



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة قاصدي مرباح - ورقلة

كلية الرياضيات وعلوم المادة
قسم الكيمياء

رسالة محاضرة لنيل شهادة الدكتوراه علوم

تخصص : الكيمياء

من إعداد: بن نونة عبد العزيز

بعنوان

دراسة الأيض الفلافونيدي لأوراق أحد نباتات الفصيلة القرعية

نوقشت يوم : 29 / 06 / 2024

أمام لجنة المناقشة المكونة من:

رئيساً	بجامعة قاصدي مرباح - ورقلة	أستاذ تعليم عال	أ.د. حجاج محمد
مشرفاً و مقررأ	بجامعة قاصدي مرباح - ورقلة	أستاذ تعليم عال	أ.د. دندوقي حسين
مناقشأ	بجامعة قاصدي مرباح - ورقلة	أستاذ تعليم عال	أ.د. سمارة ونيسة
مناقشأ	بجامعة حمه لخضر - الوادي	أستاذ تعليم عال	أ.د. وهراني محمد رضا
مناقشأ	المدرسة العليا للأساتذة بورقلة	أستاذ محاضر-أ	د. بن براهيم فوزي
مناقشأ	المدرسة العليا للأساتذة بورقلة	أستاذ تعليم عال	أ.د. العابد إبراهيم

السنة الجامعية: 2024/2023..

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

شكر و عرفان

الحمد لله رب العالمين أولاً وأخيراً الذي وفقني في إنجاز هذا العمل. فيا رب لك الحمد حتى ترضى ولك الحمد إذا رضيت ولك الحمد بعد الرضى.

بادئ ذي بدء، أود أن أتقدم بالشكر الجزيل للمشرف على أطروحتي الأستاذ الدكتور دندوقي حسين لقبوله مهمة الإشراف، وعلى لطفه واهتمامه بإتمام هذا العمل. وأود أن أشكره على صبره ونصحه وتفهمه وخصاله التربوية والعلمية التي تحلى بها. وأرجو أن تجد في هذه الأطروحة، سيدي، شهادة امتناني الصادق واحترامي العميق.

أتوجه بالشكر لكل أعضاء المخبر VPRS بقسم الكيمياء بكلية الرياضيات وعلوم المادة بجامعة قاصدي مرياح ورقلة .

أود أن أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذ حجاج محمد، أستاذ تعليم عال بجامعة قاصدي مرياح ورقلة، على هذا التشريف بالموافقة على رئاسة لجنة التحكيم لهذه الأطروحة وتقييم هذا العمل.

كما أشكر الأستاذة سمارة ونيسة ، أستاذة تعليم عال بجامعة قاصدي مرياح ورقلة، لموافقتها على المشاركة في تقييم هذا العمل وإثرائه. أود أن أشكر الأستاذ وهراني محمد رضا، أستاذ تعليم عال بجامعة حمه لخضر بالوادي، على تشريفه لي بمناقشة هذه الأطروحة. فلنكن هذه الأطروحة شاهدة على امتناني الصادق.

كما أتقدم بشكري الخالص للدكتور بن براهيم فوزي، مدير المدرسة العليا للأساتذة بورقلة، على موافقته على مناقشة هذا العمل. وأود أن أعرب له عن احترامي العميق له.

كما أشكر الأستاذ العابد إبراهيم، أستاذ تعليم عال بالمدرسة العليا للأساتذة بورقلة، على موافقته على مناقشة هذا العمل وأود أن أشكره بجرارة على المساعدة المتنوعة التي قدمها لي طوال فترة إنتاج هذا العمل.

شكر خاص للأستاذة بن ساسي شيماء و الأستاذ بلقيدوم مهدي على تواجده ودعمه الدائم.

أتوجه بالشكر الخاص لعائلي على حضورها الدائم ودعمها ومساعدتها التي لا تقدر بثمن.

إهداء

اهدي هذا العمل المتواضع إلى روح أبي العزيز عليه رحمه الله

إلى روح أمي الغالية عليها رحمة الله

إلى زوجتي وأولادي

إلى إخوتي و أخواتي

إلى كل أساتذتي

إلى كل من كان يدعو لي في الجهر أو الخفاء

الفهرس

II	شكر و عرفان
III	إهداء
IV	الفهرس
X	الملخص
XI	ABSTRACT
XII	RÉSUMÉ
XIII	قائمة الإختصارات
XV	قائمة الأشكال
XIX	قائمة الجداول
1	المقدمة
	الجانب النظري
	الفصل الأول
2	الدراسة النظرية النباتية
3	I - عموميات
4	I-1 الفصيلة القرعية
4	I-2 تصنيف النباتات القرعية :
4	I-3 الوصف النباتي لفصيلة القرعيات :
5	I-4 الوصف النباتي لجنس <i>Cucurbita</i> L.
5	I-5 الوصف النباتي لجنس <i>Cucumis</i>

5	I-6 الوصف النباتي لجنس <i>Lagenaria</i>
6	I-7 الوصف النباتي لجنس <i>Citrullus</i>
6	I-7-1 أصل توطين البطيخ
7	I-7-2 مكونات البطيخ
7	I-7-3 دورة التنمية
8	I-7-4 الإنتاج العالمي
9	I-8 استخدام البطيخ في الطب التقليدي

الفصل الثاني

10	بعض منتجات الأيض الثانوي
11	II - نواتج الأيض في النباتات
12	II-1 تعريف منتجات الأيض الثانوي
12	II-2 المركبات الفينولية
13	II-2-1 المركبات غير الفلافونيدية
13	II-2-1-1 الأحماض الفينولية
14	أ - الأحماض C_6-C_1 : hydroxybenzoic
14	ب- الأحماض C_6-C_3 : hydroxycinnamics
15	II-2-1-2 $C_6-C_2-C_6$ Stilbenes
15	II-2-1-3 $(C_6-C_3)_n$ Lignins و $(C_6-C_3)_2$ Lignans
16	II-2-1-4 الكومارينات C_6-C_3 Coumarins والكزنونات $C_6-C_1-C_6$ Xanths
16	II-2-1-5 العفصيات : Tannins
17	II-2-2 الفلافونيدات : $C_6-C_3-C_6$
18	II-2-2-1 كيمياء الفلافونيدات :

20	3-II أظعمة غنية بالفلافونيدات
20	4-II الفوائد الطبية للفلافونيدات :
20	4-II 1- مضادات للأكسدة ومضادات للشيخوخة
21	4-II 2- أمراض القلب والأوعية الدموية
22	5-II الوقاية من الأشعة فوق بنفسجية
22	6-II الفعالية المضادة للمكروبات والفيروسات
22	7-II الإصطناع الحيوي للفلافونيدات
24	7-II أ - تثبيت مجموعات الهيدروكسيل
24	7-II ب - تثبيت مجموعات الميثيل
25	7-II ج - تثبيت جزيئات السكر
26	8 - II المركبات التربينية
27	1-8-II التربينات الأحادية
28	2-8-II السيسكوتربينات
28	3-8-II التربينات الثنائية
28	4-8-II التربينات الثلاثية
29	5-8-II الككريبيتاسينات (Cucurbitacins)
30	6-8-II التربينات الرباعية
31	9- II القلويدات: Alkaloids

الفصل الثالث

32	الدراسة النباتية والفعالية البيولوجية لأوراق الدلاع
33	1 - III المادة النباتية
33	2- III الإستخلاص

35	III 3- الفصل والتنقية
35	III 1-3- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC
35	III 4- التعيين البنيوي
35	III 1-4- مطيافية الأشعة فوق بنفسجية
36	III 1-1-4- طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي
37	III 2-1-4- طيف الإمتصاص بإستخدام الكواشف
37	III 2-4- طيف الرنين المغناطيسي النووي (NMR)
37	III 1-2-4- مطيافية الرنين المغناطيسي النووي (NMR) (^{13}C و ^1H)
37	III 5- الفعالية المضادة للأكسدة
37	III 1-5- تعريف الجذور الحرة
38	III 2-5- التأثير على الصحة البشرية
38	III 3-5- أنواع الجذور الحرة
38	أ- الجذور غير المستقرة
38	ب- الجذور الحرة المستقرة
39	III 3-5- متابعة حركية الجذور الحرة
39	III 4-5- تفاعلات الجذور الحرة :
40	III 5-5- الفيتامين C (Vit. C) و الفيتامين E (Vit. E)
40	III 6-5- مضادات الأكسدة الصناعية
41	III 7-5- تفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة
42	III 6- تقدير فعالية مضادات الأكسدة
43	III 1-6- اختبار الـ DPPH
43	III 2-6- اختبار FRAP
44	III 7- الفعالية المضادة للبكتيريا

44	III - 7- 1 تعريف البكتيريا
44	III - 7- 1 -أ- البكتيريا النافعة
45	III - 7- 1 -ب- البكتيريا الإنتهازية
45	III - 7- 1 -ج- البكتيريا الضارة
46	III - 7- 2 - إختبار الحساسية
46	III - 7- 3 - طريقة الانتشار على الأقراص في الوسط الصلب
46	III - 7- 3 - أ - تحضير الأقراص
46	III - 7- 3 - ب - تحضير المستخلصات النباتية
46	III - 7- 3 - ج - تحضير وسط الزرع
47	III - 7- 3 - د - طريقة الزرع والحضن
47	III - 7- 4 - طريقة القياس
48	III - 7- 5 - تحديد التركيز الأدنى للتثبيط (MIC)

الجانب التطبيقي

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

49	
50	IV- الدراسة الكيميائية لمستخلصات أوراق الدلاع
50	1-IV النقع و الإستخلاص
50	1-IV - أ- الإستخلاص بالكلوروفورم
50	1-IV - ب- الإستخلاص بأسيتات الإيثيل
50	1-IV - ج - الإستخلاص بالبوتانول
51	IV -2- فصل المركبات
51	IV -2- 1- تحضير العينة

51	IV-2-2- تحضير العمود و فصل مكونات المستخلص البوتانولي
51	IV-2-3- فصل مكونات الكسر 7
51	IV-2-4- تحديد بنية المركبات المعزولة
51	IV-2-4- أ- التحليل البنيوي للمركب P9
61	IV-2-4- ب- التحليل البنيوي للمركب P10
67	IV 6- نتائج التحليل بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC
69	IV 7- تقييم كمية الفينولات و الفلافونيدات الكلية
69	IV 7-1- تحديد الكمية الكلية للفينولات TPC (Total Phenolic Contents)
70	IV 7-2- تحديد الكمية الكلية للفلافونيدات TFC (Total Flavonoid Contents)
72	IV 8- الفعالية المضادة للبكتريا بطريقة الانتشار في وسط صلب
72	IV 8- أ - الطبقة الأولى من الوسط الزراعي
72	IV 8- ب- المعلق البكتيري
72	IV 8- ج - تحضر الطبقة الثانية من الوسط الزراعي
73	IV 8- د- تحديد MIC
75	IV 9- الفعالية المضادة للأكسدة :
75	IV 9-1- اختبار DPPH
77	IV 9-2- اختبار FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)
80	خاتمة
82	المراجع
91	الملحق

الملخص

هذا العمل هو دراسة كيميائية نباتية لأحد أصناف الفصيلة القرعية ألا وهو *Citrullus lanatus* أو ما يعرف بالبطيخ الأحمر (الدلاع). فبالإضافة إلى القيمة الغذائية التي تتمتع بها ثمار هذه النبتة فقد أثبت أن لها فوائد صحية جمة. معظم الأبحاث تناولت بالدراسة : اللب، القشور أو البذور. في حين أن الأوراق لم تحظ بالدراسة إلا نادرا، وهو ما دفع فضولنا إلى توجيه البحث نحو دراسة أوراق هذه النبتة.

إستخدمنا طرق كروماتوغرافية مختلفة لفصل مركبات المستخلص البوتانولي لأوراق الدلاع من عمود كروماتوغرافي للطبقة الرقيقة التحليلية والتحضيرية بإستخدام كلا من عديد الأמיד و هلام السيليس وكذلك كروماتوغرافيا الورق. إذ تمكنا من فصل العديد من المركبات. وقد تمكنا في الوقت الحاضر من تعيين بنية مركبين فينولين إيتيروزيديين جديدين لحد الساعة في المملكة النباتية وحددت بنيتهما الجزئية من خلال التوصيف الكامل بإستخدام طرق التحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي أحادي وثنائي الأبعاد (البروتون ^1H ، الكربون ^{13}C ، $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY ، HSQC و HMBC).

أجرينا تحليل كمي للبوليفينولات والفلافونيدات على ثلاثة مستخلصات : كلوروفورمي، أسيتات الإيثيل و البوتانولي لأوراق نبتة الدلاع وأظهر مستويات عالية من إجمالي البوليفينولات والفلافونيدات. كما تم تقييم قوة مضادات الأكسدة لنفس المستخلصات الثلاثة بإستخدام تقنيتي كسح الجذور الحرة DPPH و FRAP. ومن وجهة نظر بيولوجية فقد إختبرنا تلك المستخلصات حيث أظهرت فعالية جيدة.

الكلمات الدالة : *Citrullus lanatus* (الدلاع) ، الفينولات الإتروزيدية ، DPPH و FRAP

Abstract

This work is a phytochemical study of one of the species in the Cucurbitaceae family, *Citrullus lanatus* commonly known red watermelon. In addition to the nutritional value of the fruits, this plant have been found to provide important health benefits. Most research has studied : The pulp, rind or seeds. The leaves have rarely been studied, which prompted our curiosity to direct our research towards the study of the leaves of this plant.

We used various chromatographic methods to separate the compounds of the butanolic extract from the leaves. Analytical and preparative thin-layer chromatography, using both polyamide and silica gel, as well as paper chromatography. We were able to separate several compounds.

At present, we have identified two new phenolic glucosides compounds isolated for the first time in the plant kingdom and their molecular structures were determined by full characterisation using 1D and 2D NMR spectroscopy methods (^1H proton, ^{13}C carbon, $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY, HSQC and HMBC)

Quantitative analysis of polyphenols and flavonoids was performed on three extracts: chloroform, ethyl acetate and butanolic extracts of the leaves and showed high levels of total polyphenols and flavonoids. The antioxidant power of the same three extracts was also evaluated using DPPH and FRAP free radical scavenging techniques. From a biological point of view, the extracts were tested and showed good efficacy.

Keywords: *Citrullus lanatus*, phenolic glucosides compounds, DPPH and FRAP

Résumé

Ce travail est une étude phytochimique de l'une des espèces de la famille des cucurbitacées, *Citrullus lanatus*, communément appelé pastèque. En plus de la valeur nutritionnelle des fruits, cette plante a démontré qu'elle avait des effets bénéfiques importants sur la santé. La plupart des recherches ont étudié : La pulpe, l'écorce ou les graines. Les feuilles ont rarement été étudiées, ce qui a poussé notre curiosité à orienter nos recherches vers l'étude des feuilles de cette plante.

Nous avons utilisé différentes méthodes chromatographiques pour séparer les composés de l'extrait butanolique des feuilles à partir d'une colonne de chromatographie en couche mince préparative et analytique utilisant le gel polyamide et le gel de silice ainsi que la chromatographie sur papier. Nous avons pu séparer plusieurs composés. À l'heure actuelle, nous avons identifié deux composés phénoliques glucosidés isolés pour la première fois dans le règne végétal et leurs structures moléculaires ont été déterminées par caractérisation complète à l'aide de méthodes de spectroscopie NMR 1D et 2D (proton ^1H , carbone ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, HSQC et HMBC).

L'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes a été réalisée sur trois extraits : chloroforme, acétate d'éthyle et butanolique des feuilles et a montré des niveaux élevés de polyphénols totaux et de flavonoïdes. Le pouvoir antioxydant de ces trois mêmes extraits a également été évalué en utilisant les techniques de piégeage des radicaux libres DPPH et FRAP. D'un point de vue biologique, les extraits ont été testés et ont montré une bonne efficacité.

Mots-clés : *Citrullus lanatus*, composés phénoliques glucosidés, DPPH et FRAP

قائمة الاختصارات

ABTS	: 2,2' -azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate
AGE	:Acid Gallic Equivalent
ATCC	: American Type Culture Collection)
BAW	: n-BuOH AcOH water
BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: Butylated hydroxytoluene
CC	: column chromatography
CFU	: Colony Forming Unit
COSY	: COrrelation SpectroscopY
CP	:Paper chromatography
d	: doublet
dd	: doublet of doublet
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAPP	: dimethylallyl pyrophosphate
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DNA	:Deoxyribonucleic acid
DPPH	: diphenyl picrylhydrazyl
FAOSTAT	:Food and Agriculture Organization Statistics
FD	: Dilution Factor
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
GGPP	: Geranylgeranyl Pyrophosphate
GPP	: Gerany pyrophosphate
GPx	: Glutathion peroxidase
GSH	: Glutathione
HMBC	: Heteronuclear Multiple Band Coherence
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HPLC-DAD	: High-performance liquid chromatography with diode-array detection
HPTLC	: High Performance Thin Layer Chromatography
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	: Half-maximal inhibitory concentration
IPP	: Isopentenyl Pyrophosphat
J	: coupling constant

LDL	: Low Density Lipoproteins
MH	: Mueller Hinton
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration
NMR	: Nuclear magnetic resonance
ORAC	: oxygen radical absorbance capacity
PG	: propyl gallate
ROS	: reactive oxygen species
s	: singlet
SOD	: Superoxide dismutase
t	: triplet
TBHQ	: tert-butyl hydroquinone
TEAC	: Trolox equivalent antioxidant capacity
TFC	: Total Flavonoid Contents
TLC	: Thin Layer Chromatographie
TP ₃ M	: Triphenylmethyl
TPC	: Total Phenolic Content
TPTZ	: 2,4 , 6 -Tripyridyl-S-Triazine Ferrique
TRAP	: Total Radical Trapping Parameter
VEAC	: Vitamine E Equivalent Antioxydant Capacity
µgEQ	: micrigramme Equivalent

قائمة الأشكال

- الشكل 1 : مختلف أجزاء نبتة الدلاع : (أ) الثمرة. (ب) الورقة. (ج) الزهرة 7
- الشكل 2: موقع و مكان واستحلاب العينة 10
- الشكل 3: تصنيف المركبات الفينولية. 13
- الشكل 4: أمثلة لبعض أحماض hydroxybenzoïque 14
- الشكل 5: أمثلة لبعض أحماض hydroxycinnamics 14
- الشكل 6: أمثلة لمركبات Stilbenes 15
- الشكل 7 : أمثلة لمركبات الـ Lignans : (1) matairesinol و (2) secoisolariciresinol 15
- الشكل 8: كحول الـ monolignols 16
- الشكل 9: أمثلة على الكومارينات 16
- الشكل 10: أنواع التانينات : (أ) القابلة للتحلل. (ب) المكثفة 17
- الشكل 11: البنية الأساسية للفلافونيدات 18
- الشكل 12: تماكب الشالكون-الفلافانون 18
- الشكل 13 : كيفية تفاعل الجذور الحرة 21
- الشكل 14: الاصطناع الحيوي للفلافونيدات 23
- الشكل 15: الهيدروكسيل في المواقع 3،5،7،3' و 4' 24
- الشكل 16: تثبيت مجموعات الميثيل O-methylation 25
- الشكل 17 : تثبيت مجموعات الميثيل C-methylation 25

25	الشكل 18 : تثبيت جزيئات السكر O-glycosylation
26	الشكل 19: تثبيت مجموعات السكريات C-glycosylation
26	الشكل 20 : وحدة الـ isopren
27	الشكل 21: بنية الوحدات IPP و DMAPP
27	الشكل 22: تشكل الـ Gerany pyrophosphate (GPP)
28	الشكل 23 squalene
29	الشكل 24 بنية cucurbitane
30	الشكل 25: أمثلة من الكيكريتاسينات
31	الشكل 26: أمثلة لبعض التربينات الرباعية
31	الشكل 27 :النيكوتين
34	الشكل 28 طريقة الإستخلاص من أوراق الدلاع
36	الشكل 29: منطقة إمتصاص benzoyl و cinnamoyl
39	الشكل 30: التراكيب المترافقة لجذر DPPH
40	الشكل 31: تفاعل الإنزيمات مع الجذور الحرة
40	الشكل 32 : تفاعل الفيتامين C و E مع الجذور الحرة
41	الشكل 33: <u>مضادات الأكسدة المستعملة في الصناعة الغذائية</u>
41	الشكل 34: <u>بنية الطوكوفيرولات</u>
42	الشكل 35: تفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة

43	الشكل 36 تفاعل الجذور الحرة.....
52	الشكل 37 : طيف إمتصاص الأشعة UV للمركب P9
54	الشكل 38 : طيف ^{13}C NMR للمركب P9
55	الشكل 39 : طيف DEPT للمركب P9
55	الشكل 40 : طيف البروتون ^1H NMR للمركب P9
56	الشكل 41 : طيف HSQC للمركب P9
56	الشكل 42 : طيف COSY للمركب P9
57	الشكل 43 : طيف HMBC للمركب P9
59	الشكل 44 : التفاعلات وفق HMBC في المركب P9
61	الشكل 45 : طيفي البروتون للمركبين P9 و P10
62	الشكل 46 : طيف البروتون ^1H NMR للمركب P10
62	الشكل 47 : طيف ^{13}C NMR للمركب P10
63	الشكل 48 : طيف DEPT للمركب P10
63	الشكل 49 : طيف HSQC للمركب P10
64	الشكل 50 : طيف HMBC للمركب P10
64	الشكل 51 : طيف COSY للمركب P10
69	الشكل 52 : كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص الأسيتات لأوراق الدلاع
69	الشكل 53 : المنحنى القياسي لحمض الغاليك.....

- الشكل 54 : المنحنى القياسي لـ Quercetine 71
- الشكل 55 : إختبار DPPH لـ (أ) : حمض الأسكوربيك (VC) و (ب) الطوكوفيرول (VE) 76
- الشكل 56 : إختبار DPPH لمستخلص : (أ) الكلوروفورم ، (ب) أسيتات الإيثيل و (ج) البيتانول 76
- الشكل 57 : إختبار FRAP لـ (أ) : حمض الأسكوربيك (VC) و (ب) الطوكوفيرول (VE) 78
- الشكل 58 : إختبار FRAP لمستخلص : (أ) الكلوروفورم ، (ب) أسيتات الإيثيل و (ج) البوتانول 79

قائمة الجداول

- الجدول 1: الخمس دول الأولى في إنتاج الدلاع (FAOSTAT) 2021/2017 9
- الجدول 2: إستعمال النيتة في الطب التقليدي..... 9
- الجدول 3: فعالية مستخلصات النيتة 10
- الجدول 4: أهم المركبات الفينولية..... 19
- الجدول 5 : تواجد الفلافونيدات في الأغذية..... 20
- الجدول 6: تصنيف التربينات على حسب عدد الوحدات من IPP 27
- الجدول 7 أنواع البكتيريا..... 45
- الجدول 8 : القياسات 47
- الجدول 9 : الإزاحات الكيميائية لذرات H و C..... 66
- الجدول 10 : بعض المركبات المتواجدة في مستخلصات أوراق الدلاع..... 68
- الجدول 11 : الفينولات الكلية للمستخلصات 70
- الجدول 12 : الفلافونيدات الكلية للمستخلصات 71
- الجدول 13 : قطرالتشبيط ب (مم) للمستخلصات : الكلوفورمي (C) ، أسيتات الإيثيل (A) و البوتانولي (B)..... 73
- الجدول 14: قيم MIC ب (mg/l) لمستخلصات أوراق الدلاع..... 74
- الجدول 15 : IC₅₀ للمستخلصات الثلاثة..... 76
- الجدول 16 : نتائج إختبار FRAP للمستخلصات وحمض الأسكوربيك..... 78

المقدمة

يعتمد الإنسان من قديم الزمان على الطبيعة. فهي مصدر للغذاء والملبس والمأوى. كما استغل النباتات والأعشاب المتواجدة في محيطه المعيشي في علاج عدد كبير من الأمراض. فأستطاع أن يستلهم من خلال التجربة والتقاليد المتوارثة أن يتداوى بهذه الأعشاب. ومع مر السنين يسعى الإنسان إلى إستبدال الأعشاب الطبيعية بمركبات إصطناعية. إلا أنه تبين بعد حين أن لهذه المركبات تأثيرات سلبية على الصحة. فقد أصبحت، مقاومة الأدوية بالإضافة إلى التسبب في الحساسية تجاه هذه المركبات، تمثل مشكلة حقيقية.

وهذا ما دفع الكثيرين إلى التوجه للطب البديل. وقد بينت إحصائيات قامت بها منظمة الصحة العالمية في 2013 ان هناك طلب كبير على ممارسي العلاج الطبيعي في جميع انحاء العالم . ففي أستراليا تم تسجيل 750 000 زيارة في فترة أسبوعين. أما في الصين فبلغ عدد زيارات الطب الصيني التقليدي 907 مليون زيارة عام 2009 وهو ما يمثل % 18 من جميع الزيارات الطبية. وبلغ عدد المرضى الذين يرددون في مؤسسات الطب الصيني التقليدي 13,6 مليون مريض وهو ما يمثل %16 من الإجمالي في جميع المستشفيات التي شملها المسح. كما أن في المملكة العربية السعودية يدفع الأفراد 560 دولارا أمريكيا سنويا مقابل خدمات الطب التقليدي والرعاية الصحية التقليدية [1].

وقد لقي هذا لإقبال محفزا كبيرا عندما أكدت نتائج الأبحاث و الدراسات العلمية حول النباتات مدى غنى هذه الأخيرة بآلاف من المركبات الكيميائية المفيدة للصحة البشرية.

فالنباتات هي من مُنتجات الأيض الثانوي والذي تُعرف مركباته بالخاصية العلاجية . فقد تم ربط الخصائص العلاجية مثل مضادات الملاريا والمسكنات ومضادات التشنج بالقلويدات. كما أن للترينينات خصائص مضادة للبكتيريا ومضادة للسرطان والإلتهابات ومضادة للفيروسات. ومن المعروف أيضا أن للفينولات والفلافونيدات خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للحساسية وللبيكتيريا. [2]

لا تقتصر الفوائد الصحية على الأعشاب الطبية بل تتعدى إلى النباتات الأكلية أيضا . وفي هذا السياق يندرج العمل البحثي الحالي. والهدف هو إثبات أن المركبات الكيميائية متواجدة في ثمار وكذا أوراق النباتات الأكلية. وقد وقع إختيارنا على نبتة واسعة الإستهلاك ألا وهي : البطيخ الأحمر (الدلاع) أو ما يعرف علميا باسم *Citrullu lanatus* وهي من الفصيلة القرعية.

وقد تضمنت هذه الرسالة جانبين. أحدهما نظري والآخر تطبيقي. قسمنا الجانب النظري إلى ثلاثة فصول. ففي الفصل الأول قدمنا تعريفا عن النبتة المدروسة من حيث التصنيف والأبحاث السابقة كما تطرقنا إلى دراسة شاملة للفصيلة القرعية. في الفصل الثاني قمنا بعرض عموميات عن منتجات الأيض الثانوي وفوائدها. أما الفصل الثالث فخصص للدراسة النباتية وكذا الفعالية البيولوجية أين إستعرضنا مختلف الطرق التي تمكننا من : إستخلاص المركبات، تحديد المحتوى الكلي للفينولات والفلافونيدات، دراسة الفعالية البيولوجية ، القدرة المضادة للأكسدة وكذلك تعيين البنى الجزيئية.

أما الجانب التطبيقي فهو مكون من فصل واحد، النتائج والمناقشة، إستعرضنا فيه نتائج مختلف الإختبارات التي اجريت على المستخلصات الثلاثة (الكلوروفورمي، اسيتات الإيثيل و البوتانولي). كما قمنا بدراسة بنوية للمركبين اللذين تم فصلهما من المستخلص البوتانولي. وفي الأخير خاتمة تلخص محتوى الرسالة.

الجانب النظري

الفصل الأول

الدراسة النظرية النباتية



I - عموميات

العديد من أشجار الغذاء لها استخدامات متعددة الأغراض ومنتجاتها الكيميائية القائمة على النبات تلي أغراضًا غير غذائية متنوعة.

فقد بينت الأبحاث السالفة في هذا المجال. أن القيمة العلاجية (الطبية) للنباتات ترجع للمركبات الكيميائية المتواجدة فيها (خاصة الأيض الثانوي). والتي تؤثر بشكل فعال على جسم الإنسان. ويمكن حصر هذه المركبات في القلويدات، الفينولات، التربينات، الصبغيات [3]

يمكن للنبات إنتاج العديد من المركبات الكيميائية و التي لها آثار مفيدة على صحة الإنسان بحيث يمكنها علاج الكثير من الأمراض بشكل فعال. في الوقت الحاضر، يتم استخدام عدد كبير من المركبات المشتقة من النباتات في الطب الحديث. من بين 25 من المركبات الصيدلانية التي تباع في جميع أنحاء العالم، يأتي 12 مركبًا من المنتجات الطبيعية. ولكن حتى الآن، 10% فقط (من أصل 250 000 نوع نباتي تم جردها) كانت موضع بحث في الجزينات النشطة بيولوجيًا [4]. ويفضل دراسة تقصي الاستخدامات البشرية التقليدية للنباتات والذي يعرف بعلم Ethnobotany، ويعتبر هذا العلم الطريقة المثلى لاكتشاف أدوية جديدة. حدد الباحثون في عام 2001 أن 122 مركبًا يستخدم في الطب الحديث، عزلت وحددت من مصادر نباتية. وتدخل هذه المركبات في تكوين حوالي 80% من العقاقير الحالية. وترتكز المنتجات الصيدلانية بشكل كبير على هذه المركبات. وقد لوحظ هذا في الطب التقليدي كإستعمال الأفيون للتداوي [5-6].

يستخدم سكان البلدان الآسيوية والأفريقية في العهود الأخيرة الأدوية العشبية لبعض جوانب الرعاية الصحية الأولية [7]. ومما ورد في الدراسات التي أجريت في البلدان الأوروبية وكذا في الولايات المتحدة والتي بينت أن للنباتات فعالية عالية في المجال الطبي. فمثلا استخدم حمض الصفصاف المسخوج من لحاء شجرة الصفصاف منذ آلاف السنين باعتباره مسكن فعال وخافض للحرارة. و ذلك لحتواه العالي من methyl salicylate وهو المستقلب النشط للأسبرين [8-9].

يعتمد البحث عن أدوية جديدة اعتمادًا كبيرًا على النباتات إذ أن أكثر من 50% من الأدوية الموصوفة إشتقت من مواد كيميائية وقد حددت لأول مرة في النباتات [10].

وتتميز العديد من الفصائل النباتية بكونها مفيدة لحياة الإنسان وباقي الكائنات الحية. وفي بحثنا هذا سنتناول إحدى هذه الفصائل الأوهي الفصيلة القرعية.

I-1 الفصيلة القرعية :

إن للقرعيات أهمية غذائية و علاجية مميزة حيث تكمن القيمة الغذائية في ثمارها الأكل (خيار، كوسى، يقطين، بطيخ...) أما ثمارها غير الأكل تستعمل عادة في العلاجات الشعبية، (كمخفضات للسكر، مسهلات...)، إلا أن هذه الأخيرة قد تكون سببا في عدة تسممات كما هو الحال مع الحنظل *Citrullus colocynthis* [11]

I-2 تصنيف النباتات القرعية :

تصنف نبات هذه الفصيلة تحت إسم القرعيات (Cucurbitaceae) وهي نباتات حولية وتنقسم إلى نوعين . فمنها الأكل مثل القثاء، البطيخ (الأحمر والأصفر)، الكوسة، القرع. والخيار. أما النوع غير أكل كالحنضل مثلا.

I-3 الوصف النباتي لفصيلة القرعيات :

Kingdom : planta	المملكة: النباتات
Division :Mognoliophyta	الشعبة: كاسيات البذور
Class : Mognoliopsida	الصف: ذوات الفلقتين
Order :Cucurbitales	الرتبة: القرعيات
Family : Cucurbitaceae	الفصيلة: القرعية

تشمل رتبة القرعيات فصيلة واحدة تدعى بالقرعية، تضم حوالي 120 جنس وأكثر من 900 نوع منتشرة في جميع القارات في المناطق ذات المناخ شبه الاستوائي والاستوائي. إن فصيلة Cucurbitaceae ينتمي إلى ترتيب الزهور الأرجواني. ينقسم إلى فصيلتين فرعيتين Zanonidoids و Cucurbitoids [12] ومن أشهر أجناسها *Cucurbita*، *Cucumis*، *Citrullus*، *Luffa*، *Bryonia*، *Lagenaria*. وتتميز أعشاب هذه الفصيلة بكونها حولية أو معمرة، زاحفة أو متسلقة معتمدة على محاليق ملتوية. أما سيقانها فهي طويلة وغالبا ما تكون خماسية المقاطع.

الأوراق: متبادلة راحية مفصصة ولها أعناق طويلة عديمة الأذينات وتكسو سيقانها و أوراقها أوبارا.

الأزهار: وحيدة الجنس و تخرج الأزهار من إباط الأوراق، والزهرة منتظمة علوية، والنبات أحادي أو ثنائي المسكن.

البذور: عديمة السويداء و جنينها مستقيم ومصطح [13].

I-4 الوصف النباتي لجنس *Cucurbita* L.

تتفق السجلات الأثرية والتاريخية على أن جنس *Cucurbita* L. (القرع والاسكواش وبعض القرع) موطنها الأمريكتان وقد إنتشرت عبر القارات الأخرى من قبل المسافرين عبر المحيطات في مطلع القرن السادس عشر [14]. يشمل هذا الجنس حوالي اثني عشر نوعا تعرف كلها بالكوسى ويمتاز هذا الجنس بأعشاب خشنة تنمو بسرعة، وبأزهار صفراء كبيرة، أغصان مشقوقة أو متفرعة، أوراق متبادلة راحية. ومن أشهر أنواع هذا الجنس في الجزائر *C. pepo* L. المعروف محليا بإسم الجربوات. وهو عبارة عن نبات عشبي حولي يملك ساقا زاوية يصل طولها إلى 10 سم ويحمل أوراقا كبيرة خماسية الشكل و متبادلة راحية و سويقات طويلة وأغصان متفرعة، أحادي المسكن و ذو أزهار كبيرة صفراء و ثماره لحمية غير متفتحة ومتطاولة يصل طولها أحيانا إلى 40 سم واللبن كثيف، اسفنجي، وبه عدد من البذور البيضاء المستوية متوضعة على المحيط الداخلي للثمرة.

I-5 الوصف النباتي لجنس *Cucumis*

يضم حوالي 60 نوعا ينتشر أغلبها في المناطق الجافة الأفريقية، تتميز بأغصان غير متفرعة وأزهار كبيرة صفراء ذات خمسة بتلات ومن أشهر أنواعه الخيار (*Cucumis sativus* L.)، البطيخ الأصفر (*C. melo*) والشمام (*C. melo* L.). يكتسب الخيار شعبية كبيرة من ضمن محاصيل الخضر وقد يصل طول جذور النبتة إلى 120 سم و تغطي سيقانها شعيرات خشنة. [15]. أما الأوراق فهي على شكل صليب بخمسة فصوص، ويكون الفص العلوي مذببا يشكل زاوية حادة في قمته. ويزرع في البيوت المحمية. وتتخذ ثمارها شكلا إسطوانيا ولونا أخضرا غامقا من الخارج و أخضرا فاتحا من الداخل [16].

