الجمهورية الجزائرية الديموقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة قاصدي مرباح ورقلة

كلية الرياضيات وعلوم المادة

قسم الكيمياء

مذكرة مقدمة لنيل شهادة ماستر أكاديمي

مجال: علوم المادة

فرع: الكيمياء

تخصص: كيمياء المنتجات الطبيعية

من إعداد:

حمادي صباح و بن عابد بشرى

الموضوع:

مساهمة في الدراسة الفيتوكيميائية وتقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا لنبات طبي

نوقشت يوم: 2019/07/01

أمام اللجنة المناقشة المكونة من:

مخلفي طارق	أستاذ محاضر(أ)	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	مناقشا
زاوي منال	أستاذ محاضر(أ)	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	رئيسا
علاوي مسعودة	أستاذ محاضر(أ)	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	مؤطرا
بالاعور ابتسام	طالبة دكتوراه	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	مساعد مؤطر

السنة الجامعية:2018- 2019

بسم الله الرحمان الرحيم

"وقل اعملوا فسيرى الله عملكم ورسوله والمؤمنون وستردون الي عالم الغيب والشهادة فينبئكم بما كنتم تعملون "

صدق الله العظيم.

سورة التوبة الاية105

الإهداء

اهدي هذا العمل المتواضع الى والديا العزيزين الكريمين و الى اخوتي واخواتي حنان، زهرة، عبلة، سرين.

وبراعم البيت كل واحد باسمه. والى صديقاتي نسرين، صبرينةو لطيفة والى كل صديقات الدراسة ريما، سرين، اسماء، امال، عقيلة، مبروكة و مغنية

و الى الاصدقاء شمس الدين، احمد وايمن على دعمهم المعنوي و بالاخص ايوب.

الى كل من ساندنا في هذا العمل.

حمادي صباح

أهدي ثمرة هذا العمل الى كل شخص كان سندا لي في مشواري الدراسي وخاصة الى منربتنيو أنارتدربيو أعانتنيفي الصلواتبالدعوات،أغلى إنسان في الوجود أمي الغالية و الى كل الأهل والاحباب

بن عابد بشرى

شكـر وعـرفان

نتقدم بجزيل الشكروالعرفان للأستاذة المؤطر علاوي
مسعودة التي لم تبخلعلينا بإرشاداتها ومساعد المؤطر بالأعور ابتسام
لمراقبتهماعن كثب للدراسة التي أجريت في هذه المذكرة ومنحهما لنا الكثيرمن وقتهما.
تشكراتناالحارة للأستاذة زاوي منال لقبولها ترأس اللجنة وللأستاذ مخلفي طارق
لقبولهما مناقشة هذه المذكرة.
كمانتقدم بخالص الشكرللأساتذة الدكاترة الحاج محفوظ، دندوقي حسين وعمار
عيدود لتوجيهاتهم.
كما نوجه شكرنا لكل من طلاب الدكتوراه امينة، شهرة وكذا الانسة لطيفة،
والى كل الأساتذة الذين قاموا بتوجيهنا ومساعدتنا ولو بكلمة طيبة.
كما نشكر عمال المخبر البيداغوجي ومخبر
مستشفى محمد بوضياف.

الإهداء	I
الشكر والعرفان	II
الفهرس	III
قائمة الجداول	VI
قائمة الأشكال	VII
قائمة المختصرات والرموز	IX
مقدمة عامة	1
الجانب النظري	
الفصل الأول: الدراسة النظرية للنبات	
I.1. عموميات حول العائلة المركبة (*Asteraceae*)	03
I.2. عموميات حول الجنس Senecio	03
I.1.2. استعمالات نبات الجنس Senecio	04
I.2.2. بعض المركبات المفصولة من الجنس Senecio	04
I.3. الوصف المورفولوجي للنباتالطبي	05
I.4. التصنيف النظامي لنباتالطبي	05
I.5. التوزيع الجغرافي للنبات في الجزائر وإفريقيا	06
I.6. الدراسات السابقة للنبات الطبي	07
الفصل الثاني: المركبات الفينولية	
II.1. منتجات الأيض الثانوي	09
II.2. المركبات الفينولية	09
II.1.2. تصنيف المركبات الفينولية	09
II.3.الفلافونيدات	11
II.1.3. تصنيف الفلافونيدات	11
II.2.3. الاصطناع الحيوي للفلافونيدات	13
II.3.3.استخلاص الفلافونيدات	14
II.4.3. خواص الفلافونيدات	15
II.5.3. العلاقة بين لون البقعة وبنية الفلافونيد	15
II.6.3. طرق فصل وتشخيص الفلافونيدات	17
II.7.3. دور الفلافونيدات	17
الفصل الثالث: الفاعلية المضادة للبكتيريا	
III.1. مدخل	19
III.2. تعريف البكتيريا	19
III.3. تصنيف البكتيريا	19
III.4. السلالات البكتيرية المدروسة	20

5.III. المضادات الحيوية	22
1.5.III. تأثير المضادات الحيوية	22
الجانب التطبيقي	
الفصل الرابع: الدراسة الفيتوكيميائية للنبات	
1.IV. المادة النباتية	24
2.IV. الأدوات والمواد المستعملة	24
3.IV. الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية للمركبات الفلافونيدية	24
1.3.IV.النتائج والمناقشة	25
4.IV.طرق الاستخلاص	25
1.4.IV. استخلاص صلب- سائل	25
2.4.IV. استخلاص سائل- سائل	26
3.4.IV. النتائج والمناقشة	28
5.IV. طرق التحليل الكروماتوغرافي	28
1.5.IV. الكروماتوغرافيا الغازية المرفقة بمطيافية الكتلة	29
1.1.5.IV. النتائج والمناقشة	30
2.5.IV. كروماتوغرافيا الورقCP	32
1.2.5.IV. كروماتوغرافيا الورق احادية البعد	32
2.2.5.IV. كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد	34
3.2.5.IV. النتائج والمناقشة	35
3.5.IV. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC	36
1.3.5.IV. النتائج والمناقشة	37
4.5.IV. كروماتوغرافيا العمود CC	37
1.4.5.IV. النتائج والمناقشة	39
5.5.IV. الفصل والتنقية	40
6.IV. مطيافية الأشعة المرئية وفوق البنفسجية UV-VIS	40
1.6.IV. طيف الامتصاص للفلافونيدات في الوسط الميثانولي	40
2.6.IV. طيف الامتصاص للفلافونيدات في وجود الكواشف	42
3.6.IV. مراحل السلسلة الطيفية	45
4.6.IV. النتائج والمناقشة	46
1.4.6.IV.السلسلة الطيفية لامتصاص المركب $B_{2'/1}$ في وجود الكواشف	47
2.4.6.IV.السلسلة الطيفية لامتصاص المركب$B_{2/1}$في وجود الكواشف	49
3.4.6.IV.السلسلة الطيفية لامتصاص المركب$B_{2/2}$في وجود الكواشف	51
الفصل الخامس: تقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا	
1.V. تقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلصات للنبات	54

