جامعة قاصدي مرباح ورقلة

كلية الرياضيات و علوم المادة

قسم الكيمياء

مذكرة تخرج لنيل شهادة

ماستر أكاديمي

تخصص: كيمياء مطبقة

من إعداد الطالبة: بن خناثة مباركة

الموضوع:

المساهمة في دراسة مستخلصات نبتة الكلخة

Ferula Vesceritensis

نوقشت يوم: 2014/06/09

أمام اللجنة المكونة من:

حاج محمد محفوظ	**أستاذ تعليم عالي**	**رئيسا**
دندوقي حسين	**أستاذ تعليم عالي**	**مناقشا**
دحاك كريمة	**أستاذة محاضرة(أ)**	**مؤطرا**

الموسم الجامعي: 2013- 2014

الاهداء

الحمد لله رب العلمين والصلاة والسلام على خاتم الأنبياء و المرسلين .

أهدي هذا العمل إلى من عمل بكد في سبيل نجاحي

وسعادتي , إلى من أفتخر بأبوته وحمل إسمه أبي رحمه الله

إلى من ربتني على الشرف والفضيلة وأعانتني بالدعوات , إلى أغلى

إنسان في هذا الوجود ,أمي أدامها الله لي

إلى إخوتي: علي, الهاشمي . عبد الله

إلى أختي الغالية: آسيا

إلى كل أفراد عائلة بن خناثة وكافة أقاربي

إلى صديقاتي : بسمة,عائشة, صبرينة ,خولة, العطرة,خديجة,

علجية, هناء, وفاء,سارة, مروة

إلى كل من لقنني حرفا أساتذتي الكرام.

إلى كل زميلاتي وزملائي الأعزاء طلبة ماستر دفعة 2014

مباركة

© Ladie Lynn
http://ladielynn.com

شكـــر وعرفان

الحمد لله الذي علم بالقلم علم الإنسان ما لم يعلم والصلاة والسلام على معلم البشر ,وعلى آله وصحبه أجمعين

أولا *وقبل كل شيء أشكر الله القدير الذي وفقني إلى إنجاز هذا العمل المتواضع.*

أتوجه بخالص تشكراتي لأستاذتي الفاضلة ***دحاك كريمة*** *على إشرافها و توجيهاتها خلال مراحل إنجاز هذا البحث*

كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى أستاذي الفاضل ***حاج محمد محفوظ*** *على السماح لنا بإستغلال مخبر بيوجيوكيمياء للأوساط الصحراوية .*

و إلى كافة عمال هذا المخبر .

كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى أعضاء اللجنة المناقشة.

أتقدم بالشكر الجزيل إلى الأساتذة الأفاضل ***حمودي رقية و رمضاني فرح و بوزيان مباركة و بلقيدوم مهدي*** *على ما قدموه لي من نصائح ومساعدات.*

كما لا يفوتني أن أتقدم بخالص شكري إلى أساتذتنا الكرام الذين أشرفوا على تكويننا خلال مشوارنا الدراسي ,دون أن أنسى زميلاتي وزملائي في الدراسة.

الفهرس

العنوان	الصفحة
قائمة الأشكال	I
قائمة الرموز	II
قائمة الجداول	III
المقدمة العامة	1
الجزء الأول : الجانب النظري	
الفصل الأول: الدراسة النظرية لأهم منتجات الأيض الثانوي	
I- الدراسة النظرية لأهم منتجات الأيض الثانوي	5
I-1- مقدمة	5
I-2- المركبات الفينولية	5
I-2-1- تعريف المركبات الفينولية	5
I-2-2- تصنيف المركبات الفينولية	6
I-2-3- مصدر المركبات الفينولية	7
I-2-4 فوائد المركبات الفينولية	7
I-2-5- الفاعلية البيولوجية للمركبات الفينولية	7
I-3- الفلافونيدات	8
I-3-1- مقدمة	8
I-3-2- تعريف الفلافونيدات	8
I-3-3- تصنيف الفلافونيدات	9
I-3-4- الإصطناع الحيوي للفلافونيدات	10
I-3-5- أهمية الفلافونيدات	13
I-3-6- الفاعلية البيولوجية للمركبات الفلافونيدية	13
I-3-7- خصائص الفلافونيدات	14
I-3-8- طرق إستخلاص المركبات الفلافوفونيدية	14
I-3-9- طرق فصل المركبات الفلافونيدية	14
I-4- التربينات و الزيوت الطيارة	17
I-4-1- التربينات	17
I-4-1-1- تعريف التربينات	17
I-4-1-2 أقسام التربينات	18
I-4-1-3 الإصطناع الحيوي للتربينات	19
1-4-2- الزيوت الطيارة	21
I-4-2-1- تعريف الزيوت الطيارة	21
I-4-2-2- خصائص الزيوت الطيارة	22
I-4-2-3- إستخلاص الزيوت العطرية	22
I-4-2-4- أهمية الزيوت الطيارة و التربينات	24
الفصل الثاني: مضادات الأكسدة	
II- مضادات الأكسدة	26
II-1- مقدمة	26
II-2- تعريف الجذور الحرة	26
II-3- أنواع الجذور الحرة	26

II-3-1- الجذور الحرة النشطة 26
II-3-2- الجذور الحرة المستقرة 27
II-4- أضرار الجذور الحرة 27
II-5- مضادات الأكسدة 28
II-5-1- مضادات الأكسدة الإنزيمية 28
II-5-2- مضادات الأكسدة غير الإنزيمية 29
II-5-3- مضادات الأكسدة المصنعة 30

الفصل الثالث: الدراسة النظرية لنبتة الكلخة (Ferula Vesceritensis)

III- الدراسة النظرية لنبتة *Ferula Vesceritensis* 32
III-1- مقدمة على النبتة 32
III-2- التعريف بالعائلة الخيمية 32
III-3- التوزيع الجغرافي للعائلة الخيمية 32
III-4- وصف النبتة 32
III-5- تصنيف النبتة 33
III-6- التركيب الكيميائي 34
III-7- الدراسات السابقة التي أجريت على النبتة 35
III-8- التوزيع الجغرافي لنبات الكلخة 36
III-9- إستعمالاتها 36
III-10- منطقة الدراسة و مميزاتها 36

الجزء الثاني: الجانب العملي

الفصل الرابع: إستخلاص بعض مركبات الأيض الثانوي و دراستها

IV- الجانب العملي 40
IV-1- الأدوات و المواد المستعملة 40
IV-1-1- الأدوات المستعملة 40
IV-1-2- المواد المستعملة 40
IV-2- طريقة الإستخلاص 41
IV-2-1- تحضير المادة النباتية 41
IV-2-2- الإستخلاص 41
IV-2-2-1- استخلاص الزيوت الطيارة 41
IV-2-2-2- استخلاص الفلافونيدات 43
IV-2-3- مخطط مراحل الاستخلاص للنبتة بطريقة هاربون 45
IV-2-4- مخطط مراحل الاستخلاص للنبتة بثنائي كلوروميثان 46
IV-3- التحليلية النوعية لمستخلصات الجزء الهوائي لنبتة الدراسة F.Vescertensis 48
IV-3-1- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM 48
IV-3-1-1- مستخلص أسيتات الإيثيل و الميثانول و الطور المائي 48
IV-3-1-2- مستخلص ثنائي كلوروميثان، الهكسان ، أسيتات الايثيل و الزيت الأساسي 51
IV-4- الدراسة التحليلية الكمية لمستخلصات الجزء الهوائي لنبتة F.Vescertensis 51
IV-4-1- تقدير المركبات الفينولية و الفلافونيدية 51
IV-4-1-1- تقدير المركبات الفينولية بإستعمال حمض غاليك 51

IV-1-4-2-	تقدير المركبات الفلافونيدية في النبات بإستعمال مركب الكيرسيتين	52
IV-5-	تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة	53
IV-5-1-	إختبار موليبدات الفوسفات	53
IV-5-2-	إختبار DPPH°	55
	الفصل الخامس:النتائج و المناقشة	
V-	النتائج و المناقشة	58
	الخاتمة	75
	المراجع المستعملة	
	الملخص	

قائمة الأشكال

الشكل (I-1)	صيغة حمض الشيكيميك	الصفحة 5
الشكل (I-2)	الهيكل القاعدي للفلافونيدات	الصفحة 8
الشكل (I-3)	تكوين Ac.p-coumarique إنطلاقا من الجلوكوز مرورا بحمض الشيكيميك	الصفحة 11
الشكل(I-4)	تحويل p-coumaroyl Co A إلىAc.p-coumarique	الصفحة 12
الشكل(I-5)	تشكيل Malonyl-Co A إنطلاقا من Acétyl-CoA و CO_2	الصفحة 13
الشكل (I-6)	Isopréne (2-méthyl but -1,3-diéne)الوحدة الأساسية لبناء التربينات	الصفحة 17
الشكل(I-7)	بعض الأمثلة عن التربينات	الصفحة 18
الشكل(I- 8)	الإصطناع الحيوي للتربينات	الصفحة 20
الشكل (I-9)	طرق الحصول على الزيوت الطيارة	الصفحة 23
لشكل(III-1)	صور فوتوغرافية لنبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*)	الصفحة 33
الشكل(III-2)	خريطة تبين المنطقة التي تم فيها قطف نبتة الكلخة بأولاد جلال ولاية بسكرة	الصفحة 37
الشكل(IV-1)	تركيب التقطير المائي بجهاز *Clevenger*	الصفحة 42
الشكل(IV-2)	الزيت الطيار لنبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*)	الصفحة 42
الشكل (IV-3)	جهاز التبخير الدوراني	الصفحة 47
الشكل (IV-4)	بعض المستخلصات المتحصل عليها بعد عملية الاستخلاص	الصفحة 47
الشكل(IV-5)	كيفية وضع البقع بصفيحة CCM	الصفحة 50
الشكل(IV-6)	طريقة وضع صفيحة CCM داخل الخلية	الصفحة 50
لشكل(V-1)	كروماتوغرام CCM لكل من مستخلص أسيتات الإيثيل(C_1وC_2) و المستخلص المائي (A_1 وA_2) و المستخلص الميثانولي تحت مصباح UV	الصفحة 60
الشكل (v-2)	كروماتوغرام CCM لكل من المستخلص المائي (A_2) و المستخلص الميثانولي(C_3) في المجال المرئي (الكشف بNH_3)	63الصفحة
الشكل (v-3)	كروماتوغرام CCM لكل من المستخلصات الغير قطبية و الزيت الأساسي. المجال المرئي (الكشف بVaniline Sulfurique)	65الصفحة
الشكل (v-4)	تقدير المركبات الفينولية في المستخلصات	68الصفحة
الشكل(v-5)	التقدير الكمي للفلافونيدات في المستخلصات	69الصفحة
الشكل(v-6)	القدرة الإرجاعية للمستخلصات الفينولية للنبتة المدروسة	70الصفحة
الشكل (v-7)	منحنيات العينات المدروسة في إختبار DPPH°	71الصفحة
الشكل (V-8)	القدرة التثبيطية للمستخلصات الفينولية	72الصفحة
الشكل (V-9)	القدرة التثبيطية للزيتين الأساسيين	72الصفحة

قائمة الرموز

AMN_3:	Mouse Mammary Adenocarcinoma
Hela:	Human Cervix epithelial Carcinomam
HIV:	Human immunodeficiency virus
DNA:	الحمض النووي
DPPH° :	الجذر الحر 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazul
V_C :	حمض الأسكوربيك (الفيتامين ج) Ascorbic Acid
λ:	طول الموجة
UV-visible	الأشعة فوق البنفسجية – المرئية
:	
A :	الإمتصاصية الضوئية
IC_{50} :	تركيز المستخلص الفينولي للقضاء على 50% من الجذور الحرة
I% :	النسبة المئوية للتثبيط
CCM :	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
HEF:	زيت طيار لنبتة الكلخة
HEA :	زيت طيار لنبتة حبة الحلاوة

قائمة الجداول

الجدول (I-1): بعض أنواع المركبات الفينولية 6

الجدول(I-2): بعض المركبات الفلافونيدية 9

الجدول (I-3): العلاقة بين طبيعة الفلافونيد واللون الظاهر تحت UV 15

الجدول (III-1): التصنيف النظامي لنبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*) 33

الجدول(V-1) : مردود مختلف المستخلصات 58

الجدول(V-2): نتائج الفصل باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (**CCM**) **60**

الجدول (V-3): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) 61

الجدول(V-4): صيغة المركبين T_1 وT_2 62

الجدول(V-5): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) 63

الجدول(V-6): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) 64

الجدول(V-7): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) 66

الجدول(IV-8): الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات المدروسة 73

مقدمة عامة

مقدمة عامة

طب الأعشاب طريقة قديمة لعلاج الأمراض التي تصيب الإنسان تعود المعالجة بهذه الطريقة إلى أزمنة بعيدة ضاربة في القدم ، و ربما صاحبت تاريخ الإنسان منذ بداية وجوده على الأرض كان الإنسان يهتدي في الخواص العلاجية للأعشاب و النباتات التي تعالج الأمراض فالنباتات التي إستعملت للتداوي أطلق عليها اسم النباتات الطبية تعددت إستخداماتها فبدأت تدخل في بعض مواد كالتجميل و الصناعات الغذائية كمواد حافظة و مكسبات للطعم و فاتحات للشهية و غيرها من الإستخدامات ذات الأهمية الإقتصادية الكبيرة [1].

يعد المجتمع العربي من أحرص المجتمعات على تدوين و تطوير استخدام النبات في معالجة الأمراض ، فقد برع الكثيرون منهم في هذا المجال حتى وصل هذا إلى البلدان المجاورة ، لذلك ارتأينا أن نتطرق في هذه الدراسة إلى أحد النباتات المعروفة في بعض مناطق بلادنا بالأساليب العلمية ،كما اعتقد الكثيرون أن الأدوية المصنعة سوف تحل محل النباتات المستعملة في هذا الطب،و كان من المتوقع أن يتراجع المرض أمام هذه الثورة الكاسحة من عالم العقاقير ، لكن الذي حدث هو العكس تماما فقد عرف الإنسان الحديث أضرارا لم تكن معروفة أو منتشرة من قبل ، بل دخل عصر الأمراض المزمنة و يرجع ذلك إلى التقدم الرهيب في الكيمياء العضوية ، حيث وجد ان المواد الفعالة في النباتات بتراكيز منخفضة ، يمكن للجسم البشري التفاعل معها برفق في صورتها الطبيعية الخام أكثر أمنا و سلامة [1].

لقد جاءت توصيات المؤتمرات الطبية و الصيدلانية المنعقدة في السنوات الأخيرة تنادي بضرورة الحد من تناول هذه العقاقير المصنعة التي ثبت أن استخدامها يسبب أثار جانبية ضارة ، و أوصت بالعودة إلى النباتات الطبية و الاهتمام بها بصفتها مصدر آمن لصناعة الأدوية ، و جعلها في خدمة الصحة بطريقة علمية و ذلك بتطبيق أسس علمية ثابتة ، أين تلعب الكيمياء النباتية (phytochimie) دورا حيويا في استخلاص المواد أو العناصر الفعالة من النبتة (principe actif) ، و هذا باستعمال طرق كيميائية تحليلية و فيزيائية مختلفة ثم يأتي الدور البيولوجي و الصيدلاني لإجراء التجارب البيولوجية [1].

لذلك اخترنا نبات مستوطن في شرق الصحراء الشمالية (Sahara septentrional) ألا و هو نبات (*Ferula vesceritensis*) الكلخة ، الذي جلب من منطقة اولاد جلال بولاية بسكرة و نبتغي إلى دراسة مركبات الايض الثانوي المكونة لمستخلصاتها من حيث الكمية مع تقدير فعاليتها المضادة للأكسدة . و في دراستنا هذه نتطرق إلى:

الفصل الأول: يتناول الدراسة النظرية لأهم منتجات الأيض الثانوي.

الفصل الثاني: و يتضمن تعريف الجذور الحرة و مدى خطورتها على جسم الإنسان ، و تطرقنا إلى معرفة مضادات الأكسدة التي يمكن أن تحمي جسم الإنسان من خطورة الجذور الحرة.

الفصل الثالث: يتناول الدراسة النظرية لنبتة الكلخة (*Ferula vesceritensis*) .

الفصل الرابع: الجانب العملي و نتطرق فيه طريقة إستخلاص الفلافونيدات و الزيوت الطيارة من الجزء الهوائي للنبتة ، و كيفية الكشف عنها بالطرق الكروماتوغرافية ، و كذلك تقدير الفينولات و الفلافونيدات المتواجدة بالنبتة ، و تحديد مدى فعاليتها المضادة للأكسدة ، إذ إستعملنا طريقتين : الأولى طريقة تثبيط جذر DPPH° التي تساهم في قياس الفعالية المضادة للأكسدة ، و الثانية إختبار موليبدات الفوسفات.

الفصل الخامس: قمنا بمناقشة النتائج المتحصل عليها في المخبر

الجزء الأول

الجانب النظري

الفصل الأول

الدراسة النظرية لأهم منتجات الأيض الثانوي

I-الدراسة النظرية لأهم منتجات الأيض الثانوي:

I-1/ -مقدمة:

منتجات الأيض الثانوي هي مجموعة من المركبات الطبيعية تشمل كل من التربينات ، الستيرويدات، القلويدات ، الفينولات ، الفيتامينات و المضادات الحيوية.

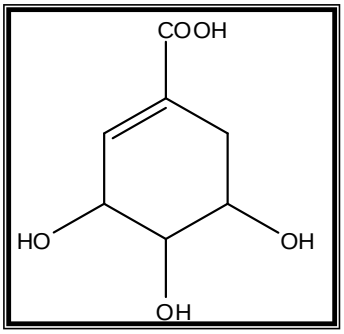
تحمي النبات من الميكروبات و الحشرات و هي مصدر للصبغات النباتية و الزيوت العطرية ،كما تفيد الإنسان في كثير من الصناعات كصناعة الأدوية، الصابون، و مواد التجميل و صناعة الجلود. [2]،[3].

سنتطرق في دراستنا النظرية إلى أهم المركبات الفينولية (الفلافونيدات) ، التربينات و الزيوت الطيارة .

المركبات الفينولية:I-2/-

تعريف المركبات الفينولية :I-2-1/-

هي جزئيات تتكون من حلقة بنزين على الأقل تحوي مجموعة هيدروكسيل حرة أو مستبدلة يشترط فيها أن تكون مشتقة غير أزوتية ، و تصطنع الحلقة أو الحلقات من حمض الشيكيميك أو عديد الاسيتات [3]،[4].

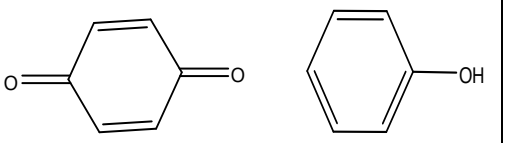
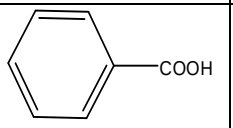
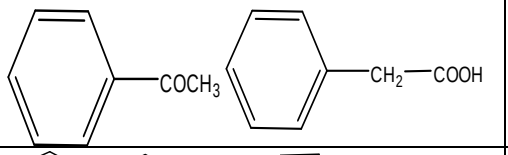
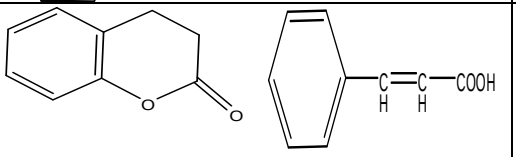
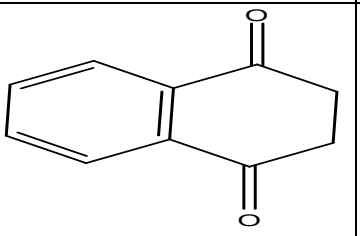


الشكل (I-1): صيغة حمض الشيكيميك

- مركبات فينولية قليلة الإنتشار : الفينولات البسيطة (C_6)
- مركبات فينولية واسعة الإنتشار: الفلافونيدات
- مركبات فينولية متعددة الجزئيات: التانينات (Tannins)

تصنف المركبات الفينولية على أساس عدد ذرات الكربون [5]، حسب الجدول الى:

الجدول (I -1): بعض أنواع المركبات الفينولية

رقم ذرة الكربون	الهيكل الاساسي	الصنف	البنيةالأساسية
6	C_8	الفينولات البسيطة البنزوكينونات	
7	C_6-C_1	الأحماض الفينولية	
8	C_6-C_2	أسيتوفينون أحماض الفينيلاسيتيك	
9	C3-C6	أحماض السينناميك الكومارينات	
10	C_6-C_4	النافتوكينون	

I-2-3/-مصدر المركبات الفينولية:

توجد المركبات الفينولية في العديد من الأطعمة ذات المصدر النباتي وتحديدا الفواكه حيث يمكن أن تصل مابين 100-500 ملغ/غ في بعض الفواكه : التفاح ، العنب ، الكرز ، المشروبات (القهوة والشاي) و الشوكولاطة ، بينما توجد في صورة أقل في الخضر والحبوب ، حيث تحتوي الخضر على ما يقارب 25- 100ملغ/غ [6] .

تعتبر المركبات الفينولية من أكثر مضادات الأكسدة الموجودة في الغذاء ، حيث يستهلك الفرد حوالي 1 غ يوميا أي ما يعادل 10 مرات أضعاف الفيتامين Cو 100 مرة أضعاف الفيتامين E وCaroténoides [7].

تمتلك المركبات الفينولية مثل(الفيتامينات C,E, Caroténoides) خواصا مضادة للأكسدة ، من خلال الإقتناص المباشر للجذور الحرة ،كما تعمل على تعزيز الدفاع الذاتي ضد التوتر التأكسدي من خلال حمايتها للمركبات النسيجية (الليبيدات ومركبات أخرى) كما تتميز بقدرتها على خفض نسبة الأيونات المعدنية (uC^{+} , Fe^{+}) وذلك بفضل قوة الارتباط العالية التي تمتلكها اتجاه هذه المعادن وتساهم بدرجة كبيرة في توفير الفيتامينات [7].