I-6 الوصف النباتي لجنس *Lagenaria*

يشمل حوالي خمسة أنواع فقط منتشرة في المناطق الإستوائية في إفريقيا. أحد أنواعه يدعى *L. siceraria* L. المعروف محليا بالقرعة. وهو نبات عشبي، حولي، متسلق، يتراوح طول ساقه من 8 إلى 10 م، وحيد المسكن، وفي أباط أوراقه العريضة الراحية أزهار بيضاء، والثمرة لها شكل القنينة ذات لب لحمي كثيف في مركزه بذور مستوية بيضاء، بيضاوية الشكل يصل طولها حوالي 9 مم [17].

I-7 الوصف النباتي لجنس *Citrullus*

ويعد البطيخ من أهم محاصيل هذه الجنس والذي عرف بعدة أسماء علمية فضلا عن التسميات المحلية إلى أن إستقرت في النهاية على *Citrullus vulgaris* ثم *Citrullus lanatus* [18]. فالجزء الأول من الإسم " *Citrullus* " يرجع للكلمة الإغريقية "citrus" وذلك نسبة للثمار، أما الجزء الثاني " *Lanatus* " فهو لاتيني ويعني صوفي في إشارة إلى الشعيرات التي تكسو السيقان والأوراق [19]. وقد عرف في جميع أنحاء العالم بعدة أسماء مثلا : Citronmelon أو watermelon بالإنجليزية ، Melon d'eau أو pastèques بالفرنسية ، Tarabooz بالهندية ، Wassermelone بالألمانية و بطيخ بالعربية.

I-7-1 أصل توطين البطيخ :

تعد المناطق الوسطى لإفريقيا الموطن الأصلي للبطيخ. ربما تم تدجينها في مصر وغرب آسيا حوالي عام 2000 قبل الميلاد وكما أنها عرفت في وقت مبكر جدا في آسيا الوسطى [20]. و يجب البطيخ المناطق الرملية الجافة والجو الحار. ولا ينمو في البرية إلا أحيانا يعد البطيخ من أهم الفواكه الصيفية بامتياز وذلك لما تتمتع به ثماره من مذاق حلو ، منعش و مزيل للعطش. بذور هذا النبات ذات لون بني باهت أو أسود أو أحمر ، بيضاوي الشكل ، مسطح ، 9-12 × 5-7 مم. وهي حولية. أما جذورها فهي كثيرة الإنتشار متفرعة وسطحية. تمتد سيقانها الزاحفة، والتي تكسوها شعيرات وعليها محاليق متفرعة و يمكن أن يصل طولها إلى ثلاثة أمتار. الأوراق مفصصة مثلثة الشكل عموما. أما الأزهار فلونها أصفر ويصل قطرها إلى حوالي 2 سم. وهي وحيدة الجنس و توجد أحيانا في بعض الأصناف أزهار مذكرة وأزهار مؤنثة [21].

ونظرا لصعوبة معرفة الجنس يسعى المزارعون إلى وضع خلايا لتربية النحل في الحقول بغية المساعدة في عملية التلقيح. تكون ثمرة البطيخ عادة كروية إلى مستطيلة نوعا ما. إلا أنها تختلف من حيث لون القشرة حسب النوع. عند النضج يبلغ قطر الثمرة تقريبا ما بين 30 إلى 35 سم. في حين يبلغ وزن الثمرة في المتوسط ما بين 4 و 16 كلغ. وتحتاج هذه النباتات لعناية معتبرة. إذ تعثرها أمراض وحشرات ضارة [19].



(ج)



(ب)



(أ)

الشكل 1 : مختلف أجزاء نبتة الدلاع : (أ) الثمرة. (ب) الورقة. (ج) الزهرة

I - 7-2 مكونات البطيخ :

المكونات الغذائية الرئيسية للبطيخ هي السكريات و فيتامين A و C والمعادن مثل البوتاسيوم والحديد والكالسيوم. أكتسب البطيخ اهتماماً كبيراً لما يتمتع به من خصائص مضادة للأكسدة وذلك لإحتوائه على تركيز عالٍ من اللايكوبين (Lycopene)، وهو كاروتيني (Carotenoids). تتراوح تركيزات Lycopene من 23 إلى 72.0 ميكروغرام في غرام واحد من الوزن الطازج. [21-22]. يحتوي البطيخ على Citrulline ، وهو عنصر ضروري لتوليد L-arginine ذو الخصائص الشفائية. والذي أكتشف لأول مرة منذ أكثر من 70 عامًا من البطيخ *Citrullus vulgaris* الذي يأخذ اسمه [23]. البطيخ هو أكبر مصدر لـ Citrulline حيث يتراوح من 0.7 إلى 3.6 غ/كلغ .

I - 7-3 دورة التنمية :

يفضل البطيخ تربة ذات نسيج من الطمي الرملي ، مع درجة الحموضة 5.8 - 7.2 لكي تزهر و تنمو جيدا. كما يفضل البطيخ كثافة ضوئية عالية ودرجة حرارة مرتفعة. إجمالي طول الدورة الخضري هو 80 إلى 110 يوما حسب المناخ. يبدأ الحصاد في أوائل أبريل في المناطق الساخنة الصحراوية أما في المناطق الشمالية فيبدأ في أوائل يوليو.

ومن العلامات التي تدل على نضج الثمار نلاحظ ما يلي: نلاحظ أن المعلاق الذي يربط الثمرة بالنبته يبيس ويجف، الجهة الملامسة للأرض يكون لونها أبيض ويتحول عند إكتمال النضج إلى اللون الأصفر، ولمعرفة نضج الثمرة من عدمه يعتمد الكثير من الناس ، وبحكم الخبرة، إلى طرق الثمرة أو ضغطها بين راحتي اليد بحيث أن الثمرة الطازجة تصدر صوتا مكتوما وتمزق أنسجتها بخلاف الثمرة غير الناضجة [15].

I -7-4 الإنتاج العالمي :

بلغ الإنتاج العالمي للبطيخ لعام 2021 ، 162 648 256 طنا. أما في الجزائر فكان 2 075 874 طنا، محتلة بذلك المرتبة الأولى إفريقيا والسادسة عالميا. وفقاً لمنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO) أن أكبر خمسة منتجين للبطيخ في العالم هم الصين وتركيا وإيران والبرازيل والولايات المتحدة (الجدول 1). بالنسبة لولاية ورقلة تمتد المحاصيل الزراعية على مساحة 2088 هكتار، منها مساحة قدرها 1535 هكتار (73.5%) مخصصة لزراعة البطيخ ، أما الباقي منها فخصص لإنتاج الشامام والطماطم والفلفل والخيار والكوسة ... إلخ.

أدت التجربة "الناجحة" لإنتاج البطيخ في السنوات الأخيرة بولاية ورقلة إلى تمديد مساحة الإنتاج من 321 هكتار في الموسم 2017/2016 إلى 1535 هكتار في الموسم 2018/2017، ويتركز بشكل رئيسي في مناطق الطيبات ، بالناصر ، منقر وعويينة موسى (بلدية سيدي حويلد) ، وقد بلغ الحصاد 407499 قنطارا [24] على مساحة تفوق 645 هكتاراً في حين كان 192600 قنطارا خلال الموسم الأسبق [25]، بإجمالي متوسط العائد 600 قنطارا/هكتار [26].

الجدول 1: الخمس دول الأولى في إنتاج الدلاع (FAOSTAT) 2021/2017 [27]

المردود hg/ha	المساحة المزروعة بالهكتار ha	الإنتاج بالطن Tonnes	البلد
414 066	1 530 141	63 357 881,00	الصين
430905	1 415 941	60 438 008,23	
437 792	91 626	4 011 313,00	تركيا
475 499	72 949	3468717,00	
241 376	70 340	1 697 838,00	إيران
227 959	54 897	1251415,25	
224 119	103 204	2 312 993,00	البرازيل
233 020	91 922	2 141 970,00	
421 882	43 670	1 842 360,00	الولايات المتحدة
384 989	40 064	1528471,00	
329818	57 343	1891273,80	الجزائر
349107	59462	2075874,00	
30977064	4628634	164 307173,00	الإنتاج العالمي
35875657	4447490	162 648 256,00	

I - 8 استخدام البطيخ في الطب التقليدي :

بينت الدراسات المرجعية الإستعمالات العديدة لمختلف أجزاء نبتة الدلاع في الإستطباب الشعبي و الجدول 2 يلخص إستعمال

هذه النبتة في الطب التقليدي :

الجدول 2: إستعمال النبتة في الطب التقليدي

المرجع	طريقة العلاج	الفائدة العلاجية	الجزء المستعمل
[28-29]		طاردة للديدان - علاج إرتفاع الضغط الدموي - مدر للبول، منشط. علاج الروماتيزم و النقرس	البذور
[30-31]		ضعف الإنتصاب، التضخم الكبدي، اليرقان	زيت البذور
[28]	بكميات كبيرة يصبح مقبئاً	ملين ومقئ	الجذور
		التسمم الكحولي، داء السكري	القشور
[32]	تمزج مع الفراولة . التفاح، الخوخ و الخيار	أقنعة للبشرة الجافة	اللب
[33]		تصفية الكلى و ملين	
[34]	تخلط مع أوراق لنباتات أخرى	الصرع، الجنون والخرف	الأوراق

كما وجد أن للمستخلصات الكيميائية، للأجزاء النباتية في المحاليل المختلفة، فعالية معتبرة. و الجدول 3 يضم بعض الأبحاث الخاصة بفعاليات بعض مستخلصات نبتة البطيخ الأحمر.

الجدول 3: فعالية مستخلصات النبتة

الرجوع	الفعالية	المستخلص	الجزء المستعمل
[30]	مضاد للمكروبات، مضاد للفطريات	الكلوروفورمي ، خلات الإيثيلي الإيثانولي	الأوراق
[35]	مضاد للبكتيريا	الكلوروفورمي ، الميثانولي ، المائي	البذور
[36]	-مضاد للفيروسات	إيثير البترول، خلات الإيثيلي	الثمار
[37]	حماية الكبد		زيوت البذور
[38]	مضاد للتقرحات	الميثانولي	البذور
[39]	مضاد للسكري	الإيثانولي	قشور
[40]	ملين	المائي	لب الفاكهة
[41]	مضاد لتضخم البروستات	الميثانولي	البذور
[42]	مضاد للأكسدة	الكلوروفورمي، خلات الإيثيلي الميثانولي	البذور
[43]	مسكن	المائي	القشور
[44]	مضاد للإلتهابات	-	زيوت البذور

منطقة العينة النباتية : المحيط الفلاحي ببلدية حاسي بن عبد الله المنتمية لدائرة سيدي خويلد من ولاية ورقلة تم جني الأوراق من

المنطقة المذكورة في شهر أوت. وكانت الأوراق تخص نبتة الدلاع (*Citrullus lanatus var. crimson sweet*) من خارج البيوت



البلاستيكية.

الشكل 2: موقع و مكان واستجلاب العينة

الفصل الثاني

بعض منتجات الأيض الثانوي

II - نواتج الأيض في النباتات:

تعد عمليات الأيض Metabolism أساس تكوين المواد الكيميائية في الكائنات الحية وتتضمن عمليات البناء

(Anabolism) و الهدم (Catabolism) وتنتج الكائنات الحية نوعين من المركبات :

أ- المركبات الأساسية والتي تتواجد في كل الخلايا النباتية القادرة على الإنقسام و تسمى بمنتجات الأيض الأولي

(primary metabolits) مثل البروتينات والسكريات والأحماض الأمينية والأحماض الدهنية وغيرها وهذه المركبات تحافظ على إستمرار العمليات الفسيولوجية الأساسية التي تعد ضرورية لنمو وبقاء الكائنات الحية [13,45].

ب- منتجات الأيض الثانوي (secondary metabolits) وهي كل المركبات التي ينتجها الكائن الحي والتي

لا تشارك بشكل مباشر في العمليات الأساسية للخلية الحية، على عكس منتجات الأيض الأولي، ومن أهم هذه المنتجات

: القلويدات (Alkaloids) كـ Vasicine الموجود في نبات Adhatoda vasica و Atropine الموجود في

نبات *Atropa belladonna*. الكلايكوسيدات (Glycosides) مثل الـ Salicin الموجود في نبات *Salix*

purpurea و الـ Digitoxin الذي نجده في نبات *Digitalis purpurea* والـ Aloedine المتواجد في نبات

Aloe vera، التانينات (Tannins) مثل proanthocyanidin المتواجد في الزعرور البري، الراتنجات (Resins) مثل

راتنج Myrrh المتواجد في الأشجار من نوع *Commiphora myrrha* و التربينات (Terpens) مثل squalene

المستخرج من قصب السكر [46] وقد تناولت العديد من الأبحاث الوظائف الفيزيولوجية لمنتجات الأيض الثانوي وكذا

أهميتها للنبات. حيث تبين أن لها دور في : الدفاع ضد العوامل المسببة للأمراض، دفع الحيوانات المفترسة وكل الأسباب

المتعلقة بالبيئة المحيطة مثل درجة الحرارة، الأشعة فوق البنفسجية إلخ [47] كما يعتبر الأيض الثانوي محولا

للإشارات الخلوية. وبالتالي، حمض الساليسيليك هو الرسول المشارك في عملية المقاومة الجهازية المكتسبة في التبغ والخيار ،

بحيث تقوم الورقة المصابة بأحد العوامل المرضية بإرسال إشارة جزيئية إلى الورقة الصحيحة والتي تنشط -استجابة - آليات

الدفاع التي تمكنها من مقاومة العدوى [48] .

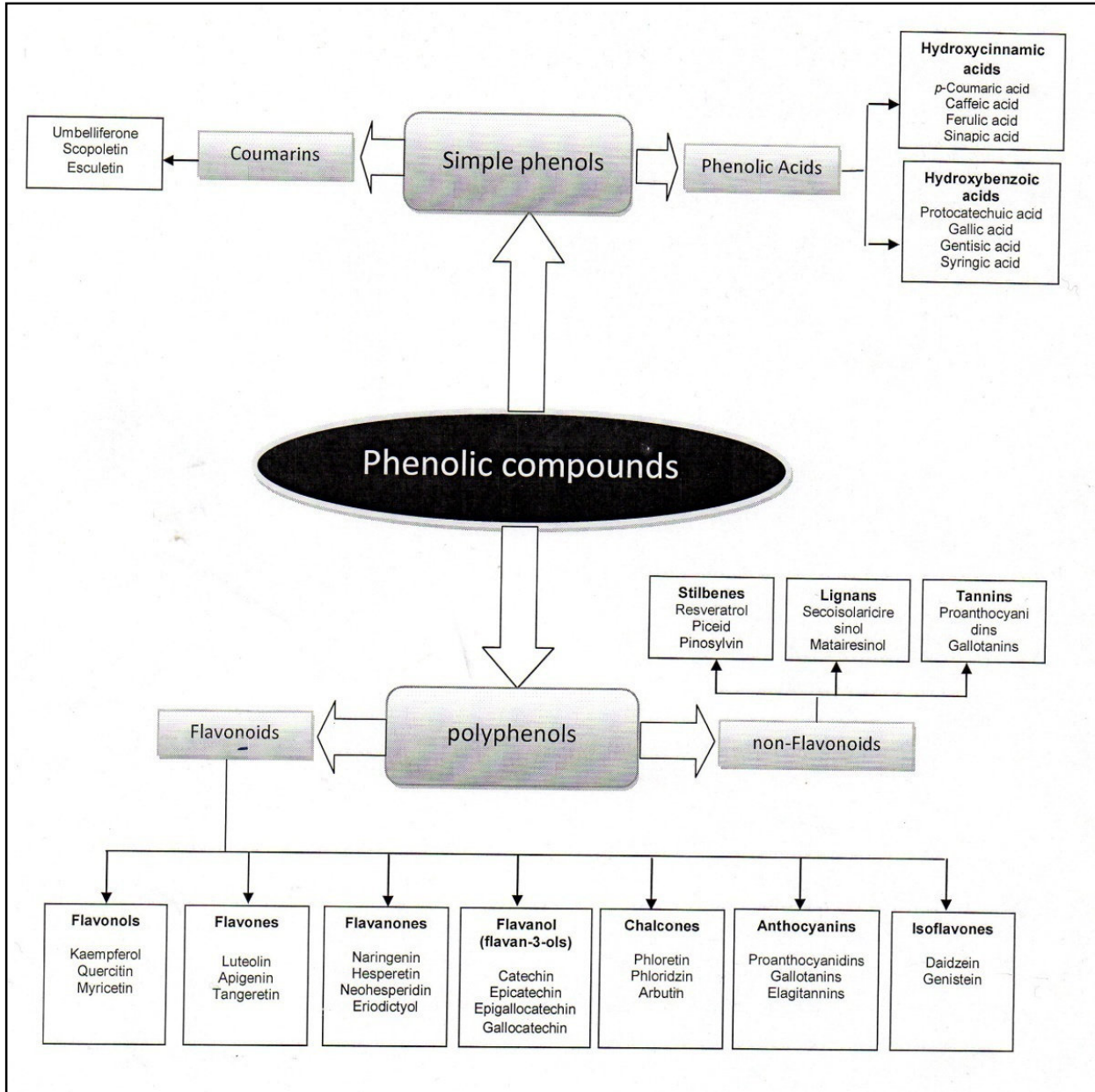
1-II تعريف منتجات الأيض الثانوي :

تتميز هذه المنتجات بتراكيزها المنخفضة في الأنسجة النباتية التي تحتزنها . وقد صنفت الآلاف من الجزئيات المختلفة إلى عائلات كيميائية وهي : المركبات الفينولية، التربينات و القلويدات.

2-II المركبات الفينولية :

تُعرف بأنها مركبات غير آزوتية ، تحتوي على حلقة بنزينية أو أكثر بما مجموعة هيدروكسي، تصنع حيويًا من حمض الشيكيميك (Shikimique) و/أو متعدد الخلات (Polyacetate) [49].

وتنقسم إلى نوعان : مركبات فلافونيدية والتي يكون الهيكل الأساسي من الشكل $C_6-C_3-C_6$ والنوع الثاني يضم المركبات غير الفلافونيدية . ويختلف هيكل هذه الأخيرة من الجزئيات البسيطة (الأحماض الفينولية البسيطة) إلى الجزئيات الأكثر بلمرة (التانينات المكثفة). يوضح الشكل 3 الفئات المختلفة للمركبات الفينولية.



الشكل 3: تصنيف المركبات الفينولية. مقتبس من [50]

II-2-1- المركبات غير الفلافونيدية :

II-2-1-1- الأحماض الفينولية :

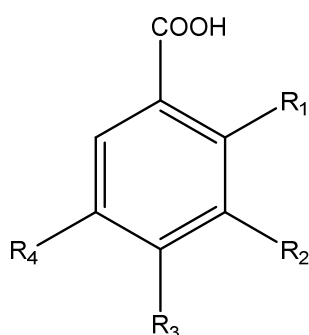
الأحماض الفينولية موجودة في جميع الفواكه والخضروات وتمثل حوالي ثلث إجمالي محتوى عديدات الفينول في النظام الغذائي.

[51] و تعتبر أحماض الفينول من أبسط أشكال المركبات الفينولية وتنقسم إلى مجموعتين رئيسيتين ، وهما أحماض هيدروكسي بنزويك

(hydroxybenzoic) التي تضم المركبات ذات الهيكل C_6-C_1 و أحماض هيدروكسي سيناميك (hydroxycinnamic) التي تضم المركبات ذات الهيكل C_6-C_3 [52].

أ - الأحماض C_6-C_1 : hydroxybenzoic

ومن بين هذه المركبات نجد salicylic acid و الذي يلعب دورا مهما في تنبيه الخلايا في حالة الإجهاد التأكسدي. كما تبين أن للأحماض الفانيليك والكافيين تتمتع بكونها مضادات الميكروبات و الفطريات [53]. تختلف السبع أصناف للأحماض عن بعضها على حسب المجموعات الهيدروكسيلية أو الميثيلية المرتبطة بالحلقة البنزينية (الشكل 4) [54].

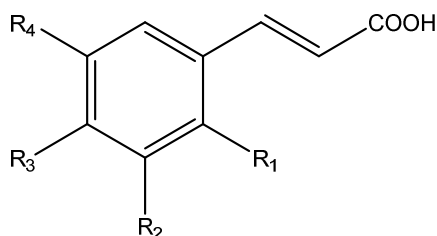


benzoic acids	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
p-hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H
Protocatechic acid	H	OH	OH	H
vanillic acid	H	OCH ₃	OH	H
gallic acid	H	OH	OH	OH
syringic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
salicylic acid	OH	H	H	H
gentisic acid	OH	H	H	OH

الشكل 4: أمثلة لبعض أحماض hydroxybenzoique

ب - الأحماض C_6-C_3 : hydroxycinnamics

وتأخذ الصيغة كما هو مبين في الشكل 5. بحيث يتكون الهيكل الأساسي والمشتق من حمض السيناميك (cinnamic) C_6-C_3 . وتتباين فعالية هذه المركبات على حسب عدد المستبدلات الهيدروكسيلية والميثيلية على الحلقة البنزينية. وأكثر هذه المركبات شيوعا هي الأحماض : p-coumaric ، cafeic و ferulic والتي تكون على شكل أسترات (الشكل 4) [55].

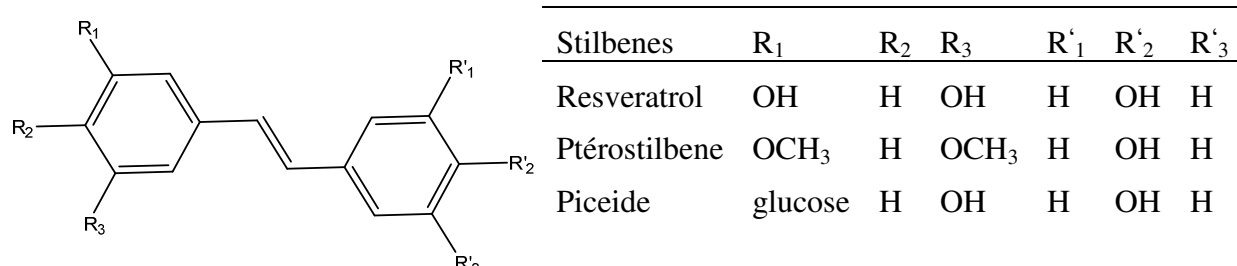


hydroxycinnamics acid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
p-coumaric acid	H	H	OH	H
cafeic acid	H	OH	OH	H
ferulic acid	H	OCH ₃	OH	H
sinapic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

الشكل 5: أمثلة لبعض أحماض hydroxycinnamics

C₆-C₂-C₆ Stilbenes 2-1-2-II

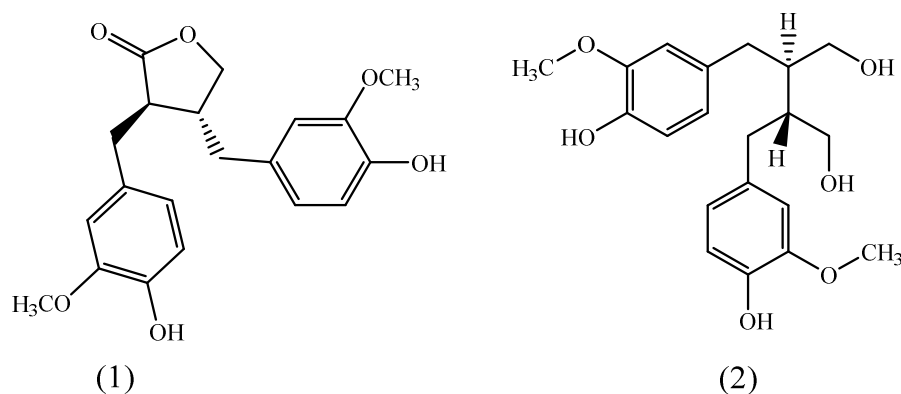
وهي عبارة عن فيتوألكتسينات (phytoalexins) بميكل قاعدي C₆-C₂-C₆ وهي مركبات تنتجها النباتات استجابة لمهاجمة مسببات الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية. وتتواجد بكميات قليلة في النباتات. وقد عرف الريسفيراترول (Resveratrol) بأنه يحمي من أمراض القلب والأوعية الدموية والسرطانات (الشكل 6) [56-57].



الشكل 6: أمثلة لمركبات Stilbenes

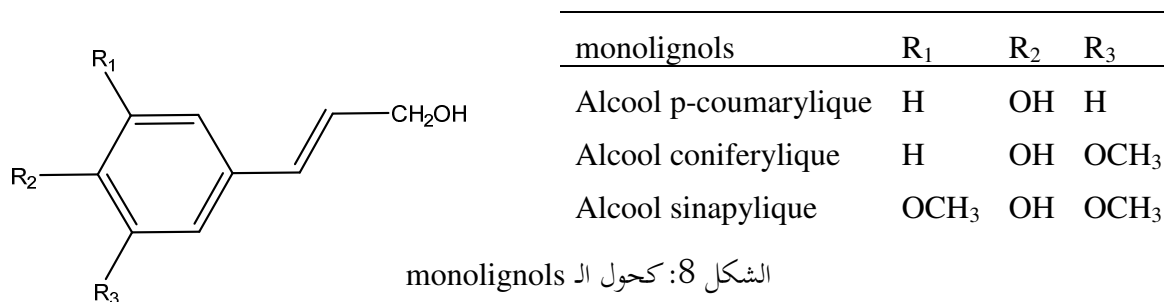
(C₆-C₃)_n Lignins و (C₆-C₃)₂ Lignans 3-1-2-II

تستجيب مركبات Lignans للتمثيل الهيكلي (C₆-C₃)₂. الوحدة (C₆-C₃) هي عبارة عن propylbenzene . فهي عبارة عن مركبات ثنائي الفينول (phenylpropanoids) بحيث ترتبط ببعضها بواسطة الكربون C8 من كل سلسلة بروبيل. (الشكل 7). و تلعب دورا دفاعيا عن النبات ضد الحشرات. أما بالنسبة للبشر فهي لها الفعالية على تقليل نسبة الإصابة ببعض أنواع السرطانات (الثدي، البروستاتا و القولون والمستقيم) [58-59].



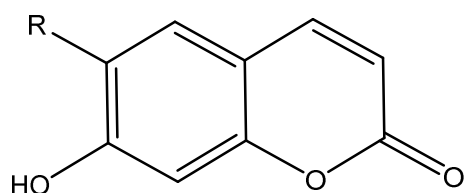
الشكل 7 : أمثلة لمركبات ال Lignans : (1) matairesinol و (2) secoisolariciresinol

تمثل مركبات الـ Lignins فئة مهمة من المنتجات الطبيعية للنبات وتشكل عن طريق البلمرة المؤكسدة لـ monolignols وهم الكحول: p-coumaric ، coniferic و sinapic. (الشكل 8) [26]. إن هذه المركبات هي من أهم المكونات للخشب.



II-2-1-4 الكومارينات C₆-C₃ Coumarins والكزنونات C₆-C₁-C₆ Xanthons

هي عبارة عن مركبات عطرية. فهي المسؤولة عن الرائحة الموجودة في الحشيش (الشكل 9). وهي مشتقة من أحماض هيدروكسي سيناميك بواسطة الحلقة الداخلية للسلسلة الجانبية. وتمتاز بخاصيتها المضادة للجراثيم، الفطريات، للتخثر، للالتهابات، للأورام، لمكافحة فيروس نقص المناعة البشرية HIV، إرتفاع ضغط الدم، عدم انتظام ضربات القلب. تنتشر الكومارينات بكثرة في المملكة النباتية وخاصة في الفصائل الخيمية والسذابية تنقسم إلى كومارينات بسيطة ومتعددة الحلقة في صورة حرة أو إيتيروزيدية [60].



Coumarine	R
Umbelliferol	H
Aesccultol	OH
Scopoletol	OCH ₃

الشكل 9: أمثلة على الكومارينات

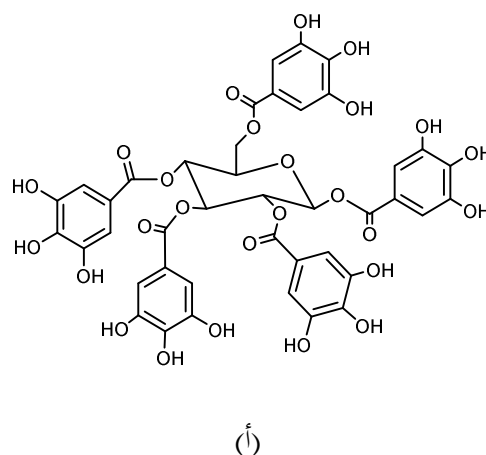
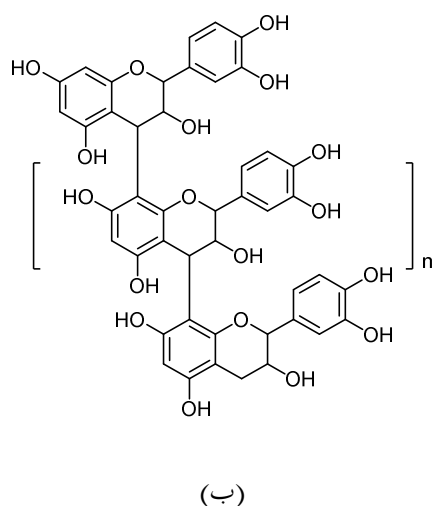
II-2-1-5 العفصيات : Tannins

هي عبارة عن مركبات عديدة الفينولات ذات وزن جزيئي كبير وتستخدم في الدباغة وذلك لقدرتها على الإتحاد مع البروتينات محولة بذلك الجلود الطرية للحيوانات إلى جلود غير قابلة للتعفن وللنفاذ. وتنقسم إلى قسمين :

أ- قابل للتحلل بالماء (hydrolyzable) : تتكون من نواة مركزية للسكريات التي ترتبط بها الأحماض الكربوكسيلية الفينولية برابطة استر. فهي استرات حمض الغاليك [61].

ب- التانينات المكثفة (condensed tannins) (المعرفة أيضًا باسم proanthocyanidins ، وبوليمرات مونومرات

polyhydroxyflavan-3-ol مرتبطة ببعضها البعض بواسطة رابطة كربون-كربون [61].



الشكل 10: أنواع التانينات : (أ) القابلة للتحلل. (ب) المكثفة

II-2-2 الفلافونيدات : C₆-C₃-C₆

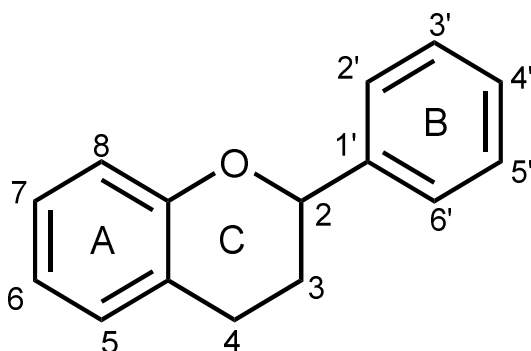
تتواجد الفلافونيدات في جل الأجزاء النباتية في صورة إيتيروزيدات بحيث تتخزن في الخلايا النباتية للزهور ، الأوراق ، السيقان والجذور. وتكون في معظم الأحيان مرفقة بالسكريات [62] بحيث ترتبط هذه الأخيرة بوحدة أو أكثر من الحلقات الفينولية. وتكون في أغلب الأحيان في المواقع 3 أو 7 (الشكل 11). والسكريات غالبا ما تكون D-glucose ، L-rhamnose ، galactose أو arabinose [63].

وقد أثبتت للمركبات الفلافونويدية فوائد صحية هامة، بما في ذلك خصائصها المضادة للالتهابات ومضادة للسرطان ومضادة

للحساسية. كما أن لها أيضًا فوائد لصحة القلب والأوعية الدموية ووظائف المخ وصحة الجلد. [64]

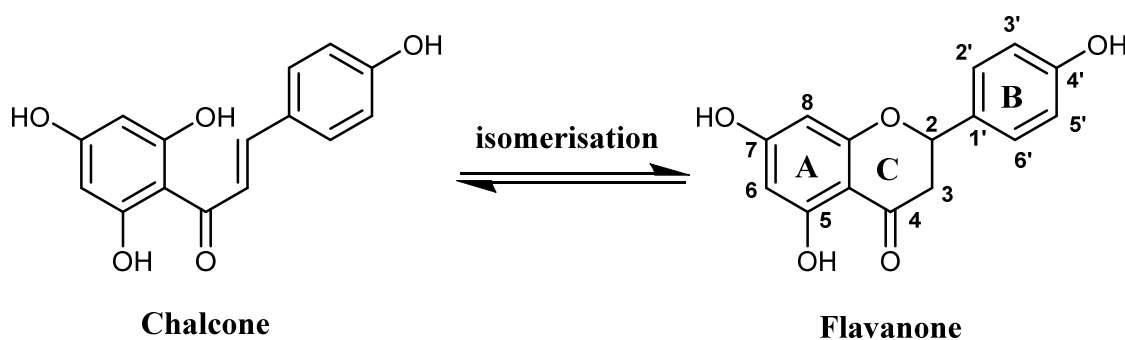
II-2-2-1 كيمياء الفلافونيدات :

هي مركبات ملونة، وهي أصل تسميتها باللاتينية flavonus والتي تعني أصفر، فهي المسؤولة عن لون الأزهار والثمار و حتى الأوراق في بعض الأحيان، تتكون البنية الأساسية للمركبات الفلافونيدية من 15 ذرة كربون بحلقتين بنزينيتين A و B مرتبطتين بسلسلة جانبية غير متجانسة مكونة من ثلاث ذرات كربون و ذرة أكسجين. وقد تكون مفتوحة او حلقية. وتبعاً لأكسدة هذه الأخيرة تتفرع الفلافونيدات [65].



الشكل 11: البنية الأساسية للفلافونيدات [66]

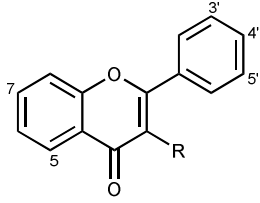
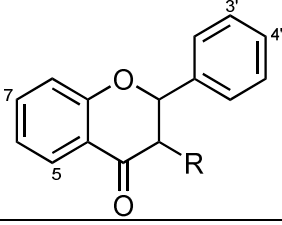
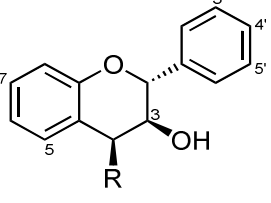
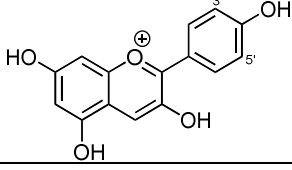
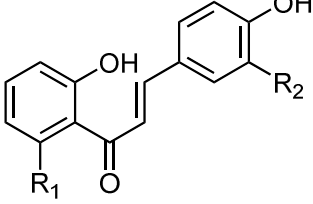
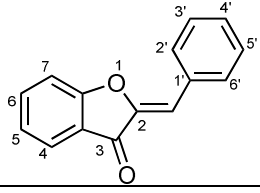
يتم تصنيع مختلف الفلافونيدات حيويًا بدءًا من الشالكون Chalcone. الشكل (12).



