الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الشهيد حمه لخضر- الوادي
كلية العلوم الدقيقة
قسم الكيمياء

رقم الترتيب:.....

الرقم التسلسلي:.....

**مذكرة تخرج لنيل شهادة**

**ماستر أكاديمي في الكيمياء**

تخصص: **كيمياء عضوية**

إعداد الطالبة: يمينة حرزولي

**بعنوان:**

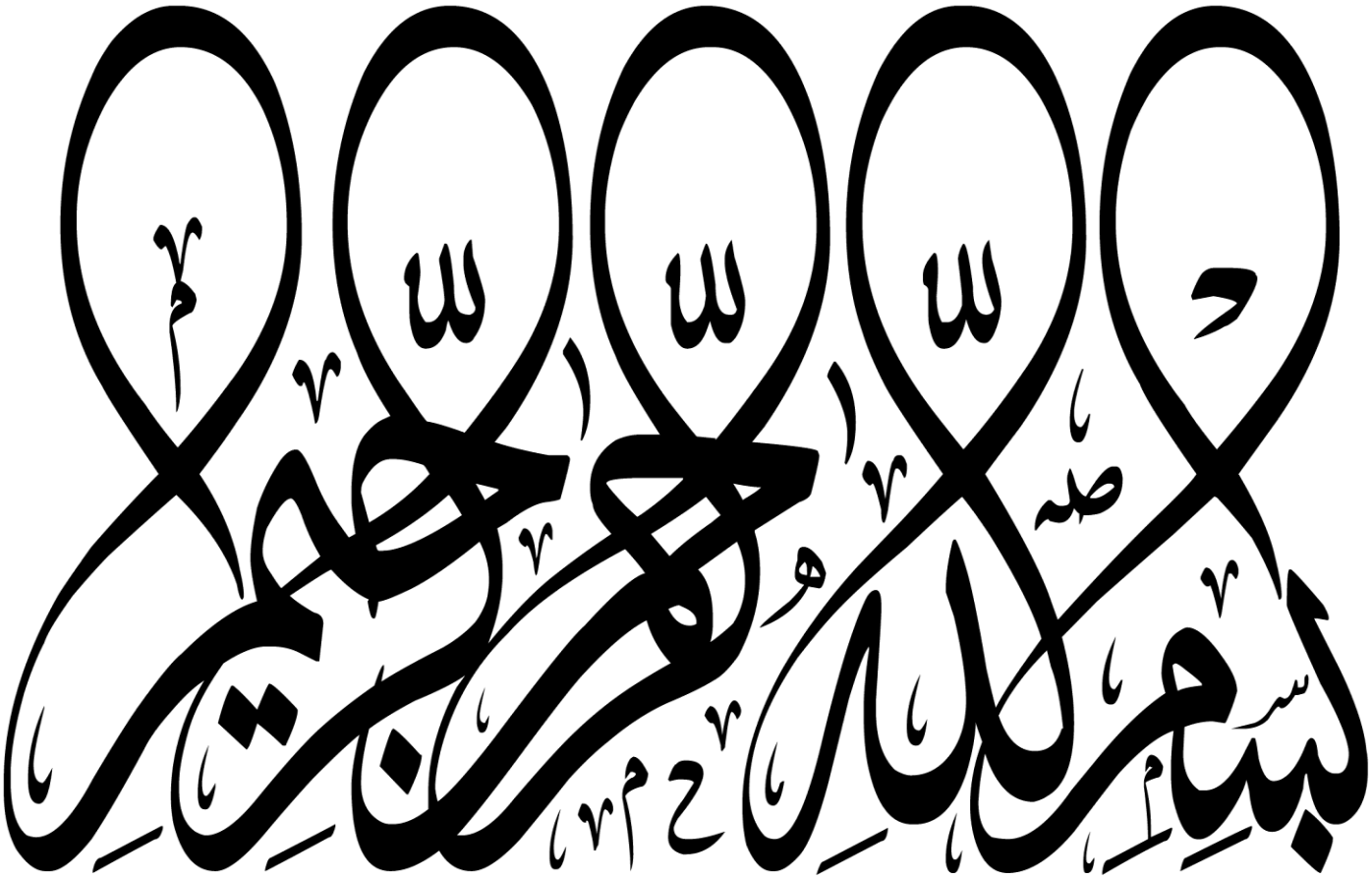
# دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات العضوية لنبات *Moltikia ciliata*

نوقشت يوم: 2018/06/09

أمام اللجنة المكونة من:

| | | | |
|---|---|---|---|
| د- بوبكري شريفة | أستاذ محاضر أ | جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي | رئيسا |
| سويعي بلقاسم | أستاذ مساعد أ | جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي | ممتحنا |
| زيدان محمد | أستاذ مساعد أ | جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي | ممتحنا |
| شيحي سمية | أستاذ مساعد أ | جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي | مؤطرا ومقررا |

الموسم الجامعي: 2018/2017


بسم الله الرحمن الرحيم

# تشكرات

أن الشكر أولا وأخيرا لله عز وجل أن أنعم علي بالتوفيق والسداد لإتمام هذا العمل.

أحمدك ربي حتى ترضى وأحمد إذا رضيت و أحمدك ربي بعد الرضى.

**وعملا بقوله سيد الخلق:** من لا يشكر الناس لا يشكر الله.

أتقدم بجزيل الشكر والامتنان وخالص العرفان والتقدير إلى **والدي ووالدتي** إلى من كللهم الله بالهيبة والوقار، أطرز من خيوط الشمس اللامعة حروف شكر، ومن ماء الذهب عرفان لحرصهم الدائم بالدعاء لي وتشجيعي

أتقدم بكل عبارات الشكر والامتنان إلى الأستاذة المشرفة **شيحي سمية** على ما بذلته من مساعدات و توجيهات ونصائحها القيمة طول مراحل إنجازنا لهذا العمل فجزاها الله خيرا ووفقها في رسالتها إن شاء الله

كما أتقدم بالشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة لقبولهم مناقشة مذكرتي

كما أتقدم بالشكر الخالص إلى : **بشيرة الأحمادي** و **سعيدة بدادة** اللتان كانتا خير معين طوال أيام البحث .

وإلى جميع موظفين وعمال المخابر بكلية العلوم الدقيقة.

وإلى جميع زميلاتي وطلبة دفعة ماستر 2018

وأخيرا أجدد شكري لله عز وجل الذي منحني التوفيق والنجاح .

**يمينة**

## الملخص:

تطرقنا في هذا البحث إلى دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة وللبكتيريا للمستخلصات العضوية (مستخلص أسيتات الأيثيل ، البيوتانول ) لنبات *Moltkia ciliata* المحصل عليها باستخدام المزيج ميثانول / ماء (20/80) ، أسيتون / ماء (20/80).

تم الكشف عن المواد الفعالة في الجزء الهوائي للنبات الجاف وأظهرت النتائج غناها بمعظمها .

ثم التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية ، الفلافونيدات الكلية ، الفلافانولات الكلية ،باستخدام مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية والتقدير الكيفي باستخدام HPLC .

أما بالنسبة لتقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بإتباع الاختبارات الكيميائية DPPH،CAT ، FRAP.

وفي ما يخص تقدير الفاعلية المضادة للبكتيرية فقد تم إنجازها تجاه ثلاث أنواع من السلالات البكتيرية ، عند المقارنة بين المستخلصات العضوية المدروسة نجد أن المحصل عليها من مزيج أسيتون / ماء كانت أفضلها من حيث الطرق المتبعة في الدراسة .



**الكلمات المفتاحية** :*Moltkia ciliata*، المستخلصات العضوية ، الفاعلية المضادة للأكسدة ، الفاعلية المضادة للبكتيرية، الاستخلاص .

## Résume:

Ce travail a été consacré à l' étude chimique et biologique des extraits organiques(extrait d'acétate d'éthyle ,n butanol) de *Moltkia ciliata* ,recueilli en .utilisant les mélangé méthanol /eau (80/20), acétone / eau (80/20)

Les Substances actives ont été détectées sue la partie aérienne de la . plante et les résultats se sont révélés riches

évaluation quantitative des composés phénoliques flavanoles , flavanoides par l' utilisation de la spectroscopie UV-visible et une estimation . qualitative par l' utilisation de l'HPLC

L'efficacité antioxydants a été évaluée par des tests chimiques ( DPPH, .CAT, FRAP).

L'efficacité biologique a été évaluée pour trois types de souches bactériennes .En comparant les extraits étudiés nous avons trouvé que l' extrait obtenu par (acétone / eau) était le meilleur en termes des méthodes utilisées dans . l'étude



**Mots clés** : *Moltkia ciliata* , activité biologique , activité antioxydant , extraits organiques ,extraction .

# الفهرس

## الفهرس


تشكرات..... I

الملخص..... II

قائمة الأشكال..... VIII

قائمة الجدول..... IX

قائمة المنحنيات..... X

قائمة الرموز والمختصرات..... XI

المقدمة..... XII

مراجع مقدمة..... XIII

**الجزء النظري**

**الفصل الأول**

**الدراسة النظرية لنبته** Moltkia Ciliata

I-1- تعريف بالعائلة Boraginaceae..... 16

I-2- التوزيع الجغرافي للعائلة..... 16

I-3- وصف نبات *Moltkia Ciliata*..... 16

I-4 -التصنيف العلمي للنبات *Moltkia Ciliata*..... 19

I-5 -أماكن التواجد..... 19

I-6- الاستعمالات..... 20

المراجع..... 21

**الفصل الثاني**

**عموميات حول الفلافونيدات**

تمهيد..... 23

II-1- تعريف الفلافونيدات..... 23

II-2-تصنيف الفلافونيدات..... 24

II-3-الخصائص الفيزيوكيميائية للفلافونيدات..... 25

II-4- أهمية الفلافونيدات..... 25

II-5- الأهمية الصيدلانية..... 27

II-6- الفاعلية المضادة للأكسدة..... 27

II-7- الفاعلية المضادة للالتهاب..... 27

II-8- الفاعلية المضادة للميكروبات..... 28

II-9- الاستخلاص..... 29

المراجع..... 31

**الفصل الثالث**

**الفاعلية المضادة للأكسدة وللبكتيريا**


مقدمة..... 35
III-1- الجذور الحرة..... 35
III-1-1- تعريفها ..... 35
III-1-2- أنواعها..... 35
III-1-3- جذر DPPH..... 36
III-2- مضادات الأكسدة..... 37
III-2-1- تعريفها..... 37
III-2-2- تصنيفها..... 37
III-2-3- الفلافونيدات والجذور الحرة والنشاط المضاد للأكسدة..... 38
III-2-4- العلاقة بين بنية الفلافونيد والنشاط المضاد للأكسدة..... 38
III-2-5- آلية الفلافونيدات المضادة للأكسدة..... 39
الفاعلية المضادة للبكتيريا..... 40
مدخل ..... 40
III-3-البكتيريا..... 40
III-3-1- تعريفها..... 40
III-3-2- بنيتها..... 40
III-3-3- تصنيف البكتيريا ..... 42
III-4- دراسة فاعلية المضادة للبكتيريا..... 43
III-5- المضادات الحيوية ..... 45
III-5-1- تعريفها ..... 45
III-5-2- انواعها..... 45
III-5-3- تأثيرها ..... 46
III-6- مقاومة البكتيرية ..... 46
III-6-1- خواص الجذمة البكتيرية..... 46
III-6-2- حساسية الميكروب ..... 46
المراجع..... 48


**الجزء العملي**

**الفصل الرابع**

**الطرق والوسائل**


IV-1- جمع العينات ..... 52
IV-2- الأجهزة والمواد المستعملة ..... 52
IV-3- الاختبارات الكيميائية الأولية ..... 53
IV-4- الاستخلاص ..... 57
IV-5- التقدير الكمي بواسطة مطيافية الأشعة فوق البنفسجية- المرئية..... 60
IV-5-1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية - المرئية (UV-visible)..... 60

IV-5-2- التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية ..... 60
IV-5-3- التقدير الكمي لفلافونيدات الكلية ..... 61
IV-5-4- التقدير الكمي لفلافانولات الكلية ..... 62
IV-6-تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بالطرق الكيميائية..... 62
IV-6-1- اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH ..... 62
IV-6-2- اختبار فاعلية مضادات الأكسدة الكلية CAT ::: ..... 64
IV-6-3- دراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP ..... 65
IV-7- كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداءHPLC ..... 66
IV-8- دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا ..... 68
المراجع ..... 70

**الفصل الخامس**

**النتائج والمناقشة**

V-1- نتائج الاختبارات الأولية ..... 74
V-2- مردود الاستخلاص ..... 75
V-3- التقدير الكمي باستخدام جهاز UV-visible ..... 76
V-3-1- التقدير الكمي للفينولات الكلية ..... 76
V-3-2-التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية ..... 78
V-3-3-التقدير الكمي للفلافانولات الكلية..... 79
V-4- التقدير الكيفي للفينولات باستخدام HPLC ..... 81
V-5- تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة ..... 84
V-5-1- اختبارDPPH ..... 84
V-5-2- الفاعلية المضادة للأكسدة الكليةCAT ..... 86
V-5-3- الفاعلية المضادة للأكسدةFRAP ..... 87
V-6– تقدير فاعلية المضادة للبكتيريا ..... 90
الخاتمة..... 96
الملاحق ..... 98

## قائمة الأشكال


الشكل (I-1): شكل تخطيطي للنبات ..... 17
الشكل (I-2): صورة فوتوغرافية لنبتة الحلمة ..... 18
الشكل (I-3): صورة فوتوغرافية لمختلف أجزاء النبته ..... 18
الشكل (II-1) : الهيكل الأساسي للفلافونيدات ..... 23
الشكل (II-2) : مختلف أقسام الفلافونيدات ..... 24
الشكل (III-1) : الصيغة المؤكسدة لـDPPH ..... 36
الشكل (III-2) : الصيغة المرجعة لـ DPPH ..... 36
الشكل (III-3) : المواقع الفعالة في النشاط المضاد للأكسدة الفلافونيدات ..... 38
الشكل (III-4) : بنية البكتيريا ..... 41
الشكل (III-5) : Escherichia Coli ملاحظة بالميكروسكوب ..... 43
الشكل (III-6) : Pseudomonas aerogenose ملاحظة بالميكروسكوب..... 44
الشكل (III-7) : Staphylococcus ملاحظة بالميكروسكوب..... 45
الشكل (III-8) : الأنتييوغرام بعد الحضن وطريقة قياس قطر منطقة التثبيط ..... 47
الشكل (IV-1) : عملية الطحن ..... 52
الشكل (IV-2) : معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة ..... 63
الشكل (IV-3) : يمثل مكونات جهاز HPLC..... 66
الشكل (V-1) : التمثيل البياني للتقدير الكمي للفينولات في العينات المدروسة..... 77
الشكل (V-2) : التمثيل البياني للتقدير الكمي للفلافونيدات في العينات المدروسة..... 79
الشكل (V-3) : التمثيل البياني للتقدير الكمي للفلافانول في العينات المدروسة..... 80
الشكل (V-4) : كروماتوغرام للمستخلص م 1..... 81
الشكل (V-5) : كروماتوغرام للمستخلص م 2..... 81
الشكل (V-6) : كروماتوغرام للمستخلص م 3..... 82
الشكل (V-7) : كروماتوغرام للمستخلص م 4..... 82
الشكل (V-8) : نتائج إختبار DPPH للمستخلصات العضوية ..... 84
الشكل (V-9) : التمثيل البياني لنتائج اختبار تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة الكلية ..... 87
الشكل (V-10) : التمثيل البياني لنتائج الفاعلية المضادة للأكسدة بطريقةFRAP ..... 89
الشكل (V-11) : نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص 1..... 92
الشكل (V-12) : نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص 2..... 92
الشكل (V-13) : نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص 3..... 93
الشكل (V-14) : نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص 4..... 93

## قائمة الجداول


الجدول (I-1): التصنيف العلمي لنبات *Moltkia ciliata* ..... 19
الجدول (II-1): بعض أنواع الفلافونيدات المستعملة في معالجة بعض الأمراض ..... 30
الجدول (IV-1) : المواد المستعملة في الاختبارات الأولية ..... 56
الجدول (IV -2): يوضح الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات باستخدام HPLC 66
الجدول (IV -3) : يوضح زمن مكوث لبعض المركبات الفينولية ..... 67
الجدول(V-1): نتائج الاختبارات الأولية ..... 74
الجدول(V-2): مردود الاستخلاص ..... 75
الجدول(V-3): نتائج التقدير الكمي للفينولات الكلية في العينات المدروسة ..... 77
الجدول(V-4): نتائج التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية في العينات المدروسة..... 78
الجدول(V-5): نتائج التقدير الكمي للفلافانولات الكلية في العينات المدروسة..... 80
الجدول(V-6): المركبات المتعرف عليها في العينات المدروسة .... ..... 83
الجدول(V-7): قيم $IC_{50}$ للمستخلصات العضوية وحمض الاسكوربيك ..... 85
الجدول(V-8): قيم الامتصاصية والنشاطية المضادة للأكسدة الكلية ..... 86
الجدول(V-9): قيم الامتصاصية والنشاطية المضادة للأكسدة FRAP ..... 88
الجدول(V-10): نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص 1..... 90
الجدول(V-11): نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص 2..... 90
الجدول(V-12): نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص 3..... 91
الجدول(V-13): نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص 4..... 91

## قائمة المنحنيات

المنحنى (V-1): يمثل المنحنى العياري لحمض الغاليك ..... 76
المنحنى (V-2): يمثل المنحنى العباري للروتين ..... 78
المنحنى (V-3): يمثل المنحنى العياري للكرستين..... 79
المنحنى (V-4): يمثل المنحنى العياري ل (A.A) ..... 85
المنحنى (V-5): يمثل المنحنى العياري للأسكوربيك (طريقة CAT) ..... 86
المنحنى (V-6): يمثل المنحنى العياري للأسكوربيك (طريقة FRAP)..... 88

## قائمة المخططات

المخطط (III- 1) : تصنيف الــبكتيريا..... 42
المخطط (IV -1) : يوضح طريقة العمل ..... 59

## قائمة الرموز والمختصرات

| الرمز | بالعربية | بالفرنسية |
|---|---|---|
| **%** | النسبة المئوية | Pourcentage |
| **A** | الامتصاصية | Absorbance |
| **AA** | حمض الاسكوربيك | Acide ascorbique . |
| **C°** | درجة مئوية | Degré celsius |
| **GA** | حمض الغاليك | Acide Gallique |
| **HPLC** | كروماتوغرافيا السائلة ذو كفاءة العالية | Chromatographie liquide à haute performance |
| **I%** | النسبة المئوية لتثبيط | Le pourcentage de d'inhibitrice à50% |
| **$Ic_{50}$** | تثبيط نسبة 50% من تركيز الجذور الحرة | Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH. |
| **UV-vis** | طيف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية | Spectrophotomètre ultra-violet et visible |
| BHT | | Butyl hydroxytoluéne |
| BHA | | Butyl hydroxyl anizole |
| ADN | | Acide Désoxyribonucléique |
| DPPH | | 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl. |
| CAT | القدرة المضادة للاكسدة الكلية | Capacité antioxydante totale (Total antioxidant capacity). |
| FRAP | | Ferric Reducing Antioxydant Power |
| TPTZ | | Tripyridyl-s-triazine ferrique |

| | | |
|---|---|---|
| WHO | منظمة الصحة العالمية | World Health Organization |
| م1 | مستخلص أسيتات الايثيل النقع (ميثانول /ماء) | Extrait d'acétate (méthanol /eau) |
| م2 | مستخلص البيوتانول النقع (ميثانول /ماء) | Extrait de butanol (acétone /eau) |
| م3 | مستخلص أسيتات الايثيل النقع (أسيتون /ماء) | Extrait d'acétate (méthanol /eau) |
| م4 | مستخلص البيوتانول النقع (أسيتون /ماء) | Extrait de butanol (acétone /eau) |
| mg EAG/g | كمية الفينولات المكافئة لحمض الغاليك الموجودة في 1غ من كل مستخلص | La quantité de phénols équivalents d'acide phénolique présents dans 1g de chaque extrait |
| mg ER/g | كمية الفلافونيدات المكافئة لروتين الموجودة في 1غ من كل مستخلص | La quantité de flavonoides équivalents à la routine contenue dans 1g de chaque extrait |
| mg EQ/g | كمية الفلافانولات المكافئة لكرستين الموجودة في 1غ من كل مستخلص | La quantité de flavanol équivalents à deux cristaux dans 1g de chaque extrait |
| mg EAA/g | كمية المكافئة لحمض الاسكوربيك الموجودة في 1غ من كل مستخلص | La quantité équivalents d'acide ascorbique trouvée dans 1g de chaque extrait |

# مقـدمة

## مقدمة

استعملت النباتات في التداوي منذ القدم ، وتشهد على ذلك الموسوعات الخاصة بالنباتات الطبيـــــة ، وكذلك ما تحويه أسواق العطارين من الأعشاب ، الثمار والبذور التي يستخدمها العامة في علاج مرضاهم ، وما يزال تجار العطارة يستخدمون : موسوعة ابن سينا ، مؤلفات الرازي وابن البيطار وغيرها من كتب العلماء العرب في الطب والصيدلة وكلها غنية عن التعريف والبيان [1-3].

فالنبتة في الواقع هي صيدلية كاملة بما تحتويه من مئات إن لم يكن آلاف من المواد الفعالة ، قد توزعت بنسب وضعها الله سبحانه وتعالى بميزان أدق من ميزان الذهب دلالة على حكمة الخالق وتقديره العظيم ، ومن حكمته أنه جعل هذه المواد الفعالة في النباتات بتراكيز منخفضة يمكن للجسم البشري التفاعل معها برفق في صورتها الطبيعية [4] فالمنتج الطبيعي أكثر أمانا وذو أعراض جانبية خفيفة فهناك بعض الدراسات التي بينت أن المنتجات الطبيعية أفضل من المنتجات الصيدلانية فعلى سبيل المثال : الخل تفوق على دواء ديمينهيدرينات ودراماماين كعلاج للدوار الحركي [5].

وتشير تقديرات منظمة الصحة العالمية (WHO) أن نسبة كبيرة من سكان العالم تستخدم الأعشاب كأدوية وزادت نسبة الأدوية المصنعة من النباتات [6-8] ومن أجل إثراء مكتبة النباتات الطبية وتسليط للضوء على إحدى النباتات الصحراوية التي لم تلقى أي دراسة علمية مسبقة في هذا المجال كانت هذه المذكره وهي دراسة فيتوكيميائية وتقييم للفاعلية المضادة للأكسدة و الفاعلية البكتيرية للمستخلصات العضوية لنبات *Moltkia ciliata*.

تمت هذه المذكرة وفق المخطط التالي :

- ✓ الجزء النظري :

الفصل الأول : الدراسة النظرية لنبات الحلمة *Moltkia ciliata* .

الفصل الثاني : عموميات حول الفلافونيدات .

الفصل الثالث : الفاعلية المضادة للأكسدة وللبكتيريا .

- ✓ الجزء العملي :

الفصل الرابع : الطرق والوسائل .

الفصل الخامس : نتائج ومناقشة .

وفي الأخير خاتمة تم فيها تلخيص مجمل النتائج المحصل عليها .

## مراجع المقدمة:

### المراجع باللاتينية:

[1] S. Prakash Rout, K. A. Choudary, D. M. Kar, J. Avijeet . International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences ,( 2009) , 1(1), 1-23.

[6] M. Gossell-Williams, O. R. Simon, M. E. West. West Indian Med. J., ( 2006), 55(4), 217-218.

[7] A. A. Elujoba, O. M. Odeleye, C. M. Ogunyemi. Afr. J. Trad.,( 2005), 2(1), 46-61.

[8] B. Abdul Rasool Hassan. Pharmaceutical Analytica Acta, (2012) , 3(10), ISSN: 2153-2435.

### المراجع بالعربية :

[2] ع. ب. محمد سيد ، ع. ت. عبد الله حسين ، الموسوعة الأم للعلاج بأعشاب و النباتات الطبية ، الطبعة الأولى ، الدار العالمية للطباعة م سليمان محمد سليمان ، (2004)، ص768.

[3] ف. بن محمد العراقي ، الأعشاب دواء لكل داء ، الطبعة الأولى ، مكة مكرمة ،(1999) ،ص 268.

[4] ج. ا. ديوك ، الصيدلية الخضراء ، الطبعة الأولى ، مكتبة جرير : المملكة العربية السعودية (2004)، ص 577.

[5] أ. شوفالييه ، الطب البديل للتداوي بالأعشاب والنباتات الطبية ، الطبعة الأولى ، أكاديميا انترناشيونال: بيروت، (2001) ، ص336.

# الجزء النظري

# الفصل الأول

الدراسة النظرية لنبتة *Moltkia ciliata*

## I-1- تعريف بالعائلة Boraginaceae :

تعرف عائلة البوراجيناسي بإسم العائلة الحمحمية ، وهي نباتات عشبية أو شجيرات تتميز بمايلي:

- **الساق:** قائمة سميكة ، لونها اخضر رمادي ، ويصل إرتفاع النبات إلى أكثر من 20سم وتغطى الساق شعيرات كثيفة .
- **الأوراق:** كبيرة يصل طولها الى 21-11 سم ، وللورقة شكل بيضوي أهليليجي .
- **الأزهار:** نجمية الشكل صغيرة ، ولونها أزرق فاتح ونادرا أبيض ، وهي تجذب لها النحـــل ، ولـذلك يزرع في المناطق التي يكثر فيها تربية النحل خاصة أنجلترا وفرنسا [1-2].

تتكون هذه العائلة من 131 جنس و حوالي 2500 نوع متضمنة لنباتات معمرة، نصف سنوية و شجيرات [3- 4].

ومن أهم نباتات هذه العائلة هو: لسان الثور ، الحمحم و حشيشة الرئة [5].

## I- 2 - التوزيع الجغرافي للعائلة :

تتوزع هذه العائلة في العالم بالمناطق الاستوائية ، شبه الاستوائية و المعتدلة و تتمركز أكثر في شمال المنطقة المعتدلة و البحر الأبيض المتوسط .

وقد إنتشرت زراعتها في أماكن كثيرة من أوروبا وغرب أسيا وشمال أمريكا، ويوجد على حالة برية في الأماكن القاحلة وفي الكثبان الرملية ،وعلى شواطئ الأنهار وأحيانا على جبال الألب، بينما أدخلت زراعتها إلى إنجلترا بعد أخذه من موطنه الأصلي ،وهو حلب في سوريا [3].

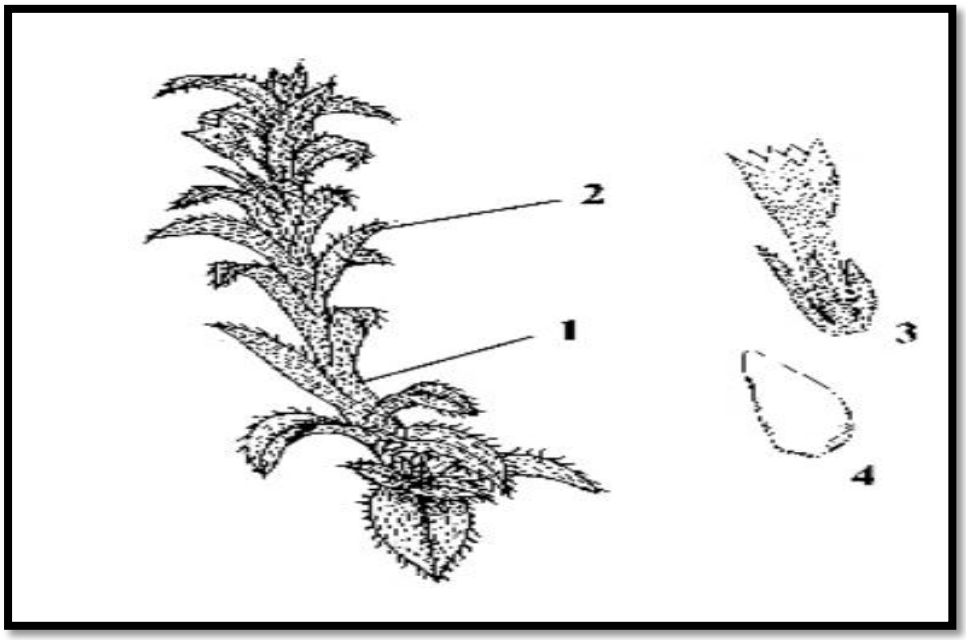
## I-3- وصف نبات *Moltkia ciliata*:

و يعرف بالإسم الشائع الحلمة وهو عبارة عن شجيرة صغيرة معمرة ،كثيرة التفرع و تكسوها شعيرات قاسية ،و طولها لا يتعدى 30 سم ،والسيقان القديمة بيضاء وملساء بينما الجديدة النمو محمـــــرة ، الأوراق تكون متوضعة على الساق بدون أعناق بطول 2-3 سم ، وتوجد أشواك تخرج من جميع حواف الأوراق يصل طولها 1سم.

تنمو الحلمة من جديد بعد سقوط المطر وتزهر في أي وقت من الربيع والشتاء والخريف ولكن غالبا ما تظهر الأزهار في الشهر الثاني والثالث والرابع الميلادية، والأزهار تتجمع في أعلى الفروع ويتفتح أوسطها أولا ثم تليها بقية الأزهار وتميل تجمعات الأزهار بعد ذلك للأسفل، وهي أزهار بوقية

الشكل بخمس بتلات بلون متفوت من أزرق وبنفسجي وأبيض في النبتة الواحدة كما يتضح في الشكلين (I-2) و(I-3).

والحلمة واسعة الإنتشار، تنبت في الارض الصلبة وكذلك الرملية وتنتشر الحلمة في جميع دول الخليج العربي وكذلك في مصر والعراق وإيران وفلسطين [6].




