رقم الترتيب:.....
رقم التسلسل:.....

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة الشهيد حمه لخضر– الوادي–

كلية العلوم الدقيقة

قسم الكيمياء

مذكرة تخرج لنيل شهادة الماستر أكاديمي في الكيمياء

تخصص : كيمياء العضوية

من إعداد: بوغزالة كريمة

بوهني أسماء

تحت عنوان :

المساهمة في دراسة التحول الكيميائي والنوعي للمحتوى الكيميائي لنبتة كرشة الأرنب لمنطقة الوادي

نوقشت يوم: 20 / 06 / 2019

أمام لجنة المناقشة:

محمد دهامشية	أستاذ محاضر أ	جامعةالشهيد حمه لخضر - الوادي	رئيسا
نعيمة بن شيخة	أستاذ محاضر أ	جامعةالشهيد حمه لخضر - الوادي	مقررا
رشيدة زواري أحمد	أستاذ مساعد أ	جامعةالشهيد حمه لخضر - الوادي	مناقشا
شيحي سمية	أستاذ مساعد أ	جامعةالشهيد حمه لخضر - الوادي	مناقشا

السنة الجامعية: 2020/2019

بسم الله الرحمن الرحيم
١٤٢٠

الاهداء

"لبسم الله الرحمان الرحيم"

الحمد لله الذي هداني ويسر لي أمري وأنار لي دربي ووفقني لإنجاز هذا العمل بكل حب واحترام أنحني تواضعا لأهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع :

إلى من أدين لهما بالفضل بعد الله تبارك و تعالى إلى أعز و أروع مالدي في هذا الوجود إلى **الوالدين** الكريمين أدامهما الله.

إلى من غمرتني بفيض حنانها و طيبة قلبها فكانت رمزا للعطاء و منبعا للدفىء إلى الوجه الذي لا يكفه إبتسامة بالرغم من كل شيئ الى مصدر الحنان كله "**أمي الغالية** ".

الى قدوتي الذي كان بمثابة الشمعة التي تحترق من أجل ان تضيء لنا الطريق إلى من منحني الأمان و الإستقرار و أحاطني بأنبل معاني الفضيلة مثلي الأعلى "**أبي العزيز** ".

إلى ريحان حياتي من أتمنى أن تبقى صورهم في عيوني **إخوتي** "علي، بوبكر وشعيب"

.

إلى رفيق دربي "محمد المكي يوسفي".

و الى **أخواتي** اللواتي لم تنجبهن أمي رفيقات دربي " أسماء،مفيدة،زبيدة،إيمان ،عفاف".

إلى من أثروني على نفسهم، الى من كانوا ملاذي وملجئي **أعمامي** و **أخوالي** و **خالاتي**

الى من شاركتني في إنجاز هذا العمل المتواضع **أختي** و **صديقتي** " أسماء".

ولا ننسى فضل **الطالبة** أصبحت بمثابة **أخت** "إيمان"وكل أفراد عائلتها وإلى جميع طالبات قسم ثانية ماستر كيمياء و البيولوجيا.

الى كل من انساهم قلمي ولم ينساهم قلبي.

كريمة

الاهداء

"لبسم الله الرحمان الرحيم"

الحمد لله الذي هداني ويسر لي أمري وأنار لي دربي ووفقني لإنجاز هذا العمل

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة ..ونصح الأمة ..إلى نبي الرحمة ونور العالمين حبيبي محمد عليه

أفضل الصلوات

إلى من أحمل إسمه بكل إفتخار أرجو الله ان يمد في عمرك لترى ثمارا قد حان قطافها بعد طول

إنتظار إلى والدي العزيز أدامه الله لي.

إلى من تبقى الكلمات عاجزة عن شكرها إلى التي كانت سندي في الشدائد و رعتني حق الرعاية

وكانت دعواها لي بالتوفيق سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى النور الذي أهتدي به في حياتي أمي

الحنون .

إلى من أعدل في تربيتي وكان وراء نجاحي إلى قدوتي و الذي كان بمثابة الشمعة

التي تحترق من اجل ان تضيء لي الطريق إلى خالي العزيز والذي كان بمثابة والدي رحمه

الله وأسكنه الفردوس الأعلى

إلى من تغمدت أرواحهم الترابب جدي وجدتي رحمهما الله وأسكنهم فسيح جناه

إلى جميع أخوالي وخالتي أعمامي وعماتي إلى كل الأحباب و الأقارب دون إستثناء

إلى من تحلو بالإخاء وتميزوا بالوفاء والعطاء إلى ينابيع الصدق الصافي

صديقاتي

أسماء

الشكر والعرفان

قال تعالى: أعوذ بالله من الشيطان الرجيم

"الحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا وَمَا كُنَّا لِنَهْتَدَيَ لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللهُ"

سورة الأعراف الآية 43

الحمد والشكر لله أولا وأخيرا الذي أعاننا ووفقنا على إنجاز هذا العمل المتواضع

لكل مبدع انجاز ولكل شكر قصيدة و لكل مقام مقال ...ولكل نجاح شكر و تقدير فجزيل الشكر أهديكم ورب العرش يحميكم

نتقدم أولا بالثناء والتقدير والشكر الجزيل إلى أستاذتنا القدير الدكتورة **بن شيخة نعيمة** لأشرافها على هذا العمل والتي لم تبخل علينا بتوجيهاتها القيمة ونصائحها الثمينة طوال مراحل إنجازنا لهذا العمل وإخراجه بالصورة المرجوة حيث كان لها الفضل في توفير كل الإمكانيات التي نحتاجها في عملنا فلها منا كل التقدير والاحترام.

كما نتقدم بشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة لقبولهم مناقشة مذكرتنا

كما تتسع دائرة شكرنا إلى جميع موظفي مخابر كلية العلوم الدقيقة ،كلية علوم الطبيعة والحياة وكلية التكنولوجيا على مجهوداتهم المبذولة .

نتوجه بأعمق وأسمى عبارات الشكر والعرفان إلى كل أساتذتنا الكرام الذين ساهموا في تأطيرنا في الحياة الدراسية ،وإلى كل طلبة دفعتنا وكل من ساعدنا من قريب أو بعيد في إنجاز هذا العمل من البداية إلى غاية الإنتهاء .

الملخص

الهدف من هذا العمل هو المساهمة في دراسة كمية الفينولات ,كمية الفلافونويدات وأيضا التقدير الكلي لسكريات ،البروتينات والدهون ودراسة الفاعلية المضادة للأكسدة وكذالك الفاعلية البيولوجية لنبتة كرشة الأرنب (*Launaea glomerata*) لمنطقة وادي سوف.

حيث تم تقدير الكمي للفينولات بإستعمال كاشف Folin-Ciocalteu و$AlCl_3$ لتقدير الكمي للفلافونويدات الكلية ،التحليل الكيفي بواسطة كروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC) بينت وجود حمض الكافييك وحمض الكوماريك

نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بإستعمال إختبار DPPH , CAT,ABTS في مستخلص العينة المدروسة بينت أنها تملك فعالية معتبرة بالمقارنة مع نباتات أخرى من نفس الجنس .

أما بالنسبة للفاعلية البيولوجية بينت الدراسة أنّ لها فعالية ضد السلالات البكتيرية و أنواع الفطريات والخميرة المدروسة.

الكلمات المفتاحية : كرشة الأرنب (*Launaea glomerata*)، الفينولات ،الفلافونويدات ، الفعالية المضادة لأكسدة , DPPH , CAT,ABTS ،البكتيريا ،الفطريات،الخميرة

فهرس المحتويات

الشكر والعرفان..... I

الملخص..... II

فهرس المحتويات III

قائمة الأشكال VIII

قائمة الجداول XI

قائمة الرموز والمختصرات XIII

مقدمة 1

المراجع 3

الجانب النظري 4

الفصل الأول: الدراسة النباتية..... 5

I-1- دراسة العائلة..... 6

I-1-1- أجناس العائلة 6

I-1-2-التصنيف النباتي..... 6

I- 1-3- إستعمالاتها 6

I-1-4- وصف الجنس *Launaea* 6

I- 2- الخصائص العامة لنبتة كرشة الأرنب (*Launaea glomerata*)..... 7

I-2-1- الوضعية التصنيفية لنبتة كرشة الأرنب(*Launaea glomerata*) 8

I-2-2- الإنتشار الجغرافي 9

I-2-3- الدراسة الكيميائية السابقة..... 9

I-3- تعريف الإستخلاص 9

I-3-1- الإستخلاص الصلب – سائل..... 10

I-3-1- 1- الإستخلاص بالنقع: 10

المراجع 11

الفصل الثاني: الدراسة الكيميائية 13

I I - 1- نواتج الايض الأولي..... 14

I I - 1-1 - تعريف الكربوهيدرات..... 14

I I - 1-1-1 -أهميتها في النبات 14
I I - 1-2- تعريف البروتيـــنات..... 14
I I - 1- 2 -1 - تعريف البروتنات النباتية وتواجدها في النبات..... 15
I I - 1- 2 -3 - أهمية البروتينات 15
I I - 1- 3 - تعريف الدهون..... 16
I I - 1- 3 -1 - خصائصها..... 16
I I - 1- 3 -2 - تواجدها 16
I I - 2- نواتج الأيض الثانوي..... 16
I I - 2- 1 - تعريف متعدد الفينولات 17
I I - 2- 2 -1 -أقسام الفينولات 17
I I - 2- 1 – 2 -الخصائص الفيزيائية والكيميائية للأحماض الفينولية..... 19
I I - 2- 1 – 3 -أهمية الفينولات وتواجدها في النبات..... 19
I I - 2- 2 – الفلافونويدات..... 19
I I - 2- 2 – 1 - تعريفها وبنيتها الكيميائية..... 20
I I - 2- 2 – 2 -تواجد الفلافونويدات في النبات..... 20
I I - 2- 2 – 3 - تصنيف الفلافونيدات..... 21
I I - 2- 2 – 4 - أهمية الفلافونويدات..... 22
I I - 2- 2 -5 - خواصها 23
المراجع 25
الفصل الثالث: التوتر التأكسدي مضادات الأكسدة والجذور الحّرة 30
III-1-التوتر التأكسدي..... 31
III-2- تعريف الجذور الحرة..... 31
III-2-1- مصادر الجذور الحرة..... 31
III-2-2- متابعة حركية الجذور الحرة 32
III-2-3- أنواع الجذور الحرة..... 33
III-2-4- تفاعلات الجذور الحرة..... 33
III-2-5-أضرار الجذور الحرة 34
III-3- مضادات الأكسدة 35
III-3- 1- مصادر مضادات الأكسدة..... 35

III-3- 2- آلية تفاعل المواد المضادة للأكسدة 36
III-3- 3- دور مضادات الأكسدة 37
III-3- 4- طرق تقدير إجمالي فعالية المواد المضادة للأكسدة 37
المراجع 39
الفصل الرابع :النشاطية ضد الميكروبية 42
IV- 1- تعريف البكتيريا 43
IV- 1- 1-التصنيف 43
IV- 1- 1-1- حسب الشكل 43
IV- 1- 1-2- عضوية التغذية وذاتية التغذية 44
IV- 1- 1-3- حسب صبغة الغرام 44
IV- 1- 3- الأنواع البكتيرية المستعملة 44
IV- 2- الفطريات 48
IV- 2- 1- تعريفها 48
IV- 2- 2- أنواع الفطريات المستعملة 48
IV- 2- 3- الأهمية العامة للفطريات 49
المراجع 50
الجانب العملي 52
الفصل الخامس: الطرق والوسائل 53
V-1- تقديم منطقة الدراسة 54
V-1-1- الموقع الجغرافي لمنطقة وادي سوف 54
V-2- مخطط العمل 55
V-3- المواد المستعملة 56
V- 3-1 المادة النباتية 56
V- 3-2- الأدوات والوسائل المستعملة 56
V- 4- طرق العمل: 58
V- 4-1 تجفيف و تنقية العينة النباتية 58
V- 4-2 - طحن العينة 59
V- 4-3- تحضير المستخلص الميثانولي بالنقع (البارد) 59
V-4-4- حساب المردود الإنتاجي للمستخلص 60

V-4-5- الكشف الأولي الفيتوكيميائي 61
V-4-6- تقدير القيمة الغذائية في النبات 63
V-4-6-1- تحضير المستخلصات 63
V-4-6-2- تقدير الكربوهيدرات 64
V-4-6-3- تقدير الدهون 65
V-4-6-4- تقدير البروتين 66
V-4-7- تقدير درجة الحموضة pH وتقدير درجة الناقليةEC : 68
V-4-8- التقدير الكمي للفينول 68
V-4-9- التقدير الكمي للفلافونيدات 70
V-4-10- الكرومتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) 72
V-4-11- الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة 74
V-4-11-1- إختبار القدرة الكلية المضادة للأكسدةCAT أو اقتناص جذر (phosphomolybdate) 74
V-4-11-2- اختبار تثبيط الجذر الحرDPPH 76
V-4-11-3- إختبار ABTS 79
V-4-12- النشاطية ضد الميكروبية 80
المراجع 85
الفصل السادس: النتائج والمناقشة 89
VI- 1- خصائص العامة للمستخلص 90
VI- 2- نتائج الكشف الأولي الفتوكيميائي 90
VI- 3 - تقدير القيمة الغذائية 93
VI-4 -تقدير المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات 95
VI- 5- التقدير الكيفي للفينولات بواسطة الـ HPLC 96
VI-6 - الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة 98
VI-6 - 1 - الفعالية المضادة للأكسدة الكليةCAT 98
VI-6 - 2 - قدرة تثبيط الجذر الحر لـ DPPH 99
VI-6 - 3- قدرة تثبيط الجذر الكاتيوني ABTS 101
VI-7 - الفعالية ضد الميكروبات 104
VI-7 – 1- النشاطية ضد البكتيريا 104

VI-7 - 2- النشاطية ضد الفطر و الخميرة 107
المراجع 110
الخاتمة العامة 113
الملاحق 115

قائمة الأشكال

الشكل (1) صور توضح جميع أجزاء النبات 8
الشكل (2) نموذجين لمركبين غير فينوليين 17
الشكل (3) الشكل العام لبنية الفلافونويد..... 20
الشكل 4: يوضح بنية المركبات فلافونويدية 22
الشكل 5: صورة لجذر تحت المجهر 31
الشكل6 : مخطط يوضح أنواع الجذور الحرة..... 33
الشكل 7 : مخطط يوضح مصادر مضادات الأكسدة 36
الشكل 8 :صورة *Escherichia coli*..... 45
الشكل 9: صورةالبكتيريا العنقودية *Staphylococcus eureus*..... 46
الشكل 10: صورة بكتيريا *Klebsielle pneumonia*..... 47
الشكل 11: صورة البكتيريا *Listeria innocua*..... 47
الشكل 12:مخطط العمل 55
الشكل 13 :صور مراحل الإستخلاص..... 60
الشكل 14 : مخطط يوضح أهم مراحل إستخلاص نواتج الأيض الأولي 64
الشكل 15: توضح المنحنى القياسي للغلوكوز 65
الشكل 16: يوضح المنحنى القياسي للدهون..... 66
الشكل 17: المنحنى القياسي لليروتين 68
الشكل 18:مستخلص ناتج عن تقدير الفينول (الأصلي) 69
الشكل 19: يوضح المنحنى القياسي للفينول..... 70
الشكل 20 : آلية تفاعل المعقد..... 70
الشكل 21 : مستخلص ناتج عن تقدير الفلافونويدات (الأصلي)..... 71
الشكل 22 : يوضح المنحنى القياسي للفلافونويدات..... 72
الشكل 23: مكونات جهاز HPLC..... 73
الشكل 24: يوضح مستخلص ناتج من إختبار الفوسفومولوبيدات (الأصلي)..... 75
الشكل 25 : يوضح المنحنى القياسي لحمض الغاليك..... 76
الشكل 26 : يمثل آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة مع الجذر الثابت DPPH..... 77
الشكل 27 : يوضح محلول DPPH المحضر(الأصلي)..... 77
الشكل 28 : مستخلص ناتج من إختبار تثبيط الجذر الحر DPPH• (الأصلي) 78

الشكل 29 : يوضح مستخلص ناتج من إختبار ABTS (الأصلي) 79
الشكل 30 : تحضير الكائنات الحية الدقيقة 81
الشكل 31 : تحضير وسط الزرع 82
الشكل 32: زراعة البكتيريا 83
الشكل 33 : وضع الاقراص 83
الشكل 34 : المضاد الحيوي Amoxyclav (AMC30) µg /disc المستخدم في المقارنة الإيجابية للنشاطية ضد البكتيريا 84
الشكل 35 : أعمدة بيانية توضح نسبة قيم السكريات ،البروتينات و الدهون في نبات *L.glomerata* 94
الشكل 36 : أعمدة بيانية توضح مقارنة لقيم الفينولات والفلافونويدات بين النبتتين *L.glomerata*،*L.taraxacifolia* 96
الشكل 37 : يوضح كروماتوغرام لمستخلص النبته*L.glomerata* 97
الشكل 38 : أعمدة بيانية توضح مقارنة قيم إختبارالقدرة الكلية المضادة للأكسدة بطريقة الفوسفومولبيبدات لنبتة *L.glomerata* و*L. procumbens* 99
الشكل 39: التأثير الازاحي لحمض الاسكوربيك على الجذر DPPH• 100
الشكل 40 : التأثير الإزاحي لمستخلص النبتة على الجذر DPPH• 100
الشكل 41: يوضح (IC_{50}) لمستخلص النبتة وحمض الأسكوربيك 101
الشكل 42 : التأثير الإزاحي لـ BHTعلى الجذر ABTS (الاصلي) 102
الشكل 43 : التأثير الإزاحي لمستخلص على الجذر ABTS 102
الشكل 44 : يوضح قيمة IC_{50} لنبتة *L.glomerata* ، *L. procumbens* وBHT 103
الشكل 45 : نتائج تثبيط السلالات البكتيرية على المستخلص (الأصلي) 105
الشكل 46 : أعمدة بيانية توضح أقطار التثبيط لسلالات البيكترية المستعملة على المستخلص.. 106
الشكل 47 : نتائج تثبيط الفطر *Fusarium sp* والخميرة *L .c .a* على المستخلص (الأصلي) 108
الشكل 48: أعمدة بيانية توضح أقطار التثبيط للفطر والخميرة المستعملة..... 109
الشكل 49 : صورة توضح سلسلة المحلول القياسي للغلوكوز 116
الشكل 50 : صورة توضح سلسلة المحلول القياسي للبروتين 116
الشكل 51 : صورة توضح سلسلة المحلول القياسي للدهون..... 117
الشكل (52) بنية الكريستين 117

الشكل (53) بنية الأسكوربيك..... 117
الشكل (54) بنية حمض الغاليك..... 117
الشكل (55) بنية BHT 117
الشكل 56: جهاز الدوران البخاري..... 118
الشكل 57 : معلومات عن جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) 118
الشكل 58 : جهاز المعقم بالضغط..... 119
الشكل 59 : معلومات عن جهاز المعقم بالضغط..... 119
الشكل 60 : ساحبة الهواء 120
الشكل 61 : صورة توضح حاضنة وضع البكتيريا..... 120
الشكل 62 : معلومات عن الحاضنة..... 121
الشكل 63 : معلومات عن جهاز HPLC المستخدم في التحليل النوعي لمركبات الفينولية..... 123

قائمة الجداول

الجدول 1 : يوضح التصنيف النباتي للعائلة النجمية 6
الجدول2 : يوضح تصنيف النبات..... 8
الجدول 3 : يوضح تصنيف الفينولات..... 18
الجدول 4 : آلية تفاعل المواد المضادة للأكسدة..... 36
الجدول 5 : يوضح تصنيف البكتيرية *Escherichia coli* 45
الجدول 6 : يوضح تصنيف البكتيرية *Staphyloccus aureus* 45
الجدول 7 : توضح تصنيف البكتيرية *Klebsielle pneumonia* 46
الجدول 8 : يوضح تصنيف البكتيرية*Listeria innocua* 47
الجدول 9 : يوضح تصنيف فطر الفيوزاريوم *Fusarium sp* 48
الجدول 10 : يوضح تصنيف فطر*Candida albicans* 49
الجدول 11 : المواد المستعملة أثناء الكشف الكيميائي..... 56
الجدول 12 : يوضح المواد المستعملة أثناء الإستخلاص 57
الجدول 13: يوضح المواد المستعملة أثناء التقدير الكمي للمركبات الفينولية..... 57
الجدول 14 : المواد المستعملة أثناء تقدير الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة..... 58
الجدول 15: المواد المستعملة أثناء النشاطية ضد الميكروبية 58
الجدول 16 : يلخص المواد اللازمة للكشف عن المركبات الفعالة في النباتات..... 62
الجدول 17 : يوضح الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات بإستخدام HPLC.. 73
الجدول 18 : يوضح زمن مكوث لبعض المركبات الفينولية 74
الجدول 19: يوضح أنواع السلالات البكتيرية والفطرية والخميرةالمستعملة..... 81
الجدول 20 : يوضح الخصائص العامة للمستخلص الميثانولي لنبتة *L.glomerata*..... 90
الجدول 21 : يوضح نتائج عملية الكشف عن المواد الفعالة 91
الجدول 22 : يوضح مقارنة نتائج الكشف للمواد الفعالة بين النبتتين *L.glomerata* و *L. taraxacifolia*..... 92
الجدول 23 : يوضح نسبة قيم السكريات ،البروتينات و الدهون في نبات *L.glomerata*..... 93
الجدول 24 : التقدير الكلي لمحتوي الفينولات والفلافونيدات 95

الجدول 25 : يوضح نتائج تحليل الكروماتوغرام 97
الجدول 26 : قيمة النشاطية الكلية المضادة للأكسدة CAT 98
الجدول 27 : يوضح نسبة التثبيط (I%) على الجذر الحرDPPH للنبتة بدلالة الإمتصاصية والتركيز (ملغ/ ملل)..... 99
الجدول 28 : يوضح قيمة IC_{50} وARP لنبتة *L.glomerat* وحمض الأسكوربيك..... 100
الجدول 29: نسبة التثبيط (I%) للنبتة على الجذر الكاتيوني ABTS بدلالة الإمتصاصية والتركيز (ملغ/ ملل)..... 102
الجدول 30 : قيم IC_{50} *L.glomerata* وBHT و*L. procumbens* 102
الجدول 31 : يوضح اقطار التثبيط لسلالات البكتيرية المستعملة على المستخلص..... 104
الجدول 32 : يوضح أقطار التثبيط للفطر والخميرة المستعملة..... 107

قائمة الرموز والمختصرات

ROS : Réactive Oxygène species.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

TCA : d'acide Trichloracétique.

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

BHT : Butyl huydroxy Toluene.

BHA :Butyl hydroxy anisole.

PG: Propylée Gallate.

TBHQ: Tetra bulhydro quinon.

CAT : Capacity Antioxidant Total.

PPM : Phosphomolybdate.

DPPH : 2,2'Diphenyl-1-picrylhdrazyl.

DPPH °: Radical- DPPH

ABTS : (2,2'-azino-bis (3- ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)).

I% :Pourcentage d'inhibition .

IC50: Inihibion concentration 50%.

Gram (+) :Coloration de Gram positive .

Gram (-) : Coloration de Gram négative.

MH : Agar Muller – Hinton.

SDA : Sabouraud dextrose agar.

ATCC: American Type Culture Collection.

مقدمة

إن تربع الجزائر على مساحة شاسعة من القارة الإفريقية (أكبر دولة مساحة إفريقياً) إلى جانب تنوع مناخها : بحرية، قارية، صحراوية وكذا تربتها وخصوبتها أثربشكل بالغ ليس فقط على شدة التنوع النباتي ولكن أيضا على تركيب النباتات وإعطائها المميزات الخاصة . وقد دلت التجارب أنّ نباتات المناطق المعتدلة أكثر فعالية وأغنى بالعناصر المفيدة من نباتات المناطق الباردة. كما أثبتت الدراسات العديدة أنّ بالجزائر ما لا يقل عن 3500 نوع من النباتات الطبية منها ماتعود الى المناخات الحارة ومنها ماتعود إلى المناخات المعتدلة . وأخرى لا نعثرعليها إلاّ في البلدان الصحراوية وأنّ هناك أنواع لازالت في الطبيعة لم تكتشف بعد رغم كثرة ما درس عن الاعشاب الجزائرية .

تحتوي بعض نباتات الأعشاب البرية والطبية على مركبات كيميائية تكوّن نواتج ثانوية ونواتج أولية من عمليات الأيض داخل النبات، وهي ذات فائدة وأهمية كبيرة تستخدمها لأغراض ديمومة حياتها أو الحماية والدفاع ضد الكائنات الحية الأخرى والتي يمكن أن يطلق عليها بالنواتج الطبيعية أو الثانوية ، وغالبا بالمواد الفعالة التي تعكس الفوائد العلاجية لهذة النباتات .

حيث أنّ منذ القدم أستخدمت هذة المركبات (شكل مستخلصات خام) كعقاقير إلّا أنّ تنقية وتشخيص العديد من هذه المواد الفعّالة ذات التأثير البيولوجي لايزال يشغل علماء الصيدلة، الكيمياء وعلوم الحياة حيث إنصب الإهتمام نحو تأثير مستخلصات النبات الخام على عدد من السلالات البكتيرية والفطرية الممرضة وكذالك لإيجاد طريقة أو نظام استخلاص محدد يعتمد على استخلاص المواد الفعّالة حيث تتغاير هذه الطرق بين مستخلصات كحولية (ميثانول أو إيثانول) أو مائية وحتى استخدام العصير النباتي أحيانا لأغراض العلاج . كما تتغير طرق الاستخلاص تبعا للنوع النباتي المعتمد للاستخلاص .

وبما أن وظائف الجسم ترتبط بتفاعلات الأكسدة والإرجاع التي تؤدي إلى إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة ومضادات الأكسدة الطبيعية، فالتوازن بين إنتاج هذه الجزيئات والتخلص منها يضمن الحفاظ على الوظائف الفيزيولوجية الطبيعية للجسم، إلا أن الإفراط في إنتاجها يؤدي الى أضرار على المستوى الجزيئي مسببا ضرر الأنسجة وحدوث العديد من الأمراض، ويمكن حماية الجسم من أضرار هذه الجزيئات عن طريق مضادات الأكسدة والتى تستعمل بكثرة كإضافات في الأغذية أو كأشكال صيدلانية مختلفة . [1]

ومنه إتجه البحث نحو المركبات التى لها القدرة على منع حدوث أو التخفيف من التوتر التأكسدي والمتمثلة في مضادات الأكسدة الطبيعية وغيرها من المركبات الفعالة الموجودة في الأغذية والنباتات الطبية والأعشاب البرية.[2]

ومساهمة منا في إثراء هذا الجانب أجرينا هذه الدراسة على إحدى الأجناس البرية لنباتات العائلة المركبة جنس *Launaea* الذي يمتاز بأهميته الطبية والعلاجية لمحتواه العالي على العديد من المركبات

الفينولية و الفلافونويدات وبعض المواد الفعالة الأخرى ولذا وقع الإختيار على نبتة *Launaea glomerata* لكونها كثيرة الإنتشار في القطر الجزائري والموجود في المناخ الصحراوي والمعروف منذ القدم حيث كان يؤكل مع السلطة عند المصريين اما الجانب العلاجي مزال الى حد الآن لم يتعرف عليه في هذة النبتة .

لهذا تبادر في ذهننا العديد من الأسئلة للتعرف عليها من الناحية العلاجية. ماهي المركبات الكيميائية الفعالة المكونة للنبات ؟وهل لهاته المركبات دور على منع الجذور الحرّة؟وماهي فوائدها ؟هل يمكن أخذها كعلاج للبعض الأمراض؟

وللإجابة على كل هذه الاسئلة إرتأينا في إن نساهم في دراسة تجريبية تهدف ألى الدراسة الكيميائية والنوعية للنبتة كرشة الأرنب بكأملها،من خلال تقدير نواتج الأيض الأولي ،وحيث تم تقدير بعض نواتج الايض الثانوي الموجودة فيها وهي المركبات الفينولية وكذالك التحليل النوعي عن طريق HPLC وكذلك إختبار فعاليتها الكيميائية المضادة للأكسدة والنشاطية ضد الميكروبية (البيكتيريا،الفطريات والخمير) للمستخلص الكحولي (الميثانول) للنبتة بعدة طرق وقد قسمنا بحثنا هذا إلى جزئين :

- **الجانب النظري :** ضم هذا الجزء اربعة فصول
  - الفصل الاول :الدراسة النباتية
  - الفصل الثاني :نواتج الأيض الأولي والثانوي
  - الفصل الثالث : التوتر التاكسدي ،مضادات الاكسد ة والجذور الحرة
  - الفصل الرابع : الفعالية ضد الميكروبية
- **الجانب العملي :** ضم هذا الجزء فصلين
  - الفصل الخامس :الطرق والوسائل
  - الفصل السادس :النتائج والمناقشة

المراجع

[1] OZGEN U., MAVI A., TERZI Z., YILDIRIM A., COSKUN M., HOUGHTON P.J., 2006- Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae (Labiatae) species. Pharm Biol. 44: 107-112

[2] بن سلامة ع.ر.،2012 – النشاطات المضادة للاكسدة والمثبطة للإنزيم الموكسد للكزانثين لمستخلصات أوراق .Hertia cheirifolial مذكرة لنيل شهادة الماجستير في البيوكيمياء ،جامعة فرحات عباس سطيف ،الجزائر،90 ص

الجانب النظري

الفصل الأول
الدراسة النباتية

I-1- دراسة العائلة

تعتبر الفصيلة المركبة إحدى الفصائل الست المشكلة لرتبة الناقوسيات (Campanulatae) وقد أطلق عليها بعض المؤلفين الفصيلة النجمية (Asteraceae) بدلاً من الفصيلة المركبة،إذ تعتبرهذه الفصيلة من أكبر الفصائل رقياً في المملكة النباتية فهي تمثل أكثر من 10% من المجموع الكلي للنباتات الزهرية [1] تشمل الفصيلة المركبة 1300 جنس على الأقل و21000 نوع تتواجد أو تتوزع هذه في جميع أنحاء العالم [2] أما في الجزائر هناك 109 جنس،480 نوع. وهي من أهم عائلات ثنائية الفلقة[3]،معظمها نباتات عشبية حولية،أومعمرة وتظهر في المناطق المعتدلة من الكرة الأرضية [4] هذه النباتات غنية بنواتج الأيض الثانوي .[5]

I-1-1- أجناس العائلة

ومن الأجناس التي تنتمي الى هذه العائلة [6]

Artemisia Cotula , Matricaria , Chrysanthemum , Anacyclus, Asteriscus, Pulicaria, Scorzonera , launaea, , Centaurea.

I-1-2-التصنيف النباتي

الجدول التالي يوضح التصنيف النباتي للعائلة [7]

الجدول 1 : يوضح التصنيف النباتي للعائلة النجمية

المملكة	**النباتات**
القسم	ثنائية الفلقة
الرتبة	النجميات
تحت الملكة	حقيقيات النواة
العائلة	النجمية

I- 1-3- إستعمالاتها

نباتات العائلة المركبة تستعمل بكثرة في المجال الطبي لأنها تشفي العديد من الامراض [8].و تستعمل نباتات هذه العائلة في التداوي،من خصائصها انها مضادة للالتهاب والحساسية وتعتبر ايضا مضاد بكتيري.[9]

I- 1-4- وصف الجنس *Launaea*

الجنس *Launaea* هو نبات معمر ذوأزهارصفراء فاقعة وهو من العائلة المركبة *(Compositae)* يصل ارتفاعه عن الارض 60 سم أحيانا . الساق الرئيسية قائمة متفرعة وتنفرش أوراقه الرمحية و المسننة الشكل على الارض وتكون بحجم كبير ويقل حجم الأوراق عند الإرتفاع قليلا بعدُ لاتكاد ترى إلا الأزهار والأغصان.

ويتميز الجنس بكثافة ازهاره الجميلة وقد تخرج صفراء حتى بعد اشتداد الحر كما يعتبر نبات رعوي جيد للابل والاغنام وينمو بعد سقوط الامطار وتظهر ازهاره في شهر فبراير الى نهاية شهر أفريل

تنتشر نباتات الجنس Launaea بصورة خاصة في منطقة البحر الأبيض المتوسط اذ يوجد حوالي 40 نوعا اما في الجزائر فتوجد بها 9 أنواع وهم : [10] [11]

Launaea acanthoclada, Launaea angustifolia (Desf.) Kuntze, Launaea anomala (Batt.), Launaea arborescens (BUTT.), Launaea cassiniana, Launaea nudicaulis Hook.F, Launaea quercifolia (Desf.) Pamp., Launaea resedifolia (O.K.) and Launaea glomerata(Cass. Hook. F)

I- 2- الخصائص العامة لنبتة كرشة الأرنب (*Launaea glomerata*)

ينتمي نبات *Launaea glomerata* إلى العائلة المركبة، وهي نباتات حولية أو ثنائية الحول، تحتوي على اللبن النباتي،تنمو في أواخر الشتاء وتزهر في الربيع،أوراقها تؤكل تشبه طعم الخس ويعتبر أيضا أنه نبات عشبي ورعوي تتغذى عليه العديد من الحيوانات.[12][13]

أجزاء النبتة :

- **الأوراق :**

يتكون من أوراق كبيرة ملساء خضراء اللون متوحدة على شكل وردة مسننة قليلة التموج ، الأوراق الأولى كاملة تليها أوراق قصيرة ،يتراوح طولها ما بين 40-10سم.

