

تقدير المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب للمستخلص الإيثانولي

لثمار العنب الأحمر *Vitis vinifera* L.

أ. بوعزيز أمال، بن الطاهر أسيا، جیدل صلیحة، بن جدیة نسیمه، سايح سمیرة، خنوف الصديق.

المخبر العلاجي الطبيعي المطبق على الأمراض المزمنة، كلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة فرحات

عباس سطيف 1، سطيف، الجزائر

تاريخ القبول: 18 جانفي 2022

تاريخ الإرسال: 13 ديسمبر 2021

إزاحة جذري (DPPH و ABTS) واختبار استخلاص الحديد واختبار بيتا كاروتين/حمض اللينوليك. يملك المستخلص تأثيرا إزاحيا لجذري (DPPH و ABTS) حيث قيمة $IC_{50} = 0.02 \pm 0.65$ ملغ/مل و 0.009 ± 0.17 ملغ/مل على التوالي، في حين قدر استخلاص الحديد للمستخلص بـ $IC_{50} = 0.08 \pm 3.56$ ملغ/مل، أما فيما يتعلق باختبار بيتا كاروتين /حمض اللينوليك فقدرت النشاطية المضادة للأكسدة بـ 0.16 ± 31.80 % وكانت النشاطية المضادة للالتهاب مخبريا بتثبيط تخريب البروتين متوسطا عند التركيزين 1 و 0.125 ملغ/مل فقد قدرت نسبة التثبيط بـ 42.63 % و 44.26 % على التوالي مقارنة مع الشاهد الأسبرين (97%).

الكلمات المفتاحية: *Vitis*

vinifera، عديدات الفينول، ، النشاطية

المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للالتهاب.

المخلص ABSTRACT: تهدف هذه الدراسة إلى تقدير المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب للمستخلص الإيثانولي لثمار العنب الأحمر من نوع (*Vitis vinifera*)، حيث قدرت النسبة المئوية لمردود الاستخلاص بـ 15.13 %، في حين قدر المحتوى الفينولي بـ 0.22 ± 75.78 ملغ مكافئ لحمض الغاليك/غ من الوزن الجاف للمستخلص، كما أظهرت النتائج أنّ مستخلص العنب يحتوي على الفلافونويدات والديباغ بقيمة قدرت بـ 0.04 ± 0.29 ملغ مكافئ للكرستين/غ من الوزن الجاف للمستخلص و 1.03 ± 53.65 ملغ مكافئ لحمض التانيك/غ من الوزن الجاف للمستخلص على التوالي. تم قياس النشاطية المضادة للأكسدة باستعمال أربعة اختبارات وهي: اختبار

Abstract: The aim of this study was to evaluate the phenolic content and the antioxidant and the antiinflammatory activities of ethanolic extract of red grapes (*Vitis vinifera*). The extraction yield was 15.13%, while the phenolic content was 75.78 ± 0.22 mg gallic acid equivalent / g dry weight of extract. The obtained results about flavonoïds and tannins contents showed that the extract contained 0.29 ± 0.04 mg quercetin equivalent /g dry weight of extract and 53.65 ± 1.03 mg tannic acid equivalent /g dry weight of extract, respectively. The antioxidant activity was evaluated using four tests: DPPH and ABTS radical scavenging activities, iron chelating activity, and β -carotene bleaching test. The scavenger effect of the grapes extract against the two

radicals DPPH and ABTS showed IC_{50} values of 0.65 ± 0.02 mg/ml and 0.17 ± 0.009 mg/ml respectively. While the iron chelating effect of the extract was estimated at 3.56 ± 0.08 mg/ml. Concerning the inhibition of lipid peroxidation, the β -carotene/ linoleic acid test indicated that the inhibition percentage was $31.80 \pm 0.16\%$. The *in vitro* anti-inflammatory activity was evaluated using the inhibition of proteins denaturation revealed a moderate inhibition at 0.125 and 1mg /ml concentrations with values of 42.63% and 44.26% successively compared to the aspirin (97%).

Key words: *Vitis vinifera*, Polyphenols, Antioxidant activity, Antiinflammatory activity.

المدخل Introduction:

ترتبط الوظائف الفيزيولوجية للجسم بتفاعلات الأكسدة والإرجاع التي تؤدي إلى إنتاج الأنواع الأكسجينية والتيتروجينية النشطة ومضادات الأكسدة الطبيعية. ففي حالة التوازن بين هاتين الأخيرتين يصبح كل منهما مفيدا للوظيفة الخلوية وكذا الاستجابة المناعية ولكن في حالة عدم الاتزان بينهما يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي وأضرار خلوية عديدة وتأثيرها الأساسي الذي يكمن في احتوائها على الفينولات خاصة الفلافونويدات التي تلعب دورا كبيرا في علاج الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي بالإضافة إلى تغيير وظيفة مجموعة كبيرة من الأنظمة الخلوية (Valco وآخرون 2007). ولذلك ازداد الاهتمام بدراسة النباتات الطبية والمواد الغذائية ذات الأصل النباتي منها الفواكه والخضروات ذات الاستعمال اليومي الواسع في مجال البحوث الصيدلانية، لسهولة الحصول عليها وكلفتها المنخفضة وخصائصها العلاجية المتعددة باعتبارها كثيرة الاستعمال في مختلف المجتمعات، ولكونها أيضا أكثر أمانا وفعالية مقارنة بالعقاقير المصنعة.

ولذلك ارتأينا في هذه الدراسة تقدير المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة للأكسدة والنشاطية المضادة للالتهاب للمستخلص الإيثانولي للعنب الأحمر (*Vitis vinifera*) والتي تعتبر من الفواكه الغنية بالمرکبات الفينولية مما جعلها مهمة في علاج العديد من الأمراض كالتهابات، الأمراض العصبية وبعض الأمراض

والتي تمس الليبيدات والبروتينات و(ADN) والسكريات مسببة بذلك العديد من الأمراض كالسرطان والسكري والربو والشيخوخة المبكرة وأمراض القلب والأوعية الدموية والتهابات (Ozen وآخرون، 2009; Tusevski وآخرون 2014).

داخلية أم خارجية المنشأ إنزيمية أو غير إنزيمية، خاصة مضادات الأكسدة الطبيعية التي شهدت اهتماما كبيرا في الآونة الأخيرة المرتبطة بالإجهاد التأكسدي لذلك قمنا بدراسة المستخلص الإيثانولي للعنب الأحمر بتقدير كمية عديدات الفينول والفلافونويدات والدباغ، و النشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب له.

