

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي -

كلية العلوم الدقيقة



مذكرة تخرج لنيل شهادة

ماستر أكاديمي

شعبة: الكيمياء

تخصص: كيمياء عضوية

إعداد الطالبتين:

فاطمة حمودي

خولة شنوف

الموضوع

محتوى المركبات الفينولية والأنشطة البيولوجية لمستخلصات نبات طبي

Artemisia absinthium

نوقشت بتاريخ: 2021/06/27

لجنة المناقشة:

رئيسا	جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي -	أستاذ تعليم عالي	رضا أحمادي
مناقشا	جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي -	أستاذ محاضر ب	بلقاسم سويبي
مؤطرا	جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي -	أستاذ محاضر أ	سكينة تجاني

السنة الجامعية 2021/2020



إهداء

الي معلم الانسانية شفيعي وحببي وقرة عيني محمد صلى الله عليه وسلم

الي من جرع الكأس فارغا ليسقيني قطرة حب، الي من كلت أنامله ليقدّم لنا لحظة سعادة الي من

حصد الاشواك من دربي ليمهد لي طريق العلم الي القلب الكبير والذي الغالي.

الي من أرضعتني الحب والحنان، الي رمز الحب وبلسم الشفاء، الي القلب الناصع بالبياض، الي

من الجنة تحت أقدامها امي الحبيبة.

الي القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة، الي رياحين حياتي الي من هم أقرب الي من روحي،

الي من شاركني حزن الأم وبهم أستمد عزتي وأصراري، أخوتي وأختي.

الي من شاركني ذكرياتي، وعشن معي أحلى وأصعب أوقاتي، الي أخواتي اللاتي لم تتجبهن أمي،

والي من زار قلبي ليترك بصمة حب ونبضة قلب، أهدي إليهم جميعا هذا البحث المتواضع.

فأطمة





إهداء

الحمد لله فالق الأنوار وجاعل الليل والنهار ثم الصلاة والسلام على سيدنا محمد المختار، الحمد لله الذي وفقنا لهذا ولم نكن لنصل إليه لولا فضل الله علينا.

إلى الذي أنار دربي وحسن خلقي وعلمني أن الحياة معركة المنتصر فيها من كان سلاحه العلم والمعرفة، إلى قدوتي في الحياة ... إلى أبي العزيز.

إلى من غمرتني بنبع حنانها وعطفها إلى التي لم تبخل علي بدعوتها، إليك يا هدية الرحمان يا منبع الحنان ... إلى أُمي الغالية.

إلى من انتظروا لحظة تخرجي إخوتي وأخي الغالي وأولاد أختي إلى من أصبحت جزءا من عائلتي صديقتي الضاوية وإلى كل عائلتي وأقاربي، إلى ملجئي إلى من تذوقت معهم أجمل اللحظات رفيقتا دربي رجاء وحليمة، إلى أحسن من عرفني بهما القدرالي من جعلهما الله إخوتي في الله العزيز الغالي الذي رحل عنا نور الإسلام رحمه الله وجموعي.

إلى من زرعوا في قلبي روح العلم والفكر والخلق الرفيع إلى كل أساتذتي على مر السنوات، إلى من سقطوا سهوا من قلبي ولم يسقطوا من قلبي، إلى كل من ساروا معي في درب العلم والمعرفة طوال مساري الدراسي إلى كل الأصدقاء والزملاء.

أهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع

خولة





شكر وعرافان

"كن عالما، فإن لم تستطيع فكن متعلما، فإن لم تستطيع فأحب العلماء، فإن لم تستطيع فلا

تبغضهم"

نتوجه الي الله العلي القدير خاشعين شاكرين النعمة التي منحها لنا بعد أن كرمتنا بفضله باتمام

رسالتنا والصبر على شئ لا يكون الا بإذنه والحمد لله الذي هدانا وما كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله.

فإن واجب الوفاء يدعونا ونحن ننهي رسالتنا هذه بأن نتقدم بجزيل الشكر الي أستاذتنا الفاضلة

تجاني سكيمة لأقتراحها موضوع الرسالة والاشراف عليها ولما ابدت لنا من ملاحظات ونصائح وتوجيهات

قيمة، راجين من الله سبحانه وتعالى أن يجعلها عطرا فواحا يملئ صدور من نذروا أنفسهم للعلم والتعليم.

كما نتوجه بأرقى عبارات الشكر والتقدير الي مدير مخبر تثمين وترقية الموارد الصحراوية (VTRS)

بجامعة الشهيد حمه لخضر بالوادي الاستاذ الدكتور التهامي العانز وكذلك لا ننسى مسؤول المخبر طلبية

على وناني الصادق لدعمهم لنا طيلة فترة البحث والذي كان له الأثر الكبير في تخفيف عنا صعوبات

ومشقات العمل وما قدمه لنا من توجيهات ونصائح راجينا من اهلل عز وجل أن يجعله في ميزان

حسانتهم.

ويمتد شكرنا وتقديرنا الي لجنة المناقشة الاستاذ رضا أحمادي على قبوله رئاسة لجنة المناقشة

والاستاذ بلقاسم سويحي لقبوله مناقشة مذكرتنا والتي جميع أساتذة كلية علوم الدقيقة والتي عمال مخبر

كيمياء والتكنولوجيا على ما بذلوه من مساعدات طوال مشوارنا في هذا البحث والتي كل من مد لنا يد

العون من قريب أو من بعيد.



المخلص

Artemisia absinthium المعروفة في الجزائر بإسم شجرة مريم هي نبات عطري طبي من العائلة النجمية (*Asteraceae*)، تستخدم على نطاق واسع في مجال الطب في جميع أنحاء العالم، والتي لها العديد من الآثار الطبية على الوقاية من الامراض. الهدف من هذه الدراسة كخطوة أولى هو التقدير الاجمالي لمحتوى الفينولي و الفلافونويدي للمستخلصات المحضرة من الأجزاء الهوائية لـ *Artemisia absinthium* التي تم حصادها من منطقة سدراته التابعة لولاية سوق أهراس في شهر ماي 2020، مع المذيبات التالية: ميثانول ومزيج ميثانول والماء (3/7)، ولقد أظهرت طريقة القياس اللوني بشكل عام أن مستخلص مزيج ميثانول-ماء يحتوي على أكبر كمية من المركبات الفينولية $1935.29 \pm 21.6 \mu\text{g EAG/g}$ ، و المستخلص ميثانولي يحتوي على الفلافونويدات قدرت أكبر قيمة بـ $8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$. وفي الجزء الثاني تمت الدراسة لمستخلصات النبتة بطريقتين: الطريقة الطيفية و الطريقة الكهروكيميائية، حيث تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الطيفية التي تمثلت في اختبار DPPH واختبار FRAP واختبار موليبيدات الفوسفات، حيث وجدنا في اختبار DPPH أعلى قيمة تثبيط للمستخلص المزيج (ميثانول-ماء) بقيمة $IC_{50} = 23.64 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$ ، كما أظهر أيضا اختبار FRAP أعلى قيمة قدرت بـ $86.74 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ ، وبقيمة $40.40 \pm 1.70 \mu\text{g/g}$ في المستخلص الميثانولي وذلك في اختبار موليبيدات الفوسفات، أما بالطريقة الكهروكيميائية استعملنا تقنية الفولتامترية الحلقي حيث أعطى مستخلص الميثانول والماء قدرة عالية على تثبيط الجذر الحر. وأخيرا تم اختبار الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلصات النبتة وذلك عن طريق سلالتين بكتيريتين، حيث تبين لنا أن البكتيريا تمتلك مقاومة ضد مستخلصات النبتة المدروسة.

الكلمات المفتاحية: *Artemisia absinthium*، شجرة مريم، المركبات الفينولية، الفعالية المضادة للأكسدة،

الفولتامترية الحلقي، الفعالية البيولوجية.

Abstract:

Artemisia absinthium, known in Algeria as the Mari tree, is an aromatic medicinal plant of the Asteraceae family, widely used medicinally all over the world, and has many medicinal effects in the prevention of diseases. The aim of this study, as a first step, is the global estimation of the phenols and flavonoids content of extracts prepared from aerated parts of *Artemisia absinthium* collected in the Sedrata region of Souk Ahras in May 2020, with the following solvents: methanol, a mixture of methanol and water (7/3) Overall, the colorimetric method showed that the mixture extract of methanol and water contained the largest amount of phenolic compounds, estimated at $1935.29 \pm 21.6 \mu\text{g EAG/g}$, and flavonoids estimated at $8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$ in methanolic extract. In the second part, plant extracts were studied in two ways: the spectroscopic method and the electrochemical method, where the antioxidant activity was estimated by the spectroscopic method represented by the DPPH test, FRAP test and molybdate phosphate test. In the DPPH test, we found the highest inhibition value for the mixed extract (methanol-water) with a value of $\text{IC}_{50} = 23.64 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$, and the FRAP test showed the highest value estimated at $86.74 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$, and with a value of $40.40 \pm 1.70 \mu\text{g/g}$ in the methanolic extract in the molybdate phosphate test, as for the electrochemical method, we used the cyclic voltammetry technique, where the methanolic and aqueous extract gave a high ability to inhibit free radicals. Finally, the antibacterial biological activity of the plant extracts was tested by two strains of bacteria, where it was found that the bacteria have resistance against the studied plant extracts.

Key words: *Artemisia absinthium*, Mary tree, phenolic compounds, antioxidant activity, cyclic voltammetry, biological activity.

Résumé:

L'Artemisia absinthium, connue en Algérie sous le nom de Mari arbre, est une plante médicinale aromatique de la famille des Astéracées, largement utilisée en médecine dans le monde entier, et possède de nombreux effets médicinaux dans la prévention des maladies. Le but de cette étude, dans un premier temps, est l'estimation globale de la teneur en phénols et flavonoïdes d'extraits préparés à partir de parties aérées d'*Artemisia absinthium* récoltées dans la région de Sedrata à Souk Ahras en mai 2020, avec les solvants suivants : méthanol, un mélange de méthanol et d'eau (7/3) Globalement, la méthode colorimétrique a montré que le mélange extrait de méthanol et d'eau contenait la plus grande quantité de composés phénoliques, estimée à $1935.29 \pm 21.6 \mu\text{g EAG/g}$, et de flavonoïdes estimée à $8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$ méthanol. Dans la seconde partie, les extraits végétaux ont été étudiés de deux manières : la méthode spectroscopique et la méthode électrochimique, où l'activité antioxydante a été estimée par la méthode spectroscopique représentée par le test DPPH, le test FRAP et le test phosphate. Dans le test DPPH, nous avons trouvé la valeur d'inhibition la plus élevée pour l'extrait mixte (méthanol-eau) avec une valeur de $\text{IC}_{50} = 23.64 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$, et le test FRAP a montré la valeur la plus élevée estimée à $86.74 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$, et avec une valeur de $40.40 \pm 1.70 \mu\text{g/g}$ dans l'extrait méthanolique dans le test au phosphate de molybdate, comme pour la méthode électrochimique, nous avons utilisé la technique de voltamétrie cyclique, où l'extrait méthanolique et aqueux a donné une forte capacité à inhiber les radicaux libres. Enfin, l'activité biologique antibactérienne des extraits de plantes a été testée par deux souches de bactéries, où il a été constaté que les bactéries ont une résistance contre les extraits de plantes étudiés.

Mots clés : *Artemisia absinthium*, Mari arbre, composés phénoliques, activité antioxydante, voltampérométrie cyclique, activité biologique.

جدول المحتويات

iv	الملخص
vii	جدول المحتويات
xiii	قائمة الجداول
xiv	قائمة الأشكال البيانية
xvi	قائمة الرموز والاختصارات
1	مقدمة عامة
xi	مراجع المقدمة

الجزء النظري

الفصل I : الدراسة النظرية لنبته شجرة مریم "*Artemisia absinthium*"

6	تمهيد
6	1.I العائلة النجمية (Asteraceae)
7	2.I الجنس الأرطماسيا (<i>Artemisia</i>)
8	3.I دراسة نوع (<i>Artemisia absinthium</i>)
9	4.I تصنيف شجرة مریم (<i>Artemisia absinthium</i>)
9	1.4.I حسب تصنيف Cronquist (1971).
10	5.I التواجد الجغرافي لنبته " <i>Artemisia absinthium</i> "
11	6.I الأسماء الشائعة لنبته " <i>Artemisia absinthium</i> "
11	7.I الاستعمال الطبي لنبته " <i>Artemisia absinthium</i> "
xvii	مراجع الفصل الأول

الفصل II : المركبات الفينولية

14	مدخل
14	1.II تعريف المنتجات الطبيعية
14	1.1.II الأيض الأولي (Métabolites Primaires)
14	2.1.II الأيض الثانوي (Métabolites Secondaires)
15	2.II عديدات الفينولات
15	1.2.II تعريف المركبات الفينولية
16	2.2.II أقسام عديدات الفينولات
16	1.2.2.II احماض الفينولية

16II.2.2.2 الفلافونويدات
17II.3.2 أهمية و دور عديدات الفينول في النباتات
17II.4.2 الاستعمالات العلاجية لعديدات الفينول
17II.5.2 الاحماض الفينولية
17II.1.5.2 الاحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك
17II.2.5.2 الاحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك
18II.6.2 الخصائص البيولوجية والعلاجية للاحماض الفينولية
18II.7.2 الكومارينات
20II.3 الفلافونويدات
20II.1.3 تعريف الفلافونويدات
21II.2.3 تصنيف الفلافونويدات
23II.3.3 فوائد الفلافونويدات بالنسبة للانسان
24II.4.3 فوائد الفلافونويدات بالنسبة للنبات
xixمراجع الفصل الثاني

الفصل III : دراسة الفعالية البيولوجية

26مدخل
27III.1 البكتيريا
27III.1.1 تعريفها
28III.2.1 تسمية البكتيريا
28III.3.1 المكونات الاساسية للخلية البكتيرية
31III.4.1 أساس تصنيف البكتيريا
31III.1.4.1 من حيث التغذية
31III.2.4.1 من حيث شكل بكتيريا
31III.3.4.1 من حيث الوسط الذي يعيش فيه
31III.4.4.1 من حيث توزيع الاسواط
32III.5.4.1 من حيث طريقة التلوين
32III.6.4.1 من حيث أثرها على الانسان
32III.2 البكتيريا المستعملة في الدراسة
33III.1.2 بكتيريا Escherichia Coli
34III.2.2 بكتيريا Pseudomonas aeruginosa
34III.3.2 بكتيريا Staphylococcus aureus
35III.3 المضادات الحيوية

35	1.3.III تعريف المضادات الحيوية.....
36	2.3.III أنواع المضادات الحيوية.....
36	1.2.3.III مضادات حيوية كابحة لنشاط الخلية البكتيرية.....
36	2.2.3.III مضادات حيوية قاتلة للخلية البكتيرية.....
36	3.3.III طرق تأثير المضادات الحيوية.....
36	1.3.3.III مضادات تعمل على إيقاف نسخ ال ADN.....
36	2.3.3.III مضادات تعمل على تخريب بنية الغشاء السيتوبلازمي.....
36	3.3.3.III مضادات تعمل على تخريب الجدار الخلوي.....
37	4.3.3.III مضادات تعمل على مقاومة تكوين البروتينات.....
37	5.3.3.III المقاومة البكتيرية للمضاد الحيوي.....
39	4.III الجذور الحرة.....
40	1.4.III تعريف الجذور الحرة (Les Radicaux libres).....
41	2.4.III أنواع الجذور الحرة.....
41	1.2.4.III الجذور التي لها أعمار قصيرة جدا.....
41	2.2.4.III الجذور الحرة التي لها أعمار طويلة.....
42	3.4.III فعالية الجذور الحرة.....
42	4.4.III اضرار الجذور الحرة.....
43	5.III مضادات الاكسدة.....
43	1.5.III الإجهاد التأكسدي.....
43	2.5.III تعريفها.....
44	3.5.III أقسام مضادات الأكسدة.....
44	1.3.5.III الأنظمة الدفاعية الأولية.....
44	2.3.5.III الأنظمة الدفاعية الثانوية.....
44	6.III تقنيات التحليل الكهروكيميائي.....
44	1.6.III تقنيات الفولتامترية.....
46	2.6.III مجالات استخدام التقنيات الفولتامترية.....
47	3.6.III أهمية تعيين النشاطية للأكسدة بالفولتامترية الحلقي.....
xxii	مراجع الفصل الثالث.....

الجزء العملي

الفصل IV : الطرق والوسائل

49	1.IV المادة النباتية.....
49	1.1.IV وصف منطقة الدراسة.....

50	2.IV الطرق المتبعة في الميدان
50	1.2.IV وقت الجمع
50	2.2.IV التجفيف
50	3.2.IV الطحن والتخزين
51	3.IV الأدوات والوسائل المستعملة
54	4.IV الطرق المتبعة
54	1.4.IV طرق الاستخلاص
54	1.1.4.IV الهدف
55	2.1.4.IV تعريف الاستخلاص
55	3.1.4.IV استخلاص (صلب - سائل)
56	4.1.4.IV تحضير المستخلصات المستعملة في الدراسة
56	5.1.4.IV تحضير المستخلص الميثانولي بالنقع (macération)
56	6.1.4.IV تحضير مستخلص مزيج من الماء والميثانول بالنقع (macération)
58	5.VI حساب مردود الانتاجية للمستخلصات
58	6.IV التقدير الكمي بواسطة مطيافية الاشعة فوق البنفسجية - المرئية
58	1.6.IV مطيافية الاشعة فوق البنفسجية - المرئية UV-visible
60	1.1.6.IV التقدير الكمي للمركبات الفينولية بواسطة UV-visible
62	2.6.IV التقدير الكمي للفلافونيدات بواسطة UV-visible
64	7.IV تقدير النشاط المضاد للأكسدة
65	1.7.IV التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الطيفية
65	1.1.7.IV اختبارات DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl)
68	2.7.IV اختبار FRAP
68	1.2.7.IV تحضير FRAP
68	2.2.7.IV طريقة العمل
69	3.7.IV اختبار موليبدات الفوسفات phosphomolybdenum
69	1.3.7.IV المبدأ
70	2.3.7.IV طريقة العمل
71	8.IV التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الكهروكيميائية
73	1.8.IV الطريقة الاولى
73	1.1.8.IV مبدأ
73	2.1.8.IV البروتوكول المتبع
75	2.8.IV الطريقة الثانية

75	1.2.8.IV خطوات العمل
77	9.IV كروماتوغرافيا عالية الاداء (HPLC)
78	1.9.IV مكونات الجهاز
78	2.9.IV طريقة العمل
79	3.9.IV شروط التجريبية
81	10.IV مطيافية الأشعة تحت الحمراء IR
81	1.10.IV تعريف
81	2.10.IV مكونات الجهاز
82	11.IV دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا
82	1.11.IV تحضير التخفيفات المختلفة لكل مستخلص
83	2.11.IV اختبار الفاعلية ضد البكتيريا للمستخلصات بطريقة اختبار الحساسية بالأقراص (الانتشار)
83	1.2.11.IV تنمية مزارع بكتيريا حديثة
83	2.2.11.IV طريقة العمل
xxv	مراجع الفصل الرابع

الفصل V : النتائج والمناقشة

85	1.V مردود الاستخلاص
86	2.V تقدير المركبات الفينولية والفلافونويدية للمستخلصات
86	1.2.V التقدير الكمي للفينولات بواسطة جهاز مطيافية الأشعة UV-visible
89	2.2.V التقدير الكمي للفلافونويدات بواسطة جهاز مطيافية الأشعة UV-visible
91	3.V التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الطيفية
91	1.3.V نتائج القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH
92	1.1.3.V منحنيات DPPH مستخلص الميثانولي ومستخلص المزيج (ميثانول+ماء)
94	3.3.V نتائج اختبار FRAP
95	4.3.V نتائج اختبار مولبيدات الفوسفات phosphomolybdenum
96	4.V التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الكهروكيميائية
96	1.4.V الطريقة الاولى
101	2.4.V الطريقة الثانية
104	5.V التقدير الكمي للفينولات بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء HPLC
108	6.V نتائج مطيافية الأشعة تحت الحمراء IR
109	7.V الفعالية البيولوجية
110	1.7.V بكتيريا P.aerogenosa
111	2.7.V بكتيريا E.Coli

xxvii	مراجع الفصل الخامس
114	خاتمة
116	الملاحق
xxxiii	الملخص

قائمة الجداول

- الجدول 1.II : تصنيف المركبات الفينولية حسب بنيتها. 19
- الجدول 1.IV : الأدوات، المحاليل والأجهزة المستعملة عند الاستخلاص. 51
- الجدول 2.IV : المحاليل الكيميائية، الأدوات والأجهزة المستعملة في تقدير المركبات الفينولية والفلافونيدية. 52
- الجدول 3.IV : المحاليل الكيميائية، الأدوات والأجهزة المستعملة في قياس الفعالية المضادة للأكسدة. 53
- الجدول 4.IV : المحاليل الكيميائية، الأدوات والأجهزة المستعملة في الفعالية المضادة للبكتيريا. 54
- الجدول 5.IV : المحاليل الكيميائية، الأدوات والأجهزة المستعملة في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC. 54
- الجدول 6.IV : المحاليل الكيميائية، الأدوات والأجهزة المستعملة في مطيافية الأشعة فوق البنفسجية IR. 54
- الجدول 7.IV : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لحمض الغاليك. 60
- الجدول 8.IV : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لمركب الروتين. 63
- الجدول 9.IV : يوضح الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات باستخدام جهاز HPLC. 79
- الجدول 10.IV : يوضح زمن المكوث لبعض المركبات الفينولية. 80
- الجدول 11.IV : أنواع البكتيريا المدروسة. 82
- الجدول 12.IV : انواع المضادات الحيوية المستخدمة. 82
- الجدول 1.V : كمية المرودود (%) لمستخلصات النباتية. 85
- الجدول 2.V : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لحمض الغاليك. 86
- الجدول 3.V : المنحنى القياسي لحمض الغاليك (A,gallic). 86
- الجدول 4.V : كمية الفينولات الكلية في مستخلصات النبتة المدروسة (ملغ/غ). 87
- الجدول 5.V : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لمركب الروتين. 89
- الجدول 6.V : كمية الفلافونويدات الكلية في مستخلصات النبتة المدروسة (ملغ/غ). 89
- الجدول 7.V : يمثل نتائج قيم IC50 للعينات المدروسة. 93
- الجدول 8.V : يمثل نتائج قيم IC50 للعينات المدروسة. 100
- الجدول 9.V : قيم كثافة شدة التيار بدلالة تركيز حمض الغاليك. 102
- الجدول 10.V : يمثل أهم المركبات الفينولية المفصولة بواسطة HPLC للمستخلص الميثانولي. 105
- الجدول 11.V : يمثل أهم المركبات الفينولية المفصولة بواسطة HPLC للمستخلص ميثانول-ماء. 106
- الجدول 12.V : يمثل نتائج الفعالية البيولوجية. 109

قائمة الأشكال البيانية

- الشكل 1.I :نبته شجرة مريم (*Artemisia absinthium*) من العائلة النجمية (*Asteraceae*) (الساق والاوراق والازهار) 8
- الشكل 2.I : أجزاء نبتة شجرة مريم *Artemisia absinthium* 9
- الشكل 3.I : خريطة العالم توضح مناطق توزع نبتة *Absinthium Artemisia* 11
- الشكل 1.II : نموذج لمركب فينولي Phenol 15
- الشكل 2.II : نموذج لمركب فينولي Thymol 15
- الشكل 3.II : مخطط لتصنيف عديد الفينول، 16
- الشكل 4.II : الهيكل الاساسي للفلافونويدات 21
- الشكل 1.III : شكل يوضح بنية البكتيريا 28
- الشكل 2.III : صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا Coli E 33
- الشكل 3.III : صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا P.aeruginosa 34
- الشكل 4.III : صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا S. aureus 35
- الشكل 5.III : قطر منطقة التثبيط للبكتيريا 39
- الشكل 6.III : صورة موضحة بالفحص المجهري للجذور الحرة 40
- الشكل 7.III : يوضح التركيب الرنينية في جزئ (DPPH) 41
- الشكل 8.III : المقادير الاساسية لمنحنى الفولتامتري الحلقي 46
- الشكل 1.IV :: خريطة لمنطقة سيدراته التابعة لولاية سوق أهراس 49
- الشكل 2.IV : صور لعملية التجفيف و الطحن 51
- الشكل 3.IV :مخطط يوضح مراحل الاستخلاص العام لمستخلصات النبتة 57
- الشكل 4.IV : رسم تخطيطي يوضح مبدأ عمل جهاز مطيافية الأشعة UV-visible 59
- الشكل 5.IV : المنحنى القياسي لحمض الغاليك(A,gallic) 61
- الشكل 6.IV : المحاليل بعد اضافة كاشف الفولين 62
- الشكل 7.IV : المنحنى القياسي للروتين(Rutin) 63
- الشكل 8.IV : المحاليل بعد اضافة كلوريد الالمنيوم 64
- الشكل 9.IV : المحاليل بعد إضافة DPPH 66
- الشكل 10.IV : المنحنى القياسي لحمض الاسكوريك 69
- الشكل 11.IV : المحاليل بعد اضافة محلول مولبيدات الفوسفات 70
- الشكل 12.IV : المنحنى القياسي لحمض الغاليك 71
- الشكل 13.IV : التركيب التجريبي لجهاز PGZ301 VoltaLab 40 و ملحقاته 72

- الشكل 14.IV : المنحنى الفولتامترى الحلقى للأكسجين في DMF /M0.1 من (TBFP) وعند سرعة المسح mV/s
100.....74
- الشكل 15.IV : رسم تخطيطي يوضح مكونات جهاز HPLC.....78
- الشكل 16.IV : رسم تخطيطي يوضح مكونات جهاز IR.....81
- الشكل 1.V : أعمدة بيانية تمثل مردود المستخلصات (%) المستعملة في الدراسة.....85
- الشكل 2.V : أعمدة بيانية تمثل كمية عديدات الفينول بالملغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من وزن المستخلص.....87
- الشكل 3.V : المنحنى القياسي للروتين (Rutin).....89
- الشكل 4.V : أعمدة بيانية تمثل كمية الفلافونويدات بالملغ مكافئ لمركب الروتين / غ من وزن المستخلص.....90
- الشكل 5.V : المنحنى القياسي لحمض الاسكوريك.....91
- الشكل 6.V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج اختبار DPPH للعينات المدروسة.....93
- الشكل 7.V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج اختبار FRAP للعينات المدروسة.....94
- الشكل 8.V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج اختبار موليبيدات الفوسفات للعينات المدروسة.....95
- الشكل 9.V : المنحنى الفولتامترى الحلقى للنظام (O₂⁻ / O₂) في وجود تراكيز مختلفة من حمض الاسكوريك.....97
- الشكل 10.V : المنحنى الفولتا متری الحلقى للنظام (O₂⁻ / O₂) في وجود تراكيز مختلفة من مستخلص ميثانول-ماء
في وسط (DMF + M0.1 TBFP) على الألكترود من الكربون الزجاجي, سرعة المسح 100 s⁻¹.mv.....97
- الشكل 11.V : المنحنى الفولتا متری الحلقى للنظام (O₂ / O₂⁻) في وجود تراكيز مختلفة من مستخلص الميثانولي في
وسط (DMF + 0.1 M(TBFP) على الألكترود من الكربون الزجاجي, سرعة المسح 100 s⁻¹.mv.....98
- الشكل 12.V : منحنى تثبيط جذر O₂⁻ بدلالة تراكيز مختلفة لحمض الاسكوريك.....98
- الشكل 13.V : منحنى تثبيط جذر O₂⁻ بدلالة تراكيز مختلفة للمستخلص الميثانولي.....99
- الشكل 14.V : منحنى تثبيط جذر O₂⁻ بدلالة تراكيز مختلفة للمستخلص ميثانول-ماء.....99
- الشكل 15.V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج قيم IC50 للعينات المدروسة.....100
- الشكل 16.V : المنحنى الفولتامترى الحلقى لحمض الغاليك في وسط موقى PH=4 [200 - 800], مسرى العمل هو
الكربون الزجاجي, سرعة المسح 100 s⁻¹.mv, درجة حرارة 25°C.....101
- الشكل 17.V : المنحنى العياري لحمض الغاليك.....102
- الشكل 18.V :: المنحنى الفولتامترى الحلقى لمستخلص الميثانولي لنبته المدروسة.....103
- الشكل 19.V : المنحنى الفولتامترى الحلقى لمستخلص ميثانول-ماء لنبته المدروسة.....103
- الشكل 20.V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج قيم IC50 للعينات المدروسة.....104
- الشكل 21.V : يمثل الكروماتوغرام الناتج عن فصل أهم المركبات الفينولية لمستخلص الميثانولي بواسطة HPLC.....105
- الشكل 22.V : يمثل الكروماتوغرام الناتج عن فصل أهم المركبات الفينولية لمستخلص ميثانول-ماء بواسطة HPLC.....106
- الشكل 23.V : طيف الأشعة تحت الحمراء للنبته المدروسة.....108
- الشكل 24.V : نتائج بكتيريا P.aerogenosa للمستخلصات النبته المدروسة.....110
- الشكل 25.V : نتائج بكتيريا E.Coli لمستخلصات النبته المدروسة.....111

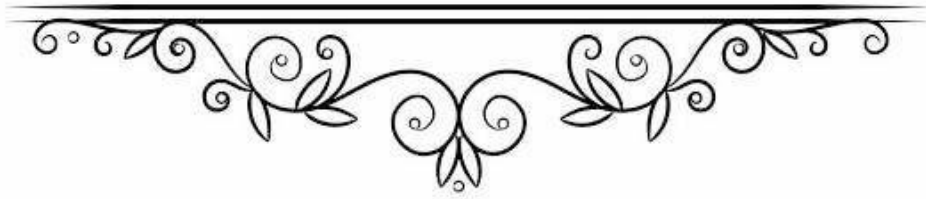
قائمة الرموز والاختصارات

A ₀	الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات
A _i	الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات) بعد مرور زمن
AA	حمض الأسكروبيك
R%	المردود
HPLC	كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء
IR	مطيافية الاشعة تحت الحمراء
UV-visible	مطيافية الاشعة فوق البنفسجية والمرئية
I%	النسبة المئوية للتنشيط
I _p	تيار الأكسدة قبل الاضافة
I _{ps}	تيار الأكسدة بعد الإضافة
IC50	تركيز المستخلص الفينولي لتنشيط 50 % من الجذور الحرة
V	سرعة المسح (V/s)
DMSO	ثنائي ميثيل سلفاكسيد (Dimethyl Sulfoxide)
DMF	ثنائي ميثيل فورماميد
DPPH	(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
FRAP	The Ferric Reducing Antioxidant Power
TAC	الفاعلية المضادة للأكسدة الكلية
C _{eq}	التركيز المكافئ الجديد
C	تركيز العينة داخل الخلية
I ₀	شدة الضوء الوارد
I	شدة الضوء الصادر

Ciprofloxacin	CIP
Cefazolin	CZ
Cefixime	CFM
Cotrimoxazole	COT



مقدمة عامة



مقدمة عامة

إن الجزائر بلد يطل على البحر الأبيض المتوسط، ويتوسط بلدان المغرب العربي، ويمتد جنوباً في العمق الصحراوي، ويتميز بتنوع التربة والمناخات، بحري، قاري، و صحراوي، ولا شك أن لهذا التنوع في المناخ والتربة الأثر البالغ في اختلاف الغطاء النباتي الطبيعي وهذا ما جعل الجزائر تزخر بأنواع شتى من الأنواع النباتية ومن أبرزها ثروتها من النباتات الطبية، التي تملك فضائل علاجية غير محدودة يمكن أن تلبي الاحتياجات الأساسية في مجال الصحة.

خلال الآلاف العديدة من السنين التي عاش فيها الإنسان على وجه الأرض جرب النباتات التي تنمو من حوله وخبر صفاتها وأحوالها مفتشاً عن الطعام في معظم الأحيان، لكنه تعلم أيضاً خلال تذوقه للنباتات أن بعضها يسبب له المرض وبعضها الآخر يمكن أن يشفيه ويجتث الألم منه وقد أعطى الله سبحانه وتعالى الحيوان خصائص غريزية يهتدي بها إلى هذه النباتات دون مرشد أو دليل. مما جعل الإنسان يفكر كيف يستفيد من هذه الغريزة ومن تلك الخصائص وذلك بمرافقة الحيوانات وتتبعها في مأكلاها ومشربها كلما احتاج إلى الدواء أو الغذاء. في الصين ظهر عام 2700 ق. م أول كتاب طبي للأعشاب وأصبح هذا الكتاب أساساً لجميع المعلومات الصينية التي كتبت بعد أما في بابل القديمة كانت The Great Herbal ذلك عن النباتات، وأشهرها كتاب الأعشاب الكبير.

المعلومات التي تتعلق بالنباتات المستعملة في الطب تسجل على الاسطوانات الحجرية والطينية وهناك ألواح مدون عليها ما يزيد على 250 نباتاً من بينها الكاسيا والهندباء والكمون والكرم والمر. وقانون حمورابي المحفور على الصخر والذي يرجع تاريخه إلى 1728 ق. م ينص على استعمال النباتات الطبية لشفاء الكثير من الأمراض. وفي مصر تدل الكتابات القديمة والصور الملونة على جدران المعابد والقبور وكذلك بقايا الأعشاب التي وجدت في المقابر بجانب الجثث المحنطة، على استعمال هذه

النباتات منذ 3000 سنة ق. م وأهم مصادر المعلومات عن الطب المصري القديم والعقاقير والتداوي بها جاء عن طريق مجموعات من لفائف البردي، اكتشفت في المقابر المصرية القديمة وأهم هذه البرديات برديات أيبيرز George Ebers وبرديات إدوين Smith Edwin ويعتبر "ايمحتب" أول طبيب في العالم حيث استخدم الكثير من الأعشاب كالمر والأفيون والصبار والشكوران في علاج المرضى. وظل العالم كله يعالج مرضاه بنفس الطرق الفرعونية القديمة حتى حدثت ثورة الطب في بداية القرن التاسع عشر الميلادي [1].

وبلاد الجزائر وكغيرها من البلدان تزخر بكم هائل من النباتات الطبية لما لها من مساحات واسعة و مناخات عديدة، ومما لا شك فيه أن لهذا التنوع المناخي الكبير الأثر البالغ على شدة التنوع النباتي ولكن أيضا على تركيب النباتات واعطاءها المميزات الخاصة [2]، لذلك فقد تركزت دراستنا في هذا البحث على احدى نباتات الجزائر الطبية والموجودة في منطقة سوق أهراس ذات الطابع المناخي الشبه رطب شمالا وشبه جاف جنوبا، والتي تعرف باسم كف مريم ذات الاسم العلمي *Arthemisia absinthium*، والتي لها العديد من الأثار الطبية لكثير من الامراض منها أعراض ما قبل الحيض والمساهمة في علاج حب الشباب وتحسين الخصوبة لدى المرأة ومسكن لالام الروماتيزم في الجنوب الغربي للبلاد.

ومن البديهي أن معرفة النبتة معرفة حقيقية وصحيحة، تحديد خصائصها ووصف مميزاتها ومكوناتها الفعالة بدقة يعد أساس البحث العلمي الصحيح، ولهذا الغرض أختارنا نبات أستخدمه الانسان منذ العصور القديمة، الا وهو نبتة المسماة بنبتة شجرة مريم (*Arthemisia absinthium*)، حيث في هذه الدراسة سنقوم بدراسة الفعالية البيولوجية (الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية المضادة للبكتيريا)، وتقدير محتوى المركبات الفينولية لمستخلص نبتة شجرة مريم (*Arthemisia absinthium*).

ومن أجل أنجاز هذا البحث تم تقسيم هذا العمل الي جزئين:

الجزء النظري: ويتضمن ثلاثة فصول

- **الفصل الأول:** الدراسة النظرية لنبته شجرة مریم "*Artemisia absinthium*"
- **الفصل الثاني:** المركبات الفينولية.
- **الفصل الثالث:** دراسة الفعالية البيولوجية.

الجزء العملي: ويتضمن فصلين

- **الفصل الرابع:** الطرق والوسائل.
 - **الفصل الخامس:** النتائج والمناقشة.
- وفي الاخير توجت هاته الدراسة بخاتمة شملت النتائج العملية المتحصل عليها.

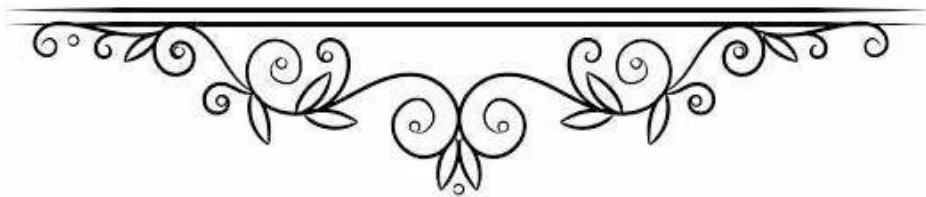
مراجع المقدمة

مراجع عربية

- [1] ع. عبد العال، الطب القديم، الطبعة الأولى.: دار أجيال للنشر والتوزيع، 2007 م.
- [2] ع. حلومي و آخرون، "النباتات الطبية" الوكالة الوطنية لحفظ الطبيعة، الاتحاد العملي لحفظ الطبيعة، ص 107، 1997.

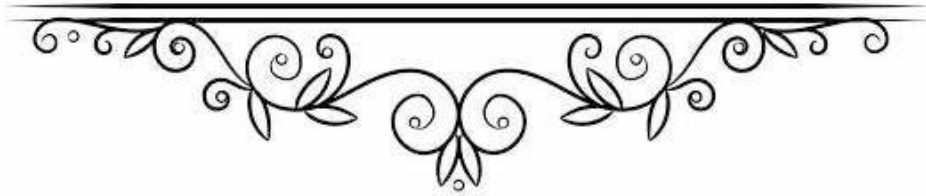


الجزء النظري





الفصل I : الدراسة النظرية لنبته شجرة مريم "*Artemisia absinthium*"



تمهيد

تعرف النباتات الطبية على أنها كل نبات يحتوي على مادة كيميائية أو أكثر، تتوزع في مختلف أعضائها بتركيز متفاوتة لها القدرة الفيزيولوجية على الحد أو العلاج من مرض معين، تعطى بصورتها النقية بعد الاستخلاص من المادة النباتية أو في صورتها العشبية الطازجة أو الجافة [1].

يزداد الاهتمام بدراسة النباتات الطبية إذ تعد المستخلصات النباتية أكثر فاعلية وذلك لاحتوائها على كميات كبيرة ومتنوعة من المواد الكيميائية التي لها القدرة على الشفاء والوقاية للعديد من الأمراض، تتميز بسرعة تأثيرها العلاجي وكذا خلوها من التأثيرات والمضاعفات الجانبية عكس الأدوية المصنعة مخبريا [2].

يتطور التداوي والاستشفاء بالأعشاب حديثا إذ يتم استخدام حوالي 35000 الي 70000 نوع من النباتات في مختلف أرجاء العالم وذلك لأغراض طبية , حيث تشكل مجموعة من التنوع البيولوجي التي يستعملها معظم الأشخاص [3, 4].

تتنتمي الجزائر إلى البلدان الإفريقية المعروفة بتنوعها البيولوجي، نظرا لمساحتها الشاسعة وموقعها الجغرافي الاستراتيجي وأيضا لخصائصها المناخية المتباينة مما ساهم في ظهور العديد من الأنواع النباتية حيث تم إحصاء أكثر من 3500 نوع منها ما لا يقل على 500 عشبه متداولة في الطب الشعبي أو ما يسمى بالطب التقليدي [4].