**الشكل (I-1) :** شكل تخطيطي للنبات *Moltkia ciliata*

1- الساق

2-الأوراق

3-الأزهار

**الشكل (I-2) :** صورة فوتوغرافية لنبتة الحلمة

**الشكل (I-3) :** صور فوتوغرافية لمختلف أجزاء النبتة

## I-4- التصنيف العلمي للنبات *Moltkia ciliata (Forsk.) Johnst* [7]:

**الاسم العلمي:** *Moltkia ciliata (Forssk.)* [7] .

**الاسم الشائع:** الحلمة، الحماط [7].

| | |
|---|---|
| **المملكة** | Végétaux |
| **الشعبة** | Magnoliophyta |
| **العائلة** | Boraginaceae |
| **تحت العائلة** | Boraginoideae |
| **الفصيلة** | Boraginoideae |
| **القبيلة** | Lithospermeae |
| **القسم** | Magnoliopsida |
| **الرتبة** | Lamiales |
| **النوع** | *M. ciliate (Forssk.) I.M.Johnst* |
| **الجنس** | *Moltkiopsis* |

**الجدول (I-1) :** التصنيف العلمي لنبات *Moltkia ciliata*

## I-5- أماكن التواجد:

نبات شائع في المناطق ذات التربة الثابتة والأماكن المحمية القريبة من المرتفعات الرملية [6].

## I-6- الاستعمالات :

يعتبر هذا النبات الملاذ الغذائي لبعض الحيوانات الصحراوية خاصة الجمال و له عدة استعمالات تقليدية منها في المجال الطبي يستخدم :

- لأمراض البطن .
- التئام الجروح .
- العلاج ضد لسعات العقارب .

لقى هذا النبات اهتمام العديد من الباحثين خاصة في الدراسات الاحصائية لبعض الخصائص الخاصة بالنباتات الصحراوية [8-10].

# مراجع الفصل الأول

## المراجع باللاتينية:

[2] James I. Cohen , *Cladistics* ,A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae :evolutionary relationships ,taxonomy, and patterns of character evolution ,(2013) ,1–31.

[3] Suleyman Dogu and all, *Pak. J. Bot.* , (2012), 44(3): 1083-1090.

[4] Fabiola .B , Joséluis. F, Robinson .G, *caldasia*, (2005) ,27(2): 151-172.

[7] *http://Commons.m.wikimedia.org/wiki/Category:Moltkiopsis*ciliata, 19:40, (05/02/2018).

[8] Benchelah A.C., Bouzaine H., Maka M., Ouahés C., Flore du Sahara, voyage ethno botanique avec les touaregs du Tassili. Préface de Théodore Monod. Ibis Atlantic. Paris(2000).

[9] J. Maley.,,Bothalia 14, 3 & 4: 377-389.

[10]M. Bouallala, A. Chehma et F. Hamel. , *Lebanese Science Journal, Vol.14, No. 1, (2013*).

## المراجع بالعربية:

[6] حليس، الموسوعة النباتية لمنطقة سوف(النباتات الصحراوية الشائعة في منطقة العرق الشرقي الكبير)، دار النشر بالمنطقة الصناعية كوينين ولاية الوادي ،مطبعة الوليد،( 2007)، ص:102-103 .

[1] **م .**على الدجوى ، موسوعة انتاج النباتات الطبية والعطرية ،مطبعة الاطلس ، (1996) ،ص243.

[5] د .حسان قبيسي ،معجم الاعشاب والنباتات الطبية ،دار الكتاب العلمية ،بيروت (1999)،ص 109-135 – 149.

# الفصل الثاني

## عموميات حول الفلافونيدات

## تـمـهيـد :

تشكل المركبات الفينولية المستخلصة من النباتات حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية و تمتاز بكثرة عددها و تباين هياكلها البنائية و العنصر البنائي الأساسي المميز لها هو وجود حلقة بنزينية واحدة على الأقل ، حاملة لمجموعة هيدروكسيلية حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى مثل : إيثر ، أستر ، سكر .

غير أن التعريف الدقيق للمركبات الفينولية يكون على النحو التالي :

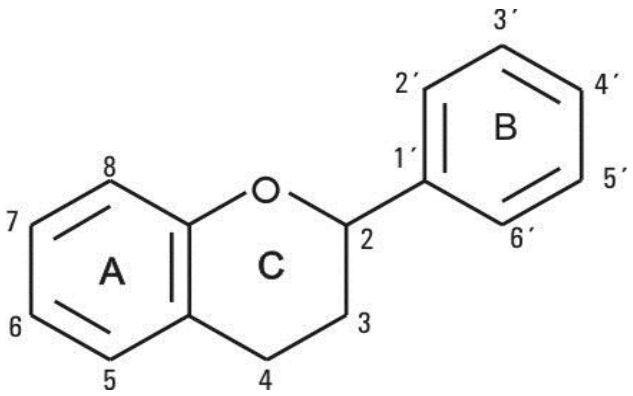
مشتق غير آزوتي ، إذ يتأتى تكوين الحلقة أو الحلقات العطرية أساسا من أيض حمض الشيكميك أو/و عديد الأسيتات ، و تعتبر الفلافونيدات من أهم المركبات الفينولية [1].

## II-1- تـعريف الـفلافـونـيدات :

كلمة " الفلافونيدات" مشتقة من اسم يوناني "Flavus" التي تعني الأصفر فهي عبارة عن صبغات ملونة تنتشر في الأجزاء المختلفة من النبات و تتمركز بصفة خاصة في الجزء الهوائي منه .

تمثل الفلافونيدات القسم الأكبر بالنسبة للميتابوليزم الثانوي للنبات و الدليل على ذلك هو استخراج أكثر من 4000 فلافونيد طبيعي [2] .

تتميز الفلافونيدات بهيكل أساسي يحتوي على 15 ذرة كربون موزعة على حلقتين عطريتين AوB مرتبطتين بحلقة C كما هو موضح في الشكل : [3]

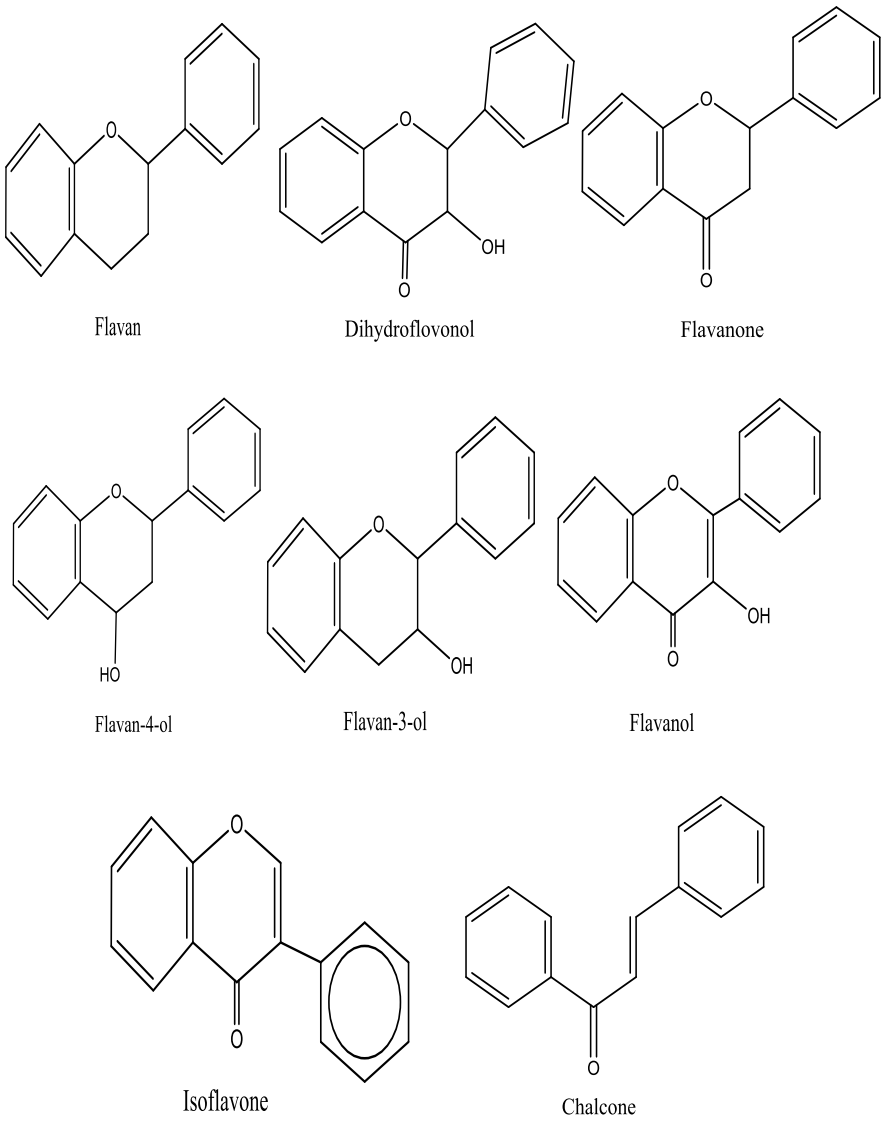



**الشكل (II-1) :** الهيكل الأساسي للفلافونيدات

## II- 2- تصنيف الفلافونيدات :

بنيويا تتفرع الفلافونيدات إلى عدة أنواع تبعا لعدد ، موضع و طبيعة المستبدلات التي تكون في أغلب الأحيان عبارة عن مجموعات ميثوكسيل أو جليكوزيل أو تبعا لمستوى الأكسدة للحلقة الغير متجانسة .

و يكمن الفارق بين مختلف الفلافونيدات في وجود أو غياب مجموعة الهيدروكسيل OH أو مجموعات المثيل $CH_3$ العدد و المواقع المختلف ، و في تثبيت مجموعة O-glycoside أو C-glycoside و يمكن للفلافونيدات أن تتواجد في صورة أحادية الجزيئة أو عديدة الجزيئة و تعرف هذه الأخيرة بـ Tanins.




**الشكل (II-2) :** مختلف أقسام الفلافونيدات

## II- 3 - الخصائص الفيزيوكيميائية للفلافونيدات :

الفلافونيدات هي مركبات هيدروكسيلية تتميز بخاصية حمضية ضعيفة ، فهي تذوب في القواعد القوية مثل : هيدروكسيل الصوديوم NaOH [4-5] .

تتميز الفلافونيدات التي تحتوي على عدد كبير من المجموعات الهيدروكسيلية الحرة أو التي تحمل جذور سكرية بقطبية قوية فهي بذلك تذوب في المذيبات القطبية مثل : الميثانول ، الايثانول ،الماء و الأسيتون أما الفلافونيدات الأقل قطبية فهي تذوب في المذيبات الغير قطبية مثل الكلوروفورم و الإيثر [4 -8].

الفلافونيدات هي مواد صلبة متبلورة تتواجد في الأنسجة النباتية و تتميز بمجال لوني يتغير من الأبيض إلى الأصفر[5] .

عموما الدراسة الأولية للمستخلصات الفلافونيدية تتم غالبا بواسطة الفصل الكروماتوغرافي للطبقات الرقيقة (TLC) و تتبع بدراسة بواسطة الكشف اللوني بجهاز الأشعة فوق البنفسجية لمختلف أنواع الفلافونيدات حيث يتم تحديد بنية الفلافونيدات انطلاقا من تفسير لون إشعاعاتها قبل و بعد اضافة $NH_3$ [9] .

و يمكن أيضا إجراء دراسة أولية بالاستعانة بتفاعلات خاصة باستخدام كواشف مثل : NaMe ، $NaOAc$ ، $H_3BO_3$ ، $HCl(2N)$ ، $AlCl_3$ [10] [3] .

## II- 4 - أهمية الفلافونيدات:

**II- 4 -1- في عالم النبات** : النبات هو كائن حي عديم الحركة يملك نظام مقاومة يسمح له بمكافحة اثار البيئة من اجل المحافظة على شكله وانتزاع حق العيش، قلب هذا النظام هو احدى اهم نواتج الميتابوليزم الثانوي و هي " **المركبات الفلافونيدية** ".

تتوزع هذه الأخيرة على كافة الأعضاء النباتية تقريبا فتوزعها على المساحات الورقية يشكل طبقة واقية تعمل على الحماية من الظواهر النحتية التبخرية في الأوساط الجافة، ومن المهام الأكثر ذكرا للمركبات الفلافونويدية هو انها تعمل بمثابة مرشحات لأشعة فوق البنفسجية ، مما يؤدي الى توفير حماية للمواد الأساسية مثل :البروتينات والأحماض النووية من التأثر السام بهذه الإشعاعات.

إن الامتصاص في المجال المرئي لبعض أنواع الفلافونيدات يضفي لها دور صبغة النباتات وخاصة الأزهار، مما يؤدي إلى جذب الحشرات والطيور المؤبرة لمباشرة عملية التلقيح فبعض النباتات

تغير في الاصطناع الحيوي للفلافونيدات بعد هذه العملية لتجنب تكرارها كما يسند لها بالمثل مراقبة نمو وتطور النباتات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة بتشكيلها معقدات مع هرمونات النمو، كما أنها تقوم بدور مثبطات أو منشطات لبعض التفاعلات الإنزيمية. إضافة إلى ذلك فان مركبات الفلافونويدات تسمح للنباتات البقاء في تربة بها معادن سامة مثل: الألومنيوم [11 -12] .

وقد لوحظ أن الفلافونيدات تلعب دور في وقاية النباتات من الأمراض التي تسببها الفطريات والبكتيريا، حيث أنها تعمل كجزيئات انذار، والبعض منها تقوم بدور مبيدات للحشرات أو مضادات حيوية مثل : الايزوفلافونات المعروفة بالسمية العالية ضد الفطريات الممرضة فتعمل كمبيدات للحشرات فبعض النباتات تفرز بعض الأنواع من المركبات الفلافونيدية على مستوى الأوراق والجذور لاستعمالها كمواد سامة ضد نمو النباتات المتطفلة وتعتبر أيضا مضادات للتأكسد جيدة تقي من التأثر بالوحدات الجذرية الأوكسجينية [13-14].

تنتج المضادات الميكروبية النباتية في الحالات التالية [15] :

- تنتج ضمن النمو الطبيعي للنبات.
- تنتج اثناء تطور النبات وتمايز تراكيبه.
- تنتج استجابة لمهاجمة الأحياء الممرضة مثل: البكتيريا.
- تنتج استجابة للإجهادات التي تعرض لها .

## II- 4 -2 - في عالم الحيوان:

وبالمقابل الفلافونيدات لها دور بالغ الأهمية في عالم الحيوانات، على سبيل المثال نذكر خاصية مضادة للفطريات ومضادة للبكتيريا لهذه المركبات التي يستعملها النحل بصفة فطرية لتعقيم خلاياه، وذلك من خلال تواجدها في المادة اللزجة التي تفرزها هذه الحشرات لسد الثغرات بين الخلايا، ولقد استعمل الرومانيون والمصريون واليونانيون هذه المادة اللزجة كمضادة للعدوى وكمرهم لإ زالة آثار الجـــــروح، ومن أمثلة الفلافونيدات التي تحتويها هذه المادة نذكر :(شريسين –كرستين)

ولبعض الفلافونيدات دور في جذب وتوجيه آكلات الأعشاب إلى غذائها وتقوم الأيزوفلافونات بدور هام خلال دورة التكاثر للثدييات على أساس منشطات، أو مثبطات للتكاثر[ 16-18 ]

## II- 5- الأهمية الصيدلانية:

الأهمية الأولية للفلافونيدات عرفت منذ اكتشاف الفيتامين C من طرف العالم Syzent gyorgyi الذي لاحظ تجريبيا أن أعراض النزيف لداء الحفر (مرض يفسد الدم ) المرتبط بضعف الأوردة، عولج بتعاطي مستخلص الفلفل الحلو أو عصير الليمون الغني بالفيتامين C والفلافونيدات ،إذ أن استعمال حمض الهيدرواسكوربيك لوحده غير فعال؛ لأن الفلافونيدات تعمل على اختزال حمض الهيدرواسكوربيك . عموما الفلافونيدات مثل الفينولات عبارة عن قناصات للجذور الحرة المتكونة [19] .

## II- 6- الفاعلية المضادة للأكسدة :

من المعروف ان الفلافونيدات لها خصائص مضادة للأكسدة قوية تجاه كثير من الأمراض المرتبطة بالأكسدة: الإجهاد والشيخوخة و هذا بفضل ارتباطها بالجذور الحرة وبالتالي بالصيغة البنيوية لها، حيث اثبتت الدراسات تواجد مستبدلات كمجموعات الهيدروكسيل على الحلقة B لها تأثير كبير في زيادة هذه الخاصية بينما تواجد هذه المجموعات على الحلقتين AوC لها تأثير ضعيف، كما أثبتت الدراسات ان هذه الخاصية تزداد ببلمرة الفلافونيدات( بوليمر الكاتشين )مضاد للأكسدة قوي لأنه يملك عدد كبير من المجموعات الهيدروكسيلية، بينما وجود المستبدلات السكرية له تأثير سلبي في هذه الخاصية ، ووجود أورثوا ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B وكذلك الترافق الموجود بين الحلقة ومجموعة الأوكسو (oxo) مرورا بالرابطة المضاعفة $C_2$-$C_3$ تعتبر عوامل ايجابية [20- 21]

الخاصية الأساسية للفلافونيدات في المعالجة الطبية هي الوقاية من آفة انخفاض سماحية الشعيرات الدموية وتقوية مقاومتها (فيتامينP) وخفض مخاطر الاصابة بالأمراض القلبية ، والأنواع الفلافونيدية التي لها دور في ذلك هي : الفلافونات، الفلافونولات الفلافانونات، الكاتشين، الايزوفلافون والانثوسيانيدينس، وللمركبات الفلافونيية دور في حماية الدماغ من مرض تصلب الشرايين [22 ]

## II- 7- الفاعلية المضادة للالتهاب:

تؤثر الفلافونيدات على مختلف الالتهابات من خلال تثبيطها لسلسلة من الأنزيمات التي تنشط خلال هذه العملية، وقد اثبتت الدراسات بان وجود الرابطة المضاعفة $C_2$-$C_3$ لها تأثير ايجابي بالإضافة الى ان عدد ومواضع المجموعات الهيدروكسيلية له تأثير بالغ الأهمية، حيث ان الخاصية التثبيطية تزداد بتواجد مجموعتي الهيدروكسيل في الموضعين 5 و 7 في الحلقة A و الموضع 4' على الحلقة B بينما تواجدها في الموضع 3 ' على الحلقة B ينقص من هذه الخاصية [23] .

**II- 8- الفاعلية المضادة للميكروبات** :

**II- 8- 1-الفاعلية المضادة للبكتيريا:** العديد من المركبات الفلافونيدية تملك خاصية المضادة للبكتيريا حيث تختلف درجة التثبيط باختلاف بنية هذه المركبات، وهذا ما بينته الدرا سات العديدة التي اجريت في هذا الصياغ حيث أثبتت أن :

الحلقة B تلعب دور هام : حيث تقتحم الحمض النووي و تثبط اصطناع ADN وARN ووجود المستبدلات الهيدروكسيلية على هذه الحلقة ضروري لتحقيق هذه الفعالية فمثلا : سوفوروفلافانون G ، بعض الكاتشينات( فلافان–3 –ول)،' 2,4,2 ثلاثي هيدروكسي5 – مثيل شالكون، النارجنين والكارستين تملك فاعلية مضادة للبكتيريا بإحداث تغيير في نفاذية الغشاء.

بالنسبة للفلافانونات تشير الدراسة إلى وجود مجموعتي هيدروكسيل في الموضع '2، '4 أو '6،'2على الحلقة B و وجود مجموعتي هيدروكسيل في الموضع 7 ،5 على الحلقة Aضروري لإحداث الفاعلية التثبيطية لبكتيريا (SAMR) ، حيث تزداد هذه الفعالية بوجود مستبدل أليفاتي بسلسلة طويلة في الموضع 6 أو8 [22] .

**II- 8-2- الفاعلية المضادة للفيطريات** :

العديد من المركبات الفلافونيدية تملك الخاصية المضادة للفيطريات أغلبيتها من الفلافونات الفلافانونات مثل :

الفلافانونات الفعالة ضد الفطر( المبيضات البيض) ، العديد من الفلافونات متعددة المستبدلات الميثوكسيلية فعالة ضد الفطر (أسبرجيلوس فلافوس )عموما. مهما كان نوع الفلافونيد وجد ان خاصية المحبة للدهن( ليبفوب ) تزيد من هذه الفعالية حيث تمكن هذه الجزيئات من النفاذ بسهولة عبر أغشية الفطريات [26].

## II- 3-8- الفاعلية المضادة للفيروسات:

العديد من الد راسات حول نشاط الفلافونيدات المضادة للفيروسات قد تم نشر ها كالدراسة التي قام بها(Che 1991)، والتي ساهمت في إعطاء فهم جيد وتوضيح للآلية الفيزيوباثولوجية، فلإحداث التأثيرات المضادة للفيروسات لابد من توفر ثلاث عوامل ضرورية : مجموعة الميثوكسيل في الموضع $C_3$، الوظيفة الكربونيلية، والرابطة $C_3$-$C_2$ المزدوجة ، ولقد توصلت الأبحاث كذلك إلى أن الزيادة في عدد المجموعات الهيدروكسيلية OH على الحلقة A أوB ينتج عنها زيادة في النشاط المضاد للورم حيث تلعب الايزوفلافونيدات دور بالغ الأهمية ضد فيروس نقص المناعة (VIH) .

من بين المركبات الفلافونيدية الفعالة نذكر على سبيل المثال:

3-methyl Kaempferol , Génistine , Quercétine

كما اقترحت الدراسات بان غياب مجموعة الهيدركسيل في الموضع '4 وغياب المستبدلات في الموضع 5 ضروري لتحقيق هذه الفعالية [27-28 ] .

## II- 9-الاستخلاص:

تستخلص الفلافونيدات باستخدام مذيبات مختلفة القطبية ويتم اختيار المذيب المناسب وفقا لنوع الفلافونيد المسطر؛ فالفلافونيدات ضعيفة القطبية (ميثوكسي فلافون، فلافانون الايزوفلافون. . . الخ ) تستخلص بأحد المذيبات: الكلوروفورم، ثنائي كلورو ميثان، ثنائي اثيل ايثر أو خلات الإيثيل، بينما المركبات الاكثر قطبية الفلافونيدات السكرية تستخلص باستعمال الكحولات او مزيج ماء/كحول.

اشهر الطرق اتباعا هي استخدام الميثانول أو الايثانول أو مزيج احدهما مع الماء بنسب 70 او 80 ٪ثم نبخر الكحول والطور المائي يخضع لاستخلاص سائل -سائل باستعمال المذيبات مختلفة وفق تدرج القطبية [29] .

| الأمراض | الفلافونيدات | المراجع |
|---|---|---|
| **القرحة** | ((+)-Cyandidanol 1-3,meciadanol,(kaempferol,catechins) (Sofalcone, Quercetin) | [23] |
| **الألتهاب** | (Quercetin, apigenin, catechin) (Hesperidin, rutin ,luteolin) (Kaempferol, myricetin, fisetin) | [23] |
| **السرطان** | (Quercetin, Kaempferol, Galangin, Apigenin) (luteolin, catechins, Genistein) | [23] |
| **ضعف الذاكرة** | (fisetin),( Quercetin),( Genistein) | [23] |
| **الكآبة** | (S- Hesperidin, Linarin, Naringenin) | [23] |
| **أمراض القلب والأوعية الدموية** | (7-monohydroxyethylrutoside) (Quercetin)(7',3',4'-trihydroxyrutoside) | [23] |
| **داء السكري** | (fisetin),( Quercetin) | [23] |
| **الحساسية** | (rutin, Citrin), ( Quercetin) | [23] |
| **الكبد** | (Onitin, luteolin)(Avicularin, Hirustrin), ( Quercetin) | [23] |
| **الجلطة** | (Tangeratin,Hesperidin,quercetin,rutin) (O-Trihydroxyethylrutoside(-Nobelitin,droxyethyl)rutoside,(+)catechol) (sinesetin) | [23] |

**الجدول (II-1) :** بعض أنواع الفلافونيدات المستعملة في معالجة بعض الأمراض

# مراجع الفصل الثاني

## المراجع باللاتينية:

[2] J.B.Harborne , « Biochemistry of phenolic compounds » , (1964) , Ed . Academic Press , London , p 88 – 89 .

[3] P.M.Dey et J.B.Harborne , « Plant Phenolic » ,volume 1 , Ed.Academic Press, (1989) , P 194 – 320 .

[4] J.Mabryt et Col , « The Systématic identification of flavonoids», Ed Springer Verlag Berlin , New York, (1970) , P 313.

[5] Abdelghafour Marfak , These de Docteur ,Radiolyse GaMMa des Flavonoids . Etude de leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools formation de depsides . P 23 .

[6] J.Bruneton , « Pharmacognosie , Phytochimie , Plante médicinales» 2eme edition ,( 1993 ), P264 – 293.

[7] Nicolas Fobre , Isabelle Rustan ,Joëlle Quetin , *American Society for Mass Spectrometry* , (2001).

[8] Gert Forkman and Stefan Martens , Metabolic engineering and application of Flavonoids , current opinion in Biotechnology , (2001) , 12 , 155-160,12,707-715 .

[9] F.Couplane,«Dictionnaire Etymologique de botanique» , Paris,(2000 ) .

[10] Sonia Gomez-Galera,Ana M.Pelacho ,Anna Gene ,Tersa Capell and Paul Christou ,The genetic manipulation of medicinal and aromatic plant , *Review* . *Springer-verlag* .( 2007), P264 – 293.

[11] H. Kaur Sandhar, B. Kumar, S. Prasher, P. Tiwari, M. Salhan, P. Sharma. *Internationale Pharmaceutica Sciencia*, (2011) , 1(1), 25-41.

[12] M. S. J. Simmonds. Phytochemistry, (2001) , 56, 245-252.

[13] R. A. Dixon, G. M. Pasinetti. *Plant Physiology*, (2010) , 154, 453-457.

[14] G. Agatia, E. Azzarellob, S. Pollastrib, M. Tattini. *Plant Science*, (2012) , 196, 67-76.

[16] J. B. Harborne. Flavonoids Pigments in Harbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites, Academic Press, (1979) , 645.

[17] J. B. Harborne, C. A. Williams. *Phytochemistry*, (2000) , 55, 481-504.

[18] M. Wink. *Theo. Appl. Genet.*, (1988) , 75, 225-233.

[19] P. M. Dey, J. B. Harborne. Phenolic Plants, Volume 1, Academic Press, **(**1989), 194-320.

[20] K. Raj Narayana, M. Sripal Reddy, M. R. Chaluvadi, D. R. Krishna. *Indian Journal of Pharmacology*,( 2001), 33, 2-16.

[21] C. G. Fraga, P. I. Oteiza. *Biology & Medicine*, (2011) , 51, 813-832.

[22] F. Dajas, F. Rivera-Megret, F. Blasina, F. Arredondo, J. A. Abin-Carriquiry, G. Costa, C. Echeverry, L. Lafon, H. Heizen, M. Ferreira, A. Morquio. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (2003) , 36, 1613-1620.

[23] S. Chirumbolo. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, (2010) , 9(3), 1-23.

[24] M. Agarwal, R. Sarin. *International Journal of Pharma Research ET Review*, **(**2014), 3(1), 21-27.

[25] T. Taechowisan, S. Chanaphat, W. Ruensamran, W. S. Phutdhawong. *Journal of Applied & Pharmaceutical Science*, (2014) , 4(4), 8-13.

[26] Z. Ni, W. Zhaoyu, S. Yong, L. Jingming. *African Journal of Microbiology Research*, (2012) , 6(3), 586-593.

[27] Y. Dan, L. Juan, L. Xiang, L. Yimei, Y. Zhanqiu, C. Keli. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative *Medicine*, (2014) , 1-7.

[28] Z. Keivan, T. Boon-Teong, S. Sing-Sin, W. Pooi-Fong, M. Mohd Rais, A. Sazaly. *Journal of Medicinal Plant Research*, (2014) , 8(6), 307-312.

[29] Ø. M. Andersen, K. R. Markham. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, Press Taylor & Francis Group, (2006) , 1197.

## المراجع بالعربية :

[1] ش .سمية ،دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلص الفلافوني لنبات*Euphorbia Guyoniana* على تأكل الفولاذ في وسط حمضي ،ماجستير في الكيمياء جامعة قاصدي مرباح ورقلة ، (2009) ،ص 24-28.

[15] ز .محمود الخفاجي، التقنية الحيوية الميكروبية ، معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا ، جامعة بغداد ، دار الكتب والوثائق ببغداد،(2008)،ص736

# الفصل الثالث

## الفاعلية المضادة للأكسدة وللبكتيريا

# الفاعلية المضادة للأكسدة

## مقدمة :

الأكسدة هي انتقال الكترونات من مادة ما إلى العامل المؤكسد، حيث أن العامل المؤكسد هو المادة القادرة على أن تختزل(تستقبل الكترونات) و تؤكسد غيرها( أي تفقد غيرها الكترونات) .

تعتبر الأكسدة أحد التفاعلات الأساسية والمهمة في جسم الإنسان، فمثلاً يقوم الجسم بأكسدة الغذاء للحصول على الطاقة، فيحتاج الأكسجين لذلك و لكن نواتج تلك الأكسدة هي ما لا تحمد عقباه أجسام ضارة تدعى الجذور الحرة [1] .