I-2-4/-فوائد المركبات الفينولية:

هي آسرات للجذور الحرة و ممخلبات للأيونات المعدنية مما يمنحها خصائص مضادة للتأكسد ذات أهمية نسبية حسب بنيتها ، حيث تعمل بمنح ذرة الهيدروجين إلى الجذور الحرة الناتجة أثناء الأكسدة الليبدية مثل : جذر البيروكسيل (ORO°) أو ألكوكسيل (RO°) ، لهذه البوليفينولات المتواجدة بصفة خاصة في الشاي أثر مفيد ضد أمراض القلب الوعائية [8].

I-2-5/-الفاعلية البيولوجية للمركبات الفينولية:

للمركبات الفينولية فاعلية ضد نوعين من خطوط الخلايا السرطانية هما خط سرطان الغدة اللبنية الفأري AMN_3 وخط سرطان عنق الرحم Hela [9] .

I-3/-الفلافونيدات:

I-3-1/-مقدمة:

نتيجة لإستعمال الفلافونيدات في ميادين حيوية متعددة ، بالإضافة إلى فائدتها الصيدلانية فقد أثارت إهتمام العديد من الباحثين و الصيادلة حيث تمثل إحدى المجموعات الطبيعية و قد تم حصر حوالي 4300 بنية في صورة إثيروزيدية أو أجليكونية.

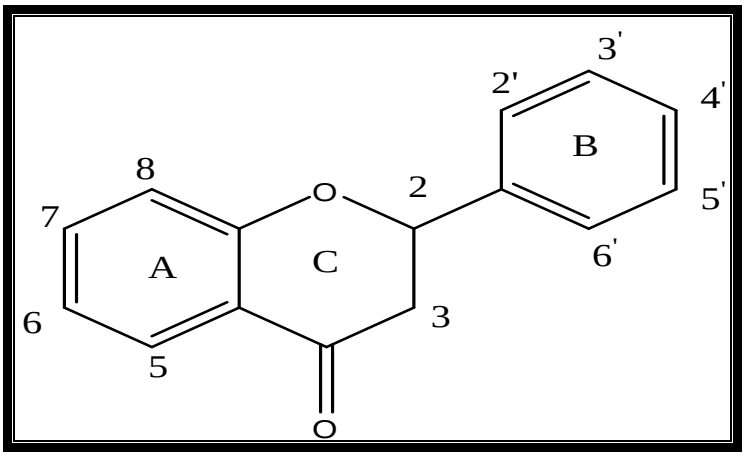
توجد الفلافونيدات في معظم الأصناف مثل البذرور، الأوراق و الأزهار ، إلا أن نسبتها تختلف من صنف لآخر فتكون في الأزهار و البراعم الزهرية أكثر.

تتواجد الفلافونيدات على مستوى الخلية النباتية في صورة إثيروزيدات تذوب في الماء متمركزة في حويصلة الخلية ، أما الفلافونيدات التي تذوب في المذيبات العضوية غير القطبية كالفلافونيدات عديدة الميثوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية[6].

I-3-2/-تعريف الفلافونيدات:

تمثل الفلافونيدات القسم الأكبر من منتجات الأيض الثانوي حيث تحوي جميع الفلافونيدات 15 ذرة كربون في هيكلها الأساسي موزعة على ثلاث حلقات (C,B,A) المميزة بالبنية $C_6-C_3-C_6$ [5]،[10] .

إشتقت كلمة الفلانويد من الكلمة اللاتينية **Flavus** والتي تعني اللون الأصفر والفلافونيدات تمثل غالبا المركبات المسؤولة عن اللون الأصفر المميز للأزهار ،الثمار وأحيانا الأوراق [4].

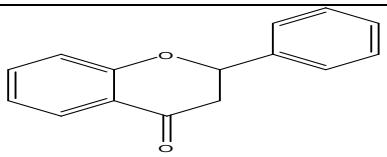
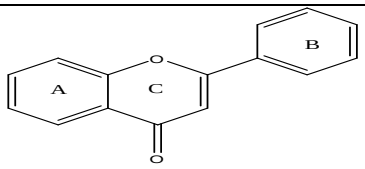
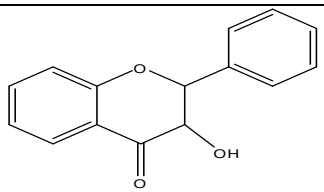
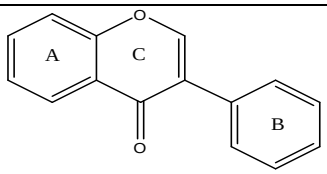
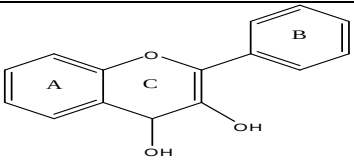


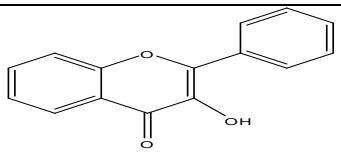
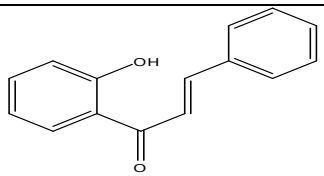
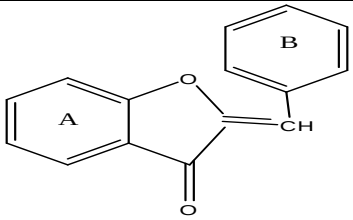
الشكل(I- 2):الهيكل القاعدي للفلافونيدات

I-3-3/-تصنيف الفلافونيدات:

بنيويا تتفرع إلى عدة أنواع تبعا لعدد ، مواضع وطبيعة المستبدلات التي تكون في أغلب الأحيان عبارة عن مجموعات ميتوكسيل أو هيدروكسيل وقد توجد المجموعات على هيئة غليكوزيدات في صورة سكر أحادي أو ثنائي ، أو قد يدخل في بناء المركب أكثر من مستبدل سكري ، أغلب السكريات الأحادية المتوفرة في بناء الفلافونيدات هي (غلوكوز ، غلاكتوز ، أرابينوز ، رامينوز و زيلوز) [3] [4]

الجدول(I-2): بعض المركبات الفلافونيدية

اسم المركب	البنية الأساسية
Flavanone	
Flavone	
Dihydroflavonol	
Isoflavone	
Flavan-3 ,4-diol	

Flavonol	
Chalcone	
Aurone	

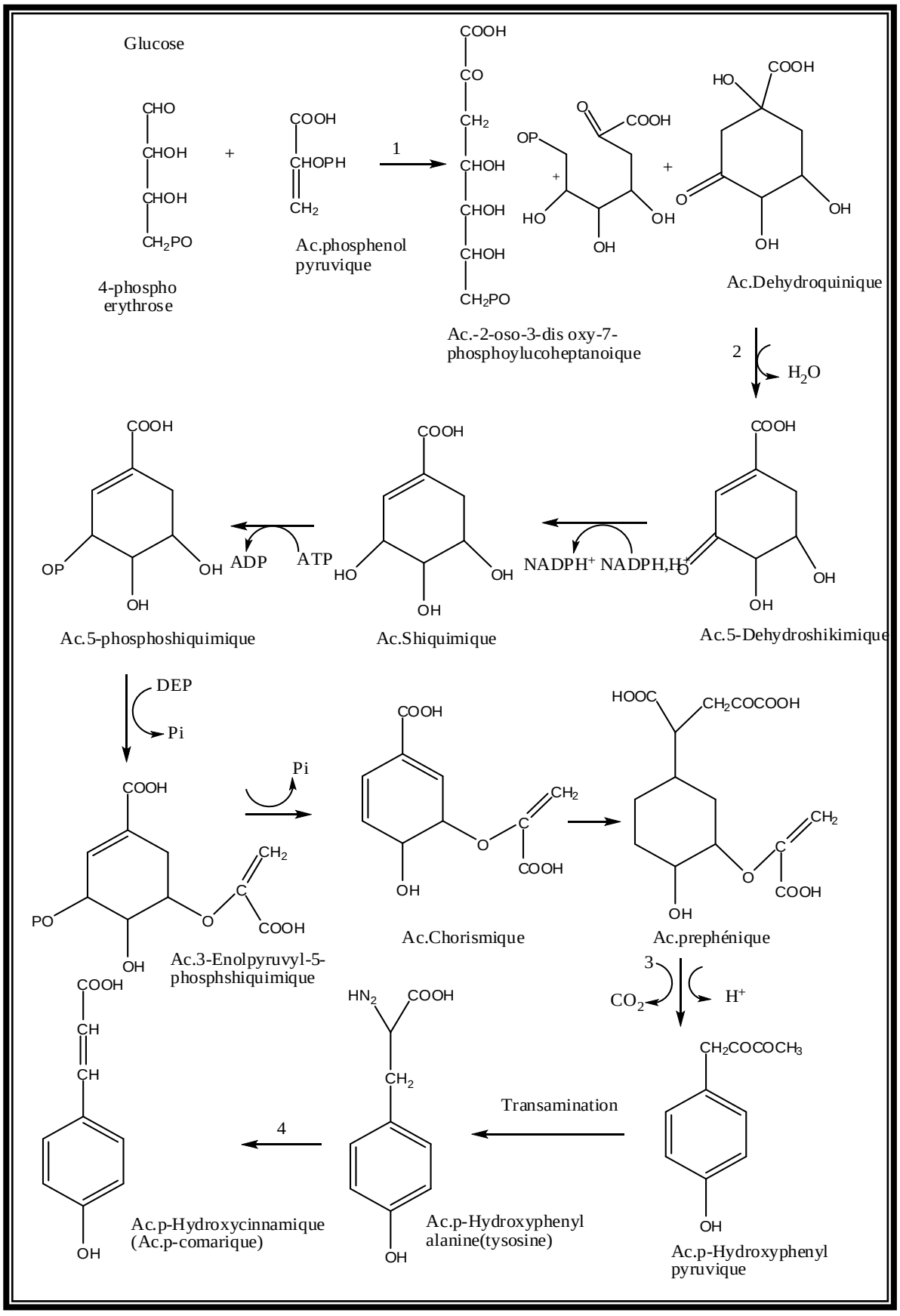
I-3-4/-الاصطناع الحيوي للفلافونيدات :

إن الاصطناع الحيوي للمركبات الطبيعية ليس إلا طريقة لتكوين هذه الأخيرة داخل مصادرها الطبيعية و ذلك عن طريق تفاعلات الأكسدة،الإرجاع،الألكلة و الحلمهة و هذا بوجود إنزيمات خاصة و لمتابعة آلية هذا الاصطناع تم إجراء تجارب عدة باستعمال النظائر الموسومة ب C^{14} المشع حيث و بالنسبة للفلافونيدات لاحظ العالم *Robinson* سنة 1936 أن استبدال النواتين البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية مختلف جوهريا مما يستلزم أنه ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي و باستمرار هذه التجارب تم التوصل إلى أن هذا الاصطناع يتم خلال ثلاث مراحل و هي: [11].

أ-المرحلة الاولى:

- **طريقة حمض الشيكيميك:**

أثبت العالم **Davis** سنة 1955 دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة (B) و السلسلة الكربونية (C_3) إنطلاقا من الجلوكوز [11].



الشكل (I-3):تكوين حمض Ac.p-coumarique إنطلاقا من الجلوكوز مرورا بحمض الشيكيميك

الإنزيمات التي رمز لها بالحروف من 1الى 4 هي على التوالي:

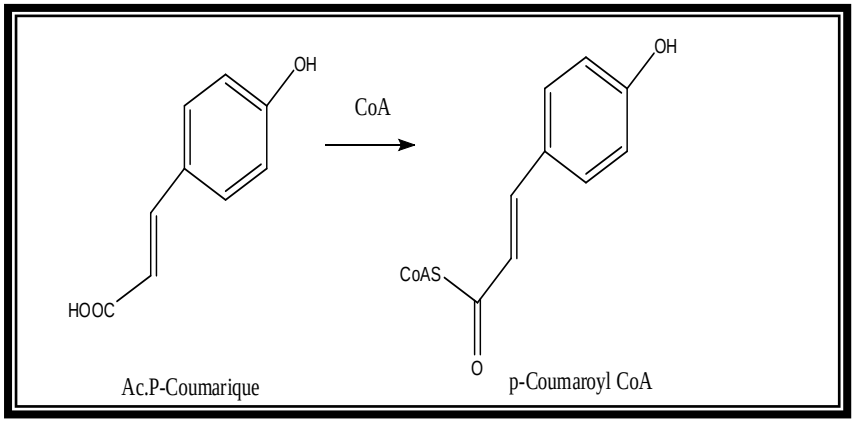
1--Aldolase, 3-désoscy-o-arabinoheptulosonate Synthase ou DHAP synthase

2-Déshydroquinate synthase

3- préphénate déshydrogénase

4- Tyrosine ammonia- lyase

p-coumaroul-CoA الى Ac.Coumarique يتم تحويل

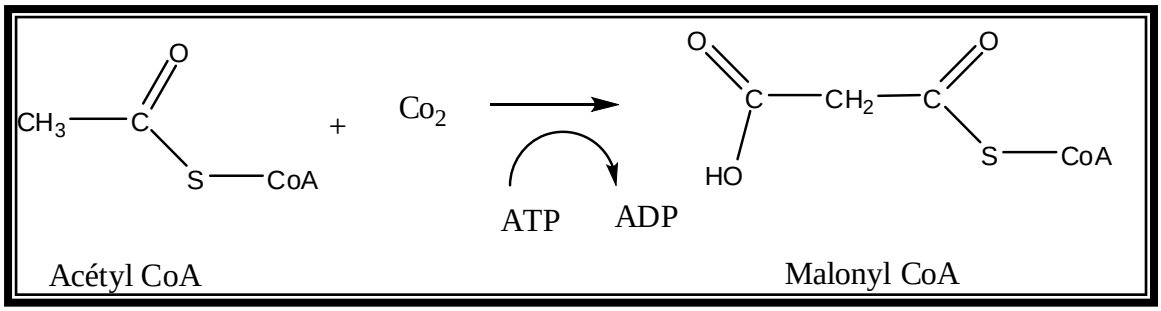


الشكل(I-4): تحول p-coumaroyl Co A إلىAc.p-coumarique

ب-المرحلة الثانية :

- **طريقة الخلات : [11]**

يتم تثبيت مجموعة كربوكسيل مع أسيتيل مرافق إنزيم (Acétyl-CoA) فينتج عنه وحدة (Malonyl-CoA) .



الشكل(I-5): تشكيل Malonyl-Co A إنطلاقا من Acétyl-CoA و CO_2

I -3-5/- أهمية الفلافونيدات:

يتمثل الدور الأساسي للفلافونيدات عند النبات في تلوينها، كما تعمل على حمايتها من الأشعة فوق البنفسجية و الحشرات[12].[13]

بعض الفلافونيدات مثل (الفلافونول ، الفلافان) لها خاصية تثبيط الفطريات .

الفلافونيدات وخاصة الإيزوفلافونات تستعمل كمبيدات للحشرات وكمضادات حيوية [9].

أما من الناحية البيولوجية فالفلافونيدات مضادة للالتهاب و منشطة للدورة الدموية[14]

تفيد في التقليص من خطر انسداد القلب[15].

تستطيع بعض الفلافونيدات مثل (الشالكون ،إيزوفلافون ،الفلافونول ، الفلافونون) تقليد الإستروجينات وتنشيطها مثل مركب génistéine

بعض الفلافونيدات لها فاعلية مضادة للفيروسات بما فيها فيروس HIV.

بعض الفلافونيدات مثل Tangeretin , nobiletin لها القدرة على منع انتشار الخلايا السرطانية [9]

I -3-6/- الفاعلية البيولوجية للمركبات الفلافونيدية:

زاد الاهتمام في السنوات الاخيرة بالمركبات الفلافونيدية بيث بينت نتائج ابحاث مكثفة في ميدان الطب و البيولوجيا فعاليتها المضادة للسرطان ، المضادة للحساسية ، المضادة للفيروسات و البكتيريا و المضادة للاكسدة و فعاليات اخرى [11].

I-3-7/-خصائص الفلافونيدات:

الفلافونيدات مركبات هيدروكسيلية ذات صفة حمضية ضعيفة ، تذوب في القواعد القوية مثل : هيدروكسيد الصوديوم NaOH بالنسبة للفلافونيدات التي تحتوي على عدد كبير من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو الفلافونيدات إلايتروزيدية تتميز بقطبية قوية فهي بذلك ذوابة في الماء خاصة الساخن .

قابلة للذوبان في الكحولات و الأسيتون و مختلف المذيبات العضوية القطبية.

أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل الإيزوفلافونات و الفلافونولات، التي تحتوي على مجموعة ميثوكسيلية مستبدلة، فهي قابلة للذوبان في المذيبات العضوية غير القطبية كالكلوروفورم و الإيثر[16].

I-3-8/-طرق إستخلاص المركبات الفلافوفونيدية:

بعد إختيار النبتة المراد دراستها وتجفيفها وطحنها ، نبحث عن المركبات الفلافونيدية التي تحتويها بإستعمال إحدى طرق الإستخلاص المعروفة ومن أهم هذه الطرق [17] :

-الإستخلاص بواسطة الماء وحمض كلور الماء(HCL/H_2O) (طريقة لبروتون).

-الإستخلاص بواسطة الكحول والماء (ROH/H_2O)(طريقة هاربون).

-الإستخلاص بواسطة الأسيتون و الماء (CH_3COOH/H_2O).

-الاستخلاص بواسطة ثنائي كلورو الميثان (DCM).

I-3-9/-طرق فصل المركبات الفلافونيدية:

من بين طرق الفصل المعتمدة حديثا هي الطرق الكروماتوغرافية و من أهمها:

-كروماتوغرافيا العمود CC

-كروماتوغرافيا الورق CP

-كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM

-كروماتوغرافيا السائل عالي الجودة HPLC

و في دراستنا هذه نستخدم كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(CCM):

❖ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(CCM):

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) هي تقنية تستخدم خاصة لفصل خليط من مختلف المركبات إما على الصعيد التحليلي أو التحضيري ، إضافة إلى كونها تزودنا بنظرة مبدئية عن مكونات المستخلص المدروس.

تعتمد كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على السيليلوز، السليكاجال، أو متعددالأميد DC6 كطور ثابت و من أهم الأنظمة المستعملة كطور متحرك على حسب نوعية المركبات قطبية أو غير قطبية [17] ،[18].

1- Toluène/Méthanol/Methylethylketone (4/3/3)

2- eau/Méthanol/Methylethylketone/Acetylcetone (13/3/3/1)

3-Méthanol/Acide acétique/eau(18/1/1)

تتم دراسة المستخلصات الفلافونيدية بإستعمال طريقة الفصل الكروماتوغرافي للطبقة الرقيقة (CCM) متبوعة بالكشف اللوني بإستعمال جهاز الاشعة فوق البنفسجية لمختلف أنواع الفلافونيدات كما هو موضح في الجدول الموالي :[19]

جدول (I-3): العلاقة بين طبيعة الفلافونيد و اللون الظاهر تحت UV

UV	$UV+NH_3$	نوع الفلافونيدات
بنفسجي	أصفر أخضر أو بني	دوما فلافون يحتوي OH في الموضعين C_5 وC_4' و OH مستبدلة في الموضع C_3
		فلافون يحتوي OH في الموضعين C_5 و C'_4
		بعض الفلافونات تحتوي OH في الموضع C_5 أو شالكونات تحوي OH في الموضع C_4 و تفتقد ل OH على الحلقة العطرية B
	تغير خفيف أو عدم تغير اللون	فلافون أ و فلافونول يحوي OH في الموضع C_5 و OH في الموضع C_4' مستبدلة و محذوفة.
		إيزوفلافونون،ثنائي هيدروفلافونول و بعض الفلافانونات التي تحوي OH في الموضع C_5 حرة.
		شالكون يحوي OH في الموضع C_2' أو C_6' مع عدم وجود OH حرة في الموضعين C_2 و C_4.
	أزرق مشع	بعض الفلافونيدات تحوي OH في الموضع C_5.
	أحمر أو برتقالي	شالكون يحوي OH في الموضع C_2 أو / و OH في الموضع C_4 .
أزرق مشع	أصفر مخضر أو أزرق مخضر	فلافون و فلافانون لا يحوي OH حرة في الموضع C_5.
	تغير خفيف أو عدم تغير اللون	إيزوفلافون لا يحوي OH في الموضع C_5 حرة.
	أزرق لامع	إيزوفلافون لا يحوي OH في الموضع C_5 حرة.
غير مرئي	أزرق مشع	إيزوفلافون لا يحوي OH في الموضع C_5 حرة.

أصفر خفيف صفر أو برتقالي شع	تغير خفيف أو عدم غير اللون	فلافونول يحوي OH حرة في الموضع C_3 مع تواجد أو عدم تواجد OH حرة في الموضع C_5.
إشعاع أصفر	برتقالي أو أحمر	أورون يحوي OH حرة في الموضعC_4 . بعض الشالكونات تحوي OH في الموضع C_2 أو في C_4.
أصفر مخضر أزرق مخضر أو أخضر	تغير خفيف أو عدم غير اللون	أورون لا يحوي OH حرة في الموضع 'C_4 أو فلافافون لا يحوي OH في الموضع C_5 . فلافونول يحوي OH حرة في الموضع C_3 و مع تواجد أو بدون تواجد OH حرة في وضع C_5. بعض الشالكونات.
أصفر مبيض	أصفر أرجواني	ثنائي هيدروفلافونول لا يحوي OH حرة في الموضع C_5.

