بيولوجيا

النشاطيّة المضادّة للأكسدة لمستخلصين ميثانوليين لنبات *Alkanna tinctoria* L.

ثريا قماز، لخميسي عرعار، عبد الرحمان بغياني
مخبر البيوكيمياء التّطبيقيّة: كليّة علوم الطّبيعة والحياة
جامعة فرحات عباس سطيف.

تاريخ الارسال: 04جانفي 2021 / تاريخ القبول: 16 جوان 2021

الملخّص (Abstract)

تهدف هذه الدّراسة إلى تقدير محتوى مستخلصين ميثانوليين، لنبات حماير العلك *Alkanna tinctoria* من عديدات الفينول والفلافونويدات وتقييم النّشاطيّة المضادّة للأكسدة لهذين المستخلصين. تجدر الإشارة إلى أن نبات*Alkanna tinctoria* .L محدود الاستعمال في الطّب الشّعبي الجزائري. حضر مستخلصان ميثانوليان؛ الأول للجزء الهوائي (AP) والآخر للجذور (R). بين تقدير محتوى المستخلصين من عديدات الفينول والفلافونويدات، احتواء المستخلص (R) على أعلى محتوى من عديدات الفينول (264.018 مغ مكافئ حمض الغاليك/ غرام من المستخلص) ومن الفلافونويدات (7.247 مغ مكافئ quercetin /غرام من المستخلص). قيمت النّشاطيّة المضادّة للأكسدة باختبار إزاحة DPPH واختبار القدرة الإرجاعيّة واختبار تثبيط أكسدة β- كاروتين. أبدى المستخلص (AP) أعلى نشاطيّة إزاحيّة لجذر DPPH (IC_{50} = 0.048 ± 0.0012 مغ/مل). تميز المستخلص (R) بنشاطيّة إرجاع عالية (EC_{50} = 0.022 ± 0.001 مغ/مل) إلا أنها أقل من نشاطيّة BHT (EC_{50} = 0.017 ± 0.0002 مغ/مل). كما أبدى المستخلص (R) في اختبار β- كاروتين، نشاطيّة جيدة في تثبيط الأكسدة (88.8 %) لكنه أقل فعاليّة مقارنة بـ BHT (98.16 %). تؤكد هذه النّتائج، الخصائص العلاجيّة التي تتميّز بها نبتة *A. tinctoria* والتي يجب استكمالها بهدف استعمالها على مستوى العلاج السريري.

الكلمات الدّالة (Keywords): *Alkanna* L. *tinctoria* ، عديدات الفينول ، الفلافونويدات النّشاطيّة المضادّة للأكسدة.

Abstract

The aim of this study is to estimate the content of two methanolic extracts of *Alkanna tinctoria* L., of polyphenols and flavonoids, and to evaluate the antioxidant activity of these extracts. It should be noted that the use of *Alkanna tinctoria* L. in Algerian folk medicine is limited.. Two methanolic extracts were prepared, one for the aerial part (AP) and the other for the roots (R). The determination of the content of the extracts of polyphenols and flavonoids, indicate that the extract (R) contained the highest content of polyphenols (264.018 mg gallic acid equivalent / g of extract) and of flavonoids (7.247 mg equivalent of quercetin / g of extract). The antioxidant activity was assessed by the DPPH scavenging test, peroxidation inhibition assay using β-carotene and the reducing power test. The extract (AP) exhibited the highest DPPH root scavenging activity (IC_{50} = 0.048 ± 0.0012 mg / mL). In the β-carotene test, the extract (R) showed significant activity in inhibiting oxidation (88.734%), but was less effective compared to BHT (98.16%). The extract (R) was characterized by a high reducing activity (EC_{50} = 0.022 ± 0.001 mg / ml) which was lower than that for BHT activity (EC_{50} = 0.017 ± 0.0002 mg / ml). These results confirm the therapeutic properties of *A. tinctoria* that must be explored for possible use in human therapy.

Key words: *Alkanna tinctoria* L. , polyphenols, flavonoids, antioxidant activity

1. المدخل (Introduction)

تتميّز النّباتات الطّبيّة بمجموعة متنوّعة من الأنشطة البيولوجيّة والدّوائيّة. إنها خزان لمجموعة واسعة من المستقلبات الثانويّة؛ بما في ذلك القلويات والفلافونويدات والدّبغ والتّربينويدات (Zerargui وآخرون، 2015). تتدخل هذه المستقلبات الثانويّة في وظائف مختلفة في النّباتات، ولها أنشطة بيولوجيّة مختلفة، لاسيما القدرة المضادّة للأكسدة وخاصة ضد الأكسدة النّاجمة عن الأنواع الأكسجينيّة؛ السبب المباشر لأمراض مختلفة مثل الشّيخوخة والسرطان (Ou وآخرون، 2019).

من بين هذه النّباتات، *Alkanna tinctoria* L. المعروفة باللغة العربيّة باسم عود حواء وبالفرنسيّة باسم Orchanet، (Elsharkawy وآخرون، 2013) وتعرف ،محليا،عند بعض سكان منطقة سطيف بحماير العلك. *Alkanna* هو جنس من النّباتات العشبيّة التي تضم حوالي 50 نوعًا من عائلة Boraginacea (Salimikia وآخرون 2015).

A. tinctoria عشبة معمرة يبلغ ارتفاعها حوالي 40 سم. السيقان كثيفة وخضراء رماديّة وناعمة ذات شعيرات طويلة. الأوراق مستطيلة الشّكل ورمحيّة وناعمة، بينما الأزهار ذات لون أزرق فاتح. جذورها محاطة بلحاء بلون بني محمر داكن (Darshan وDoreswamy، 2004 ؛ Wichtl، 2004).

