رقم الترتيب :.....
رقم التسلسل:.....

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليـم العالـي والبحـث العلمـي

جامعـة قاصـدي مربـاح ورقلـة
كليـة الرياضيات و علـوم المـادة
قسـم الكيمياء

مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماستر أكاديمي

المجال: علوم المادة

الفرع: كيمياء

التخصص: كيمياء مطبقة

من إعداد: بكه شهرزاد و حفيان خولة

الموضـوع:

الدراسة الفيتوكيميائية والفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة *Zygophyllum gaetulum*

نوقشت يوم.../.../2016

أمام لجنة المناقشة المكونة من:

زغدي سـعد	أستاذ مساعد أ	جامعة ورقلة	رئيسا
بوزيان مباركة	أستاذة محاضرة ب	جامعة ورقلة	مناقشة
دندوقي حسـين	أستاذ تعليم عالي	جامعة ورقلة	مؤطرا

السنة الجامعية : 2015-2016

تشكرات

الحمد لله أولاً و أخراً، الذي وفقنا وهيأ لنا من الظروف مابه مكننا من انجاز هذا البحث.

نتقدم بالشكر والثناء للأستاذ الدكتور الفاضل **دندوقي حسين** لقبوله الإشراف على هذا العمل، وعلى توجيهاته ونصائحه القيمة لانجاز هذا العمل على أكمل وجه.

كما نتوجه بالامتنان و الشكر الجزيل للأساتذة الذين يتولون تقييم هذه الأطروحة، لما يبذلونه من وقت هم بأشد الحاجة إلى توفيره.

كما نوجه خالص الشكر لـ **بلقيدوم مهدي** و **بيرش كميليا** على مساعدتهما لنا، ولايفوتنا أن نشكر عمال مخبر الكيمياء البيداغوجي على رأسهم رئيس المخبر **خضراوي عباس**.

وفي الأخير لاننسى أن نشكر كل الأساتذة الذين ساهموا في تكويننا الدراسي، وكل طلبة دفعة ماستر كيمياء مطبقة 2015-2016.

إهداء

أهدي ثمرة هذا العمل **إلى من** افتقدته الروح، إلى من أفتخر بأبوته واحمل اسمه **أبي** العزيز الكريم **(رحمه)، إلى من علمتني الصبر و** الكفاح إلى حبيبتي **أمي** الغالية **حفظها** الله وأطال في عمرها.

إلى أخي العزيز محمد ضياء الدين.

إلى أخواتي الكريمات **جهاد، رندة، ياسمينة،** مريم الساجدة، **نور** اليقين.

و إلى كل الأهل **والأحباب.**

بكه شهـرزاد

أهدي هذا العمل المتواضع الى والدي الكريمين **أمي وأبي** حفظهما الله و أطال في عمرهما.

إلى إخوتي الأعزاء سهيل، **أحمد** فضيل.

إلى أختي الغالية**سلاف.**

إلى أغلى صديقة ورفيقة دربي وأختي التي لم تلدها **أمي** شهرزاد**(منال)**

والى كل من تمنى لي النجاح.

حفيان خولة

الفهرس

الفهرس

العنوان	الصفحة
المقدمة	1
الجانب النظري	
الفصل الاول:الدراسة النظرية للنبتة	
I–1 مقدمة	2
I-2 الوصف النباتي لنبتة *Z.gaetulum* وتوزيعها الجغرافي	2
I–3 التصنيف النظامي لنبتة *Z.gaetulum*	3
I–4 المسح البيولوجي لنبتة *Z.gaetulum*	4
I-5 المسح الكيميائي لنبتة *Z.gaetulum*	4
الفصل الثاني:منتجات الأيض الثانوي	
II-1 الفلافونيدات	8
II-1-1 تعريف الفلافونيدات	8
II- 1-2 أقسام الفلافونيدات	8
II-1-3 الاصطناع الحيوي لمختلف الفلافونيدات بدءا من الشالكون	9
II-1-4 الفلافون و الفلافونول	11
II-1-5 خواص الفلافونيدات	12
II-2 التربينات	13
II-2-1 تعريف التربينات	13
II-2-2 أقسام التربينات	14
II-2 -3 اصطناع التربينات	14
II- 2-4 التربينات الثلاثية	15
II- 2-4-1 الصابونوزيدات **Saponosides**	16

الفصل الثالث: الفاعلية المضادة للأكسدة

III-1 الجذور الحرة 19

III-1- 1 تعريف الجذور الحرة 19

III-1-2 أنواع الجذور الحرة 19

III -1-2- أ الجذور الحرة التي لها أعمار حياة قصيرة 19

III -1-2– ب الجذور الحرة التي لها أعمار حياة طويلة 19

III -1-3 متابعة حركية التفاعل 20

III -1-4 طرق تفاعلات الجذور الحرة 20

III -1-4– أ تفاعلات التبادل الالكتروني 20

III -1-4– ب تفاعلات تفكك الجذور الحرة 21

III -1-4– ج تفاعلات اتحاد الجذور الحرة 21

III-2 مضادات الأكسدة 21

III-2- 1 تعريف مضادات الأكسدة 21

III-2- 2 تصنيف مضادات الأكسدة 21

III-2- 2- أ مضادات الأكسدة الطبيعية 21

III-2- 2- ب مضادات الأكسدة المصنعة 22

III-2- 3 آلية عمل مضادات الأكسدة 22

III-3 تقيم الفاعلية المضادة الأكسدة 23

الفصل الرابع:الفولطامتري الحلقي

IV- 1 الفولطامتري الحلقي **24**

IV- 1 – أ الجملة السريعة **25**

IV-1- ب الجملة البطيئة **25**

IV- 2 الأجهزة المستعملة في الفولطامتري الحلقي **25**

IV - 3 مجال الكهروفاعلية **26**

IV- 4 تفسير منحنى الفولطامتري الحلقي **27**

الجانب التطبيقي

الفصل الخامس : الدراسة الفيتوكيميائية و الفاعلية المضادة للأكسدة

V– الدراسة الفيتوكيميائية لنبتة *Z.gaetulum* والفاعلية المضادة للأكسدة **28**

V–1 المادة النباتية **28**

V - 2 الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية **28**

V- 1-2 الكشف عن القلويدات Les Alcaloïdes **28**

V-1-2- أ اختبار ماير Mayer **28**

V-1-2– ب اختبار Wagner **29**

V- 1-2 –ج اختبار $FeCl_3$ **29**

V-2-2 الكشف عن الفلافونيدات Les Flavonoides **30**

V- 2- 2- أ اختبار Shinoda **30**

V-2-2- ب اختبار الكاشف القاعدي NaOH **30**

V- 3-2 الكشف عن التانينات Les Tanins **31**

V- 4-2 الكشف عن الكومارينات Les coumarines **31**

V-2-5 الكشف عن الستيرولات والتربينات الثلاثية **31**

V-2-5- أ اختبار Salkowski **32**

V-2-5- ب اختبار Liebermann- Burchared 32

V-2-6 اختبار الصابونوزيدات Les Saponosides 33

V- 3 الاستخلاص 34

V- 4 التحليل الكمي للمركبات الفينولية 35

V- 4-1 التقدير الكمي للفينولات الكلية 35

V- 4- 2 التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية 36

V- 5 دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة 37

V– 5- 1 اختبار DPPH 37

V- 5- 2 اختبار موليبدات الفوسفات 39

الفصل السادس: النتائج والمناقشة

VI– 1 الدراسة الفيتوكيميائية لنبتة *Z.gaetulum* 41

VI– 1 – 1 الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية 41

VI– 1-2 التحليل الكمي للمركبات الفينولية 42

VI– 1 –1-2 التقدير الكمي للفينولات الكلية 42

VI– 1 –2-2 التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية 42

VI– 2 الفاعلية المضادة للأكسدة 43

VI–1-2 نتائج القدرة التثبيطية لجذر الـ DPPH 43

VI–2-2 نتائج اختبار موليبدات الفوسفات 44

VI– 3 دراسة علاقة الارتباط Corrélation 45

الخاتمة 46

المراجع 47

قائمة الأشكال

الأشكال **الصفحة**

الفصل الأول:الدراسة النظرية للنبتة

الشكل I.1 نبتة *Z.gaetulum* حسب Ozanda 2

الشكل I.2 صور فوتوغرافية لنبتة *Z.gaetulum* 3

الفصل الثاني:منتجات الأيض الثانوي

الشكل II .1 الوحدة الأساسية للفلافونيدات 8

الشكل II .2 أهم أقسام الفلافونيدات 9

الشكل II .3 الاصطناع الحيوي لمختلف الفلافونيدات انطلاقا من الشالكون 10

الشكل II .4 الوحدة الأساسية لبناء التربينات 13

الشكل II .5 بعض الأمثلة عن التربينات 14

الشكل II .6 الاصطناع الحيوي للتربينات 15

الشكل II .7 الاصطناع الحيوي للهيكل القاعدي للتربينات الثلاثية 16

الشكل II .8 صيغ الجنين الستيرويدي 17

الشكل II .9 مثال عن جنين تربيني Acide oléanolique 17

الشكل II .10 صيغة حمض Quinovique 18

الفصل الثالث: الفاعلية المضادة للأكسدة

الشكل III.1 التراكيب الرنينية لجذر $DPPH^{\cdot}$ 20

الشكل III .2 بنية حمض الأسكوربيك 22

الشكل III.3 مضادات الأكسدة المستعملة في الصناعة الغذائية 22

الفصل الرابع:الفولطامتري الحلقي

الشكلIV .1 المنحنى العام للفولطامتري الحلقي 24

الشكلIV .2 منحنى الفولطامتري للجملة السريعة(1) والبطيئة(2) 25

الشكل IV .3 الخلية المستعملة في الفولطامتري الحلقي 26

الشكل IV .4 التيار المتبقي ومجال الكهروفاعلية 26

الشكل IV .5 مخطط بياني مفصل امنحنى I=f(E) لانتقال الكترود واحد 27

الفصل الخامس: العمل التطبيقي

الشكل V.1 نتائج اختبار ماير 28

الشكلV.2 نتائج اختبار wagner 29

الشكل V.3 اختبار $FeCl_3$ 29

الشكل V.4 نتائج اختبار Shinoda 30

الشكلV.5 نتائج اختبار الكاشف القاعدي 30

الشكلV.6 نتائج اختبار التانينات 31

الشكلV.7 نتائج اختبار الكومارينات 31

الشكل V.8 نتائج اختبار Salkowski 32

الشكلV.9 نتائج اختبار Liebermann- Burchared 32

الشكلV.10 نتائج اختبار الصابونوزيدات 33

الشكل V.11 مراحل الاستخلاص النبتة 34

الشكل V.12 حمض الغاليك 35

الشكل V.13 المنحنى القياسي لحمض الغاليك 36

الشكل 14.V مركب الكرستين Quercetine 36

الشكل 15.V المنحنى القياسي لمركب الكرستين 37

الشكل 16.V تفاعل الـ DPPH مع الفينول 38

الشكل 17.V منحنى اختبار الـ DPPH بواسطة V.C 39

الشكل 18.V المنحني القياسي لحمض الأسكوربيك في اختبار موليبدات الفوسفات 40

الفصل السادس: النتائج والمناقشة

الشكل 1.VI نتائج اختبار الفلافونيدات لمستخلصات النبتة 41

الشكل 2.VI نتائج اختبار Liebermann- Burchared لمستخلصات النبتة 41

الشكل 3.VI المقارنة بين الكمية الكلية للفينولات لمختلف المستخلصات 42

الشكل 4.VI المقارنة بين الكمية الكلية للفلافونيدات لمختلف المستخلصات 43

الشكل 5.VI منحيات المستخلصات المدروسة في اختبار الـ DPPH 43

الشكل 6.VI منحنيات المستخلصات المدروسة في اختبار موليبدات الفوسفات 44

قائمة الجداول

الجدول **الصفحة**

الفصل الأول:الدراسة النظرية للنبتة

الجدول I.1 التصنيف النظامي لنبتة *Z.gaetulum* وفق Quezel 4

الجدول I.2 هياكل مركبات الفلافونول 5

الفصل الثاني:منتجات الأيض الثانوي

الجدول II .1 قائمة الإنزيمات المستخدمة في الاصطناع الحيوي للفلافونيدات انطلاقا من الشالكون 11

الجدول II .2 أمثلة على الفلافونات والفلافونولات 12

الجدول II .3 الفعالية البيولوجية لبعض الفلافونيدات 13

الجدول II .4 الفعالية البيولوجية لبعض التربينات 18

الفصل الخامس:العمل التطبيقي

الجدولV.1 نتائج الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية 33

الجدولV.2 مردود مختلف المستخلصات 35

الفصل السادس:النتائج والمناقشة

الجدول VI.1 كمية الفينولات الكلية للمستخلصات 42

الجدول VI.2 كمية الفلافونيدات الكلية للمستخلصات 42

الجدول VI.3 الفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة *Z.gaetulum* لاختبار DPPH 44

الجدول VI.4 الفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة *Z.gaetulum* لاختبار موليبدات الفوسفات 45

الجدول VI.5 علاقة الارتباط بين كمية المركبات الفينولية وكمية الفلافونيدات والطرق المستعملة في تقييم الفاعلية المضادة للأكسدة 45

قائمة الرموز

ADN	الحمض النووي
A	الامتصاصية
AcOEt	أسيتات الايثيل
$CHCl_3$	الكلوروفورم
$DPPH^{\cdot}$	الجذر الحر 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E	الكمون
EP_a	كمون مصعدي
EP_C	كمون مهبطي
EA	الكترود المساعد
ER	الكترود المرجع
EW	الكترود العمل
EtOH	الايثانول
I%	النسبة المئوية للتثبيط
IC_{50}	تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50 **%** من جذر الـ $DPPH^{\cdot}$
IP_a	تيار النتوء المصعدي
IP_C	تيار النتوء المهبطي
n-BuOH	البيتانول النظامي
OX	الأكسدة
PH_3CH	فنيل الميثان
$Ph_3C^{\cdot}$	جذر ثلاثي فينيل الميثان
P	المواد الناتجة
Red	الارجاع
UV-Vis	الأشعة الفوق البنفسجية– المرئية
V.C	حمض الاسكوربيك
Z.gaetulum	*Zygophyllum gaetulum*
λ	الطول الموجي
ن م	نانومتر
م°	درجة مئوية

المقدمة

المقدمة

اعتقد الكثيرون أن الأدوية المصنعة سوف تحل محل النباتات الطبية المستعملة في الطب الشعبي، و كان من المتوقع أن يتراجع المرض أمام هذه الثورة الكاسحة من علم العقاقير. لكن الذي حدث هو العكس تماما، فقد عرف الإنسان الحديث أمراضا لم تكن معروفة أو منتشرة من قبل، بل دخل عصر الأمراض المزمنة، و يرجع ذلك إلى الاستعمال اللامحدود للمواد الكيميائية في جميع مجالات الحياة، فلوثت بيئة الإنسان، و بالتالي أثرت على صحته و قوته، و مناعته في مقاومة الأمراض، كذلك فإن الأدوية المصنعة مازال منها ما يفتقر إلى معلومات وافية، ولازال البحث العلمي يحمل لنا الكثير من الآثار الجانبية الضارة لبعض الأدوية المصنعة، زد على ذلك أنها مواد كيميائية مركزة تم تحضيرها في المعمل تحت ظروف قاسية. بينما أبت حكمة الخالق عز وجل إلا أن تجعل المواد الفعالة في النباتات بتراكيز مخفضة يمكن للجسم البشري التفاعل معها برفق في صورتها الطبيعية، قال سبحانه و تعالى في كتابه الكريم :﴿ ألم تروا أن الله سخر لكم ما في السموات و ما في الأرض و أسبغ عليكم نعمه ظاهرة و باطنة ﴾ لقمان الآية 22.

وتعد نبتة *Zygophyllum gaetulum* (و مثيلات أنواع جنسها) والتي هي محل دراستنا من النباتات التي تستخدم في مجال التطبيب، لتداوي مرض السكري و الاكزيما، وكذا التهاب الكبد و آلام المعدة. وهي نبتة صحراوية معمرة متوطنة في شمال غرب الصحراء الجزائرية.

وتتمحور دراستنا حول الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلصات هذه النبتة و كذا الفعالية المضادة للأكسدة، وتشتمل الأطروحة على شق نظري يحوي أربعة فصول :

الفصل الأول : الدراسة النظرية للنبتة

الفصل الثاني : منتجات الأيض الثانوي

الفصل الثالث : الفاعلية المضادة للأكسدة

الفصل الرابع: الفولطامتري الحلقي

أما الشق التطبيقي فيحوي فصلين:

الفصل الخامس الذي يتناول المسح الفيتوكيميائي للنبتة وكذا التقدير الكمي لمركباتها الفينولية والفلافونيدية ودراسة الفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصاتها.

الفصل السادس: يتناول النتائج ومناقشتها.

الجزء النظري

الفصل الأول:

الدراسة النظرية للنبتة

I-1 مقدمة: تتنوع النباتات بتنوع المناخ و الأرض، كما تنتشر في الجزائر العديد من العائلات النباتية من بينها العائلة الرطريطية. حيث تتواجد معظم نباتات الفصيلة الرطريطية Zygophyllacées في المناطق الجافة و الصحراوية فهي تحتوي على حوالي 25 جنسًا و 500 نوع، ففي الصحراء الجزائرية نجد 7 أجناس و 27 نوعًا. ما تمثل نسبة 3 % من النباتات الصحراوية، كما أن أكبر ثلث الأنواع متوطنة في صحراء شمال إفريقيا [1].

النباتات التي تنتمي إلى هذه العائلة تعرف بشجيراتها و أوراقها المتعددة الأشكال. ففي الأجناس السبع المتواجدة في الصحراء نجد أن الجنس *Zygophyllum* هو الأكثر أهمية و الأكبر عددًا [2] ، وما نبتة *Z.gaetulum* إلا أحد أنواعه.

I-2 الوصف النباتي لنبتة *Z.gaetulum* وتوزيعها الجغرافي:

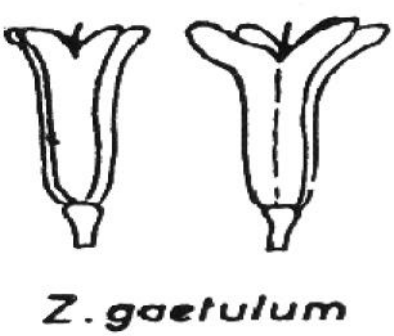
Z.gaetulum هي نبتة متوطنة في الصحراء معروفة باسمها العربي العقة « Agaya »، البرايا «Berraya»، بوقريبة « Bougriba » [5,3] و المؤسف أن جميع أنواع هذا الجنس لها نفس الاسم الشائع.

و هي عبارة عن نبتة معمرة طولها في حدود 50 سم، فروعها كثيفة، براعمها رقيقة مغطاة بشعيرات بيضاء.

أوراقها صغيرة ولحميتين في القاعدة مغطاة بشعيرات بيضاء، أزهارها محمولة على سويقات كثيفة الشعيرات (5 مم)، بيضاوية الشكل مع 5 بتلات بيضاء، لها قاعدة أنبوبية موسعة للأعلى بخمسة فصوص، تزهر عادة في فصل الربيع، ولكن لوحظت في فصل الخريف أيضا [3] .

تنمو نبتة *Z.gaetulum* في الجزائر في المناطق الصحراوية الجافة و شبه الجافة. وتستخدم في التطبيب الشعبي، و كبهار في المطبخ المغربي [4].

و هي متوطنة في جنوب المغرب و شمال غرب الصحراء الجزائرية (غرب الساورة) [1,3].



الشكل I.1 زهرة *Z.gaetulum* حسب Ozanda

الشكل 2.I صور فوتوغرافية لنبتة *Z.gaetulum*

I-3 التصنيف النظامي للنبتة:

يلخص في الجدول رقم 1.

الجدول I.1 التصنيف النظامي لنبتة *Z.gaetulum* وفق Quezel [5].

