

# جامعة قاصدي مرباح – ورقلة



رقم الترتيب: .....  
رقم التسلسل: .....

## كلية الرياضيات و علوم المادة

### قسم الكيمياء

رسالة مقدمة لنيل شهادة دكتوراه علوم

فرع: كيمياء

تخصص: كيمياء عضوية تطبيقية

من اعداد: بوهريه عبد العزيز

تحت عنوان

Contribution à l'étude phytochimique et analyse organique  
de quelques métabolites secondaires issus de la spathe du  
palmier dattier de la région de Touggourt

المساهمة في الدراسة الفيتوكيميائية والتحليل العضوي لبعض مركبات الأيض  
الثانوي لطلع نخيل التمر بمنطقة تقرت

نوقشت يوم: 01 / 07 / 2018

أمام لجنة المناقشة

رئيساً	جامعة ورقلة	أستاذ التعليم العالي	السعيد مختار
ممتحناً	جامعة الوادي	أستاذ التعليم العالي	وهراني محمد رضا
ممتحناً	جامعة ورقلة	أستاذ التعليم العالي	دندوقي حسين
ممتحناً	جامعة بشار	أستاذ التعليم العالي	شريطي عبد الكريم
مشرفاً و مقرراً	جامعة غرداية	أستاذ التعليم العالي	دادة موسى بلخير

السنة الجامعية 2017/2018

# الإهداء

أهدي هذا العمل المتواضع الى:

- روح أبي الطاهرة.

- أمي الغالية التي صبرت علي و أمانتني علي عملي،

أطال الله عمرها.

- أسرتي الصغيرة: زوجتي العزيزة و أبنائي علاء

الدين و عبد النور.

- اخوتي و اخواتي الأعماء.

# تشكرات

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات و الصلاة و السلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد، أحمد الله و أشكره على توفيقه لإتمام هذه الأطروحة.

أما بعد يشرفني أن أتقدم بجزيل الشكر الى أستاذي القدير د.أ.أ. موسى بلخير؛ أستاذ التعليم العالي بجامعة غرداية على صبره و توجيهاته القيمة و مساعدته لي على إنجاز هذا العمل.

كما يسرني أن أتقدم بجزيل الشكر لأستاذي الفاضل سعيدي مختار على قبوله ترأس لجنة المناقشة.

أوجه شكري الخاص الى الأستاذ الدكتور شريطي عبد الكريم على تحمله عناء السفر و مشاركته في لجنة المناقشة.

أوجه شكري كذلك لأستاذي وهرانبي محمد رضا لتحمله عناء السفر و مشاركته في لجنة المناقشة.

كما أشكر الأستاذ الدكتور دندوقي حسين على قبوله المشاركة في لجنة المناقشة و على التوجيهات و المساعدة القيمة.

كما أشكر السادة الأساتذة: الأستاذ الدكتور سقني لعجال أستاذ  
التعليم العالي بجامعة ورقلة، الأستاذ الدكتور قريشي مراد، و  
الأستاذ الدكتور ولد الحاج محمد ديدوي على مساعدتهم القيمة  
لي.

## الملخص

في هذا العمل اخترنا أغلفة طلع الدقلة البيضاء و طلع الذكار كمادة نباتية قيد الدراسة بحيث قمنا بتقييم الفعالية البيولوجية لسته مستخلصات على أربعة أنواع من البكتيريا ونوع واحد من الخمائر حيث تبين أن مستخلص البيتانول لطلع الذكار له فعالية كبيرة مقارنة بباقي المستخلصات ضد *Escherichia coli* و *Streptococcus sp* / *Staphylococcus aureus* و فعالية أضعف ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

التحليل الكروماتوغرافي مقترناً بمطيافية الكتلة (HPLC/MS/MS) لمستخلصات (البيتانول/ أسيتات الايثيل/ ثنائي الاثيل اثير) المدروسة يساعد على اقتراح أصناف الفلافونيدات الموجودة في طلع نخيل التمر، حيث استطعنا تصنيف حوالي واحد وعشرون فلافونويد تنوعت ما بين أوريونتين (Orientin)، كرسيتين (Quercetin)، كاتشين (Catéchine)، هيدروشالكون (dyhydrochalcon)، فلافونون (flavanone) في طلع الذكار و ثمانية عشرة فلافونويد مثل الكامفيرول (Kaempferol)، الكاتشين (Catéchine) و ليتولين (Luteoline) في طلع الدقلة البيضاء.

المستخلص المائي لطلع الذكار المدروس له فعل مخفض للسكر (Hypoglycémie) في دم الجردان و قد يكون سبب ذلك احتواء المستخلص على مركبات لها فعل مخفض للسكر مثل الكرسيتين و الكاتشين.

**الكلمات الدالة:** نخيل التمر، الفلافونيدات الفعالية المضادة للبكتريا، داء السكري، HPLC/MS/MS

# Résumé

Dans ce travail, nous avons donc choisi les poches de la spathe de Degla Beida et la spathe mâle du palmier dattier comme matériel végétal, nous avons évalué l'efficacité biologique des six extraits l'aide de quatre types de bactéries et une levure, On a constaté que l'extrait n-butanol de spathe male du palmier dattier est très efficace contre *Escherichia coli* / *Staphylococcus aureus* / *Streptococcus sp* et l'efficacité est faible contre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et cet extrait est le plus efficace parmi les extraits étudiés.

L'analyse chromatographique avec spectroscopie de masse (HPLC/MS/MS) des extraits étudiés (L'éther diéthylique/ Acétate d'éthyle/ n-butanol) il permet de proposer des dérivé des flavonoïdes dans la spathe du palmier dattier, où ont été classé environ vingt et un flavonoïde diversifié entre Orientin / Quercetin / Catéchine / dyhydrochalcon / flavanone dans la spathe male et dix-huit comme Kaempferol / Catéchine / Luteoline dans la spathe de Dagla beida.

L'extrait aqueux brut des spathes male étudié possède un effet hypoglycémie chez les rats, et peut-être la raison de cet effet est la présence des composés dans l'extrait tel que (quercétine et catéchine).

**Mots clés :** palmier dattier, flavonoïdes, efficacité antibactérienne, le diabète, HPLC / MS / MS

# Abstract

In this work, we chose the Degla Beida spathe and the date palm male spathe as plant material, we evaluated the biological effectiveness of the six extracts and so with the help of four types of bacteria and one yeast. It was found that the n-butanol extract of the date palm is very effective against *Escherichia coli* / *Staphylococcus aureus* / *Streptococcus sp* and the efficacy is low against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and this extract is the most effective among the extracts studied.

The chromatographic analysis with mass spectroscopy (HPLC / MS / MS) of the extracts studied (diethyl ether / ethyl acetate / n-butanol) makes it possible to propose derivatives of flavonoids in the date palm spathe, Was about twenty-one diversified flavonoid between Oriental / Quercetin / Catechin / dihydrochalcon / flavanone in the male spathe and eighteen as Kaempferol / Catechin / Luteoline in the spathe of Dagla beida.

The aqueous extract of the male spathes studied has a hypoglycemic effect in rats, and it may be the reason for this effect is the presence of the compounds in the extract as quercetin and catechin.

**Key words:** date palm, flavonoids, antibacterial efficacy, diabetes, HPLC / MS / MS

# الفهرس

	الملخص
I	قائمة الجداول
III	قائمة الأشكال
V	قائمة الصور
01	مقدمة

## الفصل الأول I - تقديم النبات

	1. I. النبات المدروس - نخيل التمر - (Palmier Dattier)
04	1.1. I. تسمية النبات
04	2.1. I. تصنيف النبات
06	2. I. التوزيع الجغرافي
10	4. I. الاستعمالات الطبية التقليدية للنبات
11	5. I. المراجع

## الفصل الثاني : II - الفلافونيدات

13	1. II. عموميات عن الفلافونيدات
14	2. II. الاصطناع الحيوي للفلافونيدات
17	3. II. الخصائص الطبية للفلافونيدات
20	4. II. الدراسة الكيميائية للفلافونيدات
20	1.4. II. استخلاص الفلافونيدات
20	2.4. II. فصل الفلافونيدات
20	1.2.4. II. الكروماتوغرافيا الورقية
21	2.2.4. II. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
21	3.2.4. II. كروماتوغرافية العمود
21	4.2.4. II. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (HPLC)
21	3.4. II. طرق التحليل البنيوي
21	1.3.4. II. ثابت الانحباس $R_f$ ولون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية
22	2.3.4. II. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية
23	3.3.4. II. طيف الرنين النووي المغنطيسي (RMN)
23	4.3.4. II. طيف الرنين النووي المغنطيسي للبروتون ( $^1H$ -RMN)



23	5.3.4.II. طيف الرنين النووي المغنطيسي للبروتون ( $^{13}\text{C-RMN}$ )
23	6.3.4.II. طيف الأشعة تحت الحمراء (IR)
23	7.3.4.II. مطيافية الكتلة (SM)
24	5.II. كروماتوغرافيا الطور السائل ذات الكفاءة العالية و مطيافية الكتلة
24	1.5.II- كروماتوغرافيا الطورالسائل ذات الكفاءة العالية
25	2.5.II- مطيافية الكتلة
28	3.5.II- اقتران كروماتوغرافيا السائل ذات الكفاءة العالية بمطيافية الكتلة
29	4.5.II- التحليل البنوي للفلافونيدات بمطيافية الكتلة
35	6.II. المراجع

### الفصل الثالث: III عموميات حول البكتيريا/ داء السكري

36	III-1- عموميات حول البكتيريا
36	III. 1. 1- مقدمة
36	III. 1. 2- نبذة تاريخية حول البكتيريا
37	III. 1. 3- تعريف البكتيريا
37	III. 1. 4- خصائص البكتيريا
38	III. 1. 5- تصنيف البكتيريا
41	III. 1. 6- المضادات الحيوية
41	III. 1. 6 - 1 - تعريف المضادات الحيوية
41	III. 1. 6 - 2 - الناحية التاريخية
41	III. 1. 6 - 3 - أنواع المضادات الحيوية
41	III. 1. 6 - 4 - تأثير المضادات الحيوية
41	III. 1. 6 - 5 - طريقة تحديد درجة حساسية المضادات الحيوية
42	III. 1. 6 - 6 - حساسية الميكروب
44	III. 1. 7 - قراءة النتائج

### III-2- داء السكري

46	III. 1.2- تعريف مرض السكري
46	III. 2.2- أنواع مرض السكري
47	III. 3.2- البنكرياس وإفراز الأنسولين
48	III. 4.2- الانسولين

49	III. 5.2-مضاعفات الارتفاع المزمن لنسبة السكر في الدم
49	III.6.2-علاج مرض السكري
50	III. 7.2- النباتات المضادة للسكري
51	III. 2.8- الفلافونيدات و داء السكري
53	III-3-المراجع

#### الفصل الرابع: IV. دراسة فيتوكيمائية

56	IV.1. المواد و الطرائق
56	IV. 1.1. المادة النباتية:
56	IV. 2.1. الكشف الأولي عن المركبات العضوية
57	IV.3.1. الاستخلاص
58	IV.4.1. الفحص بكمياتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)
60	IV. 2. نتائج و مناقشة
60	IV. 1.2. نتائج الكشف الأولي عن المركبات العضوية
60	IV. 3.2. مردود الاستخلاص
61	IV.4.2. نتائج الفحص بكمياتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)
61	• مستخلصات طلع الذكار
63	• مستخلصات طلع الدقلة البيضاء
67	IV.3. المراجع

#### الفصل الخامس: V دراسة الفعالية البيولوجية/الفعالية ضد السكري

	V-1- دراسة الفعالية البيولوجية
69	V-1-1- دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات طُوع النخيل
69	V-1-1-1- تحديد تركيز كل مستخلص
69	V-1-1-2- الميكروبات المختبرة
70	V-1-1-3- تجهيزات المخبر (الأدوات المستعملة)
73	V-1-2- دراسة نوعية للفاعلية البيولوجية لمستخلص نباتي ضد البكتيريا بطريقة الانتشار في وسط صلب
75	V-1-3- نتائج و مناقشة
75	أ/ مستخلصات طلع الذكار
78	ب/ مستخلصات أغلفة طلع الدقلة البيضاء
80	V-1-4- تحديد أدنى تركيز للتثبيط CMI في وسط صلب

82	V -1-5- الخلاصة
83	V -2- دراسة الفعالية ضد السكري
84	V -1.2- المواد و الطرائق
84	V -1.1.2- تحضير المستخلص المائي
84	V -2.1.2- العينات الحيوانية المستعملة
84	V -2.2- نتائج و مناقشة
87	V -3.2- الخلاصة
88	V -3- المراجع

## VI الفصل السادس

### كروماتوغرافيا الطور السائل ذي الكفاءة العالية و مطيافية الكتلة

91	VI -1- المواد و الطرائق
91	VI.1.1.1- الأجهزة
91	VI.2.1- الشروط التجريبية
92	VI.2- نتائج و مناقشة
92	VI.1.2- مستخلص ثنائي اثيل ايثر للذكار
104	VI.2.2- مستخلص أسيتات الاثيل للذكار
106	VI.3.2- مستخلص البيوتانول للذكار
108	VI.4.2- مستخلص ثنائي اثيل ايثر للدقلة البيضاء
111	VI.5.2- مستخلص أسيتات الاثيل للدقلة البيضاء
114	VI.6.2- مستخلص البيوتانول
115	VI -3- الخلاصة
117	VI -4- المراجع
121	الخاتمة

## قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	الشكل
13	الهيكل الأساسي للفلافونيدات	الشكل (1-II)
15	مختلف أقسام الفلافونيدات	الشكل (2-II)
16	الاصطناع الحيوي لمختلف أشكال الفلافونيدات في النباتات	الشكل (3-II)
24	رسم تخطيطي لقمة	الشكل (4-II)
25	مبدأ كروماتوغرافيا الطور السائل ذو الكفاءة العالية	الشكل (5-II)
26	مراحل مطياف الكتلة	الشكل (6-II)
30	شظايا مميزة لبعض أصناف الفلافونيدات	الشكل (7-II)
30	طيف كتلة للتولين luteoline	الشكل (8-II)
31	الشظايا الأساسية للتولين luteoline بـ CID منخفض الطاقة	الشكل (9-II)
45	فئات الفعالية حسب تركيز المضاد الحيوي	الشكل (1-III)
48	آلية عمل الأنسولين	الشكل (2-III)
59	مخطط الاستخلاص المطبق على المادة النباتية	الشكل (1-IV)
72	التمييز بين Staphylococcus aureus و Streptococoque بإستعمال التولين و وسيط كاشف ووسط مغذي	الشكل (1. V)
75	مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الشكل (2. V)
76	مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص أسيتات الايثيل	الشكل (3. V)
77	مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص البيوتانول	الشكل (4. V)
78	مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الشكل (5. V)
79	مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص أسيتات الايثيل	الشكل (6. V)
80	مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص البيوتانول	الشكل (7. V)
85	تأثير المستخلص على نسبة السكر في الدم	الشكل (8. V)
92	كروماتوغرام HPLC لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر للذكار	الشكل (1. V)
93	بنية أوريونتين	الشكل (2. V)
94	أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات أوريونتين	الشكل (3. V)
94	طيف الكتلة لـ أوريونتين	الشكل (4. V)

96	طيف الكتلة و شطايا الكرسيتين	الشكل (5. V)
96	أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات الكرسيتين	الشكل (6. V)
97	أطياف الكتلة للقمم 08، 09 و 10	الشكل (7. V)
99	بنية الكاتشين Catechine	الشكل (8. V)
100	الشطايا الناتجة عن تفكك الكاتشين	الشكل (9. V)
100	أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات الكاتشين	الشكل (10. V)
101	أطياف الكتلة للقمم 01، 03، 05، 06، 07	الشكل (11. V)
102	طيف كتلة لأيون للهدروشلكون/(b) طيف كتلة لأيون فلافانول	الشكل (12. V)
103	أشكال التفكك ل الهدروشلكون (DC) و الفلافانول (F)	الشكل (13. V)
103	شطايا يمكن أن تظهر في تفكك أيون للهدروشلكون، أو أيون فلافانول	الشكل (14. V)
104	طيف الكتلة للقمم 13	الشكل (15. V)
104	كروماتوغرام HPLC لمستخلص الاسيتات للذكار	الشكل (16. V)
105	أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات الكاتشين و الكرسيتين	الشكل (17. V)
105	كروماتوغرام HPLC لمستخلص البيتانول للذكار	الشكل (18. V)
108	أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات الكاتشين و الكرسيتين	الشكل (19. V)
108	كروماتوغرام HPLC لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر للدقلة البيضاء	الشكل (20. V)
110	بنية كامفيرول	الشكل (21. V)
111	ظهور الشظية m/z 151 انطلاقاً من مركبات مختلفة	الشكل (22. V)
111	كروماتوغرام HPLC لمستخلص الأسيات الدقلة البيضاء	الشكل (23. V)
113	أطياف الأشعة فوق البنفسجية للقمم	الشكل (24. V)
113	أطياف الأشعة فوق البنفسجية للقمم	الشكل (25. V)
114	كروماتوغرام HPLC لمستخلص البيتانول الدقلة البيضاء	الشكل (26. V)
115	شطايا يمكن أن تنتج عن تفكك ليتولين	الشكل (27. V)

## قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	الجدول
07	أمثلة عن الانتشار الجغرافي للنخيل في العالم	الجدول (1.I)
08	مناطق انتشار الجنس <i>Phoenix</i>	الجدول (2.I)
10	بعض الاستعمالات الطبية لنبات نخيل التمر	الجدول (3.I)
19	الفوائد المحتملة لبعض أنواع الفلافونيدات	الجدول (1.II)
22	مجالات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية للفلافونيدات في الميثانول	الجدول (2.II)
22	أمثلة عن مجالات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية بالنسبة للفلافونيدات	الجدول (3.II)
27	مختلف أنواع مصدر التآين	الجدول (5.II)
50	أمثلة عن بعض النباتات التي لها تأثير عن سكر الدم	الجدول (1.III)
51	أمثلة لبعض الفلافونيدات التي لها تأثير على سكر الدم	الجدول (2.III)
60	نتائج الكشف عن مركبات الأيض الثانوي	الجدول (1. IV)
60	مردود عملية الاستخلاص	الجدول (2. IV)
61	نتائج الفصل بوسطة CCM لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (3. IV)
62	نتائج الفصل بوسطة CCM لمستخلص أسيتات الايثيل	الجدول (4. IV)
62	نتائج الفصل بوسطة CCM لمستخلص البيتانول	الجدول (5. IV)
63	نتائج الفصل بوسطة CCM لمستخلص ثنائي اثير ايثر	الجدول (6. IV)
63	نتائج الفصل بوسطة CCM لمستخلص أسيتات الايثيل	الجدول (7. IV)
64	نتائج الفصل بوسطة CCM لمستخلص البيتانول	الجدول (8. IV)
69	المكروبات المختبرة ونوع الغرام	الجدول (1. V)
70	الأدوات والأجهزة والمذيبات والكواشف والملونات المستعملة ووسط الزرع	الجدول (2. V)
71	الخصائص البيوكيميائية لبكتريا <i>Escherichia coli</i>	الجدول (3. V)
71	الخصائص البيوكيميائية لبكتريا <i>Pseudomonas aerugino</i>	الجدول (4. V)
71	الخصائص البيوكيميائية لبكتريا <i>Staphylococcus aureus</i>	الجدول (5. V)
75	قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (6. V)
76	قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص أسيتات الايثيل	الجدول (7. V)

77	قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص البيوتنول	الجدول (8. V)
78	قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (9. V)
79	قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص أسيتات الايثيل	الجدول (10.V)
79	قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص البيوتانول	الجدول (11.V)
82	أصغر تركيز للتثبيط (CMI) لمختلف مستخلصات طلع الدكار	الجدول (12.V)
82	أصغر تركيز للتثبيط (CMI) لمختلف مستخلصات طلع الدقلة البيضاء	الجدول (13.V)
85	نتائج قياس نسبة السكر في الدم	الجدول (14.V)
92	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (1.VI)
94	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (2.VI)
98	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (3.VI)
102	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (4.VI)
105	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص الأسيتات	الجدول (5.VI)
107	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص البيتانول	الجدول (6.VI)
109	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر	الجدول (7.VI)
112	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص الأسيتات	الجدول (8.VI)
114	نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص البيتانول	الجدول (9.VI)

## قائمة الصور

الصفحة	العنوان	الصورة
06	مختلف أجزاء نخيل التمر	الصورة (1.I)
07	التوزيع الجغرافي للنخيل في العالم	الصورة (2.I)
08	مناطق انتشار الجنس <i>Phoenix</i> في العالم	الصورة (3.I)
09	التوزيع الجغرافي لنخيل التمر في الجزائر	الصورة (4.I)
37	بنية الخلية البكتيرية	الصورة (1.III)
44	الأنثيبوغرام بعد الحضان و طريقة قياس قطر منطقة التثبيط	الصورة (2.III)
45	أنواع القراءات الممكنة	الصورة (3.III)
48	رسم توضيحي للبنكرياس	الصورة (4.III)
56	طلع أثناء فترة الازهار	الصورة (1. IV)
61	ألوان المستخلصات	الصورة (2. IV)
61	التدرج اللوني أثناء الأستخلاص بالبوتانول (n-butanol)	الصورة (3. IV)
74	طريقة قياس قطر التثبيط	الصورة (1. V)
81	صورة تظهر نمو أو عدم نمو البكتريا	الصورة (2. V)
84	جهاز قياس نسبة السكر في الدم	الصورة (3. V)
91	صورة لجهازي كروماتوغرافيا الطور السائل ذي الكفاءة العالية و مطيافية الكتلة	الصورة (1.VI)



المقدمة

## المقدمة

تتميز الجزائر بغطاء نباتي متنوع وذلك راجع الى اتساع مساحتها و تنوع المناخ السائد بها، بالإضافة الى تمايز الفصول الأربعة بشكل واضح، هذا الاختلاف سمح بنمو نباتات تتلائم مع مناخ البحر الأبيض المتوسط في شمال البلاد وأخرى بالجنوب تتلائم مع المناخ الصحراوي بالإضافة الى نباتات مناطق الهضاب العليا و السهوب، هذا التنوع النباتي جلب اهتمام العديد من الباحثين كابن البيطار في رحلته من الأندلس الى المشرق العربي مروراً بشمال افريقيا (1220م) و الباحثين الأوربيين قبل و أثناء الاحتلال الفرنسي للجزائر بحيث اهتموا بأسماء هذه النباتات، مناطق انتشارها، فوائدها و مضارها. [01] [02]

و يعد نخيل التمر شجرة من بين أشجار الغطاء النباتي بالجزائر و هي شجرة معمرة تنمو عموماً في عدة مناطق من العالم ففي الماضي نمت في مناطق الشرق الأوسط وشمال افريقيا ثم انتشر الى مناطق جديدة في العالم، فهي تثمر في المناطق الصحراوية و الشبه صحراوية نظراً لتوفر الظروف الملائمة لذلك، و أصبحت لهذه الشجرة أهمية اقتصادية و اجتماعية تؤثر مباشرةً في حياة السكان، بحيث يتم استهلاك ثمارها مباشرة أو بشكل منتجات مصنعة أو شبه مصنعة مثل المعجون و الطحين و كذلك يمكن استعمال أجزاء أخرى من النبات في تصنيع السلال ، البناء و غيرها من المستلزمات. [03]

و نظراً لأهمية هذه الشجرة توجب علينا المساهمة و التعمق في دراستها من الناحية الكيميائية و البيولوجية؛ أولاً من أجل الحفاظ على الأصناف الجيدة من النخيل ، ثانياً: استغلال منتجاتها بشكل جيد بناء على فوائدها الاقتصادية، الغذائية و الصيدلانية.

و تمثل التمور مصدرراً غنياً بالطاقة لاحتوائها على الألياف الغذائية، الكربوهيدرات، البروتينات و الدهون كم تم التوصل الى احتواء التمر على المركبات الفينولية. و من المعروف أن هذه المركبات عموماً تظهر نشاطاً ضد الفيروسات، و ضد الأكسدة، وخصائص مضادة للميكروبات [04] و هذا ما يفتح المجال واسعاً لدراسة منتجات النخيل عموماً سواء كانت منتجات أساسية أو ثانوية. فقد أشار (Abdulla Y, 2008) الى أن من المحتمل أن يؤثر المستخلص المائي لطولوع دكار نخيل التمر (*Phoenix Dactylifera L*) في انخفاض شدة الاسهال لدى الجردان [05]. كما أشارت (Ghiaba.Zineb-2012) و آخرون الى احتواء بعض

أنواع التمور الجزائرية على مركبات فينولية لها فعالية مضادات للأكسدة [06] بالإضافة الى وجود دراسات أخرى.

تمتاز الجزائر بعدة أصناف من نخيل التمر و التي تميزها عن باقي الدول مثل (دقلة نور، دقلة بيضاء و الغرس) [07] و في هذا الصدد قمنا باختيار منطقة تقرت ( ولاية ورقلة - الجزائر) من أجل أخذ عينات من طلوع ذكار الدقلة البيضاء و عينات من طلوع الدقلة البيضاء لدراسة المحتوى الفلافونيدي لها .

من أجل تثمين الموارد الطبيعية المحلية للمناطق الصحراوية و الشبه صحراوية، و في اطار البحث عن مصادر مواد فعالة طبيعياً ارتأينا اجراء الدراسة الفيتوكيميائية لنخير التمر، حيث تركزت الدراسة على نواتج الأيض الفلافونيدي.

هذا العمل ينقسم الى قسمين:

• القسم الأول (الجزء النظري و المتكون من ثلاث فصول) عبارة عن بحث توثيقي نعرض فيه:

- الفصل الأول: تقديم النبات المدروس - نخيل التمر - (*Phoenix Dactylifera L*).

- الفصل الثاني: عموميات عن الفلافونيدات وطرائق الفصل.

- الفصل الثالث: عموميات حول البكتيريا و كذلك داء السكري.

• القسم الثاني (الجزء العملي و المتكون من ثلاث فصول).

- الفصل الرابع: دراسة فيتوكيميائية

- الفصل الخامس: دراسة الفعالية البيولوجية والفعالية المضادة لداء السكري.

- الفصل السادس: تحليل المستخلصات بكموتوغرافيا الطور السائل ذات

الكفاءة العالية و مطيافية الكتلة.

كما أنهينا المذكرة بخاتمة تصف مجمل النتائج المتحصل عليها.

## المراجع:

- [01] ابن البيطار ، الجامع لمفردات الأدوية و الأغذية، القاهرة، مصر 1891 .
- [02]Trabut L, Flore du Nord de l’Afrique- Répertoire des noms indigènes des Plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le nord de l’Afrique, Collection du Centenaire de l’Algérie, Alger, 1935.
- [03]Muriel Gros-Balthazard, Claire Newton, Sarah Ivorra, Margareta Tengberg, Jean-Christophe Pintaud et Jean-Frédéric Terral, Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), Revue d’ethnoécologie, 4 (2013),
- [04]Poornananda M. Naik and Jameel M. Al-Khayri, Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera L.*) Through Cell Suspension Culture, Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition, Methods in Molecular Biology, vol. 1391, New York, 2016
- [05] Abdulla Y. Al –Taher, Possible anti-diarrhoeal effect of the date palm (*Phoenix Dactylifera L*) spathe aqueous extract in rats, Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences) Vol.9 No.1 1429H (2008)
- [05]Ghiaba Zineb, Mustapha Boukouada, et all, Screening of antioxidant activity and phenolic compounds of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Algeria, Mediterr J Nutr Metab (2012) 5:119–126
- [06]Saïda Ouafi, Nicole Bounaga, Les glycosides flavoniques marqueurs de cultivars algériens du palmier—dattier *Phoenix dactylifera L*, Acta Bot. Gallica, 2008, 155 (2), 307-315.

الجزء

النظري

# الفصل الأول

تقديم النبأ

## I - تقديم النبات

### I. 1. I. النبات المدروس - نخيل التمر - (Palmier Dattier)

#### I. 1.1. I. تسمية النبات:

الاسم العلمي لنخيل التمر فينيكس داكليليفيرا *Phoenix Dactylifera* و تعود تسمية نخيل التمر بهذا الاسم للعالم Linne سنة 1734م [1]، و من الناحية التاريخية فان مصطلح Phoenix يعود للاغريق القدامى والدين أطلقوا عليها هذا الاسم نسبةً للمكان الذي شاهدوا فيه هذه الشجرة (فينيقية)، و من جهة أخرى هناك فرضية تشير الى أن اليونانيون سموها phoenix على النخيل لظراً لقدرته على البقاء على قيد الحياة و الانبعاث من تحت الرماد في حالة الاحتراق الجزئي، في حين يعود مصطلح dactylifera الى شكل فاكهة النخيل و الذي يشبه الاصبع (dactylus في اللاتينية) (Popenoe 1938)

[2] [3]

#### I. 2.1. I. تصنيف النبات:

يصنف نخيل التمر (*Phoenix. dactylifera L*) ضمن العائلة النخيلية palmae و هي العائلة الوحيدة التي تنتمي إلى الرتبة palmales وتعتبر هذه العائلة من أقدم العائلات النباتية المزهرة [4-6]

و التصنيف النباتي لنخيل التمر هو [7]

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous-Embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Monocotyledones	القسم
Sous classe	Asteridae	تحت القسم
Ordre	Arecales (Palmales)	الرتبة
Famille	(Palmae) Arecaceae	العائلة
Sous famille	Coryphoidées	تحت العائلة
Genre	<i>Phoenix</i>	الجنس
Cultivar	<i>dactylifera</i>	الصنف

## I. 3.1. وصف النبات: [8] [1]

هي من النباتات ذوات الفلقة الواحدة ومن أهم نباتات العائلة النخيلية حيث تتميز بساق اسطوانية خشبية مغطاة بليف تنتهي بتاج من الأوراق الريشية الطويلة، أهم أقسامها ما يلي:

- **الجدور:** تخرج من قاعدة الجذع في شكل مجاميع كثيفة تمتد في التربة لتثبيت النخلة وتزويدها بالماء والمواد اللازمة من التربة، يمكن أن يصل طول هذه الجذور الى ثلاث أمتار و في بعض الأحيان الى سبعة أمتار وذلك على حسب طبيعة التربة و حيوية الشجرة، كما ان للجدور إمكانية النمو و الجدد في حالة الانقطاع أو التلف.

- **الساق (الجدع):** ساق النخلة أسطوانية غير متفرع مغطى بالكرناف (بقايا الجريد المقطوع) و الذي يتخلله ليف، كما يزداد حجم الساق بانقسام الخلايا في الجزء المحيطي للجدع و من جهة أخرى قد يصل طوله الى 50م ينتهي برأس به أوراق (الجريد). [9]

- **الأوراق (الجريد):** متجمعة كباقة فوق الساق، و هي أوراق مركبة ريشية الشكل تبدأ بالكرناف (AMORSI 1975)، و مدة حياتها تتراوح بين 03 و 07 سنوات وذلك حسب الصنف و ظروف حياة النخلة (PEYRON 2000). من جهة أخرى فإن النخلة تحمل حوالي بين 30-40 جريدة و قد يزيد العدد أو ينقص، و تتكون الجريدة من نصل الجريد، الخوص أو السعف، الأشواك، عنق الجريدة أو السويق، قاعدة الجريدة أو الكرنافة و الغمد الليفي. [6]

- **البرعم:** يوجد بأعلى النخلة و يساعد على نموها.

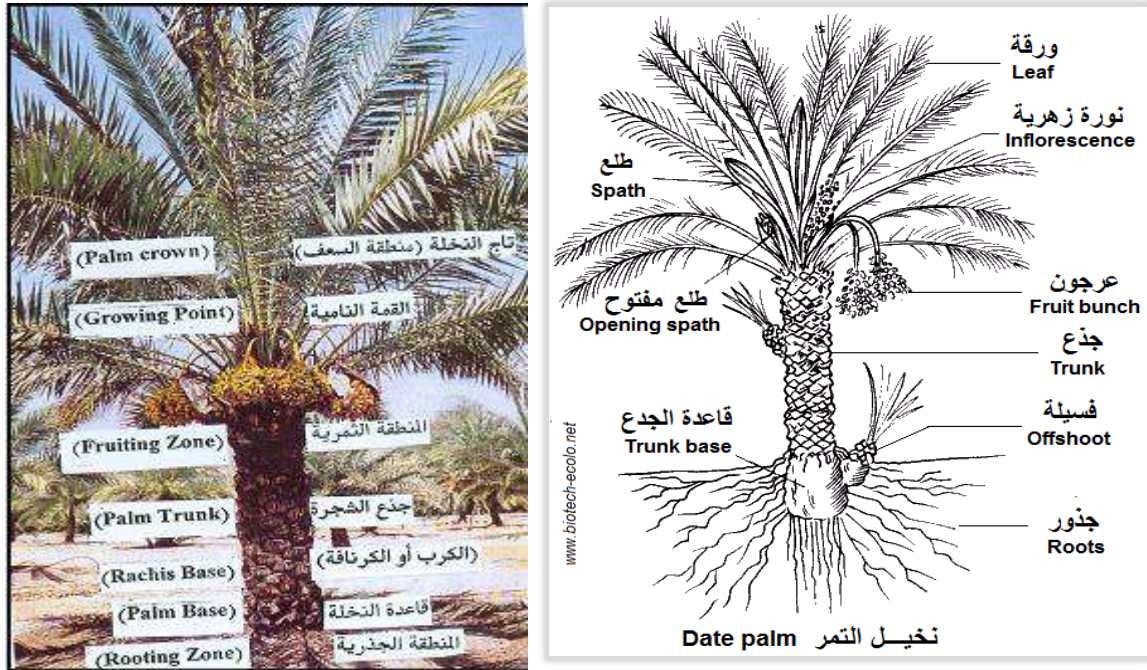
- **الأزهار:** ينشأ المجموع الزهري من براعم جانبية بين الجريد، و تكون الازهار في البداية بيضاء اللون و محمولة على شمرايح بشكل سنبله داخل أكمام (أغاريض، أغلفة الطلع)، منها الذكرية ذو رائحة قوية والانثوية بلا رائحة.

تحمل طلعة الأزهار المؤنثة ما بين 33-99 شمروخاً، و يختلف شكل الطلعة فبعضها طويل وضيق و بعضها قصير و عريض، و غلاف الازهار المؤنثة غالباً ما تكون أصغر حجماً من الذكرية، في حين أن طول الطلعة الذكرية ما بين 15-25 سم و تمتاز بشمرايح قصيرة. [10]

- **الثمار:** وتسمى بالبالح فهي في شكل حب به بكرة (نواة) بداخلها، ومغلقة اجمالاً بغلاف أملس ناعم



- البذرة: حبة صغيرة الحجم مستطيلة الشكل تحتوي على المركبات الحافظة ذات الطبيعة الدهنية والبروتينية.



الصورة (1.1) مختلف أجزاء نخيل التمر

## I. 2. التوزيع الجغرافي للنخيل:

### I. 1.2. توزيع النخيل في العالم:

ينتشر النخيل في عدة مناطق بالعالم و في القارات الخمس، بحيث تلعب الظروف المناخية دوراً في توزيعه الجغرافي كما هو مبين في الجدول (1.1) و الصورة (2.1) [5] [11]

و قد تمت زراعة نخيل التمر في المناطق الجافة و الشبه جافة، و نقلت لإفريقيا في القرن 15 ثم مدغشقر في القرن 17 تليها استراليا و القارة الامريكية، كما تتواجد بنسبة 0.02% بإسبانيا، في حين أن نسبة 97.95% من هذا النوع من النخيل يتواجد في الدول العربية و الإسلامية مثل: العربية السعودية، البحرين، الامارات، ايران، العراق، الكويت، عمان، باكستان، اليمن، مصر، ليبيا، الجزائر، تونس و المغرب. وتحتل دول الشرق الأوسط وآسيا المرتبة الاولى في الإنتاج العالمي للتمر متبوعة بدول شمال إفريقيا [12] [13] [14]

## الجدول (1.I) أمثلة عن الانتشار الجغرافي للنخيل في العالم

النوع	مناطق الانتشار
Les palmiers à sucre	الهند، ماليزيا
Les palmiers à huile	غابات غينيا ( إفريقيا الغربية ) ، برازيل
Les palmiers à ivoire	كولومبيا و الإكوادور
Le cocotier	آسيا ( الهند، سيرلانكا، أندونيسيا) في أمريكا ( المكسيك ، البرازيل) في إفريقيا (الموزمبيق، تنزانيا، غانا )
Le palmier à betel	شرق الهند ، ماليزيا
Le palmier à cire	البرازيل (الشمال الشرقي).
Le palmier à raphia	مدغشقر ، السواحل الشرقية لإفريقيا

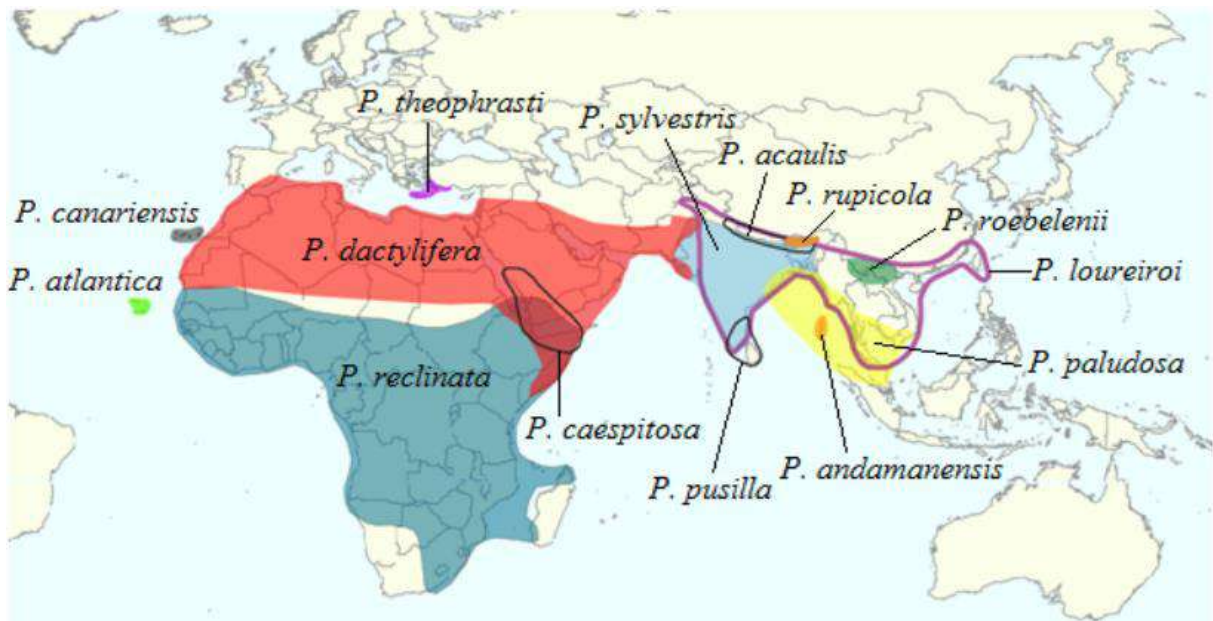


الصورة (2.I) التوزيع الجغرافي للنخيل في العالم [15]

و يبقى الجنس Phoenix من بين أكثر الاجناس انتشاراً في العالم و الذي يحتوي على 12 نوعا حسب (Ang.Chevalier 1952) [3]، كما هو مبين في الجدول و الخريطة التاليين.

الجدول (2.I) مناطق انتشار الجنس *Phoenix*

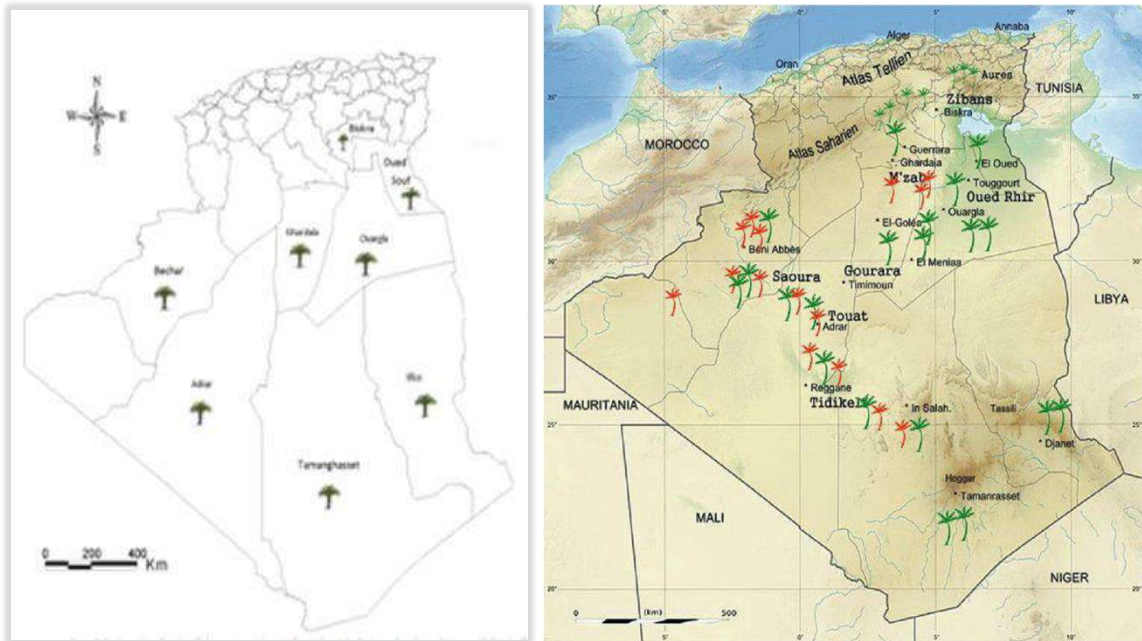
مناطق الانتشار	الجنس <i>Phoenix</i>
أوروبا المطلة على البحر المتوسط ، إفريقيا، آسيا الغربية و أدخلت على أمريكا و أستراليا	<i>Phoenix dactylifera</i> L
شبه جزيرة الرأس الأخضر، جزر الكناري	<i>Phoenix canariensis</i> Chabaud
إفريقيا الغربية و جزر الكناري	<i>Phoenix atlantica</i> A Chev
الصين الجنوبية، تايوان	<i>Phoenix hanceana</i> Naudin
الهند، برمانيا، فيتنام الجنوبية	<i>Phoenix humilis</i> Royle
الهند، سيلان.	<i>Phoenix farinifera</i> Roxb
سيلان، شمال الفيتنام	<i>Phoenix roebelinii</i> O' Brien
بنغال، <i>Nikobaren</i> ، <i>Andaman</i> ، <i>Tenasherine</i> ، تايلاندا، فيتنام الجنوبية ( <i>Cochinchine</i> )، سومطرة	<i>Phoenix paludosa</i> Roxb
بنغال	<i>Phoenix acaulis</i> Roxb
الهند	<i>Phoenix rupicola</i> T. Anders
إفريقيا الإستوائية و اليمن	<i>Phoenix reclinata</i> Jacq
الهند، الباكستان الغربية	<i>Phoenix sylvestris</i> Roxb

الصورة (3.I) مناطق انتشار الجنس *Phoenix* في العالم [2]

## I. 2.2. توزيع النخيل في الجزائر:

يعتبر نخيل التمر أساس النظم الايكولوجية في الصحراء الجزائرية بحيث يقلل من آثار أشعة الشمس وانجراف التربة ويساعد أنواع أخرى من النباتات والمحاصيل على النمو، ومن جهة أخرى يلعب دوراً هاماً من الناحية الاقتصادية والمعيشية في استقرار السكان في المناطق الصحراوية. [16]

تحتل الجزائر المرتبة السادسة عالمياً والأولى في المغرب العربي بحصة إنتاجية تقدر بحوالي 500000 طن سنوياً من التمور خلال الفترة الممتدة من 2004م الى 2008م [17] و مساحة 160000 هكتار صالحة لغرس النخيل، و ينتشر النخيل في الجزائر في عدة واحات موزعة على الجنوب حيث المناخ حار و جاف (منطقة الصحراء) بحيث تمتد من الحدود المغربية غربا إلى الحدود التونسية الليبية في الشرق ومن الأطلس الصحراوي في الشمال إلى رقان (جنوب غرب)، تمنراست (وسط) وجانت (جنوب شرق) [16] تشير الإحصائيات إلى أن إنتاج التمور في الجزائر يتركز أساسا في جهة الجنوبي الشرقي من البلاد، وهي مسؤولة عن 76% من الإنتاج الوطني، ولاية بسكرة ما يقرب من 31% تليها ولاية الوادي 27% ثم ورقلة [17]



الصورة (4.I) التوزيع الجغرافي لنخيل التمر في الجزائر [17]

### 3.I. الاستعمالات الطبية التقليدية لنخيل التمر:

تعتبر النباتات الطبية مصدر علاج بعض الأمراض و في هذا الاطار يتم استعمال بعض أجزاء نخيل التمر و كذا فاكهة التمر بمختلف أنواعه في الطب الحديث و التقليدي، و في الجدول التالي أمثلة على بعض الاستعمالات

الجدول (3.I) بعض الاستعمالات الطبية لنبات نخيل التمر

المرجع	الاستعمالات
[3]	اضطرابات الذاكرة، والحمى، والالتهاب، والشلل، وفقدان الوعي، واضطرابات الجهاز العصبي
[4]	لتخفيف من التسمم الكحولي
[18]	علاج مرض السكري
[19]	المستخلص المائي لطلع النخيل مضاد للإسهال
[20]	استعمال أوراق النخيل و التمر لعلاج السكري و ضغط الدم
[21]	النشاط المضاد للأكسدة
[22]	النشاط المضاد للأكسدة
[23]	النشاط المضاد للأكسدة

## 4.1. المراجع:

- [1] Munier, P., le palmier dattier, 24eme Ed., dans la collection de « Technique et Production tropicale » 1973, Maisonneuve et Larose Paris.
- [2] Muriel Gros-Balthazard, Claire Newton, Sarah Ivorra, Margareta Tengberg, Jean-Christophe Pintaud et Jean-Frédéric Terral, Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), Revue d'ethnoécologie, 4 (2013),
- [3] Chevalier Auguste. Recherches sur les Phoenix africains. In: Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale, 32<sup>e</sup> année, bulletin n°355-356, Mai-juin 1952. pp. 205-236;
- [4] Atef, M. I., Mohammed, N.H., 2eme Ed. « livre de palmier des datties : Culture, protection et production dans le monde arabe », 1998. Construction des connaissances : Jalel Hazi et leur associés –Alexandrie- Egypte. P.: 55-79 (Ed. en arabe)
- [5] Guglielmo, A., Pavone, P., Salmeri, C. « Les palmiers » webmaster , Département de Botanique.
- [6] القضماني م. ع. م. زيادة س. يوسف م. طيبة خ. البابا م. م. هاشم ع. م. البحري م. ابراهيم ع. ب. ع. القاضي ع. 2013. اطلس نخيل التمر في سوريا. الجمهورية العربية السورية. وزارة الزراعة و الإصلاح الزراعي. المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والاراضي القاحلة أكساد. رقم 446، 5-25
- [7] Djerbi M, (1994). Précis de phéniculture, F.A.O, Rome. p 191
- [8] حسن مرعي، النخيل و تصنيع التمور في المملكة العربية السعودية 1971م
- [9] بدر م، النخيل و أشباه النخيل. الطبعة الأولى. منشأ المعارف، الإسكندرية، مصر، ص 82-83
- [10] منير م.، إبراهيم ب.، عبد الجواد م.، 1999. فاكهة المناطق الصحراوية. الدار العربية للنشر و التوزيع، جامعة القاهرة، مصر. 199-206
- [11] Munier, P., sur l'origine de la connaissance de la pratique de la pollinisation artificielle du palmier dattier, Fruits, vol. 13, N° 11, 1958. In « Le palmier dattier » p.24-32
- [12] DAHER M. H. A., 2010 Détermination du sexe chez le palmier dattier : Approches histocytologiques et moléculaires, UNIVERSITE MONTPELLIER II.
- [13] EL-HOUMAIZI M. A., SAAIDI M., OIHABI A. and CILAS C., 2002b. Phenotypic diversity of date-palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) from Morocco. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 483-490.
- [14] Chih Cheng T. Chao' Robert R. Krueger The Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.): Overview of Biology, Uses, and Cultivation; HORTSCIENCE VOL. 42(5) AUGUST 2007
- [15] Shaymaa Sakin Abdrabo, ANALYTICAL METHODS APPLIED TO THE CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF PALM DATES (*PHOENIX*

*DACTYLIFERA L.*) FROM ELCHE'S PALM GROVE, Doctoral thesis, University Of Alicante, 2013, P 13

[16] Frédérique Aberlenc-Bertossi , Biotechnologies du palmier dattier, I R D Éditions, INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT, collection Colloques et séminaires , Paris, 2010

[17] Nadia Bouguedoura , Malika Bennaceur , Souad Babahani , and Salah Eddine Benziouche , Date Palm Status and Perspective in Algeria, Springer Science Business Media Dordrecht 2015, J.M. Al-Khayri et al. (eds.), Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1: Africa and the Americas, DOI 10.1007/978-94-017-9694-1\_4

[18] Ouafae Benkhniq, Fatiha Ben Akka, Souad Salhi, Mohamed Fadli, Allal Douira et Lahcen Zidane, Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc), Journal of Animal & Plant Sciences, 2014. Vol.23, Issue 1: 3539-3568

[19] Abdulla Y. Al-Taher, Possible anti-diarrhoeal effect of the date palm (*Phoenix Dactylifera L.*) spathe aqueous extract in rats, Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences) Vol.9 No.1 1429H (2008)

[20] A. Tahraoui , J. El-Hilaly , B. Lyoussi, Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province), Journal of Ethnopharmacology 110 (2007) 105–117

[21] Abdul Ameer A Allaith Antioxidant activity of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruit of various cultivars, International Journal of Food Science & Technology, 2007, 43(6):1033 - 1040

[22] Foroogh Biglari, Abbas F.M. AlKarkhi, Azhar Mat Easa Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran, J Food Chemistry, 2008, V107, 1636–1641

[23] Foroogh Biglari, Abbas F.M. AlKarkhi, Azhar Mat Easa, Cluster analysis of antioxidant compounds in dates (*Phoenix dactylifera*): Effect of long-term cold storage, J Food Chemistry, 2009, 112(4), 998–1001

# الفصل الثاني

معلومات عن

الفلان فونيكات

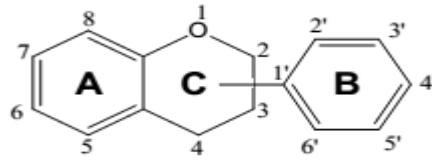


## II . الفلافونيدات

### 1.II . عموميات عن الفلافونيدات

هي مركبات طبيعية من نواتج الأيض الثانوي تشكل أحد أكبر أقسام البولي- فينول لدى النباتات، حيث تنتشر في الأجزاء المختلفة من النبات وتتمركز بصفة خاصة في الجزء الهوائي (ثمار، أزهار، أوراق)، أكتشفت سنة 1936 من طرف العالم (Albert Szent-Gyorgyi de Nagrapolt).

وهي عبارة عن أصباغ نباتية مسؤولة عن تلوين الازهار، الثمار وأحيانا الأوراق، في أغلب الأحيان تكون مرتبطة بالسكريات، أي على شكل فلافونيدات جليكوزيدية [01] وتتكون الفلافونيدات غالبا من خمس عشر ذرة كربون تتمايز الى حلقتين عطريتين متصلتين فيما بينهما بواسطة ثلاث ذرات كربون ( $C_6-C_3-C_6$ ) [02] كما هو موضح في الشكل (1-II)



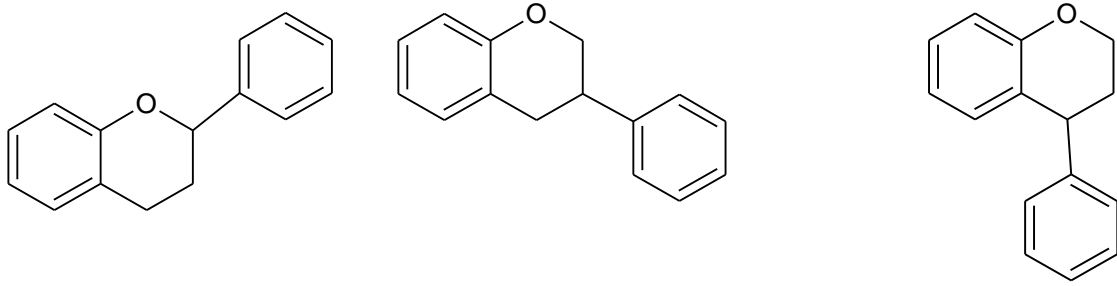
الشكل (1-II): الهيكل الأساسي للفلافونيدات

للفلافونيدات أدوار مهمة في حياة النباتات من بينها:

- تلوين الأزهار و الثمار و البذور لجلب الملقحات و تشتيت البذور.
- حماية النبات من الأشعة فوق البنفسجية حيث تعمل كمرشحات للأشعة التي تمر عبر طبقة الأوزون.
- حماية النبات ضد الحشرات و الحيوانات [03]
- حماية النبات من الميكروبات.

