التقدير الكمي للفعالية المضاد للأكسدة لنبات القراص في مدينة حمص – سورية من خلال تحديد محتواه من الفينول والفلافونوئيد وفيتامين C

الباحث: د. شعيب الأحمد صيدلة الجامعة الوطنية الخاصة

الملخص:

ينمو نبات القراص بشكل طبيعي على ضفاف العاصي في قرى حمص وحماه ويستخدم كعلاج شعبي من قبل السكان المحليين لشفاء مجموعة متنوعة من الأمراض. الغرض من هذه الدراسة هو تقييم المحتوى الكلي من الفينول والفلافونوئيد وفيتامين C باستخدام الطريقة الطيفية مع تحديد النشاط المضاد للأكسدة للمذيبات المختلفة مثل (المائي، الإيثانول، أسيتات الإيثيل، الكلوروفورم والهكسان). تم استخدام طرق عديدة لتقدير القدرة المضادة للأكسدة باستخدام كواشف عديدة مثل (2,2–ثنائي فينيل–1–بيكريل هيدرازيل، مقايسة القدرة الارجاعية، القدرة الكلية لمضادات الأكسدة، تثبيط أكسيد النيتريك، جذر الهيدروكسيل، مقايسة حمض اللينوليك بيتا كاروتين وتخليب الحديد) وتم استخدام حمض الأسكوربيك كمادة عيارية. كشفت نتائج تحديد إجمالي محتويات الفينول والفلافونوئيد باستخدام طرق Folin-Ciocalteu وكلوريد الألومنيوم أن مستخلصات المذيبات القطبية أظهرت نسبة عالية من الفينول والفلافونوئيد في حين أن مستخلص أسيتات الإيثيل يحتوي على نسبة عالية من فيتامين C. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت النتائج أن المستخلصات لها تأثيرات

مضادة للأكسدة ملحوظة مقارنة بمضادات الأكسدة القياسية مثل حمض الأسكوربيك. كان لمستخلص الإيثانول من أوراق القراص فعالية تثبيطية للجذور الحرة أقوى من المستخلصات الأخرى. كما أظهر المستخلص المائي تأثيرًا مضادًا للأكسدة أعلى من المستخلصات الأخرى وقدرة ارجاعية أكبر ومقايسة أعلى في تثبيط أكسيد النيتريك بينما انخفض نشاط مضادات الأكسدة لحمض البيتا كاروتين/حمض اللينوليك واختبارات القدرة الكلية لمضادات الأكسدة. في المقابل، كان للهكسان غير القطبي أعلى نشاط مضاد للأكسدة في مقايسة تخليب الحديد. توضح الدراسة الحالية أن مستخلصات أوراق نبات القراص هي مصدر طبيعي حيوي لمضادات الأكسدة ويمكن استخدامها في المنتجات الغذائية بالإضافة إلى التطبيقات الغذائية.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأكسدة، إجمالي محتويات الفينول، إجمالي محتويات الفلافونوئيد، إجمالي محتويات فيتامين سي، نبات القراص.

المقدمة:

يتم إنشاء أنواع الأكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (ROS) نتيجة لاستهلاك الأكسجين الذي يحدث بشكل طبيعي أثناء نمو الخلايا. يتم إنشاؤها بشكل مستمر من خلال استخدامات الجسم المنتظمة للأكسجين، بما في ذلك التنفس وبعض وظائف المناعة الخلوية. الأكسجين النشط، الذي يمكن أن يحدث في شكل جذور حرة مثل جذر الهيدروكسيل (•OH)، وأنيون الأكسيد الفائق (O_2-) والجذور غير الحرة مثل الأكسجين المفرد ($^1O_2$) وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، جميع هذه الأنواع هي نتاج طبيعي للاستقلاب لكنها في الوقت ذاته تهاجم الجزيئات الحيوية، مما يسبب تلف الخلايا أو الأنسجة [1,2]. عندما يقوم نظام مضاد للأكسدة بالدفاع عن الجزيئات الحيوية يتعرض للتخريب بسبب عوامل خارجية مثل الإشعاعات المؤينة، والتلوث، والتدخين، والمذيبات العضوية وكذلك بقايا المبيدات الحشرية، وعوامل داخلية بما في ذلك التنفس الخلوي الهوائي المنتظم، وخلايا الدم البيضاء المعززة متعددة الأشكال النووية، وكذلك البلاعم والبيروكسي سومات، مما يؤدي إلى أمراض عديدة مثل السرطان وأمراض القلب والأوعية الدموية وهشاشة العظام والالتهابات والأمراض التنكسية وتسارع عملية الشيخوخة [3,4].

ومع ذلك، يمكن استخدام المواد المضادة للأكسدة أو الأطعمة الغنية بمضادات الأكسدة للمساعدة في تقليل الضرر التأكسدي الذي تسببه الجذور الحرة وكذلك الأكسجين النشط في جسم الإنسان. بالمقارنة مع مضادات الأكسدة الطبيعية والاصطناعية المستخدمة حاليًا في تجهيز الأغذية، يمكن أن تكون مضادات الأكسدة الطبيعية بآليات عملها الخاصة بالموقع أكثر فعالية وأقل سمية[5]. ومن هنا أصبح من الضروري تحديد مصادر بديلة آمنة وطبيعية لمضادات الأكسدة الغذائية، وقد تزايد البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية، وخاصة ذات الأصل النباتي، بشكل ملحوظ في السنوات الأخيرة. وله

أهمية كبيرة في الفوائد الصحية للنباتات العطرية والعلاجية ذات القدرة العالية على التخلص من الجذور الحرة، وكذلك في التعرف على المواد الكيميائية النباتية المسؤولة عن هذه التأثيرات[6].

تعد المكونات الفينولية والمتعددة الفينول من أبرز مجموعات المستقلبات النباتية الثانوية. والتي تشكل غالبية الإمدادات الغذائية وتوجد بكميات كبيرة في الفواكه والخضروات والمشروبات. تتمتع عديدات الفينول هذه بنشاط مضاد للأكسدة في المقام الأول بسبب نشاطها الكيميائي[6]. يمكن لمضادات الأكسدة تسهيل تأثيرها من خلال التفاعل المباشر مع أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS ومانحات الهيدروجين ومخلبات الأيونات [7].