المملكة	النباتية	Plante
الفرع	النباتات البذرية	Spermaphytes
تحت الفرع	كاسيات البذور	Angiospermes
الصنف	ذوات الفلقتين	Dicotylédones
الرتبة		Zygophyllale
الفصيلة	النباتات الرطريطية	Zygophyllacées
الجنس		*Zygophyllum*
النوع		*Zygophyllum gaetulum (Emb. Et Maire)*

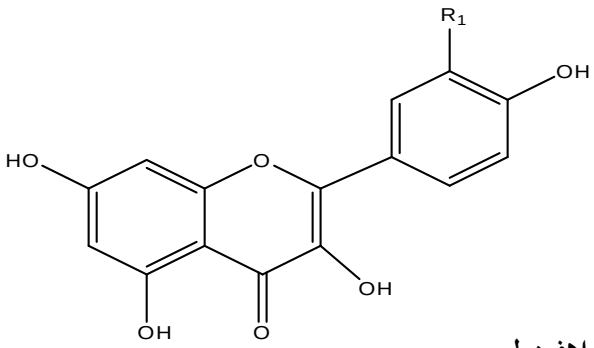
I - 4 المسح البيولوجي لنبتة *Z.gaetulum* :

تعتبر *Z.gaetulum* من النباتات المستعملة في التطبيب الشعبي لتوفرها على خصائص علاجية مدهشة، فحسب المعطيات التقليدية تستخدم كعامل مضاد للالتهابات كالتهاب الكبد[8] ، خافضة للحرارة، مخفضة للسكري [3]، مضادة للتشنج[6,4] ، مزيلة لآلام المعدة [3]، مضادة للإسهال [9]، مساعدة في تخثر الدم [3]،كما تعالج الأمراض الجلدية مثل الاكزيما [3] . و لم تشر المراجع إلى أي تقرير عن سميتها، و يتم استخدام *Z.gaetulum* في مجال التطبيب لتداوي مرض السكري و الاكزيما و الكبد وألام المعدة وللتقليل من النزيف. فلعلاج مرض السكري تستخدم رؤوس الأزهار المجففة كشراب منعش أو بإضافتها إلى الشاي، ما الأوراق المجففة بعد نقعها في الماء الساخن فإنها تستعمل لعلاج حالات ألام المعدة أو تورم الكبد الناتج عن وجود فائض من العصارة الصفراوية، وتستعمل الأوراق المسحوقة ناعما على الجروح لتكون بمثابة مثبط للنزيف و كذا لاصق يطبق على الدمامل، كما يستخدم هذا النبات لعلاج الاكزيما و مشاكل الجلد، كما أنه يستخدم في منطقة تانا و تيسينت بالمغرب لعلاج نزلات البرد، ففي غرب الصحراء المغربية تستخدم الأزهار في الحمامات كغسول باعتباره معقم للرضع و للعناية بالجسم [3].

I -5 المسح الكيميائي لنبتة *Z.gaetulum* :

لقد قادت الدراسات الفيتوكيميائية للمستخلص المائي لنبتة *Z.gaetulum* بالكشف عن وجود مركبات فلافونيدية أجليكونية من نوع فلافون[4] وكذا فلافونويدات جليكوزيدية لثلاث من الفلافونولات (kaempfèrol، quercetine، isorhamnetine) [3] .

صيغة المركبات الفلافونيدية التي تم فصلها:



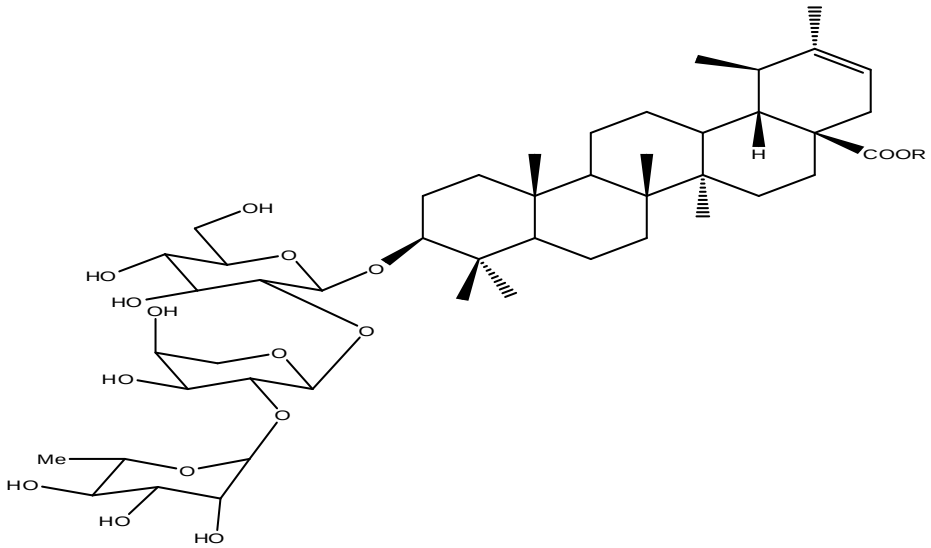
جدول I .2 هياكل مركبات الفلافونول

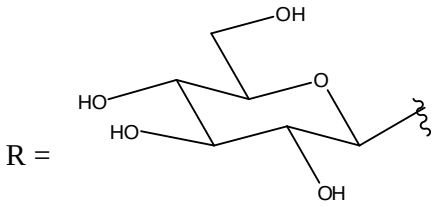
المركب	R_1
Kaempférol	H
Isorhamnetine	OCH_3
Quercetine	OH

كما تم عزل ثلاثة مركبات جديدة لتربينات ثلاثية صابونوزيدية [6].

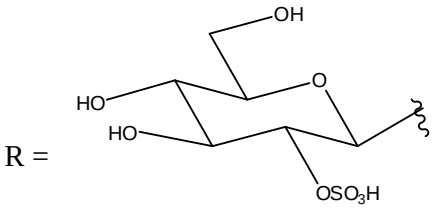
Saponine1 (zygophyloside I), Saponine 2 (zygophyloside L), Saponine 3 (zygophyloside M).

صيغة المركبات الصابونوزيدية التي تم عزلها:

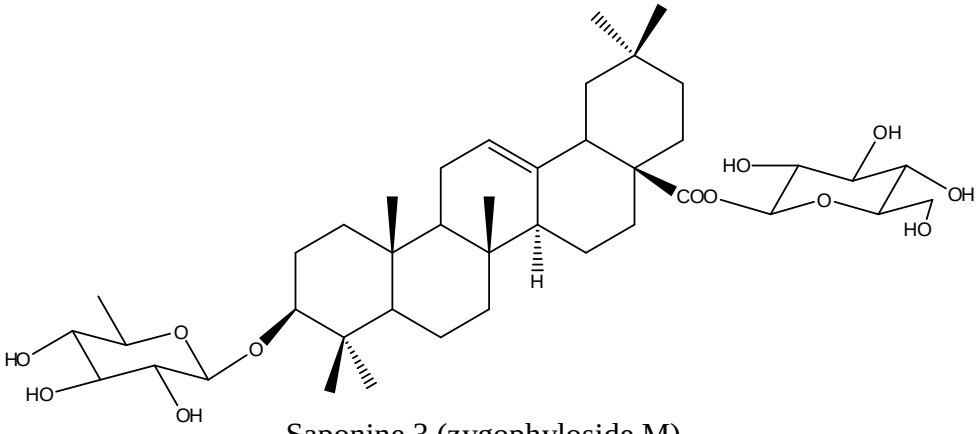




Saponine 2 (zygophyloside L)



Saponine 1 (zygophyloside I)

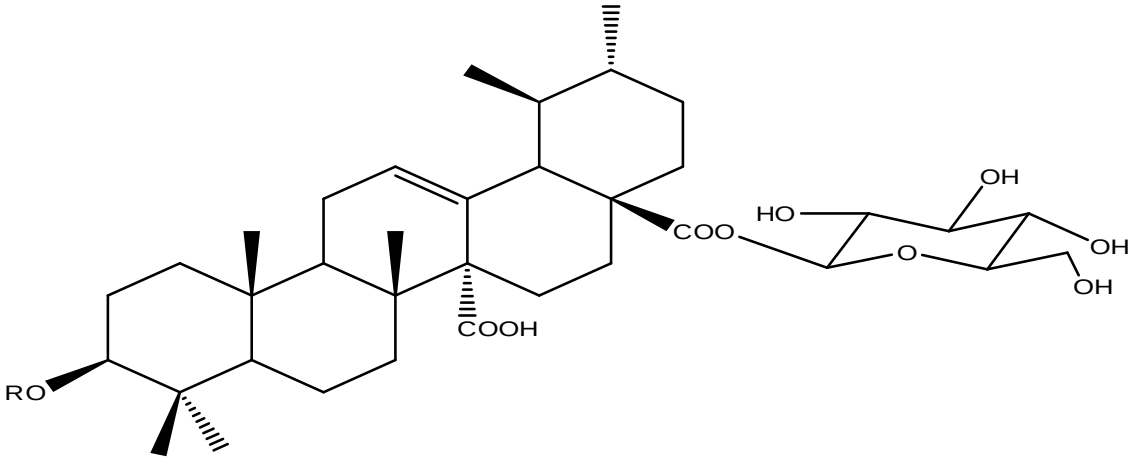


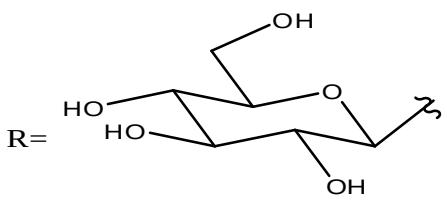
Saponine 3 (zygophyloside M)

كما تم استخراج ثلاث أحماض جليكوزيدية كينوفيكية من الجزء الهوائي للنبتة [6].

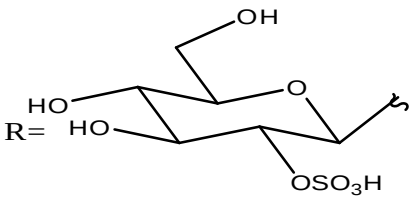
Glycoside 4 , Glycoside5 « zygophyloside G », Glycoside 6 « zygophyloside E».

صيغة مركبات الأحماض الجليكوزيدية الكينوفيكية (quinovique):

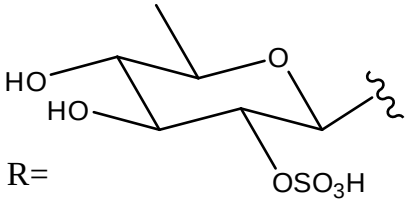




Glycoside 4

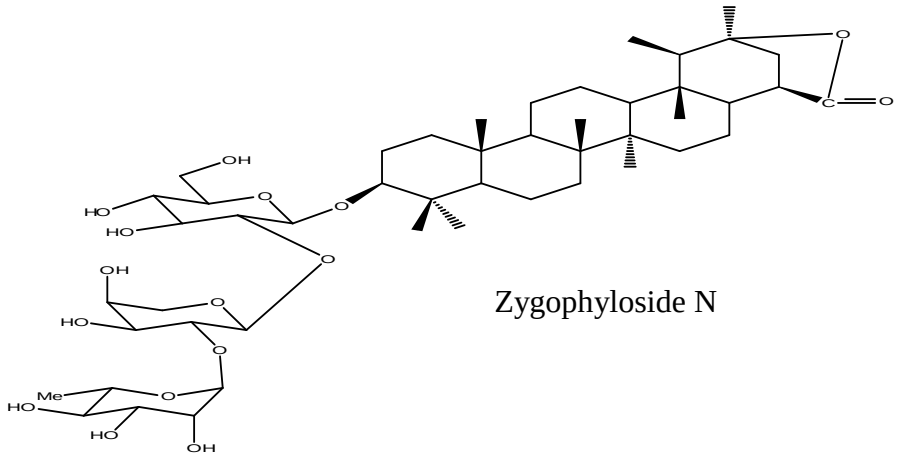


Glycoside 5



Glycoside 6

وقادت الدراسة على الجزء الأرضي (من جذور النبتة) إلى فصل مركب صابونوزيدي جديد Zygophyloside N [7].



Zygophyloside N

الفصل الثاني:

منتجات الأيض الثانوي

II- من خلال المسح الكيميائي لمختلف أنواع جنس *Zygophyllum* تبين أن من بين أكثر منتجات الأيض الثانوي انتشاراً هي: الفلافونيدات، التربينات الثلاثية من نوع صابونوزيدات و أحماض الجليكوزيد الكينوفيكية (quinovique)، وهو ما يدفعنا للاقتصار على تعريف ودراسة هذه الأنواع من منتجات الأيض الثانوي.

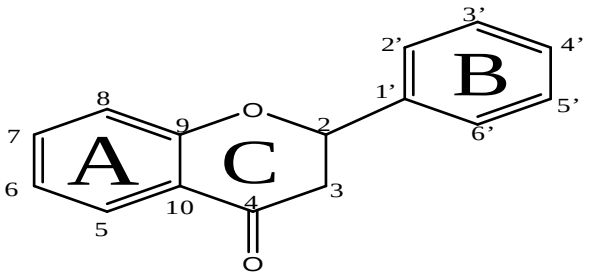
II-1 الفلافونيدات

II-1-1 تعريف الفلافونيدات

تمثل المركبات الفينولية قسما بالغ الأهمية في حقل المنتجات الطبيعية وذلك لتعددها وتباين هياكلها البنائية، من هذه المركبات منتجات أيضية ثانوية تسمى: الفلافونيدات.

يرجع تسمية Flavonoïde في اللغة اللاتينية إلى الكلمة الإغريقية Flavus التي تعني اللون الأصفر، وهي عبارة عن صبغات نباتية موزعة على جميع أجزاء النبات، وبشكل أكبر في الجزء الهوائي منه، فهي عموما المسؤولة عن ألوان الأزهار و الثمار و أحياناً الأوراق، توجد في معظم الأصناف النباتية بالأخص الراقية منها، ومنعدمة تقريبا عند الطحالب[10]، ويمكن العثور على هذه المركبات في شكلها الحر (أجليكونات) أو على شكل جليكوزيدات (مرتبطة بالسكر) [11] .

تمتلك جميع الفلافونيدات هيكلاً كربونياً مكوناً من 15 ذرة كربون موزعة على الشكل C_6-C_3-C_6، وهي عبارة عن وحدتين عطريتين تعرف إحداهما بالحلقة A و الأخرى بالحلقة B ترتبطان بسلسلة جانبية من 3 ذرات كربون قد تكون مفتوحة وقد تكون حلقية لتشكل الحلقة C التي تمثل حلقة Chromane (حلقة البيران المركزية) وتعطي الهيكل القاعدي للفلافونيدات التي تنحدر منه الوحدة الأساسية المسماة 2-phenylchromane كما في الشكل II .1 [13,12].

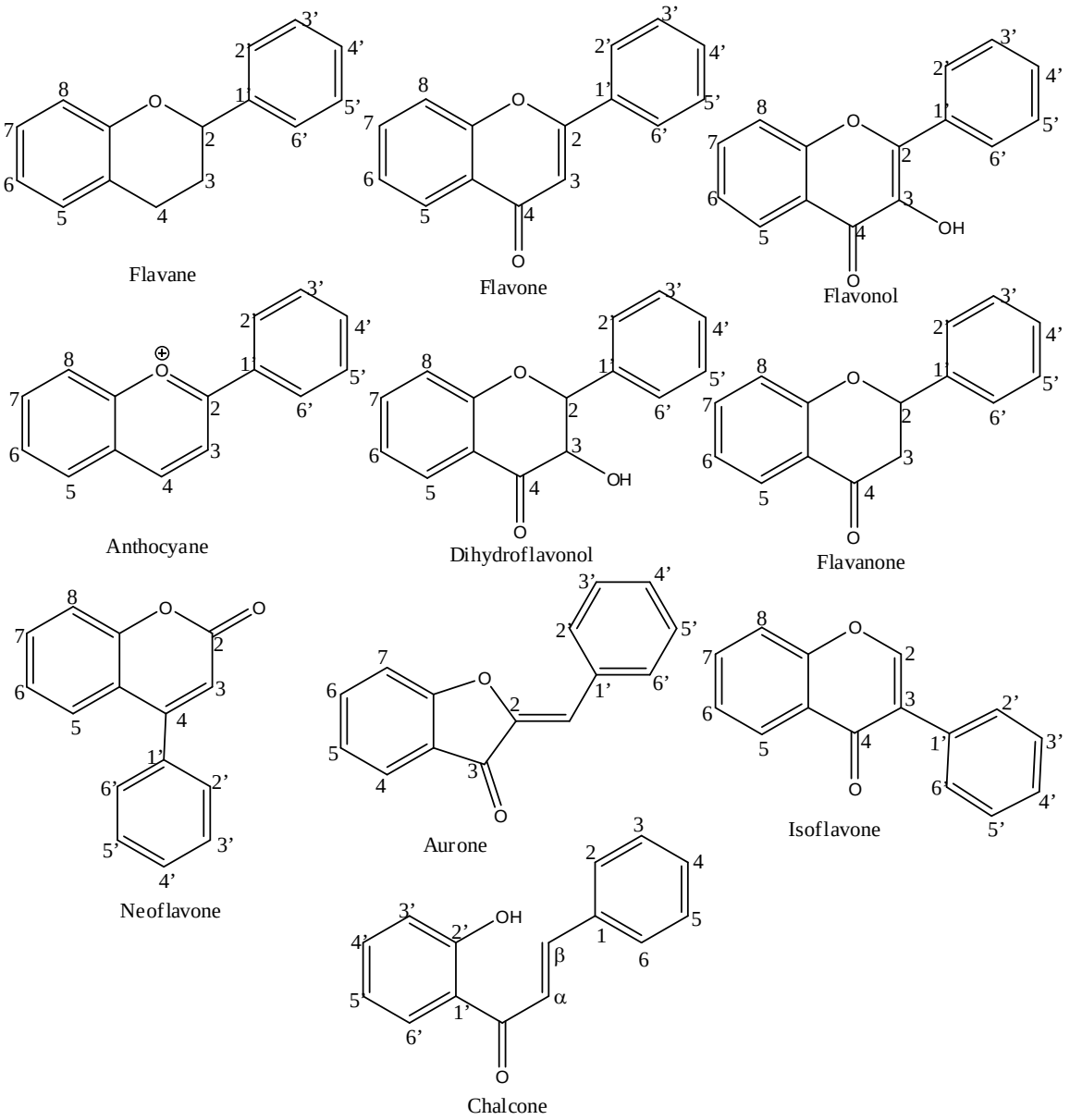


الشكل II .1 الوحدة الأساسية للفلافونيدات

II-1-2 أقسام الفلافونيدات

تصنف الفلافونيدات إلى عدة أقسام، حيث يمكن تقسيمها حسب درجة تأكسد الحلقة البيرانية C [14]، أو على أساس طريقة ارتباط الحلقة B مع الحلقة C انطلاقا من الكربون2 فهي الفلافونيدات العادية، أو الكربون 3 فهي الايزوفلافونيدات، أو التبادل الموضعي بين الحلقة B و الوظيفة الكيتونية في هيكل الفلافونيد حيث الحلقة B في الموضع 4 و الوظيفة الكيتونية في الموضع 2 وتعرف بالنيوفلافونيدات [15].

والشكل II .2 يوضح أهم أقسام الفلافونيدات[16].