1.I العائلة النجمية (Asteraceae)

تعد الفصيلة النجمية (Asteraceae) أو المركبة (Composées) من أكبر الفصائل النباتية عددا، إذ تشمل نحو 1100 جنس (Genre) و 25000 نوع (Espèce). وهي فصيلة واسعة الانتشار على مستوى العالم،

حيث تتوزع في المناطق الاستوائية والمعتدلة لجنوب شرق وشرق آسيا وإفريقيا ، وكذلك وسط أمريكا وجنوبها [5]، ويوجد حوالي 109 جنس (Genre) و 408 نوع (Espèce) في الجزائر [6]، فالغالبية العظمى من فصيلة النجميات تتواجد على شكل نباتات عشبية معمرة في حين أن الأشجار أو الشجيرات تمثل النسبة الأقل نحو (2%) .

تتكون نباتات الفصيلة المركبة (Composées) من أوراق متبادلة وقد تكون متقابلة، بسيطة عديمة الأذنيات، وقد تتحور إلى أشواك في النباتات الجافة، ذات تعرق ريشي وقد يكون متوازي. [5].

2.I الجنس الأرطماسيا (*Artemisia*)

يعتبر جنس الأرطماسيا (*Artemisia*) من أهم أجناس العائلة النجمية (*Asteraceae*) وذلك باعتباره أحد أكبر الأجناس وأكثرها انتشارا حيث يتوزع في المناطق الشمالية المعتدلة من العالم مع امتداد جنوبي يشمل المناطق الاستوائية وكذا لاحتوائه على العديد من الأنواع التي تستخدم إلى حد كبير محليا نظرا لخصائصها الطبية. وقد أثبت علميا فعالية نباتات جنس الأرطماسيا (*Artemisia*) لاحتوائها على مركبات كيميائية فعالة أهمها البوليفينولات والفلافونويدات والزيوت الأساسية.

تتميز هذه العائلة إضافة إلى تنوعها الكمي، بأهميتها الاقتصادية مثل جنس *cynara* و *cartamus*، وأيضا الغذائية مثل جنس *Helianthus*، وخاصة الطبية مثل جنس *Inula* و *Artemisia*، كما نجد بعضها يستخدم كنبات زينة مثل جنس *Chrysanthemum* و *Calendula* و *Aster* [5, 6].

3.I دراسة نوع (*Artemisia absinthium*)

نبته "*Artemisia absinthium*" المعروفة بـ "شجرة مریم" من النباتات العشبية المعمرة التي تتبع الفصيلة النجمية (*Asteraceae*) أو المركبة. وهي شبه شجيرة صغيرة تنمو إلى ارتفاع ما بين 60 و120 سم.

عبارة عن عشب معمر عطري تكسوه أوبار حريرية منطبقة، يصل طوله إلى نحو متر أو أكثر له سوق تحت أرضية أفقية متخشبة وسوق منتصبه متفرعة الساق، الساق مثلثة، رمادية اللون غزيرة الأوراق كثيرة التفرع في الجزء العلوي، الأوراق السفلية طويلة المعلاق، الأوراق الوسطى والعلوية قصيرة المعلاق. الأوراق الزهرية ثلاثية الفصوص أو تامة الحافة، تجتمع الأزهار في نورات رئيسية صغيرة، كروية الشكل تقريبا (قطرها 2-4م)، قصيرة الشمراخ، متدلّية تشكل هذه الرؤيسات بدورها نورات هرمية الشكل، عبقة الرائحة يصل طولها إلى نحو 30سم، القنابات خطية منطبقة موبرة تتوضع في 3-4 صفوف، كرسي النورة مسطح موبر بكثافة، الأزهار صفراء، الثمرة صغيرة جدا (0.8-1م) مستطيلة اسطوانية، ملساء [7].



الشكل 1.I: نبتة شجرة مریم (*Artemisia absinthium*) من العائلة النجمية (*Asteraceae*) (الساق والأوراق والأزهار)

[9, 8]

Plantae	المملكة
حقيقيات النوى	النطاق
Embryophytes النباتات الأرضية	الفرقة العليا
Tracheophytes نباتات وعائية	القسم
Spermatophytes البذريات	الشعبة
Angiospermae مستورات البذور	تحت الشعبة
Asterales نجميات	الرتبة
Asteraceae نجمية	الفصيلة
Artemisia شيح	الجنس
Artemisia absinthium شجرة مريم	النوع

5.I التواجد الجغرافي لنبته " Artemisia absinthium " [7]

لوحظت نبتة " Artemisia absinthium " في الامكان الرطبة على طول الجداول أوفي المناطق البحرية وبالخصوص في منطقة البحر الابيض المتوسط، وكذلك نجدها في شمال أفريقيا وكذلك آسيا الوسطى وغرب آسيا.

حاليا هاته النبتة متواجدة في جميع أنحاء العالم بما في ذلك الجزء الجنوبي من الولايات المتحدة في الجزائر كذلك نجد نبتة Artemisia absinthium ملجأ على ضفاف الوديان.



الشكل 3.I : خريطة العالم توضح مناطق توزع نبتة *Artemisia absinthium* [7].

6.I الأسماء الشائعة لنبته " *Artemisia absinthium* " [7]

عرفت نبتة "*Artemisia absinthium*" بعدة مسميات شائعة نذكر منها :

- شجرة مريم. - الابسنت
- شبح ابن سينا. - الشبية
- الدمسية. - الافسنتين
- الشبح الرومي. - البعيثران

7.I الاستعمال الطبي لنبته "*Artemisia absinthium*"

اسم الجنس *Artemisia* نسبة الى *Artemis* زوجة القيصر *Carian's King Mausolus* (حوالي

353-377 ق.م) باعتبار أنها أول من تناول النبات لمعالجة بعض الأمراض النسائية.

يتمتع الزيت الطيار والمركبات المرة بخواص هاضمة من خلال تأثيرها على مستقبلات التذوق في اللسان ما يطلق منعكسا ينبه المعدة والافرازات الهاضمة، كما يتمتع الزيت الطيار بخواص مضادة للالتهابات.

اثبتت الابحاث خواص المركبات المرة السيسكوتربينية كمضاد للأورام السرطانية، يستعمل العقار في حالات فقدان الشهية واضطرابات وظائف الكبد والمرارة والمعدة والهضم (زيادة الافرازات الهاضمة في المعدة والكبد)، ويستخدم لعلاج مرض كرون (التهاب الأمعاء).

ينقي العقار الجسم من السموم وعلى الأخص مركبات الرصاص والزنبيق، يستعمل مغلي النبات شعبيا، في حالة الاكتئاب، وعلاج أمراض الكبد واضطرابات الطمث، فقر الدم، طرد الديدان مثل ديدان الاسكاريس، يستعمل المستخلص موضعيا على هيئة كمادات لعلاج التقرحات والجروح ولدغ الحشرات [7].

وجد أنها تؤثر على الدورة التناسلية للإناث فهو مجهض لإنهاء الحمل مصحوب بمشاكل منها اختلال التوازن الهرموني، انخفاض الخصوبة، تأثير وسائل منع الحمل، ونشاط مضاد للزرع ومسمم للأجنة [11]. [12].

مراجع الفصل الأول

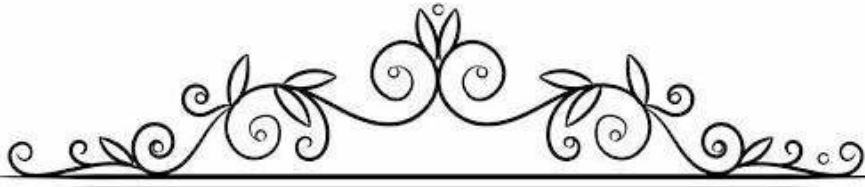
مراجع عربية

- [5] م. ه. مخلوف. س. لايقة, "دراسة التنوع الحيوي للفصيلة النجمية في محافظة اللاذقية", مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية, ج 27 (2), 2010, 299-314 ..
- [6] ل. زعيترو, "تحديد المكونات الكيميائية لأطوار الكلوروفورم والزيوت الأساسية لأنواع من العائلتين المركبة (Cistaceae) والسيستية (Compositae)", أطروحة دكتوراء جامعة منتوري، قسنطينة.
- [7] وائل. أبو. عبد. الله, أطلس النباتات الطبية والعطرية في الوطن العربي, الطبعة الاولى 2012, ed.,
- [13] ص. جيدل, "تقدير المحتوى الفينولي والتأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات نباتات Artemisia campestris L. و Pistacia lentiscus L. و Argania spinosa L " أطروحة دكتوراء جامعة فرحات عباس، سطيف 1.

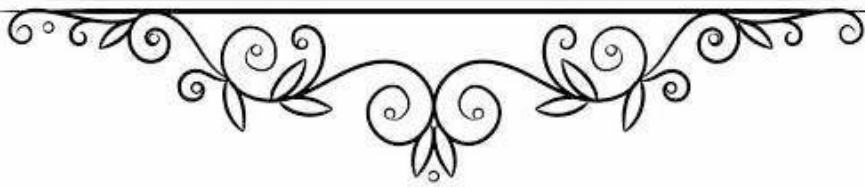
مراجع أجنبية

- [1] N. R. Faenszorth. et. al, "lace des plantes médicinales dans la thérapeutique " *Bulletin of the World Health Organization* 64 (2) p. 159, 1986.
- [2] J. A. Duke, "The green pharmacy : New discoveries in herbal remedies for common diseases and conditions from the world's foremost authority on healing herbs " *Rodale*, 1997.
- [3] M. Elqaj , A. Ahami , and D. Belghyti, "Lo phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires," *Journée scientifique " ressources naturelles et antibiotiques "*, Maroc, 2007.
- [4] N. Mahmoudi. P. Rajael "Ethnobotanical study of medicinal plants of Hezar mountain allocated in south east of Iran," *Iranian Journal of pharmaceutical research : UPR*, vol. 11 (4) : .6 . .7 .8 P. 1153 2012.
- [8] S. Mansour, "Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales: *Artemisia absinthium* L., *Artemisia herba alba* Asso et *hypericum scarboides* -Etude in vivo-," Thèse de doctorat, Université Mohamed Boudiaf, Oran, 2015.
- [9] L. Messai, "Etude photochimique d'une plante médicinale de l'est Algérien (*Artemisia herba alba*) " Thèse de doctorat, Université Mentouri, Constantine, 2011.

- [10] A. E. Al-Snafi, "The pharmacological importance of *Artemisia campestris*-A review," *Journal of pharmaceutical research*, vol. 5(2), pp. 88-92, 2015.
- [11] A. Renouf, "L'Absinthe (*Artemisia absinthium* L.) : Approche ethnobotanique," Thèse de doctorat, Université de Caen Normandie, 2019.
- [12] A. B. Farret. T. Montanari, *Effect of Artemisia L.(Asteraceae) on female reproductive cycle:a review.revista*, vol. 13 (2), pp. 163-177, 2019.



الفصل II : المركبات الفينولية



مدخل

كثرت الاهتمام بدراسة النباتات الطبية، والاستفادة منها في معالجة الأمراض المختلفة إذ تحتوي النباتات على عدد كبير جدا من المركبات الفعالة طبييا التي تعكس الامكانيات العلاجية الكبيرة لهذا النبات، فمن المعلوم أن لبعض العقاقير النباتية قدرة علاجية أكبر من تلك التي تملكها الأدوية المصنعة في معالجة بعض الأمراض [1].

1.II تعريف المنتجات الطبيعية

يطلق دارسو الكيمياء العضوية مصطلح "المنتجات الطبيعية" على المركبات التي تنتج بواسطة الكائن الحي [2]، وأكثرها أهمية تلك التي تؤدي دورا في التفاعلات الأيضية، والتي يتم فصلها من النباتات والكائنات الحية الدقيقة. وهي جزيئات تنتج انطلاقا من عمليات الأيض، وهي عبارة عن قسمين: أبيض أولي وأبيض ثانوي [3].

1.1.II الأيض الأولي (Métabolites Primaires)

تتميز المنتجات الأولية بخاصيتها الحيوية والضرورية لبقاء الخلية والجسم، فهي مركبات تدخل في التفاعلات الأولية، وتشير إلى العمليات الأيضية (Métabolites Primaires) التي تنتج عنها الأحماض الكربوكسيلية البسيطة، و الأحماض الأمينية، السكريات، الدهون والبروتين [4].

2.1.II الأيض الثانوي (Métabolites Secondaires)

هناك العديد من المركبات التي تنتج في النبات يطلق عليها اسم المشتقات الثانوية لعمليات الأيض الثانوي، وتشمل كل من التربينات، الفينولات، القلويدات وغيرها [4].

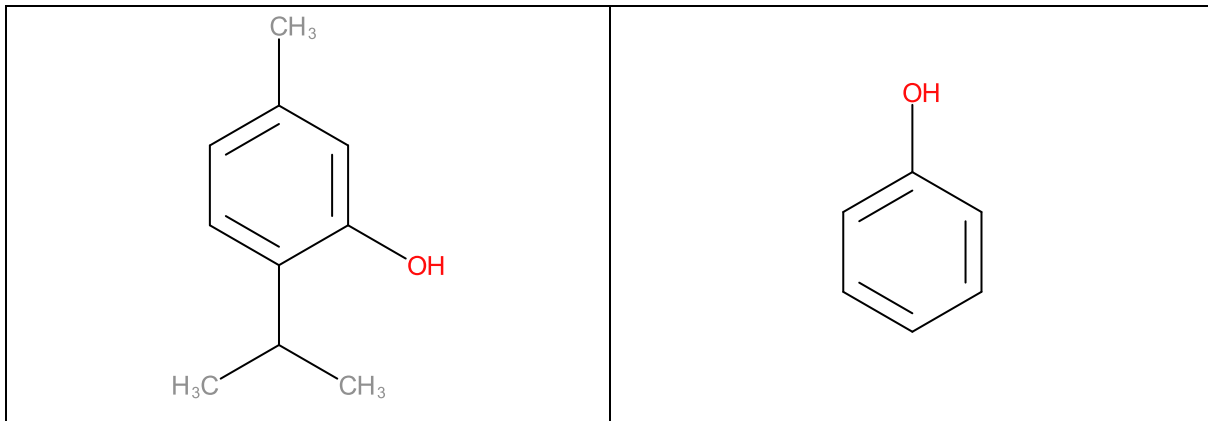
وهي جزيئات كبيرة العدد لها شكل بنيوي غير عادي و لها استعمالات دوائية عديدة و تسمى بالمنتجات الطبيعية الفعالة ، تعتبر مركبات الأيض الأولي المواد البدائية لها ولهذا فهي تمثل مركبات الأيض الثانوي (Métabolites Secondaires)، هناك ثلاثة مواد أولية رئيسية: حمض الشيكيميك، الأسيئات و الأحماض الأمينية و التي تعتبر وحدات البناء للأيض الثانوي [4].

2.II عديدات الفينولات

1.2.II تعريف المركبات الفينولية

تعتبر المركبات الفينولية من بين أهم المركبات النباتية لنواتج الأيض الثانوي، حيث تحتل حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية، حيث تم التعرف على أكثر من 8000 مركب فينولي وتم توزيعها في مختلف الأقسام بدلالة هيكلها الكربوني [5].

والعنصر الاساسي المميز لها وجود حلقة بنزينية واحدة على الاقل، حاملة لمجموعة الهيدروكسيل حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى (ايثر، سكر، أستر). والاختلاف في عدد الحلقات وعدد ونوع المجاميع المرتبطة بها يجعلها تنقسم إلى عدة مجاميع أهمها الأحماض الفينولية، الفلافونيدات، الدباغ، حيث تمثل الفلافونيدات القسم الأكبر منها [6].



الشكل II.2 : نموذج لمركب فينولي Thymol

الشكل II.1 : نموذج لمركب فينولي Phenol

2.2.II أقسام عديدة الفينولات

ان تصنيف المركبات الفينولية الطبيعية مقترحة من طرف العالمين (Harborne) و (Macheix) عام (1990-1989) حيث وجدوا أن المركبات الفينولية تضم ما يقارب 8000 مركب مقسمة الي بضعة أصناف وأهمها نذكر ما يلي:

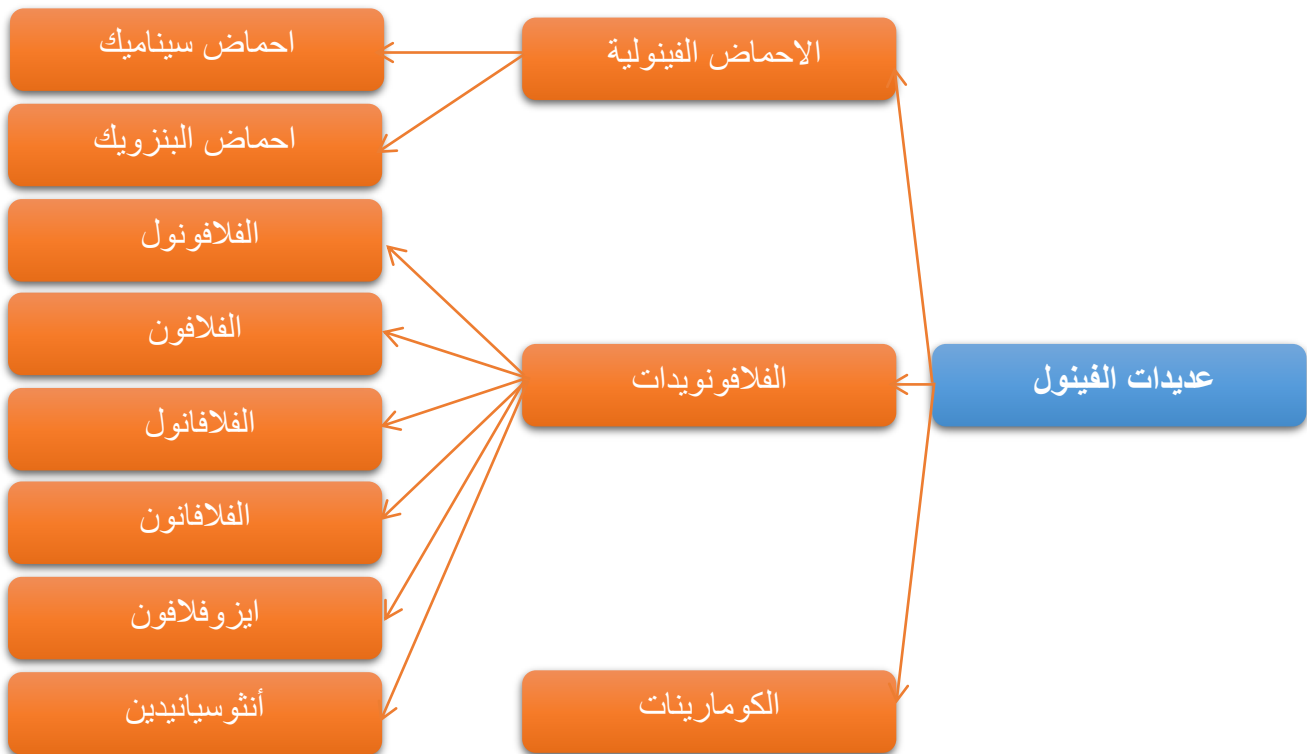
1.2.2.II احماض الفينولية

✓ الاحماض المشتقة من حمض البنزويك

✓ الاحماض المشتقة من حمض السيناميك.

2.2.2.II الفلافانويدات

✓ التانينات، اللقنينات، الكومارينات والسستينيات (تعد هذه المركبات أقل كثافة)



الشكل 3.II : مخطط لتصنيف عديد الفينول.

3.2.II أهمية و دور عديدة الفينول في النباتات [7, 8].

- الفينولات هي عبارة عن أصبغة ومركبات عطرية تمنح اللون للنباتات والرائحة مما تؤدي الي جذب الحشرات والطيور الملقحة.
- كما تلعب الفينولات أدوارا مهمة ومعروفة وهي الحماية والوقاية من الاشعة فوق البنفسجة UV.
- للفينولات خصائص مضادة للفطريات ومضادة للجراثيم.
- تساهم الفينولات في مقاومة النباتات للأمراض كما هو الحال لمقاومة نبات القطن للأمراض الذبول.

4.2.II الاستعمالات العلاجية لعديدات الفينول

- مضادة للسرطان والالتهابات وكذلك مضادة للفيروسات والجراثيم.
- مكافحة تصلب الشرايين.
- مضاد للحساسية ومضادات للاكسدة [9].

5.2.II الاحماض الفينولية

صنفت الاحماض الفينولية الي صنفين هما كالاتي:

1.5.2.II الاحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك

تمتلك الاحماض الفينولية الهيكل (C6-C1) ومشتقات حامض البنزويك تعد واسعة الانتشار سواء مرتبطة أو حرة أو في حالة سكريات أو استرات [10, 11].

2.5.2.II الاحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك

أغلبية الاحماض الفينولية من الهيكل (C6-C3)، حيث تنتشر الاحماض المشتقة من حمض السيناميك بكثرة ويعتبر حمض (Ferulic) وحمض (Caffeic) الانواع الرئيسية الاكثر انتشارا [12]، أما بقية الاحماض الاخرى مثل (2-coumaric acide) تعد الاقل تكرار ونادرا ما تكون حرة.

حيث يتكون الهيكل الكربوني لهذه المجموعة من حلقة بنزينية بالإضافة الي سلسلة جانبية من ثلاثة ذرات كربون.

6.2.II الخصائص البيولوجية والعلاجية للاحماض الفينولية

تمتلك الاحماض الفينولية خصائص بيولوجية مثيرة للاهتمام وتعتبر الاحماض الفينولية ومشتقاتها مسؤول عن العديد من النشاطات نذكر منها:

- خافضة للحرارة.
- مضادة للالتهابات.
- مطهر البولية والكبد ومحفزات أخرى.
- تعتبر كل من الاحماض acide chlorogénique ، acide caféique ، acide gallique ، مركبات تتميز بأنشطة مضادة للأكسدة.
- يعتبر acide caféique فعال جدا ضد الفيروسات والبكتيريا والفطريات.
- وكذلك acide gallique و acide caféique التي تظهر آثار مضادة للسرطان في الرئة عند الفئران في المختبر [13, 5].

7.2.II الكومارينات

اشتق اسم الكومارينات من كلمة (Coumarou) وهو اسم لنبات (Dipteryx odorata willd) وتعنى بها فول تونكا [14]، من عائلة (fabaceae) التي فصل منها الكومارين وهي أول شجرة استخلص

منها، من قبل الباحث Vogel سنة 1820، حيث تعتبر الكومارينات مركبات طبيعية تتواجد على شكل جليكونات أو مرتبطة بجزيئة سكر مشكلة جليكوزيدات . وهيكلها الأساسي يتكون من حلقتين سداسيتين أحدهما عطرية وأخرى مغايرة [15].

الجدول 1.II : تصنيف المركبات الفينولية حسب بنيتها.

التصنيف	الهيكل الكربوني الأساسي
Phénols simple الفينولات البسيطة	C6
Acides phenols carboxyliques الاحماض الفينولية الكربوكسيلية Acideshydroxybenzoïque احماض هيدروكسي بنزويك Acideshydroxycinnamiques احماض هيدروكسي سيناميك	C6-C1 C6-C3
Coumarines الكومارينات	C6-C3
Flavonoïdes الفلافونيدات Flavones الفلافونات Flavonols الفلافونولات Flavanols الفلافانولات Flavanones الفلافانونات Isoflavones ايزوفلافونات Anthocyanes انثوسيانات	C6-C3-C6
Anthocyanes انثوسيانات	(C6-C3)2

3.II الفلافونويدات

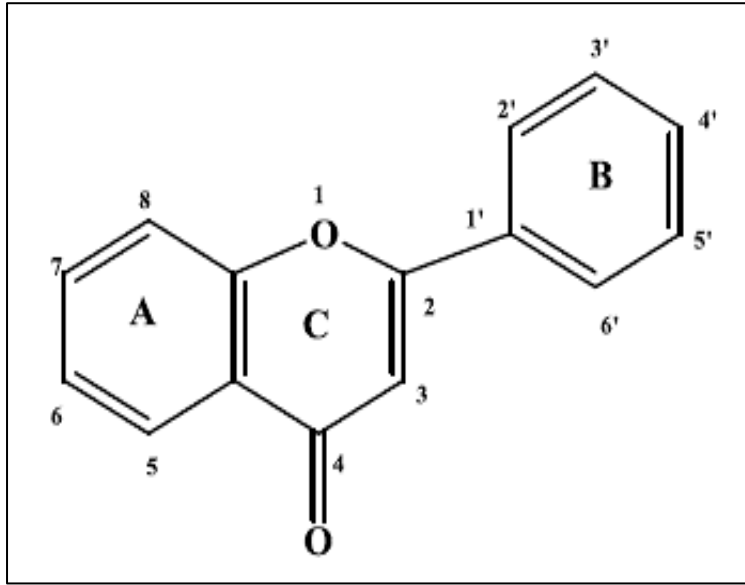
اكتشفت الفلافونويدات لأول مرة على يد عالم الكيمياء الحيوية (Albert Szent-Györgyi) و الذي صنفاها على اساس انها فيتامين P و أدراك انها تزيد وتعزز من دور الفيتامين C [16]. ونتيجة لاستعمال الفلافونويدات في ميادين حيوية عديدة ، اضافة الي فائدتها الصيدلانية فقد أثارت اهتمام العديد من الباحثين والصيدلة فهي إحدى أكبر مجموعات الطبيعية في النبات والتي تم تعدادها حوالي 9000 بنية منها في صورة ايتروزيدية (Heterosides) أو اجليكونية (Aglycones) [17, 18].

1.3.II تعريف الفلافونويدات

اشتقت عبارة الفلافونويد من اللغة اللاتينية Flavous ويرجع أصلها الي اللغة اليونانية Flavus حيث تعبر عن اللون الأصفر، وهي عبارة عن صبغات نباتية تنتشر في أجزاء النبات المختلفة، حيث تتمركز بصفة خاصة في الجزء الهوائي من النباتات على شكل مركبات ذات أساس سكري أو على مركبات حرة في الفجوات والسيتوبلازما والاعشية الليفية.

الفلافونويدات مركبات ملونة عموماً، ذات كتل جزيئية منخفضة، تتميز بهيكل أساسي يحتوي على 15 ذرة كربون موزعة على حلقتين عطريتين مرتبطتين بحلقة غير متجانسة تحتوي على ذرة أكسجين من الصيغة (C6-C3- C6) [19, 20].

تقسم الفلافونويدات بنيويًا إلى 15 عائلة أهمها ما يلي: الفلافون، الفلافونول، الفلافانول، الأيزوفلافون، الأنثوسيان. ويمكن لهذه المركبات أن توجد بصورة حرة وتعرف بالأجليكونات وبصورة جليكوزيدات.



الشكل II.4 : الهيكل الاساسي للفلافونويدات.

II.3.2 تصنيف الفلافونيدات

عادة تصنف الفلافونيدات الي عدة مجموعات، وذلك حسب درجة التأكسد في الحلقة البيروانية C التي يمكن أن تفتح أو تغلق لتعطي لحلقة فيران [21]، في حين يحدد نوع الفلافونيد داخل المجموعة الواحدة من خلال المستبدلات على الحلقتين A و B.

i. الفلافون (flavones)

تتميز بنية الفلافونات (Flavones) بوجود رابطة مزدوجة أيضا بين C2 و C3 وتعتبر هذه المجموعة الاقل معرفة بين الفلافونويدات الأخرى.

ii. الفلافونولات (flavonols)

تملك الفلافونولات (Flavonols) رابطة مزدوجة بين C2 و C3 مع وجود مجموعة هيدروكسيل في كربون 3 الحلقة C حيث تمثل هذه مجموعة الاكثر انتشارا في الاغذية.

.iii الفلافانول (flavonoles)

وهي مركبات التي تتكون فيها الرابطة (C2- C3) في هيكل الفلافون المشبعة [22, 23].

.iv الأيزوفلافون (Isoflavone)

تختلف في بنائها عن الفلافونات في موضع ارتباط الحلقة B إذ ترتبط هذه الأخيرة في الموضع

رقم 3 بدلا من الموضع رقم 2 [22, 23].

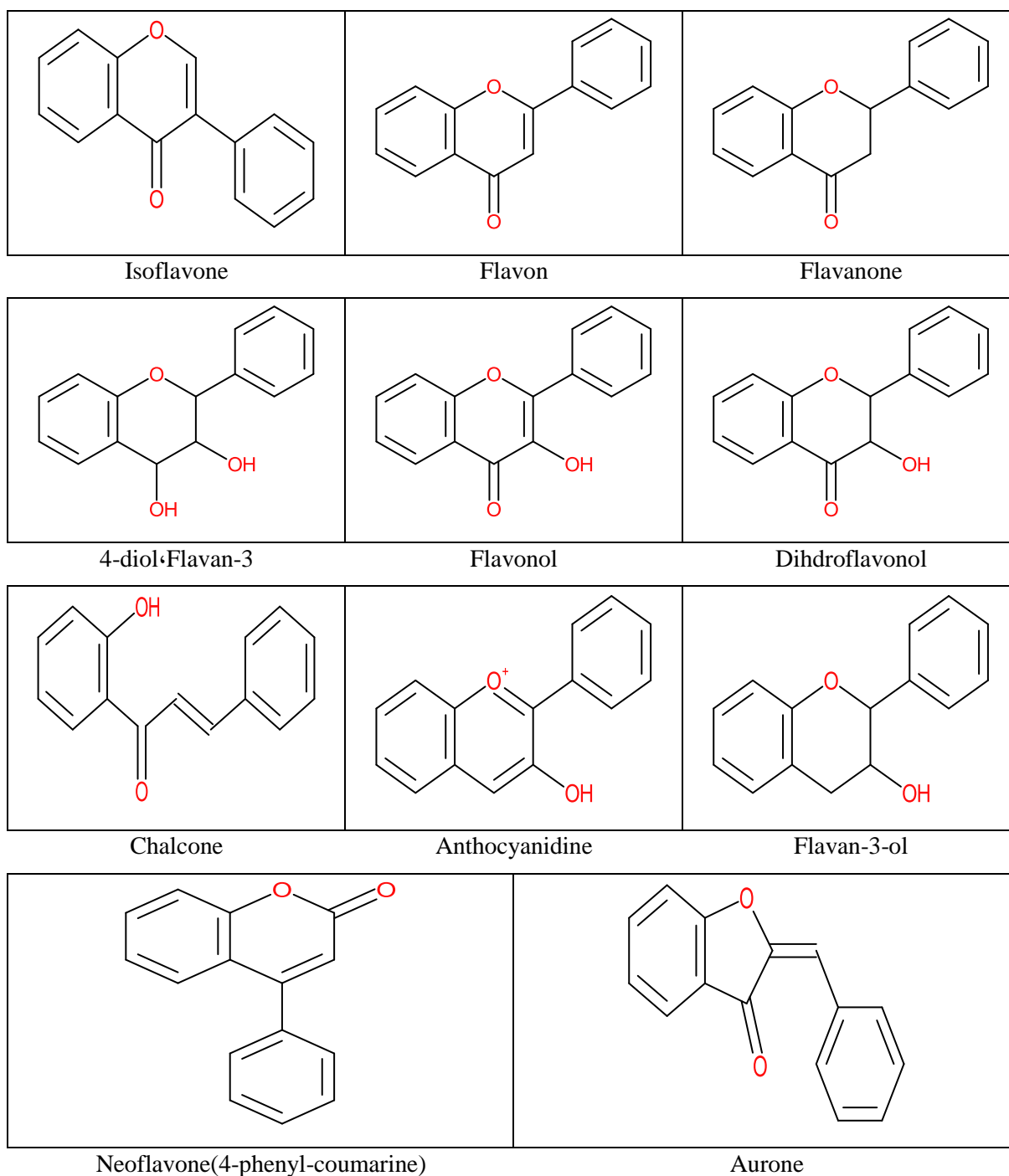
.v الأنثوسيان (Anthocyanes)

الأنثوسيانات هي صبغات ذائبة في الماء، مسؤولة عن أغلب الألوان الحمراء و الزرقاء والبنفسجية

للفواكه والخضر والازهار [24]، تظهر بشكل مركبات سكرية ترتبط أساسا في الكربون 3 للحلقة C أو في

كربون 5 و7 للحلقة A ، كما أنه نادرا ما يتم إضافة سكريات على مستوى 3 و 4 و 5 للحلقة B .

تتواجد هذه مركبات في بعض من الحبوب والخضار، وبكميات أكبر في الفواكه [25].



الوثيقة 6 الهياكل الأساسية لمختلف الفلافونويدات [26, 27].

3.3.II فوائد الفلافونويدات بالنسبة للإنسان

زاد الاهتمام في السنوات الأخيرة بالمركبات الفلافونويدية من قبل العلماء و الباحثين حيث بينت

نتائج الأبحاث خاصة في ميدان الطب والبيولوجيا كما يلي [28].

- أثبتت التجارب العديدة الدور الوقائي المضاد للسرطان.
- يعود هذا التأثير الي دور الفلافونويدات المؤثر على إنتاج الهيستامين المسبب للحساسية حيث يعتبر مضادا من مضادات الحساسية [29].
- كما تعمل المركبات الفلافونويدية دورا فعالا لمضادات الالتهاب [30].
- تعتبر الفلافونويدات نظريا ذات تأثير مضاد للبكتيريا وهذا من خلال اثبات فعاليتها المثبطة لأنزيم ADN gyrase على النماذج المخبرية in vitro [31].

4.3.II فوائد الفلافونويدات بالنسبة للنبات

- تلعب الفلافونويدات أدوار ووظائف هامة في دورة حياة النبات نذكر منها:
- تعتبر الفلافونويدات من العناصر المسؤولة عن إعطاء اللون للنبات وبصفة خاص الأزهار ، كما أنها تلعب دورا مهم في حماية النبات من الحيوانات الضارة عنها وذلك وبإعطاء طعما مميزا للنباتة [32].
 - هي مواد تحمي نسيج النبات كونها مواد تمتص الأشعة فوق البنفسجية (270-250nm) وعليه فهي تحمي المواد الأساسية من الأضرار السامة من هذه الاشعاعات [33].
 - كما تساعد على أنقاص من ظاهرة النتح في المناطق الجافة [34].
 - لها دور في مراقبة نمو وتطور النبات وذلك بتفاعلها بطريقة معقدة مع مختلف هرمونات النمو النباتية [35].

مراجع الفصل الثاني

مراجع عربية

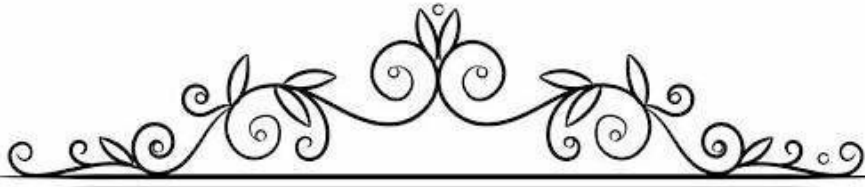
- [1] ع القادر حليمي، النباتات الطبية، الجزائر،: وزارة الفلاحة، 1997.
- [2] س. عبد العظيم، م. عبد الجليل، المنتجات النباتية، الكيمياء والاستخلاص والتقنية، الاسكندرية، 2014.
- [3] ح. دندوقي، "دراسة الميتابوليزم الفلافونيدي لنبات *Inulaviscosa*"، مذكرة ماجستير في الكيمياء العضوية، جامعة قسنطينة، 1989.
- [6] م. جرموني، "لنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة الخياطة *Teucrium polium*"، مذكرة لنيل شهادة الماجستير في البيوكيمياء و الفيزيولوجيا التجريبية، جامعة فرحات عباس، سطيف، الجزائر 2009.
- [12] ربيعي عبد الكريم، "تقدير المحتوى الفينولي والفعالية المضادة للأكسدة لمنتجات النحل في الجزائر بالطرق الكهروكيميائية"، *University of Ouargla* جامعة ورقلة، 2016.
- [19] ص. عكال، "البحث عن ثلاث أنواع للجنس سانتوريا الجزائري *C. Pullata*, *C. Fulfuracea*, *C. Napifolia*، الفعالية البيولوجية"، رسالة دكتوراه، جامعة منتوري، قسنطينة، 2001.
- [20] ن. فراش، "استخلاص فصل وتحديد منتج الأيض الثانوي عند نبات *Centaurealippii* الفعالية البيولوجية"، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة، 2002.
- [26] ميثاق. ا، "بحث وتحديد نواتج الأيض الثانوي لنبات القات، *Catha edulis* من العائلة *Celastraceae* ونبات البوليكاريا *Pulicaria jaubertii* من العائلة *Asteraceae* وتقييم الفعالية البيولوجية"، رسالة دكتوراه، جامعة منتوري، قسنطينة، 2010.
- [27] آ. عاشوري، "فصل وتحديد منتجات الأيض الفلافونيدي *Pulicaria crispa*"، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري، قسنطينة، 2004.

مراجع أجنبية

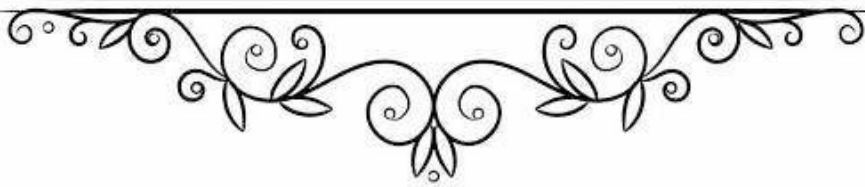
- [4] M. Shukla, K. Gupta, Z. Rasheed, K. A. Khan, and T. M. Haqqi, "Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE 2 production in human chondrocytes in vitro", *Journal of inflammation*, vol. 5, pp. 1-10, 2008.
- [5] N. BENHAMMOU, "Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien," 2011.
- [7] H. Harkat, "Hétérocycles oxygénés et composés aromatiques de *Frankenia thymifolia* Desf," UB1, 2008.
- [8] K. KANOUN, "Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L.(Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine)," 2011.

- [9] S. Athamena, "Etude quantitative flavonoides des grains de *Cuminum cyminum* et Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique," Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister. Université El-Hadj Lakhder Batna, p. 126, 2009.
- [10] J. B. Harborne, "Biochemistry of phenolic compounds," Biochemistry of phenolic compounds., 1964.
- [11] B. J. Pharmacognosie, "phytochimie, plantes médicinales," Revue et Augmentée, Tec & Doc, Paris, 1999.
- [13] N. Boukri, "Contribution a l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-elhanout," Mémoire master. Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, p. 99, 2014.
- [14] A. Lacy and R. O'Kennedy, "Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer," Current pharmaceutical design, vol. 10, pp. 3797-3811, 2004.
- [15] K. Hroboňová, J. Lehotay, J. Čižmárik, and J. Sádecká, "Comparison HPLC and fluorescence spectrometry methods for determination of coumarin derivatives in propolis," Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, vol. 36, pp. 486-503, 2013.
- [16] A. A. Ahmed, N. H. El-Sayed, S. I. el-Negoumy, and T. J. Mabry, "Flavonoids of *Cotula cinerea*," Journal of Natural Products, vol. 50, pp. 519-520, 1987.
- [17] H. J, The Flavonoids: Chapman and hall, Ltd., 1988.
- [18] C. A. Williams and R. J. Grayer, "Anthocyanins and other flavonoids," Natural product reports, vol. 21, pp. 539-573, 2004.
- [21] J. Bruneton, Pharmacognosie et phytochimie des plants médicinales, 2^{ème} ed. Pqris: Tec et Docum, 1999.
- [22] H. J, Phytochemical dictionary of the Leguminosae: Chapman and hall, London, Vol1, pp. XX-XXII, 1994.
- [23] H. A. Stafford, "Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots," The Botanical Review, vol. 63, pp.1997 ,39-27 .
- [24] G. Mazza, J. E. Cacace, and C. D. Kay, "Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids," Journal of AOAC international, vol. 87, pp. 129-145, 2004.
- [25] M. D Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability," Annali-Istituto Superiore di Sanita, vol. 43, p. 348, 2007.
- [28] B. H. Havsteen, "The biochemistry and medical significance of the flavonoids," Pharmacology & therapeutics, vol ,96 .pp. 67-202, 2002.