1.1.V. تحضير الأقراص 54
2.1.V. تحضير أوساط الزرع 54
3.1.V. زرع السلالات البكتيرية 54
4.1.V. تحضير تراكيز المستخلصات 54
5.1.V. تحضير المعلق البكتيري 54
6.1.V. تلقيح أوساط الزرع 54
7.1.V. الزرع والحضن 55
8.1.V. قراءة النتائج 55
9.1.V. النتائج والمناقشة 56
2.V. المضادات الحيوية 61
1.2.V.النتائج والمناقشة 61
الخاتمة 63
المراجع 64
الملحق

قائمة الجداول

عنوان الجداول	الصفحة
الجدول (1):بعض المركبات المفصولة من الجنس Senecio	04
الجدول (2): التصنيف النظامي للنبات الطبي	05
الجدول (3):الفلافونيداتالجليكوزيدية المفصولة من النباتالطبي	07
الجدول (4):تصنيف المركبات الفينولية	10
الجدول (5): الفئات الرئيسية للفلافونويد	12
الجدول (6): الإنزيمات المستخدمة في التصنيع الحيوي للفلافونيدات	14
الجدول (7): العلاقة بين لون البقعة وبنية الفلافونيد	16
الجدول (8): نتائج الكشف عن الفلافونيدات	25
الجدول (9): مردود الاستخلاص	28
الجدول(10): نتائج الفصل الكروماتوغرافيا الغازية المزدوجة بمطيافية الكتلة GC-MS لمستخلص كلوريد المثيلين	30
الجدول (11): بعض المركبات المرجعية ذات أعلى نسبة تواجد	31
الجدول (12): نتائج الفصل بكروماتوغرافيا الورق أحادية البعد	35
الجدول (13): نتائج الفصل بكروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد	35
الجدول (14): نتائج الفصل بكروماتوفرافيا العمود	39
الجدول (15): الانزياحات الملاحظة للعصابتين I و II في الميثانول	41
الجدول (16): أهم الانزياحات الملاحظة على العصابة I وII بعد اضافة الكواشف	43
الجدول (17): أهم الانزياحات الملاحظة على العصابة I وII بعد اضافة الكواشف	44
الجدول (18): الانزياحات الملاحظة للمركبات المفصولة في الميثانول	46
الجدول (19): معطيات UV-Vis بالنسبة للمركب $B_{2'/1}$	47
الجدول (20): معطيات UV-Vis بالنسبة للمركب $B_{2/1}$	49
الجدول (21): معطيات UV-Vis بالنسبة للمركب $B_{2/2}$	51
الجدول (22): درجة الفاعلية المضادة للبكتيريا بدلالة قطر التثبيط	55
الجدول (23): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص البيتانول مع أنواع بكتيرية مختلفة	56
الجدول (24): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص ثنائي كلور الميثان مع أنواع بكتيرية مختلفة	57
الجدول (25) : تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص هيدروكحولي مع أنواع بكتيرية مختلفة	58
الجدول (26): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص خلات الايثيل مع أنواع بكتيرية مختلفة	59
الجدول (27): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص مائي مع أنواع بكتيرية مختلفة	60
الجدول (28):الفاعلية المضادة للبكتيريا لبعض المضادات الحيوية	61

قائمة الأشكال

عناوين الأشكال	الصفحة
الشكل (1): بعض أنواع جنسSenecio المنتشرة في بعض مناطق الجنوب الجزائري	03
الشكل (2): رسم توضيحي للأجزاء الهوائية للنبات الطبي	05
الشكل(3): خريطة توضح التوزيع الجغرافي للنبات الطبي في الجزائر وإفريقيا	06
الشكل (4): دول تواجد النبات الطبي في قارة افريقيا	06
الشكل (5): يوضح بنية فينول بسيط	09
الشكل (6): النواة الرئيسية للفلافونيد	11
الشكل (7): مخطط يوضح المسارات الرئيسية للتصنيع الحيوي للفلافونويدات	13
الشكل(8): بنية البكتيريا	19
الشكل (9): المكورات العنقودية الذهبية	20
الشكل (10): الزائفة الزنجارية	20
الشكل (11): سالمونيلا	21
الشكل (12): المكورات المعوية	21
الشكل (13): العصوية الرقيقة	21
الشكل (14): الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية للفلافونيدات	25
الشكل (15): مراحل الاستخلاص سائل-سائل	26
الشكل(16): مخطط يوضح مراحل الاستخلاص بواسطة ماء/ايثانول	27
الشكل(17): كروماتوغرام مستخلص كلوريد الميثيلين	30
الشكل(18): طيف الكتلة للمركب الناتج عند زمن احتجاز 27،80 د	31
الشكل(19):طيف الكتلة للمركب الناتج عند زمن احتجاز 25،42 د	31
الشكل(20): تحضير كروماتوغرافيا الورق أحادية البعد	33
الشكل (21): كروماتوغراماتCP أحادية البعد	33
الشكل (22): تحضير كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد	34
الشكل (23): كروماتوغراماتCP ثنائية البعد	34
الشكل (24): كروماتوغراماتTLC لمستخلص البيتانول وخلات الايثيلفي وجود كاشف حمض الكبريت	37