أستعملت هذه النّبتة منذ عصور قديمة، إذ أن الطّبيب اليوناني أبقراط ذكر أنه يمكن استعمال جذور *A. tinctoria* لعلاج الأمراض الجلديّة المختلفة (Papageorgiou وآخرون، 2008). تستخدم الجذور

على نطاق واسع ضد اليرقان وحصى الكلى ولها تأثير مضادّ للجراثيم وقابض. كما تستخدم في علاج القرحة المعديّة والالتّهابات والحروق (Yousefi وآخرون، 2009؛ Khan وآخرون، 2015). من جانب آخر، يتم استخدام لحاء جذر *A. tinctoria* في مستحضرات التّجميل مثل صبغة الشّعر ذات اللون الأحمر (Barve وDighe، 2016)، وكذلك في الصناعات الغذائيّة والمكملات الغذائيّة كملون طبيعي (Chaitanya Lakshmi، 2014).

يحتوي لحاء جذر *A. tinctoria* على خليط من أصباغ حمراء قابلة للذوبان في الدّهون، والتي تتمثل أساسًا في 5,8-dihydroxy-1,4-naphtoquinone مثل alkannin وshikonin ومشتقات أخرى (Papageorgiou وآخرون، 2008؛ Assimopoulou وآخرون، 2009).

تستخدم نبتة .A tinctoria في أوروبا خصوصا اليونان وباكستان وغرب آسيا كالصين وبعض البلدان المطلة على البحر الأبيض المتوسط (Salimikia وآخرون، 2015)، إلا أنها عندنا في الجزائر، تقريبا غير معروفة كنبتة ذات خصائص علاجيّة.

حسب المعلومات المتوفرة لدينا، تركزت الدّراسات حول جذور هذه النّبتة، أما الجزء الخضري فالمعلومات حول خصائصه العلاجيّة قليلة جدا، تهدف هذه الدّراسة إلى تحضير مستخلصين ميثانوليين للجزء الخضري والجذور كل على حدة ثم المقارنة بين هذين المستخلصين من حيث المحتوى من عديدات الفينول والفلافونويدات. ثم دراسة نشاطيتهما المضادّة باستعمال ثلاثة اختبارات : النّشاط الإزاحي لجذر DPPH وتثبيط فوق أكسدة الحمض لينولييك والقدرة الإرجاعيّة.

2. الموادّ والطّرائق (Materials and methods)

2. 1. النّبتة

جنيت نبتة *Alkanna tinctoria* من منطقة واد بوسلام ولايّة سطيف. تم التّعرف عليها من قبل الأستاذ بشير أوجحيح من جامعة الحاج لخضر باتنة. غسلت النّبتة جيدا ثم فصل الجزء الهوائي للنبتة عن الجذور ثم قطع كلا الجزءين إلى قطع صغيرة وترك ليجف كليا في درجة حرارة الغرفة وفي الظل، طحن بعدها للحصول على مسحوق يحفظ بعيدا عن الضوء إلى حين استعماله.

2.2. تحضير المستخلصين الميثانوليين لنبتة Alkanna tinctoria

حضر المستخلص الميثانولي لكلا الجزءين من النّبتة؛ الجزء الهوائي والجذور حسب طريقة Abdelouhab وآخرون (2019). تم نقع مسحوق كلا الجزءين للنبتة على حدة في الميثانول النّقي بنسبة 1/ 10 (وزن / حجم)، لمدة أسبوع في درجة حرارة المخبر، كررت العمليّة مرتين. تم ترشيح المستخلص وتبخير الميثانول باستعمال جهاز التّبخير، حفظ المستخلص المتحصل عليه إلى حين الاستعمال.

2.3. تقدير المركبات الفينوليّة والفلافونويديّة للمستخلصين الميثانوليين لنبتة *Alkanna tinctoria*

2. 3. 1. تقدير عديدات الفينول الكليّة

تم تقدير عديدات الفينول الكليّة بطريقة Folin-Ciocalteau (Bentaher وآخرون، 2016). يتكون كاشف Folin-Ciocalteau من حمض الفوسفوموليبديك وحمض الفوسفوتنغستيك تحدث عمليّة الأكسدة بين الكاشف والمجاميع الفينوليّة في وسط قاعدي ويؤدي ذلك إلى ظهور لون أزرق تقاس شدته بجهاز التّحليل الطّيفي. يتم وضع 100 ميكرولتر من كلا المستخلصين في أنبوب الاختبار ،يضاف لها 500 ميكرولتر من Folin-Ciocalteau (مخفف 10 مرات). بعد 4 دقائق من الحضن، يضاف 400 ميكرولتر من كربونات الصوديوم Na_2CO_3 (7.5 %). بعد مرور ساعة ونصف من الحضن في الظلام في درجة حرارة المخبر، تقاس امتصاصيّة الخليط في طول موجة 765 نانومتر. يحدد تركيز عديدات الفينول عن طريق منحنى عياري ويعبر عن تركيز عديدات الفينول بمكافئ الملغرام من الحمض غاليك/ غرام من وزن المستخلص .