- **الأزهار**

أزهارها صفراء فاقعة اللون في القاعدة وصفراء باهتة في باقي أجزائها ومتواجدة على شكل كتلة محكمة سواء في نهاية ساق قصيرة أو في نهاية ساق طويلة متمددة على الأرض وتعطي ثمارا مجنحة تحملها الرياح.

- **البذور**

بيضوية الشكل يميل لونها إلى البياض مع بقع بنية .

- **الجذور**

لحمية أو خشبية ومعظمها ليفي.

الساق

ساق قصيرة اوساق كبيرة متمددة على الأرض.

النبتة

الاوراق

الأزهار

البذور

الجدور

الساق

الشكل (1) صور توضح جميع أجزاء النبات

I-2-1- الوضعية التصنيفية لنبتة كرشة الأرنب (*Launaea glomerata)*

الجدول2 : يوضح تصنيف النبات

القسم	*Magnoliphytes*
الصف	*Magnoliopsides – Dicotylédones*
تحت الصف	*Asteride*
الرتبة	*Asterales*

العائلة	*Asteraceae*
الجنس	*Launaea*
النوع	Launaea glomerata

- **الاسماء الشائعة**
- **الاسم العلمي** *Launaea glomerata*
- **الاسم العربي** كرشة الأرنب ،الغردالي ،لحريشية[13]

I-2-2- الإنتشار الجغرافي

- **الانتشار الجغرافي في العالم**

لوحظ انتشارها بلاد الشام ومصر وشبه الجزيرة العربية وشمال إفريقيا وتركيا وتنتشر بصورة خاصة في منطقة البحرالأبيض المتوسط وكذلك في شمال الصحراء ونادراً في الصحراء الوسطى والغربية [6]

- **الإنتشار الجغرافي في الجزائر**

تنتشروتنمو نبتة كرشة الأرنب في الصحراء الشمالية الشرقية الجزائرية كمنطقة وادي سوف و ورقلة.[13]

I-2-3- الدراسة الكيميائية السابقة

للنبتة كرشة الارنب أهمية بالغة رغم عدم وجود الدراسات المخبرية عليها ولكونها تعتبر نبات صحراوي فلها فوائد عديدة، وبكونها غنية بالمركبات الطبيعية حيث تم فصل هذه الأخير ونذكر منها :

فلافونيدات، ومواد عفصية، وسيترولات وتربينات ثلاثية وكومارينات وزيوت طيارة وهذا حسب مابينته الدراسة البيبلوغرافية [14] وفي مايلي أهم الدراسات المتعلقة بهذا النبات حيث:

- قام موساوي فيروز(2014) بفصل وتحديد منتوجات الأيض الثانوي ودراسة الفعالية ضد الميكروبية للنبتة *Launae glomerata(Cass.Hook.F)* حيث تم فصل خمسة عشرمركبا

I-3- تعريف الإستخلاص

هو طريقة تسمح بفصل أو سحب مادة عن أخرى بإستعمال المذيبات العضوية،إن كانت المادة المراد فصلها سائلة فنطبق عليها طريقة الإستخلاص (سائل – سائل)،وإن كانت المادة صلبة فنطبق عليها طريقة إستخلاص (صلب – سائل) .

I-3-1- الإستخلاص الصلب – سائل

له عدة اشكال ترتبط بعدة عوامل مختلفة منها درجة الحرارة ،الضغط ،كيفية استعمال المذيب وأشهر هذه الأشكال :

I-3-1- 1- الإستخلاص بالنقع:

يكون عادة بتغلية الماء في إناء لمدة معينة ثم يصب هذا الماء المغلي فوق المادة (النبتة) التي تكون قد وضعت في إناء ثم يترك الخليط لمدة 10الى 15 دقيقة وهي المدة الكافية لإذابة المادة في الماء الساخن وقد يكون الإستخلاص على البارد (النقع) حيث توضع المادة (العقار) داخل إناء يحتوي كمية محددة من المذيب بحيث يكون مستوى السائل فوق المادة الصلبة بعد عملية المزج ،ثم يترك لمدة زمنية معينة يتم خلالها تحريك المزيج من حين الى آخر حتى يحدث إلتماس بين المادة الصلبة والمذيب ،عندها يتم انتقال المادة المراد فصلها من المادة إلى المذيب ،ثم بعد ذلك نطبق عملية الترشيح للفصل بينهما.[15] [16] [17]

المراجع

المراجع الأجنبية

[1] Aid, S. (1971) The evolutionary taxonomy of flowering plants and the cyto-genetics principal., p.449, published by Cairo University.

[2] Bruneton, J. (1999) plantes toxiques et végétaux dangereux pour l,homme et les animaux., p.153, Editions Tec et Doc. Paris.

[3] Larguet Habiba, (2011)-les molécules terpéniques (ecdystéroides)des fleurs de Serratula cichoracea recherche d'activités antimicrobienne et antioxydante.(2).thés magistère . université de Constantine.

[4] Quezel P;SANTA/S/(1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques mérhdional Tome 2EdCNRS ,paris Vol1011: 571,1001

[5]G.flamini,C.Bullerie,I.MorelliandA.Manunta,J.Nat.prod,63,662-6635(2000)

[6] Mishio ,T ;Houma ,T; Iwashina ,T, (2006) -Yellow flavonoids in Centaurearuthencia as flower pigments .Biochemical Systematics and ecology .34,180-184.

[7] ELSPETH HASTON, JAMES E.et al, Botanical Journal of the Linnean Society, Volume 161, Issue 2, October 2009, Pages 128–131 .

[8] Bellakhdar .J,(1997)-la pharmacopée marocaine traditionnelle ,Ibis press.

[9] Vaisakh M. N. and Pandey A. (2012).The invasive weed with healing properties: areview on Chromolaena odorata. IJPSR, 3(1): 80-83.

[10] Ozenda, P., (1983) Flore du Sahara. CNRS, Paris

[11] Quezel, P., Santa, S., (1963) Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiqueméridionales. CNRS, Paris 2:162

[14] D.Ali, S.M.S. Hussain, A. Malik and Z. Ahmed .Jour. Chem.SOC.Pak. Vol. 25, No.4, 2003.

المراجع العربية

[12] حليس ي.‘2007 – الموسوعة النباتية لمنطقة سوف ، النباتات الصحراوية الشائعة في منطقة العرق الشرقي الكبير . دار الوليد ، ولاية الوادي ، الجزائر ‘ص

[13] موساوي فيروز(2014) بفصل وتحديد منتوجات الأيض الثانوي ودراسة الفعالية ضد الميكروبية للنبتتين Launae glomerata(Cass.Hook.F و Launaea resedifolia (O.K.)

[15] أ.الخطيب (الفصائل النباتية)1987م ,مطبعة خالد بن الوليد

[16] سمير عبد الرحيم سعيد غبواص- د.فتحي احمدج عبيد (الاستخلاص بالمذيبات في الكيمياء التحليلية)دار الكتب لطباعة والنشر – الموصل 1991م

[17] حميدي نور الدين "الدراسة الفيتوكيميائية لنبات الدقع "مذكرة لنيل شهادة الماجستير 2007.

الدراسة الكيميائية

مدخل

يقوم النبات بتركيب العديد من المركبات الكيميائية المعقدة والاساسية للنمو والتطور وتقسم هذه المركبات الى نواتج ايض اولية واخرى ثانوية ، وتستعمل لتلبية الحاجة الغذائية والطاقة وايضا في مجال الصناعة ويحدث هذا التركيب انطلاقا من الجزيئات البسيطة مثل ثاني اكسيد الكربون والماء ،الايونات الفوسفات وباستعمال الطاقة الشمسية وحيث تعتبر نواتج الايض الاولي مصدرا لنواتج الايض الثانوي [1].

I I - 1- نواتج الايض الأولي

هي مركبات تكون غالبا ناتجة مباشرة اما من عملية التركيب الضوئي او الايض التأكسدي (التحلل السكري ،التنفس) وتكون متواجدة في البذور والثمار وكذالك الجذور ..... ،وهي مركبات لها ادوار اساسية في التنفس والنمو والمتمثلة في السكريات والدهون ،الاحماض الامينية والعضوية والبروتينات [1][2] .

I I - 1-1 - تعريف الكربوهيدرات

هي المواد العضوية الأكثر وجودا في النبات وتسمى بالمركبات الثلاثية لانها تحتوي على العناصر الكيميائية التالية : الكربون ،الهيدروجين والأكسجين وهي تشكل نسبة 75% من المادة الصلبة في النبات.

تمثل السكريات الشكل الإدخاري للمواد (نشاء ،جليكوجين)،ولها دور هام في الحماية وتكوين الألياف والسيقان في النباتات كما يتواجد في الأوراق والجذور [3][4][5].

I I - 1-1-1 -أهميتها في النبات

تلعب العناصر المغذية كالسكريات دورا محدد في النمو النبات حيث تشارك بكميات كبيرة لضمان هذه العملية ولسكريات أدورا مختلفة وهامة تساعد النبات على التأقلم والمقاومة الإجهاد المائي [6][7][8] ،تساهم في تعديل الضغط الإسموزي للخلية [9][10]، بالإضافة إلى ذالك فإن السكريات تساعد في حماية التفاعلات المؤدية إلى تركيب الإنزيمات الشيء الذي يسمح لنبات بتحمل أفضل لمؤثرات الجفاف .[11]

I I - 1-2- تعريف البروتيـــــنات

تعتبر البروتينات مركبات عضوية معقدة ذات أوزان جزيئية عالية (12000إلى مليون كيلو دالتون أو أكثر) وقوام غروي ، تحتوي في تركيبها على نسبة ثابتة تقريبا (16 %)من النيتروجين باللإضافة إلى

إحتوائها على عناصر الكربون ، الهيدروجين و الأكسيجين، كما أن معظمها يحتوي على الكبريت و بعضها يحتوي على معادن أخرى كالفوسفور و الحديد.

تتكون البروتينات من وحدات بناء هي الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها بروابط بيبتيدية، تختلف في درجة التعقيد، العدد، وطريقة ارتباطها، كما أن هذه الأحماض تختلف في الوظيفة، حيث تختلف حتى في الكائن الواحد من عضو لآخر.

II - 1- 2 -1- تعريف البروتـنات النباتية وتواجدها في النبات

تتميز البروتينات النباتية باحتوائها على الهستونات و الغلوبولينات و نسبة منخفضة من الألبومينات لا تتعدى (1 %)، حيث تتواجد في جميع الخلايا في عدة أشكال، كمحلول غروي في السائل الخلوي أو في صورة نصف صلبة في شكل مادة غروية أو على صورة صلبة كما في البذور أو في صورة شبه بلورية تتواجد في البقوليات، الفواكه، الحبوب، الخضر، البذور. [12]

II - 1- 2 -3- أهمية البروتينات

- تدخل البروتينات في تكوين إنزيمات جسم الإنسان والكائنات الحية الأخرى، والتي بدورها تساعد على القيام بالعمليات الحيوية بالشكل الصحيح .
- بناء الغطاء الخارجي أو الهيكلي لجميع الخلايا الأساسية في الكائنات الحية .
- تلعب البروتينات دور كبيرا في نمو الجسم وبناء أنسجته كما لها دور كبير في المحافظة على صحة الإنسان، حيث إن نقصها يؤدي إلى إصابته بالعديد من المشاكل.
- تدخل في تركيب وتكوين عضلات الجسم كما وتلعب دورا كبيرا في المساعدة على حرق السعرات الحرارية الإضافية في الجسم .
- لا تقتصر أهمية البروتينات على الإنسان والحيوانات فهي مهمة أيضا للفيروسات التي تلعب دورا كبيرا في تصنيع بعض أنواع البروتينات هيكلية الشكل بالغالب والتي يصل عددها إلى 490 فيروسيا بروتينا .[13]

II - 1 - 3 - تعريف الدهون

هي مركبات تعتبر جزء مكمل لجميع الخلايا الحية في أجسامنا حتى أن بعض الأغذية النشوية التي تتكون أساسا من النشاء تحتوي على كمية صغيرة من الدهون . وقد استعملت كلمة الدهون منذ فترة طويلة للدلالة على مجموعة من المواد الكيميائية غير المتجانسة ،وهي عبارة عن سلاسل طويلة هيدروكربونية، كحولية و ألدهيدية أو أحماض دهنية ومشتقاتها مثل : الجليسريدات، الأسترات، الشموع والفوسفاتيدات كما تدخل أيضا مركبات أخرى ضمنها كالفيتامينات القابلة للذوبان في الزيوت مثل :الكاروتينات، والستيرولات ومشتقاتها من الأحماض الدهنية في صورة أستر.[14]

II - 1 - 3 -1 - خصائصها

- كارهة للماء وتذوب بصعوبة كبيرة في الماء ، تذوب في المذيبات العضوية مثل: الهكسان، الكلوروفورم والايثر...
- تحتوي في جزيئاتها على سلاسل هيدروكربونية طويلة تتركب من حموض ذات جزيئات ضخمة حلقية أو لا حلقية.
- لونها اصفر وتترك اثراً على الورقة حتى بعد الجفاف .[6]

II - 1 - 3 -2 - تواجدها

توجد في الأنسجة الحيوانية والنباتية، وترتبط مع الكربوهيدرات والبروتينات وتكون هي الأجزاء الرئيسية في تركيب جدران الخلايا الحية وفي السوائل التي تحويها .[14]

II - 2- نواتج الأيض الثانوي

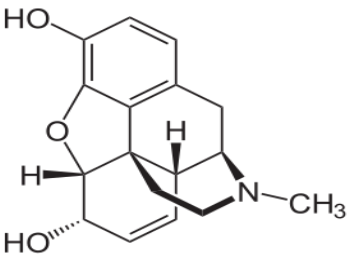
هي مركبات ليست ضرورية للنمو ولكن تساعد النبات على التكيف مع محيطه الخارجي الى جانب تنظيم العلاقات بين النبات وباقي الكائنات النباتية والحيوانية وكذا الميكروبية، ويتم انتاجها من طرف النبات بكميات ضئيلة وبشكل مستمر[16]،والمتمثلة في : المركبات الفينولية و ايزوبربانويد ،المركبات الازوتية والجليكوسيدات[1] لكن رغم هذا فإنها تقوم بدور مهم يتمثل في المحافظة على استمراره وبقائه ومن أهمها المركبات الفينولات .[17][18]

حيث تعتبر الفينولات إحدى أكبر المجموعات النباتية حيث تستعمل في الكثير من المجالات الصناعية، العلاجية والغذائية،فتستعمل صناعيا كمصبغات للجلود وصناعة الصابون[19]،أما علاجيا كمضادات للأكسدة ومضادات حيوية[20] وغذائيا كمكسب لطعم واللون والرائحة.

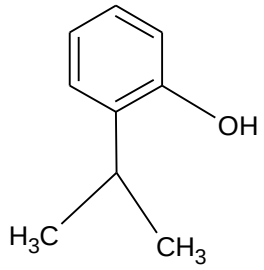
II - 2- 1 - تعريف متعدد الفينولات

تشكل المركبات الفينولية حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية نظرا لكثرة عددها وتباين هياكلها البنائية [21]،وقد تم عزل والتعرف على أكثر من 8000 مركب فينولي وتم توزيعها في مختلف الاقسام بدلالة هيكلها الكربوني. [22]

الفينولات هي مركبات عضوية تحمل حلقة بنزينية واحدة او أكثر في هيكلها العام [23]،حاملة لمجموعة هيدروكسيلية حرة او مرتبطة بوظيفة أخرى(إيثر،أستر او سكر)،غير أنّ تعريفها كيميائيا يعد غير كافي لتشخيص المركبات الفينولية النباتية،إذ أنه يوجد منتجات أيضية ثانوية أخرى تشمل هذا التعريف و لكنها تنتمي لمجموعات كيميائية نباتية مختلفة مثل بعض القلويدات كالمورفين (Morphine)الشكل رقم (2) وبعض التربينات كالتيمول (Thymol) الشكل رقم(3) التي تضم في بنائها حلقة بنزينية ومجموعة هيدروكسيل فينولية مما يستوجب إدخال شرط اللإصطناع الحيوي لحصر حدود هذه المجموعة ،وعليه فإن تعريف المركبات الفينولية يكون على النحو التالي : مشتق غير أزوتي حاوي على حلقة بنزينية او أكثر تحمل مجموعة هيدروكسيل أو مرتبطة بوظيفة أخرى تكونت حلقتها العطرية إمّا من حمض شيكيميك او عديد الأسيتات. [24]



Morphine



Thymol

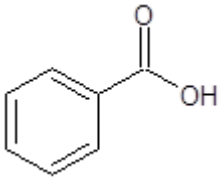
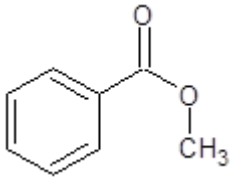
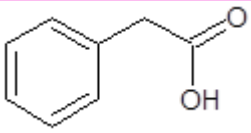
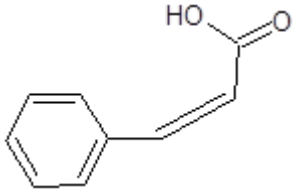
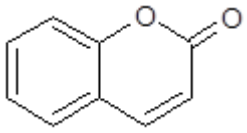
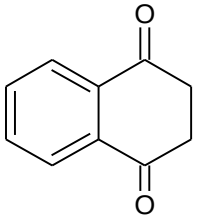
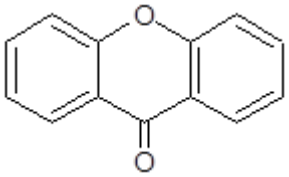
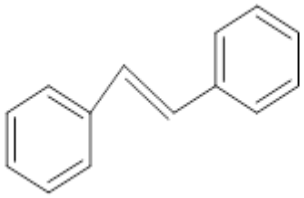
الشكل (2) نموذجين لمركبين غير فينوليين

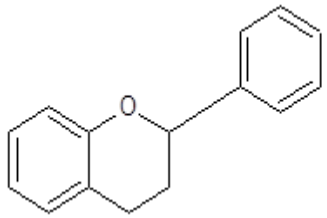
II - 2- 2 -1- أقسام الفينولات

تصنف الفينولات وفقا لعدد ذرات الكربون في الهيكل الاساسي الى عدة اقسام كما هو مبين في الجدول التالي:

جدول (02) أقسام الفينولات. [22]

الجدول 3 : يوضح تصنيف الفينولات

عدد الكربونات	الهيكل	التصنيف	مثال	الهيكل الأساسي
7	C_6-C_1	حمض الفينول	حمض الغاليك	
8	C_6-C_2	Acétophenones	Gallacetophénone	
8	C_6-C_2	Acide phénylacétique	AcideP-hydroxyphéyl-acétique	
9	C_6-C_3	Acides hydroxycinamique	Acidep-coumarique	
9	C_6-C_3	الكومورينات	Esculitine	
10	C_6-C_4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C_6-C_1-C_6	Xanthones	Mangiferine	
14	C_6-C_2-C_6	Stilbénes	Resveratrole	

	Naringénine	Flavonoïdes	C_6-C_3-C_6	15

II - 2 - 1 – 2 -الخصائص الفيزيائية والكيميائية للأحماض الفينولية

- الأحماض الفينولية تذوب وتستخلص بمذيبات عضوية قطبية في وسط حمضي مخفف ،اما الصيغ المستبدلة لها تذوب في الماء .
- جميع الفينولات قابلة للتأكسد بسهولة في الأوساط القلوية ،حيث نجد أن أحماض السيناميك تعطي تراكيب تظهر تحت تأثير الأشعة البنفسجية .
- تنحل الفينولات أساسا في المذيبات العضوية القطبية ،كما تذوب في محاليل هيدروكسيد الصوديوم وكربونات الصوديوم .[25]

II - 2 - 1 – 3 -أهمية الفينولات وتواجدها في النبات

تتواجد الفينولات في جميع الأنواع النباتية على حد سواء ،بينما تختلف توزيعها في الأنسجة النباتية والمستويات الخلوية وتحت الخلوية [26] ،حيث أظهرت أعمال [27][28] أنّ الفينولات ترتبط مع العديد من العمليات الفيسيولوجية للنباتات :نمو الخلايا،تمايز الأعضاء،الإزهار الإثمار كما أنّ لديها خصائص مضادة للجراثيم وتساهم في مقاومة الأمراض للنباتات،كما تقوم الفينولات بظاهرة هامة و هي ظاهرة تراكم المواد الفينولية في الأنسجة النباتية المصابة او في المناطق القريبة منها ويلاحظ ايضا في المناطق المجروحة الناجمة من عوامل الميكانكية وكذالك في حالة نقص بعض المعادن مثل النيتروجين والكبريت [22].

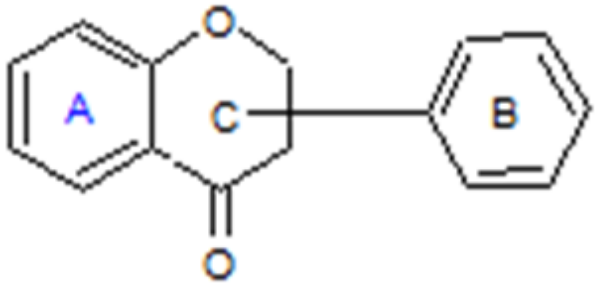
II - 2 - 2 – الفلافونويدات

تمثل المركبات الفينولية قسما بالغ الأهمية في حقل المنتجات الطبيعية و ذلك لتعددها و تباين هياكلها البنائية من هذه المركبات منتجات أيضية ثانوية تسمى الفلافونويدات . اكتشفت الفلافونويدات من طرف عالم الكيمياء الحيوية (1936) Albert Szent Gyorgyi في قشور الليمون [29] والذي صنفها على اساس انها فيتامين P و أدرك أنها تزيد و تعزز من دور الفيتامين C [30]

فقد تم التعرف على أكثر من4000 تركيب فلافونويدي [31] وهذا الإختلاف راجع الى تنوع الغطاء النباتي والأقاليم المناخية .[29]

II - 2- 2 – 1 - تعريفها وبنيتها الكيميائية

هي عبارة عن مركبات فينولية متعددة الفينولات[32] لها وزن جزئي ضعيف [33]،حيث أشتق إسمها من Flavus التى تعني اصفر باللاتينية و هي صبغات نباتية صفراء تتواجد في مختلف أجزاء النبتة (جذور، أوراق و أزهار) وهي مسؤولة عن تلوين هذه الاجزاء [34]،حيث تتميز ببنية اساسية بسيطة تتكون من 15 ذرة كربون في هيكلها الاساسي موزعة على ثلاث حلقات $C_6C_3C_6$ ويعرف بـ 1, 3 diphyenyl propane [35][36] اي على شكل حلقتين متجانستين AوB وثالثة غير متجانسة C تحتوي على وظيفة كيتون و ذرة اكسجين تتوزع تراكيب الفلافونويدات حسب طبيعة الحلقة غير المتجانسة الاكسجينية وهذه الحلقة تشتق سواء من pyrane أو Pyrone او Pyrylium [37] ،كما هو مبين في الوثيقة التالية [38]



الشكل (3) الشكل العام لبنية الفلافونويد

II - 2- 2 – 2 -تواجد الفلافونويدات في النبات

تتواجد في معظم الأصناف النباتية خاصة الراقية منها حيث انها تتواجد بتراكيز عالية في القسم الهوائي للنبات على هيئة جليكوزيدات اي يحتوي بنائها على وحدات سكرية (وجود السكر في الجزيئة يكسبها القدرة على إذابتها في الماء)[39] ،وتنتشر بكثرة عند كاسيات البذور،ومتوسطة الحضور عند عاريات البذور و شبه منعدمة عند الطحالب [40] كما وجدت عند الحزازيات[41] وكذلك عند النباتات أحادية الفلقة ، و تعتبر كأداة تشخصية لذوات الفلقتين.[40]

كما تتواجد على مستوى الخلية النباتية في صورة إيتروزيدات ذوابة في الماء متمركزة في حويصلة الخلية ،أما الفلافونيدات التى تنحل في المذيبات غير القطبية كالفلافونيدات عديدة الميتوكسيل فتتواجد في سيتوبلازما الخلية [42]، حيث ان الفلافونويدات التى هي على صورة أجليكونات (aglycone) تتوضع على الانسجة السطحية للاوراق تكون مرافقة لمواد مفرزة هي الأخرى ليبوفيلية وهو حال نباتات المناطق الجافة و شبه الجافة.[43]

II - 2- 2 – 3 - تصنيف الفلافونيدات

يمكن تقسيمها إعتمادا على نـوع الحلقـة ،عـدم التشـبع ،درجة تأكسد الحلقـة C وعلى حسب جهة إرتبـاط الحلقـة C بالحلقـة B أمـا بالنسـبة لنـوع الفلافونيـدات داخـل المجموعـة الواحـدة يحـدد مـن خـلال المسـتبدلات علـى هيكـل الفلافونيـدات ككـل[44] ،فـي حـين يمكـن تقسيمها إنطلاقا من الإصطناع الحيـوي لهـا فبعضها يعتبر وسائط ومركبات نهائية في الإصطناع الحيـوي مثـل الشـالوكونات ،الفلافـانو-3-أول،فلافـان -3,4-ديـول بعضهاالآخر تعرف فقط بـالمركبات النهـائية فيالإصطناعالحيوي كالفلافانونات،الفلافونولات[45]و يمكن تلخيصها فيمايلي:

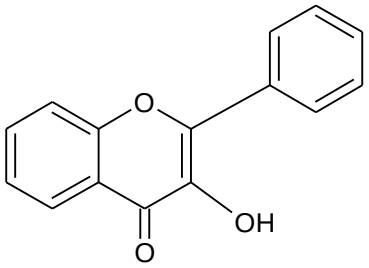
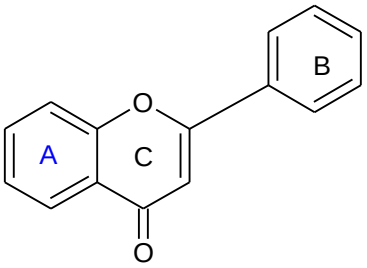
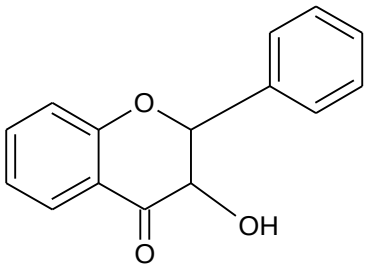
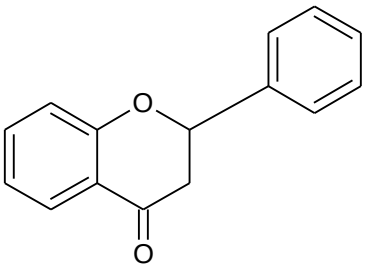
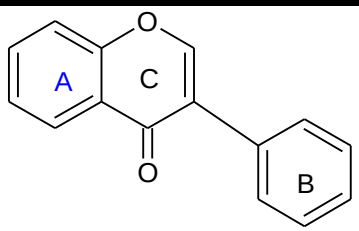
على حسب جهة ارتباط الحلقة C بـ B

فلافونويدات

تسمى فلافونويدات من خلال ارتباط الحلقة B مع الحلقة C في موضع الكربون (2) [46] وتبعا لدرجة الأكسدة للحلقة (C) فهي تنقسم الى عدة مجموعات أخرى[47] ومنه

- **الفلافون Flavone :** اذا كان موقع الكربون 3 من الحلقة C غير مستبدل .
- **الفلافونول Flavonol :** اذا كان الموقع الكربون 3 من الحلقة C مستبدل بمجموعة (OH).
- **الفلافانون Flavanone :** اذا كانت الرابطة (C_2-C_3) من الحلقة C مشبعة والموقع الكربون (3) غير مستبدل .
- **الفلافانونول Flavanonol :** اذا كانت الرابطة (C_2-C_3) من الحلقة C مشبعة والموقع الكربون(3) مستبدل بمجموعة (OH) .
- **ايزوفلافونويدات :** من خلال ارتباط الحلقة B مع الحلقة C في موضع الكربون (3) .[49]

والشكل التالي يوضح بنية المركبات الفلافونويدية [48]

	
بنية الفلافونول	بنية الفلافون
	
بنية الفلافانونول	بنية الفلافانون
	
بنية الايزوفلافونويدات	

الشكل 4: يوضح بنية المركبات فلافونويدية

I I - 2- 2 – 4 - أهمية الفلافونويدات

I I - 2- 2 – 4 -1- فائدتها عند نبات

- الفلافونويـــدات هي عناصر مسؤولة عن إعطاء لونـــا وعبيـــراً علـــى النباتـــات وبصفة خاصة الأزهاروالفواكـــه مما يمنحها الصفة الجاذبة للحشرات والطيور(آكـــلات الأعشـــاب) التي تنقل حبوب الطلع وتساهم في عملية تحرير البذور وبذلك تمنح دورة جديدة لحياة هذه النباتات.
- تلعب دور الحـماية للنبتـة إذ تعطيهـا طعما ممـيزا كـالطعم المرالـذي يـؤدي بـآكلات الاعشـاب الى إختيار نباتات أخرى مما يبـعد الحشرات الضـارة عنها.
- ولها دورفي مراقبة ونمو وتطورالنبات وهذا بتفاعلها بطريقة معقدة مع مختلف هرمونات النمو النباتية .

- تتكامل فيما بينها لتساهم فيما يسمى بـ Phytoalexines وهو إنتاج النبتة للأيض الذي بدوره يعمل على الحماية من البكتيريا والفطريات.
- لكونها تمتص الأشعة فوق البنفسجية ولذلك تحمي نسيج النبات ومنه حماية المواد الأساسية البروتينات والأحماض النووية من الآثار السامة لهذه الإشعاعات.
- كما تساعد على إنقاص من ظاهرة النتح في المناطق الجافة. [50][51] [52]

II - 2- 2 – 4 – 2- فائدة الفلافونويدات عند الانسان

- تلعب الفلافونويدات دورا مهما في صحة الانسان،اذ انها تملك فعاليات مفيدة واقية من الامراض حيث تتعلق الفعاليات البيولوجية للفلافونويدات بصيغتها الكيميائية،ومواقع المستبدلات على هياكلها .[53]
- تحمي الفلافونويدات من اضرار الاكسدة الناتجة عن الاشعة فوق البنفسجية والتلوث البيئي عن طريق الحد من تفاعلات الجذور الحرة المسببة اضرارا للأكسدة .
- تمنع نمو الخلايا السرطانية اذا فهي تقلل من خطر الاصابة بمرض السرطان كما تخفف أعراض الحساسية والتهاب المفاصل،وتزيد من نشاط الفيتامين C .[54]
- كما لها فعاليات بيولوجية اخرى ظهرت نتيجة للعديد من الابحاث منها :
  - تقوي وتحسن أداء عضلة القلب وتقلل من مخاطر أمراض القلب .[55][56]
  - تزيد من مقاومة انكسار الشعيرات الدموية وتمنع حدوث النزيف .[50]
  - تحمي من الجلطات الدموية وتخفض من نسبة الكولسترول في الدم.[50]
  - تحمي الجهاز المخاطي للجهاز الهضمي .[52]
  - تقلل من حدوث مرض السكري. [57]
  - مضادة للجراثيم والفيروسات خاصة الايزوفلافون. [56]

II - 2- 2 -5- خواصها

- الفلافونويدات عبارة عن مركبات هيدروكسيلية تتصف بخواص الفينولات ذات صفة حمضية ضعيفة، قابلة للذوبان في القواعد القوية (هيدروكسيدالصوديوم).
- تتصف الفلافونويدات التى تحمل عدد اكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحر أوالتى تحتوي على جزيئة السكر بالصفة القطبية وبالتالي فهي قابلة للذوبان في المذيبات القطبية (ميثانول اسيتون ، إيثانول ،وماء).[58]
- الفلافونويدات الاقل قطبية التى تحمل عدد أكبر من مجموعات الميثوكسيل فانها تذوب في الكلوروفور أوالايثر. [35][36]

- يتم الاصطناع الحيوي لها عن طريق ثلاث طرق :طريقة الشكيميك و طريقة الخلات وطريقة الشالكون.[59]

المراجع

المراجع الأجنبية

[1]Jean-Francois Morot-Gaudry et Roger Prat .(2012) .Biologie vègètale croissance et dèveloppement ,2e èdition . p: 217-220.

[2]Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. et Stevens P.)2002).Botanique Systématique: une perspective phylogénétique. Ed 1: DEBOECK; p: 84-336.

[3]Harper's, Illustrated Biochemistry. 27th edition, 2006, p: 112-119.

[4]Horton (2006): Principles of Biochemistry. Fourth Edition, 2006, p: 222-234.

[5]Periodical: Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.

[6]Shen B, Jensen RG, and Bohnert HJ, 1997. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. Plant Physiology, 108; 1387–1394.

[7] Zhang J, Nguyen HT, and Blum A, 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crops plants. J. Exp. Bot., 50: 291-302.

[8] Abebe T, Guenzi AC, Martin B, and Cushman JC, 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. Plant Physiology, 131: 1748-55.

[9] Blum A, 1988. Drought resistance. In: Plant breeding for stress environment CRC Press Boca Raton, Florida USA: 43-73.

[10]Ackerson RC, 1981. Osmoregulation in cotton in response to water stress. II. Leaf carbohydrate status in relation to osmotic adjustement. Plant Physiol, 67 :489-493.

[11]Bamoun A, 1997. Contribution à l'étude de quelques caractères morph-ophysiologiques, biochimiques et moléculaires chez des variétés de blé dur (Triticum tirgidum esp durum), pour l'étude de la tolérance a la sécheresse dans la région des hauts plateaux de l'ouest algérien. mémoire de magister, p: 1-33.

