رقم الترتيب:
رقم التسلسل:

الجمهوريـــة الجزائريـــة الديمقراطيـــة الشعبيـــة

وزارة التعليـــم العـــالي و البحث العلمـــي

جـامعة الشهيـد حمـه لخضر الـوادي

كليـة علـوم الطبيـعة و الحيـاة

قسـم البيـولـوجيـا

مـذكـــــــرة تخـــــــرج

لنيـــل شهـــادة مـــــاستر أكـــاديـمي

ميـدان: علـوم الطبيـعة و الحيـاة

شعبـة علـــوم البيـولوجيـا

تخصص: بيـولوجيا و تثميـــن النبـات

الموضوع

المساهمة في دراسة فيتوكيميائية والفعالية البيولوجية لنبات الرتم ***Retama raetam*** **(Forssk.) webb** النامي في منطقة واد سوف.

من اعداد:

حوقة سارة و مرغني آمال

نوقشت يوم السبت 28- 05- 2016 من طرف لجنة المناقشة:

أحمد الخليفة شمسة	أستـاذ مسـاعد قسم أ	رئيسا	جـــامعة الوادي
شويخ عـاطف	أستاذ محاضر قسم ب	مؤطرا	جـــامعة الوادي
علالي أحمد	أستـاذ مسـاعد قسم أ	ممتحنا	جـــامعة الوادي

الموسم الجامعي: 2015- 2016

اقرأ
بسم ربك الذي خلق

تشكرات

الحمد لله الذي هدانا سبيل الرشاد، وألهمنا من العلم و العمل ما يشد به أزرنا في هاته الحياة، اشكر المولى عز وجل جلاله اسمى عبارات الشكر و الامتنان و التقدير، الى من يعجز لساني عن ايجاد العبارات المناسبة لشكره، الى من سدد خطايانا، وانار دروبنا، الى واهبنا الحياة بجلها، الى ربي، ربه العزة جل جلاله.

نتقدم بالشكر الجزيل و التقدير الخالص لأستاذنا الفاضل المشرف على تأطير هاته المذكرة شويخ عاطف على توجيهاته القيمة و تشجيعه المتواصل رغم مصادفتنا بعض العراقيل، وعلى توفيره لنا كل الامكانيات والوسائل والتسهيلات، جزيل الشكر و الاحترام لكم استاذنا.

كما نتقدم بالشكر الخالص لأستاذنا القدير أحمد الخليفة شمسة على قبوله لرئاسة اللجنة و على المجهود والمساعدة التي قدمها لنا خلال انجازنا لهذا البحث.

كما لا ننسى الاستاذ الفاضل علالي أحمد على قبوله لعضوية اللجنة و امداده لنا بالنصائح القيمة والتي تفيدنا في تحسين محتوى و مضمون البحث.

و نشكر الاساتذة القديرة عمامي هادية على توفيرها لنا سبل العمل الميسرة، والتي زرعت التفاؤل في دروبنا، و قدمت لنا المساعدات و التسهيلات، الافكار و المعلومات حتى آخر لحظة من انجاز هذا العمل.

شكرنا موصول للأستاذ القدير ربيعي عبد الكريم على ما بذله من جهود و مساعدات أثناء قيامنا بهذا البحث، رغم كثرة الاعمال المنوطة به.

ولا يفوتنا تقديم الشكر الجزيل و التقدير البالغ للزميلة والرفيقة عجال الهادة لمساعدتها لنا و لمجهوداتها المبذولة قصد اتمام هذا البحث على أكمل وجه.

الى كل أساتذتنا الكرام الذين فتحو لنا درب البحث و التعلم في مشوارنا الدراسي من أول الطريق لآخره، لتنوير و فتح سبل العلم والمعرفة لنا.

كما لا ننسى شكر كل زملاء المخبر، الاصدقاء و كل من مد لنا يد العون من قريب أو بعيد.

الملخص

Résumé

Abstract

الملخـص

قصد المساهمة في تثمين الثروات النباتية الطبيعية المحلية، أجريت هاته الدراسة والتي تهدف إلى دراسة فيتوكيمائية وتقدير النشاطية البيولوجية والنشاطية المضادة للأكسدة لنبات الرتم *Retama raetam* (FROSK.) الذي يستعمل في منطقة واد سوف تقليديا في علاج الجروح و الإلتهابات.

أكد الكشف الكيميائي وجود أغلب نواتج الأيض الثانوي وغياب كل من القلويدات و التانينات الغاليكية، وبالمقابل سجلنا تباين في مردود مستخلصات النبات حيث سجلت أعلى نسبة عند المستخلص الميثانولي بقيمة % 8.80، أما مستخلصا الفلافونويدات فتقاربتا قيمهما إذ قدر المردود بـ % 3.07 عند طور 1- بيتانول و % 2.43 عند طور الأسيتات إيثيل، أما أقل مردود فسجل عند مستخلص التانينات بقيمة % 0.60.

كانت قيم عديدات الفينول الكلية للمستخلصات الثلاث الأولى متقاربة كانت أعلاها عند المستخلص الميثانولي الخام بقيمة 1.81 ± 0.098 mg AG E/g ms ، حيث كانت 1.46 ± 0.001 و 1.10 ± 0.032عند المستخلص البيتانولي ومستخلص الأسيتات إيثيل على التوالي، أما قيم الفلافونويدات فبينت النتائج احتواء مستخلص الأسيتات إيثيل على أكبر قيمة قدرت بـ 0.66 ± 0.19 mg QU E/g ms.

قدرت النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات الأربعة باستعمال بإستعمال جذر $DPPH^{\bullet}$، والتي أظهرت المستخلصات خلاله نشاطية متوسطة إذ قدرت قيم IC_{50} بـ 0.223 mg/ml – 0.234 – 0.234 – 0.343 عند كل من مستخلص التانينات، المستخلص الميثانولي، مستخلص الأسيتات إيثيل و مستخلص 1- بيتانول على التوالي.

خلال تقدير النشاطية المضادة لعشرة سلالات بكتيرية كان التركيز الأدنى لتثبيط معظمها 2mg/ml عند أغلب المستخلصات، أما أفضل الأقطار التثبيطية فسجلت مع السلالات *Vibrio sp*، *Micrococcus sp*، *Serratia sp* بقيم 15-17-18 mm على التوالي مع المستخلصات: الميثانولي، 1- بيتانول ومستخلص التانينات على التوالي. أما السلالتين البكتيريتين *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 فأظهرتا مقاومة شديدة لمعظم تراكيز المستخلصات المختبرة.

أما التحليل النوعي لبعض المركبات الفينولية لمستخلصات النبات الميثانولي، مستخلص الأسيتات إيثيل و مستخلص 1- بيتانول باستعمال جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) فأظهر تقارب تراكيز بعضها عند كل المستخلصات كـ: حمض الأسكوربيك وحمض الغاليك، وتباين تراكيز بعضها على غرار: الفانلين، ب- كومارين والروتين، وتسجيل غياب حمض الكلوروجينيك عند مستخلص التانينات وحمض الكافييك عند مستخلص 1- بيتانول، أما عن الكرسيتين فلوحظ غيابه من مستخلصات النبات الثلاثة.

الكلمات المفتاحية: نبات الرتم *Retama raetam* (FROSK.) webb، دراسة فيتوكيميائية، المستخلص الميثانولي، مستخلص طور 1- بيتانول، مستخلص طور الأسيتات إيثيل، مستخلص التانينات، عديدات الفينول، الفلافونيدات، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للبكتيريا، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).

Abstract

The aim of this study is to investigate the phytochemical properties and biological activities such as: antioxidant and antibacterial activities of *Retama raetam* for valorisation of the local natural plant resources. This latter is used in Oued souf region in folk medicine for wounds and infection treatment.

The chemical screening showed that presence of most secondary products metabolism and absence of Alkaloids and Gallic Tannins, on the other hand, noticeable differences have shown in the yield of extracts. Where, the methanol extract demonstrated higher yield with 8.80%, while the Flavonoid extracts were3.07% in 1-butanol extract and 2.43% in ethyl acetate extract. Whereas, tannin extract showed lower yield with 0.60%.

Total polyphenol contents of the first three extracts were nearly similar. The highest value showed in the methanol crude extract by 1.81±0.098 mg AG E/g ms, while it was 1.46 ± 0.001 and 1.10 ± 0.032 in butanolic and ethyl acetate extract respectively. Whereas, high total flavonoid contents showed in ethyl acetate with 0.66 ± 0.19 mg QU E/g ms.

Antioxidant activity of the all extracts were estimated by using the test DPPH assay, the extracts demonstrated medium activities, where IC_{50} values were 0.223 - 0.234 - 0.234 - 0.343 mg/ml with tannins, methanol, ethyl acetate and 1-butanol extracts respectively.

Antibacterial activity of extracts has been investigated against ten bacterial strains. Minimum inhibitory concentration was 2mg/ml in most of the extracts, the best inhibition showed against *Vibrio cholerae*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescen* with 18-17-15 mm in methanol, 1-butanol and tannin extracts, respectively. Same bacterial strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 showed high resistance against most of all extract concentrations.

The qualitative analysis of some phenolic compounds of methanol, ethyl acetate and 1-butanol extracts using liquid chromatography high performance (HPLC) showed that nearly same concentrations in all extracts in presence of some phenolic compounds such as: Ascorbic acid and Gallic acid, and the varying concentrations in other compounds like: Vanilline, B Comarin and Rotin, and absence of Chlorogenic acid in tannin extract, also absence of Cafiec acid in 1-butanol extract. While, Quercetin has not shown in all three plant extracts.

Key words: *Retama raetam* (Frosk.) weeb, phytochemicals study, 1-Butanol extract, Tannin extract, Ethyl Acetate extract, Methanol extract, Polyphenols, Flavanoids, Antioxidant Activity, Antibacterial Activity, High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Résumé

Au but contribuer l'évaluation des ressources végétales spontanée dans notre région "Oued Souf ", cette étude a été menée pour l'étude phytochimique et l'activité biologique et antioxydante de *Retama raetam* Frosk. qui est utilisé dans le traitement des plaies et des infections.

La screening chimique confirme l'existence de plupart des métabolites secondaires dans cette plante, et l'absence des alcaloïdes et les tanins galliques, A l'opposé nous avons enregistré des variations entre les rendements des extraits de plante, le pourcentage le plus élevé est dans l'extrait méthanolique (8,80%) tandis que l'extraits de flavonoïdes elles est très rapproche par des valeurs 3.07 % pour phase 1-butanole, et 2.43% chez la phase acétate d'éthyle, mais la plus moins rendement elle est enregistré chez l'extrait des tanins 0.60%.

Les valeurs de Polyphénoles totaux dans les trois premiers extraits sont rapproché, lorsque la plus grande valeur est 1.81 ± 0.098mg AG E/g ms chez l'extrait méthanolique, suivi par 1.46 ± 0.001 et 1.10 ± 0.032 dans l'extrait de 1-butanole et acétate d'éthyle respectivement, pendant que le dosage de flavonoïde elle se réfère à contenir l'extrait de l'acétate d'éthyle la plus grande valeur de flavonoïdes estimation 0.66 ± 0.19 mg QU E/g ms.

L'activité antioxydants a été évaluée en utilisant la méthode de réduction de radical libre $DPPH^{\bullet}$, qui a montré que les extraits ont activité moyen. L'CI_{50} a été estimée à 0.223- 0.234 - 0.234 - 0.343 mg/ml pour les extraits de tanins, d'acétate d'éthyle, méthanolique et 1-butanol respectivement.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur dix souches bactériennes pathologie, la concentration minimale inhibitrice est égale 2 mg/ml dans la plupart des extraits, mais les meilleurs diamètres inhibitrice trouvé chez la *Vibrio cholerae*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescen* par des valeurs 18-17-15 mm respectivement avec les extraits: méthanolique, 1-butanol et tannique consécutivement. Pendant que les souches résistance à la plupart des concentrations des extraits testés sont: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Pour l'analyse qualitative de certains composés phénoliques de l'extraits: méthanolique, acétate d'éthyle et 1-butanol on utilise Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), se montrer rapprochement des concentrations de chaque extraits comme: l'acide Ascorbique et l'acide Gallique, au contraire des concentrations variées de Vaniline, B-coumarine, Rotin. En plus nous avons enregistré l'absence d'acide Chlorogénique dans l'extrait acétate d'éthyle, et l'acide Caféique chez l'extrait butanolique, mais la Quercitine il est absent dans tous les extraits.

Les mots clé: *Retama raetam* (Frosk.) webb, Etude Photochimique, extrait Méthanolique, extrait Flavonoïdes en phase 1-butanol, extrait Flavonoïdes en phase acétate éthyle, extrait des Tanins, les Polyphénoles, les Flavonoïdes, l'Activité Antioxydante, l'Activité Antimicrobienne, Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

الفهـــــرس

الملـخص	
الفهـرس	
فهـرس الوثـائـق	
فهـرس الاشكـال	
فهـرس الجـداول	
قـــائمة المختصرات	
المقدمـــــة	
الجـزء النــظري	
الفصل الاول: المركبــات الفينـوليــة Les Composés Phénoliques	
I-1- مدخل	03
I-2- تعريف المركبات الفينولية	03
I-3- التصنيع الحيوي للمركبات الفينولية	03
I-4- تواجدها في النبات	07
I-5- الخصائص العامة للمركبات الفينولية	07
I-6- تصنيف المركبات الفينولية	08
I-6-1- الأحماض الفينولية Les acides phénoliques	09
I-6-2- الكومارينات Les Coumarines	10
I-6-2-1- تعريفها	10
I-6-2-2- تواجدها	11
I-6-2-3- تصنيفها	11
I-6-2- 4- التصنيع الحيوي للكومارينات	14
I-6-2-5- الفعالية البيولوجية للكومارينات	15
I-6-3- الأعفاص (التانينات) Les Tannins	15
I-6-3-1- تعريفها	15
I-6-3-2- تواجدها في النبات	15
I-6-3-3- تصنيف الأعفاص	15
I-6-3- 4- الخصائص العامة للأعفاص	17
I-6-3- 5- الخصائص البيولوجية للأعفاص	18
I-6- 4- الفلافونويدات Les Flavonoïdes	18
I-6- 4-1- تعريف الفلافونويدات	18
I-6- 4-2- تواجدها في النبات	19
I-6- 4-3- التخليق الحيوي للفلافونويدات	19
I-6- 4- 4- تصنيف الفلافونويدات	21

I-6- 4- 5- الخواص العامة للفلافونويدات	23
I-6- 4- 6- الفعالية البيولوجية للفلافونويدات	23
I-6- 5- الأنثوسيانات Les Anthocyanes	25
I-6- 5- 1- تعريف الأنثوسيانات	26
I-6- 5-2- الخصائص العامة للأنثوسيانات	26
I-6- 5- 3- الفعالية البيولوجية للأنثوسيانات	26
الفصل الثاني: الدراسة النباتية للنوع النباتي الرتم *Retama raetem* (Frosk.)	
I- عموميات	27
II- العائلة الفولية (الفراشية) Fabaceae	27
III- خصائص العائلة Fabaceae	27
VI- نبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) Webb	28
VI-1- الوصف النباتي لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) Webb.	28
VI-2- الوضعية التصنيفية للنبات	30
VI-3- الانتشار الجغرافي لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb.	30
VI-3-1- الانتشار الجغرافي لنبات الرتم في العالم	30
VI-3-2- الانتشار الجغرافي لنبات الرتم في الجزائر	31
VI-4- المركبات الفعالة في النبات	31
VI-5- استعمالات النبات	32
VI-6- الدراسات السابقة للنوع النباتي *Retama raetam* (Forssk.) Webb.	32
الجـزء العمـلي	
الفصل الاول: الوسائل المستعملة والطرق المتبعة	
I - الادوات و المواد المستعملة	34
I-1- الأدوات المستعملة في تحضير المادة النباتية	34
I-2- الأدوات المستعملة للكشف الكيميائي عن مواد الأيض الثانوي في النبات	34
I-3- الأدوات المستعملة عند الاستخلاص	36
I-4- الأدوات المستعمل عند التقدير الكمي للمركبات الفينولية بالطرق اللونية	36
I-5- الأدوات المستعملة في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة	37
I-6- الأدوات المستعملة عند النشاطية البيولوجية المضادة للبكتيريا	37
I-7- الأدوات المستعملة عند التحليل الكروماتوغرافي (HPLC) للعينات النباتية	38
II- الطرق المتبعة	38
II-1- الطرق المتبعة في جمع و تجفيف المادة النباتية	38
II-2- طرق الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي	39
II-3- الطرق المتبعة في استخلاص المركبات الفينولية	45
II-4- الطرق المتبعة في التقدير الكمي للمركبات الفينولية	48

II-4-1- التقدير الكمي لعديدات الفينول Dosage des Polyphénoles Totaux	48
II-4- التقدير الكمي للفلافونويدات Dosage des Flavonoïdes	49
II-5- الطرق المتبعة في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة	50
II-5-1- حساب نسبة التثبيط I % للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$	51
II-5-2- تحديد مقدار IC_{50} المثبطة لجذر $DPPH^{\bullet}$	52
II-6- الطرق المتبعة في دراسة الفعالية لنشاطية المضادة للبكتيريا	52
II -6-1- السلالات البكتيرية المستعملة	52
II -6-2- المضادات الحيوية المستعملة للمقارنة الإجابية بينها وبين المستخلصات النباتية	54
II-7- تحديد بعض المركبات الفينولية لمستخلصات النبات عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)	56
الفصل الثاني: النتـــائج و المنـــاقشة	
I- النتائج	58
I-1- النتائج المتحصل عليها بعد الكشف الكيميائي لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)	58
I-2- حساب المردود لمستخلصات النبات	59
I-3- التقدير الكمي لعديدات الفينول (PPT)	60
I-4- التقدير الكمي للفلافونويدات (FV)	61
I-5- تقدير الفعالية المضادة للأكسدة	64
I-6- تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا	67
I-7- تحديد بعض المركبات الفينولية لمستخلصات النبات عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)	75
II- المنـــاقشة	88
الخـــاتمـة	94
المـراجــع	
المـلاحــق	

الرقم	عنوان الوثيـقة	الصفحة
01	التصنيع الحيوي للفينولات عن طريق مسلك حمض الشيكميك	05
02	التصنيع الحيوي للمركبات الفينولية عن طريق الفينيل ألانين	06
03	القدرة الارجاعية و المضادة للأكسدة للفينولات	08
04	بعض مشتقات حمض البنزويك l'acide benzoique	10
05	بعض مشتقات حمض الهيدروكسي سينناميك l'acide hydroxycinnamique	10
06	الهيكل العام للكومارينات	11
07	بعض الامثلة عن الكومارينات البسيطة	11
08	مركب Rutacultine من الكومارينات البرينيلية Coumarines Prénylées	12
09	بعض أمثلة عن المركبات الكومارينية الزاوية و الخطية	12
10	بعض الامثلة عن الكومارينات الثنائية	13
11	بعض الامثلة عن الكومارينات الثلاثية	13
12	التخليق الحيوي للكومارينات	14
13	البنية الكيميائية لحمض الغاليك Gallique (A) و Ellagique (B)	16
14	بعض الامثلة عن المركبات التانينية غير القابلة للتحلل المائي	17
15	الهيكل القاعدي للفلافونويدات	18
16	التخليق الحيوي لمختلف الأقسام الفلافونويدية	20
17	الهياكل الأساسية لمختلف الفلافونويدات	22
18	الهيكل الأساسي للأنثوسيانات	26
19	القطع الزهرية المختلفة و التربيع الزهري لنباتات العائلة الفراشية Fabaceae	28
20	مختلف أجزاء نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb.	29
21	مناطق انتشار نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) في الجزائر	31
22	جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) المستخدم في عملية الاستخلاص	48
23	تفاعل الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ مع مضاد للأكسدة	50
24	جهاز المطيافية الضوئية Spectrophotométre	51
25	المضادات الحيوية المستعملة في النشاطية المضادة للبكتيريا	55
26	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي (E.M) لنبات الرتم	68

	Retama raetam (Frosk.) على السلالات البكتيرية المختبرة	
27	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الاسيتاتي (E.A.E) لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) على بعض السلالات البكتيرية المختبرة	69
28	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص البيتانولي (E.1.B) لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) على السلالات البكتيرية الممرضة المختبرة	71
29	تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص التانينات(E.T) لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) على بعض السلالات البكتيرية المختبرة	72
30	تأثير بعض المضادات الحيوية HLG و CN لسلالات البكتيرية *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas* على التوالي	74
31	البنية الكيميائية لحمض الاسكوربيك	86
32	التركيب الكيميائي لمركب الفانيلين (A) و حمض الغاليك (B)	86
33	البنية الكيميائية لكل من حمض الكلوروجينيك (A) و حمض الكافييك (B)	87

الرقم	عنوان الشكـل	الصفحة
01	مخطط الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي(01)	42
02	مخطط الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي(02)	43
03	مخطط الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي(03)	44
04	بروتوكول استخلاص المستخلص الميثانولي الخام	45
05	بروتوكول استخلاص الفلافونويدات	46
06	بروتوكول استخلاص التانينات	47
07	مردود المستخلصات المختلفة لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)	59
08	المنحنى القياسي لحمض الغاليك Acide gallique لتقدير عديدات الفينول عند المستخلصات النباتية	60
09	كمية عديدات الفينول للمستخلصات النباتية المختلفة لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /غ من المادة الجافة	61
10	المنحنى القياسي للكرستين Quercitine للتقدير الكمي للفلافونويدات عند المستخلص الميثانولي	62
11	كمية الفلافونويدات في المستخلصات النباتية المختلفة لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /غ من المادة الجافة	62
12	المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك Acide ascorbique في اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$	63
13	نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز (mg/ml) للمستخلص الميثانولي (E.M)	64
14	نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز(mg/ml) لمستخلص الاسيتات ايثيل (E.A.E)	64
15	نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز (mg/ml) للمستخلص البيتانولي (E.1.B)	65
16	نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز (mg/ml) للمستخلص التانيني (E.T)	65
17	قيم IC_{50} المثبطة لـ 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ بـ (mg/ml) لمختلف مستخلصات نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) وحمض الاسكوربيك Acide Ascorbique.	67

18	متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة لمستخلص الميثانولي (E.M)	68
19	متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة لمستخلص الاسيتاتي ايثيل (E.A.E)	70
20	متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة لمستخلص أحادي البيتانول (E.1.B)	71
21	متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة مع مستخلص التانينات لنبات الرتم(.Frosk) *Retama raetam*	73
22	متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة للمضادات الحيوية	74
23	المنحنيات الكروماتوغرافية المستخلص الميثانولي الخام (E.M)	76
24	المنحنيات الكروماتوغرافية المستخلص الفلافونويدي طور أسيتات ايثيل (E.A.E)	77
25	المنحنيات الكروماتوغرافية المستخلص الفلافونويدي طور احادي البيتانول (E.1.B)	78

الرقم	عنوان الجدول	الصفحة
01	تصنيف المركبات الفينولية حسب عدد الذرات الكربونية بها	09
02	الفروق الاساسية بين الأعفاص القابلة للإماهة وغير القابلة للإماهة	16
03	الوضعية التصنيفية لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb	30
04	الأدوات المستعملة أثناء جمع وتحضير النبات	34
05	الأدوات والمحاليل المخبرية المستعملة للكشف الكيميائي للمواد الفعالة في النبات.	34
06	الأدوات المستعملة والمحاليل المخبرية المستعملة أثناء عملية الاستخلاص	36
07	المحاليل الكيميائية والادوات والأجهزة المستعملة في التقدير الكمي للمركبات الفينولية	36
08	المحاليل الكيميائية والادوات و الأجهزة المستعملة في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة	37
09	المحاليل الكيميائية والأدوات والأجهزة المستعملة في الفعالية البيولوجية المضادة لسلالات بكتيرية ممرضة	37
10	الأدوات المستعملة عند التحليل الكروماتوغرافي (HPLC) للعينات النباتية	38
11	نتائج الكشف الكيميائي لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)	58
12	خصائص المستخلصات النباتية و نسب مردودها مقارنة بوزنها الجاف	59
13	النسب التثبيطية(I%) للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لمستخلصات نبات *Retama raetam* (Forssk.) عند التركيز (0.025 mg/ml)	66
14	قيم IC_{50} المثبطة لـ 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لمختلف مستخلصات نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)	66
15	التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفينولية للمستخلص الميثانولي الخام لنبات الرتم وتراكيز البعض منها بـالملغ/غ من المستخلص	79
16	التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفينولية للمستخلص الفلافونويدي طور اسيتات ايثيل وتراكيز البعض منها بـالملغ/غ من المستخلص	81
17	التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفينولية للمستخلص الفلافونويدي طور أحادي البيتانول وتراكيز البعض منها بـالملغ/غ من المستخلص	83
18	تراكيز المركبات الفينولية المعروفة في المستخلصات النباتية لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ/غ من كل مستخلص	85

قــائمة المختصرات

E.M	Extrait méthanolique brut
E.A.E	Extrait Acétate d'éthyle
E.1.B	Extrait 1-butanol
E.T	Extrait de Tanins
A.A	Acide Ascorbique
AcEt	Acétate d'éthyle
MeOH	Méthanol
PPT	Polyphénols total
FV	Flavonoïdes
AG E/g	Acide Gallique Equivalent par Gramme
QU E/g	Quercitine Equivalent par Gramme
V/V	Volume sur Volume
$DPPH^{\bullet}$	Radical 2,2-Diphényl-1 Picrylhydrazyle
IC_{50}	Inihibion Concentration 50%.
ROS	Réactive Oxygène Species.
DMSO	Dimethyl sulfoxide
HPLC	Heigh Performance Liquid Chromatografie.
Ret. Temps	retention temps
AlCl3	Aluminium chloride
HLG_{120}	Gentamicin
NO_{30}	Nitroxoline
CN_{30}	Cefalexin
C_1	Concentration 2mg/ml
C_2	Concentration 1mg/ml
C_3	Concentration 0.5mg/ml
C_4	Concentration 0.25mg/ml

المقدمـــة

مقدمـــة:

يعد طب الاعشاب فرع من فروع الطب المكمل أو البديل، وذلك لأن النباتات الطبية تؤدي دورا مهما في حماية صحة الإنسان وتحسين مسار حياته ومازالت العديد من الثقافات التقليدية تثمن قيمة الوصفات الطبية النباتية وأهميتها الوقائية والعلاجية ومنافعها الأخرى، يتقدم علم التداوي بمفهومه الحديث تقدما كبيرا في مختلف أرجاء العالم ويزداد الاهتمام بدراسة النباتات الطبية إذ تحتوي النباتات على عدد كبير جدا من المكونات الفعالة طبيا التي تعكس الامكانات العلاجية الكبيرة لها، فمن المعلوم أن لبعض العقاقير النباتية قدرة علاجية أكبر من تلك التي تملكها الأدوية المصنعة في معالجة بعض الأمراض بالإضافة لاحتوائها على مواد غذائية وفيتامينات فضلا عن المكونات الفعالة (MAJED et ALI-SHTAYEB, 2008).

يعرف النبات الطبي على أنه النبات الذي يحتوي في عضو أو أكثر من أعضائه المختلفة على مادة كيميائية واحدة أو أكثر بتركيز منخفض أو مرتفع، ولها القدرة الفيزيولوجية على معالجة مرض معين أو على الأقل تقلل من أعراض الإصابة بهذا المرض (هيكل و عمر، 1993)، وبالتالي امكانية استخدامها في علاج بعض الأمراض الناتجة عن الإصابات الميكروبية المختلفة، وكذلك القضاء على الجذور الحرة المختلفة الناتجة عن تفاعلات الأكسدة والإرجاع التي تحدث داخل الجسم وهذا لاحتوائها على مضادات أكسدة طبيعية.

وبلادنا الجزائر كغيرها من البلدان، تمتلك ثروة هائلة من النباتات الطبية تنتشر في مساحات شاسعة ضمن بيئات مناخية مختلفة، ما يمنحها تنوعا نباتيا كبيرا.

لذلك تطرقنا في دراستنا هاته إلى إحدى نباتات الجزائر الطبية والنامية في المناخ الصحراوي بمنطقة "واد سوف" وهو المعروف باسم الرتم *Retama raetam* (Forssk.) WEBB والذي يروج عنه في المنطقة أنه من النباتات السامة (BENHOUHOU, 2005) فهل ما يروج له صحيح؟ خلال هاته الدراسة أردنا إظهار الجوانب الإيجابية للنبات من خلال تثمين النشاطية البيولوجية والنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات النبات خاصة الفينولية منها.

ويتضمن عملنا هذا دراسة فيتوكيميائية من خلال الكشف الكيمائي عن نواتج الايض الثانوي أولا، ثم استخلاص بعض المستخلصات (الميثانولي، مستخلص الاسيتات ايثيل، مستخلص 1- بيتانول ومستخلص التانينات) ثانيا، والتقدير الكمي لعديدات الفينول و الفلافونويدات ثالثا وأتبعناها بالتحليل النوعي للمستخلصات الثلاثة الأولى عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)، ثم تثمين هاته المستخلصات في النشاطية المضادة للأكسدة والفعالية المضادة للبكتيريا أخيرا، حيث قسمت دراستنا إلى جزئين:

جزء نظري:

- يحتوي على فصلين، الفصل الأول تطرقنا فيه لعديدات الفينول، الإجهاد التأكسدي والنشاطية المضادة للأكسدة، أما في فصله الثاني خصصناه لدراسة النوع النباتي قيد الدراسة الرتم *Retama raetam* (FORSSK.) WEBB.

جزء عملي:

- و يتضمن هو الأخر فصلين، فصله الأول أدرجت فيه الطرق و المواد المستعملة في البحث، أما في الفصل الثاني فسردنا النتائج وقمنا بتحليلها ومناقشتها وختمنا بحثنا بخاتمة ذيلت بتوصيات.

الجزء النظري

الفصل الأول:

المركبات الفينولية

I-1- مدخل:

يعرف النبات بإنتاجه للعديد من المركبات يطلق عليها اسم المشتقات الثانوية لعمليات التمثيل الغذائي، تشمل كلا من التربينات و الفينولات و القلويدات و غيرها، وبالرغم من أن العديد من النظريات تعتبرها مواد لا فائدة منها بالنسبة للنبات الا أن البعض يعتبرها مصدرا للصبغات و الهرمونات النباتية و الفيتامينات و الزيوت العطرية.

من بين اهم المركبات النباتية لنواتج الأيض الثانوي الفينولات، حيث تشكل المركبات الفينولية حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية، نظرا لكثرة عددها و لتباين الهياكل البنائية لها (RICHTER, 1993) حيث تتميز بوجود نواة بنزان على الأقل مرتبطة مباشرة بمجموعة او أكثر من الهيدروكسيل الحر أو المرتبط بأستر، إيثر، أو جزيئة سكرية (El HAZIMI, 1995).

تعتبر المركبات الفينولية إحدى اكبر المجموعات النباتية حيث تستعمل بكثرة في المجالات الصناعية و الغذائية و العلاجية، فتستعمل غذائيا كمكسبات للطعم واللون و الرائحة، و علاجيا كمضادات للأكسدة و مضادات حيوية (MACHEIX *et al*., 2005)، وكذا صناعيا كصباغة الجلود و صناعة الصابون.(MAROUF, 2000)

I-2- تعريف المركبات الفينولية:

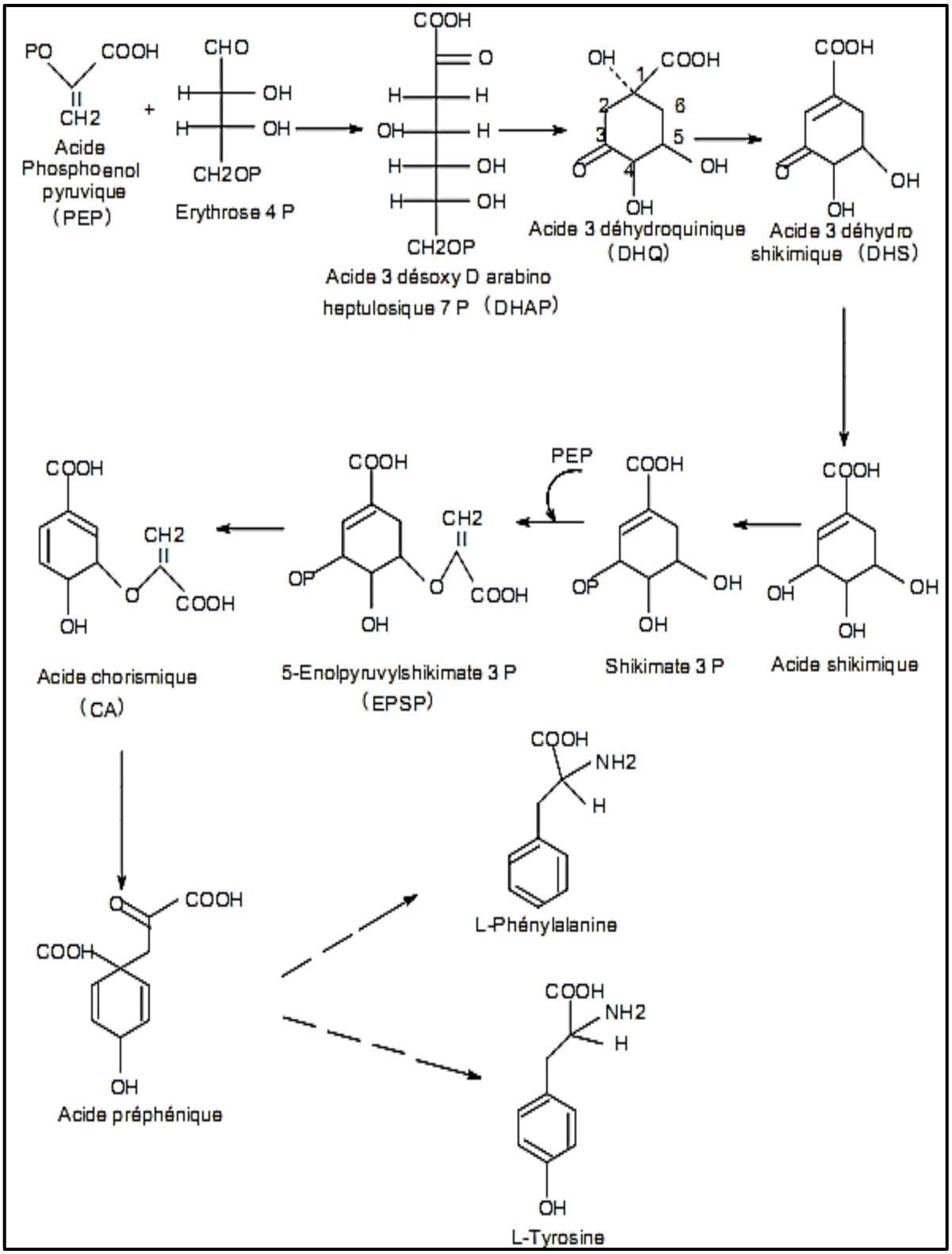
تعرف الفينولات بأنها مركبات عضوية تحمل حلقة بنزينية أو أكثر في هيكلها العام مرتبطة بمجموعة هيدروكسيلية OH أو أكثر(URQUIAGA et LEIGHTON, 2000) (GUIGNARD *et al*., 1985). تختلف بنية المركبات الفينولية الطبيعية من جزيئات بسيطة (كحامض الفينول Acides phénoliques) الى جزيئات جد معقدة يتم فيها بلمرة العديد من الفينولات لتعطي مركبات معقدة، و تسمى حينئذ بمتعددات الفينول polyphénols (MACHEIX *et al*., 2005).

I-3- التصنيع الحيوي للمركبات الفينولية :

لا تتواجد الفينولات بشكل حر داخل خلايا النبات، بل توجد مرتبطة في صورة جلوسيد أو في صورة أستر سكري، فهي مشتقات غير آزوتية تحتوي على حلقات عطرية متأتية اساسا من ايض حمض الشيكميك Acide schikimique (KENING *et al.*, 1995) أو فينيل بروبانويد phénylpropanoide، و منه فإن للتخليق الحيوي للفينولات مسلكين هما:

- مسلك حمض الشيكميك La voie de schikimate:

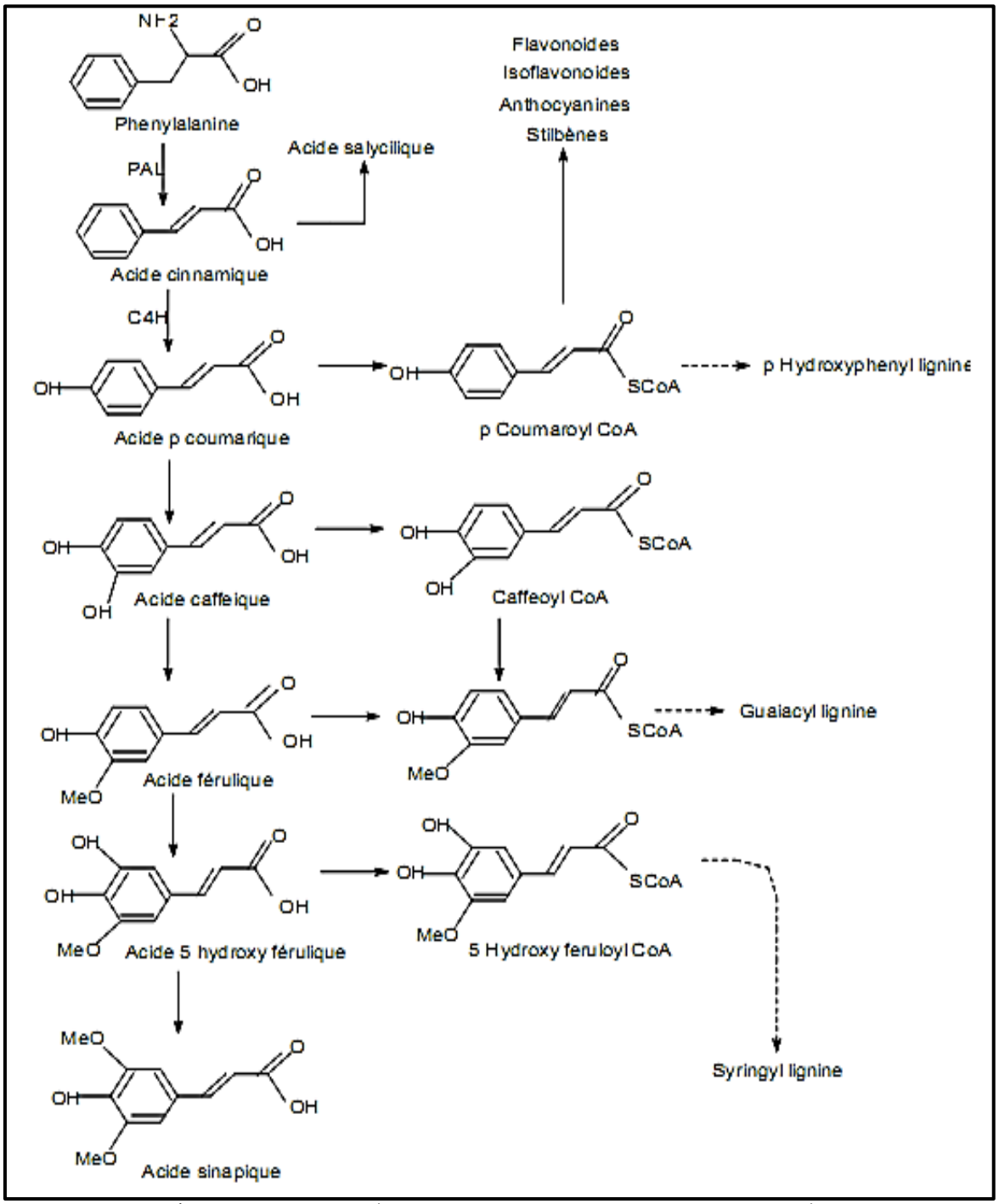
يعتبر هذا المسلك ذو أهمية كبيرة بالنسبة للنبات ليس لدوره في انتاج الفينولات فحسب، بل في بناء الاحماض الامينية الأروماتية كالتيروزين و الفينيل ألنين و التربتوفان(MEZITI, 2007). يبدأ بناء حمض الشيكميك بفوسفات أنيول حمض البيروفيك والذي يتكون في نهاية عملية الجلكزة glycolysise وكذلك يبدأ بالسكر الرباعي (CH_2OP) حيث يرتبطان معا لتكوين مركب وسطي ذو سبع ذرات كربون والذي ما يلبث حتى يتحلق(cyclisation) إلى مركب Acide-3-déhydroquinique. تحدث بعد تشكل حمض الشيكميك عدة تفاعلات خلاصتها تشكل الاحماض السيناميكية Acides Cinnamiques و مشتقاتها: كحمض البنزويك Acide Benzoïque و Lignanes et Lignines و الكومارينات Coumarines و غيرها (BOUDJELLAL, 2009; MOUFFOK, 2011; PORTES, 2008) كما هو موضح في الوثيقة (01).



الوثيقة (01): التصنيع الحيوي للفينولات عن طريق مسلك حمض الشيكميك.
(FLOSS, 1997; ZARROUR, 2012)

- مسلك فينيل بروبانويد La voie de phénylpropanoide:

يبدأ هذا المسار بواسطة الفينيلالنين phénylalanine، الذي يزود الخلية بالأحماض الفينولية البسيطة، الكومارينات ، الايزوفينولات isoflavonoïdes، الفلافونويدات flavonoïdes، و طلائع اللجينين Précurseurs de Lignine (الوثيقة 02) والذي يعتبر المركب الحيوي الثاني أهمية بعد السليلوز cellulose (BOUDJELLAL, 2009; MOUFFOK, 2011; PORTES, 2008).



الوثيقة (02): التصنيع الحيوي للمركبات الفينولية عن طريق الفينيل ألانين (HOFFMANN *et al.*,2004)

I-4- تواجدها في النبات:

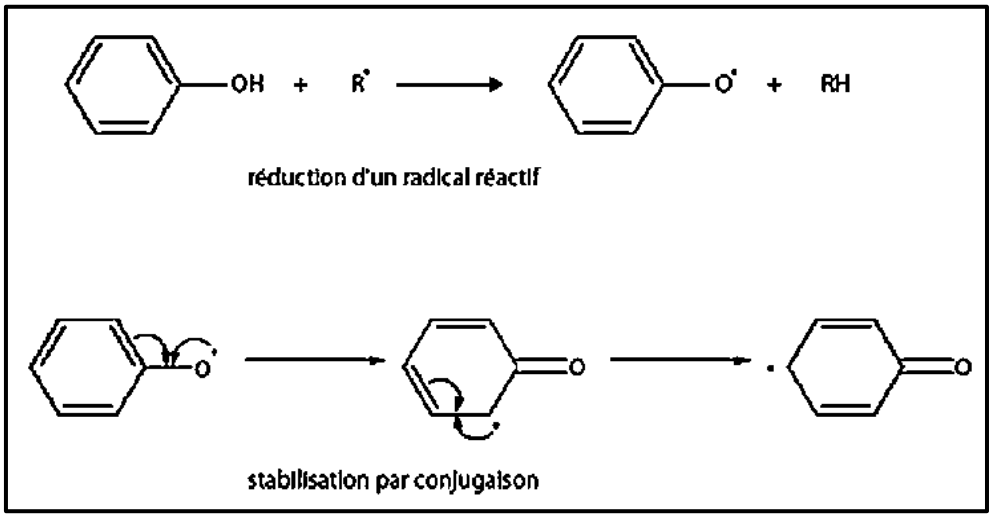
تتواجد الفينولات في جميع الانواع النباتية على حد سواء، بينما يختلف توزيعها في الانسجة النباتية و المستويات الخلوية و التحت خلوية (SANDA *et al*.,2012)، بحيث تم عزل العديد من الفينولات القابلة للذوبان من جدران الخلايا، في حين وجدت مجموعة من الفينولات غير قابلة للذوبان في الفجوات مرتبطة مع مكونات الخلية المختلفة تساهم بدعم القوة الميكانيكية لجدران الخلايا و تلعب دورا تنظيميا في نمو النبات و تطوره.(DEWICK, 2001; KORKINA, 2007).

I-5- الخصائص العامة للمركبات الفينولية:

من المعروف ان لكل مركب كيميائي خصائصه المميزة التي تعطيه أهمية خاصة من بين جميع المركبات الاخرى، ومن هنا يمكن تلخيص الخواص الكيميائية و الفيزيائية للمجاميع الفينولية أو متعددات الفينول فيما يلي:

1. ترتبط الخواص الكيميائية لدى متعددات الفينول بالانوية الفينولية التي تحتويها (DANGLES, 2006) فهي مواد بلورية في درجات الحرارة العادية، تذوب في الماء بنسبة قليلة، و تذوب بنسبة أكبر في المذيبات القطبية كالكحولات.
2. مركبات لها درجات غليان عالية بسبب احتوائها على روابط هيدروجينية بين جزيئاتها.
3. تتأكسد بفعل الهواء و الضوء كجميع منتجات الأيض الثانوي الأخرى.
4. تمتلك الأحماض الفينولية درجة حامضية أعلى من الكحولات الالفياتية هذا ما يجعلها تتفاعل مع محلول هيدروكسيد الصوديوم و تتحول الى ايونات الفينوكسيد بينما لا يؤثر هيدروكسيد الصوديوم في الكحول (NKHILI, 2009).
5. الخاصية المرجعة و الاستقراية التي تتميز بها الفينولات تسمح لها بأن تكون أهم مضادات الاكسدة الطبيعية (الوثيقة 03) (AOUISSA, 2002).
6. تتميز متعددات الفينول اللاسكرية Polyphénoles Aglycones بكونها محبة للدهون، تستخرج بواسطة مذيبات متوسطة القطبية (CH_2Cl_2)، وعند وجود OH حرة في الفينول تكون ذوابنيته عادة في المحاليل المائية القاعدية (NKHILI, 2009).

7. متعددات الفينول السكرية Polyphénoles hétérosides تتميز بكونها اكثر قطبية تذوب في الماء و الكحولات، و تستخلص حراريا باستعمال الأستون أو الكحول بتخفيفه جزئيا بالماء (اضافة 20%-50) وهذا لنزع الكلوروفيل من المستخلص، أما تنقية المستخلص فيكون بواسطة طريقة الاستخلاص سائل/سائل باستعمال مذيب الاسيتات ايثيل l'Acétate d'éthyle (NKHILI, 2009).
8. لتنقية الفينولات تستعمل عدة طرق ابرزها تقنية الفصل الكروماتوغرافي(NKHILI, 2009).



الوثيقة (03): القدرة الارجاعية و المضادة للأكسدة للفينولات (ROLLAND, 2004).