I-4/-التربينات و الزيوت الطيارة:

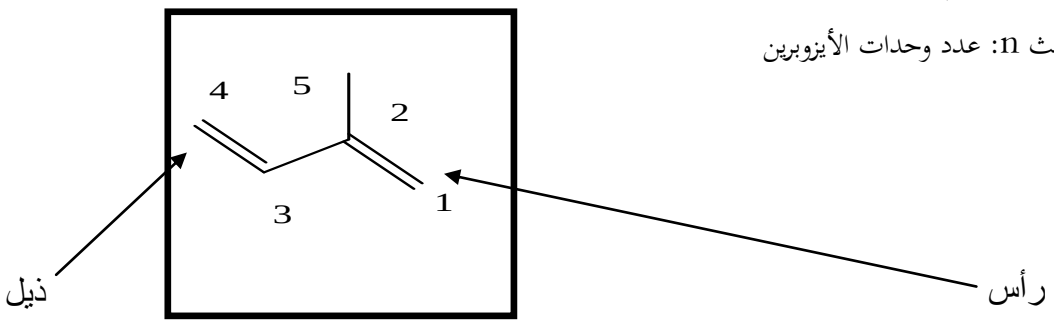
I-4-1/-التربينات:

I-4-1-1/-تعريف التربينات:

تنتمي معظم مكونات الزيوت الطيارة إلى مجموعة التربينات، التي تمثل القسم الأكبر من منتجات الأيض الثانوي للنباتات و هناك حوالي 20000مركب تربيني تم عزله من النباتات ، في أوائل القرن العشرين تمكن Ruzika من إكتشاف الوحدة الأساسية لبناء التربينات و هي الأيزوبرين isoprène أي 1-méthylbuta-1، 3 diéne [1].

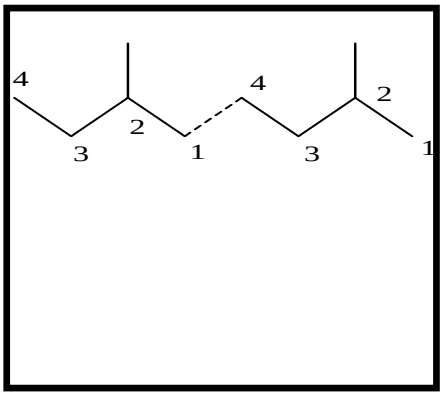
و القانون العام للتربينات هو: $(C_5H_8)_n$

حيث n: عدد وحدات الأيزوبرين

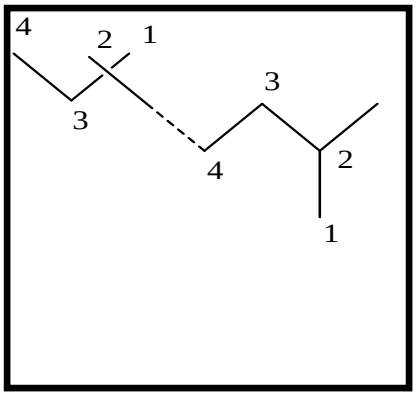


الشكل (I-6):(Isopréne (2-méthyl but -1,3-diéne

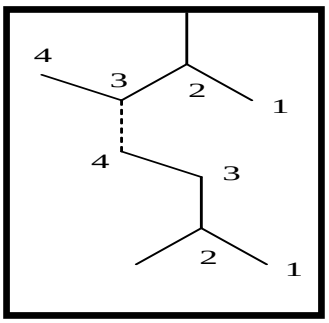
ترتبط هذه الأخيرة مع بعضها البعض عن طريق رأس – رأس (1–1) بمعنى (C_1) من الوحدة الأولى مع رأس (C_1) من الوحدة الثانية، أو رأس ذيل (1–4) أو ذيل–ذيل (4–4)، أو (4–2)



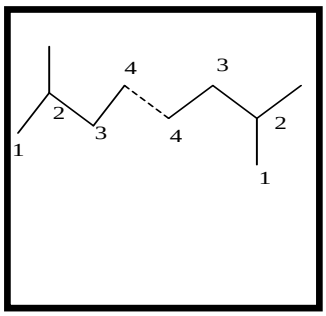
إرتباط من نوع (1–4)



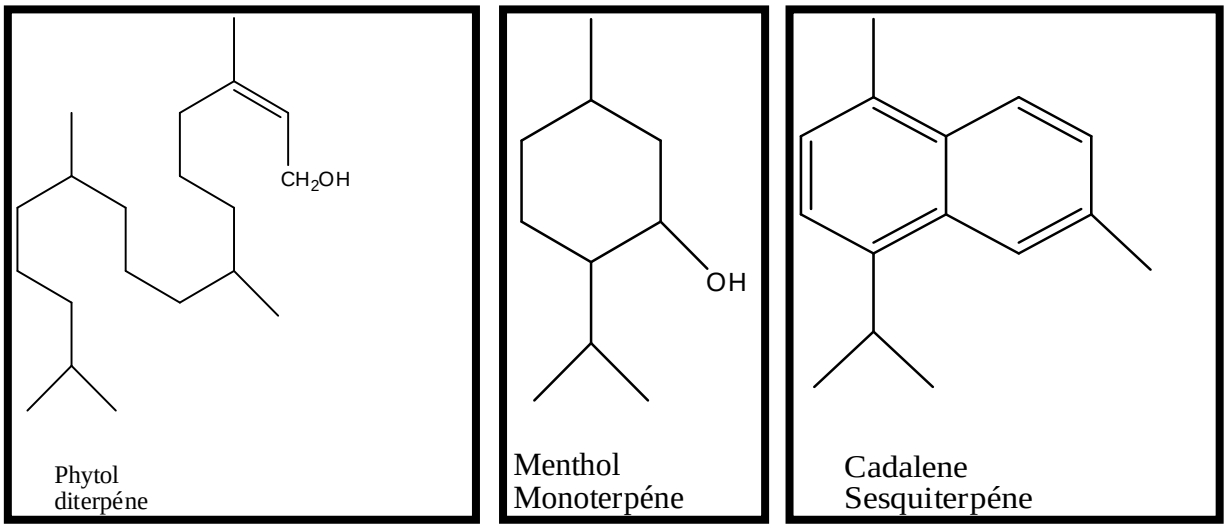
إرتباط من نوع (2–4)



إرتباط من نوع(3–4)



إرتباط من نوع (4–4)



الشكل(I-7): بعض الأمثلة عن التربينات

I-4-1-2/-أقسام التربينات:

يمكن تقسيم التربينات إلى:[4].

-تربينات أحادية Monoterpènes: وحدتين من الإيزوبرين $(C_5H_8)_2$ أي 10ذرات كربون.

-سيسكوتربينات Sesquiterpènes: 3 وحدات من الإيزوبرين $(C_5H_8)_3$ أي 15 ذرة كربون و تسمى أيضا بالنصف ثلاثية.

-التربينات الثنائية Diterpènes: 4 وحدات من الأيزوبرين$(C_5H_8)_4$ أي 20 ذرة كربون.

-سيسترتربينات Sesterterpènes: 5 وحدات من الأيزوبرين$(C_5H_8)_5$ أي 25 ذرة كربون.

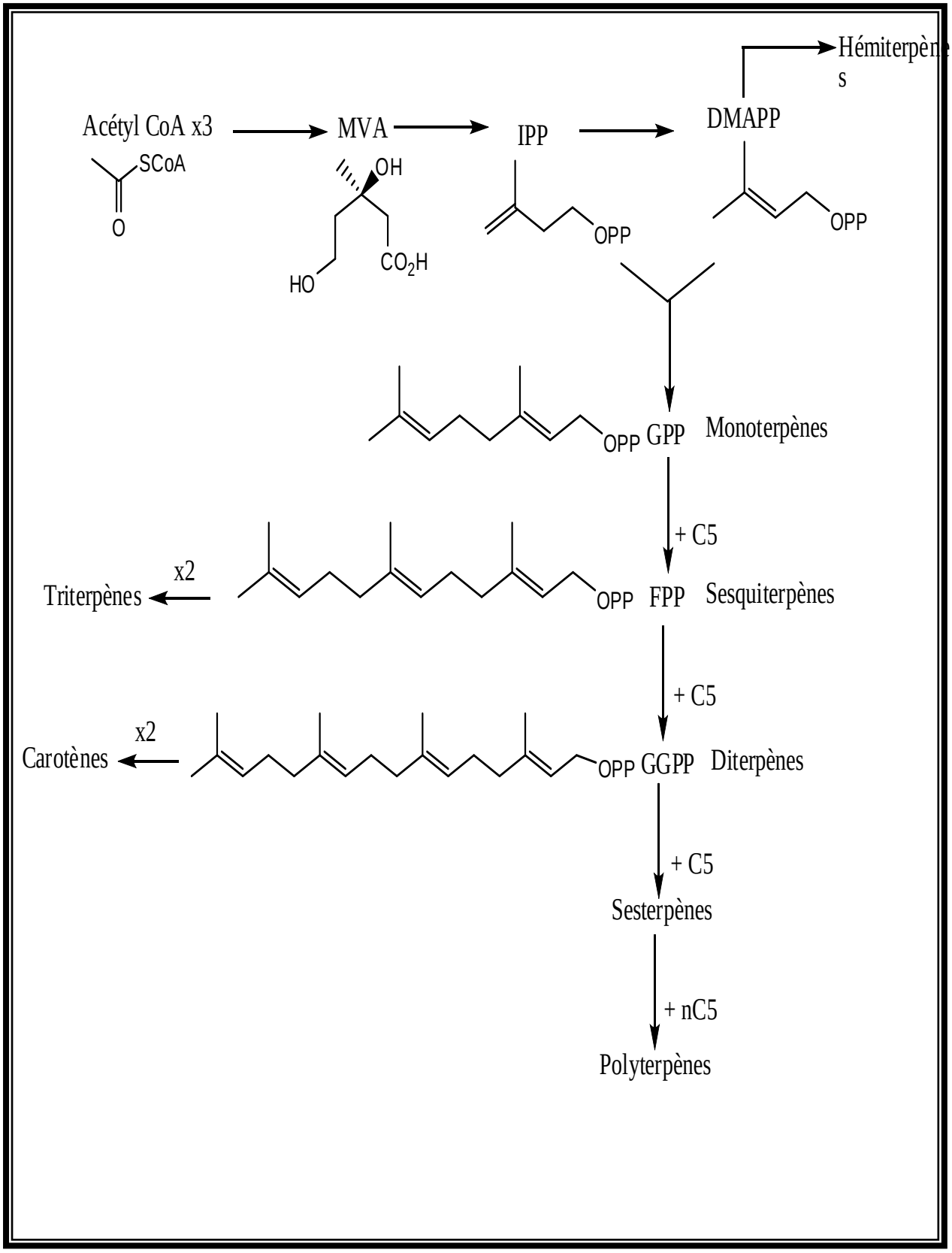
-التربيات الثلاثية Triterpènes : 6 وحدات من الايزوبرين $(C_5H_8)_6$ أي 30 ذرة كربون .

-التربينات الرباعية Caroténoides:8 وحدات من الأيزوبرين $(C_5H_8)_8$ أي 40 ذرة كربون.

-متعدد التربينات Polyterpènes: تنتج عن إتحاد عدد كبير –أكثر من 40 ذرة جزئية من الأيزوبرين.

I-4-1-3/-الإصطناع الحيوي للتربينات:

أثبتت الدراسات بإستعمال الكربون ^{14}C المشع على أن المادة الأساسية الأولية لبناء التربينات داخل الكائن الحي : (PPI) Pyrophos phate isopentenyl مع وجود الأنظمة الأنزيمية النوعية تتكون مجموعة هائلة من التربينات الأحادية و الثنائية ، وصولا إلى البوليمرات[1].



الشكل(I- 8): الإصطناع الحيوي للتربينات

I-4-2/-الزيوت الطيارة:

الزيوت الطيارة مواد زيتية ذات روائح عطرية مميزة ،تتجزاء و تتطاير عند درجات الحرارة العادية ، على عكس الزيوت الثابتة .

و تسمى الزيوت الطيارة بعدة أسماء منها:[10].

الزيوت العطرية (Aromatic oils)

الزيوت الايثرية (Etheral oil)

الزيوت الأساسية (Essential oils)

I-4-2-1/-تعريف الزيوت الطيارة: les huiles essentielles

هي عبارة عن خلائط من المركبات العطرية والطيارة ذات المصدر النباتي والتي تنجم عن عملية التحول الأيضي في النبات ,وتتجمع داخل تراكيب خاصة مثل الشعيرات الغدية (Glandula haire)

كما في العائلة الشفوية والقنوات الزيتية (Oil vittae)

كما في العائلة الخيمية او الغدد الزيتية (Oil gland)

كما في العائلة السذبية [10] .

تعد النباتات المصدر الاساسي للزيوت الطيارة والثابتة ، إذ تتواجد في اكثر من 3000 نبات وفي حوالي 60 عائلة أهمها :

-العائلة الخيمية (*Umbelliferae*)

-العائلة الشفوية (*Labiatae*)

-العائلة المركبة (*Compositae*)

-العائلة القرفية (*Lauraceae*)

-العائلة السذبية (*Ruaceae*)

-العائلة الأسية (*Myrtaceae*)

-العائلة الصنوبرية (*Pinaceae*)

تتواجد هذه الزيوت في جميع أجزاء النبات كما تتركز في بعض أجزائه (كأوراق نبات النعناع) ، (أزهار الورد والياسمين) ، (ثمار العائلة الخيمية). تتفاوت نسبة الزيوت الطيارة من نبات لأخر إذ قد تصل من 16-18 % أو تتضائل إلى 0.02%

الزيوت الطيارة عبارة عن تربينات أحادية وسيسكويتربينات ، إذ تعتبر الأولى ذات أهمية تجارية كبيرة حيث تستخدم في صناعة العطور ، كما أن للزيوت الطيارة إستخدامات طبية متنوعة [10] .

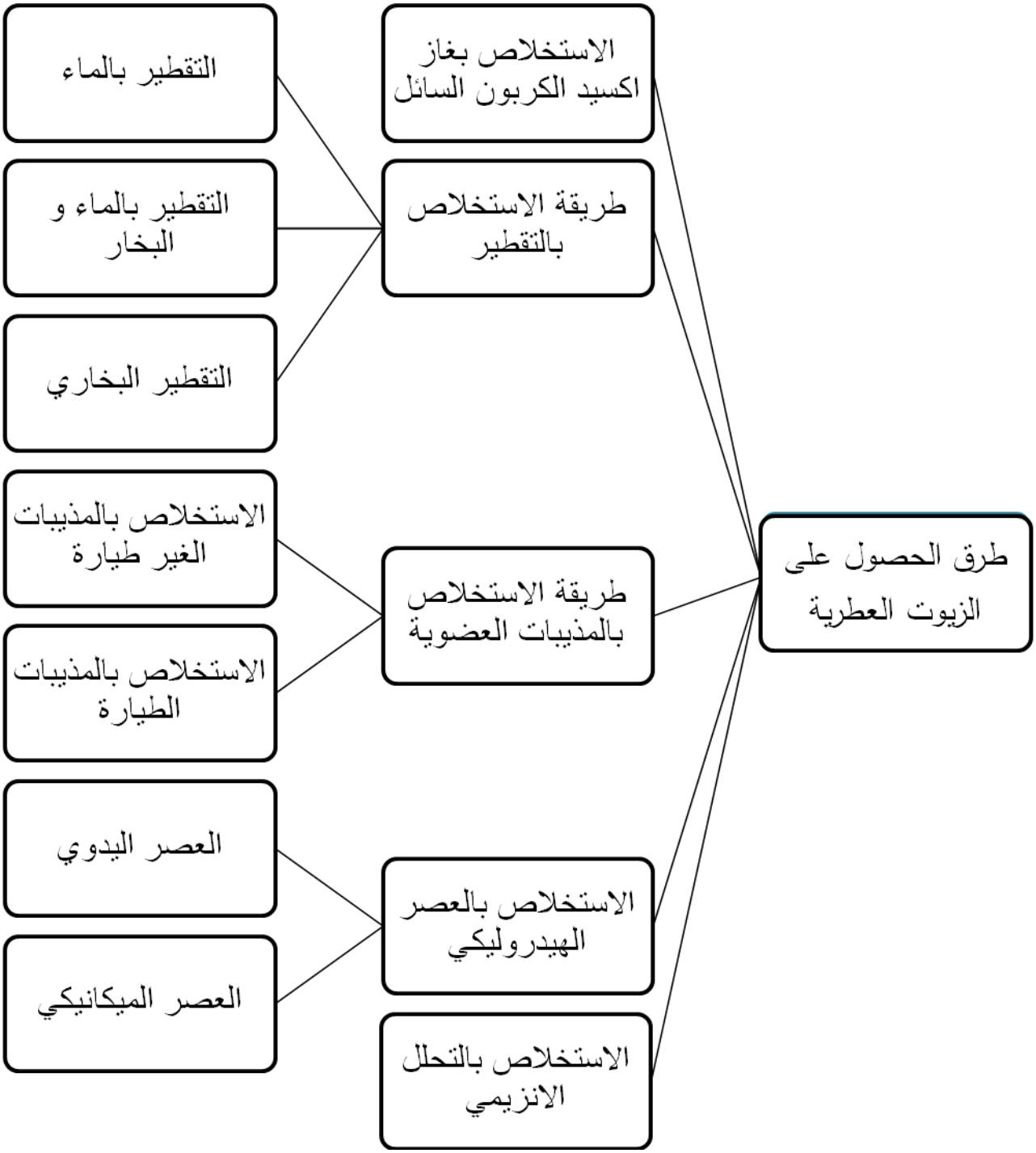
I-4-2-2/-خصائص الزيوت الطيارة:

برغم اختلاف مكونات الزيوت الطيارة في تراكيبها , إلا أنها تشترك في بعض الصفات العامة مثل:

- 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.
- لا تذوب في الماء , ولكنها تذوب في المركبات العضوية كالايثر والكحول والأسيتون و الكلوروفورم
- لها معامل انكسار ضوئي عالي, ولها خاصية الدوران الضوئي والذي يعد أهم اختبار لمعرفة نوعية الزيت ونقاوته.
- أخف من الماء .
- البعض منها يترسب بالتبريد تاركا جزءا منه سائلا.[20] ، [21].

I-4-2-3/-إستخلاص الزيوت العطرية:

توجد عدة طرق للحصول على الزيوت الطيارة من النباتات أو الأجزاء النباتية الموجودة بها و من أهم الطرق المستعملة في تحضير الزيوت العطرية ما يلي:[21].



الشكل (I-9): طرق الحصول على الزيوت الطيارة

و في دراستنا هذه نستخدم التقطير المائي.

❖ التقطير المائي:

تسخدم هذه الطريقة في حالة النباتات الجافة و الطازجة و التي تتأثر بالغليان المباشر مع الماء مثل النعناع و البردقوش و الحبوب العطرية مثل الكمون و الكروية و الينسون و غيرها....و يمكن استخدامها أيضا في النباتات الطازجة مثل حشيشه الليمون.

و في هذه الطريقة تغمر المادة النباتية في الماء ثم ترفع درجة الحرارة حتى الغليان فيتصاعد بخار الماء حاملا معه الزيوت العطرية فيعاد تكثيفها و الحصول عليها و تعتمد هذه الطريقة في مبدأها على التقطير الغير متجانس بين الخليط ماء-زيت على أساس الاختلاف في الكثافة و تمتاز هذه الطريقة ببساطتها و قلة تكاليفها.[21].

حيث تم هذا التقطير باستعمال جهاز Clevenger هذا النظام الذي أشاد به دستور الصيدلة الأوربي عام 1997 بحيث يسمح بمرور الطور المائي المقطر عن طريق أداة التقطير و هذا بتكرار عملية التقطير .

كما يفصل الماء و الجزئيات الطيارة على أساس الاختلاف في الكثافة بحيث يطفو الطور العضوي (الزيت الأساسي) على الطور المائي .و تتراوح مدة التقطير المائي ما بين 3 و 6 ساعات و هذا حسب المادة المدروسة.

I-4-2-4/-أهمية الزيوت الطيارة و التربينات:[10].

للزيوت الطيارة أو النباتات الحاوية لها استخدامات طبية عديدة منها:

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

أما بالنسبة لاستخداماتها أو فوائدها للنبات فهي تعمل كالأتي:

- ➢ جذب الحشرات لإتمام عملية التلقيح في النبات وزيادة الانتاج و المحافضة على النوع
- ➢ تساعد على التئام الجروح النباتية بعد ذوبان الرتنج منها
- ➢ التخلص من بعض نواتج العمليات الحيوية خارج انسجة لنبات
- ➢ كما أن لها دور في تنبيه وتنظيم نمو النبات .

الفصل الثاني

مضادات الأكسدة

II/-مضادات الأكسدة:

II-1/-مقدمة:

من المعروف أن الجذور الحرة يتم التغلب عليها بما يسمى بالمواد المضادة للأكسدة و التي تقوم بمعادلة الجذور الحرة في الخلايا الحيوانية و الأنسجة النباتية، و لكن هذه المواد يقل محتواها تدريجيا و ذلك بزيادة ظروف الإجهاد أو التقدم في العمر[23].

II-2/-تعريف الجذور الحرة:

تجتمع الذرات في الجزيئات بروابط قوية بواسطة إلكترونات حلزونية متعاكسةّ،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 [24].

الجذور الحرة هي أصناف كيميائية ذرية أو جزيئية ، متعادلة ، موجبة أو سالبة تمتلك إلكترون أو أكثر غير مزدوج تتولد أثناء التفاعلات الكيميائية كمركبات وسيطية أو مرحلية من أمثلتها $OH^{\cdot}$ ،$CH_3^{\cdot}$ ،$NH^{\cdot\cdot}$ ،$NH_3^{+\cdot}$ ،$O_2^{\cdot}$ ،$H_2O^{+\cdot}$ [25] [1] [26].

