

دراسة البنية التشريحية وتقييم النشاط المضاد للتأكسد والمحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات لنبات الهندقوق *Melilotus indicus* L السوري

د. أمينة ابراهيم**

د. ثناء حرامي*

الملخص

يهدف البحث إلى دراسة البنية التشريحية وتقييم النشاط المضاد للتأكسد للخلاصات الإيتانولية المائية للأجزاء النباتية المختلفة (أوراق، أزهار، ثمار) للنوع *M.indicus* السوري بدراسة المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات وقدرتها على تثبيط الجذور الحرة باستعمال جذر DPPH. تم إجراء الفحص الكيميائي النباتي للمكونات الفعالة باستعمال الكواشف اللونية وكواشف الترسيب المعروفة. حُدد المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات بطريقة فولين (Folin-Denis) وكلوريد الألمنيوم على التوالي. أظهرت نتائج الفحص الكيميائي النباتي وجود الفلافونويدات والتانينات والكومارينات، أما بالنسبة للصابونينات والقلويدات فهي موجودة ولكن بنسب ضئيلة، بينما تغيب الأنتراكينونات في أجزاء النبات المختلفة. أظهرت النتائج وجود محتوى عالٍ من الفينولات والفلافونويدات في الأجزاء النباتية المختلفة، تفاوت المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات بين الأجزاء المدروسة، حيث

*قسم العقاقير - كلية الصيدلة - جامعة حلب

**قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة دمشق

كان المحتوى الأعلى للفينولات الكلية في الأوراق (10.05 ± 0.23 mg GAE/g) ، فالأزهار (9.14 ± 0.21 mg GAE/g plant)، ثم الثمار (7.17 ± 0.63 plant). بينما المحتوى الكلي الأعلى للفلافونويدات في الأوراق (3.48 ± 0.02 mg QE/g plant)، فالأزهار (2.77 ± 0.07 mg QE/g plant)، ثم الثمار (2.60 ± 0.10 mg QE/g plant).

بينت النتائج أن قدرة الخلاصة الايتانولية للأوراق والثمار على تثبيط الجذور الحرة متماثلة %80.58، في حين ارتفعت قليلاً في الأزهار %82.46، مما يشير إلى إمكانية عد نبات *M. indicus* مصدراً واعداً للمكونات الفعالة المضادة للتأكسد. بينت الدراسة التشريحية للنوع المدروس وجود الصفات التشريحية التالية: حبات الطلع ذات ثلاثة ثقوب وثلاثة أثلام، المسام من النمط غير المنتظم، المقطع العرضي للساق مثلثي الشكل، حافة الورقة مدببة، وجود نسيج كولانشيمي تحت البشرة وفوق الحزمة الوعائية في الورقة والساق، وجود لحاء ثانوي داخلي فوق الحزمة الوعائية للورقة والساق، استمرار النسيج الحباكي تحت البشرة العلوية في منطقة الضلع الرئيس.

الكلمات المفتاحية: نبات الحندقوق *Melilotus indicus*، الفينولات TP، الفلافونويدات TF، النشاط المضاد للتأكسد، حبات الطلع، البنية التشريحية.

Anatomy study and evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenolics and Total Flavonoids Contents of Syrian *Melilotus indicus* L.

Dr. Amina Ibrahim**

Dr. Thanaa Harami*

Abstract

The research aims to studying the anatomical structure and evaluation of antioxidant activity of ethanolic extracts of different plant parts (Leaves, Flowers, Fruits) of Syrian *Melilotus indicus* by studying the total content of phenols and flavonoids and its ability of inhibition free radicals by DPPH assay.

The phytochemical screening was performed by known color and precipitated reagents, the total phenols and flavonoids determined by Folin –Denis and aluminum chloride respectively.

The results of phytochemical screening showed exist of flavonoids, tannins and coumarins, but saponins and alkaloids are present but in small proportion, while anthraquinones are absent in the different parts of plant.

The results showed high and varied content of phenols and flavonoids in different plant parts, the highest total phenolic content was in leaves (10.05 ± 0.23 mg GAE/g plant), then flowers (9.14 ± 0.21 mg GAE/g plant), then fruits (7.17 ± 0.63 mg GAE/g plant).

Also the highest total flavonoids content was in leaves (3.48 ± 0.02 mg QE/g plant), then flowers (2.77 ± 0.07 mg QE/g plant), then fruits (2.60 ± 0.10 mg QE/g plant).

*pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Aleppo University.

**Chemistry Department Faculty of Science, Damascus University.

The results showed that the ability of the ethanolic extract of leaves and fruits to inhibit free radicals was similar 80.58%, while rising slightly in flowers 82.46%, consequently *M. indicus* would be promising source of antioxidant phytochemicals.

The anatomical study showed presence of the following anatomical characters as tricolporate pollen grains, anomocyt (Ranunculaceous type) stomata, triangular shape of the stem in transverse section, acute margin of leaf in transverse section, exist of collenchyma tissue under epidermis and over vascular bundle in leaf and stem, exist of inner secondary phloem in leaf and stem, palisade tissue continue under the upper epidermis in main rib of leaf.

Key words: Melilotus indicus, Total phenols, Total flavonoids, Antioxidant activity, pollen grains, anatomical study.

المقدمة:

ينتمي جنس الحندقوق أو إكليل الملك *Melilotus* إلى الفصيلة الفولية *Fabaceae*، يضم الجنس ثمانية أنواع في سورية والنوع المدروس هو *Melilotus indicus* وهو عشب ثنائي الحول طوله 50-100 سم، الساق منتصبية، متفرعة، الأوراق مركبة متناوبة، ثلاثية الوريقات، طويلة المعلاق، تجتمع الأزهار في نورة عنقودية، الأزهار صفراء طولها يتراوح بين 2.5-2.8 mm، الثمرة قرن بيضوي الشكل وحيد البذرة تنتهي قمته بأسلة طولها 4-1.8 mm، يحمل سطح الثمرة شبكة من التجاعيد (صفة مميزة للنوع)، يزهر النبات من آذار إلى أيار (Mouterde, 1986). يبين الشكل (1) الشكل العام لنبات *Melilotus indicus* وأجزائه النباتية المختلفة. والشكل (2) الشكل العام للثمار.