تتركز الفلافونيدات غالبا في الأجزاء الهوائية للنبات على مستوى الخلايا النباتية في شكل فلافونيدات جليكوزيدية (glycosides) دوابة في الماء و التي تتواجد في فجوة الخلية النباتية، في حين أن الفلافونيدات التي في شكل جليكونات (aglycones) فتتواجد في سيتوبلازم الخلية أو على سطح الأنسجة السطحية للنبات [04]

يمكن تصنيف الفلافونويدات الى ثلاث فئات [05]



## 2-phenylbenzopyrans 3-phenylbenzopyrans 4-phenylbenzopyrans

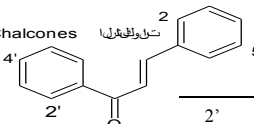
تتقسم الفلافونويدات الى عدة أنواع وذلك بناء على عدد، موضع وطبيعة المستبدلات التي تكون في أغلب الأحيان عبارة مجموعات هيدروكسي، ميثوكسيل أو جليكوزيل أو تبعاً لمستوى الأكسدة للحلقة غير المتجانسة، نلخص أهم أنواعها في الشكل (2-II) [06,02]

### 2.ii. الاصطناع الحيوي للفلافونويدات

يتشكل الهيكل الأساسي للفلافونويدات ( $C_6-C_3-C_6$ ) وفق مسلكين: الأول عن طريق جينات بنوية تحدد الانزيمات المشاركة بشكل مباشر في تكوين مركبات الفلافونويدات؛ و الثاني عن طريق جينات تنظيمية تراقب و توجه عمل الجينات البنوية ، فعلى سبيل المثال يقوم انزيم تحضير الشالكون (CHS, chalcone synthase) بتحفيز تكاثف ثلاث جزيئات من (malonyl-CoA) مع جزيئة من (P-coumaroyl-CoA) للحصول على مركب وسيط هو الشالكون (chalcone) ، في أغلب النباتات لا يكون الشالكون هو الناتج النهائي بل هو أحد مركبات الانطلاق لانواع أخرى من الفلافونويدات مثل فلافانول أو ثنائي هيدرو فلافانول (flavanones, dihydroflavonols) حيث تتشكل مركبات الأنثوسيانين (anthocyanins) الذوابة في الماء والتي تعتبر من المكونات الأساسية لصبغ الأزهار و الثمار و يتم ذلك بتحفيز أنزيمات مختلفة، أما الأقسام الأخرى من الفلافونويدات مثل: (isoflavones flavonols)، (flavones... إلخ)، فهي ناتج تفاعلات (محفزة هي الأخرى بانزيمات) في المسلك العام لتكوين مركبات الأنثوسيانين [07]

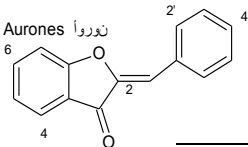
بعد تكون الهياكل الأساسية لمختلف أقسام الفلافونويدات تحدث تغيرات على هذه الأقسام مثل تثبيث السكريات (glycosylflavones) ، مثيلة الهيدروكسيلات (methylation) إلخ... بالهيكل الفلافونيدي لكن هناك استبدالات تميز أقسام معينة من الفلافونويدات [07] وتتم غالباً هذه التغيرات في نهاية الاصطناع الحيوي بعد مرحلة الشالكون. الشكل (3-II)

**Chalcones** شالون



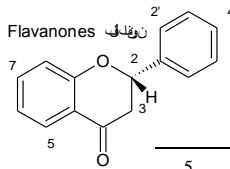
	المستبدلات					
	2'	3'	4'	6'	3	4
Davidigenin	OH	H	OH	H	H	OH
isoliquiritigenin	OH	H	OH	H	H	OH
Butein	H	H	OH	OH	OH	OH
Asebogenin	OH	H	O-CH <sub>3</sub>	OH	H	OH

**Aurones** أورون



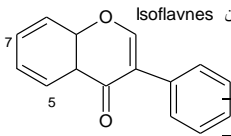
	المستبدلات					
	4	6	7	3'	4'	5'
Maritimetin	H	OH	OH	OH	OH	H
Aureusidin	OH	OH	H	H	OH	OH
Bracteatin	OH	OH	H	OH	OH	OH
Sulfuretin	H	OH	H	H	OH	OH
Hispidol	H	OH	H	H	OH	H

**Flavanones** فلافونون



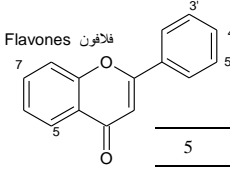
	المستبدلات					
	5	6	7	3'	4'	5'
Eriodictyol	OH	H	OH	OH	OH	H
Naringenin	OH	H	OH	H	OH	H
Butin	H	H	OH	H	OH	OH
Pinocembrin	OH	H	OH	H	H	H
Hesperetin	OH	H	OH	O-CH <sub>3</sub>	OH	H

**Isoflavnes** ايزوفلافون



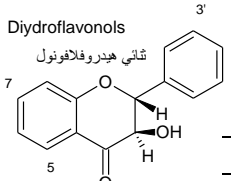
	المستبدلات					
	5'	6	7	3'	4'	5'
Daidzein	H	H	OH	H	OH	H
Genistein	OH	H	OH	H	OH	H
Orobo	OH	H	OH	OH	OH	H
Pratensein	OH	H	OH	OH	O-CH <sub>3</sub>	H
Irigenin	OH	O-CH <sub>3</sub>	OH	OH	O-CH <sub>3</sub>	O-CH <sub>3</sub>

**Flavones** فلافون



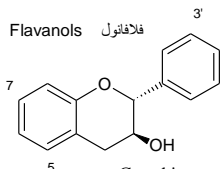
	المستبدلات					
	5	6	7	3'	4'	5'
Apigenin	OH	H	OH	H	OH	H
Chrysin	H	H	OH	H	H	H
Luteolin	OH	H	OH	OH	OH	H
Scutellarein	OH	OH	OH	H	OH	H
Diosmetin	OH	H	OH	OH	O-CH <sub>3</sub>	H

**Dihydroflavonols** ثنائي هيدرو فلافونول



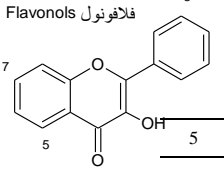
	المستبدلات					
	5	6	7	3'	4'	5'
Taxifolin	OH	H	OH	OH	OH	H
Fustin	H	H	OH	OH	OH	H
Ampelopsin	OH	H	OH	OH	OH	OH
Aromadendrin	OH	H	OH	H	OH	H
Garbanzol	H	H	OH	H	OH	H

**Flavanols** فلافانول



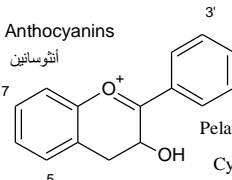
	المستبدلات					
	5	6	7	3'	4'	5'
Catechin	OH	H	OH	OH	OH	H
Gallocatechin	OH	H	OH	OH	OH	OH
Afzelechol	OH	H	OH	H	OH	H
Fisetinidol	H	H	OH	H	OH	OH
Robinetinidol	H	H	OH	OH	OH	OH

**Flavonols** فلافونول



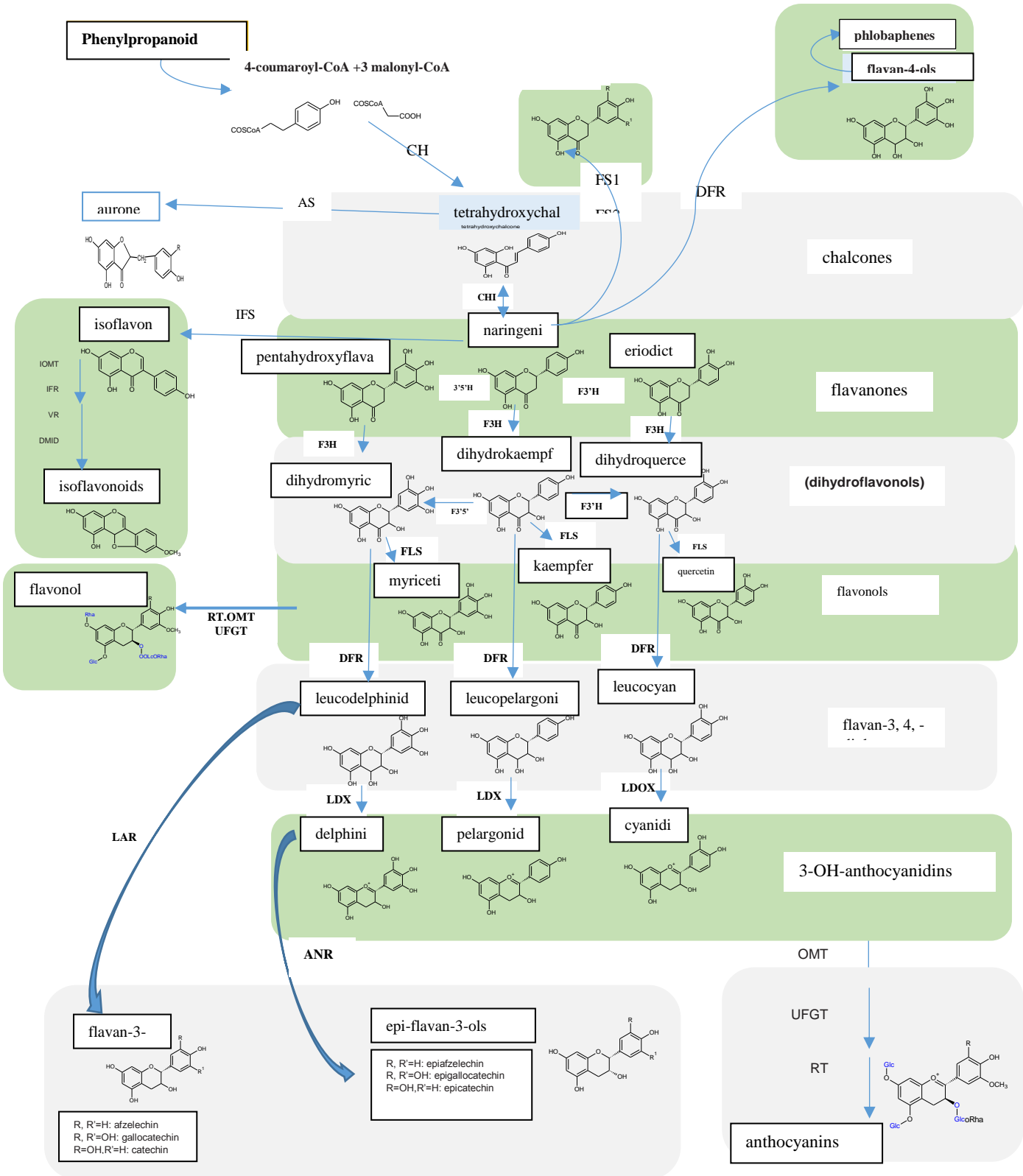
	المستبدلات					
	5	6	7	3'	4'	5'
Fisetin	H	H	OH	H	OH	OH
Quercetin	OH	H	OH	OH	OH	H
Myricetin	OH	H	OH	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	H	OH	H	OH	H
Galangin	OH	H	OH	H	H	H

**Anthocyanins** أنثوسيانين



	المستبدلات					
	5	6	7	3'	4'	5'
Pelargonidin	OH	H	OH	H	OH	H
Cyanidin	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphinidin	OH	H	OH	H	OH	H
Aurantidin	OH	OH	OH	H	OH	H
Petunidin	OH	H	OH	OH	OH	O-CH <sub>3</sub>

الشكل (2-II) مختلف أقسام الفلافونيدات [02]



الشكل (3-II) الاصطناع الحيوي لمختلف أشكال الفلافونويدات في النباتات [08]

ACCase, acetyl CoA carboxylase; ANS, anthocyanidin synthase; AS, aureusidin synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; DMID, 7,2'-dihydroxy, 4'-methoxyisoflavanol dehydratase; F3H, flavanone 3 hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3'5' hydroxylase; FLS, flavonol synthase; FSI/FS2, flavone synthase; I2'H, isoflavone 2'-hydroxylase; IFR, isoflavone reductase; IFS, isoflavone synthase; IOMT, isoflavone O-methyltransferase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; LDOX, leucoanthocyanidin dioxygenase; OMT, O-methyltransferase; RT, rhamnosyl transferase; UFGT, UDP flavonoid

### 3.11. الخصائص الطبية للفلافونيدات:

للفلافونيدات خصائص فيزيائية، كيميائية وبيولوجية عديدة أكسبتها فوائد طبية نوجز البعض منها فيما يلي:

#### - الفعالية ضد الأكسدة:

أظهرت العديد من الأبحاث مقاومة الفلافونيدات للعوامل المؤكسدة حيث تعمل كمصايد للعديد من الجذور الحرة (radicals)، حيث لوحظ أن وجود رابطة مضاعفة بين ذرتي الكربون C2 و C3 و وجود مجموعة كربونيل C4 يكون ضروري لفعالية الفلافونيد [03]. كما أثبتت الدراسات أن تواجد مستبدلات المجموعات الهيدروكسيلية على الحلقة B له تأثير كبير في زيادة الفعالية ضد الأكسدة، بينما تواجد هذه المجموعات على الحلقتين A و C له تأثير ضعيف، كما أن هذه الفعالية تزداد بيلمر الفلافونيدات (بوليمير الكاتشين مضاد للأكسدة قوي لأنه يملك عدد كبير من المجموعات الهيدروكسيلية) [10،09]

#### - أمراض القلب و الشريين:

أثبتت الاحصائيات عن وجود علاقة عكسية بين تناول الغذاء الغني بالفلافونيدات والوفيات الناتجة عن أمراض القلب و الشريين عند الأشخاص المسنين مما يعني أن تناول الأغذية الغنية بالفلافونيدات يقلل من خطر الإصابة بهذه الأمراض [14-11]

#### - مضادة للالتهابات:

تؤثر الفلافونيدات على الالتهابات من خلال تثبيط الانزيمات التي تنشط خلال هذه العملية، و أثبتت الدراسات بأن وجود الرابطة المضاعفة C2-C3 له تأثير إيجابي بالإضافة الى أن عدد و مواضع المجموعات الهيدروكسيلية له تأثير بالغ الأهمية، فمثلا أن الخاصية التثبيطية تزداد بتواجد مجموعتي الهيدروكسيل في الموضعين 5 و 7 على الحلقة A و في الموضع 4' على الحلقة B [16،15] ، كما يظهر مركب الكامبيفيرول (kaempferol) فعالية ضد الالتهابات تتناقص بارتباط سكر الجلوكوز بالموضع 3 وتتضاعف الفعالية عند إضافة مجموعة (p-coumaroyl) الى الجلوكوز بالموضع "6 ، و تتضاعف أكثر عند إضافة مجموعة (p-coumaroyl) أخرى الى الموضع "2 [03]

#### - الفعالية ضد السكري:

وقد تم الإبلاغ عن وجود فلافونيدات تعمل كمثبطات لتفاعلات ارجاع السكريات الألدهيدية (reducteur aldose) و بالتالي عرقلة مسار السوربيتول (sorbitol) المرتبط بالعديد من مضاعفات داء السكري [18،17]

## - الفعالية المضادة للميكروبات

تمتلك الفلافونيدات خاصية مضاد للبكتريا حيث تختلف درجة التثبيط باختلاف بنية هذه المركبات، فمثلا سوفوروفلافانون G و الكارستين (sephora flavanones G / Quercetin) تملك فعالية مضادة للبكتريا بإحداث تغيير في نفاذية الغشاء [09].

كما أن للفلافونات و الفلافانونات فعالية ضد الفطريات، فمثلا الفلافونات متعددة المستبدلات الميثوكسيلية فعالة ضد فطر (aspergillus flavus). [09].

من جهة أخرى فان لبعض الفلافونيدات مثل الايزوفلافونيدات (Isoflavonoides) دور هام ضد فيروس نقص المناعة (VIH) [19,9]

## الجدول (II-1): الفوائد المحتملة لبعض أنواع الفلافونيدات [20]

المراجع	البنية النشطة	الفلافونويد		التطبيقات
(Beil et al., 1995; Raj et al., 2001; Tapas et al., 2008)	-	Catechins, flavanones, flavones, flavonol	الكاتشين، فلافانون، فلافون، فلافونول	مضاد للتقرح
(Guardia et al., 2001; Kang et al., 2009)	-	Apigenin, rutin	أبيجينين، روتين	التهاب المفاصل
Miller, 1996; Le Marchand, 2002; Kang et al., 2009	(+) C3', C4', C5 et C7 درجة هدرجة رابطة مضاعفة-3, C2 (+) C4-oxo (+) متيلة C7 (-) متيلة C7 و C3', C3 (-)	Quercetin, apigenin, catechin, hesperidin, rutin, luteolin, kaempferol, myricetin, fisetin	كرسيتين، أبيجينين، كاتشين، اسبريدين، روتين، ليتولين، كامبريفول، فيزيتين	مضاد للالتهاب
Havsteen, 1983, 2002; Lea et al., 1993; Le Marchand, 2002; Ramos, 2007; Rang et al., 2007	(+) C3', C4', C5', C6' و درجة هدرجة C3 رابطة مضاعفة-3, C2 (+) متيلة C4' and C6 (-)	Many flavones, flavonols, isoflavones, flavanones, catechins	فلافونول، ايزوفلافون، فلافانون، كاتشين	مضاد للسرطان
Maher et al., 2006; Jung et al., 2010	-	Genistein, quercetin, fisetin	جينيسيتين، كيرسيتين، فيزيتين	حماية الدماغ
Fernández et al., 2006; Yi et al., 2010; Girish et al., 2012; Zhen et al., 2012	-	Naringenin, 2SHesperidin, Linarin, fisetin	نارجينين، هيسبيريدين، لينارين، فيزيتين	مضاد للاكتئاب

Knekt et al., 1996; Manach et al., 1996; Matsubara et al., 2004; Tapas et al., 2008; Mulvihill / Huff, 2010		Many flavones, flavonols, isoflavones / flavanones	فلافونول، ايزوفلافون، فلافانول،	حماية القلب و الأوعية الدموية
Russo et al., 2012; Prasath / Subramanian, 2013		Fisetin, quercetin	كرسيتين، فيزيتين	مضاد للسكري
(Amellal et al., 2007; Samuelsson et al., 2009)	هدرجة C3', C4' (+) رابطة مضاعفة C2,3	Quercetin,	كرسيتين	مضاد للحساسية
Vijayaraghavan et al., 1991; Oh et al., 2004; Jayaraj et al., 2007; Weng et al., 2011		Quercetin, luteolin, morin, silybin, apigenin, ornitin,	كرسيتين ليتولين، مورين، سيليبين، أبيجينين	مضاد للتسمم الكبدى
Formica and Regelson, 1995; Li et al., 2000; Mantas et al., 2000; Liu et al., 2008		Many flavones, flavonols / aurones, daidzein, genistein,	فلافون، فلافونول، أورون، دياذزين، جينيسيتين	مضاد للفيروسات
Capasso et al., 1991 a, 1991 b; Ghayur et al., 2007; Engelbertz et al., 2012		Catechin, luteolin, apigenin, chrysin, flavone, kaempferol, quercetin	كاتشين، ليتولين، أبيجينين، فلافون، كامبفرول	مضاد للتشنج
(Di Carlo et al., 1993)		Flavones, kaempferol, morin, myrcetin, naringenin, quercetin	فلافون، كامبفرول، مورين، ميرسيتين، كيرسيتين	مضاد الاسهال
(Alcaràz et al., 2000; Cushnie and Lamb, 2005)	هدرجة C5, C2' (+)	Many flavones, flavanones / chalcones	فلافون، شالكون	مضاد للميكروبات
(Emim et al., 1994)		Hesperidin	هيسبيريدين	مسكن للآلام

**4.II. الدراسة الكيميائية للفلافونيدات:****1.4.II. استخلاص الفلافونيدات:**

بعد قطف المادة النباتية وتجفيفها بعيدا عن أشعة الشمس يتم تقطيعها وطحنها ثم تُستخلص الفلافونيدات بمحلول كحولي بنسب حجمية ميثانول/ماء (3/7، أو 2/8) لعدة مرات و ذلك بغمر المادة النباتية كلياً بالمذيب [21]، يلي ذلك الترشيح و تركيز المحلول الكحولي الناتج الى غاية الحصول على مستخلص مركز تتم إذابته بعد ذلك في الماء المقطر، يترك المحلول المائي في مكان بارد ليلة كاملة ثم يرشح للتخلص من المواد الليبوفيلية (شموع، كلوروفيل...)

أكثر الطرق المتبعة للاستخلاص هي استخدام الميثانول أو الايثانول ثم نبخر الكحول والطور المائي يخضع لاستخلاص سائل-سائل باستعمال مذيبات عضوية مختلفة القطبية مثل ثنائي ايثيل ايثر، أسيتات الايثيل و البيتانول. [22,05].

**2.4.II. فصل الفلافونيدات:**

يمكن فصل وتنقية الفلافونيدات باستعمال الطرق الكروماتوغرافية مثل الكروماتوغرافيا الورقية (PC)، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (HPLC)، كروماتوغرافيا العمود (CC).

**1.2.4.II. الكروماتوغرافيا الورقية**

و هي نوعان تحليلية و تحضيرية يستعمل فيها ورق من السليلوز (Wathman) الذي يساعد على تحديد العدد التقريبي للمركبات في المستخلصات ويعطي دلائل على طبيعة المركب الفلافونيدي حسب اللون والموقع، ويساعد على التأكد من نقاوة المركبات، ومن جهة أخرى فان تحقيق ذلك يتم بالاعتماد على:

[23, 21]

أ) الكروماتوغرافيا الورقية أحادية البعد: بحيث يوضع المستخلص بشكل خط عريض على طول

الورقة ثم يملص باستعمال المذيب المناسب في اتجاه واحد. [21]

ب) الكروماتوغرافيا الورقية ثنائية البعد: يوضع المستخلص بشكل بقع في احدى زوايا الورقة ثم تملص

في الاتجاه الأول بمذيب مثل (BAW) وبعد اخراج الكروماتوغرام وتجفيفه يملص في الاتجاه الثاني

بشكل عمودي على الاتجاه الأول باستعمال مذيب آخر يكون مائياً [21]



**II.2.2.4.2. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة: وهي نوعان**

(أ) **تحليلية:** سمك الطور الثابت فيها ضئيل و تستعمل للكشف على الفلافونيدات وأهداف أخرى مثل دراسة غنى المستخلص، النقاوة.

(ب) **تحضيرية:** سمك الطور الثابت فيها معتبر وتستعمل للفصل الكمي للمركبات.

في كلتا الحالتين فان المواد المدمصة الأكثر استعمالاً هي السليكا جال، متعدد الاميد و السيليلوز  
(Silica gel, polyamid, cellulose) [21] [23-25]

**II.3.2.4.2. كروماتوغرافية العمود:**

تستعمل لفصل المركبات بكميات كبيرة من المستخلص و ذلك بالاعتماد على عمود كروماتوغرافي مملوء بمادة دامصة مثل (Silica gel, polyamid, cellulose) كطور ثابت، أما الطور المتحرك فيستعمل مذيبات ذات قطبية مختلفة، في حين يتم متابعة الكسور باستعمال مصباح UV، أو باستظهار كروماتوغرامات الكسور.

**II.4.2.4.2. الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (HPLC)**

تستعمل في التحليل الكيفي و الكمي للمواد [03]، وتحتوي على عمود كروماتوغرافي مهيبى بدقة عالية تساعد على الفصل الجيد، و من جهة أخرى فان نوع العمود، جملة المذيبات المستعملة و زمن الاحتجاز تسهل عملية التعرف على المركب اذا كان معروفاً مسبقاً. وتساعد هذه التقنية على تحديد العدد التقريبي للمركبات الموجودة في المستخلص و فصلها و طبيعة المركب إذا كانت مرفقة بجهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية ومطياف الكتلة [05, 25, 26]

**II.3.4.2. طرق التحليل البنوي:**

هناك عدة طرق تساعد على تحديد نوع وبنية المركب الكيميائي مثل الخصائص الكروماتوغرافية (ثابت الانحباس، لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية) والخصائص الطيفية (أطياف الرنين المغنطيسي، مطيافية الكتلة وأطياف الأشعة فوق البنفسجية).

**II.1.3.4.2. ثابت الانحباس  $R_f$  ولون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية:**

هي نسبة المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقاً من نقطة البداية الى المسافة المقطوعة من طرف المذيب من نفس النقطة، وترتبط قيمته بطبيعة المستبدلات في المركب والبنية الفراغية.

ومن جهة أخرى فان لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) قبل وبعد تعريضها لأبخرة الأمونياك أو الكواشف الأخرى يعطي معلومات أولية عن البنية الكيميائية للمركب. [27]

### 2.3.4.II. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:

تظهر أغلب أطيف الأشعة فوق البنفسجية للفلافونيدات عصابتي امتصاص، احداها  $\lambda_{II}$  تظهر بين ( $\lambda_{II}=240\text{nm}-280\text{nm}$ ) و الثانية  $\lambda_I$  بين ( $\lambda_I=300\text{nm}-400\text{nm}$ ) في الميثانول (Harborne et Williams, 2000) [20]

#### الجدول (2-II) مجالات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية للفلافونيدات في الميثانول

(Harborne 1989, Markham 1982)

قيم $\lambda_{max}$ للأشعة فوق بنفسجية (nm)		طبيعة الفلافونويد
العصابة I	العصابة II	
340-390	230-270	الشالكون/Chalcones
380-430	230-270	أورون/Aurones
300-330	275-295	فلافانون/Flavanones
310-330	245-275	ايزوفلافون/Isoflavones
310-350	250-280	فلافون/Flavones
330-385	250-280	ثنائي هيدرو فلافونول/Dihydroflavonol
-	270-280	فلافانول/Flavanols

يساعد طيف الأشعة فوق البنفسجية على التعرف على البنية الكيميائية للفلافونيدات، حيث تتميز بعصابتي امتصاص تختلف من مركب الى آخر ويتم قياسها في وسط كحولي مثل الايثانول أو الميثانول، ويتأثر طيف الامتصاص بإضافة كواشف معينة مثل  $\text{NaOH}$ ،  $\text{AlCl}_3$  وغيرها، بحيث يعطي هذا التغير معلومات عن بنية المركب كما هو موضح في الجدولين (3-II)، (4-II). [25]

#### الجدول (3-II) أمثلة عن مجالات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية بالنسبة للفلافونيدات [29,22]

فلافونويد	I (nm)	II (nm)
ليتولين/Luteolin	253	347
أبيجينين/Apigenin	268	337
هيدروكسي فلافون/5-Hydroxyflavone	272	337
فيسيتين/Fisetin	253	370
كرسيتين/Quercetin	250	370

Myricetin/ميرسيتين	255	387
Genistein/جينستين	260	328
Biochanin A/بيوشانين	261	326
Daidzein/دايدزين	250	302
Naringin/نارنجين	284	330
Naringenin/نارينجينين	288	325
Hesperetin/هسبوتين	289	330

### 3.3.4.II. طيف الرنين النووي المغناطيسي (NMR) [26,23]

تعد من أهم الطرق التحليلية التي تساعد على تحديد الصيغة الكيميائية للمركبات و من أهمها:

$^1\text{H-NMR}$  ,  $^{13}\text{C-NMR}$  , COSY, HMQC, HMBC

### 4.3.4.II. طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ( $^1\text{H-NMR}$ ) [21]

يساعد مطيافية  $^1\text{H-NMR}$  في التحليل الكيفي للفلافونيدات للتعرف على

- درجة تأكسد الحلقات A ,B ,C
- عدد مجموعات السكريات المرتبطة بالجليكون و نوع الرابطة بينهما.
- عدد مجموعات الميثوكسيل و غيرها من المجموعات على الحلقات A ,B ,C.

### 5.3.4.II. طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) [21]

يساعد مطيافية  $^{13}\text{C-NMR}$  في التحليل الكيفي للفلافونيدات للتعرف على

- تحديد عدد ذرات الكربون في المركب.
- نوع الرابطة بين السكر و الجليكون.
- نوع وطبيعة مجموعات الأسيل المرتبطة بالمركب.
- تهجين ذرات الكربون عند استعمال تجارب DEPT

### 6.3.4.II. طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) [31,30]

يعطي معلومات عن المجموعات الوظيفية الموجودة في المركب المدروس مثل: -OH, -CHO -COOH

## 7.3.4.II. مطيافية الكتلة (SM): سوف يتم التطرق اليها لاحقاً

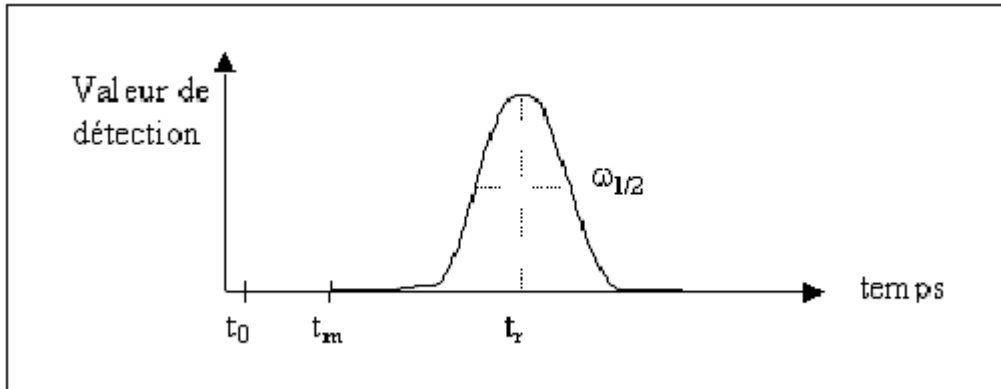
## 5.II. كروماتوغرافيا الطور السائل ذات الكفاءة العالية المقرونة بمطيافية الكتلة

## 1.5.II- كروماتوغرافيا الطور السائل ذات الكفاءة العالية:

الكروماتوغرافيا تسمح بفصل و تنقية مركب أو عدة مركبات في مزيج في اطار تحديد هويته أو التحليل الكمي له. و تسمح كروماتوغرافيا الطور السائل ذات الكفاءة العالية بتحقيق تحاليل كانت سابقاً غير ممكنة مع تقنيات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أو الطور الغازي أو كروماتوغرافيا الورق.

تعمل كروماتوغرافيا الطور السائل ذي الكفاءة العالية بأعمدة من الزجاج أو المعدن بحيث يمر السائل من خلال طور ثابت بفعل الجاذبية أو تحت تأثير ضغط منخفض، و من أجل الزيادة في التدفق يمكن زيادة الضغط شيئاً فشيئاً. [33]

المركبات المراد دراستها توضع في مذيب، هذا المزيج يتم ادخاله على الطور الثابت عن طريق الطور المتحرك وحسب طبيعة الجزيئات تتأثر بالطور الثابت و المتحرك في أنبوب يسمى عمود الكروماتوغرافيا، مخرج هذا الأخير يقرن بكاشف مناسب يستدل على خروج مركب ما بنتو أو قمة (Pic). [34]



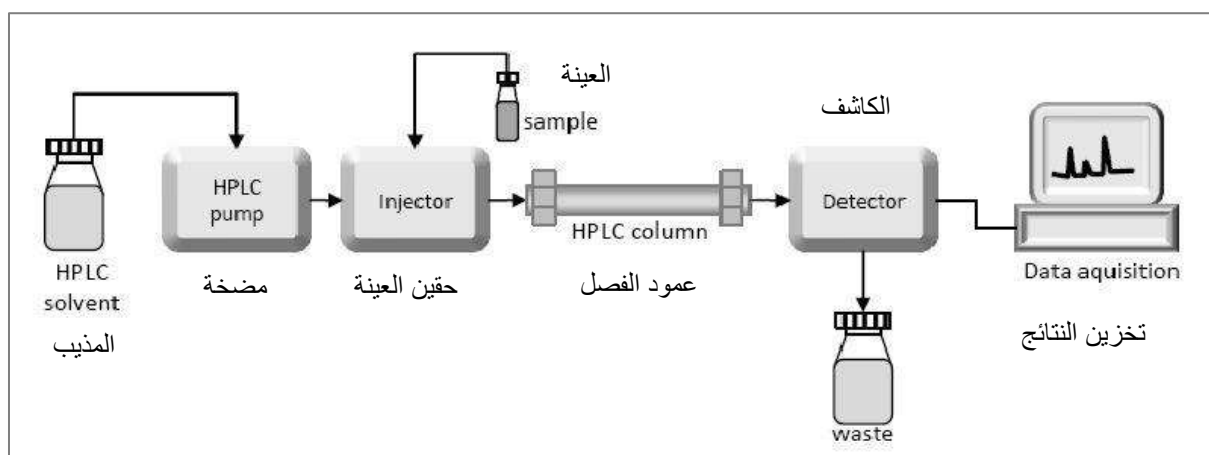
الشكل (II-4) رسم تخطيطي لكروماتوغرام (Pic)

$t_0$  زمن أو لحظة بداية الحقن.

$t_m$  الزمن الميت أو زمن المرور خلال الطور السائل و قبل الدخول على الطور الثابت.

$t_r$  زمن المرور خلال الطور الثابت. و هو مرتبط بشروط التحليل

اتساع القمة مرتبط بكمية المركب المدروس في المزيج و ظروف التجربة قيمة التدفق و درجة الحرارة و الضغط... الخ.



الشكل (II-5) مبدأ كروماتوغرافيا الطور السائل ذات الكفاءة العالية

## 2.5.II - مطيافية الكتلة:

مطيافية الكتلة طريقة فيزياءوكيميائية تستعمل للتعرف على بنية المركبات العضوية، بحيث يمكن التوصل الى الكتلة الجزيئية للمركب و كذلك يمكن الحصول على معلومات مهمة من دراسة الشظايا الناتجة. [36,35]

من بين السمات المميزة لمطيافية الكتلة هي اعتمادها أساساً على عدة مبادئ فيزيائية سواءً بالنسبة للتأيين أم لفصل الأيونات تجعلها مختلفة عن الطرق الطيفية الأخرى و توفر معلومات قد تفيد في الكشف والتقدير الكمي، و الوصف الهيكلي للمركبات [36]

تعد مطيافية الكتلة من بين أهم الطرائق التحليلية بفضل خصائصها: طريقة حساسة جداً ( تكشف عن المركبات حتى و لو كان بكميات قليلة في حدود الميليغرام)، تتميز كذلك بقدرتها تطبيقها على المزيج المعقد من المركبات أو إمكانية ربطها بطرق تحليلية أخرى في عدة مجالات (التحليل الكيميائي الكمي والكيفي، والتفاعل بين الجزيئات، والطب الحيوي، وغيرها) [37]

مرحلة التأين مرحلة أساسية في التحليل بمطيافية الكتلة، وكون المركبات متعادلة كهربائياً في الغالب يتم تحويلها الى الطور الغازي تم يلي ذلك مرحلة التأين بواسطة

مصدر التأين سواءً بالشحنة الموجبة أو السالبة، و هذا هو الجزء الأول من المطياف و يسمى بالمصدر.

يلي المصدر محلل الكتل والذي يفصل الايونات بناءً على العامل  $(m/z)$  بحيث  $m$  هي كتلة المركب و  $z$  هو عددها الشحني، يتم فصل الأنواع وفقاً لخصائصها و تحت ضغط محدد، و أثناء اجتياز المسار وصولاً للكاشف يجب أن لا تصطدم الأيونات الناتجة بجزئيات الغاز المتبقية كي لا تتجزء أو تغير مسارها. و في الأخير يتم الكشف عن الأيونات باستعمال الكاشف المكاني أو الزمني.

نظام معالجة البيانات يعطي طيف كتلة يبين فيه شدة التيار الأيوني و قيمة  $(m/z)$  لمختلف الأيونات. كما يمكن تركيب محللين للكتلة على التوالي مفصولين بخليعة للتصادم تستقبل شظايا الايونات ثم يتواصل تحليل الشظايا من أجل الحصول على معلومات أكثر عن المركب و هذا ما يسمى مطياف الكتلة الترادفي MS/MS. يبقى أن مطياف الكتلة لا يوفر معلومات مباشرة أو معلومات عن تسلسل الذرات في الجزيء، وبالتالي التمييز بين المماكبات يمكن أن يتحقق عن طريق تفتيت الجزيئات مثلاً.

العينات التي تم تحليلها بواسطة مطياف الكتلة لا يمكن استرجاعها بعد التحليل لأن هذه التقنية تحطم المركبات الأولية.



الشكل (II-6) مراحل مطياف الكتلة

## II.2.5.1- مرحلة التأين (مصدر الايونات):

في مصادر الأيونات يتم تأين العينات قبل المرور الى المحلل بحيث تستخدم عدة أساليب للتأين، و هنا تؤخذ في عين الاعتبار الطاقة الداخلية المتقلة أثناء عملية

التأين و الخصائص الفيزيائية و الكيميائية للمادة المحللة. بعض تقنيات التأين شديدة جداً وتسبب تفتت أو تشظي كبير و البعض الآخر أقل شدة ويعطي أيونات جزيئية فقط. وفيما يلي بعض طرق التأين:

#### الجدول (II-4) مختلف أنواع مصدر التأين [38]

مصدر التأين	الهدف
التأين بالتصادم الالكتروني(ESI)	تبخير القطرات المشحونة
نانوتأين بالتصادم الالكتروني(nanoESI)	تبخير القطرات المشحونة
تأين كيميائي تحت الضغط الجوي(APCI)	تفريغ التيار و انتقال البروتون
التأين بامتصاص الليزر(MALDI)	امتصاص البروتون/انتقال البروتون
التأين بالسيلكون(DIOS)	امتصاص البروتون/انتقال البروتون
التفجير الأيون(FAB)	امتزاز الأيون/انتقال البروتون
التأين الالكتروني(EI)	انتقال الالكترون
التأين الكيميائي(CI)	انتقال البروتون

#### II.2.2.5-2. التأين الالكتروني(EI) :

أبتكر التأين الالكتروني و الذي كان يسمى سابقاً بتأثير الالكترون من طرف العالم Dempster و تم تطويره من قبل Bleakney و Nier يستخدم على نطاق واسع في مطياف الكتلة العضوية، هذه التقنية تعمل بشكل جيد مع الجزيئات في الطور الغازي، و تعطي شظايا بشكل كبير بحيث لا يمكن دائماً ملاحظة نتؤ الشظية الجزيئية. [39]

#### II.2.2.5-3. التأين بالتصادم الالكتروني(ESI)

عادةً يتم استعمال هذه التقنية مع الجزيئات القطبية و يمكن أن تقترن بسهولة مع كروماتوغرافيا السائل ذي الكفاءة العالية (HPLC). و من جهة أخرى تم ابتكار طريقة اقتران مطياف الكتلة مع التأين الالكتروني (ESI) من طرف العالم Fenn John Bennett سنة 1989 [40] في البداية، تم تخصيص استخدامه لتحليل البروتينات، ثم انتشرت بسرعة لتحليل الجزيئات والبوليمرات القطبية الصغيرة. وقد أصبح هذا الأسلوب للتأين تقنية التأين الأكثر شيوعاً في أواخر التسعينيات [41].

#### II.4.2.5- التأيين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI):

تقنية (APCI) هي طريقة التأيين تحت الضغط الجوي و التي تستخدم التفاعل أيون-جزيئي في الطور الغازي [42] يتم ارفاق المصدر بجهاز للتبخير قابل للتسخين و الكترول كـمصدر للإلكترونات. هذا المصدر يطبق على المركبات القطبية أو ذات قطبية ضعيفة و يعطي أيونات أحادية الشحنة مع عدد قليل من الشظايا.

التأيين يعتمد على عدة مراحل: - المادة المحللة في صورتها المتعادلة كهربائياً و يتم إدخالها بتدفق (0.2-2مل/د) قبل أن يتم التبخير في درجة حرارة (300-500م<sup>0</sup>) لتشكيل قطرات صغيرة. ثم التقليل من ذوبانيتها باستعمال تيار من الأزوت لتتشكل أيونات  $N_2^+$  بتفاعل الإلكترونات مع  $N_2$ ، هذه الأفراد الكيميائية تقود الى سلسلة من تحولات البرتونات أو الشحن مع المذيب في الطور المتحرك ليعطي أفراد كيميائية نشطة في شكل  $H_3O^+[H_2O]_n$  ذات شحنة موجبة أو في شكل  $O_2^-[H_2O]_n$  ذو شحنة سالبة [43] و بناء على المذيب و المادة المدروسة تحدث عملية التأيين بناء على

- استقطاب الإلكترونات (الجزيئات العطرية، الهالوجينات) .

- تبادل الشحنات.

#### II.5.2.5- التأيين الكيميائي (CI):

التأيين الإلكتروني يؤدي الى تفتت الأيون الجزيئي و الذي يمنع أحياناً اكتشافه، التأيين الكيميائي (CI) هو الاسلوب الذي ينتج أيونات مع القليل من الطاقة الزائدة. وهكذا تمكن هذه التقنية من الاستفادة من الطيف مع أقل عدد من الشظايا التي يتم التعرف بها على الأنواع الجزيئية بسهولة . و نتيجة لذلك، التأيين الكيميائي مكمل لألتأيين الإلكتروني. [39]

#### II.3.5- اقتران كروماتوغرافيا السائل ذي الكفاءة العالية بمطيافية الكتلة:

اقتران الكروماتوغرافيا مع مطيافية الكتلة أعطت تطوراً و نجاحاً في مجال تحليل الفلافونيدات بمطياف الكتلة [44]

مع تطور مصادر التأيين تحت الضغط الجوي (APCI) اقترانت كروماتوغرافيا السائل ذي الكفاءة العالية مع مطيافية الكتلة (LC-MS) و أصبحت الوسيلة الأكثر فعالية و الأكثر استعمالاً في تحليل الفلافونيدات الموجودة في المزيج، بالإضافة الى أنها



الأكثر استحساناً نظراً لأن المركبات المدروسة لا تحتاج الى تنقية، وتساعد على العمل حتى في حالة العينات الصغيرة [45]. وهناك أمثلة عديدة لتطبيق هذه التقنية في تحليل مزائج معقدة من المنتجات الطبيعية وخاصة مزائج الفلافونويدات [46]

الاقتزان (LC-MS) يقدم عدة معلومات مثل زمن الاحتجاز (temps de rétention) و المتعلق بنوع عمود الفصل، طول موجة امتصاص الأشعة فوق بنفسجية (UV absorbance) و يسمح بالمقارنة مع عينات قياسية، يعد هذا الأسلوب سريع و مفضل للتعرف عن المركبات دون الفصل الكيميائي من مزيج المركبات الطبيعية و ما اذا كان المركب معرّف سابقاً أم لا ، أو يستحق و العزل و دراسة بنيته بدقة [37] للتعرف على مركبات غير معروفة مسبقاً فان (LC-MS) مرفوقة بالكاشف (UV) تسمح بالتعرف السريع على صنف الفلافونويد و تطبق في عدة مجالات بالإضافة الى (LC-MS/MS) [47]

#### II.4.5- التحليل البنيوي للفلافونيدات بمطيافية الكتلة:

يستخدم التأين بالتصادم الالكتروني (EI) بشكل كبير للحصول على أطياف الكتلة للتعرف على بنية الفلافونيدات، و هذا النوع من التأين استعمل مع كل أنواع الفلافونويد جليكون (Flavonoïdes aglycones). بحث تمد الشظايا الناتجة معلومات بنيوية و مع ذلك قد تنتج شظايا معقدة نظراً لانتشار الطاقة الداخلية أثناء انتاج الأيونات الأولية بحيث تخفي أو تحدف القمة الجزيئية  $M^+$  [48]

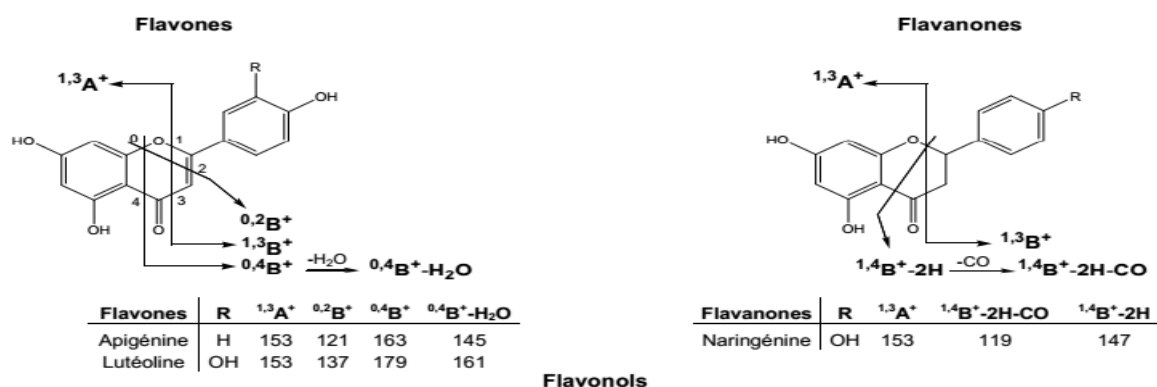
و حسب (Maciej Stobiecki 2000) تعد مطيافية الكتلة الأكثر ملائمة لدراسة المنتجات الطبيعية من المواد البيولوجية عموماً من أهم طرق تحديد هوية و بنية الفلافونيدات الجليكوسيدية خصوصاً (favonoïdes glycosides) في حين أن التأين الكيميائي لا يصلح لهذه الأخيرة [36]

في السنوات الأخيرة التحليل بمطيافية الكتلة للفلافونيدات يتماشى مع تطور تقنيات التأين الناعمة: الكتروسبراي (ESI) و التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI) و التي تسمح بالتحليل مع كميات جد صغيرة من العينات بحيث تعطي أيونات جزيئية للمركبات الصغيرة نسبياً مثل الفلافونيدات [49]

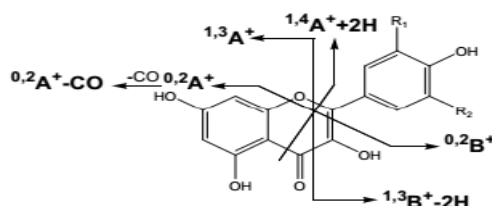
تفسير تفتت الفلافونيدات بمطيافية الكتلة يسمح بالوصول الى عدة معلومات مفيدة للتعرف على البنية، و يسمح كذلك برسم أو انشاء الشظايا المتوزع بين الحلقين A و B الدراسة المتأنية لأنماط التجزئة يمكن أن تساعد أيضا في تحديد طبيعة وتسلسل وموقع الارتباط مع الشظايا البنت.

في هذا الفصل لوصف شظايا مركبات الفلافونويد التي حصل عليها مطياف الكتلة، سوف نستخدم نظام التصنيف المقترح من قبل Ma et al و التي تستخدم حالياً لوصف الشظايا الأبناء [48]

هناك بعض الشظايا تعتبر شظايا مميزة لأصناف الفلافونيدات و تساهم بشكل كبير في تحديد بنية المركب كما هو مبين في الشكل (II-7) [49]

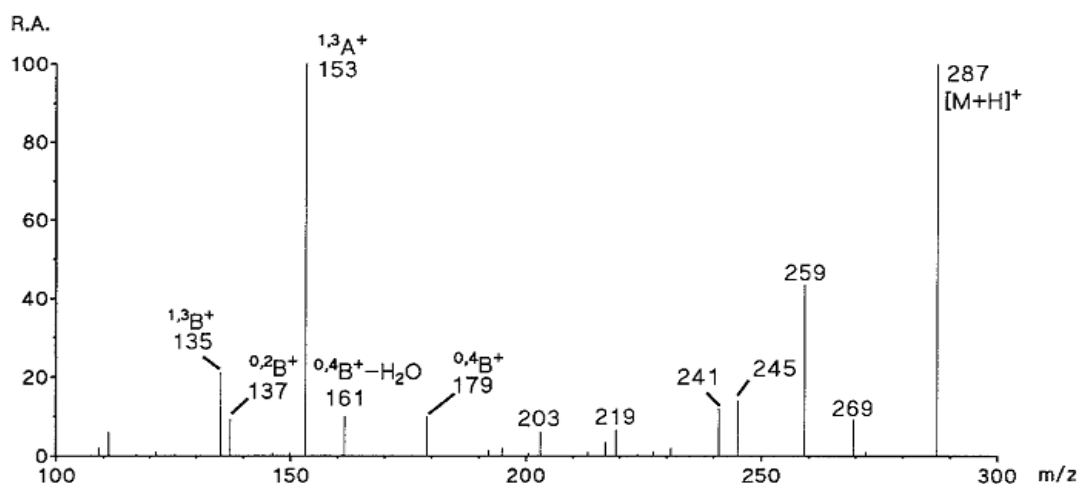


**Flavonols**

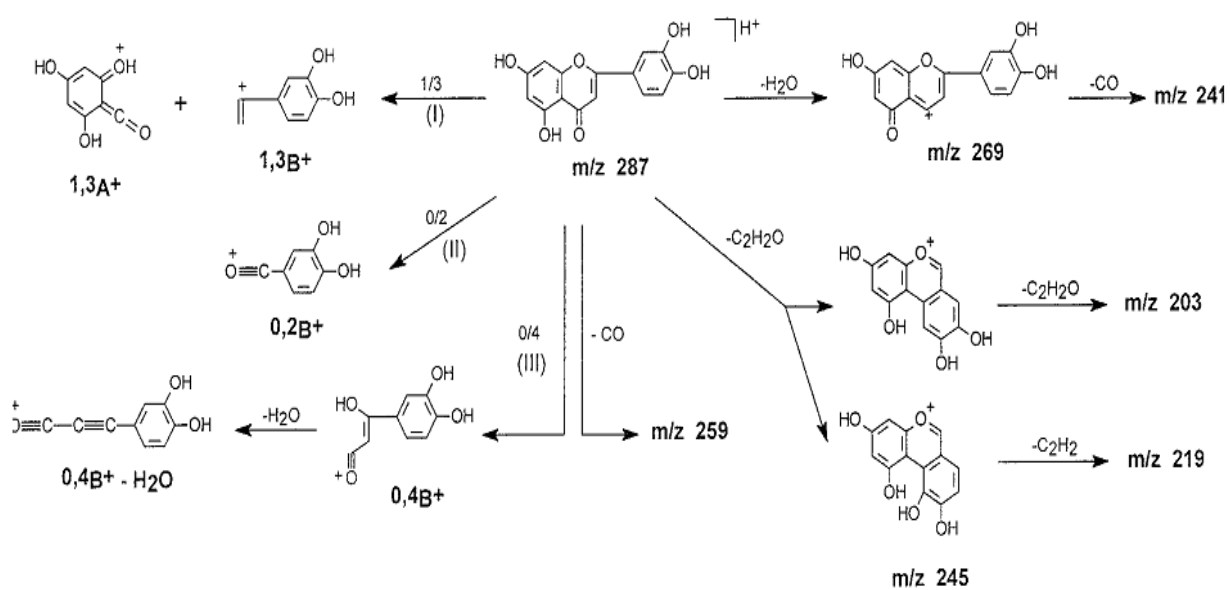


Flavonols	R1	R2	1,3A <sup>+</sup>	0,2A <sup>+</sup> -CO	1,3B <sup>+</sup> -2H	0,2B <sup>+</sup>
Kaempférol	H	H	153	137	133	121
Quercétine	OH	H	153	137	149	137
Myricétine	OH	OH	153	137	165	153

الشكل (II-7) شظايا مميزة لبعض أصناف الفلافونيدات



الشكل (II-8) طيف مطياف الكتلة للتولين luteoline [48]



الشكل (9-II) الشظايا الأساسية لتولين (luteoline) بـ CID منخفض الطاقة [48]

## 6.II. المراجع:

- [01] Nigel C Veitch, Renée J Grayer, Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins, *Natural Product Reports*, 2008, 25(3):555-611
- [02] Dr. Venketeshwer Rao, *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, InTech, 2012, P538, Rijeka, Croatia.
- [03] Harborne JB, Williams CA, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*. 2000 Nov;55(6):481-504.
- [04] Harbone J.B, Flavonoids, in *Phytochemistry, Vol II*, Eds; Lawrence P.M, Litton Educational Publishing Inc, 1973, 344
- [05] Erich Grotewold, *The Science of Flavonoids*, Springer Science+Business Media, United States of America, 2006,P2,273
- [06] Vermerris Wilfred, Nicholson Ralph, *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, 2006, P276
- [07] Schijlen EG, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG, Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants, *Phytochemistry*. 2004 ,65(19):2631-48.
- [08] Loic Lepiniec, Isabelle Debeaujon, Jean-Marc Routaboul, Antoine Baudry, Lucille Pourcel, Nathalie Nesi, and Michel Caboche, Genetics and biochemistry of seed flavonoids, *Annual review of plant biology*, 2006. 57:405–430
- [09] K. RAJ NARAYANA, M. SRIPAL REDDY, M.R. CHALUVADI, D.R. KRISHNA, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential *Indian Journal of Pharmacology* 2001; 33: 2-16
- [10] Fraga Cesar G, Oteiza Patricia I. "Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling." *Free radical biology & medicine*, 2011, 51 (4): 813-23.
- [11] Leake DS, The possible role of antioxidants in fruits and vegetables in protecting against coronary heart disease, *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Clarendon Press, Oxford, 1997, 287-311
- [12] M.G.LHertog, E.J.MFeskens, DKromhout, M.G.LHertog ; Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study; *J THE LANCET* Volume 342, Issue 8878, 1993, Pages 1007-1011
- [13] Eric B. Rimm, Martijn B. Katan, Alberto Ascherio, Meir J. Stampfer; Relation between Intake of Flavonoids and Risk for Coronary Heart Disease in Male Health Professionals; *Ann Intern Med*. 1996;125(5):384-389.
- [14] John W. Erdman, Jr. Douglas Balentine Lenore Arab Gary Beecher Johanna T. Dwyer ; Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop; *The Journal of Nutrition*, Volume 137, Issue 3, 1 March 2007, Pages 718S–737S

- [15] J González-Gallego, S Sánchez-Campos, MJ Tunon, Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids, *Nutricion Hospitalaria*, 2007, 22 (3), 187
- [16] Corrado Tringali, *Bioactive Compounds from Natural Sources*, Taylor & Francis, London, 2001
- [17] Ana Plazonić, Franz Bucar, Željko Maleš, Ana Mornar, Biljana Nigović and Nikola Kujundžić, Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos L.*), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J Molecules* 2009, 14, 2466-2490
- [18] Sergio Granados , Norman Balcázar , Alis Guillén and Fernando Echeverri, Evaluation of the Hypoglycemic Effects of Flavonoids and Extracts from *Jatropha gossypifolia L.*, *J Molecules* 2015, 20, 6181-6193
- [19] T.P. Tim Cushnie, Andrew J. Lamb, Antimicrobial activity of flavonoids, *international journal of antimicrobial agents*, 2005,25, 343–356
- [20] Yannick Malbert. Flavonoid gluco diversification with engineered sucrose-active enzymes. *Biotechnology*. INSA de Toulouse, 2014
- [21] KR Markham, *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic press, London, 1982
- [22] Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham, *FLAVONOIDS; Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, 2006
- [23] Gangwal A., Parmar S. K., Sheth N. R., Triterpenoid, flavonoids and sterols from *Lagenaria siceraria* fruits, *Der Pharmacia Lettre*, 2010: 2 (1) 307-317
- [24] Liselotte Krenn, Brigitte Kopp, Flavonoids from *Achillea nobilis L.*, *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 2003
- [25] Sonia Piacente, Ely E.S. Camargo, Aurelia Zampellia, Juliano S. Gracioso, Flavonoids and Arbutin from *Turnera diffusa*, *Z. Naturforsch C*, (2002), 983-985
- [26] Pedro F. Pinheiro and Gonçalo C. Justino, Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds – A Review of Spectroscopic Applications, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 2012, 978-953
- [27] Tom J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, 1st ed. 1970.
- [28] Eva de Rijke, Wilfried M A Niessen, Freek Ariese, Cees Gooijer, Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 31–63
- [29] J. B. Harborne, T. J. Mabry, Helga Mabry, *The Flavonoids*, Springer US, 1975
- [30] M Heneczkowski, M Kopacz, D Nowak, Anna Kuźniar, Infrared spectrum analysis of some flavonoids, 2001, *Acta poloniae pharmaceutica* 58(6):415-20
- [31] Abe Rita Temidayo, Extraction and Isolation of Flavonoids Present in the Methanolic Extract of Leaves of *Acanthospermum Hispidium Dc.*, *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 2013, 1(1): 111-123,

- [32] Emilia Constantin; André Schnell, Spectrométrie de masse : principes et applications, Paris : Tec&Doc, cop. 1986
- [33] Yuri Kazakevich, Rosario LoBrutto, HPLC THEORY, HPLC for Pharmaceutical Scientists, 2007 by John Wiley & Sons, Inc, 25-72
- [34] Rosario LoBrutto , Yuri Kazakevich, REVERSED-PHASE HPLC, HPLC for Pharmaceutical Scientists, , 2007 by John Wiley & Sons, Inc., 139-237
- [35] Hoffmann E., Charette J., Stroobant V. (1999) Spectrométrie de masse. Dunod. Paris
- [36] Maciej Stobiecki, Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides, Phytochemistry , 2000, 54, 237-256
- [37] Prasain J.K., Wang C.C., and Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. Free Radical Biology and Medicine, 2004, 37(9), 1324-1350.
- [38] Ju-Seop Kang, Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles, InTech Europe, Rijeka, Croatia ,2012, 794.
- [39] Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant, Mass Spectrometry Principles and Applications, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, 2007,
- [40] Fenn J.B., Mann M, Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. , Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, Science. 1989; 246:64
- [41] Tatiana C. Rohner, Niels Lion and Hubert H. Girault, Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionization, Phys. Chem. Chem. Phys., 2004,6, 3056-3068
- [42] French J. B., Reid N. M. Dynamic Mass Spectrometry, Vol 6, Heyden, London, 1980, p. 220-233
- [43] Bruins A. P., Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure , *Mass Spectrometry Reviews*,1991, 10:53
- [44] Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. Phytochemistry, 2000, 54(3), 237-256.
- [45] Cuyckens F., and Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. Journal of Mass Spectrometry (2004) , 39(4), 1-15
- [46] Exarchou V., Fiamegos Y.C., van Beek T.A., Nanos C., and Vervoort J. (2005) Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. Journal of Chromatography A
- [47] Careri M., Elviri L., and Mangia A. Validation of a liquid chromatography ionspray mass spectrometry method for the analysis of flavanones, flavones and flavonols. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999, 13(23), 2399-2405.