ومن لطف الخالق بنا وعظمة تدبيره أن أجسامنا تصنع مركبات تثبط هذه الجذور تسمى مضادات الأكسدة، تتمتع هذه المركبات بميزة أنها قابلة للأكسدة من قبل الجذور الحرة، وبهذا فهي تحمي المركبات العضوية في الجسم من الأكسدة ،و لكننا نحتاج إلى كمية إضافية لحماية الجسم عن طريق الأغذية المحتوية على مضادات الأكسدة الطبيعية الموجودة في الخضروات الطازجة والفواكه والأغذية البحرية وبعض المكسرات وغيرها .

تسبب الجذور الحرة عدة أمراض خطيرة منها:

السرطان، الأمراض القلبية ،الشيخوخة بعض أمراض العيون ، الأمراض النفسية والعصبية، تليف الكبد، أمراض الدم وغيرها [2] .

## III- 1-الجذور الحرة:

### III– 1-1- تعريفها :

وهي عبارة عن جزيئات غير مستقرة تعاني من نقص الالكترونات، فهي تسعى لإكمال هذا النقص بهجومها على مركبات بها ذرات تملك كما من الالكترونات [3] ، و إن حجم الذرة و الوضعية الفراغية و الخاصية الميزوميرية لهذه العناصر لها علاقة مباشرة في استقرار أو عدم استقرار الجذر .

**III– 1-2-انواعها:** تنقسم الى نوعين هما :

**1- الجذور النشطة (غير المستقرة):** و هي الجذور التي لها أعمار قصيرة جدا أي غير مستقرة في الظروف العادية و لها أوزان جزئية صغيرة مثل جذر الهيدروجين ، الفلور ، الكلور و ما شابه ذلك طاقة تنشيطها تقترب من الصفر أثناء التفاعل.

**2- الجذور المستقرة أو الصامدة:** هي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو بالساعات أو حتى بالأيام مثل جذور ثلاثي فينيل مثيل TP3M و جذور ثنائي فينيل بكريل هايد رازيل DPPH و جذور ثنائي فينيل و أكسيد النيتريك Ph2NO و مشتقاته .

و نستطيع القول أن معظم الجذور الأروماتية التي تشمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها تكون مستقرة في أغلب الأحيان ، فكلما ازداد ثبات الجذر الحر قلت فاعليته ، و من الناحية الديناميكية الحرارية فإن قلة فاعليته تعود إلى أنه يحتاج إلى طاقة تنشيط عالية نسبيا أثناء التفاعل .

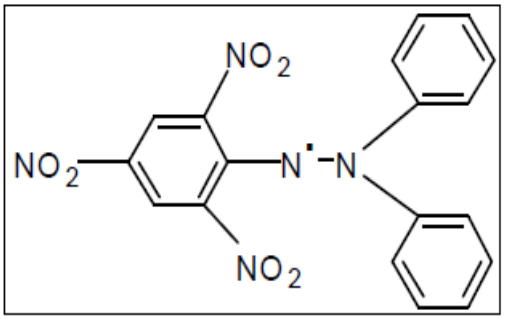
## III– 1-3- جذر DPPH ( 1,1- Diphenyl-2-picryl-Hydrazyl):

هو عبارة عن جذر مستقر على غرار الجذور الحرة الأخرى لان الإلكترون المنفرد تتقاسمه كل ذرات الجزئ ،الصيغة المفصلة موضحة في الشكل (1-III).

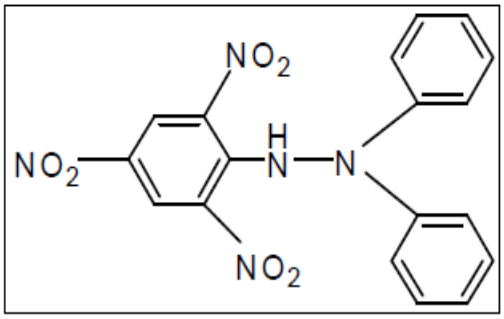
عدم ثبات الالكترون المنفرد يعطي اللون البنفسجي الداكن عند إذابته في الميثانول و يتميز بطول موجة امتصاص 515-520 nm.

عند خلط محلول DPPH مع المادة المضادة للتأكسد نتحصل على الصيغة المرجعة الموضحة في الشكل(2-III) و يمكن ملاحظة هذا الارجاع بفقدان اللون البنفسجي.

تم تطبيق طريقة DPPH على نطاق واسع لتقدير نشاط مضادات الأكسدة في السنوات الأخيرة نظرا للإيجابيات التي تتميز بها هذه الطريقة أهمها السرعة [4].




**الشكل (1-III) :** الصيغة المؤكسدة لـ DPPH




**الشكل (2-III) :** الصيغة المرجعة لـ DPPH

## III– 2- مضادات الأكسدة:

### III– 2- 1- تعريفها :

هي جزيئات قادر على إبطاء أو منع تأكسد الجزيئات في جسم الكائن الحي و بما أن التأكسد هو تفاعل كيميائي يقوم بتحويل الالكترونات من مادة معينة إلى عامل مؤكسد أي تخليق سلسلة من التفاعلات تتلف الخلايا ، فإن مضادات التأكسد تنهي هذه السلسلة من التفاعلات بإ زالة الوسيط الأساسي تماما ، كما عرفها هاليويل : «كل مادة تتواجد بتركيز منخفض بالنسبة للمادة المؤكسدة ولها القدرة على منع أو تثبيط هذه المادة»[5].

ومن الناحية الغذائية تعرف مضادات الأكسدة بأنها تلك المركبات التي تضاف إلى الغذاء بتراكيز منخفضة، بحيث تمنع أو تعيق أكسدة بعض المركبات الحيوية مثل الدهون والكربوهيد رات والأحماض النووية.

**III– 2- 2- تصنيفها:** تصنف مضادات الأكسدة اعتمادا على مصدرها إلى: [6]

**1 - طبيعية :** و من مضادات الأكسدة التي يمكن أن تكون في متناول اليد في غذائنا اليومي مثل : الفيتامينات من أصل البيتاكاروتين وفيتامين E و فيتامينC ومن المعادن الزنك والسيلنيوم.

**2- صناعية :** مثل :

**(** Butyl hydroxyl anizole**)** : BHA

( Butyl hydroxy toluéne) : BHT

حمض الغاليك Ac.gallique و الغالات Gallates

أثيرت في السنوات الأخيرة العديد من الشكوك حول مدى سلامة مضادات الاكسدة الصناعية من الناحية الصحية، إذ أشارت الى أن استخدام هذه المضادات ينتج عنه مواد مسرطنة أو سمية، لذلك اتجه الباحثون واجتهدوا في ايجاد مضادات طبيعية الأكثر أمانا فسلط الضوء على المركبات المستخرجة من النباتات وعلى ر أ سهم المركبات الفينولية و الفلافونيدات التي تتمتع بفعالية مضادة للأكسدة عالية فتعددت طرق تقديرها [7-9].

## III– 2- 3- الفلافونيدات و الجذور الحرة و النشاط المضاد للأكسدة:

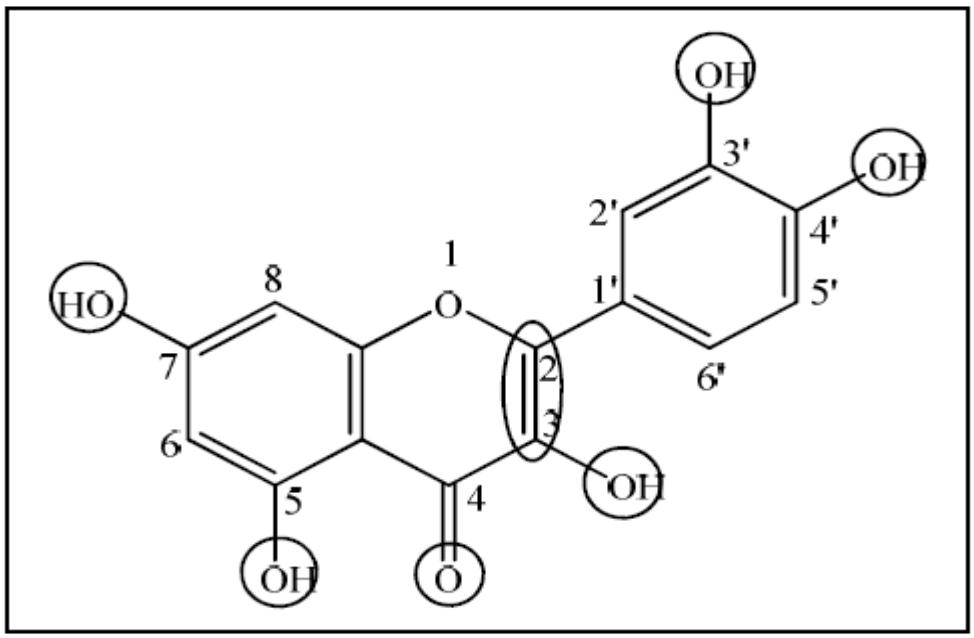
إن من أهم مميزات الفلافونيدات هو نشاطها المضاد للأكسدة و الناتج أساسا عن خاصيتها القابلة للأكسدة و الإرجاع، و بذلك فهي تعمل على الوقاية من الإجهاد التأكسدي الناتج عن الجذور الحرة [10].

## III– 2- 4- العلاقة بين بنية الفلافونيد و النشاط المضاد للأكسدة :

أدت الأبحاث التي أجريت على النماذج المخبرية و التي اهتمت بالعلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونيد و نشاطه المضاد للأكسدة للتوصل إلى التعرف على المجاميع و المواقع النشطة في الآلية المضادة للأكسدة و المتمثلة في : ( الشكل (III-3)) .

- مجموعة أرثو ثنائي هيدروكسيل '3 و'4 على الحلقة B.
- الرابطة غير المشبعة بين الموقعين ($C_2$-$C_3$)و المترافقة مع مجموعة الكربونيل$C_4$ للحلقة C.
- مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للحلقة C .
- مجموعة الهيدروكسيل في الموضعين 5 ,7 للحلقة A .

و يعد Quercétine بامتلاكه لكل هذه المجاميع من أحسن الفلافونيدات فعالية [11-12-13] .




**الشكل (III- 3) :** المواقع الفعالة في النشاط المضاد للأكسدة للفلافونيدات

### III– 2- 5- آلية الفلافونيدات المضادة للأكسدة [11-13-14]

إن النشاط المضاد للأكسدة يرجع للفاعليات التالية:

- الاقتناص المباشر للجذور الحرة.
- حجز و التقاط الايونات المعدنية المتدخلة في تخليق الجذور الحرة.
- تثبيت الإنزيمات المولدة للجذور الحرة.
- حماية أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة.

# الفاعلية المضادة للبكتيريا

**مدخل :**

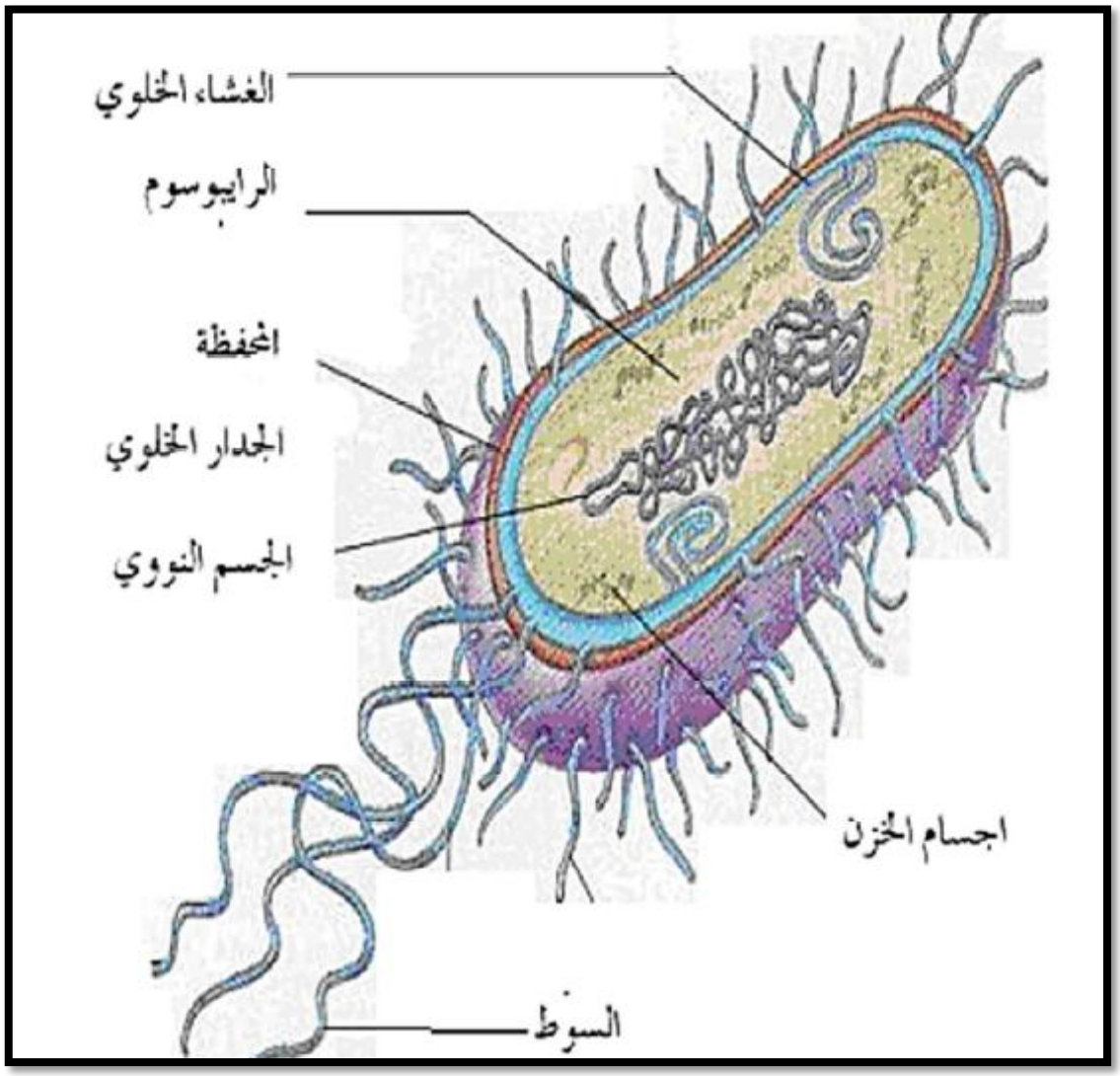
تتواجد البكتيريا في كل مكان من حولنا في الماء و الهواء وكما تعيش في الأغذية وداخل وخارج أجسامنا وفي أي نظام بيئي، وهناك ألاف الأنواع منها و يعيش عدد كبير منها داخل جسم الإنسان وهي في معضمها غير ضارة له ومنها ما يسبب بعض الأمراض، غير أن الكثير منها نافعة ، وقد كان للكشف المجهرى الأثر الكبير في التعرف عليها .

إرتبط اسم البكتيريا كثيرا بالأمراض التي تسببها للإنسان ولكن الاكتشافات الحديثة و التقدم السريع الذي حدث في العلوم التطبيقية أظهرت أن البكتيريا تلعب دورا هاما في الكثير من المجالات كالصناعات الدوائية والغذائية و المعالجة الحيوية لمخالفات ا لمزارع واستخدامها في إنتاج الطاقة و غاز الميثان و كذلك التخلص من المواد العضوية وغير العضوية ومعالجة المياه.

## III– 3- البكتيريا :

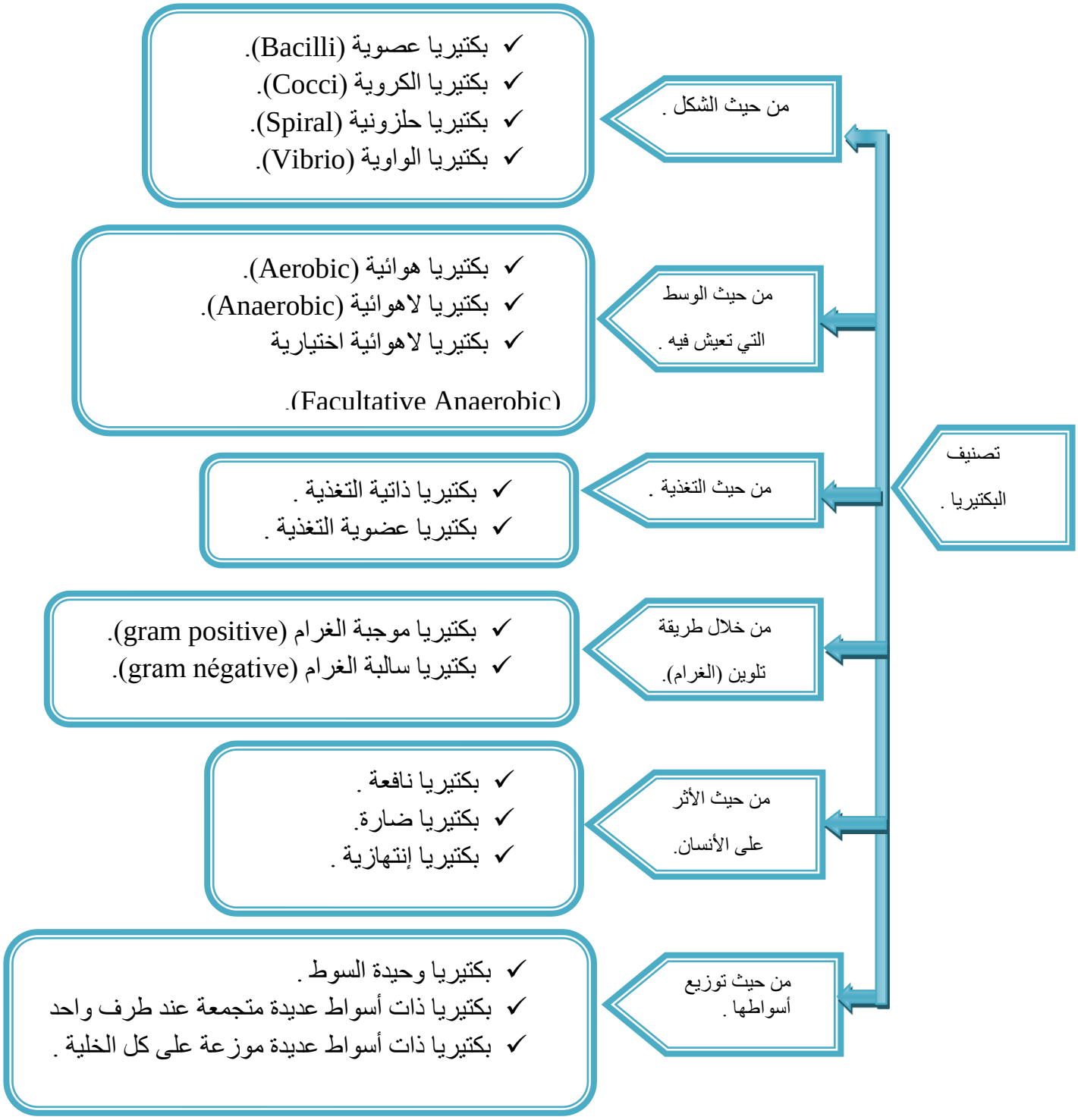
**III– 3- 1- تعريفها** : البكتيريا هي كائنات حية دقيقة مجهرية، بدائية النوى بسيطة تحتوي على خلية واحدة وتعتبر من أصغر الكائنات الحية هي قابلة للتكاثر والبقاء والتكيف في البيئة[15 ] ، ويتراوح طول الخلية أو قطرها عادة بين ميكرون واحدأ واثنين، وهي ذات أشكال مختلفة [16].

**III– 3- 2- بنيتها** : تتميز بنية البكتيريا بالبساطة حيث تتركب من الكبسولة التي هي عبارة عن طبقة هلامية خارجية تكون غلافا حول الخلية من مادة تشبه الجلي وتغطي الجدار الخلوي، وتقوم المحفظة بحماية الخلية البكتيرية من الظروف البيئية غير المناسبة مثل الجفاف ،تحاط الخلية البكتيرية بجدار يعطي لها شكلا ثابتا يقوم بحماية محتوياتها الداخلية، ويلعب جدار الخلية البكتيرية دورا هاما في تقسيمها إلى نوعين، وجدار اخر هو غشاء رقيق جدا يقع تحت جدار الخلية ويغلف السيتوبلازم ويتراوح سمكه من1 إلى 2 ملليميكرون ويمتاز بخاصية " النفاذية الاختبارية " حيث يسمح بمرور الماء وبعض المواد الغذائية اللازمة للنمو والنشاط والحيوية دون مواد أخرى، يقوم هذا الغشاء ببعض العمليات الحيوية لتحطيم المواد السكرية لإنتاج الطاقة، ويوجد داخل الجدار السيتوبلازم ويتكون السيتو بلازم من خليط معقد من مواد، و لا تحتوي الخلية البكتيرية على نواة ويوجد أيضا أعضاء الحركة في البكتيريا وتعرف بالسواط بأنها زوائد خيطية رفيعة جدا وطويلة، وتتصف الخلية التي تحتوي على أسواط بأنها متحركة والتي لا تحتوي على أسواط توصف بأنها غير متحركة [16-18].




**الشكل (III- 4) :** بـــنـيـة الـــبكتيريا

**III– 3- 3- تصنيف البكتيريا:** صنف العلماء البكتيريا لعدة تصنيفات و هي : [19]




**المخطط (III- 1) :** تصنيف البكتيريا

## III– 4- دراسة فاعلية المضادة للبكتيريا :

تهدف هذه الدراسة لمعرفة مدى تأثير المستخلصات العضوية على البكتيريا التالية :

- **Escherichia Coli:**

هي بكتيريا ذات غرام سالب ، والتي تنتمي إلى :

**المملكة :** Bacteria .

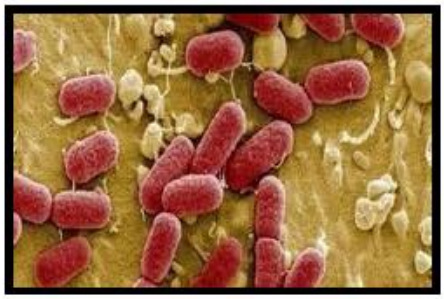
**التصنيف :** Proteobacteri .

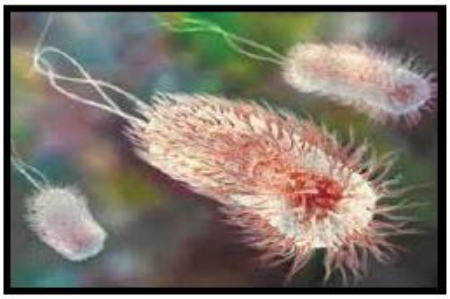
**القسم :** Gamma proteobacteria .

**الرتبة :** Enterobactriales.

**العائلة :** Enterobacteriaceae .

هي بكتيريا تعيش في جسم الإنسان والحيوان والنبات وفي التربة ذات غرام سالب وأبعادها من 1إلى 3 ميكرومتر ،هوائية ولاهوائية وتنمو بسرعة في وسط عادي ، تكون متحركة على شكل عصيات مسببة للمرض ، ومن بين الأمراض التي تسببها : الإسهال الطفيلي ، إلتهاب السحايا وتسمم الدم [20- 21 ].





**الشكل (III- 5) :** Escherichia Coli ملاحظة بالميكروسكوب

- **Pseudomonas aerogenose:**

هي بكتيريا ذات غرام سالب ، والتي تنتمي إلى :

- **المملكة :** Bacteria .
- **التصنيف :** Proteobacteri .
- **القسم :** Gamma proteobacteria .
- **الرتبة :** Pseudomonadales .
- **العائلة :** Pseudomonadaceae .

تعد هذه البكتيريا إحدى أكبر المجاميع البكتيريا العصرية السالبة الغرام الهوائية ولها القدرة على إنتاج أصبغة ملونة والتي تنتشر بصورة واسعة في البيئة ، فهي توجد في التربة والمياه وبشكل طبيعي في جسم الإنسان والحيوان ، تمتاز بمقاومتها للمضادات الحيوية والمطهرات ، وهي ممرضة للجهاز الهضمي وتسبب التعفنات الجروح والحروق وتجرثم الدم [ 21- 22].

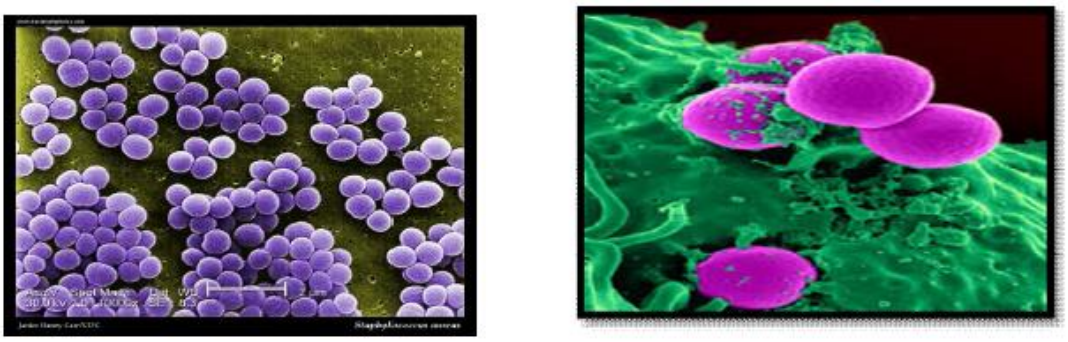
**الشكل (III- 6) :** Pseudomonas aerogenose ملاحظة بالميكروسكوب

- **Staphylococcus aureus:**

هي بكتيريا ذات غرام موجب ، والتي تنتمي إلى :

- **المملكة :** Bacteria .
- **التصنيف :** Firmicutes.
- **القسم :** Cocci.
- **الرتبة :** Bacillales.
- **العائلة :** Staphylococcaceae .

هي بكتيريا لاهوائية إختيارية ، موجبة الغرام تتواجد لدى الإنسان ، تكون كروية الشكل ، كما أنها عديمة الحركة وتكون على شكل عناقيد ، وتسبب تسمم الغذاء ، إلتهابات جلدية خطيرة ،أمراض السحايا إلتهابات الرئيتين ، تسمم الدم [ 21- 32].



**الشكل (III- 7) :** Staphylococcus aureus ملاحظة بالميكروسكوب

## III – 5- المضادات الحيوية:

### III– 5- 1- تعريف المضادات الحيوية :

استعملت الكلمة لأول مرة بواسطة العالم Vullemin 1889 الذي عرفها بأنها الظروف التي يمكن تحتها لكائن حي إبادة كائن حي آخر ليحتفظ هو بحياته ووجوده ولا يختلف تعريف فيولمين لهذه الظاهرة كثيرا عن التعريف الحالي والذي ذكره Wacksman (1945) في أن هذه الظاهرة ترجع إلى أفراد مواد كيمياوية ذات تأثير ضار بالميكروبات [21 ].

### III– 5- 2- أنواع المضادات الحيوية :

إن الوظيفة الأساسية للمضاد الحيوي في الجسم تنقسم إلى قسمين :

**مضادات حيوية كابحة لنشاط الخلية البكتيرية :** يمنع تكاثرها وهو يساعد في القضاء عليها .

**مضادات حيوية قاتلة للخلية البكتيرية :** إما عن طريق التأثير على جدار خليتها ، أو بالتسبب في إنتفاخ خليتها وانفجارها ، أو بمنع تكوين مادة البروتين داخل خليتها [24 ].

**III– 5- 3- تأثير المضادات الحيوية :**

تعمل المضادات الحيوية على قتل الميكروبات ، أو كبح الميكروبات ، وقد يكون مفعول المضاد على الغلاف الخارجي للميكروب (Cell Wall) ، أو الغلاف الداخلي (Membrane Cell) ، او يعمل على مستوى الخلية للإيقاف تصنيع البروتين (Protein Synthesis) [ 21].

1. **العمل على الجدار الخارجي للبكتيريا:** المضاد الحيوي يوقف تركيب الجدار بتثبـــــــيط transpeptidase هذا ما يمنع من تركيب peptidoglycane ، وهذا يوقف نموها وعملها ويمكن ان يشمل تدميرها .
2. **العمل على الغشاء الداخلي للبكتيريا :** المضاد الحيوي له خواص سطحية التي تمكنه من تخريب عمل نفاذية الغشاء الداخلي ، ويسمح بطرح المواد السائلة خارج البكتيريا ، وهذا ما يسمح بتدميرها .
3. **العمل على تثبيط نمو ADN:** أن اضطراب عمل ال ADN يمنع الخلية من الأنقسام وتكوينها للإنزيمات الخاصة بذلك ، ومن بين اسباب هذا الأضطراب المضادات الحيوية .

## III – 6- المقاومة البكتيرية :

### III – 6- 1- خواص الجذمة البكتيرية :

في علم الطب ، الجذمة البكتيرية هي مقاومة للمضاد الحيوي على حسب تركيز المضاد الحيوي ، أي بإرتفاع التركيز تقل مقاومة لإعطاء أفق لكي تتم المعالجة [25 ].

### III – 6- 2- حساسية الميكروب :

إن دراسة حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي لها عدة أهداف ، أولها إختيار المضاد الأكثر نشاطا إضافة إلى انه في حالة معالجة الأمراض المعدية ، يجب معرفة المضاد الفعال وهذا باختباره عـلى الميكروب المسؤول عن المرض ، وأخيرا تحديد التركيز اللازم للتخلص من العامل المعدي والممرض للعضو المريض [19 ].

ومن اهم طرق التعرف على حساسية أو مقاومة البكتيريا للمضاد طريقة الأنتشار .