المواد والطرائق Materials and methods العيينة النباتية

تم شراء ثمار العنب الأحمر (*Vitis vinifera*) (L. من محل تجاري بولاية سطيف شمال شرق الجزائر في شهر نوفمبر 2018، حيث تم التعرف عليها من قبل الأستاذة وفاء نويوة بكلية علوم الطبيعة والحياة، جامعة سطيف 1، تم تنظيف ثمار العنب وغسلها بالماء المقطر ثم طحنها بواسطة خلاط كهربائي.

طريقة تحضير المستخلص الإيثانولي:

باتباع طريقة (Markham، 1982) يتم إضافة 1 كغ من الثمار المطحونة إلى 5 لتر من المحلول الإيثانولي المائي (20/80: حجم/حجم) لاستخلاص المركبات الفينولية، ثم يحضن المستخلص لمدة 5 أيام في الظلام مع الرج كل 24 ساعة في درجة حرارة المختبر. يرشح الخليط

المنقوع بواسطة ورق الترشيح ثم تبخر الرشاحة المتحصّل عليها بجهاز التبخير الدوراني (Rotavapor) بدرجة حرارة 45° ثم تجفف للحصول على المستخلص الإيثانولي التقدير الكمي لعديدات الفينول الكلية

تم تقدير عديدات الفينول الكلية في هذا المستخلص بواسطة كاشف Follin (Ciocalteu Reagent) حسب طريقة Li وآخرون (2007). وتتلخّص الطريقة فيما يلي: يمزج 100 ميكرو لتر من المستخلص المذاب في الماء المقطر مع 500 ميكرو لتر من كاشف (Follin Ciocalteu) (مخفف 10 مرات) ثم ترجّ الأنابيب تحضن في درجة حرارة المختبر لمدة 4 دقائق بعدها يضاف 400 ميكرو لتر من كربونات الصوديوم (7.5%) وترجّ الأنابيب وتحضن لمدة 90 دقيقة، ثم تقاس امتصاصية المحلول الناتج في طول الموجة 765 نانومتر بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي ويكون الامتصاص مرتبطاً بكمية عديدات الفينول المتواجدة في كل تركيز. يعبر عن النتائج بالمليغرام مكافئ لحمض الغاليك لكل غرام من وزن المستخلص الجاف.

التقدير الكمي للفلافونويدات

تم تحديد كمية الفلافونويدات بطريقة التفاعل مع كلوريد الألومنيوم (Bahorum وآخرون، 1996). يضاف 0.5 مل من محلول $AlCl_3$ بتركيز 2% المذاب في الميثانول النقي إلى 0.5 مل من المستخلص المذاب في الماء المقطر، ترجّ الأنابيب ثم تحضن لمدة 10 دقائق في الظلام وتقرأ الامتصاصية عند طول الموجة 430 نانو متر وتكون الامتصاصية مرتبطة

بكمية الفلافونويدات المتواجدة في كل تركيز. ويعبر عن النتائج بالمليغرام مكافئ للكرستين لكل غرام من الوزن المستخلص.

التقدير الكمي للدّباغ

تم تقدير كمية الدّباغ الموجودة في المستخلص بالاعتماد على خاصية ترسيب الهيموغلوبين الذي يتميز به الدّباغ (Charzouli وآخرون، 1999). توضع 500 ميكرو لتر من المستخلص في أنابيب الاختبار ثم تضاف إليها 500 ميكرو لتر من الدّم المخفف (امتصاصيته تساوي 1.6) وترجّ الأنابيب ثم تحضن لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة المختبر، بعد ذلك يتم إجراء عملية الطرد المركزي لمدة 10 دقائق (4000 دورة / دقيقة)، يتم قراءة امتصاصية الجزء الطافي عند طول الموجة 576 نانو متر ويتم التعبير عن النتائج بالمليغرام مكافئ لحمض التانيك لكل غرام من وزن المستخلص.

دراسة النشاطية المضادة للأكسدة لثمار

العنب الأحمر

التأثير الإزاحي لجذر DPPH

تم تقدير التأثير الإزاحي لجذر DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) حسب (Hanato) وآخرين (1998) وتتلخص الطريقة في إضافة 500 ميكرو لتر من محلول (DPPH) الميثانولي إلى 250 ميكرو لتر من المستخلص وترجّ الأنابيب بشكل خفيف، وتحضن في الظلام في درجة حرارة المختبر لمدة 30 دقيقة ثم تقاس الامتصاصية على طول الموجة 517 نانومتر مقارنة مع الشاهد BHT (Butylated hydroxytoluene) الذي يحتوي

على جميع مواد التفاعل ما عدا المستخلص.
ويتم حساب نسبة تثبيط نشاط جذر (DPPH)
(1%) بواسطة مستخلص (Vitis)
vinifera باستعمال العلاقة التالية:

$$I\% = \frac{A - A_{\text{الشاهد}}}{A_{\text{الشاهد}}} \times 100$$

حيث: I%: نسبة إزاحة الجذر الحر
A والشاهد: امتصاصية الشاهد الذي يحتوي
على جميع المتفاعلات ما عدا المادة المختبرة
A والعينة: امتصاصية العينة في وجود المادة
المختبرة.

وتقاس القدرة المضادة للأكسدة بتحديد
معامل C₅₀ وهو نسبة تركيز المستخلص
المسؤول عن تثبيط 50% من جذر (DPPH)
والذي يحسب من خلال منحنى نسب التثبيط
I% بدلالة تراكيز المستخلص ويعبر عنها
بالميكروغرام /مل وتُقارن النتائج المتحصل عليها
بالمعيار العياري لـ (BHT) والقيم الأقل من
C₅₀ تمثل التأثير الإزاحي الأكبر للمستخلص
المعيار.

اختبار إزاحة جذر ABTS

تم استعمال اختبار (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic)ABTS
الذي يعتبر أيضا من أكثر الطرق استعمالا
لتحديد التأثير الإزاحي للمستخلصات النباتية
وقد تم اتباع طريقة (Re وآخرون، 1999). يتم
أولا تحضير جذر ABTS بمزج محلول Potassium
(7ميلي مول /لتر) ومحلول persulfate (2.45 ميلي مول / لتر)، يحضن
المحلول المحضر في مكان مظلم في درجة حرارة

المخبر على الأقل لمدة 16 ساعة. ثم يخفف هذا
المحلول بالميثانول للحصول على امتصاصية
بقيمة 0.7 عند طول الموجة 734 نانومتر.
تضاف 1 مل من المحلول الميثانولي لـ ABTS إلى
50 ميكرو لتر من مختلف تراكيز المستخلص
ويستعمل BHT كمعيار للمقارنة، بعد الحضانة
في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام لمدة 30،
تقاس الامتصاصية في طول الموجة 734 نانومتر
مقارنة مع الشاهد الذي يحتوي على كل مواد
التفاعل ما عدا المستخلص، تحسب نسبة
تثبيط الجذر الحر ABTS (I%) بنفس
طريقة DPPH.