الشكل (25): تقنية كروماتوغرافيا العمود	38
الشكل (26):مراحل الفصل والتنقية للكسر F_{48} بواسطةكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية	40
الشكل (27): ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقتين البنزنيتين A وB	41
الشكل (28): يوضح المعقد المتكون بين الفلافونيد والمحلول ($NaOAc+H_3BO_3$)	42
الشكل (29): المعقد الثابت ومعقد غير ثابت بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل وبعد اضافة HCl	42
الشكل (30): مراحل الدراسة الطيفية (UV-Vis)للفلافونيدات في وجود عدة كواشف	44
الشكل (31): أطياف الامتصاص في الميثانول للمركبات المفصولة	45
الشكل (32): سلسلة أطياف الامتصاص للمركب $B_{2'/1}$في وجود الكواشف	46
الشكل (33): سلسلة أطياف الامتصاص للمركب $B_{2/1}$في وجود الكواشف	48
الشكل (34): سلسلة أطياف الامتصاص للمركب $B_{2/2}$في وجود الكواشف	50
الشكل (35): طريقة تلقيح أوساط الزرع بالمعلق البكتيري	53
الشكل (36): مخطط دراسة نشاط التثبيط للمستخلصات على سلالات البكتيريا بطريقة الانتشار المباشر للأقراص	54
الشكل (37): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص البيتانول ضد السلالات البكتيرية مع تراكيز مختلفة	55
الشكل (38): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص ثنائي كلور الميثان ضد السلالات البكتيرية مع تراكيز مختلفة	56
الشكل(39): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص هيدروكحولي ضد السلالات البكتيرية مع تراكيز مختلفة	57
الشكل (40): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص خلات الايثيل ضد السلالات البكتيرية مع تراكيز مختلفة	58
الشكل (41): صورة توضيحية لأكبرالأقطار للمستخلصات ضد السلالات البكتيرية المدروسة	59
الشكل(42): صورة للفاعلية المضادة للبكتيريا لبعض المضادات الحيوية	60

كروماتوغرايا الورق	CP
كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة	TLC
كروماتوغرافيا العمود	CC
البيتانول	n-BuOH
حمض الخل	AcOH
أستون	CH_3COCH_3
كروماتوغرافيا الغازية المرفقة بمطيافية الكتلة	GC-MS
مطيافية الأشعة المرئية وفوق البنفسجية	UV/Vis
Amikacin	AN
Chloramphenicol	CH
Ciprofloxacin	CIP
Gentamicin	GM
مستخلص	Ex
ثنائي كلور الميثان، كلوريد الميثيلين	CH_2Cl_2
خلات الإثيل	AcOEt
البيتانول	n-BuOH
إثر البترول	EP
ثنائي ميثيل سلفوكسيد	DMSO

مقدمة عامة

مقدمة عامة:

تعتبر النباتات من أهم الموارد الطبيعية المتواجدة بشكل كبير على الكرة الأرضية حيث تعود علاقة الانسان بالنباتات الى أقدم العصور فالحضارات القديمة سواء الصينية، الهندية أو الشرق الأوسط كانت تعتمد على كل ما هو طبيعي لغنى حضارتها بحقل العلم والمعرفة والصحة والبيئة فهي ذات أهمية كبيرة جدا في انتاج وتوفير المواد الفعالة [1]. تنتج مواد طبيعية تسمى بمنتجات الأيض الثانوي. لهذا لجأ العلماء والباحثين الى دراستها واستخلاصها بغرض استخدامها في الأدوية الصيدلانية كبديل للمواد الكيميائية وهذا بهدف التقليل من الأعراض الجانبية التي تسببها.

لقد كان جل اهتمام الناس استعمال الكثير من الادوية في الطب الشعبي لتثبيط البكتيريا الممرضة خاصة التي اكتسبت مقاومة طبيعية من المضادات الحيوية المعروفة، اما المساهمة في حماية الخلايا من السرطان فكانت اهتمامهم الاكبر في العشرين سنة الاخيرة [2]. لهذا انتشرت زراعة النباتات الطبية والعطرية الغنية بمستقلبات الأيض الثانوي في دول العالم وتنوعت استخداماتها.

تحتل الجزائر مساحات واسعة وبيئات مختلفة ومناخ متنوع، مما يؤدي الى اختلاف النباتات البرية، الطبية والعطرية ذات الأهمية البيولوجية والاقتصادية. لذا فالضرورة تلح على استعمال واستغلال الثروات الخضراء في صحرائنا الواسعة [3].

تعد العائلة المركبة واحدة من أضخم العائلات النباتية واوسعها انتشارا وتعرف بعائلة عباد الشمس تتواجد في كل بقاع العالم وتستوطن جميع البيئات [4].

تتمحوردراستنا حول المساهمة في الدراسة الفيتوكيميائية وتقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلصات أحد نباتات العائلة المركبة وسنتناول في عملنا هذا بعد المقدمة، جزء نظري و يحتوي على ثلاث فصول:

الفصل الأول: دراسة نظرية للنبات المدروس.

الفصل الثاني: المركبات الفينولية.

الفصل الثالث: الفاعلية المضادة للبكتيريا.

وجزء عملي يشتمل على فصلين:

الفصل الرابع: دراسة فيتوكيميائية للنبات.

الفصل الخامس: تقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا.

وتم اختتام هذه الدراسة بخاتمة ملمة بكل النتائج التجريبية التي تم الوصول اليها.

الفصل الأول:
الدراسة النظريةللنبات

1.I.عموميات حول العائلة المركب (*Asteraceae*):

يعود أصل التسمية *Asteraceae* الى الكلمة اللاتينية: aster والتي تعني نجمة وهي تشير إلى شكل الإزهار، وهي الكلمة التي أنشأها عالم النبات إيفان إيفانوفيتش مارتينوف في عام 1820، والتي كانت تُسمى سابقًا*Compositae*.