نبات القراص (Stinging Nettle) والذي يعرف بالاسم العلمي (Urtica Dioica) وهو عضو في عائلة Urticaceae وهو نوع عشبي معمر نسبياً يسمى شعبيًا باسم نبات القريص. النبات من حيث التركيب وفير بالمواد النشطة بيولوجيًا كيميائياً [8,9]. وقد تم التعرف عليه منذ فترة طويلة وتم استخدامه كنبات طبي في العديد من الدول حول العالم [10]. تحتوي ورقة وساق نبات القراص على مجموعة ثلاثية الألوان صغيرة الحجم، حيث أنها تحتوي على حمض الفورميك والهيستامين وهما العاملان الرئيسيان لحساسية الجلد عند التفاعل مع هذا النبات. ينمو هذا النبات في تربة غنية بالنيتروجين [11].

في الطب التقليدي، يتم استخدام النبات بأكمله لعلاج حصوات الكلى والحروق والسكري ونقص الكريات البيض والنزيف الداخلي والطفح الجلدي وأمراض أخرى [12].

علاوة على ذلك، تحتوي أوراق نبات القراص على كمية كبيرة من المواد النشطة بيولوجيا، بما في ذلك التربينويدات والفلافونويدات والكاروتينات مثل البيتا كاروتين والفيولاكسانثين والنيوكسانثين والليكوبين واللوتين، والأحماض الدهنية وخاصة 9،12

لينوليك والبالمتيك وألفا لينولينيك أسيد والمركبات المتعددة الفينول المختلفة والكلوروفيل والأحماض الأمينية والفيتامينات مثل C و A و K و E والستيرول والعفص والأيزوليكتينات والكربوهيدرات والمعادن[10،12،13]. وفقًا للدراسات العلمية، فإن مستخلصات نبات القراص لها خصائص مضادة للالتهابات، خصائص مضادة لارتفاع السكر في الدم ومضادة للميكروبات ومضادة للشيخوخة بسبب وجود مركبات الفينول والفلافونويد في هذا النبات[14،15].

تهدف هذه الدراسة وهي الأولى التي يتم إجراؤها على هذا النبات في سورية (الصورة 1)، إلى تطوير طرق لتحديد النشاط المضادة للأكسدة لمستخلصات مختلفة من نبات القراص الذي تم قطافه من منطقة جبورين على ضفاف العاصي في ريف حمص، سورية. يتضمن البحث الحالي المحتوى الكلي من الفينول والفلافونويد وفيتامين C للمستخلصات المذيبة المختلفة مثل (المائي والإيثانول وخلات الإيثيل والكلوروفورم والهكسان) لأوراق القراص. كان الهدف الهام من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأكسدة باستخدام طرق مختلفة بما في ذلك مقايسة DPPH لتقدير الجذور الحرة، والقدرة الكلية لمضادات الأكسدة، ومقايسة القدرة المرجعة، ومقايسة تثبيط أكسيد النيتريك، ومقايسة تبييض اللينوليك بيتا كاروتين، ومقايسة تثبيط جذر الهيدروكسيل وفحص تخليب الحديد لكل مستخلص من أوراق نبات القراص .

الصورة 1: نبات القريص

الطريقة والمواد:

جمع النباتات والكواشف المستخدمة:

تم قطاف نبات القراص وعزل الأوراق من قرية جبورين في ريف حمص الشمالي (نيسان2022).

تم غسل الأوراق بماء الصنبور، ثم غسلها بالماء المقطر وتركتها لتجف في الظلام لمدة 15 يومًا، ثم طحنها إلى مسحوق وتخزينها في حاويات عاتمة في الثلاجة حتى يوم التحليل.

كانت جميع الكواشف المطبقة هي ذات درجة نقاوة تحليلية وتم شراؤها من شركة Sigma Aldrich Chemical Company

الجهاز المستخدم:

UV-Vis double-beam spectrophotometer—Shimadzu UV-1800 (Kyoto, Japan)

مزود بخلايا كوارتز 1سم ومتصل بحاسب لإظهار وتحليل وحفظ النتائج.

تحضير المستخلصات:

تحضير مستخلص أوراق القراص: تم تحضير خمسة مستخلصات من أوراق القراص باستعمال خمس مذيبات مختلفة باستخدام جهازسوكسيليه Soxhlet [16]. تم وضع وزن (100 جم) من مسحوق أوراق القراص في كشتبان في Soxhlet منقوع بمذيب من المذيبات الخمس المستخدمة طوال الليل لمدة 12 ساعة حيث تم استخلاصه بواسطة باستخدام 100 مل من نفس المذيب وهو أحد المذيبات التالية (الماء المقطر والإيثانول وخلات الإيثيل والكلوروفورم والهكسان). تم بعد ذلك تركيز المحلول باستخدام المبخر الدوار تحت الفراغ عند 40 درجة مئوية. وتم حفظ المستخلصات المجففة في الثلاجة حتى يتم اختبارها.

محتوى الفينول الكلي:

تم تقدير المحتوى الفينولي الكلي لجميع المستخلصات بطريقة Folin-Ciocalteu [17].

لتحضير المستخلصات النباتية، تم إذابة 10 ملغ من المستخلص في 5 مل من المذيب المطلوب (ماء، إيثانول، كلوروفورم، خلات الايتيل و ن الهكسان). تم وضع 100

ميكرولتر من المستخلصات النباتية المحضرة بشكل فردي في أنبوب اختبار وخلطها مع 2 مل من Folin-Ciocalteu regent الممدد 10 مرات ثم تمت إضافة 2 مل من 7.5٪ كربونات الصوديوم، ومزجت جيدًا وحضنت لمدة 30 دقيقة عند 40 درجة مئوية. تم استخدام مقياس الطيف الضوئي لقياس الامتصاصية عند 760 نانومتر. وتم استخدام منحنى قياسي تم إعداده بنفس الطريقة باستخدام التراكيز التسلسلية لمحلول حمض التانيك القياسي (50–500 ملغ/ مل) لتحديد تركيزالفينول الاجمالي في كل مستخلص.

محتوى الفلافونويد الكلي:

تم استخدام طريقة كلوريد الألومنيوم [18] لتحديد محتوى الفلافونويد الإجمالي حيث تم استخدام كيرسيتين كمعياري في هذه الطريقة وتم إجراء جميع التقييمات من خلال رسم منحني معايرة كيرسيتين.

لتحضير منحني كيرسيتين القياسي، تم تحضير محلول أم عن طريق إذابة 20 ملغ من كيرسيتين في 100 مل من الميثانول للحصول على محلول بتركيز 200 ميكروغرام/مل.