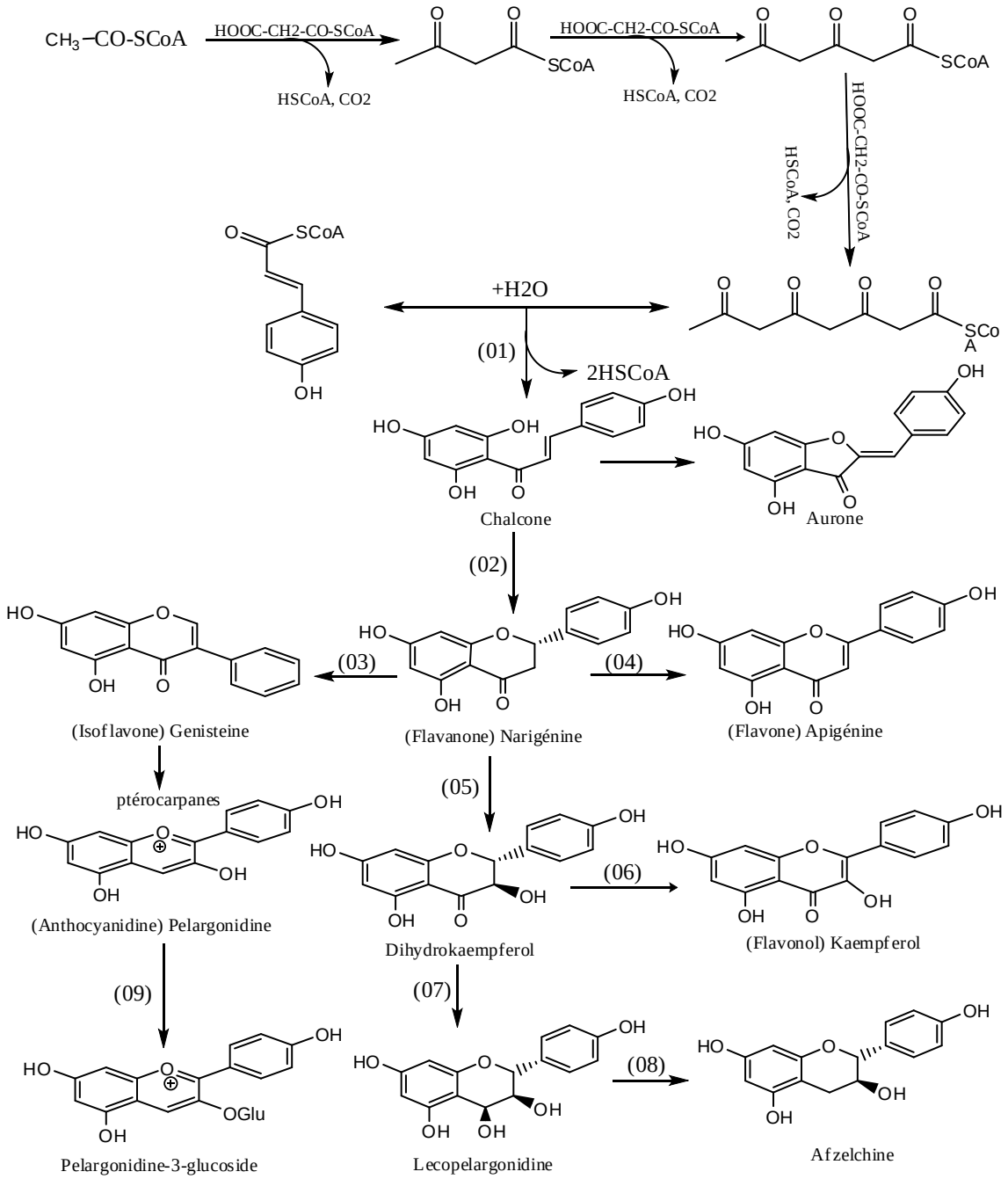


الشكل II .2 أهم أقسام الفلافونيدات

II-1-3 الاصطناع الحيوي لمختلف الفلافونيدات بدءًا من الشالكون

نظرا لأهمية الفلافونيدات و انتشارها الواسع، فقد أثارت اهتمام الباحثين من كيميائيين، بيولوجيين ومن علماء الوراثة وقاموا بتوجيه أبحاثهم لمعرفة كيف يتم تصنيعها داخل النبات. فحيويا تُصنع مختلف الفلافونيدات بدءًا من الشالكون Chalcone[18,17] ، الذي يتكون من تكاثف ثلاث وحدات من Malonyl-CoA مع P-coumaroyl-CoA كما في الشكل II .3 [10].

أما الإنزيمات المشاركة في الاصطناع فهي موضحة في الجدول II .1.



الشكل II.3 الاصطناع الحيوي لمختلف الفلافونيدات انطلاقا من الشالكون.

الجدول II .1 قائمة الإنزيمات المستخدمة في الاصطناع الحيوي للفلافونيدات انطلاقا من الشالكون.

الرقم	الإنزيم
01	Chalcone synthase
02	Chalcone isomérase
03	2-hydroxyisoflavanone synthase
04	Flavone synthase
05	(2S)-Flavanone 3-hydroxylase
06	Flavonol synthase
07	Dihydroflavonol 4-réductase
08	Flavan-3,4-cis –diol 4-réductase
09	Anthocyanidine/flavonol 3-O glucosyltransférase

II-1-4 الفلافون والفلافونول

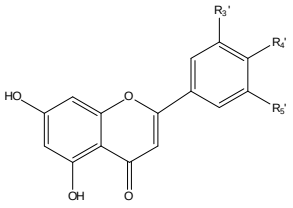
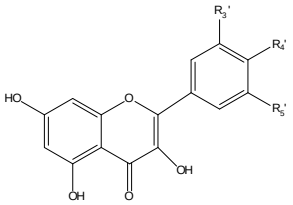
تعتبر هذه الفلافونيدات الأكثر انتشاراً، وهي مركبات متماثلة في الهيكل الرئيسي ويكمن الاختلاف بينها في الموضع C_3، فإذا كان غير مستبدل فهو الفلافون. أما إذا كان مستبدلاً بـR فهو الفلافونول. بحيث إذا كان R=OH فيمثل الفلافونول أما إذا كان R=OR',O-Sucre فهو الفلافونول المستبدل.

والحلقة A عادة ما تكون مستبدلة في الموضعين C_5و C_7، إما بهيدروكسيلات حرة أو مستبدلة بمجموعات ميثيلية أو مرتبطة بسكريات وهناك استبدالات أخرى تكون بنسب متفاوتة :كاستبدال الموضع C_8 و/أو C_6 بهيدروكسيل حر أو مستبدل، الاستبدال بمجموعة ميثيل أو Isoprenyl في المواضع C_6و /أو C_8، أو بسكر وفي هذه الحالة تكون الرابطة من نوع كربون – كربون.

أما الحلقة B فتكون مستبدلة في الموضع C_4، و قد تكون مستبدلة في المواضع C_3، و C_5 لكن بنسب قليلة. وهذه المستبدلات يمكن أن تكون مجموعات هيدروكسيلية أو ميثوكسيلية، أما المواضع الأخرى C_2، و C_6 فنادرا ما تكون مستبدلة[19,10].

و الجدول II-2 يوضح بعض الأمثلة عن الفلافونات والفلافونولات.

الجدول II .2 أمثلة على الفلافونات والفلافونولات

القسم	الصيغة الكيميائية	R_3,	R_4,	R_5,	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine

II -1 -5 خواص الفلافونيدات

الفلافونيدات مركبات فينولية ذات صفة حمضية ضعيفة، سهلة الذوبان في القواعد القوية، مثل هيدروكسيد الصوديوم NaOH، أما الفلافونيدات التي تحتوي على عدد كبير من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو الفلافونيدات الايتروزيدية التي تتميز بصفة قطبية عالية فهي قابلة للذوبان في الكحولات ومختلف المذيبات العضوية القطبية، أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل الايزوفلافونات والفلافونونات المحتوية على مجموعة مستبدلة ميثوكسيلية، فهي قابلة للذوبان في المذيبات العضوية غير القطبية مثل: الكلوروفورم و الايثر [10].

تعمل الفلافونيدات على حماية نسيج النبات لكونها تمتص الأشعة فوق البنفسجية وعليه فهي تحمي المواد الأساسية (البروتينات و الأحماض النووية) من الآثار السامة لهذه الإشعاعات، كما تساعد على الإنقاص من ظاهرة النتح في المناطق الجافة[20].

وتسند إلى الفلافونيدات العديد من الفعاليات البيولوجية حيث يمكن أن نشير إلى أكثرها تداولا وأهمية في الجدول II.3.

الجدول II .3 الفعالية البيولوجية لبعض الفلافونيدات

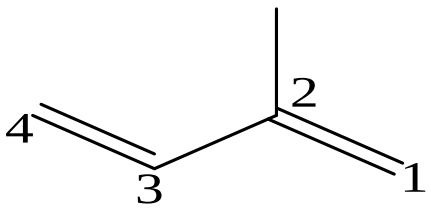
الفلافونيدات		
اسم الفلافونيد	فاعليته البيولوجية	المرجع
Merolloflavone Volkensiflavone	Anti-cancer مضاد للأورام السرطانية	[17]
Nobilitime	Anti-allergique مضاد للحساسية	[10]
3-méthylquercentime	Antiviral مضاد للفيروسات	[31]
8-glucosyle hypolatine	Anti inflammatoire مضاد للالتهاب Anti-ulcère مضاد للقرحة	[10,33]
7-4'- dihydroxyisoflavon	Contraceptif مانع للحمل	[32]
Quercétine	Antispasmodique مضاد للتشنج Anti-inflammatoire مضاد للالتهاب	[30]
Morine 3-méthylkaempférol	Antipolivirus مكافح لفيروس شلل الأطفال	[10]

II -2 التربينات

II -2-1 تعريف التربينات

تعتبر التربينات أحد أهم منتجات الأيض الثانوي للنباتات، وهي مركبات هيدروكربونية تنتج من تكاثف وحدات الايزوبران **(**Isoprène**)** 2-méthylbuta-1,3-diène .

والصيغة العامة للتربينات هي: $(C_5H_8)_n$ [21 , 22].



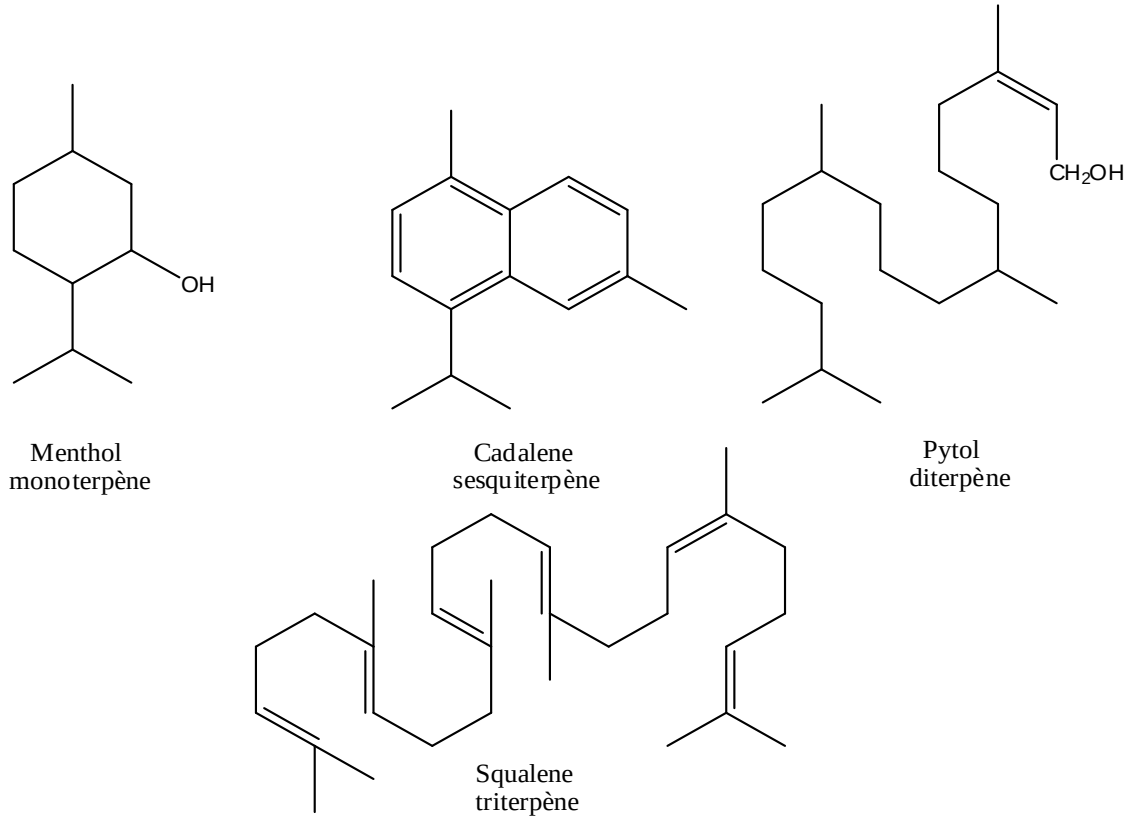
Isoprène
2-méthylbuta-1,3-diène

الشكل II .4 الوحدة الأساسية لبناء التربينات

II-2-2 أقسام التربينات

يمكن تقسيم التربينات إلى:

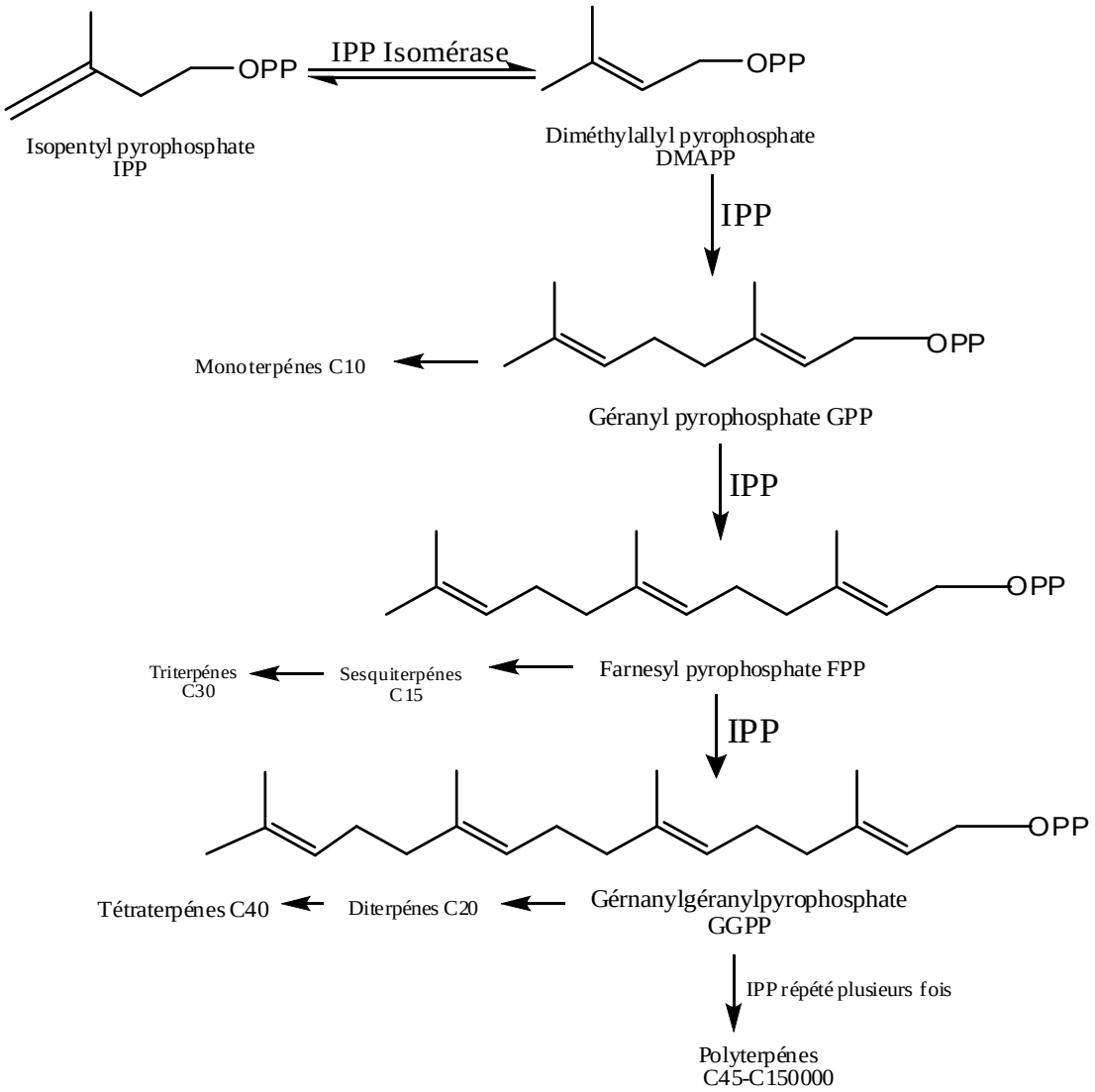
تربينات أحادية monoterpènes ($C_{10}H_{16}$)، سيسكوتربينات sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$)، التربينات الثنائية diterpènes ($C_{20}H_{35}$)، التربينات الثلاثية triterpène ($C_{30}H_{48}$)، التربينات الرباعية tetraterpènes ($C_{40}H_{64}$)، متعدد التربينات polyterpènes $(C_5H_8)_n$ حيث $n > 8$. والشكل II-5 يوضح بعض الأمثلة عن التربينات [22].



الشكل II.5 بعض الأمثلة عن التربينات

II-2-3 اصطناع التربينات

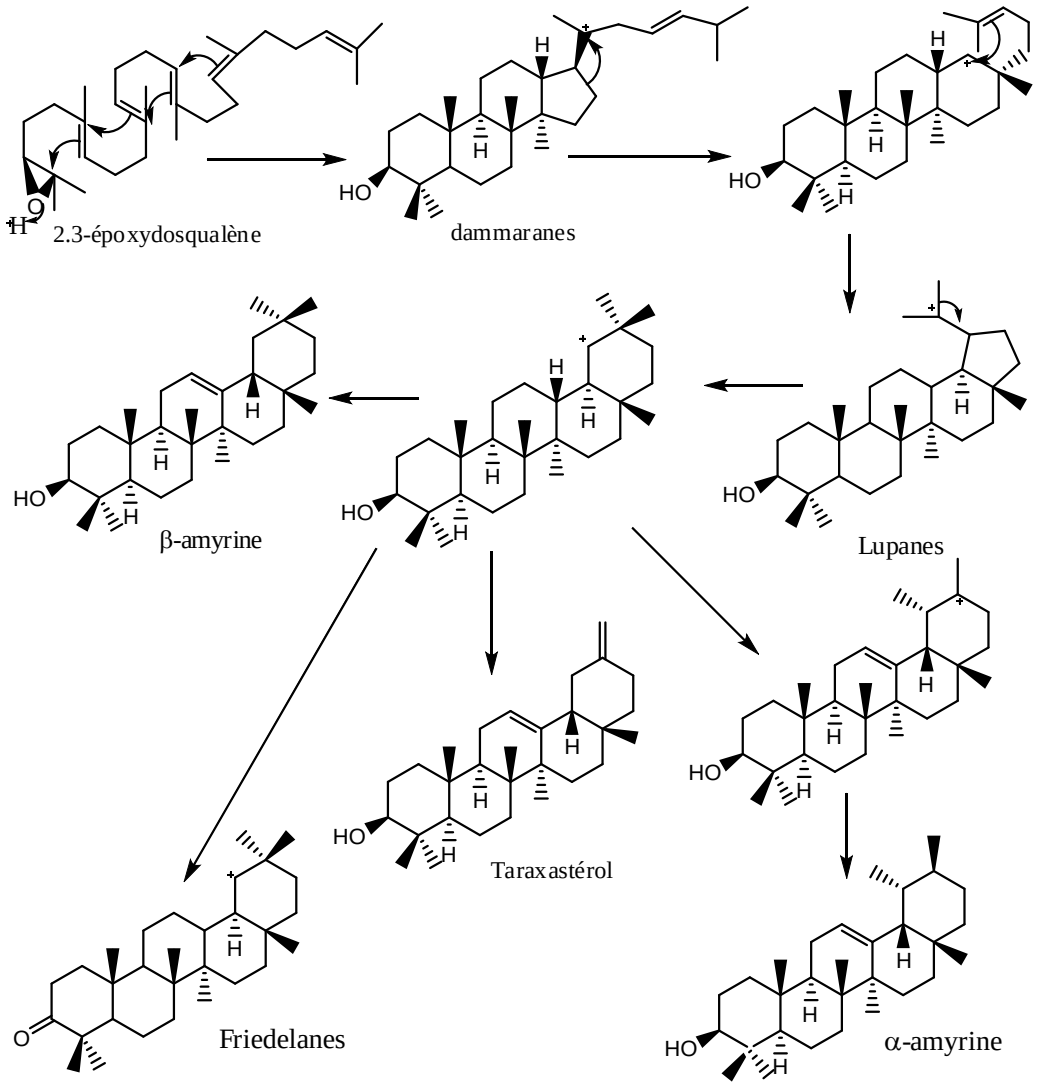
لقد أثبتت الدراسات أن الوحدة الأساسية لتشكيل التربينات ليست Isoprène ذاته بل وحدة شبيهة له و هي Isopentényl pyrophosphate (IPP) و الشكل II.6 يوضح الاصطناع الحيوي للتربينات انطلاقًا من وحدةIPP [23] .