- **طريقة الأنتشار ( Méthode de diffusion):**

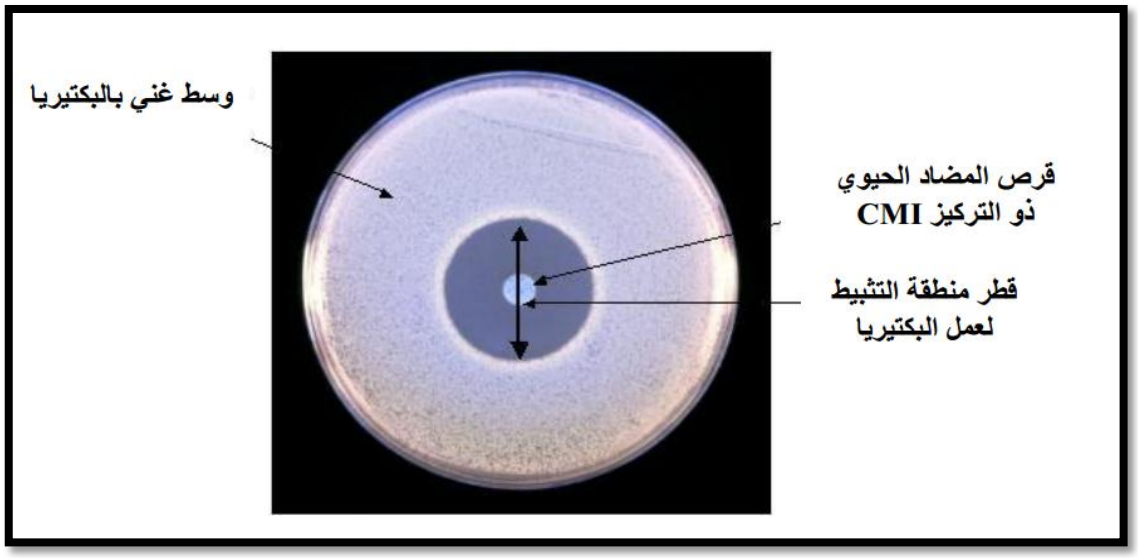
وهي الأكثر استعمالا في المستشفيات لتشخيص الأمراض المعدية ، ويكون الوسط المستعمل صلب من الجيلوز gélose وأهم وسط جيلوزي هو وسط Hilton Muller ، نسبة للباحث الذي حضره عام 1941 ، والهدف من هذه الطريقة التحليلية هو معرفة مدى حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي ، ويتم التحليل بإتباع الخطوات التالية :

بعد إذابة معقمة للوسط الجيلوزي ، يسكب بكميات محددة في علب بتري ، يحضر المعلق الميكروبي بوضع جذمة منه في الماء الفيزيولوجي ، ثم يشتل في علب بتري المحضرة مسبقا ( بعد تصلب الوسط الجيلوزي ) ، تدخل العلب للحاضنة للتجفيف ، بعدها توضع أقراص الإختبار معقمة ومشبعة بتراكيز مختلفة للمضاد الحيوي المراد إختبار فاعليته ، ثم تعاد العلب للحاضنة تحت درجة حرارة 37°م لمدة 18-24 ساعة [19 ].

ولمعرفة مدى حساسية البكتيريا وتأثير المضاد الحيوي ، نقيس قطر طبقة التثبيط بعد مرور الفترة الزمنية المذكورة سابقا وكنتيجة لهذا الأختبار يمكن أن نحدد درجة حساسية البكتيريا اتجاه المضاد الحيوي ويمكن القول أن :

- ✓ إذا كان قطر التثبيط أكبر أو يساوي 15 ملم فهي حساسة .
- ✓ إذا كان قطر التثبيط أصغر من 15 ملم فهي متوسطة حساسة .
- ✓ إذا كان قطر التثبيط منعدم فإنها مقاومة [26 ] .

ويعتمد نجاح هذه الطريقة على مدى الانتشار الجيد للمضاد الحيوي في وسط الزرع ، فإن لم يكن كذلك فنتبع طريقة أخرى لقياس مدى حساسية الميكروب [ 19].




**الشكل (III-8 ) :** الأنتيبيوغرام بعد الحضن وطريقة قياس قطر منطقة التثبيط.

# مراجع الفصل الثالث

## المراجع باللاتينية :

[1] E. G. Zézérov. Abrégé de Microbiologie Générale et d'Immunologie, Académie de Médecine: Moscou, (2002), 195.

[3] M. H. Gerardi. Wastewater Bacteria, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey : Canada, (2006), 255.

[5] S. A. Ochoa, F. López-Montiel, G. Escalona, A. Cruz-Córdoval, L. B Dávila, B. López-Martínez, Y. Jiménez-Tapia, S. Giono, C. Eslava, R. Hernández-Castro, J. Xicohtencatl-Cortes. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, (2013), 70(2), 133-144.

[11] A. Milane, HLa quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteur de radicaux libres; étude et applications thérapeutiques Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur, Strasbourg I, (2004) ,22-36.

[12] J. B. Harborne, Flavonoids in phytochemistry Lawrence, *Litton Educatinal Phytochemistry*,(2000), (55), 481-504.

[13] B. Halliwell, J. M. Gtteridge, Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine some problems and concept ,*Arch. Biochem. Biophys*,(1986),146, 501-514.

[14] K. Ishige, D. Schubert, Y. Sagara, Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms, *Free Radic. Biol Med*, (2001), 30, 433 -446.

[16] Tony Hart ، " Atlas de Poche de Microbiologie ".Paris. edition.(1997)

[20] Madeleine iréneMirabaud ،" entrobacteries a beta-lactamases a specterelargi enpediatrie en 1996" ،these pour obtenir le grade de docteura en medicine ، faculté demedicine. l'université de Genève ; (2003) ،p 2-3.

[25] Guerin F . Carret C. L'antibiogramme: Principes, méthodologie , intérêt et limites. Journées nationales GTV-INSZ (1999).

## المراجع بالعربية :

[2] ج .بوستجيت،الميكروبات والإنسان، عالم المعرفة، المجلس الوطني للثقافة والفنون والآداب : الكويت، (1985 )، ص278.

[4] ز .محمود الخفاجي، أحياء الأغذية المجهرية، الموسوعة الزراعية لمنظمة التربية والثقافة والعلوم، ص 122.

[6] مصطفى بوقوادة، دراسة فيتوكيميائية لليبيدات والفينولات في بعض أنواع التمر المحلى ، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير تخصص التحضير العضوي والفيتوكيمياء ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة ،(2008)،ص..... .

[7] ع .خ .الركابي، *مجلة أبحاث البصرة*، (2007) 33(2) ص5-18.

[8] ط .الكوري، ج .المقطري ، *مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية*، (2011) ،**27** (1) ، ص-228. 213

[9] ص .جعفر ، *المجلة العراقية البيطرية الطبية*،( 2012)،36(2) ،ص 111-112.

[15] ج، يوستجيت ،الميكروبات و الأنسان:علم المعرفة،الكويت ، (1990)، ص 34-33 .

[17] أبو الوليد ،" المختصر الشامل في علم البكتيريا " ،الجزء الأول،(2009) .

[18] عبد الوهاب بن صادق، مدخل الى الدراسة العلمية في الأحياء الدقيقة و علم الميكروبيولوجي و التجارب العلمية، ص8-13

[19] ع .إبراهيم ،"دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران ، ماجستير في الكيمياء ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة، (2009 )،ص 38 -40.

[ 21] تامة نور الدين ، " تحضير ودراسة التفاعلية الكيميائية لمشتقات الألكيليدين بيتونوليد وفعاليتها البيولوجية " ، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير ، تخصص تحضير عضوي وفيتوكيمياء ، جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2007).

[22] أنوار حاج علي ، "عزل بكتيريا Pseudomonas arguons وتشخيصها من ترب سورية ملونة بالزيت "،مجلة جامعة دمشق العلوم الزراعية سوريا المجلد 27.العدد1. (2011) .ص 231-232

[23] عباس عبود الدليمي ،"تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرض التهاب اللثة " ،كلية التربية جامعة ديالي الرازي ، (2011). ص 215-216.

[24] د. عادل نوفل، جامعة دمشق ، كتاب الكيمياء الصيدلانية (1981) .

[26] س .قرح و ح. حمره ، "الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلصات نبات القطن و فاعليتها " ، مذكرة لنيل شهادة ماستر أكاديمي ، تخصص كيمياء مطبقة ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة ، (2015 ).

# الجزء العملي

# الفصل الرابع

## الطرق والوسائل

تم انجاز هذه التجارب على مستوى مخابر كلية العلوم الدقيقة ومخبر تثمين وترقية الموارد الصحراوية (VTRS) بجامعة الشهيد حمة لخضر بالوادي .

## IV -1- تحضير العينة النباتية :

تم جنى القسم الهوائي لنبات الحلمة (*Moltakia ciliata*) من منطقة اميه ونسه بولاية الوادي وذلك وقت إزهارها، بعد ذلك تمت تنقيتها من الشوائب والأعضاء الميتة ،ثم غسلها بالماء المقطر وفرشها على الورق لتجف وتتم هذه العملية بعيدا عن أشعة الشمس مع التقليب من حين لأخر وبعد التأكد من جفافها تم طحنها ، دامت مدة التجفيف 15يوما .

**الشكل (IV -1) :** عـملية الــطحن

## IV -2- الأجهزة و المواد المستعملة :

### IV -2- 1 - الأجهزة :

- ميزان إلكتروني حساس.
- جهاز التبخير الدوار (Rotavapeur).
- جهاز مطيافية الأشعة الفوق البنفسجية – المرئية (Spectroscopie UV-Visible).
- جهاز كروماتوغرافيا السائلة ذو الكفاءة العالية (HPLC).
- حاضنة (Etuves).
- معقمة (Autoclave).
- حمام مائي.

(أنظر الملحق 1 )

### IV -2- 2 - المواد :

- ميثانول 80%($CH_3OH$).
- أسيتون80%( $C_3H_6O$ ).
- حمض الغاليك ($C_7H_6O_5,H_2O$).
- الروتين ($C_{27}H_{30}O_{16}$).
- الكرستين ($C_{15}H_{10}O_7$).
- حمض الاسكوربيك ($C_6H_8O_6$).
- كاشف الفولين (Réactif de Folin-ciocalteai).
- محلول ثلاثي كلوريد الألمنيوم($AlCl_3$ ، 2%).
- محلول كربونات الصوديوم ($Na_2CO_3$;7.5%).
- محلول أسيتات الصوديوم ($CH_3COONa$).
- حمض الخل ($CH_3COOH$).
- حمض الهيدروكلوريك (HCl).
- كلوريد الحديد الثلاثي($FeCl_3$).
- حمض الكبريتيك ($H_2SO_4$).
- موليبيدات الألمنيوم (Molybdate d'ammonium).
- فوسفات الصوديوم ($NaH_2PO_4,2H_2O$).
- DPPH ذو النقاوة (99%).
- DMSO.
- TPTZ.
- Muller Hinton.
- كبريتات الصوديوم ($Na_2SO_4$).

### IV - 3- الاختبارات الكيميائية الأولية : [1]

تم القيام بجملة من الاختبارات الأولية لتحديد و حصر مختلف المواد الفعالة التي يحتويها القسم الهوائي للنبات الجاف، نلخصها فيما يلي :

### IV -3- 1- اختبار الكشف عن الفلافونيدات (les Flavonoides):

نزن10g من المسحوق النباتي الجاف ، ينقع في 150مل من حمض كلوروهيدريك المخفف (1%) لمدة 48 ساعة ثم يرشح .

### IV - 3- 1-1- الاختبار العام للفلافونيدات:

نأخذ 10مل من الراشح المحصل عليه و نعايره بواسطة محلول النشادر $NH_4OH$ (2N) حتى القاعدية، ظهور اللون الأصفر الفاتح بعد قاعدية الوسط دليل على وجود الفلافونيدات .

### IV - 3- 1-2- اختبار الفلافونيدات الحرة (Les Flavonoides Libres):

نأخذ 5 مل من الراشح المحصل عليه و نضعها في أنبوب اختبار و نضيف له 2.5 مل من الكحول الإميلي فنلاحظ بعد الرج تلون الطور الكحولي ( الطور العلوي ) باللون الأصفر و هذا يدل على وجود الفلافونيدات الحرة .

### IV - 3- 1-3- اختبار الفلافونيدات السكرية ( Glycoside Flanoniques):

نبخر الطور الكحولي المحصل عليه من الاختبار السابق والراسب المحصل عليه يذوب في 3ml من حمض الكلور وهيدريك المخفف (1%) ثم يسخن المحلول في حمام مائي لمدة دقيقتين، وبعد التبريد نضيف له 2.5 مل من الكحول الإميلي فنلاحظ بعد الرج تلون الطور الكحولي (الطور العلوي ) باللون الأصفر و هذا دليل على وجود الفلافونيدات السكرية.

و يمكن الكشف عنها بطريقة أخرى بأخذ 5 مل من الراشح المحصل عليه و نضعها في أنبوب اختبار و نضيف لها كمية قليلة من المغنيزيوم ثم نرجها جيدا ، بعد مدة نلاحظ ظهور اللون الأحمر دليل على تواجد الفلافونيدات السكرية.

### IV - 3- 2- اختبار الكشف عن القلويدات (Les Alcaloides) :

نزن 10 غ من المسحوق النباتي الجاف، ينقع في 150 مل من حمض كلوروهيدريك المخفف (1%) لمدة 48 ساعة ثم يرشح ، الراشح المحصل عليه نعايره بواسطة محلول النشادر $NH_4OH$ (N2) حتى pH = 9 بعد عملية المعايرة نقوم بعملية استخلاص ( سائل- سائل) ثلاث مرات بواسطة الكلوروفورم يجمع الطور العضوي و يبخر ، الراسب المحصل عليه يذوب في 2 مل من حمض

كلوروهيدريك المخفف (1%) ثم نضيف له ثلاث قطرات من كاشف ماير، تشكل راسب دليل على تواجد القلويدات .

**كاشف ماير:** يحضر باستخدام 5 غ من KI و 1.358 غ من $Hg_2Cl_2$ مذابة في 100 مل من الماء المقطر.

## IV - 3- 3- اختبار الكشف عن الستيرولات والتربينات الثلاثية : (Les Stéroles et Les Terpénes)

نزن 5 غ من المسحوق النباتي ،ينقع في 20 مل من الكلوروفورم لمدة 30 دقيقة ثم يرشح ، نضع الراشح المحصل عليه في أنبوب اختبار و نضيف له 1 مل من حمض الكبريت ( $H_2SO_4$) بحذر على جدار الأنبوب ، عند ظهور اللون الأخضر الذي يتحول بعد مدة إلى اللون الأحمر في الطبقة الفاصلة بين الطورين هذا دليل على تواجد الستيرولات والتربينات الثلاثية .

## IV - 3- 4- اختبار الكشف عن العفصيات ( Les Tanins ) :

نزن 10 غ من المسحوق النباتي الجاف ، ينقع في الكحول الإيثيلي (50%) لمدة 30 دقيقة ثم يرشح، الراشح المحصل عليه يضاف له قطرات من ثلاثي كلوريد الحديد بعد مدة ملاحظ ظهور اللون الأخضر دليل على تواجد العفصيات .

## IV - 3- 5- اختبار الكشف عن الكومارينات (Les Coumarins) :

يبخر 3 مل من المستخلص الإثيري حتى الجفاف ، و يذاب المتبقي بشكل جيد في2 مل ماء مقطر ثم يقسم إلى حجمين متساويين ، يترك الأول كشاهد و الثاني نجعله قلوي بإضافة 0.5 مل من محلول الأمونيا $NH_4OH$ (10%) ،إن ظهور فلورسة كثيفة تحت الأشعة فوق البنفسجية دلالة على وجود الكومارينات و مشتقاتها.

## IV - 3- 6- اختبار الكشف عن الكدينوليدات( Les cardénolides ):

نزن 1 غ من المسحوق النباتي الجاف ، ينقع في 20 مل من الماء المقطر لمدة 20 - 30 دقيقة ثم يرشح ، نأخذ 10مل من الراشح المحصل عليه و يخضع لعملية استخلاص ( سائل- سائل) بواسطة10 مل من خليط مكون من الكلوروفورم و الإيثانول، نبخر الطور العضوي المحصل عليه و الراسب الناتج يذوب في 3 مل من حمض الإيثانويك وبعض القطرات من ثلاثي كلوريد الحديد $FeCl_3$ ، يليها إضافة

1 مل من حمض الكبريت $H_2SO_4$ فنلاحظ تلون الطور الحمضي بلون أخضر مزرق دليل على تواجد الكدينوليدات.

### IV - 3- 7- اختبار الكشف عن الصابونيات ( Les Saponoisides ):

نزن 2 غ من المسحوق النباتي الجاف ، يوضع في 80 مل من الماء المقطر يسخن لمدة 15 دقيقة بعدها يرشح و يبرد، يوضع الراشح في أنبوب اختبار و يرج جيدا ، ثم يترك لمدة زمنية معينة نلاحظ بعدها ظهور رغوة تبقى لمدة 15 دقيقة تدل على تواجد الصابونيات.

### IV - 3- 8- اختبار الكشف عن الزيوت الطيارة (les huiles essentielles):

نضع كمية من المستخلص الأثيري من 10مل الى 20 مل في حوجلة و يبخر المستخلص حتى الجفاف عندما تنبعث رائحة طيبة من المحلول الكحولي المتبقي يذاب في كمية الكحول و تكرر عملية الإذابة يبخر جزء من المحلول الكحولي حتى الجفاف ، فإذا تميز المحلول المتبقي برائحة طيبة فهذا دليل على وجود الزيوت الطيارة (انظر الملحق 2) .

| المواد | الاسم | الصيغة |
|---|---|---|
| **المذيبات العضوية** | كلوروفورم<br>إيثر البترول | $CHCL_3$<br>R-O-R |
| **الأحماض** | حمض كلور الماء<br>حمض الإيثانويك<br>حمض الكبريت | HCL<br>$CH_3COOH$<br>$H_2SO_4$ |
| **القواعد** | هيدروكسيد الصوديوم<br>الأمونياك | NaOH<br>$NH_3$ |
| **الكحولات** | الإيثانول | $C_2H_5OH$ |
| **الأملاح** | ثلاثي كلور الحديد | $FeCl_3$ |

**الجدول (IV -1) :** المواد المستعملة في الاختبارات الاولية

## IV- 4- الاستخلاص :

### IV- 4- 1- تعريف الاستخلاص:

هو عزل مركب أو عائلة مركبات من المادة الخام باستعمال المذيبات العضوية ،إن كانت المادة الخام سائلة فيطلق عليه استخلاص سائل – سائل و أما إذا كانت صلبة فيطلق عليه استخلاص سائل - صلب ،ولهذا الأخير عدة أشكال ترتبط بعدة عوامل مختلفة منها درجة الحرارة ،الضغط وكيفية استعمال المذيب[2].

### IV- 4- 1-1- استخلاص سائل – سائل :

وهو طريقة تسمح بعزل مادة ما من مزيج يحوي على عدة مواد أخرى ، ويعتمد مبدأ الاستخلاص على عامل توزع المواد بين سائلين غير قابلين للامتزاج كالطور المائي والطور العضوي فإذا كانت المادة موجودة في طور مائي غير منحلة فيه و أضيف إلى هذا المحلول مذيب عضوي فهو لا يمتزج معه ويستطيع أن يذيب المادة ، فإن المادة ستنتقل إلى المذيب العضوي مشكلا طبقتين من سائلين غير ممتزجين [ 3] .

وتعتمد نسبة الانحلال للمادة في المذيب العضوي على :

- قابلية انحلال المادة في المذيب العضوي .
- حجم المذيب المستخدم.

### IV- 4- 1-2- استخلاص صلب – سائل :

ويسمى أيضا استخلاص على البارد (النقع) و تعتمد هذه الطريقة على وضع المادة الخام داخل إناء يحتوي على كمية محددة من المذيب ،بحيث يكون حجم المذيب المستعمل يغطي المادة الجافة بنسبة تقريبية قدرها (المذاب 1/ المذيب 3) في الظروف العادية (ضغط ودرجة حرارة الغرفة) مع التحريك من حين لآخر تترك مدة زمنية معينة ،خلالها يتم انتقال المركبات المراد فصلها من المادة الجافة إلى المذيب ،تتبعها عملية الترشيح . نستعمل طريقة النقع للمواد التي تتأثر وتتفكك بالحرارة[4].

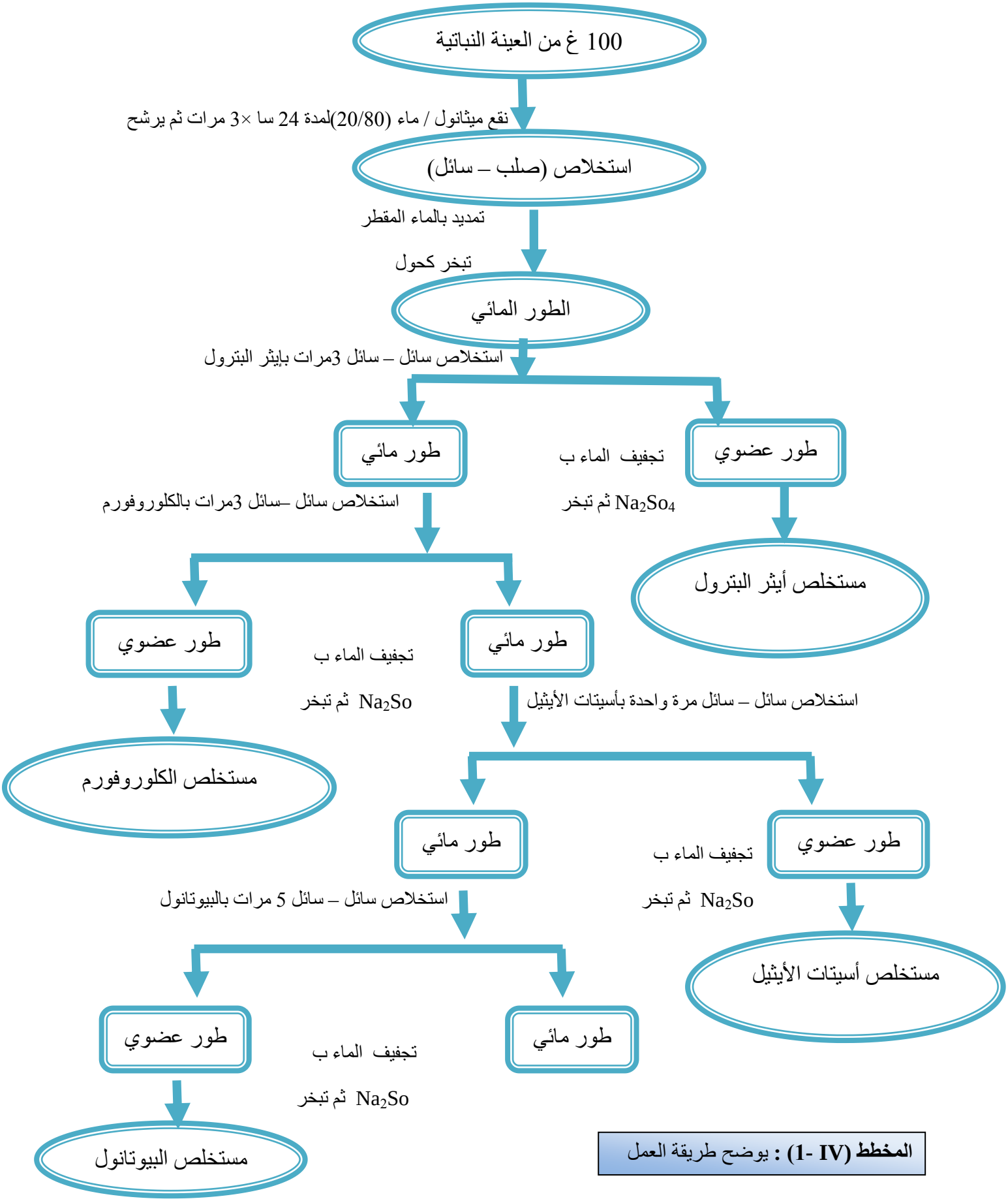
## IV- 4-2- طريقة الاستخلاص المتبعة :

### IV- 4-2-1- الاستخلاص بواسطة الميثانول /ماء (20/80) :

نزن 100 غ من العينة النباتية الجافة ثم تنقع في خليط من ميثانول /ماء (20/80) لمدة 24ساعة تكرر العملية 3مرات متتالية مع تجديد المذيب في كل مرة ،بعدها تجمع الرشاحات ويبخر الميثانول بواسطة جهاز التبخير الدوراني ، عاملنا هذا الاخير بـ 200 مل بالماء المقطر الدافئ حتى يصل حجم المحلول 500 مل يترك ليلة كاملة تحت الرج ثم يرشح لنحصل على الطور المائي نقوم بالاستخلاص سائل – سائل 3مرات بواسطة 150 مل من ايثرالبترول ، نفس العملية تكررت بإستعمال الكلوروفورم ومرة واحدة بواسطة اسيتات الايثيل وبعدها البيوتانول من 4 الى 5 مرات تجمع الأطوار العضوية و نضيف كبريتات الصوديوم اللامائية $Na_2SO_4$ للتخلص من أثار الماء وترشح ، ثم تبخر كل الأطوار وفي النهاية نحصل على أربع مستخلصات وهذا بعد عملية التركيز وهم على التوالي :

- مستخلص ايثر البترول .
- مستخلص الكلوروفورم .
- مستخلص اسيتات الايثيل .
- مستخلص البيوتانول .

المخطط التالي يلخص كل الخطوات السابقة .




**المخطط (IV -1) :** يوضح طريقة العمل

### IV- 4-2-2- الاستخلاص بواسطة الاسيتون /ماء (20/80):

نزن 100 غ من العينة النباتية الجافة ونعاملها كما في الخطوة السابقة لكن نستبدل الميثانول بالأسيتون فنتحصل أيضا على أربع مستخلصات عضوية وهي :

- مستخلص ايثر البترول .
- مستخلص الكلوروفورم .
- مستخلص اسيتات الايثيل .
- مستخلص البيوتانول .

## IV- 5- التقدير الكمي بواسطة مطيافية الأشعة فوق البنفسجية- المرئية :

### IV- 5-1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية - المرئية UV-Visible:

تعد هذه التقنية من أقدم طرق التحليل الكيفي والكمي والأكثر استعمالا فهي تساعد في تحديد البنى الكيميائية للمركبات ، ومن أهم طرق التقدير الكمي طريقة قياس الإمتصاصية (الكثافة الضوئية) للمحاليل ، حيث مجال طولها الموجي λ محصور بين 400- 800 نانومتر .

يتكون الجهاز من قسمين رئيسيين هما المصدر الضوئي لأي طول موجي محدد ومقياس الكثافة الضوئية، حيث يتم وضع المحاليل المراد قياس امتصاصيتها داخل أنبوب خاص يسمح بمرور الضـــــوء وبالتالي فإن كمية الضوء المار خلال العينة يعبر عنها بالامتصاصية [5- 6 ].

### IV- 5-2 - التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية:

يتم تقدير كمية المركبات الفينولية الكلية باستخدام الطريقة اللونية لSingleton Rossi (1965) باستعمال كاشف الفولين Folin ciocalteu، حيث أن هذا الكاشف يتكون من حمض فوسفوتنغستينيك ($H_3P_{12}O_{40}$) وحمض فوسفومولييبديك($H_3PMO_{12}O_{40}$) الذي يرجع بواسطة الفينولات الى أكسيد التنغستين ($W_8O_{23}$) والموليبدين ($Mo_8O_3$) ذات اللون الأزرق ، يتم تقدر المركبات الفينولية كميا بواسطة جهاز المطيافية الضوئية وباستعمال حمض الغاليك كفينول مرجعي تقاس امتصاصيته الضوئية عند طول موجي λ =765 نانومتر [7].

- **المنحنى العياري لحمض الغاليك :**

نـقوم بـتحضير محـاليل مـخففة مـن حـمض الـغاليك تـراكـيزها تتراوح مـا بـين ( 0.03 - 0.3 مغ /مل) في أنابيب اختبار ، نأخذ 1مل من المحلول المخفف ونضيف له 0.5 مل من كاشف ( Folin ciocalteu) المخفف10مرات ، ثم نضيف للمزيج 2 مل من محلول كربونات الصوديوم ( $Na_2CO_3$, 7.5%)، وثم نرج المزيج جيدا ويحضن في درجة حرارة المخبر بعيدا عن الضوء لمدة 30 دقيقة .

تتم بعد ذلك قراءة الامتصاصية الضوئية لكل تركيز بجهاز UV-Visible عند طول موجي $\lambda$=765 نانومتر [8] .

- **طريقة العمل :**

نحضر من كل مستخلص عضوي تركيز قدره 0.4 مغ / مل ونعاملها بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الغاليك ( انظر الملحق 3 ).

## IV- 3-5 - التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية:

يتم تحديد كمية الفلافونيدات الكلية وفق الطريقة اللونية لكلوريد الألمنيوم التي وصفها Chang et al واعتمدنا على طريقة Woisky and Salation مع بعض التعديلات الطفيفة ، ويمكن تقديرها كميا عن طريق التفاعل مع كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ وتكوين معقد ذو لون الاصفر مع الفلافونيدات .

تقدر المركبات الفلافونيدية كميا بواسطة جهاز المطيافية الضوئية عند طول موجي $\lambda$=420 نانومتر حيث نستعمل الروتين كفلافانويد مرجعي ،ولأجل التقدير الكمي للمركبات الفلافونيدية نستعمل المنحنى القياسي للروتين [9] .

- **المنحنى العياري لمحلول الروتين:**

نقوم بتحضير عدة تراكيز من محلول الروتين محصورة بين (0.02 - 0.1 مغ /مل ) حيث نأخذ من كل تركيز1.5 مل ونضيف له1.5 مل من محلول ثلاثي كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ ذو تركيز 2 % ثم نرج المزيج جيدا ونتركه في درجة حرارة المخبر لمدة ساعة في الظلام ،بعدها نقوم بقراءة الامتصاصية عند طول موجي $\lambda$=420 نانومتر.