الشكل 12: تماكب الشالكون-الفلافانون

و الفلافونيدات متفرعة من الشالكون وعليه فإن جملها يحمل الوظيفة الهيدروكسيلية في المواقع C-5، C-7 و C-4' [67]. وقد أقرح مصطلح "فيتامين P" للفلافونويدات في أول إكتشاف لها سنة 1936 [68]. الجدول 4 يلخص أهم المركبات الفينولية.

الجدول 4: أهم المركبات الفينولية

بنية الفلافونويد	إسم الفلافونويد	R	أمثلة
	الفلا فون Flavones	H	OH (5,7,3',4') : luteoline OH (5,7,4') : apigenin chrysin OH (5,7) : chrysin
	والفلافونول : Flavonols	OH	OH (5,7,3',4') : quercetin OH (5,7,4') : kaempférol OH (5,7) : galangine OH (5,7,3',4',5') : myricetin
	الفلا فانون : Flavanones	H	OH (5,7,3') ; OCH ₃ (4') : hesperetin OH (5,7,4') : maringenin
	ثنائي هيدروفلافونول Dihydroflavonols	OH	OH (5,7,3',4') : taxifolin
	الفلافانول-3 : Flavan-3-ols	H	β OH(3); OH (5,7,3',4') : (+) -catechin
	وثنائي الفلافانول - 3,4 Flavan-3,4-diols	OH	α OH(3); OH (5,7,3',4') : (-) -epicatechin α OH(3); OH (5,7,3',4',5') : (-) -epigallocatechin
	الأنتوسيانيدين : Anthocyanidines		OH(3') : Cyanidin OH(3',5') : Delphinidin [69]
	الشالكون Chalcones		(R1=OH , R2=H) Isoliquiritigenin (R1= R2 =OH)Butein
	الأورون Aurones		OH(6,4',5') Sulfuretin OH (4,6,3',4') Aureusidine

II-3 أظعمة غنية بالفلافونيدات :

تتواجد المركبات الفلافونيدية في العديد من الأطعمة بنسب متفاوتة. الجدول 5 يظهر تواجد الفلافونيدات المختلفة في بعض

الأغذية. [70]

الجدول 5 : تواجد الفلافونيدات في الأغذية

نوع المركب الفلافونيدي	المصدر الغذائي
الفلافونول	البصل-اللفت-البروكلي-التفاح-الكرز-الشاي-النبذ الأحمر
الفلافون	البقدونس-الزعر
الفلافانول	الحمضيات
الكاتشين	التفاح-الشاي
الأنتيسيانيدين	الكرز-العنب
إيزوفلافون	فول الصويا-البقوليات

II-4 الفوائد الطبية للفلافونيدات :

تشير الدراسات الوبائية إلى وجود علاقة عكسية بين ارتفاع الإستهلاك الغذائي للفواكه والخضروات والعديد من الأمراض مثل

السرطان وأمراض القلب والأوعية الدموية [71-72]. وقد افترض أن الخضار والفواكه تحتوي على مركبات نشطة بيولوجيا لها تأثيرات وقائية ، بغض النظر عن العناصر الغذائية والمغذيات الدقيقة المعروفة.

وقد شهد نهاية القرن الماضي و منذ 1990 العديد من الدراسات في محاولة للربط بين تناول الفلافونيدات والأمراض

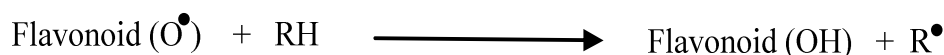
الوبائية.مثل أمراض القلب التاجية، السكتة القلبية ، السرطان إلخ [73].

II-4-1 مضادات للأوكسدة ومضادات للشيخوخة:

تعمل مضادات الأوكسدة على تحييد الإجهاد التأكسدي عن طريق تثبيط تكوين الجذور الحرة ، قاطعة بذلك أومثبطة

التفاعلات التسلسلية للأوكسدة الذاتية.

تتحد الجذور الفلافونيدية الناتجة فيما بينها مكونة الكينون المستقر. ويرجع هذا بسبب الجهد المنخفض للزوج مؤكسد ومرجع $0.23 < E < 0.75$ v فالفلافونيدات قادرة ترموديناميكيا على إختزال الجذور الحرة مثل alkoxyl, pyroxyl ، peroxide و hydroxyl radicals (و التي يتراوح جهد الزوج مؤكسد/مرجع بين $v(13 - 2)$) عن طريق فقد ذرة الهيدروجين الشكل (13) [74]



الشكل 13 : كيفية تفاعل الجذور الحرة

لا يخفى مدى خطورة الجذور الحرة والتي تنتج مثلا عن الأكسدة التلقائية للدهون: فأثناء الإجهاد التأكسدي تقوم الجذور الحرة، والخالية من أي سيطرة، بمهاجمة المواقع النشطة بيولوجيا مثل البروتينات، وبالتالي تغيير المستقبلات والإنزيمات الخلوية ولأحماض النووية (تعزير حدوث الطفرات كمصدر للسرطانات المختلفة) و الفلافونيدات كمضادات للأكسدة ، قادرة على تثبيط التسرطن وتقلل من انتشار الخلايا السرطانية [75] . وقد أظهرت الأبحاث أن مجموعة الكربونيل C-4 والرابطة المزدوجة بين C₂-C₃ في مركبات الفلافونويد مهمة للغاية بالنسبة لزيادة النشاط المضاد للأكسدة [76].

II-4-2 أمراض القلب والأوعية الدموية :

ارتبط تناول الطعام المحتوي على مركبات فلافونويدية مع انخفاض كبير في معدل الوفيات من أمراض القلب والأوعية الدموية. في الواقع ، أجريت دراسة في هولندا (دراسة Zulphen للمسنين) مع 805 من المسنين مما أظهر صحة العلاقة العكسية المذكورة آنفا بين تناول الفلافونيدات الغذائية (مثل الشاي ، البصل والتفاح) وأمراض القلب والأوعية الدموية [77]. وقد أشارت هذه الدراسات إلى درجة ما من الارتباط العكسي بين تناول الفلافونيدات و أمراض القلب التاجي المमित أو غير المमित وكذلك أمراض القلب ، مع انخفاض مخاطر الوفاة بنسبة تصل إلى 65%.

وقد أظهرت الدراسات بأن البصل يحتوي على مادة الريتين (Rutine) بنسب عالية جدا البصل (0.3 mg \ g وزن طازج) والتي تفوق نسبة تواجهه في التفاح (1 mg / g قشر التفاح الطازج). ويمتص الجسم هذه المادة والتي تبقى لمدة معتبرة. مما يعزز البلازما وبذلك تضاعف الخاصية المضادة للأكسدة لهذه الأخيرة. و بالمثل ، تم إجراء عدد من الدراسات الوبائية بحيث ربطت بين

الاستهلاك المتكرر للخضروات الصليبية مع انخفاض خطر الإصابة بالسرطان وقد أرجع الباحثون العامل المضاد للسرطان لخصائص الخضروات الصليبية للإرتفاع النسبي لمحتوى glucosinolate فيها [78].

II-5 الوقاية من الأشعة فوق بنفسجية:

تعد أشعة الشمس ضرورية لعملية التمثيل الضوئي إلا أن الأشعة فوق بنفسجية والتي تنقسم إلى ثلاث مجموعات. ولعل أخطرها تلك التي تخترق طبقة الأوزون والتي تعرف بـ UVB (280-320 nm) بحيث يمكن أن تخترق طبقة البشرة وتسبب تأثيرات بيولوجية ضارة لحياة النبات والإنسان [79-80].

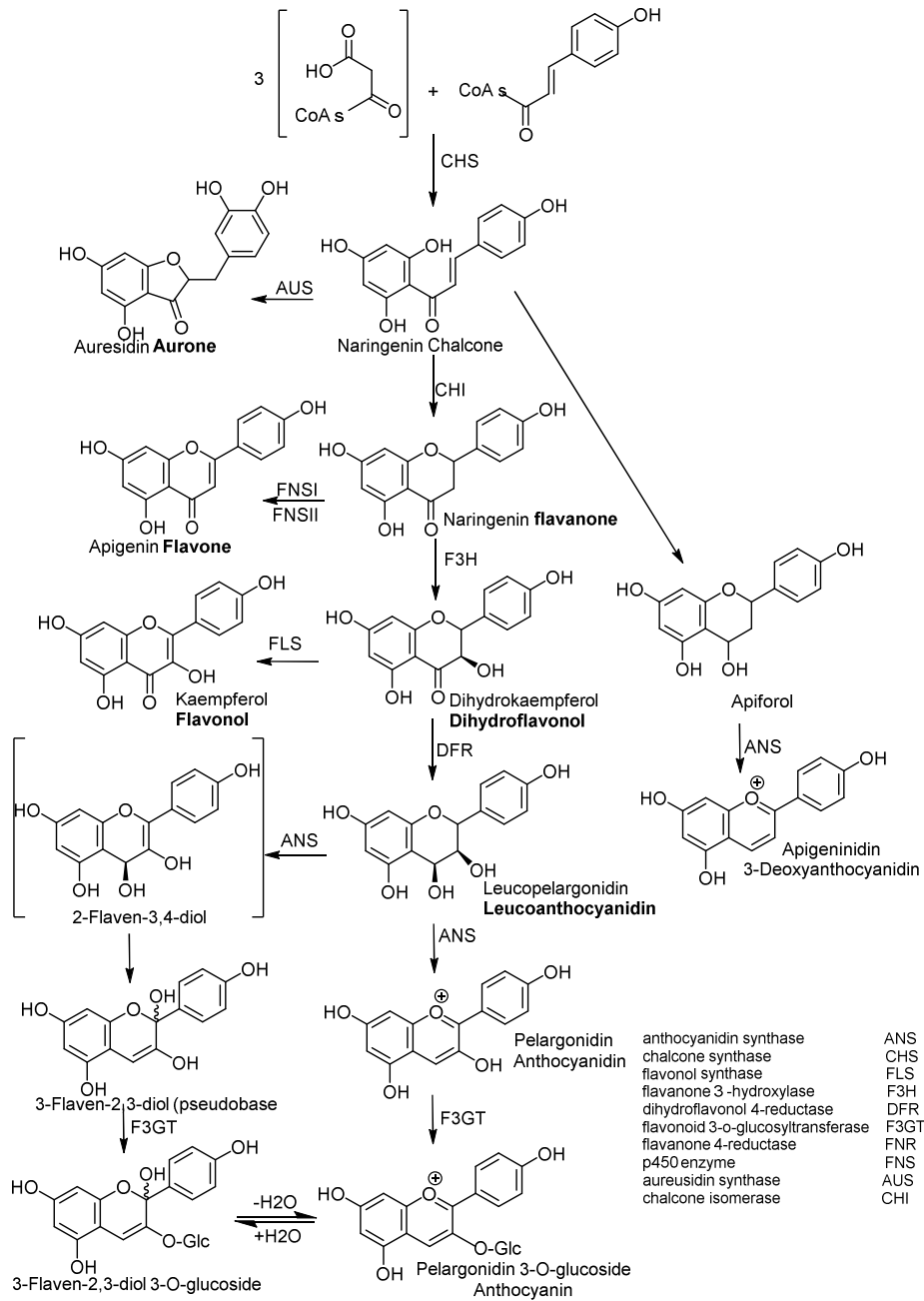
ولكي تحافظ النبتة على بقائها وتدفع عنها هذه الأشعة الضارة تنتج المركبات الفلافونويدية على مستوى الأوراق الخضراء. وتتراكم الفلافونويدات المتواجدة على مستوى الأوراق على شكل glucoside قابلة للذوبان في الماء. وتعمل المجموعات O-Me على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند طول الموجة الأقصر، (250 - 320 nm). وبالتالي تقوم بحماية أوراق النبات من الأشعة فوق البنفسجية [81]، فتعمل كمرشح للأشعة الضارة. وعليه فقد استعملت الأحماض الفينولية والفلافونويد في تركيبات التجميل والعناية بالبشرة عند التعرض للشمس [50].

II-6 الفعالية المضادة للمكروبات والفيروسات :

من المعروف أن المركبات الفلافونويدية يتم تصنيعها من طرف النباتات استجابة للعدوى الميكروبية. وقد أظهرت مخبرياً أن هذه المركبات جد فعالة ضد مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة. فقد تبين أن Quercetin مضاد ل: داء الكلب وشلل الأطفال، Rutin مضاد ل فيروس الإنفلونزا وفيروس نقص المناعة. [82].

II-7 الإصطناع الحيوي للفلافونويدات :

تبدأ عملية التصنيع الحيوي إنطلاقاً من Naringenin [83]. تتم عملية الإصطناع الحيوي عبر ثلاث مراحل. في المرحلة الأولى ويتم فيها تكوين الحلقة B والسلسلة الثلاثية C3 إنطلاقاً من الجلوكونات [84] والذي ينتج في البداية Ac.p-coumaric والذي يتحول بدوره، في وسط إنزيمي، إلى Ac.p-coumaroyl-CoA. المرحلة التالية وهي المرحلة الخاصة بتكوين الحلقة A وذلك بتكاثف 3 وحدات من Malonyl-CoA. وفي الأخير يتم تكوين نواة الشالكون Chalcone وذلك بتكاثف ثلاث وحدات من مالونيل كوتزيم (Malonyl-CoA) مع حمض P-coumaroyl-CoA الشكل 14 [85].



الشكل 14: الاصطناع الحيوي للفلافونيدات [86]

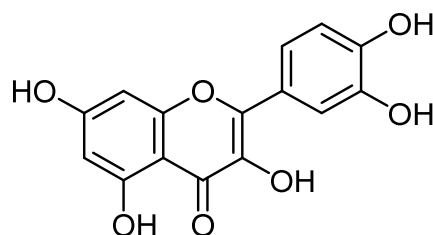
إعتمادا على المراحل الثلاثة السالفة الذكر وبعد تكوين naringenin الناتج من جراء تفاعل الشالكون مع الإنزيم

chalcone synthase . ال naringenin يعد النواة الأساسية تكوين كل من 4-diols، Flavan-3-ols و

procyanidins. ويتواصل الأمر بالنسبة للمركبات الفلافونويدية الأخرى من تثبيت المجاميع الهيدروكسيلية ، الميثيل ، الميثوكسي ، السكر...إلخ.

II - 7 - أ - تثبيت مجموعات الهيدروكسيل :

نظرا لطريقة تشكيلها تتوفر أغلب المركبات الفلافونيدية على مجموعات هيدروكسيلية أصلية في المواضع 5 ، 7 و 4'. في حين نادرا ما يكون الإستبدال لهذه المجموعات في المواقع 2' و 6'. الشكل 15.



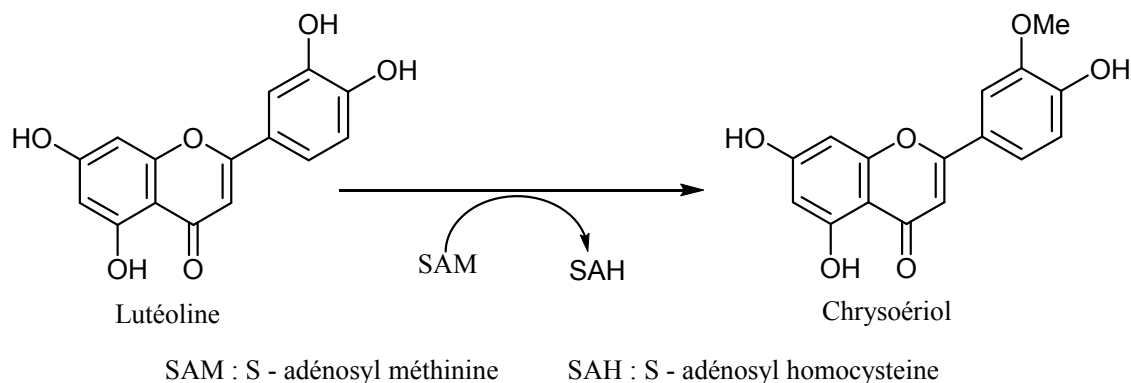
Quercetin

الشكل 15: الهيدروكسيل في المواقع 3،5،7،3' و 4'

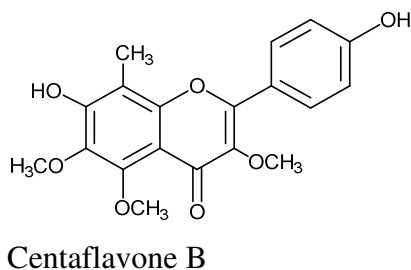
II - 7 - ب - تثبيت مجموعات الميثيل :

إنه مثيلة مجموعات OH ، الأصلية منها والإضافية وتكون على شكلين: C-methylation الشكل 17: وتتم هذه العملية في وجود أنزيمات [87] . وتكون الرابطة مباشرة بين كربون الميثيل وكربون من الحلقة A و/أو B الشكل . أو غير مباشرة عبر ذرة أكسجين

O-methylation الشكل 16



الشكل 16: تثبيت مجموعات الميثيل O-methylation



الشكل 17 : تثبيت مجموعات الميثيل C-methylation

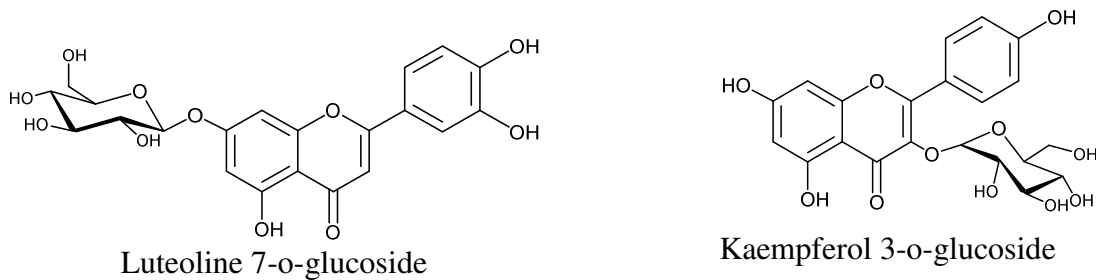
II - 7 - ج - تثبيت جزيئات السكر :

تماما مثل المجموعات الميثيلية نجد نوعين من طريقة تثبيت الجزيئات السكرية على الهيكل الفلافونويدي فنجد :

O-glycosylation : ويكون في المواقع الهيدروكسيلية بحيث تكون في الموضع 7 بالنسبة للفلافونوات والموقع 3 بالنسبة للفلافونولات.

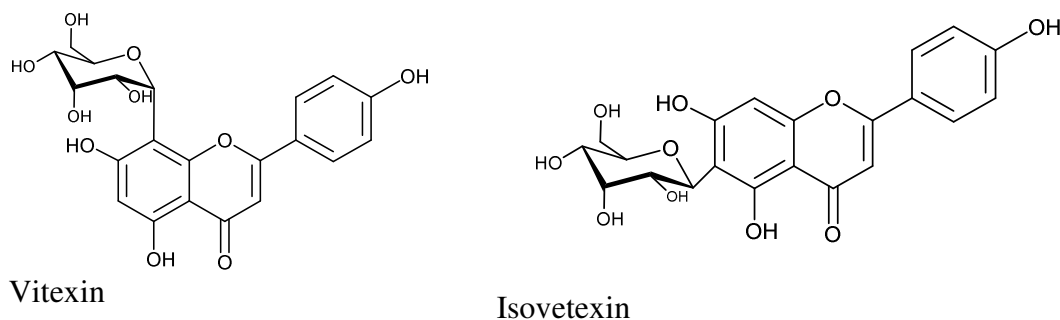
ويتم التفاعل بين OH المركب الفينولي و ال OH الكحولي للسكر. كما يمكن للسكر المرتبط بالفلافونويدي أن يرتبط بسكر آخر. وكل

هذه التفاعلات تتم في وجود أنزيمات "O -glucosyl transferase". الشكل 18.



الشكل 18 : تثبيت جزيئات السكر O-glycosylation

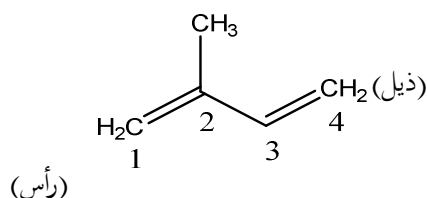
- C-glycosylation : وتتم الرابطة غالبا بين كربون السكر و أحد الموضعين 6 أو 8 للأجلكون.



الشكل 19: تثبيت مجموعات السكريات C-glycosylation

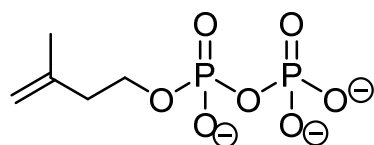
II - 8 المركبات التربينية :

التربينات من أهم منتجات الأيض الثانوي في المملكة النباتية، فهي مسؤولة عن نكهة ورائحة ولون النباتات وغالبًا ما تستخدم في صناعة العطور والعلاج في الطب التقليدي [88]. ترتكز الوحدة البنوية لهذه المركبات على (2-methyl buta-1,3-dien) (Isopren : C₅H₈) وتصنف هذه المركبات الهيدروكربونية على حسب عدد وحدات Isopren المكونة لها [89]. الشكل 20.

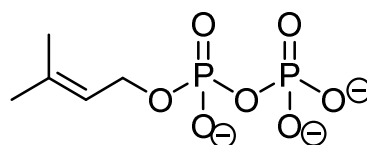


الشكل 20 : وحدة ال isopren

إلا أن الأبحاث المتوالية بينت أن المادة الأساسية لبناء التربينات في الكائنات الحية هي نتاج تكاثف (IPP) isopentenyl pyrophosphat مع مماكبه الـ (DMAPP) dimethylallyl pyrophosphate بطريقة متسلسلة بفعل إنزيمات تسمى prenyltransferases [88] الشكل 22.

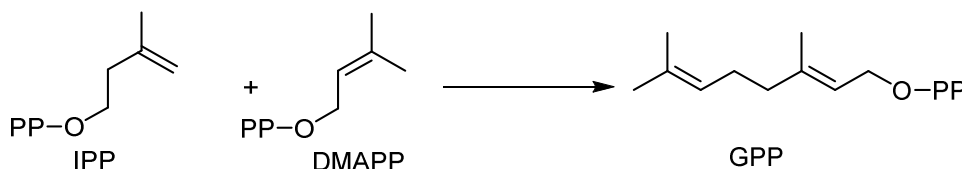


isopentenyl pyrophosphate (IPP)



Dimethylallyl pyrophosphate (DMPP)

الشكل 21: بنية الوحدات IPP و DMAPP



الشكل 22: تشكل الـ Geranyl pyrophosphate (GPP)

الجدول 6: تصنيف التربينات على حسب عدد الوحدات من IPP

عدد الوحدات من IPP	عدد ذرات الكربون	المركب التربييني	
02	10	Monoterpènes	تربينات أحادية
03	15	Sesquiterpènes	سيسكويتربينات
04	20	Diterpènes	تربينات ثنائية
05	25	Sesterterpènes	سيسسترتربينات
06	30	Triterpènes	تربينات ثلاثية
08	40	Tetraterpènes	تربينات رباعية
-	-	Polyterpènes	تربينات المتعددة

II-8-1- التربينات الأحادية :

تشتمل على 10 ذرات كربون، حلقيّة أو مفتوحة وهي عبارة عن زيوت طيارة. و وظيفتها الرئيسية هي حماية الأوراق من الحيوانات والحشرات وتوجد كزيوت أساسية للعديد من النباتات ومثالا عن التربينات الأحادية limonen والذي يعد المسؤول عن الرائحة عند البرتقال والليمون. كما تستعمل في المستحضرات الطبية، مثلا يستخدم camphor في المراهم ضد الألام الروماتيزمية ،

ويستخدم menthol في المراهم كعلاج ضد الحكة و يستخدم thymol و carvacrol في مبيدات للحراثيم [90]. وقد استعملت limonen كمضافات غذائية لكونها رحيصة وغير سامة ولها القدرة على الوقاية من السرطان [88].

II-8-2 السيسكوتربينات :

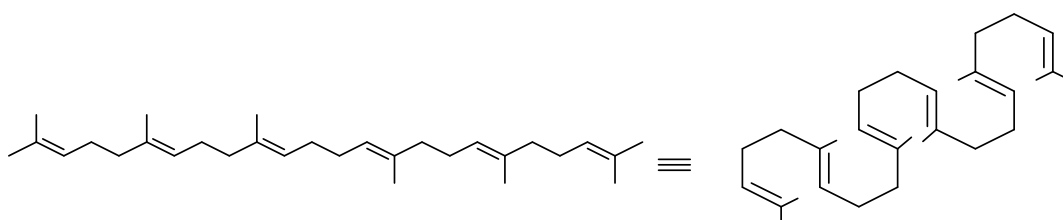
وتتكون من ثلاث وحدات IPP في تركيبها أي C_{15} وتكون عادة في صورة هيكل متعدد الحلقات. ولها فوائد طبية معروفة مثل فالأرتيميسينين (artemisinin) هو دواء مضاد للملاريا. و الـ farmesene يعتبر منشطا للمزاج وله تأثيرات مهدئة ومهدنة.

II-8-3 التربينات الثنائية :

تتضمن على 20 ذرة كربون كذلك تتميز بهيكل متعددة مفتوحة أو حلقة أحادية، ثنائية أو ثلاثية و عادة تكون في صورة هيكل متعدد الحلقات. وقد عرف منها ما هو مضاد للسرطان مثل gibberellins. ولعل أهم مركبين متواجدين في البن هما kahweol و cafestol وهما عبارة عن تربينات ثنائية والذين يأتزان على الكولسترول لدى الإنسان [91].

II-8-4 التربينات الثلاثية :

تتضمن على 30 ذرة كربون، تضم أكثر من 4000 مركبا، وتمتاز بكونها عديمة اللون، صلبة، أغلبها ينصهر عند درجة حرارة عالية و تكون حرة أو في صورة إيتيروزيدية. وعادة ما تنتج من حلقة الـ squalène (الشكل 23). وتكون على شكل مركبات حلقة وتحمل وظيفة كحولية، كربونيلية أو حمضية [92].

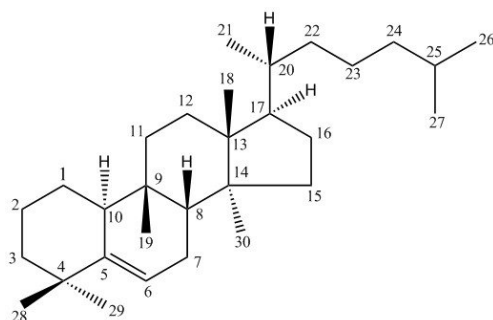


الشكل 23 squalene

5-8-II الكريبتاسينات (Cucurbitacins)

هي تربينات ثلاثية رباعية الحلقة ذات هيكل هيدروكربوني (الشكل 24) عالية الأكسجة ، توجد في أغلب الأحيان في صورة

إيتروزيدية و عادة ماتكون في شكل مركبات بلورية قليلة الذوبان في الماء بينما تذوب في المحاليل العضوية كالكلوروفورم [93].



الشكل 24 بنية cucurbitane

نظرا لوجود الكريبتاسينات في الكثير من القرعيات فقد إشتقت من إسمها نسبة لها (Cucurbitaceae) للإعتقاد أنها

محصورة في هذه الفصيلة النباتية فقط ولكن تم إكتشافها فيما بعد في فصائل نباتية أخرى مثل Rubiaceae ، Datisceae [43].

تصنف حسب الحروف الأبجدية اللاتينية (T...C,B,A) Cucurbitacin [94].

وتختلف فيما بينها تبعاً ل:

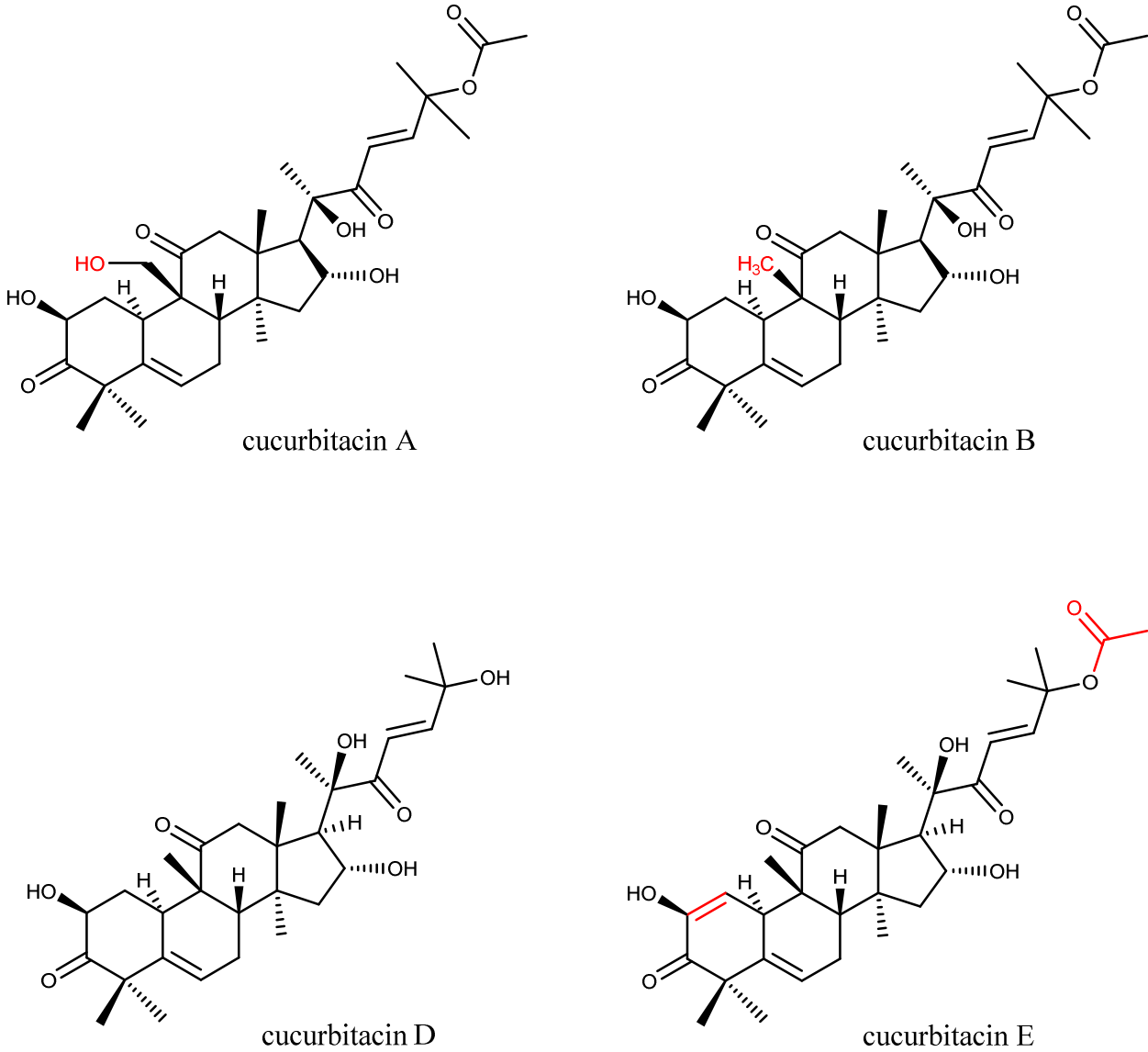
- غياب أو وجود روابط مضاعفة في مواقع معينة، حيث كلها تحتوي رابطة مضاعفة عند C5-C6 معظمها عند C23 والقليل منها عند C1.

- حالة التأكسد: معظمها يحتوي 3،11،22،trione و 16،25-dihydroxy و جملها يحمل ذرة أكسجين في الموقع C20 و في

الموقع C2 هيدروكسيل أو سكر و النادر منها يحمل ذرة أكسجين عند C24

فقد أظهرت هذه المركبات فعاليتها كمضادة للسرطان بالإضافة إلى ذلك، يتم استخدامها لعلاج أمراض الكبد الفيروسي في الطب

الصيني التقليدي. [95] الشكل 25.



الشكل 25: أمثلة من الكيكربيتاسينات

II-8-6 التربينات الرباعية :

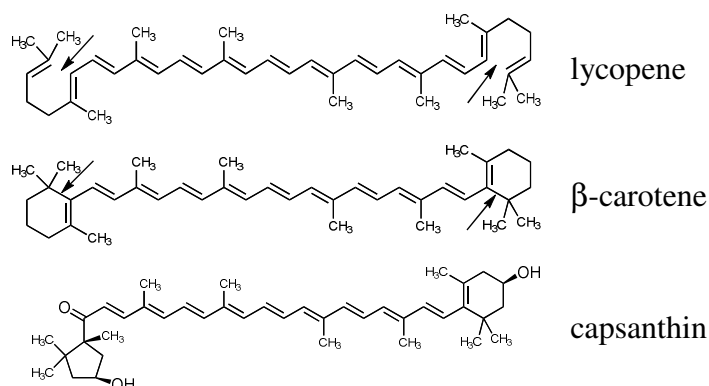
تتكون من 40 ذرة كربون. وتنشأ عن طريق اقتران ذيل إلى ذيل لوحدين من GGPP. وتعتبر الكاروتينات (carotenoids)

ونظائرها من أمثلة التربينات الرباعية (Tetraterpenes) فنجد: الشكل 26.

- β -carotene، وهي صبغة برتقالية اللون للجزر. ويتم تحويله إلى فيتامين A1 (retinol) داخل الكبد.

- الليكوبين (lycopene) وهي صبغة مميزة في ثمار الطماطم الناضجة.

– capsanthin وهي الصباغ الأحمر اللامع من الفلفل .



الشكل 26: أمثلة لبعض التربينات الرباعية

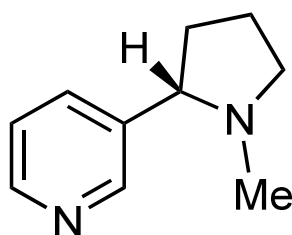
9- II القلويدات: Alkaloids

هي عبارة عن مركبات قاعدية ذات أصل نباتي. وهي مركبات آزوتية . وغالبا ما يكون الأزوت في حلقة في صورة أمين ثانوي

أو ثالثي. تختلف درجة القاعدية اختلافا كبيرا ، تبعا للبنية الجزيئية وموقع المجموعات الوظيفية. معظم القلويدات هي مواد صلبة بلورية

ومرة المذاق [90]. وقد إصطلح على انتهاء أسمائها بالمقطع (ine) مثل Nicotine من الدخان (Nicotiana) النوع النباتي

مثل cocaine من الإسم الشائع للنبات (Irythroxyllone coca) [96] الشكل 27.