اختبار استخلاص الحديد

تقاس قدرة المستخلصات على استخلاص
الحديد بمتابعة تثبيط تشكيل المعقد -Fe²⁺
Ferrosine بعد حضانة المستخلصات مع
الحديد ثنائي التكافؤ حسب طريقة Decker و
Welch (1990). يضاف إلى 250 ميكرو لتر من
التراكيز المختلفة للمستخلص 50 ميكرو لتر من
FeCl₂ (0.6 ميلي مولار) و 450 ميكرو لتر
ميثانول وبعد رج الخليط وتركه في درجة حرارة
المختبر لمدة 5 دقائق، تضاف 50 ميكرو لتر من
Ferrosine (5 ميلي مولار) إلى وسط التفاعل،
ثم يرج ثانية ويترك لفترة حضانة 10
دقائق في درجة حرارة المخبر، يسمح هذا
التفاعل بتكوين المركب Ferrosine-Fe²⁺ ذي
اللون الأحمر والذي يمتص في طول الموجة 562
نانومتر. تمت مقارنة النتائج باستعمال EDTA
كشاهد.

اختبار بيتا كاروتين/حمض اللينوليك:

قدرت النشأطية المضادة للأكسدة في هذا الاختبار بقياس نسبة تثبيط تشكل جذر البيروكسيد والمواد العضوية الطيارة الناتجة عن أكسدة حمض اللينوليك. باستعمال طريقة Dapkevicius وآخرون (1998). تمت إذابة 0.5 ميلي غرام من بيتا كاروتين في 1 ميليلتر من الكلوروفورم ثم تضاف 25 ميكرو لتر من حمض اللينوليك و 200 ميلي غرام من Tween 40 وترج وتم تبخير الكلوروفورم كلياً في درجة حرارة 40° باستعمال جهاز التبخير الدوراني ثم تضاف 100 مل الماء المقطر المشبع بالأكسجين إلى الخليط مع الرج جيداً. في الأخير يوضع 2500 ميكرو لتر من الخليط المحضر سابقاً لبيتا كاروتين في أنابيب الاختبار المحتوية سابقاً على 350 ميكرو لتر من المستخلص المحضر بتركيز 2 مغ /مل أو من BHT كشاهد موجب ومع مذيئات المستخلصات النباتية كشواهد سالبة (ماء مقطر + الميثانول). يحضن المزيج في درجة حرارة المختبر وفي الظلام ثم تقرأ امتصاصية المحاليل عند طول الموجة 490 نانو متر وذلك خلال الأزمنة 0 ساعة، 1 ساعة، ساعتين، 4 ساعات، 6 ساعة، 24 ساعة. تقارن النشأطية المضادة للأكسدة لمستخلص ثمار العنب الأحمر مع BHT والشواهد السالبة، ويتم حساب هذه النشأطية حسب العلاقة التالية:

$$AA\% = 100 \times \frac{A_{\text{الشاهد}}}{A_{\text{العينة}}}$$

حيث: AA: النشأطية المضادة للأكسدة و A العينة: امتصاصية العينة و A الشاهد: امتصاصية الشاهد

دراسة النشأطية المضادة للالتهابات: تمت دراسة النشأطية المضادة للالتهاب للمستخلص الإيثانولي لثمار العنب الأحمر *Vitis vinifera* باستخدام تقنية تثبيط تخريب البروتين مخبرياً التي تمت دراستها وفقاً لـ Akkouche وآخرون (2012) مع بعض التعديلات. بعد غسل البيض الطازج وتنظيفه يتم تكسيه لفصل بياض البيض عن الصفار. يتم قياس حجم بياض البيض باستخدام أنبوب اختبار مدرج ويضاف له محلول Tris HCl (pH=6.8 والتركيز =20 ميلي مول) للحصول على محلول مخفف 1/100 ثم نقوم بالرج الخفيف للمحلول لمدة 10 دقائق وبعد ذلك بترشيحه بواسطة قماش ثم نقوم بتوزيع أحجام متساوية على الأنابيب المحتوية على المستخلص بتركيز مختلفة أو الشاهد الموجب الأسبرين ليتم حضنها لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 74°، بعد تبريد العينات يتم قياس الامتصاصية عند 650 نانو متر. تم حساب نسبة تثبيط تخريب البروتين لمستخلص العنب الأحمر كالتالي:

$$I\% = 100 \times \frac{A_{\text{الشاهد}} - A_{\text{العينة}}}{A_{\text{الشاهد}}}$$

التحليل الإحصائي

كل القيم المتحصل عليها تم التعبير عنها بالمتوسط الحسابي $(M) \pm$ الانحراف المعياري (SD). وحللت النتائج إحصائياً عن طريق اختبار Student وكذلك اختبار (One-way analyse) Anova متبوعاً باختبار Dunnet. لمقارنة قيم المستخلص مع الشواهد، اعتبر الفرق إحصائياً ذو معنى عند الدلالة 5%

أي أن معامل التحديد $P < 0.05$ ، كما استعمل برنامج Graphpad prism v.5.0 في رسم المنحنيات و التحليلات الإحصائية.

النتائج والمناقشة Results and discussion

مردود الاستخلاص

تم تحضير المستخلص من ثمار العنب الأحمر *Vitis vinifera* عن طريق مزيج من الإيثانول و الماء (20/80: حجم/حجم) للحصول على المركبات الفينولية، حيث أظهر المستخلص الإيثانولي المائي الخام مردود قدر بـ 15.13 % ويرتبط مردود الاستخلاص عموماً بطريقة وشروط الاستخلاص، قطبية المذيب، مدة الاستخلاص، التقنية المستعملة في التجفيف ودرجة الحرارة، نسبة العينة بالنسبة للمحلول، التركيب الكيميائي للنبات (Gonga وآخرون، 2014).