2. 3. 2. تقدير الفلافونويدات

تم تقدير محتوى المستخلص للفلافونيدات بطريقة كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ (Boussoualim وآخرون، 2015). تتكون رابطة قويّة بين $AlCl_3$ وجذر OH للفلافونويدات ينتج عنها مركب أصفر عالي الامتصاصيّة عند طول موجة 430 نانومتر. عمليا، يضاف 500 مل من المستخلصين إلى 500 مل من $AlCl_3$ مذاب في الميثانول بتركيز 2 %. ترج الأنابيب وتحضن 10 دقائق في درجة حرارة المخبر، تقاس بعدها الامتصاصيّة في طول موجة 430 نانومتر. يحدد تركيز الفلافونويدات عن طريق من منحنى عياري ويعبر عن تركيز الفلافونويدات بمكافئ الملغرام من الكرستين/ غرام من وزن المستخلص الجاف.

2. 4. دراسة النّشاطيّة المضادّة للأكسدة للمستخلصين الميثانوليين لنبتة Alkanna tinctoria

2. 4. 1. إختبار إزاحة جذور DPPH

تم اختبار التّأثير الإزاحي للمستخلصين لجذر 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) حسب Belkhiri وآخرون (2017). يعتمد هذا الاختبار على استعمال جذر DPPH ذي اللون البنفسجي الدّاكن والذي يتحول إلى اللون الأصفر عند إزاحته (إرجاعه) بواسطة المركبات المضادّة للأكسدة، مما يؤدي إلى انخفاض الامتصاصيّة عند طول موجة 517نانومتر. تحضن 50 ميكرولتر من عدة تراكيز من المستخلص مع 1250 ميكرولتر من محلول PPH الميثانولي بتركيز 0.004 % . بعد 30 دقيقة من الحضن في الظلام تقاس الامتصاصيّة عند طول موجة 517 نانومتر.أستعمل BHT كمضادّ أكسدة مرجعي وتم حساب نسبة إزاحة جذر DPPH كما يلي:

$$I\% = [(A_C - As) / A_C] \times 100$$

A_C : امتصاصيّة محلول DPPH؛

A_s : الامتصاصيّة في وجود المستخلص؛

تم التّعبير عن النّتائج بالتّركيز المزيح لـ 50 % من جذر DPPH (IC_{50}).

2. 4. 2. إختبار القدرة الارجاعيّة

يعتبر إرجاع Fe^{3+} كاشفا لنشاطيّة منح الالكترونات والتي تمثل آليّة مهمة في النّشاط المضادّ للأكسدة للمركبات الفينوليّة. تم قياس القدرة الإرجاعيّة للمستخلصين باستعمال طريقة Bencheikh وآخرون (2016) . يمزج 0.2 مل من المستخلص بتراكيز مختلفة مع نفس الحجم من المحلول المنظم (0.2مولر، pH = 6.6) و0.2 مل من K_3FeCN_6 بعد الحضن لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة 50°م لإرجاع ferricyanide إلى ferrocyanide، يضاف 0.2 مل من حمض Trichloroacetic (1%) لإيقاف التّفاعل، ثم تجري عمليّة طرد مركزي بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 10دقائق. يؤخذ 0.4 من الجزء الطّافي ويضاف له 0.4 مل من الماء المقطر و0.08 مل من $FeCl_3$(0.1%)، تقرأ الامتصاصيّة عند طول موجة 700نانومتر لتقدير كميّة ferrocyanide ferric المتشكل.

2. 4. 3. إختبـــار β-carotene/ حمـــض اللينولييك

تم تقدير النّشاطيّة المضادّة للأكسدة للمستخلصين بواسطة اختبار β-carotene/حمض اللينولييك (Bouaziz وآخرون 2015). ينتج عن أكسدة حمض اللينولييك جذور البيروكسيل تؤدي هذه الجذور الحرة إلى أكسدة β-carotene مما يؤدي إلى تغير اللون من الأحمر إلى الأصفر تقاس شدة اللون بجهاز التّحليل الطّيفي عند طول موجة 490 نانومتر. تقوم مضادّات الأكسدة بإزاحة الجذور الحرة النّاتجة عن أكسدة حمض اللينولييك، يؤدي إلى حمايّة β- carotene (Kartal وآخرون، 2007). يذاب 0.5 مغ من β- carotene في 1 مل من الكلوروفورم فيضاف له 25ميكرولتر من حمض اللينولييك و 200مغ من ween 40 يمزج هذا الخليط جيدا ثم يتم تبخير الكلوروفورم في جهاز التّبخير في 40°م، تضاف 100مل من الماء المقطر المشبع بالأكسجين .يمزج 2.5مل من المستحلب مع 350 ميكرولتر من المستخلص الميثانولي 2 مغ/مل تكرر العمليّة مع BHT كشاهد موجب والميثانول كشاهد سالب. يحضن المزيج في الظلام وتقرأ الامتصاصيّة عند طول موجة 490 نانومتر وذلك خلال الأزمنة 0 سا و 1سا و 2سا و3سا و 4سا و 6سا و 12سا و 24 سا و 48سا .تحسب النّشاطيّة المضادّة للأكسدة للمستخلصين عند 24 ساعة حسب العلاقة التّاليّة:

$$AA\% = A_s / As_0 \times 100$$

As_0 : الامتصاصيّة في وجود المستخلص في الزمن 0 ساعة؛

As: الامتصاصيّة في وجود المستخلص.

2. 5. التّحليل الإحصائي

يعبر عن كل القيم المحصل عليها بالمتوسط الحسابي (M) ± الانحراف المعياري (SD). عموما حللت النّتائج إحصائيا عن طريق اختبار ANOVA one-way متبوعا باختبار Tukey. استعمل برنامج

Graphpad Prism v.5.0 في رسم المنحنيات والتّحليلات الإحصائيّة.