- **طريقة العمل :**

نحضر من كل مستخلص عضوي تركيز قدره 0.4 مغ / مل ونعاملها بنفس الطريقة التي عاملنا بها الروتين ( انظر الملحق 3 ).

## IV- 4-5 - التقدير الكمي للفلافانولات الكلية :

يتم تقدير كمية الفلافانول بطريقة Kumaran et Karunakaran بواسطة جهاز المطيافية الضوئية عند طول موجي 440 =λ نانومتر وقد اختير الكرستين كفلافانول مرجعي [10].

- **المنحنى العياري للكرستين :**

نقوم بتحضير عدة تراكيز مخففة من الكرستين ، ونأخذ من كل تركيز 2 مل في أنابيب ونضيف له 2 مل من محلول ثلاثي كلوريد الألمنيوم 2 % و 3 مل من خلات الصوديوم 50 مغ /مل ثم تحضن في درجة حرارة المخبر لمدة ساعتين ونصف ،بعدها نقوم بقراءة الامتصاصية عند طول موجي 440= λ نانومتر .

- **طريقة العمل :**

نحضر من كل مستخلص عضوي تركيز قدره 2 مغ /مل ونعامله بنفس الطريقة التي عاملنا بها الكرستين ( انظر الملحق 3 ).

## IV- 6- تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بالطرق الكيميائية :

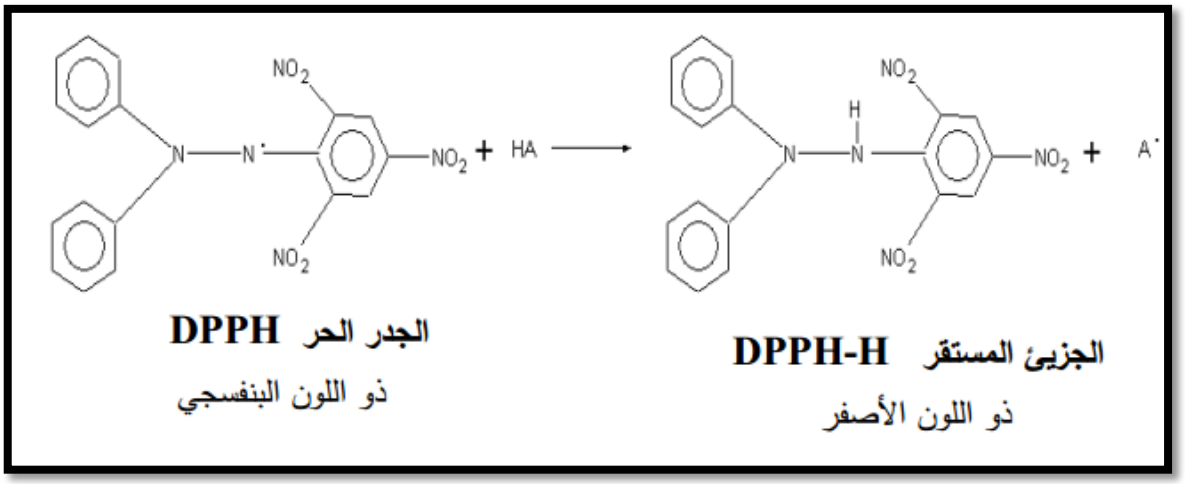
هي قياس لقدرة المركب أو المستخلص العضوي في تثبيط الجذور الحرة أو توقيف عملية الأكسدة، حيث تقدر الفاعلية المضادة للأكسدة بعدة طرق نذكر منها : اختبار(ABTS)، و إختبار (DPPH)، أو إختبار (FRAP) و اختبار القدرة الارجاعية هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين وتقدير الامتصاصية عند طول موجي معين [11].

وفي دراستنا هذه قمنا باختبار : DPPH، FRAP ، CAT .

## IV- 6-1- اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH:

وهو اختبار مضاد للجذور الحرة ولقد سبق تعريفه منذ 50سنة ماضية من طرف العالم "بولواز" سنة 1958 ولقد اعتمد في ذلك على توضيح بعض الحسابات الخاصة بمضادات الأكسدة .

هذا الإختبار يعتمد على تثبيط الجذر الحرة DPPH ،وذلك بالاعتماد على قابلية إعطاء المستخلصات العضوية لذرة الهيدروجين ويظهر ذلك من خلال التفاعل اللوني للجذر الحر DPPH ذو اللون البنفسجي الذي يتحول الى DPPH-H ذو اللون الاصفر ، ويتم قياس الامتصاصية عند طول موجي 517= λ نانومتر [12].




**الشكل (IV -2) :** معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة

وتحسب نسبة التثبيط المئوية وفق العلاقة التالية :

$$I\% = [ ( A_0 - A_i ) / A_0 ] \times 100$$

حيث:

$A_0$: الامتصاصية الضوئية للجذر الخالي من العينة .

$A_i$: الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر+ العينة).

I%: نسبة تثبيط العامل المضاد للأكسدة لجذر .

- **تحضير الكاشف :**

يتم تحضير محلول DPPH بإذابة 2 مغ من ثنائي فينيل هايدرازيل في 50 مل من الميثانول فنتحصل عن محلول بنفسجي داكن ذو التركيز 100 ميكرو مولاري .

- **المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك (AA):**

نحضر عدة تراكيز مخففة من (AA) محصورة بين (0.01- 0.1 مغ /مل) ونأخذ من كل تركيز 1.5 مل ونضيف له 1.5 مل من محلول DPPH ، نجانس المزيج ونتركه 30 دقيقة في الظلام وبعدها تتم القراءة عند طول موجي 517 = λ نانومتر .

- **طريقة العمل :**

نحضر عدة تراكيز مختلفة من المستخلصات العضوية المخففة ونعاملها بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الاسكوربيك (أنظر الملحق 3).

## IV- 6-2- اختبار اجمالي القدرة المضادة للأكسدة الكلية CAT:

تم تقدير فاعلية المضادة للأكسدة على طريقة Prieto et al ، مع بعض التعديلات التي قام بها Dasgupta al وتتضمن هذه التقنية الكاشف الذي يتميز بلون اخضر فاتح ويتكون من :

- Acide sulfurique :0.6 M.
- Phosphate de sodium :28 mM.
- Molybdate d'ammonium :4 mM.

أن اجمالي الفاعلية المضادة للأكسدة تقدر كميا بواسطة جهاز UV-Visible حيث يستعمل حمض الاسكوربيك كفينول مرجعي عند طول موجي 695 = λ نانومتر[ 13-15] .

- **المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك:**

نقوم بتحضير عدة تراكيز مخففة من حمض الاسكوربيك محصورة بين (0.01 – 0.2 مغ / مل) ، نأخذ من كل تركيز 0.3 مل ونضيف له 3مل من الكاشف ونتركه لمدة ساعة في حمام مائي درجة حرارته $95C^0$ فنتحصل على اللون الأخضر ، نتركها تبرد ثم تقرأ الامتصاصية عند طول موجي 695 =λ نانومتر .

- **طريقة العمل :**

نحضر من كل مستخلص عضوي تركيز قدره 0.4 مغ /مل و نعاملها بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الأسكوربيك ( انظر الملحق 3 ).

## IV- 6- 3- دراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP:

يتم تقدير القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات العضوية بطريقة FRAP حسب طريقة Benzine وStrain المعدلة من طرف pulido وآخرون ، حيث تسمح هذه التقنية بتقدير القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة بالمعقد الحديدي لأيون TPTZ حيث يمتص $Fe^{+2}$ فيعطي اللون الأزرق البحري الشديد ، و يتم قياس التغيرات التي تحدث في الامتصاصية عند طول موجي 593نانومتر ، واستخدام حمض الأسكوربيك كمركب قياسي [ 16- 17].

- **تحضير محلول FRAP:**

يتم تحضير محلول FRAP من ثلاث محاليل مختلفة :

1- محلول Tompon : وهو عبارة عن مزيج من اسيتات الصوديوم (0.1 N) مع حمض الخل (0.1 N) الأس الهيدروجيني للمزيج PH=3.6 .

2- محلول TPTZ: نقوم بإذابة 0.031 غ من TPTZ في 10 مل من حمض الكلوريد ( 0.04 مولاري)

3- محلول كلوريد الحديد الثلاثي ذو التركيز (20 Mm).

نأخذ25 مل من محلول Tompon و 2.5 مل من محلول TPTZ و 2.5مل من محلول كلوريد الحديد الثلاثي فنتحصل على محلول FRAP [ 18].

- **المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك :**

نقوم بتحضير عدة تراكيز مخففة من حمض الاسكوربيك محصورة بين (0.1 - 0.6 مغ / مل )، نأخذ من كل تركيز 0.3 مل في أنابيب ونضيف لها 0.27 مل من الكاشف FRAP ونتركه لمدة 30 دقيقة في الظلام فنتحصل على اللون البنفسجي ، ثم تقرأ الإمتصاصية بعد أربع دقائق عند طول موجي $\lambda$= 593 نانومتر.

- **طريقة العمل :**

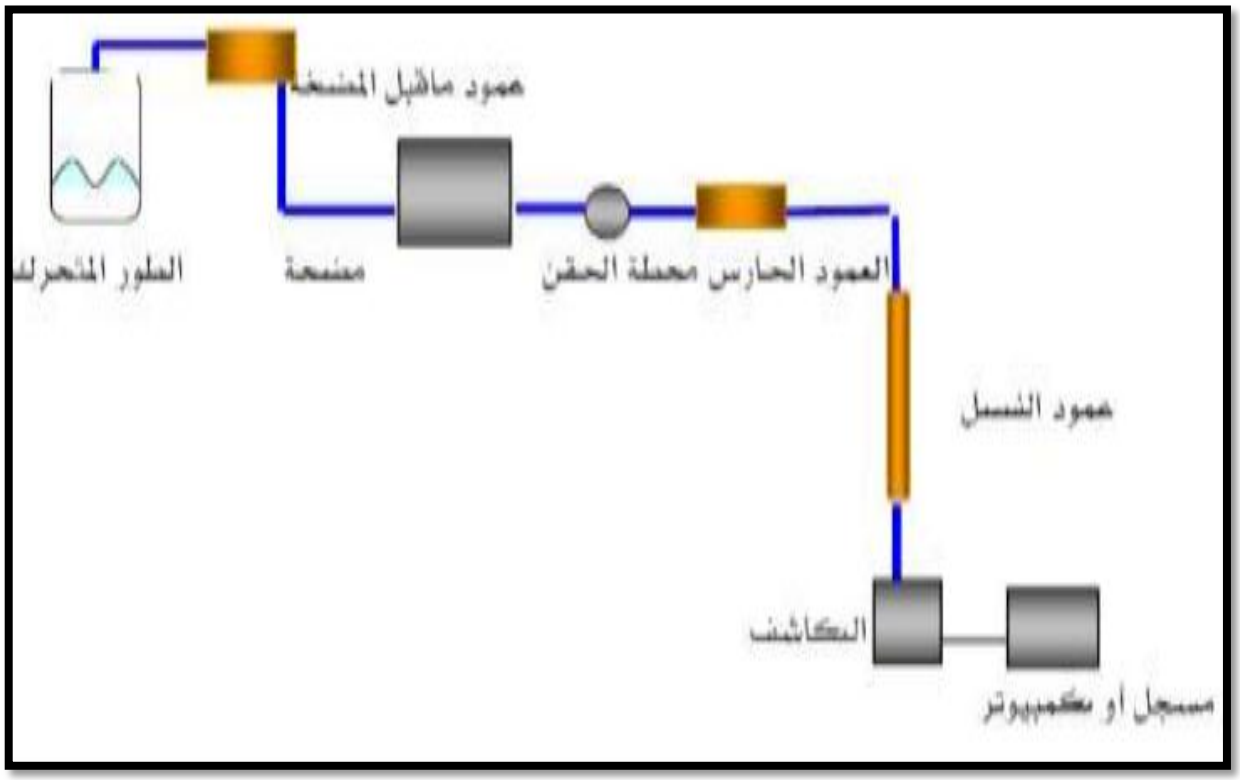
نحضر من كل مستخلص عضوي تركيز قدره 0.4 مغ /مل ونعاملها بنفس الطريقة التي عاملنا بها حمض الأسكوربيك ( انظر الملحق 3 ).

## IV- 7– كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

يعتبر HPLC أحد الطرق الأساسية لتحليل العديد من المواد العضوية وهو يمتاز مثل الطرق التحليل الكروماتوغرافي الأخرى بالدقة والحساسية العالية كما أن مدى إستخداماته لا تعتمد على تطاير العينة أو تأثرها بدرجة الحرارة ، كما يمتاز جهاز HPLC بكفاءته العالية جدا بالأضافة إلى إستخدامه في فصل العديد من المركبات المختلفة .

يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها وتقديرها كميا ، ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة ما بين طورين أحدهما طور متحرك سائل والآخر طور ثابت سائل أو صلب ، وعادة يكون الطور الثابت في عمود طوله حوالي 25سم وقطره الداخلي 4 ملم [ 19].

يتكون الجهاز الكروماتوغرافي من : مضخة – الحقن – العمود – الكاشف – المسجل .




**الشكل (IV -2) :** يمثل مكونات جهاز HPLC

- **شروط التجربة :**

**الجدول (IV -2) :** يوضح الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات باستخدام HPLC

| العامل | الشروط |
|---|---|
| النظام | الطور المعكوس RP -HPLC |
| العمود | ($C_{18}$ 46 ملم ×25سم) |
| حجم الحقن | 20ميكرولتر |
| معدل الحقن | 1مل / دقيقة |
| طول الموجة | λ=268 نانومتر |
| الزمن | 50 دقيقة |
| درجة الحرارة | 25°C |
| الطور المتحرك | acetonitrile:(A)<br>%0.2 acide acetique :(B) |

ويتم تحديد المركبات الفينولية من خلال زمن مكوثها .

**الجدول (IV -3) :** يوضح زمن مكوث لبعض المركبات الفينولية .

| المركبات الفينولية المرجعية | زمن مكوث t بالدقائق |
|---|---|
| حمض الغاليك | 5.21 |
| حمض الكلوروجينيك | 13.39 |
| حمض الفانيليك | 15.53 |
| حمض الكافييك | 16.3 |
| الفانيلين | 21.46 |
| حمض بيوكومارين | 23.81 |
| الروتين | 28.22 |
| نرجينين | 34.78 |
| كرستين | 45.04 |

- **طريقة العمل :**

نأخذ وزن قدره 10 ملغ من كل مستخلص عضوي ونقوم بإذابته في 5 مل ميثانول نتحصل على تركيز قدره 2 ملغ/ مل ونقوم بترشيحه بورق ترشيح ثم نعيد عملية الترشيح باستخدام ورق ترشيح خاص لتصبح العينة جاهزة للحقن في جهاز HPLC .

## IV- 7- دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا :

تهدف هذه الدراسة لمعرفة تأثير المستخلصات العضوية تجاه ثلاث أنواع من البكتيريا بتطبيق أشهر الطرق و هي طريقة الانتشار حول الأقراص المشبعة بالمضادات الحيوية على طبق مزروع زرعا متجانسا بالبكتيريا في وسط ميلر هنتون ( Mueller Hinton ) ،وبعد حضن الأطباق لمدة 24 ساعة يقاس قطر دوائر التثبيط حول الأقراص [ 20 - 21].

### السلالات البكتيرية المستعملة :

خلال هذه الدراسة تم استعمال ثلاث انواع من البكتيريا وهي :

- .Escherichia Coli
- .Pseudomonas aerogenose
- .Staphylococcus aureus

- **طريقة العمل :**

قبل الشروع في هذا العمل يجب تعقيم كل الأدوات في المعقمة والتنظيف الجيد لمكان العمل بالقرب من موقد بنزن وسنتبع في هذا العمل طريقة الانتشار كما في الخطوات التالية :

### 1- تحضير التراكيز :

نحضر ثلاث تراكيز مختلفة لكل مستخلص عضوي : 1 مغ /مل - 5 مغ /مل - 10مغ /مل وذلك بإذابتها في DMSO.

### 2 - تحضير وسط الزرع :

يتم تحضير اوساط الزرع بتسخين محلول الغلوكوزي Muller Hinton في حمام مائي درجة حرارته 85C° ، بعدها تسكب بكميات محددة في علب بتري معقمة بسمك موحد5 ملم ، ونتركها تبرد حتى تتجانس وتتماسك ، ثم تجفف في فرن لإزالة الرطوبة المتبقية [20 ].

### 3 - تحضير الأقراص :

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

### 4 - تحضير المعلق البكتيري :

باستخدام العود القطني نأخذ الجذمة بكتيرية ، ونضعها في أنبوب اختبار يحوي على 3 مل من الماء الفيزيولوجي المعقم نقوم بالرج جيدا حتى يتجانس المحلول بوجود موقد بنزين لتجنب إتلاف الوسط من البكتيريا، ثم نزرع نوع بكتيري في علبة بتري حيث يتم مسح بالعود القطني وتوزيع البكتيريا على مستوى السطح بشكل منتظم .

### 5 - وضع الأقراص المشبعة :

توضع الأقراص المشبعة بالمستخلصات داخل علب بتري بواسطة ملقط معقم ، أي كل علبة تحتوي على ثلاث أقراص مختلفة التركيز مع ترك مسافات مناسبة ،ونتركها تجف لمدة وجيزة بعدها نضعها في الفرن للحضن تحت درجة حرارة $37C^0$ لمدة 24 ساعة ويتم قلب علب بتري لكي لا يتلف الوسط نتيجة الماء، ثم تقرأ الأقطار بواسطة قدم القنوية (انظر الملحق 4).

# مراجع الفصل الرابع

## المراجع باللاتينية :

[1] P.Arora et al,E-Journal of Chemistry,(2007),vol4,No 4,p450-456.

[2] Shohami E., Gati I., Biet-Yannai E., Trombovler V., Kohen R.,Neuratrauma J,(1999)

[3] Chevion . S, Roberts M.A, Chevion M., *Frre Radical Biology and Medicine* ,(2000).

[4] Chevion S., Chevion M, Chock P.B., Beecher G.R, *Jornale of Medicinal Food*, (1999).

[5] 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*,(2010).

[6] Hamidi .A, Etude phytochimique et activité biologique de la plante Limoniastrum guyonianum, PHYSICO-CHIMIE MOLECULAIRE, Université Kasdi Merbah Ouargla ,(2012).

[7] Ivana. K, Milena .N, Miodrag . L, Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the Artemisia sp. Recovered by different extraction techniques , *Biotechnology and bioengineering Chinese journal of chemical engineering* ,(2011) 19(3):504-511.

[9] Zhishen .J, Mengcheng .T, Jianming. W, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals ,*Food chemistry* ,(1999) ,64(4): 555- 559.

[10] Mbaebie .BO, Edeoga. HO, Afolayan. AJ, "Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of Schotia latifolia Jacq" . Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,(2012).

[14] ALIYU. A.B,and all ,Free radical scavenging and total antioxidant capacity of ; ethanol extract of Ethulia conyzoides growing in Nigeria Romanian ,Biotechnological Letters ,Vol.17, No.4,(2012).

[16] Pellegrini. N , Serafini .M, Colombi .B, Del Rio. D, Salvatore .S, et all.Total antioxidant capacity of plant Food , beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. J Nutr ,(2003) ,p:2812-2819.

[17] Thaipong K , Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L and Byrne DH ,Comparison of ABTS ,DPPH ,FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant

activity from guava fruit extracts , Journal of Food Composition and Analysis, 19:669-675.

[18] Iris F . F. Benzie, and J. J. Strain, The Ferric Reducing Ability of plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power", Journal of Food Composition and Analysis, (1996).

[21] V .Guerin-Faublée, C.Carrt,L'antibiogramme: principes , méthodologie, Intérêt et limites .Journées nationales GVT-INRA.(1999), P:5-12 .

**المراجع بالعربية :**

[8] ربيعي عبد الكريم ، المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية ، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير ، تخصص كيمياء تحليلية ومراقبة المحيط جامعة قاصدي مرباح ورقلة ، (2010 ).

[11] مصطفى بوقوادة ، دراسة فيتوكيميائية لليبيدات والفينولات في بعض أنواع التمر المحلى ، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير، تخصص التحضير العضوي والفيتوكيمياء ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2008) .

[12] العابد إبراهيم ، دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمرانTraganum nudatum ، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير ، تخصص كيمياء عضوية تطبيقية ، جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2009).

[13] بسمة شمسة ، دراسة مقارنة للمردودية و النشاطية المضادة للأكسدة في المستخلص الكحولي والمائي عند نبات Zygophyllum album L ، مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر أكاديمي ، علوم الطبيعة والحياة ، جامعة الوادي (2015).

[15] غيابة زينب ، دراسة تحليلية للبيدات وفينولات ومكونات أخرى لبعض أصناف نخيل التمر المحلية ، رسالة محضرة لنيل شهادة دكتوراه علوم ، تخصص كيمياء جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2015) .

[19] د. رضوان صدقي فرج محمد ، "الطرق الحديثة لتحليل الاحماض الأمينية وتقييم نوعية البروتين "، كلية الزراعة .جامعة القاهرة ، المكتبة الاكاديمية ، (2004) ص 68-71.

[20] علاوي مسعودة ، الدراسة الفيتوكيميائية والتقييم الميكروبيولوجي لنبتتين من الفصيلة الرمرامية تستعملان في طب التقليدي الصحراوي Haloxylon Scoparium Pomel (Remth) Traganum nudatum (Thamran)، رسالة محضرة لنيل شهادة دكتوراه علوم ، تخصص كيمياء عضوية تطبيقية جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2015) .

# الفصل الخامس

النتائج والمناقشة

## V -1- نتائج الاختبارات الكيميائية الأولية:

| المادة الفعالة | نسبة تواجدها في النبات |
|---|---|
| **الفلافونيدات العامة** | + |
| **الفلافونيدات الحرة** | + |
| **الفلافونيدات السكرية** | + |
| **القلويدات** | + |
| **الستيرولات و التربينات الثلاثية** | + |
| **العفصيات** | + |
| **الكومارينات** | - |
| **الكردينوليدات** | - |
| **الصابونيات** | + |
| **الزيوت الطيارة** | + |

**الجدول (V-1) :** نـتائج الاخـتبارات

**ملاحظة:**

(+) : وجود المادة الفعالة . (-) : غياب المادة الفعالة .

من خلال نتائج المدونة في الجدول (V-1) يتضح لنا ما يلي: غنى القسم الهوائي للنبتة بمعظم المواد الفعالة كالستيرولات والتربينات الثلاثية و القلويدات، الصابونيات، الفلافونيدات بكل أنواعها ، العفصيات ،الزيوت الطيارة ونلاحظ غياب كل من الكومارينات والكردينوليدات.

## V -2- مردود الاستخلاص :

يتم حسابه بالعلاقة التالية :

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

$m_f$: كتلة المستخلص العضوي المتحصل عليه.

$m_i$: كتلة العينة النباتية.

بعد جفاف المستخلصات العضوية يتم وزنها وحساب مردود الاستخلاص.

| المستخلصات العضوية | مردود الاستخلاص % | |
|---|---|---|
| | النقع (ميثانول / ماء) | النقع (أستون / ماء) |
| ايثر البترول | 0.411 | 0.38 |
| الكلوروفورم | 0.458 | 0.503 |
| أسيتات الإيثيل | 1.16 | 1.268 |
| البيوتانول | 1.54 | 1.158 |

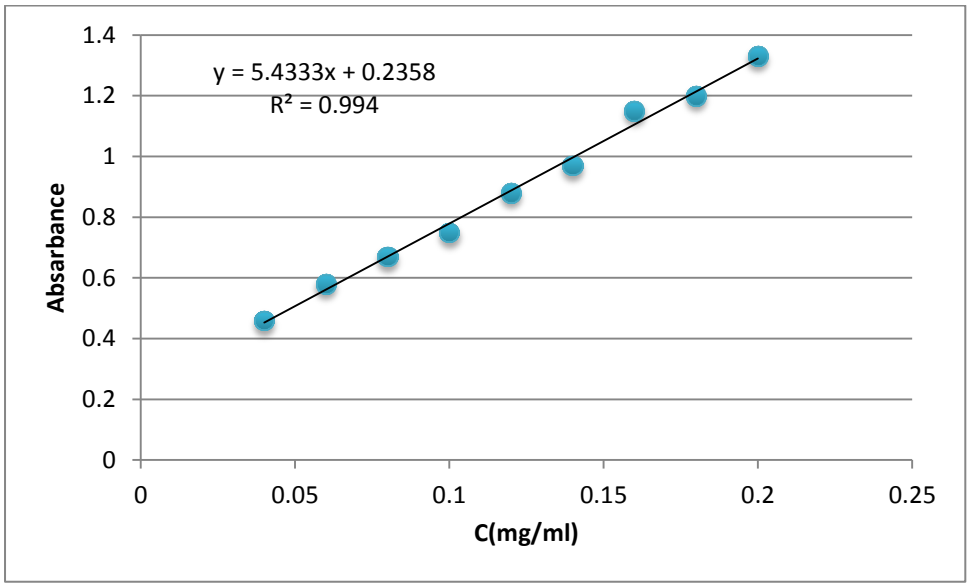
**الجدول (2-V) :** مردود الاستخلاص

من خلال النتائج الموضحة في الجدول (2-V) نلاحظ إختلاف في مردود الاستخلاص بين المستخلصات العضوية ، حيث أخذت مستخلصات الاسيتات و البيوتانول على أعلى قيمة و يرجع ذلك لغنى النبتة بالمواد القطبية ، و عند المقارنة بين طريقتي النقع كانت النتائج متقاربة وستقتصرهذه المذكرة على دراسة مستخلص أسيتات الإيثيل و مستخلص البيوتانول عند استعمال مذبيين مختلفين .

## V - 3 -التقدير الكمي باستخدام جهازالاشعة فوق البنفسجية والمرئية :

### V - 3 - 1- التقدير الكمي للفينولات الكلية :

من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة من المستخلصات العضوية وباستخدام علاقة المنحنى العياري لحمض الغاليك ، تم تقدير كمية فينولات المكافئة لحمض الغاليك الموجودة في 1غ من كل مستخلص :




**المنحنى(V-1) :** يمثل المنحنى العياري لحمض الغاليك

من خلال التعويض في معادلة المنحنى العياري نتحصل على كمية الفينولات بـ mg EAG/1gextre نعتمد على الترميز التالي :

**م1**:مستخلص البيوتانول (ميثانول/ ماء)

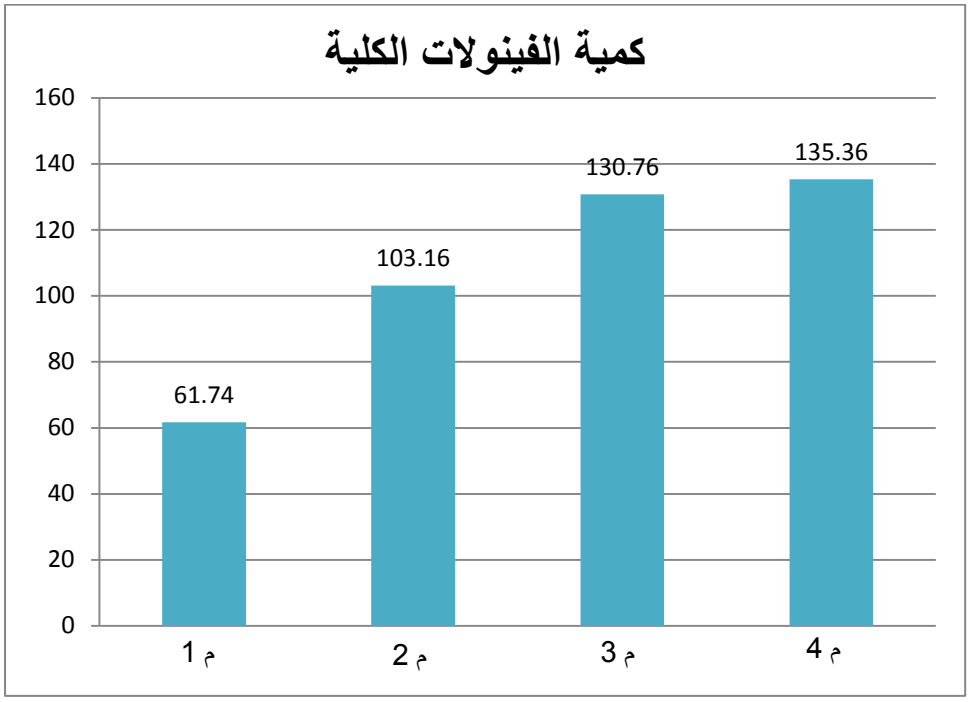
**م3**:مستخلص البيوتانول (أستيون/ ماء).