تقدير عديدات الفينول الكلية

تم استعمال طريقة Folin-ciocalteau لتقدير عديدات الفينول الكلية باستعمال حمض الغاليك كشاهد و التي تعتبر أفضل طريقة لتمييزها بالسهولة و الفعالية (Li وآخرون، 2007) حيث تعطي المركبات الفينولية اللون الأزرق بارتباطها مع حمض-Phosphomolybdic

phosphotungstic (Folin-ciocalteau) الذي

يتم قياس امتصاصيته في طول الموجة 765 نانومتر. يتم التعبير عن المحتوى الفينولي بعدد الميلي غرامات المكافئة لحمض الغاليك لكل غرام من الوزن الجاف للمستخلص. أظهرت النتائج غنى المستخلص الإيثانولي بعديدات

الفينول الكلية حيث قدرت بـ 0.22 ± 75.78 ملغ مكافئ لحمض الغاليك/ غ من الوزن الجاف للمستخلص. تختلف هذه النتائج عن النتائج المتحصل عليها من طرف Doshi وآخرون (2006) حيث قدرت عديدات الفينول الكلية في المستخلص الميثانولي لـ *Vitis vinefera* بـ 0.48 ± 57.66 ملغ مكافئ لحمض الغاليك/ غ من الوزن الجاف للمستخلص، أما في الدراسة التي قامت بها Zeghad وآخرون (2019) على نفس النوع فقدرت عديدات الفينول الكلية في المستخلص الميثانولي بـ 0.17 ± 23.06 ملغ مكافئ لحمض الغاليك/ غ من الوزن الجاف للمستخلص.

تقدير الفلافونويدات

تم استعمال طريقة $AlCl_3$ لتقدير الفلافونويدات وهي من أكثر الطرق انتشاراً وذلك باستعمال منحى العيارية للكرستين الذي استعمل كشاهد موجب وتعتمد هذه الطريقة على تشكل معقد فلافونويد-أيون الألمنيوم والذي يملك امتصاصية عظمى عند طول الموجة 430 نانومتر. يتم التعبير على محتوى الفلافونويدات بعدد الميلي غرامات المكافئة للكرستين لكل غرام من الوزن الجاف للمستخلص حيث بينت النتائج أن مستخلص العنب الأحمر يحتوي على كمية من الفلافونويدات قدرت بـ 0.04 ± 0.29 ملغ مكافئ للكرستين/ غ من الوزن الجاف للمستخلص. و تعتبر هذه الكمية قليلة مقارنة مع النتائج المتحصل عليها في الدراسة التي قام بها Doshi وآخرون (2006) على *Vitis vinifera* حيث قدرت كمية الفلافونويدات الموجودة في

المستخلص الميثانولي بـ 0.77 ± 3.09 ملغ مكافئ للككتشين/ غ من الوزن الجاف للمستخلص، في حين قدرت في دراسات أخرى قامت بها Djenidi وآخرون (2019) بـ 0.02 ± 0.63 ملغ مكافئ للكركستين/ غ من الوزن الجاف للمستخلص.

غالبًا ما يكون من الصعب المقارنة بين النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة ونتائج الدراسات السابقة، حيث يعود سبب هذا الاختلاف في كمية عديدات الفينول الكلية والفلافونويدات إلى نوعية المذيب، اختلاف الأصناف، الطريقة المستعملة في الاستخلاص، مرحلة نضج الثمار، وقت الجني، العوامل البيئية، الخصائص الوراثية (Sraavanthi وGangadhar وآخرون، 2015).

تقدير الدبّاغ

قدّرت كمية الدبّاغ الكلية بالاعتماد على ترسيب الهيموغلوبين ويعبّر عن النتائج بعدد الملي غرامات المكافئة لحمض التانيك لكل غرام من الوزن الجاف للمستخلص. قدرت كمية الدبّاغ بـ 1.03 ± 53.65 ملغ مكافئ لحمض التانيك/ غرام من الوزن الجاف للمستخلص. وتختلف هذه النتائج عن النتائج المتحصّل عليها في الدراسة التي قام بها Bordiga وآخرون (2011)، حيث قدرت بـ 36.0 ملغ مكافئ لحمض التانيك/ غ من الوزن الجاف، في حين قدرت في المستخلص الميثانولي بـ 0.07 ± 4.99 ميكروغرام مكافئ لحمض التانيك/ ملي غرام من الوزن الجاف للمستخلص، وذلك في دراسة قامت بها Djenidi وآخرون (2019) ويمكن أن يرجع هذا الاختلاف إلى الأسباب المذكورة

سابقا كنوعية المذيب أساسا، بالإضافة إلى العوامل البيئية (Gonga وآخرون، 2014).

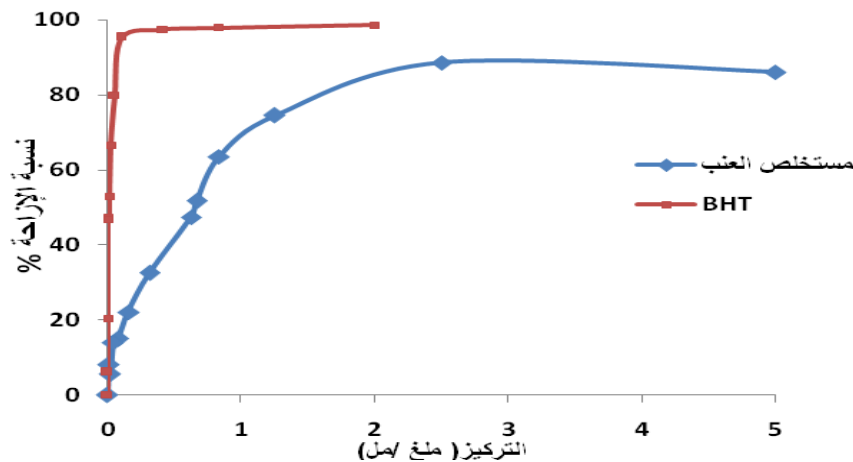
دراسة النشاطية المضادة للأكسدة مخبريًا
دراسة قدرة المستخلص على إزاحة جذر