يُستخدم نبات *Melilotus* في مجال الطب الشعبي، كمضاد للتشنج ومضاد للبكتيريا ونظراً لاحتوائه على الكومارينات، فقد استخدم كمضاد لتخثر الدم وفي معالجة المشاكل الوعائية وخاصة الدوالي والبواسير وقرحة القدم السكرية (IzabelaJasicka- Misiak et al. 2017)، كما أنه مضاد للأكسدة لاحتوائه على الفينولات والفلافونويدات وملين وطارد للحشرات، واستعملت بذوره في معالجة أمراض الأعضاء التناسلية، ومضادة للديدان وخافضة للحرارة ولعلاج أمراض القلب والشعب الهوائية (Qureshi et al., 2008; Sayed Ahmed et al., 2014). يحتوي النبات على العديد من المنتجات الثانوية كالفلافونويدات (catechin, coumarin, coumarol,)، والكومارينات (epicatechin, taxifolin and quercetin)، والحموض الدسمة كحمض (linoleic acid)، والتركيبات الثلاثية (Melilotoside A2, adzukisaponinV)، والحموض الفينولية (hydroxycinnamic acid, melilotic acid, coumaric acid)، والستيرويدات (Dildar et al., 2012; Sayed Ahmed et al., 2014) والغلوكوزيدات.



الشكل (1): الشكل العام لنبات *Mellilotus indicus* وأجزائه النباتية المختلفة.



الشكل (2): الشكل العام للثمار باستخدام المكبرة (التكبير 4×)

هدف البحث:

يهدف البحث إلى الكشف الكيفي عن المكونات الفعالة المختلفة في أجزاء النبات، دراسة النشاط المضاد للتأكسد من خلال تحديد المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات للخلاصة الإيتانولية المائية لأجزاء النبات المختلفة (أوراق - أزهار - ثمار)، تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة DPPH، وتوضيح الصفات التشريحية للورقة والساق ونمط حبات الطلع.

المواد والطرائق:

المواد الكيميائية: إيتانول (Fulka)، حمض الغاليك (Sigma)، كاشف الفولين-دينس (Folin-Denis) (sigma) كربونات الصوديوم اللامائية Qualikems، كيرستين (Sigma) Quercetin، كلوريد الألمنيوم المائي (AlCl₃.6H₂O) (Riedel-)، خلاص البوتاسيوم (Riedel-Haën)، كاشف (Sigma)-DPPH (de Haën)، ماء ثنائي التقطير (Aldrich).

الأجهزة: حمام مائي يعمل بالأموح فوق الصوتية نموذج (Elma) Transsonic 460/H، جهاز الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-VIS نموذج (Human) Huma Reader، ميزان رقمي نموذج XB 220 A0.0001 (Precisa)، مطحنة كهربائية نموذج (Panasonic) MX-J220P، ماصات ميكروية (Socorex).

الدراسة التشريحية:

دراسة حبات الطلع: درست حبات الطلع في قطرة ماء باستخدام المجهر الضوئي العادي على التكبيرين 40×، 100×.

دراسة نمط المسام وخلايا البشرة: درست المسام وخلايا البشرة للورقة من خلال نزع البشرة السفلية ووضعها في قطرة ماء، وفحصها باستخدام المجهر الضوئي العادي على التكبيرين 10×، 40×.

دراسة البنية النسيجية لمقاطع عرضية في الساق والورقة: أجريت مقاطع يدوية باستخدام الشفرة العادية في الساق والورقة (منطقة الصفيحة الورقية والضلع الرئيس)، لونت بطريقة التلوين المضاعف (أخضر اليود وأحمر الكارمن) (حمد وآخرون 2010)، حُفظت بالجليسرين وفحصت على التكبيرين $10\times$ ، $40\times$.
الدراسة الكيميائية:

جمع النبات ومعالجته: جُمع نبات *Melilotus indicus* النامي برياً في سورية من كلية العلوم في جامعة دمشق في صيف عام 2017، فصلت الأجزاء النباتية المختلفة (أوراق، أزهار، ثمار) وجُففت في الظل بدرجة حرارة الغرفة، طُحنت وحُفظت في أوعية عاتمة محكمة الاغلاق.

تحضير المستخلص النباتي: أخذ (1g) من المسحوق الجاف للأجزاء النباتية الهوائية (أوراق، أزهار، ثمار) واستُخلصت ثلاث مرات بالايثانول 70% (15 ml في كل مرة) (Sonju et al., 2017) في حمام الأمواج فوق الصوتية ultrasonic bath لمدة نصف ساعة في درجة حرارة 50°C ، رُشحت الخلاصات الناتجة عبر فلاتر بأبعاد $0.45\mu\text{m}$ ، ثم أتمم الحجم بمحلول الايثانول 70% في دوارق حجمية حتى 50 ml. حُفظت العينات في زجاجات عاتمة في درجة حرارة 5°C لحين استعمالها.

