الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الشهيد حمّه لخضر الوادي

كلية العلوم الدقيقة

قسم الكيمياء

رقم الترتيب:.....

الرقم التسلسلي:.....

رسالة محضرة لنيل شهادة

دكتوراه في العلوم

تخصص كيمياء

من إعداد:

زواري أحمد رشيدة

تحت عنوان:

دراسة المحتوى الفينولي و الفعالية المضادة للأكسدة و البكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات القناوية *Abelmoschus Esculentus* L.

نوقشت يوم: **2021/01/05**

أمام لجنة المناقشة:

أ. عطية جمال	أستاذ محاضر أ	جامعة الوادي	رئيسا
أ. ربيعي عبد الكريم	أستاذ محاضر أ	جامعة الوادي	مناقشا
أ. زغدي ساعد	أستاذ محاضر أ	جامعة ورقلة	مناقشا
أ. بلفار مُحَمَّد الأخضر	أستاذ محاضر أ	جامعة ورقلة	مناقشا
أ. نجيمي مُحَمَّد السعيد	أستاذ محاضر أ	جامعة ورقلة	مناقشا
أ. وهراني مُحَمَّد رضا	أستاذ التعليم العالي	جامعة الوادي	مؤطرا
أ. صلاح الدين لعويني	أستاذ محاضر أ	جامعة الوادي	مدعو

الموسم الجامعي: 2020-2021

الإهداء

إلى أبي و أمي حفظهما الله و رعاهما

إلى زوجي و ابني العزيز

إلى إخوتي و أخواتي و أولادهم

إلى كل أهلي و أحبيتي و أصدقائي

إلى كل من علمني و وجهني بإخلاص

أهدي هذا العمل المتواضع راجية

من الله أن يحظى بالنجاح و القبول

كلمة شكر و عرفان

أحمد الله جل علاه أن و فقني في إنجاز هذا البحث المتواضع و قاد لي من الصالحين الطيبين الذين مدوا لي يد العون و ساعدوني على إتمام هذا العمل و أخص بالشكر الأستاذ الفاضل وهراني مُحَّد رضا على قبوله الإشراف على هذه الرسالة و على دعمه و صبره. و أتقدم بخالص الشكر للأستاذ لعويني صلاح الدين على كل ما قدمه لي و لهذا البحث من دعم و توجيه و مساعدة فشكرا جزيلا. و أقدم شكري و إمتناني إلى زوجي الفاضل و والداي الكريمين على دعمهم المتواصل لي و خالص الشكر لأختي الخنساء التي ساعدتني في كتابة و طباعة هذا البحث.

كما أتقدم بالشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة و على رأسهم الأستاذ عطية جمال على قبوله ترأس هذه اللجنة و على دعمه الدائم، و الشكر أيضا للأستاذ زغدي سعد و الأستاذ بلفار مُحَّد الأخضر و الأستاذ نجيمي مُحَّد السعيد و الأستاذ ربيعي عبد الكريم على قبولهم المشاركة في مناقشة هذا العمل و تقويمه و إثراءه.

و أتقدم أيضا بالشكر لقروي رجاء، فوناس لويزة، الأحمادي بشيرة، واري بسمة و عثماني منال على كل ما قدموه في سبيل إنجاز هذا البحث فشكرا لكن.

كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر إلى السيد عميد كلية العلوم الدقيقة الأستاذ عبد الوهاب منصور و السيد مدير الدراسات الأستاذ تواتي مُحَّد السعيد و على الدعم الغير مباشر و أشكر أيضا الأستاذ تامة نور الدين على دعمه الدائم و نصحه. و إلى كل من ساهم في إنجاز هذا العمل و لو من بعيد شكرا لكم جميعا.

Abstract

الملخص

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تثمين ثمار نبات القناوية، من خلال دراسة المحتوى الفينولي و النشاط البيولوجي للمستخلص الخام لثمار نبات القناوية *Abelmoschus esculentus* L. لمنطقة الوادي. استعملنا ثمار مقطوفة في ثلاثة أشهر مختلفة (أوت، سبتمبر و أكتوبر) و ثلاث طرق للاستخلاص و مذيبين. تم التقدير الكمي للمركبات الفينولية باستخدام كاشف الفولين FC، تم استخدام العديد من الاختبارات الكيميائية الحيوية لتقييم خواصها المضادة للأكسدة: DPPH˙ ، FRAP وTAC علاوة على ذلك، تم فحص النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام طريقة الانتشار ضد الإشريكية القولونية، المكورات العنقودية، الزائفة الزنجارية، المكورات العنقودية الذهبية، السالمونيلا التيفية و الكلبسييلا. أظهرت النتائج أن مستخلص ثمار *Abelmoschus esculentus* L. يحتوي على كميات مهمة من مادة البوليفينول بما في ذلك الفلافونويد و الفلافونول، و يمكن اعتبارها مصادر جيدة لهذه المركبات للتطبيقات الطبية والغذائية.كما أوضحت النتائج أن مستخلص شهر أوت أغنى بالمكونات الفيتوكيميائية كمادة الفلافانول، الفلافونيدات و متعددات الفينول حيث وصلت قيمة كل منها على التوالي(190.11±5.75 ملغ/غ، 24.21±0.54 ملغ/غ و 9.87±0.05 ملغ/غ)، و هذا ما أعطاه أعلى نشاط مضاد للأكسدة بتثبيط الجذر الحر DPPH˙ وTAC وFRAP مقارنة بمستخلص شهر سبتمبر و أكتوبر حيث قدرت قيمة IC_{50} بـ (14.33±0.55 لمستخلص أوت< 15.33±0.58 لمستخلص سبتمبر< 17.43±0.63 ملغ/مل لمستخلص أكتوبر بالنسبة لاختبار DPPH). أظهرت جميع السلالات البكتيرية المدروسة حساسية عالية ضد مستخلص الثمار و كان لمستخلص شهر أوت أفضل نشاط مضاد للجراثيم ضد المكورات العنقودية الذهبية. و كشفت النتائج أن مستخلص الأسيتون غني بالمكونات الفيتوكيميائية و له أعلى نشاط مضاد للأكسدة. بينت نتائج تأثير طرق الاستخلاص أن طريقة الاستخلاص بجهاز سوكسلي هي الأمثل لاستخلاص المركبات الفينولية بالتالي تبدي قدرات مضادة للأكسدة عالية مقارنة بالاستخلاص بالنقع و طريقة الأمواج الفوق الصوتية. أما عن النشاط التثبيطي للبكتيريا فوجد أن السلالات البكتيرية المدروسة كانت حساسة لمختلف المستخلصات و أن لمستخلص الأسيتون أفضل نشاط مضاد للبكتيريا ضد المكورات العنقودية الذهبية و الكلبسييلا. يمكن للمركبات الفينولية أن تلعب أدوارًا مهمة في النشاط المضاد للأكسدة لـ *Abelmoschus esculentus* L. استنادًا إلى العلاقة الجيدة الموجودة بين النشاط و المحتويات الفيتوكيميائية و التي تشير إلى أن التأثيرات الملحوظة يمكن أن تُعزى إلى المركبات الفينولية. و عليه يمكن استخدام مستخلص ثمار *Abelmoschus esculentus* L. في العديد من التطبيقات في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: *Abelmoschus esculentus* L.، المستخلص الخام، مضادات الأكسدة، الفعالية البيولوجية.

Abstract

The objective of this study was to determine the phytochemical profile, antioxidant, and antibacterial activity of fruit extracts from *Abelmoschus esculentus* L. for El-Oued region. We used three methods of extraction, fruits collected in August, September, October and two solvents. The total phenolic content evaluated in fruit extracts using Folin-Ciocalteu reagent. Several biochemical assays were used to evaluate their antioxidant properties: (DPPH, FRAP and TAC). Further, antibacterial activity was screened using disk diffusion method against *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aerigunosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Klepsiella*. Three fruits extracts of *Abelmoschus esculentus* L. was found to contain a high total phenolic content (190.11± 5.75 for AFE, 159.64± 4.28 for SFE 138.19± 4.34 mg GAE/g DW for OFE). The fruit extract exhibited potent antioxidant activity determined by DPPH˙, FRAP, and total antioxidant activity assays, the high antioxidant capacity of all extracts has been observed and related to the relative amounts of total phenolic content with good antioxidant properties (DPPH˙ assay, IC_{50}= 14.33±0.55 mg/ml for AFE> IC_{50}= 15.33±0.58 mg/ml for SFE> IC_{50}= 17.43±0.63 mg/ml OFE). All bacteria showed high sensitivity against fruits extract and the AFE had the best antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. The results obtained for the photochemical analysis and the DPPH˙ test gave a good result to the Soxhlet method, but the maceration method has a high antioxidant property compared to the other methods. The results revealed that acetone extract is very rich in polyphenols, flavonoids and flavonols, the same extract had the highest antioxidant activity. As for the antibacterial inhibition, it was found that the studied bacterial strains were sensitive to different extracts and the acetone extract had the best antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Klepsiella*. Phenolic compounds may play important roles in the antioxidant activity of *Abelmoschus esculentus* L. based on The good correlation found between activity and phytochemical contents indicates that effects observed could be attributed to phenolic compounds. The results suggest that the fruits of *Abelmoschus esculentus* L. can be considered as a good source of natural antioxidant and antibacterial drugs and may be used in many applications in the future.

Keywords: *Abelmoschus esculentus* L., raw extract, antioxidant, biological activity.

الفهرس

الفهرس

اهداء

تشكرات

ملخص

الفهرس I

قائمة الأشكال VI

قائمة الجداول VIII

الرموز و الاختصارات IX

المقدمة X

الفصل الأول: عموميات حول نبات القناوية و منتجات الأيض الثانوي

I.1.عموميات حول نبات القناوية 01

I.1.1. نبذة تاريخية 01

I.1.2. تعريف القناوية (*Abelmoschus esculentus* L.) 01

I.1.3. الأسماء الشائعة للقناوية (*Abelmoschus esculentus* L.) 02

I.1.4. التصنيف العلمي للقناوية (*A esculentus* L.) 03

I.1.5.الوصف النباتي للقناوية (*A esculentus* L.) 03

I.1.6. القيمة الغذائية للقناوية (*A esculentus* L.) 05

I.1.6.1.مضادات الأكسدة 05

I.1.6.2. الألياف الغذائية 05

I.1.6.3. الزيوت 05

I.1.6.4. الكربوهيدرات و الصمغ 06

I.1.6.5. البروتينات والدهون 06

I.1.6.6. الأحماض الأمينية 06

I.1.7.أنواع القناوية (*A esculentus* L) 06

I.1.8. الإنتشار الجغرافي لنبات القناوية (*A esculantus* L.) 07

I.1.9. المناخ المناسب لزراعة القناوية (*A esculantus* L.) 08

I.1.10. فوائد القناوية 08

I.1.11. بعض الدراسات سابقة لنبات *A esculentus* L. 09

I.2. منتجات الأيض الثانوي 10

I.2.1. المركبات الفينولية الطبيعة 10

I.1.2.1. تعريف 10
I.1.2.2. مصدر المركبات الفينولية 10
I.1.2.3. الخصائص العامة للمركبات الفينولية 11
I.1.2.4. تصنيف المركبات الفينولية 11
I.1.2.5. الأحماض الفينولية 12
I.1.2.6. الفلافونيدات 14
I.1.2.7. أهمية الفينولات و الفلافونيدات 14
المراجع 17

الفصل الثاني: عموميات حول الجذور الحرة و مضادات للأكسدة و البكتيريا

II.1. الجذور الحرة و مضادات الأكسدة 23
II.1.1. الجذور الحرة 23
II.1.2. نشأة الجذور الحرة و أضرارها 23
II.1.3. أسباب زيادة الجذور الحرة 24
II.1.4. مضادات الأكسدة 24
II.1.4.1. تعريف مضادات الأكسدة 24
II.1.4.2. تصنيف مضادات الأكسدة 24
II.2. الفعالية المضادة للبكتيريا 25
II.2.1. مفهوم البكتيريا 26
II.2.2. تسمية البكتيريا 26
II.2.3. مبادئ تصنيف البكتيريا 26
II.2.3.1. من حيث الشكل 26
II.2.3.2. من حيث توزيع أسواطها 27
II.2.3.3. من حيث الوسط الذي تعيش فيه 27
II.2.3.4. من حيث التغذية 27
II.2.3.5. من حيث طريقة التلوين 28
II.2.3.6. من حيث أثرها على الإنسان 28
II.2.4. أنواع البكتيريا المدروسة 28
II.2.5. المقاومة البكتيرية 31
II.2.5.1. تعريف المقاومة البكتيرية 31
II.2.5.2. طرق التعرف على حساسية أو مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي 31

المراجع 32

الفصل الثالث: الجزء العملي

III.1. وسائل العمل 36

III.1.1. الأجهزة و المواد الكيميائية 36

III.1.2. جمع العينة 37

III.2. التقدير الكمي للمركبات الفينولية 37

III.2.1. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية 37

III.2.2. التقدير الكمي للفلافونيدات 38

III.2.3. التقدير الكمي للفلافانولات 39

III.2.5. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) 39

III.3. تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الكيميائية 41

III.3.1. إختبار تثبيط الجذر الحر DPPH 41

III.3.2. إختبار فعالية مضادات الأكسدة الكلية TAC باستعمال موليبدات الأمنيوم 42

III.3.3. دراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP 42

III.4. دراسة الفعالية البيولوجية 43

III.4.1. أنواع البكتيريا المدروسة 43

III.4.2. طريقة العمل 44

III.4.3. تحضير وسط الزرع 44

III.4.4. تحضير الأقراص 44

III.5. النتائج و المناقشة 45

III.5.1. دراسة تأثير طرق الإستخلاص على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الخام لثمار نبات (*Abelmoschus esculentus* L.). 45

III.5.1.1. تحضير المستخلصات 45

III.5.1.2. مردود المستخلصات 47

III.5.1.3. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية 47

مناقشة النتائج 48

III.5.1.4. التقدير الكيفي و الكمي للفينولات بإستخدام HPLC 49

مناقشة النتائج 51

III.5.1.5. تقدير الفعالية المضادة للأكسدة 52

أ) الفعالية المضادة للأكسدة الكلية TAC 52

مناقشة النتائج 52
ب) القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH 53
مناقشة النتائج 54
III.2.5. دراسة تأثير وقت الجني على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة و البكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات (*Abelmoschus esculentus* L.). 56
III.2.5.1. تحضير المستخلص 56
III.2.5.2. مردود المستخلصات 58
III.2.5.3. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية 58
مناقشة النتائج 59
III.2.5.4. التقدير الكمي للفلافونيدات 60
مناقشة النتائج 60
III.2.5.5. التقدير الكمي للفلافانول 61
مناقشة النتائج 62
III.2.5.6. التقدير الكيفي و الكمي للفينولات بإستخدام HPLC 63
مناقشة النتائج 64
III.2.5.7. الفعالية المضادة للأكسدة 65
أ) الفعالية المضادة للأكسدة الكلية TAC 65
مناقشة النتائج 66
ب) القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH 66
مناقشة النتائج 67
ج) الفعالية المضادة للأكسدة طريقة FRAP 68
مناقشة النتائج 68
III.2.5.8. الفعالية البيولوجية 69
مناقشة النتائج 69
III.3.5.دراسة تأثير المذيب على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة و البكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات (*Abelmoschus esculentus* L.). 71
III.3.5.1. تحضير المستخلص 71
III.3.5.2. مردود المستخلصات 73
III.3.5.3. التقدير الكمي للفينولات 73
مناقشة النتائج 74
III.3.5.4. التقدير الكمي للفلافونيدات 74

مناقشة النتائج 75
III.5.3.5. الفعالية المضادة للأكسدة 75
أ) القدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC 75
مناقشة النتائج 76
ب) القدرة التثبيطية للجذرالحر •DPPH 76
مناقشة النتائج 77
III.6.3.5. الفعالية المضادة للبكتيريا 78
مناقشة النتائج 79
المراجع 81
الملاحق

قائمة الأشكال

الفصل الأول: عموميات حول نبات القناوية و منتجات الأيض الثانوي		
01	صورة فوتوغرافية لنبات القناوية	02
02	صورة توضح بذور القناوية	03
03	صورة توضح أوراق القناوية	04
04	صورة توضح أزهار القناوية	04
05	صورة توضح ثمار القناوية	05
06	الانتشار الجغرافي لتوزع زراعة القناوية	07
07	صيغة فينول بسيط	10
08	الهيكل الاساسي للأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك	12
09	الهيكل الاساسي للأحماض الفينولية المشتقة من حمض السينامك	13
10	*الهيكل الأساسي للفلافونويدات* و أهم المواقع المتدخلة في تأثيراتها الحيوية	14
الفصل الثاني: عموميات حول الجذور الحرة و مضادات الأكسدة و البكتيريا		
01	بنيات بعض مضادات الاكسدة الاصطناعية	25
02	*صور بالمجهر الالكتروني لبكتيريا E.coli*	29
03	*صور بالمجهر الالكتروني لبكتيريا P . aeruginosa*	29
04	صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *S.auris*	30
05	*صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا Salmonella typhy*	30
06	*صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا Klebsiella*	30
الفصل الثالث: الجزء العملي		
01	يمثل كروماتوغرام مزيج المركبات المرجعية	40
02	آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة مع الجذر الثابت DPPH	41
03	مخطط يوضح مراحل العمل على المستخلصات	46
04	المنحنى القياسي لحمض الغاليك	48
05	كمية الفينولات الكلية للمستخلصات	49
06	كروماتوغرام مستخلص النقع. (أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)	49
07	كروماتوغرام مستخلص سوكسلي. (أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)	50
08	كروماتوغرام مستخلص الأمواج الفوق الصوتية. (أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)	50
09	المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك	52
10	نتائج إختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية (mg AAE/g Extrac).	52
11	تأثير مستخلصات النقع على الجذر الحر DPPH (أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)	53
12	تأثير مستخلصات سوكسلي على الجذر الحر DPPH (أ):العينة(A) و(ب): العينة(B)	53
13	تأثير مستخلصات الأمواج الفوق الصوتية على الجذر الحر DPPH (أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)	54

14	مخطط يوضح مراحل العمل على المستخلصات	57
15	المنحنى القياسي لحمض الغاليك	58
16	كمية عديدات الفينول بملغم كافئ لحمض الغاليك/ غ من وزن المستخلص	59
17	المنحنى القياسي لمحاليل الروتين	60
18	كمية الفلافونيدات بالمغ مكافئ لروتين / غ من وزن المستخلص	61
19	المنحنى القياسي للكرستين	61
20	كمية الفلافانول بالملغ مكافئ لكرستين / غ من وزن المستخلص	62
21	كروماتوغرام مختلف المستخلصات (أ) عينة أكتوبر، (ب) عينة سبتمبر، (ج) عينة أوت.	63
22	نتائج إختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية (ملغ / غ)	65
23	منحنى النشاطية في تثبيط الجذر الحر •DPPH بدلالة التركيز (أ): شهر أوت، (ب): شهر سبتمبر، (ج): شهر أكتوبر	67
24	نتائج إختبار FRAP	68
25	مخطط يوضح مراحل العمل على المستخلصات	72
26	كمية الفينولات بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /غ من وزن المستخلص	74
27	كمية الفلافونيدات بالملغ مكافئ لحمض الروتين /غ من وزن المستخلص	75
28	قيم القدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC	76
29	إختبار DPPH للمستخلصات (أ) : المستخلص الأسيتوني (ب) :المستخلص الإيثانولي	77
30	أقطار مناطق التثبيط بالملم لمستخلص الإيثانولي	78
31	أقطار مناطق التثبيط بالملم لمستخلص الأسيتوني	79

قائمة الجداول

الفصل الأول: عموميات حول نبات القناوية و منتجات الأيض الثانوي		
01	بعض تسميات للقناوية *(Abelmoschus esculentus* L.)	02
02	التصنيف العلمي للقناوية (*Abelmoschus esculentus* L.)	03
03	يوضح بعض أصناف عديدات الفينول	11
04	الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك	12
05	الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك	13
06	بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب و الصيدلة	16

الفصل الثالث: الجزء العملي		
01	الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات باستخدام HPLC	39
02	زمن مكوث المركبات الفينولية المرجعية	40
03	قيم مردود المستخلصات	47
04	قيم الإمتصاصية و كمية الفينولات في كل مستخلص	48
05	تركيز متعددات الفينول في مستخلصات ثمار نبات *A esculentus* L.	50
06	قيم IC_{50} لكل مستخلص	54
07	قيم مردود المستخلصات	58
08	قيم الإمتصاصية و كمية الفينولات في كل مستخلص	59
09	قيم الامتصاصية و كمية الفلافونيدات في كل مستخلص	60
10	قيم الامتصاصية و كمية الفلافانول في كل مستخلص	62
11	زمن مكوث المركبات الفينولية و تركيزها بالمكروغرام/المليغرام	64
12	قيم IC_{50} لكل مستخلص	66
13	أقطار التثبيط لأنواع البكتيريا الناتجة عن تراكيز مختلفة للعينات التراكيز مأخوذة بالملم	69
14	قيم مردود المستخلصات	73
15	قيم الإمتصاصية و كمية الفينولات في كل مستخلص	73
16	قيم الامتصاصية و كمية الفلافونيدات في كل مستخلص	74
17	قيم IC_{50} لكل مستخلص	77
18	أقطار التثبيط لأنواع البكتيريا الناتجة عن تراكيز مختلفة للعينات التراكيز مأخوذة بالملم	78

الرموز و الاختصارات

الرمز	العربية	الإنجليزية
A	الامتصاصية الضوئية.	Absorbance.
AAE	مكافئ لحمض الاسكوربيك.	Ascorbic Acid Equivalent.
ABTS		2,2-azinobis-(3-ethylbenzothialozine-6-sulphonic acid).
ARP	القدرة المضادة للجذور، و تساوي ($1/IC_{50}$)	Anti-radical power, equal to $1/IC_{50}$
A esculentus L.		*Abemoschus esculentus* L.
BHA	بيوتيل هيدروكسي أنيزول.	Butyl Hydroxy Anizole.
BHT	بيوتيل هيدروكسي طولوين.	Butyl Hydroxy Toluène.
DNA	الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين	Deoxyribonucleic acid
DMSO		Dimethyl Sulfoxide.
DPPH		1,1-diphenyl-2-picryilhydrazyl.
FC	كاشف الفولين.	Folin-Ciocalteu
FRAP		Ferric Reducing Antioxydant Power.
HPLC	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.	High-Performance Liquid Chromatography.
IC_{50}	مستخلص الفينولي لتثبيط 50 % من الجذور الحرة.	The concentration mg/l of the extract that inhibited the formation of radical by 50%.
LMWA	مضادات الأكسدة منخفضة الوزن الجزيئي.	Low Molecular Wight Antioxidant.
PG	بروبيل غالات.	Propyl Gallate.
PR	القدرة الإرجاعية.	Power Reducing.
RNA	الحمض النووي الريبوزي	Ribonucleic acid
TAC	إجمالي القدرة المضادة للأكسدة.	Total Antioxidant Capacity.
TBHQ	تترا بيوتيل هيدروكينون.	Tetra-butylhydroquinone.
TPTZ		Tripyridyltriazine
TRAP		Total Radical-trapping Antioxidant Parameter.
UV-Visible	مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و المرئية.	Spectrophotometer UV-Visible.
λ_{max}	طول الموجة الأعظمي.	Wave length of Maximum Absorbance.

المقدمة

مقدمة

لا أحد ينكر أفضال الصناعة الدوائية في إنقاذ البشرية من ويلات الأوبئة و آلام الآفات المرضية، فلقيت بذلك رواجا و توهجا، و بالرغم من أن هذه الصناعة تطالعنا بكل جديد مع التطورات الصناعية، إلا أنها باتت تشكل هاجسا يؤرق البشرية لما لازمها من آثار جانبية و مضاعفات علاجية إثر الفعل التراكمي مما جعل منظمات الصحة الدولية (OMS) تنادي بالتعامل العقلاني و الحذر، بل و تعالت الصيحات للاصطلاح مع الطبيعة و العودة إلى المنتجات الطبيعية و مشتقاتها التي تشكل 50% من العقاقير المتداولة إكلينيكيا[1]، فقد عرف الإنسان منذ فجر التاريخ الأعشاب و فوائدها العلاجية المختلفة، فمن خلال المشاهدة و التجربة و البحث عبر آلاف السنين ازدادت المعارف عن النباتات الطبية و خصائصها العلاجية، فقد برع الصينيون و المصريون القدماء في علم التداوي بالأعشاب، حيث استخدموا العديد من هذه الأعشاب في علاج الكثير من الأمراض بالإضافة إلى استخدامها في التحنيط و كذلك الزينة و التجميل[2][3].

تمثل المواد والنباتات الطبيعية على وجه الخصوص مصدرًا هائلاً للمركبات الفينولية (حمض الفينول، الفلافونويد، الفلافونول، التانين المكثف ، إلخ) ، والمستخلص الخام الطبيعي لهذه المركبات والمعزول من الأنواع النباتية المستخدمة في الطب التقليدي يمكن أن يكون مورداً غزير الإنتاج أدوية جديدة[4].
و اليوم، جذبت مضادات الأكسدة ذات المصادر الطبيعية اهتمامًا خاصًا لأنها يمكن أن تحمي جسم الإنسان من الأمراض التي تسببها الجذور الحرة دون أي آثار جانبية،على عكس مضادات الأكسدة الإصطناعية.
تعد مادة البوليفينول واحدة من أهم مجموعة المركبات الموجودة في النباتات، فهي تبدي نشاطًا مضادًا للأكسدة وتلعب دورًا مثبطًا للجذور الحرة[4].

و من بين النباتات الطبية التي جرى تداولها نبات القناوية(*Abelmoschus esculentus* L.) التي تنتمي إلى العائلة الخبازيات (Malvacées) و تدعم الدراسات الحديثة الأهمية التاريخية و الفوائد الصحية للقناوية حيث تستخدم قرون القناوية بشكل شائع في آسيا كخضروات، ومكون غذائي، ودواء تقليدي للعديد من الأمراض المختلفة، على سبيل المثال كعامل مدر للبول، لعلاج أمراض الأسنان والحد من تهيج المعدة[5].

الهدف من هذا البحث دراسة فيتوكيميائية تثمينية لثمار القناوية التي تستعمل في الطب الشعبي و اختبار المواد الفعالة الموجودة فيها، و نبتغي في هذه الدراسة استخلاص المواد الفعالة و التعرف عليها، كذلك تحديد كمية الفينولات و الفلافونويدات فيها، و تقدير فعاليتها المضادة للأكسدة و في هذا الصدد طرحنا الإشكاليات التالية:

ما مدى احتواء القناوية(*Abelmoschus esculentus* L.) للمواد الفعالة خصوصا المواد الفينولية ؟ و ما مدى فعاليتها المضادة للأكسدة؟ و ما تأثير المواد المستخلصة من النبات على نمو السلالات البكتيرية؟

و قصد الإجابة على هذه الإشكاليات المطروحة قسمنا البحث إلى ثلاث فصول:

الفصل الأول: و يشمل عموميات حول نبات القناوية و منتجات الأيض الثانوي.

الفصل الثاني: و يشمل عموميات حول الجذور الحرة و النشاط المضاد للأكسدة و البكتيريا.

الفصل الثالث: و يشمل الجزء العملي.

و في الأخير خلاصه عامة حول هذه الدراسة.

المراجع

1- Velazquez E. Tournier H A. Mordujovich P. De Bushiazzo G. Schinella G R. Antioxidant activityof *paraguan* plant extracts. Fitoterapia, 74, (2003), 91-97.

2- Maarouf A M. Redécouverte des plantes médicinales, Expérience du Qatar, (2002).

3- Ibrahim S S. Abdallah E Abdelkareem M S. Plantes médicinales aromatiques et toxiques du monde arabe. Ed OADA, Egypte, (1988).

4- Salah Eddine Laouini. « Etude du plan phytochimique et l'activité biologique d'extrait de *Phoenix dactylifera L* dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) ». Thèse de doctorat,Université Mohamed Khider, Biskra, (2014) .

5- Sengkhamparn N. Verhoef R P. Schols H A. Sajjaanantakul T. Voragen A G J. Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench).Carbohydrate Research. 344(14), (2009), 1824-1832.

الفصل الأول

عموميات حول نبات القناوية

و منتجات الأيض الثانوي

I.1.عموميات حول نبات القناوية

تفرض النباتات نفسها على الكوكب بمظهرها وحيويتها وغموضها. فمنذ العصور الأولى، بحث الإنسان عن طريقة لإشباع جوعه و قد وجد الأطعمة المغذية في النباتات، وجد فيها أيضا علاجات لأمراضه و تعلم تمييز النباتات السامة. هذه المعرفة، انتقلت شفويا أولا، ثم في الكتابات ولا تزال هناك آثار لاستخدام النباتات كأدوية في أقدم الحضارات[1] و يعزى ذلك لاحتوائها على العديد من المركبات الفعالة حيويا. وتعد القناوية (*Abelmoschus esculentus* L.) هي واحدة من الخضروات الهامة التي لها قيمة غذائية عالية مع أهمية طبية وصناعية معتبرة[3،2].

I.1.1.نبذة تاريخية

لا يزال أصل القناوية(البامية) مثير للجدل، حيث اقترح (De Candolle) عام 1883 أنها من أصل إفريقي حيث كانت تزرع من قبل المصريين سنة 1216 قبل الميلاد[4]، لأنها وجدت منحوتة في معابد فرعونية منذ العصريين الروماني و الإغريقي[5]. بينما أعتقد العالم (Van Borssum Waalkes) سنة 1966 أن أصولها تعود إلى منطقة جنوب شرق آسيا[4].

نشأت القناوية في إفريقيا الاستوائية وبدأت زراعتها في الشرق الأوسط والهند منذ فترة طويلة، وفي القرن التاسع عشر الميلادي شوهدت نباتات القناوية البرية على ضفاف النيل الأبيض في السودان. هذا وقد تم إدخال القناوية للمرة الأولى إلى أوروبا بواسطة فاتحي الأندلس المسلمين. وقد وصف العالم أبو العباس النباتي، أحد مواطني اشبيلية، نبات القناوية وصفاً دقيقاً في عام 1216 للميلاد. وبمجرد اكتشاف العالم الجديد (الأمريكتين) نقلت القناوية مع المهاجرين إلى هناك وعرفت في البرازيل في عام 1658 للميلاد. وتوجد الآن عدة أصناف محلية من القناوية في جنوب الولايات المتحدة، حيث تتمتع بشعبية كبيرة هناك، كما توجد أصناف كثيرة منها في إفريقيا وحول حوض البحر الأبيض المتوسط. وتنقَّل النوع الثاني من رتبة (المالفيسي)، المسمى (بالروزيل)، في الاتجاه المعاكس للبامية، فقد انتقل من جزر الهند الغربية إلى الهند والصين ثم بقية القارة الآسيوية[4].

تم تصنيفها إلى عائلة الخبازيات (Malvacèes) من قبل عالم النبات الألماني(Friedrich Medikus) في نهاية القرن السابع عشر وتتميز بعدة أنواع.كانت القناوية (Gombo) تنتمي أساسا إلى عائلة (Hibucus) و في سنة 1924 اقترح (Hochreutiner) جعله نوع في حد ذاته لكن تم معارضته بأنه لا يتوفر على العناصر اللازمة لتصنيفه كنوع جديد[5].

I.1.2.تعريف القناوية (*Abelmoschus esculentus* L)

تعتبر القناوية (*Abelmoschus esculentus* L.) من محاصيل الخضر الصيفية التي تنتشر زراعتها في المناطق المدارية والمعتدلة الدافئة في آسيا وإفريقيا[7،6].يعود ذلك لثمارها أو قرونها الليفية التي تحتوي على بذور بيضاء مستديرة [8].حيث تنتمي إلى عائلة (Malvaceae)[9,2]و التي تضم حوالي 1500 نوع حيث يسهل التعرف عليها من خلال الزهرة الملتوية [10].