الشكل II.6 الاصطناع الحيوي للتربينات .

II-2-4 التربينات الثلاثية

لعل أكثر أنواع التربينات انتشارًا في الطبيعة هي التربينات الثلاثية C_{30}، **وهي مركبات صلبة، عديمة اللون، أغلبها ينصهر عند درجة حرارة عالية وهي مواد فعالة ضوئيا لاحتوائها** العديد من المراكز الكيرالية، موجودة في الطبيعة في صورة حرة أو ايتروزيدية، ويدخل في التركيب البنائي لهذه التربينات أربع أو خمس حلقات. إلا أن التربينات المحتوية على خمس حلقات هي الأكثر وفرة في الطبيعة[24]، **وعادة ما تنتج من حلقنة** (3S)-2,3-epoxy-2,3- dihydroxysqualène **ونادرا من** squalène ذاته، وتمتلك التربينات الثلاثية بنية مميزة، وتفسر الاختلافات الرئيسية في البنية لـ epoxy squalène **و** squalène **قبل الحلقنة وكذلك للانتقالات** 2،1 للبروتونات و **الميثيلات على مستوى الكاتيون الناتج من الحلقنة** [25]. **و الشكل** II.7.**يوضح** الاصطناع الحيوي للهيكل القاعدي للتربينات الثلاثية.



الشكل II.7 الاصطناع الحيوي للهيكل القاعدي للتربينات الثلاثية.

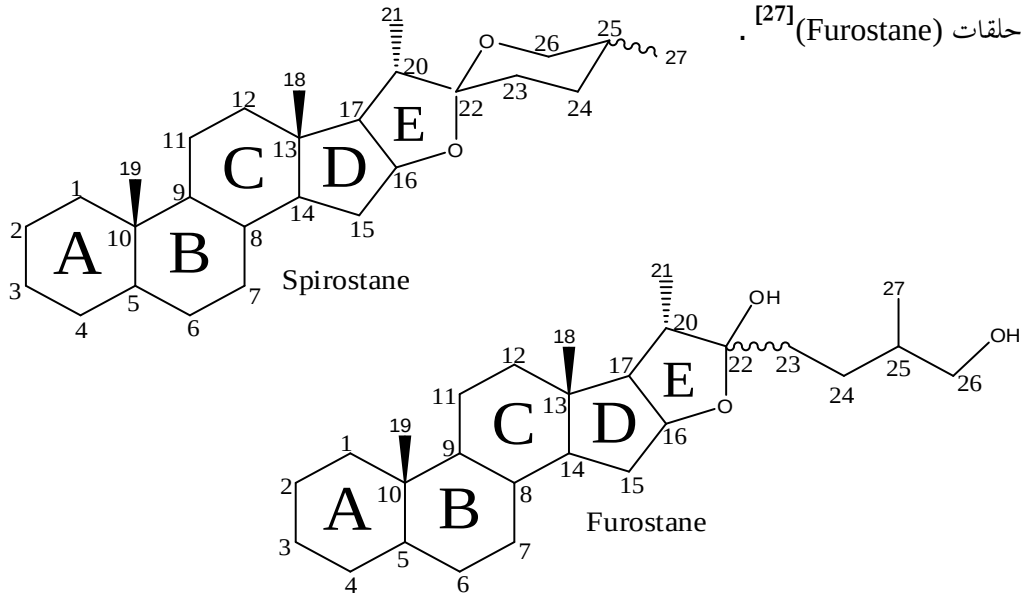
وهناك من صنف التربينات **الثلاثية** إلى عدة مجموعات جزئية **من ضمنها** : **الصابونوزيدات** (Saponosides) [26].

II-2-4-1 الصابونوزيدات Saponosides

هي مركبات جليكوزيدية نباتية تتميز بخاصية التوتر السطحي (tensio-actif)**،** تتحلل في الماء مشكلة محاليل رغوية**،** تذوب في الكحولات المخففة وعمليا لا تذوب في **المذيبات ضعيفة القطبية كايثر** البترول، الكلوروفورم، البنزن وثنائي ايثيل ايثر، **تتميز بدرجة** انصهار مرتفعة عادة ما تكون محصورة بين (200 – 300) م°**، تتكون من شقين: شق سكري** (hydrophile) **وشق لا سكري** (génine) [28].

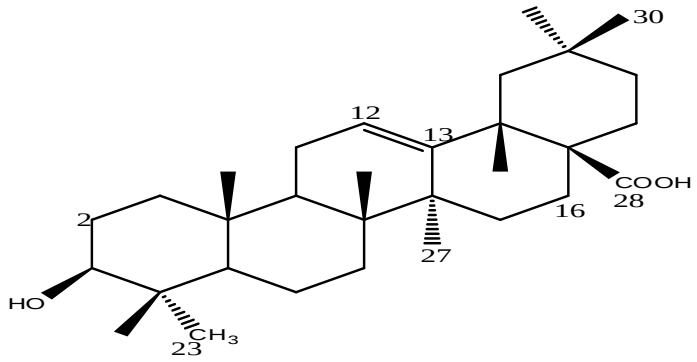
وتصنف الصابونوزيدات حسب طبيعة الشق اللاسكري إلى مجموعتين : جنين سترويدي **و** جنين تربيني **ثلاثي.**

الجنين الستيرويدي **génine stéroidique** يتكون من 27 ذرة كربون تتوزع على ستة حلقات (Sperostane) **أو** خمسة حلقات (Furostane)[27] .



الشكل II. 8 صيغ الجنين الستيرويدي

الجنين التربيني الثلاثي (génine triterpénique) يتكون من 30 ذرة كربون، يرتبط مع الشق السكري برابطة من **نوع** أستر مع مجموعة الحمض لكربون الموضع 28 أو رابطة من نوع ايثر مع مجموعة هيدروكسيل **الموضع** C_3، **أو بالرابطتين معا** [27 ,22].



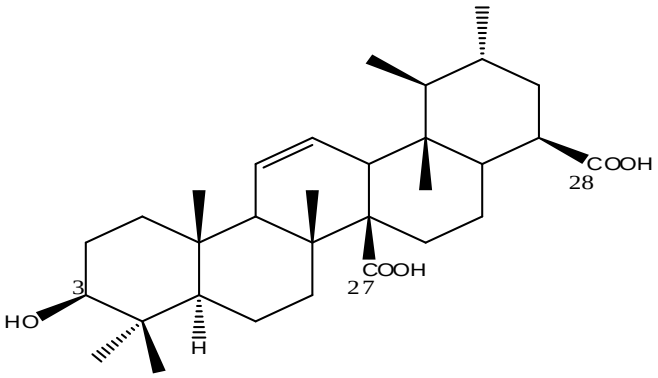
الشكل II. 9 مثال عن جنين تربيني Acide oléanolique

أغلب السكريات التي تحتويها **الصابونوزيدات هي**

D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose.

و من أنواع التربينات الثلاثية المنتشرة في جنس *Zygophullum* نجد أحماض الكينوفيك **الجليكوزيدية** (quinovique)، التي تعتبر من المركبات التربينية الثلاثية خماسية الحلقة من نوع $\alpha - amyrol$. **و صيغتها العامة** : $C_{30}H_{46}O_5$.

تحمل في هيكلها مجموعة من الوظائف: وظيفة هيدروكسيلية محمولة على الموضع C_3، وظيفتين حمضيتين كربوكسيليتين في كل من الموضع C_{28} و C_{27}[29]. (الشكل II .9)



الشكل II .10صيغة حمض Quinovique

وتنسب إلى منتجات الأيض الثانوي التربيني العديد من الفعاليات البيولوجية حيث يمكن أن نشير إلى بعض تلك الفعالية المنسوبة لبعض جزيئات التربينات في الجدول II .4.

الجدول II .4 الفعالية البيولوجية لبعض التربينات

التربينات		
نوع التربين	الفاعلية البيولوجية	المرجع
Azuléne (Sesquiterpène)	Anti-inflammatoire مضاد للالتهاب	[35]
Thuyone (monoterpène)	Stupéfiant مخدر، مدهش	[34]
Linalol, Cinéol, géraniol (monoterpène)	Antiseptique مطهر	[35]
Ascaridol (monoterpène)	Vermifuge طارد للديدان	[34]
Jatrophane (diterpène)	Anti-cancer مضاد للسرطان	[26]
Paralian (diterpène)	Anti-VIH مضاد للسيدا	[26]

الفصل الثالث:

الفاعلية المضادة للأكسدة

III-1 الجذور الحرة

III-1-1 تعريف الجذور الحرة

للجذور الحرة دور كبير في الآليات الجزيئية للعديد من الأمراض، كونها تتولد بشكل طبيعي في جسم الإنسان ويزداد تشكلها بفعل عدة عوامل داخلية وخارجية. وعلى ذلك يتركز الاهتمام على دراسة مضادات الأكسدة (les antioxydants) داخلية و خارجية المنشأ لأنها النظام الذي يحمي العضوية من أضرار الجذور الحرة[36].

فتعرف الجذور الحرة بأنها وحدات كيميائية (ذرات أو جزيئات) تمتلك إلكترونًا أو أكثر حرًا في مدارها الخارجي. ما يجعلها غير مستقرة، وتتفاعل بسرعة مع مركبات أخرى محاولة اقتناص ما ينقصها من الكترونات لتصل إلى الثبات الكيميائي.

وعادة ما تهاجم الجذور الحرة أقرب جزيء ثابت إليها آخذة الكتروناته التي تحتاجها، وفي هذه الحالة تتحول الجزيئات المهاجَمة بدورها والتي فقدت إلكترونًا إلى جذور حرة تبحث عن الاستقرار، بادئة سلسلة من التفاعلات تتفاقم لتهاجم غشاء الخلية الحية ومكوناتها حتى تصل جزيء ألـ ADN [37].

III-1-2 أنواع الجذور الحرة

تنقسم الجذور الحرة من حيث استقرارها إلى نوعين [38] :

III-1-2-أ الجذور الحرة التي لها أعمار حياة قصيرة

وهي الجذور الحرة غير المستقرة في الظروف العادية، ويشمل هذا النوع ذرات العناصر مثل الهيدروجين و النتروجين و الكلور و الفلور و الجذور التي لها وزن جزيئي ضعيف بصورة عامة مثل :

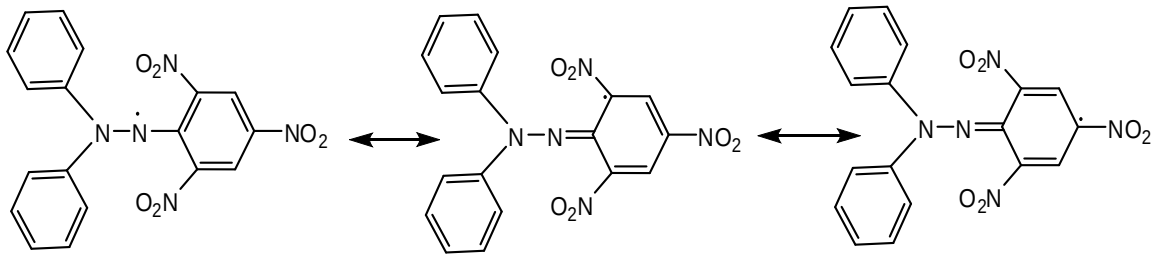
$NO^{\bullet}$، $OH^{\bullet}$ ، $CH_3^{\bullet}$ وما شابه ذلك.

تقدر أعمار حياة هذه الجذور بالميكروثانية أو أقل حتى تصل إلى البيكوثانية (10^{-12} ثانية). تلاحظ تفاعلات هذه الجذور وتُشخص حركة تفاعلها بالطرق الطيفية الحديثة.

III -1-2- ب الجذور الحرة التي لها أعمار حياة طويلة

وهي الجذور التي تقدر أعمارها بالثواني أو الدقائق أو الساعات و حتى الأيام، مثل جذر triphenylméthyl ذو لون أصفر و مستقر بدرجة حرارة الغرفة لبضع ساعات، وجذر 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) ذو لون بنفسجي مسود وهو عبارة عن مادة صلبة ومحلوله مستقر لعدة أيام.

معظم الجذور الحرة الأروماتية والتي بها التراكيب الرنينية تكون مستقرة في أغلب الأحيان، ويعزى استقرار هذا النوع من الجذور لعدم تمركز الإلكترون الحر، أي ينتقل من موقع لآخر على طول تركيب الجذر. كعدم تمركز الإلكترون بجذر 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) وهو ما يوضحه الشكل III .1



الشكلIII .1 التراكيب الرنينية لجذر DPPH·

III -1-3 متابعة حركية التفاعل

إن الجذور الحرة إما أن تكون ذات أعمار طويلة أو قصيرة، فالقصيرة منها لا يمكن متابعة حركية تفاعلاتها إلا بالطرق الطيفية السريعة مثل أطياف تجزيء الكتلة، أما الجذور المستقرة نسبيا فيمكن متابعة حركية تفاعلاتها بالطرق التقليدية مثل قياس التغير بالتوصيلة الكهربائية بوحدة الزمن، أو التغير بالتركيز المولاري بوحدة الزمن، أو التغير بحجم الغاز عن طريق التسحيح بالحامض أو القاعدة.

و لكن أدق هذه الطرق هي قياس تغير كثافة الضوء الممتص بوحدة الزمن بواسطة أجهزة قياس أطياف الأشعة فوق البنفسجية– المرئية (UV-Vis)، شرط أن يمتص الجذر الحر الضوء بمنطقة تختلف عن منطقة امتصاص المادة الناتجة. فمثلا يمتص جذر ثلاثي فينيل المثيل ($Ph_3C^{\cdot}$) الضوء عند 345 ن م وعند 510 ن م بينما يمتص مركب ثلاثي فينيل الميثان (Ph_3CH) الضوء عند 262 ن م فقط[39].

III -1-4 طرق تفاعلات الجذور الحرة

تتفاعل الجذور الحرة بمعظم أنواعها طويلة أو قصيرة العمر، المشحونة منها والمتعادلة بتفاعلات سريعة جدًا ومختلفة وهذه بعض طرق تفاعلاتها[40].

III-1-4- أ تفاعلات التبادل الالكتروني

يتم في هذا التفاعل انتقال إلكترون من المادة المستقرة المتواجدة بالمحيط إلى الجذر الحر وبذلك يتكون أيون سالب مشتق من الجذر الحر وجذر حر جديد مشتق من الأيون السالب.

$$OH^{\cdot} + Cl^{-} \rightarrow OH^{-} + Cl^{\cdot}$$

III-1-4-ب تفاعلات تفكك الجذور الحرة

تتفكك الجذور الحرة بصورة مختلفة معتمدة بذلك على طبيعة الجذر الحر. وكمثال على ذلك تفكك جذور الأسيل بواسطة فقدان جزيئة أول أكسيد الكربون.

$$RC^{\cdot}=O \rightarrow R^{\cdot} + CO$$

III-1-4- ج تفاعلات اتحاد الجذور الحرة

إن تفاعلات الجذور الحرة مع بعضها البعض يعد من التفاعلات المهمة جدًا، حيث ينتهي وجود هذه الجذور بنظام ما لهذه التفاعلات مع تكوين مركبات مستقرة ويطلق على هذه التفاعلات تفاعلات الاتحاد أو تكوين الدايمر.

$$OH^{\cdot} + OH^{\cdot} \rightarrow H_2O_2$$

$$NH_2^{\cdot} + NH_2^{\cdot} \rightarrow N_2H_4$$

III-2 مضادات الأكسدة

III-2-1 تعريف مضادات الأكسدة

مضادات الأكسدة هي مجموعة من المواد التي تحمي الخلايا من الأضرار التي تسببها الجزيئات غير المستقرة والتي تعرف بالجذور الحرة. ويمكن تعريفها في النظام البيولوجي على أنها أي مادة تكون بتراكيز منخفضة مقارنة بما كانت عليه المواد القابلة للأكسدة وتمنع أكسدتها، و توجد مضادات الأكسدة بصورة طبيعية في معظم الخضروات و الفواكه و الأعشاب الطبية، فهي تعد كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة وعليه فدورها الأساسي هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة من الأكسدة[37, 41].

III-2-2 تصنيف مضادات الأكسدة

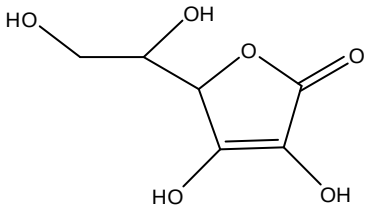
تصنف مضادات الأكسدة من حيث مصادرها إلى طبيعية و مصنعة

III-2-2- أ مضادات الأكسدة الطبيعية

في الحالة الفيزيولوجية فان تركيز الجذور الحرة مثل $O^{\cdot\cdot}$ و$HOO^{\cdot}$ و $HO^{\cdot}$ تكون مراقبة من طرف الخلايا التي تستعمل العديد من الاستراتيجيات المضادة للأكسدة وتستهلك طاقة كبيرة من أجل مراقبة مستوى تفاعلات الأكسجين، باستعمال وسائل دفاعية طبيعية ذاتية داخلية (مثل إنزيمات catalases, Pyroxydases, superoxyde dismutases)، و عوامل

مضادة للأكسدة مستخلصة من الغذاء (مصادر خارجية) كالفيتامين C (Acide ascorbique)، الفيتامين Q (Ubiquinone) ، حمض البوليك (Acide urique) و Vitamine E.

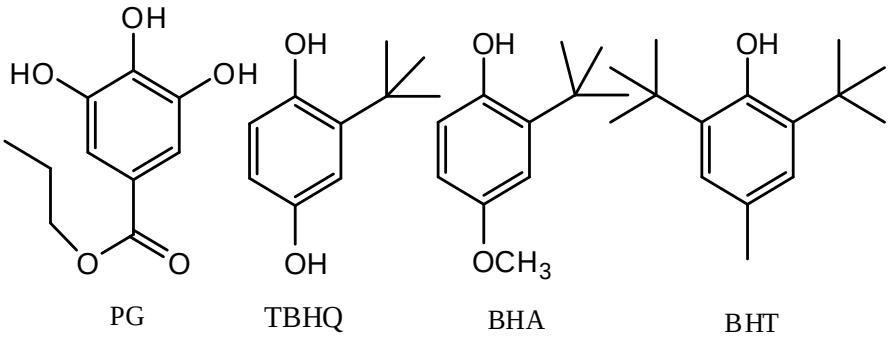
فتُشكل مضادات الأكسدة مصيدة للجذور الحرة وتقتبض على الالكترونات الحرة و تحولها إلى مركبات ثابتة. و على هذا الأساس يمكن القول أن مضادات الأكسدة مواد داخلية (أو خارجية المصدر) تستطيع أن تمنع، تعدل أو تصلح الإتلاف الذي سببته الجذور الحرة [13].



الشكل 2.III بنية حمض الاسكوربيك

III-2- 2- ب مضادات الأكسدة المصنعة

تعتبر مضادات الأكسدة المصنعة كعنصر أساسي يجب إضافته للأطعمة المعلبة للتقليل من إتلافها إلى أقصى حد وذلك لسرعة تأكسدها، منها PG (Propyl Gallate)، TBHQ (tertiobutylhydroxyquinone) و BHA(3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole)، BHT (2,6-ditertiobutyle-4-hydroxytoluéne). هذه المركبات واسعة الاستعمال في الصناعة الغذائية، لأنها فعالة وقليلة التكلفة بالمقارنة مع مضادات الأكسدة الطبيعية كما أنها غير سامة [41, 13].