-
- [29] M. N. Dicaarlo G., Izzo A., Capasso F, "Flavonoids : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs," Review, Life Sci, , vol. 65, pp. 53-337., 1999.
- [30] R. Landolfi, R. L. Mower, and M. Steiner, "Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations," Biochemical pharmacology, vol. 33, pp. 1525-1530, 1984.
- [31] K. Ohemeng, C. Schwender, K. Fu, and J. Barrett, "DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1)," Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 3, pp. 225-230, 1993.
- [32] J. B. Harborne and C. A. Williams, "Advances in flavonoid research since 1992," Phytochemistry, vol. 55, pp. 481-504, 2000.
- [33] J. W. McClure, "Physiology and functions of flavonoids," in The flavonoids, ed: Springer, 1975, pp. 970-1055.
- [34] E. WOLLENWEBRE and V. Dietz, "Biochemical Systematic and Ecology," V8, vol. 21, 1980.
- [35] M. T. T. Mabry, K. Markham, The systimatic identifation of flavonoids: Springer, Verlag, Berlin, 1970.



الفصل III : دراسة الفعالية البيولوجية



مدخل

أن كلمة ميكروب (microorganisme) وصف للكائنات المجهرية الدقيقة التي لا يمكن ملاحظتها أو رؤيتها الا بالمجهر فهي تشمل الفيروسات والبكتيريا والفطريات والطحالب. بيئات البكتيريا متنوعة جدا فهي قادرة على العيش في أي مكان أو بيئة مناسبة على وجه الأرض حتى تربة والمياه العميقة وقشرة الأرض حتى ضمن بيئات ذات نسب عالية من الفضلات النووية والكبريتية الحمضية.

حيث كان أول اكتشاف للبكتيريا من طرف العالم الكيميائي الفرنسي لويس باستور (Louis Pasteur)، وقد كان ذلك في عام 1859، حيث يرجع اكتشافها من خلال تجاربه على التخمر، وكذلك أكتشف طعومها، حيث عملية البسترة سميت تيما بإسمه وهي عملية قتل الكائنات الحية المجهرية المتواجدة في السوائل.

أما العالم الألماني روبرت كوخ (Robert Koch) المتحصل على جائزة نوبل في الطب والفيزيولوجيا عام 1905 فقد كانت له أسهامات في أكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض حيث ارتبط أسم البكتيريا كثيرا بالمرض الذي تسببه ويعتبر أول من عمل مزارع نقية للبكتيريا، ولكن التطور السريع والاكتشافات الحديثة التي حدثت في العلوم التطبيقية بينت لنا أن للبكتيريا دورا مهما وأساسا في عدة مجالات منها الصناعات الغذائية وكذلك الدوائية وكذلك لها استخدامات هامة في إنتاج الطاقة و غاز الميثان [1, 2].

1.III البكتيريا

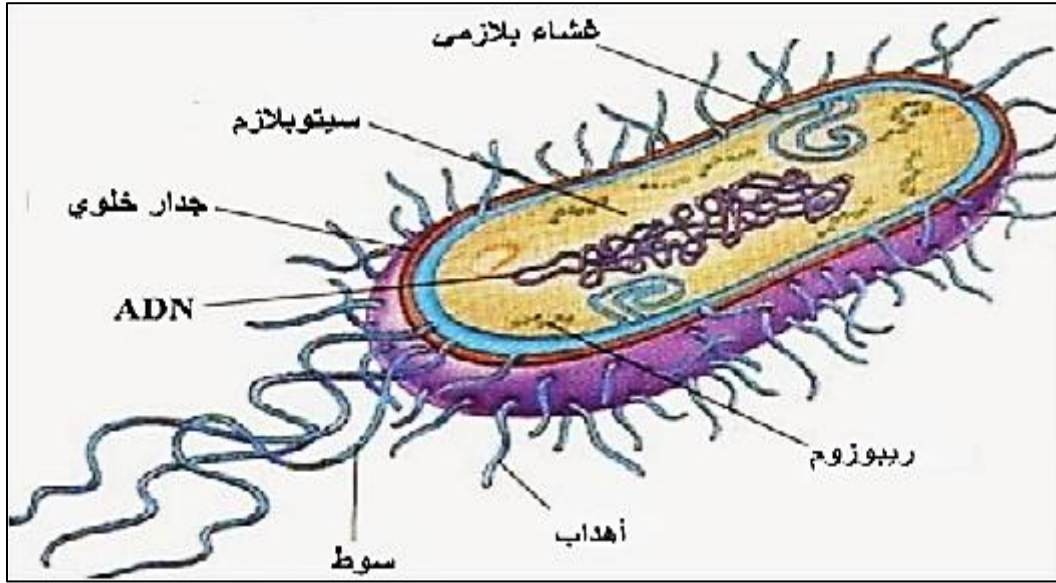
الميكروب هو وصف للكائنات المجهرية الدقيقة التي لا يمكن ملاحظتها الا بالمجهر فهي تشمل الفيروسات والبكتيريا والفطريات والطحالب.

حيث أن الكائنات الدقيقة تعتبر أكثر عدد من الكائنات الحية اذ ما قورنت بالكائنات الأخرى، حيث أن أول من أكتشف البكتيريا العالم الكيميائي لويس باستور خلال تجاربه على التخمر [2].

1.1.III تعريفها

البكتيريا هي عبارة عن كائنات دقيقة الحجم مجهرية أحادية الخلية بدائية النواة (Procaryote) تكون أما كروية أو عصوية أو حلزونية وتعتبر أصغر الكائنات الحية ويتراوح قطر معظمها ما بين الميكرومتر الواحد الي بضعة أعشار الميكرومتر [3].

والمعروف عنها انها تعيش لأعوام طويلة ولها القدرة على تحمل جميع الأحوال الغير مناسبة، حيث تتواجد في كل مكان الماء والهواء والترربة.



الشكل 1.III : شكل يوضح بنية البكتيريا [3].

2.1.III تسمية البكتيريا

تأخذ البكتيريا أسماء ثنائية (Binominal) حيث ينقسم الاسم الي مقطعين المقطع الاول من الاسم يعبر عن الجنس (Genre) والمقطع الثاني الي نوع (espace) وقد يحمل اسم الجنس شكل البكتيريا كما هو الحال في (Streptocoque Staphylocoque) أو اسم المكتشف مثل (Escheriche.coli).

أما بالنسبة للنوع فقد يشير الي المرض كما هو الحال (Cholerae) و (VibrioCholerae) أو مكان عزلها كما هو الحال في (E.coli) تعزل في (Une-cole) او قد يحمل صفات اللون مثل (Staphylocoque aureus) اي الذهبية [1]

3.1.III المكونات الاساسية للخلية البكتيرية

تتركب الخلية البكتيرية من اربعة اجزاء اساسية وهي كالآتي:

i. جدار خلوي (Paroi cellulaire)

جدار سميك وصلب [4] وهو الذي يعطي للخلية شكلها الثابت و المميز كما أنه يلعب دور حماية محتويات الخلية الداخلية، يتركب الجدار من مادتين هما الكربوهيدرات والبيبتيدات [5].

ii. الغشاء البلازمي (Plasma membrane)

غشاء رقيق جدا مكون من الدهون والبروتينات، يتألف من بلايين الثنيات، وظيفته المشاركة في عملية انقسام البكتيريا وهو مركز انزيمات التنفس ويحدد نوعية وكمية المواد التي تنفذ من أو الي البكتيريا والتي تعرف بالنفاذية الاختيارية.

iii. سيتوبلازم (Cytoplasm)

كتلة بروتينية هلامية تحتوي على غذاء مدخر وتدور فيها المواد الغذائية والفضلات لأخراجها، وكذلك توجد بها حبيبات من مادة ARN تعرف بالريبوزومات، وظيفتها تكوين البروتينات سواء كانت تركيبية أو وظيفية مثل الانزيمات والهرمونات، وكذلك يوجد بيها حبيبات مكونة من ADN تحمل صفات (جينية) معينة وتعرف بالبلازميدات.

iv. النواة (Nucleoide)

هي المادة التي تحمل الصفات الوراثية لتواجدها في المنطقة النووية في السيتوبلازم في بدائيات النواة غير محاطة بغشاء نووي، وهي عبارة عن جزئ طويل مفرد من ADN في صورة حلقة يرتبط ارتباط غير محكم ببعض البروتينات مكونة مما يسمى بالكروموسوم حيث تحتوي الخلية البكتيريا على كروموسوم واحد [4]. واربعة اجزاء اخري غير ضرورية لحياة البكتيريا وهي:

i. البذور (Spores)

عندما تسوء الظروف البيئية تكون بعض أنواع البكتيريا جدار سميك يحيط النواة وقليل من الستوبلازم ويعرف هذا التركيب بالبذرة التي تضل حية لمدة طويلة الي أن تتحسن الظروف ،فيتشقق جدار البذرة وتخرج منه النواة وتستعيد شكل البكتيريا مثل الجمرة الخبيثة و كلوستريديا و الغرغرينا الغازية [5].

ii. الاسواط (Flagella)

زوائد طويلة جدا حول البكتيريا في توزيع مميز لكل نوع فقد تخرج من طرف واحد من الخلية أو كلا الطرفين، أو من جميع سطح البكتيريا.

iii. الحافظة (Capsule)

طبقة هلامية سميكة تحيط بالبكتيريا وتمنع التصاقها بالخلايا البلعمية (Phagocyte) لذلك فهي من العوامل الضرورية لبعض الانواع وتوجد في الثنيات الرئوية والجمره الخبيثة.

iv. الهدبيات (Ciliés)

زوائد دقيقة جدا تدعى (Pilli)، وظيفتها تثبيت على سطح الخلايا العائلة وبعضها يعرف بالهدبيات الجنسية التي تلتصق ببعضها لاندماج الانوية من خلية لآخرى وهي مسؤولة عن ضراوة البكتيريا مثلا بكتيريا السيلان.

4.1.III أساس تصنيف البكتيريا

صنف العلماء البكتيريا على عدة اعتبارات ومعايير وهي كالتالي:

1.4.1.III من حيث التغذية

- بكتيريا ذاتية التغذية: هي البكتيريا التي تستهلك الكربون للنمو.
- بكتيريا عضوية التغذية: هي البكتيريا التي تحصل على الكربون من تحليل المواد النيئة كالسكر [6].

2.4.1.III من حيث شكل بكتيريا

- البكتيريا الكروية (Cocci): التي تأخذ خلاياها شكل الكريات الصغيرة.
- البكتيريا العصوية (Bacilli): التي تأخذ خلاياها شكل العصويات الصغيرة.
- البكتيريا الحلزونية (Spiral): التي تأخذ الشكل الحلزوني.
- البكتيريا الواوية (Vibrio): التي تأخذ شكل الواو أو الضمة العربية.

3.4.1.III من حيث الوسط الذي يعيش فيه

- بكتيريا هوائية (Aerobic): وهي البكتيريا التي تعيش فقط في وجود الهواء الجوي وهي تعتبر المصدر الأساسي لتسمم المواد الغذائية.
- بكتيريا لاهوائية (Anaerobic): وهي البكتيريا التي تعيش فقط في غياب الهواء الجوي.
- بكتيريا لاهوائية اختيارية (Anaerobic Facultative): وهي البكتيريا التي تستطيع العيش في وجود الهواء الجوي أو بدونه [7].

4.4.1.III من حيث توزيع الاسواط

- وحيدة السوط (monotrichous): التي يخرج سوط واحد من أحد قطبي الخلية البكتيرية.
- سوطية الطرف (lophotricous): وفيها تخرج حزمة سوطية من قطب واحد في الخلية البكتيرية.

- **سوطية الطرفين (amphitrichous):** وهي التي يخرج سوط واحد أو حزمة سوطية من كل قطب من أقطاب الخلية البكتيرية.
- **محيطة الأسواط (eritrichous):** وفيها تنتشر الأسواط من جميع الاتجاهات حول سطح الخلية البكتيرية.

III.4.1.5 من حيث طريقة التلوين [8, 9].

- تصنف البكتيريا عن طريق استخدام الفروق في بنية الجدار الخلوي حسب تقنية غرام (Gram) نسبة للعالم البلجيكي (J.Gram) المكتشفة سنة 1884 وعن طريقها يمكن أن نقسم البكتيريا الي:
- **بكتيريا موجبة (G+):** عند تلوينها تمتص اللون وتظهر إرجوانية.
 - **بكتيريا سالبة (G -):** لا تمتص أو قليلة الامتصاص للون وتحرر صبغا وتظهر حمراء.

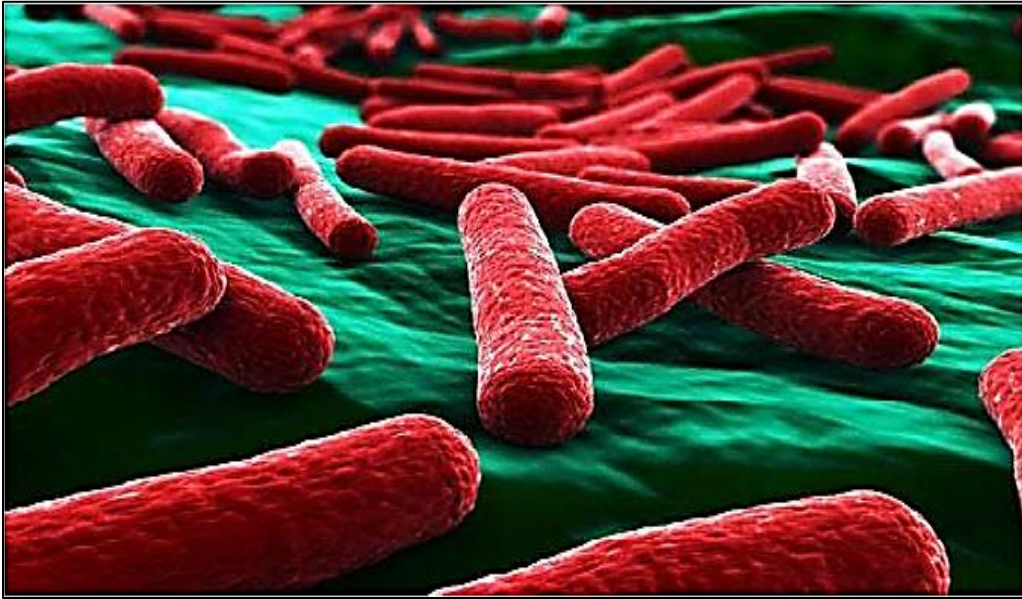
III.4.1.6 من حيث أثرها على الانسان

- **بكتيريا نافعة (Bénéficial Bactérie):** هي التي تقدم خدمات جلييلة للإنسان والحيوان والبيئة ، في البكتيريا النافعة لها عدة فوائد مثلا تساعد على هضم الطعام في جسم الانسان وكذلك تعمل على تدمير البكتيريا الضارة ، وتستعمل في الميادين الصناعية كإنتاج منتجات الالبان وكذلك في مجالات الصيدلانية لصناعة الأدوية [2, 10].
- **بكتيريا انتهازية (Opportunistic Bactérie):** وهي البكتيريا المتعايشة في جسم الانسان ويمكن أن تسبب المرض عندما تقل مقاومة الانسان عند المرض [11].
- **بكتيريا ضارة (Pathogenic bacteria):** وهي البكتيريا التي تهاجم جسم الانسان مسببة أمراض متفاوتة الخطورة مثل السل، التيفويد و الزهري و غيرها [12].

III.2 البكتيريا المستعملة في الدراسة

1.2.III بكتيريا *Escherichia Coli*

تعتبر بكتيريا (*Escherichia Coli*) من عائلة (Enterobacteriaceae) تحت تصنيف (Proteobactérie)، هي بكتيريا سالبة الغرام (G-) من الرتبة (Enterobacteriales) تتواجد في الجهاز الهضمي للإنسان وكذلك الفضلات الحيوانية والنبات والتربة تأخذ شكل عصوي، مسببة لعدة أمراض منها: التهاب السحايا وتسمم الدم وكذلك الاسهال الطفيلي [13, 14].



الشكل 2.III : صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *E Coli* [14].

2.2.III بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

تعد بكتيريا (*Pseudomonas aeruginosa*) تندرج تحت عائلة (Enterobacteriaceae) ضمن تصنيف (Pseudomonabactéries) ، تعتبر بكتيريا موجبة الغرام (G+) من الرتبة (Enterobacteriales) وهي عبارة عن عصيات مستقيمة بأسواط طرفية ، متحركة هوائية مصدرها الجهاز الهضمي للإنسان و الحيوان وتتواجد كذلك في الماء والتربة، أما طولها يتراوح ما بين 1.5 μm الي 4 μm وعرضها 0.5 μm الي 1 μm ، تعمل على الإلتلاف السطحي للأغذية المبردة وكذلك تعتبر ممرضة للإنسان و الحيوان ، كما تسبب أمراض الرئتين والسحايا [15, 16].

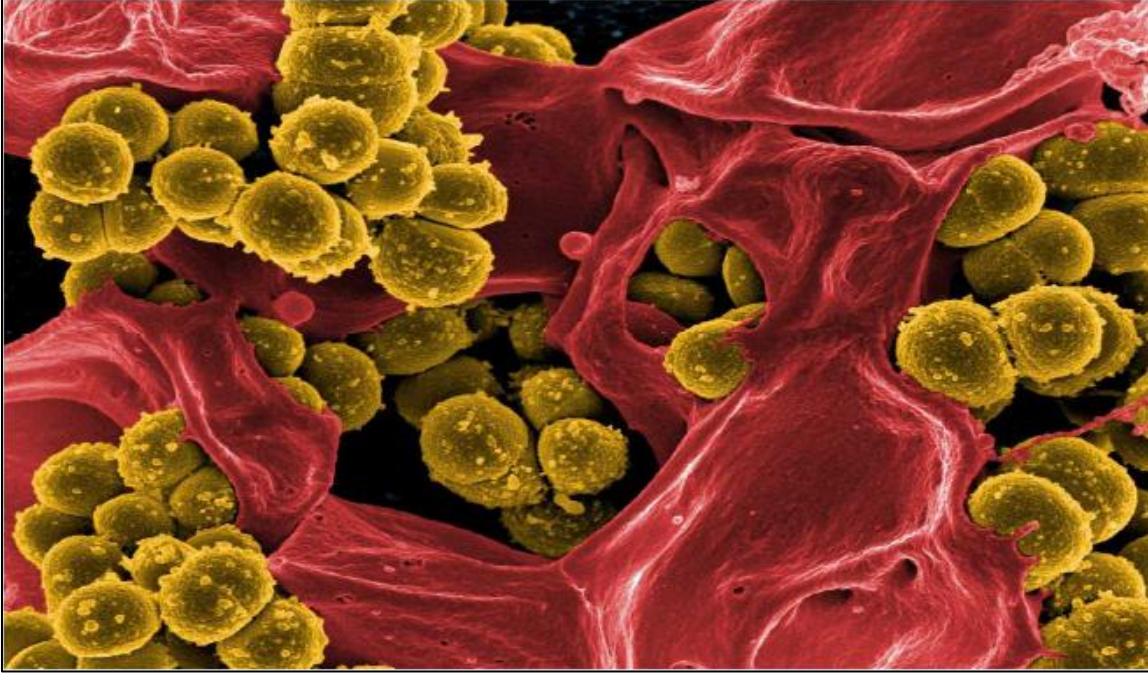


الشكل 3.III : صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *P.aeruginosa* [16].

3.2.III بكتيريا *Staphylococcus aureus*

هي بكتيريا من العائلة (*Staphylococcus aureus*) تحت تصنيف (Firmicutes) من الرتبة (Bacillales) تعبر موجبة الغرام (G+) تمتاز باللون الأصفر البراق عديمة حركة ، تأتي هاته البكتيريا

على شكل الكروي تسمى كوكسي (Cocci)، هذه البكتيريا مسؤولة عن التسمم الغذائي وكذلك تتسبب في التهابات جلدية خطيرة [17, 18].



الشكل III.4 : صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *S. aureus* [18].

3.III المضادات الحيوية

1.3.III تعريف المضادات الحيوية

استعملت كلمة المضادات الحيوية لأول مرة من طرف العالم (Vullemin) سنة 1889 والتي عرفت على أساس مركبات كيميائية ناتجة عن دقائق عضوية، أو من التصنيع العضوي والتي تكون ذات فعالية انتقائية على الدقائق العضوية الممرضة تحت تراكيز ضعيفة، فهي تستطيع إيقاف وتنشيط نموها وتكاثرها، وكذلك تفجيرها وقتلها مباشرة أثناء انقسامها.

وتستعمل المضادات الحيوية حاليا كنوع من المواد الكيميائية الطبيعية العلاجية لعلاج الكثير من

الأمراض الميكروبية [19-21].

2.3.III أنواع المضادات الحيوية

إن الوظيفة الأساسية للمضاد الحيوي في الجسم تندرج الي قسمين وهما كالتالي:

1.2.3.III مضادات حيوية كابحة لنشاط الخلية البكتيرية

يمنع تكاثرها وهو ما يساعد على القضاء عليها علي سبيل المثال: سلفوناميد، كلورامفينكول.

2.2.3.III مضادات حيوية قاتلة للخلية البكتيرية

وأما هاته الأخيرة فيكون طريقة تأثيرها على جدار خليتها ، أو بالتسبب في انتفاخ خليتها و انفجارها، أو بمنع تكوين مادة البروتين داخل خليتها [22].

3.3.III طرق تأثير المضادات الحيوية

1.3.3.III مضادات تعمل على إيقاف نسخ ال ADN

إن اضطراب عمل ال ADN يمنع الخلية من الانقسام وتكوينها للإنزيمات الخاصة بذلك.

2.3.3.III مضادات تعمل على تخريب بنية الغشاء السيتوبلازمي

كما هو معروف وجود بعض المضادات الحيوية تأثر على هندسة Apidoprotine لهذا الغشاء فيقوم بتحللها مما يؤدي الي فقد السيتوبلازم الكروموزومي [23].

3.3.3.III مضادات تعمل على تخريب الجدار الخلوي

إن الجدار الخلوي مكون من الميكوببتيدات (mucopeptides) أثناء الانقسام الخلوي (acétylmuramidase) تنتج اولا تحلل الجزئي للجدار في الخلية البكتيرية الأم، ثم محولة (ARN

(transpeptidase) تتدخل لإنتاج جدار الخلايا الجديدة، فيقوم المضاد بإيقافها، وبالتالي يؤدي الي انتاج جدار غير كامل مما يؤدي الي انفجار الخلية وموتها [24].

III.3.3.4 مصادات تعمل على مقاومة تكوين البروتينات

إن حمض الـ ADN يحمل مفتاحا خاصا بتحضير البروتينات وذلك من خلال عملية النسخ والنقل والترجمة فقبل عملية الترجمة تعترض المصادات الحيوية عملية تحرير الاحماض الامينية، وبالتالي يفقد الريبوزوم المادة الأولية مما يؤدي الي تكوين بروتينات دون أهمية، الامر الذي يؤدي الي تحطيم الغشاء السيتوبلازمي، وهذا يعني ايقاف تكوين الانزيمات المسؤولة عن حماية البكتيريا في مرحلة تكوين البروتين.

III.3.3.5 المقاومة البكتيرية للمضاد الحيوي

i. تعريف المقاومة

ظهرت المقاومة البكتيرية مباشرة بعد بداية استعمال المصادات الحيوية ضد الامراض المعدية، وقد أظهرت مقاومة شرسة لأنها أصبحت امرا مستعصيا على الاطباء لأنها كانت في تطور مستمر، ونقول عن البكتيريا أنها مقاومة إذا كانت تستطيع النمو والتكاثر في وجود نسبة من المضاد الحيوي تفوق النسبة المعتادة وهي نوعان:

▪ مقاومة طبيعية.

▪ مقاومة مكتسبة.

ii. أسباب مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي

تكون المقاومة على شكل طفرة جينية تلقائية أو مكتسبة أو اكتساب جين مقاوم من بكتيريا أخرى حتى وإن كانت سلالة مغايرة ويتم ذلك عن طريق عملية نقل الجين الأفقي.

ويرجع سبب زيادة مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية من أسبابها التعرض الكثير للمضادات الحيوية المستهلكة بدون أذن الطبيب ولا وصفات طبية، وبالتالي تظهر مقاومة وظهور عدة أجيال جديدة [23].

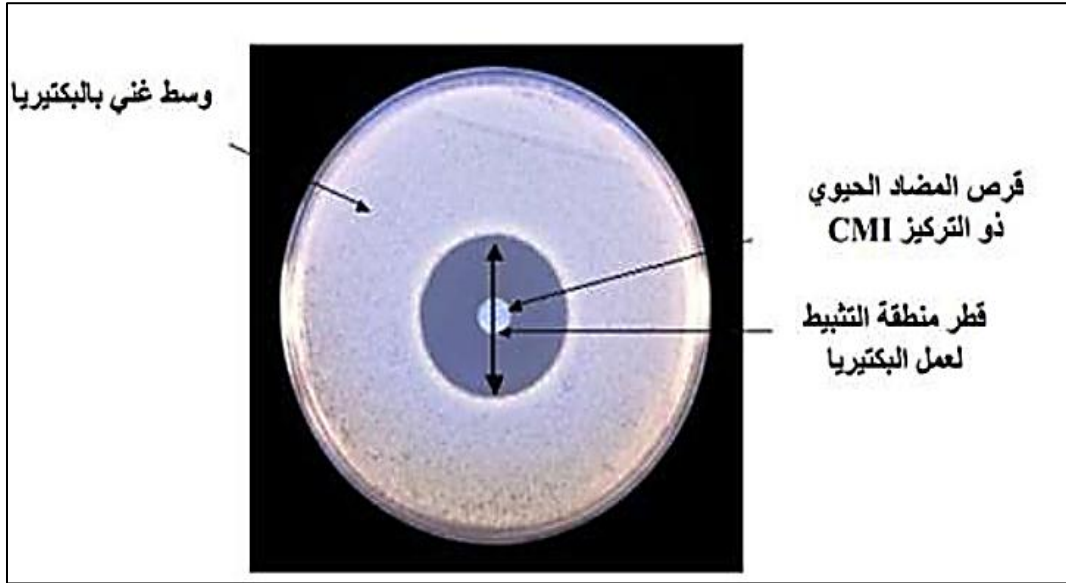
iii. كيفية المعالجة بالمضاد الحيوي

▪ طريقة التمديد

مبدأ هذه التقنية تعتمد على إجراء تخفيف متدرج للمضادات الحيوية في أنابيب اختبار أو تخفيف الاجار في الاطباق ثم يزرع الميكروب، ويتم تحديد أقل جرعة مثبتة لنمو الميكروب (CMI) وبالطبع المضاد الحيوي ذو أقل (CMI) هو الذي يتم اختياره بعد النظر في ظروف المريض [25].

▪ طريقة الانتشار (Méthode de diffusion)

وهي الأكثر استعمال في المستشفيات لتشخيص الامراض المعدية، ويكون الوسط المستعمل صلب من الجيلوز وأهم وسط جيلوزي هو وسط (Hilton Muller)، نسبة للباحث الذي حضره عام 1941، وكان الغرض منه معرفة مدى حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي، وتحديد تركيز الأدنى للتثبيط (CMI).



الشكل 5.III : قطر منطقة التثبيط للبكتيريا.

4.III الجذور الحرة

تحتاج خلايا الجسم الي الاكسجين الذي يتفاعل مع جزيئات طعام المهضوم بحيث ينتج ثاني أكسيد الكربون والماء والطاقة، وأثناء هذا التفاعل تنشأ بعض المجموعات الوسطية النشطة نتيجة لعمليات التحول الغذائي وهي تلك التي يطلق عليها الجذور الحرة.

تعمل هذه الجذور على مهاجمة وتدمير مكونات الخلايا لتحدث بيها أضرار بالغة مؤدية الي تعطيل وظائفها الخلوية المختلفة. ومع زيادة تراكم الجذور الحرة تظهر العديد من الامراض مثل امراض القلب والاورعية الدموية والسرطان وكذلك الشيخوخة وغيرها.

يستطيع جسم الانسان السيطرة على هذه السلسلة من التفاعلات من الوقت المناسب، عن طريق نظام يدعى بنظام المواد المضاد للأكسدة داخل الخلايا، وتتقسم هذه المضادات الي قسمين أنزيمية وأخرى غير أنزيمية.

الا أنه في شروط معينة قد لا تعمل هذه الأنظمة بشكل صحيح مما يزيد من ضرر الأنسجة [26].

في السنوات الاخيرة زاد الاهتمام بمضادات الأوكسدة ذات المصادر الطبيعية بسبب قدرتها على تحسين الجسم ضد غزو الجراثيم والقضاء عليها، كما تقي الجسم من أمراض العصر الشائعة.

1.4.III تعريف الجذور الحرة (Les Radicaux libres)

الجذر الحر هو نوع كيميائي لديه إلكترون او عدة إلكترونات غير مقترنة، أي على الاقل أحد إلكتروناته يتواجد وحده على الاوربيتال بالاتفاق يرمز للجذر الحر بنقطة متواجدة فوق وعلى اليمين لرمز الذرة.

الجذر الأكثر بساطة هو ذرة الهيدروجين (H) ويكون الجذر الحر غير مستقر، بسبب تواجد إلكترون أعزب، يظهر هذا على المستوى الطاقوي والحركي للجذر.



الشكل 6.III : صورة موضحة بالفحص المجهرى للجذور الحرة.

2.4.III أنواع الجذور الحرة

تقسم الجذور الحرة بصورة عامة من حيث استقرارها الي نوعين:

1.2.4.III الجذور التي لها أعمار قصيرة جدا

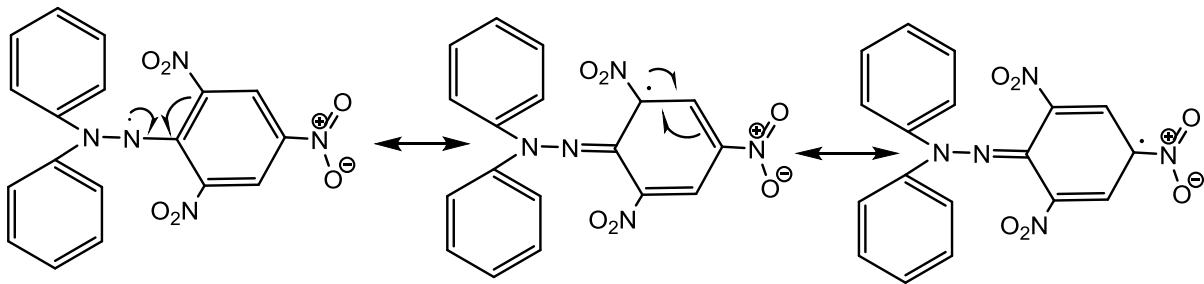
تعتبر هذه الجذور غير مستقرة في الظروف الاعتيادية، وتشمل بعض العناصر مثل: ذرات الهيدروجين والنتروجين والفلور والكلور والبروم واليود وكذلك الجذور التي لها وزن جزيئي صغير بصفة عامة نذكر منها الميثيل ($\cdot\text{CH}_3$) والايثيل ($\cdot\text{C}_2\text{H}_5$) و الفينيل ($\cdot\text{C}_6\text{H}_5$) و الهيدروكسيل ($\cdot\text{OH}$)، حيث تعتبر ذات أعمار صغيرة تقدر برتبة الميكروثانية وقد تصل حتى البيكوثانية [27].

2.2.4.III الجذور الحرة التي لها أعمار طويلة

كما نعلم أن غالبية الجذور الاروماتية التي تشتمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها الجزيئي تكون مستقرة في معظم الاحيان.

ويعود استقرار هذا النوع لعدم تمركز الالكترن المنفرد بموقع معين في تركيب الجذر، وخير مثال

على هذه الحالة عدم تمركز الالكترن المنفرد بجذر (DPPH) [27].



الشكل 7.III : يوضح التركيب الرنينية في جزئ (DPPH).

III.4.3 فعالية الجذور الحرة

معظم الجذور الحرة على درجة عالية من الفاعلية وعادة لا يمكن فصلها، وفي بعض الاحيان لايد من استخدام طرق غير مباشرة للكشف عن أحد الجذور، وطاقات التنشيط بين جذرين حرين ضئيلة للغاية تقرب من الصفر غالبا ومع ذلك فالمعدل الحقيقي للتفاعل يعتمد على سرعة تقابل الوحدتين مع بعضهما البعض.

ومثل هذه التفاعلات توصف بأنها محكومة بالانتشار وتنطوي خطوة الايقاف في كثير من التفاعلات المتسلسلة على هذا الطراز من الاتحاد بين الجذور السريعة [27, 28].

III.4.4 اضرار الجذور الحرة

الجذور الحرة تتكون بشكل دائم داخل الجسم، ويكمن الضرر عندما يكون تركيزها في الجسم يفوق قدرتها على التعامل معها وحذفها، فكلما زادت الجذور الحرة كانت قدرتها على اختراق غشاء الخلية ونفاذها الي الداخل أكبر وذلك بتفاعلها مع الدهون الفوسفورية للأغشية الخلوية وتصل الي الميتوكوندريا والكروموزومات وينتهي الامر بتدمير الخلايا، رغم أن الخلية لديها حماية ذاتية وخط دفاعي بإفرازها مضادات الاكسدة الذاتية والايينزيمات التي تفرزها الخلايا، مما ينجر عن ذلك أضرار أهمها:

- أمراض القلب والأوعية الدموية.
- أمراض الجهاز الهضمي والتمثيل الغذائي.
- ظهور الشيخوخة نتيجة ضعف وظائف الخلايا والأنسجة بسبب تعرض للجذور الحرة.
- أمراض العيون واضطرابات في الرؤية.
- أمراض جلدية وأمراض الكلى ، اضطرابات عصبية [29].

5.III مضادات الاكسدة

1.5.III الإجهاد التأكسدي

أصبح الاجهاد التأكسدي ظاهرة العصر فهو يتسبب في العديد من الاضطرابات الخلوية مؤديا الي الكثير من المشاكل الصحية.

يعرف على انه اختلال التوازن بين المؤكسدات ومضادات الأكسدة وهذا نتيجة لانخفاض مضادات الاكسدة او الانتاج المفرط للجذور الحرة [30].

كثيرا ما نسمع مصطلح المواد المضادة للأكسدة ولكن الكثيرين منا لا يعلم بالضبط ماهي المواد المضادة للأكسدة أو السبب في أنها مهمة ولذلك نتطرق الي تعريف بهذه المواد بما في ذلك تصنيفها وأين يكمن دورها.

2.5.III تعريفها

كلمة (مضاد للأكسدة): يقصد بها منع تأكسد وعمليات الأكسدة تحدث عند تواجد الكثير من الجذور الحرة في جسم الكائن الحي [31]. تحت تأثير الأوكسجين المتواجد في الغلاف الجوي أو أنواع الأوكسجين التفاعلية [32].

وهي عناصر ومركبات موجودة بصورة طبيعية في أغلب الخضروات وكذلك الأعشاب الطبية، حيث تلعب دورا هاما كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة.

ومنه فالدور الاساسي لمضادات الأكسدة هو كسر تفاعل السلسلة للأكسدة الذاتية، وذلك بتفاعل مع جذور الهيدروبيروكسيدات. وعليه فدورها الاساسي هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة عن الأكسدة [33].

3.5.III أقسام مضادات الأكسدة

يمكن تصنيف الدفاعات الخلوية المضادة للأكسدة الي صنفين وهما:

1.3.5.III الأنظمة الدفاعية الأولية

يتكون من الأنظمة الانزيمية الخاصة مثل: Superoxyde dismutase ، Catalase و glutation peroydase المختلفة المضادة للأكسدة.

2.3.5.III الأنظمة الدفاعية الثانوية

يتكون من جهة من أنزيمات هادمة تعمل على عدم تراكم المركبات الأوكسجينية الناتجة عن هجوم جذري ومن جهة اخرى من أنظمة تصليحية لل DNA في هذا العنصر لا نتطرق للأنظمة الدفاعية الثانوية ولا الأنظمة الانزيمية للدفاع الاولي وسنركز خصوصا على الجزيئات الصغير مضادة للأكسدة مثل الفيتامينات وأيضا على العديد من المركبات الطبيعية المستخلصة من النبات، خاصة المركبات المتعددة الفينول.

6.III تقنيات التحليل الكهروكيميائي

التقنيات الكهروكيميائي طبقت في تحديد الفعالية المضادة للاكسدة حيث استخدمت تقنية الامبيرومترية والبيامبيرومترية، وهي تعتبر من أحسن الطرق لما تميزت به من مصداقية ودقة في العمل وتم استخدام تقنية الفولتامتري الحلقي في التحليل المدروس وهي الاكثر طرق استخدمنا.

1.6.III تقنيات الفولتامترية

الفولتامتري هي تقنية تحليلية كهربائية تعتمد على قياس تدفق التيار الناتج من ارجاع أو أكسدة الانواع المتواجدة في المحلول وهذا تحت تأثير فرق جهد بين مسريين نوعيين، والتي تسمح بتحديد وقياس

كمي لعدد كبير من المركبات (شوارد موجبة وسالبة ،مركبات عضوية)، كما تسمح أيضا بدراسة التفاعلات الكيميائية التي تحتوي على هذه المركبات [34].

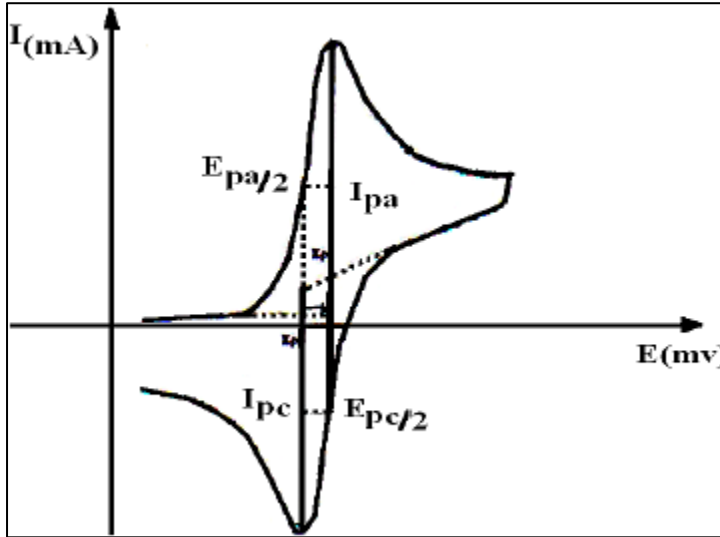
هناك عدة طرق لقياس الفولتامتري التي تقدم لنا معلومات حول خصائص المواد، وفي هذه الدراسة تم استخدام طريقة الفولتامتري الحلقي.

i. طريقة الفولتامتري الحلقي

فولتامتري الحلقي هي واحدة من طرق التحليل الكهروكيميائي وفيها ينطبق فرق الجهد المتغير على مسرى العمل بالنسبة للمسرى المرجعي ويقاس التيار بين مسرى العمل والمسرى المساعد.

هذه الطريقة تسمح على الخصوص بتحديد الشروط التي ينجز فيها تفاعل الأكسدة أو الارجاع ، وكذا تقدير درجة عكسية جملة (أكسدة - ارجاع) ، كما تسمح أحيانا بتحديد آلية التفاعل عند المسرى خاصة عندما تشترك تفاعلات كيميائية في نقل الالكترونات وكذلك تحديد ثوابت السرعة للتفاعلات الكهروكيميائية السريعة [35].

