الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الشهيد حمه لخضر– الوادي

كلية العلوم الدقيقة

قسم الكيمياء

رقم الترتيب :.....

رقم التسلسلي : .....

مذكرة تخرج لنيل شهادة الماستر أكاديمي في الكيمياء

تخصص: كيمياء عضوية

من إعداد الطالبتين:

–داودي اسراء

–أبزيز ندا

تحت عنوان:

تحليل مقارن لكمية القلويدات والفعالية البيولوجية لمستخلصات نبات العلندة

نوقشت يوم : 11 / 06 / 2024 أمام اللجنة المكونة من :

زبيدي عمار	أستاذ تعليم عالي	جامعة الشهيد حمه لخضر–بالوادي	رئيسا
ربيعي عبد الكريم	أستاذ تعليم عالي	جامعة الشهيد حمه لخضر–بالوادي	مقررا
مصباحي مُحَّد عادل	أستاذ مساعد (أ)	جامعة الشهيد حمه لخضر–بالوادي	مناقشا

السنة الجامعية :2023 / 2024

بسم الله الرحمن الرحيم

إهداء

بعدد نزخات المطر، واوراق الشجر، ارفع راحتي لمن جل علاه ،ومن علي برضاه ،ويسر لي ما سموت اليه و اتمناه .

الحمد لله حمدا كثيرا طيبا مباركا فيه اما بعد :

الحمد لله الذي وفقني لهذا، ولم اكن لاصل اليه لولا فضل الله علي .

احق الناس باهدائي اثنان :ابي الغالي سندي وقت ضعفي ، ومؤنستي في مسيرتي ووقت حيرتي امي جنتي . .

ا لى من يزهو بهم جمع بيتنا : اخوتي والى برعم البيت زياد، اعمامي ،عماتي ،خالي ،خالاتي .

الى من ساندوا خطاي المتعثرة بنات خالتي "**عبير**"،"**هناء** "،"**ميسون**" .

لى صديقات الدرب الرائعات من قريب او بعيد ، والى اعزهم "الدكتورة ايمان"،"الأستاذة حنان"،"نور "،"أسماء"، "سارة "أتمنى لكم دوام الصحة والنجاح.

الى اغلى أستاذة على قلبي أستاذة الفرقان "فتيحة ذ "والى صديقات الجمعية .

والى توامتي في عملي وشريكتي في اجتهادي "**ندى**" .

والى كل من عرفتهم وعرفوني وتركوا ذكرى جميلة في مسيرتي العلمية والتعلمية .

إسراء

إهداء

الحمد لله الذي وفقني وأنار دربي بنور العلم وأعانني على إنجاز هذا العمل .

أهدي ثمرة جهدي ونجاحي هذا :

إلى من نطق بكلمة التوحيد لسانه وصدقها قلبه، إلى معلنا الأعظم وقدوتنا الأكبر المصلح الجليل المبعوث رحمة للعالمين سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم .

إلى من إسمه لايفارق إسمي . . . . .

والدي العزيز

إلى من أرضعتني من لبنها الإستقامة والتقوى . . . . . .

والدتي الحنونة

إلى من أشد بهم أزري . . . . . .

إخوتي وأخواتي

إلى كل عائلتي ، إلى الذين فارقو الحياة ولم تفارقنا ذكراهم **"جدتاي"** رحمة الله عليهما .

إلى رفيقات دربي وزميلتي في هذا المشوار **"إسراء"**، إلى كل صديقاتي .

إلى الذين نسيهم قلمي ولم ينساهم قلبي

ندى

شكر وعرفان

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيدنا محمد وآله وصحبه أجمعين .

الحمد لله الذي أنار دربنا وثبت خطانا وأمدنا بالصبر لإتمام هذا العمل، فبحمد الله نبدأ وبشكره نستعين في تقديم إمتناننا الكبير والشكر الجزيل إلى الأستاذ الفاضل **مربيعي عبد الكريم** الذي أشرف على هذا العمل ، ولم يبخل علينا بإرشاداته وتوجيهاته .

كما نتوجه بجزيل الشكر إلى من أرادت تميزنا ونجاحنا الأستاذة **الأحمادي بشيرة** على ما أسدته لنا من نصائح وإرشادات فجزاها الله خيرا وسدد خطاها .

ومن العرفان أن نتقدم بالشكر والتقدير إلى مسؤولي المخبر البيداغوجي بكلية العلوم الدقيقة إلى كل من **كريمة، حفيظة، كنزة.**

كما نتوجه بالشكر الخالص إلى جميع طلبة الدكتوراه على مستوى مخبر الكيمياء التطبيقية بالجامعة وبالأخص الأستاذة **نريدان حليمة** .

كما نتوجه بالشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة الأستاذين الفاضلين الأستاذ زبيدي عمار والأستاذ صباحي محمد عادل لقبولهم مناقشة هذة المذكرة .

شكـــــرا لكل من ساعدنا ولو بكلمة طيبة .

شكـــــرا لكل طلبة دفعة ماستر 2024 .

الملخص:

تضمنت هذه الدراسة إستخلاص المركبات الفينولية والفلافونويدات المتحصل عليها عن طريق عملية النقع في الماء والإيثانول بنسبة (60/40) لنبات العلندة الهشة النامية بضواحي منطقة الوادي، بالإضافة إلى استخلاص القلويدات من النبات الذي تم باستخدام تركيب السوكسليت.

تم تقدير مردود المستخلصات المتحصل عليها (المائي، 1-بيتانول، خلات الإيثيل، الهكسان،القلويدات) بنسبة: 0.94%، 11.8%، 0.807% ، 0.169%، 4.44% على التوالي.

تم تقدير المحتوى الفينولي والفلافونويدي للمستخلصات بإستخدام كاشف الفولين وكاشف كلوريد الألومنيوم الثلاثي، أظهرت النتائج أن مستخلص خلات الإيثيل يحتوي على أكبر كمية من الفينولات والفلافونويدات قدرت ب $323.965\ mg_{GAE}/g_{ext}$ و $43.998 mg_{EQ}/g_{ext}$. كما أكدت نتائج التقدير الكمي للقلويدات أن النبتة غني بالقلويدات.

أما بالنسبة للفعالية المضادة للأكسدة تمت بإتباع اختبار DPPH وبالطرق الكهروكيميائية فكانت النتائج متوافقة مع بعضها في كلا الطريقتين حيث أظهر مستخلص خلات الإيثيل أفضل فعالية.

تمت دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا بطريقة الإنتشار في الأجار ضد ثلاث أنواع من البكتيريا موجبة وسالبة الغرام، حيث أبدت جميع المستخلصات فاعلية تثبيطية لنمو بعض الأنواع البكتيرية بإستثناء مستخلص 1-بيتانول.

الكلمات المفتاحية: نبات العلندة الهشة، المركبات الفينولية، الفلافونويدات ، القلويدات ،الفعالية المضادة للأكسدة، الفعالية المضادة للبكتيريا.

Abstract:

This study aimed to extract phenolic and flavonoid compounds from Ephedra fragilis growing in the region of EL OUED .using water and ethanol (60/40) solvents and to evaluate their antioxidant and antibacterial activities. Additionally, alkaloids were extracted from the plant using a Soxhlet apparatus.

The yields of the water, 1-butanol, ethyl acetate, hexane, and alkaloid extracts were 0.94%, 11.8%, 0.807%, 0.169%, and 4.44%, respectively. The total phenolic and flavonoid contents were determined using the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride reagents, respectively. The results showed that the ethyl acetate extract contained the highest amount of phenolics and flavonoids, with values of 323.965 mg_{GAE}/g_{ext} and 43.998mg_{EQ}/g_{ext} respectively. Quantitative determination of alkaloids confirmed that the plant is rich in alkaloids.

Antioxidant activity was evaluated using the DPPH assay and electrochemical methods. The results were consistent with each other in both methods, with the ethyl acetate extract showing the highest activity. Antibacterial activity was studied using the agar diffusion method against three Gram-positive and Gram-negative bacteria. All extracts showed inhibitory activity against some bacterial strains, except for the 1-butanol extract.

Keywords: *Ephedra fragilis*, phenolic compounds, flavonoids, alkaloids, antioxidant activity, antibacterial activity.

	المحتويات	الصفحة
	الإهـــــــداء	i
	شــكر وعرفــان	iii
	الملخـــــص	iv
	الفهـــــرس	vi
	قائمة الجــداول	xi
	قائمة الأشكــال	xiii
	قائمة الإختصارات والرموز	xv
	المقـــــدمة العامة	01
	الجزء النظري	
	الفصل الأول: عموميات حول نبات العلندة	
I	تمهيـد	7
1.I	العائلة العلندية (الإفيدراسية)	7
1.1.I	التعريف بالعائلة	7
2.1.I	التوزيع الجغرافي لنبات العلندة	7
3.1.I	بعض أنواع نبات العلندة	8
4.1.I	التركيبة الكيميائية لنبات العلندة	9
5.1.I	الفوائد الطبية لنبات العلندة	9
6.1.I	تعريف الإيفدرين	10
7.1.I	الآثار الجانبية للإيفدرين	10
2.I	نبات العلندة الهشة	10
1.2.I	الوصف المورفولوجي	10
2.2.I	تسميات نبات العلندة الهشة	11
3.2.I	التصنيف العلمي لنبات العلندة الهشة	11

4.2.I	التوزيع الجغرافي لنبات العلندة الهشة	11
قائمة المراجع		13
الفصل الثاني: عموميات حول نواتج الأيض الثانوي		
II	تمهيد	17
1.II	المركبات الفينولية	17
1.1.II	تعريفها	17
2.1.II	تصنيفها	18
1.2.1.II	مركبات فينولية قليلة الإنتشار	18
2.2.1.II	مركبات فينولية واسعة الإنتشار	19
3.2.1.II	مركبات فينولية متواجدة على شكل بوليميرات	22
3.1.II	الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمركبات الفينولية	23
1.3.1.II	الخصائص الفيزيائية	23
2.3.1.II	الخصائص الكيميائية	23
4.1.II	أهمية المركبات الفينولية	23
2.II	الفلافونويدات	25
1.2.II	تعريفها	25
2.2.II	تصنيف الفلافونويدات	25
3.2.II	الخصائص الفيزيائية والكيميائية للفلافونويدات	27
4.2.II	أهمية الفلافونويدات	27
3.II	القلويدات	28
1.3.II	تعريفها	28
2.3.II	تصنيف القلويدات	28
3.3.II	الخصائص الفيزيائية والكيميائية للقلويدات	29
1.3.3.II	الخواص الفيزيائية	29
2.3.3.II	الخواص الكيميائية	30
4.3.II	الأهمية العلاجية للقلويدات	31

قائمة المراجع		32
الفصل الثالث: الفعالية البيولوجية		
1.III	الجذور الحرة	37
1.1.III	تعريف الجذور الحرة	37
2.1.III	أقسام الجذور الحرة	37
1.2.1.III	التقسيم على أساس الاستقرار	37
2.2.1.III	التقسيم على أساس النوع	37
3.1.III	دور الجذور الحرة	37
4.1.III	آلية تشكل الجذور الحرة	37
2.III	مضادات الأكسدة	38
1.2.III	تعريف مضادات الأكسدة	38
2.2.III	تصنيف مضادات الأكسدة	38
1.2.2.III	مضادات أكسدة طبيعية	38
2.2.2.III	مضادات أكسدة مصنعة	39
3.2.III	آلية عمل مضادات الأكسدة	39
4.2.III	شروط إضافة مضادات الأكسدة	40
3.III	الفعالية المضادة للبكتيريا	40
1.3.III	تعريف البكتيريا	40
2.3.III	الخصائص العامة للبكتيريا	40
3.3.III	تشريح البكتيريا	41
1.3.3.III	التراكيب التي تقع خارج الجدار الخلوي	41
2.3.3.III	التراكيب الموجودة داخل الجدار الخلوي	42
4.3.III	تسمية البكتيريا	43
5.3.III	تصنيف البكتيريا	44
6.3.III	البكتيريا المدروسة	45
1.6.3.III	بكتيريا *Escherichia coli*	45

2.6.3.III	بكتيريا *Pseudomonas aerogenosa*	46
3.6.3.III	بكتيريا *Bacillus subtilis*	47
قائمة المراجع		48
الجزء العملي		
الفصل الرابع: الطرق والوسائل		
1.IV	تحضير المادة النباتية المدروسة	54
2.IV	الأدوات والأجهزة والمواد المستعملة	54
3.IV	الإستخلاص	56
1.3.IV	تعريف الإستخلاص	56
2.3.IV	إستخلاص صلب_سائل	56
3.3.IV	إستخلاص سائل_سائل	56
4.3.IV	طريقة إستخلاص المركبات الفعالة المتبعة خلال التجربة	56
5.3.IV	مردود الإستخلاص	63
4.IV	التقدير الكمي للمركبات الفينولية والفلافونيدية والقلويدية للمستخلصات بواسطة مطيافية الاشعة فوق البنفسجية_ المرئية UV- Visible	63
1.4.IV	مطيافية الأشعة فوق البنفسجية_ المرئية UV- Visible	63
2.4.IV	التقدير الكمي للمركبات الفينولية	63
3.4.IV	التقدير الكمي للفلافونويدات	64
4.4.IV	التقدير الكمي للقلويدات	65
5.IV	تقدير الفعالية المضادة للأكسدة	66
1.5.IV	إختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$	66
2.5.IV	الطرق الكهروكيميائية (تقنية الفولطامتري الحلقي) لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة	68
3.5.IV	الإختبار الكهروكيميائي للقدرة المضادة للأكسدة	69
6.IV	النشاط المضاد للبكتيريا	70

1.6.IV	أنواع البكتيريا المختبرة	70
2.6.IV	خطوات العمل	71
قائمة المراجع		72
الفصل الخامس: النتائج والمناقشة		
1.V	حساب مردود المستخلصات	75
2.V	التقدير الكمي للفينولات والفلافنويدات والقلويدات	76
1.2.V	التقدير الكمي للفينولات	76
2.2.V	التقدير الكمي للفلافونويدات	79
3.2.V	التقدير الكمي للقلويدات	81
3.V	تقدير الفعالية المضادة للاكسدة بالطريقة الكيميائية	83
1.3.V	القدرة التثبيطية للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$	83
4.V	التقدير الاجمالي للقدرة المضادة للاكسدة بالطريقة الكهروكيميائية	86
5.V	دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا	90
قائمة المراجع		93
الخلاصة العامة		94
الملحق		I

الجزء النظري		
الفصل الأول: عموميات حول نبات العلندة		
الجدول 1.I	بعض أنواع نبات العلندة	8
الجدول 2.I	التصنيف العلمي لنبات العلندة	11
الفصل الثاني:عموميات حول نواتج الأيض الثانوي		
الجدول 1.II	المركبات الفينولية قليلة الإنتشار	18
الجدول 2.II	بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب والصيدلة	24
الجدول 3.II	مختلف أقسام الفلافونويدات	26
الفصل الثالث: الفعالية البيولوجية		
الجدول 1.III	تصنيف بكتيريا *E.coli*	45
الجدول 2.III	تصنيف بكتيريا *P.aeuginosa*	46
الجدول 3.III	تصنيف بكتيريا *B.subtilis*	47
الجزء العملي		
الفصل الرابع: الطرق والوسائل		
الجدول 1.IV	المواد والأدوات المستعملة	55
الجدول 2.IV	أنواع البكتيريا المستعملة	71
الفصل الخامس: النتائج والمناقشة		
الجدول 1.V	كمية المردود لمستخلصات نبات العلندة	75
الجدول 2.V	قيم الإمتصاصية وكمية وتركيز الفينولات للمستخلصات	77
الجدول 3.V	قيم الإمتصاصية وكمية وتركيز الفلافونويدات للمستخلصات	80
الجدول 4.V	قيم الإمتصاصية وكمية وتركيز القلويدات للمستخلصات	82
الجدول 5.V	مقدار IC_{50} للمسخلصات	84
الجدول 6.V	نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص 1-بيتانول	90
الجدول 7.V	نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإيثيل	90

الجدول V.8	نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص القلويدات	91
الجدول V.9	نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص المائي	92

الجزء النظري		
الفصل الأول: عموميات حول نبات العلندة		
الشكل I.1	الإنتشار الجغرافي لنبات العلندة	8
الشكل I.2	نبات العلندة الهشة	11
الفصل الثاني:عموميات حول نواتج الأيض الثانوي		
الشكل II.1	أمثلة لبعض أحماض هيدروكسي بنزويك	19
الشكل II.2	أمثلة بعض أحماض هيدروكسي سيناميك	20
الشكل II.3	الهيكل الأساسي للفلافونويدات	20
الشكل II.4	آلية تشكل الكومارينات	21
الشكل II.5	نماذج لبعض الكومارينات	21
الشكل II.6	وحدة التانينات المتحللة	22
الشكل II.7	وحدة التانينات المكثفة	22
الشكل II.8	الهيكل القاعدي للفلافونويدات	25
الفصل الثالث: الفعالية البيولوجية		
الشكل III.1	بنيات بعض مضادات الأكسدة الصناعية	39
الشكل III.2	صورة توضح غشاء الخلية	41
الشكل III.3	صورة توضح خلية بدائية النواة	42
الشكل III.4	مخطط يوضح تصنيف البكتيريا	44
الشكل III.5	صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *E.coli*	45
الشكل III.6	صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *P.aeuginosa*	46
الشكل III.7	صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *B.subtilis*	47
الجزء العملي		
الفصل الرابع: الطرق والوسائل		
الشكل IV.1	النبات قبل الطحن	54
الشكل IV.2	النبات بعد الطحن	54

الشكل 3.IV	مخطط يوضح طريقة الاستخلاص بواسطة الماء والايثانول	59
الشكل 4.IV	مخطط يوضح طريقة استخلاص القلويدات بجهاز Soxhlet	62
الشكل 5.IV	معادلة تثبيط جدر $DPPH^{\bullet}$ في وجود مضادات الجذور الحرة	67
الشكل 6.IV	التركيب التجريبي لجهاز (***Voltalab* 80**) وملحقاته	68
الفصل الخامس: النتائج والمناقشة		
الشكل 1.V	أعمدة بيانية تمثل قيم مردود المستخلصات المستعملة للدراسة	75
الشكل 2.V	المنحنى العياري لحمض الغاليك لتقدير الفينولات للمستخلصات	76
الشكل 3.V	أعمدة بيانية تمثل التقدير الكمي للفينولات الموجودة في المستخلصات	78
الشكل 4.V	المنحنى العياري لحمض الكيرستين لتقدير الفلافونويدات للمستخلصات	79
الشكل 5.V	أعمدة بيانية تمثل التقدير الكمي للفلافونويدات في المستخلصات	80
الشكل 6.V	المنحنى العياري للاتروبين لتقدير القلويدات للمستخلصات	81
الشكل 7.V	أعمدة بيانية تمثل التقدير الكمي للقلويدات الموجودة في المستخلصات	82
الشكل 8.V	منحنى تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ بدلالة تراكيز مستخلص خلات الايثيل	83
الشكل 9.V	منحنى تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ بدلالة تركيز مستخلص1-بيتانول	84
الشكل10.V	أعمدة بيانية تمثل قيم IC_{50} للمستخلصات	85
الشكل11.V	المنحنى الفولطامتري الحلقي لحمض الاسكوربيك	86
الشكل12.V	المنحنى الفولطامتري الحلقي للمستخلص المائي	86
الشكل13.V	المنحنى الفولطامتري الحلقي لمستخلص 1_بيتانول	87
الشكل14.V	المنحنى الفولطامتري الحلقي لمستخلص خلات الإيثيل	88
الشكل15.V	المنحنى الفولطامتري الحلقي لمستخلص القلويدات	89

الرمز	الاختصار
%	النسبة المؤوية
°C	درجة مؤوية
A	الامتصاصية
EGA	حمض الغاليك المكافئ
EQ	حمض الكرستين المكافئ
EA	حمض الاتروبين المكافئ
A_0	الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات
A_i	الامتصاصية الضوئية للخليط
I%	نسبة تثبيط العامل المضاد للاكسدة للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$
IC_{50}	تثبيط نسبة 50% من تركيز الجذور الحرة
BHT	بيوتيل هيدروكسي تولين
BHA	بيوتيلات هيدروكسي الانيزول
ADN	حمض نووي ريبوزي منقوص الاكسجين
mg	ميلي غرام
ml	ميلي لتر
M	مولاري
T	درجة الحرارة
µg	ميكرو غرام
DMSO	ثنائي ميثيل السلفوكسيد
UV-Vis	الاشعة فوق البنفسجية_ المرئية
R	المردود
DPPH	2.2-ثنائي فينيل-1- بكريلهيدرازيل
G^+	غرام ايجابي
G^-	غرام سلبي
λ	طول الموجة
I	كثافة التيار
V	الكمون

المقدمة العامة

مقدمة عامة:

عرف الانسان منذ فجر التاريخ الأعشاب وفوائدها العلاجية المختلفة، فمن خلال المشاهدة والتجربة والبحث عبر الاف السنين ازدادت المعارف عن النباتات الطبية وخصائصها العلاجية فقد برع الصينيون والمصريون القدماء في علم التداوي بالاعشاب، حيث استخدموا العديد من هذه الأعشاب في علاج الكثير من الامراض بالإضافة الى استخدامها في التحنيط وكذلك الزينة والتجميل[1][2]. كما جعلها الله غذاء لا يستغنى عنه للإنسان في الحياة. ووهب الله للحيوان الذي لا يعقل غريزة الاهتداء الى نوع الذي يلائمه ويحفظ وجوده وترك للإنسان العاقل ان يهتدي لما يناسبه من النباتات بالبحث والتجربة بفضل العقل الذي خصه به من بين سائر الكائنات[3].

النباتات الطبية هي النباتات التي تحتوي في عضو او اكثر من أعضائه المختلفة على مادة كيميائية واحدة او اكثر بتركيز منخفض او مرتفع، ولها القدرة الفيزيولوجية على معالجة مرض معين او على الأقل تقلل من اعراض الإصابة بالمرض، وبالتالي إمكانية استخدامها في علاج بعض الامراض الناتجة عن الإصابات الميكروبية المختلفة، وكذلك القضاء على الجذور الحرة المختلفة الناتجة عن تفاعلات الاكسدة الارجاعية التي تحدث داخل الجسم، وهذا لاحتوائها على مضادات اكسدة طبيعية[4].

تتميز الجزائر عن باقي بلدان العالم بالثروة النباتية الطبية الهائلة، والتي تنتشر في مساحات مختلفة مايمنحها تنوعا نباتيا كبيرا يرجع ذلك الى موقعها الاستراتيجي وتعدد مناخاتها، وهذا ما دفع بالباحثين لدراستها وتحليلها كيميائيا[5].

ولتثمين هذه الثروة النباتية الهائلة ارتاينا ان نجري هذا البحث على نبات العلندة الهشة من عائلة (Ephedraceae) من ولاية الوادي نظرا لعدم وجود دراسات سابقة متعلقة بتقييم نشاطها البيولوجي وبناء على هذه المعطيات حددنا هدف هذه الدراسة والمتمثلة في استخلاص المركبات الفينولية والقلويدية للجزء الهوائي، وتقدير فعاليته المضادة للاكسدة، واختبار قدرتها على مكافحة بعض الأنواع البكتيرية.

تم تقسيم خطة العمل الى جزئين:

الجزء النظري: ويضم هذا الجزء ثلاث فصول هما

– الفصل الأول: تمحور هذا الفصل على عموميات حول نبات العلندة.

– الفصل الثاني: بعد القيام بدراسة لنبات العلندة تم تحديد المركبات الفعالة المتواجدة به، وعلى ضوء المعلومات تمحور هذا الفصل على عموميات حول مركبات الايض الثانوي.

– الفصل الثالث: الفعالية البيولوجية.

الجزء العملي: ويضم فصلين

– الفصل الرابع: تضمن الطرق والوسائل المستخدمة خلال التجربة.

– الفصل الخامس: الذي تم فيه تدوين النتائج النتحصل عليها ومناقشتها.

وفي الأخير نختتم هذا العمل بخاتمة تبرز اهم النتائج المتحصل عليها.

❖ المراجع باللغة العربية:

[3] أحمد شمس الدين، التداوي بالاعشاب والنباتات قديما وحديثا، الطبعة الاولى، دار الكتب العلمية، بيروت، لبنان، (2000)، ص1.

[4] حوقة سارة ، مزغني آمال، المساهمة في الدراسة الفيتوكيميائية والفعالية البيولوجية لنبات الرتم النامي في منطقة واد سوف، مذكرة ماستر، الوادي : جامعة الوادي.2016.

[5] قاسمي منال، غمام نواس صفاء، تقدير المحتوي الفينولي والفعالية المضادة للاكسدة للمستخلص الخام لنبات الذنون Cistanche violacea(Desf) Beck ، مذكرة ماستر، جامعة الشهيد حمه لخضر _الوادي2019.

❖ المراجع باللغة الأجنبية:

[1] MAAROUF. A. M, Rédécouverte des plantes médicinales, Expérience du Qatar, (2002).
[2] IBRAHIME. S. S, ABDALLAH. E, ABDELKAREEM. M. S, médicinales aromatique et toxiques du monde arabe, Ed OADA, Egypte, (1988).

الجزء النظري

الفصل الأول:

عموميات حول نبات العلندة

I.تمهيد:

بلادنا الجزائر غنية جدا في اعشابها الطبيعية المتنوعة لما لها من مساحات واسعة ومناحات عديدة: بحرية، قارية، صحراوية، ولما تتمتع به من دفئ وسطوع شمسي، وطقس جميل، وتربة متنوعة وخصبة للغاية في معظمها.

ولا شك ان لهذه المناخات والتربة من اثر بالغ ليس فقط على شدة التنوع النباتي ولكن ايضا على تركيب النباتات واعطائها المميزات الخاصة، وقد دلت التجارب ان نباتات المنطق المعتدلة اكثر فعالية واغنى في العناصر المفيدة من نباتات المناطق الباردة.