[13] Heller R, Esnault R. et lance C.(2000).physiologie Végétal, nutrition. 6ed Dunod Paris. 760.

[14] MACHEIX J J FLEURIET A . et JAY ALLEMAND C. ¸(2005)- les composes phénolique des végétaux :un exemple de métabolites secondaires d' importance économique (ED) Presses polytechnologique et universitaires romandes ¸p4-5.

[16]Joel Reynaud .(2011).comprendre la botanique :Histoire, èvolution, systèmatique , Ellipses èdition Marketing S.A., pp :57,58,59,63.

[17] RICHTER G., Métabolisme des végétaux physiologie et biochimie. PRESSES, polytechniques et Universitaires Romandes, p328-339,(1993).

[19] MAROUF A., Dictionnaire de botanique, les phanérogames. MASSONX iences, DUNOD, paris, p 66-82,(2000).

[20] MACHEIX J. J., FLEURIET A., Les composés phénolique des végétaux: Un exemple de métabolité secondaires d'un portance économique.(Ed) Presses polytechnologiques et Universitaire romandes, p 4-5,(2005).

[22] BENHAMMOU N., 2012 -Activité antioxydante des extraits des composes phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thése doctorat. Université Aboubakr Belkaïd.Tlemcen. 174 p.

[23] URQUIAGA I, LEGHTON F.,plant polyphénol antioxidants and oxidactive stree, Biological Research,p 64-55,(2000).

[25] Jean B., pharmacognnosie phytochimie planates médicinales, 3eme edition Technique. Et Documentions, Paris .(1999).

[26] DEWICK P., Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Jhon Wiley ET SONS, West Sussex, United Kingdom,(2001).

[27] NITSCH, J.P., NITSCH, C. 1961-Synergistes naturels des auxinex et des giberellines. Bull. Soc.Fr.26: 2237-2240.Cité par BENHAMMOU N., 2012 -Activité antioxydante des extraits des composes phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thése doctorat. Université Aboubakr Belkaïd.Tlemcen. 174 p.

[28] ALIBERT, G., RANJEVA, R., BOUDET, M.A. 1977-Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. Physiol. Veg. 15 : 279-301.

[29]Cook P, and Samman S.,(1996).Flavonoids –chemistry,metabolism,cardio -protective effectsm and dietry sources ,nutrutionalbiochemistry ;7:pp 66-76.

[30] Mabry T. J., Thomas M. B., Markham K. R. (1970),the systhematic identification of flavonoids, 13.

[31]Bruneton J.,(1993).Pharmacognosie.Phytochimie ,plantesmédicinales,technique et documentation.Laviosier.

[32] Ribereau-Gayou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetals, Dundo, Paris.

[33] Sai Ran , Sai Sun , Shok , Dai., (2002) .Cytoproctective and immunomodulating properties of (Emblica officinalis) on lymphocytes in vitro study J ethno Pharmacology 81, pp (5-10).

[34] Martens S., Mitthöfer A., (2005), « Flavones and flavone synthases », Phytchemistry, 66 (19), 2399-407.

[35] Bruneton J.,(1993).Pharmacognosie.Phytochimie ,plantes médicinales ,technique et documentation.Laviosier.

[36] Bruneton, J.,(2009). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, 1288 p.

[37] Bruneton., (1999). J.Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales (3éme édition) Tec & Doc Paris ,1999/1120.

[38] Yakhlef. G, (2010)- .Etude De L'activite Biologique Des Extraits De Feuilles De Thymus VulgarisL. Et Laurus NobilisL.,thèse de Magister, université el hadj Lakhdar (Batna),.P18-19.

[39] Martens S., Mitthöfer A., (2005), « Flavones and flavone synthases », Phytchemistry, 66 (19), 2399-407.

[40] Harborne J. B. (1989). The flavonoids, advances in research since 1980, eds. Chapman and Hall, New York.

[41] Harborne J. B. (1975). Progress in phytochemistry, V. 5, eds. Swin, T, Pregamon press.

[42] Harborne J. B. (1973). phytochemistry, 2, 334.

[43] Wollenweber, E. and Dietz, V. H. (1980). Biochem. Syst.Eco, 8, 21.

[44] KIJHNAU J., 1976- The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. Wld. Rev. Nutr. Diet. 24.P :117-191.

[45] Satyajit, D. (2007). Chemistry for Pharmacy Students, John Wiley & Sons Ltd, England.

[46] Harborne J. B., Williams C. A, (2000)-:advances in flavonoid research since 1992. Photochemistry. 55 481 -504 .

[47] Rice-Evans C.A., Miller N.J., and Paganga G. (1996). Structur-antioxidant activity relationshirps of flavonoids and phenolic acids. Free. Radical. Biol. Med. 20, 933-956.

[48] Grotewold.E. ,(2008).The Science of Flavonoids, Business Media .P : 2 .

[49] Belkacem, s,(2009)-thèse de magister, investigation phytochimique de la phase n-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes decentaureaparviflora(compositae). université mentouri – constantine , p 34.

[50] BROWN D., RASHOTTE A., MURPHY A., NORMANLY B., TAGUE W., PEER L., TAIZ G., 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxine pharmacie. Botanique – Pharmacognosie – Phytothérapie – Homéopathie. Ed. Pharmacol, 32.P :1995.

[51] PALAZON J., CUSIDO R., MORALES C., 1999- Métabolisme et la signification biologique des polyphénols dans le vin, Groupe de biotechnologie des plantes, Faculté de Pharmacie, Université de Barcelone.p:156.

[52] DICARLO G., MASCOLO N., IZZO A., CAPASSO F., 1999- Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences, 65(4), 337353.

[53] PIETTA P., 2000. Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products,63(7), 1035-1042.

[54] ZHOU J., WANG L., WANG J., TANG N., 2001. Antioxidative and antitumour activities of solid quercetin metal(II) complexes. Transition Met. Chem ,26(1-2), 57-63.

[55] YOCHUM L., 1999. Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. American Journal of Epidemiology.p: 14910.

[56] HERTOG M., 1995- Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart. disease and cancer in the seven countries study. Archives of Internal Medicine, Vol. 155 No. 4.p:28.

[57] CHAUDHRY P., CABRER A ., JULIANI H., VARMA S., 1983- Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and Indomethacin Biochem Pharmacol, vol 32.p:1995.

[58] Dragan A ,Dusanka D-A ,Drago B ,Nenad T., (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids . Croat . Chem.Acta .2003 ; 76(1) :pp 55-61.

[59] Hollman P.C.H., Arts I.C.W (2000) Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80(7), 1081-1093.

المراجع العربية

[12] احمد عاشورمروان(2000) أساسيات كيمياء الأغدية، دار الكتاب الجديدة المتحدة.

[15] بن عاشورة صبرينة البتول .،2007 الفعالية المضادة للاكسدة للزيوت الطيارة والمركبات الفينولية ،مذكرة ماجستير ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة.

[18] بن بوط أمال،(2014)،تأثير بعض المركبات الميثابوليزم الثانوي لنبات الحرمل Peganum Harmal L على بعض السلالات البكترية ،وبعض النواحي الفيزيولوجية ،النسيجية والسلوكية عند الفئران المخبرية ،مذكرة دكتوراء، جامعة منتوري قسنطية .

[21] بوبطيمة أ.،2012 – مقارنة بين الطريقة الفيتوكيميائية والطريقة الفيتوكيميائية في دراسة فينولات بعض النوى التمر المحلي .مذكرة ماستر اكاديمي .جامعة قاصدي مرباح .ورقلة .الجزائر .97ص

[24] عزري خضرة (2013) دراسة الليبيدات والفينولات في بعض انواع التمر المحلي ،مذكرة ماجستير في الكيمياء ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة .

التوتر التأكسدي، مضادات الأكسدة و الجذور الحرّة

III-1-التوتر التأكسدي

يعرف التوتر التأكسدي بإختلال التوازن ما بين الأليات التي تؤدي إلى إنتاج الجذور الحرة والاليات التي تعمل على التخلص منها أو ما تسمى بمضادات الأكسدة و قد يرجع ذلك الإختلال إما إلى تنشيط الأليات الأولى أو إلى تثبيط الاليات الثانية أو الإثنين معا. وتؤدي كل تلك الحالات إلى تراكم الجذور الحرة و التي تتميز بقدرة عالية على إتلاف الانسجة . [2]

III-2- تعريف الجذور الحرة

تعرف الجزيئات على انها مجموعة من الذرات المرتبطة بروابط قوية عن طريق الكترونات حلزونية متعاكسة تكون محملة بطاقة كافية لها القدرة على تخريب هذه الأواصر ومن هنا تظهر وحدات كيميائية جديدة تدعى بالجذر الحر. [3]

وعلى هذا الأساس تم تعريف الجذر الحر بأنه عبارة عن ذرة أو جزيئة حيادية أو مشحونة تمتلك إلكترون أو اكثر على مدارها الخارجي غير متزاوج [4][5] وهي مواد غير مستقرة تتفاعل مع جزيئات أكثر إستقرارا لإرتباط إلكترونها، ويحدث هذا اما بأخذها إلكترون (تتصرف كمؤكسد) أو بفقدها إلكترون (تتصرف كمرجع). وينتج عن هذا التفاعل ظهور جذور جديدة، ومن هنا يمكن تفسير قدرة جذر واحد على إتلاف الخلية. [6]

الشكل 5: صورة لجذر تحت المجهر

III-2-1- مصادر الجذور الحرة

تنشا الجذور الحرة في جسم الانسان عن طريق مصادر داخلية وخارجية وتتكاثر في حالات المرض والارهاق النفسي والجسدي والزيادة في العمر شيئا فشيئا. [7]

مصدرها الطبيعي

حيث تظهر طبيعيا اي داخليا من اثر التفاعلات الحيوية داخل الجسم و يعتبر النشاط الايضي داخل الخلايا مصدر داخليا للجذور الحرة [8]، حيث تعد بيوت الطاقة (الميتوكوندريا) المتواجدة داخل الخلية المنبع الرئيسي للتوليد هذه الجذور [9]، بالإضافة الى الادرينالين و الدوبامين. [7]

مصدرها الخارجي

اما بالنسبة الى مصادرها الخارجية فهي عديدة أهمها :

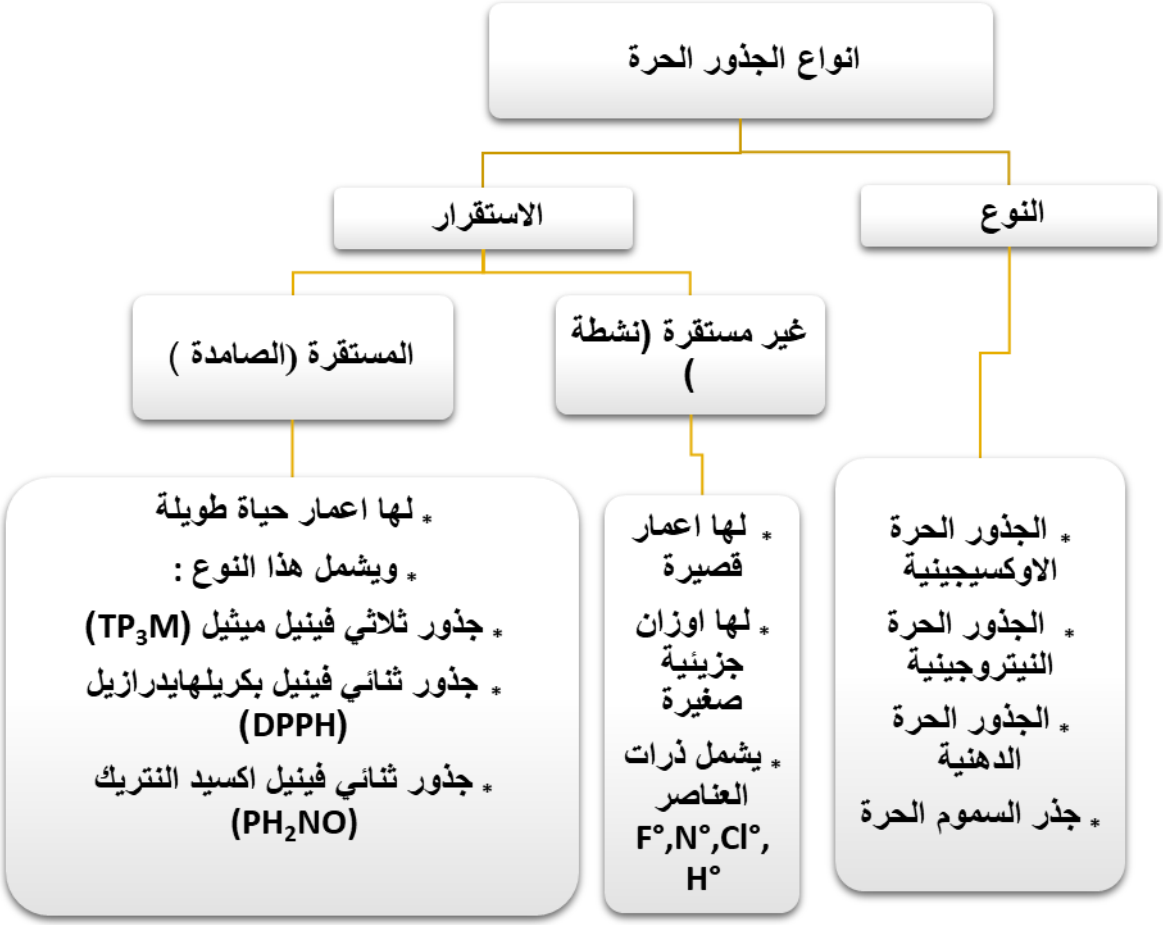
تنشأ من الأشعة البنفسجية ومن السجائر وكل انواع التدخين بالإضافة الى المبيدات والمواد البيتروكيميائية،المذيبات البنزينية، بعض العقاقير،الاشعة الكونية واشعة X ،فرن الامواج القصيرة ،القوى الكهرومغناطيسية والمولدات الكهربائية وبعض الاطعمة المتناولة ،الغازات المنبعثة وهكذا لا يمكن منع ظهور الجذور الحرة لأنها جزء من نشاطاتنا الايضية و حياتنا اليومية داخل هذا العالم الصناعي. [7]

III-2-2- متابعة حركية الجذور الحرة

تكون الجذور الحرة ذات أعمار طويلة أو قصيرة، فالقصيرة لا يمكن متابعة حركية تفاعلاتها إلا بالطرق الطيفية السريعة مثل أطياف تجزيء الكتلة وأطياف رنين البرم الإلكتروني ، أما الجذور المستقرة نسبيا فيمكن متابعة حركية تفاعلاتها في الطرق التقليدية مثل قياس التغير بالتوصيلة الكهربائية بوحدة الزمن، أو التغير بالتركيز المولاري بوحدة الزمن،أو التغير بحجم الغاز عن طريق المعايرة بالحامض أو القاعدة ولكن أدق هذه الطرق هي قياس تغير كثافة الضوء الممتص بوحدة الزمن بواسطة أجهزة قياس أطياف الأشعة فوق البنفسجية – المرئية (UV-Vis) شرط أن يمتص الجذر الحر الضوء بمنطقة تختلف عن منطقة امتصاص المادة الناتجة فمثلا يمتص الجذر ثلاثي فينيل المثيل ($Ph_3C°$) الضوء عند 345 نانومتر و510 نانومتر بينما يمتص ثلاثي فينيل ميثان (Ph_3CH)الضوء عند الضوء عند 262 نانومتر. [10]

III-2-3- أنواع الجذور الحرة

يتم تقسيمها اعتمادا على الاستقرار [11]والنوع كما هو مبين في المخطط التالي



الشكل6 : مخطط يوضح أنواع الجذور الحرة

III-2-4- تفاعلات الجذور الحرة

تتفاعل الجذور الحرة بكافة أنواعها طويلة أو قصيرة العمر المشحونة أو المتعادلة بتفاعلات سريعة جدا ومختلفة.وهذه بعض تفاعلاتها :

تفاعلات التبادل الإلكتروني

يتم في هذا التفاعل انتقال إلكترون من المادة المستقرة المتواجدة بالمحيط إلى الجذر الحر وبذلك يتكون أيون سالب مشتق من الجذر الحر وجذر حر جديد مشتق من الأيون السالب [12]

$$OH^{\bullet} + CL^{-} \rightarrow OH^{-} + CL^{\bullet}$$

تفاعلات تفكك الجذور الحرة

تتفكك الجذور الحرة بصورة مختلفة معتمدة بذلك على طبيعة الجذر الحر ومثال على ذلك تفكك جذور الأسيل بواسطة فقدان جزيئة أول أكسيد الكربون [12] كما هو موضح في الآلية التالية :

$$RC^{\bullet} = O \rightarrow R^{\bullet} + CO$$

تفاعلات إتحاد الجذور الحرة

إن تفاعلات الجذور الحرة مع بعضها البعض تعد من التفاعلات المهمة جدا حيث ينتهي وجود هذه الجذور بنظام ما بهذه التفاعلات مع تكون مركبات مستقرة ويطلق على هذه التفاعلات بتفاعلات الإتحاد أو تفاعلات تكوين الدايمر [12] كما هو موضح في الالية تالية :

$$OH^{\bullet} + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O_2$$

$$NH_2^{\bullet} + NH_2^{\bullet} \rightarrow N_2H_4$$

الإحتراق

الإحتراق من أشهر تفاعلات الجذور الحرة ،حيث يتم كسر الرابطة المزدوجة القوية فيخلف ذلك إنتاج الجذر الحر للأكسجين .وتعتمد مدى قابلية أي مادة للاشتعال على تركيز الجذور الحرة التي يجب أن تكون موجودة قبل بدء الإشتعال والتي تؤدي لحدوثه. وعند انتهاء المادة المشتعلة تبدأ تفاعلات الإنتهاء والتي تؤدي لإطفاء النيران. [13]

III-2-5-أضرار الجذور الحرة

تتواجد الجذور الحرة في جسم الكائن الحي بتراكيز ضعيفة حيث تلعب أدواراً فيزيولوجية مهمة وفعالة كما تستعمل كوسائط منظمة للوظائف البيولوجية على سبيل المثال:

- توسيع الأوعية الدموية .
- تستعمل على شكل رسائل عصبية.
- الدفاع عن الجسم ضد الجراثيم.

بالمقابل فإن الإنتاج المفرط للجذور الحرة يؤدي إلى عدة إختلالات على مستوى الجزيئات الخلوية[14] منها :

- أضرار واقعة على البروتينات .
- أضرار واقعة على الدهون وهي الأخطر.
- أضرار اخرى كالأمراض القلبية والأوعية الدموية . [15]

III-3- مضادات الأكسدة

يطلق مصلح مضادات الأكسدة على كل مادة أو مركب له فعالية ضد الأضرار التأكسدية و يعمل على تأخير أو الوقاية من فعل الجذور الحرة،تعمل مضادات الأكسدة على الحماية بعدة طرق إما بالتثبيط المباشرلإنتاج صنف الاكسجين النشط (ROS) أو منع إنتشارها أو هدمها [16]،أي عمليات الأكسدة التي تحدث تحت تأثير الأكسجين المتواجد في الغلاف الجوي أو أنواع الأكسجين التفاعلية [17]، تستعمل الخلية العديد من الآليات المضادة للأكسدة،وتختلف طبيعة هذه الأنظمة المضادة للأكسدة حسب الأنسجة والنوع الخلوي وحسب تواجدها في الوسط داخل وخارج الخلوي. وتتواجد مضادات الأكسدة في جسم الكائن الحي على صورة أنظمة إنزيمية وأخرى مرافقات إنزيمية (Co- enzymes) أو مركبات تحتوي على عنصر الكبريت المختزل [18]،كما تتواجد بصورة طبيعية في معظم الخضروات والفاكهة ومعظم الأعشاب الطبية.

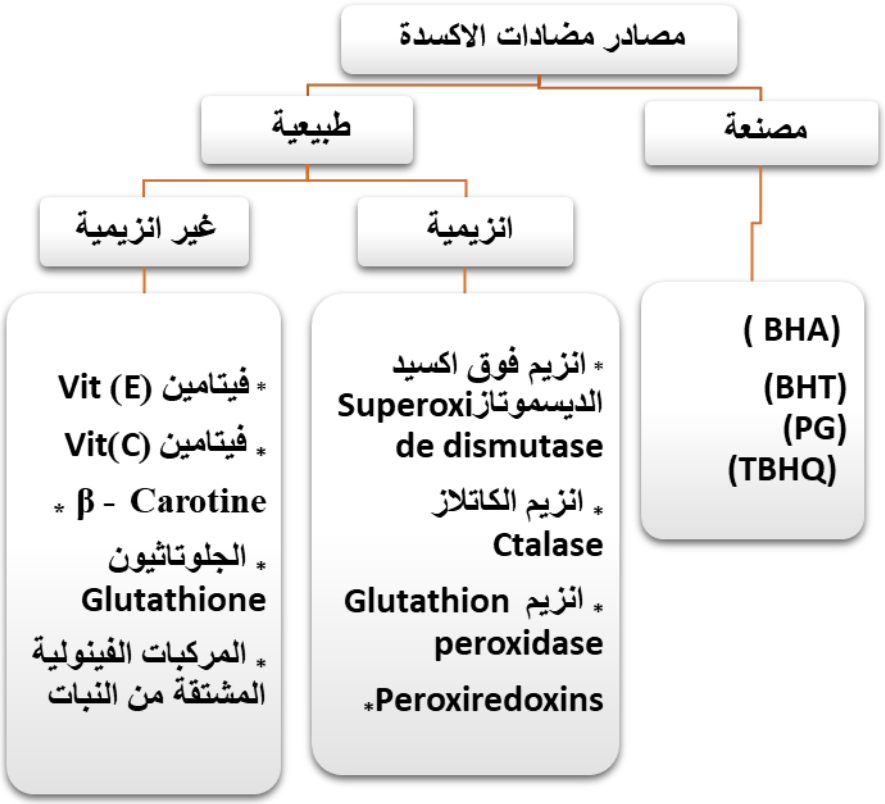
وهي عبارة عن مواد مانحة لذرات الهيدروجين أو أنها تتحد مع الجذر و تحوله إلى مركب مستقر [19] [20]كما هو موضح في الآلية التالية :

$$ROO^{\bullet} + AH_2 \rightarrow ROOH + AH^{\bullet}$$

$$AH^{\bullet} + \mathrm{AH} \rightarrow A + AH_2$$

III-3- 1- مصادر مضادات الأكسدة

تنقسم مضادات الأكسدة من حيث مصادرها إلى طبيعية وإصطناعية وذلك حسب المخطط التالي:[21] [16]



الشكل 7 : مخطط يوضح مصادر مضادات الأكسدة

III-3- 2- آلية تفاعل المواد المضادة للأكسدة

المراحل الأساسية للأكسدة عن طريق الجذور الحرة تظهر في سلسلة التفاعلات المتمثلة في المرحلة الابتدائية و الإنتشار و التفرع والمرحلة النهائية[22] ويتم التفاعل في وجود عوامل خارجية مثل الضوء والحرارة أو المواد الكيميائية . [23]

الجدول 4 : آلية تفاعل المواد المضادة للأكسدة

المرحلة الإبتدائية	$LH + R^{\bullet} \longrightarrow L^{\bullet} + RH$
مرحلة الإنتشار	$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$ $LOO^{\bullet} + LH \rightarrow L^{\bullet} + LOOH$
مرحلة التفرع	$LOOH \rightarrow LO^{\bullet} + OH^{\bullet}$ $2LOOH \rightarrow LOO^{\bullet} + LO^{\bullet} + H_2O$

المرحلة النهائية	$LO^{\bullet} + LO^{\bullet}$ $LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet}$ $LO^{\bullet} + LOO^{\bullet}$

III-3- 3- دور مضادات الأكسدة

لقد زاد الاهتمام بمضادات الأكسدة في السنوات الأخيرة بسبب قدرتها على تحصين الجسم ضد غزو الجراثيم والقضاء عليها، كما تقي الجسم من أمراض العصر الشائعة [24]،كما تحمي ADN من الضررو تثبط عمل الجذور الحرة [25]. ويكّمن دورها الأساسي في أنها تمنع من إنتشار سلسلة تفاعلات الجذور الحرة الناتجة من الأكسدة . [16]

III-3- 4- طرق تقدير إجمالي فعالية المواد المضادة للأكسدة

إنّ قدرة الفعالية الكلية المضادة للأكسدة (TAC) تعتبرأداة في تحقيق العلاقة بين مضادات الأكسدة الغذائية والأمراض الناجمة عن الأكسدة [26]،وقد وضعت لها العديد من الطرق التحليلية لقياس قدرة مضادات الأكسدة الكلية للنباتات والأغذية والمشروبات،هذه الطرق تختلف في آلية توليد مختلف أنواع الجذور و الجزيئات المستهدفة وهي الطرق التي يتم بها قياس المنتجات المدروسة.[27]

هناك العديد من الطرق التحليلية المختلفة لإختبارالقدرة الكلية المضادة للأكسدة [28] سنذكراهمها فيما يلي :

- **التقنيات الطيفية**

التقنيات الطيفية تعتمد على التفاعلات الجذرية تفاعل الجذر مع الكاتيون، أو المعقدات مع جزيء مضاد للأكسدة ،التي لها القدرة على منح ذرة هيدروجين [28][29] نذكر الأهم منها :

طريقة DPPH ، ABTS ، FRAP و PPM

- **طريقة فوسفومولبيبدات PPM**

ويصنف من الطرق المباشرة لقياس القدرة الإرجاعية المضادة للاكسدة[30]،ويعد إختبار الفوسفومولبيبدات (PPM) بديلا للاختبار $DPPH^{\bullet}$، ويحدث في هذا الإختبار تغير الهيدروجين والإلكترون من المركب المرجع المتواجد في المستخلص النباتي المضاد للأكسدة إلى المعقد المؤكسد (PPM) ويحدث التحويل إعتمادا على pH الوسط و هيكل المركب المضاد للأكسدة ويتحقق من خلال تشكيل معقد أخضر في وسط حامضي . [31]

- **طريقة الجذر الكاتيوني ABTS**

يعتبر جذراً فعالا إتجاه معظم المركبات المضادة للأكسدة، كما أنه يذوب في كل من المذيبات العضوية والمائية، لذلك يمكن استعماله لتقدير نشاطية كل من مضادات الأكسدة التي تذوب في الماء والدهون في أطوارمختلفة. [32]

طريقة $DPPH^{\bullet}$

هو جذر حر مستقر،وذلك بسبب عدم التمركز الطفيف للإلكترون على كامل الجزيء و منه $DPPH^{\bullet}$ لا يفقد استقراره كما يحدث مع معظم الجذور الحرة،و عدم التمركز لجزيء $DPPH^{\bullet}$ يحدد بظهور اللون الأرجواني مع ظهور قمة إمتصاص أعظمية في حدود520 نانومتر [33][34]،عندما يتفاعل $DPPH^{\bullet}$ مع الهيدروجين المعطى يتم إنشاء جزيء مخفض بشكل (DPPH) ويرافقه إختفاء في اللون البنفسجي ولذلك فإن نقصان الإمتصاصية يعتمد على تركيزمضادات الأكسدة ويستعمل حمض الأسكوربيك كمنحى قياسي مرجعي للمادة المضادة للأكسدة. [35] [36]

المراجع الأجنبية

[1] JULES B et CHARLES-MARIE E., 2002- Botanique systématique. 1ére Ed. Bibliothéque nationale, Paris. 373p.

[2] Halliwel B. (1997).Antioxidants and human disease: General Introduction. Nutrition Revieus;55(1): 544 – 552 .

[3] MILANE H., 2004- La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; étude s et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat . Université Louis Pasteur Strasbourg, France, 268 p.

[4] Kerkeni A. (1998). Radicaux libres, systèmes antioxydants et pathologies oxydatives.Deuxième Colloque International. Eléments trace, Radicaux libres et pathologie oxydatives.Manashi. Tunisie. 17-18 Avril 1998.

[5] Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 160 (Issue 1):1–40.

[6] Dodet B. (1991). La chasse aux radicaux libres oxygénés . Biofutur, 101: 23 34.

[7] Poulose SM ; Harris ED ; Patil BS.,(2005). Citrus limonoids induce apoptos is in humain neuroplastoma cells and have radical scarenging activity. J Nut Val 135,pp 870-877.

[8]Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J.(2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 39: 44-84.

[9] RAQUIBUL HASAN S.M., 2009- DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants, Journal of Medicinal Plants Research. 3(11): 875-879.

[11] Percival antioxidants- chimical nutrition insights :1-4,(1998).

[14] FLAVIER A., 2003- Le stress oxidant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.

[15] GOD'SWILL N.A., KAYODE O.O., 2010- Comparative Antioxidant Phytochemical and Proximate Analysis of Aqueous and Methanolic Extracts of Vernonia amygdalina and Talinum triangulare, Pakistan Journal of Nutrition. 9 (3) 5 259-264.

[16] Miquel , can antioxidant diet supplementation protect against age- related mitochondrial damage, Acad S ci .959.p:508-516, (2002).

[17] Litescu SC, Sandra AV, Eremia SAV, Diaconu M, Tache A, et al. (2011) Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants. Environmental Biosensors. In Tech Rijeka Croatia.

[18] KITTERINGHAM N.R., POWELL H., CLEMENT Y.N., DODD C.C., TETTEY J.N., PIRMOHAMED M. , SMITH D.A., MCLELLAN L.I. and KEVIN PARK B., 2000- Hepatocellular response to chemical stress in CD-1 mice: induction of early genes and gamma-glutamylcysteine synthetase, Hepatology. 32, 321–333.

[19] HILCENT.R, « chimie organique hétérocyclique », (2003), EDP. Sciences.

[21] Desai P. B., Manjunath S., Kadi S., Chetana K. and Vanishree J.(2010). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. Eur Rev Med µPharmacol Sci. 14: 959-967.

[22] Antolovic M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S and Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. Analyst 127: 183–198 .

[23] Kanner J, German JB and Kinsella JE (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems. Crit Rev Food Sci Nutr 25: 317-364.

[24] PIETTA P.G., 2000- Flavonoids as antioxidants.J.Nat.Prod. 63 (7), 1035 1042.

[25] CHOWDHURY A., SANTRA A., BHATTACHARJEE K., GHATAK S., SAHA D.R., DHALI G.K., 2006- Mitochondrial oxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice. J Hepatol. 45(1): 117-126 .

[26] Serafini M, Bellocco R, Wolk A and Ekstrom AM (2002) Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. Gastroenterology 123: 985-999.

[27] Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brighenti F, et al. (2000) Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). J Agric Food Chem 48: 732-735

[28] Giardi MT, Rea G, Berra B (2010) Bio Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

[29]Chong PL, Olsher M (2007) Fluorometric assay for detection of sterol oxidation in liposomal membranes. Methods Mol Biol 400: 145-158.

[30] BERCHE P., GAILLARD J.L., SIMONET M., 1988- Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Ed Flammarion Médecine-Sciences, Paris, France, 660 p .

[31] Ardestani A., Yazdanaparast R., Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Teucrium polium on in vitro protein glycoxidation, Food and chemical Toxicology. 45:2402-2411,(2007).

[32] Çelik, S.E., Ozyürek, M.,Güçlü , K., Apak, R. (2010). Solvent effect s on the antioxida nt capac ity of lipophilic and hy drophilic antioxidants measured by CUPRA C, ABTS/ persulp hate and FRAP methods. Talanta 81, 1300–1309.

[33] Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-Wiss u-Technol 28: 25-30 .

[34] Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 26 : 211-219.

[35] Pisoschi AM, Cheregi MC and Danet AF (2009) Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. Molecules14 : 480-493 .

[36] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L and Byrne DH (2006) 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.

المراجع العربية

[12]علي عبد الحسن سعيد ،كيمياء الجذور الحرة ،دار المسيرة للنشر و التوزيع والطباعة الطبعة الأولى (2009).

[13] الصديق قمولي ،دراسة كهروكيميائية لفينولات نوى التمر المحلي ،مذكرة ماستر كيمياء مطبقة,جامعة قاصدي مرباح ورقلة(2011).

[10] الدكتور:ع.ع .سعيد "كيمياء الجذور الحرة "دار المسيرة للنشر و التوزيع و الطباعة- الأردن (2001) الطبعة الأولى صفحة 192.

[20].د .ب .كامل، د .كـ .الركابي ،"كيمياء الأغذية المكتبة ", 1981 ,الوطنية ببغداد.

الفصل الرابع
الفعالية ضد الميكروبية

مقدمة:

يوجد العديد من الكائنات الحية الدقيقة قادرة على العيش في أي مسكن أو بيئة مناسبة على وجه الأرض حتى التربة والمياه العميقة والقشرة الأرضية ضمن البيئات ذات نسب عالية من الفضلات النووية والكبريتية الحمضية ومن بين هذه الكائنات البكتيريا ،الفطريات والخمائر.

IV- 1- تعريف البكتيريا

البكتيريا (Bactérie) كائنات حية دقيقة مجهرية بدائية النوى بسيطة وحيدة الخلية وتعتبر من اصغر الكائنات الحية يتراوح قطر معظمها مابين 3. 0 و 2 ميكرون منها المكورات والعصيات وهي تتجمع مع بعضها وتأخذ أشكالا متعددة مثل عقد أو سبحة فتسمى مكورات عقدية أو على شكل عنقود فتسمى مكورات عنقودية ،تتراوح أبعاد البكتيريا ما بين (5-0.5 ميكرومتر) مع أن التنوع الواسع للبكتيريا يمكن أن يظهر تعدد أشكال كبيرة جداً. [1][2]

IV- 1- 1-التصنيف

و يصنف العلماء البكتيريا وفق عدة تصنيفات نذكر من بينها:

IV- 1- 1-1- حسب الشكل

بعض البكتريا مكورة الشكل وتسمى المكورات وبعضها يأخذ شكل عصا وتسمى العصويات ،والبعض يأخذ شكل الفاصلة أو الضمة وتسمى بالضميات ومن أنواعها حسب الوسط الذي تعيش فيه. **[3][2]**

- **البكتيريا الهوائية**

يعيش هذا النوع من البكتيريا فقط في الهواء المحيط بنا أي الجو ،وهي تعتبر مصدراً رئيسيا لتسمم الأغذية ومن أمثلتها Neisseria.