الكشف الكيفي عن المركبات الكيميائية الفعالة حيويًا في المستخلص النباتي: أجري الفحص الكيميائي النباتي لمستخلصات الأجزاء النباتية (أوراق، أزهار، ثمار)، لدراسة وجود، أو غياب المركبات الكيميائية المختلفة من صابونينات، فلافونويدات، تانينات، انتراكينونات، قلويدات وذلك باستعمال كواشف الترسيب والكواشف اللونية.
الكشف عن الفلافونويدات:

اختبار شينودا (Shinoda test): استخلص 1g من مسحوق النبات باستعمال 10ml ميثانول بالتسخين على حمام مائي، جُفف حتى الحصول على الرسابة، التي حُلّت في 1ml إيثانول وأضيف لها بضع قطرات من HCl المركز و0.1g من

المغنزيوم، يتشكل بوجود الفلافونويدات لون أحمر ثابت. (Harbone,1973; Ajayi *et al.*,2011)

الكشف عن الصابونينات:

اختبار حدوث الرغوة: استخلص 1g من مسحوق النبات باستعمال 10 ml ماء مقطر في أنبوب اختبار، رُج الأنبوب جيداً. يتشكل بوجود الصابونينات عمود ثابت من الرغوة يصل ارتفاعه إلى 10 cm يبقى ثابتاً ولا يزول بإضافة حمض كلور الماء. (Harbone.,1973.;Sonju *et al.*, 2017)

الكشف عن التانينات:

التفاعل مع كلوريد الحديد: استخلص 1g من مسحوق النبات بـ 5 ml إيثانول، بالتسخين على حمام مائي مدة 5 دقائق، أُضيف إلى الخلاصة 1-2 قطرة من $FeCl_3$ الإيثانولي 5%، ظهور لون أخضر زيتوني سريع الانقلاب إلى اللون الأسود دليل على وجود التانينات (Harbone,1973; Ajayi *et al.*, 2011; Sonju *et al.*, 2017)

الكشف عن الغليكوزيدات الانتراسينية (الانثراكينونات):

تفاعل بورنتريرغ *Borntrager*:

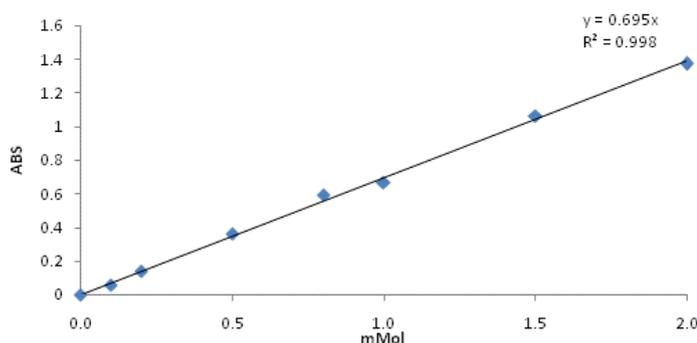
الكشف عن المشتقات الانثراكينونية (بشكل غليكوزيدي): استخلص 1g من مسحوق النبات باستعمال 25 ml من حمض HCL 7% بالتسخين، بُرد واستخلص بمقدار 10ml إيثربترول، يُضاف إلى طبقة الإيثرا 5ml من محلول الأمونيا 10%، تتلون طبقة الأمونيا بوجود الانثراكينونات الغليكوزيدية بلون أحمر وردي. (النوري وآخرون 2009; Evans,2009; 2009; Sonju *et al.*, 2017)

الكشف عن القلويدات: استخلص 1g من مسحوق النبات بـ 3 ml من حمض كلور الماء الممدد و 15 ml ماء مقطر، أُضيف إلى الرشاحة بضع قطرات من كاشف دراجيندورف *Dragendorff's*، تشكل راسب برتقالي أو برتقالي محمر دليل على وجود القلويدات. (Evans,2009.; Sonju *et al.*, 2017)

الكشف عن الكومارينات: استخلص 0.5g من مسحوق النبات بـ 10ml ماء، مع الغليان لمدة 5 دقائق ثم رُشحت العينة، وأُضيف إلى الرشاحة 1ml من محلول هيدروكسيد الصوديوم 1:1، رُجبت العينة، ظهور لون وردي محمر خلال 2 دقيقة دليل وجود الكومارينات. (النوري وآخرون 2009 Ajayi et al. 1973; Harbone, 2011,

تعيين محتوى الفينولات الكلية باستخدام كاشف الفولين:

استعملت طريقة الفولين (Folin -Denis) لتعيين المحتوى الكلي للفينولات TP في الخلاصة الإيثانولية للأجزاء النباتية المختلفة (الأوراق، الأزهار، الثمار)، وباستعمال حمض الغاليك كمادة عيارية. أُخذ 250µl من الخلاصة الإيثانولية (بتكرار ثلاث مرات لكل عينة) وأُضيف إليها على التوالي: 4ml ماء ثنائي التقطير و 250µl كاشف الفولين، مُزجت المحتويات بشكل جيد وتُركت في درجة حرارة الغرفة مدة 10 دقائق. ثم أُضيف لها 500ml من كربونات الصوديوم (10%, w/v). مُزجت الإضافات جيداً، وحُفظت في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة. سجلت امتصاصية اللون الأزرق المتشكل عند طول موجة 750 nm، باستعمال جهاز مطياف الضوء المرئي كُرر الإجراء السابق على سلسلة معيارية من حمض الغاليك بتراكيز (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM). تم تعيين المحتوى الكلي للفينولات في الخلاصات الإيثانولية للأجزاء النباتية المختلفة من معادلة المنحني المعياري لحمض الغاليك ($Y=0.695X, R^2=0.998$)، وقُدرت بعدد الملي غرامات المكافئة لحمض الغاليك لكل 1 غرام من الوزن الجاف للنبات (mg GAE/g plant). حُسب المحتوى الكلي للفينولات على النحو التالي: متوسط قيمة المحتوى الكلي للفينولات \pm الانحراف المعياري (Singleton et al., 1999).