[48] Y. L. Ma, Q. M. Li, H. Van den Heuvel and M. Claeys, Characterization of Flavone and Flavonol Aglycones by Collision-induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 11, 1357–1364 (1997)

[49] Wolfender J.L., Waridel P., Ndjoko K., Hobby K.R., Major H.J., and Hostettmann K, Evaluation of Q-TOFMS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis*, 2000, 28(10), 895-906.

# الفصل الثالث

عموميات حول

البيكتريا/ داء

السكري



### III-1-1- عموميات حول البكتيريا

#### III.1.1- مقدمة :

تشكل البكتيريا مجموعة الكائنات بدائية النوى، تعامل معها الإنسان دون أن يراها فقد عرف أنها تسبب المرض واستعمل بعضها في عمليات تخمر مختلفة.

ولقد كان للكشف المجهرى الأثر في التعرف عليها، أول من إكتشف وجود البكتيريا العالم الكيميائي الفرنسي ( باستير ) من خلال تجاربه على التخمر و اكتشف أيضا طعومها و إرتبط إسمه بعملية البسترة لقتل الكائنات الحية المجهرية التي يمكن أن توجد بالسوائل وخاصة الحليب. [01-03]

أما العالم الألماني روبرت كوخ فقد أسهم في اكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض وهو أول من عمل مزارع نقية للبكتيريا . [01]

ولقد إرتبط إسم البكتيريا كثيرا بالأمراض التي تسببها للإنسان، ولكن الاكتشافات الحديثة والتقدم السريع الذي حدث في العلوم التطبيقية أظهرت أن البكتيريا تلعب دورا هاما في كثير من الصناعات الغذائية والدوائية والتخلص من المواد العضوية وغير العضوية وكذلك معالجة المياه العادمة والمعالجة الحيوية لمخلفات المزارع واستخدامها في إنتاج الطاقة وغاز الميثان.

#### III.1.2- نبذة تاريخية حول البكتيريا :

تميل بعض الأبحاث العلمية إلى الاعتقاد بأن البكتيريا - أو بعض صورها - تمثل أول صورة للحياة ظهرت على سطح الأرض، فأقدم الحفريات المعروفة، كانت لبكتيريا عاشت وتكاثرت، على ظهر الأرض، منذ أمد بعيد، قد يصل إلى 3.5 ألف مليون عام الأمر الذي حدا ببعض العلماء إلى الاعتقاد بأن بعض أنواع البكتيريا ، قد تطورت تدريجيا ، إلى كائنات متعددة الخلايا.

وكان أول من وصف البكتيريا، هو العالم الألماني أنتوني فان لوفينهوك ( Antonie Van Leewenhoek ) وذلك عقب تطويره لجهاز مبسط من العدسات يشبه المجهر، وقد اعتقد العلماء في بداية الأمر، أن البكتيريا إن هي إلا ناتج مواد غير حية إلى أن أثبت العالم الفرنسي لويس باستير ( Pasteur Louis ) في نهاية القرن الثامن عشر ، أن البكتيريا كائن حي ، وأن الكائن الحي لا يتولد إلا من كائن حي آخر . [01-03]

ثم توالى بعد ذلك مجموعة من الأبحاث والأعمال العظيمة الناجحة التي قام بها كل من لويس باستير والعالم الألماني روبرت كوخ (Robert Koch) اللذين يعزى إليهما الفضل في إنشاء علم دراسة البكتيريا في العصر الحديث [01].

**III. 1. 3- تعريف البكتيريا :**

البكتيريا كائنات دقيقة الحجم ، لا ترى إلا بالمجهر ، توجد البكتيريا في كل مكان ، في الهواء وفي الماء ، وعلى جسم الإنسان ، وداخل قنواته الهضمية ، وجهازه التنفسي .

وتستطيع جرثومة البكتيريا العيش لأعوام طويلة متحملة جميع الأحوال غير الملائمة من ارتفاع درجة الحرارة ، أو انخفاضها ، أو غير ذلك من الظروف البيئية القاسية ، وعند تحسن الظروف البيئية المحيطة تتخلص الجرثومة من الغشاء السميك ، وترجع إلى سابق عهدها نشاطا وحيوية [02].

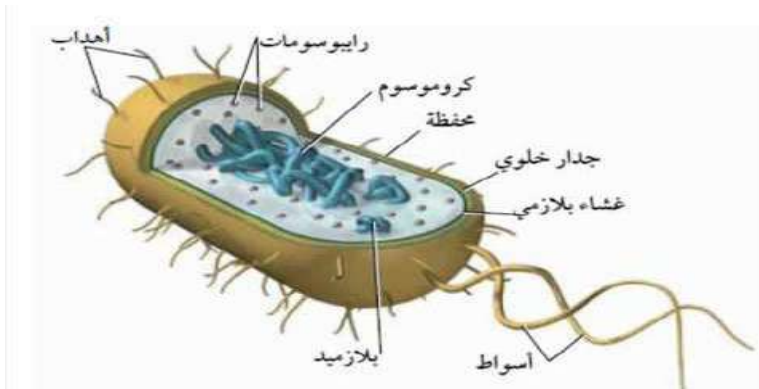
**III. 1. 4- خصائص البكتيريا :**

- البكتيريا كائنات دقيقة الحجم يتراوح حجمها بين 0.3 - 2 ميكرون .

- البكتيريا كائنات دقيقة مجهرية بدائية النوى.

- تتميز البكتيريا ببساطة التركيب

إذ تتركب من جدار وغشاء خلويين يحيطان بالسيتوبلازم الذي يحوي كروموزوما حلقيا واحدا ولا يحتوي على بروتين الهستون وقد يحتوي على واحد أو أكثر من جزيئات DNA على شكل دوائر صغيرة تسمى البلازميدات وتتكاثر بصورة مستقلة عن الكروموزوم و الرايبوزومات وبعض الأجسام التخزينية. [01-02]



الصورة (1.III): بنية الخلية البكتيرية

- تحتوي الخلية البكتيرية على غلاف ، قاس ، متماسك ، متمم للبكتيريا ، وهو المسؤول عن حماية شكل الخلية من الإضطرابات الناتجة عن تأثير الضغط الخارجي كالأجسام الغريبة .

وهناك أنواع أخرى تحتوي على حافظة خارجية حول غلاف تدعى capsule .

- درجة الحرارة المناسبة لنمو البكتيريا تتراوح بين 37 - 45 ° م بحيث يمكنها التكاثر خلال مدة وجيزة إلى أعداد كبيرة [03] .

**III. 1. 5- تصنيف البكتيريا :** صنف العلماء البكتيريا على إعتبار عدة معايير :

**III. 1. 5- 1 من حيث توزيع أسواطها [03] :**

فيمكن تقسيمها إلى :

1 - بكتيريا وحيدة السوط .

2 - بكتيريا ذات أسواط عديدة : متجمعة عند طرف واحد .

3 - بكتيريا ذات أسواط عديدة : موزعة على كل الخلية .

**III. 1. 5- 2 من حيث الشكل [03] :**

1 - البكتيريا العصوية (Bacilli) : التي تأخذ خلاياها شكل العصويات الصغير تحت المجهر .

2- البكتيريا الكروية (Cocci) : التي تأخذ خلاياها شكل الكريات الصغيرة .

3 - البكتيريا الحلزونية (Spiral) : التي تأخذ الشكل الحلزوني .

4 - البكتيريا الواوية (Vibrio) : التي تأخذ شكل الواو أو الضمة العربية .

**III. 1. 5- 3 من حيث الوسط الذي تعيش فيه [03] :** فيمكن تقسيمها إلى ثلاثة أنواع :

1 - بكتيريا هوائية (Aerobic) : وهي البكتيريا التي تعيش فقط في وجود الهواء الجوي وهي تعتبر المصدر الأساسي لتسمم المواد الغذائية .

2 - بكتيريا لا هوائية (Anaerobic) : وهي البكتيريا التي تعيش فقط ، في غياب الهواء الجوي

3 - بكتيريا لا هوائية إختيارية (Facultative Anaerobic) : وهي البكتيريا التي يمكنها العيش و النمو ، في ظل وجود الهواء الجوي ، أو عدمه .

**III. 1. 5- 4 - من حيث التغذية :** فيمكن تقسيمها إلى نوعين : **[03-04]**

1 - بكتيريا ذاتية التغذية : هي البكتيريا التي تستهلك الكربون للنمو .

2 - بكتيريا عضوية التغذية : هي البكتيريا التي تحصل على الكربون من تحليل المواد النيئة كالسكر .

**III. 1. 5- 5 من حيث طريقة التلوين ( غرام ) :**

يوضح الاختلاف في تركيب جدار الخلية بالتلوين ، حسب تقنية غرام ( GRAM ) نسبة للعالم J GRAM المكتشفة سنة 1884 ، واستنتج نوعين من خلال هذه الطريقة **[05]**:

1 - بكتيريا غرام موجب (gram positive) : عند تلوينها تمتص اللون وتظهر أرجوانية

2 - بكتيريا غرام سالب (gram négative) : تحرر صبغ وتظهر حمراء .

ويظهر جدار خلية البكتيريا موجب (gram positive) ، أسمك من جدار خلية البكتيريا غرام سالب ( gram négative) .

### III. 1. 5 - 6 من حيث الأثر على الإنسان : يمكن تقسيمها إلى نوعين :

#### 1 - بكتيريا نافعة : وهي التي تقدم خدمات جليلة للإنسان والحيوان والبيئة .

فهناك نوع من البكتيريا يعيش في أمعاء الإنسان ، يساعده على هضم الطعام ، ويفرز بعض المواد المفيدة للجسم ، مثل ، الفيتامينات ، ويعمل على تدمير البكتيريا الضارة . [06]

وهناك نوع آخر من البكتيريا يعيش في التربة ، ويلعب دورا هاما في غذاء النبات ، إذ يقوم بتثبيت النيتروجين الموجود في الهواء الجوي ، ليكون بمثابة عنصر أولي ، يستطيع من خلاله النبات أن يكون البروتين ، كما تقوم بكتيريا التربة بتحليل أجسام الكائنات الحية بعد موتها ، وكذا المواد العضوية المعقدة ، وتحولها إلى صور بسيطة ، تستفيد منها التربة والنبات والحيوان . ولا يقتصر الأمر على ذلك فحسب ، بل إن هناك صناعات كاملة تقوم على إستخدام بعض أنواع البكتيريا النافعة ، فصناعة بعض منتجات الألبان ، وبعض الأدوية ما هي إلا ناتج عمل البكتيريا النافعة . [06،03]

وحديثا تمكن العلماء من استخدام البكتيريا في معالجة مياه الصرف الصحي ، حماية للبيئة من التلوث ، ويطلق على كل هذه الأنواع البكتيرية إسم البكتيريا النافعة (Bénéficial bactérie) .

2 - البكتيريا الانتهازية : هناك أنواع من البكتيريا تعيش في جسم الإنسان من دون أن تسبب له أي أضرار صحية إلا أنها تؤدي إلى ، انخفاض مناعة جسم الإنسان لأي سبب من الأسباب ، تهاجم الجسم ، متحولة إلى بكتيريا ضارة تسبب عددا من الأمراض ، وذلك على نحو ما هو شائع في الإصابة بالتهاب الحلق أو التهاب اللوزتين ، ويطلق على هذه البكتيريا ، إسم البكتيريا الانتهازية (Opportunistic Bacteria)

3 - البكتيريا الضارة : ويطلق على هذا النوع إسم البكتيريا الممرضة (bactérie pathogenic) توجد بكتيريا ضارة تهاجم الإنسان، فتسبب له أمراضا ومشاكل صحية عديدة، وذلك على نحو ما يحدث في أمراض : السل والكوليرا، والتيفوئيد، السعال الديكي، والزهري والسيلان - ومن بين البكتيريا الضارة والمسببة للأمراض [06]

#### - بكتيريا ايشريشكولي Esherichia coli :

وهي بكتيريا هوائية سالبة الغرام ، تعيش في جسم الإنسان والحيوان والنبات وفي التربة ، تكون متحركة على شكل عصيات ، مسببة للأمراض من هذه الأمراض : أمراض الجهاز البولي ، الإسهال الطفيلي ، التهاب السحايا وتسمم الدم . [06،03]

- **بكتيريا ستافيلوكوك Staphylococcus aureus** :

هي بكتيريا موجبة الغرام كروية الشكل تسمى كوكسي (Cocci) ذات لون أصفر براق ، عديمة الحركة ، تكون عناقيد على شكل أكوام ، وتتواجد لدى الإنسان في الجلد والأمعاء والجهاز التناسلي وعلى الوجه .  
 هذه البكتيريا مسؤولة على تشكل الصديد وتسبب تسمم الغذاء ، وتسبب في التهابات جلدية خطيرة ، ويتسبب هذا النوع من البكتيريا بالعديد من الإلتهابات التي تسهل إنتشارها في الأماكن المزدحمة المغلقة .  
 وقد تسبب البكتيريا في موجات وبائية ووفيات هائلة نتيجة إلتهابات الرئتين ، وخراريج المخ ، وأمراض السحايا ، وتسمم الدم ، وغيرها من أمراض قاتلة . [06،03]

- **بكتيريا بسودوموناس pseudomonas aeruginosa**

هي بكتيريا ذات سالبة الغرام متحركة هوائية مصدر هذه البكتيريا الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان والماء والتربة تعمل على الإلتلاف السطحي للأغذية المبردة وتعد من بين المكروبات المحللة للدهون باللبن مما يؤدي إلى تغير لونه وطعمه وهي مقاومة للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات مما يفسر نموها وتكاثرها في الأوساط الإستشفائية حيث تنمو في الأجهزة الطبية ، الأفرشة ، الألبسة .... وتكون ممرضة بضعف الجهاز المناعي للجسم [06،03]

- **تريبتيكوك Streptocoque**

هي بكتيريا موجبة الغرام من بينها أنواع تنتج إصابات خطيرة ، توجد هذه البكتيريا طبيعيا في جسم الإنسان في الرئتين و الجهاز الهضمي في المسالك و المجاري البولية . [06،03]  
 هذه البكتيريا يمكنها أن تسبب إصابات خطيرة للإنسان من بينها إلتهاب البلعوم و الروماتيزم و بعض إلتهابات المسالك البولية و إلتهاب السحايا الناجم عن Streptocoque و تنتقل العدوى من إنسان إلى آخر عن طريق الهواء هذه البكتيريا لا تستطيع العيش طويلا خارج جسم الإنسان Le pneumocoque : هو عينة من Streptocoque يصيب الرئتين (إلتهاب الرئتين) . وعلاج لهذه الجرثومة هو المضاد الحيوي الدينيسيلين و للوقاية منه ينصح الأطفال و كبار السن بالتطعيم (التلقيح) ضد Le pneumocoque

- **سلمونيلا salmonilla**

هي بكتيريا عضوية الشكل ، سالبة الغرام، تسبب هذه البكتيريا مرض يتميز بالتهاب حاد في الأمعاء و القولون في بداية الأمر . بعد وقت من الإصابة تنتشر البكتيريا مع الدم لتسبب الإلتهاب في أي عضو تستقر فيه

لا يوجد تطعيم ضد السلمونيلا التي تسبب نزلات معوية و لكن النظافة الشخصية و نظافة اليدين و كذلك الطرق الصحية لحفظ الأطعمة و طهيها و خاصة اللحم و الدواجن ، و كذلك البيض طهيا جيدا .  
 هذه الطرق تساعد على التقليل من نسبة الإصابة بهذه البكتيريا [06،03]

**III. 1. 6 - المضادات الحيوية :****III. 1. 6 - 1 - تعريف المضادات الحيوية :**

استعملت الكلمة لأول مرة بواسطة العالم Vullemin سنة 1889 الذي عرفها بأنها الظروف التي يمكن تحتها لكائن حي إبادة كائن حي آخر ليحتفظ هو بحياته ووجوده ولا يختلف تعريف فيولمين لهذه الظاهرة كثيرا عن التعريف الحالي والذي ذكره Waksman سنة (1945) في أن هذه الظاهرة ترجع إلى إفراز مواد كيميائية ذات تأثير ضار بالميكروبات [07،04].

**III. 1. 6 - 2 - من الناحية التاريخية :**

رغم أن مفهوم المضاد الحيوي لم ينشأ إلا في القرن العشرين إلا أن إستخدامها قد بدأ في الصين منذ أكثر من 2500 سنة ، وكثيرا من الحضارات القديمة كالحضارة الفرعونية و الحضارة الإغريقية قد إستعملوا النباتات في علاج الكثير من الأمراض والعدوى دون التنبه إلى المادة الفعالة داخل النباتات ، في ألمانيا عام 1909 طور بول أرليك (Paul Ehrlich) مضاد حيوي ضعيف المدى أسماه سالفرسان (Salvarsan) وأستخدم في علاج السيلان الذي كان منتشرا بكثرة في هذه الفترة ، وكان الإكتشاف الحقيقي للمضادات الحيوية في إنجلترا عام 1928 بواسطة أليكساندر فليمينج (Alexander Fleming) حيث إكتشف البنيسيلين وأثبت أن عفن *Penicillium notatum* ينتج مادة البنسلين القادرة على القضاء على بعض أنواع الجراثيم مثل : *Staphylococcus*.

وبعد عشرة أعوام قام أرنست تشين وهاورد فلوري بتحضير نوع صافي من البنسلين وحصل الثلاثة على جائزة نوبل في الطب عام 1945 .

ومنذ ذلك الوقت إكتشفت مئات من المضادات الحيوية ، وأمكن التعرف عليها وأستعمل بعضها في العلاج الداخلي للإنسان . [08]

**III. 1. 6 - 3 - أنواع المضادات الحيوية :**

إن الوظيفة الأساسية للمضاد الحيوي في الجسم تنقسم إلى قسمين [09] :

**III. 1. 6 - 3 - أ مضادات حيوية كابحة لنشاط الخلية البكتيرية :**

يمنع تكاثرها وهو ما يساعد في القضاء عليها مثل : سلفوناميد ، كلورام فينكول .

**III. 1. 6 - 3 - ب مضادات حيوية قاتلة للخلية البكتيرية :**

إما عن طريق التأثير على جدار خليتها، أو بالتسبب في انتفاخ خليتها وانفجارها، أو بمنع تكوين مادة البروتين داخل خليتها ، مثل : أمبسلين ، جنتاميسين ، بنسلين .

**III. 1. 6 - 4 - تأثير المضادات الحيوية :**

تعمل المضادات الحيوية على قتل الميكروب ، أو كبح الميكروبات ، وقد يكون مفعول المضاد على الغلاف الخارجي (Cell wall) ، أو الغلاف الداخلي (Membrane cell) ، أو يعمل على مستوى الخلية لإيقاف تصنيع البروتين (Protéine Synthesis) . [05،04]

**III . 1. 6 - 4 - أ العمل على الجدار الخارجي للبكتيريا:** المضاد الحيوي يوقف تركيب الجدار بتثبيط transpeptidase هذا ما يمنع من تركيب peptidoglycane . وهذا يوقف نموها وعملها ويمكن أن يشمل تدمير تلك الأخيرة بالفعل وتعمل وفق هذا الأسلوب من العمل : - سيكلوسبرين cyclosporine - بنسلين penicillin - سيفلوسبورين céphalosporine - فانكوميسين vancomycin

**III . 1. 6 - 4 - ب العمل على الغشاء الداخلي للبكتيريا :** المضاد الحيوي له خواص سطحية التي تمكنه من تخريب عمل نفاذية الغشاء الداخلي (زيادة غير طبيعية) ، ويسمح بطرح المواد السائلة خارج البكتيريا ، هذا ما يسمح بتدميرها ، مثل ، ( lipopeptides cycliques) polymyxines يعمل وفق هذا الأسلوب من العمل . [05،04]

### III . 1. 6 - 4 - ج العمل على تثبيط نمو ADN :

يعمل المضاد الحيوي على المعقد ADN-ADN ، حيث يعمل المضاد الحيوي على التثبيط الأيضي لنمو ADN للبكتيريا وتعمل وفق هذا الأسلوب من العمل : [05،04]

- سترينتوميسين Streptomycin - كاناميسين Kanamycin

- أرثروميسين Erythromycin - ريفامبيسين Rifampicin - سبترين Septrin

### III . 1. 6 - 5 - طريقة تحديد درجة حساسية المضادات الحيوية : [10،08،07]

**III . 1. 6 - 5 - أ تمهيد:** المضادات الحيوية هي مركبات كيميائية محضرة ذات فاعلية خاصة بتراكيز مخففة ، بعض المضادات الحيوية تملك فاعلية (كبيرة أو صغيرة) تختلف بحسب البكتيريا الحساسة لفعل المضاد .

### III . 1. 6 - 5 - ب - خواص الجذمة البكتيرية (la souche bactérienne):

في علم الطب، الجذمة البكتيرية هي مقاومة للمضاد الحيوي على حسب تركيز المضاد الحيوي ، أي بإرتفاع التركيز تقل المقاومة لإعطاء أفق للعلاج .

### III . 1. 6 - 6 - حساسية الميكروب [10،08،07] :

إن دراسة حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي لها عدة أهداف، أولها إختيار المضاد الأكثر نشاطا، إضافة إلى أنه في حالة معالجة الأمراض المعدية، يجب معرفة المضاد الحيوي الفعال وهذا بإختباره على الميكروب

المسؤول عن المرض، وأخيرا تحديد التركيز اللازم للتخلص من العامل المعدي والممرض للعضو المريض، ولتحقيق هذا توجد طريقتين :

### III.1.6 - 7 - أ دراسة فعالية المضاد الميكروبي :

وهي تدرس مدى حساسية الميكروب لمضاد حيوي بدلالة الزمن وبدلالة التركيز، وهذا برسم منحنيين الأول يسمى منحنى النمو، حيث عدد البكتيريا بدلالة الزمن

(ساعات)، والثاني نسبة التثبيط بدلالة تركيز المضاد الحيوي، ويحدد من المنحنيين التركيز الأدنى للتثبيط La Concentration Minimale Inhibitrice CMI ، وتحديد التركيز الأدنى القاتل للبكتيريا La Concentration Minimal Bactéricide أو ما يسمى CMB. [10,08,07]

والقيمتين CMB,CMI ، متقاربة بالنسبة للمضادات الحيوية القاتلة ، ومتباعدة بالنسبة للمضادات المثبطة .  
و توجد عدة طرق لقياس التزايد البكتيري كاستعمال خلية hématimètre ( هيماسيماتر ) ، قياس الوزن الجاف ، تقدير قيمة استهلاك البكتيريا للمادة العضوية أو الأكسجين .

### - طريقة الأنتيبيوغرام القياسي : [10,09]L'antibiogramme

وهي طريقة تحليلية لتحديد مدى فعالية المضاد الحيوي على الميكروب (CMI)، وهي الأفضل لمعالجة المرض المتسبب في هذا الأخير. و تنقسم بدورها إلى طريقتين:

أ/ طريقة التمديد: (Méthode de dilution) ، والتي تتم على وسط سائل أو صلب ، وهي صعبة التطبيق في حالة التحليل الروتيني .

### ب/ طريقة الانتشار : ( Méthode de diffusion ):

وهي الأكثر استعمالا في المستشفيات لتشخيص الأمراض المعدية، ويكون الوسط المستعمل صلب من الجيلوز gélose وأهم وسط جيلوزي هو وسط Hilton Muller ، نسبة للباحث الذي حضره Hilton Muller عام 1941 ، والهدف من هذه الطريقة التحليلية هو معرفة مدى حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي ، وتحديد التركيز الأدنى للتثبيط CMI ( وهو أقل تركيز يبدأ عنده تثبيط نمو البكتيريا ) ويتم التحليل بإتباع الخطوات التالية :

بعد إذابة معقمة للوسط الجيلوزي ، يسكب بكميات محددة في علب بتري ، يحضر المعلق الميكروبي بوضع جذمة منه في الماء الفيزيولوجي ، ثم يشتل في علب بتري المحضرة مسبقا ( بعد تصلب الوسط الجيلوزي ) ، تدخل العلب الحاضنة للتجفيف ، بعدها توضع أقراص الإختبار معقمة و مشبعة بتركيز مختلفة للمضاد الحيوي المراد اختبار فعاليته ، ثم تعاد العلب للحاضنة تحت درجة 37° م لمدة 18 سا - 24 سا .

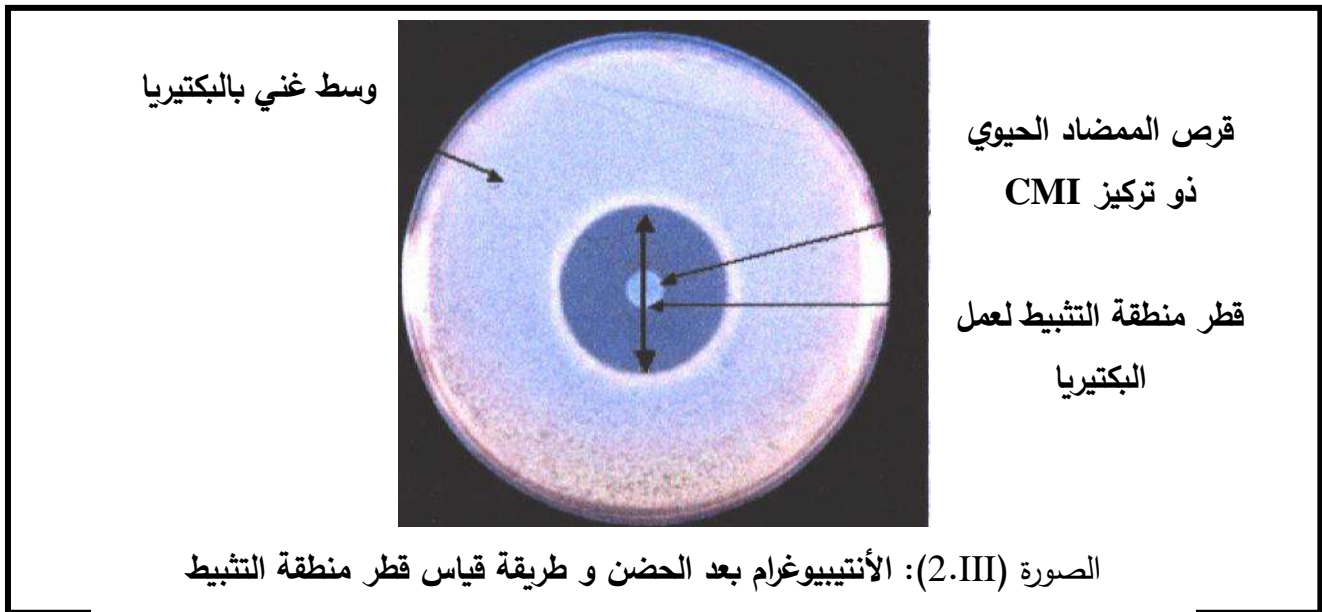


ولمعرفة مدى حساسية البكتيريا وتأثير المضاد الحيوي ، نقيس قطر طبقة التثبيط بعد مرور الفترة الزمنية المذكورة سابقا ( طريقة قياس قطر الكبت موضحة في الصورة (2.III) ) .

وكنتيجة من هذا الإختبار يحدد CMI ، ويقارن بالتركيز المتوسط للمضاد الحيوي اللازم للعلاج ( الجرعة اللازمة للعلاج) Taux thérapeutique ، وعندها نقول عن البكتيريا أنها :

- حساسة : إذا كان CMI أقل من Taux therap للمضاد الحيوي .
- مقاومة : إذا كان CMI أكبر من Taux therap للمضاد الحيوي .
- محدودة : إذا كان CMI مطابق لـ Taux therap للمضاد الحيوي .

ويعتمد نجاح هذه الطريقة على مدى الإنتشار الجيد للمضاد الحيوي في وسط الزرع، فإن لم يكن كذلك فنتبع طريقة أخرى لقياس مدى حساسية الميكروب.



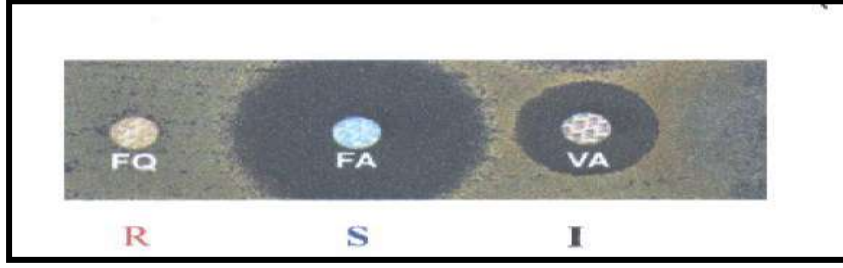
### - طريقة الأنتيبيوغرام الآلي : Antibiogramme automatisé [10:09]:

وهذا بإستعمال عدة أنواع من الأجهزة لقياس مدى حساسية الميكروب وتحديد CMI وكمثال جهاز Autobac ، جهاز MS2..... الخ .

### III -7- قراءة النتائج :

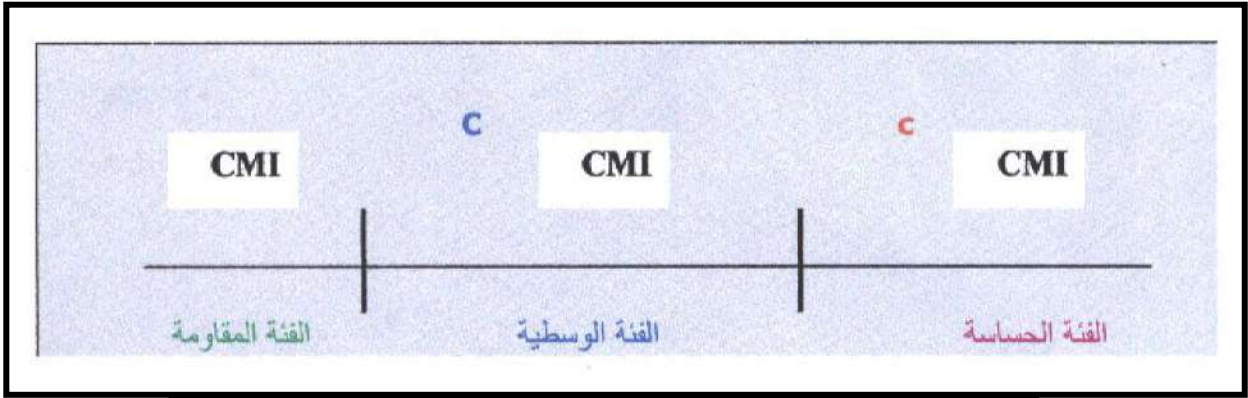
خاصية الجذمة البكتيرية هي حساسة (S) ، مقاومة (R) ، حساسية وسطية (I) .

هذا كما توضحه الصورة رقم (3.III) حيث : FQ – FA – VA مضادات حيوية



ونعتمد في القراءة على المعطيان: الصورة (3.III): أنواع القراءات الممكنة

- ( C ) : هو التركيز الأعلى للجرع للمضاد الحيوي وتكون فيه الفعالية ضعيفة .
- ( c ) : هو التركيز الأقل للجرع للمضاد الحيوي المحقون و تكون فيه الفعالية كبيرة .



الشكل (1.III) : فئات الفعالية حسب تركيز المضاد الحيوي

ونعرف الفئات حسب التركيز كالتالي:

- إذا كان  $CMI > c$  : الجرعة البكتيرية حساسة للمضاد الحيوي (S) .
- إذا كان  $CMI < C$  : الجرعة البكتيرية مقاومة للمضاد الحيوي (R) .
- إذا كان التركيز  $c > CMI > C$  : الجرعة البكتيرية ذات حساسية وسطية للمضاد الحيوي (I) .

### III-2- داء السكري

يعد داء السكري من بين أخطر الأمراض في الوقت الحالي و أكثرها شيوعاً بحث يمس (5-7)% من سكان العالم. [11]

#### III.2.1- تعريف مرض السكري:

داء السكري هو مرض يتعلق بفشل الآليات البيولوجية التي تنظم السكر في الدم مما يؤدي إلى ارتفاع نسبة السكر في الدم . حيث يصبح الجسم غير قادر على إنتاج كمية كافية من الأنسولين، وهذا الأخير هو الهرمون المسؤول عن خفض نسبة السكر في الدم، وقد يصاحب هذا المرض على المدى الطويل مضاعفات تمس بعض الأعضاء الحيوية في الجسم مثل : شبكية العين والكلى والشرابين ... الخ [12]

[13]

#### III.2.2- أنواع مرض السكري:

يمكن تصنيف مرض السكري إلى ثلاثة أنواع: السكري من النوع 1، السكري من النوع 2 و سكري الحمل.

##### - السكري من النوع 1:

يصيب عادة الأطفال و يمكن أن يحدث في أي سن. و يمثل حوالي 10% من اجمالي حالات السكري (يعتمد على الأنسولين) و يتميز بعجز خلايا بيتا ( $\beta$ ) في جزر لانجرهانز عن إنتاج كمية كافية من الأنسولين و هذا ما لا يسمح بدخول الجلوكوز الى الخلايا من أجل إنتاج الطاقة أو التخزين على شكل جليكوجين. [13] [14]

المرضى المصابين بهذا النوع من السكري يعتمدون حالياً بشكل أساسي على أخذ أنسولين خارجي، وهذا النوع من العلاج يعتبر مكلف نوعاً ما و يفرض قيود و نمط حياة معين على المريض، و من جهة أخرى يبقى زرع البنكرياس أو زرع جزر لانجرهانز حلول أكثر فعالية تحتاج الى التطوير [14]

حالياً يتم العمل على الخلايا الجذعية البالغة و الجنينية كمصدر واعد لجزر لانجرهانز المعدة للزرع و قد أظهرت البحوث الجديدة على زرع الخلايا الجذعية لنخاع العظم أن الخلايا الجذعية البالغة يمكن أن تؤدي إلى عملية تجديد أنسجة البنكرياس، مما يؤدي الى إعادة إنتاج الأنسولين الطبيعي و التخلص من أعراض مرض السكري [13]. ان استخدام الخلايا الجذعية البالغة لديها ميزة مهمة بحيث يمكن استخدام خلايا المريض نفسه، وبتجنب الرفض المناعي من قبل جسم المريض [14]

##### - السكري من النوع 2:

يحدث عادة بعد سن الـ 30 أو 40 سنة وهذا النوع من السكري يشكل حوالي 90% من جميع حالات السكري. [12] [13] و يترتب داء السكري من النوع 2 على عدم قدرة الجسم على الاستجابة بشكل مناسب لعمل الأنسولين. وقد يكون الأنسولين بنسبة عالية أو منخفضة و ذلك بسبب مقاومة الأنسولين أو نقص الأنسولين، و عادة ما يرتبط بالاستعداد الوراثي [13] [14]

## - سكري الحمل:

هو الحساسية المفرطة تجاه الجلوكوز والذي يظهر للمرة الأولى أثناء الحمل . وقد يصيب هذا النوع من السكري نحو 4% من النساء الحوامل في الثلاث أشهر الثانية أو الثالثة من الحمل هذا النوع من السكري حالة عابرة وتختفي في الأسابيع التي تلي الولادة . النساء اللواتي عانين من سكري الحمل هن أكثر عرضة لتطور داء السكري من نوع 2 في وقت لاحق. [15]

حتى في حالة غياب العلاج الطبي، يمكن التعرف على مرض السكري من الارتفاع المزمن لنسبة السكر في الدم . ويرافق ذلك أحيانا بعض الأعراض مثل: العطاش، التبول، ضعف عام، وفقدان الوزن أو السمنة، وضعف الوعي مما أدى إلى غيبوبة.

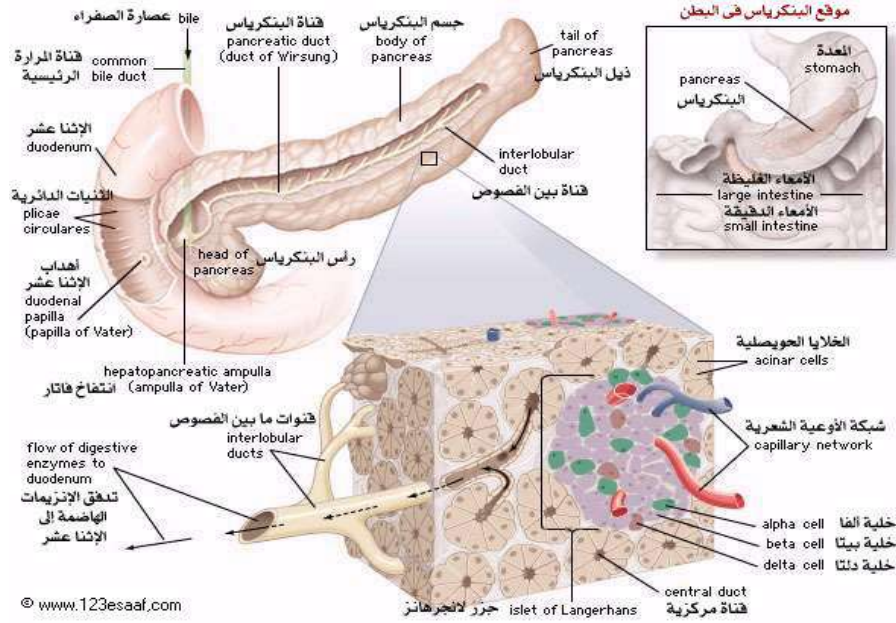
مرض السكري يؤدي إلى مضاعفات مثل أمراض القلب والأوعية الدموية والكلية . هذه المضاعفات يمكن أن تتأخر في الظهور، [13] [14]

في حين أن مرض الشريان موجود بنسبة (8-20)% من مرضى السكري الذين تجاوزوا 45 عاما، وهو يزداد مع التقدم في العمر [13] و يعد مرض السكري من بين أسباب حالات العمى لدى البالغين بين 30 و 75 عاما [12] [13]

## III. 2. 3- البنكرياس وإفراز الأنسولين

على الرغم من أن التزود بالجلوكوز يختلف من وقت الى آخر الا أن مستوى السكر في الدم يبقى يتراوح بين 0.7 و 0.8 غ/لتر [13]، يتم توفير هذه المراقبة من قبل إفرازات الغدد في البنكرياس ، [12] و يقع البنكرياس في تجويف البطن في وضع أعمق من المعدة بالقرب من الجزء الأول من الأمعاء الدقيقة و البنكرياس عبارة عن غدة صماء ( داخلية الإفراز ) ؛ لأنها تفرز "هرمون الأنسولين ، و هرمون الجلوكاغون " ، و خارجية الإفراز ؛ لأنها تفرز العصارة البنكرياسية الهاضمة [16] .

يتكون البنكرياس من أربعة أقسام - الرأس : أكبر جزء فيه دائري الشكل - العنق : و هو أضيق الأجزاء في البنكرياس - الجسم : الجزء الأوسط منه - الذيل : و هو يقع في نهاية الغدة ، ضيق ، يلامس مدخل الطحال . يوجد في البنكرياس قناتين ، يفرز من خلالهما عصاراته الهاضمة . للبنكرياس وظائف في الجسم ، فهو يفرز العصارات الهاضمة التي تتدفق عن طريق قناة خاصة إلى ( الأمعاء الدقيقة )، و نجد نوعان من الغدد في البنكرياس ، فهناك الغدد القنوية : التي تفرز عصارات هضمية ، و هنالك الغدد اللاقنوية : الغدد الصماء ، و هي كتجمعات من الخلايا ، تفرز هذه الغدد ( هرمون الأنسولين ) ، و هرمونات أخرى تذهب إلى الدم مباشرة دون قنوات . و تنتشر في البنكرياس عنقايد صغيرة من الخلايا ، " جزر لانجرهانس " ، و تحتوي على خمس أنواع من الخلايا منها ( خلايا ألفا ، وخلايا بيتا ، و خلايا دلتا ، و خلايا تفرز بروتين البنكرياس)



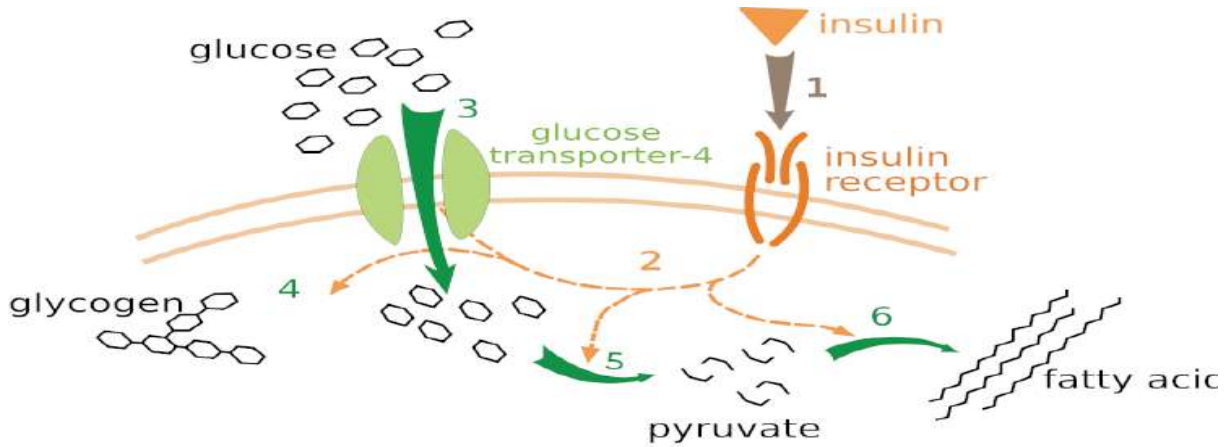
الصورة (4.III) رسم توضيحي للبنكرياس

### III. 2. 4- الانسولين:

- الانسولين: هو هرمون مهمته الأساسية الحفاظ على نسبة السكر في الدم في المجال الطبيعي، بحيث يُفرز من قبل خلايا بيتا ( $\beta$ ) في جزر لانجرهانز في البنكرياس [17]. و يطرح في الدم من أجل نقل الجلوكوز الزائد الى خلايا العضلات، الخلايا الشحمية و الكبد على شكل جليكوجين.

على مستوى الخلايا المستهدفة، يسهل هرمون الأنسولين امتصاص الجلوكوز إلى داخل الخلايا عن طريق

زيادة نفاذية غشائها عن طريق مستقبلات مثل GLUT 4 [17] [18]



الشكل (2.III) آلية عمل الأنسولين

**- مقاومة الأنسولين:**

هي استجابة بيولوجية للجسم ضد الأنسولين حيث يصبح هذا الأخير أقل فعالية في تخفيض مستوى السكر في الدم من خلال العمل الخاطئ و ينتج عن ذلك زيادة في مستوى السكر في الدم يمكن أن يسبب آثار صحية ضارة. بعض أنواع الخلايا مثل الخلايا العضلية والخلايا الدهنية تحتاج إلى الانسولين من اجل امتصاص الجلوكوز، وسوف ترتفع مستويات الجلوكوز في الدم عندما تقشل هذه الخلايا في الاستجابة بشكل مناسب لانتشار الأنسولين. [12] [13]

**- الجلوكاجون**

هو هرمون بيتيدي يصنع من قبل خلايا ألفا، وهو هرمون يعمل على زيادة السكر الدم أي عكس عمل الأنسولين بحيث يحفز تحلل الغليكوجين.

**III. 2. 5- مضاعفات الارتفاع المزمن لنسبة السكر في الدم:**

مضاعفات مرض السكري مهمة وهي نوعين: المضاعفات الحادة المرافقة لمرض السكري من النوع 1 و أخرى مزمنة مرافقة لداء السكري من النوع 2 [19] المضاعفات الحادة لمرض السكري تصنف الى ثلاثة مضاعفات:

[20]- acidose lactique- syndrome d'hyperglycémie- acidocétose diabétique-

ويرتبط الارتفاع المزمن لنسبة السكر في الدم بمضاعفات عضوية معينة لا سيما العينين، الأعصاب ، الكلى ، القلب والأوعية الدموية [13]

فعلى سبيل المثال عدد وفيات الأشخاص المصابين بداء السكري من النوع 2 بسبب القلب والأوعية الدموية في فرنسا هو تقريبا ضعف عدد الوفيات غير المصابين بداء السكري لنفس السبب. [21]

**III. 2. 6- علاج مرض السكري:**

من المستحسن مراقبة نسبة السكر في الدم بشكل منتظم و ذلك لتقادي أو لتأخير ظهور المضاعفات [22] ولتحقيق ذلك توجد عدة حلول من بينها اتباع نظام غذائي متوازن من الكربوهيدرات والبروتين والدهون [23] وممارسة التمارين الرياضية [24] عناصر أساسية للتخفيف من حدة مرض السكري دون أدوية. و مع ذلك فان العلاج بالأنسولين من أهم العلاجات لمرض السكري نوع 1 ومرض السكري من النوع 2 [23] خصوصاً خلال المراحل المتقدمة من المرض. بالإضافة الى ذلك توجد مضادات للسكري تؤخذ عن طريق الفم و تصنف حسب طريقة عملها الى ثلاث أصناف.