- **البكتيريا الاهوائية**

يعيش وينمو هذا النوع من البكتيريا فقط في غياب الهواء ومن أمثلتها Clostridium.

- **البكتيريا الاهوائية إختيارية**

يعيش هذا النوع من البكتيريا في غياب الهواء ومن امثلتها E.COLI

IV- 1- 1-2- عضوية التغذية وذاتية التغذية

تنتمي أغلب الجراثيم إلى مجموعة البكتيريا عضوية التغذية Hétérotrophie Bactérie وتنقسم هذه المجموعة إلى نوعين جراثيم رمية وأخرى طفيلية،تعيش الجراثيم الرمية وتتغذى على حساب المواد العضوية للعضويات الميتة أما الجراثيم الطفيلية المرضية فتعيش على سطح جسم العضويات الحية أو داخلها (نباتات أو حيونات)،حيث تتغذى على حسابها وتسبب هذه الفئة من الجراثيم للإنسان والحيوان كثيرا من الأمراض مثل الكوليرا.

أما الجراثيم ذاتية التغذية Autotrophie bactérie فهي التي تستطيع تمثيل غاز الفحم الجوي ،ويدعى هذا النمط من التغذية بالتركيب الكيميائي Chimiosynthéses والذي تستخدمه في تصنيع مواد عضوية مهمة لنموها وتكاثرها إنطلاقا من مواد عضوية .

IV- 1- 1-3- حسب صبغة الغرام

تصنف البكتيريا عن طريق إستخدام الفروق في بنية الجدار الخلوي وهذا بإستخدام التقنية المسماة (Gram Stain) نسبة للعالم البلجيكي H.C.J.GRAM المخترعة سنة 1884 وعن طريقها يمكن أن نقسم البكتيريا إيجابية لغرام Gram Positive وسلبية لغرام Gram négative.

وتعود هذه الفروق إلى بنية الجدار الخلوي فالخلية سالبة الغرام تحتوي على غشاء خارجي مشكل من الفوسفوليبيدات Phospholipides وهذا مالانجده في البكتيريا موجبة لغرام ،ونتيجة لهذا الفرق تعطي البكتيريا ألوان مختلفة مع صبغة الغرام :فإذا حافظت البكتيريا على لون الكاشف كانت البكتيريا موجبة لغرام أما إذا تغير اللون إلى وردي كانت البكتيريا سالبة الغرام .[4]

IV- 1- 3- الأنواع البكتيرية المستعملة

عندما تدخل البكتيريا الضارة للجسم، تطوقها كريات الدم البيضاء وتهاجمها ،كما يكوّن الدم أجساما مضادة وهي مواد تقتل أو تضعف البكتيريا.غير أنه مايجلب الإنتباه أن البكتيريا تبدي مقاومة الأجسام المضادة حيث هذه المقاومة إما طبيعية أو مكتسبة كما نوضحه من خلال البكتيريات المستعملة وهي:

- ***Escherichia coli***

تنتمي بكتيرية هذا النوع الى عائلة *Enterobacteriaceae* وتمثل أكبر قسم من الكائنات الدقيقة التي تعيش في الأنبوب الهضمي لكنها ممرضة للجهاز البولي [5] تتميز بأنها عصوية على شكل قضيب ذات أبعاد من 1 الى 3 ميكرومتر سالبة لغرام،تتكاثر بسرعة كبيرة للغاية عند درجة حرارة 37م° تشكل سلاسل وتتحرك بواسطة أسواط جسمية . [1][2][6]

الجدول 5 : يوضح تصنيف البكتيرية *Escherichia coli*

الشعبة	*Bacteria*
الطائفة	*Gammaproteobacteria*
الرتبة	*Entérobacteriales*
العائلة	*Enterobacteriaceae*
الجنس	*Escherichia*

الشكل 8 :صورة *Escherichia coli*

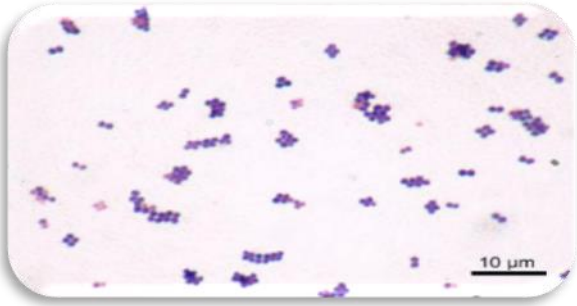
البكتيريا العنقودية *"Staphyloccus aureus"*

تنتمي إلى عائلة *Micrococcaceae*، تظهر هذه البكتيريا في المجهر على شكل مكورات موجبة لغرام غير متحركة قطرها حوالي 1ميكرومتر تتجمع في ثنائيات أو على شكل عنقود عنب صغير[7] [8] لاهوائية اختيارية تنمو بالتنفس الهوائي او بالتخمر،تتواجد على الجلد في الغدد الجلدية وعلى كثير من المواد الغذائية [9]،لها القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء يمكنها إفراز سموم في بيئة النمو في سلالات ممرضة ،كما قد تحدث تسمم غذائيا،كذالك تفرز هذه البكتيريا مجموعة من السموم الداخلية .[7]

.

الجدول 6 : يوضح تصنيف البكتيرية *Staphyloccus aureus*

الشعبة	*Bacteria*
الطائفة	*Bacilli*
الرتبة	*Bacillales*
العائلة	*Micrococcaceae*
الجنس	*Staphylococcus*



الشكل 9: صورةالبكتيريا العنقودية *Staphylococcus eureus*

بكتيريا *Klebsielle pneumonia*

تنتمي إلى *Enterobactériaceae* ، تعتبر من بين البكتيريا البيئية (تتواجد في الماء ،تربة ،هواء ....)،هي عبارة عن عصويات سالبة لغرام،غير متحركة تتميز بشكلها الدائري محدبة [8][10][11] لا هوائية إختيارية يترواح طولها من 1 إلى 2 ميكرومتر وعرضها حولي (0.5- 0.8) ميكرومتر تكون منفردة او ثنائية او على هيئة سلاسل قصيرة،تتواجد بصورة طبيعية في الفم،الأمعاء وعلى الجلد تسبب إلتهاب شديد في المثانة ،الرئة،الأذن،الأنف والجيوب الأنفية. [12]

الجدول 7 : توضح تصنيف البكتيرية *Klebsielle pneumonia*

الشعبة	*Bacteria*
الطائفة	*Gammaproteobacteria*
الرتبة	*Enterobacteriales*
العائلة	*Enterobacteriaceae*
الجنس	*Klebsiella*

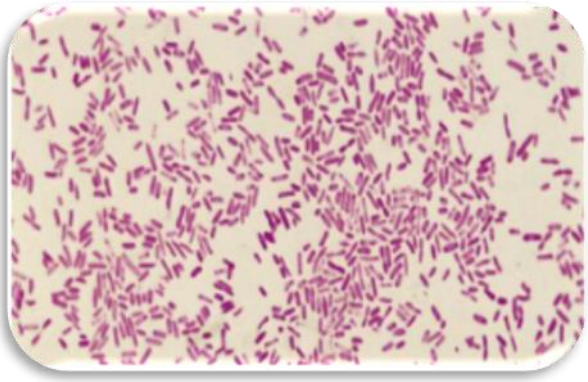
الشكل 10: صورة بكتيريا *Klebsielle pneumonia*

بكتيرية *Listeria innocua*

تنتمي الى عائلة Listeriaceae،عصوية موجبة لغرام تسبب أعراضا خفيفة لدى معظم المصابين ،إلا أنه في حالات نادرة تتطور العدوى وتسبب مضاعفات خطيرة مثل إلتهاب السحايا كما قد تقود إلى الموت.[2]

الجدول 8 : يوضح تصنيف البكتيرية*Listeria innocua*

Bacteria	الشعبة
Bacilli	الطائفة
Bacillales	الرتبة
Listeriaceae	العائلة
Listeria	الجنس



الشكل 11: صورة البكتيريا *Listeria innocua*

IV- 2- الفطريات

IV- 2- 1- تعريفها

الفطريات كائنات حية ثالوسية تنتشر في الأوساط المختلفة في التربة الرطبة لأنها تحتاج بشكل كبيرلروطوبة مرتفعة حيث أن الحد الأدنى الذي يمكن أن تتحمله هو مايقارب 20 % رطوبة، والمناطق الجافة وفي المياه العذبة والمالحة وفي الهواء ويهاجم الكثير منها النبات والحيوان والإنسان كما يستعمل بعضها كغذاء وتعتبر من الكائنات الدقيقة الخالية من الكلوروفيل كما أن لها جدار خلوي صلب يحدد شكلها ماعدا الفطريات المخاطية وهي عادة عديمة الحركة ولكن لها خلايا تناسلية متحركة . [13]

IV- 2- 2- أنواع الفطريات المستعملة

وهناك عدة أنواع من الفطريات وأثناء الدراسة تم إستخدام فطر فيوزاريوم *Fusarium sp* و الخميرة *Candida albicans* .

فطر *Fusarium sp*

يعتبر فطر فيوزاريوم *Fusarium sp* من الفطريات الناقصة والتى تحوي تجمعات آلاف من الفطريات التى تتميز بأن لها خيوطا فطرية مقسمة ولكن حتى الآن لم تكتشف طريقة تكاثرها جنسيا ،لذلك فإنها تتكاثرتكاثراً لاجنسيا بواسطة الجراثيم الكونيدية، تعيش معظم أنواع الفطريات الناقصة رمية ولكن هناك عدد كبير يعيش عيشة متطفلة على الإنسان والحيوان والنباتات مسببة أمراضا كثيرة ومن هنا كانت تسميتها بالفطريات الناقصة .[13] والجدول التالي يوضح تصنيف الفطر [14]

الجدول 9 : يوضح تصنيف فطر الفيوزاريوم *Fusarium sp*

المملكة	*Fungi*
القسم	*Acomycota*
الصف	*Sordariomycetes*
تحت الصف	*Hypocreomycetidae*
الرتبة	*Hypocreales*
العائلة	*Nectriaceace*
الجنس	*Fusarium*

فطر Candida albicans

يعتبر فطر *C . albicans* من أشهر وأهم أنواع جنس *Candida* ترى بوضوح تحت المجهر على شكل بيضوي أو كروي أحيانا وتكون الخلية جوفاء،ينمو على بيئة Gelose - sang و Sabouraud، مستعمراته دائرية كبيرة ذات لون أبيض قشدي .

تتكاثر بالتبرعم وتكونّ سلسلة طـــويلة تكون على شكل مستعمرات تظهر هـــذه المستعمرات بلون أبيض مائل للأصفر، تعيش في أنبوب الهضم ومستوى الجلد، تسبب عدوى مرضية Candidose والذي يكون أساسا على مستوي الأغشية المخاطية الهضمية والتناسلية.[15][16] والجـــدول التـــالي يوضـــح تصنيف فطر *Candida albicans*[17]

الجدول 10 : يوضح تصنيف فطر *Candida albicans*

المملكة	*Fungi*
القسم	*Ascomycota*
الصف	*Saccharomycètes*
الرتبة	*Saccharomyce tales*
العائلة	*Saccharomycetaceae*
الجنس	*Candida*
النوع	*C.albicans*

IV- 2- 3- الأهمية العامة للفطريات

تلعب الفطريات دوراً أساسيا في الحياة العامة لجميع الكائنات وفي جميع المجالات حيث لها أهميتها الخاصة في :

- ❖ الصناعات الغذائية والطبية والزراعية وهي بحد ذاتها مصدرا هاما للمواد الغذائية
- ❖ تلعب دورا اساسيا في التوازن البيئي والحفاظ عليه واستمراريته
- ❖ لها دور كبير في مجال المقاومة البيولوجية والتى تحد بشكل ملحوظ من استعمال بعض المواد الكيميائية الضارة بيئيا .[13]

المراجع

المراجع الأجنبية

[1] N. Hamidi 1, H. A. Lazouni2, A. Moussaoui3, L. Ziane4, M. Djellouli, A Belabbesse.Ethnopharmacology, Antibacterial and AntioxidantActivities, Phytochemical Screening of Bioactive ExtractsFrom the Aerial Parts of Fagonia Longispina.Asian Journal of Natural& Applied Sciences Vol.3(3) September 2014.

[3] Kiarostami, Kh., Mohseni, R., Saboora, A, Biochemical changes of Rosmarinusofficinalis under salt stress, Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 6 No.3 2010, pp. 114-122 ISSN 1997-0838.

[5] Salgues, R., ‘1958), C. R. Soc. Biol, 83, 393 – 400.

[6] Ana Carolina de Mello Santos, Ana Carolina Matos Zidko, A virulência de scherichiacoli patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro,M u n dod a S a ú d e, São Paulo: 2009.

[7] Ferron, A. (1976). Bactériologie (à l’usage des étudiants en médicine) Edition Gouan et Roque (8ere édition).

[8] Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Varguas, R. (1987).Bactériologie médicale, Techniques usuelles. SIMEP. Paris.

[9] Ahmed, Z. F., Hamouda, F. M., Rizk, A. M. and Hsmail, S. I.,(1970), Planta Med, 18, 227- 231.

[10] Berche, P., Gaillard, J.L., Simont, M. (1989). Bactériologie : les bactéries des infections humaines, Flammarion (1ere édition), Paris.

[11] Leclerc, H. (1975). Microbiologie générale. Edition Dund.

[14] DEBOURGOGNE , A.(2003) .Typage moléculaire du complexe d’espéces fusarium sàlani et détermination de son mécanisme au voriconazole .Thése de doctoat, Université de Lorraine , France .

[15] Bennett, R.J. & Johnson, A.D. (2003). Completion of parasexual cycle in Candida albicans by induced chromosome loss in tetraploid strains. Embo J. 22: 2505-2515.

[16] Bennett, R.J. & Johnson, A.D. (2005). Mating in Candida albicans and the search for sexual cycle, Annu. Rev. Microbiol., n° 59, P. 233-225.

[17] Berkhout, (1923). In: Bennett R. J. & Johnson. A. D. (2003): Completion of parasexual cycle in Candida albicans by induced chromosome loss in tetraploid strains. Embo J. 22: 2505-2515.

المراجع العربية

[2] حوة ابراهيم دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات عائلة شفوية والفعالية ضد الاكسدة مذكرة لنيل شهادة ماجستير 2014 .

[4] لبوزمريم ،(2012)، الدراسة الفيتو كيميائية لنبتة Rhetinolepis Lonadioides، جامعة قاصدي مرباح ورقلة .

[12] محمد م. عبد الرزاق س. عبد الباسط ر.,2013- اساسيات التشخيص البكتريولوجي المعملي والسريري، الطبعة الأولى ، مركز التقنيات الحيوية . جامعة ليبيا . الفصل الأول .ص :10- 25

[13] مقاربة للمكافحة البيولوجية ضد فطرFusarium sp. المصاحب لنبات الحمصCicer arietinum مذكرة لنيل شهادة ماستر 2015 ، جامعة العربي بن مهيدي أم البواقي

الجانب العملي

الفصل الخامس
الطرق والوسائل

تمت التجارب على مستوى مخابر كلية العلوم الدقيقة،كلية علوم الطبيعة والحياة و مخبر تثمين تكنولوجيا الموارد الصحراوية (VTRS) بجامعة الشهيد حمه لخضر بالوادي .

V-1- تقديم منطقة الدراسة

V-1-1- الموقع الجغرافي لمنطقة وادي سوف

تقع منطقة وادي سوف في الجنوب الشرقي من القطر الجزائري بالعرق الشرقي من الصـــــحراء الكبـرى و تمتد أراضيها بـين خطـي عـرض 34°- 31° شـمالا وبين خطي طول 8°- 6° شـرقا، وتبلـغ مساحتها 82.800 كلم مربـع ، حيث تتميز بارتفاع درجات الحرارة في فصل الصيف و يصل متوسطها إلى 34°، أما بالنسبة للأمطار فهي قليلة التساقط يصل متوسطها السنوي إلى 3.8 ملم.[1]

V-2- مخطط العمل

الشكل 12:مخطط العمل

V-3- المواد المستعملة

V- 3-1 المادة النباتية

في العادة قد تستعمل جميع أجزاء النبتة، كما قد يؤخذ كل جزء لوحده (الجزء الهوائي، الجذور، الثمار و ازهار) وبالنسبة لدراستنا تم جمع عينات نباتية من نبتة كرشة الارنب (NLR- 019) بمنطقة واد العلندة بولاية الوادي يوم (24 نوفمبر) ووضعها في المخب،وأستعملت أجزاء النبتة كاملة(القسم الهوائي واللاهوائي)،وتم التعرف عليه من طرف شخص مختص في معرفة وتصنيف النبات" **شويخ عاطف"**

V- 3-2- الأدوات والوسائل المستعملة

المواد المستعملة اثناء الكشف الكيميائي عن نواتج الايض الثانوي

اثناء الكشف الكيميائي عن نواتج الايض الثانوي في النبات استعمالنا الأدوات و المحاليل،الاجهزة و الكواشف المدونة في الجدول التالي:

الجدول 11 : المواد المستعملة أثناء الكشف الكيميائي

الادوات	المحاليل والكواشف	الاجهزة
❖ المادة النباتية ❖ بيشر ❖ قمع ❖ ورق الترشيح ❖ أنابيب اختبار ❖ ماصة ❖ ملعقة	❖ ميثانول ❖ ماء مقطر(H_2O)	❖ ميزان حساس ❖ صفيحة مسخنة ❖ مبرد

المواد المستعملة أثناء الإستخلاص

خلال عملية الإستخلاص تم إستخدام الاجهزة والمحاليل،الأدوات المدرجة في الجدول التالي:

الجدول 12 : يوضح المواد المستعملة أثناء الإستخلاص

الادوات	المحاليل والكواشف	الاجهزة
❖ المادة النباتية ❖ بيشر ❖ قمع ❖ ورق الترشيح ❖ انابيب اختبار ❖ ماصة ❖ ملعقة ❖ دورق	❖ ميثانول ❖ ماء مقطر(H_2O)	❖ ميزان حساس ❖ صفيحة مسخنة ❖ مبرد ❖ جهاز الدوران البخاري

المواد المستعملة أثناءالتقدير الكمي للمركبات الفينولية

اثناء تقدير المركبات الفينولية تم إستخدام المحاليل و الأدوات ،الأجهزة المبينة في الجدول اسفل

الجدول 13: يوضح المواد المستعملة أثناء التقدير الكمي للمركبات الفينولية

	المحاليل	الأدوات	الأجهزة
التقدير الكمي لعديدات الفينول PPT	❖ المستخلص ❖ ميثانول ❖ حمض الغاليك ❖ كربونات الصديوم (7.5%) (Na_2CO_3) ❖ فولن- سوكالتو (10%)	❖ أنابيب إختبار ❖ بيشر ❖ ماصة مجهرية ❖ ماصة	❖ ميزان حساس ❖ جهاز المطيافية الضوئية
التقدير الكمي للفلافونيدات FV	❖ ميثانول ❖ حمض الكرستين ❖ ثلاثي كلوريد الالمنيوم ($AlCl_3$)		

المواد المستعملة أثناء تقدير الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة

للتقدير الفعالية المضادة للاكسدة تم استعمال الأدوات والمحاليل،الأجهزة الموجودة في الجدول التالي

الجدول 14 : المواد المستعملة أثناء تقدير الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة

	الادوات	المحاليل	الاجهزة
اختبار القدرة الكلية المضادة للاكسدة CAT	❖ المستخلص ❖ أنابيب اختبار ❖ بيشر ❖ حامل أنابيب اختبار ❖ ورق الالمنيوم ❖ ماصة مجهرية ❖ ملعقة	❖ ميثانول ❖ حمض الغاليك ❖ حمض الكبريت ❖ فوسفات الصوديوم ❖ موليبدات الأمونيوم ❖	❖ ميزان حساس ❖ جهاز المطيافية الضوئية
اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$		❖ ميثانول ❖ حمض الاسكوربيك	

ABTS

المواد المستعملة النشاطية ضد الميكروبية

أثناء اختبار نشاطية المستخلص لنبتة المدروسة على الأنواع البكتيرية المختبرة استعملنا الأدوات ،الأجهزة والمحاليل المبينة في الجدول التالي

الجدول 15: المواد المستعملة أثناء النشاطية ضد الميكروبية

الأدوات	المحاليل	الأجهزة
❖ المستخلص ❖ انابيب اختبار ❖ حامل انابيب اختبار ❖ علب بيتري ❖ ماسح قطني ❖ ملقاط ❖ ماصة مجهرية ❖ ماصة	❖ وسط الزرع (MH) وSDA ❖ ميثانول ❖ ماء فيزيولوجي معقم	❖ ميزان حساس ❖ موقد بنزن ❖ حاضنة ❖ المعقم بالضغط ❖ ساحبة الهواء

V- 4- طرق العمل :

قبل الشروع في عملية الإستخلاص لابد من تجهيز النبتة المراد دراستها و ذلك بـــــ

V- 4-1 تجفيف و تنقية العينة النباتية

بعد عملية الجني تأتي عملية التنقية والتجفيف للنبتة حيث نقوم بغسلها بالماء البارد حتى نتخلص من الغباروالشوائب وبعض العوالق ثم نقوم بنزع الأجزاء الخشنة،بعد ذلك نقوم بتقسيمها الى أجزاء صغيرة حتى تسهل عملية التجفيف ،ثم نقوم بتوزيعها على قطعة قماش قطنية بيضاء وعلى شكل طبقة رقيقة لتسهيل التقليب بمعدل مرتين في اليوم ويجب أنّ نراعي عدم تعرض النبات لأشعة الشمس أي تجفيفها في الظل وبعيدا عن الرطوبة وتنتهي عملية التجفيف عند التأكد من خلو النبات من الماء.

V- 4-2 - طحن العينة

بعد عملية التجفيف التى دامت مدة 3 أسابيع في الظل نقوم بطحن المادة الجافة بواسطة آلة طحن كهربائية لنحصل على مسحوق النبتة،ومنه يتم حفظها في ظروف لا تسمح لها بالتعفن أو التأثيرعلى مركباتها الفعالة،وبذالك يتم حفظ المسحوق المتحصل عليه في قارورات زجاجية عاتمة محكمة الغلق بعيدة عن الضوء.

V- 4-3- تحضير المستخلص الميثانولي بالنقع (البارد)

تمت عملية الاستخلاص للنبات وذلك بعد تجفيفه ووضع 100g في بيش، ثم نضيف له الميثانول (80%) و الماء (20%)،توضع في خلاط مغناطيسي مع الرج لمدة 24 ساعة لغرض النقع وتم تكرار العملية ثلاثة أيام،ثم ترشيح المستخلص وعرضها على جهاز التبخير الدوراني Rota vapeur (عند درجة الحرارة 45 م°) حتى الجفاف، بعد القيام بعملية تجفيف الرشاحة للعينة نبتة كرشة الأرنب تم الحصول على مستخلص له عدة خصائص (لون ومظهر) وذلك حسب نوع العينة وتركيز المذيب يستعمل الراسب لحساب المردود ثم يتم الإحتفاظ به في الثلاجة (4 م°) إلى غاية التقديرات المدروسة وكذا إختبار الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة والفعالية البيولوجية و حساب المردود .

الشكل 13 :صور مراحل الإستخلاص

V-4-4- حساب المردود الإنتاجي للمستخلص

المردود الإنتاجي للمستخلص هو النسبة بين وزن المادة المستخلصة و التى نرمز لها ب (M_F) على وزن المادة الابتدائية للنبتة ونرمز لها ب (M_I) حسب العلاقة التالية :

$$R\% = (M_F/M_I) \times 100$$

- M_F : وزن المستخلص بعد التجفيف .
- M_I : وزن المادة النباتية .
- R% : نسبة المردود. [2]

V-4-5- الكشف الأولي الفيتوكيميائي

الإختبارات الكيميائية النباتية عبارة عن تحليل نوعي يسمح لنا بتسليط الضوء على فئات مختلفة من الأيضات الثانوية التي يحتوي عليها النبات، تعتمد ردود الفعل هذه على ظاهرة أو تلطيخ بواسطة كواشف محددة لكل عائلة من المركبات.[3]

تعرض المستخلص الميثانولي لبعض الاختبارات الكيميائية النباتية لإكتشاف وجود أو عدم وجود عائلات كيميائية معينة. لذلك أدركنا في مقتطفاتنا بعض الاختبارات النوعية:

القلويدات [4]

نمزج 1 مل من المستخلص المائي أو الميثانولي مع عدة قطرات من الكواشف التالة:

- **كاشف دراجندروف:** إذا تشكل راسب برتقالي فهذا يدل على وجود القلويدات.
- **كاشف وانر:** إذا تشكل راسب بني فهذا يدل على وجود القلويدات.

الفلافونويدات [5]

نأخذ 2 مل من المستخلص المائي او الكحولي ونمزجه مع 1 مل من NaOH (0.5M) إذا ظهر اللون الأصفر هذا يدل على وجود الفلافونويدات.

يتحول اللون الأصفر إلى عديم اللون إذا أضفنا 2 قطرات من حمض مخفف.

التربينات الثلاثية والستيرولات [6]

نأخذ 5 غ من النبات الجاف ونمزجه مع 20 مل من $CHCl_3$ ثم يرشح المزيج ونأخذ 1 مل من الرشاحة ونضيف إليها H_2SO_4بعناية على جدران الأنبوب تتشكل طبقتين. الطبقة ذات اللون الأخضر تشير إلى وجود التربين.

الصابونين

نمزج 2 مل من الماء المقطر مع المستخلص الكحولي او المائي يرج المحلول بقوة ثم يترك 20 دقيقة .

- عدم تشكل رغوة دلالة على عدم وجود الصابونين.
- رغوة اقل من 1 سم معناه وجود الصابونين بكمية ضعيفة.
- رغوة من 1 إلى 2 معناه وجود الصابونين .
- رغوة أكثر من 2 سم معناه النبات غني جدا بالصابونين.

التانينات [5]

نمزج 1 مل من المستخلص المائي أو الكحولي مع 1 مل من الماء المقطر و2 قطرات من $FeCl_3$ المخفف 1%. إذا ظهر اللون الأخضر الداكن أو أخضر مزرق دلالة على وجود التانينات.

الأنثوسيانات [7]

نمزج 2.5 غ من النبات الجاف مع 50 ملل من ماء مقطر مغلي 15 دقيقة فنتحصل على مستحلب نقوم بتصفيته ونأخذ منه 2 مل ونمزجه مع 2مل من (HCl) وقطرات من (NH_4OH) إذا ظهر اللون الوردي أو أحمر مائل للأزرق بنفسجي هذا دليل على وجود الأنثوسيانات

المركبات المرجعة (الكربوهيدرات) (السكريات) [8]

نمزج 5غ من النبات الجاف مع 30 مل من الإيثانول ونترك المزيج يغلي لمدة 1سا، نصفي المزيج ونأخذ منه 1مل ونضيف اليه 2 مل من الماء المقطر و20 قطرة من كاشف فهلنج ثم نقوم بالتسخين، إذا ظهر راسب أحمر أجوري فهذا دليل على وجود السكريات المرجعة.

الجدول 16 : يلخص المواد اللازمة للكشف عن المركبات الفعالة في النباتات

	الإختبار	المواد اللازمة	الكمية
1	**القلويدات**	نبات جاف HCl (مخفف 1/10) كاشف دراجندروف كاشف وانز	5 غ 10 مل قطرة قطرة
2	**الفلافونيدات**	نبات جاف HCl (مخفف 1/100) كحول	10 غ 150 مل 2.5 مل
3	**التربينات الثلاثية والستيرولات**	نبات جاف $CHCl_3$ H_2SO_4	5 غ 20 مل 1 مل
4	**الصابونين**	مستخلص النبات ماء مقطر	2 مل
5	**التانينات**	نبات جاف $FeCl_3$ ماء مقطر	5 غ قطرة 32 مل
6	**الأنثوسيانات**	نبات جاف HCl NH_4OH ماء مقطر	2.5 غ 2 مل قطرة 50 مل

7	**النشاء**	نبات جاف ماء مقطر ماء اليود	5 غ 30 مل قطرة
8	**المركبات المرجعة (السكريات) (الكربوهيدرات)**	نبات جاف ايثانول ماء مقطر كاشف فهلنج	5 غ 30 مل 2 مل 20 قطرة

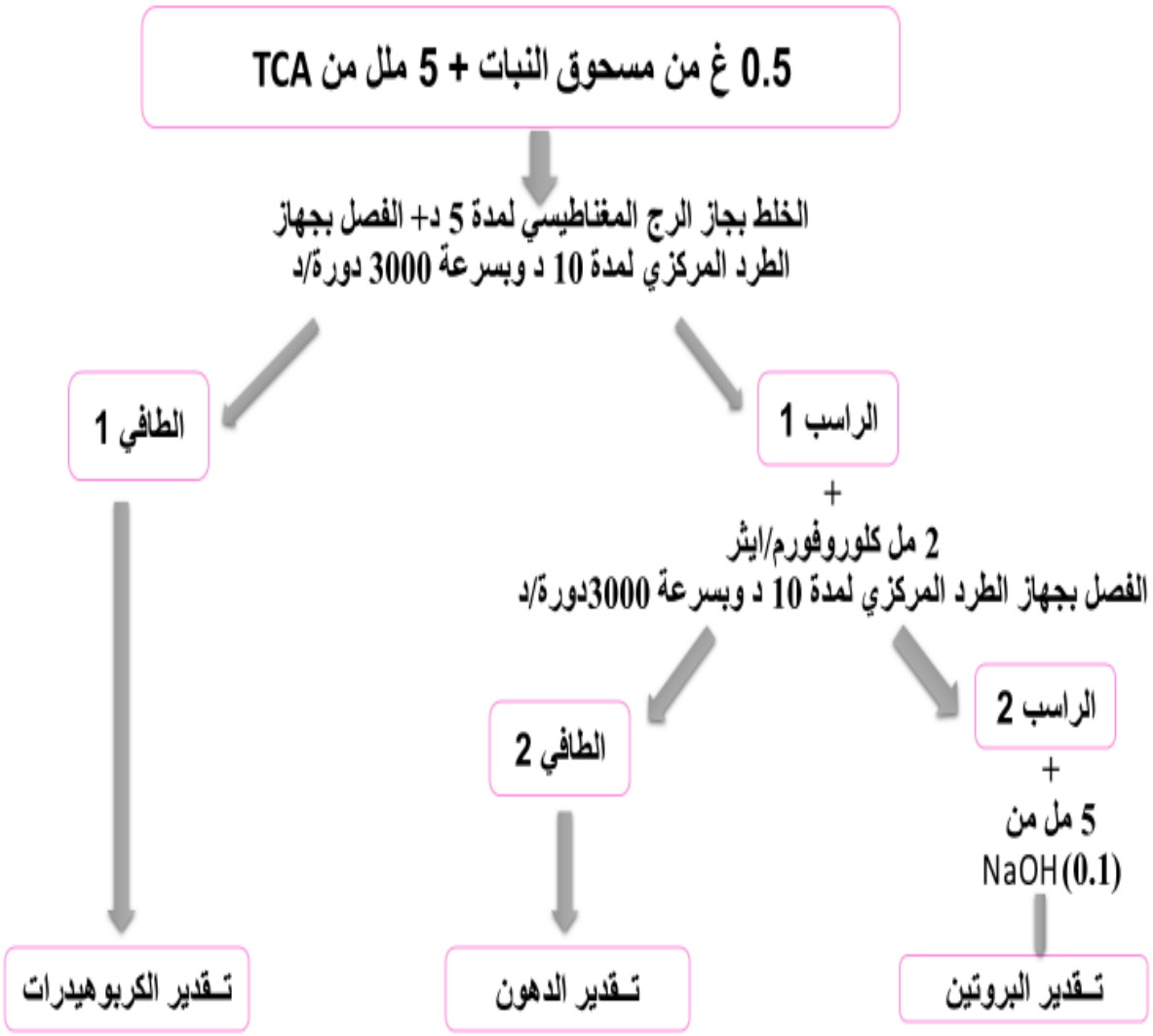
V-4-6- تقدير القيمة الغذائية في النبات

V-4-6-1- تحضير المستخلصات

تم إستخلاص مواد الايض الاولي حسب طريقة SHIBKO (1996) من مسحوق النبتة المدروسة من خلال إتباع الخطوات التالية [9][10]

- ❖ أخذ 0.5 غ من مسحوق نبتة كرشة الأرنب ووضعها في بيشر.
- ❖ إضافة 5 ملل من (20 %) (TCA) ثم الخلط بجهاز الرج المغناطيسي لمدة 5 دقائق ثم وضعها في أنابيب زجاجية .
- ❖ فصل المزيج بجهاز الطرد المركزي لمدة 10 د وبسرعة 3000 دورة/ د والحصول على طافي (1) الذي نقدر به الكربوهيدرات .
- ❖ أما الراسب (1) نضيف له 2 ملل من محلو (1V /1 V) éther/chloroforme .
- ❖ ثم نقوم بفصل الخليط مرة أخرى بجهاز الطرد المركزي لمدة 10 د وكذلك بسرعة 3000 دورة/د للحصول على الطافي (2) الذي نقدر به الدهون.
- ❖ أما الراسب (2) نضيف 5 ملل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.1N)ويرج الخليط ثم نقدر به البروتين.