II-3/-أنواع الجذور الحرة:

II-3-1/-الجذور الحرة النشطة:

من المعروف أن أنواع الأوكسجين النشطة هي المادة المؤكسدة الرئيسية والهادمة للخلايا والأنسجة النباتية تحت ظروف الإجهاد وهذه الأنواع الأوكسجينية هي:[23] [24].

1-جذر أنيون سوبيرا أكسيد super oxide radicals $O^{\cdot-}_2$

2-جذر هيدروكسيلي Hydroxy radicals$OH^{\cdot}$

3-أنيون السوبيرا أكسيد singlet oxygen radical $O^{\cdot-}_2$

4-بروكسيل الهيدروجين peroxyl radicals $ROO^{\cdot}$

5-جذر الكوكسيل Alkoxyl radicals $RO^{\cdot}$

6-جذربيروكسيل Peroxyl radicals H_2O_2

7-جذر اوكسيد النيتريك oxide nitric radical $NO^{\cdot}$

8-بيروكسينيتريت Peroxinitrite $ONOO^{-}$

9-الابوكلوريت Hypochlorite OCl^{-}

هذه المواد أكسيجينية نشطة و خاصة(OH) ، (O_2) مواد مؤكسدة قوية جدا و تقوم سريعا بمهاجمة الجزئيات البيولوجية مثل جزئيات ADN مما يؤدي إلى خلل شديد في عمليات الميتابوليزم (Metabolism) و إختلال وظيفي لا يمكن إصلاحه أو تعويضه مما يؤدي إلى هدم الأنسجة النباتية و الحيوانية .

II-3-2/-الجذور الحرة المستقرة:[27].

هي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو الساعات أو حتى بالأيام مثل جذور ثلاثي فينيل مثيل (MTP_3) وجذور ثلاثي فينيل بكريل هايدرازيل ($DPPH^\circ$) وجذور ثنائي فينيل وأكسيد النتريك (PH_2NO) ومشتقاته.

ونستطيع القول أن معظم الجذور الأورماتية التي تشمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها تكون مستقرة في أغلب الأحيان ، فكلما زاد ثبات الجذر الحر قلت فعاليته، ومن الناحية الديناميكية الحرارية فإن قلة فعاليته تعود الى أنه يحتاج طاقة تنشيط عالية نسبيا أثناء التفاعل .

إن إزالة الجذور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة مهمة جدا لصحة وحياة الكائن الحي ومع ذلك فالجذور الحرة ليست مجرد مواد ضارة فحسب ، لكنها قد تكون في بعض الأحيان بمثابة السلاح الذي يستخدمه الجسم للدفاع عن نفسه.

II-4/-أضرار الجذور الحرة:

يمكن إجمال أضرار الجذور الحرة إلى ثلاثة أنواع هي كما يلي:

1-الضرر الواقع على حامض النووي ADN و الذي يؤدي إلى طفرات تؤدي إلى موت الخلايا أو تسرطنها أو حدوث أمراض المناعة الذاتية.

2-الضرر الواقع على البروتينات و الذي يؤدي إلى فقد طبيعة هذه البروتينات و من ثم وظيفتها أو تحول طبيعتها إلى أشكال جديدة تؤدي إلى أمراض المناعة الذاتية.

3-الضرر الواقع على الدهون أو الأكسدة الفوقية للدهون و هي أخطر هذه الأضرار، و يشتمل على زيادة سيولة الجدران الخلوية و تطفر الحامض النووي و ما يتبعه من موت الخلايا أو أمراض المناعة الذاتية أو السرطان [28] [29].

4-تثبيط السلسلة التنفسية للميتوكندري

5-تثبيط العديد من الإنزيمات مثل إنزيم الصوديوم-البوتاسيوم-أتيباز Sodium-Potassium-ATPase على جدران الخلايا.

6-زيادة نشاط الأنزيمات المصاحب لتوتر الأكسدة [30].

II-5/-مضادات الأكسدة: Antioxydants

هي مجموعة من العناصر والمركبات التي لها القدرة على منع أو إبطاء عملية الأكسدة بهدف حماية المركبات الأخرى من الأوكسجين .وتوجد مضادات الأكسدة في جسم الكائن الحي على صورة إنزيمات أو مرافقات إنزيمية Co-enzyme أو مركبات تحتوي على عنصر الكبريت المختزل مثل الجلوتانيون Glutanthion .

كما توجد مضادات الاكسدة بصورة طبيعية في الخضروات والفواكه والحبوب ومعظم الاعشاب الطبية.

ولقد زاد الإهتمام بمضادات الاكسدة في السنوات الاخيرة بسبب قدرتها على تحصين الجسم ضد غزو الجراثيم والقضاء عليها ،كما تقي الجسم من امراض العصر الشائعة .وتتعدد وظائف مضادات الاكسدة لتغطي معظم حاجات جسم الإنسان من الوقاية والشفاء وترميم أنسجته وخلايا جسمه ،كما تثبط عمل الجذورالحرة،وتصنف مضادات الاكسدة في مجموعتين هما:[24]

II-5-1/-مضادات الأكسدة الإنزيمية Enzymatic antioxidants

و تلعب دورا هاما و أساسيا في حماية الخلية من الإجهاد التأكسدي ، و تنقسم هذه المجموعة إلى ثلاث فئات هي :

✓ فوق أكسيد الديسميوتاز : superoxide dismutase(SOD)

يعتبر هذا الإنزيم أحد أهم الأنزيمات الفاعلة كمضاد للأكسدة فهو يقوم بإزالة جذور فوق الأوكسجين و ذلك بتسريع معدل إزالته بحوالي أربع مرات بمساعدة بعض المعادن مثل السلينيوم و النحاس و الزنك، و لأنه يعتبر عامل مؤكسد و مختزل في ان واحد ، فإن إنزيم SOD يقي الكائنات الحية الهوائية من التأثيرات الضارة لهذا الجذر (غير موجود في اللاهوائية إجباريا) .[31]

➢ الكاتالاز : Catalase

و يوجد في الأجسام البيروكسية peroxismes في خلايا أنسجة الكائنات الراقية كالدم و نخاع العظام و الأغشية المخاطية و الكلى و الكبد .

كما أن هذه الأجسام غنية بإنزيم أخر هو الأكسيداز Oxidase ، فبينما يعمل الأكسيداز على تكوين H_2O_2 يقوم الكاتالاز بتكسيره وتحويله إلى ماء و أوكسجين، حيث أن الماء و الأوكسجين الناتجة ثابتة و مستقرة و لا ضرر منها .

لأنزيم الكاتالاز نشاط البيروكسيداز البيروكسيداز فهو يمكن أن يستخدم جزئيات H_2O_2 كركيزة مانحة للإلكترون و جزئيات H_2O_2 أخرى كمؤكسد أو مستقبل للإلكترون[31].

➢ جلوتاثيون بيروكسيداز Glutathione peroxidase

البيروكسيداز في النبات تدخل في تكوين الجدار الخلوي و بالأخص تكوين اللجنين و السيوبرين.

يقوم الجلوتاثيون بيروكسيداز بحماية دهون الأغشية الحيوية و الهيموغلوبين ضد الأكسدة بواسطةperoxides التي يمكن أن يستخدمها كركائز أخرى [31].

II-5-2/-مضادات الأكسدة غير الإنزيمية: Non-enzymiatic antioxidant

هناك عدة أنواع من مضادات الأكسدة غير الإنزيمية و منها:

➢ فيتامين ج : Vitamin C

يسمى أيضا بحمض الأسكوربيك Ascorbic acid، و هو مضاد أكسدة يذوب في الماء و يعمل داخل الخلايا و يستطيع إختزال الجذور الحرة من معظم مصادرها، كما يعمل على مساندة النظام لدفاعي للجسم و يستخدم أيضا ضمن أليات الجسم

لإزالة سمية بعض المواد الكيميائية وله دور هام في عملية الأكسدة و الإختزال في الجسم ،كما أن هذا الفيتامين دورا مضاد للموت الخلوي المبرمج و يؤثر أيضا على بعض الماد الضارة للتكاثر ، و بصفة عامة يلعب فيتامين ج دورا هاما في الحفاظ على الصحة العامة و مقاومة الأمراض و تقوية الأغشية الخلوية و إبطال فعل السموم و الجذور الحرة و لأن جسم الإنسان لا يستطيع إنتاج هذا الفيتامين ، يجب تناول الأطعمة التي تحتوي عليه كالحمضيات و خاصة من قبل الأشخاص المدخنين.

➢ **فيتامين هـ : Vitamin- E**

يعتبر فيتامين هـ من أكثر مضادات الأكسدة ذوبانية في الدهون و تعرف مركباته بالتوكوفيرولات Tocopherols و التوكوترينولات Tocotrenols و من أهمها مركب ألفاتوكوفيرول الذي يلعب دورا حيويا في حماية الأغشية الخلوية من التلف التأكسدي و بالتالي منع الكوليسترول من الإلتصاق بجدران الشرائين حيث إن هذا الفيتامين يقوم بإقتناص الجذور البيروكسية في الأغشية الخلوية و لذلك يطلق عليه تعبير (كاسح الجذور) Radicals Scavenger،كما يعادل تأثير بعض الجذور الحرة الأخرى و بالتالي يعمل على الوقاية من بعض الأمراض ،كما تعمل مركبات فيتامين- هـ على منع أكسدة بعض العناصر الغذائية و إعاقة سلسلة التفاعلات التي تؤدي إلى أكسدة الدهون و الزيوت و ذلك بمعادلة مركبات أنواع الأوكسجين النشط.

إكتسب فيتامين- هـ أهمية بالغة بعد أن عرف دوره كمضاد للأكسدة و إطالة العمر الإفتراضي لخلايا الجسم و معالجة عدد من الأمراض كتقليل نسبة حدوث الإصابة بالجلطات القلبية بمعدل 77% و تصلب الشرايين بنسبة 47% ،كما أن لهذا الفيتامين دور في وقاية الجين P53 من التطفر. و من المصادر الغنية بهذا الفيتامين زيت النخيل و الذرة و الفول السوداني [31].

➢ الجلوتاثيون : Glutathione

هو بيبتده قصيرة مكونة من ثلاثة أحماض أمينية هي الجلوتاميك Glutamic، و السيستين Cystine و الجلايسين Glycine. يوجد الجلوتاثيون في الأنسجة الحيوانية و يلعب دورا مهما كمضاد للأكسدة، حيث يحمي من التلف، التأكسدي و يثبط تكون الجذور الحرة داخل الخلية [31].

هناك العديد من مضادات الأكسدة غير الإنزيمية مثال:

➢ البوليفينولات polyphenols :

تمتلك تركيبة كيميائية مثالية للتخلص من الجذور و هي أكثر فاعلية في التجارب المعملية الأكثر من التوكوفيرول و الأسكوربات[31].

➢ الفلافونيدات: Flavonoids

لها القدرة على تغير عملية الperoxidation (عملية تكوين H_2O_2) و لذلك فهي تحمي النباتات أيضا من فوق أوكسيد الهيدروجين.

الفينولات تؤخر أو تمنع الأكسدة الخارجية للدهون وظيفتها في أسر الجذيرات الحرة و كذلك فهي مضادات الأكسدة .

تزداد الفينولات الكلية مع زيادة الملوحة في التربة و التي تعمل على مقاومة هذه الملوحة .

المركبات الفينولية وسيلة تكيف خلوية لأسر جذيرات الأوكسجين الحرة أثناء الإجهاد و هذه المركبات مع الأسكوربات تتأكسد في داخل الخلية مما يؤدي إلى ضرر بالخلية [31].

و الكاروتينويدات Carotenoids و هي مضادات أكسدة فعالة خصوصا في عمليات الاكسدة الخاصة ببعض المعادن [24].

II-5-3/-مضادات الأكسدة المصنعة:

إن مضادات الأكسدة التي تتكون طبيعيا داخل الخلايا غير كافية مما أدى إلى تصنيع مجموعة من المركبات التي تعمل كمضادات للتأكسد أطلق عليهااسم مضادات الأكسدة المصنعة و التي يضاف بعضها إلى الأطعمة لمنع أكسدة مكوناتها من الدهون و السكريات و البروتينات[23].

و من هذه المركبات مادة(Butylhydroxynile(BHA ، Butylated hydroxytoluene(BHT), Gallate propylée(PG), tetre-butylhydroquinone(TBHQ).

الفصل الثالث

الدراسة النظرية لنبتة الكلخة

Ferula Vesceritensis

III/-الدراسة النظرية للنبتة:

III-1/-مدخل:

تنتشر نباتات العائلة الخيمية على نطاق واسع في العالم و خصوصا في المناطق المعتدلة و بصفة أخص في نصف الكرة الشمالي و تضم هذه العائلة حوالي 3000 صنف أغلبها أعشاب معمرة [32].

III- 2/-التعريف بالعائلة الخيمية (*Apiaceae*):[32]

نباتات العائلة الخيمية هي في معظمها نباتات عشبية سنوية (كل سنتين أو أكثر في كثير من الأحيان) و غالبا ما تكون معمرة.

- **الأزهار**: تكون صغيرة الشكل و كثيرة ،عادة ما تكون صفراء و بيضاء و نادرا ما تكون ذات لون مخضر أو وردي ذات بتلات عريضة تحمل شعيرات على عروقها .
- **الأوراق**: تكون صغيرة خضراء اللون ذات شكل إبري محمولة على سويقات طويلة نسبيا و متفرعة.
- **الجذع** (**الساق**): يكون عشبي صلب و تزداد صلابته صيفا.
- **الثمار**: تكون بيضاوية الشكل ذات قمم حادة محمولة على سويقات قصيرة جدا.

و من أهم نباتات العائلة الخيمية حبة الحلاوة ، الكمون، الكرواية و البسباس.

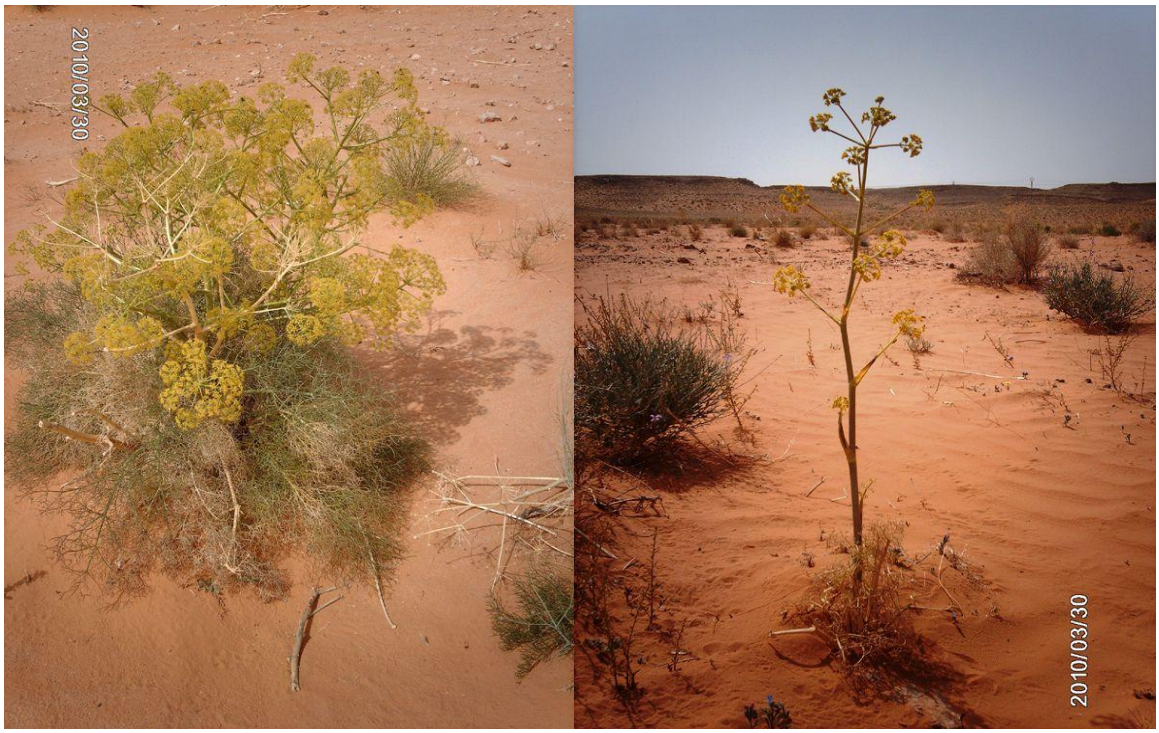
III- 3/-التوزيع الجغرافي للعائلة الخيمية: [32]

يوجد حوالي 3000 صنف من العائلة الخيمية تنتشر في جميع المناطق المعتدلة ، و لكن بصفة خاصة في نصف الكرة الشمالي . و هذه العائلة متجانسة جدا و يسهل التعرف عليها و ذلك بفضل نظام إزهارها الخيمي المركب ، و خلافا لذلك فمن الصعب التمييز بين الأصناف المكونة لهذه العائلة.

III-4/-وصف نبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*) :

الكلخة هي عبارة عن شجرة معمرة من العائلة الخيمية (***Apiaceae***) يصل طولها إلى أكثر من 1 متر ، و هي ذات أوراق صغيرة إبرية خضراء ،محمولة على سويقات طويلة نسبيا و متفرعة ،و أزهارها صفراء ذات بتلات عريضة تحمل شعيرات على عروقها. و ثمارها بيضاوية الشكل ذات قمم حادة محمولة على سويقات قصيرة جدا.

و تزهر هذه النبتة في فصل الربيع (أفريل –ماي) و في فصل الصيف تصبح سيقانها أكثر صلابة . [33][34].



الشكل(III-1): صور فوتوغرافية لنبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*)

III-5/-تصنيف النبتة [34]:

الإسم الشائع: الكلخة

الإسم العلمي: *Ferula Vesceritensis*

أما التصنيف النظامي فهو موضح في الجدول التالي:

لجدول(III-1): التصنيف النظامي لنبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*)

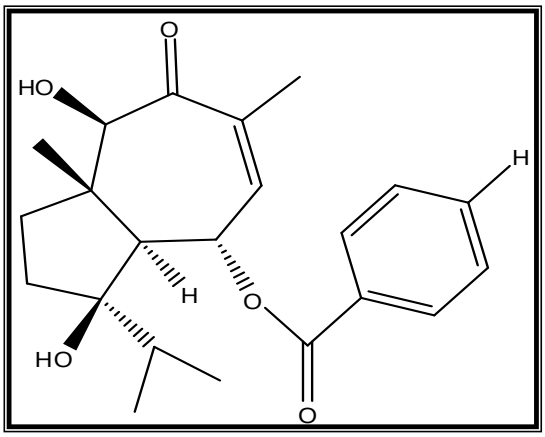
المملكة	نباتية	Végétal	Règne
الشعبة		Campanulidées ou Euastéridées	Embranchement
القسم	ذوات الفلقتين	Magnoliopsida(Dicotylédones)	classe
الرتبة		Apiales	Ordre
العائلة	لخيمية	Apiaceae	Famille
الجنس		Ferula	Genre

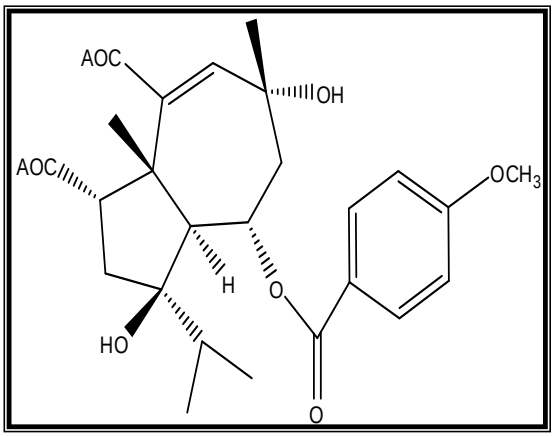
لنوع		**Ferula vesceritensis**	**Espèce**
لصف	كاسيات البذور	**Magnoliophyta (Angiospermes)**	**Division**

III-6/- التركيب الكيميائي [34]:

تمكن فريق عمل مكون من دحاك كريمة و اخرين من تحديد 9 مركبات إنطلاقا من إستخلاص الأجزاء الهوائية لنبتة *F. Vesceritensis* بإستعمال ثنائي كلورو ميثان ، كما تم توضيح هياكلها البنيوية من خلال تحليل البيانات الطيفية (RMND) الخاصة بها و مقارنتها مع البيانات الطيفية السابقة (SM) نذكر منها:

(1) : 10-hydroxylancerodiol-6-anisate.





(2) :10-hydroxylancerodiol-6-benzoate.

(3) : vesceritenone

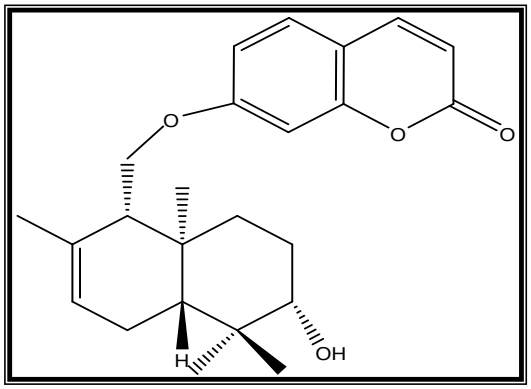
(4) : epoxyvesceritenol.