**م2**:مستخلص أسيتات الإيثيل(ميثانول/ ماء).

**م4**:مستخلص أسيتات الإيثيل(أستيون/ ماء).

| العينات mg EAG/g | 1م | 2م | 3م | 4م |
|---|---|---|---|---|
| التركيز (مغ /مل) | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| الامتصاصية | 0.37 | 0.46 | 0.52 | 0.53 |
| الكمية (مغ / غ ) | 61.74 | 103.16 | 130.76 | 135.36 |
| SD | 0.10 | 0.072 | 0.110 | 0.120 |

**الجدول (V-3) :** نتائج التقدير الكمي للفينولات الكلية في العينات المدروسة



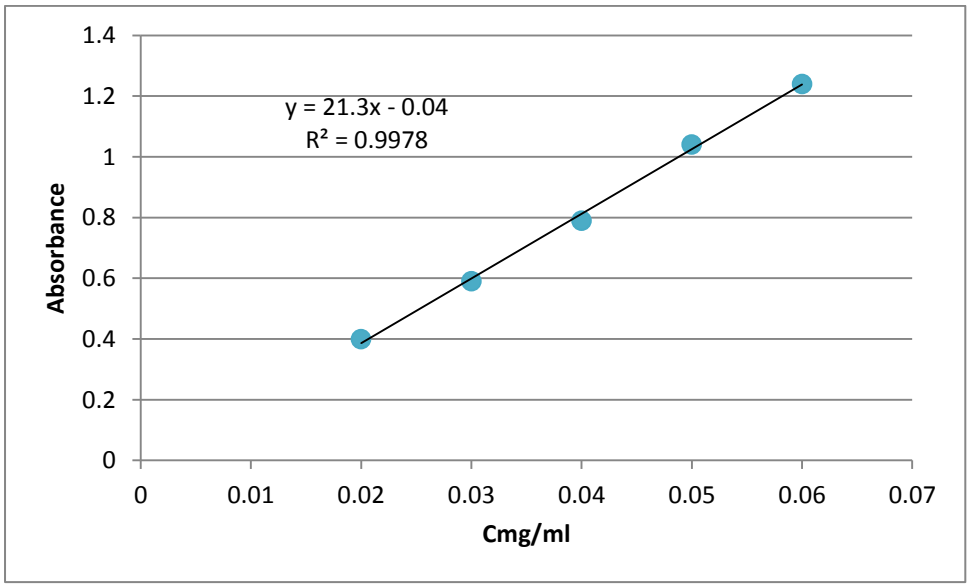

**الشكل(V-1 ) :** التمثيل البياني للتقدير الكمي للفينولات الكلية في العينات المدروسة

من خلال النتائج المدونة في الجدول (V- 3) والموضحة في الشكل (V-1) نلاحظ بالنسبة للمستخلصات العضوية المدروسة أن أعلى كمية للمركبات الفينولية الكلية سجلت في مستخلص الأسيتات (م 4) حيث قدرت ب ( 0.120 ± 135.36مغ /غ) وأقل كمية في مستخلص البيوتانول (م 1) قدرت ب

(0.10 ± 61.74 مغ /غ).

## V - 3 - 2- التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية:

من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة من المستخلصات العضوية وباستخدام علاقة المنحنى العياري للروتين ، تم تقدير كمية الفلافونيدات المكافئة للروتين الموجودة في 1غ من كل مستخلص :

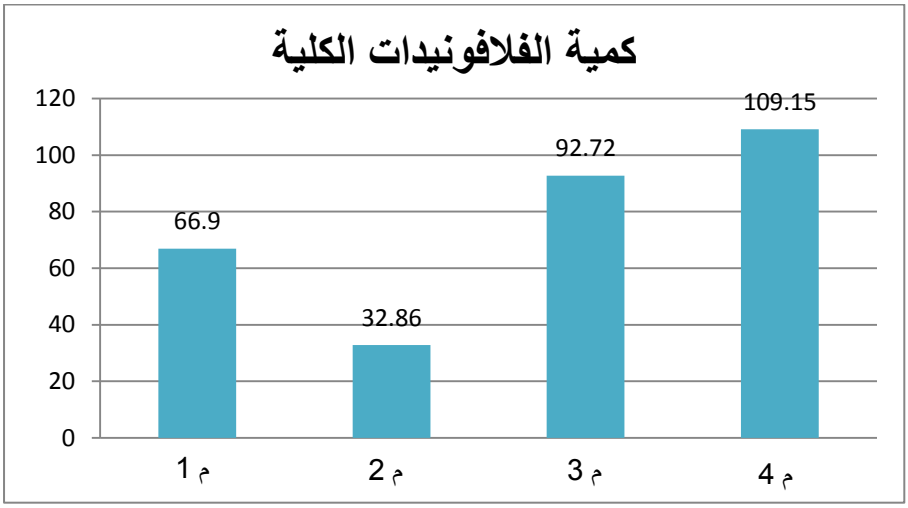



**المنحنى(V-2) :** يمثل المنحنى العياري للروتين

بالتعويض في معادلة المنحنى العياري نتحصل على كمية الفلافونيدات بـ mg ER/1gextre

| العينات mg ER/g | م1 | م2 | م3 | م4 |
|---|---|---|---|---|
| التركيز (مغ / مل ) | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| الامتصاصية | 0.53 | 0.24 | 0.75 | 0.89 |
| الكمية (مغ/غ ) | 66.90 | 32.86 | 92.72 | 109.15 |
| SD | 0.120 | 0.080 | 0.032 | 0.01 |

**الجدول (V-4) :** نتائج التقدير الكمي للفلافونيدات الكلية في العينات المدروسة

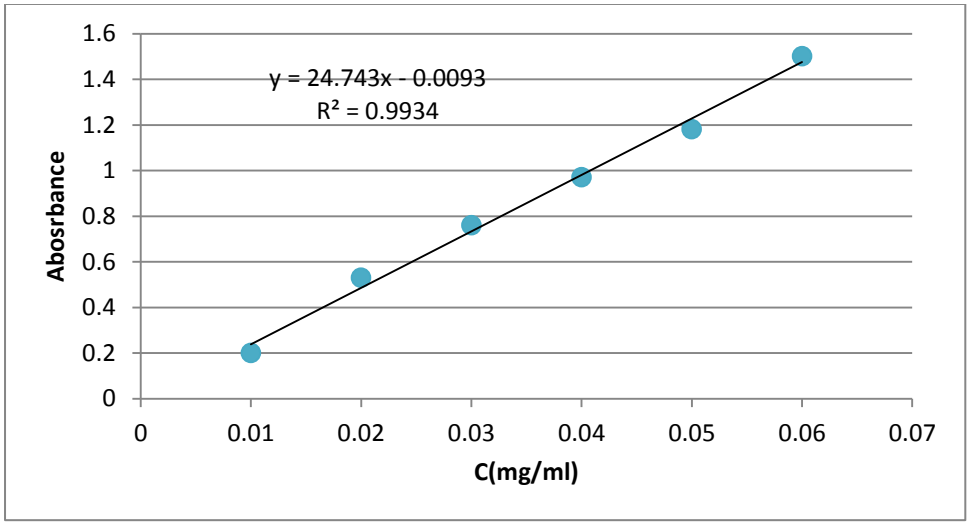



**الشكل(V-2 ) :** التمثيل البياني للتقدير الكمي للفلافونيدات الكلية في العينات المدروسة

اعطى التقدير الكمي للفلافونيدات في المستخلصات العضوية المدروسة النتائج المسجلة في الجدول(V-4) والموضحة في الشكل (V- 2) ويتضح أن أكبر كمية الفلافونيدات سجلت في مستخلص الأسيتات (م 4) حيث قدرت ب ( 0.01± 109.15مغ /غ) وأقل كمية في مستخلص الأسيتات (م 2) وقدرت ب (0.080 ± 32.86 مغ /غ) .

## V - 3 - 3- التقدير الكمي للفلافانولات الكلية :

من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة من المستخلصات العضوية وباستخدام علاقة المنحنى العياري للكرستين ، تم تقدير كمية الفلافانولات المكافئة للكرستين الموجودة في 1 غ من كل مستخلص :

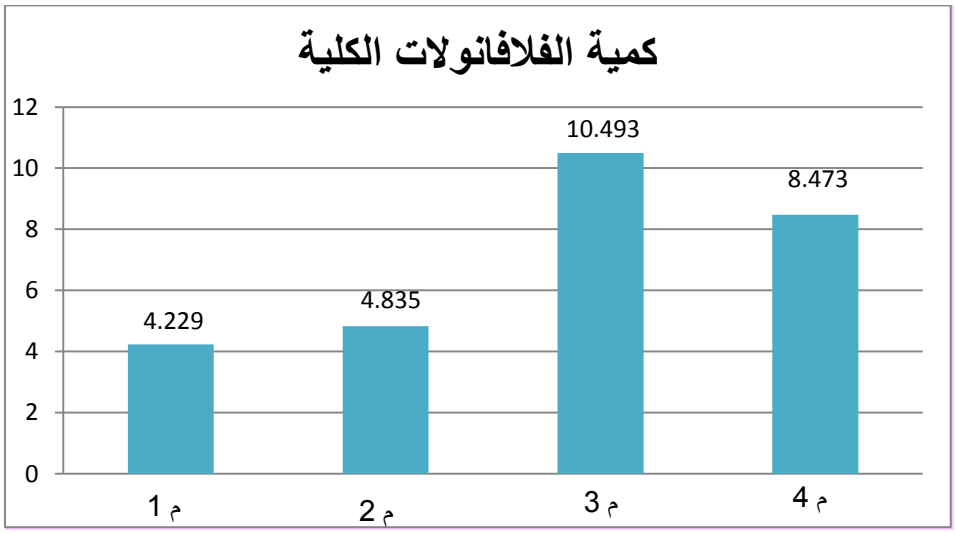



**المنحنى(V-3) :** يمثل المنحنى العياري للكرستين

بالتعويض في معادلة المنحنى العياري نتحصل على كمية الفلافانولات بـ Mg EQ/1gextre

| العينات mg EQ/g | م1 | م2 | م3 | م4 |
|---|---|---|---|---|
| التركيز (مغ / مل ) | 2 | 2 | 2 | 2 |
| الامتصاصية | 0.20 | 0.23 | 0.51 | 0.41 |
| الكمية (مغ /غ) | 4.229 | 4.835 | 10.493 | 8.473 |
| SD | 0.10 | 0.13 | 0.11 | 0.1305 |

**الجدول (V-5) :** نتائج التقدير الكمي للفلافانولات الكلية في العينات المدروسة




**الشكل(V-3 ) :** التمثيل البياني للتقدير الكمي للفلافانولات الكلية في العينات المدروسة

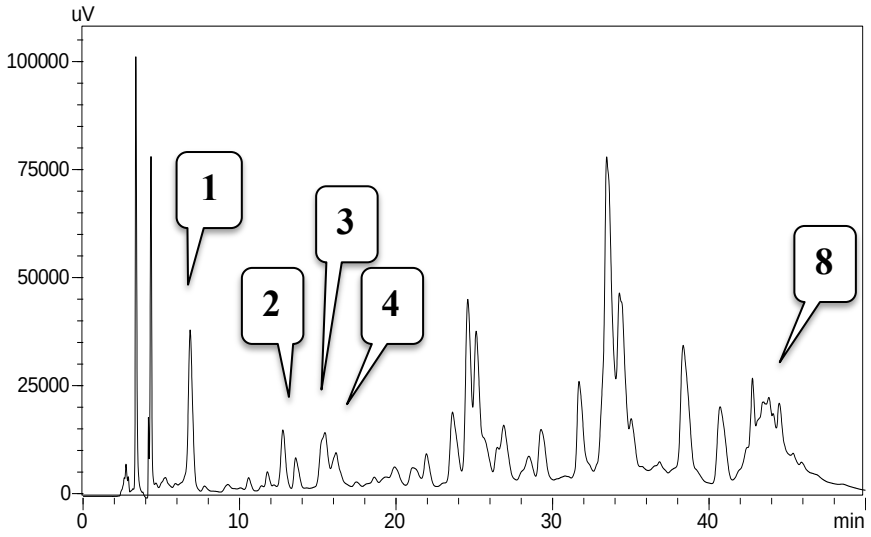
اعطى التقدير الكمي للفلافانولات الكلية في المستخلصات العضوية المدروسة النتائج المسجلة في الجدول(V-5) والموضحة في الشكل (V-3) ويتضح أن أكبر كمية الفلافانولات الكلية سجلت في

مستخلص البيوتانول (م 3) حيث قدرت ب (0.11 ± 10.493مغ /غ) وأقل كمية في مستخلص البيوتانول (م 1) وقدرت ب (0.104± 4.229 مغ /غ) .

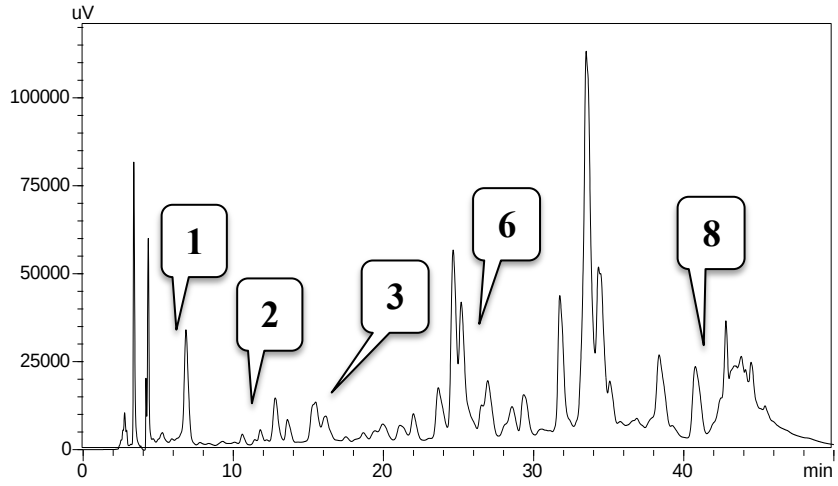
وبالمقارنة بين طريقتي النقع نجد أن المستخلصات المحصل عليها من النقع أسيتون / ماء تحوي على أكبر الكميات من المركبات الفينولية الكلية ،الفلافونيدات الكلية ،الفلافانولات الكلية بالمقارنة مع المستخلصات المحصل عليها من النقع ميثانول / ماء .

## V - 4- التقدير الكيفي للفينولات باستخدام HPLC :

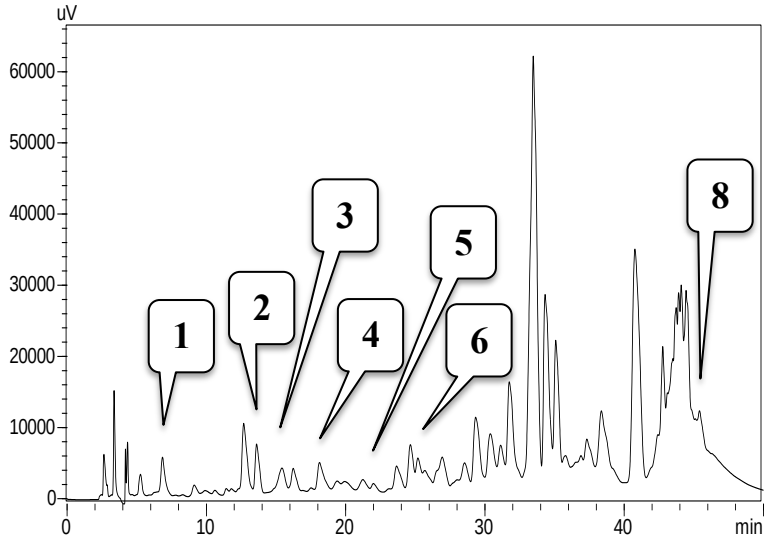
الكورماتوغرامات الناتجة عن الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء للمستخلصات العضوية المدروسة .



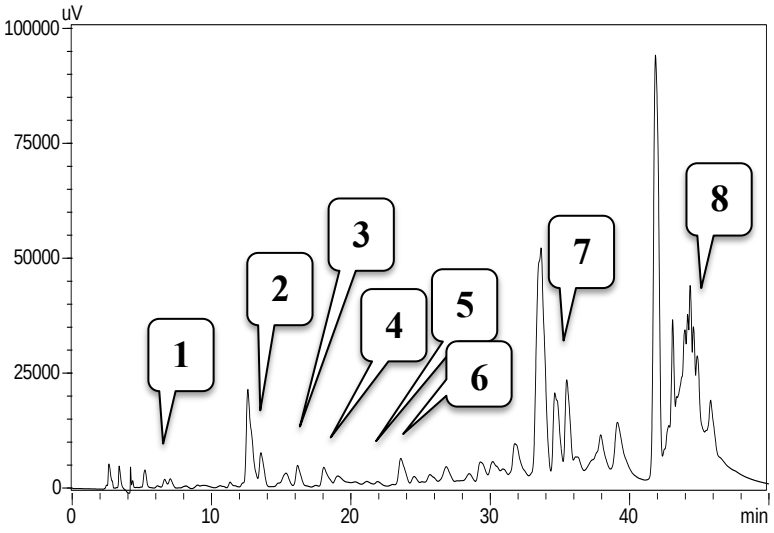

**الشكل (V- 4):** كروماتوغرام للمستخلص م 1




**الشكل (V- 5):** كروماتوغرام للمستخلص م **2**




**الشكل (V- 6):** كروماتوغرام للمستخلص م **3**




**الشكل (V- 7):** كروماتوغرام للمستخلص م **4**

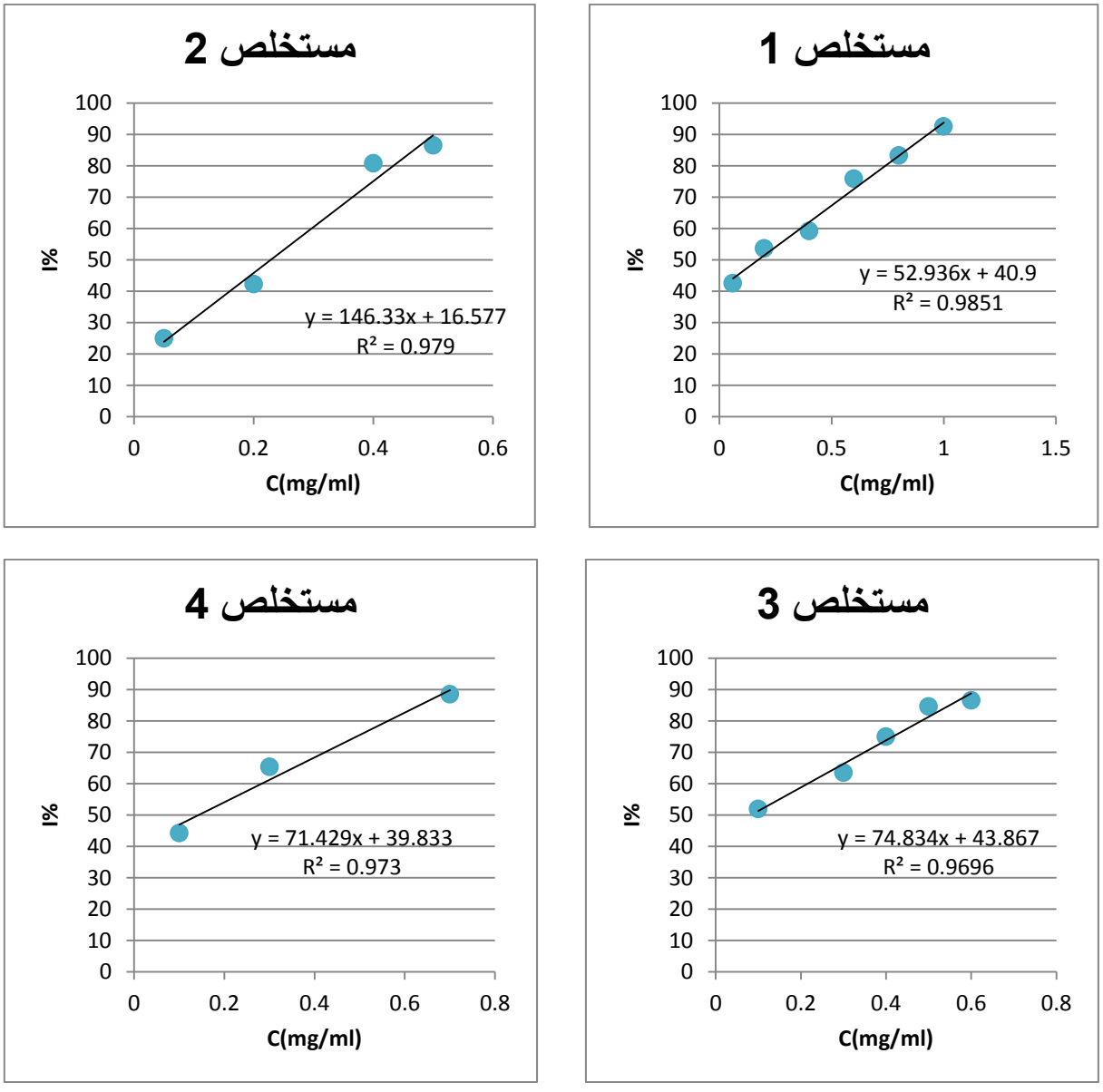
**جدول (V- 6):** المركبات المتعرف عليها في العينات المدروسة .

| رقم المركب | المركبات المرجعية | زمن المكوث المرجعي (min) | زمن المكوث للمستخلص م 1 | زمن المكوث للمستخلص م 2 | زمن المكوث للمستخلص م 3 | زمن المكوث للمستخلص م 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | حمض الغاليك | 5.29 | 5.89 | 5.90 | 5.89 | 5.21 |
| 2 | حمض الكلوروجينيك | 13.39 | 13.58 | 13.59 | 13.60 | 13.53 |
| 3 | حمض الفانيليك | 15.53 | 15.45 | 15.47 | 15.42 | 15.34 |
| 4 | حمض الكافييك | 16.27 | 16.15 | / | 16.23 | 16.17 |
| 5 | الفانيلين | 21.46 | / | / | 21.22 | 21.14 |
| 6 | حمض بيوكومارين | 23.81 | / | 23.65 | 23.65 | 23.53 |
| 7 | روتين | 28.37 | 28.47 | 28.55 | 28.53 | 28.49 |
| 8 | نرجينين | 34.78 | / | / | / | 34.36 |
| 9 | كرستين | 45.04 | 45.36 | 45.41 | 45.10 | 45.84 |

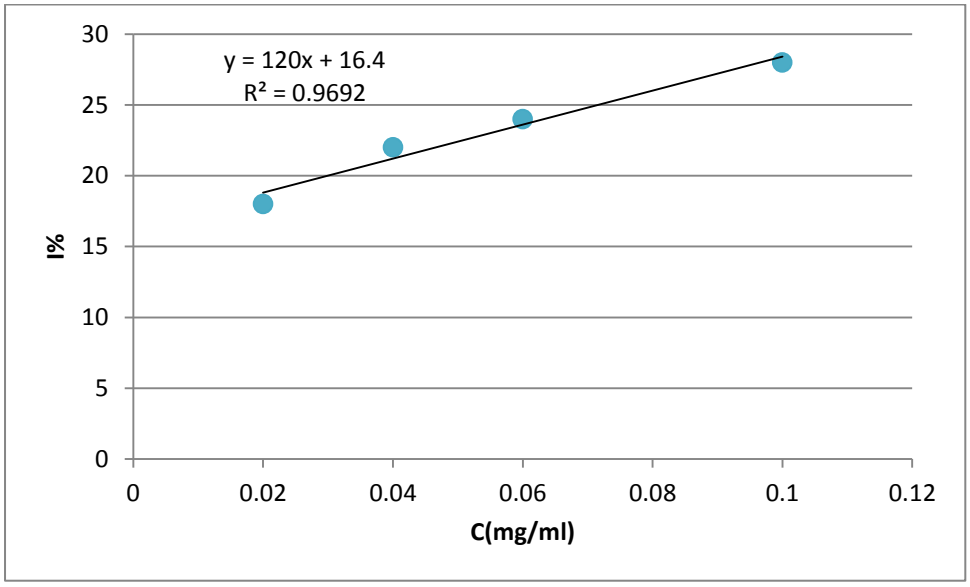
يمكن القول من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول (V-6) أن جميع المستخلصات العضوية المدروسة تحتوي على معظم المركبات المرجعية تقريبا لكن كميتها تختلف من عينة لأخرى ويتضح أيضا غنى كل من م 3، م 4 بالمركبات الفلافونيدية الكلية عن م 1 ، م 2 .

## V - 5 -تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة :

### V - 5 - 1- إختبار DPPH:




**الشكل(V- 8 ) :** نتائج اختبار DPPH للمستخلصات العضوية




**المنحنى(V -4):** يمثل المنحنى العياري لـ (AA).

من منحنيات تغير النسبة المئوية للتثبيط بدلالة تركيز المستخلصات العضوية ومن المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك نحسب قيم $IC_{50}$ والمدونة في الجدول التالي .

| العينة | قيم $IC_{50}$ | SD |
|---|---|---|
| **AA** | 0.28 | 0.030551 |
| **م1** | 0.171 | 0.015395 |
| **م2** | 0.228 | 0.028308 |
| **م3** | 0.081 | 0.020421 |
| **م4** | 0.142 | 0.025325 |

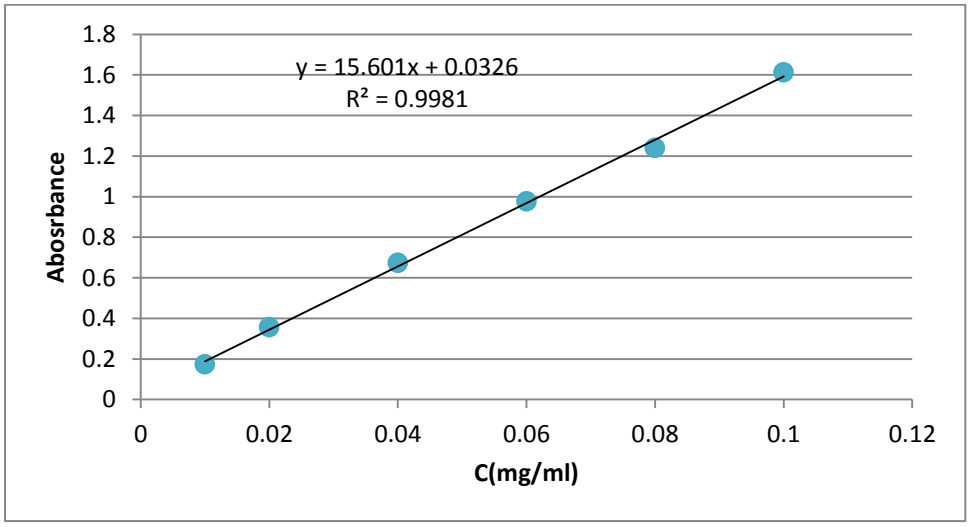
**الجدول (V-7) :** قيم $IC_{50}$ للمستخلصات العضوية و حمض الأسكوربيك

إعتمادا على أنه كلما نقصت قيمة $IC_{50}$ زادت الفاعلية المضادة للأكسدة ومن خلال النتائج المدونة في الجدول( V-7) يمكننا إستنباط مايلي :

كل المستخلصات العضوية المدروسة لها الفاعلية المضادة للأكسدة أكبر من فاعلية حمض الاسكوربيك ، ويتضح من خلال القيم أن أكبر فاعلية مضادة للأكسدة سجلت في مستخلص البيوتانول (م 3) بقيمة $IC_{50}$ قدرت ب (0.020421 ± 0.081 مغ /غ) ، وأقل فاعلية سجلت في مستخلص الأسيتات (م 2) حيث قدرت ب (0.028308 ± 0.228 مغ /غ ).

## V - 5 - 2- الفاعلية المضادة للأكسدة الكلية CAT:

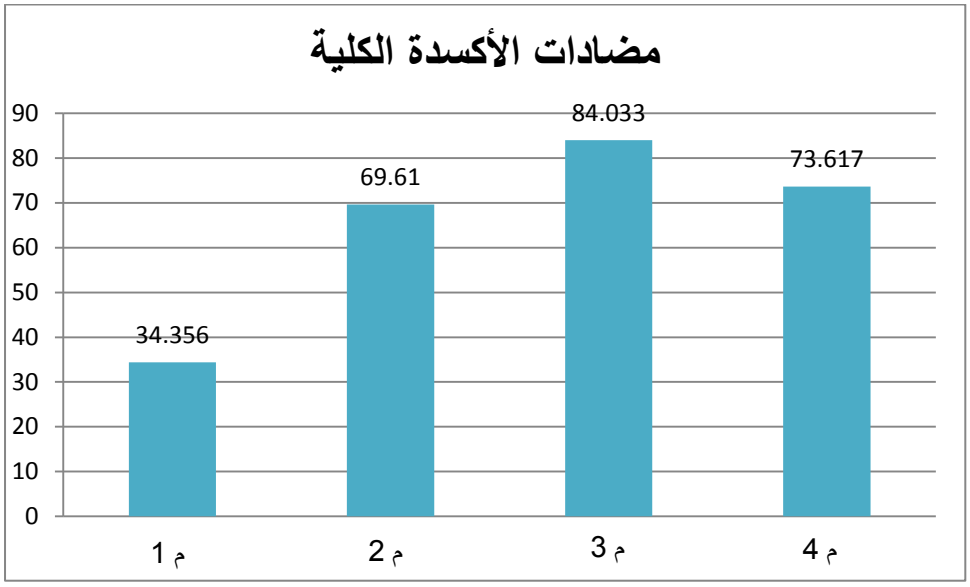
من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة من المستخلصات العضوية وبإستخدام علاقة المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك تم تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية CAT للمستخلصات و حساب كمية المكافئة لحمض الاسكوربيك الموجودة في 1غ من كل مستخلص :




**المنحنى(V-5) :** المنحنى العياري للأسكوربيك (طريقة CAT)

| العينة mg EAA/g | م1 | م2 | م3 | م4 |
|---|---|---|---|---|
| التركيز (مغ /مل) | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| الامتصاصية | 0.247 | 0.467 | 0.557 | 0.492 |
| قيم اختبار النشاطية CAT | 34.356 | 69.610 | 84.033 | 73.617 |
| SD | 0.111 | 0.093 | 0.083 | 0.086 |

**الجدول (V-8) :** يمثل قيم الامتصاصية والنشاطية المضادة للأكسدة الكلية لمكافئة غرامي



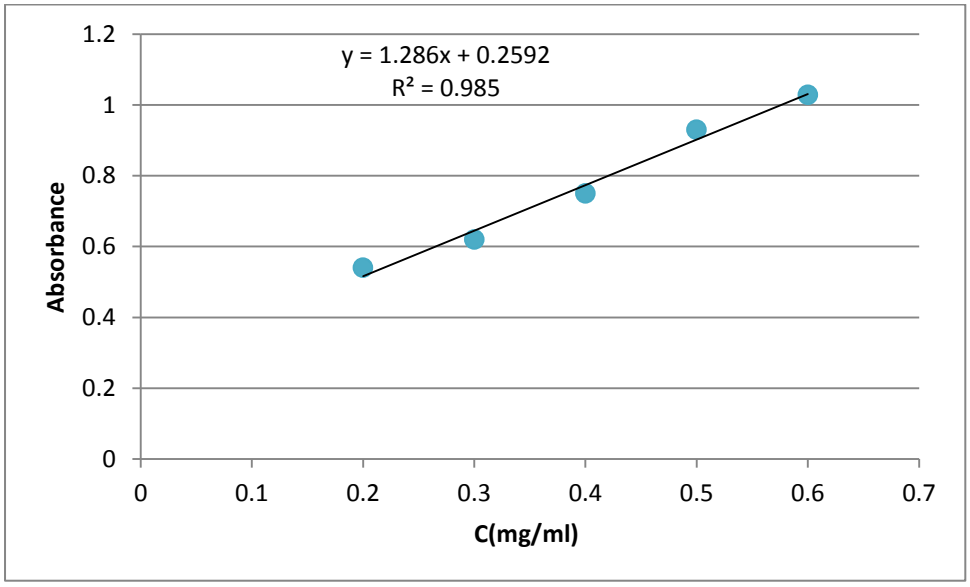

**الشكل(V-9 ) :** التمثيل البياني لنتائج اختبار تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة الكلية

يتضح من خلال النتائج المدونة في الجدول(V-8) والموضحة في الشكل (V- 9) والتي تعبر عن نتائج اختبار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة الكلية بعدد الملغرامات الموافقة لحمض الأسكوربيك لكل غرام من المستخلص العضوي جاءت متقاربة فيما بينها حيث سجلت أكبر قيمة في مستخلص البيوتانول (م 3) قدرت قيمتها ب ( 84.0330±0.083 مغ /غ )بينما سجلت أقل قيمة في مستخلص الأسيتات(م1) قدرت ب( 34.356 ± 0.111 مغ / غ).