من المحلول الأم، تم تحضير سلسلة من التركيزات المختلفة (10، 20، 30، 60، 90، 120، 150، و180 ميكروغرام/مل).

لتحضير المستخلصات، تم إذابة 50 ملغ من كل مستخلص في 50 مل من الميثانول (1 ملغ/مل) .تم خلط 0.5 مل من كل تركيز مع 1.5 مل من الميثانول المطلق، 0.1 مل من كلوريد الألومنيوم 10%، 0.1 مل من 1 مولار من أسيتات البوتاسيوم، وأضيف 2.8 مل من الماء المقطر وحضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. بعد ذلك، تم

تحديد الامتصاصية لعينات مختلفة عند 415 نانومتر باستخدام مقياس الطيف الضوئي، تم استبدال 10% من محلول كلوريد الألومنيوم بالماء المقطر .لتقدير محتوى الفلافونوئيد الاجمالي، تم الحصول على منحنى قياسي للكيرسيتين عن طريق رسم تركيز كيرسيتين مقابل الامتصاص و تم حساب معادلة الانحدار لهذا المنحني.

المحتوى الكلي لحمض الاسكوربيك:

تم تحديد المحتوى الكلي لحمض الاسكوربيك لمستخلصات مذيبات مختلفة لأوراق القراص بواسطة طريقة تحضير محلول حمض الاسكوربيك القياسي [19]، تم استخدام حمض الاسكوربيك كمعياري لتقدير فيتامين C.

تم إذابة الحمض في 100 مل من الماء المقطر لإعطاء محلول أم يحتوي على 100 ميكروغرام / مل. لإعداد منحنى المعايرة القياسية لحمض الأسكوربيك، تم أخذ أحجام مختلفة من المحلول الأم من 0.05، 0.1، 0.25، 0.5، 1.0 و 1.5 مل ونقل الحجم إلى دوارق حجمية وإكمال الحجم إلى 10 مل بواسطة الماء المقطر. لتحضير المستخلصات وزنت 10 ملغ وخلطت مع 10 مل من المذيبات المناسبة للحصول على تركيز 1 ملغ/غم. لإنشاء منحنى معايرة، تم وضع 300 ميكرولتر من حمض الأسكوربيك القياسي ومستخلصات نباتية مختلفة محضرة في أنبوب اختبار نظيف وخلطها مع 100 ميكرولتر من حمض ثلاثي كلورو أسيتيك 13.3% TCA و100 ميكرولتر من الماء المقطر. بعد ذلك تمت إضافة 75 ميكرولتر من المحلول (تم إذابة 2 جم من دينتروفينيل هيدرازين و320 مجم ثيوريا و270 مجم من كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.5H_2O$ في 100 مل من حمض الكبريتيك 5 مولار). تم حضن مزائج التفاعل عند 37 درجة مئوية لمدة 3 ساعات. ثم تمت إضافة 0.5 مل 65% من

حمض الكبريت H_2SO_4 لكل أنبوب اختبار، متبوعًا بقياس الامتصاص عند 520 نانومتر باستخدام مقياس الطيف الضوئي، تم إجراء الاختبارات في ثلاث مكررات. تم بعد ذلك تحديد تركيز حمض الأسكوربيك في المستخلصات عن طريق الاستقراء من المنحنى القياسي وتم حساب كمية حمض الأسكوربيك لكل جرام من المادة النباتية الجافة.

القدرة المضادة للأكسدة:

بعد تحضير المستخلصات المختلفة لأوراق القراص وتحضير حمض الأسكوربيك القياسي، تم إذابة 50 ملغ من حمض الأسكوربيك وكل مستخلص في 50 مل من الميثانول للحصول على محلول أم 1000 ميكروغرام / مل. من محلول الأم، تم تحضير سلسلة التمديد تراوحت من 6.25 إلى 100 ميكروغرام/مل.

قدرة DPPH على كسح الجذور الحرة:

تم استخدام جذر 1,1–ثنائي فينيل–2–بيكريل هيدرازيل (DPPH) لتقييم قدرة المستخلصات على كسح الجذور الحرة [20]، تم استخدام 2 ملليلتر من كل مستخلص مع شاهد من حمض الأسكوربيك بتركيزات مختلفة (6.25، 12.5، 25، 50، 75 و100 ميكروجرام/مل) حيث مزجت مع 3 مل من DPPH المحضر حديثًا (0.1 مم في الميثانول). وبعد 30 دقيقة من الحضن، تم قياس الامتصاصية عند 517 نانومتر بواسطة مقياس الطيف الضوئي. أظهر مستوى تحول DPPH من اللون الأرجواني إلى اللون الأصفر أن المستخلصات تتمتع بكفاءة في تثبيط الجذور الحرة كما تم تحديد النسبة المئوية لتثبيط الجذور الحرة باستخدام المعادلة التالية:

تثبيط الجذور الحرة = [(AC- AS) / AC] ×100

حيث

AC = امتصاص DPPH الطازج

AS = امتصاص المستخلصات والمعيار

قياس القدرة المرجعة:

تم قياس قدرة الارجاع لمستخلصات مختلفة لأوراق القراص بواسطة مقايسة Oyaizu [21]، حيث تم حضن 0.250 مل من تركيزات مختلفة من المستخلصات النباتية وحمض الأسكوربيك القياسي (6.25، 12.5، 25، 50، 75 وتم دمج 100 ميكروغرام/مل) مع 0.625 مل من محلول وقاء فوسفات (0.2 م، 6.6 درجة الحموضة)، و0.625 مل من فيروسيانيد البوتاسيوم 1%. تم تحريك المزيج وحضنه لمدة 20 دقيقة عند 50 درجة مئوية. بعد الحضن، أضيف لكل أنبوب 0.625 مل من محلول حمض ثلاثي كلورو أسيتيك 10% ثم تم تكثيفه عند 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق. بعد ذلك تم مزج (1.8) من الطبقة العليا من المحلول مع 1.8 مل من الماء المقطر وإضافة 0.36 مل من كلوريد الحديدي 0.1% وقياس الامتصاصية مباشرة عند 700 نانومتر.