I-6- تصنيف المركبات الفينولية:

تتميز الفينولات عادة بوجود حلقة عطرية هيدروكسيلة hydroxylique على الاقل في هيكلها البنائي، و تصنف الى مجموعات استنادا على عدد الحلقات العطرية فيها و عدد التفرعات او العناصر المرتبطة بها، فمنها البسيط les phénols simples و منها المعقد كالأعفاص les Tanins و الفلافونويدات les Flavonoides (BOROS *et al.*, 2010) كما ان معظم المركبات الفينولية مرتبطة مع بجزيئة او اكثر من الساكاريد Saccharides ترتبط مع واحد او اكثر من المجموعات الفينولية (MADI, 2008)، و يمكن ان تصنف هاته المركبات كما هو موضح في الجدول (01) الاتي:

الجدول (01): تصنيف المركبات الفينولية حسب عدد الذرات الكربونية بها (BOROS *et al.*, 2010)

Classe	Structure
Phénols simples, benzoquinones	C_6
acide hydroxybenzoique	C_6-C_1
acéthophénones, acide phénylacétique	C_6-C_2
acide hydroxycinnamique, phénylpropanoides (coumarines, isocoumarines, chromones)	C_6-C_3
flavonoides, isoflavonoides	C_6-C_3-C_6
lignanes, néolignanes	$(C_6$-$C_3)_2$
biflavonoides	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$
tannins condensés (proanthocyandines, ou flavolans)	$(C_6$-C_3-$C_6)_n$

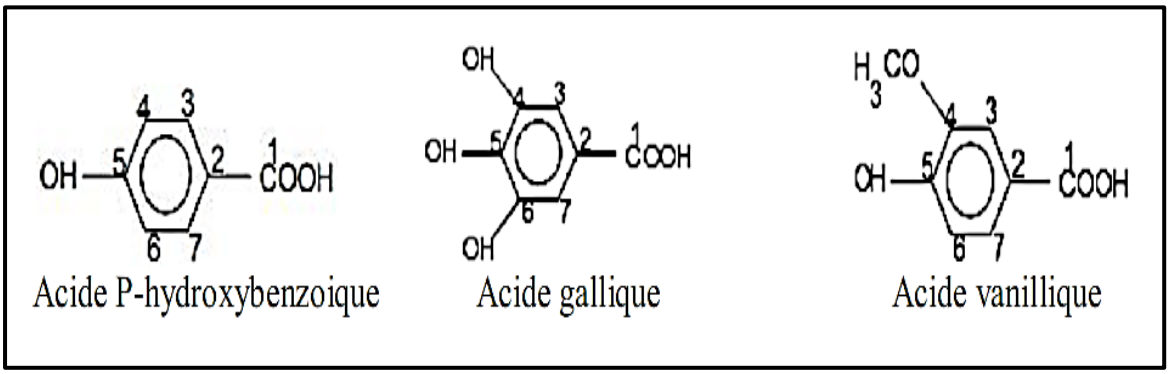
و قد اعتبر TAPIERO و اخرون (2002) ان اهم المركبات الفينولية تتمثل في الاحماض الفينولية، الفلافونويدات، التانينات، الكومارينات Coumarines، و الانثوسيانات Anthocyanes، فهي المجموعات الاساسية التي تتواجد في جل النباتات.

و فيما يلي نذكر بعض المركبات الفينولية الاساسية و التي تعرف بخصائصها البيولوجية الفعالة:

I-1-6- الأحماض الفينولية Les acides phénoliques:

لا تحمل هاته الاحماض هياكل فلافان Flavane في بنيتها التركيبية، ذائبة في الإيثر، ويمكن ان تتواجد في الخلية مرتبطة مع اللجنين المتواجد في شكل استرات (BARBONI, 2006)، تمتلك خصائص بيولوجية عديدة، فهي مضادة للالتهابات، مطهرات للمسالك البولية، مضادات للجذور الحرة Antiradicalaires، مدر الصفراء Cholagogues، منبه للمناعة Immunostimulants (BRUNETON, 1999)، و نميز فيها نوعان حسب(TOUAFEK, 2010):

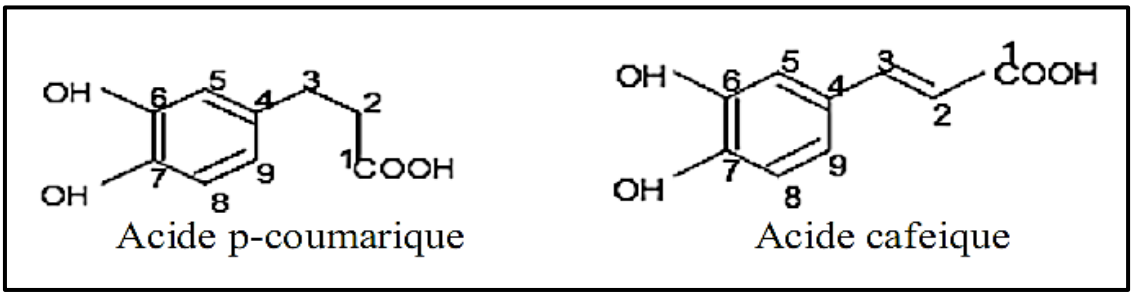
❖ مشتقات حمض البنزويك les divers de l’acide benzoïque: يتكون هيكلها من 7 ذرات كربون. (الوثيقة 04)



الوثيقة (04): بعض مشتقات حمض البنزويك l’acide benzoïque.

(KANOUN, 2010; RIBEREAU, 1968)

❖ مشتقات الاستر الهيدروكسي سيناميك les divers de l’esters hydroxycinnamiques: هيكلها من النوع C6-C3. (الوثيقة 05)



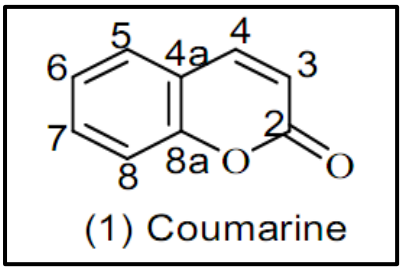
الوثيقة (05): بعض مشتقات حمض الهيدروكسي سيناميك l'acide hydroxycinnamique.

(BOUAYED, 2007; RIBEREAU, 1968)

I-6-2- الكومارينات Les coumarines:

I-6-2-1- تعريفها:

اشتق مصطلح الكومارين Coumarine من كلمة "cumaru" الامازونية والتي تعني شجرة "التونكا" (*Dipteryx odorata*) من العائلة الفراشية Fabaceae والتي تحتوي بذورها من 1 الى 3 % كومارينات (BRUNETON, 1999)، تتواجد ايضا في بعض النباتات بكمية جد منخفضة كالخزامى، البرسيم والشاي الاخضر. و الكومارينات هي مركبات فينولية نباتية تحمل نواة بنزوبيرانية Noyau Benzopyrone في هيكلها (الوثيقة 06) (ALIGNAN, 2006).



الوثيقة (06): الهيكل العام للكومارينات (KEATING et O'KENNEDY, 1997).

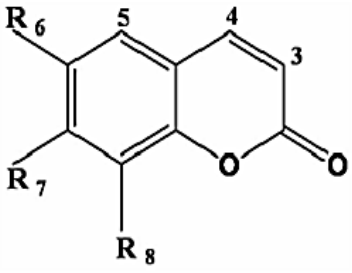
I-6-2-2- تواجدها:

تتواجد الكومارينات و مشتقاتها (اكثر من 300 مركب مشتق) في العديد من العائلات النباتية (70 عائلة من ثنائيات الفلقة و 9 عائلات من أحاديات الفلقة)، و تتواجد بصورة حرة أو في شكل ايتيروزيدات في أغلب ثنائيات الفلقة نذكر منها العائلة الخيمية Apiaceae، المركبة Asteraceae، الفراشية Fabaceae ، الوردية Rosaceae و غيرها (CAI *et al*., 2004).

I-6-2-3- تصنيف الكومارينات:

يمكن تقسيم الكومارينات حسب تفرع المركبات المرتبطة بالحلقة الاروماتية لديها، كذلك حسب طبيعة التفرع و نوعه الى عدة أقسام (HAMIMED, 2009; MURRY *et al*., 1982):

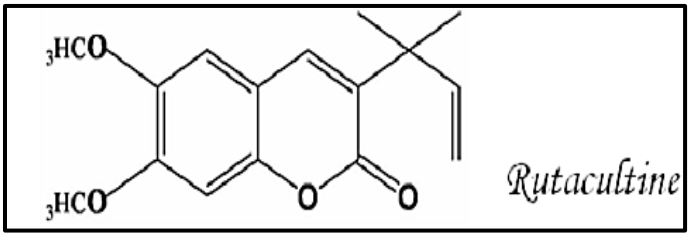
أ- Coumarines Simples كومارينات بسيطة:



Composé	*R6*	*R7*	*R8*
Daphnétine	H	OH	OH
Erioside	OH	OH	O-Glc
Esculétine	OH	H	OH
Esculine	O-Glc	H	OH
Fraxétine	OCH 3	OH	OH
Scopolétine	OCH 3	H	OH
Umbélliférone	H	H	OH

الوثيقة (07): بعض الامثلة عن الكومارينات البسيطة (HAMIMED, 2009).

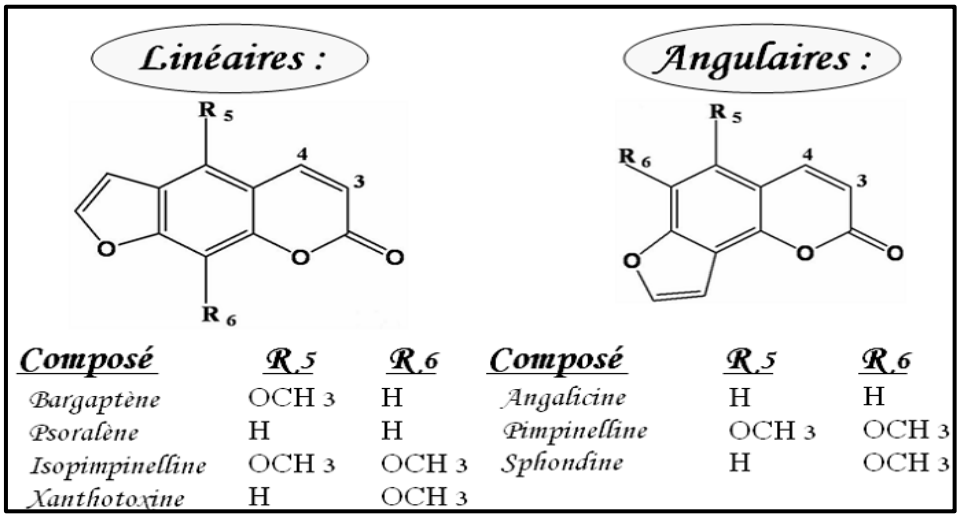
ب- Coumarines Prénylées كومارينات برينيلية:



الوثيقة (08): مركب Rutacultine من الكومارينات البرينيلية Coumarines Prénylées.

(MURRY *et al*., 1982)

ت- Furanocoumarines (Linéaires et Angulaires) الكومارينات الخطية و الزاوية:

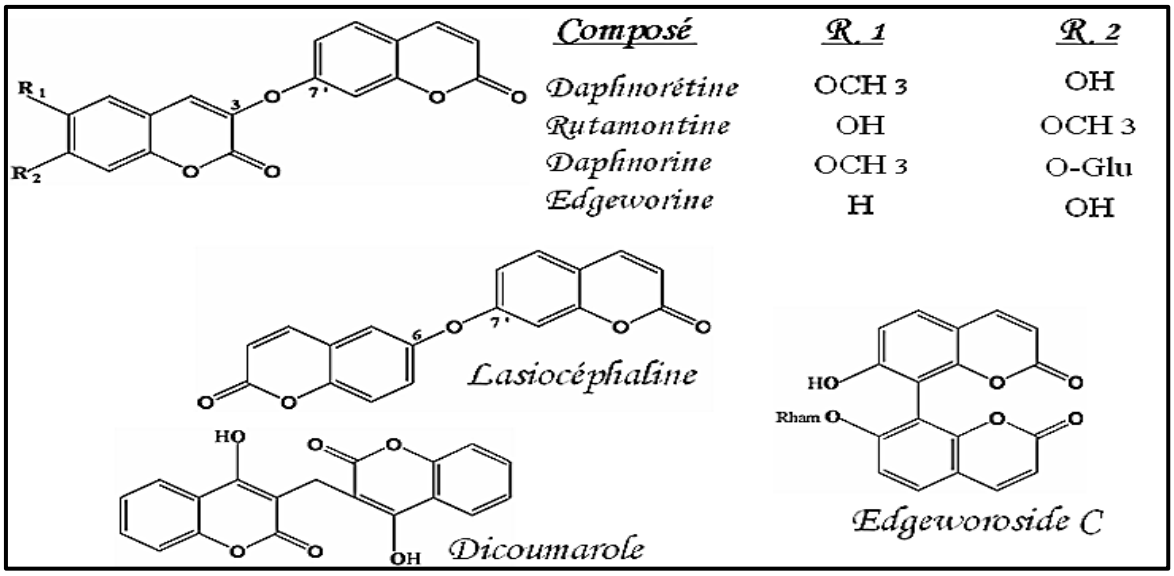


Composé	R5	R6	Composé	R5	R6
Bargaptène	OCH 3	H	Angalicine	H	H
Psoralène	H	H	Pimpinelline	OCH 3	OCH 3
Isopimpinelline	OCH 3	OCH 3	Sphondine	H	OCH 3
Xanthotoxine	H	OCH 3			

الوثيقة (09): بعض أمثلة عن المركبات الكومارينية الزاوية و الخطية.
(MURRY *et al*.,1982; HAMIMED, 2009)

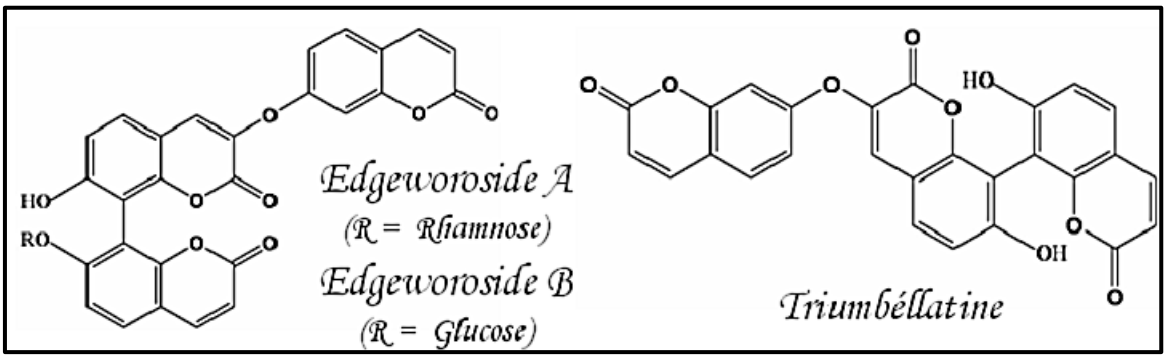
ث- Pyranocoumarines البرانكومارينات: بها نوعان البسيطة و الثنائية، كما نميز في هاته الأخيرة ثلاث سلاسل مختلفة:

- La série des Calanolide
- La série des Inophyllum
- La série des Cordatolide



الوثيقة (10): بعض الامثلة عن الكومارينات الثنائية.
(MURRY *et al*., 1982; HAMIMED, 2009)

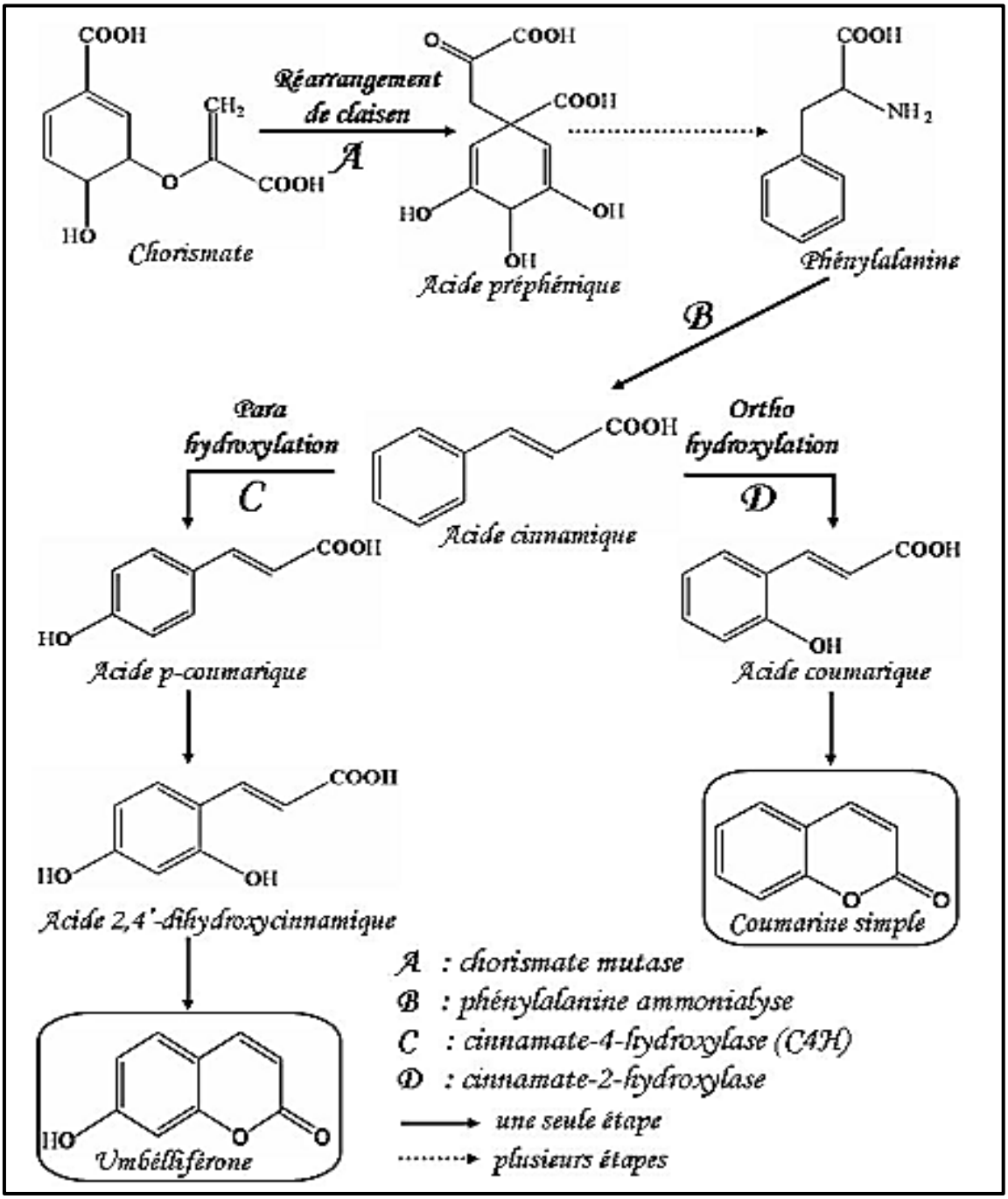
ج- Coumarines à l'état trimériques (Tricoumarines):



الوثيقة (11): بعض الامثلة عن الكومارينات الثلاثية.
(MURRY *et al*., 1982; HAMIMED, 2009)

I-2-6- 4- التصنيع الحيوي للكومارينات:

تختلف طرق تخليق الكومارينات حسب نوعها فمنها المعقد و البسيط و الوثيقة (12) توضح التصنيع الحيوي للكومارينات البسيطة والمعقدة (LIEVRE, 2004):



الوثيقة (12): التخليق الحيوي للكومارينات (LIEVRE, 2004).

I-6-2- 5- الفعالية البيولوجية للكومارينات :

- ❖ يستعمل المركب Coumermycine A_1 والمركب Novobiocine كمضادات للبكتيريا.
- ❖ يعرف المركب Hydroxy-4-coumarine بخصائصه المضادة لتخثر الدم (MURRY *et al.*,1982).

I-6-3- الأعفاص (التانينات) Les Tannins :

I-6-3-1- تعريفها:

هي أكثر مجموعات متعددات الفينول تعقيدا، تشمل أعدادا كبيرة من مواد معقدة التركيب تخلو من النتروجين وذات وزن جزيئي كبير يتراوح ما بين 500 الى 3000 غ/مول (BRUNETON, 1997)، هذه المواد قادرة على دبغ الجلود وترسيب الجلاتين من المحاليل و بعض القلويدات (SEREME *et al.*, 2010)، هاته الخاصية تعرف بالخاصية القابضة أو العفصية (الكرد، 2010 ؛ حجاوي وآخرون، 2009).

I-6-3-2- تواجدها في النبات:

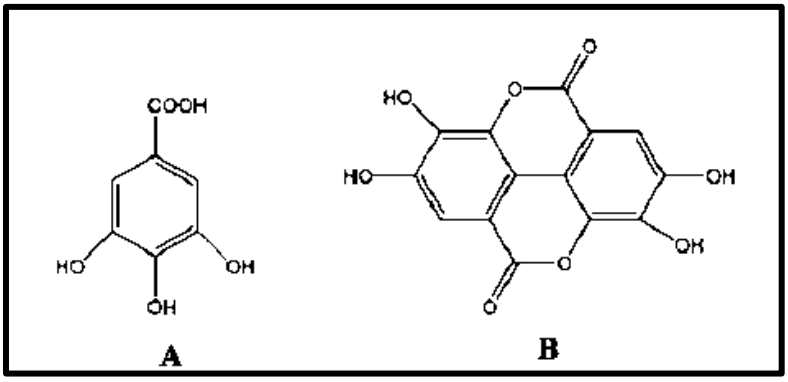
تتواجد التانينات في العديد من العائلات النباتية وتتكون عادة في الفجوات العصارية للخلايا البرنشيمية، كما تتوزع الأعفاص في مختلف أجزاء النباتات لكنها في الغالب توجد بتركيز كبير في أوراق و قشور النباتات (SCALBERT, 1991; MESSAI, 2011)

I-6-3-3- تصنيف الأعفاص:

اعتمادا على طبيعة التجمع الجزيئي للأعفاص فهي تنقسم إلى مجموعتين هما:

1/ الأعفاص الحقيقية: وهي التانينات ذات الوزن الجزيئي العالي يتراوح بين 1000 و 5000 (حجاوي وآخرون، 2009) وهي بدورها تنقسم إلى نوعان:

1/1- الأعفاص القابلة للإماهة les Tanins Hydrolysables: وهذا النوع قابل للإماهة بوجود الأحماض أو الانزيمات مثل Tannase وهو عبارة عن استرات أحماض فينولية Gallic Acide و Ellagic Acide مرتبطة مع الجلوكوز (الوثيقة 13). (BRUNETON, 1997; SEREME *et al.*, 2010; HAGERMAN *et al.*, 1999)



الوثيقة (13): البنية الكيميائية لحمض الغاليك Gallique (A) و Ellagique (B).

(BELYAGOBI et BENHAMMOU, 2012)

2/1- الأعفاص الغير قابلة للإماهة Les Tanins Condensé: سميت بهذا الاسم لأنه لا يمكن اماهتها، وعند تعرضها لعوامل إماهة فإنها تتبلمر مكونة مواد غير ذوابة، حمراء في الغالب تدعى Phlobaphenes، يحتوي هذا النوع على نواة فينولية وأحيانا على كربوهيدرات و بروتينات (حجاوي و آخرون، 2009؛ BRUNETON, 1999).

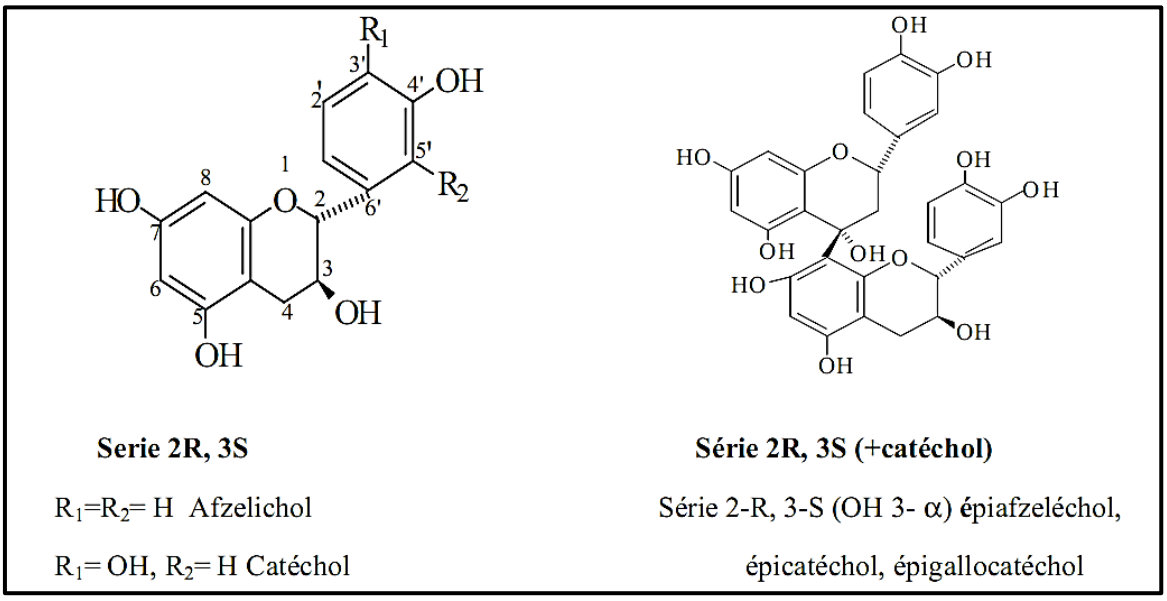
والجدول (02) يوضح بعض الفروق بين الأعفاص المقابلة للإماهة و الأعفاص غير القابلة للإماهة.

الجدول (02): الفروق الاساسية بين الأعفاص القابلة للإماهة وغير القابلة للإماهة.

(حجاوي و آخرون، 2009)

الصفة الكيميائية	أعفاص قابلة للإماهة	أعفاص غير قابلة للإماهة
1- التركيب الكيميائي	Acide Phénoliques + Sucre	Flavonoïdes
2- محتواها السكري	تحتوي على سكر	لا تحتوي على سكر
3- قابليتها للإماهة	قابلة لإماهة	غير قابلة للإماهة.
4- امثلة عليها	Tanins Gallique	Catéchines

2/ الأعفاص الكاذبة Pseudo Tanins: وهي ذات وزن جزئي منخفض، ولكنها تشترك مع الأعفاص الحقيقة في بعض تفاعلاتها الملونة.(الوثيقة 14)



الوثيقة (14): بعض الامثلة عن المركبات التانينية غير القابلة للتحلل المائي.

(BOUHADJERA, 2005)

I-6-3-4- الخصائص العامة للأعفاص:

عادة ما تكون الأعفاص النباتية غير متبلورة لذا يصعب الحصول عليها من النباتات. كما أن لها تفاعلات كيميائية ملونة تختلف حسب اختلاف النوع (حجاوي و آخرون، 2009)، تذوب في الماء و المحاليل القلوية والكحول و الأسيتون و الغليسرول، ولا تذوب في المذيبات العضوية الأخرى كالكلوروفورم (BOUHADJERA, 2005)، تترسب بواسطة المعادن الثقيلة كالرصاص و الحديد و تعطي رواسب قاتمة اللون مثل الأسود والبني، لذا تستخدم في صناعة الأحبار و مخثرات المطاط (حجاوي وآخرون، 2009).

تعرف الأعفاص بالخاصية القابضة Astringente والتي تستغل في دبغ الجلود و تتمثل هاته الخاصية في ارتباط الأعفاص بالبروتينات المكونة للجلود حيث تجعله صلبا و تحميه من تحليل الكائنات الدقيقة (حجاوي و آخرون، 2009)، كما ترسب القلويدات و الجيلاتين (COWAN, 1999; HASLAM, 1996)

I-6-3-5- الخصائص البيولوجية للأعفاص:

للتانينات خصائص بيولوجية مهمة، فهي تستخدم طبيا كمضادات للتسمم بالقلويدات والمعادن الثقيلة، كما تستعمل كمواد قابضة في حالات الإسهال و معالجة الأمراض الإشعاعية، و عرفت ايضا بخاصيتها المضادة للالتهابات و القاتلة للميكروبات (حجاوي و آخرون، 2009؛ طه، 1981).

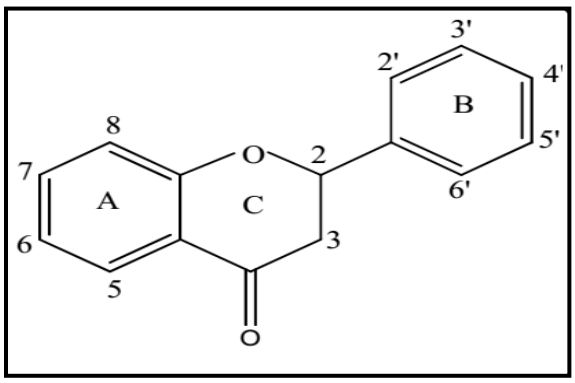
كما أنها تستعمل في تطهير الجروح السطحية و الحروق فتعمل على وقف النزيف لمفعولها القابض هذا بالإضافة إلى تأثيرها المطهر (BOUHADJERA, 2005)

بالرغم من فوائدها العديدة سواء للنبات أو للإنسان الا أن هيكل و عمر (1993) أشارا بأن أكل العلكة و شرب الشاي بكميات كثيرة و مركزة يؤدي إلى الإصابة بالسرطان و ذلك لاحتوائها على التانينات (الأعفاص)، و لهذا نجد البريطانيين يضيفون الحليب للشاي لأن البروتينات ترسب الأعفاص مما يخفف من أضرارها.

I-6-4- الفلافونويدات Les Flavonoïde:

I-6-4-1- تعريف الفلافونويدات:

مصطلح الـ Flavonoide في اللغة اللاتينية مشتق من الكلمة اليونانية "Flavus" و التي تعني اللون الأصفر، والذي ظهر لأول مرة من قبل عالم الكيمياء الحيوية "Albert Szent-Györgyi" حيث صنفها على أساس أنها فيتامين (P) ، كما أثبت أنها تعزز دور الفيتامين (C) (MABRY *et al.*, 1970)، و هي عبارة عن صبغات نباتية تنتشر في أجزاء النبات المختلفة، تحتوي جميعها على 15 ذرة كربون في هيكلها الأساسي موزعة على ثلاث حلقات C،B،A (الوثيقة 15) (GUIGNARD *et al.*, 1980)، إذ تتميز الفلافونويدات ببنية C_6-C_3-C_6، وعموما هي مركبات ملونة مسؤولة عن لون الأزهار و الثمار و الأوراق في النبات (ميثاق، 2010)



الوثيقة (15): الهيكل القاعدي للفلافونويدات (عاشوري، 2004 ؛ شروانة، 2007).

I-6-4-2- تواجدها في النبات:

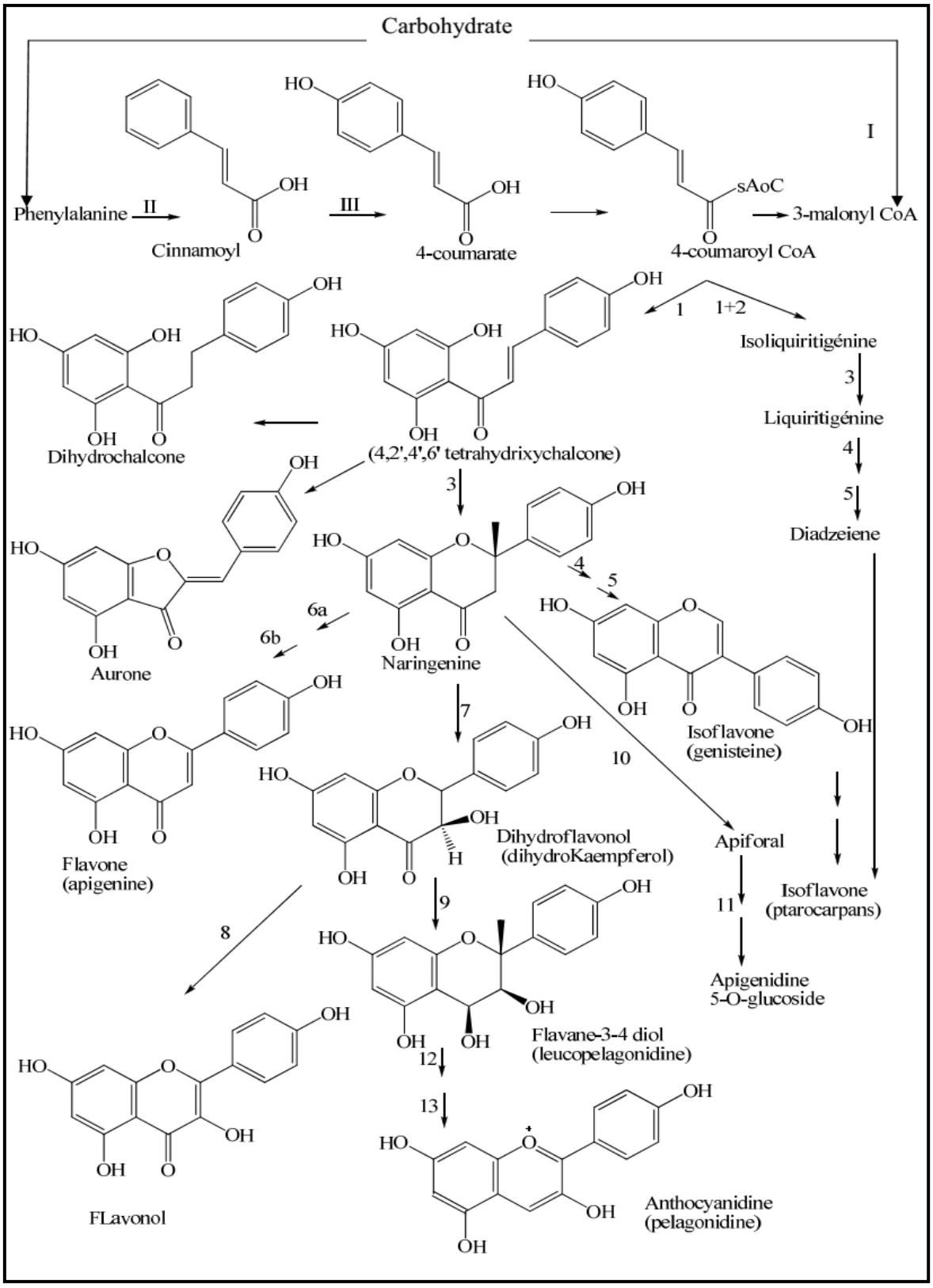
تعتبر الفلافونويدات من المركبات الطبيعية الأكثر انتشارا في المملكة النباتية حيث تتواجد عادة في النباتات الراقية خاصة مغلفات البذور Angiospermes كما تتواجد بصفة متوسطة عند عاريات البذور Gymnosperms وتكون شبه منعدمة في الطحالب والفطريات (HARBORNE, 1989) تتوزع الفلافونويدات بشكل واسع في الأوراق، الأغصان و الأزهار (MEDIC-SARIC *et al*., 2004) كما في السبانخ و الكرنب، و كذا في الغشاء الخارجي لبعض الفواكه كالليمون و الحوامض (MARFAK, 2003).

أما على مستوى الخلوي فإن الفلافونويدات تتواجد بشكل جليكوزيدات تذوب في الماء و تتمركز بالخصوص في الفجوة العصارية، أما تواجدها بشكل أجليكونات و التي تكون ذوابة في المذيبات غير القطبية (الفلافونويدات عديدة الميثوكسيل) فإنها تتوضع على مستوى سطح النبات و خاصة الأوراق (HARBORNE, 1973; WOLLENWEBRE et DIETZ, 1980).

I-6-4-3- التخليق الحيوي للفلافونويدات:

تعتبر البلاستيدات المصدر الحيوي لتصنيع الفلافونويدات انطلاقا من Cnanmoyl CoA الناتجة من الشبكة الأندوبلازمية المحببة، مركبة في شكل إيتيروزيدات، بواسطة انزيم "Chalcone Synthase" (CHS) وهو الانزيم المفتاح في تشكيل الهيكل الفلافونيدي، كما أن البعض منها يغادر البلاستيدة و يتراكم في الفجوة كالاونثوسيانات (HELLER et FORKMANN, 1980). انزيم "Chalcone Synthase" الذي يحفز تدريجيا تكاثف ثلاث وحدات الخلات من 4-coumaroyl malonyl-CoA إلى 4,2',4',6-tetrahydroxychalcon، هذا الأخير يعتبر نقطة الانطلاق لإصطناع العديد من الفلافونويدات (الوثيقة 16) و هذا بوجود محفزات إنزيمية تخص كل مرحلة من المراحل المختلفة (بن مرعاش، 2012) .

و يمثل الفلافانون أهم الفروع الفلافونويدية حيث ينتج من عملية تحوير فراغية نوعية انطلاقا من نواة الشالكون (BOLAND et WONG, 1975)، كما أن إعادة الترتيب للفلافانون بفعل أنزيم "Iso flavones synthase" والذي يقود إلى الإيزوفلافون يعتبر أول تفاعل نوعي للاصطناع الحيوي للإيزوفلافونويدات (KOCH et GRISEBACH, 1986) أما أنزيم "Flavonone hydroxylase" فهو يحفز تفاعل hydroxylation للفلافانون إلى Dihydroflavanol (STOTZ *et al*., 1984).



الوثيقة (16): التخليق الحيوي لمختلف الأقسام الفلافونويدية (بن مرعاش، 2012؛ ميثاق، 2010)

I-6- 4- 4- تصنيف الفلافونويدات:

صنفت المركبات الفلافونويدية إلى عدة مجموعات (الوثيقة 17)، وذلك حسب درجة التأكسد في الحلقة البيرانية (C) التي يمكن أن تفتح أو تغلق لتعطي حلقة فيران (BRUNETON, 1993)، في حين يحدد نوع الفلافونيد داخل المجموعة الواحدة من خلال المستبدلات على الحلقتين (A) و (B):

- **الفلافون Les flavones:**

يمكن للحلقة B المشار اليها سابقا أن تتواجد في الموضع 2، و تكون الرابطة C_2-C_3 غير مشبعة، و يسمى حينئذ فلافون.

- **الفلافونول Les flavonoles:**

إذا وجدت في الموضع 3 مجموعة هيدروكسيل(OH) حرة أو مستبدلة (OR) لمركب الفلافون حيث يتم تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في مرحلة الشالكون سمي المركب بالفلافونول، حيث يشكل هذا الأخير نواة أساسية للعديد من المركبات الطبيعية.

- **الفلافانون Les flavanones:**

وهي مركبات التي تكون فيها الرابطة C_2-C_3 في هيكل الفلافون مشبعة.

- **نيوفلافون Les Neoflavones:**

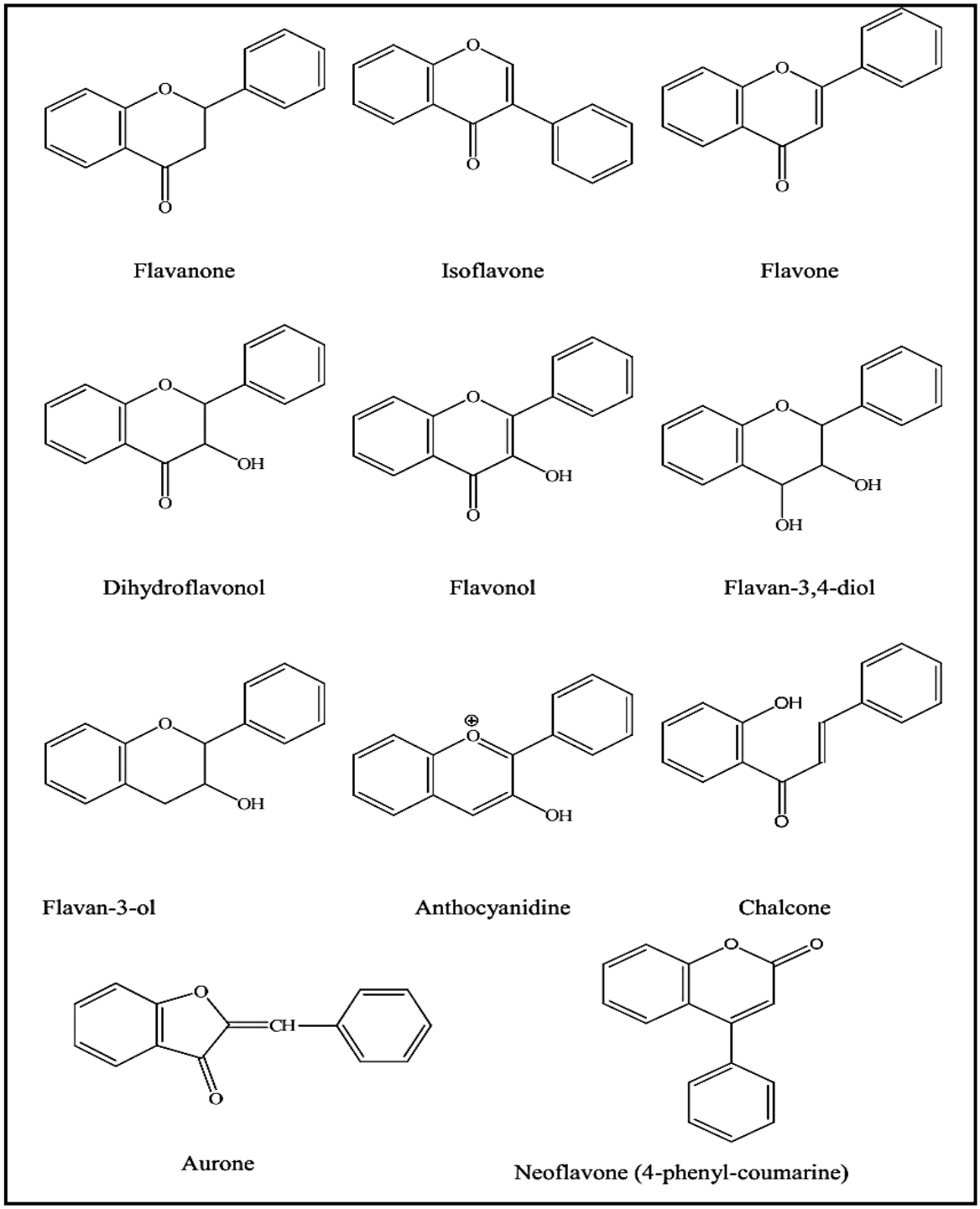
إذا وجدت الحلقة B في الوضع 4 و مجموعة الكربوكسيل في الموضع 2 و الرابطة C_2-C_3 كانت غير مشبعة سمي المركب نيوفلافون (EYTON *et al.*, 1965)، فهو قليل الانتشار في الطبيعة خلافا عن الفلافونات و الفلافونولات المنتشرة على نطاق واسع (ELHAZIMI, 1995).

- **إيزوفلافون Les Isoflavones:**

تختلف في بنائها عن الفلافونات في موضع ارتباط الحلقة B إذ ترتبط هذه الأخيرة في الموضع رقم 3 بدلا من الموضع 2 (HARBORNE, 1994; STAFFORD, 1997).

- **الفلافونويدات الثنائية Les Biflavonoides:**

هي عبارة عن ارتباط وحدتي فلافون و فلافانون، بحيث يمكن للفلافونويدات أن تكون مرتبطة عن طريق ذرات الكربون الأكثر فعالية C-6 أو C-8 (ميثاق، 2010؛ عاشوري، 2004).



الوثيقة (17): الهياكل الأساسية لمختلف الفلافونويدات (ميثاق، 2010؛ عاشوري، 2004).

I-6- 4- 5- الخواص العامة للفلافونويدات:

بما أن الفلافونويدات مركبات هيدروكسيلية فلا بد أن تتصف بخواص و صفات الفينولات، فهي مركبات ذات صفة حامضية ضعيفة تذوب في القواعد القوية مثل هيدروكسيل الصوديوم، وتتصف الفلافونويدات الحاملة لعدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو السكرية بالصفة القطبية، و بالتالي فهي تذوب في المذيبات القطبية مثل (الميثانول، الإيثانول، الأسيتون و الماء) (ELHAZIMI, 1995 ؛ بومعراف، 2007).

أما الفلافونويدات الأقل قطبية مثل الإيزوفلافونات و الفلافونات و الفلافانولات و التي تحمل عددا أكبر من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الإيثر و الكلوروفورم (ISTRATESCU GUTI, 1985).

I-6- 4- 6- الفعالية البيولوجية للفلافونويدات:

إضافة الى دورها الجلي في النبات كمواد جاذبة للحشرات، و منتجة لبروتينات Phytoalexines (MARFAK, 2003)، تعمل على تقليل عملية النتح لدى نباتات المناطق الجافة (WOLLENWEBER et DIETZ, 1980)، فهي أيضا تستعمل في ميادين حيوية عديدة، أثارت اهتمام العديد من الباحثين والصيادلة، فقد تم تعداد حوالي 9000 بنية منها في صورة إيتيروزيدية Heterosides أو أجليكونية Aglycone (WILLIAMS et GRAYER, 2004 ; HARBORNE, 1988).

وقد اثبتت مجموعة من الابحاث في ميدان الطب و البيولوجيا فعالية الفلافونويدات في النشاطية المضادة للاكسدة، المضادة للحساسية، و المضادة للفيروسات و البكتيريا (HAVSTEEN, 2002)

- ✓ **التأثير المضاد للأكسدة:**

تعد الفلافونويدات من المواد الواقية ضد ظهور السرطان، والناتج عن التزايد الكبير في الجذور الحرة المسؤولة عن تشويه الحمض النووي في الخلية إثر ارتفاع الإجهاد التأكسدي بحيث يعتبر النشاط المضاد للأكسدة لهذه المركبات إحدى الآليات الأولى التي تمت دراستها و اثبات فعاليتها (OBERMEIR *et al*., 1995).

تعمل الفلافونويدات على اقتناص الجذور الحرة التي تؤدي الى إحداث تشوهات بالحمض الريبي النووي ADN المنقوص الأكسيجين، و بالتالي حدوث طفرات في المورثات الورمية أو الكابحة لظهور الأورام، التي تعتبر بادرة لظهور هذا المرض (SATYAJIT, 2007; NIJVELDT *et al*., 2001).

- ✓ **التأثير المضاد للحساسية:**

يعود هذا التأثير الى دور الفلافونويدات المؤثر على إنتاج الهيستامين المسبب للحساسية، فتعمل الفلافونويدات على تثبيط بعض الأنزيمات المحررة للهيستامين من خلايا الماستوسيت و الخلايا القاعدية مثل phosphodiesterase AMP و -+Ca2 dépendante ATPases، حيث يعمل هذا الأخير على تحرير الطاقة من إماهة ATP لتسهيل إمتصاص الكالسيوم من قبل الأغشية الخلوية هذا ما يؤدي الى تحرير الهيستامين المخزن داخل الحويصلات الخلوية (بن مرعاش، 2012)، كما أثبتت الدراسات أن مركب Quercetine أظهر قدرة أكبر من تلك التي يؤثر بها الـ Cromoglycate de sodium و المستعمل كدواء مضاد لتحرير الهيستامين (DICAARLO *et al*., 1999).