كما اثبتت الدراسات العديدة ان بالجزائر حوالي 3500 نوع من النباتات منها ما تعود الى المناخات الحارة ومنها ما تعود الى المناخات المعتدلة.

ان من بين هذا العدد حوالي 1900 نوع يمكن العثور عليها في اسبانيا وما يقارب 1500 نوع في ايطاليا والبعض لا نعثر عليها الا في البلدان الصحراوية واخرى اصلية لا نجدها الا في بلدان شمال افريقيا، بل هناك اشكال نباتية لا تظهر الا في اماكن محددة بالجزائر[1].

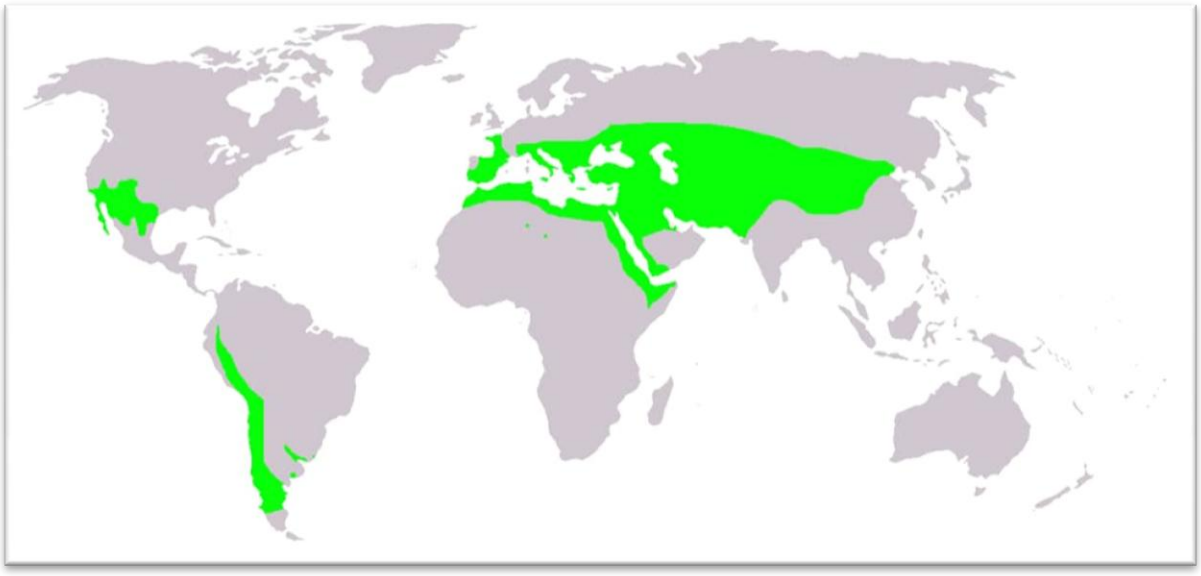
1.I. العائلة العلندية (الايفدراسية) :

1.1.I. التعريف بالعائلة :

يحتوي هذا النوع النباتي على اكثر من 60 صنفا [2]، وهو نبات له افرع رفيعة ومفصصة، و العلندة من معراة البذور، ولا تنتج ازهار، ولكن تنتج اسدية ومبايض في مخاريط صغيرة، والبذور داخل مبيض شفاف[3].

2.1.I. التوزيع الجغرافي لنبات العلندة:

هناك اكثر من 60 نوعا من الايفيدرا تنتشر في جميع انحاء العالم، في اوروبا، اسيا المعتدلة، امريكا الجنوبية وافغانستان الى بوتان (2400–5000 متر) تتكيف مع البيئة شبه القاحلة والصحراوية، يتم توزيعها على نطاق واسع في كل من نصف الكرة الشرقي والغربي.



الشكل I.1: الانتشار الجغرافي لنبات العلندة

العدد الاجمالي للانواع هو نفسه تقريبا بين العالم الجديد والعالم القديم في المناطق شبه الاستوائية المعتدلة. في العالم القديم كان منتشرا على نطاق واسع في وسط وغرب اسيا ومنطقة البحر الابيض المتوسط. في العالم الجديد يوجد في نيو مكسيكو و اريزونا وكاليفورنيا وامريكا الشمالية. وهي اكثر وفرة في منطقة الانديز في امريكا الجنوبية وتمتد حتى جزيرة المحيط الاطلسي[4].

I.1.3. بعض انواع نبات العلندة :

يوجد اكثر من 60 نوع من انواع *Ephedra* من بينها [2]:

الجدول I.1: بعض انواع نبات العلندة

الاسم العلمي	الصنف النباتي
Ephedra faemineas	العلندة الانثوية
Ephedra altissama	العلندة العالية

العلندة الكبيرة	***Ephedra magor***
العلندة المجنحة	***Ephedra alata***
العلندة الهشة	***Ephedra fragilis***
العلندة الورقية	***Ephedra foliata***
العلندة عديمة الاوراق	***Ephedra aphylla***
العلندة الانتقالية	***Ephedra transitoria***

I.1.4. التركيبة الكيميائية لنبات العلندة :

– تحتوي العلندة على قلويدات الافيدرين وقد تم عزل قلويدات اخرى ومركبات امنية والفلافانول والعفص والاحماض الكربوكسيلية والتربينات[5].

– كما تحتوي على مركبات فينولية وفلافونويدية، كما ان مستخلصات هذه النبتة لها تاثيرات عالية: مضادة للاكسدة، ومضادة للاتهابات، وكما تستخدم في مستحضرات صيدلانية ومستحضرات التجميل[6][7][8].

I.1.5. الفوائد الطبية لنبات العلندة :

– تستخدم العلندة في الطب الشعبي كمنشط ومزيل للاورام لعلاج الكلى، وعلاج القصبات الهوائية والجهاز الدائري، واضطرابات الجهاز الهضمي وتخفيف نوبات الربو كما يتم مضغ سيقان النبات لعلاج الالتهابات البكتيرية والفطرية[9] [10].

– علاج امراض المناعة الذاتية وتوسيع حدقة العين بالتطبيق الموضعي وذلك بالتاثير على العضلة الشعاعية ويستعمل في ازالة الاحتقان في الغشاء المخاطي للانف[11].

– تستخدم لعلاج السعال وكذلك له تاثير مزيل للاحتقان[12].

– استعملت في حالة اضطرابات الدورة الدموية.

– زادت استخدام العشبة بين مرضى السرطان وذلك بعد انتشار قصة احد الرعاة الفلسطينيين الذي شفي بعد استخدامه للعشبة ومن ثم ازداد بيع العشبة بين المزارعين[13].

– مضادة للاعصاب وللالتهابات ومضادة للميكروبات[14].

– يتم بيع الايفيدرا كمكمل غذائي تحت ذريعة فقدان الوزن، وبناء الجسم، وزيادة اليقظة وتعزيز مستويات الطاقة[15].

I.6.1. تعريف الايفدرين:

العنصر النشط في العلندة هو الايفيدرين، حيث يتشابه الايفيدرين والقلويدات المرتبطة به (pseudoephedrine, norephedrine, N-methyl ephedrine) من الناحية الهيكلية (amphetamines) وتعمل عن طريق تحفيز المستقبلات الادرينالية [16].

I.7.1. الاثار الجانبية للافيدرين :

– سرعة خفقان القلب والقيئ والغثيان والخز وزيادة ضغط الدم وتنميل الاطراف[17].

– الايفدرين والكافيين معا اكثر فعالية ويؤديان الى مخاطر صحية اكثر خطورة بما في ذلك السكتة الدماغية الثانوية للنزيف داخل الجمجمة والنوبات والذهان[18].

I.2. نباتات العلندة الهشة :

I.1.2. الوصف المورفلوجي :

العلندة الهشة هي شجيرة دائمة الخضرة ثنائية المسكن، يصل ارتفاعها الى 4 امتار[19]، محبة للشمس وليست شديدة التحمل للصقيع، المصنع لا ينتج المخاريط كل عام، ويظهر سنوات من انتاج المخاريط. يقوم كل من الذكور والاناث بتطوير مخاريط تفرز قطرة التلقيح وهو محلول غني بالسكر يتم انتاجه لاتقاط حبوب اللقاح من الهواء، ولكنها تستهلكها ايضا السحالي و الحشرات[20]، تصبح المخاريط الانثوية لحمية بعد فترة التلقيح، وتنتج هياكل تشبه الفاكهة حمراء او صفراء، يحمل كل منها بذرة واحدة فقط[21].

الشكل 2.I: نبات العلندة الهشة [22]

2.2.I. تسميات نبات العلندة الهشة :

العلندة الهشة او الفدر الهش او القعود الهش [23] و بالاتينية: Ephedra Fragilis، اسمها العلمي: Ephedra Fragilis.

3.2.I. التصنيف العلمي لنبات العلندة الهشة : [22]

الجدول 2.I: التصنيف العلمي لنبات العلندة

النطاق	حقيقيات النوى
المملكة	النباتات
الشعبة	الجنتويات
الرتبة	العلنديات
الفصيلة	*Ephedraceae*
الجنس	*Ephedra*
النوع	*Fragilis*

I.4.2. التوزيع الجغرافي لنبات العلندة الهشة :

تتوزع العلندة الهشة في حوض غرب البحر الابيض المتوسط الى جانب جزر البليار، فهي تتواجد في جنوب شبه الجزيرة الايبيرية، وفي بعض النقاط في شمال افريقيا، وايضا في بعض جزر الكناري، تحديدا في (لابالما و تينيريفي). تفضل الاماكن القاحلة الجيرية او الجبسية والمناطق الرملية المالحة والاراضي الصلبة ذات الارتفاع من 0الى1100متر[23].

❖ المراجع باللغة العربية:

[1] عبد القادر، ح. "النباتات الطبية في الجزائر"،الجزائر،1997، ص_1.

[3] محمد عبد البارئ، ا، "الدليل الحلقي للأشجار و النجيليات في بر قطر"، مركز العلوم البيئية. جامعة قطر ص_ 39 .

[11] درمش م.خ، وهبي ع، المحمد ح، كردوش م، دهان م، اليوسف م .2014" مجلة بحوث سلسة العلوم الزراعية". جامعة حلب. العدد (82).

❖ المراجع باللغة الاجنبية:

[2] BRAIN. S.T, SARA. C, ERDAL. B, IKHLAS. K.A, The role of chemical Fingerprinting : application to ephedra", phytochemistry,4 november 2002.

[4] HUNZIKER, 1949 ; Price , 1996.

[5] SCHNNEBERG. B.T, CROCKETT. S, BEDIR. E, KHAN. I.A, The role of chemical fingerprinting application to ephedra. 2003, 62., pp:911-918.

[6] SOUMAYA. B, YOUSRA. E, RIM.B. M, SARRA. D,SAWSENE. S, SARA. B,KAMEL.M. K, WISSAM. A.W, SODA. H, WIDED. M.K. Preliminary pheto chemical analysis, Antioxidant, anti inflammatory and anticancer activities of two Tunisian Ephedra species: Ephedra Alata und E fragilis. South African Journal of Botany.2020,135,421_428.

[7] Al-RIMAWI. F, ABU-LAF. S, ABBADI. J, ALAMARNEH. A.A, SAWAHREH. R. A, & ODEH. I, Anal- ysis of phenolic and favonoids of wild Ephedra alata plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2017, 14, 130–141.

[8] KITTANA. N, ABU- RASS. H, SABRA. R, MANASRA. L, HANANY. H, JARADAT. N, HUSSEIN. F,& ZAID. A. N, Topical aqueous extract of Ephedra alata can improve wound healing in an animal model. Chinese Journal of Traumatology. 2017, 20, 108-113.

[9] AL-QARAWI. A, ABD ALLAH. E, HASHEM. A, Pak. J. Bot. 44 (2012) 425.

[10] GUPTA. M, MANDOWARA. D, JAIN.S, Asian Agrihis. 12 (2008) 321.

[12] Al-Qarawi A., Abd Allah E., Hashem A., Pak. J. Bot. 44 (2012) 425.

[13] JAMOUS.M.R, SHTAYEB.A.M.S, Traditional Arabic Palestinian Herbal Medicine. Biodiversity and Environmental Reasherch Center (BERC), Til Nablus. 2008, 182:35

[14] DANCIU. C, MUNTEAN. D, ALEXA. E, FARCAS. C, OPREAN. C, ZUPKO. I, BOR. A, MINDA. D, PROKS.M, BUDA. V, et al. Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antimicrobial, Antiproliferative and Pro- Apoptotic Potential of Ephedra alata Decne. Hydro alcoholic Extract against the MCF- 7 Breast Cancer Cell Line. Molecules . 2018, 24, 13.

[15] The Neutraceutical Research and Education Act (HR3001). Representative...Pallone http://thomas.loc.gov/cgi-bin/query/C?c106:./temp/~c106tYLTl3 7/05/2024.

[16] ROBBERS, James E.. Herbs of choice. Tyler's Herbs of choice : the therapeutic use of phytomedicinals /, James E. Robbers, Varro E. Tyler. New York : Haworth Herbal Press, c1999.

[17] WHITE. L.M, GARDNER. S.F, GURLEY. B.J, MARX. M.A, WANG. P.L, ESTES. M, Pharmacokinetics and cardiovascular effects of ma-huang (Ephedra sinica) in normotensive adults. Journal of Clinical Pharmacology. 1997, 37(2):116-22.

[18] YOUNG. R, GABRYSZUK. M, GLENNON. R.A, (-)Ephedrine and caffeine mutually potentiate one another's amphetamine-like stimulus effects. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 1998,61(2): 169-73.

[19] MARKGRAF. F, Ephedra L. In:Tutin TG, heywood Vh Burges NA, Valentine Dh, Walters SM, Webb DA, ed. Flora Europea. Volume I : ly copodiaceae to Platonceae Combridge University Press . 1964, 40.

[20] CELEDON. N.C , SANTAMARE .A. L, GONZALZ. T. M, the role of pollination drops in animal pollination the Mediterranean gymnosperm Ephedra fragilis (G netales). Plant Ecology. 2016, 217. 1545-1552.

[21] HERRERA. C.M, Vertebrate- dispersed plants of the Iberina Peninsula a study of fruits characteristics. Ecological Monograph. 1987, 57: 30-331.

[22] areq. Net/ m/ علندة هشة. html.2/03/2024

[23] SAIDA. I, EMIN. S ," Chemical composition of various Ephedra species."1-Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 2-Departmentof Pharmacoinformatics and Pharmacoeconomics, Faculty of Pharmacy, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

الفصل الثاني:

عموميات حول نواتج الأيض الثانوي

II. تمهيد:

تعرف المنتجات الطبيعية على أنها مركبات عضوية ذات أصل طبيعي ، فهي مواد تم عزلها من الكائنات الحية وأكثر هذه المواد أهمية هي تلك التي تؤدي دورا في التفاعلات داخل النباتات [1]، حيث تصنف المنتجات الطبيعية الى قسمين رئيسيين هما : القسم الاول يسمى منتجات الايض الاولي تتمثل في الاحماض الكربوكسيلية ،الاحماض الامينية ،السكريات ، الدهون وغيرها ، أما القسم الثاني يسمى منتجات الايض الثانوي أهمها: التربينات و القلويدات و المركبات الفينولية [2] .

من خلال الدراسة الكيميائية لمختلف أنواع الجنس إفيدرا (*Ephédra*) تبين أن من أكثر نواتج الايض الثانوي تواجدا فيها هي: الفينولات والفلافونويدات والقلويدات، وهذا ما دفعنا للتعرف على هذه المركبات.

II.1. المركبات الفينولية:

II.1.1. تعريفها:

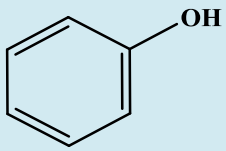
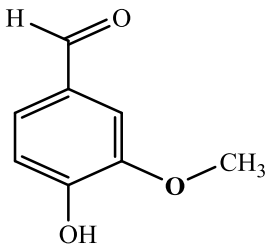
تعد المركبات الفينولية من أكثر مجموعات المواد الكيميائية النباتية انتشارا ، لما لها أهمية فيزيولوجية و مرفولوجية كبيرة في النبات [4][3]، تتميز المركبات الفينولية بوجود حلقة بنزينية واحدة على الاقل، حاملة لمجموعة هيدروكسيل حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى (إيثر، أستر، سكر). غير أن هذا التعريف الكيميائي البحت للفينولات غير كاف لوصف المركبات الفينولية النباتية، إذ أن هناك منتجات أيضية ثانوية أخرى تشمل هذا التعريف أيضا و لكنها تنتمي إلى مجموعات كيميائية نباتية مختلفة، مثل بعض القلويدات كالمورفين (Morphin) [5]، والعديد من التربينات كالتيمول (Thymol)، التي تحتوي بنيتها على نواة بنزن و مجموعة هيدروكسيل فينولي، لذلك من الضروري إدخال معيار التخليق الحيوي لحصر حدود هذه المجموعة [6]، ومنه يمكن تعريف المركبات الفينولية على أنها مشتق غير ازوتي حاوي على حلقة بنزن أو أكثر تحمل مجموعة هيدروكسيل حرة أو مرتبطة بوظيفة أخرى اصطنعت حلقاتها العطرية إما من حمض شيكيميك أو عديد الاسيتات [5][7].

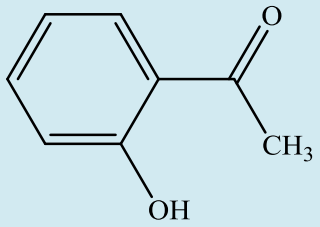
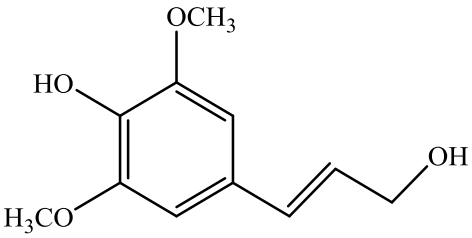
II.1.2. تصنيفها:

صنفت المركبات الفينولة من قبل العالم Marbone and Simmond (1964) حيث اعتمد في تصنيفها على عدد ذرات الكربون في المركب، أما العالم Swain and Baten-Smith(1962) صنفها حسب تعقيداتها [8] ، حيث قسمت الى ثلاث مجموعات وهي:

II.1.2.1. مركبات فينولية قليلة الانتشار: هيكلها البنائي من الشكل C_6 ، C_6-C_1، C_6-C_2، C_6-C_3 [5] كما هو موضح في الجدول (II.1).

الجدول II.1: المركبات الفينولية قليلة الانتشار

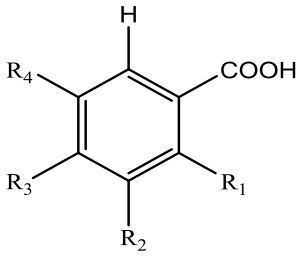
الهيكل الكربوني	البنية الكيميائية	التسمية
C_6		Phenol
C_6-C_1		Vanillin

1-(2-hydroxyphenyl)ethan-1-one		C_6-C_2
Sinapyl Alcohol		C_6-C_3

II.2.2.1.مركبات فينولية واسعة الانتشار:

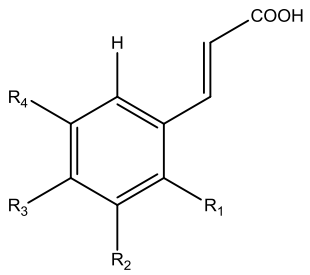
من أهمها الاحماض الفينولية ، الكومارينات، و الفلافونويدات ، وهي مصنفة كالتالي:

❖ **الاحماض الفينولية** : تتمثل في احماض هيدروكسي بنزويك هيكلها الكربوني من الشكل C_6-C_1، بنيتها ممثلة في الشكل (1.II). و أحماض هيدروكسي سيناميك **C_6-C_3** بنبتها موضحة في الشكل (2.II) [4][9].



R_1=R_2 =R_3 =H , R_4=OH	p-hydroxybenzoic acid
R_1=H , R_2=R_3=R_4= OH	Gallic acid
R_1=OH , R_2=R_3=R_4=H	Salicylic acid
R_1=H,R_2=R_4=OCH_3,R_3=OH	Syringic acid

الشكل II.1: أمثلة لبعض أحماض هيدروكسي بنزويك

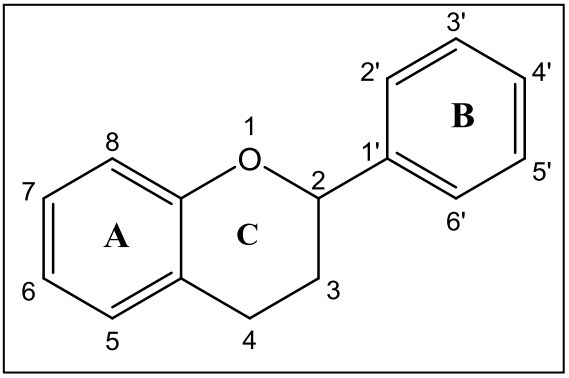


R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H	Coumaric acid
R_1=R_4=H, R_3=OH, R_2=OCH_3	Ferulic acid
R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH	Sinapic acid
R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH	Caffeic acid

الشكل 2.II: أمثلة بعض أحماض هيدروكسي سينامك

❖ **الفلافونويدات:**

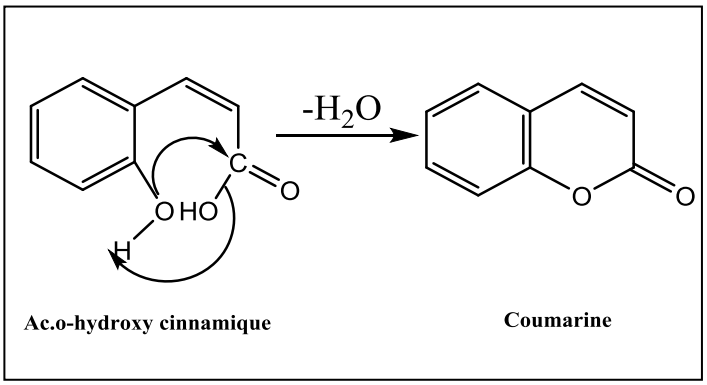
تم اكتشاف الفلافونويدات من قبل العالم الكيميائي Albert Szent-Gyorgyi[5]، تتكون جميعها من هيكل أساسي يحتوي على 15 ذرة كربون، متواجدة على شكل C_6-C_3-C_6 [10]، وهي عبارة عن حلقتين عطريتين(A،B) مرتبطتين بسلسلة من ذرات الكربون الحلقية C_3 الشكل (3.II) .



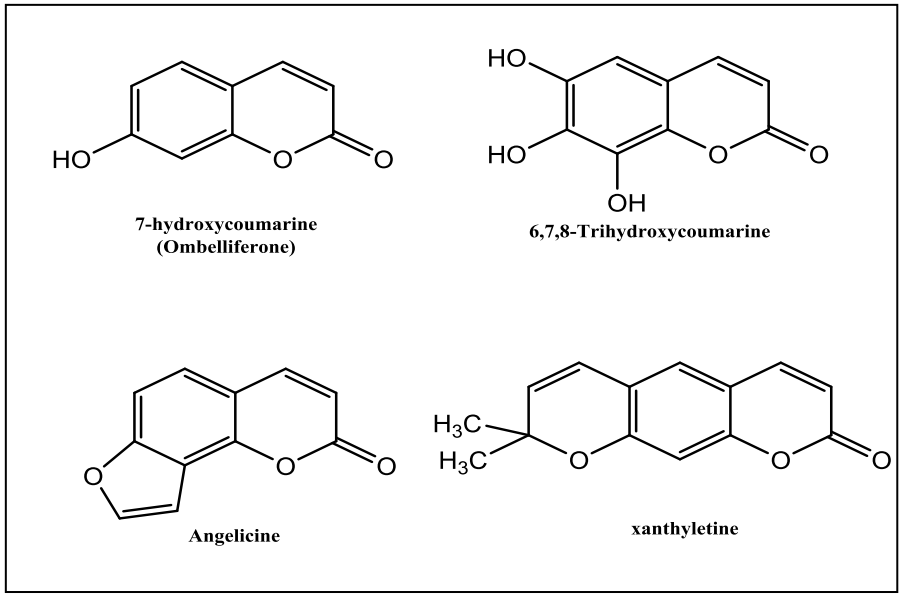
الشكل 3.II: الهيكل الاساسي للفلافونويدات

❖ **الكومارينات :**

تم عزل الكومارينات في عام 1820، وفي سنة 1996 تم اكتشاف حوالي 1300 كومارين، وهي عبارة عن مركبات فينولية مكونة من نواة بنزن وحلقة سداسية بها ذرة أكسجين [11]، لها بنية من الشكل C_6-C_3 ، تتشكل الكومارينات انطلاقا من التفاعل الموضح في الشكل (4.II).



الشكل 4.II: آلية تشكل الكومارينات



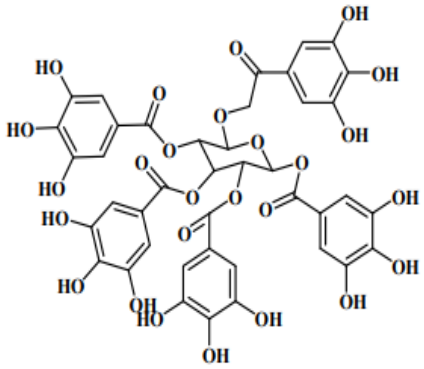
الشكل 5.II: نماذج لبعض الكومارينات

II.3.2.1. مركبات فينولية متواجدة على شكل بوليميرات : تتمثل في التانينات و الليغنين.

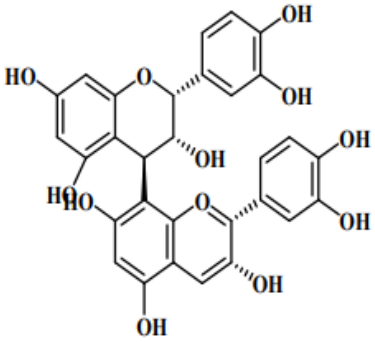
✓ **التانينات :** وهي مركبات تتكون من مجموعات الفينول متعدد الهيدروكسيل ذات أوزان جزيئية تتراوح من 500 إلى 3000 وحدة، ترتبط فيما بينها بروابط C_4-C_8 أو C_4-C_6. تدخل في تركيب الادوية المعالجة للاسهال، بالاضافة الى استخداماتها المتعددة في الصناعة [12]، حيث تتواجد في نوعين[13]:

– **تانينات متحللة:** هي عبارة عن شق سكري مرتبط بوحدات من حمض الغاليك ، وهي قابلة للذوبان في الماء، شكل(II.6) .