(5) : 2,10-diacetyl-8-hydroxyferutriol-6-anisate

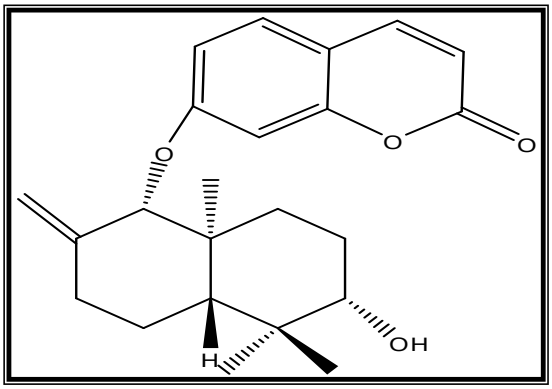
(6):feselol

(7): farnesiferol A

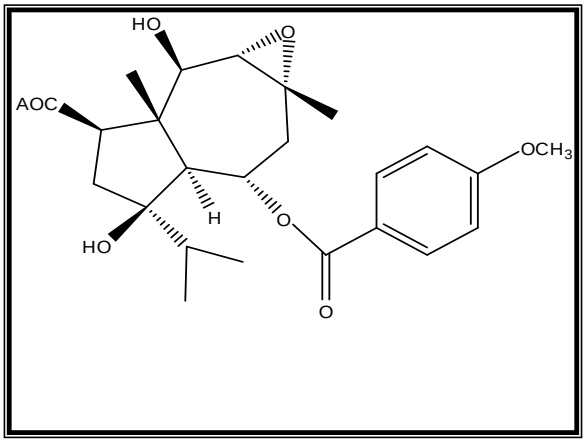
(1) : R= OCH_3 , (2) :R=H (3)



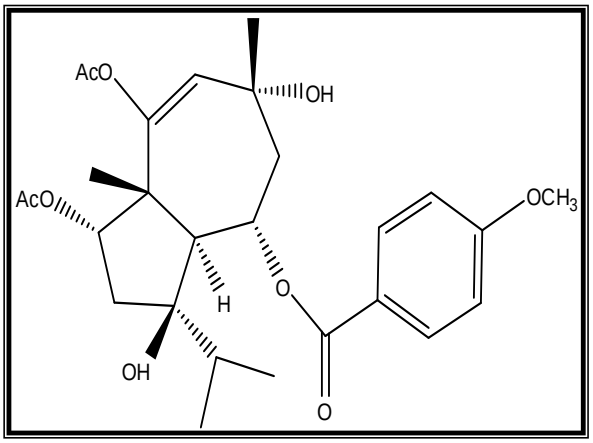
(4)



(5)



(6)



(7)

III-7/-الدراسات السابقة التي أجريت على النبتة:

قام فريق عمل مكون من : عثمان بن شعبان، محمد حزيت، عمر باعلي عمار، فايزة موهوش من التوصل إلى النتائج التالية: [36] بالمقارنة مع مضادات الأكسدة الإصطناعية ، أظهرت نبتة *F. Vesceritensis* الكفاءة المعتدلة لنشاط مضاد الأكسدة ، هذه النتائج يمكن أن تعتبر واعدة لمزيد من التجارب البيوكيميائية و التي سوف تركز على تقييم الأثار الجانبية الأخرى ، و علاوة على ذلك فإن هذه الدراسة توفر البيانات الأولى على التركيب الكيميائي و نشاط مضادات الأكسدة .

كما قام فريق عمل أخر مكون من : زلاقي عمر ، قراف نور الدين ، رواني صالح من التوصل إلى النتائج التالية:[37] أدت دراسة أوراق نبتة *F. Vesceritensis* إلى تحديد 23 مركب من الزيت الطيار لها و ذلك بإستعمال طريقة GC/MS نذكر منها (Nerylacetone ,Dihydrocarvyl acetate,5,9-tetradecadiyne) المتواجدة بنسب عظمى ، و نسبها على الترتيب (24.72% ، 6.20%، 4.45 %) و تقييم نشاط مضادات الميكروبات، و تبين أن جنس *Ferula* يعتبر مصدر جيد للزيوت الطيارة.

قام فريق عمل مكون من دحاك كريمة و آخرين من التوصل إلى :[34]

تحديد 9 مركبات إنطلاقا من إستخلاص الأجزاء الهوائية لنبتة الكلخة (Ferula .V) بإستعمال ثنائي كلوروميثان و توضيح هياكلها البنيوية من خلال طيف RMND و مقارنته مع طيف SM.

III-8/-التوزيع الجغرافي لنبتة الكلخة:[33] [35]

الكلخة هي نبات صحراوي يتواجد عموما على ضفاف الوديان.

و في الجزائر يتواجد نبات الكلخة في شمال الجزء الشرقي للأطلس ألصحراوي كما يتواجد بكل من منطقة غرداية و تقرت ولاية ورقلة و منطقة أولاد جلال ولاية بسكرة.

و يتواجد أيضا بجنوب تونس بمنطقة قربوز.

III-9/-الاستعمالات التقليدية للنبتة:[34].

تستخدم من قبل السكان المحليين لعلاج الحمى ، إلتهاب الحلق ، الذبحة الصدرية و الصداع و كذلك مشاكل الخصوبة لدى الرجال ، و يستعمل نقيع ثمارها في علاج الجهاز التنفسي كما أنه مدر للبول، حيث أنه لا يستعمل للأغراض الرعوية.

III-10/-منطقة الدراسة و مميزاتها:

تقع أولاد جلال على الجانب الأيسر من واد جدي على بعد 100 كلم من بسكرة عاصمة الولاية ، و 400 كلم عن العاصمة و تبلغ مساحتها 32660 هكتار ، وتتميز هذه المنطقة بوجود الهضاب و بالجفاف صيفا و البرودة في الشتاء .

الشكل(III-2): خريطة تبين المنطقة التي تم فيها قطف نبتة الكلخة بأولاد جلال ولاية بسكرة

الجزء الثاني

الجانب العملي

الفصل الرابع

إستخلاص بعض مركبات الأيض

و دراستها

IV/-الجانب العملي :

1/- الأدوات و المواد المستعملةIV-

IV -1-1/-الأدوات المستعملة:

جهاز طحن كهربائي (لطحن النبتة) ، ميزان إلكتروني (BP221S)، جهاز التبخير الدوراني (-JANKEZ-KUNEZ-RV05-ST) ، صفائح CCM كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، حمام الذبذبات فوق الصوتية ، خلية كروماتوغرافية، حمام مائي، مضخة (knF-Laboport-NEUBERGER) ، مصباح UV Visible ، ألة تصوير فوتوغرافية ، جهاز تسخين الخاص بالدورق (Heating Mantel) ، جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية

IV -1-2/-المواد المستعملة:

النبتة ، الماء المقطر (H_2O) ، أسيتات الإيثيل (d=0.889/ $CH_3COOC_2H_5$)، الميثانول (CH_3OH) ، كبريتات الصوديوم (Na_2SO_4) ، إيثانول (C_2H_5OH) ، هكسان (d=0.66/ C_6H_{14})، ثنائي كلوروميثان (d=1.320/CH_2Cl_2) ، أسيتون (d=0.79/ CH_3COCH_3)،الكلوروفورم ($CHCl_3$) ، كاشف Folin Ciocalteu، حمض الخل ($C_2H_4O_2$) ، حمض الفورميك (CH_2O_2) ، كربونات الصوديوم (Na_2CO_3)، حمض غاليك ، حمض الأسكوربيك، محلول DPPH، كلور الألمنيوم ($AlCl_3$).البيتانول (d= 0.81) ، فانيلين سلفيريك .

IV-2/-طريقة الاستخلاص

IV-2-1/- تحضير المادة النباتية:

1-القطف:

تم قطف الجزء الهوائي للنبتة من منطقة أولاد جلال ولاية بسكرة خلال شهر مارس 2014.

2-التجفيف:

بعد القطف يتم التجفيف في الظل بعيدا عن الرطوبة و بمكان جيد التهوية.

3-الطحن:

بعد التجفيف الجيد تطحن النبتة في جهاز الطحن الكهربائي.

تم الاحتفاظ بمسحوق النبتة في قارورات زجاجية محكمة الإغلاق ، بعيدة عن الضوء و الحرارة إلى حين استعمالها .

IV-2-2/- الاستخلاص:

IV-2-2-1/- إستخلاص الزيوت الطيارة:

من أجل استخلاص الزيوت الطيارة للجزء الهوائي (السيقان+الأوراق) لنبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*) إتبعنا طريقة التقطير المائي باستعمال جهاز *Clevenger* و ذلك بإتباع الخطوات التالية:

-نأخذ عينة من النبتة الجافة وزنها 287.332 g و نضعها في دورق سعته 2L .

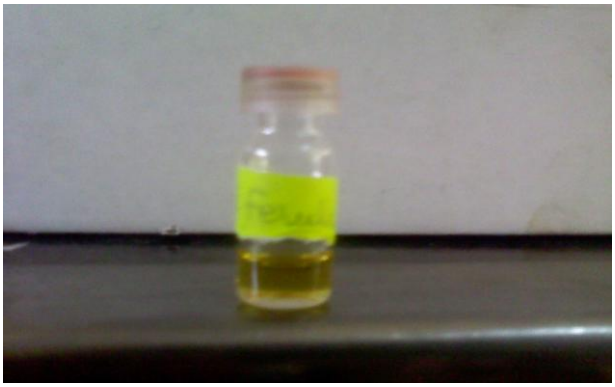
-نضيف لها 1600 mL من الماء المقطر .

-يسخن الدورق في جهاز التسخين الخاص به لمدة 3 ساعات.

-بعد عملية التكثيف يتشكل طورين مختلفين (ماء- زيت) و يفصل هذين الطورين على أساس الاختلاف في الكثافة.

-كما نفصل الزيت المتبقي بالطور المائي عن طريق الاستخلاص سائل-سائل باستعمال مذيب ثنائي كلورومیثان.

الشكل (IV-1) :تركيب التقطير المائي بجهاز *Clevenger*



الشكل(IV-2): الزيت الطيار لنبتة الكلخة (*Ferula Vesceritensis*)

IV-2-2-2/-استخلاص الفلافونيدات:

- نتبع طريقة هاربون لاستخلاص الفلافونيدات من النبتة.

- نأخذ عينتين من مسحوق النبتة وزن كل عينة g 2.

- نقوم بتنقيع كل عينة في مزيج كما يلي:

- العينة (1): إيثانول +ماء (30/70)

- العينة(2): ميثانول+ماء (30/70)

و هذا لمدة 24 ساعة ، ثم نقوم بترشيح المستخلصات المتحصل عليها و تكرر العملية 3 مرات مع تجديد المذيب بعد كل عملية ترشيح .

-تجمع المستخلصات الخاصة بكل عينة ، ثم نقوم بتركيز كل من مستخلص الخليط (إيثانول+ ماء) و مستخلص الخليط (ميثانول+ ماء) ، و ذلك باستعمال جهاز التبخير الدوراني (Rotavabeur) للتخلص من المذيبات تحت درجة حرارة لا تتجاوز 40 م° .

- يضاف الماء المقطر الساخن(50mL) إلى الطور المائي لكل من المستخلصين السابقين ، ويترك للراحة ليلة كاملة وذلك لإذابة الشوائب العالقة بالمستخلص ومن ثم ترشيحه.

- ننتقل إلى الاستخلاص الانتقائي من نوع سائل-سائل باستعمال قمع الفصل، و ذلك باستخدام مذيبات عضوية لا تمتزج مع الماء.

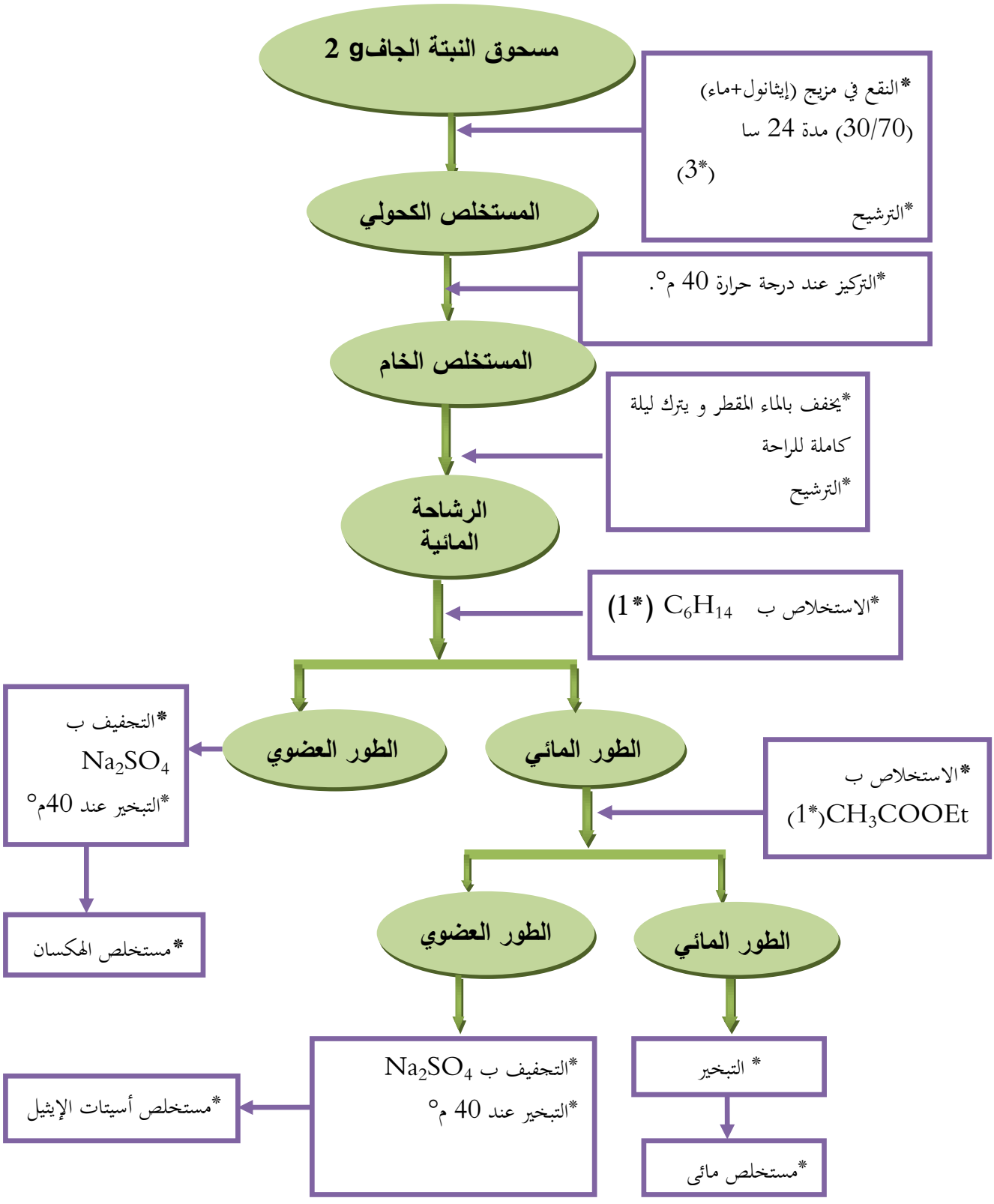
1)- الاستخلاص ب الهكسان C_6H_{14}:

لاستخلاص المركبات غير القطبية مثل التربينات و الكومارينات، بحيث نضيف 45 mL من الهكسان ، و بعد الرج و التوازن تتشكل طبقتين متمايزتين عندها يتم فصل الطور المائي (الذي يكون للأسفل) عن الطور العضوي (الذي يكون للأعلى) ، يجفف الطور العضوي ب Na_2SO_4 و يبخر تحت ضغط منخفض في جهاز التبخير الدوراني (Rotavabeur) عند درجة حرارة لا تتجاوز 40 م° ، يحفظ المستخلص بعيدا عن الضوء و في مكان بارد.

2)- الاستخلاص ب أسيتات الإيثيل CH_3COOEt:

بإضافة 50 mL من أسيتات الإيثيل إلى الطور المائي لاستخلاص المركبات متوسطة القطبية (الفلافونيدات الجليكونية أو أحادية السكر) ، بعد الرج و التوازن تتشكل طبقتين مختلفتين عندها يتم فصل الطور المائي (الذي يكون للأسفل) عن الطور العضوي (الذي للأعلى)، يجفف الطور العضوي ب Na_2SO_4 و يبخر في جهاز التبخير الدوراني عند درجة حرارة 40 م° ، كما نقوم بتبخير الطور المائي.

IV -2-3/-مخطط مراحل الاستخلاص للجزء الهوائي للنبتة بطريقة هاربون



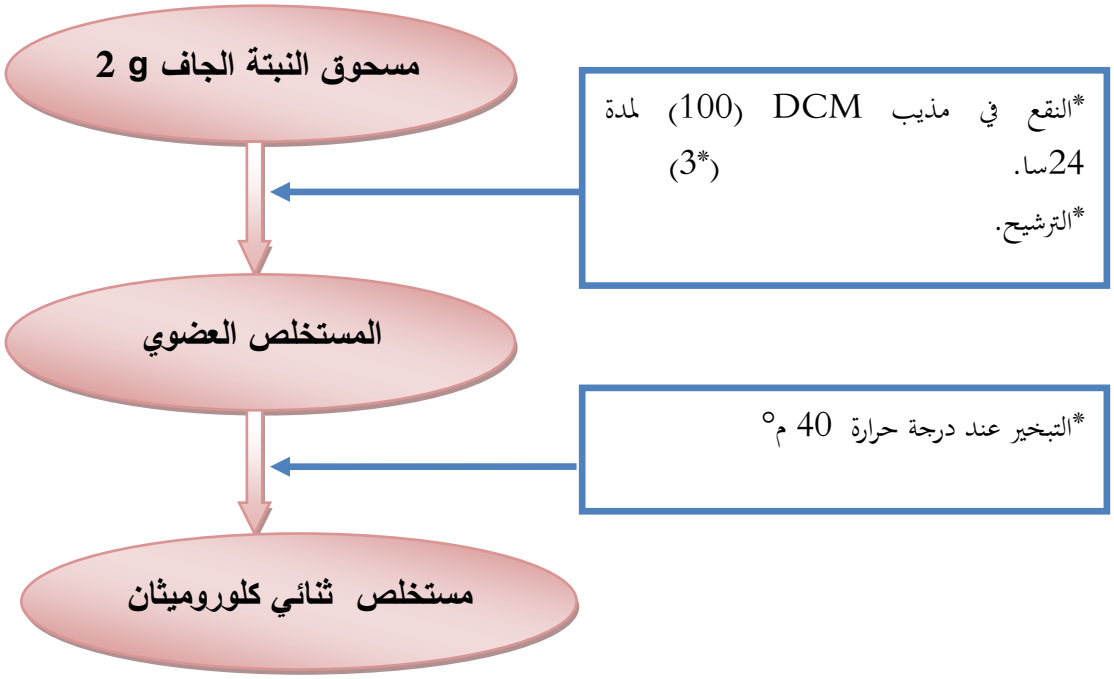
ملاحظة: نفس الخطوات التجريبية السابقة تمت مع العينة (2) بإستعمال المزيج (ميثانول+ماء) (30/70).

كما نقوم باستخلاص المركبات الغير قطبية باستعمال المذيب ثنائي كلوروميثان .

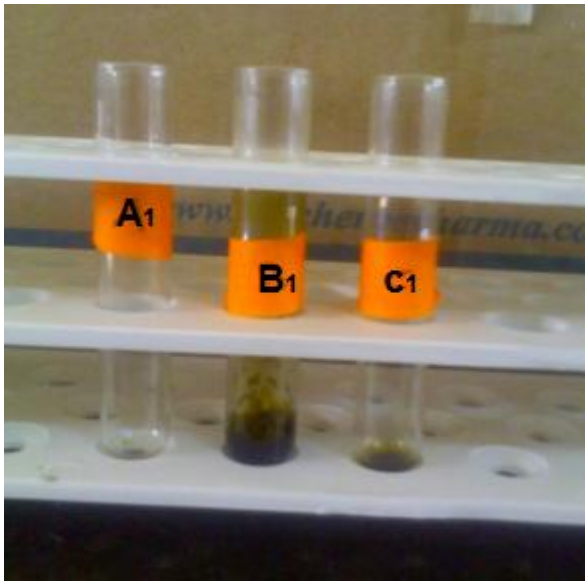
- نقوم بتنقيع عينة (3) وزنها 2 g في مذيب ثنائي كلوروميثان لمدة 24 ساعة ، ثم نقوم بترشيح المستخلص المتحصل عليه و تكرر العملية 3 مرات مع تجديد المذيب بعد كل عملية ترشيح .

-تجمع المستخلصات المتحصل عليها ثم تبخر باستعمال جهاز التبخير الدوراني (Rotavapeur) للتخلص من المذيب تحت درجة حرارة لا تتجاوز 40 م° .

IV-2-4/-مخطط مراحل الاستخلاص للجزء الهوائي للنبتة بثنائي كلوروميثان



الشكل (IV-3): جهاز التبخير الدوراني Rotavabeur



الشكل (IV-4): بعض المستخلصات المتحصل عليها بعد عملية الاستخلاص

حيث:

A_1: مستخلص هكسان المتحصل عليه بإستعمال الخليط ($EtOH+H_2O$)

B_1: مستخلص ثنائي كلوروميثان

C_1: مستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه بإستعمال الخليط ($EtOH+H_2O$)

IV- 3/-الدراسة التحليلية النوعية لمستخلصات الجزء الهوائي لنبتة *F. Vesceritensis*

IV-3-1/- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM:

IV-3-1-1/- مستخلص أسيتات الإيثيل ، الميثانول و المستخلص المائي:

✓ حيث نعطي للمستخلصات الترميز التالي:

C_1: مستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه باستعمال المزيج (إيثانول+ماء).

C_2: مستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه باستعمال المزيج (ميثانول+ماء).

C_3: مستخلص ميثانولي (محضر في دراسة سابقة).

A_1: المستخلص المائي المتحصل عليه باستعمال المزيج (إيثانول+ماء).

A_2: المستخلص المائي المتحصل عليه باستعمال المزيج (ميثانول+ماء).