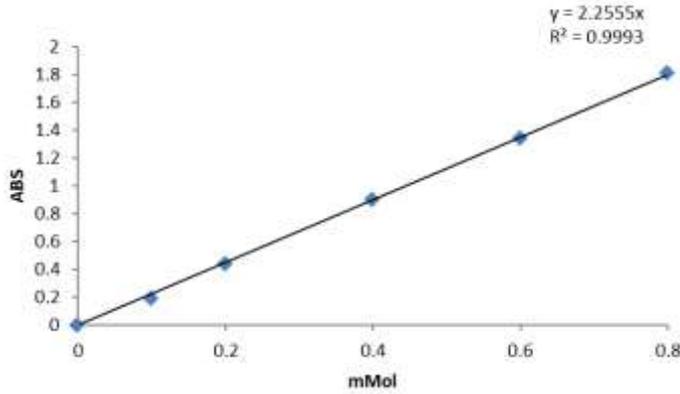


الشكل (3): السلسلة العيارية لحمض الغالبك

تعيين المحتوى الكلي للفلافونويدات TF:

عُيّن المحتوى الكلي للفلافونويدات في الخلاصات الإيثانولية لأجزاء النباتية المختلفة (أوراق، أزهار، ثمار) طيفياً بتشكيلها معقداً أصفر اللون مع كلوريد الألمنيوم وباستعمال الكيرستين كمادة عيارية.

أخذ 1ml من عينات الخلاصة النباتية (بتكرار ثلاث مرات كل عينة)، أضيف 3ml من الإيثانول 99.5% و 0.2ml محلول كلوريد الألمنيوم (10%, w/v) و 0.2ml من محلول خلات البوتاسيوم (1M)، ثم 5.6ml ماء ثنائي التقطير. مُزجت الإضافات جيداً، وحفظت العينات في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة مدة 40 دقيقة. قيس امتصاصية اللون الأصفر المتشكل عند طول موجة 440nm، باستعمال جهاز مطياف الضوء المرئي. كُـرر الإجراء السابق على سلسلة معيارية من الكيرستين بتركيز (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8mM).



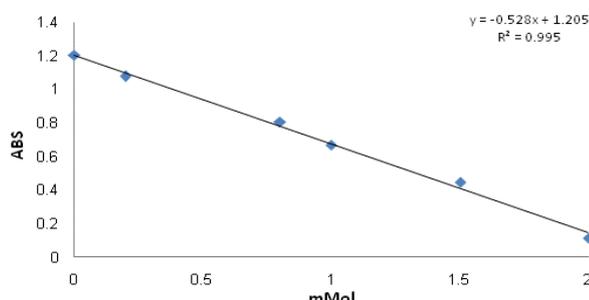
الشكل (4). السلسلة العيارية للكيرستين

عُين المحتوى الكلي من الفلافونويدات في الخلاصات الإيثانولية للأجزاء النباتية من معادلة المنحني المعياري للكيرستين، ($Y=2.255X$, $R^2=0.999$)، وقُدِّرت بعدد الملي غرامات المكافئة للكيرستين لكل 1 غرام من الوزن الجاف للنبات (mg QE/g plant). حُسب المحتوى الكلي للفلافونويدات على النحو التالي: متوسط قيمة المحتوى الكلي للفلافونويدات \pm الانحراف المعياري (AlHafez *et al.* 2014; Shaghghi *et al.*, 2009)

تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة باستخدام كاشف الـ DPPH:

عُيِّنت القدرة على تثبيط الجذور الحرة لكل من الخلاصات الإيثانولية للأجزاء النباتية المختلفة (الأوراق والأزهار والثمار)، ولحمض الغاليك كمادة عيارية، باستعمال كاشف DPPH. أُخذ 200 μ l من عينات الخلاصات النباتية (وبتكرار ثلاث مرات لكل عينة)، ومن محاليل السلسلة العيارية لحمض الغاليك وأضيف إليها 3ml من محلول الـ DPPH المحضر بالإيثانول بتركيز 45 μ g/L مُزجت الإضافات بشكل جيد، ثم حفظت العينات في الظلام عند درجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة. سجلت امتصاصية DPPH المتبقي عند طول موجة 515 nm، باستعمال جهاز مطياف الضوء المرئي.

كُرر الإجراء السابق على سلسلة معيارية من حمض الغاليك بالتراكيز (0,0.2,0.8,1.0,1.5,2.0 mM). عُينت النسبة المئوية DPPH المتبقي من المعادلة $(Y=-0.5288X+1.205, R^2=0.996)$.



الشكل (5). السلسلة العيارية لتثبيت حمض الغاليك بواسطة كاشف الـ DPPH

حُدثت النسبة المئوية للقدرة على تثبيت الجذور الحرة للعينات من المعادلة التالية: $DPPH\% = (A_C - A_S) * 100 / A_C$ حيث: A_C امتصاصية العينة الشاهدة (DPPH 100%)، A_S امتصاصية العينة المدروسة (Saha et al., 2008).

الدراسة الاحصائية:

حُدثت قيم الانحراف المعياري St لثلاث مكررات لكل من الخلاصات النباتية المدروسة (أوراق- ثمار أزهار). ثم حُدثت قيمة معامل الانحراف المعياري المساهم S_{pool} ، ثم حسبت قيمة t_{exp} عند حد ثقة 95%، بهدف تحديد الفروق المعنوية بين العينات المدروسة اعتماداً على المعادلات التالية.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$s_{pool} = \sqrt{\frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_B - 1)s_B^2}{n_A + n_B - 2}}$$

$$t_{exp} = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{s_{pool} \times \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}}}$$

النتائج والمناقشة:

I: الدراسة التشريحية:

يُعد هذا البحث أول دراسة عن البنية التشريحية للنوع *Melilotus indicus* النامي برياً في سورية.

1- حبات الطلع: كروية الشكل ذات ثلاثة تقوُب إنتاش وثلاثية الأثلام *tricolporate*، ذات جدار مضاعف، وهذا توافَق مع دراسة للباحث (El-Sayed *et al.*, 2010) على أنماط حبات الطلع لبعض نباتات تحت الفصيلة *Papilionoideae* (الشكل 6).