إجمالي القدرة المضادة للأكسدة:

تم استخدام طريقة الفوسفومولبدنوم (Phosphomolybdate assay) لتحديد قدرة مضادات الأكسدة لمستخلصات أوراق القراص وحمض الأسكوربيك كمعياري[22] حيث

تمت اضافة 0.3 مل من مستخلصات العينة وحمض الأسكوربيك بتركيزات مختلفة (6.25، 12.5، 25.50،75 و100 ميكروغرام/مل) إلى محلول الكاشف 3 مل (حمض الكبريت 0.6 مولار، فوسفات الصوديوم 28 مل ومولبيدات الأمونيوم 4 مل). تمت تغطية الأنابيب التي تحتوي على المزيج بورق الألمنيوم ثم تم حضنها لمدة 90 دقيقة في حمام مائي بدرجة حرارة 95 درجة مئوية، بعد ذلك تم تبريد العينة عند درجة حرارة الغرفة وقراءة الامتصاصية عند 695 نانومتر.

اختبار قدرة تثبيط أكسيد النيتريك:

تم تقييم أكسيد النيتريك (NO−) الناتج عن نيتروبروسيد الصوديوم (SNP) بطريقة ماركوتشي Marcocci et al [23] حيث تم تحضير 1مل من نيتروبروسيد الصوديوم بتركيز 10mM في وقاء فوسفاتي (PH7.4) تم مزج مع 0.250 مل من أوراق القراص وحمض الأسكوربيك القياسي بتركيزات مختلفة (12.5، 25،50،75 و100 ميكروغرام/مل) و 0.250 مل من محلول وقاء فوسفات PH 7.4 بعد ذلك تم تحريك المزيج وحضنه عند 37 درجة مئوية لمدة ساعتين. على فترات، تم وضع 0.5 مل من خليط الحضانة في أنبوب اختبار جديد وإضافة 0.5 مل من كاشف جريس Griess reagent (1% سلفانيلاميد، 5% حمض الفوسفوريك H_3PO_4 و0.1% نفثيل إيثيلين ثنائي هيدروكلوريد الأمين). تم قياس امتصاصية الكروموفور المتكون عند 540 نانومتر. كان الشاهد هو نفس خليط التفاعل ولكن بكمية مساوية من الميثانول بدلاً من المستخلص. تم حساب كمية أكسيد النيتريك المثبط بواسطة المعادلة التالية:

% تثبيط أكسيد النيتريك = [(AC- AS) / AC] ×100

حيث

AC = امتصاص الشاهد

AS = امتصاص مستخلص العينة والعياري (حمض الأسكوربيك)

نشاط تثبيط جذور الهيدروكسيل($-OH$) :

تم إجراء تفاعل فنتون Fenton's reaction لتقييم قدرة تثبيط جذور الهيدروكسيل لمستخلصات مذيبات مختلفة لأوراق القراص باستخدام طريقة Smirnoffو Cumbes [24].

في البداية، 40 ميكرولتر من المستخلصات المختلفة وحمض الأسكوربيك بتركيزات مختلفة (12.5، 25، 50، 75 و 100 ميكروغرام / مل) تم مزجها مع 24 ميكرولتر من محلول كبريتات الحديدوز 8mM($FeSO_4$) و 20 ميكرولتر من 20mM H_2O_2 و 20 ميكرولتر من حمض الساليسيليك (3mM). تم تحريك المزيج واحتضانه لمدة 30 دقيقة في محلول مائي عند 37 درجة مئوية. بعد ذلك أضف 36 ميكرولتر من الماء المقطر إلى خليط التفاعل. يحتوي الشاهد على 40 ميكرولتر من الماء بدلاً من المستخلص والمعيار. تم قياس امتصاصية جذر الهيدروكسيل عند 510 نانومتر. تم حساب نسبة التثبيط لجذر الهيدروكسيل بالمعادلة التالية:

% تثبيط جذر الهيدروكسيل OH- = [(AC- AS) / AC] ×100

حيث

AC = امتصاص الشاهد

AS = امتصاص مستخلص العينة والمعيار (حمض الأسكوربيك)

مقايسة البيتا كاروتين/ اللينوليك:

تم استخدام نظام نموذج البيتا كاروتين/حمض اللينوليك، كما هو موصوف [25]، لتقييم نشاط مضادات الأكسدة في مستخلصات أوراق. تم إذابة 2 ملغ من البيتا كاروتين في 10 مل من الكلوروفورم ($CHCL_3$) لتكوين محلول البيتا كاروتين. ثم تم مزج ملليلتر واحد من هذا المحلول مع 20 ملغ من حمض اللينوليك و 200 ملغ من توين 20. تم تبخير الكلوروفورم بواسطة المبخر الدوار تحت ضغط منخفض، وبعد ذلك تم تمديد المحلول الناتج مباشرة باستخدام (50 مل) من الماء المقطر مع الرج بقوة. تم مزج 5 مل من هذا المستحلب المحضر مع 0.2 مل من كل مستخلص وحمض الأسكوربيك كشاهد ايجابي بتركيزات مختلفة (6.25، 12.5، 25، 50،75، 100 ميكروجرام/مل). يحتوي البلانك على 0.2 مل من الميثانول بدلاً من المستخلص. تم قياس الامتصاصية مباشرة عند 470 نانومتر بواسطة مقياس الطيف الضوئي. تم وضع أنابيب الاختبار التي تحتوي على خليط التفاعل في حمام مائي بدرجة حرارة 50 درجة مئوية ثم تم قياس الامتصاص بعد ساعتين. تم اختبار جميع العينات ثلاث مكررات. تم استخدام المعادلة التالية لحساب نشاط مضادات الأكسدة:

النشاط المضاد للأكسدة= [الامتصاصية بعد ساعتين/الامتصاصية في الزمن صفر]×100

قدرة تخليب الحديد:

تم تحديد قدرة خلب الحديد لمستخلصات المذيبات المختلفة بطريقة فينانثرولين [26]، حيث تم خلط 0.325 مل من المستخلصات النباتية المختلفة وحمض الأسكوربيك

