الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الشهيد حمّه لخضر الوادي

كلية: التكنولوجيا
قسم: هندسة الطرائق والبتروكيمياء

مذكرة تخرج تندرج ضمن متطلبات نيل شهادة الماستر أكاديمي

فرع: هندسة الطرائق
تخصص: هندسة كيميائية

من اعداد الطالبين :
ناني الصادق و طليبة علي

تحت عنوان

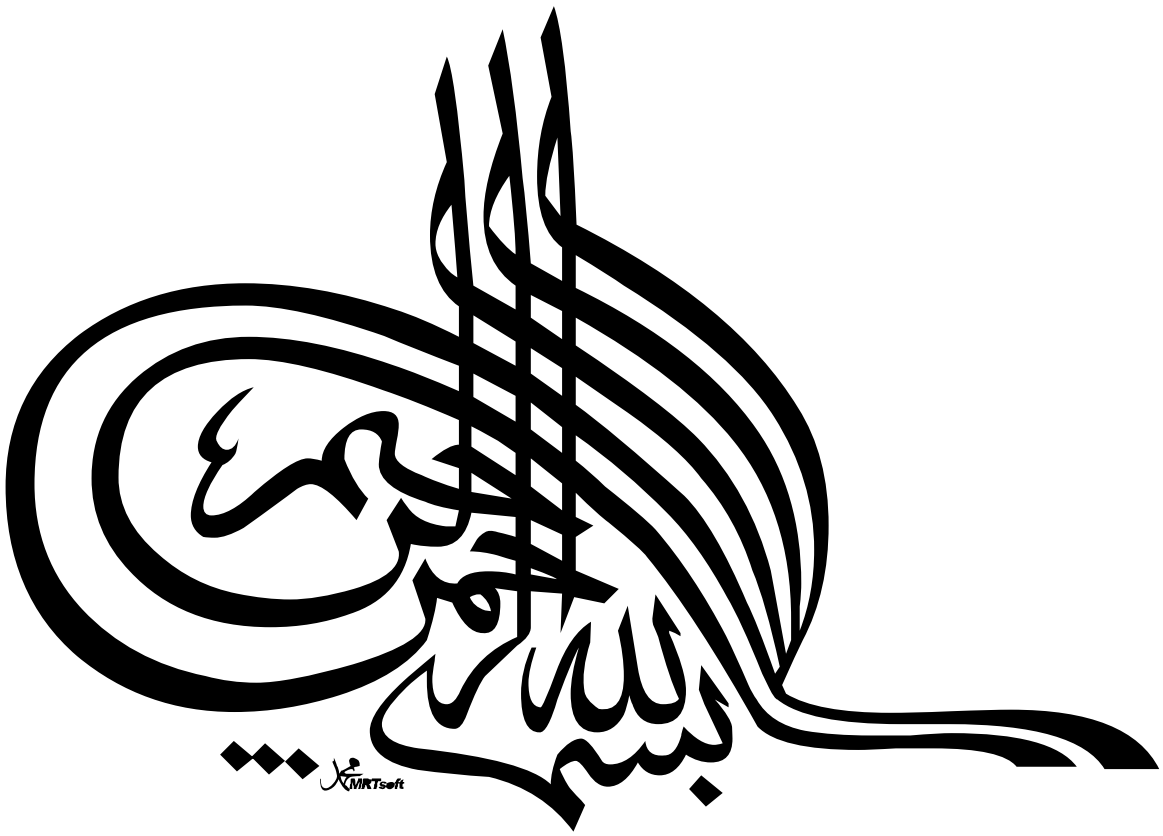
دراسة جودة وتركيبة البروبوليس (منتج النحل) بمختلف الطرق الكروماتوغرافية

نوقشت يوم :2016/05/26

أمام لجنة المناقشة المكونة من السادة:

لعويني صلاح الدين	أستاذ محاضر (ب)	رئيسا
بلفار محمد الأخضر	أستاذ مساعد (أ)	مناقشا
ربيعي عبد الكريم	أستاذ مساعد (أ)	مؤطرا

السنة الجامعية 2016/2015


بسم الله الرحمن الرحيم
MRTsoft

الإهـــــداء

أهدي ثمرت هذا العمل إلى والديا الكريمين (عمار وعائشة)

إلى إخوتي وأخواتي وأبنائهم كلٌ باسمه

إلى زوجتي فاطمة الزهراء وإلى أبويها وإخوتها وأخواتها كل باسمه

إلى ابنتاي (ريم وكوثر)

إلى كافة الأقارب والأصدقاء

إلى جميع طلبة ماستر دفعة هندسة كيميائية

إلى كل من عرف (الصادق) وأحب له الخير

الصادق نازي

الإهـــــداء

إلى من جعل الله طاعتهما بعد طاعته (أمي وأبي)

إلى إخوتي وأخواتي كلٌ باسمه

إلى كافة الأقارب والأصدقاء

إلى جميع طلبة ماستر دفعة هندسة كيميائية

إلى كل من عرف (علي) وأحب له الخير

شكر وعرفـــان

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

تحية عطرة للسيد رئيس الجامعة الأستاذ الدكتور **عمر فرحاتي** الذي كان سببا في التحاقنا بمقاعد الدراسة،

شكر خاص للأستاذ الدكتور **العانز التهامي** على تشجيعاته،

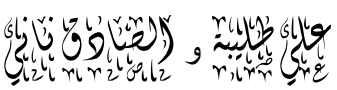
تشكراتنا الخالصة للأستاذ **ربيعي عبد الكريم** على توجيهاته القيمة طيلة اشرافه على هذا العمل،

نتقدم بالشكر الى أعضاء لجنة المناقشة الذيـن تفضلـوا بالموافقة علـى مناقشة هـذا العمـل

الأستاذ **صلاح الدين لعويني** والأستاذ **بلفار محمد الأخضر**.

الشكر الجزيل لكل من ساهم في انجاز هذا العمل ، ونخص بالذكر الاستاذ **مصباحي محمد عادل،**

كما نتوجه بالشكر لكافة أعضاء الأسرة الجامعية أساتذة وموظفين.



الجدول		الصفحة
	الفصــل الثانـــي	
جدولII.1.	العينات المدروسة و تاريخ جنيها	13
جدولII.2.	أهم خصائص المناطق التي أخذت منها العينات	14
جدولII.3.	الشروط التجريبية لجهاز (HPLC) لفصل المركبات الفينولية المدروسة	22
جدول II.4.	تغيرات نسبة الطور المتحرك A و B بدلالة الزمن	23
جدولII.5.	نتائج فصل المركبات القياسية المدروسة بجهاز (HPLC)	23
جدولII.6.	شروط الفصل باستخدام جهاز (GC)	25
جدول II.7.	نتائج كروماتوغرام CPG لفصل المركبات القياسية	26
	الفصــل الثالـــث	
جدول III.1.	قيم تقدير كيمة الفينولات والفلافونويدات للعينات المدروسة	31
جدول III.2.	تلخيص نتائج التحليل بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء للعينات المدروسة	36
جدول III.3.	نتائج كروماتوغرام CPG لفصل الأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية المتواجدة في العينة PR6	38
جدول III.4.	نتائج تحليل الأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية بكروماتوغرام CPG للعينات المدروسة	43

الجدول		الصفحة
	الفصـــل الأول	
شكل I.1.	عملية جني المواد الصمغية من براعم الأشجار	06
شكل I.2.	بروبوليس تم جنيه من طرف الإنسان	07
شكل I.3.	صورة لاستخدامات البروبوليس في تحنيط الجثث داخل الخلية.	09
شكل I.4.	صورة لاستخدامات البروبوليس في تقوية أماكن ترابط الأقراص.	09
	الفصـــل الثـــاني	
شكلII.1.	خريطة الأقاليم المناخية للمناطق التي أخذت منها العينات	15
شكلII.2.	خريطة الغطاء النباتي للمناطق التي أخذت منها العينات	15
شكلII.3.	مخطط لاستخلاص المركبات الفعالة من البروبوليس	16
شكلII.4.	المنحنى القياسي لحمض الغاليك	17
شكلII.5.	المنحنى القياسي للروتين	18
شكلII.6	المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك	21
شكلII.7.	المنحنى القياسي لحمض الغاليك	22
شكل II.8.	كروماتوغرام HPLC لبعض الشواهد	23
شكل II.9.	كروماتوغرام CPG لفصل المركبات القياسية	26
	الفصـــل الثـــالث	
شكلIII.1.	تمثيل بياني لنتائج مردود الاستخلاص للعينات المدروسة	30
شكلIII.2.	تمثيل بياني لنتائج تقدير المحتوى الفينولي والفلافونويدات للعينات المدروسة	31
شكلIII.3.	تمثيل بياني لنتائج اختبارات DPPH للعينات المدروسة	34
شكلIII.4.	تمثيل بياني لنتائج اختبارات FRAP للعينات المدروسة	34
شكلIII.5.	تمثيل بياني لنتائج اختبارات موليبدات الفوسفات للعينات المدروسة	35
شكلIII.6.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR6	37
شكلIII.7.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR1	39
شكلIII.8.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR2	40
شكلIII.9.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR3	40
شكلIII.10.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR4	41
شكلIII.11.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR5	41
شكلIII.12.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR7	42
شكلIII.13.	كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR8	42

العنوان	الصفحة
التشكرات	
الاهـــداء	
قائمة الأشكال	
قائمة الجداول	
المقدمة	01
الفصـــل الأول: عموميات حول البروبوليس	
I.1. البروبوليس	04
I.1.1. تعريف	04
I.1.2. تاريخ استعمال البروبوليس	04
I.1.3. جني البروبوليس	06
I.1.4. التخزين	07
I.1.5. الخواص الفيزيائية (الظاهرية)	07
I.1.6.المكونات الأساسية للبروبوليس	08
I.1.7.دور البروبوليس في خلية النحل	09
I.1.8.الأهمية الطبية للبروبوليس	10
الفصـــل الثـــاني: المواد وطرق العمل	
II.المواد و طرق العمل	12
II.1.المواد الكيميائية المستعملة	12
II.2.الأجهزة المستعملة	12
II.3.العينات المدروسة	12
II.4.خصائص المناطق التي أخذت منها العينات	13
II.4.1. الخصائص الجغرافية	13
II.4.2. الخصائص المناخية	15
II.4.3.خصائص الغطاء النباتي	15
II.5. تحضير المستخلصات	16
II.6. تقدير المحتوى الفينولي والمواد الفعالة	17
II.6.1. تقدير كمية الفينولات	17
II.6.2. تقدير كمية الفلافونويدات	18
II.6.3.اختبارات مضادات الأكسدة	19
II.6.3.1.اختبار DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl)	19
II.6.3.2. اختبار (FRAP)	20
II.6.3.3 اختبار موليبدات الفوسفات (MP)	21
II.6.4.تقدير بعض الأحماض الفينولية والفلافونويدات بالكروماتوغرافيا (HPLC)	22
II.6.5.تعريف بعض الأحماض الدهنية بالكروماتوغرافيا الغازية(GC)	24

الفصـــل الثـــالث: النتائج والمناقشة

III. النتائج والمناقشة	30
1.III.نتائج مردود الاستخلاص	30
2.III. نتائج تقدير المحتوى الفينولي والفلافونويدات	31
3.2.III.نتائج اختبارات مضادات الاكسدة	33
1.3.2.III. نتائج اختبارات (DPPH)	33
2.3.2.III نتائج اختبارات (FRAP)	34
2.3.2.III نتائج اختبارات موليبدات الفوسفات(MP)	35
6.2.III.نتائج تقدير بعض الأحماض الفينولية والفلافونويدات بالكروماتوغرافيا HPLC	36
7.2.III.تعريف بعض الأحماض الدهنية بالكروماتوغرافيا الغازية (CPG)	37
الخاتمة	46
المراجع	49
الملاحق	

المقدمة

قال تعالى في محكم تنزيله:{ وَأَوۡحَىٰ رَبُّكَ إِلَى ٱلنَّحۡلِ أَنِ ٱتَّخِذِي مِنَ ٱلۡجِبَالِ بُيُوتٗا وَمِنَ ٱلشَّجَرِ وَمِمَّا يَعۡرِشُونَ ﴿٦٨﴾ ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ ٱلثَّمَرَٰتِ فَٱسۡلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلٗاۚ يَخۡرُجُ مِنۢ بُطُونِهَا شَرَابٞ مُّخۡتَلِفٌ أَلۡوَٰنُهُۥ فِيهِ شِفَآءٞ لِّلنَّاسِۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَأٓيَةٗ لِّقَوۡمٖ يَتَفَكَّرُونَ ﴿٦٩﴾ } (النحل:68-69).

لقد خلق الله سبحانه وتعالى هذا الكون وجعله نظاما محكما ، تعتمد فيه المخلوقات على بعضها البعض، وأمرنا بالتأمل والتدقيق فيه حتى ندرك عظمته ووجدانيته، وبالتدبر في الآيتين 68-69 من سورة النحل، نجد أن أعجب المخلوقات التي خلقها الله هي النحل، والعجب لا ينحصر في أسلوب عيشه في مجتمعات منظمة لكل دور محدد يقوم به وفي دقة بنائه فقط، بل يتعداهما إلى ما ينتج النحل من منتجات متعددة تخدم الإنسان.

فالإنسان منذ القدم أصيب بعدة أمراض لزم عليه أن يتداوى منها، ففي بداية الأمر بدأ يستكشف الأرض ويستخرج منها ما يلزمه من أدوية طبيعية، فيما عرف حديثا ب (الصيدلية الطبيعية) [1]، فعرف مختلف منتجات النحل التي أشهرها العسل، حبوب اللقاح، الشمع وغذاء الملكات والبروبوليس (العكبر). واستعملها في مداواة عدة أمراض أصيب بها، فهذه الحضارات الفرعونية والصينية والهندية واليونانية ثم العربية تركت إرثا زاخرا بالاستعمالات الطبية المتعددة لمنتج البروبوليس[6].

وفي العصر الحديث تراجع اعتماد الإنسان على الصيدلية الطبيعية المفتوحة، وعوضها بأخرى مغلقة داخل المخابر تنتج أدوية مصنعة ومركزة، وكان أمله أن يتخلص من أمراضه التي يصاب بها، ولكن من حيث لا يدري أنتج لنفسه أمراضا جديدة لم يعرف لها التاريخ تواجدا من قبل.

في منتصف شهر فيفري 2002 حذر خبراء دوليين مستهلكي الأدوية المصنعة، من أن كميات ضخمة من الأدوية المزيفة والمغشوشة تغرق أسواق العالم، ففي سنة 1995 لقي الآلاف من النيجيريين حتفهم بسبب عقار مزيف، قتل 89 طفلا، وكذلك في هايتي حدث نفس الشيء، على العموم ليست هناك عقوبات في هذا المجال، حتى وإن وجدت فإنها لا تساوي حجم الضرر البشري والصحي الحاصل[1].

ومن هنا بدأت الدراسات الحديثة تركز على فوائد كل ما هو طبيعي من صنع الخالق، وتدرسه بجدية، لتخلص في الأخير بضرورة التداوي من الطبيعة، ومن بين المخلوقات التي حضت باهتمام كبير لدى الباحثين هو مخلوق النحل وما ينتجه. حيث بدأت الدراسات ببحوث تاريخية لاستعمالات الإنسان لمنتجاته، ومن بين هذه المنتجات (البروبوليس)، فاسمه يدل على قدم استعماله ، فالفيلسوف اليوناني طاليس هو من

أطلق عليه هاته التسمية، كما أن هناك دليل وربط منطقي بين تحنيط النحل للجثث داخل الخلية وتحنيط الفراعنة لبعض ملوكهم.

لقد حضت مادة البروبوليس بدراسات مهمة في مختلف أصقاع العالم، قصد تثمينها واستخلاص فوائدها، فأصبح لهذه الأخيرة جنسية ، فنقول هذا بروبوليس روسي وهذا بروبوليس أسترالي، وهذا أرجنتيني وذاك كندي والآخر أمريكي، لتباين الجودة والمحتوى.

ومواكبة للتطور الحاصل في عالمنا، وإيمانا منا بأن بلدنا يزخر بكل الموارد الطبيعية والبشرية التي تجعله من ضمن أهم البلدان في العالم، ونظرا لأهمية منتج البروبوليس العلاجية والوقائية من عدة أمراض، لعل أهمها مرض السرطان بأنواعه، ارتأينا أن نقوم بدراسة مكونات وفاعلية البروبوليس الجزائري، حيث قمنا بدراسة ثمانية عينات من البروبوليس تغطي جميع أقاليم الوطن، وقد أخذنا في الحسبان المتغيرات التالية: المنطقة الجغرافية، المناخ، التربة، الكثافة السكانية، تواجد المنشئات الملوثة، النشاط الزراعي والغطاء الغابي، والتي قد تؤثر على جودة البروبوليس المنتج من طرف النحل.

وقد تم تقسيم هذا العمل إلى ثلاث فصول رئيسية وهي كالتالي:

الفصل الأول- عموميات حول البروبوليس: وفيه تطرقنا لتعريفها ومختلف استعمالاتها وطرق جنيها وحفظها.

الفصل الثاني- المواد وطرق العمل: وفي هذا الفصل تم التعريف بالمواد المستعلمة وشرح طرق العمل المتبعة ومختلف المنحنيات القياسية.

الفصل الثالث- النتائج والمناقشة: وفيه تم عرض النتائج المتحصل عليها ومناقشتها.

وأنهينا هذا العمل بخاتمة تم فيها تلخيص مجمل النتائج المتحصل عليها واستنباط توصيات مهمة من شأنها أن تحسن جودة المنتوج الجزائري من مادة البروبوليس.

الفصل الأول:
عموميات حول البروبوليس

I.1.البروبوليس:

I.1.1.تعريف:

البروبوليس عبارة عن مواد صمغية راتنجية طبيعية تنتجها شغالات النحل من براعم الأشجار، له رائحة عطرية ويكون في بعض الأحيان لاذع المذاق لزج الملمس لونه يتدرج من الأصفر حتى البني القاتم ويرجع هذا الاختلاف إلى التباين في مصادر جمعه[4].

كما يعرف البروبوليس أيضا بعدة أسماء منها العكبر وعلك النحل وصمغ النحل وغراء النحل وسذاب النحل والصمغ الشمعي والراتنجي والدنج والسميطة.

يقوم النحل باستخدام عجينة هذه المادة لمنع أي فرصة لنمو البكتيريا والطفيليات داخل أقراص الشمع عبر تغليف الأجزاء الخارجية لأقراص الشمع بها، وفي سد أي ثغرات أو فجوات في بناء الأقراص تلك. وفي طلاء أسطح وجدران العيون السداسية لتعقيمها، وهي التي قد تحتوي على العسل أو على الغذاء الملكي لحبوب اللقاح والهلام أو على البيض الذي تضعه الملكة[4].

هذا من جانب، ومن جانب آخر يستخدم النحل مادة البروبوليس لتثبيت أسقف أقراص الشمع الملتصقة بين الصخور في الجبال أو على أفرع الأشجار، كي تقاوم الاهتزاز بفعل الرياح أو الحيوانات. كما يستخدمها لتغليف وتحنيط أي حشرات تعلق بأقراص الشمع، لمنع تحللها وإفسادها للبيئة النقية والمعقمة في داخل أقراص شمع عسل النحل[4].

I.2.1.تاريخ استعمال البروبوليس:

يقول الخبراء إن البروبوليس موجود منذ أكثر من 45 مليون عام، وأنه استخدم من قبل الإنسان منذ ألاف السنين[6]. لكن معرفة البروبوليس أقل قدما من معرفة العسل ويعتقد أنه عرف عند المصريين القدامى[7]، حيث أشارت النقوش المرسومة على جدران المعابد الفرعونية أنهم استخدموا البروبوليس للحفاظ على الصحة والجمال كما استخدموه كمضاد حيوي طبيعي ومضاد للبكتيريا[8-9]. كما ثبت استخدامه في التحنيط، ولعلهم اكتسبوا ذلك من ملاحظتهم تحنيط النحل لجثث الكائنات التي تدخل خليته ولا يستطيع إخراجها بعد قتلها.

وتشير مصادر تاريخ الطب إلى أن الفيلسوف أرسطو هو من أطلق عليها هذا الاسم (بروبوليس)، والذي يعني باللغة اللاتينية (الخط الأمامي للدفاع عن القلعة)

فالنحل البري يستعمل البروبوليس لإحكام مداخل خليته وسد الشقوق لمنع الحشرات، والهوام، وكذلك الهواء البارد من دخول الخلية.

و تحدث أرسطو في كتابه تاريخ الحيوان: البروبوليس دواء لأمراض الجلد والجروح والتقيحات[10].

وكان أبقراط يصف وضع البروبوليس كمعجون لتغليف القروح والجروح بغية تسهيل شفائها والتئام حوافها، وتحدث الفيلسوف طاليس عن فوائده، واستمر أطباء الرومان في ذلك. وكذا الطب العربي القديم، وطب مناطق جنوب الصحراء الكبرى في أفريقيا، وطب الشعوب القديمة لأميركا الوسطى واللاتينية، والطب الصيني القديم وطب مناطق روسيا وشمال آسيا القديمة.

وبعد أربعة قرون كتب الطبيب الروماني الشهير " ليني" عن فوائد البروبوليس في شفاء القروح وتخفيف التورمات وتطرية المناطق القاسية. واستعمل البروبوليس في القرون الوسطى كمادة مضادة لالتهابات جوف الفم ومضاد لتسوس الأسنان[9].

وقبل حوالي ألف سنة تقريبا ناقش الرومانيان :ديوسكوريد (Dioscoride) – بليني(Pline)

مصدر هذه المادة وكتبا في شأنها: تنزع الشوك وكل ما يدخل الجلد، تنقص من التورم، وتلين تصلب الجلد، تنقص ألآم العصبة وتداوي القروح والدمل[5]. و في بداية القرن الماضي زادت شعبية هذه المادة بشكل باهر حيث لم تكتشف بعد المضادات الحيوية، وكان العلاج يتم بوضع مادة البروبوليس مباشرة على الجروح والتورمات كمضاد.

بسبب اكتشاف خواصه المضادة للجراثيم، والمضادة للأكسدة، والمضادة للقروح، إضافة إلى فعاليته كمضاد للأورام السرطانية، بدأ الباحثون في التعمق في دراسة مادة البروبوليس حيث أن خلال الثلاثين سنة الأخيرة أجريت بحوثا تحليلية وصيدلية وطبية لهذه المادة في كل أصقاع العالم، و استطاعوا أن يحصروا الأهمية الكبرى للبروبوليس في مركبات كيميائية متعددة الفينول[11].

وقد نجح العلماء في تحديد التركيب الكيميائي لهذه الفينولات المتعددة وعزل المواد الفعالة المسؤولة عن نشاطه العلاجي[12].

I.3.1.جني البروبوليس:

هذه العملية يقوم بها عدد معين من النحلات العاملة الجامعة للرحيق هذه الأخيرة متخصصة في هذه المهمة ولا تقوم بغيرها[13] **(الشكلI.1.)**، ويتراوح إنتاج الخلية من 10 إلى 30 غ في السنة[14].

وعملية الجني مرتبطة بعدة عوامل وقوانين ثابتة يمكننا على إثرها استخلاص نتائج مهمة هي:

- **فصلي:** يكون الجني حسب الحالات في بداية فصل الربيع وخصوصا عند نهاية الإزهار أو عند اقتراب الخريف وبدء النحل في تهيئة المستوطنة لفصل الشتاء. [4]
- **جغرافية المكان:** الخلايا الموجودة في المناطق الغابية تنتج البروبوليس باستمرار أكثر من الخلايا الموجودة في المناطق السهلية. [4]
- **المناخ:** (درجة الحرارة) النحل الجامع للبروبوليس يكون أكثر نشاطا خلال الأيام الحارة (درجة الحرارة > 20°) وفي الساعات الأكثر تعرضا لهذه الحرارة (10سا – 15:30 سا) وهذا لأن المواد الصمغية تكون صلبة جدا خارج هذه الساعات ولا يمكن جنيها. [4]

كتلة من البروبوليس على الرجل الخلفية لعاملة من النحل ضمن سلة غبار الطلع

الشكل I.1. عملية جني المواد الصمغية من براعم الأشجار

كما يمكن أن يقوم الإنسان بعملية الجني بواسطة تقنيات متعددة ككشط أطر وجدران الخلية وفي درجات حرارة منخفضة حيث تكون المادة صلبة وقابلة للتفتت وتنفصل بسهولة عن الجدران. **(الشكل I.2.)**

وتحدثت بعض المصادر على أن أفضل نوعية للبروبوليس المجني بعد فصل الإزهار مباشرة، أي في فصل الصيف.