- ✓ **التأثير المضاد للإلتهاب:**

إن إستقلاب حمض الأراشيدونيك Acide Arachidonique تحت تأثير كل من أنزيمي Cyclooxygénase و Lipooxygénase يؤدي إلى إنتاج كل من Leucotriènes و Prostaglandines المسؤولة على مظاهر الإلتهاب، و قد بين Landolfi و فريقه (1984) أن بعض الفلافونويدات قادرة على تغيير مسار حمض الأراشيدونيك داخل الصفائح الدموية، حيث ثبت أن كل من Myricètine و Quercetine بتراكيز عالية يثبطان كلا من Cyclooxygénase وLipoxygénase أما عند التراكيز المنخفضة فيثبطان أنزيم Lipooxygénase في حين أن كلا من Chrysin وApigénin يوقفان نشاط Cyclooxygénase.

✓ **التأثير المضاد للفيروسات و البكتيريا:**

أكثر ما ركزت عليه الأبحاث فيما يخص نشاط الفلافونويدات المضادة للفيروسات هو دراسة تأثير هذه المركبات على فيروس (HIV) المسؤول عن أعراض فقدان المناعة المكتسبة (HARBORNE et WILLIAMS, 2000) و قد تم إثبات فعالية الفلافونويدات على كبح تضاعف فيروس السيدا وذلك بتثبيطها لإنزيم الإستنساخ العكسي Revers Transcriptase (SPEDDING, 1989; NIJVELDT *et al*., 2001)، لكن تأثيرها الكابح على كل من أنزيمي ADN و ARN بوليميراز للخلية العائل أكبر من ذلك الملاحظ على الفيروس (ONO et NAKANE, 1990; ONO *et al*., 1990).

للفلافونويدات أيضا تأثير مضاد للبكتيريا هذا ما تم إثباته إثر دراسة قام بها العالم OHEMENG (1993)، حيث اثبت فعالية المركبات الفلافونويدية في تثبيط أنزيم ADN gyrase على النماذج المخبرية.

كما يمكن للفلافونويدات ان تؤثر ضد الميكروبات بألية جد معقدة، و من بين أهم الفرضيات الموضوعة لهاته الآلية نذكر ما يلي:

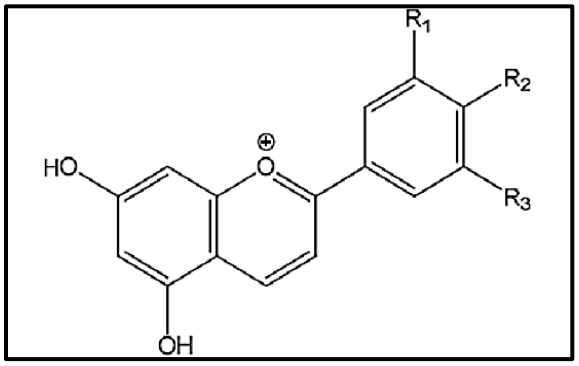
- حجز المواد الضرورية للنمو الميكروبي والتقاط بعض المعادن مثل الحديد.
- تثبيط النشاط الأيضي للميكروبات.
- تثبيط الأنزيمات الميكروبية الخارج خلوية (MILA et SCALBERT, 1994).

I-6- 5- الأنثوسيانات Les Anthocyanes:

تفصل الانثوسيانات عادة عن الفلافونويدات بسبب تميزها عن باقي اصناف الفلافونويدات بوجود (O^+) في هيكلها الكيميائي (الوثيقة 18)، مما يجعلها مميزة عن باقي الفلافونويدات لذا ارتأينا دراستها على وجه الخصوص نظرا لأهميتها المضادة للأكسدة.

I-6- 5- 1- تعريف الأنثوسيانات:

هي عبارة عن أصباغ طبيعية ينتجها النبات أثناء التمثيل الضوئي خلال النضج، وهي مواد فينولية تنتمي لعائلة الفلافونويدات وتتجمع في خلايا الطبقة الخارجية لقشور الثمار (الوثيقة 18) (BOHM *et al*., 1998)، و بالخصوص في سيتوبلازم خلايا النباتات البرية، و تغيب غالبا عند النباتات المائية (LACAILLE, 1996).



الوثيقة (18): الهيكل الأساسي للأنثوسيانات (بومعراف، 2007).

I-6- 5-2- الخصائص العامة للأنثوسيانات:

تعرف الانثوسيانات بقابليتها للذوبان في الماء (LACAILLE, 1996)، تعطي بعد تأينها ألوان مختلفة من أجل قيم متنوعة للـpH تتروح من أحمر برتقالي في الوسط الحامضي الى أزرق نيلي في الوسط القاعدي (بن مرعاش، 2012)، كما انها تعتبر مواد مضادة للأكسدة تستعمل ضد الشيخوخة، توجد في النباتات في صورة ايتيروزيدية (عاشوري، 2004).

I-6- 5- 3- الفعالية البيولوجية للأنثوسيانات :

للانثوسيانات دور مهم في الوقاية من الاشعة الفوق بنفسجية UV، كما أنها تعرف كمواد تقلل من أعراض أمراض القلب و الأوعية الدموية، ذلك لدورها المضاد للأكسدة الذي يخفف من التوتر التأكسدي (BOHM *et al*., 1998)، و تستعمل ايضا كمواد مضادة للشيخوخة كونها مضادات للأكسدة (عاشوري، 2004).

الفصل الثاني:

الدراسة النباتية

للنوع

Retama raetem

(Frosk.)

I- عموميات:

استطاع العلماء إعطاء اسماء محددة على بعض الأصناف و الأنواع النباتية و إدراجها ضمن عائلات لتسهيل الدراسات التجريبية التي تهدف لتثمين المواد الفعالة في كل نوع أو صنف أو عائلة (EDDOUKS *et al*., 2007)، العائلة الفراشية Fabaceae أو ما تسمى أيضا بالعائلة الفولية Fabaceae أو البقولية Légumineuses، من أشهر العائلات النباتية التي تشمل أنواع مختلفة، الرابط المشترك بينها هو شكل الثمار فيها بحيث تكون بشكل قرون، ما دفع لتسميتها بالعائلة البقولية Légumineuses (HEYWOOD, 1996).

II- العائلة الفولية (الفراشية) Fabaceae :

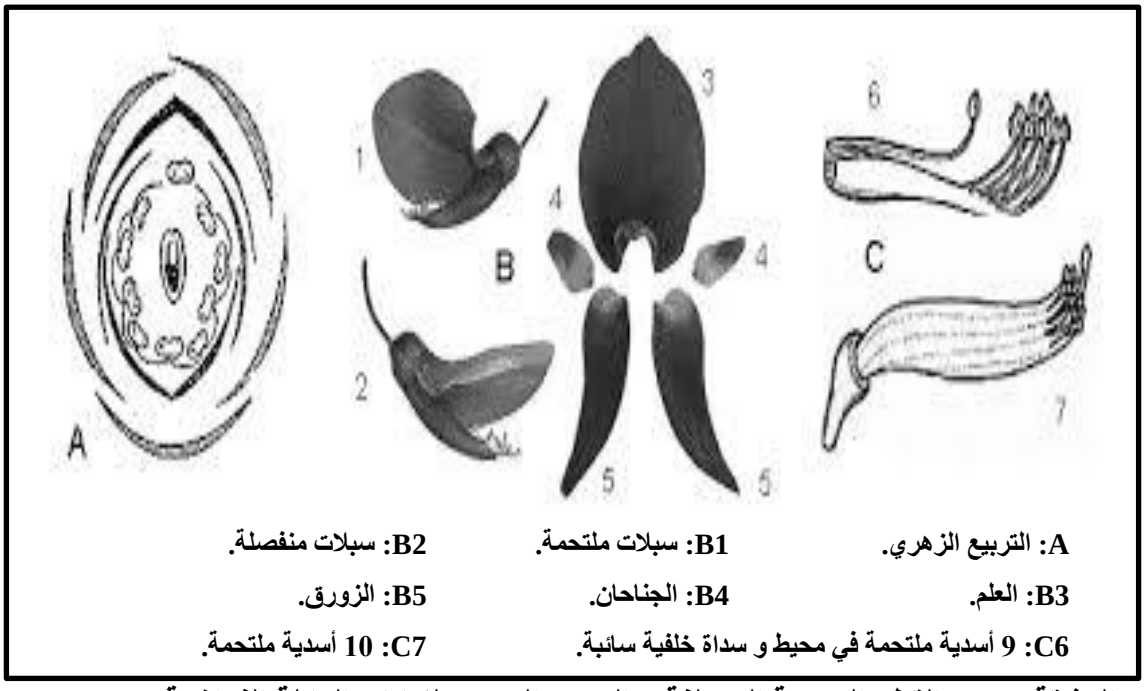
هي واحدة من اكبر عائلات النباتات الزهرية، تشمل أكثر من 730 جنسا و 19 ألف نوع منتشرة في المناطق المعتدلة من الكرة الأرضية، تختلف أنواعها اختلافا ملحوظا منها الشجرية وتنتشر في المناطق الحارة نسبيا، ومنها ذات أشكال عشبية تتوزع عادة في المناطق المعتدلة (MORALE, 2011).

تميل معظم نباتات هاته العائلة للنمو في المناطق الجافة وشبه الجافة نظرا لتكيفها مع المناخات القاسية، كما تعرف هاته العائلة بأنها تمتلك معدلات عالية من النيتروجين والامونيا (SPICHIGER *et al*., 2002 ; MORALE, 2011).

III- خصائص العائلة Fabaceae:

- نباتات واسعة الانتشار، أوراقها مركبة أو منتظمة، متبادلة، و مؤذنة.
- غلافها الزهري بسيط مختزل، أزهارها بسيطة أو مركبة، خنثى، غير منتظمة، تتركب من خمس سبلات ملتحمة أو منفصلة، وخمس بتلات تعرف الخلفية منها بالعلم (vexillum standard) والجانبيتان بالجناحين (alaevings)، والأماميتان الملتحمتان بالزورق (caria keel) (الوثيقة 19).
- التربيع الزهري متراكب (imbriquée)، متنازل (descendante)، او متصاعد (vexillaire) (A في الوثيقة 19).
- نوراتها متفاوتة الطول، بها عدد محدود من الأسدية يصل الى 10 أسدية والزهرة وحيدة التناظر(Zygomorphe).

- يتكون الطلع من عشر اسدية (C6 الوثيقة 19)، تلتحم خيوط الاسدية كلها أو تسعة منها وتشكل أنبوبة سدائية تضم بداخلها المتاع (C7 الوثيقة 19) أو تبقى كل سداة حرة حسب الأنواع.
- يتركب المتاع من كربلة واحدة ذات مبيض وحيد المسكن، أحادي القلم والميسم، ويوجد بداخلها صفان متقابلان من البويضات، والمبيض علوي.
- ثمارها قرنية أو بقلة (ثمرة تتكون من غرفة واحدة تتفتح من طرزيها الظهري والبطني عند النضج).
- التلقيح ذاتي غالبا وقد يكون خلطيا بالحشرات (عبد المنعم، 2012).



A: التربيع الزهري. B1: سبلات ملتحمة. B2: سبلات منفصلة.
B3: العلم. B4: الجناحان. B5: الزورق.
C6: 9 أسدية ملتحمة في محيط و سداة خلفية سائبة. C7: 10 أسدية ملتحمة.

الوثيقة (19): القطع الزهرية المختلفة و التربيع الزهري لنباتات العائلة الفراشية Fabaceae.

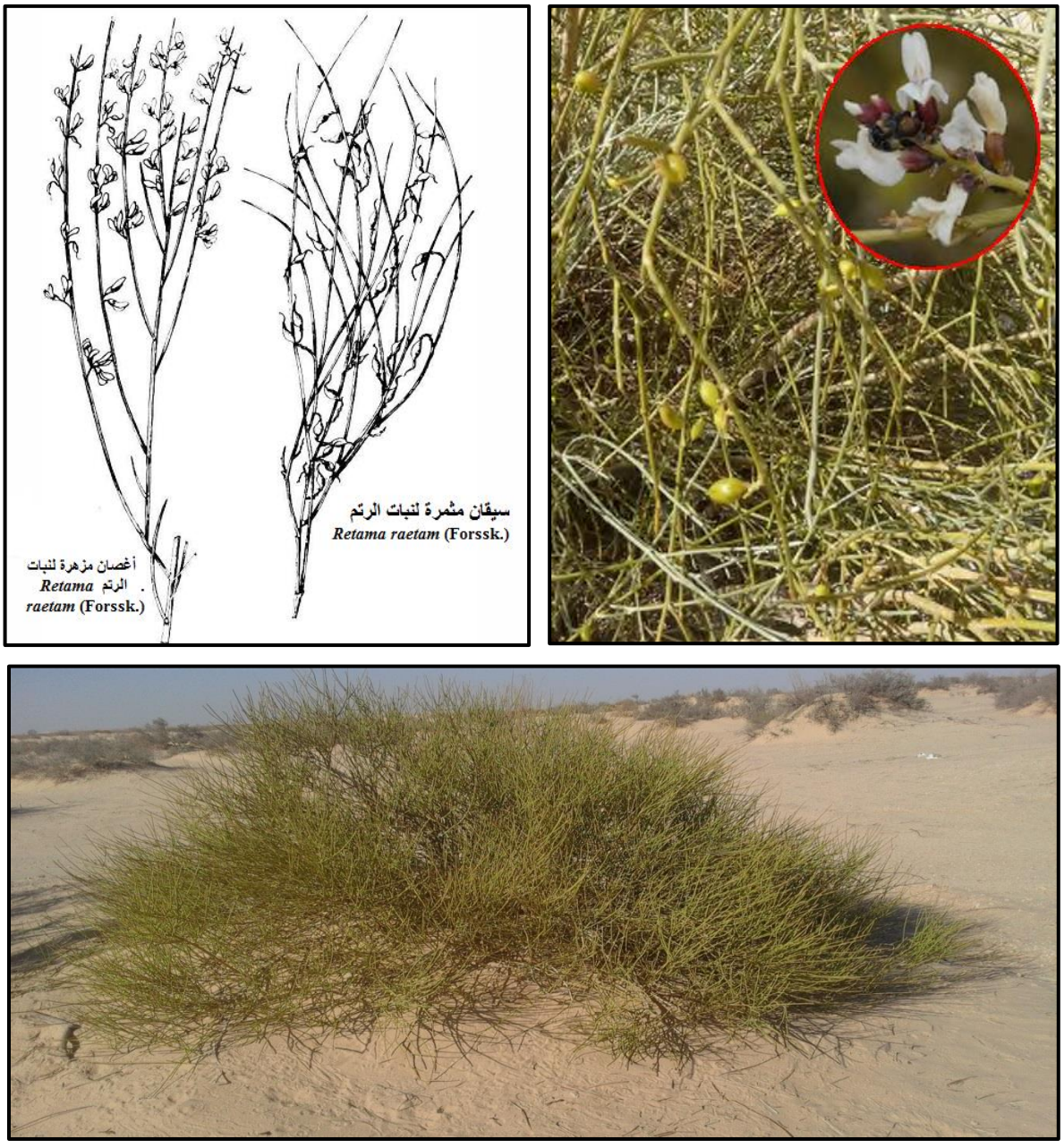
(عبد المنعم، 2012)

VI- نبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) Webb.:

VI-1- الوصف النباتي لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.):

نبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) هي شجيرات تنتشر في الصحاري يبلغ طولها ما بين 1 الى 3.5 أمتار (HADJ MOUSSA, 2012)، ذات أغصان خضراء مخططة طوليا، تحمل أزهار بيضاء اللون عليها مساحات بنفسجية أرجوانية قطرها يتراوح ما بين 8 الى 10 مليمترات تتجمع فيما بينها مشكلة باقات زهرية صغيرة تحتوي من 5 الى 10 زهرات (حليس، 2007).

تنمو هاته الشجيرات المعمرة في مناطق العرق و الصحن و الأراضي المستوية قليلة الرمال (OZENDA, 1991)، تزهر في أواخر الربيع (MAGHRANI *et al.*, 2005)، و تثمر في فصل الصيف، ثمارها قرنية بيضاوية تنتهي بقلم طويل مقوس قليلا (الوثيقة 20)، وأوراقها كثيرة التساقط منها السفلية ثلاثية الوريقات، وأزهارها العلوية بسيطة و وحيدة الوريقة (QUEZEL et SANTA, 1962)، جذورها متفرعة عميقة تلامس الطبقة الرطبة من التربة قد تصل إلى 10 أمتار أو أكثر (SELAMI, 2004; ZOHARY, 1962).



الوثيقة (20): مختلف أجزاء نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb.

(MAIRE, 1987)

VI- 2- الوضعية التصنيفية للنبات Position systématique:

حسب ما ذكره QUEZEL و SANTA (1962)، يصنف نبات الرتم الصحراوي وفق الجدول (03):

جدول (03): الوضعية التصنيفية لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb.
(BENHOUHOU, 2005; QUEZEL et SANTA, 1962)

Règne	Végétal	المملكة
Embranchement	Spermaphytes	**الشعبـــة**
Sous embranchement	Angiospermes	**تحت الشعبة**
Classe	Dicotylédones	**القـــسم**
Ordre	Fabales	**الرتبـــة**
Sub famille	Légumineuses	**فوق العائلة**
Famille	Fabacées	**العـــائلة**
Sous famille	Papilionacées	**تحت العائلة**
Genre	Rétama	**الجنـــس**
Espèce	*Retama raetam* (Forssk.) Webb.	**النـــوع**
Nom Vernaculaires	R'tam، Telit، Telggit، white weeping broom، Genêt du desert	**الاسم الشائع**

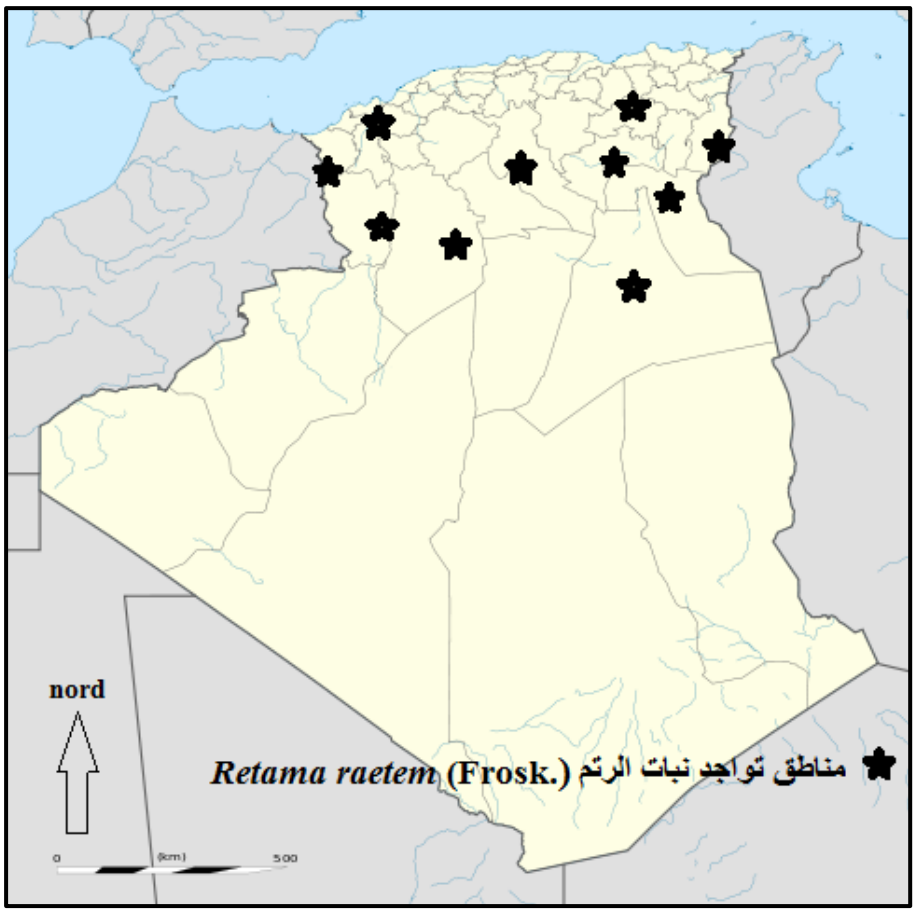
VI-3- الانتشار الجغرافي لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb.:

VI-3 -1- الانتشار الجغرافي لنبات الرتم في العالم:

يتواجد نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb. في الصحراء الكبرى بشمال افريقيا كما لوحظ النبات في الرمال البحرية على شريط ساحل البحر الابيض المتوسط، حيث تنمو في الكثبان والمنحدرات الرملية بكل من الجزائر (THOMAS, 1968) و تونس، المغرب، ليبيا و مصر (BOULOS, 1999)، كما ينتشر أيضا ببلدان آسيا المعتدلة كفلسطين و لبنان والاردن (AL-TUBULY *et al.*, 2011) وفي دول جنوب شرق اوروبا (GRIN, 2011).

VI-2-3- الانتشار الجغرافي لنبات الرتم في الجزائر:

ينمو نبات الرتم الصحراوي *Retama raetam* (Forssk.) في الاراضي الرملية بالجزائر، وقد لوحظ في كل من ولاية الوادي، ورقلة (ALLAL-BENFAKIH, 2006)، تقرت تبسة، بسكرة (IGHIL, 1990)، الجلفة، عين الصفراء، النعامة، وسط القبائل، جنوب وهران و تلمسان (MITTLER *et al*., 2001; DAMERDJI et AMARA, 2013) الوثيقة (21).



الوثيقة (21): مناطق انتشار نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) في الجزائر.
(MITTLER *et al*., 2001; DAMERDJI et AMARA, 2013)

VI-4-المركبات الفعالة في النبات:

يحتوي نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) حسب BENHOUHOU (2005) على قلويدات Quinolizidine حيث تتمركز في ثمارها بينما تكون أزهارها غنية بالفلافونويدات، كما ذكر DEHAK و أخرون (2005) أن الزيوت الطيارة لنبات الرتم غنية بالهيدروكربونات الالفاتية Hydrocarbures Aliphatiques، و السيسكوتربينات Sesquiterpènes.

VI-5 - استعمالات النبات:

استعمل هذا النبات منذ القديم في إزالة التشوهات الخلقية، أو الندبات، كما استعمل مستخلصاتها كمعالج للالتهابات و دامل للجروح، و قد استخدمه البعض كمدر للبول و منشط للكلى، طارد للديدان مطهر، أو مسهل، ومهدئ، كما استعمل أيضا لمرضى السكري في بعض المناطق (حليس، 2007) (BENHOUHOU, 2005; RACHID *et al*., 2012).

تعتبر ثمار الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb من أكثر الثمار سمية نظرا لاحتوائها على قلويدات تثير الهلوسة عند تناولها، كما تؤدي في بعض الحالات الى الاجهاض أو التسمم (BENHOUHOU, 2005).

VI-6- الدراسات السابقة للنوع النباتي *Retama raetam* (Forssk.) Webb.:

يعتبر نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb. ذو أهمية بالغة في الكثير من الدراسات المخبرية، كونه نباتا طبيا ذو أثر علاجي على بعض الأمراض الشائعة، ما أدى الى دراسته من قبل بعض الباحثين، و فيما يلي أهم الدراسات المتعلقة بهذا النبات حيث:

- قام SAADAOUI و أخرون (2007) في دراسة تجريبية حول نبات الرتم أثبت فيها القدرة المتوسطة المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا للنبات.
- أثبت كل من EDDOUKS و زملائه (2007) و MAGHRANI و رفاقه (2003) قدرة المستخلصات المائية لنبات الرتم على ادرار البول Diurétique و تقليل نسبة السكر في الدم Activité Hypoglycémiante.
- كما قام HADJ MOUSSA (2012) بدراسة تأثير مستخلصات النبات حول تثبيط أنزيم l'α – amylase، و ارجع التأثير التثبيطي للأنزيم لمتعددات الفينول و الفلافونويدات المتواجدة في المستخلصات.
- أعطت دراسة حول مستخلصات مائية لنبات الرتم فعاليته السمية ضد الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*، والمتسببة في اتلاف درنات البطاطا الحلوة (ATEYYAT *et al*., 2009)
- في دراسة اخرى قام بها EDZIRI و زملاؤه (2012) أثبتت النتائج قدرة بعض الفلافونويدات المعزولة من المستخلصات النباتية لنبات الرتم، أن لها قدرة مثبطة لبعض الانواع البكتيرية و الفطرية، مما يسمح بإمكانية استخدامها في الأدوية الطبية مستقبلا.

- أجريت دراسة مخبرية على بعض الحيوانات المخبرية تم فيها معاملتها بالمستخلصات الميثانولية لنبات الرتم، لوحظت إثرها اضطرابات في الجهاز المركزي العصبي لهاته الحيوانات، مما يثبت وجود مواد فعالة في النبات قادرة على التحكم في الجهاز العصبي المركزي يفترض أن تكون القلويدات (AL-TUBULY *et al*., 2011).
- أثبت DJEDDI وزملاؤها (2013) في دراسة قاموا بها امكانية المستخلصات الميثانولية و المائية لأجزاء نبات الرتم (جذور، سيقان، أوراق و أزهار) في كبحها للجذور الحرة بنسبة ضعيفة و قدرتها المسكنة للألم.
- تم تعداد نبات الرتم في أكثر من دراسة و ذلك نظرا لقدرتها الكبيرة على التكيف مع المناخات القاسية الشديدة الجفاف (ZAAFOURI et CHAÏEB, 1999; BENKHEIRA, 2008 ; LISAN, 2014).
- درس كل من (MULLERO, 1945) و (BELLAKHDAR, 1978) عواقب الاستهلاك المفرط لهذا النبات فلوحظ أن الابل يصيبه المرض اثر افراطه في استهلاك الرتم، و قد ارجع السبب لكونه يحدث احتباسا بوليا و انسداد في المجاري البولية كما يحدث الاجهاض لدى النياق أحيانا.
- لوحظ أن تناول جرعات (20 ملغ/كلغ) من المستخلصات المائية لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) تفيد في التقليل من مستوى السكر في الدم عند الفئران العادية (MAGHRANI *et al*., 2005)، كما تقلل مستويات السكر في الدم عند الجرذان المصابة بداء السكري المحفز بالستربتوزوتوسين (STZ).
- كما بين MAGHRANI و اخرون (2005) أن المستخلصات المائية لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) تؤثر على أيض الدهون عند الفئران العادية و تؤدي إلى خفض مستويات الدهون الثلاثية Triglycérides في البلازما الخلوية.
- تم عزل العديد من الفلافونويدات من أجزاء مختلفة لنبات الرتم، حيث عزلت مادة الكرسيتين Quercetin، الابجنين Apigenin و الفكتينين Vicenin-2 من الاوراق، و Daidzein، Chrysoeriol 7-O-Glucoside و Orientin من الاجزاء الهوائية للنبات، كما اثبتت فعاليتها المضادة للبكتيريا و الفطريات (EL BAHRI *et al*., 2000; KASSEM *et al*., 2000).

الجزء العملي

الفصل الاول:

الوسائل المستعملة والطرق المتبعة

I -الادوات و المواد المستعملة:

I-1- الأدوات المستعملة في تحضير المادة النباتية:

عند جمع النبات استعملنا الأدوات الموضحة في الجدول (04):

جدول (04): الأدوات المستعملة أثناء جمع وتحضير النبات.

الطرق	الأدوات المستعملة
الجمع	مقص - أكياس ورقية
التجفيف	قطعة قماش
الطحن	مقص- ألة كهربائية - أكياس ورقية

I-2- الأدوات المستعملة للكشف الكيميائي عن مواد الأيض الثانوي في النبات:

الأدوات والمحاليل المستعملة في المخبر للكشف الكيميائي عن نواتج الأيض الثانوي في النبات موضحة في الجدول (05).

جدول (05): الأدوات والمحاليل المخبرية المستعملة للكشف الكيميائي للمواد الفعالة في النبات.

مواد الأيض الثانوي	المحاليل المستعملة	الأدوات المستعملة
النشاء Amidon	- المادة النباتية المجففة والمطحونة - الماء المقطر - كاشف النشاء(ماء اليود)	- ميزان حساس. - أنابيب اختبار. - بيشر. - ورق ترشيح. - قمع.
الصابونوزيدات Les saponosides	- المادة النباتية المجففة والمطحونة. - ماء مقطر.	- ميزان حساس. - حوجلة مدرجة - بيشر- أوراق ترشيح - قمع - أنابيب اختبار - ملعقة - مسطرة - حاملة - أنابيب اختبار- Papier film

التانينات Les tannins	- المادة النباتية المجففة والمطحونة . - ماء مقطر . - محلول ثلاثي كلوريد الحديد $FeCl_3$	- ميزان حساس . - حوجلة مدرجة - بيشر- أوراق ترشيح - قمع - أنابيب اختبار- ملعقة - Micropipette
الفلافونيدات Les flavonoids	- المادة النباتية المجففة والمطحونة. - محلول حمض كلور الماء HCl - محلول NH_4OH- ماء مقطر.	- ميزان حساس. - حوجلة مدرجة - بيشر- أوراق ترشيح - قمع - أنابيب اختبار- Micropipette
الأنثوسيانات Les anthocyanes	- المادة النباتية المجففة والمطحونة. - محلول حمض كلور الماء HCl - محلول NH_4OH - ماء مقطر	- ميزان حساس. - حوجلة مدرجة - بيشر- أوراق ترشيح - قمع - أنابيب اختبار.
الستيرولات و التربينات Stérols et Triterpénes	- المادة النباتية المجففة والمطحونة - محلول الإثير - محلول حمض الخل Anhydride acétique - محلول الكلوروفورم Chloroforme - حمض الكبريت Sulfurique	- ميزان حساس. - مسخن بنزن- بيشر- أوراق ترشيح - ملصقات - أنابيب اختبار- Micropipette.

I-3- الأدوات المستعملة عند الاستخلاص:

عند عملية الاستخلاص قمنا باستعمال الادوات والمحاليل والأجهزة الموضحة في الجدول (06):

جدول (06): الأدوات المستعملة والمحاليل المخبرية المستعملة أثناء عملية الاستخلاص.

الادوات	المحـاليل	الأجهزة
- المادة النباتية- قمع زجاجي - ورق ترشيح- بيشر. - Spatule -Erlenmeyer -Ballon -Ampoule à decanter	- ميثانول - اسيتون - ماء مقطر - Acétate d' éthyle - Dichlorométhane - 1-butanol	- ميزان حساس. - جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur)

I- 4- الأدوات المستعمل عند التقدير الكمي للمركبات الفينولية بالطرق اللونية:

خلال عملية التقدير الكمي لكل من الفلافونويدات و عديدات الفينول قمنا باستخدام المحاليل الكيميائية والادوات والاجهزة التالية (جدول07):

جدول (07): المحاليل الكيميائية والادوات والأجهزة المستعملة في التقدير الكمي للمركبات الفينولية.

	المحاليل	الأدوات	الأجهزة
التقدير الكمي لعديدات الفينول (PPT)	- ميثانول - حمض الغاليك - كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) (%7.5) - كاشف Folin Ciocalteau (%10)	- أنابيب إختبار - بيشر - حامل أنابيب إختبار - Micropipette -Spatule - Les cuves	- ميزان حساس. - جهاز المطيافية الضوئية: Spéctrophotométre
التقدير الكمي للفلافونويدات (FV)	- ميثانول - كريسين - ثلاثي كلوريد الصوديوم Trichlorure d'aluminium (AlCl3) (2%)		

I-5- الأدوات المستعملة في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة:

بالنسبة لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة استعملنا المحاليل الكيميائية و الأدوات والأجهزة المدرجة في الجدول (08).

جدول (08): المحاليل الكيميائية والادوات و الأجهزة المستعملة في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة.

	المحاليل و المواد	الأدوات	الأجهزة
اختبار اقتناص الجذر الحر ($DPPH^{\bullet}$)	- ميثانول - حمض الأسكربيك - $DPPH^{\bullet}$ (0.1 mM) - المستخلصات النباتية	- أنابيب إختبار - بيشر - حامل أنابيب إختبار - ورق ألامنيوم - Micropipette - Spatule - Les cuves	- ميزان حساس. - جهاز المطيافية الضوئية (Spectrophotométre)

I-6- الأدوات المستعملة عند النشاطية البيولوجية المضادة للبكتيريا:

خلال اختبار النشاطية البيولوجية للمستخلصات النباتية على الأنواع البكتيرية المختبرة استعملنا المحاليل والأدوات والأجهزة الموضحة في الجدول (09).

جدول (09): المحاليل الكيميائية والأدوات والأجهزة المستعملة في الفعالية البيولوجية المضادة لسلالات بكتيرية ممرضة.

المحاليل و المواد	الأدوات	الأجهرة
- المستخلصات النباتية - وسط الزرع Muller Hinton - ماء فيزيولوجي معقم - محلول DMSO	- أنابيب اختبار - حامل أنابيب اختبار - أطباق بيتري - ماسح قطني - مسطرة مدرجة - Micropipette - Pipette Pasteur	- ميزان حساس - موقد بنزن - حاضنة - Autoclave

I-7- الأدوات المستعملة عند التحليل الكروماتوغرافي (HPLC) للعينات النباتية:

عند التحليل الكروماتوغرافي للمستخلصات النباتية بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) استعملت المواد التالية (الجدول 10):

الجدول (10): الأدوات المستعملة عند التحليل الكروماتوغرافي (HPLC) للعينات النباتية.

المحاليل و المواد	الأدوات	الأجهزة
- المستخلصات النباتية - ماء مقطر - محلول حمض الخل. - الاسيتونتريل	- أنابيب اختبار - حامل أنابيب اختبار - Micropipette	- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة HPLC - جهاز حاسوب

II- الطرق المتبعة:

II-1- الطرق المتبعة في جمع و تجفيف المادة النباتية:

❖ **وقت الجمع:**

تم قطف نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) من منطقة حاسي خليفة التابعة لولاية الوادي بتاريخ 19 أكتوبر 2015 حيث قطف الجزء الهوائي للنبات برفق، و وضع في اكياس غير مغلقة لأجل التهوية.

❖ **عند التجفيف:**

قمنا بتجفيف النبات بعد غسله، و بتعريضه للتيار الهوائي الطبيعي في الظل و بعيد عن أشعة الشمس المباشرة والرطوبة لمدة شهر كامل.

❖ **بعد التجفيف:**

بعد جفاف النبات، نقوم بتقطيعه إلى أجزاء صغيرة بواسطة مقص لتسهيل عملية سحقه بواسطة آلة كهربائية نظيفة، وتم وضعها في أكياس ورقية محكمة الغلق.

II-2- طرق الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي:

II-2-1- الكشف عن الفلافونويدات (Les Flavonoïdes):

نقوم بغلي 10 g من المادة النباتية المجففة والمطحونة ونضعها في 60 ml من الإيثانول لمدة ساعة، ثم نقوم بتصفية المزيج ونأخذ 5 ml من هذ المزيج المصفى ونضيف له 1ml من محلول حمض كلور الماء (HCl) مع 0.5 g من برادة المغنزيوم (Mg) ويترك المزيج مدة 03 دقائق، فإذا لاحظنا ظهور اللون الوردي أو الأحمر فهذا دليل على وجود الفلافونويدات في العينة النباتية (PARIS et MOYSE, 1969; DEBRAYB *et al*., 1971).

II-2-2- الكشف وتحديد نوع التانينات (Les Tanins Cathéchiques ou Galliques):

قمنا بأخذ 1ml من المحلول الذي تم تحضيره سابقا وأضفنا له 2 ml من الماء المقطرH_2O ومن 2 الى3 قطرات من محلول ثلاثي كلور الحديد$FeCl_3$ ، فإذا ظهر اللون الأزرق المخضر فهو دليل على وجود التانينات الكاتيشيكية (Les Tanins Cathéchiques) أما إذا ظهر اللون الأزرق المسود فهذا يدل على وجود التانينات الغاليكية (Les Tanins Galliques) (TREASE et EVANS, 1987).

II-2-3- الكشف عن المركبات المرجعة (Les Composés Réducteurs):

نأخذ 1ml من المحلول المحضر سابقا ونضيف له 2ml من الماء المقطرH_2O ونعامله بحوالي 20 قطرة من كاشف Fehling، ونقوم بتسخين المزيج، عند ظهور راسب أحمر أجوري فهذا دليل على وجود المركبات المرجعة في العينة النباتية (TREASE et EVANS, 1987).

II-2-4- الكشف عن الأنثوسيانينات (Les Anthocyanes):

نقوم بتحضير مستحلب للنبات وذلك بوضع 5g من المادة النباتية في 100 ml من الماء المقطر الذي قمنا بغليه ويترك لمدة 15 دقيقة ثم يصفى، نأخذ 2 ml من المحلول المصفى ونضيف له 2 ml من حمض كلور الماء (HCl) (2N) وبعض قطرات من الأمونياك (NH_3). إذا لاحظنا ظهور اللون الوردي أو الأحمر فهذا دليل على وجود الأنثوسيانينات (DEBRAYB *et al*., 1971; PARIS et MOYSE, 1969).

II-2-5- الكشف عن القلويدات (Les Alcaloïdes):

قمنا بتحضير منقوع النبات بوضع 5g من المادة النباتية الجافة في 20 ml من H_2SO_4 المخفف 10 مرات (1V/10V) لمدة 24 ساعة في الظلام، ثم نقوم بترشيح المستخلص ونأخذ منه 1ml ثم نعامله ببعض القطرات (2 إلى 3) من كاشف Wagner، عند ظهور راسب بني فهو دليل على وجود القلويدات في العينة النباتية (PARIS et MOYSE, 1969).

II-2-6- الكشف عن الصوبونوزيدات (Les Saponosides):

وذلك بحساب معامل الرغوة حيث نقوم بتحضير مغلي النبتة بوضع 5g من المادة النباتية الجافة والمطحونة في 30 ml من الماء المقطر فوق صفيحة مسخنة لمدة نصف ساعة (30 دقيقة)، بعد الغليان نقوم بتصفية المحلول ثم معادلته الى 100 ml بالماء المقطر، نقوم بترقيم الأنابيب من 1 إلى 10 و نخفف المحلول الأصلي من % 10 إلى % 100 بالترتيب في الأنابيب بحيث يكون تركيز المحلول في الأنبوب رقم (1) 10%، بينما الأنبوب رقم 10 تركيزه % 100.

بعد قيامنا بالتخفيف، نقوم برج سريع لجميع الأنابيب في نفس الوقت وبشكل أفقي لمدة 15 ثانية وعند مرور20 دقيقة نقوم باختيار الأنبوب الذي يكون فيه ارتفاع الرغوة أقرب الى 1 سم، ونقوم بحساب معامل الرغوة (شامي، 1982 ؛ العاني، 1998; BENKHERARA, 2010) وذلك وفق القانون التالي:

$$\mathbf{I = \frac{hauteur\ de\ mousse\ (en\ cm) dans\ le\ tube\ x\ \times 5}{0.0x}}$$

I: معامل الرغوة

Hauteur de mousse dans le x tube: ارتفاع الرغوة في الأنبوب الأقرب الى 1 سم

x: رقم الأنبوب الذي تكون الرغوة فيه أقرب الى 1 سم

نستطيع الحكم عن النبات بأنه غني أو فقير من الصوبونوزيدات بعد حساب معامل الرغوة (I) فإذا كان معامل الرغوة أكبر من 100 فالنبات غني بالصابونزيدات، وإذا وجدت (I) أقل من 100 فهو إذن فقير من الصوبونوزيدات.

II-2-7- الكشف عن الستيرولات و التربينات (Les Stérols et Triterpénes):

نقوم بنقع 5g من المادة النباتية الجافة في 20 ml من الإيثر (éther) لمدة 24 ساعة، ثم نقوم بتصفية المزيج تسخينه باستعمال موقد بنزن حتى يجف المستخلص، نضيف للراسب المتبقي 0.5 ml من Anhydride Acétique و 0.5 ml من Chloroforme وقليل من Acide Sulfurique وعند ظهور حلقة حمراء بنية أو بنفسجية فهذا يدل على وجود Stérols et Triterpénes (TREASE et EVANS, 1987).

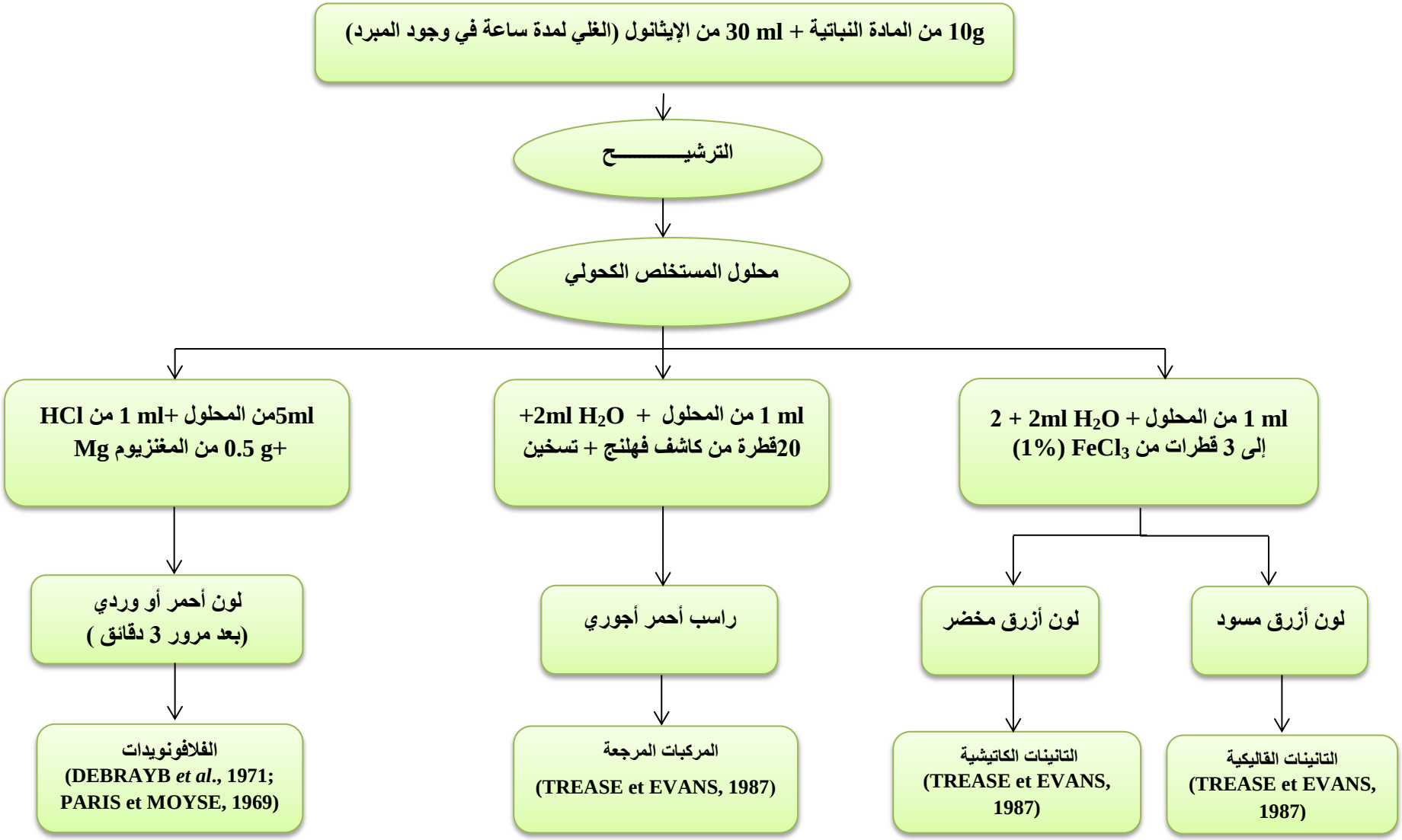
II-2- 8- الكشف عن النشاء (Amidons):

نقوم بغلي 5g من المادة النباتية الجافة والمطحونة في 30 ml من الماء المقطر لمدة ساعة، ثم نقوم بتصفية المزيج، نأخذ منه 5 ml من المزيج المرشح، و نضيف لها قطرات من كاشف النشاء (ماء اليود)، فإذا ظهر اللون الأزرق البنفسجي فهو دليل على وجود النشاء في المستخلص(BRUNETON, 1999).

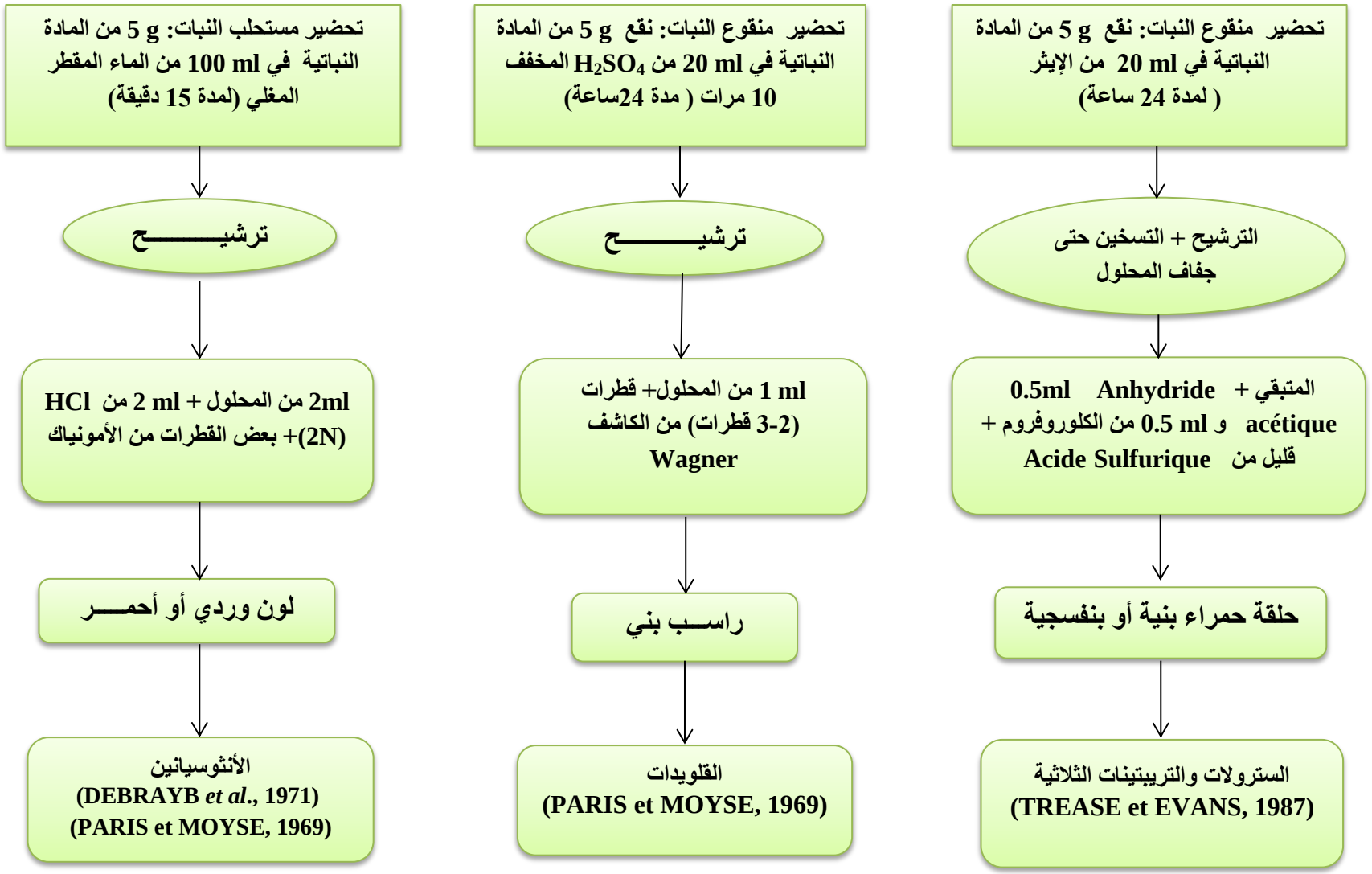
II-1-9- الكشف عن التانينات (Les Tanins):

نقوم بغلي 5g من المادة النباتية الجافة والمطحونة في 30 ml من الماء المقطر لمدة ساعة، ثم نقوم بتصفية المزيج ونأخذ 1ml من هذا المحلول السابق ونضيف إليها 1ml من الماء المقطر وقطرات من محلول ثلاثي كلوريد الحديد $FeCl_3$ وإذا ظهر اللون اخضر قاتم أو ازرق مخضر فهذا يدل على وجود التانينات (TREASE et EVANS, 1987).