العياري بتركيزات مختلفة (6.25، 12.5، 25، 50، 75 و100 ميكروغرام/مل) مع 1 مل من كل من كلوريد الحديدي 0.2% والفينانثرولين 25% في الميثانول. الشاهد يحتوي على كلوريد الحديدي وكاشف 1–فينونثرولين. وبعد ذلك تم رج المزيج بقوة وتركه لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة، وتم قياس الامتصاصية عند 520 نانومتر بواسطة مقياس الطيف الضوئي. تم إجراء كل اختبار 3 مرات على الأقل. تم حساب النسبة المئوية لقدرة تخليب الحديد بالمعادلة التالية:

$$\text{قدرة تخليب الحديد } \% = [(AC- AS) / AC] \times 100$$

حيث

AC = امتصاص الشاهد

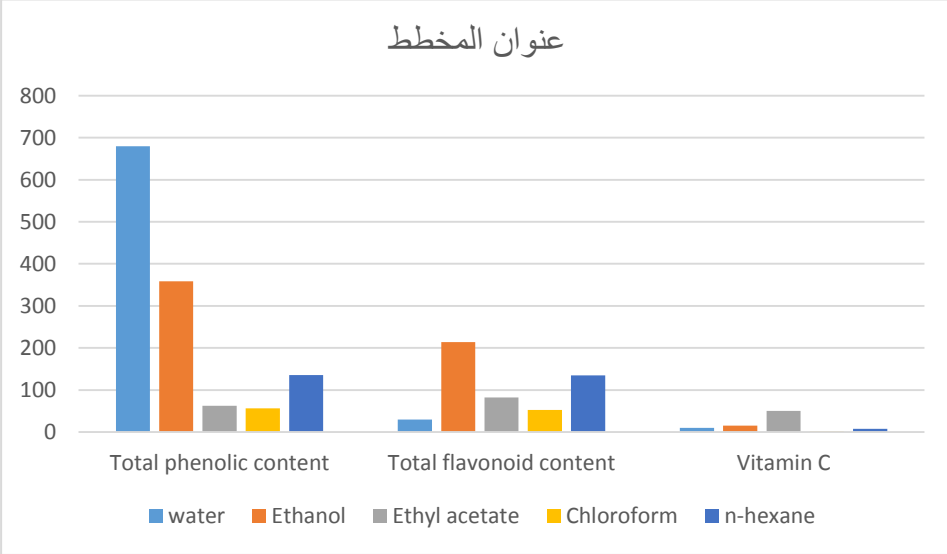
AS = امتصاص مستخلص العينة والمعيار (حمض الأسكوربيك)

التحليل الإحصائي:

تم عرض البيانات بأخذ وسطي من الخطأ المعياري للمتوسط SEM± لثلاث مكررات وتم تقييمها إحصائيا عن طريق تحليل التباين في اتجاه واحد (ANOVA) وتم فصل القيم عن طريق اختبارات Duncan multiple دنكان المتعددة باستخدام برنامج SPSSالإصدار 26 واعتبرت الاختلافات مع القيم ذات دلالة إحصائية عند ($P<0.05$).

النتائج:

إجمالي محتويات الفينول والفلافونوئيد ومحتويات فيتامين C في أوراق القراص.



الشكل 1: المحتوى الكلي من الفينول والفلافونوئيد وفيتامين C لأوراق القراص

النشاط المضاد للأكسدة لأوراق القراص:

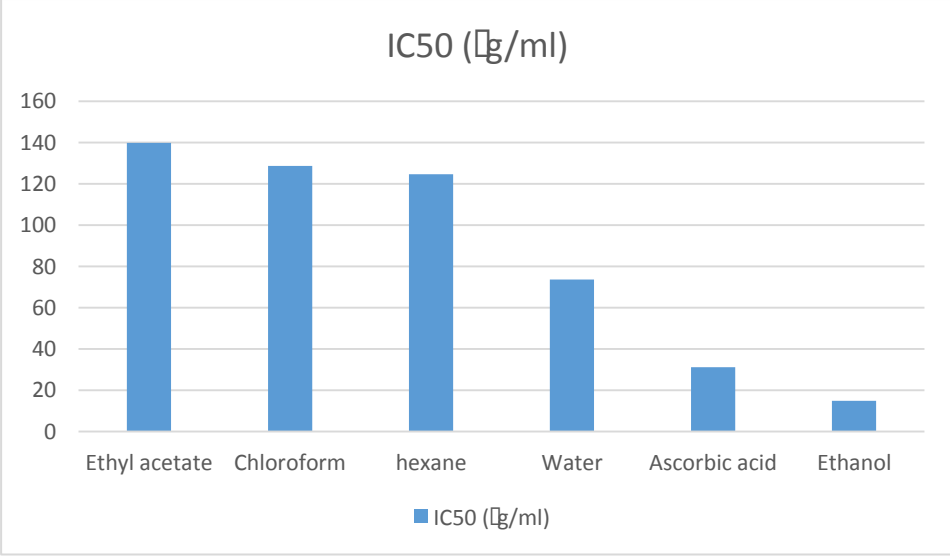
قدرة تثبيط الجذور الحرة:

تم تقدير التأثير المضاد للأكسدة لأوراق القراص لمستخلصات المذيبات المختلفة باستخدام طريقة DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhdrazyl) بالإضافة إلى حمض الأسكوربيك كمادة قياسية حيث أظهرت النتائج التي توصلنا إليها أن جميع مستخلصات أوراق القراص وحمض الأسكوربيك كان لها مستوى معتدل من نشاط التثبيط DPPH• تراوح من 10.98٪ إلى 96.06٪، كما هو موضح في الجدول 2. وكان النشاط المثبط لحمض الأسكوربيك القياسي أكبر بفارق إحصائي ملحوظ $0.05>$ أكثر من المستخلصات.

بينما كان مستخلص الإيثانول هو الأعلى نشاطاً كقدرة مثبطة للجذور الحرة بين المستخلصات الأخرى .أظهرت جميع المستخلصات تناسبا طرديا مع التركيز (مع زيادة التركيز تحصل زيادة في نسبة نشاط تثبيط الجذور الحرة) عند 50 ميكروغرام/مل من المستخلصات المائية والإيثانول كان لها نشاط تثبيط DPPH أقوى قليلاً من معياري حمض الأسكوربيك، وقد وجد أنه في الترتيب 67.09 > 46.19 >5.43 على التوالي .

بالإضافة إلى ذلك، تم تعريف قيمة IC50 التركيز المثبط النصف الأقصى على أنها تركيز المستخلصات الخام للمركبات النشطة بيولوجيًا المطلوبة لتقليل 50% من الجذور الحرةDPPH

كانت قوة قيم IC50 لجميع المستخلصات ولحمض الأسكوربيك لأوراق القراص كما يلي:



الشكل 2: قيم IC50 لجميع المستخلصات ولحمض الأسكوربيك لأوراق القراص

الجدول 2. القدرة التثبيطية للجذور الحرة لمستخلصات المذيبات المختلفة لأوراق القراص وحمض الأسكوربيك.