DPPH

استعمل في هذه الطريقة DPPH كجذر حر مستقر نسبيا بهدف تقدير التأثير الإزاحي للمستخلص، وذلك ينعكس من خلال تغير اللون البنفسجي الداكن إلى اللون الأصفر عند إرجاعه بواسطة مضادات الأكسدة والتي تمنحه إلكترونات أو ذرة هيدروجين، وبذلك تعمل كمزيجات للجذور الحرة، ويترجم هذا التغير في اللون بانخفاض الامتصاصية الضوئية المرتبطة بارتفاع تركيز المستخلص والتي يتم قياسها عند طول الموجة 517 نانومتر (Saoudi وآخرون، 2020)، واستعمل في هذه الدراسة BHT كشاهد. من النتائج المتحصل عليها من اختبار DPPH والموضحة في الشكل 1 نلاحظ أن كلاً من المستخلص والشاهد لهما القدرة على إزاحة جذر DPPH بشكل يتوافق مع التركيز حيث بلغت نسبة إزاحة جذر DPPH عند التركيز 2 ملغ / مل 98.55% بالنسبة لـ BHT و 79.65% لمستخلص العنب عند نفس التركيز. كما أظهرت النتائج أن مستخلص *Vitis vinifera* له تأثير إزاحي لجذر DPPH معتدل مقارنة مع القدرة الإزاحية للشاهد حيث قدرت IC_{50} بـ 0.02 ± 0.65 ملغ/مل، وهذا راجع لغناه بالمرکبات الفينولية بينما يملك BHT نشاطية مضادة للأكسدة عالية حيث قدرت IC_{50} بـ 0.001 ± 0.01 ملغ/مل. يعود التأثير الإزاحي للمستخلص الإيثانولي

للأكسدة حيث لهذه المركبات القدرة على منح الإلكترونات أو ذرات الهيدروجين للتخلص من الجذور الحرة (Bentahar وآخرون، 2016).

للغلب لغناه بالمركبات الفينولية، حيث بينت عدة دراسات سابقة العلاقة الطردية بين المحتوى الفينولي والنشاطية المضادة



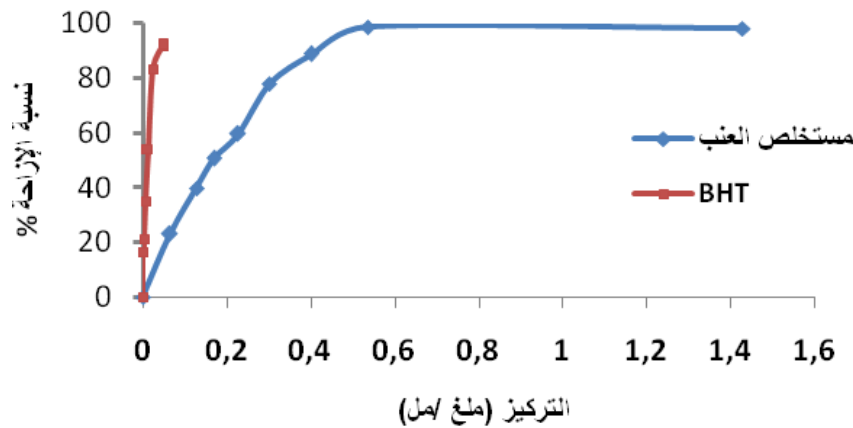
شكل 1: التأثير الإزاحي لثمار العنب الأحمر *Vitis vinifera* و BHT لجذر DPPH. كل قيمة تمثل الوسيط الحسابي لثلاثة قياسات $\pm$ الانحراف المعياري (SD $\pm$ M).

تعرف طريقة ABTS مثل طريقة DPPH باستعمالاتها الكثيرة في تقدير التأثير الإزاحي للجذور الحرة والقدرة المضادة للأكسدة لمختلف المستخلصات الطبيعية. فهو اختبار جيد لتحديد قدرة المركبات المضادة للأكسدة على منح الهيدروجين ويعتبر هذا الجذر أقل استقراراً من DPPH ويتميز ABTS باللون الأزرق المخضر وعند إضافة المركبات المراد دراسة نشاطيتها تقل شدة اللون إلى أن يختفي ويرتبط ذلك بقدرة هذه المركبات على منح الهيدروجين وعموما تستعمل هذه الطريقة بكثرة في تحديد التأثير المضاد للأكسدة للمستخلصات الطبيعية لأن جذر ABTS يمتلك امتصاصية قصوى عند طول الموجة 734 نانومتر. في حين أنّ أغلب المستخلصات لا تمتص عند طول هذه الموجة بالإضافة إلى أنّها صالحة لكل من الأنظمة المحبة للماء والدهون (Bouaziz و

أظهرت النتائج التي قامت بها Zeghad وآخرون (2019) أن القدرة الإزاحية لجذر DPPH للمستخلص الميثانولي لثمار العنب الأحمر قدرت بـ $IC_{50} = 0.001 \pm 0.27$ ملغ/مل، في حين قدرت IC_{50} للمستخلص الميثانولي للعنب في دراسة أخرى قامت بها Djenidi وآخرون (2019) بـ 0.00 ± 0.74 ملغ/مل. وهي قيمة مقارنة للقيمة المتحصل عليها في دراستنا الحالية.

دراسة قدرة المستخلص على إزاحة جذر ABTS

أسرع عند الشاهد BHT حيث قدرت نسبة إزاحة جذور ABTS بـ 91.57% بالنسبة لـ BHT عند أعلى تركيز له 0.04 ملغ / مل بينما قدرت نسبة إزاحة جذور ABTS لمستخلص العنب بـ 98.03 % عند أعلى التركيز له 1.42 ملغ / مل .



آخرون، 2015). من النتائج المتحصّل عليها ترجمت القراءات في صورة منحنى خطّي لنسبة التثبيط (1%) بدلالة تراكيز مختلفة. الشكل 2 يظهر أن كلاً من المستخلص الإيثانولي للعنب الأحمر والشاهد لهما قدرة على إزاحة جذور ABTS بشكل يتوافق مع تركيزهما لكن بنسبة

القيمة المسجلة للمستخلص الإيثانولي المستعمل في دراستنا وبالتالي المستخلص الميثانولي لـ *Vitis vinifera* يملك قدرة إزاحيّة لجذر ABTS أكبر من المستخلص الإيثانولي. ويعود سبب اختلاف نتائج قدرة المستخلص على إزاحة جذري DPPH و ABTS أساساً إلى نوعيّة المذيب، طريقة الاستخلاص والتقنيّة المستعملة، مرحلة نضج وجني الثمار، منطقة زراعة العينة، الظروف المناخية (Zeghad وآخرون، 2019).