هي واحدة من أكبر وأكثرالعائلات تطورا للغاية؛ تتكون من 5 عائلات فرعية، 43 قبيلة،1600 جنس و23000 نوع. توجد بشكل خاص في المناطق المدارية وشبه المدارية[1]. تضم هذه العائلة 408 نوعًا مقسمة إلى 109 أجناس في الجزائر[2]. أعضائها الاحتياطية تحتوي على مادة الاينولين[3]، اذ ان غالبيتها العظمى نباتات عشبية، والقليل منها نحو 2 بالمئة أشجار او شجيرات وبعضها لها اهمية اقتصادية، فبعض اجناسها تعد نباتات زينة مثل *Aster*،*ChrysanthemumCalendula* وكثير منها ذو اهمية طبية مثل *Artemisia*،*Inula* وبعضها ذو اهمية غذائية مثل *Lactuca*،*Helianthus* [4].

2.I. عموميات حول الجنس *Senecio*:

يتألف جنس العائلة من 1500 نوع، غالبًا ما تكون منتشرة، أو سنوية، أو كل سنتين أو معمرةأو دائمة تكون على شكل شجيرات وأعشاب، منتشرة في الارض أو منتصبة في الهواء تكون خضراء وبها أوراق وأزهار ذات ألوانصفراء بنفسجية، ثمارها على شكل بذور،ينتشر هذا الجنس في نطاق واسع من العالم باستثناء القارة القطبية الجنوبية.كما أنبعض الأنواع تحتوي على قلويدات سامة. وحسب العالم Qezel تم إحصاء 18 نوع في الجزائر الموضحة فيالشكل(1)[8][5][6].

الشكل (1): بعض أنواع جنس*Senecio* المنتشرة في بعض مناطق الجنوبالجزائري

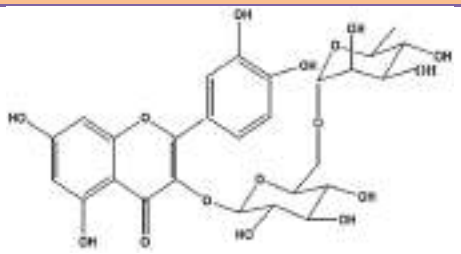
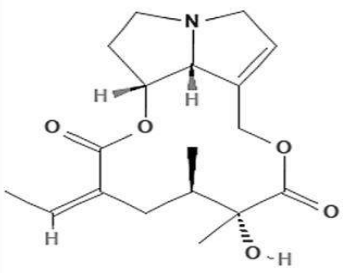
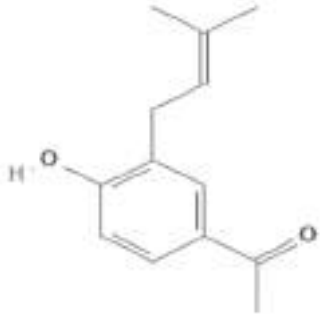
I.1.2.استعمالات نبات الجنس *Senecio*:

يتم استخدام العديد من الأنواع التي تنتمي إلى جنس *Senecio* في الطب الشعبي في معالجة الالتهابات. على الرغم من سميتها المعترف بها بسبب وجود قلويداتPyrrolizidineلنشاطه الاستقلابي الخاص.كما أن هذه المجموعة من النباتات لها أهمية كبيرة على الصعيدين الاقتصادي والطبي فقد استعملتٍلعلاج الربو والسعال والتهاب الشعب الهوائية والأكزيما والتئام الجروح. نباتات العائلة المركبة قادرةعلى إنتاج مضادات حيوية تستخدم في الدفاع ضد الإفتراسات الصادرة من قبل الكائنات الحية الدقيقة، الحشرات والحيوانات العاشبة [9].

I.2.2. بعض المركبات المفصولة من الجنس *Senecio*:

تم تحديد المئات من المركبات الكيميائية التي تنتمي الى الجنس*Senecio*خلال العشرين عام الماضية. الجدول (1) يوضح بعض المركبات الكيميائية المفصولة [6].

الجدول (1): بعض المركبات المفصولة من الجنس *Senecio*

النبات	المركبات المفصولة	العلاج	المرجع
***S. delphinifolius*Vahl**	 Rutin	- وقاية من تخثر الدم الوريدي - مضاد للشيخوخة - مضاد لضغط الدم - مضاد للجلطات - مزيل للتشنجات	[6]
S. vulgaris	 Senesionine	- مسكن الألم - منشطات القلب والأوعية الدموية. - منشطات الجهاز العصبي المركزي والاكتئاب.	[7]
S. gravesolens	 4-hydroxy-3- (3-methyl-2-buténynl) acetophenone	-علاج السرطان	[8]

I.3.الوصف المورفولوجي لنبات الطبي:

هي عشبة سنوية لديها العديد من الفروع بسيقان مستقيمة أحيانا يصل طولها الى 50 cm؛ أوراقها سميكة ومقطعة للغاية مع الفصوص الخطية. في بعض الأحيان تحمل السيقان الطويلة أزهار ذهبية صفراء الا ان اللون الارجواني للزهور المشار إليها في نباتات هذا النوع لم يتم ملاحظتها[9].

