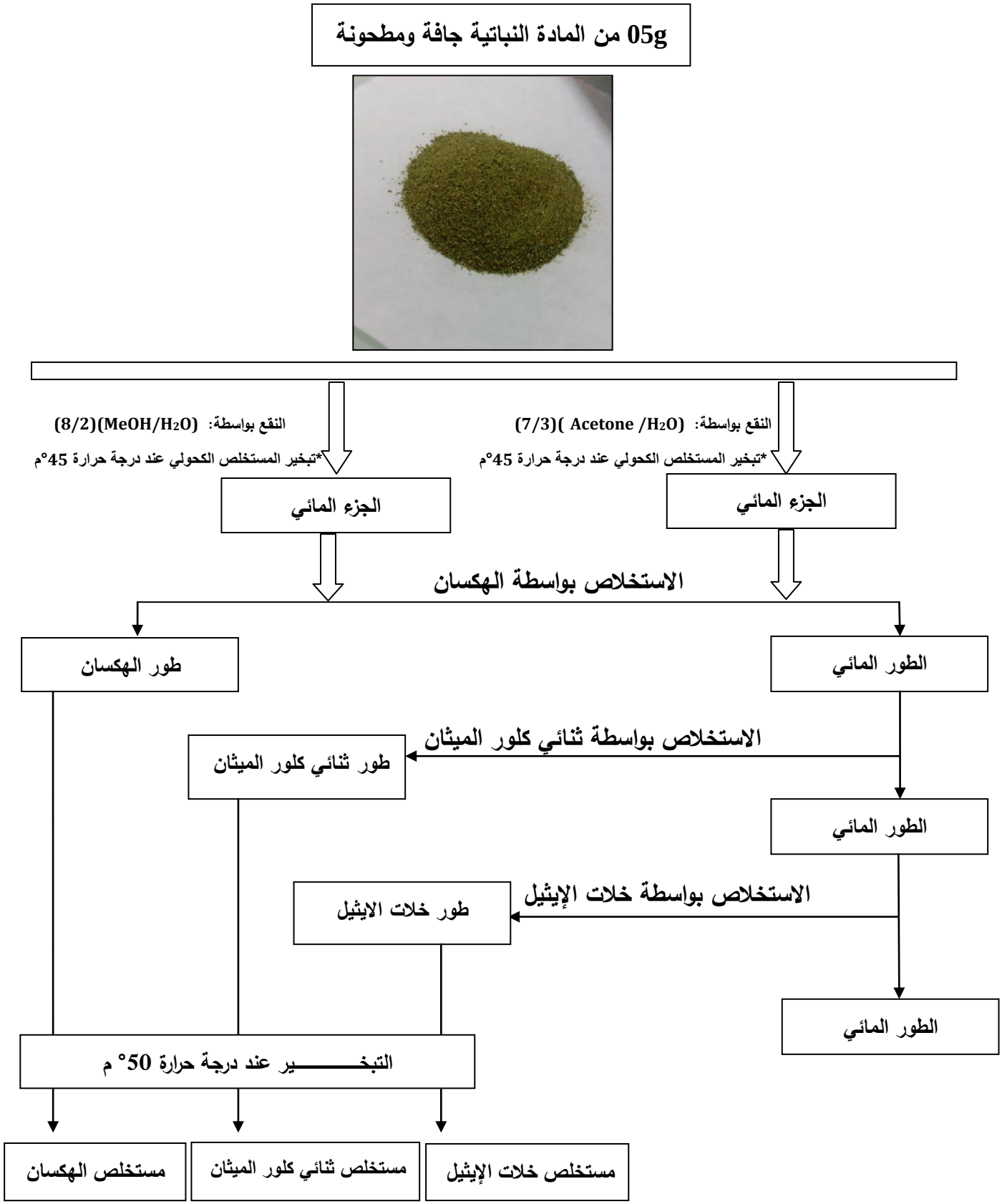
عدم التجانس بين الماء والمحاليل القطبية يساعد على تشكل طورين لذا نقوم بغسل الجزء المائي مرات متتالية بمحاليل مختلفة القطبية لفصل المواد المماثلة لقطبيتها معها، وتم استعمال المذيبات التالية:

المذيب الأول "الهكسان" Hexane : C_6H_{14} وهو مذيب عضوي غير قطبي يستعمل لإزالة الأصباغ والدهون، يغسل الطور المائي حتى يصبح طور الهكسان شفافا.

المذيب الثاني ثنائي كلور الميثان Dichloromethane:(CH_2Cl_2) وهو مذيب عضوي قليل القطبية يستعمل لإزالة المركبات قليلة القطبية ، يغسل الطور المائي حتى يصبح طور ثنائي كلور الميثان شفافا.

المذيب الثالث "خلات الإثيل "Acétate d Ethyle : $C_4H_8O_2$ مذيب عضوي معتدل القطبية، يستعمل لاستخراج المركبات الفينولية متوسطة القطبية (أحادية وثنائية السكر)، نعيد نفس عملية الغسل للجزء المائي حتى يصبح طور خلات الإثيل شفافا.

نتحصل في الاخير على ثلاث مستخلصات عضوية (هكسان، ثنائي كلور الميثان و خلات الايثيل)، باستعمال جهاز التبخير الدوراني (Rotavapeur) نقوم بالتبخير للمستخلصات النباتية عند درجة حرارة لا تتجاوز °50م، تسمح هذه العملية بحساب مردود الاستخلاص.



الشكل III.5. مخطط عام لاستخلاص المركبات الفينولية (من إعداد الطالب)

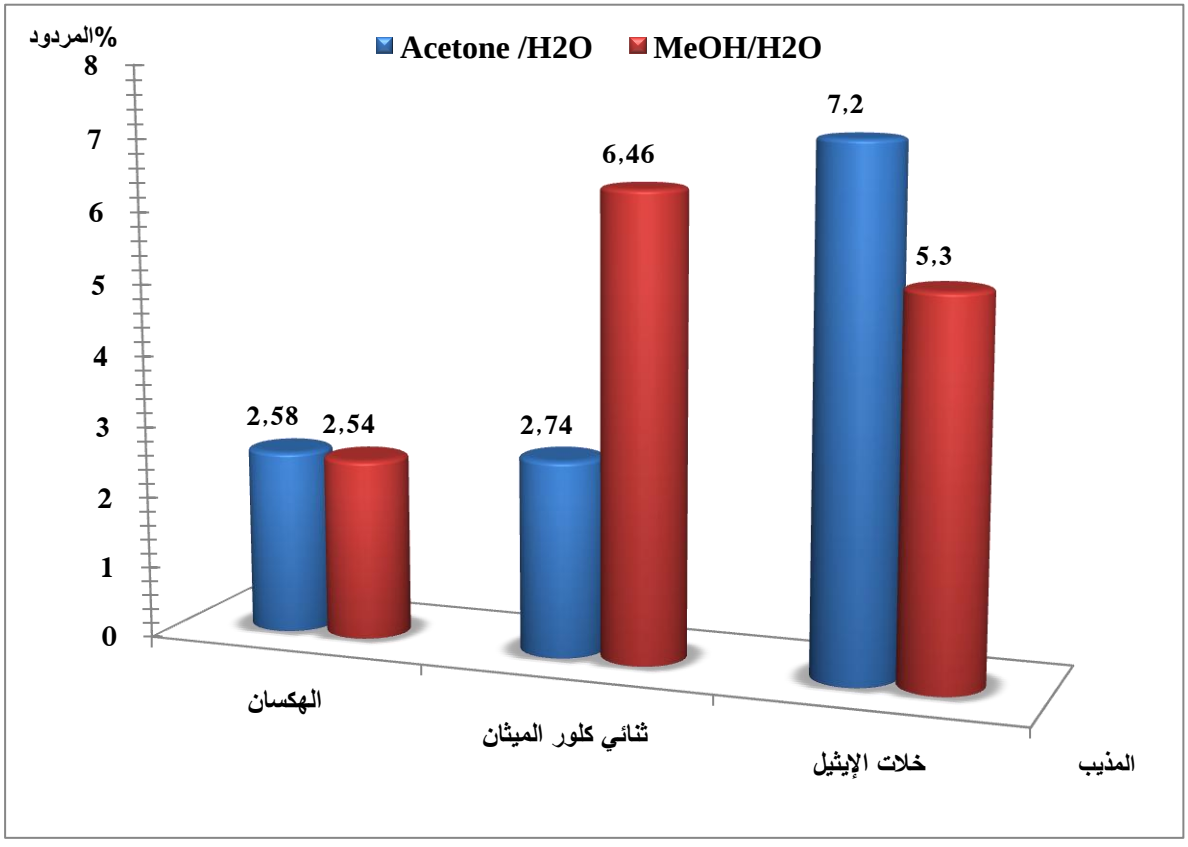
نقوم بحساب النسبة المئوية لمردود كل مذيب بالعلاقة التالية :