- Les sulfamides hypoglycémiantes [25] - Les biguanides - Les inhibiteurs des alpha-glucosidases [26]

للحد من معاناة مرضى السكري يجري البحث عن حلول جديدة مثل زرع جزر لانجرهانز [27] بالإضافة الى أن البحث عن مواد جديدة من أصل نباتي يجذب اهتمام الباحثين من أجل تحضير أدوية جديدة

### III. 2. 7- النباتات المضادة للسكري:

استخدمت المنتجات الغذائية الطبيعية من أصل نباتي لعلاج الأمراض التي تصيب الإنسان منذ آلاف السنين. في السنوات الأخيرة، أثارت الدراسات الاثنوبناتية للنباتات المستخدمة كمضاد للسكري اهتماما كبيرا. وقد نشرت الصحف المتخصصة في مجال النباتات الطبية والسكري مقالات علمية مهمة تبرر الاهتمام

الكبير بالاستخدام التقليدي للنباتات: [28] [29] [30]

(Journal of Ethnopharmacology, Phytomedicine, Phytotherapy Research, Journal of natural products, Diabetes Care, Phytothérapie, Journal of Medicinal Plants Research, Phytomedicine,)

في هذا السياق، تم اختبار أكثر من 1123 نوع من النباتات التي تم تحديدها من قبل المختصين ضد مرض السكري من النوع 2، هذه النباتات شملت 725 جنسا و 183 عائلة [28] [31]

النباتات التي تم تحديدها، و المقدمة في الجداول الموالي مع الاسم العلمي للنبات، العائلة النباتية، طريقة التأثير والجزء المستخدم (جزء هوائي، الساق، الجذور والأوراق والثمار... الخ) وكذلك المركبات النشطة (قلويدات، جليكوسيدات، الصابونيات، الفلافونيدات، الخ)، الأساليب التقليدية المتبعة للإعداد (النقع مثلاً) والحيوانات المستخدمة في الاختبار (الفئران، الجردان، الأرنب، الكلب، القط... الخ)

الجدول (I.III): أمثلة عن بعض النباتات التي لها تأثير عن سكر الدم

المرجع	آلية التأثير	الجزء المستعمل	العائلة	الاسم العلمي
Nammi et al 2003	تحفيز إنتاج الأنسولين من خلايا $\beta$ الموجودة في البنكرياس	أوراق	Apocynacées	<i>Catharanthus roseus (L).G.Don</i>
Numila et al 2002		بذور	Cucurbitacées	<i>Citrulluscolocynthis L.</i>
Shibib et al 1993	تحفيز تكوين جليكوجين	ثمار	Cucurbitacées	<i>Coccinia grandis L. Voigt</i>
Bhowmik et al 2009		أوراق/ثمار	Anacardiaceae	<i>Mangifera indica L</i>
Ishikawa et al 2007	تثبيط انزيم $\alpha$ glucosidase	أوراق	Apocynacées	<i>Nerium oleander L</i>
Li et al 2005		ثمار	Lythracées	<i>Punica granatum L.</i>
Mohammadi et Naik 2008	زيادة عدد خلايا $\beta$	أوراق	Moracées	<i>Morus alba L</i>
Sharma et al 2011 Kamalakkannan 2005	تناقص مقاومة الأنسولين حماية خلايا $\beta$	أوراق /ثمار	Rutacées	<i>Aegle marmelos</i>
Kojima et al 2006	يحفز انقسام خلايا	أوراق	Apocynacées	<i>Ervatamia</i>

	البنكرياس			<i>microphylla</i>
Gholap et Kar 2004	تناقص فعالية الكورتيزول cortisol	النبته كاملة	Amarantacées	<i>Amaranthus esculents</i>

### III. 2. 8- الفلافونيدات و داء السكري:

من المعقول بيولوجيا أن استهلاك مركبات الفلافونويد أو الأطعمة الغنية بالفلافونويدات قد يقلل من خطر الإصابة بمرض السكري و مع ظهور مفاهيم جديدة في هذا الاتجاه، مثل المغذيات، العلاج الغذائي، المغذيات النباتية والعلاج بالنباتات. هذه الأغذية تلعب أدوارا إيجابية في الحفاظ على مستوى السكر في الدم، في هذه السنوات تبدل جهود مختلفة لاستخدام مركبات الفلافونويد في التجارب المختبرية والنماذج الحية من أجل ضبط امتصاص الجلوكوز وافراز الانسولين و ذلك بدمج عدة طرق مبتكرة لتحسين نشاطها المضادة لمرض السكر [32]

وقد تم اقتراح بعض الفلافونيدات الطبيعية (flavones, flavonols, flavanones, flavonols, isoflavones, anthocyanidins) كمكملات غذائية تقلل من خطر الإصابة بمرض السكري و من المضاعفات المصاحبة

للمرض على المدى البعيد، وذلك على أساس النتائج المتحصل عليها مخبرياً. [32]

و قد رصد Ramachandran Vinayagam و زميله عدد لا بأس به من الفلافونيدات التي لها فعالية ضد السكري نذكر البعض منها في الجدول -02- [32]

#### الجدول (2.III) أمثلة لبعض الفلافونيدات التي لها تأثير على سكر الدم

المرجع	آلية التأثير	المصدر	بنية الفلافونويد
Srinivasan and Pari 2010, 2012, 2013	تحفيز إنتاج الأنسولين من خلايا $\beta$ الموجودة في البنكرياس	<i>Scrophularia nodosa L</i> fruites de citrus	Diosmin ديوسمين
Prasath and Subramanian 2013	تحسين نسبة السكر في الدم وحالة مضادة للأكسدة	الفرولة /البصل	Fisetin فيزيتين
Sendrayaperumal 2014	حساسية الانسولين والاكسدة	<i>Chlorophora tinctoria</i> (L.) Gaud., <i>Psidium guajava L.</i> الفواكه	Morin مورين
Vanitha 2014	منع اتلاف خلايا $\beta$ من جزر لانغرهانس		
Liu 2014	تثبيط مسار NF- $\kappa$ B	البقدونس وأوراق البصل والفلفل والجزر وقشور التفاح	Luteolin ليتولين



Ola 2015	تناقص الجلوكوز/زيادة الأنسولين	البرتقال، العنب، خوخ، توت	رويتين Rutin
Dai 2013	منع اتلاف خلايا $\beta$ من جزر لانغرهانس	التفاح و الكرز	Quercetin كرسيتين

أكد علماء ماليزيون التأثيرات المفيدة للعديد من مركبات الفلافونويد الغذائية في علاج و متابعة داء السكري من نوع 2 ومضاعفاته مثل التأثير على إفراز الأنسولين [33]

كما وجد باحثون تونوسيون أن استهلاك التمور قد يكون ذات فائدة في السيطرة على السكر والدهون لدى مرضى السكري [34]

وأظهرت النتائج انخفاض مؤشرات نسبة السكر في الدم لخمسة أنواع من التمور التي شملتها الدراسة والتي استهلاكها من قبل الأفراد السكري لا يؤدي إلى الرحلات الجلوكوز بعد الأكل كبيرة. وتشير هذه النتائج إلى الفوائد المحتملة من التمور لمرضى السكري عند استخدامها في اتباع نظام غذائي صحي ومتوازن [35]

## III. 3. المراجع:

- [01] E.G.Zézérov, Abrégé de microbiologie générale et d'immunologie, Académie de Médecine de Moscou I.M.Sétchénov, Moscou 2002.
- [02] - د . محمد عبد المحسن معارج 1995 وراثة الأحياء الدقيقة . شركة الشهاب للنشر و التوزيع ص 18 – 20
- [03] – EMILE Pr, DE LAVERGNE, BURDIN Jean-Claude, Les Bactéries, 1973, p. 11-14
- [04] COUVQLIN, Interprétative Reading of antimicrobial susceptibility testes ASM News. 1992, p. 58- 368 – 375
- [05] JORGENSEN J . H., FERRQRO M . J., Antimicrobial susceptibility testing : general principles and contemporary practices Clin Infect Dis , 1998, p. 26-973 – 980.
- [06] ROBERT – DERNMET S . Antibiotique et antibiogrammes . Décarie Vigot ,Montréal,1995, p.322 .
- [07] ERICSSON H. M . O SHERRIS . J. C ., Antibiotic Sensitivity Testing Report of an International Collaborative Study Actes Path. Microbiol Scand , B Suppl, 1971, p. 90 - 217.
- [08] BAURER A. W ., KIRRY W . M .M , SHERRES . J.C.A , TURCH . M , Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method – Amer J. Clin Pathol., 1966, p. 45-493 - 496
- [09] Bactériologie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie, 2003
- [10] GUERIN - FAUBLEE V . , CARRET . C . L'antibiogramme : principes ,méthodologie ,intérêt et limites . Journées nationales GVT – INRA , 1999, p.5-12
- [11]Weaber G. Diabétologie expérimentale. Revue médicale de la Suisse Romande. 2000; 120 : 907-913.
- [12] Buysschaert M, Vandeleene B, Parus I, Hermans MP. Le diabète sucré d'une réalité d'aujourd'hui à un défi de demain. Louvain Med. 1999; 118 : S189-S195
- [13]Raccah D. Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré.EMC-Endocrinologie. 2004; 1(1) : 29-42.
- [14] Calop J., Limat S., Frnandez C., 2008. pharmacie clinique et thérapeutique. 3<sup>ème</sup> Ed. Masson, Elsevier Masson, Paris. pp.417-427
- [15] Naylor C.D., Sermer M., Chen E., Farine D., 1997. Selective screening for gestational diabetes mellitus. N. Engl. J. Med.; 337 (22): 1591-1596
- [16] Nelson D.L., Cox M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Ed. W H Freeman and Co. Ltd, 4 th edition, Newyork.p. 881 -901

- [17] Malaisse WJ., Malaisse-Lage F, Sener A, Pipeleers DG., 1982. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B-cell. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 79: 927-930
- [18] Oberley LW. 1988. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 5: 113-124
- [19] Capet F., Debaillie R., Tafforeau J., Van-Oyen H., 1999. Situation Actuelle et Eléments pour le développement d'une Politique de Santé: diabète épidémiologie. *CROSP*; 19(1-12) :27-28
- [20] Orban J.C., Ichai C., 2008. Complications métaboliques aiguës du diabète. *Réanimation* ; 17 : 761-767.
- [21] Drouin P, Buckle JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ, Plauin PF, Daninos JM, Balarac N, Sauvanet JP. Diagnostic et classification du diabète sucré : les nouvelles critères. *Diabète et métabolisme*.1999; 25 :72-83
- [22] Jaspreet V, Sivakami S, Shahani S, Sulhar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Antihyperglycemic effect of three extracts from *Momordica charantia*. *J of ethnopharmacology*. 2003; 88: 107-111
- [23] Gin H et Rigalleau V. Diabétiques et diabète. *EMC- Endocrinology nutrition*. 1999; 10-366-R-10: 6p
- [24] Charbonnel B, Cariou B. Diabète non insulino-dépendant: indications thérapeutiques. *Médecine thérapeutique*. 1997 ; 3 : 103-111
- [25] Dey lucey MD, Anoja S, Attele DDS, Chun-Su Yuan MD. Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review*. 2002; 7(1): 45-58.
- [26] Hermans MP. Diabète de type2 et adaptation thérapeutique. *Louvain Med*. 1998; 118 : S2-S8
- [27] Barrou B, Bitker MO, Grimaldi A, Debré P, Richard F. Transplantation pancréatique: indications, résultats et perspectives. *EMC-Endocrinologie*. 2004; 1:43-53.
- [28] Bailey C.J., Day C., 1989. Traditional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care*; 12:553-564
- [29] Ivorra M.D., Paya M., Villar A., 1989. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *J Ethnopharmacol.*; 27: 243-75
- [30] Soumyanath A., 2006. *Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic plants*. CRC Press (Taylor Francis Group); 6: 19-82.
- [31] Marles R.J., Farnsworth N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: 13-189.
- [32] Ramachandran Vinayagam and Baojun Xu, Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review, *Vinayagam and Xu Nutrition & Metabolism* (2015) 12:60

- [33] Fatemeh Hajiaghaalipour<sup>1</sup>, Manizheh Khalilpourfarshbafi, Aditya Arya, Modulation of Glucose Transporter Protein by Dietary Flavonoids in Type 2 Diabetes Mellitus, Int. J. Biol. Sci. 2015, Vol. 11, 508-524
- [34] Emna Behija Saafi , Mouna Louedi , Abdelfattah Elfeki and al, Protective effect of date palm fruit extra ct (*Phoenix dactylifera L.*) on dimethoate induced-oxidative stress in rat liver, Experimental and Toxicologic Pathology 63 (2011) 433–441
- [35] Juma M Alkaab, Bayan Al-Dabbagh , Shakeel Ahmad, Glycemic indices of five varieties of dates in healthy and diabetic subjects, Alkaabi et al. Nutrition Journal 2011, 10:59

الجزء

العملي

# الفصل الرابع

## دراسة

### فيتروكيماوية

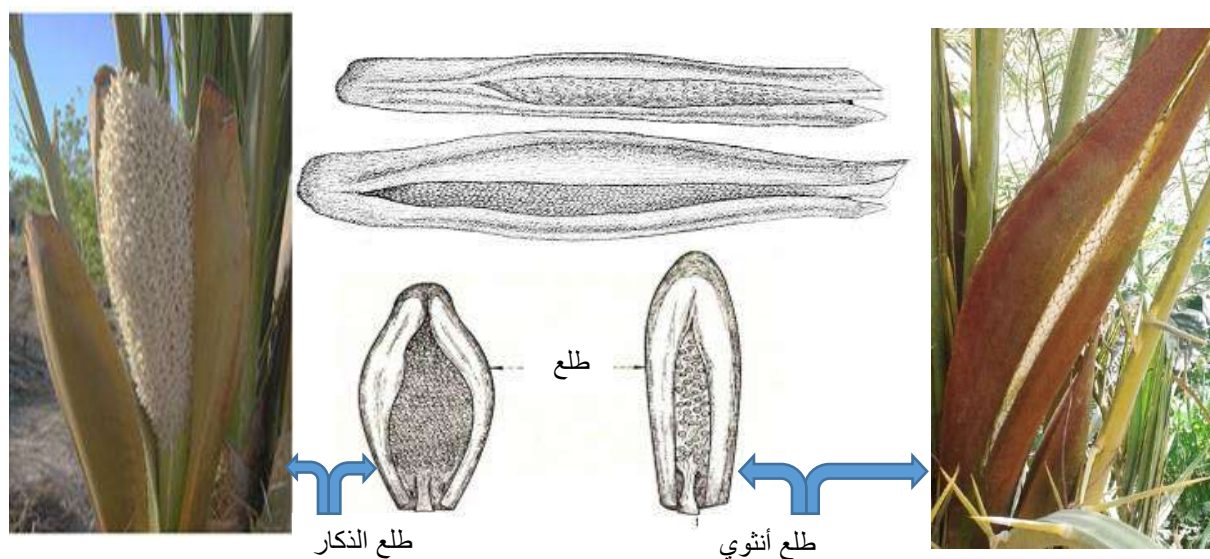
## IV . دراسة فيتوكيميائية

### 1.IV. المواد و الطرائق:

#### IV 1.1. المادة النباتية:

تم جمع المادة النباتية (أغلفة طُلوغ نخيل التمر - Les spathes du palmier dattier) المستعملة في هذه الدراسة من منطقة بلدة عمر بضواحي مدينة تقرت، و ذلك في شهر مارس 2012 في مرحلة الازهار أي بعد انفتاح الطلع مباشرة، بحيث كانت هذه المادة سليمة من الأضرار المرفولوجية و الامراض الفطرية ثم جففت العينات في مكان مهوَّ بعيداً عن أشعة الشمس و الرطوبة.

وتحضيراً للمراحل التالية قمنا بتقطيع المادة النباتية الى أجزاء صغيرة تسهل عمليات الكشف و الاستخلاص.



الصورة (1. IV) طلع أثناء فترة الازهار

### IV 2.1. الكشف الأولي عن المركبات العضوية:

من أجل الكشف الأولي عن أصناف المركبات العضوية الموجودة في المادة النباتية قمنا بإجراء مجموعة من الاختبارات نلخصها فيما يلي: [03-01]

#### اختبار العفصيات (Tanins)

نضيف الى 1ملل من مستخلص المادة النباتية 1ملل من ثلاثي كلور الحديد (FeCl<sub>3</sub>) 5% ظهور لون أخضر مسود أو أزرق مسود دليل على وجود العفصيات. [03-01]

#### اختبار الصابونيات (Saponosides) :

نضيف الى 1ملل من مستخلص المادة النباتية 1ملل من الماء المقطر يرح المحلول الناتج، ظهور رغوة دليل على وجود الصابونيات. [03-01]

#### اختبار الفلافونيدات (les Flavonoides) :

نضيف الى 1ملل من مستخلص المادة النباتية 1ملل من هيدروكسيد الصديوم (NaOH) 2N ظهور اللون الأصفر يدل على وجود الفلافونيدات. [03-01]

#### اختبار التربينات (les Terpenoides) :

نضيف الى 1ملل من مستخلص المادة النباتية 1ملل من الكلوروفورم و قطرات من حمض الكبريت 98% ظهور اللون البني المحمر يدل على وجود التربينات. [03-01]

#### اختبار القلويدات (les Alkaloides) :

نضيف الى 1ملل من مستخلص المادة النباتية 1ملل من حمض كلور الهيدروجين HCl ثم نضيف ثلاث قطرات من كاشف ماير عند ظهور تعكر أو راسب أبيض يدل على وجود القلويدات بصفة عامة. [02-01]

### IV.3.1. الاستخلاص:

اعتمدنا في عملية الاستخلاص صلب-سائل على جهاز سوكسليه (Soxhlet) [02] به ورق بحجم 1000ملل و مزيج من ميثانول/ماء (3/7) [04]. وعادة ما يتم استخلاص الفينولات البسيطة و البولي فينول بهذا الأسلوب أو بأسلوب التنقيع مع استعمال مذيبات عضوية مثل الايثانول، الميثانول، الأستون و الكلوروفورم... الخ [02] [05]

وضعنا المادة النباتية في جهاز سوكسليه مع مزيج الاستخلاص، تستمر العملية ما بين 4 أو 5 ساعات الى حين انخفاض تركيز لون المذيب الراشح من أجل الحصول



على مردود أعلى. ثم قمنا بتبخير المذيب و تركيز الراشح عند درجة حرارة 40 م°. [02]

بعد ذلك أذبنا المستخلص الخام و الذي كان بشكل عجينة في ماء مقطر دافئ بمقدار ( 1ل من الماء المقطر لكل 1كغ من المستخلص)، تركناه للراحة ليلة كاملة ثم تخلصنا من المواد المترسبة و التي كانت عبارة عن (دهون و الكلوروفيل) [02] ، أخضعنا الراشحة المائية أو السائل المتحصل عليه للاستخلاص سائل-سائل بإيثر البترول من أجل التخلص من المركبات الطبيعية التي لم تترسب ذات القطبية الضعيفة مثل: الدهون، التربينات و الكلوروفيل، تحصلنا على رشاحة مائية تعتبر المستخلص الخام للفلافونيدات. بعد ذلك نواصل الاستخلاص بمذيبات عضوية مختلفة القطبية: بحجم من اثير دي ايتليك يساوي ثلث(3/1) المستخلص الخام مرة أو مرتين فقط، ثم بأسيتات الاثيل ثم بالبيتانول كما هو مبين في الشكل (1. IV)

#### IV.4.1. الفحص بکروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM):

قمنا باجراء فحوصات كروماتوغرافي أولية بالاعتماد على ألواح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من السليكا جال و الجمل المملصة:

-الجملة الأولى: أسيتات الايثيل/ حمض الميثانويك/ حمض الاثانويك/ الماء (11/26/26/100)  
Acétate de diéthyle / acide formique / acide acétique / eau (100/26/26/11) v / v

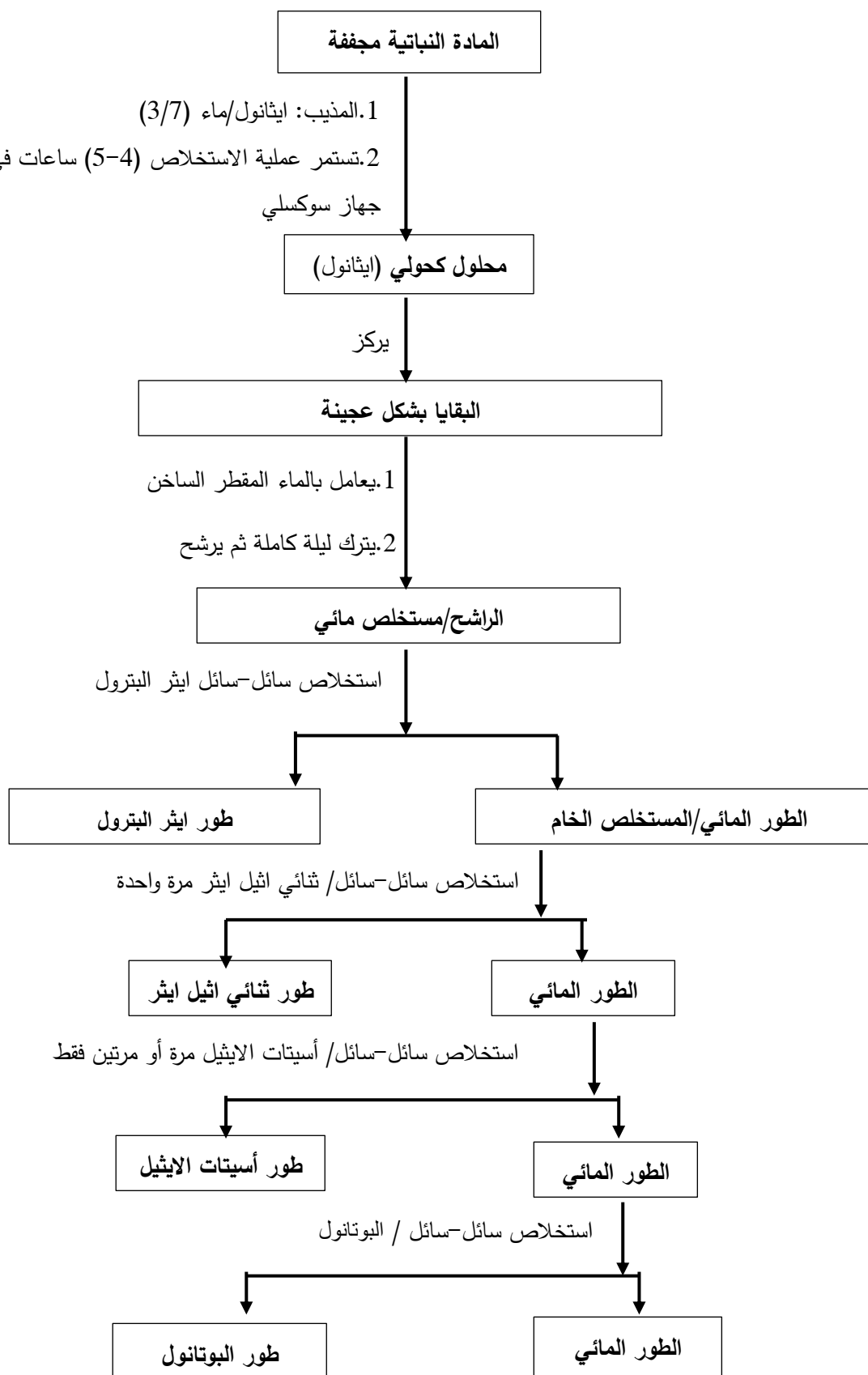
-الجملة الثانية: أسيتات الايثيل/ البيوتانول/ميثانول/ الماء (1/1/30/60)

Acétate de diéthyle / n-butanol / méthanol / eau (60/30/1/1)

-الجملة الثانية: البيوتانول/حمض الايثانويك/ الماء (1/1/3)

BAW ;n-butanol / acide acétique / eau (3/1/1)

بالإضافة الى ذلك قمنا بتنشيط الألواح بوضعها في درجة حرارة 100م° لمدة 30 دقيقة ثم بردناها الى درجة حرارة المخبر قبل الاستعمال. أما بالنسبة لملاحظة البقع فاستعملنا مصباح الأشعة فوق البنفسجية (254-365)nm و أبخرة NH<sub>3</sub> ككاشف.



الشكل (1. IV) مخطط الاستخلاص المطبق على المادة النباتية

## IV. 2. نتائج و مناقشة

### IV. 1.2. نتائج الكشف الأولي عن المركبات العضوية:

الجدول (1. IV) نتائج الكشف عن مركبات الأيض الثانوي

المواد الفعالة	طلع دكار	طلع دقلة بيضاء	أوراق دكار	أوراق دقلة بيضاء
الفلافونيدات	++	++	++	++
الصبونيات	+	+	+	+
التربينات	+	+	++	++
القلويدات	+	+	+	+
العفصيات	+	+	+	+

تدل النتائج المتحصل عليها على احتواء الأجزاء المدروسة (طُلووع و أوراق) على بعض مركبات الأيض الثانوي مثل الفلافونيدات، لذلك ارتأينا الاهتمام بمستخلصات الطُلووع (Spathes)

### IV. 3.2. مردود الاستخلاص:

الجدول (2. IV) مردود عملية الاستخلاص

اللون	المردود % (ملغ/غ)		المستخلص
	طلع دقلة بيضاء	طلع دكار	
بني/أحمر أجوري	15.10	19.4	المستخلص الخام
أخضر زيتي	1.40	1.74	ثنائي إيثيل اثير
أخضر/بني	4.20	4.30	اسيتات الايتيل
بني/أحمر أجوري غامق	6.30	9.42	البوتانول
بني فاتح	3.20	3.91	المائي الأخير

قراءة النتائج تبين أن طور البوتانول (n-butanol) يحتوي على أكبر كمية من الفلافونيدات مقارنةً بالأطوار الأخرى بشكل عام، يليه طور الأسيتات (Acétate d'éthyle) و من ناحية أخرى فإن مردود

الاستخلاص كان مقبولاً نوعاً ما رغم أنه يمكننا مضاعفة هذا المرود بالاعتماد على درجة الحرارة و المدة الزمنية المناسبة لذلك وفق ما توصل اليه (Mandana Bimakr 2011) و آخرون.[06]



الصورة (1. IV) التدرج اللوني أثناء  
الاستخلاص بالبيوتانول



الصورة (2. IV) ألوان المستخلصات

1- كسر اثير البترول 2- الكسر الخام 3-ثنائي ايثيل ايثر 4-  
أسيتات الايثيل 5- كسر البوتانول 6- آخر كسر مائي

#### IV.4.2. نتائج الفحص بكمروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM):

قمنا بفحص المستخلصات المتحصل عليها بكمروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) و كانت النتائج كما هو مبين في الجداول التالية:

#### • مستخلصات غلاف طلع الذكار

الجدول (3. IV) نتائج الفصل بكمروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

نوع المركب المحتمل [07]	لون البقعة مع الكواشف		قيمة Rf	الطور المتحرك (الجملة المملصة)
	UV365 nm + VaporNH <sub>3</sub>	UV254 nm		
/	بني/أصفر	رمادي	0.96	Acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; (100/26/26/11)v/v/v/v
حمض الكومارين / Flavonoides / فلافونويد	أزرق	/	0.91	
/	بنفسجي فاتح	رمادي	0.88	
/	أخضر	/	0.85	
/	بنفسجي	رمادي	0.83	
/	بنفسجي	رمادي	0.93	Acétate d'éthyle / n- butanol / méthanol / eau (60/30/1/1)
/	أزرق	رمادي	0.89	

## الجدول (4. IV) نتائج الفصل بکروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص أسيتات الايثيل

نوع المركب المحتمل [07]	لون البقعة مع الكواشف		قيمة R <sub>f</sub>	الطور المتحرك (الجملة المملصة)
	UV365 nm + VaporNH <sub>3</sub>	UV254 nm		
/	أحمر فاتح	رمادي	0.94	Acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; (100/26/26/11)v/v
/	أخضر	/	0.91	
حمض الكومارين / Acide coumarin	أزرق	رمادي	0.90	
/	بنفسجي	رمادي	0.83	
/	أسود	/	0.81	
/	رمادي	رمادي	0.80	
/	بنفسجي	/	0.77	
/	أزرق	رمادي	0.76	
/	أحمر فاتح	رمادي	0.98	
/	بني	رمادي	0.92	
Hydroxyflavonol A, B et C; Flavone méthylée	أزرق فاتح	رمادي	0.85	Acétate d'éthyle / n-butanol / méthanol / eau (60/30/1/1)
/	رمادي	/	0.81	
فلافونيد جليكوزيد / Flavonoïde-glycoside	بنفسجي	رمادي	0.75	
حمض فينوليک / acide phénolique	أزرق فاتح	/	0.72	
/	أزرق غامق	/	0.70	
/	برتقالي	رمادي	0.67	
فلافونيد جليكوزيد / Flavonoïde-glycoside	بنفسجي	/	0.57	
/	أصفر	رمادي	0.31	

## الجدول (5. IV) نتائج الفصل بکروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص البيوتانول

نوع المركب المحتمل [07]	لون البقعة مع الكواشف		قيمة R <sub>f</sub>	الطور المتحرك (الجملة المملصة)
	UV365 nm + VaporNH <sub>3</sub>	UV254 nm		
acide caféique	أزرق	/	0.83	Acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; (100/26/26/11)v/v
/	أخضر	رمادي	0.82	
/	برتقالي	رمادي	0.77	
/	أزرق	/	0.66	
فلافونيد جليكوزيد / Flavonoïde-glycoside	أصفر	/	0.50	
جليكوزيد / جليكوزيد	برتقالي	رمادي	0.46	
/	أخضر	رمادي	0.95	
/	أزرق	/	0.76	
/	أخضر	رمادي	0.67	
فلافونيد جليكوزيد / Flavonoïde-glycoside	بنفسجي	/	0.64	
کرسيتين / Quercetin	أزرق غامق	رمادي	0.54	BAW ; n-butanol / acide acétique / eau (3/1/1)
/	برتقالي	/	0.46	
کرسيتين / Quercetin	أصفر	/	0.06	

### • مستخلصات غلاف طلع الدقلة البيضاء

الجدول (6. IV) نتائج الفصل بكموتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص ثنائي ايثيل اثير

نوع المركب المحتمل [07]	لون البقعة مع الكواشف		قيمة Rf	الطور المتحرك (الجملة المملصة)
	UV365 nm +VaporNH <sub>3</sub>	UV254 nm		
/	برتقالي	رمادي	0.98	Acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; (100/26/26/11)v/v/v/v
حمض الكومارين / Acide coumarin	أزرق	/	0.93	
/	برتقالي	رمادي	0.87	
/	أحمر	رمادي	0.83	
/	برتقالي	رمادي	0.97	Acétate d'éthyle / n-butanol / méthanol / eau (60/30/1/1)
حمض الكومارين / Acide coumarin	أزرق	رمادي	0.93	
/	بني	/	0.89	

الجدول (7. IV) نتائج الفصل بكموتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص أسيتات الايثيل

نوع المركب المحتمل [07]	لون البقعة مع الكواشف		قيمة Rf	الطور المتحرك (الجملة المملصة)
	UV365 nm /NH <sub>3</sub>	UV254 nm		
/	أزرق	رمادي	0.93	Acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; (100/26/26/11)v/v/vv
/	برتقالي	رمادي	0.84	
/	أحمر أجوري	/	0.81	
/	أزرق	/	0.78	
Flavonoïde-glycoside / فلافونيد جليكوزيد	أصفر	رمادي	0.73	
/	أخضر	رمادي	0.69	
روتين / Rutin	أصفر	رمادي	0.66	
/	أزرق	رمادي	0.98	Acétate d'éthyle / n-butanol / méthanol / eau (60/30/1/1)
/	بني مصفر	رمادي	0.95	
/	أزرق فاتح	رمادي	0.87	
/	رمادي غامق	رمادي	0.84	
/	برتقالي	رمادي	0.78	
/	أزرق غامق	/	0.71	
/	أصفر	/	0.70	
/	أصفر	رمادي	0.30	

## الجدول (8. IV) نتائج الفصل بكمروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص البيوتانول

نوع المركب المحتمل [07]	لون البقعة مع الكواشف		قيمة Rf	الطور المتحرك (الجملة المملصة)	
	UV365 nm + VaporNH <sub>3</sub>	UV254 nm			
/	أحمر أجوري	/	0.97	Acétate d'éthyle / acide formique / acide acétique / eau ; (100/26/26/11)v/v/v/v	
/	أخضر	/	0.96		
/	أصفر	/	0.93		
/	/	رمادي	0.88		
Acide phénolique	أزرق غامق	/	0.79		
/	/	رمادي	0.72		
/	برتقالي	/	0.70		
/	بنفسجي	/	0.67		
/	أصفر	/	0.55		
/	أزرق غامق	/	0.49		
/	/	رمادي	0.30		
/	أصفر	/	0.08		
/	بنفسجي	رمادي	0.88		n-butanol / acide acétique / eau (3/1/1)
/	أزرق	/	0.83		
/	برتقالي	/	0.82		
/	أصفر	رمادي	0.72		
/	أصفر	/	0.66		
/	بنفسجي	/	0.61		
/	أصفر/أخضر	رمادي	0.30		
/	أصفر	/	0.15		

الملاحظ للنتائج السابقة يمكن أن يستنتج أن هذا الجزء (غلاف الطلع) من النخيل يحتوي على عدد لا بأس به من الفلافونيدات، لكن الجزم بغنى طور عن الآخر بهذه المركبات يحتاج الى المزيد من عمليات الفحص و الفصل و استعمال أطوار متحركة و كواشف تتلائم في كل مرة مع صنف من أصناف الفلافونيدات. أو نعتمد على طرق تحليل أخرى أكثر دقة مثل HPLC و CG.

بناءً على النتائج السابقة فمن المحتمل أن تحتوي مستخلصات:

- البيوتانول للذكار على فلافونيد الروتين (Rutine) نظراً لظهور بقعة برتقالية عند Rf=0.46 [07].

- أسيتات الاثيل للدقلة البيضاء قد يحتوي على فلافونيد أوريونتين (Orientine) نظراً لظهور بقعة صفراء عند Rf=0.73 [07].

- مستخلصات أسيتات الايثيل و البيوتانول (Acétate d'éthyle/n-butanol) لكلى النوعين من النخيل قد يحتوي على فلافونيدات من نوع فلافون أو فلافونول (Flavones/Flavonoles) نظراً لظهور الألوان: الأصفر/ الأخضر/ البرتقالي.

[08]

- كما يمكن أن يدل ظهور اللون البرتقالي على وجود الكرسيتين، ميريسيتين أو ليتولين (Quercetin/myricetin/Luteolin) أو أحد مشتقاتها في كل المستخلصات. [09]

- ظهور اللون الأصفر المخضر أو أخضر مصفر قد يعطي فكرة عن وجود الكامبريفول، ايزورامنتين أو أيجينين (Kaempferol/isorhamnetin/Apigenin) أو أحد مشتقاتها في مستخلص البيوتانول للدقلة البيضاء. [09] أو أرون (Aurone) [10] [11]

- الأخضر /أخضر غامق قد يدل على وجود فلافونون في المستخلص [08] بعض الشالكونات [10] [11]

- أصفر أو أصفر باهت في الأسيتات و البيوتانول لكلى النوعين من النخيل قد يدل على فلافونول مع OH حر في 3 أو دون OH في 5 [10] [11] أو على ثنائي هيدرو فلافونول (dihydroflavonols) [12]

- أما ظهور اللون الأصفر المشع قد يدل على وجود فلافونول، أرون، شالكون أو فلافون [12]

- اللون البنفسجي في مستخلصات الدكار و مستخلص البيوتانول للدقلة البيضاء قد يدل على وجود فلافونول أو فلافانول يملك هيدروكسيل في 3 / فلافون أو فلافانون دون OH في 5 [10] [11]

- البنفسجي غامق في مستخلصات الدكار و مستخلص البيوتانول للدقلة البيضاء قد يدل على وجود فلافون / 5,6,7 أو 5,7,8 ثلاثي هيدروكسيل فلافون/ بعض الشالكونات [10] [11]

من ناحية أخرى فان الزيادة في قيمة Rf مرتبطة بزيادة تواجد مجموعات الهيدروكسيل (OH) الحرة . - مثيلة مجاميع ال هيدروكسيل: يؤدي الى زيادة قيمة



ثابت الانحباس في 3/1 أو 2/1 القيمة المرجعية. وجود مجموعات الجليكوزيدات يقلل من قيم ثابت الانحباس. [13]

كما أن ثابت الانحباس يتأثر بطبيعة المذيب حسب ما توصل اليه (Markham1982) فيما يخص العلاقة بين Rf و بنية الفلافونيدات و طبيعة المذيب. [10]

## 3.IV. المراجع:

- [01] R. Anto Suganya, G. Jeya Jothi, PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF COMMELINA NUDIFLORA (COMMELINACEAE), Int. Res. J. Pharm. 2014, 5 (11).
- [02] Harborne, Jeffrey Barry, Phytochemical Methods ; A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall Ltd 1973,
- [03] Subash Vishwakarma, Kumar Chandan, R. Caroline Jeba, Sheikh Khushbu, Comparative study of Qualitative Phytochemical screening and antioxidant activity of *Mentha arvensis*, *Elettaria cardamomum* and *Allium porrum*, Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 2014, 2231-6876
- [04] Gordana S. Četković, Sonja M. Đilas, Jasna M. Čanadanović-Brunet ,Vesna T. Tumbas, THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY ANALYSIS AND SCAVENGING ACTIVITY OF MARIGOLD (*Calendula officinalis L.*) EXTRACTS, Original scientific paper, (2003) 34, p. 93–102.
- [05] Constantine D. Stalikas ; Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids; (2007); 3274
- [06] Mandana Bimakr , Russly Abdul Rahman , Farah Saleena Taip et al, Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves, J Food and Bioproducts Processing, 89 ( 2011 ) 67–72.
- [07] N'gaman Kohué Christelle Chantal, Békro Yves-Alain, Mamyrbékova-Békro Janat Akhanovna, Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea Roxb.* (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince, European Journal of Scientific Research, Vol.36 No.2 (2009), pp.161-171
- [08] Carolina L. C. Albuquerque, Ádina L. Santana, M. Angela A. Meireles, Thin Layer Chromatographic Analysis of Annatto Extracts Obtained Using Supercritical Fluid, Food and Public Health 2015, 5(4): 127-137.
- [09] Øyvind M. Andersen;FLAVONOIDS Chemistry,Biochemistry and Applications; 2006; 2

- [10] . Markham ,K.R. « Techniques of flavonoids identification » Academic press. London (1982)
- [11] Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H« The flavonoids » Tome I. Academic press. London .(1975).
- [12] Lahouel M.. Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine, 2005
- [13] V. A. Bandyukova, A . L. Shinkarenko, THE THIN – LAYER CHROMATOGRAPHY OF FLAVONOIDS , Pyatigorsk Pharmaceutical Institute. Translated from Khimiya Prirodnikh Soedinenii, No. 1,1973, pp. 20-25,

# الفصل الخامس

## دراسة الفعالية

### البيولوجية / الفعالية

### ضد السكري

## V-1- دراسة الفعالية البيولوجية

### V-1-1- دراسة الفعالية البيولوجية لمستخلصات الفلافونيدات من طلوع النخيل

بعد عملية إستخلاص الفلافونيدات من طلوع الذكار و الدقلة البيضاء، قمنا باختبار فعالية هذه المستخلصات على أربعة أنواع من البكتيريا ونوع واحد من الخمائر: Escherichia coli, Staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginasa Streptocoque, condida,

#### 1.1.1.V- تحديد تركيز كل مستخلص:

من أجل تحديد تركيز المستخلصات المدروسة نبخر حجم V من كل مستخلص من أجل تحديد كمية المادة التي كانت مذابة في الحجم، وبتالي نخلص الى التركيز الكتلي لكل مستخلص، بعد ذلك نحضر التراكيز المراد تحضيرها عن طريق التمديد انطلاقاً من المحلول الأم.

استطعنا تحضير ستة محاليل بنفس التركيز الكتلي  $C=5g/l$  المحلول الأم (solution mère) و أربع تراكيز أخرى  $C/16, C/8, C/4, C/2$  في هذه الدراسة قمنا بما يلي:

1. اختبار الفعالية البيولوجية لهذه المستخلصات على أربعة أنواع من البكتيريا ونوع من الخمائر
2. تحديد قيمة CMI أقل تركيز لتثبيط نمو البكتيريا لكل مستخلص على كل نوع من المكروبات المختبرة

#### 2.1.1.V- المكروبات المختبرة:

الجدول (01-V) : المكروبات المختبرة ونوع الغرام

نوع غرام (gram)	المكروبات المدروسة
-	E.coli
-	pseudomonas aeruginasa
+	Staphylococcus aureus
+	Streptocoque
خميرة levures	Condida albicans

**3.1.1.V - تجهيزات المخبر (الأدوات المستعملة):**

الأجهزة و الأدوات والمذيبات والملونات والكواشف المستعملة موضحة في الجدول:

**الجدول (02-V) :** الأدوات والأجهزة والمذيبات والكواشف والملونات المستعملة ووسط الزرع

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ampoule à décanter photo 1</li> <li>- Autoclave</li> <li>- Bain marie</li> <li>- Béchers</li> <li>- Balance photo2</li> <li>- Boîtes de pétri</li> <li>- Bec benzène photo 3</li> <li>- Chambre UV</li> <li>- Disque d'absorbance</li> <li>- Erlenmeyer</li> <li>- Etuve poupinel</li> <li>- Pied à coulisse</li> <li>- Etuve de 37°C et 25°C photo 4</li> <li>- Pipette pasteur</li> <li>- Galeries Api20 E, Api 20 NE, Api Staph photo5</li> <li>- Lecteur des zone photo 6</li> <li>- Mirroscope</li> </ul>	الأجهزة والأدوات المستعملة
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bouillon nutritif</li> <li>- Bouillon Mueller hinton</li> <li>- Gélose sabouraud</li> </ul>	وسط الزرع
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réactif de griess ( Nit I, Nit II )</li> <li>- Réactif de Kovaces</li> <li>- Réactif de voges prauskauer ( V pI, V pII )</li> <li>- Réactif pour tryptophane désaminase (TDA)</li> <li>- Rouge de méthyle (RM)</li> </ul>	الكواشف
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bleu de méthylène</li> <li>- Fushine de ziehel</li> <li>- Lugol</li> <li>- Violet de gentiane 1%</li> </ul>	الملونات
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alcool acétone à 90%</li> <li>- Eau distillé stérile</li> <li>- Eau physiologique stérile</li> <li>- Ether</li> <li>- Eau Djafel</li> </ul>	المذيبات

**أ - عصيات لصبغة (-) Bâtonnets à Gram négatif**

**الجدول (03-V) الخصائص البيوكيميائية لبكتريا Escherichia coli**

خصائص بيوكيميائية	نتائج
ARA	+
AMY	-
MEL	+
SAC	-
RHA	+
SOR	+
INO	-
MAN	+
GLU	+
GEL	-
VP	-
IND	+
TDA	-
URE	-
H2S	-
CIT	-
ODC	-
LDC	+
ADH	-
ONPG	+

**الجدول (04-V) الخصائص البيوكيميائية لبكتريا Pseudomonas aerugino**

خصائص بيوكيميائية	نتائج
NO3	-
TRP	-
GLU	-
ADH	-
URE	-
ESC	-
GEL	+
ONPG	-
GLU	+
ARA	-
MNE	-
MAN	+
NAG	+
MAL	-
GNT	+
CAP	+
ADI	+
MLT	+
CIT	+
PAC	-

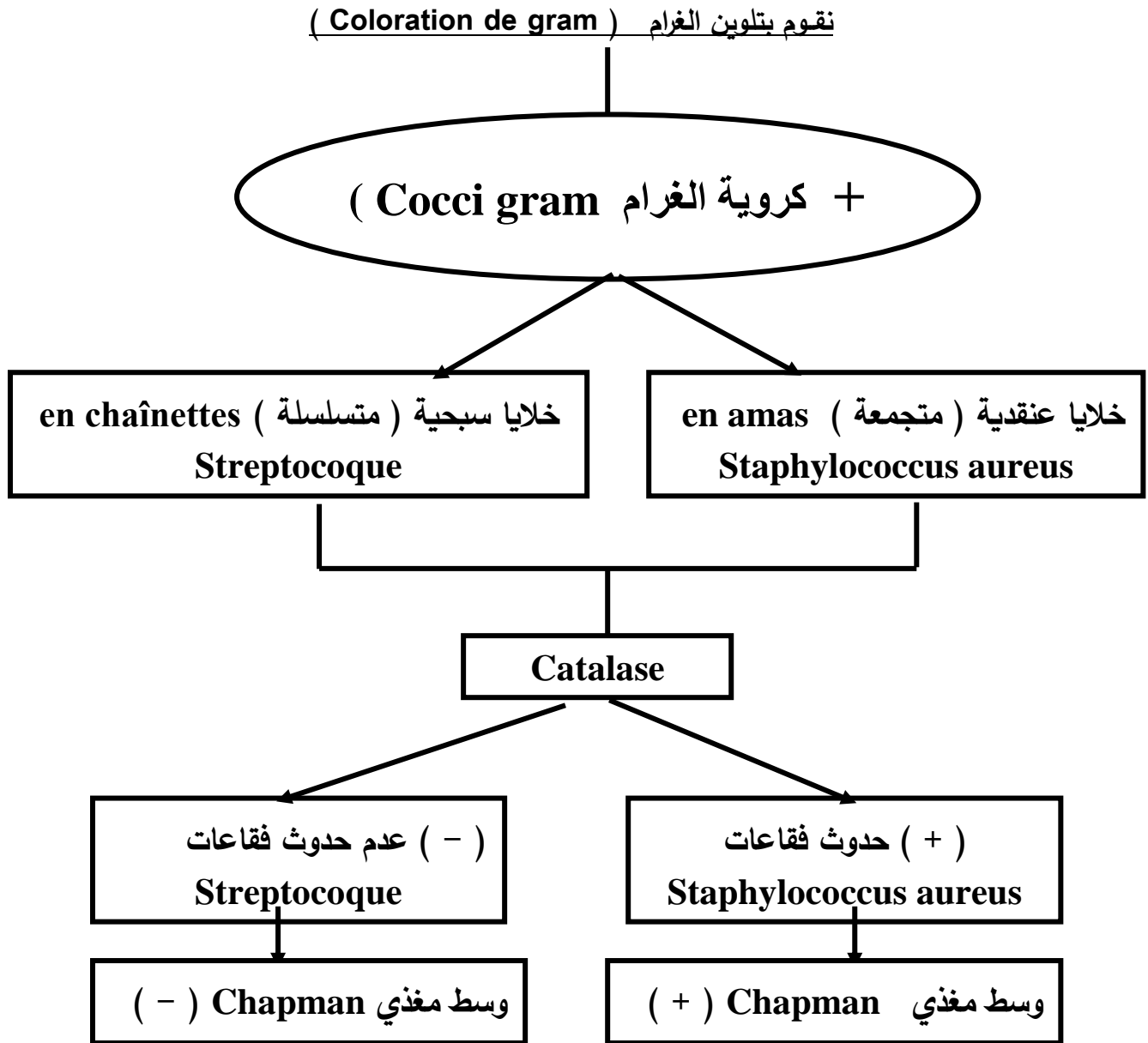
**ب - بكتيريا كروية لصبغة غرام موجب : (Cocci à Gram positif)**

**الجدول (05-V) الخصائص البيوكيميائية لبكتريا Staphylococcus aureus**

خصائص بيوكيميائية	نتائج
GLU	+
FRU	+
MNE	+
MAL	+
LAC	+
TRE	+
MAN	+
XLT	-
MEL	-
NIT	+
PAL	+
VP	+
RAF	-
XYL	-
SAC	+
MDG	-
NAG	+
ADH	+

**- التمييز بين بكتيريا *Slaphylococcus aureus* et *Slreptocoque* :**

إنطلاقاً من وسط مغذي GN(+) gélose nutritive و (-) Heckton ووسط (-) BCP بالنسبة لكل بكتيريا .



الشكل (01-V) : التمييز بين *Streptocoque* و *Staphylococcus aureus*

بإستعمال التلوين و كاشف Catalase ووسط مغذي Chapman



2. 1. V- دراسة نوعية للفاعلية البيولوجية لمستخلص نباتي ضد البكتيريا بطريقةالانتشار في وسط صلب:1. 2. 1. V- طريقة العمل:

هذه الطريقة تبين مدى فعالية المستخلص النباتي ضد البكتيريا المحضرة بتركيز **0.5 Mc Farland** هذه القيمة توافق المجال التركيز مل/بكتيريا ( $10^7-10^8$ ) المقاسة بواسطة جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية Spectrophotométre à UV-V الأقرص الممتصة والمعقمة تبلل بكمية من المستخلص النباتي وتوضع داخل علبه بتري على سطح الجيلوزي المحتوى على البكتيريا المختبرة .  
 - إنتشار المادة المستخلصة في الوسط الجيلوزي تمنع نمو البكتيريا حول القرص .  
 - في حالة وجود منع لنمو البكتيريا تظهر حالة (حلقة) حول القرص ( منطقة التثبيط ) .  
 - قراءة النتائج تكون بعد وضع علب بتري في الحاضنة تحت درجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  لمدة 24 ساعة .

2. 2. 1. V- تحضير الطبقة الأولى من الوسط الزراعي:

- ندوب وسط (MH) Muler-Hinton، وسط Gélose Sabouraud بالنسبة للخمائر في حمام مائي تحت درجة حرارة  $95^{\circ}\text{C}$  .  
 - نسكب 15 مل من وسط (MH) في علب بتري ذات قطر 90 ملليمتر يترك يبرد ويتجمد على سطح طاولة المخبر (Paillasse) .

3. 2. 1. V- تحضير المعلق البكتيري :

انطلاقاً من زراعة حديثة من 18-24 ساعة نحضر معلق بكتيري بأخذ 3 إلى 5 مستعمرة بكتيرية بعيدة عن بعضها ومعزولة توضع في 5 إلى 6 ملل ماء فيزيولوجي معقم نخلط جيداً بجهاز Vortex أول قراءة لتركيز المعلق البكتيري المحضر تكون بواسطة جهاز Spectrophotométre a UV-V على طول موجة  $\lambda = 620\text{nm}$  حيث نقرأ قيمة الإمتصاص **0.5 McFarland** التي توافق تركيز المعلق البكتيري ( $10^7-10^8$ ) بكتيريا/مل

إذا كانت القراءة على الجهاز لا توافق القيمة المناسبة نخفف بالماء الفيزيولوجي إذا كانت بزيادة أو إضافة مستعمرات بكتيرية إذا كانت بالنقصان ، نكرر هذه العملية حتى نحصل على القيمة المناسبة على الجهاز .

ملاحظة:

المعلق البكتيري المحضر يجب استخدامه بعد 15 دقيقة من تحضيره .

**4. 2. 1. V - تحضير الطبقة الثانية من الوسط الزراعي:**

- نذوب وسط (MH) في حمام مائي تحت درجة حرارة  $95^{\circ}\text{C}$ . ثم نخفض درجة الحرارة إلى  $45^{\circ}\text{C}$ .
- نضع في قارورات زجاجية معقمة 50 ml من وسط زراعي (MH) ونزرع في كل وسط 200µl من كل جزمة [عينة] بكتيرية.
- نخلط القارورات جيداً.
- نسكب بسرعة 5 مل من محتوى كل قارورة في علب بتري المحتوية على الطبقة الأولى من الوسط الزراعي على كل المساحة نتركها تتجمد على سطح طاولة المخبر (Paillasse).

**5. 2. 1. V - وضع الأقراص :**

- بواسطة ملقط (pince) معقم نأخذ قرصاً معقماً وبطرف القرص نلمس المستخلص النباتي و سيتبلب تلقائياً.
- نضع القرص فوق سطح الجلوزي داخل علب بتري .
- نترك العلب على سطح طاولة المخبر لمدة 30 دقيقة ثم نضعها بشكل مقلوب في الحاضنة تحت درجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  لمدة 24 ساعة (بعض العلب تركت لمدة 48 سا) .

**6. 2. 1. V - قراءة النتائج:**

- المستخلصات الطبيعية للنبات لها قدرة فعالة ضد البكتيريا إذا كان قطر التثبيط أكبر من محيط القرص .
- وجود منطقة واضحة حول القرص إختبار إيجابي و غيابها إختبار سلبي.
- نقوم بقياس قطر منطقة التثبيط المتواجد على علبه بتري ، ونكرر العملية عدة مرات للتأكد من النتائج المتحصل عليها و حساب القطر المتوسط.



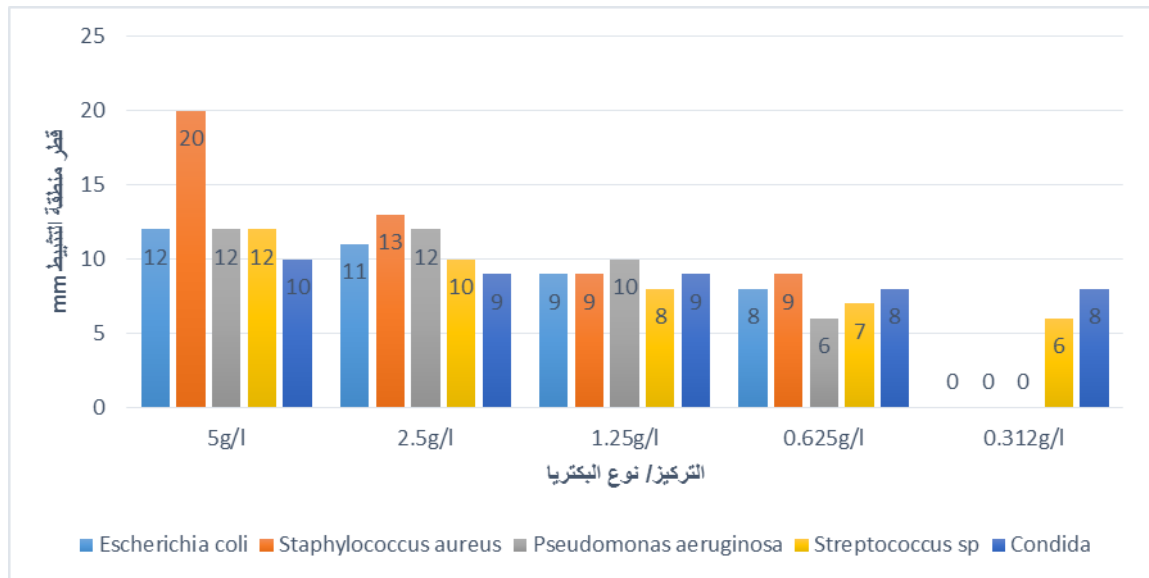
الصورة (01-V) : طريقة قياس قطر

### 3.1.V - نتائج و مناقشة:

أ/ مستخلصات غلاف طلع الذكار

الجدول (06-V) قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

تركيز المستخلصات					الغرام	المكروبات
DE/16	DE/8	DE/4	DE/2	DE=5g/l		
00	00	00	07	09	-	Escherichia coli
06	07	15	16	18	+	Staphylococcus aureus
00	07	07	09	08	-	Pseudomonas aeruginosa
06	09	09	09	12	+	Streptococcus sp
00	08	09	10	14	فطر	Condida



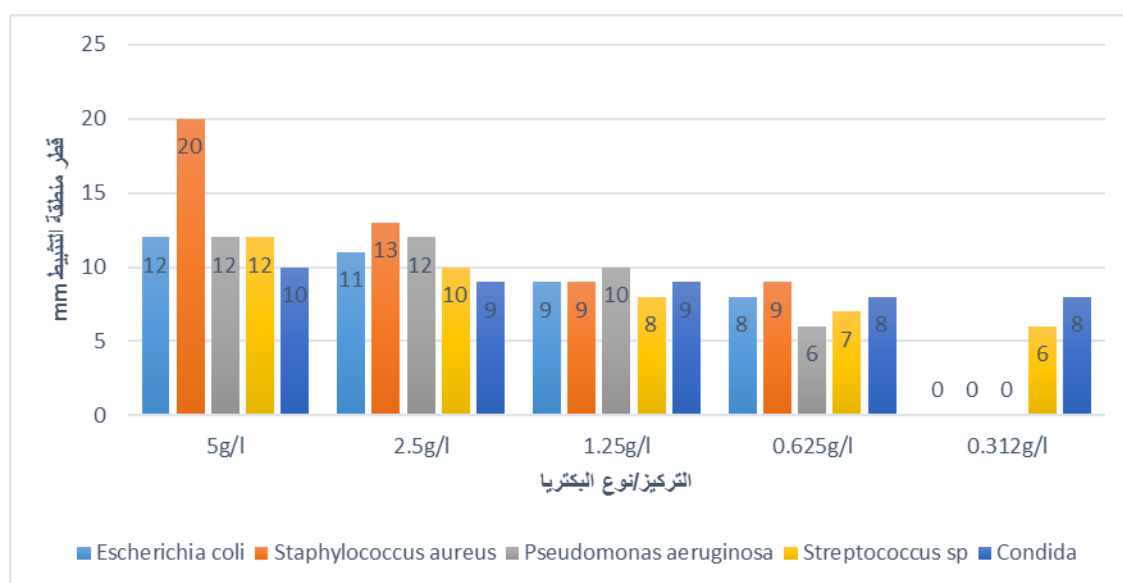
الشكل (02-V) مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

تشير النتائج المتحصل عليها الى أن مستخلص ثنائي ايثيل ايثر له فعالية ضد أنواع البكتيريا المختبرة، لكن هذه الفعالية تختلف من نوع الى آخر و يمكن ملاحظة ذلك عند التراكيز  $DE=2.5g/l$  /  $DE=5g/l$  أو عند تراكيز أكبر من ذلك، في حين أن التراكيز الأقل لا تسمح بإجراء مقارنة واضحة بين أنواع البكتيريا المختبرة لأن المستخلص لا يظهر فعالية مثلاً ضد

Escherichia coli عند التركيز  $DE=0.625g/l$

الجدول (07-V) قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص أسيتات الايثيل

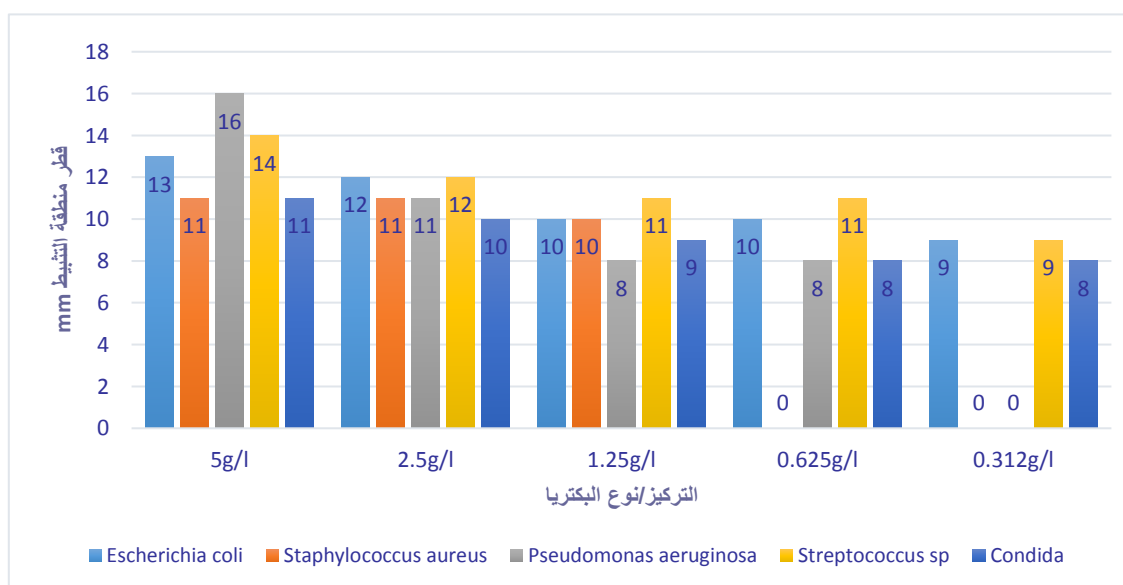
تركيز المستخلصات					الغرام	المكروبات
AE/16	AE/8	AE/4	AE/2	AE=5g/l		
00	08	09	11	12	-	Escherichia coli
00	09	09	13	20	+	Staphylococcus aureus
00	06	10	12	12	-	Pseudomonas aeruginosa
06	07	08	10	12	+	Streptococcus sp
08	08	09	09	10	فطر	Condida



الشكل (03-V) مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص أسيتات الايثيل مستخلص أسيتات الايثيل له فعالية ضد أنواع البيكتريا المختبرة، لكننا لاحظنا نفس الملاحظة السابقة بحيث أن هذه الفعالية تختلف من نوع الى آخر و يمكن ملاحظة ذلك عند التراكيز الأكبر من  $DE=0.625g/l$  ، في حين أن التراكيز الأقل لا تسمح بإجراء مقارنة واضحة بين أنواع البيكتريا المختبرة لأن المستخلص لا يظهر فعالية فقط ضد *Streptococcus sp* و *Condida*

## الجدول (08-V) قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص البيوتنول

تركيز المستخلصات					الغرام	المكروبات
nB/16	nB /8	nB /4	nB /2	nB =5g/l		
09	10	10	12	13	-	Escherichia coli
00	00	10	11	11	+	Staphylococcus aureus
00	08	08	11	16	-	Pseudomonas aeruginosa
09	11	11	12	14	+	Streptococcus sp
08	08	09	10	11	فطر	Condida



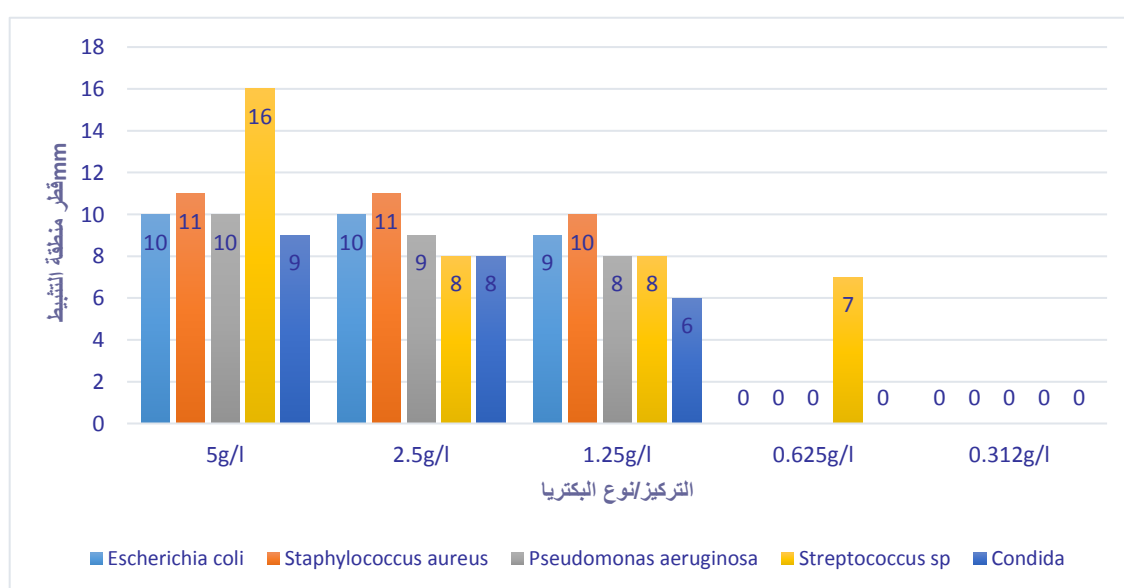
## الشكل (04-V) مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص البيوتنول

أظهر المستخلص فعالية كبيرة ضد *Escherichia coli* / *Streptococcus sp* / *Condida* حتى مع تراكيز صغيرة و فعالية أقل مع *Pseudomonas aeruginosa* / *Staphylococcus aureus*. المستخلصات الثلاثة: أسيتات الاثيل، ثنائي ايثيل ايثر و البيوتانول لها فعالية ضد بكتريا *Streptococcus sp* و *Condida* حتى مع تراكيز من رتبة **0.31g/l**. يمكن أن يعود سبب ذلك لاحتواء هذه المستخلصات على فلافونيدات أو مركبات فينولية ذو فعالية ضد هته البكتريا. عموماً لأجراء دراسة مقارنة لمختلف مستخلصات طلع الدكار على أنواع البكتريا المختبرة يجب اختيار تراكيز أكبر من **1.25g/l**.