الشكل 2.I.بروبوليس تم جنيه من طرف الإنسان

4.1.I.التخزين:

مادة البروبوليس يتم تخزينها بسهولة بدون أي شروط خاصة لمعظم أشكالها، ولكن يستحسن أن تخزن في أواني تمنع مرور الضوء، ومحكمة الإغلاق وبعيدة عن الحرارة (بعض أشكالها تستلزم هذه الشروط من أجل عملية حفظ جيدة مثل المرهم)[15].

بعض التجارب أثبتت أن تخزين هذه المادة لفترة طويلة لا ينقص من كمية المركبات الكيميائية المكونة لها ولا من فعاليتها ضد البكتيريا.

ويجدر بالذكر أن التجفيف للبروبوليس الحاصل بواسطة التجميد العنيف في درجة حرارة منخفضة متبوع بتصعيد تحت الفراغ يسمح بالحصول على بودرة مسامية والتي تخزن إلى أمد طويل تحت الفراغ.

هذه العملية تسمح لهذه المادة بأن تحتفظ بفاعليتها ضد الميكروب وهذا ما يجعل هذه الطريقة جد هامة يجب التقيد بها أثناء استعمال هذه المادة على أعلى مستوى من الأبحاث[16].

5.1.I.الخواص الفيزيائية (الظاهرية):

البروبوليس يظهر على شكل مادة مواصفاتها ما يلي:

- ذات متانة متغيرة بتغير درجة الحرارة صلبة وتتفتت عند 15م° وطرية وقابلة للتشكيل في حدود 30م°.
- إذا سخنت بلطف في حمام مائي فإنها تنقسم إلى قسمين مميزين؛ قسم لزج يسقط إلى الأسفل وقسم سائل يطفو على السطح يستعمل هذا الجزء بكثرة في مجال تربية النحل.

- لونها يتغير حسب مصدرها من الأصفر الفاتح إلى البني الداكن تقريبا أسود مرورا بالسلسلة اللونية المنتشرة(حمراء.. خضراء....الخ)
- مذاقها لاذع وفي بعض الأحيان مر[17].
- البنية الميكروسكوبية للبروبوليس أصبحت معروفة حاليا نتيجة عمل مهم وجديد لـ (Colette Jeansonand Philippe Marchenay) اللذان قاما بواسطة ميكروسكوب كهربائي بمسح على عينات من أنحاء فرنسا بأكملها والنتائج أثبتت دوما الحصول على نفس البنية المجهرية[18].
- مادة البروبوليس لا تذوب في الماء ولكن تذوب جزيئا في الأستون، الكحولات، النشادر، البنزين، الكلوروفورم، ثلاثي كلوروإيثلين أو مزيج مناسب من مختلف هذه المذيبات.

I.6.1.المكونات الأساسية للبروبوليس:

يعتبر البروبوليس مادة طبية ذات مصدر نباتي وبالتالي كانت مثلها مثل النباتات الطبية حيث خضعت لدراسات من قبل الكيميائيين النباتيين والصيادلة والبيولوجيين، ويعتمد تركيب البروبوليس على النباتات المحلية والخصائص الجغرافية والمناخية للموقع، هذه الحقيقة تفسر التنوع الكبير لتركيبه وخاصة في المنطقة الاستوائية. [4]

أسوة بالعسل، من الطبيعي أن تختلف مكونات ولون وخصائص معجون مادة البروبوليس لدى نحل منطقة عن نحل مناطق أخرى، وفي فصول السنة المختلفة. والسبب أن النحل يقوم بتجميع أصل هذه المادة من الأشجار والنباتات المحيطة به، والتي تختلف أنواعها باختلاف المنطقة الجغرافية والظروف المناخية. ومن ناحية اللون. ويحتوي بصفة غنية على أنواع مختلفة من المواد الطبيعية المضادة للأكسدة. وتشكل المواد الشمعية نسبة 30% من تركيبه، والمواد الصمغية الراتنجية النباتية نسبة 50%، والزيوت العطرية الطيارة نسبة 10%، وحبوب اللقاح نسبة 5%، إضافة إلى 5%مزيج العشرات من المواد الكيميائية المختلفة التي هي بيت القصيد في شأن الفوائد الصحية لـ مادة البروبوليس. [4]

وتشير بعض المصادر العلمية إلى أن الأنواع الشائعة من مادة البروبوليس تحتوي على أكثر من 50 نوعا من المواد الكيميائية الطبيعية التي أثبتت الدراسات العلمية أنها ذات فاعلية حيوية بيولوجية، وأن هناك المئات من المواد الكيميائية الأخرى التي توجد في البروبوليس لكن لم تدرس بشكل علمي متعمق حتى اليوم، وتحديدا أكثر من 400 مركب كيميائي. [4]

I.7.1.دور البروبوليس في خلية النحل:

يستطيع النحل أن يحافظ على الخلية خالية من الأمراض على الرغم من كونها بيئة مثالية لتكاثر البكتريا والطفيليات، هذه البيئة ذات درجة حرارة ورطوبة مرتفعتين بالإضافة إلى وفرة لثاني أوكسيد الكربون طوال السنة، وترجع هذه الحصانة لمادة البروبوليس التي ينتجها، فالبروبوليس مضاد بكتيري[19،20] وصاد فطري[21،22] ومعطّل فيروسي[17،23]ومضاد للأكسدة[6]، إضافة إلى أن عالم النحل عالم حضاري صغير نظيف، إذ يقوم النحل بتنظيف الخلية وتعقيمها بواسطة البروبوليس.

- حيث يستخدم النحل البروبوليس في تحنيط الحشرات التي يمكن أن تتسلل إلى داخل الخلايا، حتى ولو كانت المتسللة حيوانات صغيرة مثل الفئران و السحالي حيث يقتلها أولاً بلسعها، ثم يقوم بلفها بالبروبوليس حيث يمنعها من التحلل،

ثم يغطي هذه المادة بطبقة من الشمع حتى لا تلوث جو الخلية[24] **(الشكل I.3.)**.

- كما يستخدم النحل البروبوليس في سد الشقوق داخل الخلية وتضييق مدخلها في الشتاء.
- لصق الإطارات الخشبية مع بعضها البعض وتثبيت الأقراص الشمعية في سقوف الجحور أو الكهوف أو حتى الأشجار التي يسكنها **(الشكلI.4.)**
- صقل وتنعيم الأجزاء الداخلية بالخلية.
- طلاء الجدر الداخلية للعيون السداسية الخاصة بالحضن.
- تقوية أماكن ترابط الأقراص.
- يقدم حماية طبيعية للنحل نظراً لطبيعته اللزجة حيث يقوم باصطياد الكائنات الدقيقة.
- حماية الخلية من الابتلال بالماء.

الشكل I.3. صورة لاستخدامات البروبوليس في تحنيط الجثث داخل الخلية.

الشكل I.4. صورة لاستخدامات البروبوليس في تقوية أماكن ترابط الأقراص.

I.8.1.الأهمية الطبية للبروبوليس:

أثبتت الأبحاث التي أجريت خلال الثلاثين سنة الأخيرة، أن لمادة البروبوليس خصائص علاجية كبيرة ووفق تصنيف اللجان العلمية لـقاعدة البيانات الشاملة للطب الطبيعي التابعة لوزارة الصحة بالولايات المتحدة(Natural Medicines Comprehensive Database)، يتم تصنيف فعالية أي نوع من وسائل العلاج الطبي الطبيعي، للأعشاب والمنتجات الحيوانية وغيرها، إلى ست درجات، أعلاها فعّال(Effective) وأدناها غير فعّال(Ineffective)، وذلك حسب نتائج المرجعيات العلمية لمجمل الدراسات والأبحاث المتوافرة حول تلك الوسيلة العلاجية. ومادة البروبوليس كما تشير نشرات هذه المؤسسة الطبية الأميركية لها درجة فعالية عالية (Effective) في معالجة الأمراض بمختلف أنواعها[4].

وفي هذا الإطار يعتبر البروبوليس مضاد حيوي مهم وممتد إلى العديد من أنواع البكتريا[11].

حيث بينت الأبحاث أن مركبات البروبوليس تمنع تكاثر خمسة أنواع من بكتيريا (Staphylococcus) بالإضافة إلى نوع من السالمونيلا وأربعة أنواع من الفيروسات، بالإضافة إلى ذلك فإن مستخلص البروبوليس يزيد في فعالية بعض المضادات الحيوية هذا من جهة ومن جهة أخرى أثبتت تجارب تأثير محاليل البروبوليس على ستة أنواع من الجراثيم الشهيرة التي كثيرا ما تصيب الإنسان. وهي المكورات العنقودية، والإيشيريشا القولونية، والمكورات العقدية، والمكورات المعوية (EntercoccusFaecalis)، وعصية القيح الزرقاء (Pseudomonas) ، والـ (Bacillus subtilis)، حيث تبين أن فعالية محاليل البروبوليس التي كانت تحتوي على نسبة من الفلافانويدات تزيد عن (1 %) فقط كانت قادرة على محاربة الجراثيم ولها خواص مضادة للجراثيم الستة التي تم دراستها[9].

ودلت معظم الأبحاث الطبية التي لا تزال متواصلة أن لهذه المادة (البروبوليس) قيمة علاجية كبيرة نذكر منها:

- يستخدم في الالتهاب الكبدي الفيروسي[25]، وذلك كمضاد للفيروس.
- يستخدم كمداوي عام للقروح والتهابات الأمعاء.
- يساعد في تأخير أو إعاقة تكاثر الخلايا السرطانية، حيث أكدت أبحاث السرطان قدرة أحماض ألكافييك الموجودة في البروبوليس على تثبيط نمو الخلايا السرطانية إذ يعمل على تعزيز قدرات جهاز المناعة بشكل عام والخلايا الليمفاوية بشكل خاص، وتحثها على إفراز العامل المضاد والذي يقضي على الخلايا المصابة بالسرطان، فأحماض الكافييك تختار الخلايا المصابة بالسرطان وتتلفها

أو تمنع انتشارها دون أن تُلحق أي ضرر بالخلايا السليمة، على عكس الأدوية الكيمائية التي تقضي على الخلايا المصابة والسليمة على حد سواء[27،26]، كما اثبت فعاليته كمضاد لسرطان الجلد الخطير المعروف باسم الملانوم (الورم الملاني) وأيضا فعال ضد سرطان القولون[29،28].

- وبينت دراسات حديثة أن أحماض الكافييك وحمض الفيروليك تقاوم سرطان الثدي والورم القتامي[30].
- مقوي عام حيث يزيد النشاطات الطبيعية والنشاطات الذهنية [26].
- ينبه الجهاز المناعي ويهدئ الحساسية [26].
- نافع لأمراض الغدة الدرقية [26].
- مفيد لالتهابات الأذن والأنف والحنجرة [26].
- ضد أمراض الفم (الأسنان[31]، اللثة، الرائحة الكريهة[32]).
- أمراض الرئة والنزلات الصدرية الحادة(السل)[33].
- أمراض الكلى والمثانة بشكل أخص[34].
- الأمراض التناسلية[18] (خاصة غدة البروستاتة عند الرجال والتشنجات المهبلية عند النساء).
- الالتهابات الجلدية (حروق درجة أولى، ضربات الشمس، كل الآثار الطويلة والصعبة) حيث استعمل البروبوليس لمعالجة الجروح والحروق والتسلخات الجلدية الملوثة بالجراثيم والفطريات، وأعطى نتائج مذهلة في القضاء التام على الجراثيم وفي سرعة التئام الجروح وتكوين أنسجة جديدة بدلا من تلك التالفة. كما تم علاج حروق شديدة في فئران كانت ملوثة بجرثومة السيدوموناس (Seudomonas) المقاومة للمضادات الحيوية بمرهم يحتوي على البروبوليس بنسبة (3%) فتحقق شفاؤها تماما خلال أيام معدودة دون حدوث تأثيرات جانبية.
- التهابات العين [26].
- الحالات العصبية (القلق)[35].
- السكري[36].
- يفيد في حالة كسر العظام حيث يساعد على إعطاء شفاء أفضل للمريض.
- الروماتيزم[37].
- مضاد لداء فقدان المناعة السيدا[39،38].

الفصل الثاني:

المـواد وطـرق العمــل

II. المواد و طرق العمل:

1.II.المواد الكيميائية المستعملة:

المواد الكيميائية المستعملة في الجزء العملي هي كالتالي:

المادة	Hexane	Methanol	Hcl	H_2SO_4	Folin-ciocalteau	DPPH	TPTZ	ammonium Moybdate	AlCl3
النقاوة	98%	100%	37%	98%	100%	98%	98%	98%	
اسم الشركة	VWR	VWR	Biochem	Biochem	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	Biochem	Biochem

2.II.الأجهزة المستعملة:

أثناء إنجازنا هذا العمل تم الاستعانة بالتجهيزات الموجودة على مستوى مخبر ترقية وتكنولوجيا الموارد الصحراوية بجامعة الشهيد حمّه لخضر بالوادي.

تم تقدير الفينولات الكلية والفلافونويدات الكلية واختبارات الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال جهاز المطيافية فوق البنفسجية و المرئية (UV-VIS/1800- SHIMADZU).

كما تم تقدير بعض المركبات الفينولية بجهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء نوع-RP) (HPLC-SHIMADZU، مرفق بمضختين (Pompe A)(Pompe B)نوع (LC 20 AL)لنقل الطور المتحرك تحت ضغط، مرفق ببرنامج تشغيل (LCSolution)،

نوع عمود الفصل(VP-ODS-C18)، (250mm x 4.5mm,5µm)، كاشف أحادي اللون (الأشعة فوق البنفسجية) نوع (SPD-20A).

كذلك تم تقدير بعض الأحماض الدهنية باستعمال جهاز الكروماتوغرافيا الغازية نوع (GC-2014/SHIMADZU) ذات كاشف متأين باللهب (FID Flame) ملحقة بعمود فصل نوع(DB-WAX).

3.II.العينات المدروسة:

تتوزع خلايا تربية النحل التي أخذت منها العينات على مناطق مختلفة من الوطن وذلك مراعات للتنوع المناخي والتضاريسي، فقد تم الحصول على العينات من منطقة الساحلية والداخلية والجنوب في فترة ممتدة بين 2011-2013، في **الجدول1.II**.العينات المأخوذة وتاريخ الحصول عليها، علما أن أغلب العينات المدروسة تم أخذها من خلايا تربية النحل تحت إشراف المربين وبعضها تم استلامها من مربي النحل لتعذر الوقوف على جنيها من الخلايا مباشرة.

الجدول1.II.العينات المدروسة و تاريخ جنيها

	المنـــاطق	رمز العينة	تاريخ الجني
1	جيجل- ميلة	PR1	2012
2	تيزي وزو	PR2	ديسمبر 2012
3	بومرداس	PR3	2011
4	بومرداس	PR4	نوفمبر 2012
5	تلمسان	PR5	2013
6	خنشلة	PR6	سبتمبر 2012
7	تيزي وزو	PR7	2011
8	الوادي	PR8	2012

4.II.خصائص المناطق التي أخذت منها العينات:

أخذت العينات من مناطق ذات تنوع مناخي وجغرافي، مع مراعات الكثافة السكانية والمحيط الصناعي الذي ربما يؤثر على خلايا النحل وبالتالي منتجه محل الدراسة (بروبوليس).

1.4.II. الخصائص الجغرافية:

من حيث الجغرافيا والتضاريس فهناك عينات أخذت من خلايا نحل بالسهول وأخرى بالجبال وأخرى بالهضاب وأخرى بالصحراء. يعني تم مسح أغلب أنحاء الجزائر الساحلية والداخلية والجنوبية كما هو موضح على الجدول التالي:

جدول2.II.أهم خصائص المناطق التي أخذت منها العينات[2].

	الجهة	الأقليم المناخي	المنطقة	خصائص التربة	الكثافة السكانية	تواجد المنشئات الملوثة	النشاط الزراعي	الغطاء الغابي
1	الشرق	رطب	جيجل- ميلة	صخرية + تربة خصبة	عالية	عالي	عالي	كثيف
2	الوسط	تحت رطب	تيزي وزو	صخرية + تربة خصبة	متوسطة	متوسط	متوسط	كثيف
3	الوسط	تحت رطب	بومرداس	صخرية + تربة خصبة	عالية جدا	عالي جدا	متوسط	كثيف
4	الغرب	شبه جاف	تلمسان	صخرية + تربة خصبة	متوسطة	عالي	عالي	كثيف
5	الداخلية	تحت شبه جاف	خنشلة	تربة ملحية	منخفضة	منخفضة جدا	متوسط	غير كثيف
6	الجنوبية	جاف	الوادي	رملية	منخفضة جدا	منخفضة جدا	عالي	خفيف جدا

جدول 2.II.أعلاه يحوي عدة عوامل تتعلق بالمحيط الذي أخذت منه العينات حيث أن هاته العوامل لها علاقة مباشرة أو غير مباشرة بخلايا النحل وإنتاجها، فمثلا المحيط الصناعي أو نوعية التربة نستطيع أن تكون سبب في خمول خلايا النحل أو نشاطها كأن يكثر النسيج الصناعي وبالتالي زيادة التلوث الذي يؤثر على مصادر عيش النحل، هواء وتربة وماء، كذا زيادة الكثافة السكانية.

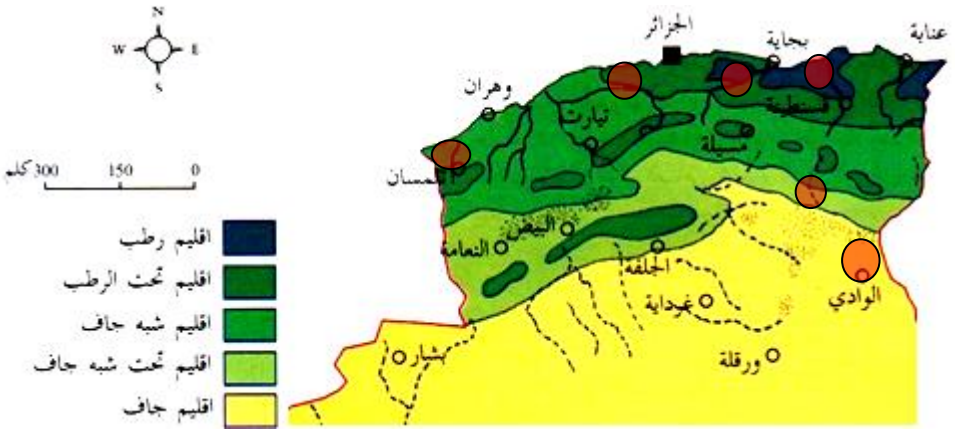
التربة والمناخ يعتبران العاملان الأساسيان المؤثرين في الغطاء النباتي وتنوعه فمثلا في المناطق الجافة ذات الحرارة المرتفعة صيفا والتربة الرملية تنموا هناك العديد من النباتات العطرية ذات الخصائص الطبية، حيث تمثل هذه النباتات مصدر رعي مهم للنحل. [4]

أما الغطاء الغابي والزراعي فكلما زاد الغطاء الغابي زاد من إنتاجية وحيوية النحل والعكس صحيح، وقد يكون الغطاء الزراعي عامل سلبي إذا أعتمد على المبيدات الزراعية أي أن أي زيادة فيه هي زيادة للتلوث بالمبيدات الزراعية. [4]

كـل تلك العوامـل هي مؤثرة على بيئة النحل، وربمـا يكون النحل أيضـا مؤثر لتلك البيئـة.

2.4.II. الخصائص المناخية:

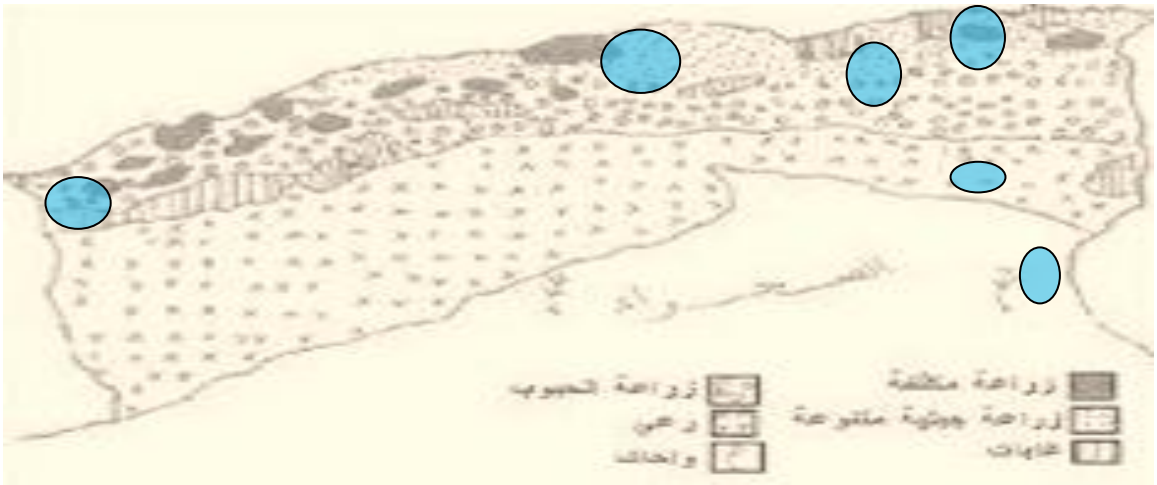
بتنوع الجغرافيا يتنوع المناخ وبالجزائر خمس أقاليم مناخية مهمة: رطب، تحت رطب، شبه الجاف، تحت شبه جاف وجاف. العينات أخذت من الأقاليم الخمسة كما هو موضح على الخريطة في (**الشكل1.II.**)[2]



الشكل1.II. خريطة الأقاليم المناخية للمناطق التي أخذت منها العينات

3.4.II.خصائص الغطاء النباتي:

الغطاء النباتي أهم شيء بالنسبة للنحل، فكلما ازدادت كثافته وتنوعه، زادت منتجات النحل وتنوعت فائدتها. و (**الشكل2.II.**) يوضح خريطة الغطاء النباتي للمناطق التي أخذت منها العينات[2].



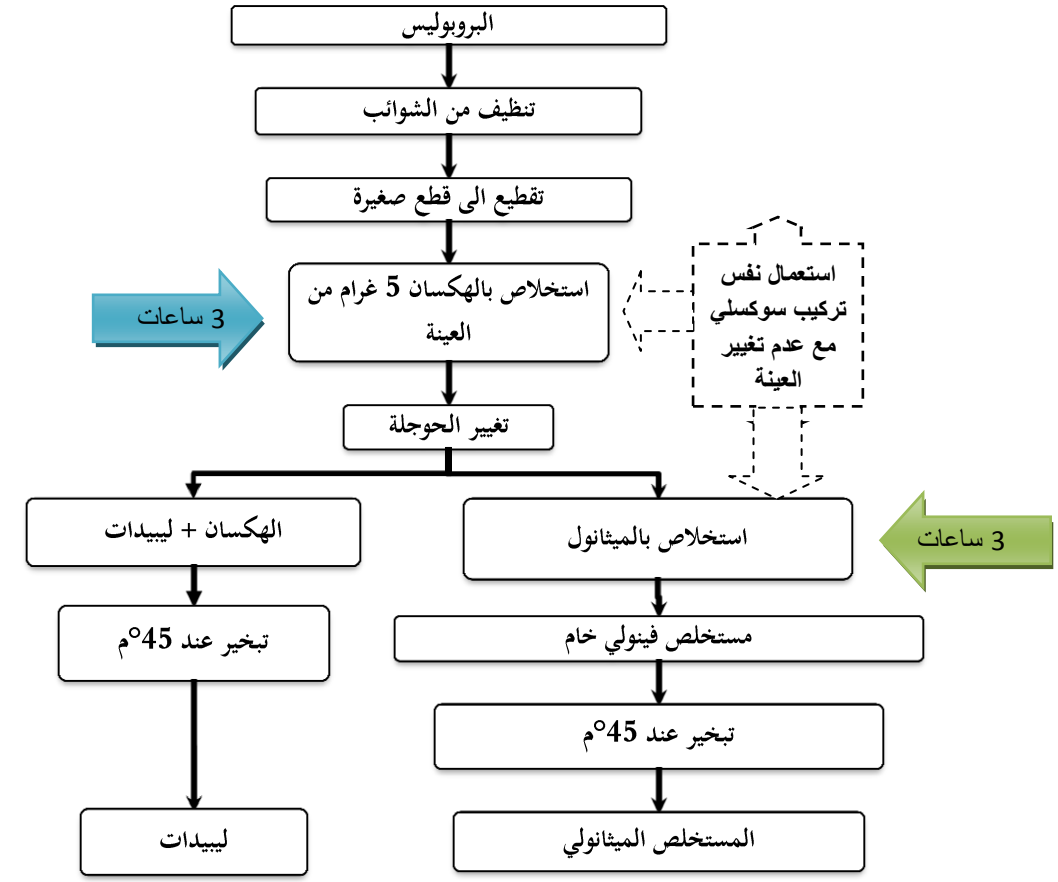
الشكل2.II. خريطة الغطاء النباتي للمناطق التي أخذت منها العينات

5.II. تحضير المستخلصات:

هناك الكثير من الدراسات عن طرق استخلاص المواد الفعالة من البربوليس منها الطرق التي اقترحها الباحث (Park YK)[40]، قبل عملية الاستخلاص تم تنظيف عينات البروبوليس من الشوائب العالقة بها، واستخلصنا الليبيدات بواسطة سوكسلي لمدة 3 ساعات وذلك بأخذ 150 ml من الهكسان(hexane) كمذيب لكل 5g من عينة البروبوليس، وثم يتم التبخير بواسطة جهاز (Rotavapor) تحت درجة 45°م. للحصول على المستخلص الهكساني (الليبيدات).