الشكل (1.I): صورة فوتوغرافية لنبات القناوية

3.1.I.الأسماء الشائعة للقناوية (*Abelmoschus esculentus* L.)

تُزرع القناوية (*A esculentus* L.)على نطاق واسع للحصول على ثمارها الخضراء الصالحة للأكل، والتي يتم حصادها عندما تكون غير ناضجة[11]. لذا تختلف تسميتها حسب البلد المنتج كما بالجدول (1–I).

الجدول (1.I):بعض التسميات للقناوية (A esculentus L)[3].

البلد	التسمية
المشرق العربي	البامية
الولايات المتحدة	Okra
فرنسا	Gombo
إسبانيا	Gombo
الهند	Bhendi
الجزائر	قناوية
البرتغال	Guigambo
أوربا	Quiabo
الصين	Qui-kui

I.1.4.التصنيف العلمي للقناوية (*A esculentus* L.)

الجدول(I.2):التصنيف العلمي للقناوية(A esculentus L.) حسب عالم النبات الألماني (Friedrich Medikus) [12]

النطاق	حقيقيات النوى
المملكة	النباتات
الفرقة العليا	النباتات الأرضية
القسم	النباتات الوعائية
الشعبية	مستورات البذور
الشعبة	البذريات
الرتبة	خبازيات
الفصيلة	خبازية
الجنس	Abelmoschus
النوع	Esculentus
الاسم العلمي	Abelmoschus esculentus L

I.1.5.الوصف النباتي للقناوية (*A esculentus* L.)

هو نبات عشبي سنوي منتصب مستقيم الشكل يبلغ طوله حوالي 3 إلى4 أمتار يعيش طويلا متفرع الجذور وساق أسطوانية بشعيرات كثيفة يصل طولها من 0,2 إلى 1,4 مم وهو يتكون من[13].

البذور: كروية أو بيضوية الشكل براقة و ناعمة الملمس ذات حجم كبير و لون رمادي تحفظ في ظروف مناسبة لمدة عامين أو أكثر[10].

الشكل (I.2): صورة توضح بذور القناوية

الجذر: هو عبارة عن جذر رئيسي به العديد من الجذور الثانوية وهو ما يسمح بتثبيت النبتة بعمق في التربة[4].

الساق:الساق الأساسي لل (*Abelmoschus*) أسطواني ذا لون بنفسجي أو أخضر مغطى بشعيرات دقيقة يبلغ طوله 1,5 إلى 3 أمتار[4,14].

الأوراق: طويلة العنق(سويقات بطول 5- 10 سم) راحية قلبية الشكل متشاربة الحافة يصل طولها إلي 2 سم وغالبا ما تكون مغطاة بشعيرات قوية[16,15].

الشكل (I.3): صورة توضح أوراق القناوية

الأزهار: أزهار إبطية الشكل منعزلة أو عنقودية ذات أبعاد كبيرة لونها أصفر أو أرجواني[17]، يبلغ طولها 3 إلى7سم، تتفتح أزهارها قبل الفجر و تذبل في الظهيرة[18].

الشكل (I.4): صورة توضح أزهار القناوية

الثمار:عبارة عن كبسولة أسطوانية إلى هرمية، مغزلية، مستديرة (فاكهة ناعمة) أو زاويّة (من 5 إلى 10 حواف لكل ثمرة). لونه متغير من الأحمر–البنفسجي، الأخضر المحمر، الأخضر الداكن، الأخضر الباهت إلى الأصفر. يمكن أن تكون الثمار صلبة أو خشنة بعض الشيء أو شائكة[4, 12]، وتحتوي تقريبا على 100 بذرة، يكتمل نموها خلال أسبوع حيث يتم حصادها طازجة بعد أيام قليلة من الإزهار وبعدها تتخشب و تصبح غير صالح للاستهلاك[17].

الشكل (5.I): صورة توضح ثمار القناوية

I.1.6. القيمة الغذائية للقناوية (*A esculentus* L.)

تعد القناوية من الخضراوات ذات القيمة الغذائية العالية لغناها بالعديد من العناصر الغذائية كالفيتامينات، السكريات، الماء و البروتينات كما أنها تحتوي على المعادن كالحديد، الزنك، الكالسيوم و المغنزيوم[19].

I.1.6.1.مضادات الأكسدة

تحتوي البامية على كميات قليلة من المركبات المضادة للأكسدة، مثل بيتا كاروتين، و لوتين وكميات أعلى من الكيرسيتين 100جرام من البامية الطازجة توفر 11 مغ/غ من الكيرسيتين. و بالمقارنة، يحتوي البصل، الذي هو أحد المصادر الرئيسية لمادة الكيرسيتين في النظام الغذائي على 13 إلى 20 مغ/100غ.[21, 20]

I.1.6.2. الألياف الغذائية

توجد الألياف الغذائية فقط في المنتجات النباتية. فهو يجمع مجموعة من المواد التي لا يهضمها الجسم. يتم تصنيفهم إلى مجموعتين رئيسيتين، الألياف القابلة للذوبان و الألياف غير القابلة للذوبان. تحتوي البامية على نسبة عالية من الألياف القابلة للذوبان ما يقدر ب 40% من إجمالي محتواها من الألياف الغذائية.[23, 22]

I.1.6.3.الزيوت

منذ الخمسينيات من القرن الماضي، درس العديد من الباحثين تكوين الزيت المستخرج من بذور البامية. وفقًا لدراسة أجراها باحثون أفارقة (Nzikou & all … 2006)[24]، فإن هذا الزيت له محتوى دهني جيد، أفضل من زيت الذرة أو عباد الشمس أو زيت بذور العنب.[12]

I.1.6.4.الكربوهيدرات والصمغ

تحتوي ثمار القناوية على نسبة عالية من الكربوهيدرات، و التي تحتوي على حوالي 7 إلى 8% من المادة الجافة و تشمل كل من الجالاكتوز 25%، ورامنوز 22%، و حمض الجالاكتورونيك 27%. أما الصمغ فيمثل الفئة الرئيسية من الكربوهيدرات الموجودة في القناوية.[25]

I.1.6.5.البروتينات والدهون

تحتوي بذور القناوية على حوالي 20%بروتين، يمكن مقارنته ببروتين الصويا وحوالي 20% دهون يمكن مقارنته بزيت بذرة القطن[25].

I.1.6.6.الأحماض الأمينية

القناوية مصدر جيد لحمض الأسبارتيك والأرجينين اللذين يمثلان 10%من إجمالي الأحماض الأمينية[25].

علاوة على ذلك، القناوية غنية جدًا بالأملاح المعدنية والفيتامينات مثل الكالسيوم (63مغ/100غ)، الفوسفور (56مغ/100غ)، المغنيسيوم (43مغ/100غ) والصوديوم (45مغ/100غ) والحديد (0.4مغ/100غ)، المنجنيز، النحاس وكذلك الفيتامينات C (16.3مغ/ 100غ)، فيتامين B2، B3، B6، B9،K و A.[25]

I.1.7.أنواع القناوية (*A esculentus* L.)

يوجد عدة أنواع للقناوية ومنها:

جولد كوست

ارتفاع هذا النوع يصل إلى2متر،القرون (الثمار) مستديرة غير مضلعة لونها أخضر مبيض نسبيا لارتفاع كمية الألياف به، إذ تصل نسبة بالقرن الصالح للتسويق فتصل إلى 9غ/100غ وزن جاف و لزوجتها مرتفعة. يتم الإزهار والعقد بعد حوالي 70يوم من الزراعة.

هوايت فلفيت

يعرف بأصابع السيدة Ladys Fingers قرونها مستديرة طويلة ورفيعة ملساء لحمية، بيضاء مخضرة غضة ذات بذور كبيرة الحجم في القرن الصالح للتسويق. يصل ارتفاع النبات إلى 130سم تقريبا ولكن محصوله وفير.

كلمسون إسباينلس

يتمتع النبات بقدرة كبيرة على التكيف و يصل طوله 1.1 إلى 1.4متر. الفاكهة موحدة وخضراء جذابة و هي ذات قرون مضلعة، طويلة، خالية من الأشواك يصل طولها إلى 95 سم بها نسبة مرتفعة من الألياف. تتمتع الفاكهة بنكهة

جيدة.النباتات قوية ولكن من السهل حصادها فهي خالية من العمود الفقري تقريبًا مما يحسن من سهولة قطفها. ولها مدة صلاحية جيدة فهي مناسبة للتسويق طازجة أو التصدير[26].

دوارف جرين لونج بود

نباتات هذا الصنف أقصر من السابق فتصل إلى60سم القرون مضلعة، ملمسها وبري، لون القرون أخضر داكن. لها نسبة ألياف منخفضة في3.16غ/100غ وزن جاف، متأخر في الإزهار والعقد 75يوم من الزراعة. محصول النبات الصالح للتسويق يحتوى على نسبة عالية من الكربوهيدرات تصل إلى 14غ/100غ وزن جاف.

بثيرا

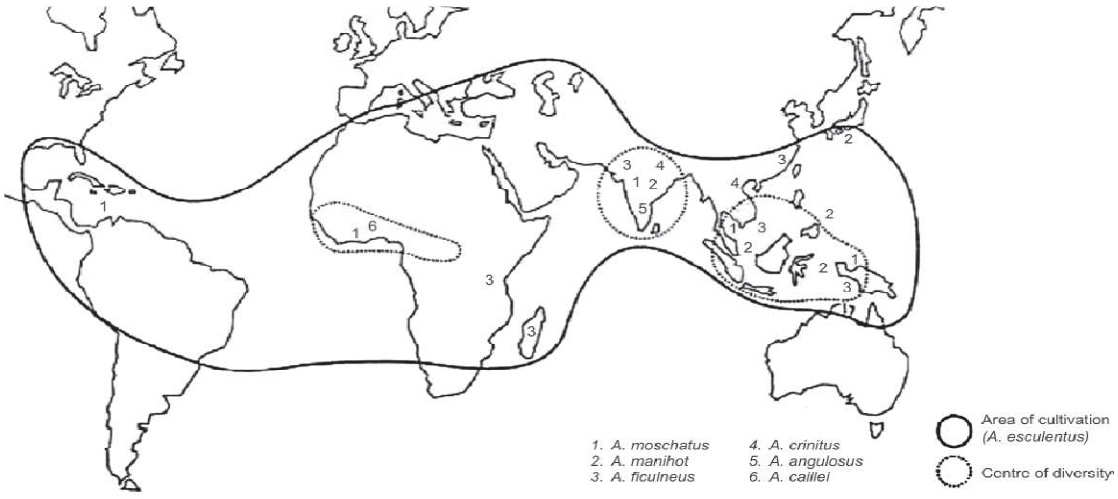
يصل طول النبات إلى130 سم، القرن مضلع أخضر به قليل من الأشواك والساق سميكة بها أيضا أشواك. نموه الخضري قوي.

ارتست

القرن طويل جلدي الملمس، لونه أحمر داكن به نسبة قليلة من الأشواك ويصل طول النبات إلى 120سم. الساق تتميز بلونها الأحمر الداكن رفيعة عليها أشواك[16]. الإزهار والعقد بعد 65 يوم من الزراعة و محصوله غزير.

I.8.1.الإنتشار الجغرافي لنبات القناوية (*A esculantus* L.)

تزرع القناوية كخضروات في معظم مناطق البحر الأبيض المتوسط والمناطق المدارية وشبه المدارية في إفريقيا والهند وأمريكا، فمن إفريقيا الاستوائية وبالتحديد السودان وإثيوبيا انتشرت زراعتها إلى غاية وصولها شمال أفريقيا ومن ثم إلى شرق حوض البحر الأبيض المتوسط والهند وصولا إلى أوروبا وأمريكا[5]، والخريطة في الشكل**(6.I)** توضح ذلك:



***الشكل (6.I):** الإنتشار الجغرافي لتوزع زراعة القناوية[28,27,5].*

I.1.9.المناخ المناسب لزراعة القناوية (*A esculantus* L.)

تعتبر القناوية من المحاصيل الصيفية حيث تحتاج لموسم نمو طويل دافئ، حيث تنبت البذور في درجة حرارة تتراوح من21 –35 درجة مئوية. ولا تنبت في أقل من 15درجة مئوية و يمكن إسراع إنبات بذورها في الجو البارد بنقعها في الماء لمدة لا تقل عن 8 ساعات، ثم كمرها في مكان دافئ لمدة لا تقل عن 24 ساعة، قبل زراعتها مع مراعاة عدم زيادة مدة النقع حتى لا تؤدي إلي تلف البذور وتليفها ونقص المحصول.كذلك يمكن إسراع الإنبات في الجو البارد بنقع البذور في محلول البولي إيثيلين جيليكون 400 جم في لتر لمدة 12 ساعة ثم غسلها بالماء حتى يزال آثار هذه المادة من البذور قبل زراعتها[27].تفضل البامية التربة الطينية الرملية جيدة التصريف و pH 7-6 مع نسبة عالية من المواد العضوية[31, 30, 29]

بعض أصناف القناوية حساسة للفترة الضوئية و بعضها الآخر غير حساس وقد تفشل البراعم الزهرية في اكتمال نموها عند زيادة طول النهار عن 11 ساعة في أصناف معينة.[27]

I.1.10.فوائد القناوية

القناوية (*A esculentus*. L) هي محصول نباتي ذو أهمية كبيرة [32]، مزروع في العديد من البلدان،و تكمن أهميته في الاستخدامات المختلفة للأوراق والبراعم والزهور والقرون، السيقان والبذور الطازجة[33]

- **طبيا**

يرتبط الاستهلاك العالي للمنتجات النباتية بتقليل مخاطر الإصابة بعدد من الأمراض المزمنة، مثل تصلب الشرايين والسرطان[34] في بعض البلدان تستخدم البامية في الطب التقليدي كعامل مدر للبول[35]. بذور القناوية غنية بالمركبات الفينولية و تملك فعالية مضادة للأكسدة، مضادة للالتهابات ومضاد للميكروبات.كما يساعد أيضًا محتواها العالي من الألياف على دعم مستوى السكر في الدم، مما يبطئ من امتصاص السكر في الدم الأمعاء. بالإضافة إلى ارتفاع نسبة حمض الفوليك في القناوية يلعب دورًا مهمًا في تكوين الأنبوب العصبي للجنين خلال الفترة من الأسبوع الرابع إلى الأسبوع الثاني عشر من الحمل. القناوية غنية أيضا بالبكتين الذي يمكن أن يخفض نسبة الكوليسترول المرتفع في الدم. من الاختبارات التي أجريت في الصين تشير إلى أن المستخلص الكحولي لأوراق البامية قد يكون صالحا في القضاء على الجذور الحرة من الأكسجين، وتقليل بروتينية الكلى وتحسين وظائفها[27].

- **صناعيا**

يتكون الجذع من الألياف التي تستخدم في صناعة الحبال، الحقائب، السلال، خطوط الصيد،فخاخ الألعاب كما تستخدم أيضا في صناعة النسيج والورق والورق المقوى[27].كما تستعمل بذور القناوية في اليونان كمصدر للزيوت الأساسية[36].

I.1.1.1.بعض الدراسات سابقة لنبات *A esculentus* L.

قام مجموعة من الباحثين بدراسات مختلفة على نبات *A esculentus* L. نذكر منها :

Dahli K-1 من الجزائر (2019) قامت بدراسة تأثير الإجهاد الملحي لمحلول كلوريد الصوديوم على إنتاش البذور (المحتوى الكلي للفينولات و السكريات) و النبتات الفتية. فوجدت من نتائج الدراسة الكيميائية النوعية للمستخلصين المائي و الإيثانولي احتواء بذور *A esculentus* L. على مجموعة كبيرة و متنوعة من المستقلبات الثانوية مثل التانينات، الفلافونيدات، الكومارينات، الأنتراكينونات، الصمغ و الصابونوزيدات. كما وجدت أن المحتوى الفينولي للبذور يتأثر بالإجهاد الملحي، و وجدت أن أكبر محتوى من السكريات كان لمستخلصات الجذور، أما أكبر محتوى من الفينولات كان للأوراق[12].

Rose Estelle KANFON et all-2 من البنين (2018) قاموا بدراسة الخصائص الفيزيوكيميائية و تقدير النشاط المضاد للجذور لمستخلصات لأنواع مختلفة من *A esculentus* L. المزروعة في البنين، فوجدوا أن كل الأنواع المدروسة غنية بالمستقلبات الثانوية، و أن قيمة IC_{50} (في اختبار DPPH) للمستخلصات كانت أكبر منها بالنسبة للمركبات المرجعية و بالتالي تبدي أقل فعالية مضادة للجذور[37].

Bibata KONATA et all-3 من واغادوغو بوركينا فاسو (2017) قاموا بدراسة العوامل الفيزيولوجية و البيوكيميائية لأنواع مختلفة من *A esculentus* L. النامية في الحقول الطبيعية. فوجدت أن أوراق و ثمار القناوية غنية بالمركبات الفينولية و تملك نشاط مضاد للأكسدة معتبر. كما وجدت أن هناك علاقة طردية بين النشاط المضاد للأكسدة و كمية الفينولات و الفلافونيدات المتواجدة في أجزاء النبات، و أن المحتوى الفينولي يتغير حسب مراحل تطور النبات[38].

Rakesh K Sindhu, Vishal Puri-4 من الهند (2016) قاما بتقدير المحتوى الكلي للفينولات و السكريات لقشور و بذور القناوية. فوجدا أن المحتوى الكلي للفينولات و السكريات الكلية للمستخلص الإيثانولي للقشور و البذور هو (1.25% و 43.1%) على التوالي. و وجدا أن محتوى مركبات الفلافونويد الكرسيتين و 3- إيزوكرسيتين و الأجنتيوبيوز هو (2.0267%، 5.35% و 2,741%) على التوالي، و هي تتواجد في البذور دون القشور. كما وجدا أن للمستخلصات تأثير مضاد للإلتصاق لبكتريا هيليكو باكتر بيلوري(H Pylori).كما قاما بتقييم التأثير المضاد للأكسدة باستخدام DPPH و كذلك التأثير الوقائي للكبد للمستخلصات على الفئران البيضاء. فوجدا أن قيم IC_{50} مستخلص نبات *A esculentus* L. بلغت (270.99 و 532.86 مكغ/ مل) على التوالي. و أن للمستخلصات تأثير وقائي للكبد[3].

Sathish Kumar Doreddula et all-5 من الهند (2014) قاموا بدراسة فيتوكيميائية و تقدير النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص المائي و الميثانولي لبذور القناوية. حيث بين الكشف الكيميائي الأولي للمستخلصين عن وجود قلويدات، الكربوهيدرات، الفلافونويد، الفينولات، البروتينات، التربينويدات، التانينات، والستيرولات، و عدم تواجد صابونين وجليكوسيدات في كلا المستخلصين. و كشفت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن وجود الكربوهيدرات، الفينولات و التربينويدات.

و وجدوا أن للمستخلصات نشاط مضاد للأكسدة و ذلك باستعمال اختبار DPPH و FRAP و β-carotene[39].

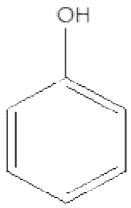
I.2.منتجات الأيض الثانوي

أطلق دارسو الكيمياء العضوية لفظ ''المنتجات الطبيعية"على المركبات العضوية من أصل طبيعي التي تنتج بواسطة النباتات و الكائنات الحية الدقيقة، و أكثر هذه المركبات أهمية تلك التي تؤدي دورا في التفاعلات الأيضية والتي يتم استخلاصها من النباتات[40].تنتج النباتات، بالإضافة إلى الجزيئات الأساسية، عددًا كبيرًا من المركبات التي لا تأتي مباشرة من التركيب النباتي، ولكنها تنتج من التفاعلات الكيميائية الثانوية، تسمى هذه المركبات المستقلبات الثانوية. يتم إنتاجها بكميات صغيرة جدًا، و تمثل هذه المنتجات الطبيعية المصادر الرئيسية للجزيئات النشطة بيولوجيًا. من بين المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيًا الموجودة في النباتات هناك فئة المركبات الفينولية التي تشمل البوليفينول والعفص والكينون والكومارين والفلافونويد[12].

I.1.2.المركبات الفينولية الطبيعية

I.1.1.2. تعريف

المركبات الفينولية أو متعددات الفينول هي عائلة كبيرة من مركبات جد معقدة يتكون هيكلها القاعدي من الأحماض الفينولية البسيطة.[42,41] و هي مركبات ذات هياكل بسيطة قليلة الانتشار في الطبيعة، و تعد في معظم الأحيان مكونات للزيوت الطيارة[43] تعرف المركبات الفينولية على أنها مجموعة من المواد الأيضية الثانوية، تتميز بنيتها بوجود حلقة عطرية أو أكثر مرتبطة بعدة مجاميع هيدروكسيلية حرة أو مرتبطة بمجاميع أخرى مثل الأستر أو الإيثر[45,44]. تكونت حلقاتها العطرية إما من حمض الشيكيميك أو عديد الأسيتات[46].



Phénole simple

الشكل(I-7):صيغة فينول بسيط

I.2.1.2.مصدر المركبات الفينولية

توجد الفينولات في العديد من الأطعمة ذات المصدر النباتي و تحديدا الفواكه تتراوح ما بين 100و500مغ/غ في بعض الفواكه مثل التفاح، العنب، الكرز، المشروبات (الشاي، القهوة، النبيذ) و الشكولاطة بينما توجد بصورة أقل في الخضر والحبوب، حيث تحتوي الخضر ما بين 25 و100مغ/غ. تعد الفواكه غير الناضجة غنية جدا بالمركبات الفينولية مثل(flavonols) يمكن الحصول عليها من البصل والتفاح، الفاصوليا الخضراء، الكرنب غير الناضج، نجد كذلك (isoflavones) في الشاي و(flavanones) في الحمضيات والتي يتراوح محتواها ما بين 250-6000 مغ/كغ [47]

I.2.1.3.الخصائص العامة للمركبات الفينولية

- الفينولات تذوب أساسا في المذيبات العضوية القطبية، و تذوب كذلك في محاليل هيدروكسيد الصوديوم و كربونات الصوديوم.
- كل الفينولات قابلة للتأكسد بسهولة خاصة في الأوساط القلوية.
- لها درجة غليان عالية بسبب احتوائها على روابط هيدروجينية بين جزيئاتها.
- تتأكسد بالهواء و الضوء كجميع منتجات الأيض الثانوي الأخرى.
- تتميز الفينولات بالخاصية المرجعية و الاستقرارية التي تسمح لها بأن تكون أهم مضادات الأكسدة الطبيعية.
- تتميز متعددات الفينول اللاسكرية Polyphénoles Aglycones بكونها محبة للدهون، تستخرج بواسطة مذيبات متوسطة القطبية (CH_2Cl_2)، عند وجود OH حرة في الفينول تكون ذوبانيته عادة في المحاليل المائية القاعدية[48].

I.2.1.4.تصنيف المركبات الفينولية

هناك العديد من التصنيفات للمركبات الفينولية التي قسمتها إلى مجموعات، إذ صنفها العالم (Dacosta) حسب بنيتها إلى أقسام: الأحماض الفينولية، الفلافونويدات، التانينات و الصابونيات [49]، أما العالمان (Harborne) و (Simmonds) فصنفاها حسب انتشارها و تعقيدها إلى عائلة المركبات الفينولية قليلة الانتشار (فينولات بسيطة)، وأخرى واسعة الانتشار (أحماض فينولية، الفلافونيدات، الكومارينات) و المركبات الفينولية على شكل بوليمرات[50]. تمثل الأحماض الفينولية والفلافونيدات الأقسام الأكثر انتشارا[45]. و الجدول (I.3) يوضح بعض أصناف عديدات الفينول:

الجدول(I.3):يوضح بعض أصناف عديدات الفينول [51].

الهيكل الكربوني	الصنف	مثال	المصدر
C6	فينول بسيط (Simple phenols)	كاتيشول (Catechol)	
C6-C3	أحماض الهيدروكسي بنزويك (Hydroxy benzoic acids)	بارا هيدروكسي بنزويك (p-Hydroxy benzoic)	البهارات، الفراولة
C6-C3	أحماض الهيدروكسي سيناميك (Hydroxy cinnamic acids)	حمض الكافييك (Caffeic acid) ، حمض الفيريليك (Ferulic acid)	البطاطا، التفاح
	الكومارينات (Coumarins)	سكوبوليتين (Scopoletin)، إسكيليتين (Aesculetin)	الحمضيات
C6-C2-C6	السيلان(Silenus)	ريسفيراترول (Resveratrol)	الكروم
C6-C3-C6	الفلافانويدات (Flavonoids)		
	الفلافونول (Flavonols)	الكامفيرول (Kampherol)، الكرسيتين (Quercetin)	فواكه، خضر، أزهار
	الأنثوسيان (Anthocyanins)	السيانيدين (Cyanidin)، بيلارغونيدين (Pelargonidin)	الأزهار، الفوكه الحمراء
	الفلافانول (Flavanols)	الكاتيشين (Catechin) ، إبيكاتيشين (Epicatechin)	التفاح، العنب
	الفلافانون (Flavanones)	نيرانجينين (Naringenin)	الحمضيات
	الإيزوفلافونول (Isoflavonols)	دايدزين (Daidzein)	الصويا
(C6-C3)2	الليقنان (Lignans)	بينوريزينول (Pinoresinol)	الصنوبر
(C6-C3)n	الليقنين (Lignins)		الخشب، نواة الفواكه
(C15)n	التانينات (Tannins)		العنب الأحمر، البرسيمون

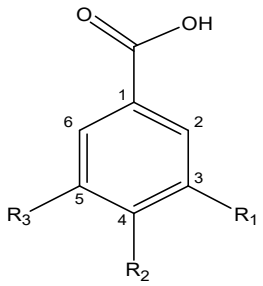
I.2.1.5.الأحماض الفينولية

تعتبر من المركبات الفينولية كثيرة الإنتشار، وهي المركبات التي تملك على الأقل وظيفة كربوكسيلية (COOH)، وتشتق إما من حمض البنزويك benzoic acid أو حمض السيناميك cinnamic acid.

أ) بنية وتصنيف الأحماض الفينولية

الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك

تمتلك الهيكل الأساسي(C_6-C_1) كما في الشكل (8.I)، وتكون حرة أو مرتبطة أو في حالة سكريات أو أسترات[52] .



الشكل (8.I):الهيكل الأساسي للأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك.

بعض الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك مبينة في الجدول التالي:

الجدول (4.I): الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك.

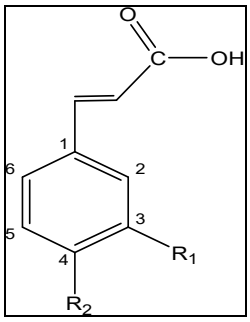
R3	R2	R1	الإسم
H	OH	H	حمض-4-هيدروكسي Hydroxy-4- benzoic acid
H	OCH_3	H	حمض-4-ميثوكسي بنزويك Methoxy-4-benzoic acid
H	OH	OH	حمض بروتوكاتشيك Protocatechuic acid
OH	OH	OH	حمض الغاليك Gallic acid
H	OH	OCH_3	حمض الفانيليك Vanillic acid

الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك

تملك الهيكل الأساسي (C_6-C_3)، و الأكثر إنتشارا هي أحماض الكوماريك، الكافييك، الفيريليك والسينابيك، أما بقية الأحماض مثل 2-comaric-acid فهي أقل تواجدا ونادرا ما تكون حرة[52].

أحماض السيناميك توجد على شكل متماكبات (diastereoisomers E et Z) بسبب وجود رابطة مزدوجة في الجذر الجانبي، حيث أن التشكيلة E أكثر تواجدا لأنها أكثر استقرارا ترموديناميكيا. وتوجد في شكل أسترات أو سكريات[53].

وتشمل أحماض السيناميك أربعة مركبات لا يكاد عضو نبات يخلو تقريبا من أحدها على الأقل وهي: أحماض الفيريليك، السينابيك (OCH_3 في الموقع 5) الكافييك، الكوماريك[52].



الشكل (9.I):الهيكل الأساسي للأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك.

بعض الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك مبينة في الجدول التالي:

الجدول(5.I):الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك.

الإسم	R1	R2
حمض p-كوماريك p-Coumaric acid	H	OH
حمض الكافييك Caffeic acid	OH	OH
حمض الفيريليك Ferulic acid	OCH_3	OH
حمض إيزوفيريليك Isoferulic acid	OH	OCH3

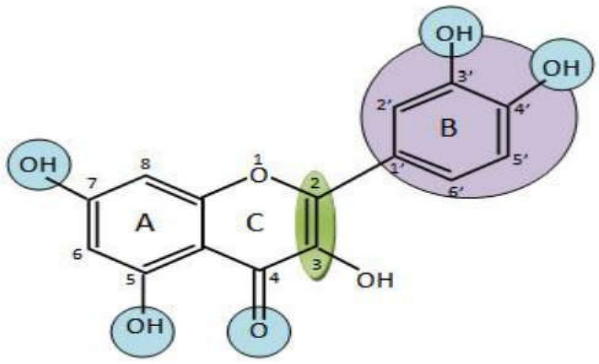
ب) الخصائص الفيزيائية والكيميائية للأحماض الفينولية

- الفينولات تنحل أساسا في المذيبات العضوية القطبية،وتذوب كذلك في محاليل هيدروكسيد الصوديوم وكربونات الصوديوم.
- الأحماض الفينولية تذوب و تستخلص بمذيبات عضوية قطبية في وسط حمضي مخفف،كذلك كل الصيغ المستبدلة (Heterosides) للمركبات الفينولية تذوب في الماء.
- كل الفينولات قابلة للتأكسد بسهولة خاصة في الأوساط القلوية،حيث أن أحماض السيناميك تعطي تراكيب تظهر تحت تأثير الأشعة فوق البنفسجية.
- عندما يتأكسد حمض السناميك في الوضع أورثو للسلسلة الجانبية له وتكوين حلقة اللاكتون مع نزع جزىء من الماء سوف يؤدى ذلك لتكوين الكومارين الذي يعتبر فسيولوجيا أنشط من الفينولات فهو المسؤول عن تثبيط نمو الكائنات الدقيقة التي قد تهاجم النبات[52].

I.2.1.6.الفلافونيدات

كلمة الفلافونيدات مشتقة من اللفظ اللاتيني flavus التي تعني اللون الأصفر وهي عبارة عن صبغات ملونة تنتشر في معظم الأصناف النباتية(إلا أن وجودها قليل في الطحالب السرخس) خاصة عند كاسيات البذور، تتمركز بصفة خاصة في الجزء الهوائي من النبات على شكل مركبات ذات أساس سكري (وجود السكر في الجزيئة يكسبها القدرة على الإذابة من الماء)أو على شكل مركبات حرة في الفجوات و السيتوبلازما والأغشية الليفية تم استخراج أكثر من 4000 فلافانويد طبيعي.

و الفلافونويدات هي مركبات ملونة عموما ذات كتل جزيئية منخفضة تتميز بهيكل أساسي يحتوي على 15 ذرة كربون موزعة على حلقتين عطريتين A وB مرتبطتين بحلقة C غير متجانسة تحتوي على ذرة أوكسجين من الصيغة C6-C3-C6 [45]كما هو موضح فيما يلي:



الشكل(I.10):الهيكل الأساسي للفلافونويدات و أهم المواقع المتدخلة في تأثيراتها الحيوية [54,45].