✓ **الشواهد المستعملة:**

T_1 :Acide Chlorogénique

T_2 :7-O- -glucopyranosyl(1,6)- -L-rhamnopyranoside apigénine

T_3 :lutéoline

T_4 Apigénine :

T_5 : Apigénine 7- glucoside

T_6 : Quercetine

ملاحظة: تم اختيار الشواهد على أساس تواجدها في جنس *Ferula* حسب المراجع [38].

استعملنا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM ذات

-الطور الثابت: متعدد الأميد

الطور المتحرك: (Toluène/méthyléthylcétone/MeOH) (4/3/3)

و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM ذات

الطور الثابت: السيليلوز

الطور المتحرك(الطور العضوي) : BAW (n- Butanol/Acide acétique/H_2O) (4/1/5)

و لم نتحصل على نتائج فصل جيدة ، على عكس كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM ذات

الطور الثابت: السليكاجال (SiO_2)

-الطور المتحرك:إستعملنا عدة أطوار متحركة مختلفة.

-الطور المتحرك(1): ($CHCl_3$/MeOH/H_2O/Acide acétique) (70/30/4/1)

-الطور المتحرك (2): (ACOEt/MeOH/H_2O) (100/13.5/10)

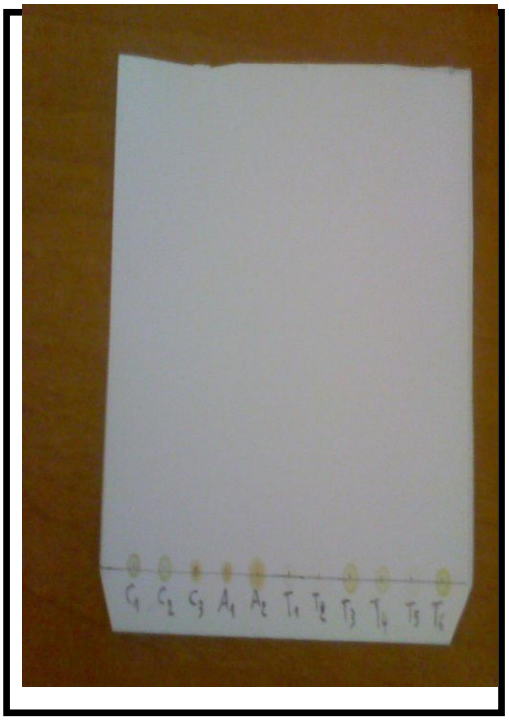
-الطور المتحرك (3): ($CHCl_3$/MeOH/H_2O) (70/30/4)

-الطور المتحرك (4): (AcOEt/A.Formique/A.acétique/H_2O) (100/11/11/26)

التي أعطت نتائج فصل مقبولة .

1- تحضير صفيحة CCM :

- نحضر صفيحة CCM ذات الأبعاد cm (10×12) ، ثم نرسم خط رفيع بقلم الرصاص يبعد عن حافة الصفيحة ب 1 cm ، نحدد مكان وضع البقع بحيث تكون المسافة بين البقع 1 cm.
- بواسطة أنابيب شعرية نضع البقع بشكل دائري كما هو موضح في الشكل (5) ، تجفف البقع ثم نضعها داخل الخلية الكروماتوغرافية التي تحتوي على الطور المتحرك(1): ($CHCl_3$/MeOH/H_2O/Acide acétique) (70/30/4/1) وتغلق الخلية كما يوضحه الشكل (6):



الشكل(IV-5): كيفية وضع البقع

الشكل(IV-6):طريقة وضع الصفيحة داخل الخلية

- عند وصول الطور المتحرك إلى أعلى الصفيحة (بحيث يبقى حوالي 1cm) نخرج الصفيحة و نعين بقلم رصاص مستوى صعوده .
- تجفف الصفيحة جيدا من الطور المتحرك ثم يكشف عليها باستعمال مصباح UV.

IV-3-1-2/-مستخلص ثنائي كلوروميثان ، الهكسان ، أسيتات الايثيل و الزيت الأساسي:

استعملنا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة **CCM** ذات

الطور الثابت: السليكاجال

الطور المتحرك: (Cyclohexane/AcoEt) بالنسبتين التاليتين : (90/5) ، (90/10) فأعطت النسبة الأخيرة أحسن فصل.

حيث نعطي للعينات الترميز التالي:

B_1: مستخلص ثنائي كلوروميثان

B_2: مستخلص الهكسان المتحصل عليه باستعمال الخليط ($EtOH+H_2O$)

B_3: مستخلص الهكسان المتحصل عليه باستعمال الخليط ($MeOH+H_2O$)

B_4: مستخلص هكساني (محضر في دراسة سابقة)

HE: الزيت الأساسي

IV-4/-الدراسة التحليلية الكمية لمستخلصات الجزء الهوائي لنبتة *F.Vesceritensis*:

IV -4-1/-تقدير المركبات الفينولية و الفلافونيدية :

IV-4-1-1/-تقدير المركبات الفينولية بإستعمال حمض غاليك:

- **المبدأ:**

-نتبع طريقة ***Ringleton_Rossi*** باستخدام كاشف Folin_Ciocalteu الذي يتركب من حمض فوسفوتنغستيك ($H_3P_{12}O_4$) Phosphotungstique و الذي يرجع في وجود المركبات الفينولية إلى أكاسيد التنغستين (W_8O_{23}) و الموليبدن (Mo_8O_3) ذات اللون الأزرق .

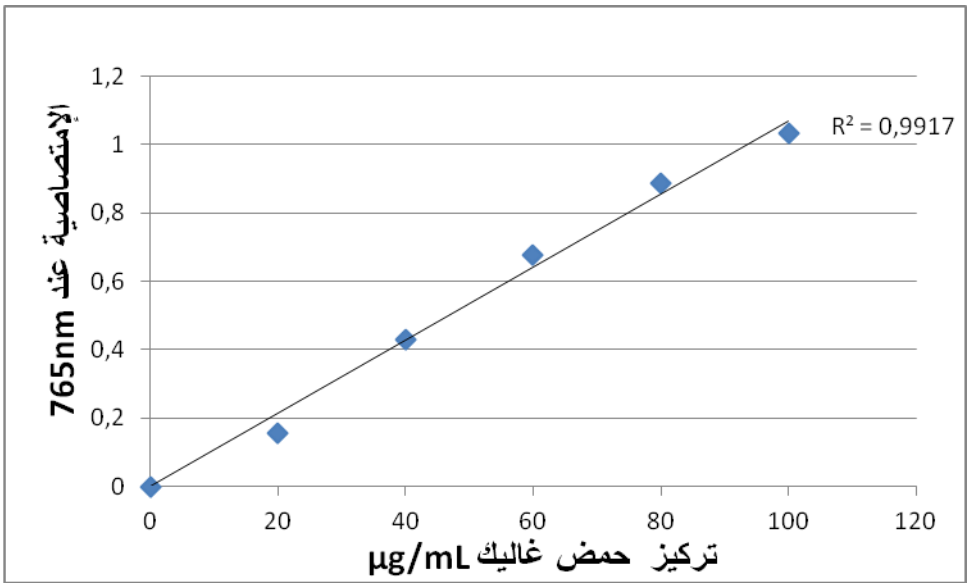
-نقدر كمية الفينولات بقياس امتصاصية العينات للأشعة فوق البنفسجية بجهاز Spectroscopie UV عند طول موجة 765 نانومتر حيث نستعمل حمض غاليك كفينول مرجعي .

- **طريقة العمل:**

-نأخذ 0.5 mL من الأحجام المحضرة سابقا التي تتراوح تراكيزها بين 20 و100 (μg/mL) من محلول حمض غاليك الذي تركيزه 1 mg/mL نضعها في أنابيب اختبار على الترتيب ثم نضيف لها 2.5 mL من كاشف Folin Ciocalteu (10%) فيظهر لون أصفر يزداد قتامة مع زيادة التركيز و نتركها لمدة 5 دقائق .

-نضيف لها 2 mL من محلول كربونات الصوديوم Na_2CO_3 (7.5 **%**) فيتحول إلى اللون الأخضر ثم أزرق فاتح و يصبح قاتما مع زيادة التركيز و نتركها في الظلام لمدة نصف ساعة **[25]**.

ثم نقيس بواسطة جهاز UV-Visible الإمتصاصية **A** عند طول موجة أعظمي 765 نانومتر فنحصل على منحنى الامتصاصية بدلالة التركيز:



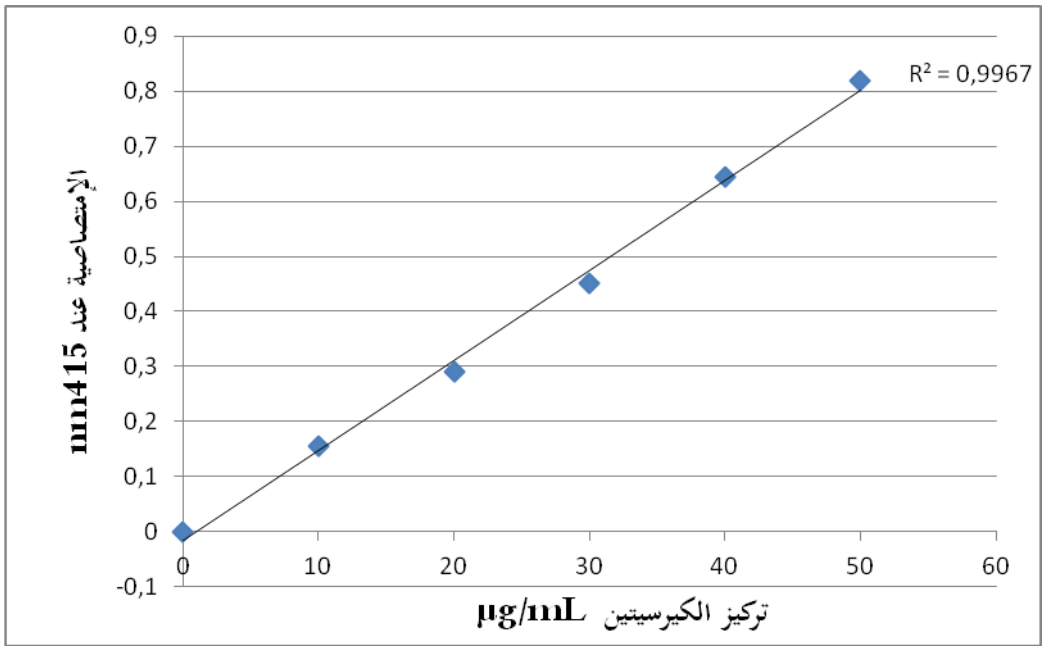
المنحنى (IV-1): المنحنى القياسي لحمض غاليك

بنفس الطريقة نعامل المستخلصات بشرط أن نستبدل حمض غاليك بالمستخلص و نقوم بحساب التقدير الكمي للمركبات الفينولية.

IV-4-1-2/-تقدير المركبات الفلافونيدية في النبتة بإستعمال مركب الكيرسيتين :

- **طريقة العمل:**

نأخذ 1.5mL من الأحجام المحضرة سابقا التي تتراوح تراكيزها بين 10و50 (g/ml) من محلول الكيرسيتين الذي تركيزه 1 mg/mL، و نضيف له 1.5 mL من محلول $AlCl_3$ تركيزه 2% فيظهر اللون الأخضر المصفر و نتركها في الظلام لمدة ساعة ، ثم نقيس بواسطة جهاز UV-Visible الامتصاصية A عند طول الموجة 420 نانومتر فنحصل على منحنى الامتصاصية بدلالة التركيز:



المنحنى(IV-2): المنحنى القياسي لمركب الكيرسيتين

بنفس الطريقة نعامل المستخلصات بشرط أن نستبدل المحلول المرجعي بالمستخلص و نقوم بحساب التقدير الكمي للمركبات الفلافونيدية.

IV-5/- تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة:

لغرض تقدير الفعل الآسر للجزئيات المضادة للتأكسد للمستخلص أو المركب ، و تقدير الفعالية المضادة للأكسدة ، قمنا باختبار موليبدات الفوسفات ، و إختبار DPPH° ، حيث كلا من هاتين الطريقتين تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجي معين.

IV-5-1/- إختبار موليبدات الفوسفات:

المبدأ:

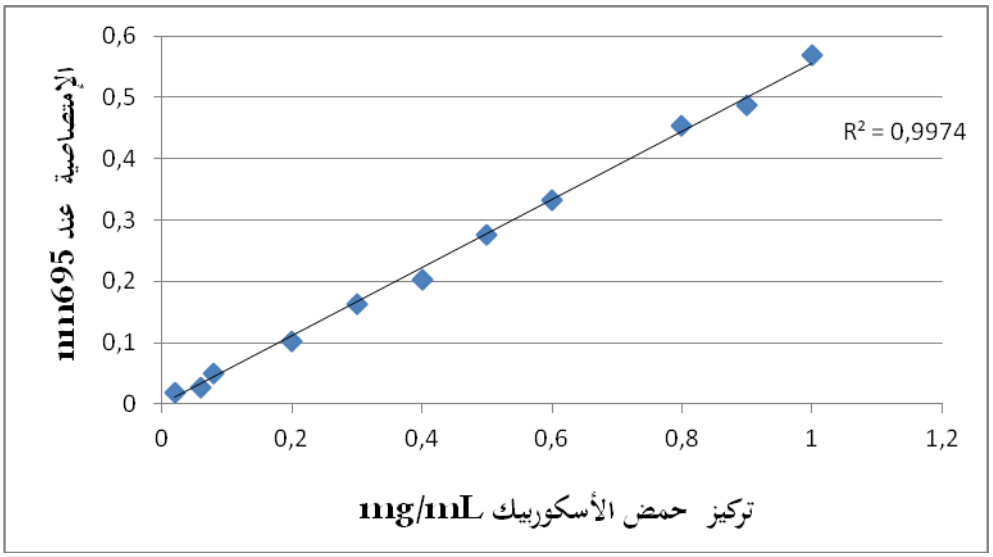
هي من الطرق المباشرة لقياس القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة غير الإنزيمية ، تعتمد على إرجاع الموليبدات Molybdate (MoO_4^{-2}) إلى Molybden (Mo) هذه الأخيرة التي تتميز بلون أخضر باهت، و يمكن قياس الامتصاصية بجهاز UV.Visible عند طول موجة 695 نانومتر.

في هذه الدراسة استعملنا حمض الأسكوربيك (Vitamine C) كأساس مرجعي في آسر الجذور الحرة.

طريقة العمل:

نأخذ 300 µL من الأحجام المحضرة سابقا التي تتراوح تراكيزها بين 0.01) mg/mL إلى 1) من محلول حمض الأسكوربيك الذي تركيزه 1mg/mL، و نضيف له 3 mL من محلول موليبدات الفوسفات الذي حضر بمزج 0.6 M من حمض الكبريتيك H_2SO_4 و 28 mM من فوسفات الصوديوم Na_3PO_4 و 4 mM من موليبدات الأمونيوم $(NH_4)_2MoO4$ لكل 100 mL من المحلول، ثم وضع المزيج في العتمة و في حمام مائي حرارته 95 C° لمدة ساعة

و نصف ، بعدها تركت الأنابيب تبرد و قيست الامتصاصية عند طول موجة 695 نانومتر ، ثم رسمنا المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك .



(V-3): المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك في إختبار موليبدات الفوسفات

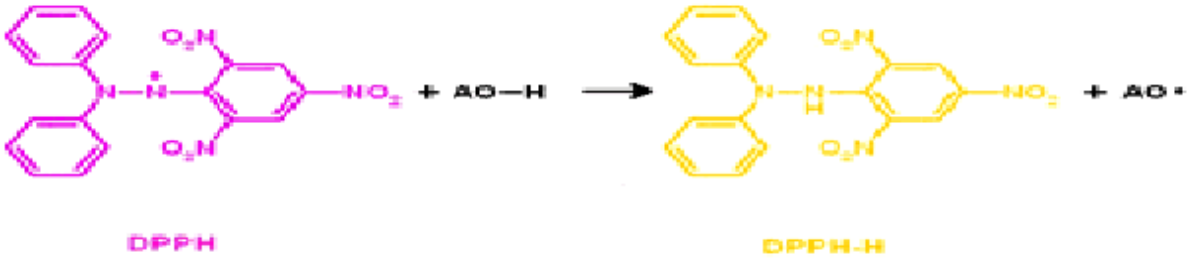
بنفس الطريقة نعامل المستخلصات (و هي ذات تركيز 1 mg/mL) بشرط أن نستبدل المحلول المرجعي (Vitamine C) بالمستخلص المدروس ثم نحسب القدرة الإرجاعية للمستخلصات الفينولية للنبتة.

IV -5-2/-إختبار DPPH:

يتم تقدير التأثير الإزاحي للمستخلصات المدروسة عن طريق اختبار ال DPPH° و الممثلة ب IC_{50} التي تمثل التركيز المثبط ل 50% من جذور ال DPPH° و القيمة الأقل لها تعني التأثير الإزاحي الأفضل للعينة.

- **المبدأ:**

لقد تم قياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص النباتي المستعمل في دراستنا هذه من خلال قدرته على منح ذرة هيدروجين أو إلكترون ، و المتمثل في أسره للجذر الحر DPPH° و يعتمد هذا الاختبار على قدرة المستخلص على أسر الجذر المستقر، و يظهر ذلك من خلال التفاعل اللوني للجذرDPPH ذو اللون البنفسجي الذي يتحول إلى DPPH-H ذو اللون الأصفر.



معادلة (1): تفاعل مضاد أكسدة مع جذر ثابت DPPH°

في هذه الدراسة استعملنا حمض الأسكوربيك (Vitamine C) كأساس مرجعي في أسر الجذور الحرة.

- **طريقة العمل:**

- نقوم بتحضير محلول DPPH° في الميثانول ذو تركيز 9.39×10^{-5} M
- نحضر تراكيز مختلفة من حمض الأسكوربيك (V.C) تتراوح بين 80 و 200 (µg/mL).
- نضع في أنابيب اختبار من كل تركيز 0.1 mL و نضيف لها 3 mL من محلول الDPPH° ثم نرج المحلول جيدا.
- نتركها في الظلام لمدة 30 دقيقة.
- نقيس الامتصاص في جهاز UV-Visible عند طول الموجة الأعظمي 517 نانومتر.

من خلال النتائج نقوم بحساب النسبة المئوية للتثبيط (I%) و ذلك وفق العلاقة التالية:

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

A_0: الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات.

A_i: الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلص) بعد مرور 30 دقيقة.

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

المنحنى(IV-4): منحنى إختبار DPPH° بواسطة V.C

نجري نفس العملية على كل عينة بشرط نقوم بتبديل المركب المستعمل كأساس مرجعي بالعينة المدروسة ثم نحسب IC_{50} ل DPPH° .

- إستعملنا زيت طيار اخر(HEA) لنبتة حبة الحلاوة من نفس عائلة نبتة الكلخة للمقارنة بين القدرة الإرجاعية لهما.

الفصل الخامس

النتائج و المناقشة

v/-النتائج و المناقشة:

v-1/- حساب مردود كل من الزيت الطيار والمستخلصات:

بعد وزن الزيت الطيار المستخلص من النبتة نقوم بحساب المردود له بالعلاقة التالية

المردود (%)= وزن الزيت الطيار(g)/ وزن الجزء الهوائي للنبتة(g)*100 ..... (1)

% 0.317 > % 0.1

نلاحظ أن كمية المردود التي تحصلنا عليها (0.317 %) أفضل من كمية المردود (0.1 %) التي تحصل عليها كل من دحاك و بن شعبان في دراسات سابقة على نفس النبتة لكن من منطقة سبسب ولاية غرداية و هذا قد يعود إلى الاسباب التالية: (عمر النبتة، الظروف المناخية، مرحلة نمو النبتة و الجزء النباتي المدروس) [38][36] .