– **تانينات مكثفة:** لها البنية العامة للفلافونويدات، وهي غير قابلة للذوبان في الماء، شكل (II.7).



الشكل II.6: وحدة التانينات المتحللة



الشكل II.7: وحدة التانينات المكثفة

✓ **الليغنين:** هي بوليميرات ذي بنية منتظمة تتكون أساسا من وحدات فينيل بروبان من الشكل C_6-C_3، كارهة بشدة للماء، بالاضافة الى انها شق غير سكري [13] .

II.3.1. الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للمركبات الفينولية :

II.1.3.1. الخصائص الفيزيائية:

- ✓ **درجة الغليان:**

تتميز المركبات الفينولية بدرجات غليان مرتفعة بسبب قدرتها على تكوين روابط هيدروجينية بين جزيئاتها، وبمقارنتها بالكحولات المقابلة لها في الوزن الجزيئي، نجد أن درجة الغليان للفينولات أعلى، بسبب حلقة الفينيل الساحبة للالكترونات، التي تزيد قطبية الرابطة O-H الهيدروكسيلية بالتالي تؤدي إلى تكوين روابط هيدروجينية أقوى من التي تكونها الكحولات[14].

- ✓ **الذوبانية:**

تمتلك الفينولات ذوبانية منخفضة في الماء بسبب احتوائها على هيكل كربوني ذو ست ذرات كربون على الاقل، وتزداد ذوبانية الفينولات بزيادة مجموعات الهيدروكسيل على الحلقة الاروماتية [14].

II.2.3.1. الخصائص الكيميائية:

- ✓ تشكل الفينولات أحماضا ضعيفة، حيث يؤدي نزع بروتون الرابطة OH للفينول إلى تكوين أيون الفينات [15].
- ✓ تتأكسد الفينولات بواسطة عوامل مؤكسدة فيؤدي إلى نزع ذرة الهيدروجين وتكوين جذر حر مع ذرة الأكسجين [15].
- ✓ تشكل الفينولات مع المعادن (Al, Fe) معقدات خاملة [16].

II.4.1. أهمية المركبات الفينولية:

بالرغم مما تقدمه المركبات المستخلصة من النباتات من فوائد عظيمة للانسان، فإن دورها للنبات نفسه لم يكن معروفا، ومن هنا كثفت الابحاث على زراعة الانسجة النباتية داخليا وخارجيا لمعرفة الدور الفيزيولوجي لمنتجات الايض الثانوي [11]، حيث يكمن دور الفينولات في مراقبة نمو وتطور النباتات وذلك بتشكيلها معقدات مع هرمون النمو، وقد لوحظ أيضا ان الفينولات تلعب دورا في وقاية الباتات من الامراض التي تسببها البكتيريا والفطريات [13][17].

❖ **في المجال الاقتصادي:**

تستخدم الفينولات في الصناعات الغذائية كمضادات أكسدة ومثبطات للأنزيمات، بالإضافة الى أنها تستخدم في صناعة مواد التجميل لحماية البشرة من الاشعة فوق البنفسجية.

❖ **في المجال الطبي:**

تتميز المركبات الفينولية بخصائص علاجية عديدة، حيث يتم استخدامها في طب الاعشاب بسبب دورها في الحماية ضد بعض الامراض [9][18]، وكذلك تستخدم كمضادات للإلتهاب والاورام، حيث تحتوي الفينولات على مجموعات الهيدروكسيل كلما كثر وجودها في المركب زادت في نشاط المضاد، تعد قناصات للجدور الحرة فهي تمنح الهيدروجين ليوقف عملية انتشار الجذور[13]. والجدول (2.II) يوضح بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب .

الجدول 2.II: بعض المركبات الفينولية المستعملة في الطب والصيدلة

المركب الفينولي	الامراض المعالجة	
* **ليقنان**	* مضادات للسرطان	
* **الكومارينات**	* حماية الاوعية الدموية	* مضاد للأمراض الجلدية
* **الفلافونويدات**	* مضادات الالتهاب * مضاد للسرطان	* تخفيض ارتفاع الدم * مدرة للبول
* **الاحماض الفينولية**	* مضادات الاكسدة	* مضادات البكتيريا

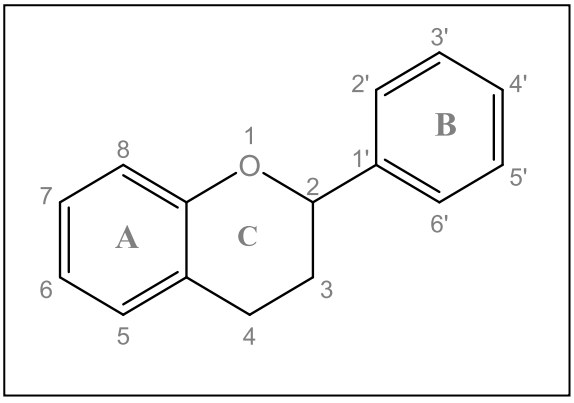
II.2. الفلافونويدات:

II.2.1. تعريفها :

تتواجد الفلافونويدات في معظم النباتات، وهي أصباغ فينولية تساهم في تلوين الزهور والفواكه باللون الاصفر، البرتقالي، الابيض، والاحمر، حيث تم التعرف على أكثر من 4000 فلافونويد طبيعي حتى الان [19].

وقد أدخل مصطلح فلافونويدات (Flavonoid) سنة 1952 من طرف (Geissman) و (Hinreiner)، وهو مشتق من الكلمة اللاتينية (Flavus) والتي تعني أصفر، أي أصبغة صفراء [11].

تتألف الفلافونويدات جميعها من هيكل قاعدي ذو 15 ذرة كربون، تتوزع على حلقتين عطريتين تدعى الوحدتين A و B ترتبطان بسلسلة من ثلاث كربونات تشكل في غالب الاحيان الحلقة البيرانية C من الشكل C_6-C_3-C_6 ، الشكل (II.8) [20].

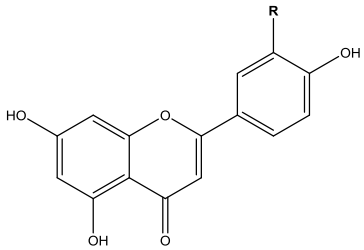
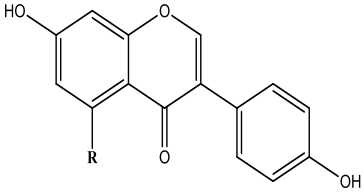
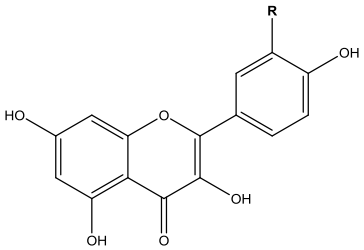
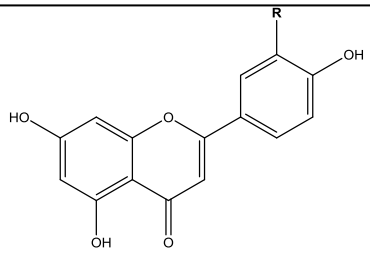
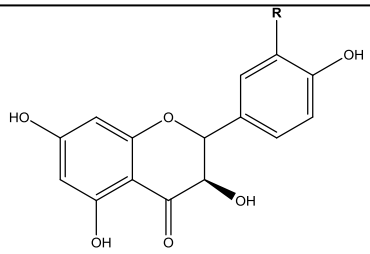
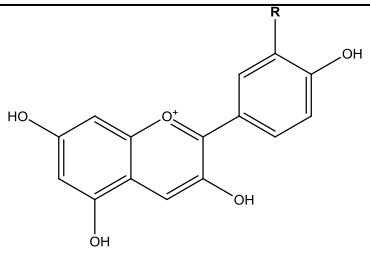
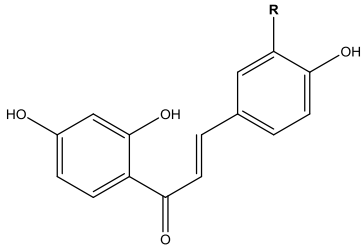
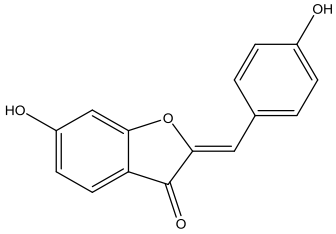
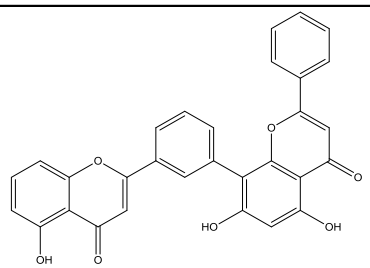


الشكل II.8: الهيكل القاعدي للفلافونويدات

II.2.2. تصنيف الفلافونويدات:

لقد صنفت الفلافونويدات بنيويا حسب عدد، موضع و طبيعة المستبدلات [7][21]، والجدول (II.3) يوضح مختلف أقسام الفلافونويدات.

الجدول II.3: مختلف أقسام الفلافونويدات

 **Flavones** **الفلافونات**	 **Isoflavones** **الإيزوفلافونات**	 **Flavonols** **الفلافونولات**
R= H Apigénine R= OH Lutéoline	R= H Daidzeine R= OH Genisteine	R=H Kaempferol R=OH Quercetin
 **Flavanones** **الفلافانون**	 **Flavanon-3-ol** **فلافانون-3- ول**	 **Anthocyanidine** **الأنثوسياندين**
R=H Naringenin R=OH Eriodictyol	R=H , Dihydrokaempferol R=OH , Dihydroquercetine	R=H Pelargonidine R=OH Cyanidine
 **Chalcones** **الشالكونات**	 **Aurones** **الأورونات**	 **Biflavonoide**
R=H Isoliquiritigénine R=OH Butéine	Hospidol	Amentoflavone

II.2.3. الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للفلافونويدات:

ترتبط الفلافونويدات بقسمها وحالة وجودها (فلافونويدات حرة، جليكونية، كبريتية.....) من بين هذه الخصائص مايلي[9][22]:

- ✓ من أهم خاصية للفلافونويدات، أنها تساهم في تلوين النباتات حيث تعتبر أصباغ نباتية وهي مسؤولة جزئيا عن تلوين الزهور.
- ✓ تتميز الفلافونويدات بتدرج ألوانها من الأصفر إلى الأحمر، بحسب قسم الفلافونويد (الفلافونات، الفلافونولات، الأرونات)، أما الأنثوسياندات فتأخذ ألوان متعددة كالأزرق، والأحمر الغامق.
- ✓ تذوب الفلافونويدات الجليكوزيدية في الماء والكحول، أما الفلافونويدات الجليكونية متعددة الهيدروكسل فتذوب في الكحول، بينما الأقل استبدالا تذوب في الإيثر، الأسيتون.
- ✓ تعتبر الفلافونويدات مركبات حامضية ضعيفة، تذوب في القواعد القوية ، ويتم هدم معظمها في ظروف قاعدية قوية وذلك بتكسير الحلقة **C**.
- ✓ للفلافونويدات خصائص طبية كثيرة من بينها، لها نشاط مضاد للأكسدة، مضاد للإلتهاب، خافضة للضغط.

II.2.4. أهمية الفلافونويدات:

- ✓ أظهرت الدراسات المكثفة في المجال الطبي فعالية الفلافونويدات المختلفة، حيث تعمل على تقوية الجهاز المناعي وتزيد من النشاط المضاد للسرطان[11].
- ✓ لها فوائد عديدة منها: الوقاية من أمراض القلب، الاوعية الدموية، تصلب الشرايين[23].
- ✓ تمنع الحشرات من التغذي على النباتات [9].
- ✓ مضادة للإلتهابات والفيروسات [24].

II.3. القلويدات:

II.3.1. تعريفها:

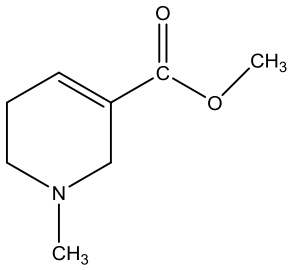
أدخل مصطلح قلويد من طرف الصيدلاني ميسنر (Meissner) عام 1918 [25]، وتعرف القلويدات على أنها قواعد عضوية مستخلصة نباتيا، معقدة التركيب لإحتوائها على الكربون، الاكسجين، والنيتروجين، وغالبا ما يوجد النيتروجين فيها على هيئة أمين ثالثي [26]، تتواجد في النباتات في صورة حرة، أو في صورة أملاح لبعض الأحماض الأمينية [27].

II.3.2. تصنيف القلويدات:

يختلف تصنيف القلويدات من مصدر لاخر، فتصنف حسب توزيعها النباتي، أو حسب خواصها الصيدلانية، أو تركيبها الكيميائي، ونظرا لتزايد إكتشاف المئات من هذه المركبات، فقد إعتمد على نظام التصنيف الذي وضعه هيجانور (Heganauer) [28] [29] وهو كالتالي:

❖ **القلويدات الحقيقية:**

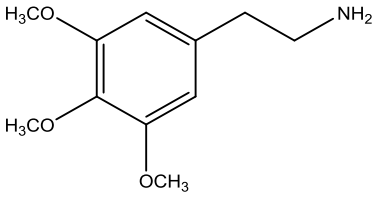
هي قلويدات سامة ولها تأثيرات فيزيولوجي، وتحتوي على ذرة نيتروجين واحدة على الأقل في حلقات متغايرة، وهي مشتقة من الأحماض الأمينية، تتواجد في النباتات على هيئة أملاح للأحماض العضوية، مثل الأريكولين.



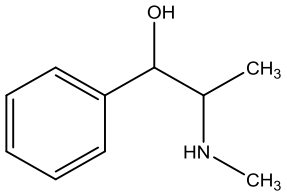
Arécoline

❖ **القلويدات الأولية :**

عبارة عن أمينات بسيطة تكون فيها ذرة النيتروجين خارج الحلقة، وهي قلويدات قاعدية، يتم إصطناعها في الكائن الحي انطلاقا من أحماض أمينية، مثل الإيفيدرين والمسكالين.



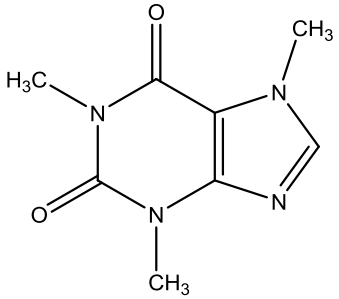
Mescaline



Ephédrine

❖ **القلويدات غير الحقيقية:**

هي قلويدات قاعدية، لا تشتق من الأحماض الأمينية، غالبيتها عبارة عن قلويدات تربينية، مثل الكافيين.



Caffeine

II.3.3. الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للقلويدات:

II.3.3.1. الخواص الفيزيائية:

- ✓ الوزن الجزيئي للقلويدات يتراوح من 100 إلى 900 g/mol [28] .
- ✓ معظم القلويدات التي لا تحتوي على أكسجين تكون في حالة سائلة في الحالة الطبيعية، بينما التي تحتوي على الأكسجين تكون بلورية صلبة، لها درجات انصهار محددة [29].
- ✓ غالبية القلويدات البلورية لها القدرة على دوران الضوء المستقطب [30] .
- ✓ القلويدات عموما مركبات عديمة اللون والرائحة ولها طعم مر[30].
- ✓ تعتمد ذوبانية القلويدات على طبيعتها سواء كانت قاعدية أو ملحية، فهي تتغير في المذيبات بدلالة pH وهي كالتالي[29]:

- **في شكلها القاعدي:**

ـ تذوب في المذيبات العضوية اللاقطبية (كلوروفورم، الإيثر الإيثيلي،.....).

ـ تذوب في المذيبات العضوية القطبية (الكحولات).

ـ لا تذوب في الماء.

- **في شكلها الملحي:**

ـ تذوب في الماء.

ـ تذوب في المذيبات العضوية القطبية.

ـ لا تذوب في المذيبات العضوية اللاقطبية.

II.3.3.2. الخواص الكيميائية:

- ✓ تكوَن القلويدات أملاحا عند تفاعلها مع الأحماض العضوية أو غير العضوية ، وعادة ماتكون الأملاح سهلة الذوبان في الماء مقارنة بالقلويد الأم، حيث تعتبر أملاح القلويدات أكثر ثباتا وأقل تحللا من القلويدات القاعدية [28].
- ✓ القلويدات مركبات قاعدية وذلك لإحتوائها على الزوج الإلكتروني الحر على ذرة النتروجين، هذه الخاصية تجعلها أكثر تحللا خاصة عند التعرض للحرارة والضوء في وجود الأكسجين[29].
- ✓ ترتبط القلويدات مع بعض أملاح المعادن الثقيلة لتكون أملاح معقدة مزدوجة، لا تذوب في الماء، وتترسب في وسط حامضي ضعيف أو متعادل على شكل بلورات [30].
- ✓ تترسب القلويدات ببعض الكواشف النوعية من أهمها[29] :

ـ **كاشف ماير** (reactif de Mayer) : عبارة عن محلول كلوريد الزئبق ويوديد البوتاسيوم الذي يعطي مع القلويدات راسب أبيض مصفر.

ـ **كاشف دراجندروف** (reactif de Dragendroff) **:** عبارة عن محلول نترات البزموت ويوديد البوتاسيوم والذي يعطي مع القلويدات راسب أحمر برتقالي .

ـ **كاشف بوشردا** (reactif de Bouchardat) : عبارة عن محلول يوديد البوتاسيوم واليود والذي يعطي مع القلويدات راسب بني.

II.4.3. الأهمية العلاجية للقلويدات :

النباتات القلويدية لها أهمية بالغة في طب الأعشاب ولكل منها تأثير فيزيولوجي متنوع وهي كالتالي:

- ✓ تعمل القلويدات على مستوى الجهاز العصبي المركزي سواء كانت مثبطة(المورفين) أو منشطة (الكافيين) أو محفزة[19].
- ✓ تلعب القلويدات دور كبير كمسكنات ألم، وبعضها يعمل كمخدر موضعي (كوكايين) [31].
- ✓ أظهرت العديد من الدراسات أن القلويدات لها أنشطة مضادة للتشنج ومضادة للسرطان[32].
- ✓ يستخدم قلويد الأتروبين في جراحة العيون، حيث يعمل على توسيع حدقة العين[33].

❖ المراجع باللغة العربية:

[2] م.م. عبد الله زيد خلف، محاضرة كيمياء النواتج الطبيعية.

[5] بلفار آسيا، دراسة القدرة المضادة للأكسدة وللبكتيريا وللتآكل للمسخلصات الفينولية لنبات الزيتة Limoniastrum guyonianum (Dur)، رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2018.

[11] بالفار محمد الأخضر، المساهمة في دراسة القدرة المضادة للأكسدة لبروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية، رسالة دكتوراه، ورقلة: جامعة قاصدي مرباح، 2016.

[12] حوة إبراهيم، دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة، مذكرة ماجستير، ورقلة: جامعة قاصدي مرباح، 2013، ص 23.

[13] ربيعي عبد الكريم، المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية، مذكرة ماجستير، ورقلة: جامعة قاصدي مرباح، 2010.

[14] وائل غالب محمد، وليد محمد السعيطي.أسس الكيمياء العضوية.الطبعة الاولى. دار الكتب الوطنية: بن غازي ليبيا،2008، ص 177.

[20] بودرمين سهام، فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي لنبات Centaurium Erthraea (Gentianacaea)، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة، 2010، ص 20.

[22] شباح كوثر، فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونويدي للنبتة Phoenix dactylifera (Degla beida)، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة، 2007.

[23] برحال جمعة، فصل وتحديد منتجات الأيض الفلافونويدي لبعض نباتات العائلة الريزيدية (Resedaceae)، أطروحة دكتوراه، جامعة منتوري قسنطينة، 2017.

[24] باز مسعود، إستخلاص، فصل وتحديد بنيات منتوج الأيض الثانوي عند نبات جنس Centaurea: C.Spaerocephala L.، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة، 2006.

[25] سليمان محمد العليمات. كيمياء النواتج الطبيعية(القلويدات). الطبعة الأولى. عمان_الأردن: دار مجدلاوي للنشر والتوزيع.2014.

[26] زمور.س، بومعزة.ج، بن عسكر.ه، النشاط الصيدلاني للقلويدات المستخلصة من نبات السكران، مذكرة لنيل شهادة الدراسات العليا، جامعة جيجل، 2007.

[27] الشحات نصر أبو زيد. النباتات والأعشاب الطبية.بيروت: دار البحار،1986.

[28] شبوعات الياقوت، دراسة فيتوكيميائية وتقييم ميكروبيولوجي لنبتتين طبيتين صحراويتين: السدرو العلندة، أطروحة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2014.

[29] بن فرج الله السعيد، فصل وتحديد صيغة الأتروبين من نبات Hyoscyamus muticus النامي بإليزي، مذكرة ماجستير، المركز الجامعي بورقلة، 2001.

[30] علي الغنيمي علي. موسوعة نباتات الإمارات العربية المتحدة في تراث الطب الشعبي. جامعة الإمارات العربية. 1993.

[32] العابد إبراهيم، دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة للمستخلص القلويدي الخام لنبات الظمران Traganeum، مذكرة ماجستير، جامعة ورقلة، 2009.

[33] أبو زيد.ش. فسيولوجيا وكيمياء القلويدات في النباتات الطبية وأهميتها الدوائية والعلاجية. القاهرة: دار الكتب العلمية للنشر و التوزيع.2005.

❖ المراجع باللغة الأجنبية:

[1] MOHAMMEDI. Z, Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'Algérie.Thése doctorat. Tlemcen: Université Abou Bekr Belaid, 2013.

[3] BRAVO. L, Nutrition Reviews. 1998, 56, 317-333.

[4] KHALFAOUI. A , Isolation, Structural Determination of Secondary Metabolites and Biological Activities of Asphodelus tenuifolius (Liliaceae), Thesis Presented for Doctorate (LMD), Universite des Freres Mentouri-Constantine, 2018.

[6] BRUNETON. J, Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. (5eéd). Technique et Documentation Lavoisier: Paris. 2016, p.289.

[7] BRUNETON. J, Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales (3eéd.). Technique et Documentation Lavoisier: Paris. 1999.

[8] VERMERRIS. W, NICHOLSON. R, Phenolic compounds biochemistry. Springer.Netherlands. 2006.

[9] AISSANI. F, Caractérisation phytochimique, valorisation biologique et toxicologique des différents extraits d'une espèce Algérienne Sonchus oleraceus L,Thése de Doctorat,Université 8 Mai 1945 Guelma, 2022, p.17-18.

[10] MERATATE. F, Etude phytochimique et pouvoir biologique des mètabolites secondaires de la plante Zizyphora hispanica L. de la règion de M'SILA, mémoire de Magister ,Université de M'Sila, 2013, p14.

[15] YAHIAOUI. N, Etude de l'adsorption des composes phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxyapatite et charbon actif, mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou, 2012.

[16] ACHAT. S, Polyphénols de l'alimentation: Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques, Thèse de Doctorat, Université A.Mira BEJAIA, 2013.

[17] GROTEWOLD. E,The Science of Flavonoids,1ST ed, Columbus, Ohio, USA, Springer Science_Business Media, Inc,2006.

[18] MACHEIX. J-J, FLEURIET. A, & JAY-ALLEMAND. C, Les composés phénoliques des végétaux:un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.Presses polytechniques et universitaires romandes. Collection biologie, Lausanne.2005.

[19] RADJAH. A, Valorisation et identification phytochimique des principes actifs de quelques plantes médicinales de la règion de Biskra, Thése de Doctorat, Biskra: Université Mohamed Kheider,2020, p 12.

[21] HARBONE. J.E, Biochemistry of phenolic compound, Academic press, London and Newyork,1964.

[31] CHAOUCH. N, Etude des Alcaloïdes dans le coloquinte colocynthins Vulagaris(l) Schard (Cucurbitacées)Region de Oude N'sa (Wilaya de Ourgla), mémoire de Magister, Université de Ourgla. 2001.

الفصل الثالث:

الفعالية البيولوجية

III.1. الجذور الحرة:

III.1.1. تعريف الجذور الحرة:

يعرف الجذر الحر على أنه نوع كيميائي إما جزيء أو ذرة يحتوي على إلكترون أعزب، مما يجعله أكثر نشاطا وتفاعلا [1][2]، وهذا ما يؤدي إلى تفاعله مع جزيئات بيولوجية كالدهون والبروتينات بحثا عن الإستقرار[3].

III.1.2. أقسام الجذور الحرة:

III.1.2.1. التقسيم على أساس الإستقرار:

تقسم الجذور الحرة حسب إستقرارها إلى جذور حرة غير مستقرة (نشطة) وجذور حرة مستقرة، حيث تتميز الأولى بطاقة نشاط قريبة من الصفر، بالإضافة إلى أن أعمارها صغيرة جدا، تقدر بالميكروثانية وأحيانا تصل إلى البيكوثانية، يتمثل هذا النوع في الجذور ذات العناصر مثل: الهيدروجين، النتروجين، الفلور، الكلور، والبروم، وغيرها. أما الجذور الحرة المستقرة هي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو الساعات أو الأيام مثل: ثلاثي بكريل هايدرازيل (DPPH) [4].

III.1.2.2. التقسيم على أساس النوع:

يتم تقسيمها حسب هذا التصنيف إلى جذور حرة أكسيجينية، جذور حرة نيتروجينية وجذور حرة دهنية [5].