$$\text{المردود} = \frac{\text{كتلة المستخلص (غ)} \times 100}{\text{كتلة العينةالنباتية (غ)}}$$

جدول 2.III. المردود بالنسبة المئوية لكل 5غ من الوزن الجاف (من إعداد الطالب)

المذيب	الهكسان	ثنائي كلور الميثان	خلات الايثيل
	المردود%		
Acetone /H_2O	2.58	2.74	7.2
MeOH/H_2O	2.54	6.46	5.3

من خلال النتائج المحصل عليها والموضحة في الجدول أعلاه والتي دلت على التباين في نسب المردود لكل مستخلص نباتي، ولتوضيح ذلك أكثر عبر عن هذه القيم بالأعمدة البيانية التالية:



الشكل 6.III. أعمدة بيانية للمردود بالنسبة المئوية لكل 05غ من الوزن الجاف

(من إعداد الطالب بالاعتماد على نتائج الجدول 2.III.)

III.3.1. مناقشة النتائج

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول(**2.III**) نلاحظ أن مردود الاستخلاص يتراوح بين 5.3 غ/ل و 7.2 غ/ل ،حيث سجلنا تباينا في النسبة المئوية لمردود الإستخلاص ،فكانت نسب المردودية أعلى بالنسبة لمستخلص خلات الإيثيل والهكسان والمستخرجة من المستخلص الخام الناتج عن المحلول **Acetone /H_2O** والتي قدرت على التوالي بـ : 7.2 / 2.58 إلا أنها كانت منخفضة في مستخلص ثنائي كلور الميثان 2.74 .

أما عن نسب المردودية بالنسبة لمستخلص الهكسان وخلات الإيثيل المستخرجة من المستخلص الخام الناتج عن المحلول **$MeOH/H_2O$** فكانت منخفضة بالمقارنة مع المستخلص الخام الاخر والتي كانت نسبها على الترتيب :2.54 ،5.3 ، أما مستخلص ثنائي كلور الميثان فكانت نسبه مرتفعة 6.46 .

بالرغم من أن العينة النباتية واحدة إلا أنه سجل تباين في نسبة المردود وهذا يرجع إلى الإختلاف أولا في نوع المذيب المستعمل في عملية الإستخلاص بالنقع **$MeOH/H_2O$** و **Acetone /H_2O** ، فلاحظنا أنه غالبا ما كان المردود عاليا بالنسبة للمستخلص الخام والمستخرج بالمذيب الأخير وهذا دليل على أن قدرة إذابته أكبر. أما فيما يخص مذيبات المرحلة الثانية والمستخدمة في تنقية المركبات الفينولية فكذلك كانت النسب بينها متباينة ويمكن أن يرجع هذا الإختلاف إلى طبيعة المذيب أي الفرق في القطبية بين المذيبات الثلاث ، وكنتيجة يمكن القول أن هذا النوع النباتي المدروس غني بالمركبات متوسطة القطبية (أحادية وثنائية السكر) **.(Hamdi. A, 2011)**

4.III. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الإجمالية

1.4.III. مبدأ العمل

تم التقدير الكمي للمركبات الفينولية الإجمالية بطريقة Folin-Ciocalteu حسب **(Bahorum. T, 1997)** حيث تعتمد على إرجاع مكونات الكاشف Folin-Ciocalteu وهي مزيج من ($H_3PM_{12}O_{40}$) Phosphomolybdate و($H_3PW_{12}O_{40}$) Phosphotungestate ذو اللون الأصفر، بواسطة المركبات الفينولية في وسط قاعدي كربونات الصديوم (Na_2CO_3) إلى مجموع أكاسيد Tungstene (W_8O_{23}) و Molybdene (MO_8O_{23}) ذات اللون الأزرق والذي تتناسب شدته طردا مع نسبة الفينولات المتواجدة في الوسط، يمكن تقديرها بقياس الامتصاصية عند طول الموجة الموافقة لـ 760nm **(Macheix J.J et al., 2005).**

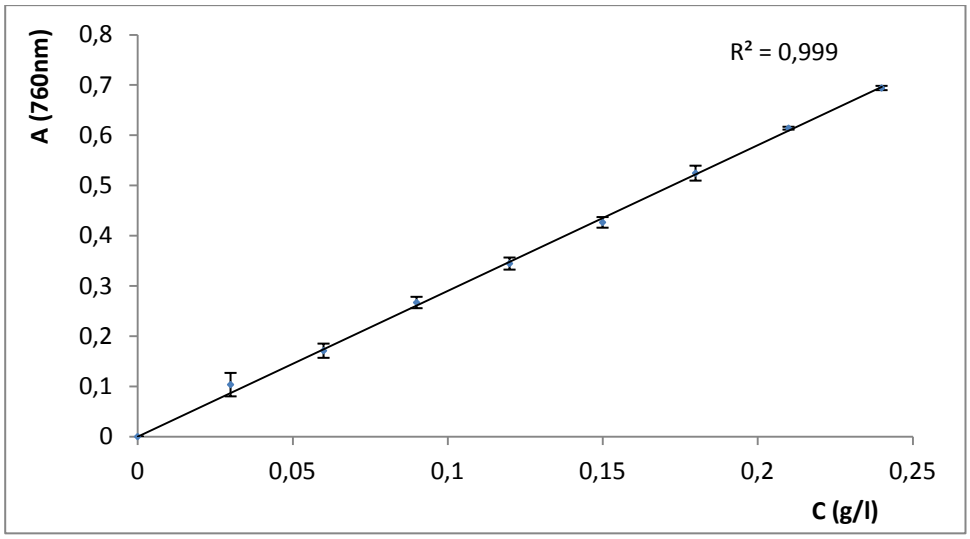
لقياس مجموع المركبات الفينولية ضمن المستخلصات يجب تحضير منحنى قياسي خاص بحمض الغاليك ($C_7H_6O_5$، مسحوق بلوري لونه أبيض، عديم الرائحة).

2.4.III. طريقة العمل

المنحنى القياسي لحمض الغاليك

انطلاقا من المحلول الأم لحمض الغاليك، نحضر سلسلة تخفيف ذات تراكيز متزايدة، نأخذ من كل تركيز من السلسلة السابقة حجم 100μl نضعها في أنبوب اختبار ونضيف لها 500μl من كاشف Folin-Ciocalteu (10%) مع الرج، بعد حضنها لمدة 5 دقائق في درجة حرارة المخبر نضيف 2ml من كربونات الصوديوم Na_2CO_3 (الوسط قاعدي) وبعد الرج ثانية تحفظ المحاليل في الظلام وفي درجة حرارة المخبر لمدة 30 دقيقة، وتكرر التجربة ثلاثة مرات.