Urtica dioica L. Conc. (µg/ml)	DPPH scavenging activity (%)						P-value
	Aqueous	**Ethanol**	**Ethyl acetate**	**chloroform**	**n-Hexane**	**Ascorbic acid(standard)**	
6.25	39.73 ±0.00969	43.42 ±0.05933	12.22 ±0.01226	10.99 ±0.00736	15.12 ±0.02200	38.81 ±0.2711	P<0.0009
12.5	40.52 ±0.01120	47.24 ±0.02769	29.74 ±0.62690	12.24 ±0.01181	15.35 ±0.00763	39.05 ±0.03387	
25	43.12 ±0.00850	53.51 ±0.01123	32.45 ±0.00559	18.04 ±0.03813	17.22 ±0.00423	39.74 ±0.03376	
50	46.19 ±0.01676	67.10 ±0.00367	33.67 ±0.16642	18.20 ±0.08812	36.26 ±0.03940	45.44 ±0.06794	
75	49.82 ±0.04851	80.20 ±0.03601	37.26 ±0.01100	37.57 ±0.00210	36.77 ±0.01481	84.56 ±0.06981	
100	51.47 ±0.00764	90.36 ±0.03363	37.62 ±0.15253	38.06 ±0.02149	37.25 ±0.02357	96.06 ±0.00213	
IC_{50}	73.61	14.92	139.80	128.67	124.65	31.23	

مقايسة القدرة الارجاعية:

أظهرت النتائج التي توصلنا إليها أنه كلما زاد الامتصاص للمستخلص النباتي، كلما زاد نشاط الارجاع. زادت القدرة الارجاعية للمستخلصات المختلفة مع زيادة التركيز زيادة ذات دلالة إحصائية $P < 0.05$ حيث أظهرت مستخلصات القراص قدرة ارجاع أقل قليلاً من حمض الأسكوربيك في جميع التراكيز التي تم اختبارها، بالإضافة إلى أن المستخلص المائي لديه قوة ارجاع أكبر من حمض الأسكوربيك عند التركيز 6.25 ميكروجرام/مل. ونتيجة لذلك، تم اكتشاف قوة الارجاع بالترتيب التالي:

حمض الأسكوربيك > الماء > الإيثانول > الكلوروفورم > أسيتات الإيثيل > والهكسان.

القدرة الكلية لمضادات الأكسدة:

تم تحديد القدرة الكلية لمضادات الأكسدة لمستخلصات المذيبات المختلفة لأوراق القراص باستخدام مقايسة الفسفوموليبدينوم. حيث أظهرت النتائج أن قدرة مضادات الأكسدة لجميع المستخلصات وحمض الأسكوربيك العياري تزداد مع زيادة التركيز. ونتيجة لذلك اكتشف أن ترتيب زيادة النشاط الكلي لمضادات الأكسدة كان كما يلي:

حمض الأسكوربيك > أسيتات الإيثيل > الإيثانول > الكلوروفورم > ن–هكسان > الماء.

تم فحص القدرة الكلية لمضادات الأكسدة لجميع المستخلصات باستخدام تحليل التباين ANOVA، وأظهرت النتيجة وجود فارق إحصائي $P < 0.05$ لجميع المستخلصات.

تأثير مقايسة تثبيط أكسيد النيتريك:

تزداد نسبة تثبيط أكسيد النيتريك مع زيادة تركيز المستخلصات النباتية وحمض الأسكوربيك الأمر زيادة ذات دلالة إحصائية P <0.05 الى جانب ذلك وجد أن معدل التثبيط لمستخلص خلات الإيثيل عند التركيز 12.5 ميكروغرام/مل كان أعلى من المستخلصات 25 و50 ميكروغرام/مل وفق الأرقام التالية: 65.29، 63.74 و61.13% على التوالي. علاوة على ذلك، وجد أن المستخلص المائي لأوراق القراص هو أعلى نشاط لتثبيط أكسيد النتريك من المذيبات الأخرى وحمض الأسكوربيك أيضًا، ولوحظ أن جميع المستخلصات كانت وفق التسلسل:

مائي > كلوروفورم > هكسان > أسيتات الإيثيل> الإيثانول.

تم العثور على قيمة IC50 لجميع المستخلصات على النحو التالي: الإيثانول 56.34 ميكروغرام/مل > أسيتات الإيثيل 53.25 ميكروغرام/مل > الهكسان 50.92 ميكروغرام/مل > الكلوروفورم 46.26 ميكروغرام/مل > والماء 38.27 ميكروغرام/مل.

كانت قيمة IC50 لحمض الأسكوربيك العياري 46.60 ميكروغرام / مل.

مقايسة تثبيط جذر الهيدروكسيل:

زاد تثبيط جذور الهيدروكسيل $-OH$ للمستخلصات النباتية وحمض الأسكوربيك العياري مع زيادة التركيز. حيث أظهرت النتائج أن وجود فعالية للمستخلصات القراص ولحمض الاسكوربيك ذات دلالة إحصائية P<0.05 كما لوحظت أقصى قدرة على تثبيط جذور الهيدروكسيل في مستخلص الإيثانول من بين مستخلصات المذيبات الأخرى. وجد أن

زيادة فعالية للمستخلصات النباتية وحمض الأسكوربيك تترتب كمايلي: حامض الأسكوربيك > الإيثانول > الماء > الهكسان > الكلوروفورم > أسيتات الإيثيل. بالإضافة إلى ذلك، ظهرت أعلى قيمة IC50 في أسيتات الإيثيل 535.32 ميكروجرام/مل يليها الكلوروفورم 521.22 ميكروجرام/مل، الهكسان 401.5 ميكروجرام/مل، الماء 232.24 ميكروجرام/مل، الإيثانول 145.45 وحمض الأسكوربيك 120.33 ميكروجرام/مل على التوالي.

الفعالية المخلبة الحديد:

تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة لكل مستخلص من أوراق القراص ومقارنتها بحمض الأسكوربيك العياري عن طريق إستخلاب أيونات الحديدوز Fe+2 يوضح الجدول 3 النشاط المخلب المعدني للمستخلصات المختلفة من أوراق نبات القراص وحمض الأسكوربيك العياري بتراكيز مختلفة تتراوح بين (6.25 إلى 100 μجم/مل). حيث وجد أن نسبة نشاط خلب الحديد لجميع مستخلصات أوراق نبات القراص أعلى من حمض الأسكوربيك العياري، وهو وفق الترتيب: الهكسان > الماء > الكلوروفورم > الإيثانول > أسيتات الإيثيل > حمض الاسكوربيك.

الجدول 3: يوضح الفعالية المخلبة للمعادن لمستخلصات القراص وحمض الأسكوربيك العياري.