3. النّتائج والمناقشة (Results and Discussion**)**

3. 1. استخلاص وتقدير المركبات الفينوليّة والفلافونويديّة للمستخلصين الميثانوليين لنبتة *Alkanna tinctoria*

تم الاستخلاص باستعمال الميثانول النّقي 98 %، يسمح هذا باستخلاص عديدات الفينول والفلافونويدات وللزيادة في مردود الاستخلاص دامت عمليّة النّقع 7 أيام ثم تُكرَّر عمليّة الاستخلاص مرتين أخريين. تميز مستخلص الجزء الهوائي (AP) بلون أخضر وبقوام لزج، في حين تميز مستخلص الجذور (R) بلون أحمر وبشكل مسحوق. قدر مردود الاستخلاص للجزء الهوائي وللجذور بـ 7 % و8.28 % على التّرتيب.

عموما، يعتمد مردود الاستخلاص على طبيعة المادة النّباتيّة وأصلها ومحتواها من الرطوبة وحجم جزيئات أنسجة النّبات وطول فترة الاستخلاص ونسبة المذيب / العينة (نسبة العينة إلى محلول الاستخلاص) والمذيب المستخدم للاستخلاص؛ يسمح الميثانول باستخلاص أكبر عدد ممكن من المركبات Tiwari وآخرون (2011).

تم تطبيق طريقة Folin-Ciocalteau لتقدير عديدات الفينول الكليّة باستعمال حمض الغاليك لتحديد المنحنى العياري، تتميّز هذه الطّريقة بسهولتها وفعاليتها. تم التّعبير عن المحتوى الفينولي في المستخلص بعدد الملغرامات المكافئة من حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص أظهرت النّتائج أن مستخلص الجزء الهوائي يحتوي على94.11 ± 31.88 مغ مكافئ حمض الغاليك/غ بالمقارنة مع مستخلص الجذور الذي يحتوي على 234.83 ± 72.22 مغ مكافئ حمض الغاليك/غ، نلاحظ أن كميّة عديدات الفينول في الجذور أكبر منها في الجزء الهوائي.

تم تطبيق طريقة $AlCl_3$ لتقدير الفلافونيدات باستعمال quercetin لتحديد المنحنى العياري يتم قياس كميّة هذا المعقد لونيا وكلما كانت كميّة المعقد أكبر كلما كانت الامتصاصيّة في 430 نانومتر أعلى. يعبر عن النّتائج بعدد ميليغرامات المكافئة لـ quercetin لكل غ من المستخلص، أظهرت النّتائج أن مستخلص الجزء الهوائي يحتوي على 6.61 ± 2.45 مغ مكافئ quercetin/ غ من المستخلص وبمقارنته مع مستخلص الجذور الذي يحتوي على 7.4 ± 1.75 مغ مكافئ quercetin / غ من المستخلص، نلاحظ أنه لا يوجد اختلاف في المحتوى من الفلافونويدات (الجدول).

الجدول : مردود مستخلص الجزء الهوائي والجذور لنبتة *Alkanna tinctoria* ومحتواهما من عديدات الفينول والفلافونويدات.

المستخلص	المردود %	عديدات الفينول الكليّة (مكافئ مغ حمض الغاليك / غ من المستخلص)	الفلافونويدات (مكافئ مع quercetin / غ من المستخلص)
AP	7	31.88 ± 94.11	2.45 ±6.61
R	8.28	40.6 ± 264.83	0.208 ± 7.4

AP : الجزء الهوائي

R : الجذور

حسب Ozer وآخرون (2010)، يحتوي المستخلص الميثانولي لجذور *Alkanna tinctoria* على عديدات الفينول بمعدل 58.56 ± 0.46 مغ مكافئ حمض الغاليك / غ من المستخلص وعلى الفلافونويدات بقيمة 24.81 ± 0.36 مكافئ quercetin / غ من المستخلص.

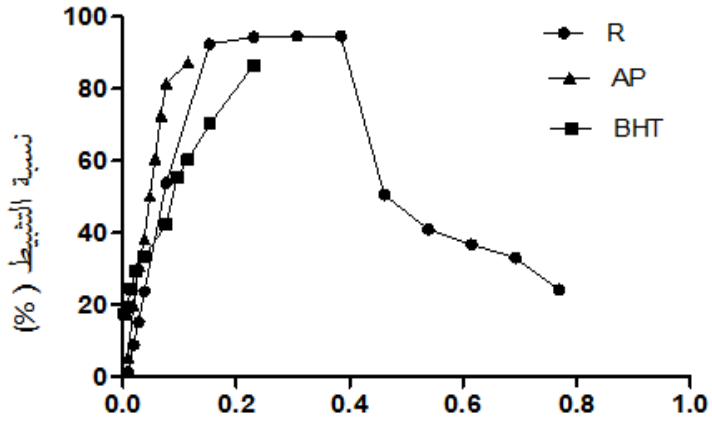
يختلف محتوى عديدات الفينول والفلافونويدات من حيث النّوعيّة والكميّة من نبات إلى آخر. يمكن أن يعزى ذلك إلى عدة عوامل: العوامل المناخيّة والبيئيّة والمادة الوراثيّة وفترة الحصاد، ومرحلة تطور النّبات وطريقة الاستخلاص، كما يمكن أن تؤثر طريقة القياس الكمي أيضًا (Ebrahimi وآخرون، 2008).