نقيس امتصاصية كل محلول عند طول الموجة الموافقة لـ 760nm بإستعمال جهاز مقياس الطيف الضوئي **(الملحقII)** ، سمحت النتائج المحصل عليها برسم المنحنى القياسي لحمض الغاليك (الشكل III.7)



الشكل III.7. المنحنى القياسي لحمض الغاليك (من إعداد الطالب بالاعتماد على نتائج الامتصاصية)

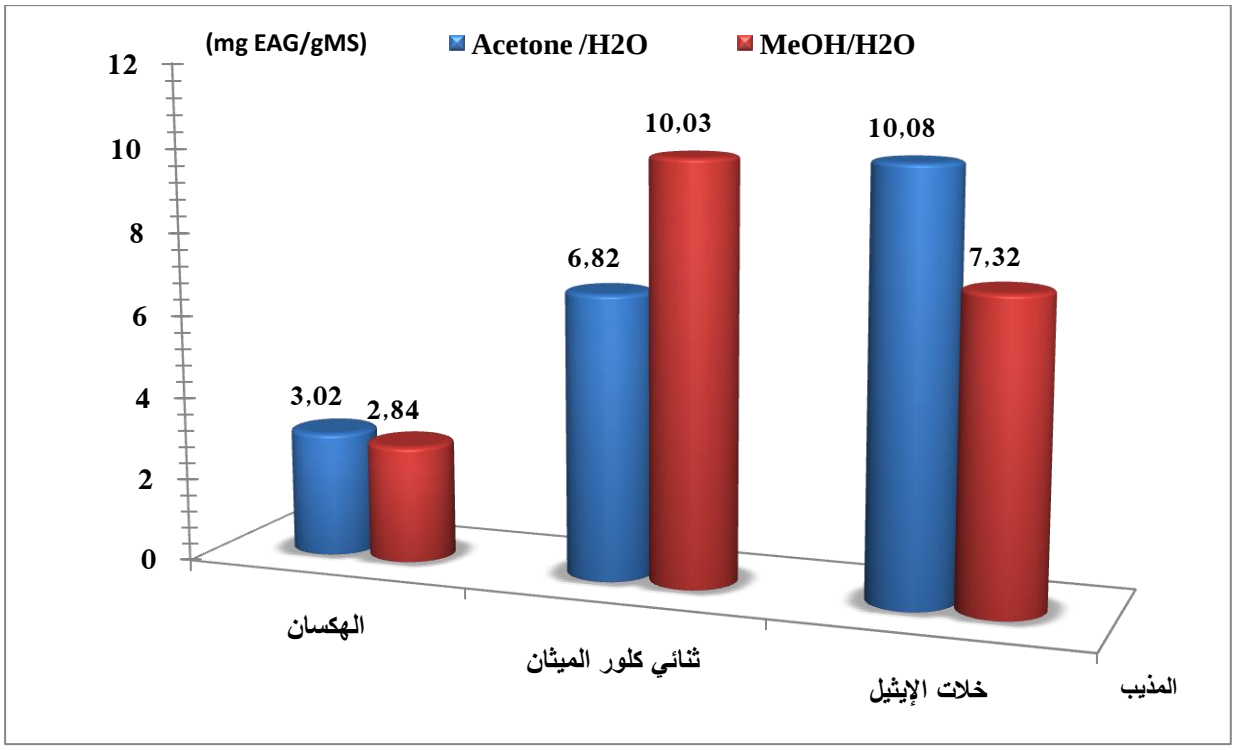
III.3.4. تقدير المركبات الفينولية في المستخلصات النباتية

من أجل التقدير الكمي للفينولات الكلية، نعيد نفس خطوات تحضير المنحنى القياسي بتعويض حمض الغاليك بالمستخلصات النباتية المذابة في أحجام معينة من الميثانول، مع إعادة التجربة ثلاث مرات، يتم تقدير إجمالي المركبات الفينولية باستغلال علاقة المنحنى القياسي لحمض الغاليك والنتائج معبر عنها بـ : مغ المكافئ لحمض الغاليك / غ من المادة النباتية الجافة (mg EAG/gMS) **(Marja. P, 1999)** والنتائج موضحة في الجدول أدناه.

جدول III.3. محتوى المركبات الفينولية الإجمالي للمستخلصات النباتية (من إعداد الطالب)

المحتوى	المحتوى ب مغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من المادة الجافة (mg EAG/gMS)		
المستخلص / المذيب	الهكسان	ثنائي كلور الميثان	خلات الايثيل
Acetone /H_2O	3.02±0.04	6.82±1.68	10.08±0.08
MeOH/H_2O	2.84±0.92	10.03 ±0.1	7.32 ±0.72

من خلال النتائج المحصل عليها والموضحة في الجدول أعلاه والتي دلت على التباين في محتوى المركبات الفينولية ، ولتوضيح ذلك أكثر عبر عن هذه القيم بالأعمدة البيانية التالية:



الشكل III.8. أعمدة بيانية لمحتوى المركبات الفينولية الإجمالي للمستخلصات النباتية

(من إعداد الطالب بالاعتماد على نتائج الجدول III.3.)

III.4.4. مناقشة النتائج

وفقا لملخص النتائج التي تم الحصول عليها خلال التقدير الكمي للمركبات الفينولية الإجمالية في العينة النباتية نرى أن المحتوى تتراوح نسبته ما بين 2.84 و 10.08 (mg EAG/gMS)، وسجلت أعلى قيمة في في مستخلص خلات الإيثيل بالمذيب **Acetone /H_2O** والتي قدرت بحوالي 10.08في حين أن مستخلص الهكسان بمذيب **MeOH/H_2O** سجل أدنى قيمة بحوالي 2.84 .

عموما يمكن القول المحتوى من المركبات الفينولية عالي في مستخلصي خلات الإيثيل وثنائي كلور الميثان لكلا المذيبين وهذا إذا ما قورنت بمستخلص الهكسان وقد يصل الفرق في المحتوى إلى حوالي الضعف والضعفين .

هذه المحتويات من إجمالي الفينولات هي أقل مردودا على نطاق أوسع من تلك التي لوحظت بالنسبة لأنواع أخرى تمت دراستها في مختبر العلوم الأساسية **(Djeridane .A et al., 2006)**.

جدول III.4. أنواع أخرى تمت دراستها في مختبر العلوم الأساسية (Djeridane .A et al., 2006).

Plant extract	Total phenolic (mg GAE/g dw)
Anthemis arvensis	32.32 ± 0.2
Artemisia campestris	20.38 ± 0.30
Globularia alypum	21.54 ± 0.81
Artemisia herba halba	13.06 ± 0.40
Juniperus oxycedrus	12.66 ± 0.41
Oudneya africana	7.75 ± 0.22
Thapsia garganica	7.63 ± 0.61
Thymelaea hirsuta	6.81 ± 0.40
Teucrium polium L	4.92 ± 0.21
Artemisia arboresens	3.42 ± 0.50
Ruta montana	3.13 ± 0.30

قد ترجع هذه القيم المنخفضة إلى فترة حصاد العينات النباتية (نوفمبر 2018) وهذه الفترة تعتبر خارج فترة إزهارها .

إضافة إلى ذلك فإن هذه الأخيرة تتأثر كثيرا بمرحلة التطور والنضج وبالنمط الوراثي وأيضا بحالة حفظ المواد النباتية **(Machex JJ. et al., 2005)**

تعتبر هذه النتائج تقريبية لأن جرعة الكاشف Folin-Ciocalteu لا يتفاعل مع المركبات الفينولية فحسب، وإنما قد تتفاعل مع جزيئات أخرى مختزلة وخاصة الأحماض الأمينية والسكريات المرجعة وغيرها من المركبات **(Machex JJ. et al., 2005)**.