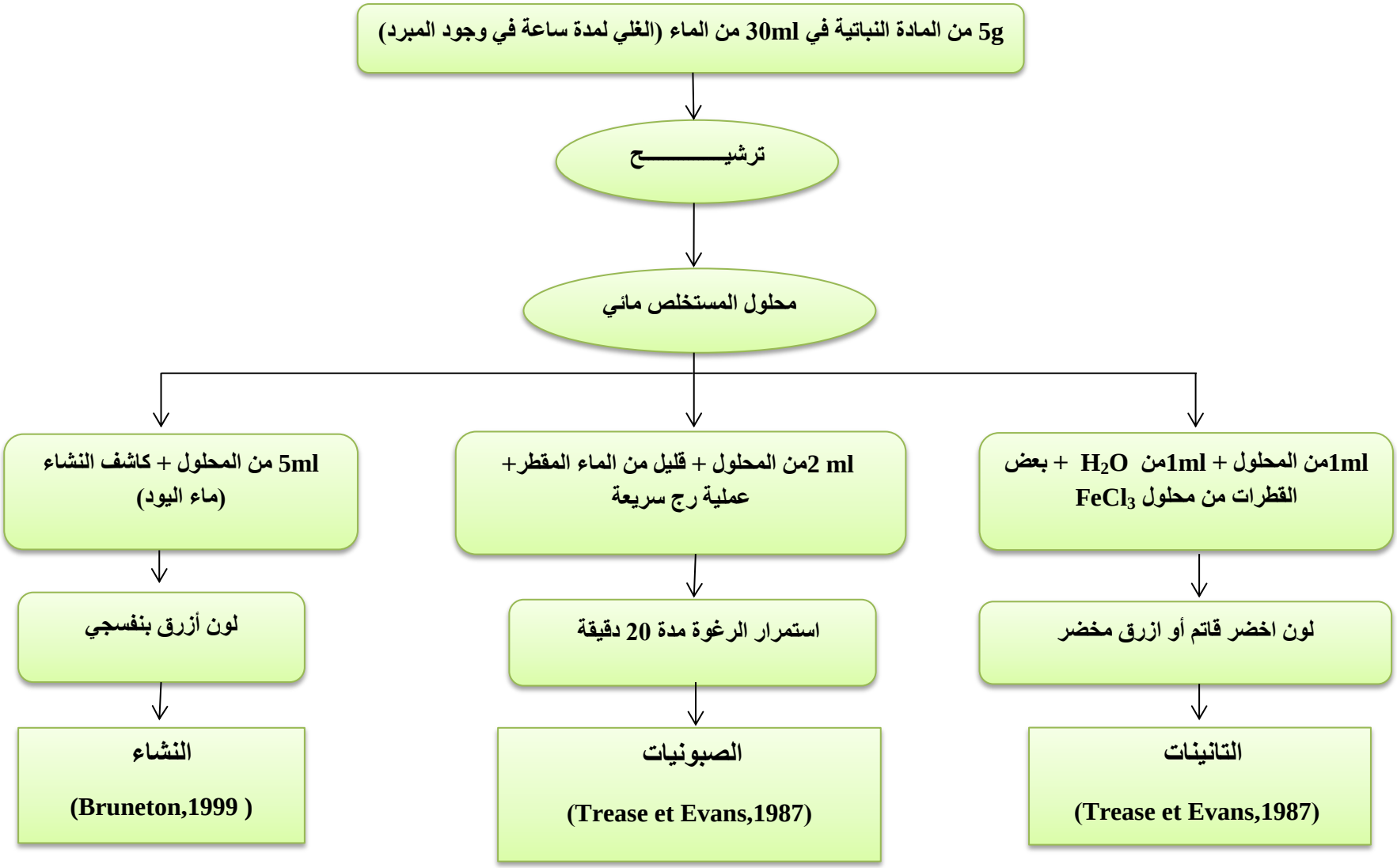
والاشكال (01-02-03) توضح الطرق المتبعة عند الكشف الكيميائي.



الشكل (01): مخطط الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي(01)



الشكل (02): مخطط الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي(02)

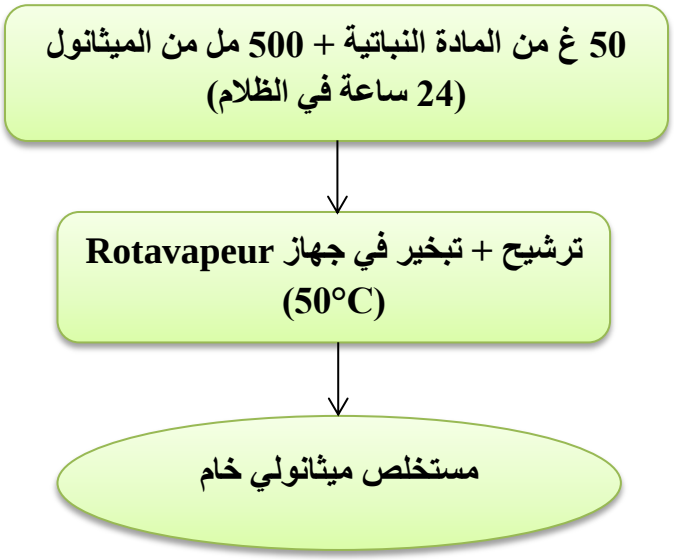


الشكل (03): مخطط الكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي(03)

II-3- الطرق المتبعة في استخلاص المركبات الفينولية:

- **تحضير المستخلص الميثانولي:**

تم وضع 50 g من المادة النباتية المجففة في 500 ml من الميثانول و تترك لمدة 24 ساعة في الظلام، ثم نقوم بترشيح المزيج ونقله إلى جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) عند درجة حرارة 60°C.

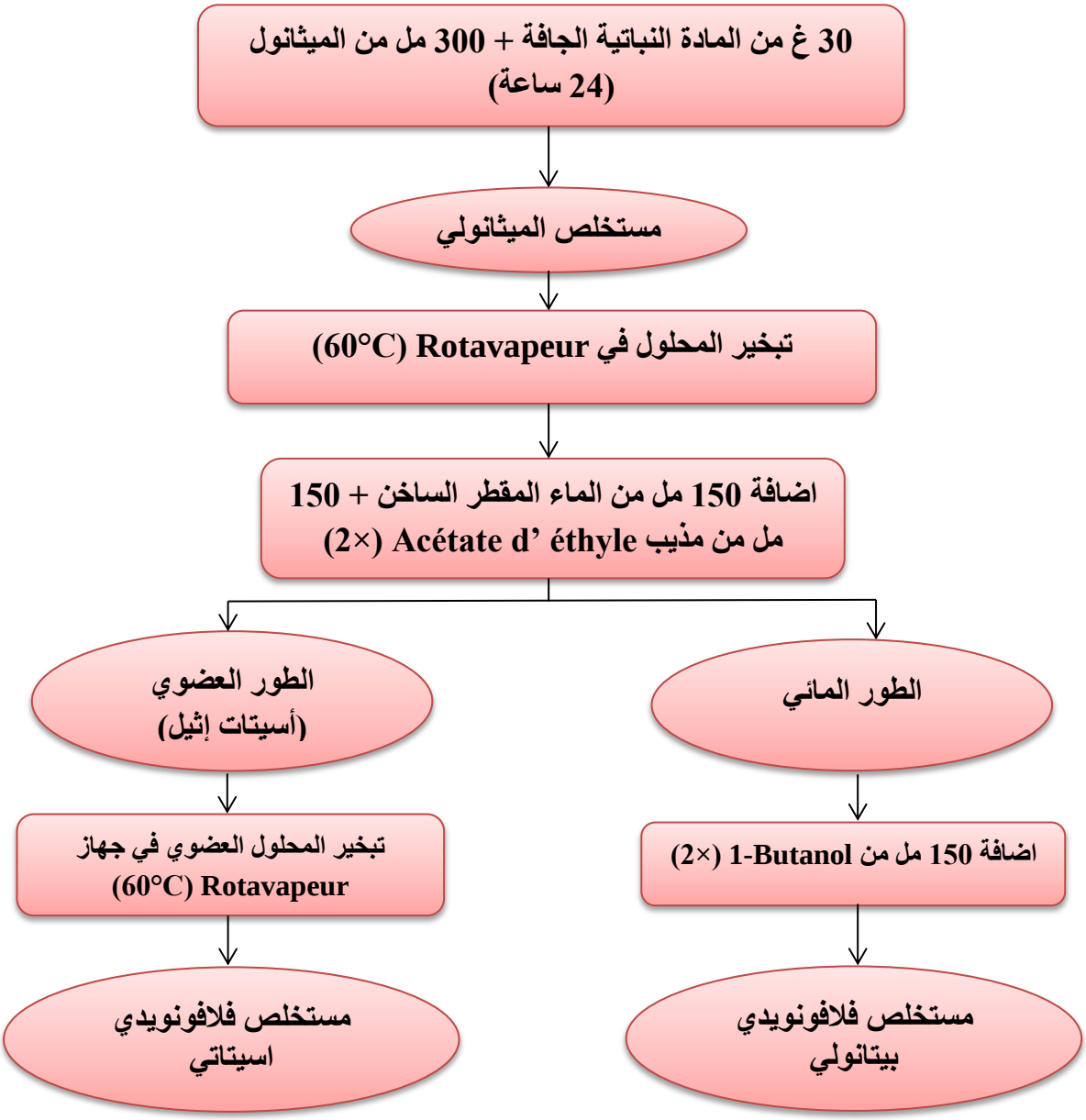


الشكل (04): بروتوكول استخلاص المستخلص الميثانولي الخام.

- **تحضير المستخلص الفلافونويدي :**

حسب (BEKKARA *et al.*, 1998) تم أخذ 30g من المادة النباتية الجافة والمطحونة و وضعت في 300 ml من الميثانول ونتركها مدة 24 ساعة ثم نقوم بترشيح المزيج واخذه لجهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) في درجة حرارة 60ºC حتى نتحصل على مستخلص ميثانولي، نضيف لهذا المستخلص 150 ml من الماء المقطر الدافئ ويمزج جيدا مع اضافة 150 ml من مذيب Acétate d'éthyle، و يوضع المزيج في قمع للفصل (Ampoule à décanter) و تكرر العملية مرتان، ثم يؤخذ الطور العضوي Phase organique و ينقل إلى جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) في درجة 60ºC للحصول على المستخلص الفلافونويدي طور Acétate d' éthyle (E.A.E)، والذي يحفظ في درجة حرارة منخفضة (4° C).

نضيف للطور المائي Phase aqueuse المتبقي 150 ml من أحادي البيتانول 1- butanol ويرج المزيج جيدا ويوضع في قمع الفصل، مع تكرار هذه العملية مرتين، يمزج الطوران العضويان ويبخر المزيج في الجهاز (Rotavapeur) عند درجة حرارة 50°C للحصول على المستخلص الفلافونيدي البيتانولي (E.1.B).



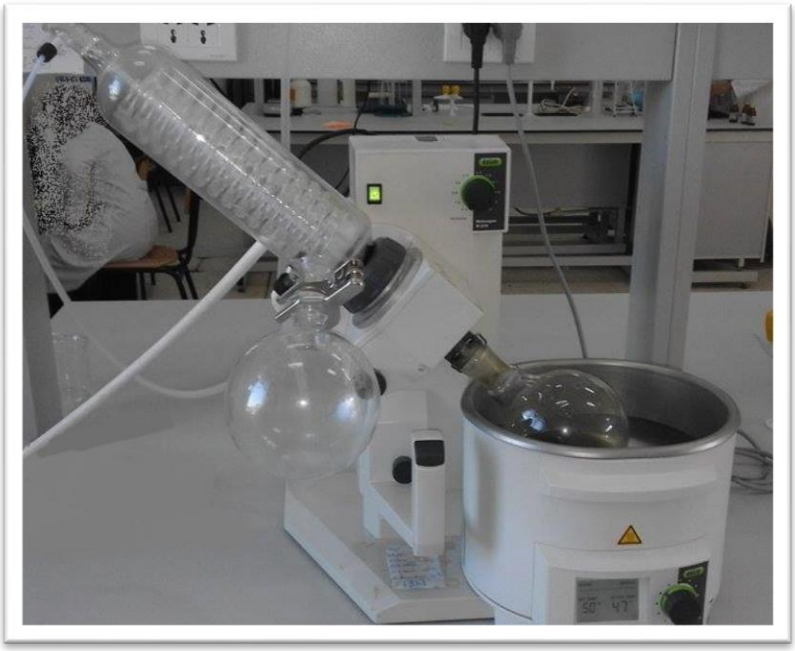
الشكل (05): بروتوكول استخلاص الفلافونويدات.

- **تحضير المستخلص الأسيتوني العفصي :**

حسب (ZHANG *et al.*, 2008) قمنا بنقع 30g من المادة النباتية الجافة والمطحونة في 300 ml من الأستون/الماء المقطر (V/V.3/7) ويترك المزيج لمدة 3 أيام في الظلام، وبعد الترشيح ينقل المزيج المصفى الى جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) في درجة حرارة 50ºC لتخلص من الأسيتون Acétone، ثم نضيف للجزء المتبقي 180 ml من Dichlorométhane للتخلص من الصبغات والدهون، يوضع المزيج بعدها في قمع الفصل (Ampoule à décanter).

بعد الفصل نأخذ الطور المائي Phase aqueuse ونضيف له 180 ml من Acétate d'éthyle ونكرر العملية مرتين ونمزج الطورين العضويتين معا ثم تنقل إلى جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) عند درجة حرارة 50 ºC.

الشكل (06): بروتوكول استخلاص التانينات.



الوثيقة (22): جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) المستخدم في عملية الاستخلاص.

❖ **ملاحظة:** يحسب المردود في كل مرة بالعلاقة التالية حسب (MATKOWSKI et PIOTROWSKI, 2006):

المردود = (وزن المستخلص / وزن المادة النباتية الابتدائية الجافة) × 100

II-4- الطرق المتبعة في التقدير الكمي للمركبات الفينولية:

II-4-1- التقدير الكمي لعديدات الفينول (PPT) Dosage des Polyphénoles Totaux:

اعتمدت طريقة SINGLETON and ROSSI (1965) خلال تقدير المركبات الفينولية الكلية، حيث تقدر كميا بواسطة جهاز المطيافية الضوئية (Spectrophotomètre) اعتمادا على فينول مرجعي، و قد اختير حمض الغاليك Acide gallique في عملنا هذا كفينول مرجعي تقاس امتصاصيته الضوئية عند طول موجة $\lambda = 760$ nm (IVANA *et al.*, 2011) ومن أجل التقدير الكمي للمركبات الفينولية اتبعنا الخطوات التالية:

قمنا بتحضير محاليل مخففة من حمض الغاليك Acide gallique في الميثانول ذو تراكيز(0.4-0.05 mg/ml) للتقدير الكمي لعديدات الفينول في المستخلصات النباتية، حيث تم تقدير عديدات الفينول الكلية باستعمال كاشف Folin-ciocalteau وهو كاشف يتكون من حمض فوسفوتنغستنيك ($H_3PW_{12}O_{40}$) وحمض فوسفوموليبيديك ($H_3PMO_{12}O_4$) والذي يرجع بواسطة الفينولات إلى أكسيد التنغستين (W_8O_{23}) و الموليبدن (MO_8O_3) ذات اللون الأزرق.

تمزج 0.2ml من سلسلة تراكيز المستخلصات النباتية مع 0.8ml من كربونات الصوديوم (7.5%)، نضيف للمزيج 1 ml من Folin-ciocalteau المخفف 10 مرات، ثم نرج الأنابيب جيدا وتحضن في درجة حرارة المخبر وبعيدا عن الضوء لمدة 30 دقيقة.

بعد قياس شدة الامتصاصية للمزيج عند طول موجة 760 nm، يتم التعبير عن الناتج بالملغ مكافئ من حمض الغاليك لكل غرام من المادة الجاف (mg AG Equivalent/g Matière Sèche) (ملغ مكافئ من حمض الغاليك/ غ من المادة الجافة) عن طريق رسم منحنى المعايرة لتراكيز حمض الغاليك المذاب في الميثانول.

II-4-2- التقدير الكمي للفلافونيدات Dosage des Flavonoïde(FV):

تعتبر الفلافونيدات من المجموعات الكبيرة من المركبات الفينولية، ويمكن تقديرها كميا عن طريق التفاعل مع $AlCl_3$ وتكوين معقد ذو لون أصفر مع الفلافونيدات، وتقدر المركبات الفلافونيدية كميا عن طريق جهاز المطيافية الضوئية (Spectrophotométre) عند طول موجة 420 nm ومن أجل التقدير الكمي للمركبات الفلافونيدية نعتمد على استعمال المنحنى القياسي للكرستين (ZHISHEN *et al*., 1999).

حضرنا حسب ORDONEZ وزملائه (2006) تراكيز متزايدة (0.1-0.02mg/ml) من الفلافونويد المرجعي الكيرستين Quercitine المذاب في الميثانول.

تم تقدير محتوى الفلافونويدات بمزج 0.5 ml من المستخلصات المذابة في الميثانول ونضيف لها من $AlCl_3$ ذو تركيز 2%، نقوم برج الانابيب جيدا وتحضن في درجة حرارة المخبر وبعيدا عن الضوء، كما تقاس شدة امتصاصية المزيج عند طول موجة 420 nm حيث يتم التعبير عن الناتج بالملغ المكافئ للكرستين لكل غرام من المادة الجافة، وذلك من خلال المعادلة الخطية لمنحنى المعايرة للكرستين المحضر في الميثانول.

II-5- الطرق المتبعة في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة:

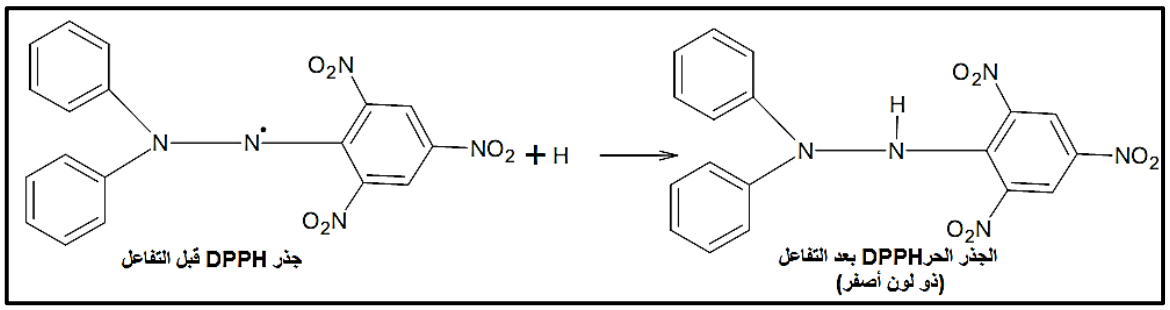
وهي طريقة يتم فيها قياس قدرة المستخلص النباتي أو مركب ما على تثبيط الجذور الحرة من خلال التقليل من عملية الأكسدة، و تقدر الفعالية المضادة للأكسدة بعدة طرق أهمها: اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$.

تم تحديد الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الأربعة:

- المستخلص الميثانولي الخام.
- المستخلص الاسيتوني أو العفصي.
- المستخلص الفلافونويدي طور الاسيتات ايثيل.
- مستخلص الفلافونويدي طور أحادي البيتانول.

استخدمت طريقة اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لتقدير الفعالية المضادة للأكسدة، نظرا لسرعتها ودقتها، كما أنها غير مكلفة، حيث اكتشفت سنة 1958 وهي تعتمد على نسبة اختزال الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ في وجود مركب اخر لتقدير فعاليته كمضاد للأكسدة، و لتتبع هذا التفاعل لونيا يستعمل جهاز المطيافية اللونية Spectrophotométre.

جذر $DPPH^{\bullet}$ هو مركب ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (diphenyl-picry-lhydrazyl) حالته الفيزيائية صلبة ذات لون بنفسجي مسود (PAREJO *et al.*, 2002)، يتحول لونه للأصفر الارجواني عند تفاعله مع مضادات الاكسدة (المستخلصات النباتية) (الوثيقة 23) مما يسمح بتتبع التفاعل لونيا عبر جهاز المطيافية اللونية Spectrophotométre عند طول موجة 517nm (حوة، 2013).



الوثيقة (23): تفاعل الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ مع مضاد للأكسدة

(PAREJO *et al.*, 2002; MAISUTHISAKUL *et al.*, 2007)

ومن أجل المقارنة الإيجابية لنسبة تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ نستعمل حمض الاسكوربيك Acide Ascorbique ذو التراكيز (0.002-0.0075 mg/ml) للمقارنة بينه وبين مستخلصات النبات الأربعة.

حسب BRAND وزملائه (1995)، تم أخذ 0.5ml من مختلف التراكيز للمستخلصات النباتية ويضاف إليها 1 ml من محلول $DPPH^{\bullet}$ ذو التركيز: (0.04mg/ml: 0.1mM) وتحضن الأنابيب في الظلام لمدة 15 دقيقة، ثم تسجل قراءات الكثافة الضوئية للتراكيز المختلفة في جهاز المطيافية الضوئية Spectrophotométre عند طول موجة 515nm (24).

الوثيقة (24): جهاز المطيافية الضوئية Spectrophotométre.

II-1-5- حساب نسبة التثبيط I % للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$:

يتم حساب نسبة تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لمختلف التراكيز للمستخلصات النباتية وحمض الاسكوربيك Acide ascorbique وفق المعادلة التالية :

$$I\ \% = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

Ac: الكثافة الضوئية للعينة الشاهد Contrôle.

As: الكثافة الضوئية للعينات Sample أو حمض الاسكوربيك Acide Ascorbique.

II-2-5- تحديد مقدار IC_{50} المثبطة لجذر $DPPH^{\bullet}$:

يعرف هذا المقدار على أنه تركيز المستخلص اللازم لتثبيط أو كبح 50% من $DPPH^{\bullet}$ والذي يحسب من خلال المعادلة الخطية لمنحنيات تغيير نسبة التثبيط (I%) بدلالة تركيز المستخلصات (DZIRI *et al*., 2012).

II- 6- الطرق المتبعة في دراسة الفعالية لنشاطية المضادة للبكتيريا:

- **النشاطية المضادة للبكتيريا:**

منذ نشأة البشرية يتعرض الانسان الى كائنات دقيقة تكاد تغطي كل عضو من أعضائه من الطبقة الخارجية الجلدية الى اعضائه الداخلية، وبالرغم من انتشارها على الجلد وفي الجسم الا انه يستطيع مقاومتها بفضل الحواجز الفيزيولوجية أوالتشريحية، الاليات الفطرية للمقاومة والمناعة المكتسبة. معالجة الاصابات البكتيرية عادة تكون باستعمال المضادات الحيوية، و تتم غالبا دراسة السلالات البكتيرية المقاومة لتسمح باكتشاف المصادر النباتية المحتوية على مضادات بكتيرية (HESS *et al*, 1997).

متعددات الفينول و لاسيما الفلافونويدات و الاعفاص معروفة بسميتها الشديدة للكائنات الحية الدقيقة، هاته السمية قد تكون مرتبطة بتثبيط الانزيمات المحللة (les protéases et les carbohydrolases) أو بتفاعلات أخرى لتعطيل الروابط الميكروبية، البروتينات الناقلة، و الغلاف النووي للخلية (COWAN, 1999).

II- 6-1- السلالات البكتيرية المستعملة:

في اختبار حساسية البكتيريا للمستخلصات النباتية استعملنا عشر سلالات بكتيرية ممرضة والتي تم الحصول عليها من معهد باستور بالجزائر العاصمة وهي :

Escherichia coli ATCC 25922	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
Staphylococcus aureus ATCC 25923	*Bacillus anthracis*
Staphylococcus epidermidis	*Enterobacter cloacae*
Salmonella enterica	*Serratia marcescen*
Vibrio cholerae	*Micrococcus luteus*

و كتعريف بسيط عن خصائص كل نوع من الأنواع البكتيرية نذكر ما يلي:

- ***Escherichia coli* ATCC 25922:**

وهي من نوع سالبة لغرام، تعيش في الانبوب الهضمي للإنسان و الحيوان (HARRAR, 2012) لا تتواجد بشكل أبواغ، هوائية و متحركة عادة بفضل أسواطها، طولها يتراوح ما بين 2 الى 6 ميكروميتر في حين يكون عرضها ما بين 1.1 الى 1.5 مايكرومتر، تعتبر هاته البكتيريا من الانواع البكتيرية الاكثر شيوعا و مشاركة في الالتهابات الحادة للجهاز الكلوي، و تسبب ايضا عدة اضطرابات في الجهاز الهضمي عن طريق تسممات غذائية تؤدي الى الاسهال الحاد بالأخص عند الرضع (PERCIVAL, 2004).

- ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923:**

هي من المكورات البكتيرية موجبة غرام قطرها يتراوح ما بين 0.5 الى 1.5 ميكرومتر، غير بوغية الشكل، تميل الى التجمع في شكل أزواج، و سلاسل صغيرة، و توجد عادة بغير كبسولة أو تحمل كبسولات محدودة، لاهوائية اختياريا. بكتيريا *Staphylococcus aureus* تعتبر عاملا في الالتهابات التي تحصل بعد الجروح، الالتهابات الباطنية الحادة، بالإضافة الى التسممات الغذائية (DWORKIN et FALKOW, 2006).

- ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853:**

هي عصيات هوائية سالبة غرام تتواجد في شكل غير بوغي ، متحركة بفضل احتوائها اسواط (من 1 الى 2) هي أيضا من أكثر الانواع البكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية، هاته البكتيريا مسؤولة عن % 16 من حالات الالتهاب الرئوي، % 12 من الالتهابات الكلوية و المسالك البولية، و8% من الالتهابات التي تلي العمليات الجراحية (VAN DELDEN et IGLEWSKI, 1998).

- ***Salmonella enterica*:**

هي بكتيريا عصوية الشكل سالبة الغرام، تسبب هذه البكتيريا مرض يتميز بالتهاب حاد في الامعاء والقلون في بداية الأمر ومن الاعراض التي تسببها هذه البكتيريا صداع، آلام في البطن، إسهال مصحوب بالدم (العابد، 2009).

II- 6-2- المضادات الحيوية المستعملة للمقارنة الإجابية بينها وبين المستخلصات النباتية:

المضادات الحيوية بمعنى دقيق هي مواد عضوية تنتجها الكائنات الحية الدقيقة، لكنها تشمل أيضا المواد الشبه مصنعة و المواد المصنعة و التي تلعب دورا في تثبيط بعض الطرق الأيضية للبكتيريا دون احداث أضرار صحية للكائن العائل للبكتيريا غالبا، وتختلف طرق تأثير المضاد الحيوي على البكتيريا فمنها ما يؤثر على الجدار الخلوي او الغشاء السيتوبلازمي للبكتيريا و منها ما يحفز الخلية على انتاج بروتينات كالاستربتوميسين والتتراسكلين، أو يسمم البروتينات البكتيرية والاحماض النووية لها ما يوقف نشاطها بشكل سريع (BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1995).

نطلق اسم المضاد الحيوي عادة على كل مادة طبيعية ذات أصل بيولوجي تنتجها أحياء دقيقة أو كل المواد الكيميائية المصنعة أو النصف مصنعة والتي يتحصل عليها بواسطة تعديلات كيميائية لبعض الجزيئات ذات أصل طبيعي تحمل الخصائص التالية:

- نشاطية مضادة للبكتيريا.
- نشاطية في الوسط العضوي.
- ذات امتصاصية عالية و انتشار جيد داخل جسم الكائن الحي (HILLIARE, 2008).

لدى المضادات الحيوية خاصية التدخل السريع والمباشر أثناء تكاثر الكائنات الدقيقة و في تراكيز منخفظة نسبيا لا تضر بالكائن العائل (MOHAMMEDI, 2009).

من خلال دراسة نشاطية المستخلصات المختلفة لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) على الأنواع البكتيرية المذكورة سابقا تم استعمال ثلاث مضادات حيوية (الوثيقة 25) قصد المقارنة الفعالية البيولوجية للمستخلصات مع المضادات الحيوية المستعملة وهي:

1-Gentamicin HLG_{120} :30 µg /disc

2-Nitroxoline NO_{30} : 30 µg /disc

3-Cefalexin CN_{30} :30 µg /disc

الوثيقة (25): المضادات الحيوية المستعملة في النشاطية المضادة للبكتيريا.

- **تحضير اوساط الزراعة:**

بعد تحضير وسط الزرع و تعقيمه بجهاز Autoclave عند درجة حرارة 121°C، قمنا بتعقيم منطقة العمل أولا، و تحضير أطباق بتري ذات اقطار متساوية (9 cm) ويسكب فيها وسط الزرع (Mueller Hinton) المذاب بحذر، بحيث يحتوي كل طبق على 25ml تقريبا، وتتم كل الخطوات العملية بالقرب من موقد بنزن (Bec de Benzene) وذلك لتوفير مكان معقم، تقلب الاطباق و تترك لتبرد وتتصلب (حواء، 2013).

- **تحضير المعلق البكتيري:**

لأجل تحضير المعلق البكتيري أخذنا مستعمرة من كل سلالة بكتيرية نقية بواسطة ماصة باستور معقمة، ونضعها في انبوب اختبار محتوي على ماء فيزيولوجي، ثم نرج قليلا حتى الحصول على معلق عكر اللون (العابد، 2009).

- **زراعة البكتيريا:**

لزراعة البكتيريا نقوم بغمس الماسح القطني المعقم في المعلق البكتيري ثم يمسح به على كامل الوسط الجاف لأوساط الزرع المحضرة سابقا وتكون العملية بشكل خطوط متلاصقة مع تكرار العملية ثلاث مرات وذلك بتدوير طبق بيتري بزاوية °60 درجة في كل مرة .

- **وضع الأقراص :**

بعدما قيامنا بتحضير الأوساط الزراعية وزراعة البكتيريا تم وضع أقراص المضادات الحيوية في مكانها الخاص في أطباق بيتري المحضرة سابقا، ووضع أربعة أقراص من ورق Wattman ذات اقطار متساوية (5mm) فارغة و معقمة، بحيث يوضع في كل قرص بواسطة Micropipette حجم حوالي 10 µl من كل مستخلص ذات التراكيز المختلفة (0.25 mg/ml - 0.5 - 1 - 2) وذلك بعد تخفيف المستخلصات في الـ DMSO (HARRAR, 2012).

كما وضعنا مع كل سلالة مختبرة أقراص فارغة وأخرى بها المذيب DMSO لأجل المقارنة السلبية، وتوضع أطباق بيتري مقلوبة في الحاضنة تحت درجة حرارة 37ºC لمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء مدة الحضن نخرج علب بيتري ونقوم بقياس الأقطار التثبيطية بـ (mm) لكل مستخلص و للمضادات الحيوية المختبرة.

II-7- تحديد بعض المركبات الفينولية لمستخلصات النبات عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

تستخدم كلمة الكروماتوغرافيا للإشارة إلى تقنيات الفصل المختلفة، و تعتمد جميعها على توزيع المادة المراد دراستها بين طورين أحدهما ثابت والاخر متحرك، الطور الثابت قد يكون جامدا أو سائلا محملا على دعامة جامدة، أما الطور المتحرك فعادة ما يكون سائلا عضويا (ABD ELCHAKOUR, 1987).

كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء (HPLC) هي طريقة من بين الطرق المستعملة في التحليل الكروماتوغرافي التجزيئي، تسمح بتحديد الانواع الفينولية للعينة المراد تحليلها، و تعتبر التقنية الأفضل والاحدث لتحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير (FRANCISCO et TOMAS-BARBERAN, 1990).

تعتمد هاته التقنية على استخدام ضغوط عالية لدفع المذيب (الطور المتحرك) خلال عمود رفيع، والذي يحتوي على جزيئات جد دقيقة (قطرها ما بين 3 الى 5 ميكرون)، و التي تسمى بالطور الثابت، بينما يتكون الطور المتحرك عادة من مزيج من الماء المقطر/ الاسيتونتريل / حمض الخل بنسب متفاوتة (SIRARD, 2012).

مبدأ الجهاز يعتمد على حقن عينات من المستخلصات النباتية (20 µl) في مجرى تدفق الطور المتحرك (injecteur)، مع مراعاة الضغط العالي الذي تحدده المضخة (pompe) والتي تعمل على دفع الطور المتحرك (phase mobile) نحو العمود (colonne) المحتوي على جزيئات السيليس (والمتمثل في الطور الثابت phase stationnaire) (XIANG *et al*., 2006)، هذا الاخير يستطيع فصل المركبات المحقونة حسب قطبيتها و وزنها الجزيئي. هاته الاجزاء موصولة بالكاشف (détecteur) والذي يقوم بكشف و تحديد المركبات الموجودة في العينات و تقديمها لجهاز الكمبيوتر الملحق بالجهاز لإعطاء النتائج على شكل منحنيات تحتوي على قمم (pics) تحدد لنا عدد ونوع المركبات في كل مستخلص (KUPIEC, 2004).

الفصل الثاني:

النتائج و المناقشة

I- النتائج:

I-1- النتائج المتحصل عليها بعد الكشف الكيميائي لنبات الرتم (Forssk.) *Retama raetam*:

بعد الكشف الكيميائي لنبات الرتم (Forssk.) *Retama raetam* سجلت النتائج في الجدول (11).

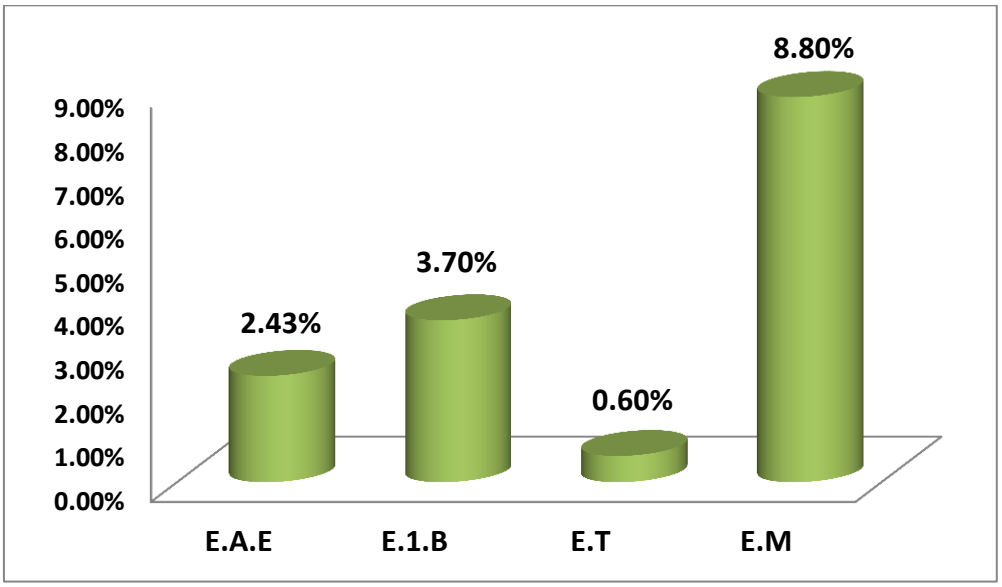
جدول (11): نتائج الكشف الكيميائي لنبات الرتم (Forssk.) *Retama raetam*

موادا الأيض الثانوي	الملاحظات	النتائج
الفلافونويدات (Les Flavonoïdes)	ظهور اللون الأحمر	+
المركبات المرجعة (Les Composés Réducteur)	ظهور راسب أحمر أجوري	+
التانينات الكاتيشية (Les Tanins Cathéchique)	ظهور لون أخضر مزرق	+
التانينات الغاليكية (Les Tanins Gallique)	عدم ظهور لون أزرق مسود	-
الأنثوسيانات (Les Anthocyanes)	ظهور اللون الوردي	+
القلويـدات (Les Alcaloïdes)	عدم ظهور راسب أبيض	-
الستيرولات والتريبتينات الثلاثية (Les Stérols et Triterpènes)	ظهور حلقة بنفسجية	+
النشـــاء (L'Amidons)	ظهور لون بنفسجي	+
الصابونيات (Les saponosides)	ظهور رغوة في جميع الأنابيب بأحجام مختلفة	+

(+) وجود المركب (-) غياب المركب

I-2- حساب المردود لمستخلصات النبات:

بعد عملية الاستخلاص تم تقدير المردود بـ (%) والنتائج مدونة في (الشكل 07).



الشكل (07) : مردود المستخلصات المختلفة لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)

(E.T) المستخلص العضي (الأسيتوني). (E.A.E) المستخلص الفلافونويدي طور أسيتات ايثيل.

(E.M) المستخلص الميثانولي الخام. (E.1.B) المستخلص الفلافونويدي طور احادي البيتانول.

والجدول (12) يبين خصائص المردود لكل مستخلص:

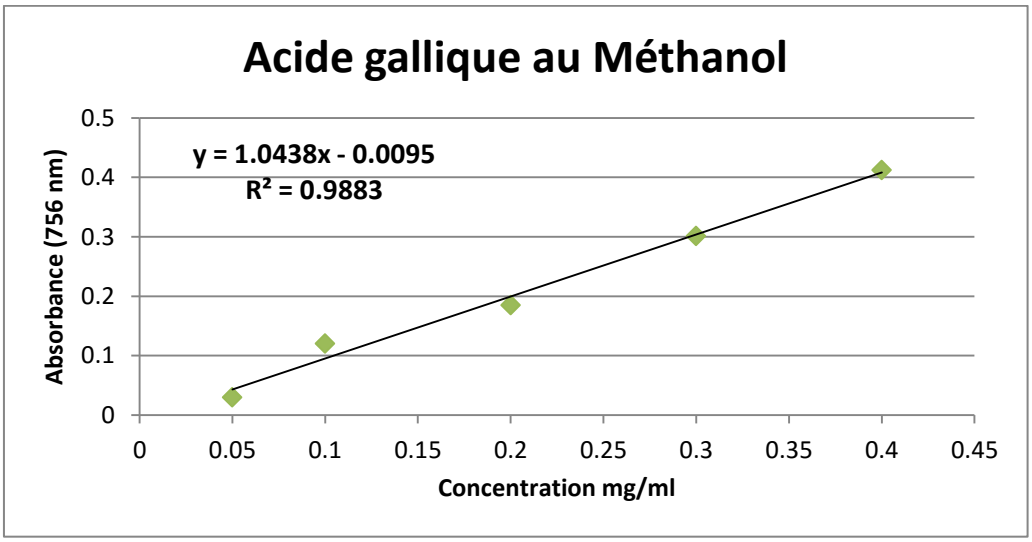
جدول (12): خصائص المستخلصات النباتية و نسب مردودها مقارنة بوزنها الجاف.

المستخلص	القوام	اللون	نسبة المردود بـ (%)
E.M	عجيني متصلب	أخضر مسود	8.80 %
E.A.E	عجيني	بني داكـن	2.43%
E.1.B	لزج	بني مصفر	3.07%
E.T	عجيني متصلب	أخضر مسود	0.60%

من خلال النتائج المتحصل عليها نلاحظ أن مردود المستخلص الميثانولي (E.M) قدرت نسبته بـ (8.80%) وهي أعلى قيمة من بين المستخلصات الأخرى كما أعطى المستخلص 1-Butanol نسبة مردود معتبرة قدرت بـ (3.06%) وكذلك بالنسبة لمستخلص الاسيتات ايثيل بنسبة (2.43%) أما مستخلص التانينات (E.T) فقد قدرت نسبة المردود بـ (0.60%) وهي أقل نسبة مردود من بين باقي المستخلصات.

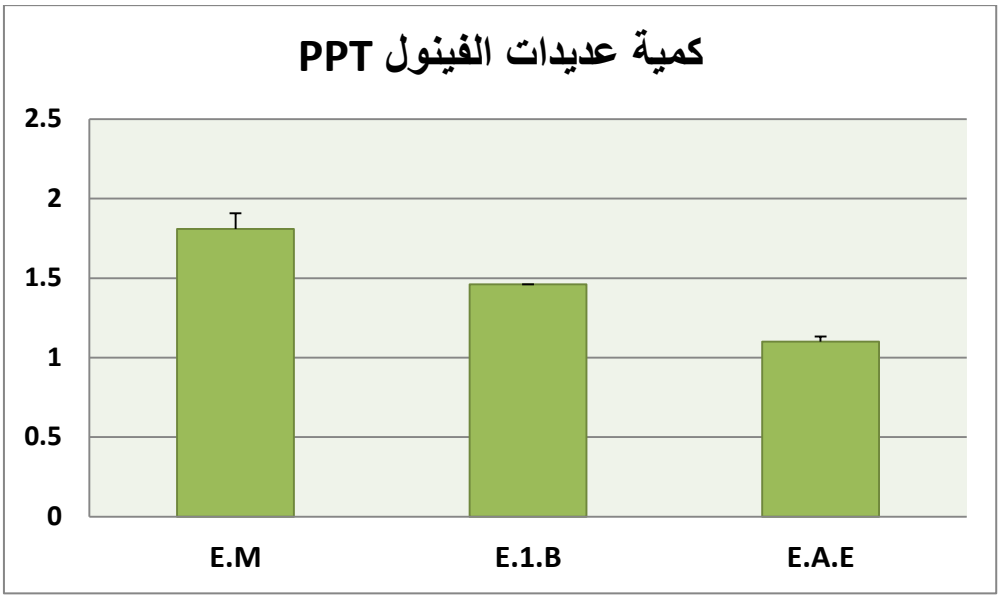
I- 3- التقدير الكمي لعديدات الفينول (PPT):

تم التقدير الكمي لمتعددات الفينول باتباع طريقة SINGLETON et ROSSI (1965) باستعمال كاشف Folin-Ciocalteu، حيث يعبر عن المحتوى الكمي لعديدات الفينول إنطلاقا من المعادلة الخطية للمنحنى القياسي لحمض الغاليك Acide gallique المذاب في الميثانول (الشكل 08) لكل من المستخلص الميثانولي الخام (E.M) و المستخلصات الفلافونويدية (E.A.E و E.1.B) بالملغ مكافئ من حمض الغاليك/غ من المادة النباتية الجافة.



الشكل (08): المنحنى القياسي لحمض الغاليك Acide gallique لتقدير عديدات الفينول عند المستخلصات النباتية.

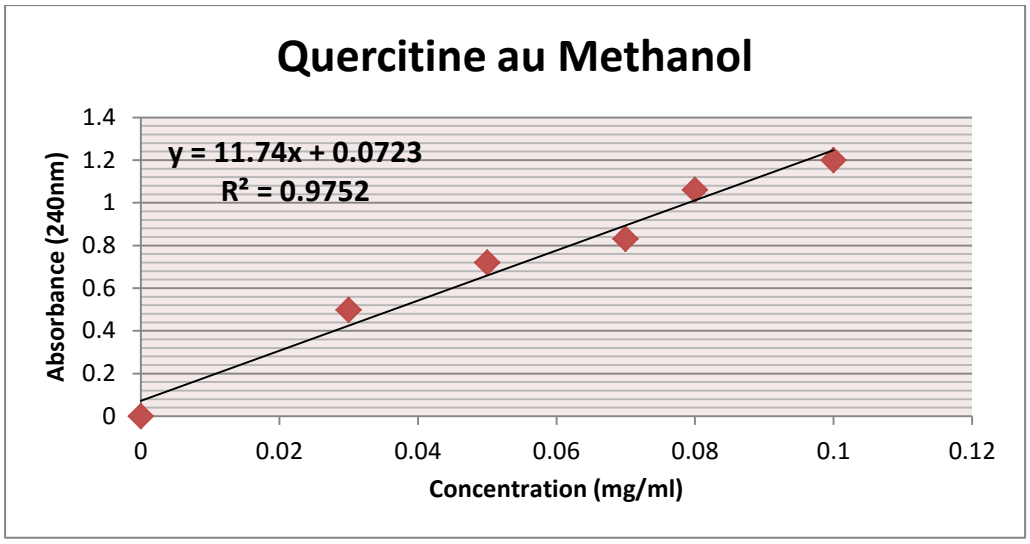
تقاربت كمية عديدات الفينول عند المستخلصات الثلاثة (المستخلص الميثانولي الخام E.M المستخلص البيتانولي E.1.B، مستخلص الاسيتات ايثيل E.A.E) حيث سجلت أعلى كمية لعديدات الفينول لدى المستخلص الميثانولي الخام (E.M) بمقدار 1.81 ± 0.098 mg AG E/g تليها كمية أقل عند مستخلص أحادي البيتانول (E.1.B) بقيمة 1.46 ± 0.001 mg AG E/g أما أقل مقدار سجل عند مستخلص الاسيتات ايثيل (E.A.E) بقيمة 1.10 ± 0.032 mg AG E/g (الشكل 09)



الشكل (09): كمية عديدات الفينول للمستخلصات النباتية المختلفة لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /غ من المادة الجافة (mg AG E/g Matiére séche)

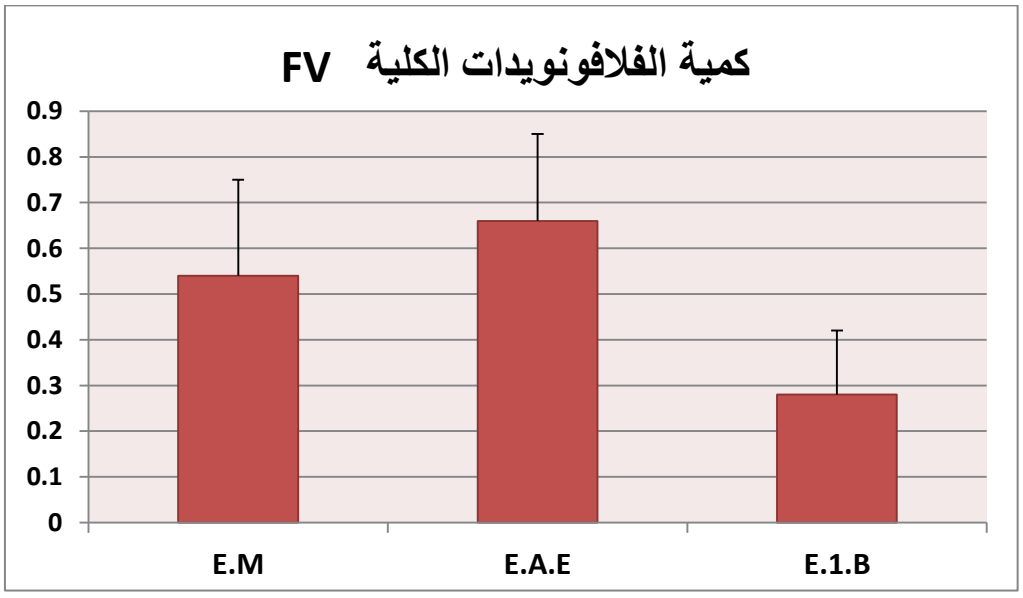
I- 4- التقدير الكمي للفلافونويدات (FV):

قدرت كمية الفلافونويدات للمستخلصات الفلافونودية (E.A.E و E.1.B) و المستخلص الخام (E.M) باستخدام طريقة (ZHISHEN *et al*., 1999)، و هذا باستخدام كاشف $AlCl_3$ حيث يتم التعبير عن النتائج بالملغ مكافئ للكرستين Quercitine في الغرام من المادة النباتية الجافة، باستعمال المعادلة الخطية للمنحنى القياسي للكرستين المحضر في الميثانول (الشكل 10).