وقصد استخلاص المركبات الفعالة يتم تغيير الحوجلة من نفس تركيب سوكسلي السابق بأخرى تحوي 150ml من الميثانول (Me-OH) كمذيب، ومعاملتها بنفس الطريقة السابقة لمدة 3 ساعات. ويتم التبخير بواسطة جهاز (Rotavapor)تحت درجة 45°م. للحصول على المستخلص الميثانولي.

يمكن تلخيص خطوات الاستخلاص في **الشكل3.II.**



الشكل3.II.مخطط الاستخلاص باستعمال تركيب سوكسلي

6.II. تقدير المحتوى الفينولي والمواد الفعالة:

وتمت الدراسة على العينات المستخلصة عن طريق الميثانول كمذيب

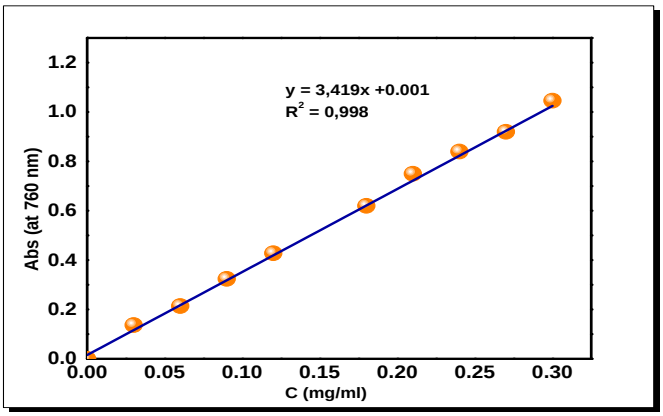
1.6.II. تقدير كمية الفينولات:

تقدر الفينولات بطريقة (Singleton Rossi) بمساعدة كاشف الفولينFolin-ciocalteai، حيث أن هذا الكاشف يتكون من حمض فوسفوتنغستينيك ($H_3P_{12}O_{40}$) وحمض فوسفوموليبيديك ($H_3PMO_{12}O_{40}$) الذي يرجع بواسطة الفينولات إلى أكاسيد التنغستين (W_8O_{23}) والموليبدين (Mo_8O_3) ذات اللون الأزرق [41].

يتم تقدير المركبات الفينولية كميا بواسطة جهاز طيف الأشعة الفوق بنفسجية و المرئية (UV-Vis) باستعمال حمض الغاليك كفينول مرجعي عند الطول الموجي $\lambda_{max} = 760nm$.

ويتم ذلك عمليا بتحضير محاليل ممددة لحمض الغاليك ذو تراكيز مختلفة محصورة ما بين (0,3-0,03)mg/ml، وبإضافة 0,5 ml من كاشف الفولين المخفف و 2ml من محلول كربونات الصوديوم Na_2CO_3بتركيز 20%لكل 100 µl من التراكيز المحضرة وبرجها بواسطة جهاز المزج الكهربائي ثم تركها في الظلام لمدة 30 min، تتم بعد ذلك قراءة الامتصاصية الضوئية لها بواسطة جهاز UV-Vis عند الطول الموجي $\lambda_{max} = 760nm$ [42].

نتحصل على المنحنى القياسي لحمض الغاليك برسم تغير الامتصاصية الضوئية بدلالة التركيز A=f(C)، كما هو موضح في (**الشكل4.II**) تعامل المحاليل المحضرة لعينات المستخلصة من البروبوليس بنفس معاملة حمض الغاليك، و بعد الحصول على قيم الامتصاصية الضوئية لهذه المحاليل تستخدم المعادلة التالية في حساب كمية الفينولات: Abs = 3.419 C+ 0.001 (mg/ml), (R^2=0.998)



الشكل4.II.المنحنى القياسي لحمض الغاليك

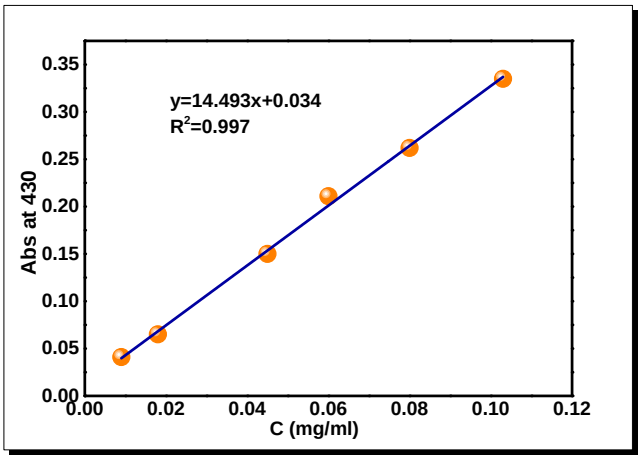
2.6.II. تقدير كمية الفلافونويدات:

يعتمد في تقدير الفلافونويدات على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين ثلاثي كلور الألمنيوم($AlCl_3$)مع مجموعة الهيدروكسيل(OH) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافونويدات، حيث يشكل معقدا ثابتا بين مجموعة الكربونيل و هيدركسي الموقـــع 5 و 3، كمـــا يشكل معقدات غير ثابتـــة مـــع مجموعتي اورثوهيدركسي، ذو معامل امتصاص عال. ويمتص عند طول موجة$\lambda_{max} = 430nm$.

تقدر كمية الفلافونويدات بواسطة جهاز طيف الأشعة الفوق بنفسجية والمرئية (UV-Vis) باستعمال الروتين كمحلول قياسي عند الطول الموجي $\lambda_{max} = 430nm$. ويتم ذلك عمليا بتحضير محاليل بتراكيز مختلفة للروتين محصورة ما بين (0,1-0,02)mg/ml، وبإضافة 1ml من محلول ثلاثي كلور الألمنيوم$AlCl_3$ ذو تركيز 2%(المحضر في الميثانول) لكل 1ml من التراكيز المحضرة و برجها ثم تركها في الظلام لمدة 30 min، تتم بعد ذلك قراءة الامتصاصية الضوئية لها بواسطة جهاز طيف الأشعة الفوق بنفسجية و المرئية (UV-Vis) عند الطول الموجي $\lambda_{max} = 430nm$.[41]

و من ثم نتحصل على المنحنى القياسي للروتين برسم تغير الامتصاصية الضوئية بدلالة التركيز A=f(C)، كما هو موضح في (**الشكل.5.II**) تعامل المحاليل المحضرة لعينات البروبوليس بنفس معاملة الروتين، و بعد الحصول على قيم الامتصاصية الضوئية لهذه المحاليل تستخدم المعادلة التالية في حساب كمية الفلافونويدات.

$$Abs = 14.493\ C + 0.034\ (mg/ml),\ (R^2=0.997)$$



الشكل.5.II.المنحنى القياسي للروتين

II.3.6.اختبارات مضادات الأكسدة:

إن خاصية تثبيط الجدر الحر لمركب ما، لا تتعلق فقط ببنيته الكيميائية، بل تتعداها إلى نوعية الجدر الحر القادر على معالجته،[43] لهذا السبب قمنا بدراسة الفاعلية المضادة للأكسدة لعينات البروبوليس المدروسة بثلاث اختبارات مختلفة.

II.1.3.6.اختبار DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl):

هذا الاختبار يعتمد على تثبيط الجذر (DPPH·) ثنائي فينيل بكريلهايدرازيل (diphenylpicrylhydrazyl) المستقر نسبيا و ذو اللون البنفسجي حيث يتفاعل مع جزيئة مضادة للجذور الحرة و يتحول إلى (DPPH-H) ثنائي فينيل بكريلهايدرازين (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) يتبع ذلك نقصان الامتصاصية عند طول الموجة الأعظمية بين λ_{max} = 515-517nm المذيب المستعمل هنا الميثانول او الإيثانول.

ارجاع جذر (DPPH·) ثنائي فينيل بكريلهايدرازيل (diphenylpicrylhydrazyl) و اكتسابه بروتون يؤدي الى تشكل (DPPH-H) ثنائي فينيل بكريلهايدرازين (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) ذو اللون الأصفر أو الأخضر.

المركب المراد اختباره يضاف الى محلول (DPPH·) المحضر في الميثانول او الإيثانول، بعد ترك الخليط في الظلام لمدة من 10 الى 30 دقيقة، يتم قياس الامتصاصية الضوئية عند طول موجي 515 nm - 517 بجهاز قياس الاشعة فوق البنفسجية و المرئية (spectrophotométrie). قياس تهافت اللون البنفسجي للخليط مع الزمن تسمح لنا بالحصول على IC_{50}، زمن يتهافت فيه 50% من لون الخليط.

عموما النتائج تعتمد على كمية مضادات الاكسدة اللازمة لتثبيط 50% من اجمالي الجذور الحرة (DPPH·) الابتدائية IC_{50}، يعني أن النتائج متعلقة بالتركيز الابتدائي لـ (DPPH·)، حيث نستطيع تعريف النشاط المضاد للأكسدة والموسوم بالرمز AA و المعبر عنه بالنسبة $AA = [DPPH\cdot]_{initiale}/IC_{50}$ [44،45].

لغرض تقدير الفعل الآسر للجزيئات المضادة للتأكسد للمستخلص الميثانولي لكل من العينات تم استعمال اختبار (DPPH) ثنائي فينيل بكريلهايدرازيل (Diphenylpicrylhydrazyl) الذي يعتبر من أكثر الطرق استعمالا في تقدير التأثير الإزاحي للجزيئات المضادة للتأكسد[46]. قمنا بتحضر 250 µM من محلول (DPPH) في الميثانول ثم تراكيز مختلفة من مستخلصات البروبوليس المخففة في الميثانول من كل تركيز نأخذ 1ml نضيف لها 1ml من (DPPH) نجانس المحلول، و نتركه 30 دقيقة في الظلام بعدها تـتم

القراءة في جهاز UV-Vis عند طول الموجة الأعظميλ_{max}=517nm. نجري نفس العملية على حمض الأسكوربيك (AA) وذلك قصد مقارنة فعالية مستخلصات البروبوليس بالمركبات المضادة للجذور الحرة وللأكسدة[47].

نقوم بحساب النسبة المئوية للتثبيط (I%) و ذلك من العلاقة التالية:

$$I\% = \left(\frac{A_0 - A_I}{A_0}\right) \times 100$$

حيث أن:

A_0:الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات.

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

II.2.3.6. اختبار (FRAP)

اختبـار (FRAP(FerricReducing/AntioxydantPower يـدرس فعاليـة مضـادات الأكسـدة الإرجاعية في تفاعـل الارجـاع اللوني ، أي تدرس مدى قدرة المستخلصات كمثبطات لعمليـة الأكسـدة يعتمـد مبـدأ الطريقـة علـى تلويـن أو عـدم تلـوين للمعقد ثـلاثي بيريديـل ثـلاثي أزيـن فريـك -2,4,6 tripyridyl-s-triazine ferrique (TPTZ) في الوسط الحامضي.

تحضير المحاليل:

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

المحلول الأول: هو محلول منظم (الموقي-Tampon) نحضر 300mM من أستات بريف (Buffer) عند PH=3 .6 (نحضر 3 .1g من أستات الصوديوم (CH_3COONa) مع 16ml من حمض الخل الثلجي (CH_3COOH) يكمل المحلول الى 1لتر بالماء المقطر).

المحلول الثاني: نحضر 10mM من (TPTZ) في محلول من (40mM من HCl)

المحلول الثالث: نحضر 20mM من ثلاثي كلوريد الحديد المائية ($FeCl_3.6H_2O$) في الماء المقطر.

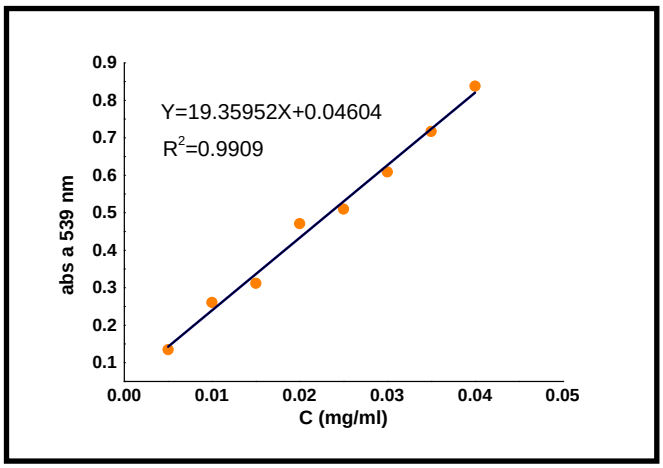
نخلط المحاليل الثلاثة بتكافؤ على الترتيب 1/1/10 وحدة حجمية ونتحصل على خليطFRAP ويحفظ هذا الأخير في 37م° لمدة 30min.

طريقة العمل:

رســم المنحنى القيــاسي : نقوم بتحضيــر تراكيز مختلفــة من حمض الأسكوربيك تكـــون محصورة بين 0 .005mg/ml و 0.04mg/ml .

نـأخذ 0.1ml من كل تركيز ونضيف له 0.9ml من الخليط (FRAP) و تحفظ في 37م°لمدة 4دقائق فقط ثم تبدأ عملية القراءة على جهاز UV-VIS عند الطول الموجي 539nm. [42]

انطلاقا من قيم الامتصاصية (A) لحمض الأسكوربيك، نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيزبـ(mg/ml) الموضح في (**الشكلII.6.**).



الشكلII.6 المنحنى القياسي لحمض الأسكوربيك

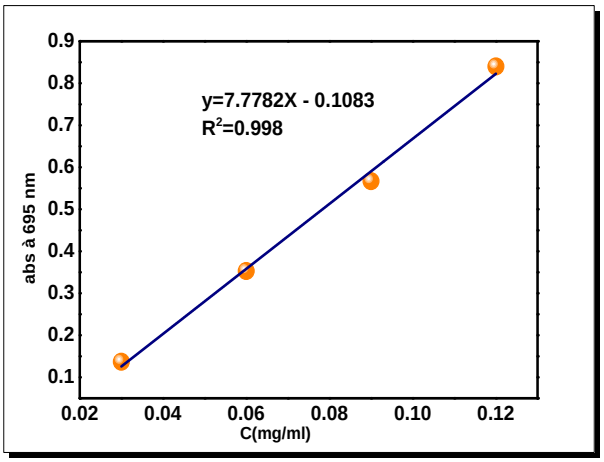
نجري نفس العملية على جميع العينات قيد الدراسة، وذلك قصد مقارنة فعالية مستخلصات البروبوليس على تثبيط الجذور الحرة وعمليات الأكسدة بفعالية حمض الأسكوربيك المستعمل في الصناعات الغذائية.

3.3.6.II اختبار موليبدات الفوسفات (MP):

تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة حسب طريقة Prieto [48] بعد بعض التعديلات التي تتضمن ما يلي، 0.2 ml من تراكيز ممددة من مستخلصات العينات المدروسة نضيف لها 2 ml من الكاشف و هو محلول محضر يحتوي على 4 mM من موليبدات الامونيوم، 28 mM من فوسفات الصوديوم، 0.6 M من حمض الكبريت، يتم حضن الخليط في حمام مائي بدرجة حرارة 95 °C و لمدة 90 min ، بعد انقضاء المدة تترك العينات تبرد في درجة حرارة الغرفة.

تتم قراءة الامتصاصية بجهاز (UV-Visible) عند طول الموجة $\lambda\ max = 695nm$.

تم استعمال حمض الغاليك كمركب قياسي بتراكيز محصورة بين (0.03 mg/ml و 0.12 mg/ml) ومعاملة التراكيز بنفس الكاشف والطريقة ، انطلاقا من قيم الامتصاصية (A) لحمض الغاليك، نرسم المنحنى القياسي الذي يبين تغير الامتصاصية (A) بدلالة التركيز بـ(mg/ml) الموضح في (**الشكل.6.II**).



الشكل.7.II.المنحنى القياسي لحمض الغاليك

4.6.II.تقدير بعض الأحماض الفينولية والفلافونويدات بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء(HPLC)

تم تقدير بعض المركبات الفينولية بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء(HPLC) وفقا للشروط المحسنة الموضحة في (**جدول.3.II**).

حيث تم تقدير المكونات بالاستعانة بالمنحنيات القياسية المتحصل عليها [49].

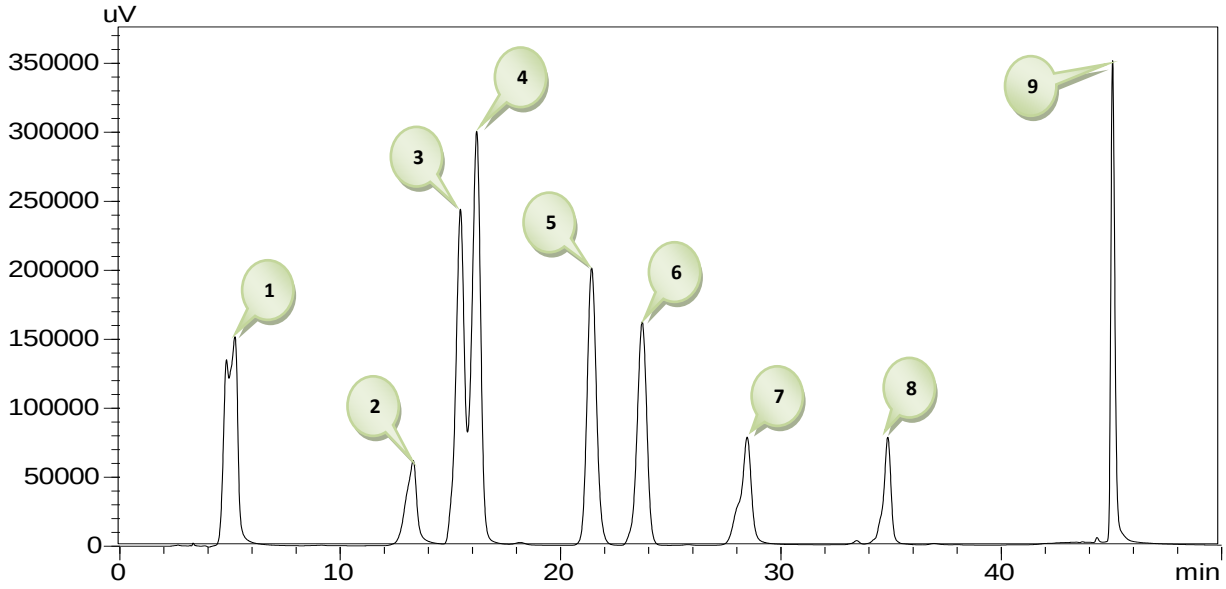
جدول.3.II.الشروط التجريبية لجهاز (HPLC) لفصل المركبات الفينولية المدروسة.

العامل	الشروط
النظام	الطور المعكوسRP-HPLC
العمود	(25 cm x 46 nm) C18
حجم المحقن	20µl
معدل التدفق	1ml/min
طول الموجة	λ= 268nm
الزمن	50 min
درجة الحرارة	°C25
الطور المتحرك	(A)أسيتونتريل (acétonitrile).
	(B) حمض الخلH_2O(0.2% acidacétique)

جدول4.II. يوضح تغيرات نسبة الطور المتحرك A و B بدلالة الزمن:

الزمن (*min*)	نسبة(A) %	نسبة (B) %
0.01	10	90
2.00	10	90
6.00	14	86
16.00	17	83
23.00	19	81
28.00	23	77
35.00	23	77
38.00	40	60
50.00	10	90

يعتمد تقدير الفينولات في العينات على استعمال المنحنيات القياسية للمركبات الفينولية المراد تقديرها.



الشكل 7.II.كروماتوغرام HPLC لبعض الشواهد

و**الجدول5.II.** يبين رقم النتوء واسم الشاهد ورمز الشاهد وزمن الاحتجاز الموافق له

الرقم	الاسم	الرمز	زمن الاحتجاز(t_r)
1	حمض الغاليك	GA	5.29
2	كلوروجينيك	CLA	13.392
3	حمض الفانيلين	VA	15.531
4	حمض الكافييك	CA	16.277
5	الفانيلين	VN	21.46
6	ب-كومارين	p-CO	23.817
7	روتين	RU	28.37
8	نارينجين	NR	34.788
9	كريستين	QR	45.047

5.6.II.تعريف بعض الأحماض الدهنية بالكروماتوغرافيا الغازية(GC)

وتمت الدراسة على الليبيدات المستخلصة عن طريق الهكسان كمذيب.