Urtica dioica L. Conc. (µg/ml)	Iron chelating agent (%)						P-value
	Aqueous	**Ethanol**	**Ethyl acetate**	**chloroform**	**n-Hexane**	**Ascorbic acid(standard)**	
6.25	83.08 ±0.00969	84.33 ±0.05933	85.49 ±0.01226	88.02 ±0.00736	87.18 ±0.02200	78.07 ±0.27110	P<0.0006
12.5	83.54 ±0.01120	84.51 ±0.02769	88.18 ±0.62690	88.28 ±0.01181	87.81 ±0.00763	78.74 ±0.03387	
25	83.58 ±0.00850	91.24 ±0.01123	90.35 ±0.00559	90.52 ±0.03813	91.74 ±0.00423	89.05 ±0.03376	
50	91.75 ±0.01676	91.60 ±0.00367	90.96 ±0.16642	90.89 ±0.08812	91.56 ±0.03940	91.03 ±0.06794	
75	91.61 ±0.04851	91.53 ±0.03601	91.46 ±0.01100	91.71 ±0.00210	91.89 ±0.01481	91.56 ±0.06981	
100	92.17 ±0.00764	91.89 ±0.03363	91.79 ±0.15253	92.09 ±0.02149	92.25 ±0.02357	91.82 ±0.00213	
IC_{50}	36.51	37.25	37.27	37.17	37.04	37.56	

مناقشة النتائج:

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن أوراق نبات القراص ذات فعالية معتدلة في كبح الجذور الحرة، ويمكن أن تمنع الضرر الناجم عن الجذور الحرة في الجهاز الفيزيولوجي، وذلك بسبب محتوى هذا النبات من الفينول والفلافونوئيد وفيتامين C، أظهرت نتائج البحث أن مستخلص الإيثانول لديه أعلى نشاط تثبيطي للجذور الحرة من مستخلص الكلوروفورم والهكسان. من ناحية أخرى، أظهرت مجموعات أخرى أن الأوراق الطازجة لمستخلص الإيثانول في نبات القراص اللاذع لديه الحد الأدنى من القدرة المضادة للأكسدة.

تتفق النتائج التي توصلنا إليها مع نتائج العديد من الابحاث التي ابلغت عن مركبات الفلافونويد (إيزورهامنيتين، كيمبفيرول، إيزوكيرسيترين، روتين وكيرسيتين) والأحماض الفينولية (حمض الكلوروجينيك وحمض الكافيك) والكاروتينات (فيولاكسانثين، لوتوكسانثين، إيبوكسيد اللوتين، بيتا كاروتين و hydroxyl– β–carotene وكذلك الأحماض الدهنية والزيوت الأساسية والمكونات الأخرى مثل الفيتامينات والمعادن في الأوراق وكانت المستخلصات ذات فعالية مضادة لأكسدة قوية[27].

أظهرت مستخلصات أوراق نبات القراص فعالية في تثبيط أكسيد النيتريك تزداد بازدياد تركيز المستخلص، كذلك كشفت نتائج هذا البحث أن أوراق القراص لكل مستخلص لديها قدرة معتدلة على تفكيك جذور الهيدروكسيل. كما أظهر البحث أن مستخلص الماء حقق أعلى نشاط مضاد للأكسدة بين جميع المستخلصات الأخرى باستخدام مقايسة β– كاروتين / حمض اللينوليك. كذلك كشفت نتائج البحث أن جميع المستخلصات كانت ذات فعالية مخلبة للحديد أكبرها كانت لمستخلص الهكسان وأقلها لحمض الأسكوربيك العياري. ونتيجة لذلك، فإن القدرة على خلب الحديد لجميع مستخلصات أوراق القراص من شأنها أن تمنع المعادن الانتقالية من المساهمة في إنشاء الإجهاد التأكسدي.

الاستنتاجات:

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن أوراق القراص هي مصدر جيد لمضادات الأكسدة (عديدات الفينول والفلافونوئيد وفيتامين C)

بالمقارنة بين المستخلصات، كان للمستخلص المائي أعلى محتوى إجمالي فينولي، في حين كان للمستخلص الإيثانولي أعلى محتوى إجمالي للفلافونويد. تم العثور على المستخلص الذي يحتوي على أعلى مستويات فيتامين C بشكل عام وهو خلات الإيثيل. علاوة على ذلك، بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك التقليدي، أظهرت نتائجنا نشاطًا عاليًا للأكسدة (2،2–ثنائي فينيل–1–بيكريل هيدرازيل، القدرة الكلية المضادة للأكسدة، تقليل الطاقة، جذر الهيدروكسيل، تثبيط NO، وتخليب الحديد). ولهذا السبب، يبدو أن نبات القراص يمثل مصدراً هاماً لمضادات الأكسدة الطبيعية التي يمكن استغلالها في الزراعة والرعاية الصحية.

المراجع:

1. Mailloux, R. J, 2020- An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production, **Antioxidants**, Vol. *9* (6), 472.

2. Juana, C. A.; Perez de Lastra, J. M.; Plou, F. J.; Perez-Lebena, E, 2021-The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies, **Int. J. Mol. Sci**, Vol. *22* (9), 4642.

3. Mustafa', A. J; Ismail, P. A, 2022-Association of Potent Inflammatory Cytokine and Oxidative DNA Damage Biomarkers in Stomach Cancer Patients. **Baghdad Sci. J**, Vol. *19* (6), 1313.

4. Jabbar, A. A, 2021-Onosma Mutabilis: Phytochemical Composition, Antioxidant, Cytotoxicity, and Acute Oral Toxicity. **Food Sci. Nutr,** Vol. *9* (10), 5755-5764.

5. Bhusal, K. K.; Magar, S. K.; Thapa, R.; Lamsal, A.; Bhandari, S.; Maharjan, R.; Shrestha, S.; Shrestha, J, 2022-Nutritional and Pharmacological Importance of Stinging Nettle (Urtica Dioica L.): A Review. **Heliyon**, Vol. e09717.

6. Lia, P.; Liu, H.; Shi, X., 2021-Hydrogen Sulfide: Novel Endogenous and Exogenous Modulator of Oxidative Stress in Retinal Degeneration Diseases, **Molecules**, Vol. *26* (9), 2411.

7. Mailloux RJ. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. Antioxidants (Basel). 2020 Jun 2;9(6):472. doi: 10.3390/antiox9060472. PMID: 32498250; PMCID: PMC7346187.