الشكل (10): المنحنى القياسي للكرستين Quercitine للتقدير الكمي للفلافونويدات عند المستخلص الميثانولي.

ولوحظ من النتائج المتحصل عليها اكبر كمية للفلافونويدات عند كل من المستخلص الميثانولي (E.M) و مستخلص الاسيتات ايثيل (E.A.E) بمقدار 0.21 ± 0.54 mg QU E/g و ± 0.66 0.19 على التوالي (الشكل 11)، بينما قدرت كمية الفلافونويدات عند المستخلص البيتانولي بـ 0.14 ± 0.28 بالملغ مكافئ للكرستين Quercitine في الغرام من المادة النباتية الجافة.



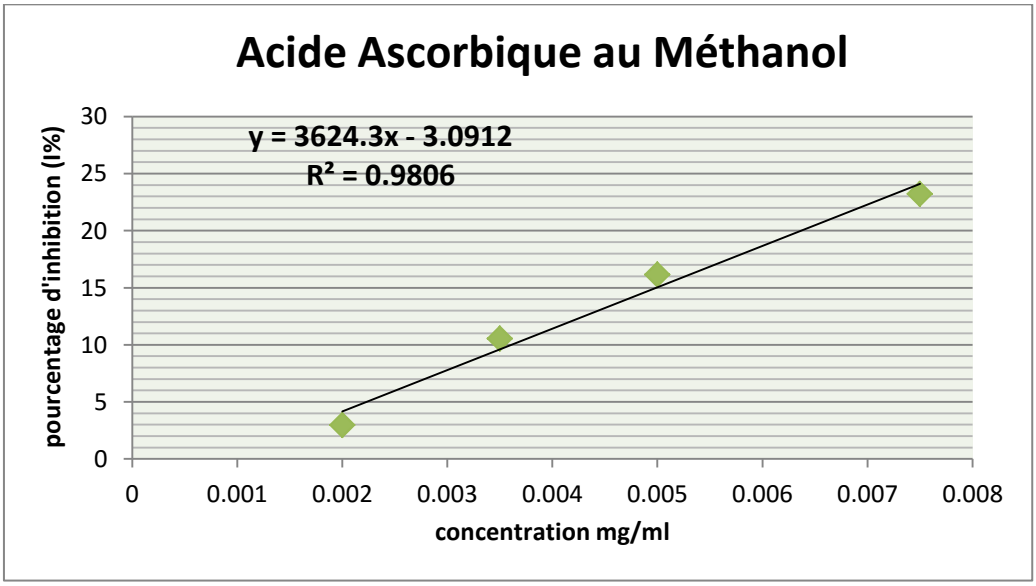
الشكل (11): كمية الفلافونويدات في المستخلصات النباتية المختلفة لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /غ من المادة الجافة (mg QU E/g Matiére séche)

من خلال ما تحصلنا عليه من نتائج للتقدير الكمي لكل من متعددات الفينولات و الفلافونويدات نجد أن:

- ✓ كمية عديدات الفينول الاكبر سجلت عند المستخلص الميثانولي بينما كانت أكبر كمية للفلافونويدات عند المستخلص الاسيتات ايثيل.
- ✓ مذيب الاسيتات ايثيل يعتبر اكثر قدرة على استخلاص الفلافونويدات من مذيب أحادي البيتانول و الميثانول، بينما يعتبر مذيب الميثانول أكثر قدرة على استخلاص عديدات الفينول من مذيب الاسيتات ايثيل و احادي البيتانول.
- ✓ مقدار عديدات الفينول عند المستخلص البيتانولي أكبر من مقدار الفلافونويدات عند نفس المستخلص.
- ✓ عموما نلاحظ ان مذيب الميثانول اكثر قدرة على استخلاص الفينولات و الفلافونويدات معا.

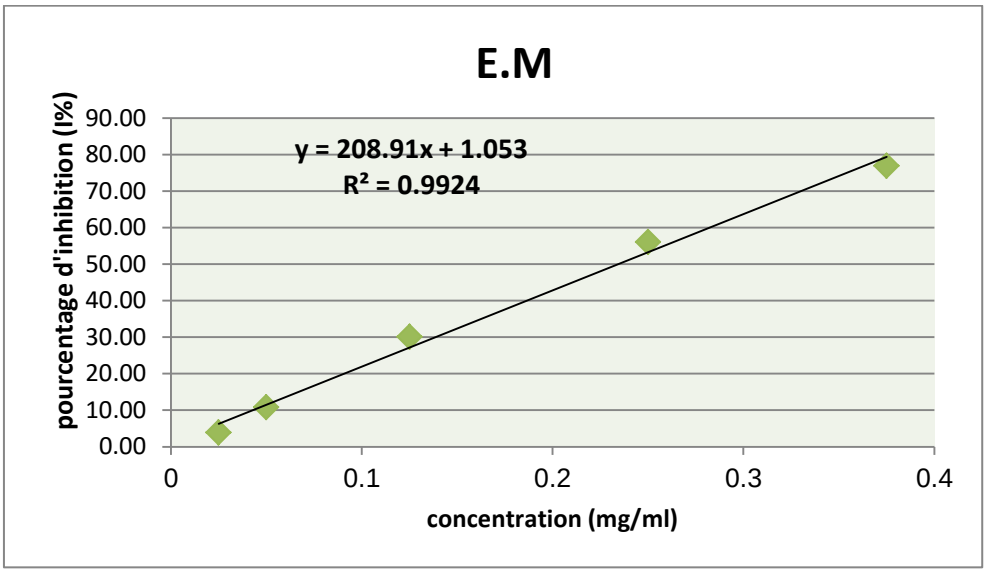
I- 5- تقدير الفعالية المضادة للأكسدة:

استعملت طريقة اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ للمستخلصات النباتية الاربعة، وهو الاختبار الاكثر استعمالا في الكشف عن قدرة مستخلص ما والمضاد للجذور الحرة نظرا لاستقرار هذا الجذر و ثباته (BOZIN *et al.*, 2008). و لتحديد نسبة تثبيط I% المستخلصات لجذر $DPPH^{\bullet}$ استخدم المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك Acide Ascorbique المذاب في الميثانول (الشكل 12).

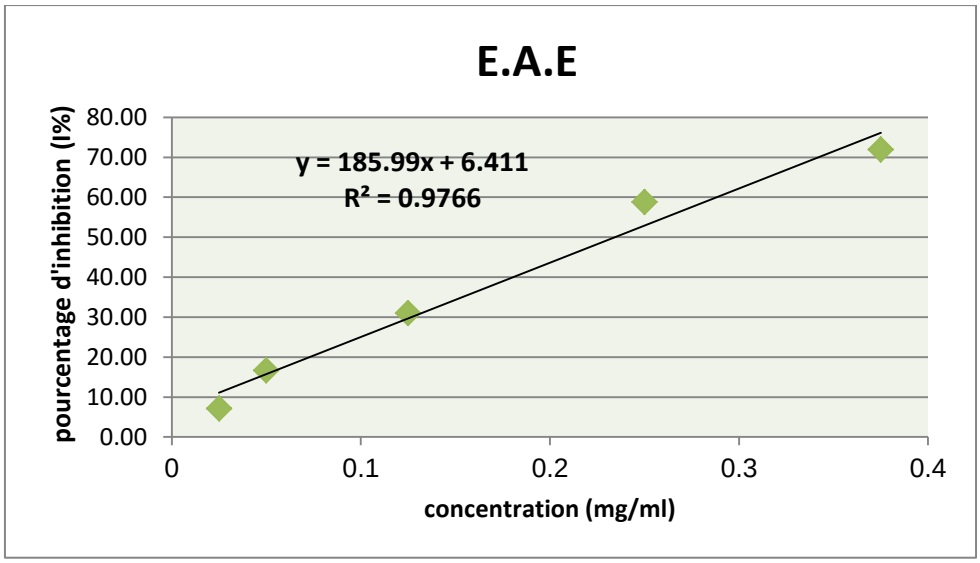


الشكل (12): المنحنى القياسي لحمض الاسكوربيك Acide Ascorbique في اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$.

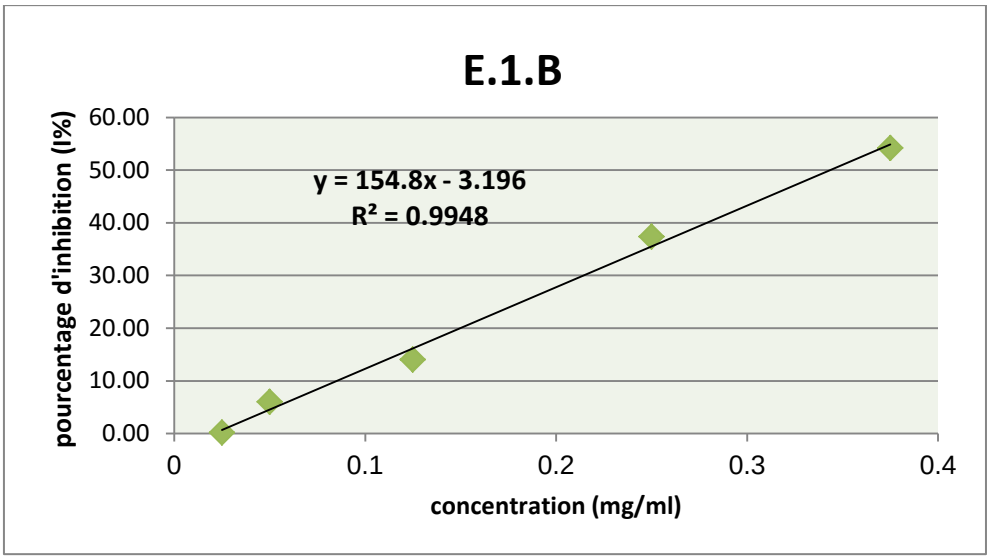
النتائج المتحصل عليها توضحها الاشكال (13-14-15-16)، والتي تظهر أن كل المستخلصات النباتية لها قدرة في اقتناص جذر الـ $DPPH^{\bullet}$ بشكل يتناسب طرديا مع الزيادة في التركيز.



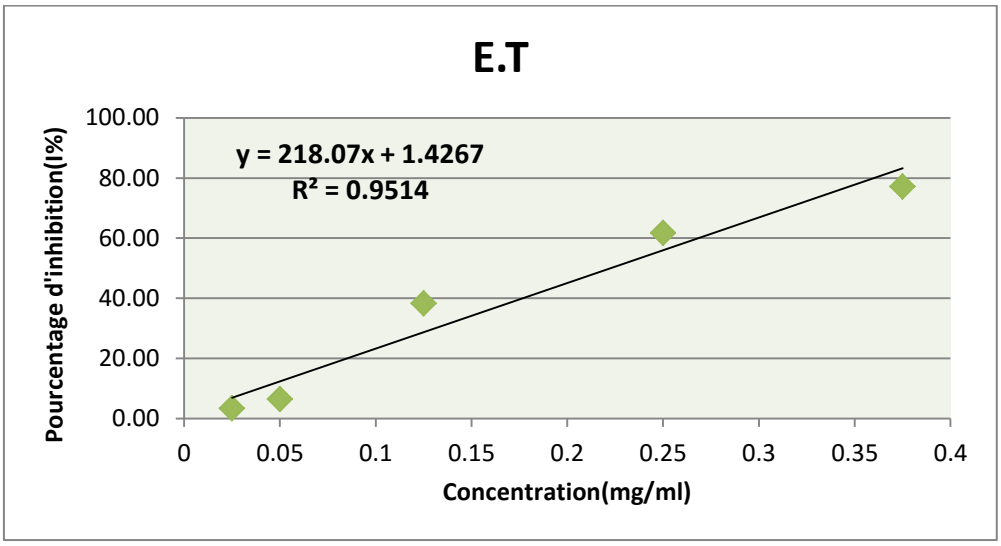
الشكل (13): نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز (mg/ml) للمستخلص الميثانولي الخام (E.M)



الشكل (14): نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز (mg/ml) لمستخلص الاسيتات ايثيل (E.A.E)



الشكل (15): نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز (mg/ml) للمستخلص البيتانولي (E.1.B)



الشكل (16): نسبة التثبيط I% بدلالة التركيز (mg/ml) للمستخلص التانيني (E.T)

بينت النتائج أن المستخلص الفلافونويدي طور أسيتات ايثيل(E.A.E) لديه قدرة تثبيطية أكبر للجذر الحر DPPH• تقدر بـ (7.10%) مقارنة مع المستخلص الميثانولي الخام (E.M) و العفصي (E.T) والتي قدرت بـ (3.86%) و (3.40%) على التوالي (الجدول 13)، بينما كانت أقل نسبة تثبيط للجذر الحر DPPH• لدى المستخلص البيتانولي (E.1.B) عند التركيز (0.025mg/ml) والتي قدرت بـ 0.15% و قد سجلت نسبة تثبيط قصوى لجذر DPPH• عند حمض الاسكوربيك Acide Ascorbique بقيمة I%= 87.50% في نفس التركيز (0.025mg/ml).

الجدول (13): النسب التثبيطية (I%) للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لمستخلصات نبات *Retama raetam* (Forssk.) عند التركيز (0.025 mg/ml)

المستخلص	E.M	E.A.E	E.1.B	E.T	A.A
نسبة التثبيط I%	3.86	7.10	0.15	3.40	87.50

I- 5-1- تحديد مقدار الـ IC_{50}:

نستطيع حساب مقدار IC_{50} المثبطة لـ 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ من المعادلات الخطية لكل من منحنيات التثبيط (I%) للمستخلصات النباتية المختلفة وحمض الاسكوربيك كما هو موضح في الجدول (14).

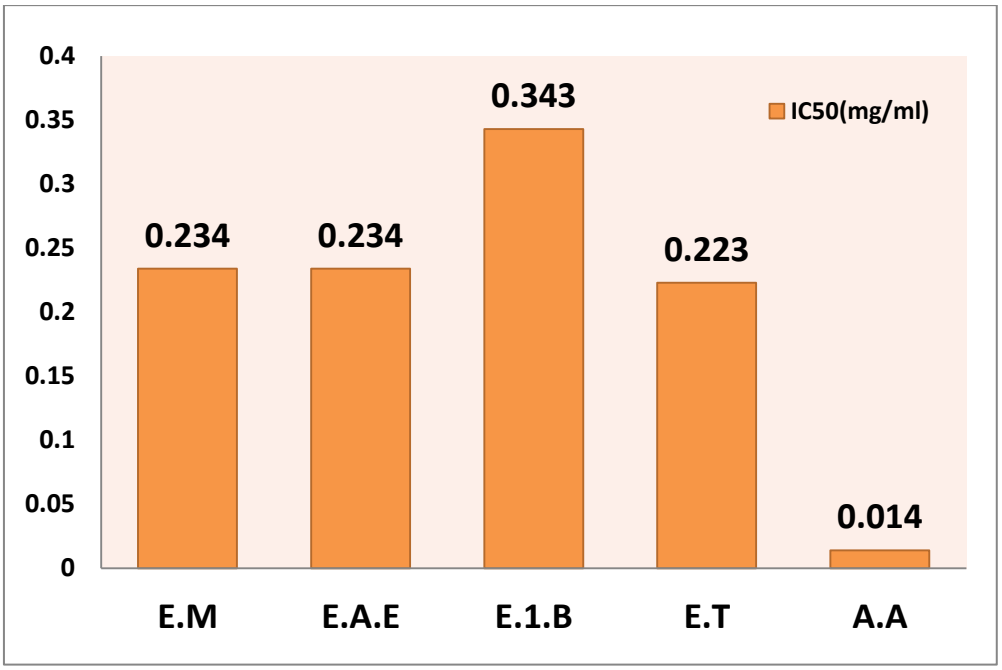
ومن الجدير ذكره أنه كلما كانت قيم الـ IC_{50} أقل كان التأثير المضادة للجذور الحرة أو المضاد للأكسدة أفضل.

جدول (14): قيم IC_{50} المثبطة لـ 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لمختلف مستخلصات نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)

المستخلص	E.M	E.A.E	E.1.B	E.T	A.A
IC_{50} (mg/ml)	**0.234**	**0.234**	**0.343**	**0.223**	**0.014**

أظهرت قيم الـ IC_{50} المتحصل عليها أن للمستخلص الأسيتوني العفصي (E.T) نشاطية أكبر من مثيلتها في اقتناص الجذر $DPPH^{\bullet}$ عن باقي المستخلصات بمقدار IC_{50}=0.223 mg/ml مع تسجيل قيمة متماثلة لدى المستخلصين الميثانولي (E.M) و مستخلص الاسيتات ايثيل (E.A.E) الفلافونويدي بقيمة IC_{50}=0.234 mg/ml أما المستخلص طور البيتانولي (E.1.B) فإن مقدار IC_{50} له قدر بـ (0.343 mg/ml).

وبالمقارنة مع قيمة (IC_{50}) لحمض الاسكوربيك والتي قدرت بـ (0.014 mg/ml) فإن القيم السابقة لتثبيط 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ تعتبر متوسطة لأنها تختلف كثيرا عن ما أظهره حمض الاسكوربيك Acide Ascorbique خلال هذا الإختبار (الشكل17).



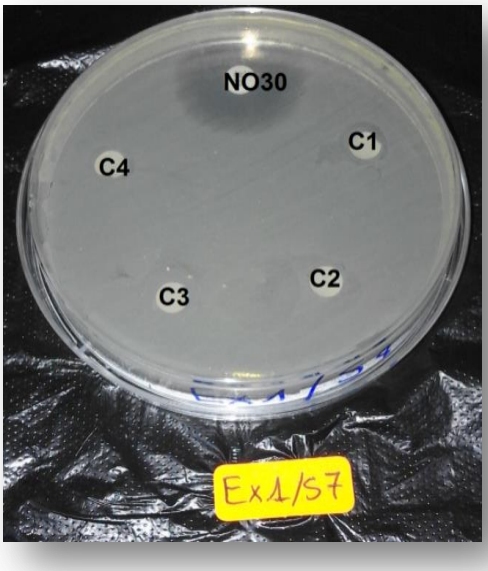
الشكل (17): قيم IC_{50} المثبطة لـ 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ بـ (mg/ml) لمختلف مستخلصات نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) وحمض الاسكوربيك Acide Ascorbique.

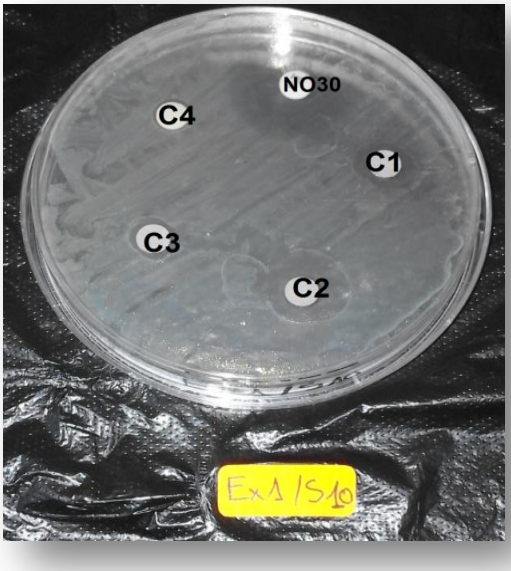
I- 6- تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا:

من خلال دراسة النشاطية البيولوجية لمستخلصات نبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) والمقارنة بينها وبين بعض المضادات الحيوية على عشر سلالات بكتيرية ممرضة تحصلنا على النتائج التالية :

- **المستخلص الميثانولي (E.M):**

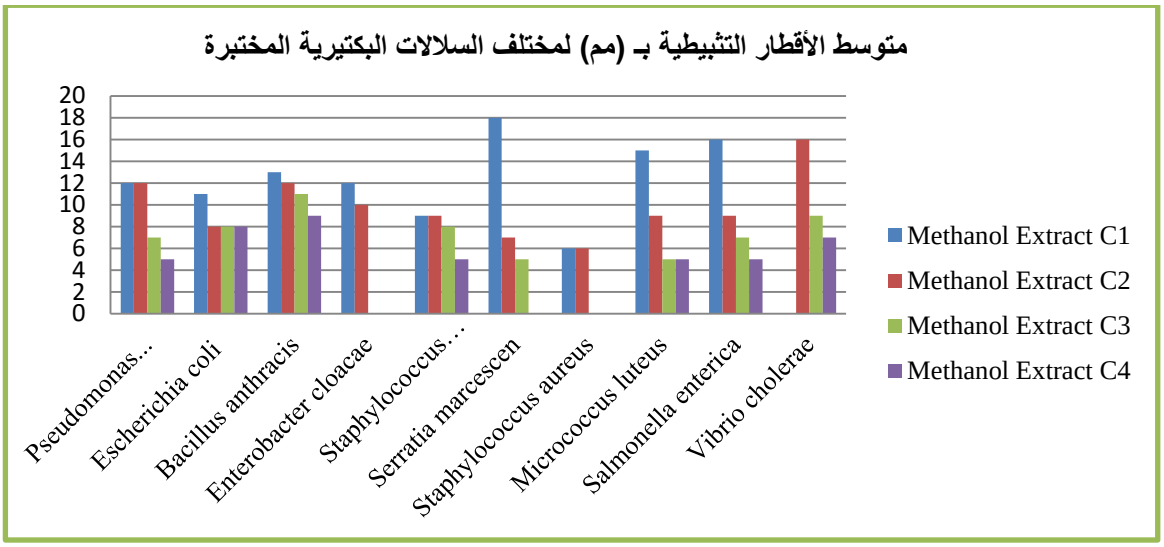
أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي يمتلك أعلى فعالية تثبيطية للبكتيريا (الوثيقة 26) حيث سجل أعلى قطر تثبيطي بـ (18 مم) عند تركيز 2 mg /ml مع السلالات البكتيرية *Vibrio cholerae* و*Serratia marcescen* كما سجلت حساسية معتبرة لكل من *Salmonella enterica* و *Micrococcus luteus* بقطر تثبيطي 16 مم و 15 مم لنفس التركيز، و لاحظنا عند السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* حساسية ضعيفة للمستخلص حيث كان القطر التثبيطي 6 مم عند التراكيز 2 mg /ml و 1mg/ml ، بينما تراوحت اقطار التثبيط عند باقي التراكيز بين (5-13 مم) لمختلف السلالات البكتيرية الأخرى (الشكل 18).





الوثيقة (26) : تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي (E.M) لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) على السلالات البكتيرية المختبرة.

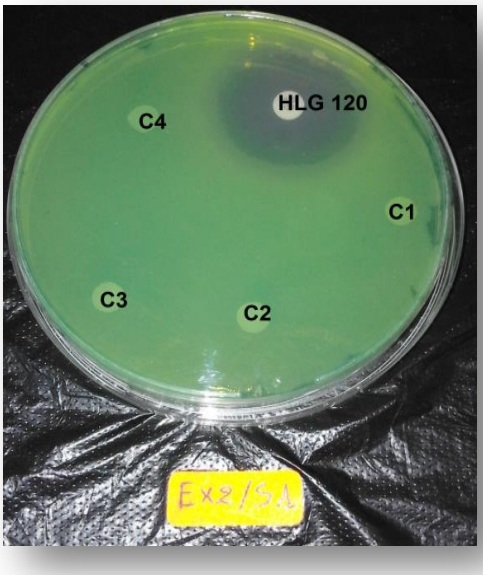
(Ex1): المستخلص الميثانولي، (S7): *Staphylococcus aureus*، (S10) : *Vibrio cholerae*

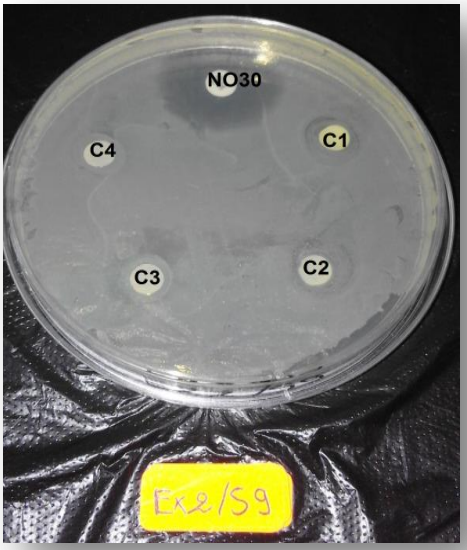


الشكل (18): متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة للمستخلص الميثانولي (E.M)

- **مستخلص الفلافونويدي الاسيتاتي (E.A.E):**

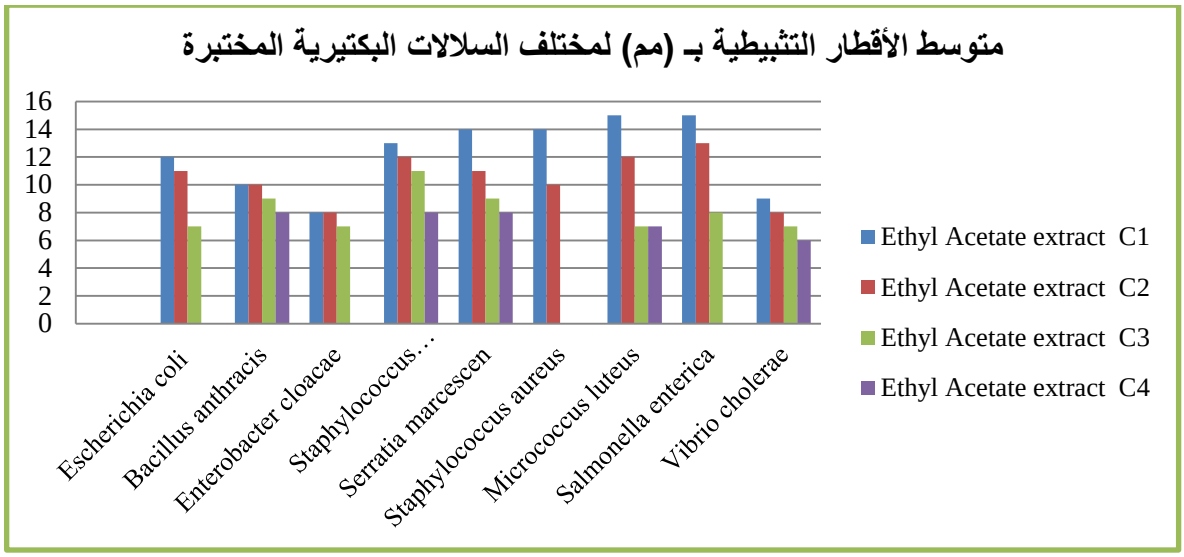
أظهرت السلالات البكتيرية *Salmonella enterica* و*Micrococcus luteus* حساسية معتبرة عند تركيز 2 mg/ml بقطر تثبيطي 15 مم، كما سجلنا حساسية ضعيفة للسلالة *Enterobacter cloacae* بقطر تثبيط 8 مم عند التراكيز 2 mg/ml و 1 mg/ml (الوثيقة 27) بينما أبدت السلالة البكتيرية *Pseudomonas aeruginosa ATCC* 27853 مقاومة شديدة لهذا المستخلص حيث لم نسجل اي قطر تثبيطي، أما السلالات البكتيرية الأخرى فكانت أقطار تثبيطها تتراوح بين (6-14 مم) مع مختلف تراكيز المستخلص (الشكل19).





الوثيقة (27): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الاسيتاتي (E.A.E) لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) على بعض السلالات البكتيرية المختبرة.

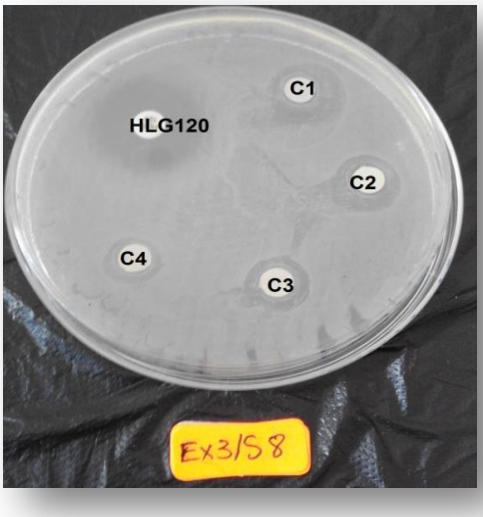
(Ex2): مستخلص Acétate d'éthyle، (S9): *Salmonella enterica*، (S1):*Pseudomonas aeruginosa*

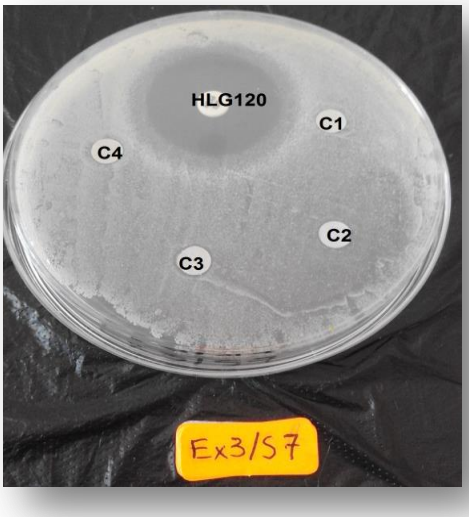


الشكل (19): متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة لمستخلص الاسيتات ايثيل (E.A.E)

- **المستخلص البيتانولي (E.1.B):**

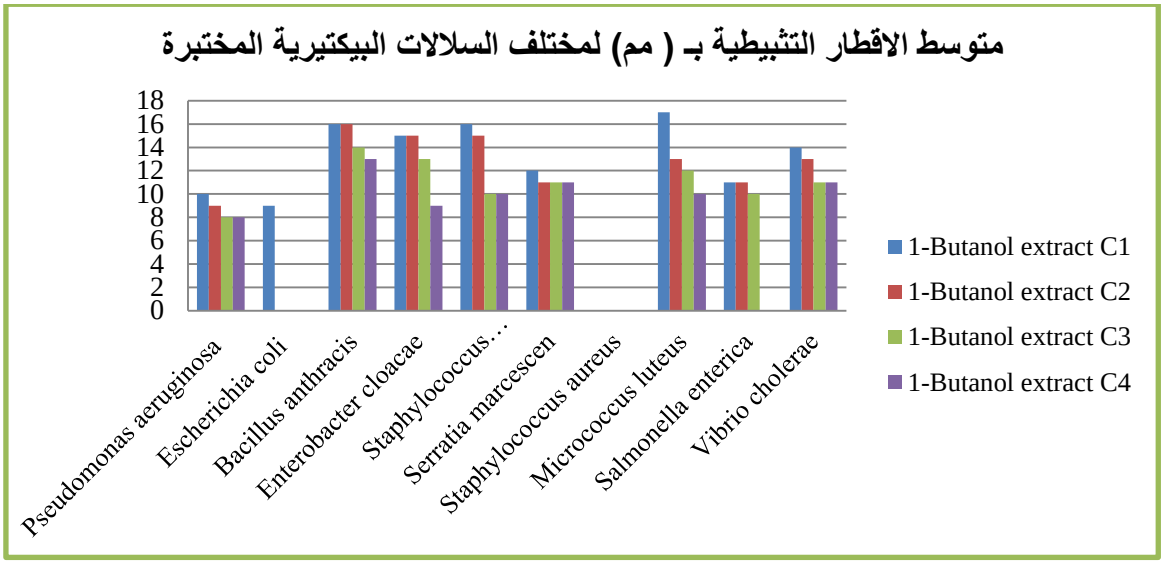
أبدت السلالة البكتيرية *Micrococcus luteus* حساسية معتبرة بقطر تثبيطي 17 مم وكما أن السلالات *Staphylococcus epidermidis* و *Bacillus anthracis* أظهرت هي الأخرى حساسية معتبرة للمستخلص بقطر تثبيطي 16 مم وهذا عند التركيز 2 mg /ml، بينما لاحظنا مع السلالة *Escherichia coli* حساسية ضعيفة للمستخلص عند نفس التركيز بقطر تثبيطي 9 مم ولم نسجل أي قطر تثبيطي عند باقي التراكيز(الوثيقة 28)، أما السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* فكانت جد مقاومة للمستخلص حيث لم نسجل أي قطر تثبيطي كما هو موضح في الشكل (20).





الوثيقة (28): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص البيتانولي (E.1.B) لنبات الرتم *Retama raetam*(Frosk.) على السلالات البكتيرية الممرضة المختبرة.

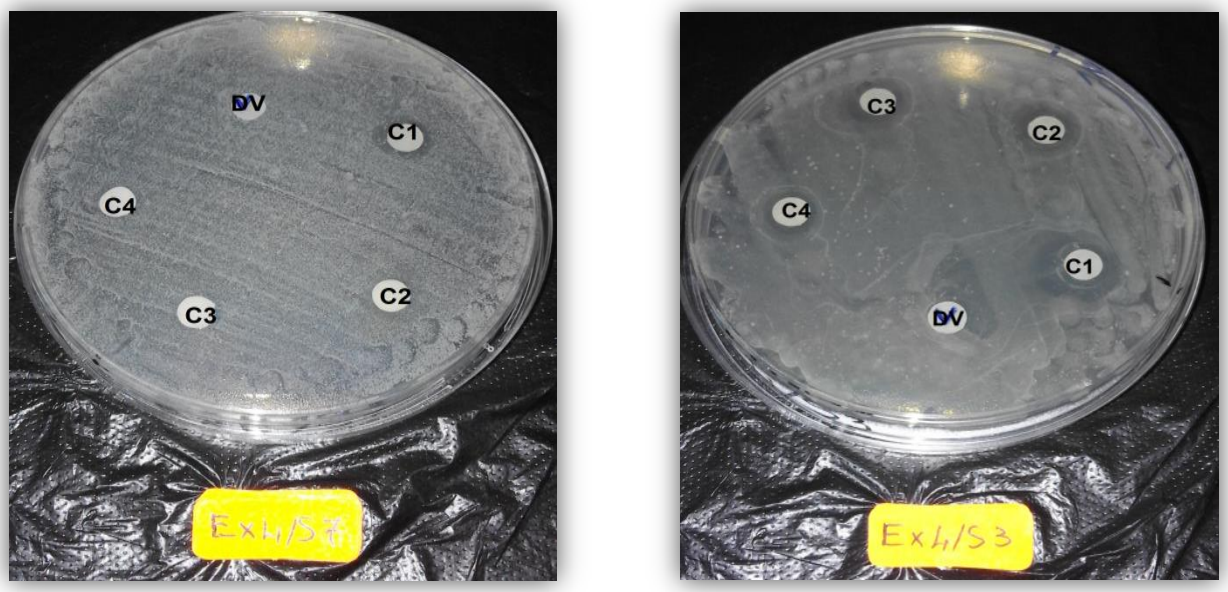
(Ex3): مستخلص 1-Butanol، *Staphylococcus aureus*:(S7)، *Micrococcus luteus*:(S8)



الشكل (20): متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة لمستخلص أحادي البيتانول (E.1.B)

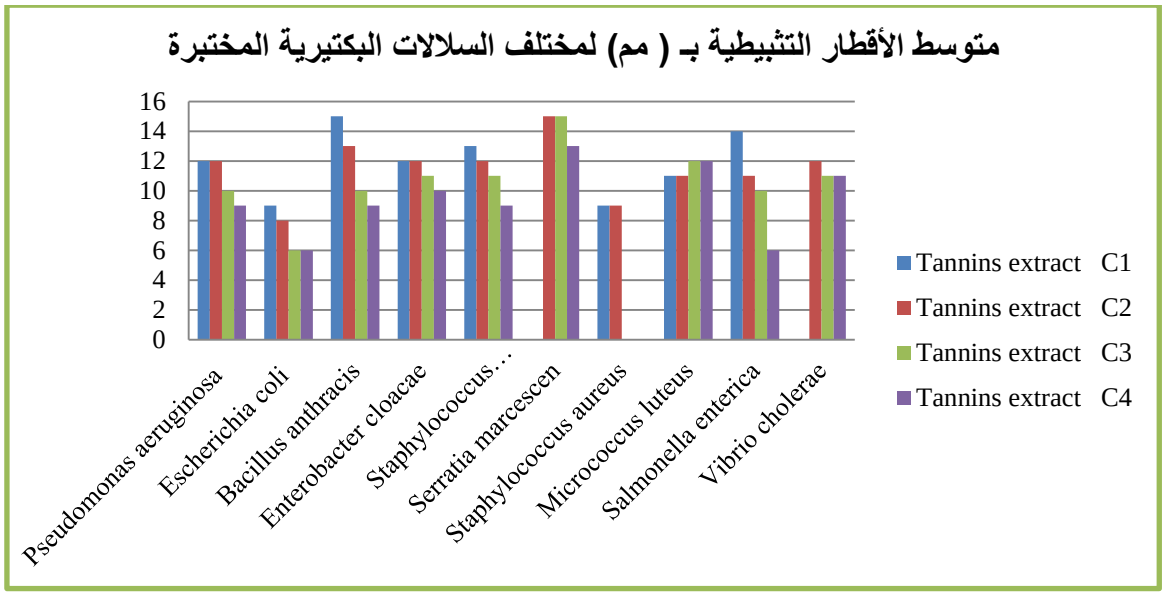
- **مستخلص التانينات الأسيتوني (E.T):**

أظهرت السلالة *Bacillus anthracis* حساسية معتبرة بقطر تثبيطي 15 مم عند أغلب تراكيز المستخلص، أما السلالة البكتيرية *Serratia marcescen* أبدت حساسية معتبرة (13-15مم) مع أغلب التراكيز بينما اظهرت السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* حساسية ضعيفة عند التراكيز 2 mg/ml ، 1 mg/ml بقطر تثبيطي 9 مم (الوثيقة 29)، و (الشكل 21) يبن متوسط الاقطار التثبيطية للسلالات البكتيرية المختبرة.



الوثيقة (29): تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص التانينات(E.T) لنبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) على بعض السلالات البكتيرية المختبرة.

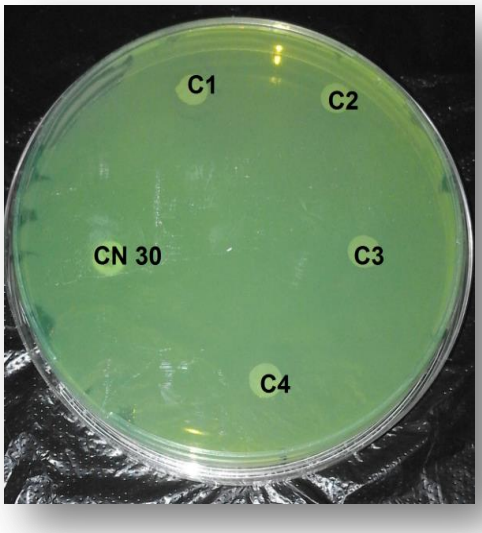
(EX4): مستخلص التانينات، (DV): قرص فارغ، (S3):*Bacillus subtilis*،(S7): *Staphylococcus aureus*

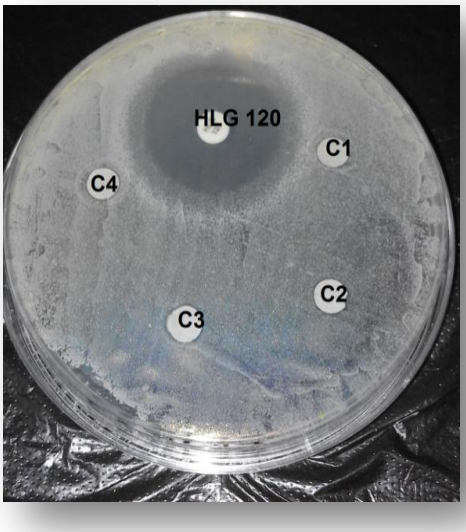


الشكل (21): متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة مع مستخلص التانينات لنبات الرتم*Retama raetam*(Frosk.)

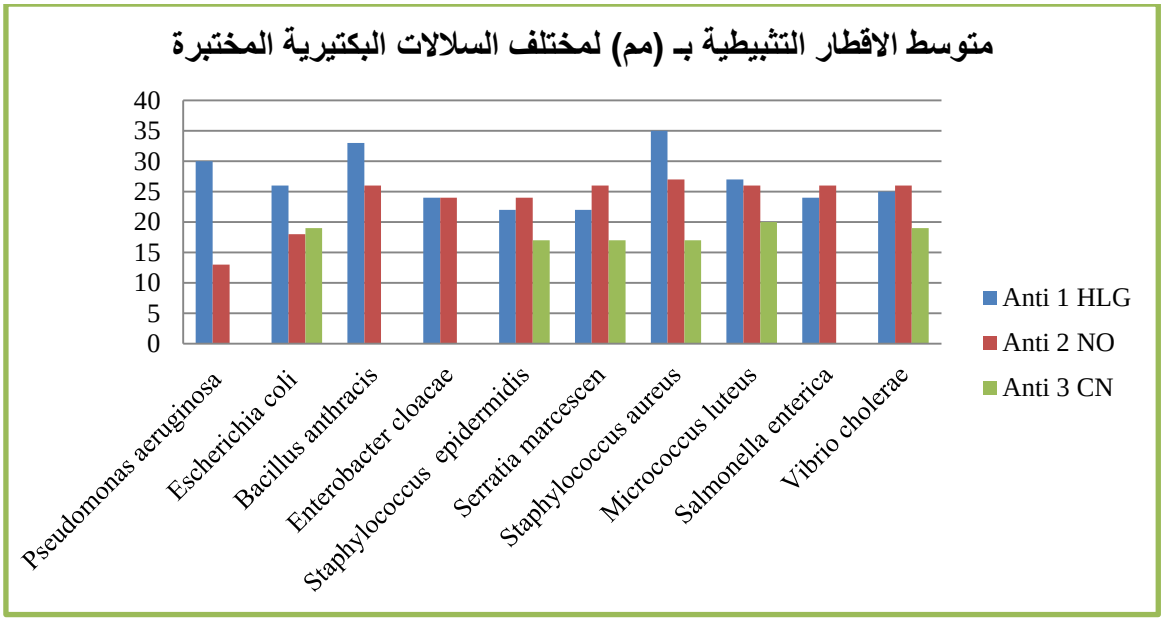
- **المضادات الحيوية (Les Antibiotique):**

سجلت أكبر حساسية للمضادات الحيوية مع السلالة *Staphylococcus aureus* (35 مم) والسلالة *Bacillus anthracis* (33 مم) وتراوحت أقطار التثبيط مع باقي السلالات البكتيرية المختبرة بين (22-27 مم) وذلك مع المضاد الحيوي HLG وكما أعطت السلالات *Enterobacter cloacae* و *Bacillus anthracis* و *Pseudomonas aeruginosa* مقاومة شديدة للمضاد الحيوي CN باستثناء بعض السلالات التي أبدت حساسية شديدة للمضاد الحيوي بأقطار تثبيط 23 مم و 20 مم و 19 مم عند *Vibrio cholerae* و *Micrococcus luteus* و *Escherichia coli* على التوالي، كما أظهرت السلالات *Staphylococcus aureus* و *Salmonella enterica* حساسية معتبرة بأقطار تثبيطية (27 مم) و(26 مم) مع المضاد الحيوي NO و تراوحت الأقطار مع باقي السلالات بين (16-25 مم) كما هو مبين في الشكل (22).





الوثيقة (30): تأثير بعض المضادات الحيوية HLG و CN لسلالات البكتيرية *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* على التوالي.



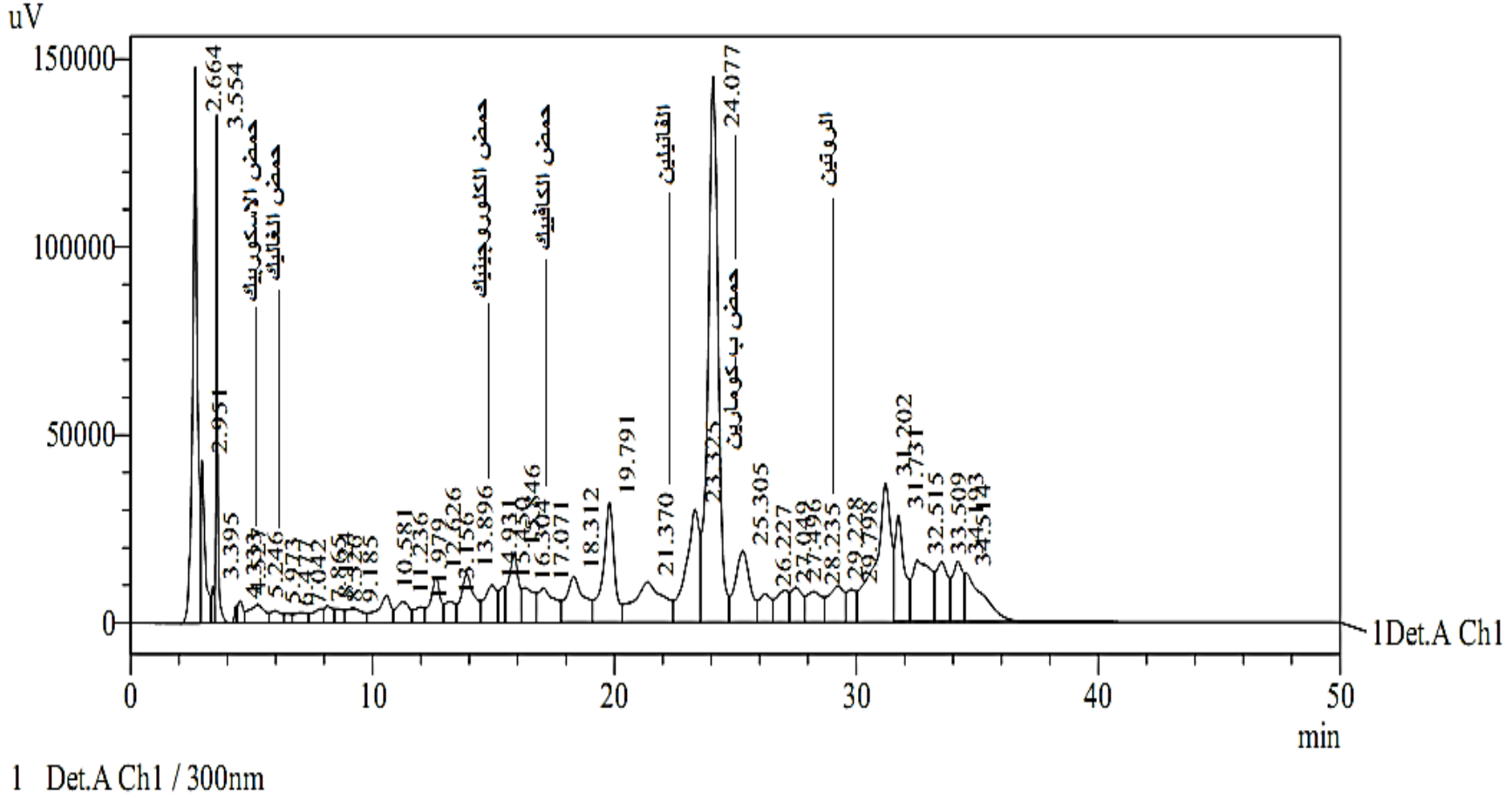
الشكل (22): متوسط الأقطار التثبيطية بـ (مم) للسلالات البكتيرية المختبرة للمضادات الحيوية.