يمكن أن يرتفع محتوى بعض المركبات الفينوليّة بما في ذلك الفلافونويدات، أيضًا في ظل الظروف المجهدة التي تسببها الأشعة فوق البنفسجيّة والالتهابات بالميكروبات والطّفيليات المسببة للأمراض ، والإصابات ، وتلوث الهواء وكذلك التّعرض لدرجات حرارة عاليّة. (Treutter، 2006).

3. 2. دراسة النّشاطيّة المضادّة للأكسدة لمستخلصي نبتة *Alkanna tinctoria*

3. 2. 1. إختبار التّأثير الإزاحي لجذور DPPH

تم تقدير التّأثير الإزاحي للمستخلص عن طريق اختبار DPPH الذي يعتبر من أكثر الاختبارات استعمالا وفعاليّة في تحديد التّأثير المضادّ للأكسدة للمركبات الفينوليّة والمستخلصات النّباتيّة حيث أن درجة التّغير من اللون البنفسجي إلى اللون الأصفر يرتبط بالتّراكيز المختلفة للعينات، تقاس الامتصاصيّة في طول موجة 517 نانومتر، حيث تتناقص الامتصاصيّة كلما ارتفع تركيز المستخلص. أظهرت النّتائج أن المستخلصين لهما القدرة على إزاحة جذر DPPH بشكل يتناسب طرديا مع تركيزهما (شكل 1).

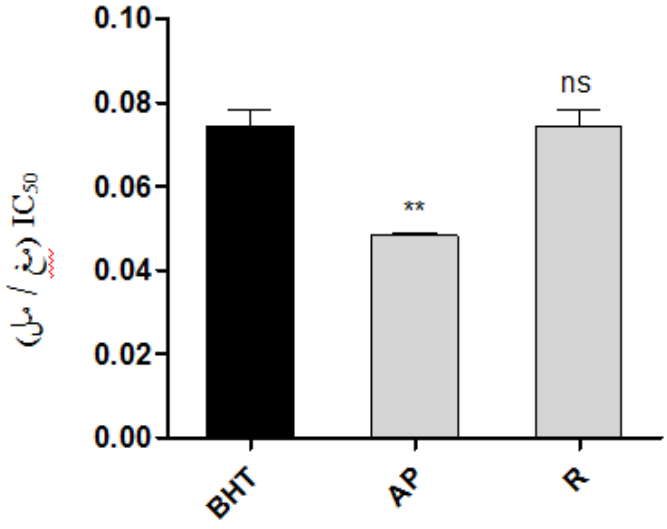


الشّكل 1 : نسبة تثبيط جذور DPPH بمستخلصي نبتة *Alkanna tinctoria* بدلالة التّركيز.

R : الجذور ؛ AP: الجزء الهوائي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n=3).

أبدى مستخلص الجذور تأثيرا مؤيدا للأكسدة (pro-oxydant)، ابتداء من التّركيز 0.4 مغ / مل. لوحظت هذه الظاهرة مع مضادّات أكسدة أخرى؛ مثل الفيتامين C وذلك عند اختباره بتراكيز عاليّة (Rahal وآخرون، 2014).

تم حساب IC_{50} للمستخلصين وهو التّركيز الموافق لتثبيط 50 % من جذر DPPH وأدنى قيمة له تعكس أحسن فعل إزاحي للمركبات. يبين الشّكل 2 قيم IC_{50} لكلا المستخلصين وBHT.



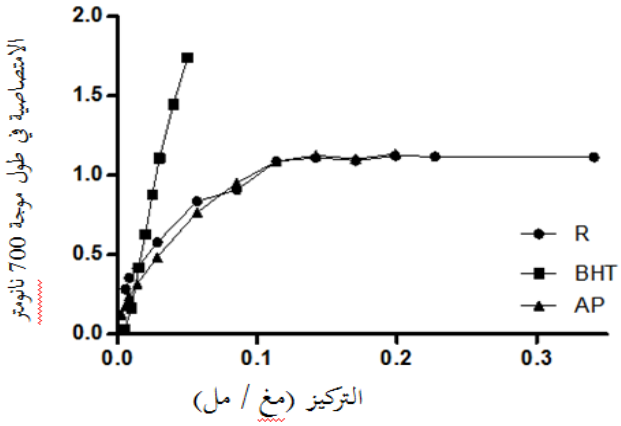
الشّكل 2 : قيم IC_{50} لمستخلصي نبتة *Alkanna tinctoria* بدلالة التّركيز. R : الجذور ؛ AP: الجزء الهوائي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري (n=3). ($p < 0.001$).

أظهر مستخلص الجزء الهوائي ومستخلص الجذور قدرة على إزاحة جذر DPPH بقيمة IC_{50} = 0.048 ± 0.0012 مغ/مل وبقيمة IC_{50} = 0.074 ± 0.006 مغ/مل على التّرتيب.

تظهر مقارنة هاتين القيمتين مع BHT (IC_{50} = 0.087 ± 0.001 مغ/مل)، أنه لا يوجد فرق معنوي في حالة مستخلص الجذور. وأن مستخلص الجزء الهوائي يتميز بفعاليّة أكبر من تلك لـ BHT. قد يعود التّأثير الإزاحي المرتفع لمستخلصي *Alkanna tinctoria* إلى غناهما بالمركبات الفينوليّة والفلافونويدات.