الخصائص الفيزيائية والكيمائية للفلافونويدات

- الفلافونويدات مركبات ملونة، وهي تتواجد في جميع أجزاء النباتات الراقية حيث تتواجد بكثرة في الجزء الهوائي وخاصة الأوراق و الأزهار إذ تسبب تلوين هذه الأخيرة.
- تعتبر الفلافونويدات مركبات ذات صفة حامضية ضعيفة تذوب في القواعد القوية، وتتصف الفلافونيدات التي تحمل عددا كبيرا من مجموعات هيدروكسيل حرة أو سكر بالصفة القطبية، وبالتالي فهي تذوب في المذيبات القطبية مثل(الميثانول، الإيثانول، الأستون و الماء)[55].
- المركبات الأقل قطبية مثل الإيزوفلافونات والفلافونات التي تحمل عدد أكبر من مجاميع الميثوكسيل فإنها تذوب في الكلوروفورم أو الإيثر[56,55].

I.2.1.7.أهمية الفينولات و الفلافونيدات

أهمية الفينولات بالنسبة للنبات

بالرغم مما تقدمه المركبات المستخلصة من النباتات من فوائد عظيمة للإنسان، فإن دورها للنبات نفسه لم يكن معروفا، فكثفت الأبحاث على زراعة الأنسجة النباتية داخليا (التجارب التي تحدث على النبات وهو يقوم بجميع وظائفه in vivo)

وخارجيا (التجارب التي تتم داخل أنابيب الاختبار in vitro) أدت إلى معرفة الدور الفسيولوجي لمنتجات الأيض الثانوي، فهي تؤمن العيش للنبات في ظروف حياته القاسية. يكمن دور الفينولات في مراقبة نمو تطور النباتات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة وذلك بتشكيلها معقدات مع هرمون النمو وقد لوحظ أيضا أن الفينولات تلعب دورا في وقاية النباتات من الأمراض التي تسببها البكتيريا والفطريات فهي مبيدات للحشرات أو مضادات حيوية، فبعض النباتات تفرز مركبات فينولية على مستوى الأوراق والجذور كمواد سامة ضد نمو النباتات الطفيلية.

الفاعلية المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية

تمتلك المركبات الفينولية خصائص مضادة للأكسدة قادرة على كنس الجذور الحرة الناجمة عن (التدخين، والتلوث)،حيث أن حماية القلب والأوعية الدموية بالمركبات الفينولية أصبحت الأكثر رسوخا.

يتم امتصاص المركبات الفينولية من خلال الحاجز المعوي ومن ثم الوصول إلى الأنسجة المستهدفة، حيث يمكن أن تؤدي إلى وقاية الجسم من تعرضه للأكسدة، والأمراض المختلفة مثل أمرض القلب والسرطان وأمراض الأعصاب[52].

ولأن الفلافونويدات من أهم الفينولات المضادة للأكسدة فإنها تقوم على تثبط الأكسدة الفوقية للبيدات في المرحلة الإبتدائية باقتناصها لجذور الهيدروسكيل وذلك لقدرتها على التداخل مع الطبقة ثنائية اللبيد للغشاء الخلوي، كما تنهي سلسلة تفاعلات الجذور الحرة وذلك بإعطائها ذرات الهيدروجين لجذور البيروكسيٌ ROO• (proxy) أو RO• (alkoxyl) مشكلة بذلك جذر الفلانويد [54].

وفي المجال الاقتصادي لها أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية حيث تستعمل كمضادات للتأكسد ومثبطات للإنزيمات كما يتم استعمالها في صناعة مواد التجميل حيث تحمي البشرة الخارجية من الأشعة فوق البنفسجية [52].

الفعالية البيولوجية للمركبات الفينولية

تملك خصائص علاجية متنوعة إذ تؤدي دورا كبيرا في ميدان الطب والصيدلة لما لها من تأثيرات على الكائنات الحية عامة،وعلى الإنسان خاصة فهي تحمي الأوعية الدموية، مضادة للالتهابات منها مثبطة ومنها محفز للإنزيمات، مضادة للأورام.تحتوي الفينولات على المجموعات الهيدروكسيلية (OH) فكلما كثر وجودها في المركب زادت في نشاطه المضاد (المقاومة للأورام)، تعد مخالب (مفخخة) للجذور الحرة فهي تمنح الهيدروجين ليوقف عملية انتشار الجذور.

بالإضافة إلى خصائصها المضادة للأكسدة تعمل بعض الفلافونويدات كعوامل ممخلبة للمعادن metal-chelating وبالتالي تثبط تفاعل fenton الذي يعتبر مصدر مهم لإنتاج الجذور الأوكسجينية النشطة. أيضا تعمل على التقليل من نفاذية وهشاشة الشعيرات الدموية، إذ أنها ضرورية للبنية الطبيعية والوظيفية للشعيرات الدموية. وكذلك فإن لها دورا مضادا للالتهاب نظرا لتداخلها مع ميتابولزم حمض الأراشيدونيك.كما أن الفلافونويدات تلعب دورا في تثبيط تطور السرطان، حيث تعمل على تنظيم التكاثر الخلوي من خلال تثبيطها لطرق التنبيه الداخل خلوي، كما تعمل على تحريض الموت المبرمج للخلايا السرطانية[54].

عموما الفلافونويدات هي مركبات غير سامة و متقبلة لدى الإنسان، إن كمية 1 غ من المركبات الفلافونيدية المختلطة كافية من الناحية الصيدلانية لتفي احتياجات الأنسجة من هذه المواد وعدم الوقوع في الأمراض[52].

ونبين في الجدول أدناه بعض المركبات الفينولية التي تستعمل لعلاج العديد من الأمراض:

الجدول(6.I): بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب و الصيدلة [52].

المركب الفينولي	الفعالية البيولوجية
الكومارينات	حماية الأوعية الدموية مضاد للأمراض الجلدية (البهاق)
الفلافونيدات	مضاد للالتهاب مضاد للسرطان يخفض ارتفاع ضغط الدم مدر للبول مضاد للأكسدة تمنع تخثر الدم
التانينات المتراكمة و متحللة	مضادات للأكسدة
الأحماض الفينولية	مضاد البكتيريا مضاد للطحالب. مضاد للأكسدة
Proanthocyanidins	تمتن العظام مضاد للسرطان مضاد للالتهابات
Phytoestrogen	مكمل غذائي

تمتلك المركبات الفينولية أهمية كبيرة من حيث أنها مضادات للأكسدة، وقد عنيت هذه الخاصية بكثير من الدراسات السابقة والحالية، كما أن للفينولات فعالية بيولوجية عالية جدا خاصة فعاليتها المضادة للبكتيريا، فهذه المركبات تساهم طبيعيا بشكل كبير في حماية النباتات من البكتيريا. إذ أن المركبات الفينولية وخاصة الفلافونويدات تتداخل مع الأحماض النووية وتثبط تركيب الDNA و الـ RNA للبكتيريا [53].

المراجع

المراجع العربية

45- جروموني م. « دراسة التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات نبتتي الحرمل *Peganum harmala* و الجعدة *Chamaecyparissus Santolina* ». مذكرة دكتوراه، جامعة فرحات عباس1، سطيف،(2014).

المراجع الأجنبية

1- Chabrier J Y.«Plantes Médicinales et Formes D'utilisation en Phytothérapie». Thèse de doctorat en pharmacie, Universite Henri Poincare - Nancy 1, France, (2010).

2- Chidozie O M. Onosigbere-Ohwo U and Edwin O M. Morphological Characterization of Okra (*Abelmoschus* [Medik.]) Accessions. Makara Journal of Science, 22(2),(2018), 67-76.

3- Sindhu R K. Puri V. Phytochemical, Nutritional and Pharmacological evidencesfor *Abelmoschus esculentus* (L.), The Journal of Phytopharmacology, 5(6),(2016), 238-241.

4- G De Lannoy. Gombo *Abelmoschus esculentus* L. Moench. In Agriculture en Afrique Tropicale. Legume. Direction Générale de la Coopération Internationale (DGCI), (2001), 478-484.

5- Hamon S. Etude de la variation génétique des espèces cultivées et des espèces spontanées du genre *Abelmoschus* (Gombo) non originaires d'Afrique de l'Ouest. Rapport de Convention IBPGR, Rome–ORSTOM, Paris Cedex, 87(42), (1989), 84.

6- Marius C. Gerard V. Antoine G. Le gombo, *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, une source possible de phospholipids. Agronomie et biotechnologies, Oleagineuse, corps gras, lipides, 4(5), (1997), 389-392.

7- Saifullah M and Rabbani M G. Evaluation and characterization of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.) genotypes. SAARC J Agric ,7, (2009), 92-99.

8- Singha P. Chauhan V. An overview on okra (*Abelmoschus esculentus*) and its importance as a nutritive vegetable in the world, 4(2), (2014), 227- 233.

9- Naveed A. Khan A A and Khan I A. Generation mean analysis of water stress tolerance in okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Pak J Bot, 41, (2009), 195-205.

10- Guignard J L. Botanique, Ed Masson, France, (1993), 27.

11- El Tahir I M. Catalogue of okra (*Abelmoschus ssp*) Genetic Ressources in Sudan. Agricultural Research Corporation-Sudan, (2018).

12- Dahli K. «Action combinee d'un herbicide et de la salinite sur la germination (*Abelmoschus esculentus* L.) ». Thèse de doctoraten sciences biologiques, Universite d'oran, Algerie, (2019).

13- Weniger. B. a caballo pharmacopée végétale caribéénne, Paris, France, (1999).

14- Siemonsma J S. Hamon S. *Abelmoschus esculentus* L. Moench. In; Ressources végétales de l'Afrique Tropicale 2. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas, (2004), 25-30.

15- Rohwer T G. Guide des plantes Tropicales. In: Delachaux et Niestle, Eds, (2012), 266.

16- Achoure A.«Caractérisation physiologique et biochimique du gombo (*Abelmoschus esculentus* (L.)) sous stresse salin».Thèse de Doctorat, Université d'Oran, Algerie, (2016).

17- Ouis M. «Recherche des marqueurs biochimiques de la tolérance à la salinité chez le gombo (*Abelmoschus esculentus* L) ».Thèse de doctorat, Universite d'oran, Algerie, (2016).

18- Charrier A. Hamon S. tropical Plant Breeding. Editions Quae, Versailles, France, (2001), 315.

19- Sorapong B. okra (*Abelmoschus esculentus*(L) Moench) as a valuable Vegetable of the World. Ratar Povrt, 49, (2012), 105-112.

20- Huang Z. Wang B. Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African American sin United States. Food Chemistry, 103, (2007), 402-1395.

21- Shui G et Peng L L. An improved method for the analysis of major antioxidant of *Hibiscas esculentus* Linn. Journal of Chromatography A, 1048(1), (2004), 17-24.

22- Dikeman C L. Fahey G C. Viscosity as related to dietary fiber: a review. Crit Rev Food Sci Nutr, 48(8), (2006), 63-649.

23- Fernandez M L. Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effect on plasma lipids and cardiovascular risk. Cum Opin Lipidol, 12(1), (2001), 35-40.

24- Nzikou J M. Mvoula T. Matouba E. Ouamba J M. Kapseu C. Parmentier M et Desobry S. A study on gumbo seed grown in Congo Brazzaville for its food and industrial application. African Journal of Biotechnology, 5(24), (2006), 2469-2475.

25- Benchasri S. Okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) as a valuable vegetable of the world. IFVC, Ratar, Povrt, 49, (2012), 105-112.

26- Arturo D F. Alfredo S. Ortegon M and Jessus L G. Fruit Characteristies and Yeild of a New Okra Hybrids. Subtropical plant Science, 49, (1997), 8-11.

27- Rahim Guealla H. «Reponses hydriques et physiologiques du gombo (*Abelmoschus esculentus* L) conduit sur substrat bentonise sous contrainte saline». Thèse de doctorat, Universite de Mostaganem, Algerie, (2019).

28- Chidozie O M. Osawaru M E. Aiwansoba R O & Iroh R N. Ethnobotany and Collection of West African Okra [*Abelmoschus caillei* (A. Chev.) Stevels] Germplasm in Some Communities in Edo and Delta States, Southern Nigeria. Borneo Journal of Resource Science and Technology, 6(1), (2016), 25-36.

29- Akanbi W B. Togun A O. Adeliran J A. Ilupeju E A O. Growth dry matter and fruit yields components of okra under organic and inorganic sources of nutrients. American-Eurasian J. Sustain. Agric, 4, (2010), 1-13.

30- Adilakshmi A. Korat D M. Vaishnav P R. Effect of organic manures and inorganic fertilizers on insect pests infesting okra. Karnataka J. Agric. Sci, 21, (2008), 287-289.

31- Akande M O. Oluwatoyinbo F I. Makinde E A. Adepoju A S. Adepoju I S. Response of okra to organic and inorganic fertilization. Nature Sci, 8, (2010), 261-266.

32- Saifullah M. Rabbani M G. Evaluation and characterization of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench.) genotypes. SAARC J, Agric, 7, (2009), 92-99.

33- Mihretu Y. Wayessa G. Adugna D. Multivariate Analysis among Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) Collection in South Western Ethiopia. Journal of Plant Sciences, 9(2), (2014), 43-50.

34- Gosslau A. Chen K Y. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. Nutrition, 20, (2004), 95-102.

35- Gurbuz I,. Antiulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey. Journal of Ethnopharmacology, 88(1), (2003), 93-97.

36- Sorapong B. Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) as a Valuable Vegetable of the World. Ratar, Povrt, 49, (2012), 105-112.

37- Kanfon R E. Gnawe M. Agbangnan Dossa C P. Yedomonhan H. Wotto D V et Sohounhloue C K D. Caractérisation physico-chimique et évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits de sept morphotypes de gombo(Abelmoschus spp.) cultivés au Bénin Int. J Biol Chem Sci, 12(3), (2018), 1447-1458.

38- Konate B. Nana R. Zongo K J. Badiel B. Nanema S L and et Tamini Z. Evaluation of agro-physiological and biochemical parameters of a variety and four accessions of gombo [*Abelmoschus esculentus* (L.) moench] grown undernatural field conditions. International Journal of Recent Scientific Research, 8(10), (2017), 21154-21162.

39- Sathish K D. Srinivasa R B. Durga P G. Brahma Srinivasa R D. Nadendla R and Vijayapandi P. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antistress, and Nootropic Activities of Aqueous and Methanolic Seed Extracts of Ladies Finger (*Abelmoschus esculentus* L.) in Mice. The Scientific World Journal, 2014, (2014), 1-14.

40- Hhurableille M. Abrégé De Matière Médicale, Pharmacognosie, Tom1 Généralisés, Mongraphies, Masson, (1980),10-18 ,261-266.

41- Hopkins W G. Physiologie végétale, Ed De Boeck Université, Belgique, (2003), 267-280.

42- Hennebelle T. Sahpaz S. Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, 1, (2004), 3-6.

43- Grotwold E. The science of flavonoids. Kindle Edition, French, (2006),1-123.

44- Manach C. Scalbert A. Morand C. Remesy C. Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability, American Journal of Clinical Nutrition, 79, (2004), 727-747.

46- Bruneton J. pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 3eme édition Technique et Documentions, paris,(1999).

47- Abdel ghafour M. radiolyse gamma des flavanoides, étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools formation de depsides. Thèse de doctorat, Universite de Limoges, France,(2003).

48- Nkhili E. Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec lésions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxidant. Thèsede doctorat, Université Cadi Ayyad, Marrakech, (2009).

49- Idrissi Hassani M L, Hermas. J, Effects of Peganum harmala L. (Zygophyllaceae) feeding on the digestive track of the migratory locust Schistocerca gregariaForsk, (Orthoptera, Acrididae). Zool, Baetica, 19,(2008), 71-84.

50- Monsef. H.R, Ghobadi. A, Iranshahi. M, Abdollahi. M, Antinociceptive effects of Peganum harmala L. Alkaloid extract on mouse formalin test, J Pharm Pharmaceut Sci,4, P65,(2004).

51- Boubekri C. «Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques».Thèse de doctorat, Université Mohamed Khider,Biskra, (2014).

52- Bruneton J. Pharmacognosie-phytochimie plantes médicinales, 3eme edition Technique et documentation, paris 1999.

53- Salah Eddine Laouini, « Etude du plan phytochimique et l'activité biologique d'extrait de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'OuedSouf) ». Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider. Biskra. (2014).

54- Cazarolli L H, Zanatta L, Alberton E H, Figueiredo M S, Folador P, Damazio RG, Pizzolatti M G and Silva F R. Flavonoids : prospective drug candidates. Mini Rev Med Chem, 8, (2008), 1429-1440.

55- Satyajit D, Chemistry for Pharmacy Students, John Wiley & Sons Ltd, England, (2007).

56- Bronner WE, Beecher GR. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grape fruit juice concentrates. Journal of Chromatography, 705,(1995), 247-256.

الفصل الثاني

عموميات حول الجذور الحرة

و مضادات الاكسدة و البكتيريا

II.1. الجذور الحرة و مضادات الأكسدة

عندما تتلاقى الرطوبة مع الحديد فإنه يخضع لعملية كيميائية تسمى الأكسدة و التي ينتج عنها قشرة حمراء المعروفة باسم الصدأ. عملية الأكسدة هذه التي تجعل المعدن يصدأ تعمل بنفس الطريقة داخل أجسامنا و تعرف الأكسدة بأنها تفاعل يتم فيه فقدان إلكترون أو أكثر، تصبح بعدها الجزيئات التي فقدت إلكتروناتها نشطة جدا و طلقة تسمى بالجذور الحرة[1].

II.1.1. الجذور الحرة

هي عبارة عن جزيء (أو ذرة) يحتوي على واحد أو أكثر من إلكترونات المنفردة مما يجعلها غير مستقرة وشديدة التفاعل. ويمكن للجذور الحرة أن تجرد المركبات الأخرى من الإلكترونات لتحقيق الاستقرار، وبهذا يفقد الجزيء الذي تمت مهاجمته إلكترونه، ويصبح جذرًا حرًا في حد ذاته، ويبدأ سلسلة متتالية من التفاعلات التي تضر الخلية الحية.

II.1.2. نشأة الجذور الحرة وأضرارها

الجذور الحرة و فعلها العكسي اكتشفت في العشرية الأخيرة، هذه المواد الخطيرة تنتج في الجسم دائما مع التسمم و تتشكل خلال معالجة الأيض الطبيعي في الجسم كجزء من المسالك الأيضية و التي تعدل نشاطيتها بوجود نظام مضاد للأكسدة مثل catalase ، peroxidase glutathion، dismutase superoxyde و نظام لا إنزيمي مثل الفيتامينات C و E و الفلافونويدات و غيرها من المواد الطبيعية، إلا أن عدم التوازن بين المؤكسدات و مضادات الأكسدة يؤدي إلى حدوث الإجهاد التأكسدي [2].

يتحصل الجسم على الطاقة بأكسدة الكربوهيدرات و الدهون و البروتينات خلال الطريقة الهوائية و اللاهوائية التي تقود إلى نشوء الجذور الحرة، أو تكون من مصادر خارجية مثل التلوث و دخان السجائر والإشعاع والمواد الكيميائية. إن الزيادة في هذه الجذور يمكن أن تكون مسئولة على تلف النسيج[3].تهاجم الجذور الحرة الجزيئات المهمة مما يؤدي إلى تلف الخلايا، وتشمل أهدافها جميع أنواع الجزيئات في الجسم، مثل الدهون، الأحماض النووية والبروتينات. ويعتقد بأن الجذور الحرة تلعب دورا في العديد من الأمراض والحالات مثل[4,3]:

- الشيخوخة.
- السرطان.
- أمراض القلب والأوعية الدموية.
- الأمراض العصبية مثل ألزهايمر.
- مرض الرئة مثل الربو ومرض الانسداد الرئوي المزمن.
- التهاب المفاصل الروماتويدي.

- مرض الكلى.
- الضمور البقعي المرتبط بالعمر.
- إعتام عدسة العين.
- داء السكري الذي هو نتاج الإجهاد التأكسدي.

II.3.1. أسباب زيادة الجذور الحرة

يزيد تشكل الجذور الحرة بزيادة سرعة الإستقلاب و في حالة التوتر "stress oxydant"، و كذلك يزيد بزيادة عوامل التلوث البيئي المختلفة التي يتم تحطيمها في الجسم فتتحول إلى جذور حرة، و تزيد أشعة الشمس و الأشعة السينية و التدخين بجميع أنواعه من إنتاج الجذور الحرة.كذلك كثرة استهلاك الدهون و السكريات تحفز إنتاجها و يزيد الإجهاد و استهلاك الأكسجين خلال التمارين الرياضية العنيفة من تكاثرها [1].

II.4.1. مضادات الأكسدة

II.1.4.1. تعريف مضادات الأكسدة

إن التغيرات التي تحدثها الانفعالات التأكسدية على المستوى الخلوي تؤدي إلى العديد من الأمراض لذلك توجد بعض المركبات التي تستطيع أن تحمي أو تؤخر أكسدة الجزيئات الأخرى تعرف بمضادات الأكسدة والتي تعرف على أنها كل مادة لها نشاط ضد الأضرار التأكسدية[5].

II.2.4.1. تصنيف مضادات الأكسدة

تصنف مضادات الأكسدة إلي قسمين هما:

أ) مضادات الأكسدة الطبيعية

تؤثر مضادات الأكسدة بطريقة فعالة وتلقائية على المواد المؤكسدة من أهمها المركبات ذات المصدر الغذائي مثل المواد الكبريتية و عديدات الفينول و الفيتامين Cو الفيتامين E وغيرها كما يمكن لمضادات الأكسدة أن تكون داخلية المنشأ مثل coenzyme Q والميلاتونين وحمض اليوريك تتميز مضادات الأكسدة داخلية المنشأ بأوزان جزيئية منخفضة و لها القدرة على الوقاية من أضرار الإجهاد التأكسدي أو الحد من أضراره.

ب) مضادات الأكسدة الاصطناعية

تعتبر العناصر التي يجب إضافتها للأطعمة المصنعة كمواد حافظة للنكهة أو اللون أو القيمة الغذائية لأنها تتأكسد قبل غيرها، و تستعمل في صناعة المطاط و المشتقات البترولية. و رغم عدم وجود دراسات تثبت سلامة استعمالها إلى أنها

مازالت تستعمل كبديل لمضادات الأكسدة الطبيعية لانخفاض تكلفتها. و من أشهر مضادات الأكسدة الصناعية نجد[7,6]:

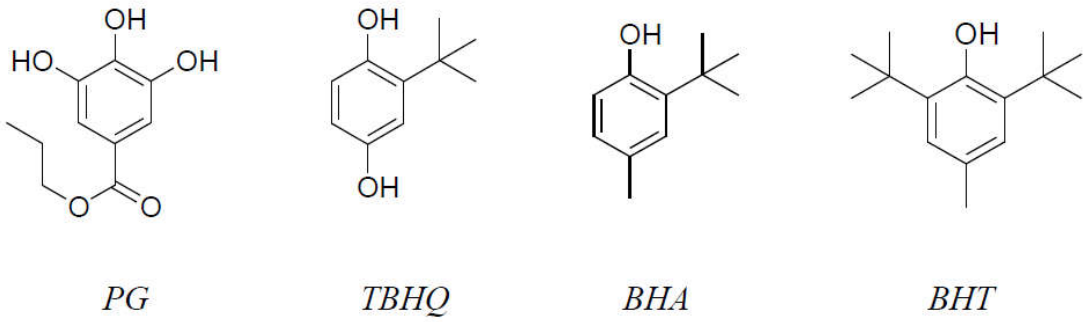
بيوتيل هيدروكسي أنيزول ((BHA)، (Butylhdroxyanisole

بيوتيل هيدروكسي طولوين ((BHT) (Butylhydroxytoluene

تترا بيوتيل هيدروكينون ((TBHQ) (Tetra-butylhydroquinone

بروبيل غالات ((PG) (Propylgallate

الغالات (Gallate)



الشكل (II-1): بنى بعض مضادات الأكسدة الاصطناعية

الفينولات و الجذور الحرة و النشاط المضاد للأكسدة

إن أهم مميزات عديدات الفينول هو نشاطها المضاد للأكسدة و الناتج أساسا عن خاصيتها القابلة للأكسدة و الإرجاع، و بذلك فهي تعمل على الوقاية من الإجهاد التأكسدي الناتج عن الجذور الحرة[8]. تستطيع عديدات الفينول تعديل الجذور الحرة بإعطاء إلكترونات أو ذرات هيدروجينية، ويرتبط التأثير المضاد للأكسدة ببنية المركبات الفينولية، حيث أن إضافة مجموعة الهيدروكسيل على مستوى الكربون 3 لمركبات الفلافانول يجعلها مضادات أكسدة قوية، كما يمكن أن تؤثر المركبات الفينولية بالإزاحة المباشرة للجذور الحرة المتسببة في أكسدة الليبيدات. بالإضافة إلى هذا يمكن أن تستعمل عديدات الفينول كملتقطات للمعادن مثل الحديد وبذلك تحد من تفاعلات fenton المتسببة في إنتاج جذر الهيدروكسيل الذي يعتبر من أخطر الجذور الحرة يمكن لعديدات الفينول أيضا أن تؤثر كمساعدات لمضادات الأكسدة الأخرى عن طريق إعادة تجديد الفيتامينات، وتقوم بتحفيز الإنزيمات المضادة للأكسدةglutathion peroxidase و catalase و dismutase-superoxide التي تخلص من جذور الهيدروبيروكسيد و H_2O_2 و O_2 على التوالي[9].

II.2.الفعالية المضادة للبكتيريا

منذ نشأة البشرية يتعرض الإنسان إلى كائنات دقيقة تكاد تغطي كل عضو من أعضائه، من الطبقة الخارجية للجلد إلى أعضائه الداخلية، ومن بينها الميكروبات التي تشمل البكتيريا، الفطريات، الفيروسات. إن أول من اكتشف البكتيريا هو

العالم الكيميائي الفرنسي لويس باستور (Louis Pasteur) في عام 1859 فقد اكتشف البكتيريا الهوائية و اللاهوائية من خلال تجاربه على التخمر، و اكتشف أيضا طعومها. أما العالم الألماني روبرت كوخ (RobertKoch) فقد عمل على اكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض وهو أول من عمل مزارع نقية للبكتيريا، حيث ارتبط اسم البكتيريا مع الأمراض المسببة لها، إلا أن العلوم الحديثة أثبتت أن البكتيريا تلعب دورا هاما في الصناعات الغذائية و الدوائية والتخلص من المواد العضوية وغير العضوية[10].

II.1.2. مفهوم البكتيريا

هي عبارة عن كائنات دقيقة الحجم لا ترى إلا بالمجهر وموجودة في كل مكان حولنا في التربة في الهواء و في الأغدية وداخل وخارج أجسامنا حيث أن الكائنات الدقيقة تعتبر أكثر عددا من الكائنات الحية، أحادية الخلية بدائية النواة (Procaryote)، تكون إما كروية أو عصوية أو حلزونية حيث يتراوح طولها بين الميكرومتر الواحد إلى بضعة أعشار الميكرومتر[10]، حيث أنها تستطيع العيش لمدة طويلة وتتحمل جميع الأحوال غير المناسبة من إرتفاع درجة الحرارة إلى انخفاضها وغيرها من الظروف القاسية[11].

II.2.2. تسمية البكتيريا

تسمى البكتيريا بأسماء ثنائية (Binominal) بحيث يشير المقطع الأول من الاسم إلى الجنس و المقطع الثاني إلى النوع. وقد يحمل اسم الجنس شكل البكتيريا،كما هو الحال في (*Staphylococcus*،*Streptococcus*) أو اسم مكتشفها مثل (*Escheriche.coli*). أما بالنسبة للنوع فقد يشير إلى المرض كما هو الحال (*Vibrio Cholerae*)(Cholerae) أو مكان عزلها كما هو الحال في (*E. coli*) تعزل في (une Cole)، أو قد يحمل صفات اللون مثل(*Staphylococcus aureus*) أي ذهبية[12].

II.3.2. مبادئ تصنيف البكتيريا

الهدف الأساسي من تصنيف البكتيريا هو التعرف على الأنواع المختلفة للبكتيريا وتشخيصها و وضع أسمائها في مجموعات لدراسة كل من العلاقة فيما بينها، وطبيعتها الوراثية، ولذا صنف العلماء البكتيريا لعدة اعتبارات وهي:

II.1.3.2. من حيث الشكل[10]

البكتيريا الكروية

وهي البكتيريا التي تأخذ شكل الكريات الصغيرة، حيث يتراوح قطرها nm0,1 إلى nm4 و يطلق عليها باللاتيني Coccus ولها عدة أشكال منها:

- كروية متجمعة بشكل سبحة (بكتيريا سبحية) Streptococci.

- كروية عنقودية Diplococci.

البكتيريا العصوية

وهي البكتيريا التي تأخذ شكل العصيات صغيرة يطلق عليها باللاتيني .Bacillus

البكتيريا الحلزونية

وهي البكتيريا التي تأخذ شكل حلزوني تدعى باللاتيني Spirillus.

البكتيريا الواوية

وهي البكتيريا التي تأخذ شكل الواو (الضمة) باللاتيني Vibrio. [10]

II.2.3.2. من حيث توزيع أسواطها[10]

بكتيريا وحيدة السوط

بها سوط واحد يخرج من أحد قطبي الخلية البكتيرية.

بكتيريا متعددة الأسواط

هذا النوع ينقسم إلى قسمين:

- متجمعة على طرف واحد.
- موزعة على كل الخلية.

II.3.3.2. من حيث الوسط الذي تعيش فيه[10]

بكتيريا هوائية (Aerobic)

وهي البكتيريا التي تعيش فقط في وجود الهواء حيث تعتبر المصدر الرئيسي لتسمم الأغذية.

بكتيريا لاهوائية (Anaerobic)

وهي البكتيريا التي تعيش في غياب الهواء.

بكتيريا لاهوائية اختيارية (Facultative Anaerobic)

وهي البكتيريا التي تستطيع العيش في وجود الهواء أو عدمه.

II.4.3.2. من حيث التغذية[10]

تم تصنيفها إلى قسمين هما: **بكتيريا ذاتية التغذية** و هي البكتيريا التي تستهلك الكربون للنمو.

بكتيريا عضوية التغذية و هي البكتيريا التي تحصل على الكربون من تحليل المواد كالسكر.

II.5.3.2.من حيث طريقة التلوين [13]

يفسر الاختلاف بين البكتيريا في تركيب جدار الخلية بالتلوين، حسب تقنية غرام Gram نسبة للعالم البلجيكي J.Gram المكتشفة سنة 1884، حيث قسمت إلى نوعين:

بكتيريا غرام موجب (+G):عند تلوينها تمتص اللون وتظهر أرجوانية.

بكتيريا غرام سالب (-G):لا تمتص أو قليلة الامتصاص للون وتحرر صبغا وتظهر حمراء.

يظهر جدار الخلية (+G) أسمك من جدار الخلية (-G) ويعود ذلك لاحتوائها على غشاء خارجي.

II.6.3.2. من حيث أثرها على الإنسان[14]

بكتيريا نافعة (Bénéficial Bactérie)

وهي التي تقدم للإنسان والحيوان خدمات نافعة، يوجد نوع من أنواع البكتيريا يعيش في أمعاء الإنسان وتساعده على عملية الهضم وتفرز بعض المواد المفيدة للجسم، وهناك نوع آخر يعيش في التربة، ويلعب دورا هاما في غذاء النبات وتستعمل الأنواع الأخرى في صناعة منتجات الألبان وبعض الأدوية.

بكتيريا انتهازية (Opportunistic Bactérie)

وهي بكتيريا تعيش في جسم الإنسان، بدون أن تسبب له أي ضرر أو أذى إلا عند نقص المناعة، متحولة إلى بكتيريا ضارة تسبب العديد من الأمراض مثل التهاب اللوزتين والحلق.