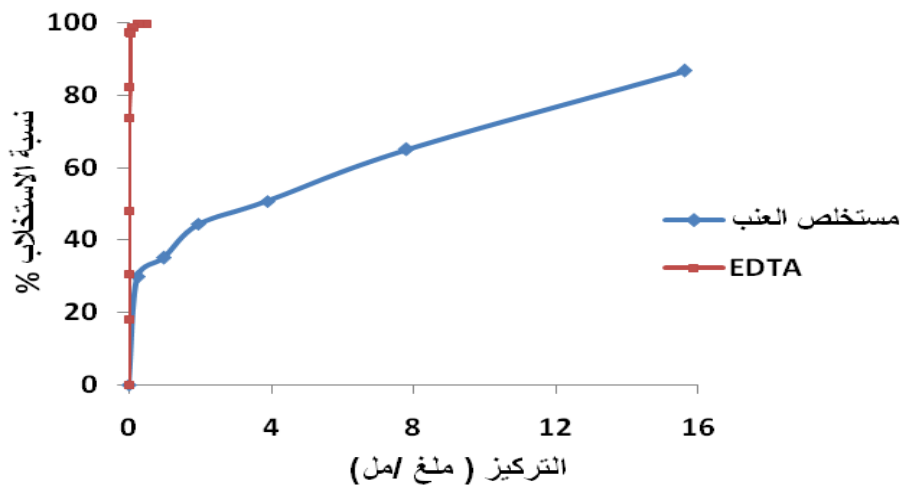
قدرة المستخلص على استخلاص الحديد

تعتبر أيونات Fe^{2+} الموجودة بشكل حرّ كعوامل فعالة في أكسدة الدهون بسبب نشاطيتها العاليّة وإنتاج الجذور الحرّة خاصة جذر الهيدروكسيل وفقاً لتفاعل Fenton بوجود بيروكسيد الهيدروجين وهذا الأخير

شكل 2: التأثير الإزاحي لثمار العنب الأحمر *Vitis vinifera* (A) و BHT (B) لجذر ABTS كل قيمة تمثّل الوسيط الحسابي لثلاثة قياسات $\pm$ الانحراف المعياري (SD $\pm$ M).

تم حساب قيم IC_{50} من المنحنيات الخطيّة لنسب التثبيط بدلالة التراكيز المختلفة حيث أظهر المستخلص الإيثانولي لـ *Vitis vinifera* قدرة إزاحيّة قدرت IC_{50} بـ 0.009 ± 0.17 ملغ/مل، وبالمقارنة مع قيمة الـ BHT تبين أن المستخلص يملك قدرة إزاحيّة أقل من الشاهد الذي قدرت قيمته الإزاحيّة بـ $IC_{50} = 0.0003 \pm 0.01$ ملغ/مل، بفارق معتبر ($P \leq 0.01$). أظهرت النتائج التي قامت بها Zeghad وآخرون (2019) على المستخلص الميثانولي لثمار *Vitis vinifera* أن له قدرة إزاحيّة لجذر ABTS قدرت بـ 0.003 ± 0.040 ملغ/مل وهذه القيمة أقل من

Fe^{2+} ممّا يؤدي إلى انخفاض في اللون الأحمر للمعقد. يسمح قياس نسبة انخفاض اللون بتقدير نشاطية استخلاص الحديد لمختلف المركبات (Rajapakse وآخرون، 2005). يتبين من خلال هذه الدراسة والموضحة في الشكل 3 أنّ مستخلص الإيثانولي لـ *Vitis vinifera* له قدرة على تثبيط تشكّل المركب Ferrozine- Fe^{2+} بشكل يتناسب طرديًا مع التركيز لكن بنسبة أقل من الشاهد الموجب EDTA.



شكل 3: استخلاص أيونات الحديد من قبل مستخلص ثمار العنب الأحمر *Vitis vinifera* و EDTA بدلالة التركيز. كل قيمة تمثل الوسيط الحسابي لثلاثة قياسات $\pm$ الانحراف المعياري (SD $\pm$ M).

كما أظهر المستخلص الإيثانولي للعنب الأحمر فعالية متوسطة في استخلاص الحديد بقيمة IC_{50} تساوي 3.56 ± 0.08 ملغ/مل والتي هي أقل من IC_{50} الشاهد EDTA والتي قدرت بـ 0.0005 ± 0.003 ملغ/مل. تتوافق هذه النتائج مع ما أوردته Djenidi وآخرون (2019) حيث وجد أنّ المستخلص الميثانولي لثمار العنب الأسود يمتلك قدرة استخلاصية تقدر بـ

اختبار بيتا كاروتين / حمض اللينوليك

يتمّ تحديد القدرة المضادة للأكسدة عن طريق اختبار بيتا كاروتين / حمض اللينوليك بقياس تثبيط المستخلصات النباتية وكذا جذور الهيدروبيروكسيد الناتجة من أكسدة

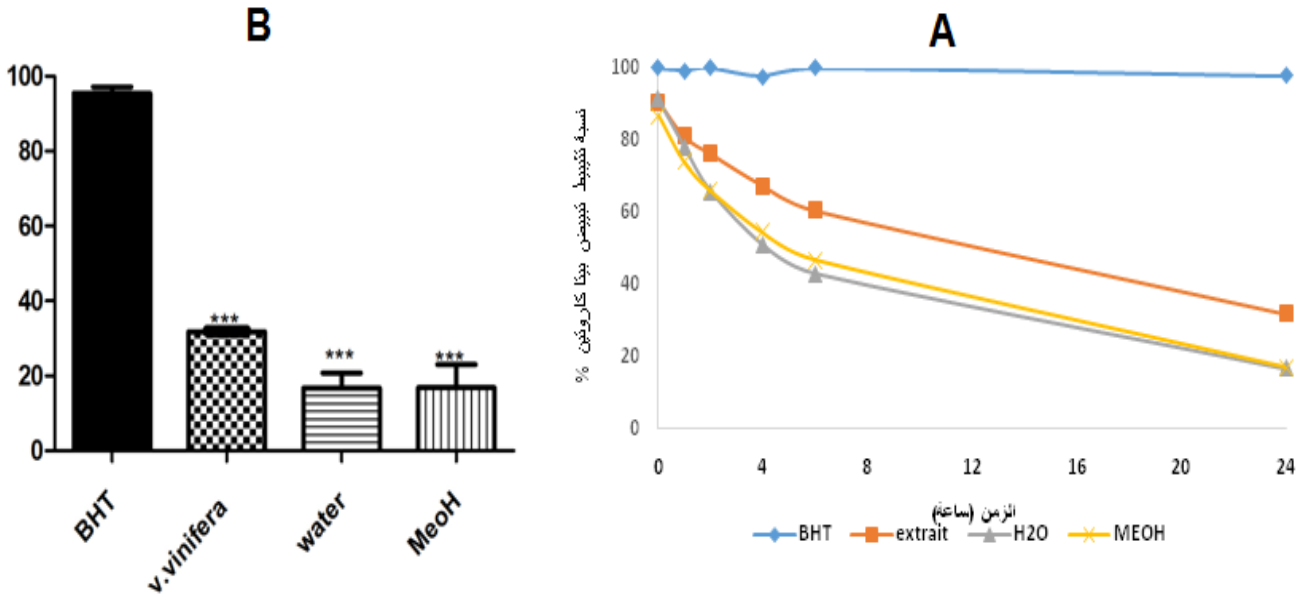
يتفكك إلى جذور Alcoxy و Peroxy ممّا يزيد من عملية فوق أكسدة الليبيدات (Wang وآخرون، 2009) لذلك فالمركبات الفعالة المزيحة لأيونات الحديد بإمكانها أن تؤمن الحماية من الأضرار التأكسدية وذلك عبر استخلاصها لهذه الأيونات. يشكل مركب الـ Ferrozine مع أيونات الحديد المرجعة (Fe^{2+}) وفي وجود عوامل أخرى ملتقطة للحديد ينقص تشكيل المعقد (Ferrozine-)