والوثيقة توضح أهم مراحل استخلاص مواد الأيض الأولي حسب طريقة (SHIBKO) من النبتة المدروسة .



الشكل 14 : مخطط يوضح أهم مراحل إستخلاص نواتج الأيض الأولي

V-4-6-2- تقدير الكربوهيدرات

تم تقدير الكربوهيدرات وفق طريقة DUBOIS 1956 وذلك بإتباع الخطوات التالية مع إجراء بعض التعديلات[11][12]

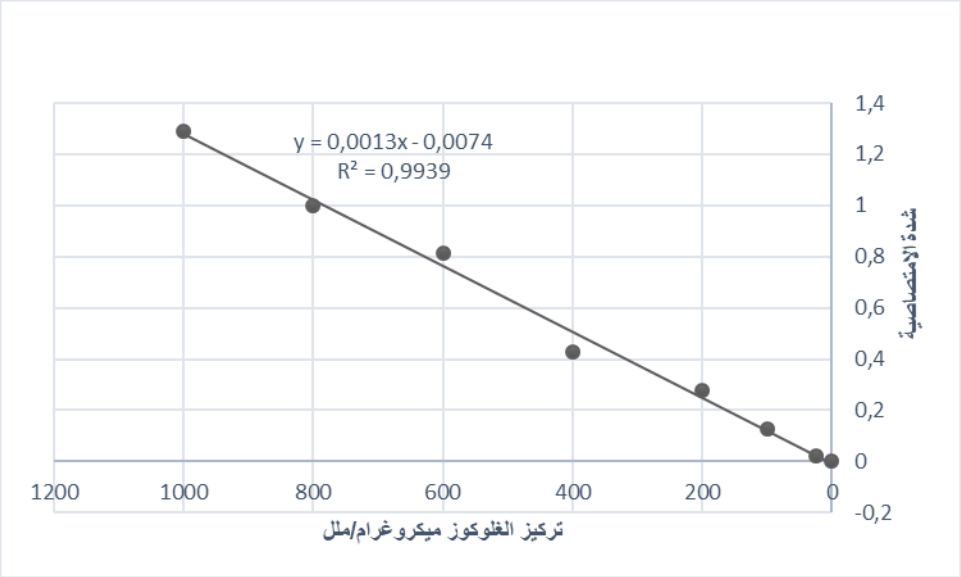
الخطوات العملية لتقدير

- ❖ وضع 1ملل من مستخلص العينة الطافي (1) في أنابيب إختبار زجاجية.
- ❖ إضافة 1ملل من الفينول (5%) ثم 5 ملل من حمض الكبريت المركز.
- ❖ رج وترك العينات لمدة 15 دقيقة .
- ❖ قراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول الموجة 490 نانومتر بواسطة جهاز مطيافية الضوئية.

تحضير المحلول القياسي للغلوكوز

تم إذابة 5 ملغ من الغلوكوز في 5ملل من حمض الكبريت (1N) للحصول على محلول ذو تركيز 1000ميكروغرام/ملل ومنه تم تحضير سلسلة المحلول القياسي ذو تركيز(0،25،100،200) ميكروغرام /ملل .

- ثم نعامل الأنابيب بنفس الخطوات السابقة للتقدير المحتوى الكربوهيدراتي . بعد ذلك قراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول موجة 490 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية .
- رسم المنحى القياسي للتراكيز بدلالة شدة الإمتصاصية الذي يعبر عنه بمعادلة خطية التي تحدد تركيز الكربوهيدرات في العينة والموضح في الشكل (15)



الشكل 15: توضح المنحنى القياسي للغلوكوز

V-4-6-3- تقدير الدهون

تم تقدير الدهون وفق طريقة GOLDSWORTHY (1972) مع إحداث التعديلات وذلك بإتباع الخطوات التالية [13][10]

تحضير المحلول الكاشف sulfophosphovanillinique

إذابة 76 ملغ من Vanilline في 11ملل ماء مقطر ثم إضافة 39 ملل من حمض الفوسفوريك H_3PO4 (85%) للحصول على حجم 50 ملل.

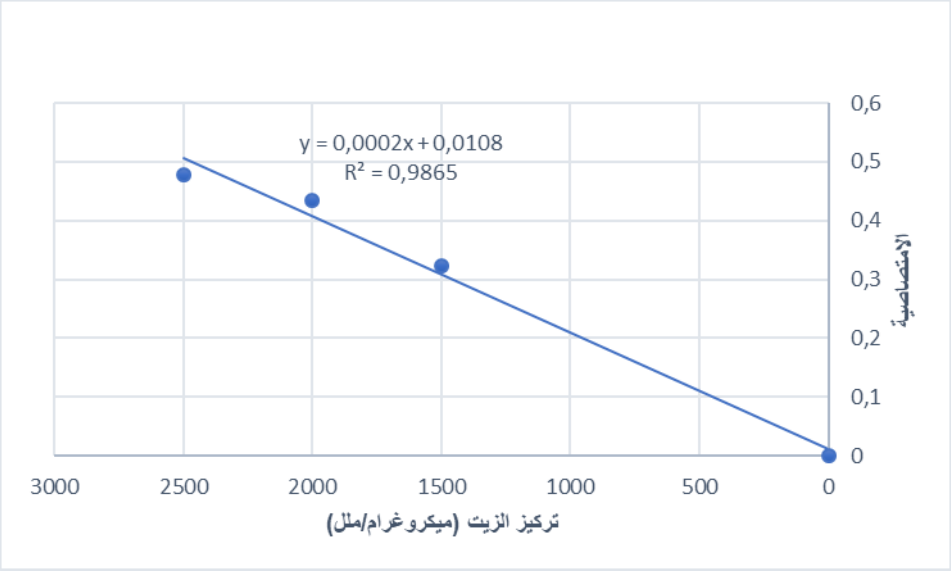
الخطوات العملية لتقدير

- وضع 0.1 ملل من المستخلص العينات الطافي(2) في أنابيب إختبار زجاجية.
- إضافة 1ملل من حمض الكبريت المركز (H_2SO_4).
- رج الأنابيب ثم تترك لمدة 10د في حمام مائي عند 100م° .
- بعد أن تبرد الأنابيب نأخذ منها 0.15 ملل ونضعها في أنابيب أخرى.

- إضافة 1.5 ملل من الكاشف المحضر.(sulfophosphovanillinique)
- خلط الأنابيب في الظلام لمدة 30 د.
- قراءة شدة الامتصاصية الضوئية عند طول الموجة 530 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية .

تحضير المحلول القياسي لدهون

تم إذابة 2.5 ملغ من زيت الزيتون (100%) في 1ملل من محلول éther/chloroforme (1V/1V)للحصول على محلول ذو تركيز 2500 ميكروغرام /ملل، ومنه تم تحضير سلسلة المحلول القياسي ذو التراكيز (0،500،1000،1500،2000،2500) ميكروغرام/ملل. ثم نعامل الانابيب بنفس الخطوات السابقة لتقدير المحتوى الدهني. بعد ذلك قراءة شدة الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 530 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية و رسم المنحى القياسي للتراكيز بدلالة شدة الامتصاصية الذي يعبر عنه بمعادلة خطية التي تحدد تركيز الدهون في عينة. والموضح في الشكل (15)



الشكل 16: يوضح المنحنى القياسي للدهون

ملاحظة : في وجود الدهن يتحول لون المحلول إلى اللون الوردي.

V-4-6-4- تقدير البروتين

تم تقدير البروتين وفق طريقة (Lowry (1951 وذلك بإجراء الخطوات التالية :

تحضير المحاليل [14][15]

- المحلول (1) يتم تحضيره بمزج 50 ملل من كربونات الصوديوم (2%) Na_2CO_3 مع 50 ملل من هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.1N) .

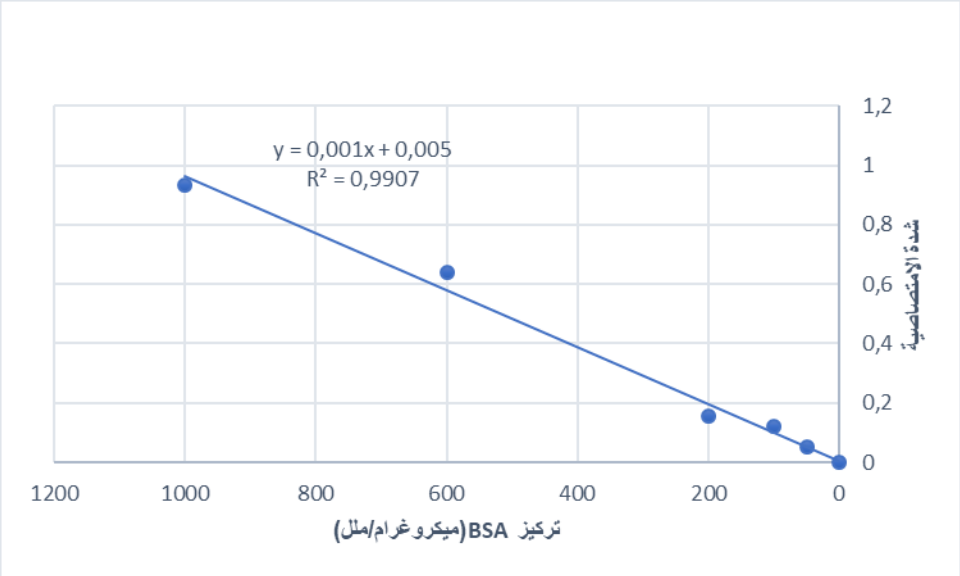
- المحلول (2): يتم تحضيره بمزج 10 ملل من محلول كبريتات النحاس ($CuSO_4$ (0.5 % مع 10 ملل من محلول تيترات الصوديوم – بوتاسيوم .($KNaC_4H_4.O_6\ 4H_2O$ (0.1 %)
- المحلول (3): يتم تحضيره بإماهة محلول الفولن سيكالتو Folin – Cicalteau المركز بنسبة (1V/1V)
- المحلول (4) : يحضر كاشف كبريتات النحاس القاعدي بمزج 50 ملل من محلول (1) مع 1 ملل من محلول (2) .

الخطوات العملية للتقدير

- وضع 0.2 ملل من المستخلص البروتيني للعينة في انابيب اختبار زجاجية .
- اضافة 2ملل من المحلول (4)، ثم نضيف 0.2 ملل من المحلول (3) .
- ترج الأنابيب ثم تترك في الظلام لمدة 30 د بدرجة حرارة المخبر .
- ثم نقوم بقراءة شدة الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 750 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية.

تحضير المحلول القياسي

إذابة 3 ملغ من بروتين ألبومين مصل البقر (BSA) في 3 ملل من هيدروكسيد الصوديوم NaOH (0.5N) للحصول على محلول ذو تركيز 1000 ميكرو غرام/ملل ومنه تم تحضير المحلول القياسي ذو التراكيز (0،100،400،600،800،1000) ميكروغرام/ملل. ثم نعامل الأنابيب بنفس الخطوات السابقة لتقدير المحتوى البروتيني. بعد ذلك قراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول موجة 750 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية و رسم المنحى القياسي للتراكيز بدلالة شدة الإمتصاصية الذي يعبر عنه بمعادلة خطية التي تحدد تركيز البروتين في العينة.



الشكل 17: المنحنى القياسي لليروتين

V-4-7- تقدير درجة الحموضة pH وتقدير درجة الناقلية EC :

تم تقدير درجة الحموضة وفق طريقة MARX (1999) وقيمة الناقاية الكهربائية وفق طريقة JONES (2001) وذلك بإتباع الخطوات التالية :[16][17]

- ❖ نضع 2 غرام من مسحوق النبتة الجافة في 20 ملل من الماء المقطر.
- ❖ نرج الخليط بجهاز الرج المغناطيسي لمدة 10د ثم نقوم بترشيحه للحصول على الراشح.
- ❖ تقدير درجة حموضة الراشح بواسطة جهاز pH métre ودرجة الناقلية الكهربائية بجهاز قياس الناقلية الكهربائية.

طريقة المعايرة

- ❖ وضع 5 ملل من المحلول المستخلص أي بعد الترشيح في بيشر.
- ❖ إضافة 6 قطرات من فينول فيتالين.
- ❖ نعاير المحلول بواسطة محلول هيدروكسيد الصديوم(NaOH) .

V-4-8- التقدير الكمي للفينول

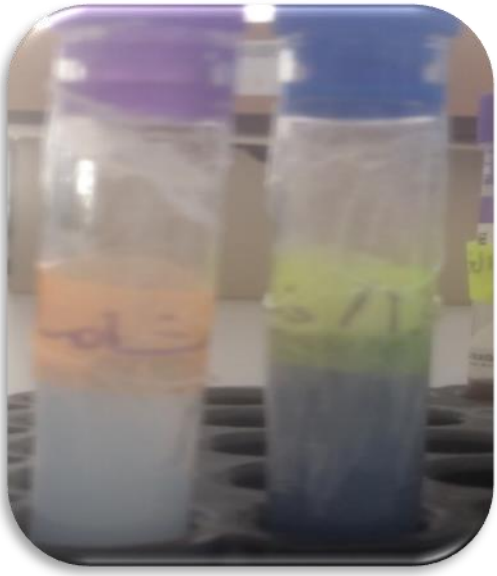
المبدأ

تم تقدير الكمي للعديدات الفينول الكلية بطريقة Singleton et Rossi 1965 لمستخلص النبتة المدروسة ويحدث ذلك باستخدام كاشف الفولين (Réactif de Folin-Ciocalteai) والذي يتغير لونه من أصفر إلى أزرق بالأكسدة وهذا الأخير يتكون من حمض الفوسفوتنغستيني ($H_3PW_{12}O_{40}$) وحمض الفوسفومولبديك ($H_3PMO_{12}O_{40}$) وتؤدي هذه الطريقة الى ارجاع كاشف الفولين عن طريق المركبات

الفينولية إلى اكسيد التنغيستين (W_8O_{23}) والمولبيدين (Mo_8O_3) أي اعطاء كيتون او كينون ذو اللون الازرق ويتم تقديرها كميا باستعمال جهاز المطيافية الضوئية استنادا الى حمض الغاليك كمنحى قياسي مرجعي عند طول موجه 765نانومتر [18] ومن اجل تقدير الكمي للعديدات الفينول تم اتباع الخطوات التالية: [19]

الخطوات العملية للتقدير:

- وضع 1 ملل لكل من مستخلص العينة ذو تركيز0.2 ملغ / ملل في أنابيب زجاجية.
- اضافة 0.5 ملل من كاشف الفولن(Folin- Ciocalteau) .
- رج وترك لمدة 5 دقائق في الظلام.
- اضافة 2 ملل من كربونات الصديوم(7.5%) Na_2CO_3 .
- رج وترك في الظلام لمدة 30 دقيقة.
- قراءة شدة الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 765نانومتربواسطة جهاز المطيافية الضوئية

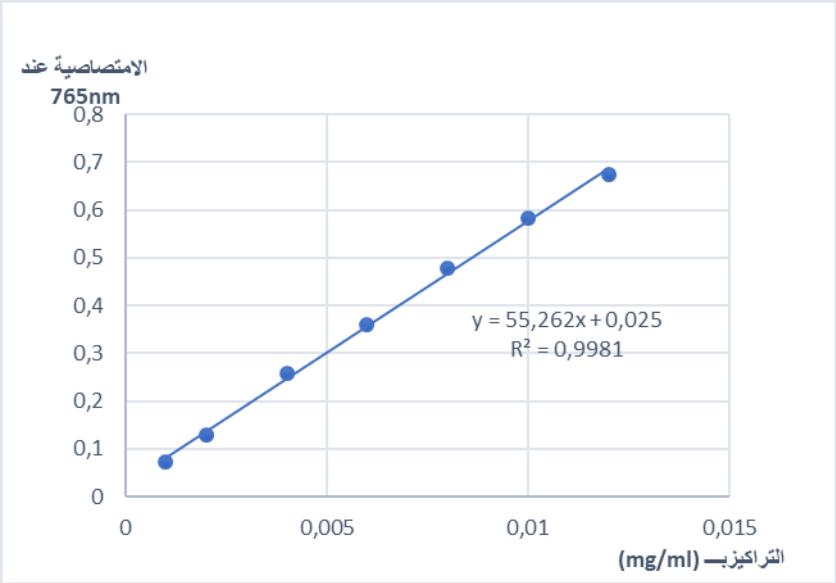


الشكل 18:مستخلص ناتج عن تقدير الفينول (الأصلي)

تحضير المنحنى القياسي :

وذلك بإذابة 8 ملغ حمض الغاليك في 2 ملل من الميثانول للحصول على محلول ذو تركيز 4 ملغ : غرام /ملل . ومنه تم سلسلة من المحلول القياسي ذو تركيز (0.012 - 0) ملغ / ملل.

- ثم نعامل الانابيب بنفس الخطوات السابقة لتقدير المحتوى الفينولي.بعد ذلك قراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول موجة 420 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية
- رسم المنحى القياسي للتراكيز بدلالة شدة الامتصاصية الذي يعبرعنه بمعادلة خطية التى تحدد تركيز الفينولي في كل عينة (بوحدة ملغ / غ من المادة الجافة المكافئة لحمض الغاليك)

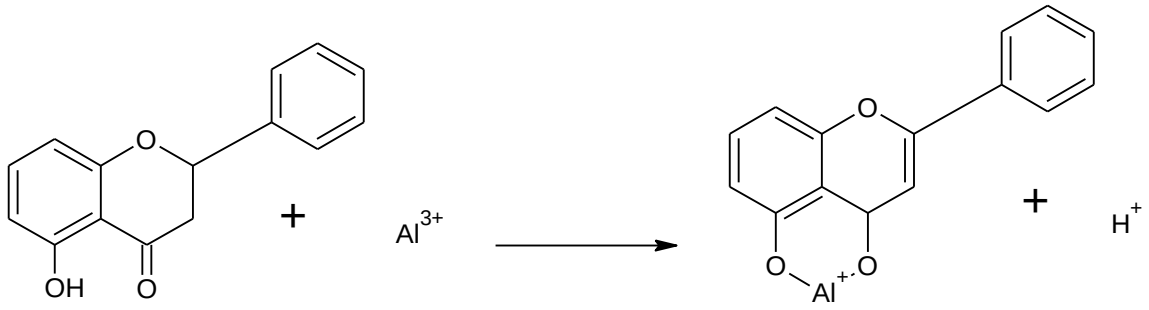


الشكل 19: يوضح المنحنى القياسي للفينول

V-4-9- التقدير الكمي للفلافونيدات

المبدأ

تمثل الفلافونيدات مجموعة كبيرة من المركبات الفينولية حيث تم تقدير الكمي للفلافونيدات للمستخلص النبتة المدروسة وذلك من خلال التفاعل الحادث مع ثلاثي كلوريد الألومينيوم $AlCl_3$ وهذا التفاعل يجرى بينه $(AlCl_3)$ و بين مجموعة الهيدروكسيل OH الموجودة في الحلقات البنزينية للفلافونيدات والذي بدوره يؤدي الى تشكيل معقد ذو لون اصفر .



الشكل 20 : آلية تفاعل المعقد

و تقاس المركبات الفلافونويدية كميا باستعمال جهاز المطيافية الضوئية (Spectrophotomètre) وفقا لطول موجة 420 نانومترحيث نستعمل حمض الكريستين كمنحى قياسي مرجعي ومن أجل التقدير الكمي لمركبات الفلافونويدية نقوم بإتباع الخطوات التالية مع إجراء بعض التعديلات:[20][21]

الخطوات العملية للتقدير

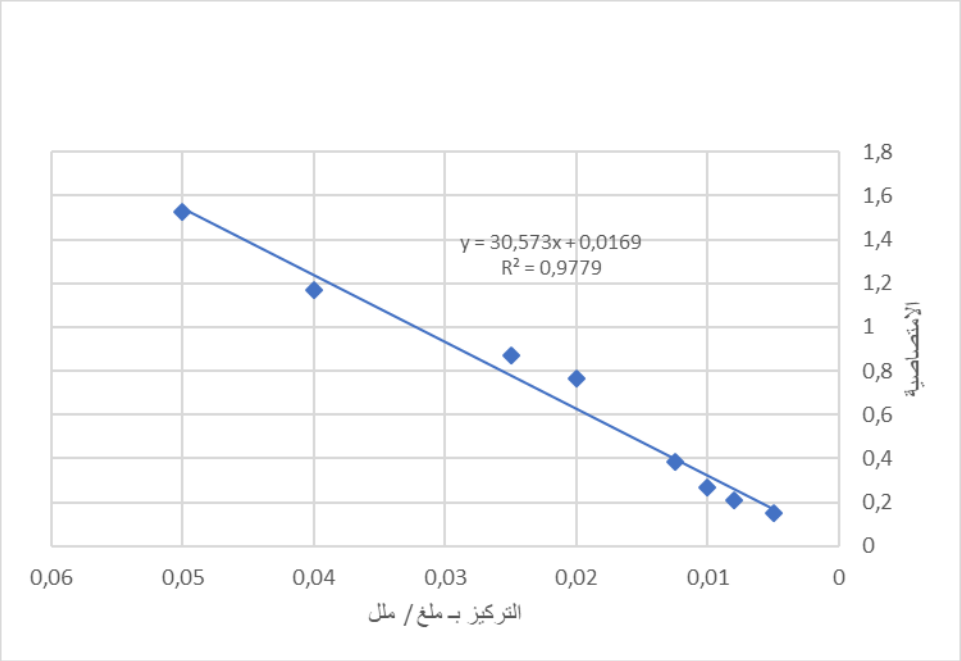
- وضع 1ملل لكل من مستخلص العينات ذو تركيز 0.2 ملغ/ملل المحضرفي انابيب زجاجية
- اضافة 1ملل من ثلاثي كلور الالمنيوم ($AlCl_3$ (2%
- رج وترك العينات في ظلام لمدة ساعة حتى يتغير اللون الى أصفر.
- قراءة شدة الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 420 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية.

الشكل 21 : مستخلص ناتج عن تقدير الفلافونويدات (الأصلي)

تحضير المنحنى القياسي

وذلك بإذابة 5 ملغ من حمض الكريستين في 10 ملل من الميثانول للحصول على محلول ذو تركيز 5 .0ملغ/ملل. ومنه تم سلسلة من المحلول القياسي ذو تركيز (0.05 – 0) ملغ/ ملل .

- ثم نعامل الانابيب بنفس الخطوات السابقة لتقدير محتوى الفلافونيويدات. بعد ذلك قراءة شدة الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 420 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية.
- رسم المنحى القياسي للتراكيز بدلالة شدة الإمتصاصية الذي يعبر عنه بمعادلة خطية التى تحدد تركيز الفلافونويدات في كل عينة (بوحدة ملغ / غ من المادة الجافة المكافئة لحمض الكريستين).



الشكل 22 : يوضح المنحنى القياسي للفلافونويدات

V-4-10- الكرومتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)

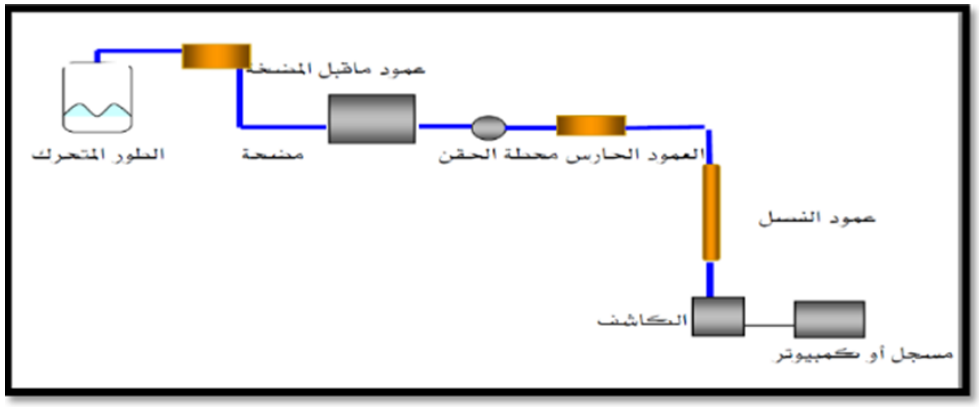
هي تقنية تطورت من كروماتوغرافيا سائلة إلى ما يعرف الآن بكروماتوغرافيا السائلة ذو الكفاءة العالية حيث تطبق في الدراسات التحليلية للجزيئات الغير قابلة لتبخر ذات القطبية العالية كما تعتبر من أدق وأنجح الطرق لفصل وتحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير[22] يقوم الجهاز بفصل مكونات العينة وتقديرها كمياً،ويتم الفصل عن طريق توزيع العينات مابين طورين أحدهما متحرك سائل غالبا مايكون مذيب عضوي او ماء،اما الطور الثابت يكون صلب (عمود مملوء بمادة صلبة) طوله يتراوح 30-12 سم وقطره 4 ملم [23]. تستعمل هذه التقنية لفصل المواد الثقيلة،كما أننا لا نحتاج لتحويل المركبات إلى مواد متطايرة . [24]

نقوم بحقن كمية قليلة جدا من العينة المراد تحليلها (بعض ميكرولترات) في المحلول وتحت الضغط ، بعد فصل المكونات تم الكشف عنها في مخرج العمود بواسطة جهاز يقوم بمعالجة كل المعطيات . [25]

مكونات الجهاز

- **الحاقن :** وهو لحقن العينات المراد تحليلها ويقدر حجم الحقن ب 20 ميكروليتر .
- **المضخة :** هي نظام يتكون من مضختين من أجل نقل الطور المتحرك إلى الضغط العالي .
- **العمود :** يبلغ طوله 125 mm وقطره الداخلي 4.6 ، يحتوي على مرحلة ثابتة لفصل العديد من المركبات الطبيعية .

- **الكاشف :**هو كاشف أحادي اللون طوله الموجي متغير (400-190nm) للكشف عن مختلف المركبات التى تحتويها العينة.
- **المسجل :** عرض النتائج .
- **الفرن** [26]



الشكل 23: مكونات جهاز HPLC

شروط التجربة

الجدول 17 : يوضح الشروط اللازمة لفصل المركبات الفينولية في العينات بإستخدام HPLC

العامل	الشروط
النظام	الطور المعكوس RP-HPLC
العمود	(25cm×46mm)C18
حجم الحقن	20 ميكرولتر
معدل الحقن	1ملل / دقيقة
طول الموجة	λ= 268 نانومتر
الزمن	50
درجة الحرارة	25 م°
الطور المتحرك	(A)acetonitrile
	(B)0.2% acide acetique

- ✓ يمكن تحديد المركبات الفينولية وذلك من خلال زمن مكوثها .

الجدول 18 : يوضح زمن مكوث لبعض المركبات الفينولية

المركبات الفينولية المرجعية	زمن المكوث (دقيقة) tr	المعادلة
حمض الغاليك	5.29	Y=54681x
حمض الكلوروجينيك	13.392	Y= 21665x
حمض الفانيليك	15.531	Y=65077x
حمض الكافييك	16.277	Y=84066x
الفانيلين	21.46	Y=58930x
حمض الكومارين	23.817	Y=49495x
الروتين	28.37	Y=28144x
النرجينين	34.788	Y=19379x
الكرستين	45.047	Y=45378x

طريقة العمل

نحضر تركيز قدره 5 ملغ / ملل من المستخلص ثم نقوم بترشيحه بورق الترشيح ثم نعيد عملية الترشيح بواسطة ورق ترشيح خاصة لتصبح جاهزة،ليتم حقنها في جهاز الـــ HPLC .

V-4-11- الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة

وهي قياس لقدرة المستخلص أوالمركب لتثبيط الجذرالحرأو توقيف عملية الأكسدة للاكسدة بعدة طرق و في دراستنا هذه تم إختبار الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة من خلال تطبيق الاختبارات التالية DPPH و CAT، ABTS، هذه الطرق تعتمد على التلوين ونزع التلوين في طول موجة معين هم على التوالي **[27]**

V-4-11-1- إختبار القدرة الكلية المضادة للأكســـدةCAT أو اقتنـــاص جـــذر (phosphomolybdate)

المبدا

تم تقدير القدرة الكلية المضادة للأكسدة CAT للمستخلص المثانولي بالإعتماد على طريقة فوسفوموليبيدات (phosphomolybdate) وذلك بالإعتمادعلى إرجاع الموليبيدات (MoO4-2) Molybdate إلى M (Mo) مشكلة لون أخضر لون فاتح.

وهذه الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة تم تقديرها كميا بواسطة جهاز المطيافية الضوئية عند طول موجة 695 نانومترحيث يؤخذ حمض الغاليك كمنحى قياسي مرجعي [28]

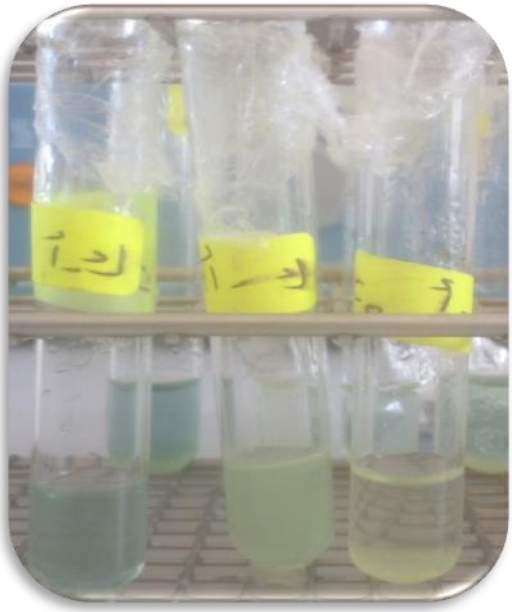
إعتمدنا خلال تقدير القدرة الكلية المضادة للأكسدةCAT على إجراء الخطوات التالية

تحضير المحلول الكاشف (محلول الموليبدات)

- 4Mm من موليبدات الأمونيوم $(NH_4)2MoO2$
- 0.6Mمن حمض الكبريت H_2SO_4
- 28Mmمن فوسفات الصوديوم Na_2HPO_4

الخطوات العملية للتقدير

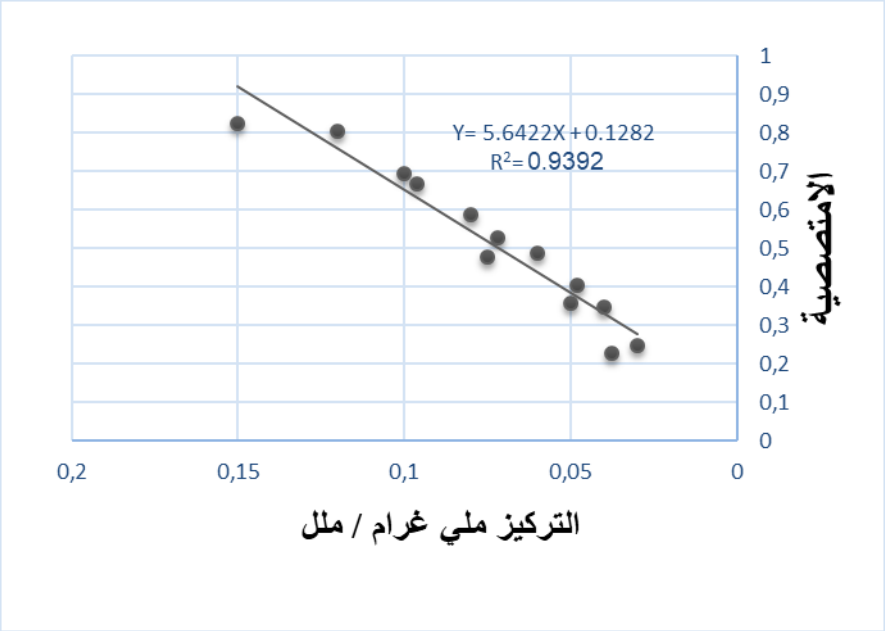
- وضع كل من 0.1 ملل من مستخلص العينة ذو تركيز 0.8 ملغ/ ملل في أنابيب إختبار.
- إضافة 1ملل من المحلول الكاشف المحضر .
- رج الأنابيب ثم تترك لمدة ساعة في حمام مائي عند 95م°.
- بعد أن تبرد الأنابيب نقوم بقراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول موجة 695 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية .



الشكل 24: يوضح مستخلص ناتج من إختبار الفوسفوموليبيدات (الأصلي)

تحضير المنحنى القياسي

- وذلك بإذابة 20 ملغ من حمض الغاليك في 10 ملل من الميثانول للحصول على محلول ذو تركيز 2 ملغ / ملل. ومنه تم تحضير سلسلة من المحلول القياسي ذو تركيز (0.12 ، 0.1، 0.08 ، 0.06، 0.04، 0.02) ملغ / ملل.
- ثم نعامل الانابيب بنفس الخطوات السابقة لتقدير القدرة الكلية المضادة للأكسدة،بعد ذلك قراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول موجة 695 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية .
- رسم المنحى القياسي للتراكيز بدلالة شدة الإمتصاصية الذي يعبرعنه بمعادلة خطية التى تحدد تركيز في كل عينة (بوحدة ملغ / غ من المادة الجافة المكافئة لحمض الغاليك).