8. Dumanovic, J.; Nepovimova, E.; Natic, M.; Kuca, K.; Jaevic, V, 2021-The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Front,* ***Plant Sci,*** Vol. *11*, 552969.

9. Grauso, L.; de Falco, B.; Lanzotti, V.; Motti, R. Stinging Nettle, Urtica Dioica L, 2020-Botanical, Phytochemical and Pharmacological Overview. **Phytochem. Rev,** Vol. *19* (6), 1341-1377.

10. Sharifi-Rad, J.; Bahukhandi, A.; Dhyani, P.; Sati, P.; Capanoglu, E.; Docea, A. O.; Al-Harrasi, A.; Dey, A.; Calina, D, 2021-Therapeutic Potential of Neoechinulins and Their Derivatives: An Overview of the Molecular Mechanisms behind Pharmacological Activities. **Front.**

Nutr, Vol. *8*, 664197.

11. Devkota, H. P.; Paudel, K. R.; Khanal, S.; Baral, A.; Panth, N.; Adhikari-Devkota, A.; Jha, N. K.; Das, N.; Singh, S. K.; Chellappan, D. K, 2022-Stinging Nettle (Urtica Dioica L.): Nutritional Composition, Bioactive Compounds, and Food Functional Properties. **Molecule**, Vol. *27* (16), 5219.

12. Koczkodaj, S.; Przybył, J. L.; Kosakowska, O.; Węglarz, Z.; Bączek, K. B, 2023-Intraspecific Variability of Stinging Nettle (Urtica Dioica L.), **Molecules**, Vol. *28* (3),1505.

13. Paulauskienė, A.; Tarasevičienė, Ž.; Laukagalis, V, 2021-Influence of Harvesting Time on the Chemical Composition of Wild Stinging Nettle (Urtica Dioica L.). **Plants**, Vol. *10* (4), 686.

14. Dhouibi, R.; Affes, H.; Salem, M. Ben; Hammami, S.; Sahnoun, Z.; Zeghal, K. M.; Ksouda, K, 2020-Screening of Pharmacological Uses of Urtica Dioica and Others Benefits. **Prog. Biophys. Mol. Biol,** Vol. *150*, 67-77.

15. Zawawi, S. S. A.; Zamli, Z.; SAAD, N, 2023-The Effectiveness and Application of Urtica Dioica (Stinging Nettle) for Musculoskeletal Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis, **Int. J. ALLIED Heal. Sci,** Vol. *7* (1),

2863–2874.

16. Hussein, N. N.; Marzoog, T. R.; Al-Niaame, A. E, 2019- The Antibacterial, Antiheamolytic, and Antioxidant Activities of Laurus Nobilis and Alhagi Maurorum Native to Iraq. ***Baghdad Sci. J,*** Vol. *16* (3 Suppl.), 707–712.

17. Marjoni, M. R.; Naim, A.; Zubaidah, Y. F.; Nadia, R, 2023- The Effect of Different Extraction Solvents on Total Phenolic and Flavonoid Total of Snake Plant (Sansevieria Trifasciata Var. Laurentii). **J. Pharm. Negat. Results**, Vol. *14* (1), 38–43.

18. Diab, F.; Khalil, M.; Lupidi, G.; Zbeeb, H.; Salis, A.; Damonte, G.; Bramucci, M.; Portincasa, P.; Vergani, L, 2022-Influence of Simulated In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Phenolic Profile, Antioxidant, and Biological Activity of Thymbra Spicata L. Extracts. **Antioxidants**, Vol. *11* (9), 1778.

19. Mazhar, M. W.; Ishtiaq, M.; Maqbool, M.; Ajaib, M.; Hussain, I.; Hussain, T.; Parveen, A.; Thind, S.; Sardar, T.; Akram, R, 2023-Synergistic Application of Calcium Oxide Nanoparticles and Farmyard Manure Induces Cadmium Tolerance in Mung Bean (Vigna Radiata L.) by Influencing

Physiological and Biochemical Parameters. **PLoS One**, Vol. *18* (3), e0282531.

20. Sadeq, O.; Mechchate, H.; Es-Safi, I.; Bouhrim, M.; Jawhari, F. zahra; Ouassou, H.; Kharchoufa, L.; N. AlZain, M.; M. Alzamel, N.; Mohamed Al Kamaly, O, 2021- Phytochemical Screening, Antioxidant and Antibacterial Activities of Pollen Extracts from Micromeria Fruticosa, Achillea Fragrantissima, and Phoenix Dactylifera. **Plants**, Vol. *10* (4), 676.

21. Ergün, F, 2023-Effects of Drying Methods on Amounts of Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidants Capacity of Plantago lanceolata L. **J. Anim. Plant Sci**, Vol. *33* (1), 159-165.

22. El Khomsi, M.; Kara, M.; Hmamou, A.; Assouguem, A.; Al Kamaly, O.; Saleh, A.; Ercisli, S.; Fidan, H.; Hmouni, D, 2022-In Vitro Studies on the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Total Polyphenol Content of Cynara Humilis from Moulay Yacoub Area (Morocco). **Plants**, Vol. *11* (9), 1200.

23. Ezeanyika, L. U. S.; Anosike, C. A.; Oji, C. N.; Chibuogwu, C. C, 2022-Phytochemistry, Micronutrient Composition, and

Antioxidant Potentials of Citrus Maxima (Shaddock) Fruit Juice. **J. Pharmacogn. Phytochem,** Vol. *11* (5), 20–23.

24. Saravanakumar, A.; Periyasamy, P.; Jang, H. T, 2019–In Vitro Assessment of Three Different Artemisia Species for Their Antioxidant and Anti-Fibrotic Activity. **Biocatal. Agric. Biotechnol,** Vol. *18*, 101040.

25. Nickavar, B.; Esbati, N, 2012–Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Three Thymus Species. *J.* **Acupunct. Meridian Stud,** Vol. *5* (3), 119–125.

26. Hechaichi, F. Z.; Bendif, H.; Bensouici, C.; Alsalamah, S. A.; Zaidi, B.; Bouhenna, M. M.; Souilah, N.; Alghonaim, M. I.; Benslama, A.; Medjekal, S, 2023–Phytochemicals, Antioxidant and Antimicrobial Potentials and LC-MS Analysis of Centaurea Parviflora Desf. Extracts. **Molecules**, Vol. *28* (5), 2263.

27. Joshi, B. C.; Mukhija, M.; Kalia, A. N, 2014–Pharmacognostical Review of Urtica Dioica L. **Int. J. Green Pharm,** Vol. *8* (4).