5.III. النشاط المضاد للأكسدة

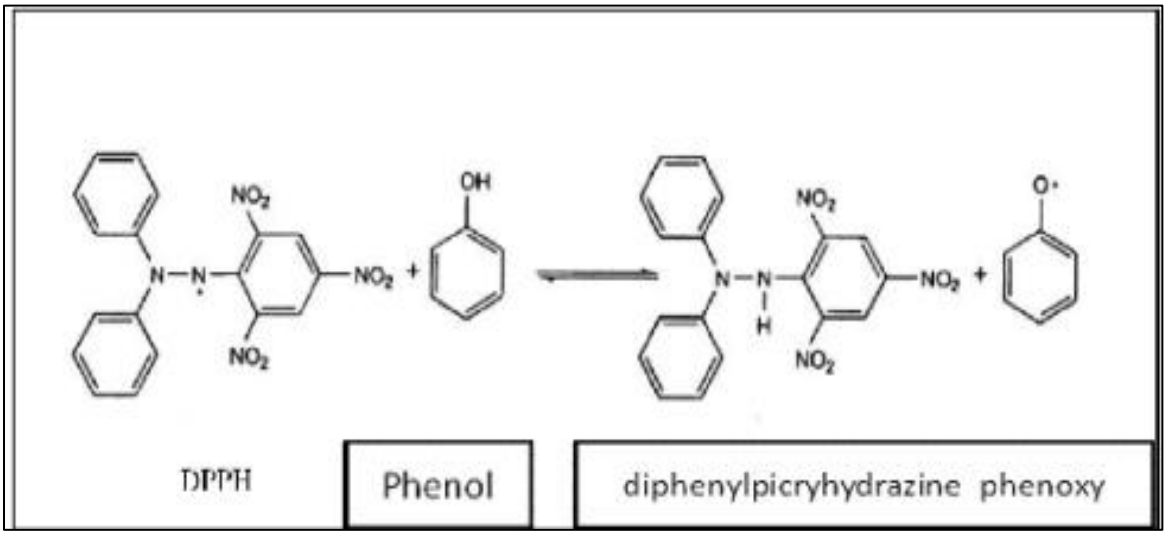
يتم في هذا الجزء تحديد فعالية المستخلصات النباتية ضد الأكسدة من خلال تثبيط الجذور الحرة وفق اختبار **DPPH**.

5.1.III. اختبار DPPH

1.1.5.III. مبدأ العمل

تم اختبار التأثير الإزاحي للمستخلصات النباتية على جذر **DPPH** وهو 2.2 ثنائي فينيل-1-بيكريل هيدرازيل 2.2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl وهو جذر حر مستقر نسبيا، عبارة عن مادة صلبة ذو لون بنفسجي مسود، يصبح لونه أرجواني إلى بنفسجي بعد التحضير **(Ionita .P, 2003)**

يستخدم اختبار الـ **DPPH** على نطاق واسع لخصائصه المميزة (سريع، سهل وغير مكلف) وذلك من أجل قياس مدى قدرة المواد المضادة للأكسدة من بينها الفينولات على إرجاع الجذور الحرة **(Marinova .G, 2011)**. حيث أن المرحلة الأولى من التفاعل هي التقاط ذرة الهيدروجين للمركب الفينولي من طرف جذر الـ **DPPH** كي يعطي Diphenylpicrylhydreazine وجذر Phenoxy كما يوضحه الشكل الاتي :



الشكل III.9. التفاعل الجذري لـ DPPH مع الفينول(Marinova .G, 2011)

في هذا الاختبار نلاحظ تغيرات مختلفة لمضادات الأكسدة تبعا لطبيعتها، تتجلى في تغير اللون البنفسجي للـ**DPPH** إلى اللون الأصفر بدرجات مختلفة، وتحسب قدرة مضادات الأكسدة (نسبة التثبيط) انطلاقا من نسبة **DPPH** المتبقية في نهاية الوقت المحدد للتفاعل بعد قراءة الامتصاصية وفقا للمعادلة التالية :

$$I\% = \{(A_0 - A_1) \div A_0\} \times 100$$

A_0 : الامتصاصية للجذر الحر في غياب مضاد الأكسدة .

A_1 : امتصاصية المزيج (الجذر الحر + مضاد الأكسدة) بعد مرور 30 دقيقة .

يتم مقارنة نشاط المستخلصات بتحديد قيمة الـEC_{50} التي تعبر عن تركيز المحلول (g/l) بالنسبة للمستخلصات الخام أو المركبات النقية اللازمة لإرجاع 50% من جذور **DPPH (Akrout .A et al., 2011).**

III.5.1.2. طريقة العمل

تم اجراء اختبار **DPPH** اعتمادا على الطريقة التي وصفها **(Ani et al., 2006)** مع بعض التعديلات البسيطة، بعد تحضير سلاسل تراكيز متزايدة من المركبات المرجعية والمستخلصات النباتية والممددة بالميثانول يؤخذ من كل تركيز حجم 500µl يضاف له حجم آخر 500µl من **DPPH.**

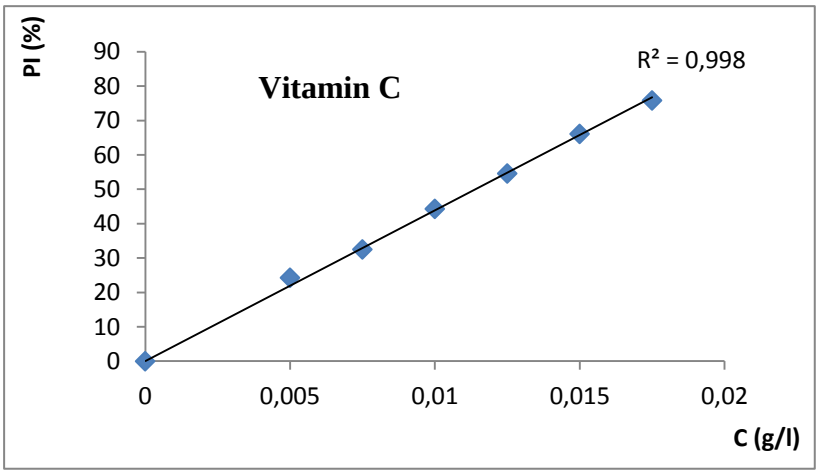
– بعد مجانسة المحاليل السابقة بالرج قليلا، تحفظ لمد 30 دقيقة في الظلام وعلى درجة حرارة المخبر.

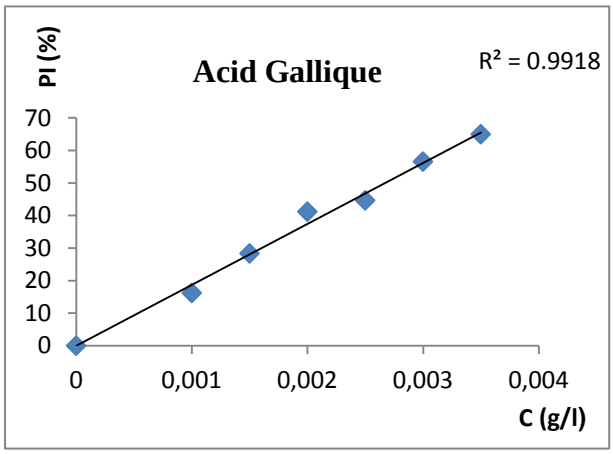
– بعد انقضاء المدة نقيس الامتصاصية في جهاز spectrophotometre عند طول موجة الأعظمي الموافق لـ 517nm.