يعرفنا جهاز الكروماتوغرافيا الغازية نوع**(GC-2014/SHIMADZU)**،ذات كاشف متأين باللهب (FID)، ملحقة بعمود فصل نوع (DB-WAX) علىبعض الأحماض الدهنية. حيث قمنا بعملية أسترة لليبيدات حتى يتسنى لنا عمليا تحرير وتحويل الأحماض الدهنية المتواجدة في الليبيدات وجعلها قابلة للفصل عن طريق الكروماتوغرافيا الغازية وذلك وفق البروتوكول **(AFNOR NF 60-233)**.[3]

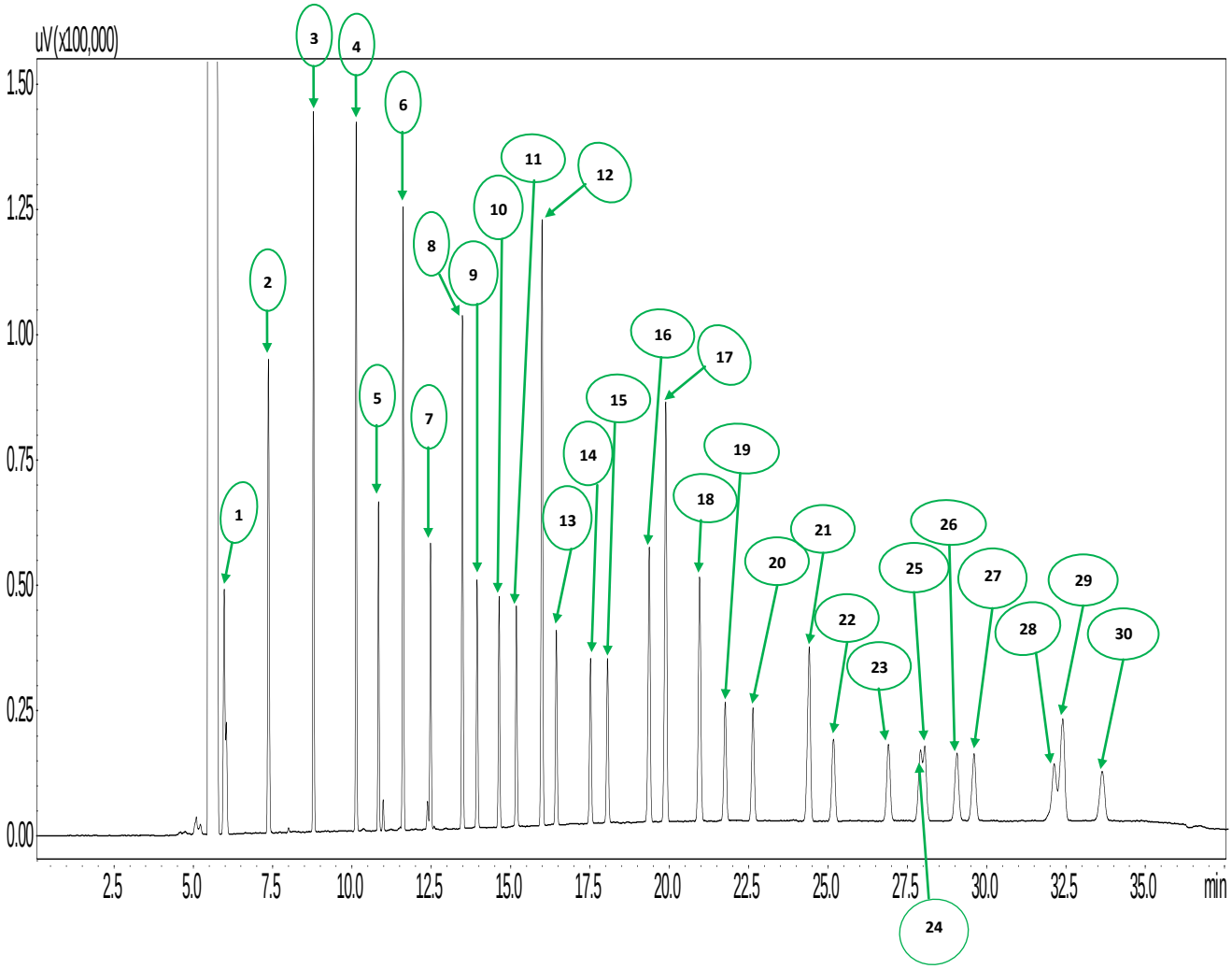
1- نستعمل في هذه العملية (montage à reflux).
2- نزن 0.5 غرام من العينة داخل حوجلة ذات سعة 100ml وتسخينها على حمام زيتي مع تدفق غاز الأزوت.
3- نقوم بإضافة 10 ml من الميثانول (CH_3OH) و0.2 ml من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH)المذاب في الميثانول(CH_3OH) بكمية مركزة.
4- يسخن المزيج بواسطة حمام زيتي حتى الغليان مع الرج، وهنا يستخدم مبرد يثبت أعلى الحوجلة، تحت تدفق غاز الأزوت دوما، لمدة 45 دقيقة.
5- بعد ذلك يتم فصل الحوجلة عن التركيب ويترك المزيج يبرد حتى يصل إلى درجة حرارة المخبر.
6- يسكب المزيج داخل قمع الفصل (سائل – سائل) ذي سعة 60 ml.
7- يتم غسل الحوجلة ب: 5 ml من الهكسان ويسكب في قمع الفصل.
8- نعيد عملية الغسل مرة ثانية بنفس كمية من الهكسان وتسكب في قمع الفصل.
9- نضيف على المزيج 10 ml من المحلول المائي لكلوريد الصوديوم المركز (NaCl) بتركيز (200g/l) ويرّج المزيج داخل قمع الفصل جيدا.
10- يترك المزيج يستقر حتى يظهر لنا طورين منفصلين تماما (في الأسفل طور مائي- في الأعلى طور عضوي). (هذه الخطوة تتطلب الصبر وعدم التسرع حتى تحصل على طور عضوي شبه نقي)
11- يفتح صمام قمع الفصل ويستبعد الطور المائي كليا.
12- الطور العضوي المحتوي على الأحماض الدهنية المتشكلة يعالج عن طريق إضافة كبريتات الصوديوم (Na_2SO_4) المعروفة لشراهتها للماء.
13- يؤخذ الطور العضوي بواسطة حقنة ويتم ترشيحه بواسطة مرشح40µm.

14- أخذ 500µl من مصفى الطور العضوي نضيف إليه 500µl من الهكسان، ويتم الحقن وفقا لشروط الفصل الموضحة في (**جدول6.II.**) وقد تم فصل المكونات وتعريفها بالاستعانة بقاعدة بيانات الجهاز، حيث تم حقن العينة في نفس شروط قاعدة البيانات حتى نتحصل على نفس زمن الاحتجاز والتعرف على بعض الأحماض الدهنية الموجودة في الجزء اللبيدي للبروبوليس.

جدول6.II. شروط الفصل باستخدام جهاز (**GC**) قصد فصل الأستر المشتق لبعض الأحماض الدهنية وتعريفها.

شروط غرفة الحقن	**درجة حرارة (C°)**	**نسبة التجزئة**		**سرعة الغاز الحامل(Cm/Sec)**	
	250	1/50		12	
عمود الفصل	**التسمية**	**الطبيعة**	**الطول(m)**	**القطر الداخلي(mm)**	**سمك الطور الثابت(µ m)**
	DB-WAX	قطبي	30	0.32	0.25
شروط الغرفة الحاضنة لعمود الفصل	**الخطوة (Min /°C)**	**درجة الحرارة (C°)**		**زمن الاستراحة (Min)**	
	-	50		1	
	25	200		0	
	3	230		18	
	-20	50		-	
شروط الكاشف	**النوع**			**درجة الحرارة**	
	كاشف التأين باللهب (FID)			280	

يعتمد تعريف الأحماض الدهنية في العينات على مقارنة زمن الاحتجاز للمركبات القياسية وهي عبارة عن أسترات ميثيلية مكافئة للأحماض الدهنية المراد تعريفها.



الشكل II.8.كروماتوغرام CPG لتقدير المركبات القياسية

الجدول II.7. نتائج كروماتوغرام CPG لتقدير المركبات القياسية:

الرقم	زمن الاحتجاز	مساحة النتوء	علو النتوء	التركيز	التسمية	رقم النتوء
1	1.115	1263.40	216.30	0.00167		غير مرقم
2	1.335	1519.50	219.10	0.00201		غير مرقم
3	1.488	1288.50	229.30	0.0017		غير مرقم
4	1.935	1171.00	227.90	0.00155		غير مرقم
5	2.955	1029.20	182.60	0.00136		غير مرقم
6	3.098	1284.80	204.20	0.0017		غير مرقم
7	3.558	1137.10	204.50	0.0015		غير مرقم
8	4.604	3988.40	638.60	0.00526		غير مرقم
9	4.738	5673.30	760.80	0.00749		غير مرقم
10	4.875	1316.90	305.20	0.00174		غير مرقم
11	5.096	20209.90	3584.70	0.02668		غير مرقم
12	5.222	9940.60	2025.00	0.01312		غير مرقم

غير مرقم		49.52251	6584852.90	37519405.70	5.477	13
غير مرقم		42.29763	5137967.20	32045670.20	5.61	14
1	C4:0	0.23731	48885.40	179788.70	5.972	15
غير مرقم		0.08319	22359.80	63023.50	6.041	16
2	C6:0	0.41223	94533.70	312317.30	7.365	17
غير مرقم		0.00344	878.40	2605.00	8	18
3	C8:0	0.45938	143776.00	348039.80	8.786	19
4	C10:0	0.45554	141473.40	345130.30	10.13	20
غير مرقم		0.00474	501.70	3593.00	10.36	21
5	C11:0	0.21856	65665.70	165588.20	10.835	22
غير مرقم		0.02214	6270.00	16771.50	10.983	23
غير مرقم		0.00247	316.10	1872.90	11.232	24
غير مرقم		0.00411	691.00	3115.80	11.518	25
6	C12:0	0.43884	124470.10	332476.60	11.61	26
غير مرقم		0.00153	232.40	1160.70	11.884	27
غير مرقم		0.0021	272.70	1587.70	12.008	28
غير مرقم		0.02384	5588.20	18058.90	12.382	29
7	C13:0	0.20734	57125.70	157087.00	12.476	30
غير مرقم		0.00199	559.60	1509.80	12.586	31
غير مرقم		0.00183	268.80	1387.40	12.962	32
8	C14:0	0.40513	102330.50	306938.00	13.479	33
9	C14:1	0.20219	49494.70	153186.00	13.943	34
10	C15:0	0.19116	46088.80	144824.80	14.636	35
11	C15:1	0.19441	44174.00	147288.70	15.18	36
غير مرقم		0.00133	204.00	1010.40	15.358	37
12	C16:0	0.56764	120990.40	430053.60	15.989	38
غير مرقم		0.00212	292.90	1603.60	16.205	39
غير مرقم		0.00206	346.70	1563.40	16.302	40
13	C16:1	0.1894	39002.40	143494.20	16.44	41
غير مرقم		0.00132	210.80	1003.50	16.603	42
غير مرقم		0.00147	295.50	1117.00	16.862	43
غير مرقم		0.00341	344.20	2580.60	16.965	44
غير مرقم		0.00281	289.30	2126.40	17.081	45
غير مرقم		0.0021	271.40	1588.50	17.222	46
غير مرقم		0.0015	211.20	1132.90	17.325	47
14	C17:0	0.17811	33083.10	134939.70	17.516	48
غير مرقم		0.00201	288.40	1524.50	17.757	49
15	C17:1	0.18448	33003.50	139767.70	18.054	50
غير مرقم		0.0024	317.40	1820.00	18.245	51
غير مرقم		0.00232	298.10	1759.50	18.362	52
غير مرقم		0.00228	238.70	1724.90	18.673	53

16	C18:0	0.33787	54897.50	255977.20	19.369	54
17	C18:1 c+t n-9	0.5256	83749.90	398204.90	19.891	55
18	C18:2 c+t n-6	0.34996	48740.10	265136.40	20.955	56
19	C18:3 n-6	0.17411	23760.90	131911.00	21.763	57
غير مرقم		0.0017	226.70	1289.20	22.177	58
20	C18:3 n-3	0.17017	22619.80	128928.50	22.636	59
غير مرقم		0.00136	233.10	1033.20	23.911	60
21	C20:0	0.305	34757.60	231075.80	24.411	61
22	C20:1 n-9	0.15714	16412.20	119049.50	25.173	62
23	C20:2 n-6	0.15675	15298.40	118754.20	26.903	63
24	C20:3 n-6 + C21:0	0.15513	14171.30	117533.70	27.919	64
25	C20:3 n-3	0.14364	14986.70	108823.50	28.051	65
26	C20:4 n-6	0.15734	13521.30	119203.80	29.069	66
27	C23:0	0.15102	13302.30	114413.10	29.604	67
غير مرقم		0.0016	194.20	1215.00	31.109	68
28	C24:1 n-9	0.16297	11306.90	123468.30	32.131	69
29	C20:5 n-3 + C24:0	0.27478	20329.00	208180.60	32.402	70
30	C22:6 n-3	0.14714	9911.00	111479.60	33.64	71
غير مرقم		0.00151	199.00	1147.40	34.737	72
غير مرقم		0.00211	233.80	1597.20	34.876	73
غير مرقم		0.00401	372.70	3041.60	36.593	74
غير مرقم		0.00246	408.40	1864.40	36.699	75

الفصل الثالث:
النتائج والمناقشة

III. النتائج والمناقشة:

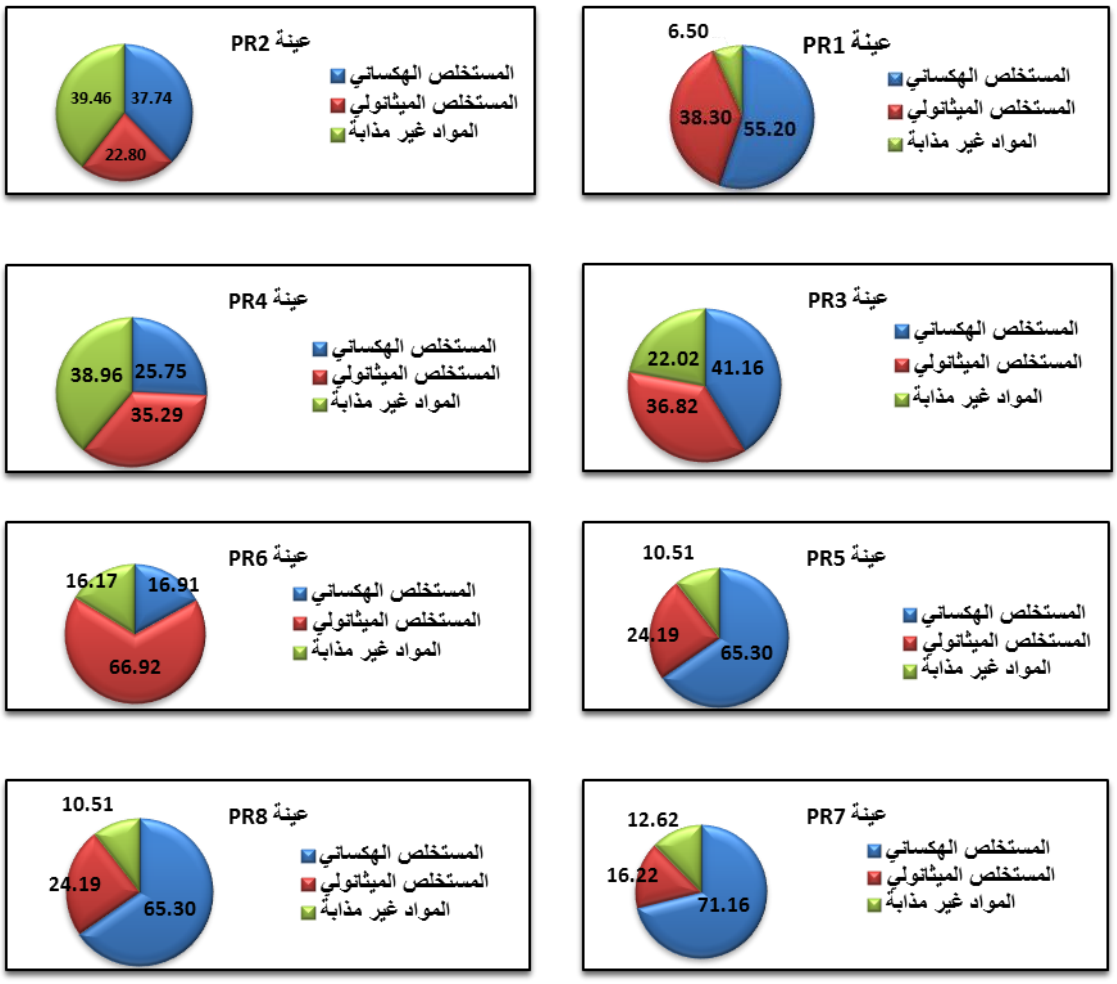
III.1.نتائج مردود الاستخلاص:

تم الحصول على مادة دهنية (ليبيدات) من المستخلص الهكساني ذو رائحة مميزة وذو لون متباين بالنسبة لجميع العينات المدروسة متدرج من اللون الأصفر الى اللون البني .

كذلك تم الحصول على سائل غروي شديد الالتصاق ذو رائحة مميزة وذو لون متماثل بالنسبة لجميع العينات وهو اللون البني.

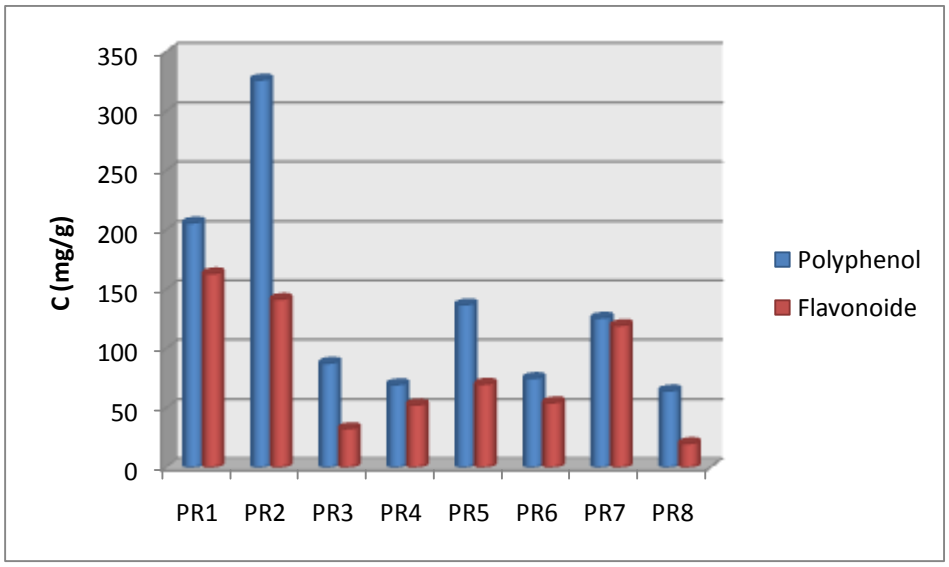
انطلاقا من الوزن المستعمل في هذه التجربة وهو (5g) لجميع العينات، ومع مقارنته بالأوزان النهائية للمستخلصات المتحصل عليها، يمكن تقدير المردود المتحصل عليه في كل عينة.

والدوائر النسبية التالية توضح قيم المردود الكتلي لجميع العينات المدروسة:



الشكلIII.1. تمثيل بياني لنتائج مردود الاستخلاص للعينات المدروسة

2.III. نتائج تقدير المحتوى الفينولي والفلافونويدات:



الشكل2.III. تمثيل بياني لنتائج تقدير المحتوى الفينولي والفلافونويدات للعينات المدروسة

العينة	PR1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR6	PR7	PR8
الفينولات(mg/g)	205,90	326,41	87,74	69,61	136,88	74,87	125,76	64,34
الفلافونويدات(mg/g)	**163,11**	**141,58**	**32,56**	**52,43**	**70,10**	**54,37**	**119,50**	20,01

الجدول 1.III. قيم تقدير كيمة الفينولات والفلافونويدات للعينات المدروسة

نلاحظ من خلال نتائج تقدير المركبات الفينولية والفلافونويدات الموجودة في المستخلص الميثانولي لعينات البروبوليس، تباين محسوس في كمية المركبات الفينولية والفلافونويدات في مختلف العينات المدروسة ،حيث تراوح مقدارها بين (326.41mg/g) و(64.34mg/g).

حيث بلغت كمية المركبات الفينولية أعلى قيمة لها في العينة PR2 قدرت ب(326.41mg/g) وهي القيمة الأعلى مقارنة بباقي العينات المدروسة ، أيضا نلاحظ وجود قيمة أخرى جيدة في العينة PR1 وتقدر ب(205 .9mg/g)، مع وجود قيمتين معتبرتين في كل من العينة PR5 والعينة PR7 تقدران ب (136.88mg/g) و (125.76mg/g) ، بينما لم تتعدى نتائج باقي العينات القيمة (90mg/g).

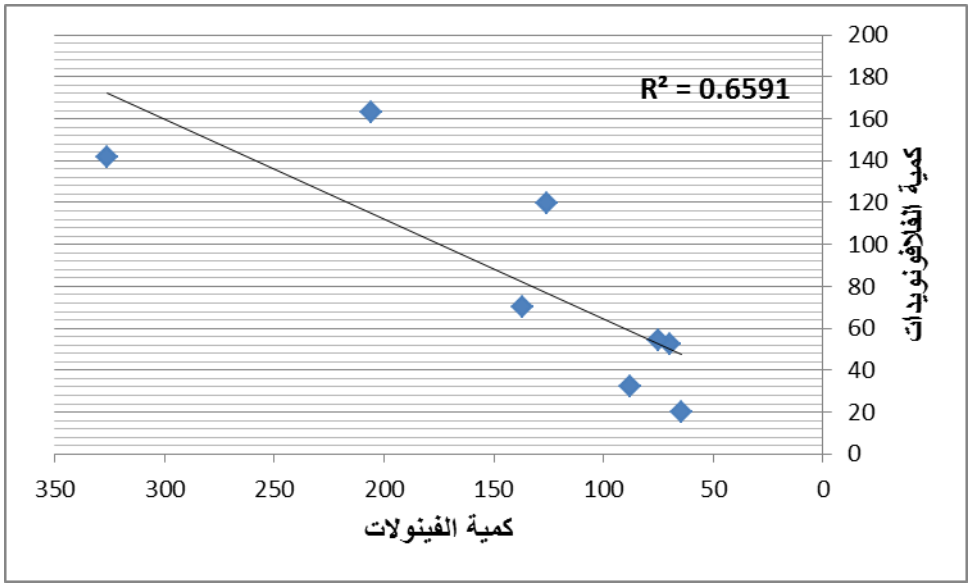
كذلك نلاحظ نتائج قيم الفلافونويدات وهي قريبة نسبيا لنتائج المركبات الفينولية في أغلب عينات البروبوليس المدروسة ، حيث تراوح مقدارها بين (20.01mg/g) و (163.11mg/g).

حيث بلغت كمية الفلافونويدات أعلى قيمة لها في العينة PR1 قدرت ب(163.11mg/g) وهي القيمة الأعلى بالنسبة للعينات المدروسة، مع وجود قيمتين معتبرتين في كل من العينة PR2 والعينة PR7 تقدران ب (141.58mg/g) و (119.5mg/g)، بينما لم تتعدى نتائج باقي العينات القيمة (71mg/g).

وبمقارنة نتائج تقدير المركبات الفينولية ونتائج تقدير الفلافونويدات نستنتج أن عينات البروبوليس المدروسة تحتوي على كمية معتبرة من الفينولات والفلافونويدات.

من خلال النتائج السابقة وبالرجوع إلى المعطيات المتعلقة بالمناخ وكثافة الغطاء النباتي وفصل الجني، نلاحظ أن العينات التي أخذت من المناطق الساحلية وفي شهر ديسمبر، أعطت كمية جيدة من المركبات الفينولية والفلافونويدات بالمقارنة بباقي العينات ، حيث ترتفع نسبة الرطوبة في الجو خلال شهر ديسمبر في المناطق الساحلية وهذا عامل مهم يساعد على نشاط البكتيريا في الخلية، مما يتوجب على النحل انتاج بروبوليس غني بالمركبات الفينولية والفلافونويدات لتعقيم الخلية، على عكس المناطق والفصول الأخرى الأقل رطوبة التي أخذت منها باقي العينات .