الشكلIII .3 مضادات الأكسدة المستعملة في الصناعة الغذائية

III -3-2 آلية عمل مضادات الأكسدة

تعمل مضادات الأكسدة على منع تكوين أو منع تأثير أصناف الأكسجين والنتروجين الفعال الناشئين داخل الجسم والـــذين يؤديـــان إلى أضـــرار في الأحمـــاض النوويـــة والـــدهون والبروتينـــات والجزيئـــات الحيويـــة الأخـــرى. وتصنف المادة المضادة للأكسدة بأنها المادة التي لديها القدرة على تثبيط الجذور الحرة أو تقليلها، لذا فان القليل من جزيئات مضادات الأكسدة كبعض الإنزيمات تكون غير كافية لمنع هذا الضرر تمامًا، إن إزالة الجذور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة تبدو هامة لصحة الإنسان، رغم ذلك لا يمكن أن نعيش بدون جذور حرة، فالجسم يستخدم الجذور الحرة لتحطيم الجراثيم، وتستخدم أيضا في إنتاج الطاقة، والمشكلة تكمن في أن معظم الناس يتعرضون لكميات فائضة (زائدة) من الجذور الحرة، ولكن يمكن تجنب العوامل التي تزيد من تعرضنا للجذور الحرة أو تزيد من إنتاج أجسامنا لها بتناول الأغذية الغنية بمضادات الأكسدة كالخضروات و الفواكه[42].

III-3 تقييم الفاعلية المضادة للأكسدة

الفاعلية المضادة للأكسدة هي قياس لقدرة المستخلص أو المركب لتثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة، ويمكن تقدير الفاعلية بعدة تقنيات تحليلية كلاسيكية مثل التحليل الطيفي، اللوني، الكروماتوغرافي، مطيافية الكتلة، الأشعة تحت الحمراء. أو بطرق حديثة كالتحليل الكهربائي مثل طرق القياس البولاروغرافي، الفولطامتري (الفولطامتري النبضي التفاضلي، الفولطامتري الحلقي، الفولطامتري الترددي)، الامبيرومترية[13].

الفصل الرابع:

الفولطامتري الحلقي

IV – لتقدير الفاعلية المضادة للأكسدة استخدمت الطرق الكيميائية التقليدية و بعد اكتشاف سلبياتها، اقترحت الطرق الالكتروكيميائية كبديل من ذلك الفولطامتري الحلقي الذي يمتاز بالسرعة، قلة التكلفة، والدقة.

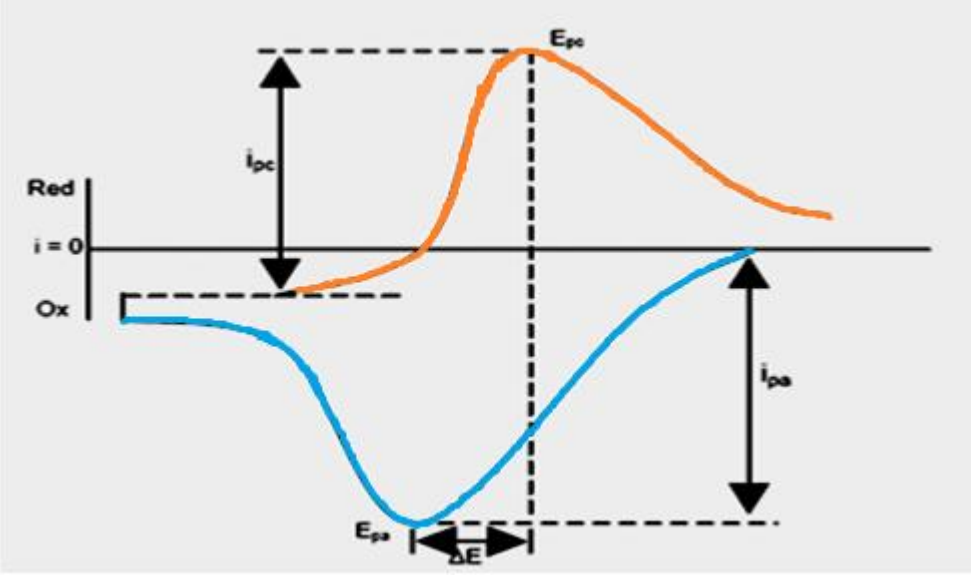
وتتلخص أسس دراسة التحليل الفولطامتري في معرفة تقنية الفولطامتري المستعملة، و معرفة الخصائص الكهروكيميائية للمواد المدروسة.

IV- 1 الفولطامتري الحلقي

تعد طريقة الفولطامتري الحلقية من طرق التحليل الكهروكيميائي، وفيها تقاس منحنيات التيار- الجهد التي تتم على قطب صلب ساكن مثل البلاتين[13]، وتسمح هذه الطريقة بتحديد الشروط التي ينجز فيها تفاعل الأكسدة و الإرجاع وكذا تقدير درجة عكوسية الجملة (أكسدة- إرجاع)، كما تسمح أحيانا بتحديد آلية التفاعل عند الالكترود خاصة عندما تشترك بتفاعلات كيميائية في نقل الالكترونات فلآلية إما أن تكون الكتروكيميائي- الكتروكيميائيEE، الكتروكيميائي- كيميائي- الكتروكيميائيECE، الكتروكيميائي- كيميائيEC، ويظهر المخطط الفولطامتري على هيئة قمم مصعدية و مهبطية متعاكسة تقريبا والتي تمثل عمليتي الأكسدة والإرجاع[43] .

وتعتبر الطريقة الفولطامتري واحدة من أكثر الوسائل الحديثة المستخدمة لقياس نشاط مضادات الأكسدة .

والشكل العام لمنحنيات الفولطامتري الحلقي موضحة في الشكل IV .**1**[44] :



الشكلIV.1 المنحنى العام الفولطامتري الحلقي

حيث I_{Pc}، I_{Pa}: تيارات النتوءات المصعدية والمهبطية

E_{Pc}،E_{Pa} : كمونات النتوءات المصعدية والمهبطية

ΔE_P: التغير في الكمونات بين I_{Pc} وI_{Pa}

كما تسمح هذه الطريقة بدراسة عكوسية الانتقال الالكتروني فنتحصل على نوعين من أنظمة جمل التحويل [45]

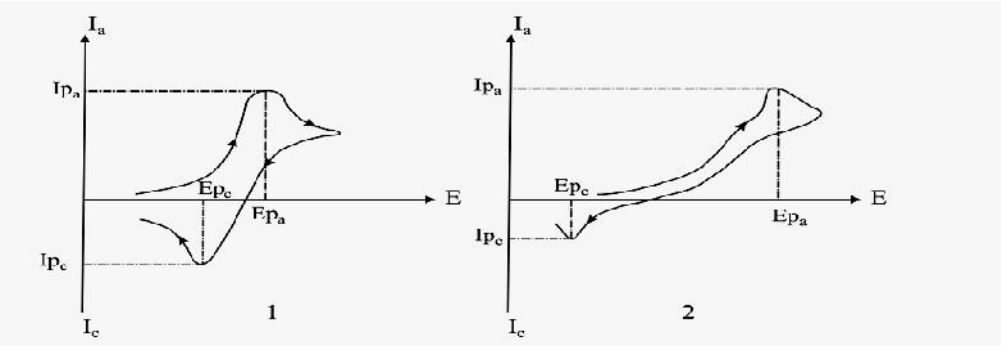
IV -1- أ الجملة السريعة:

يكون فيها الفرق بين كمونات قمم النتوءات مستقل عن سرعة المسح.

$$\Delta Ep=Ep_a - Ep_c = 0.06/n$$

IV -1- ب الجملة البطيئة :

تكون فيها قيمة ΔEp كبيرة وتتغير بتغير سرعة المسح.



الشكلIV .2 منحنى الفولطامتري للجملة السريعة(1) ، والبطيئة(2)

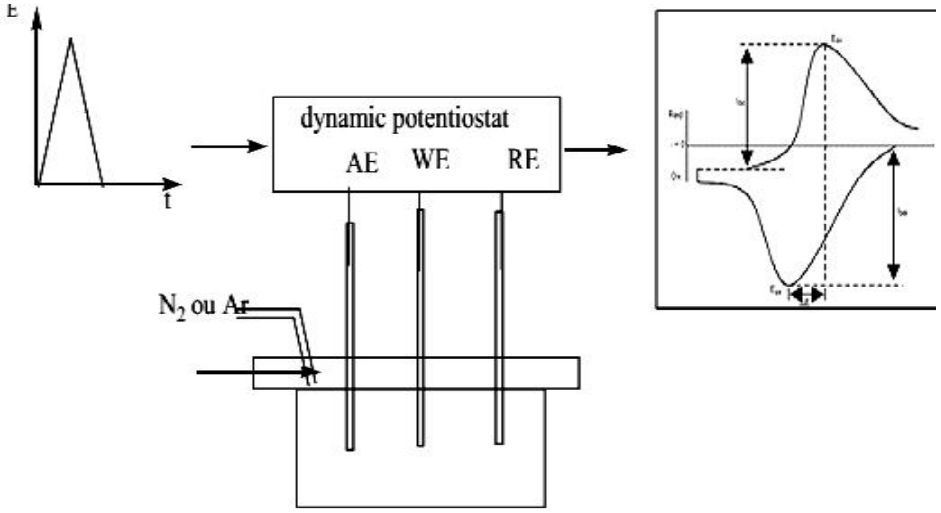
IV -2 الأجهزة المستعملة في الفولطامتري الحلقي

تتم دراسة السلوك الكهروكيميائي داخل خلية زجاجية مزدوجة الجدار غطاؤها يحتوي على خمس ثقب.
ثلاثة منها تسمح بدخول (الكترود العمل، الكترود المرجع، الكترود المساعد)، أما الثقبان الآخران فأحدهما يسمح بتزويد الوسط بالأزوت الذي يعمل على نزع الأكسجين و يمكن أن يكون نشط كهربائيا، والثقب الأخر لإضافة المواد[43] . (الشكل 3.IV)

الكترود العمل: هو عبارة عن أسطوانة من كربون زجاجي أو أسطوانة من البلاتين، وهو الذي تتم فيه عمليات الأكسدة والإرجاع.

الكترود المرجع: هو عبارة عن الكترود من الكالومال المشبع بـ KCl.

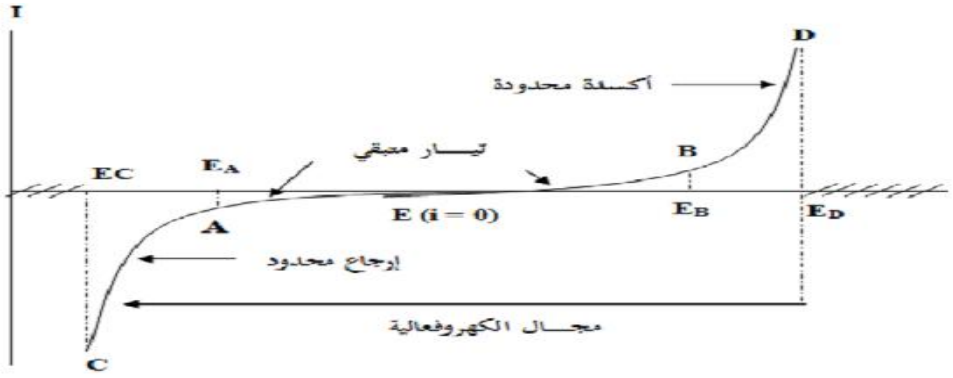
الكترود المساعد: هو عبارة عن الكترود مصنوع من البلاتين يضمن مرور التيار الكهربائي.



الشكل 3.IV الخلية المستعملة في الفولطامتري الحلقي

IV -3- مجال الكهروفاعلية

إن مجال الكهروفاعلية يتعلق بالمنحنى الفولطامتري الحلقي فقط الذي نتحصل عليه باستعمال الكترود المرجع ومحلول الالكتروليت المساعد، منحناه العام يكون ممثل في الشكلIV .4



الشكلIV .4 يمثل التيار المتبقي ومجال الكهروفاعلية

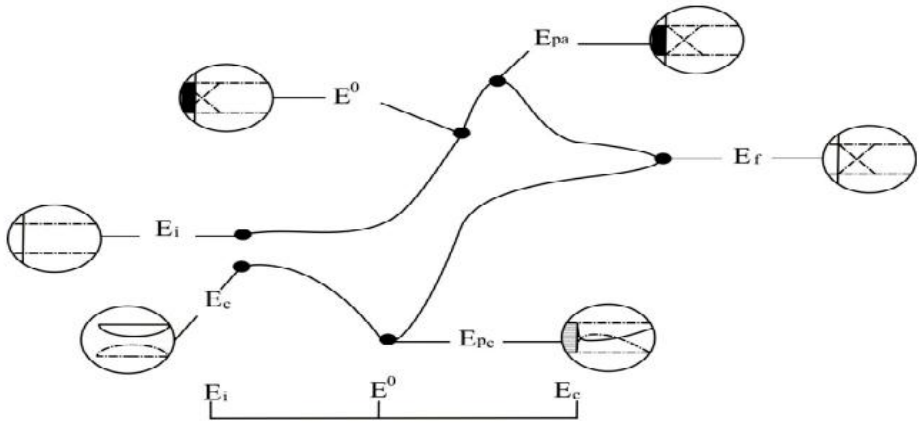
الجزء AB : المحصور بين فرق الكمون E_B و E_A يوافق التيار المتبقي والذي نقول بأنه تيار ضعيف جدًا، وبين القيمتين E_A وE_B لفرق الكمون توجد قيمة يكون التيار فيها معدوماً (i=0) تعرف بفرق الكمون التحليلي أو الإهمال.

ينقسم منحنى الفولطامتري (الحلقة شبه مفتوحة) إلى قسمين : مصعدي ومهبطي

عند القيمتين للجزء AB تظهر تغيرات كبيرة للتيار توافق تفاعل إرجاع عندما تكون $E_A<E$ أو تفاعل أكسدة $E_B>E$ ، هذان التغيران الكبيران يقومان بتشكيل حواجز إذ أن كمية التيار الحدي عند المصعد توافق فرق الكمون E_C لا يمكن تجاوزه، بينما

توافق الكمية الكهربائية الحدية المصعدية فرق كمون حدي E_D يستحيل الاستمرار بعده، ويعرف مجال فرق الكمون المحصور بين E_C و E_D بأنه مجال الكهروفاعلية للمواد المضافة إلى محلول الكهروليت المساعد [46].

IV-4-تفسير منحنى الفولطامتري الحلقي :



الشكلIV .5 مخطط بياني مفصل لمنحنى$I=f(E)$ لانتقال الكترود واحد

إن تركيز المواد المتفاعلة R و المواد الناتجة P المشار إليها في الشكلIV .5 عند فرق كمونات مختلفة تمثل Ep_c و Ep_a الكمون المهبطي والمصعدي على التوالي.

عند الكمون E_i :يكون تركيز المادة الفعالة R إلى C_0 في المحلول وكذالك عند الالكترودات، أما تركيز ناتج التفاعلP من البديهي أن يساوي الصفر.

عند الكمون E^0 :تكون المادة الكهروفعالةR عند الالكترود في تناقص، بينما المادة الناتجة P في تزايد.

عند الكمون Ep_a :يتناهى تركيز المادة المتفاعلة R عند الصفر بجوار الالكترود، في حين أن تركيز المادة الناتجة P تؤول إلى C_0 ما نفسره بظاهرة استهلاك المادة الكهروفاعلية بجوار الالكترود بسبب سرعة المسح العالي.

عند الكمون E_f :يزداد سمك طبقة الانتشار لأن المادة الناتجة P تنتشر في المحلول ويتناقص مقدار التركيز حتى الثبات، ثم يعكس اتجاه المسح لفرق الكمونات.

عند الكمون Ep_c :المادة الناتجة P الكهروفاعلية هي التي تكون موجودة عند الالكترود، وهي التي تخضع للاستهلاك فيتناقص تركيزها عند الالكترود إلى أن يصل إلى الصفر، في حين تركيز المادة المتفاعلة يقترب مرة أخره إلى C_0 ونعود إلى فرق الكمون الابتدائي من جديد[45].

الجزء التطبيقي

الفصل الخامس:

الدراسة الفيتوكيميائية

والفاعلية المضادة للأكسدة

V - الدراسة الفيتوكيميائية لنبتة *Z.gaetulum* و *الفاعلية المضادة للأكسدة*

V -1 المادة النباتية

تم تجميع نبتة *Z.gaetulum* في شهر ماي 2015 من ولاية تندوف. أجريت عملية تجفيف المادة النباتية في مكان خاص تحت الظل وبعيدا عن الرطوبة حيث كان الوزن المستعمل و المتمثل في الأجزاء الهوائية 200 غ.

V-2 الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية

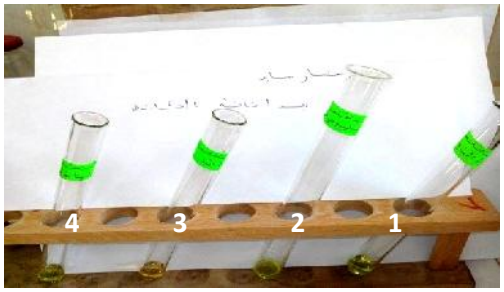
قمنا بتحضير 4 ارلينات ذات سعة 100 مل، تحوي كل منها 3 غ من مسحوق النبتة، وتنقع في 50 مل من مذيب (الارلينة 1 بها ايثر البترول، الارلينة 2 الكلوروفورم، الارلينة 3 الماء المقطر، الارلينة 4 الايثانول) ونغطيها ونتركها لمدة ساعتين، ثم نرشح وتستعمل للمسح الفيتوكيميائي[47].

V- 2-1 الكشف عن القلويدات Les Alcaloïdes

V- 2-1 - أ اختبار ماير Mayer

نأخذ 1 مل من كل مستخلص ونضيف له قطرات من كاشف ماير (5 غ من KI و 1.36 غ من $HgCl_2$ وندوبها في 100 مل من الماء المقطر) ، تشكل الراسب الأبيض المصفر دليل على وجود القلويدات[47].

قبل إضافة الكاشف



بعد إضافة الكاشف

حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - مستخلص الكلوروفورم

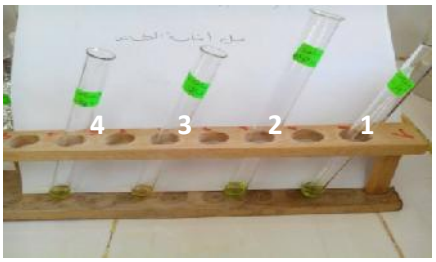
3- المستخلص المائي 4- المستخلص الايثانولي

الشكل1.V نتائج اختبار ماير

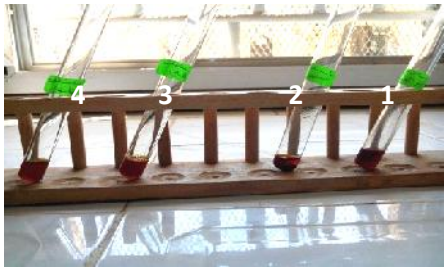
V– 2–1 –ب اختبار Wagner

نأخذ 1 مل من كل مستخلص و نضيف له نفس الحجم من كاشف Wagner (2 غ من KI و 1.27 غ من I_2 تذاب في 100 مل من الماء المقطر).

تشكل الراسب البني المحمر دليل على تواجد القلويدات [47].



قبل إضافة الكاشف



بعد إضافة الكاشف

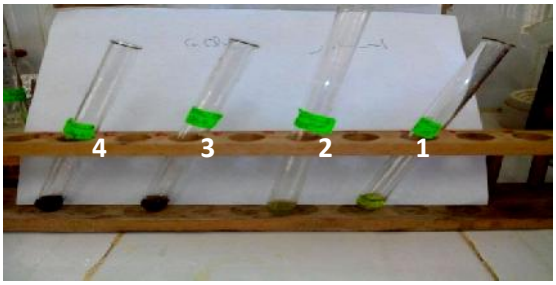
حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - مستخلص الكلوروفورم

3- المستخلص المائي 4- المستخلص الايثانولي

الشكل2.V نتائج اختبار wagner

V- 2-1 –ج اختبار $FeCl_3$

نأخذ 1 مل من كل مستخلص ونضيف له قطرات من محلول كلوريد الحديد، ظهور راسب أصفر يدل على وجود القلويدات.



حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - مستخلص الكلوروفورم

3- المستخلص المائي 4- المستخلص الايثانولي

الشكل3.V اختبار $FeCl_3$

V-2-2 الكشف عن الفلافونيدات Les Flavonoides

V-2-2- أ اختبار Shinoda

نأخذ 1 مل من كل مستخلص ونضع فيها قليل من المغنزيوم ثم نضيف له قطرات من حمض الكلوروهيدريك المركز بحذر **على** جدار الأنبوب، ظهور اللون الأحمر يدل على وجود الفلافونيدات[47].