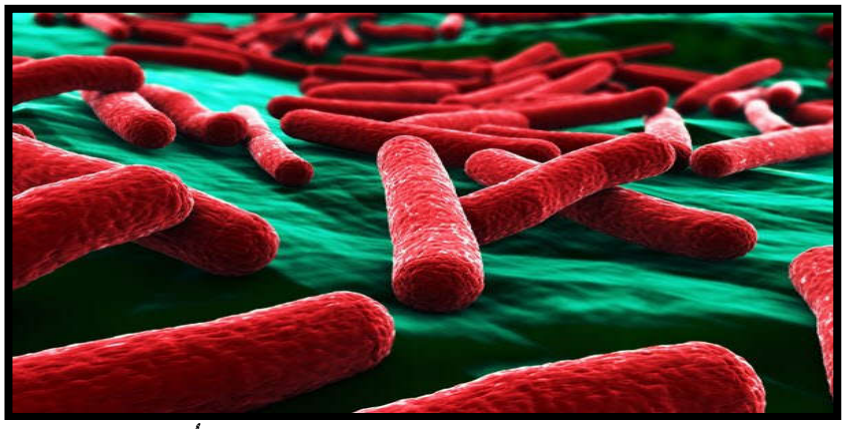
بكتيريا ضارة (Bactéries nocives)

وهي بكتيريا تهاجم جسم الإنسان مسببه له أمراض متفاوتة الخطورة مثل: الكوليرا، التيفويد والسل.

II.4.2. أنواع البكتيريا المدروسة

بكتيريا *Escherichia Coli*

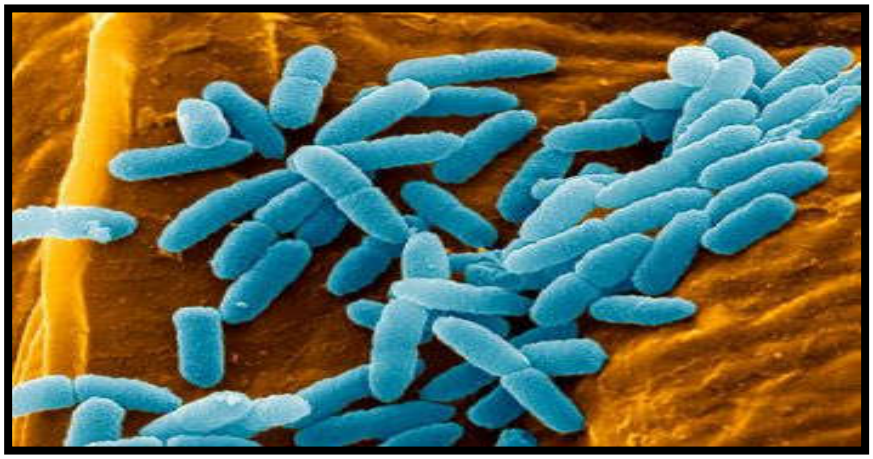
هي بكتيريا عصوية الشكل سالبة الغرام (-G) طولها يتراوح بين 2-6 ميكرومتر(أنظر الشكل(II-2)) وهي أكثر وجودا في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان، وتتواجد في النبات والتربة. تسبب أمراض الجهاز التنفسي، التهاب الزائدة الدودية، التهاب القلب، الإسهال الطفيلي، التهاب السحايا ومن أعراضها ارتفاع في درجة الحرارة [16,15].



الشكل (II-2):صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا E.coli

بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

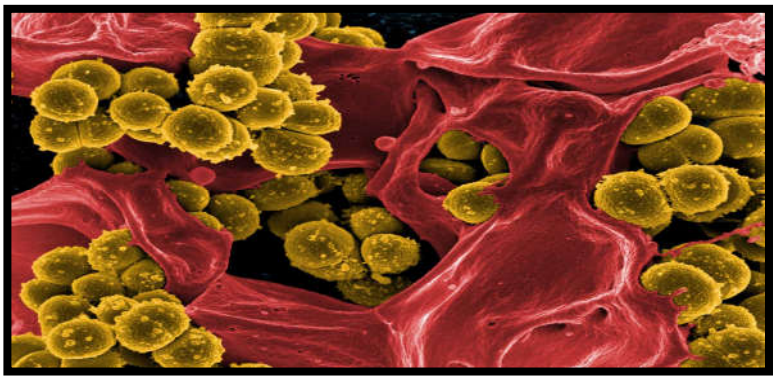
هي بكتيريا عصوية ذات أسواط طرفية (أنظر الشكل(II-3))، هوائية سالبة الغرام (G-) تعيش في درجة حرارة 41-43°م، مقاومة للعديد من المضادات الحيوية. تعتبر ممرضة للإنسان والحيوان حيث تسبب تعفن كل من العين والحروق والجروح كما تسبب أمراض الرئتين [17].



الشكل (II-3):صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا P . aeruginosa

بكتيريا *Staphylococcus auris*

هي بكتيريا كروية الشكل ذات لون أصفر براق، موجبة الغرام (G+) تكون على شكل عناقيد قطرها يتراوح بين0.5-1.5 ميكرومتر (أنظر الشكل(II-4))، وهي مسئولة عن تشكل الصديد، مسببة للعديد من الأمراض من بينهم الالتهابات جلدية خطيرة التهاب الرئتين وتسمم الدم وغيرها[18].



الشكل (II-4): صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *S.auris*

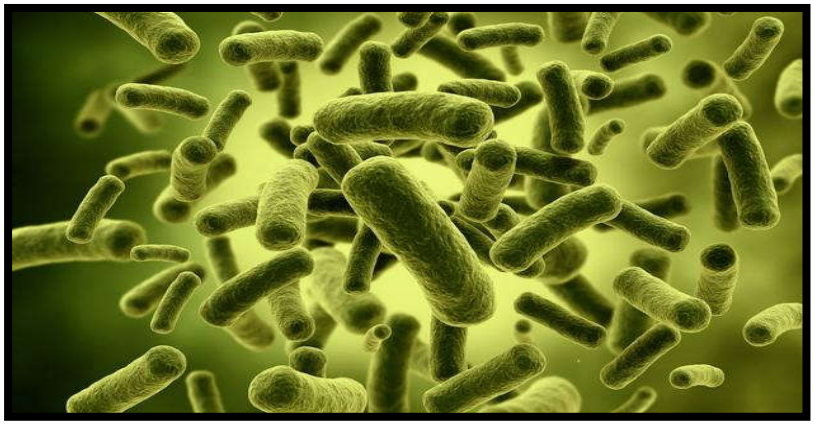
بكتيريا *Salmonella typhy*

هي بكتيريا لاهوائية اختيارية سالبة الغرام (-G) عصوية الشكل، حركية ضارة تنتشر في حليب ولحم الأبقار وقد تنتقل إلى الإنسان حيث تسبب حمى التفؤيد[19].

الشكل (II-5): صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *Salmonella typhy*

بكتيريا *Klepsiella*

هي بكتيريا سالبة الغرام -G، عصوية الشكل، غير متحركة، من عائلة البكتيريا المعوية (أنظر الشكل(II-5))، تسبب العديد من الأمراض مثل أمراض الرئة والتهاب الجهاز البولي والدم[8].



الشكل (II-6): صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *Klebsiella*

II.5.2. المقاومة البكتيرية

II.5.2.1. تعريف المقاومة البكتيرية

نقول عن البكتيريا أنها مقاومة إذا كانت تستطيع النمو والتكاثر في وجود نسبة من المضاد الحيوي تفوق النسبة المعتادة حيث ظهرت المقاومة البكتيرية بعد بداية استعمال المضادات الحيوية ضد الأمراض المعدية وهي نوعان:[20]

- مقاومة طبيعية.
- مقاومة مكتسبة.

II.5.2.2. طرق التعرف على حساسية أو مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي

إن دراسة حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي لها عدة أهداف تتمثل في:

- اختيار المضاد الأكثر نشاطا.
- تحديد التركيز اللازم للتخلص من العامل المعدي والممرض.

طريقة التمديد (Méthode de dilution)

والتي تتم على وسط سائل أو صلب وهي صعبة التطبيق في حالة التحليل الروتيني.

طريقة الإنتشار (Méthode de diffusion)

وهي الأكثر استعمالا في المستشفيات لتشخيص الأمراض المعدية، ويكون الوسط المستعمل صلب من جيلوز gélose، أهم وسط جيلوزي هو وسط Muller Hilton حيث يذاب الوسط الجيلوزي في وسط معقم ويسكب بكميات محددة في علب بتري، يحضر المعلق البكتيري بوضع جذمة منه في الماء الفيزيولوجي ثم يوزع في العلب، تترك العلب لتجف ثم توضع أقراص اختبار معقمة ومشبعة بتراكيز مختلفة للمضاد الحيوي المراد اختبار فعاليته وتترك العلب في الحاضنة عند درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة[10].

المراجع

المراجع العربية

1-برحال جمعة.« فصل و تحديد منتوجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لبعض نباتات العائلة الريزيدية (*Resedaceae*)». رسالة دكتوراه في الكيمياء العضوية، جامعة منتوري، قسنطينة، (2011).

6- رويحة الزهرة.« تأثير حموضة الوسط على مردود الاستخلاص و فعالية المستخلص المائي لأوراق النخيل». مذكرة دكتوراه، جامعة القاصدي مرباح، ورقلة، (2018).

8-زيدان مُحَمَّد. « دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و البكتيريا لمستخلصات الرمان *Punica granatum* L». رسالة دكتوراه في العلوم، تخصص كيمياء، جامعة قاصدي مرباح، ورقلة، (2018).

9-جيدل صليحة. « تقدير المحتوى الفينولي و التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات نباتات *Pistacia lentiscus* L.و *Artemisiacampestris* L.و *Argania spinosa* L.»». أطروحة دكتوراه علوم، فرع بيولوجيا تخصص بيوكيمياء، جامعة فرحات عباس، سطيف، (2015).

10- الدراجي الهادف.« Investigation phytochimique des extraits des plantesaromatiques et médicinales aux propiétésantioxydantes.». أطروحة دكتوراه، كيمياء عضوية، جامعة قاصدي مرباح، ورقلة،(2017).

11- د. مُحَمَّد عبد المحسن معارج. وراثة الأحياء الدقيقة. شركة الشهاب للنشر و التوزيع، (1995).

المراجع الأجنبية

2- Maria L. Illa M. Clarkson Toxicology, 189, (2003), 41.

3- Cohen M. Phytothérapie européenne, 6, (2002), 18.

4- Dröge W. free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev, 82, (2002), 47-95.

5- Halliwell B, Gutteridge J. Antioxidant defences. In: Halliwell B. Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine Oxford,*Oxford University Press*,(1999), 105-245.

12-Hennebelle T. Sahpaz S. Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, 1,(2004), 3-6.

13- Jorgensen J H, Ferrero M J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices, Clin Infect Dis, 26, (1998), 973-980.

14- Robert-Dernmet S. Antibiotique et antibiogrammes. Décarie Vigot, Montréal, (1995), 322.

15-Anthony D. Harris M D. Johnson J A. Glenn P J. Johnson J K. Balimore P. Haw important is patient-transmission is extended - spectrum β-lactamase Escherichia-coli acquition. (March 2007).

16-Mellies J. Barron A. Carmona A. Enterpathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. Infection and Immunity, (2007), 4199-4210.

17- K Pool. Multidrug effux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and releted organisms, *J*. MOL. Microbiol. Biotechnol, 3(2), (2001), 255-264.

18- Adegoke A, Komolafe. Multidrug resistant Staphylococcus aureus in clinical cases in Ile-Ife. Southwest Nigeria, International Journal of Midicine and Medical Sciences, 1 (3), (2009), 68-72.

19- Zhang X L. JezaV T. Pan Q. *Salmonella Typhi*: from a Human Pathogen to a Vaccine Vector. Cellular & Molecular immunology, 5 (2), (2008), 91-97.

20- Gurin-Faublée V. Carrt C. L'antibiogramme :principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales, GVT – INRA, (1999), 5-12.

الفصل الثالث

الجزء العملي

بهدف دراسة المحتوى الفينولي و النشاط البيولوجي للمستخلص الخام لثمار نبات القناوية (*A esculentus*. L) لمنطقة الجنوب الشرقي للجزائر و تحديدا وادي سوف قسمنا هذا العمل إلى ثلاث أقسام:

- القسم الأول دراسة تأثير طرق الاستخلاص على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الخام لثمار نبات (*A esculentus* L.)
- القسم الثاني دراسة تأثير وقت الجني على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة و المضاد للبكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات(*A esculentus* L.).
- القسم الثالث و الأخير الثاني دراسة تأثير المذيب على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة و المضاد للبكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات (*A esculentus* L.).

تمت هذه التجارب على مستوى مخابر كلية العلوم الدقيقة و أيضا مخبر ثمين و ترقية الموارد الصحراوية (VTRS) بجامعة الشهيد حمّه لخضر بالوادي. و اختبار الفعالية المضادة للبكتيريا بمخبر مستشفى بشير بن ناصر بالوادي.

1.III. وسائل العمل

1.1.III. الأجهزة و المواد الكيميائية

جميع المواد المستعملة في هذا العمل عالية الجودة و النقاوة و هي مقتناة من طرف شركة (Prolabo)، (Alfa Aesar)، (Biochem Chemopharma) و(Sigma- Aldrich).

و الأجهزة المستعملة هي:

- جهاز مطيافية الأشعة الفوق البنفسجية –المرئية(UV-1800 Shimadzu).
- جهاز كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (Shimadzu type HPLC-RP-C18).
- جهاز الموجات فوق الصوتية (J.P.SELECTA, s.a) Ultrason – H.
- جهاز التبخير الدوار (Rotavapor Buchi Heating bath R-210).
- فرن (Mommert, Beschickung-Loadig Modell 100-800) Etuve.
- ميزان تحليلي(Shanghai Sunrise Instrument précision 0.001g).
- جهاز سوكسلي.
- حاضنة.

III.2.1. جمع العينة

القسم الأول: دراسة تأثير طريقة الاستخلاص

تم جمع ثمار القناوية (*A esculentus* L.) المستعملة في هذا الجزء من العمل بداية من شهر جويلية إلى غاية أكتوبر من سنة 2015 من منطقة قمار بولاية الوادي بالنسبة للعينة الخضراء، أما العينة المتخشبة تحصلنا عليها من السوق المحلية في شهر ديسمبر 2015. تم غسل ثمار القناوية الخضراء و المتخشبة بالماء و تجفيفها في الظل ثم تم طحنها لتصبح مسحوق و حفظا في الثلاجة في درجة حرارة 4°م لحين الاستخدام، سميت العينة الخضراء (**A**) و العينة المتخشبة (**B**).

القسم الثاني: دراسة تأثير وقت الجني

تم جمع ثمار القناوية(*A esculentus* L.) المستعملة في هذا الجزء من العمل لثلاث أشهر مختلفة (أوت، سبتمبر،أكتوبر) من سنة 2016 من منطقة قمار بولاية الوادي، بعد غسلها تمت عملية التجفيف في الظل على قطعة قماش سميكة مع تقليبها من حين لآخر. ودامت مدة التجفيف 25 يوما، و تمت بعد ذلك عملية الطحن حتى أصبحت عبارة عن مسحوق تم الاحتفاظ به داخل علب في مكان بارد وجاف.

القسم الثالث: دراسة تأثير المذيب

تم جمع ثمار القناوية (*A esculentus* L.) المستعملة في هذا الجزء من العمل بداية من شهر جويلية إلى غاية أكتوبر من سنة 2018 من منطقة قمار بولاية الوادي، بعد غسلها تمت عملية التجفيف في الظل على قطعة قماش سميكة مع تقليبها من حين لآخر مدة 25 يوما، و تمت بعد ذلك عملية الطحن حتى أصبحت عبارة عن مسحوق تم الاحتفاظ به داخل علب في مكان بارد وجاف.

III.2. التقدير الكمي للمركبات الفينولية

تهدف الدراسة الكمية للمستخلصات الخام المحضرة من ثمار (*A esculentus* L.) بواسطة الطرق الطيفية إلى تحديد محتوى المركبات الفينولية. و يرتبط السبب الرئيسي لاختيار هذه المواد بالتأثيرات الدوائية للنباتات.

III.2.1. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية

تقدر كمية الفينولات بطريقة (Singleton and Rossi)[1] باستخدام كاشف الفولين(Folin-Ciocalteu) FC، حيث أن هذا الكاشف يتكون من حمض فوسفوتنغستيني ($H_3PW_{12}O_{40}$) و حمض فوسفوموليبيديك ($H_3PMo_{12}O_{40}$) الذي يرجع إلى أكسيد التنغستين (W_8O_{23}) و الموليبدين (Mo_8O_3) ذات اللون الأزرق. ويتم تقدير كميتها بواسطة جهاز UV–Visible باستخدام حمض الغاليك كفينول مرجعي عند طول موجي λ_{max}=756nm[1].

أ) المنحنى القياسي لحمض الغاليك

تحضر محاليل ممددة لحمض الغاليك تراكيزها تتراوح ما بين 0.03 و 0.3 ملغ/مل في أنابيب اختبار، نأخذ 0.2 مل من المحاليل الممددة و يضاف لها 1مل من كاشف FC (الممدد 10 مرات)، ثم يضاف 0.8 مل من محلول كربونات الصوديوم (Na_2CO_3 7.5%)، وتوضع المحاليل في الظلام لمدة 30 دقيقة، تتم بعد ذلك قراءة الامتصاصية الضوئية لكل تركيز بجهاز uv–vis عند طول موجي λ_{max} = 765 nm.

ب)طريقة العمل على المستخلصات

يحضر من كل المستخلص تركيز قدره 0.8 ملغ/مل و يأخذ منه 0.2 مل و يضاف له1مل من كاشف الفولين FC (المخفف 10 مرات) ويترك مدة 5دقائق في الظلام ثم يضاف له 0.8 مل من محلول كربونات الصوديوم (Na_2CO_3 7.5%)، و يترك في الظلام لمدة نصف ساعة للحصول على اللون، ثم تقرأ الامتصاصية عند طول موجي λ_{max} =756 nm.

3.2.III. التقدير الكمي للفلافونيدات

يعتمد في التقدير الفلافونيدات على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ مع مجموعة الهيدروكسيل OH الموجودة في الحلقات البنزينية للفلافونيدات، حيث يشكل معقدا ثابتا بين مجموعة الكربونيل و هيدروكسي الموقع 3 و5 كما يشكل معقدات غير ثابتة مع مجموعتي أورثوهيدروكسي[2]، ذو معامل امتصاص عال، ويمتص عند طول موجي λ_{max} = 420 nm.

ونستعمل في هذه التجربة فلافانويد الروتين كأساس مرجعي قياسي لرسم المنحنى القياسي و يتم تقدير كمية الفلافونيدات بواسطة جهاز uv–vis باستعمال الروتين كمحلول القياسي عند طول موجي λ_{max}= 420 nm [3].

أ) المنحنى القياسي لمحلول الروتين

نقوم بتحضير عدة تراكيز من محلول الروتين محصورة بين (0.02-0.1) ملغ/مل، نأخذ من كل تركيز 1 مل و نضيف له1مل من محلول ثلاثي كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ ذو التركيز 2% ثم نتركها لمدة 30 دقيقة في الظلام، بعدها نقوم بقراءة الامتصاصية عند طول موجي λ_{max} = 420 nm.

ب)طريقة العمل على المستخلصات

نحضر محلول تركيزه 2 ملغ/مل من كل المستخلص، ثم نأخذ منه 1 مل و نضيف له 1 مل من محلول كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ ذو التركيز 2% ثم نتركها لمدة 30 دقيقة في الظلام نتحصل على اللون الأصفر، بعدها نقوم بقراءة الامتصاصية عند طول موجي λ_{max}= 420 nm.

4.2.III. التقدير الكمي للفلافانولات

يتم تقدير كمية الفلافانول بطريقة Kumaran and Karunakaran[4,3] باستخدام جهاز UV-visible و الكرستين كفلافانول مرجعي عند طول موجي λ_{max}= 440 nm [5].

أ) المنحنى القياسي للكرستين

نقوم بتحضير عدة تراكيز مختلفة من الكرستين، و نأخذ من كل تركيز 2 مل في أنابيب ونضيف له 2 مل من كلوريد الألمنيوم 2% و 3 مل من خلات الصوديوم 500 ملغ/مل ونتركها لمدة ساعتين و نصف في الظلام ثم تقرأ الامتصاصية تحت طول موجي λ_{max} =440 nm. و من قيم الامتصاصية لمحاليل الكرستين نقوم برسم المنحنى القياسي بدلالة التراكيز.

ب) طريقة العمل على المستخلصات

نقوم بتحضير تركيز قدره 2 ملغ/مل من كل مستخلص، و نأخذ منه 2 مل في أنبوب ونضيف له 2 مل من كلوريد الألمنيوم 2% و 3مل من خلات الصوديوم 500 ملغ/مل ونتركها لمدة ساعتين و نصف في الظلام فنتحصل على اللون الأخضر، ثم تقرأ الامتصاصية تحت طول موجي λ_{max} =440 nm.

5.2.III. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)

تطورت الكروماتوغرافيا السائلة إلى ما يعرف الآن بالكروماتوغرافيا السائلة ذو الكفاءة العالية، التي تعتبر واحدة من أهم طرق الفصل و التحليل مقارنة بطرق الفصل الأخرى لما تتميز به من دقة و سرعة. يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات عينة و تقديرها كميا، و يتم الفصل عن طريق توزيع العينات ما بين طورين أحدهما طور متحرك سائل و الآخر طور ثابت سائل أو صلب.يكون الطور الثابت في عمود طوله 2 سم و قطره 4 ملم[7,6].

أ) شروط التجربة

الجدول(1.III): الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات باستخدام HPLC

العامل	الشروط
النظام	الطور المعكوس RP-HPLC
العمود	(25cm×46mm)C18
حجم الحقن	20µl
معدل الحقن	1ml/min
طول الموجة	λ=300nm
الزمن	50min
درجة الحرارة	25°C
الطور المتحرك	acetonitrile :(A) (0.2% acide acetique):(B)

ب) طريقة العمل على المستخلصات

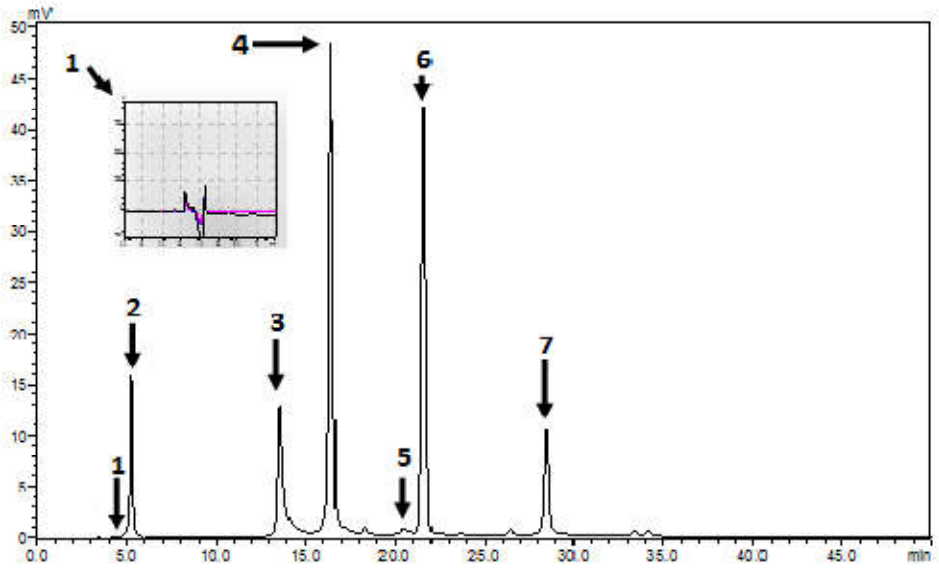
نأخذ وزن قدره 10 ملغ من المستخلص الخام و نقوم بإذابته في 5 مل إيثانول 80% نتحصل على تركيز قدره 2 ملغ/مل و نقوم بترشحه بورق ترشيح تم نعيد عملية الترشيح باستخدام ورق ترشيح خاص لتصبح العينة جاهزة للحقن في جهاز الـ HPLC

ج) زمن مكوث بعض المركبات الفينولية المرجعية

يتم تحديد المركبات الفينولية من خلال زمن مكوثها وبالمقارنة مع زمن مكوث المركبات المرجعية المبين في الجدول(2.III).

الجدول(2.III): زمن مكوث المركبات الفينولية المرجعية

المركبات الفينولية المرجعية	زمن مكوث t(min)
حمض الاسكوربيك	4.21
حمض الغاليك	5.23
حمض الكلوروجينيك	13.62
حمض الكافييك	16.3
كريستين	20.37
الفانيلين	21.46
الروتين	28.22



الشكل(1.III): كروماتوغرام مزيج المركبات المرجعية

1–حمض الأسكوربيك، **2**–حمض الغليك، **3**– الكلورجينيك، **4**– حمض الكافييك، **5**– الكرسيتين، **6**– الفانيلين، **7**– الروتين.

يتم التقدير الكيفي للمركبات الفينولية المحتواة في المستخلصات بمقارنة زمن مكوث المركبات المرجعية و المعد سلفا، أما التقدير الكمي فيكون بحسابات رياضية باستخدام معادلات المنحنيات العيارية للمركبات المرجعية و مساحات قمم للمركبات المحتواة في العينات.

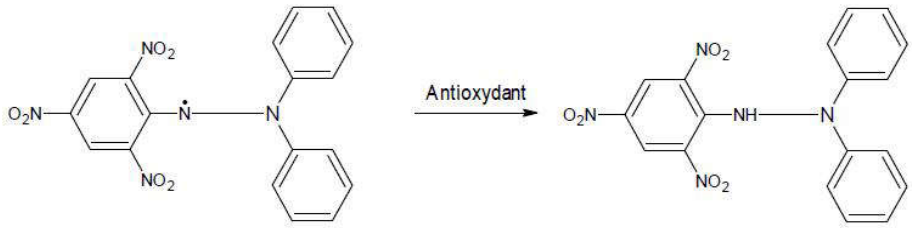
3.III. تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بالطريقة الكيميائية

هي قياس لقدرة المستخلص أو المركب على تثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة، تقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق نذكر منها: اختبار (DPPH)، اختبار(FRAP)، اختبار (ABTS)، اختبار(LMWA)، اختبار(TRAP) أو اختبار القدرة الإرجاعية (PR)، وهذه الطرق تعتمد على التلوين و نزع التلوين في طول موجي معين.

وفي هذه الدراسة تم اختيار ثلاث اختبارات مختلفة DPPH و FRAP وTAC

1.3.III. اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH

وهو اختبار مضاد للجذور الحرة وقد عرفها العالم بولواز سنة 1958 ولقد أعتمد في ذلك على توضيح بعض الحسابات الخاصة بمضادات الأكسدة DPPH. ثنائي فينيل هايدرازيل و هي مادة صلبة لونها بنفسجي، يشتق هذا الجذر الحر من جزيئة ثنائي فينيل بكريل هايدرازين وهي مادة صلبة غير جذرية لونها أصفر [8].



الشكل(2.III): يمثل آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة مع الجذر الثابت DPPH [9].

هذا الاختبار يعتمد على تثبيط الجذور الحرة حيث يترك 30 دقيقة مباشرة مع مستخلصات المضادة للجذور مع العلم أن الجذر DPPH مستقر نسبيا[10]، و يتفاعل مع جزيئة مضادة للجذور ليتحول إلى DPPH-H مع نقصان الامتصاصية عند طول موجي λ_{max} = 517 nm.

وتحسب نسبة التثبيط المئوية وفق العلاقة التالية:

$$I\%=[(A_0-A_i)A_0] \times 100 \qquad \textbf{(III.1)}$$

A_0= الامتصاصية الضوئية للجذر الخالية من العينة.

A_i= الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + العينة)

و بعد رسم المنحنى نحسب IC_{50} (تركيز المحلول لتثبيط 50% من جذور DPPH).

أ) تحضير الكاشف

يتم تحضير محلول DPPH بإذابة 2 ملغ من ثنائي فينيل هايدرازيل في 50 مل من الميثانول فنتحصل عن محلول بنفسجي داكن.

ب) طريقة العمل على المستخلصات

نحضر عدة تراكيز مختلفة من المستخلصات المخففة في المذيب و نأخذ من كل تركيز 1مل و نضيف له 1مل من (DPPH) نجانس المحلول ونتركه 30 دقيقة في الظلام و بعدها تتم القراءة عند طول موجي λ_{max} =517nm.

2.3.III. اختبار فعالية مضادات الأكسدة الكلية TAC باستعمال موليبدات الأمنيوم

يتم قياس القدرة الكلية المضادة للأكسدة للمستخلصات باستعمال طريقة الفوسفومولييبدات (phosphomolybdenum) حسب Ardestani and Yazdanparast (2007)، وهي من الطرق المباشرة لقياس القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة غير الإنزيمية، تعتمد على إرجاع الموليبيدات Molybdate (MoO_4^{-2}) إلى Molybden (Mo) و هذه الأخيرة التي تتميز بلون أخضر فاتح[12,11].

أ) **الكاشف**: يتكون من

- 4 mM من ($(NH_4)_2MoO_4$).
- 0.6 M من (H_2SO_4).
- 28 mM من (Na_2HPO_4).

إن إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة تقدر كميا بواسطة جهاز UV-Visible حيث يستعمل حمض الغاليك أو حمض الأسكوربيك كفينول مرجعي عند طول موجي λ_{max} = 695nm [13,3].

ب) طريقة العمل على المستخلصات

يحضر تركيز قدره 0.9 ملغ/مل من كل مستخلص، و يأخذ من كل تركيز 0.1 مل في أنابيب و يضاف له 1مل من الكاشف ويترك لمدة ساعة في حمام مائي 95°C للحصول على اللون الأخضر، و يترك يبرد ثم تقرأ الامتصاصية تحت طول موجي λmax= 695 nm.

3.3.III. دراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP

يتم تقدير القدرة المضادة للأكسدة (القدرة الإرجاعية) للمستخلصات بطريقة (FRAP) Ferric reducing ability of plasma حسب طريقة Benzine و Strain[8] (1996) المعدلة من طرف Pulido وآخرون (2000)[14] حيث تسمح هذه التقنية بتقدير القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة بالمعقد الحديدي أيون

TPTZ حيث يمتص Fe^{+2} فيشكل اللون الأزرق البحري الشديد حيث ترتكز على قياس التغيرات التي تحدث في الامتصاصية عند طول موجي 593 نانومتر و باستخدام حمض الأسكوربيك كمركب قياسي [6,5].

أ) **تحضير محلول FRAP**: يتم تحضير محلول FRAP من ثلاث محاليل مختلفة:

- محلول موقي: و هو عبارة عن مزيج من أسيتات الصوديوم (0.1N) مع حمض الخل (0.1N) الأس الهيدروجيني للمزيج pH = 3.6 .
- محلول TPTZ: نقوم بإذابة 0.031 غ من TPTZ في 10مل من حمض الكلوريد (0.04M)
- محلول كلوريد الحديد الثلاثي ذو التركيز (20mM)

نأخذ 25 مل من المحلول الموقي و 2.5 مل من محلول TPTZ مع 2.5 مل من كلوريد الحديد الثلاثي فنحصل عن محلول لفراب [7].

ب) طريقة العمل على المستخلصات

يحضر تركيز قدره 0.9 ملغ/مل من كل مستخلص، و يأخذ من كل تركيز 0.1 مل في أنابيب ويضاف له 0.9 مل من الكاشف FRAP ويترك لمدة نصف ساعة في الظلام للحصول على اللون البنفسجي، ثم تقرأ الامتصاصية بعد أربع دقائق تحت طول موجي λ_{max} =593nm.