III.1.3. دور الجذور الحرة:

تلعب الجذور الحرة دورا أساسيا بيولوجيا، منها ماهو ضار وبعضها نافع، يكمن هذا الدور في:

- ✓ تسبب في إتلاف الخلايا السرطانية، كما تتدخل في عمل الإنزيمات[6].
- ✓ تعمل على تقوية المناعة ضد مسببات الأمراض[6].
- ✓ تساعد في تمايز الخلايا[7].

III.1.4. آلية تشكل الجذور الحرة:

تلعب الجذور الحرة دورا أساسيا في تفاعلات الإضافة الجذرية والإستبدال الجذري، وغالبا ماتنقسم هذه التفاعلات إلى ثلاث مراحل: البداية، الإنتشار، النهاية [8].

- ✓ **مرحلة البداية:** تدعى أيضا بتفاعلات البداية، والتي يتم فيها تشكيل الجذر الحر، بالإضافة إلى زيادة عددها.

$$LH + \dot{R} \longrightarrow \dot{L} + RH$$

✓ **مرحلة الإنتشار**: في هذه المرحلة الذور الحرة تجدد سلسلة من تفاعلات.

$$\dot{L} + O_2 \longrightarrow LO\dot{O}$$

$$LH + LO\dot{O} \longrightarrow LOOH + \dot{L}$$

$$\dot{L} + O_2 \longrightarrow LO\dot{O}$$

✓ **مرحلة النهاية:** يتم في هذه المرحلة اتحاد جذرين لتكوين فئات أكثر ثباتا.

$$\dot{L} + \dot{L} \longrightarrow LL$$

$$LO\dot{O} + LO\dot{O} \longrightarrow LOOL + O_2$$

$$LO\dot{O} + \dot{L} \longrightarrow LOOL$$

2.III. مضادات الأكسدة:

1.2.III. تعريف مضادات الأكسدة:

تعرف مضادات الأكسدة على أنها جزيئات أو أيونات قادرة على تثبيط الجذور الحرة أو منع أكسدة الجزيئات الأخرى[9]، متواجدة بصورة طبيعية في معظم الخضروات والفواكه والأعشاب الطبية، حيث تعمل كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة [10]، لها دور كبير في كسر سلسلة التفاعلات الجذرية التي تنتج من عملية الأكسدة [4]، حيث يحتوي جسم الإنسان على مجموعة متنوعة من مضادات الأكسدة التي تعمل على توازن المواد المؤكسدة [11].

2.2.III. تصنيف مضادات الأكسدة:

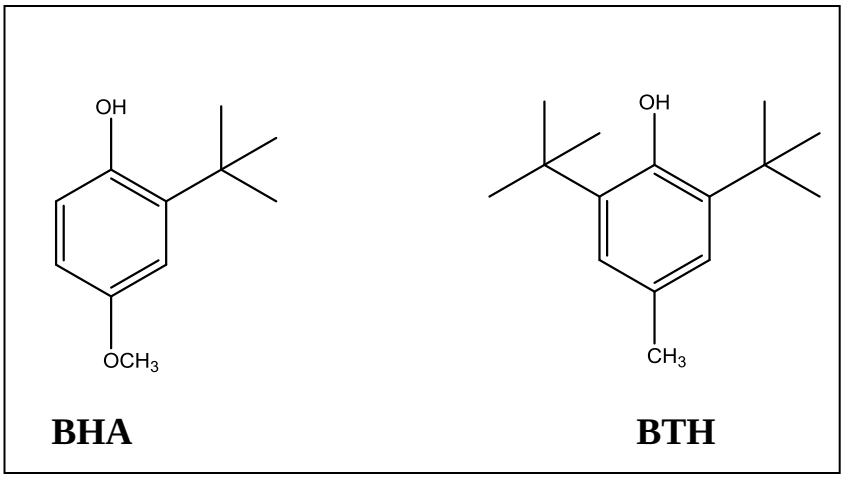
يمكن تصنيف مضادات الأكسدة إلى صنفين هما:

1.2.2.III. مضادات أكسدة طبيعية: [12] [13] [14]

يتعدد هذا النوع من مضادات الأكسدة والمتمثل في الفيتامينات مثل: فيتامين C، فيتامين E. بالإضافة إلى المعادن الطبيعية كالزنك والسيلينيوم والمنغنيز، والأحماض الدسمة من نوع أوميغا−3 و أوميغا−6، والتي تتواجد في الخضر والفواكه والأعشاب الطبية بكميات كبيرة.

III.2.2.2. مضادات أكسدة مصنعة:

يتم استخدام مضادات الأكسدة الإصطناعية كمضافات غذائية لحفظ الطعام والتقليل من فساده وذلك لتأكسدها قبل غيرها،لأنها فعالة وأقل تكلفة من مضادات الأكسدة الطبيعية، بالإضافة إلى أنها تستخدم في صناعة المطاط والمشتقات البترولية منها: حمض الغاليك، Butylhydroxyanisole(BHA)و Butylhydroxytoluene (BTH) [15]، التي تسخدم في الحفاظ على الدهون والزيوت الموجودة في مستحضرات التجميل والمستحضرات الصيدلانية [16].



الشكل III.1: بنيات بعض مضادات الأكسدة الصناعية

III.2.3. آلية عمل مضادات الأكسدة:

تعمل مضادات الأكسدة على عدة آليات تتمثل في إعاقة وكبح إنتشار سلسلة التفاعلات الجذرية، امتصاص الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، توقيف انتقال الإلكترونات وإزالة المعادن الثقيلة بالإستخلاب [17][18]. وتلعب مضادات الأكسدة بالدرجة الأولى كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة حيث أنها تتحد مع الجذر وتحوله إلى مركب مستقر كما هو موضح في المعادلة التالية [19].

$$ROO^{\cdot} + AH_2 \longrightarrow ROOH + AH$$

$$A^{\cdot}H + AH \longrightarrow A + AH_2$$

III.4.2. شروط إضافة مضادات الأكسدة:

لإضافة هذه المواد للأغذية يشترط توفر مايلي:

* يجب أن تكون درجة السمية ضعيفة، وفعالة بتركيز منخفض في أنواع عديدة من الدهون[20].
* يجب أن لا يؤثر على الغذاء المضاف إليه، أي لا يغير من طعمه ولا رائحته [21].

III.3. الفعالية المضادة للبكتيريا:

III.1.3. تعريف البكتيريا:

البكتيريا هي كائنات احادية الخلية مصنفة على أنها بدائيات النواة، لأنها لا تملك غشاء نووي، وخلاياها غير مجزأة، بامكاننا العثور على الحمض النووي الخاص بها في جميع أنحاء السيتوبلازم وعادة ما يكون دائريا. هذه الخصائص تميزهم عن كائنات وحيدة الخلية مصنفة على أنها حقيقيات النواة (الفطريات، الطحالب،...). تختلف أشكالها (كروي، قضيب، منحني..)، هيكلها مرئي فقط في المجهر الإلكتروني. وتتكاثر عن طريق الانشطار أو عن طريق تكوين الأبواغ، متواجدة في كل مكان على سطح الارض وفي المحيط، وتتأقلم البكتيريا في جميع أنواع البيئات مثل التربة، النفايات المشعة، وأجسام الكائنات الحية الأخرى،...). في حين إن بعضها ضار، وبعضها مفيد لصحة الإنسان، حيث إن الإنسان يتعايش مع البكتيريا، ويتبادل المنفعة معها دون معرفة ذلك [22][23].

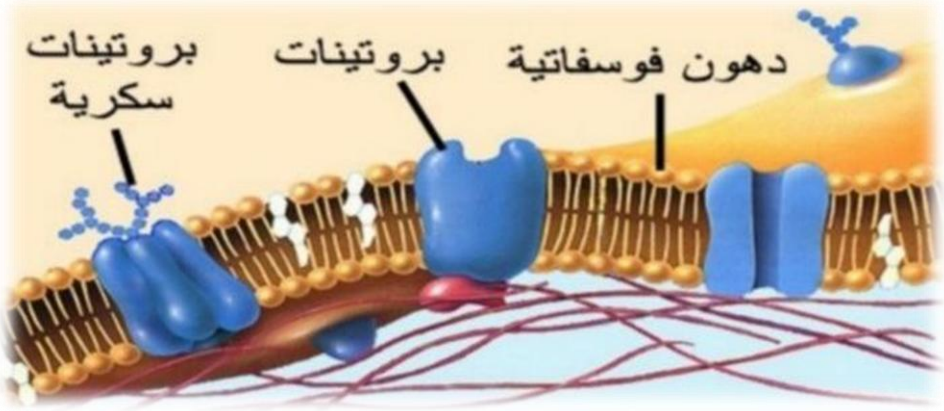
III.2.3. الخصائص العامة للبكتيريا: [24]

- ✓ احياء مجهرية دقيقة احادية النواة.
- ✓ تركيبتها بسيطة.
- ✓ جدرانها الخارجي صلب بسبب مادة متددة البيبتيد.
- ✓ اختلاف الخلية البكتيرية في الحجم و الشكل.
- ✓ تتكاثر بالانشطار الثنائي البسيط.
- ✓ تتغذى على المواد العضوية و اللاعضوية.
- ✓ تتحرك بالاسواط ان وجدت.
- ✓ تنتشر على سطح خلاياها سالبة الغرام تدعى بالاهداب.

III.3.3. تشريح البكتيريا:

III.3.3.1. التراكيب التي تقع خارج الجدار الخلوي: [25]

✓ **جدار الخلية:** وظيفته الحد من تمدد الخلية وانفجارها نتيجة دخول الماء اليها ويتركب من مادة تسمى ببتيدوكلايكان واحياناً تسمى الميورين (Murein)، وهي مادة غير قابلة للذوبان، مسامية موجودة في الخلايا بدائية النواة (procaryote) وغير موجودة في الحقيقية النواة.



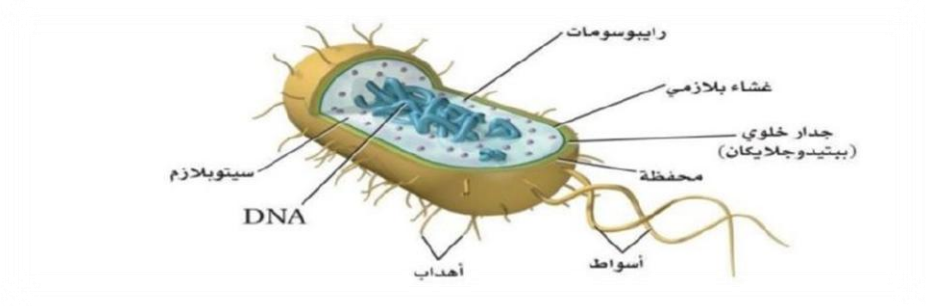
الشكل III.2: صورة توضح غشاء الخلية[25]

✓ **الكبسولة:** هي عبارة عن مادة لزجة تشكل طبقة او غلافاً هلامياً حول الجدار الخلوي يحيط ببعض الخلايا البكتيرية، ويتركب من مركبات مختلفة منها كربوهيدرات معقدة مثل الدكستران (Dextran) او من خليط من السكريات والأحماض العضوية.

✓ **الاسواط:** وهي تراكيب دقيقة جدا تشبه الشعيرات، وتبرز من جدار الخلية الى الخارج، وتكون مسؤولة عن حركة البكتيريا. يتركب السوط من ثلاثة اجزاء وهي : جسم قاعدي، الخطاف، الخيط الحلزوني.

✓ **الاهداب:** هي بروزات شعرية مجوفة وغير ملتوية تكون ادق واقصر واكثر عددا من الاسواط البكتيرية، لا تستخدم في الحركة.

III.3.3.2. التراكيب الموجودة داخل الجدار الخلوي :



الشكل III.3: صورة توضح خلية بدائية النواة [25]

- ✓ **الغشاء السيتوبلازمي:** وهو حاجز انتقائي، يتكون من فوسفوليبيدات وبروتين وظيفته الاساسية هي تنظيم مرور الجزيئات بصورة انتقائية حيث يقوم بامرار الجزيئات الغذائية الى الداخل ويسمح للفضلات بالخروج منها.
- ✓ **البروتوبلاست:** وهو الجزء المتكون من الغشاء السايتوبلازمي وما يحتويه من مكونات خلية البكتيريا الداخلية.
- ✓ **السايتوبلازم:** يمكن تقسيم مواد الخلية التي يحيط بها السايتوبلازم الى ثلاث مناطق:

1. منطقة السايتوبلازم وتكون غنية بالرايبوسومات.
2. المنطقة الكروماتينية وتكون غنية بال ADN.
3. الجزء السائل الذي يحتوي على المواد الذائبة .

- ✓ **المادة النووية:** البكتيريا ليس لها نواة حقيقية ولكنها تحتوي على اجسام نووية او نواة بدائية تتكون اساسا من ADN وليس لها غشاء نووي ويطلق عليها النوية او الكروماتيني او الكروموسوم البكتيري.
- ✓ **حبيبات القوليوتين:** حبيبات السايتوبلازم الموجودة في بكتيريا مثل (Corynebacterium) تعمل كمخازن للفوسفات وتوفر مصدرًا للكربون والطاقة. بالإضافة إلى ذلك، تتضمن المخازن جسيمات PHB التي تخزن الكربوهيدرات وتعمل كمخزن للطاقة في البكتيريا الهوائية. وتساعد حبيبات السكريات المتعددة

والكلايكوجين والفجوات الهوائية في مقاومة الضغط الذي يحدث في عمق المياه وتمنع تمزق الخلايا.

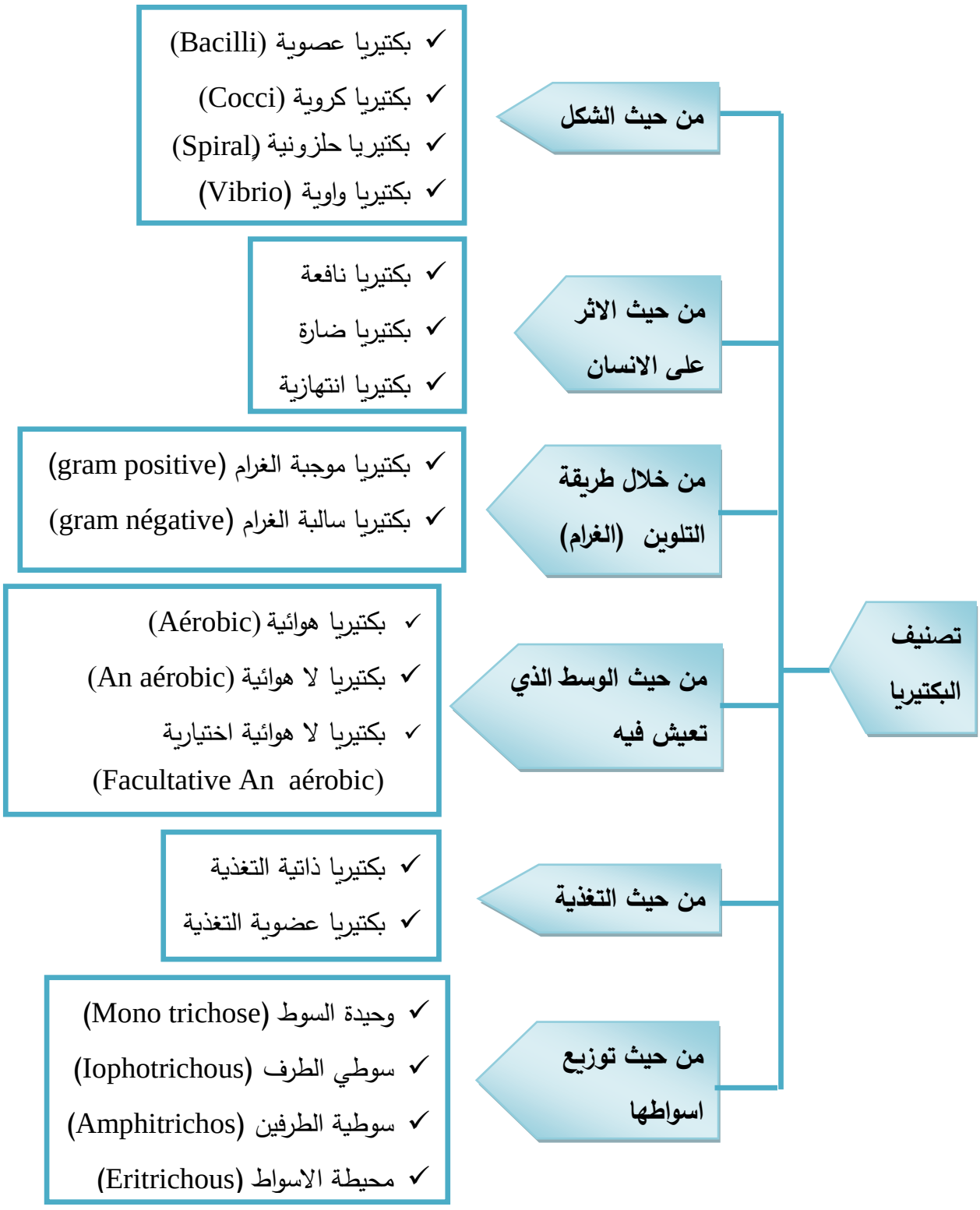
- ✓ **سبورات البكتيريا:** السبورات هي خلايا ساكنة ذات جدران سميكة، يمكنها التحول والنمو لتصبح خلايا خضرية في ظروف مناسبة. عادة ما يوجد سبور واحد في كل خلية، وتنقسم السبورات إلى مجموعتين: السبورات الداخلية والسبورات الخارجية.
- ✓ **الحويصلات:** تركيبة جدرانها سميكة وتستخدم للسكون والسبات الحيوي وهي مقاومة للظروف الصعبة ولديها بعض التشابه مع السبورات الا انها لا تستطيع مقاومة الحرارة العالية وتختلف في تركيبها الكيميائي عن السبورات الداخلية مثل الحويصلة الناتجة من جنس (Azotobacter).

III.4.3. تسمية البكتيريا:

- ✓ البكتيريا تأخذ أسماء ثنائية (Binomial) حيث يُشير المقطع الأول من الاسم إلى الجنس، والمقطع الثاني إلى النوع. يمكن أن يحمل اسم الجنس شكل البكتيريا، مثل *Staphylococcus* و *Streptococcus*، أو اسم المكتشف مثل:*E. coli* أما بالنسبة للنوع، فيمكن أن يشير إلى المرض مثل (Cholerae) نوعه (Vibrio cholerae) ، أو

إلى مكان العزل مثل *E. coli* الذي يعزل فيUne Col ، أو قد يحمل صفات اللون مثل *Staphylococcus aureus* (aureus تعني ذهبي)[26].

III.5.3. تصنيف البكتيريا:[27][28][29]



الشكل III.4: مخطط يوضح تصنيف البكتيريا

III.6.3. البكتيريا المدروسة:

- ✓ *Escherichia coli*
- ✓ *Pseudomonas aerogenosa*
- ✓ *Staphylococcus aureus*

III.6.3.1. بكتيريا *Escherichia coli*:

هي بكتيريا متواجدة في الجهاز الهضمي للإنسان أو الفضلات الحيوانية،(G^-) عصوية الشكل ذات أبعاد من1µm الى 3µm، سالبة غرام(G^-)، تتكاثر بسرعة عند درجة حرارة 37°C تمتاز بأنها تنتج كمية CO_2 تساوي كمية الاكسجين والتي تؤدي الى تحميض اللبن، وبالتالي تخثره. وتسبب كذلك عدة أمراض، كأمراض الجهاز التنفسي، التهاب الزائدة الدودية، التهاب القلب، الإسهال الطفيلي، وتتسبب في ارتفاع شديد في درجة الحرارة عند انتشارها في الدم[4].

جدول III.1: تصنيف بكتيريا *E.coli* [30]

المملكة	**Bactérie**
التصنيف	*Proteobactérie*
القسم	*Gammaproteobacteria*
الرتبة	*Enterobacteriales*
العائلة	*Enterobacteriaceae*
النوع	*Escherichia*
الصنف	*Escherichia coli*

الشكل III.5: صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *E.coli*

III.2.6.3. بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*:

هذه البكتيريا من نوع(G^-) متحركة هوائية، وعبارة عن عصيات مستقيمة بأسواط طرفية، وتصنف من أقوى أنواع البكتيريا المقاومة طبيعيا لمعظم المضادات الحيوية، لانها تمتلك القدرة على التصدي لهذه المضادات بعدة طرق، مصدرها الجهاز الهضمي للإنسان، الماء أو التربة، تعمل هذه البكتيريا على الإتلاف السطحي للأغذية المبردة ومحللة للدهون الموجودة في اللبن مما يؤدي إلى تغير لونه وطعمه، كما ترتبط هذه البكتيريا بحالات العدوى المكتسبة في المستشفيات خصوصا في غرف العمليات الجراحية، وهي أيضا تنمو في نطاق حراري واسع ما بين 34° الى 43° ويبلغ عرضها 0.5 µm الى1µm اما طولها ما بين 1.5µm الى4µm، تعتبر ممرضة للإنسان والحيوان حيث تسبب تعفن كل من العين والحروق والجروح كما تسبب أمراض الرئتين والسحايا[4].

جدول III.2: تصنيف بكتيريا *P. aeuginosa*[30]

المملكة	Bactérie
التصنيف	*Pseudomonabactéries*
القسم	*Gammaproteobacteria*
الرتبة	*Enterobacteriales*
العائلة	*Enterobacteriaceae*
النوع	*Pseudomonas*
الصنف	*Pseudomonas aeruginosa*

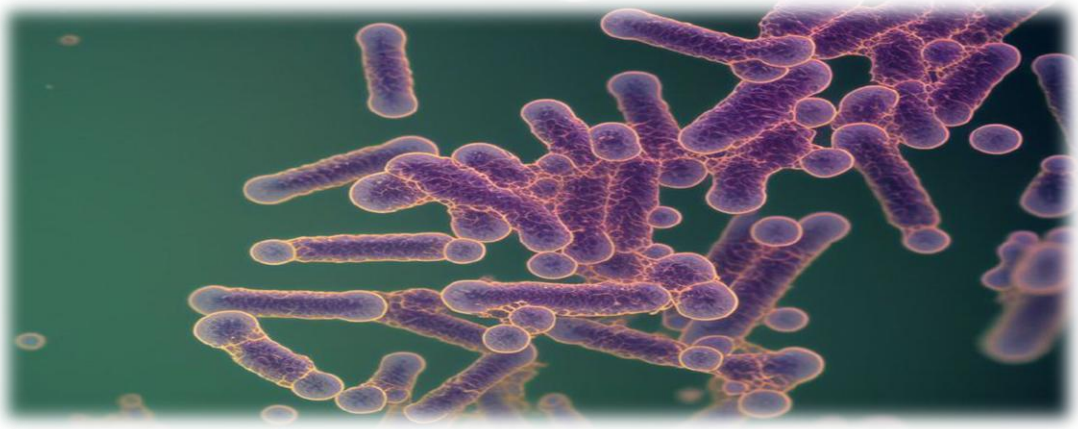
الشكل III.6: صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *P.aeruginosa*

3.6.3.III. بكتيريا *Bacillus subtilis*:

هي بكتيريا موجبة الغرام(G^+)، تتواجد عادة في التربة والنبات وتنمو بالهواء المضغوط عند درجات حرارة وحموضة متوسطة، تمتلك القدرة على افراز كميات كبيرة من البروتين، وخاصة الانزيمات المائية مثل: الاميلاز، والبروتياز، وغالبا ما يشار الى هذه البكتيريا انها بكتيريا غير مسببة للامراض، ويستهلكها الانسان بكميات كبيرة في طعام النانو الياباني. بالاضافة الى ذلك، تم توثيق الاثار السريرية لها كعامل منبه للمناعة في مجموعة متنوعة من الامراض وكعامل مسبب للتخثر في المخبر[30].

جدول III.3: تصنيف بكتيريا *B.subtilis*[31]

المملكة	Bactérie
التصنيف	*Firmicutes*
القسم	*Bacillus*
الرتبة	*Bacillales*
العائلة	*Bacillaceae*
الجنس	*Dèlicate*



الشكل III.7: صورة بالمجهر الالكتروني لبكتيريا *B.subtilis*

❖ المراجع باللغة العربية:

[1] بن طبة فطيمة الزهرة، تأثير أطوار النضج على المركبات الفينولية والفعالية المضادة للأكسدة والجذور الحرة لبعض أصناف النخيل المثمرة (Phoenix dactylifera L) ، رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة،2021.

[4] زيدان محمد، دراسة الفاعلية المضادة للأكسدة والبكتيريا لمستخلصات الرمان punica granatum L، رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة،2018.

[5] د. ريدة أبو سمرة. الجذور الحرة، جملة مضادات المؤكسدات وداء التهاب المفاصل الرثياني، مجلة جامعة دمشق المجلد 15 العدد2، 1999.

[8] بن ساسي شيماء، تقييم الفعالية المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للمركبات الفينولية لبعض أصناف التمور من منطقة وادي ريغ بطرق مختلفة، رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2018، ص21-22.

[9] جاسم محمد. مضادات الأكسدة. الطبعة الأولى. دار المستقبل للنشر والتوزيع: عمان،2013، ص13.

[10] خضرة عزري، دراسة الليبيدات والفينولات في بعض أنواع التمر المحلي، مذكرة ماجستير، جامعة قاصدي مرباح ورقلة،2013 ، ص54.

[14] شربي رقية، دراسة النشاط المضاد للأكسدة لجزيئات الدهون والمركبات الفينولية لأوراق وبذور نبات Lawsonia inermis من الجزائر، رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2017.

[19] بوبلوطة.ح، النشاط المضاد للتأكسد وإمكانية وقاية المستخلص الميثانولي لنبتتي Centaurea Incana و Matricaria Peubescens على السمية الكبدية، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة، 2009، ص 125.

[24] ج، محمود."مبادئ علم الاحياء المجهرية محاضرة رقم 2" جامعة الانبار قسم التربة والموارد المائية.

[25] س، غازي. "علم الاحياء المجهرية محاضرة رقم1" قسم علوم الاغذية.