تعتمد تقنية الفولتامتري الحلقي على قياس التيار بدلالة فرق الكمون المتغير المطبق بين المسريين العمل والمرجعي ، هذا الكمون يتغير بصفة خطية بين قيمتين حديتين E_i (كمون الابتدائي) ، E_f (كمون النهائي) حيث يتم مسح فرق الكمونات المصعدية في هذه الطريقة بصورة حلقيه فبعد اجراء المسح مثلا باتجاه فرق الكمونات المصعدية وانجاز تفاعل الاكسدة يعكس اتجاه تغيرات فرق الكمون لاجراء المسح في اتجاه فرق الكمون المهبطي [36].



الشكل 8.III : المقادير الأساسية لمنحنى الفولتامترى الحلقى [37]

حيث:

I_{pa} و I_{pc} : تيارات النتوات المصعدية (عملية أكسدة) والمهبطية (عملية ارجاع) على الترتيب.

E_{pa} و E_{pc} : كمونات النتوات المصعدية والمهبطية على الترتيب [36]

2.6.III مجالات استخدام التقنيات الفولتامترية

التقنيات الفولتامترية متعددة الاستعمالات في مختلف مجالات البحث العلمي وخاصة في مجال

الكيمياء الكهربائية وتفاعلاتها، وكان استخدامها متعدد نذكر منها كالتالي:

- البحث عن المواد المقاومة للصدأ (التآكل يكون نتيجة لسلسلة من التفاعلات الكهربائية والكيميائية).
- انتاج انواع جديدة من البطاريات التي يمكنها تخزين كميات كبيرة من الطاقة.
- من أهم التطبيقات الفولتامترية هي التحليل الكمي لأثار المعادن مثل الذهب من أكسدة وارجاع هذه المواد الكيميائية.

▪ استخدمت مؤخرًا في تقدير فعالية المواد المضادة للأكسدة باستعمال تقنية الفولتامترية الحلقية

[39, 38].

3.6.III أهمية تعيين النشاطية للأكسدة بالفولتامترية الحلقية

حماية الإنسان من الجهد التأكسدي هي وقاية من تطور السرطان والأمراض المزمنة وهي مهمة أخرى مباشرة في الطب والكيمياء الحيوية في العالم، مضادات الأكسدة تلعب دور كبير في حماية النظام البيولوجي من عدة أمراض لا تشفى ولديها استعمال واسع في مختلف المجالات الصناعية والطبية كمواد توقف سلسلة جذور الأكسدة.

الفولتامترية الحلقية هي طريقة ملائمة لدراسة خصائص مضاد الأكسدة وتحديد نشاطية مضاد الأكسدة في النظام البيولوجي، في هذه الأيام تطور الكيمياء الالكتروتحليلية هو الناجح وهو المشروط بطبيعة المادة لأن الطريقة الكروكيميائية تعمل على أساس أغلبية معالجات الكيمياء الحيوية [40].

مراجع الفصل الثالث

مراجع عربية

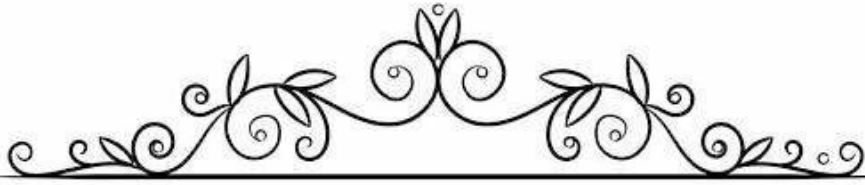
- [2] ج. بوستجيت, ترجمة د. عزت شعلان, الميكروبات والانسان: عالم المعرفة الكويت, 1985.
- [4] رأفت حسن عبد الوهاب. فضاء ادعيح العون, تصنيف عالم نبات والاحياء الدقيقة. الكويت: شركة دار العلم للنشر والتوزيع, 2018.
- [5] مجلة العلوم, تحديات المقاومة الكبيرة, 15. العدد 10 أكتوبر/ تشرين الأول, 1999.
- [9] أبو. الذهب. م. الشيرح. ح. القزاز. س. عاية. ش. البكتيريا. الجزء الأول: دار المعارف, 1997.
- [12] نور الدين تامة, "الدراسة الفيتو كيميائية للمنتجات الفعالة (الفلويدات, الفينولات, الفلافونويدات, التربينات الثلاثية) والنشاط المضاد للأكسدة والمضاد للميكروبات لنبات الباقل والحمير التي تنمو في جنوب شرق الجزائر", مذكرة تخرج لنيل شهادة دكتوراه علوم, تخصص كيمياء نباتية, جامعة العربي بن مهدي, أم البواقي, 2018.
- [22] ع. نوفل, كتاب الكيمياء الصيدلانية. الجزء الثاني: جامعة دمشق, 1981.
- [24] ع. نوفل, كتاب الكيمياء الصيدلانية. الجزء النظري: جامعة دمشق, 1981.
- [25] ز. محمد, "دراسة الفعالية المضادة للأكسدة والبكتيريا لمستخلصات الرمان Punica " مذكرة دكتوراه لنيل شهادة دكتوراه في العلوم, تخصص علوم الكيمياء, جامعة قاصدي مرباح, ورقلة, 2018.
- [27] م. بوقوادة, "دراسة فيتوكيميائية لليبيدات والفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي", مذكرة ماجستير, جامعة قاصدي مرباح ورقلة, 2008.
- [28] م. وبويد, ترجمة فاروق قنديل وصلاح القادري الكيمياء العضوية. دمشق: منشورات المركز العربي للتعريب والترجمة والتأليف والنشر, 2000.
- [29] ب. ع. الوهاب, "دراسة الزيوت الأساسية, المركبات الفينولية وفعاليتها البيولوجية في بعض الأنواع التابعة للفصليتين: السذبية Rutaceae والمركبة compositae", مذكرة تخرج لنيل شهادة دكتوراه في العلوم, تخصص كيمياء نباتية, جامعة العربي بن مهدي, أم البواقي, 2017.
- [31] نشرة علمية اعلامية فصلية. المجلد الثاني و العشرون . العدد 2010.
- [37] نور الهدى حمادو , تقدير المحتوى الفينولي والفعالية المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للنبته . Senecio delphinifolius Vahl مذكرة لنيل شهادة الماستر في كيمياء العضوية 2018/2017.

مراجع أجنبية

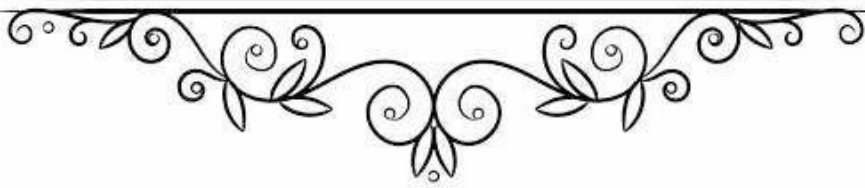
- [1] J. P. Euzeby, "Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale, à l'usage des étudiants de l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse Courriel CV SBSV Pseudomonas"..
- [3] K. PARRENO, "Development and assessment of pomegranate (Punica granatum.L) derived food products. Rich in bioactive phytochemicals," Thèse doctorat.

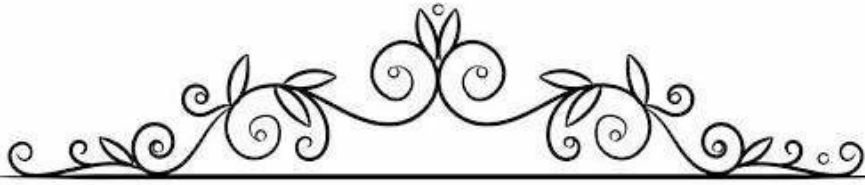
-
- [6] P. Courvalin, "Interpretive reading of antimicrobial susceptibility tests. Molecular analysis and therapeutic interpretation of in vitro tests to improve antibiotic therapy," ASM American Society for Microbiology News, vol. 58(7), 368-375, 1992.
- [7] "bactériologie," Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Université Paris-VI 2002-2003.
- [8] H. L. e. al ,Microbiologie générale Nouvelle édition. Doin édition-paris., 1983.
- [10] G. F. P. Munro, E. Lemichez, "Bacteria and the ubiquity pathway," 2007.
- [11] U. P. e. M. Curie, "Bactériologie," 2002-2003.
- [13] Brazilian Journal of Microbiology, 2006.
- [14] S. Robert-Dernmet, "Antibiotique et antibiogrammes," Décarie Vigot, Montréal, p. 322, 1995.
- [15] C. S. J.N. Joffin, "Pseudomonas et apparentés ou bactéries gram négatif aérobies strictes," 2003.
- [16] K. POOL, "Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms," J. MOL. Microbiol. Biotechnol, vol. 3(2):255-264, 2001.
- [17] Staphylococcus, Un article de Wikipédia, l'encylopédielibre, Juillet 2007.
- [18] A. A. a. A.Omoniyi, "Multi-drug resistant Staphylococcus aureus in clinical cases in Ile-Ife, Southwest Nigeria," International Journal of Medicine and Medical Sciences, vol. 1(3), 068-072, 2009.
- [19] C. A.R, "Role résidus d'antibiotique dans environnements hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres Aeromonas, Acinetobacter et Legionella," Thèse de doctorat l'Université de Genève, 2006.
- [20] R. S. e. al, "Lack of penicillin resensitization in patients with a history of penicillin allergy after receiving repeated penicillin courses," Arch Intern Med, 2002.
- [21] J. Zhang, "Synthèses of Phosphinic Acide and Aza β and γ -lactams as Potential Inhibitors of D, D-Peptidases and β -lactamases," These of doctor at University Catholique de Louvain, 2003.
- [23] A. B. e. al, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method," Am J clin pathol, vol. 45, 493-496, 1966.
- [26] I. Aruoma, "Free radicals, antioxidants and international nutrition," Asia Pacific J Clin Nutr, vol. 8(1), pp. 53-63, 1999.
- [30] A. Favier, "le stress oxydant .intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique," mécanisme biochimique, pp. 108-115.

-
- [32] S. A. Litescu SC, Eremia SAV, Diaconu M, Tache A, et al, "Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants," Environmental Biosensors. In Tech Rijeka Croatia, 2011.
- [33] Y.MOULAY, "Investigation .phytochimique de l'Acacia arabaica aux proprietes antioxydantes et inhilutrices," Diplome Remarque de Magistes .Ourgla- Universite Kasdi Merbak, 2012.
- [34] A. J. Bard, Faulkner, L.R, Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications, 2nd ed. New York: John Wiley and Sons 2001.
- [35] Alexis LAFORGUE doctorat - PARIS XII - val de marne. synthèse et de polymères conducteurs - plicationap au stockage de l'énergie P- 23. 24. 25 (2001)
- [36] BADA, A., FAULKNER, L.R. Electrochimie, Principes, Méthodes et Applications.Masson Paris ed.1983 ,
- [38] Vire, J.C,Kauffmann,J. M, Patriache, G.J.J. Pharm. Biomed. Anal. 7 , 1323.
- [39] R.Kopanica, M. Pure Appl. Ch Kalvoda pp. 61,97, 1987.
- [40] E.I.Korotkova. Y.A.Karbainov.O.A.Avranchik.,Anal BioanalChem,465, 2003.

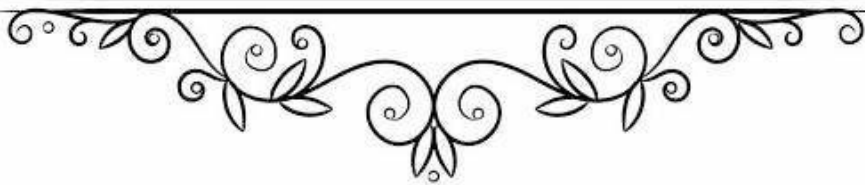


الجزء العملي





الفصل IV : الطرق والوسائل



1.IV المادة النباتية

1.1.IV وصف منطقة الدراسة

نقصد بمنطقة الدراسة منطقة جمع النبات حيث تم قطف النبات من ولاية سوق أهراس، وهي ولاية جزائرية تلقب بسوق الأسود لأن الولاية في سابق كانت الأسود تتأخذ من غاباتها عرينا لها.

يطلق عليها الامازيغ أسم طاغاست، و تاجيلت و هو أسمها الأمازيغي القديم، ذكرها المؤرخ الكبير بلينيوس الأكبر في كتبه وتميزت بخصوبة أرضها وتنوع فلاحتها وأنتاجها الزراعي الوفير و بمناطقها السوقية الشاسعة والمتعددة، وأصبحت عاصمة الولاية سنة 1984، تبعد بمسافة 640 كلم عن العاصمة (الجزائر)، وتبعد عن المطار الدولي ومن عنابة بمسافة 97 كلم أي مايعادل ساعة وثلاثين دقيقة من الزمن ولا تفصلها عن الحدود التونسية غير 40 كلم عبر الحدادة (سوق أهراس) و 65 كلم عبر الوفير.



الشكل 1.IV :: خريطة لمنطقة سيدراته التابعة لولاية سوق أهراس.

2.IV الطرق المتبعة في الميدان

1.2.IV وقت الجمع

تم قطف نبتة شجرة مریم (*Arthemisia absinthium*)، من منطقة سدراثة التابعة لولاية سوق أهراس من شهر ماي لعام 2020، في هاته الدراسة قمنا باستعمال الاجزاء الهوائية من النبتة وتم وضعها في أكياس ورقية غير مغلقة من أجل التهوية.

2.2.IV التجفيف

قمنا بتجفيف نبتة شجرة مریم (*Arthemisia absinthium*) بالتيار الهوائي الطبيعي في الظل وبعيدا عن أشعة الشمس المباشرة والرطوبة والدخان وجميع الروائح الضارة تحت درجة حرارة الغرفة.

قمنا بتجفيف النبات لعدة أسباب نذكر منها:

- التخلص من النسبة العالية للرطوبة في النبات الطازج لمنع تعفنه ولإيقاف مفعول الاينزيمات وعمليات تحلل المائي وإبطال التغيرات الكيميائية والمحافظة على مكوناته الفعالة.
- تسهيل عملية سحق وطحن النبات.
- تقليل وزن العقار وحجمه بغرض تسهيل عمليات الحفظ والتخزين والنقل

3.2.IV الطحن والتخزين

بعد التجفيف الجيد والتام للأجزاء النباتية، نقوم بتقطيعها الي قطع صغيرة بواسطة مقص ثم نقوم بعملية الطحن بواسطة آلة كهربائية نظيفة ومعقمة، مع الاخذ بعين الاعتبار تفادي الطحن الدقيق وذلك لتجنب كسر الروابط الكيميائية للنبتة، وتم وضعها في أكياس ورقية محكمة الغلق، وذلك لمنعها من التعفن أو تعرضها لأشعة الشمس المباشرة.



الشكل 2.IV : صور لعملية التجفيف و الطحن.

3.IV الأدوات والوسائل المستعملة

الجدول 1.IV : الأدوات، المحاليل والأجهزة المستعملة عند الاستخلاص.

الأجهزة	المحاليل	الأدوات
ميزان حساس جهاز المبخر الدوراني Rotavapeur حاضنة Etuves	ميثانول (CH ₃ OH) ماء مقطر	المادة النباتية بيشر ورق ترشيح قمع Spatule Parafilm Erlenmeyer

الجدول 2.IV : المحاليل الكيميائية، الأدوات والأجهزة المستعملة في تقدير المركبات الفينولية والفلافونيدية.

التقدير الكمي	المحاليل	الأدوات	الأجهزة
	<ul style="list-style-type: none"> ميثانول (CH₃OH) ماء مقطر 		
التقدير الكمي للفينولات	<ul style="list-style-type: none"> حمض الغاليك كربونات الصوديوم (Na₂CO₃) 	<ul style="list-style-type: none"> المستخلصات أنابيب اختبار حامل أنابيب اختبار 	<ul style="list-style-type: none"> ميزان حساس جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV- Vis 1800 SHIMADZU)
	<ul style="list-style-type: none"> Folin 		
التقدير الكمي الفلافونيدية	<ul style="list-style-type: none"> ميثانول (CH₃OH) ماء مقطر كرستين ثلاثي كلور الألمنيوم (AlCl₃) 	<ul style="list-style-type: none"> Micropipette Spatule Les cuves 	

الجدول 3.IV : المحاليل الكيميائية , الأدوات و الأجهزة المستعملة في قياس الفعالية المضادة للأوكسدة.

الأجهزة	الأدوات	المحاليل	الطريقة
PGZ301 VoltaLab 40	<ul style="list-style-type: none"> • مستخلصات • أنابيب الاختبار • حامل أنابيب الاختبار • خلية زجاجية • Micropipette 	<ul style="list-style-type: none"> • DMF • TBFP • Acétone • حمض الأسكوربيك • ماء مقطر • أسنات الصوديوم • CH₃COONa • حمض الخل • CH₃COOH • حمض الغاليك 	طريقة الفولتامتري الحلقي
		<ul style="list-style-type: none"> • ميثانول (CH₃OH) • ماء مقطر • محلول DPPH • حمض الأسكوربيك 	اختبار تثبيط الجزر الحر DPPH
<ul style="list-style-type: none"> • ميزان حساس • جهاز مطيافية الأشعة ال فوق البنفسجية والمرئية (UV-Vis 1800 SHIMADZU) 		<ul style="list-style-type: none"> • أسنات الصوديوم • CH₃COONa • حمض الخل الثلجي • CH₃COOH • الماء المقطر • TPTZ • HCl • ثلاثي كلوريد الحديد • المائية FeCl₃.6H₂O • حمض الأسكوربيك 	اختبار FRAP
		<ul style="list-style-type: none"> • حمض الكبريتيك • H₂SO₄ • فوسفات الصوديوم • Na₃PO₄ • موليبيدات • الأمونيوم (NH₄) 2MoO₄ • حمض الغاليك 	اختبار موليبيدات الفوسفات

الجدول 4.IV : المحاليل الكيميائية , الأدوات و الأجهزة المستعملة في الفعالية المضادة للبكتيريا .

المحاليل	الأدوات	الأجهزة
<ul style="list-style-type: none"> • وسط الزرع (Muller Hinton) • DMSO • ماء فيزيولوجي معقم 	<ul style="list-style-type: none"> • المستخلصات • أنابيب اختبار • Pipette pasteur • Micropipette • أطباق بيتري • ماسح قطني • القدم القنوية 	<ul style="list-style-type: none"> • ميزان حساس • موقد بنزن • حاضنة • Autoclave

الجدول 5.IV : المحاليل الكيميائية , الأدوات و الأجهزة المستعملة في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC .

المحاليل	الأدوات	الأجهزة
<ul style="list-style-type: none"> • Acetonitrile • acide acetique 	<ul style="list-style-type: none"> • المستخلصات • أنابيب اختبار 	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC SHIMADZU

الجدول 6.IV : المحاليل الكيميائية، الأدوات والأجهزة المستعملة في مطيافية الاشعة فوق البنفسجية IR

الأدوات	الأجهزة
<ul style="list-style-type: none"> • المستخلصات • أنابيب اختبار 	<ul style="list-style-type: none"> • Agilent Technoogies Cary 630 FTIR

4.IV الطرق المتبعة

1.4.IV طرق الاستخلاص

1.1.4.IV الهدف

تهدف هاته الدراسة الي استخلاص أكبر كمية من متعدد الفينول المتواجد في الجزء الهوائي من نبتة شجرة مريم (*Arthemisia absinthium*) , وقد تم استخدام بعض المذيبات العضوية من اجل انجاح التجربة وهما على التوالي الميثانول والماء .

2.1.4.IV تعريف الاستخلاص

وهو فصل مركب أو عائلة مركبات من المادة الخام باستعمال المذيبات العضوية أن كانت المادة المراد فصلها سائلة فنطبق عليها استخلاص (سائل - سائل) وإن كانت المادة صلبة فنطبق استخلاص (صلب - سائل) , ولهذا الاخير عدة أشكال ترتبط بعدة عوامل مختلفة منها درجة الحرارة والضغط وكيفية استعمال المذيب [1].

3.1.4.IV استخلاص (صلب - سائل)

i. الاستخلاص على البارد (النقع)

وتعتمد هذه الطريقة على وضع المادة الخام داخل إناء يحتوي على كمية محددة من المذيب، بحيث يكون حجم المذيب المستعمل يغطي المادة الجافة بنسبة تقريبية قدرها (حجم المذاب 1 / حجم المذيب 3) في الظروف العادية (الضغط ودرجة الحرارة الغرفة) مع التحريك من حين الي آخر وتترك لمدة زمنية معينة خلالها يتم انتقال المركبات المراد فصلها من المادة الجافة الي المذيب، تتبعها عملية ترشيح.

ونستعمل طريقة التنقيع للمواد التي تتأثر وتتفكك بالحرارة و تتأثر أيضا بقطبية المذيب (التشابه في القطبية بين المذيب و المستخلص المراد الحصول عليه من المادة الجافة أي مبدأ " الشبيه يذيب الشبيه") [2].

ii. الاستخلاص على الساخن

هي تقنية سريعة نسبياً لسابقتها حيث يتم غمس النبات في المذيب مع التسخين وتطبق على المواد الصلبة التي تطلق موادها الفعالة إلا تحت تأثير درجة الحرارة العالية ، وتطبق لفصل المواد المتبخرة (الطيارة) وغير قابلة للتبخر [3].

4.1.4.IV تحضير المستخلصات المستعملة في الدراسة

تم تحضير المستخلص الميثانولي ومستخلص مزيج من الميثانول والماء (3/7) عن طريق النقع لتحصل على مستخلصين نستعملهما في الدراسة.

5.1.4.IV تحضير المستخلص الميثانولي بالنقع (macération)

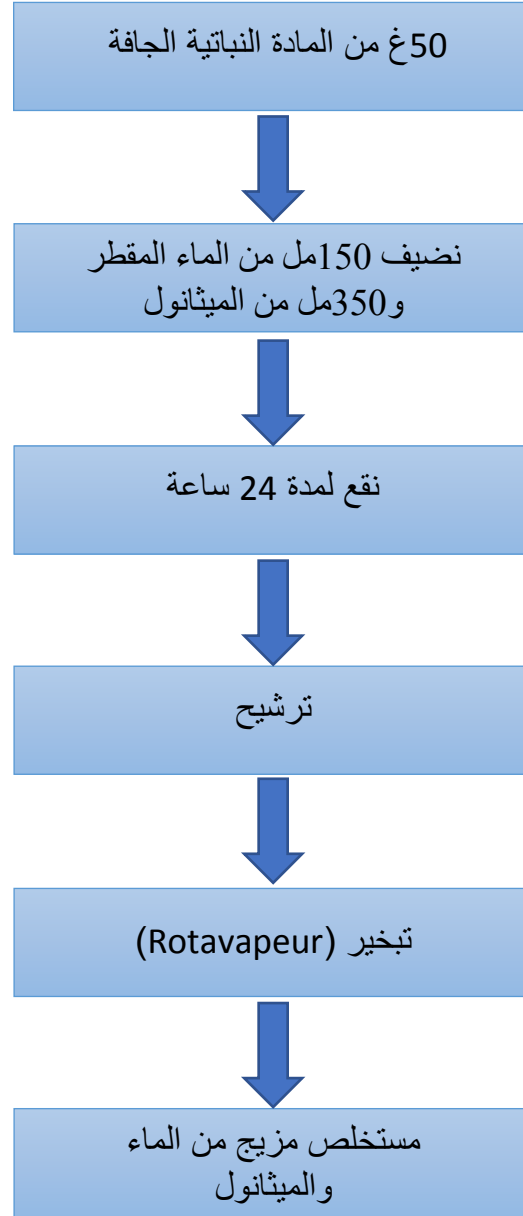
نأخذ وزناً قدره 50 غ من نبتة شجرة مريم *Arthemisia absinthium* الجافة والمطحونة نضيف 500 مل من الميثانول داخل أرنل ماير سعته 1000 مل و نقوم بتغطيته بواسطة Parafilm لمنع المذيب من التبخر نتركه لمدة 24 ساعة في مكان يحفظ الشروط النظامية نقوم بعد ذلك بالترشيح نستحفظ بالرشاحة ونعيد بنفس الخطوة و بنفس المذيب في 24 ساعة التالية ، نقوم بترشيح ونضع هذا المستخلص في جهاز المبخر الدوراني عند درجة تبخر المذيب حتى نحصل على مركب ذو قوام سميك لزج نتركه تحت التهوية لنتأكد من تبخر الميثانول ثم نقوم بحساب المردود.

6.1.4.IV تحضير مستخلص مزيج من الماء والميثانول بالنقع (macération)

نضع في أرنل ماير 50 غ من نبتة شجرة مريم *Arthemisia absinthium*، نضيف 150 مل من الماء المقطر و 350 مل من الميثانول ، نقوم بتغطيته ونتركه لمدة 24 ساعة في مكان يحفظ الشروط النظامية نقوم بعد ذلك بالترشيح نستحفظ بالرشاحة ونعيد بنفس الخطوة بنفس مزيج من الميثانول والماء

(3/7) لمدة 24 ساعة التالية , نقوم بترشيح ونضع هذا المستخلص في جهاز المبخر الدوراني حتى نتحصل

على مركب ذو قوام سميك لزج نتركه تحت التهوية لتتأكد من تبخر الماء ثم نقوم بحساب المردود.



الشكل 3.IV: مخطط يوضح مراحل الاستخلاص العام لمستخلصات النبتة .

بالنسبة لمستخلص الميثانولي قمنا بنفس المراحل السابقة للاستخلاص، حيث تم الحصول على

كتلة قدرها 9.45 غ، و أما المستخلص المزيج الميثانولي والماء فكانت كتلته 13.97 غ.

5.IV حساب مردود الانتاجية للمستخلصات

مردود الانتاجية للمستخلصات هي النسبة بين وزن المادة المستخلصة والتي نرمز لها m_f على

وزن المادة الابتدائية للنبته ونرمز لها ب m_i حسب العلاقة التالية:

$$R\% = (m_f/m_i) * 100$$

حيث:

$R\%$: المردودية الانتاجية للمستخلصات ب% [4].

m_i : الكتلة الابتدائية .

m_f : الكتلة النهائية .

6.IV التقدير الكمي بواسطة مطيافية الاشعة فوق البنفسجية – المرئية

1.6.IV مطيافية الاشعة فوق البنفسجية – المرئية UV-visible

تعد هذه التقنية من أقدم الطرق للتحليل الكيفي والكمي والاكثر استعمالا، تساعد في تحديد البنى

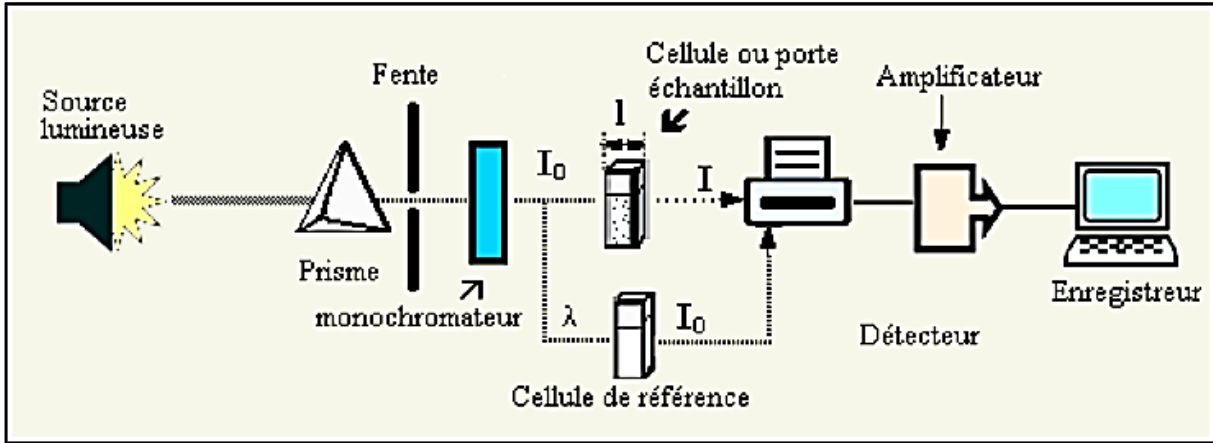
الكيميائية للمركبات، ومن أهم طرق التقدير الكمي طريقة قياس الامتصاصية (الكثافة الضوئية) للمحاليل

،حيث مجال طولها الموجي محصور بين 800 -400 نانومتر .

يتكون هذا الجهاز من قسمين هما المصدر الضوئي لأي طول موجي محدد ومقياس الكثافة

الضوئية , حيث يتم وضع العينة المراد قياس امتصاصيتها داخل انبوب يسمح بمرور الضوء , وبالتالي

فإن كمية الضوء المار خلال العينة يعبر عنه بالامتصاصية [5, 6].



الشكل 4.IV : رسم تخطيطي يوضح مبدأ عمل جهاز مطيافية الأشعة UV-visible [6].

مبدأ العمل

يتكون جهاز الطيف الذري من قسمين رئيسيين هما المصدر الضوئي لكل أي طول موجي محدد ، و مقياس كثافة الضوء ، حيث وضع السائل المراد قياس تركيز العناصر الموجودة في داخله في حامل العينة (Cuvette) ، ثم وضع العينة بين المصدر الضوئي والكاشف، وعند تعرض الكاشف الضوئي للضوء فإنه يتولد على أقطابه إشارة كهربائية تتغير بتغير كمية الضوء الممتصة من قبل السائل ، حيث تعتمد تغير امتصاص العينة للضوء على تغير تركيز المادة في المحلول وبالتالي يمكن حساب التركيز بالاعتماد على امتصاص الضوء عند طول موجي محدد [1].

قانون لامبرت بير:

$$A = \log I_0 / I$$

حيث

I_0 : شدة الضوء الوارد

I : شدة الضوء الصادر

1.1.6.IV التقدير الكمي للمركبات الفينولية بواسطة UV-visible

يتم تقدير كمية المركبات الفينولية الكلية باستخدام الطريقة اللونية (Singleton Rossi) 1965 وذلك باستعمال كاشف الفولين (Folin ciocalteu)، حيث أن هذا يتكون من حمض فوسفوتغستينيك ($H_3PW_{12}O_{40}$) وحمض فوسفوموليبيديك ($H_3PMo_{12}O_{40}$) الذي يرجع بواسطة الفينولات الي أكسيد التغستين (WO_3) و الموليبيدين (MoO_3) ذات اللون الأزرق [7].

يتم تقدير المركبات الفينولية كميًا بواسطة جهاز طيف الأشعة فوق بنفسجية و المرئية -UV visible باستعمال حمض الغاليك كفينول مرجعي عند الطول الموجي $\lambda_{max} = 760nm$ [8].

المنحنى القياسي لحمض الغاليك (Ac,gallic)

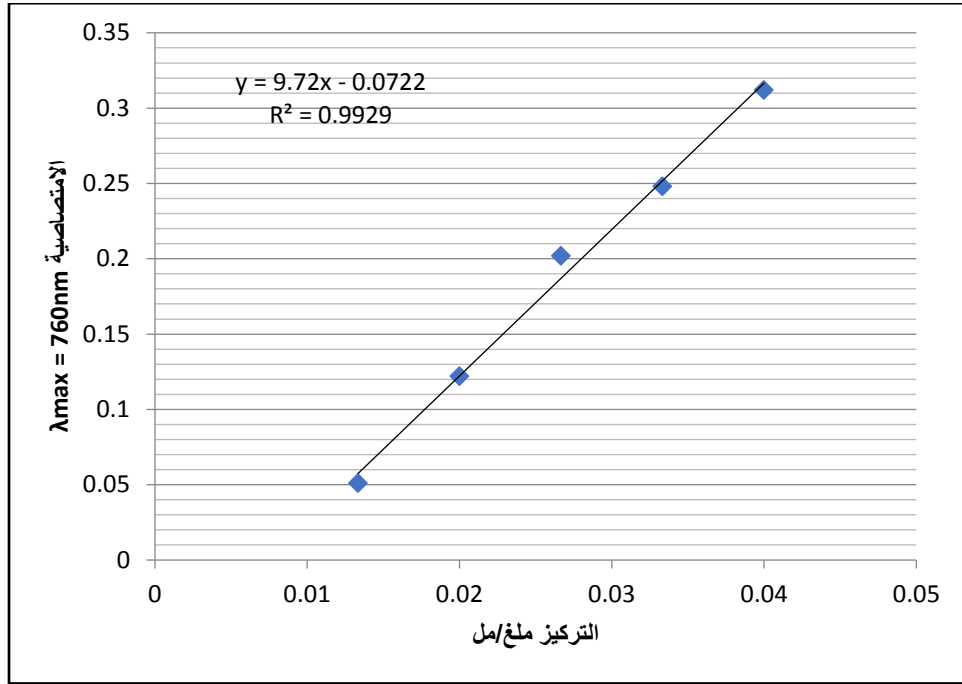
نقوم بتحضير محاليل ممددة لحمض الغاليك تراكيزه تتراوح ما بين (0.0133-0.04) ملغ/مل في أنابيب اختبار، ثم نأخذ 0.2 مل من المحاليل الممددة ونضيف لها 1 مل من كاشف الفولين (Folin ciocalteu) الممدد 10 مرات، ثم نضيف 0.8 مل من محلول كربونات الصوديوم (7.5% Na_2CO_3)، ونضع المحاليل في الظلام لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة، بعدها نقوم بقياس الامتصاصية عند طول موجي عند $\lambda_{max} = 760nm$.

انطلاقاً من قيم الامتصاصية لمحاليل حمض الغاليك الجدول 7.IV، نرسم منحنى

القياسي للكثافة الضوئية (الامتصاصية) بدلالة التركيز [9] $A=f(C)$.

الجدول 7.IV : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لحمض الغاليك.

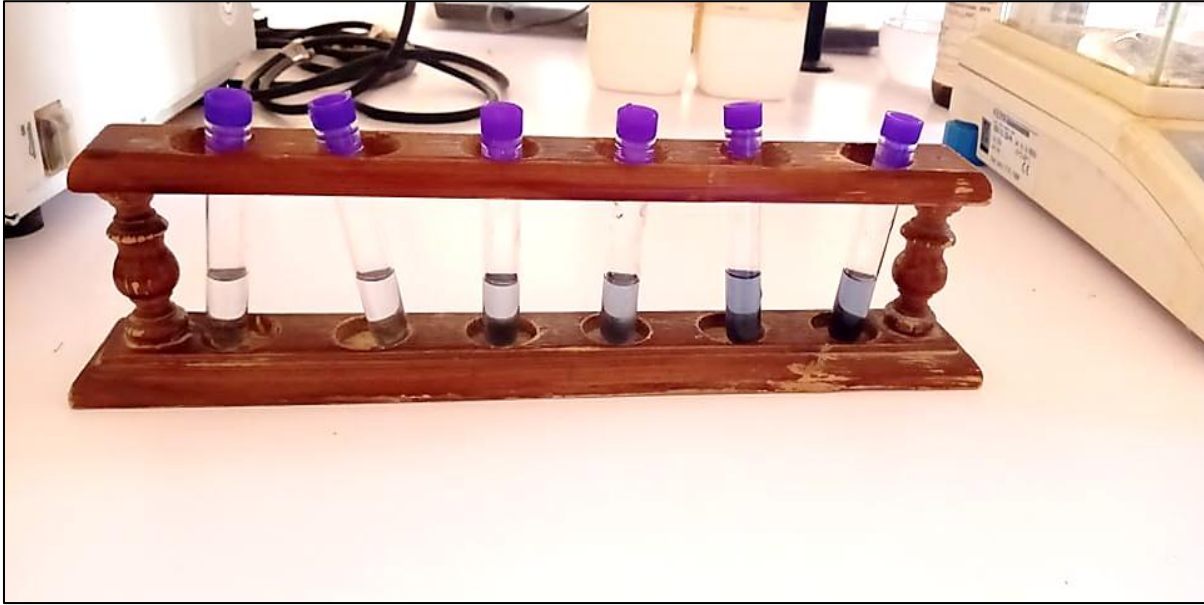
0.04	0.033	0.026	0.02	0.0133	التركيز (ملغ/مل)
0.312	0.248	0.202	0.122	0.051	الامتصاصية A



الشكل 5.IV : المنحنى القياسي لحمض الغاليك (A,gallic).

التقدير الكمي للفينولات الكلية في المستخلصات

نحضر من كل مستخلص عضوي تركيز قدره 0.1 ملغ/مل، نأخذ من كل تركيز 0.2 مل ونضيف له 0.5 مل من كاشف الفولين (Folin ciocalteu) ثم نضيف له 0.8 مل من محلول كربونات الصوديوم (7.5% Na_2CO_3)، ونتركه في الظلام لمدة 30 دقيقة فنتحصل على اللون الأزرق، ثم نقرأ الامتصاصية عند طول موجي $\lambda_{max} = 760nm$.



الشكل 6.IV : المحاليل بعد اضافة كاشف الفولين.

2.6.IV التقدير الكمي للفلافونيدات بواسطة UV-visible

تمثل الفلافونيدات مجموعة كبيرة من المركبات الفينولية، حيث يتم تحديد كمية الفلافونيدات الكلية وفق الطريقة اللونية لكلوريد الالمنيوم التي وصفها Chang et al واعتمدنا على طريقة Woisky and salation

مع بعض التعديلات الطفيفة، ويمكن تقديرها كميًا عن طريق التفاعل مع كلوريد الالمنيوم ($AlCl_3$) مع مجموعة الهيدروكسيل (OH) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافونيدات، حيث يشكل معقدًا ثابتًا بين مجموعة الكربونيل وهيدروكسي الموقع 5 و3، كما يشكل معقدات غير ثابتة مع مجموعتي أورثوهيدروكسي، ذو معامل امتصاص عالٍ. ويمتص عند طول موجة $\lambda_{max} = 430nm$.

ونستعمل في هذه التجربة الروتين كأساس مرجعي قياسي لرسم المنحنى القياسي ويتم تقدير كمية الفلافونيدات بواسطة جهاز المطيافية الضوئية باستعمال الروتين كمحلول قياسي عند طول موجي λ_{max} [10] = 430nm.

المنحنى القياسي للروتين (Rutin)

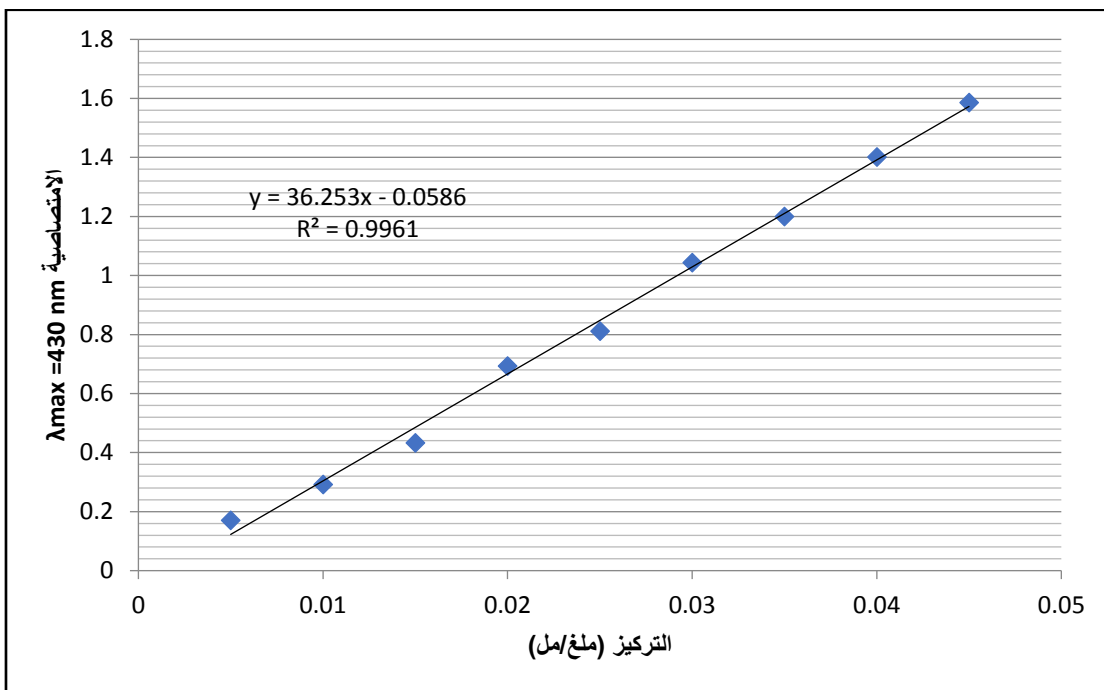
ويتم ذلك عمليا بتحضير محاليل بتركيز مختلفة للروتين محصورة ما بين (0.005-0.045) ملغ/مل، وبإضافة 1 مل من محلول ثلاثي كلور الالمنيوم ($AlCl_3$) ذو تركيز (2% المحضر في الميثانول) لكل 1 مل من التراكيز المحضرة ثم نتركها في الظلام لمدة 30 دقيقة، تتم بعد ذلك قراءة الامتصاصية الضوئية لها بواسطة جهاز طيف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-visible عند الطول الموجي $\lambda_{max} = 430 \text{ nm}$ [11].