الشكل 27: النيكوتين

الفصل الثالث

الدراسة النباتية والفعالية

البيولوجية لأوراق الدلاع

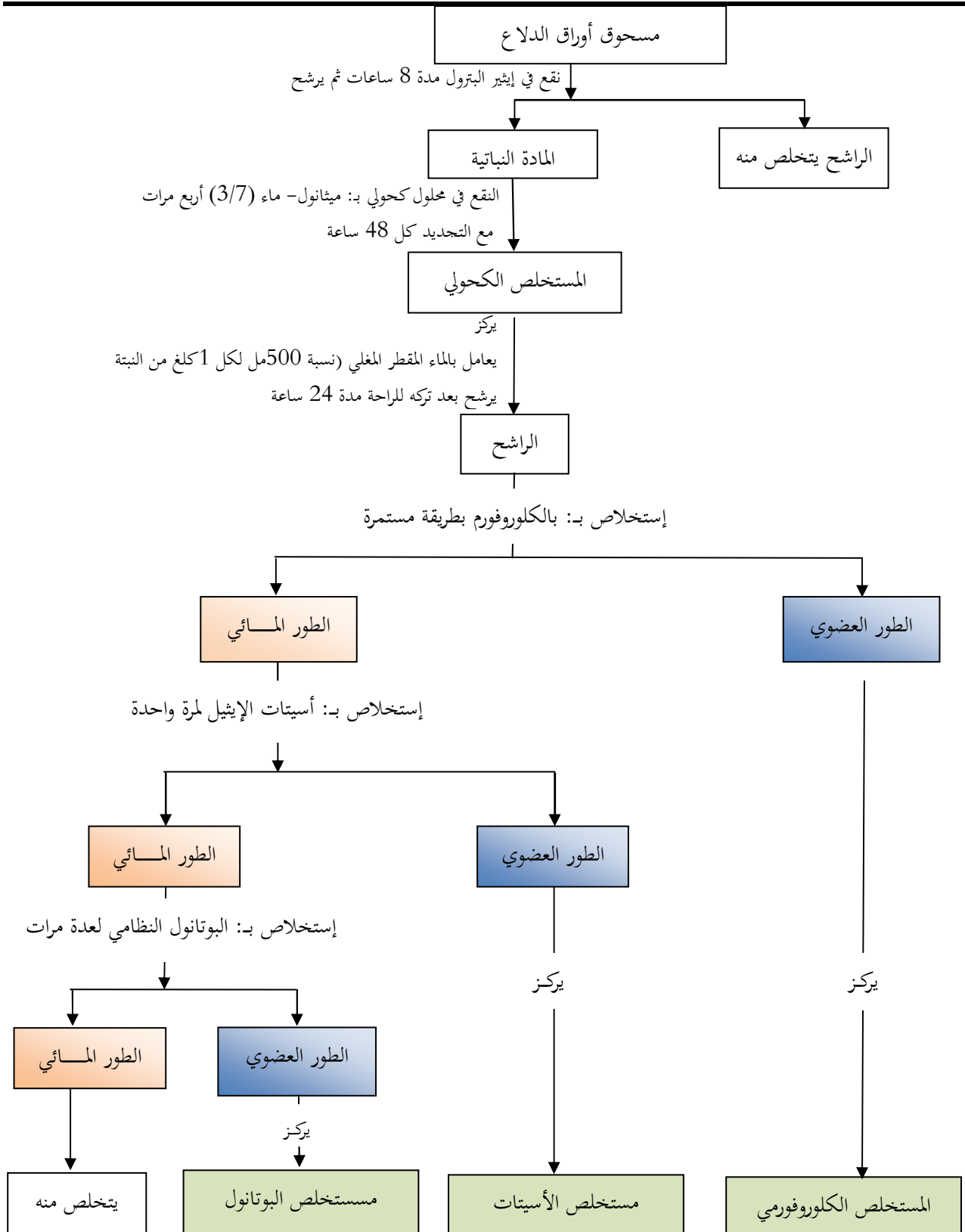
III-1 المادة النباتية :

تعرف زراعة القرعيات الأكلة على مختلف أنواعها نطاقا واسعا. ونظرا لما تتسم به المناطق الصحراوية بخصوص المناخ فيلجأ العديد من المزارعين إلى إستعمال البيوت البلاستيكية. وقد وقع إختيارنا على نوع من هذه القرعيات ألا وهو البطيخ الأحمر أو ما يعرف بالدلاع، ففي شهر أوت 2015، قطفنا و جمعنا الأوراق للنبته التي نمت خارج البيوت البلاستيكية من منطقة حاسي بن عبد الله بورقلة ، إذ روعيت فيها عناية خاصة وخلصت من الشوائب. جففت تحت الظل في مكان جيد التهوية بعيدا عن الرطوبة وكنا نقلبها من حين لآخر، ثم طحنتا طحنا جزئيا، ثم أخضعت لعملية النقع و الإستخلاص.

III-2 الإستخلاص :

انقعت أوراق الدلاع المطحونة سلفا في إيثر البترول على البارد لتخليصه من الدهون والكلوروفيل مدة 8 ساعات ثم رشحت وجففت من جديد. ليجرى الاستخلاص باستعمال ماء/ميثانول بنسبة (7/3) لعدة مرات مع التجديد كل 48 سا ويراعى في كل مرة ضمان غمور المذيب المادة النباتية كليا. بعد الترشيح يركز المحلول الكحولي إلى حد الجفاف ويضاف بعد ذلك الكمية المناسبة من الماء المقطر لتذوب اقصى كمية من المستخلص المركز ثم نتركه للراحة ليلة كاملة. نرشح المحلول بجذر شديد للتخلص من الأتربة و عديمت الذوبان في الماء. نجري على الراشح المائي استخلاص إنتقائي من نوع سائل/سائل باستعمال مذيبات متزايدة القطبية بدءا بالكلوروفورم ($CHCl_3$) فأسيئات الإيثيل (EtOAc) وأخرا بالبوتانول (n-BuOH) [97].

ويمكن تلخيص هذه المراحل في المخطط في الشكل 28



الشكل 28 طريقة الإستخلاص من أوراق الدلاع

III - 3 الفصل والتنقية :

للقيام بعملية فصل المكونات لجأنا إلى الطرق الإعتيادية لفصل هذا النوع من المركبات ألا وهي الفصل الكروماتوغرافي المتنوعة : كروماتوغرافيا العمود [98] ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية والتحضيرية، بإستخدام كل من عديد الأמיד و السيليكاجال وكذلك كروماتوغرافيا الورق Watman N°3 بإستخدام كلا من المذيب BAW و % 20 AcOH كأطوار متحركة [99].

III - 3-1 الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC :

(High Performance Liquid Chromatography)

وقد ثبت أنها الطريقة المفضلة للتحليل الكيفي والكمي وكذا فصل الفلافونويدات في عينات مختلفة [97]. ويستخدم في هذه اللتقنية عمود يحتوي على الطور الثابت ومضخة لتحريك الطور المتنقل والذي يحتوي على العينة المراد تحليلها. كما يزود الجهاز بكاشف لتحديد زمن الإحتباس أو العبور لكل مركب (t_R : Retention time) حيث أن زمن الإحتباس يختلف من مادة لأخرى ويرجع ذلك لإختلاف الروابط البينية التي تربط المادة المدروسة والمادة الثابتة في العمود مما يؤخر ظهورها على الكاشف. ونحصل على مخطط (chromatogram) والذي يحمل المعلومات التالية : العرض ، المساحة، زمن العبور أو الإحتباس.

ويتم التعرف على المركبات المفصلة بمقارنة الخصائص المتحصل عليها بنظيرتها للمركبات المرجعية المعروفة [100].

III - 4- التعيين البنوي :

يمكن التعرف على بنية المركبات من خلال عدة خصائص منها ثابت الإنجباس، اللون الإشعاعي، الأطياف المختلفة (الأشعة فوق البنفسجية، الرنين المغناطيسي النووي بروتون 1H و كربون ^{13}C) [102-101, 99].

III - 4-1 مطيافية الأشعة فوق بنفسجية :

تمتاز الفلافونويدات بإمتصاص الأشعة فوق البنفسجية لثمتعها ببنى ذات أنظمة مترافقة كما أنها تحمل مجموعات هيدروكسيل (-OH) و/ أو الميثوكسيل ($-OCH_3$) أو سكر و التي تسمى بـ chromophores. وهذه الأخيرة ماهي إلا ذرات أو مجموعات كيميائية غنية بالإلكترونات.

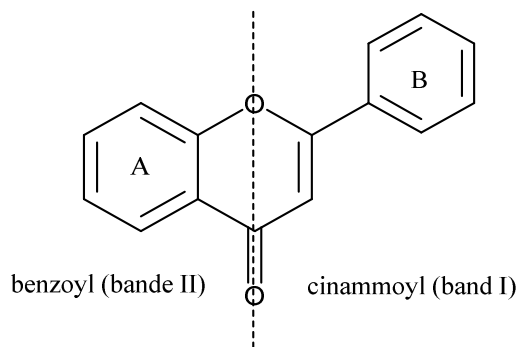
ويعتبر طيف المركبات الفلافونيدية في الوسط الميثانولي بوجود عصابتين تشيران لوجود حلقتين عطريتين متميزتين. وللتعرف على المستبدلات ومواقعها نلجأ إلى إضافة كواشف محددة مثل هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)، أسيتات الصوديوم NaOAc، كلوريد الألمنيوم (AlCl₃)، ثم هذا الكاشف مضافاً مع حمض الكلوريدريك (AlCl₃+HCl)، أسيتات الصوديوم مع حمض البوريك (NaOAc + H₃BO₄) والتي تعطي معقدات ملونة.

III-4-1-1 طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي :

في الوسط الميثانولي يُظهر طيف المركبات الفلافونيدية من نوع فلافون و فلافونول قمتي امتصاص رئيسيتين في المجال المحصور بين (240-400 nm) يشار إليهما بـ :

I العصابة I : وفيها تنحصر قيم الإمتصاص العظمى في المجال (300 - 380 nm) والتي ترجع إلى امتصاص مجموعة الـ Cinnamoyl حيث ترافق الحلقة العطرية (B) و مجموعة الكربونيل، والتي تمنح معلومات عن المستبدلات ومواقعها في كل من الحلقتين B و C (الشكل 29).

II العصابة II : تنحصر قيم الإمتصاص العظمى في المجال (240 - 280 nm) والتي ترجع إلى امتصاص مجموعة الـ Benzoyl حيث ترافق الحلقة العطرية A مع مجموعة الكربونيل. [103]



الشكل 29: منطقة إمتصاص benzoyl و cinnamoyl

III -4-1-2- طيف الإمتصاص باستخدام الكواشف:

اما الكواشف المضافة فلكل منها إفادة بمعلومة محددة، لمواقع معينة، كأن نتعرف مثلا ما إذا كانت المواقع المعهودة (3، 5، 7 و'4) تحمل هيدروكسيالات حرة أم مستبدلة. أو ما إذا كانت بجوارها مجموعات اكسجينية أم لا. أو أن تكون لدينا أنظمة أورتونائي هيدروكسي (orthodihydroxy) أم لا.

III -4-2- طيف الرنين المغناطيسي النووي (NMR):

تعد مطيافية الرنين المغناطيسي النووي من أقوى الأدوات لتحديد بنية أنواع المركبات العضوية وغير العضوية. وتعتمد على الرنين المغناطيسي الذي تتمتع به الذرات وخاصة البروتونات (^1H) و الكربون (^{13}C) [104].

III -4-2-1- مطيافية الرنين المغناطيسي النووي (NMR) (^{13}C و ^1H):

توفر هذه التقنية الكثير من المعلومات مثل الأنواع المختلفة من الهيدروجين فالإنزياح الكيميائي و ثابت الإقتران، ميزة يتمتع بها الهيدروجين حسب موقعه في المركب المدروس والبيئة الإلكترونية التي يتواجد فيها. ويستعمل عدة مذيبات مثل CDCl_3 ، CD_3OD حسب قطبية المركبات. وقد استعمل DMSO-d_6 لكونه مذيب جيد لكل أنواع الفلافونيدات [105-106]. و باللجوء لتقنية الرنين المغناطيسي النووي ثنائي البعد يمكننا تحديد مواضع الإرتباط لوحدة السكر وكذا معرفة العدد الإجمالي لذرات الكربون للمركب المدروس .

III -5- الفعالية المضادة للأكسدة :

أخذت الجذور الحرة إهتماما كبيرا من طرف الباحثين وذلك لما قد تسببه بعض هذه الجذور من مشاكل صحية وكذلك لكونها تتولد بشكل طبيعي في جسم الإنسان. وعليه أرتكر الإهتمام على مضادات الأكسدة للقضاء على هذه الجذور.

III -5-1- تعريف الجذور الحرة :

هي عبارة عن ذرات أو جزيئات تحتوي على الأقل إلكترونات غير مزدوج (غير مرتبط). مما يجعل الذرة أو الجزيء غير مستقر .

هذا الخلل عابر فقط . ومخنا على الإستقرار يقوم الجذر الحر إما بنزع أو منح إلكترون من جزئ آخر . وتبدأ بذلك سلسلة من التفاعلات مهاجمة الخلايا الحية وصولاً لغاية الـ DNA. [107]

يُعرّف عموماً المضاد للأكسدة كل مادة متواجدة بأقل تركيز مقارنة بالمحاليل المؤكسدة و المتواجدة معها بحيث أن المضاد للأكسدة يمنع أو يقلل درجة تأكسد المواد والمركبات الكيميائية [108] يختلف مصدر هذه المركبات فمنها الداخلية وهي التي ينتجها الجسم للحد من التأثيرات السلبية للجذور. ومنها الخارجية كالفيتامينات والفلافونيدات. إن فعالية مضاد الأكسدة تكون وفق آليتين وهما :

- 1- القضاء على الجذور الحرة ومنع تسلسل تفاعلات هذه الأخيرة.
- 2- تفكيك الهيدروبيروكسيدات (وهي عبارة عن مركبات إنتقالية تكون جذور حرة) وذلك بإعتراض الرابطة الأكسجينية من أجل إبطاء سرعة التشكل [109].

III -5- 2 - التأثير على الصحة البشرية :

إن لمضادات الأكسدة دور هام في التمثيل الغذائي للبشر. كما تمثل عملية أكسدة الدهون في بعض الصناعات أمراً معقداً بحيث تحفظ من جودة ومدة حفظ المنتوجات [110].

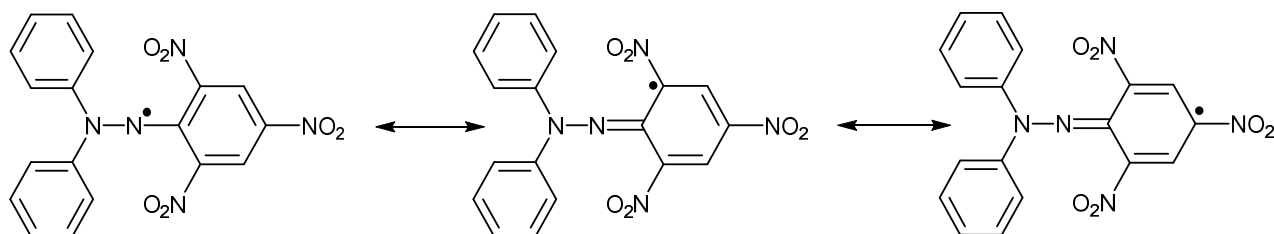
III -5- 3 - أنواع الجذور الحرة :

إن عبارة الأنماط الأكسوجينية النشطة (ROS) reactive oxygen species لا تقتصر على الأكسجين فقط بل تضم كل الأنواع من الجذور الحرة مثل : superoxid ($O_2^{\bullet-}$) ، hydroxyl (OH^{\bullet}) ، nitrogen monoxide (NO^{\bullet}) ... إلخ. وتنقسم الجذور الحرة إلى قسمين :

- أ- الجذور غير المستقرة : ويمتاز هذا النوع بالفعالية الكبيرة مما يجعل أعمارها قصيرة . ويشمل هذا النوع الجذور التي لها أوزان جزيئية صغيرة مثل جذر الهيدروجين H^{\bullet} ، جذر الفلور F^{\bullet} ، جذر الهيدروكسيل OH^{\bullet} ، جذر اليود $I_2^{\bullet-}$ ، إلخ.
- ب- الجذور الحرة المستقرة :

تدوم أعمار هذه الجذور من الثواني إلى الساعات بل حتى لأيام مثل triphenylméthyl (TP₃M) الذي يبقى محافظاً على لونه الأصفر عند درجة الحرارة العادية لبضع ساعات أما diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ذي اللون البنفسجي المسود فيبقى مستقراً ويحافظ على لونه لعدة أيام (الشكل 30) .

إن جذور معظم المركبات المترافقة مستقرة ويرجع ذلك لعدم تركز الإلكترون الحر . وهذا ما يجعلها أقل نشاطا.



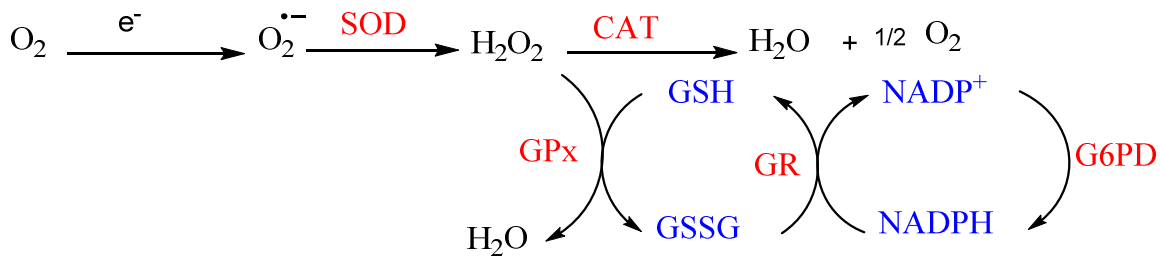
الشكل 30: التراكيب المترافقة لجذر DPPH.

III - 5- 3 متابعة حركية الجذور الحرة :

إن الطريقة الأكثر إستعمالا هي قياس كثافة الضوء الممتص بوحدة الزمن وذلك بواسطة أجهزة قياس أطيف الأشعة فوق البنفسجية المرئية (UV-Vis) شرط أن يمتص الجذر الحر الضوء بمنطقة تختلف عن منطقة امتصاص المادة الناتجة . فمثلا يمتص جذر ثلاثي فينيل الميثيل ($\text{Ph}_3\text{C}^\bullet$)، الضوء عند 345 n.m وعند 510 n.m بينما يمتص مركب ثلاثي فينيل الميثان (Ph_3CH) الضوء عند 262 n.m.

III - 5- 4 تفاعلات الجذور الحرة :

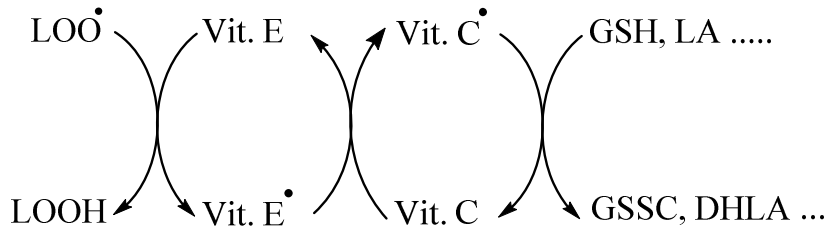
تنتج الجذور الحرة بشكل تلقائي و باستمرار داخل أجسامنا. إلا أنه يسيطر عليها ما يسمى مضادات الأكسدة الذاتية. عندما يختل هذا التوازن سواء بزيادة عدد الجذور الحرة ، أو انخفاض في النشاط المضاد للأكسدة ، يحدث ما يسمى بالإجهاد التأكسدي. هذا الأخير يمكن أن يسبب عدة أنواع من تلف الخلايا الطبيعية في الجسم. ففي الحالة العادية يقوم الجسم بإستعمال العديد من الإستراتيجيات المضادة للأكسدة منها ما هو ذاتي داخلي كإستعمال الأنزيمات مثل (SOD) Superoxide dismutase ، (CAT) Catalase ، (GPx) Glutathion peroxidase [111] (الشكل 31) . ومنها ما هو خارجي بحيث يستخرج من المواد الغذائية كالفيتامين C (Ascorbic acid)، الفيتامين Q (ubiquinone)، الفيتامين E [112] و الجزريات . وتقوم هذه المركبات بتقييد و أسر الجذور الحرة و تحويلها إلى مركبات ثابتة.



الشكل 31: تفاعل الإنزيمات مع الجذور الحرة

III -5-5- الفيتامين C (Vit. C) و الفيتامين E (Vit. E) :

يعمل كلا هذين الفيتامينين على إزاحة سمية بعض المواد عن طريق عملية الأكسدة والإختزال في الجسم. بالإضافة إلى إزاحة كل من الجذور الحرة OH^\bullet ، $\text{O}_2^{\bullet-}$ ، NO^\bullet . ويعمل الـ Vit. C على إستخلاص المعادن ومنع أكسدة الـ LDL [113]. في حين يتفاعل الـ Vit. E (alpha-tocopherol) مع الجذور الليبيدية ويمنع إنتشارها [114] . ويكمن دوره الرئيسي البيولوجي في التفاعل مع جذور البيروكسيل ROO^\bullet لتشكيل جذور الطوكوفيرول. ويمكن تجديده بواسطة الفيتامين C و GSH وفق التفاعل المشار إليه في الشكل [115]32.

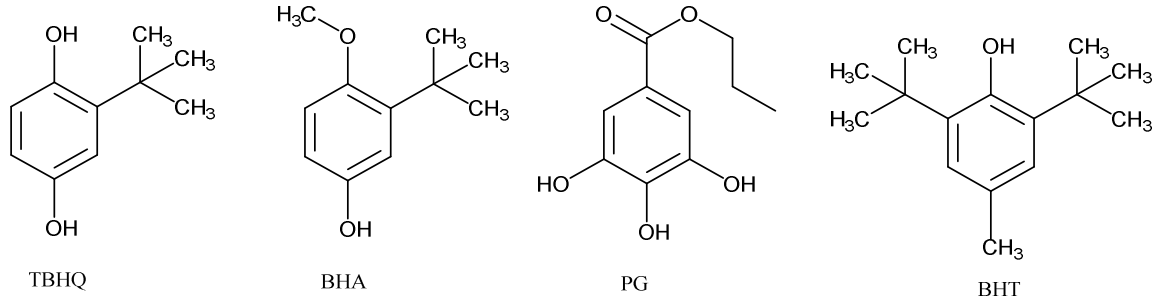


الشكل 32 : تفاعل الفيتامين C و E مع الجذور الحرة

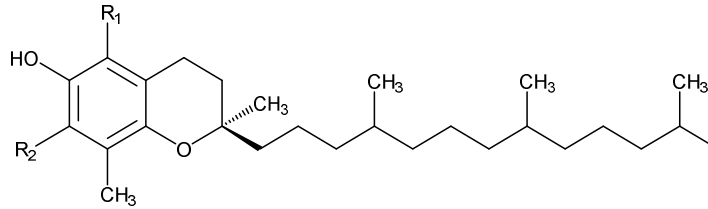
III -5-6 مضادات الأكسدة الصناعية :

يعتمد في الصناعات الغذائية الحديثة إلى إضافة مضادات الأكسدة وذلك بغية إطالة مدة حفظها. فهذه المركبات الصناعية رخيصة الثمن مقارنة مع مثيلاتها ذات المصدر الطبيعي. وقد دفع الإستعمال المفرط لها العلماء للتحذير من تأثيراتها على الصحة البشرية. من بين المضادات للأكسدة المصنعة (BHA) butylated hydroxyanisole ، Butylated hydroxytoluene

(BHT) ، propyl gallate (PG) ، tert-butyl hydroquinone (TBHQ) الشكل 33 و 34



الشكل 33: مضادات الأكسدة المستعملة في الصناعة الغذائية



- α -Tocopherol (α -T) R₁ = R₂ = CH₃
 β -Tocopherol (β -T) R₁ = CH₃, R₂ = H
 γ -Tocopherol (γ -T) R₁ = H, R₂ = CH₃
 δ -Tocopherol (δ -T) R₁ = R₂ = H

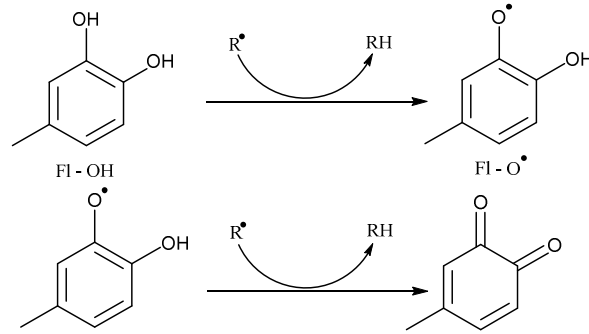
الشكل 34: بنية الطوكوفيرولات

III-5-7- تفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة :

حازت الفلافونيدات على إهتمام كبير منذ أمد بعيد وحتى يومنا هذا. فقد إستعملت في كثير من المستحضرات الطبية من أجل معالجة أمراض عديدة. فقد ثبت مدى قدرتها على أسر الجذور الحرة مثل جذور الهيدروكسيل وفوق الأكسيد [116]. ومدى تأثيرها الوقائي بشكل خاص في نظام عمل القلب والأوعية الدموية .

كما أن الجهد المنخفض للزوج مؤ/مر ($0.23 < E < 0.75 \text{ V}$) يمنح للمركبات الفلافونيدية القدرة على إحتزال الجذور الحرة. [74]. تقوم الفلافونيدات بإرجاع الجذور (R^\bullet) وذلك بنقل إلكترون أو بروتون. فيما تتفاعل الجذور الفلافونيدية فيما بينها معطية

الكينون المستقر. الشكل 35



الشكل 35: تفاعل الفلافونيدات مع الجذور الحرة

III-6 - تقدير فعالية مضادات الأكسدة :

أكدت الأبحاث على ان الفعالية المضادة للأكسدة تتمثل في منح إلكترون أو بروتون. ويمكن تعيين القدرة المضادة للأكسدة بعدة طرق تحليلية مثل : [117]

- إختبار DPPH• (2,2-Di Phenyl-1-Picryl Hydrazyl)

- إختبار FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

- إختبار ABTS (2,2'-Azinobis (3-ethyl Benzo Thiazoline 6-Sulfonate))

- إختبار TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

- إختبار TRAP (Total Radical Trapping Parameter)

- إختبار ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

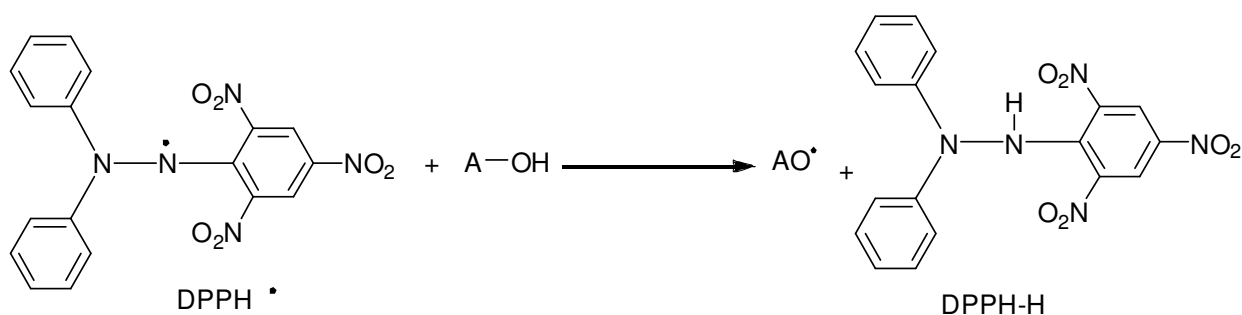
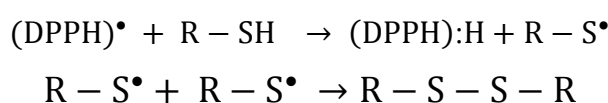
و تعتبر طريقة الأسر الجذري الأكثر إستعمالا. فيتم في هذه الطريقة تحديد قدرة مضادات الأكسدة على تثبيط الجذور الحرة . وتعتمد على التلوين في طول موجي معين. في دراستنا التي أجزناها قمنا بإختبار DPPH و FRAP.

: DPPH - 1-6-III

أوضحت الدراسات المرجعية على أن الجذور الحرة لـ DPPH[•] هي الطريقة الأنسب لإختبارات الفعالية المضادة للأوكسدة.

فيما كان جذر الـ DPPH أن ينتزع ذرة هيدروجين لكي يتحول ، ويتفاعل ليعكوس ، من DPPH[•] ذي اللون البنفسجي إلى DPPH-H (diphenyl picryl hydrazine) ذو اللون الأصفر. مع فقدان الإمتصاصية للأشعة فوق البنفسجية المرئية بطول الموجة

الأعظمية $\lambda_{max} = 517 \text{ nm}$ [118] . الشكل 36



الشكل 36 تفاعل الجذور الحرة

يتم القياس بتتبع الإنخفاض اللوني و يمكننا من تحديد IC_{50} . وهو اختبار مضاد للجذور الحرة ، يعتمد قدرة هذه المستخلصات لتثبيط 50% من جذور DPPH وتحسب من منحنيات تغير نسب التثبيط بدلالة تركيز المستخلصات، والنتيجة يعبر عنها بـ IC_{50} والتي تتناسب عكسيا مع الفعالية أي كلما كانت قيمة IC_{50} صغيرة كانت فعالية المستخلص كبيرة [119-120].

: FRAP - 2-6 - III

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على تلوين أو عدم تلوين للمعقد 2,4,6-Tripyridyl-S-Triazine Ferriqye في الوسط الحامضي.

III - 7 - الفعالية المضادة للبكتيريا :

منذ أمد بعيد، و الإنسان يبحث عن مضادات حيوية، مهما كان مصدرها ، كي تساعد على التغلب عن الكائنات الدقيقة المؤذية. فهو إذا بصدد البحث عن المواد التي تنتجها النباتات والتي تقوم بتثبيط هذه الأحياء الدقيقة المؤذية [121].

وينبغي للمضاد الحيوي أن يتمتع بالخصائص التالية :

- قابلية الذوبان في جسم الإنسان مثل باقي الأدوية الكيميائية.
- قابلية الإمتصاص بواسطة الأمعاء الدقيقة و لا تتأثر بحموضة المعدة.
- أن يكون من الصعب على مسببات المرض تشكيل مقاومة ضدها [122].

III - 7 - 1 تعريف البكتيريا:

البكتيريا كائنات دقيقة، لا ترى إلا بالمجهر وتتواجد في كل مكان. و البكتيريا منها ما هو ضار ومسبب للأمراض: كأعراض الجهاز الهضمي والبولي، الإلتهابات، التعفنات الجلدية، وبعض التسممات ومنها ما هو مفيد ونافع للإنسان. وتتكاثر البكتيريا في أوساط كثيرة فهي تعيش بأعداد كبيرة في جسم الإنسان كالأمعاء، الرئتين، فوق الجلد... إلخ، وتنتقل عن طريق الهواء، الماء و الأكل [123].

صنف العلماء البكتيريا إعتبارا على عدة معايير نذكر منها مثلا:

- من حيث الشكل : فنجد العصوية (Bacilli) ، الكروية (Cocci)، الحلزونية (Spiral) ، الواوية (Vibrio).
- من حيث طريقة التلوين GRAM (الغرام): إذ يمكن التفريق هنا بين نوعين من البكتيريا: ذات الغرام الموجب (gram positif) وتمتاز بجدار سميك مما يجعلها قادرة على إمتصاص الألوان بينما تمتاز البكتيريا ذات الغرام السالب (gram negativ) بجدارها الخلوي الأرفع مما يجعلها غير ماصة للألوان. أما التصنيف الأهم فهو الذي يعتمد على مدى تأثيرها على الإنسان ، إما ضارة أو نافعة .

III - 7 - 1 - أ - البكتيريا النافعة :

هي التي يمكن أن تتواجد في الأمعاء لتساعد في عملية هضم الطعام لكي يستفيد منها الجسم. أو يكون لها دور في الغذاء بحيث تتواجد في التربة. فهي المسؤولة عن تحلل الكائنات الميتة وفضلات الحيوانات إلى عناصر كيميائية بسيطة ليسهل على النبات

إستغلالها في التغذية. ومن هنا يبرز الدور الهام لهذه الكائنات. فلولاها لبقيت الكائنات الميتة والفضلات على ما هي عليه ولسرعان ما توقفت الحياة بأكملها. كما أنها تدخل في صناعات عديدة كالألبان وبعض الأدوية.

III - 7 - 1 - ب - البكتيريا الإنتهازية :

هي التي تتعايش في جسم الإنسان دون أن تسبب له أضرارا صحية مادامت مناعته قوية. وما إن ضعفت هذه الأخيرة لأي سبب من الأسباب ، تنتهز هذه الكائنات الفرصة وتهاجم الجسم مسببة له أمراضا وحساسية كبيرة كما هو الحال مثلا في إلتهاب الحلق واللوزتين.

III - 7 - 1 - ج - البكتيريا الضارة :

هي تلك الكائنات الدقيقة التي تهاجم جسم الإنسان مسببة له أمراضا مختلفة مثل السل والكوليرا، والتيفوئيد، الزهري والسيلان..... إلخ. والجدول 7 يلخص بعض البكتيريا الضارة موضحا بعض الأمراض التي تسببها.

الجدول 7 أنواع البكتيريا

البكتيريا	نوع الغرام	أماكن تواجدها	الأمراض التي تسببها
Escherichia coli	-	جسم الإنسان ، الحيوان والنبات	-أمراض الجهاز البولي - الإسهال الطفيلي - التهاب السحايا -تسمم الدم
Staphylococcus aureus	+	الجلد ، الأمعاء ، الجهاز التناسلي وعلى الوجه	- تسمم الغذاء - إلتهابات جلدية خطيرة
pseudomonas aeruginosa	-	الجهاز الهضمي	الإتلاف السطحي للأغذية المبردة
Streptocoque	+	الرئتين ، الجهاز الهضمي ، المسالك و المجاري البولية	إلتهاب البلعوم و الروماتيز إلتهابات المسالك البولية
Salmonilla	-	الأمعاء و القولون	إلتهاب الأمعاء والقولون و تسمم الدم

III - 7 - 2 - إختبار الحساسية:

من الطرق الأكثر شيوعا لدراسة فعالية المستخلصات النباتية المضادة للبكتيريا هي الانتشار على الآجار باستعمال الأقراص (disc diffusion agar) أو التخفيف على الآجار (agar dilution)، تستعمل طريقتي اختبار الانتشار على الآجار باستعمال الأقراص و التخفيف على الآجار البكتيريا النامية على الوسط الصلب، وذلك لكونهما غير مكلفتين وسريعتين ولا يتطلبان مواد وأجهزة معقدة.