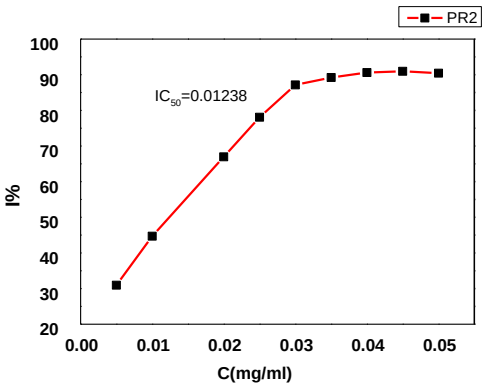
معامل الارتباط بين نتائج تقدير كمية الفينولات وكمية الفلافونويدات

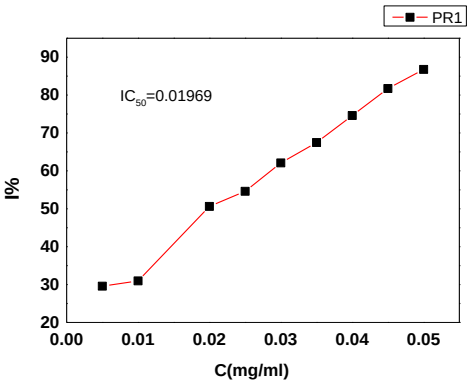


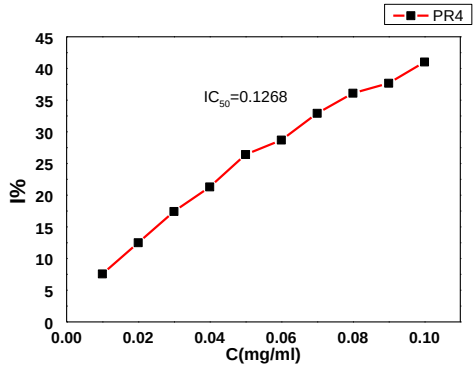
من هذه النتائج نستنتج أن مادة البروبوليس المحلي تعتبر مصدرا مهما للمركبات الفينولية والفلافونويدات، وهما يتناسبان طردا بمعامل ارتباط R^2= 0.6591

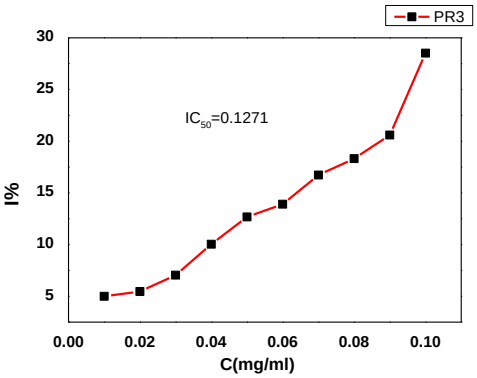
3.2.III.نتائج اختبارات مضادات الاكسدة:

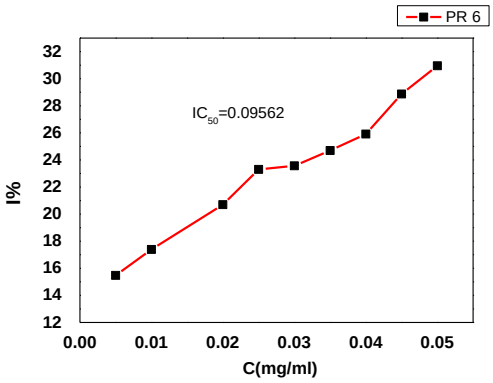
1.3.2.III. نتائج اختبارات DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl):

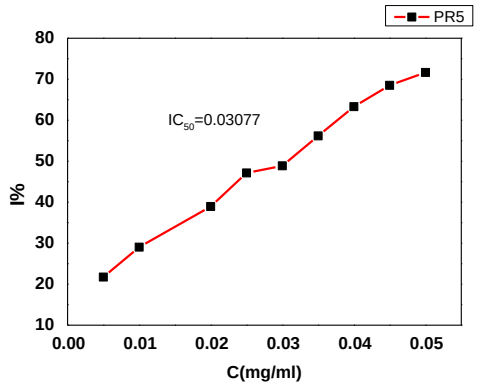


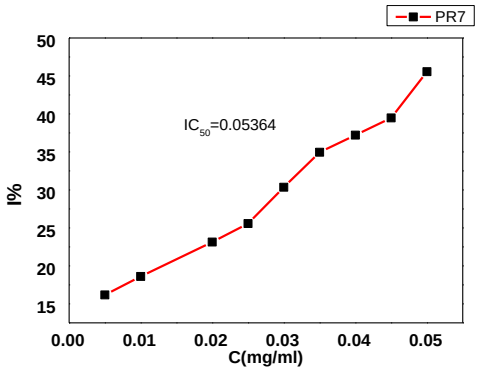


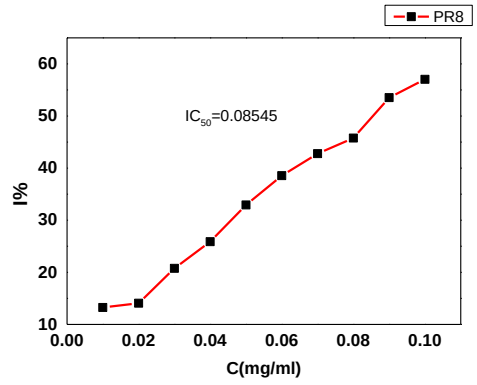


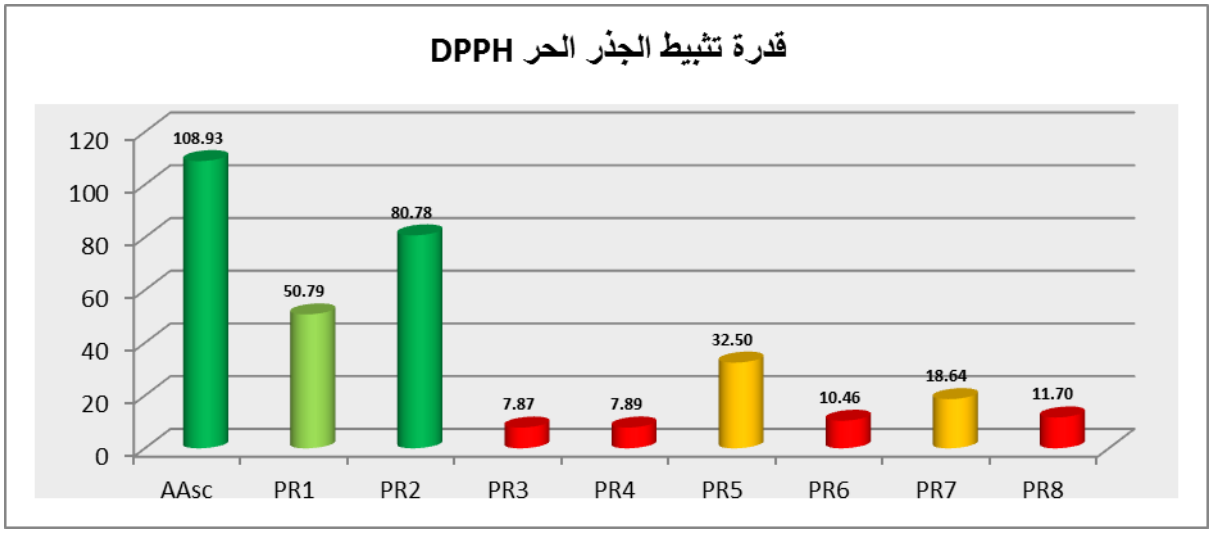








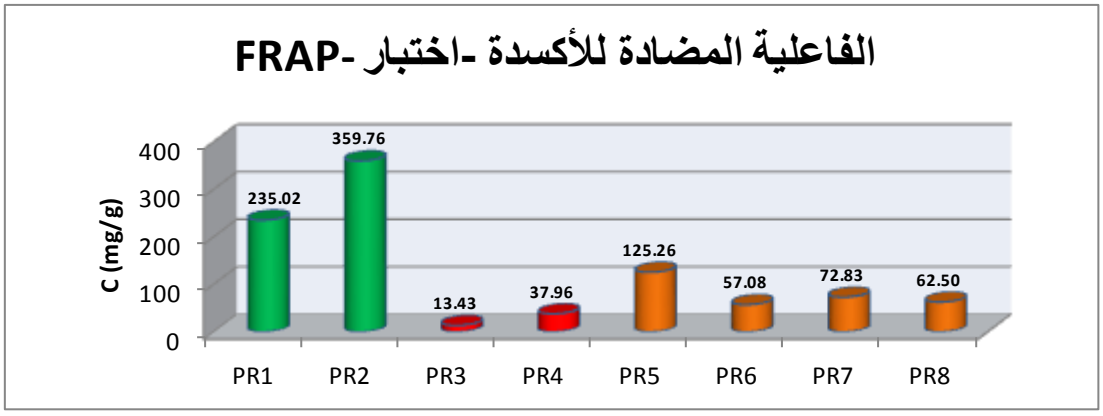




الشكل3.III. تمثيل بياني لنتائج اختبارات DPPH للعينات المدروسة

بمقـارنة القدرة التثبيطية للجذور الحرة خلال اختبار (DPPH) للعينات المدروسة مع الشاهد AAsc، وجد أن عينة البروبوليس PR2 (تيزي وزو ديسمبر2012) ذات فعاليـة عالية على تثبيط الجذور الحرة متقاربة مع قدرة تثبيط الجذور الحرة للشاهد AAsc، تليها العينة PR1(جيجل- ميلة 2012) لها فعالية جيدة نسبيـا بالمقارنة مع الشاهد، بينما باقـي العينـات المدروسـة تميـزت بفعاليـة متواضعـة، أعلاهـا العينـة PR5(تلمسان 2013) وأضعفها PR3 و PR4 المأخوذتين من منطقة بومرداس، وهي أضعف من قدرة الشاهد AAsc على تثبيط الجذور الحرة بحوالي 14 مرة.

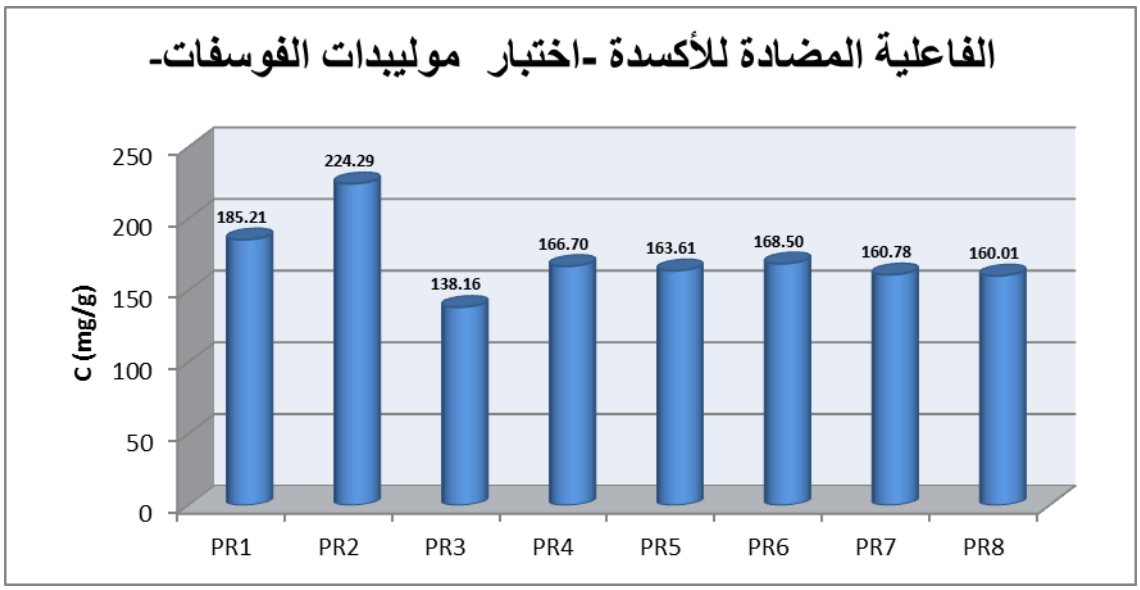
2.3.2.III نتائج اختبارات (FRAP):



الشكل4.III. تمثيل بياني لنتائج اختبارات FRAP للعينات المدروسة

بعد تقدير كمية المواد المضادة للأكسدة من خلال اختبار (FRAP) للعينات المدروسة، تبين أن عينة البروبوليس PR2 (تيزي وزو ديسمبر2012) لها فعاليـة عالية، تليها العينة PR1(جيجل- ميلة 2012) لها فعالية جيدة نسبيـا، بينما باقـي العينـات المدروسـة تميـزت بفعاليـة متواضعـة، أعلاهـا العينـة PR5(تلمسان 2013) وأضعفها PR3 و PR4 المأخوذتين من منطقة بومرداس، وكانت نتائج هذا الاختبار متوافقة تماما مع نتائج اختبار DPPH.

2.3.2.III نتائج اختبارات موليبدات الفوسفات (MP):



الشكل5.III. تمثيل بياني لنتائج اختبارات موليبدات الفوسفات للعينات المدروسة

أظهرت نتائج اختبار موليبدات الفوسفات تقارب كبير في كمية المواد المضادة للأكسدة، حيث حافظت عينة البروبوليس PR2 (تيزي وزو ديسمبر2012) على المرتبة الأولى من حيث الفعاليـة، تليها العينة PR1(جيجل- ميلة 2012) بينما ارتفعت الفاعلية لدى باقي العينات لتتراوح في بين 160 mg/g و 167 mg/g، لتبقى عينة البروبوليس PR3 المأخوذة من منطقة بومرداس تقبع في مؤخرة ترتيب العينات من حيث نسبة تواجد المركبات الفعالة والمضادة للأكسدة.

نلاحظ تطابق نسبي وليس كلي بين نتائج هذا الاختبار والاختبارين السابقين(FRAP،DPPH)، وقد يرجع هذا الاختلاف لطبيعة المركب المستهدف خلال كل اختبارففي الاختبارين الأول والثاني يتم إرجاع الجذرين (DPPH*) إلى (DPPH) وإرجاع ذرة الحديد داخل جزئ (TPTZ) من Fe^{3+} إلى Fe^{2+} على التوالي. أما في الاختبار الأخير فيتم إرجاع جزئ الموليبدات إلى الموليبدين الأقل نشاطا.

من خلال النتائج السابقة وبالرجوع إلى المعطيات المتعلقة بالمناخ وكثافة الغطاء النباتي وفصل الجني والكثافة السكانية وتواجد المنشآت الملوثة، نلاحظ أن عينات البروبوليس المجنية في فصل الشتاء التي أخذت من المناطق الساحلية ذات الغطاء النباتي الكثيف والأقل تواجدا للمنشآت الملوثة والأقل كثافة سكانية، أعطت قدرة تثبيطية عالية للجذور الحرة وفاعلية مضادة للأكسدة عالية بالمقارنة بباقي العينات، حيث أنه كلما زادت نسبة التلوث في محيط خلية النحل بفعل الكثافة السكانية العالية وكثرة المنشآت الملوثة أدى ذلك لاستهلاك كميات معتبرة من المركبات الفعالة لحماية الخلية، كما أنه كلما اتجهنا نحو المناطق الصحراوية ضعف الغطاء النباتي وانحصر تنوعه، هذه العوامل مجتمعة تؤثر على جودة البروبوليس المنتج في الخلية ويضعف قدرته على تثبيط للجذور الحرة وفاعليته المضادة للأكسدة.

III.6.2.نتائج تقدير بعض الأحماض الفينولية والفلافونويدات بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:

بعد تحليل العينات الثمانية المدروسة بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، وبالتركيز على الشواهد التسعة المتوفرة لدينا، قمنا بتقدير كمية الشاهد مقابل كل غرام من العينة ولخصناها في **الجدول III.2**

العينة	GA (µg/g)	CLA (µg/g)	VA (µg/g)	CA (µg/g)	VN (µg/g)	p-CO (µg/g)	RU(µg/g)	NR (µg/g)	QR (µg/g)
PR1	66.59	2639.34	512.04	6797.11	22.61	2396.89	1266.09	0.00	4964.35
PR2	136.41	1387.35	134.38	7826.77	460.81	1768.21	29.49	0.00	2021.15
PR3	505.29	1573.62	1204.78	1062.53	335.66	284.70	529.41	553.45	3839.83
PR4	151.17	457.62	240.12	61.88	65.65	98.87	117.03	483.13	2989.08
PR5	28.21	2513.92	473.52	1139.26	311.47	1189.53	110.02	0.00	4193.52
PR6	364.96	708.84	65.06	85.35	87.29	80.81	36.86	141.40	926.10
PR7	387.38	1044.24	378.55	231.37	0.00	230.03	188.41	1106.50	17713.79
PR8	2567.11	1296.30	188.27	352.04	318.70	200.21	283.25	415.18	1283.11

الجدول III.2. تلخيص نتائج التحليل بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء للعينات المدروسة

نلاحظ من الجدول وجود أربع عينات وهي: (**PR3، PR4، PR6، PR8**) تشتمل على كافة الفينولات والفلافونويدات التي استعملناها كشواهد .إلا إن العينتين (**PR3،PR8**) احتوت على تقدير كمي إجمالي معتبر من الفينولات والفلافونويدات بالمقارنة بالعينتين (**PR4، PR6**).

وكما نلاحظ من الجدول بروز بعض القيم الجيدة من الفينولات والفلافونويدات نذكر منها أعلى قيمة التي حاز عليها الكرستين (**QR**) قدرت ب(**17713.79 µg/g**) في العينة (**PR7**)، تليها قيمة حمض الكافييك (**CA**) التي قدرت ب (**7826.77µg/g**) الموجودة في العينة (**PR2**)، مع غياب النارينجين (**NR**) في العينات الثلاث التالية (**PR1،PR2 ، PR5**) وغياب الفانيلين (**VN**) في العينة (**PR7**).

ومن خلال هاته النتائج يمكن الحكم على جودة العينات المدروسة من خلال التواجد المعتبر والمتوازن للمركبات المدروسة مجتمعة على النحو التالي: **PR4 > PR8 > PR3 >PR6.**

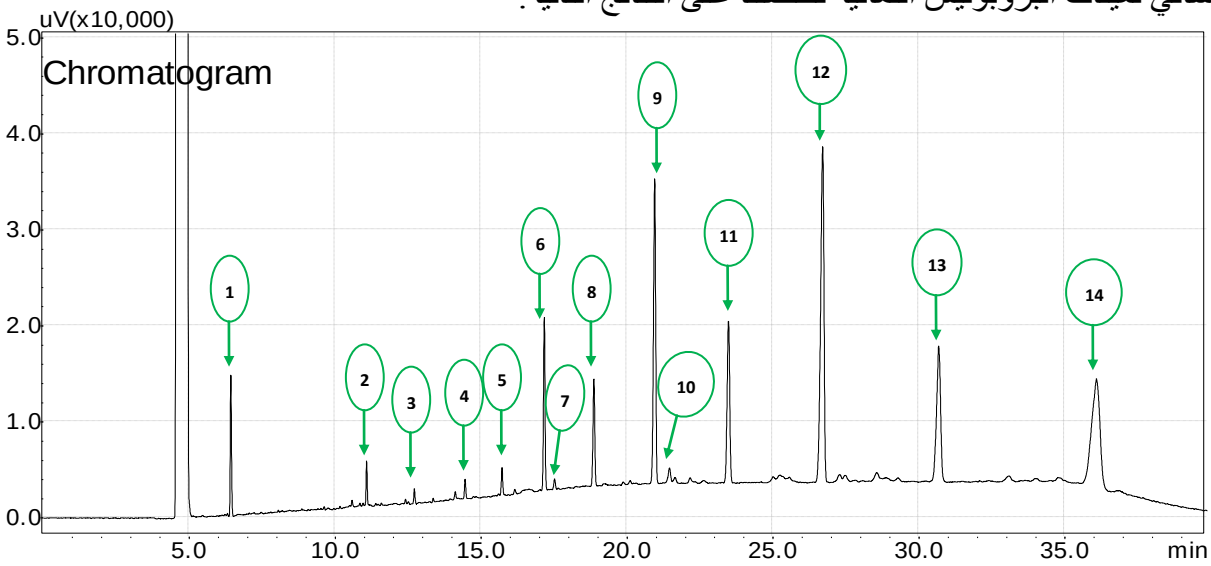
وبالرجوع للمعطيات المتعلقة بالمناخ وكثافة الغطاء النباتي وفصل الجني والكثافة السكانية وتواجد المنشآت الملوثة، نلاحظ أن هاته العوامل لا تؤثر بشكل محسوس على غنى البروبوليس بالأحماض الفينولية والفلافونويدات، وقد يرجع سبب غنى البروبوليس إلى نوعية الغطاء النباتي في حد ذاته، حيث أن عينتين **PR3** و**PR4** المأخوذتين من منطقة بومرداس المعروفة بانتشار نبتة الزعتر البري فيها وهو نبات مستعمل بكثرة عند التداوي بالأعشاب، كما أن العينة **PR8** المأخوذة من منطقة الوادي المعروفة بانتشار النباتات الطبية بها بكثرة، وكذلك العينة **PR6** المأخوذة من منطقة خنشلة المعروفة عنها أنها منطقة رعوية ومصدر مهم من النباتات الطبية.

وبالرجوع للفوائد الطبية والوقائية للبروبوليس، خاصة ما تعلق بأبحاث السرطان التي أكدت على قدرة أحماض ألكافييك الموجودة في البروبوليس على تثبيط نمو الخلايا السرطانية، إذ يعمل على تعزيز قدرات جهاز المناعة بشكل عام والخلايا الليمفاوية بشكل خاص، وتحثها على إفراز العامل المضاد والذي يقضي على الخلايا المصابة بالسرطان، فأحماض الكافييك تختار الخلايا المصابة بالسرطان وتتلفها أو تمنع انتشارها دون أن تُلحق أي ضرر بالخلايا السليمة، على عكس الأدوية التي تقضي على الخلايا المصابة والسليمة على حد سواء، فإننا نجده بكميات في كل من العينات المأخوذة من المناطق التالية: تيزي وزو، وميلة وجيجل، وبومرداس وتلمسان أي على الشريط الساحلي للوطن.

كما لاحظنا أن كل العينات المدروسة تحتوى على مركبات كيميائية غير معرفة لدينا ظهرت على الكروماتوغرام الخاص بكل عينة (أنظر الملاحق).

III.7.2.تعريف بعض الأحماض الدهنية بالكروماتوغرافيا الغازية (CPG):

بعد فصل الأسترات المكافئة للأحماض الدهنية المتحصل عليهاعبر عملية الأسترة للمستخلص الهكساني لعينات البروبوليس الثمانية تحصلنا على النتائج التالية:



الشكلIII.6. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR6

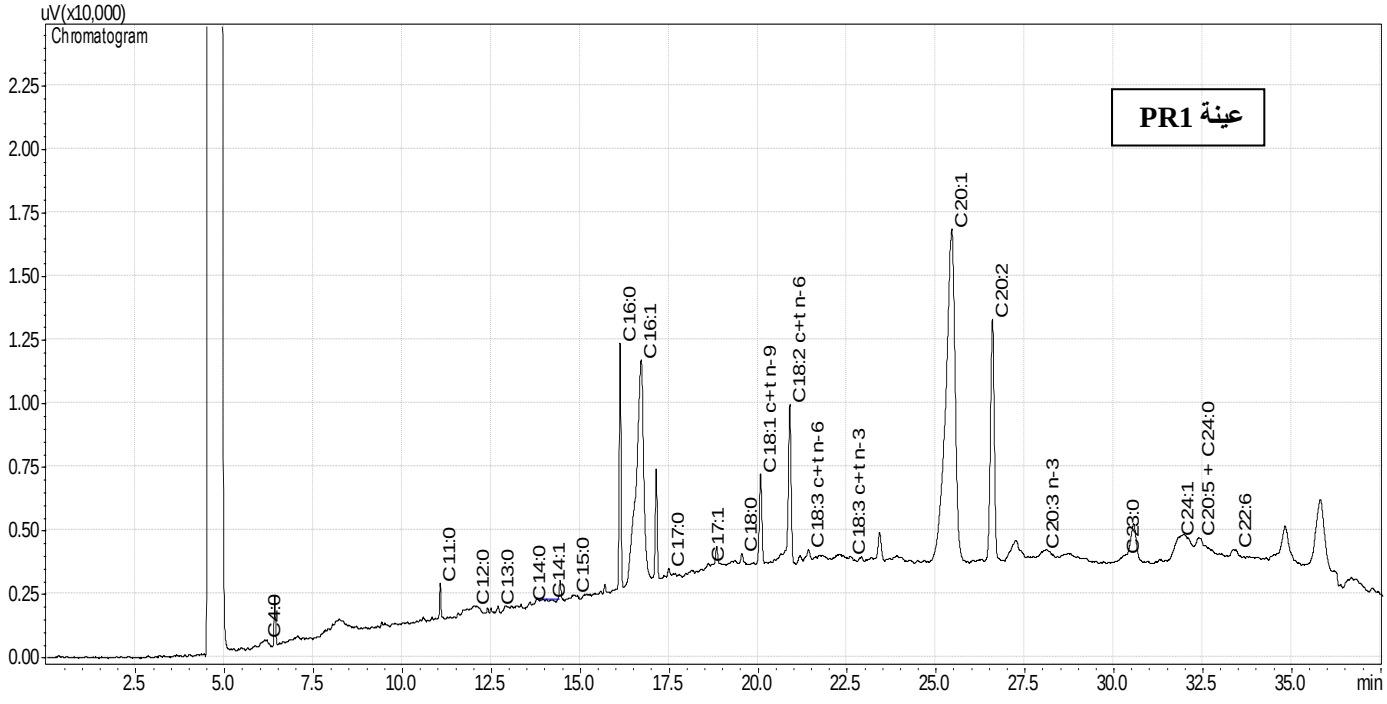
و(الجدولIII.3.) يوضح زمن الاحتجاز لكل أستر مكافئ مساحة كل نتوء ثم ارتفاعه ونسبة الأستر المكافئ بالنسبة للكتلة الكلية التي تم حقنها وتسمية، المركب ورقم النتوء الممثل للأستر المكافئ على الكروماتوغرام (CPG) أعلاه.