شكل 3: استخلاص أيونات الحديد من قبل مستخلص ثمار العنب الأحمر *Vitis vinifera* و EDTA بدلالة التركيز. كل قيمة تمثل الوسيط الحسابي لثلاثة قياسات $\pm$ الانحراف المعياري (SD $\pm$ M).

كما أظهر المستخلص الإيثانولي للعنب الأحمر فعالية متوسطة في استخلاص الحديد بقيمة IC_{50} تساوي 3.56 ± 0.08 ملغ/مل والتي هي أقل من IC_{50} الشاهد EDTA والتي قدرت بـ 0.0005 ± 0.003 ملغ/مل. تتوافق هذه النتائج مع ما أوردته Djenidi وآخرون (2019) حيث وجد أنّ المستخلص الميثانولي لثمار العنب الأسود يمتلك قدرة استخلاصية تقدر بـ

اختبار تبييض بيتا كاروتين. مضادات الأكسدة التي تحتوي على ذرات الهيدروجين يمكن أن تحيد الجذور الحرة المشتقة من حمض اللينوليك وبالتالي تمنع أكسدة وتبييض بيتا كاروتين (Sarikurcu وآخرون، 2015). يوضح الشكل 4 النتائج المتحصل عليها.

حمض اللينوليك وقد استخدم هذا الاختبار لقياس تثبيط أكسدة الليبيدات الغشائية بوجود المركبات المضادة للأكسدة (Mata وآخرون، 2007). تعتمد هذه الطريقة على اختفاء اللون البرتقالي، حيث أن نقل ذرة الهيدروجين تمنع أكسدة الليبيدات وهو أساس



بنسبة تقدر بـ 31.80% مقارنة مع الشاهد الموجب الذي أظهر قدرة تثبيطية عالية قدرت بـ 97.61 %، وقد يرجع ذلك إلى وجود عديدات الفينول التي تمتلك فعلاً إزاحياً اتجاه الجذور الليبيدية وتمنع أكسدتها. تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Rockenbach وآخرون (2011) حيث وجد أن المستخلص الميثانولي لصنفي *Merlot* و *Cabernet Sauvignon* يمتلكان قدرة تثبيطية بنسبة تقدر بـ 35.56% و 34.38% على التوالي.

دراسة النشاطية المضادة للالتهاب مخبرياً

تخرب البروتين هو ظاهرة يفقد من خلالها البروتين تركيبه الثلاثي الأبعاد أو الثانوي ، بعد

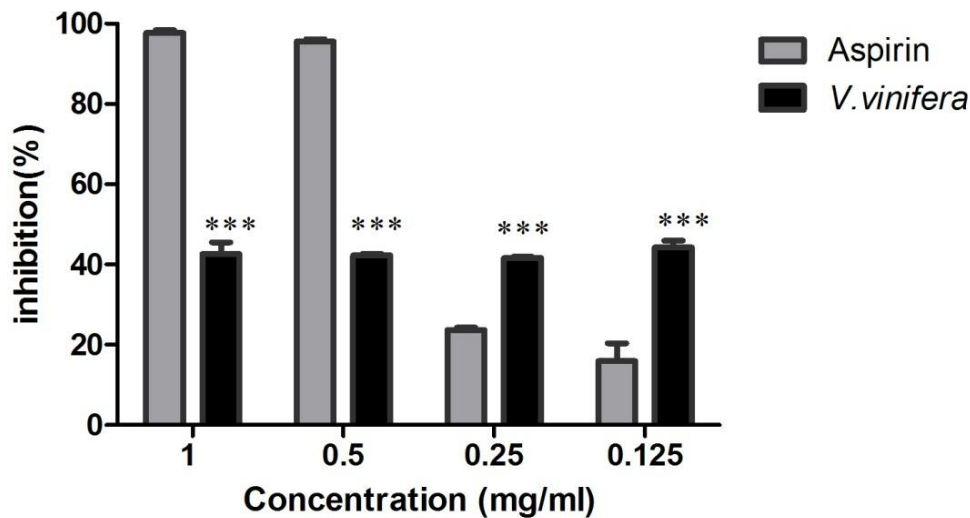
شكل 4: قدرة المستخلص الإيثانولي للعنب الأحمر على تثبيط تبييض بيتا كاروتين بدلالة الزمن مقارنة مع BHT كشاهد موجب والميثانول والماء كشواهد سالبة (A) ;نسب تثبيط المستخلصات والشواهد BHT، الميثانول، الماء لأكسدة بيتا كاروتين بعد 24 ساعة. تمثل كل قيمة الوسيط الحسابي لثلاث قياسات $\pm$ الانحراف المعياري (SD $\pm$ M)، (***) ($P \leq 0.001$).

من النتائج المتحصل عليها في شكل 4، يتضح أن المستخلص الإيثانولي لثمار *Vitis vinifera* له تأثير تثبيطي معتدل على بيتا كاروتين مقارنة مع BHT، حيث أن المستخلص الإيثانولي يملك قدرة تثبيطية لنواتج الأكسدة

تعرضه للحرارة إلى عامل معدي أو مادة كيميائية (Adrach وآخرون، 2011). وربما تنطوي آليات تمسخ البروتين على تغيير الروابط الهيدروستاتيكية، الهيدروجينية، الكارهة للماء، والروابط ثنائية الكبريت في الماء (Karthik وآخرون، 2013). يعد تخرب البروتين أحد أسباب العديد من الأمراض الالتهابية في الواقع فإن تغير طبيعة بروتينات الأنسجة هو أحد أسباب أمراض المناعة الذاتية مثل التهاب المفاصل وقد تكون سببا في إنتاج مستضدات ذاتية (Umapathy وآخرون، 2010).