بعد وزن كل مستخلص، تحصلنا على النتائج الموضحة في الجدول (V-1):

جدول(V-1): مردود مختلف المستخلصات

النبتة	المستخلص		الكتلة الناتجة (g)	المردود %
2g	ماء + إيثانول	هكسان	1.1×10^{-3}	0.055
		أسيتات الإيثيل	0.0184	0.92
		مستخلص مائي	0.2721	13.61
2g	ماء + ميثانول	هكسان	0.0177	0.885
		أسيتات الإيثيل	0.0114	0.57
		مستخلص مائي	0.3398	16.99
2g	ديكلوروميثان		0.1526	7.63

المردود(%)= وزن المسخلص/(g2)وزن الجزءالهوائي.....(2)

من العلاقة (2) استطعنا حساب مردود كل مستخلص ، و على سبيل المثال قمنا بحساب مردود مستخلص الديكلوروميثان بالطريقة التالية:

$$\%7.63 = 100 \times \frac{0.1526}{2}$$

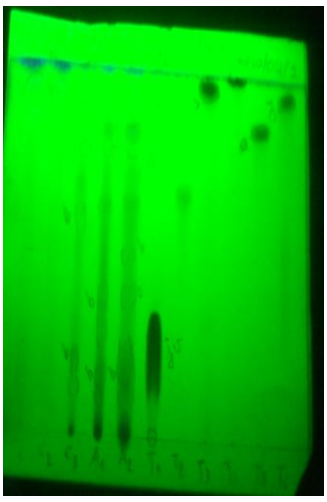
من خلال الجدول (v-1) نلاحظ أن نسبة مردود المستخلص المائي المتحصل عليه بإستعمال الخليط (ميثانول + ماء) معتبرة حيث بلغت 16.99% ثم يليه المستخلص المائي المتحصل عليه بإستعمال الخليط (إيثانول + ماء) التي بلغت 13.61 % و هذا يدل أن هذه النبتة غنية بالمركبات القطبية .

v-2/- الدراسة التحليلية النوعية لمستخلصات الجزء الهوائي لنبتة *F. Vesceritensis*

v-2-1/- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM :

v-2-1-1/- مستخلص أسيتات الإيثيل و الميثانول و المستخلص المائي:

✓ **الطور المتحرك (1):($CHCl_3$/MeOH/H_2O/Acide acétique)(70/30/4/ 1)**



λ_2= 365nm λ_1= 254 nm

الشكل(v-1):كروماتوغرام CCM لكل من مستخلصي أسيتات الإيثيل (C_1 وC_2) و المستخلصين المائيين (A_1 وA_2) و المستخلص الميثانولي تحت مصباح UV

الجدول(٧-2): نتائج الفصل باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

الشواهد	اللون: UV=365nm	R_f
T_1	أزرق	0.20
T_2	بني	0.66
T_3	بني	0.96
T_4	بني	0.97
T_5	بني	0.85
T_6	أصفر	0.95

الجدول(V-3): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

المستخلص	اللون UV=365 nm	R_f
C_1	أزرق	0.94
C_2	أزرق	0.94
C_3	أزرق	0.13
	أزرق	0.19
	أزرق	0.57
	بني	0.66
	أصفر	0.91
A_1	أزرق	0.10
	أزرق	0.18
	أزرق	0.28
	أزرق	0.32
	أزرق	0.38
	أزرق	0.61
	بني	0.66
	بني	0.82
	أزرق	0.10

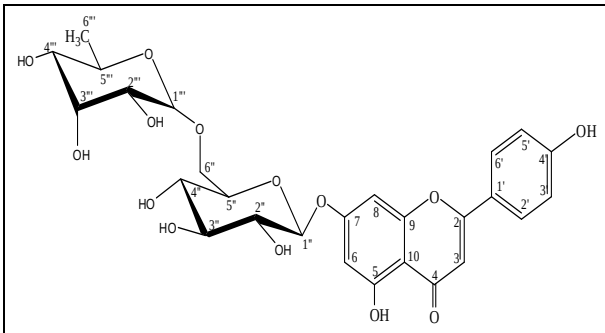
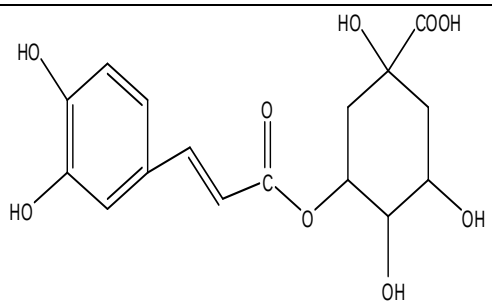
A_2	أزرق	0.18
	أزرق	0.38
	أزرق	0.48
	أزرق	0.60
	بني	0.66
	أزرق	0.77
	أصفر	0.82
	بني	0.91

من خلال الجدول (v-3) نلاحظ:

- ظهور بقعة ذات R_f=0.94 و لون أزرق بكل من مستخلصي أسيتات الإيثيل المتحصل عليه بإستعمال الخليط ($EtOH/H_2O$) و الخليط ($MeOH/H_2O$) .
- ظهور عدة بقع (أكثر من 05) مختلفة الألوان (أزرق ، بني) بالمستخلص الميثانولي.
- ظهور عدة بقع بالمستخلصين المائيين المتحصل عليهما بإستعمال الخليط ($EtOH/H_2O$) و الخليط ($MeOH/H_2O$) (06 بقع مشتركة ذات لون أزرق) مع الإختلاف في تركيز البقع .

و من أهم المركبات المتواجدة نذكر على سبيل المثال الفينولات و الفلافونيدات (ذات بقع بنية أو صفراء أو زرقاء) .[39]

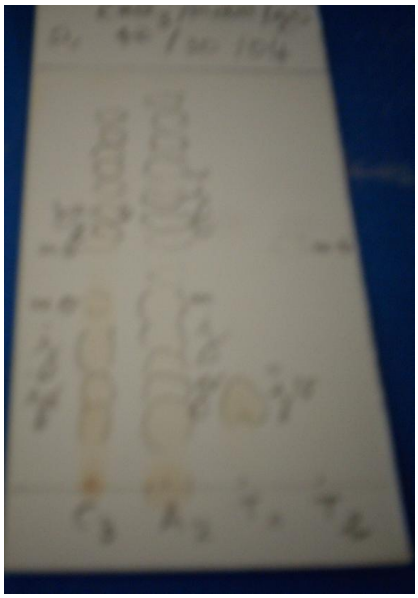
و بالمقارنة بين نتائج الجدول (v-2) و الجدول (v-3) نلاحظ ظهور بعض البقع (ذات لون بني R_f=0.66 ، و ذات لون أزرق R_f = 0.20) بكل من المستخلصين المائيين المتحصل عليهما بإستعمال الخليط ($EtOH/H_2O$) و الخليط ($MeOH/H_2O$) ، هذه البقع مماثلة لبقع الشاهدين T_1 و T_2 مما يدل على وجود حمض فينولي من نوع Acide Chlorogénique و وجود مركب فلافوني ثنائي السكر
7-O-β -glucopyranosyl-(1,6)- α -L-rhamnopyranoside apigénine .[38]

	
T_2 :7-O-β - glucopyranosyl-(1,6)-α-L- rhamnopyranoside apigénine	T_1 : Acide Chlorogénique

الجدول (V-4) : صيغة المركبين T_1 و T_2

كما نلاحظ غياب بقية الشواهد (T3-T4-T5-T6) بالمستخلصات المدروسة.

✓ **الطور المتحرك(2): (ACOEt/MeOH/H_2O) (100/13.5/10)**



الشكل (V-2):كروماتوغرام **CCM** لكل من المستخلص المائي (**A_2**) و المستخلص الميثانولي (**C_3**) في المجال المرئي (**الكشف ب**NH_3)

الجدول (V-5): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

الشواهد	اللون UV+ NH_3	R_f
T_1	أصفر مخضر	0.17
T_2	أخضر	0.53

الجدول(V-6): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

المستخلص	اللون UV	R_f
C_3	أصفر مخضر	0.13
	أصفر	0.2
	أصفر	0.29
	بنفسجي	0.39
	أخضر	0.53
	أزرق	0.56
	أزرق	0.6
	بنفسجي	0.71
	أزرق	0.77

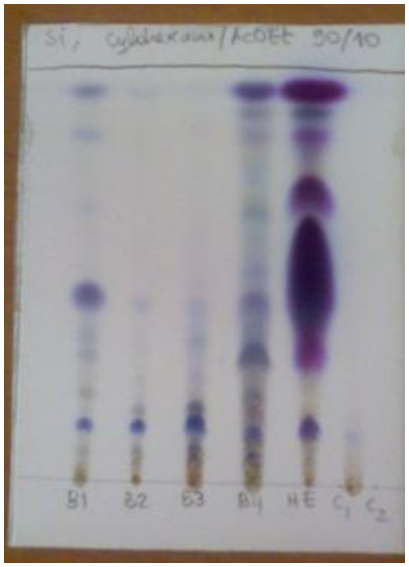
	أزرق	0.81
	أزرق	0.87
A_2	أصفر مخضر	0.15
	أصفر	0.2
	بنفسجي	0.26
	أصفر	0.31
	بنفسجي	0.39
	أصفر	0.44
	أخضر	0.53
	أزرق	0.59
	أصفر	0.64
	بنفسجي	0.67
	أزرق	0.73
	أزرق	0.8
	أزرق	0.86

❖ من خلال نتائج الجدول (V-5) و الجدول (V-6) نلاحظ:

- ظهور عدة بقع (أكثر من 06 مختلفة الألوان) بكل من المستخلص الميثانولي و المائي المتحصل عليه من الخليط ($MeOH/H_2O$) .
- ظهور بقع بالمستخلصين الميثانولي و المائي المتحصل عليه من ($MeOH/H_2O$) ، هذه البقع مماثلة لبقع الشاهدين T_1و T_2 هذا يؤكد وجود الحمض الفينوليي Acide Chlorogénique و الفلافون 7-O-β -(1,6)-α -glucopyranosyl -L- rhamnopyranoside apigénine [38]

V-2-1-2/-المستخلصات الغير قطبية و الزيت الأساسي:

✓ **الطور المتحرك:** (Cyclohexane/AcoEt) (90/10)



الشكل (V-3): كروماتوغرام CCM لكل من المستخلصات الغير قطبية و الزيت الأساسي.

المجال المرئي (الكشف بVaniline Sulfurique)

الجدول (V-7): نتائج الفصل بإستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

المستخلص	لون البقعة Vaniline sulfurique	R_f
C_1	أصفر	0.06
	بنفسجي	0.13
HE	أصفر	0.06
	بنفسجي	0.13
	أصفر	0.24
	بنفسجي	0.33
	أصفر	0.52
	بنفسجي	0.71
	بنفسجي	0.77
	بنفسجي	0.81
	بنفسجي	0.84
	أزرق	0.90
	بنفسجي	0.95

0.06	أصفر	$\mathbf{B_1}$
0.13	بنفسجي	
0.20	أزرق	
0.25	أزرق	
0.30	أزرق	
0.34	أزرق	
0.44	بنفسجي	
0.84	بنفسجي	
0.95	بنفسجي	
0.06	أصفر	$\mathbf{B_2}$
0.13	بنفسجي	
0.17	أزرق	
0.25	أزرق	
0.33	بنفسجي	
0.42	أزرق	
0.95	بنفسجي	
0.08	بني	$\mathbf{B_3}$
0.10	بني	
0.14	بنفسجي	
0.18	بني	
0.22	أزرق	
0.25	أزرق	
0.34	أزرق	
0.42	أزرق	
0.06	أصفر	
0.11	بنفسجي	
0.17	أزرق	
0.20	أزرق	
0.25	أزرق	
0.32	بنفسجي	
0.35	أزرق	
0.43	أزرق	

B_4	ازرق	0.49
	أزرق	0.58
	أزرق	0.65
	بنفسجي	0.73
	بنفسجي	0.80
	بنفسجي	0.84
	بنفسجي	0.90
	بنفسجي	0.95

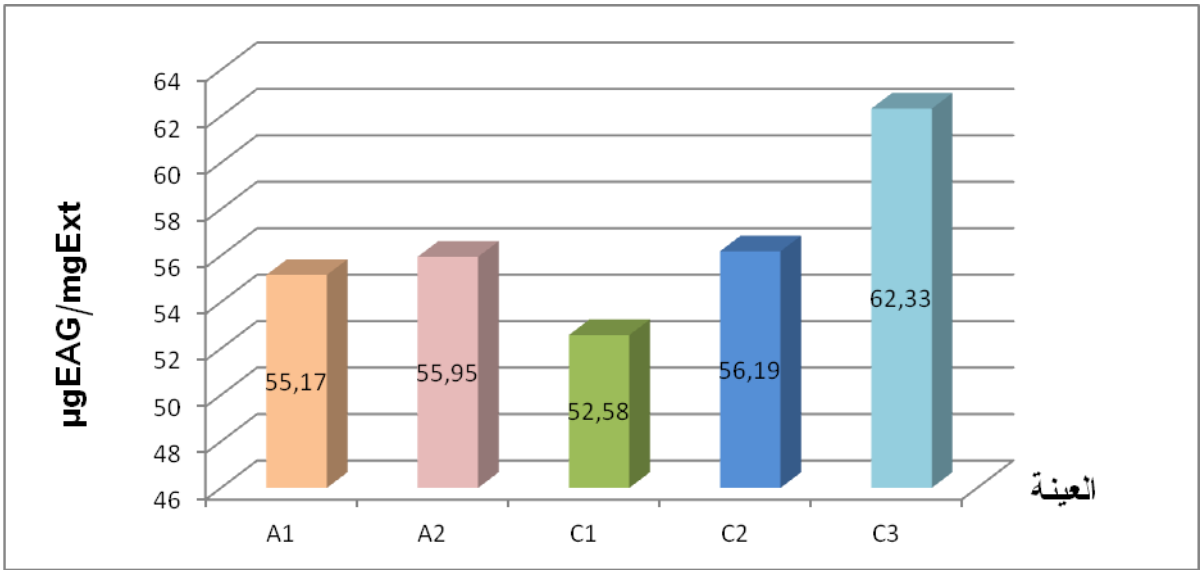
❖ من خلال نتائج الجدول (V-**7**) نلاحظ:

- ظهور بعض البقع لها نفس R_f (مثلا R_f=0.06) مشتركة بين كل من مستخلص أسيتات الإيثيل (C_1) المتحصل عليه بإستعمال الخليط ($EtOH/H_2O$) ، الزيت الأساسي (HE)، مستخلص ثنائي كلوروميثان (B_1)، مستخلص الهكسان (B_2) المتحصل عليه بإستعمال الخليط ($MeOH/H_2O$) و المستخلص الهكساني (B_4).

-كما نلاحظ ايضا اشتراك المستخلصات السابقة في عدد محدود من البقع مع المستخلصين C_1 و C_2 لأسيتات الايثيل هذا يدل على أن المركبات التربينية ذات قطبية متوسطة.

– ظهور عدة بقع (أكثر من 10 بقع ذات لون بنفسجي و أزرق) بالزيت الطيار و المستخلص الهكساني و الذي يدل على أن هذه المستخلصات غنية بالمركبات التربينية [40]

V-3/-تقدير المركبات الفينولية:



الشكل (V-4): تقدير المركبات الفينولية في المستخلصات

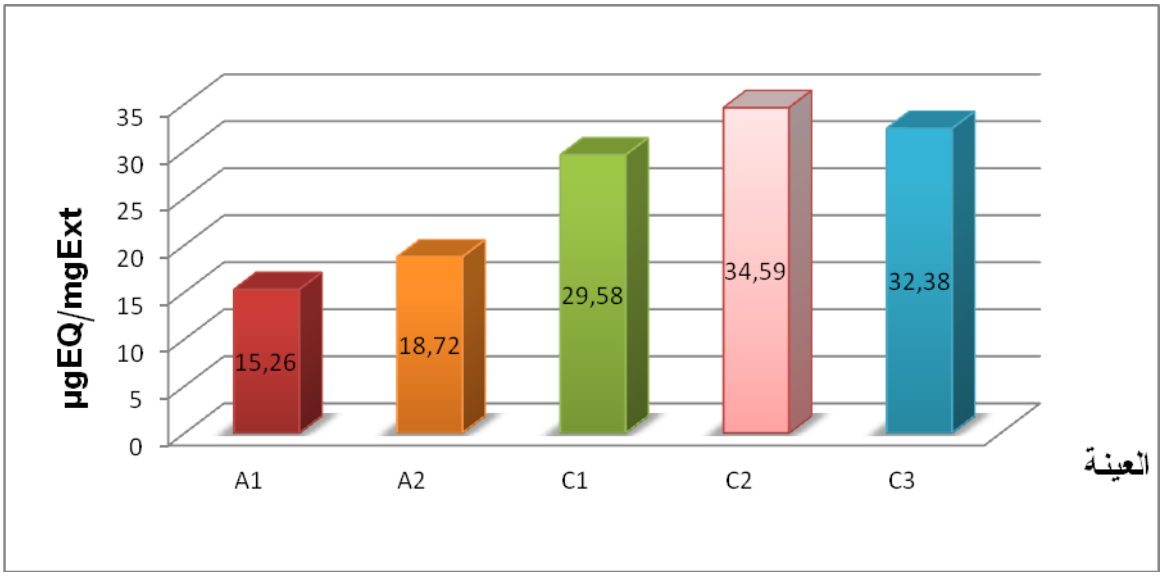
بإستعمال منحنى العيارية لحمض غاليك، تم تدوين النتائج المتعلقة بتقدير المركبات الفينولية.

من خلال منحنى الأعمدة نلاحظ أن كمية الفينولات المتواجدة بمستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه من الخليط (ميثانول+ماء) أكبر من كمية الفينولات المتواجدة بمستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه من الخليط (إيثانول+ماء) ، و كمية الفينولات المتواجدة بالمستخلص المائي المتحصل عليه من الخليط (ميثانول+ماء) أكبر من كمية الفينولات المتواجدة بالمستخلص المائي المتحصل عليه من الخليط (إيثانول+ماء).

و كانت الكمية الأكبر للفينولات هي المتواجدة بالمستخلص الميثانولي ، و هذا يعني أن الميثانول لديه القدرة الاكبر لاذابة الفينولات المتواجدة بالنبتة.

كانت نتائجنا مقاربة لنتائج دراسة سابقة قام بها بوشوكة ، حيث كانت كمية الفينولات 61.91µg EAG/g d'extrait لمستخلص أسيتات الإيثيل على ثمار نبتة الكلخة [41].

V-4/-تقدير المركبات الفلافونيدية:



الشكل(V-5) :التقدير الكمي للفلافونيدات في المستخلصات

بإستعمال منحنى العيارية لمركب الكيراسيتين ، تم تدوين النتائج المتعلقة بكمية الفلافونيدات.

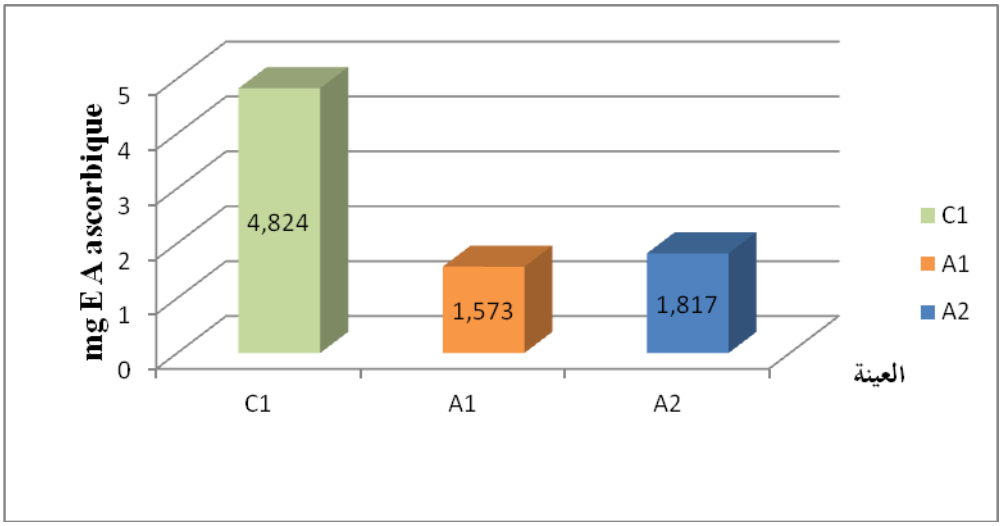
نلاحظ من خلال منحنى الأعمدة أن كمية الفلافونيدات المتواجدة بالمستخلص المائي المتحصل عليه من الخليط (ميثانول+ماء) أكبر من كمية الفلافونيدات المتواجدة بالمستخلص المائي المتحصل عليه من الخليط(إيثانول+ماء) ، كما نلاحظ أن كمية الفلافونيدات المتواجدة بمستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه من الخليط (ميثانول+ماء) أكبر من كمية الفلافونيدات المتواجدة بكل من مستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه من الخليط (إيثانول+ماء) و المتواجدة بالمستخلص الميثانولي.

و تعتبر كمية الفلافونيدات التي تحصلنا عليها كبيرة بالمقارنة بكمية الفلافونيدات لنفس النبتة في دراسة قام بها بوشوكة 10.57 µg EAQ/g d'extrait [41].

- كما تجدر الإشارة إلى أن نتائج CCM السابقة لم تظهر غنى المستخلصين C_1 و C_2 بالفلافونيدات و الفينولات ، على عكس المنحنيين الخاصين بتقدير المركبات الفينولية و الفلافونيدية ، و يمكن تفسير هذا كون الإختبارين السابقين غير إنتقائيين .

v-5/-تقدير الفعالية المضادة للأكسدة:

v- 5-1/- نتائج اختبار موليبدات الفوسفات:



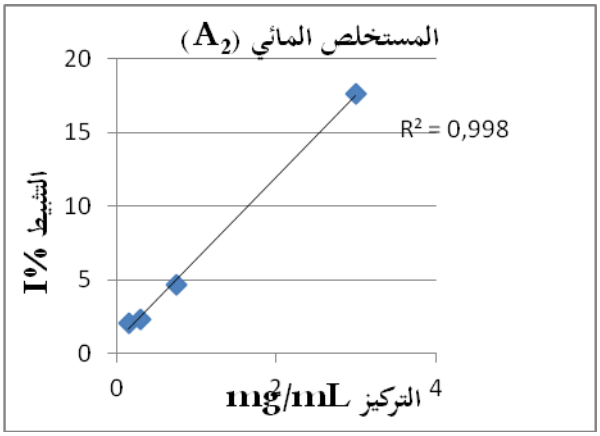
الشكل(v-6): القدرة الإرجاعية للمستخلصات الفينولية للنبتة المدروسة

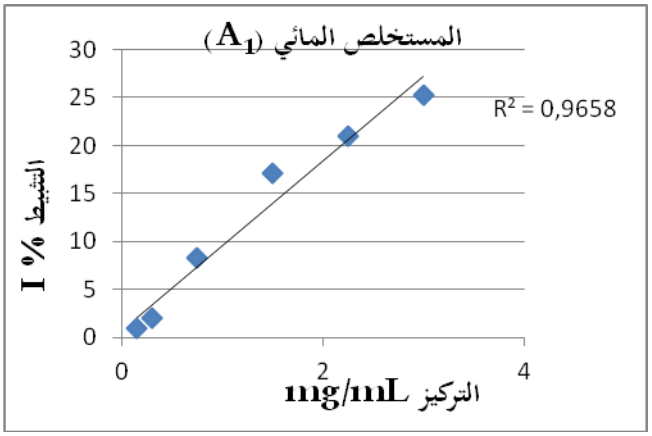
من خلال منحنى القدرة الإرجاعية للمستخلصات الفينولية نلاحظ أن :

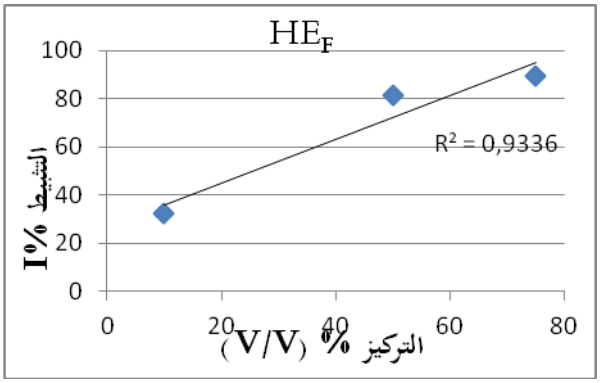
تركيز حمض الأسكوربيك المكافئ لمستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه من الخليط ($EtOH/H_2O$) مرتفع و هذا يدل على أن الفينولات كانت فعالة في إرجاع الموليبدات.