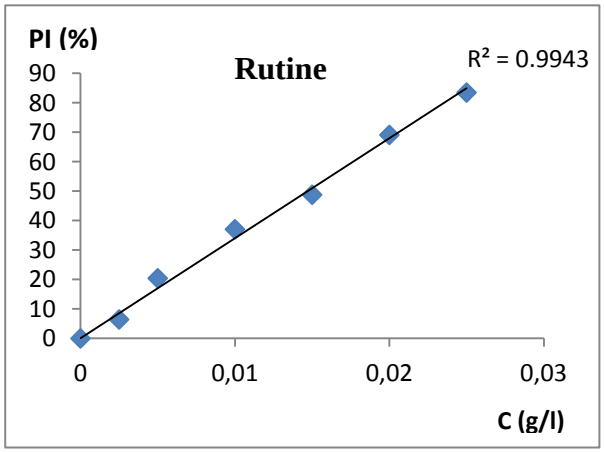
إستعملنا في هذه الدراسة كل من : حمض الأسكوربيك Vitamin C، حمض الغاليك Gallic Acid (C.phenelique)، الروتين Rutin (Flavonooide) كأسس مرجعية في تثبيط الجذر الحر **DPPH.**

3.1.5.III. النتائج والمناقشة

من خلال النتائج المحصل عليها نقوم بحساب النسبة المئوية للتثبيط (I%) ورسم المنحنيات بدلالة التركيز (g/l) والموضحة في الأشكال(8.III، 9.III و10.III) التالية :

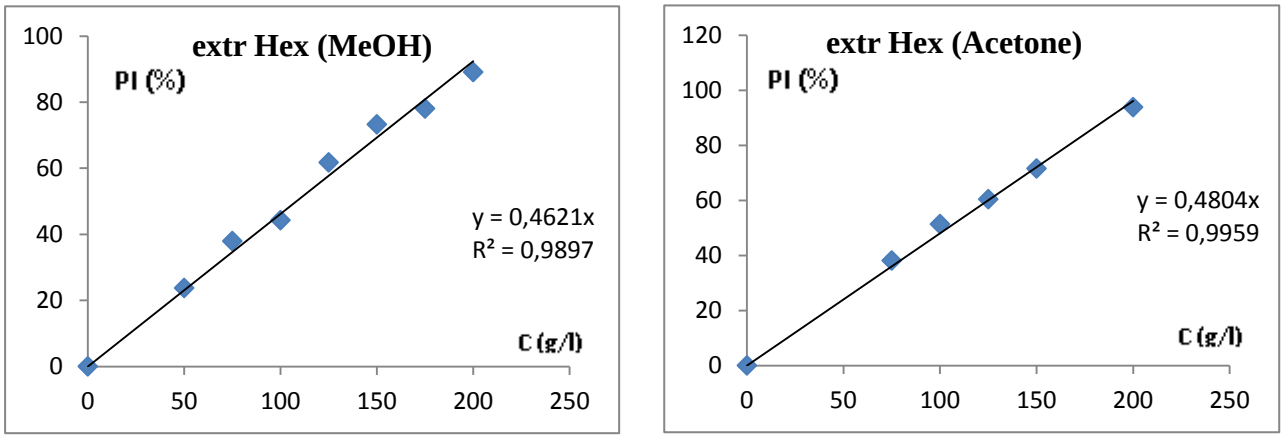




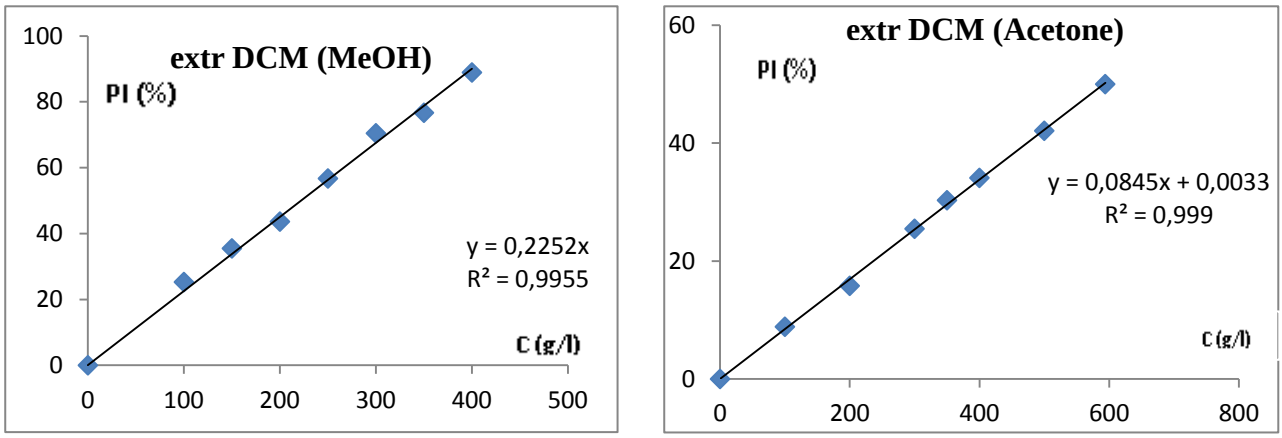


الشكل III.10. المنحنيات القياسية لاختبار الـDPPH

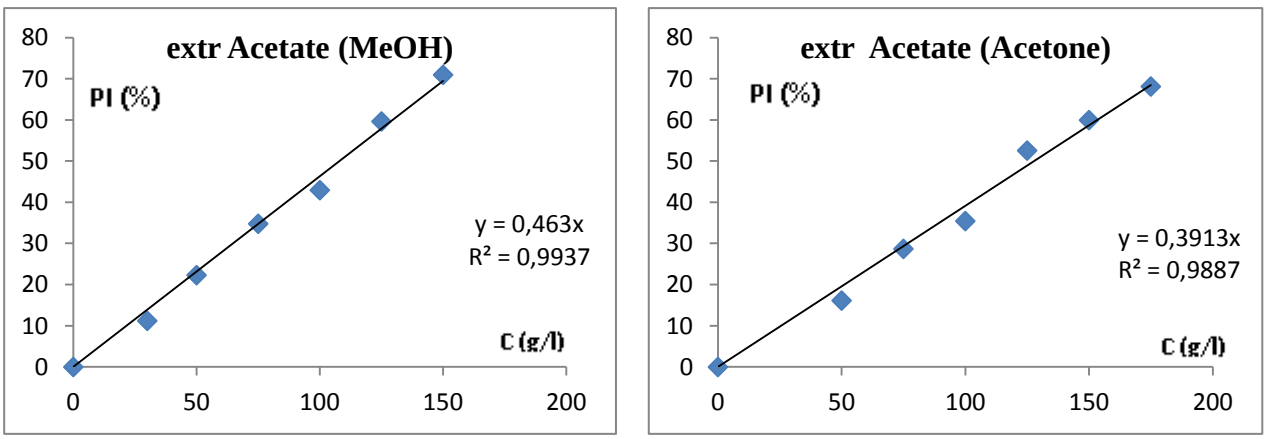
(من إعداد الطالب بالاعتماد على نسب PI (%))



الشكل III.11. منحنيات اختبار الـDPPH لمستخلص الهكسان



الشكل III.12. منحنيات اختبار الـDPPH لمستخلص ثنائي كلور الميثان



الشكل III.13. منحنيات اختبار الـDPPH لمستخلص خلات الإثيل

لمقارنة النتائج المحصل عليها وتحليلها يجب التعبير عن النشاط المضاد للأكسدة لكل من المركبات المرجعية والمستخلصات النباتية بالمعامل EC_{50}، وقيم هذا العامل موضحة في الجدول الأتي :

الجدول III.5. قيم المعامل EC_{50} للمركبات المرجعية والمستخلصات النباتية

(من إعداد الطالب بالاعتماد على نتائج منحنيات اختبار الـDPPH)

		قيم المعامل(غ/ل) EC_{50}
Acetone /H_2O	extr Hex	104.07
	extr DCM	590.31
	extr Acetate	127.77
MeOH/H_2O	extr Hex	108.2
	extr DCM	222.02
	extr Acetate	108
Standard	Vit C	0,011
	Gallic Acid	0,002
	Rutin	0,014

يعرف المعامل EC_{50} بأنه التركيز الفعال القادر على تثبيط نسبة 50% من الجذر الحر الـ **DPPH**، مع العلم أنه كلما زادت قيمة EC_{50} قلت فعالية مضادات الأكسدة، لذا فقد أظهرت النتائج أن كل المستخلصات تزيح جذر **DPPH** بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز (III.11، III.12 و III.13).