أظهرت النتائج أن لمستخلص *Vitis vinifera* قدرة عالية في حماية البروتين من التخرب الحراري في تركيز 0.125 ملغ/ مل قدرت بـ

44.26% مقارنة مع الشاهد الأسبرين الذي يعتبر مضاد التهاب غير ستيرويدي مصنع والذي أظهر نسبة تثبيط تخرب البومين البيض في تركيز 0.125 ملغ/ مل أقل والتي قدرت بـ 15.93%. من خلال شكل 5 نجد أن للمستخلص الإيثانولي قدرة متوسطة على حماية تخرب البروتين عند التركيز 1 ملغ/ مل مقارنة بالأسبرين (97%) عند نفس التركيز. في حين وجدت Chandra و Srividya (2015) في دراستهما أن المستخلص الميثانولي لثمار *Vitis vinifera* له القدرة على حماية البروتين في تركيز 100 ميكروغرام/ مل والتي قدرت بـ 46% وهو ما يتوافق مع دراستنا الحالية.



شكل 5: نسبة تثبيط مستخلص *Vitis vinifera* لتخرب بروتين البومين البيض مقارنة

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن مستخلص الإيثانولي للعنب الأحمر يحتوي على نسبة عالية من المركبات الفينولية الكلية التي يمكن أن تساهم في مجال الأغذية الوظيفية، حيث قدمت هذه الدراسة أفقا لاستخدامات جديدة

مع الأسبرين. تمثل كل قيمة الوسيط الحسابي لثلاث قياسات $\pm$ الانحراف المعياري (SD $\pm$ M)، ($P \leq 0.001$ ***).

الخاتمة Conclusion

على مستخلصات العنب لإيجاد الآلية الدقيقة لخصائصه الدوائية.

المراجع References

1. Adrach VM., Ajay Kumar P , Kavitha

2. D , Aurag K B. 2011 . Anti denaturation and antioxidant activity of *Annon cherimola* in vitro. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 2 (2): 1-

3. Akkouche Z, Aissat L, Madani K.2012. Effect of Heat on Egg White Proteins. *International Conference on Applied Life Sciences*, 407-413.

4. Bahorun T, Gressier B, Troitin F, Brunet C, Dine T, Luyckx .1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, 46 : 1086-1089.

5. Bentahar 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(12):88-99.

محتملة للعنب الأحمر، ولا سيما دوره في الوقاية من الأمراض المضادة للالتهابات والأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي. ورغم هذا يبقى هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات

6. Bordiga M, Travaglia F , Locatelli M, Coisson J, Arlorio M. 2011. Characterization of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chem*, 127: 180-187.

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

8. Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek T A, Linssen JPH.1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agric*, 77: 140-146.

9. Decker EA and Welch B.1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*, 38: 674-677.

10. Djenidi H, Khennouf S, Bouaziz A. 2020 Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Progress in Nutrition*, 22: (1): 224-235.
11. Doshi P, Adsule P, Banerjee k. 2006. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chornyi (Sharad Seedless) during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(s):1-9.
12. Gharzouli K, Khennouf S, Amira S, Gharzouli A. 1999. Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytother Res*, 13: 42-45.
13. Gonga H, Liu W, Zhou X. 2014. Analysis of essential oils of *Origanum Vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Rev Bras Farmacogn*, 24:25-32.
14. Hanato T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. 1998. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2090–2097.
15. Karthik K, Bharath R P, Venu Priya, R, Sunil Kumar K, Ranjith Singh B, Rathore A. 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 2320–3471.
16. Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chem*, 102: 771-776.
17. Markham K R. Techniques of Flavonoid Identification, London Academic Press, Chap. 1 and 2, 1982, p. 113.
18. Mata Bilbao M L, Andres-Lacueva C, Jauregui O, Lamuela-Raventos R M. 2007. Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LCMS. *Food Chem*. 101:1742-1747.

19. Ozen T.2009. Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (watercress) leaf extracts. *Acta Pol Pharm* ,66:187-93.
20. Rajapakse N, Mendis E, Byun H.G and Kim S.K. 2005. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 562– 569.
21. Re R., Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med*, 26(9-10): 1231– 1237.
22. Rockenbach I I, Rodrigues E, Gonzaga L V, Caliar V, Genovese M I, Gonçalves A E, Fett R.2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chem*, 127(1): 174-179.
23. Saoudi S, Khennouf S, Mayouf N, Amira S, Dahamna S, Hosni K, Phytochemical Screening and *in vivo* and *in vitro* evaluation of antioxidant capacity of *Fargaria ananassa*, *Prunus armeniaca* and *Prunus persica* fruits growing in Algeria. *Progress in Nutrition*, 2020; 22 (1): 236-252.
24. Sarikurkcu C, Tepe B, Sefa Kocak M , Cemil Uren M.2015. Metal concentration and antioxidant activity of edible mushrooms from Turkey. *Food Chem*, 15(175):549-55.
25. Sravanthi j, Ganga dhar Rao S. Antioxidative studies in *Moringa oleifera* Lam.2015. *Annals of Phytomedicine*,3: 101-105.
26. Srividya N and Chandra M.2015.. *In vitro* anti-inflammatory activity of some common fruits of west coast of india.2015. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4 (11): 1999-2006.
27. Tusevski O, Kostovska A, Iloska A, Trajkovska L, Simic S G. 2014. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants .*Open Life Sciences*, 9 (9): 888– 900.
28. Umapathy E, Ndebia E J, Meeme A, Adam B, Menziwa P, Nkeh-

- Chungag B N, Iputo J E.2010. An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *J. Med. Plants Res*, 4:789–795.
29. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J. 2007 .Free radical and antioxidants in normal physiological function and human disease .*The international Journal of biochemistry& Cell biology*,39 (1):44-84.
30. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT D, Mazur M, Telser J. 2007 .Free radical and antioxidants in normal physiological function and human disease .*The international Journal of biochemistry& Cell biology*,39 (1) :44-84.
31. Wang T, Jonsdottir R, Olafsdottir G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from *Icelandic seaweeds*. *Food Chemistry*, 116: 240-248.
32. Zeghad N, Ahmed E, Belkhiri A, Heyden Y V, Demeyer K. 2019. Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, 5: 01575-015761