وعند المقارنة بين فاعلية المستخلصات يتضح لنا أن هناك علاقة طردية بين محتوى المستخلصات المركبات الفينولية الكلية والقدرة المضادة للأكسدة الكلية.

## V - 5 - 3-الفاعلية المضادة للأكسدة FRAP:

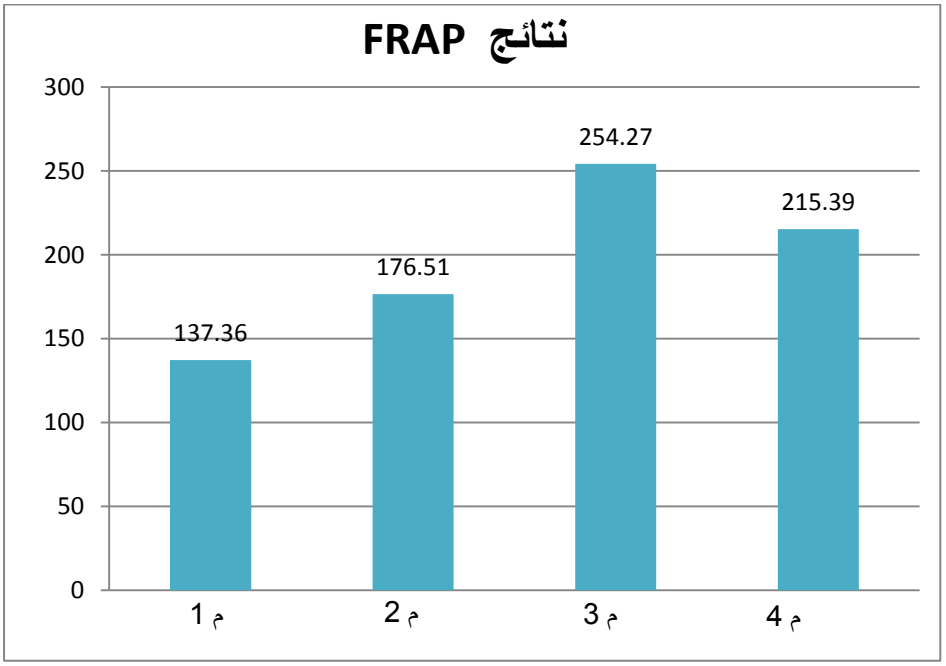
من نتائج الامتصاصية للمحاليل المحضرة من المستخلصات العضوية وبإستخدام علاقة المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك تم تقييم النشاطية المضادة للأكسدة بطريقةFRAP للمستخلصات العضوية و حساب كمية المكافئة لحمض الاسكوربيك الموجودة في 1 غ من كل مستخلص:




**المنحنى(V-6) :** المنحنى العياري للأسكوربيك (طريقة FRAP)

| العينات mg EAA/g | 1م | 2م | 3م | 4م |
|---|---|---|---|---|
| التركيز (مغ /مل) | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| الامتصاصية | 0.33 | 0.35 | 0.39 | 0.37 |
| قيم اختبار النشاطية FARP | 137.36 | 176.51 | 254.27 | 215.39 |
| SD | 0.03 | 0.15 | 0.01 | 0.07 |

**الجدول (V-9) :** قيم الامتصاصية والنشاطية المضادة للأكسدة FRAP




**الشكل(V-10 ) :** التمثيل البياني لنتائج اختبار تقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بطريقة FRAP

يتضح من خلال النتائج المدونة في الجدول(V-9) والموضحة في الشكل (V- 10) والتي تعبر عن نتائج اختبار FRAP بعدد الملغرامات الموافقة لحمض الأسكوربيك لكل غرام من المستخلص العضوي جاءت متقاربة فيما بينها حيث سجلت اكبر قيمة في مستخلص البيوتانول (م 3) قدرت قيمتها ب ( 254.27±0.01 مغ /غ) بينما سجلت أقل قيمة في المستخلص البيوتانول (م 1) قدرت قيمتها ب(137.36 ±0.03 مغ /غ)

وعند المقارنة بين فاعلية المستخلصات نجد أن هناك علاقة طردية بين محتوى المستخلص من المواد الفعالة (الفينولات الكلية ، الفلافونيدات الكلية ، الفلافانولات الكلية ) وفاعليتها المضادة للأكسدة .

كل المستخلصات المدروسة لها فاعلية مضادة للأكسدة هامة تختلف قيمتها من مستخلص إلى آخر ، تبعا لأختلاف نوع المركبات الموجودة في كل مستخلص .

## V – 6 - تقدير الفاعلية المضادة للبكتيريا:

بعد زرع وحضن أطباق بتري الحاوية على السلالات البكتيرية لمدة 24 ساعة ، نقوم بقياس قطر التثبيط حول الأقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة للمستخلصات العضوية حيث تم اجراء هذه الاختبارات في المؤسسة الاستشفائية بشير بن ناصر .

| أنواع البكتيريا | قطر التثبيط (ملم) | | |
|---|---|---|---|
| | 1(مغ /مل) | 5(مغ /مل) | 10(مغ /مل) |
| **Escherichia Coli** | 7 | 10 | 10 |
| **Pseudomonas** | 9 | 9 | 10 |
| **Staphylococcus aureus** | 9 | 9 | 10 |

**الجدول (V-10):** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م1

| أنواع البكتيريا | قطر التثبيط (ملم) | | |
|---|---|---|---|
| | 1(مغ /مل) | 5(مغ /مل) | 10(مغ /مل) |
| **Escherichia Coli** | 9 | 9 | 10 |
| **Pseudomonas** | 8 | 10 | 12 |
| **Staphylococcus aureus** | 8 | 8 | 10 |

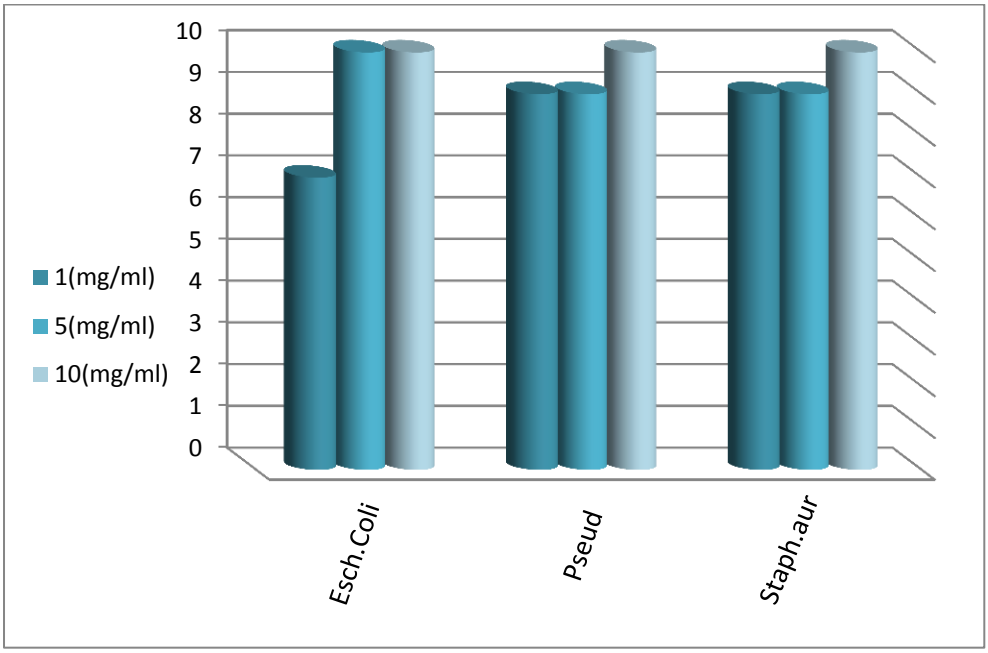
**الجدول (V-11) :** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م2

| أنواع البكتيريا | قطر التثبيط (ملم) | | |
|---|---|---|---|
| | 1(مغ /مل) | 5(مغ /مل) | 10(مغ /مل) |
| **Escherichia Coli** | 7 | 7 | 9 |
| **Pseudomonas** | 8 | 10 | 11 |
| **Staphylococcus aureus** | 9 | 9 | 10 |

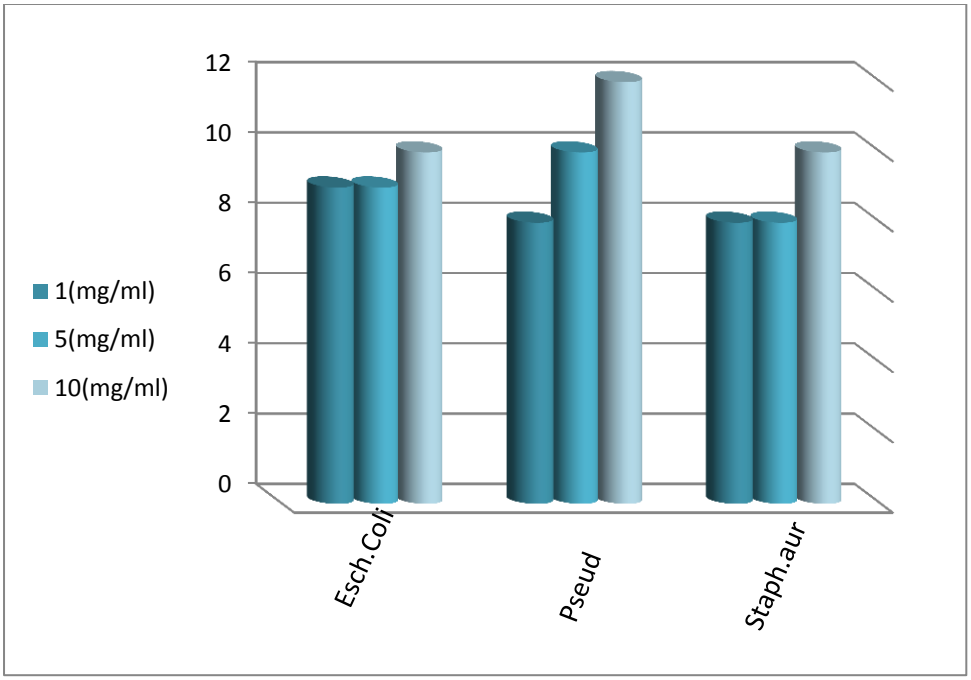
**الجدول (V-12) :** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م3

| أنواع البكتيريا | قطر التثبيط (ملم) | | |
|---|---|---|---|
| | 1(مغ /مل) | 5(مغ /مل) | 10(مغ /مل) |
| **Escherichia Coli** | 7 | 9 | 10 |
| **Pseudomonas** | 10 | 10 | 11 |
| **Staphylococcus aureus** | 9 | 10 | 10 |

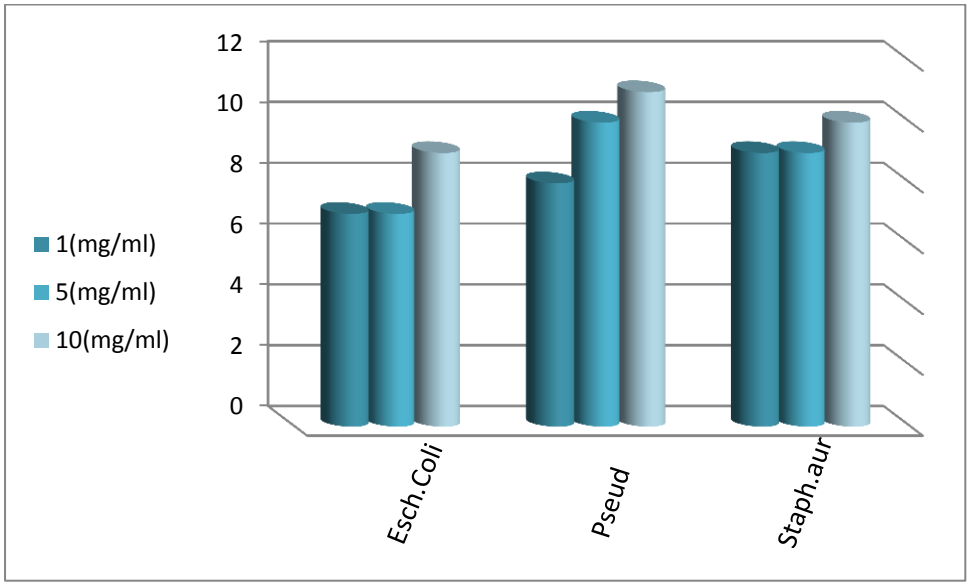
**الجدول (V-13) :** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م4



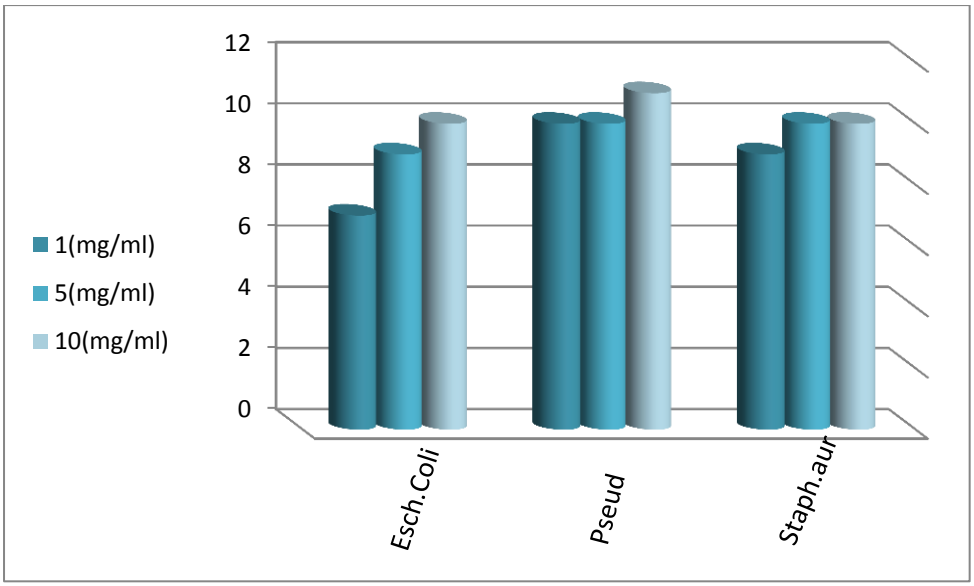

**الشكل(V-11 ) :** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م1




**الشكل(V- 12 ) :** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م2




**الشكل(V- 13 ) :** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م3




**الشكل(V- 14 ) :** نتائج اختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص م4

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول السابق نلاحظ ان مستخلص 1 أعطى نتائج ايجابية اتجاه سلالات البكتيري المدروسة ، فحين نسجل أكبر قطر تثبيط (10ملم) اتجاه كل من Pseudomonas و Staphylococcus aureus و Escherichia Coliعند التركيز (10 مغ /مل) وأصغر قطر تثبيط (7 ملم) اتجاه Escherichia Coli ، يمكن استنتاج أن هذا المستخلص يملك فاعلية مضادة للبكتيريا متوسطة الحساسية .

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول السابق نلاحظ ان مستخلص 2 أعطى نتائج ايجابية اتجاه سلالات البكتيرية المدروسة ، فحين نسجل أكبر قطر تثبيط (12ملم) ضد Pseudomonas عند التركيز (10 مغ /مل) وأصغر قطر تثبيط (8ملم)اتجاه كـــل من Pseudomonas و Staphylococcus aureus ، يمكن استنتاج أن هذا المستخلص يملك فاعلية مضادة للبكتيريا متوسطة الحساسية

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول السابق نلاحظ ان مستخلص 3 أعطى نتائج ايجابية اتجاه سلالات البكتيرية المدروسة ، فحين نسجل أكبر قطر تثبيط (11 ملم) ضد Pseudomonas عند التركيز (10 مغ /مل) وأصغر قطر تثبيط (7 ملم) اتجاه Escherichia Coli ، يمكن استنتاج أن هذا المستخلص يملك فاعلية مضادة للبكتيريا متوسطة الحساسية .

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول السابق نلاحظ ان مستخلص 4 أعطى نتائج ايجابية اتجاه سلالات البكتيرية المدروسة ، فحين نسجل أكبر قطر تثبيط (11 ملم) ضد Pseudomonas عند التركيز (10 مغ /مل) وأصغر قطر تثبيط (7 ملم) اتجاه Escherichia Coli، يمكن استنتاج أن هذا المستخلص يملك فاعلية مضادة للبكتيريا متوسطة الحساسية .

عموما وفي حدود الأنواع البكتيرية المختبرة وفي ظل الشروط المطبقة نستطيع القول أن :

أنه عند زيادة تركيز المستخلص يزداد قطر التثبيط ، حيث أعطت المستخلصات العضوية المدروسة فاعلية مضادة لبكتيرية متقاربة فيما بينها ، وعند المقارنة بينها نجد أن المستخلصات المحصل عليها من النقع أسيتون / ماء أفضل من غيرها .

وانطلاقا من نتائج التقدير الكمي والكيفي المطبقة على المستخلصات المدروسة يمكن القول أن غنى المستخلصات م 3 ، م 4 المحصل عليها باستخدام الاسيتون / ماء بالمركبات الفلافونيدية و الفينولية عن غيرها من المستخلصات هو ما أعطاها فاعلية مضادة للأكسدة وللبكتيريا أكبر .

# الخاتمة

## الخاتمة

هدف هذا العمل هو دراسة اختبار الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلصات العضوية لنبات *Moltkia ciliata* والمحصل عليها من طريقة النقع (أسيتون / ماء )والنقع (ميثانول / ماء) و على ضوء النتائج المحصل عليها يمكننا أن نستنبط النقاط التالية :

نتائج الفحص القسم الهوائي للنبات الجاف بينت تواجد أغلب المركبات الفعالة الأساسية ونظرا لخصائص الفلافونيدات وأهميتها أرتأينا أن نقوم بدراسة مستخلصاتها (مستخلص أسيتات الأيثيل والبيوتانول ).

أكبر كمية للمركبات الفينولية الكلية و الفلافونيدات الكلية والفلافانولات الكلية سجلت في المستخلص أسيتات الأيثيل و البيوتانول المحصل عليها من النقع أسيتون / ماء وأثبتت هذه النتيجة أيضا الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء حيث إتضح غنى المستخلصات م3، م4 بالمركبات الفعالة .

دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة بطريقة DPPH، CAT، FRAP. للمستخلصات العضوية أظهرت أن لها فاعلية معتبرة وعند المقارنة فيما بينهما نجد أن هناك علاقة طردية بين كمية المواد الفعالة التي تحتويها وفاعليتها ومن هذا المنطلق نجد أن للمستخلصات العضوية المحصل عليها بالنقع أسيتون / ماء فاعلية أكبر من غيرها .

إختبار الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلصات العضوية المدروسة تجاه ثلاث أنواع موجبة وسالبة الغرام ، أظهرت نتائج متقاربة لكن المستخلصات المحصل عليها من النقع أستون / ماء كانت الأفضل .

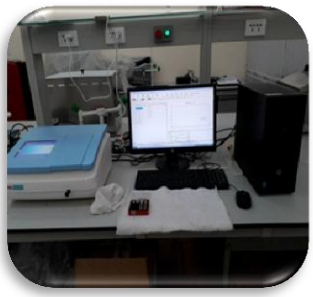
ونأمل في المواصلة في هذا البحث والتعرف أكثر عن المركبات الفعالة التي تحتويها هذه المستخلصات العضوية وذلك بالإستعانة ببقية الطرق الكروماتوغرافية .

# الملاحق

## الملحق 1 : الأجهزة المستعملة:

PH-méter

حمام مائي



جهاز UV-visible

ميزان حساس

حاضنة

جهاز التبخير

قدم قنوية

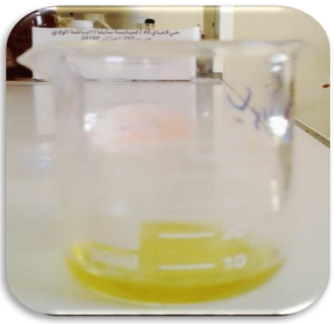
معقمة

جهاز HPLC

# **الملحق 2 :** نتائج الاختبارات الأولية

الكشف عن الستيرولات والتربينات الثلاثية

الكشف عن الصابونيات



الكشف عن الفلافونيدات

الكشف عن القلويدات

الكشف عن الزيوت الطيارة

الكشف عن الفلافونيدات

## **الملحق 3 :** نتائج التقدير الكمي بـ UV-visible

تقدير الفينولات في المستخلصات العضوية

تقدير الفلافونيدات في المستخلصات العضوية

تقدير الفلافانول في المستخلصات العضوية

## نتائج دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة

مضادات الأكسدة DPPH1م

مضادات الأكسدة DPPH2م

مضادات الأكسدة DPPH3م

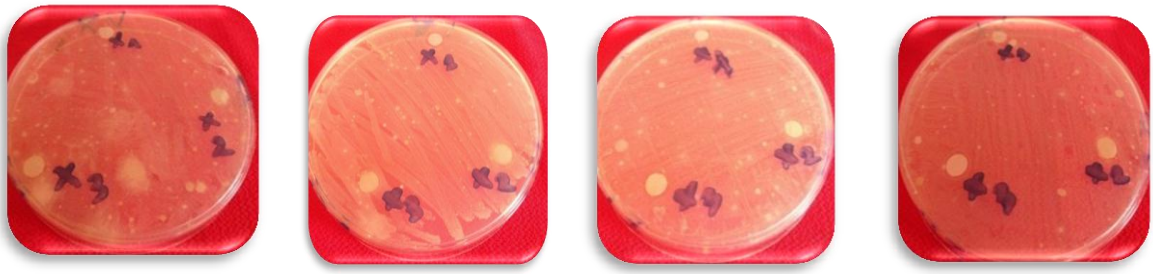
مضادات الأكسدة DPPH4م

مضادات الأكسدة CAT

مضادات الأكسدة FRAP

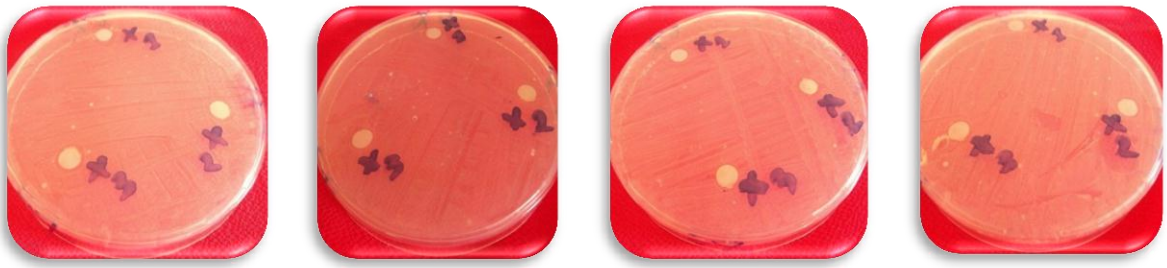
**الملحق 4 :** نتائج دراسة الفاعلية المضادة للبكتيرية

Escherichia Coli



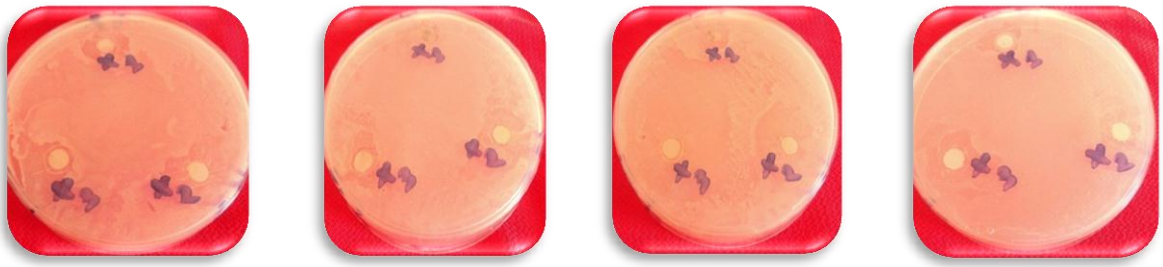
مستخلص م1 | مستخلص م 2 | مستخلص م 3 | مستخلص م 4

Pseudomonas



مستخلص م1 | مستخلص م 2 | مستخلص م 3 | مستخلص م 4

Staphylococcus aureus



مستخلص م1 | مستخلص م 2 | مستخلص م 3 | مستخلص م 4

## **الملحق 5 :** نتائج HPLC للمستخلص م1

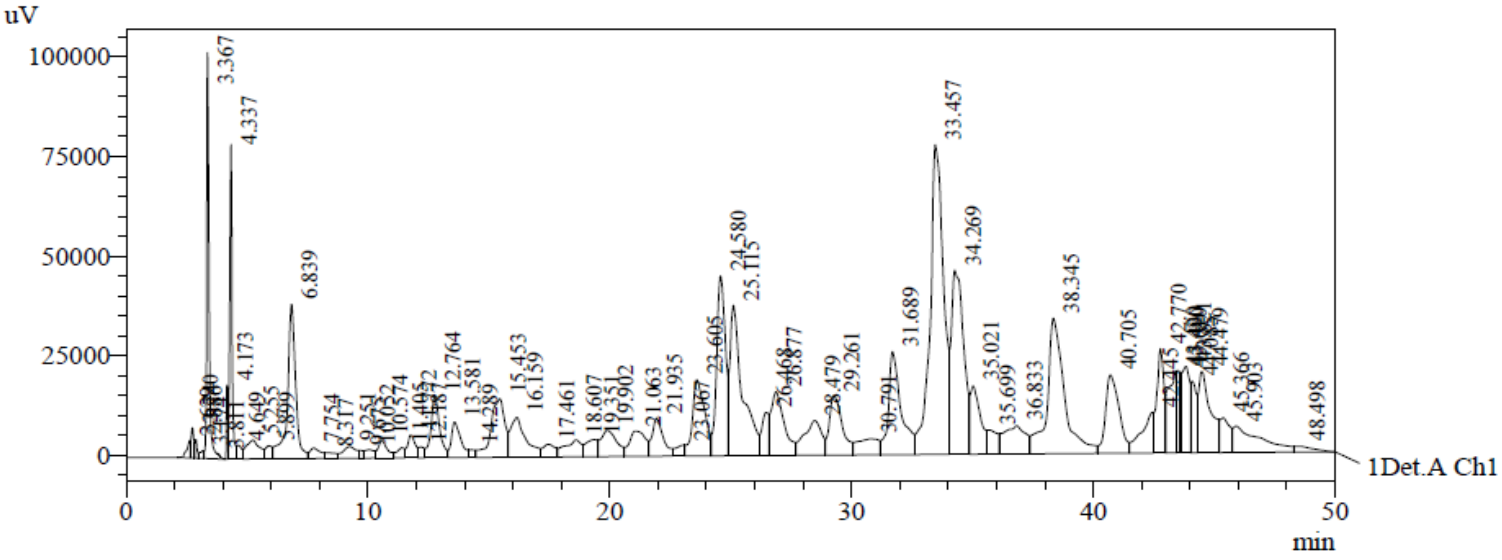
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar d'EL Oued
مخبر الموارد الصحراوية ترقيتها وتكنولوجيتها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

Sample Information

| | |
|---|---|
| Acquired by | : Admin |
| Sample Name | : Harzouli-M1 |
| Sample ID | : Harzouli-M1 |
| Vail# | : |
| Injection Volume | : 20 uL |
| Data Filename | : Harzouli-M1. |
| Method Filename | : Noumia21 mc |
| Batch Filename | : |
| Report Filename | : dis0.lcr |
| Date Acquired | : 21-05-2018 1 |