الشكل (6). الشكل العام لحبات الطلع وتَقوُب الإنتاش على التكبيرين (40×، 100×)

2- نمط المسام وخلايا البشرة في الورقة: المسام من النمط *Anomocytic* (*Ranunculaceous type*)، حيث يُحيط بالسَم 3-4 خلايا حارسة، خلايا البشرة غير منتظمة الشكل، ذات جدار متعرج وتموج بعمق (الشكل 7).



الشكل (7). خلايا البشرة والمسام في الورقة من النمط *Anomocytic* (*Ranunculaceous type*) على التكبير (40×)

3- البنية النسيجية لمقاطع عرضية في الساق والورقة:

البنية النسيجية لمقطع عرضي في الساق:

أبرز ما يميز المقطع العرضي للساق أنه مثلثي الشكل، يتميز بوجود ثلاثة أعراف (نتوءات)، ويتألف من الطبقات التالية الشكل (9،10):

1- القشيرة: عبارة عن ترسب الكيوتين أو القشيرين على السطح العلوي لخلايا البشرة.

2- البشرة: تتألف من طبقة واحد من الخلايا السيللوزية مربعة - مستطيلة الشكل مترابطة، تحمل عدداً قليلاً من الأوبار اللامسة وحيدة الخلية مثألة، وأوبار مفرزة وحيدة القاعدة وحيدة الرأس (الشكل 8).

3- النسيج الكولانشيمي الزاوي: يتألف من 3-4 طبقات من الخلايا السيللوزية، لا تحوي فيما بينها فراغات هوائية نظراً لترسب البكتوسيللوز في زوايا الخلايا.

4- النسيج البرانشيمي: يتألف من 2-3 طبقات من خلايا سيللوزية متطولة - مضلعة حاوية على صناعات خضراء.

5- النسيج السكرانشيمي: يكون على شكل تجمعات فوق الحزم الوعائية، ويتألف من 5-6 صفوف من الخلايا المتخشبة.

6- منطقة الحزم الوعائية: تتألف من:

- اللحاء ابتدائي: يكون على شكل تجمعات صغيرة من الخلايا السيللوزية المترابطة.

- اللحاء الثانوي: يُشكل اللحاء الثانوي حلقة دائرية مستمرة من الخلايا السيللوزية المترابطة.

- الكامبيوم الوعائي: متمايز إلى لحاء ثانوي وخشب ثانوي.

-الخشب الثانوي: يكون على شكل حزم متعددة تتوزع بشكل حلقة، يفصل فيما بينها صفوف قليلة من البرانشيم الوعائي، يتألف الخشب الثانوي من أوعية خشبية ثانوية.

-الخشب الابتدائي: يتألف من تجمع لأوعية خشبية ابتدائية.

-اللحاء الابتدائي الداخلي: تنتهي كل حزمة وعائية بتجمع للحاء ابتدائي داخلي مؤلف من تجمع لخلايا سيللوزية متراسة.

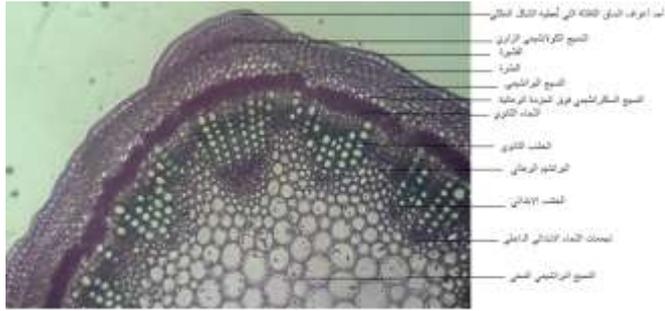
7-النسيج البراشيمي المخي: يحتل مركز الساق ويتألف من عدة طبقات من الخلايا السيللوزية كروية الشكل تحوي فيما بينها فراغات هوائية.



وبرة مفرزة وحيدة القاعدة وحيدة الرأس



الشكل(8).وبر لامسة وحيدة الخلية مثألة



الشكل (9). الشكل العام لمقطع عرضي في الساق على التكبير (10×)



الشكل (10). الشكل العام لمقطع عرضي في الساق على التكبير (40×)

البنية النسيجية للورقة: تتضمن دراسة منطقة الصفيحة الورقية (نصل الورقة) ومنطقة الضلع الرئيس.



الشكل (11). الشكل العام لمقطع عرضي في الورقة (منطقة الصفيحة الورقية والضلع الرئيس) على التكبير (10×)

لاحظنا وجود صفة مهمة وهي أن حافة الورقة في المقطع العرضي مدببة مؤلفة من عدة طبقات من الخلايا السيللوزية.



الشكل (12). الشكل العام لحافة الورقة المدببة على التكبير (10×)

1- منطقة الصفيحة الورقية : تتألف من الطبقات التالية الشكل (13):

1- القشيرة العلوية: عبارة عن ترسب الكيوتين أو القشيرين على السطح العلوي لخلايا البشرة.

2- البشرة العلوية: تتألف من صف واحد من خلايا سيللوزية مستطيلة الشكل.

3- النسيج المتوسط: يتألف من النسيج الحباكي والنسيج الفراغي.

يتألف النسيج الحباكي من طبقتين من خلايا سيللوزية متطاوله متراسة على بعضها البعض حاوية على صانعات خضراء، يستمر تحت البشرة العلوية في منطقة الضلع

الرئيس. أما النسيج الفراغي فهو شبيه بالحبكي مؤلف من 2-3 طبقات من خلايا مضلعة - كروية الشكل حاوية فيما بينها فراغات هوائية صغيرة (أصمخة هوائية) حاوية على صناعات خضراء.

- 4- **البشرة السفلية:** تتألف من طبقة واحدة من خلايا سيللوزية مستطيلة الشكل تحمل أعداداً قليلة من أوبار لامسة وحيدة الخلية مثألة.
- 5- **القشيرة السفلية:** عبارة عن ترسب الكيوتين أو القشيرين على السطح العلوي لخلايا البشرة.