من خلال النتائج قيم EC50% الموضحة في الجدول(III.4)، نرى أن المركبات المرجعية ذات قدرة عالية لإرجاع جذر الـ **DPPH** وقد سجلت أعلاها لمركب Acid Gallic بقيمة 0,002g/l وأدناها لمركب Rutin بقيمة 0,014g/l يتوسطهما Vit C بقيمة 0,011g/l.

وفيما يخص المستخلصات النباتية فقد سجلت أعلى قيمة للفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص الهكسان بمذيب **Acetone /H_2O** بقيمة 104.07 g/l ، أما أدنى قيمة فقد كانت لمستخلص ثنائي كلور الميثان بمذيب **Acetone /H_2O** بقيمة 590.31g/l .

عموما يمكن القول أن الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات ضعيفة إذا ما قورنت بالمركبات المرجعية ، لكن تبقى لها فعالية معتبرة في التراكيز الكبيرة والتي تفوق100 g/l .

وفيما يخص تباين الفعالية المضادة للأكسدة بالنسبة للمستخلصات النباتية فإنه يمكن أن يعزى ذلك لاختلاف محتوى كمية كل مستخلص من المركبات الفعالة التي لها القابلية على اقتناص الجذور والعمل كمضادات الأكسدة، وتعد المركبات الفينولية من أبرز مضادات الأكسدة الطبيعية التي تشمل الفلافونيدات و التانينات والكاروتينات والحوامض الفينولية، والتي توجد تقريبا في جميع أجزاء النبات (**الحلفي والموسوي، 2011**) لكن بالرغم من أن هذه النتائج لا تتوافق نظريا مع النسبة المئوية لمردود كل مذيب فمثلا مستخلص الهكسان كانت قيمه متدنية 2.58 و2.54 إلا إن فعاليته المضادة للأكسدة كانت مرتفعة 104.07 و 108.2 ، وقد ترجع هذه الحالة من التباين إلى بنية ونوعية هذه المركبات الفينولية (**الحلو والبكري، 2013**) ومن هذه النتائج لا يمكن ربط النشاط المضاد للأكسدة بمحتوى المستخلصات على المركبات الفينولية

كالفينولات والفلافونيدات (**عمر. ل، 2010**)، حيث أكدت دراسات سابقة أنه توجد علاقة بين البنية الكيميائية للفينولات والتأثير الإزاحي لـ **DPPH** ترجع هذه العلاقة إلى مجاميع الهيدروكسيل التي تمتلكها المركبات الفينولية ***(ع. بن سلامة، 2011)***، لذا فيمكن القول أنه كلما زادت مجموعات الهيدروكسيل في بنية المركب الفينولي زادت القدرة على أسر الجذور الحرة **(بن مرعاش، 2011)**.

هذه النتائج تؤكد أن النشاط المضاد للأكسدة له علاقة ببنية ونوعية المركبات التي يحويها المستخلص وهذا ما يوافق نتائج دراستنا المتوصل إليها، أن النشاط المضاد للأكسدة للمركبات الفينولية يرجع الى بنية هذه المركبات التي تؤدي دورا مهما في النشاط المضاد للجذور الحرة.

❖ الدراسة الإحصائية :

وللتأكد من النتائج المتوصل إليها سابقا نلجأ للدراسة الإحصائية (**الملحق I**) بالإعتماد على { تحليل التباين أحادي الطرف OneWayANOVA} عند مستوى معنوية (0.05).

والتي كانت نتائجه كالأتي: $H_{0=}$ **Acetone /H_2O = MeOH/H_2O**

$H_{1=}$ **أحد المستخلصات مختلف**

مقارنة P_C مع P_t : 0.05<0.47 وعليه نقبل الفرضية H_0 والتي تدل على أنه لا يوجد فروق جوهرية بين مستخلصات **Acetone** و **MeOH** عند مستوى معنوية (0.05) .

مقارنة F_C مع F_t : 7.70>0.61 وعليه نقبل الفرضية H_0 والتي تدل كذلك على أنه لا يوجد فروق جوهرية بين مستخلصات **Acetone** و **MeOH** عند F_t الجدولية(7.70) .

خـاتمــة

خـــــــــاتـمة

النباتات مصدر لا ينضب من المواد والمركبات الطبيعية النشطة بيولوجيا والتي يمكن إعادة تدويرها في المجال الصيدلاني لصناعة الأدوية والعقاقير، وإنطلاقا من الهدف الرئيس لهذا البحث وهو إثراء قائمة النباتات الطبية في الجزائر ومعرفة وتثمين المركبات الفعالة فيها، أردنا من خلال هذا البحث تحقيق هذه الغاية والمساهمة في تطوير الموارد النباتية المحلية من خلال دراسة القدرة المضادة للأكسدة لأحدالأنواع النباتية البرية اخترنا منها نبات "**القرطوفة**" ***Cotula cinerae***.

بعد تحضير العينة النباتية قمنا باستخلاص المركبات الفينولية بطريقة النقع على البارد والتقدير الكمي لها بإتباع طريقة Folin-Ciocalteu حيث كانت النتائج التي تم الحصول عليها تتراوح نسبها ما بين 2.84 و 10.08 (mg EAG/gMS)، وسجلت أعلى قيمة في في مستخلص خلات الإيثيل بالمذيب **Acetone /H_2O** والتي قدرت بحوالي 10.08في حين أن مستخلص الهكسان بمذيب **MeOH/H_2O** سجل أدنى قيمة بحوالي 2.84

لتقييم قدرة المستخلصات النباتية على إزاحة الجذر الحر **DPPH** والتي أظهرت نتائجه المعبر عنها بقيم EC_{50} أنها تراوحت مابين104.7 و 590.31 g/l أن الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات ضعيفة إذا ما قورنت بالمركبات المرجعية ، لكن تبقى لها فعالية معتبرة في التراكيز الكبيرة والتي تفوقg/l 100 .

اتضح من خلال نتائج الدراسة أنه لايوجد تناسب طردي بين القدرة المضادة للأكسدة والنسبة المئوية لمردود الاستخلاص بشكل عام وإنما التناسب يكمن في بنية ونوعية هذه المركبات الفينولية .

بناءا على هذه النتائج لا يمكن ربط النشاط المضاد للأكسدة بمحتوى المستخلصات على المركبات الفينولية وإنما له علاقة ببنية ونوعية المركبات التي يحويها المستخلص والتي لها فعالية معتبرة لإزاحة وتثبيط الجذور الحرة المسببة لحالات الإجهاد التأكسدي.

أما فيما يخص التوصيات التي يمكن أن نقترحها في دراسات مماثلة هي الأخذ بعين الاعتبار طرق جمع العينات النباتية وكيفية حفظها وتجفيفها بما يضمن المحافظة على المركبات الفعالة فيها، طرق الاستخلاص واختيار المذيبات المناسبة أثناء الفصل، وقبل هذا لابد من الإلمام بقواعد العمل المخبري والتحكم في استخدام الوسائل والأدوات مع الحرص على توخي الحذر و اتباع شروط الأمن والسلامة.

في الأخير نرجو أن نكون قد وفقنا في الوصول إلى الهدف المسطر لهذه الدراسة وهو اختبار القدرة المضادة للأكسدة لهذه الأنواع النباتية أو على الأقل نكون قد أثرنا تساؤلات تفتح المجال لدراسات أخرى على هذه الأنواع ، كدراسة النشاط البيولوجي المضاد للبكتيريا والفطريات والالتهاب.