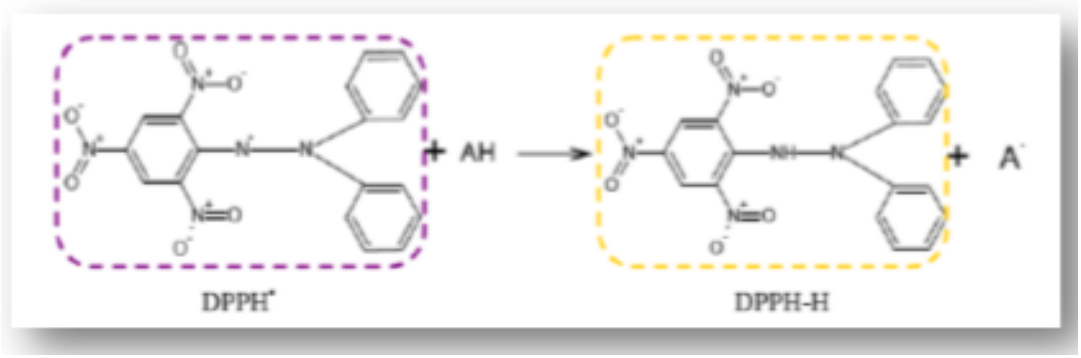
الشكل 25 : يوضح المنحنى القياسي لحمض الغاليك

V-4-11-2- اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH

المبدأ

إختبار DPPHهو إختبار مضاد للجذور الحرة يعتمد هذا الإختبارعلى إستعمال جذر DPPH المستخلص من جزيئة H-DPPH وذلك اعتمادا على قابلية المستخلصات إعطاء لذرة الهيدروجين وهو مادة صلبة ذو اللون البنفسجي المسود والذي يتحول الى اللون الأصفر عند ارجاعه بواسطة المركبات المضادة للأكسدة كما هو موضح في الشكل (25) يمكن تتبع عملية إرجاع هذا الجذر لونيا باستعمال جهاز المطيافية الضوئية [28][29]

والشكل التالي يوضح آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة [30]



الشكل 26 : يمثل آلية تثبيط العامل المضاد للأكسدة مع الجذر الثابت DPPH

طريقة العمل [31]

لتحديد نسبة تثبيط الجذر الحر DPPH نستعمل حمض الأسكوربيك لغرض المقارنة بالمستخلص النباتي المدروسة.

تحضير محلول DPPH

تم تحضيره بإذابة 4 ملغ من DPPH في 100ملل ميثانول ومنه تم تحضير محلول ذو تركيز (0 .4Mmol)

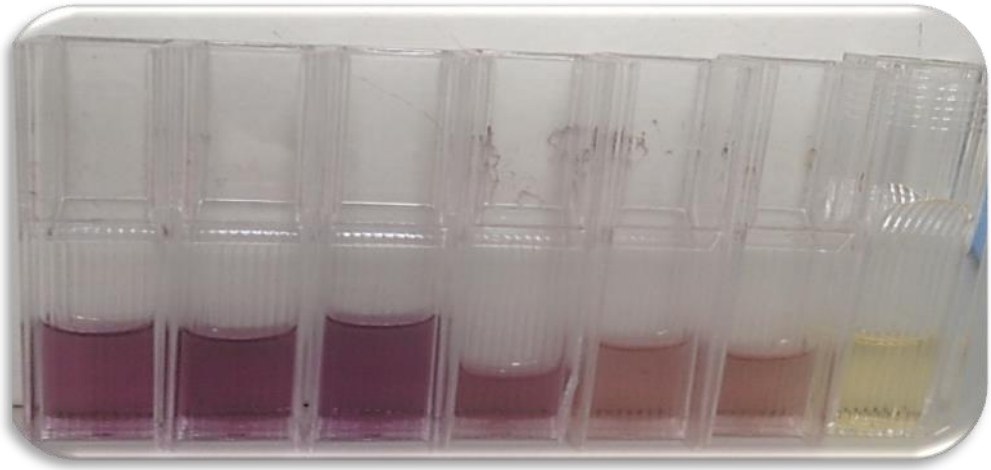
وضع المحلول المحضر في حوجلة مغطاة بورق الألمنيوم لمنع التفاعل مع الأشعة الضوئية ترك المحلول مع التحريك المتواصل لذوبان DPPH في الميثانول كليا علما أن الكتلة المولية الجزيئية هي DPPH=394.32g/mol

الشكل 27 : يوضح محلول DPPH المحضر(الأصلي)

الخطوات العملية للتقدير

- وضع في خلية ضوئية سعتها 1 ملل من التراكيز المحضرة للمستخلص النباتي المستعمل (0.5-0.03125) ملي غرام / ملل .

- إضافة 200 ميكرولترمن الميثانول ويضاف إليه 800 ميكرولتر من محلول DPPH
- تحضن العينات في الظلام لمدة 30 د.
- قراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول الموجة 517 نانومتر بواسطة جهاز UV-Visible.يتم تعديل الجهاز بواسطة الميثانول.
- ملاحظة : يستعمل الشاهد المرجعي يحتوي على 200ميكرولتر من الميثانول ويضاف إليه 800 ميكرولتر من DPPH .



الشكل 28 : مستخلص ناتج من إختبار تثبيط الجذر الحر DPPH• (الأصلي)

يمكن حساب النشاطية المضادة للأكسدة بالعلاقة التالية [32]

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

- **A_0** :إمتصاصية DPPH عند (517 nm) .
- **A** :إمتصاصية DPPH في وجود المادة المدروسة بعد 30 دقيقة عند. (517nm)
- **I%** :نسبة تثبيط العامل المضاد للأكسدة.

تحديد مقدار IC_{50} المثبطة لجذر DPPH :

يعرف مقدار IC_{50} على أنه تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50%من جذر DPPH• والذي يحسب من خلال المعادلة الخطية لمنحنيات تغير نسبة التثبيط (I%) بدلالة تراكيز المستخلص المدروس.[30]

V-4-11-3- إختبار ABTS

يعتمد إختبار ABTS على قياس قدرة المركبات المضادة للأكسدة على إزاحة الجذرالكاتيوني ABTS•+ يتم تشكيله من خلال أكسدته بواسطة فوق سولفات البوتاسيوم (potassium persulphate) [33][34] أو ثاني أكسيد المنغنيز[35] فيظهر لون أخضرمزرق ناتج من فقدان الإلكترون من ذرة النيتروجين لـ ABTS كما أنه في وجود Trolox (أو مضادات أخرى للأكسدة قادرة على منح الهيدروجين)،ذرة النيتروجين تخمد ذرة الهيدروجين،مما يعمل على إختفاء اللون في المحلول [36] .

وهذه الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة تم تقديرها كميا بواسطة جهاز المطيافية الضوئية عند طول موجة 734 نانومتر،حيث يؤخذ BHT كمنحى قياسي مرجعي [37]

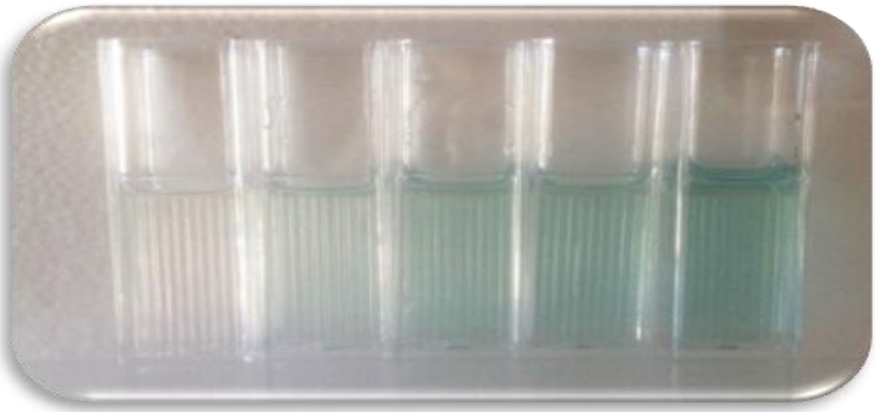
إعتمدنا خلال هذا الإختبار على إجراء الخطوات التالية:

تحضير محلول $ABTS^{\bullet+}$

- 7Mm من ABTS
- 2.45Mm من فوق سولفات البوتاسيوم (K_2SO_5) potassium persulfate
- ماء مقطر(H_2O)
- يترك المزيج في الظلام لمدة من (12 - 16) ساعة،ثم نقوم بتمديد محلول ABTS بالميثانول إلى غاية الوصول إلى قيمة الامتصاصية (0.76 ± 0.01) عند طول موجي 734 نانومتر

الخطوات العملية لتقدير

- مزج 1ml من محلول ABTS مع 50 ميكرولتر من مستخلص النبتة في أنابيب إختبار.
- رج الأنابيب ثم تترك في ظلام لمدة 10- 30 د عند درجة حرارة الغرفة 30 م°.
- نقوم بقراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول موجي 734 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية.



الشكل 29 : يوضح مستخلص ناتج من إختبار ABTS (الأصلي)

تحضير المنحنى القياسي

وذلك بإذابة 10 ملغ من BHT في 10 ملل من الميثانول للحصول على محلول ذو تركيز1 ملغ/ ملل . ومنه تم تحضيرسلسلة من المحلول القياسي ذو تركيز (0.1 - 1) ملغ / ملل.

- ثم نعامل الأنابيب بنفس الخطوات السابقة لتقدير. بعد ذلك قراءة شدة الإمتصاصية الضوئية عند طول موجة 734 نانومتر بواسطة جهاز المطيافية الضوئية .
- رسم المنحى القياسي للتراكيز بدلالة شدة الامتصاصية الذي يعبر عنه بمعادلة خطية التى تحدد تركيز في كل عينة(بوحدة ملغ / غ من المادة الجافة المكافئة لBHT)

وتقاس نسبة التثبيط (I%) للمستخلصات بالعلاقة التالي :

$$I\ \% = ((Ac - A_E) / A_C) \times 100$$

حيث أن

- A_C الإمتصاصية في غياب المثبط (الشاهد)
- A_E الإمتصاصية في وجود المثبط (العينة)
- I% نسبة التثبيط

V-4-12- النشاطية ضد الميكروبية

في هذه الدراسة تم إختبار حساسية ضد الميكروبية (البكتيريا،فطريات،خميرة) من أجل تحديد النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص النباتي الذي تم الحصول عليه عن طريق الإستخراج بإستخدام الميثانول[38]،وهذا بتطبيقها على 4 أنواع من سلالات بكتيرية ممرضة والتي تم الحصول عليها من معهد باستور بالجزائر العاصمة وبالإضافة إلى إستخدام خميرة وفطر من جنس الفيزاريوم كما هي موضحة في الجدول (19) .[39 -41]

الجدول 19: يوضح أنواع السلالات البكتيرية والفطرية والخميرةالمستعملة

الأنواع المختبرة	الغرام	العائلة	الإختصارات
***Escherichia coli* ATCC25922**	-	*Enterobacteriaceae*	*E.coli*
***Staphylococus aureus* ATCC14028**	+	*Micrococcaceae*	*S.a*
***Klebsielle pneumonia* ATCC700603**	-	*Enterobacteriaceae*	*K.p*
***Listeria innocua* CLIP74915**	+	*Listeriaceae*	*Lis.inno*
***Candida Albicans* IPA200**	/	*Saccharomycetaceae*	*L. c.a*
Fusarium sp	/	*Nectriaceace*	*Fusarium sp*

الخطوات العملية لهذا الإختبار

❖ **إختبار تحضير الكائنات الحية الدقيقة**

بعد نمو الفطريات و البكتيريا في أوساط الزرع لمدة حوالي عشرة أيام،تم كشط سطح البكتيريا وكذا الفطريات المسببة للأمراض النباتية بقضيب زجاجي على شكل حرف L ثم إذابتها في 5 مل من الماء الفيزيولوجي المعقم . [42]

الشكل 30 : تحضير الكائنات الحية الدقيقة

❖ **تحضير أوساط الزرع**

نعقم منطقة العمل بواسطة موقد بنزن ثم نقوم بتحضير طبق بتري نحدد به 3 أجزاء حيث نخصص الجزء الأول للمستخلص أما الجزء الثاني لشاهد (ميثانول) أما الجزء الثالث للمضاد الحيوي ويوضع في مركز الطبق لغرض المقارنة بالنسبة للبكتيريا،ثم نسكب به وسط الزرع (MH) الذي تم إذابته في المعقم بالضغط بالنسبة للبكتيريا،وتلقيح الأطباق بالوسط (SDA) بالنسبة للفطروالخميرة [43][44] وبوجود موقد البنزن في طاولة العمل نحصل على وسط معقم وتترك الأطباق لتبرد وتتجمد.[45]

الشكل 31 : تحضير وسط الزرع

❖ **تحضير المستخلصات**

تم إذابة المستخلص في الميثانول من أجل الحصول على تركيز 20 ملغ / مل بالنسبة للفطريات اما البكتيريا تم تحضيرمستخلص ذو تركيز 10 ملغ/ ملل .

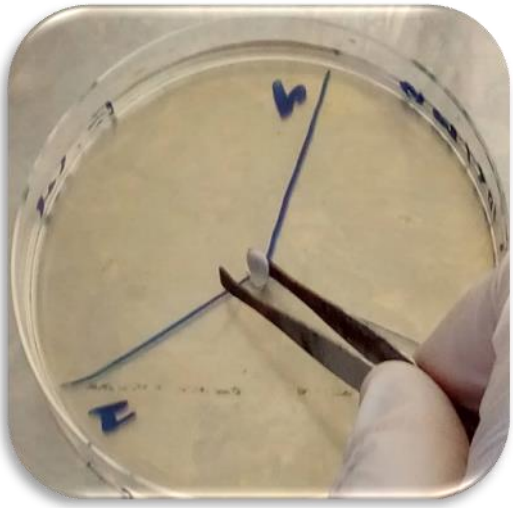
❖ **زراعة البكتيريا والفطريات والخميرة**

من أجل زراعة البكتيريا والفطريات .والخميرة نغمس الماسح القطني في المعلق البكتيري أو الفطري أو الخميري ثم يتم مسحه على كامل أوساط الزرع المحضرة سابقا في أطباق بتري على شكل خطوط متقاربة مع تكرار العملية 3 مرات وتدوير الطبق بزاوية 60 في كل مرة .[45].

الشكل 32: زراعة البكتيريا

❖ **وضع الأقراص**

تم إستعمال أوراق محضرة من ورق الترشيح معقمة (قطرها 6 مم)،بواسطة ماصة مجهرية نأخذ 10 ميكرولتر من المستخلص ونضعها على الأقراص المعقمة ثم نضعها على سطح وسط الزرع الملقح بالفطرأو البكتيريا أو الخميرة،كما تم إستخدام الميثانول كعنصر تحكم سلبي.[38]



الشكل 33 : وضع الاقراص

❖ تم وضع الأطباق التي تم إنهاؤها لمدة ساعتين عند درجة حرارة4 م°،ثم يتم وضع علب بتري بشكل مقلوب في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة بالنسبة للبكتيريا و72 ساعة بالنسبة للفطريات والخميرة.

❖ من خلال دراسة نشاطية المستخلص لنبات كرشة الأرنب على الأنواع البكتيرية المذكورة سابقا تم إستعمال مضاد حيوي قصد مقارنة الفعالية البيولوجية للمستخلص النباتي مع المضاد الحيوي (Amoxyclav AMC30: 30 µg /disc) الموضح في الشكل (29)

الشكل 34 : المضاد الحيوي Amoxyclav (AMC30) µg /disc المستخدم في المقارنة الإيجابية للنشاطية ضد البكتيريا

❖ بعد إنتهاء مدة الحضن نقوم بإخراج علب بتري لقياس الأقطار المثبطة بـ (مم) للمستخلص ،المضاد الحيوي والشاهد التي تكشف عن النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص. [43]

قراءة النتائج: بعد الحضن إذا ثبط المستخلص نمو البكتيريا والفطر تظهر مناطق واضحة حول محيط الأقراص تسمى : مناطق تثبيط النمو البكتيري للسلالة المختبرة. يحسب قطر هذا التثبيط بالميليمتر و حسب سلم تقدير Estimation ، ترتب قيم اقطار مناطق التثبيط (D) للنمو الميكروبي في خمسة أقسام :[46].

❖ جدّ قوية التثبيط: ($D \geq 30$) مم

❖ قوية التثبيط : ($21 \leq D \leq 29$)مم

❖ معتدلة التثبيط : ($16 \leq D \leq 20$)مم

❖ واسعة التثبيط : ($11 \leq D \leq 15$)مم

❖ غير مثبطة: ($D \leq 10$) مم

المراجع

[2]BoukrinH., Contribution à létude phytochimique des extraits bruts des épices Contenus dans le mélange Ras-el hanout. Théme Master Academique. Université kasdi Merbah ourgla.P99.(2014).

[3] HADJ MOUSSA ALI. ,2012- Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de Retama raetam sur l'activité de l'α-amylase. 31p

[4] Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R., (2003). Phytochemical screening of some species of Iranien plants. Iranien Journal of Pharmaceutical Research. 77-82

[5] Karumi, Y; Onyeyili, P.A; Ogugb uaja, V.O; (2004). Identification of active principales of balsamina (Balsam apple) leaf extract. J. Med. Scien. 4: 179-182

[6] TREASE E., EVANS W., 1987-A textbook of Pharmacognosy Bacilluere Tinal Ltd, London.13 th Edition. P 61-62.

[7] DEBRAYB M.,JACQUEMIN H., RAZAFINDRAMBO R., 1971-Travaux et documents del'Orstom. Paris, France, N°8.

[8] Oloyede, O.I; (2005). Chemical Profile of Unripe Pulp of Carica papaya. Pakistan journal of nutrition. 4: 379-381.

[9] SHIBKO S., KOIVISTOINEN P., TRATYNECK C., HALL N., FEIDMAN L ., 1966 - A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction . Analyt. Biochem . 19: 415-528

[10] BELDI H ., 2007- Etude de gambusia affinis (poisson, téléostéen) et donax trunculus (mollusque, pélécypode) : écologie, physiologie et impacts de quelques. Thèse de Doctorat, Université Annaba, Algérie, p86.

[11] DUBOIS M . K ., GILLES K . A., HAMILTON J . K., REBERS P . A ., Smith F., 1956 - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.chem . 28:350-356

[13] GOLDSWORTHY A . C., MORDUE W., GUTHKELCH J., 1972 - Studies on insect adipokinetic hormone.Gen. Comp. Endocrinol . 18: 306-314

[14] LOWRY O. H., ROSEBROUGH N .J., FARR A .L., RANDALL R .J., 1951- Protein measurments with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem 193: 265-275.

[15] PRABHU I ., KRISHNASWAMY J ., 2012 - Combined effects of zinc and high irradiance stresses on photoinhibition of photosynthesis. Bean Journal of Stress Physiology et Biochemistry, p14.

[16] MARX E.,1999-Soil Test Interpretation Guide . Oregon State University, USA , p 1478.

[17] JONES J., 2001- Laboratory guide for conducting soils test and plant analysis. CRC Press , Boca Raton Florida ,USA, P 382.

[18] IVANA K., MILENA N., and MIODRAG L., 2011- 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. 19 (3): 504-511.

[19] SINGLETON V. L ., ROSSSI J. A ., 1965 - Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phototungstic acid reagents. Am J Enol Vitic . 16:144-158.

[20] Ardestani A, yazdanparast R, (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Teurcin polin on in vitro protein glycosidation. Food and chemical toxicology; 45:2402-2111.

[21] Zhishj, Mengheng T, Jainming W, (1999). The determination of flavonoide contents mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chem. 64: 555-9.

[24] Vincent Dalmeyda, Claudine David, Jean-Marie Fougnion, Brigitte Arnaud, et Claude Genty, Chromatographie en phase liquide(CHROMLIQ),(1999)

[25] AUDIGIE C DUPON G .et ZONSGAIN F. 1995-principes des méthodes d'analyse biohimique.T1 ¸2émeéd .Doin.paris.p.44

[26] XIANG Y., LIU Y. and LEE M.L., 2006- Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. Journal of Chromatography. 1104 (1-2): 198-202.

[27] Bloisms., antioxidant determination by theuse of astable free radical. Nature.181.pp: 1199-2000.(2012).

[28] Ardestani A., Yazdanaparast R., Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Teucrium polium on in vitro protein glycoxidation, Food and chemical Toxicology. 45:2402-2411(2007),

[29] DZIRI S., HASSEN I., FATNASSI S., MRABET Y., CASABLANCA H., HANCHI B., HOSNI K, Phenolic contituents antioxidant . and antimicrobial activities of rosy garlic (Alliumroseum var. odoratissimum). SciVerse Science Sirect joumal of functional foods (4).423-432.

[31] BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E., BERSET C., 1995- Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT. 28: 25-30.

[33] Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, et al. (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. J Nutr 133: 2812–2819

[34] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L and Byrne DH (2006) 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.

[35] Su L, Yin JJ, Charles D, Zhou K, Moore J, et al. (2007) Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. Food Chem 100: 990–997

[36] Marc F, Davin A, Deglène-Benbrahim L, Ferrand C, Baccaunaud M, et al. (2004) Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. Med Sci 20 : 458-463

[37]Igbinosa, O. O., Igbinosa, I. H.et al. International Journal of Molecular Sciences, (2011)12(5), 2958–2971.

[38] Hazalin N. A., Ramasamy K., Lim S. M., Wahab I. A., Cole A. L. and Abdul Majeed A. B. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine 2009; 9: 46

[39] L . Mc Kane, J. Kandel :Microbiology, Eessential and Application, Mc Graw Book Company, 1985

[40]J. Valnet: Aromatherapie, Traitement des maladies par des plantes, Maloine S.A.Editeur Paris, 1984.

[41] Batérie Médicale et Vétérinaire systémitique bactérienne dépôt le pal,4,N°1933,1981.

[42] Mukhtar I. Influence of Trichoderma species on seed germination in okra. Mycopathologia 2008; 6(1&2): 47-50.

[43] Yamaç M. and Bilgili F. Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. Pharmaceutical Biology 2006; 44: 660-667.

[44] Mohanta J., Tayung K. and Mohapatra U. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. The Internet Journal of Microbiology 2008; 5(2).

[46] Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D. & Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of Acacia m ellifera extracts and lupane triterpenes – Journal of Ethnopharmacology.

الراجع العربية

[1]ضيف إ.،2014 – الواقع السوسيولو ثقافي و علاقتها بالمشكلات البيئية مقاربة سوسيو اثنوغرافية في منطقة واد سوف . مذكرة دكتوراه،جامعة محمد خيضر بسكرة ، الجزائر ،ص308 .

[12] بن جامع ع .، 2008 – المحتوى الكيميائي لأوراق وبذور أصناف من القمح الصلب (Triticum durum Desf) النامية تحت ظروف الإجهاد المائي ونقعا ورشا (AIA) المعاملة بالأوكسين .جامعة منتوري قسنطية ، الجزائر، 105 ص.

[22] لكحل ه، فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي لنبتة Stach·ys ocymastrum(L).Briq.(Lamiaceae), مذكرة ماجستير , جامعة منتوري , قسنطينة ص142, (2008).

[23] الأستاذ أحمد خميس محمد سلامة ،أجهزة التحليل الطيفي والكروماتوغرافيا (2006).

[30] بن حناثة م،المساهمة في دراسة مستخلصات نبتة الكخلة (Ferula Vesceritensis)، مذكرة ماستر ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة ،ص83،(2006).

[32] اللبي ز، دردوري س، التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويد ودراسة النشاطية البيولوجية لمستخلصات نبات الغبيثاء (Bassi muricata L) مذكرة تحرج لنيل شهادة ماستى أكاديمي تخصص بيولوجيا وتثمين النبات ، جامعة الشهيد حمه لحضر ، وادي ،(2006).

[45] حوة إ.،2013- دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة .مذكرة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية والفيزيوكيمياء الجزيئات ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة ، الجزائر ، 109 ص.

الفصل السادس
النتائج و المناقشة

VI- 1- خصائص العامة للمستخلص

الجدول 20 : يوضح الخصائص العامة للمستخلص الميثانولي لنبتة *L.glomerata*

الخصائص	اللون	المظهر	الإنحلالية			الـ pH	الحموضة الكلية ملمكافئ \كغ	الناقلية ms/cm عند 25مْ	المردود
			MeOH	H_2O	MeOH/H_2O				
المستخلص	أخضر داكن	لزج	جزئي	جزئي	كلي	5.86	37.5	13.08	3%

تعليق على النتائج

من خلال النتائج التى تحصلنا عليها في الجدول أعلاه قدرت قيمة المردود للمستخلص الميثانولي بعد عملية الإستخلاص بطريقة النقع ب(3%)،ترتبط قيم المردود بخصائص وطبيعة المذيب من حيث القطبية و الطبيعة الكيميائية للمركبات الفعالة الموجودة في النبات مما يدل على أنها غنية بالمركبات النشطة حيث أنه كلما زادت أنواع وكميات المركبات النشطة في النبات زاد معها المردود. [1]

أما بالنسبة لناقلية سجلت قيمتها (13.08ms/cm) اما الحموضة الكلية قدرت قيمتها ب(37.5 ملي مكافئ / كلغ)، حيث انها كلما كانت قيمة الحموضة الكلية كبيرة دلت على وجود أحماض عضوية أكبر،كذلك تم قياس درجة الأس الهيدروجيني pH لمحلول النبته الجافة فكانت النتيجة (5.86) بينما قدرت قيمته لنبات آخر من نفس الجنس (*L.taraxacifolia*) ب(6.8)[2] إن هذه الإختلافات تعود إلى نوع التربة،المناخ،وقت القطف .

VI- 2- نتائج الكشف الأولي الفتوكيميائي

بعد عملية الكشف الفتوكيميائي عن نواتج الأيض الثانوي في النبتة المدروسة تحصلنا على النتائج التجريبية لمقتطفاتنا في الجدول وجود أو عدم وجود مجموعات كيميائية معينة. ترتبط هذه الإختبارات بكثافة الترسبات أو التعكر أو اللون، والتي تتناسب مع كمية المادة المطلوبة.

الجدول 21 : يوضح نتائج عملية الكشف عن المواد الفعالة

المواد الفعالة		النتيجة	الملاحظة	الصور
1-القلويدات	كاشف دراجندروف	-	راسب برتقالي	/
	كاشف وانر	-	راسب بني	/
2-الفلافونيدات		+	لون أصفر	
3-التربينات		+	لون أخضر	
4-الصابونين		+	تشكل رغوة أقل من 1سم	
5-التانينات		+	أخضر داكن	

6-الأنثوسيانات	-	/	/
7-النشاء	-	/	/
8-المركبات المرجعة (السكريات) (الكربوهيدرات)	+	راسب أحمر أجوري	

نرمز ب (+) دلالة على وجود المادة الفعالة، و (-) دلالة على غياب المادة الفعالة.

تعليق على النتائج

الجدول 22 : يوضح مقارنة نتائج الكشف للمواد الفعالة بين النبتتين *L.glomerata* و *L. taraxacifolia*

النبتة / طرق الكشف	*L.glomerata*	*L. taraxacifolia*
القلويدات	-	-
الفلافونيدات	+	+
التربينات	+	+
الصابونين	+	+
التانينات	+	+
الانثوسيانات	-	-
الكربوهيدرات	+	-
النشاء	-	/

نتائج الكشف لمستخلص نبتة (***L.glomerata***) المسجلة في الجدول تبين وجود المركبات (صابونيات،الفلافونويدات،التربينات،الكربوهيدرات ،القلويدات والتانيات) كما بين عدم تواجد المركب (الأثوسيانات ،والنشاء) على عكس نبتة (***L. taraxacifolia***) حيث سجل فيها مركبات (فلافونويدات

،تربينات،صابونيات وتيانات) وغياب (الأثوسيانات ،قلويدات وكربوهيدرات)[2].إن هذا الإختلاف الموجود بين النبتتين راجع إلى عدة عوامل كوّن أن النبتتين ليستا من نفس النوع ، المناخ والتربة

- تعتبر الفلافونويدات من المركبات التي تلعب دورا دفاعيًا فوجودها في النبات يمكن أن يفسر أنها نوع من أنواع مضادات الأكسدة [3]،وهي مواد تقي النباتات من البكتيريا[4]،وتملك أيضا خاصية مضادة للفيروسات والميكروبات.[5]

يزيد انتاج فلافونويدات من طرف النبات لمقاومة الإجهاد الحراري والمائي المعرض له. [3]

- يفسر وجود الكربوهيدرات بإرتبطها مباشرة بتكوين الغلوكوزيدات فوجودها إذن في النبات هو نتيجة لوجود الغلوكوزيدات كما أنها تعتبر مواد مخزنة يستعملها النبات في مراح نموه .[6]
- لتانينات دور هام في النبات فهي تتواجد عادة بشكل مركز في أجزاء النبات مثل الأوراق و السيقان [7]،وتعتبر كمضادات للأكسدة في النبات لأنها ضمن مجموعة عديدات الفينول وتحمي النبات من الحشرات والفطريات الضارة وتحافظ على حياته،لها خاصية جذب الأكسجين لإحتوائها على الفينول وبالتالي لها وظيفة تنفسية لزيادة قدرة النبات للحصول على الأكسجين [8].
- يعتبر غياب الأثوسيانات لكونها مواد منفرة للحيوانات الرعوية حيث تعطي اللون المحمر للنبات [3].
- يفسر غياب القلويدات في نبتة كرشة الأرنب الرعوية لكونها مواد سامة ضارة بالحيوانات وآكلات الأعشاب [9][10].
- التربينات والسترويلات يفسر أنّ النبات ينتج هذه المادة لتوفر الأنسجة الخاصة كالخلايا الغدية و القنوات الزيتية. [11]
- ربما يعود وجود الصابونيات في النبات للمرحلة العمرية لنبات لكونها مواد مرة الطعم تعمل على طرد الحيوانات آكلات الأعشاب لإستمرار مراحل النمو.[12]

VI- 3 - تقدير القيمة الغذائية

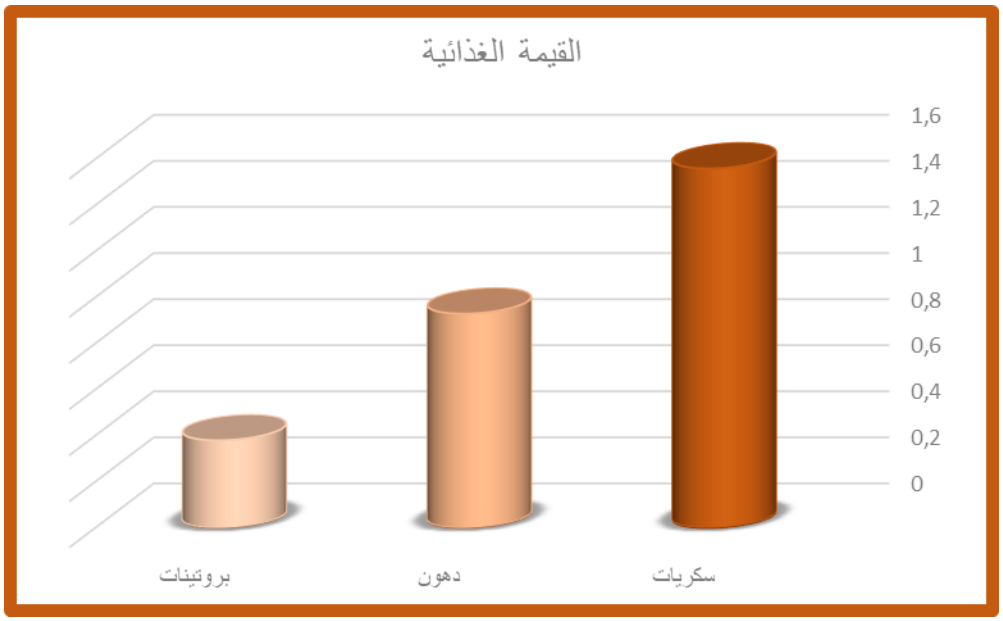
- تم تقدير كمية السكريات والدهون والبروتينات للمادة الجافة للنبتة المدروسة بالإعتماد على طريقة SHIBKO (1966) وبإ ستخدام الدالة الخطية للمنحنيات القياسية المذكورة سابقا تحصلنا على النتائج الموضحة في الجدول التالي

الجدول 23 : يوضح نسبة قيم السكريات ،البروتينات و الدهون في نبات *L.glomerata*

القيمة الغذائية	الإمتصاصية	التركيز	التركيز%
السكريات	0.72	15666 .84 µg EqG/g	1.56
الدهون	0.316	8393µg EqH /	0.83
البروتينات	0.800	3816 µg EqB/g	0.38

تعليق على النتائج

قدرت قيمة السكريات ،البروتينات و الدهون في نبات *L.glomerata* على التوالي بـ (1.56%، 0.38 % و0.83%)،لحداثة البحث ونظرا لعدم توفر مراجع سابقة حول هذه الدراسة للنبتة (المستخلص الخام) تم مقارنة القيمة الغذائية مع نبات آخر ينتمي إلى نفس جنس النبتة (*L. taraxacifolia*)،والتي سجلت نتائجها لقيمة السكريات ،البروتينات والدهون على التوالي (30.56 %، 26.67 % و 6.5%) [2]،وهذا الإختلاف تتحكم فيه عوامل خارجية منها : نوع النبات،التربة والمناخ.