[31] بالاعور ابتسام، مساهمة في الدراسة الفيتوكيميائية وتقييم الفعالية البيولوجية والفعالية المضادة للتاكل لمستخلصات نبات Senecio hoggariensis Batt.&Trab، رسالة الدكتوراه، جامعة قاصدي مرباح– ورقلة، 2020.

❖ المراجع باللغة الأجنبية:

[2] GOUDABLE.J, FAVIER.A, Radicaux libers oxygénes et antioxydants. Nurition clinique et metabolisme, 1997.11(2):P.115-120.

[3] NAGMOTI. D.M, KHATRI. D.K, JUVEKAR. P.R, JUVEKAR. A.R, Antioxidant activity free radical scavenging potential of Pithecellobium dulce Benth seed extracts. Free Radicals and Antioxidants, 2012.2(2) :p.37-43.

[6] FAVIER. A, Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique Review. l'actualite chimique, nouvembre 2003,p:108-115.

[7] SOHAL.R, ALLEN.R, and NATION. C, Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. Journal of free radicals in biology & medicine, 1986.2(3):p.175-181.

[11] BIRBEN.E,SAHINER.U.M,SACKESEN. C,ERZURUM.S,& KALAYCI.O, Oxidative stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organization Journal,2012. 5(1),p:9-19.

[12] ABADI. A, Extraction, composition,propriétés anti oxydantes et l'activité biologique de l'huile essentielle de Ruta graviolens L, Brocchia cinera collectèe dans les régions saharienne, Thése Doctorat, Université Kasdi Merbah: Ourgla, 2019,p27.

[13] GODSWILL. N. A, KAYODE.O.O, comparative Antioxidant, Phytochemical and Proximate Analysis of Aqueous and Methanolic Extracts of Vernonia amygdalina and Talinum triangulare,Pakistan Journal of Nutrition,2010.9(3):p,259-264.

[15] IONITA. P, Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?,Chem.Pap.59(1):11-16,2005.
[16] LISU.W,JUI-HUNG. Y,HSIAO-LING.L, et WU.M.J, Antioxidant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (Nelumbo nucifera Gertn). J.food Drug Anal,2003.11(1): p,60-66.
[17] EPSTEIN.S, SAPOROSCHETZ. I.B, KATSIOULES.C, BISHOP.Y, Bioassay for Antioxidants Based on Protection of Isolated Rat Liver Mitochondria Against the Photodynamic Toxicity of Benzo[a]pyrene. Food and Cosmetics toxicology, 1971. 9(3): p. 367-377.
[18]EBRAHIMZADEH.M.A,NABAVI.S.M,NABAVI.S.F, BAHRAMIAN.F, BEKHRADNIA.A.R, Antioxidant and free radical scavenging activity of H. officinalis L. var. angustifolius, V. odorata, B. hyrcana and C. speciosum. Pak J Pharm Sci, 2010. 23(1): p. 29-34.

[20] NEWKIRK.K.A, GILCHRIST.L, HAND.L.W, SUTTON. D.S, Effects of Synthetic Antioxidants and Rosemary Extracts on Oxidative Rancidity and Color Stability in whole hog Sausage.Animal Science, 1993:p.78-83.
[21] FRITSCHE. K, MCGUIRE.S, The use of dietary synthetic antioxidants at recommended levels does not alter rat immune cell eicosanoid production or hepatic vitamin E concentration. Nutrition Research, 1997. 17(8): p. 1311-1319.
[22] GISLENE. G. F. N, LOCATELLI. J, FREITAS. P.C, SILVA.G.L, Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. Environmental and Soil Microbiology. Braz. J. Microbiol, 2000.31(4).
[23] STEWARD. K.Phd, An Introduction to culturing Bacteria. Technology Network.Immunology& Microbiologi, 2021.
[26] J.P.Euzeby: Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale, à l'usage des étudiants de l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse Courriel CV SBSV Peseudomonas.
[27] COURVALIN.P, Interpretive reading of antimicrobial susceptibility tests. Molecular analysis and therapeutic interpretation of in vitro tests to improve antibiotic therapy. ASM American Society for Microbiology News, 1992. 58(7): p. 368-375.

[28] JORGENSEN. J. H, FERRARO. M. J, Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases, 1998: p. 973-980.

[29] SABINE. R.D, Antibiotiques et antibiogrammes, Décaire Vigot1995: Montréal, Paris: p. 322.

[30] Université Pierre et Marie Curie, Bactériologie, DCEM1, 2002 – 2003.

الجزء العملي

الفصل الرابع:

الطرق والوسائل

تم إنجاز هذا العمل على مستوى مخبر الكيمياء التطبيقية والبيئة بجامعة الشهيد حمه لخضر، وبالنسبة للجزء الخاص بالفعالية المضادة للبكتيريا تم إنجازه بمخبر المجد للتحاليل الطبية بولاية الوادي.

1.IV. تحضير المادة النباتية المدروسة:

تم استعمال في هذه الدراسة نبات العلندة الهشة، والتي تم قطفها من ضواحي منطقة الوادي بتاريخ 2024/01/27، قمنا بفصل الجزء الهوائي عن الترابي وتقطيعه، ثم غسله بالماء المقطر لتنقيته من الشوائب والطفيليات والأتربة، تم تجفيف العينة باستخدام الفرن على درجة حرارة 60°C. ثم طحنها باستخدام جهاز الطحن الكهربائي.

الشكل 1.IV: النبات قبل الطحن

الشكل 2.IV: النبات بعد الطحن

2.IV. الأدوات والأجهزة والمواد المستعملة:

في هذه الدراسة قمنا بتحضير المستخلصات النباتية والتقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويدات، وكذلك الفعالية المضادة للأكسدة، بالإضافة إلى الفعالية المضادة للبكتيريا، إستخدمنا الأدوات والمحاليل والأجهزة التالية:

الجدول 1.IV: المواد والادوات المستعملة

الأدوات	الاجهزة	المواد والمحاليل
- بيشر (100,250,1000)ml - ملعقة - قمع - ورق ترشيح - مخبار مدرج (100، 50)ml - انابيب اختبار - حوجلة (1000)ml - قمع الفصل 500ml - دورق 250ml - قمع بيخنر - حامل - ماصة (5، 10)ml - إيرلنماير (500، 2000)ml - ماصة دقيقة Micropipette - ماصة باستور - حوض - وسط مولر-هينتون Mueller-Hinton culture media - أطباق بتري - ممسحة وعصا معقمة	- ميزان الكتروني حساس - جهاز رج وتسخين - جهاز طيف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية - الفرن - جهاز فولتامتري الحلقي - تركيب السوكسليت Soxhlet - جهاز المبخر الدوراني - ميزان عادي - جهاز pH - جهاز الطحن الكهربائي - موقد بنزن - جهاز تعقيم بالبخار Autoclave - حاضنة على درجة حرارة 37 درجة مئوية - ثلاجة - جهاز قياس كثافة عكارة VITEK® DENSICHEK® McFarland	- الماء المقطر - إيثانول (96%) - ميثانول - خلات الإيثيل - الهكسان(95%) - 1- بوتانول - حمض هيدروكلوريك HCl - هيدروكسيد الصوديوم NaOH - هيدروكسيد الامونيوم NH_4OH - كلوريد الألومنيوم الثلاثي $AlCl_3$ - كاشف الفولين Foline - الكرستين - حمض الغاليك - بيكربونات الصوديوم Na_2CO_3 - ديكلوروميثان CH_2Cl_2 - حمض الكبريت H_2SO_4 - كبريتات المغنيزيوم اللامائية $MgSO_4$ - حمض الستريك - ملح فوسفات ثنائي البوتاسيوم K_2HPO_4 - Bromo Cresol Green

IV.3. الاستخلاص:

IV.3.1. تعريف الاستخلاص:

يمكن تعريف الاستخلاص بأنه طريقة كيميائية من طرائق الفصل الكيميائي [1]، ويهدف الى معالجة خليط متجانس أو غير متجانس من السوائل أو المواد الصلبة، بواسطة مذيب نقي، لغرض استخراج مكون صلب أو سائل.

إذا كانت المادة المراد فصلها سائلة يطلق على هذا الإستخلاص، إستخلاص سائل_سائل، أما اذا المادة المراد فصلها صلبة فيطلق عليه بإستخلاص صلب_سائل [2].

IV.3.2. استخلاص صلب _سائل:

- ✓ **الإستخلاص على البارد (التنقيع):**

تعتمد هذه الطريقة على وضع المادة الخام داخل اناء يحتوي على كمية معينة من المذيب، بحيث حجم المذيب المستعمل يغطي المادة الجافة بنسبة قدرها (المذاب1/ المذيب3) في الظروف العادية (ضغط ودرجة حرارة الغرفة)، مع التحريك من حين لآخر تترك لمدة زمنية محددة، خلالها يتم انتقال المركبات المراد فصلها من المادة الجافة إلى المذيب، تليها عملية الترشيح، يتم استخدام طريقة النقع للمواد التي تتأثر وتتفكك بالحرارة[3].

IV.3.3. استخلاص سائل_سائل:

تعتمد عملية الاستخلاص سائل _ سائل على المذيبات كالهكسان لنزع الكلوروفيل والليبيدات، واكثر المذيبات استعمالا هي خلات الايثيل والبيتانول.

IV.3.4. طريقة استخلاص المركبات الفعالة المتبعة خلال التجربة:

1. استخلاص عديدات الفينول والفلافونويدات:

تمت عملية الاستخلاص كما يلي:

. تم وزن 100g من مسحوق النبتة ووضعها في ايرلنماير سعتها 2000 ml ونضيف لها حجم 600ml ايثانول و400ml ماء نتركها فوق جهاز الرج لمدة ساعة.يترك المنقوع لمدة 24h في درجة حرارة المخبر.

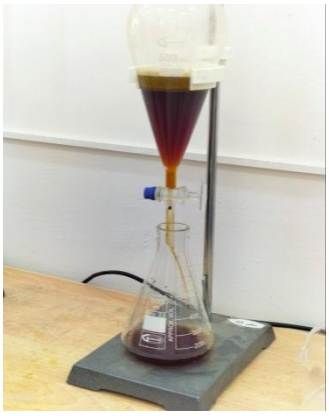
. نقوم بترشيح المستخلص بإستخدام ورق الترشيح والقطن مع الإحتفاظ بالرشاحة والراشح.

. تكرار نفس المراحل مرة اخرى للمسحوق النباتي.

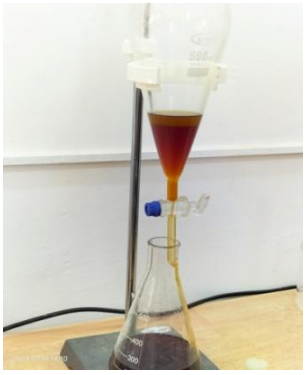
. جمعنا الرشاحة وقمنا بتركيزها بإستخدام الفرن.

✓ ثم نقوم بعملية الاستخلاص سائل _ سائل بإتباع المراحل التالية:

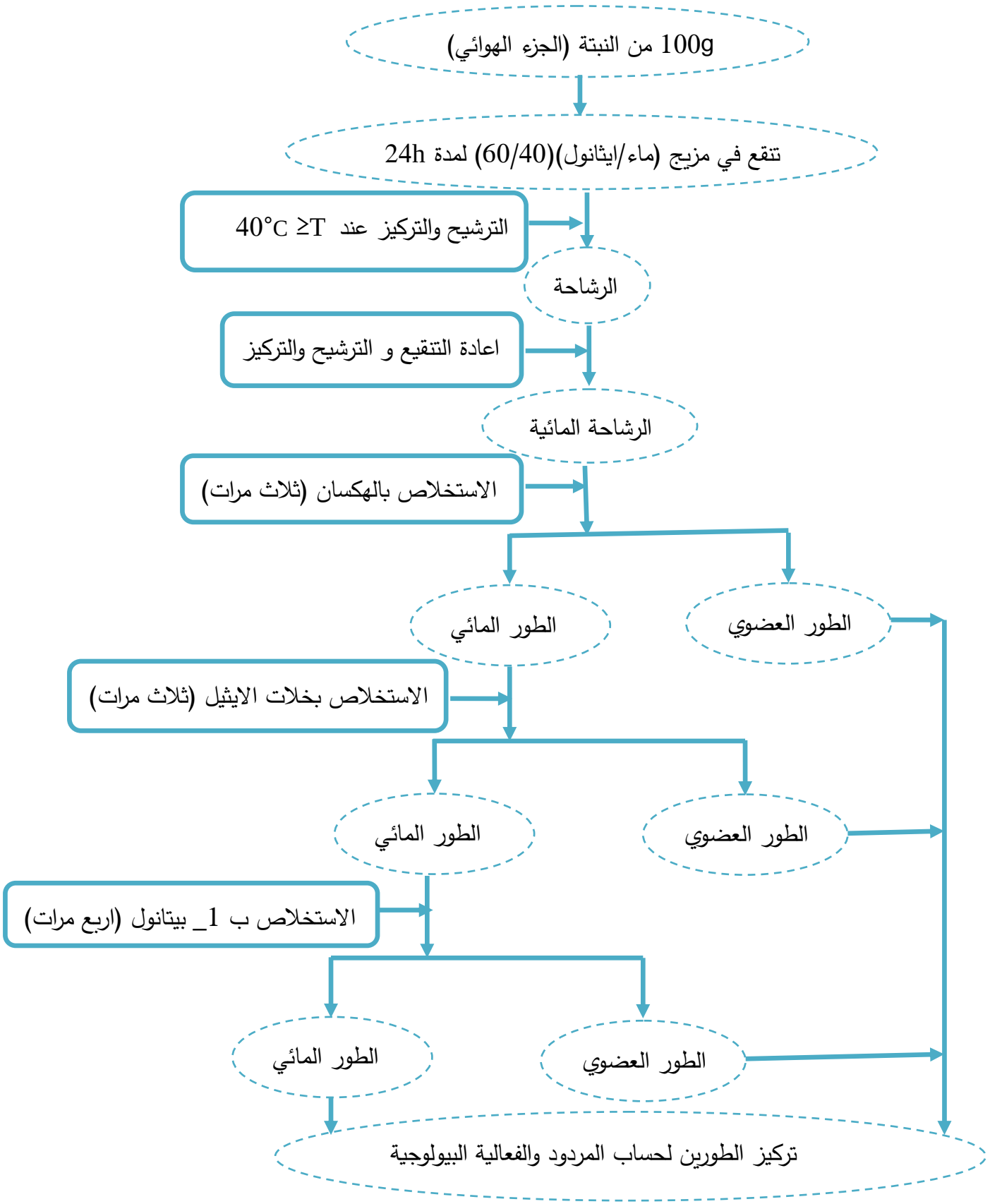
أولا: يعامل المستخلص المائي بالهكسان(3/1 من حجم المستخلص) مع الرج الخفيف، ويترك لمدة زمنية كافية، لغاية تشكل طورين عضوي ومائي، نفصل الطورين عن بعض،(تكرر العملية ثلاث مرات)، نجمع الطور العضوي ويركز بإستخدام جهاز المبخر الدوراني على درجة حرارة 30°C، يحفظ المستخلص في قنينة زجاجة ويوضع في مكان بارد.



ثانيا: نعامل الطور المائي بأسيتات الإيثيل (ثلاث مرات بنفس الطريقة السابقة)، لغاية تشكل طورين، بعدها نقوم بفصل الطور المائي و العضوي، تجمع الأطوار العضوية وتركز باستخدام جهاز المبخر الدوراني على درجة حرارة 30°C، يحفظ المستخلص في قنينة زجاجية ويوضع في مكان بارد.



ثالثا: نعامل الطور المائي بالبيتانول (أربع مرات بنفس الخطوات السابقة)، يترك لغاية تشكل طورين، نفصل الطور المائي والطور العضوي، يركز هذا الأخير باستخدام جهاز المبخر الدوراني على درجة حرارة لا تفوق 40°C، يحفظ المستخلص في قنينة زجاجية ويوضع في مكان بارد. كما يركز الطور المائي ويحفظ بنفس الطريقة.



الشكل 3.IV: مخطط يوضح طريقة الاستخلاص بواسطة الماء و الايثانول (60/40)

2. استخلاص القلويدات:

تمت عملية استخلاص القلويدات بإستخدام جهاز السوكسليت بالطريقة التالية [4]:

- يتم وزن كتلة 60g من مسحوق النبات الجاف ووضعها داخل حوض زجاجي .

- تنقع العينة في 100ml من هيدروكسيد الأمونيوم(5M) لمدة يوم كامل.

- يتم تركيب جهاز السوكسليت لبداية عملية الإستخلاص بإستخدام الديكلوروميثان CH_2Cl_2 كالتالي:

- بعد تنقيع العينة قسمت إلى قسمين، وضع قسم منها في ورق الترشيح داخل كبسولة السوكسليت .

- نملىء الدورق بحجم 300ml من المذيب ونفتح على الجهاز لمدة 12h.

- بنفس الطريقة يتم إستخلاص الكمية المتبقية.

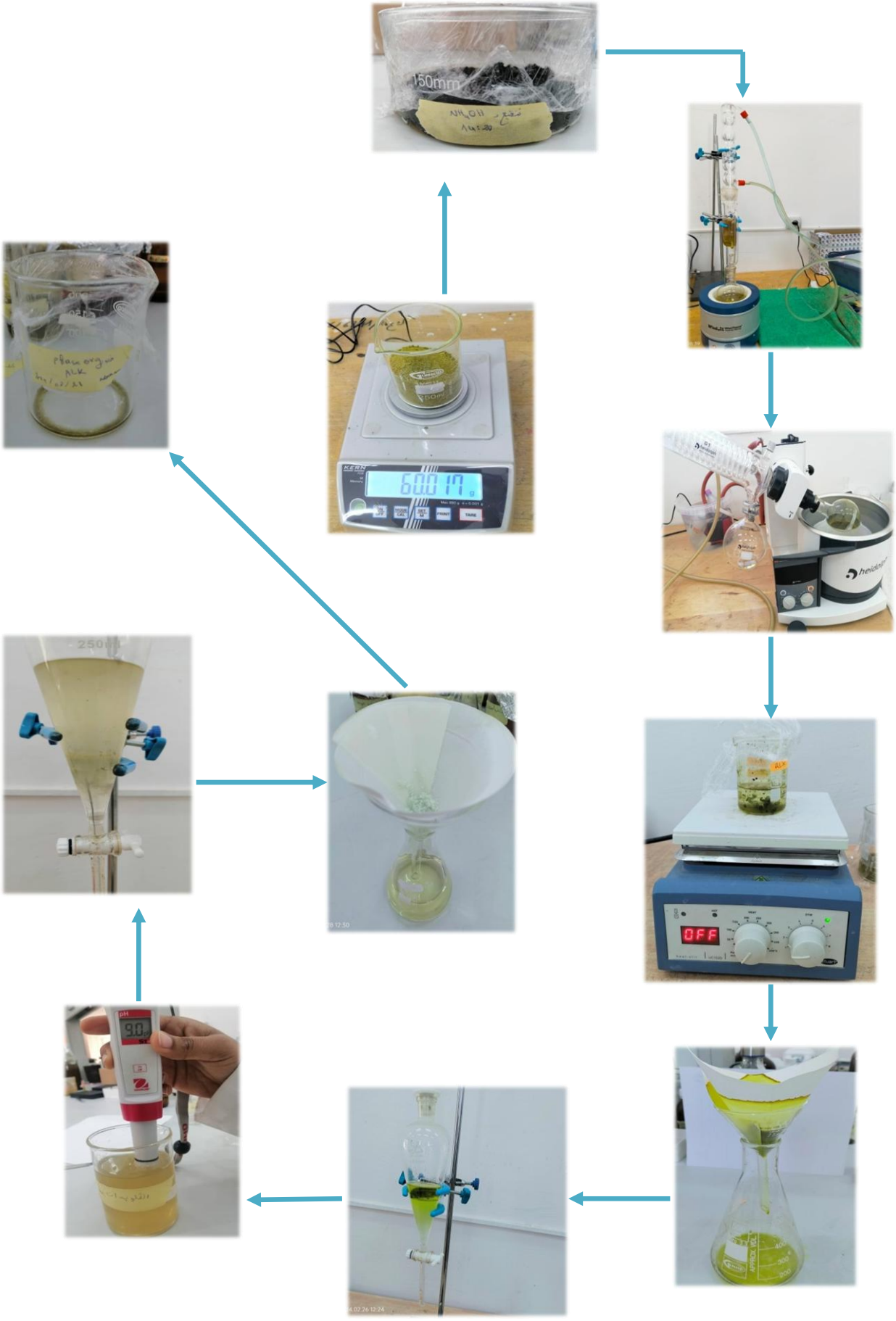
- يجمع المستخلص ويركز باستخدام جهاز المبخر الدوراني على درجة حرارة 40°C.

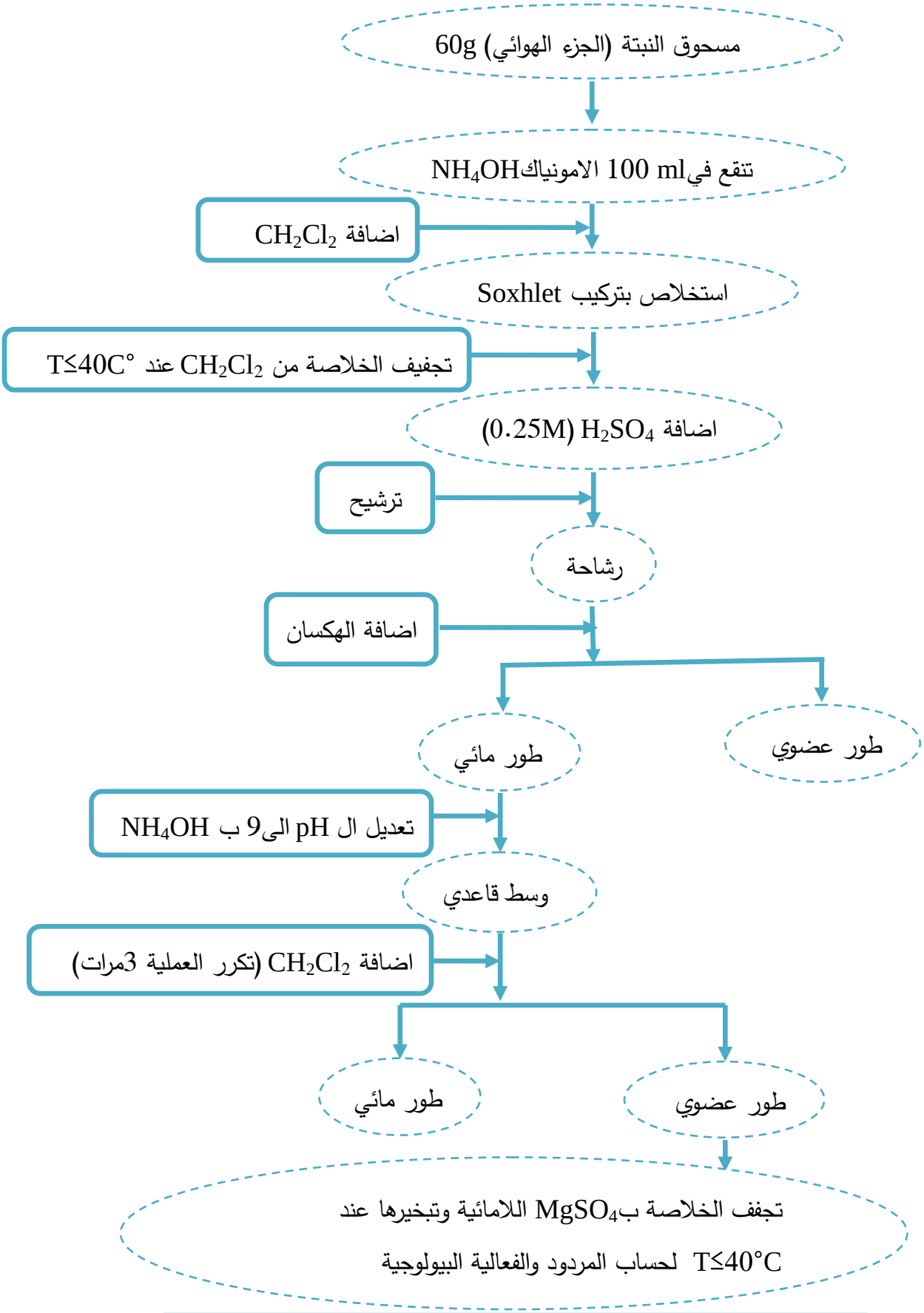
- يوضع المستخلص في بيشر ويعامل بحمض H_2SO_4 (0.25M) مع الرج لمدة 20h ثم نقوم بترشيحه.

- يوضع الراشح في قمع الفصل ونضيف 30ml من الهكسان مع الرج الخفيف، يترك مدة كافية لغاية تشكل طورين (تكرر العملية مرتين)، نفصل الطور المائي المحتوي على الحمض ونقوم بتعديل pH إلى 9 باستخدام الأمونيا(5M).

- نعامل الطور المائي بالديكلوروميثان لإستخلاص القلويدات ثم نقوم بفصل الطور العضوي عن الطور المائي (تكرر العملية ثلاث مرات)، نجمع الأطوار العضوية الثلاثة ونضيف لها 2g من $MgSO_4$ اللامائية للتجفيف.

- نقوم بعملية الترشيح ونركز الراشح باستخدام الفرن على درجة حرارة 40°C .


150mm
60.017 g
OFF



الشكل 4.IV: مخطط يوضح طريقة استخلاص القلويدات بتركيب Soxhlet

5.3.IV. مردود الإستخلاص:

لحساب مردود الاستخلاص نستخدم العلاقة التالية:

$$R\% = (m/m_0)*100$$

حيث أن:

m: كتلة المستخلص(g).

m_0: كتلة النبتة الجافة(g).

R: مردود الاستخلاص.