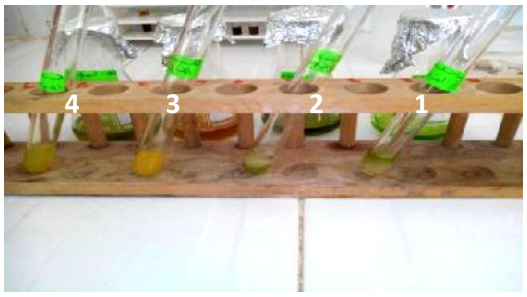
حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - **مستخلص الكلوروفورم**

3- **المستخلص المائي** 4- المستخلص الايثانولي

الشكل 4.V نتائج اختبار Shinoda

V-2-2- ب اختبار الكاشف القاعدي NaOH

نأخذ 1 مل من كل مستخلص توضع في أنابيب اختبار ثم يضاف إليها محلول هيدروكسيد الصوديوم، يدل تغير لون المستخلص إلى **الأصفر على وجود الفلافونيدات**[47].



حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - **مستخلص الكلوروفورم**

3- **المستخلص المائي** 4- المستخلص الايثانولي

الشكل5.V نتائج اختبار الكاشف القاعدي

V-2-3- الكشف عن التانينات Les Tanins

نأخذ 0.5 مل من كل مستخلص ونضيف له 1 مل من الماء المقطر، ثم نضيف له من 1-2 قطرات من محلول كلوريد الحديد الثلاثي $FeCl_3$. ظهور اللون المخضر يدل على تواجد التانينات[48].

حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - مستخلص الكلوروفورم

3- المستخلص المائي 4- المستخلص الايثانولي

الشكل6.V نتائج اختبار التانينات

V-2-4- الكشف عن الكومارينات Les coumarines

نأخذ 2 مل من كل مستخلص ثم نضيف له 3 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم(NaOH (10%، ظهور اللون الأصفر يدل على وجود الكومارينات (المركبات الفينولية)[49].

حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - مستخلص الكلوروفورم

3- المستخلص المائي 4- المستخلص الايثانولي

الشكل7.V نتائج اختبار الكومارينات

V-2-5- الكشف عن الستيرولات والتربينات الثلاثية

V-2-5- أ اختبار Salkowski

نضع 1 مل من كل مستخلص ونضيف له 5 مل من الكلوروفورم، ثم يضاف له 1 مل من حمض الكبريت المركز H_2SO_4 بحذر وبرج جيدا. تشكل اللون الأحمر القرمزي في الطبقة السفلى يدل على وجود الستيرولات[47].

قبل إضافة H_2SO_4

بعد إضافة H_2SO_4

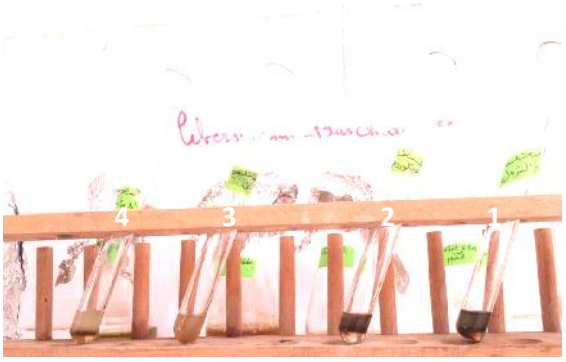
حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - مستخلص الكلوروفورم

3- المستخلص المائي 4- المستخلص الايثانولي

الشكل 8.V نتائج أ اختبار Salkowski

V-5-2-ب اختبار Liebermann- Burchared

نأخذ 1 مل من كل مستخلص ونضيف له القليل من قطرات محلول لاماءات الاسيتيك، ثم نضيف بضع قطرات من حمض الكبريت المركز H_2SO_4. ظهور حلقة حمراء دليل على وجود التربينات الثلاثية و ظهور اللون الأخضر دليل على وجود الستيرولات[47,49].



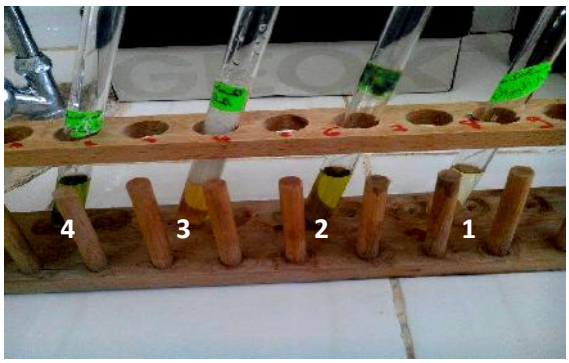
حيث 1-مستخلص ايثر البترول 2 - مستخلص الكلوروفورم

3- المستخلص المائي 4- المستخلص الايثانولي

الشكل9.V نتائج اختبار Liebermann- Burchared

6-2-V اختبار الصابونوزيدات Les Saponosides

نحضر 4 أنابيب اختبار ونضع فيها 5مل من كل مستخلص ترج جيدًا، عند تشكل رغوة ثابتة نضيف لها من 5 إلى 6 قطرات من الزيت. تشكل المستحلب يدل على تواجد الصابونوزيدات[47].



قبل إضافة الزيت

بعد إضافة الزيت

الشكل10.V نتائج اختبار الصابونوزيدات

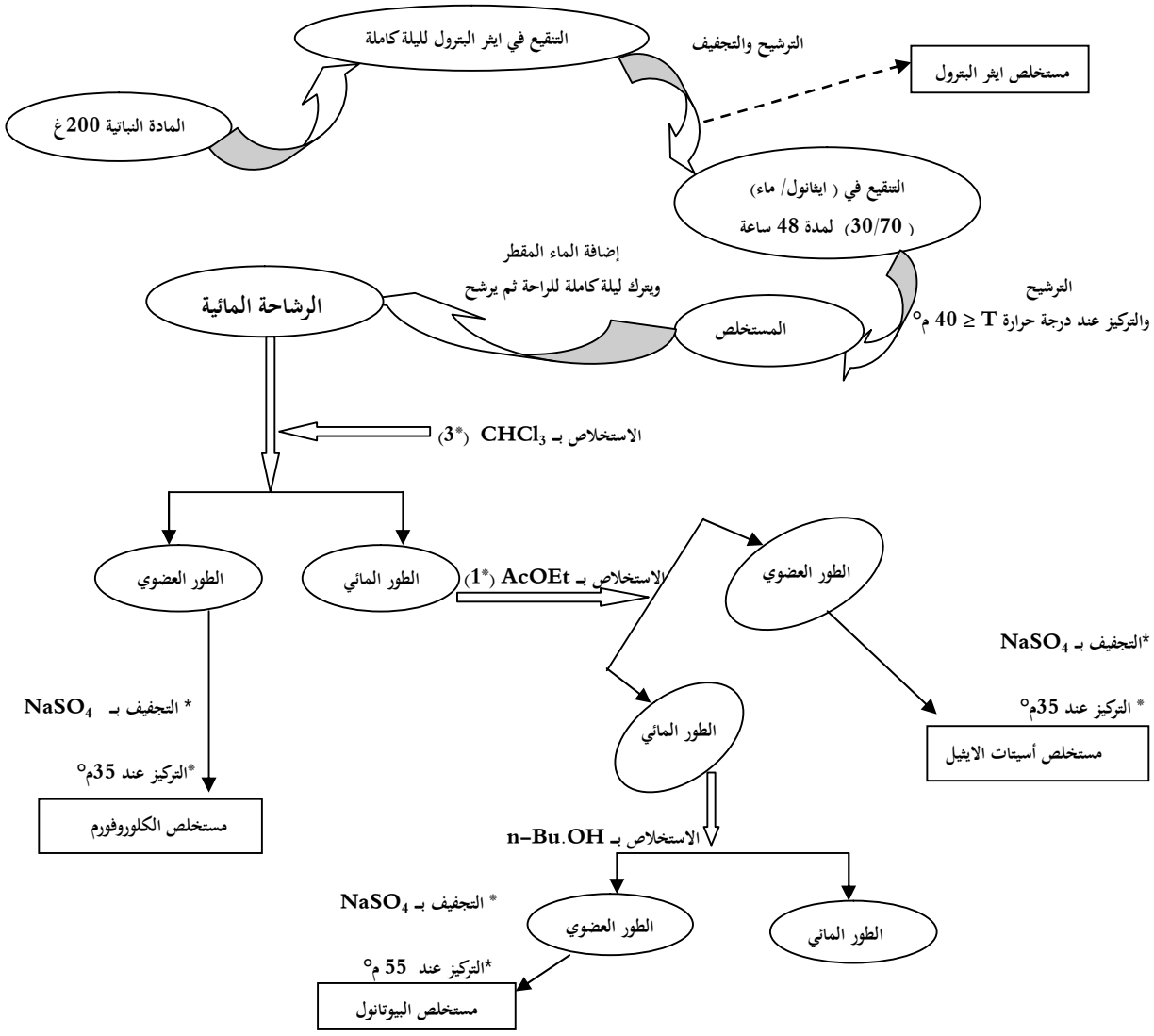
الجدول V-1 نتائج الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية

		مستخلص ايثر البترول 1	مستخلص الكلوروفورم2	مستخلص الماءالمقطر3	مستخلص الايثانول 4
القلويدات	اختبار ماير Mayer	+	+	–	–
	اختبارWagner	+	++	–	–
	اختبار $FeCl_3$	+	+	–	–
الفلافونيدات	اختبار Shinoda	–	–	+++	+++
	اختبار NaOH	–	–	+++	+++
اختبار التانينات		–	–	+++	–
اختبار الكومارينات		–	–	+++	+
اختبار الستيرولات و التربينات	اختبار Salkowski	–	–	–	–
	اختبار Liebermann-Burchared	+++	++	–	+++
اختبار الصابونوزيدات		–	–	+++	–

V -3 الاستخلاص

بعد تجفيف النبتة وسحقها تُنقع في ايثر البترول مدة 24 ساعة بغية التخلص من الكلوروفيل والدهون، بعدها ترشح وتجفف وتنقع من جديد في محلول كحولي ($EtOH/ H_2O$: 70/30) وتركت لمدة 48ساعة، ليُرشح بعدها ويُركز الراشح أما المذيب المسترجع بعد التركيز فيُجدد بالكمية الكافية لغمر المادة النباتية، وهذا لإعادة العملية حتى يضعف تركيز لون الراشح أي استخلاص أكبر كمية ممكنة، ولذلك كررنا العملية 3 مرات، ثم نضيف للمستخلص الخام 100 مل من الماء المقطر الدافئ(حسب العلاقة 400 مل ماء -600 مل ماء → 1كغ نبتة جافة) ويترك ليلة كاملة للراحة، ثم يرشح للتخلص من الرواسب.

ثم قمنا بفصل انتقائي من نوع سائل-سائل، حيث بدأنا بالكلوروفورم بنسبة 3/1 من حجم المستخلص المذاب في الماء المقطر وكررت العملية 3 مرات، وبعد فصل الطور العضوي عاملنا الطور المائي المتبقي بأسيتات الايثيل (مرة واحدة)، ثم فصلنا الطور العضوي و عاملنا الطور المائي الجديد بالبيوتانول النظامي لأكثر من مرة (كل المراحل السابقة موضحة في الشكل 11.V)



الشكل 11.V مراحل الاستخلاص للنبتة

الجدول 2.V مردود مختلف المستخلصات

	المستخلص	وزن كل مستخلص	المردود%
المادة النباتية 200غ	مستخلص ايثر البترول	1.2953غ	0.65%
	المستخلص الكلوروفورمي	0.7264غ	0.36%
	مستخلص أسيتات الايثيل	0.4763غ	0.24%
	المستخلص البيوتانولي	8.2549غ	4.13%

4-V التحليل الكمي للمركبات الفينولية

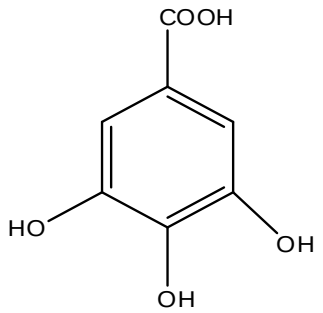
يقوم التحليل الكمي للمركبات الفينولية بتقدير كمية الفينولات الكلية باستخدام الطريقة اللونية لـ Singeleton et Rossi باستخدام كاشف Folin – Ciocalteu، وتقدير كمية الفلافونيدات الكلية باستعمال طريقة Lamaison et Carnat التي تعتمد على كلوريد الألمونيوم[50].

1-4-V التقدير الكمي للفينولات الكلية

قدرنا كمية المركبات الفينولية الكلية باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu في وسط قاعدي، ويتكون هذا الكاشف من حمض الفوسفوتنغستيك (acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$) و حمض فوسفوموليبديك (acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$) و الذي يُرجع في وجود المركبات الفينولية إلى أكاسيد التنغستن والموليبدن (W_8O_{23}/Mo_8O_3) ذات اللون الأزرق.

وتقدر كمية الفينولات بقياس امتصاصية العينات باستخدام جهاز Spectrophotometer UV عند طول موجة 760 ن م.

حيث استعملنا حمض الغاليك كفينول مرجعي.



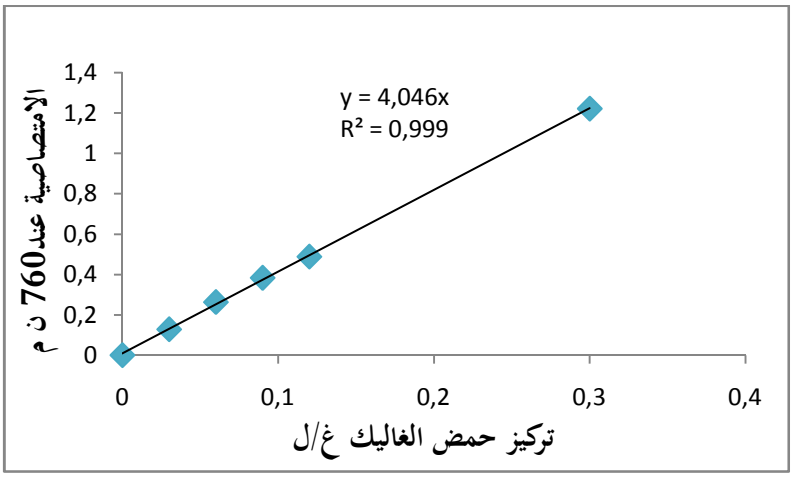
الشكل 12.V حمض الغاليك

المنحنى القياسي

حضرنا محاليل ممددة لحمض الغاليك تراكيزها تتراوح مابين (0.3-0.03)غ/ل.

أخذنا من كل تركيز 0.1 مل وأضفنا له 0.5 مل من كاشف Folin-Ciocalteu (معدد 10 مرات) نتركها مدة 5 دقائق، ثم نضيف لها 2 مل من محلول كربونات الصوديوم Na_2CO_3 (20%) نتركها مدة 30 دقيقة في الظلام وفي درجة حرارة الغرفة.

المنحنى القياسي لحمض الغاليك في الشكل 13.V.

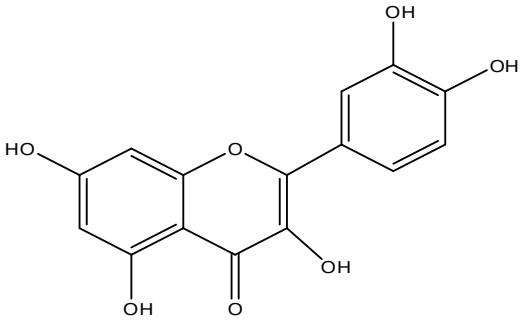


الشكل 13.V المنحنى القياسي لحمض الغاليك

وعاملنا مختلف المستخلصات بنفس معاملة حمض الغاليك بكاشف Folin-Ciocalteu.

2-4-V التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية

قمنا بتقدير كمية الفلافونيدات الكلية باستخدام $AlCl_3$، حيث يشكل كلوريد الالومنيوم معقدات مع المركبات الفينولية ذات لون أصفر يمتص في المجال المرئي عند طول موجة 430 ن م، واستعملنا مركب الكرسترين كفلافونيد مرجعي.



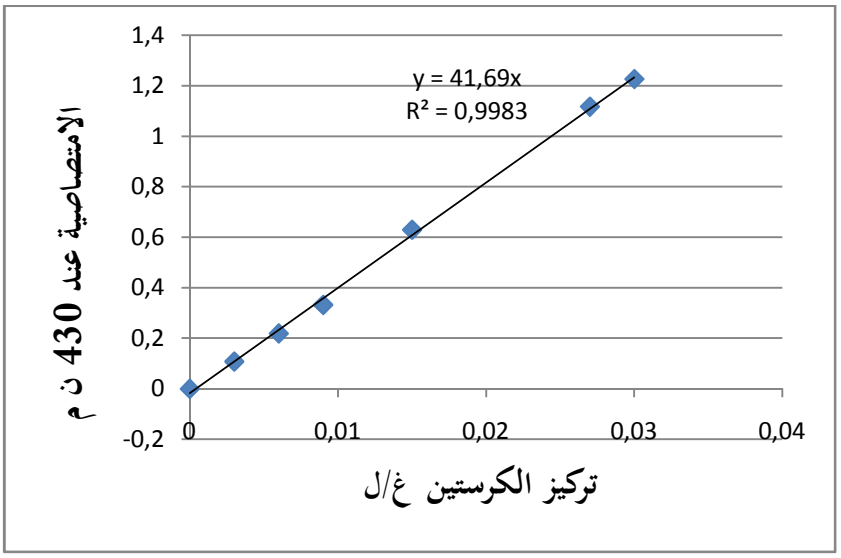
الشكل 14.V مركب الكرستين Quercetine

المنحنى القياسي

حضرنا محاليل ممددة للكرستين تراكيزها تتراوح مابين (0.03-0.003)غ/ل.

أخذنا من كل تركيز 1.5 مل وأضفنا له 1.5 مل من محلول كلوريد الألمونيوم الايثانولي(2 %)، ثم نتركها مدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم قسنا امتصاصية كل تركيز عند 430 ن م.

المنحنى القياسي لمركب الكرستين في الشكل 15.V.



الشكل 15.V المنحنى القياسي لمركب الكرستين

وعاملنا المستخلصات بنفس الإضافات التي أضيفت للمحاليل الممددة لمركب الكرستين.

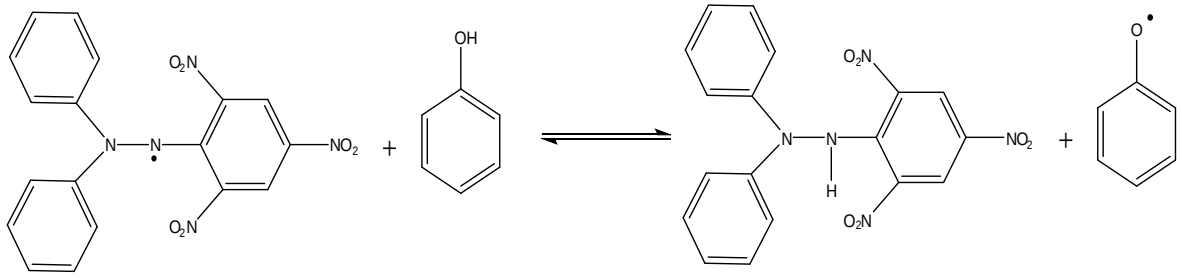
5-V دراسة الفعالية المضادة للأكسدة

كان هدفنا من البداية تقييم الفعالية المضادة للأكسدة اعتمادًا على الطرق الكهروكيميائية، غير أن غياب الأكسجين حال بيننا وبين استخدام طريقة الفولطامتري الحلقي. مما حملنا على اعتماد الطرق الكيميائية الكلاسيكية لإجراء هذه الدراسة وهما اختبار DPPH و اختبار موليبدات الفوسفات.

1-5-V اختبار DPPH

يسمح هذا الاختبار بتقييم قدرة المستخلصات على أسر والتقاط الجذور الحرة بالطريقة اللونية، وذلك باستعمال الجذر الحر الثابت DPPH$^{\bullet}$ الذي يعتبر من أهم الاختبارات المعتمدة في تقييم الدور المانع للأكسدة.