3. 2. 2. إختبار القدرة الارجاعيّة

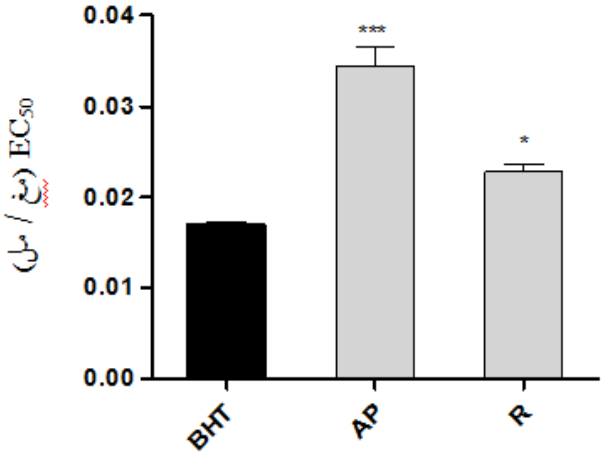
تعكس الخاصيّة الإرجاعيّة قدرة المركبات الفعالة على منح الالكترونات والتي تعتبر من الآليات المضادّة للأكسدة. تتفاعل المستخلصات التي تملك قدرة على الإرجاع مع فريسيانيد البوتاسيوم (Fe^{3+}) لتشكيل فيروسيانيد البوتاسيوم (Fe^{2+})، يتفاعل هذا الأخير مع كلورور الحديد لإعطاء مركب يمتص في طول موجة 700 نانومتر. من خلال هذه التّجربة يتحول اللون الأصفر للمركبات المدروسة إلى اللون الأزرق المخضر بدرجات متفاوتة حسب درجة الإرجاع للمواد المضادّة للأكسدة (Belkhiri وآخرون 2017). يبين الشّكل 3 أن المستخلصين لهما قدرة على إرجاع Fe^{3+} إلى Fe^{2+}، يعبر عنها بالزيادة في الامتصاصيّة عند طول موجة 700 نانومتر وذلك بزيادة التّركيز.



الشّكل 3 : القدرة الإرجاعيّة لمستخلصي نبتة *Alkanna tinctoria* بدلالة التّركيز. R : الجذور ؛ AP: الجزء الهوائي. القيم عبارة عن المتوسط الحسابي (n= 3).

تم حساب التّركيز الفعال (EC_{50}: effective concentration) الذي يوافق قيمة الامتصاصيّة 0.5، وكلما كانت قيمة EC_{50} أقل دلت على قدرة إرجاعيّة للمستخلص أكبر.

كلا المستخلصين يُرجعان Fe^{3+} إلى Fe^{2+} (شكل 3) لكن بنسب متفاوتة. يبين الشّكل 4 قيم EC_{50} لكل من مستخلص الجزء الهوائي (EC_{50} = 0.034 ± 0.004 مغ/مل) ومستخلص الجذور (EC_{50} = 0.022 ± 0.001 مغ/مل) و BHT (EC_{50} = 0.0170 ± 0.0003 مغ/مل).



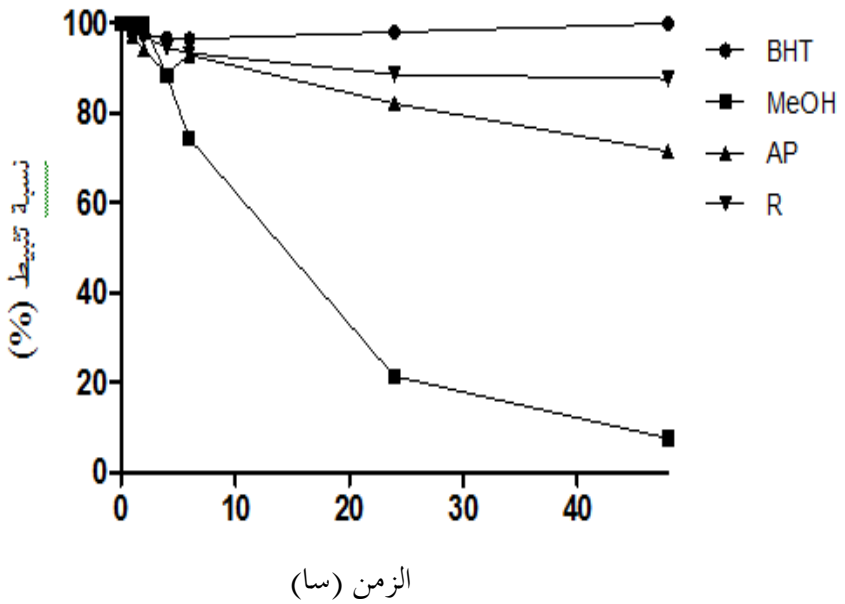
الشّكل 4: القدرة الإرجاعيّة لمستخلصي *Alkanna tinctoria*. R : الجذور ؛ AP: الجزء الهوائي (القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري، n=3) ($p < 0.001$).

عند المقارنة بين قيم التّراكيز الفعالة للمستخلصين وBHT ؛ تبين أن الفرق بين مستخلص الجذور وBHT معنوي (* ، $p < 0.001$). تعكس القدرة الإرجاعيّة إمكانيّة منح الالكترونات وبالتّالي القدرة على إبطال مفعول الجذور الحرة. قد تعود القدرة الإرجاعيّة للمستخلص إلى وجود المركبات الفينوليّة (Djidel وآخرون، 2013).

تجدر الإشارة إلى كون المستخلصات الحاويّة على مركبات قطبيّة (مثل المستخلصات المحضرة بالماء أو الميثانول) تُظهر نشاطًا مضادّات للأكسدة معتبرا. نظرًا لخصائصه غير القطبيّة، يتميز الزيت الأساسي لجذور *Alkanna tinctoria* بنشاط مضادّ للأكسدة ضعيف (Ozer وآخرون، 2010).