4.IV. التقدير الكمي للمركبات الفينولية والفلافونيدية والقلويدية للمستخلصات بواسطة جهاز مطيافية الاشعة فوق البنفسجية– المرئية UV- Visible:

1.4.IV. مطيافية الاشعة فوق البنفسجية– المرئية UV- visible:

تعد هذه التقنية من أقدم الطرق للتحليل الكيفي والكمي والأكثر إستعمالا، تساعد في تحديد البنى الكيميائية للمركبات، ومن أهم طرق التقدير الكمي، طريقة قياس الإمتصاصية (الكثافة الضوئية) للمحاليل، حيث مجال طولها الموجي محصور بين 400_ 800 نانومتر. يتكون هذا الجهاز من قسمين هما: المصدر الضوئي لأي طول موجي محدد، ومقياس الكثافة الضوئية، حيث يتم وضع العينة المراد قياس إمتصاصيتها داخل أنبوب يسمح بمرور الضوء، وبالتالي فإن كمية الضوء المار خلال العينة يعبر عنه بالإمتصاصية[5][6].

2.4.IV. التقدير الكمي للمركبات الفينولية:

تقدر الفينولات بطريقة (Singleton Rossi) بمساعدة كاشف الفولين Folin- ciocalteai ، حيث أن هذا الكاشف يتكون من حمض فوسفوتنغستينيك($H_3PW_{12}O_{40}$) وحمض فوسفومولييبيديك ($H_3PMo_{12}O_{40}$)الذي يرجع بواسطة الفينولات إلى أكاسيد التنغستين(WO_3) والموليبدين (MoO_3)

ذات اللون الأزرق[7].

يتم تقدير المركبات الفينولية كميا بواسطة جهاز طيف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV- Vis) بإستعمال حمض الغاليك كفينول مرجعي عند الطول الموجي λ_{max}=756 nm .

❖ **تحضير المنحنى العياري:**

نقوم بتحضير محاليل ممددة من حمض الغاليك تتراوح تراكيزها مابين0.3mg/ml و0.03mg/ml في أنابيب إختبار، ثم نأخذ من كل محلول 0.1ml ونضيف له 0.5ml من كاشف الفولين(الممددة 10 مرات) ثم نضعها في الظلام لمدة 5 دقائق، بعدها نضيف لها0.4ml من محلول كربونات الصوديوم (Na_2CO_3 %7.5)، نرج الانابيب ليتجانس المحلول جيدا، ونضع المحاليل في الظلام لمدة 30 دقيقة.

تتم بعد ذلك قراءة الامتصاصية الضوئية لكل تركيز بجهاز بواسطة جهاز المطيافية الضوئية عند طول موجة λ_{max}=756 nm، بعد ان يعدل صفر الجهاز بالشاهد.

❖ **تحضير العينات:**

نقوم بتحضير محلول ام من كل مستخلص ذو تركيز2mg/ml نقوم بتمديده بالماء لنتحصل على تركيزين هما 1mg/ml و0.5mg/ml اما مستخلص خلات الإيثيل فجهزنا تركيزين هما 0.25mg/ml و 0.125mg/ml ونعاملهم مثل ما عاملنا المحلول القياسي. نقوم بعدها بحساب كمية المركبات الفينولية الكلية الموجودة في المستخلصات بالنسبة لحمض الغاليك ويعبر عنها بmg من حمض الغاليك المكافئ لg من المستخلص (mg/g) نجد العلاقة الخطية التالية.

$$A=aC+b$$

3.4.IV. التقدير الكمي للفلافونيدات:

يعتمد في تقدير الفلافونيدات على قدرة تكوين المعقد الأصفر بين ثلاثي كلور الألومنيوم ($AlCl_3$) مع مجموعة الهيدروكسيل (OH^-) الموجودة على الحلقات البنزينية للفلافونويدات، حيث

يتشكل معقد ثابت بين مجموعة الكربونيل وهيدروكسي في الموقع5 و3، كما يشكل معقدات غير ثابتة مع مجموعتي أورثو هيدروكسي، ذو معامل امتصاص عال [8].

تقدر كمية الفلافونويدات بواسطة جهاز طيف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية(UV-Vis) باستخدام الكريستين كمحلول قياسي.

❖ **تحضير المنحنى القياسي:**

نحضر محاليل للكريستين ذات تراكيز محصورة بين (0.002-0.1) ملغ/مل، نأخذ من المحاليل حجما قدره 0.5 مل ونضيف لها 0.5 مل من ثلاثي كلوريد الألومنيوم $AlCl_3$ ذو التركيز2% مع الرج، وتترك في الظلام لمدة 30 دقيقة.

تتم قراءة الإمتصاصية بواسطة جهاز UV-Vis عند طول موجة λ_{max}=420 nm، بعد تعديل صفر الجهاز بإستخدام الإيثانول.

❖ **تحضير العينات:**

نحضر محلول أم من المستخلصات ذو تركيز 2mg/ml ثم نمدد للحصول على تركيز 1mg/ml و0.5mg/ml من كل مستخلص بإستثناء مستخلص خلات الإيثيل نمدد للحصول على تركيز 0.25mg/ml و 0.125mg/ml، نأخذ من كل مستخلص حجم 0.5ml ونضيف لها 0.5ml من ثلاثي كلوريد الألومنيوم نقوم برج الأنابيب في كل مرة، ثم يترك في الظلام لمدة 30دقيقة.

تتم قراءة الإمتصاصية بواسطة جهاز UV-Vis عند طول موجي يقدر بλ_{max}=420 nm.

IV.4.4. التقدير الكمي للقلويدات: [9]

قدرت كمية القلويدات بالإعتماد على طريقة(Dhumal jeevan وآخرون) مع بعض التعديلات وذلك باستخدام كاشف Bromo Cresol Green.

❖ **تحضير المحلول القياسي:**

نحضر محاليل للاتروبين ذات تراكيز محصورة بين mg/ml(0.1-1)، ناخذ من كل تركيز 1ml ونضعها في انبوب اختبار ونضيف لها 1ml من NaOH و1mlمن HCl و 2.5ml من كاشف BCG و2.5ml من المحلول الموقي و3ml من ديكلورو ميثان نقوم بعدها بالرج.

❖ **تحضير العينات:**

نقوم بوزن 5mg من كل مستخلص ونقوم باذابته في 5ml من HCl (2N) فنحصل على تركيز قدره1mg/ml، ناخذ من كل مستخلص 1ml في انبوب اختبار ونضيف لها 1ml من NaOH و1ml من HCl و2.5ml من كاشفBCG و2.5ml من المحلول الموقي مع 3ml من ديكلوروميثان نقوم بالرج قليلا فيتشكل معقد قلوي.

5.IV. تقدير الفعالية المضادة للأكسدة:

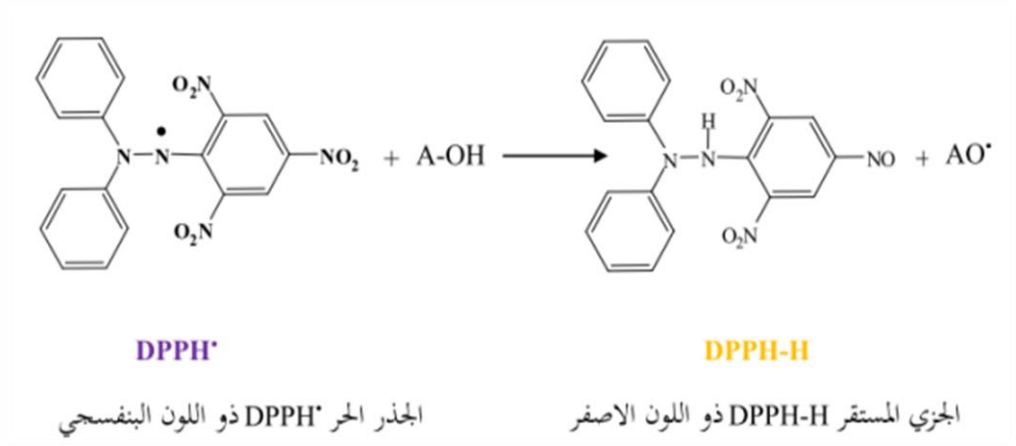
تمت تقدير الفعالية المضادة للأكسدة اعتمادا على الطرق الكيميائية المتمثلة في اختبار $DPPH^{\bullet}$، والطرق الكهروكيميائية باستخدام الفولطامتري الحلقي.

1.5.IV. اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$:

يعتمد هذا الإختبار على نسبة ارجاع الجذر $DPPH^{\bullet}$ في وجود مركب مضاد للأكسدة قادر على منح إلكترون أوجذر هيدروجيني، ويظهر ذلك من خلال التفاعل اللوني للجذر $DPPH^{\bullet}$ ذو اللون البنفسجي الداكن الذي يتحول الى جزيئة مستقرة DPPH-H وهي مادة صلبة غير جذرية لونها أصفر، ويتم قياس الإمتصاصية بواسطة جهاز UV-Vis عند الطول الموجي 517 nm، حيث يشير الإنخفاض في الإمتصاصية إلى كفاءة المستخلص على تثبيط الجذر الحر بعد مدة زمنية قدرها 30 دقيقة في وجود المستخلص المضاد للأكسدة، وتحدد قدرة مضادات الأكسدة بتحديد معامل جديد IC_{50} [10].

تعريف المقدارIC_{50} : يعرف على أنه كمية مضادات الأكسدة اللازمة لتثبيط 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ [10].

والشكل (5.IV) يوضح معادلة تثبيط جذر $DPPH^{\bullet}$ في وجود مضادات الجذور الحرة:



الشكل 5.IV: معادلة تثبيط جدر DPPH· في وجود مضادات الجذور الحرة

❖ **تحضير محلول DPPH· :**

– قمنا بتحضير محلول DPPH· وذلك بإذابة كتلة 4mg من DPPH· في 100ml من الميثانول، يوضع المحلول داخل حوجلة مغطات بورق الألومنيوم ثم توضع على جهاز الرج لمدة 30 دقيقة لغاية ذوبان DPPH· كليا.

– نقرأ الإمتصاصية لمحلول DPPH· بواسطة جهاز UV-Vis عند طول موجي 517 nm بعد تعديل صفر الجهاز بإستخدام الميثانول.

❖ **تحضير العينات:**

– قمنا بتحضير محلول أم ذو تركيز 1mg/ml من المستخلصات الثلاثة (المستخلص القلويدي، الأسيتات،البوتانول)، إنطلاقا من هذا التركيز قمنا بتمديد المستخلصات بواسطة الإيثانول للحصول على سلسلة من التراكيز mg/ml(0.1، 0.2 ، 0.4 ، 0.6 ، 0.8 ،1).

– نأخذ من كل تركيز من المستخلصات حجم 100 µl ونضيف لها حجم 900 µl من محلول DPPH· المحضر سابقا، ونتركها في الظلام لمدة 30 دقيقة.

– نقرأ إمتصاصية المستخلصات بواسطة جهاز UV-Vis عند طول موجة 517 nm.

❖ **حساب نسبة التثبيط للجذر الحر I%:**

يتم حساب النسبة المئوية لتثبيط الجذر الحر للمستخلصات النباتية وفق العلاقة التالية [11]:

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

حيث:

A_0: إمتصاصية الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$.

A: إمتصاصية العينة ($DPPH^{\bullet}$ + المستخلص) بعد 30 دقيقة.

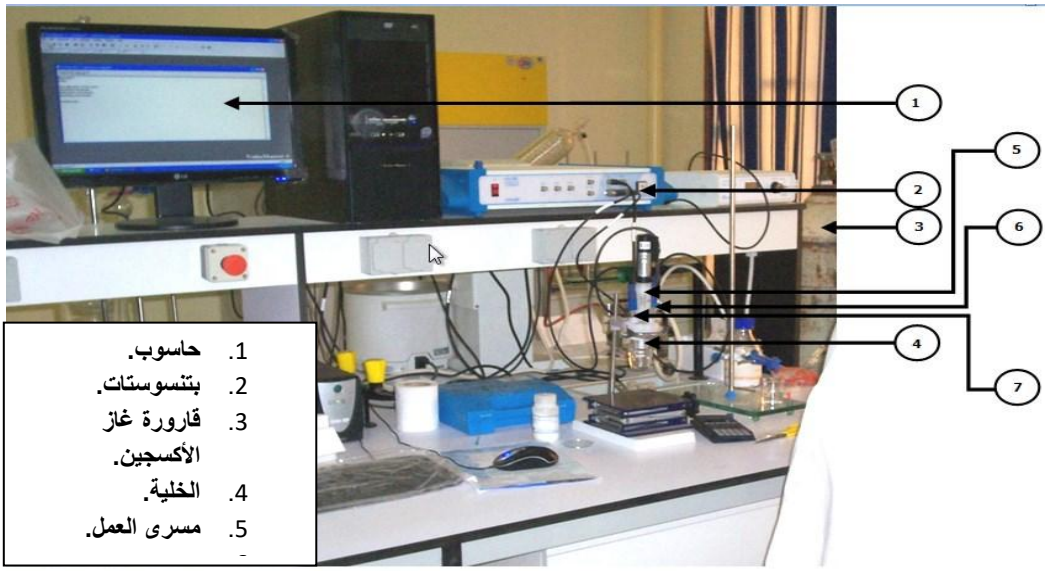
I%: نسبة تثبيط العامل المضاد للأكسدة للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$.

❖ **حساب تركيز التثبيط IC_{50}:**

يتم حساب IC_{50} بعد رسم المنحنى البياني للنسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز، وذلك بتعيين معادلة البيان وقيمة الميل، حيث يتم تعويض قيمة y ب50 واستخراج قيمة x التي تمثل IC_{50} [10].

2.5.IV. الطرق الكهروكيميائية (تقنية الفولطامتري الحلقي) لتقدير الفاعلية المضادة للأكسدة:

تعتبر طريقة الفولطامترية الحلقية من أهم طرق التحليل الكهروكيميائي، حيث استعملنا هذه التقنية لتقدير الفاعلية المضادة للأكسدة، وتم ذلك بإستخدام التركيب التجريبي الموضح في الشكل (6.IV)



الشكل 6.IV: التركيب التجريبي لجهاز (***Voltalab* 80**) وملحقاته

جهاز (VOLTALAP 80, 230 V) (PGZ 401 POTENTIOSTAT TYPE) .

صنع من طرف (Radiometer Analytical SAS) ، مرفق ببرنامج تشغيل (VoltaMaster 4).

المساري:

- **المسرى المرجعي:** هو إلكترود الكالومال المشبع بكلوريد البوتاسيوم (ECS).
- **المسرى المساعد:** له وظيفة وحيدة وهي إغلاق الدارة، وهو عبارة عن سلك من البلاتين(Ø=1mm).
- **مسرى العمل:** هو الإلكترود الذي تتم عليه تفاعلات الأكسدة والإرجاع ، وهو عبارة عن اسطوانة من الكربون الزجاجي (Ø=3mm).

IV.3.5. الاختبار الكهروكيميائي للقدرة المضادة للأكسدة:

✓ **تحضير العينات:**

– تم وزن 30 mg من كل مستخلص وإذابتها في حجم 10 ml من الإيثانول و5 ml من الماء نرج إلى غاية الذوبان.

– نضيف كتلة 0.11g من ملح كلوريد البوتاسيوم KCl.

– تم تحضير المحلول الشاهد وذلك بمزج 5 ml ماء و10 ml إيثانول وإضافة 0.11 g من KCl.

✓ **تحضير مسرى العمل:**

يعتبر مسرى العمل الركيزة الاساسية للدراسة الكهروكيميائية حيث تتم على سطحه عملية الاكسدة والارجاع، لذا وجب التأكد من خلو السطح من أي مادة تعمل على إعاقة عمليتا الاكسدة والارجاع، كوجود أكاسيد أو مادة مرجعة أو دهون من هنا كانت أهمية معالجة السطح وتنظيفه قبل أي عملية قياس.

معالجة السطح و تنظيفه تتم فيزيائيا بإستعمال اوراق كربيد السيلكون (4000) وكيميائيا باستعمال الاسيتون لازالة الدهون والماء المقطر لازالة الاملاح كما يجفف السطح من الماء لأنه يؤثر في القياسات، ويتم التأكد من نظافة السطح كهروكيميائيا.

- ✓ **الالكتروليت المساعد**:

نحضر تركيز 0.1M من ملح (KCl) ، يمزج مع العينات ونضعه في خلية العمل، نقوم بعملية الرج لمدة 5 دقائق وذلك لتجانس المحلول.

- ✓ **السلوك الكهروكيميائي للعينات:**

تطرقنا إلى دراسة السلوك الكهروكيميائي للعينات بواسطة الفولطامتري الحلقي في وسط كحولي/مائي، وفي وجود الملح بتركيز 0.1M وذلك على مسرى من الكربون الزجاجي (CV) ذا قطر 3mm (مسرى العمل) أما المسرى المرجعي فهو عبارة عن مسرى الكالومال (ECS) المشبع بـ KCl، قمنا بتحديد مجال الكهروفعالية لأكسدة وارجاع العينات، حيث حدد المجال من (0 إلى 1000 mV) في الجهة المهبطية، سرعة المسح 100 *mv/s*.

تم دراسة حمض الاسكوربيك كمضاد أكسدة مرجعي للمقارنة به.

- تم تجهيز الخلية و ضبط الشروط وفق الخطوات المبينة أعلاه.
- تم تحضير محاليل مختلفة التركيز من المركب.
- يتم حقن المحاليل في الخلية الكهروكيميائية بتراكيز متصاعدة.
- رسم المنحنيات الفولتامترية بعدة تكرارات للتأكد من أستقراريته.

IV.6. النشاط المضاد للبكتيريا:

تمت هذه الدراسة على مستوى مخبر المجد للتحاليل الطبية بولاية الوادي وذلك بتاريخ 06/05/2024، حيث تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات على ثلاث أنواع من البكتيريا.

IV.6.1. أنواع البكتيريا المختبرة:

تم الحصول على السلالات الثلاثة للبكتيريا من مخبر المجد للتحاليل الطبية وهي موضحة في الجدول التالي :

الجدول 2.IV: أنواع البكتيريا المستعملة

البكتيريا المستعملة	طبيعة الجدار الخلوي
Escherichia coli ATCC 25922	سالبة الغرام
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	سالبة الغرام
Bacillus subtilis ATCC 25973	موجبة الغرام

2.6.IV. خطوات العمل:

تم الاعتماد على طريقة الإنتشار في الأجار في تقدير النشاط المضاد للبكتيريا.

- ✓ قمنا بوزن 40 mg من المستخلصات الأربعة (الأسيتات، البيتانول، المائي، المستخلص القلويدي) وإذابتها في حجم 2ml من DMSO.
- ✓ تُغرس أطباق بتري المحتوية على أجار صابورة دكستروز المضاف إليه 2٪ جلوكوز (للخميرة) وأجار مولر–هينتون (للجراثيم) بشكل معقم بمعلق 10^6 cells/mL يتم الحصول عليه من مزرعة حديثة للخميرة أو البكتيريا على التوالي.
- ✓ بعد جفاف الأطباق، يتم ثقْب الآجار في الوسط باستخدام الجزء العلوي من ماصة باستير. تُعبأ التجاويف الناتجة بالمحلول المائي للمستخلص بتركيزات (5,10,15,20) mg/ml
- ✓ تحضن الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة للخميرة و 24 ساعة للبكتيريا.
- ✓ يشير الفعل المثبط إلى تكوين منطقة تثبيط حول الآبار. حيث يتم قراءة النتائج عن طريق قياس أقطار مناطق التثبيط. يعتبر المستحضر فعالًا إذا كان قطر منطقة التثبيط أكبر من 6مم [12][13].

❖ المراجع باللغة العربية:

[1] قريشي بثينة، دراسة مقارنة بين مختلف المستخلصات القطبية وغير القطبية لنبات قرع الكوسا Cucurbita pepo L، مذكرة ماستر، جامعة الشهيد حمه لخضر :الوادي، 2018.

[2] الأحمادي بشيرة، التقدير الكمي،الكيفي للمركبات الفينولية ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة والضد بكتيرية لمستخلصات ثمار نبات القناوية Aelmoxhus exulentus، مذكرة ماستر، جامعة الشهيد حمه لخضر: الوادي، 2017.

[4] زكري روضة، ساسوي رشيدة، تقييم قلويدات نبات الرتم النامي بضواحي الحجيرة– ورقلة، مذكرة ماستر، جامعة قاصدي مرباح: ورقلة،2019.

❖ المراجع باللغة الأجنبية:

[3] IQBAL. H, KHATTAK.M, RIAZ.U, ZIA. M, ,NAEEM. K, FARHAT. A.K, ZAHOOR.U, SAJJAD. H, Phytochemicals screening and antimicrobial activities of selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakisatan African Journal of Pharmacy and Pharmacology.2011, Vol.5(6).pp.746-750.

[5] ASADI. S, AHMADIANI. A, ALI ESMAEILI. A, SONBOLI. A, ANSARI. N, KHODAGHOLI. F, In vitro antioxidant activities and an inverstigation of neuroprotection by six Sabiria species from Iran: A comparative study. Food Chemical and Toxicology. 2010.

[6] JENCY. M.K,CHAIRMANB, ANTIA. R.J, SINGHC.J, VANMATHID.S, YvesAlain-Bekro.J.A, MAMYRBEKOVA.B, Boua.,Fézan, H., TRA B12., et Indumathy, A and Aruna.A, International Journal of pharmacy and Pharmaceutical Science.2013, 5(4),634-637.

[7] SAFFIDINE. K, Etude analytique et biologique des flavonoides extraits de Carthamus caeruleus L. et de Plantago major L. Thése Doctorat en sciences. Setif: université Ferhat Abbas, 2015.

[8] Heing-Helmut Perkampus. UV-VIS Spectroscpopy and its applications. Springer Laporatory, 1992.

[9] DHUMAL.J.S, CHAUDHARI. S.R, CHAVAN. M.J, Effect of different extraction conditions on total alkaloids.total phenolic and total flavonoid content of vigna mungo L hepper. Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2019,9(4), 89-91.

[10] TIGRINE. N, Activité antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe de Citrus limon et Citrus sinensis. Mémoire de magister, Université Abderrahmane Mira - Bejaïa, Algérie. 2016. p 25- 26.

[11] DZIRI. S, HASSENI. I, FATNASSI. S, MRABET. Y, CASABIANCA. H, HANCHI. B, HOSNI. K, Phenolic constituents antioxidant and anti microbial activities of rosy garlic (Allium roseum var. odoratissimum) SciVerse Science Direct journal of functional foods, 2012. (4).423-432.

[12] KIEHLBAUCH. J.A, et al, Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories. Journal of clinical microbiology, 2000. **38**(9): p. 3341-3348.

[13] BONEV. B, HOOPER.J, PARISOT.J, Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2008. 61(6): p. 1295-1301.

الفصل الخامس:

النتائج والمناقشة

V.1. مردود الاستخلاص:

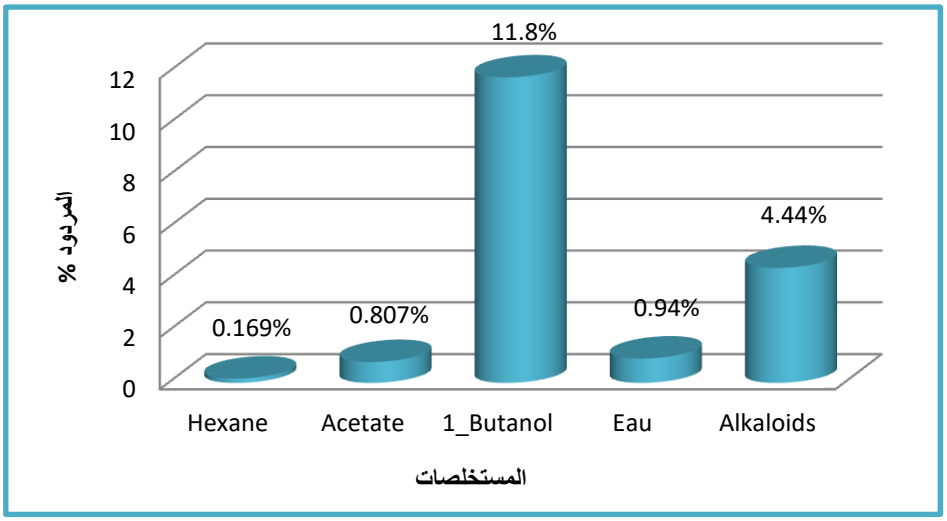
تحصلنا في تجربتنا على خمس مستخلصات: الهكسان، خلات الايثيل، 1- بوتانول، المائي، القلويدات.

$$R\%=(m/m_0)*100$$

بعد عملية الاستخلاص تحصلنا على النتائج التالية:

الجدول V.1: كمية المردود لمستخلصات نبات العلندة

Alkaloids	Eau	1-Butanol	Acetate	Hexane	
60	100	100	100	100	m_0
2.669	0.94	11.8	0.807	0.169	m
4.44	0.94	11.8	0.807	0.169	R%



الشكل V.1: أعمدة بيانية تمثل قيم مردود المستخلصات المستعملة للدراسة

❖ **النتائج والمناقشة:**

من خلال الجدول (1.V) والشكل (1.V) نلاحظ ان مردود مستخلص 1-بيتانول اكبر مردود، وذلك بنسبة 11.8%، يليه مردود مستخلص القلويدات بنسبة 4.44%، رغم ان الكتلة الابتدائية للنبة الجافة اقل من بقية المستخلصات، ونلاحظ كذلك تقارب مردود المستخلص المائي وخلات الإيثيل، حيث بلغ مردودهم 0.94% و0.807% على التوالي، اما مستخلص الهكسان فيعتبر المردود ضئيل جدا بنسبة 0.169% .