هاته النتائج تمكننا من المقارنة بين السلالات البكتيرية و المستخلصات النباتية مقارنة ايجابية تزيد من فهم النتائج بشكل عام، حيث لوحظ أن:

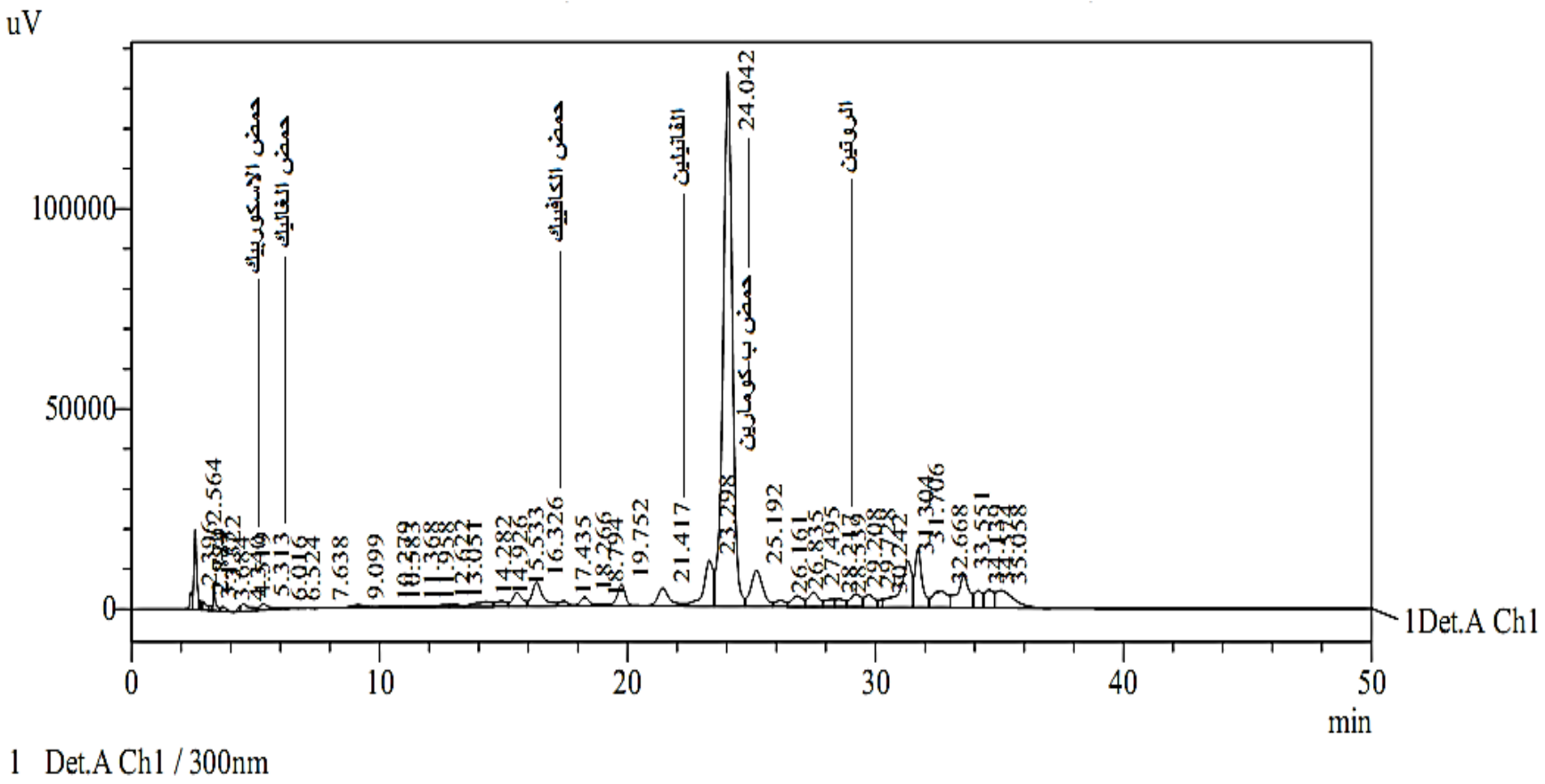
- ✓ المستخلص الاكثر فعالية في تثبيط السلالات البكتيرية بصفة عامة هو المستخلص الأسيتوني العفصي، فقد سجلت عنده عدد كبير من الاقطار التثبيطية العالية لمعظم السلالات.
- ✓ المستخلص الاضعف فعالية في تثبيط السلالات البكتيرية هو المستخلص الاسيتاتي، فبالرغم من وجود اقطار تثبيطية عالية لديه ضد انواع البكتريا المختلفة، غير انه يعتبر الاضعف من بين باقي المستخلصات النباتية.
- ✓ نلاحظ أن بكتيريا سالبة الغرام كانت اكثر حساسية من موجبة الغرام ويعود هذا إلى الجدار الخلوي لكل نوع.
- ✓ عند مقارنة المستخلصات الاربعة فيما بينها من ناحية تأثيرها على البكتيريا نجد أن مستخلص الأعفاص الأسيتوني أعطى تأثيرا ايجابيا على جميع السلالات البكتيرية المختبرة، يليها المستخلص الميثانولي الذي اعطى هو الأخر نتائج إيجابية أما مستخلص الفلافونويدات فلم يثبط جميع السلالات البكتيرية حيث سجلنا بعض السلالات البكتيرية ذات مقاومة عالية لكل تراكيز مستخلصات النبات.

I-7- تحديد بعض المركبات الفينولية لمستخلصات النبات عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

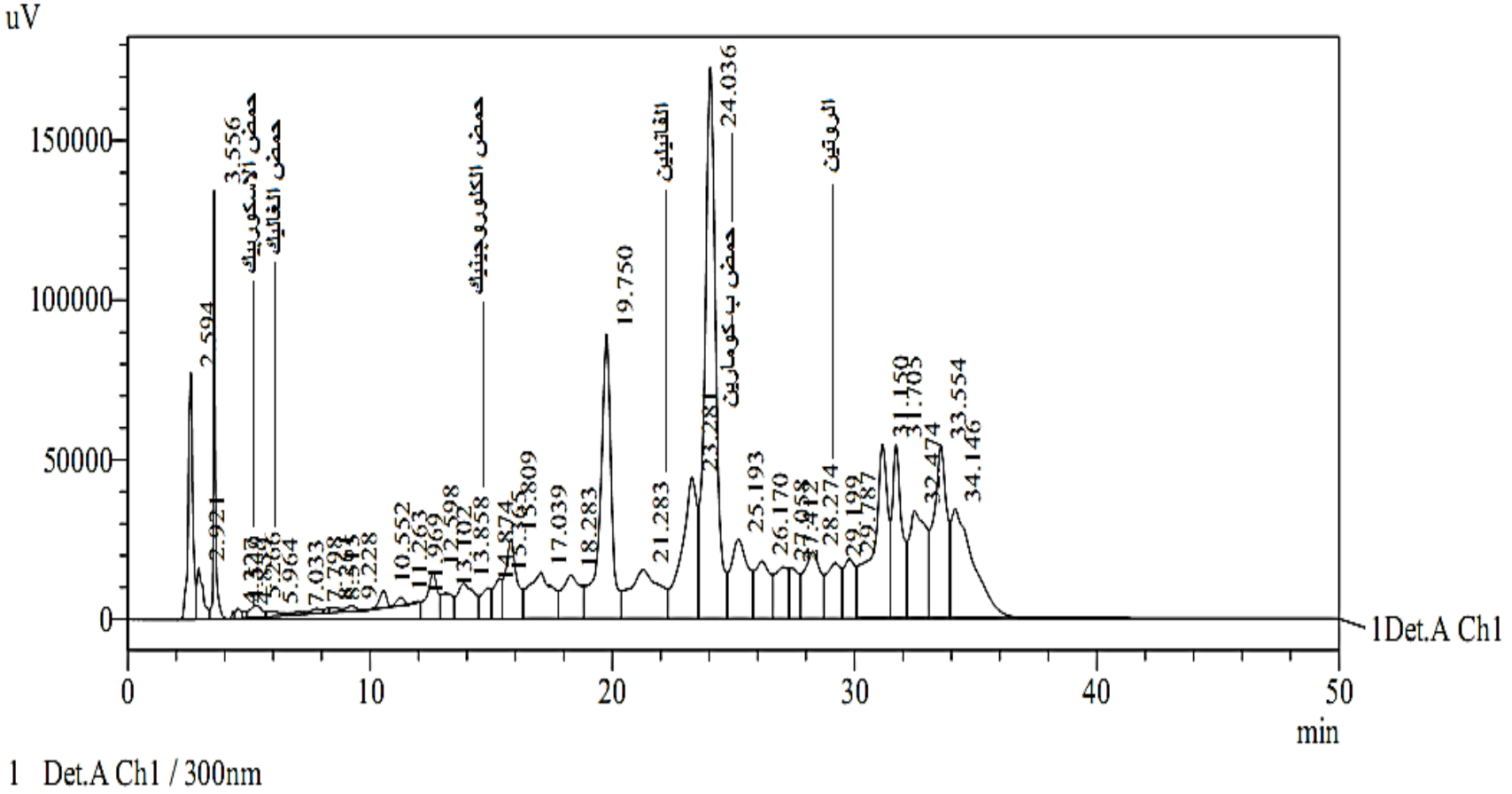
بعد التحليل الكروماتوغرافي للمستخلصات النباتية لنبات الرتم *Retama raetam* باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء (HPLC)، تم الحصول على منحنيات كروماتوغرافية والتي أظهرت وجود عدد معتبر من المركبات الفينولية في كل مستخلص كما هو موضح في الأشكال (23-24-25) و الجداول (15-16-17).



الشكل (23): المنحنيات الكروماتوغرافية المستخلص الميثانولي الخام (E.M)



الشكل (24): المنحنيات الكروماتوغرافية المستخلص الفلا فونويدي طور أسيتات ايثيل (E.A.E)



الشكل (25): المنحنيات الكروماتوغرافية المستخلص الفلافونويدي طور احادي البيتانول (E.1.B)

الجدول (15): التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفينولية للمستخلص الميثانولي الخام لنبات الرتم وتراكيز البعض منها بـالملغ/غ من المستخلص.

Pics	اسم المركب	تركيز المركب (mg/g) من المستخلص	Ret. Temps	hauteur	surface	Hauteur %	Surface %
1	غير معروف	/	2.664	1937421	147778	8.212	16.284
2	غير معروف	/	2.951	506273	43255	2.146	4.766
3	غير معروف	/	3.395	74123	9947	0.314	1.096
4	غير معروف	/	3.554	658554	135102	2.791	14.887
5	حمض الاسكوربيك	14.705	4.333	29233	4502	0.124	0.496
6	غير معروف	/	4.527	90896	5813	0.385	0.640
7	حمض الغاليك	0.949	5.246	223672	4906	0.948	0.541
8	غير معروف	/	5.973	104335	3255	0.442	0.359
9	غير معروف	/	6.477	50684	2432	0.215	0.268
10	غير معروف	/	7.042	102439	2718	0.434	0.299
11	غير معروف	/	7.865	120159	3777	0.509	0.416
12	غير معروف	/	8.124	107428	4574	0.455	0.504
13	غير معروف	/	8.526	93926	3780	0.398	0.417
14	غير معروف	/	9.185	181388	3885	0.769	0.428
15	غير معروف	/	10.581	284338	7236	1.205	0.797
16	غير معروف	/	11.236	211981	5531	0.898	0.609
17	غير معروف	/	11.979	117502	4148	0.498	0.457
18	غير معروف	/	12.626	346871	12323	1.470	1.358
19	غير معروف	/	13.156	169442	5572	0.718	0.614
20	حمض الكلوروجينيك	1.209	13.896	493542	12991	2.092	1.431
21	غير معروف	/	14.931	353361	9988	1.498	1.101
22	غير معروف	/	15.450	164468	9662	0.697	1.065
23	غير معروف	/	15.846	534463	18589	2.265	2.048

24	حمض الكافييك	0.422	16.304	314559	9276	1.333	1.022
25	غير معروف	/	17.071	449534	9198	1.905	1.014
26	غير معروف	/	18.312	629241	12232	2.667	1.348
27	الكيرستين	0	19.791	1038735	31920	4.403	3.517
28	الفانيلين	1.070	21.370	910807	10751	3.860	1.185
29	غير معروف	/	23.325	1174777	30052	4.979	3.311
30	حمض ب-كومارين	2.644	24.077	4290832	145198	18.187	15.999
31	غير معروف	/	25.305	819751	18900	3.474	2.083
32	غير معروف	/	26.227	259941	7490	1.102	0.825
33	غير معروف	/	27.049	313665	8401	1.329	0.926
34	غير معروف	/	27.496	310355	9229	1.315	1.017
35	الروتين	1.467	28.235	363296	8107	1.540	0.893
36	غير معروف	/	29.228	437067	9625	1.852	1.061
37	غير معروف	/	29.798	221589	8644	0.939	0.953
38	غير معروف	/	31.202	1716750	36819	7.276	4.057
39	غير معروف	/	31.731	770818	28425	3.267	3.132
40	غير معروف	/	32.515	886715	16425	3.758	1.810
41	غير معروف	/	33.509	542581	16017	2.300	1.765
42	غير معروف	/	34.193	502488	16067	2.130	1.770
43	غير معروف	/	34.514	683395	12983	2.897	1.431
total	/	/	/	23593397	907523	100.000	100.000

الجدول (16): التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفينولية للمستخلص الفلافونويدي طور اسيتات ايثيل وتراكيز البعض منها بـالملغ/غ من المستخلص.

Pics	اسم المركب	تركيز المركب (mg/g) من المستخلص	Ret. Temps	hauteur	surface	Hauteur %	Surface %
1	غير معروف	/	2.396	31932	4326	0.434	1.466
2	غير معروف	/	2.564	149543	20034	2.034	6.788
3	غير معروف	/	2.779	12895	2318	0.175	0.785
4	غير معروف	/	2.884	24294	2192	0.330	0.743
5	غير معروف	/	3.177	8021	1118	0.109	0.379
6	غير معروف	/	3.322	38750	5738	0.527	1.944
7	غير معروف	/	3.684	17223	1048	0.234	0.355
8	حمض الاسكوربيك	10.286	4.340	8383	1246	0.114	0.422
9	غير معروف	/	4.519	45144	1839	0.614	0.623
10	حمض الغاليك	0.385	5.313	39628	1623	0.539	0.550
11	غير معروف	/	6.016	7772	336	0.106	0.114
12	غير معروف	/	6.524	2998	118	0.041	0.040
13	غير معروف	/	7.638	1487	87	0.020	0.030
14	غير معروف	/	9.099	22839	655	0.311	0.222
15	غير معروف	/	10.279	6116	209	0.083	0.071
16	غير معروف	/	10.583	1713	137	0.023	0.046
17	غير معروف	/	11.368	1565	92	0.021	0.031
18	غير معروف	/	11.958	2303	120	0.031	0.041
19	غير معروف	/	12.622	14819	507	0.202	0.172
20	غير معروف	/	13.051	14831	593	0.202	0.201
21	غير معروف	/	14.282	58456	1188	0.795	0.402
22	غير معروف	/	14.926	38849	1353	0.528	0.458
23	غير معروف	/	15.533	95368	3493	1.297	1.183
24	حمض الكافييك	0.497	16.326	185341	6016	2.521	2.038

25	غير معروف	/	17.435	30309	1252	0.412	0.424
26	غير معروف	/	18.266	54598	2193	0.743	0.743
27	غير معروف	/	18.794	12836	500	0.175	0.169
28	الكيرستين	0	19.752	119804	5365	1.630	1.818
29	الفانيلين	0.340	21.417	143496	4372	1.952	1.481
30	غير معروف	/	23.298	308285	11401	4.194	3.863
31	حمض ب- كومارين	4.257	24.042	3454183	133389	46.987	45.195
32	غير معروف	/	25.192	301986	8958	4.108	3.035
33	غير معروف	/	26.161	43852	1550	0.597	0.525
34	غير معروف	/	26.835	85312	2678	1.160	0.907
35	غير معروف	/	27.495	108413	3622	1.475	1.227
36	الروتين	0.410	28.217	49939	1888	0.679	0.640
37	غير معروف	/	28.539	52383	1953	0.713	0.662
38	غير معروف	/	29.208	99299	3230	1.351	1.094
39	غير معروف	/	29.728	88205	3041	1.200	1.030
40	غير معروف	/	30.242	22341	1898	0.304	0.643
41	غير معروف	/	31.304	390768	11565	5.316	3.919
42	غير معروف	/	31.706	293888	14672	3.998	4.971
43	غير معروف	/	32.668	175623	4068	2.389	1.378
44	غير معروف	/	33.551	260067	8064	3.538	2.732
45	غير معروف	/	43.139	96416	4302	1.312	1.458
46	غير معروف	/	34.574	112539	4492	1.531	1.522
47	غير معروف	/	35.058	216528	4303	2.946	1.458
total	/	/	/	7351393	295143	100.000	100.000

الجدول (17): التحليل الكروماتوغرافي للمركبات الفينولية للمستخلص الفلافونويدي طور أحادي البيتانول وتراكيز البعض منها بـالملغ/غ من المستخلص.

Pics	اسم المركب	تركيز المركب (mg/g) من المستخلص	Ret. Temps	hauteur	surface	Hauteur %	Surface %
1	غير معروف	/	2.594	1003016	77313	2.900	7.375
2	غير معروف	/	2.921	281850	16073	0.815	1.533
3	غير معروف	/	3.556	1727698	134320	4.996	12.814
4	حمض الاسكوربيك	8.436	4.327	15564	2316	0.045	0.221
5	غير معروف	/	4.549	48049	3048	0.139	0.291
6	غير معروف	/	4.859	24222	2184	0.070	0.208
7	حمض الغاليك	0.563	5.266	129783	3822	0.375	0.365
8	غير معروف	/	5.964	63396	1609	0.183	0.154
9	غير معروف	/	7.033	30682	869	0.089	0.083
10	غير معروف	/	7.798	47377	1453	0.137	0.139
11	غير معروف	/	8.261	21147	1468	0.061	0.140
12	غير معروف	/	8.515	39517	1443	0.114	0.138
13	غير معروف	/	9.228	49070	1997	0.142	0.159
14	غير معروف	/	10.552	108924	5319	0.315	0.507
15	غير معروف	/	11.263	55028	2410	0.159	0.230
16	غير معروف	/	11.969	4290	252	0.012	0.024
17	غير معروف	/	12.598	447991	14613	1.295	1.394
18	غير معروف	/	13.102	272116	8007	0.787	0.764
19	غير معروف	/	13.858	544209	11113	1.574	1.060
20	غير معروف	/	14.874	268684	9634	0.777	0.919
21	غير معروف	/	15.365	305562	12551	0.884	1.197
22	غير معروف	/	15.809	824323	24983	2.383	2.383
23	غير معروف	/	17.039	961208	14454	2.779	1.379
24	حمض الكافييك	0.497	18.283	703932	13638	2.035	1.301

25	الكيرستين	0	19.750	2860503	89228	8.271	8.512
26	الفانيلين	1.531	21.283	1303643	15276	3.769	1.457
27	غير معروف	/	23.281	1908966	44179	5.520	4.215
28	حمض ب- كومارين	3.356	24.036	5446700	172657	15.749	16.471
29	غير معروف	/	25.193	1232333	24720	3.563	2.358
30	غير معروف	/	26.170	769100	17882	2.224	1.706
31	غير معروف	/	27.058	606068	16077	1.752	1.534
32	غير معروف	/	27.412	420609	15721	1.216	1.500
33	الروتين	4.035	28.274	1001136	20906	2.895	1.994
34	غير معروف	/	29.199	701752	17288	2.029	1.649
35	غير معروف	/	29.787	612368	18599	1.771	1.774
36	غير معروف	/	31.150	2372695	54640	6.861	5.212
37	غير معروف	/	31.705	1503396	54351	4.347	5.185
38	غير معروف	/	32.474	1644479	33703	4.755	3.215
39	غير معروف	/	33.554	1996633	54219	5.773	5.172
40	غير معروف	/	34.146	2226551	34249	6.438	3.267
total	/	/	/	34584569	1048256	100.000	100.000

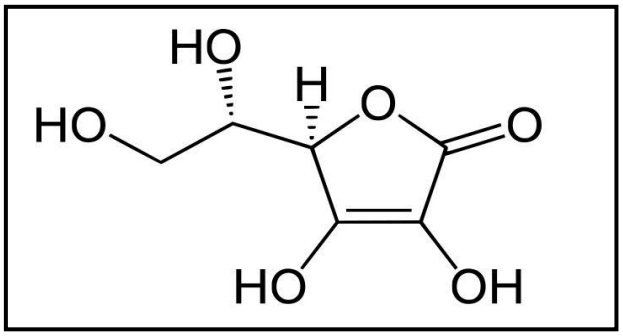
تم مقارنة النتائج التي أظهرتها منحنيات المستخلصات النباتية وزمن استبقاء كل مركب بأزمنة الاستبقاء لقمم (pics) مركبات فينولية مرجعية استعملت كمقياس للتعرف على المركبات الموجودة في كل مستخلص، وقد استعملت 08 مركبات مرجعية هي حمض الاسكوربيك، حمض الغاليك، حمض الكلوروجينيك، حمض الكافييك، الكيرسيتن، الفانيلين، حمض ب- كومارين و الروتين.

بينت النتائج احتواء كل مستخلص على عدد من المركبات الفينولية تختلف من مستخلص لآخر، حيث تم الحصول على 47 مركبا فينوليا عند تحليل المستخلص الفلافونويدي طور الاسيتات ايثيل (E.A.E) كأعلى عدد للمركبات الفينولية في هذا المستخلص، عرف منها 6 مركبات هي حمض الاسكوربيك، حمض الغاليك، حمض الكافييك، الفانيلين، حمض ب- كومارين و الروتين بتراكيز 10.286 ، 0.385 ، 0.497 ، 0.340 ، 4.257 ، 0.410 ملغ/ غ من المستخلص على التوالي، يليها عدد المركبات الفينولية عند المستخلص الميثانولي الخام (E.M) بـ 43 مركبا فينوليا، عرف منها كل المركبات ماعدى الكريستين بتراكيز مختلفة، حيث ابدى التحليل الكروماتوغرافي للمستخلص الخام تراكيز كبيرة لحمض الاسكوربيك عند هذا المستخلص بقيمة 14.705 ملغ/غ من المستخلص، تليها تراكيز حمض ب-كومارين، الروتين، حمض الكلوروجينيك، الفانيلين بتراكيز 2.644 ، 1.467 ، 1.209 ، 1.070 ملغ/غ من المستخلص على التوالي، و تراكيز منخفضة لكل من حمض الغاليك و حمض الكافييك بقيم 0.949 و 0.422 ملغ/غ للمستخلص على الترتيب، بينما تم الكشف عن 40 مركبا فينوليا فقط إثر التحليل الكروماتوغرافي للمستخلص البيتانولي (E.1.B) من بينها 6 مركبات معروفة وهي حمض الاسكوربيك بتركيز 8.436 ملغ/غ من المستخلص، حمض الغاليك 0.385 ملغ/غ حمض الكلوروجينيك 1.333 ملغ/غ، الفانيلين بتركيز 1.531 ملغ/غ، حمض ب- كومارين 3.356ملغ/غ، والروتين والذي ظهر بتركيز عال نسبيا 4.035 ملغ/غ من المستخلص (الجدول 18).

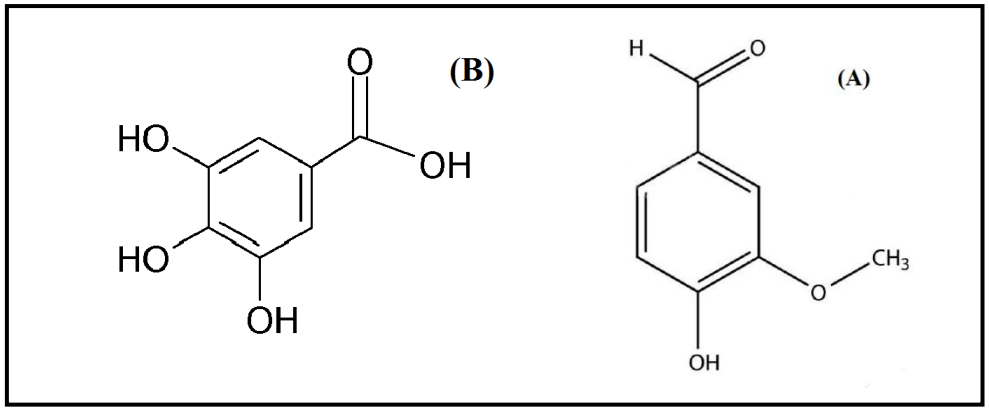
جدول (18): تراكيز المركبات الفينولية المعروفة في المستخلصات النباتية لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ/غ من كل مستخلص.

المركبات الفينولية	التراكيز بـملغ/غ (mg/g) من المستخلص		
	E.A.E	E.1.B	E.M
حمض الاسكوربيك	10.286	8.436	14.705
حمض الغاليك	0.385	0.563	0.949
حمض الكلوروجينيك	0	1.333	1.209
حمض الكافييك	0.497	0	0.422
كريستين	0	0	0
الفانيلين	0.340	1.531	1.070
حمض ب- كومارين	4.257	3.356	2.644
الروتين	0.410	4.035	1.467

تضاربت قيم تراكيز المركبات الفينولية عند المستخلصات الثلاث، كما لوحظ تواجد بعضها في جميع المستخلصات أهمها حمض الاسكوربيك (الوثيقة 31) وهو الذي أبدى تركيزا أعلى من غيره من المركبات كانت أقصاها لدى مستخلص الميثانولي (E.M) بقيمة 14.705 ملغ/غ من المستخلص و أضعفها عند المستخلص البيتانولي (E.1.B) بقيمة 8.436 ملغ/غ من المستخلص، كما لوحظ تواجد كل من حمض الغاليك، الفانيلين (الوثيقة 32)، حمض ب- كومارين، والروتين لدى جميع المستخلصات بتراكيز مختلفة.



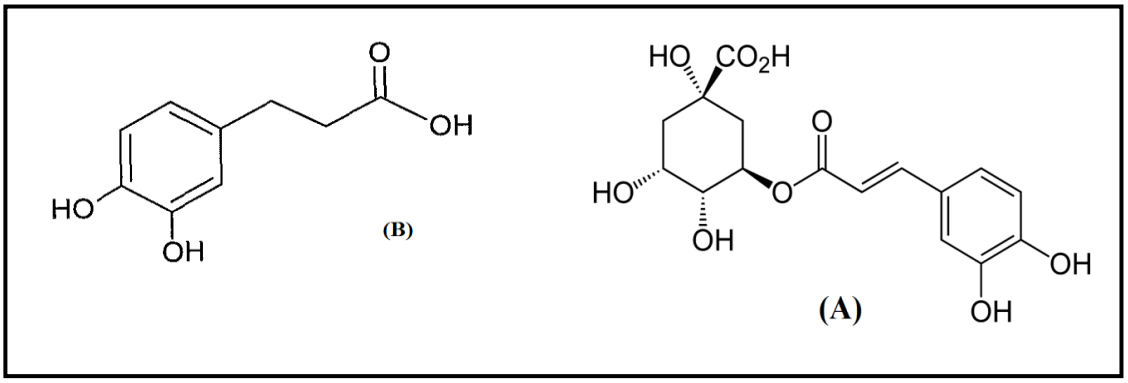
الوثيقة (31): البنية الكيميائية لحمض الاسكوربيك (SEKLI-BELAIDI, 2011).



الوثيقة (32): التركيب الكيميائي لمركب الفانيلين (A) و حمض الغاليك (B) (BRUNETON, 1993 ; REIMER, 1976).

وقد بينت النتائج غياب حمض الكلوروجينيك (الوثيقة 33) من المستخلص الفلافونويدي اسيتات ايثيل (E.A.E) بينما ظهر في المستخلصين الميثانولي و البيتانولي بتراكيز 1.209 و 1.333 ملغ/غ على التوالي، و غياب حمض الكافييك (الوثيقة33) من المستخلص البيتانولي (E.1.B) و تواجده في مستخلص الميثانول و الاسيتات ايثيل بتركيز 0.422 و 0.497 ملغ/غ من المستخلص.

بينما لم يلاحظ مركب الكيرستين في اي من المستخلصات النباتية.



الوثيقة (33): البنية الكيميائية لكل من حمض الكلوروجينيك (A) و حمض الكافييك (B) (MARINOVA *et al.*, 2009).

يجدر بنا القول هنا أن تراكيز المركبات الفينولية المعروفة في كل مستخلص اختلفت اختلافا ملحوظا، فحمض البيتا كومارين كان تركيزه اعلى في المستخلص الاسيتاتي بقيمة قدرت بـ 4.257 ملغ/الغرام من المستخلص، كما سجلت قيمة قصوى لمركب الروتين عند المستخلص البيتانولي بقيمة 4.035 ملغ/غ من المستخلص.

ملاحظة:

- يجدر الإشارة إلى أن المستخلص الاسيتوني لم يحلل بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) نظرا لكونه مستخلصا نقيا، يحتوي على التانينات المكثفة Les tanins condensé والتي تتميز بكبر حجم جزيئاتها و تعقيدها البنيوي.
- من الملاحظ ايضا أن هناك بعض المركبات غير المعروفة ذات التركيز العالي في مختلف المستخلصات تفوق تراكيز حمض الاسكوربيك و حمض الغاليك.
- كما يمكن ملاحظة التوافق الايجابي و التناسب الطردي بين معظم النتائج بعد التحليل الكروماتوغرافي للمستخلصات النباتية حيث أن:

✓ التراكيز المتزايدة لحمض الغاليك لدى المستخلصات النباتية تفسر لنا نتائج التقدير الكمي لعديدات الفينول، كما أن وجود عدد كبير من المركبات الفينولية في المستخلص الاسيتاتي (47 مركبا) يتناسب مع كمية الفلافونويدات الموجودة في نفس المستخلص.

✓ تتوافق نتائج التحليل الكروماتوغرافي للمستخلصات مع النتائج المضادة للأكسدة من حيث تراكيز حمض الاسكوربيك فيها، حيث كان مقداره في كل من المستخلص الميثانولي والمستخلص الاسيتاتي 14.705 و 10.286 ملغ/غ من المستخلص على التوالي، بينما قدرت قيمته عند المستخلص البيتانولي كأقل مقدار بـ 8.436 ملغ/غ من المستخلص.

II- المناقشة:

1. الكشف الكيميائي للنبات:

تعتبر الفلافونويدات من المركبات المسؤولة عن إعطاء اللون خصوصا في الأزهار لذلك هي مواد جاذبة للحشرات (HARBORNE et WILLIAMS, 2000)، كما تلعب الفلافونويدات دورا دفاعيا كونها نوع من أنواع مضادات الأكسدة خاصة عند الإجهاد المائي الذي يسبب إنتاج الجذور الحرة (PINCEMAIL *et al*., 1986)، و تعمل على معالجة و حماية النبات من الإصابات البكتيرية و الفطرية (MARFAK, 2003)، كما تعمل على خفض عملية النتح وهذا ما يفسر تواجدها في هذه النبتة كونها نبات صحراوي يعيش في المناطق الجافة (WOLLENWEBER et DIETZ, 1980).

المركبات المرجعة عبارة عن سكريات بسيطة ينتجها النبات أثناء عمليات الأيض الأولي والتي يستخدمها في عمليات البناء، ويرتبط وجود السكريات البسيطة بتكوين الجليكوسيدات وتحللها فوجودها في النبات هو نتيجة لوجود الجليكوسيدات، وهي عبارة عن مركبات مخزنة يمكن للنبات اعادة استعمالها خلال مراحل حياته وهو ما يفسر وجود المركبات المرجعة (هيكل وعمر، 1993).

إن وجود التانينات في أجزاء مختلفة من النبات يفسرها دور التانينات الهام في عملية البناء التركيبي للنبات، إضافة لخاصيتها في جذب الاوكسجين بسبب احتوائها على حلقة الفينول فهي تعتبر ذات وظيفة تنفسية (عميرة، 2005)، كما تصنف التانينات من مضادات الأكسدة من مجموعة عديدات الفينول (FULLER, 2004)، وتتميز بكونها مواد مطهرة تحمي النبات من الحشرات الضارة، وبما أن نبات الرتم ينمو في الظروف القاسية من قلة الأمطار وكثرة الحشرات فوجودها ضروري لحماية النبات لينمو نموا طبيعيا (شويخ، 2004).

بما أن الأنثوسيانات تعتبر من عديدات الفينول فهي تلعب دور مضادات للأكسدة (PINCEMAIL *et al*., 1986) كما لها دور في مقاومة الإجهادات البيئية، و تمنح اللون الأحمر للنبات وتحمي من البكتيريا الضارة (KANOUN, 2010; CHYNIER *et al*., 1998).

تم قطف النبات في مرحلته الخضرية في أوائل فصل الشتاء، ما يفسر غياب القلويدات والتي يتركز تواجدها في الثمار(BENHOUHOU, 2005).

التربينات والستيرولات هي مركبات هيدروكربونية تتميز بالرائحة العطرة من هذا المنطلق نستطيع تفسير وجودها في النبات كونها مركبات يستعملها النبات استعدادا لمرحلة الإزهار نظرا لرائحتها الجاذبة للحشرات بهدف مساعدة النبات في عملية التلقيح (MESSAI, 2011)، بالإضافة إلى هذا ينتج النبات مثل هاته المواد لتوفر الأنسجة الخاصة كالخلايا الغدية والقنوات الزيتية (BABA AMER, 2013).

تتميز الصابونزيدات بكونها مواد مرة الطعم تعمل على طرد الحيوانات الرعوية الآكلة للعشب لهذا يعود تواجدها في النبات (علاوي، 2003).

2. مردود المستخلصات النباتية:

بعد تقدير مردود كل مستخلص ومن خلال النتائج المتحصل عليها، نستنتج للمذيب أهمية في عملية الاستخلاص إذ يعود الاختلاف في نسبة المردود إلى نوع المذيب المستخدم، و اختلاف قطبيته (NAJAA *et al*., 2011; LEE *et al*., 2003)، بالإضافة الى اختلاف طريقة الاستخلاص و ظروفها (BEN AMMAR *et al*., 2008 ; LEE *et al*., 2003) و نلاحظ من النتائج أن مذيب الميثانول MeOH يعتبر اكثر فعالية في الاستخلاص الكمي لمتعددات الفينول من غيره من المذيبات الاسيتات ايثيل واحادي البيتانول.

كما قد يتدخل المذيب احيانا في استخلاص مواد غير فينولية كالأصباغ و الدهون و البروتينات و السكريات، مما يؤدي الى عدم نقاوة المردود و انخفاض قيمته الصافية (DJERIDANE *et al*., 2007).

من المعروف أن مذيب الأسيتون والأسيتات إيثيل يتميزان بقطبيتهما الضعيفة مقارنة بقطبية الميثانول و أحادي البيتانول، الأمر الذي يفسر انخفاض المردود عند المستخلصين الأسيتوني (التانينات) والأسيتات إيثيل (الفراجي، 2003 ؛ حجاوي و آخرون، 2009).

3. التقدير الكمي لعديدات الفينولات و الفلافونويدات:

كاشف Folin هو كاشف يتميز بحساسيته للمجموعات الهيدروكسيلية ليس في المركبات الفينولية فحسب بل في كل المركبات السكرية والبروتينة (VUORELA, 2005) (GROSSI *et al*., 2015; GMEZ-CARAVACA *et al*., 2006) لذلك يمكن أن يعزى الاختلاف في قيم عديدات الفينول لهذا السبب.

تتغير كمية الفينولات من مستخلص الى آخر حسب اختلاف المركبات الفينولية في كل مستخلص (HAYOUNI *et al*., 2007) فسلوكها يختلف مع اختلاف بنيتها الكيميائية و الوسط الموجودة فيه (حمضي- قاعدي).

تتأثر كمية الفينولات و الفلافونويدات المستخلصة من النبات بتغير مكان و مناخ و بيئة النبات (ATMANI *et al*., 2009; KSOURI *et al*., 2008)، كما يلعب وقت القطف و طريقة التخزين في كمية المواد الفعالة في النبات (REBIAI *et al*., 2013; KÄHKÖNEN *et al*., 1999).

كما لطرق الاستخلاص و المذيبات المستعملة دور مهم في تغير كمية الفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات (ALBUQUERQUE et HANAZAKI, 2006; TOLEDO *et al*., 2011).

4. النشاطية المضادة للأكسدة:

يمكن ربط نتائج التقدير الكمي للفلافونويدات بنتائج النشاطية المضادة للأكسدة ربطا ايجابيا فالنتائج تبين تناسبا طرديا بين المحتوى الكلي للفلافونويدات و القدرة المضادة للأكسدة (MOHAMMEDI Z, 2011)، وهذا ما أكده AHN وآخرون (2007) في دراسة أجريت عن النشاطية المضادة للأكسدة و المحتوى الفينولي لعدد من النباتات.

إضافة الى الجانب الكمي لعديدات الفينول و علاقتها بكبح الجذور الحرة، بين العديد من الباحثين من بينهم ZHENG و زملاؤه (2010) أن القدرة التثبيطية للمركبات ذات الأصل النباتي على جذر $DPPH^{\bullet}$ لها علاقة كبيرة بالبنية الكيميائية للمركبات الفينولية، حيث ان عدد المجموعات الهيدروكسيلية، موقعها، والجذور المرتبطة مع هاته المركبات (كالسكريات) تلعب دورا في زيادة القدرة التثبيطية للجذر $DPPH^{\bullet}$.

يختلف سلوك المواد الفينولية المضادة للأكسدة عند تفاعلها مع الجذور الحرة، منها ما يشكل معقد مع (ROS) و ينتج مواد مستقرة، ومنها ما يكسر رابطة للمركب الفينولي (HERRERA and BARBAS, 2001) كما يمكنها أن تكون مستقبلة للجذور الحرة أو مانحات للهيدروجين (YORDIL *et al*., 2012; COS *et al*., 1998).

يمكن إيعاز القدرة التثبيطية للمستخلص الأسيتوني (E.T) للجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ مقارنة بالمستخلصات الأخرى للنبات، إلى كونه يحتوي مواد فعالة اقدر على ارجاع الجذر أو اقتناصه، فالأنواع الفينولية الموجودة في هذا المستخلص اكثر تأثيرا ضد الجذور الحرة بالرغم من تراكيزها الضعيفة (BAGHIANI *et al*., 2010).

كما اقترح KANG و زملاؤه (2003) أن المستخلصات النباتية التي تحتوي على جزيئات قادرة على المنح البروتوني او الالكتروني لاقتناص الجذر بأكثر فاعلية، لها قدرة تثبيطية أكبر للجذور الحرة.

ارتفاع نشاطية المستخلص العفصي (الأسيتوني) والميثانولي و الاسيتاتي مقارنة بالمستخلص البيتانولي، يرجع لكمية المركبات الفينولية و الفلافونويدية الحاوية لها (UMADEVI *et al*., 1988) واختلاف بنياتها التركيبية في كل مستخلص (CHRYSSAVGI *et al*., 2008; DUDONNE *et al*., 2009; ROMANI *et al*., 2002).

وقد يرجع تساوي قيم IC_{50} لدى مستخلص الفلافونويدات (الاسيتات ايثيل) و المستخلص الميثانولي الخام الى كون المستخلصين يحتويان على مركبات فينولية متشابهة بنيويا و مثبطة للجذور الحرة بنفس التفاعلات (FABRI *et al*, 2009; TIAN *et al*, 2009).

اثبت SAADAOUI و زملاؤها (2007) و DJEDDI وأخرون (2013) في دراسة اجريت حول النشاطية المضادة للأكسدة لنبات الرتم أن النبات يملك قدرة متوسطة في اقتناص الجذر الحر$^{\bullet}$DPPH، وهو ما يوافق دراستنا الحالية، كما ان لطريقة الاستخلاص ايضا دور فعال في رفع أو تقليل القدرة الإرجاعية للجذر الحر $^{\bullet}$DPPH بحيث يمكن تفسيرها لدى المستخلص الأسيتوني (العفصي) باحتمالية وجود مركبات فينولية متعددة السكر hétérosides يمكن لها ان تستخلص مع التانينات (KARABEGOVIÜ *et al*., 2011).

اعتمادا على ما تحصلنا عليه من نتائج خلال التحليل الكروماتوغرافي للمستخلصات بواسطة (HPLC)، فإن إرتفاع النشاطية المضادة للأكسدة لدى المستخلص الفلافونويدي طور الأسيتات و المستخلص الميثانولي المحتويان على حمض الكافييك على عكس المستخلص البيتانولي المحتوي على حمض الكلوروجينيك حيث تتوافق هذه النتائج مع الدراسة التي قام بها MARINOVA وزملاؤه (2009) إذ وجدوا أن حمض الكافييك يمتلك قدرة مضادة للأكسدة أكبر من حمض الكلوروجينيك.

5. النشاطية المضادة للبكتيريا:

سجل اختلاف في التأثير بين المستخلصات على السلالات البكتيرية المختبرة وذلك حسب تراكيز المواد الفعالة في كل مستخلص (IVANA, 2011)، كما يعود الاختلاف في الحساسية بين السلالات المختبرة موجبة الغرام وسالبة الغرام إلى بنية وتركيبة و طبيعة جدار الخلية البكتيرية لكل نوع (LAMBERT, 2002).

حيث أعطت المستخلصات النباتية تأثيرا مضادا لأغلب الانواع البكتيرية خاصة مستخلص التانينات الذي أعطى تأثيرا ملموسا على نمو جميع السلالات المختبرة، وذلك لكون التانينات تحتوي على حمض الغاليك Acide Gallique و حمض التانيك Acide Tannique و التي تحتوي على مجموعة الهيدروكسيل التي يمكنها تكوين روابط هيدروجينية بين مجموعة الهيدروكسيل في تلك المركبات ونيتروجين الاحماض الأمينية في الخلية البكتيرية ويؤدي هذا إلى تعطيل فعاليتها وتثبيط نموها، هذا من ناحية، ومن ناحية أخرى يمكن تكوين روابط هيدروجينية بين مجموعة الهيدروكسيل في تلك المركبات وجزيئات الماء في الخلية البكتيرية مما يؤدي إلى تعطيل الوظائف الحيوية في الخلية البكتيرية وتدميرها (الخافجي، 1990) وتحتوي التانينات على بعض المركبات الفينولية التي تمتلك قدرة تثبيط بعض الأنزيمات التي تشترك في تصنيع الأحماض الأمينية الضرورية لزيادة الانقسام الخلوي، وذلك من خلال تكوين معقدات مع المادة الاساسية للخلية البكتيرية (الدهري وآخرون، 2010) وكذلك قدرتها على تثبيط بعض الانزيمات و البروتينات الناقلة الموجودة ضمن الغشاء الخلوي، بالإضافة إلى تدميرها لجدار الخلية البكتيرية من خلال التلاصق مع بروتينات الجدار والتأثير على نفاذية الخلية وبالتالي موتها (CASLEY-SMITH, 1997).

بالنسبة للفلافونويدات يعود الفعل الرئيسي لها تجاه البكتيريا لقابليتها على تكوين مركب معقد مع البروتينات الخلوية والذائبة ويتراكب مع الجدار لخلوي للبكتيريا مؤثرا على نفاذية الجدار البكتيري بالتالي موت البكتيريا وكذلك تتداخل مع الـ ADN مؤثرة على الفعاليات الحيوية للخلية البكتيرية (محمد، 2007 ; FERNANDES *et al*, 1972; NADAIA *et al*., 2000).

أما المستخلص الميثانولي فأعطى هو الآخر نتائج إيجابية وذلك لكونه يحتوي على مواد فعالة كالفينولات قادرة على تثبيط نمو البكتيريا، والتي تحتوي على جليكوسيدات قادرة على تثبيط نمو البكتيريا، وذلك بإذابة الطبقة الدهنية لجدار الخلية البكتيرية، وبالتالي يؤثر ذلك على نفاذية جدار الخلية، مما يسبب في خروج بعض مكونات الخلية أو دخول مواد كيمائية غريبة اليها، والذي يحدث اضطرابا في الخلية البكتيرية يؤدي الى موتها (العاني، 2002).

بينما المضادات الحيوية فهي تعمل على كبح البيكتيريا فقد يكون مفعول المضاد على الغلاف الخارجي حيث يوقف تركيب الجدار بتثبيط Transpeptidase وهذا ما يمنع تكوين Peptidoglycane وبالتالي يوقف عملها ونموها ويمكن ان يشمل تدميرها هذا من جهة، ومن جهة اخرى يعمل على الغلاف الداخلي لان المضاد الحيوي له خواص سطحية تمكنه من تخريب عمل نفاذية الغشاء الداخلي ويسمح بطرح المواد السائلة خارج البكتيريا مما يؤدي إلى تدميرها، أو يعمل على مستوى الخلية لإيقاف تصنيع البروتين كما يعمل على جزيء ADN فيؤدي إلى التثبيط الأنشطة الايضية لنمو ADN للبكتيريا (العابد، 2009).

بالنسبة للسلالات البكتيرية التي أظهرت مقاومة للمستخلصات، يمكن أن يعود ذلك لاحتواء هذه البكتيريا على غشاء نفاذي فعال يمنع دخول بعض مركبات المستخلصات المختبرة إلى داخل الخلية البكتيرية وبذلك يمنع تأثيرها التثبيطي (HANAFY et HATEM, 1991) كما تعود حساسية البكتيريا سالبة الغرام عند مقارنتها مع موجبة الغرام لأن هذه الأخيرة تملك جدار اسمك من سالبة الغرام (العابد، 2009).