III.4. دراسة الفعالية البيولوجية

اعتمدنا في هذا الاختبار على طريقة الانتشار وهي الأسهل وتعتمد على وضع أقراص مشبعة بالمستخلصات على طبق مزروع زرعا متجانسا بالبكتيريا على وسط صلب من الجيلوز Gélose من أهم هذه الأوساط هو Muller Hinton وبعد حضن الأطباق لمدة 24 ساعة يقاس قطر دوائر التثبيط حول الأقراص وكلما زاد القطر ازدادت قدرة المستخلص على قتل أو وقف نمو البكتيريا [15].

قمنا بتحضير ثلاث تراكيز مختلفة لكل مستخلص (5 ملغ/مل – 10 ملغ/مل – 15 ملغ/مل) وذلك بإذابتها في DMSO.

III.4.1. أنواع البكتيريا المدروسة

أ)بالنسبة لدراسة تأثير وقت الجني

- ✓ *Escherichia coli* ATCC 8737.
- ✓ *Staphylococcus auris* ATCC 6538 .
- ✓ *Pseudomonas aerogenosa* ATCC14028.

ب) بالنسبة لدراسة تأثير المذيب

- ✓ *Pseudomonas aerogenosa* ATCC14028.
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 8737.
- ✓ *Staphylococcus auris* ATCC 6538 .
- ✓ *Salmonella typhi* 14028ATCC.
- ✓ *Klepsiella*. ATCC700603

III.2.4. طريقة العمل

قبل الشروع في هذا العمل يجب تعقيم كل الأدوات في المعقمة و التنظيف الجيد لمكان العمل و بالقرب من موقد بنزن و سنتبع في هذا العمل طريقة الانتشار.

تم تحضير ثلاث تراكيز مختلفة لكل مستخلص (5 ملغ/مل – 10 ملغ/مل – 15 ملغ/مل) وذلك بإذابتها في DMSO، بالنسبة لدراسة تأثير وقت الجني. أما بالنسبة لدراسة تأثير المذيب فقد حضرت ثلاث تراكيز مختلفة لكل مستخلص (10 ملغ/مل – 15 ملغ/مل – 20 ملغ/مل).

III.3.4. تحضير وسط الزرع

يتم تحضير أوساط الزرع بتسخين المحلول الجيلوزي Muller Hinton في حمام مائي درجة حرارته 85°C ثم يسكب فيعلب بيتري حتى يغطى السطح مع مراعاة التجانس في سمك السطح، و تترك لتبرد حتى تتجانس و تتماسك.

III.4.4. تحضير الأقراص

بواسطة آلة خاصة يقص ورق الترشيح إلى أقراص بقطر 6 ملم، ثم نضعها في أنبوب اختبار للتعقيم في درجة حرارة عالية ثم نشبع الأقراص بالمستخلص المحضر.

III.5. النتائج و المناقشة

III.5.1. دراسة تأثير طرق الاستخلاص على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الخام لثمار نبات (*Abelmoschus esculentus* L.).

III.5.1.1. تحضير المستخلصات

المرحلة الأولى: استخلاص الشحوم بالنقع في الهكسان 150 ملل مع 30 غ

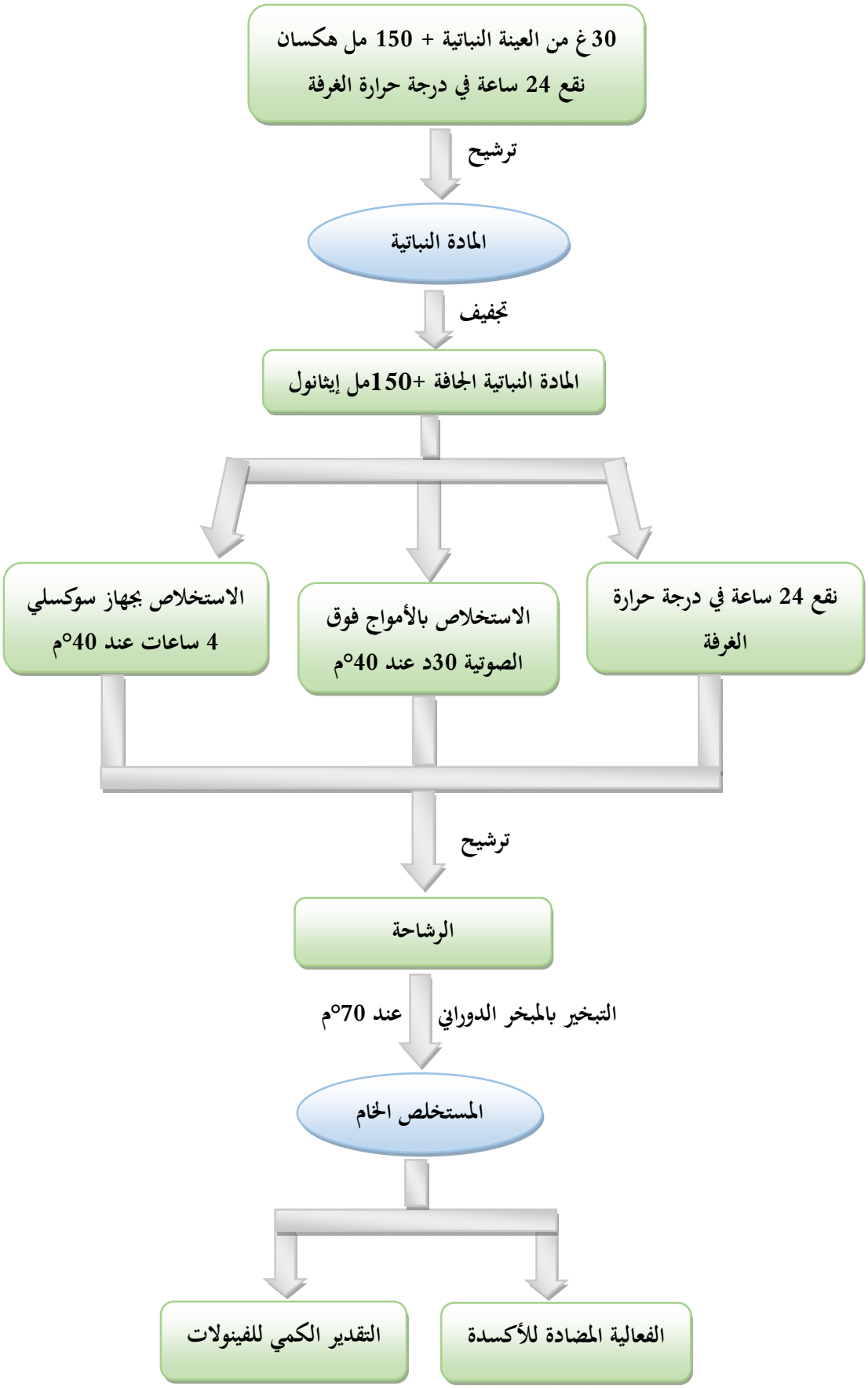
المرحلة الثانية: حيث يتم الاستخلاص بثلاث طرق مختلفة:

1- بعد عملية الترشيح نتخلص من الراشح و الباقي المتحصل عليه بعد المرحلة الأولى يوضع في إرلينة و يضاف إليه الإيثانول و ينقع مع الرج في درجة حرارة الغرفة، ثم بعد ذلك يرشح.

2- بعد عملية الترشيح نتخلص من الراشح و الباقي المتحصل عليه بعد المرحلة الأولى يضغط و يوضع في أنبوب جهاز سوكسلي و يوضع الإيثانول في الدورق ثم يسخن فيبدأ الاستخلاص، يتوقف الاستخلاص بعد خمس دورات عندما يصبح لون المذيب الذي يعود إلى الدورق فاتح أي أنه لا مزيد من المواد المستخلصة في العينة. استغرق زمن المعالجة ساعات، و الدورق يحتوي على المذيب و المواد المستخلصة.

3- بعد عملية الترشيح نتخلص من الراشح و الباقي المتحصل عليه بعد المرحلة الأولى يوضع في إرلينة و يضاف إليه الإيثانول و يتم استخلاصه بواسطة الأمواج الفوق الصوتية عند 40°م، ثم يرشح بعد ذلك.

بعد هذه المراحل يجفف الراشح باستخدام المبخر الدوراني عند درجة حرارة 70°م، و المستخلص الخام المتحصل عليه يوضع في قارورات زجاجية و يحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4°م إلى حين الاستخدام.



الشكل(3.III): مخطط يوضح مراحل العمل على المستخلصات

III.2.1.5. مردود المستخلصات

المردودية الإنتاجية للمستخلصات هي النسبة بين كتلة المادة النباتية الجافة المستخلصة التي تم الحصول عليها والتي نرمز لها بـ(M_f) على كتلة المادة النباتية الجافة المستخدمة ويرمز لها بالرمز (M_i) و يحسب بالعلاقة التالية:

$$R\ \% = (M_f/M_i) \times 100 \qquad \text{(III.2)}$$

R%: المردودية الانتاجية للمستخلص ب %.

M_f: كتلة المادة النباتية الجافة المستخلصة بعد تبخير المذيب.

M_i: كتلة المادة النباتية الجافة المستخدمة في الاستخلاص.

بعد عملية الاستخلاص توزن العينات لحساب المردود

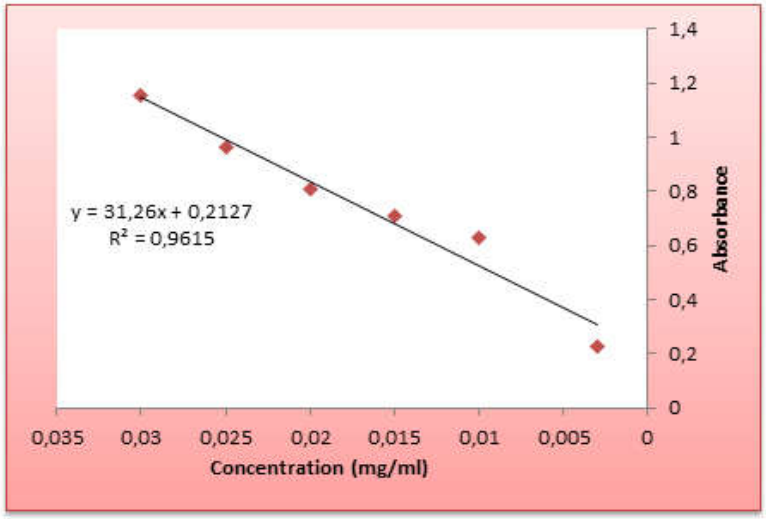
الجدول(3.III): قيم مردود المستخلصات

العينة		الكتلة الابتدائية (غرام)	الكتلة النهائية (غرام)	المردود%
طريقة النقع	A	30	0.8607	2.869
	B	30	0.6260	2.086
طريقة سوكسلي	A	30	1.5634	5.211
	B	30	0.8448	2.816
طريقة الأمواج فوق الصوتية	A	30	0.3840	1.280
	B	30	0.3388	1.129

من خلال النتائج الموضحة في الجدول **(3.III)** نجد أن أكبر مردود بالنسبة للعينتين الخضراء (A) و المتخشبة (B) كان لمستخلص سوكسلي و أقل مردود كان لمستخلص الأمواج الفوق صوتية، و بمقارنة العينتين وجد أن مردود العينة الخضراء (A) أكبر من مردود العينة المتخشبة (B) بالنسبة للطرق الثلاث و هذا الاختلاف راجع إلى كمية الفينولات المتواجدة في كل عينة.

III.3.1.5. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية

من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة وبحسابات رياضية باستخدام علاقة المنحنى القياسي لحمض الغاليك (الشكل**(4.III)**) تم تسجيل النتائج المتعلقة بتقدير الفينولات الكلية للمستخلصات.



الشكل(4.III): المنحنى القياسي لحمض الغاليك

و الجدول الآتي يوضح كمية الفينولات لمكافئ غرامي:

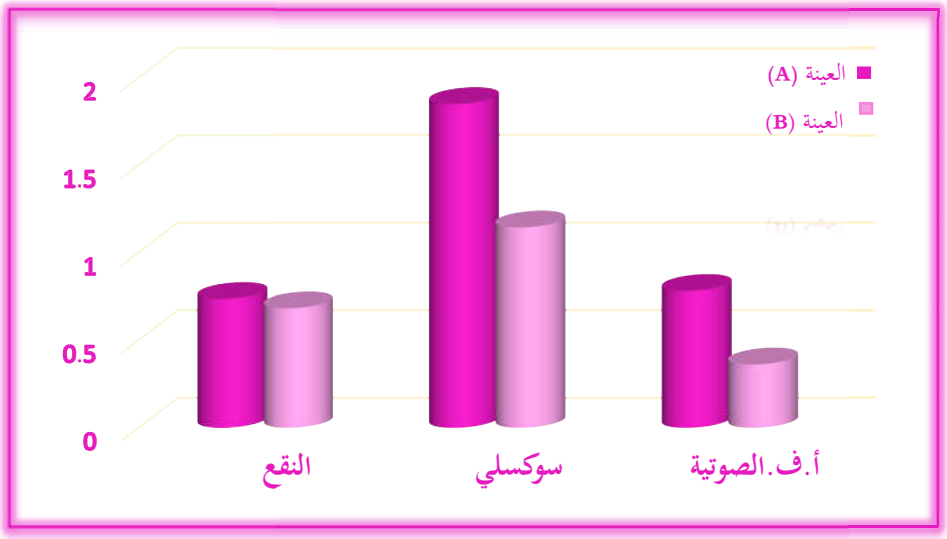
الجدول(4.III): قيم الامتصاصية و كمية الفينولات في كل مستخلص

العينة	طريقة النقع		طريقة سوكسلي		طريقة الأمواج فوق الصوتية	
	A	B	A	B	A	B
التركيز ملغ/مل	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
الامتصاصية nm	0.232	0.221	0.258	0.241	0.231	0.229
كمية الفينولات الكلية ملغ/غ	0.781	0.362	1.846	1.143	0.736	0.682

مناقشة النتائج

من خلال النتائج الموضحة في الجدول(4.III) و التي تمثل كمية الفينولات الكلية للمستخلصات التي تم الحصول عليها بالطرق الثلاث، لوحظ أن طريقة سوكسلي هي أفضل طريقة حيث قدرت كمية الفينولات الكلية بـ 1.846 ملغ/غ للعينة الخضراء(A) و هي قيمة مشابهة لتلك المسجلة في دراسة قام بها (Iliyasu & al… 2020) حيث كانت قيمة الفينولات الكلية 1.685 ملغ/غ للمستخلص الميثانولي باستخدام طريقة سوكسلي[16]. وقد بلغت قيمة الفينولات الكلية 1.143 ملغ/غ للعينة المتخشبة(B)، تليها طريقة النقع بمحتوى 0.781 ملغ/غ للعينة (A) و 0.362 ملغ/غ للعينة (B)، و في المرتبة الأخيرة طريقة الموجات الفوق الصوتية بمحتوى أقل بحوالي 0.736 ملغ/غ للعينة (A) و0.682 ملغ/غ للعينة

(B). يمكن تفسير هذه النتائج من خلال تأثير الوقت ودرجة حرارة الاستخلاص على أكسدة و إرجاع المركبات الفينولية.

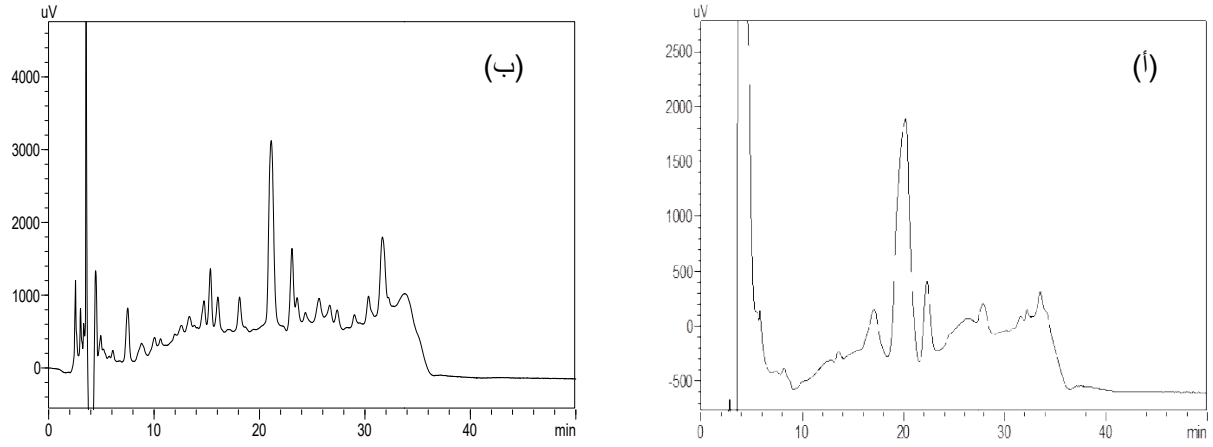


الشكل(5.III): كمية الفينولات الكلية للمستخلصات

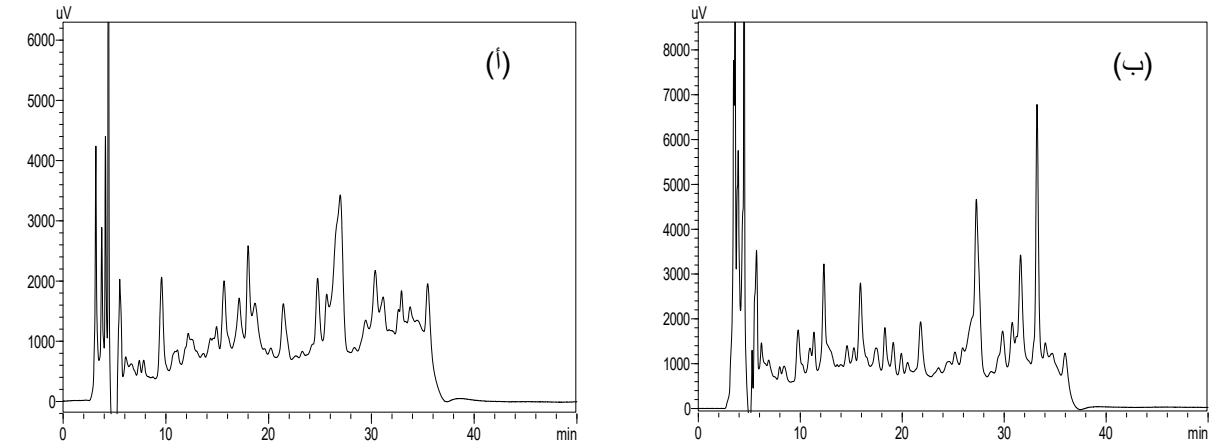
4.1.5.III. التقدير الكيفي و الكمي للفينولات باستخدام HPLC

أ) كروماتوغرام المستخلصات

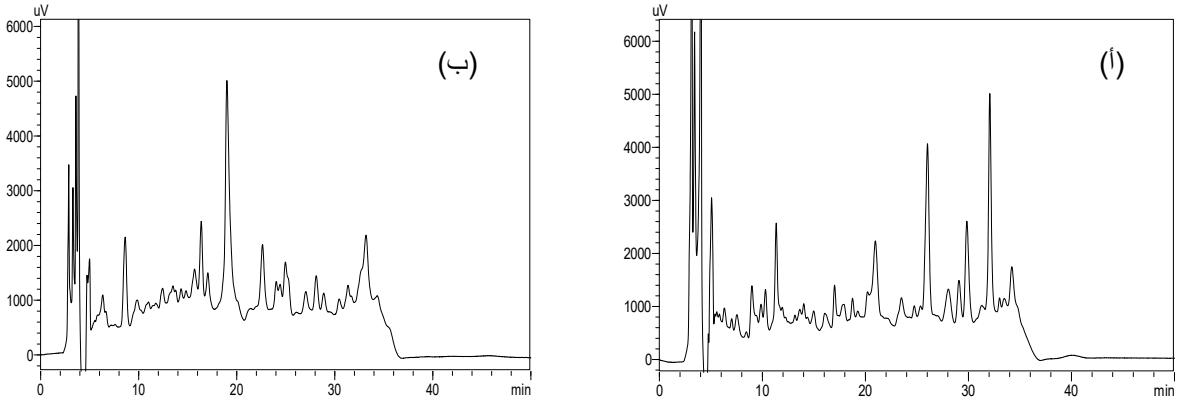
تظهر الأطياف التالية و الجدول **(5.III)** نتائج فصل المركبات الفينولية لمستخلصات ثمار نبات *A esculentus*. L بواسطة HPLC:



الشكل(6.III): كروماتوغرام مستخلص النقع.(أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)



الشكل (7.III): كروماتوغرام مستخلص سوكسلي. (أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)



الشكل (8.III): كروماتوغرام مستخلص الأمواج الفوق الصوتية. (أ): العينة(A) و (ب): العينة(B)

الجدول (5.III): تركيز متعددات الفينول في مستخلصات ثمار نبات *A esculentus. L*

المركب	التركيز (مكغ/ملغ)					
	العينة (A1)	العينة (B1)	العينة (A2)	العينة (B2)	العينة (A3)	العينة (B3)
حمض الاسكوربيك	181.637	/	22.368	/	/	/
حمض الغاليك	/	0.1101	/	0.0848	0.1015	/
حمض الكلورجينيك	0.01	/	0.0072	0.0175	0.0174	0.0138
حمض الكافييك	/	0.01378	/	/	0.0125	0.0462
الكرسيتين	35.209	/	0.9538	/	2.106	/
الفانيلين	/	/	0.037	/	/	/
الروتين	/	/	0.0098	/	0.0937	0.0646

مناقشة النتائج

➢ مستخلص النقع

التحليل الكمي للمركبات الفينولية المتواجدة في العينة (A) يظهر تواجد حمض الأسكوربيك بتركيز (181.637 مكغ/ملغ)، الكرسيتين (35.209 مكغ/ملغ) و حمض الكلورجينيك (0.01 مكغ/ملغ)، نلاحظ أن حمض الأسكوربيك هو الأكثر تواجدا في هذه العينة.

أما بالنسبة للعينة (B) فيظهر تواجد حمض الغاليك بتركيز(0.1101 مكغ/ملغ) و حمض الكافييك (0.01378 مكغ/ملغ) نلاحظ أن حمض الغاليك هو الأكثر تواجدا في هذه العينة.

➢ مستخلص سوكسلي

التحليل الكمي للمركبات الفينولية المتواجدة في العينة (A) يظهر تواجد حمض الغاليك بتركيز(22.368 مكغ/ملغ)، الكرسيتين (0.9538 مكغ/ملغ)، الفانيلين (0.037 مكغ/ملغ)، الروتين (0.0098 مكغ/ملغ) و حمض الكلورجينيك (0.0072 مكغ/ملغ)، نلاحظ أن حمض الغاليك هو الأكثر تواجدا في هذه العينة.

و بالنسبة للعينة (B) يظهر تواجد حمض الغاليك بتركيز(0.0848 مكغ/ملغ) و حمض الكلورجينيك (0.0175 مكغ/ملغ) نلاحظ أن حمض الغاليك هو الأكثر تواجدا في هذه العينة.

➢ مستخلص الأمواج الفوق الصوتية

التحليل الكمي للمركبات الفينولية المتواجدة في العينة (A) يظهر تواجد الكرسيتين بتركيز (2.106 مكغ/ملغ)، حمض الغاليك (0.1015 مكغ/ملغ)، الروتين (0.0937 مكغ/ملغ)، حمض الكلورجينيك (0.0174 مكغ/ملغ) وحمض الكافييك (0.0125 مكغ/ملغ)، نلاحظ أن الكرسيتين هو الأكثر تواجدا في هذه العينة.

و في العينة (B) يظهر التحليل الكمي للمركبات الفينولية تواجد الروتين بتركيز(0.0646 مكغ/ملغ)، حمض الكافييك (0.0462 مكغ/ملغ) و حمض الكلورجينيك (0.0138 مكغ/ملغ)، نلاحظ أن الروتين هو الأكثر تواجدا في هذه العينة.

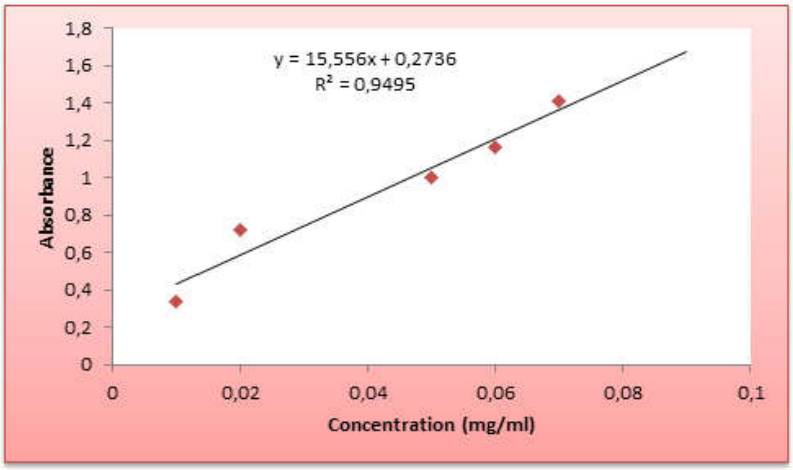
من خلال هذه النتائج نلاحظ أن مستخلص سوكسلي للعينة (B) به أكبر تنوع من المركبات الفينولية مقارنة بباقي المستخلصات. و أن أكبر تركيز من حمض الأسكوربيك و الكرسيتين كان لمستخلص النقع للعينة (A)، بينما لاحظنا غياب كل منهما في مستخلص النقع للعينة (B).

تظهر النتائج أن هناك تباين في نوع و كم الفيونولات المحتواة في المستخلصات الست و من هنا يبدو جليا تأثير طرق الاستخلاص و كذلك تأثير نضج الثمار على المحتوى الفينولي.

III.5.1.5. تقدير الفعالية المضادة للأكسدة

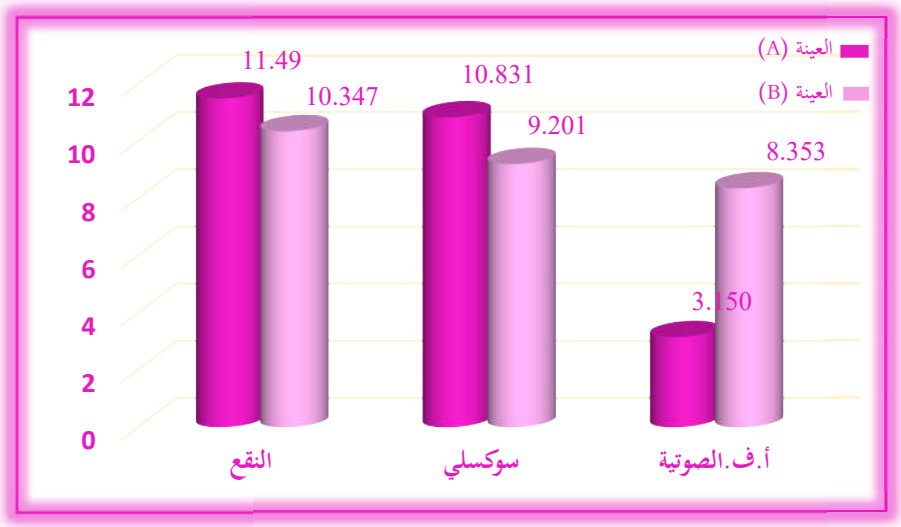
أ) الفعالية المضادة للأكسدة الكلية TAC

من نتائج الامتصاصية لمحاليل المحضرة و من علاقة المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك (الشكل (9.III)) تم تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية TAC للمستخلصات.



الشكل(9.III): المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك

الشكل التالي يوضح قيم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية لمكافئ غرامي:



الشكل(10.III): نتائج اختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية (ملغ مكافئ/غ)

مناقشة النتائج

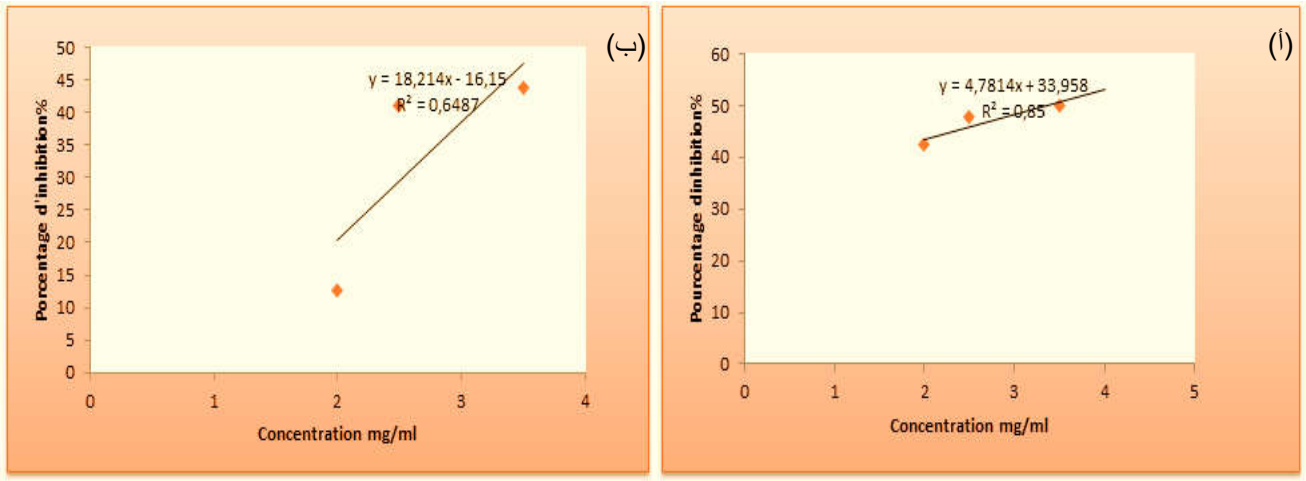
من النتائج المدونة في الشكل (10.III) والتي تعبر عن نتائج اختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية بعدد المليغرامات الموافقة لحمض الأسكوربيك لكل غرام من المستخلص لوحظ أن طريقة النقع هي أفضل طريقة بالنسبة للعينتين (A) و (B) حيث قدرت قيمة القدرة الكلية المضادة للأكسدة ب (11.49±0.0405 ملغ/غ) للعينة (A)

و(10.347±0.162 ملغ/غ) للعينة (B) تليها طريقة سوكسلي (10.831±0.378 ملغ/غ) للعينة (A) و (9.201±0.0108 ملغ/غ) للعينة (B) في الأخير طريقة الأمواج الفوق الصوتية (3.150±0.004 ملغ/غ) للعينة (A) و (8.353±0.015 ملغ/غ) للعينة (B).