الشكل 13. مقطع عرضي في منطقة الصفيحة الورقية على التكبير (4×، 10×)

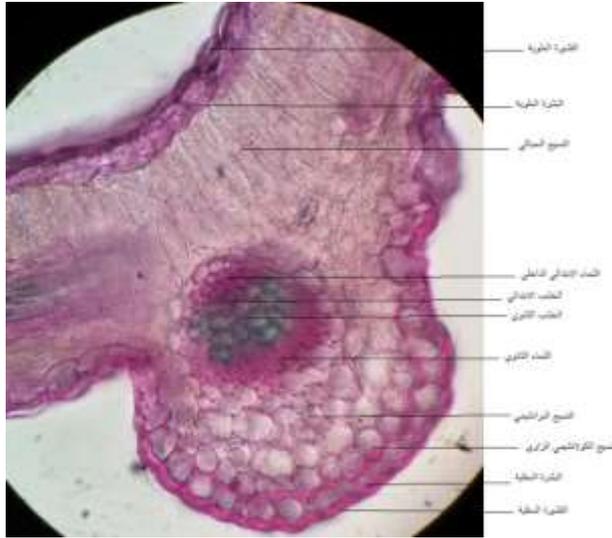
2: منطقة الضلع الرئيس:

تتميز الورقة في منطقة الضلع الرئيس باستمرار النسيج الحبكي تحت البشرة العلوية وهي صفة مميزة للنوع نظراً لكونها صفة غير سائدة في أوراق النباتات.

تتألف منطقة الضلع الرئيس من الطبقات التالية: الشكل (14)

- 1- القشيرة العلوية: عبارة عن ترسب الكيوتين على السطح العلوي لخلايا البشرة.
- 2- البشرة العلوية: تتألف من طبقة واحدة من الخلايا السيللوزية مستطيلة الشكل.
- 3- النسيج الحبكي: يتألف من طبقتين من خلايا سيللوزية متطاولة ومتراصة حاوية على صناعات خضراء.
- 4- الحزمة الوعائية: تتألف من الطبقات التالية:
- لحاء ابتدائي داخلي: تجمعات لخلايا سيللوزية متراصة.

- خشب ابتدائي: تجمع لأوعية خشبية ابتدائية.
- خشب ثانوي: مؤلف من عدة طبقات من الأوعية الخشبية.
- الكامبيوم الوعائي: متميز إلى لحاء ثانوي وخشب ثانوي.
- لحاء ثانوي: يتألف من عدة طبقات من خلايا سيللوزية مضلعة متراسة.
- لحاء ابتدائي: يتألف من تجمع خلايا سيللوزية متراسة.
- 5- النسيج البرانشيمي: يتألف من 6-7 طبقات من خلايا سيللوزية بيضوية - مضلعة الشكل حاوية على صناعات خضراء، تحوي فيما بينها فراغات هوائية.
- 6- النسيج الكولانشيمي الزاوي: يتألف من طبقة واحدة من الخلايا السيللوزية لا تحوي فيما بينها فراغات هوائية، نظراً لترسب البكتوسيلولوز في زوايا الخلايا.
- 7- البشرة السفلية.
- 8- القشيرة السفلية



الشكل (14). مقطع عرضي في منطقة الضلع الرئيس على التكبير (10×)

قورنت نتائج دراستنا مع نتائج الدراسة التشريحية التي أجريت من قبل الباحث (FundäÖzbek.2014) على النوع *Mellilotus bicolor* النامي في تركيا، وقد لاحظنا وجود توافق في نمط المسام والعديد من الصفات التشريحية العامة للساق والورقة رغم اختلاف النوع، علما أن الدراسة على النوع النامي في تركيا، لم تُشر إلى تسلسل الطبقات النسيجية للحزمة الوعائية.

II: الدراسة الكيميائية:

لا بد من الإشارة إلى أن الدراسة الحالية هي أول دراسة عن النوع *M. indicus* في سورية وخاصة فيما يتعلق بدراسة المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات والقدرة على تثبيط الجذور الحرة، وأيضاً الكشف الكيفي عن المركبات الفعالة حيويًا في الأجزاء النباتية المختلفة (الأوراق، الأزهار، الثمار) أما الدراسات العالمية فلم نستطع الحصول إلا على دراستين للنوع المدروس، أجريت إحداها في بنغلادش والأخرى في باكستان. تناولت كل منهما دراسة المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات، والقدرة على تثبيط الجذور الحرة. وقد قمنا بمقارنة نتائجنا مع نتائج كلتا الدراستين، في حين أن الدراسات العالمية عن النوع *M.officinalis* متعدّدة.

1- الكشف الكيفي عن المركبات الكيميائية الفعالة حيويًا:

بيّن الكشف الكيفي باستخدام كواشف الترسيب والكواشف اللونية وجود المركبات الكيميائية الموضحة في الجدول (1).

تبين من خلال الكشف احتواء الأجزاء النباتية على الفلافونويدات والتانينات والكومارينات، فقد تشكل لون أحمر ثابت واضح في كشف الفلافونويدات ولون أسود قاتم في كشف التانينات، ولون وردي مائل للبرتقالي قاتم في كشف الكومارينات، أما بالنسبة للصابونينات والقلويدات فهي موجودة في الأجزاء النباتية المختلفة ولكن بنسب ضئيلة، فقد تشكل راسب خفيف مع كاشف دراجيندورف في الكشف عن القلويدات وعمود من الرغوة ارتفاعه حوالي 2cm في الكشف عن الصابونينات، بينما تغيب الأنتراكينونات في أجزاء النبات المختلفة.