انطلاقا من قيم الامتصاصية لمحاليل الروتين الجدول 8.IV نرسم منحنى القياسي للكثافة الضوئية

$$A=f(C) \text{ (الامتصاصية) بدلالة التركيبي}$$

الجدول 8.IV : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لمركب الروتين.

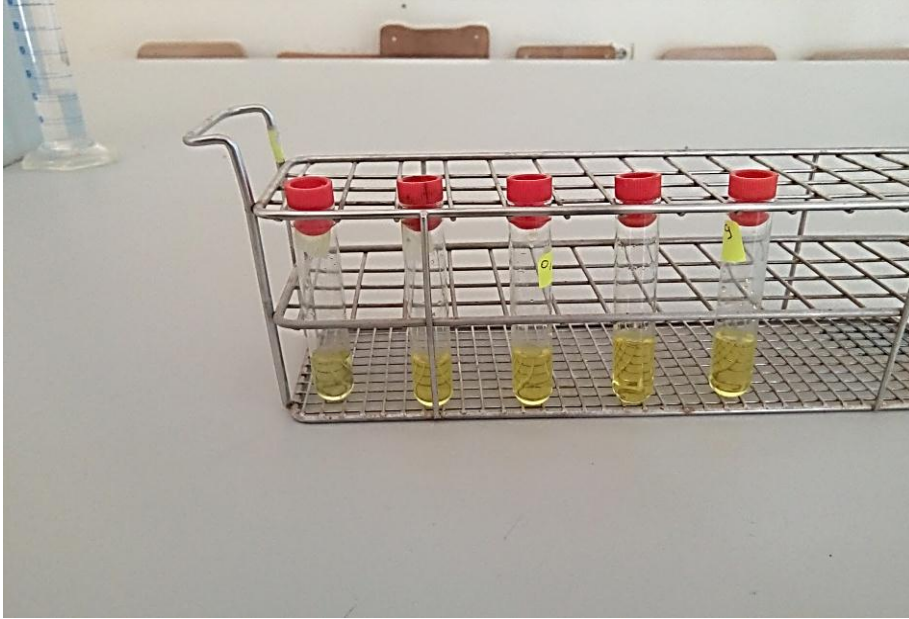
0.045	0.04	0.035	0.03	0.025	0.02	0.015	0.01	0.005	التركيز (ملغ/مل)
1.586	1.401	1.2	1.044	0.811	0.693	0.433	0.292	0.17	الامتصاصية A



الشكل 7.IV : المنحنى القياسي للروتين (Rutin).

التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية في المستخلصات

نحضر من كل مستخلص عضوي تركيز قدره 1.5 ملغ/مل، نأخذ من كل تركيز 1 مل ونضيف له 1 مل من محلول ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) ذو تركيز 2%، ونتركه في الظلام لمدة 30 دقيقة فنحصل على اللون الأصفر، ثم نقرأ الامتصاصية عند طول موجي $\lambda_{max} = 430nm$.



الشكل 8.IV : المحاليل بعد اضافة كلوريد الألمنيوم.

7.IV تقدير النشاط المضاد للأكسدة

على مدى العقود الماضية أقتُرحت العديد من الطرق التي تهدف الى تحدد مستوى النشاط المضاد للأكسدة، منها ما كانت تعتمد على كواشف كيميائية او تجهيزات ونظم آلية، فقد نشرت العديد من الدراسات التي تتناول هذا الميدان حيث أعتد في طرق كيميائية وفيزيائية لتحديد النشاط المضاد للأكسدة، هذه الطرق مبنية على القياس المباشر أو الغير مباشر لسرعة التفاعل ونسبته.

1.7.IV التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الطيفية

1.1.7.IV اختبارات DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl)

هذا الاختبار يعتمد على تثبيط الجذر (DPPH[·]) ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل diphenyl picrylhydrazyl) المستقر نسبيا و ذو اللون البنفسجي حيث يتفاعل مع جزيئة مضادة للجذور الحرة و يتحول إلى (DPPH-H) ثنائي فينيل بكريل هايدرازين (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) يتبع ذلك نقصان الامتصاصية عند طول الموجة الأعظمية بين $\lambda_{max}=517 \text{ nm}$ المذيب المستعمل هنا الميثانول .

ارجاع جذر (DPPH[·]) ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (diphenyl picrylhydrazyl) واكتسابه بروتون يؤدي الى تشكل (DPPH-H) ثنائي فينيل بكريل هايدرازين (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) يؤدي الى تشكل picrylhydrazine ذو اللون الأصفر او الاخضر.

المركب المراد اختباره يضاف الى محلول (DPPH[·]) المحضر في الميثانول، بعد ترك الخليط في الظلام لمدة 30 دقيقة، يتم قياس الامتصاصية الضوئية عند طول موجي $\lambda_{max}=517 \text{ nm}$ بجهاز قياس الاشعة فوق البنفسجية و المرئية UV-visible ، قياس تهافت اللون البنفسجي للخليط مع الزمن تسمح لنا بالحصول على IC 50 ، زمن يتهافت فيه % 50 من لون الخليط.

عموما النتائج تعتمد على كمية مضادات الاكسدة اللازمة لتثبيط % 50 من اجمالي الجذور الحرة (DPPH[·]) الابتدائية IC 50 ، يعني أن النتائج متعلقة بالتركيز الابتدائي ل (DPPH[·]) ، حيث نستطيع

تعريف النشاط المضاد للأكسدة والموسوم بالرمز AA و المعبر عنه بالنسبة $[DPPH^{\cdot}]_{initiale} / IC50$

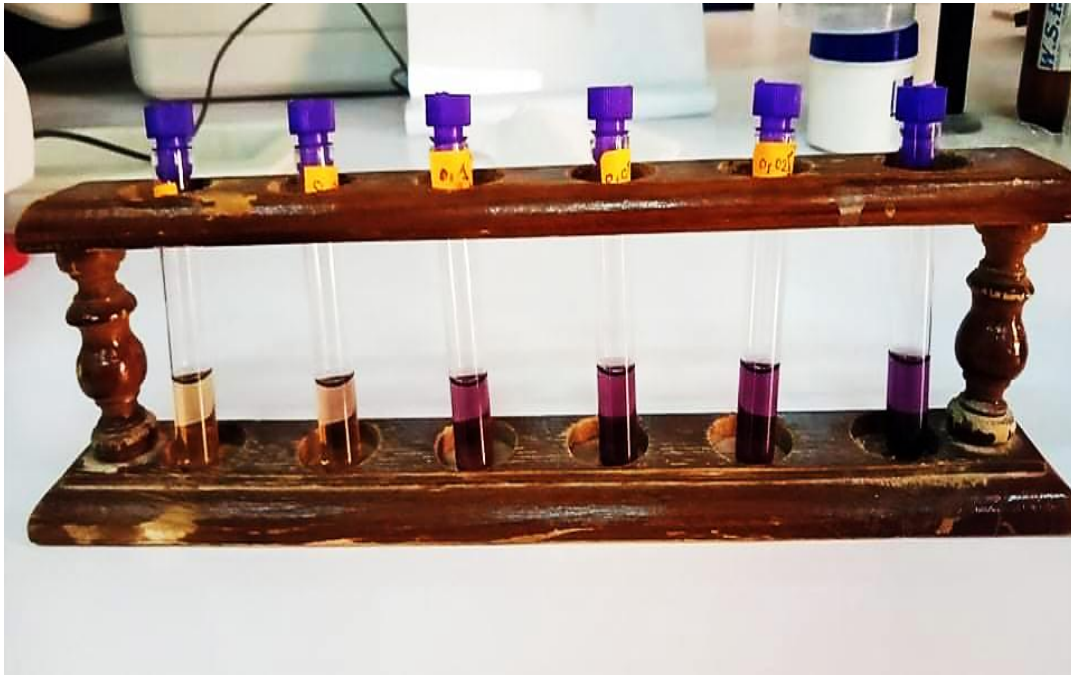
AA = [13 ,12].

i. تحضير DPPH

قمنا بتحضير المحلول وذلك بإذابة 4 ملغ من DPPH في 100 مل من الميثانول لنحصل على محلول بنفسجي داكن، يحفظ في الظلام وفي درجة حرارة مناسبة للحفاظ على خصائصه.

ii. تحضير المحلول المدروس

نقوم بتحضير تراكيز مختلفة من المستخلصات المخففة بالميثانول نأخذ 1 مل من كل تركيز ونضعها في أنابيب اختبار ثم نقوم بإضافة كمية تقدر ب 1 مل من محلول DPPH، نتركها في الظلام لمدة 30 دقيقة ثم نقوم بقراءة الامتصاصية في جهاز الأشعة فوق البنفسجية و المرئية UV-visible عند الطول الموجي المقدر ب $\lambda_{max}=517 \text{ nm}$.



الشكل 9.IV : المحاليل بعد إضافة DPPH.

نقوم بنفس الخطوات مع حمض الاسكوربيك قصد مقارنة الفاعلية المضادة للجذور الحرة والأكسدة

للعينات المدروسة مع حمض الاسكوربيك AA

.iii تقدير النشاط المضاد للأكسدة

لتقدير النشاط المضاد للأكسدة، حددت القدرة المستخلصات على تثبيط والتقاط الجذور الحرة بالنسبة المئوية لإرجاع الجذور الحرة DPPH ومقارنة هذه النسب بتلك الخاصة بحمض الاسكوربيك

.AA

تحدد النسبة المئوية لإرجاع الجذر الثابت DPPH بالعلاقة التالية:

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

حيث أن:

A_0 : لامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات .

A_I : الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات) بعد مرور 30 دقيقة .

.iv تحديد قيمة IC 50

تحدد قيم IC 50 من خلال المنحنيات البيانية لتثبيط الجذر الحر بدلالة التركيز، حيث يتم حساب

قيمة التركيز الموافق ل 50% اعتمادا على المنحنى البياني:

$$Y = a.x + b$$

إذا كانت Y نسبة الإرجاع المقدرة ب 50% تكون قيمة IC 50 كما يلي :

$$X = (50 - b)/a$$

2.7.IV اختبار FRAP

اختبار (FerricReducing/AntioxydantPower) يدرس فعالية مضادات الأكسدة الإرجاعية في تفاعل الإرجاع اللوني ، أي تدرس مدى قدرة المستخلصات كمثبطات لعملية الأكسدة يعتمد مبدأ الطريقة على تلوين أو عدم تلوين للمعقد ثلاثي بيريديل ثلاثي أزين فريك - tripyridyl-s-triazine ferrique 2,4,6 (TPTZ) في الوسط الحامضي.

1.2.7.IV تحضير FRAP

للحصول على خليط FRAP نحضر ثلاث محاليل في أوساط مائية كالتالي:

هو محلول منظم (الموقي-Tampon) نحضر 300 mM من أستات بريف (Buffer) عند 3.6 = PH (نحضر 3.6 g من أستات الصوديوم CH₃COONa مع 16 ml من حمض الخل الثلجي CH₃COOH يكمل المحلول الى 1l بالماء المقطر) .

نحضر 10 mM من (TPTZ) في محلول من 40mM HCl .

نحضر 20 mM من ثلاثي كلوريد الحديد المائية FeCl₃.6H₂O في الماء المقطر.

نخلط المحاليل الثلاثة بتكافؤ على الترتيب 1/1/10 وحدة حجمية ونتحصل على خليط FRAP

ويحفظ الأخير في 37 م° لمدة 30 دقيقة.

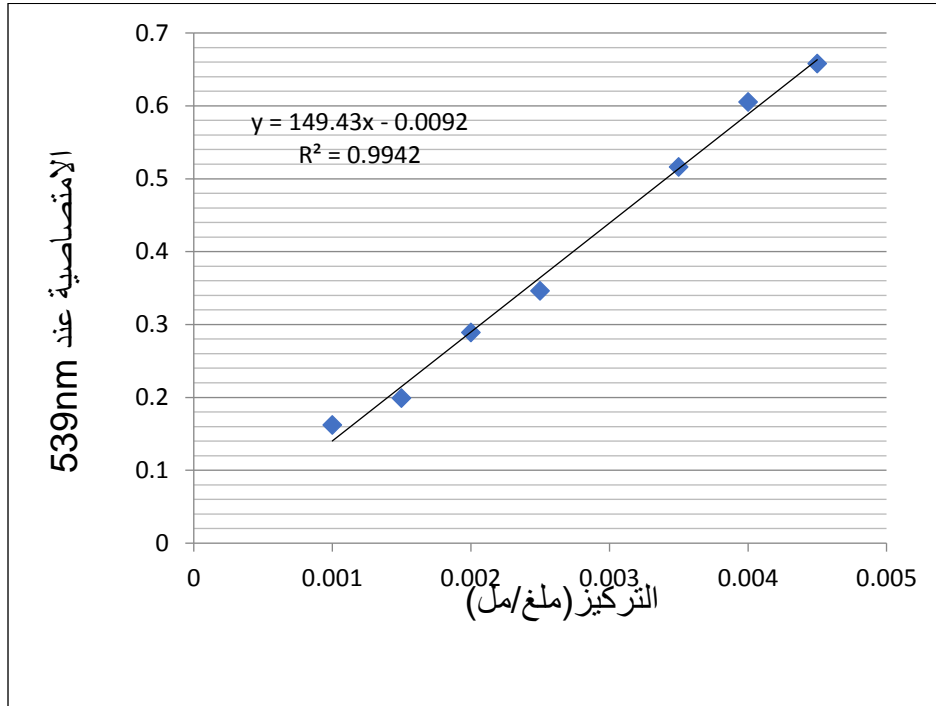
2.2.7.IV طريقة العمل

نقوم بتحضير تراكيز مختلفة من حمض الأسكوربيك تكون محصورة بين (0.0045-0.001)

ملغ/مل، نأخذ 0.1 من كل تركيز ونضيف له 0.9 من خليط FRAP و نحفظ في 37 م° لمدة 4 دقائق

تقرأ الامتصاصية في جهاز الأشعة فوق البنفسجية و المرئية UV-visible عند الطول الموجي المقدر بـ:
[14] $\lambda_{\max} = 539 \text{ nm}$.

انطلاقاً من قيم الامتصاصية لحمض الأسكوربيك، نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز (mg/ml) الموضح كمايلي:



الشكل 10.IV : المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك.

نجري نفس العملية على جميع العينات قيد الدراسة، وذلك قصد مقارنة فعالية مستخلصات على تثبيط الجذور الحرة وعمليات الأكسدة بفعالية حمض الأسكوربيك المستعمل في الصناعات الغذائية.

3.7.IV اختبار موليبيدات الفوسفات phosphomolybdenum

1.3.7.IV المبدأ

تم قياس القدرة الكلية المضادة للأكسدة للمستخلصين باستعمال طريقة الفوسفوموليبيدات (phosphomolybdenum) حسب (ARDESTANI and YAZDANPARAST (2007), وهي من الطرق

المباشرة لقياس القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة الغير الإنزيمية ، تعتمد على إرجاع الموليبدات (MoO_4^{2-}) Molybdate إلى Molybden (Mo) هذه الأخيرة التي تتميز بلون أخضر فاتح.

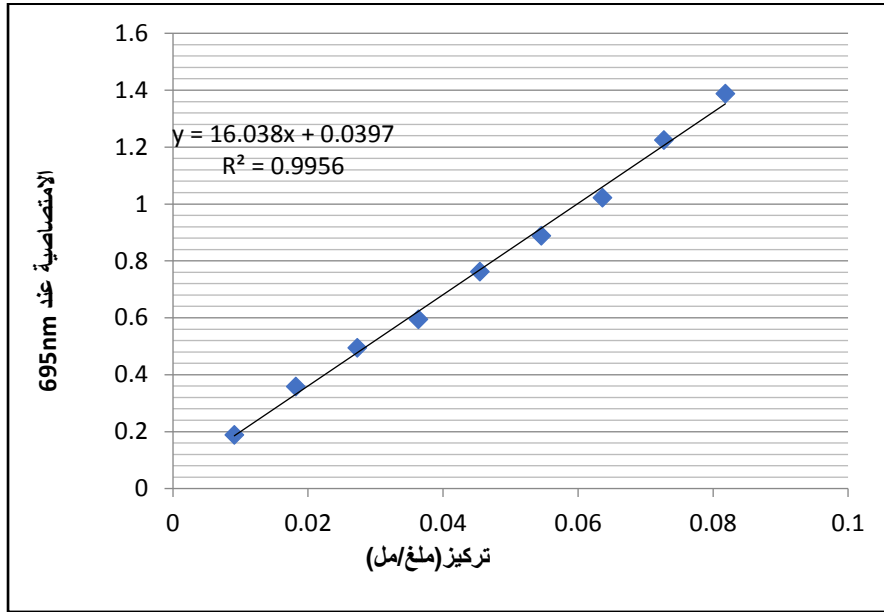


الشكل 11.IV : المحاليل بعد اضافة محلول موليبدات الفوسفات.

2.3.7.IV طريقة العمل

نأخذ 0.1 مل من تراكيز مختلفة من المستخلصات المذابة في الميثانول أو الماء و نضيف لها 1 مل من محلول موليبدات الفوسفات الذي حضر بمزج 0.6 مولاري من حمض الكبريتيك (H_2SO_4) و 28 mM من فوسفات الصوديوم (Na_3PO_4) و 4 mM من موليبدات الأمونيوم ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) ، ثم يوضع المزيج في الظلام في حمام مائي حرارته 95°C لمدة 90 دقيقة . بعدها نترك الأنابيب تبرد ثم نقيس الامتصاصية عند طول موجة $\lambda_{\text{max}}=695 \text{ nm}$ بجهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و المرئية UV-visible.

تم استعمال حمض الغاليك كمركب قياسي بتراكيز محصورة بين (0.009-0.081) ملغ/مل ومعاملة التراكيز بنفس الكاشف والطريقة، انطلاقاً من قيم الامتصاصية (A) لحمض الغاليك، نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التراكيز (ملغ/مل) الموضح كما يلي:



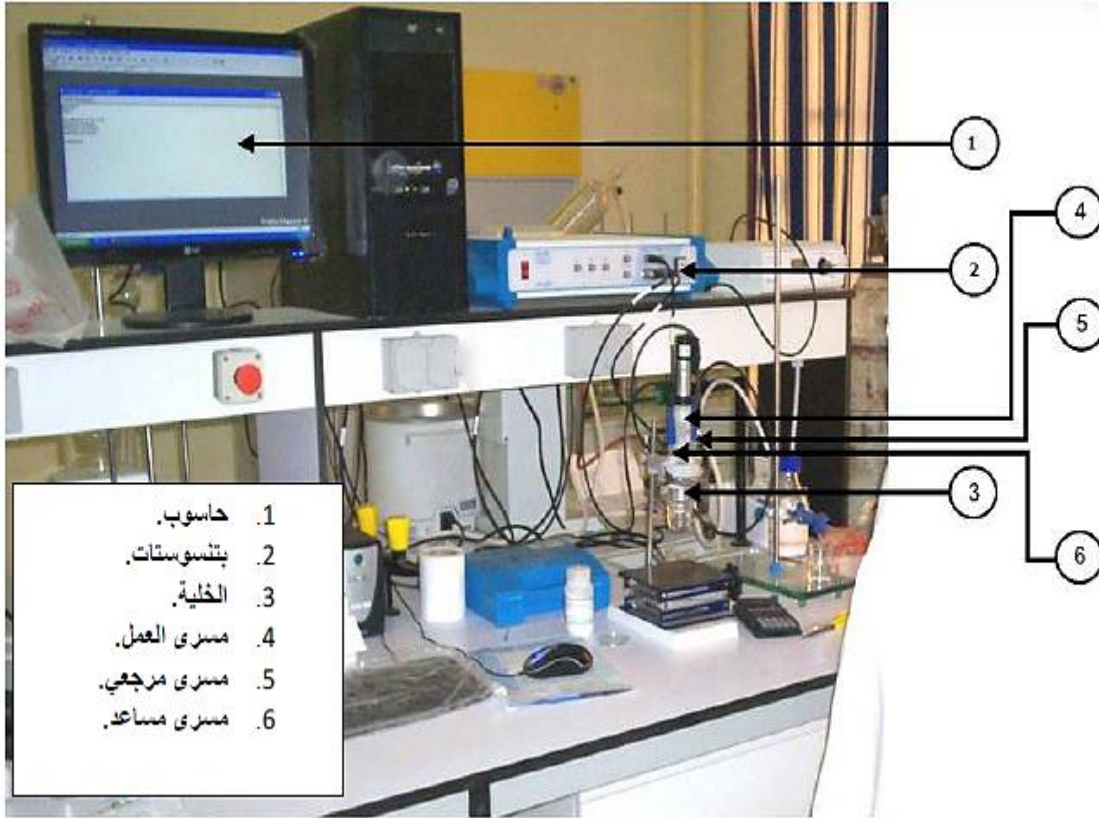
الشكل 12.IV : المنحنى القياسي لحمض الغاليك.

8.IV التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الكهروكيميائية

تمت الدراسة الكهروكيميائية وذلك باستعمال اختبار الفولتامترية الحلقي وهو اختبار كهروكيميائي، بحيث يعتبر واحد من طرق التحليل الكهروكيميائي وهذه الطريقة تسمح بتحديد الشروط التي ينجز فيها تفاعل الاكسدة والارجاع.

تعتمد هاته التقنية على قياس التيار بدلالة فرق الكمون المتغير المطبق بين مسرى العمل والمرجعي، حيث يتم مسح فرق الكمونات المصعدية بصورة حلقيّة.

حيث أن هذا العمل أنجز بمخبر ترقية وتكنولوجيا الموارد الصحراوية (VTRS) بجامعة حمه لخضر - الوادي، حيث تم فيه دراسة السلوك الكهروكيميائي للمواد المضادة للأكسدة.



الشكل 13.IV : التركيب التجريبي لجهاز PGZ301 VoltaLab 40 و ملحقاته.

الاجهزة المستعملة في الدراسة

أجريت الدراسة الكهروكيميائية للمستخلصات بواسطة جهاز (PGZ402VoltaLab80) المرفوق

برنامج (VoltaMaster 4.07) وأستعملت تقنية الفولتامتري الحلقي.

السلوك الكهروكيميائي للمستخلصات تم في خلية زجاجية بسعة 25مل تحوي ثلاث أقطاب:

- **القطب المرجعي:** يتمثل في قطب الكالوميل المشبع بكلوريد البوتاسيوم (ECS).
- **القطب المساعد:** و يتمثل في سلك البلاتين ($L=1\text{cm}$, $\text{Ø}=1\text{mm}$)، حيث له وظيفة وحيدة تتمثل في اغلاق الدارة.
- **القطب العمل:** وهو قطب الكربون الزجاجي ($\text{Ø}=3\text{mm}$) حيث تتم عليه تفاعلات الاكسدة والارجاع.

تم في هاته الدراسة باستعمال طريقتان وهما:

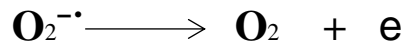
1.8.IV الطريقة الاولى

1.1.8.IV مبدأ

أن عملية إرجاع الأوكسجين هي بمثابة تفاعل نموذجي لعملية الإرجاع في خلايا الكائنات الحية هاته العملية التي تتم هي نفسها ما يحدث للمنتجات الطبيعية و الصناعية [15].

هذه الطريقة مبنية على حركية التفاعل بين الأوكسجين النشط ($O_2^{\cdot-}$) و المواد المضادة للأكسدة، التقنية الفولطأمبيرومترية استخدمت لإنتاج الأوكسجين النشط ($O_2^{\cdot-}$) و ذلك بإرجاع الأوكسجين في أوساط غير بورتية (aprotique) حيث يتميز الأوكسجين النشط ($O_2^{\cdot-}$) بأنه طويل العمر في هذه الأوساط [16]، في نفس التقنية يمكن قياس الانخفاض في مستوى الجذور الحرة ($O_2^{\cdot-}$) مباشرة من قيمة التيار المصعدي الذي يتناقص عند أكسدة هذه الجذور بواسطة تراكيز متزايدة للمواد المضادة للأكسدة محل

الدراسة [15].

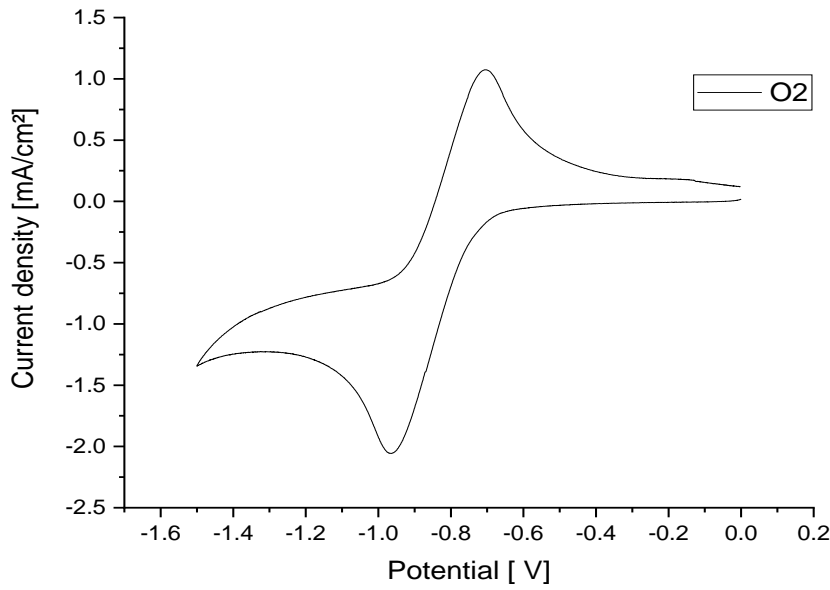


2.1.8.IV البروتوكول المتبع

▪ الخطوة الاولى

نشبع محتوى الخلية التي تحتوي على (DMF) فائق النقاوة كمذيب عضوي و في وجود الملح (TBFP) بتركيز 0.1 مولاري كمادة كهروليتية بالأوكسجين لمدة زمنية معينة، و بعدها نقوم بعملية الرج لمدة 5 دقائق و ذلك لنتحصل على محلول متجانس.

نسجل المنحنى الفولتامترى الحلقى للأوكسجين، المسجل على مسرى الكربون الزجاجي في مجال فرق الكمون المحصور بين 0 الي -1.6 V وعند سرعة المسح 100 mV/s.



الشكل 14.IV : المنحنى الفولتامترى الحلقى للأكسجين في DMF /M0.1 من (TBFP) وعند سرعة المسح mV/s 100.

▪ الخطوة الثانية

قمنا بتحضير 10 ملغ من حمض الاسكوريك (مركب قياسي) في 2 مل من المذيب العضوي (DMF)، يتم إضافة محلول من حمض الاسكوريك المحضر تدريجياً بحجوم مختلفة من 0.1 إلى 1 مل بواسطة حقنة ذات سعة 1 مل، ثم نقوم بعملية تسجيل المنحنيات الفولتامترية الحلقية الخاصة بكل إضافة عند نفس الشروط التجريبية السابقة، أن الزيادة في تركيز حمض الاسكوريك يؤدي إلى النقصان في شدة التيار المصعدي للـ ($O_2^{•-}$)، بينما شدة التيار المهبطي لم تتغير.

والتي يمكن من رسم المنحنى 1% بدلالة التركيز المواد المضادة للأكسدة فتكون النتيجة عبارة عن

خط مستقيم متزايد.

- تحسب نشاطية نسبة التثبيط % بالعلاقة التالية :

$$I\% = [(I_p - I_{ps}) / I_p] \times 100$$

حيث

I%: نسبة التثبيط.

I_p: تيار الأكسدة قبل الاضافة.

I_{ps}: تيار الأكسدة بعد الاضافة.

تم اتباع نفس الدراسة التي انجزت على حمض الاسكوريك (مركب قياسي) من أجل دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية.

حيث تم تحضير 10 ملغ/مل من تركيز المستخلصين الميثانولي والمزيج ميثانول والماء، ومنه يتم التحصل على المنحنيات الفولتامترية الحلقية المتناقصة بزيادة التركيز المضاف للمحلول المحضر ابتداء من 0.1 الي 1 مل.

وبعد حساب قيم نسبة القدرة اللازمة لتثبيط الجذور الحرة يتم رسمها بدلالة التركيز.

2.8.IV الطريقة الثانية

التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الكهروكيميائية عند PH = 4

1.2.8.IV خطوات العمل

i. كيفية تحضير المحلول الموقى (Tampon)

نقوم بتحضير المحلول الموقى انطلاقا من مزج حجم يقدر ب 18 مل من (CH₃COONa) ذات

تركيز 0.2 مولاري مع 82 مل من (CH₃COOH) ذات تركيز 0.2 مولاري.

ii. تحضير الخلية الكهروكيميائية

نقوم بوضع 9.4 مل من المحلول الموقى مع 0.24 مل من الميثانول داخل الخلية، نقوم بعملية تشبيح محتوى هاته الخلية ذلك بواسطة غاز الازوت لمدة زمنية معينة، وعندها نقوم برسم المنحنى الفولتامترى.

عند إضافة 1 مل من تركيز كل عينة، نرسم المنحنى الفولتامترى، حيث نعيد تجربة نفسها لكل عينة.

المركب القياسي في هذه التجربة هو حمض الغاليك، نقوم بتحضير الخلية الكهروكيميائية كما حضرت سابقا بنفس الخطوات وعندها نقوم برسم المنحنى الفولتامترى.

حيث في كل مرة نضيف حجم معين من محلول حمض الغاليك ذو تركيز 10 mg/ml , نرسم المنحنى الفولتامترى الموافق لكل إضافة.

لتحديد الفاعلية المضادة للأكسدة الكلية للعينات يستلزم رسم المنحنى الخطى القياسي لحمض الغاليك.

$$Y = a \cdot X + b$$

حيث:

Y: تمثل قيمة كثافة التيار المصعدية بوحدة $\mu A \cdot cm^{-2}$

X: تمثل قيمة تركيز المحلول القياسي بوحدة g/l

بعد الحصول على المعادلة نقوم بكل مرة بتعويض قيمة التيار لكل عينة ونحسب التركيز المكافئ

الجديد ومنه يمكن حساب الفاعلية المضادة للأكسدة الكلية حسب العلاقة التالية:

$$TAC = Ceq/C$$

حيث:

TAC : هي الفاعلية المضادة للأكسدة الكلية وحدتها mg/g

Ceq : التركيز المكافئ الجديد وحدتها g/l

C : تركيز العينة داخل الخلية وحدتها g/ml

9.IV كروماتوغرافيا عالية الاداء (HPLC)

تطورت الكروماتوغرافيا السائلة الي ما يعرف الآن بكروماتوغرافيا السائلة ذو الكثافة العالية, التي

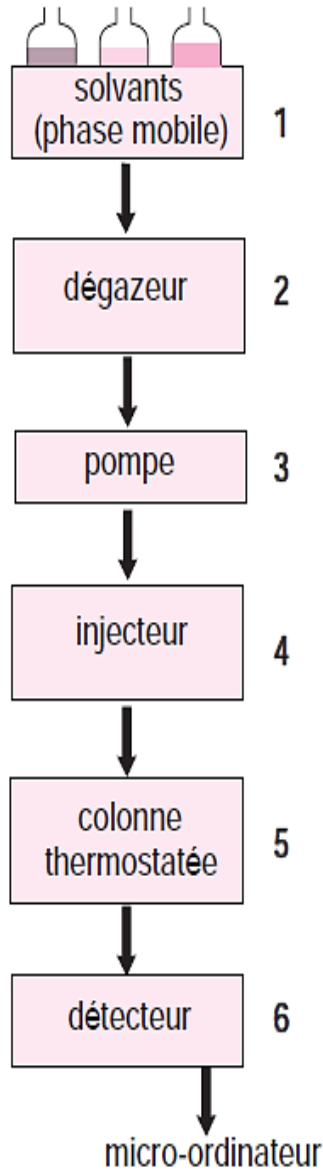
تعتبر واحدة ما أهم الطرق الفصل والتحليل مقارنة بطرق الفصل الاخرى لما تتميز به من دقة وسرعة .

يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة وتقديرها كميًا , ويتم الفصل عن طريق توزيع العينات

ما بين الطورين أحدهما طور متحرك سائل و الاخر طور ثابت سائل أو صلب يكون الطور الثابت في

عمود طوله 2 سم وقطره 4 ميليمتر [17, 18].

1.9.IV مكونات الجهاز



الشكل 15.IV : رسم تخطيطي يوضح مكونات جهاز HPLC.

2.9.IV طريقة العمل

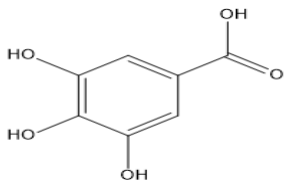
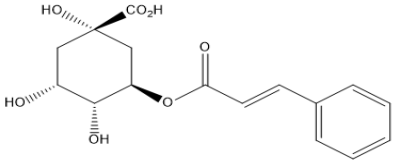
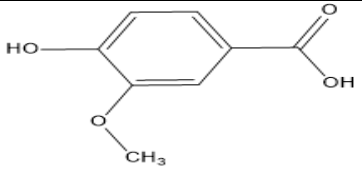
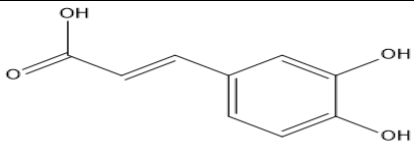
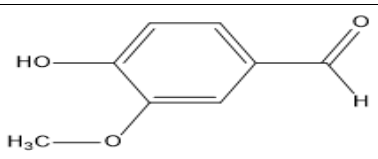
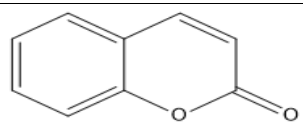
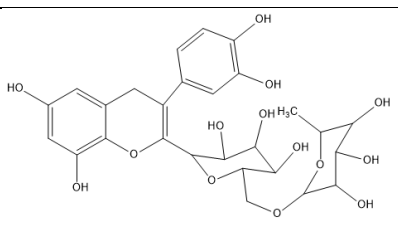
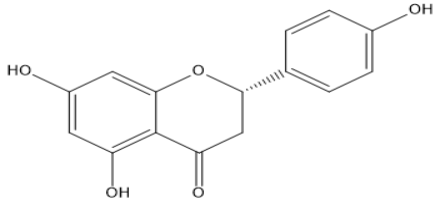
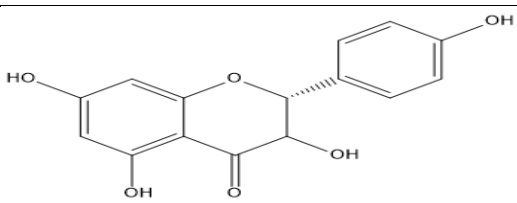
اخذنا وزن قدره 10 غ من المستخلص الخام وقمنا بإذابته في حجم مقداره 5 مل من الميثانول، حيث تحصلنا على تركيز قدره 2 ملغ /مل ونقوم بترشيحه بورقة ترشيح من نوع عملية الترشيح باستخدام ورق ترشيح خاصة لتصبح العينة جاهزة للحقن في جهاز HPLC .

3.9.IV شروط التجريبية

الجدول 9.IV : يوضح الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات باستخدام جهاز HPLC [17].

الشروط	العامل
الطور المعكوس RP-HPLC	النظام
(25cmx46mm) C 18	العمود
20µl	حجم الحقن
1 ml/min	معدل الحقن
$\lambda=268\text{nm}$	طول الموجة
50min	الزمن
25°C	درجة الحرارة
(A) : (acetonitrile)	الطور المتحرك
(B) : (0.2% acide acetique)	

الجدول 10.IV : يوضح زمن المكوث لبعض المركبات الفينولية [17].

الصيغة الكيميائية	المركبات الفينولية المرجعية	زمن المكوث المرجعي (min)
	حمض الغاليك	5.23
	حمض كلوروجينيك	13.392
	حمض الفانيليك	15.531
	حمض الكافيك	16.277
	حمض الفانيلين	21.46
	حمض ب-كومارين	23.95
	الروتين	28.37
	النرجين	34.78
	كرستين	45.047

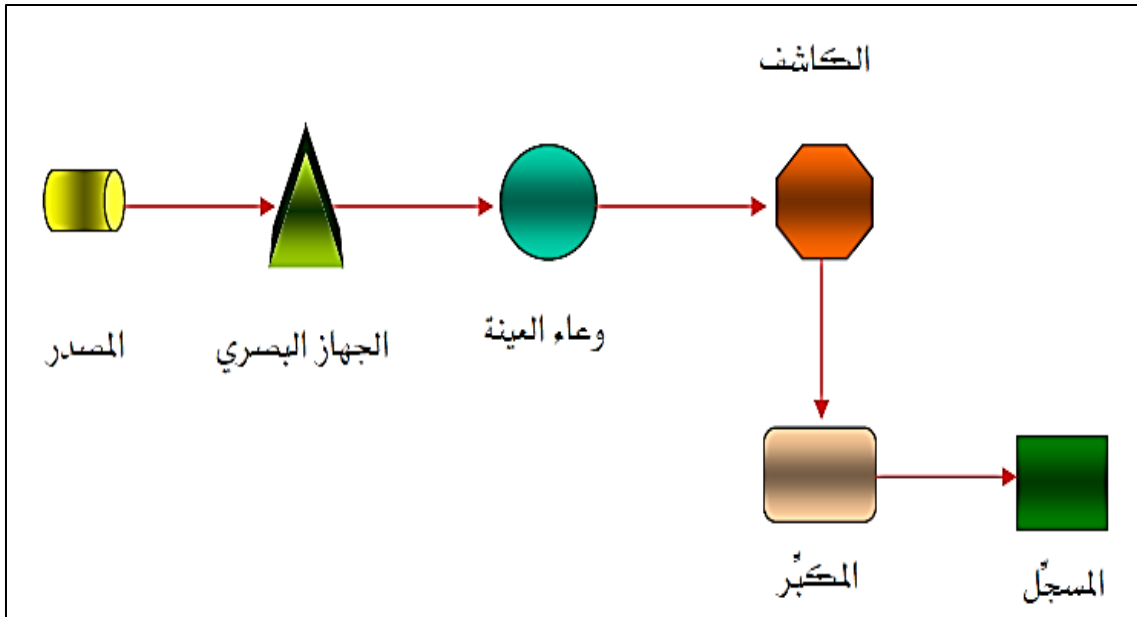
10.IV مطيافية الأشعة تحت الحمراء IR

1.10.IV تعريف

تعني كلمة Infra تحت وهذا يعني أننا في منطقة الأشعة تحت الحمراء والتي ترددها أقل من تردد الأشعة الحمراء في الطيف الكهرومغناطيسي المرئي، يقع طيف الأشعة تحت الحمراء بين الطيف المرئي و طيف أشعة المايكرويف.

تغطي الأشعة تحت الحمراء منطقة واسعة من الطيف الكهرومغناطيسي، يؤدي امتصاص الأشعة تحت الحمراء الي حركة اهتزازية للذرات المكونة للجزيء.