الجدول III.3. نتائج كروماتوغرام CPG لفصل الأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية المتواجدة في العينة PR6

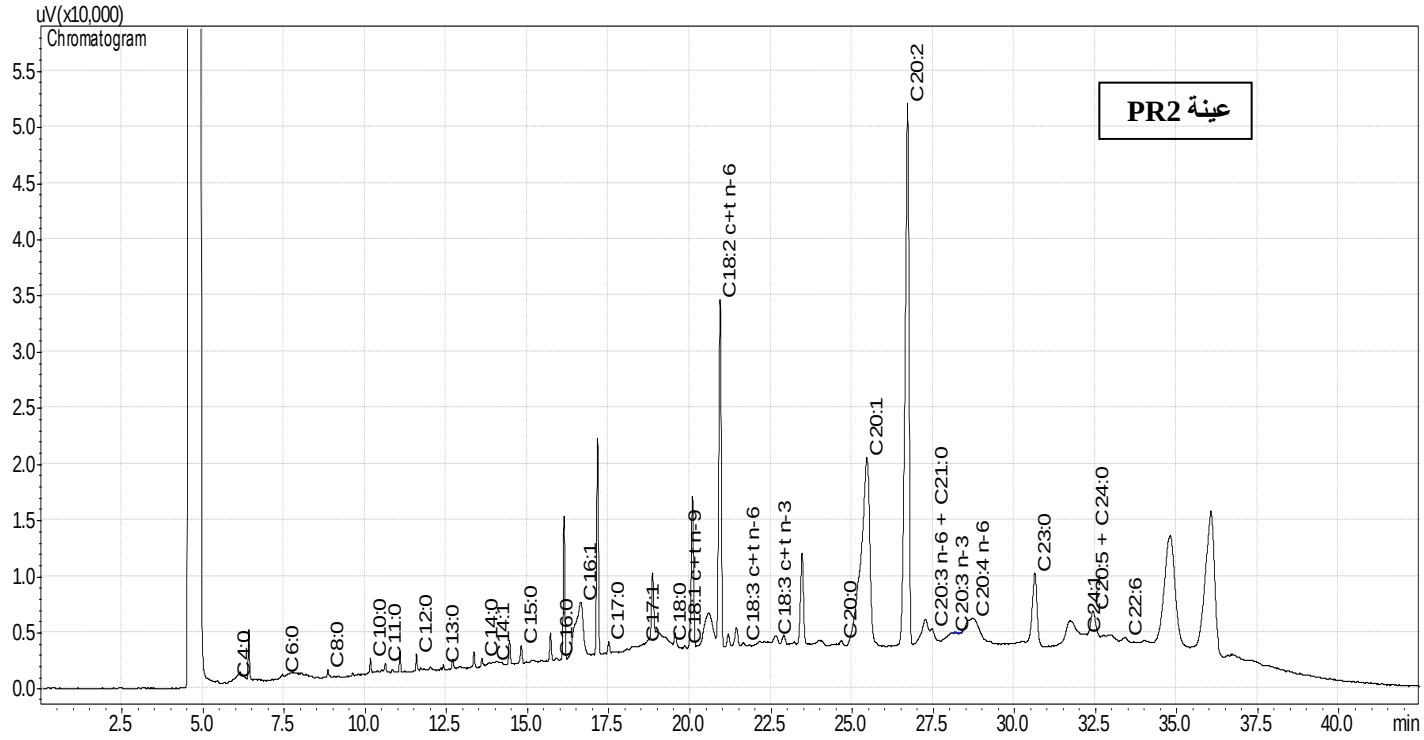
رقم النتوء	التسمية	التركيز	علو النتوء	مساحة النتوء	زمن الاحتجاز
غير مرقم	المذيب	98.10630	44439969.10	203076408.20	4.613
غير مرقم	المذيب	0.64820	919852.80	1341744.10	4.751
غير مرقم	المذيب	0.66220	632730.00	1370727.90	4.869
1	غير معرّف	0.01986	14698.60	41100.50	6.423
غير مرقم	غير معرّف	0.00050	337.30	1044.10	9.622
غير مرقم	C10:0	0.00058	216.70	1208.80	9.756
غير مرقم	غير معرّف	0.00107	712.90	2215.80	10.576
غير مرقم	C11:0	0.00052	367.10	1086.60	10.843
2	غير معرّف	0.00640	4708.60	13254.20	11.074
غير مرقم	C13:0	0.00061	489.10	1269.60	12.408
3	غير معرّف	0.00235	1627.60	4866.30	12.711
غير مرقم	C14:0	0.00066	458.30	1355.90	13.356
غير مرقم	C14:1	0.00120	747.70	2474.70	14.112
4	C15:0	0.00307	2033.70	6345.80	14.449
5	غير معرّف	0.00477	2879.30	9874.90	15.714
غير مرقم	C16:0	0.00122	573.80	2528.20	16.152
غير مرقم	C16:1	0.00137	366.20	2826.00	16.435
غير مرقم	غير معرّف	0.00114	398.70	2358.90	16.515
غير مرقم	غير معرّف	0.00113	429.70	2330.50	16.633
غير مرقم	غير معرّف	0.00089	318.50	1835.30	16.739
غير مرقم	غير معرّف	0.00062	226.80	1274.60	17.011
6	غير معرّف	0.03283	18100.40	67963.90	17.161
7	C17:0	0.00235	1186.10	4874.60	17.514
8	غير معرّف	0.02293	11158.40	47456.90	18.859
غير مرقم	C18:0	0.00069	167.40	1429.20	19.241
غير مرقم	C18:1 c+t n-9	0.00085	324.70	1759.80	19.865
غير مرقم	غير معرّف	0.00090	375.40	1860.10	20.103
9	C18:2 c+t n-6	0.07915	31730.30	163834.20	20.943
10	غير معرّف	0.00479	1613.30	9919.50	21.450
غير مرقم	C18:3 c+t n-6	0.00186	610.10	3844.00	21.638
غير مرقم	غير معرّف	0.00174	560.20	3598.20	22.155
غير مرقم	C18:3 c+t n-3	0.00133	298.70	2760.60	22.652
11	غير معرّف	0.05058	16855.20	104701.00	23.470
غير مرقم	غير معرّف	0.00185	476.00	3819.50	25.002
غير مرقم	C20:1	0.00234	511.70	4836.20	25.244

غير مرقم	غير معرّف	0.00066	294.80	1357.50	25.339
غير مرقم	غير معرّف	0.00049	210.10	1018.90	25.555
12	C20:2	0.13577	34980.40	281029.80	26.699
غير مرقم	غير معرّف	0.00356	779.00	7365.80	27.279
غير مرقم	C20:3 n-6 + C21:0	0.00290	677.10	5993.50	27.462
غير مرقم	C20:3 n-3	0.00290	693.90	6007.00	28.554
غير مرقم	C20:4 n-6	0.00062	187.70	1289.00	28.874
غير مرقم	غير معرّف	0.00149	364.00	3076.70	29.279
13	C23:0	0.06615	14204.50	136926.50	30.672
غير مرقم	غير معرّف	0.00392	617.20	8124.50	33.088
غير مرقم	C22:6	0.00089	287.20	1844.20	33.982
غير مرقم	غير معرّف	0.00063	251.60	1295.30	34.052
غير مرقم	غير معرّف	0.00136	360.80	2820.80	34.759
غير مرقم	غير معرّف	0.00050	273.60	1029.30	34.865
14	غير معرّف	0.10934	11345.20	226331.30	36.075

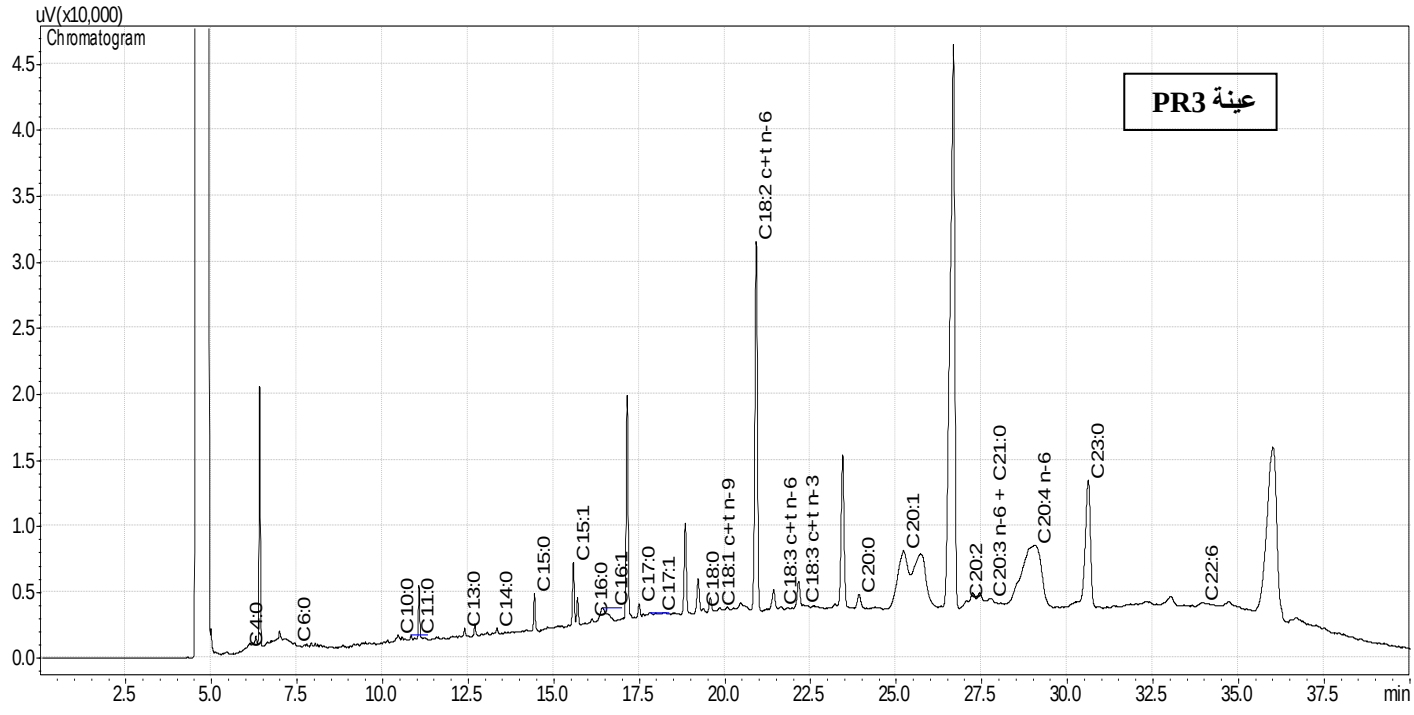
والأشكال التالية توضح نتائج كروماتوغرام CPG لفصل الأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية المتواجدة في بقية العينات:



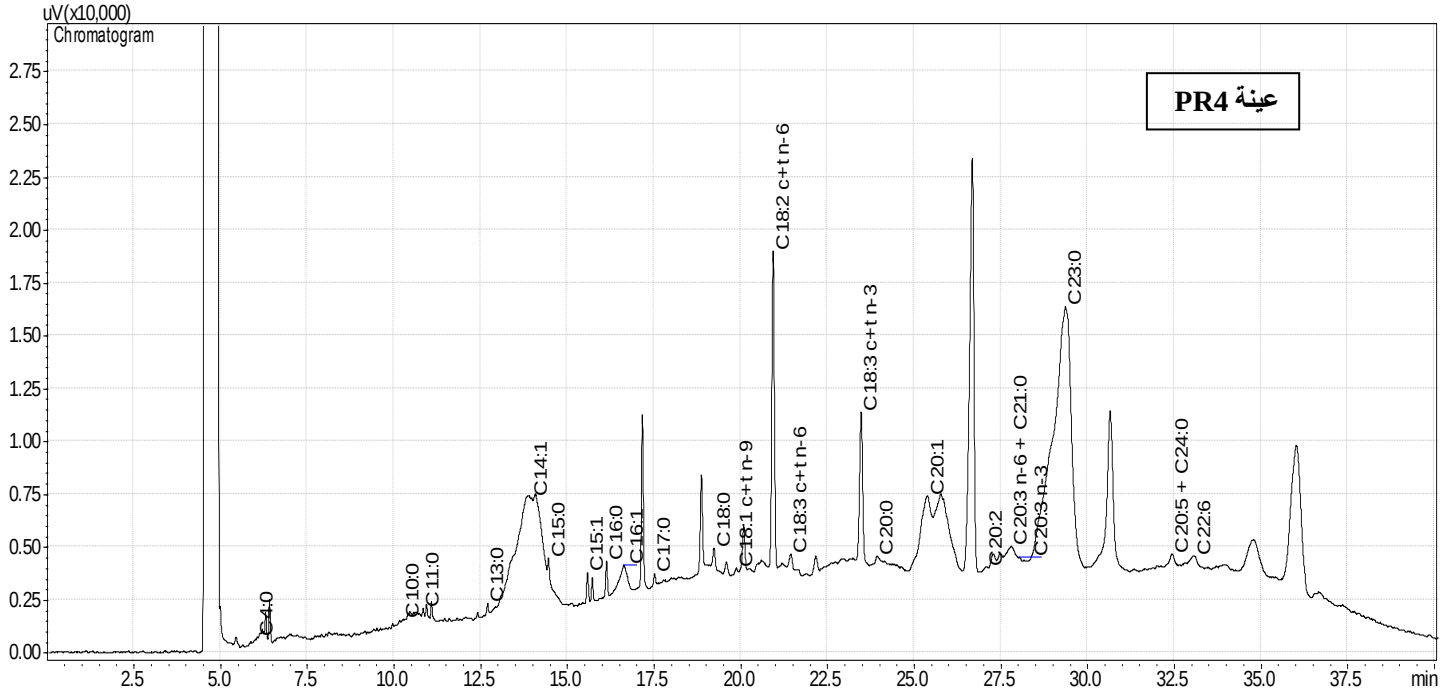
الشكلIII.7. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR1



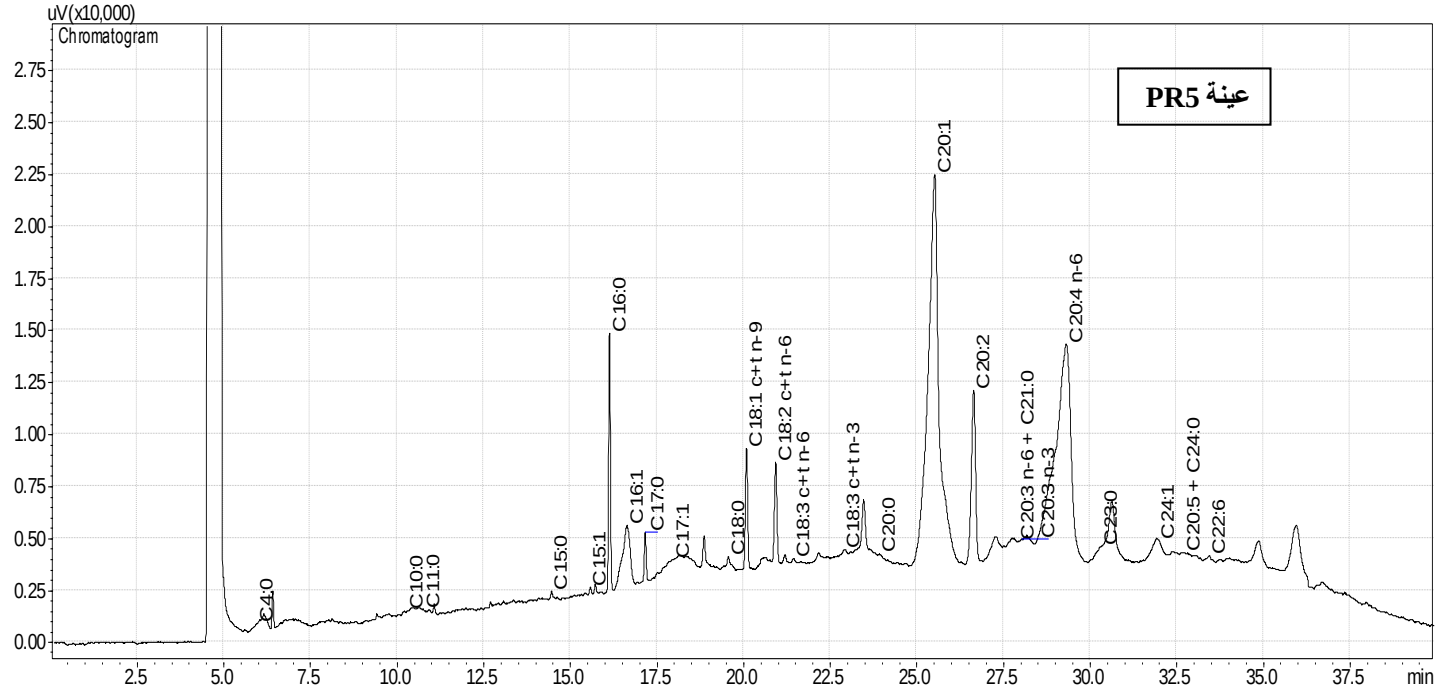
الشكلIII.8. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR2



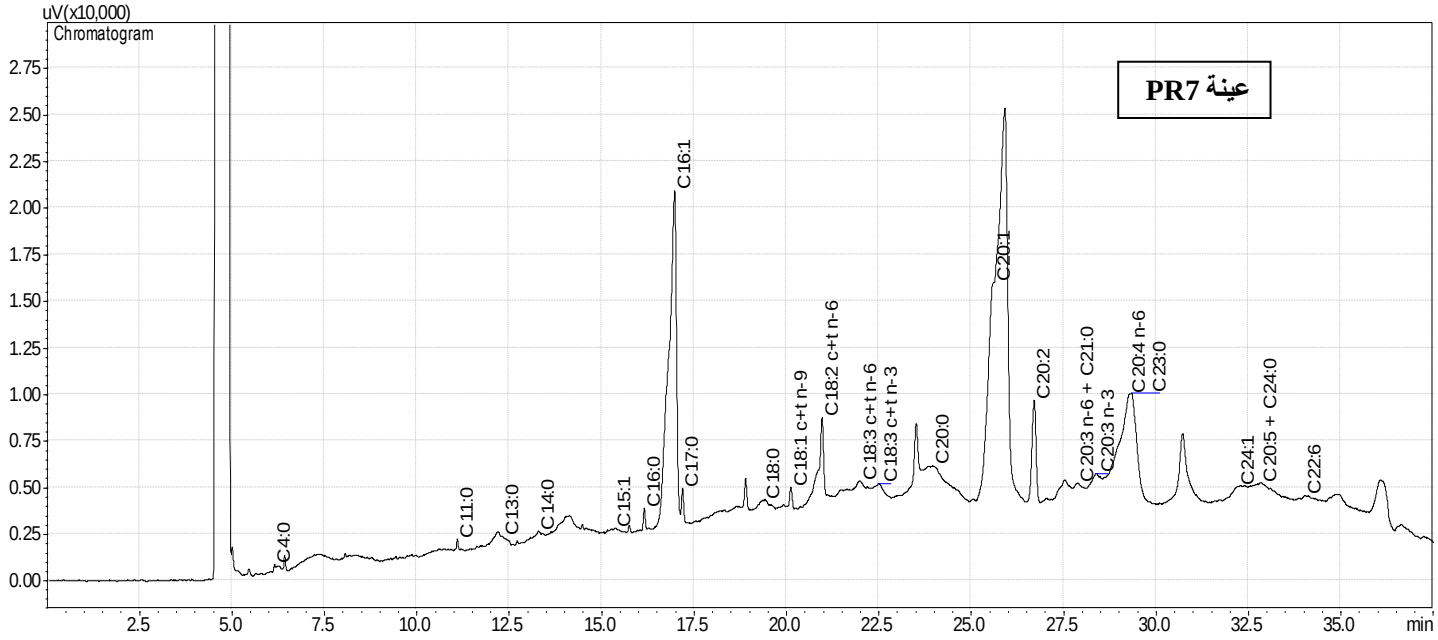
الشكلIII.9. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR3



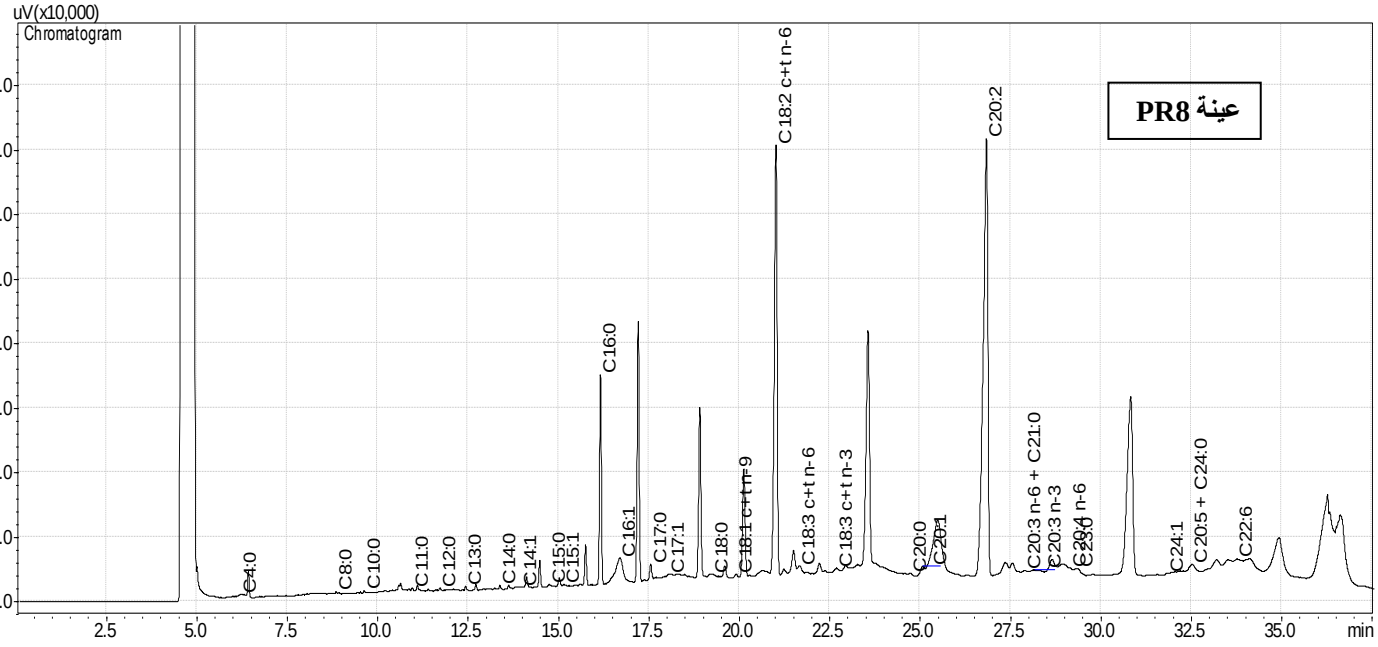
الشكلIII.10. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR4



الشكلIII.11. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR5



الشكلIII.12. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR7



الشكلIII.13. كروماتوغرام CPG للأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية للعينة PR8

ونلخص نتائج تحليل أسترات الميثيل للأحماض الدهنية في **الجدول 4.III**. والقيم التي يحتويها الجدول هي النسبة المئوية الكتلية للحمض الدهني بالنسبة لكتلة العينة المحقونة داخل جهاز (CPG).