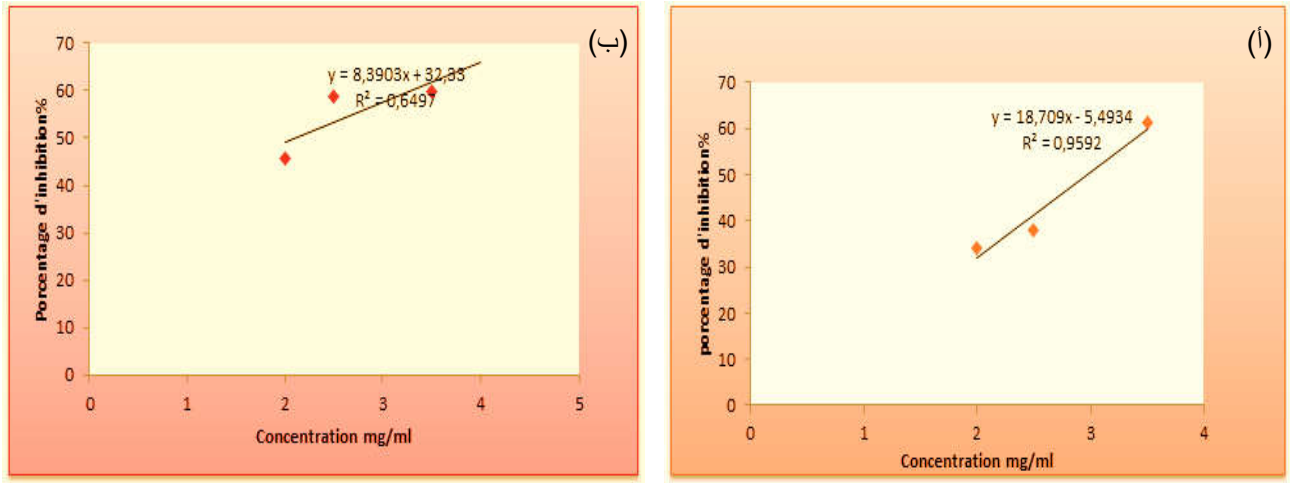
ويتضح من خلال النتائج المتحصل عليها أن القدرة الكلية المضادة للأكسدة للعينة الخضراء (A) أكبر مقارنة بالعينة الجافة (B) في طريقتي النقع و سوكسلي حيث نلاحظ وجود علاقة طردية بين كمية الفينولات الكلية و الفعالية المضادة للأكسدة الكلية و بالعكس في طريقة الأمواج الفوق الصوتية.

ب) القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH

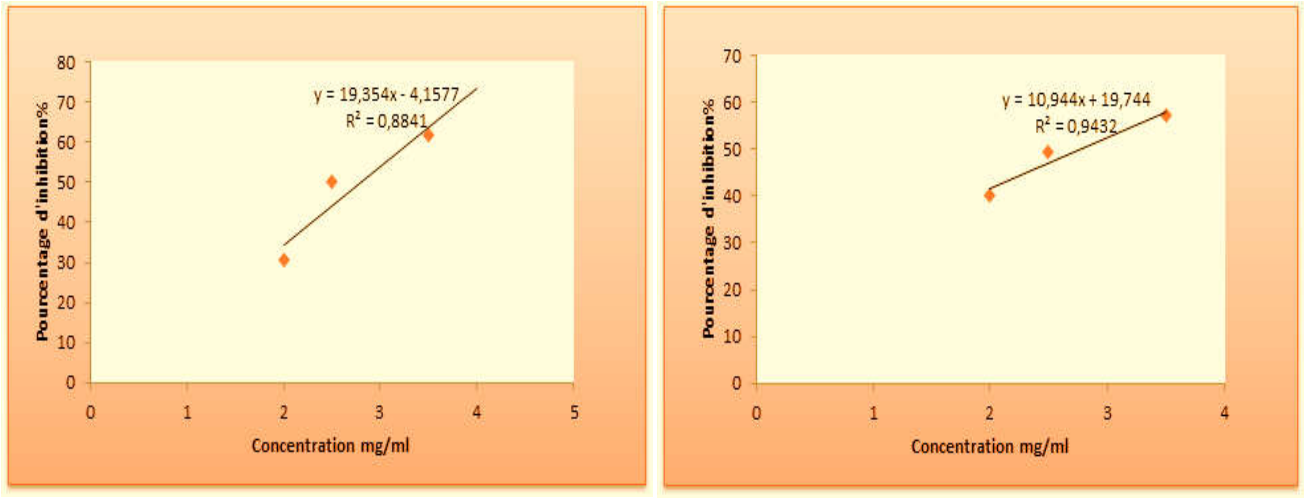
من خلال المنحنيات التي تمثل منحنيات النشاطية للعينات المدروسة في تثبيط الجذر الحر DPPH و التي من خلالها تحسب قيمة IC_{50} للعينات علما أن القيمة الأقل لها تعني التأثير التثبيطي الأفضل، أظهرت أن كل من المستخلصات والشاهد حمض الأسكوربيك تثبط الجذر الحر DPPH بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز.



الشكل(11.III): تأثير مستخلصات النقع على الجذر الحر DPPH (أ): العينة (A) و (ب): العينة (B)



الشكل(12.III): تأثير مستخلصات سوكسلي على الجذر الحر DPPH(أ): العينة (A) و (ب): العينة (B)



الشكل(13.III): تأثير مستخلصات الأمواج الفوق الصوتية على الجذر الحر DPPH (أ): العينة (A) و (ب): العينة (B)

الجدول(6.III): قيم IC_{50} لكل مستخلص.

العينة	طريقة النقع		طريقة سوكسلي		طريقة الأمواج فوق الصوتية	
	A	B	A	B	A	B
IC_{50}	3.355	3.631	2.106	2.966	2.764	2.798
ARP	0.298	0.275	0.475	0.337	0.362	0.357

مناقشة النتائج

من دراسات سابقة أثبتت أن كلما قلت قيمة IC_{50} زادت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص. و من خلال نتائج الجدول(6.III) التي تتراوح بين (3.631-2.106) ملغ/مل حيث كانت أعلى فعالية مضادة للأكسدة لمستخلص سوكسلي للعينة (A) حيث وصلت قيمتها إلى (2.106 ملغ/مل) تليها طريقة الأمواج الفوق الصوتية للعينة (A) بقيمة (2.764 ملغ/غ) و بعدها العينة (B) بنفس طريقة الاستخلاص، و تأتي طريقة النقع في المرتبة الأخيرة للعينتين (A) و (B). أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات أظهرت اختلافا في النسبة المئوية للتثبيط الجذر الحر DPPH وهذا ما بينته دراسات سابقة [17، 18، 19].

تظهر النتائج أن الفعالية المضادة للأكسدة تتوافق مع كمية الفينولات الكلية المتواجدة في كل عينة. و أن العينة الخضراء (A) أكثر فعالية مقارنة بالعينة المتخشبة (B). و تعتبر الفاكهة الطازجة غير الناضجة لنبات القناوية(*A esculentus* L.) هي الخضار الأكثر استهلاكا في معظم أنحاء العالم، فقد بينت دراسات سابقة [17، 18، 19] أنها ثروة من المركبات الفينولية و تأثيراتها المضادة للأكسدة، كما وجدوا في دراسة لـ (Bibata & all... 2017) من واغادوغو بوركينا فاسو لأنواع مختلفة من *A esculentus* L. النامية في الحقول الطبيعية، أن أوراق و ثمار القناوية غنية بالمركبات الفينولية و تملك نشاط

مضاد للأكسدة معتبر. كما وجدت أن هناك علاقة طردية بين النشاط المضاد للأكسدة و كمية الفينولات و الفلافونيدات المتواجدة في أجزاء النبات، و أن المحتوى الفينولي يتغير حسب مراحل تطور النبات[20].

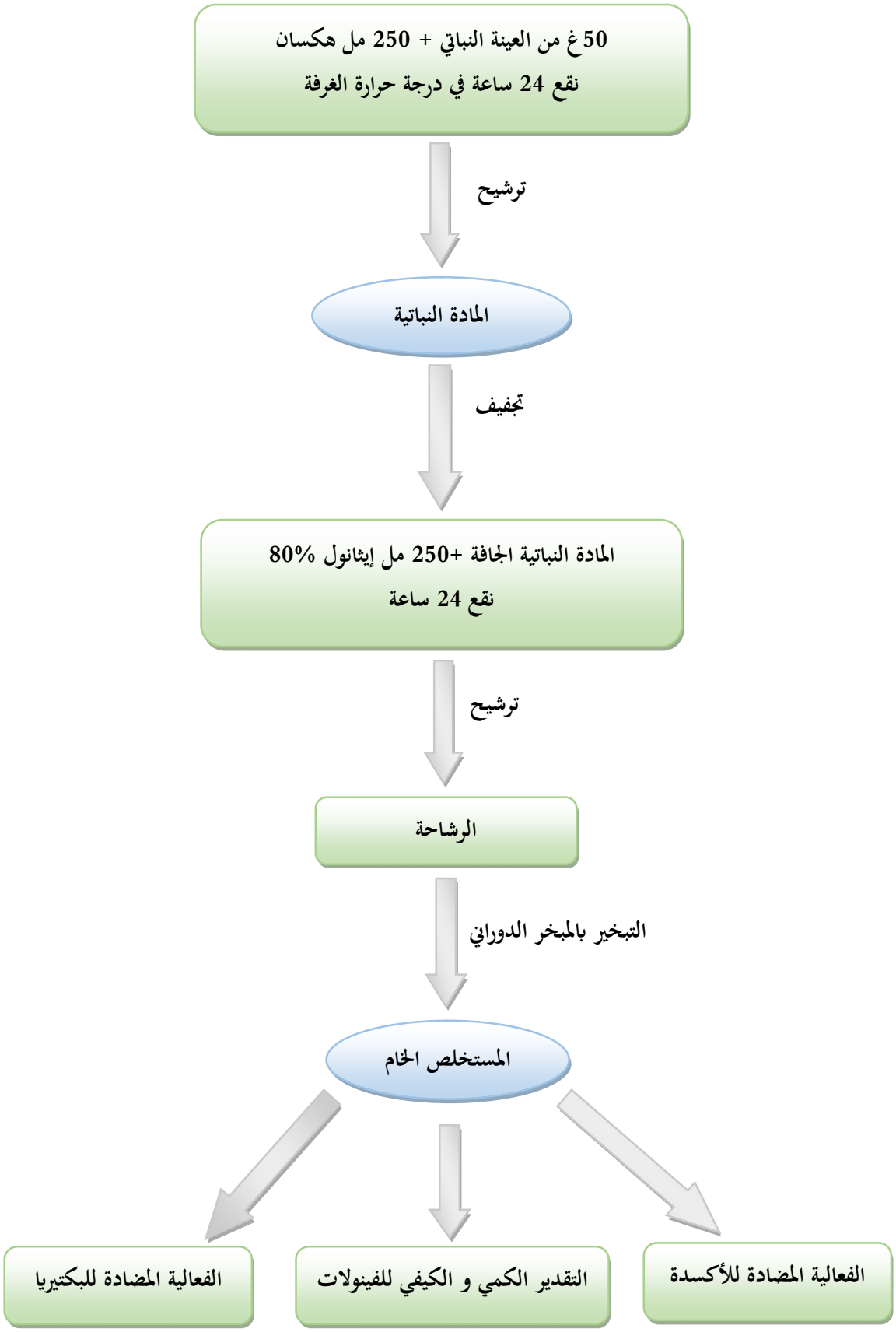
III.2.5. دراسة تأثير وقت الجني على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة و البكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات (*Abelmoschus esculentus.* L).

III.1.2.5. تحضير المستخلص

المرحلة الأولى: استخلاص الشحوم يؤخذ وزنا قدره 50 غ من مسحوق ثمار نبات القناوية للعينات الثلاثة و نقوم بنقعه في حجم قدره 250 ملل من الهكسان لمدة ساعة مع تحريك مستمر و نتركه مدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة، بعدها نرشح المزيج.

المرحلة الثانية: نقوم بالتخلص من الراشح المتحصل عليه في المرحلة الأولى و الباقي نضعه في إرلينة و يضاف إليه 250مل من الإيثانول 80% و تترك 24 ساعة مع التحريك ثم يرشح بعد ذلك.

بعدها يجفف الراشح بواسطة جهاز التبخير الدوراني عند درجة حرارة 70°م، و المستخلص الخام المتحصل عليه يوضع في قارورات زجاجية و يحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 2°م إلى حين الاستخدام.



الشكل(14.III): مخطط يوضح مراحل العمل على المستخلصات

III.2.2.5. مردود المستخلصات

بعد عملية الاستخلاص نتحصل على قيم المردود التالية:

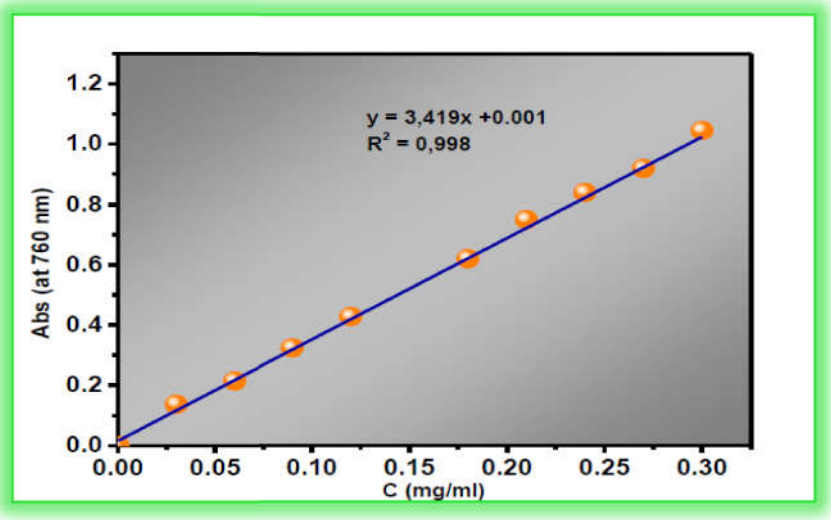
الجدول(III.7): قيم مردود المستخلصات

العينة	الكتلة الابتدائية (غرام)	الكتلة النهائية (غرام)	المردود%
أوت	50	7.658	15.317
سبتمبر	50	3.033	6.066
أكتوبر	50	5.249	10.492

من خلال نتائج الموضحة في الجدول (III.7) نجد أن أكبر مردود كان في مستخلص شهر أوت و أقل مردود كان في شهر سبتمبر أما عن شهر أكتوبر فهي نسبة متوسطة، و هذا الاختلاف راجع إلى كمية الفينولات المتواجدة في كل عينة.

III.3.2.5. التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية

من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة و من علاقة المنحنى القياسي لحمض الغاليك (الشكل(III.15)) تم حساب الكمية المكافئة ل1غ من المستخلص و من ثم تسجيل النتائج المتعلقة بتقدير الفينولات الكلية للمستخلصات.

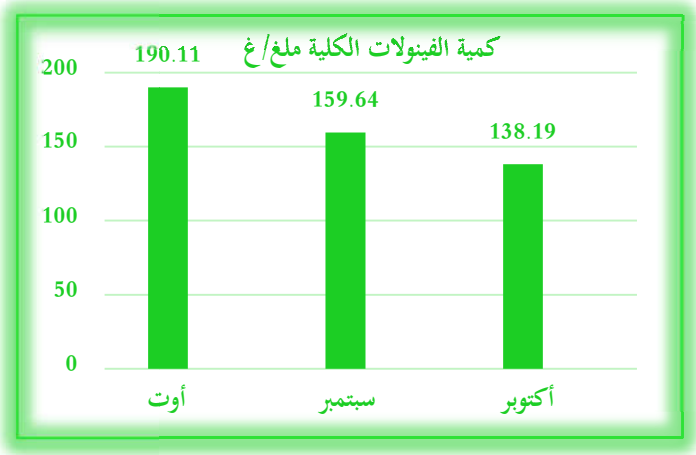


الشكل(III.15): المنحنى القياسي لحمض الغاليك

و الجدول الآتي يوضح كمية الفينولات لمكافئة غرامي:

الجدول(8.III): قيم الإمتصاصية و كمية الفينولات في كل مستخلص

العينة	أوت	سبتمبر	أكتوبر
التركيز ملغ/مل	0.8	0.8	0.8
الامتصاصية nm	0.521	0.437	0.379
الكمية ملغ/غ	190.11	159.64	138.19
SD	5.75	4.28	4.34



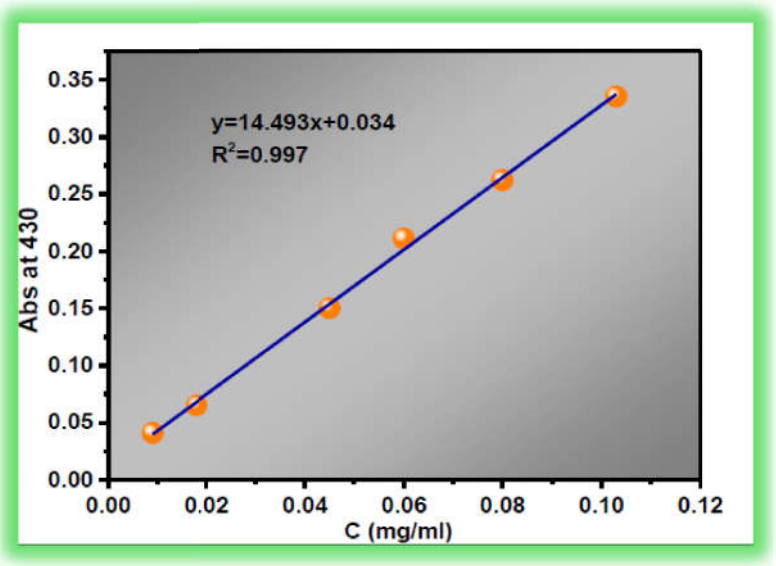
الشكل(16.III): كمية عديدات الفينول بملغ مكافئ لحمض الغاليك/ غ من وزن المستخلص.

مناقشة النتائج

من خلال النتائج الموضحة في الشكل **(16.III)** و التي تمثل كمية الفينولات للمستخلصات تبين أن كمية الفينولات متقاربة بين المستخلصات حيث سجلت أكبر قيمة في شهر أوت قدرت بـ (190.11±5.75) ملغ/غ و في شهر سبتمبر قدرت قيمتها بـ (159.64±4.28) ملغ/غ، أما في شهر أكتوبر فقدرت بـ (138.19±4.34) ملغ/غ، اختلاف هذه النتائج راجع إلى اختلاف في التركيبة الكيميائية لكل عينة حيث أن لوقت الجني تأثير على مستخلصات القناوية فهي من الخضار الصيفية و بالتالي تبلغ ذروتها في شهر أوت. نلاحظ أن كمية الفينولات المتحصل عليها في هذا العمل أكبر مقارنة بالنتائج التي تحصل عليها (Tiwari & al… 2016) حيث وصل إجمالي المحتوى الفينولي للمستخلص المائي لثمار نبات القناوية (*A esculentus* L.) المزروعة في الهند إلى (9.65±0.08) ملغ/غ [21]، و كذلك بالنسبة لدراسة قام بها (Bogninou & al .. 2018) لمستخلصات أنواع مختلفة من ثمار نبات القناوية للبنين حيث تراوحت كمية الفينولات الكلية بين (20.210±0.005) و (25.514±0.005) ملغ/غ [17].

III.4.2.5. التقدير الكمي للفلافونيدات

من نتائج الامتصاصية لمحاليل المحضرة و من علاقة المنحنى القياسي لروتين (الشكل (17.III)) نجد تركيز الفلافونيدات الكلية للمستخلصات و يمكننا حساب الكمية المكافئة ل1غ من المستخلص.



الشكل(17.III): المنحنى القياسي لمحاليل الروتين

و الجدول الآتي يوضح كمية الفلافونيدات لمكافئ غرامي:

الجدول(9.III): قيم الامتصاصية و كمية الفلافونيدات في كل مستخلص

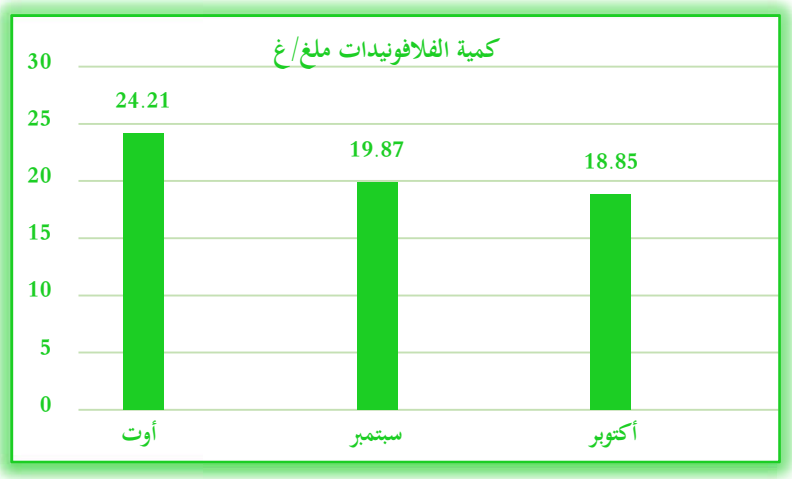
العينة	أوت	سبتمبر	أكتوبر
التركيز ملغ/مل	2	2	2
الامتصاصية nm	1.086	0.898	0.853
الكمية ملغ/غ	24.21	19.87	18.85
SD	0.54	0.4	0.46

مناقشة النتائج

من خلال النتائج الموضحة في الشكل(18.III) و التي تمثل كمية الفلافونيدات المتواجدة في كل عينة لوحظ أن كمية الفلافونيدات متقاربة في ما بينها حيث قدرت في شهر أوت (24.21±0.54) ملغ/غ أما في شهر سبتمبر قدرت بـ (19.87±0.4) ملغ/غ، أما في شهر أكتوبر قدرت بـ (18.85±0.46) ملغ/غ وهذا يتوافق مع كمية الفينولات الكلية المتواجدة في هذه العينات. و كما لوحظ أن كمية الفلافونيدات المتحصل عليها في هذا البحث كانت أكبر بالمقارنة مع دراسات سابقة، حيث قدرت كمية الفلافونيدات (9.25±0.05) ملغ/غ في المستخلص المائي لثمار(*A esculentus* L.)

المزروعة في الهند حسب (Tiwari & al… 2016) [21] و في دراسة أخرى قام بها (Saptono & al …. 2019) حيث وجدوا أن المستخلص الإيثانولي لقشرة ثمار القناوية(*A esculentus* L.) المزروعة في جاكارتا بأندونيسيا يحتوي (4.41±0.07) ملغ/غ[22] و هي أقل بكثير من القيمة المتحصل عليها في هذا العمل و ذلك بالنسبة لمستخلصات الأشهر الثلاث.

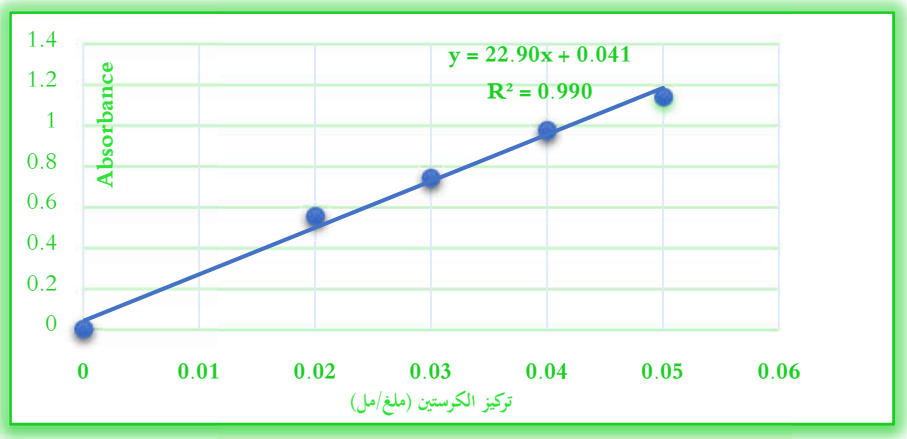
تلعب الفلافونيدات دورا حيويا في تعديل بيروكسيد الدهون المشاركة في تصلب الشرايين و تجلط الدم حيث ترتبط أهمية الفلافونيدات بتأثيرها المضاد للأكسدة [21].



الشكل(18.III): كمية الفلافونيدات بالملغ مكافئ لروتين / غ من وزن المستخلص.

III.5.2.5. التقدير الكمي للفلافانول

من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة و من علاقة المنحنى القياسي للكرستين (الشكل (19.III)) نجد تركيز الفلافانول الكلية للمستخلصات ويمكننا حساب الكمية المكافئة ل1غ من المستخلص.

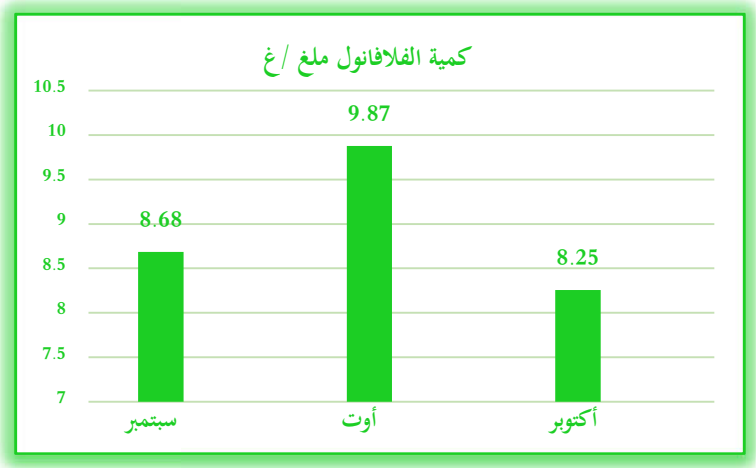


الشكل(19.III): المنحنى القياسي للكرستين

الجدول (10.III) يوضح كمية الفلافانول لمكافئة غرامي.

الجدول (10.III): قيم الامتصاصية و كمية الفلافانول في كل مستخلص

العينة	أوت	سبتمبر	أكتوبر
التركيز ملغ/مل	3	3	3
الامتصاصية nm	0.637667	0.719667	0.608333
الكمية ملغ/غ	8.68	9.87	8.25
SD	0.15	0.05	0.02



الشكل (20.III): كمية الفلافانول بالملغ مكافئ لكرستين / غ من وزن المستخلص.

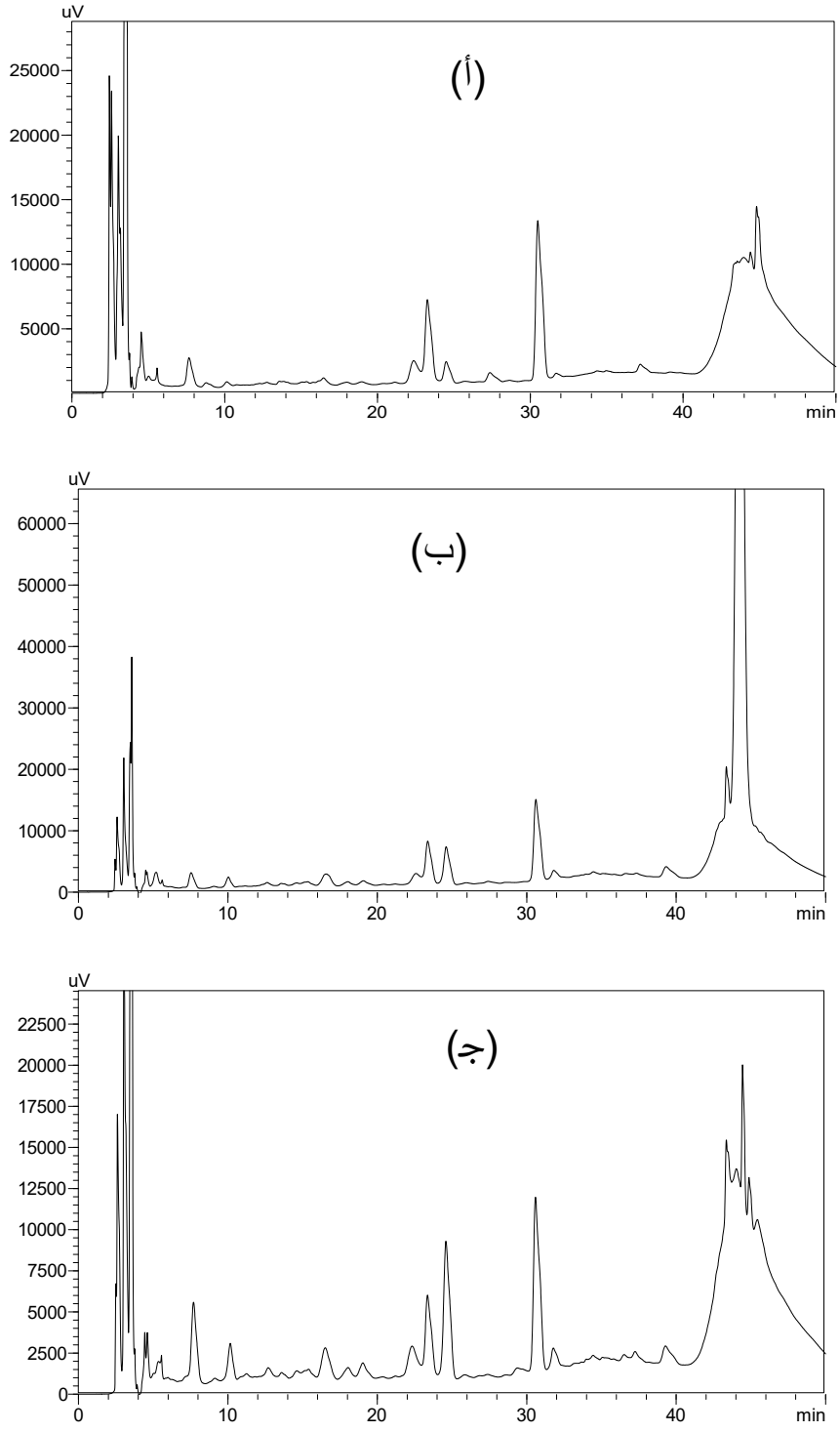
مناقشة النتائج

من خلال النتائج الموضحة في الشكل(20.III) و التي تمثل التقدير الكمي لفلافانول في كل مستخلص لوحظ أن كمية فلافانول متقاربة بين المستخلصات حيث سجلت أكبر قيمة في شهر أوت قدرت بـ (9.87±0.05) ملغ/غ أما في شهر سبتمبر قدرت بـ (8.68±0.15) ملغ/غ وفي شهر أكتوبر وصلت قيمتها (8.25±0.02) ملغ/غ وهذه النتيجة تتوافق مع كمية الفينولات الكلية و الفلافونيدات. هذه النتائج متقاربة مع النتائج التي تحصل عليها (Tiwari & al… 2016) حيث قدرت كمية الفلافانول بـ (6.12±0.14) ملغ/غ.

إن الفلافانول مكون نباتي مهم يساعد في علاج أمراض القلب و الأوعية الدموية الناجمة عن الإجهاد التأكسدي[21].

III.6.2.5. التقدير الكيفي و الكمي للفينولات باستخدام HPLC

تظهر الأطياف التالية نتائج فصل المركبات الفينولية لمستخلصات ثمار نبات *A esculentus* L. بواسطة HPLC:



الشكل(III.21): كروماتوغرام مختلف المستخلصات (أ) عينة أكتوبر، (ب) عينة سبتمبر، (ج) عينة أوت.

من خلال الكروماتوغرام يتبين أن المستخلصات تحوي العديد من المركبات، حيث تم تحديد 6 مركبات في كل عينة من خلال مقارنة زمن مكوثها مع زمن مكوث المركبات المرجعية و الجدول(III.11) يوضح المركبات الموجودة.

الجدول (11.III): زمن مكوث المركبات الفينولية و تركيزها بالمكروغرام/المليغرام

	عينة أوت		عينة سبتمبر		عينة أكتوبر	
المركب	زمن المكوث المرجعي	زمن المكوث	التركيز	زمن المكوث	التركيز	زمن المكوث
حمض الأسكوربيك	4.21	4.43	171.653	4.49	160.411	4.39	89.305
حمض الغاليك	5.23	5.35	1.819	5.19	3.192	5.57	1.204
حمض الكلورجينيك	13.62	13.58	0.809	13.56	0.279	13.57	0.132
حمض الكافييك	16.3	16.51	1.221	16.58	1.094	16.46	0.250
الكرستين	20.37	20.34	11.761	20.43	11.664	/	/
الفانيلين	21.46	21.22	0.0527	21.19	0.0563	21.13	0.0392
الروتين	28.22	/	/	/	/	28.65	0.177

مناقشة النتائج

- **مستخلص شهر أوت**

التحليل الكمي للمركبات الفينولية المتواجدة في عينة شهر أوت يظهر تواجد حمض الأسكوربيك بتركيز (171.653 مكغ/ملغ)، حمض الغاليك (1.819 مكغ/ملغ)، حمض الكلورجينيك (0.809 مكغ/ملغ)، حمض الكافييك (1.221 مكغ/ملغ) وحمض الكرسيتين (11.761 مكغ/ملغ) و الفانيلين (0.0527 مكغ/ملغ) نلاحظ أن حمض الأسكوربيك هو الأكثر تواجدا في هذه العينة.