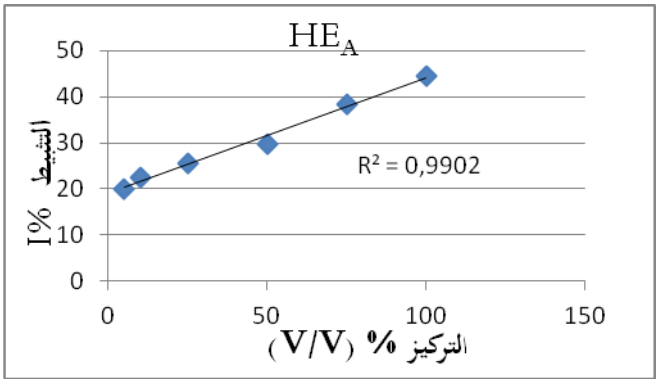
أما تركيز حمض الأسكوربيك المكافي للمستخلص المائي المتحصل عليه من ($EtOH/H_2O$) و المستخلص المائي المتحصل عليه من ($MeOH/H_2O$) كان ضعيف بالمقارنة بتركيز حمض الأسكوربيك المكافي لمستخلص أسيتات الإيثيل المتحصل عليه من ($EtOH/H_2O$) و هذا راجع إلى أن كمية الفينولات بهما ضعيفة.

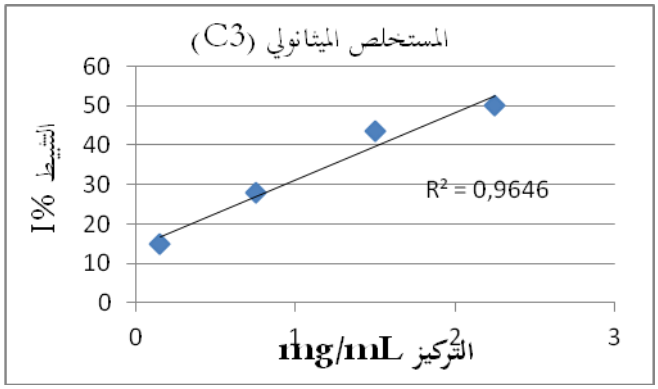
V-5-2/-نتائج القدرة التثبيطية لجذر DPPH°



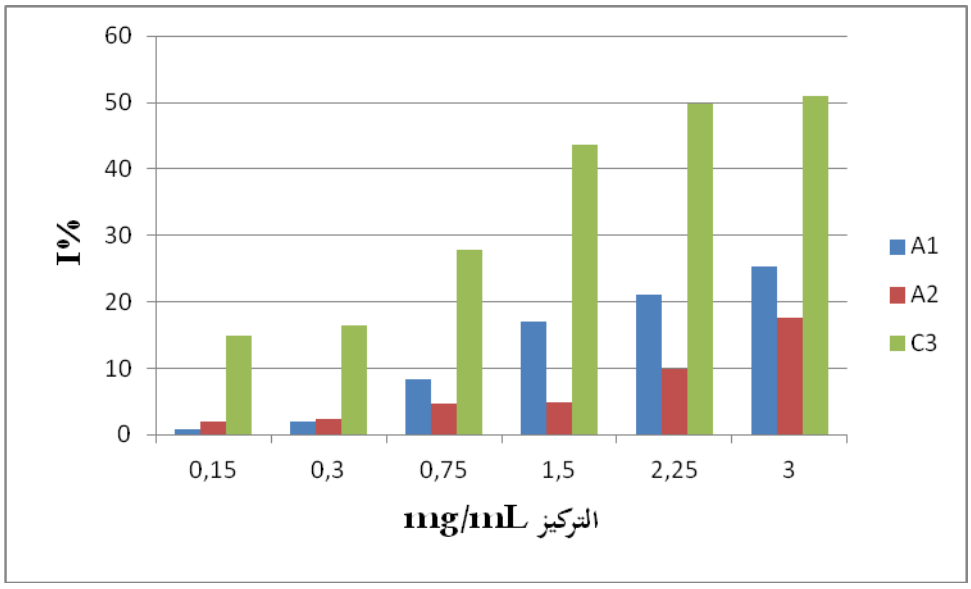






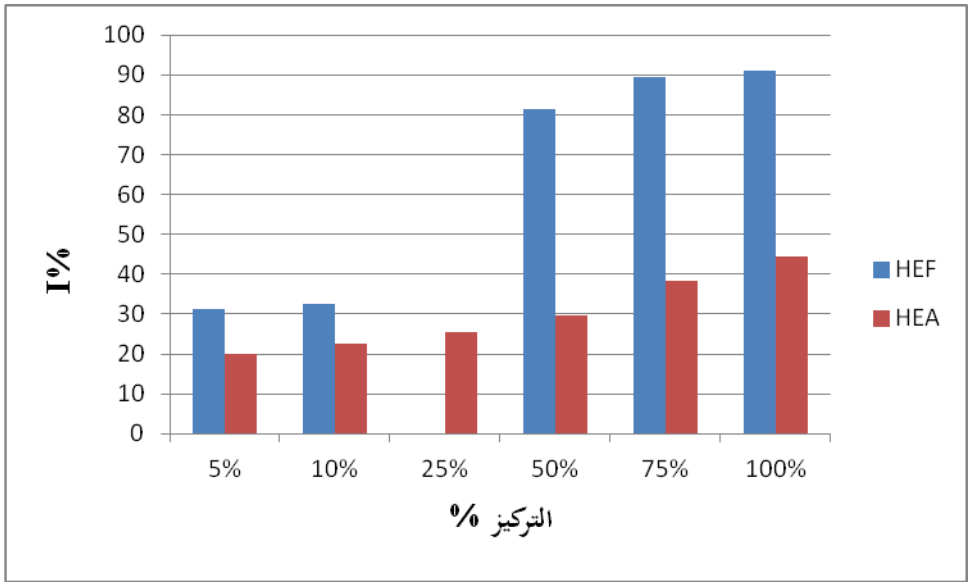


الشكل (V-7): منحنيات العينات المدروسة في إختبار DPPH°



الشكل (V-8) : القدرة التثبيطية للمستخلصات الفينولية

نلاحظ أن المستخلص الميثانولي له القدرة التثبيطية العظمى ، حيث كانت IC_{50} = 2.088 mg/m ، و هذا يعود للكمية المعتبرة للفلافونيدات و الفينولات المتواجدة به ، بينما المستخلصين المائيين لم يصل التثبيط إلى 50 % حتى في أكبر تركيز مستعمل.



الشكل (V-9): القدرة التثبيطية للزيتين الأساسيين

الجدول (V-7) : الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات المدروسة

العينة	IC_{50}
حمض الأسكوربيك	0.191 mg/mL
مستخلص ميثانولي	2.088 mg/mL
زيت طيار لنبتة الكلخة	25.463 % (v/v)

❖ مع العلم أنه كلما زادت قيمة IC_{50} قلت الفعالية المضادة للأكسدة ، و بمقارنة قيمة IC_{50} لحمض الأسكوربيك و التي تساوي 0.191mg/mL مع قيمة IC_{50} للمستخلص الميثانولي نجد أن الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي أقل بحوالي 10 مرات من فعالية حمض الأسكوربيك .

- من خلال الشكل (V-9) و الجدول (V-7) نلاحظ أن القدرة التثبيطية للزيت الطيار لنبتة الكلخة كانت أكبر منها في الزيت الطيار لنبتة حبة الحلاوة ، حيث بلغت IC_{50} =25.46% ، بينما لم تصل القدرة التثبيطية لزيت (HEA) نبتة حبة الحلاوة ل 50 % (IC_{50}) حتى بإستعمال الزيت نقيا (100 %) و هذا راجع إلى الإختلاف في المركبات الكيميائية المكونة للزيتين .

كما تم الحصول أيضا على قيمة القدرة التثبيطية تساوي I = 27 % في دراسة سابقة أجراها بن شعبان على نفس الزيت الطيار و ذلك بتركيز 2000 µg/mL [36] .

الخـاتمــة

خاتمة

أردنا من خلال هذا العمل المساهمة في دراسة بعض المركبات الفعالة و المهمة في نبتة الكلخة *Ferula Vesceritensis* ألا و هي الفلافونيدات و الزيت الطيار ، ثم تقدير الفعالية التثبيطية لها .

حيث قمنا بإستخلاص الزيت الطيار بطريقة التقطير المائي بإستعمال جهاز Clevenger ، و إستخلاص الفلافونيدات بطريقة هاربون بإستعمال المزيج ($MeOH+H_2O$) و المزيج ($EtOH+H_2O$) و أيضا إستخلاص بإستعمال ثنائي كلورو ميثان، فتحصلنا على عدة مستخلصات شكلت محور الدراسة لما يلي:

الدراسة التحليلة للمستخلصات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM من أهم المركبات التي وجدت هي التربينات و الفلافونيدات

تم التعرف على كمية المركبات الفينولية و الفلافونيدية و تبين لنا أن النبتة غنية بالمركبات الفينولية و الفلافونيدية حيث كانت النسبة الأكبر للفينولات في المستخلص الميثانولي، بينما تحصلنا على النسبة الاكبر للفلافونيدات في مستخلص أسيتات الإيثيل ($MeOH+eau$).

تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لبعض المستخلصات بطريقتين هما إختبار موليبدات الفوسفات و إختبار DPPH° ، فيما يخص إختبار موليبدات الفوسفات تبين أن مستخلص أسيتات الإيثيل الناتج بإستعمال المزيج ($MeOH+H_2O$) ذو فعالية أكبر في إرجاع الموليبدات.

أما بالنسبة لإختبار DPPH° وجدنا أن الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي أقل من فعالية حمض الأسكوربيك .

و عليه نخلص إلى أن المستخلصات المدروسة تحتوي على كمية كبيرة من الفينولات و كذا الفلافونيدات و هكذا يمكن أن تلعب دورا في القدرة التثبيطية المضادة للأكسدة ، حيث بينت نتائج هذه الدراسة أنه يمكن استخدام هذه النبتة كمصدر طبيعي مضاد للأكسدة سهل الوصول إليه و ذلك بعد إجراء تجارب تثبت عدم سميتها و إلحاق الضرر بصحة الإنسان.

قائمة المراجع بالعربية

[1] بن عاشورة صبرينة البتول، الفعالية المضادة لأكسدة الزيوت الطيارة و المركبات الفينولية ل Deverra Scoparia ، مذكرة ماجستير جامعة ورقلة (2007).

[2] منال محمد اكبر ، ناصر المنصور ، علاء ناظم حاتم، تأثير بعض مستخلصات المذيبات العضوية و مستخلصات المركبات الثانوية على الأداء الحياتي لحشرة الذبابة المنزلية . مجلة أبحاث البصرة (العلميات) العدد 37.الجزء 2 15 نيسان (2011).

[6] زمالي ابراهيم ، دراسة فيتوكيميائية و بيولوجية لنبتة صحراوية Solanum Nigrum ، مذكرة ماجستير جامعة ورقلة ، (2007) ، ص15.

[7] لطرش عائشة ، دراسة الدور الوقائي من الفيتامين E و بعض المستخلصات النباتية اتجاه سمية المبيد كلوروبيرفيوس ، مذكرة ماجستير ، جامعة قسنطينة ، (2011) ،ص41-42.

[8] عابد هاجر ، الفعل الوقائي للمستخلص الفلافونيدي من الالتهاب النفروني المحرض بال Paracetamol لدى الجرذان ، مذكرة ماجستير جامعة منتوري قسنطينة (2011) ، ص 34.

[10] ميثاق الجبر ، بحث و تحديد نواتج الايض الثانوي لنبات القات Catha edulis من العائلة (Celastraceae) و نبات البوليكاريا Pulicaria Jauberti من العائلة (Asteraceae) ، رسالة دكتوراه جامعة منتوري قسنطينة (2010) ، ص36-37.

[11] شروانة سهيلة ، فصل و تحديد منتجات الايض الثانوي و الفلافونيدي للنبتة Lycium arabicum.L مذكرة ماجستير قسنطينة (2007) ، ص4-7.

[17] بودهان عائشة، دراسة الفلافونيدات الموجودة في الجزء الهوائي لنبتة Fumaria Parviflora و تطبيقاتها كمثبط ضد التآكل ، مذكرة ماستر ، جامعة ورقلة (2013).

[23] د/محب طه صقر ، استاذ فسيولوجيا النبات ، منشور بعنوان فسيولوجيا الاجهاد ، Stress physiology كلية الزراعة ، جامعة المنصورة.

[24] بوبلوطة حورية ، النشاط المضاد للتاكسد و امكانية وقاية المستخلص الميثانولي لنبتتي ال Matricaria pubescens و Centaurea Incana على السمية الكبدية ، مذكرة ماجستير ، جامعة منتوري قسنطينة 2009.

[25] مصطفى بقوادة ، دراسة فيتوكيميائية للبيدات و الفينولات في بعض انواع نوى التمر المحلي ، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير جامعة قاصدي مرباح ورقلة 2007.

[26] نسرين بنت عصام بن صالح الباز ، العلاقة بين محتوى الاغذية من مضادات الاكسدة و الحالة الصحية للحوامل ، مذكرة ماجستير ، جامعة ام القرى المملكة العربية السعودية 2009.

[27] العابد ابراهيم ، دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا و المضادة للاكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران Tragnum nudatum ، مذكرة ماجستير جامعة ورقلة (2000).

[30] مسعي محمد احمد ، دراسة فيتوكيميائية للبيدات و فينولات نوى خمسة انواع من التمر المجني من منطقة ورقلة ، مذكرة ماجستير جامعة ورقلة (2013).

[31] بو القندول رمزي ، الدور الوقائي لبعض المستخلصات الفلافونيدية ضد الالتهاب الكبدي المحرض بالباراسيتامول لدى الجرذان ، مذكرة ماجستير ، جامعة قسنطينة 2011 ، ص 33-39.

المراجع باللاتينية

J .Bruneton , pharmacognsie , Deuxième édition , Tec-Doc , Paris.]3[

[4] A.Crozier , M.N.Clifford , H. Ashihara (2006), plant Secondary Metabolites , Blackwell publishing , Oxford UK.

[5] W.Vermevis , R.Nicholson (2006) , phenolic Compound biochemistry , Springer , the Netherlands.

[9]S , Fiorucis ,.Activité biologique de composés de la famille des flavonoides : Approche par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire , se de doctorat de l'université Nice 2006.èTh

[12] R, Milcent , (2003) . chimie organique hétérocyclique , EDG. Sciences , France.

[13]p, Prokch , Rodriguez , E (1985) . Biologie, 15,75.

[14] Keli , S.O.Hertog , M.G.L.Feskens , E.J.M. and Krombout , D.(1996) , Br , J. Nutr ,1033.

[15] Hertog , M.G.L. , Fekens , E.J.M , Hollman , P.C.H.Katan , M.B.and krombout , D , (1993) , lancet , 342 ,1007.

[16]H, El Hazemi., (1995) , Natural product ,149-190.

[18] A, Berthillier , la chromatographie et ses applications , DUNOD ,PARIS 1972, p42-67, p 152-187.

[19] J.Barbry , K.R.Makham et M.B.Thoma , « The Systematic identification of flavonoides » 1970, Ed. Springer- Verlag ,Newyork ,p9-14.

[20] Bahri Hanaa , Zouzou Saliha (2010-2011)
Evaluation biologique des extraits issus des plantes Ferula Vesceritensis et Deverra Scoparia ,Mémoire DES ,université de ouragla ,p11.

[21] Bekhechi chahra zed , ABDELOUAHID , « Les huiles essentielles » (2009-2010) , office , Puplications universitaire.

[22] Mohamed Amine Ferhat,Brahim youcef Meklati , Farid chemat ,
s d'extraction « (2010) , é« CitrusD'algerie les huiles essentielles et leurs proced Office des Puplications universitaire,p40.

[28] Sen ck , packer L. antioxidant and redox regulation of gene transcription faseb J 10 (7) pp709-720 (1996).

[29] Khder H,Falah M. Aziz ,the effect of sustanon (testosterone derivatives) taken by athletes on the testis rat , Jordan Journal of Biological Sciences 5(2) pp 113-119 (2012).

[32] Paloma Filliat ,les plantes de la famille des Apiacéae dans les troubles digestif ,these de doctorat de l'université JOSEPH FOURIER , 2012.

[33] A , chehma , « Catalogue des planes Spotanées du Shara Sep tenrional algérien » , (Juin 2006) , les presses de Dar El Houda Ain M'lila.
[34] K.oughlissi-Dehak et al /phytochemistry 69 (2008) 1933-1938.
[35] Flore et Végétation du Sahara , Apul Ozenda 3 é édition PARIS.1991 , 2004.
[36] Othmane Benchabane et al ./ Jeob p 15(5) 2012.774-781.
[37] Zellagui et al . organic and Medicinal chemistry letter 2012.
[38] Dehak-Oughlissi karima , Etude phytochimique de quelques plantes médicinales sahariennes cas de Ferula Vesceritensis , thèse de doctorat , USTHB , Alger, 2012.
[39]A, Bicman.K , Ramieri, R.L.T , G.H.N , Lan, J, (1960), J.Chomat, 189-187.
[40] H.Wagner, S. Bladt ; plant DrugAnalysis, a thin layer Chromatographie Atlas 2ème édition, Mannich 1996.
[41]E,D, Bouchouka. A, Bekkouche ,2012, Antibacterial and antioxidant , activites of three endemic plants from Algerien Sahara.Acta Sci.pol , Technol.Aliment, 1(11),61-65.

الملخـــــص

هذه الدراسة ترتكز على الجزء الهوائي لنبات" *Ferula vesceritensis* "(العائلة الخيمية) المقطوفة من منطقة أولاد جلال حيث استخلصت مختلف منتجات الأيض الثانوي كالزيوت الأساسية الناتجة عن طريق التقطير المائي بمردود قدر ب0.32%.و المركبات الفينولية حيث تم الحصول على مستخلص ثنائي كلوروميثان, كما قمنا بمعايرة الفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات حيث أن المستخلص الميثانولي غني بالفينولات (62.33 µg E AG/mg للمستخلص)،حيث أن نتائج التحليل عن طريق CCM للمستخلصات تسمح بفصل الفلافونويدات والكشف عن سكر الأبيجينين والحمض الفينولي , بالإضافة إلى تقدير فاعلية مضادات الأكسدة عن طريق إختبارين مختلفين حيث حققت على بعض المستخلصات وعلى الزيت الأساسي المتحصل عليه في إختبارDPPH حيث قدرت قيمة IC_{50} للزيت الأساسي ب 25.463% وللمستخلص الميثانولي ب 2.088mg/ml .

الكلمات الدالة: *Ferula vesceritensis*, مستخلصات فينولية , زيت أساسي , معايرة الفينولات, معايرة الفلافونيدات, CCM, فاعلية مضادات الأكسدة, DPPH.

Résumé

Cette étude a été consacrée aux parties aériennes de l'espèce *Ferula vesceritensis* (Apiaceae) provenant de la région de Ouled Djellal. Diverses extractions de métabolites secondaires ont été réalisées. L'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation avec un rendent de 0.32 %. Des extraits phénoliques et l'extrait au dichlorométhane sont également préparés. Le dosage des polyphénols et des flavonoides a été réalisé pour les extraits phénoliques. L'extrait au méthanol a montré la plus importante teneur en polyphénols (62.33 µg E AG/mg d'extrait). Les résultats de l'analyse par CCM des extraits ont permis de proposer les classes des flavonoides et d'identifier un glycoside de l'apigénine et un acide phénolique présents dans ces extraits. Par ailleurs, une évaluation de l'activité antioxydante par deux tests différents a été réalisée pour quelques extraits et pour l'huile essentielle obtenus. Dans le cas du test du DPPH, la valeur de l'IC_{50} calculée pour l'huile essentielle était de 25.463 % (v/v) et celle de l'extrait méthanolique était de 2.088 mg/mL.

Mots clé: *Ferula vesceritensi*, extraits phénoliques, huile essentielle, dosage des polyphénols, dosage des flavonoides, CCM, activité antioxydante; DPPH.

Abstract

This study is based on the aerial parts of the species *Ferula vesceritensis* (Apiaceae) taking from the area of Ouled Djellal. Various extractions of secondary metabolites were carried out. Essential oil is obtained by hydrodistillation with yiel of 0.32 %. Phenolic extracts and dichloromethane extract were prepared. The total phenolic compounds and total flavonoid cotent were mesured for phenolic extracts. Results obtained revealed that MeOH extract was found to have the highest content of total phenolic (62.33 µg E GA/mg of extract). Results of TLC had allowed to propose some flavonoids classes and to identify a glycoside of apigenin and one phenolic acid in these extracts. In addition, an evaluation of the antioxydant activity by two different tests was carried out for some extracts and for the essential oil. In the case of the DPPH test, the value of the IC_{50} calculated for essential oil was 25.463 % (v/v) and the IC_{50} of methanolic extract was 2.088 mg/mL.

Key words: *Ferula vesceritensi*, phenolic extracts, essential oil, total phenolic compounds, flavonoids content, TLC, antioxydant activity; DPPH.