الشكل (2): رسم توضيحي للأجزاء الهوائية للنبات المدروس

I.4. التصنيف النظامي للنبات:

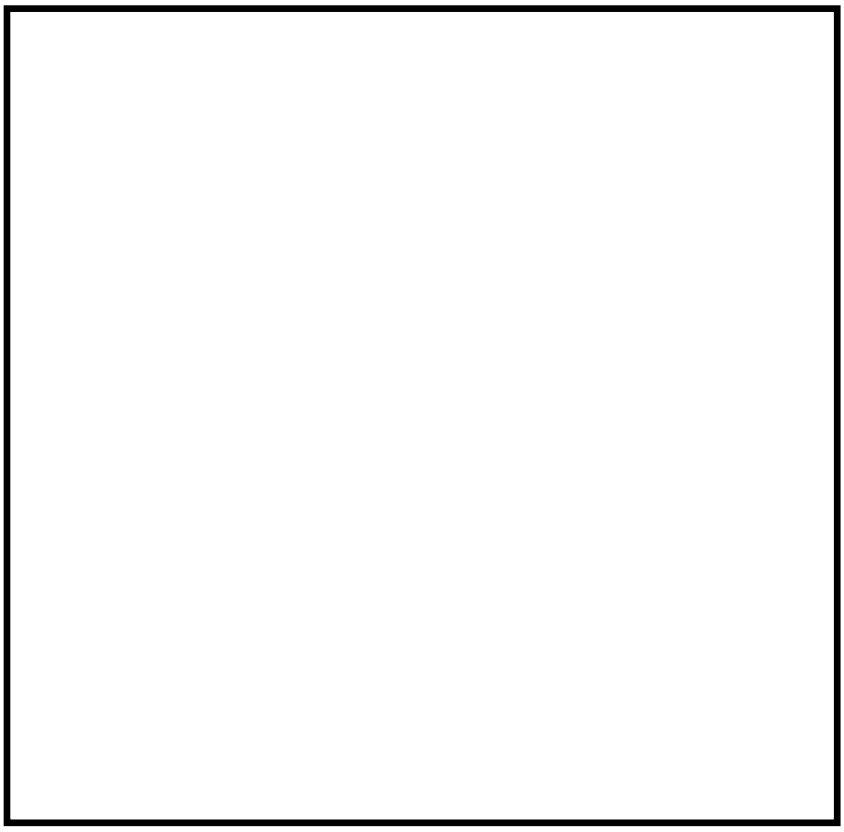
تم تشخيص النبات الطبي من طرف الأستاذ الدكتور عيدود عمار بقسم العلوم الزراعية في كلية علوم الطبيعة والحياة بجامعة قاصدي مرباح ورقلة، حيث أعطى التصنيف النظامي.

الجدول (2): التصنيف النظامي للنبات المدروس

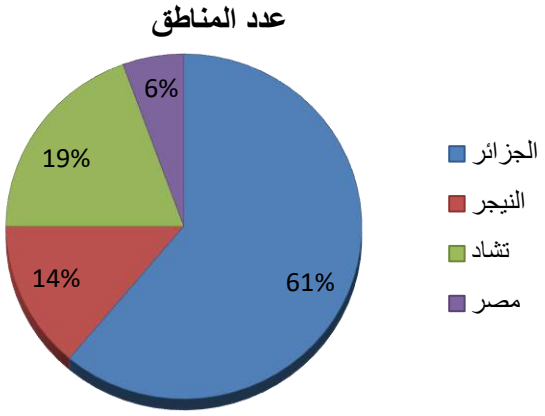
Kingdom	**Plantae**	**المملكة**
Subkingdom	Tracheobionta	تحت المملكة
Superdivision	Spermatophyta	الفرع
Division	Magnoliophyta	الشعبة
Class	Magnoliopsida	الصنف
Subclass	Asteridae	الفئة الفرعية
Order	Asterales	الرتبة
Family	Asteraceae	الفصيلة
Genus	Senecio L.	الجنس

I.5.التوزيع الجغرافي للنبات الطبيفي الجزائر و إفريقيا:

يتوزع النبات المدروس على مستوى إقليم محدد جيدا وذلك في الجنوب الصحراوي الكبير على بعد 800 الى 3400 كلم لكل من الدول التالية: الجزائر (الهقار)، النيجر (جبال الآير)، تشاد (تيبستي)، مصر (جبل علبة) وهذا ما يوضحه الشكل (4) وجد أنها تنتشر بشكل واسع مقارنة بالدول الأخرى بنسبة أكبر في الجزائر.وهذا ما يوضحه الشكل (3) [9].



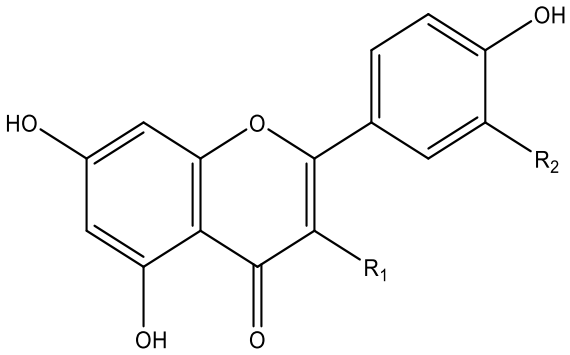
الشكل (3): خريطة توضح التوزيع الجغرافي لجنس*Senecio*في الجزائر وإفريقيا



الشكل (4): دول تواجد الجنس*Senecio*في قارة افريقيا

6.I. الدراسات السابقة لنبات الطبي:

تم عزل فلافونويدات سكرية وتنقيتها وتشخيصها من النبات الطبيوذلك بطرق الاستخلاص المعروفة بداية بعملية الاستخلاص بالإيثانول 70% ثم التحليل الكروماتوغرافيا المقارن مع عينات شاهدة من جليكوزيدات.



Isorhamnetin

الجدول (3): الفلافونيداتالجليكوزيدية المفصولة من النبات الطبي

	R_1	R_2
Q 3-glucoside	$C_6H_{12}O_6$	**OH**
I 3-rutinoside	$C_{12}H_{22}O_{10}$	**OCH_3**
I 3-monosulphate	HSO_4	**OCH_3**

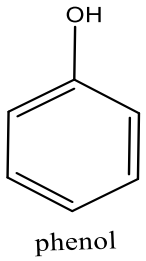
الفصل الثاني:
المركبات الفينولية

1.II.منتجات الأيض الثانوي:

ترتبط حياة الإنسان على الأرض ارتباطًا وثيقًا باستغلال النباتات. لهذه الأخيرة القدرة على إنتاج مواد طبيعية متنوعة للغايةبالإضافة إلى الا الأولية الذي يؤدي تتراكمهالانتاج ما يسمى بالايض الثانوي، والتي تمثل مصدرًا مهمًا للمركبات التي يمكن أن يستخدمها الإنسان، وبالأخص في المجال العلاجي. يتم تصنيع هذه المركبات في أجزاء مختلفة من النبات (الجذور، السيقان، الأوراق، الزهور).