حيث يتم إرجاع جذر الـ DPPH$^{\bullet}$ باقتناصه لذرة هيدروجين من الجزيئات المانحة لذرات الهيدروجين (الجزيئات المضادة للأكسدة) إلى مركب DPPH-H، ويصاحب ذلك تغير في اللون من البنفسجي إلى الأصفر وهذا حسب التفاعل التالي[50] :



الشكل V.16 تفاعل الـ DPPH مع الفينول

طريقة العمل

استعملنا في دراستنا حمض الاسكوربيك (V.C) كأساس مرجعي في أسر الجذور الحرة، حيث قمنا بتحضير تراكيز ممددة من V.C تتراوح ما بين (0.03 – 0.003)غ/ل.

أخذنا 1 مل من كل تركيز وأضفنا له 1 مل من محلول الـــ DPPH المذاب في الميثانول ذو تركيز 250 مليمولر يرج جيدا ويترك في الظلام مدة 30 دقيقة.

قيست الامتصاصية عند طول موجة 517 ن م، ثم من خلال النتائج نقوم بحساب النسبة المئوية للتثبيط I % وذلك وفق العلاقة التالية:

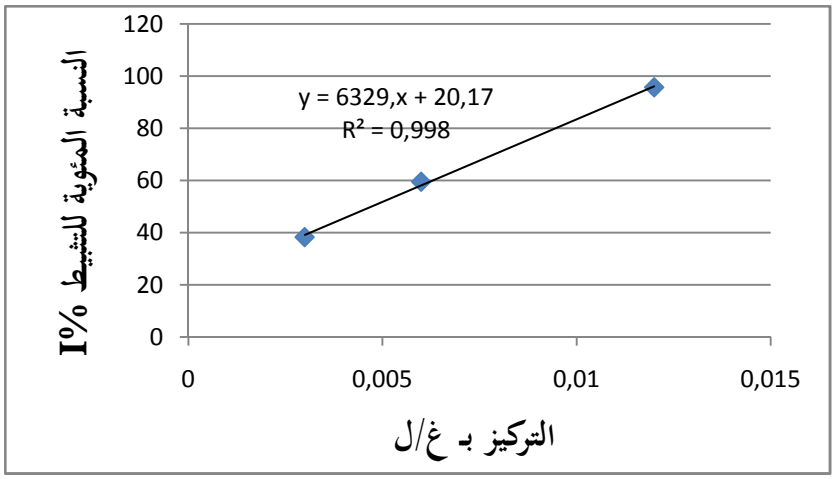
$$I\% = (A_0 - A_i) * 100 / A_0$$

حيث:

A_0: الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلص.

A_i: الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في وجود المستخلص.

ثم نرسم المنحنى البياني للنسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز I%= f(C).



الشكل 17.V منحنى اختبار الـ DPPH بواسطة V.C

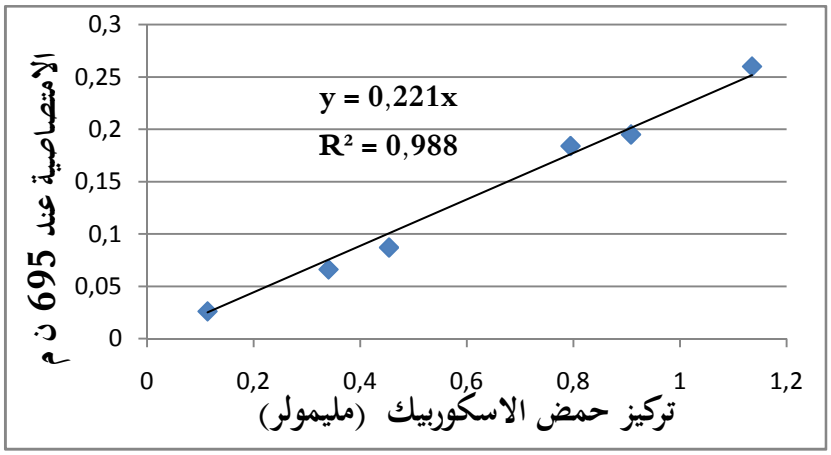
وعاملنا كل المستخلصات بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الاسكوربيك، ثم حسبت IC_{50} المعرفة على أنها تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50% من جذر $DPPH^{\cdot}$.

V-5-2 اختبار موليبدات الفوسفات

يسمح هذا الاختبار بقياس القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات المراد دراستها في وجود عامل اختزال، وهذا بإرجاع حمض الفوسفوموليبديك (Acide phosphomolybdique) إلى فوسفوموليبدات ذات اللون الأزرق[51].

حضرنا محاليل ممددة من حمض الاسكوربيك (المحلول المرجعي) تراكيزها تتراوح من (0.2 - 0.02)غ/ل، ثم أخذنا من كل تركيز 0.3 مل وأضفنا له 3 مل من محلول موليبدات الفوسفات الذي حضر بمزج 4 مليمولر من موليبدات الامونيوم، 28 مليمولر من فوسفات الصوديوم و 0.6 مولر من حمض الكبريتيك.

ثم يحضن الخليط في حمام مائي عند درجة حرارة 95م° لمدة 90 دقيقة، بعدها يترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة وقيست الامتصاصية عند طول موجة 695 ن م.



الشكل 18.V المنحني القياسي لحمض الاسكوربيك في اختبار موليبدات الفوسفات

وبنفس الطريقة نعامل المستخلصات (ذات تركيز 0.1غ/ل) بشرط أن نستبدل المحلول المرجعي (V.C) بالمستخلص المدروس ثم نحسب القدرة الارجاعية لهذه المستخلصات.

الفصل السادس:

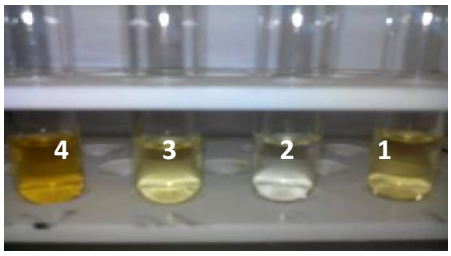
النتائج و المناقشة

1-VI الدراسة الفيتوكيميائية لنبتة *Z.gaetulum*

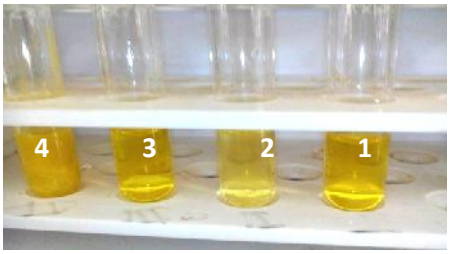
1-1-VI الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية

من خلال المسح الفيتوكيميائي الأولي تبين أن نبتة *Z.gaetulum* غنية بمنتجات الأيض الثانوي، بالأخص الفلافونيدات والتربينات الثلاثية وهذا ما أكدته نتائج المسح التي أجريت على المستخلصات التي تم الحصول عليها عن طريق الفصل الانتقائي سائل – سائل (مستخلص الكلوروفورم، مستخلص أسيتات الايثيل، مستخلص البيوتانول، الطور المائي).

اختبار الفلافونيدات (اختبار الكاشف القاعدي)



قبل اضافة NaOH



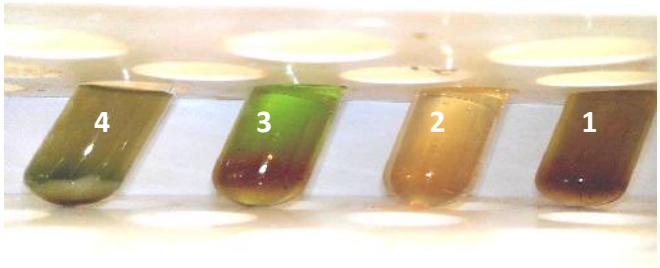
بعد اضافة NaOH

حيث 1 مستخلص الكلوروفورم 2 مستخلص أسيتات الايثيل

3 مستخلص البيوتانول 4 الطور المائي

الشكل 1.VI نتائج اختبار الفلافونيدات لمستخلصات النبتة

اختبار التربينات الثلاثية و الستيرولات (اختبار Liebermann- Burchared)



حيث 1 مستخلص الكلوروفورم 2 مستخلص أسيتات الايثيل

3 مستخلص البيوتانول 4 الطور المائي

الشكل 2.VI نتائج اختبار Liebermann- Burchared لمستخلصات النبتة

فتغير لون المستخلصات إلى الأصفر دليل على وجود الفلافونيدات، أما ظهور الحلقة الحمراء فيدل على وجود التربينات الثلاثية.

VI-1-2 التحليل الكمي للمركبات الفينولية

VI-1-2-1 التقدير الكمي للفينولات الكلية

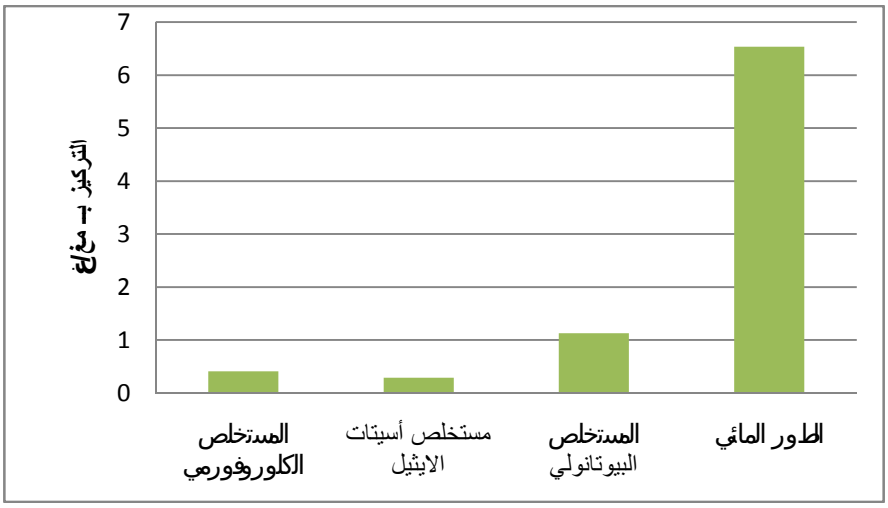
قدرت كمية الفينولات الكلية للمستخلصات الفينولية باستعمال المنحنى القياسي لحمض الغاليك، حيث تم التعبير عن المحتوى الفينولي لكل مستخلص بعدد الملغرامات المكافئة من حمض الغاليك لكل غرام من الوزن الجاف للنبتة (مغ/غ).

والنتائج مدونة في الجدول(1.VI).

الجدول 1.VI كمية الفينولات الكلية للمستخلصات

المستخلص	المستخلص الكلوروفورمي	مستخلص أسيتات الايثيل	المستخلص البيوتانولي	الطور المائي
كمية الفينولات (مغ/غ)	0.413	0.289	1.131	6.537

نلاحظ من النتائج المدونة في الجدول (1.VI) أن الطور المائي يحوي أكبر كمية من الفينولات قدرت بـ 6.537 مغ/غ، و أن أدنى كمية سجلت عند مستخلص أسيتات الايثيل بـ 0.289 مغ/غ.



الشكل 3.VI المقارنة بين الكمية الكلية للفينولات لمختلف المستخلصات

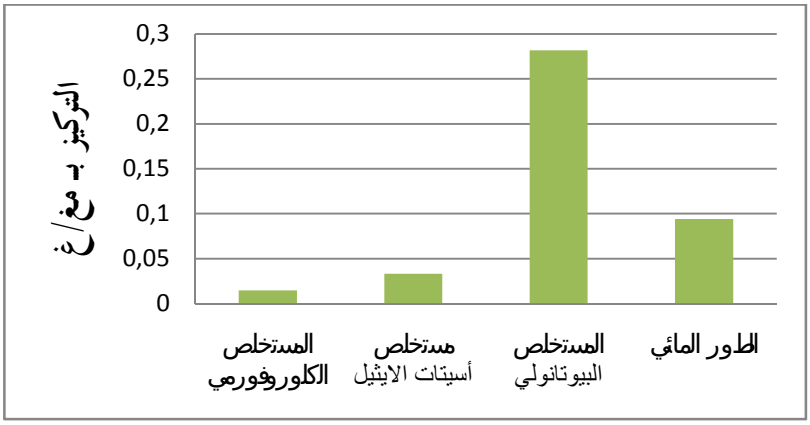
VI-1-2-2 التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية

قدرت كمية الفلافونيدات الكلية باستعمال المنحنى القياسي للكرسيتين، إذ حسبت كمية الفلافونيدات الكلية بالمليغرام المكافئ للكرسيتين لكل غرام من الوزن الجاف للنبتة (مغ/غ)، وبين الجدول (2.VI) أن كمية الفلافونيدات تتراوح ما بين (0.0146-0.282)مغ/غ.

الجدول 2.VI كمية الفلافونيدات الكلية للمستخلصات

المستخلص	المستخلص الكلوروفورمي	مستخلص أسيتات الايثيل	المستخلص البيوتانولي	الطور المائي
كمية الفلافونيدات (مغ/غ)	0.0146	0.033	0.282	0.094

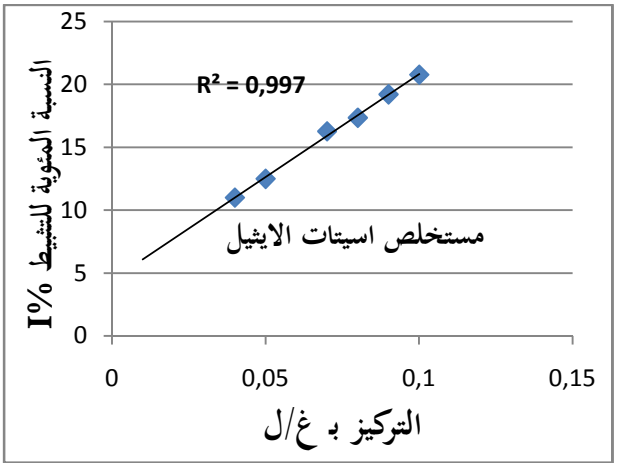
حيث سجلت أكبر كمية للمستخلص البيوتانولي بمقدار 0.282 مغ/غ، و أقل كمية لمستخلص الكلوروفورم بمقدار 0.0146 مغ/غ.

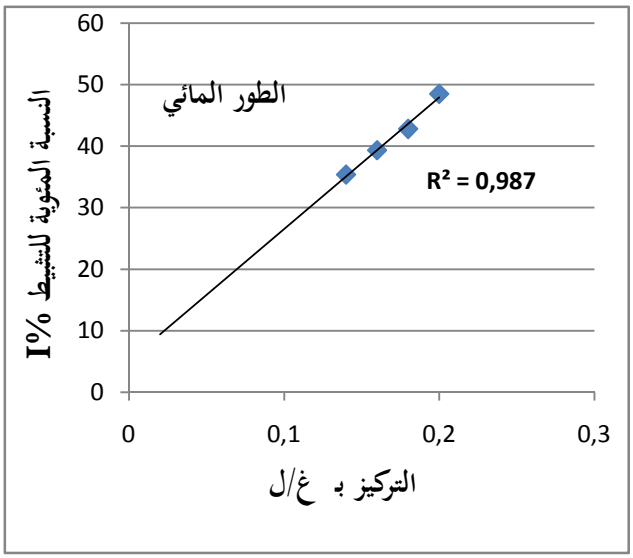


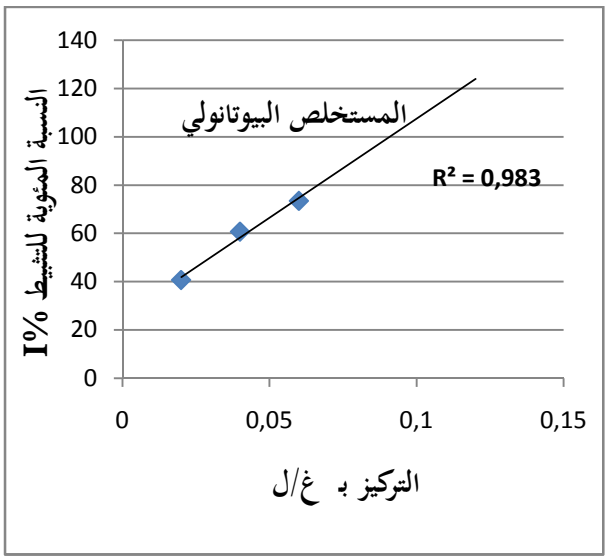
الشكل 4.VI المقارنة بين الكمية الكلية للفلافونيدات لمختلف المستخلصات

2-VI الفاعلية المضادة للأكسدة

VI- 2 -1- نتائج القدرة التثبيطية لجذر الـ DPPH·







الشكل 5.VI منحنيات نسبة التثبيط للمستخلصات المدروسة في اختبار الـ DPPH

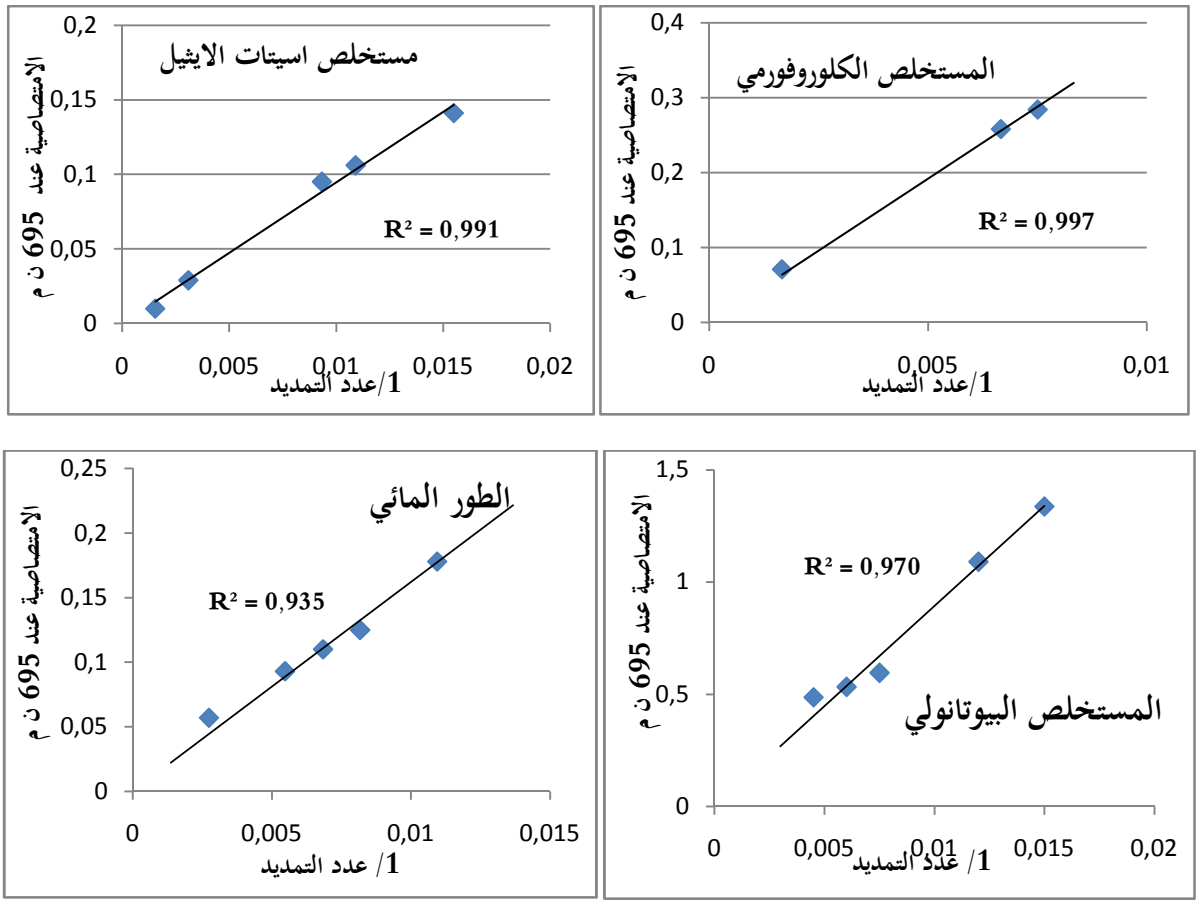
لمقارنة الفاعلية المضادة للأكسدة لمختلف المستخلصات المدروسة حسبت القيمة IC_{50} من معادلة كل منحنى (الشكل 3.VI)، ودونت النتائج في الجدول 3.VI.