الشكل 35 : أعمدة بيانية توضح نسبة قيم السكريات ،البروتينات و الدهون في نبات *L.glomerata*

VI-4 - تقدير المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات

تم تقدير كمية الفينولات الكلية للمستخلص الكحولي للنبتة المدروسة باستخدام طريقة Singleton et Rossi وبالاعتماد على الدالة الخطية للمنحى القياسي لحمض لغاليك في الميثانول حيث يتم التعبير عن النتائج المدرجة في الجدول بالملغ غرام مكافئ للكريستين في الغرام من المستخلص الجاف .

$$Y=55.262\times+0.025$$

تم تقدير كمية الفلافونويدات الكلية للمستخلص الكحولي للنبتة المدروسة باستخدام كاشف $AlCl_3$ و بالاعتماد على الدالة الخطية للمنحى القياسي لحمض الكريستين في الميثانول حيث تم التعبير عن النتائج المدرجة في الجدول بالملغ غرام مكافئ للكريستين في الغرام من المستخلص الجاف.

$$Y=30.573\times + 0.0169$$

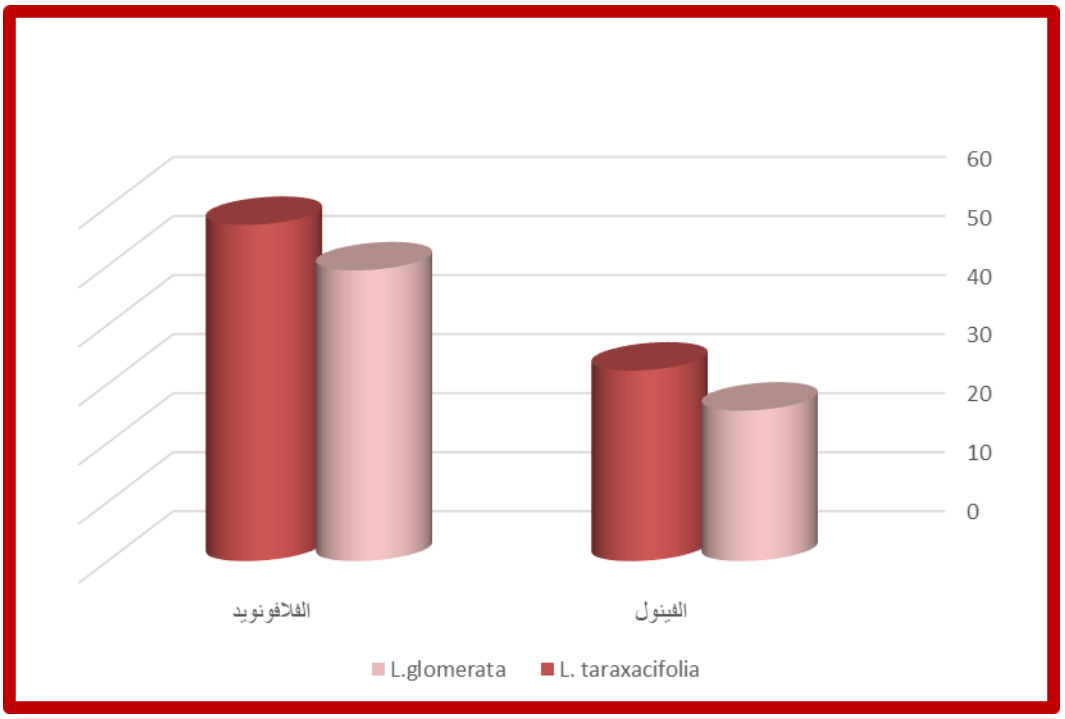
الجدول 24 : التقدير الكلي لمحتوي الفينولات والفلافونيدات

الفينولات			الفلافونويدات		
الامتصاصية	تركيز mg EqAG/g	تركيزmg EqAG/ 100 g من المادة جافة	الامتصاصية	التركيز mg EqQr/g	التركيز mg EqQr / 100 g من المادة جافة
0.309	25.69	856.33	0.318	49.24	1641.33

تعليق على النتائج :

من خلال النتائج المتحصل عليها قدرت قيمة الفينولات بـ (25 .69ملغ مكافئ من حمض الغاليك / غ من مستخلص المادة الجافة) والفلافونويدات بـ (49.24 ملغ مكافئ من الكريستين / غ من مستخلص المادة الجافة) في نبات (*L.glomerata*) ونظرا لعدم توفر المراجع السابقة لدراسة مستخلص هذه النبتة تمت مقارنة قيم الفينولات و الفلافونويدات مع نبات آخر ينتمي الى نفس الجنس (*L.taraxacifolia*)

مما لاحظنا تقارب في القيم،حيث قدرت قيمة الفينولات بـ (32.27 ملغ مكافئ من حمض الغاليك / غ من مستخلص المادة الجافة) أما الفلافونويدات بـ (56.95 ملغ مكافئ من الكريستين / غ من مستخلص المادة الجافة) لنبات (*L.taraxacifolia*).[13]



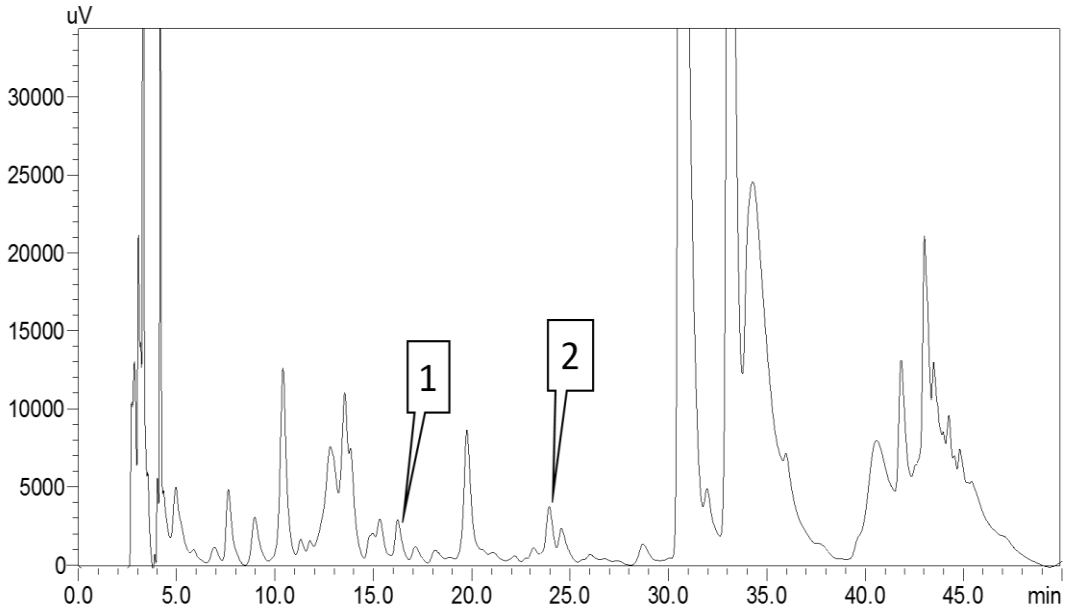
الشكل 36 : أعمدة بيانية توضح مقارنة لقيم الفينولات والفلافونويدات بين النبتتين *L.glomerata*، *L.taraxacifolia*

يمكن تفسيرهذا التقارب لتغير تركيزالمركبات الحيوية في النباتات وكذا تأثيراتها البيولوجية تبعا لعدة عوامل منها الموقع الجغرافي،المرحلة الضوئية والحرارة. تؤثر هذه العوامل على البناء الحيوي للمستقلبات الثانوية كالفلافونيدات والفينولات هذا ما يغير نشاطيتها المضادة للأكسدة.

كما أن نوع المذيب وطريقة وشروط الإستخلاص تلعب دوراً هاما في تقدير كمية الفينول والفلافونيدات داخل النبتة. [14]

VI- 5- التقدير الكيفي للفينولات بواسطة الـ HPLC

تبين من خلال الكروماتوغرام (37) إن المستخلص يحتوي على العديد من المركبات حيث تم تحديد بعض المركبات الفينولية من المستخلص وذلك من خلال زمن مكوثهما مع المركبات المرجعية والجدول(23) يوضح ذلك .



الشكل 37 : يوضح كروماتوغرام لمستخلص النبته *L.glomerata*

الجدول 25 : يوضح نتائج تحليل الكروماتوغرام

رقم المركب	المركبات الفينولية	زمن المكوث القياسي (min)	زمن مكوث العينة(min)	المساحة	الكمية بـ µg/g
1	حمض الكافييك	16.277	16.220	93500	222.44427
2	حمض الكوماريك	23.817	23.946	111267	449.6090514

تعليق على النتائج

نلاحظ من خلال الكروماتوغرام (37) ظهور عدة عُصابات مما يؤكد على وجود عدة مركبات للمستخلص،لم نتمكن من تحديدها لعدم توفر المركبات المرجعية الموافقة لها .

يمكن ان نلاحظ من الجدول (25) وجود مركبين (حمض الكافييك بكمية قدرها 222.44427 µg/g و ايضا حمض الكوماريك بكمية تقدربـ (449.6090514 µg /g) .

6-VI - الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة

6-VI - 1 - الفعالية المضادة للأكسدة الكلية CAT

من خلال إختبار القدرة الكلية المضادة للأكسدة بطريقة الفوسفوموليبدات وكذلك نتائج الإمتصاصية المتحصل عليها وبحسابات رياضية بالتعويض في معادلة المنحنى القياسي لحمض الغاليك في الميثانول يتم التعبير عن القدرة الكلية المضادة للأكسدة بملغ مكافئ لحمض الغاليك على الغرام من المستخلص الجاف تم تقييم النشاطية الكلية المضادة للأكسدة فتحصلنا على النتائج المدونة في الجدول (23)

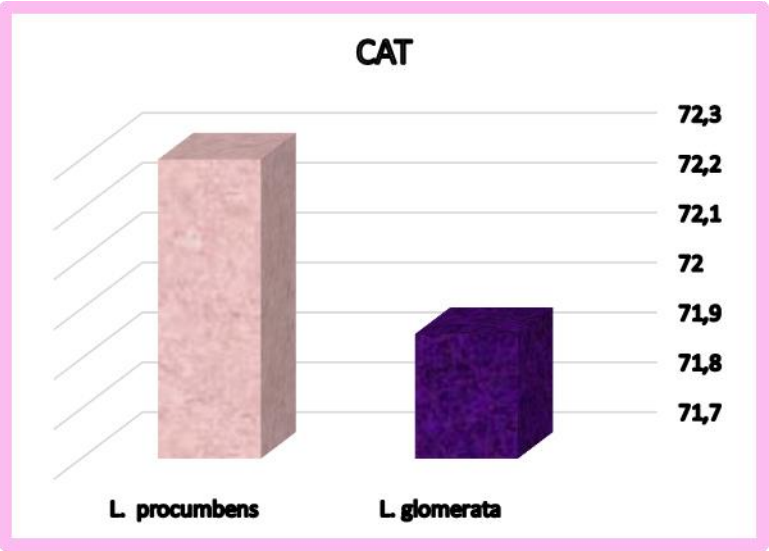
$$Y= 5.6422X + 0.1282$$

الجدول 26 : قيمة النشاطية الكلية المضادة للأكسدة CAT

C_0 mg /ml	الامتصاصية	C mg EqAG/g
0.8	0.25	71.95

التعليق على النتائج

من خلال النتائج المتحصل عليها لإختبار القدرة الكلية المضادة للأكسدة بطريقة الفوسفوموليبدات والتى قدرت بـ (71.9 ملغ مكافئ لحمض الغاليك /غرام من المستخلص الجاف) وتم مقارنة نتيجة هذا الإختبار مع نبات آخر من نفس الجنس (*L. procumbens*) الذي قدرت قيمته بـ (72.3 ملغ مكافئ لحمض الغاليك /غرام من المستخلص الجاف).[15]



الشكل 38 : أعمدة بيانية توضح مقارنة قيم إختبارالقدرة الكلية المضادة للأكسدة بطريقة الفوسفوموليبيدات لنبتة *L.glomerata* و*L. procumbens*

VI-6 - 2 - قدرة تثبيط الجذر الحر لـ DPPH

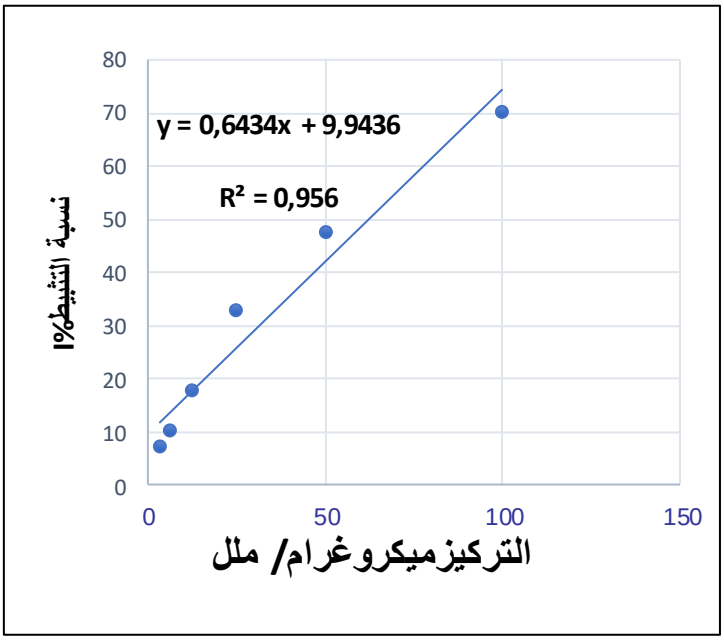
يتم حساب نسبة تثبيط للجذر الحر DPPH• للمستخلص الكحولي الميثانولي للنبتة المدروسة من خلال قيم الإمتصاصية المتحصل عليها وبحسابات رياضية باستعمال العلاقة التالية

$$I\ \% = [(A_0 - A) / A0] \times 100$$

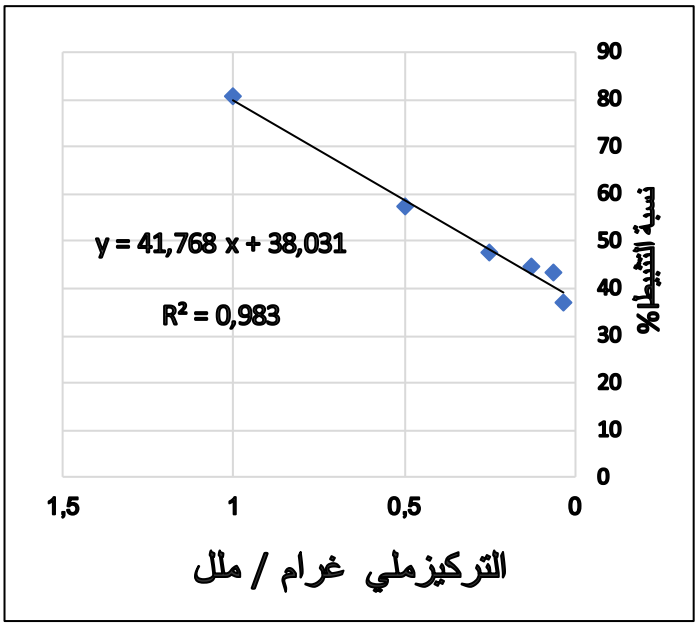
ومنه تم التحصل على النتائج المدونة في الجدول

الجدول 27 : يوضح نسبة التثبيط (I%) على الجذر الحرDPPH للنبتة بدلالة الإمتصاصية والتركيز (ملغ/ ملل)

تركيز ملغ/ ملل	الإمتصاصية	I % نسبة التثبيط
0.03125	1.228	36.86
0.0625	1.100	43.44
0.125	1.074	44.78
0.25	1.022	47.45
0.5	0.830	57.33
1	0.378	80.56



الشكل 39: التأثير الازاحي لحمض الاسكوربيك على الجذر DPPH·



الشكل 40 : التأثير الإزاحي لمستخلص النبتة على الجذر DPPH·

ومن خلال منحى النشاطية للمستخلص الميثانولي في تثبيط الجذر الحر DPPH· وكذا المنحى القياسي لحمض الأسكوربيك تم حساب قيمة IC_{50} للمستخلص علما أن القيمة الأقل لها تعني التأثير التثبيطي الأفضل كما هي موضحة في الجدول (28).

الجدول 28 : يوضح قيمة IC_{50} وARP لنبتة *L.glomerat* وحمض الأسكوربيك

النبتة	IC_{50}ميكروغرام/ ملل	ARP
كرشة الارنب	288.55	0.0034
حمض الأسكوربيك	62.29	0.0160

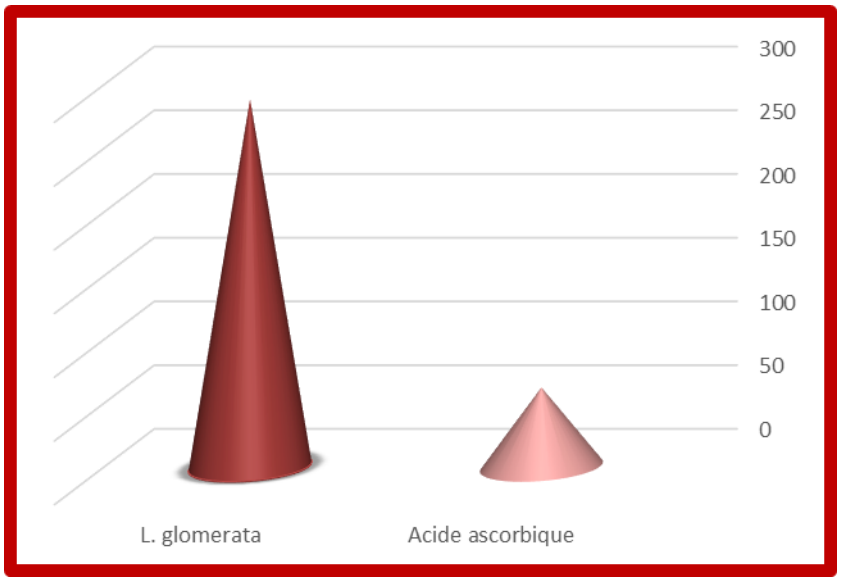
ARP=$1/IC_{50}$

تعليق على النتائج

قدرت نشاطية المستخلص المدروس على إزاحة جذر DPPH عبر إرجاع هذا الجذر ذو اللون البنفسجي إلى الأصفر و يتضح من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول (24) أن قدرة المستخلص المدروس على إزاحة الجذرDPPH تتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز.

لمقارنة الفعالية المضادة للأكسدة للعينة تم حساب قيمة IC_{50} (.55 288 ميكروغرام/ ملل) التي تمثل التركيز المناسب للقضاء على 50% من الجذور الحرة بوحدة (mg /ml) من معادلة منحنى الشكل (39) وإعتمادا على دراسات سابقة كلما كانت قيمية IC_{50} صغيرة كانت الفعالية المضادة للأكسدة كبير للمستخلص.[16]

وبالمقارنة مع قيمة (IC_{50}) لحمض الأسكوربيك والتي تقدر بـ (62.29 ميكروغرام/ ملل)،أن المستخلص أقل فعالية من تأثير حمض الأسكوربيك بحوالي 4 مرات،حيث أن حمض الأسكوربيك يستعمل كمواد حافظة في الصناعة الغذائية.



الشكل 41: يوضح (IC_{50}) لمستخلص النبتة وحمض الأسكوربيك

6-VI - 3- قدرة تثبيط الجذر الكاتيوني ABTS

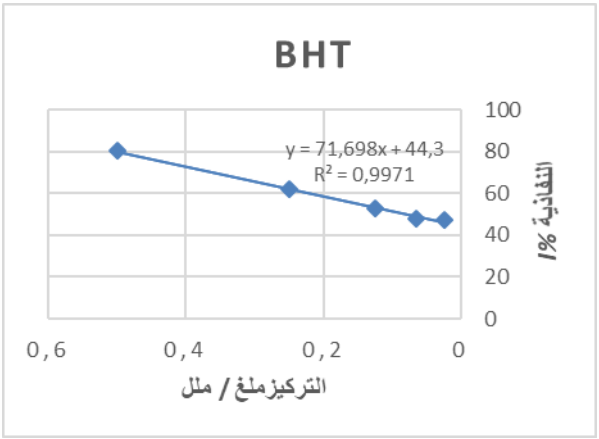
يتم حساب نسبة تثبيط الجذر الكاتيوني للمستخلص الميثانولي للنبات من خلال قيم الإمتصاصية المتحصل عليها وبحسابات رياضية باستعمال العلاقة التالية

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

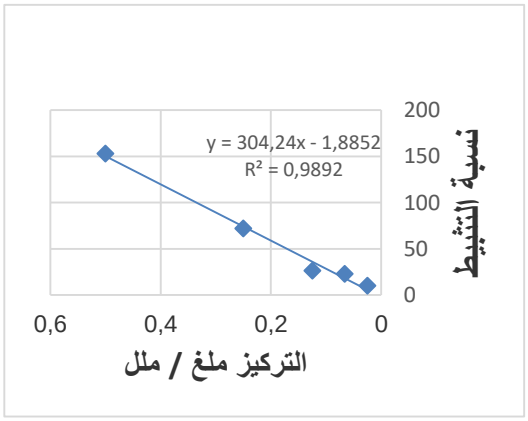
ومنه تم التحصل على النتائج المدونة في جدول (29)

الجدول 29: نسبة التثبيط (I%) للنبتة على الجذر الكاتيوني ABTS بدلالة الإمتصاصية والتركيز (ملغ/ ملل)

I %	الإمتصاصية	C mg/ml
10.25	0 .39	0 .025
22.85	0 .35	0.066
26 .47	0.34	0.142
72	0.25	0 .25
152.9	0 .17	0 .5



الشكل 42 : التأثير الإزاحي لـ BHTعلى الجذر ABTS (الاصلي)



الشكل 43 : التأثير الإزاحي لمستخلص على الجذر ABTS

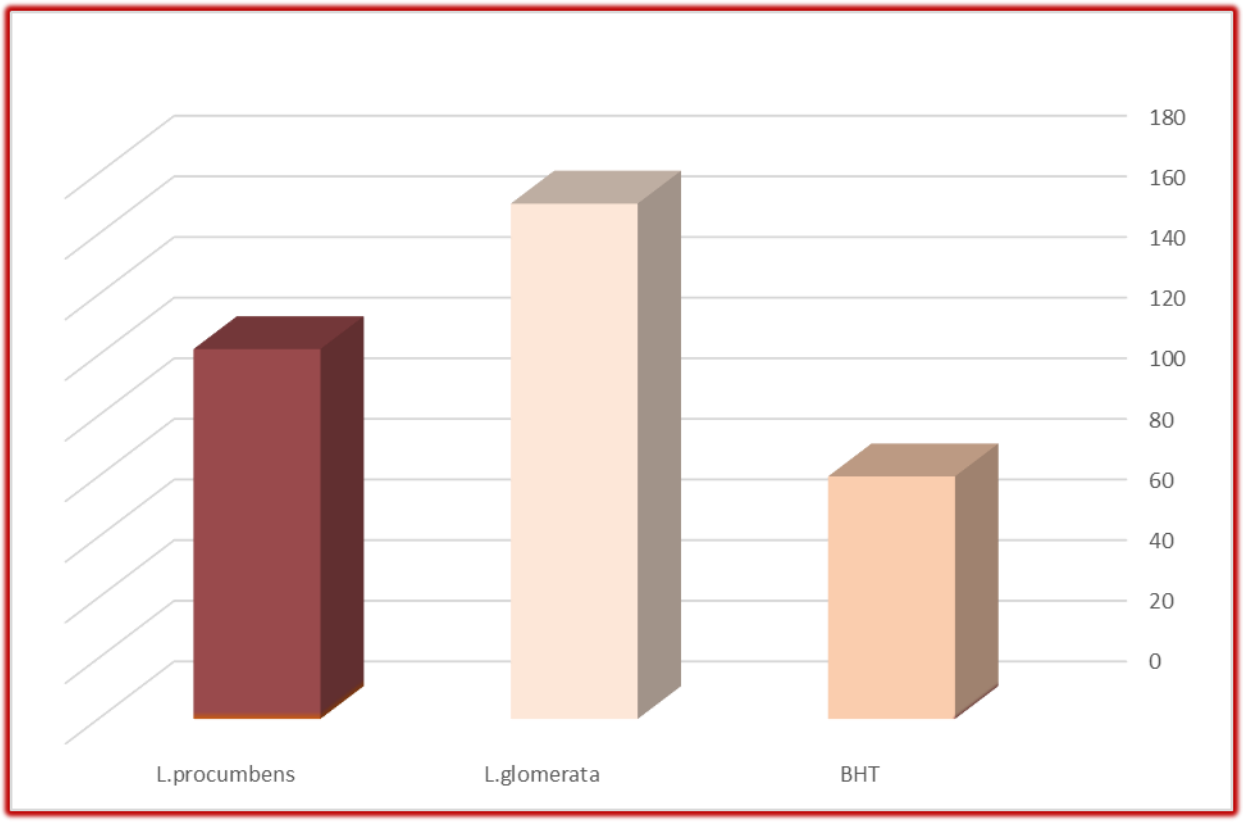
الجدول 30 : قيم IC_{50} لـ *L.glomerata* وBHT و*L. procumbens*

ABTS	قيمة IC_{50} ميكروغرام / ملل
L.glomerata	170
BHT	80
L. procumbens	122

تعليق على النتائج

بينت النتائج أن لمستخلص النبتة قدرة إزاحة معتبرة لجذر ABTSتزداد بزيادة التركيزكما هي موضحة في الجدول (29) والشكل (43) ولمقارنة الفعالية الكيميائية المضادة للأكسدة للعينة تم حساب قيمة IC_{50} والتى قدرت بـ (170 ميكروغرام / ملل)التي تمثل التركيز المناسب للقضاء على 50% من الجذور الحرة بوحدة (ملغ / ملل) وبالمقارنة مع قيمة(IC_{50})لحمض BHT والتي تقدر بـ (80 ميكروغرام / ملل)،ومنه أظهرت النتائج أن المستخلص فعاليته أقل من BHT بحوالي مرتين.

بالإضافة إلى ذلك تمت المقارنة مع نبات آخر (*L.procumbens*) من نفس الجنس لمستخلص الميثانولي حيث قدرت قيمته بـ (122 ميكروغرام/ ملل) كما هي موضحة في الجدول (30).[15]



الشكل 44 : يوضح قيمة IC_{50} لنبتة *L.glomerata* ، *L. procumbens* وBHT

هذه الإختلافات تتعلق بآلية التفاعل بين المركبات المضادة للأكسدة CAT ،جذرDPPH$^{\bullet}$ و الجذر الكاتيوني ABTS$^{\bullet+}$ وبنيتها الكيميائية (للفينولات وللفلافونيدات) ونوعيتها،تركيز وكمية هذه المركبات داخل اللأنسجة النباتية .[17]

بالإضافة إلى أن قدرة هذه المركبات على إزاحة الجذور ترتبط وترجع هذه العلاقة الى عدد المجاميع الهيدروكسيلية التي تمتلكها الفينولات والفلافونيدات حيث كلما زادت مجموعة الهيدوكسيل في بنية الفلافونويدات زادت القدرة على أسر الجذور الحرة وهذا يؤكد أن النشاط المضاد للأكسدة له علاقة

ببنية ونوعية المركبات التى يحويها المستخل ،حيث أدت الأبحاث التى إهتمت بالعلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونيدات ونشاطه المضاد للأكسدة الى التعرف على عدد وموقع المجاميع النشطة فعلى سبيل المثال بين أن وجود المجموعة dihydroxylated في الحلقة B والرابطة المزدوجة 2-3 مع وجود الوظيفة 4-oxo في الحلقة C ووجود مجاميع OH إضافية على كربون C_3 و C_5 يرفع من النشاطية المزيحة للجذور الحرة مثل fisetin و myricetin و querceti.[18]

إن الإختلاف في سلوك إعطاء البروتون والإلكترون يفسرالفرق في النشاطية المضاد للأكسدة.[19]

VI-7 - الفعالية ضد الميكروبات

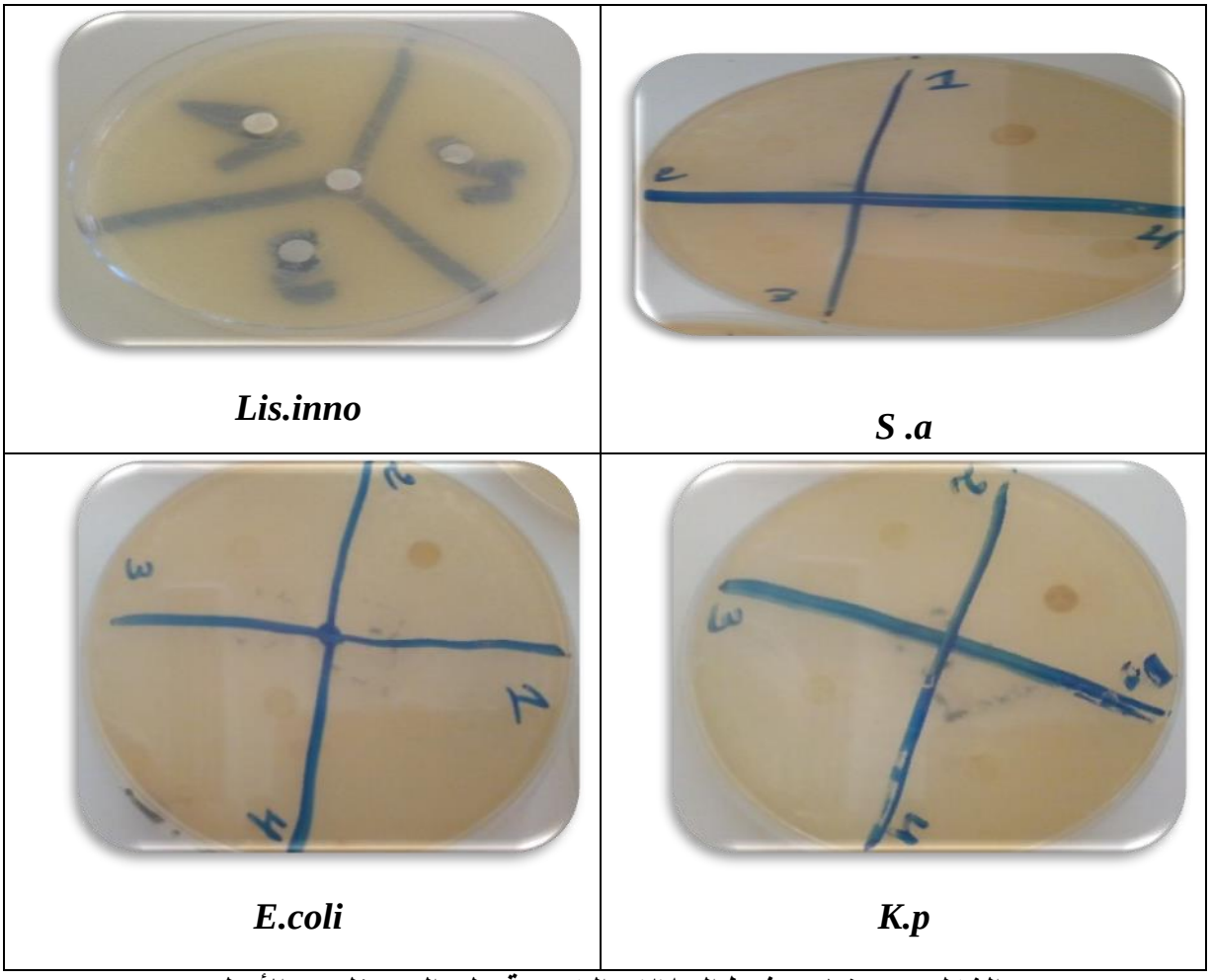
VI-7 – 1- النشاطية ضد البكتيريا

من خلال دراسة النشاطية البيولوجية للمستخلص الكحولي وبإستعمال المضاد حيوي(المضادة لبعض الأنواع البكتيرية الممرضة) تحصلنا على النتائج المرفقة في االشكل (45) والجدول (31)

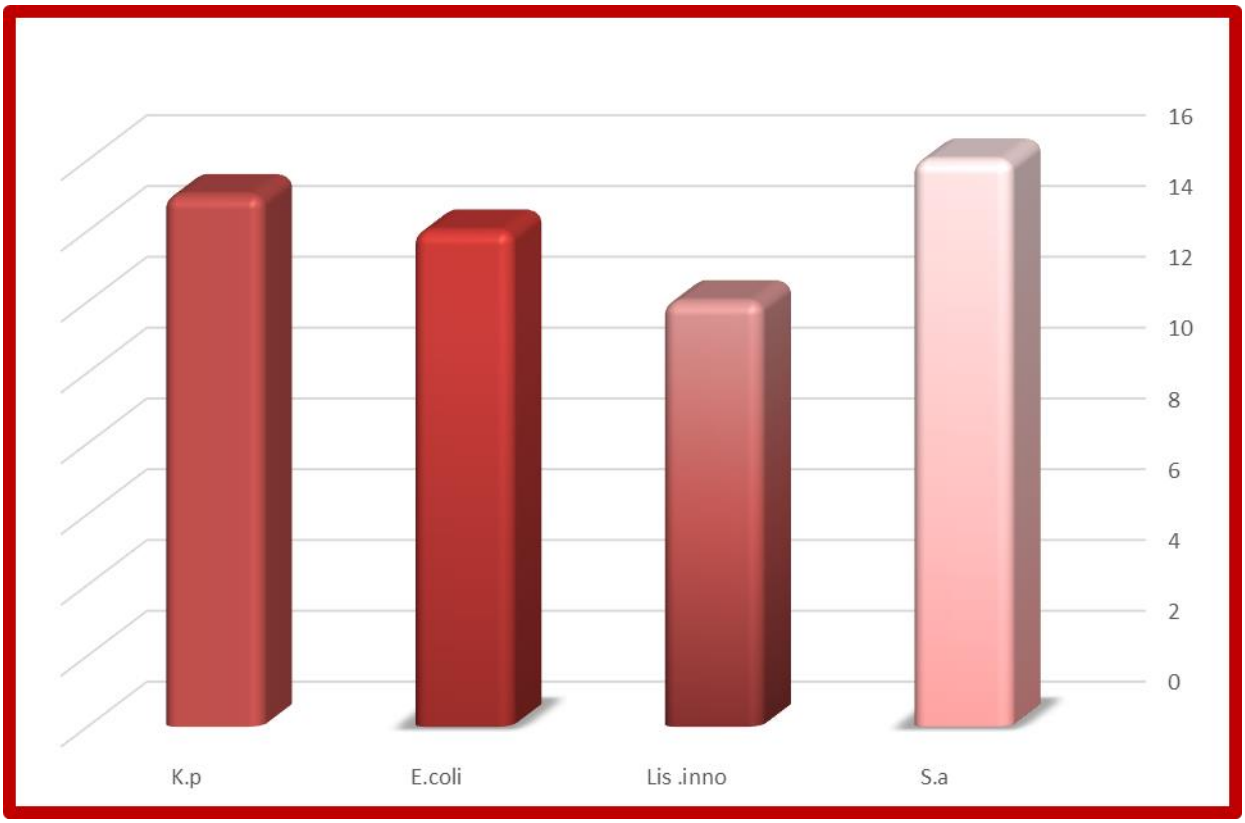
الجدول 31 : يوضح اقطار التثبيط لسلالات البكتيرية المستعملة على المستخلص

الصبغة	انواع البيكتيريا	التثبيط (مم)
G^+	***S.a***	**16**
	Lis .inno	**12**
G^-	***E.coli***	**14**
	K.p	**15**
S .a :staphylococcus aureus *Lis.inno : Listeria innocua* *E.coli :Escherichia coli* *K.p : Klebsielle pneumonia*		
ملاحظة :القيم المتحصل عليها بوحدة (مم) تكون مضافة مع قطر القرص الذي طوله(6 مم)		

✓ العملية مكررة ثلاث مرات



الشكل 45 : نتائج تثبيط السلالات البكتيرية على المستخلص (الأصلي)



الشكل 46 : أعمدة بيانية توضح أقطار التثبيط لسلالات البيكترية المستعملة على المستخلص

تعليق على النتائج

من خلال النتائج المرفقة في الجدول (31) والمدرجة في الوثائق لاحظنا أن

صبغة الموجبة الغرام

أظهرت السلالة البكتيرية (S.a) أعلى قطر تثبيطي 16 مم بينما كانت السلالة (Lis .inno) بـ 12 مم

صبغة سالبة الغرام :

أظهرت السلالاتين *(K .p)* و*(E.coli)* قيم متقاربة (15 مم) و(14مم)

مقارنة بين الصبغتين

من خلال النتائج السابقة لاحظنا أن الصبغتين قد أظهرت حساسية معتبرة مع المستخلص بنسب متقاربة بينما أبدى المضاد الحيوي حساسية جيدة قدرت قيمته بـ 23مم

- تحتوي النباتات على العديد من المركبات التي لها تأثيرعلى النشاطية المضادة للبكتيريا وأهمها المركبات الفينولية والفلافونيدات والتربينات. [20]
- يفسر تأثير النشاطية المضادة للبكتيريا بإمتصاص الأغشية الخلوية للبكتيريا للمركبات الفينولية وتفاعلها مع الإنزيمات الفعالة والعناصر المعدنية في الجدران الخلوية .