2.II. المركبات الفينولية:

الفينولات هي مجموعة تضم العديد من المستقلبات الثانوية الموجودة في النباتات. من الناحية الهيكلية، تتألف من حلقة عطرية واحدة أو أكثر، أي ستة كربون C6 مع مجموعة وظيفية أو أكثر من مجموعات الهيدروكسيل كوحدة كيميائية أساسية. وبالتالي فهي معروفة باسم مركبات الفينول أو عديدات الفينول[10].

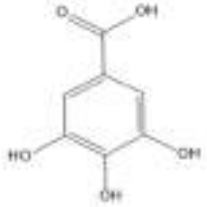
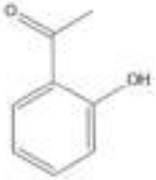
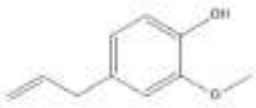
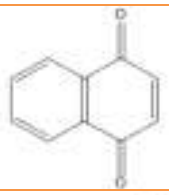
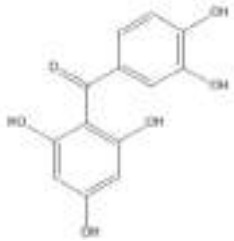
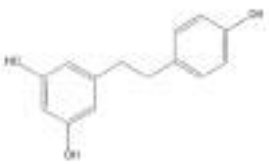
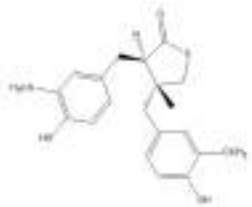
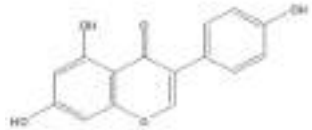


الشكل (5): يوضح بنية فينول بسيط

1.2.II. تصنيف المركبات الفينولية:

هناك تصنيف للصيغ الكيميائية الرئيسية للمعظم المجموعات الفرعية لعديد الفينول التي تتضمنها النباتات حيث تختلف باختلاف تموضع المستبدلات وطبيعتها ونلخص ذلك في الجدول (4).[11]

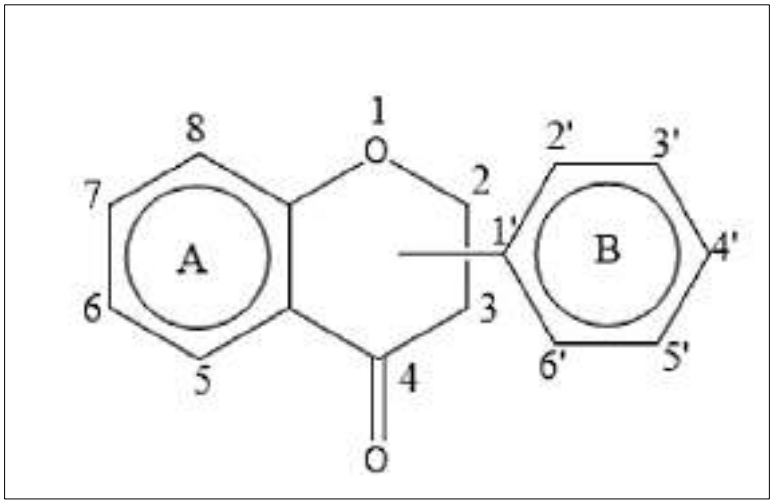
الجدول (4): تصنيف المركبات الفينولية

الصيغ الكيميائية	مثال	الصنف
	Phenol	**Phenolicsacids**
	Gallicacid	**Hydrobenzoicacid**
	O-hydroxy acetophenone	**Acetophenones**
	Eugenol	**Coumaricacids**
	Naphtoquinone	**Naphtoquinone**
	Maclurin	**Benophenones**
	Resveratol	**Stilbenes**
	Matairesinol	**Lignans**
	Genistein	**Flavonoids**

II.3.الفلافونيدات:

كلمة فلافونويد يعود أصلها إلى Flavusوهي كلمة لاتينية تعني اللون الأصفرتوجد في معظم الأصناف النباتية خاصة الراقية منها وبشكل واسع عند كاسيات البذور كذلك عند نباتات احادية الفلقة ونسبية عند عاريات البذور و شحيحة لدى الطحالب. تشكل الفلافونويدات ومشتقاتها مجموعة كبيرة جدًا من المنتجات الطبيعية .تم العثور عليها في العديد من الأنسجة النباتية، حيث توجد داخل الخلايا أو على أسطح الأعضاء النباتية المختلفة.

تعتمد التركيبات الكيميائية لهذه الفئة على بنية كيميائية من الشكل C6-C3-C6 وهي تختلف في تشبع الحلقة غير المتجانسةCفي تموضع الحلقة العطرية B في المواقع C-2 أوC-3 من الحلقة C3،وفي الاستبدالاتالهيدروكسيليةالكلية [12].

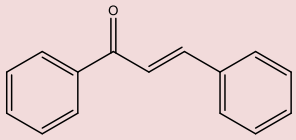
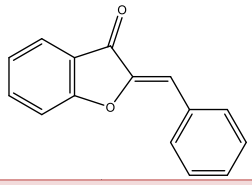
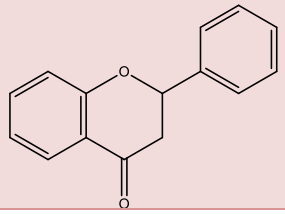
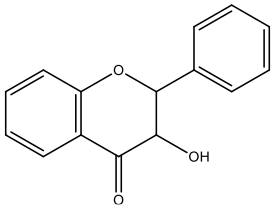
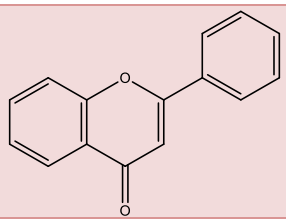
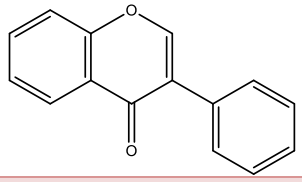
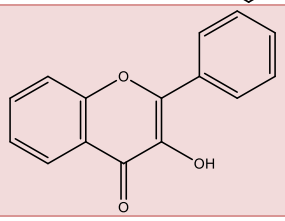
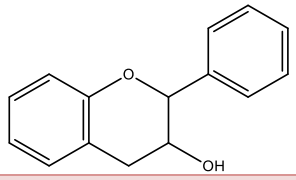
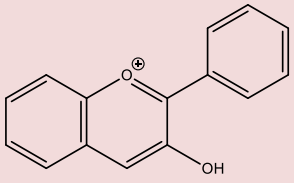