الجدول (1): الكشف الكيفي عن المكونات الفعالة حيوياً في الأجزاء النباتية المختلفة

الجزء النباتي	الفلافونويدات	الصابونينات	التانينات	الأنتراكينونات	القلويدات	الكومارينات
الأوراق	+	+	+	-	+	+
الأزهار	+	+	+	-	+	+
الثمار	+	+	+	-	+	+

تتوافق هذه النتيجة مع الاختبارات التي أجريت على الخلاصة الايتانولية لأوراق نبات الـ *M.indicus* النامي في بنغلاديش (Sonju et al., 2017) من حيث وجود الصابونينات والقلويدات وغياب الأنتراكينونات، وتختلف عنها من حيث وجود الفلافونويدات والتانينات التي تغيب في النوع النامي في بنغلادش. لم تكشف الدراسة عن النوع النامي في بنغلادش عن وجود الكومارينات الموجودة في النوع السوري.

2- تحديد المحتوى الكلي للفينولات:

يبين الجدول 2 المحتوى الكلي للفينولات في الأجزاء النباتية المختلفة (الأوراق، الثمار، الأزهار). تملك الخلاصة الايتانولية 70% لأوراق نبات الـ *M.indicus* المحتوى الأعلى من الفينولات فالأزهار ثم الثمار الجدول 2. يتبين من الدراسة أن الخلاصة الايتانولية 70% لأوراق نبات الـ *M. indicus* النامي في سورية يحوي نسبة أعلى من الفينولات بأربع مرات من محتوى الفينولات الكلي (2.57 mg GAE/g Plant) للخلاصة الايتانولية 100% لأوراق النبات النامي في بنغلادش (Sonju et al., 2017). كما بينت الدراسة (Dildar et al., 2012) أن الخلاصة الميتانولية 100% للأجزاء الهوائية كاملة للنبات النامي في باكستان، والمجموع فترة الإزهار تحوي كمية أقل من الفينولات (25 µgGAE/ml PE) مقارنة بالنبات المجموع فترة الإثمار (45 µgGAE /ml PE). يعود الاختلاف في محتوى الفينولات الكلي إلى اختلاف

البيئة والجزء النباتي المدروس، فقد تناولت الدراسة على النوع النامي في الباكستان الأجزاء الهوائية كاملة، بينما تناولت دراستنا كل جزء نباتي على حدة.

الجدول (2). المحتوى الكلي للفينولات في الأجزاء النباتية المختلفة

Con(mg GAE/g plant)	الجزء النباتي
10.05*± 0.23	الأوراق
7.17± 0.63	الثمار
9.14± 0.21	الأزهار

* كل قيمة هي متوسط (3) تكرارات ± الانحراف المعياري

3- المحتوى الكلي للفلافونويدات

يبين الجدول 3 المحتوى الكلي للفلافونويدات في الأجزاء النباتية المختلفة. تملك الخلاصة الايتانولية 70% لأوراق نبات الـ *M.indicus* المحتوى الأعلى من الفلافونويدات فالأزهار ثم الثمار الجدول 3. يتبين من الدراسة أن الخلاصة الايتانولية 70% لأوراق نبات الـ *M.indicus* النامي في سورية يحوي كمية أعلى من الفلافونويدات بثلاث مرات من محتوى الفلافونويدات الكلي (1.16 mg QE/g Plant) للخلاصة الايتانولية 100% لأوراق النبات النامي في بنغلادش (Sonju et al., 2017) كما بينت الدراسة (Dildar et al., 2012) أن الخلاصة الميتانولية 100% للنبات النامي في الباكستان والمجموع فترة الإزهار تحوي كمية أقل من الفلافونويدات (150 µgRE/ml PE) مقارنة بالنبات المجموع فترة الإثمار (550 µgRE/ml PE). يعود الاختلاف إلى اختلاف البيئة والجزء النباتي المدروس، فقد تناولت الدراسة على النوع النامي في الباكستان الأجزاء الهوائية كاملة، بينما تناولت دراستنا كل جزء نباتي على حدة.

الجدول(3). المحتوى الكلي للفلافونويدات في الأجزاء النباتية المختلفة

Con(mg QE/g plant)	الجزء النباتي
3.48*± 0.02	الأوراق
2.60± 0.10	الثمار
2.77± 0.07	الأزهار

* كل قيمة هي متوسط (3) تكرارات ± الانحراف المعياري

4- القدرة على تثبيط الجذور الحرة باستعمال كاشف DPPH

تم تعيين القدرة على تثبيط الجذور الحرة في الخلاصة الإيتانولية للأجزاء النباتية باستعمال مركب الـ DPPH، وحُددت النسبة المئوية للقدرة على تثبيط جذر DPPH للعينات وفقاً للمعادلة التالية:

$DPPH\% = (A_C - A_S) * 100 / A_C$ حيث: A_C امتصاصية العينة الشاهدة (DPPH) (100%)، A_S امتصاصية العينة المدروسة. كما حُسب الانحراف المعياري لثلاثة مكررات. يبين الجدول (4) النسبة المئوية لتثبيط الـ DPPH في الأجزاء النباتية المختلفة، حيث أن نسبة تثبيط الجذور الحرة لكل من الخلاصة الإيتانولية للأوراق والثمار متماثلة 80.58%، بينما ترتفع نسبة تثبيط الجذور الحرة في الأزهار قليلاً 82.46% (لكل 200µL من الخلاصة النباتية). تبين أن IC_{50} لتثبيط الجذور الحرة للنبات النامي في بنغلادش (Sonju *et al.*, 2017) 0.854mg/ml. كما بينت الدراسة الباكستانية (Dildar *et al.*, 2012) أن الخلاصة الميتانولية 100% للنبات قد تثبتت جذر الـ DPPH بمقدار 6.55% في فترة الإزهار مقارنة بفترة الإثمار والتي تبلغ 2.78%.