2.10.IV مكونات الجهاز



الشكل 16.IV : رسم تخطيطي يوضح مكونات جهاز IR.

11.IV دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا

أعتمدنا في هذا الاختبار على طريقة الانتشار، وهي الأسهل وتعتمد على وضع أقراص مشبعة بالمضادات الحيوية على طبق مزروع زرعاً متجانساً بالبكتيريا على وسط صلب من الجيلوز (gelose) من أهم هذه الأوساط هو (Muller Hinton) ، وبعد حضانة الأطباق لمدة 24 ساعة يقاس قطر دوائر التثبيط حول الأقراص كلما زاد القطر ازدادت قدرة المضاد الحيوي على قتل أو وقف نمو البكتيريا [19].

الجدول 11.IV : أنواع البكتيريا المدروسة.

البكتيريا المدروسة	طبيعة الجدار الخلوي
Escherichia coli	Gram négatif
Pseudomonas aerogenosa	Gram négatif

الجدول 12.IV : أنواع المضادات الحيوية المستخدمة.

المضاد الحيوي	التركيز (µg /disk)
COT	25
CIP	5
CZ	30
CFM	5

1.11.IV تحضير التخفيفات المختلفة لكل مستخلص

نقوم بتحضير التراكيز المختلفة من كل مستخلص، حيث قمنا بإذابة 5ملغ و 10ملغ و 15ملغ من مستخلصين (الميثانولي والمزيج ميثانول و الماء 3/7) في 1مل من DMSO من أجل الحصول على تراكيز قياسية التالية (5ملغ/مل، 10ملغ/مل، 15ملغ/مل).

2.11.IV اختبار الفاعلية ضد البكتيريا للمستخلصات بطريقة اختبار الحساسية بالأقراص (الانتشار)

لتقدير الفاعلية ضد البكتيريا للمستخلصات اعتمدنا طريقة الانتشار بالأقراص، وتعتبر هذه التقنية الاسهل حيث تعتمد على وضع أقراص مشبعة بالمضادات الحيوية على طبق مزروع زرعاً متجانساً بالبكتيريا.

1.2.11.IV تنمية مزارع بكتيريا حديثة

نقوم بتنشيط سلالات البكتيريا التي سوف نستخدمها في هاته الدراسة و ذلك بأخذ مسحة من العزلات البكتيرية anse platine وتميتها في وسط زراعي مغذي gélose nutritive و حضنها في حاضنة Etuve تحت درجة حرارة ° 37 لمدة 24 ساعة [20].

2.2.11.IV طريقة العمل

قبل البدا في هذا العمل يجب أولاً تعقيم كافة الادوات اللازمة في جهاز التعقيم، كذلك نقوم بتنظيف الجيد لمكان العمل وأيضاً من موقد البنزن وسنتبع في هذا العمل طريقة الانتشار.

▪ تحضير أوساط الزرع

- أولاً نقوم بتعقيم وسط (MH) Muler-Hinton في Autoclave .
- نسكب من الوسط (MH) في علبة بتري حتى النصف تقريباً ونتركها تتجمد على سطح طاولة المخبر.
- نترك العملية تتم أمام موقد حراري من أجل خلق وسط معقم.

▪ تحضير الأقراص

- بواسطة آلة خاصة بالقص نقوم بقص ورق الترشيح الي أقراص، ثم نضعها في أنبوب اختبار للتعقيم في درجة حرارة عالية ثم نشبع الاقراص بالمستخلص المحضر.

▪ تحضير المعلق البكتيري

لتحضير معلق بكتيري نقوم بأخذ مستعمر لكل سلالة بكتيرية (البكتيريا تكون منشطة مسبقا) بواسطة ماصة باستور معقمة , ثم نضع في أنبوب اختبار يحتوي على ماء فيزيولوجي وترج قليلا حتى نتحصل على معلق متجانس وعكر [21].

▪ وضع الأقراص المشبعة

بعد تحضير الأوساط الزراعية وزراعة السلالات البكتيرية الثلاثة، نضع أقراص المضادات الحيوية والأقراص الورقية المشبعة بالمستخلصات المحضرة بتركيز معلوم.

كل منها على حدى داخل الاطباق المحضرة سابقا، بعد ذلك نترك الاطباق مدة 30 دقيقة قرب الموقد الحراري ومن ثم نضع في حاضنة بوضع مقلوب في درجة حرارة ° 37 لمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء مدة الحضان يتم قياس قطر منطقة التنشيط.

مراجع الفصل الرابع

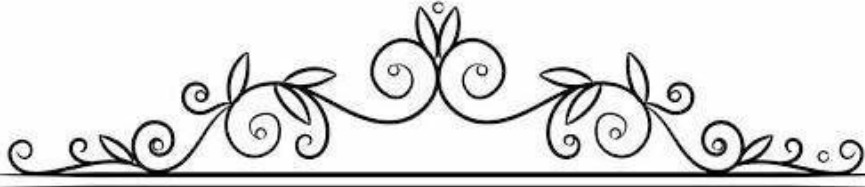
مراجع عربية

- [1] ربيعي عبد الكريم, "المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلصات بريوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية و الكهروكيميائية", مذكرة ماجستير في الكيمياء, جامعة قاصدي مرياح ورقلة, 2010.
- [2] ح. زيدان, "الفعالية البيولوجية لمستخلص الخام المائي و الكحولي لأزهار شجرة الرمان الحامض و الحلو Punica granatum.L " مذكرة ماستر أكاديمي في كيمياء عضوية جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي 2018.
- [3] م. فاتح, زيدي, "المساهمة في دراسة الفيتوكيميائية لنبات *Deverra scoparia* (البسباس البري)- الزيوت الطيارة والليبيدات", مذكرة ماستر أكاديمي, جامعة قاصدي مرياح ورقلة, 2012.
- [9] م. دركي, ع. سبوعي, "دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات الفينولية و القلويدية لعشبة العننبة", مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر أكاديمي في الكيمياء, تخصص كيمياء عضوية, جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي, 2019.
- [20] أ. حوة, "دراسة فعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوة والفعالية ضد الاكسدة", مذكرة ماجستير في الكيمياء, جامعة قاصدي مرياح, ورقلة 2013.
- [21] أ. العابد, "دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران", مذكرة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية التطبيقية, جامعة قاصدي مرياح, ورقلة 2009.

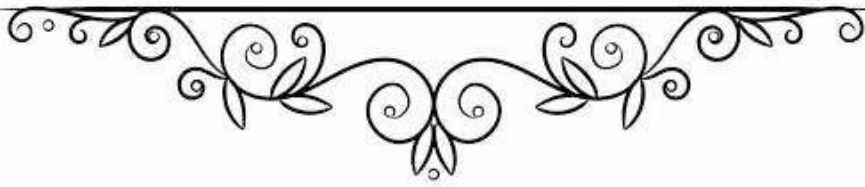
مراجع أجنبية

- [4] N. H. Boukri, "Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout," Thème Master Academique, Université Kasdi Merbah Ouargla, 2014.
- [5] S. Asadi. e. al, "In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran:A comparative study".
- [6] A. Hamdi, "Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*," PHYSICO-CHIMIE MOLECULAIRE, 2012.
- [7] S. Asadi. e. al, "In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study," *Food and chemical toxicology*, vol. 48(5), pp. 1341-1349, 2010.
- [8] J. Ito. et al, "Anti-AIDS agents. 48. 1 Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis," *Journal of Natural Products*, vol. 64(10), pp. 1278- 1281, 2001.

- [10] J. Zhishen. et. al, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals," *Food chemistry*, vol. 64(4), pp. 555-559, 1999.
- [11] C. C. Chang, Yang, M. H., Wen, H. M., &Chern, J. C, "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods," *Journal of food and drug analysis*, vol. 10(3.2002 ,(
- [12] V. Bondet, Brand-Williams, W., &Berset, C, " Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. ," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 30(6), pp. 609-615, 1997.
- [13] S. Dudonne, Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., &Mérillon, J. M, "Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57(5), pp. 1768.2009 ,1774-
- [14] T. L. A. Rebiai, M. L. Belfar, "In vitro evaluation of antioxidant capacity of Algerian propolis by spectrophotometrical and electrochemical assays," *Int J Pharmacol*, vol. 7, pp. 113-118, 2011.
- [16] *D.T. Sawyer, Oxygen Chemistry, Oxford University Press, Oxford, p. 27, 1991.*
- [18] S. Lloyd R., Joseph J., Kirkland ., John W., Dolan, "Introduction to modern liquid chromatography, Printed in the Untied States of America " *ISBN 978-0-470-16754-0(cloth),pp:1-2, 2010.*
- [19] F. C. Guerin V., Carrt, "L'antibiogramme: principes méthodologie, Intérêt et limites," *Journées nationales GVT-INRA*, pp. 5-12, 1999.
- [15] *C. Le Bourvellec, D.Hauchard, A.Darchen, J.L.Burgot, M.L.Abasq .Talanta 75 1098–1103, 2008.*
- [17] *Vincent DALMEYDA., Claudine DAVID., Jean-Marie FOUGNION., Brigitte ARNAUD., et Claude GENTY., «Chromatographie en phase liquide (CHROMLIQ.(*



الفصل V : النتائج والمناقشة



1.V مردود الاستخلاص

تم حساب مردودية المستخلصات وذلك انطلاقا من الكتلة الناتجة من عملية الاستخلاص وكتلة

المادة النباتية الجافة المستخدمة لكل المستخلصات باستخدام العلاقة التالية:

$$R\% = (mf/mi) * 100$$

حيث:

R% : مردودية الانتاجية للمستخلصات ب%.

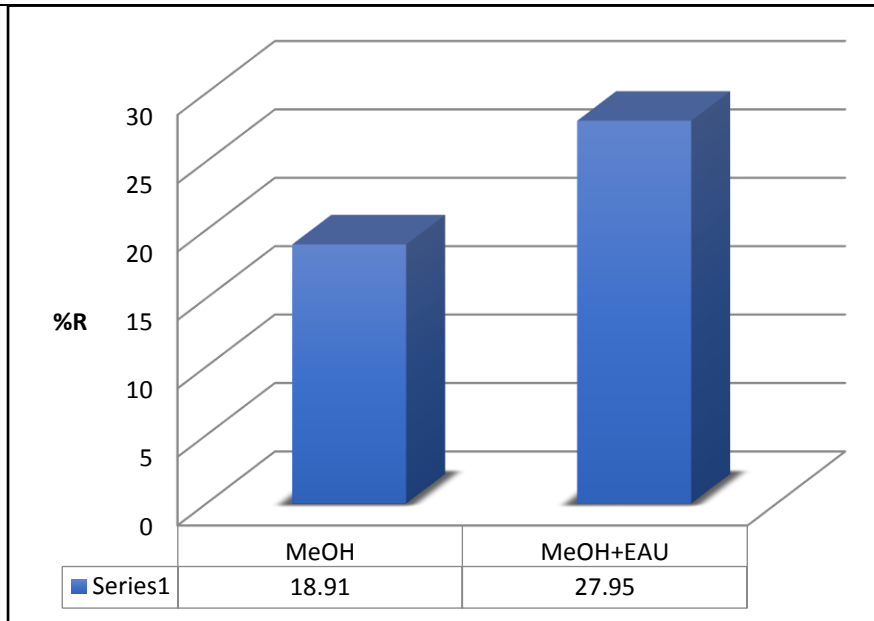
mi : الكتلة الابتدائية.

mf : الكتلة النهائية.

وكانت نسبة مردودية الانتاجية لكل مستخلص كما هي موضحة في الجدول أدناه.

الجدول 1.V : كمية المردود (%) لمستخلصات النباتية.

المردود (%)	الكتلة المتحصل عليها ب غ	المستخلص	كتلة العينة
18.91	9.45	المستخلص الميثانولي	50 غ
27.95	13.97	المستخلص مزيج (ميثانول+ماء)	



الشكل 1.V : أعمدة بيانية تمثل مردود (%) المستخلصات المستعملة في الدراسة.

من خلال الجدول 1.V والشكل 1.V نلاحظ أن مردود المستخلص الميثانولي كان ذو قيمة معتبرة حيث بلغ %18.91 بالنسبة للمستخلص مزيج (ميثانول+ماء) الذي قدر بنسبة %27.95، و هذا الاختلاف يرجع إلى نوع المذيب، وأيضاً إلى الجزء النباتي المدروس حيث استخدم في هذه الدراسة الأجزاء الهوائية من هذا النبات.

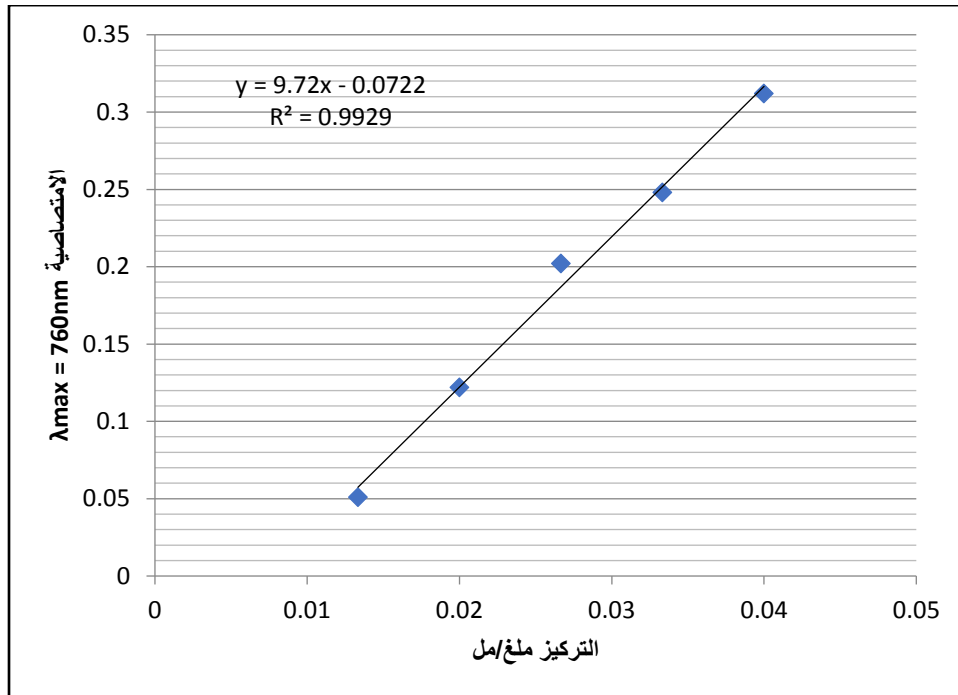
2.V تقدير المركبات الفينولية والفلافونويدية للمستخلصات

1.2.V التقدير الكمي للفينولات بواسطة جهاز مطيافية الأشعة UV-visible

نتائج الامتصاصية الضوئية للمحاليل المحضرة المدونة في الجدول أدناه

الجدول 2.V : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لحمض الغاليك.

0.04	0.033	0.026	0.02	0.0133	التركيز (ملغ/مل)
0.312	0.248	0.202	0.122	0.051	الامتصاصية (A)



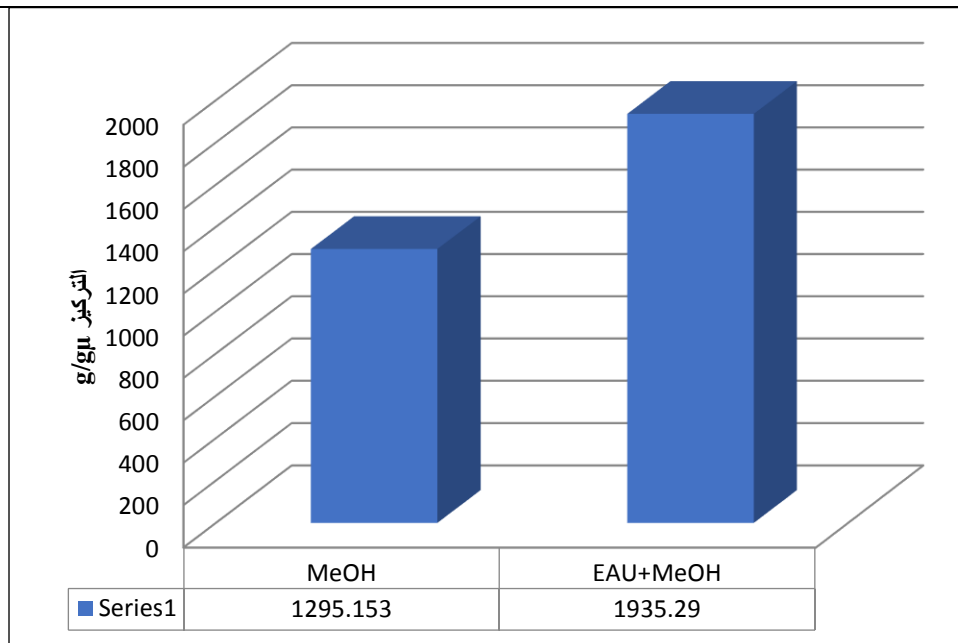
الجدول 3.V : المنحنى القياسي لحمض الغاليك (A,gallic).

باستعمال المنحنى العياري لحمض الغاليك الموضح في الشكل 3.V تم تدوين النتائج المتعلقة

بتقدير المركبات الفينولية للمستخلصات المدروسة كما هو موضح في الجدول 4.V:

الجدول 4.V : كمية الفينولات الكلية في مستخلصات النبتة المدروسة (ملغ/غ).

مستخلصات النبتة المدروسة	كمية المركبات الفينولية ($\mu\text{g EAG/g}$)
المستخلص الميثانولي	1295.153±47.6
المستخلص مزيج (ميثانول+ماء)	1935.29±21.6



الشكل 2.V : أعمدة بيانية تمثل كمية عديدات الفينول بالملغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من وزن المستخلص.

من خلال النتائج المدرجة في الشكل 2.V والتي تمثل التقدير الكمي لعديدات الفينول بالملغ

المكافئ لحمض الغاليك لكل غرام من وزن المستخلص لوحظ أن كمية المركبات الفينولية للمستخلصات

المدروسة كانت متفاوتة إذ قدرت قيمتها بين $1295.153\pm 47.6\mu\text{g EAG/g}$ و $1935.29\pm 21.6\mu\text{g EAG/g}$.

من خلال التمثيل البياني بالاعمدة، بلغت كمية المركبات الفينولية أعلى قيمة لها في المستخلص

مزيج (ميثانول-ماء) والتي قدرت ب : $1935.29\pm 21.6\mu\text{g EAG/g}$ ، أما بالنسبة للمستخلص الميثانولي

سجلت أدنى قيمة للمركبات الفينولية قدرت ب : $1295.153\pm 47.6\mu\text{g EAG/g}$.

كما نجد من خلال النتائج أن اختلاف في نوع المذيب يؤثر في مردود الفينولات الكلية، فالمستخلص ميثانول-ماء يضم أكبر كمية من عديدات الفينول مقارنة بالمستخلص الميثانولي، وهذا يعود إلى اختلاف نسبة الذوبانية والقطبية للمركبات في المذيبات، وهذا يعني أيضا أن ميثانول-ماء لديه القدرة الأكبر لإذابة الفينولات المتواجدة في هذه النبتة.

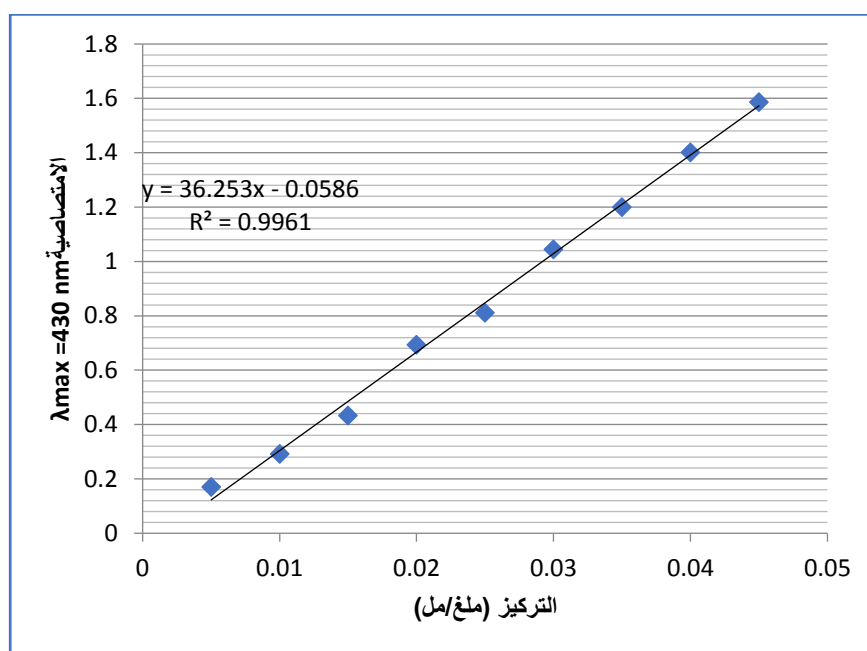
حيث لوحظ أن كمية الفينولات التي تحصلنا عليها كانت عالية، وهذا يرجع إلى وقت جمع النبتة في فصل الصيف، وبحكم ارتفاع درجات الحرارة مما يؤدي إلى وضع النبتة في حالة إجهاد ومن المعروف أن المركبات الثانوية ومن بينها المركبات الفينولية فهي تعمل بطريقة فعالة في تحمل النبتة لمختلف الإجهادات ضد الجفاف وضوء الأشعة فوق البنفسجية UV، وهذا ما يفسر بإنتاجها بكميات أكثر من أجل خلق آلية لتكيف النبتة مع بيئتها.

2.2.V التقدير الكمي للفلافونويدات بواسطة جهاز مطيافية الأشعة UV-visible

نتائج الامتصاصية الضوئية للمحاليل المحضرة المدونة في الجدول 5.V الموضح أدناه:

الجدول 5.V : نتائج الامتصاصية بدلالة التركيز لمركب الروتين.

0.045	0.04	0.035	0.03	0.023	0.02	0.015	0.01	0.005	التركيز (ملغ/مل)
1.586	1.401	1.2	1.044	0.811	0.693	0.433	0.292	0.17	الامتصاصية A



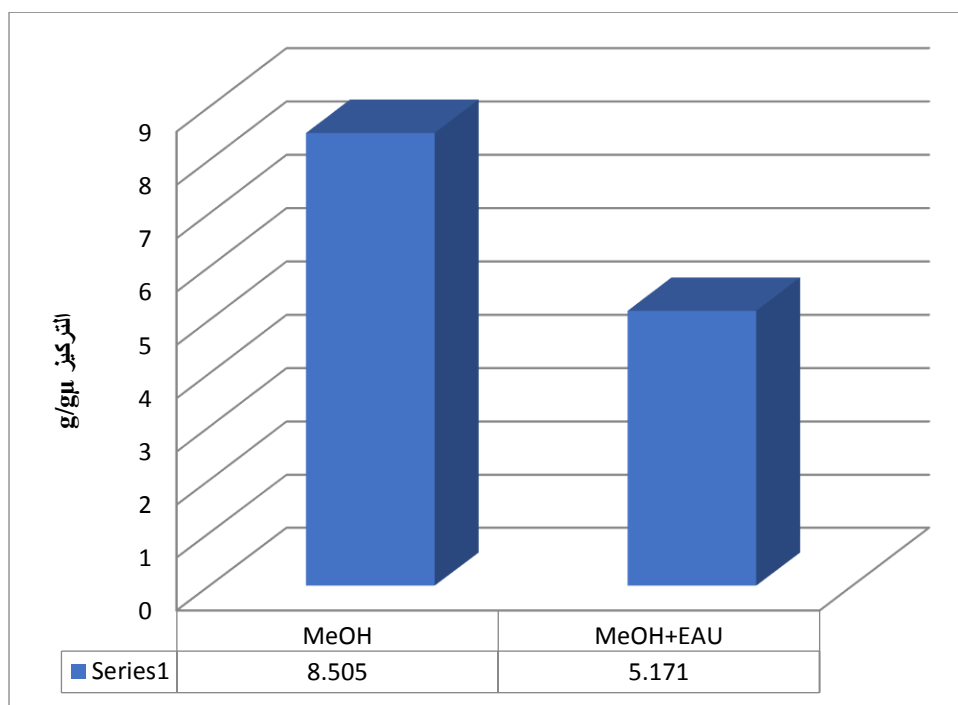
الشكل 3.V : المنحنى القياسي للروتين (Rutin).

باستعمال المنحنى العياري لمركب الروتين الموضح في الشكل 3.V تم تدوين النتائج المتعلقة

بتقدير المركبات الفلافونويدية للمستخلصات المدروسة كما هو موضح في الجدول 6.V:

الجدول 6.V : كمية الفلافونويدات الكلية في مستخلصات النبتة المدروسة (ملغ/غ).

كمية المركبات الفلافونويدية (µg ER/g)	مستخلصات النبتة المدروسة
8.505±0.11	المستخلص الميثانولي
5.171±0.06	المستخلص مزيج (ميثانول+ماء)



الشكل 4.V: أعمدة بيانية تمثل كمية الفلافونويدات بالملغ مكافئ لمركب الروتين / غ من وزن المستخلص.

يظهر من خلال الشكل 4.V الذي يعبر عن كمية الفلافونويدات بعدد المليغرامات الموافقة للروتين

لكل غرام من وزن المستخلص، لوحظ أن كمية الفلافونويدات في المستخلص الميثانولي قدرت ب :

$8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$ ، وأما بالنسبة لكمية الفلافونويدات في مستخلص مزيج (ميثانول+ماء)

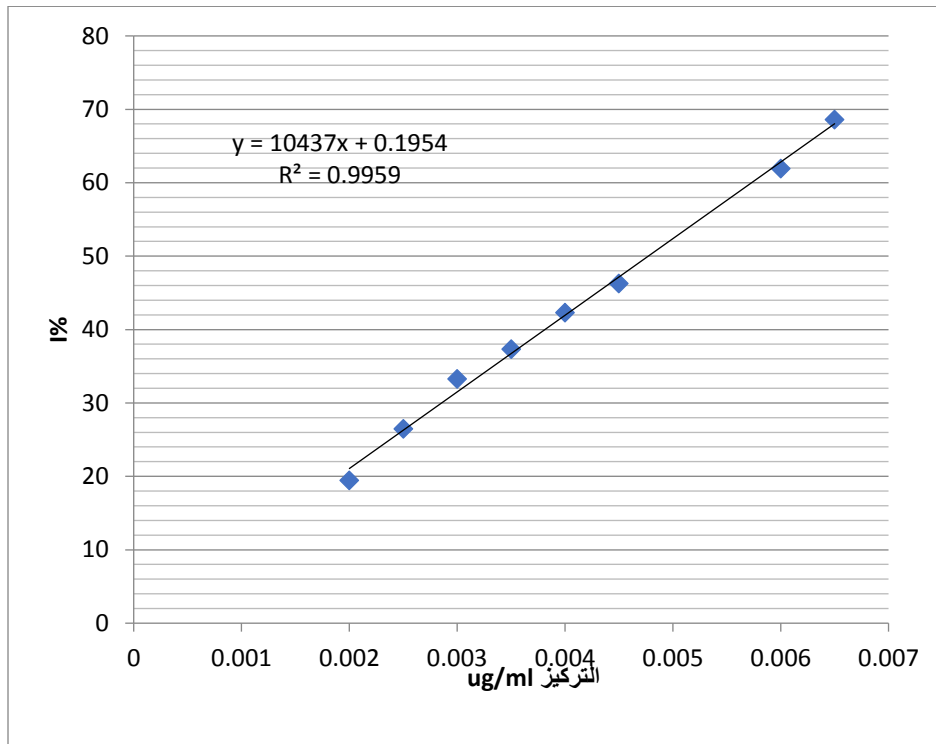
ب $5.171 \pm 0.06 \mu\text{g ER/g}$ ، بالمقابل كانت قيمة كمية الفلافونويدات في المستخلص الميثانولي أعلى مقارنة

بمستخلص مزيج (ميثانول+ماء).

3.V التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الطيفية

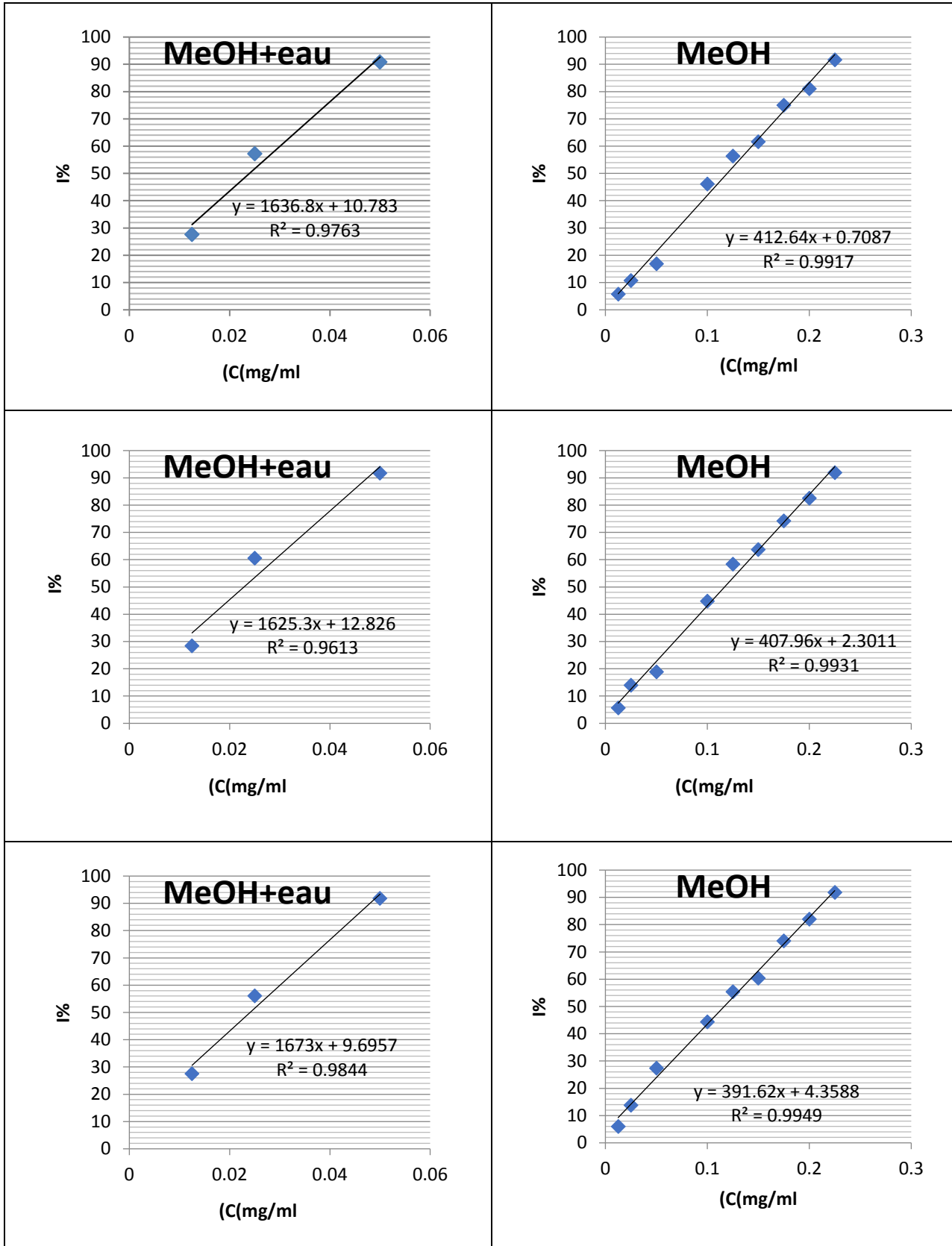
1.3.V نتائج القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH

تم تقدير نشاطية المستخلصات النباتية المضادة لجذر DPPH ومقارنتها بنشاطية حمض الاسكوربيك بإعتباره مركبا قياسيا، وذلك بحساب IC50 بعد رسم المنحنى البياني للنشاطية المضادة للأكسدة بدلالة التركيز، ومنه نستخرج المعادلة وقيمة R^2 ، ويتم تعويض قيمة Y بـ 50 واستخراج قيمة X وهي التي تمثل IC_{50} .



الشكل 5.V : المنحنى القياسي لاختبار ال DPPH لحمض الاسكوربيك.

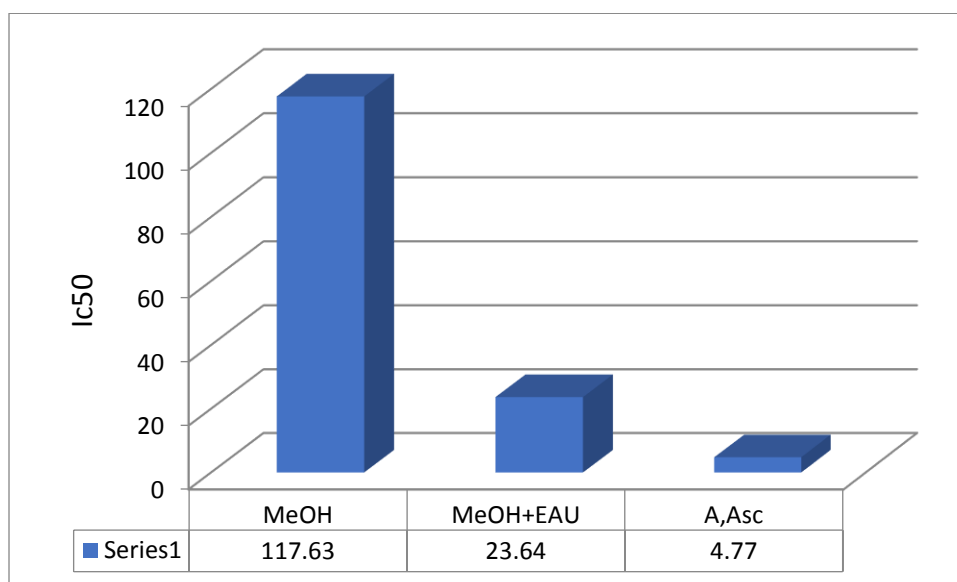
1.1.3.V منحنيات DPPH مستخلص الميثانولي ومستخلص المزيج (ميثانول+ماء)



الشكل 6.V : منحنيات اختبار DPPH للعينات المدروسة.

الجدول 7. V : يمثل نتائج قيم IC50 للعينات المدروسة.

العينة	المستخلص الميثانولي	المستخلص مزيج (ميثانول+ماء)	حمض الاسكوربيك
50IC (µg/ml)	117.63±1.29	23.64±0.54	4.77



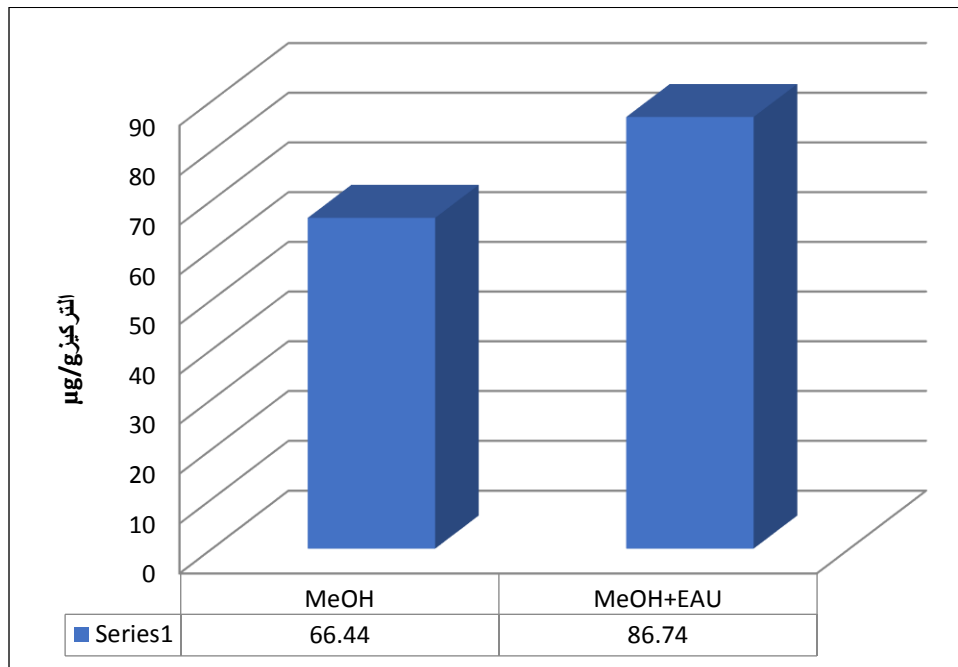
الشكل 7. V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج اختبار DPPH للعينات المدروسة.

من خلال قيم 50IC المثبطة للجذر الحر DPPH في المستخلص ميثانول-ماء لنبته *Artemisia absinthium* المتمثلة في الشكل 7. V، نجد أن المستخلص ميثانول-ماء أبدى أكبر فعالية في تثبيط الجذر الحر DPPH إذ قدرت قيمة IC50 بـ $23.64 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$ ، علماً أن التركيز الأقل لها تعني التأثير التثبيطي الأفضل، بينما قدرت قيمة IC50 في المستخلص الميثانولي بـ $117.63 \pm 1.29 \mu\text{g/ml}$ ، و من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح أن هناك تناسب طردي بين محتوى المستخلصات من المركبات الفينولية و الفلافونيدات والتأثير التثبيطي على جذر الحر DPPH فقد أظهرت في المستخلص ميثانول-ماء الذي يحتوي على أكبر كمية من الفينولات و الفلافونيدات أعلى تأثير تثبيطي للجذر الحر DPPH.

كما بين العديد من الباحثين أن القدرة التثبيطية للمركبات النباتية على جذر DPPH لها علاقة كبيرة بالبنية الكيميائية، والفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات يمكن ربطها بمحتواها من المركبات الفينولية،

وتعتمد كفاءة هذه المركبات الفينولية كمضادات أكسدة على عدد المجموعات الهيدروكسيل المرتبطة في الحلقة العطرية [1]، وكذلك بمحتواها من الفلافونيدات حيث أظهر في دراسة للتأثير التثبيطي ل 13 فلافونويد على جذر DPPH، أن عدد مجموعات الهيدروكسيل و موقع تموضعها له دور كبير في التأثير التثبيطي، إذ أن وجود مجموعة هيدروكسيل في C3 و بنية ال ortho-dihydroxyl يعطي أفضل فعل تثبيطي على جذر DPPH [2].

2.3.V نتائج اختبار FRAP

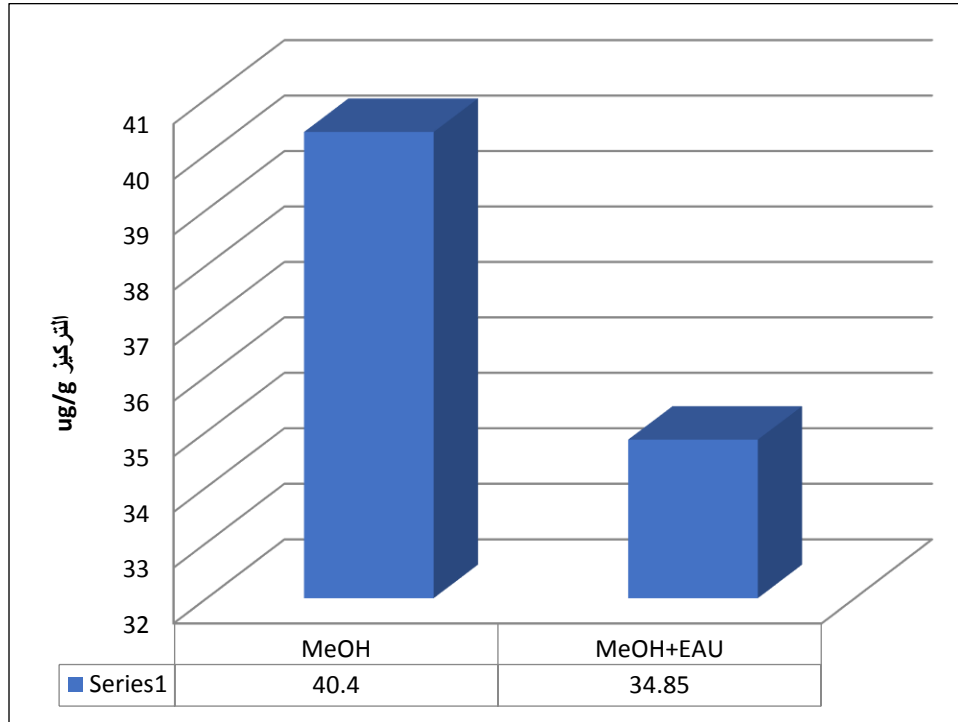


الشكل 8.V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج اختبار FRAP للعينات المدروسة.