- **مستخلص شهر سبتمبر**

التحليل الكمي للمركبات الفينولية المتواجدة في عينة شهر سبتمبر يظهر تواجد حمض الأسكوربيك بتركيز (160.411 مكغ/ملغ)، حمض الغاليك (3.192 مكغ/ملغ)، حمض الكلورجينيك (0.279 مكغ/ملغ)، حمض الكافييك (1.094مكغ/ملغ) و حمض الكرسيتين (11.664 مكغ/ملغ) و الفانيلين (0.0563 مكغ/ملغ) نلاحظ أن حمض الأسكوربيك هو الأكثر تواجدا في هذه العينة أيضا.

- **مستخلص شهر أكتوبر**

التحليل الكمي للمركبات الفينولية المتواجدة في عينة شهر أكتوبر يظهر تواجد حمض الأسكوربيك بتركيز (89.305 مكغ/ملغ)، حمض الغاليك (1.204 مكغ/ملغ)، حمض الكلورجينيك (0.132 مكغ/ملغ)، حمض الكافييك

(0.250مكغ/ملغ) و حمض و الفانيلين (0.0392 مكغ/ملغ) و الروتين (0.177 مكغ/ملغ) نلاحظ أن حمض الأسكوربيك هو الأكثر تواجدا في هذه العينة كذلك.

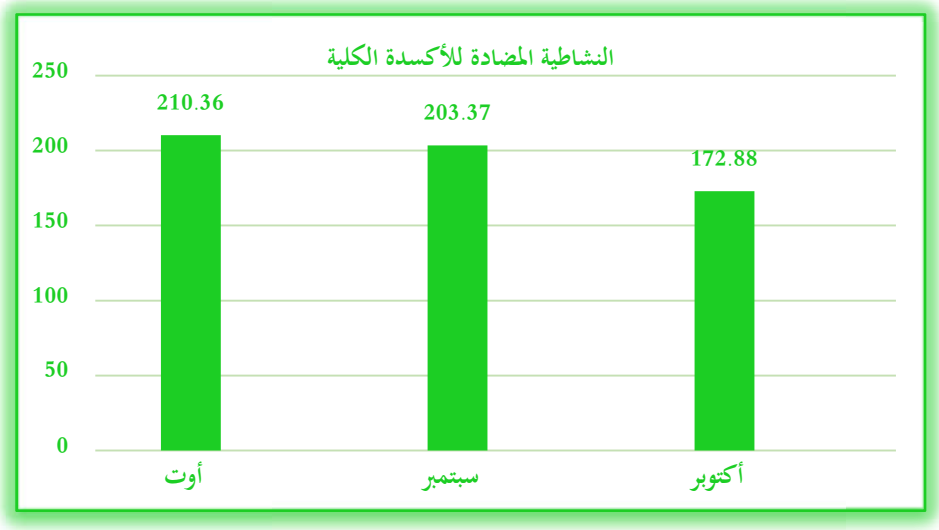
تظهر نتائج التقدير الكمي و الكيفي للمركبات الفينولية للمستخلصات الثلاث أن هناك تقارب في المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونيدات و الفلافونولات للمستخلصات. كما أنها تحتوي تقريبا على نفس المركبات الفينولية مع اختلاف في كميتها و هنا يظهر تأثير وقت الجني على مستخلصات نبات القناوية(*A esculentus* L.) التي تعتبر من الخضر الصيفية، مما يعني أنها تكون في ذروتها في فصل الصيف (تنمو أحسن) و هذا يتوافق مع نتائج هذا العمل، حيث وجدنا أن أكبر كمية للفينولات و الفلافونيدات و الفلافونولات كانت لمستخلص شهر أوت يليه مستخلص شهر سبتمبر و يأتي في الأخير مستخلص شهر أكتوبر.

III.7.2.5. الفعالية المضادة للأكسدة

أ) الفعالية المضادة للأكسدة الكلية TAC

من نتائج الامتصاصية لمحاليل المحضرة ومن علاقة المنحنى القياسي لحمض الغاليك تم تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية TAC للمستخلصات و حساب الكمية المكافئة لـ1 غ من المستخلص.

الشكل التالي يوضح قيم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية لمكافئ غرامي:



الشكل (III.22):نتائج اختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية (ملغ / غ).

مناقشة النتائج

أظهرت النتائج المدونة في الشكل **(22.III)** و التي تعبر عن نتائج اختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية بعدد المليغرامات الموافقة لحمض الغاليك لكل غرام من مستخلص حيث قدرت قيمة القدرة الكلية المضادة للأكسدة في عينة شهر أوت ب (210.36±3.74) ملغ/غ وشهر سبتمبر ب (203.37±3.21) ملغ/غ أما في شهر أكتوبر(172.88±2.59) ملغ/غ. إن قيم القدرة الكلية المضادة للأكسدة المتحصل عليها في هذه الدراسة هي قيم معتبرة مقارنة بالقيم المتحصل عليها في دراسة قام بها (Mamuna & al.. 2020) من جامعة لاهور في باكستان للمستخلص الميثانولي و الإيثانولي لأوراق و بذور القناوية(*A esculentus* L.) [23].

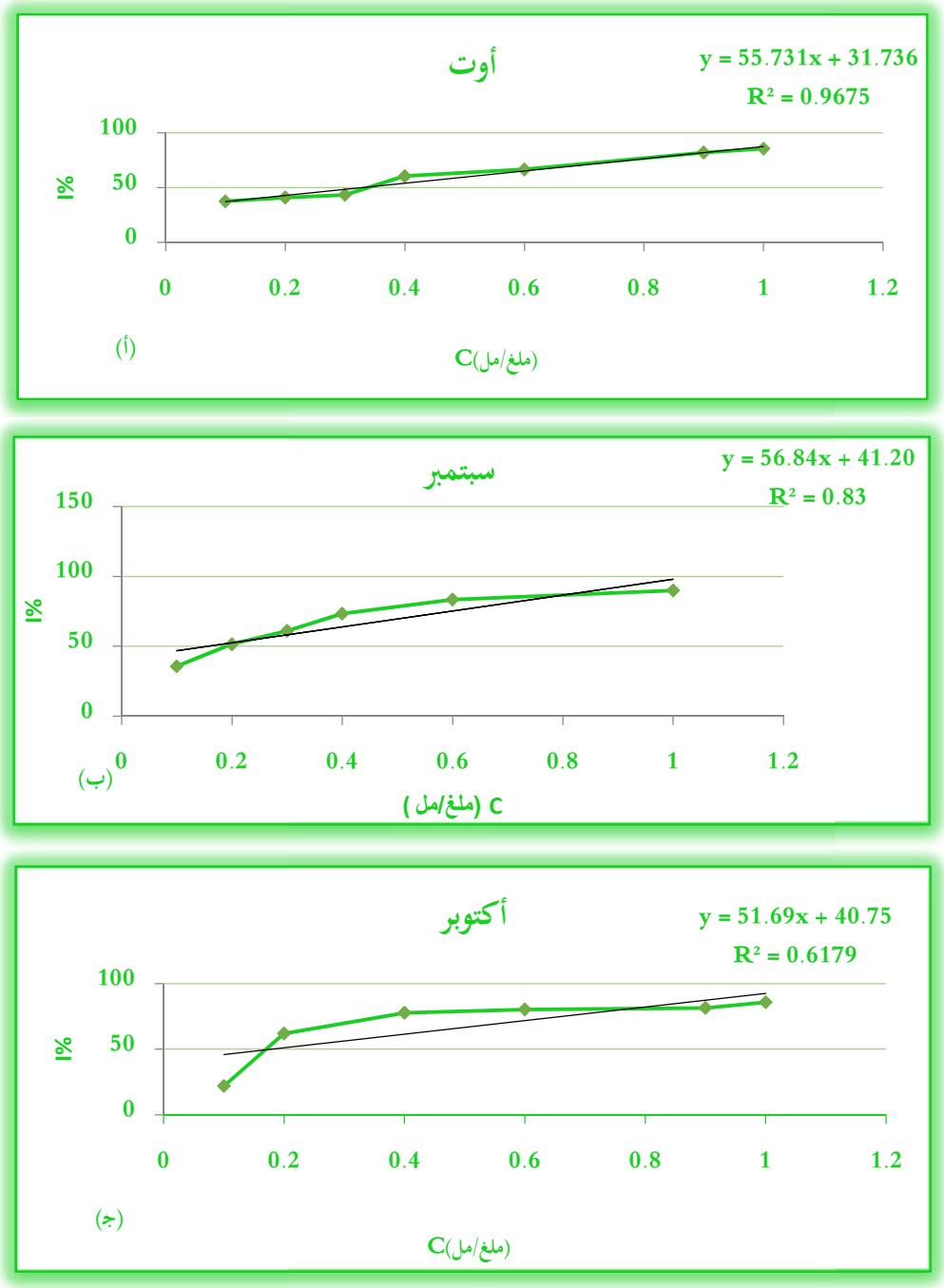
ويتضح من خلال النتائج المتحصل عليها أن هناك علاقة طردية بين القدرة الكلية المضادة للأكسدة و كمية المركبات الفينولية المحتواة في المستخلصات، حيث أن لها أهمية كبيرة بين مضادات الأكسدة الأخرى و تعتبر مصدر جيد للمواد الحافظة[24].

ب) القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH

من خلال المنحنيات التي تمثل منحنيات النشاطية للعينات المدروسة في تثبيط الجذر الحر DPPH و التي من خلالها تحسب قيمة IC_{50} للعينات علما أن القيمة الأقل لها تعني التأثير التثبيطي الأفضل، أظهرت أن كل من المستخلصات الإيثانولي والشاهد حمض الأسكوربيك تثبط الجذر الحر DPPH بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز. و النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول التالي:

الجدول(12.III): قيم IC_{50} لكل مستخلص

العينة	أوت	سبتمبر	أكتوبر
IC_{50}	14.33	15.33	17.43
SD	0.55	0.58	0.63
ARP	0.069	0.065	0.057



الشكل(23.III): منحنى النشاطية في تثبيط الجذر الحر DPPH• بدلالة التركيز

(أ): شهر أوت، (ب): شهر سبتمبر، (ج): شهر أكتوبر

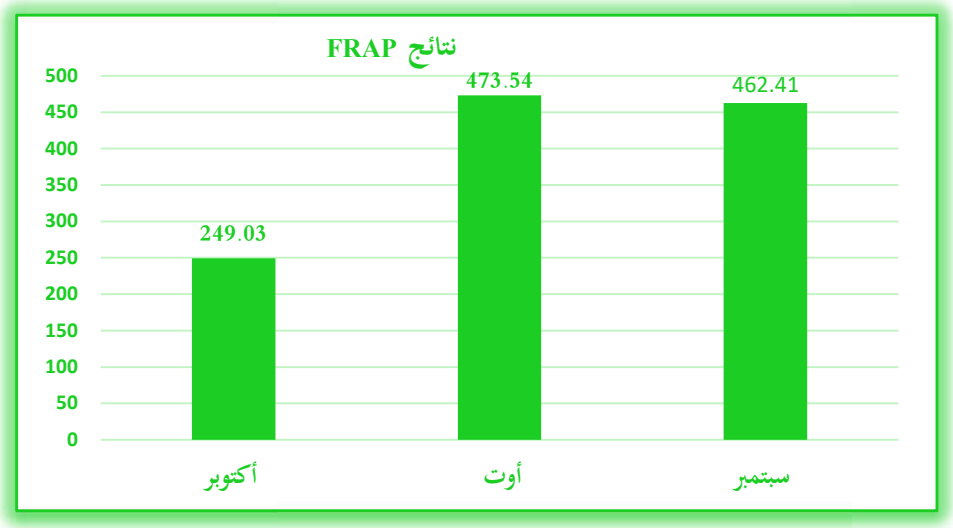
مناقشة النتائج

من دراسات سابقة أثبتت أن كلما قلت قيمة IC_{50} زادت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص.ومن خلال نتائج الجدول التي تتراوح بين (14.33-17.43) ملغ/مل حيث كانت أعلى فعالية للأكسدة في شهر أوت حيث وصلت قيمتها إلى (14.33±0.55) ملغ/مل أما عن شهر سبتمبر (15.33±0.58) ملغ/مل وأقل قيمة في شهر أكتوبر قدرت بـ(17.43±0.63) ملغ/مل.

نلاحظ أن قيم IC_{50} لجميع العينات كانت أكبر مقارنة بحمض الأسكوربيك، و هي أكبر بالمقارنة مع نتائج دراسة قام بها (Iliyasu & al... 2020) حيث وجدوا قيمة IC_{50} للمستخلص المائي لأوراق نبات القناوية (*A esculentus* L.) (59.15) مكغ/مل[16]. لكن يمكن القول أن جميع العينات تملك فعالية مضادة للأكسدة وهذا راجع إلى كمية الفينولات و الفلافونيدات و الفلافونولات المتواجدة في كل عينة. حيث يرتبط نشاط الكسح أو تثبيط الجذور الحرة بالمحتوى الكلي للمركبات الفينولية[16، 25].

ج) الفعالية المضادة للأكسدة طريقة FRAP

من نتائج الامتصاصية لملحاليل المحضرة و من علاقة المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك تم تقييم النشاطية المضادة للأكسدة FRAP للمستخلصات و حساب الكمية المكافئة ل1غ من المستخلص.الشكل التالي يوضح قيم النشاطية المضادة للأكسدة FRAP لمكافئ غرامي:



الشكل(III.24): نتائج اختبار FRAP

مناقشة النتائج

أظهرت النتائج المدونة في الشكل (III.24) و التي تعبر عن نتائج اختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة FRAP بعدد المليغرامات الموافقة لحمض الأسكوربيك لكل غرام من مستخلص حيث قدرت قيمة FRAP في عينة شهر أوت بـ (473.54±7.05) ملغ/غ و في شهر سبتمبر بـ (462.41±7.28) ملغ/غ شهر أما في أكتوبر قدرت بـ(249.03±5.42) ملغ/غ من هنا نلاحظ أن القدرة الإرجاعية لـ FRAP تتناسب طرديا مع كمية الفينولات الكلية. هذه الدراسة تبين أن نبات القناوية (*A esculentus* L.) لمنطقة الواد له فعالية معتبرة مقارنة بتلك المزروعة في ماليزيا و التي قدر النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص بذورها بطريقة FRAP بـ 122.39 ملغ/غ حسب دراسة قام بها (Sathish & al …2014) [26].

بينت نتائج هذه الدراسة أن مستخلص شهر أوت له أكبر نشاط مضاد للأكسدة و ذلك في الاختبارات الثلاث (DPPH، FRAP و TAC) و هذا يتوافق مع نتائج الدراسة الفيتوكيميائية. كما أكدت دراسات سابقة أن بذور القناوية تمتلك خواص مضادة للأكسدة و مضادة للتعب وذلك باختبار (DPPH، FRAP، RPT و TAC) [27، 28].

III.8.2.5. الفعالية البيولوجية

بعد الزرع والحضن لمدة 24 ساعة، نقوم بقياس قطر التثبيط حول الأقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة للمستخلصات.

الجدول(13.III): أقطار التثبيط لأنواع البكتيريا الناتجة عن تراكيز مختلفة للعينات التراكيز مأخوذة بالملم

نوع البكتيريا	أوت			سبتمبر			أكتوبر		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Escherichia Coli	6	6	8	-	8	9	-	8	9
Staphylococcus auris	6	9	12	-	9	8	-	7	8
Pseudomonas aerogenosa	-	12	8	-	-	9	5	7	11

مناقشة النتائج

- ***Escherichia Coli***

مستخلص شهر أوت أظهر في التركيزين 5 ملغ/غ و 10 ملغ/غ أقطار أقل من 6 ملم، أما عند تركيز 15 ملغ/غ فقد وصل قطر التثبيط إلى8 ملم. و بالنسبة لمستخلص شهر سبتمبر فأظهر أقطار في كل من التراكيز 10 ملغ/غ و15 ملغ/غ وصلت أقطارها إلى 8 ملم و9 ملم على التوالي و بالنسبة لمستخلص أكتوبر فأظهر أقطار في نفس التراكيز السابقة و بنفس الأقطار.

- ***Staphylococcus auris***

أظهر مستخلص شهر أوت عند تركيز 15 ملغ/غ أعلى قطر تثبيط وصل إلى 12 ملم. أما مستخلص شهر سبتمبر و أكتوبر فقد أظهرا عند نفس التركيز أقطار أقل وصلت إلى 9 و 8 ملم على التوالي بالنسبة لشهر سبتمبر و 7 و8 ملم بالنسبة لشهر أكتوبر. و هذا يتوافق مع دراسة (Taiye & al ... 2013) حيث بينت النتائج أن مستخلص ثمار القناوية (*A esculentus* L.) له خصائص مثبطة لنشاط بكتيريا *Staphylococcus auris* [29].

Pseudomonas aerogenosa

أظهر مستخلص شهر أوت عند تركيز 10 ملغ/غ أعلى قطر تثبيط وصل إلى 12 ملم، بينما كانت أقطار التثبيط لمستخلص شهر سبتمبر و أكتوبر أقل حيث وصلت إلى 9 و 11 ملم على التوالي عند التركيز 15 ملغ/غ. و هذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه (De Carvalho & al .. 2011) عن وجود تأثير تثبيطي لمستخلص ثمار و أزهار نبات القناوية (*A esculentus* L.) على بكتيريا *Pseudomonas aerogenosa*[30].

من خلال النتائج المتحصل عليها من دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات نستنتج أن مستخلص شهر أوت كانت له فعالية أكبر مقارنة بالمستخلصات الأخرى وهذا يتوافق مع الفعالية المضادة للأكسدة والتي تعزى إلى كمية الفينولات المتواجدة في كل عينة. إذ تؤثر الفينولات في تثبيط نمو البكتريا من خلال تثبيط الإنزيمات المسؤولة عن التفاعلات الايضية الأساسية بتداخلها غير المتخصص مع البروتينات مما يؤدي إلى مسخ البروتين ومن ثم عدم قدرة الجرثومة على الاستمرار (Mason and Wasserman, 1987)[31].

III.3.5. دراسة تأثير المذيب على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة و البكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات (*Abelmoschus esculentus* L.).

III.1.3.5. تحضير المستخلص

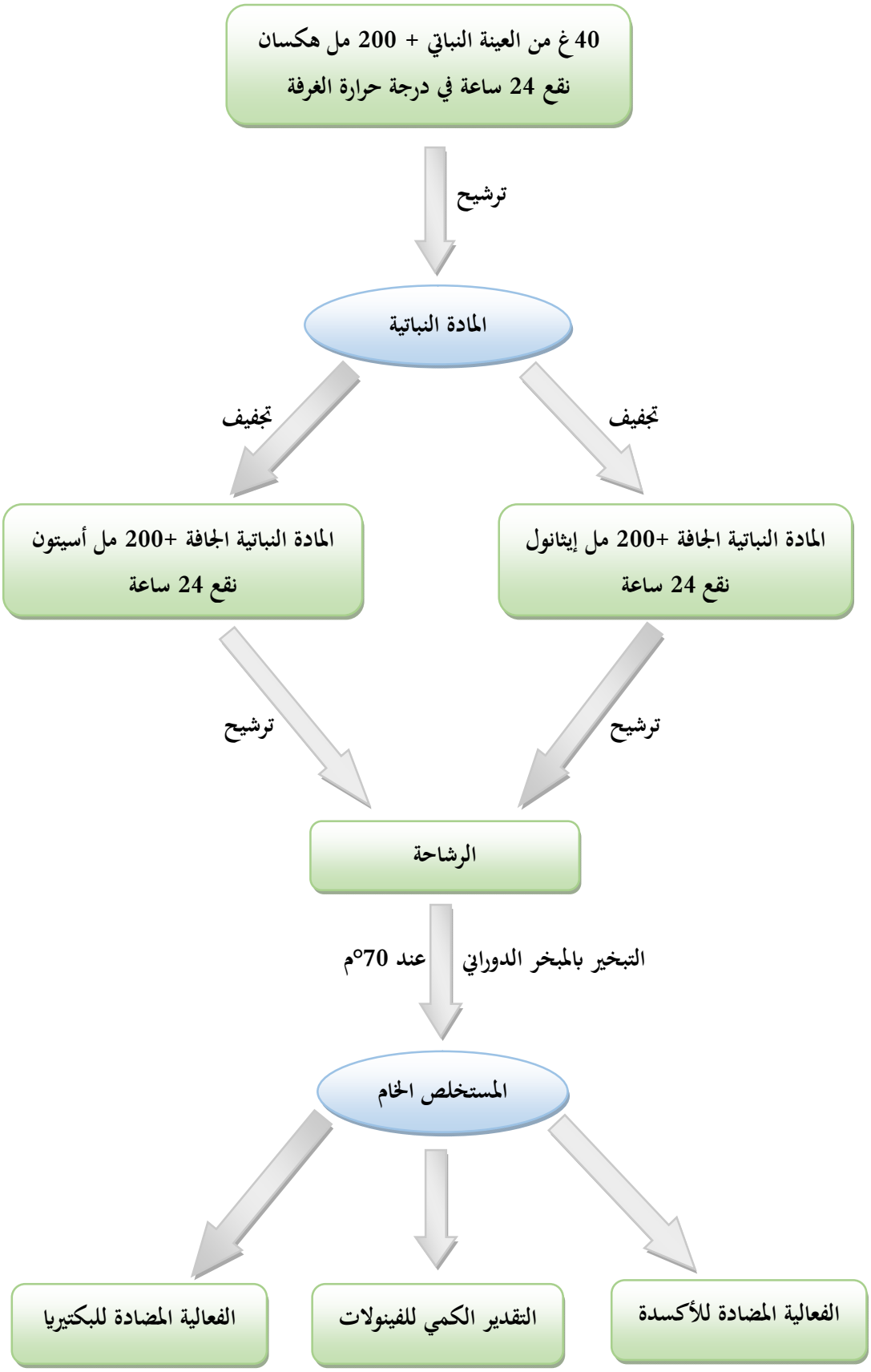
المرحلة الأولى: استخلاص الشحوم: يأخذ وزنا قدره 40غ من مسحوق ثمار نبات القناوية للعينتين و نقوم بنقعه في حجم قدره 200 ملل من الهكسان لمدة ساعة مع تحريك مستمر و نتركه مدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة، بعدها نرشح المزيج.

المرحلة الثانية:

1- يتم التخلص من الراشح المتحصل عليه في المرحلة الأولى و الباقي يوضع في إرلينة و يضاف إليه 200 مل من الأستون و تترك 24 ساعة مع التحريك ثم يرشح بعد ذلك.

2- يتم التخلص من الراشح المتحصل عليه في المرحلة الأولى و الباقي يوضع في إرلينة و يضاف إليه 200 مل من الإيثانول و تترك 24 ساعة مع التحريك ثم يرشح بعد ذلك.

بعدها يجفف الراشح بواسطة جهاز التبخير الدوراني عند درجة حرارة 70°م، و المستخلص الخام المتحصل عليه يوضع في قارورات زجاجية و يحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4°م إلى حين الاستخدام.



الشكل(25.III): مخطط يوضح مراحل العمل على المستخلصات

III.2.3.5. نتائج و مناقشة مردود المستخلصات

تم حساب مردود التفاعل للمستخلصات المدروسة بتطبيق العلاقة **(2.III)**.

الجدول (14.III): قيم مردود المستخلصات.

المستخلص	كتلة العينة ب (الغرام)	كتلة المستخلص ب (الغرام)	المردود%
مستخلص الإيثانول	40	1.2386	3.0965
مستخلص الأسيتون	40	0.5735	1.4337

من خلال النتائج نلاحظ أن مردود الاستخلاص للمستخلص الإيثانولي أكبر منه للمستخلص الأسيتوني، ويعود ذلك إلى الاختلاف في طبيعة المذيب و الطبيعة الكيميائية للعينات المدروسة.

III.3.3.5. التقدير الكمي للفينولات

أ) طريقة العمل على المستخلصات

نقوم بتحضير المستخلص الأم تركيزه 5 ملغ /مل من كل عينة موجودة لدراسة، ومن هذا الأخير نقوم بتحضير تراكيز مقدرة ب 2 ملغ /مل للمستخلص الإيثانولي و 0.8 ملغ /مل للمستخلص الأسيتوني، و تأخذ من كل تركيز 0.2 مل ونضيف له 1مل من كاشف الفولين FC، يترك في الظلام لمدة 5 دقائق ثم نضيف له 0.8 مل من محلول كربونات الصوديوم بتركيز 7.5%، ونتركه في الظلام لمدة 30دقيقة، حتى نتحصل على اللون المطلوب (أزرق).

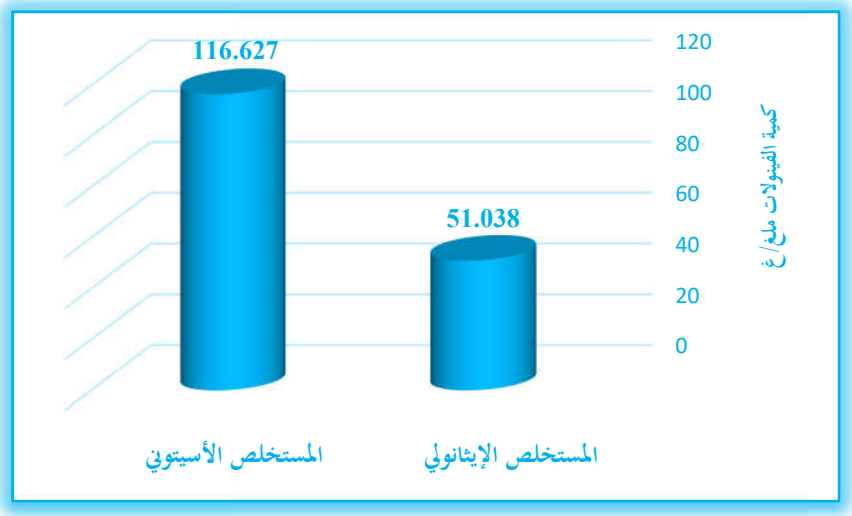
من خلال التجارب المدروسة في التقدير الكمي للفينولات، تم تسجيل الامتصاصية للمستخلصين و من المنحنى القياسي لحمض الغاليك (الشكل**(15.III)**)، حيث يتم تقدير التركيز وكمية الفينولات في المستخلصين (الإيثانولي و الأسيتوني) كما يوضحه الجدول الموالي:

الجدول (15.III): قيم الامتصاصية و كمية الفينولات في كل مستخلص

العينات	مستخلص إيثانول	مستخلص أسيتون
التركيز ملغ/مل	2	0.8
الإمتصاصية	0.35	0.32
تركيز الفينول ملغ/مل	0.1020	0.0933
كمية الفينول ملغ/غ	51.038	116.627

مناقشة النتائج

من خلال النتائج المدونة في الشكل **(26.III)** للتقدير الكمي للفينولات الكلية، لوحظ أن أعلى قيمة لكمية الفينول كانت في للمستخلص الأسيتوني حيث بلغت 116.62 ملغ/غ، بينما بلغت 51.03 ملغ/غ بالنسبة للمستخلص الإيثانولي. ومنه فإن أكبر كمية للفينولات تعود للمستخلص الأسيتوني هذا راجع إلى اختلاف التركيب الكيميائي لكل مستخلص حيث تختلف ذوبانيتها حسب المذيب المستعمل. ونلاحظ أن هذه النتائج تتفق مع نتائج سابقة (Adewale & al… 2020) حيث وجدوا أن كمية الفينولات الكلية للمستخلص المائي للثمار (150.5±2.97) ملغ/غ و للمستخلص الإيثانولي (20.79±3.65) ملغ/غ[32].



الشكل(26.III): كمية الفينولات بالملغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من وزن المستخلص.

III.4.3.5. التقدير الكمي للفلافونيدات

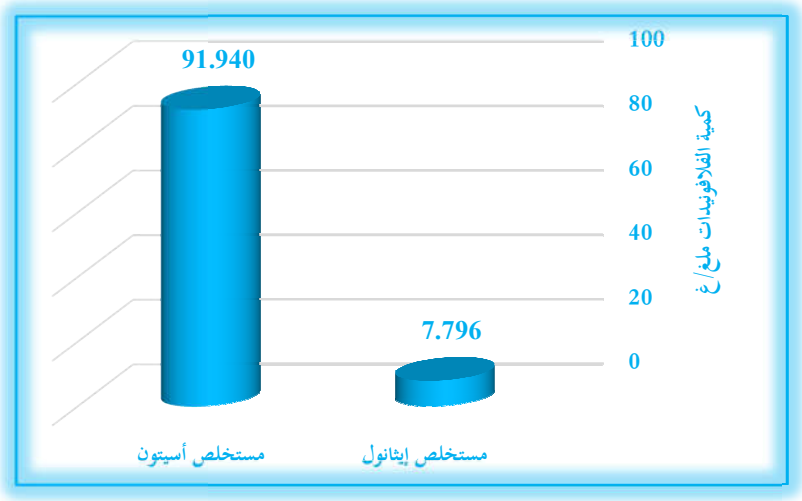
من خلال التجارب المدروسة في التقدير الكمي للفلافونيدات، تم تسجيل الامتصاصية للمستخلصين و بتطبيق علاقات رياضية مطبقة على المنحنى القياسي الروتين، حيث يتم تقدير التركيز وكمية الفلافونيدات في المستخلصين الإيثانولي والأسيتوني، و النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول التالي:

الجدول (16.III): قيم الامتصاصية و كمية الفلافونيدات في كل مستخلص.

العينات	مستخلص إيثانول	مستخلص أسيتون
التركيز ملغ/مل	2	0.8
الامتصاصية	0.26	1.10
تركيز الفلافونيدات ملغ/مل	0.0155	0.0735
كمية الفلافونيدات ملغ/غ	7.796	91.940

مناقشة النتائج

من خلال الجدول (16.III) لوحظ أن أكبر كمية للفلافونيدات كانت للمستخلص الأسيتوني حيث بلغت 91.94 ملغ/غ، بينما بلغت في المستخلص الإيثانولي 7.79 ملغ/غ، و في دراسة ل (Mbaebie & al…2012) كانت كمية الفلافونيدات للمستخلص المائي لثمار نبات القناوية (*A esculentus* L.) 72.69 ملغ/غ[33]، و 50.52 ملغ/غ للمستخلص الإيثانولي للثمار في دراسة أخرى (Bogninou & al…2018)[17]. ومنه يعود الفرق في كمية الفلافونيدات لكل مستخلص لاختلاف المذيبات، كما أن هذه النتائج تتوافق مع كمية الفينولات في كل المستخلص.

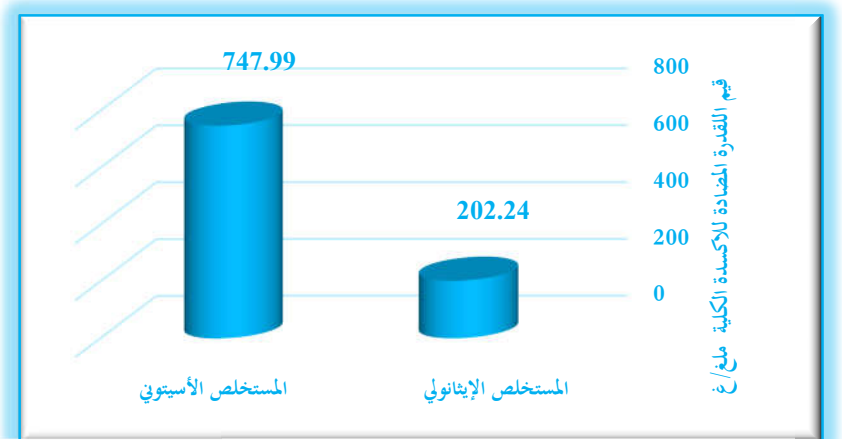


الشكل (27.III): كمية الفلافونيدات بالملغ مكافئ لحمض الروتين / غ من وزن المستخلص.