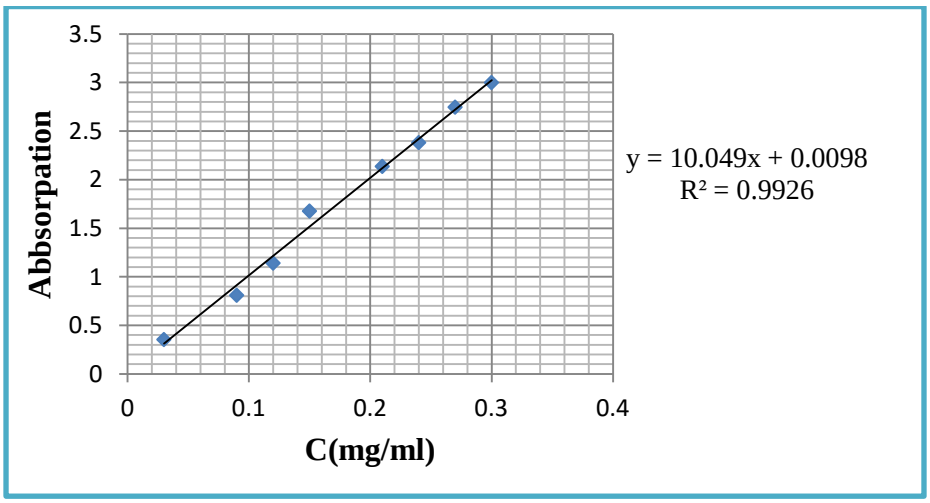
عند مقارنة قيمة مردود المستخلص القلويدي الذي تم الحصول عليه خلال تجربتنا بدراسة زكري روضة وآخرون (2019) نجد أن مردود القلويدات في نبات العلندة اكبر من مردود القلويدات الموجودة في أغصان نبات الرتم والمستخلصة كذلك بجهاز سوكسليت بنسبة 1.36% [1].

أما بالنسبة لمردود مستخلص 1- بيتانول تحصلنا على مردود أعلى بكثير مقارنة بدراسة قامت بها بلفار آسيا (2018) على نبات الزيتة من منطقة وادي سوف بنسبة% 2.133 [2].

2.V. التقدير الكمي للفينولات والفلافونويدات والقلويدات:

1.2.V. التقدير الكمي للفينولات:

تم تقدير كمية الفينولات الكلية للمستخلصات المدروسة بالاعتماد على طريقة كاشف (Folin_ciocalte).



الشكل 2.V: المنحنى العياري لحمض الغاليك لتقدير الفينولات للمستخلصات

معادلة المنحنى القياسي لحمض الغاليك هي:

$$y = 10,049x + 0,0098$$

$$Q=(X/C)*1000$$

حيث:

Q: تمثل كمية الفينولات (mg_{EAG}/g_{ext}) .

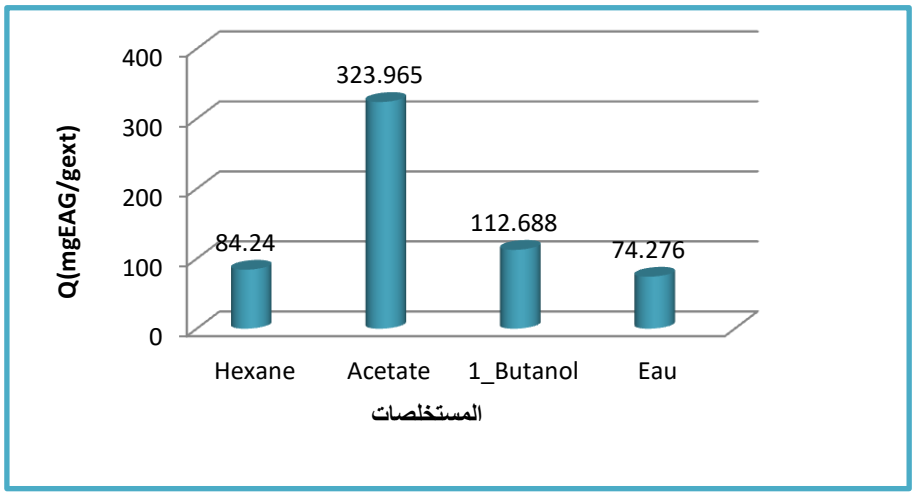
X: تمثل تركيز الفينولات (mg/ml) .

C: تمثل تركيز المستخلص (mg/ml).

فنتحصل على النتائج التالية:

الجدول V.2: قيم الامتصاصية و كمية وتركيز الفينولات للمستخلصات

المستخلصات	C(mg/ml)	A	X(mg/ml)	Q(mg_{EAG}/g_{ext})
الهكسان	1	0.826	0.084240	84.240
	0.5	0.3055	0.032842	65.685
الاسيتات	0.25	0.706	0.07239	289.562
	0.125	0.383	0.040495	323.965
1_بيتانول	1	0.971	0.098558	98.558
	0.5	0.5435	0.063444	112.688
المائي	1	0.7225	0.074019	74.019
	0.5	0.349	0.003713	74.276



الشكل 3.V: أعمدة بيانية تمثل التقدير الكمي للفينولات الموجودة في المستخلصات

❖ **النتائج والمناقشة:**

قدرت كمية المركبات الفينولية باستعمال المنحنى القياسي لحمض الغاليك كما في الشكل(2.V).

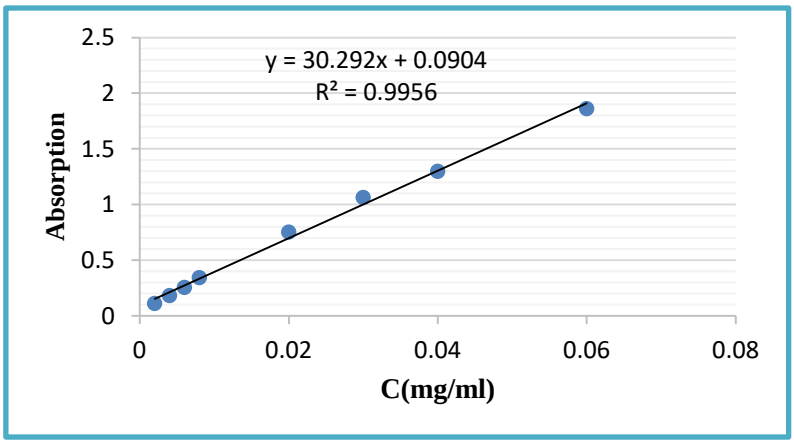
إذ حسبت كمية المركبات الفينولية بالميلي غرام على أساس حمض الغاليك المكافئ لغرام واحد من المستلخص(mg_{GAE}/g_{ext}).

من خلال الجدول(2.V) والشكل(3.V) نلاحظ ان: مستخلصات البيتانول وخلات الإيثيل تحتوي على كمية معتبرة من الفينولات، إذ وجدنا اعلى كمية للفينولات في مستخلص خلات الإيثيل والمقدرة ب $323.965mg_{GAE}/g_{ext}$، يليه مستخلص1- بيتانول بمقدار 112.688 mg_{GAE}/g_{ext}، يليه الهكسان بنسبة $84.24mg_{GAE}/g_{ext}$، وآخرهم المستخلص الماني بنسبة $74.276mg_{GAE}/g_{ext}$.

من خلال دراسة أجريت على نبات العلندة المجنحة الناشئة في منطقة ششار قامت بها شرفي شيماء (2019) تبين أن كمية الفينولات في المستخلص الميثانولي كانت أقل وذلك بنسبة $816.62\mu g_{GAE}/g_{ext}$ [3] مقارنة بنسبة الفينولات في مستخلص خلات الإيثيل المتحصل عليه خلال تجربتنا.ومنه نستنتج ان العلندة من نوع الهشة اغنى من العلندة من نوع المجنحة من حيث تواجد كمية الفينولات.

2.2.V. التقدير الكمي للفلافونويدات:

قدرت كمية الفلافونويدات للمستخلصات المدروسة بالإعتماد على طريقة كاشف كلوريد الألومنيوم الثلاثي $AlCl_3$.



الشكل 4.V: المنحنى العياري لحمض الكيرستين لتقدير الفلافونويدات للمستخلصات

معادلة المنحنى القياسي لحمض الكريستين هي:

$$Y = 30.292X + 0.0904$$

$$Q = \frac{X}{C} \times 1000$$

حيث:

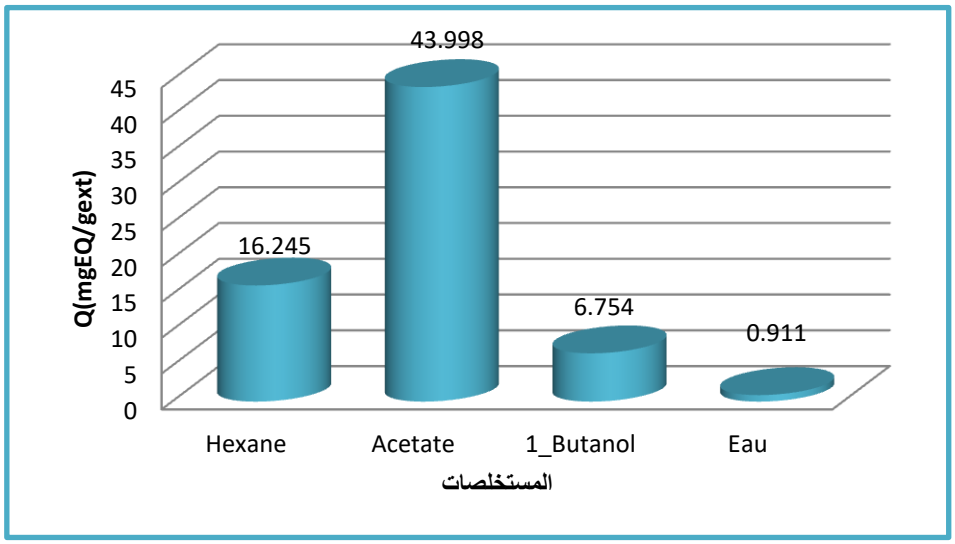
X: تمثل تركيز الفلافونويدات mg/ml.

C: تمثل تركيز المستخلص mg/ml .

Q: تمثل كمية الفلافونويدات mg_{EQ}/g_{ext} .

جدول 3.V : قيم الإمتصاصية وكمية الفلافونويدات للمستخلصات

المستخلص	C(mg/ml)	A	X(mg/ml)	$Q(mg_{EQ}/g_{ext})$
الهكسان	1	0.5825	0.016245	16.245
	0.5	0.312	0.007315	14.630
خلات الايثيل	0.25	0.4075	0.010468	41.872
	0.125	0.257	0.005499	43.998
1-بيتانول	1	0.295	0.006754	6.754
	0.5	0.167	0.002528	5.057
المائي	1	0.118	0.000911	0.911



الشكل 5.V: أعمدة بيانية تمثل التقدير الكمي للفلافونويدات الموجودة في المستخلصات

❖ **النتائج والمناقشة:**

قدرت كمية المركبات الفلافونويدية باستعمال المنحنى القياسي للكرستين كما في الشكل (3.V).

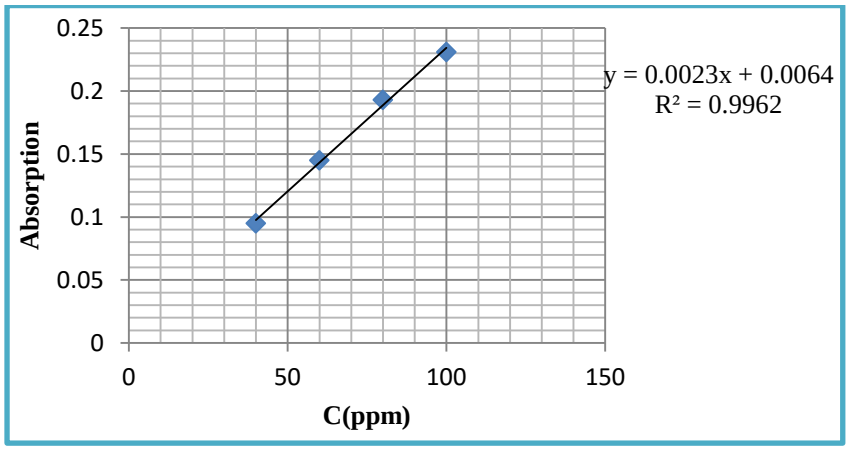
اذ حسبت كمية المركبات الفلافونويدية بالميلي غرام على أساس الكرستين المكافئ لغرام واحد من المستخلص (mg_{EQ}/g_{ext}).

من خلال الجدول(3.V) والشكل(4.V) نلاحظ ان مستخلص خلات الايثيل يحتوي على اعلى كمية للفلافونويدات بنسبة قدرها mg_{EQ}/g_{ext} 43.998 يليه مستخلص الهكسان بنسبة mg_{EQ}/g_{ext} 16.245 بعدها يأتي مستخلص 1_بيتانول والهكسان بنسب على التوالي $6.754mg_{EQ}/g_{ext}$ و $0.911\ mg_{EQ}/g_{ext}$.

بمقارنة هذه النتائج مع الدراسات السابقة التي أجريت على نبات العلندة الهشة من بينها دراسة Ismail Guenaou وآخرون (2021) الذين وجدوا أن مستخلص أسيتات الإيثيل يحتوي على كمية عالية من الفلافونويدات [4]، وهي متوافقة مع نتائجنا، مما تشير نتائجنا إلى أن أسيتات الإيثيل قد تكون المذيب المناسب لتركيز المزيد من المركبات الفلافونويدية.

3.2.V. التقدير الكمي للقلويدات:

تم تقدير كمية القلويدات الكلية للمستخلصات المدروسة بالاعتماد على طريقة Dhumal.j واخرون (معدلة) وذلك باستخدام كاشف Bromo Cresol Green و المحلول الموقي .



الشكل 6.V: المنحنى العياري للاتروبين لتقدير القلويدات للمستخلصات

معادلة المنحنى القياسي للاتروبين:

$$y = 0{,}0023x + 0{,}0064$$

$$Q=(X/C)*1000$$

حيث:

Q: تمثل كمية القلويدات (mg_{EA}/g_{ext}) .

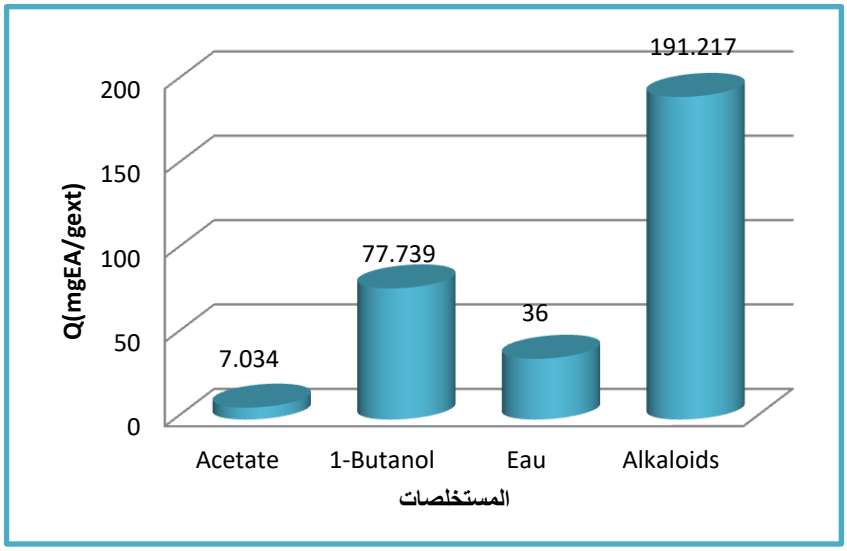
X: تمثل تركيز القلويدات (µg/ml) .

C: تمثل تركيز المستخلص (mg/ml).

فنتحصل على النتائج التالية:

الجدول 4.V: قيم الامتصاصية وكمية وتركيز القلويدات للمستخلصات

المستخلصات	C(mg/ml)	A	X(µg/ml)	$Q(mg_{EA}/g_{ext})$
الاسيتات	1/3	0.012	2.434782	7.304
1-بيتانول	1/3	0.066	25.913043	77.739
المائي	1/3	0.034	12	36
القلويدات	1/3	0.153	63.739130	191.217



الشكل 7.V: أعمدة بيانية تمثل التقدير الكمي للقلويدات الموجودة في المستخلصات

❖ **النتائج والمناقشة:**

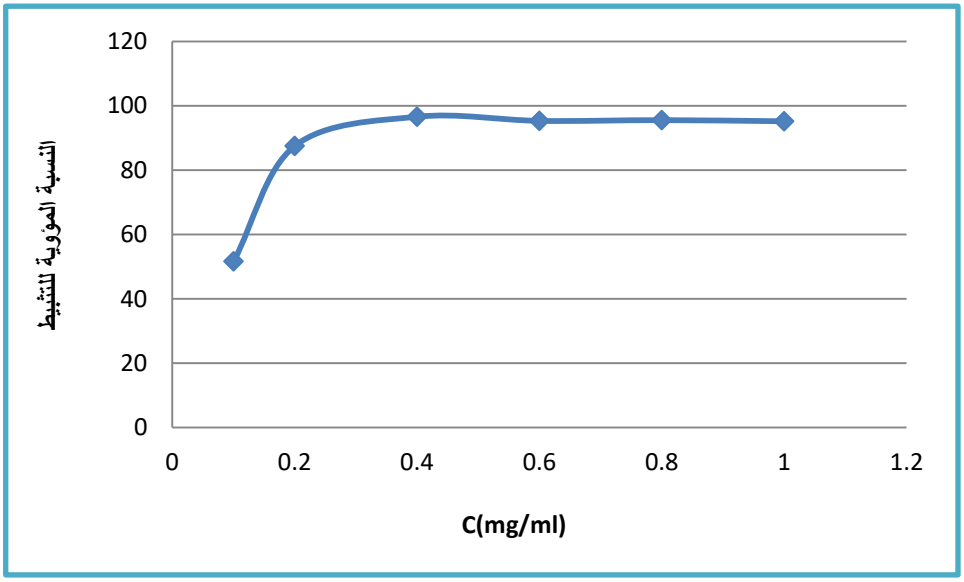
من خلال الشكل(6.V) هناك تباين في الاعمدة كما نلاحظ ان المستخلص القلويدي يحتوي على اعلى نسبة من القلويدات مقدارها 191.217 mg_{EA}/g_{ext}، يليه مستخلص1-بيوتانول بنسبة 77.739 mg_{EA}/g_{ext}، بعدها المستخلص المائي حيث بلغت نسبة القلويدات فيه 36 mg_{EA}/g_{ext}، واقل نسبة في المستخلص المائي بنسبة 7.739 mg_{EA}/g_{ext}.

من خلال دراسة أجريت على نبات العلندة الهشة قامت بها Saida Ibragic وآخرون أثبتت أن النبتة غنية بالقلويدات [5]، وهذا ماتؤكده نتائج تجربتنا.

3.V. تقدير الفعالية المضادة للاكسدة بالطريقة الكيميائية:

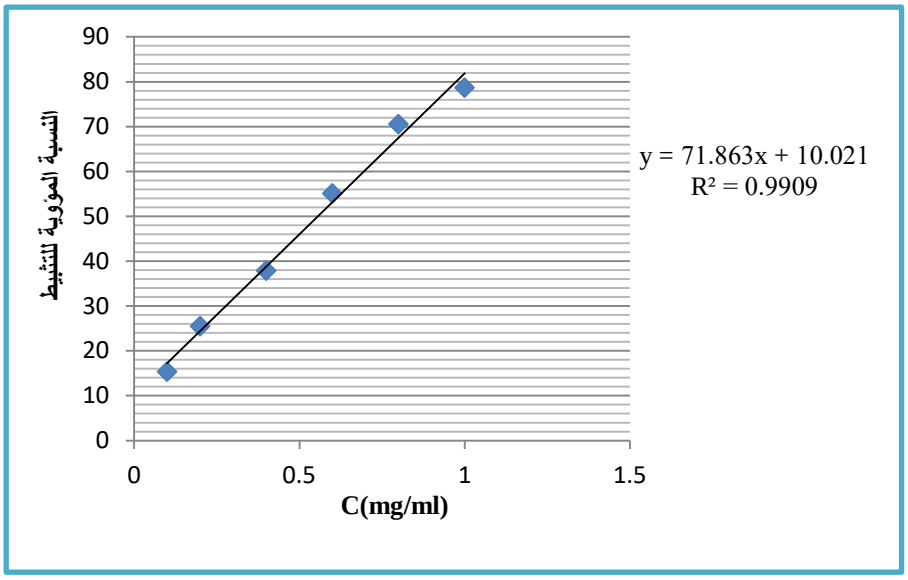
1.3.V. القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH˙ :

✓ **مستخلص خلات الإيثيل:**



الشكل 8.V: منحنى تثبيط الجذر الحر DPPH˙ بدلالة تراكيز مستخلص خلات الايثيل

✓ **مستخلص 1-بيتانول:**

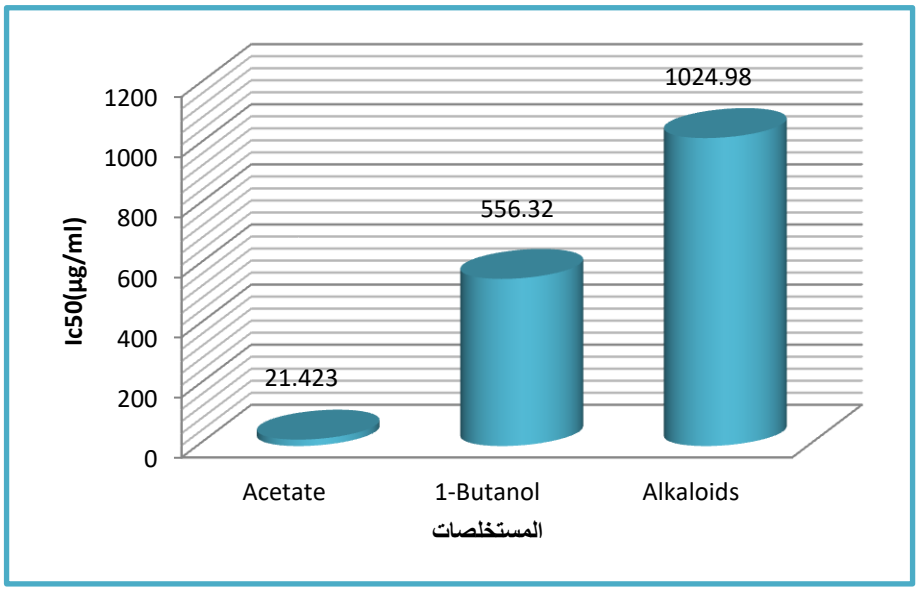


الشكل 9.V: منحنى تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ بدلالة تركيز مستخلص1-بيتانول

❖ **حساب IC_{50}:** من خلال المنحنيات السابقة نحسب قيمة IC_{50} للعينات علما ان القيمة الاقل لها تعني التاثير التثبيطي الافضل، وهي مبينة في الجدول(5.V):

الجدول 5.V: مقدار IC_{50} للمستخلصات

المستخلصات	خلات الايثيل	1-بيوتانول	القلويدات
IC_{50} (µg/ml)	21.423	556.32	أكبر من 1024.98



الشكل V.10: أعمدة بيانية تمثل قيم IC_{50} للمستخلصات

❖ **النتائج والمناقشة:**

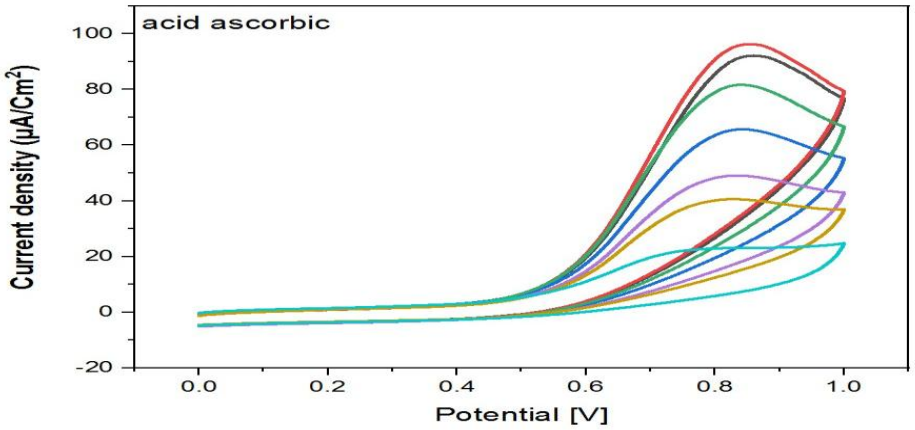
من خلال الشكل(V.10) أعلاه نلاحظ تباين في قيمIC_{50} المثبطة للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لكل من المستخلص القلويدي 1024.98 µg/ml ومستخلص خلات الايثيل 21.423µg/ml ومستخلص 1_بيتانول 556.32µg/ml. وبما ان قيمة IC_{50} الاقل لها التاثير التثبيطي الأفضل هذا يعني ان مستخلص خلات الايثيل لنبات العلندة الهشة اعطى اكثر فعالية في تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$.

تبين في دراسة قامت بها شبوعات إيمان(2024) على ثمار نبات السدر[6]، نجد أن قيمة IC_{50} التي تحصلت عليها في مستخلص خلات الإيثيل و1_بيتانول أكبر، أي اقل فعالية والتي قدرت ب 0.331 mg/ml و0.737 mg/ml على التوالي.

أما بالنسبة لمستخلص القلويدات قدرت قيمة IC_{50} ب1024.98 µg/ml اي انه ضعيف الفاعلية، وهذا ما تؤكده دراسات سابقة للقلويدات.

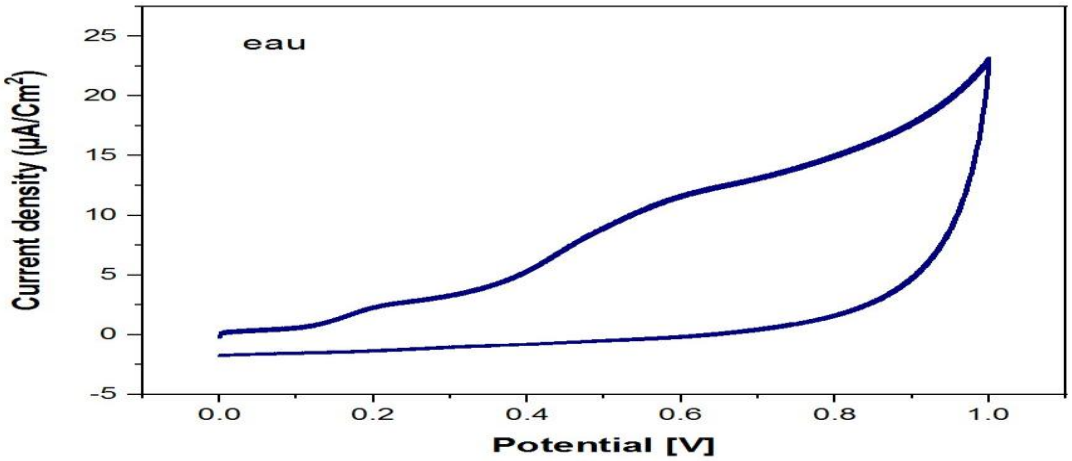
4.V. التقدير الإجمالي للقدرة المضادة للاكسدة بالطريقة الكهروكيميائية:

قمنا بتحديد الفعالية المضادة للاكسدة الكلية للمستخلصات. بالنسبة لحمض الاسكوربيك لذلك يجب رسم منحنى قياسي له.