## ب/ مستخلصات غلاف طلع الدقلة البيضاء

الجدول (09-V) قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

تركيز المستخلصات					الغرام	المكروبات
DE/16	DE/8	DE/4	DE/2	DE=5g/l		
00	00	09	10	10	-	Escherichia coli
00	00	10	11	11	+	Staphylococcus aureus
00	00	08	09	10	-	Pseudomonas aeruginosa
00	07	08	08	16	+	Streptococcus sp
00	00	06	08	09	فطر	Condida

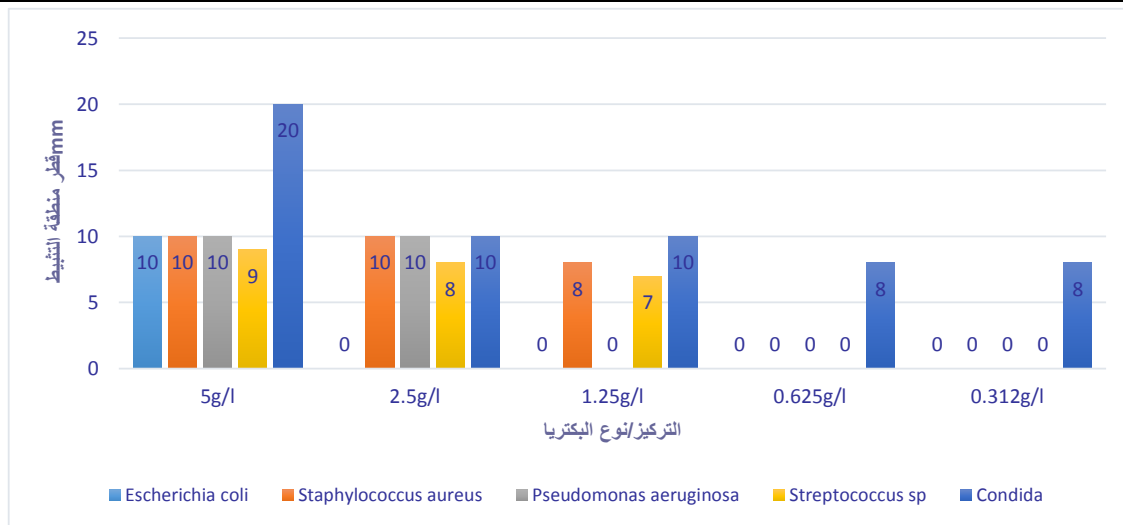


الشكل (05-V) مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

تشير النتائج المتحصل عليها الى أن مستخلص ثنائي ايثيل ايثر له فعالية ضد أنواع البيكتريا المختبرة، لكن هذه الفعالية تختلف من نوع الى آخر و يمكن ملاحظة ذلك عند التراكيز  $DE=1.25g/l$  /  $DE=2.5g/l$  /  $DE=5g/l$  / أو عند تراكيز أكبر من ذلك، و قد تصل الفعالية الى أكثر من ذلك كما هو الحال مع بكتريا Streptococcus sp عند التركيز  $DE=0.625g/l$

الجدول (10-V) قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص أسيتات الايثيل

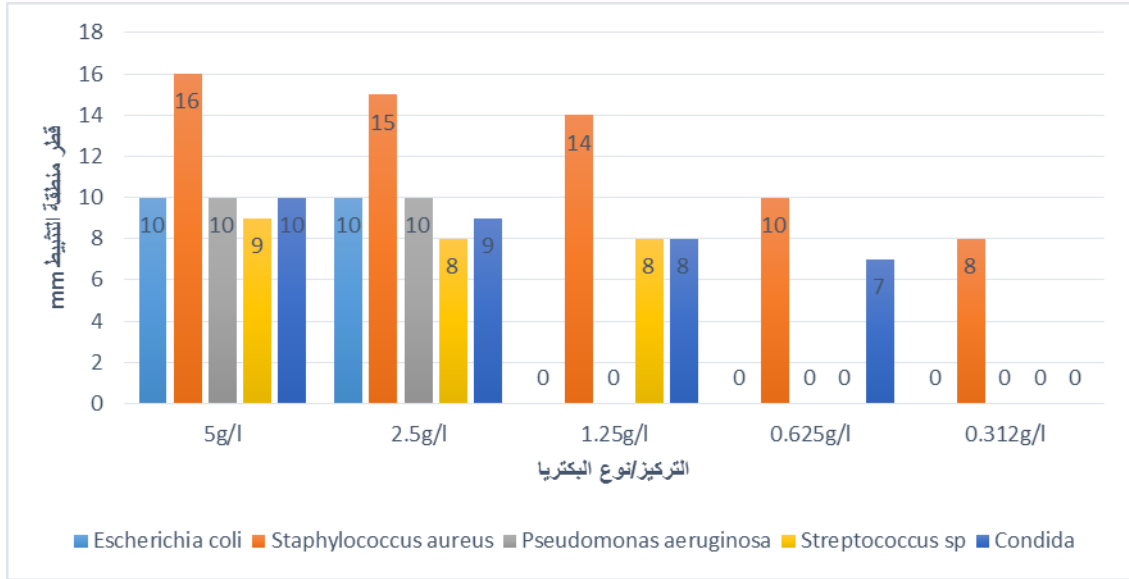
تركيز المستخلصات					الغرام	المكروبات
AE/16	AE /8	AE /4	AE /2	AE =5g/l		
00	00	00	00	10	-	Escherichia coli
00	00	08	10	10	+	Staphylococcus aureus
00	00	00	10	10	-	Pseudomonas aeruginosa
00	00	07	08	09	+	Streptococcus sp
08	08	10	10	20	فطر	Condida



الشكل (06-V) مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص أسيتات الايثيل مستخلص أسيتات الايثيل له فعالية ضد أنواع البيكتريا المختبرة، حيث أن هذه الفعالية تختلف من نوع الى آخر و يمكن مقارنة النتائج فقط عند التركيز الأكبر أو يساوي  $DE=5g/l$  ، في حين أن التراكيز الأقل لا تسمح بإجراء المقارنة.

الجدول (11-V) قطر التثبيط ب (ملم) لمستخلص البيوتانول

تركيز المستخلصات					الغرام	المكروبات
nB/16	nB /8	nB /4	nB /2	nB =5g/l		
00	00	00	10	10	-	Escherichia coli
08	10	14	15	16	+	Staphylococcus aureus
00	00	00	10	10	-	Pseudomonas aeruginosa
00	00	08	08	09	+	Streptococcus sp
00	07	08	09	10	فطر	Condida



الشكل (07-V) مقارنة بيانية لنتائج الفعالية المضادة للبكتريا لمستخلص البيوتانول

أظهر المستخلص فعالية كبيرة ضد *Staphylococcus aureus* حتى مع تراكيز صغيرة و فعالية أقل مع أنواع البكتريا الأخرى وقد يعود سبب ذلك لاحتوائها على مركبات فعالة ضد *Staphylococcus aureus*

#### 4. 1. V تحديد أدنى تركيز للتثبيط CMI في وسط صلب:

التركيز الأدنى للتثبيط CMI لعينات بكتيرية مختلفة يحدد عن طريق تخفيف المستخلص النباتي في وسط جيلوزي من (MH). حيث يعرف CMI بأنه أدنى تركيز من المضاد الحيوي لتثبيط نمو البكتيريا في مدة 24 ساعة.

#### - طريقة العمل:

- تحضير الوسط الجيلوزي ( MH ) وهذا بعد تعقيم الوسط .
- تحضير المعلق البكتيري بتركيز  $10^4$ UFC/ml إنطلاقاً من مزرعة بكتيرية حديثة من 18- 24 ساعة.
- تحضير المحاليل المخففة من المستخلصات من 10% إلى 0.15% في الوسط الجيلوزي.



**\* - طريقة التمديد:**

- نأخذ 5 مل من كل مستخلص في قارورة (1) ذات سعة 50 مل ونكمل بالوسط الجيلوزي (MH) إلى العلامة 50 مل فنحصل على تركيز 10% .
- نصب نصف محتوى القارورة (1) في قارورة (2) ونكمل حتى 50 مل من الوسط الجيلوزي (MH) فنحصل على تركيز 5% نتبع هذه الطريقة حتى نحصل على 0.15% .
- نسكب 15 مل من محتوى كل قارورة في علب بتري نجفف علب بتري في حاضنة تحت درجة حرارة 37°C مدة 30 دقيقة.
- نزرع في علب بتري بحقنة دقيقة ابتداء (micropipettes) من كل معلق بكتيري بمعدل 1µl بتركيز 10<sup>4</sup>UFC/ml توضع علب بتري في الحاضنة تحت 37°C لمدة 24 ساعة.

**- قراءة النتائج:**

- تحدد قيمة CMI بعد 24 ساعة
- نقرأ CMI أين لا يوجد نمو واضح للبكتيريا.
- لا نأخذ في الحسبان وجود مستعمرة أو مستعمرتين.

**- النتائج :**

الصورة (2-V) صورة تظهر نمو أو عدم نمو البكتريا

الجدول (12-V) أصغر تركيز للتثبيط (CMI) لمختلف مستخلصات طلع الدكار

المستخلصات			الغرام	المكروبات
n-butanol	Acétate d'éthyle	L'éther diéthylique		
0.05	0.05	0.1	-	Escherichia coli
0.05	0.05	0.1	+	Staphylococcus aureus
0.5	-	-	-	Pseudomonas aeruginosa
0.05	0.05	0.1	+	Streptococcus sp
0.06	0.06	0.06	فطر	Condida

الجدول (13-V) أصغر تركيز للتثبيط (CMI) لمختلف مستخلصات طلع الدقلة البيضاء

المستخلصات			الغرام	المكروبات
n-butanol	Acétate d'éthyle	L'éther diéthylique		
0.05	0.1	0.1	-	Escherichia coli
0.05	0.1	-	+	Staphylococcus aureus
-	-	-	-	Pseudomonas aeruginosa
0.05	0.1	0.1	+	Streptococcus sp
-	-	-	فطر	Condida

من خلال النتائج المتحصل عليها نلاحظ

-عموماً فعالية مستخلصات ثنائي ايثيل ايثر لكلا النباتين أضعف من المستخلصات الأخرى لأن (CMI) لهذه الأخيرة أكبر من (CMI) مستخلصات البيوتانول علماً أن كلما كانت قيمة CMI صغيرة كلما كان للمستخلص فعالية كبيرة اتجاه البكتيريا.

-مستخلص n-butanol لطلع الدكار له فعالية كبيرة ضد *Escherichia coli* /*Staphylococcus aureus* و *Streptococcus sp* و فعالية أضعف ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و هذا المستخلص هو الأحسن من بين المستخلصات المدروسة، يفسر ذلك باحتواء المستخلص على مركبات لها فعالية متباينة ضد هته البكتريا.

- مستخلصات طلع الدكار أكثر فعالية من مستخلصات طلع الدقلة البيضاء

#### الخلاصة:

بناءً على النتائج المتحصل عليها يمكن أن نخلص الى أن لمستخلصات غلاف طلع الدكار و مستخلصات غلاف طلع الدقلة البيضاء لها فعالية على بعض الميكروبات لكن هذه الفاعلية مختلفة تبعاً لنوع المركبات الموجودة في المستخلص أو لنسبة تواجد هذا المركب في المستخلص في حد ذاته.

## V -2- دراسة الفعالية ضد السكري

### V. 2. 1- المواد و الوسائل:

#### V. 1. 2. 1-المادة النباتية:

المادة النباتية (أغلفة طُلوغ دكار نخيل التمر - Les spathes de mâle du palmier dattier) المستعملة في هذه الدراسة هي نفسها المستعملة في الفصل السابق.

#### V. 2. 1. 2-تحضير المستخلص المائي:

يتم استخلاص المادة النباتية بالماء المقطر الساخن لمدة لا تقل عن نصف ساعة [01] ، أو باستعمال جهاز سوكسليه مع كميات صغيرة من المادة النباتية [02]، يتم جمع المستخلص و تركيزه بجهاز rotavapora عند 40°C [03] ثم يحفظ المستخلص عند 4م<sup>0</sup>

#### V. 3. 1. 2-العينات الحيوانية المستعملة:

استعملنا جردان من نوع rats wistar من كلا الجنسين تزن ما بين 140-190غ و تم اقتنائها من معهد باستور بالجزائر بحيث كان عمر أصغرها شهرين وتركت لمدة معينة كي تتأقلم مع ظروف البحث. بحيث كانت تتعرض للضوء و الظلام بشكل طبيعي، و درجة حرارة مناسبة. تم تقسيم الجردان الى أربع مجموعات و كل مجموعة بها 5 جردان.

- المجموعة الأولى: جردان سليمة من المرض

- المجموعة الثانية: جردان مصابة بداء السكري مع متابعة بالانسولين.

- المجموعة الثالثة: جردان مصابة بداء السكري تعامل بمستخلص مائي 100 ملغ لكل كلغ من وزن الجرد

- المجموعة الخامسة: جردان مصابة بداء السكري تعامل بمستخلص مائي 200ملغ لكل كلغ من وزن الجرد

- المجموعة الرابعة: جردان مصابة بداء السكري تركت دون علاج.

استعملنا streptozotocine (STZ) لاصابة الجردان بداء السكري و هو مركب واسع الاستعمال لاحداث مرض السكري على عدة أنواع من الحيوانات لأن له سمية خاصة اتجاه خلايا جزر لانجرهانس في البنكرياس [02] كما أثبت تجريباً أن (STZ) يحدث داء سكري نموذجي بناءً عن الجرعة المأخوذة. تم احداث مرض السكري بوضع (STZ) في محلول للحقن tampon de citrate (pH 4,5) من أجل حقن intrapéritonéale للجردان بـ (STZ) 40 ملغ لكل كلغ من وزن الجرد [02] أو (50 ملغ لكل كلغ) (Like et Rossini 1976) [05] [04]، نترك الجردان صائمة ليوم كامل ثم نعطيها محلول الجلوكوز بتركيز

20% لمدة 24 ساعة لمنع موت الجردان الذي يسببه حقن STZ للحيوانات، ونتأكد من سكري الجردان عن طريق قياس تركيز السكر في الدم أثناء الصيام، وتعتبر العينات جاهزة للتجارب عند بلوغ مستوى السكر في الدم أكثر من (240 mg / dL)

يتم تغذية الجردان بالمستخلصات بأنبوب عن طريق الفم بعد حساب الكمية اللازمة لكل عينة و تسخين المحلول المغذي قليلا ، ثم يتم متابعة نسبة السكر في الدم لفترات زمنية معينة.

مراقبة و علاج مرض السكري و مضاعفاته يعتمد أساساً على متابعة عوامل كيميائية و بيوكيميائية [02] لذلك لجئنا لقياس نسبة السكر في الدم بالجهاز On call Plus



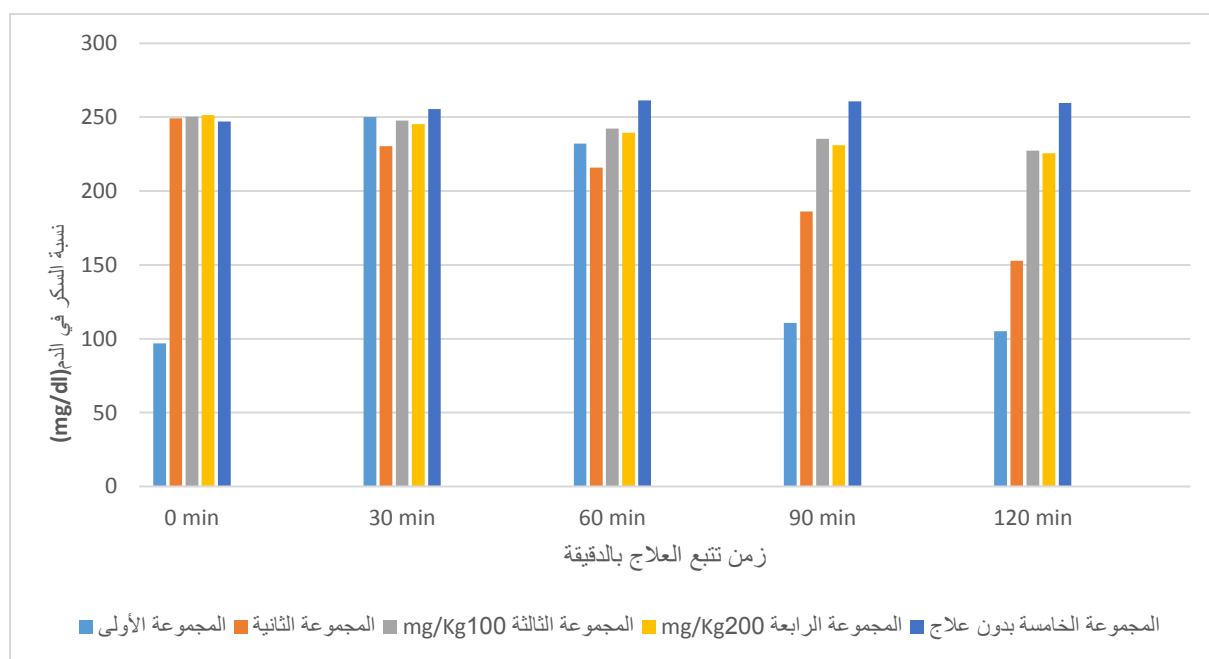
الصورة (3. V) جهاز قياس نسبة السكر في الدم

## 2. 2. V- نتائج و مناقشة

قبل بدء العلاج يجب ترك الجردان صائمة لمدة لا تقل عن 12سا [02] ، أو لمدة 18سا مثلاً [06] و نحن اخترنا 12سا

الجدول (14-V) نتائج قياس نسبة السكر في الدم

نسبة السكر في الدم (ملغ/دل)					المجموعة و المستخلص
120 دقيقة	90 دقيقة	60 دقيقة	30 دقيقة	0 دقيقة	
105.2	110.8	232	250.1	96.8	المجموعة الأولى
152.85	186.10	215.82	230.7	249.20	المجموعة الثانية
227.33	235.40	242.19	247.6	250.2	المجموعة الثالثة 100ملغ/كغ
225.7	230.91	239.38	245.21	251.49	المجموعة الرابعة 200ملغ/كغ
259.54	260.62	261.43	255.60	247.1	المجموعة الخامسة بدون علاج



الشكل (08-V) تأثير المستخلص على نسبة السكر في الدم

- من خلال النتائج المتحصل لاحظنا ارتفاع نسبة السكر في الدم لدى الجردان السليمة بعد نصف ساعة من تناول المادة المغذية الى أن تصل ( 250ملغ/دسل) ثم تتراجع الى المجال الطبيعي وهذا راجع الى وجود بنكرياس سليمة تعمل على تعديل التغير في نسبة السكر في الدم.
- نسبة السكر في الدم تراجعت في المجموعة الثانية بفضل الأنسولين.

- ازدياد نسبة السكر في الدم في المجموعة الثالثة و الرابعة يعود الى تناول المادة المغذية ثم تتراجع هذه النسبة قليلاً و يعود سبب ذلك الى وجود بعض مركبات الأيض الثانوي في المستخلص النباتي مثل الفلويديات، الفلافونيدات و غيرها [07]. حيث أن التحليل الكروماتوغرافي في الفصل العملي الأخير يشير الى وجود الفلافونيدات مثل: أوريونتتين ، كرسيتين و كاتشين في الجزء النباتي المستعمل، و بالتالي قد يكون لها تأثير مباشر أو غير مباشر لخفض نسبة السكر في الدم.

-في المجموعة الخامسة نسبة السكر في الدم في تزايد مستمر نظراً لعدم وجود عامل يقلل منها و هذا ما يؤثر سلباً على نشاط و حياة الجردان.

يمكن دعم تفسير انخفاض نسبة السكر في الدم لدى الفئران المعالجة بالمستخلصات و عدم تطور المرض بشكل سريع لما توصلت له الأبحاث التالية:

هناك أدلة على أن من مضاعفات ارتفاع نسبة السكر في الدم تولد أكسجين فعال كيميائياً، قد يؤدي إلى حدوث الأكسدة في الأنسجة المختلفة، بما في ذلك الأوعية الدموية. و نظراً لقدرة مضادات الأكسدة على الحماية ضد الآثار الضارة لارتفاع السكر في الدم وأيضاً لتحسين ايض الجلوكوز فمن المحتمل أن تساعد الفلافونيدات على الحد من تطور مضاعفات داء السكري من النوع2 [08] كما توصل LIDAO BAO ( و آخرون 2016) الى أن الفلافونيدات المستخرجة من *Lomatogonium rotatum* تساعد على تخفيض الدهون في الدم. [09].

و في الولايات المتحدة الأمريكية توصل مجموعة من العلماء (Oran Kwon و آخرون 2006) الى أن وجود الفلافونيدات كرسيتين و ميريسيتين (Quercetin, myricetin) في الاغذية و الخضروات يقلل من امتصاص الفركتوز و الجلوكوز في الأمعاء [10] و توصل الباحث Republic of Korea ( و آخرون 2014) في الجمهورية الكورية مخبرياً الى أن أوريونتتين يقلل من التهاب الأوعية الدموية و كذلك تصلب الشريين الناتجين عن ارتفاع نسبة السكر في الدم [11]

تشير النتائج المتحصل عليه من طرف Abeer M. El Sayed (و آخرون 2016) الى أن مستخلصات الميثانول من نبات الصبار في مصر لها تأثير ايجابي على الالتهابات و يحد من تطور الجروح لدى مرضى السكري خلال عشرة أيام. من جهة أخرى أثبت التحاليل الكروماتوغرافية لهذه المستخلصات على احتوائها على بولي فينولات مثل: أوريونتتين ، فيسينين و ايزوفيتوكسين [12] كما ذكر Kit Ying Lam (و آخرون 2016) يمكن أن يكون أوريونتتين أحد العوامل العلاجية المفيد للسمنة والسكري من النوع 2 ، و قد وجد أيضاً أن المعالجة بـ أوريونتتين يقلل من مضاعفات داء السكري مثل تصلب الشريين و تعقيدات التصاق الجزيئات بالخلايا و تفاعلات الأكسجين بالجسم [13]

أظهرت نتائج البحث الذي قام به Hussain S. A ( و آخرون 2012) بأن تناول فلافونيد كرسيتين يقلل بشكل فعال من ارتفاع نسبة السكر في الدم و قد يعود سبب ذلك الى تثبيط انزيم  $\alpha$ -glucosidase [14] و من المفيد أيضاً استعمال كرسيتين (Quercetin) حتى في فترة ما قبل السكري لتأخير الإصابة

به و لحماية الخلايا  $\beta$  و زيادة افراز الأنسولين [15][16][17] كما تم ذكر الأثر العلاجي للكروستين على داء السكري من النوع 2 و السمنة [18] [19] وتقدم دراسة Rehab Ahmed Rifaai (2012) دليلا على أن كيرسيتين يمكن أن تمارس تأثير وقائي ضد تلف الخلايا  $\beta$  ويساعد على تجديدها [20][21][22][23][24][25][26]

Nilüfer ŞENDOĞDU (و أخرون 2006) المستخلص الكحولي الخام لـ *Vitis vinifera L* يحتوي على مشتقات الكاتشين و ايبيكاتشين تساعد على إعادة تنشيط الخلايا بيتا في البنكرياس بصفة وظيفية لدى الفئران المصابة بداء سكري تجريبي، بالإضافة الى التأثير الملحوظ في الكبد والكلى والأنسجة الحيوية. [27]

و قد ذكر Samuel Legeay (و أخرون 2015 ) بأن أحد مشتقات الكاتشين و هو ابيقالوكاتشين قالات يساعد على خفض نسبة السكر في الدم و له تأثير مفيد ضد المضاعفات المصاحبة لداء السكري مثل ضغط الدم في العين و اعتلال الكلية و غيرها [28][29] و في البحث الخاص بـ *Rhododendron groenlandicum* لـ (Meriem Ouchfoun 2010) تم التوصل الى أن الكروستين ، كاتشين و ايبيكاتشين مركبات نشطة بيولوجياً و لها تأثير مضاد للسكري، بالإضافة الى أن مشتقات كاتشين و ايبيكاتشين تساعد على تفعيل تشكيل الدهون في الجسم. [30]، كما أن الشاي الأخضر الغني بالكاتشين يؤثر على نسبة السكر في الدم و وضائف الكلى و الكبد لدى الفئران المصابة بداء السكري [31]

### 3. 2. V- الخلاصة:

في انتظار التوصل الى نتائج أخرى تدعم ما سبق يمكننا تفسير تحسن الحالة الصحية بالنسبة للأشخاص الذين استعملوا هذا الجزء من النبات كعلاج تقليدي لداء السكري بوجود فلافونيدات (مثل: أوريونتين ، كروستين و الكاتشين ) أو مركبات أخرى تقلل من مضاعفات المرض.

## 4. 2. V -المراجع:

- [01] M. Eddouks, A. Lemhadri, J.B. Michel, Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology* 94 (2004) 143–148.
- [02] Sekar Subashini, Kodukkur Viswanathan Pugalendi, Krishnan Baskaran, Evaluation of anti-hyperglycemic effect of *Gracilaria corticata* extract in Normal and Streptozotocin -induced Diabetic rat, *Chemical Biology LETTER*, 2015, 2(1), 6-11
- [03] Jabbar A. A. Al-Sa'aidi and Basim Ali Kraidi Al-Shihmani, Antihyperglycaemic and pancreatic regenerative effect of nbutanol extract of celery (*Apium graveolens*) seed in STZinduced diabetic male rats, *SCVMJ*, XVIII (1) 2013, 71-85
- [04] Purusotam BASNET,, Shigetoshi KADoTA, Mineo SHIMIZU,b Hong-Xi Xu, Tsuneo NAMBA, 2'-Hydroxymatteucinol, a New (LMethyl Flayanone Deriyativefrom *Matteecia orientatis*; Potent Hypoglycemic Actiyity in Streptozotoc, (STZ)-Induced Diabetic Rat, *Chem. Pharm. Bull.* 41(10)1790-1795 (1993).
- [05] N. OMARI, Y. DAHMANI-AÏT AKLI , F. LABROUSSE, F. HADJ BEKKOUCHE, Influence de la streptozotocine sur l'axe corticotrope du rat Wistar (*Rattus norvegicus*), *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, V 80, 2011, p. 907 – 938
- [06] Saidu, A.N and Okorochoa, S.C, Phytochemical Screening and Hypoglycemic Effect of Methanolic Extract of *Gongronema Latifolium* Leaf in Alloxan Induced Diabetic Rats, *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences (JETEAS)*,2013,4(6):855-858.
- [07] Mathieu Ndomou, Patricia Kammegne Djidjou, Moise Ntah Ayong, Evaluation de l'activite antidiabetique des extraits de feuilles de *Gnetum africanum* et *Gnetum bulchozzianum* (Gnétacées), *Sciences, Technologies et Développement*,2014,Volume15,pp60-65
- [08] E. Nicolle, F. Souard, P. Faure , A. Boumendje , Flavonoids as Promising Lead Compounds in Type 2 Diabetes Mellitus: Molecules of Interest and Structure-Activity Relationship, *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18, 2661-2672
- [09] LIDAO BAO, LIXIA HU, YING ZHANG, YI WANG, Hypolipidemic effects of flvonoids extracted from *Lomatogonium rotatum*, *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 11: 1417-1424, 2016
- [10] Oran Kwon, Peter Eck, and all, Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids, *The FASEB Journal*, Vol. 21 February 2007, 366-377
- [11] Sae-Kwang Ku, Soyoung Kwak, and Jong-Sup Bae, Orientin Inhibits High Glucose-Induced Vascular Inflammation In Vitro and In Vivo, *Inflammation* ( 2014)



- [12] Abeer M. El Sayed , Shahira M. Ezzat , Moataz M. El Naggar , Seham S. El Hawary, In vivo diabetic wound healing effect and HPLC–DAD–ESI–MS/MS profiling of the methanol extracts of eight Aloe species, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26 (2016) 352–362
- [13] Kit Ying Lam , Anna Pick Kiong Ling, Rhun Yian Koh, Ying Pei Wong, and Yee How Say, A Review on Medicinal Properties of Orientin, *Pharmacological Sciences Volume* 2016, 09
- [14] Hussain S. A, Ahmed Z. A, Mahwi T. O, Aziz T. A, Quercetin Dampens Postprandial Hyperglycemia in Type 2 Diabetic Patients Challenged with Carbohydrates Load, *International Journal of Diabetes Research* 2012, 1(3): 32-35,
- [15] Guillaume BARDY, Effets insulino-sécrétoires et protecteurs de la quercétine au niveau de la cellule  $\beta$  pancréatique. Implication du calcium intracellulaire et de ERK1/2, L'UNIVERSITE MONTPELLIER 1, décembre 2012
- [16] RAMULU JADHAV, GOVERDHAN PUCHCHAKAYALA, HYPOGLYCEMIC AND ANTIDIABETIC ACTIVITY OF FLAVONOIDS: BOSWELLIC ACID, ELLAGIC ACID, QUERCETIN, RUTIN ON STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE INDUCED TYPE 2 DIABETIC RATS, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 4, Issue 2, 2012
- [17] Omer Coskun, Mehmet Kanter, Ahmet Korkmaz, Sukru Oter, Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and -cell damage in rat pancreas, *Pharmacological Research* 51 (2005) 117–123
- [18] Shuang Chen, Hongmei Jiang, Xiaosong Wu, and Jun Fang, Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type2 Diabetes, *Mediators of Inflammation*, Volume 2016, P5.
- [19] Jamshid Narenjkar, Mehrdad Roghani, Hanieh Alambeygi, Farnoosh Sedaghati, The Effect of the Flavonoid Quercetin on Pain Sensation in Diabetic Rats, *NEUR SCINCE*, Spring 2011, Volume 2, Number 3.
- [20] Rehab Ahmed Rifaai, Nashwa Fathy El-Tahawy, Entesar Ali Saber and Randa Ahmed, Effect of Quercetin on the Endocrine Pancreas of the Experimentally Induced Diabetes in Male Albino Rats: A Histological and Immunohistochemical Study, *Diabetes & Metabolism*, 2012, 3:3.
- [21] M A Abdelmoaty, M A Ibrahim , N S Ahmed, and M A Abdelaziz, CONFIRMATORY STUDIES ON THE ANTIOXIDANT AND ANTIDIABETIC EFFECT OF QUERCETIN IN RATS, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2010 / 25 (2) 188-192.
- [22] Mona F. Mahmoud, Noura A. Hassan, Hany M. El Bassossy, Ahmed Fahmy, Quercetin Protects against Diabetes -Induced Exaggerated Vasoconstriction in Rats: Effect on Low Grade Inflammation, *PLOS ONE*, May 2013 , Volume 8, Issue 5

- [23] Piyasi Mukhopadhyay and A. K. Prajapati, Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers – a review, *Journal of Royal Society of Chemistry* 2015, 5, 97547–97562.
- [24] Leixuri Aguirre, Noemi Arias, M. Teresa Macarulla, Ana Gracia and Maria P. Portillo, Beneficial Effects of Quercetin on Obesity and Diabetes, *The Open Nutraceuticals Journal*, 2011, 4, 189-198.
- [25] Mariana Torres-Piedra , Rolffy Ortiz-Andrade and all, A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 2606-2612.
- [26] Arash Khaki, Fatemeh Fathiazad, and all, Beneficial Effects of Quercetin on Sperm Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats, *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, (2010).
- [27] Nilüfer ŞENDOĞDU, Mustafa ASLAN, Didem DELİORMAN ORHAN, Fatma ERGUN, Erdem YEŞİLADA, ANTIDIABETIC and ANTIOXIDANT EFFECTS of *Vitis vinifera* L. LEAVES in STREPTOZOTOCIN-DIABETIC RATS, *Turkish J. Pharm. Sci.* 3 (1), 7-18, 2006
- [28] Samuel Legeay , Marion Rodier, Laetitia Fillon , Sébastien Faure and Nicolas Clere, Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome, *J Nutrients* 2015, 7, 5443-5468
- [29] Pooja Bhardwaj, Deepa Khanna, Pitchai Balakumar, Catechin Averts Experimental Diabetes Mellitus-Induced Vascular Endothelial Structural and Functional Abnormalities, *Cardiovasc Toxicol* (2014) 14:41–51
- [30] Meriem Ouchfoun, Validation des effets antidiabétiques de *Rhododendron groenlandicum*, une plante médicinale des Côtes de la Baie James, dans le modèle in vitro et in vivo, Université de Montréal, 2010.
- [31] Usama El-Sayed Mostafa, Effect of Green Tea and Green Tea Rich with Catechin on Blood Glucose Levels, Serum Lipid Profile and Liver and Kidney Functions in Diabetic Rats, *Jordan Journal of Biological Sciences*, Volume 7, ISSN 19951, March 2014. P7-12

الفصل السادس

كروماتوغرافيا الطور

المسائل ذي الكفاءة

العالية و مطيافية

الكتلة

## VI\_ كروماتوغرافيا الطور السائل ذات الكفاءة العالية و مطيافية الكتلة

### VI -1. المواد و الطرائق:

#### VI.1.1.الأجهزة:

تم استعمال أجهزة HPLC/MS/MS الموجود بالمركز البيوتكنولوجي بصفاقس - تونس - و المزود بعمود الفصل **zorbax eclips C18** (15cm x 6mm x 5µm)

#### VI.2.1. الشروط التجريبية:

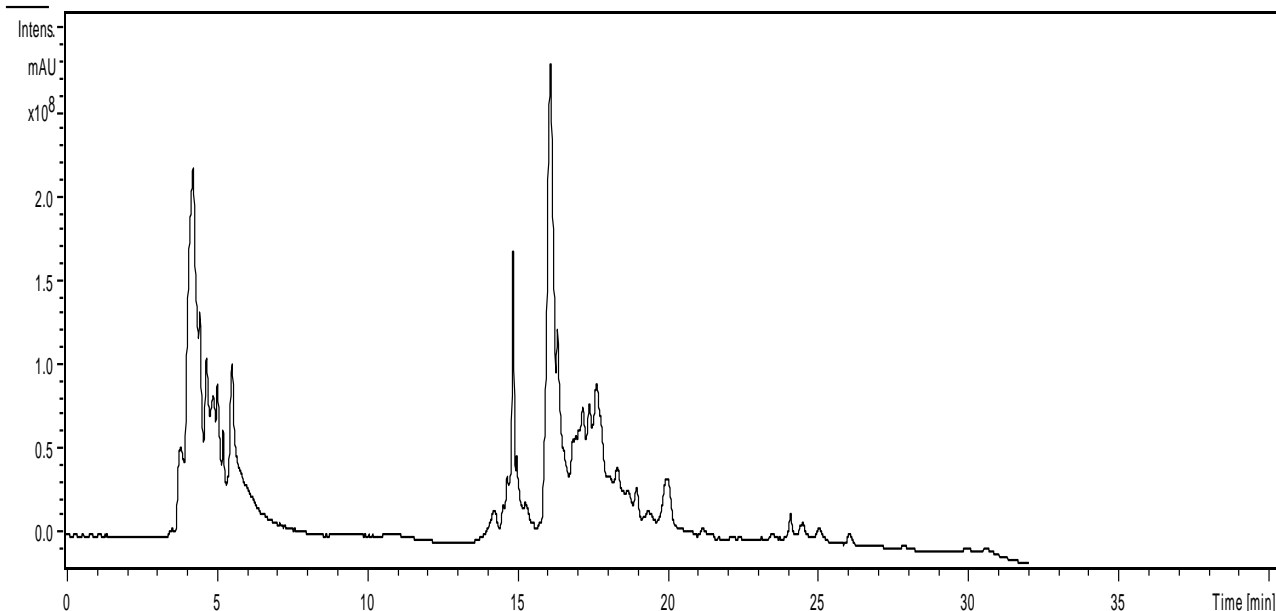
- تدفق العمود: 400.00 ميكروليتر/دقيقة = 0.4 ملل/د
- وقت التوقف: 32.00 دقيقة.
- المذيب A1 %80.00 (ماء+0.1% حمض الايثانويك).
- المذيب A2 %20.00 (أسيتونتريل+0.1% حمض الايثانويك).
- الكاشف : Agilent 1100 Diode Array Detector
- مجال المسح 200 نانومتر الى 700 نانومتر



الصورة (1-VI) صورة لجهازي كروماتوغرافيا الطور السائل ذات الكفاءة العالية و مطيافية الكتلة

## 2.VI. نتائج و مناقشة:

## 1.2.VI. مستخلص ثنائي ايثيل ايثر للذكار



الشكل (1-VI) كروماتوغرام HPLC لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر للذكار

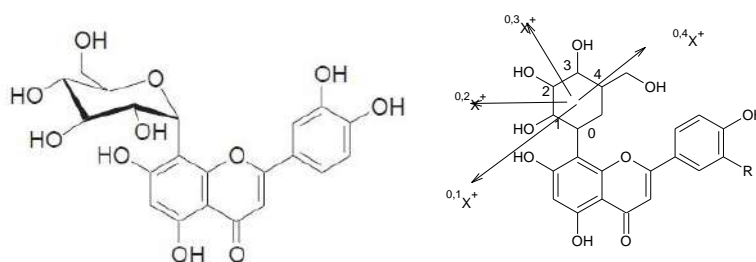
## 1.1.2.VI القمم 12، 02، 04:

تم تصنيف هذه القمم في نفس الجدول نظراً لتكرار ظهور بعض قيم الشظايا فيما بينها.

الجدول (1-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

المرکبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز t <sub>R</sub> (min)	القمم
أوريونتين (Orientin) (Luteolin- di- glycoside)	324.9	[M-H] <sup>-</sup> 446.8, 418.8, 396.8, 360.9, 326.9, 307.0, 236.9, 166.8, 112.8	325	17.6	12

مشتقات أوريونتين (Orientin)	449.8, 256.1, 237.5, 69	844.6, <b>360.7</b> , 336.7, 276.8, 248.8, 186.9, 112.9,	<b>250</b>	<b>3.4</b>	<b>02</b>
	443.5, 311.8 , 170.8, 124.9, 113.5	611, 458.5, 316.8, 216.9, 187, 112.9	<b>280</b>	<b>4.8</b>	<b>04</b>
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-4H-chromen-4-one					
<b>مركبات تم تحديدها سابقا</b>					
1/Luteolin-di-glycoside derivative m/z 447, 357, 327 [01]					
2/Orientin m/z 447, 357, 327, 285 [02]					
3/ Orientin m/z 447, 357 [(M-H)-90], 327[(M-H)-120], [01]					
4/luteolin-(7-O-glucopyranosil)-8-C-glucopyranoside (orientin-7-O-glucoside) m/z 447, 357, 327, [01]					
5/luteolin 8-C-β-D-glucopyranoside (orientin) m/z 447, 357, 326.9 [03]					

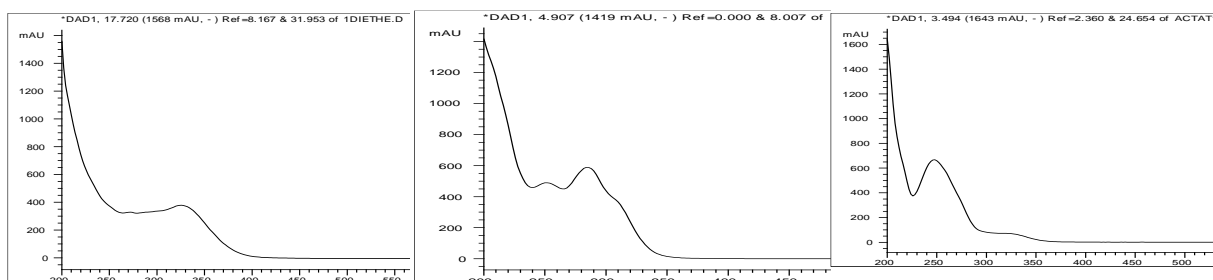


الشكل (2-VI) بنية أوريونتين (Orientin)

الشظية ( $m/z 447$ ) هي شظية مميزة للمركب أوريونتين كما هو مبين في الجدول السابق، بالإضافة إلى الشظية 418.8 الناتجة عن فقد الجزء ( $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) أو ( $\text{CO}$ )، 360 ناتجة عن فقد  $[(\text{M}-\text{H})-90]$  و 327 ناتجة عن  $[(\text{M}-\text{H})-120]$ ، 309 ناتجة عن فقد جزيئة ( $\text{H}_2\text{O}$ )  $[(\text{M}-\text{H})-120-18]$ ، كما أنه يمكن أن تظهر شظايا أخرى ناتجة عن تفكك جزء الجليكوزون وفق  $^{0.4}\text{X}^+$ ،  $^{0.2}\text{X}^+$ ،  $^{0.1}\text{X}^+$

من جهة أخرى فإن وجود الشظايا الظاهرة في القمة 12 (360.9، 112.8)، 02 (446.8، 236.9) و القمة (112.8، 360.7، 449.8 / 186.9،

و القمم (458.8، 336.7) و القمم (112.8 و 360.9 / 187.0، 458.5) تبين وجود علاقة بين مركبات القمم 02 و 04 و مشتقات أوريونتين

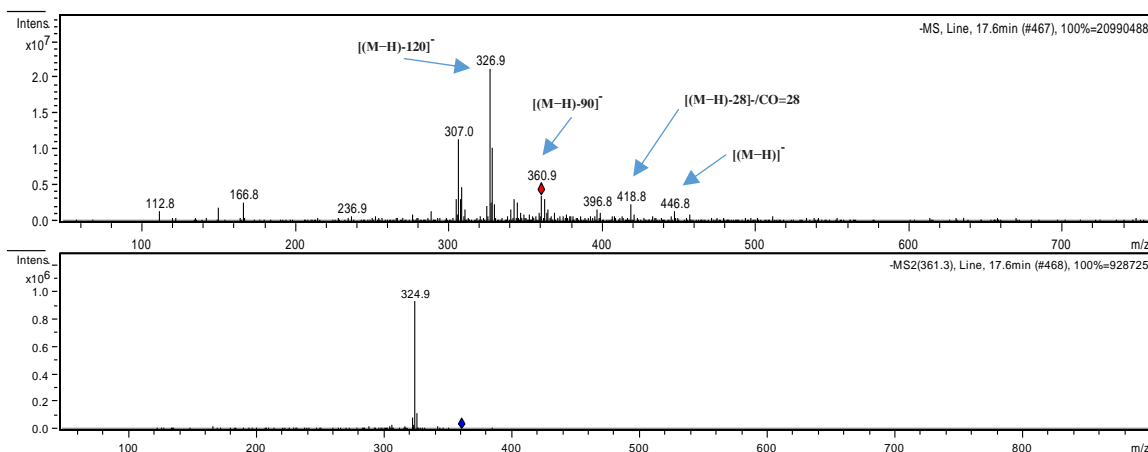


طيف UV القمة 12

طيف UV القمة 04

طيف UV القمة 02

الشكل (3-VII) أطيف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات أوريونتين (Orientin)



الشكل (4-VI) طيف الكتلة لـ أوريونتين (Orientin)

### VI.2.1.2. القمم 08، 09، 10، 11:

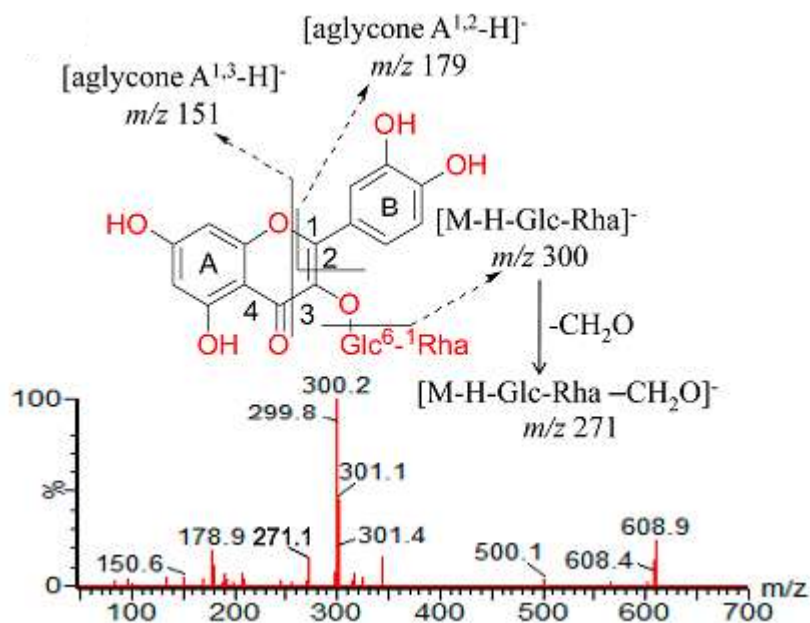
أطيف هذه المركبات أو القمم تتشارك في بعض القيم.

الجدول (2-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

المركبات الغلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة λ (nm)	زمن الاحتجاز t <sub>R</sub> (min)	القمة
كرسيتين	182.9,165	[M-H] <sup>-</sup>	250	15.1	08

Quercetin		404.8,388.8, <b>327.1</b> ,293,308,299, <b>282.9</b> ,272,268.9, <b>248.8</b> ,227, <b>213</b> , <b>165</b> ,150,147,137			
كروسيٲين Quercetin	218.9,236.9	[M-H] <sup>+</sup> 382.9,366.9,350.9, <b>327.0</b> ,308.9, <b>299.9</b> ,276.9, <b>272</b> , <b>254.9</b> , <b>246</b> , <b>236.9</b> , <b>227</b> , <b>212</b> ,199,180,134	<b>230</b> <b>280</b>	<b>16.2</b>	<b>09</b>
كروسيٲين Quercetin	348.9,332.9, <b>315</b> ,280,252.9,235	[M-H] <sup>+</sup> 366,350.9, <b>299</b> , <b>272</b> , <b>275</b> , <b>254.9</b> , <b>236.9</b> , <b>213</b>	<b>260</b> <b>330</b>	<b>16.8</b>	<b>10</b>
كروسيٲين Quercetin	272.9, 188.9, 157, 130, 106.9	412.9, 350.9, 330.9, 309, 291, 253, 213, 196.9, 152.9		<b>17.4</b>	<b>11</b>
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one					
<b>مركبات تم تحديدها سابقا</b>					
Quercetin-hexoside m/z <b>[300.9]</b> :178.8,150.8, 106.9, 120.8, 272.9, 228.9, 256.8; Quercetin-3-O-rhamnoside m/z <b>[300.9]</b> :178.8,150.8, 106.9, 120.8, 272.9, 228.9, 256.8; Quercetinuronic acid m/z [300.9]:178.8,150.8, 106.9, 272.9, 228.9, 256.9, 192.8, 168.8 <b>[04]</b> Quercetin m/z 301,179, 151 ;Quercetin 7-O-glucoside-3-O-rutinoside m/z 463, 301,179, 151 ;Rutin m/z 301,179, 151 <b>[05]</b> Rutin m/z 300,271,179 ,151 ; quercetin m/z 273,255,151,133 <b>[06]</b> Quercetin-O-hexoside 301, 273, 179, 151 ; quercetin-3-O-β-Dgalactopyranoside 301, 273, 179, 151 <b>[07]</b> Quercetin ; quercetin-3-O-galactoside ; quercetin-3-O-glucoside ; quercetin-3-O-glucuronide ; rutin (querc-3-O-rutinoside) 300.0284 ;151.0036 <b>[08]</b> Quercetin m/z 303,285,275,247,257,229,153,149,165,137 <b>[09]</b> Quercetin 3-O-galactoside m/z 301.0342, 300.0270, 273.0054,178.9968, 151.0038 <b>[10]</b>					

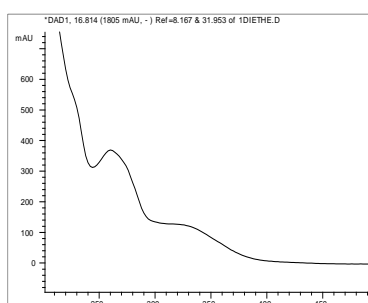




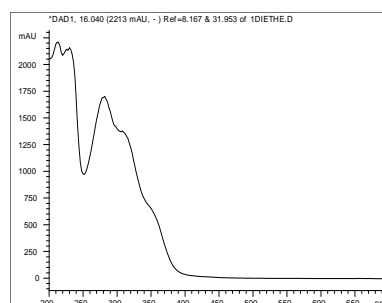
الشكل (5-VI) طيف الكتلة و شطايا الكرسيتين (Quercetin) (06)

القمم 08، 09 و 10 تشير الى وجود مشتقات الكرسيتين بناءً على مقارنة زمن الاحتجاز (Rt) و أطيف الكتلة لها مع بيانات تم التوصل اليها مسبقاً، بحيث أن الشطايا  $m/z$  137,272,300 و 165 تعتبر شطايا مميزة لـ مشتقات الكرسيتين ، كما أن الأيونات الجزئية  $m/z$  227,229 تنتج عن التفكك  $([M+H^+-H_2O-2CO]^+)$  و  $([M-H^- - H_2O-2CO]^-)$  على التوالي.