Chromatogram

Harzouli-M1 C:\LabSolutions\Data\2018\Harzouli-M1.21-05-2018-59.lcd




1 Det.A Ch1 / 268nm

PeakTable

Detector A Ch1 268nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.629 | 42287 | 4374 | 0.170 | 0.461 |
| 2 | 2.740 | 61511 | 7566 | 0.248 | 0.798 |
| 3 | 2.886 | 27447 | 4678 | 0.111 | 0.493 |
| 4 | 3.174 | 22770 | 1960 | 0.092 | 0.207 |
| 5 | 3.367 | 678727 | 101972 | 2.736 | 10.754 |
| 6 | 3.811 | 1167 | 302 | 0.005 | 0.032 |
| 7 | 4.173 | 69503 | 18616 | 0.280 | 1.963 |
| 8 | 4.337 | 539281 | 79020 | 2.174 | 8.333 |
| 9 | 4.649 | 48326 | 3457 | 0.195 | 0.365 |
| 10 | 5.255 | 180574 | 4708 | 0.728 | 0.496 |
| 11 | 5.899 | 65259 | 3281 | 0.263 | 0.346 |
| 12 | 6.839 | 919354 | 38799 | 3.705 | 4.092 |
| 13 | 7.754 | 82258 | 2636 | 0.332 | 0.278 |
| 14 | 8.317 | 45151 | 1435 | 0.182 | 0.151 |
| 15 | 9.251 | 111358 | 2928 | 0.449 | 0.309 |
| 16 | 9.675 | 23164 | 1963 | 0.093 | 0.207 |
| 17 | 10.052 | 55080 | 2119 | 0.222 | 0.223 |

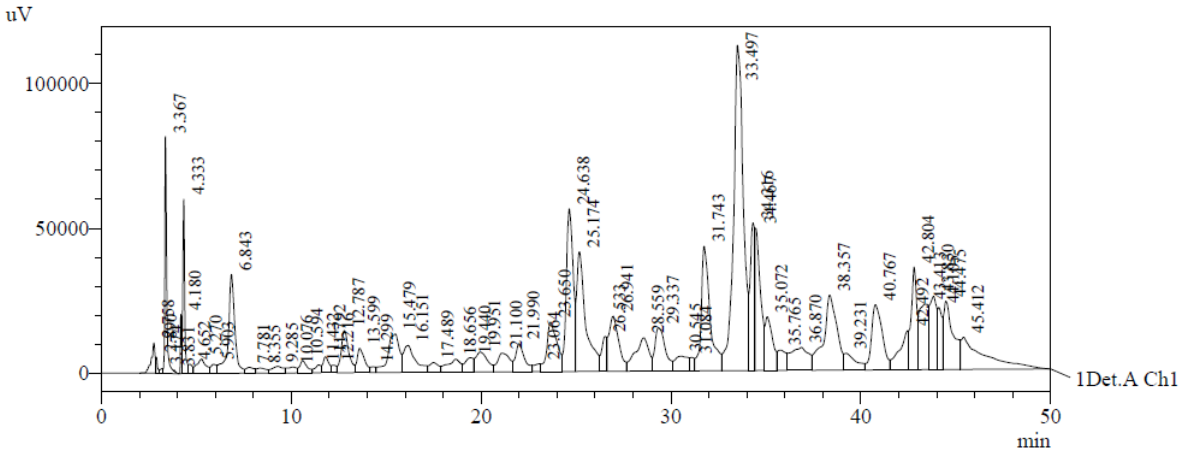
| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 18 | 10.574 | 121057 | 4476 | 0.488 | 0.472 |
| 19 | 11.405 | 57598 | 2556 | 0.232 | 0.270 |
| 20 | 11.772 | 126248 | 5777 | 0.509 | 0.609 |
| 21 | 12.187 | 46229 | 2711 | 0.186 | 0.286 |
| 22 | 12.764 | 392211 | 15410 | 1.581 | 1.625 |
| 23 | 13.581 | 240600 | 8950 | 0.970 | 0.944 |
| 24 | 14.289 | 37057 | 1940 | 0.149 | 0.205 |
| 25 | 15.453 | 593815 | 14712 | 2.393 | 1.551 |
| 26 | 16.159 | 439146 | 10015 | 1.770 | 1.056 |
| 27 | 17.461 | 110889 | 3191 | 0.447 | 0.336 |
| 28 | 18.607 | 198217 | 4256 | 0.799 | 0.449 |
| 29 | 19.351 | 147415 | 4269 | 0.594 | 0.450 |
| 30 | 19.902 | 297095 | 6563 | 1.197 | 0.692 |
| 31 | 21.063 | 291252 | 6355 | 1.174 | 0.670 |
| 32 | 21.935 | 307117 | 9548 | 1.238 | 1.007 |
| 33 | 23.067 | 70772 | 2733 | 0.285 | 0.288 |
| 34 | 23.605 | 677814 | 19125 | 2.732 | 2.017 |
| 35 | 24.580 | 1136079 | 45181 | 4.579 | 4.765 |
| 36 | 25.115 | 1369012 | 37771 | 5.518 | 3.983 |
| 37 | 26.468 | 211844 | 10830 | 0.854 | 1.142 |
| 38 | 26.877 | 615050 | 15954 | 2.479 | 1.682 |
| 39 | 28.479 | 434965 | 8701 | 1.753 | 0.918 |
| 40 | 29.261 | 562199 | 14888 | 2.266 | 1.570 |
| 41 | 30.791 | 246585 | 4041 | 0.994 | 0.426 |
| 42 | 31.689 | 951957 | 25909 | 3.837 | 2.732 |
| 43 | 33.457 | 3007243 | 77773 | 12.121 | 8.202 |
| 44 | 34.269 | 1653567 | 46240 | 6.665 | 4.876 |
| 45 | 35.021 | 503717 | 17142 | 2.030 | 1.808 |
| 46 | 35.699 | 168530 | 6045 | 0.679 | 0.637 |
| 47 | 36.833 | 442585 | 7077 | 1.784 | 0.746 |
| 48 | 38.345 | 1695156 | 33975 | 6.832 | 3.583 |
| 49 | 40.705 | 774804 | 19657 | 3.123 | 2.073 |
| 50 | 42.445 | 347803 | 10194 | 1.402 | 1.075 |
| 51 | 42.770 | 546059 | 26187 | 2.201 | 2.762 |
| 52 | 43.420 | 481993 | 20633 | 1.943 | 2.176 |
| 53 | 43.490 | 163859 | 20656 | 0.660 | 2.178 |
| 54 | 43.610 | 101006 | 20228 | 0.407 | 2.133 |
| 55 | 43.821 | 434393 | 21704 | 1.751 | 2.289 |
| 56 | 44.085 | 274038 | 17955 | 1.104 | 1.893 |
| 57 | 44.479 | 716900 | 20334 | 2.889 | 2.144 |
| 58 | 45.366 | 247440 | 8720 | 0.997 | 0.920 |
| 59 | 45.903 | 518906 | 6621 | 2.091 | 0.698 |
| 60 | 48.498 | 77750 | 1448 | 0.313 | 0.153 |
| Total | | 24811189 | 948268 | 100.000 | 100.000 |

## **الملحق 6 :** نتائج HPLC للمستخلص م2

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

Sample Information

| | |
|---|---|
| Acquired by | : Admin |
| Sample Name | : Harzouli-M2 |
| Sample ID | : Harzouli-M2 |
| Vail# | : |
| Injection Volume | : 20 uL |
| Data Filename | : Harzouli-M2. |
| Method Filename | : Noumia21 mc |
| Batch Filename | : |
| Report Filename | : dis0.lcr |
| Date Acquired | : 21-05-2018 1 |
| Data Processed | : 21-05-2018 1. |




PeakTable

Detector A Ch1 268nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.758 | 139731 | 10502 | 0.507 | 1.036 |
| 2 | 2.890 | 32351 | 5572 | 0.117 | 0.550 |
| 3 | 3.174 | 17669 | 1608 | 0.064 | 0.159 |
| 4 | 3.367 | 554433 | 81815 | 2.013 | 8.073 |
| 5 | 3.831 | 1307 | 352 | 0.005 | 0.035 |
| 6 | 4.180 | 75443 | 20451 | 0.274 | 2.018 |
| 7 | 4.333 | 429892 | 60185 | 1.561 | 5.939 |
| 8 | 4.652 | 44123 | 3228 | 0.160 | 0.319 |
| 9 | 5.270 | 169879 | 4960 | 0.617 | 0.489 |
| 10 | 5.903 | 63822 | 3150 | 0.232 | 0.311 |
| 11 | 6.843 | 826642 | 34135 | 3.002 | 3.368 |
| 12 | 7.781 | 61470 | 2053 | 0.223 | 0.203 |
| 13 | 8.355 | 60893 | 1748 | 0.221 | 0.173 |
| 14 | 9.285 | 96253 | 2327 | 0.350 | 0.230 |
| 15 | 10.076 | 70832 | 2046 | 0.257 | 0.202 |
| 16 | 10.594 | 118201 | 4322 | 0.429 | 0.426 |
| 17 | 11.432 | 58466 | 2738 | 0.212 | 0.270 |

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 18 | 11.792 | 121669 | 5569 | 0.442 | 0.550 |
| 19 | 12.216 | 45122 | 2654 | 0.164 | 0.262 |
| 20 | 12.787 | 410571 | 14537 | 1.491 | 1.434 |
| 21 | 13.599 | 231099 | 8392 | 0.839 | 0.828 |
| 22 | 14.299 | 38488 | 1962 | 0.140 | 0.194 |
| 23 | 15.479 | 558842 | 13278 | 2.029 | 1.310 |
| 24 | 16.151 | 410313 | 9266 | 1.490 | 0.914 |
| 25 | 17.489 | 113002 | 3332 | 0.410 | 0.329 |
| 26 | 18.656 | 216622 | 4464 | 0.787 | 0.441 |
| 27 | 19.440 | 145423 | 4970 | 0.528 | 0.490 |
| 28 | 19.951 | 306061 | 6886 | 1.111 | 0.679 |
| 29 | 21.100 | 287269 | 6470 | 1.043 | 0.638 |
| 30 | 21.990 | 328062 | 9738 | 1.191 | 0.961 |
| 31 | 23.064 | 66878 | 2702 | 0.243 | 0.267 |
| 32 | 23.650 | 634988 | 17071 | 2.306 | 1.684 |
| 33 | 24.638 | 1408689 | 56196 | 5.115 | 5.545 |
| 34 | 25.174 | 1389681 | 41353 | 5.046 | 4.081 |
| 35 | 26.533 | 228590 | 12043 | 0.830 | 1.188 |
| 36 | 26.941 | 691953 | 18960 | 2.513 | 1.871 |
| 37 | 28.559 | 579307 | 11519 | 2.104 | 1.137 |
| 38 | 29.337 | 574570 | 14881 | 2.086 | 1.468 |
| 39 | 30.545 | 244488 | 5082 | 0.888 | 0.501 |
| 40 | 31.084 | 72448 | 4627 | 0.263 | 0.457 |
| 41 | 31.743 | 1403698 | 42988 | 5.097 | 4.242 |
| 42 | 33.497 | 4040736 | 112384 | 14.672 | 11.090 |
| 43 | 34.316 | 845879 | 51000 | 3.071 | 5.033 |
| 44 | 34.467 | 961056 | 49152 | 3.490 | 4.850 |
| 45 | 35.072 | 512425 | 18580 | 1.861 | 1.833 |
| 46 | 35.765 | 219760 | 7019 | 0.798 | 0.693 |
| 47 | 36.870 | 510008 | 7908 | 1.852 | 0.780 |
| 48 | 38.357 | 1292665 | 25894 | 4.694 | 2.555 |
| 49 | 39.231 | 243940 | 5759 | 0.886 | 0.568 |
| 50 | 40.767 | 889239 | 22508 | 3.229 | 2.221 |
| 51 | 42.492 | 449331 | 13514 | 1.632 | 1.334 |
| 52 | 42.804 | 709098 | 35430 | 2.575 | 3.496 |
| 53 | 43.413 | 728057 | 22623 | 2.644 | 2.232 |
| 54 | 43.830 | 652723 | 25284 | 2.370 | 2.495 |
| 55 | 44.105 | 337947 | 21492 | 1.227 | 2.121 |
| 56 | 44.475 | 847079 | 23569 | 3.076 | 2.326 |
| 57 | 45.412 | 970622 | 11156 | 3.524 | 1.101 |
| Total | | 27539806 | 1013401 | 100.000 | 100.000 |

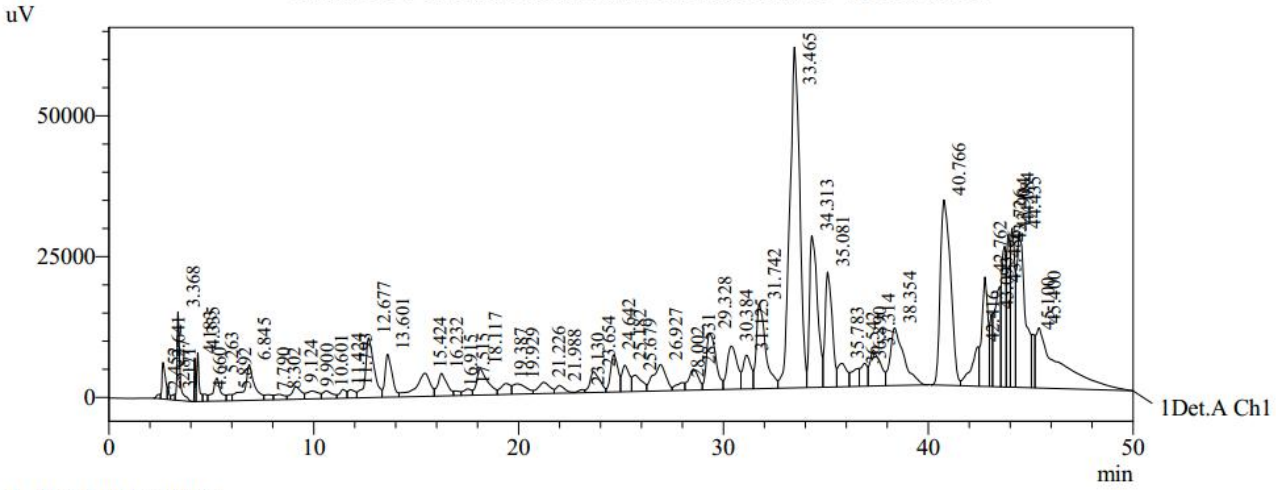
## **الملحق 7 :** نتائج HPLC للمستخلص م3

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

Sample Information

| | |
|---|---|
| Acquired by | : Admin |
| Sample Name | : Harzouli-M3 |
| Sample ID | : Harzouli-M3 |
| Vail# | : |
| Injection Volume | : 20 uL |
| Data Filename | : Harzouli-M3. |
| Method Filename | : Noumia21 mc |
| Batch Filename | : |
| Report Filename | : dis0.lcr |
| Date Acquired | : 21-05-2018 1 |
| Data Processed | : 21-05-2018 1 |

Chromatogram
Harzouli-M3 C:\LabSolutions\Data\2018\Harzouli-M3.21-05-2018-61.lcd




1 Det.A Ch1 / 268nm

PeakTable

Detector A Ch1 268nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.452 | 9449 | 784 | 0.069 | 0.149 |
| 2 | 2.641 | 75123 | 6494 | 0.546 | 1.235 |
| 3 | 2.877 | 13043 | 2281 | 0.095 | 0.434 |
| 4 | 3.171 | 11538 | 996 | 0.084 | 0.189 |
| 5 | 3.368 | 144633 | 15692 | 1.052 | 2.983 |
| 6 | 4.183 | 30592 | 7705 | 0.223 | 1.465 |
| 7 | 4.335 | 71416 | 8670 | 0.519 | 1.648 |
| 8 | 4.660 | 18333 | 1285 | 0.133 | 0.244 |
| 9 | 5.263 | 105578 | 4074 | 0.768 | 0.775 |
| 10 | 5.892 | 19041 | 1115 | 0.138 | 0.212 |
| 11 | 6.845 | 216349 | 6341 | 1.574 | 1.206 |
| 12 | 7.790 | 24226 | 928 | 0.176 | 0.176 |
| 13 | 8.302 | 32143 | 942 | 0.234 | 0.179 |
| 14 | 9.124 | 72477 | 2231 | 0.527 | 0.424 |
| 15 | 9.900 | 57872 | 1402 | 0.421 | 0.267 |
| 16 | 10.601 | 45480 | 1374 | 0.331 | 0.261 |
| 17 | 11.424 | 34867 | 1547 | 0.254 | 0.294 |

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 18 | 11.793 | 36099 | 1503 | 0.263 | 0.286 |
| 19 | 12.677 | 312602 | 10604 | 2.274 | 2.016 |
| 20 | 13.601 | 181701 | 7627 | 1.322 | 1.450 |
| 21 | 15.424 | 196547 | 4094 | 1.430 | 0.778 |
| 22 | 16.232 | 124181 | 3994 | 0.903 | 0.759 |
| 23 | 16.915 | 17282 | 825 | 0.126 | 0.157 |
| 24 | 17.515 | 31357 | 1139 | 0.228 | 0.217 |
| 25 | 18.117 | 174958 | 4647 | 1.273 | 0.884 |
| 26 | 19.387 | 65095 | 1935 | 0.473 | 0.368 |
| 27 | 19.929 | 83612 | 1830 | 0.608 | 0.348 |
| 28 | 21.226 | 78856 | 1986 | 0.574 | 0.378 |
| 29 | 21.988 | 40732 | 1380 | 0.296 | 0.262 |
| 30 | 23.130 | 11686 | 544 | 0.085 | 0.103 |
| 31 | 23.654 | 123046 | 3701 | 0.895 | 0.704 |
| 32 | 24.642 | 166588 | 6605 | 1.212 | 1.256 |
| 33 | 25.182 | 118217 | 4694 | 0.860 | 0.892 |
| 34 | 25.679 | 96331 | 2900 | 0.701 | 0.551 |
| 35 | 26.927 | 201768 | 4677 | 1.468 | 0.889 |
| 36 | 28.002 | 41537 | 1392 | 0.302 | 0.265 |
| 37 | 28.531 | 122459 | 3730 | 0.891 | 0.709 |
| 38 | 29.328 | 324129 | 10079 | 2.358 | 1.916 |
| 39 | 30.384 | 260890 | 7664 | 1.898 | 1.457 |
| 40 | 31.125 | 164333 | 5991 | 1.195 | 1.139 |
| 41 | 31.742 | 477027 | 14852 | 3.470 | 2.824 |
| 42 | 33.465 | 2028354 | 60473 | 14.753 | 11.497 |
| 43 | 34.313 | 732523 | 26921 | 5.328 | 5.118 |
| 44 | 35.081 | 488258 | 20418 | 3.551 | 3.882 |
| 45 | 35.783 | 128740 | 4148 | 0.936 | 0.789 |
| 46 | 36.542 | 83045 | 3159 | 0.604 | 0.601 |
| 47 | 36.890 | 92377 | 4061 | 0.672 | 0.772 |
| 48 | 37.314 | 229938 | 6341 | 1.672 | 1.206 |
| 49 | 38.354 | 469987 | 10225 | 3.418 | 1.944 |
| 50 | 40.766 | 1158384 | 32897 | 8.425 | 6.254 |
| 51 | 42.416 | 186288 | 6986 | 1.355 | 1.328 |
| 52 | 42.762 | 394578 | 19416 | 2.870 | 3.691 |
| 53 | 43.093 | 116258 | 12957 | 0.846 | 2.463 |
| 54 | 43.486 | 371116 | 17798 | 2.699 | 3.384 |
| 55 | 43.726 | 364533 | 24980 | 2.651 | 4.749 |
| 56 | 43.904 | 305558 | 27097 | 2.222 | 5.152 |
| 57 | 44.084 | 388415 | 28190 | 2.825 | 5.360 |
| 58 | 44.435 | 818502 | 27489 | 5.953 | 5.226 |
| 59 | 45.100 | 94152 | 9496 | 0.685 | 1.805 |
| 60 | 45.400 | 864371 | 10669 | 6.287 | 2.028 |
| Total | | 13748570 | 525977 | 100.000 | 100.000 |

## **الملحق 8 :** نتائج HPLC للمستخلص م4

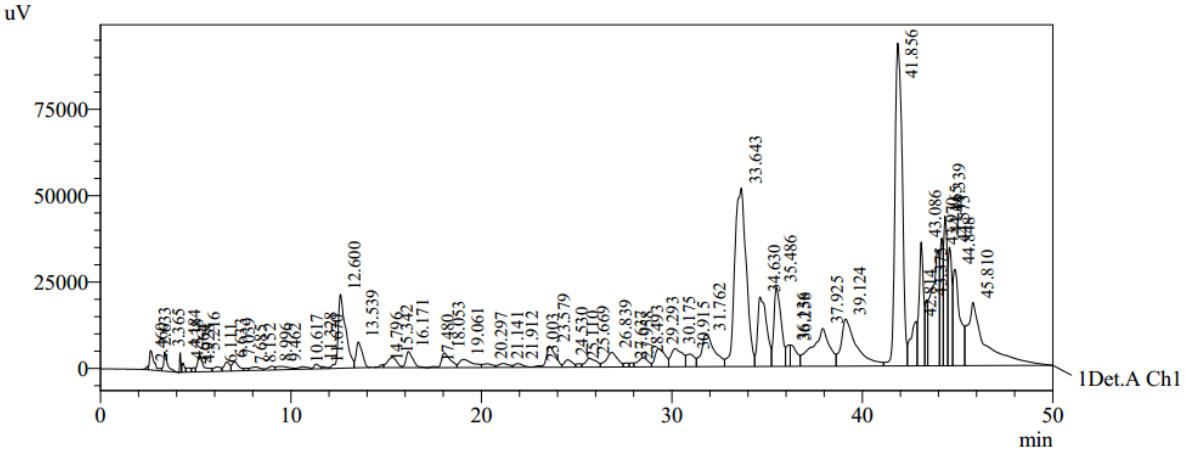
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar d'EL Oued
مخبر الموارد الصحراوية ترقيتها وتكنولوجيتها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

Sample Information

| | |
|---|---|
| Acquired by | : Admin |
| Sample Name | : Harzouli-M4 |
| Sample ID | : Harzouli-M4 |
| Vail# | : |
| Injection Volume | : 20 uL |
| Data Filename | : Harzouli-M4. |
| Method Filename | : Noumia21 mc |
| Batch Filename | : |
| Report Filename | : dis0.lcr |
| Date Acquired | : 22-05-2018 1( |
| Data Processed | : 22-05-2018 1 |

Chromatogram

Harzouli-M4 C:\LabSolutions\Data\2018\Harzouli-M4.22-05-2018-62.lcd




1 Det.A Ch1 / 268nm

PeakTable

Detector A Ch1 268nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.460 | 8259 | 981 | 0.050 | 0.158 |
| 2 | 2.633 | 92301 | 5663 | 0.554 | 0.913 |
| 3 | 3.365 | 76747 | 5585 | 0.461 | 0.901 |
| 4 | 4.184 | 24546 | 5659 | 0.147 | 0.913 |
| 5 | 4.338 | 24860 | 2702 | 0.149 | 0.436 |
| 6 | 4.664 | 20480 | 1185 | 0.123 | 0.191 |
| 7 | 4.928 | 15331 | 1230 | 0.092 | 0.198 |
| 8 | 5.216 | 107333 | 4878 | 0.645 | 0.787 |
| 9 | 6.111 | 34470 | 1333 | 0.207 | 0.215 |
| 10 | 6.633 | 54001 | 2635 | 0.324 | 0.425 |
| 11 | 7.039 | 65074 | 2723 | 0.391 | 0.439 |
| 12 | 7.685 | 10256 | 675 | 0.062 | 0.109 |
| 13 | 8.152 | 35783 | 1015 | 0.215 | 0.164 |
| 14 | 8.996 | 27162 | 1083 | 0.163 | 0.175 |
| 15 | 9.462 | 45842 | 961 | 0.275 | 0.155 |
| 16 | 10.617 | 25294 | 733 | 0.152 | 0.118 |
| 17 | 11.328 | 26165 | 1376 | 0.157 | 0.222 |

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 18 | 11.670 | 9797 | 581 | 0.059 | 0.094 |
| 19 | 12.600 | 590351 | 21383 | 3.546 | 3.448 |
| 20 | 13.539 | 167611 | 7480 | 1.007 | 1.206 |
| 21 | 14.796 | 10422 | 807 | 0.063 | 0.130 |
| 22 | 15.342 | 100559 | 2963 | 0.604 | 0.478 |
| 23 | 16.171 | 118039 | 4667 | 0.709 | 0.753 |
| 24 | 17.480 | 6875 | 355 | 0.041 | 0.057 |
| 25 | 18.053 | 133954 | 4272 | 0.805 | 0.689 |
| 26 | 19.061 | 116149 | 2356 | 0.698 | 0.380 |
| 27 | 20.297 | 38844 | 1069 | 0.233 | 0.172 |
| 28 | 21.141 | 43209 | 1138 | 0.260 | 0.184 |
| 29 | 21.912 | 34814 | 1097 | 0.209 | 0.177 |
| 30 | 23.003 | 8903 | 430 | 0.053 | 0.069 |
| 31 | 23.579 | 195735 | 6105 | 1.176 | 0.984 |
| 32 | 24.530 | 62828 | 2128 | 0.377 | 0.343 |
| 33 | 25.110 | 18421 | 980 | 0.111 | 0.158 |
| 34 | 25.669 | 100910 | 2517 | 0.606 | 0.406 |
| 35 | 26.839 | 173550 | 4223 | 1.043 | 0.681 |
| 36 | 27.637 | 20803 | 1138 | 0.125 | 0.184 |
| 37 | 27.958 | 17155 | 1160 | 0.103 | 0.187 |
| 38 | 28.493 | 101379 | 2669 | 0.609 | 0.430 |
| 39 | 29.293 | 194333 | 5182 | 1.167 | 0.836 |
| 40 | 30.175 | 220729 | 5243 | 1.326 | 0.845 |
| 41 | 30.915 | 109401 | 3642 | 0.657 | 0.587 |
| 42 | 31.762 | 442885 | 9121 | 2.661 | 1.471 |
| 43 | 33.643 | 2175366 | 51653 | 13.068 | 8.329 |
| 44 | 34.630 | 666697 | 20105 | 4.005 | 3.242 |
| 45 | 35.486 | 609068 | 22935 | 3.659 | 3.698 |
| 46 | 36.136 | 89542 | 6150 | 0.538 | 0.992 |
| 47 | 36.258 | 147634 | 6130 | 0.887 | 0.988 |
| 48 | 37.925 | 685494 | 10900 | 4.118 | 1.758 |
| 49 | 39.124 | 760001 | 13609 | 4.566 | 2.195 |
| 50 | 41.856 | 2478369 | 93426 | 14.889 | 15.066 |
| 51 | 42.814 | 302954 | 12843 | 1.820 | 2.071 |
| 52 | 43.086 | 577511 | 35837 | 3.469 | 5.779 |
| 53 | 43.375 | 166390 | 19119 | 1.000 | 3.083 |
| 54 | 43.970 | 945777 | 33629 | 5.682 | 5.423 |
| 55 | 44.165 | 397520 | 36949 | 2.388 | 5.958 |
| 56 | 44.339 | 547082 | 43251 | 3.287 | 6.974 |
| 57 | 44.573 | 453115 | 34276 | 2.722 | 5.527 |
| 58 | 44.848 | 712347 | 27921 | 4.279 | 4.502 |
| 59 | 45.810 | 1199719 | 18272 | 7.207 | 2.947 |
| Total | | 16646147 | 620126 | 100.000 | 100.000 |

## الملخص:

تطرقنا في هذا البحث إلى دراسة الفاعلية المضادة للاكسدة وللبكتيريا للمستخلصات العضوية (مستخلص أسيتات الأيثيل ، البيوتانول ) لنبات *Moltkia ciliata* المحصل عليها باستخدام المزيج ميثانول / ماء (20/80) ، أسيتون / ماء (20/80).

تم الكشف عن المواد الفعالة في الجزء الهوائي الجاف للنبات وأظهرت النتائج غناها بمعظمها .

ثم التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية ، الفلافونيدات الكلية ، الفلافانولات الكلية ،باستخدام مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية والتقدير الكيفي باستخدام HPLC .

أما بالنسبة لتقدير الفاعلية المضادة للأكسدة بإتباع الاختبارات الكيميائية CAT، DPP، FRAP .

وفي ما يخص تقدير الفاعلية المضادة للبكتيريا تجاه ثلاث أنواع من السلالات البكتيرية ، عند المقارنة بين المستخلصات العضوية المدروسة نجد أن المحصل عليها من مزيج أسيتون / ماء كانت أفضلها من حيث الطرق المتبعة في الدراسة .



**الكلمات المفتاحية** :*Moltkia ciliata*، المستخلصات العضوية ، الفاعلية المضادة للأكسدة ، الفاعلية المضادة للبكتيريا ، الاستخلاص .



## Résumé :

Ce travail a été consacré à l' étude chimique et biologique des extraits organiques(extrait d'acétate d'éthyle,n butanol) de *Moltkia ciliata* ,recueilli en utilisant les .mélangé méthanol /eau (80/20), acétone / eau (80/20)

Les Substances actives ont été détectées sue la partie aérienne de la plante et les . résultats se sont révélés riches

évaluation quantitative des composés phénoliques flavanoles , flavanoides par l' utilisation de la spectroscopie UV-visible et une estimation qualitative par l' utilisation de . l'HPLC

L'efficacité antioxydants a été évaluée par des tests chimiques ( DPPH, CAT, .FRAP).

L'efficacité biologique a été évaluée pour trois types de souches bactériennes .En comparant les extraits étudiés nous avons trouvé que l' extrait obtenu par (acétone / eau) . était le meilleur en termes des méthodes utilisées dans l'étude



**Mots clés** : *Moltkia ciliata* , activité biologique , activité antioxydant , extraits organiques ,extraction .