6- التحليل الكروماتوغرافي للمستخلصات النباتية:

أظهرت نتائج الـ (HPLC) تباينا واضحا من حيث المحتوى العددي للمركبات الفينولية فالمستخلص الميثانولي الخام مثلا احتوى على كل المركبات الفينولية المرجعية ما عدا الكيرستين، وهذا يرجع غالبا الى قطبية المذيب و قدرته على استخلاص معظم عديدات الفينولات الهشة، و هو ما يوافق نتائج المردود عند المستخلصات، بينما غاب مركب الكلوروجينيك لدى المستخلص الاسيتاتي و تواجد عند المستخلص البيتانولي، وعلى العكس من هذا، تواجد مركب حمض الكافييك عند المستخلص الاسيتاتي و غاب لدى مستخلص البيتانول، والسبب هنا حسب ما أورده كل من الحلو وآخرون (2013)، و VISIOLI و رفقاؤه (1999)، وMARCO و زملاؤها (2007) بأن مذيب الاسيتات ايثيل AcEt انتقائي تجاه المركبات الفينولية ذات الاوزان الجزيئية المنخفضة و المتوسطة، بينما لا يعتبر مثاليا لاستخلاص الفينولات ذات الاوزان الجزيئية المرتفعة، ما يدفعنا لتخمين ان العدد الكبير للمركبات الفينولية عند هذا المستخلص (47 مركبا) هو مزيج من مركبات فينولية ذات أوزان جزيئية منخفضة، كما يمكن ان تكون فلافونويدات حسب ما ذكره BOUMERFEG و زملاؤه (2009).

يمكن الاشارة الى ان ظروف الخارجية للنبات و مرحلة نموه تلعب دورا في تغير المركبات الفينولية فيه (KSOURI *et al*., 2008).

الخـــاتمة

خـــاتمة:

يندرج هذا العمل في إطار تثمين الموارد النباتية لمنطقة واد سوف، إذ وقع إختيارنا على نبات الرتم *Retama raetam* (Frosk.) نظرا لإنتشاره في المنطقة بشكل واسع ولما يحويه من عناصر فعالة من خلال تثمين النشاطية البيولوجية والنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات النبات.

خلال إنجازنا لهذا البحث قمنا كخطوة أولية بالكشف الكيميائي لنواتج الأيض الثانوي للنبات من خلال عمليات التلوين والترسيب التي أظهرت وجود كل من: الفلافونويدات، الانثوسيانينات، التانينات الكاتيشيكية، المركبات المرجعة، الصبونوزيدات، الستيرولات والتريبينات الثلاثية والنشاء مع غياب كل من القلويدات والتانينات الغاليكية.

بعد عملية الكشف الكيميائي قمنا باستخلاص بعض المواد النبات الفعالة بطريقة النقع و قد استعمالنا مذيبات مختلفة حيث عند استخلاص التانينات استعملنا الاسيتون، والميثانول للحصول على المستخلص الميثانولي (الخام) أما لاستخلاص الفلافونويدات استعملنا كل من أسيتات الإثيل و أحادي البيتانول، بعد عملية الاستخلاص تمكنا من تقدير مردود المستخلصات حيث أعطى المستخلص الميثانولي مردود معتبر بالمقارنة مع المستخلصات الأخرى، بعد الحصول على المستخلصات ومن أجل المقارنة بين المستخلص الميثانولي والمستخلصات الفلافونويدية (E.A.E و E.1.B) قمنا بما يلي :

- التقدير الكمي لعديدات الفينول باستعمال كاشف Folin-Ciocalteu حيث سجلت أعلى كمية لعديدات الفينول لدى المستخلص الميثانولي الخام (E.M) بمقدار 1.81 ± 0.098 mg AG E/g تليها كمية أقل عند مستخلص أحادي البيتانول (E.1.B) بقيمة 1.46 ± 0.001 mg AG E/g أما أقل مقدار فسجل عند مستخلص الأسيتات إيثيل (E.A.E) بقيمة 1.10 ± 0.032 mg AG E/g يعود هذا الاختلاف في كمية الفينولات بين المستخلصات الثلاثة إلى اختلاف المركبات الفينولية في كل مستخلص.
- أما عند التقدير الكمي للفلافونويدات استخدامنا كاشف $AlCl_3$، حيث لاحظنا ارتفاع كمية الفلافونويدات عند كل من المستخلص الميثانولي و مستخلص الاسيتات ايثيل بمقدار 0.54 ± 0.21 mg QU E/g MS و 0.66 ± 0.19 mg QU E/g MS على التوالي بينما قدرت كمية الفلافونويدات عند مستخلص أحادي البيتانولي بـ 0.28 ± 0.14 mg QU E/g MS

نستنتج من خلال النتائج أن كمية الفينولات والفلافونويدات تتغير بحسب طرق الاستخلاص والمذيبات المستعملة، كما أن لطريقة التخزين دورا مهما في تغير كمية الفلافونويدات.

بعد تقدير كل من عديدات الفينول و الفلافونويدات لجأنا إلى دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لكل المستخلصات وذلك عن طريق اختبار تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ حيث تمكنا من حساب مقدار IC_{50} المثبطة لـ 50% من الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ لكل منها ، و قد أظهرت قيم الـ IC_{50} المتحصل عليها أن المستخلص الأسيتوني يملك أكبر نشاطية في اقتناص الجذر الحر $DPPH^{\bullet}$ عن باقي المستخلصات بمقدار $IC_{50}=0.223$ mg/ml مع تسجيل قيمة متماثلة لدي المستخلص الميثانولي ومستخلص الفلافونويدي اسيتات الاثيل بقيمة $IC_{50}=0.234$ mg/ml أما المستخلص البيتانولي فإن الـ IC_{50} له قدرت بـ 0.343 mg/ml.

كما قمنا بدارسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات الأربعة ضد عشرة سلالات بكتيرية ممرضة (*Escherichia coli* ATCC 25922 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus sp, subtilis sp,* , *Staphylococcus B sp , Serratia sp , Enterobacter sp , Vibrio sp , Micrococcus sp , Salmonella sp*) بإتباع طريقة الانتشار بالأقراص حيث كانت النتائج جد إيجابية خاصة مع المستخلص الميثانولي و مستخلص التانينات وقد كانت لديهما فعالية بيولوجية معتبرة مع السلالات *Salmonella sp* و *Serratia sp* و *Bacillus subtilis sp* بالمقارنة مع باقي السلالات البكتيرية وذلك بتسجيل أقطار تثبيط معتبرة، كما أبدت سلالات أخرى مقاومة للمستخلصات الفلافونويدية حيث أبدت السلالة *Staphylococcus aureus* مقاومة معتبرة للمستخلص البيتانولي، أما السلالة *Pseudomonas aeruginosa* فأظهرت هي الأخرى مقاومة للمستخلص الفلافونويدي طور أسيتات إيثيل.

وختمنا بحثنا بالتعرف على بعض المركبات الفينولية للمستخلصات عن طريق التحليل النوعي باستخدام جهار الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC) إذ سجلنا وجود كل المركبات الفينولية المرجعية (08 مركبات) ماعدا الكرسيتين الذي غاب في كل المستخلصات، وكذلك غياب مركب الكلوروجينيك في المستخلص الفلافونويدي طور أسيتات إيثيل، بينما غاب مركب حمض الكافييك في مستخلص الفلافونويدي طور أحادي البيتانول.

وفي الأخير ونظرا للنتائج المشجعة المتحصل عليها مع مستخلصات النبات، يمكن تثمين خصائص النبات التي تؤهله ليكون ضمن النباتات الطبية المستعملة في الطب الشعبي.

أما لزيادة أفاق هذا البحث نوصي بالدراسة التحليلية الكمية والنوعية للمركبات الفعالة من خلال التعرف على الصيغ الكيميائية لمركبات النبات المسؤولة عن هذه الفعاليات كخطوة أولى لأعمال مستقبلية إن شاء الله.

كما نرجو أن يكون عملنا هذا محفزا للباحثين في مجال البيولوجيا والصيدلة للمضي في مجال البحث والتثمين لنباتات المنطقة، كما نوصي بالحفاظ على الأوساط الطبيعية لهذه النباتات.

المراجع

- **المذكـــــرات:**

1. العابد إ.، 2009- دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum*. مذكرة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية التطبيقية، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، الجزائر، 106 ص.
2. العاني أ.، 1998- دراسة مكونات الحبة السوداء المحلية .*Nigella sativa* L وتأثير مستخلصاتها على بعض الأحياء المجهرية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية، العراق، ص:14.
3. العاني و.، 2002- استخلاص بعض المركبات الفعالة في مسحوق ثمار الشوك (الخرنوب) *Prosopis farcta* وفصلها ودراسة فعاليتها البيولوجية. أطروحة دكتوراه كلية العلوم، جامعة الانبار، العراق، ص:139.
4. الفراجي غ.، 2003- تعيين و تنقية مساعد الأنزيم CoQ_{10} في عشرة أصناف من التمور العراقية بأطوار النمو الاربع، الكمري، والخلال، والرطب، والتمر. اطروحة دكتوراه فلسفة كيمياء، جامعة بغداد، العراق، ص: 29-38.
5. الكرد ر.، 2010- تأثير التانينات من مصادر نباتية مختلفة على الوضع التغذوي للحديد في الجرذان. كلية الصيدلة والعلوم الطبية، جامعة البترا عمان، الاردن، ص:1-21.
6. بن مرعاش ع.، 2012- دراسة نواتج الايض الفلافونيدي و الفعالية المضادة للأكسدة لنبتة *Convolvulus supinus* .Coss. مذكرة ماجيستر، جامعة منتوري قسنطينة،الجزائر، 102 ص.
7. بومعراف م.، 2007- فصل و تحديد منتجات الايض الثانوي الفلافونويدي. مذكرة ماجيستر، جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر، 97 ص.
8. حواء إ.، 2013- دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة. مذكرة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية و فيزيوكيمياء الجزيئات، جامعة قاصدي مرباح ورقلة، الجزائر، 109ص.
9. شامي س.، 1982- دراسة بعض الصفات الدوائية و السمية لازهار القيصوم. رسالة ماجيستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، العراق، ص:53.
10. شروانة س.، 2007- فصل و تحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي للنبتة *Lycium arabicum*. مذكرة ماجيستير، جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر، 85 ص.
11. شويخ ع.، 2004- تعداد النباتات الطبية في ولايتي أم لبواقي والوادي. مذكرة لنيل شهادة الدراسات العليا في بيولوجيا النبات، المركز الجامعي أم لبواقي، الجزائر، ص: 10- 40.
12. عاشوري آ.، 2004- فصل و تحديد منتجات الايض الفلافونيدي *Pulicaria crispa*. مذكرة ماجيستير، جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر، 98 ص.
13. علاوي م.، 2003- مساهمة في دراسة بعض المركبات العضوية الفعالة في نبات الرمث *Haloxyonsco parium*. مذكرة لنيل شهادة ماجستير في الكيمياء العضوية التطبيقية، جامعة ورقلة الجزائر، ص: 6 -11.

14. محمد ع. هيثم ه.، 2007- دراسة تاثير المستخلص الكحولي لاوراق وثمار نبات *Beayveria bassiana* (balsam)Vull. الدورنتا وفطر *Duranta repen* على الاداء الحياتي لبعوضة *Culex pipiens pipiens* . رسالة ماجستير لكلية العلوم للنبات، جامعة بغداد، العراق، ص:35.

15. ميثاق ا.، 2010- بحث و تحديد نواتج الأيض الثانوي لنبات القات *Catha edulis* من العائلة Celastraceae و نبات البوليكاريا *Pulicaria jaubertii* من العائلة Asteraceae و تقييم الفعالية البيولوجية. رسالة دكتوراه، جامعة منتوري قسنطينة، الجزائر، 177ص.

- **الكـــتـــب:**

1. الخافجي ز.، 1990- التقنية الحيوية. دار الحكمة للطباعة و النشر، بغداد، العراق، 889 ص.
2. حجازوي غ. المسيمي ح. قاسم ر.، 2009 - علم العقاقير و النباتات الطبية. دار الثقافة للنشر و التوزيع، بيروت، لبنان، ص: 126-129، 253-257.
3. حليس ي.، 2007- الموسوعة النباتية لمنطقة سوف، النباتات الصحراوية الشائعة في منطقة العرق الشرقي الكبير. مطبعة الوليد، الوادي، ص:130-131.
4. عبد المنعم أ.، 2012- انتاج محاصيل الخضر، الدار العربية للنشر و التوزيع، القاهرة، مصر، الطبعة الثانية،711 ص.
5. عميرة إ.، 2005- علم العقاقير الطبية النظرية والعملية، الطبعة الاولى، دار البداية للنشر، الاردن، 364 ص.
6. طه ح.، 1981- النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. دار المريخ للنشر، الرياض، ص: 63-112، 122-156.
7. منصور ح.، 2006- النباتات الطبية العلمية وصفها مكوناتها طرق استعمالها وزراعته. جامعة الزقازيق، القاهرة، مصر، ص: 355- 365 ، 367 -370.
8. هيكل م. عمر ع.، 1993- النباتات الطبية و العطرية (كيمياؤها- انتاجها- فوائدها)،الطبعة الثانية، دار منشأة المعارف، الاسكندرية، مصر، ص:510: 13-14.

- **المقالات:**

1. الحلو ر. البكري إ. الصباغ م.، 2013- استخلاص الفينولات من مياه عصير الزيتون بمُحلات مختلفة و دراسة فعالية المستخلصات كمضادات أكسدة. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، سوريا، المجلد29، العدد الثاني، ص:307-327.
2. الدهري ع.ع. حازم حمودي العبيدي ر. يونس محمد العالي و.، 2010- دراسة بعض الخواص الكيميائية لبذور نبات الشوك *Prosopis farcta* وفعالية مستخلصاتها ضد البكتيريا. مجلة الانبار للعلوم الزراعية، المجلد (8) العدد (4).

- **Les Mémoires:**

1. ABD ELCHAKOUR A.S., 1987- Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abdel Elaziz, Djeddah, P:132.

2. ALIGNAN M., 2006- Phoma du Tournesol: déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie. Thèse de doctorat, Toulouse, 122P.

3. ALLAL-BENFAKIH L., 2006- Recherche quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* Orth. Oedipodinae dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques. Thèse de Doctorat, Univ de LIMOGE, Laboratoire UMR INRA 1061, Institut National Agronomique d'El Harrach, Algérie, p:27.

4. AOUISSA I.W.R., 2002- Etude des activités biologiques et toxicité aigue de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera indica* L. (anacardiaceae). Mémoire de doctorat, Université de Bamako, MALI, 127p.

5. BARBONI T., 2006- Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de Doctorat, Université de CORSE, p: 26.

6. BELYAGOBI N., BENHAMMOU N., 2012- Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. thése Doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie p: 05-16.

7. BEN KHERARA S., 2010- Activite bactericide des huiles essentielle et des flavonoïdes esoles d'une plante medicinale du nord-est, Algerian :la souge officinale L. Mémoire Magistère, université Badji-Mokhtar ,Annaba, Algérie, p:106.

8. BOUAYED J., 2007- Etude de la corrélation anxiété/statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants/ neuroactifs des polyphénols extraits de *Prunus domestica* L. *Prunus domestica* L.. Thèse de Doctorat, Université de Paul Verlaine-Metz. P:10-14-69-72-74.

9. BOUDJELLAL K., 2009- Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L.. Mém de Magister, Université de Batna, Algérie, p:9-29-30.

10. BOUHADJERA K., 2005- Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicanales sahariennes, *Oudneyaa fricana* R. et *Aristida pungens* L. thése de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, p:20-56.

11. HADJ MOUSSA A., 2012- Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de *Retama raetam* sur l'activité de l'α-amylase. Diplôme d'Etude Supérieur en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, p:9-11.

12. HAMIMED S., 2009- Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacyclus pyrethrum* L. Mémoire de Magister, Universite Mentouri Constantine, Algérie, p:165.

13. HARRAR A., 2012- Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. diplôme de Magister, Université Ferhat Abbas Sétif, Algérie, p:76.

14. IGHIL HARIZ Z., 1990- Etude du comportement physiologique, biochimique et structurale du *Retama raetam* vis à vis du NaCl. Thèse de Magister, Université d'Oran Algérie, 120 P.

15. KANOUN K., 2010- Contribution à l'étude phytochimique et activite Antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la region de themcem (Honaine). Mémoire Magister, Université Aboubeker Belkaid Tlemcen, Algérie, 86p.

16. LIEVRE K., 2004- Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (*Ruta graveolens*) par transformation génétique. Thèse de Doctorat: Strasbourg, p: 96.

17. MADI A., 2008- Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister, Université de Constantine, Algérie, p:12-49.

18. MARFAK A., 2003- Radiolyse gamma des flavonoides, Etude de leur reactivite avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. thèse de Doctorat, Université de LIMOGES, biophysique, 187p.

19. MESSAI L., 2011- Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'est Algerien (*Artemisia herba alba*). thèse de Doctorat Chimie Organique, Option Phytochimie, Universite Mentouri Constantine, Algérie, p:1-18.

20. MEZITI A., 2007- Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister, Université de Batna, Algérie, P: 30-67.

21. MOHAMMEDI Z., 2011- Etude du pouvoir Antimicrobien et Antioxydant des Huile Essentielles et flavanoides de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister, Université de Tlemcen, Algérie, p:18-50.

22. MORALE S., 2011- etude phytochimique et évaluation biologique de (*derris ferruginea benth*) Fabaceae. Université d'Angers, page 25-27.

23. MOUFFOK S., 2011- Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* SSP. *Omphalotricha* (Asteraceae). Mémoire de Magister Université de Batna, Algérie, P: 125-134.

24. NKHILI E., 2009- Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec lesions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Marrakech, P:309:08-51.

25. PORTES E., 2008- Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes: Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux I, P: 44-46.

26. SEKLI-BELAIDI F., 2011- Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4 -éthylène dioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des Acides Ascorbique et urique: application à l'étude des propriétés Antioxydante du sérum sanguin. thèse de Doctorat, l'Université Toulouse III, Paul Sabatier, 167p.

27. SELAMI N., 2004- Contribution à l'étude Caryologique de quatre Population de *Retama raetam* des zones arides et semi-arides Algériennes. Mém Mag, USTO, Oran, 94p.

28. TOUAFEK O., 2010- Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algerien. Thèse de Doctorat, Université de Constantine, P 9-12-76.

29. ZARROUR B., 2012 - Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de le plante *Matricaria pubescens* (Astéracéas) et évaluation de leur activité Antioxydante. Mémoire de Master Academique, Université Ouargla, Algérie, P:3-15.

- **Les Livres :**

1. BELLAKHDAR J., 1978- Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes. Rabat, Ed, Techniques Nord-africaines, 365p.

2. BERGOGNE-BEREZIN E. and DELLAMONICA P., 1995- Antibiothérapie en pratique clinique, Ed, Masson, Paris, p 486.

3. BRUNETON J., 1993- Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier, Paris, 3 ème Ed, p: 454-457.

4. BRUNETON J., 1997- Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales. Lavoisier, 3ème Edition, Tec et Doc ,Paris.

5. BRUNETON J., 1999- Phrmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2eme Ed, Tec et Docum, Paris, p:119-266.

6. DEBRAYB M., JACQUEMIN H., RAZAFINDRAMBO R., 1971- Travaux et documents de l'Orstom. Paris, France, N°8.

7. DWORKIN M.M. and FALKOW S., 2006- Proteobacteria: Gamma subclass. Ed, Springer, New York, NY, p: 1248.

8. EYTON W., OLLIS W., SUTHERLAND I., GOTTLIEB O., TAVIRA MAGALHAES M., 1965- Proc Tetrahedron. 21, 2683p.

9. GUIGNARD J., COSSON L., HENRY M., 1980- Abrége de Phytochimie. Ed, Masson, 325p.

10. HEYWOOD V.H., 1996- Flowering Plants of the World. 3th Edition, Oxford University Press, Oxford, p: 141-145, 149-152.

11. MAJED JAMOUS R. ALI-SHTAYEB M.S., 2008- Traditional Arabic Palestinia Herbal Medicine. Biodiversity and Environmental Reasherch Center (BERC), Til, Nablus.

12. MAlRE R., 1987- Flore de l'Afrique du Nord XVI, Encyclopédie Biologique. Centre National Des Lettres, Editions Lecheyalier S.A.R.L. 120 bd Sint Germain PARIS, p302:194-195.

13. MAROUF A., 2000- Dictionnaire de botanique, les phanérogames. MASSON Xiences, DUNOD, paris, P:66-82.

14. MOHAMMEDI D., 2009- Classification et mode d'action des antibiotiques. livre electronique,13 p.

15. MULLERO M.C., 1945- Los territorio sespanoles de Sahara y sus gruposnumados. Les Canarias.

16. NETON J., 1993- pharmacognosie et phytochimie des plantes medicinales. 2eme ed, Tec et Docum, Paris, p: 119-266.

17. OZENDA P., 1991- Flore et végétation du Sahara. 3ème édition, Paris: Cnrs édition, 622p.

18. PARIS R. et MOYSE H., 1969- Précis de matière médicinale. Ed, Masson, Paris, France, p:148.

19. QUEZEL P. and SANTA S., 1962- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. édition du centre national de la recherche scientifique, Tome I, p:156-162.

20. RIBEREAU G., 1968- Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, p 254.

21. RICHTER G., 1993- Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. PRESSES, polytechniques et universitaires Romandes, P: 328-339.

22. SIRARD T., 2012- Fundamentals of HPLC. Waters Corporation, the science of what'spossible, p:103.

23. TREASE E. et EVANS W.C., 1987- Pharmacognosie. Billiaire Tindall, 13th Edition London, UK, p: 61-62.

24. ZOHARY M., 1962- Plant Life in Palestine, Israel and Jordan. The Ronald Press New York. p:38-120.

- **Les Articles:**

1. AHN M.R., KUMAZAWA S., USUI Y., NAKAMURA J., MATSUKA M., ZHU F., 2007- Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chem, 101(4): 1383-1392.

2. AL-TUBULY R., AUZI A., AL-ETRI-ENDI A., NAHAR L. and SARKER S., 2011- Effects Of *Retama Raetam* (Forssk.) Webb. et Berthel. (Fabaceae) On The Central Nervous System in Experimental Animals. DOI: 10.2298/ABS1104015A, Arch, Biol, Sci, Belgrade, 63 (4): 1015-1021.

3. ATEYYAT A., Al-MAZRA'AWI M., ABU-RJAI T., SHATNAWI A., 2009- Aqueous extracts of some medicinal plants are as toxic as Imidacloprid to the sweet potato white fly, *Bemisia tabaci*, 6pp, Journal of Insect Science 9:15, available online: insectscience.org/ 9.15.

4. ATMANI D., CHAHER N., BERBOUCHA M., AYOUNI K., LOUNIS H., BOUDAOUD H., DEBBACHE N., ATMANI D., 2009- Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chem, 112: 303-309.

5. BAGHIANI A., BOUMERFEG S., BELKHIRI F., KHENNOUF S., CHAREF N., HARZALLAH D., ARRAR L. and ABDEL-WAHHAB M., 2010- Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in Algeria flora. Comunicata Scientiae, 1: 128-136.

6. BEKKARA F., JAY M., VIRICEL M.R., 1998- Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of tow *Vicia faba* cvs differing in their seedtannin content, and study of their seed and root phenolic exudation. Journal Plant and Soil, 203: 27-36.

7. BEN AMMAR R., KILANI S., BOUHLEL I., EZZI L., SKANDRANI I., BOUBAKER J., BEN SGHAIER M., NAFFETI A., MAHMOUD A., CHEKIR-GHEDIRA L. and GHEDIRA K., 2008- Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. Drug, Chem, Toxicol, 31: 61-80.

8. BEN KHEIRA A., 2008- Les zones arides Algériennes les prédispositions du territoire et du climat à la dégradation imposent une intervention rapide et rigoureuse. Bulletin d'information, Une publication du Projet ALG/00/G35, N°7, p15.

9. BENHOUHOU S., 2005- A Guide to Medicinal Plants in North Africa, IUCN, Suisse, p: 256: 225-226.

10. BOHM H., BOEING H., AND HEMPEL J., 1998- Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. Zeitschrift für Ernahrungswissenschaft 37(2), p: 147-63.

11. BOLAND M., WONG E., 1975- Purification and kinetic properties of chalcone flavonoide isomerase from soya. Biochem, 50, p:383-389.

12. BOROS B., JAKABOVA S., DORNYEI A., HORVATH G., PLUHARE Z., KILAR F., FELINGERA A., 2010- Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography masss pectrometry in Thymus species. Journal of Chromatography A, p1217: 7972-7980.

13. BOULOS L., 1999- Flora of Egypt, Azollacea-Oxalidaceae. Cairo, Egypt: Al-Hadara Publishing, Vol.1, p: 258-259.

14. BOUMERFEG S., BAGHIANI A., MESSAOUDI D., KHENNOUF S. and ARRAR L., 2009- Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. Phytother Res, 23 :283-288.

15. BOZIN, B., MIMICA-DURIC N., SAMOJLIK I., GORAN A., IGIC R., 2008- Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae). Food Chemistry, 111: 925-929.

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

17. CAI Y., LUO Q., SUN M., CORKE H., 2004- Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences, 74(17), 2157-2184.

18. CASLEY-SMITH J.R., 1997- Coumarin in the treatment of lymphedema and other high-protein oedemas. 348 In R, O'Kennedy and R.D. Thornes (Ed.), Coumarins: biology, applications and mode of action, John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

19. CHRYSSAVGI G., VASSILIKI P., ATHANASIOS M., KIBOURI T., MICHAEL K., 2008- Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L, and *Myrtus communis* L. Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, Food Chemistry, 107: 1120-1130.

20. CHYNIER W., SOUQUET J.M., SOUQUET J.M., FUNLCRAND H., SARNI P., MOUTOUNET M., 1998- Stabilisation tannins anthocyanes donnees generals, CRC, USA, 145 p.

21. COS P., YING L., CALOMME M., HU J.P., CIMANGA K., VAN P.B., PIETERS L., VLIETINCK A.J. and VANDEN BERGHE D., 1998- Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. J Nat Prod, 61: 71-76.

22. COWAN M., 1991- Plant products as Antimicrobial agents. Clin Microbiology Re, 12, P: 564-582.

23. DAMERDJI A. et AMARA A., 2013- Composition et structure des Gastéropodes dans les stations à *Retama raetam*(Fabaceae) dans la région de Naâma (Algérie). ISSN 1813-548X, Afrique SCIENCE 09(1):77-88.

24. DANGLES O., 2006- Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, p: 29-50.

25. DEHAK K., HADI MAHAMMED M. et BAJAH HADJ Y., 2005-Identification de quelques sesquiterpénes de *Retama raetam* par gc/ms. Séminaire International Valorisation des Plantes Médicinales dans les zones arides, Ouargla (Algérie) ,1-2 et 3 février 2005.

26. DEWICK P., 2001- Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley ET Sons, ISBN 0-471-49641-0, 122-166, West Sussex, United Kingdom.

27. DICAARLO G., MASCOLO N., IZZO A., CAPASSO F., 1999- Flavonoids: oldand new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review,Life Sci, 65,p:53-337.

28. DJEDDI S., KARIOTI A., YANNAKOPOULOU E.P.K., CHATTER R. and SKALTSA H., 2013- Analgesic and Antioxidant Activities of Algerian *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthe l Extracts. Rec, Nat, Prod, (7):3, Academy of Chemistry of Globe Publications, p:169-176

29. DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJEMI B., VIDAL N., LESGARDS J.F. and STOCKER P., 2007- Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. Eur, Food Res, Technol, 224: 801-809.

30. Dudonne S., Vitrac X., Coutiere P., Woillez M., Merillon J.M., 2009- comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH. ABTS, FRAT, SOD, AND ORAC assays, J Agric Food Chem, 57(5): 1768-1774.

31. DZIRI S., HASSEN I., FATNASSI S., MRABET Y., CASABIANCA H., HANCHI B., HOSNI K., 2012- Phenolic constituents antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Alliumroseum* var. *odoratissimum*). SciVerse Science Direct journal of functional foods (4).423 - 432.

32. EDDOUKS M., OUAHIDI M.L., FARID O., MOUFID A., KHALIDI A., LEMHADRI A., 2007- L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. Springer Phytothérapie (5): 194-203.

33. EDZIRI H., MASTOURI M., MAHJOUB M., MIGHRI Z., MAHJOUB A., and VERSCHAEVE L., 2012- Antibacterial Antifungal and Cytotoxic Activities of Two Flavonoids from *Retama raetam* Flowers Molecules. 7284-7293, DOI: 10.3390/ molecules 17067284, ISSN 1420-3049, p:7285-7293.

34. EL BAHRI L., DJEGHAM M., BELLIL H., 2000- *Retama raetam* W.A poisonous plant of North Africa. Vet, Hum, Toxicol, p: 41, 33–35.

35. ELHAZIMI H., 1995- les produits Naturelles. Université du Roi Saoud, Djada, p: 149-190.

36. FABRI R.L., NOGUEIRA M.S., BRAGA F.G., COIMBRA E.S., 2009- *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, Bioresource Technology, p100: 428-433.

37. FERNANDES D.E., CALEYA R.B., GONZALEZ-PASCUAL F., GARCIA O. and CARBONERO P., 1972- Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat pu-rothionins in vitro. Appl, Microbiol, p23: 998-1000.

38. FLOSS H.G., 1997- Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. Natural Product Reports, p14: 433-434.

39. FRANCISCO A., TOMAS-BARBERAN F., 1990- High performance liquid chromatography, thin layer chromatography and ultra violet behaviour of flavone Aglycone with unsubstituted rings. Phytochemistry, Anal, I, 44.

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

41. GMEZ-CARAVACA A.M.G., MEZ-ROMERO M., ARR-ÉEZ-ROM-ÉN D., SEGURA-CARRETERO A. and FERN-ÉNDEZ-GUTIÑRREZ A., 2006- Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal Pharm, Biomed, Anal, 41: 1220-1234.

42. GROSSI M., DI LECCE G.E., ARRU M., GALLINA T., TULLIA RICCO B., 2015- An opto-electronic system for in-situ determination of peroxide value and total phenol content in olive oil. Journal of Food Engineering, 146: 1-7.

43. HAGERMAN A., RIEDL K., RICE R., 1999- Tannins as biological antioxidants, In: Gross G.G, Hemingway, Yoshida.T, (Eds), Plant polyphenols 2, Chemistry biology, Pharmacology, Ecology. Kluwer Academie publishers, plenum press, Dordrecht, New York, P: 85-86.

44. HANAFY M.S. and HATEM M.E., 1991- Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seeds (black cumin). Journal Ethnopharmaco, l.34 (2-3) :275-278.

45. HARBORNE J. et WILLIAMS C., 2000- Advances in flavonoids resarch since 1992. Pytochemistry .55(6): 481-504.

46. HARBORNE J., 1973- Phytochemistry. Litton Educational Publishing Inc, Lawrenc P, L, Ed, Vol II, p: 334.

47. HARBORNE J., 1988- The Flavoniods. Chapman and hall, Ltd, p:539.

48. HARBORNE J., 1989- The flavonoids, advances in recherch since 1980, Eds Chapman and Hall, New York.

49. HARBORNE J., 1994- Phytochemical dictionary of the legumeneusae.

50. HASLAM E., 1996- Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs possible modes of action. J Nat Pro, 59, P: 205-215.

51. HAVSTEEN B., 2002- The biochemistry and medical sinificance of the flavonoids. Pharmacol et therapeutics, 96, p:76-202.

52. HAYOUNI E., ABEDRABBA M., BOUIX M., HAMDI M., 2007- The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chem, 105: 1126-1134.

53. HELLER W., FORKMANN G., 1980- In Flavonoids Advances in Research since. Editor Haborne J Chapmann and Hall, London 1988-400p.

54. HERRERA E. and BARBAS C., 2001- vitamin E action, metabolism and perspectives, journal of physiology and biochemistry 57,43-56.

55. HESS J., DIETRICH G., GENTSCHEV I., MIKO D., GOEBEL W., KAUFMANN S., 1997- protection against murine listeriotic by an attenuated recombinant salmonella-typhimurium vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide-dismutase. infection and immunity, 65(4), 1997, pp. 1286-1292.

56. HILLIARE B., 2008- Les antibiotiques. Pharmacologie médicale et thérapeutique générale. Médecine Montpellier-Nîmes. france, Montpellier, P: 1-8.

57. HOFFMANN L., BESSEAU S., GEOFFROY P., RITZENTHALER C., MEYER D., LAPIERRE C., POLLET B. et LEGRAND M., 2004- Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate quinate hydroxy cinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant cell, 16(6):1446-1465.

58. ISTRATESCU G.L., 1985- Ascorbic acid content of some plants Note V Ascorbic acid content of some plants of the Tubiflorae Order. Farmacia, 33-(2), p:113-115.

59. IVANA K., MILENA N. and MIODRAG L., 2011- Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *artemisia* sp. recovered by different extraction techniques. Biotechnology and bioengineering Chinese journal of chemical engineering, 19(3): 504-511.

60. KÄHKÖNEN M., HOPIA A., VUORELA H., RAUHA J., PIHLAJA K., KUJALA T., 1999- Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem, 47(10): 3954-3962.

61. KANG D.G., YUN C.K. and LEE H.S., 2003- Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. Journal of Ethnopharmacol, 87:231-236.

62. KARABEGOVIÜ I., NIKOLOVA M., VELIÞKOVIÜ D., STOJIÞEVIÜ S., VELJKOVIÜ V. and LAZIÜ M., 2011- Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques, Biotechnology And Bioengineering Chinese Journal of Chemical Engineering, 19(3) 504-511.

63. KASSEM M., MOSHARRAFA S., SALEH N., 2000- Two new flavonoids from *Retama raetam*. Fitoterapia, 71: 649-654.

64. KEATING G.J., O'KENNEDY R., 1997- Thechemistry and occurrence of coumarins. P: 23-66.

65. KENING Y., VINCENZO D.L. et NORMAND B., 1995- Creation of a metabolic sink fortryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the subsceptibility of potato to Phytophtorainfestans. The plant cell, (7): 1787-1799.

66. KOCH G., GRISEBACH H., 1986- Reaction mechamism of oxidative rearrangement of flavonone in isoflavone biosynthesis. Biochem, p:155-311.

67. KORKINA L., 2007- Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant de fence to human health. Cellular and Molecular Biology, Vol.53. No.6, pp, 15-25, ISSN 0270-7306.

68. KSOURI R., MEGDICHE W., FALLEH H., TRABELSI N., BOULAABA M., SMAOUI A., ABDELLY C., 2008- Influence of biological environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. C, R, Biol, 331: 865- 873.

69. KUPIEC T., 2004- Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography, International Journal of Pharmaceutical Compounding, Vol, 8 No, p: 223-227.

70. LACAILLE M., DUBOIS A., WAGNER H., 1996- Importance pharmacologique des dérivés phénoliques, Acta Botanica Gallica, 143(6), p:555-62.

71. LAMBERT P.A., 2002- Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. Journal of Applied Microbiology, 92: 46-54.

72. LANDOLFI R., MOWER R., STEINER M., 1984- Modification of platelet functin and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations, Biochem, Pharmacol, 33, p: 1525-1530.

73. LEE K.W., KIM Y.J., LEE H.J. et LEE C.Y., 2003- Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine, Journal Agric Food Chem, (51)7292-7295.

74. LISAN B., 2014- Planter en condition sarides et salines Désertiques et/ou sahéliennes. Célébrer les forêts pour les hommes et Planter un arbre, Version V2.0, p240.

75. MABRY T., THOMAS M., MARKHAM K., 1970- The systematic identification of flavonoids. Springer, Verlag, Berlin, p:13

76. MACHEIX J.J., FLEURIET A. et JAY ALLEMAND C., 2005- Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. (Ed) Presses polytechnologiques et universitaires romandes, p4-5.

77. MAGHRANI M., LEMHADRI A., JOUAD H., MICHEL B., EDDOUKS M., 2005- Effect of the desert plant *Retama raetam* on glycaemia in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Journal Ethnopharmacol, 87, 21-25.

78. MAISUTHISAKUL P., SUTTAJIT M., PONGSAWATMNIT R., 2007- Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants. Food Chemistry, 100: 1418-1409.

79. MARCO E., MARIA S., ANTONELLO P., RAFFAELE S., 2007- Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. Food Chemistry, 104, 858-867.

80. MARINOVA E., TONEVA A., YANISHLIEVA N., 2009- Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids , Food Chemistry, vol. 114, p: 1498-1502.

81. MATKOWSKI A., PIOTROWSKA P., 2006- Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. Fitoterapia, 77(5): 346-353.

82. MCLURE J., 1975- Physiology and fonction of flavonoids. Harborne Journal EDS, Chapmann and hall, London, p:970-1055.

83. MEDIC-SARIC M., JASPRICA I., SMOLCIC-BUBALO A., MORNAR A., 2004- Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids, Croatica Acta, p:361-366.

84. MILA H., SCALBERT A., 1994- Tannin antimicrobial properties through iron deprivation a new hypothesis. Internationl Symposium on Natural Phenolsin Plant Resistance,16(3), p: 517-544.

85. MITTLER R., MERQUIOL E., HALLAK-HERR E., RACHMILEVITCH S., KAPLAN A., COHEN M., 2001- Living undera dormant canopy: amolecular acclimation mechanism of the desert plant. *Retama raetam* L. Plant. Journal Blackwell Science, 25(4): 407-416.

86. MURRY R., MÉNDEZ J., BROWN A., 1982- The Natural Coumarine: Occurrence Chemistry and Biochemistry. John Wiley and Sons Ltd, Chichester.

87. NADIA A.S., BIDLACK W.R. and CRECELIN S., 2000- Hytoantimicrobials in: Natural food Atimicrobial System Aidu, A, Seds, CRC (New York), 325-417.

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

89. NIJVELDT R., NOOD E., HOORN D., BOOELENS P., NORREN K., 2001- Leeuwen PAV Flavonoids. Review of probable mechanisms of action and potentiel applicatins, Am, Journal Clin, Nurt, p: 418-425.

90. OBERMEIR M., WHITE R., YANG C., 1995- Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. Pharmacologie, Res, 25(6), p: 575-584.

91. OHEMENG K., SCHWENDER C., FU K., BARRETT J., 1993- DNA gyrase inhibitoyry and antibacterial activity of some flavones. Bioorg Med, Chem, Lett, 3(2), p: 225-230.

92. ONO K., NAKANE H., 1990- Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. Biochem,108 (4), p: 609-613.

93. ONO K., NAKANE H., FUKUSHIMA M., MANN J., BARRE-SINOUSSI F., 1990- Differential inhibitory effect of various flavonoids on the activities of reverrse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. Eur, Biochem,190 (3), p: 469-76.

94. ORDONEZ A.A.L., GOMEZ J.D., VATTUONE M.A., ISLA M.I., 2006- Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq), Food Chem, 97:452-458.

95. PAREJO I., VILADOMAT F., BASTIDA J. *et al*., 2002- Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity, Life Sci, 73: 1667-81.

96. PERCIVAL SL., 2004- Microbiology of waterborne diseases. Ed, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, p: 480.

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

98. RACHID A., DJAZIRI R., LAHFA F., SEKKAL F.Z., BENMEHDI H., BELKACEM N., 2012- Ethnopharma cological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. Journal of Medicinal Plants Research Vol, 6(10), pp, 2041-2050.

99. REBIAI A., LANEZ T., AND BELFAR M., 2013- Total Polyphenol Contents, Radical Scavenging And Cyclic Voltammetry Of Algerian Propolis. Int J Pharm Pharm Sci, Vol(6), Issue 1, ISSN-0975-1491. P: 395-400.

100. REIMER K., 1976- Ueber eine neue Bildungsweise aromatischer Aldehyde, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol.9 n^{o} 1, p: 423-424.

101. ROLLAND R., 2004- Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux Corps Gras et Lipides, 11(6): 419-424.

102. ROMANI A., PINELLI P., GALARDI N., MULINACCI N. et TATTINI M., 2002- Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L, Phytochemical Analysis, 13: 79 86.

103. SAADAOUI B., MERABET S., SAMBRANI N., HUDRY B., PRADEL J., AFFOLTER M., 2007- Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride Tunisien. Revue des régions arides, pp:316-321, Édition: Institut des régions arides, Médenine, Tunisie.

104. SANDA V., BILJANA B., MAJA B., and MARIJA B., 2012- Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health, Phytochemicals as Nutraceuticals- Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed), ISBN: 978-953-51-0203-8, In Tech, P:156-182.

105. SATO M., TSUCHIYA H., TAKASE I., KURESHIRO H., TANIGAKI S., LINUMA M., 1995- Antibacterial activity of flavanone isolated from Sophora exigua againstmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination whith antibiotics. Phytother, Res, 9 (7), p: 509-512.

106. SATYAJIT D., 2007- Chemistry for pharmacy Students. John wiley et Sons, Ltd, England.

107. SCALBERT A., 1991- Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30, p: 3875-3883.

108. SEREME A., MILLOGO-RASOLODIMBY J., GUINKO S., NACRO M., 2010- Antonomie et concentration des Tanins des plantes tanniferes du Burkina Faso. Université 03 Ouagadougou 03 Burkina Faso (Afrique de l'ouest) , P: 1-9.

109. SINGLETON, V.L, ROSSI J.A., 1965- Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.

110. SIRARD T., 2012- Fundamentals of HPLC. Waters Corporation, the science of what spossible, p:103.

111. SPEDDING G., RTTY A., MIDDIETON E., 1989- Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. Antivir, Res, 12 (2), p: 99-110.

112. SPICHIGER R.E., SAVOLAINEN V.V., FIGEAT M., JEANMONED D., 2002- Botanique systématique des plantes à fleur. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH-Lausanne.

113.STAFFORD H., 1997- Rol of Flavonoids is symbiol and defuse functions in legume roots. Bot , Rev 63, p:27-39.

114. STOTZ G., SPRIBILLE R., FORKMANN G., 1984- Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*. Plant Physiol, 116, p:173-183.

115. TAPIERO H., TEW K.D., NGUYEN B.G. and MATHÉ G., 2002- Polyphenol do they play a rolein the prevention, of the human pathologies. Biomed, Pharmacother, 56: 200-207.

116. THOMAS J.P., 1968- Ecologie et dynamique de la végétation de la dune littorale dansla région de Djidjelli. Bull, Soc, Hist, Nat, Afr, Nord, 59: 37-98.

117. TIAN F., LI B., YANG J., ZHANG G., CHEN Y., LUO Y., 2009- Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from Galla chinensis: The polarity affects the bioactivities. Food Chemistry, 113:173-179.

118. TOLEDO C., BRITTAA E., CEOLEB L., SILVAC E., DE MELLOA J., DIAS FILHO B., NAKAMURA C., NAKAMURA T., 2011- Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado ،using Brazilian cachaca as extractor liquid. Journal of Ethnopharmacology 133,420-425

119. UMADEVI I., DANIEL M., SABNIS S.D., 1988- Chemotaxonomic studies on some members of *Anardiaceae* In Proceedings of the Indian Academy of Sciences. Plant sciences, 98(3), p: 205-208.

120. URQUIAGA I. et LEIGHTON F., 2000- Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological Research, 33 (2): 55-64.

121. VAN DELDEN C. and IGLEWSKI B.H., 1998- Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg, Infect, Dis, 4: 551-560.

122. VISIOLI F., ROMANI A., MULINACCI N., ZARINI S., CONTE D., VINCIERI F., 1999- Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3397-3401.

123. VUORELA S., 2005- Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. Ed, University of Helsinki, Helsinki, p:76.

124. WILLIAMS C., GRAYER R., 2004- Anthocyanins and other flavonoids. Natural products repopts, V21, p:539-573.

125. WOLLENWEBRE E., DIETZ V., 1980- Biochemical Systematic and Ecology, V8, p:21.

126. **X**IANG Y., LIU Y. and LEE M.L., 2006- Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. Journal of Chromatography, 1104 (1-2): 198-202.

127. YORDI1 E., PÉREZ E., MATOS M. and VILLARES E., 2012- Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. Nutrition, Well- Being and Health, In Tech, ISBN 978-953-51-0125-3.

128. ZAAFOURI M., CHAÏEB M., 1999- Arbres et arbustes de la Tunisie méridionale menacés de disparition, Acta Bot, Gallica, 146(4), 361-373. Journal homepage, DOI:10.

129. ZHANG S.Y., ZHENG C.G., YAN X.Y., TIAN W.X., 2008- Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 371: 654-658.

130. ZHENG C.D., LI G., LI H.Q., XU X.J., GAO J.M. and ZHANG A.L., 2010- DPPH-scavenging activities and structure-activity relationships of phenolic compounds. Nat Prod Commun, 5: 1759-1765.

131. ZHISHEN J., MENGCHENG T., JIANMING W., 1999- The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, 64(4): 555-559.

- **Sites:**

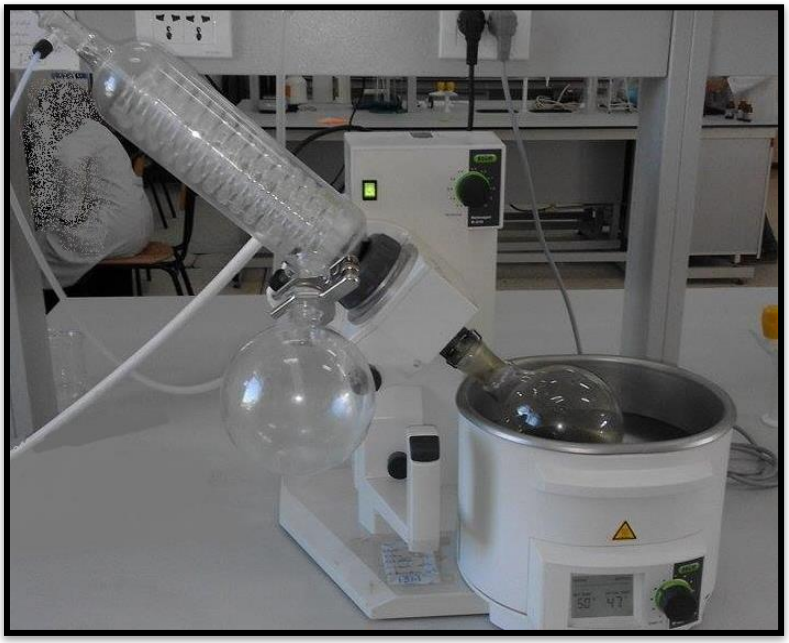
1. GRIN., 2011- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.