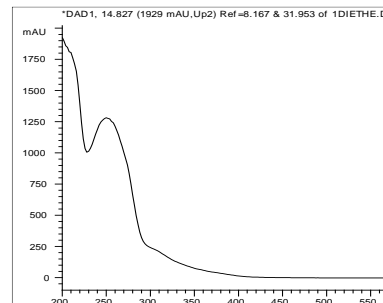
من جهة أخرى فان مركبات القمم الثلاث تمتلك شطايا تفوق القيمة  $m/z$  300 مثل 388 بالنسبة لمركب القمة 08 و التي تشير الى وجود جزء أجلكون (Aglycone) مرتبط بنواة الكرسيتين (Quercetin)



طيف UV للقمة 10

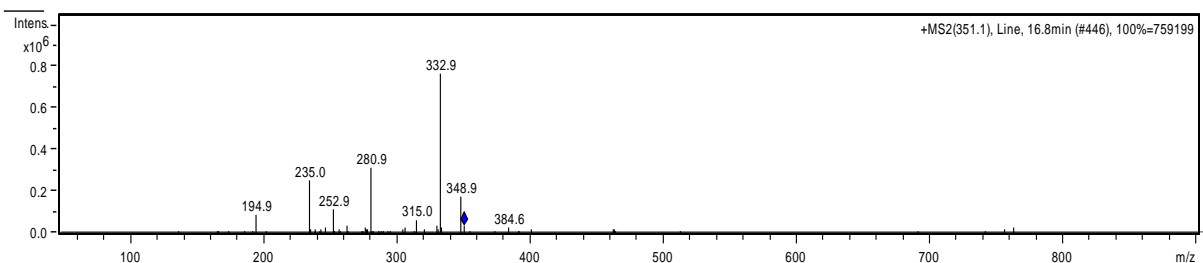
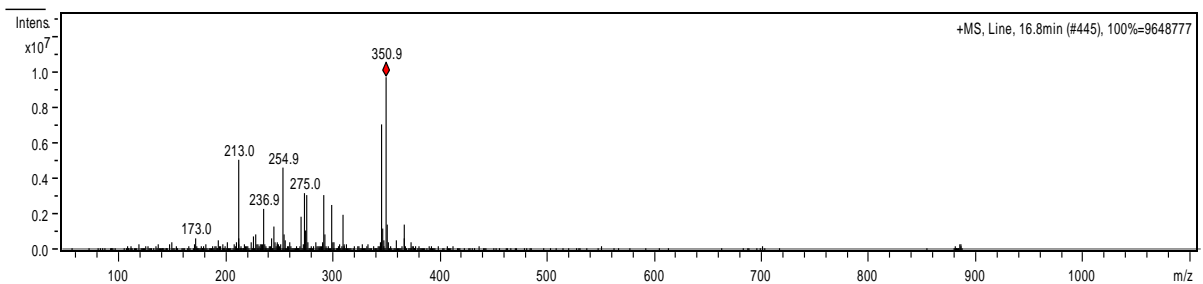
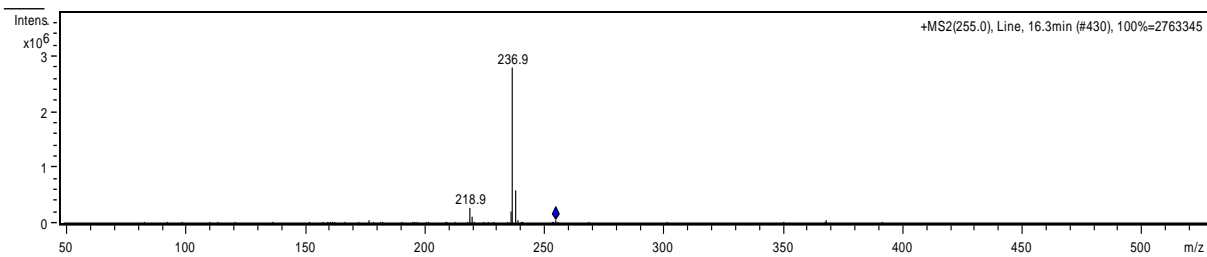
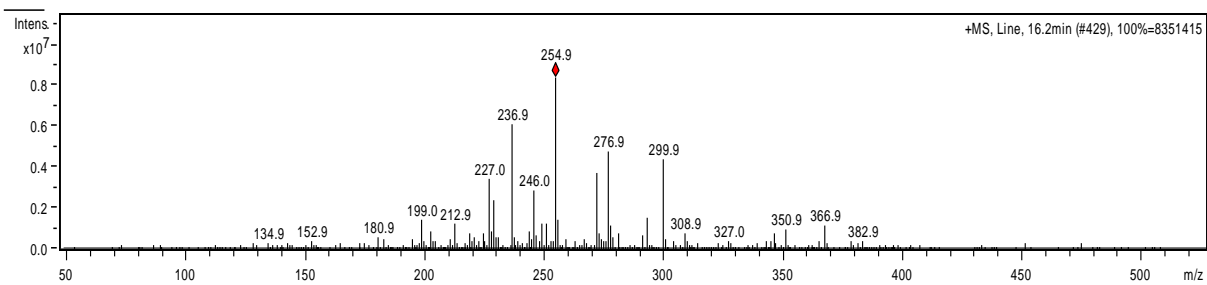
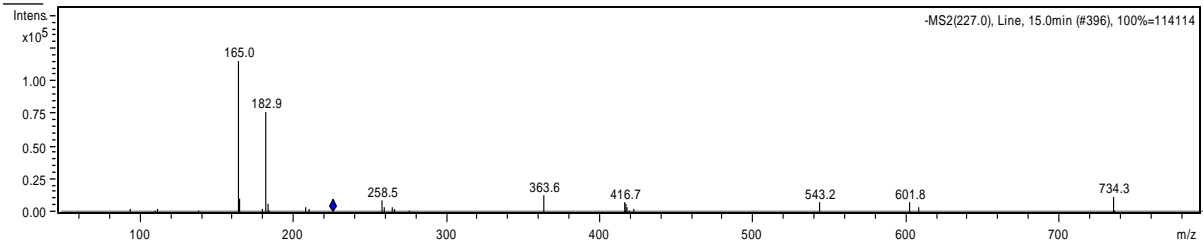
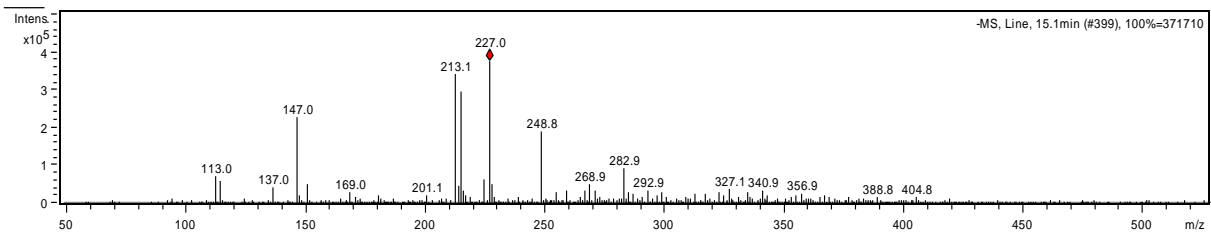


طيف UV للقمة 09



طيف UV للقمة 08

الشكل-(6-VI)- أطيف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات الكرسيتين (Quercetin)



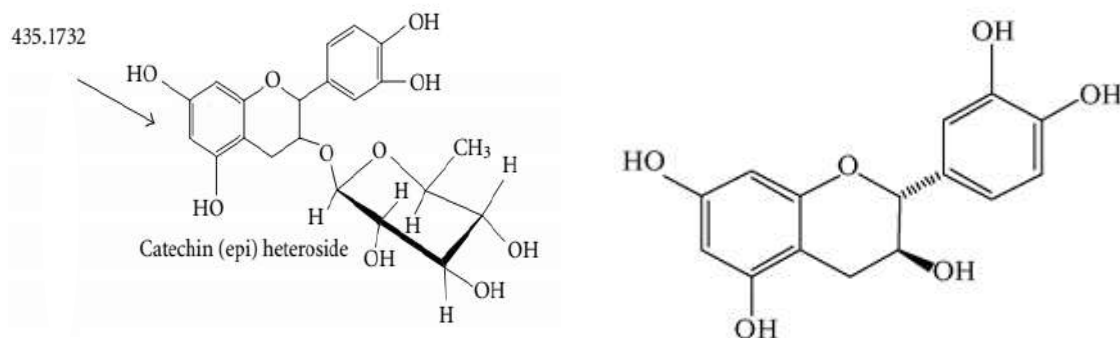
الشكل (7-VI) أطياف الكتلة للقمم 08، 09 و 10

## 07، 06، 05، 03، 01 القمم 3.1.2.VI

الجدول (3-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

المركبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز t R (min)	القيمة
catechin (epi) heteroside [11]	138.1, 133.9, 120.9, 107.9, 97.9, 81,	435, 405.6, 323.9, 278.9, 251.9, 195.9, 139.0, 87.1	245	4.1	01
الكاتشين Catéchine	380.2, 346, 266.6, 126	1000.6, 899.8, 739.5, 677, 391.9, 251.9, 139.0, 87.1	250 280	4.6	03
	147.8, 128.2, 82.8	531.0, 396.7, 362.7, 345.9, 323.9, 278.9, 251.9, 236, 210.9, 188.9, 175, 151, 139, 126.9, 101, 87	248	5.0	05
	277.3, 244.8, 188.9, 169, 148.9	[M-H] <sup>+</sup> 416.0, 366.7, 323.9, 289.9, 251.9, 209, 204.9, 188.9, 164.9, 139, 87.0	250	5.5	06
	264.3, 188.9, 171, 125	600.6, 390.9, 353.1, 266.8, 205, 188.9, 118, 87.1		5.6	07
(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol					
مركبات تم التعرف عليها سابقا					
Catechin m/z 139 [12]; catechin m/z 292, 251.1, 206.9, 177.4, 147, 138.9, 125, 122 [13]; catechin m/z 289, 245, 205, 151 [12]; Catechin (epi) heteroside m/z 435, 325, 289.1, 253.2; catechin/epicatechin m/z 289, 245, 205 [14]; catechin m/z 435, 323, 289, [15]; (+)-catechin standar m/z 121, 123, 139.3, 151.3, 165.3, 244.2, 273.2, 289. 291.2 [16]; catechin m/z 289, 245, 205, 203, 137 [17]; (+)-Catechin m/z 290, 289 (245, 205, 179) [18]; (-)epicatechin m/z 123.2, 139.2, 151.1, 165.0, 172.6, 291; Epicatechin m/z 291, 289, 273, 245, 205, 179, 151, 139, 123 [19]; Catechin m/z 393.0, 289.1, 245.2, 204.9; Epicatechin m/z 289.1, 245.2, 204.9 [20]; Catechin					

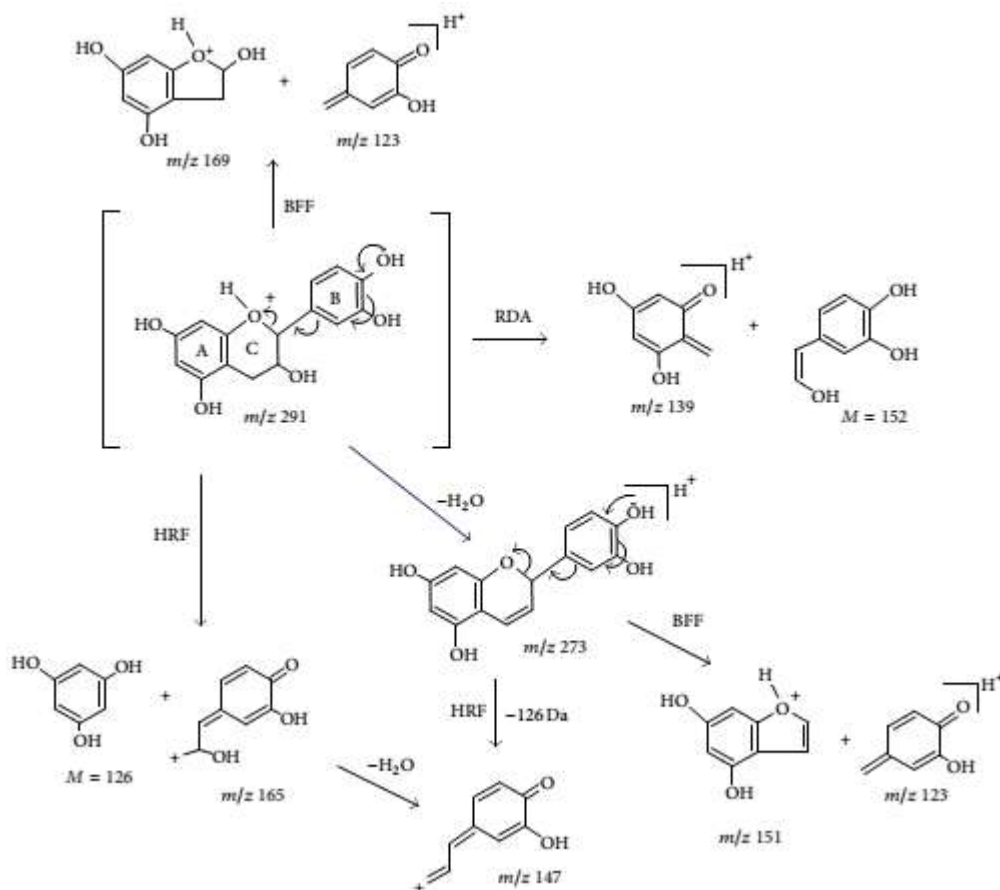
$m/z$  289.28, 271.02, 244.99, 226, 212.2, 203, 187.5, 175.0, 161, 136.9, 125.1 [21]



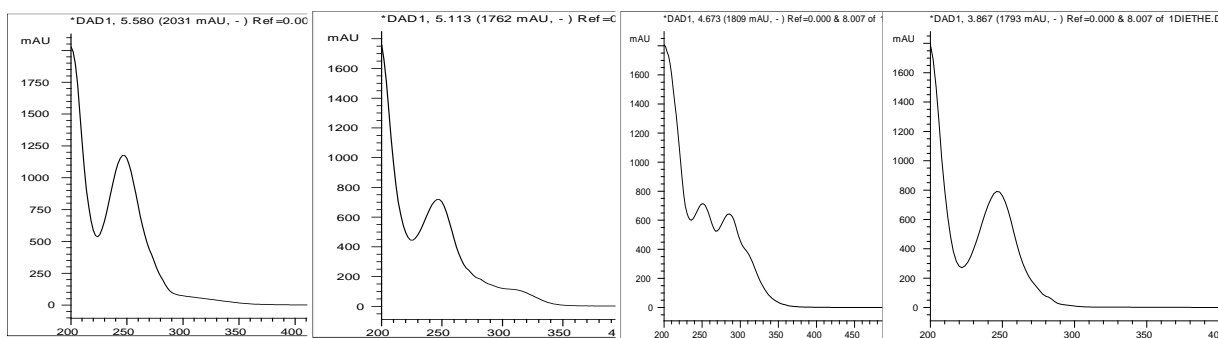
الشكل - (8-VII) - بنية الكاتشين (Catéchine)

ظهور الشظايا  $m/z$  139 و  $m/z$  151.1 في العادة تدل على وجود أحد مشتقات الكاتشين اذا كان المستخلص يحتوي على الفلافونيدات فقط ، و يمكن التأكيد أو النفي على ذلك بالبحث على شظايا مميزة أخرى مثل 289 ، 290 أو 251 ، 245 .

من جهة أخرى فان تكرار ظهور الشظايا 139، 251، 244.9، 323.9 و 87.1 في أطياف القمم 01، 03، 05، 06، و 07 يؤكد وجود علاقة بين البنى الكيميائية للمركبات الممثلة بهذه القمم.



الشكل (9-VI)- الشظايا الناتجة عن تفكك الكاتشين (Catéchine) [22]



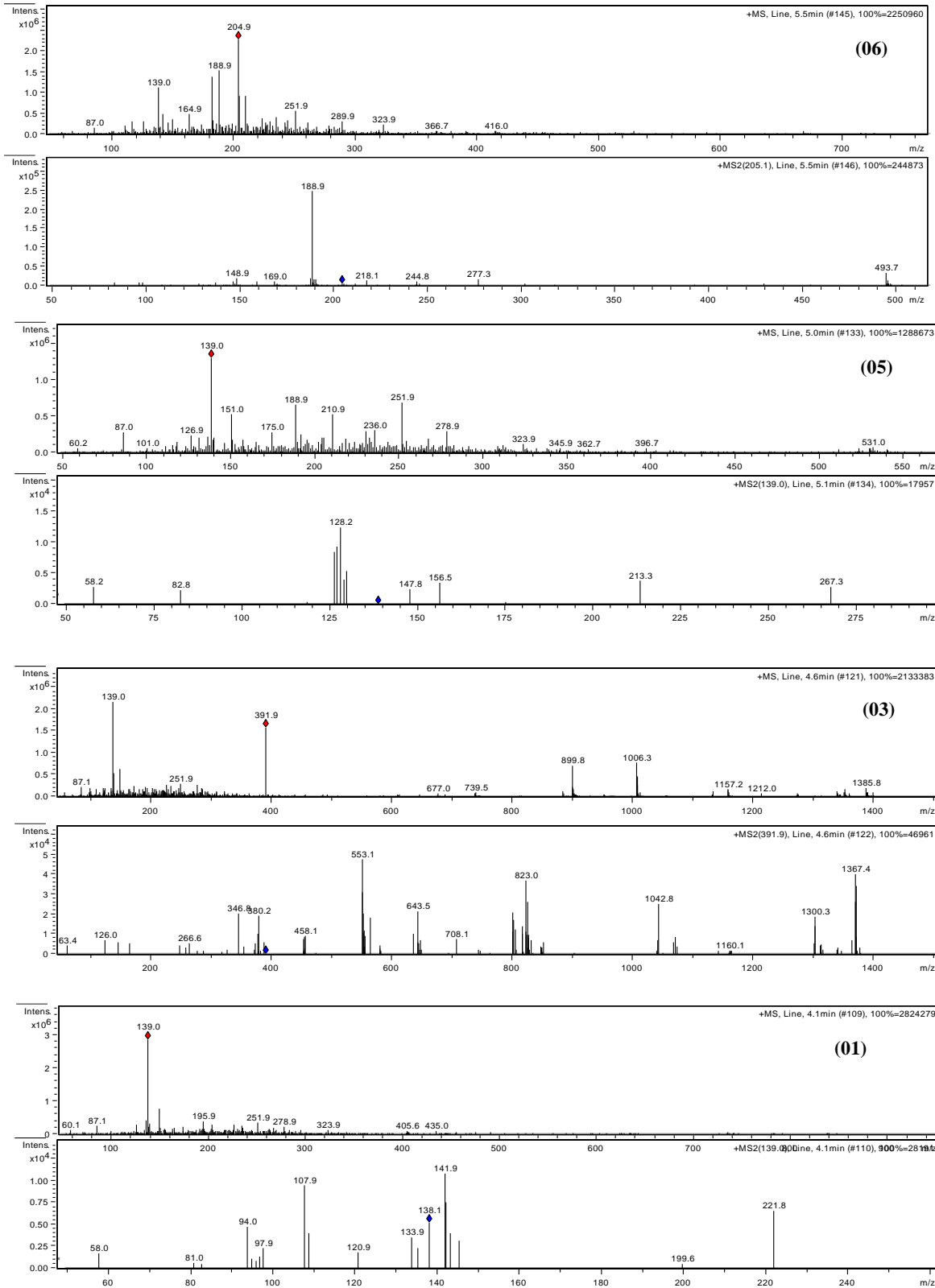
طيف UV للقيمة 06

طيف UV للقيمة 05

طيف UV للقيمة 03

طيف UV للقيمة 01

الشكل (10-VI)- أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات الكاتشين (Catéchine)

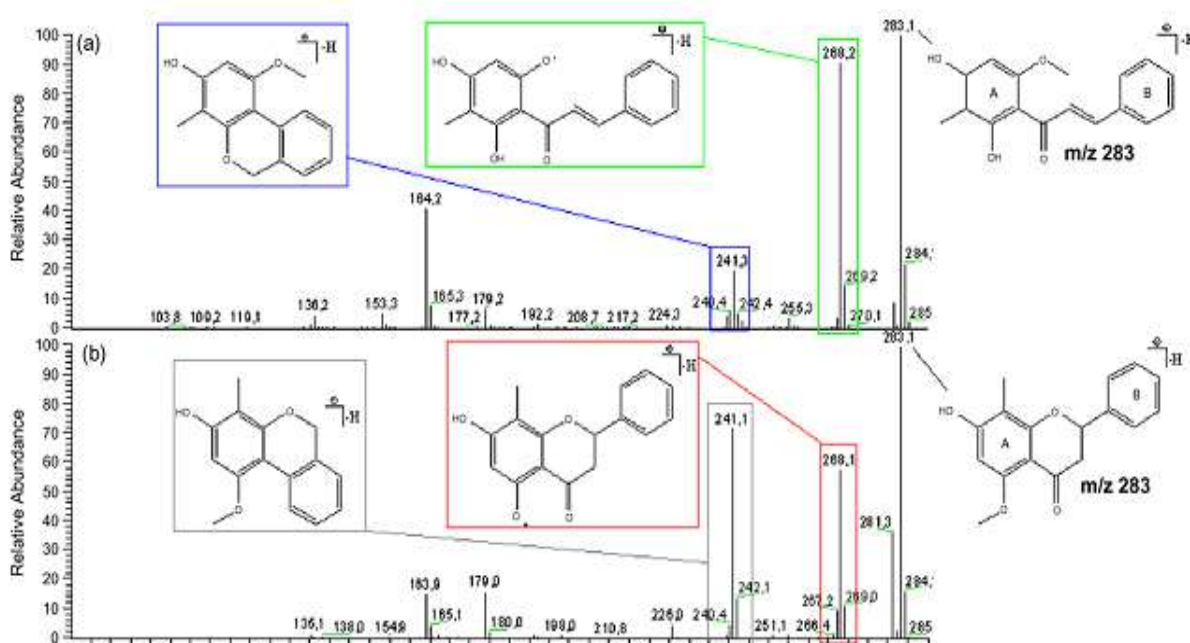


الشكل (11-VI) أطياف الكتلة للقمم 07، 06، 05، 03، 01

## 13.4.1.2.VI القمة

الجدول (4-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايتز

المركبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز $t_R$ (min)	القمة
ثنائي هيدروشالكون أو فلافون chalcone ou flavone aglycone	344.8,30 8.9,280.8 ,238.8,20 8.8,178.9 ,136.8	[M-H] <sup>-</sup> 574.4,460.9,416.8,380.8,344.9,3 09, 284.9,268.9,243.1,223,208,150.9 ,112.9	260 325	18.2	13
<p><b>مركبات تم تحديدها سابقا</b></p> <p>[M - H]- ions de dihydrochalcones m/z 301 : 283,268, 225,152 [23]</p> <p>[M - H]- ions de flavanones; 283,268,151 ; 285,270, 243, 226,175, 151,136, [24]</p> <p>[M-H]- ions de chalcones ; 283,268, 241, 226, 239, 179,153. [23]</p>					



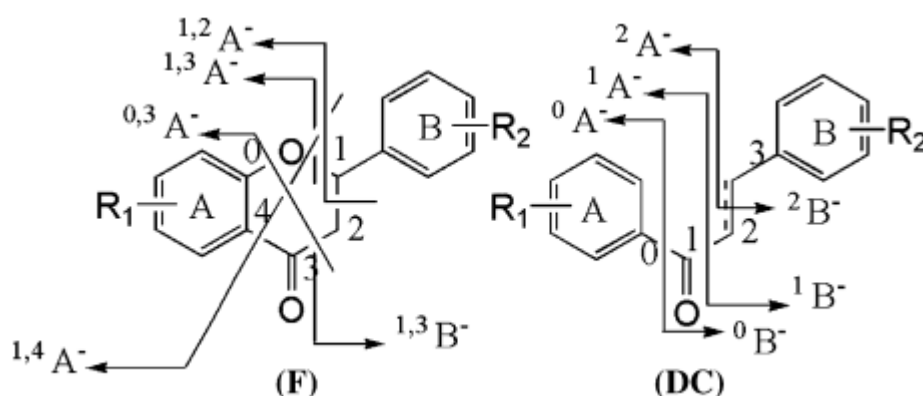
الشكل (12-VI) (a) طيف MS/MS لأيون للهيدروشالكون (dihydrochalcones)، (b) طيف MS/MS لأيون فلافانون (flavanones) [23]

الشظية  $m/z$  268 ناتجة عن فقدان  $(\cdot\text{CH}_3 ; 15\text{u})$  من الشظية  $m/z$  283، و الشظية  $m/z$  241 ناتجة عن فقدان  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$  من نفس الشظية السابقة.

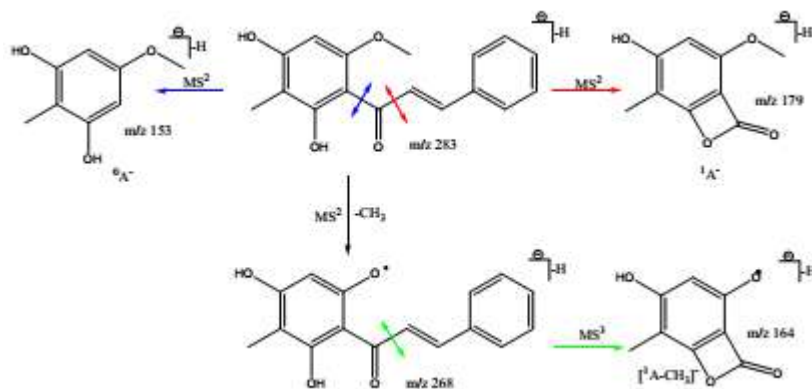
بالنسبة للشالكون يمكن تفسير أغلب الشظايا كما يلي:  $268 \equiv [M-H-\text{CH}_3]^- / 283 \equiv [M-H]^-$

$141 \equiv [M-H-\text{CO}_2]^- / 239 \equiv [M-H-\text{CO}_2]^- / [M-H-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^- \equiv 141$  بالإضافة الى شظايا أخرى كما هو

مبين في الشكل

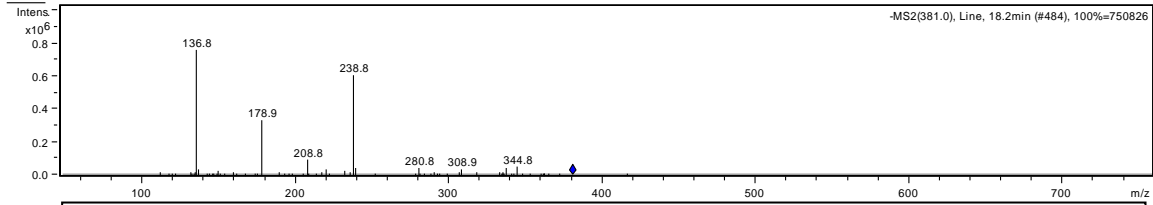
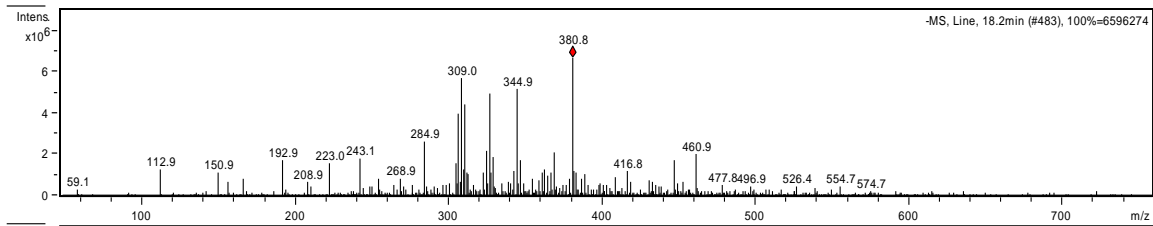


الشكل (13-VI)- أشكال التفتك لالهيدروشلكون (DC) و الفلافونون (F) [23]



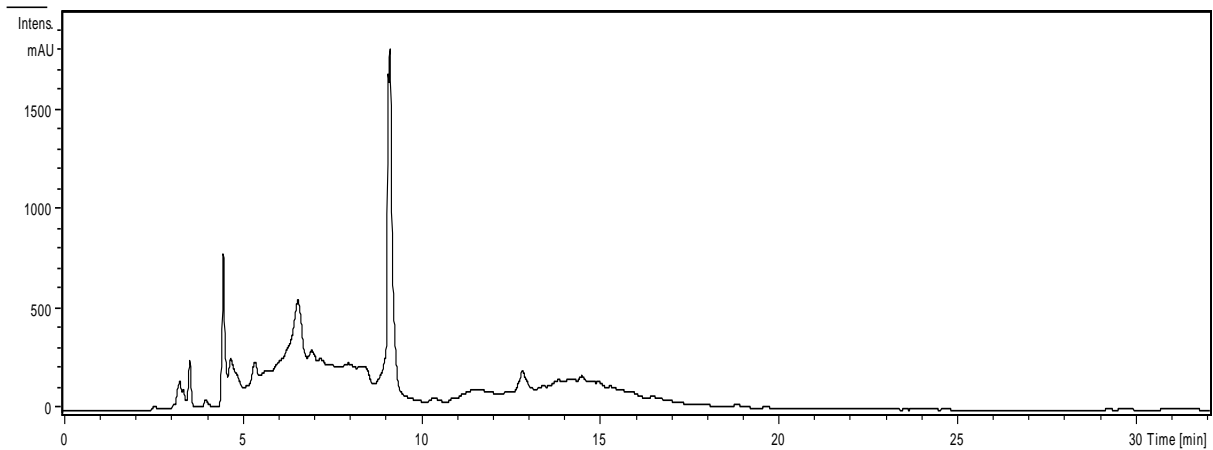
الشكل (14-VI)- شظايا يمكن أن تظهر في تفتك أيون للهيدروشلكون (dihydrochalcones)، أو أيون فلافانون (flavanones)





الشكل - (15-VI) - طيف الكتلة للقيمة 13

## 2.2.VI. مستخلص أسيتات الايثيل للذكار



الشكل ( 16-VI ) كروماتوغرام HPLC لمستخلص أسيتات الايثيل للذكار

## الجدول (5-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص الأسيئات

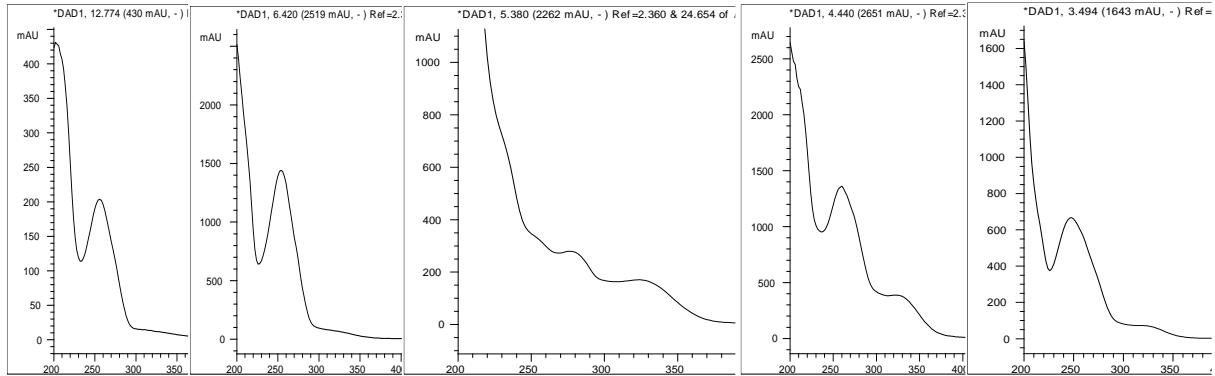
المركبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز t <sub>R</sub> (min)	الرقم
الكيرسيتين Quercetin	316.7, 290.9, 228.9, 178.8, 160.9, 134.9, 110.9	366.8, 334.8, 327.1, 292.8, 255, 178.9, 150.9, 132.9, 114.9		3.6	01
الكاتشين Catechine	275, 226	578.7, 415.9, 390.8, 358.9, 322.9, 244, 218.9, 202.9, 164.9, 151.0, 139.0, 116.0, 94, 82.1, 60.2		4.8	02
الكاتشين Catechine	238.8, 208.9, 178.8, 136.9, 92.9	418.7, 334.8, 298.9, 200.8, 116.9		5.4	03
الكيرسيتين Quercetin	136.9, 238.8	418.7, 334.8, 298.9, 200.8, 116.9			
الكاتشين Catechine	272.8, 246.9, 206, 164.9, 122.9	777.1, 530.6, 502.6, 454.8, 419.9, 390.8, 336.8, 290.9, 288.8, 244.0, 226.9, 184.9, 178, 139, 83		6.5	04
الكاتشين Catechine	400.7	820.6, 722.6, 538.7, 442.8, 343, 294.9, 258.9, 194.9, 108.9		13.1	05

هذا المستخلص يحتوي على مشتقات الكاتشين (Catechine) و الكيرسيتين (Quercetin):

- المركبات ذو القمم 02، 04 تنتج شظايا مميزة مثل 139، 164.9، 226، 244.0 وهي شظايا مميزة لمشتقات الكاتشين (Catechine).

- القمة 01 تظهر شظايا 150.9، 178.9، 255، 327.1 و هذا يرشحها أن تكون من مشتقات الكرسيتين (Quercetin).

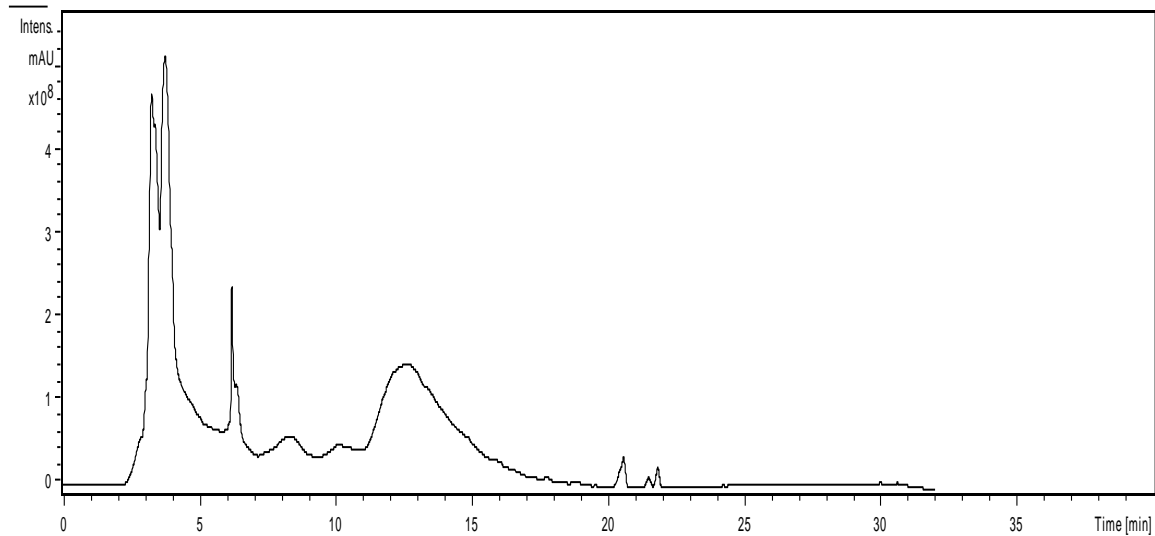
- القمة 05 لا تظهر شظايا مميزة تسهل عملية التصنيف.



طيف UV للقمة 01 طيف UV للقمة 02 طيف UV للقمة 03 طيف UV للقمة 04 القمة 05

الشكل-(17-VI)- أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمشتقات الكرسيتين/ الكاتشين

### 3.2.VI. مستخلص البيتانول للذكار



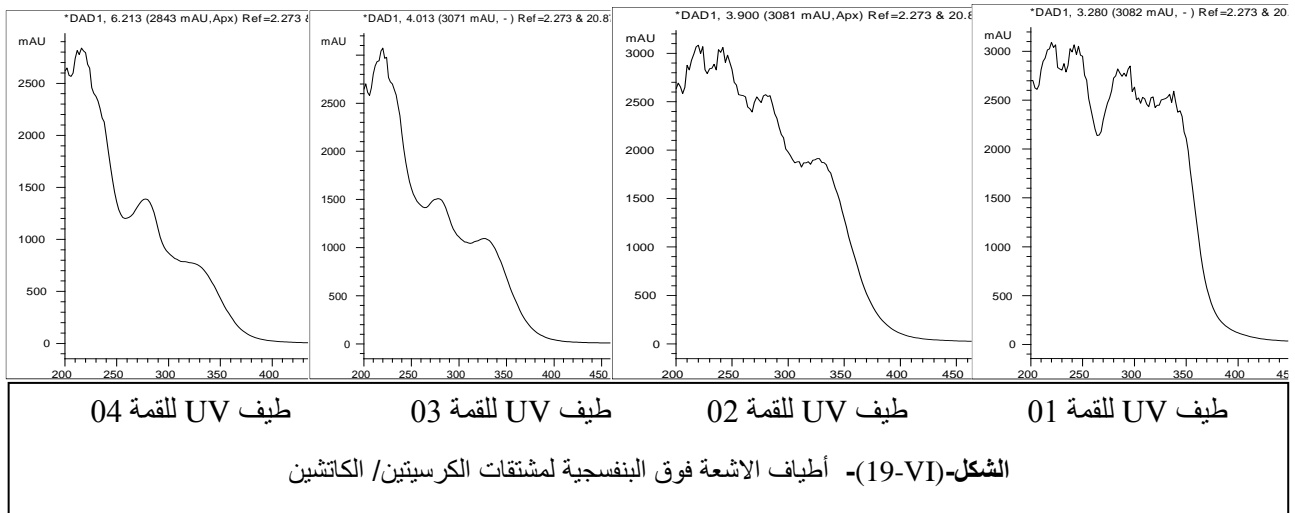
الشكل(18-VI) كروماتوغرام HPLC لمستخلص البيتانول

## الجدول (6-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص البيتانول

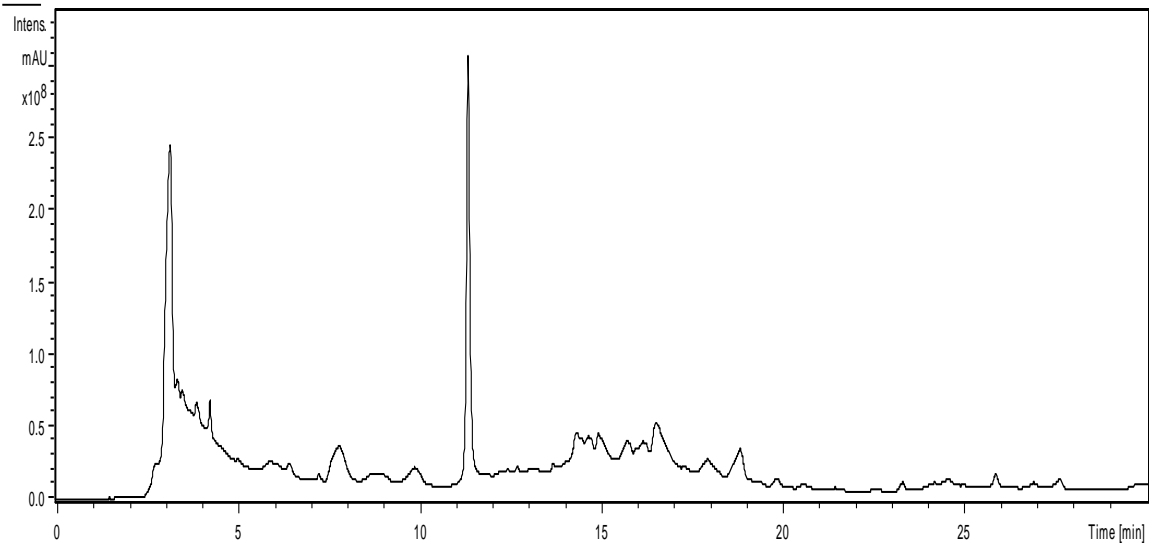
المركبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز t <sub>R</sub> (min)	الرقم
الكرسيتين Quercetin	264.3, 211.8, 192.8, 177.8, 114.9, 96.9	706.5, 559.5, 468.8, 370.8, 327.1, 272.9, 191.0, 113.0		3.5	01
الكاتشين Catechine	131.9, 117.9	256.9, 234.9, 220.9, 202.9, 179.9, 155.9, 139.9, 117.9		4.0	02
الكاتشين Catechine	271.4, 105.3, 74.1	624.5, 541.6, 377, 272.8, 256.9, 234.9, 220.9, 155.9, 139.9, 117.9, 104		4.5	03
الكرسيتين Quercetin	366.7, 352.8, 334.9, 192.9, 172.9	786.2, 528.7, 458.9, 418.8, 334.8, 270.9, 234.9, 136.9, 112.9		6.6	04

نلاحظ ظهور الشظايا المميزة لمشتقات الكاتشين و الكرسيتين (Catechine/ Quercetin)

نتائج تحليل مستخلصات الذكار تبين وجود مشتقات أوريونتين ، الكاتشين و الكرسيتين (Orientin /Quercetin/ Catechine) بالإضافة الى شالكون أو فلافون آجليكون و هذه الأنواع من الفلافونيدات أثبت أن لها فعالية بيولوجية وهذا ما قد يفسر النتائج المحصل عليها في جزء البحث الخاص بالفعالية البيولوجية.



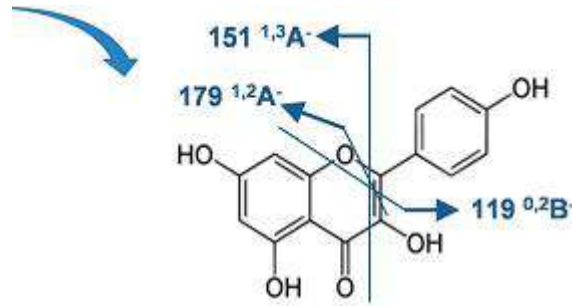
#### 4.2.VI. مستخلص ثنائي إيثيل إيثر للدقلة البيضاء



الشكل (20-VI) كروماتوغرام HPLC لمستخلص ثنائي إيثيل إيثر للدقلة البيضاء

## الجدول (7-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص ثنائي ايثيل ايثر

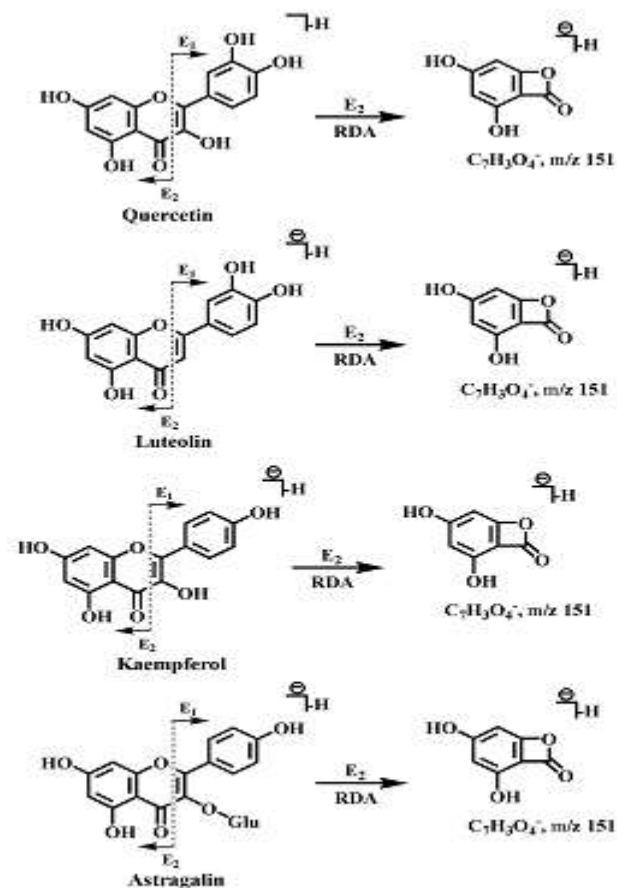
المركبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز t R (min)	الرقم
كامفيرول Kaempferol rhamnoside	242.8, 224.8, 198.7, 168.7, 128.7	[M-H] <sup>-</sup> 645.4, 542.3, 482.4, 452.3, <b>430.6</b> , 394.5, <b>360.7</b> , <b>327</b> , <b>300.8</b> , <b>281.0</b> , <b>255.0</b> , <b>226.9</b> , <b>186.9</b> , 146.8, 112.9, 96.9, 59.1	210- 245	3.2	01
كامفيرول Kaempferol	92.9	[M-H] <sup>-</sup> <b>360.6</b> , <b>334.7</b> , 292.9, <b>255</b> , <b>186.9</b> , <b>152.9</b> , <b>136.9</b> , <b>93</b>	250	3.9	02
كامفيرول Kaempferol	330.7, 290.8, <b>178.8</b> , 160.8, 134.9	[M-H] <sup>-</sup> 418.7, 378.6, <b>334.7</b> , <b>214.8</b> , <b>136.8</b> , <b>92.9</b>	250	4.2	03
<b>مركبات تم تحديدها سابقا</b>					
Kaempferol rhamnoside m/z <b>[431]</b> : 327, 299, 285, 256 <a href="#">[25]</a>					
kaempferol 3- O-sophorotrioside-7- O-sophoroside m/z ; 429, 327, 285, 255, <a href="#">[26]</a>					
Kaempferol 3-O-glucoside ; m/z 447, 285/284, 255, 227 <a href="#">[27]</a> Kaempferol m/z 284.9, 255.0, 227.0, 281.9, 93.0, <a href="#">[28]</a>					
Kaempferol m/z 284, 255, 227, 178.9, 151 ; Kaempferol-3-O- rutinoside-7-O- b- Dglucopyranoside :593.1 431.1, 285, 284, 151 ;					
Kaempferol 3-O-lathyroside-7-O- a- Lrhamnopyranoside : 593.1526, 431.1001, 285.0415, 284.0337, 178.9994, 151.0042 <a href="#">[29]</a> Kaempferol 285.0411 (C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> ) 267.0315 ; 257.0449 ; 243.0298 ; 241.0502; 239.0323 ; 229.0493 ; 213.0543 ; 185.0589 ; 151.0040 <a href="#">[30]</a>					



Kaempferol 284 [M-H-H]<sup>-</sup>  
 255 [M-CH<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>  
 227 [M-CH<sub>2</sub>O-CO-H]<sup>-</sup>

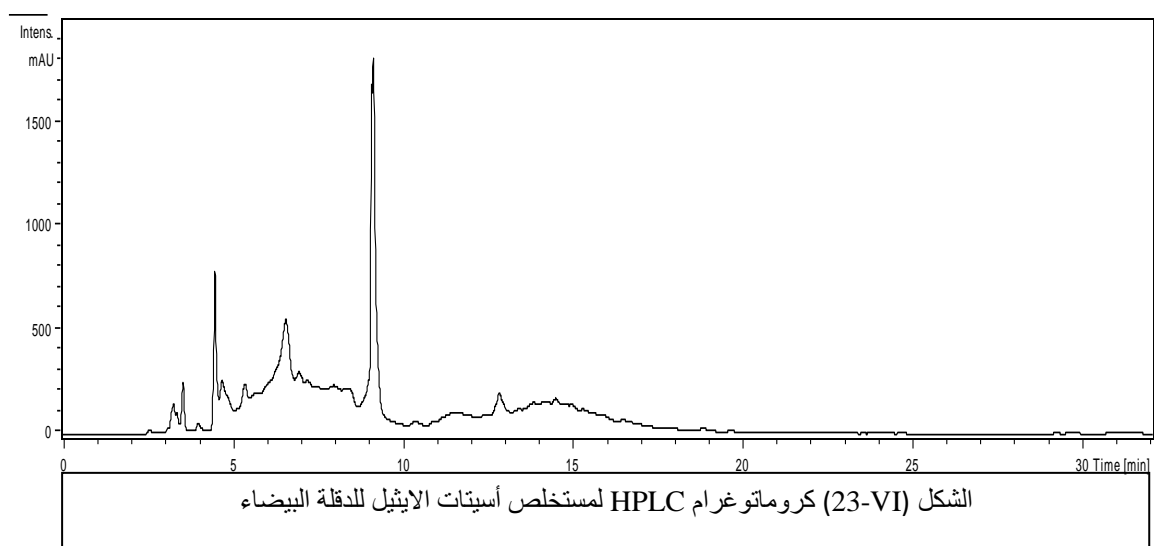
الشكل (21-VI) بنية كامبفيرول (Kaempferol)

وجود الشظية 151 يفتح المجال لاقتراح عدة أصناف من الفلافونيدات كما هو موضح في الشكل أدناه ، لكن ظهور شظايا مميزة مثل: 284، 255، 227 تعزز من احتمال أن يكون المركب من مشتقات كامبفيرول بالإضافة الى وجود علاقة بين المركبات الممثلة بالقمم 01،02 و 03 من خلال مقارنة أطياف الكتل لها فيما بينها، و من جهة أخرى بمقارنتها بأطياف الكتل لمركبات تم التعرف عليها سابقاً فمن الممكن جداً أن تكون هذه المركبات من مشتقات كامبفيرول (Kaempferol)



الشكل (22-VI)- ظهور الشظية  $m/z$  151 انطلاقاً من مركبات مختلفة

## 5.2.VI. مستخلص أسيتات الايثيل للدقة البيضاء

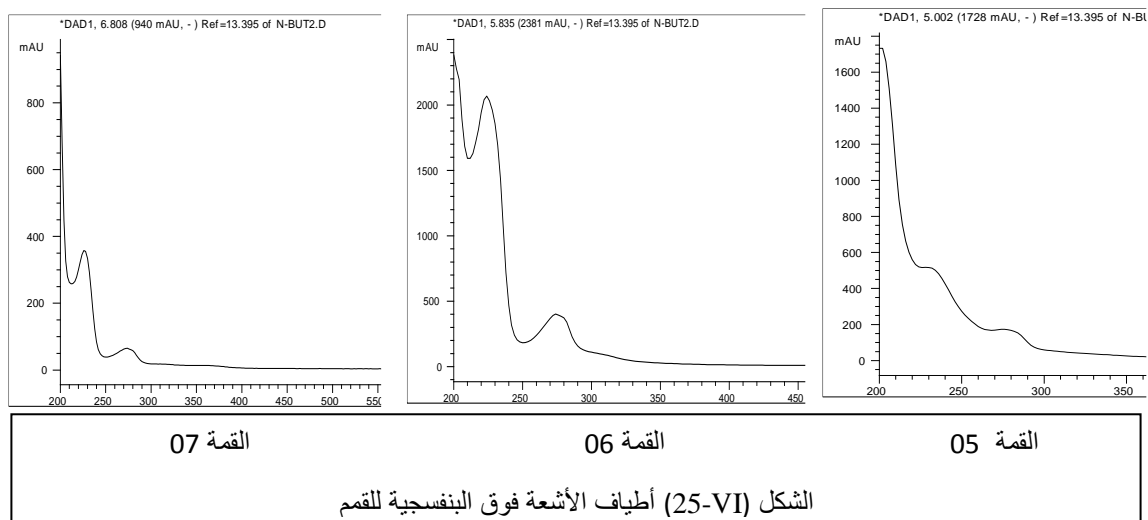
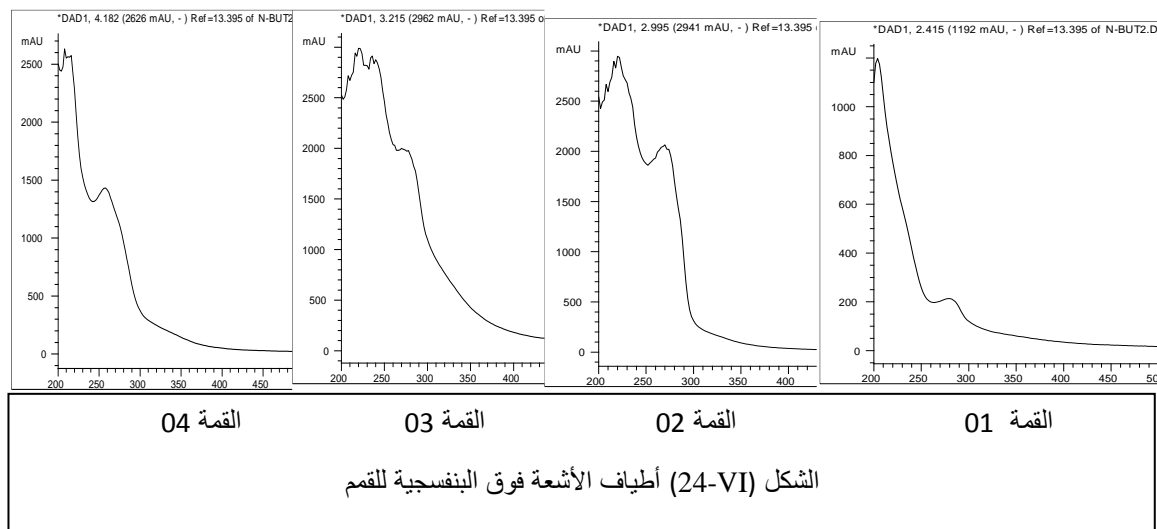




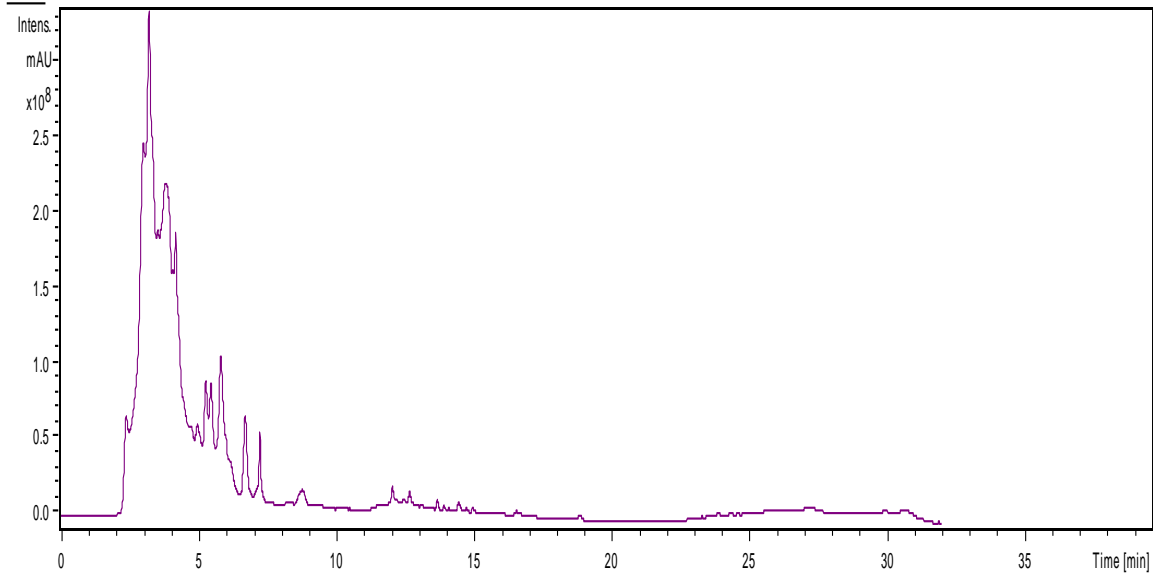
## الجدول (8-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص أسيتات الايثيل

المركبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز t <sub>R</sub> (min)	الرقم
الكاتشين Catechine	148.8, 204.8, 262.9, 317.8, 396.8, 615.6	60.1, 156.9, 204.9, 278.9, 323.9, 390.8, 456.1, 640.7		3.3- 3.5	01
	110.9, 134.9, 178.8, 246.9, 290	136.9, 186.9, 334.8, 418		3.7	02
	162.8, 185.8, 300.8	60.2, 82.0, 139, 162.9, 202.9, 278.8, 336.8, 358.8, 463.8, 703.5		4.6	03
	280.8, 136.9, 93.3	454.9, 418.8, 370.8, 334.8, 318.8, 298.8, 152.9, 136.9		5.9	04
	95, 120.9, 138.9, 247, 264.8	60.1, 94.1, 96.9, 143.9, 188.9, 224.9, 243.9, 282.8, 300.8, 322.7, 347.8, 378.7, 390.8, 436.1, 454.8, 532.0, 591.4		6.0	05
الكاتشين Catechine	288.8	136.9, 187.0, 208.9, 242.9, 261.0, 288.9, 324.8, 418.8, 454.7		7.0	06
	59.2, 73, 116.9, 130.9	121, 149, 170.9, 194.9, 217.9, 245.9, 273.9, 317, 345,366.8, 402.7, 441.7		8.1	07
	198.8, 262.7, 370.7, 400.7, 401.7, 446.5	137.0, 225.0, 268.9, 334.9, 404.8, 440.8, 538.7, 820.7		9.8	08

بناءً على تكرار قيم بعض الشظايا بين القمم كما هو موضح في الجدول السابق استنتجنا وجود علاقة بنيوية تربط كل مركبات هذا المستخلص و التي تعد من مشتقات الكاتشين (Catechine)



## 6.2.VI. مستخلص البيتانول



الشكل (26-VI) كروماتوغرام HPLC لمستخلص البيتانول للدقلة البيضاء

## الجدول (9-VI) نتائج الدراسة التحليلية HPLC/MS لمستخلص البيتانول

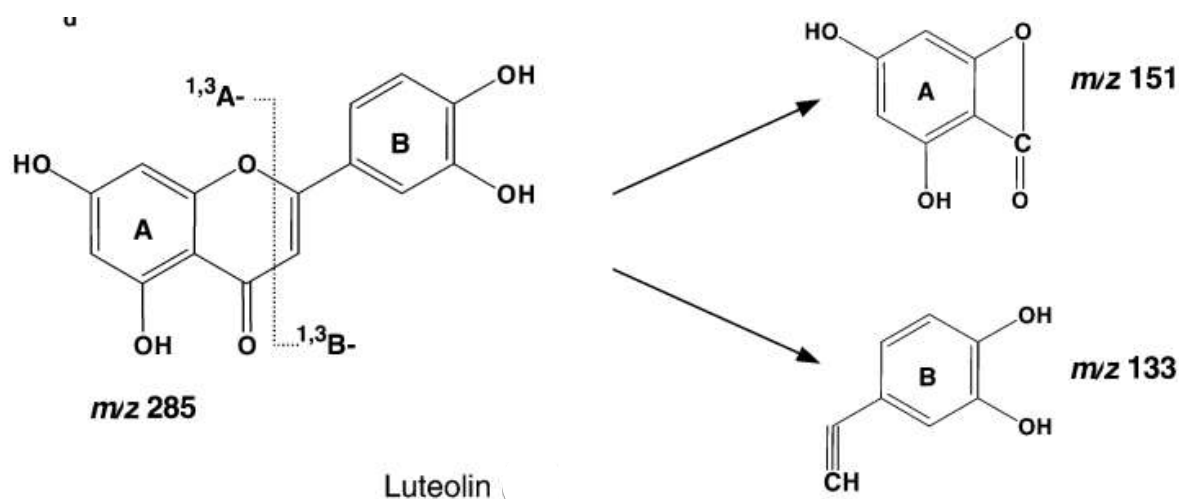
المركبات الفلافونويدية المقترحة	MS <sup>2</sup>	MS	طول الموجة $\lambda$ (nm)	زمن الاحتجاز t <sub>R</sub> (min)	الرقم
/	110.9, 156.9, 174.9, 203.0, 230.9	79, 100 , 139, 180.9, 225.9, 255.9, 286.9, 437.1		2.6	01
/	134.9, 148.6,	112.9, 150.9, 255.0, 327, 366, 686.9		3.2	02
لتولين Luteoline	60.1, 81, 95.1, 121, 135, 150, 162, 180.7, 202.7, 221.8, 238.8, 275.8, 293.8,	57.1, 79.0, 100.9, 110.9, 122.5, 138.9, 156.9, 180.9, 225.9, 240.9, 286.9, 308.9, 332, 390.9		3.5- 3.7	03
/	71.0, 88.9, 112.8,	178.8, 214.7, 376.7		4.2	04
<b>مركبات تم تحديدها سابقا</b>					

Luteolin-4'-O-rhamnosyl : m/z 327.0, 285.0, 254.7 [31]

Luteolin: m/z 288.8, 255.8, 240.8, 218.8, 196.9, 134.9, 178.9, 146.8, 108

[32]

Luteolin; [33]



الشكل (27-VI) شظايا يمكن أن تنتج عن تفكك ليتولين Luteolin [34]

شظايا المركب الممثل بالقمة 03 تشير الى احتمال كون المركب من مشتقات ليتولين أو مشتقات كامبفيرول ( 285، 255، 225) و بالاعتماد على الموقع الالكتروني [hmdb.ca/metabolites](http://hmdb.ca/metabolites) والذي يقترح أطياف كتلة لمركبات الأيض الثانوي مثل الفلافونيدات اتضح لنا أن المركب أقرب الى أن يكون من مشتقات ليتولين نظراً لتشابه أكثر من 20 شظية من شظايا المركب دو القمة 03 مع شظايا مشتقات ليتولين (Luteolin) .