الشكل (6): النواة الرئيسية للفلافونيد

II.1.3. تصنيف الفلافونيدات:

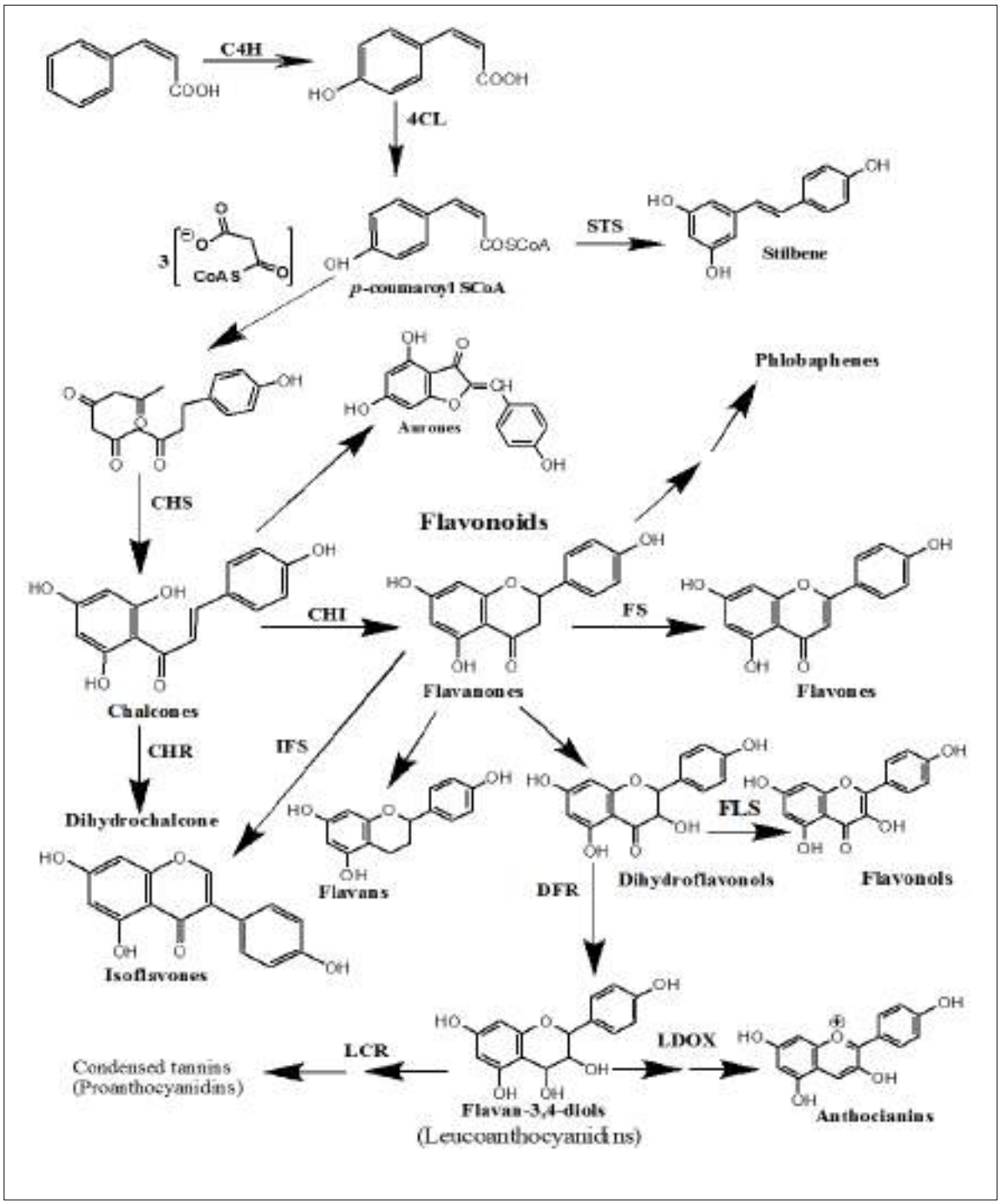
تتغير وتتنوع الفلافونيدات حسب درجة تأكسد الحلقة C[13] وجهة ارتباط الحلقة C بالحلقة A[14]وكذلك باختلاف المجموعات المستبدلة و تموضعها على الحلقات فتتشكل مجموعة من الفلافونيدات تنقسم الى 9 أقسام [15] موضحة في الجدول التالي:

الجدول (5):الفئات الرئيسية للفلافونويد**[17]**

الفلافونيد	الهيكل الأساسي	الأمثلة
Chalcones		Asebogenin
Aurone		Leptosodin
Flavanones		Naringenin
Dihydroflavanols		Taxifolim
Flavones		Apigenin
Isoflavones		Genistein
Flavonols		Kampherol
Flavan-3-ols		Catchin
Anthocyanidine		Pelargonidin

2.3.II. الاصطناع الحيوي للفلافونيدات:

يمكن تقسيم الاختلافات الهيكلية المعروفة لمركبات الفلافونويد إلى ما لا يقل عن 15 فئة؛ والشكل (7) يظهر بعض منها. يتم تمييز مركبات الفلافونيد التي لا تعد ولا تحصى داخل كل فئة عن بعضها البعض بعدد مجموعات هيدروكسيل ومكان توضعها و بالدرجة التي يمكن بها تعديل هذه المجموعات بواسطة بدائل الميثيل والإيزوبرينيلوالجليكوزيل[21].