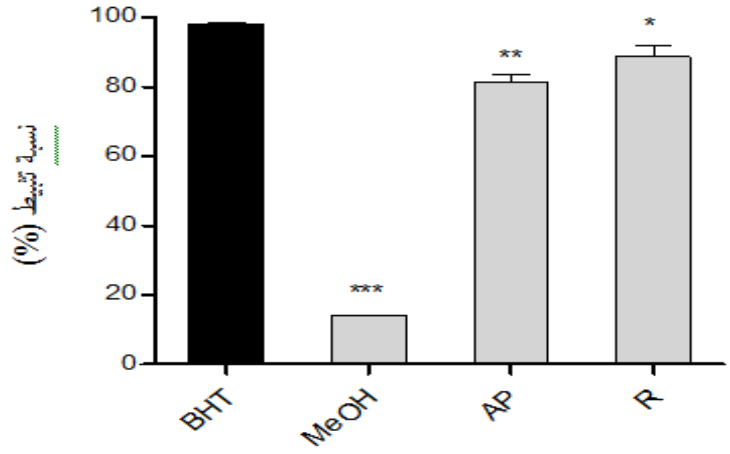
3. 2. 3. إختبار β-Carotène/ حمض لينولييك

خلال عمليّة الأكسدة تفقد مجموعة الميثيلان لحمض اللينولييك ذرة هيدروجين (Baghiani وآخرون، 1998) ، تقوم الجذور المتشكلة بمهاجمة الروابط المزدوجة لـ β-carotene لاستعادة استقرارها مؤديّة بذلك إلى فقدان اللون البرتقالي الذي تتميّز به الكاروتنويدات بصفة عامة وبذلك زوال لونها وانخاض امتصاصيتها عند طول موجة 490 نانومتر. تبين نتائج حركيّة التّثبيط (شكل 5) قدرة المستخلصين على تثبيط أكسدة β-carotene لكن بنسب مختلفة خلال 48 ساعة.



الشّكل 5: قدرة مستخلص *Alkanna tinctoria* على تثبيط اكسدة β-carotene بدلالة الزمن. R : الجذور ؛ AP: الجزء الهوائي. (القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري n=3).

يبين الشّكل 6 نسب النّشاطيّة المضادّة للأكسدة بالنّسبة لاختبار β-carotene/ حمض اللينولييك لكل من مستخلص الجزء الهوائي للنبتة ومستخلص الجذور وBHT.



الشّكل 6 : نسب التّثبيط لمستخلصي *Alkanna tinctoria* عند 24 ساعة باستعمال طريقة β-carotene/حمض اللينولييك. R : الجذور ؛ AP: الجزء الهوائي ؛ MeOH : شاهد سالب. (القيم عبارة عن المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري، n=3) ($p < 0.001$).

من خلال مقارنة نسب تثبيط المستخلص مع BHT الذي يعتبر من أقوى مضادّات الأكسدة المنتجة صناعيا بعد مرور 24 ساعة (الشّكل 6) حيث قدرت نشاطيّة BHT بـ 98.15% . في حين أظهر مستخلص الجزء الهوائي نشاطيّة مضادّة للأكسدة قدرت بـ 82.22 % ، أما مستخلص الجذور فقد تميز بنشاطيّة مضادّة للأكسدة قدرت بـ 88.73 %. من خلال النّتائج المتحصل عليها في اختبار β-carotene/ حمض اللينولييك، يتضح أن هناك علاقة طرديّة بين محتوى المستخلص من المركبات الفينوليّة والفلافونويدات والنّشاطيّة التّثبيطيّة لأكسدة β-carotene. يمكن تفسير النّشاطيّة المضادّة للأكسدة الكبيرة للمستخلصين لاحتوائهما على المركبات الأكثر قطبيّة حيث تملك قدرة عاليّة على التّثبيط وقد يعود ذلك إلى أن هذا المستخلص يجمع بين عدد كبير من المركبات المحبة والكارهة للماء لها نشاطيّة مضادّة للأكسدة بشكل تعاوني (Kyselova وIvanova ، 2006) .

وفقًا لـ Haddadi (2005)، يبدو أن هناك عدة عوامل تتدخل في تثبيط أكسدة حمض اللينوليك، وهي طبيعة مضادّات الأكسدة القابلة للذوبان في الدّهون أو القابلة للذوبان في الماء وتراكيزها. إن قابليّة ذوبان الفلافونويدات وتوزيعها بين طورين في وسط دهني- مائي تؤثر على حمايّة الدّهون (Burda وOleszek، 2001).

خلاصة (Conclusion)

وفقا لنتائج هذه الدّراسة، أبدى المستخلصان الميثانوليان لـ *Alkanna tinctoria* نشاطا مضادّا للأكسدة معتبرا. تميز مستخلص الجزء الهوائي بأعلى نشاطيّة إزاحيّة لجذر DPPH، في حين أظهر مستخلص الجذور قدرة إرجاع عاليّة ونشاطيّة معتبرة في تثبيط أكسدة اللبيدات. قد تعود هذه النّشاطيات إلى محتوى المستخلصين من عديدات الفينول والفلافونويدات.

المراجع (References)

Abdelouhab, K., Aouachria, S., Guemmaz, T., Charef, N., Baghiani, A., Louaileche, H., and Arrar, L. (2019). Comparative study of the polyphenol content related-antioxidant and anti-inflammatory activities of methanolic extracts from different parts of *Hertia cheirifolia*.. Intern J Pharmac Res., 11 (4) : 209-215.