PR8	PR7	PR6	PR5	PR4	PR3	PR2	PR1	نوع الحمض / العينة
0.10	0.09	X	0.15	0.11	0.12	0.06	0.05	C4:0
X	X	X	X	X	0.06	0.05	X	C6:0
0.04	X	X	X	X	X	0.10	X	C8:0
0.04	X	0.06	0.08	0.06	0.08	0.19	X	C10:0
0.04	0.10	0.05	0.06	0.15	0.05	0.16	0.21	C11:0
0.07	X	X	X	X	X	0.20	0.06	C12:0
0.09	0.20	0.06	X	0.08	0.12	0.05	0.06	C13:0
0.06	0.10	0.07	X	X	0.06	0.11	0.06	C14:0
0.04	X	0.12	X	0.79	X	0.10	0.06	C14:1
0.07	X	0.31	0.10	1.00	0.37	0.27	0.06	C15:0
0.04	0.09	X	0.10	0.25	0.75	X	X	C15:1
3.71	0.22	0.12	2.37	0.30	0.07	0.05	1.78	C16:0
1.92	14.58	0.14	2.50	0.98	0.52	3.45	6.91	C16:1
0.32	0.43	0.24	0.47	0.12	0.17	0.16	0.10	C17:0
0.04	X	X	0.06	X	0.06	0.06	0.06	C17:1
0.10	0.19	0.07	0.21	0.22	0.08	0.07	0.09	C18:0
0.08	0.30	0.09	1.42	0.09	0.06	0.04	0.93	C18:1 c+t n-9
12.01	1.50	7.92	1.30	3.63	6.20	6.90	1.49	C18:2 c+t n-6
0.28	0.27	0.19	0.06	0.19	0.07	0.05	0.16	C18:3 n-6
0.29	0.20	0.13	0.14	2.12	0.05	0.22	0.06	C18:3 n-3
0.04	0.41	X	0.07	0.12	0.31	0.12	X	C20:0
0.41	8.28	0.23	22.62	3.66	3.85	13.21	12.86	C20:1 n-9
19.71	2.33	13.58	3.73	0.06	0.15	16.86	3.82	C20:2 n-6
0.04	0.10	0.29	0.22	0.75	0.09	0.48	0.07	C20:3 n-6 + C21:0
0.04	0.57	0.29	0.30	0.05	X	0.07	X	C20:3 n-3
0.19	6.51	0.06	18.83	X	3.84	1.07	X	C20:4 n-6
0.24	3.26	6.62	0.45	21.59	3.99	2.63	0.13	C23:0
0.03	0.13	X	0.27	X	X	0.25	0.07	C24:1 n-9
0.36	0.10	X	0.05	0.27	X	1.63	0.11	C20:5 n-3 + C24:0
0.96	0.09	0.09	0.07	0.33	0.09	0.19	0.07	C22:6 n-3
4.888	4.997	7.585	3.956	23.741	5.479	4.226	2.599	نسبة الأحماض الدهنية المشبعة
36.43	35.05	23.12	51.67	13.16	15.71	44.58	26.67	نسبة الأحماض الدهنية الغير مشبعة
7.45	7.01	3.05	13.06	0.55	2.87	10.55	10.26	نسبة الأحماض الدهنية الغير مشبعة إلى الأحماض الدهنية المشبعة

الجدول 4.III. نتائج تحليل الأسترات الميثيلية المكافئة للأحماض الدهنية بكروماتوغرام CPG للعينات المدروسة

من خلال **الجدول 4.III**. نلاحظ وجود تباين واضح في نسبة الأحماض الدهنية المشبعة والأحماض الدهنية غير المشبعة، فالأحماض الدهنية الغير مشبعة هي المكون الغالب في معظم العينات، حيث تراوحت نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة بين القيمتين 13.16 % و 51.67 %.، بينما نسبة الأحماض الدهنية المشبعة فلم تتعدى نسبة 23.74 % وكانت أقل نسبة لها هي 2.59 % .

وبحساب نسبة الأحماض الدهنية الغير مشبعة إلى الأحماض الدهنية المشبعة فهي تصل إلى حوالي 13 ضعف عند العينة **PR5** المأخوذة من منطقة تلمسان. ويمكن ترتيب عينات البروبوليس المدروسة بحسب هاته النسبة كالتالي **PR5 >PR2 >PR1> PR8 >PR7> PR6> PR3> PR4**.

كما لاحظنا أن كل العينات المدروسة تحتوى على مركبات كيميائية غير معرفة لدينا ظهرت على الكروماتوغرام الخاص بكل عينة.

يحتاج جسم الإنسان لجميع أنواع الدهون المشبعة أو غير المشبعة لكن جسم الإنسان لا يستطيع إنتاج الأحماض الدهنية غير المشبعة ذاتياً على عكس الدهون المشبعة والتي يستطيع جسم الإنسان تحول فائض السعرات الحرارية إليها ويخزنها على هيئة شحوم. ويمكن اعتبار العينات المدروسة مصدرا للإنسان يمّكنه من تعويض حاجته من الدهون غير المشبعة.

الخاتمة

اهتمت دراستنا بتثمين منتوج البروبوليس من مختلف مناطق الجزائر، وذلك بدراسة المستخلصات الفينولية والفلافونويدية لمختلف العينات، ودراسة فاعليتها المضادة للأكسدة وكذا دراسة مكوناتها الكيميائية الأساسية.

حيث أنجزت هذه الدراسة بمخبر ترقية وتكنولوجيا الموارد الصحراوية (VTRS) بجامعة الشهيد حمّه لخضر الوادي وتحت إشراف الأستاذ: **عبد الكريم ربيعي** أستاذ مساعد (أ) بجامعة الشهيد حمّه لخضر الوادي.

وأول خطوات الدراسة هي استخلاص الليبيدات والفينولات والفلافونويدات من عينات البروبوليس المدروسة، التي تراوح مردود استخلاصها ما بين 71-16 % بالنسبة لليبيدات وما بين 66-16 % للفينولات والفلافونويدات، ومنه يمكن تصنيف البروبوليس كمصدر أساسي لهاتين المادتين.

وبغية تثمين هاتين المادتين تمت الدراسة التقديرية للفينولات والفلافونويدات وكذا فاعليتها المضادة للأكسدة، والتعرف على أهم المركبات الكيميائية لليبيدات، فتحصلنا على النتائج التالية:

تم تقدير كمية الفينولات بواسطة طريقة (Singleton Rossi) بمساعدة كاشف الفولين، وجدنا أن أعلى مقدار لها (326.41 mg/g) وكانت في العينة المأخوذة من منطقة تيزي وزو، وهي قيمة معتبرة جدا.

وكذا تقدير كمية الفلافونويدات باستعمال طريقة ((Woisky and salatino (1998)، وجدنا أن أعلى مقدار لها (163.11 mg/g) وكانت في العينة المأخوذة من منطقة ميلة وجيجل.

وبدراسة الفاعلية المضادة للأكسدة، خلصنا إلى أن هناك ترابط واضح بين كمية الفينولات والفلافونويدات والفاعلية المضادة للأكسدة للعينات المدروسة، حيث أن أعلى فاعلية سجلتها العينة المأخوذة من منطقة (تيزي وزو) وتليها العينة المأخوذة من منطقة (ميلة وجيجل)، فيما تذيل الترتيب العينات المأخوذة من منطقة (بومرداس).

وبتحليل العينات عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، أسفر هذا التحليل على ثراء عينات البروبوليس المدروسة بالمركبات الفينولية، ذات النوعية والجودة العالية .

كما أن نتائج تحليل الليبيدات بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية أعطت نتائج مهمة، حيث أن نسبة الدهون غير المشبعة بلغت نسب عالية، وأعلاها كان لحمض الغادولييك بنسبة 22.62 %، وهو مركب من مجموعة الأوميغا 9، وهي مركبات يبحث الإنسان دائما على مصادرها، على اعتبار أن جسمه يحتاجها وفي نفس الوقت غير قادر على تصنيعها.

ومما سبق نستنتج أن أجود عينة من العينات المدروسة هي المأخوذة من منطقة تيزي وزو تليها تلك المأخوذة من منطقة ميلة وجيجل.

وفي ختام دراستنا فإننا نوصي بتربية النحل في مناطق الساحلية، حيث يسود مناخ البحر الأبيض المتوسط، المتميزة بغطاء نباتي كثيف ومتنوع، بعيدا عن المنشآت الملوثة والمناطق الصناعية وبعيدا عن التجمعات السكانية ذات الكثافة العالية، وأفضل وقت لجني محصول البروبوليس خلال نهاية فصل الشتاء، وعلى اعتبار أن خلية نحل مجتمعة تنتج كميات هزيلة من هاته المادة المهمة من الناحية العلاجية، حيث تتراوح ما بين10g إلى 30g في السنة، نوصي بالإكثار من المناحل المنتجة وكذا تأهيل وتدريب المربين على جني البروبوليس بأكبر قدر ممكن، للحصول على كمية معتبرة من البروبوليس ذو الجودة العالية.

وكما نوصي بإجراء المزيد من البحوث للكشف عن المزيد من المركبات التي لم نتمكن من تعريفها خلال هاته الدراسة، و المزيد من البحوث الطبية والبيولوجية والصيدلانية المتخصصة، لتثمين البروبوليس الجزائري، وكيفية استغلاله في العلاج والوقاية من مختلف الأمراض المستعصية، التي أثبتت البحوث الطبية الحديثة مساهمة البروبوليس كعلاج لها.

المراجع

المراجع العربية:

1. بن عشورة صبرينة البتول، الفعالية المضادة لأكسدة الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية ل "Deverra scoparia"،مذكرة ماجستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، ماي 2007.
2. أ.د محمد الهادي لعروق، أطلس الجزائر والعالم، دار الهدى عين مليلة الجزائر، طبعة جديدة مزيدة ومنقحة.
3. مصطفى بوقوادة، دراسة فيتوكيميائية للبيبيدات والفينولات في بعض أنواع نوى التمر المحلي، مذكرة ماجستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، ماي 2007.
4. ربيعي عبد الكريم، دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة والمحتوى الفينولي لمنتجات النحل الجزائرية بالطرق الكهروكيميائية، مذكرة دكتوراه في العلوم، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، جوان 2016.

المراجع الأجنبية:

5. **Bankova, V. S., Popov, S. S., &Marekov, N. L. (1982). High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. Journal of Chromatography A, 242(1), 135-143.**

6. **Makashvili,Z. A.(1978) From the history of propolis. In Remarkable hive product :Propolis. Scientific data and suggessions concerning its composition, propertiesand possible use in therapeutics.APIMONDIA standing Commission onBeekeeping technology and Equipment, Bucharest.**

7. **Melliou, E., Stratis, E., &Chinou, I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece–Antimicrobial activity. Food chemistry, 103(2), 375-380.**

8. **Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, 26(2), 83-99.**

9. **Castaldo, S., &Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73, S1-S6.**

10. **Vanhaelen, M., &VanhaelenFastré, R. (1979). Propolis. I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. Journal de pharmacie de Belgique, 34(5), 253-259.**

11. **J. Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., &Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry, 101(4), 1383-1392.**

12. **Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., &Simonetti, P. (2007). Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–**

tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 45(3), 390-399.

13. Bankova, V. S., de Castro, S. L., &Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 31(1), 3-16.

14. Krell R. Value-addedproductsfrombeekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin Nº. 124. Rome 1996.

15. da Silva, F. C., da Fonseca, C. R., de Alencar, S. M., Thomazini, M., de Carvalho Balieiro, J. C., Pittia, P., &Favaro-Trindade, C. S. (2013). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. Food and Bioproducts Processing, 91(1), 28-36.

16. Bankova, V. S., Popov, S. S., &Marekov, N. L. (1983). A study on flavonoids of propolis [A resinous hive product collected by bees, is known to have been used in folk medicine as early as 300 BC, Bulgaria]. Journal of natural products (USA), 46, 471

17. St. Nikolov, E. Georgieva, V. Vasilev, S. Todorov and S. Drianska, in Proceedings of The International Congress of Apiculture, Grenoble, 8-14 Sptember 1975, Apimondia, Bucharest, 1976, p. 235.

18. Nakamura, S., & Miyake, T. (1996). U.S. Patent No. 5,561,116. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

19. Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., &Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. Journal of Ethnopharmacology, 86(1), 69-73.

20. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of ethnopharmacology, 64(3), 235-240.

21. Strehl, E., Volpert, R., &Elstner, E. F. (1994). Biochemical activities of propolis-extracts III. Inhibition of dihydrofolate reductase. ZeitschriftfürNaturforschung c, 49(1-2), 39-43.

22. Wang, L., Mineshita, S., Ga, I., Shigematsu, T., &Matsuno, T. (1993). Antiinflammatory effect of propolis. Jpn J PharmacolTher, 24, 223-224.

23. Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. Journal of natural products, 57(5), 644-647.

24. Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J. M., & Franklin, I. (1989). Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. Microbios, 62(250), 19-22

25. Drogovoz, S. M., Tikhonov, A. I., Slyshkov, V. V., &Sal'nikova, S. I. (1993). [The liver-protective properties of the pediatric drug form of propolis in animals of different age groups]. Eksperimental'naiaiklinicheskaiafarmakologiia, 57(4), 39-42.

26. Ahn, M. R., Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., Kamihira, M., Kaji, K., ...& Nakayama, T. (2007). Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. Cancer letters, 252(2), 235-243.

27. Kimoto, T., Arai, S., Aga, M., Hanaya, T., Kohguchi, M., Nomura, Y., & Kurimoto, M. (1996). Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the artepillin C extracted from Brazilian propolis. Gan to kagakuryoho. Cancer & chemotherapy, 23(13), 1855.

28. Chen, C. N., Wu, C. L., & Lin, J. K. (2007). Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanesepropolis. Cancer letters, 245(1), 218-231.

29. Shimizu, K., Das, S. K., Hashimoto, T., Sowa, Y., Yoshida, T., Sakai, T., ...& Kanazawa, K. (2005). Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. Molecular carcinogenesis, 44(4), 293-299.

30. Padmavathi, R., Senthilnathan, P., Chodon, D., &Sakthisekaran, D. (2006). Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7, 12 dimethyl benz (a) anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. Life sciences, 78(24), 2820-2825.

31. Hayacibara, M. F., Koo, H., Rosalen, P. L., Duarte, S., Franco, E. M., Bowen, W. H., ...&Cury, J. A. (2005). In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. Journal of Ethnopharmacology, 101(1), 110-115.

32. Uzel, A., Önçağ, Ö.,Çoğulu, D., &Gençay, Ö. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiological research, 160(2), 189-195.

33. Scheller, S., Dworniczak, S., Waldemar-Klimmek, K., Rajca, M., Tomczyk, A., & Shani, J. (1999). Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-

tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. ZeitschriftfürNaturforschung C, 54(7-8), 549-553.

34. Li, Y. J., Lin, J. L., Yang, C. W., &Yu, C. C. (2005). Acute renal failure induced by a Brazilian variety of propolis. American Journal of Kidney Diseases, 46(6), e125-e129.

35. Noelker, C., Bacher, M., Gocke, P., Wei, X., Klockgether, T., Du, Y., &Dodel, R. (2005). The flavanoidecaffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. Neuroscience letters, 383(1), 39-43.

36. Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H. R., & Uz, E. (2005). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. Clinical Biochemistry, 38(2), 191-196.

37. Hu, F., Hepburn, H. R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S. E., &Daya, S. (2005). Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. Journal of Ethnopharmacology, 100(3), 276-283.

38. Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. Journal of Ethnopharmacology, 102(2), 158-163.

39. Ito, J., Chang, F. R., Wang, H. K., Park, Y. K., Ikegaki, M., Kilgore, N., & Lee, K. H. (2001). Anti-AIDS agents. 48. 1 Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. Journal of Natural Products, 64(10), 1278-1281.

40. Park YK, Paredez-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY 2004. Chemical constituents in Baccharis dracunculifoliaas the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis.J Agr Food Chem 52: 1100-1103.

41. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., &Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis, 10(3).

42. Rebiai, A., Lanez, T., &Belfar, M. L. (2011). In vitro evaluation of antioxidant capacity of Algerian propolis by spectrophotometrical and electrochemical assays. Int J Pharmacol, 7, 113-118.

43. Salah Eddine LAOUINI, Etude de la structure chimique et l'activité biologique d'extrait de Phoenix dactylifera L(date Palm) dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf), thèse doctorat, université Mohamed Khider Biskra, soutenue Octobre 2014.

44. Bondet, V., Brand-Williams, W., &Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. LWT-Food Science and Technology, 30(6), 609-615.

45. Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., &Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(5), 1768-1774.

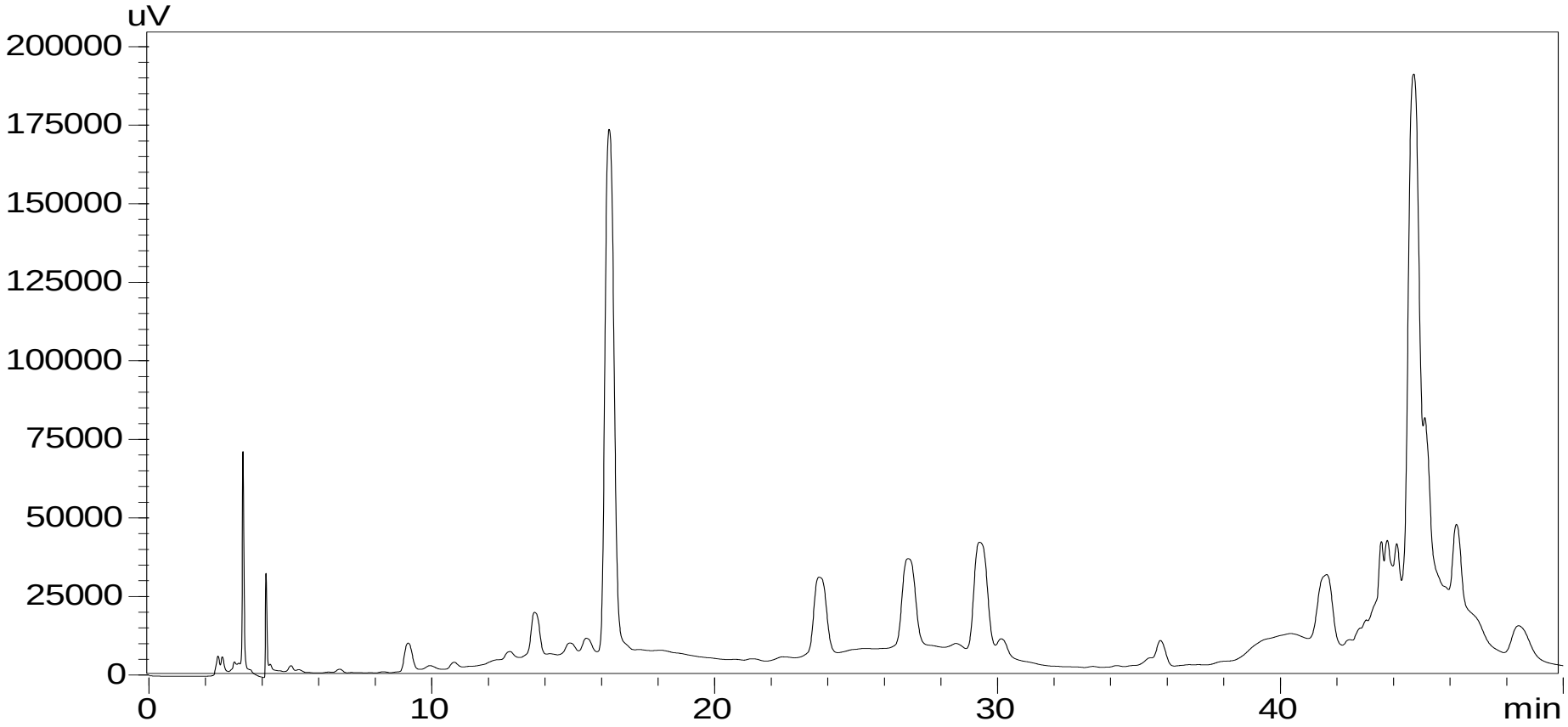
46. Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., ...&Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. Molecules, 17(9), 11199-11215.

47. Rebiai, A., &Lanez, T. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of Apismellifera bee pollen from northwest Algeria. Journal of Fundamental and Applied Sciences, 4(2), 155-163.

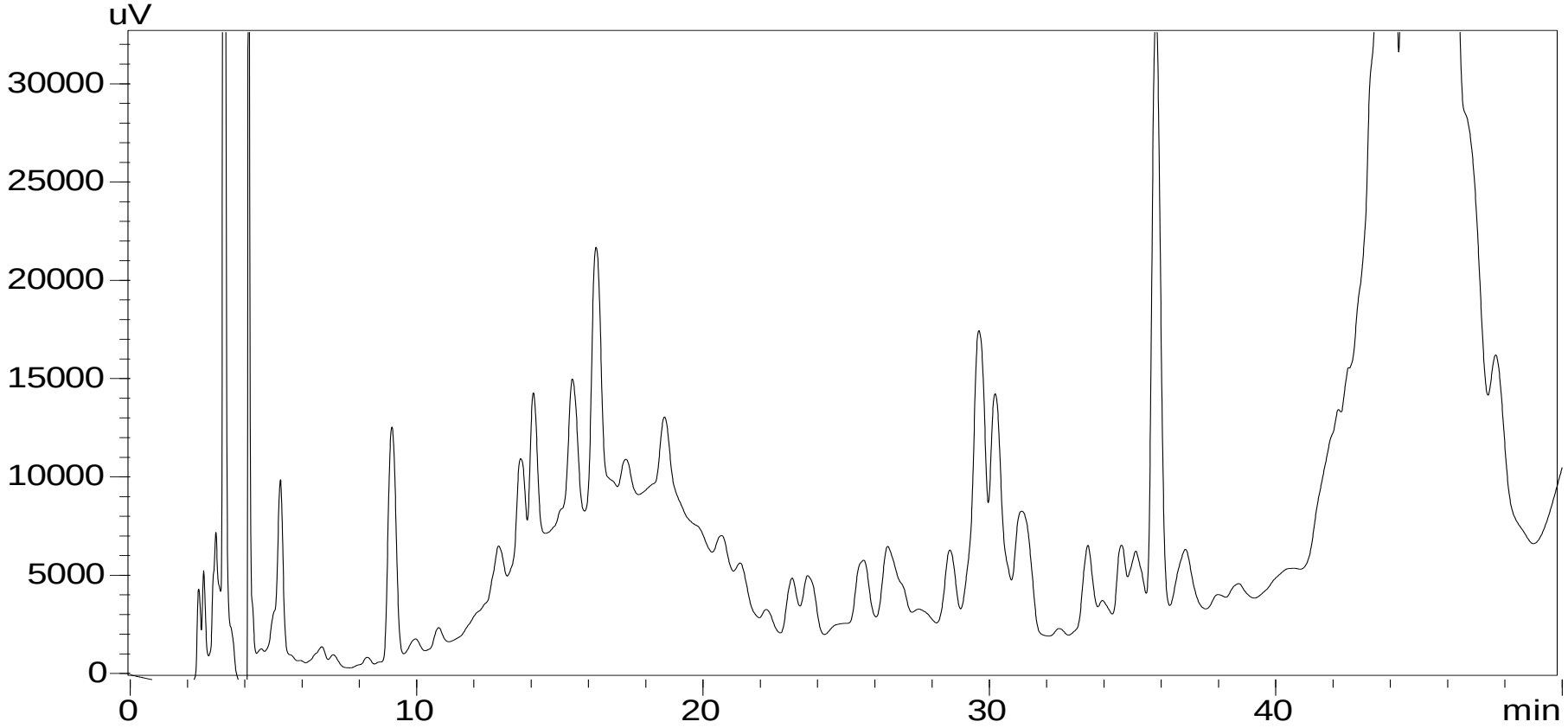
48. Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical biochemistry, 269(2), 337-341.

49. Rebiai, A., Lanez, T., &Belfar, M. L. (2013). Determination of caffeic acid and gallic acid in Algerian bee pollen by HPLC method. 4 Phytochem&BioSub Conference. At Bechar, Algeria.