وقد إحتزنا في بحثنا هذا الإنتشار في وسط Mueller Hinton (MH) بإستبدال أقراص المضادات الحيوية فقط بأقراص مشبعة بالمستخلصات المراد دراستها.

III - 7 - 3 - طريقة الانتشار على الأقراص في الوسط الصلب :

تمتاز هذه الطريقة بكونها تستعمل كميات صغيرة جدا من المستخلصات المراد دراستها. فكمية μl (10 - 30) كافية لإجراء الدراسة. تتم عملية الزرع بالبكتيريا في الوسط أجار MH ويوضع حوالي 15-25 مل في أطباق بيتري ثم توضع الأقراص (6 أو 8 ملم) - المغموسة سلفا في محلول المستخلص النباتي - في مركز علبه بيتري. ثم تحضن الأطباق لمدة 24 ساعة، بعدها يقاس قطر التثبيط وهي الحالة المحيطة بالقرص.

III - 7 - 3 - أ - تحضير الأقراص:

تحضر الأقراص من ورق Whatman 3 يقص دوائر بقطر لا يتجاوز 6 ملم وهي التي ستبلل بالمستخلصات النباتية وكذلك بالشاهد.

III - 7 - 3 - ب - تحضير المستخلصات النباتية :

يجب تذويب المستخلص النباتي الجاف في الـ DMSO (10 مل لكل 150 مغ) والذي يستعمل كشاهد سالب أيضا. [124]

III - 7 - 3 - ج - تحضير وسط الزرع :

في البداية يجب وضع المعلق المكروي المحتوي على مستعمرة واحدة لبكتيريا مفعلة حديثا (24 سا) في ماء فيزيولوجي معقم. بتركيز يعادل

$10^8 - 10^6$ وحدات مشكلة للمستعمرات (CFU) (Colony-Forming Unit) \ مل .

يشتل المعلق علب بتري المحضرة مسبقا (بعد تصلب الوسط الجيلوزي). توضع في الحاضنة للتجفيف ثم توضع فيها الأقراص المعقمة والمشبعة بتراكيز مختلفة للمستخلص المراد إختبار فعاليته. تخزن العلب تحت درجة 37° م لمدة تتراوح بين 18 إلى 24 سا.

III - 7 - 3 - د - طريقة الزرع والحضن :

تجفف العلب التي سيتم فيها الزرع جيدا. يغمس الماسح القطني المعقم في المعلق البكتيري ثم نمسح كامل الوسط تكرارا على شكل خطوط متلاصقة مع تدوير العلب ب 60° كل مرة وفي النهاية يمسح محيط دائرة العلب، و تعلم أماكن وضع الأقراص في أسفل علب بيتري وتوضع متباعدة و في الأخير تخزن في الفرن لمدة 24 سا في درجة حرارة 37°م، وكل هذه التحضيرات تكون قرب موقد بنزين . [124].

III - 7 - 4 - طريقة القياس :

لمعرفة حساسية أو مقاومة المستخلص للبكتيريا عن طريق قياس قطر دائرة التثبيط بال مم، بإستعمال قدم قلووية، حيث حسب قطر دائرة التثبيط تحدد مدى حساسية البكتيريا والجدول (8) يوضح القياسات المعمول بها. [123]

الجدول 8 : القياسات

الناتج	حساسية البكتيريا	قطر دائرة التثبيط
-	Insensitive غير حساسة	أقل من 7 مم
+	acceptable sensitivity حساسية مقبولة	ما بين 7 مم و 8 مم
++	sensitive حساسة	ما بين 8 مم و 9 مم
+++	very sensitive حساسة جدا	أكبر من 9 مم

III - 7 - 5 - تحديد التركيز الأدنى للتثبيط (MIC):

يعرف MIC بأنه أدنى تركيز للمضاد الحيوي لتثبيط نمو البكتيريا مدة 24 ساعة عند 37° م . ولإجراء هذا الإختبار نتبع طريقة الإنتشار على سطح صلب ولكن هذه المرة نقوم بتحضير تراكيز مختلفة من المستخلص النباتي حسب طريقة التخفيف المزدوج . والتركيز الأدنى الذي لا يعطي أي تغير ملحوظ على الأقراص يدون على أنه MIC.

الجانب التطبيقي

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

IV- الدراسة الكيميائية لمستخلصات أوراق الدلاع :**1-IV- النقع و الإستخلاص:**

أخذنا 1800 غ من الأوراق المسحوقة و أنقعت في إيثير البترول (40° - 60°) ليلة كاملة بغية تخلصها من الدهون والكلوروفيل وبعدها رشحت و جففت المادة النباتية و أنقعت من جديد في مزيج أكثر قطبية: محلول كحولي ميثانول/ماء (3/7:حجم/حجم) لمدة 48 ساعة كررت العملية أربع مرات متتالية لاستخلاص معتبر وكاف.

ركزنا المحلول المتحصل عليه من الترشيح وذلك تحت ضغط منخفض و عند درجة حرارة لا تتعدى 40° م إلى حد قريب من الجفاف ثم أضفنا 900 مل من الماء الدافئ (بنسبة 400 مل إلى 600 مل مقابل كل 1 كغ من المادة الجافة) وتركناها ليلة كاملة للراحة، ثم قمنا بعملية الترشيح لإزالة ما لم يذوب في الماء من الأتربة والشوائب العالقة. ثم أجزنا سلسلة من عمليات الاستخلاص سائل - سائل بإستعمال مذيبات متزايدة القطبية بدءاً من إيثير البترول وانتهاً بالبوتانول، فأضفنا له ثلث حجمه من إيثير البترول بعد الرج والراحة في قمع الفصل، فصل الطوران وأعيد على الطور المائي إستخلاص CHCl_3 .

1-IV - أ - الإستخلاص بالكلوروفورم :

نواصل عملية الفصل سائل - سائل ولكن هذه المرة بإستعمال الكلوروفورم. من أجل هذا إستعملنا الجهاز الخاص بالمذيبات الأثقل من الماء بحيث تكون عملية الإستخلاص مستمرة. وفي نهاية الإستخلاص ركزنا المستخلص الكلوروفورمي فحصلنا على 7,83 غ.

1-IV - ب - الإستخلاص بأسيتات الإيثيل :

عالجنا المحلول المائي المتبقي في قمع الفصل بأسيتات الإيثيل مضيفين ثلث حجمه. أجرينا هذه العملية مرة واحدة فقط وبعد الفصل ركزنا الطور العضوي (العلوي) فتحصلنا على 6,68 غ من مستخلص الأسيتات المركز.

1-IV - ج - الإستخلاص بالبوتانول :

عاملنا الطور المائي المتبقي بإضافة ثلث حجمه بوتانول عادي و بعد عمليات الرج والراحة من حين لآخر نفصل في الأخير الطور البوتانولي (العلوي). نكرر العملية خمس مرات (05). بعد تركيز الأطوار البوتانولية حصلنا 95,44 غ.

IV -2- فصل المركبات :**IV -2-1- تحضير العينة :**

أخذنا 20 غ من مستخلص البوتانول المجفف وأذناه في كمية من MeOH ثم أضفنا إليه 12 غ من السيليكاجال الأدق من تلك المستعملة في العمود. و بعد الرج الجيد جففنا الخليط بغية إدمصاص المستخلص على السيليكاجال.

IV -2-2- فصل مكونات المستخلص البوتانولي:

أختارنا عمودا مناسباً لمثل هذا النوع من الفصل حيث أبعاده : طوله 34.5سم، وقطره 2.15 سم، مزود بطبقة مزججة في الأسفل، ثم وضعنا فيه 360 غ من السيليكاجال الممزوج بالمذيب (أسيتات الإيثيل) ثم أضفنا بعناية المستخلص في صورة متجانسة السمك، تلتها إضافة حلقة من ورق Whatman 3 (قبل وبعد) لضمان عدم تشوه السطح عند كل إضافة للمذيب.

متابعة سير العمود، وتجميع الكسور، أنجزت بفحص ومراقبة هذه الأخيرة على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية تحت مصباح UV (245-365 nm) فحصلنا على 98 كسراً. وبناءً على فحوص الكسور - من خلال البقع وتداخلاتها والكمية الوزنية لكل منها - وقع إختيارنا على الكسر 7. أجرينا للكسر 7 تجزئة جديدة على عمود كروماتوغرافي بإستخدام RP C18 كطور ثابت والمذيب ماء/ميثانول كطور متحرك.

IV -2-3- فصل مكونات الكسر 7 :

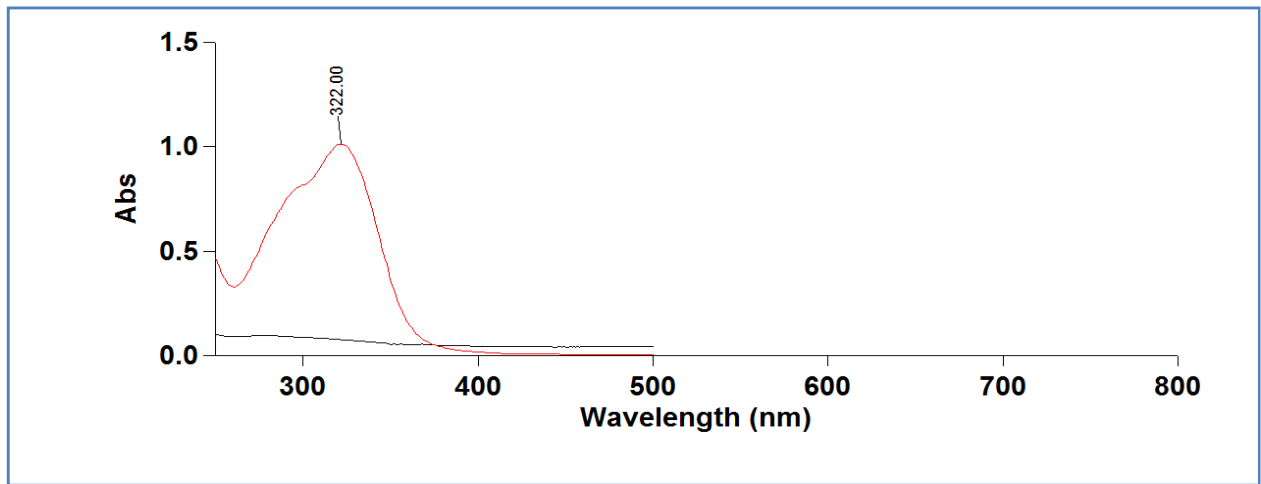
من أجل التنقية الأولية للمركبات إتبعنا تقنيات العمود بحيث يكون الطور الثابت RP C18 وكان المملص الأنسب، بعد الإختبار، هو: الماء/ميثانول (1/5) وفي الأخير نلجأ لتقنية الطبقة الرقيقة التحضيرية (PTLC) على الكسور الفرعية 'f32 - f6' بإستخدام النظام : $CH_2Cl_2/MeOH/CH_3COOH$ (4/1/0,01). تحصلنا على أربع مركبات متفاوتة النقاوة P9، P10، P11 و P12 .

IV -2-4- تحديد بنية المركبات المعزولة :**IV -2-4- أ- التحليل البنيوي للمركب P9:**

من اجل التعرف على بنى المركبات المتحصل عليها بعد تنقيتها إعتدنا على طرق التحليل الفيزيائية-الكيميائية : مطيافية الأشعة فوق

البنفسجية - المرئية. وكذا مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية البعد $^1\text{H NMR}$ و $^{13}\text{C NMR}$ وثنائية البعد : COSY, HMBC , HSQC.

فمن خلال طيف الأشعة فوق البنفسجية في المجال (250-500 nm) لاحظنا أن المركب يظهر عصابة إمتصاص واحدة فقط عند : 322 n.m موافقة لوجود مجموعة cinnamoyl (الشكل 37).



الشكل 37 : طيف إمتصاص الأشعة UV للمركب P9

ومما يعضد ذلك ظهور بروتونات عطرية لطيف $^1\text{H NMR}$ (5.04-7.61 ppm). بعد معاينة إزاحاتها وثوابت تزاوجاتها تلحق بحلقتين عطريتين

بارا ثنائيي الإستبدال (paradisubstitué)

بالنظر لطيف الكربون $^{13}\text{C NMR}$ للمركب P9 (الشكل 39) يبين وجود 23 ذرة كربون. وبالرجوع إلى طيف تجارب DEPT (الشكل 40) يمكن توزيع هذه الذرات بين :

- سبعة (07) ذرات كربون رابعة ، 6 منها تھجينها sp^2 : مجموعتين أستر عند 167,14 ppm و 168,77ppm

و 4 مجموعات إيثيلينية عند 160,14 ppm ، 125,69 ppm ، 157,78ppm و 129,43 ppm .

أما الكربون الرابعي الأخير فهو يعود لذرة كربون تھجينها sp^3 عند 70,38 ppm فهي متصلة بذرة أكسجين.

كربونين ميثيلين أكسيجينين (-CH₂-O) تمجنيها sp³ عند 61,09 ppm و 66,27 ppm . مجموعتي ميثيل (-CH₃) عند 24,86 ppm و 25,05 ppm .

14 كربونات ميثينية (CH-): مرتبطة كلها بذرات أكسجين إحداهن تمجنيها sp³ عند 79,24 ppm و الـ 8 ذرات الأخرى فتهمجنيها sp² عند : 129,66 ppm ، 116,26 ppm ، 130 ppm و 115,52 ppm و يعود إختفاء أربع ذرات كربون من التعداد الكلي لذرات الكربون كون هذه الأخيرة لها نفس الإنزياحات الكيميائية مع مثيلاتها في الحلقتين العطريتين البارائين ثنائيتي الإستبدال. و يظهر ذلك جليا في طيف ¹H NMR إذ تظهر ثنائية عند 7,39 ppm ، 6,72 ppm ، 7,22 ppm و 6,97 ppm بتكامل بروتونين لكل منها.

أما الـ 5 الكربونات الميثينية المتبقية تمجنيها sp³ عند : 100,80 ppm ، 73,50 ppm ، 76,57 ppm ، 69,95 ppm و 75,74 ppm وترفق كلها لجزئ السكر.

في المجال الأوليفيني في طيف ¹H NMR تتجلى إشارات ثنائيتين لبروتونين ميثينيين في المجال المنخفض عند 6,31 ppm و 7,61 ppm بثابت تزاوج 15,90 Hz و 16,01 Hz مشخصة لرابطة ثنائية ذات تشكيل مفروق.

دائما في المجال الأوليفيني نلاحظ ظهور إشارة ثنائية عند 7,99 ppm ، 4,79 ppm بثابت تزاوج 7,55 Hz تدل على كونها ترجع لبروتون أنوميري لسكر الجلوكوز. وقد دلت التعالقات الموضحة في طيف HMBC إرتباط السكر من موقعين:

عن طريق جسر أكسيجين حسب $\delta C_{1'} = 100,80$ ppm

إرتباط مع ذرة أكسجين لأستر حسب $\delta C_{6'} = 61,09$ ppm

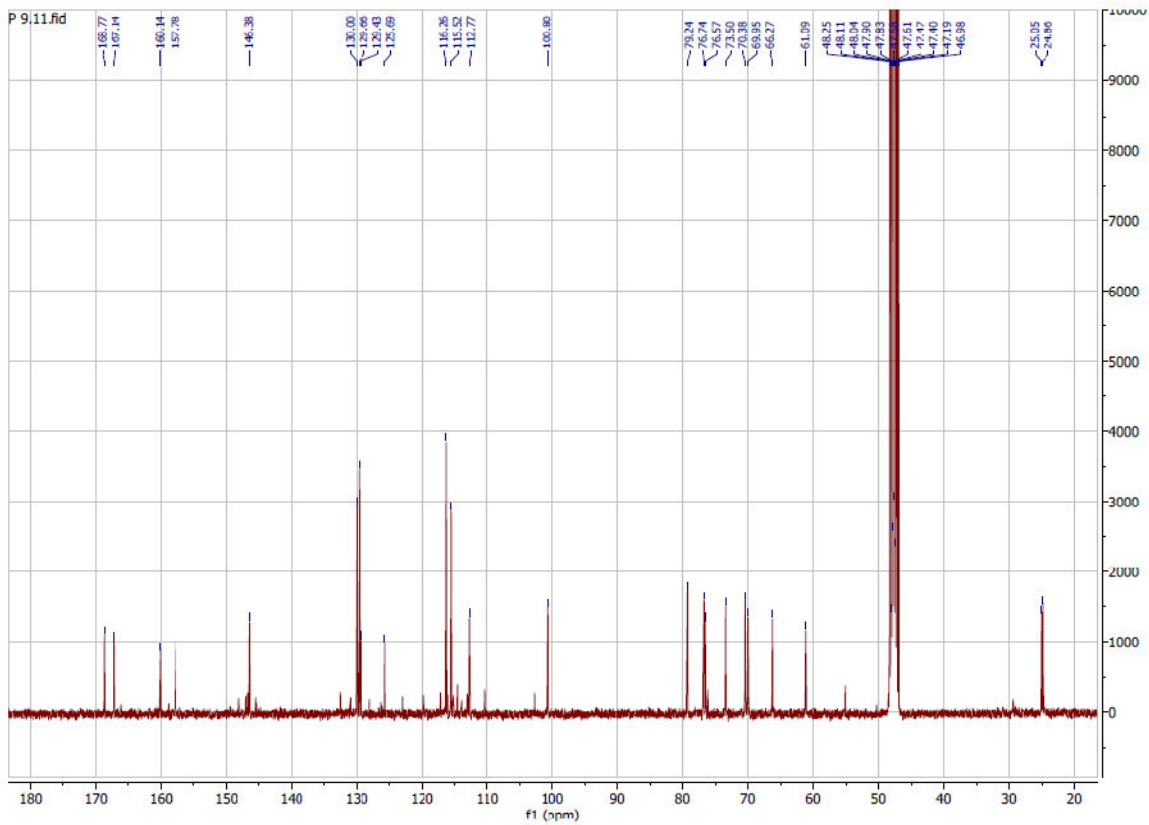
في حين تنحصر باقي إشارات بروتونات السكر في المجال (3,30 - 3,78)

باستعمال مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون مع تقنية COSY و تعالق البروتونات AMX للحلقة البنزينية عند $(\delta_H : 7,22 (2H, d, J = 8,68 Hz) ,$ و $(\delta_H : 6,97 (2H, d, J = 8,70 Hz)$ تبين أن الحلقة البنزينية ثنائية الإستبدال في موضعي بارا (1" و 4").

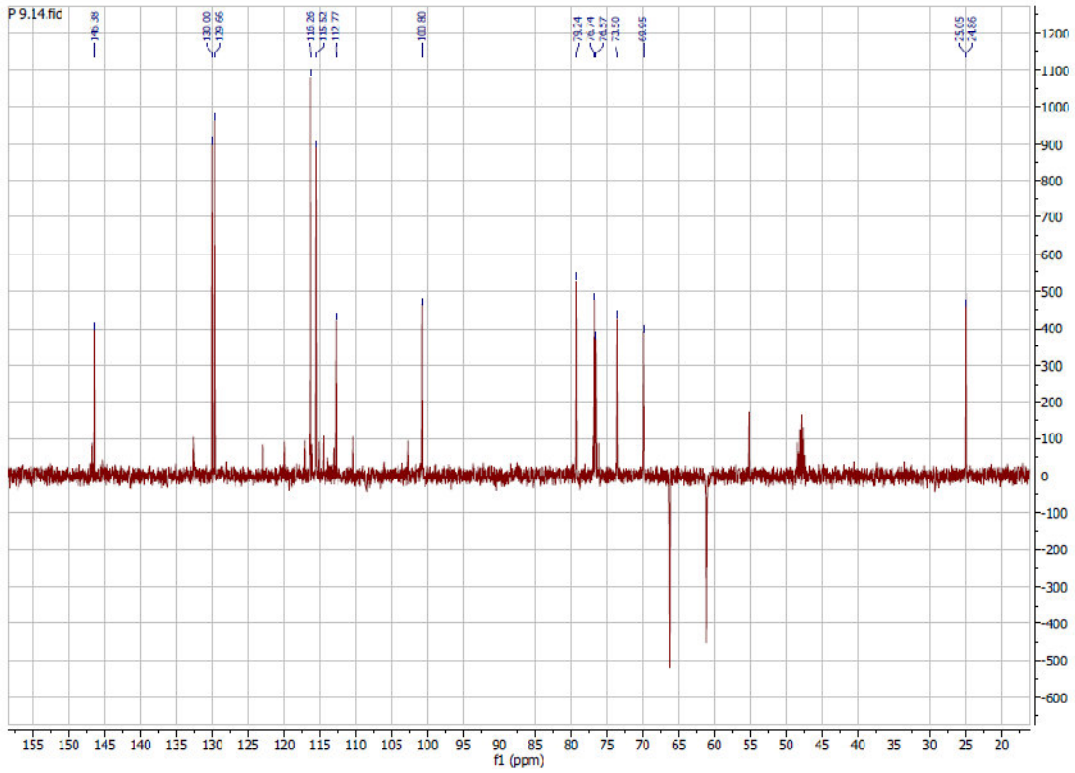
أما بالنسبة للحلقة البنزينية المشكلة لجزئ coumaroyl فإن ثوابت التزاوج وتكاملات الثنائيتين عند

الجانبا أيضا (1 و 4).
 $\delta_{H_{\alpha}}$: 6,31 (1H, d, J = 15,90 Hz) و $\delta_{H_{\beta}}$: 7,39 (2H, d, J = 8,64 Hz) ، تؤكد أن هذه الحلقة بدورها ثنائية الإستبدال في موضعي

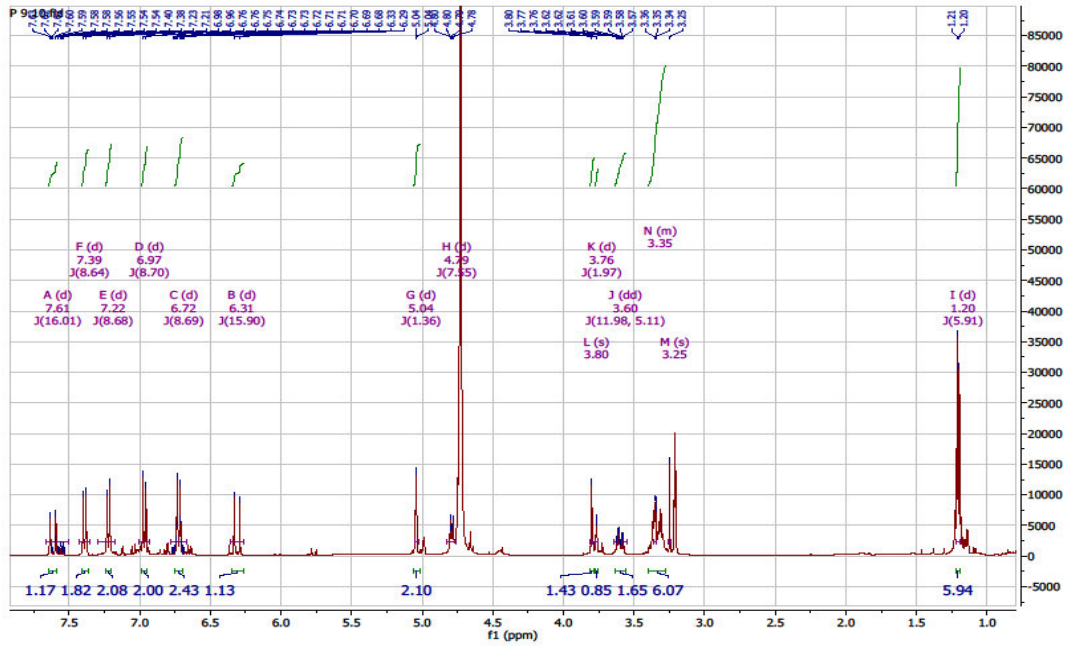
كما أن ظهور H_{α} و H_{β} بروتوني الرابطة المزدوجة عند $\delta_{H_{\alpha}}$: 6,31 (1H, d, J = 15,90 Hz) و $\delta_{H_{\beta}}$: 7,61 (1H, d, J = 16,01 Hz) وهما مميّزان لرابطة ثنائية إيثيلينية ثنائية الإستبدال مفروق (trans diaxial) . المترافقة مع الوظيفة أستر وهو ما يؤكد طيف الكربون ^{13}C الذي يبين إشارة الإزاحة الكيميائية الضعيفة مما يقودنا إلى كون كربوني الرابطة الثنائية هما C_7 و C_8 حيث أن إزاحة بروتينيهما هي δ_{H_7} : 6,31 و δ_{H_8} : 7,61ppm. كما نلاحظ في المجال المرتفع مجموعتين ميثيل عند δ_H : 1,20 (3H, S) و δ_H : 1,21 (3H, S) والتي ترتبط بـ C_{11} و C_{12} على التوالي.



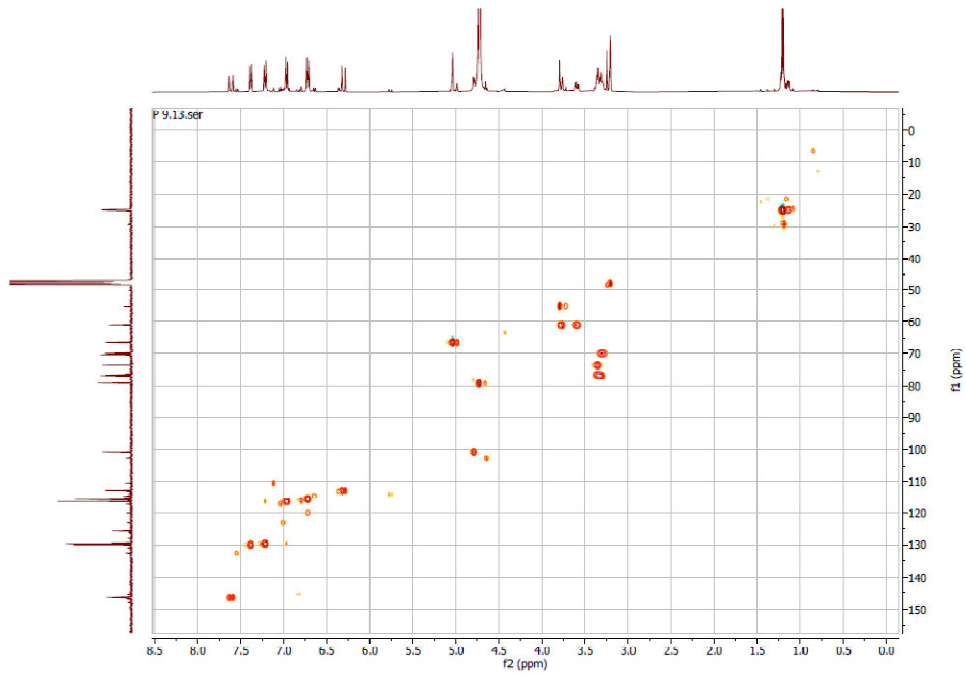
الشكل 38: طيف ^{13}C NMR للمركب P9



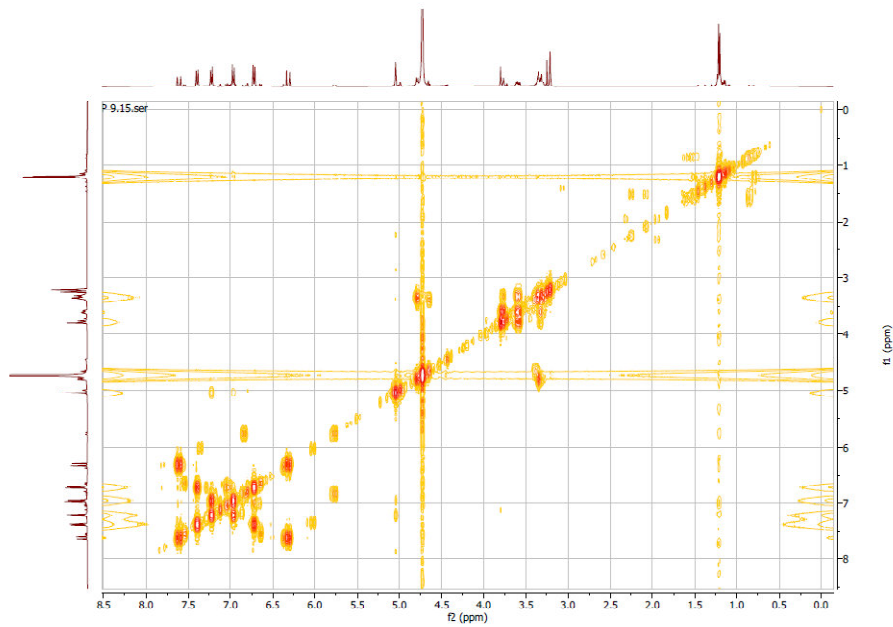
الشكل 39 : طيف DEPT للمركب P9



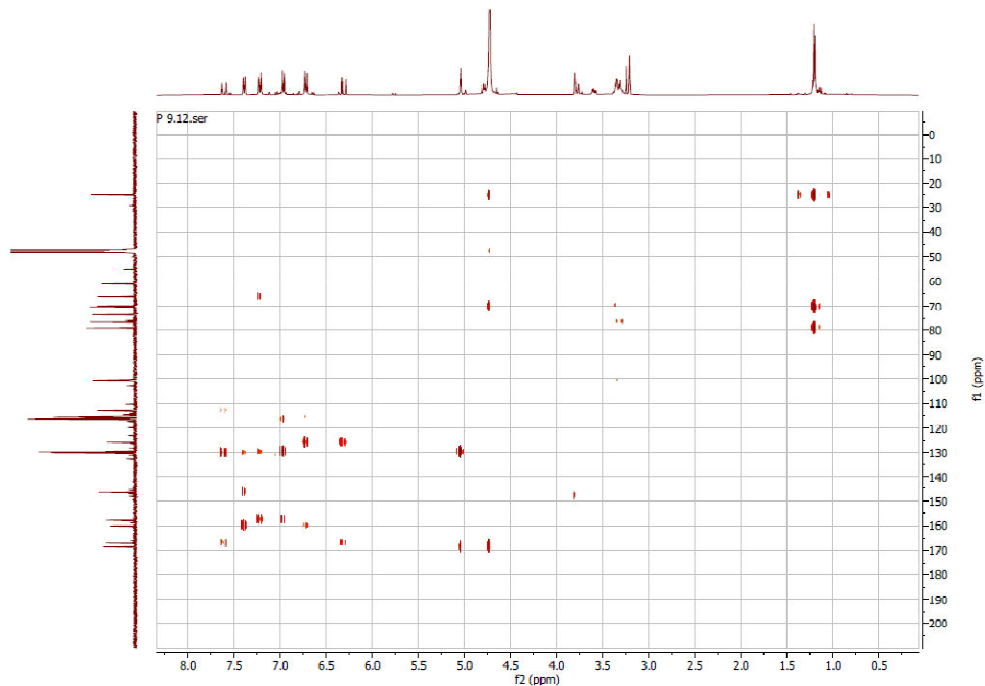
الشكل 40: طيف البروتون ^1H NMR للمركب P9



الشكل 41 : طيف HSQC للمركب P9



الشكل 42: طيف COSY للمركب P9



الشكل 43 : طيف HMBC للمركب P9

ولتحديد موقع إرتباط السكر بالهيكل نلاحظ أن إشارة الثنائية عند $\delta_H = 4,79$ ppm تخص البروتون الأنوميري H_1 المرتبط بالكربون C_1 ($\delta_C 100,8$) و يتعالق مع C_4 ($\delta_H 157,78$) وهذا ما يدل على أن الجليكوز مرتبط مع الكربون المستبدل C_4 للحلقة البنزينية. هذا الأخير يتعالق مع البروتونات H_3 ($\delta_H 6,97$) و H_5 ($\delta_H 6,97$) واللذان يرتبطان مع كربونات الحلقة البنزينية C_3 ($\delta_H 116,26$) و C_5 ($\delta_H 116,26$) على التوالي. من جهة أخرى يتعالق البروتون H_7 ($\delta_H 5,04$) مع الكربون المستبدل الثاني في الحلقة البنزينية C_1 ($\delta_C 129,43$) ، C_2 ($\delta_C 129,66$) و C_6 ($\delta_C 129,66$) نستنتج من هذا أن C_1 مرتبط مع C_7 ($\delta_C 66,27$). كذلك فإن تعالق H_7 ($\delta_H 5,04$) مع C_8 ($\delta_C 168,77$) تثبت أن C_7 و C_8 يرتبطان برابطة أستر.

بالنسبة لبروتونات المجموعتين الميثيليتين ومن خلال طيف HSQC، تلحق بذرات الكربون C_{11} و C_{12} .

و بالنظر إلى تعالقات بروتونات الميثيل H_{11} ($\delta_H 1,20$) مع كل من C_9 ($\delta_C 79,24$) ، C_{10} ($\delta_C 70,38$) و C_{12} ($\delta_C 25,05$) نستنتج أن كلا الميثيلين C_{11} ($\delta_C 129,66$) و C_{12} ($\delta_C 25,05$) مرتبط بالكربون C_{10} ($\delta_C 129,66$).

ومما يعزز هذا الإستنتاج هو ما يتجلى من طيف HMBC بحيث يظهر جليا تعالق البروتون H_9 (δ_H 4,72) مع C_{10} (δ_C 70,38) و C_8 (δ_C 168,77) و C_{12} (δ_C 25,05).

بالنسبة للحلقة البنزينية الثانية (coumaroyl) و كما ذكرنا آنفا فإن هذه الأخيرة بارا مستبدلة . الكربون المستبدل C_4 (δ_C 160,14) وبالمنظر للإنزياح فهو مرتبط بميدروكسيل أما C_1 (δ_C 125,69) فهو يرتبط مع كربون الرابطة المزدوجة C_7 .

ويتضح هذا من خلال تعالقات ذرات الهيدروجين التي تظهر في طيف HMBC .

كما أن الهيدروجينين الأليفيايين H_7 (δ_{H_7} : 6,31 (1H, d, J = 15,90 Hz)) و H_8 (δ_{H_8} : 7,61 (1H, d, J = 16,01 Hz)) والذين ألحقا بالكربونين C_7 (δ_C 112,77) و C_8 (δ_C 146,38) على التوالي حيث فكان التعالقات كالاتي :

H_7 (δ_H 6,31) مع C_1 (δ_C 125,69) ، C_8 (δ_C 146,38) و C_9 (δ_C 167,14)

H_8 (δ_H 7,61) مع C_1 (δ_C 125,69) ، C_7 (δ_C 112,77) ، C_2 (δ_C 130) و C_9 (δ_C 167,14) كل هذه المعلومات تدل على تواجد مجموعة كومارويل (E-P-coumaroyl).

كما أن إنزياح H_6 (δ_H 3,60 – 3,78) نحو المجال المنخفض وتعالقه مع الكربون الأليفاتي C_8 تؤكد أن جزئ الكومارويل ملتصق بالكربون الميثيليني للسكر C_6 (δ_C 61,09).