### خلاصة:

من خلال تحليلنا لأطياف HPLC للمستخلصات نستنتج أن كلى المستخلصين غني بالفلافونيدات مع وجود تنوع كيمي و كمي، حيث أن مستخلص الدكار يحتوي على أكثر من واحد وعشرون فلافانويد تنوعه ما بين أوريونتين، الكرسيتين، الكاتشين و الفلافونون أو ثنائي هيدرو شالكون (Orientin / Quercetin / Catéchine/ flavanone / dyhydrochalcon) فيما بقي المستخلص المائي دون تحليل.

في حين أن مستخلص الدقلة البيضاء يحتوي على أكثر من ثمانية عشرة فلافانويد ككامفيرول، الكاتشين و ليتولين ( Kaempferol/ Catéchine/ Luteoline ) فيما بقي المستخلص المائي دون تحليل.

## 3.VI المراجع

- [01] Mario J. S, Guillermo .S , Jorge .B and Edward J. K, The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS, *Molecules journal*, (2013), 18, 1672-1692
- [02] Ilina .K and Stefan .N, FLAVONOIDS IN *Astragalus corniculatus*, *J. Quim. Nova*, Vol. 31, No. 1,(2008) 59-60.
- [03] Mario J. Simirgiotis, Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile, *Molecules journal*, (2013), 18, 2061-2080.
- [04] Ana Plazonić, Franz Bucar, Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos L.*), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Molecules journal*,(2009);14, 2466-2490
- [05] Anghel Brito, Javier E. Ramirez, HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile, *Molecules journal*, (2014), 19, 17400-17421
- [06] Yu Lin , Wen Xu, Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Iridoid Glycosides in Yinhua Kanggan Tablet by UPLC-QqQ-MS/MS, *Molecules journal*,(2015);20, 12209-12228
- [07] Luiz L. Saldanha, Wagner Vilegas, Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR, *Molecules journal*, 2013, 18, 8402-8416.
- [08] Mirko .De R, Annarita .P, Antonio. Dalla V , Massimo G and Riccardo. F, Characterization of Non-Anthocyanic Flavonoids in Some Hybrid Red Grape Extracts Potentially Interesting for Industrial Uses, *Molecules journal*, 2015, 20, 18095-18106.
- [09] Dimitrios .T, Martina .S, George .P and Vassiliki .O, Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules journal*, (2007), 12, 593-606
- [10] Mohamed Gamaleldin Elsadig Karar and Nikolai Kuhnert, UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (*Crataegutt Tropfen*), *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*, (2015), 1:1

- [11] Felipe Meira-de-Faria, Ana Cristina Alves Almeida, Anderson Luiz-Ferreira, Antioxidant Action of Mangrove Polyphenols against Gastric Damage Induced by Absolute Ethanol and Ischemia-Reperfusion in the Rat, *The Scientific World Journal*, Volume 2012, Article ID 327071, page 9
- [12] Daniel JZ, Bryant CN, Klaus A, Joseph JD, 2000, Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry, *Anal. Chem*, 72, 5020-5026
- [13] Paola M, March 2006, Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: Characterisation and LC/ESI/MS/MS quali-quantitative analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*
- [14] Youwu H, Liang C, Li Feng, Fujiang G, 2013, Characterization of Total Phenolic Constituents from the Stems of *Spatholobus suberectus* Using LC-DAD-MS<sup>n</sup> and Their Inhibitory Effect on Human Neutrophil Elastase Activity, *J Molecules*, 18, 7549-7556
- [15] Maffei RF, 1997, A Rapid Screening by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Fast-atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry of Phenolic Constituents with Radical Scavenging Activity, from *Krameria triandra* Roots, *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*, VOL 11, 1303–1308
- [16] Chia-Lin.C, Rong-Tsun.W, 2011, Quantification of (+)-catechin and (+)-epicatechin in coconut water by LC–MS, *Food Chemistry*, 126, 710–717.
- [17] JIANPENG D, VIOLA SYL, JASON TCT, MAW-RONG L, 2007, Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea Manufactured by Semifermentation and Drying Processes, *J. Agric. Food Chem*, 55, 7462–7468
- [18] Jianping S, Feng L, Yan B, Ping L, Changqing D, 2007, Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries, *J Molecules*, 12, 679-693.
- [19] Guanghou S, Lai Peng L, 2004, Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1022, 67–75.
- [20] Sami A, Michael W, 2014, Green Tea Extract Induces the Resistance of *Caenorhabditis elegans* against Oxidative Stress, *Antioxidants*, 3, 129-143.
- [21] Yubin L, Tao S, Xing J, 2016, UPLC– MS/MS assay for simultaneous determination of four compounds in rat plasma: application to pharmacokinetic study after oral administration of *Caulis Spatholobi* extract, *J Biomed. Chromatogr*

- [22] Riccardo Flamini, Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols, Hindawi Publishing Corporation, ISRN Spectroscopy, Volume 2013, Article ID 813563, 45 pages.
- [23] Bénédicte .P, Nicolas .F, Raoul .R, Jean-L Habib-J, Claude .M, Joëlle Quetin-L, Analysis of minor flavonoids in Piper hostmannianum var. berbicense using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, Journal of Chrom atography A , 1210 ( 2008 ) 45 – 54
- [24] Nicolas .F, Edmond .H, Joelle Quetin.L, Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, J American Society for Mass Spectrometry, (2001), 12, 707–715
- [25] Riccardo Flamini and Pietro Traldi, Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry, Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Inc
- [26] F . Ferreres, R . L lorach and A . Gil - Izquierdo, Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, 2004; 39: 312–321
- [27] Anna Wojakowska , Anna Piasecka , Pedro M. García-López, Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican lupine species using LC–MS techniques, Phytochemistry · (May 2013) 92, 71-86
- [28] Feng Chen<sup>1</sup>, Yin-Feng Tan<sup>1</sup>, Hai-Long Li, Differential systemic exposure to galangin after oral and intravenous administration to rats, Chen et al. Chemistry Central Journal (2015) 9:14
- [29] Reham Hassan Mekky, Maria del Mar Contreras, Mohamed Roshdi El-Gindi, Profi ling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study, RSC Adv., 2015, 5, 17751
- [30] Minchao Wang, Aocheng Cao, Canbin Ouyang, Yuan L and Yun Wei, Rapid screening and identification of non-target flavonoid components in invasive weeds by LC/MS-IT-TOF, Anal. Methods, 2015, 7, 10207
- [31] Ya Zhao, Xiong Li, Xing Zeng, Song Huang, Shaozhen Hou and Xiaoping Lai, Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*, The Royal Society of Chemistry 2013
- [32] Hanen Bouaziz-Ketata and all, Flavonoid profile and antioxidant activites of methanolic extract of *Hyparrhenia hirta* (L) stapf, Indian Journal of Experimental biology , Vol 53, 2015, 208-210



[33] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB05800>

[34] Ferran Sanchez-Rabaneda<sup>1</sup>, Olga Jauregui, Rosa Maria Lamuela-Raventos, Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004; 18: 553–563

الملاحق



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2016, 8 (13):171-176  
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



## Phytochemical study and evaluation antibacterial activity of flavonoid excerpts: Male spathe of date palm

Abdelaziz Bouhoreira<sup>\*1</sup>, Belkhir Dadamoussa<sup>2</sup> and Nouredine Gherraf<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Sciences et Environnement ; Département Sciences de la matière ; Institut des Sciences et de la Technologie ; Centre Universitaire de Tamanghasset-Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides; l'université Kasdi Merbah Ouargla- Algérie

<sup>3</sup>Laboratoire des Ressources Naturelles et Aménagement des milieux sensibles, l'université Larbi ben M'hidi, Oum Elbouaghi- Algérie

---

### ABSTRACT

*Date palm (Phoenix dactylifera L.) contains a wide array of flavonoids, but little is known about their antimicrobial effects. In this paper a phytochemical and biological study of flavonoids extracted from the male spathe grown in Touggourt, Algeria at flowering Stage is conducted. Analysis by TLC chromatography of the three flavonoids extracts (diethyl ether, Ethyl-Acetate and n-Butanol) indicate that the n-Butanol phase is rich in flavonoids compounds compared to other fractions. The antimicrobial activity was determined on the strains (Streptococcus sp, Staphylococcus sp, Escherichia coli, Pseudomonas species, Candida) using the disk diffusion method and all samples showed an inhibitory effect on the microorganisms*

**Key words:** *Phoenix dactylifera* L, flavonoids, antimicrobial activity.

---

### INTRODUCTION

In recent years, research efforts are under-way on the possibilities of utilization of natural source of bioactive compounds for the dietary management of certain chronic diseases such as diabetes, obesity, cardiovascular diseases, and cancer [1]. There is an increasing body of evidence that many of the today's diseases are caused by the oxidative stress, which is the result of imbalance between formation and neutralization of reactive free radicals. These free radicals are continuously produced and neutralized in our body so as to maintain the constant internal environment i.e. redox state. These reactive free radicals are generated due to endogenous source for example by-products of normal metabolic processes for ATP production [2]

Date fruits are rich in phenolic compounds possessing antioxidant activity. The pollen grains of date palm have been used in Egyptian local practices to improve fertility in women, and in some locations in Arabia, date pits are roasted and used in lieu of coffee as a hot beverage.

Relatively few pharmacological studies have been conducted on dates. For example, it has been shown that, depending on the type of extract used, date fruit and pit extracts significantly increase or decrease gastrointestinal transit (GIT) in mice [3]

Date fruit is considered as a folk remedy for the treatment of atherosclerosis, hypertension, diabetes and cancer. The fruit pulp is rich in phytochemicals like phenolics, sterols, carotenoids, anthocyanins, procyanidins, and flavonoids [4]

Some flavonoids are more selective towards cancer cells and may have the potential for reducing side-effects compared with other anticancer drugs[5]. The fruit pulp is rich in phytochemicals like phenolics, sterols, carotenoids, anthocyanins, procyanidins, and Flavonoids. Some studies have shown that flavonoids, polyphenols and tannins are able to altering proliferation of cancer cell [5]

The inflorescence of date palm tree, in its early stages of growth is enclosed in a hard covering/envelope known as spathe which splits open as the flowers reach maturation. The spathes are removed during pollination and insemination of date. Spathe has a specific fragrance particularly when it is fresh and is utilized in large scale in production of Taroonah hydrodistilled water. This water contains volatile components and is widely consumed as a beverage to improve heart functioning in local and traditional health practice. It also possesses analgesic and anti-inflammatory effects [4]

## MATERIALS AND METHODS

### 2-1-Plant Material

The spathes of *Phoenix dactylifera* L used for this study were collected in Touggourt south-east of Algeria in Avril 2012 at flowering stage. They were free of physical damage and injury from insects and fungal infection. The dried material was milled and stored in air tight container and kept at 4°C until further analysis[6]

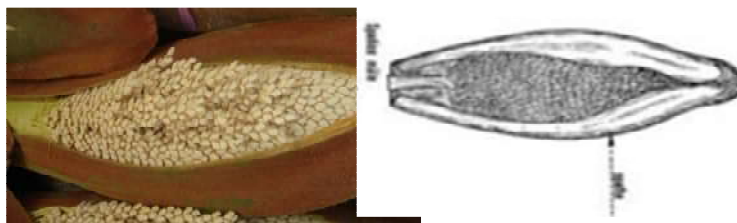


Figure 1: spathes of *Phoenix dactylifera* L

### 2-2-Phytochemical Screening

The dry extracts were subjected to various chemical tests in order to detect the presence of different phyto-constituents.

- **flavonoids**:, the addition of KOH (1%) to alcoholic extract led to the formation of yellow color indicating the presence of flavonoids.
- **Phenolic compounds**:5 mL of aqueous filtrate of each plant extract was added to2 drops of 1% of ferric chloride. A blue-green color indicated the presence of phenolic compounds.

### 2-3-Extraction

Liquid-liquid and solid-liquid extraction are the most commonly used procedures prior to analysis of polyphenolics and simple phenolics in natural plants. They are still the most widely used techniques, mainly because of their ease of use, efficiency, and wide-ranging applicability. Commonly used extraction solvents are alcohols (methanol, ethanol), acetone, diethyl ether, and ethyl acetate[7]

Soxhlet extraction is frequently used to isolate flavonoids from solid samples. In most cases, aqueous methanol or acetonitrile is used as solvent. In the literature, reported extraction times vary up to 12 h using this extraction mode. Polarity is an important consideration in extraction. Less polar flavonoids (e.g., isoflavones, flavanones, methylated flavones, and flavonols) are extracted with chloroform, dichloromethane, diethyl ether, or ethyl acetate, while flavonoid glycosides and more polar aglycones are extracted with alcohols or alcohol–water mixtures. Glycosides have increased water solubility and aqueous alcoholic solutions are suitable. The bulk of extractions of flavonoid-containing material are still performed by simple direct solvent extraction[8].

Fifteen grams (15 g) of dried male spathe were placed in a soxhlet apparatus with methanol. Extraction was performed with 200mL of an appropriate solvent for 4 h. After extraction, a rotary vacuum evaporator at 40 °C was

used in order to remove solvent. In this experiment six solvents of different polarity were used: water, methanol, n-butanol, diethyl Acetate, diethyl ether and petroleum ether[9,10] .

After evaporation the solvent the residue was dissolved in boiling water to obtain an aqueous extract. Petroleum ether fraction was discarded due to its high content in fatty substances.

#### 2-4-Determination of total flavonoids

Flavonoid content in the methanolic extract was determined by aluminum chloride colorimetric method [11] . Briefly, 0.50 mL of methanolic extract was diluted with 1.5 mL of distilled water and 0.50 mL of 10% (w/v). Aluminum Chloride was added along with 0.10 mL of 1 M potassium acetate and 2.80 mL of distilled water. This mixture was incubated at room temperature for 30 min. The absorbance of resulting reaction mixture was measured at 430nm UV spectrophotometer (Hitachi U-2001). Quantification of flavonoids was done on the basis of standard curve of quercetin prepared in 80% methanol and results were expressed in milligram quercetin equivalent (QE) per 100 g of spathe. [3,6]

#### 2-5-Antibacterial activity:

##### 2-5-1-Preparation of extract solution:

Test solutions were prepared by dissolving the extracts in DMSO

##### 2-5-2-Antibacterial activity:

- **Bacterial Cultures:**

The bacterial strains used in this study were *Staphylococcus sp* and *Escherichia coli* obtained in Microbiology laboratory, Touggourt Hospital, Ouargla-Algeria. The bacterial strains were grown and maintained on nutrient agar slants.

- **Screening for antibacterial activity**

The disc diffusion method was used to evaluate the antibacterial activity. Mueller Hinton (Pasteur Institute, Algiers, Algeria) agar was prepared in the plates as the media for the test microorganisms. Sterile filter paper discs (Whatman No. 1) left to dry under the laminar flow cabinet overnight. The bacterial inoculum was spread evenly onto the surface of the Mueller Hinton agar plates using a sterile glass L-form rod before the extract discs were positioned on the inoculated agar surface. Each extract was assayed in triplicate. Sterile distilled water served as negative control. All the plates were incubated for 48 h at 37° C. The antibacterial activity was interpreted from the size of the diameter of zone inhibition measured to the nearest millimeter (mm) as observed from the clear zones surrounding the discs [12].

#### 2-6-TLC analysis

Aliquots of standards and crude extracts were spotted on TLC plate (silica gel). Thereafter; they were kept at 100°C for 30 minutes for activation and were then cooled at room temperature prior to loading of sample and developed in different mobile phases below. Components were visualized under ultraviolet light (254 and 365 nm) and detected by spraying the TLC plates with reagent. Flavonoids were verified in extracts after concomitant running with standards and they were visible as yellow and orange fluorescent spots [13].

## RESULTS AND DISCUSSION

#### 3-1-Extraction yield

The extraction yield calculated by the formula

$$\text{The Percentage extractive value (yield \%)} = \left( \frac{\text{Weight of dry extract}}{\text{Weight taken for extraction}} \right) \times 100$$

Table 1. Yield and Color of Extracts

Extract	Yields (%)	Color
Overall flavonoid fraction	19.4	brown /redbrick
Diethyl ether fraction	1.74	red glass
Ethyl acetate fraction	4.30	Glass/ brown
Butanolic fraction	9.42	Dark redbrick
Last watery fraction	3.91	Light redbrick

#### 3-2-Antimicrobial Activity

The results obtained from antimicrobial assay are presented in Tables 2,3,4,5 According to Table 5. the extracts of spathes showed variable ranges of antimicrobial activities against 5 microbes.

**Table 2. Inhibition zone diameter (mm) of Diethyl ether extract(DE=5mg/mL)**

Microorganisms	inhibitory concentration				
	DE	DE/2	DE/4	DE/8	DE/16
Escherichia coli	9	7	0	0	0
Staphylococcus aureus	18	16	15	7	6
Pseudomonas aeruginosa	9	8	7	7	0
Streptococcus sp	12	9	9	9	6
Condida	14	10	9	8	0

**Table 3. Inhibition zone diameter (mm) of Ethyl acetate extract (EA=5mg/mL)**

Microorganisms	inhibitory concentration				
	EA	EA /2	EA /4	EA /8	EA /16
Escherichia coli	12	11	9	8	0
Staphylococcus aureus	20	13	9	9	0
Pseudomonas aeruginosa	12	12	10	6	0
Streptococcus sp	12	10	8	7	6
Condida	10	9	9	8	8

**Table 4. Inhibition zone diameter (mm) of n-butanolextract(nB=5mg/mL)**

Microorganisms	inhibitory concentration				
	nB	nB/2	nB/4	nB8	nB/16
Escherichia coli	13	12	10	10	9
Staphylococcus aureus	11	11	10	0	0
Pseudomonas aeruginosa	16	11	8	8	0
Streptococcus sp	14	12	11	11	9
Condida	11	10	9	8	8

**Table 5 : Minimum inhibition concentration (MIC) of different extracts**

Microorganisms	MBC (mg/mL)	Extracts		
		Diethyl ether	Ethyl acetate	n-butanol
Escherichia coli	2	0.1	0.05	0.05
Staphylococcus aureus	2	0.1	0.05	0.05
Pseudomonas aeruginosa	2	-	-	0.5
Streptococcus sp	2	0.1	0.05	0.05
Condida	2	0.06	0.06	0.06

Flavonoids present in plants possess diverse health benefits, which includes antioxidant and radical scavenging activities, reduction of certain chronic diseases, prevention of some cardiovascular disorders and certain kinds of cancerous processes assessed the flavonoid content in the male spathe during the flowering stage [14].

To obtain the active component related to the antibacterial activity, date was extracted with MeOH and fractionated successively with n- butanol, EtOAc and Diethyl ether. Antibacterial activities of these fractions against Microorganisms were tested. The n- butanol fraction showed significant MIC values in comparison with the other fractions.

The extraction yields were 1.74%, 4.30% and 9.42% for Diethyl ether, Ethyl acetate and n-butanol respectively.

### 3-3-Analysis of Flavonoids TLC Methods

TLC was used for the analysis of the flavonoid exudates. was used for the development of the exudates on silica gel plates[12]. the dry TLC plates were observed under UV light at 365 nm and characterize groups of compounds

**Table 6 : Showing the results of the TLC for Diethyl ether extract**

Solvent system	Reagents	Number of spots	Rf value	probable compounds [10]
diethyl acetate / formic acid / acetic acid / water (100/26/26/11) v/v	UV254 nm	3	Three gray Spots 0.96 ; 0.88 ; 0.83	
	UV365 nm	5	0.96 Brown / yellow ; 0.91 Blue ; 0.88 Mauve ; 0.85 Green ; 0.83 Violet	0.96 Brown / yellow ; quercetin 0.91 Blue ; coumaric acid ; 0.91 Blue ; Flavonoïds

**Table 7 : Showing the results of the TLC for ethyl acetate extract**

Solvent system	Reagents	Number of spots	Rf value	probable compounds [10]
diethyl acetate / formic acid / acetic acid / water (100/26/26/11) v/v	UV254 nm	5	Five gray Spots 0.94 ; 0.90 ; 0.80 ; 0.83 ; 0.76	
	UV365 nm	8	0.94 red glass ; 0.91 Green ; 0.90 Blue ; 0.80 gray ; 0.83 Violet ; 0.81 Black ; 0.77 Violet ; 0.76 Blue	0.90 Blue ; coumaric acid ; 0.75 Violet ; flavonoid-glycoside

**Table 8 : Showing the results of the TLC for n-butanol extract**

Solvent system	Reagents	Number of spots	Rf value	probable compounds [10]
diethyl acetate / formic acid / acetic acid / water (100/26/26/11) v/v	UV254 nm	3	Five gray Spots 0.82 ; 0.77 ; 0.46	-
	UV365 nm	6	0.83 Blue ; 0.82 green ; 0.77 Orange ; 0.66 Blue ; 0.50 yellow ; 0.46 Orange	0.83 Blue ; caffeic acid / chlorogenic acid ; 0.46 Orange / 0.50 yellow ; flavonoid-glycoside

Results obtained show that in comparison with Number of spots and Rf value in similar conditions, more than three spots in the chromatograms, These results indicated that the extracts rich by compounds.

## CONCLUSION

The flavonoids of spathe allowed the inhibition of some microorganisms that may be causal agents of human urinary, intestinal and respiratory tract infections; indicating that they could be used to cure these diseases, the flavonoid extracts showed the best antibacterial activity and acute toxicity effect which encouraged its use.

Comparatively minor attention has been given to date palm products other than utilization of all parts of the date palm may offer socio-economic benefits to date farmers and other sectors. The results of the present study may highlight the potential importance of spathe of date palm as a product rich in essential flavonoids. Future researches are needed to explore other characteristics of spathe of date palm.

## Acknowledgements

The authors wish to thank LA Segni and OU Mohamed Didi. (University kasdimerbah- Ouargla- Algeria) for their skillful technical assistance.

## REFERENCES

- [1] VVadivel, HK Biesalski, *Food Science and Biotechnology*, **2011**, 20, 3, 783-791
- [2] VSingh, N Guizani, MMEssa, *International Food Research Journal*, **2012**, 19, 3, 1063-1065
- [3] S Selim, S El Alfy, *African Journal of Biotechnology*, **2012**, 11, 2, 417
- [4] M Ali, F Jahromi, MR Moein, *International Journal of Plant, Animal and environmental Sciences*, **2014**, 4, 2231-4490
- [5] O Benkhiguel, F Ben Akka, *Journal of Animal & Plant Sciences*, **2014**, 23, 1, 3539-3568
- [6] DM Trabzuni, SE Ahmed, HM Abu-Tarboush, *Food and Nutrition Sciences*, **2014**, 1380-1381

- 
- [7]CD Stalikas, *Journal of Separation Science* **2007**, 30, 3268 – 3295
- [8]ØM Andersen, KR Markham, *FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications, United States of America*, **2006**, 2
- [9]M Bimakr, R Abdul Rahman,FS Taip,*Food and Bioproducts Processing*, **2011**, 89, 67–72
- [10]GS Četković, SM Đilas, JM Čanadanović-Brunet, VT Tumbas, *Original Scientific Paper*, **2003**, 94
- [11]C Chang, M Yang, H Wen, J Chern, *J Food Drug Analysis*,**2002**, 10, 178-182
- [12]RAHussein,*QMJ*, **2013**,9,16, 84-86
- [13]CP Victório, CS Lage,*ECLÉTICA*, **2009**, 34, 1,19-24
- [14]AR Tapas, DM Sakarkar, RB Kakde, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, September **2008**, 7, 3, 1089-1099





## Characterization of Some Flavonoids in *Phoenix dactylifera L* Using HPLC-MS-MS

Abdelaziz Bouhoreira<sup>1\*</sup> and Blkhir Dadamoussa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Sciences et Environnement; Département Sciences de la matière; Institut des Sciences et de la Technologie; Centre Universitaire de Tamanghasset-Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides; Université Kasdimerbah- Ouargla-Algérie

---

### Abstract

The spathes of *Phoenix dactylifera L* (aerial parts at flowering Stage) are used in traditional medicine and are also exploited commercially as herbal drugs for the treatment of diabetes mellitus. The present study investigates the chemical composition of the spathes. Method of coupling high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrospray ionization mass spectrometry (MS) was optimized for the separation and identification of flavonoid. Fragmentation behavior of flavonoid was investigated using The MS, MS<sup>n</sup> and UV data together with HPLC retention time (Rt) of flavonoids allowed structural. Spectral data for all peaks were recorded in the range of 200-700 nm. Some flavonoids including three quercetin derivatives (peak 8;9;10 of retention time 15.1, 16.2 and 16.8 respectively), one orientin derivative (peak 12 of Rt 17.6 min) and one flavanone derivative (peaks 13 of Rt 18.2 min) were identified in negative and positive modes using full scan mass measurements and MS<sup>n</sup> fragmentations. All flavonoid derivatives were indicated in flavonic extract of diethyl ether.

**Key words:** *Phoenix dactylifera L*, Spathes, flavonoids, HPLC-MS/MS analysis.

---

### INTRODUCTION

In recent years, research efforts are under-way on the possibilities of utilization of natural source of bioactive compounds for the dietary management of certain chronic diseases such as diabetes, obesity, cardiovascular diseases, cancer etc.[01]

Recently, herbal medicines have received great interest and have been used as an important part of health care in the anti-viral treatment field since they have relatively few side-effects compared to modern therapeutics [1,2]

Date fruits are rich in phenolic compounds possessing antioxidant activity. The pollen grains of date palm have been used in Egyptian local and in some locations in Arabia practices to improve women's fertility, date pits are roasted and used in lieu of coffee as a hot beverage[03]

Some flavonoids are more selective towards cancer cells and may have the potential for reducing side-effects compared with other anticancer drugs[01], The fruit pulp is rich in phytochemicals like phenolics, sterols, carotenoids, anthocyanins, procyanidins, and Flavonoids, some studies have shown that flavonoids, polyphenols and tannins are able to alter proliferation of cancer cell.[01]

The importance of the date in human nutrition comes from its rich composition in carbohydrate (sugars such as fructose, glucose, and sucrose; dietary fiber), salts and minerals (calcium, magnesium, phosphorus, potassium, iron, zinc, copper, manganese, and selenium), vitamins (A, A1, B, B1, B2, B3, B5, B6, and C), fatty acids, amino acids

and protein (Elleuch M ;and all 2008).Studies have shown that dates have potent anthocyanin, carotenoid, and phenolic compounds (mainly cinnamic acids) and flavonoids (flavones, flavonols and flavanones), which like most other fruits, have antioxidant properties (Biglari F and all 2009) [04]

Flavonoids are one of the most important groups of bioactive compounds in plants, which exist in the free aglycones and the glycoside forms showing a diverse structure and a broad range of biological activities. Flavonoids include several classes of compounds with similar structure having a C6-C3-C6 flavone skeleton.(de Rijke, E and all 2006),(Naczki, M and all 2004)[05]

Moreover, interact with various enzymatic systems. Their inhibition of the enzymes cyclooxygenase and lipooxygenase results in a decrease of platelet activation and aggregation, protection against cardiovascular diseases, cancer chemoprevention and their anti-inflammatory activity (Yao, L.H and all 2006),( Al-Fayez, M and all 2006) Many other biological activities are attributed to flavonoids and phenolic acids: antiviral, antimicrobial, antihepatotoxic, antiosteoporotic, antiulcer, immunomodulatory, antiproliferative and apoptotic activity[05]

The inflorescence of date palm tree, in its early stages of growth is enclosed in a hard covering / envelope known as spathe which splits open as the flowers reach maturation. The spathes are removed during pollination and insemination of date. Spathe is commonly called and has a specific fragrance particularly when it is fresh and is utilized in large scale production of Taroonah hydrodistilled water in Fars province. This water contains volatile components and is widely consumed as a beverage to improve heart functioning in local and traditional health practice. It also possesses analgesic and anti inflammatory effects [04]

## EXPERIMENTAL SECTION

### 2.1.Plant Material

The spathes of *Phoenix dactylifera L* used for this study were collected from Touggourt in the southern Algerian in March and Avril 2012 at flowering Stage. free of physical damage and injury from insects and fungal infection, were selected and used for all experiments. Upon arrival at the laboratory [02]

Polarity is an important consideration here. Less polar flavonoids (e.g., isoflavones, flavanones, methylated flavones, and flavonols) are extracted with chloroform, dichloromethane, diethyl ether, or ethyl acetate, while flavonoid glycosides and more polar aglycones are extracted with alcohols or alcohol–water mixtures. Glycosides have increased water solubility and aqueous alcoholic solutions are suitable. The bulk of extractions of flavonoid-containing material are still performed by simple direct solvent extraction[6,1]

### 2.2.Extraction

fifteen grams (15 g) of dried male spathe were placed in a soxhlet apparatus with methanol. Extraction was performed with 200 ml of an appropriate solvent for (4-5) h. After extraction, a rotary vacuum evaporator at 40 °C was used in order to remove solvent. In this experiment six solvents of different polarity were used: water, methanol, petroleum ether, diethyl ether, diethyl Acetate, n-butanol.[7,8]

### 2.3.HPLC and Mass Spectrometric Analysis

Nowadays, the main concerns about natural medicinal products are effectiveness, safety and the quality of the herbal drugs (Calixto, J. Band all 2000), (Mosihuzzaman, M and all 2008). Consequently, it is essential to identify and measure all the bioactive constituents of medicinal plants in order to ensure the biological research reliability and repeatability as well as to ensure enhancing the quality control over the pharmacological benefits and/or hazardous. HPLC–MS plays a prominent role as an analytical tool for detecting and identifying pharmacologically active metabolites and/or reactive metabolites (V and all 2009), (Xing, J and all 2007). When compared to other detection methods, MS not just allows determining natural compounds chemical structure with known and unknown structures, but also offers excellent sensitivity to low amount of samples within relatively short analysis time as well as plays an important role in screening flavonoids and other phenolics (Gouveia, S.C.; Castilho, P.C ;2010),( Tiberti, L.A and all 2007)[09].

In the last few years, several mixtures of phenolics have been analyzed with advanced LC-MS/MS equipment (Kang, H.J and all 2011) (Steinmann, D.; Ganzera, M 2011) including various publications dealing with the on-line HPLC-MS detection of flavonoids, phenolic acids and alkaloids in citrus fruits (Liu, E.-H and all 2013),( García-Salas, P and all 2013) The advantage of HPLC-MS is its sensitivity and selectivity, and the ability to use tandem mass spectrometry for the observation of aglycones and diagnostic fragments[10]

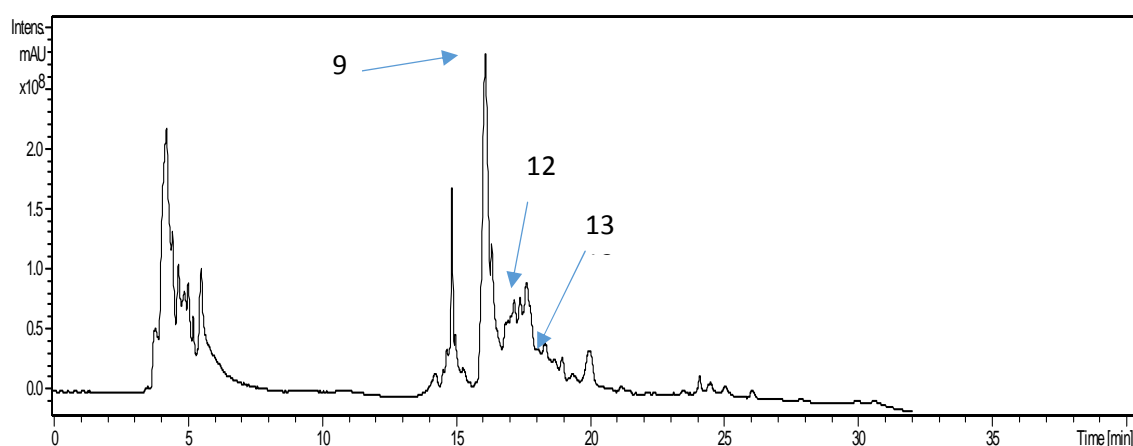
## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, a total of 13 compounds were characterized. Five flavonoid derivatives of them were unambiguously identified by comparing retention times (*TR*), UV and MS data with those of the compounds previously identified. The possible structures of another some peaks in the chromatogram were tentatively characterized on the basis of literature data. The HPLC-DAD chromatograms and total ion chromatograms (TIC) in negative and positive mode of the extracts of *Phoenix dactylifera L* are shown in Figure 1.

Figure 01 shows ionic current of the 13 natural flavonoid investigated by LC-MS. The LC conditions permitted a good separation of these compounds and were optimized for further separations of crude plant extracts containing flavonoid derivatives in 30 min.

Preliminary analysis of UV-vis spectra obtained for the peaks gave a first indication of the family of phenolic compounds [10]

Figure 01. HPLC chromatogram of flavonoid extract (diethyl ether) of spathes of *Phoenix dactylifera L*. Peak identities are numbered in Table 1,2 and Table 3



### 3.1. Identification of flavonoid aglycones (Quercetin derivatives)

Some detected ions (9,8 and 10) have been previously reported and their fragmentations are summarized in Table 1.

Table 1. Detection wavelength ( $\lambda$ ), retention time (*T R*), HPLC-MS<sup>n</sup> *m/z*

Peak	t R (min)	$\lambda$ (nm)	MS	MS <sup>2</sup>	Proposed flavonoids derivative
9	16.2	230 280	[M-H] <sup>+</sup> 382.9,366.9,350.9, <b>327.0</b> ,308.9, <b>299.9</b> ,276.9, <b>272,254.9,246,236.9,227,212</b> ,199, <b>180,134</b>	218.9,236.9	Quercetin
10	16.8		[M-H] <sup>+</sup> 366,350.9, <b>299,272,275,254.9,236.9,213</b>	348.9,332.9,315,280, 252.9,235	
8	15.1		[M-H] <sup>-</sup> 404.8,388.8, <b>327.1</b> ,293,308,299, <b>282.9,272</b> ,268.9, <b>248.8,227, 213</b> , <b>,165,150,147,137</b>	182.9,165	
<b>compounds previously identified :</b>					
Quercetin-hexoside <i>m/z</i> [300.9]:178.8,150.8, 106.9, 120.8, 272.9, 228.9, 256.8; Quercetin-3-O-rhamnoside <i>m/z</i> [300.9]:178.8,150.8, 106.9, 120.8, 272.9, 228.9, 256.8; Quercetinuronic acid <i>m/z</i> [300.9]:178.8,150.8, 106.9, 272.9, 228.9, 256.9, 192.8, 168.8 [05]					
Quercetin <i>m/z</i> 301,179, 151 ;Quercetin 7-O-glucoside-3-O-rutinoside <i>m/z</i> 463, 301,179, 151 ;Rutin <i>m/z</i> 301,179, 151 [10]					
Rutin <i>m/z</i> 300,271,179 ,151 ; quercetin <i>m/z</i> 273,255,151,133 [02]					
Quercetin-O-hexoside 301, 273, 179, 151 ; quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside 301, 273, 179, 151 [09]					
Quercetin ; quercetin-3-O-galactoside ; quercetin-3-O-glucoside ; quercetin-3-O-glucuronide ; rutin (querc-3-O-rutinoside) 300.0284 ;151.0036 [11]					
Quercetin <i>m/z</i> 303,285,275,247,257,229,153,149,165,137 [12]					
Quercetin 3-O-galactoside <i>m/z</i> 301.0342, 300.0270, 273.0054,178.9968, 151.0038 [13]					

In this fraction, a total of 13 compounds were characterized. Three of them were unambiguously identified by comparing  $\lambda_{\max}$  (nm) and MS data with those of the flavonoids previously identified:

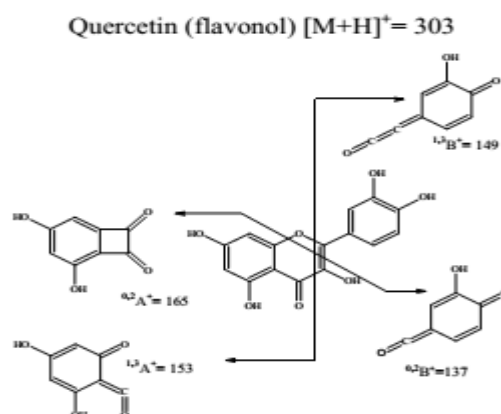
Chromatogram peak areas on 256nm for quercetin-3-O-galactoside; 256,356 nm for Quercetinhexoside; 256,362 nm for quercetin-3-O-rhamnoside [05]

- 266, 356nm for quercetin-O-(O-galloyl)-hexoside; 254, 362nm for quercetin-O-hexoside[09]
- 256,372 nm for Standard compound (quercetin)[12]

Peaks 9,10 and 8 were identified as quercetin derivatives by comparing their retention time and MS/MS2 data with those of the flavonoids previously identified. In the positive ion mode, these two compounds showed common fragment ions at  $m/z$  165 ( $[^{0,2}A]^+$ ), 153 ( $[^{1,3}A]^+$ ), 137 ( $[^{0,2}A-CO]^+$ ) for quercetin, and Diagnostic fragment ions ( $[M + H^+ - H_2O - 2CO]^+$ ) and ( $[M - H - H_2O - 2CO]^+$ ) were also observed at  $m/z$  229,227 respectively for quercetin. [12]

The MS spectra of the  $[M - H]^-$  of compounds 9 ( $m/z$  382.9) that showed fragment ions characteristic of a protonated flavonoid aglycone. formed from the loss of a deoxyhexose ( $[M - H - 146]^-$ ) suggested that these compounds were flavonoid O-monoglycosides.

Scheme 1. The observed retrocyclization cleavages of quercetin



The basic fragments produced by C-ring fission of quercetin are presented in Scheme 1. In particular, the C-ring fission of fisetin results in  $0,2B^+$  and  $1,3A^+$  fragments that possess equal  $m/z=137$  peaks, as well as  $0,2A^+$  and  $1,3B^+$  ones with  $m/z=149$ . Therefore, instead of four characteristic fragments, like in the case of quercetin and kaempferol, only two were observed ( $m/z=137$  and  $m/z=149$ ). Flavonol did not exhibit the  $1,3B^+$  fragment as its formation is associated with the presence of B-ring *o*- or *p*-hydroxy-substitution. This was also confirmed by the mass spectrum of galangin (Hughes, J.R and all 2001)[12]

Major diagnostic fragments of flavonoid aglycone identification are those involving the cleavage of two C-C bonds of the C-ring giving two fragment ions which provide information about the number and type of substituents in A- and B- rings. These fragment ions are designated according to the nomenclature proposed by Ma et al (Ma, Y.L 1997). For free aglycone  $i,jA$  and  $i,jB$  labels refer to the fragments containing intact A- and B-rings, respectively, in which the superscripts *i* and *j* indicate the C-ring bonds that have been broken.[05]

The structures of these compounds were proposed based on UV maxima (Table 1) as well as fragmentation pattern using ESI-MS-MS experiments (key aglycone fragments of 179 and 151 for quercetin and its methyl derivatives. In addition, the loss of 162 Daltons was indicative of hexose (glucose or galactose, the most common sugars found in flavonoids) the loss of 146 Daltons was indicative of rhamnose, the loss of 133 Daltons was indicative of pentose (xylose or arabinose, the most common pentoses found in natural products), and the loss of 308 Daltons indicative of compounds having the disaccharide structure rutinose or neohesperidose linked through an -O-glycosidic bond [10]

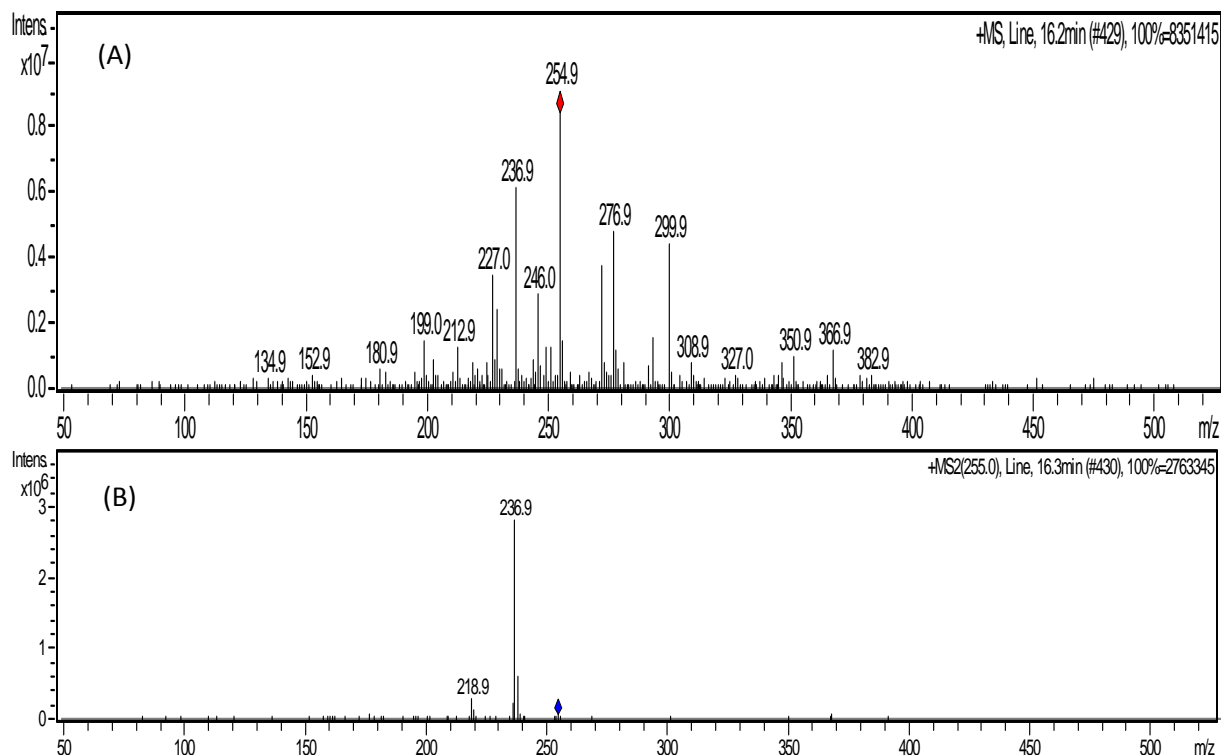


Figure 02:LC-MS/MS spectra obtained of compound peak 9,MS (A), MS<sup>2</sup>(B)

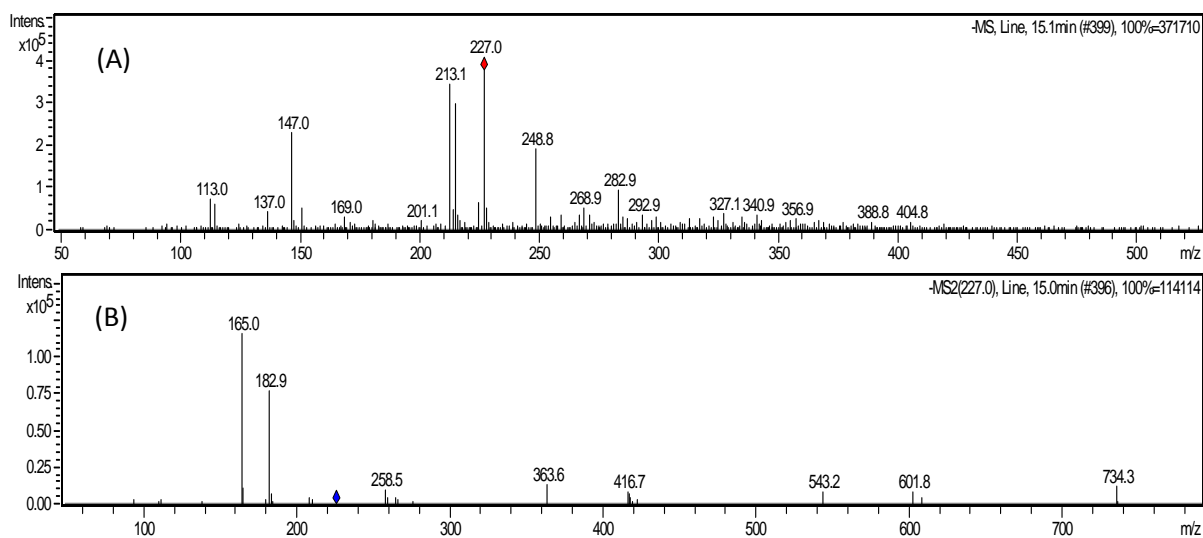
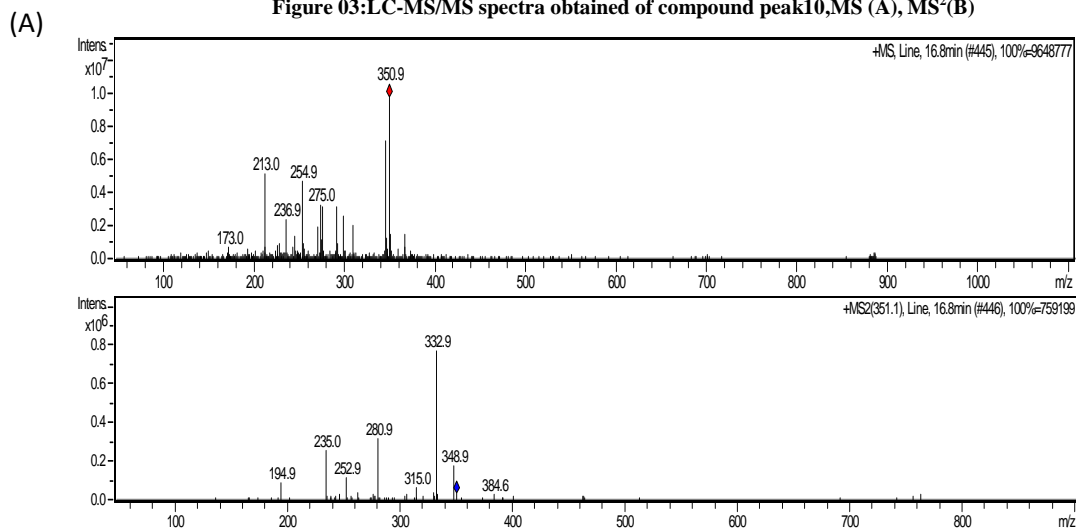


Figure 03:LC-MS/MS spectra obtained of compound peak10,MS (A), MS<sup>2</sup>(B)



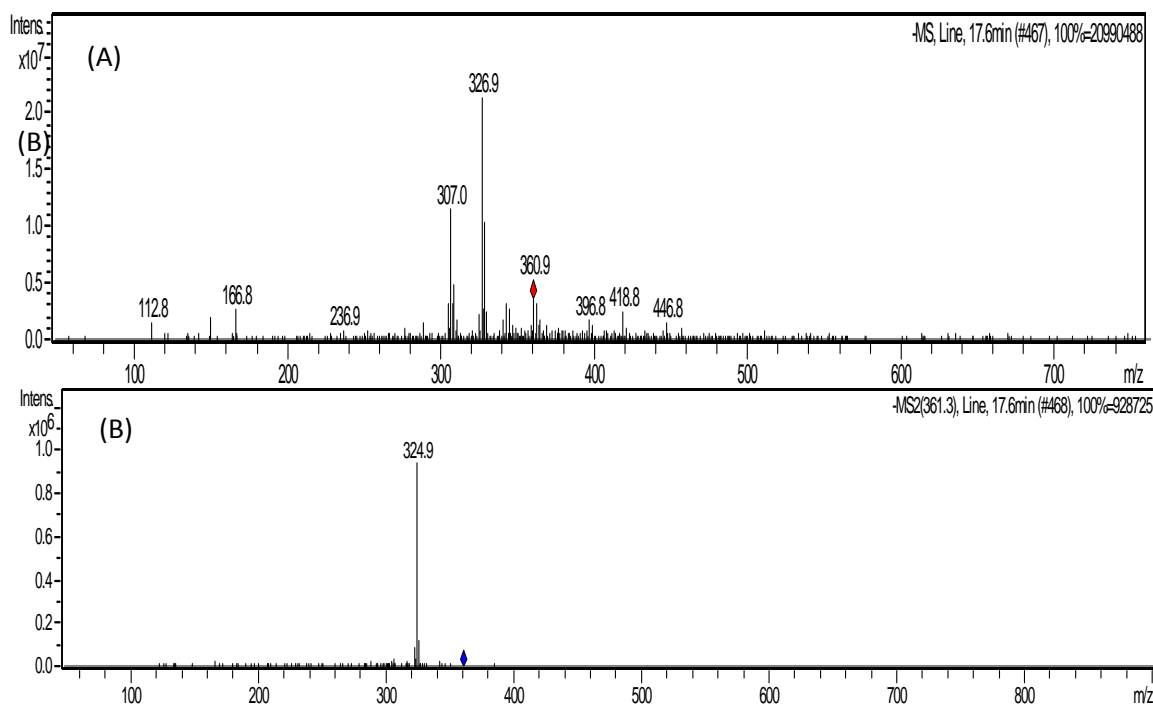


Figure 04:, LC-MS/MS spectra obtained of compound peak 8,MS (A), MS<sup>2</sup>(B)