إن أحسنا فمن الله وحده وإن أخطأنا فمن أنفسنا ومن الشيطان

قائمة المصادر والمراجع

باللغة العربية

- بن سلامة. ع، 2012، **النشاطات المضادة للأكسدة والمثبطة للأنزيم المؤكسد للكزانثين لمستخلصات أوراق Hertia Cheirifolia**، ماجستير في البيوكيمياء، جامعة فرحات عباس سطيف، الجزائر.
- بن عاشور. ص، 2007، **الفعالية المضادة لأكسدة الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية لـ Deverra Scoparia**، ماجستير، جامعة ورقلة، الجزائر.
- بن مرعاش .ع، 2011، **دراسة نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي والفعالية المضادة للأكسدة للنبتة**، ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة.
- بوالقندول. ر، 2011، **الدور الوقائي لبعض المستخلصات الفلافونيدية ضد الإلتهاب الكبدي المحرض بالباراسيتامول لدى الجرذان**، ماجستير، فيزيولوجيا أمراض الخلية، جامعة قسنطينة، الجزائر.
- بوبلوطة. ح، 2009، **النشاط المضاد للتأكسد وإمكانية وقاية المستخلصين الميثانوليين لنبتتي Matricaria pubescens والـ Centaurea على السمية الكبدية**، ماجستير في البيولوجيا الخلوية والجزيئية، فرع علم السموم الخلوي والجزيئي جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر.
- الحلفي والموسوي،2011، **الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات المائية والكحولية لبعض الفواكة**، مجلة الأبحاث العدد 37 البصرة، العراق.
- حوة. إ، 2013، **دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة**، ماجستير، جامعة ورقلة، الجزائر.
- خلف الله .ع، 1988، **النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي**، دار مصر لطباعة الخرطوم، السودان.
- روحية. أ، 1983، **التداوي بالأعشاب طريقة علمية تشمل الطب الحديث والقديم**، دار القلم بيروت، لبنان.

- السيد يوسف. م و التارقي. ز، 2005، **دور المواد المضادة للتغذية في تغذية الانسان**، مجلة أسيوط للدراسات البيئية، مصر.
- شرف. م، 2011، **الكيمياء العضوية**، دار المسيرة عمان، الاردن.
- شوفالييه. أ، 2003، **الطب البديل التداوي بالأعشاب والنباتات الطبية**، أكاديميا بيروت، لبنان.
- طه صقر. م، بدون سنة، **فسيولوجيا النبات**، كلية الزراعة، جامعة المنصورة، مصر.
- عابد .ع، 2004، **أساسيات علم البيئة**، دار وائل عمان، الأردن.
- العابد. إ، 2008، **دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران Traganum nudatum**، ماجستير، فرع الكيمياء جامعة ورقلة، الجزائر.
- عابد. هـ،2011، **الفعل الوقائي للمستخلص الفلافونيدي من الإلتهاب النفروني المحرض بالـParacetamol لدي الجرذان**، ماجستير جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر.
- عباسي. م، 2009، **كيمياء المركبات العطرية(النظرية والتطبيق)**، دار الوفاء الإسكندرية، مصر.
- عثمان الحاج .س، 2014، **إستخلاص وتعبئة المواد الفعالة من نباتات الحرجل والحنظل والصبار واستخدامها في التداوي**، بكلاريوس في البيئة والموارد، قسم البيئة والموارد الطبيعية، كلية العلوم التطبيقية، جامعة البحر الأحمر، السودان.
- علي منصور.ح، 2006، **النباتات الطبية العالمية وصفها ومواصفاتها**، الجلال لطباعة الإسكندرية، مصر.
- عمر. ل، 2010، **دراسة بعض الخصائص البيوكيميائية لنبات الشيح Artemisia herba albaAsso**، ماجستير في بيولوجيا وفيسيولوجيا النبات، جامعة فرحات عباس سطيف، الجزائر.
- عمراني. أ ،2013، **دور فيتامين C-E والمستخلص البوتانولي لنباتي Rhantherieum Suaveolens و Chrysanthemum Fontanesii في الوقاية من التسمم المحرض بدواء Sodium Valproat لدى الفئران الحوامل دراسة In Vivo و In Vitro**، دكتورا العلوم في بيولوجيا وفيزيولوجيا الخلية الحيوان، جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر.
- لاكوست .ص، 2013، **الأعشاب التي تشفي**، دار الفراشة للطباعة والنشر والتوزيع بيروت، لبنان.
- ماهر حسن. م، 2007، **الطب البديل وبعض الوصفات العلاجية في الحضارات القديمة**، دار الوفاء لدنيا الطباعة والنشر الإسكندرية، مصر.

❖ محمد سيد. ع، 2004، **الموسوعة الأم للعلاج بالأعشاب والنباتات الطبية**، دار ألفا للطبع والنشر، الطبعة الأولى، مصر.

❖ محمود جبر. ر، 2009، **علم العقاقير والنباتات الطبية الجزء الثاني**، مكتبة المجتمع العربي عمان، الأردن.

❖ هيكل. م و عمر. ع، 1993، **النباتات الطبية والعطرية كيمياؤها، إنتاجها، فوائدها**، منشأة المعارف الإسكندرية، مصر.

باللغة الأجنبية

❖ Akrout .A et al 2011., **Antioxidant and antitumor activities of Artemisia campestris and Thymelaea hirsuta from southern Tunisia**, Food and Chemical Toxicology, No.49 : 342-347.

❖ Ashutosh Kar, 2007, '**Pharmacognosy And Pharmacobiotechnology**, IInd Edition, new age international (p) limited, publishers, P5.

❖ Attou. A 2011, **contribution a l'étude phytochimique et activites biologiques des extrail de la plante Ruta chalepensis (Fidjel) de la région d Ain Témouchent**, Magister en biologie, Universite Belkaid Telemcen, Algeria.

❖ Bahorun .T, 1997, **Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d' approvisionnement potentielle**, AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius :83-94.

❖ Chehma .A, 2006, **Catalogue des planes Spotanées du Shara Sep tenrional algérien**, les presses de Dar El Houda, Ain M'lila, Algeria.

❖ Crozier. A et al., 2006, **Plant Seondary Metabolites**, Blackwell Publishing, First published, Oxford, UK.

❖ Djeridane .A et al., 2006, **Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds**, Food Chemistry Vol 97 : 654-660.

❖ Dudonne .S et al., 2009, **Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays**. J Agric Food Chem. Vol.**57**: 1768-1774.

❖ Halliwell .B, 2001, **Free Radicals and other reactive Speciesin, Disease**, Encyclopedia of life sciences, **N**ature Publishing Group, p.1.

❖ Hamdi .A, 2011, **Effet des polyphénols naturels de Salsola baryosma sur l'a-glucosidase et évaluation de leur pouvoir antioxydant**, Magister en biologie, Valorisation et Connaissance des Produits Naturels, Universite AMAR TELIDJI Laghouat, Algeria.

❖ Hamoudi .S, et al., 2013, **Etude l extraction des composee phenoliques differentes parties de la fleur d artichaut(Cynaras scolymus L)**, Nature and technologie No.09 : 35-40.

❖ Ionta .P, 2003, **Is DPPH Stab le Fr ee Radical a Go o d Scaven ger for Oxygen Active Species?.**

❖ Jalil E. C. et al., 2003, **Delayed treatment with nimesulide reduces measures of oxidative stress following global ischemic brain injury in gerbils,** Neuroscience Research Vol 47,No2 : 245-253.

❖ Kaliora A. C. et al., 2006**, Dietary antioxidants in preventing atherogenesis** , Atherosclerosis, No.187 : 1-17.

❖ Macheix J. J. et al., 2005, **Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires**, Presses plytechnique et universitaires romandes, p 121.

❖ Marfak .A, 2003, **radiolyse gamma des flavonoides.etude de leur reactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides,** Docteur, Biophysique, universite de Limoges, France.