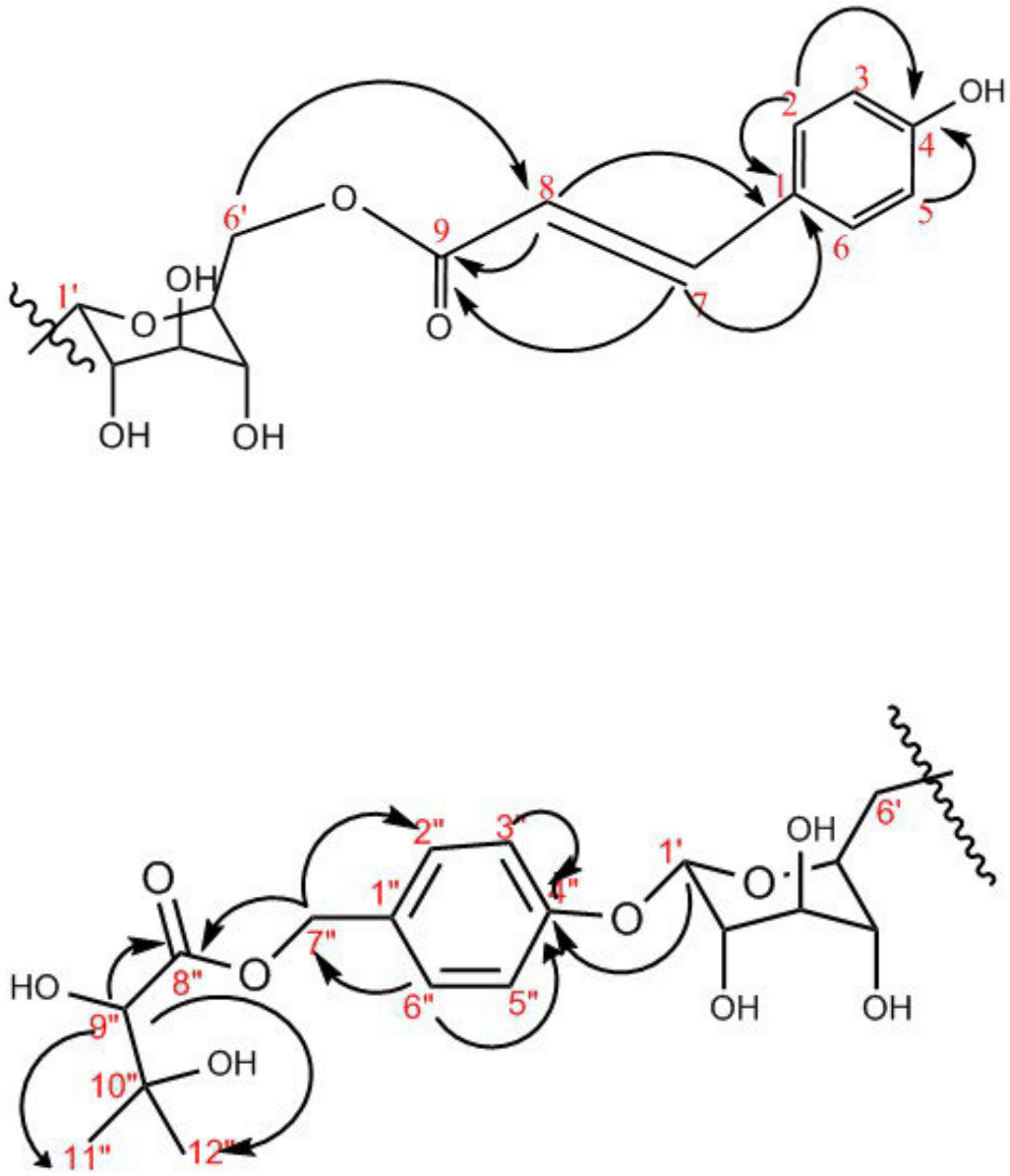
وتتعلق هيدروجينات جزئ الكومارويل كالاتي :

H_2 (δ_H 7,39) مع C_4 (δ_C 160,14) و C_8 (δ_C 146,38)

H_3 (δ_H 6,72) مع C_1 (δ_C 125,69) ، C_4 (δ_C 160,14) و C_8 (δ_C 146,38)

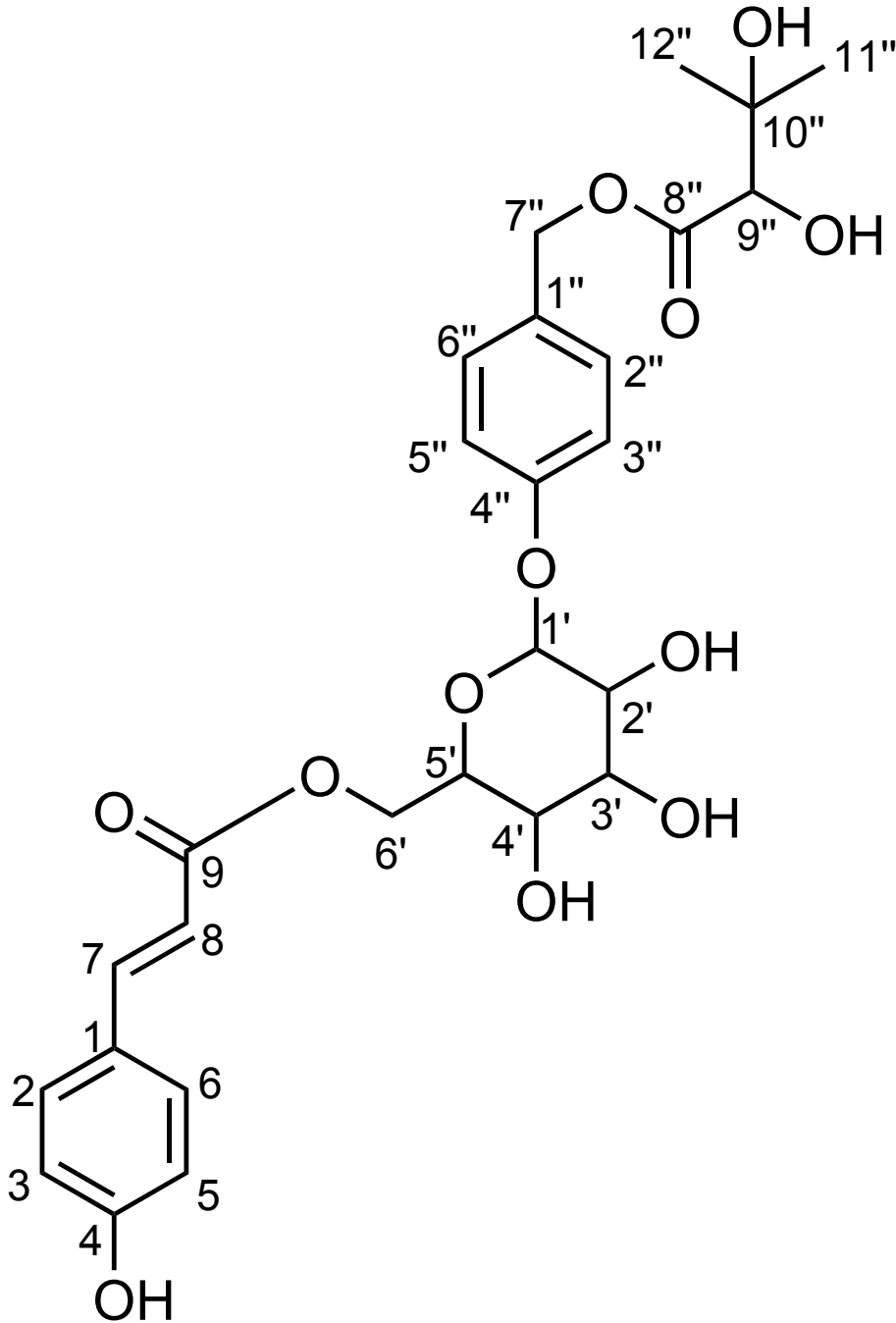
كما أن التعالقات التي تظهر في طيف COSY بين كل من : (H_6-H_5) H_3-H_2 و $(H_6''-H_5'')$ $H_3''-H_2''$

تؤكد إرتباط ذرات الكربون الملحقة بها. C_2 مع C_3 (C_5 مع C_6) و C_2'' مع C_3'' (C_5'' مع C_6'')



الشكل 44: التعلقات وفق HMBC في المركب P9

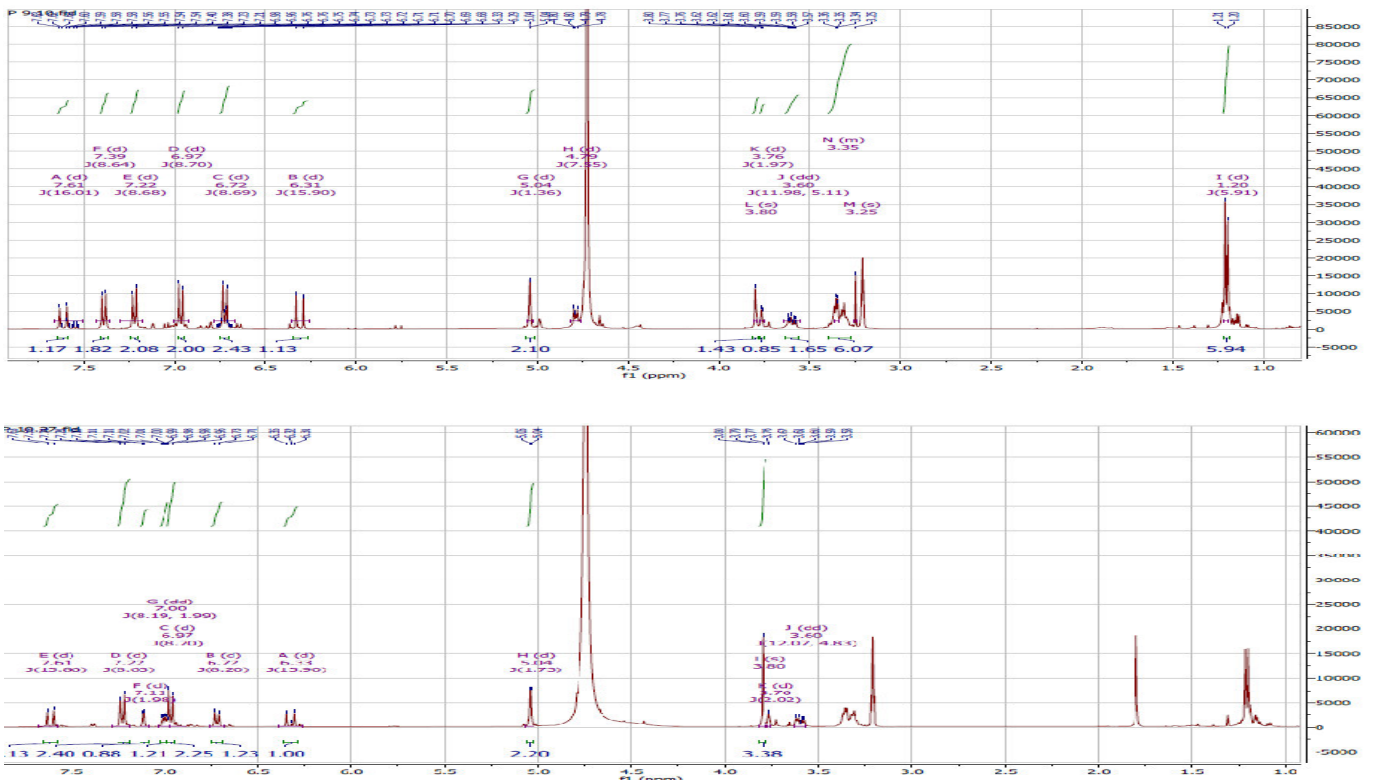
ومن خلال كل ما ورد يمكننا إستنتاج الهيكل البنوي للمركب P9



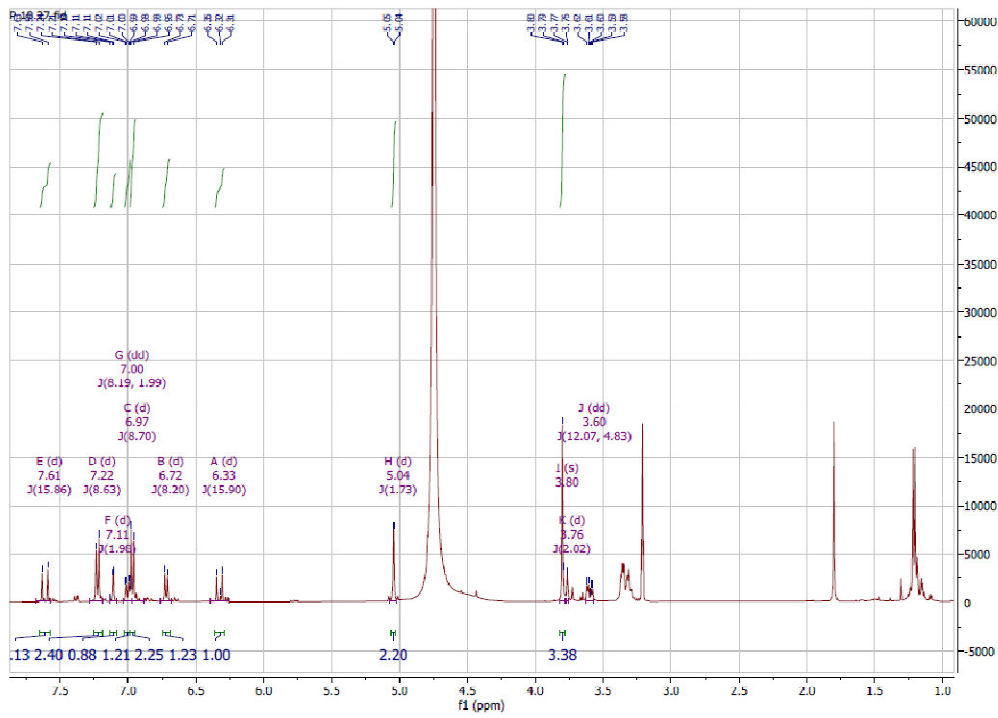
IV-2-4 - ب- التحليل النيوي للمركب P10:

نلاحظ تطابقا شبه كلي للأطياف مع ملاحظة إختلاف بسيط. فمن حيث تعداد ذرات الكربون نلاحظ أن هذا المركب P10 يحتوي على 28 ذرة وهو يفوق المركب P9 بذرة واحدة. وبمقارنة الأطياف (الشكل 46) نستنتج ما يلي :

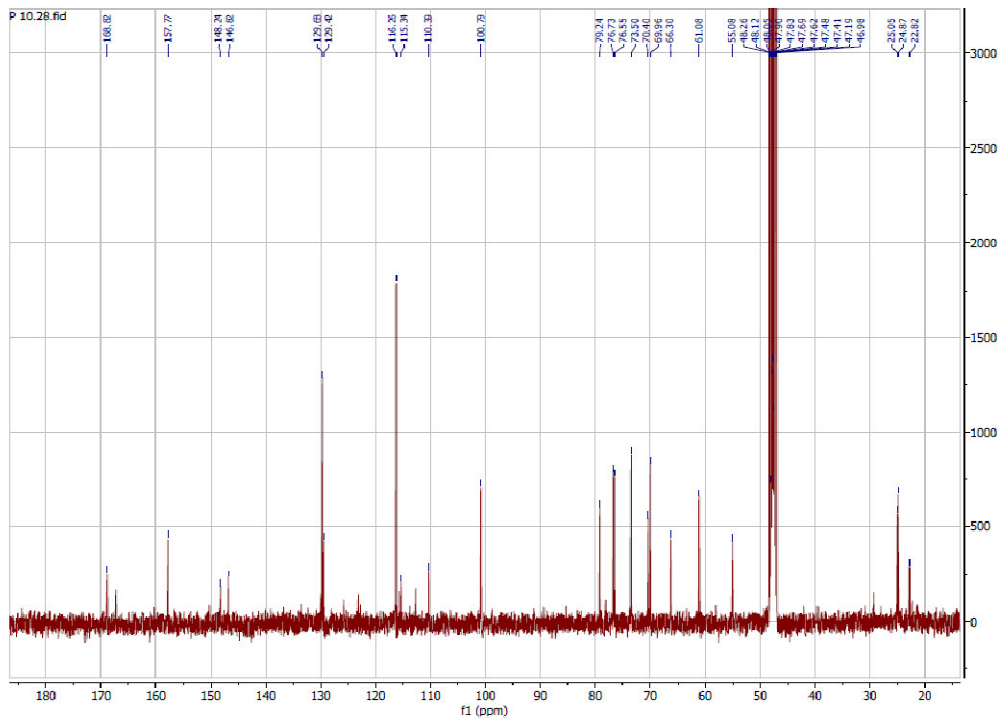
بالنسبة للحلقة البنزينية لا يوجد أي إختلاف. فهي باراثنائية الإستبدال مع إختفاء ذرتين كربون وذلك لأن لها نفس الإنزياحات الكيميائية مع مثيلاتها. في حين بالنسبة لحلقة الكومارويل نلاحظ إختفاء ذرة كربون واحدة. وهذا يعني أن كلا الموقعين بارا وميتا مستبدلين. وهذا ما يؤكد طيف البروتون بحيث يظهر جليا إختفاء الإشارة الخاصة بالبروتون H₅ كما سجلنا ظهور إشارة أحادية عند 3,80 ppm وترجع لمجموعة ميثوكسي. ومنه نستنتج أن الحلقة البنزينية لجزئ الكومارويل أصبحت ثلاثية الإستبدال وهو ما يعرف بإسم فيروليك (ferulic).



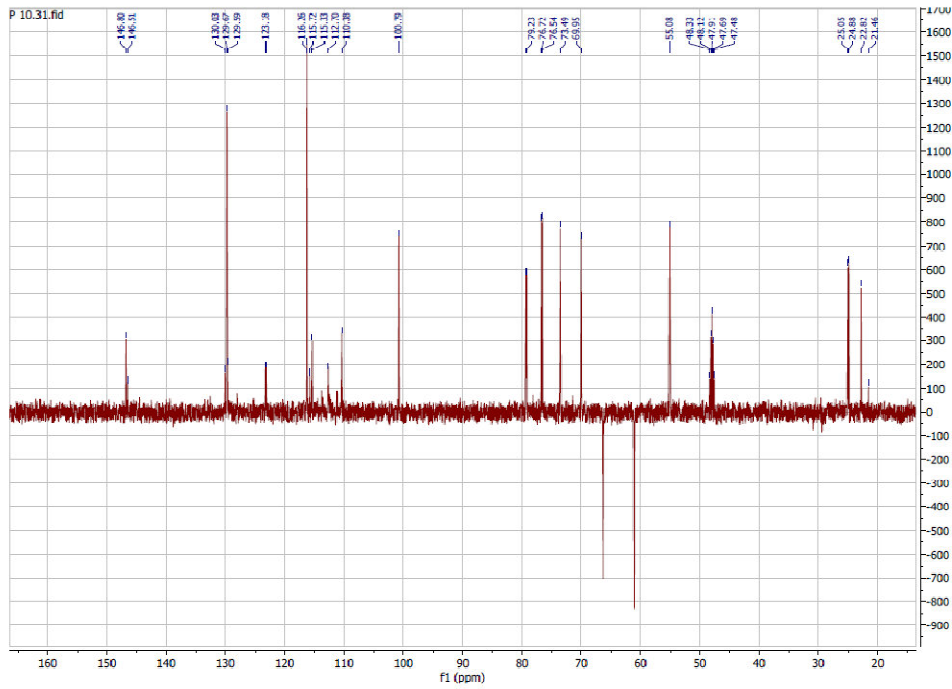
الشكل 45 : طيفي البروتون للمركبين P9 و P10



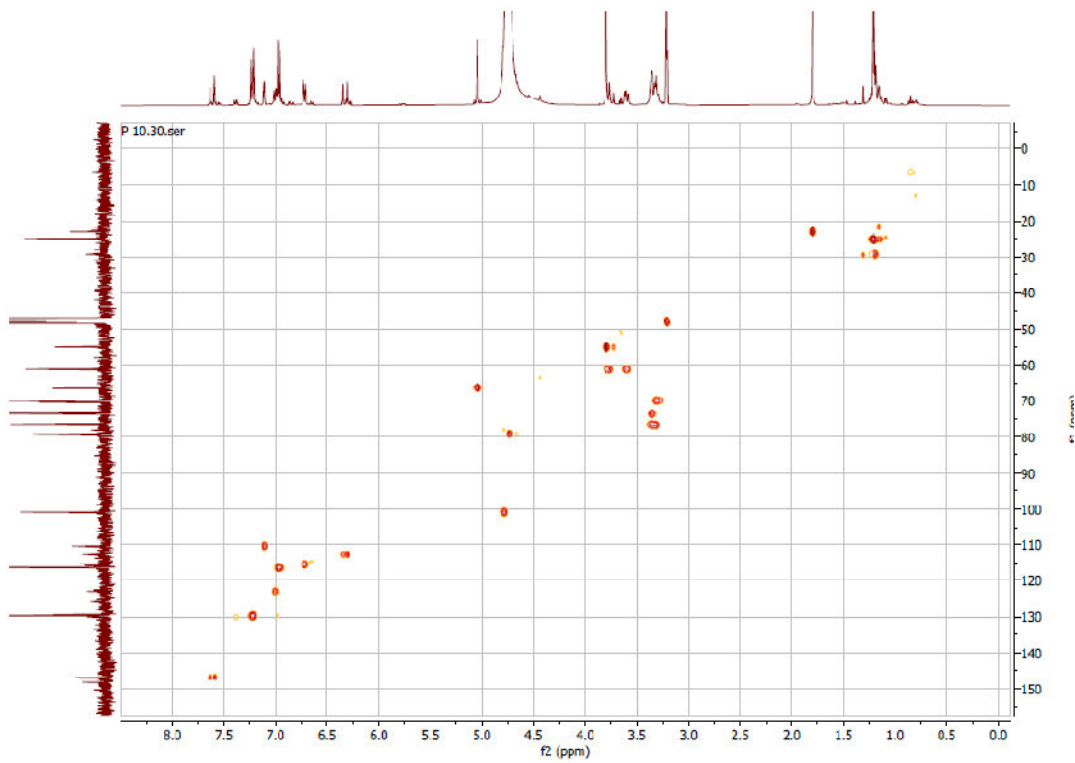
الشكل 46 : طيف البروتون ^1H NMR للمركب P10



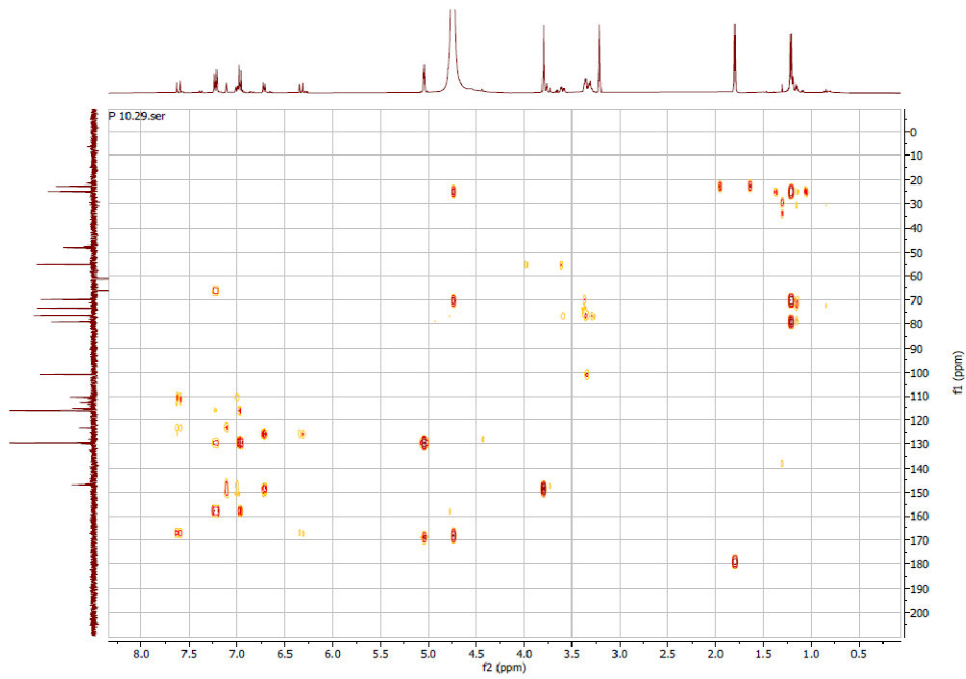
الشكل 47 : طيف ^{13}C NMR للمركب P10



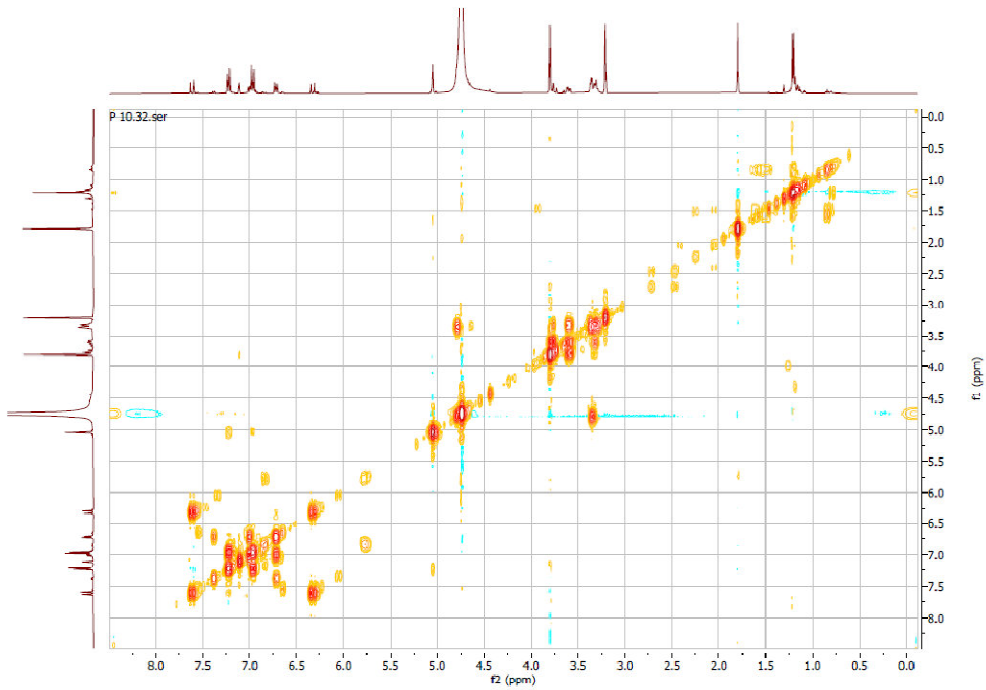
الشكل 48 : طيف DEPT للمركب P10



الشكل 49 : طيف HSQC للمركب P10

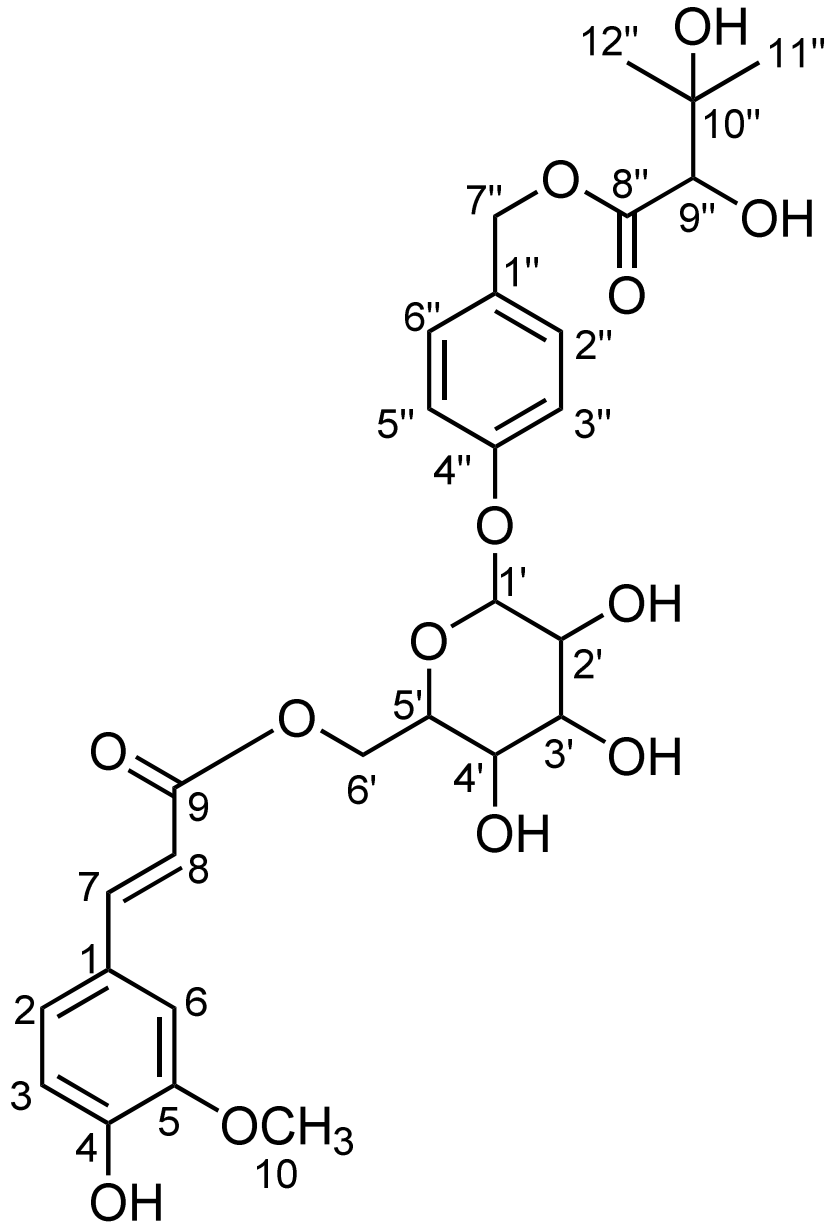


الشكل 50 : طيف HMBC للمركب P10



الشكل 51 : طيف COSY للمركب P10

ويتطابق باقي الأطياف مما يمكننا من إقتراح الهيكل البنوي للمركب P10 كالآتي :



الجدول 9 : الإزاحات الكيميائية لذرات H و C

P9				P10		
p-coumaroyl moiety				p-coumaroyl moiety		
	σ H	σ C	multiplicity	σ H	σ C	Multiplicity
1	-	125.69	C	-	125.87	C
2	7.39 d 8.64	130	CH	7.00 d 8.19; 1.99	123.18	CH
3	6.72 d 8.69	115.52	CH	6.72 d 8.20	115.34	CH
4	-	160.14	COH	-	148.24	COH
5	6.72 d 8.69	115.52	CH	-	148.24	C
6	7.39 d 8.64	130	CH	7.11 d 1.98	110.39	CH
7	6.31 d 15.90	112.77	=CH	6.33 d 15.90	112.70	=CH
8	7.61 d 16.01	146.38	=CH	7.61 d 15.86	146.82	=CH
9	-	167.14	C=O	-	167.24	C=O
10	-	-	-	3.80 s (3H)	55.08	O-CH ₃
glucose moiety				glucose moiety		
1'	4.79 d 7.55	100.80	CHOH	4.79 overlap	100.79	CHOH
2'	3.35	73.50	CHOH	3.31	76.73	CHOH
3'	3.35	76.57	CHOH	3.35	76.55	CHOH
4'	3.30	69.95	CHOH	3.30	69.96	CHOH
5'	3.31	76.74	CHOH	3.35	73.50	CHOH
6'	3.60 dd 11.98, 5.11 3.78 dd 11.97, 1.84	61.09	CH ₂ OH	3.60 dd 12.07; 4.83 3.76 dd 12.01; 2.02	61.08	CH ₂ OH
benzyl alcohol moiety				benzyl alcohol moiety		
1''	-	129.43	C	-	129.42	C
2''	7.22 d 8.68	129.66	CH	7.22 d 8.63	129.68	CH
3''	6.97 d 8.70	116.26	CH	6.97 d 8.70	116.26	CH
4''	-	157.78	C-OH	-	157.77	C-OH
5''	6.97 d 8.70	116.26	CH	6.97 d 8.70	116.26	CH
6''	7.22 d 8.68	129.66	CH	7.22 d 8.63	129.68	CH
7''	5.04 d 1.36	66.27	-CH ₂ -O-	5.04 d 1.73	66.30	-CH ₂ -O-
2,3-dihydroxyisovaleroyl moiety				2,3-dihydroxyisovaleroyl moiety		
8''	-	168.77	C=O	-	168.82	C=O
9''	4.72	79.24	CH-OH	4.73 overlap	79.24	CH-OH
10''	-	70.38	C	-	70.40	C
11''	1.20	24.86	CH ₃	1.20	24.87	CH ₃
12''	1.20	25.05	CH ₃	1.22	25.05	CH ₃

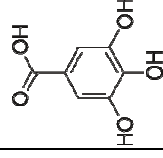
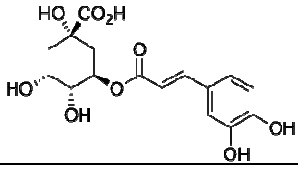
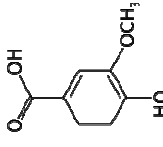
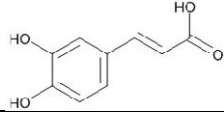
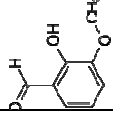
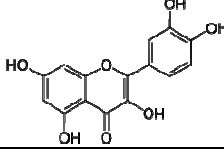
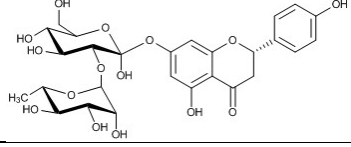
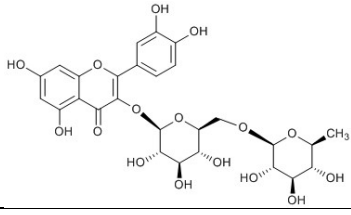
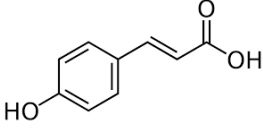
IV-6 نتائج التحليل بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC :

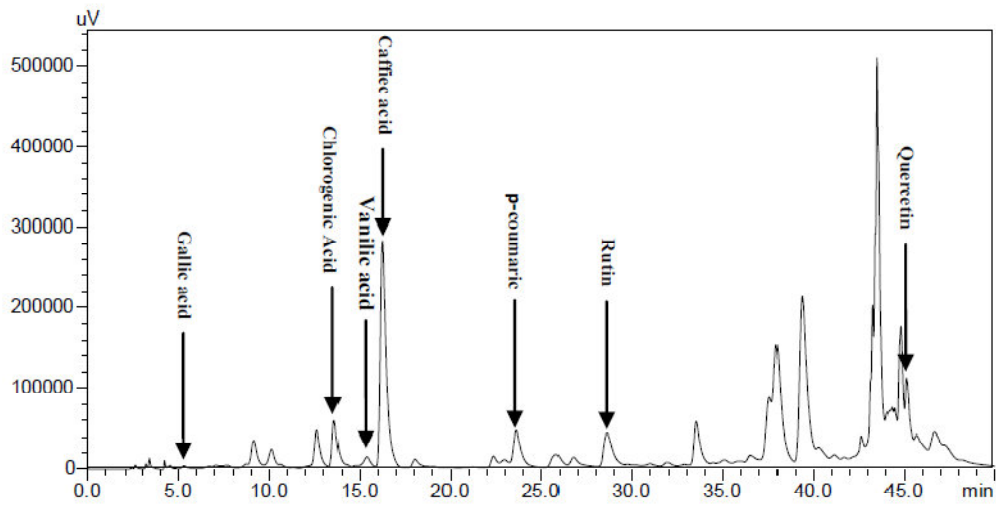
أثبتت الأبحاث السابقة، وباستعمال عدة تقنيات مثل HPLC ، أن نبات البطيخ الأحمر (الدلاع) يحتوي على العديد من المركبات القطبية بما في ذلك الأحماض الفينولية والفينولات وغيرها. فقد ذكرت المراجع أنه تم الكشف عن 71 مركبا متواجدا في نبتة الدلاع. [129]

اما في بحثنا هذا فقد تم العثور على تسعة (9) مركبات فقط وهذا راجع لعدم توفر المركبات العيارية. وتختلف نسبة وتراكيز تواجدها في مستخلص كل من الأسيتات والботانول قيد الدراسة.