### 3.2. Identification of Luteolin glycoside derivative (Orientin derivatives)

Table 2.Detection wavelength ( $\lambda$ ), retention time ( $T R$ ), HPLC-MS<sup>n</sup>  $m/z$

Peak	t R (min)	$\lambda$ (nm)	MS	MS <sup>2</sup>	Proposed flavonoids derivative
12	17.6	325	[M-H] <sup>-</sup> 446.8,418.8,396.8,360.9,326.9,307.0,236.9,166.8,112.8	324.9	Orientin
<b>compounds previously identified :</b>					
luteolin 8-C-b-D-glucopyranoside (orientin) m/z 447,357,326.9 [14]					
luteolin-(7-O-glucopyranosil)-8-C-glucopyranoside (orientin-7-O-glucoside) m/z 447, 357, 327, Luteolin-di-glycoside derivative m/z 447, 357, 327 [15]					
Orientin m/z 447, 357, 327,285 [16]					

The fragment at  $m/z$  447 showed the characteristic orientin MS ions at  $m/z$  357 (M-H-90), and 327 (M-H-120). The compound was tentatively assigned as luteolin-(7-O-glucopyranosil)-8-C-glucopyranoside (orientin-7-O-glucoside,) [14]

The product ion spectra of the ion  $m/z$  447 of orientin differs in relative abundance of the  $m/z$  357 (loss of 90 u) and  $m/z$  327 (loss of 120 u).[16]

Peak12 ([M-H]<sup>-</sup> ions at  $m/z$  447) was tentatively identified as luteolin 8-C-Glucoside [10]

The MS spectra of the [M - H]<sup>-</sup> of compounds 12 ( $m/z$  446.8) that showed fragment ions characteristic of a protonated flavonoid . formed from the loss of a deoxyhexose ([M - H 146]<sup>-</sup>) suggested that these compounds were flavonoid O-monoglycosides

Peaks 12 with a [M-H]<sup>-</sup> ion at  $m/z$  447 were assigned according to UV and mass spectral data (Table 2) of this compound is consistent with the proposed flavonoid structure, Luteolin-di-glycoside derivative

Scheme 2: The observed retrocyclization cleavages of orientin

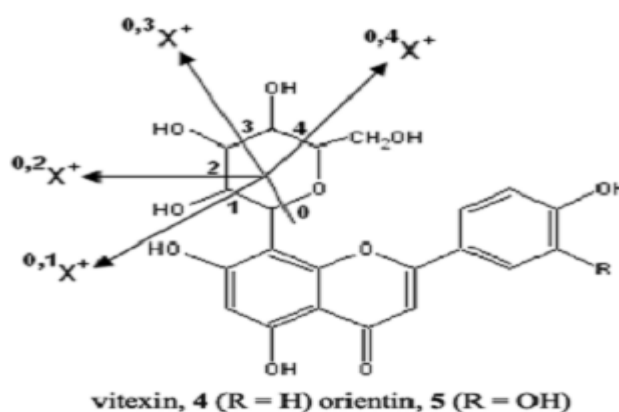


Figure 05:LC-MS/MS spectra obtained of compound peak 12,MS (A), MS<sup>2</sup>(B)

### 3.3. Identification of chalcone or flavone aglycone

Table 3. Detection wavelength ( $\lambda$ ), retention time ( $T R$ ), HPLC-MS<sup>n</sup>  $m/z$

Peak	t R (min)	$\lambda$ (nm)	MS	MS <sup>2</sup>	Proposed flavonoids derivative
13	18.2	260 325	[M-H] <sup>-</sup> 574.4,460.9,416.8,380.8,344.9,309, 284.9,268.9,243.1,223,208,150.9,112.9	344.8,308.9,280.8 ,238.8,208.8,178.9 ,136.8	chalcone or flavone aglycone
<b>compounds previously identified :</b>					
[M - H] <sup>-</sup> ions of dihydrochalcones $m/z$ 301 : 283,268, 225,152 [17]					
[M - H] <sup>-</sup> ions of flavanones; 283,268,151 ; 285,270, 243, 226,175, 151,136, 1[18]					
[M-H] <sup>-</sup> ions of chalcones ; 283,268, 241, 226, 239, 179,153. [17]					

The absorption bands were preliminary identified as chalcone or flavone aglycone according to maxima absorption bands at about 290 and 340 nm. and the others a dihydrochalcone or flavanone aglycone (absorption bands at 230 and 290 nm)[17]

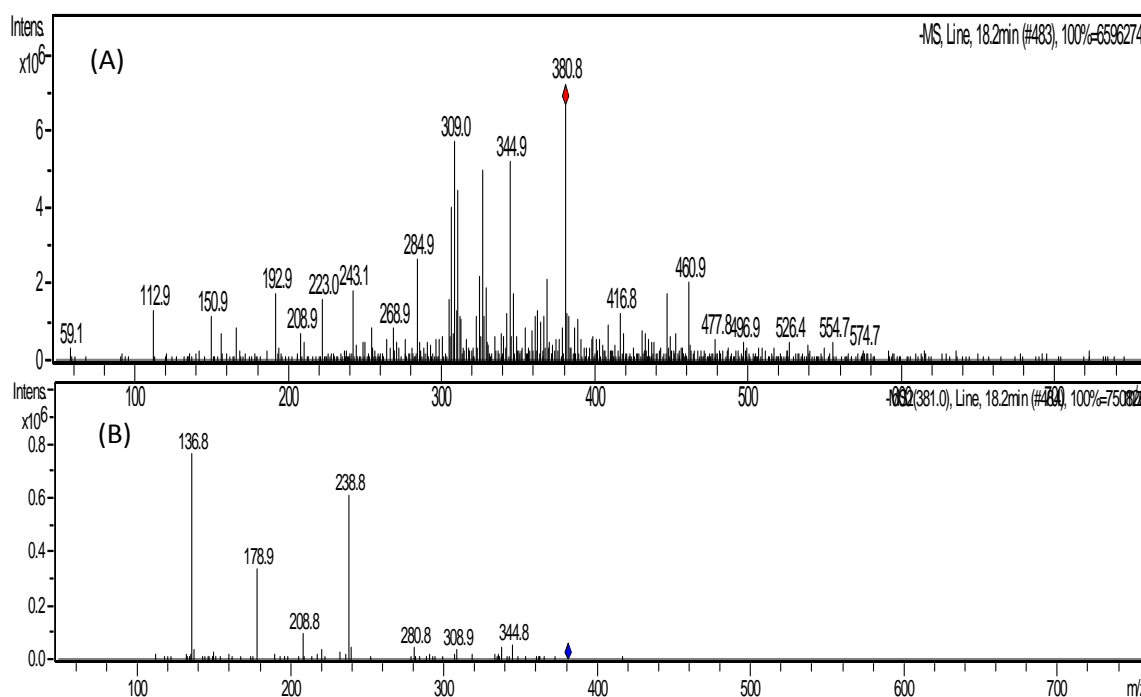


Figure 06:LC-MS/MS spectra obtained of compound peak 13,MS (A), MS<sup>2</sup>(B)

## CONCLUSION

LC/MS/MS analysis of diethyl ether fractions from the aerial parts of *Phoenix dactylifera L* (spathes) to the identification of five flavonoids derivative. Quercetin, orientin and flavanone are identified for the first time in genus *Phoenix dactylifera L*.

## Acknowledgments

The authors wish to thank LA. Segni and OU. Mohamed Didi.(University kasdimerbah- Ouargla- Algeria) for their skillful technical assistance.

## REFERENCES

- [01] V Singh, N Guizani, MM Essa, FL Hakkim, MS Rahman, *International Food Research Journal*, **2012**, 19 (3), 1063-1065
- [02] Y Lin, W Xu, M Huang, Li Huang, M Ye, X Zhang, K Chu, *Molecules journal*, **2015**,20, 12209-12228
- [03] S Selim1, SEAlfy, MA Ruwaili1, A Abdo, SA Jaouni, *African Journal of Biotechnology*, **2012**, 11(2), 417
- [04] G Zineb, MBoukouada, A Djeridane, M Saidi, M Yousfi, *Mediterr J NutrMetab*, **2012**, 5, 119–126
- [05] A Plazonić , F Bucar , Ž Maleš , A Mornar , B Nigović , N Kujundžić , *Molecules journal*,**2009**,14, 2466-2490
- [06]. ØM Andersen , KR. Markham, FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press Taylor & Francis Group, New York, **2006**, 1048-1197
- [07] M Bimakr, RA Rahman, FS Taip, A Ganjloo, LM Salleh, J Selamat, A Hamid, IS Zaidul, *Food and Bioproducts Processing*, **2011**,89, 67–72.
- [08] GS Četković, SM Đilas, JM Čanadanović-Brunet,VT Tumbas, *Original scientific paper* , **2003** ,34, 93–102
- [09] LL Saldanha, W Vilegas, ALDokkedal, *Molecules journal*, **2013**, 18, 8402-8416.
- [10] A Brito, JE Ramirez, C Areche, B Sepúlveda , MJ Simirgiotis, *Molecules journal*,**2014**, 19, 17400-17421.
- [11] MD Rosso, A Panighel , AD Vedova, M Gardiman, R Flamini, *Molecules journal*, **2015**, 20, 18095-18106.
- [12] D Tsimogiannis, M Samiotaki, G Panayotou, VOreopoulou, *Molecules journal*, **2007**, 12, 593-606
- [13] M Gamaleldin, E Karar, N Kuhnert, *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*,**2015**, 1:1
- [14] MJ Simirgiotis, *Molecules journal*, **2013**, 18, 2061-2080.
- [15] MJSimirgiotis, G Hirschmann, J Bórquez , E J Kennelly, *Molecules journal*, **2013**, 18, 1672-1692.
- [16] I Krasteva, S Nikolov, *J. Quim. Nova*, **2008**, 31(1), 59-60.
- [17] B Portet, N Fabre, R Rozenberg, JLH Jiwan, C Moulis, JQ Leclercq, *Journal of Chromatography A*, 1210, **2008**, 45 – 54
- [18] N Fabre, I Rustan, E Hoffmann, JQLeclercq, *J American Society for Mass Spectrometry*, **2001**, 12, 707–715



ISSN 0330 - 7956



# REVUE DES RÉGIONS ARIDES

Editée par l'Institut des Régions Arides - Médenine - TUNISIE

Numéro Spécial

**Actes du 5<sup>ème</sup> Meeting International  
sur l'Aridoculture et les Cultures Oasiennes sous le thème:  
«BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE  
EN ZONES ARIDES»**

Zarzis(Tunisie),  
19-21 Décembre 2016

43(3/2017)

**Tome I**

**Décembre 2017**

Répertoriée dans la base PASCAL de l'INIST

---

## Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires bioactives du palmier dattier

Abdelaziz Bouhoreira\*, Blkhir Dadamoussa  
\*E-mail : abdealazizb@gmail.com

### Résumé

La Spathe de *Phoenix dactylifera* L. utilisée largement dans la médecine traditionnelle grâce à ses propriétés biologiques. Cette étude vise à réaliser l'extraction et identification de certains flavonoïdes dans la spathe. La matière sèche a été extraite et broyée à l'aide d'eau et de méthanol comme solvant, et l'extracteur de Soxhlet. Nous avons utilisé la technique d'extraction et décoction par différents solvants (éther d'éthylrique, l'acétate d'éthyle, le n-butanol) de polarité différente, On réalisées les analyses par la chromatographie liquide haute performance couplée à une détection de diodes UV et spectrométrie de masse, elle même légèrement classer parmi les meilleur méthodes de séparation et l'identification de flavonoïde. Les données spectrales de tous les pics enregistrés dans la gamme de 200-700 nm, L'extrait d'éther d'éthylrique comprennent Certains flavonoïdes de dérivés de catéchines, Les résultats de cette étude peuvent mettre l'importance potentielle des spathes de palmier dattier comme un produit riche en flavonoïdes.

**Mots-clés:** flavonoides, HPLC-MS/MS, *Phoenix dactylifera* L, Spathes

### Summary

Spathes of *Phoenix dactylifera* L. which is largely used in traditional medicine due to its biological properties. The current study aims to verify and determine some Flavonoids in spathes of *Phoenix dactylifera* L. Dried leaves were extracted using water and methanol alcohol as a solvent by soxhlet extraction. We used extraction technique and decoction by different solvents which are (diethyl ether, diethyl Acetate, n-butanol) of different polarity. The analyses were carried out by high-performance liquid chromatography coupled to diode array UV detection and mass spectrometry was optimized for the separation and identification of flavonoid, Spectral data for all peaks were recorded in the range of 200-700 nm. Some flavonoids includ five catechins derivatives in the different fractions. The results of the present study may highlight the potential importance of date palm spathes as a product rich in Flavonoids.

**Key words:** flavonoids, HPLC-MS / MS, *Phoenix dactylifera* L, Spathes

### 1. Introduction

Les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme, elles sont utilisées comme source essentielle de médicaments. Ces dernières années, les efforts de recherche sont en cours sur les possibilités d'utilisation de la source naturelle de composés bioactifs pour la gestion diététique de certaines maladies chroniques telles que le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, le cancer, etc (Vadivel et Biesalski, 2011). Les fruits de dattes sont riches en composés phénoliques possédant une activité antioxydante (Singh et Guizani, 2012). Les grains de pollen de palmier dattier ont été utilisés dans les pratiques locales égyptiennes pour améliorer la fertilité chez les femmes, et dans certains endroits en Arabie Saoudite (Samy et Sahar, 2012). Le présent travail est une contribution dans la valorisation, la caractérisation et l'identification de quelques métabolites secondaires bioactives contenus dans la palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

### 2- Matériel végétal

Les spathes de *Phoenix dactylifera* L. utilisées dans cette étude ont été recueillies près de Touggourt dans le sud algérien en Mars et Avril 2012 à la saison de la floraison. La matière séchée a été broyée et stockée dans un contenant et conservée à 4°C jusqu'à une analyse ultérieure [3].

## 2.1- Extraction

Suivant le protocole d'extraction décrit par Markham (1982), avec modification inspirée selon la méthode de Bruneton (1993) (Merghem et *al.*, 1995). Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. Le matériel végétal broyé (30 g) est soumis à une extraction par l'extracteur soxhlet dans le mélange méthanol / eau (80/20 : v/v) pendant 5 heures, les extraits obtenus sont concentrés et évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif puis repris avec 500 ml d'eau bouillante. Après filtration, la solution aqueuse est épuisée successivement par l'éther de pétrole (élimination des cires, des lipides et de la chlorophylle par lavages (v/v)), l'éther diéthylique (v/v) (phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés, l'acétate d'éthyle (certains flavonoïdes aglycones) et enfin par le n-butanol (les flavonoïdes di et triglycosides). La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires, les extraits obtenus sont ensuite stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation [04] [05].



Les résultats ont montré que l'extraction au Soxhlet est très efficace par rapport à la macération. En outre, le rendement maximal (%) a été observé pour les extraits de méthanol (par extraction de Soxhlet), suivi de l'extrait aqueux et du chloroforme [06]

Généralement les solvants d'extraction utilisés sont des alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther diéthylique et de l'acétate d'éthyle. Cependant, les acides phénoliques très polaires (benzoïque, cinnamique) n'a pas pu être extraite complètement avec des solvants organiques purs, et les mélanges d'alcool et d'eau ou d'acétone et d'eau sont recommandés [07].

## 2.2- L'activité antibactérienne

**Préparation des solutions** : les solutions d'extraits d'essai ont été préparées par les extraits dissous dans du DMSO. Le procédé de diffusion sur disque a été utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne. Mueller Hinton (Institut Pasteur, Alger, Algérie) agar a été préparé dans les plaques comme les médias pour les micro-organismes des tests. Les disques de papier filtre stérile (Whatman n° 1mm). On laisse sécher sous la hotte à flux laminaire pendant une nuit. Toutes les plaques ont été incubées pendant (24-48) h à 37 °C. L'activité antibactérienne a été interprétée de la taille du diamètre de la zone d'inhibition mesurée au millimètre (mm) comme observé à partir des zones claires autour des disques [08].

## 2.3- L'analyse par HPLC et spectrométrie de masse

La technique HPLC-MS joue un rôle comme outil d'analyse pour détecter et identifier des métabolites pharmacologiquement actifs ou métabolites réactifs (V et tout 2009), (Xing, J et tout 2007). Par rapport d'autres méthodes de détection, MS non seulement permet de déterminer la structure naturelle chimique des composés avec des structures connues et inconnues, mais offre également une excellente sensibilité à une faible quantité d'échantillons dans relativement peu de temps d'analyse ainsi que joue un rôle important pour classer et identifier les flavonoïdes et autres composés phénoliques (Gouveia, SC; Castilho, PC, 2010), (Tiberti, LA et tout 2007) [09].

## 3- Résultats et discussion

### 3.1- Tests phytochimiques

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des familles chimiques essentiellement tel que les composés phénoliques (Flavonoïdes, Coumarines, Quinones, Tanins) dans la Spathe du palmier dattier.

**Tableau 1.** Résultats des tests phytochimiques d'extraits

Extraction	Parties aériennes (Spathes) MeOH/Eau	Parties aériennes (Folioles) MeOH/Eau
Flavonoïdes	+++	+++
Quinones	+	+
Coumarines	++	++
Alcaloïdes	-	+
Tanins	+++	+++

### 3.2- Extraction

On remarque que le rendement de la fraction butanolique est plus élevé, ainsi que le rendement d'extrait d'éther d'éthylrique est faible par rapport aux autres fractions. Ces résultats ont montré que le rendement d'extraction dépend du choix des solvants utilisés selon leurs polarité, la quantité des flavonoïdes contenue dans chaque fraction.

**Tableau 2 :** Rendement des extraits obtenus par extraction

Extrait	Couleur	Le rendement (%)
Fraction des flavonoïdes globale	marron /rouge brique	8.95
Fraction d'éther d'éthylrique	vert huileux	0.7
Fraction d'acétate d'éthyle	Verre/marron	1.9
Fractionn-butanol	Rouge brique foncé	4.2
Fraction aqueuse finale	Rouge brique clair	1.70



**Figure 1 :** (A) l'extraction par n-butanol; (B) l'extraction par éther de pétrole ; (C) les différents extraits

### - Analyse d'extrait par CCM

**Tableau 3 :** Résultats des observations des plaques CCM

Système	Réactifs	Spot(s)	valeurs Rf
acétate d'éthyle/ acide formique/acide acétique / Eau (100/26/26/11) v/v	UV254 nm	3	Trois taches grises 0.96 ; 0.88 ; 0.83
	UV365 nm vapeurs d'ammoniac	5	0.96 marron/ jaune; 0.91Bleu0.88Mauve; 0.85vert ; 0.83Violet
acétate d'éthyle /n-butanol/ méthanol/Eau (60/30/1/1)	UV254 nm	2	0.93 (Gris) ; 0.89 (Gris)
	UV365 nm vapeurs d'ammoniac	2	0.93(Violet) ; 0.89(Bleu)

### 3.3-L'activité antibactérienne

**Tableau 4 :** Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de fraction d'éther d'éthylque (DE = 5 mg / ml)

Microorganismes	concentration inhibitrice				
	DE	DE/2	DE/4	DE/8	DE/16
Escherichia coli	9	7	0	0	0
Staphylococcus aureus	18	16	15	7	6
Pseudomonas aeruginosa	9	8	7	7	0
Streptococcus sp	12	9	9	9	6
Condida	14	10	9	8	0

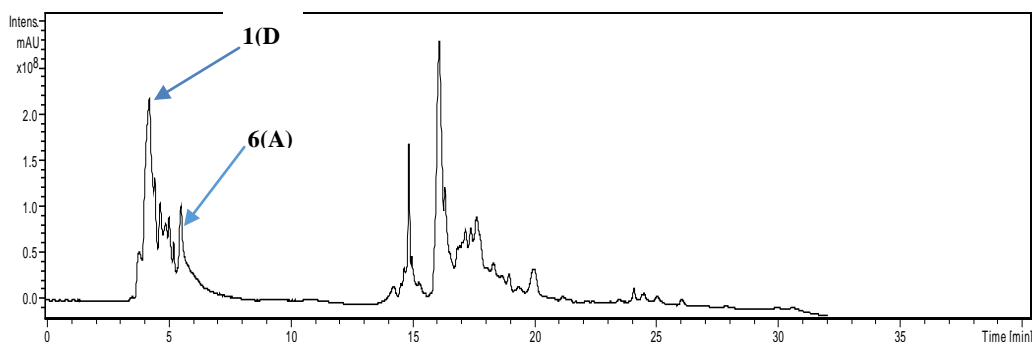
**Tableau 5.** Longueur d'onde de détection ( $\lambda$ ), Temps de rétention (T R), HPLC-SM<sup>n</sup> m/z

Pic	Temps de rétention	$\lambda$ (nm)	MS	MS <sup>2</sup>	Dérivés flavonoïdes (proposées)
06 (A)	5.5 min	250	[M-H] <sup>+</sup> 416.0, 366.7, 323.9, 289.9, 251.9, 209, 204.9, 188.9, 164.9, 139, 87.0	277.3, 244.8, 188.9, 169, 148.9	Catéchine
05 (B)	5.0 min	245	531.0, 396.7, 362.7, 345.9, 323.9, 278.9, 251.9, 236, 210.9, 188.9, 175, 151, 139, 126.9, 101, 87	147.8, 128.2, 82.8	
03 (C)	4.6 min	250 ; 285	100.6, 899.8, 739.5, 677, 391.9, 251.9, 139.0, 87.1	380.2, 346, 266.6, 126	
01 (D)	4.1 min	245	435, 405.6, 323.9, 278.9, 251.9, 195.9, 139.0, 87.1	138.1, 133.9, 120.9, 107.9, 97.9, 81,	

**Des Composés identifiés précédemment :** Catechin m/z 139[10]; catechin m/z 292, 251.1, 206.9, 177.4, 147, 138.9, 125, 122 [11]; catechin m/z 289, 245, 205, 151[10]; Catechin (epi) heteroside m/z 435, 325, 289.1, 253.2 ; catechin/epicatechin m/z 289, 245, 205 [13]; catechin m/z 435, 323, 289, [14]; (+)-catechin standar m/z 121, 123, 139.3, 151.3, 165.3, 244.2, 273.2, 289, 291.2 [15]; catechin m/z 289, 245, 205, 203, 137[16]; (+)-Catechin m/z 290, 289 (245, 205, 179) [17]; (-)epicatechin m/z 123.2, 139.2, 151.1, 165.0, 172.6, 291; Epicatechin m/z 291, 289, 273, 245, 205, 179, 151, 139, 123[18]; Catechin m/z 393.0, 289.1, 245.2, 204.9; Epicatechin m/z 289.1, 245.2, 204.9 [19]; Catechin m/z 289.28, 271.02, 244.99, 226, 212.2, 203, 187.5, 175.0, 161, 136.9, 125.1 [20]

### 3.4. L'analyse par HPLC et spectrométrie de masse

Dans cette fraction ont été caractérisés quatre dérivés de catéchineselon la comparaison des données avec des Composés identifiés précédemment



**Figure 2 :** Chromatogramme HPLC deFraction d'éther d'éthylque

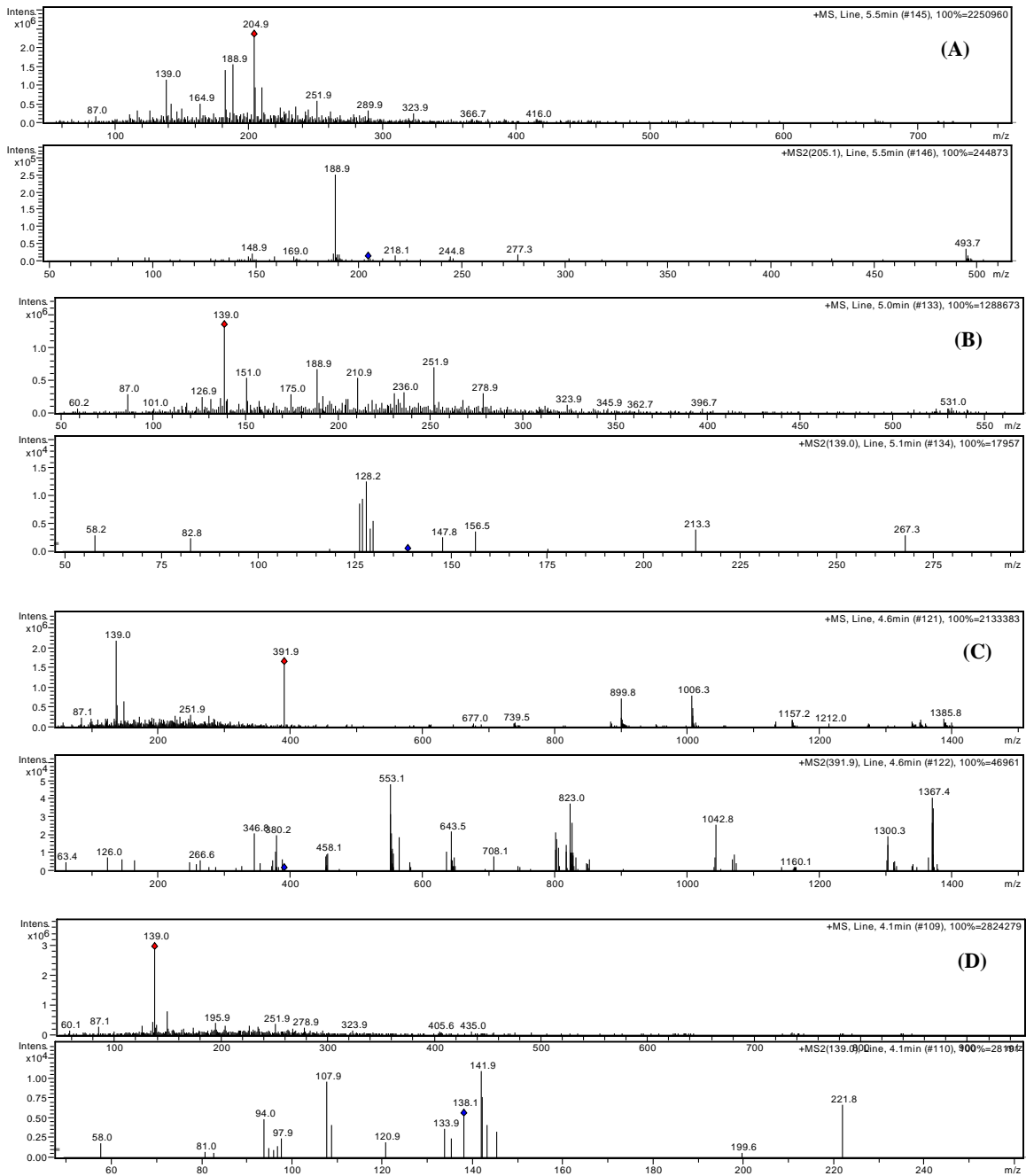


Figure 3 : Différent spectres de masse des pics A, B, C et D

#### 4- Conclusion

La présence de dérivés de catéchine dans cette plante est intéressante compte tenu du rôle possible de la catéchine et ses dérivés polymères de l'activité biologique liée à l'utilisation traditionnelle.

#### Remerciements

Les auteurs tiennent à souligner l'aide fournie par l'Université Kasdi Merbah Ouargla - Algérie, Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie.

---

## Références bibliographiques

- Singh V, Guizani N. (2012) : Comparative analysis of total phenolics, flavonoid content and antioxidant profile of different date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) from Sultanate of Oman. *International Food Research Journal* 19 (3), 1063-1065
- Samy S, Sahar EA, (2012) : Susceptibility of imipenem-resistant *Pseudomonasaeruginosa* to flavonoid glycosides of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tamar growing in Al Madinah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 417
- Dina MT, Saif Eldien B. (2014) : Chemical Composition, Minerals and Antioxidants of the Heart of Date Palm from Three Saudi Cultivars. *Food and Nutrition Sciences*, 1380-1381.
- Mandana B, Russly AR. (2011) : Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bio-products Processing*.
- Gordana SC, Sonja MD, (2003) : Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of Marigold (*Calendula officinalis* L.) EXTRACTS, Original scientific paper, 94.
- Lalit KB, Pratima V, Rekha V, (2013) : Determination of preliminary phytoconstituents, total phenolic and flavonoids contents in the roots, leaves and stems of *Cleome viscosa* Linn, *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 4(12), 891-895.
- Constantine DS, (2007) : Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci*, 30, 3268 – 3295
- Rajaa AH. (2013) : Extraction and Identification of A Flavonoid compound from Oak Plant(*Quercus infectoria* Oliv.) and study Of Its Antibacterial Activity, in vitro, QMJ, VOL.9 No.16, 84-86
- Cristiane PV, Celso Luiz SL. (2009) : Flavonoid extraction from *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith leaves using different techniques and solvents, [www.scielo.br/eq](http://www.scielo.br/eq); [www.electica.iq.unesp.br](http://www.electica.iq.unesp.br). *ELECTICA*, Volume 34. número 1, 20.
- Daniel JZ, Bryant CN, Klaus A, Joseph JD. (2000) : Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry, *Anal. Chem*, 72, 5020-5026.
- Paola M, March (2006) : Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: Characterisation and LC/ESI/MS/MS quantitative analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Renan G. (2015) : Differentiation of two morphologically similar Amazonian Aniba species by mass spectrometry leaf fingerprinting, Analytical methods.
- Youwu H, Liang C, Li Feng, Fujiang G, (2013) : Characterization of Total Phenolic Constituents from the Stems of *Spatholobus suberectus* Using LC-DAD-MS<sup>n</sup> and Their Inhibitory Effect on Human Neutrophil Elastase Activity, *J Molecules*, 18, 7549-7556.
- Maffei RF. (1997) : A Rapid Screening by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Fast-atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry of Phenolic Constituents with Radical Scavenging Activity, from *Krameria triandra* Roots, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL 11, 1303–1308
- Chia-Lin.C, Rong-Tsun.W. (2011) : Quantification of (+)-catechin and (–)-epicatechin in coconut water by LC–MS. *Food Chemistry*, 126, 710–717.
- JIANPENG D, VIOLA SYL, JASON TCT, MAW-RONG L. (2007) : Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea Manufactured by Semifermentation and Drying Processes. *J. Agric. Food Chem*, 55, 7462–7468
- Jianping S, Feng L, Yan B, Ping L, Changqing D. (2007) : Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. *J. Molecules*, 12, 679-693.
- Guanghou S, Lai Peng L. (2004) : Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1022, 67–75.
- Sami A, Michael W, 2014, Green Tea Extract Induces the Resistance of *Caenorhabditis elegans* against Oxidative Stress, *Antioxidants*, 3, 129-143.
- Yubin L, Tao S, Xing J. (2016) : UPLC– MS/MS assay for simultaneous determination of four compounds in rat plasma: application to pharmacokinetic study after oral administration of *Caulis Spatholobi* extract. *J Biomed. Chromatogr.*



# Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires bioactives du palmier dattier

Abdelaziz Bouhoreira<sup>1</sup>, Blkhir Dadamoussa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département sciences de la matière, Institut des sciences et technologies, Centre universitaire de Tamanghasset – Algérie.

<sup>2</sup> Université de Ghardaïa – Algérie.

**Résumé:** La Spathe de *Phoenix dactylifera L* qui utilisé largement dans la médecine traditionnelle grâce à ses propriétés biologiques, Cette étude à réaliser l'extraction et identification de certains flavonoïdes dans la spathe. Ont été extraites la matière séchées et broyées à l'aide d'eau et de méthanol comme solvant, et l'extracteur de Soxhlet. Nous avons utilisé la technique d'extraction et décoction par différents solvants (éther d'éthylque, l'acétate d'éthyle, le n-butanol) de polarité différente, On réalisées les analyses par la chromatographie liquide haute performance couplée à une détection de diodes UV et spectrométrie de masse, elle même légèrement classer parmi les meilleur méthodes de séparation et l'identification de flavonoïde. Les données spectrales de tous les pics enregistrés dans la gamme de 200-700 nm, L'extrait d'éther d'éthylque comprennent Certains flavonoïdes de dérivés de catéchines, Les résultats de cette étude peuvent mettre l'importance potentielle des spathes de palmier dattier comme un produit riche en flavonoïdes.

**Abstract:** Spathes of *Phoenix dactylifera L* which is largely used in traditional medicine due to its biological properties. the current study aims to verify and determine some Flavonoids in spathes of *Phoenix dactylifera L*. Dried leaves were extracted using water and methanol alcohol as a solvent by soxhlet extraction. we used extraction technique and decoction by different solvents witch are (diethyl ether, diethyl Acetate, n-butanol) of different polarity. The analyses were carried out by high-performance liquid chromatography coupled to diode array UV detection and mass spectrometry was optimized for the separation and identification of flavonoid, Spectral data for all peaks were recorded in the range of 200-700 nm. Some flavonoids includ five catechins derivatives in the different fractions. The results of the present study may highlight the potential importance of date palm spathes as a product rich in Flavonoids.

## 1. Introduction

Les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme, elles sont utilisées comme source essentielle de médicaments. Ces dernières années, Les efforts de recherche sont en cours sur les possibilités d'utilisation de la source naturelle de composés bioactifs pour la gestion diététique de certaines maladies chroniques telles que le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, le cancer, etc. (Vadivel et Biesalski, 2011). Le fruits de date sont riches en composés phénoliques possédant une activité antioxydant. Les grains de pollen de palmier dattier ont été utilisés dans les pratiques locales égyptiennes pour améliorer la fertilité chez les femmes, et dans certains endroits en Arabie saoudite. Le présent travail est une contribution dans la valorisation, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires bioactives contenus dans la Palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*)

## 2. Matériel et Méthodes

### Matériel végétal

En utilisées dans cette étude les spathes de *Phoenix dactylifera L* qui ont été recueillies près de Touggourt dans le sud algérien en Mars et Avril 2012 à la saison de la floraison. La matière séchée a été broyée et stockée dans un contenant et conservé à 4°C jusqu'à une analyse ultérieure

**Extraction:** le protocole d'extraction décrit par Markham (1982), avec modification inspirée selon la méthode de Bruneton (1993) (Merghem et al, 1995) Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. le matériel végétal broyé (30 g) est soumis à une extraction par l'extracteur soxhlet dans le mélange méthanol / eau (80/20 : v/v) pendant 5 heures, l'extraits obtenus sont concentré et évaporé presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif puis repris avec 500 ml d'eau bouillante. Après filtration, la solution aqueuse est épuisée successivement par l'éther de pétrole (Elimination des cires, des lipides et de la chlorophylle par lavages (v/v)), l'éther diéthylique (v/v) (phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés, l'acétate d'éthyle (certains flavonoïdes aglycones) et enfin par le n-butanol (les flavonoïdes di et triglycosides). La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires, les extraits obtenus sont ensuite stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

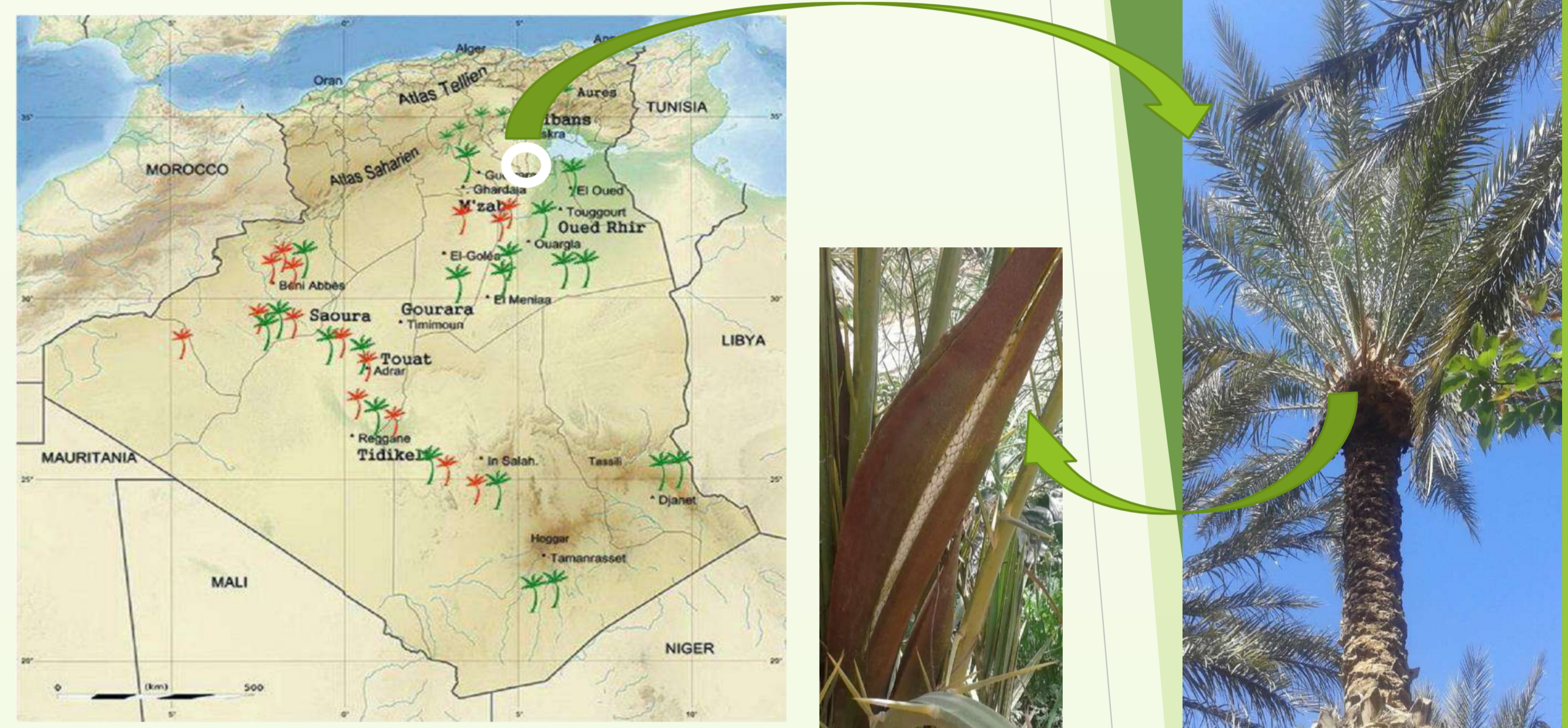
### L'activité antibactérienne :

Préparation des solutions : les solutions d'extraits d'essai ont été préparées par les extraits dissous dans du DMSO.

Le procédé de diffusion sur disque a été utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne. Toutes les plaques ont été incubées pendant (24-48) h à 37 °C. L'activité antibactérienne a été interprétée de la taille du diamètre de la zone d'inhibition mesurée au millimètre (mm) comme observé à partir des zones claires autour des disques

### L'analyse par HPLC et spectrométrie de masse

La technique HPLC-MS/MS joue un rôle comme outil d'analyse pour détecter, classer et identifier des métabolites pharmacologiquement actifs (les flavonoïdes), (Gouveia, SC; Castilho, PC, 2010), (Tiberti, LA et tout 2007)



Zone d'échantillonnage

Pic	Temps de rétention	λ (nm)	MS	MS <sup>2</sup>	Dérivés flavonoïdes (proposées)
06 (A)	5.5 min	250	[M-H] <sup>-</sup> 416.0, 366.7, 323.9, 289.9, 251.9, 209, 204.9, 188.9, 164.9, 139, 87.0	277.3, 244.8, 188.9, 169, 148.9	Catéchine
05 (B)	5.0 min	245	531.0, 396.7, 362.7, 345.9, 323.9, 278.9, 251.9, 236, 210.9, 188.9, 175, 151, 139, 126.9, 101, 87	147.8, 128.2, 82.8	
03 (C)	4.6 min	250 ; 285	100.6, 899.8, 739.5, 677, 391.9, 251.9, 139.0, 87.1	380.2, 346, 266.6, 126	
01 (D)	4.1 min	245	435, 405.6, 323.9, 278.9, 251.9, 195.9, 139.0, 87.1	138.1, 133.9, 120.9, 107.9, 97.9, 81,	

Des Composés identifiés précédemment : Catechin m/z 139 [10] ; catechin m/z 292, 251.1, 206.9, 177.4, 147, 138.9, 125, 122 [11]; catechin m/z 289, 245, 205, 151 [10] ; Catechin (epi) heteroside m/z 435, 325, 289.1, 253.2 ; catechin/epicatechin m/z 289, 245, 205 [13]; catechin m/z 435, 323, 289, [14]; (+)-catechin standar m/z 121, 123, 139.3, 151.3, 165.3, 244.2, 273.2, 289, 291.2 [15]; catechin m/z 289, 245, 205, 203, 137 [16]; (+)-Catechin m/z 290, 289 (245, 205, 179) [17]; (-)-epicatechin m/z 123.2, 139.2, 151.1, 165.0, 172.6, 291; Epicatechin m/z 291, 289, 273, 245, 205, 179, 151, 139, 123 [18]; Catechin m/z 393.0, 289.1, 245.2, 204.9; Epicatechin m/z 289.1, 245.2, 204.9 [19]; Catechin m/z 289.28, 271.02, 244.99, 226, 212.2, 203, 187.5, 175.0, 161, 136.9, 125.1 [20]

## 3. Résultats et discussion

### Tests phytochimiques

**Extraction:** On remarque que le rendement de la fraction butanolique est plus élevés, ainsi que le rendement d'extrait d'éther d'éthylque est faible par rapport les autres fractions

Extrait	Couleur	Le rendement (%)
Fraction des flavonoïdes globale	marron /rouge brique	8.95
Fraction d'éther d'éthylque	vert huileux	0.7
Fraction d'acétate d'éthyle	Verre/marron	1.9
Fraction n-butanol	Rouge brique foncé	4.2
Fraction aqueuse finale	Rouge brique clair	1.70

(A) l'extraction par n-butanol; (B) l'extraction par éther de pétrole ; (C) les différents extraits

### Analyse d'extrait éther d'éthylque par CCM

Système d'elution	Reactifs	Spot(s)	valeurs Rf
acétate d'éthyle / acide formique/ acide acétique / Eau (100/26/26/11) v/v	UV254 nm	3	Trois taches grises 0.96 ; 0.88 ; 0.83
UV365 nm	vapeurs d'ammoniac	5	0.96 marron / jaune; 0.91 Bleu 0.88 Mauve; 0.85 vert ; 0.83 Violet
acétate d'éthyle /n-butanol/ méthanol/Eau (60/30/1/1)	UV254 nm	2	0.93 (Gris) ; 0.89 (Gris)
UV365 nm	vapeurs d'ammoniac	2	0.93(Violet) ; 0.89(Bleu)

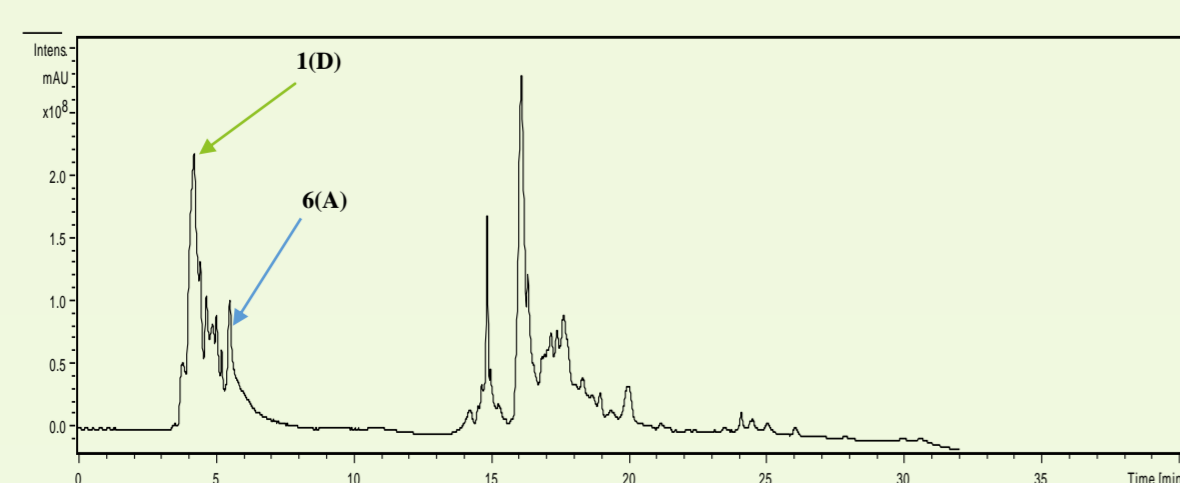
### L'activité antibactérienne d' éther d'éthylque

Microorganismes	concentration inhibitrice				
	DE= 5 mg / ml	DE/2	DE/4	DE/8	DE/16
Escherichia coli	9	7	0	0	0
Staphylococcus aureus	18	16	15	7	6
Pseudomonas aeruginosa	9	8	7	7	0
Streptococcus sp	12	9	9	9	6
Candida	14	10	9	8	0

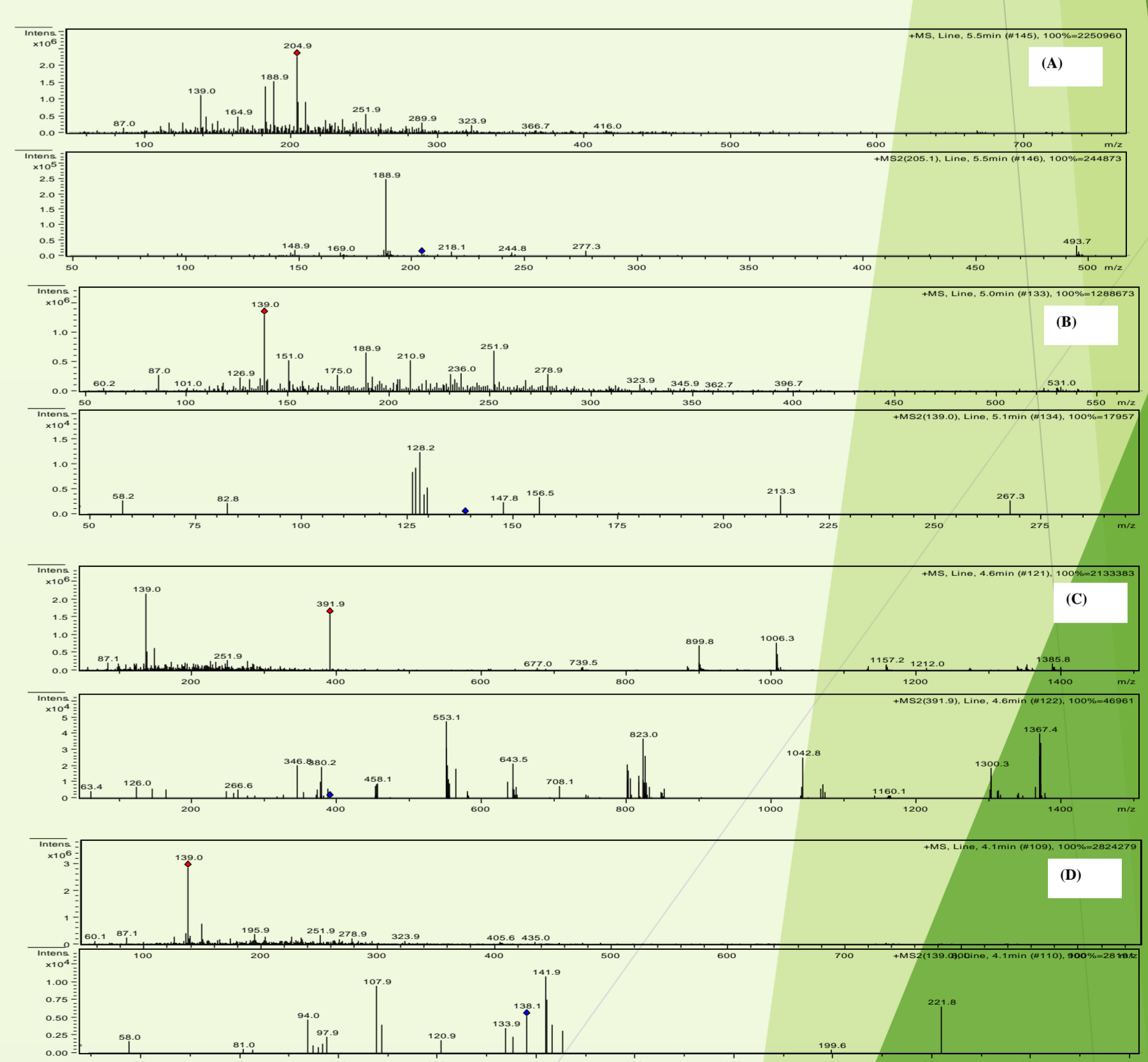
Ces résultats sont en accord avec l'activité antibactérienne des flavonoïdes en générale

### L'analyse par HPLC et spectrométrie de masse

Dans cette fraction ont été caractérisés quatre dérivés de catéchine selon la comparaison des données avec des Composés identifiés précédemment



Chromatogramme HPLC de Fraction d'éther d'éthylque

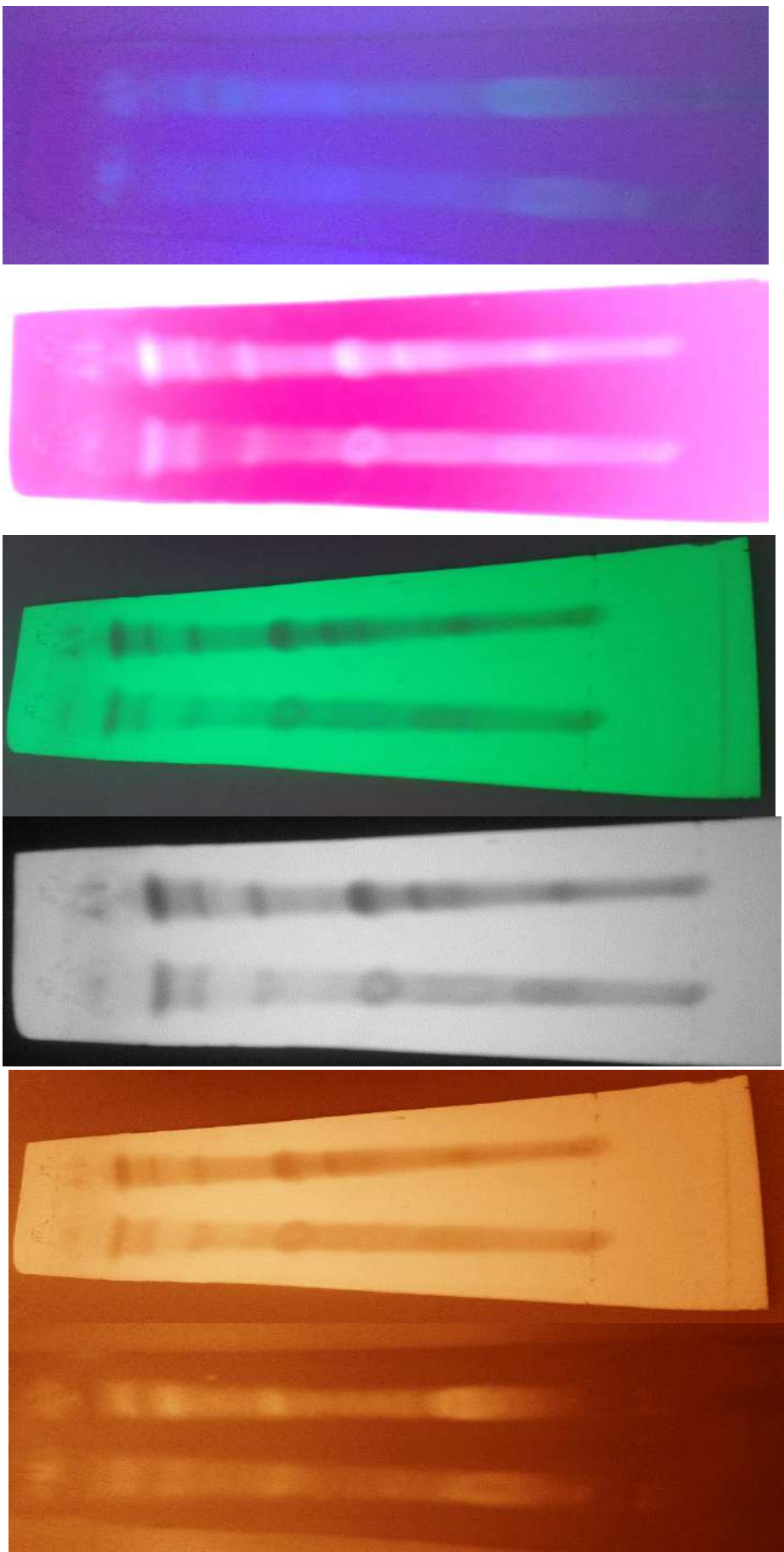


différent spectres de masse des pics A,B,C,D

## 4. Conclusions

La présence de dérivés de catéchine dans cette plante est intéressante compte tenu du rôle possible de la catéchine et ses dérivés polymères de l'activité biologique liée à l'utilisation traditionnelle.





الصورة -- صور البقع (Spotes) الظاهرة على ألواح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

1 تحت أشعة UV 365nm الصورة 01 بالتصوير السلبى .3. تحت UV 254nm .04. الصورة بالأبيض و الأسود .05. الصورة بالخلفية البنية .04 بالتصوير السلبى