الجدول 3.VI الفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة *Z.gaetulum* لاختبار DPPH.

المستخلصات	حمض الأسكوربيك	مستخلص الكلوروفورم	مستخلص أسيتات الايثيل	مستخلص البيوتانول	الطور المائي
IC_{50}(غ/ل)	0.0047	0.122	0.278	0.029	0.209

من المعلوم أنه كلما زادت قيمة IC_{50} قلت الفاعلية المضادة للأكسدة، وبمقارنة قيمة IC_{50} لحمض الأسكوربيك التي قدرت بـ 0.0047 غ/ل مع قيم المستخلصات نجد أن الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلص البيوتانولي كانت أقل بحوالي ست مرات من فاعلية حمض الأسكوربيك وقدرت فاعليته بـ 0.029 غ/ل، حيث كانت فاعلية هذا المستخلص هي المثلى مقارنة مع فاعلية المستخلصات الأخرى.

VI- 2- 2 نتائج اختبار موليبدات الفوسفات



الشكل 6.VI منحنيات المستخلصات المدروسة في اختبار موليبدات الفوسفات

لخصت نتائج القدرة الارجاعية لمستخلصات نبتة *Z.gaetulum* لاختبار الموليبدات في الجدول 4.VI

الجدول 4.VI الفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة *Z.gaetulum* لاختبار الموليبدات.

المستخلص	مستخلص الكلوروفورم	مستخلص أسيتات الايثيل	مستخلص البيوتانول	الطور المائي
الموليبدات (مليمولر)	173.4	42.77	395.32	72.44

قدرت الفاعلية المضادة للأكسدة لجميع مستخلصات نبتة *Z.gaetulum* مابين (42.77-395.32) مليمولر، حيث امتلك المستخلص البيوتانولي أكبر فاعلية بقيمة 395.32 مليمولر، وأدنى فاعلية سجلت عند مستخلص أسيتات الايثيل بـ 42.77 مليمولر. ولاحظنا أن كلا الطريقتين تطابقتا في نتائج الفاعلية المضادة للأكسدة.

VI- 3 دراسة علاقة الارتباط Corrélation

درسنا علاقة الارتباط بين كمية المركبات الفينولية وكمية الفلافونيدات والطريقتين المستعملتين في تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة ولخصنا النتائج المتحصل عليها في الجدول التالي:

الجدول 5.VI علاقة الارتباط بين كمية المركبات الفينولية وكمية الفلافونيدات و الطرق المستعملة في تقييم الفاعلية المضادة للأكسدة

	كمية الفينولات(مغ/غ)	كمية الفلافونيدات (مغ/غ)	موليبدات الفوسفات (مليمولر)	DPPH (غ/ل)
كمية الفينولات(مغ/غ)	1	–	0.088	0.13
كمية الفلافونيدات (مغ/غ)	–	1	0.723	0.529
موليبدات الفوسفات (مليمولر)	0.088	0.723	1	0.914
DPPH (غ/ل)	0.13	0.529	0.914	1

نلاحظ من خلال النتائج المتحصل عليها أن علاقة الارتباط موجبة ومحصورة بين 0.088 و 0.914 بحيث القيم المحصورة بين 0.088 و0.13 تكون علاقة الارتباط ضعيفة والقيم المحصورة بين 0.529- 0.914 تكون علاقة الارتباط جيدة.

توجد علاقة ارتباط متوسطة بين كمية المركبات الفينولية المقدرة و كمية الفلافونيدات وهذا يدل على أنه توجد مركبات أخرى غير المركبات الفلافونيدية في المستخلصات المدروسة، و يمكن تفسير العلاقة الجيدة بين الاختبارات على أن المستخلصات تحوي نفس المركبات الفلافونيدية الفعالة أو تشترك في بعض منها.

الخاتمة

الخاتمة

تركز اهتمامنا في هذا البحث على الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلصات نبتة *Z.gaetulum*، وذلك بإجراء مسح فيتوكيميائي أولي للتعرف على مختلف منتجات الأيض الثانوي المتواجدة بها، وكذا استخلاص المركبات الفينولية من النبتة باستخدام محلول كحولي ماء/ايثانول (70/30)، متبوعاً بفصل انتقائي (سائل–سائل) باستخدام كل من الكلوروفورم، أسيتات الايثيل، البيوتانول والطور المائي المتبقى، كما قمنا بالتقدير الكمي للفينولات الكلية وكذا التقدير الكلي للفلافونيدات باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu **وكلثف** $AlCl_3$ على التوالي.

فبينت النتائج المحصل عليها أن الطور المائي والمستخلص البيوتانولي يملكان أكبر كمية من الفينولات والفلافونيدات. كما تمت دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة *Z.gaetulum* باستخدام الطرق اللونية، وهذا اعتماداً على مطيافية الاشعة UV :

– تقدير الفاعلية باختبار الـ DPPH

–تقدير الفاعلية بطريقة موليبدات الفوسفات

و أظهرت نتائج تقييم الفاعلية التثبيطية الفاعلية المثلى للمستخلص البيوتانولي على غرار المستخلصات الأخرى.

المراجع

المراجع

المراجع باللغة اللاتينية

[1] P.OZENDA. Flore du Sahara. Deuxième Edition. Paris : CNRS, 1977, 309-311p.

[2] M.BELGUIDOUM. Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*. Mémoire master. Ouargla : Université kasdi Merbah, 2012,2p.

[3] A. F.CHADI. A Guide to Medicinal plants in North Africa. Malaga (Spain): IUCN centre for Mediterranean cooperation, 2005, 239-240p.

[4] A. GUENZE. Effets des extraits aqueux lyophilisés de *Protulaca oleracea* et *Zygophyllum gaetulum* sur le profil lipidique et le statut redox. Mémoire de magister. Oran : Université d'Oran, 2012,15-16p.

[5] P.QUEZEL et S. SANTA. Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions désertiques méridionales. Tom I. paris : CNRS, 1963.

[6] C.ANNA, O. SAFIR, S.F. TETOUAMI, S.LUDOVICO, R.AQUINO. Properties and Effects on Isolated Guinea-pig Ileum of *Zygophyllum gaetulum* species endemic in Moroccan Sahara. Pharmaceutical Biology, 1998, Vol. 36, n° 5, pp.320-326.

[7] R. AQUINO, S. TORTORA, S. F. TETOUANI, A. CAPASSO. Saponine from the roots of *Zygophyllum gaetulum* and their effects on electrically stimulated guinea pig ileum, Phytochemistry,2001, Vol. 56, pp. 393-398.

[8] M.AIT ELCADI,S.MAHRAM,M.ANSAR,Y.KHABBAL,K.ALAOUI,M.A.FAOUZI, Y.CHERRAH, J.TAOUFIK.Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. Annales pharmaceutiques françaises, 2012, Vol. 70, pp. 113-116.

[9] M.AIT EL CADI, Y.KHABBAL, K.ALAOUI, M.A.FAOUZI, E.BRUNO, L.MAHRAOUI, Y.CHERRAH. Activité antidairréique de *Zygophyllum gaetulum*. Phytothérapie, 2008, Vol. 6, pp. 2-4.

[11] N .ZERROUKI. Contribution à l'étude phytochimique de la plante *Tetraclinis articulata*.Activité biologique et biochimique de la plante *Tetraclinis articulata*. Mémoire de Magister. Oran : Université d'Oran, 2009, 17-18p.

[12] S .ATHAMENA. Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mémoire de Magister. Batna : Université Hadj Lakhdar, 2009, 19-20p.

[14] K .BENZAHI. Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante *Cynodon dactylon-L* " chiendent". Thème de Magister. Ouargla. Université Kasdi Merbah, 2001, 4p.

[16] E. GROTEWOLD. The science of flavonoids. Columbus, Ohio. USA: Springer, 2006, 2-3p.

[19] A. MARFAK. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur reactivite avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thése de doctorat. Limoges : université de Limoges, 2003, 26p.

[21] O.BENAISSA. Etude des métabolismes terpénique et flavonique des espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthenum* et *Rhamherium*. Activité biologique. Thèse de doctorat. Constantine : université Mentori, 2011, 63p.

[22] J.BRUNTON.pharmacognosie (phytochimie, médicales plantes). 3^{éme} édition. Paris : Edition internationales et édition Tec et Doc, 1999, 445-464-674-675p.

[23] E. KOLLI. Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires d'espèces du genre Centaurea. Activité cytoxique. Thèse de doctorat. Constantine : université Constantine 1, 2013,18-19p.

[24] B.BOUZGHAILA. Etude phytochimique de la plante *Bassia muricata*. Mémoire de Magister. Batna : Université Hadj lakhdar, 2010, 28p.

[25] N.BOUTAGHANE. Etude phtochimique des plantes médicinales *Algériennes Genista ulicina* spoch (faboceae) et *chrysanthenum macrocarqum* (Sch.Bip) coss. & kralik ex Bott (Asteraceae). Thèse de doctorat. Constantine : Université de Constantine, 2013, 46p.

[27] D.ABDESSEMED. Etude phytochimique de *Gladiolus segetum*. Thèse de doctorat. Batna : université El hadj lakhdar, 2010, 21-25p.

[29] F. G. ROBINET. Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. Thèse de doctorat. Zurich : Ecole polytechnique fédéral, 1951, 43-44p.

[30] N.BOUTAOUI. Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria Chamomilla* (Asteraceae).étude de la phase acétate d'éthyle. Mémoire de Magister. Constantine : Université de Constantine, 2012, 27p.

[31] D. K SHARMA. Pharmacological properties of flavonoids including - Integrations of petrocrops with development from plants. Journal of scientific industrial research, 2006, Vol. 65, pp. 477-478.

[33] F .KHOLKHAL . Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *thymus ciliatus* ssq *coloratus* et ssq *euciliatus*. Thèse de doctorat. Tlemcen : Université Abou bekr belkaid, 2014, 45 p.

[34] L.MESSAL. Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'est Algérien (*Artemisia Herba Alba*). Thèse de doctorat. Constantine : Université de Constantine, 2011,9p.

[35] B.RAMLI. Extraction des flavonoïdes de la plante *Inula viscosa* de la région d'Oran et mise en évidence de l'activité microbienne. Mémoire de Magister. Oran : Université d'Oran, 2013, 33p.

[37] Y.MOULAY. Investigation phytochimique de *l'Acacia arabica* aux propriétés antioxydantes et inhibitrices. Mémoire de Magister. Ouargla : Université Kasdi Merbah, 2012, 5-8 p.

[40] P. SYKES. A guide book to mecanisam in organic chemistry. Sixth Edition. New York : Longman scientific & technical, 1985, 299-339 p.

[41] C.HAMIA. Contribution à la composition et à l'étude chimique de l'huile du fruit de l'Arganier « *Argania spinosa* ». Mémoire de Magister. Ouargla : Université Kasdi merbah, 2007, 80-82 p.

[44] N.MOUATS**.**Etude électrochimique des dérives de l acide 2-Nitrophenyl sulfonyl Acétique. Mémoire de Magister. Skikda : Université De 20 Aout 1955, 2010, 20 p.

[47] P.ARCHANA, T.SAMATHA, B.MAHITHA, N.RAMASWAMY. Preliminary phytochemical screening from leaf and seed extracts of Senna alata L.Roxb-an Ethnomedicinal plant. Journal of pharmaceutical and biological research, 2012, Vol.3, PP 82-85.

[48] G.AYOOLA, H.COKER, S.ADESEGUN, A.ADEPOJU-BELLO, K.OBAWEYA, E.EZENNIA, T.ATANGBAYILA. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. Journal of pharmaceutical Research, 2008, Vol.7, PP 1021.

[49] N.SAVITHRAMMA, M.LIMGA RAO AND D.SUHRULATHA. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. Journal of Scientific Research, 2011, Vol.8, PP 580-581.

[50] M.BELGUIDOUM, H.DENDOUGUI, Z.KENDOUR, A.BELFAR, C.BENSACI, M .HADJADJ. Antioxidant activities, phenolic, flavonoid and tannin contents of endemic *Zygophyllum cornutum coss*.from Algerian sahara. Pharma Chemica, 2015, Vol.7, PP 313.

[51] R.S.PHATAK, A.S.HENDRE.Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *kalanchoe pinnata*. Journal of pharmacognosy and phytochemistry, 2014, Vol.2, PP 33-34.

المراجع باللغة العربية

[10] عاشوري آمال. فصل وتحديد منتجات الأيض الفلافونيدي *Pulicaria crispa* (Forsk). مذكرة ماجستير. قسنطينة : جامعة منتوري قسنطينة، 2006، 21-26-36 ص.

[13] غيابة زينب. دراسة تحليلية للبيدات وفينولات ومكونات أخرى لبعض أصناف نخيل التمر المحلية. رسالة دكتوراه. ورقلة : جامعة قاصدي مرباح، 2015، 40 – 106- 113- 120ص.

[15] باز مسعود. استخلاص فصل وتحديد بنيات منتوج الأيض الثانوي عند نبات جنس *centaurea c.sphaerocephala L*. مذكرة ماجستير. قسنطينة : جامعة منتوري، 2006، 8-109 ص.

[17] زعيتر لحسن.تحديد المكونات الكيميائية لأطوار الكلوروفورم و الزيوت الأساسية لأنواع من العائلتين المركبة (*Compositase*) و السيستية (*Citacea*). رسالة دكتوراه. قسنطينة : جامعة منتوري، 2006، 21-25-26 ص.

[18] لكحل هشام. فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي لنبتة *Stachys ocymastrum (L)*.مذكرة ماجستير. قسنطينة : جامعة منتوري، 2006، 28 ص.

[20] شباح كوثر. فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لنبتة *Phoenix dactylifera* (Degla beida). مذكرة ماجستير. قسنطينة. جامعة منتوري، 2007، 31 ص.

[26] طارق بوديار. فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة لنبتة *Eupharlia gugoniana* .مذكرة ماجستير. قسنطينة : جامعة منتوري، 2008، 19-77 ص.

[28] علاوي مسعودة. مساهمة في دراسة بعض المركبات العضوية الفعالة في نبات الرمث *(haloxylon Scoparinum)* مذكرة ماجستير. ورقلة : جامعة قاصدي مرباح، 2003، 9ص.

[32] ميثاق جبر. بحث و تحديد نواتج الأيض الثانوي لنبات القات *Catha edulis* (celastraceae) ونبات البوليكاريا *Pulicaria jaubertin* من العائلة *Asteraceae* وتقييم الفعالية البيولوجية. رسالة دكتوراه. قسنطينة : جامعة منتوري، 2010، 54 ص.

[36] عباس بن مرعاش. دراسة نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي والفعالية المضادة للأكسدة لنبتة *convolvulus supinus* (convolvalaceae) *coss . kral*. مذكرة ماجستير. قسنطينة : جامعة منتوري، 2012، 91 ص.

[38] حوة إبراهيم. دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية و الفعالية ضد الأكسدة. مذكرة ماجستير. ورقلة : جامعة قاصدي مرباح، 2013، 69-70 ص.

[39] العابد إبراهيم. دراسة الفعالية المضادة للبكتريا و المضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum*.مذكرة ماجستير. ورقلة : جامعة قاصدي مرباح، 2009، 51 ص.

[43] لقميري سهيلة. تحضير ودراسة الكتروكيميائية وبنيوية للأمينات فيروسينيل مثيل أمين- 2- (3و4)-نتروبنزين. مذكرة ماجستير. ورقلة : جامعة قاصدي مرباح، 2008، 24-30 ص.

[45] بن ساسي حمزة. تصنيع ودراسة كهروكيميائية لبعض مشتقات الفينيل هيدرازيد الفيروسينية. مذكرة ماجستير. ورقلة : جامعة قاصدي مرباح، 2013، 13-15 ص.

[46] الصديق قمولي. دراسة الكتروكيميائية لفينولات بعض نوى التمر المحلي. مذكرة ماستر. ورقلة : جامعة قاصدي مرباح، 2010، 46 ص.

الملخص

يعنى هذا العمل بالمساهمة في الدراسة الفيتوكيميائية لنبتة *Z.gaetulum* وتقدير الفاعلية المضادة للأكسدة لمستخلصاتها، فمن خلال نتائج الاختبارات الأولية تبين تواجد جل منتجات الأيض الثانوي خصوصا الفلافونيدات و التربينات الثلاثية، فقمنا باستخلاصها بدءا بمحلول كحولي ماء / ايثانول (70/30) وبعد التخلص من الايثانول قمنا بإجراء استخلاص انتقائي للمستخلص المائي الخام بمذيبات متزايدة القطبية كلوروفورم، أسيتات الايثيل، بيوتانول حيث تحصلنا على أعلى مردود في المستخلص البيوتانول (4.13 %)، و أخضعنا كل المستخلصات للتحليل الكمي للمركبات الفينولية و الفلافونيدية، حيث وجدنا أن أكبر كمية للفينولات في الطور المائي أما الفلافونيدات فتحصلنا على النسبة الأكبر في المستخلص البيوتانولي.

كما قمنا بدراسة الفاعلية المضادة للأكسدة لجميع المستخلصات بطرقتين اختبار موليبدات الفوسفات واختبار الـ DPPH، فكانت فاعلية المستخلص البيوتانولي في كلا الطريقتين هي المثلى يليها المستخلص الكلوروفورمي.

الكلمات الدالة: *Z.gaetulum*، الفاعلية المضادة للأكسدة، الفلافونيدات، التربينات الثلاثية، الفينولات، موليبدات الفوسفات، DPPH.

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude phytochimique de la plante *Z.gaetulum*, et à l'étude de l'activité antioxydante, de ses différents extraits.

Les résultats des tests préliminaires ont révélé la présence de la majorité des métabolites secondaires spécifiquement, les flavonoïdes et les triterpènes. Ensuite nous avons fait appel à l'extraction de ces produits qui à été réalisée premièrement avec un mélange hydroalcoolique eau /éthanol (30/70). Après l'évaporation de l'éthanol nous avons réalisé l'extraction liquide-liquide de l'extrait aqueux brut avec des solvants de polarité croissante: Chloroforme, Acétate d'éthyle, Butanol.

Ainsi, nous avons obtenu un rendement élevé pour l'extrait butanolique (4 ,13%) et nous avons soumis tous ces extraits à l'analyse quantitative des composés phénoliques et flavonoïdiques mettant aussi en évidence une grande quantité de phénols dans la phase aqueuse, tandis que les flavonoïdes ont été trouvés en grande quantité dans l'extrait du butanol.

Nous avons également fait l'étude de l'activité antioxydante de tous ces extraits à l'aide de deux méthodes: test de phosphate de molybdate et le test de DPPH. Nous avons trouvé que l'extrait butanolique est le plus efficace parmi tous ces extraits selon ces deux méthodes, suivie de l'extrait Chloroformique .

Mots-clés : *Z.gaetulum* , activité antioxydante, flavonoïde, triterpènes, phénols, phosphate molybdate, DPPH.

Abstract

This work is a contribution to the phytochemical study of Z.gaetulum plant, and study of the antioxidant activity of its different extracts.

The preliminary test results revealed the presence of the majority of secondary metabolites specifically, flavonoids and triterpenes. Then we appealed to the extraction of these products was performed at first with a water-alcohol mixture water / ethanol (30/70). After evaporation of ethanol we realized the liquid-liquid extraction of the crude aqueous extract with solvents of increasing polarity: Chloroform, ethyl acetate, butanol.

Thus, we obtained a high return for the butanol extract (4, 13%) and we submitted all these extracts to the quantitative analysis of phenolic and flavonoid compounds also showing a large amount of phenols in the aqueous phase, while flavonoids were found in large quantities in the extract butanol.

We also made the study of the antioxidant activity of these extracts using two methods: molybdate phosphate test and test of DPPH. We found that the butanol extract is the most effective among all the extracts according to these methods, followed by chloroform extract.

Keywords: Z.gaetulum, antioxidant activity, flavonoids, triterpenes, phenols, molybdate phosphate, DPPH.