نلاحظ أن Gallic Acid يتواجد بكمية أكثر في المستخلص البوتانولي منه في مستخلص الأسيتات. أما بالنسبة للأحماض الفينولية الأخرى (Chlorogenic Acid، Vanilic Acid، Caffiec Acid و p-Comaric Acid) فلاحظنا أنها تتواجد بكميات أكثر في مستخلص الأسيتات عنها في مستخلص البوتانول. كما نلاحظ أيضا أن المركبات الأكثر قطبية (الفينولات الجليكوزيدية) (Rutin، Naringin) تتواجد في المستخلص البوتانولي بمقادير أكبر منها في مستخلص الأسيتات ، أما بالنسبة لـ Quercetin الأقل قطبية فيتواجد في مستخلص الأسيتات بكميات أكبر عنها في المستخلص البوتانولي. هذه النتائج تتوافق مع ما جاء في الأعمال السابقة بحيث ذكر أن هذه المركبات وجدت في لب البطيخ الأحمر [130]، القرعة [131] و الخيار [132]. (الجدول 9).

الجدول 10 : بعض المركبات المتواجدة في مستخلصات أوراق الدلاع

تركيز المركبات ($\mu\text{g/g}$)	مستخلص أسيتات الإيثيل	مستخلص البوتانولي	هيكل المركب	زمن الإحتباس t_R (min)
Gallic Acid	572,341	610,859		5.278
Chlorogenic Acid	13164,810	4378,897		13.561
Vanilic Acid	1378,628	0		15.341
Caffieic Acid	16825,033	2785,502		16.205
Vanilin	0	0		
Quercetin	9394,138	4012,244		45.086
Naringin	0	932,153		
Rutin	11035,226	20810,070		28.592
p-Comaric Acid	5888,813	142,447		23.594

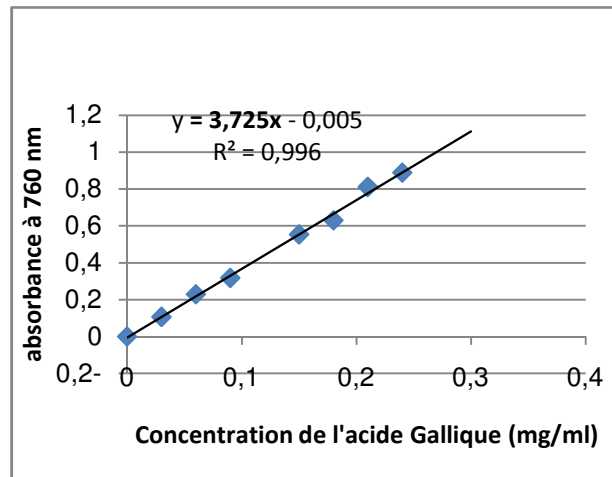


الشكل 52 : كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص الأسيتات لأوراق الدلاع

IV-7- تقييم كمية الفينولات و الفلافونيدات الكلية :

IV-7-1 تحديد الكمية الكلية للفينولات (Total Phenolic Contents) TPC

لتحديد الكمية الكلية للفينولات إتبعنا طريقة Folin من أجل ذلك قمنا أولاً بالرسم البياني للمنحنى القياسي [125] (الشكل 43).



الشكل 53 : المنحنى القياسي لحمض الغاليك

طريقة العمل :

نأخذ كمية من المستخلص المراد فحصه وذلك بإذابته أولاً في أقل كمية من الميثانول ثم نمدد المحلول إلى 100 مرة. وبعد قراءة الإمتصاص نحسب كمية الفينولات الكلية بواسطة العلاقة التالية :

$$C \left(\frac{mgAGE}{gExtract} \right) = \frac{A \times FD \times V}{K \times m}$$

بحيث A الإمتصاص، FD معامل التمديد، V حجم المحلول، K ميل منحنى التوحيد.

تعاد التجربة ثلاث (03) مرات وتأخذ القيمة الوسطية.

إختبار العينات الثلاثة (مستخلص الكلوروفورم، مستخلص الأسيتات ومستخلص البوتانول) أعطى النتائج المدونة على الجدول 10.

تعطى القيم بالمليغرام من حمض الغاليك المكافئ نسبة لغرام من المادة الجافة (mg AGE/g MS)

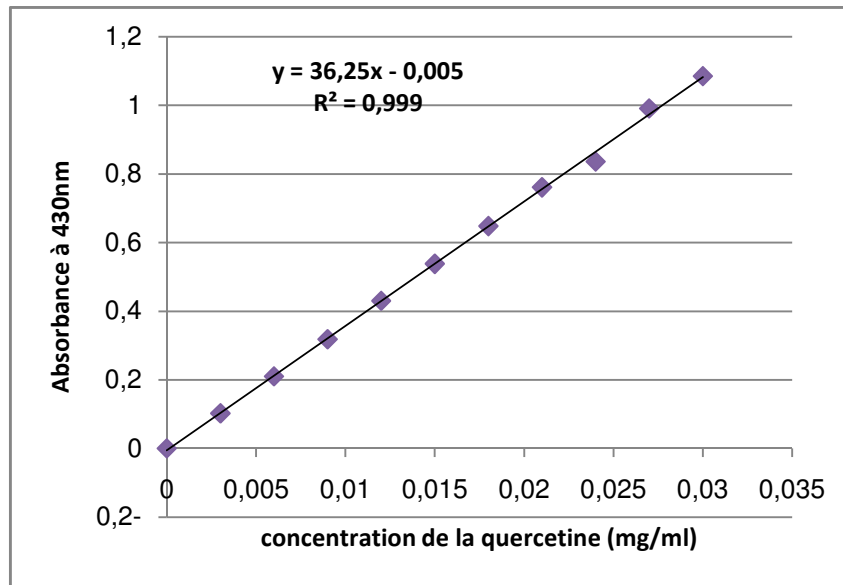
الجدول 11 : الفينولات الكلية للمستخلصات

المستخلص	الفينولات الكلية (mg AGE/g MS)
الكلوروفورمي	0,359 ± 0,012
أسيتات الإيثيل	1,156 ± 0,035
البوتانولي	10,528 ± 0,956

IV -7- 2 تحديد الكمية الكلية للفلافونيدات (Total Flavonoid Contents) TFC

نقوم أولاً برسم المنحنى القياسي وذلك بإستعمال كلوريد الألومنيوم. [126] ترسم منحنيات الإمتصاص بدلالة تراكيز الـ

Quercetin. الشكل 44



الشكل 54 : المنحنى القياسي لـ Quercetine

تعطى القيم بالميكروغرام من مركب الكرسيتين المكافئ نسبة لغرام من المادة الجافة ($\mu\text{g EQ/g MS}$) وقد دونت نتائج إختبار عينات

المستخلصات الثلاثة في الجدول 11.

الجدول 12: الفلافونيدات الكلية للمستخلصات

المستخلص	الفلافونيدات الكلية ($\mu\text{g EQ/g MS}$)
الكلوروفورمي	$56,010 \pm 1,277$
أسيئات الإيثيل	$32,964 \pm 0,075$
البوتانولي	$278,771 \pm 5,763$

المناقشة: من خلال النتائج الموضحة في الجدولين أعلاه نلاحظ أن كمية الفلافونيدات وكذلك الفينولات المتواجدة في أوراق *Citrullus lanatus*

(الدلاع) ، جد معتبرة. تتراوح كمية الفينولات ما بين $0,359 \pm 0,012$ و $10,528 \pm 0,956$ (mg AGE/g MS). أما كمية

الفلافونيدات فهي تتراوح ما بين $32,964 \pm 0,075$ و $278,771 \pm 5,763$ ($\mu\text{g EQ/g MS}$).

وعلى ضوء هذه النتائج تستنتج أن أوراق الدلاع وخاصة المستخلص البوتانولي بحوز على الكميات الأكبر من الفينولات أو الفلافونيدات ، مقارنة مع المستخلصين الآخرين. وهذا ما يتوافق مع النتائج المتحصل عليها في مطيافية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة. كما تجدر الإشارة أيضا أن كمية الفينولات أقل مما وجد في المستخلص الإيثانولي لبذور الدلاع في حين أن كمية الفلافونيدات تفوقها بكثير. [28]

IV -8- الفعالية المضادة للبكتريا بطريقة الانتشار في وسط صلب:

IV -8- أ - الطبقة الأولى من الوسط الزراعي :

يستعمل وسط الزرع Mueller Hinton (MH) لإختبار جميع الأنواع البكتيرية و يجب أن تكون المزرعة البكتيرية حديثة التحضير بحيث لا يتجاوز عمرها 19-24 ساعة. يصب الوسط (MH) المذاب في علب بيتري ذات القطر 90 مم ويترك ليتصلب.

IV -8- ب - المعلق البكتيري : تأخذ المستعمرات البكتيرية المعزولة عن بعضها البعض ويضاف إليها من 5 إلى 6 مل من ماء

فيزيولوجي معقم. و باستعمال جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية UV-Vis عند طول الموجة $\lambda = 620 \text{ nm}$. نقوم بضبط المزيج (حتى تتم قراءة الكثافة الضوئية ما بين 0.08 و 0.1 أي McFarland 0.5 هذه القيمة توافق مجال التركيز ($10^6 - 10^8$) وحدات مشكلة للمستعمرات (Colony-Forming Unit) \CFU\مل. يجب أن يستعمل هذا المعلق البكتيري خلال 15 دقيقة الأولى من تحضيره لتفادي زيادة نمو البكتيريا.

IV -8- ج - تحضر الطبقة الثانية من الوسط الزراعي: نأخذ 50 مل من (MH) وتزرع $200 \mu\text{l}$ من العينة البكتيرية.

السلالات البكتيرية : إستعملنا أربع سلالات بكتيرية مرجعية وهي :

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus sp</i>	ATCC 49619

طريقة العمل :

نصب حوالي 5 مل من الوسط الزراعي الثاني في علب بيتري المحتوية على الطبقة الأولى. يغمس القرص ذي القطر 6 ملم في المستخلص النباتي الخام بتركيز معلوم ثم يوضع في علب بيتري، المحتوية على وسط الزرع ، وبعد 30 دقيقة توضع العلب في الحاضنة تحت درجة حرار 37°C لمدة 24 ساعة. يقاس قطر التشبيط وتحدد حساسية سلالة ما وفقاً لقيم هذا الأخير والذي يجب أن يفوق قطر القرص .

النتائج : وقد دونت نتائج هذه التجربة في الجدول 12.

الجدول 13 : قطر التشبيط ب (مم) للمستخلصات : الكلو فورمي (C) ، أسيتات الإيثيل (A) و البوتانولي (B)

40			60			80			100			120			150			التركيز (mg/ml)	صيغة الغرام	البكتريا المختبرة
B	A	C	B	A	C	B	A	C	B	A	C	B	A	C	B	A	C	المستخلصات		
00	00	00	11	11	08	14	15	10	17	18	11	19	20	12	22	23	14	-	<i>Escherichia coli</i>	
00	00	00	00	00	00	11	10	18	12	11	16	13	13	11	15	14	12	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
00	00	00	10	10	12	12	14	14	16	17	15	20	20	17	25	26	20	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	
00	00	00	00	00	00	10	12	09	11	5.13	10	13	14	11	14	15	13	+	<i>Streptococcus sp</i>	
00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00		DMSO	

IV- 8- د- تحديد MIC:

طريقة العمل :

في وسط معقم نقوم بتحضر الوسط الجيلولوزي (MH). نحضر محاليل المستخلصات المخففة من 10% إلى 0.15% يتم بإتباع طريقة التمديد التالية : نأخذ 5 مل من المستخلص ونضيف له المحلول الجيلولوزي (MH) حتى نحصل على 50 مل من المحلول وبذلك يكون عندنا محلول بتركيز 10%. للحصول على التركيز 5% نأخذ نصف الكمية السابقة (25مل) من المحلول 10% ونكمل بالمحلول الجيلولوزي حتى نحصل على 50 مل. نواصل بنفس الطريقة حتى الوصول إلى التركيز 0.15%. نسكب 15 مل من كل تركيز في علب بيتري ثم نوضع في الحاضنة تحت 37°C م لتتحف ليتم بعدها زرع المعلق البكتيري بواسطة حقنة دقيقة، بمعدل 1µl

بتركيز 10^4 CFU /ml من مزرعة بكتيرية حديثة التحضير (18-24 سا). وتمت القراءة بعد 24 ساعة من الحضانة تحت 37°C م حينما لا يوجد نمو واضح للبكتيريا، ولا نأخذ بعين الاعتبار وجود مستعمرة او مستعمرتين . وقد دوننا النتائج المتحصل عليها في الجدول 13.

الجدول 14: قيم MIC ب (mg/l) لمستخلصات أوراق الدلاع

قيم MIC ب (mg/l)			البكتريا المختبرة
مستخلص البوتانول	مستخلص أسيتات الإيثيل	مستخلص الكلورفورم	
50	55	40	<i>Escherichia coli</i>
70	70	75	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
55	40	40	<i>Staphylococcus aureus</i>
50	75	50	<i>Streptococcus sp</i>

نتائج ومناقشة:

من خلال النتائج المتحصل عليها نجد أن قيمة MIC لمستخلص الكلورفورم قدرت ب 40 mg/l على البكتيريا *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* ونفس القيمة سجلت بالنسبة لمستخلص الأسيتات على بكتيريا *Staphylococcus aureus* . و بلغت قيمة MIC مقدار 50 mg/l بالنسبة للبكتيريا *Streptococcus sp* في المستخلصين الكلورفورمي والبوتانولي وهي نفسها بالنسبة للبكتيريا *Escherichia coli* وكذا بالنسبة للمستخلص البوتانولي. وبلغت قيمة MIC 55 mg/l في مستخلص الأسيتات بالنسبة للبكتيريا *Escherichia coli* ومستخلص البوتانول بالنسبة للبكتيريا *Staphylococcus aureus* وبلغت أيضا قيمة MIC 70 mg/l للمستخلصين أسيتات وبوتانول على البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*. وقد سجلت أعلى قيمة لـ MIC والتي بلغت 75 mg/l لمستخلصات الكلورفورم والأسيتات على البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Streptococcus sp* على التوالي.

ومن خلال النتائج المحصل عليها يمكننا أن نستنتج أن أوراق هذا النبات لها نشاط جيد مضاد للجراثيم ضد بعض الكائنات الحية الدقيقة.

IV-9- الفعالية المضادة للأكسدة :

IV-9-1- إختبار DPPH:

طريقة العمل : من أجل القيام بهذا الإختبار نقوم بتحضير المحاليل التالية :

1- محلول DPPH بتركيز $250\mu\text{M}$. أي ما يعادل 0.0049 g من DPPH في 50 ml من الميثانول.

2- نحضر تراكيز مختلفة من المستخلصات الثلاثة لأوراق الدلاع.

نأخذ 1ml من كل تركيز ونضيف لها 1ml من DPPH يترك المزيج - بعد رجه جيدا- 30 دقيقة في الظلام. ويتم بعدها قراءة الإمتصاص بواسطة

مطيافية UV-Vis عند طول موجة أعظمي $\lambda_{\text{max}} = 517\text{nm}$. ثم نحسب نسبة التثبيط من العلاقة التالية :

بجث أن : A_0 : إمتصاصية الجذور الحرة منفردة، أما A_i فتمثل إمتصاصية المزيج (جذور حرة +مستخلص).

نقارن النتائج المتحصل عليها بنتائج المركبين النقيين حمض الأسكوربيك (VC) والبطوكوفيرول (VE) اللذان يعاملان بنفس الطريقة السالفة الذكر.

نتائج ومناقشة:

من منحنيات تغير النسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز لمستخلصات النبات ، حمض الأسكوربيك (VC) و البطوكوفيرول (VE) (الشكل 56)

نحسب قيم IC_{50} والتي بلغت : 0,185g/l ، 0,158g/l ، 0,102g/l ، 0,010g/l ، 0,015g/l في مستخلصات النبات (

مستخلص الكلوروفورم، مستخلص الأسيتات و مستخلص البوتانول) وحمض الأسكوربيك (VC) والبطوكوفيرول (VE) على الترتيب .(الجدول

14). من خلال هذه القيم يتضح أن:

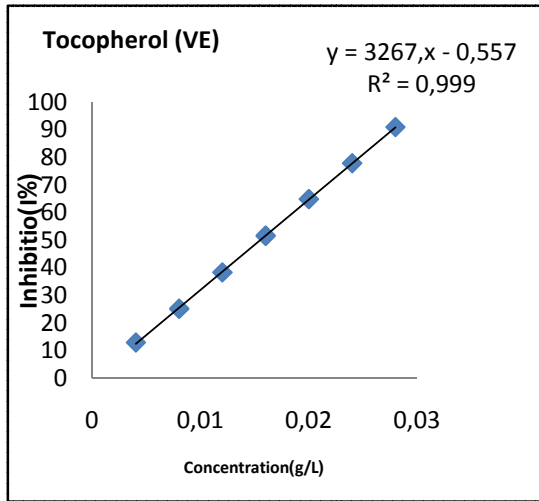
أن مستخلصات أوراق الدلاع أقل فعالية من حمض الأسكوربيك (VC) والبطوكوفيرول (VE) المستعملان كمواد حافظة في الصناعة الغذائية . و

بمقارنة المستخلصات فيما بينها نجد أن مستخلص البوتانول له فعالية مضادة للأكسدة أحسن من مستخلص الأسيتات وهذا الأخير له فعالية

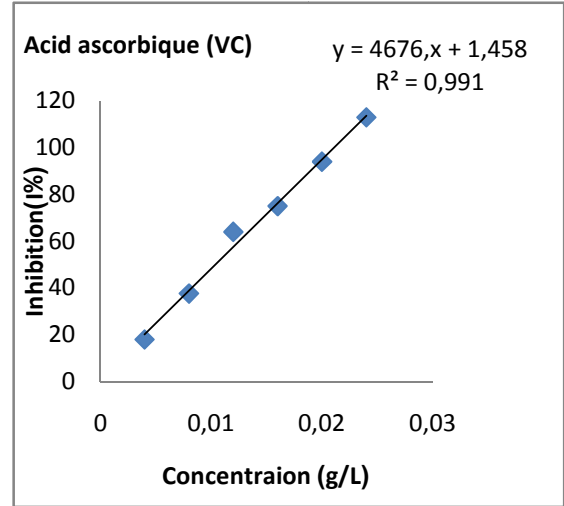
أحسن من مستخلص الكلوروفورم.

الجدول 15 : IC₅₀ للمستخلصات الثلاثة

المستخلص	مستخلص الكلوفورم	مستخلص أسيتات الإيثيل	مستخلص البيتانول	Vitamine C (VC)	Vitamine E (VE)
IC ₅₀ (g/l)	0,185	0,158±0.002	0,102±0.015	0,010	0,015

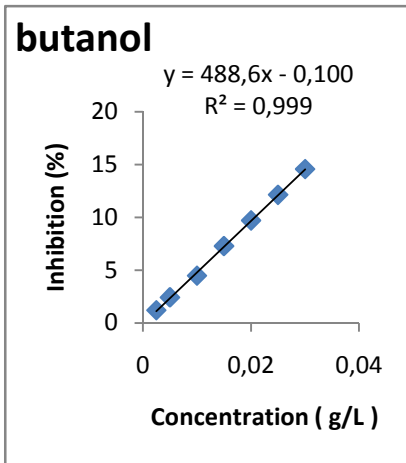


(ب)

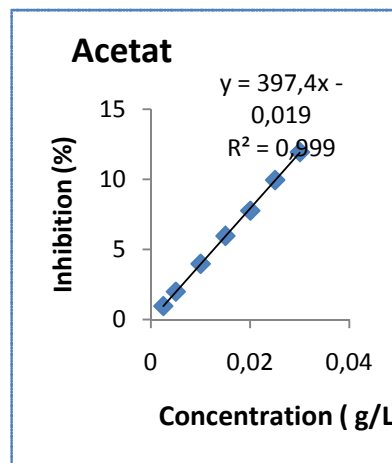


(أ)

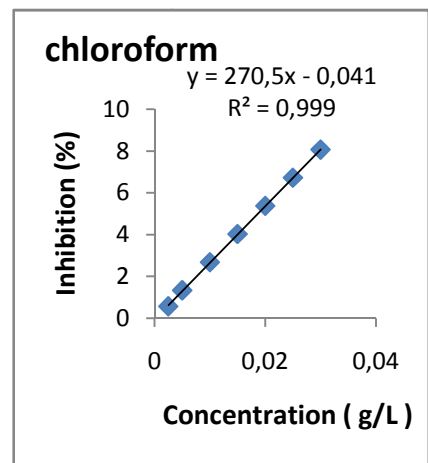
الشكل 55 : إختبار DPPH لـ (أ) : حمض الأسكوربيك (VC) و (ب) الطوكوفيرول (VE)



(ج)



(ب)



(أ)

الشكل 56 : إختبار DPPH لمستخلص : (أ) الكلوروفورم ، (ب) أسيتات الإيثيل و (ج) البيتانول

IV- 9- 2- إختبار (Ferric Reducing Antioxydant Power) FRAP

و يمكن هذا الإختبار في دراسة فاعلية مضادات الأكسدة الإرجاعية و ذلك بتفاعل الإرجاع اللوني، أي أنه يدرس مدى قدرة المستخلصات كمثبطات لعملية الأكسدة. يعتمد مبدأ الطريقة على تلوين أو عدم التلوين في الوسط الحامضي للمعقد :

[127-128]. 2,4,6-Tripyridyl-S-Triazine Ferrique (TPTZ)

تحضير المحاليل :

نقوم بتحضير ثلاثة محاليل. أولاً نحضير محلول موقى من أسيتات الصوديوم (CH_3COONa) 0.3 M عند $\text{pH}=3.6$. وذلك بأخذ 0.62 g من أسيتات الصوديوم مع 3.2 ml من حمض الخل ونضيف الماء المقطر حتى نحصل على حجم 200 ml . من جهة أخرى نقوم بتحضير محلول 0.01 M TPTZ وهو ما يكافئ 0.078 g من هذا الأخير في 25 ml من حمض HCl . أما المحلول الثالث فيخصص ثلاثي كلوريد الحديد $[\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ وذلك بأخذ 0.135 g منه ونذيبها في 25 ml من الماء. نخلط المحاليل الثلاثة بتكافؤ $10:1:1$ ونسميه خليط FRAP من أجل رسم المنحنيات القياسية للطوكوفيرول نتبع الخطوات التالية :

نحضر تراكيز من الطوكوفيرول محصورة بين 0.01 M و 0.2 M . نأخذ 1 ml من خليط FRAP المحضر سلفاً ونضيف له 2 ml من الميثانول و $100 \mu\text{l}$ من تراكيز الطوكوفيرول . نسجل القراءة بواسطة جهاز UV-Vis ونقوم بعدها برسم المنحنى البياني وفي نفس الوقت نجري نفس العملية على حمض الأسكوربيك (VC) المستعمل في الصناعة الغذائية وذلك قصد مقارنة النتائج (الشكل 58).

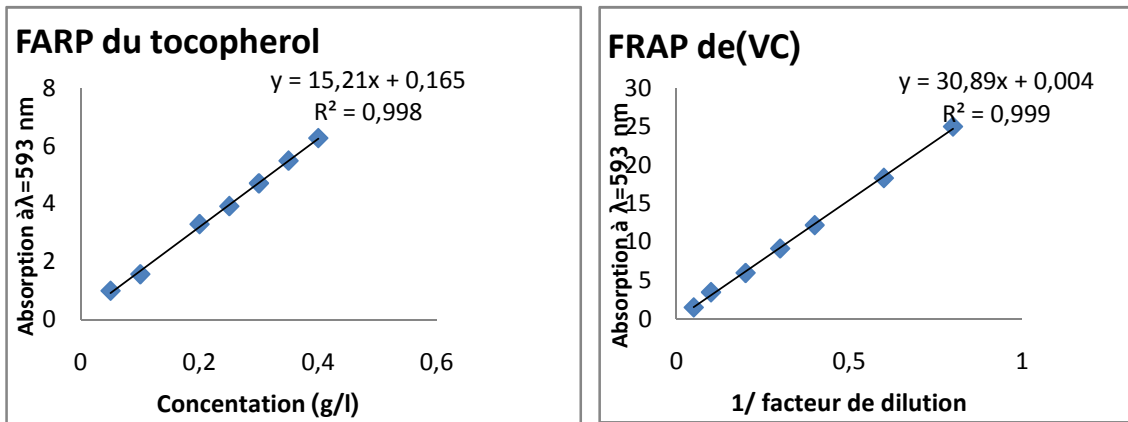
نحضر تراكيز مختلفة من المستخلص الممدد في الإيثانول و نأخذ من كل تركيز $100 \mu\text{l}$ ونعاملها بنفس الكيفية التي عاملنا بها الطوكوفيرول (VE) .
($100 \mu\text{l}$ من كل مستخلص) + 2 ml من الميثانول + 1 ml من خليط FRAP . باستعمال المنحنى القياسي للطوكوفيرول (VE) تحصلنا على

النتائج الموضحة في الجدول رقم 15

الجدول 16 : نتائج إختبار FRAP للمستخلصات وحمض الأسكوربيك

المستخلص	Vitamine C	المستخلص الكلوروفورمي	مستخلص أسيتات الإيثيل	المستخلص البوتانولي
VEAC (g/l)	2,031±0,002	0,970±0,002	0,988±0,002	1,533±0.002

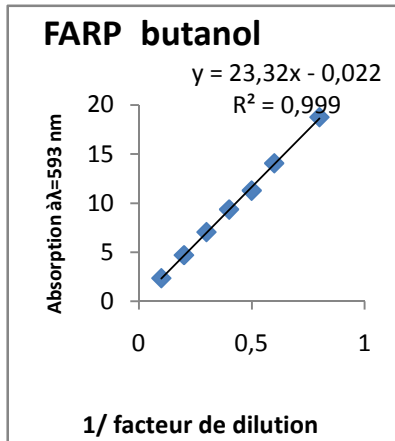
- بلغت القدرة المضادة للأكسدة المكافئة للطوكوفيرول (VE) 1,533 g/l ، 0,988 g/l ، 0,970 g/l للمستخلصات : البوتانولي ، أسيتات الإيثيل و الكلوروفورم على التوالي و 2,031g/l لحمض الأسكوربيك (Vc) .
تدل هذه النتائج أن حمض الأسكوربيك المستعمل في الصناعة كمادة حافظة ومضادة للأكسدة له فعالية أكبر من المستخلصات المدروسة. ومستخلص البوتانولي له فعالية أحسن من المستخلصين أسيتات الإيثيل و الكلوروفورم.
من خلال النتائج لمتحصل عليها يتبين أن الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات أوراق الدلاع أقل فعالية من حمض الأسكوربيك (Vc) والطوكوفيرول (VE) واللذان يستعملان كمواد حافظة.



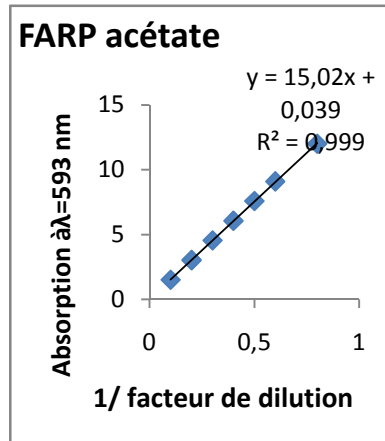
(ب)

(أ)

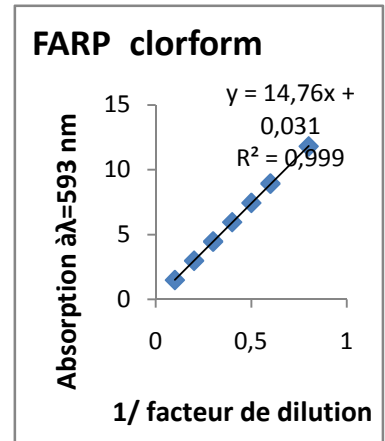
الشكل 57 : إختبار FRAP لـ (أ) : حمض الأسكوربيك (VC) و (ب) الطوكوفيرول (VE)



(ج)



(ب)



(أ)

الشكل 58 : إختبار FRAP لمستخلص : (أ) الكلوروفورم ، (ب) أسيتات الإيثيل و (ج) البوتانول

خاتمة

الخلاصة

تلقي النباتات الأكلة في الآونة الأخيرة إهتماما كبيرا من طرف الباحثين. سعيًا منهم لإكتشاف ما تخفيه من مكونات تجعلها مفيدة للصحة فضلا عن قيمتها الغذائية. وتوجهت معظم الأبحاث إلى دراسة الثمار (لب، قشور و بذور) في حين أن الأوراق لم تعر الإهتمام اللازم.

وفي هذا الصدد يندرج بحثنا. فتناولنا أوراق نبتة الدلاع (*Citrullus lanatus* var. *crimson sweet*) وهي من الفصيلة القرعية وتلقى توسعا كبيرا من حيث زراعتها في كل المناطق.

وقد تبين أن هذه الأوراق تحتوي على كمية معتبرة من الفينولات والفلافونيدات و هذا ما توصلنا إليه من خلال مطيافية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة وبتحديد كمي للفينولات والفلافونيدات الكلي. هذا من جهة ومن جهة أخرى لاحظنا ان مستخلصاتها (الكلوروفورمي، أسيتات الإيثيل و البوتانولي) لها قدرة مضادة للأكسدة معتبرة وتمتاز أيضا بفعالية بيولوجية ملحوظة ضد بعض السلالات البكتيرية.

وباستعمال طرق الفصل الكروماتوغرافي المتنوعة تمكنا من فصل وعزل عدة مركبات. والإستعانة بطرق التحليل الطيفي تمكنا من تحديد بنى مركبين فينولينين إيتيروزيديين جديدين في المملكة النباتية.

وكأفاق، نطمح إلى مواصلة معالجة باقي الكسور بما فيها تلك المعقدة وكذا المستخلصات المتبقية الأخرى من أجل فصل مركبات وكذا إختبار فعاليتها وخاصة تجاه أمراض العصر.

المراجع

1. Organization, W. H. (2013). WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023: World Health Organization.
2. Lall, N. (2022). Medicinal Plants for Cosmetics, Health and Diseases: CRC Press.
3. Edeoga, H. O., Okwu, D., and Mbaebie, B. (2005)., Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. **4**(7): p. 685-688.
4. Bérubé-Gagnon, J., (2006), Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*: Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi.
5. Tapsell, Linda C.; Hemphill, Ian; Cobiac, Lynne; Sullivan, David R.; Fenech, Michael; Patch, Craig S.; Roodenrys, Steven; Keogh, Jennifer B.; Clifton, Peter M.; Williams, Peter G.; Fazio, Virginia A.; and Inge, Karen E. (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. Medicinal Journal of Australia, **185**(84), S1-S24.
6. Lai, P. and Roy, J. (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. Current Medicinal Chemistry, **11**(11): p. 1451-1460.
7. Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental Health Perspectives. **109**(suppl 1): p. 69-75.
8. Chalet, P., (2016). Le bouleau : une espèce au pollen présentant un risque d'allergie respiratoire très élevé, mais aussi une espèce aux multiples usages pour l'Homme. Thèse Doctorat , Univesité de Picardie Jules Verne.
9. Academia - لبنان. معجم لاتيني-انكليزي- فرنسي-عربي , الكامل في الأعشاب و النباتات الطبية ، أ. بنيلوب international 2012.
10. Phillipson, J.D., (2001). Phytochemistry and Medicinal Plants. Phytochemistry, **56**(3): p. 237-243.
11. Armougom, P.R., (1998). Etude de la fraction lipidique des graines de Cucurbitacées tropicales des genres *Lagenaria*, *Luffa*, *Momordica*, Thèse Doctorat, Université de la Réunion.
12. Dupont, F. and Guignard, J.-L., (2015). Botanique: les familles de plantes: 16^e édition. Elsevier Masson.
13. Lagunez Rivera, L., (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe, Thèse Doctorat. L'Institut National Polytechnique de Toulouse.
14. Paris, H.S., (1989). Historical records, origins, and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). Economic Botany, **43**(4): p. 423-443.
15. Van Alfen, N. K. (2014). Encyclopedia of agriculture and food systems: Elsevier.
16. Staub, J.E., Robbins, M.D. and Wehner, T.C., (2008). Cucumber, in Vegetables I, Springer. p. 241-282.
17. Minocha, S. (2015). An overview on *Lagenaria siceraria* (bottle gourd). Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research. **4**(3): p. 4-10.
18. Renner, S. S., Chomicki, G., and Greuter, W. (2014). (2313) Proposal to conserve the name *Momordica lanata* (*Citrullus lanatus*)(watermelon, Cucurbitaceae), with a conserved type, against *Citrullus battich*. Taxon, **63**(4), p. 941-942.