الشكل11.V: المنحنى الفولطامتري الحلقي لتراكيز متزايدة لحمض الاسكوربيك في الشروط: قطب الكالومال ، C_{KCl}=0.1M، V [0_0.1mV]

✓ **المستخلص المائي:**



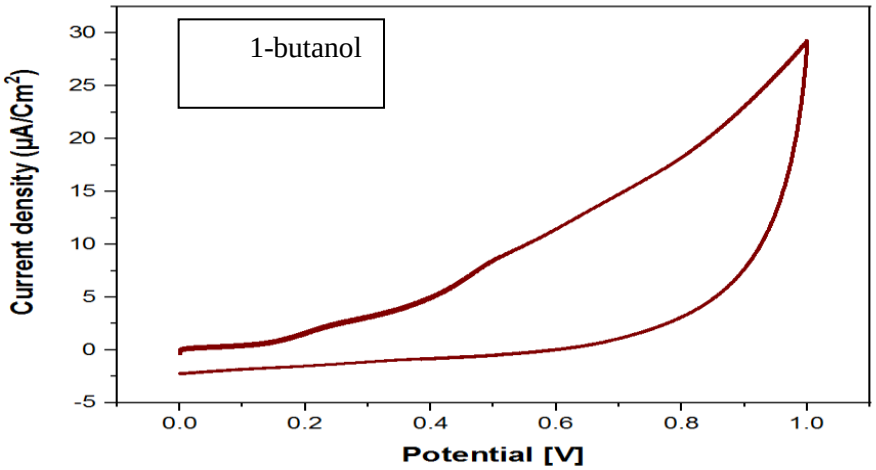
الشكل12.V: المنحنى الفولطامتري الحلقي للمستخلص المائي

في الشروط: قطب الكالومال ، C_{KCl}=0.1M، V [0_0.1mV]

نلاحظ من المنحنى وجود كمونين للاكسدة الأولى عند $Ve_1=0.21V$ كثافة تياره $Ia_1=2.6\mu A/cm^2$ و الثانية عند $Ve_2=0.65V$ كثافة تياره $Ia_2=12.5\mu A/cm^2$.

المركبات الموجودة في المستخلص المائي تتعرض فقط للاكسدة ولا يوجد ارجاع.

✓ **مستخلص1_بيتانول:**



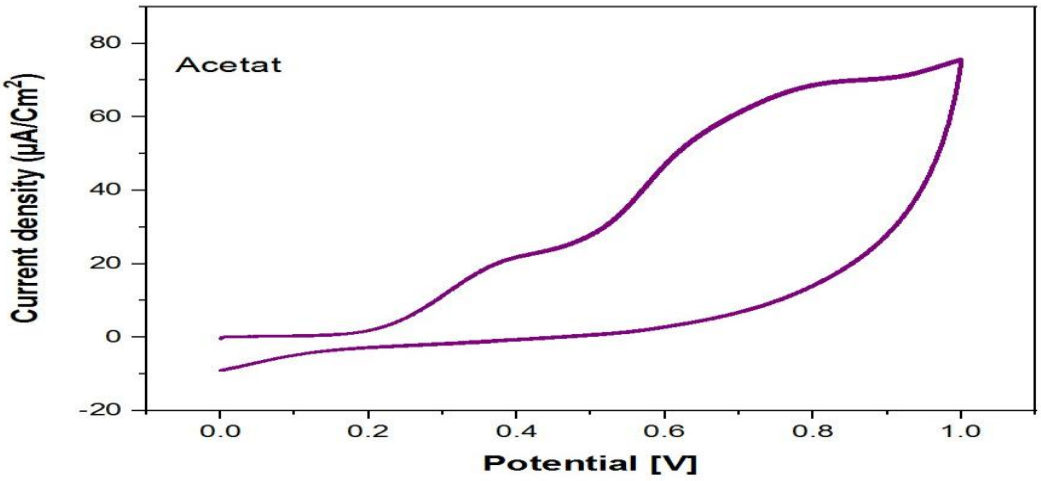
الشكل13.V: المنحنى الفولطامتري الحلقي لمستخلص 1_بيتانول

في الشروط: قطب الكالومال ، $C_{KCl}=0.1M$، V [0_0.1mV]

نلاحظ من المنحنى وجود كمونين اكسدة الأولى عند $Ve_1=0.21V$ كثافة تياره $Ia_1=2.6\mu A/cm^2$ والثانية عند$Ve_2=0.52V$ كثافة تياره $Ia_2=10\mu A/cm^2$.

المركبات الموجودة كذلك في مستخلص 1_بيتانول تتعرض للاكسدة مرتين ولا يحدث لها ارجاع.

✓ **مستخلص خلات الإيثيل:**



الشكل14.V: المنحنى الفولطامتري الحلقي لمستخلص خلات الإيثيل

في الشروط: قطب الكالومال ، C_{KCl}=0.1M، V [0_0.1mV]

نلاحظ من المنحنى وجود كمونين للاكسدة الأولى عند Ve_1=0.42V بلغت كثافة تياره Ia_1=21µA/cm^2 و الثانية عندVe_2=0.92V كثافة تيارهIa_2=70µA/cm^2.

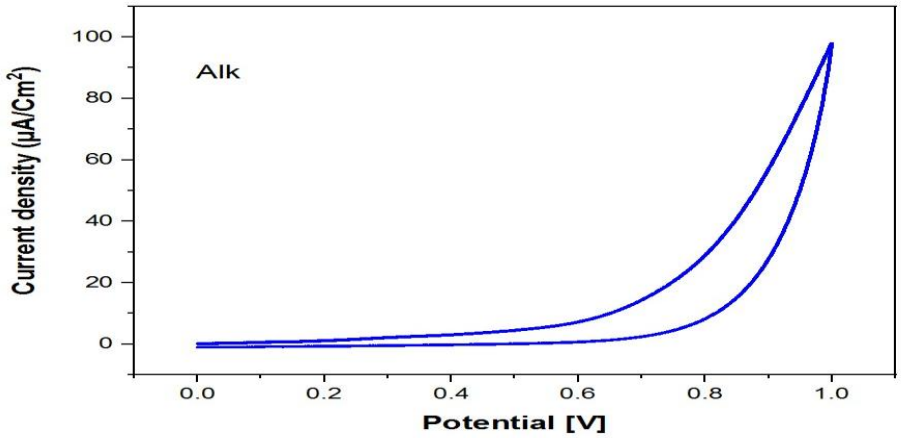
المركبات الموجودة كذلك في مستخلص خلات الايثيل تتعرض للاكسدة مرتين ولا يحدث لها ارجاع.

الاستنتاج

لدينا علاقة طردية مع شدة التيار والفاعلية المضادة للاكسدة فكلما زادت كثافة التيار زادت الفاعلية و العكس صحيح.

وحسب النتائج نلاحظ ان المستخلص المائي و 1_بيتانول لديهم كثافة تيار ضعيفة مقارنة مع مستخلص خلات الايثيل وهذا ما يتوافق مع دراسة الجذر الحر DPPH$^•$.يعني ان مستخلص خلات الايثيل لديه افضل فعالية مضادة للاكسدة.

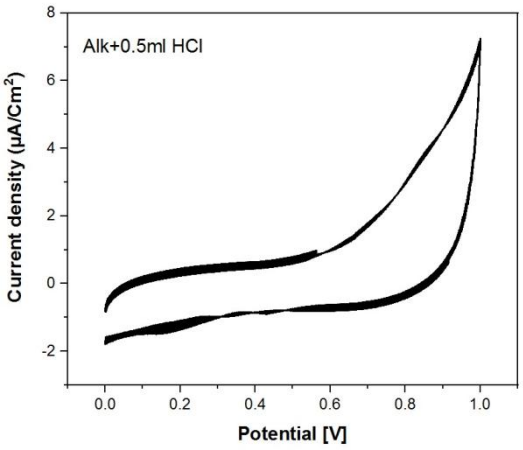
✓ **مستخلص القلويدات:**

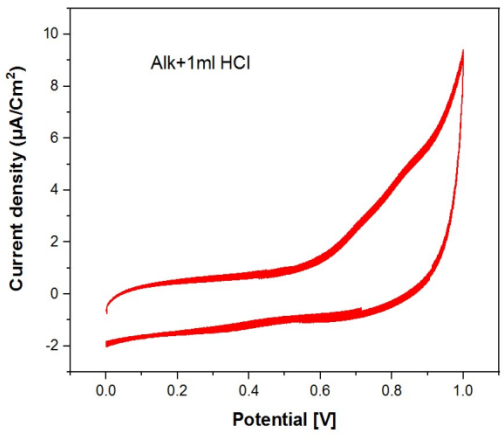


الشكل15.V: المنحنى الفولطامتري الحلقي لمستخلص القلويدات

في الشروط: قطب الكالومال ، C_{KCl}=0.1M ،V [0_0.1mV]

نلاحظ ان مستخلص القلويدات لما pH=7 لا يعطي أي فعالية .





عند تغيير الوسط لا نلاحظ اي استجابة.

من خلال دراسات سابقة معروف بان القلويدات لديها فعالية مضادة للاكسدة قليلة مقارنة بالفينولات وهذا ما وجدناه في دراستنا.

5.V. دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا:

بعد زرع وحضن اطباق بتري الحاوية على السلالة البكتيرية المدروسة لمدة 24 ساعة نقوم بقياس قطر التثبيط حول الأقراص المشبعة بتراكيز مختلفة للمستخلصات. وفي ما يلي نتائج الاستجابة للعينات (تم اجراء هذه التجارب على مستوى مخبر المجد للتحاليل).

1. مستخلص 1_بيتانول:

جدول 6.V: نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص 1_بيتانول

	تثبيط الميكروبات				
Strains used	20mg/ml	15mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	CN
***Escherichia coli* ATCC 25922**	NI	NI	NI	NI	33
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	NI	NI	NI	NI	34
Bacillus subtilis ATCC 25973	NI	NI	NI	NI	27

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول (6.V) نلاحظ ان مستخلص1_بيتانول لم يحقق أي استجابة عند كل سلالات البكتيريا في كل التراكيز .

2. مستخلص خلات الايثيل:

جدول 7.V: نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإيثيل

	تثبيط الميكروبات				
Strains used	20mg/ml	15mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	CN
***Escherichia coli* ATCC 25922**	NI	NI	NI	NI	33
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	13	7	8	7	32
Bacillus subtilis ATCC 25973	NI	NI	NI	NI	25

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول (7.V) نلاحظ ان مستخلص خلات الايثيل حقق استجابة إيجابية عند سلالة البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* .

حيث نلاحظ ان المستخلص اعطى استجابة إيجابية عند *Pseudomonas aeruginosa* باقطار تثبيط 13mm و7mm و8mm و7mm عند التراكيز 20mg/ml و 15mg/ml و10mg/ml و5mg/ml على التوالي.

اما بالنسبة للسلالتين *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* فلا نلاحظ أي استجابة إيجابية ضد البكتيريا في كل التراكيز. ومنه يمكن القول ان مستخلص خلات الايثيل لديه حساسية للسلالة *Pseudomonas aeruginosa*.

3. مستخلص القلويدات:

جدول 8.V: نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلص القلويدات

	تثبيط الميكروبات				
Strains used	20mg/ml	15mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	CN
***Escherichia coli* ATCC 25922**	**17**	**10**	NI	NI	33
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	NI	NI	NI	NI	33
Bacillus subtilis* *ATCC 25973	NI	NI	NI	NI	28

من خلال النتائج المتحصل عليها في الجدول(8.V) نلاحظ ان مستخلص القلويدات حقق استجابة إيجابية عند سلالة *Escherichia coli*.

حيث نلاحظ ان مستخلص القلويدات اعطى استجابة إيجابية عند *Escherichia coli* بقطرين تثبيطيين 17 mm و10 mm عند التراكيز 20mg/ml و 15mg/ml على التوالي . بينما لا نسجل أي استجابة في بقية التراكيز.

اما بالنسبة للسلالتين *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* فلا نلاحظ أي استجابة إيجابية ضد البكتيريا في كل التراكيز . ومنه يمكن القول ان مستخلص القلويدات يملك فاعلية مضادة للبكتيريا ضعيفة الحساسية.

4. المستخلص المائي:

جدول 9.V: نتائج إختبارات الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلص المائي

	تثبيط الميكروبات				
Strains used	20mg/ml	15mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	CN
***Escherichia coli* ATCC 25922**	NI	NI	NI	NI	33
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	NI	NI	NI	NI	31
Bacillus subtilis* *ATCC 25973	**12**	NI	NI	NI	25

من خلال نتائج الجدول (8.V) المتحصل عليها نلاحظ أن المستخلص المائي حقق إستجابة إيجابية عند سلالة *Bacillus subtilis*، بقطر تثبيطي12mm عند التركيز 20mg/ml، بينما لا تسجل أي إستجابة عند التراكيز الأخرى.

كما نلاحظ أن المستخلص المائي لم يعطي أي حساسية في جميع التراكيز عند السلالتين *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*.

❖ المراجع باللغة العربية:

[1] زكري روضة، ساسوي رشيدة، تقييم قلويدات نبات الرتم النامي بضواحي الحجيرة– ورقلة، مذكرة ماستر، جامعة قاصدي مرباح: ورقلة،2019.

[2] بلفار آسيا، دراسة القدرة المضادة للأكسدة وللبكتيريا وللتآكل للمسخلصات الفينولية لنبات الزيتة Limoniastrum guyonianum (Dur)، رسالة دكتوراه، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، 2018.

[3] شرفي شيماء، دراسة النشاط البيولوجي لنبات العلندة الناشئة في الشرق الجزائري (منطقة ششار)، مذكرة ماستر، جامعة الإخوة منتوري:قسنطينة،2019.

❖ المراجع باللغة الأجنبية:

[4] GUENAOU.I,NAITIRAHAL.I,ERRAMI.A, LAHLOU.F.A,HMIMID.F,BOURHIM.N, . Bioactive Compounds from Ephedra fragilis: Extraction Optimization, Chemical Characterization, Antioxidant and AntiGlycation Activities. Molecules 2021, 26, 5998.

[5] IBRAGIC.S, SOIC.E, Chemical composition of various Ephedra species. Bosn J Basic Med Sci. 2015, 15(3):21-27.

الخلاصة العامة

الخلاصة العامة:

أجريت العديد من الدراسات الكيميائية على العائلة العلندية والتي تتواجد بأنواع متعددة في الطبيعة، أغلب هذه الدراسات تمت على نبات العلندة المجنحة (*Ephédra Alata*)، والتي كشفت من خلالها التركيب الكيميائي والفعالية البيولوجية لهذا النوع من النبات، وهذا مادفع بنا إلى دراسة نوع ثان من نفس العائلة العلندية وهي نبات العلندة الهشة (*Ephedra fragilis*).

بغرض تثمين النبات الطبية النامية بمنطقة الوادي وإبراز أهميتها، أردنا من خلال هذا العمل إستخلاص المركبات الفينولية والفلافونويدات والقلويدات، وتقدير محتواها بإستخدام مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، وكذلك الفعالية البيولوجية لنبات العلندة الهشة.

تطرقنا في بداية العمل إلى عملية إستخلاص بعض المواد الفعالية (فينولات، فلافونويدات، قلويدات)، وذلك بعد نقع النبات لمدة يوم، تحصلنا من خلالها على خمس مستخلصات (الهكسان، خلات الإيثيل، 1-بيتانول، المائي، القلويدات)، قمنا بحساب مردود الإستخلاص فوجد أن مستخلص 1-بيتانول حقق أعلى مردود مقارنة ببقية المستخلصات يليه مستخلص القلويدات. وبتقدير المحتوى الكلي للفينولات بطريقة Folin-Ciocalteu و تقدير المحتوى الكلي للفلافونويدات بطريقة $AlCl_3$ وجد أن مستخلص خلات الإيثيل يحتوي على أكبر كمية من الفينولات والفلافونويدات بقيمة $323.965mg_{GAE}/g_{ext}$ و $43.998mg_{EQ}/g_{ext}$ على التوالي مقارنة ببقية المستخلصات، إضافة إلى ذلك تم تقدير المحتوى الكلي للقلويدات والذي أعطى نتيجة مرضية تؤكد غنى النبتة المستخدمة بالقلويدات.

وفيما يخص الفعالية المضادة للأكسدة تمت بطريقتين هما: إختبارDPPH والطريقة الكهروكيميائية بإستخدام الفولطامتري الحلقي، فنلاحظ من خلال نتائج DPPH أن قيم IC_{50} تختلف من مستخلص لآخر،حيث أظهر مستخلص خلات الإيثيل يمتلك أكبر قدرة لتثبيط الجذر الحر مقارنة ببقية المستخلصات،أما نتائج الفولطامتري الحلقي أبدت تطابقا في الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الإيثيل.

كما تمت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلصات بطريقة الإنتشار ضد ثلاث سلالات بكتيرية، حيث أظهرت جميع المستخلصات فاعلية تثبيطية لنمو بعض الأنواع البكتيرية بإستثناء مستخلص 1-بيتانول الذي لم يعطي أي نتيجة تثبيطية.

وفي الأخير نتمنى أن يكون هذا العمل إنطلاقة جيدة لمواصلة الدراسة على نباتات العائلة العلندية لما لها من فوائد علاجية متعددة، كما نأمل في المستقبل القريب بتوسيع نطاق البحث من خلال التعرف على الصيغة الكيميائية للمواد الفعالة المستخلصة من هذه النبتة، وإستخدامها في مجالات أخرى غير العلاج.

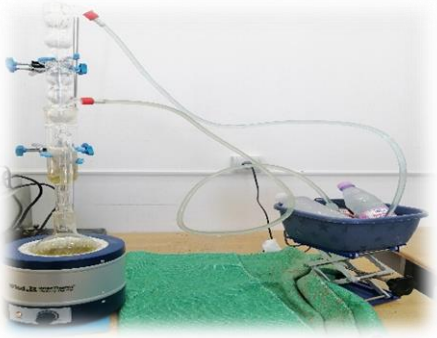
الملحق

الأجهزة المستعملة:

ميزان عادي

ميزان حساس

جهاز المبخر الدوراني

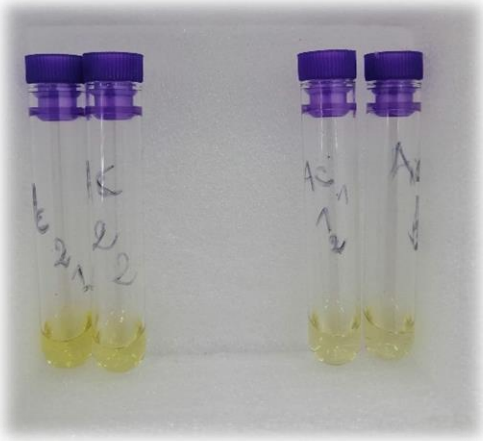


جهاز السوكسليت Soxhlet

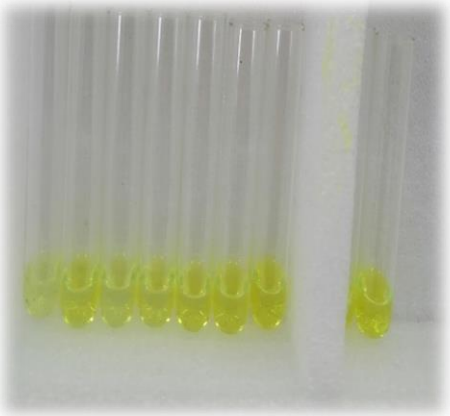
الفرن

جهاز UV-vis

بعض المحاليل:

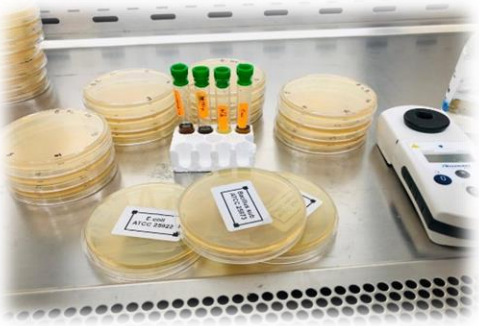


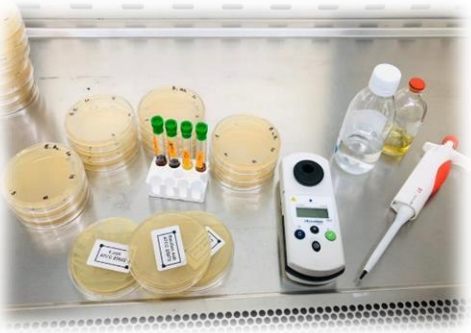
نتائج التقدير الكمي لبعض المستخلصات



المحلول القياسي للفلافونويدات (الكرستين)

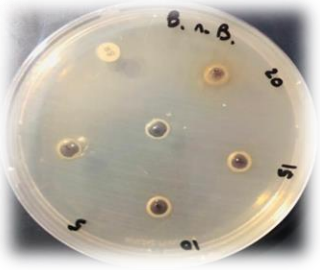
الفعالية المضادة للبكتيريا:

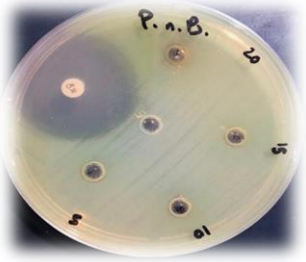


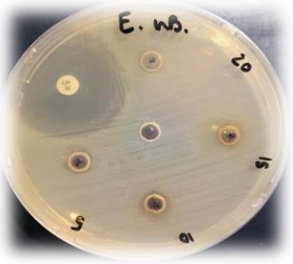


الأدوات والمواد المستعملة في اختبار المضاد للبكتيريا

B.subtilis *P. aeruginosa* *E. coli*

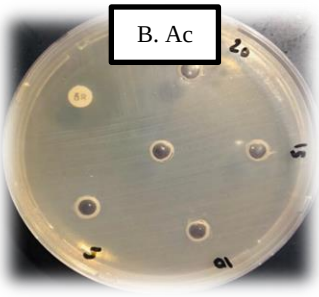


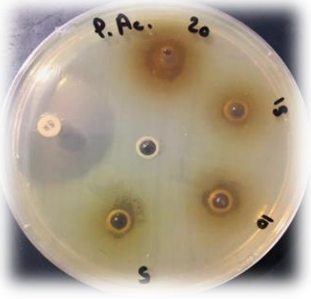


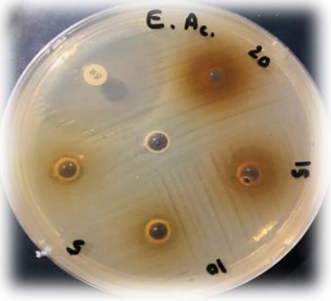


مستخلص 1_بيتانول

B. subtilis *P. aeruginosa* *E. coli*

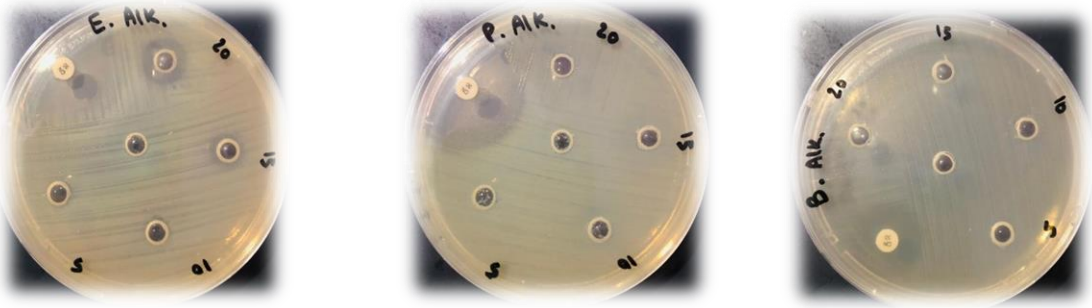






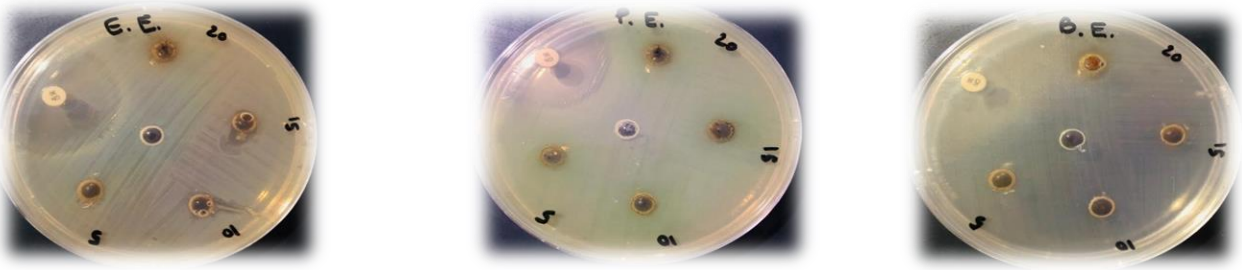
مستخلص خلات الايثيل

E. coli *P. aeruginosa* *B.subtilis*



مستخلص القلويدات

E. coli *P. aeruginosa* *B. subtilis*



المستخلص المائي

نتائج الاختبارات المضادة للبكتيريا