كثير من المركبات تعتمد في اليتها المضادة للأكسدة على القدرة الارجاعية لمختلف الجذور الحرة، ولتقدير هذه القدرة عند مستخلصات نبتة *Artemisia absinthium*، قمنا بدراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP، حيث تركز هذه التقنية على قياس التغيرات التي تحدث في الإمتصاصية بسبب ظهور اللون الأزرق الناتج عن إرجاع مضادات الأكسدة لمركب Fe+3-TPTZ الي Fe+2-TPTZ في وسط حمضي [3].

بعد تقدير كمية المواد المضادة للأكسدة من خلال إختبار **FRAP** للعينات المدروسة، لاحظنا أن المستخلص ميثانول-ماء ذات فعالية عالية قدرت قيمتها بـ $86.74 \pm 1.65 \mu\text{g EAG/g}$ مقارنة بكمية المواد المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي ذات فعالية ضئيلة التي قدرت بـ $66.44 \pm 2.09 \mu\text{g EAG/g}$.

3.3.V نتائج اختبار موليبدات الفوسفات phosphomolybdenum



الشكل 9.V : مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج اختبار موليبدات الفوسفات للعينات المدروسة.

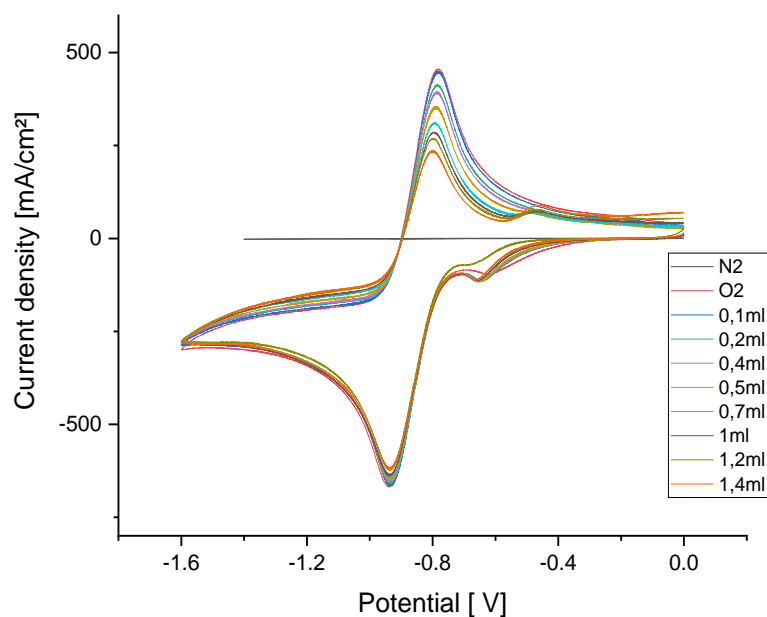
أظهرت النتائج المدونة في الشكل 9.V والتي تعبر عن نتائج اختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية بعدد الملغرامات الموافقة لحمض الغاليك لكل غرام من وزن المستخلص بتفوق المستخلص الميثانولي بقيمة $40.40 \pm 1.70 \mu\text{g EAG/g}$ مقارنة بقيمة المستخلص ميثانول-ماء بقيمة $34.85 \pm 5.72 \mu\text{g EAG/g}$ ، ويتضح من خلال النتائج المتحصل عليها أن هناك علاقة طردية بين محتوى المستخلصات من المركبات الفينولية والفلافونويدية والقدرة الكلية المضادة للأكسدة للمستخلصين.

4.V التقدير الاجمالي للقدره المضادة للأكسدة بالطريقة الكهروكيميائية

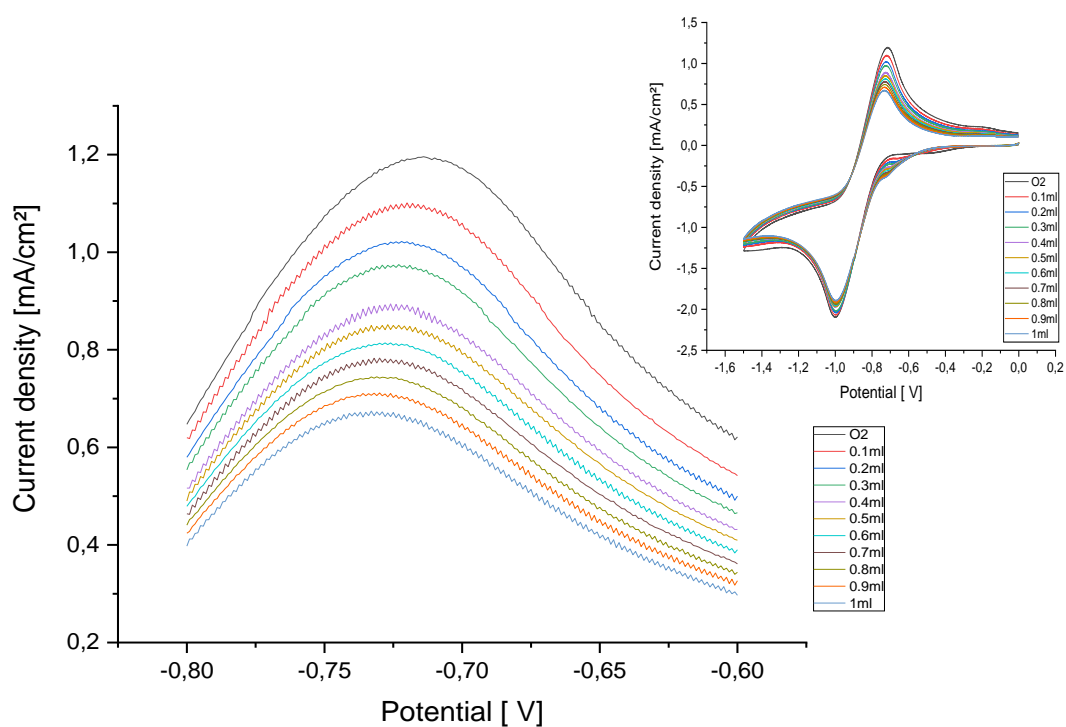
1.4.V الطريقة الاولى

تعد طريقة الفولتامترية الحلقية إحدى طرق التحليل الكهروكيميائي الفولطامبيرومترية ومن أكثرها استعمالاً في قياس النشاط المضاد للأكسدة حديثاً فهي طريقة انتقائية يطبق فيها فرق الكمون المتغير على قطب العمل بالنسبة للقطب المرجعي، تمكننا من تحديد الشروط التي ينجز فيها تفاعل الأكسدة والإرجاع وتحديد آلية التفاعل عند قطب العمل، تتميز بأنها طريقة قياس منحنيات (تيار - جهد) المطبقة على قطب صلب من الكربون الزجاجي حيث يُظهر مخطط الفولتامترية الحلقية عمليتي الأكسدة والإرجاع على هيئة قمم مهبطية ومصعدية متعاكسة تقريباً، تعتمد طريقة الفولتامترية الحلقية على إرجاع الأكسجين وتكوين الأنيون فائق الأكسيد $O_2^{\cdot-}$ ومن ثمة منح إلكترون أو هيدروجين لهذا الجذر وذلك بفضل مضادات الأكسدة [4, 5].

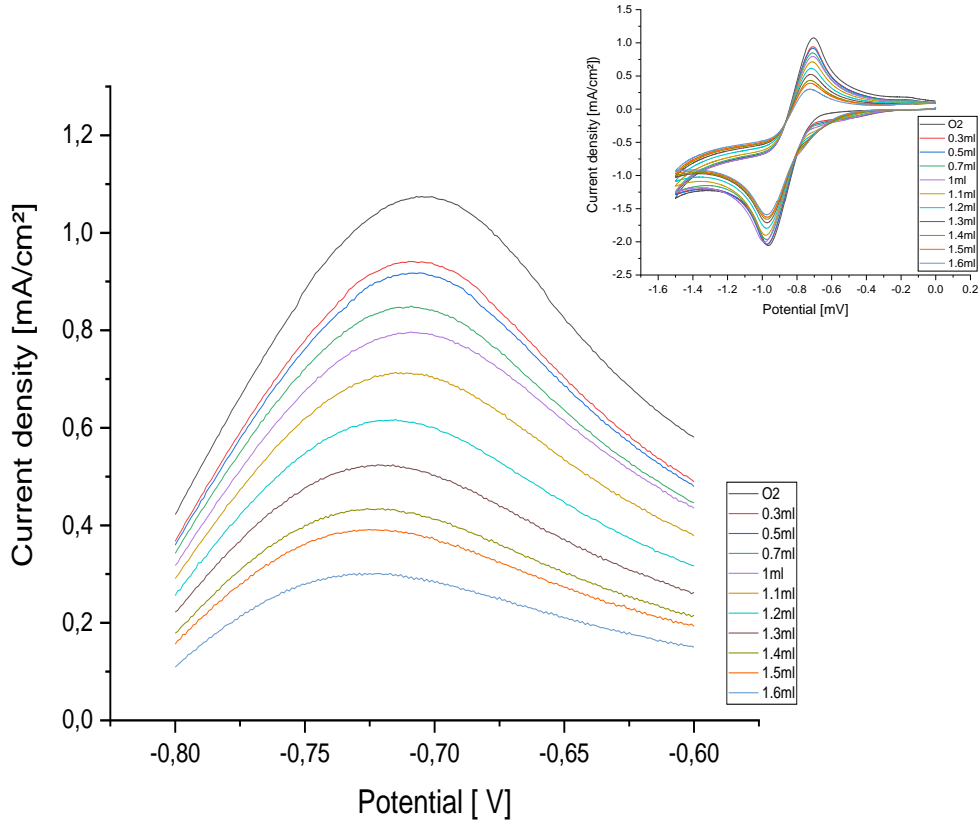
قدرت الفعالية المثبطة للجذر $O_2^{\cdot-}$ لحمض الاسكوربيك ومستخلصات النبتة، وتم تسجيل المخططات الفولتامترية لإرجاع وأكسدة O_2 ، نلاحظ أن الزيادة في تركيز مضادات الأكسدة تؤدي إلى انخفاض في كثافة التيار الأنودي للجذر $O_2^{\cdot-}$ في حين لا يوجد تغيير ملحوظ في كثافة التيار الكاثودي ل O_2 كما هو موضح في الأشكال الأتية:



الشكل 10.V : المنحنى الفولتامترى الحلقي للنظام (O_2^{2-} / O_2) في وجود تراكيز مختلفة من حمض الاسكوربيك.



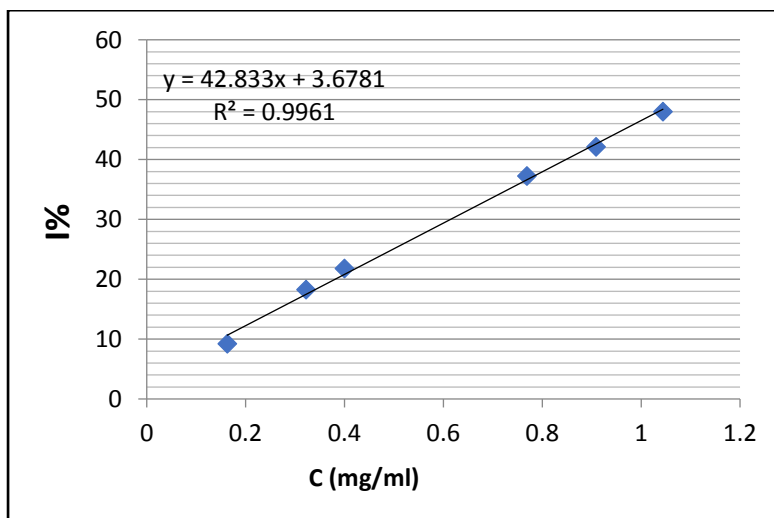
الشكل 11.V : المنحنى الفولتامترى الحلقي للنظام (O_2^{2-} / O_2) في وجود تراكيز مختلفة من مستخلص ميثانول-ماء في وسط (TBFP) M0.1 + DMF على الألكترود من الكربون الزجاجي, سرعة المسح 100 $mv \cdot s^{-1}$.



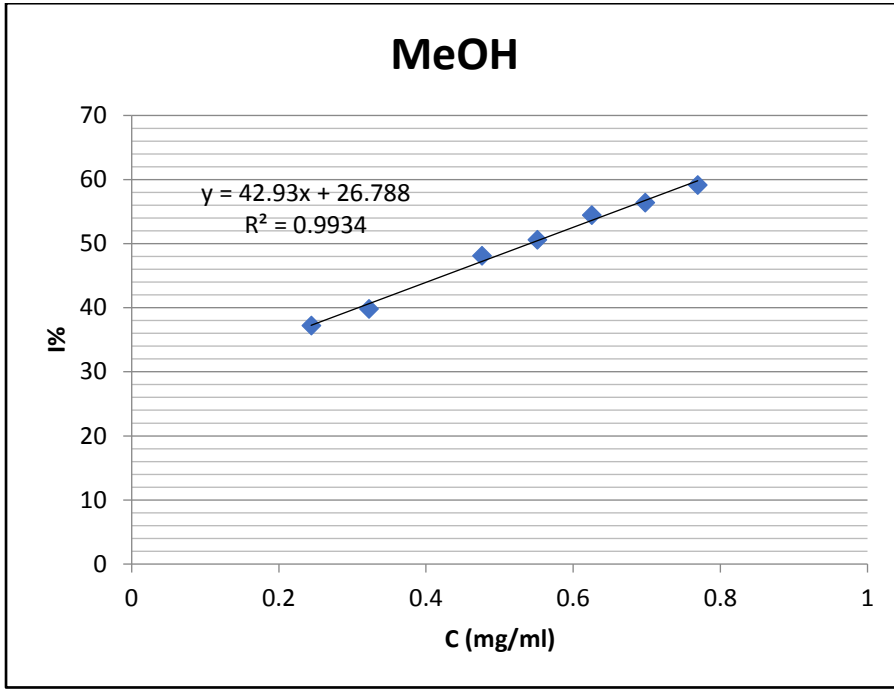
الشكل 12.V : المنحنى الفولتامي الحلقي للنظام (O₂ / O₂⁻) في وجود تراكيز مختلفة من مستخلص الميثانولي في وسط DMF + 0.1 M(TBFP) على الألكترود من الكربون الزجاجي, سرعة المسح 100 mv .s⁻¹.

انطلاقاً من نسب التنشيط بدلالة التركيز تم حساب قيم IC50 التي تعبر عن التركيز اللازم لتنشيط

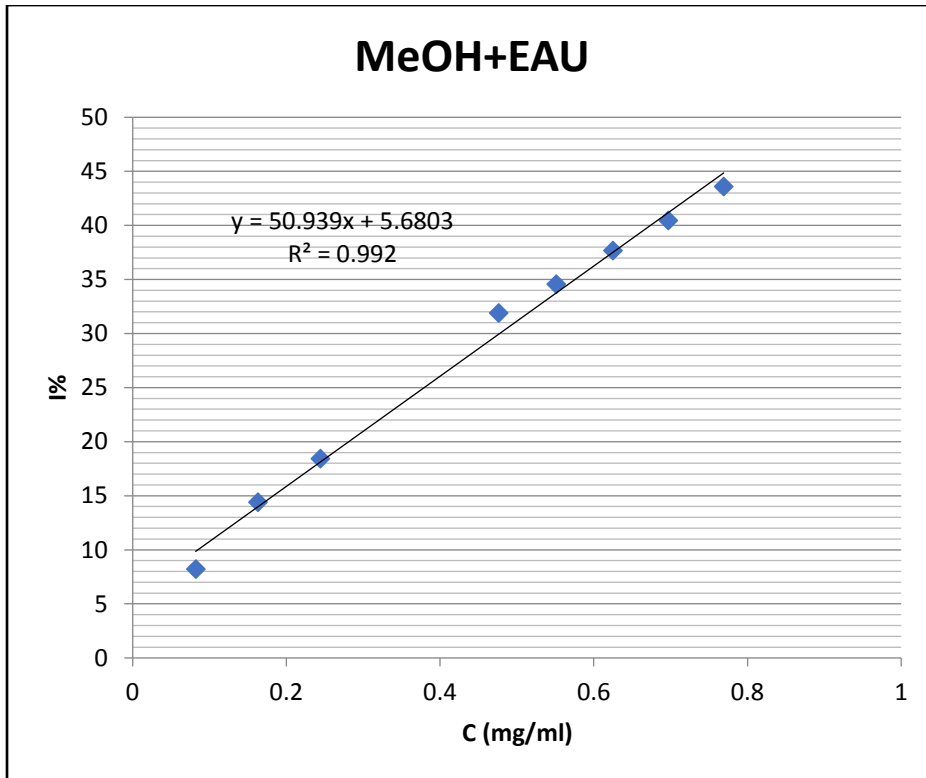
نصف تركيز الجذر الحر O₂^{-•} الابتدائي، كما هو موضح في الاشكال التالية:



الشكل 13.V: منحنى تنشيط جذر O₂^{-•} بدلالة تراكيز مختلفة لحمض الاسكوريك.



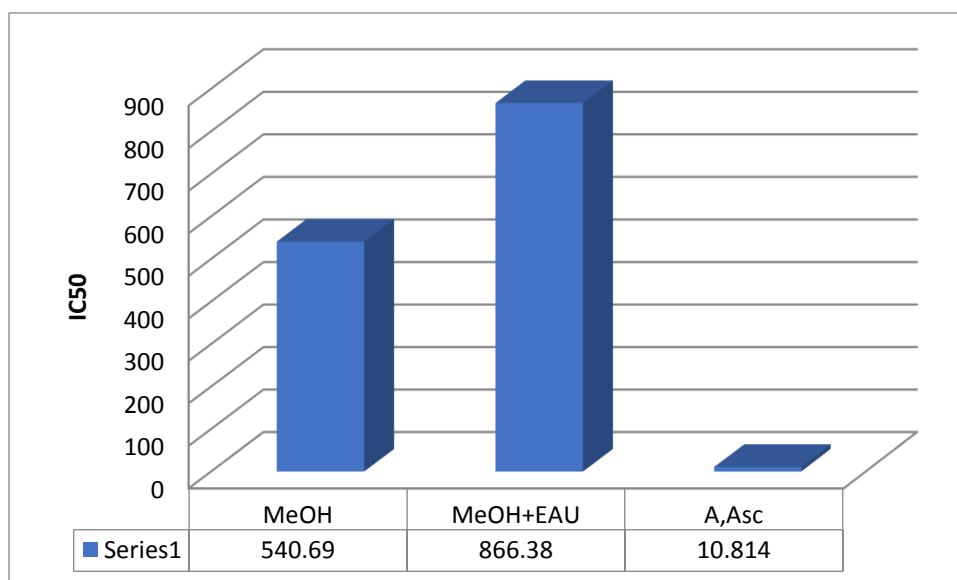
الشكل 14.V: منحنى تثبيت جذر O_2^{2-} بدلالة تراكيز مختلفة للمستخلص الميثانولي.



الشكل 15.V: منحنى تثبيت جذر O_2^{2-} بدلالة تراكيز مختلفة للمستخلص ميثانول-ماء.

الجدول 8.V: يمثل نتائج قيم IC50 للعينات المدروسة.

العينة	المستخلص الميثانولي	المستخلص مزيج (ميثانول+ماء)	حمض الاسكوربيك
50IC ($\mu\text{g/ml}$)	540.69	866.38	10.814



الشكل 16.V: مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج قيم IC50 للعينات المدروسة.

احتواء المستخلصات المدروسة على كمية من الفينولات والفلافونويدات، أي ان هاته المركبات تحتوي في بنيتها على الأقل وظيفة الهيدروكسيل OH، ومنه الهيدروجين المحتوى في مجموعة الهيدروكسيل يعتبر هو المسؤول الاول عن التفاعل مع فوق الاكسيد.

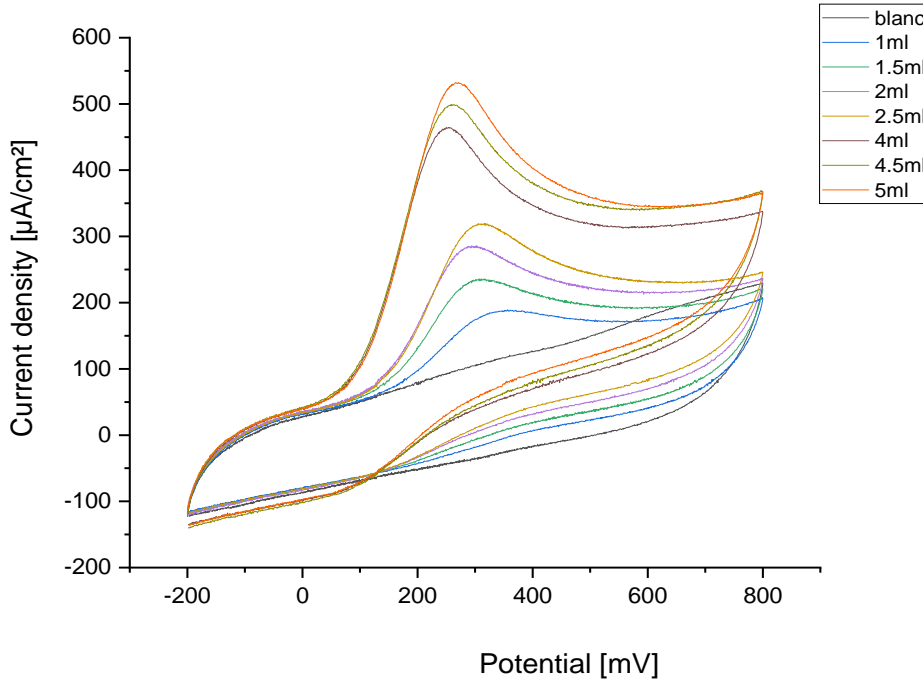
إن مخططات الفولتامترية الحلقية للمستخلصات المدروسة، نلاحظ وجود تماثل وذلك يؤكد فرضية وجود مركبات متعددة الهيدروكسيل وبالتالي حققت صحة أن الهيدروجين من مجموعة الهيدروكسيل هي المسؤولة عن التفاعل فوق الاكسيد.

ما يثبت هذا القول أنه في حالة استخدام مذيب DMF الذي تتواجد به نسبة من جزيئات الماء فإن الفولطاغرام يتغير عند أكسدة الجذر O_2^- ينقص دون تدخل مضادات الاكسدة والذي يعطي علاقة طردية بين التيار وتركيز الجذر [6].

2.4.V الطريقة الثانية

حددنا الفعالية المضادة للأكسدة الكلية للمستخلصات النباتية، بالنسبة لحمض الغاليك وذلك برسم

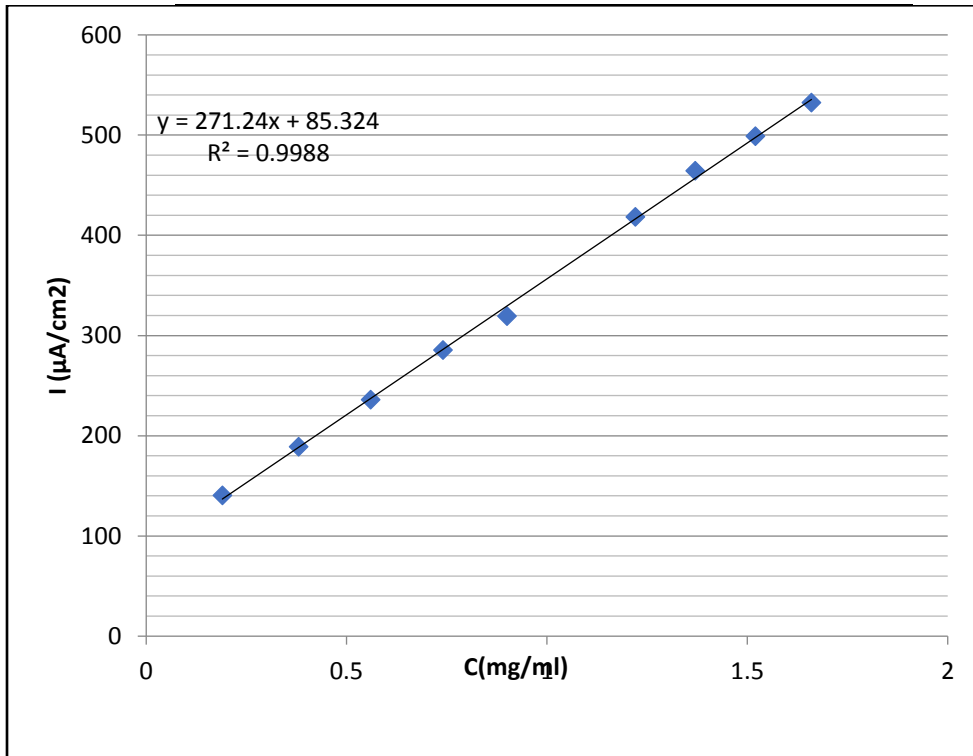
منحنى لهذا الفينول المرجعي:



الشكل 17.V: المنحنى الفولتامميري الحلقي لحمض الغاليك في وسط موقى PH=4 [800-200-], مسرى العمل هو الكريون الزجاجي, سرعة المسح $100 \text{ mv} \cdot \text{s}^{-1}$, درجة حرارة 25°C .

الجدول 9.V: قيم كثافة شدة التيار بدلالة تركيز حمض الغاليك.

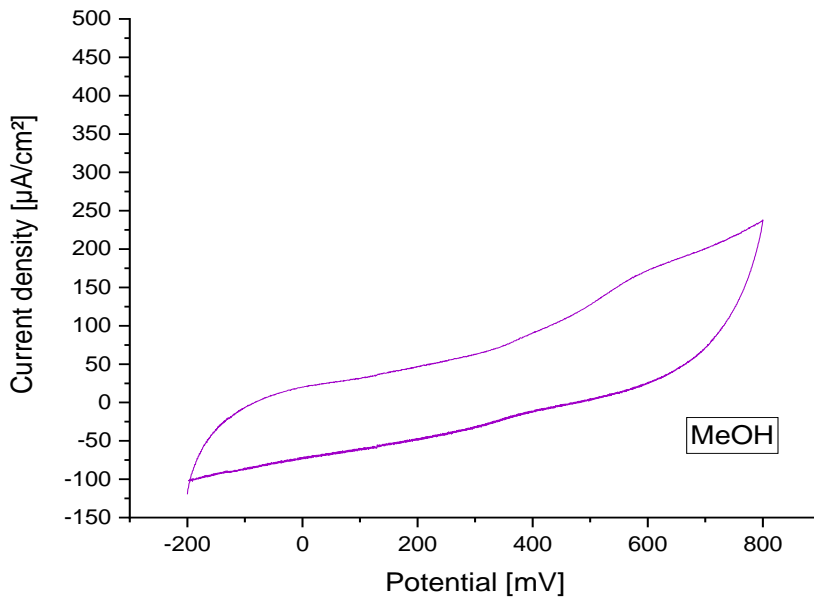
C(mg/ml)	I(μ A/cm ²)
0.19	140.6
0.38	189
0.56	235.9
0.74	285.6
0.9	319.4
1.22	418.3
1.37	464.2
1.53	499
1.66	532.3



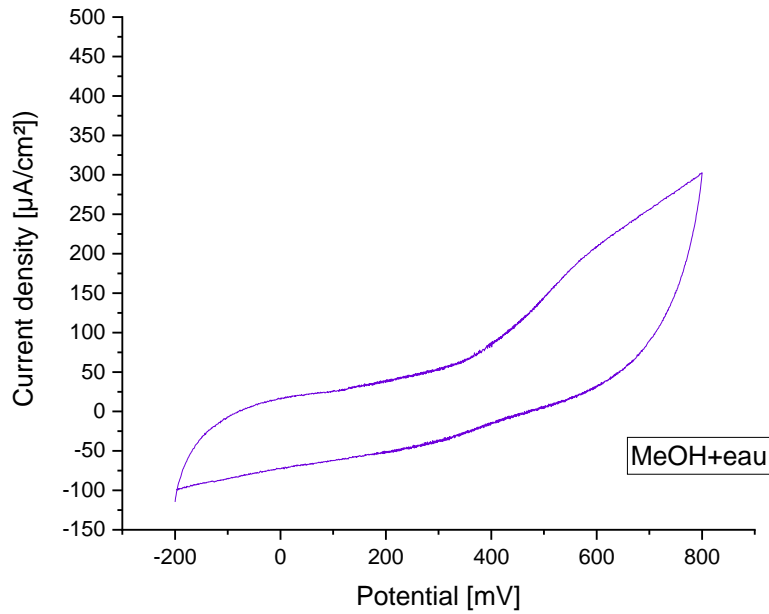
الشكل 18.V: المنحنى العياري لحمض الغاليك.

المنحنيات الفولتامترية الحلقية للمستخلصات في وسط موفي PH=4 [200 – 800]، مسرى العمل

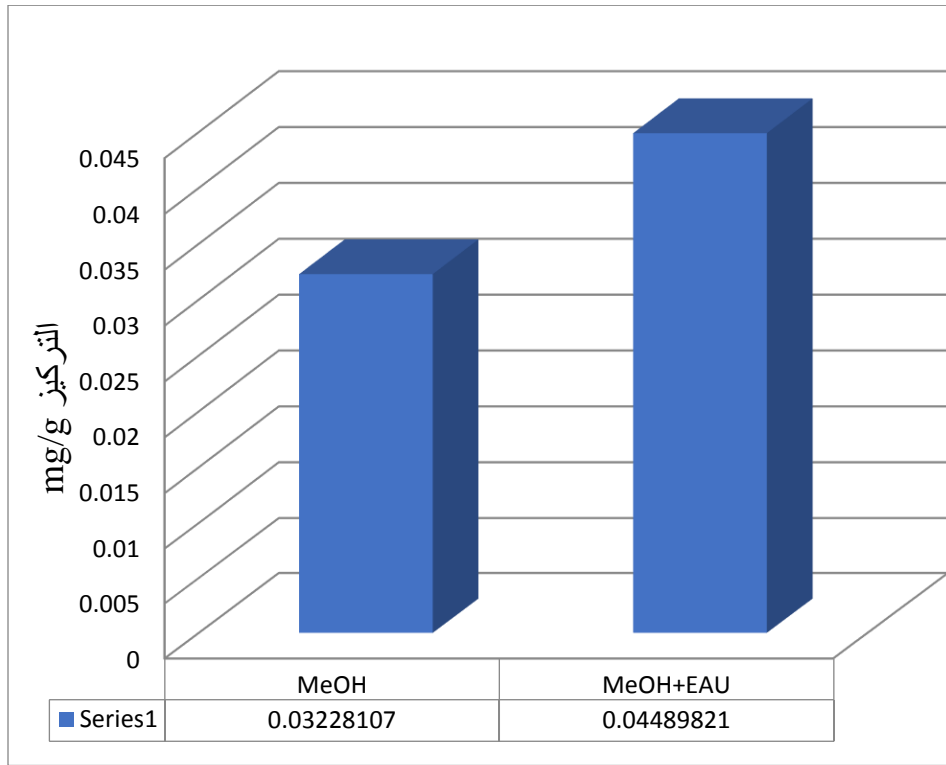
هو الكربون الزجاجي، سرعة المسح $100 \text{ mv} \cdot \text{s}^{-1}$ ، درجة حرارة 25°C ، موضحة في الشكل الاتية:



الشكل 19.V :: المنحنى الفولتامترى الحلقى لمستخلص الميثانولي لنبته المدروسة.



الشكل 20.V: المنحنى الفولتامترى الحلقى لمستخلص ميثانول-ماء لنبته المدروسة.



الشكل 21.V: مخطط أعمدة بيانية يوضح نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الفولتميترية الحلقية للعينات المدروسة.

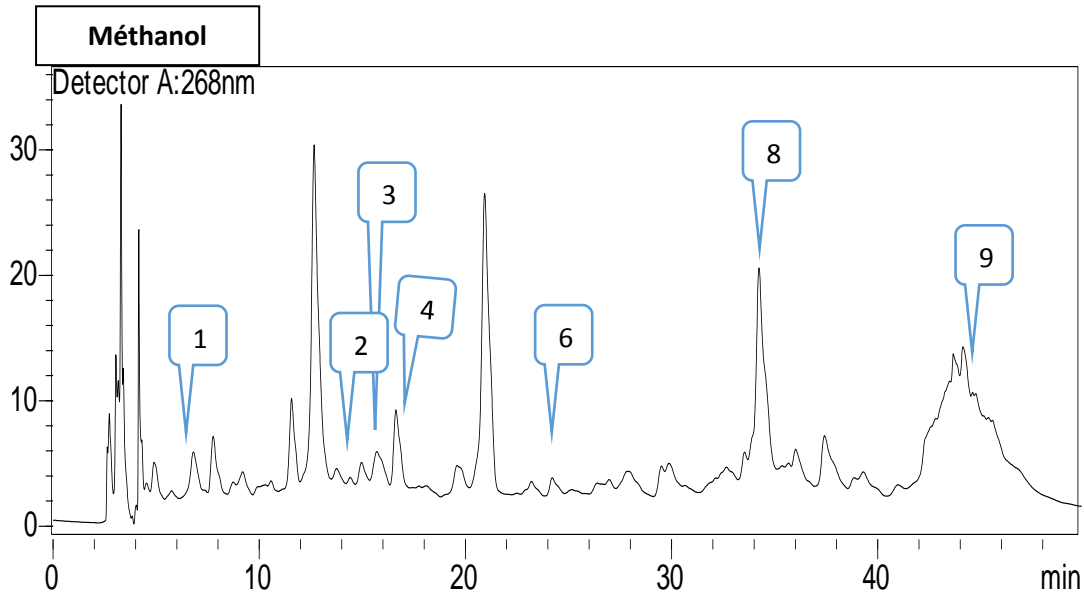
نلاحظ من البيان والمنحنيات الفولتامترية الحلقية للمستخلصات أن تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الكهروكيميائية عند $PH=4$, في المستخلص ميثانول-ماء أعطت أكبر قيمة لكثافة شدة التيار ب $I=190.3\mu A/cm^2$ وأعلى كمية للمضادة الأكسدة قدرت ب: 0.04 ملغ/غ ، حيث سجل المستخلص الميثانولي أقل قيمة قدرت ب: $I=160.8\mu A/cm^2$ و 0.032 ملغ/غ ، وهذا ما لاحظناه في اختبار التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للأكسدة بالطريقة الكيميائية.

5.V التقدير الكمي للفينولات بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء

HPLC

الكروماتوغرام الناتج عن التحليل والكيفي بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا عالية الاداء للمستخلص

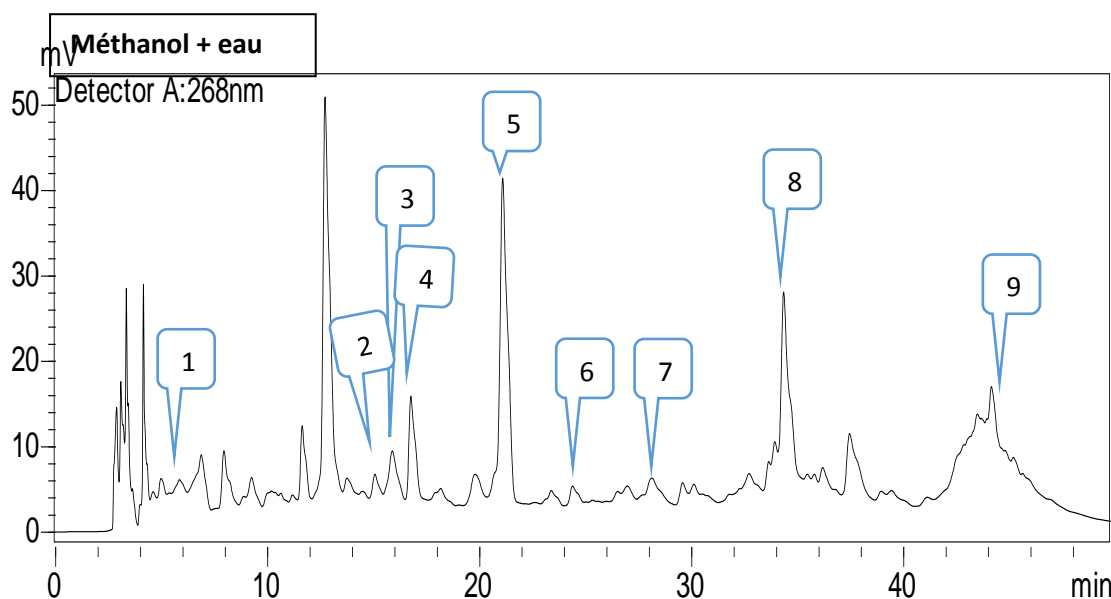
الميثانولي والمستخلص ميثانول-ماء لنبته *Artemisia absinthium* (الملحق رقم 02)



الشكل 22.V : يمثل الكروماتوغرام الناتج عن فصل أهم المركبات الفينولية لمستخلص الميثانولي بواسطة HPLC.

الجدول 10.V : يمثل أهم المركبات الفينولية المفصولة بواسطة HPLC للمستخلص الميثانولي.

كمية الفينولات ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	زمن المكوث (min)	زمن المكوث المرجعي (min)	المركبات الفينولية	
318.83	5.741	5.23	حمض الغاليك	1
1070.44	13.745	13.392	حمض الكلوروجينيك	2
584.16	15.698	15.531	حمض الفانيليك	3
519.78	16.625	16.277	حمض الكافيك	4
0	0	21.46	الفانيلين	5
166.64	23.200	23.95	حمض ب-كومارين	6
0	0	28.37	الروتين	7
6949.83	37.413	37.788	النرجين	8
320.75	45.133	45.047	كريستين	9



الشكل 23.V: يمثل الكروماتوغرام الناتج عن فصل أهم المركبات الفينولية لمستخلص ميثانول-ماء بواسطة HPLC.

الجدول 11.V : يمثل أهم المركبات الفينولية المفصولة بواسطة HPLC للمستخلص ميثانول-ماء.