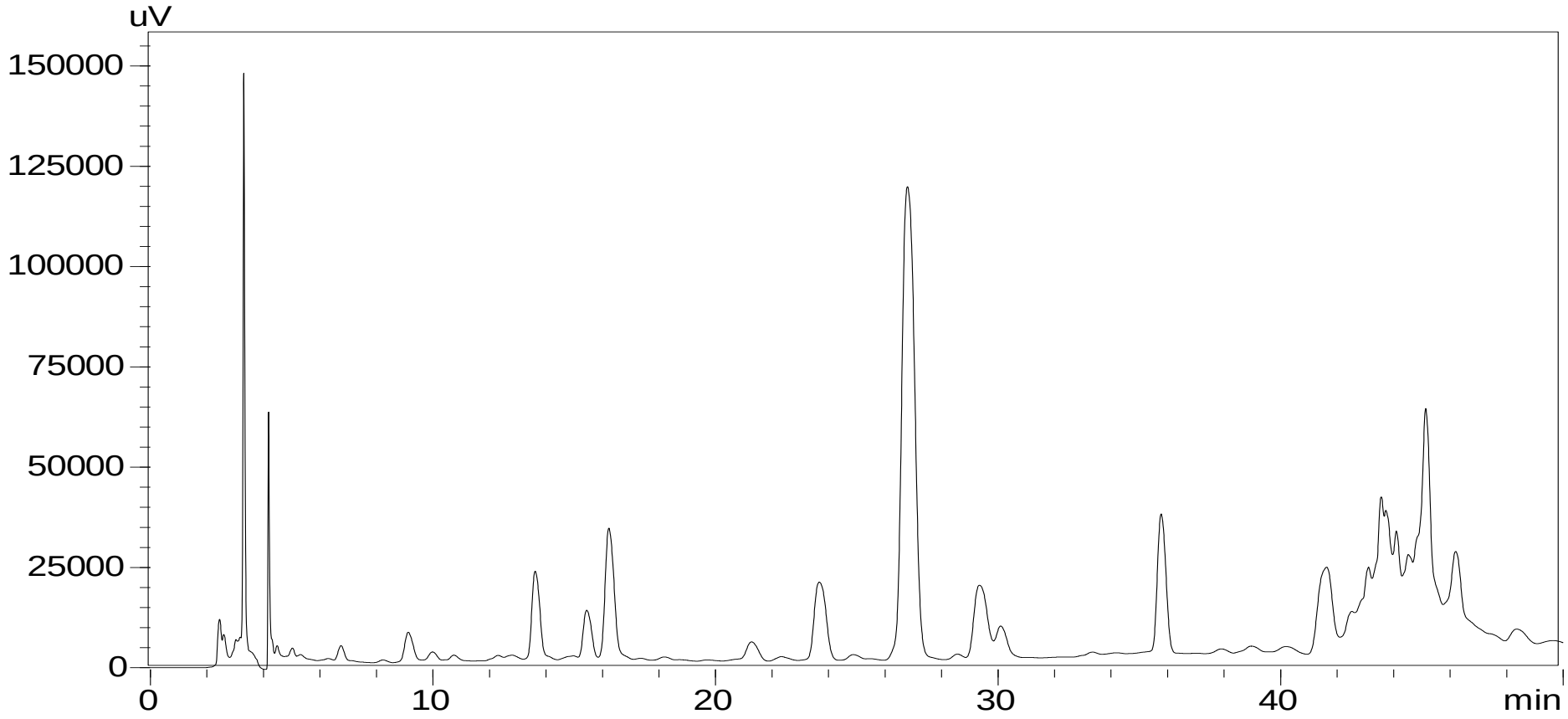
الملاحـــق



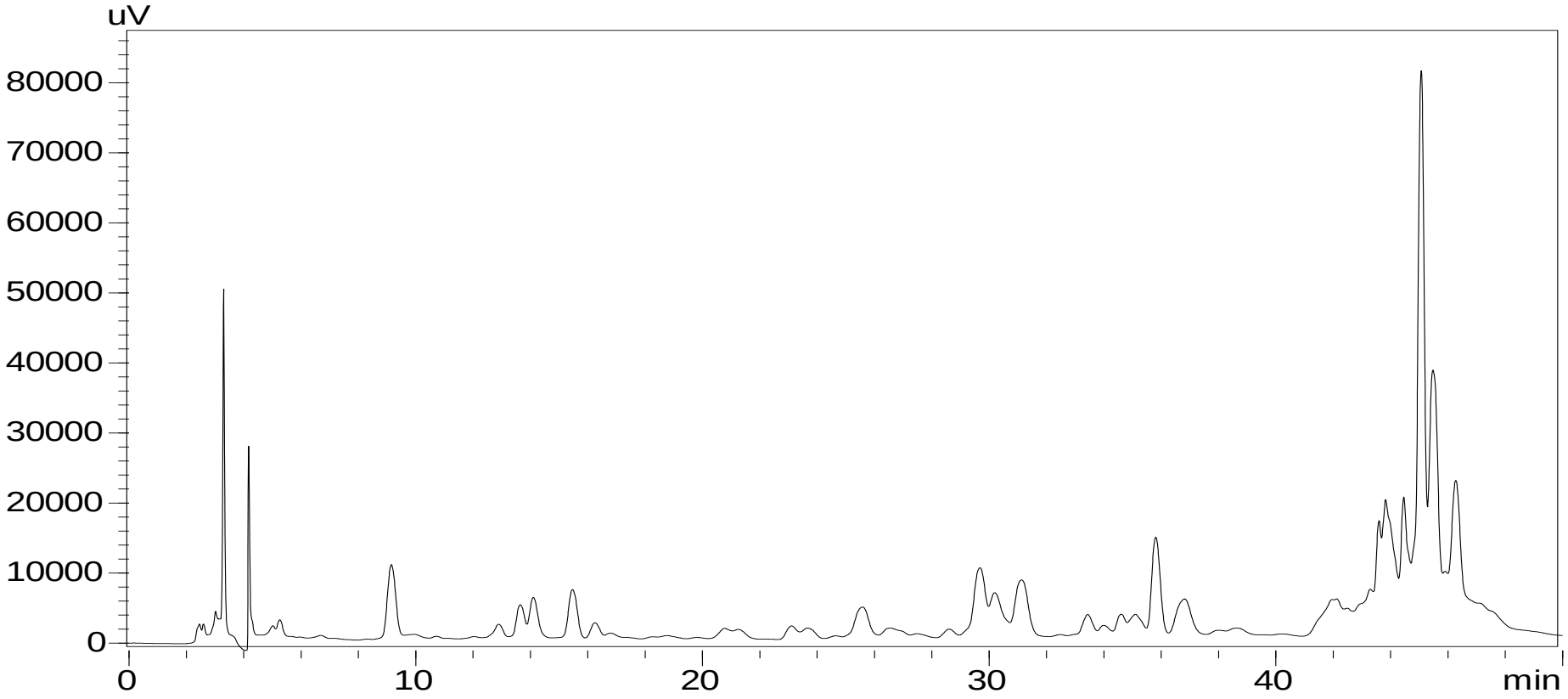
الملحق رقم 1: كروماتوغرام HPLC للعينة PR1 (جيجل - ميلة 2012)



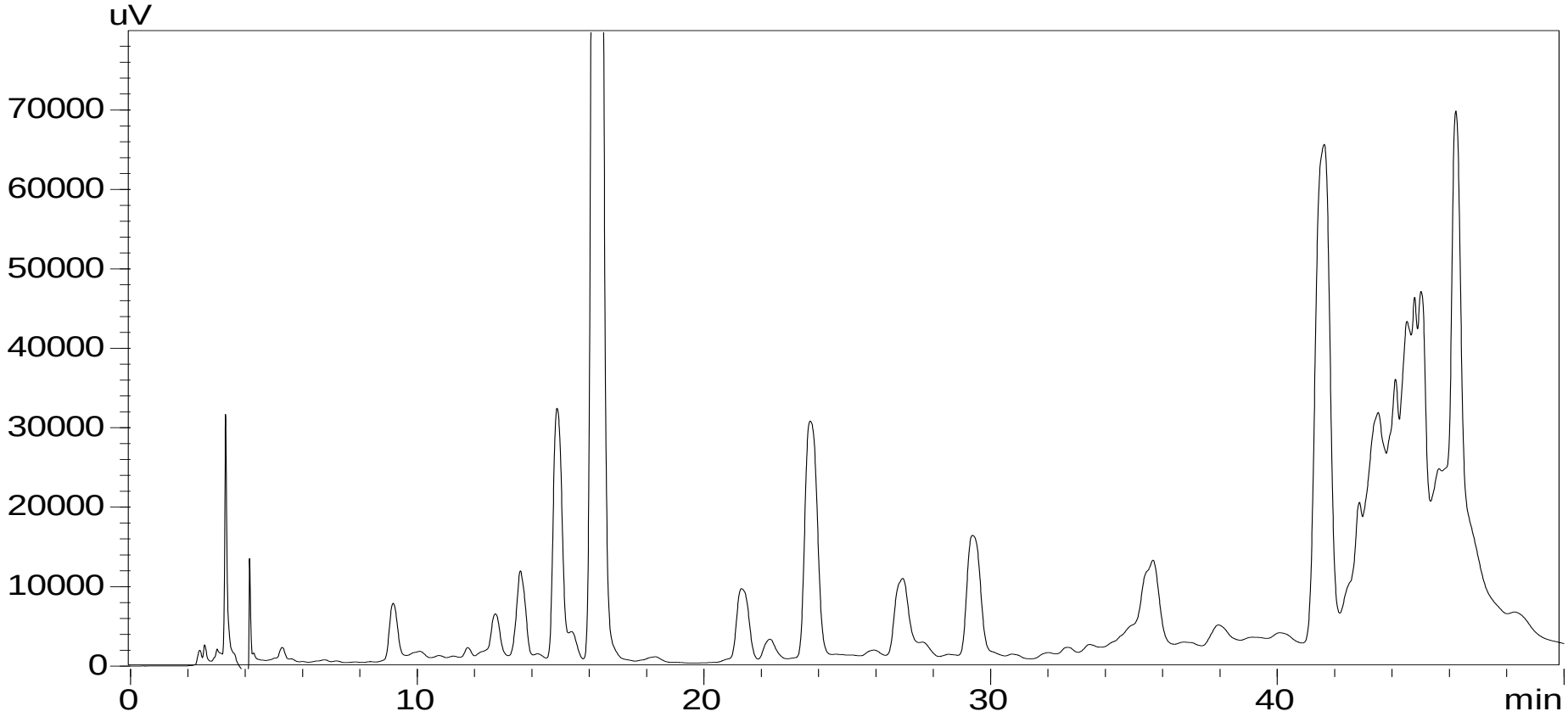
الملحق رقم 2: كروماتوغرام HPLC للعينة PR2 (تيزي وزو ديسمبر 2012)



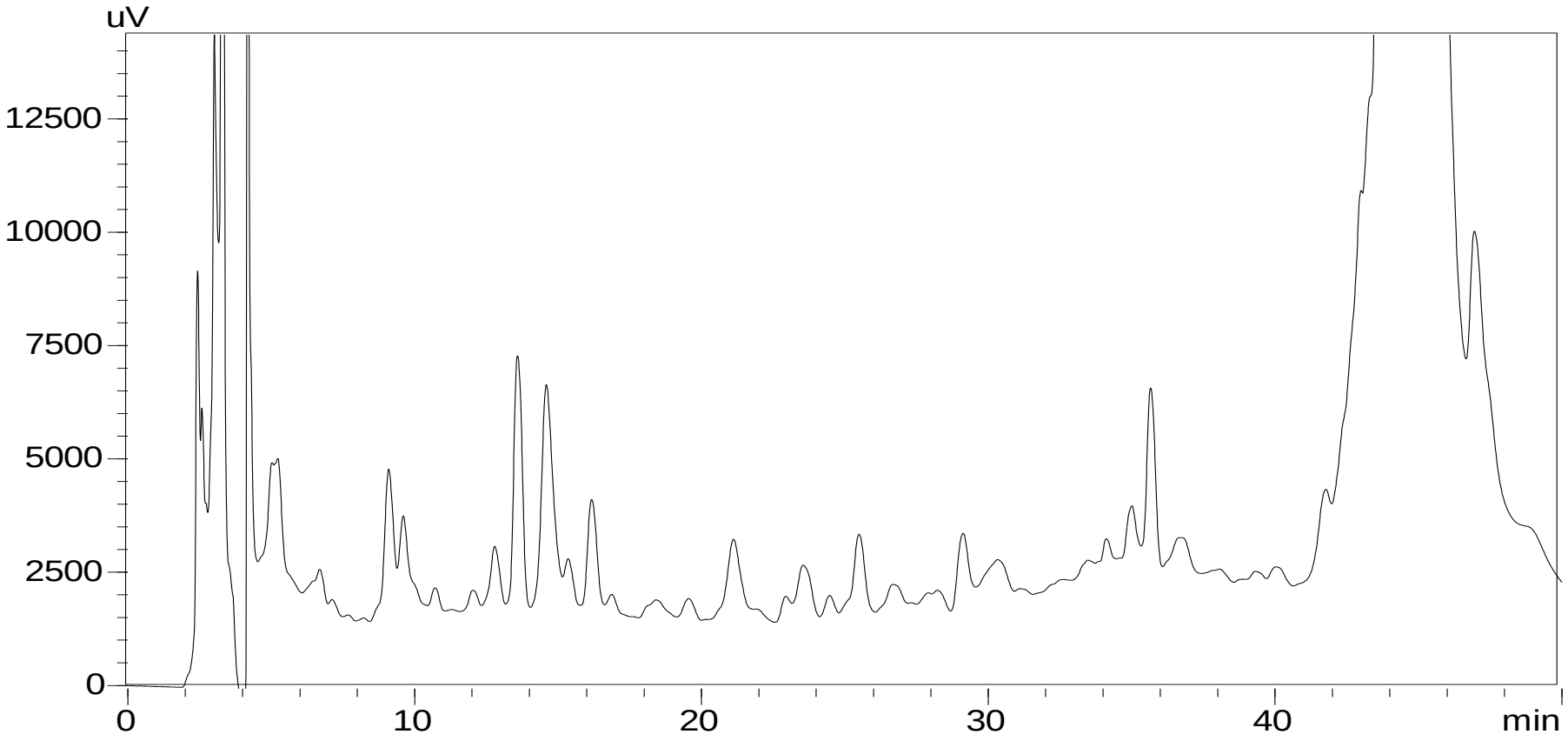
الملحق رقم 3: كروماتوغرام HPLC للعينة PR3 (بومرداس 2011)



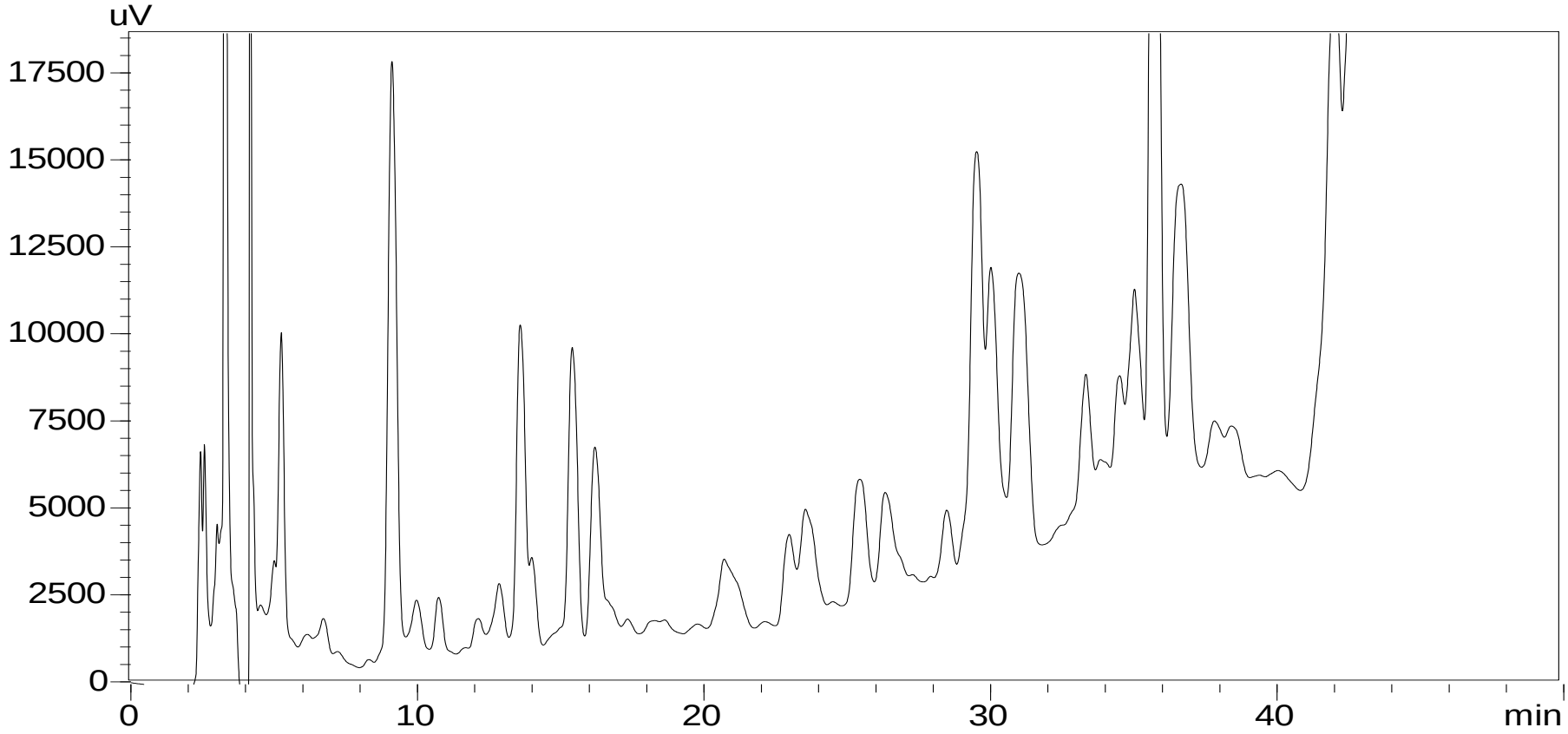
الملحق رقم 4: كروماتوغرام HPLC للعينة PR4 (بومرداس 2012)



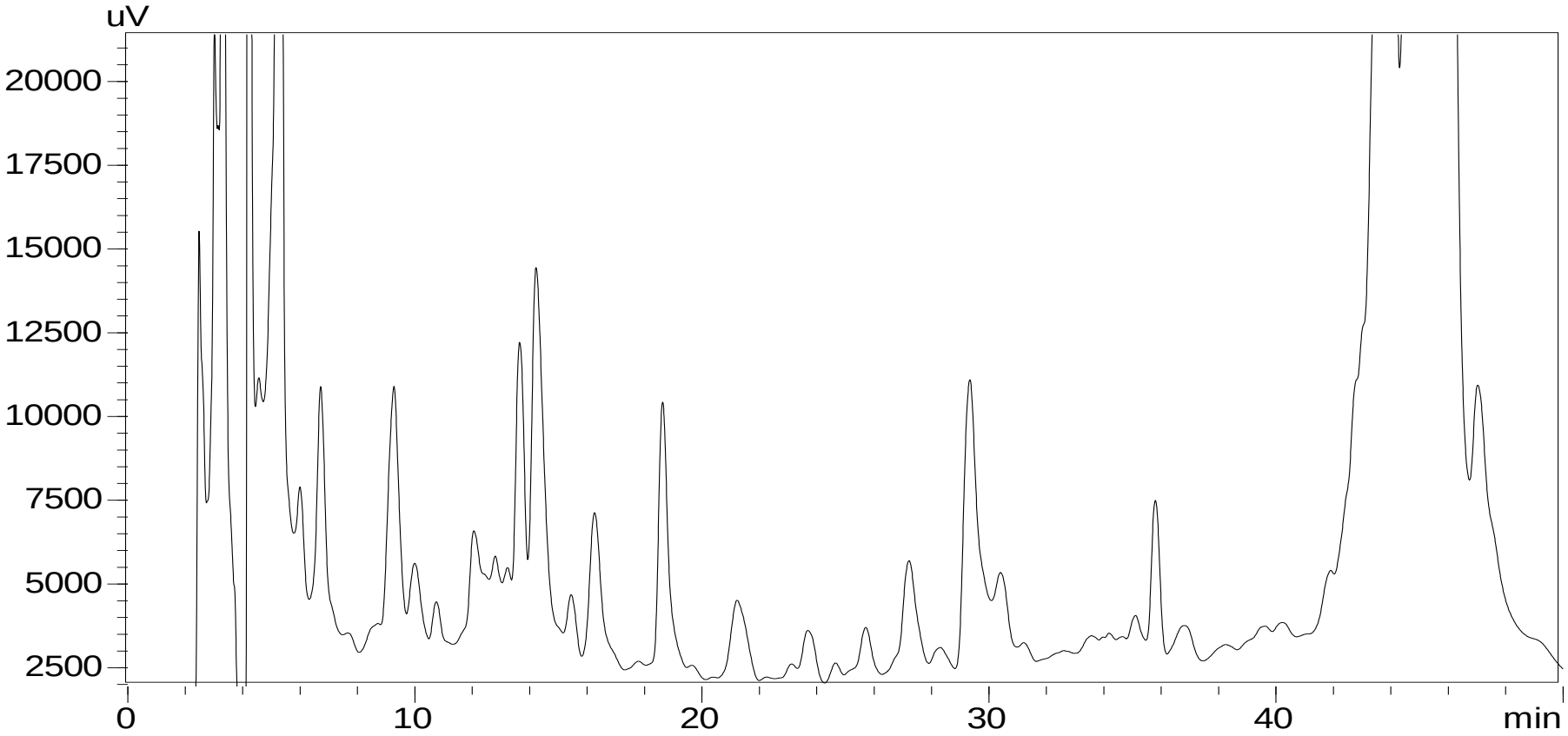
الملحق رقم 5: كروماتوغرام HPLC للعينة PR5 (تلمسان 2013)



الملحق رقم 6: كروماتوغرام HPLC للعينة PR6 (خنشلة سبتمبر 2012)



الملحق رقم 7: كروماتوغرام HPLC للعينة PR7 (تيزي وزو 2011)



الملحق رقم 8: كروماتوغرام HPLC للعينة PR8 (الوادي 2012)

اهتمت الدراسات الحديثة بمنتجات النحل عموما، ومنتج البروبوليس خصوصا، حيث توصلت أحدث الدراسات إلى أنه يعد من أهم الأدوية الطبيعية، في ظل طغيان الأدوية المصنعة في مجال التداوي، وما تتركه من تأثيرات جانبية خطيرة على جسم الإنسان، ومن هذا المنطلق أردنا تثمين البروبوليس المنتج في الجزائر، وذلك عن طريق دراستنا لثماني عينات من مناطق متفرقة وفي ظروف مختلفة، وتمت الدراسة عن طريق تقدير كمية الفينولات والفلافونويدات، وفاعلية العينات على تثبيط الجذور الحرة وتفاعلات الأكسدة، وتقدير كمية بعض الأحماض الفينولية والفلافونويدات والتعرف على بعض الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة، وقصد استنباط الظروف التي تمكننا من إنتاج بروبوليس جزائري عالي الجودة.

خلصت الدراسة إلى أن تربية النحل في المناطق الساحلية، حيث يسود مناخ البحر الأبيض المتوسط، والمتميزة بغطاء نباتي كثيف ومتنوع، بعيدا عن المنشآت الملوثة والمناطق الصناعية وبعيدا عن التجمعات السكانية ذات الكثافة العالية، وكما أن أفضل وقت لجني محصول البروبوليس يكون خلال نهاية فصل الشتاء. كل هاته العوامل تعطي بروبوليس جزائري عالي الجودة.

الكلمات المفتاحية: بروبوليس، فينولات، فلافونويدات، فاعلية مضادة للأكسدة، كروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء، كروماتوغرافيا الغازية.

Les récentes études se sont intéressée aux produits d'abeilles, et surtout la propolis, où elles ont réussi à déterminer que la propolis est l'une des médicaments naturels les plus importants, loin des médicaments fabriqués qui laissent de graves effets secondaires sur le corps humain. Et de ce point, nous voulons valoriser la propolis produite en Algérie, à travers l'étude de huit échantillons de différentes régions et dans des circonstances différentes; Notre étude s'est basée sur l'estimation de la quantité des phénols et des flavonoïdes, et l'efficacité des échantillons sur l'inhibition des radicaux libres et les réactions d'oxydation, l'estimation de la quantité de certains acides phénoliques et flavonoïdes, et de connaître quelques-uns des acides gras saturés et non-saturés, et pour concevoir toutes les circonstances pour produire du propolis de haute qualité. L'étude a conclut que l'apiculture dans les zones côtières, où il y a un climat méditerranéen, et la couverture végétarienne dense et diversifié, loin des installations contaminées et les zones industrielles et loin des centres de population à forte densité, et le meilleur moment pour récolter la propolis est vers la fin de l'hiver. Tous ces facteurs combinés donnent une propolis algérienne de haute qualité.

Mots clés: propolis, phénols, flavonoïdes, efficacité antioxydants, Chromatographie liquide haute performance, chromatographie en phase gazeuse.