❖ Marinova .G, 2011**, Evaluation of the Methodds for Determination Of The free radical Scavenging activity by DPPH,** Agricultural Academy, Bulgarian Journal of Agricultural Science Vol 17, No, 1: 11-24.

❖ Marja .P, 1999, **Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds.** American Chemical Society.

❖ Milane .H, 2004, **La quercétine est ses dévivés molécules a caractére proxydant on capteurs de radicaux libres et application thérapeutiques**, Docteur, Pharmacochimie, Universite Louis Pasteur Strasbourg, France.

❖ Moldovan .L et al., 2006**, Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1**, Cardiovascular Research, Vol.71 : 236-246.

❖ Otsuka .H, 2006, **Purification by Solvent Extraction Using Partition Coefficient in Methods in Biotechnology** in Natural Products Isolation,. (S. D. Sarker, Z. Latif, et A. I. Gray ; éd), 2eme édition, Vol. 20, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, P : 270.

❖ Ozenda .P, 1977, **Flore de sahara**, Editions du CNRS, Paris, France

❖ Palazzetti .S, 2005**, Sport- Stress- Nutrition : Ce que doit savoir le biologiste. In : Cahier de formation, Biologie médicale** : Sport et Biologie. ed. Bermon, S. Bioforma. Formation Continue des biologistes.

❖ Pincemail .J et al., 2003, **Stress oxydant, antioxydant et exercice physique**, Medcine Interne, aisseaux, Cœur, Poumons, Vol 6 . No.5.

❖ Pincemail .J et defraigne .J 2004, **Les antioxidant : Un vast réseau de defence pour lullercontre les effets toxiques de l oxygéne**, Symposium, Antioxnidants et alimentation, Institut Danone : 1-2.

❖ Prakash .A, 2001, **Antioxidant activity**, Medallion Laboratories Vol 19,No.02 : 01-06.

❖ Quezel .P et Santa, 1962, **Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales**, C.N.R.S , Paris ,France.

❖ Roberts . M. F, 1998, **Alkaloids Biochemistry**, Ecology and Medicinal Aplication, Plenum Press, New York and London.

❖ Tsinogiannis .D. I. et Oreopoulou V. 2004**, Free radical scavening and antioxidant activity of 5,7,3V,4V,hydroxy Substituted flavonoids**, Inaroative food Science and Emerging Technogies Vol 5 : 523-528

❖ Valko .M et al., 2007, **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol. 39 : 44-84.

❖ Vermerris .W et Nichoison .R, 2009, **Phenolic compound Biochemistiy**, Springer Science .

الملاحق

I

Analyse de variance: un facteur				
RAPPORT DÉTAILLÉ				
Groupes	*Nombre d'échantillons*	*Somme*	*Moyenne*	*Variance*
Acetone	3	822,15	274,05	75155,7132
MeOH	3	438,22	146,0733333	4325,932133
Standare	3	0,027	0,009	0,000039

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	*Somme des carrés*	*Degré de liberté*	*Moyenne des carrés*	*F*	*Probabilité*	*Valeur critique pour F*
Entre Groupes	24567,0408	1	24567,0408	0,61818149	0,47568754	7,70864742
A l'intérieur des groupes	158963,291	4	39740,8227			
Total	183530,331	5				

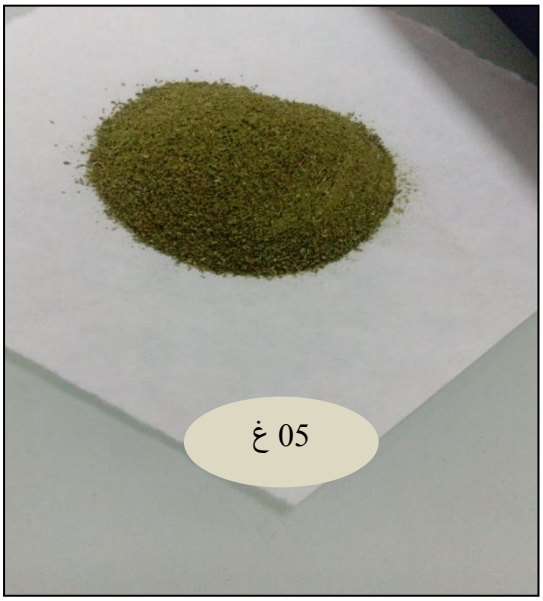
II

الأجهزة المستعملة :

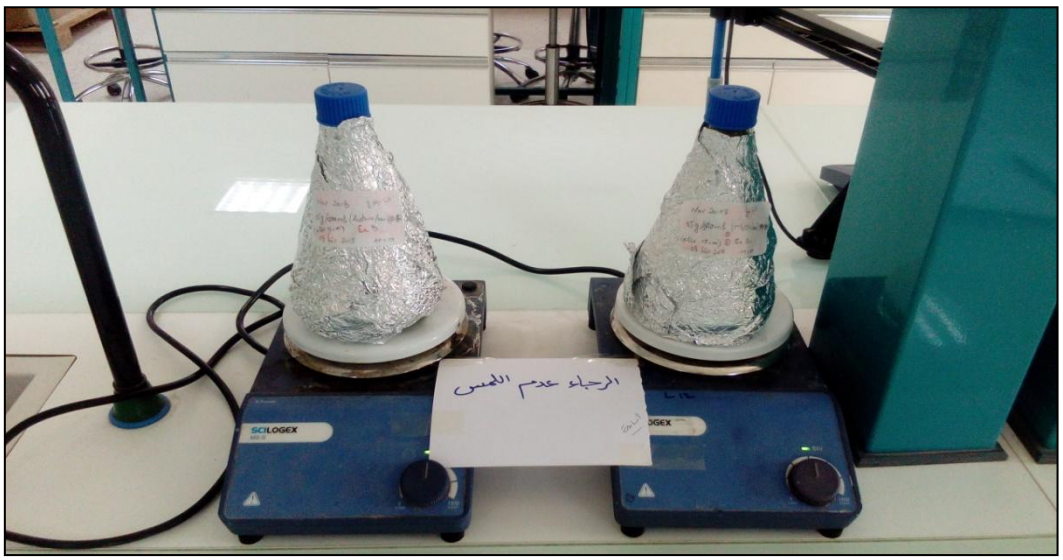
Rotavapour Hei-VAP Rotary Evaporators Made in Germany	 **الشكل III.1. صورة جهاز التبخير الدوراني**

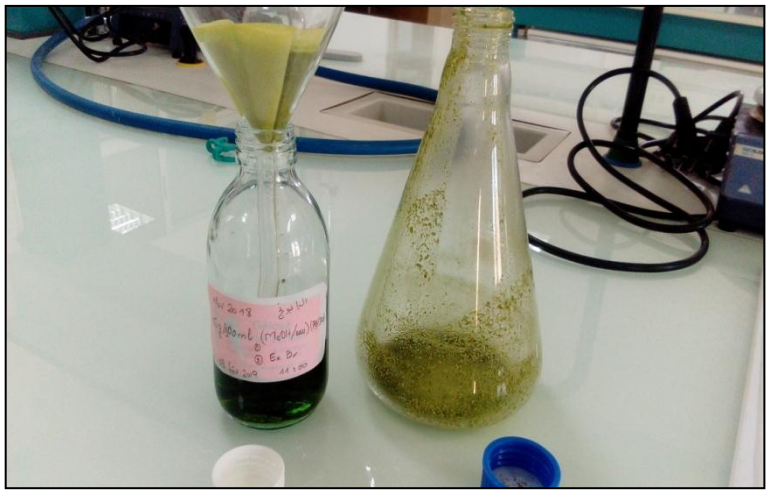
Spectrophotometre SECOMAM(UviLine9400) Made in EU	 **الشكل III.2. صورة جهاز مقياس الطيف الضوئي**

1) تحضير العينة النباتية :



2) الاستخلاص :





3) تنقية المركبات الفينولية :