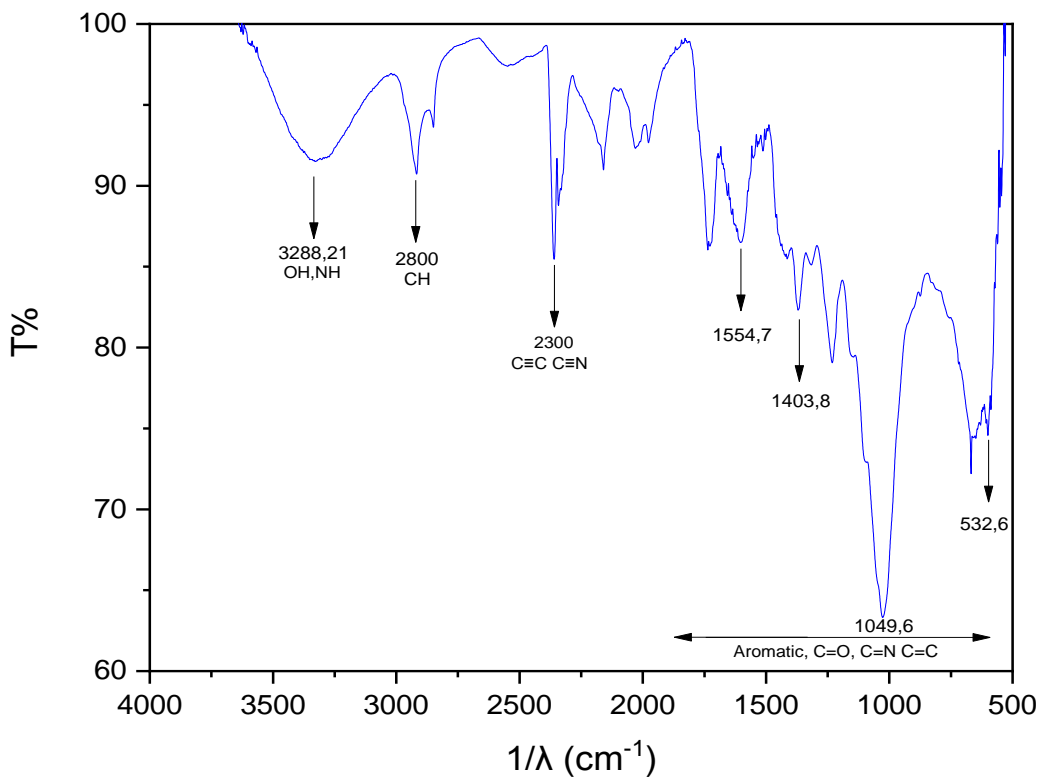
كمية الفينولات ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	زمن المكوث (min)	زمن المكوث المرجعي (min)	المركبات الفينولية	
200.23	5.368	5.23	حمض الغاليك	1
1795.36	13.730	13.392	حمض الكلوروجينيك	2
1010.16	15.055	15.531	حمض الفانيليك	3
975.21	16.748	16.277	حمض الكافيك	4
4263.18	21.078	21.46	الفانيلين	5
586.11	23.371	23.95	حمض ب-كومارين	6
1600.56	28.107	28.37	الروتين	7
8423.40	37.440	37.788	النرجين	8
733.64	45.163	45.047	كريستين	9

من خلال نتائج الكروماتوغرام تبين أن المستخلص الميثانولي والمستخلص ميثانول-ماء يحتوي العديد من المركبات، حيث حددنا في المستخلص ميثانولي وجود (07) مركبات وفي المستخلص ميثانول-ماء وجدنا (09) مركبات، وذلك من خلال مقارنة زمن مكوناتهم مع المركبات الفينولية المرجعية وهي مدونة في الجدول 10.v و الجدول 11.v.

يمكن القول أن أعلى قيمة لمتعدد الفينول كانت للمستخلص ميثانول-ماء وتنخفض نسبته تدريجياً في المستخلص ميثانولي، كما يبين المستخلص الميثانول-ماء يحتوي على كمية معتبرة من حمض الغاليك مقارنة مع المستخلص الميثانولي بقيمة $200.23 \mu\text{g}/\text{mg}$ ، أما بالنسبة لحمض كلوروجينيك فكانت قيمته في مستخلص ميثانول-ماء عالية قدرت بـ $1795.36 \mu\text{g}/\text{mg}$ مقارنة بالمستخلص الميثانولي منخفضة، أما بالنسبة لحمض الفانيليك تراوحت قيمته في مستخلص ميثانول-ماء بـ $1010.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ حيث كان المستخلص الميثانولي منخفض بـ $584.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ ، أما كافيين كانت أعلى قيمة $975.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ في مستخلص ميثانول-ماء وأقل قيمة في مستخلص الميثانولي، أما بالنسبة للفانيلين والروتين فإنهم غير موجودين في المستخلص الميثانولي وفي المستخلص ميثانول-ماء بقيمة مرتفعة جداً بقيمة $4263.18 \mu\text{g}/\text{mg}$ و $1600.56 \mu\text{g}/\text{mg}$ على التوالي، أما ب-كومارين كانت قيمته في مستخلص ميثانول-ماء عالية مقارنة بالمستخلص الميثانولي بقيمة $166.64 \mu\text{g}/\text{mg}$ ، أما في مستخلص ميثانول-ماء ومستخلص الميثانولي مرتفعة جداً قدرت بـ $8423.40 \mu\text{g}/\text{mg}$ و $6949.83 \mu\text{g}/\text{mg}$ على التوالي، أما بالنسبة للكركستين فقد وجدت بقيمة عالية قدرت بـ $733.64 \mu\text{g}/\text{mg}$ في مستخلص ميثانول-ماء مقارنة بالمستخلص ميثانولي.

6.V نتائج مطيافية الأشعة تحت الحمراء IR

تم تحديد الروابط الكيميائية من خلال مواقع اهتزازها في طيف الأشعة تحت الحمراء بواسطة جهاز (Agilent Technologies Cary 630 FTIR) حيث أنجزت هذه الدراسة بمخبر ترقية وتكنولوجيا الموارد الصحراوية (VTRS) بجامعة الشهيد حمه لخضر الوادي, كما هو موضح في الشكل 24.V.



الشكل 25.V : طيف الأشعة تحت الحمراء للنبذة المدروسة.

لقد تم تشخيص مواقع الحزم في طيف الأشعة تحت الحمراء للنبذة المدروسة في الشكل 25.V, حيث أظهر حزمة امتصاص عريضة ضعيفة عند 3288.21cm^{-2} تعود الي وظيفة الهيدروكسيل (OH), كما نلاحظ أيضا وجود حزمة امتصاص في منطقة 2800cm^{-2} تدل على وجود (H-C), وعند قيمة 2300cm^{-2} نجد (CC) (CN), كذلك أظهرت العينة وجود حزم ذو شدة منخفضة عند 1554.7cm^{-2} ,

وجود 1403.8cm^{-2} و 532.6cm^{-2} وعند 1049.6cm^{-2} وجود حزمة أمتصاصية ذو شدة قوية ويدل ذلك على وجود (Aromatic) (C=C) (C=O) (C=N).

7.V الفعالية البيولوجية

لقد تم هذا العمل في المؤسسة الاستشفائية الشهيد عمر الجيلاني بالشط، لقد تم هذا على مرحلتين هما الزرع والحضن.

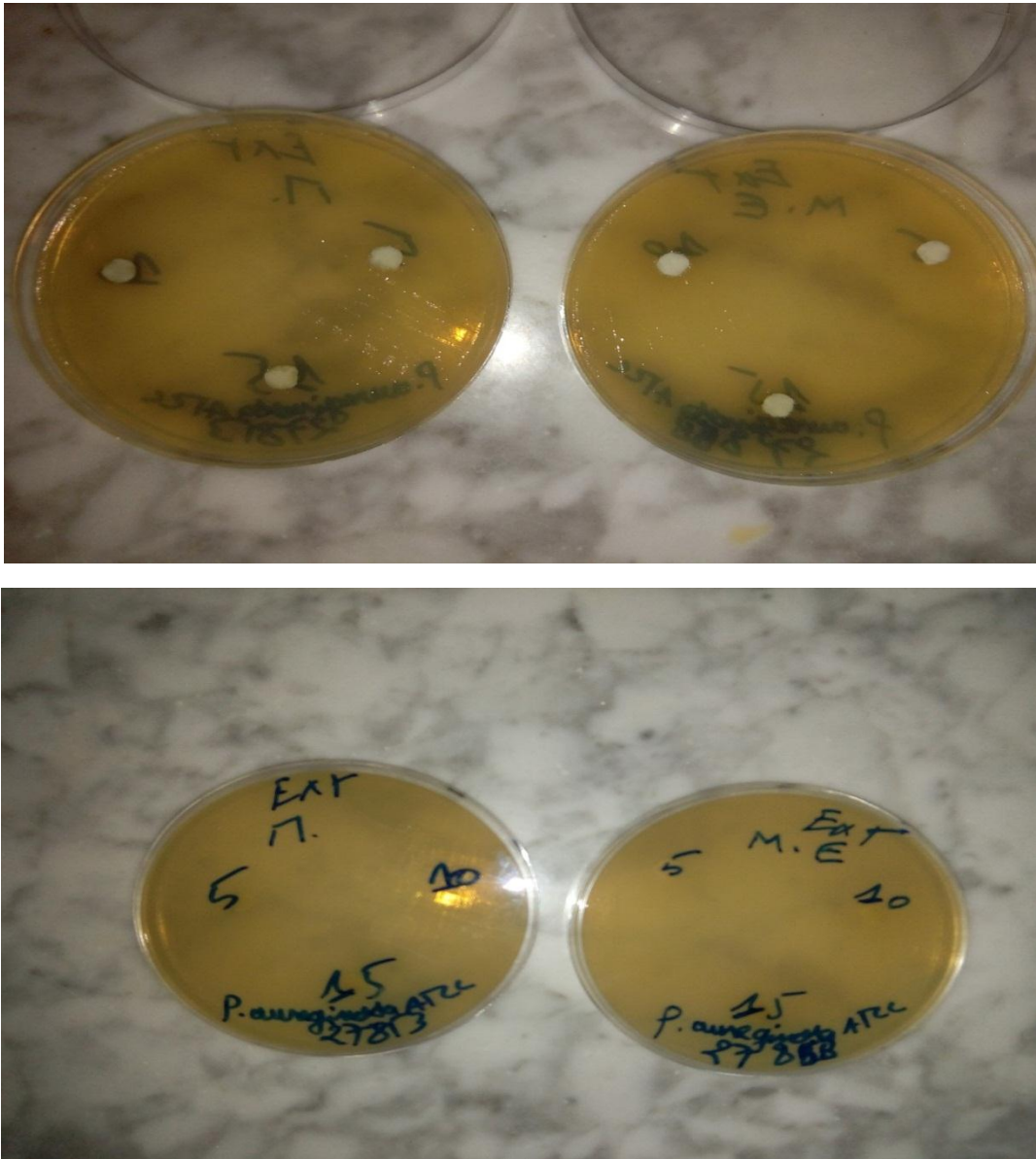
حيث تم الزرع ومن ثم قمنا بعملية الحضن لمدة 24 ساعة، في الحالة العادية نقوم بقياس أقطار التثبيط حول الاقراص المشبعة بالمستخلصات، لكن في حالتنا لم نستطع قياس أقطار التثبيط وذلك لأن البكتيريا مؤخوذة من المرضى وذلك لتثبيطها بالمضادات الحيوية ولهذا تمتلك مقاومة ضد مستخلصات النبتة المدروسة.

نتائج الفعالية البيولوجية لمستخلصات النبتة المدروسة عند تراكيز 10ملغ/مل و5ملغ/مل و15ملغ/مل كما هي موضحة في الجدول الآتي:

الجدول 12.V : يمثل نتائج الفعالية البيولوجية.

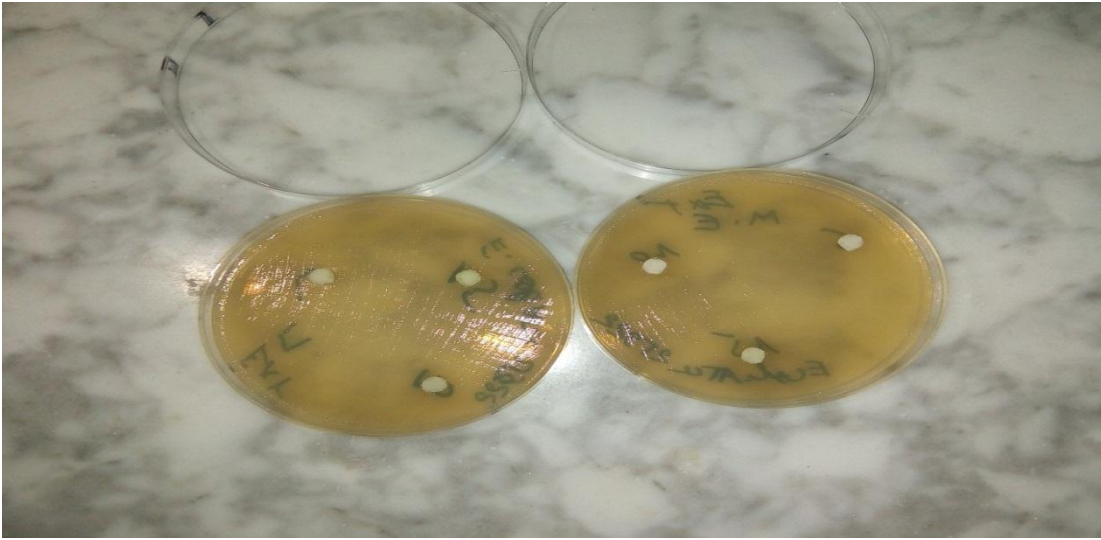
المستخلص الميثانول-ماء			المستخلص الميثانولي			العينة البكتيريا
15mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	15mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	
00 mm	00mm	00mm	00 mm	00 mm	00 mm	<i>Escherichia coli</i>
00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>

1.7.V بكتيريا *P.aerogenosa*



الشكل 26.V : نتائج بكتيريا *P.aerogenosa* للمستخلصات النباتية المدروسة.

E.Coli بكتيريا 2.7.V



الشكل 27.V : نتائج بكتيريا E.Coli لمستخلصات النبتة المدروسة.

مراجع الفصل الخامس

مراجع عربية

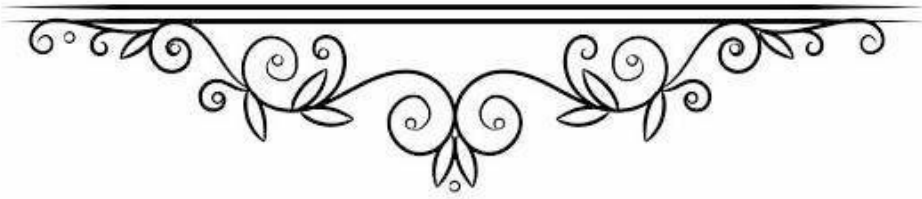
- [2] ع. أ. بن سلامة, "النشاطات المضادة للأكسدة والمثبطة للإنزيم المؤكسد للكزانثين لمستخلصات أوراق *Hertia cheirifolia* L . .", مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماجستير في البيوكيمياء, . جامعة فرحات عباس .سطيف. الجزائر. 90 ص, 2012.

مراجع أجنبية

- [1] M. DEBOUBA. et. al, "Antioxidant capacity and total phenols richness of *Cistanche violacea* hosting *Zygophyllum album*," *International Journal of Phytomedicine*, vol. 4(3), pp. 399-402, 2012.
- [3] J. J. Strain. I. F. Benzie, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power"," the FRAP assay. *Anal Biochem*, vol. 239, pp. 70-76, 1996.
- [4] L. Korotkova, "New method of determining antioxidant activity," *J. Phys . Chem*, vol. 74, pp. 1544-1546 2000.
- [5] Y. A. Karbainov. L. Korotkova , and O. Avramchik "Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry," *Analytical and bioanalytical chemistry* vol. 375 (3) p. 465.468 2003.
- [6] F. Shakeel. S. Ahmed, "Voltammetric determination of antioxidant character in *Berberis youm Royel* , *Zanthoxylum armatum* and *Morus nigra* Linn plants," *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* vol. 25 (3), 2012.



خاتمة



خاتمة

تعد النباتات الطبية من أهم مصادر الغذاء والدواء التي عرفها الانسان على مر العصور، تعددت أهميتها واستخداماتها فهي تدخل في الصناعات الصيدلانية والدوائية، والصناعات الغذائية كفاتحات الشهية ومواد حافظة وغيرها.

تعتبر الرقعة الجغرافية لبلادنا موردا طبيعيا هاما لما لها من مساحات شاسعة ومناخات متعددة من بحرية وقارية وصحراوية ولما تتمتع به من تربة غنية متنوعة وخصبة، ولا شك أن لهذا التنوع أثر بالغ على التركيب النباتي واكتسابها المميزات الخاصة.

اهتمامنا في هذه الدراسة على تثمين نبتة شجرة مرير *Artemisia absinthium* التي تم حصادها من منطقة سدراته التابعة لولاية سوق أهراس الجزائر باستخلاص المركبات الفينولية والفلافونويدية وتقييم الفعالية البيولوجية لمختلف المستخلصات المتحصل عليها من الاجزاء الهوائية لنبته ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمعرفة نشاطها وقدرتها على تثبيط الجذور الحرة.

حيث أنجزت هذه الدراسة بمخبر ترقية وتكنولوجيا الموارد الصحراوية (VTRS) بجامعة الشهيد حمه لخضر الوادي وتحت اشراف مسؤول المخبر علي طليبة.

وأول خطوات الدراسة هي استخلاص الفينولات والفلافونويدات من المستخلص الميثانولي و المزيج ميثانول والماء، التي تراوح مردود استخلاصها على التوالي 18.91% و 27.95% .

وبغية تثمين هاتيه المادة تمت الدراسة التقديرية للفينولات والفلافونويدات وكذا فاعليتها المضادة للأكسدة بطريقتين الطيفية والكهروكيميائية، فتحصلنا على النتائج التالية:

تم تقدير كمية الفينولات بواسطة طريقة (Singleton Rossi) وذلك باستعمال كاشف الفولين (Folin ciocalteu)، وجدنا أن أعلى مقدار لها في المستخلص ميثانول-ماء قدرت $1935.29 \pm 21.6 \mu\text{g EAG/g}$ ، كذلك تم تقدير كمية الفلافونويدات باستعمال طريقة (Woisky and salation)، وجدنا أن أعلى قيمة $8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$ في المستخلص الميثانولي.

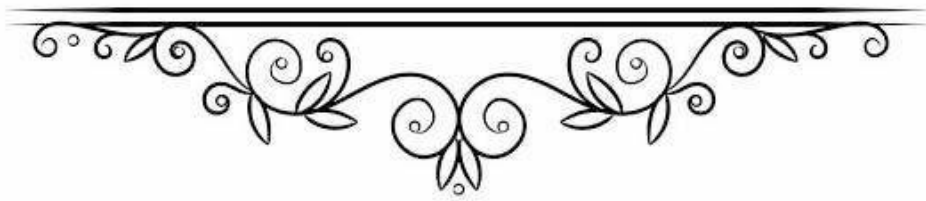
وبدراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات تم ذلك بطريقتين: الطريقة الطيفية والطريقة الكهروكيميائية، حيث أتمدت الطريقة الطيفية على تقدير النشاطية المثبطة للجذور الحرة باستعمال اختبار DPPH واختبار FRAP، وقد بينت النتائج أن المستخلص الميثانول والماء كانت له فعالية أعلى مقارنة بالمستخلص الميثانولي وحمض الأسكوربيك، وأما في اختبار موليبيدات الفوسفات وجدنا أن المستخلص الميثانولي أعطي فعالية أعلى مقارنة بالمستخلص المزيج ميثانول والماء، أما بالنسبة للطريقة الكهروكيميائية المتمثلة في طريقة الفولتامترية الحلقية، وقد كانت النتائج جيدة حيث توصلنا الي أن المستخلص ميثانول والماء يمتلك القدرة على تثبيط الجذور الحرة.

وقد ختمنا دراستنا هاته بإختبار الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلصات النبتة وذلك عن طريق سلالتين بكتيريتين، حيث تبين لنا أن البكتيريا *E.Coli*, *P.aerogenosa* تمتلك مقاومة ضئيلة ضد مستخلصات النبتة المدروسة.

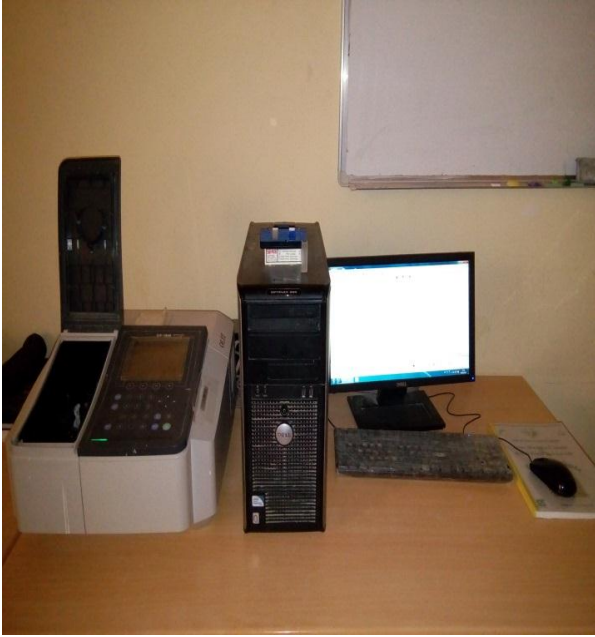
كما نوصي بإجراء المزيد من البحوث للكشف عن المزيد من المركبات التي لم نتمكن من تعريفها خلال هاته الدراسة، والمزيد من البحوث الطبية والبيولوجية والصيدلانية المتخصصة وذلك لغرض لتثمين نبتة *Artemisia absinthium* المعروفة بشجرة مريم، وكيفية استغلالها في العلاج والوقاية من عديد الامراض المستعصية، التي أثبتت البحوث الطبية الحديثة مساهمة شجرة مريم *Artemisia absinthium* كعلاج لها.



الملاحق



I. الملحق A : صور الأجهزة المستعملة



جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis



جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء HPLC



PH Meter Radiometer



PGZ301 VoltaLab 40



الفرن



جهاز التبخير الدوراني



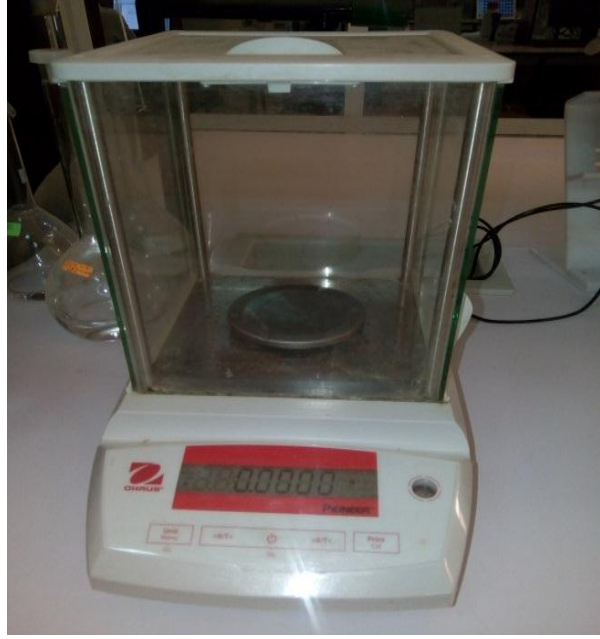
حاضنة



موقد بنزيني



جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء IR



ميزان

II. الملحق B: النتائج التطبيقية: نتائج الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء HPLC.



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar d'EL Oued
مخبر الموارد الصحراوية ترقيتها وتكنولوجياها
Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes

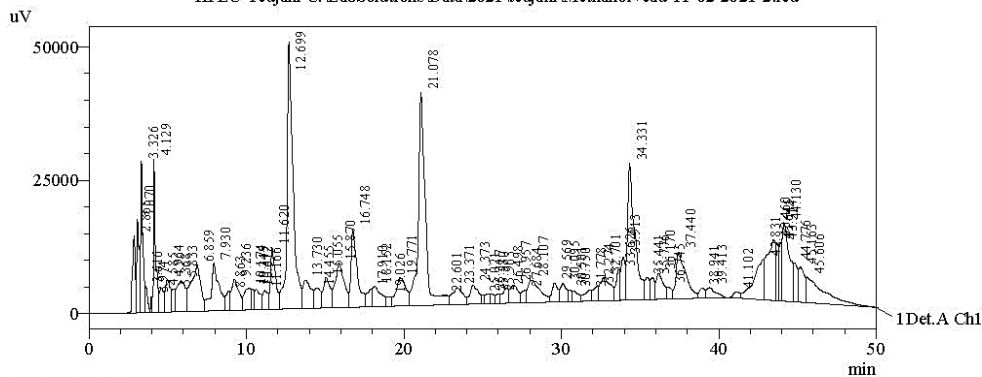


Sample Information

Acquired by : Admin
Sample Name : HPLC-Teçjar
Sample ID : HPLC-Teçjar
Vail# :
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Methanol+eau
Method Filename : Noumia21 mc
Batch Filename :
Report Filename : dis0.lcr
Date Acquired : 11-02-2021 1
Data Processed : 11-02-2021 1

Chromatogram

HPLC-Teçjani C:\LabSolutions\Data\2021\teçjani\Methanol+eau-11-02-2021-2.lcd



1 Det.A Ch1 / 268nm

PeakTable

Detector A Ch1 268nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.865	167724	14460	1.307	2.873
2	3.070	196484	17491	1.531	3.475
3	3.326	267059	28363	2.082	5.636
4	3.616	45358	4892	0.354	0.972
5	3.974	19530	3000	0.152	0.596
6	4.129	249032	28745	1.941	5.711
7	4.585	77382	4475	0.603	0.889
8	4.964	140584	5981	1.096	1.188
9	5.368	54745	4263	0.427	0.847
10	5.833	221837	5768	1.729	1.146
11	6.859	375085	8618	2.924	1.712
12	7.930	323775	8975	2.524	1.783
13	8.863	66234	3597	0.516	0.715
14	9.236	187067	5777	1.458	1.148
15	10.174	123301	4120	0.961	0.819
16	10.349	43633	3934	0.340	0.782
17	10.612	95193	3815	0.742	0.758

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
18	11.166	81959	3568	0.639	0.709
19	11.620	261026	11647	2.035	2.314
20	12.699	1327413	50066	10.346	9.948
21	13.730	194483	5341	1.516	1.061
22	14.455	101583	3731	0.792	0.741
23	15.055	170630	5715	1.330	1.135
24	15.870	328693	8359	2.562	1.661
25	16.748	409911	14712	3.195	2.923
26	17.910	69458	3350	0.541	0.666
27	18.152	148391	3798	1.157	0.755
28	19.026	35305	1799	0.275	0.357
29	19.771	237411	5330	1.850	1.059
30	21.078	1256146	39916	9.791	7.931
31	22.601	3082	165	0.024	0.033
32	23.371	145050	3164	1.131	0.629
33	24.373	134560	3614	1.049	0.718
34	25.021	20025	1681	0.156	0.334
35	25.317	39990	1878	0.312	0.373
36	25.580	28688	1736	0.224	0.345
37	25.963	30784	1695	0.240	0.337
38	26.498	77711	2810	0.606	0.558
39	26.957	122170	3408	0.952	0.677
40	27.684	44825	2330	0.349	0.463
41	28.107	225232	4247	1.756	0.844
42	29.569	91979	3585	0.717	0.712
43	30.095	90905	3373	0.709	0.670
44	30.501	38197	2204	0.298	0.438
45	30.750	52143	1992	0.406	0.396
46	31.778	59613	2081	0.465	0.414
47	32.274	60725	2705	0.473	0.537
48	32.701	207402	4420	1.617	0.878
49	33.626	96437	5763	0.752	1.145
50	33.913	144155	8065	1.124	1.602
51	34.331	816186	25549	6.362	5.076
52	35.441	82860	4145	0.646	0.824
53	35.776	76796	4119	0.599	0.819
54	36.170	152339	4875	1.187	0.969
55	36.745	43924	2271	0.342	0.451
56	37.440	373316	8744	2.910	1.737
57	38.941	48316	1874	0.377	0.372
58	39.413	76592	1926	0.597	0.383
59	41.102	32734	1136	0.255	0.226
60	42.831	327740	7610	2.555	1.512
61	43.460	410105	11326	3.197	2.250
62	43.645	144360	10900	1.125	2.166
63	43.914	85679	10866	0.668	2.159
64	44.130	485256	14678	3.782	2.917
65	44.776	132728	7321	1.035	1.455
66	45.163	166456	6608	1.297	1.313
67	45.606	384094	4812	2.994	0.956
Total		12829589	503283	100.000	100.000

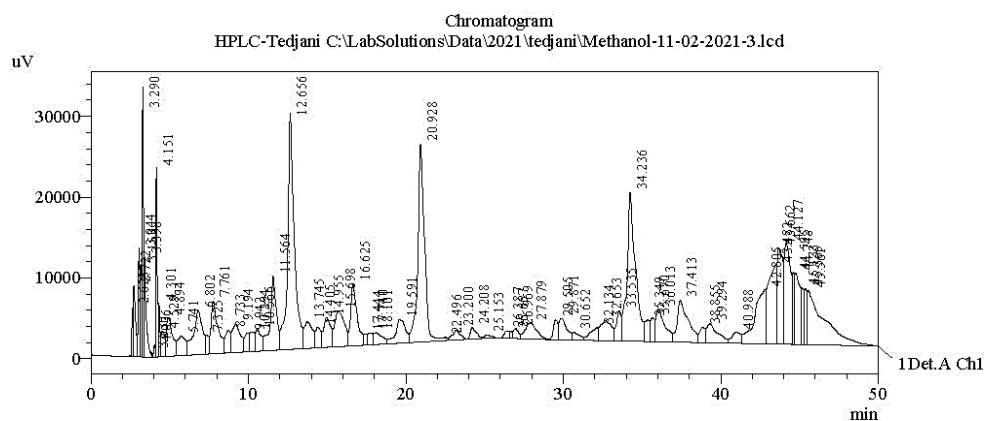


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar d'EL Oued
مخبر الموارد الصحراوية ترقيتها وتكنولوجياها
Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes



Sample Information

Acquired by : Admin
Sample Name : HPLC-Tedjar
Sample ID : HPLC-Tedjar
Vial# :
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Methanol-11-
Method Filename : Noumia21.m
Batch Filename :
Report Filename : dis0.lcr
Date Acquired : 11-02-2021 1:
Data Processed : 11-02-2021 1:



PeakTable



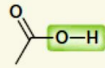













Detector A Ch1 268nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.623	26730	6079	0.299	1.569
2	2.722	90514	8729	1.014	2.254
3	3.044	86827	13442	0.973	3.471
4	3.153	74424	11389	0.834	2.941
5	3.290	186433	33438	2.089	8.633
6	3.398	104014	12369	1.165	3.194
7	3.830	1060	314	0.012	0.081
8	4.036	9882	1474	0.111	0.381
9	4.151	124122	23427	1.391	6.048
10	4.301	41878	6655	0.469	1.718
11	4.529	48792	3174	0.547	0.819
12	4.894	133651	4794	1.497	1.238
13	5.741	87171	2435	0.977	0.629
14	6.802	218850	5411	2.452	1.397
15	7.325	29093	2315	0.326	0.598
16	7.761	200729	6551	2.249	1.691
17	8.733	64436	2794	0.722	0.721

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
18	9.194	128345	3560	1.438	0.919
19	9.942	43848	2298	0.491	0.593
20	10.294	51823	2403	0.581	0.621
21	10.566	71281	2684	0.799	0.693
22	11.564	252594	9148	2.830	2.362
23	12.656	862167	29252	9.659	7.552
24	13.745	115956	3311	1.299	0.855
25	14.405	62036	2532	0.695	0.654
26	14.955	115877	3667	1.298	0.947
27	15.698	190079	4450	2.130	1.149
28	16.625	218480	7669	2.448	1.980
29	17.444	20752	1397	0.232	0.361
30	17.740	27532	1479	0.308	0.382
31	18.101	57847	1459	0.648	0.377
32	19.591	128421	2912	1.439	0.752
33	20.928	721548	24470	8.084	6.318
34	22.496	1164	95	0.013	0.025
35	23.200	41241	1233	0.462	0.318
36	24.208	35704	1412	0.400	0.365
37	25.153	11519	374	0.129	0.096
38	26.387	18787	892	0.210	0.230
39	26.667	9056	830	0.101	0.214
40	26.969	29231	1215	0.327	0.314
41	27.879	101280	1928	1.135	0.498
42	29.505	44968	2440	0.504	0.630
43	29.871	92706	2667	1.039	0.689
44	30.652	30642	942	0.343	0.243
45	32.134	55741	1590	0.624	0.411
46	32.653	121852	2472	1.365	0.638
47	33.535	78625	3695	0.881	0.954
48	34.236	673404	18417	7.544	4.755
49	35.349	56493	2689	0.633	0.694
50	35.670	53943	2906	0.604	0.750
51	36.013	161450	4030	1.809	1.041
52	37.413	248688	5167	2.786	1.334
53	38.855	43132	1866	0.483	0.482
54	39.294	116090	2347	1.301	0.606
55	40.988	55370	1384	0.620	0.357
56	42.805	320174	6727	3.587	1.737
57	43.482	345445	9732	3.870	2.513
58	43.662	290661	11929	3.256	3.080
59	44.127	347076	12513	3.888	3.231
60	44.595	87479	8892	0.980	2.296
61	44.748	197754	8805	2.216	2.273
62	45.133	72776	7043	0.815	1.819
63	45.365	88437	6913	0.991	1.785
64	45.561	497807	6690	5.577	1.727
Total		8925887	387314	100.000	100.000

III. الملحق C: ترددات أهم الروابط في مطيافية الأشعة تحت الحمراء IR.

TABLE 14.2 IMPORTANT SIGNALS IN IR SPECTROSCOPY

STRUCTURAL UNIT	FREQUENCY (cm ⁻¹)	STRUCTURAL UNIT	FREQUENCY (cm ⁻¹)
USEFUL SIGNALS IN THE DIAGNOSTIC REGION			
Single Bonds (X—H)		Double Bonds	
	3200–3600		1750–1850
	2200–3600		1700–1750
	3350–3500		1700–1750
	~3300		1680–1750
	3000–3100		1650–1700
	2850–3000		1600–1700
	2750–2850		1450–1600 1650–2000
Triple Bonds			
	2100–2200		
	2200–2300		

Discussed in Chapter 20

Discussed in Chapter 17

المخلص

Artemisia absinthium المعروفة في الجزائر بإسم شجرة مريم هي نبات عطري طبي من العائلة النجمية (*Asteraceae*)، تستخدم على نطاق واسع في مجال الطب في جميع أنحاء العالم، والتي لها العديد من الآثار الطبية على الوقاية من الامراض. الهدف من هذه الدراسة كخطوة أولى هو التقدير الاجمالي لمحتوى الفينولي و الفلافونويدي للمستخلصات المحضرة من الأجزاء الهوائية لـ *Artemisia absinthium* التي تم حصادها من منطقة سدراته التابعة لولاية سوق أهراس في شهر ماي 2020، مع المذيبات التالية: ميثانول ومزيج ميثانول والماء (3/7)، ولقد أظهرت طريقة القياس اللوني بشكل عام أن مستخلص مزيج ميثانول-ماء يحتوي على أكبر كمية من المركبات الفينولية $1935.29 \pm 21.6 \mu\text{g EAG/g}$ ، و المستخلص ميثانولي يحتوي على الفلافونويدات قدرت أكبر قيمة بـ $8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$. وفي الجزء الثاني تمت الدراسة لمستخلصات النبتة بطريقتين: الطريقة الطيفية و الطريقة الكهروكيميائية، حيث تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الطيفية التي تمثلت في اختبار DPPH واختبار FRAP واختبار موليبيدات الفوسفات، حيث وجدنا في اختبار DPPH أعلى قيمة تثبيط للمستخلص المزيج (ميثانول-ماء) بقيمة $IC_{50} = 23.64 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$ ، كما أظهر أيضا اختبار FRAP أعلى قيمة قدرت بـ $86.74 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ ، وبقيمة $40.40 \pm 1.70 \mu\text{g/g}$ في المستخلص الميثانولي وذلك في اختبار موليبيدات الفوسفات، أما بالطريقة الكهروكيميائية استعملنا تقنية الفولتامترية الحلقي حيث أعطى مستخلص الميثانول والماء قدرة عالية على تثبيط الجذر الحر. وأخيرا تم اختبار الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلصات النبتة وذلك عن طريق سلالتين بكتيريتين، حيث تبين لنا أن البكتيريا تمتلك مقاومة ضد مستخلصات النبتة المدروسة.

الكلمات المفتاحية: *Artemisia absinthium*، شجرة مريم، المركبات الفينولية، الفعالية المضادة للأكسدة،

الفولتامترية الحلقي، الفعالية البيولوجية.

Abstract:

Artemisia absinthium, known in Algeria as the Mari tree, is an aromatic medicinal plant of the Asteraceae family, widely used medicinally all over the world, and has many medicinal effects in the prevention of diseases. The aim of this study, as a first step, is the global estimation of the phenols and flavonoids content of extracts prepared from aerated parts of *Artemisia absinthium* collected in the Sedrata region of Souk Ahras in May 2020, with the following solvents: methanol, a mixture of methanol and water (7/3) Overall, the colorimetric method showed that the mixture extract of methanol and water contained the largest amount of phenolic compounds, estimated at $1935.29 \pm 21.6 \mu\text{g EAG/g}$, and flavonoids estimated at $8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$ in methanolic extract. In the second part, plant extracts were studied in two ways: the spectroscopic method and the electrochemical method, where the antioxidant activity was estimated by the spectroscopic method represented by the DPPH test, FRAP test and molybdate phosphate test. In the DPPH test, we found the highest inhibition value for the mixed extract (methanol-water) with a value of $\text{IC}_{50} = 23.64 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$, and the FRAP test showed the highest value estimated at $86.74 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$, and with a value of $40.40 \pm 1.70 \mu\text{g/g}$ in the methanolic extract in the molybdate phosphate test, as for the electrochemical method, we used the cyclic voltammetry technique, where the methanolic and aqueous extract gave a high ability to inhibit free radicals. Finally, the antibacterial biological activity of the plant extracts was tested by two strains of bacteria, where it was found that the bacteria have resistance against the studied plant extracts.

Key words: *Artemisia absinthium*, Mary tree, phenolic compounds, antioxidant activity, cyclic voltammetry, biological activity.

Résumé:

L'Artemisia absinthium, connue en Algérie sous le nom de Mari arbre, est une plante médicinale aromatique de la famille des Astéracées, largement utilisée en médecine dans le monde entier, et possède de nombreux effets médicinaux dans la prévention des maladies. Le but de cette étude, dans un premier temps, est l'estimation globale de la teneur en phénols et flavonoïdes d'extraits préparés à partir de parties aérées d'*Artemisia absinthium* récoltées dans la région de Sedrata à Souk Ahras en mai 2020, avec les solvants suivants : méthanol, un mélange de méthanol et d'eau (7/3) Globalement, la méthode colorimétrique a montré que le mélange extrait de méthanol et d'eau contenait la plus grande quantité de composés phénoliques, estimée à $1935.29 \pm 21.6 \mu\text{g EAG/g}$, et de flavonoïdes estimée à $8.505 \pm 0.11 \mu\text{g ER/g}$ méthanol. Dans la seconde partie, les extraits végétaux ont été étudiés de deux manières : la méthode spectroscopique et la méthode électrochimique, où l'activité antioxydante a été estimée par la méthode spectroscopique représentée par le test DPPH, le test FRAP et le test phosphate. Dans le test DPPH, nous avons trouvé la valeur d'inhibition la plus élevée pour l'extrait mixte (méthanol-eau) avec une valeur de $\text{IC}_{50} = 23.64 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$, et le test FRAP a montré la valeur la plus élevée estimée à $86.74 \pm 1.65 \mu\text{g/g}$, et avec une valeur de $40.40 \pm 1.70 \mu\text{g/g}$ dans l'extrait méthanolique dans le test au phosphate de molybdate, comme pour la méthode électrochimique, nous avons utilisé la technique de voltamétrie cyclique, où l'extrait méthanolique et aqueux a donné une forte capacité à inhiber les radicaux libres. Enfin, l'activité biologique antibactérienne des extraits de plantes a été testée par deux souches de bactéries, où il a été constaté que les bactéries ont une résistance contre les extraits de plantes étudiés.

Mots clés : *Artemisia absinthium*, Mari arbre, composés phénoliques, activité antioxydante, voltampérométrie cyclique, activité biologique.