- إن الإختلاف في الحساسية بين السلالات البكتيرية موجبة الغرام وسالبة لغرام يعود للإختلاف في بنية،تركيبة،طبيعةجدار،الخليةالبكتيريةبين النوعين [21]، وفي وجود Lipopolysaccharides التي يحتويها الغشاء الخارجي لبكتيريا سالبة لغرام .[22]

VI-7 - 2- النشاطية ضد الفطر و الخميرة

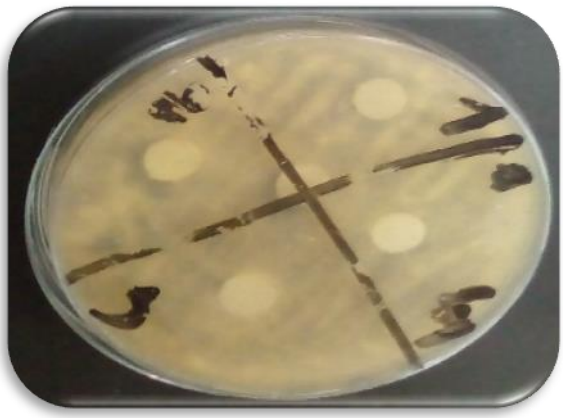
من خلال دراسة النشاطية البيولوجية للمستخلص الكحولي لبعض الأنواع الفطرية الممرضة تحصلنا على النتائج المرفقة في االشكل (47) والجدول (32)

الجدول 32 : يوضح أقطار التثبيط للفطر والخميرة المستعملة

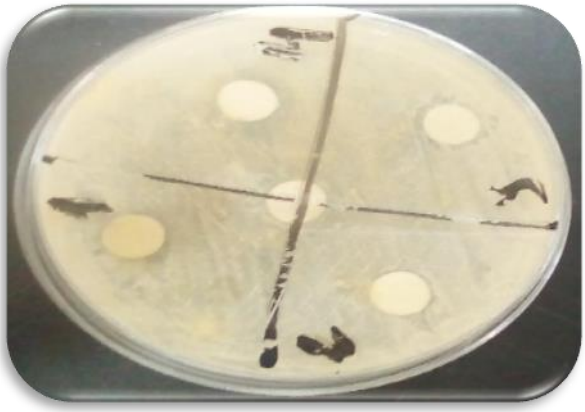
	نوع الفطر		قطر التثبيط (مم)
الخميرة	***L .c .a***		1
الفطر	***Fusarium sp***	***S1***	1
		S2	1
		S3	0.8
L .c .a :leuvre condid albican			

✓ العملية مكررة ثلاث مرات

Fusarium sp S1



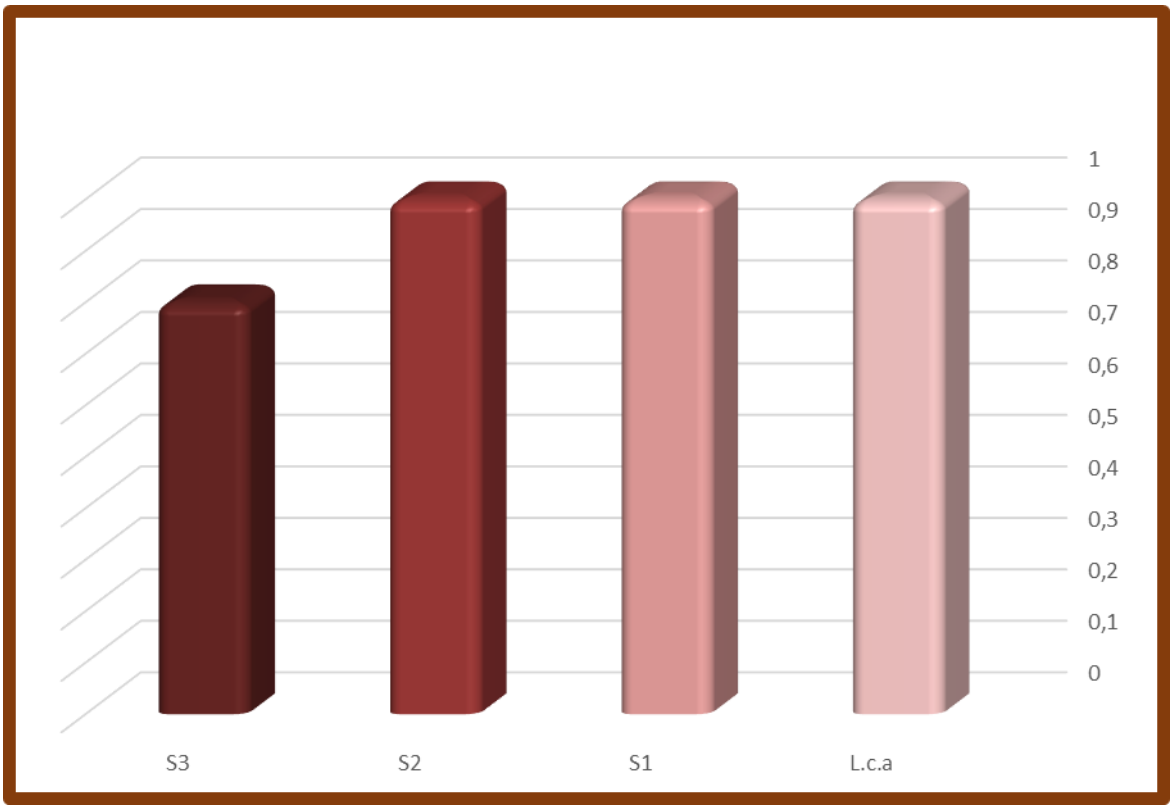
Fusarium sp S2



L .c .a

Fusarium spS3

الشكل 47 : نتائج تثبيط الفطر *Fusarium sp* والخميرة *L .c .a* على المستخلص (الأصلي)



الشكل 48: أعمدة بيانية توضح أقطار التثبيط للفطر والخميرة المستعملة

تعليق على النتائج

من خلال النتائج المدرجة في الجدول (32) والشكل (48) لاحظنا أن هذه الفطريات أبدت حساسية ضعيفة أتجاه المستخلص تراوحت أقطار التثبيط بين (1 - 0.8) مم

أظهرت العديد من الدراسات أن الفطريات المعزولة من النباتات المختلفة قد يكون لها نشاط مضاد للميكروبات ، تقاوم الغزو وتمنع مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تضر بالبشر والحيوانات والنباتات من خلال إنتاج الأيضات الثانوية.[23]

الميكروبات المدروسة ليست دائما نفسها [24]،بمعنى أن الميكروبات قد تكون لها فعاليات مختلفة تماما وفي الأخير النوع والجنس للنبتة يلعب دوراً فعالا ضد الفعالية الميكروبية،مما يؤكد العلاقة بين البنية الكيميائية لمركبات مستخلص النبات ونشاطها البيولوجي مما أكدته دراسات سابقة [25- 27]

المراجع

[1]DJEMAI S., 2009- etude de l'activité biologique des extrait du fruit de zizyplus lotus L. Mémoire de magister. Université -El hadj lakhater-Batna. 91p.

[2] M.B. Adinortey .,DEBBY C.,et al.,2012- of Medicineal Plant,10.3923/rjimp.

[3]PINCEMAIL J., DEBBY C., LION Y., BRAQUET P., HANS P., DRIEU K and GOUTIER R., 1986- Stud. Org. Chem 23, p: 423.

[4]GRYGLEWSKI R.J., KORBUT R and SWIES J.,1987- Biochemie. Pharmcol. 36-317.

[5]JEFFREY B H. and CHRISTINE A W., 1992- Advances in flavonoid research since1992 .Elsevies science LTD. Japon, Vol 55: 481-504 p.

[8]FULLER M.F., 2004-The encyclopedia of form animal nutrition .CABI publishing, London, UK, 581p.

[11]BABA AMER Z., 2013- Chemical constituents of flora of Algeria chemical constituentes of Pergularia tomentosa L. Memoire doctorat science in chemistry, University Kasdi Merbah, Ouargla, Agerie, 131 p.

[13]Omédine Koukoui1, Pascal Agbangnan2, Sylviane Boucherie3, Mahudro Yovo2, Oliver Nusse3, Laurent Combettes3, Dominique Sohounhloué2. American Journal of Plant Sciences, (2015)10.4236/ajps.2015.611177

[14] NAJJAA H., NEFFATI M., ZOUARI S., AMMAR E., 2000- Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of Allium roseum L., a North African endemic species. Comptes Rendus de Chimie. 10: 820-826.

[15] Khan et al.Chemistry Central Journal 2012, journal .chemistry central ./6/1/43.

[16] Spingo G ., Tramelli L., de faveri D. M. Effects of extaction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, Journal of Food Engineering, 81: 200-208,(2007).

[17] Tsimogiannis, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. Innovative Food Science and Emerging Technologies 7, 140-146.

[18]RICE-EVANS C.A, SAMPSON J., BRAMELEY P.M., HOLLOWAY D.E., 1997- Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vitro?. Free Radical Res. 26 (4): 381-398.

[19] MILIAUSKAS G.V., ENSKUTONIS P.R., VAN BEEK T.A., 2004- Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry. 85 (2): 231-237.

[20]ROJAS A., HERNANDEZ L., PEREDA-MIRANDA R., and MATA R., 1992- Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 35: 275-283

[21] DHAOUADI K., RABOUDI F., ESTEVAN C., BARRAJON E., VILANOVA E., HAMDAOUI M. and FATTOUCH S., 2010- Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. J. Agric. Food Chem. 59: 402-406.

[22] DZIRI S., HASSEN I., FATNASSI S., MRABET Y., CASABIANCA H., HANCHI B., HOSNI K., 2012- Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (Allium roseum var. odoratissimum). Journal of Functional Foods. 4: 423- 432.

[24] N.Chanegriha,A.Baaniouamer,B .Y.Meklati :Rivista Italiana EB-POS ,12 ,5-12 ,1994 .

[25] R.S.Farrg,Z .Y.Daw,F.M.Hewedi, El-Baroty : J . Food Protect,52(5) ,665-667,1989.

[26]LensLisbonne .A.Cremieux ,C.Maillard,G.Blansard :J.Pharm .Belg .,42(5) ,297-302 ,1987 .

[27] J.B .Hinou,G.E.Harval and E.B.Hinou :Pharmazie,44(4),302-3 ,1989.

المراجع العربية

[6] هيكل م. عمرع.، 1993- النباتات الطبية والعطرية (كيمياؤها -انتاجها-فوائدها) . الطبعة الثانية ،دار منشأة المعارف الإسكندرية،مصر،ص:13-16، 90-99، 239 -510 .

[10] المريقي أ.، 2005 – كيمياء نباتات البساتين .جامعة الإسكندرية ،مصر،ص:107-106.

[7] منصورح.،2006-النباتات الطبية العلمية وصفها مكوناتها طرق استعمالها وزراعته.جامعة الزقازيق،القاهرة ،مصر،ص:355-367،365-370.

[9] أبو زيد ش.،1986-النباتات والاعشاي الطبية .مكتبة مدبولي ،دار البحار،القاهرة،ص:122-137.

[12] علاوي م.،2003-مساهمة في دراسة بعض المركبات العضوية الفعالة في نبات الرمث Halaxyonscoparium . مذكرة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية التطبيقية،جامعة ورقلة،الجزائر،ص:6-11 .

الخاتمة العامة

الخاتمة العامة

من خلال هذه الدراسة التطبيقية في مايخص تثمين الموارد الطبيعية النباتية لمنطقة واد سوف للانواع النباتية الصحراوية ،وذالك بالكشف الأولي للمواد الفعالة ،التقدير الكمي لبعض نواتج الايض الاولي والثانوي ، تقييم الفعالية ضد الميكروبية و النشاطية المضادة للإجهاد التأكسدي يكتسي هذا الأخير أهمية بالغة نظرا لكثرة المواد المحفزة والنشطة لتكوين الجذور الحرة .

اهتمت هذه الدراسة بنبات *L .glomerata*،كمرحلة أولية لهذا العمل تمت عملية الإستخلاص بواسطة النقع فتحصلنا على المردود 3% وتم قياس درجة الحموضة pH=5.86 والحموضة الكلية (37.5 ملي مكافئ /ملغ)

ومن هذا المنطلق تعرفنا على محتوى المواد الفعالة في هذا النبات ومستخلصه قمنا بالكشف الأولي وأظهرت النتائج ان مستخلص النبات الميثانولي يحتوي على كل المواد الفعالة التالية :الفلافونيدات ،القلويدات ،التربينات،التانينات ، النشاء ،الصابون ،الأنثوسيانات و الكربوهيدرات.

كما تمت دراسة تقديرالكمي لنواتج الأيض الأولي والمتمثلة في السكريات ،الدهون والبروتينات وكانت نتائجها على التوالي (1.56%،0.83%،0.38%)، اما بالنسبة لتقدير نواتج الأيض الثانوي تم التقدير الكمي للفينولات71.9(25.69 ملغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من المستخلص الجاف) و الفلافونويدات (49.2471.9ملغ مكافئ لكريستين / غ من المستخلص الجاف) في المستخلص الكحولي بإستخدام طريقة كاشف Folin-Ciocalteu وطريقة كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ علي الترتيب .

التحليل النوعي بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداءHPLC كشفت وجود الكافين والكومارين في مستخلص العينة المدروسة .

وفيما يخص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص النباتي استعملت الطرق التالية : DPPH , CAT و ABTS.

في إختبار تثبيط الجذر الحر DPPH والجذر الكاتيوني ABTS تمكنا من حساب IC50المثبطة50% من الجذر الحر للمستخلص والتي كانت لها قدرة تثبيطية معتبرة قيمتها (288.55 ميكروغرام/ ملل) (170 ميكروغرام / ملل) على التوالي ، في حين سجلت القدرة الإرجاعية CAT للمستخلص الميثانولي (71.9 ملغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من المستخلص الجاف) .

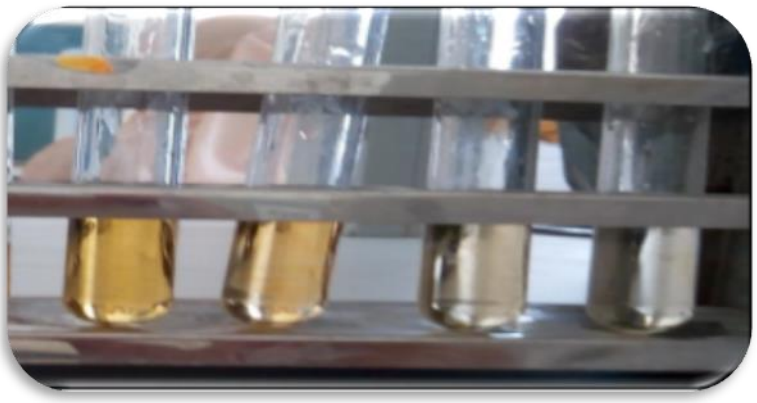
و بدراسة النشاطية ضد الميكروبية للمستخلص النباتي على اربعة سلالات البكتيرية المدروسة (. Listeria innocua, Klebsielle pneumonia, Staphyloccus aureus,Escherichia coli) بإستعمال طريقة الإنتشار بالأقراص ،حيث أظهرت النتائج المتحصل عليها على التوالي ،ان المستخلص الكحولي لنبات كرشة الأرنب لها فعالية معتبرة ومتقاربة على السلالات المدروسة أما بالنسبة للفطريات والخميرة أبدت فعالية ضعيفة .

الخاتمة

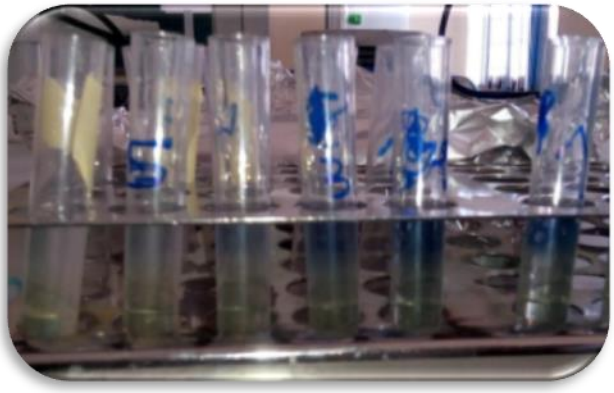
بعد إجراء هذه الدراسة يمكن التطلع مستقبلا لإجراء درسات معمقة على نوع النبات المختار والتي تتمثل في النقاط التالية :

- دراسة كل جزء من النبتة وإستخراج المواد الفعالة
- ربط الدراسة بين المواد الفعالة والقيمة الغذائية
- إستخدام جهاز HPLC له أكثر مراجع من المركبات

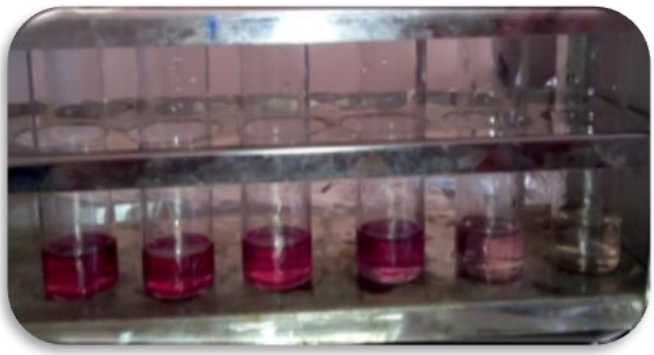
الملاحق



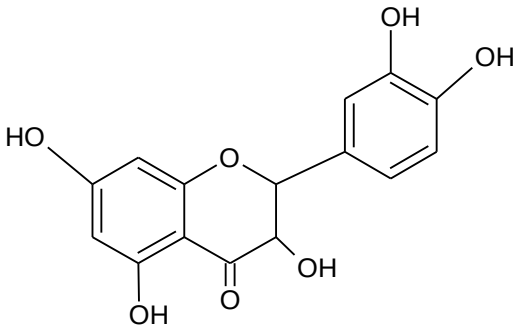
الشكل 49 : صورة توضح سلسلة المحلول القياسي للغلوكوز



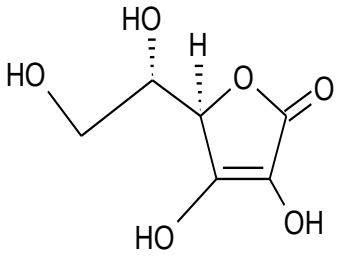
الشكل 50 : صورة توضح سلسلة المحلول القياسي للبروتين



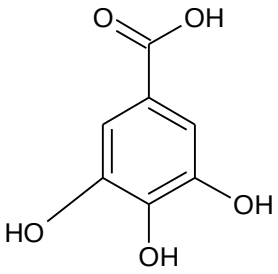
الشكل 51 : صورة توضح سلسلة المحلول القياسي للدهون



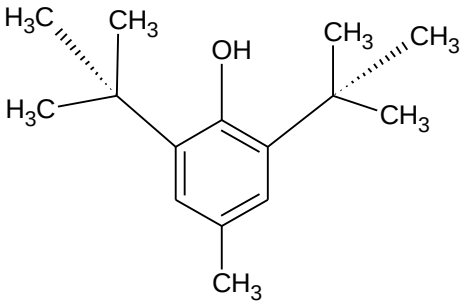
الشكل (52) بنية الكريستين



الشكل (53) بنية الأسكوربيك



الشكل (54) بنية حمض الغاليك



الشكل (55) بنية BHT

الشكل 56: جهاز الدوران البخاري

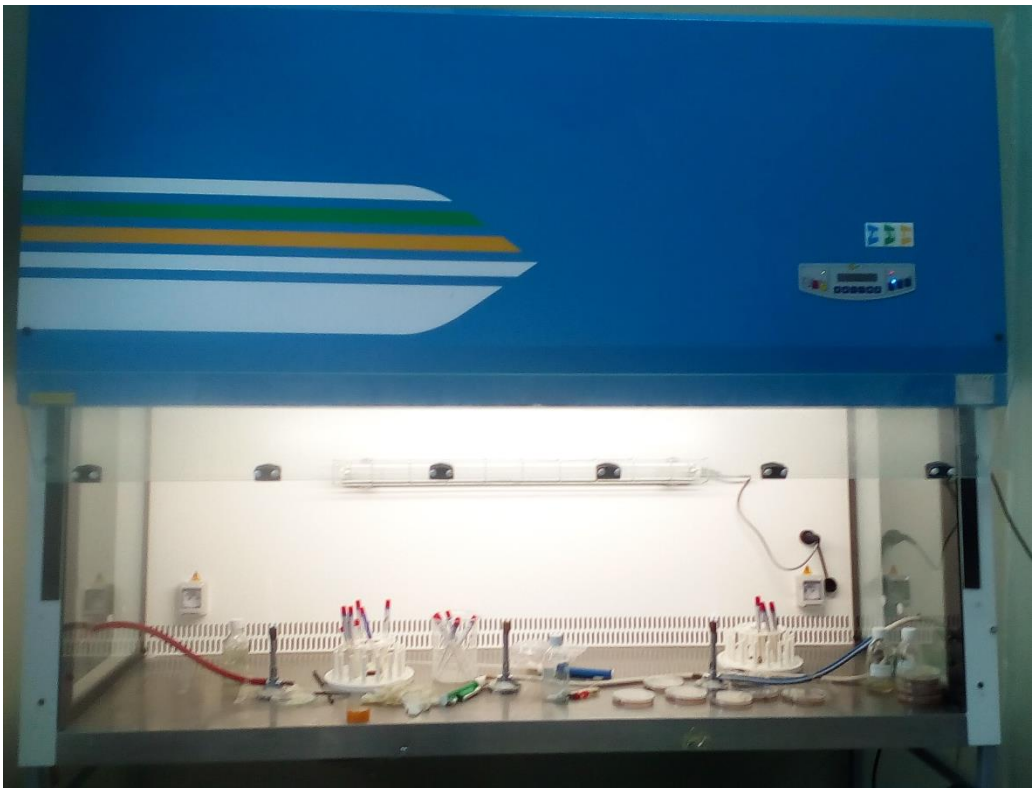
BUCHI Laortechnik AG	BUCHI Laortechnik AG
CH-9230Flawil1/Switzeriand	CH-9230Flawil1/Switzeriand
Type : B-491	Type : R-210
SN: 1000047946	SN : 1000048012
Voit: 220-240VAC	Voit : 100-240VAC
Frequency: 50/60Hz	Frequ: 50/60Hz
Power : 1700W	Power: 60W

الشكل 57 : معلومات عن جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur)

الشكل 58 : جهاز المعقم بالضغط

- Pbinternational			
- ANNO	2010	- SERIAL	N. 030004
- WATT	1300	- MOD	TIMO
- VOLT	220	- HZ	50/60

الشكل 59 : معلومات عن جهاز المعقم بالضغط



الشكل 60 : ساحبة الهواء

الشكل 61 : صورة توضح حاضنة وضع البكتيريا

- Mommert
- Beschickung – loadig
- Modell 100- 800

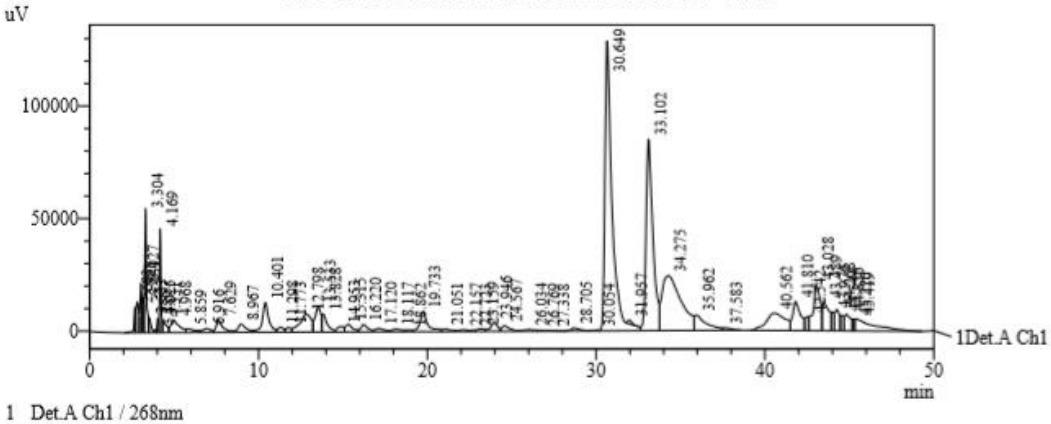
الشكل 62 : معلومات عن الحاضنة

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	: Iman-T
Sample ID	: Iman-T
Vail#	:
Injection Volume	: 20 uL
Data Filename	: Iman-T.21-05
Method Filename	: Noumia21 mc
Batch Filename	:
Report Filename	: dis0.lcr
Date Acquired	: 21-05-2019 1
Data Processed	: 21-05-2019 1

Chromatogram
Iman-T C:\LabSolutions\Data\2018\Iman-T.21-05-2019-47.lcd



1 Det.A Ch1 / 268nm

PeakTable

Detector A Ch1 268nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.683	71873	11142	0.460	1.767
2	2.821	148404	13744	0.949	2.180
3	3.027	156652	21861	1.002	3.467
4	3.131	91522	14974	0.585	2.375
5	3.304	367937	55256	2.353	8.762
6	3.533	57071	6627	0.365	1.051
7	3.889	7426	1369	0.047	0.217
8	4.025	37335	6217	0.239	0.986
9	4.169	238145	46204	1.523	7.327
10	4.331	86677	5443	0.554	0.863
11	4.968	192500	5635	1.231	0.894
12	5.859	56703	1602	0.363	0.254
13	6.916	59239	1718	0.379	0.272
14	7.629	146211	5397	0.935	0.856
15	8.967	121343	3610	0.776	0.572
16	10.401	346874	13116	2.218	2.080
17	11.298	51618	2131	0.330	0.338

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
18	11.773	42050	2027	0.269	0.321
19	12.798	370031	8016	2.366	1.271
20	13.533	268358	11429	1.716	1.812
21	13.828	166445	7876	1.064	1.249
22	14.953	65306	2402	0.418	0.381
23	15.315	98289	3302	0.629	0.524
24	16.220	93500	3234	0.598	0.513
25	17.120	53763	1499	0.344	0.238
26	18.117	47728	1240	0.305	0.197
27	18.862	20727	767	0.133	0.122
28	19.733	286754	8880	1.834	1.408
29	21.051	40530	1023	0.259	0.162
30	22.157	27071	749	0.173	0.119
31	22.723	10481	604	0.067	0.096
32	23.159	34944	1246	0.223	0.198
33	23.946	111267	3867	0.712	0.613
34	24.567	80658	2454	0.516	0.389
35	26.034	33140	752	0.212	0.119
36	26.769	14755	451	0.094	0.072
37	27.338	9550	295	0.061	0.047
38	28.705	50024	1318	0.320	0.209
39	30.054	10597	382	0.068	0.061
40	30.649	3775625	128758	24.144	20.418
41	31.957	28516	1614	0.182	0.256
42	33.102	2366028	85043	15.130	13.486
43	34.275	1906225	24350	12.190	3.861
44	35.962	324939	6847	2.078	1.086
45	37.583	37405	1032	0.239	0.164
46	40.562	593198	7668	3.793	1.216
47	41.810	413569	12883	2.645	2.043
48	42.542	88771	6201	0.568	0.983
49	43.028	583605	20937	3.732	3.320
50	43.489	337358	12842	2.157	2.036
51	43.976	88985	8399	0.569	1.332
52	44.268	177335	9453	1.134	1.499
53	44.544	89004	6889	0.569	1.092
54	44.820	179476	7343	1.148	1.164
55	45.220	46725	5219	0.299	0.828
56	45.419	427534	5282	2.734	0.838
Total		15637795	630621	100.000	100.000

Un chromatographe liquide haute performance HPLC (SHIMADZU type HPLC-RP-C18)

Four: CTO 20A

Pompe: LC 20AL, LC20A

الشكل 63 : معلومات عن جهاز HPLC المستخدم في التحليل النوعي لمركبات الفينولية

الملخص

الهدف من هذا العمل هو المساهمة في دراسة كمية الفينولات ،كمية الفلافونويدات وأيضا التقدير الكلي لسكريات ،البروتينات والدهون ودراسة الفاعلية المضادة للأكسدة وكذالك الفاعلية البيولوجية لنبتة كرشة الأرنب (Launaea glomerata) لمنطقة وادي سوف.

حيث تم تقدير الكمي للفينولات بإستعمال كاشف Folin-Ciocalteu و$AlCl_3$ لتقدير الكمي للفلافونويدات الكلية ،التحليل الكيفي بواسطة كروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC) بينت وجود حمض الكافييك وحمض الكوماريك

نتائج الفعالية المضادة للأكسدة بإستعمال إختبار ABTS, CAT, DPPH في مستخلص العينة المدروسة بينت أنها تملك فعالية معتبرة بالمقارنة مع نباتات أخرى من نفس الجنس .

أما بالنسبة للفاعلية البيولوجية بينت الدراسة أنّ لها فعالية ضد السلالات البكتيرية و أنواع الفطريات والخميرة المدروسة.

الكلمات المفتاحية : كرشة الأرنب (Launaea glomerata) ،الفينولات ،الفلافونويدات ، الفعالية المضادة لأكسدة ABTS, DPPH CAT، البكتيريا ،الفطريات،الخميرة

L’objectif de ce travail est de contribuer à l’étude de la quantité de phénols, de la quantité de flavonoïdes, de l’estimation totale des sucres, des protéines et des graisses, ainsi que de l’efficacité antioxydante ainsi que de l’efficacité biologique de *Launaea glomerata* pour Wadi Suf.

La quantification des phénols a été estimée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu et d'$AlCl_3$ pour quantifier les flavonoïdes totaux. Une analyse qualitative par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a montré la présence d'acide caféique et d'acide comarique.

Les résultats de l'efficacité antioxydante à l'aide du test DPPH, CAT, ABTS dans l'extrait d'échantillon étudié ont montré qu'ils présentaient une efficacité significative par rapport à d'autres plantes du même sexe.

En ce qui concerne l’efficacité biologique, l’étude a montré qu’elle avait un effet contre les souches bactériennes, les champignons et les espèces de levure étudiés.

Mots-clés: *Launaea glomerate*,phénols, flavonoïdes, activité antioxydante, DPPH, CAT, ABTS, bactéries, champignons, levure