III.5.3.5. الفعالية المضادة للأكسدة

أ) القدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC

من نتائج الامتصاصية لمحاليل المحضرة و من علاقة المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC للمستخلصات و حساب الكمية المكافئة لـ1 غ من المستخلص.



الشكل(28.III): قيم القدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC.

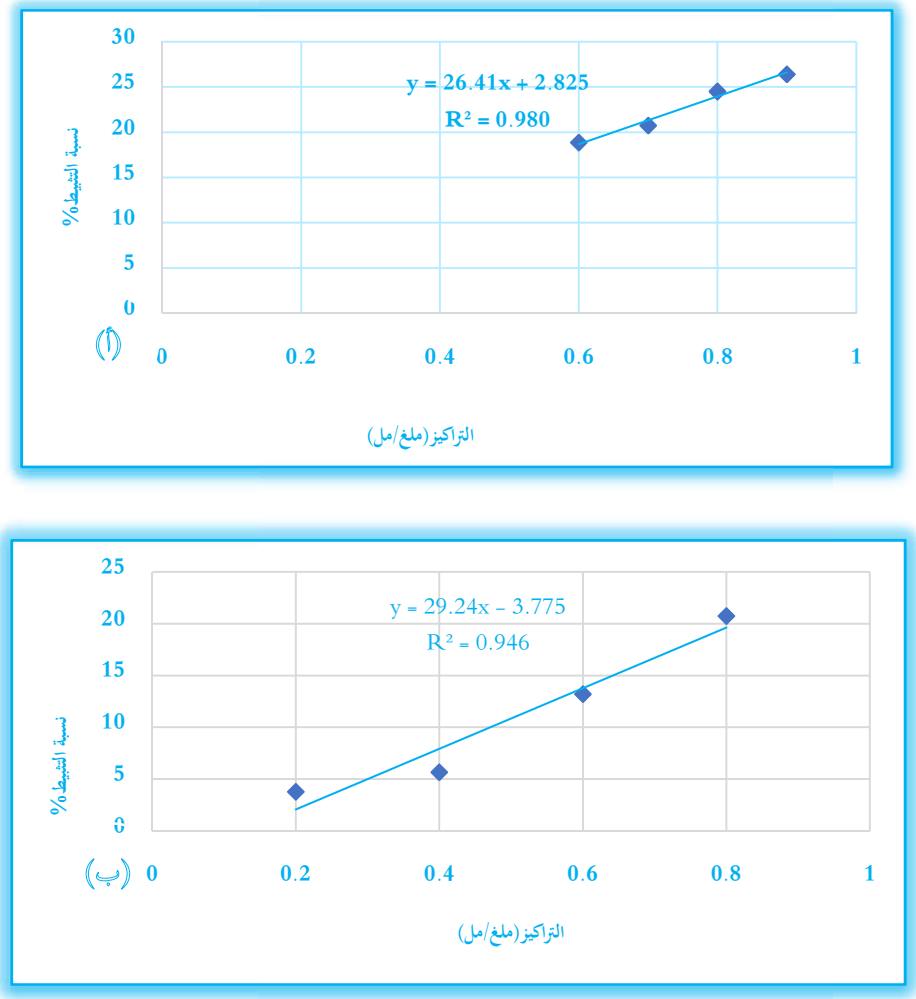
مناقشة النتائج

من خلال النتائج السابقة المتحصل عليها و جد أن أكبر قيمة لاختبار القدرة المضادة للأكسدة الكلية كانت للمستخلص الأسيتوني حيث بلغت قيمة قصوى 747.99 ملغ/غ، بينما في المستخلص الإيثانولي قدرت ب 202.24 ملغ/غ.

و منه كانت أعلى قيم القدرة المضادة للأكسدة للمستخلص الأسيتوني و هذا دليل على محتوى المستخلصات للمركبات الفينولية و الفلافونيدات التي كانت أكثر في المستخلص الأسيتوني. حيث كشفت دراسات سابقة أن ثمار و بذور القناوية تحتوي على نسب عالية من الفينولات و الفلافونيدات[34]. وقد ثبت أيضا أن الفينولات و الفلافونيدات تمتلكان تأثيرات قوية مضادة للأكسدة و للإجهاد[35].

ب) القدرة التثبيطية للجذرالحر DPPH•

من خلال المنحنيات المبينة في الشكل (29.III) و التي تمثل منحنيات النشاطية للعينات المدروسة في تثبيط الجذر الحر DPPH والتي من خلالها تحسب قيمة IC_{50} للعينات علما أن القيمة الأقل لها تعني التأثير التثبيطي الأفضل، أظهرت أن كل من المستخلصات والشاهد حمض الأسكوربيك تثبط الجذر الحر DPPH بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز و النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول (17.III).



الشكل(29.III): اختبار DPPH للمستخلصات (أ): المستخلص الأسيتوني (ب): المستخلص الإيثانولي.

الجدول(17.III): قيم IC_{50} لكل مستخلص

العينة	الإيثانولي	الأسيتوني
IC_{50}	1.83	1.78
ARP	0.54	0.56

مناقشة النتائج

من خلال نتائج الجدول (17.III) تبين أن أعلى فعالية مضادة للأكسدة كانت للمستخلص الأسيتوني حيث وصلت قيمة IC_{50} إلى 1.78 ملغ/مل أما بالنسبة للمستخلص الإيثانولي فقد بلغت 1.83 ملغ/مل. وهذا يتوافق مع كمية الفينولات المتواجدة في كل عينة. كما لاحظنا أن قيمة IC_{50} المتحصل عليها في هذا البحث أكبر من تلك المتحصل

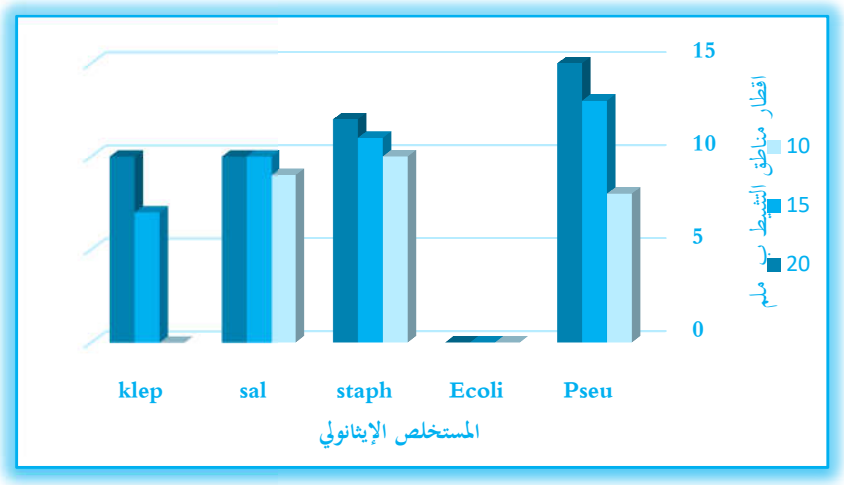
عليها في دراسة (Nargis & al... 2019) إذ قدرت ب 270.99 مكغ/مل[27]. وقد أظهر التحليل البيوكيميائي أن ثمار و بذور القناوية (*A esculentus* L.) تعزز القدرة المضادة للأكسدة و ذلك عن طريق خفض مستوى Malondialdehyde و زيادة مستويات فوق أكسيد الايسموتاز وبيروكسيد الجلوتاثيون[36].

III.6.3.5. الفعالية المضادة للبكتيريا

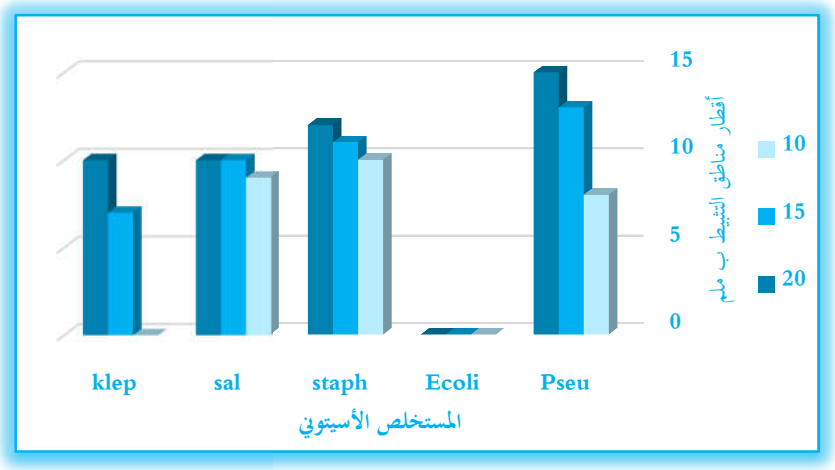
بعد الحضن لمدة 24h، تم قياس قطر التثبيط حول الأقراص المشبعة بالمستخلصات بتراكيز مختلفة، حيث أن المذيب DMSO لم ينتج عنه أي قرص تثبيطي و النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول التالي:

الجدول (III.18): أقطار التثبيط لأنواع البكتيريا الناتجة عن تراكيز مختلفة للعينات التراكيز مأخوذة بالملم

المستخلص الأسيتوني			المستخلص الإيثانولي			نوع البكتيريا
20	15	10	20	15	10	
9	7	7	9	7	0	***Pseudomonas Aerogenosa***
9	8	7	8	0	0	***Escherichia Coli***
13	12	11	12	11	10	***Staphylococcus Auris***
10	10	9	10	8	0	***Salmonella Typhi***
9	7	7	10	9	7	***Klepsiella***



الشكل (III.30): أقطار مناطق التثبيط بالملم للمستخلص الإيثانولي



الشكل(31.III): أقطار مناطق التثبيط بالملم للمستخلص الأسيتوني.

مناقشة النتائج

- ***Pseudomonas aerogenosa***

المستخلص الإيثانولي لم يظهر قطر تثبيطي في التركيز 10 ملم بينما ظهرت أقطار تثبيطية في التركيز15 ملغ/مل و20 ملغ/مل حيث بلغت 7 ملم و9 ملم على التوالي. و بالنسبة لمستخلص الأسيتوني ظهرت أقطار تثبيطية عند كل من التراكيز 10ملغ/مل و 15 ملغ/مل حيث وصلت هذه الأقطار التثبيطية إلى 7 ملم و عند التركيز 20 ملغ/مل أعطى قطر تثبيطي قدر ب 9 ملم.

- ***Escherichia coli***

المستخلص الإيثانولي لم يظهر قطر تثبيطي عند التراكيز الضعيفة بينما ظهر قطر تثبيطي عند التركيز 20 ملغ/مل حيث وصل القطر التثبيطي إلى 8 ملم. و المستخلص الأسيتوني أعطى أقطار تثبيطية عند التراكيز 10، 15، 20 ملغ/مل قدرت ب: 7، 8، 9 ملم على الترتيب.

- ***Staphylococcus auris***

المستخلص الإيثانولي أعطى أقطار تثبيطية عند التركيز 10 ، 15 ، 20 ملغ/مل حيث قدرت ب: 10،11 و 12 ملم على التوالي. و كذلك المستخلص الأسيتوني أظهر أقطار تثبيطية عند نفس التراكيز السابقة قدرت ب: 11، 12 و 13 ملم على التوالي.

- ***Salmonella typhi***

المستخلص الإيثانولي لثمار القناوية لم يظهر نتيجة عند التركيز10 ملغ/مل بينما أعطى نتائج عند كل من التركيز 15 و 20ملغ/مل حيث كانت قيمة قطر التثبيط: 8 و10 ملم على التوالي.و بالنسبة للمستخلص الأسيتوني ظهر قطر تثبيطي عند التركيز 10 ملغ/مل قدر ب 9ملم و عند كل من التراكيز 15 و20 ملغ/مل أعطى نفس النتيجة المقدرة ب 10 ملم.

- ***Klepsiella***

ظهرت أقطار تثبيطية للمستخلص الإيثانولي عند التركيز 10، 15 و 20 ملغ/مل قدرت ب: 7، 9 و 10 ملم على التوالي. و المستخلص الأسيتوني أظهر نتائج عند نفس التراكيز قدرت الأقطار الثبيطية ب: 9، 12، 13 ملم على الترتيب.

و منه يمكن القول أن بكتيريا *Staphylococcus auris* أكثر حساسية للمستخلصين الإيثانولي و الأسيتوني، يليها بكتيريا *Klepsiella* ثم *Salmonellatyphi* بينما كانت *E coli* أقل حساسية للمستخلص الإيثانولي و *Pseudomonas aerogenosa* أقل حساسية للمستخلص الأسيتوني. و لوحظ أنه كلما زاد التركيز زادت الاستجابة و منه نستنتج أن للمستخلصات فعالية حيوية و بيولوجية.

وقد بينت دراسات سابقة (Taiye & al…2013) أن مستخلص ثمار و أزهار نبات (*A esculentus* L.) له خصائص مضادة لبكتيريا *Staphylococcus auris* و *Klepsiella*[24] و في دراسة أخرى(De Carvalho & al... 2011) وجود فعالية ضد بكتيريا *Pseudomonas aerogenosa* [30].

المراجع

المراجع العربية

31- فاطمة إ س و أياد ج خ. فصل وتشخيص بعض المركبات الفينولية و حامض الماليك من أزهار الكجرات *Hibiscus sabdariffa* L. و دراسة تأثيرها على بعض أنواع البكتريا الممرضة. مجلة علوم الرافدين. علم النبات. عدد خاص بالمؤتمر العلمي الثالث لعلوم الحياة،27(5)، (2018)، 169-180.

المراجع الأجنبية

1- Singleton V L and Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158, (1965).

2- Ham J S. Kim H Y and Lim S T. Antioxidant and deodorizing activities of phenolic components in 24. chestnut inner shell extracts. Industrial Crops and Products, 73, (2015), 99-105.

3- Prieto P. Pineda M and Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem, 269, (1996), 337-341.

4- Kumaran A and Karunakaran R J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. Food Science and Technology, 40, (2007), 344-352.

5-Mbaebie B O. Edeoga H O and Afolayan AJ. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of Schotia latifolia Jacq. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(2), (2012), 118-124.

6- Snyder L R. Kirkland J J and Dolan J W. Introduction tomodern liquid chromatography. A John Wiley & Sons. Inc., Publication. Hoboken. New Jersey. Untied States of America.1-2. (2010).

7- Brand-Williams W. Cuvelier M E. Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technology, 28, (1995), 25-30.

8- Benzie I F and Strain J J. The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analatical Biochemistry, 239, (1996), 70-76.

9-Dia Ouahida. « Optimisation de l'extration des polyphénols des (*Phoenix dactylifera)* L par différents solvants et méthodes». Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah. Ouargla, (2019).

10- Dhull S B. Kaur P and Purewal S S. Phytochemical analysis, phenolic compounds, condensed tannin content and antioxidant potential in Marwa (Origanum majorana) seed extracts. Resource Efficient Technologies, 2(4), (2016), 168-174.

11- Singh J P. Kaur A. Singh N. Nim L. Shevkani K and Kaur H et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolana (*Syzygiumcumini*) fruit polyphenols. LWT-Food Science and Technology, 65, (2016), 1025-1030.

12- Ardestani A. Yazdanaparast R. Inhibitery effects of ethyl acetate extract of Teucrium polium on in vitro protein glycoxidation. Food and Chemical Toxicology, 45, (2007), 2402-2411.

13- Asadi S. Ahmadiani A. Ali Esmaeili A. Sonboli A. Ansari N. Khodagholi F. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six Salvia species from Iran: A comparative study. Food Chemical and Toxicology, 48(5), (2010), 1341-1349.

14- Pulido R. Bravo L. Sama-Catixto F. Antioxidant activity of dictay polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. J Agric Food Chem, 48(8), (2000), 3396-3402.

15- Delgado-Adámez J. Fernández-León M F. Velardo-Micharet B andGonzález-Gómez D. In vitro assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different Prunus salicina Lindl. cultivars. Food and chemical toxicology, 50(7), (2012), 2481-2486.

16- Iliyasu A A I. Muhammad C. Faisal A. Halilu I. Phytochemical Screening of Selected Varieties of Okro (*Abelmochus Esculentus)* Fruit. Central European Journal of Botany, 6(1), (2020), 7-11.

17- Bogninou G S R. Bigo A P H. Gnanwe M. Agbangnan D C P. Chabi N W. Yedomonhan H. Avlessi F. Phytochemical Composition and Antioxydant Capacity of *Abelmoschus esculentus* L. Fresh Immature Fruits. American Journal of Food Science and Technology, 6(5), (2018), 223-227.

18- Lianmei H. Wenlan Y. Ying L. Nagendra P. and Zhaoxin T. Antioxidant Activity of Extract and Its Major Constituents from Okra Seed on Rat Hepatocytes Injured by Carbon Tetrachloride. Bio Med Research International, (2014), 1-9.

19- Fangbo X. Yu Z. Mengqiu L. Qi C. Yonghong L. Xinmin L and Ruile P. Antioxidant and Anti-Fatigue Constituents of Okra. Nutrients, 7, (2015), 8846-8858.

20- Konate B. Nana R. Zongo K J. Badiel B. Nanema S L and et Tamini Z. Evaluation of agro-physiological and biochemical parameters of a variety and four accessions of gombo [*Abelmoschus esculentus* (L.) moench] grown undernatural field conditions. International Journal of Recent Scientific Research, 8(10), (2017), 21154-21162.

21- Tiwari A. Dubey P. Gupta S K. Watal G. Screened Phytochemicals of *A. esculentus* Leaves and their Therapeutic Role as an Antioxidant. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 8(9), (2016), 1509-1515.

22- Saptono H. Thu Zar S M. Spectrophotometric Determination of Flavonoids Content in Fruit of Okra (*Abelmoschus escullentus* L. Moench) from Magelang Central Java Indonesia. International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology, (2019).

23- Mamuna H. Syeda M H. Shahzad S M. Muneeza M, Muhammad K K. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Potential of *Abelmoschus esculentus*. Chemical and Biomolecular Engineering, 5(4), (2020), 69-79.

24-Mamuna H. Syeda M H. Shahzad S M. Maryam M. Evaluation of Biological Characteristics of *Abelmoschus esculentus*. International Journal of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology, 5(2), (2020), 44-51.

25- Gemede H F. Ratta N. Haki G D. Beyene F. Woldegiorgis A Z. Nutritional quality and health benefits of okra (Abelmoschusesculentus). A review Am J Food Sci Nutr, 2(1), (2015), 1-8.

26- Sathish K D. Srinivasa R B. Durga P G. Brahma S R D. Nadendla R and Vijayapandi P. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antistress, and Nootropic Activities of Aqueous and Methanolic Seed Extracts of Ladies Finger (*Abelmoschus esculentus* L.) in Mice. the Scientific World Journal, (2014), 1-14.

27- Nargis S C. Sifat J. Farhana F. Nadira B. Elina A Z. A Review on Ethnomedicinal, Pharmacological, Phytochemical and Pharmaceutical Profile of Lady's Finger (*Abelmoschus esculentus* L.) Plant. Pharmacology & Pharmacy, 10, (2019), 94-108.

28- Kobori M. Takahashi Y. Akimoto Y. Sakurai M. Matsunaga I. Nishimuro H. Ippoushi K. Oike H and Ohnishi-Kameyama M. Chronic High Intake of Quercetin Reduces Oxidative Stress and Induces Expression of the Antioxidant Enzymes in the Liver and Visceral Adipose Tissues in Mice. Journal of Functional Foods, 15, (2015), 551-560.

29- Taiye O A. Temitope L O. Christopher I C and Bolanle A. Anti-Helicobacter pylori Activity of Abelmoschusesculentus L. Moench (okra): An in vitro Study. Afr J Pure and Appl Chem, 7 (9), (2013), 330-336.

30-De Carvalho C C C R. Cruz P A. Da Fonseca M M R and Filho L X. Antibacterial Properties of the Extract of Abelmoschusesculentus. Biotechnol Bio processs Eng, 16(5), (2011), 971-977.

32- Esan A M. Olaiya C O. Omolekan T O. Aremu K A. Adeyemi H R Y. Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Aqueous and Ethanol Extracts of Indole Acetic Acid-Treated Okra Fruits. Journal of Advanced Biochemistry, 1(1), (2020), 1-9.

33- Mbaebie B O, Edeoga H O, Afolayan A J. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of Schotia latifolia Jacq. Asian Pac J Trop Biomed, 2(2), (2012), 118-124.

34- Zhou Y. Jia X. Shi J. Xu Y. Jing L and Jia L. Two New Pentacyclic Triterpenes from *Abelmoschus esculentus*. Helvetica Chimica Acta, 96, (2013), 533-537.

35- Lin Y. Liu H L. Fang J. Yu C H. Xiong Y K and Yuan K. Anti-Fatigue and Vaso-Protective Effects of Quercetin-3-O-Gentiobiose on Oxidative Stress and Vascular Endothelial Dysfunction Induced by Endurance Swimming in Rats. Food and Chemical Toxicology, 68, (2014), 290-296.

36- Xia F. Zhong . Li M and Chang Q. Anti-Oxidant and Anti-Fatigue Constituents of Okra. Nutrients, 7, (2015), 8846-8858.

الخلاصة

الخلاصة العامة

تعد القناوية من النباتات التي تتميز عن بقية المحاصيل الأخرى بثمارها فهي مرغوبة بدرجة كبيرة عند الإنسان، و لهذا قمنا بدراسة اختبار فعالية المركبات الفينولية المتواجدة فيها المضادة البكتيريا و المضادة للأكسدة. حيث اختبرنا تأثير طريقة الاستخلاص، تأثير وقت الجني و كذلك تأثير المذيب على المحتوى الفينولي و النشاط المضاد للأكسدة و المضاد للبكتيريا للمستخلص الخام لثمار نبات (*Abelmoschus esculentus*).

- دراسة تأثير طريقة الإستخلاص

تم إستخلاص المركبات الفينولية لعينتين من ثمار نبات القناوية بثلاث طرق (النقع، سوكسلي و الأمواج الفوق الصوتية) و بإستخدام الإيثانول كمذيب. فكان أكبر مردود لمستخلص سوكسلي للعينتين الخضراء (A)بقيمة 5.211غ/100غ و المتخشبة (B) 2.816غ/100غ، و أقل مردود كان لمستخلص الأمواج الفوق الصوتية 1.280غ/100غ للعينة (A) و 1.129غ/100غ للعينة (B)، و بمقارنة العينتين وجد أن مردود العينة (A) أكبر من مردود العينة الجافة (B) بالنسبة للطرق الثلاث.

أما عن كمية الفينولات الكلية التي تم الحصول عليها بالطرق الثلاث باستخدام جهاز الأشعة الفوق بنفسجية و المرئية، وجد أن طريقة سوكسلي هي أفضل طريقة حيث قدرت كمية الفينولات الكلية بـ 1.846 ملغ/غ للعينة(A) و1.143 ملغ/غ للعينة(B)، تليها طريقة النقع بمحتوى 0.781 ملغ/غ للعينة (A) و0.362 ملغ/غ للعينة (B)، و في المرتبة الأخيرة طريقة الموجات الفوق الصوتية بمحتوى أقل بحوالي 0.736 ملغ/غ للعينة (A) و 0.682 ملغ/غ للعينة (B).

بين التحليل الكمي للمركبات الفينولية لمستخلص النقع للعينة (A) تحتوي على حمض الأسكوربيك، الكرسيتين و الكلورجينيك ، أما للعينة (B) فتحتوي حمض الغاليك و حمض الكافييك، و مستخلص سوكسلي للعينة (A) يحتوي حمض الغاليك، الكرسيتين، الفانيلين، الروتين و حمض الكلورجينيك. و العينة (B) تحتوي حمض الغاليك و حمض الكلورجينيك. أما بالنسبة لمستخلص الأمواج الفوق الصوتية العينة (A) فوجد أنها تحتوي على الكرسيتين، حمض الغاليك، الروتين، حمض الكلورجينيك و حمض الكافييك (0.0125 مكغ/ملغ). في حين وجد أن العينة (B) تحتوي على الروتين، حمض الكافييك و حمض الكلورجينيك. تظهر النتائج أن هناك اختلاف في نوعية و كمية الفيونولات للمستخلصات و من هنا يبدو جليا تأثير طرق الاستخلاص و كذلك تأثير نضج الثمار على المحتوى الفينولي.

وفي تقييم القدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC بعدد المليغرامات الموافقة لحمض الغاليك لكل غرام من مستخلص وجد أن طريقة النقع هي أفضل طريقة بالنسبة للعينتين (A) و (B) حيث قدرت قيمة القدرة الكلية المضادة للأكسدة ب

0.0405±11.49 ملغ/غ للعينة (A) و 0.162±10.347 ملغ/غ للعينة (B) تليها طريقة سوكسلي و في الأخير طريقة الأمواج الفوق الصوتية. كما وجد أن القدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC للعينة الخضراء (A) أكبر مقارنة بالعينة الجافة (B) في طريقتي النقع و سوكسلي و بالعكس في طريقة الأمواج الفوق الصوتية. أما عن اختبار DPPH فقد وجد أن أعلى فعالية مضادة للأكسدة لمستخلص سوكسلي للعينة (B) حيث وصلت قيمة IC_{50} إلى 2.106 ملغ/مل تليها طريقة الأمواج الفوق الصوتية للعينة (B) 2.764 ملغ/مل و بعدها العينة (A) بنفس طريقة الاستخلاص، و تأتي طريقة النقع في المرتبة الأخيرة للعينتين (A) و (B).

تظهر النتائج أن قيم الفعالية المضادة للأكسدة تتوافق مع كمية الفينولات الكلية المتواجدة في كل عينة مما يؤكد أن المركبات الفينولية هي المسؤولة عن النشاط المضاد للأكسدة. كما بينت النتائج أن طريقة سوكسلي هي الأمثل للإستخلاص مقارنة بطريقة النقع، و طريقة الأمواج الفوق الصوتية.

- دراسة تأثير وقت الجني

تم استخلاص المركبات الفينولية من ثمار نبات القناوية لثلاث أشهر مختلفة (أوت، سبتمبر، أكتوبر) بطريقة النقع و باستخدام الإيثانول 80% كمذيب، فكان أكبر مردود استخلاص لعينة شهر أوت 15.3174 غ/100 غ و أقل مردود لعينة شهر سبتمبر 6.6276 غ/100 غ.

أظهرت النتائج أن كمية كل من الفينولات، الفلافونيدات و الفلافانول لمستخلص شهر أوت كانت هي الأكبر بقيمة 5.75±190.11 ملغ/غ، 0.54±24.21 ملغ/غ و 0.05±9.87 ملغ/غ على الترتيب يليه مستخلص شهر سبتمبر و يأتي مستخلص شهر أكتوبر في الأخير ، حيث وجد أن هناك توافق كبير بين كمية الفينولات الكلية و كمية الفلافونيدات و الفلافانول.

كما بينت النتائج أن عينة شهر أوت تحتوي على حمض الأسكوربيك، حمض الغاليك، حمض البيوكومارين، الفانيلين و الكرسيتين، و تحتوي عينتي شهري سبتمبر و أكتوبر على حمض الأسكوربيك، حمض الكافييك، حمض البيوكومارين و الكرسيتين لكن بكميات متفاوتة.

و في ما يخص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات استعملنا ثلاث طرق وهم اختبار TAC و اختبار DPPH و اختبار FRAP، و قد بينت النتائج أن هناك نشاطية معتبرة للمستخلصات، ففيما يخص اختبارTAC أظهرت النتائج أن مستخلص شهر أوت كانت له أكبر فعالية قدرت بـ (210.36±3.74) ملغ/غ، و كذلك اختبار FRAP و DPPH بينا أن مستخلص شهر أوت له فعالية أكبر. حيث قدرت الفعالية بـ (473.54±7.05) ملغ/غ بالنسبة لاختبار FRAP

وصلت قيمة IC_{50} إلى (14.33±0.55) ملغ/مل بالنسبة لاختبار DPPH. يليه مستخلص شهر سبتمبر و أقل فعالية كانت لمستخلص شهر أكتوبر. ونلاحظ وجود علاقة طردية بين النشاط المضاد للأكسدة و كمية الفينولات المتواجدة في كل عينة.

أما عن دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات تمت بالاختبار على ثلاث أنواع مختلفة من البكتيريا حيث أظهرت فعالية أكبر عند التراكيز القوية خاصة عند نوع *Staphylococcus auris*، وقد كان لعينة شهر أوت فعالية أكثر ضد البكتيريا مقارنة بعينتي شهري سبتمبر و أكتوبر.

هذه النتائج تتوافق كثيرا مع طبيعة القناوية كونها من الخضر الصيفية إذ تصل ذروة نموها الطبيعي في فصل الصيف، حيث بينت النتائج أن عينة شهر أوت كانت الأحسن.

- دراسة تأثير المذيب

تم الاستخلاص بمذيبين (الإيثانول و الأسيتون) و بإتباع طريقة النقع فكان مردود المستخلص الإيثانولي 3.09 غ/100 غ و هو أكبر من مردود المستخلص الأسيتوني و الذي قدر بـ 1.43 غ/100 غ.

و بالنسبة لكمية الفينولات الكلية و كذا كمية الفلافونويدات التي يحويها المستخلص الخام لثمار القناوية فقد أظهرت النتائج أن كمية كل من الفينولات، الفلافونيدات في المستخلص الأسيتوني و التي قدرت بـ 116.62 ملغ/غ و 51.03 ملغ/غ على التوالي أكبر منها في المستخلص الإيثانولي و المقدرة ب 91.94 ملغ/غ و 7.796 ملغ/غ

و بالنسبة للقدرة المضادة للأكسدة الكلية TAC فكانت أعلى قيمة مسجلة للمستخلص الأسيتوني حيث قدرت بـ 747.99 مغ/غ، بينما قدرت قيمتها بالنسبة للمستخلص الإيثانولي بـ 202.24 مغ/غ. كذلك في اختبار DPPH وجد أن أقل قيمة لـIC_{50} للمستخلص الأسيتوني حيث وصلت قيمتها إلى 1.78 ملغ/مل، و بالنسبة للمستخلص الإيثانولي فقدرت ب 1.83 ملغ/مل مما يعني أن المستخلص الأسيتوني هو الأكثر فعالية.

و فيما يخص دراسة النشاط المضاد للبكتيريا تم اختبار تأثير المستخلصات على خمسة أنواع مختلفة من السلالات البكتيرية *Pseudomonasaerogenosa*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus auris*، *Salmonella typhi*، *Klepsiella* حيث أظهرت هذه المستخلصات نشاط متفاوت بين الضعيف و الواضح حيث أنه كلما زاد التركيز زاد التثبيط ويرجع ارتفاع نشاط التثبيط إلى زيادة تركيز المادة الفعالة في المستخلصات، و قدر أكبر قطر تثبيطي بـ 13ملم عند التركيز 20 ملغ/مل بالنسبة للسلالات البكتيرية *Staphylococcus auris* و *Klepsiella* للمستخلص الأسيتوني.

و بناءا على هذه النتائج يمكن القول أن ثمار نبات القناوية *Abelmoschus esculentus* غنية جدا بالمركبات الفينولية مما يكسبها نشاط مضاد للأكسدة و للبكتيريا. كما يمكن إستخدام مستخلصاتها في المستقبل كبديل عن المواد الحافظة الصناعية و استعمالات أخرى...