الجدول (4). النسبة المئوية لتثبيط جذر DPPH في الأجزاء النباتية المختلفة

DPPH inhibition %	الجزء النباتي
80.58*± 1.67	الأوراق
80.58± 1.68	الثمار
82.46± 1.04	الأزهار

* كل قيمة هي متوسط (3) تكرارات \pm الانحراف المعياري

يعود هذا التباين في قيم محتوى الفينولات والفلافونويدات الكلي إلى قطبية المحل المستخدم، الايتانول 70% أعلى قطبية من الايتانول 100% لذلك كان أكثر كفاءة في استخلاص كمية أكبر من الفينولات والفلافونويدات. وأن نسبة تثبيط الجذور الحرة أعلى في الدراسة الحالية لكل جزء من أجزاء النبات على حدة، ويعود ذلك إلى ارتفاع كمية الفينولات والفلافونويدات الكلية في أجزاء النبات المختلفة.

الدراسة الإحصائية:

تمت مقارنة نتائج المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات وقيم تثبيط جذر DPPH لكل من (أوراق-ثمار) و(ثمار-أزهار) و(أوراق-أزهار). بينت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية في المحتوى الكلي للفينولات لخلاصات الأجزاء النباتية المختلفة. أما بالنسبة لاختبار تثبيط الجذور الحرة لم توجد فروق معنوية بين النتائج. بينما كانت الفروق معنوية في المحتوى الكلي للفلافونويدات عند مقارنة (أوراق-ثمار) و(أوراق-أزهار)، وغير معنوية عند مقارنة (ثمار-أزهار). يوضح الجدول 5 قيم t_{exp} المحسوبة، قورنت قيم t_{exp} الناتجة بالنسبة إلى قيمة مرجعية $t_{exp}=2.776$ عند حد ثقة 95%.

الجدول (5). قيم t_{exp} المحسوبة لمقارنة الفروق المعنوية لخلاصات الأجزاء النباتية المختلفة

قيمة t_{exp}	المحتوى الكلي للفينولات	المحتوى الكلي للفلافونويدات	تثبيط جذر DPPH
أوراق-ثمار	7.40	14.60	1.04×10^{-14}
ثمار-أزهار	5.11	2.37	1.64
أوراق-أزهار	5.05	16.84	1.66

الخاتمة:

بينت الدراسة أن النوع *M. indicus* ذو محتوى عال من الفينولات والفلافونويدات وقدرة عالية على تثبيط جذر DPPH وبالتالي يمكن عده مصدراً واعداً للمكونات المضادة للتأكسد.

المراجع References

- Ajayi I A, Ajibade O, Oderinde R A., (2011). Preliminary phytochemical analysis of some plant seeds, Res. J. Chem. Sci.; 1(3) 58-62.
- AlHafez M., Kheder F., Aljoubbeh M.(2014). Polyphenols, flavonoids and (-)-epigallocatechingallate in tea leaves and in their infusions under various conditions. Nutrition and Food Science Vol.44,5,pp455-463.
- Dildar Ahmed, HiraBaig and Saman Zara (2012).Seasonal variation of phenolic ,flavonoids, antioxidant and lipid peroxidation inhibitory activity of methanolic extract of Melilotusindicus and its sub-fractions in different solvents. Int. J. Phytomed. 4: 326-332.
- El-Sayed MS, Tantawy ME, Ibrahim AG, El-SheekhAA (2010). Pollen morphology of some species of subfamily Papilionoideae. Paper presented at the 5th scientific enviromental conference, University of Zazazig, 71-86
- Evans W C, X (2009), Trease and Evans Phamacognose, W.B. Saunders Company Limited, W C, 315-316.
- Funda Özbek, Mehmet UfukÖzbek, Murat Ekici (2014).,Morphological, anatomical, pollen and seed morphological properties of Melilotus bicolor Boiss. &Balansa (Fabaceae) endemic to Turkey, Australian Journal of Crop Science AJCS 8(4):543-549.
- Harborne J B. (1973).Phytochemical methods. Chapman and Hall Ltd., London; 49-188.
- Izabela Jasicka-Misiak, Ewa Makowicz and Natalia Stanek (2017), Polish Yellow Sweet Clover (*Melilotus officinalis*L.). Honey,Chromatographic Fingerprints, and Chemical Markers, Molecules, Nancy D. Turner. P 2-14

- Mouterde, P. (1986).Nouvel le flore du Liban et de la Syrie. 2. Librairie orientale Beyrouth, Liban:458.
- Qureshi SJ, Khan MA and Ahmad M (2008).A survey of useful medicinal plants of Abbottabad in northern Pakistan.Trakia J. Sci., 6(4): 9-51
- Sayed Abdel Kader Ahmed and Mahmoud Al-Refai, (2014). Chemical constituents and cytotoxic activities of the extracts of Melilotusindicus, European Journal of Chemistry 5 (3) 503 • -506.
- Saha, M. R., S. M. R. Hasan, R. Akter, M. M. Hossain, M. S. Alam, M. A. Alam, M. E. H. Mazumder. (2008). In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of mimusopselengilinn. Bangl. J. Vet. Med. 6(2): 197-202.
- SingletonL., Orthofer R., Lamuela-Ravents.(1999).Analysis of Total phenols and other oxidation substratsand antioxidants by means of folin-Ciocalteureagent. Methods in Enzymology, Vol.299.
- Shaghghi M., Manzoori J.L., Afshar D.J., Jouyban A.(2009). Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using terbium sensitized flouresnce method export citation. DARU- Journal of Faculty of Pharmacy,Tehran University of Medical Science.Vol 17,pp.264-268.
- Sonju J. J., Islam MD. F., Sutradhar K., Akter T. (2017). Analysis of phytochemical, antioxidant and microbial property of various extracts of the plant MelilotusIndica. World Journal of Pharmaceutical Research, Vol.6, Issue 4, 129-147.
- ابنتسام حمد، آغا عصام، القاضي عماد، سوسان عماد (2010). عملي علم النبات، جامعة دمشق. ص 117
- النوري سمير، آغا محمد عصام، حواصلي هيفاء (2009). عملي علم العقاقير وكيمياء العقاقير (2)، جامعة دمشق. ص 79