19. Njoroge, G., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L., and Ngumi, V. (2004). Pollination ecology of *Citrullus lanatus* at Yatta, Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science*, **24**(1), p. 73-77.
20. Zeven, A.C. and De Wet, J.M. (1982) *Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity: excluding most ornamentals, forest trees and lower plants*: Pudoc.
21. Wehner, T.C., (2008) *Watermelon*, in *Vegetables I*, Springer. p. 381-418.
22. Fraser, P.D. and Bramley, P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*. **43**(3): p. 228-265.
23. Ijaz, A., Tufail, T., Saeed, F., Afzaal, M., Shahid, M. Z., and Suleria, H. A. R. (2022). Health Benefits of Watermelon (*Citrullus lanatus*), in *Bioactive Compounds from Multifarious Natural Foods for Human Health*, Apple Academic Press. p. 77-98.
24. newsletter, A.E. Ouargla : 750.000 QX de fruits et légumes réalisés durant la saison 2017/2018. mardi 09 Avril 2019]; Available from: <https://www.algerie-eco.com/2018/08/04/>.
25. dknews. Ouargla : Une production de 192.600 QX de pastèque attendue pour la saison 2016-2017. mardi 09 avril 2019; Available from: <http://dknews-dz.com/article/79378>.
26. Landri, L. and Simoud, y.L. (2019/2020). Les propriétés nutritionnelles, antioxydantes et thérapeutiques de la pastèque (*Citrullus lanatus*), Thèse Master, Univ. Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
27. FAO. the statistics division. 09 Avril 2019]; Available from: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
28. Varghese, S., Narmadha, R., Gomathi, D., Kalaiselvi, M., and Devaki, K. (2013)., Phytochemical screening and HPTLC finger printing analysis of *Citrullus lanatus* (Thunb.) seed. *Journal of Acute Disease*, 2013. **2**(2): p. 122-126.
29. Goyal, M. and Sharma, S. (2009). Traditional wisdom and value addition prospects of arid foods of desert region of North West India. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, **8**(4): p. 561-585.
30. Hassan, L. E. A., Sirat, H. M., Yagi, S. M. A., Koko, W. S., and Abdelwahab, S. I. (2011). In vitro Antimicrobial activities of chloroformic, hexane and ethanolic extracts of *Citrullus lanatus* var. citroides (Wild melon). *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(8): p. 1338-1344.
31. Thirunavukkarasu, P., Ramanathan, T., Ravichandran, N., and Ramkumar, L. (2010). Screening of Anti-microbial Effect in Watermelon(*Citrullus sp.*). *Journal of Biological Sciences*, **10**(7): p. 682-685.
32. Kumawat, G., (2017), *Citrullus lanatus*: An Overview on Pharmacological Activities. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*. **8**(1): p. 6-9
33. Meena, S., Singh, R., Sharma, B., and Singh, D., (2016). Most favourite traditional cucurbitaceous vegetables and their utilization pattern in Thar desert of the western Rajasthan, India. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, **15**(3): p. 385-394.
34. Kibungu Kembelo, A., (2003). *Quelques plantes médicinales du Bas-Congo et leurs usages*. London: DFID,: p. 157-60.
35. Adunola, A., Chidimma, A. L., Olatunde, D. S., & Peter, O. A., (2015). Antibacterial activity of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed against selected microorganisms. *African Journal of Biotechnology*. **14**(14): p. 1224-1229.

36. Hassan, L.E.A., Koko, W. S., Osman, E., Dahab, M. M. and Sirat, H. M.,(2011). In vitro anti-giardial activity of *Citrullus lanatus* var. citroides extracts and cucurbitacins isolated compounds. Journal of Medicinal Plants Research. **5**(15): p. 3338-3346.
37. Madhavi, P., Kamala, V. and Habibur, R., (2012) Hepatoprotective activity of *Citrullus lanatus* seed oil on CCl₄ induced liver damage in rats. Scholars Academic Journal of Pharmacy. **1**(1): p. 30-33.
38. Bhardwaj, A., Kumar, R., Dabasa, V., and Alam, N. (2012). Evaluation of anti-ulcer activity of *Citrullus lanatus* seed extract in wistar albino rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. **4**(5): p. 135-139.
39. Ahn, J., Choi, W., Kim, S., and Ha, T., (2011). Anti-diabetic effect of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad) on Streptozotocin-induced diabetic mice. Food science and biotechnology. **20**(1): p. 251-254.
40. Sharma, S., Sarvesh, P., Dwivedi, J., & Amita, T., (2011). First report on laxative activity of *Citrullus lanatus*. Pharmacologyonline. **2**: p. 790-797.
41. Olamide, A.A., Olayemi, O. O., Demetrius, O. O., Olatoye, O. J., & Kehinde, A. A., (2011). Effects of methanolic extract of *Citrullus lanatus* seed on experimentally induced prostatic hyperplasia. European Journal of Medicinal Plants: p. 171-179.
42. Singh Gill, N., Sood, S., Muthuraman, A., Bali, M., & Dev Sharma, P. (2011). Evaluation of antioxidant and anti-ulcerative potential of *Citrullus lanatus* seed extract in rats. Latin American journal of pharmacy. **30**: p. 429-434.
43. Kumari, A., Rao, J., Kumari, J., Sharma, N., Jain, P., Dave, V., & Sharma, S. (2013). Analgesic activity of aqueous extract of *Citrullus lanatus* peels. Advances in Pharmacology and Pharmacy. **1**(3): p. 135-138.
44. Abdelwahab, S.I., Hassan, L.E.A., Sirat, H.M.,Yagi, S.M.A., Koko, W.S., Mohan, S., Taha, M.M.E. Ahmad, S., Chuen, C.S., Narrima, P., Rais, M.M., Hadi, A.H.A., (2011). Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. citroides: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. Fitoterapia. **82**(8): p. 1190-1197.
45. Rhodes, M., (1994). Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. Plant Molecular Biology. **24**(1): p. 1-20.
46. Lobo, M., N. Hounsome, and B. Hounsome, (2018). Biochemistry of Vegetables: Secondary Metabolites in Vegetables—Terpenoids, Phenolics, Alkaloids, and Sulfur-Containing Compounds. Handbook of Vegetables and Vegetable Processing: p. 47.
47. Bell, E.A., (1981). The physiological role (s) of secondary (natural) products. The Biochemistry of Plants. **7**: p. 1-19.
48. Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., and Raskin, I., (1990), Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science. **250**(4983): p. 1002-1004.
49. Bravo, L., (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews. **56**(11): p. 317-333.
50. Soto, M. L., Falqué, E., and Domínguez, H. (2015). Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. Cosmetics, **2**(3), 259-276.
51. Sharma, S. and Barasi, M., (2015). Nutrition at a Glance. second edition ed: John Wiley and Sons.

52. Ignat, I., I. Volf, and V.I. Popa, (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. **126**(4): p. 1821-1835.
53. Cowan, M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. **12**(4): p. 564-582.
54. Chira, K., et al., (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. **6**(2): p. 75-82.
55. Crozier, A., M.N., (2008) Clifford, and H. Ashihara, *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet: John Wiley and Sons*.
56. Tomas-Barberan, F.A. and Gil, M.I., (2008) *Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products: Elsevier*.
57. Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. and Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(11): p. 3337-3340.
58. Adlercreutz, H., & Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, **29**(2): p. 95-120.
59. Lamblin, F., Hano, C., Fliniaux, O., Mesnard, F., Fliniaux, M.-A., & Lainé, É., (2008). Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers. *Médecine/Sciences*. **24**(5): p. 511-520.
60. Katsori, A.-M. and Hadjipavlou-Litina, D., (2014). Coumarin derivatives: an updated patent Review (2012–2014). *Expert opinion on therapeutic patents*. **24**(12): p. 1323-1347.
61. Porter LW. Tannins. In: Harborne JB, e.M., (1989). *Methods in Plant biochemistry*. p. 389-419.
62. Wagner, H. and Blatt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas: Springer Science & Business Media*.
63. Kumar, S. and Pandey, A.K., (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an Overview. *The Scientific World Journal*.
64. Hounsome, N., Hounsome, B. and Lobo, M., (2018). *Biochemistry of Vegetables: Major Classes of Primary Metabolites (Carbohydrates, Amino Acids, Vitamins, Organic Acids, and Fatty Acids). Handbook of Vegetables and Vegetable Processing: p. 25*.
65. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, **65**(4): p. 337-353.
66. Ghedira, K., (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. **3**(4): p. 162-169.
67. Ross, J. A. and Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, **22**(1): p.19-34.
68. Kuo, S.-M., (1997). Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*. **8**(1): p.47-69
69. Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R. and Schmitz, H. H. (1999). Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(2): p. 490-496.
70. Hollman, P. and Katan, M., (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **51**(8): p. 305-310.
71. Steinmetz, K.A. and Potter, J.D., (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a Review.

- Journal of the American Dietetic Association. **96**(10): p. 1027-1039.
72. Riboli, E. and Norat, T., (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **78**(3): p. 559S-569S.
 73. Arts, I.C. and P.C. Hollman, (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, **81**(1): p. 317S-325S.
 74. Pietta, P.-G., Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 2000. **63**(7): p. 1035-1042.
 75. Rice-Evans, C., (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. **8**(7): p. 797-807.
 76. Das, N. and Pereira, T., (1990). Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **67**(4): p. 255-258.
 77. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Kromhout, D., Hollman, P., & Katan, M. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342(8878): p. 1007-1011.
 78. Verhoeven, D. T., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H., & van den Brandt, P. A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **5**(9): p. 733-748.
 79. Saewan, N. and Jimtaisong, A., (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*. **14**(1): p. 47-63.
 80. Peng, Y., Xuan, M., Leung, V. Y. and Cheng, B. (2015). Stem cells and aberrant signaling of molecular systems in skin aging. *Ageing Research Reviews*, **19**: p. 8-21.
 81. Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**(6), 481-504.
 82. Middleton, E., (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function, in *Flavonoids in the living system*, Springer. p. 175-182.
 83. Manthey, J.A. and Buslig, B.S., (1998). Flavonoids in the living system, in *Flavonoids in the Living System*, Springer.
 84. De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H. and Vlietinck, A. (1999), Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*. **27**(4): p. 445-459.
 85. Hahlbrock, K. and Grisebach, H. (1975). Biosynthesis of flavonoids, in *The flavonoids*, Springer. p. 866-915.
 86. Andersen, O. M. and Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*: CRC press.
 87. Jay, M., De Luca, V., and Ibrahim, R. (1983). Meta-methylation of flavonol rings A (8-) and B (3'-) is catalysed by two distinct O-methyltransferases in *Lotus corniculatus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. **38**(5-6): p. 413-417.
 88. Humphrey, A.J. and Beale, M.H. (2006). Terpenes. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*: p. 47-101.
 89. Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*. **9**(10): p. 357-367.
 90. Satyajit, D. and Lutfun, N. (2007). *Chemistry for Pharmacy Students General, Organic and Natural*

Product Chemistry, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England, John Wiley and Sons Ltd.

91. Urgert, R. and Katan, M. (1997). The cholesterol-raising factor from coffee beans. Annual review of nutrition. **17**(1): p. 305-324.
92. Harborne, A., (1984). Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. (2 ed): springer science and business media.
93. Abbas, S. (2012). Étude des propriétés de deux séries de substances d'origine naturelle: les cucurbitacines et les parabènes: analyse de leur biotransformation chez l'homme et mesure du pouvoir cytotoxique des cucurbitacines sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine.
94. جامعة منتوري, رسالة دكتوراة. دراسة الايض الغلافونيدي والتريني لبعض انواع نباتات ضايات الصحراء الجزائرية). 2002(دندوقي, ح. قسنطينة.
95. Lee, D. H., Iwanski, G. B., & Thoennissen, N. H. (2010). Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. The Scientific World Journal, **10**: p. 413-418.
96. Zulak, K. G., Liscombe, D. K., Ashihara, H., & Facchini, P. J. (2006). Alkaloids. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. p.102-136.
97. Bronner, W. and Beecher, G., (1995). Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. Journal of Chromatography A. **705**(2): p. 247-256.
98. Zechmeister, L., Mikhail Tswett (1946). The Inventor of Chromatography. Isis. **36**(2): p. 108-109.
99. Mabry, T., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Berlin· Heidelberg . New Y ork 1970: Springer Science & Business Media.
100. Bligh, S.A., Ogegbo, O. and Wang, Z. (2013). Flavonoids by HPLC, in Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes, Springer. p. 2107-2144.
101. Benguerba, A. (2008). Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *inula crithmoides l*. Thèse Magister, Universite Mentouri Constantine.
102. Kiple, K.F. and Ornelas, K. (2000). The Cambridge world history of food: Cambridge University Press.
103. Yao, L. H., Jiang, Y.-M., Shi, J., Tomas-Barberan, F., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. Plant Foods for Human Nutrition, **59**(3): p. 113-122.
104. Markham, E. and Geiger, H. (1994). ¹H NMR Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. Flavonoids, Harborne, JB (1993), Chapman and Hall, London.
105. Agrawal, P. K. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier Science Publishers B.V., 1989: Elsevier.
106. Batterham, T. and Highet, R. (1964). Nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids. Australian Journal of Chemistry. **17**(4): p. 428-439.
107. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (2015). Free radicals in biology and medicine. Fifth Edition ed: Oxford University Press, USA.

108. Avlessi, F., Dangou, J., Wotto, V. D., Alitonou, G. A., Sohounhloue, D. K., & Menut, C. (2004). Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes Rendus Chimie*, **7**(10-11): p. 1057-1061.
109. Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T. and Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **96**(1-2): p. 145-150.
110. Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., & Dessì, M. A. (2004). Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *inodora*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, **18**(10): p. 789-792.
111. Desai, P. B., Manjunath, S., Kadi, S., Chetana, K., & Vanishree, J. (2010). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **14**(11): p. 959-967.
112. Karthikeyan, J., & Rani, P. (2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in selected Piper species. *Indian Journal of Experimental Biology*, **41**: p. 135-140.
113. Traber, M.G., (2007). Heart disease and single-vitamin supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **85**(1): p. 293S-299S.
114. Ryan, M. J., Dudash, H. J., Docherty, M., Geronilla, K. B., Baker, B. A., Haff, G. G., Cutlip, R. G., Alway, S. E. (2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental gerontology*, **45**(11), 882-895.
115. Chan, A., Tran, K., Raynor, T., Ganz, P., & Chow, C. (1991). Regeneration of vitamin E in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(26), 17290-17295.
116. Havsteen, B.H., (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and therapeutics*. **96**(2-3): p. 67-202.
117. Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, **41**(1): p. 1-15.
118. Blois, M.S., (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**(4617): p. 1199-1200.
119. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. **28**(1): p. 25-30.
120. Manual, P., OxiSelect™ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay Kit. Cell Biolabs, Inc.
121. Hugo, W. B., and Russell, A. D. (1998). *Pharmaceutical microbiology* (Sixth Edition ed.). Osney Mead, Oxford OX2 0EL 25 John Street, London WC1N 2BL: Blackwell science.
122. Hogg, S. (2013). *Essential microbiology* (Second Edition ed.): A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.527
123. Toty, A.A. ., Guessennnd, N., Bahi, C., KRA, A. K. M., Tokore, D. A., and Dosso, M., (2013). Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **V 82**: p. 12-21
124. Shahid, W., Durrani, R., Iram, S., Durrani, M., & Khan, F. A. (2013). Antibacterial activity in vitro of medicinal plants. *Sky Journal of Microbiology Research*, **1**(2): p. 5-21.

125. Chang, S.-T., Wu, J.-H., Wang, S.-Y., Kang, P.-L., Yang, N.-S., & Shyur, L.-F. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(7): p. 3420-3424.
126. Wang, H., Gao, X. D., Zhou, G. C., Cai, L., & Yao, W. B. (2008). In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry*, **106**(3): p. 888-895.
127. Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**(1): p. 70-76.
128. دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات *Traganum nudatum* الضمران. العابد, إ. ن. ا. , و غراف, م. م. & يوسف, م. (2011). *Annales des Sciences et Technologie*, **3**(1) : p. 54-61.
129. Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Quirantes-Piné, R., Fernández-Arroyo, S., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2012). HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Research International*, **46**(1): p. 108-117.
130. Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI–QTOF–MS). *Food Research International*, **51**(1): p. 354-362.
131. Abu Reidah, I. M. (2013). Characterization of phenolic compounds in highly-consumed vegetable matrices by using advanced analytical techniques. Doctoral Thesis, University of Granada, Spain.
132. Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Phytochemical characterisation of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by using high-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, **24**(2), 105-116.

الملك قاف



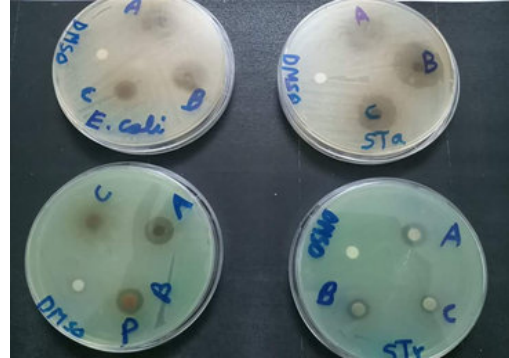
بداية الإستخلاص بالكلوروفورم



الإستخلاص بالكلوروفورم



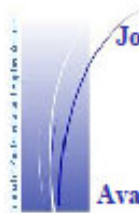
قياس منطقة التثبيط



منطقة التثبيط



منطقة جمع العينة (حاسي بن عبد الله - ورقلة)



IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHLOROFORM, ETHYLACETATE AND BUTANOL EXTRACTS OF LEAVES OF CITRULLUS LANATUS VAR. CRIMSON SWEET GROWN IN THE REGION OF OUARGLA, ALGERIA

A. Bennouna^{1,2*}, B. Labed² and H. Dendougui¹

¹Université de Ouargla, Faculté des mathématiques et des sciences de la matière Lab. valorisation et promotion des ressources sahariennes (VPRS) 30 000 Ouargla, Algeria

²Ecole Normale Supérieure de Ouargla, Algeria

Received: 11 February 2019 / Accepted: 29 April 2019 / Published online: 01 May 2019

ABSTRACT

We are always trying to discover antibiotics, of natural origin, the most effective. For this purpose, our work is devoted to the evaluation of the antibacterial activity of the chloroformic, ethyl acetate and butanolic extracts of the leaves of *Citrullus lanatus* crimson sweet variety cultivated in the region of Ouargla. This activity was tested against microorganisms derived from the reference strains gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp) and gram negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). All extracts showed a remarkable sensitivity against bacteria by giving inhibition diameters varying between 12 and 26 mm. The evaluation of the minimum concentration of inhibition (MIC) led to the values between 40 and 75 µg/ml. From the results obtained, we can conclude that the leaves of this plant have a good antibacterial activity against certain microorganisms.

Keywords: *Citrullus Lanatus* var. Crimson sweet, antibacterial activity, CMI.

Author Correspondence, e-mail: bennounaab@mail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v11i2.30>



1. INTRODUCTION

La pastèque ou Dellaa est originaire de l'Afrique [1]. Elle est connue dans le monde entier [2] à cause de ses fruits riches en teneur élevée d'eau et son goût sucré. Ce qui fait d'elle le légume le plus consommé surtout en été. En plus, elle possède des propriétés bénéfiques pour la santé [3]. En effet, la médecine traditionnelle a signalé l'utilisation des différentes parties de cette plante en Asie et Moyen Orient. Les fruits sont connus comme étant diurétiques [4], ainsi elles peuvent être utilisées pour remédier les maladies des reins [4]. La chair est prescrite dans les cas d'empoisonnement alcoolique et antidiabétique [5]. La pastèque est connue sous le nom scientifique *Citrullus Lanatus*. Elle appartient à la famille des cucurbitacées [6]. Ces derniers possèdent des composés biologiquement actifs comme les cucurbitacines et les triterpènes [7].

En Algérie, la cultivation du Pastèque est en croissance ces dernières années à cause de la forte demande par les consommateurs et sa bonne rentabilité économique [8]. Par exemple, à Ouargla, la production a atteint 192 kantars dans la saison 2016-2017 [9]. Le but de ce travail est centré sur la détermination des concentrations des flavonoïdes, et des phénols totaux dans les extraits bruts des feuilles de *Citrullus Lanatus* (CL) variété *Crimson sweet* cultivée dans la région de Ouargla, ainsi que leur activité antibactérienne vis à vis quelques microorganismes.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1 Dosage des Phénols et flavonoïdes totaux :

La teneur des phénols et des flavonoïdes totaux est influencée par différents facteurs, parmi lesquelles on cite : la méthode de séchage [10], le solvant d'extraction, le milieu de culture et même la variété [11]. Les résultats obtenus dans ce travail montrent que les quantités des phénols et flavonoïdes contenus dans les fractions des extraits bruts des feuilles de *Citrullus Lanatus* variété *crimson sweet*, sont assez importantes. La quantité des phénols varient entre $0,359 \pm 0,012$ et $10,528 \pm 0,956$ mg AGE/g MS et celle des flavonoïdes est comprise entre $32,964 \pm 0,075$ et $278,771 \pm 5,763$ µg EQ/g MS (Tableau 1).

Tableau 1. Teneur des phénols et flavonoïdes totaux dans les feuilles de (CL)

Extraits	Phénols totaux mg AGE/g MS	Flavanoïdes totaux µg EQ/g MS
Chloroformique	0,359 ± 0,012	56,010 ± 1,277
Acétate d'éthyle	1,156 ± 0,035	32,964 ± 0,075
Butanolique	10,528 ± 0,956	278,771 ± 5,763

2.2 Activité antibactérienne

Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies et infections, comme la diarrhée (*E.Coli*), infection cutanée (*Staphylococcus aureus*), infection urinaire (*Pseudomonas aeruginosa*) [12]. Les extraits testés, présentent un effet remarquable sur les différentes souches utilisées (Figures 1 et 2). Le plus grand diamètre d'inhibition a été observé pour l'extrait acétate d'éthyle (26 mm) (Tableaux 2-4). Ces résultats sont plus élevés que ceux trouvés par Cemaluk et al .,[13]

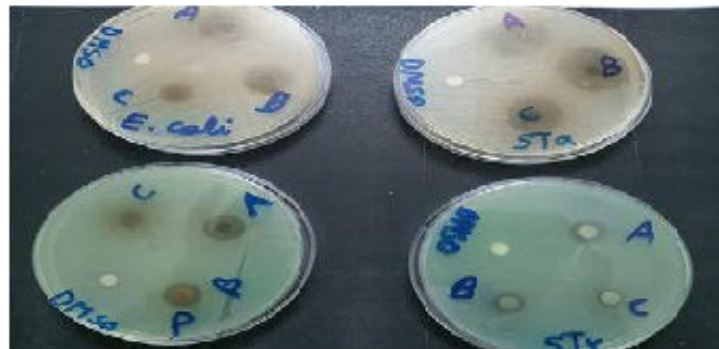
Fig.1. Zone d'inhibition**Fig.2.** Mesure de la zone d'inhibition

Tableau 2. diamètre d'inhibition de l'extrait Chloroformique

Type de bactérie	Type de Gram	Concentration de l'extrait en mg/ml					
		150	120	100	80	60	40
<i>Escherichia coli</i>	-	14	12	11	10	08	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	12	11	16	18	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	20	17	15	14	12	00
<i>Streptococcus sp</i>	+	13	11	10	09	00	00
DMSO	/	00	00	00	00	00	00

Tableau 3. diamètre d'inhibition de l'extrait Acétate d'éthyle

Type de bactérie	Type de Gram	Concentration de l'extrait en mg/ml					
		150	120	100	80	60	40
<i>Escherichia coli</i>	-	23	20	18	15	11	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	14	13	11	10	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	26	20	17	14	10	00
<i>Streptococcus sp</i>	+	15	14	13,5	12	00	00
DMSO	/	00	00	00	00	00	00

Tableau 4. diamètre d'inhibition de l'extrait Butanolique

Type de bactérie	Type de Gram	Concentration de l'extrait en mg/ml					
		150	120	100	80	60	40
<i>Escherichia coli</i>	-	22	19	17	14	11	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	15	13	12	11	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	25	20	16	12	10	00
<i>Streptococcus sp</i>	+	14	13	11	10	00	00
DMSO	/	00	00	00	00	00	00

2.3 Calcul de La CMI

Les valeurs des CMI montrent que les extraits ont tous un grand effet (Figures 1 et 2). La plus grande valeur a été observée avec la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (70-75 mg/l) (Tableau 5).

Tableau 5. Valeurs du CMI

Souches utilisées	Valeurs du CMI en mg/l		
	Extrait chloroformique	Extrait Acetate d'Ethyle	Extrait Butanolique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	40	55	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	75	70	70
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	40	40	55
<i>Streptococcus sp</i> ATCC 49619	50	75	50

3. MATERIAUX ET METHODES

3.1 Plante utilisée

Malgré les études menées dans ce domaine [14] et qui ont étudié cette plante (*Citrullus Lanatus*), peu d'entre-eux qui se sont intéressés aux feuilles. Les feuilles de *Citrullus Lanatus* ont été récoltées le mois d'août 2015, de la région de Hassi Ben Abdellah, Ouargla, située au sud de l'Algérie. Séchées à l'ombre à la température ambiante, les feuilles ont été tamisées afin de les rendre en petits grains.

Les extraits ont été obtenus après une macération à froid dans l'éther de pétrole. Le filtrat est traité par chloroforme, acétate d'éthyle et enfin par le n-butanol successivement.

3.2 Détermination des phénols et Flavonoïdes totaux

Les quantités des phénols et des flavonoïdes, contenues dans les extraits bruts des feuilles de *Citrullus lanatus* variété crimson sweet, ont été déterminées par les méthodes Folin-ciocalteau [15] et chlorure d'aluminium respectivement [16]. Les courbes d'étalonnage sont réalisées dans les mêmes conditions opératoires. (figure 3 et 4)

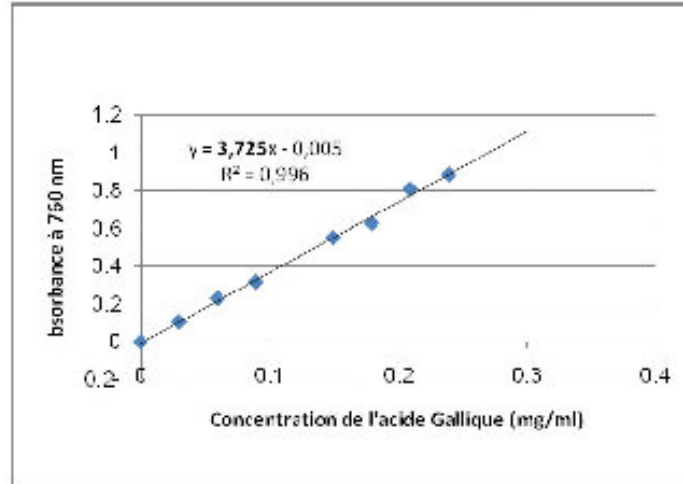


Fig.3. Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique

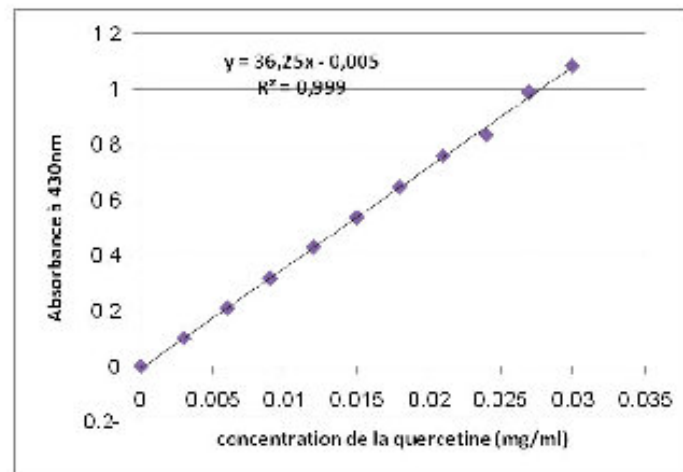


Fig.4. Courbe d'étalonnage de la quercetine

3.3 Détermination des phénols totaux

La concentration des phénols totaux a été déterminée selon le protocole de Folin- Ciocalteu [15]. Un mélange de 0,1 ml de l'extrait et 0,1 ml du réactif de Folin secoué et, après 5 min, on ajoute 2ml d'une solution de Na_2CO_3 (2%). Une lecture, après 30 minutes d'incubation à température ambiante, est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à la longueur d'onde 760 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'Equivalent d'Acide

Gallique par gramme de la matière sèche (mg AGE/g MS).

3.4 Détermination des flavonoïdes totaux

En suivant le protocole de la méthode calorimétrique de trichlorure d'aluminium, la teneur des flavonoïdes a été évaluée [16]. Le mélange de 1,5 ml de l'extrait et 1,5 ml de $AlCl_3$ (2 % dans le méthanol) est conservé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 430 nm. Le calcul de la concentration des flavonoïdes; est déterminé par rapport à la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (figure 4). Elle est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme de la matière sèche (μg EQ/g MS).

3.5 Activité antibactérienne

On cherche souvent, dans les plantes à trouver des antibiotiques naturels de compositions chimiques différentes pour battre les bactéries qui ne cessent pas à résister aux antibiotiques utilisés [17]. La méthode utilisée pour l'évaluation du taux de l'activité antibactérienne des différents extraits est celle qui adopte la diffusion dans un milieu gélose sec [18]. De même elle a été utilisée pour tester la sensibilité et la détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) [19-20]. Les souches de référence utilisées sont de différents gram .Elles sont originaires de American Type Culture Collection (ATTC), USA obtenus de l'Hôpital de Slimane Amirat de Touggourt.

La culture de souches bactériennes a été préparée avant 18 - 24 h et les suspensions ont été ajustées à $0,5 \times 10^8$ Mc Ferland à 570 nm avec un spectrophotomètre UV-Vis. Des boîtes de Pétri ont été préparées avec 20 ml d'agar Mueller Hinton (MH); les inoculums ont été étalés sur le milieu solidifié et laissés à sécher pendant 60 min. Les disques stériles (6 mm de diamètre) imprégnés dans l'extrait brut dissout dans le diméthyle sulfoxide (DMSO) ont été ensuite déposés dans les boîtes de Pétri. Les plaques ont été laissées pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre la diffusion de l'extrait avant incubation à 37°C pendant 24 heures. Le contrôle négatif a été préparé sur des disques imprégnés dans le DMSO et déposés dans les mêmes boîtes. En cas d'inhibition bactérienne, on remarque une zone autour du disque que l'on appelle la zone d'inhibition. Le diamètre du halo est évalué en millimètre. Cette expérience a été répétée pour des différentes concentrations de chaque extrait.

3.6 Détermination de la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI)

La CMI est définie comme étant la concentration minimale de l'antibiotique inhibant toute

croissance visible du micro-organisme après une incubation de 24 h. La dilution des extraits bruts dans un milieu gélosé (MH) nous permet l'évaluation des CMI. On note ainsi la plus petite concentration qui ne correspond à aucun trouble observable à l'œil nu.

4. CONCLUSION

Les résultats de dosage des phénols et flavanoïdes contenus dans les feuilles de *Citrullus Lanatus* montrent que cette plante est riche en composés phénoliques, ce qui est en accord avec les tests antibactériens.

En effet, les extrais testés vis-à-vis des microorganismes ont montré un très bon effet en comparaison avec des travaux antérieurs [13], où le meilleur diamètre d'inhibition a été observé pour l'extrait de l'acétate d'éthyle avec une valeur de 26 mm.

Finalement, les résultats obtenus lors de cette étude confirment bien l'utilisation des feuilles de la plante (*Citrullus Lanatus*) dans la médecine traditionnelle.

5. REFERENCES

- [1] Paris, H. S., Origin and emergence of the sweet dessert watermelon, *Citrullus lanatus*. *Annals of botany*, 2015, 116(2), 133-148.
- [2] Prohens-Tomás, J., and Nuez, F. *Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae (Vol. 1): Springer Science & Business Media., 2007, pp. 381-418.*
- [3] Kumawat G ,Goyal M, Math ur K, Yadav S K, *Citrullus lanatus: An Overview on Pharmacological Activities, International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2017; 8 (1), 6 – 9
- [4] Siddiqui, W. A., Shahzad, M., Shabbir, A., and Ahmad, A. Evaluation of anti-urolithiatic and diuretic activities of watermelon (*Citrullus lanatus*) using in vivo and in vitro experiments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018. 97, 1212-1221.
- [5] Erhirhie, E., and Ekene, N.. Medicinal values on *Citrullus lanatus* (watermelon): pharmacological review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2013, 4(4), 1305-1312.

- [6] Saboo, S. S., Thorat, P. K., Tapadiya, G. G., and Khadabadi S., Ancient and recent medicinal uses of cucurbitaceae family, *International Journal of Therapeutic Applications*, 2013, 9, 11-19.
- [7] Biu, A. A., Buratai, L. B., Luka, J., Konto, M., Onwuotogwu, J., and Agada, N. O.. In vitro assessment of trypanocidal activity of aqueous extract of *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae)(Thunb) leaf and its effects on the haematological parameters of *Trypanosoma brucei* infected Albino rats. *Biokemistri*, 2013, 25(3), 127-132.
- [8] Quezel P. and Santa S., *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. II, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1963, pp. 894-895
- [9] <http://www.dknews-dz.com/pdf/voir.html?id=1775> ; consulté le 02/12/2018
- [10] Ho, L.-H., Ramli, N. F., Tan, T.-C., Muhamad, N., and Haron, M. N., Effect of Extraction Solvents and Drying Conditions on Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Watermelon Rind Powder. *Sains Malaysiana*, 2018, 47(1), 99-107
- [11] Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M. S., Riadh, I., Jebari, H., and Dalessandro, G Bioactive compounds and antioxidant activities of different watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) cultivars as affected by fruit sampling area. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, 24(3), 307-314.
- [12] Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 1999 12(4), 564-582.
- [13] Cemaluk, C. E. A., Comparative investigation of the antibacterial and antifungal potentials of the extracts of watermelon (*Citrullus lanatus*) rind and seed. *EJMP*, 2015, 9(4). 1-7.
- [14] Rahman, H., Priyanka, P., Lavanya, P., Srilakshmi, N., & Kumar, P. R., A review on ethno botany, phytochemistry and pharmacology of *Citrullus lanatus* L. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2013., 3(2), 77-81.
- [15] Chang S.-T., Wu J.-H., Wang S.-Y., Kang P.-L., Yang N.-S., and Shyur L.-F., *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (7), 3420–3424, DOI: 10.1021/jf0100907
- [16] Wang H.; Gao X. D.; Zhou G. C.; Cai, L.; Yao W. B., *Food Chemistry* 2008, 106,

888-895, doi :10.1016/j.foodchem.2007.05.068

[17] Toty, A. A., Guessennd, N., Bahi, C., KRA, A. K. M., Tokore, D. A., & Dosso, M. Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 2013, 82, 12-21

[18] Abdel-Wahab S. I., Abdul A. B., Zhew K., and Fong, S. Antimicrobial and Free Radical Scavenging activities of the dichloromethane extract of *Goniiothalamus umbrosus*. Int. J. Trop. Med, 2009, 4(1), 32-36

[19] Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) Document édité avec la collaboration de l'OMS, 6ème Edition, 2011

[20] Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J. C., and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. clin. Pathol., 1966, 45(4), 493-496.

How to cite this article:

Bennouna A, Labed B and Dendouguie H. In vitro antibacterial activity of chloroform, ethyl acetate and butanol extracts of leaves of *Citrullus lanatus* var. *crimson sweet* grown in the region of ouargla, Algeria. J. Fundam. Appl. Sci., 2019, 11(2), 1023-1032.