Annexes

- **جدول لخصائص بعض المذيبات و المحاليل المستعملة:**

SOLVANTS	CARACTÈRE
Méthanol	SIGMA-ALDRICH, pureté: >99.7% (GC), CAS: 67-56-1, CH_4O
Acétate d'éthyle	PANREAC, pureté: 99.5% (GC), $CH_3COOC_2H_5$
1-Butanol	VWR, pureté: 99.9%, CAS: 71-36-3, C_4H_{100}
Acétone	SIGMA-ALDRICH, pureté: >99% (GC), CAS: 67-56-1, C_3H_6O
Dichlorométhane	SIGMA-ALDRICH, pureté: >99% (GC), CAS: 67-64-1, CH_2Cl_2
Diméthyle Sulfoxide	SIGMA-ALDRICH, pureté: >99.7%(HPLC), CAS: 67-68-5, C_2H_4OS.
Sodium Carbonate	SIGMA-ALDRICH, pureté: 99.5-100.5%, CAS: 497-19-8,
Ether	SIGMA-ALDRICH, pureté: >95%, CAS: 101316-46-5
Chloroforme	MERCK KGAA, pureté: 90-99.4%, $CHCl_3$
Acide sulfurique	SIGMA-ALDRICH, pureté: 95-97%, CAS: 7664-93-9, H_2O_4S
Acide Ascorbique	SIGMA-ALDRICH, pureté: 99%, CAS: 50-81-7, $C_6H_8O_6$
HCl	SIGMA-ALDRICH, pureté: 36.5-38%, CAS: 7647-01-0, HCl
NH_4OH	AMMONIAQUE, hydroxyde d'ammonium à 34%

- **معلومات جهاز المبخر الدوراني (Rotavapeur) :**



BUCHI LAORTECHNIK AG
CH-9230Flawil 1 /SWITZERIAND
Type : R-210
SN : 1000048012
Volt : 100-240VAC
Frequ: 50/60Hz
Power: 60W
Built 2010
T 1.6 A L 250V (2x)

- **معلومات جهاز المطيافية الضوئية (Spectrophotomètre) :**

SHIMADZU CORPORATION
MODEL UVmini – 1240
CAT. No. 206-24000-38
SERIAL NO. A10934603363 CD
220-240v~ 50/60Hz 160VA
MADE IN JAPAN

- **معلومات جهاز الحاضنة (Etuve):**

LAB TECHASIA PTE. LTD.	
ISO 9001 CERTIFIED	
MODEL	**LIB-060M**
Volts	**220V 50Hz**
Watts	**200W / 1A**
SERIAL NO.	**08061323**

- **خصائص جهاز الأتوكلاف (Autoclave) :**

PBINTERNATIONAL	
VIA NONARA, 89 20153	
SERIAL N.	**030004**
Volts	**220V 50/60Hz**
Watts	**1300W**
MOD	**TIMO**
ANNO 2010	

- **معلومات جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) :**

CHIMADZU CORPORATION **MODEL CTO-20AC** **CAT. NO. 228-45010-38** **SERIAL NO. L20214806938** **220-240v~ 50/60Hz 600VA** **MADE IN JAPAN**	**CHIMADZU CORPORATION** **MODEL SPD-20A** **CAT. NO. 228-45003-38** **SERIAL NO. L20134813938** **230-240v~ 50/60Hz 160VA** **MADE IN JAPAN**

الجهاز مكون من:

مضخة: هي نظام يتكون من مضختين LC 20 AL ,LC 20 AL لنقل الطور المتحرك الى الضغط العالي.

الحاقن: وهو صمام لحقن العينات المراد تحليلها و حجمها 20µl.

العمود: يبلغ طوله 125 mm وقطره 4.6 mm و يتكون من مركب السيليس والتي تشكل مرحلة ثابتة غير قطبية.

الكاشف: عبارة عن جهاز استشعار أحادي اللون UV SPD-20A، طول الموجة متغير ما بين (190-400 nm)، يسمح بكشف مختلف المركبات الموجودة في العينات.

الفرن: CTO 20A.

- **جداول للتقدير الكمي لعديدات الفينول و الفلافونويدات:**

كمية متعددات الفينول للمستخلصات الفلافونويدية و المستخلص الميثانولي الخام لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /غ من المادة النباتية الجافة.

مستخلصات نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)	E.A.E	E.1.B	E.M
كمية عديدات الفينول (PPT)	1.10 ± 0.032	1.46 ± 0.001	1.81± 0.098

كمية الفلافونويدات الكلية للمستخلصات الفلافونويدية و المستخلص الميثانولي الخام لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) بالملغ مكافئ للكرستين/غ من المادة الجافة.

مستخلصات نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.)	E.A.E	E.1.B	E.M
كمية الفلافونويدات الكلية (FV)	0.66 ± 0.19	0.28 ± 0.14	0.54 ± 0.21

- **جدول الاقطار التثبيطية للسلالات البكتيرية لمختلف المستخلصات النباتية حيث:**

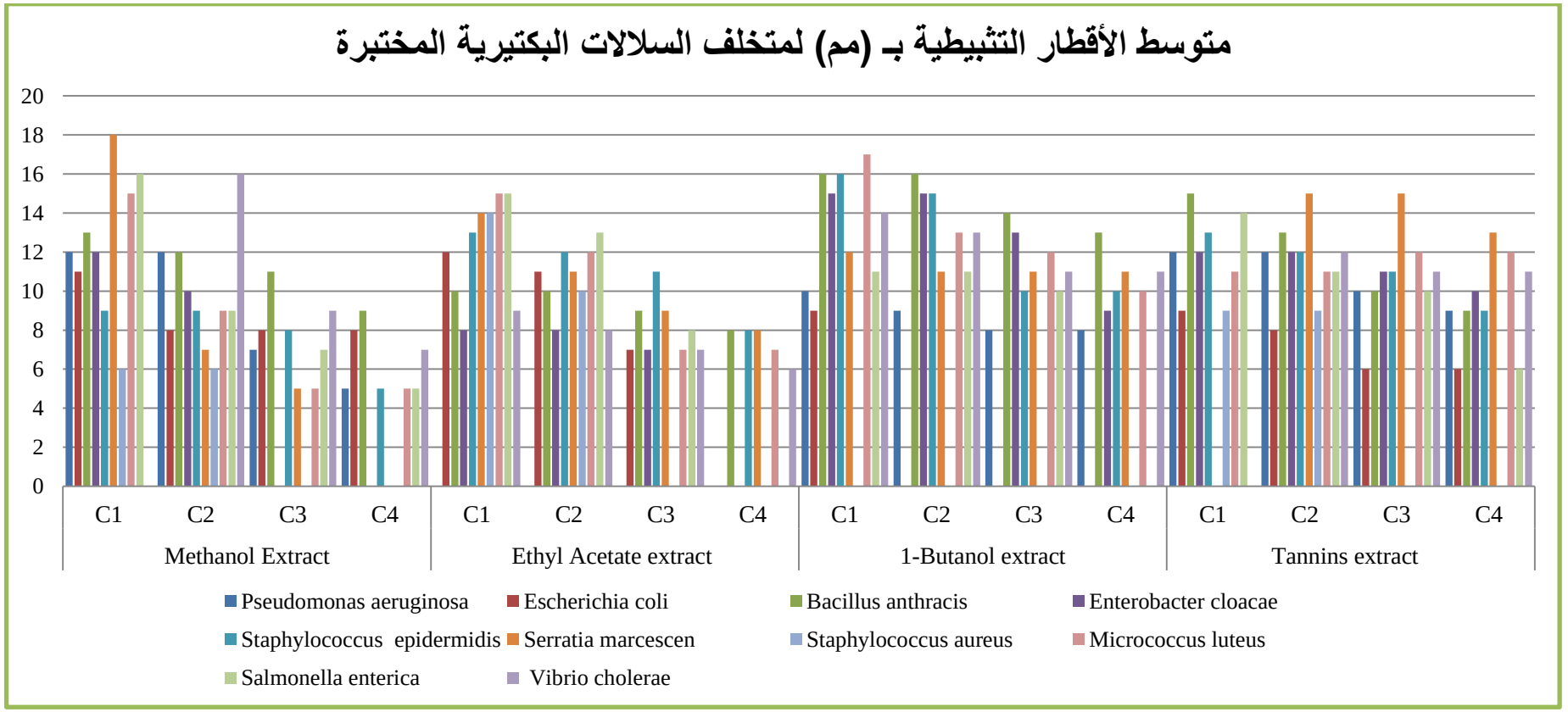
C_1=2mg/ml C_2=1mg/ml C_3=0.5mg/ml C_4=0.25mg/ml

السلالات البكتيرية	Methanol Extract				Ethyl Acetate extract				1-Butanol extract				Tannins extract			
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4
Pseudomonas aeruginosa	12	12	7	5	0	0	0	0	10	9	8	8	12	12	10	9
Escherichia coli	11	8	8	8	12	11	7	0	9	0	0	0	9	8	6	6
Bacillus anthracis	13	12	11	9	10	10	9	8	16	16	14	13	15	13	10	9
Enterobacter cloacae	12	10	0	0	8	8	7	0	15	15	13	9	12	12	11	10
Staphylococcus epidermidis	9	9	8	5	13	12	11	8	16	15	10	10	13	12	11	9
Serratia marcescen	18	7	5	0	14	11	9	8	12	11	11	11	/	15	15	13
Staphylococcus aureus	6	6	0	0	14	10	0	0	0	0	0	0	9	9	0	0
Micrococcus luteus	15	9	5	5	15	12	7	7	17	13	12	10	11	11	12	12
Salmonella enterica	16	9	7	5	15	13	8	0	11	11	10	0	14	11	10	6
Vibrio cholerae	18	16	9	7	9	8	7	6	14	13	11	11	/	12	11	11

- **جدول الاقطار التثبيطية للسلالات البكتيرية لمختلف المضادات الحيوية حيث:**

Anti 3: Cefalexin CN_{30} **Anti 2:** Nitroxoline NO_{30} **Anti 1:** Gentamicin HLG_{120}

السلالات البكتيرية	Anti 1	Anti 2	Anti 3
	HLG	NO	CN
Pseudomonas aeruginosa	30	13	0
Escherichia coli	26	18	19
Bacillus anthracis	33	26	0
Enterobacter cloacae	24	24	0
Staphylococcus epidermidis	22	24	17
Serratia marcescen	22	26	17
Staphylococcus aureus	35	27	17
Micrococcus luteus	27	26	20
Salmonella enterica	24	26	/
Vibrio cholerae	25	26	19



مخطط بياني للأقطار التثبيطية لمختلف المستخلصات النباتية لنبات الرتم*Retama raetam* (Frosk.)

Le 14-15 Mars 2016

Université HAMMA Lakhder El Oeud
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie cellulaire et moléculaire

جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El-Oued

2ème Séminaire National BIOLOGIE ET SANTE

Attestation de participation

Le directeur du 2ème séminaire national « biologie et santé » atteste que:

Mr, Mme, Melle. **Houga Sara**

A présenté une communication affichée intitulée :

«Antioxidant activity of methanol extract, flavonoids and tannins from plant medicinal saharian retamaraetam (forssk.) webb & berthel».

Co auteur:Meraghni Amel ,Chouikh Atef ,Adjal El Hadda, Hemmami Hadia

Directeur du séminaire
MR DEROUICHE S

Présidente du comité d'organisation
Melle AOUIMER. M

Université HAMMA Lakhder El Oeud
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie cellulaire et moléculaire

جامعة الشهيد حمه لخضر - الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El-Oued

Le 14-15 Mars 2016

2ème Séminaire National BIOLOGIE ET SANTE

Attestation de participation

Le directeur du 2ème séminaire national « biologie et santé » atteste que:

Mr, Mme, Melle. **Meraghni Amel**

A présenté une communication affichée intitulée :

« Antibacterial activity of methanol, ethyl acetate, 1- butanol, tannins extracts of retamaraetam (forssk.) webb & berthel. on ten strains bacteria's pathogens»

Co auteur: Houga Sara ,Chouikh Atef ,Adjal El Hadda, Hemmami Hadia

Directeur du séminaire

MR DEROUICHE S

Présidente du comité d'organisation

Melle AOUIMER. M

Université

Echahid Hamma Lakhdar – El-Oued

2eme

Séminaire National Biologie Et Sante

2016

Antioxidant Activity Of Methanol Extract, Flavonoids And Tannins From Plant Medicinal SAHARIAN *Retama raetam* (FORSSK.) WEBB & BERTHEL.

HOUGA Sara 1, MERAGHNI Amel 1, CHOUIKH Atef 1, ADJAL El Hadda 1, HEMMAMI Hadia 2.

1. Department of Biology, Faculty of Natural Science and Life, University of El Oued, Algeria.

2. University of El Oued, VTRS Laboratory, P.O. Box 789, 39000, El-Oued, Algeria

الملخص

الهدف من هاته الدراسة هو تحديد النشاطية المضادة للأكسدة لعدة مستخلصات من نبات الرتم (FORSSK) *Retama raetam* التابع للعائلة الفولية Fabaceae و النامي بمنطقة الجنوب الشرقي لمنطقة وادي سوف بولاية الوادي.

اختبار DPPH هو الاختبار الذي يسمح بقياس نسبة تثبيط الجذر الحرDPPH و تحديد التراكيز القصوى التي تثبطه، وقد بينت النتائج أن أكثر المستخلصات تثبيطا للجذر الحر DPPH هو المستخلص التانيني (العفصي) بقيمة IC50=0.223mg/ml بالإضافة الى مستخلص الفلافونويدات (اسيتات ايثيل) بمقدار IC50=0.234mg/ml و بقيمة IC50= 0.334 mg/ml للمستخلص البيتانولي (1-بيتانول)، اما المستخلص الميثانولي الخام فقدرت نسبة التثبيط بـ I%=76.85% ذات IC50 =0.234mg/ml.من هاته النتائج نلاحظ الفرق بين نشاطية المستخلصات الاربعة لنفس النبات، كما نلاحظ انها ليست بفاعلة بما يكفي مقارنة مع نشاطية حمض الاسكوربيك المقدرة بـ IC50= 0.015mg/ml.

الكلمات المفتاحية:

نبات الرتم *Retama raetam* (FORSSK.) WEBB & BERTHEL ، المستخلص الميثانولي، نشاطية مضادة للأكسدة، DPPH ، التانينات، الفلافونويدات.

مقدمـــة

تعد مضادات الاكسدة والمنتشرة في النباتات الغنية بالفينولات الكلية مثبطا للجذور الحرة ، وهي بذلك أول وسيط يحد من تعزيز حدوث امراض السرطان و امراض القلب و تصلب الاوعية و الشرايين (Zhang et Hamauzu, 2003)

تتوفر عديدات الفينول في الكثير من الانواع النباتية والتي لها الدور الابرز في الوقاية من الامراض في مقدمتها أمراض السرطان و التهاب المفاصل و الروماتيزم وكذا امراض القلب الوعائية (Manach *et al*, 2004) بحيث تعرف مضادات الاكسدة بالمركبات القادرة على منع اكسدة المركبات الاخرى أو اعاقتها، اذ تقوم بتقديم الكترونات الى الجذور الكيميائية الحرة ، و تتحول بدورها الى جذور حرة ضعيفة غير فعالة و غير سامة مما يجعلها اقل ضررا للجسم مقارنة بالجذور القوية (Halliwell,1999) .

و بالرغم من أن الجزائر تزخر بكم هائل من النباتات البرية الغنية بمواد فعالة عديدة الا ان استغلالها في علاج الامراض الخطيرة يعد من الامور التقليدية القديمة ، هذا ما دفعنا لدراسة نوع نباتي منتشر بكثرة في منطقتنا و تحديد قدرته المضادة للأكسدة، وهو نبات الرتم الصحراوي Webb (Forssk.) *Retama raetam*، والمنتمي للعائلية الفولية Fabaceae املا منا في فتح مجال استغلال النباتات البرية في معالجة و وقاية الجسم من الامراض السرطانية و غيرها ، واستعمال مواده الفعالة في انتاج الادوية و المستحضرات الصيدلية و الطبية.

الوسائل المستعملة والطرق المتبعة:

تحضير المادة النباتية:

نبات الرتم (*Retama raetam* (Forssk. وهو نبات صحراوي واسع الانتشار يتراوح طوله من متر الى 3 امتار و نصف ذو ازهار بيضاء صغيرة (8-10مليمتر)، ينتشر في منطقة الصحراء العربية الكبرى ، حيث ينمو في الاراضي الرملية الجافة سواء في المنحدرات او الكثبان (Trabut,1935)، و يندر تواجده في الاراضي المالحة (حليس ، 2007).

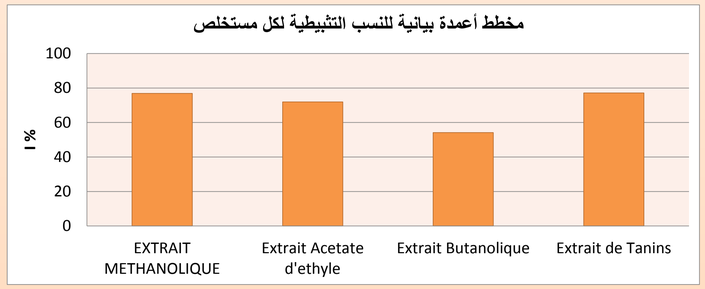
تم جمع النبات صباحا من منطقة حاسي خليفة بالجنوب الشرقي لمنطقة وادي سوفي في ولاية الوادي ، وتم تجفيفه على مدار شهر تقريبا في الظل و تحت درجات حرارة متوسطة (20-25) درجة مئوية .بعد التأكد من الجفاف التام للنبات ، تم سحقه جيدا باستعمال الة كهربائية و حفظه في اكياس ورقية خاصة لحين استعمالها مخبريا .

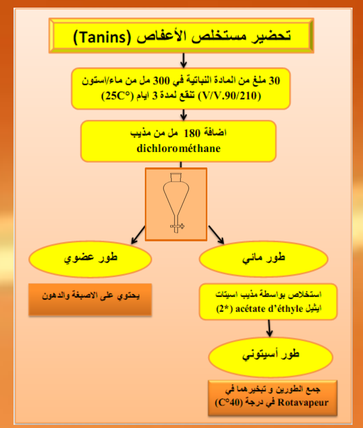
النتـــائج والمنـــاقشة

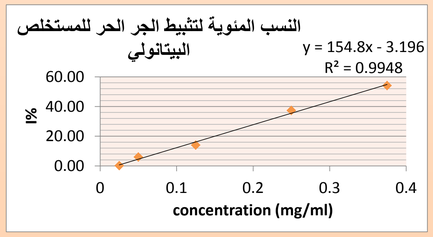
سجلت اعلى نسبة تثبيط للجذر الحر لدى مستخلص التانينات بمقدار I% =77.16 % بالإضافة الى المستخلص الخام الميثانولي بقيمة I%=76.85% في نفس التركيز 0.75 ملغ /مل، كما سجلنا نسبة تثبيط قصوى لحمض الاسكوربيك I%= 23.22% بتركيز قدر بـ 0.0075 ملغ /مل ، و الجدول (01) يبين اعلى مستويات تثبيطية في المستخلصات الاربعة .

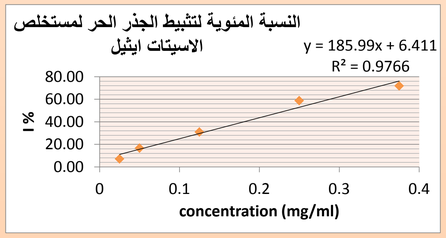
Extrait	Extrait methanolique	Extrait acetate d'ethyle	Extrait butanolique	Extrait de tanins
I%	76.85	71.91	54.16	77.16

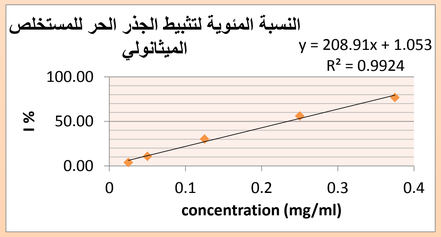
والمنحنيات (01-02-03-04) تمثل نسب التثبيط للجذر DPPH لكل مستخلص ، اما المنحنى 05 فيمثل المنحنى المعياري لحمض الاسكوربيك Acide Ascorpic.

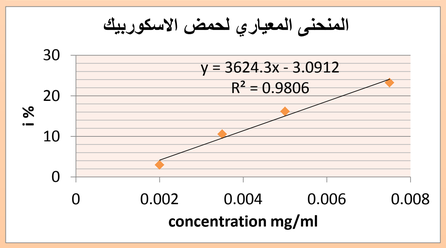


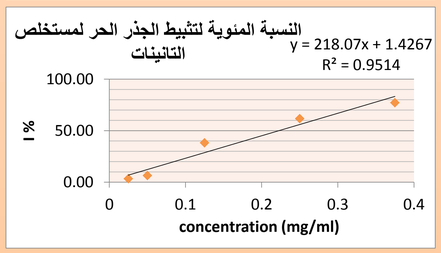




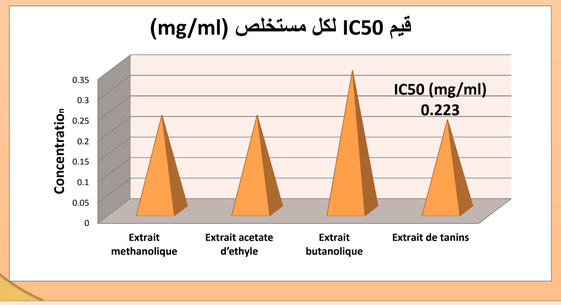








من هاته المنحنيات قمنا بحساب مقدار IC50 لكل نسبة تثبيطية لكل مستخلص (الجدول 02) حيث لوحظ أن لمستخلص الأعفاص نشاطية مضادة للأكسدة أكبر من مثيلتها في باقي المستخلصات بمقدار IC50=0.223 mg/ml مع تسجيل قيمة متماثلة لدى المستخلصين الميثانولي و مستخلص الاسيتات ايثيل للفلافونويدات بقيمة IC50=0.234 mg/ml وبالنسبة للمستخلص البيتا نولي فان مقدار IC50 له عال قدر بـ mg/ml0.343



Extraits	Extrait methanolique	Extrait acetate d'ethyle	Extrait butanolique	Extrait de tanins
IC_{50} (mg/ml)	0.234	0.234	0.343	0.223

تختلف الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات نفس النبات تبعا لطرق الاستخلاص و اختلاف الانواع الفينولية الموجودة في النبات، بالإضافة الى اختلاف تراكيز المواد الفعالة فيها (Peinado, 2009) كما ان اختلاف سلوك المركبات الفينولية مع الجذور الحرة يختلف على حسب تشكيل معقد او اعطاء جذر او بكسر رابطة في المعقدات الناتجة بين الجذر و الفينول (Molineux , 2004) كما تلعب المذيبات دورا في اهمية المستخلص كونها تشكل روابط بينها و بين بعض المركبات الذائبة فيها لذا فالمستخلص البتانولي يعطينا أقل نشاطية مقارنة بالمذيبات الاخرى .

اختبار قياس نسبة تثبيط الجذر الحر DPPH

هو اختبار يسمح بقياس قدرة مستخلص ما على قابليته لإعطاء ذرات هيدروجين للجذر الحر DPPH، (Goupy *et al*, 2003) بحيث يتم هذا الاختبار حسب (Singh *et al*, 2002) بمزج 0,5 ml من التراكيز المختلفة لكل مستخلص و حمض الاسكوربيك مع 1 ml من محلول DPPH (1mM)، وتحضن في الظلام لمدة 15 دقيقة، يتم تسجيل قراءات الكثافة الضوئية للتراكيز المختلفة في جهاز المطيافية الضوئية Spectrophotométre عند طول موجة 515 نانومتر. ويتم حساب النسبة المئوية لتثبيط جذر DPPH (I %) وفق المعادلة التالية:

$$I\ \% = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100$$

حيث:

A_c: الكثافة الضوئية للعينة الكاشف . A_s : الكثافة الضوئية للعينة.

معامل IC_{50} عبارة عن مقدار يدل على تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50 % من جذر DPPH، ويحسب من خلال المعادلة الخطية لمنحنيات تغير نسبة التثبيط (I %) بدلالة تراكيز المستخلصات الفينولية. (Dziri et *al*., 2012).

خـــاتمـة

تعد النباتات الصحراوية البرية من أهم مصادر مضادات الاكسدة في الطبيعة، حيث ان لكل نبات مواد فعالة تجعله يصنف ضمن احدى اصناف مثبطات الجذور الحرة و تمنحه فعالية مميزة تميزه عن غيره من النباتات، ومن هنا نستطيع القول ان لنبات الرتم الصحراوي فعالية متوسطة كمضادة للمؤكسدات هذا راجع لكونه فقيرا من الفينولات بشكل عام أو ربما لاختلاف الانواع الفينولية فيه ، فقد قدرت نسبة تثبيطه لجذر DPPHبالضعيفة مقارنة بفعالية حمض الاسكوربيك في تثبيطه لهذا الجذر.

Références

Bekkara F., Jay M., Viricel M., (1998)- Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of tow Vicia faba cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, Journal Plant and Soil, 203: 27-36.///Dziri S., Hassen I., Fatnassi S., Mrabet Y., Casabianca H., Hanchi B., Hosni K., (2012)-. Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). Journal Of Functional Foods. 4: 423- 432.///Goupy P., Dufour C., Loonis M., and Dangles O.,(2003)- Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. J Agric Food Chem. 51: 615-622 /// .Halliwell B and Gutteridge J., (1999)- Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press. 181-188./// Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jime N., (2004)-Polyphenols: food sources and bioavailability, American Society for Clinical Nutrition, 79, 727– 47.///Matkowski A., Piotrowska M., (2006)- Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae, Fitoterapia, 77: 346-353.///Matkowski A., Piotrowska M., (2006)- Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae, Fitoterapia, 77: 346-353.///Molineux P., (2004)-The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J-Sci.Technol, 26:211-219 ///Peinado J., Lopez J., Moreno A., Peinado., (2009)- Antioxidant activity of different phenolics fractions isolated in must from Pedro Ximenez grapes at different stages of the off-vine drying process. Food Chemistry, 114(3-1): 1050-1055. ///Singh P., Chidambara N., Jayaprakasha K., (2002)- Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. J. Agric. Food. Chem. 50, 81-86.///Trabut L ., (1935)- Répertoires des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique.Collection du Centenaire de l'Algérie، Alger.355 p.////Zhang D., and Hamauzu Y., (2003)- Phenolic compounds, ascorbic acid ،carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. J. Food Agriculture &Environment. 1, 22-27.// Zhang S., Zheng G., Yan Y., Tian X., (2008)- Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 371: 654-658.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF METHANOL, ETHYL ACETATE, 1-BUTANOL, TANNINS EXTRACTS OF *Retama raetam* (FORSSK.) WEBB & BERTHEL. ON TEN STRAINS BACTERIA'S PATHOGENS.

النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلص الميثانولي ، الفلافونويدي والعفصي لنبات الطبي الصحراوي الرتم

Retama raetam (FORSSK.) WEBB & BERTHEL

MERAGHNI Amel [1], HOUGA Sara [1], CHOUIKH Atef [1], ADJAL El Hadda[1], HEMMAMI Hadia [2].

[1]. *Department of Biology, Faculty of Natural Science and Life, University of El Oued, Algeria.*

[2]. *VTRS Laboratory, University of El Oued, P.O. Box 789, 39000, El-Oued, Algeria.*

الملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو معرفة النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلص الميثانولي و الفلافونويدي والتانينات لنبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) التابع للعائلة الفولية Fabaceae والنامي في منطقة وادي سوف(جنوب شرق الجزائر).

وكان الإختبار على عشرة سلالات بكتيرية: ستة سلبية الغرام (*Escherichia coli ATCC 25922; Enterobacter; Serratia; Salmonella; Vibrio* ; *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*) وأربعة سلالات موجبة الغرام (; *Staphylococcus aureus ATCC 25923; Staphylococcus aureus; Bacillus subtilis Micrococcus*) وكانت التراكيز كما يلي :

(2 mg/ml; 1 mg/ml; 0.5 mg/ml; 0.25 mg/ml) تم استخلاصها من نبات الرتم حيث سجلنا افضل حساسية عند السلالة *Micrococcus* بقطر تثبيطي 15 mm مع مستخلص d'ethyl Acetate و 17mm مع 1-Butanol وكذلك بالنسبة للسلالة *Vibrio* بقطر تثبيطي 18 mm مع المستخلص الميثانولي، وكما سجلنا حساسية عالية عند السلالة *Serratia* بقطر تثبيطي 15mm مع مستخلص التانينات واظهرت مقاومة متوسطة مع تركيزات مختلفة لجميع المستخلصات .

بينما كانت السلالة *Staphylococcus aureus ATCC* 25923 مقاومة جدا لمختلف التراكيز حيث تراوح القطر التثبيطي عند المستخلص الميثانولي (00-06mm) وعند مستخلص التانينات (00-009mm) أما مستخلص Butanol -1فكان القطر التثبيط 00mmعند كل التراكيز وكانت السلالة *Pseudomonas aeruginosa* مقاومة جدا عند مختلف تراكيز مستخلص d'ethyl Acetate .

الكلمات المفتاحية :

نبات الرتم *Retama raetam* (FORSSK.) WEBB & BERTHEL ، السلالات البكتيرية ، المستخلص الميثانولي ، التانينات ، 1- Butanol. ، d'ethyl Acetate

المقدمة :

أصبحت النباتات الطبية تأخذ إهتمام الكثير واحتلت مكانة كبير في مجال الطب وهذا لإحتوائها على الكثير من المواد الفعالة والتي تعكس الفوائد العلاجية لهذه النباتات ولذلك هي من أهم المواد التي يتم إستعمالها في صناعة الدواء (العابد،2009) ، و تعتبر من أهم المواد المستعملة في علاج كثير من الأمراض خاصة الأمراض الناتجة عن الإصابات البكتيرية ، مثل إلتهاب المسالك البولية والمعوية وغيرها من الإصابات وقصد التقليل من هذه الإصبات البكتيرية تم إستعمال النباتات سواءا البرية أو المزروعة والتي تملك مواد فعالة ومضادة لهذه البكتيريا.(العابد،2009)

لذلك تطرقنا في هذه الدراسة إلى معرفة مدى قدرة المواد الفعالة الموجودة في نبات الرتم *Retama raetam* على مقاومة العديد من الانواع البكتيرية بهدف تثمين مثل هذه النباتات البرية الموجودة في بلادنا ومعرفة أهميتها في علاج الكثير من الأمراض وإستغلال المواد الفعالة في إنتاج الأدوية .

الدراسة الفعالية للنشاطية المضادة للبكتيريا :

1- السلالات البكتيرية المستعملة :

خلال دراستنا هذه استعملنا عشرة سلالات بكتيرية التي تم الحصول عليها من معهد باستور بالجزائر العاصمة وهي :

Pseudomonas aeruginosa و *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* و *Enterobacter* و *Staphylococcus B* و *Staphylococcus aureus* و *Serratia* و *Micrococcus* و *Salmonella* و *Vibrio* .

2-المضادات الحيوية المستعملة للمقارنة الإجابية بينها وبين المستخلصات :

من خلال دراسة نشاطية المستخلصات لنبات الرتم *Retama raetam* على الأنواع البكتيرية المذكورة سابقا تم استعمال ثلاث مضادات حيوية قصد المقارنة الفعالية البيولوجية للمستخلصات مع هذه الأنواع من المضادات الحيوية وهي:

1-Gentamicin HLG_{120} :30 µg /disc

2-Nitroxoline NO_{30} : 30 µg /disc

3-Cefalexin CN_{30} : 30 µg /disc

I- المواد والطرق المستعملة :

I-1- المادة االنباتية :

يعتبر نبات الرتم *Retama raetam* (Forssk.) Webb نبات صحراوي واسع الإنتشار حيث يتراوح طوله من متر إلى 3 أمتار ونصف وهو ذو أزهار بيضاء وصغيرة (8-10مليمتر) بحيث ينتشر في منطقة الصحراء العربية الكبرى حيث ينمو في الأراضي الصحراوية الجافة وفي الكثبان (Trabut,1935) وينمو في المناطق الرملية الجافة ويندر تواجده في الأراضي المالحة (حليس ،2007) تم قطف نبات الرتم من منطقة حاسي خليفة التابعة لولاية الوادي والواقعة بالجنوب الشرقي لها ثم قومنا بتجفيفه وطحنه

I-2- تحضير المستخلصات :

تحضير المستخلص الفلافونويدي

30 غ من المادة النباتية الجافة وتوضع في 300 مل من الميثانول و تنقع لمدة 24 ساعة

ترشيح المستخلص

تبخير الناتج في (60C°) Rotavapeur

150 مل من الماء المقطر الساخن+ 150 مل من مذيب Acétate d' éthyle (2*)

فصل المستخلص

الطور مائي

استخلاص بواسطة مذيب احادي البيتانول 1-Butanol (2*)

طور عضوي (بيتانولي)

جمع الطورين و تبخيرهما في Rotavapeur في درجة (C°60)

طور مائي

الطور عضوي (اسيتات ايثيل)

جمع الطورين و تبخيرهما في Rotavapeur في درجة (C°60)

تحضير مستخلص الأعفاص (Tanins)

30 ملغ من المادة النباتية في 300 مل من ماء/استون (V/V.210/90) تنقع لمدة 3 ايام (25C°)

ترشيح المستخلص

تبخير الناتج في (50C°) Rotavapeur

اضافة 180 مل من مذيب dichlorométhane

فصل المستخلص

طور مائي

استخلاص بواسطة مذيب اسيتات ايثيل (2*) acétate d'éthyle

طور أسيتوني

جمع الطورين و تبخيرهما في Rotavapeur في درجة (C°40)

طور عضوي

يحتوي على الاصبغة والدهون

I-3-تحضير البكتيريا في أطباق بيتري :

*** تحضير اوساط الزراعة :**

تعقيم وسط العمل ثم إذابة وتعقيم وسط الزرع (Mueller Hinton) وسكبه في أطباق بتري وتركها حتى تبرد وتتجمد (حواء ،2013)

*** تحضير المعلق البكتيري :**

أخذ مستعمرة من كل سلالة ثم وضعها في أنبوب به ماء فيزيولوجي نرج جيدا (العابد،2009)

*** زراعة البكتيريا :**

غمس الماسح القطني المعقم في المعلق البكتيري ثم مسح على كامل وساط الزرع الجاف

*** وضع الأقراص :**

وضع اربعة اقراص فارغة ومعقمة داخل علب بيتري ثم وضع 0.01 ml من التراكيز المختلفة في كل قرص ثم وضع اقراص المضادات الحيوية في كل طبق بيتري ثم وضع اطباق بيتري في الحاضنة لمدة 24ساعة درجة حرار 37ºC وبعد إنتهاء مدة الحضن نخرج العلب من الحاضنة ونقيس القطر التثبيطي (mm) لكل علبة (HARRAR, 2012)

II- النتائج والمناقشة :

- **المستخلص الميثانولي :**

من خلال النتائج أظهر المستخلص الإيثانولي احسن أقطار تثبيطة حيث سجل أعلى قطر تثبيطي 18mm عند تركيز C1 =2 mg /ml مع السلالات البكتيرية *Vibrio* و *Serratia* وكما سجلنا حساسية معتبرة لكل من *Salmonella* و *Micrococcus* بقطر تثبيطي 16mm و 15 mm على التوالي عند تركيز C1 =2 mg /ml ، كما لاحظنا في السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* حساسية ضعيفة للمستخلص حيث كان القطر التثبيطي 6mm عند التراكيز C1 =2 mg /ml ,C2 = 1mg/ml و بينما تراوحت اقطار التثبيط عند باقي التراكيز بين (5 mm-13mm) لمختلف السلالات البكتيرية الأخرى.

- **مستخلص 1-Butanol:**

أعطت السلالة البكتيرية *Micrococcus* حساسية جيدة بقطر تثبيطي 17 mm وكما كانت كل من السلالات *Staphylococcus B* و *Bacillus subtilis* حساسة لهذا المستخلص بقطر تثبيطي 16 mm وهذا عند التركيز C1 =2 mg /ml بينما كانت *Escherichia* ذات حساسة ضعيفة ضد هذا المستخلص عند تركيز C1 =2 mg /ml بقطر تثبيطي 9 mm ولم نسجل أي قطر تثبيطي عند باقي التراكيز، أما السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus ATCC 25923* فكانت مقاومة لهذا المستخلص لذلك لم نسجل أي قطر تثبيطي .

- **مستخلص Acetate d' ethyl:**

أظهرت السلالات البكتيرية *Salmonella* و *Micrococcus* حساسية معتبرة عند تركيز C1 =2 mg /ml بقطر تثبيطي 15 mm كما سجلنا حساسية ضعفية عند السلالة *Enterobacter* بقطر تثبيط عند التراكيز C1 =2 mg /ml ,C2 = 1mg/ml بينما أظهرت السلالة البكتيرية *Pseudomonas aeruginosa ATCC* 27853 مقاومة شديدة لهذا المستخلص حيث لم نسجل اي قطر تثبيطي ، أما السلالات البكتيرية الأخرى كانت اقطار التثبيط لها بين (6 mm- 14mm) مع مختلفة التراكيز.

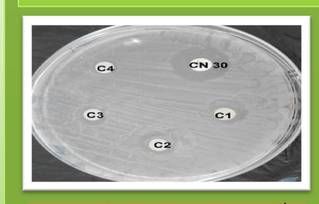
- **مستخلص التانينات :**

سجلنا حساسية معتبرة بقطر تثبيطي 15mmلسلالة *Bacillus subtilis* عند التركيز C1 =2 mg /ml وعند التراكيز C2 = 1mg/ml , C3 = 0.5 mg/ml عند السلالة البكتيرية *Serratia* بينما أعطت السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* حساسية ضعيفة عند التراكيز C1 =2 mg /ml ,C2 = 1mg/ml بقطر تثبيطي 9 mm ولم تعطي أي حساسة عند التراكيز C3 = 0.5 mg/ml ,C 4= 0.25 mg/ml.

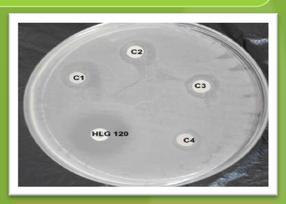
- **المضادات الحيوية :**

سجلنا افضل حساسية عند السلالة *Staphylococcus aureus* (35mm) وعند السلالة *Bacillus subtilis* (33mm) وتراوحت اقطار التثبيط عند باقي السلالات البكتيرية بين (22-27mm) مع المضاد الحيوي HLG 120 وكما أعطت السلالات مقاومة شديد للمضاد الحيوي CN 30باستثناء بعض السلالات التي ابدت حساسية ضعيفة لهذ ا المضاد الحيوي بأقطار تثبيط 23mm و 20mm و 19mmعند *Vibrio* و *Micrococcus* و *Staphylococcus* على التوالي ، واعطت السلالات *Escherichia coli* و *Salmonella aureus* حساسية معتبرة بأقطار تثبيط 27mm و 26mm مع المضاد الحيوي NO 30وترواحت باقي السلالات بين (16-25mm) .

والصور التالية توضح أهم النتائج لكل مستخلص أما المخططات فتوضح نتائج المتحصل عليها خلال النشاطية المضادة للبكتريا

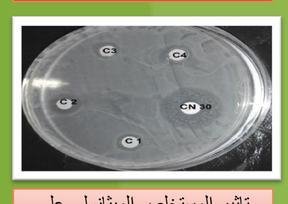


تأثير مستخلص اسيتات إثيل على *Staphylococcus* B

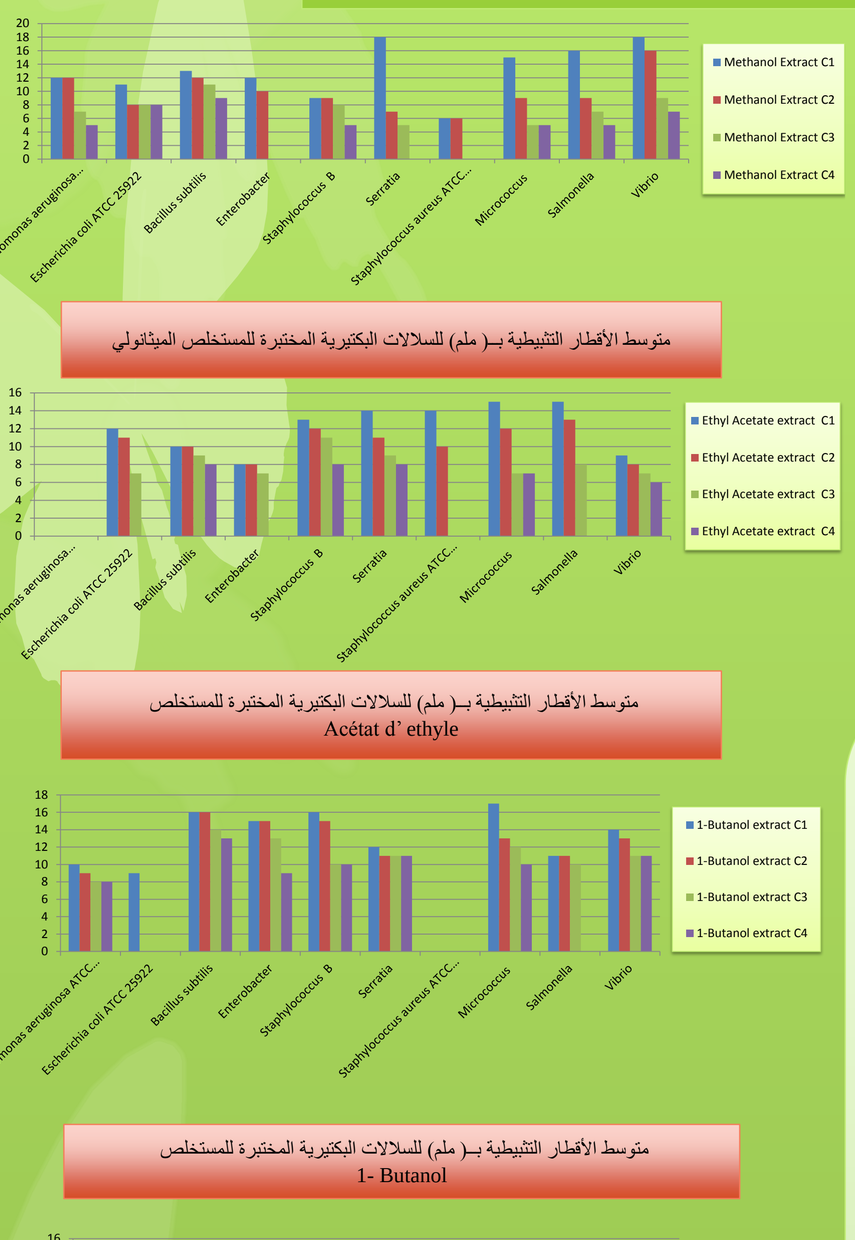


تاثير مستخلص 1-Butanol على *Micrococcus*

تاثير مستخلص التانينات على *Vibrio*



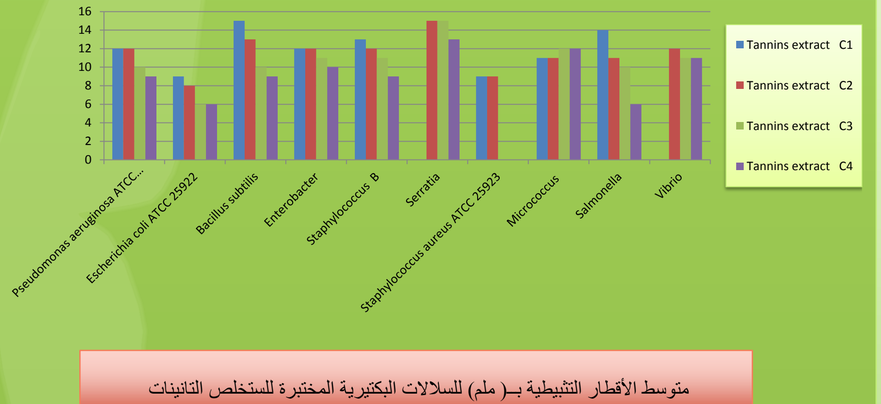
تاثير المستخلص الميثانولي على *Salmonella*



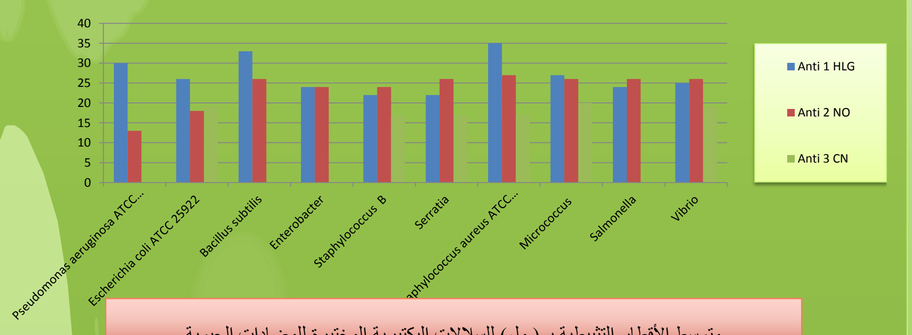
متوسط الأقطار التثبيطية بـــ(ملم) للسلالات البكتيرية المختبرة للمستخلص الميثانولي

متوسط الأقطار التثبيطية بـــ(ملم) للسلالات البكتيرية المختبرة للمستخلص Acétat d' ethyle

متوسط الأقطار التثبيطية بـــ(ملم) للسلالات البكتيرية المختبرة للمستخلص 1- Butanol



متوسط الأقطار التثبيطية بـــ(ملم) للسلالات البكتيرية المختبرة للستخلص التانينات



متوسط الأقطار التثبيطية بـــ(ملم) للسلالات البكتيرية المختبرة للمضادات الحيوية

من خلال هذه النتائج نستنتج أن الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلصات نبات الرتم تختلف حسب السلالات البكتيرية المختبرة وكذلك تختلف بإختلاف التراكيز وجدنا سلالات مقاومة للمستخلصات وسلالات حساسة لها وكذلك بالنسبة للمضادات الحيوية .

خاتمة

وفي الأخير وبعد اطلاعنا على النتائج المتحصل عليها من خلال هذه الدراسة نستطيع تقدير أهمية هذا النبات كونه يحتوي على مواد فعالة لديها القدرة على المقاومة والحماية من الإصابات بعدة سلالات بكتيرية والتقليل منها حيث ان هذه المواد تمنحه فعالية مميزة في علاج الكثير من الأمراض ولهذا يجب ان نعطي لهذا النبات الصحراوي أهمية كبيرة خاصة في بلادنا واستثماره في مجال الطب وصناعة الأدوية .

المراجع:

* العابد إ .، (2009)-دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للاكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum* .مذكرة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية التطبيقية ،جامعة قاصدي مرباح ورقلة ،الجزائر .106 ص.

* حليس ي .،(2007) –الموسوعة النباتية لمنطقة سوف ، النباتات الصحراوية الشائعة في العرق الشرقي الكبير .دار النشر بالمنطقة الصناعية كوينين ولاية الوادى، مطبعة الوليد ، 248 ص.

* حواءإ.، (2013) – الدراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة .شهادة لنيل شهادة الماجيستر في الكيمياء العضوية والفيزيوكيمياء الجزيئات.جامعة قاصدي مرباح ورقلة ،الجزائر ،109ص.

*Bekkara F., Jay M., Viricel M., (1998)- Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of tow Vicia faba cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, Journal Plant and Soil, 203: 27-36.

* **H**ARRAR A.E.N., 2012- Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Memoire Magister en biochimie et physiologie expérimentale, Université Farhat Abbas-Sétif, Algérie, 95 p.

* Matkowski A., Piotrowska M., (2006)- Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae, Fitoterapia, 77: 346-353.

* Trabut L ., (1935)- Répertoires des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique.Collection du Centenaire de l'Algérie، Alger.355 p.

* Zhang S., Zheng G., Yan Y., Tian X., (2008)- Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 371: 654-658