Assimopoulou, A. N., Sturm, S., Stuppner, H., Papageorgiou, V. P. (2009). Preperative isolation and purification of alkannin/shikonin derivatives from natural products by high-speed counter chromatography, Biomed. Chromatogr., 23(2) : 182-198.

Baghiani A., Boumerfeg S., Adjadj M., Ameni J., Djermouni M., Khelifi-Touhami F., Charef N., Khennouf S. and Arrar L. (2011). Antioxidants, free radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of *Ajuga iva* L. extracts. Free Radic Antioxid. J. 1(4) : 21—30.

Barve, K., Dighe, A. (2016). Hair Colours/Dyes, The chemistry and application of sustainable natural hair products, Springer, United States, pp. 45-50.

Belkhiri F., Baghiani A., Zerroug M.M. Arrar L.(2017). Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibitory, antioxdant and antimicrobial properties of *Salvia verbenacal L.* Aerial part extracts. Afr J Tradit Complment Altern Med., 14(2) : 273-281.

Bencheikh D., Khennouf S., Bouaziz A., Baghiani A., Dahamna S., Amira S., Arrar L. (2016). Antioxidant and antidiabetic activities of the methanolic extract of *Olea europaea L.* leaves in streptozotocin induced diabetes in rats. Intern J Pharmacogn Phytochemic Res; 8(8); 1347-1357.

Bentaher A, Khennouf S, Bouaziz A, Baghiani A, Dahamna S, Amira S, Arrar L. (2016). Polyphenols Content and Antioxidant Activities of Selected Algerian Plants Used for Gastro-duodenal Ulcers. Der Pharma Chemica. 8 : 88-99.

Bouaziz A., khennouf S., Abu zarga M., Abdalla S., Baghiani A., and Charef N. (2015) Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. Asian Pac J Trop Biomed; 5(1): 19-28.

Boussoualim N., Baghiani A., Krache I., Trabsa H., Kenouf S. and Arrar L. (2015). Inhibitory effects of *Anchusa azurea* extracts on xanthine oxidase activity and its hypouricemic effects on mice. Intern J Pharm Pharmac Sc., 7(8) : 195-199.

Burda S and Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J Agric Food Chem., 49: 2774-2779.

Chaitanya Lakshmi, G. (2014). Food coloring : the natural way, Res. J. Chem. Sci., 4 : 87-96.

Darshan, S. and Dorewamy, R. (2004). Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. Phytother. Res., 18(5) : 343-357.

Djidel S., Khennouf S., Ameni D., Baghiani A., Arrar L., and Charef N. (2013). Antioxidant proprieties of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. Pharmacognosy Communications, 3(2) : 28-34.

Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli A., et Yousefadi, M. (2008). Essential oil composition and antimibacterial activity of Thymus caramanicus at different phonological stages. *Food chemistry,* 110(4), 927-931.

Elsharkawy E, Elshathely M, Abdeljaleel G, Ibrahim Al-johar H. (2013). Anti-inflammatory effects of medicinal plants mixture used by Bedouin people in Saudi Arabia. Herba Pol. 59 (3): 76-87.

Haddadi H. (2005). Détermination de l'activité antioxydante de quelques fruits. Mémoire de magister Université de Béjaïa, p76.

Khan UA., H Rahman H., Qasim M., Hussain A., Azizllah A., Murad W, Khan Z., Anees M. and Adnan M. (2015). *Alkanna tinctoria* leaves extracts: a prospective remedy against multidrug resistant human pathogenic bacteria. BMC Complem Altern. Med., 15(127):1-6.

Kyselova Y. and Ivanova D. (2006). Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. Phytother Res., 20 : 961-965.

Ou J, Wang M, Zheng J, and Ou, S. (2019). Positive and negative effects of polyphenol incorporation in baked foods. Food chem., 284: 90-99.

Ozer MS, Sarikurkcu C, Tepe B, and Can S. (2010). Essential Oil Composition and Antioxidant Activities of Alkanet (Alkanna tinctoria subsp. tinctoria). Food Sci. Biotechnol., 19(5): 1177-1183.

Papageorgiou, V., Assimopoulou, A., Ballis, A. (2008). Alkannins and shikonins : a new class of wound healing agents. Curr. Med. Chem., 15(30) : 3248-3267.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, and Dhama K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. BioMed Res Int., 19.

Salimikia I, Yazdinezhad AR, Golfakhrabadi F, Esfahani HRM. (2015). *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of four *Alkanna* species growing in Iran. Pharmacog. Res. 7 (1): 100-104

Tiwari P, Kumar B, Kaur M , Kaur G , and Kaur H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. Intern Pharmac Sc, 1: 98-106.

Treutter, D. (2006). Importance des flavonoïdes dans la résistance des plantes: une revue. Lettres de chimie environnementale , 4 (3) : 147.

Wichtl, M. (2004). Herbal drugs and phytopharmaceuticals : a handbook for practice on a scientific basis, CRC press, United States.

Yousefi R, Ghaffarifar F, Dalimiasl A. (2009). The Effect of *Alkanna tincturia* and *Peganum harmala* extracts on Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) *in vitro*. Iran J Parasitol., 4 (1): 40-47.

Zerargui F, Boumerfeg S, Charef N, Baghiani A, Djarmouni M, Khennouf S, Arrar L, Musa H. Abu Zarga, Mohammad SM. (2015). Antioxidant Potentials and Xanthine Oxidase Inhibitory Effect of Two Furanocoumarins Isolated from *Tamus communis* L. Med. Chem. 11:506-513.