الشكل (7): مخطط يوضح المسارات الرئيسية للتصنيع الحيوي للفلافونويدات

الجدول (6): الإنزيمات المستخدمة في التصنيع الحيوي للفلافونيدات[3]

الاختصار	الانزيم المحفز
C4H	Cinnamate-4-hydroxylase
4CL	4-coumaroyl:CoA-ligase
STS	Stilbene Synthase
CHS	Chalcone Synthase
CHR	ChalconeReductase
CHI	ChalconeIsomerase
IFS	Isoflavone Synthase
FS	Flavone Synthase
FLS	Flavonol Synthase
DFR	Dihydroflavonol-4-reductase
LDOX	Leucoanthocyanidindioxygenase
LCR	Leucoanthocyanidinreductase

II.3.3.إستخلاصالفلافونيدات:

✓ **طريقة الاستخلاص بواسطة ماء/حمض كلور الماء (HCl/H_2O) Lebreton :**

نزن 5g من المسحوق النباتي الجاف (الجزء العلوي) نضعها في دورق يحتوي على400 ml من حمض كلور الماء المخفف (2N) يوضع الدورق داخل حمام مائي درجة حرارته 70C° ولاننسى غلق الدورق جيدا مع التهوية (النفخ) والتحريك في كل10min لمدة 45min بعد التبريديرشحا لمحلول و الراشح يستخلص بواسطة ثنائي إيثيلالإيثر 3 مرات (100/150/150ml) الطورالعضوي الناتج يبخر تحت الضغط و الراسب المحصل عليه يذاب في الميثانول أما الطور المائي فيستخلص مرة ثانية بواسطة البيتانول(100/150/150ml) و الطور العضوي الناتج يبخر تحت ضغط منخفض و المستخلص المحصل عليه يذاب في الميثانول.

✓ **طريقة الاستخلاص بواسطة ايثانول/ماء ($EtOH/H_2O$) :**

نزن 200g من المسحوق النباتي (الجزء العلوي) في إيثر البترول مدة 24h ثم تنقع في إيثانول ساخن ذو تركيز70% لمدة 24h،ثم يرشيح وتكرر العملية 3 مرات. تجمع الأطوارالعضوية و تركز تحت الضغط ثم تخفف بالماء المقطر و تترك لمدة ليلة كاملة ثم ترشح، يستخلص الراشح الناتج بواسطة خلات الإيثيل(ثلث الحجم) مرة واحدة (200ml)؛ يبخرالطور العضوي تحت الضغط ويذاب المستخلص المحصل عليه في الميثانول، أما الطور المائي فيستخلص بواسطة البيتانول 3 مرات (200ml)،يبخر الطور العضوي تحت الضغط ويذاب المستخلص المحصل عليه في الميثانول[22].

✓ **طريقة الاستخلاص بواسطة الأسيتون والماء (CH_3COCH_3/H_2O) :**

نزن g 200 من المسحوق النباتي (الجزء العلوي) تنقع في إيثرالبترول لمدة 24h وترشح، وبعد الترشيح يفضل التجفيف في الهواء لمدة ساعة ثم يستخلص المسحوق النباتي بالخليط أسيتون/ماء(CH_3COCH_3/H_2O)

على الساخن (يغلى بارتداد لمدة 7 ساعات) بعد التبريد يرشح؛ الراشح يبخر منه الأسيتون تحت الضغط فنحصل على طور مائي يخضعلعمليات الاستخلاص التالية:

1) استخلاص 3 مرات بثنائي إيثيلالايثر (100ml).
2) استخلاص 3 مرات بخلات الإيثيل (100ml) [22].

II.4.3. خواص الفلافونيدات:

الفلافونيدات مركبات هيدروكسيلية لها خواص المركبات الفينولية فهي مركبات ضعيفة الحمضية تذوب في القواعد القوية مثل هيدروكسيد الصوديوم والفلافونيدات التي تحمل المجموعة السكرية تذوب في المذيبات القطبية مثل الميثانول، الايثانول، الماء والأسيتون. أما الفلافونيدات ضعيفة القطبية مثل الايزوفلافونات، الفلافانوناتوالفلافونات التي تحمل عدد أكبر من مجموعة الميثوكسيل فهي تذوب في الكلوروفوم أو الايثر.[17]

تعتبر الفلافونيدات كعوامل مرجعة قوية تعمل على تكسير تسلسل التفاعلات الجذرية نتيجة لبنيتها المستقرة الناتجة عن ظاهرة الرنين الالكتروني الناشئة عن الحلقة الاروماتية. تعمل على حماية الانظمة المضادة للأكسدة داخل الخلية[14].

II.5.3. العلاقة بين لون البقعة وبنية الفلافونيد:

لون البقع تحت الأشعة فوق البنفسجية UVلوحده أو بعد التظهير بأبخرة الأمونيا/UV يبدي تشخيص أولي عن نوع الفلافونيد المفصول بكروماتوغرافيا الورق [18].

الجدول (7): العلاقة بين لون البقعة وبنية الفلافونيد

لون البقعة		نوع الفلافونيد
ب:UV	ب:UV/NH_3	
بنفسجي داكن	أصفر، أصفر مخضر أو بني	(4'-OH) و(5-OH)فلافون أوالفلافانول مستبدل (3-OH)،(5-OH) و(4'-OH) أو فلافانون(5-OH) أو (4'-OH)الشالكون مع افتقار الحلقةBعلى (OH)
	تغير طفيف في اللون أو عدم حدوث تغير	فلافون أو فلافانون(5-OH) مع غياب (4'-OH)أو مستبدلة ايزوفلافون، ثنائي هيدروفلافون، وبعض (5-OH) فلافانونأوشالكون ('2-OH أو6'-OH) بدون (2-OH) أو(4-OH)
	أزرق مشع	(5-OH) فلافانون
	أحمر أو برتقالي	2-OH) شالكون و/أوبدون(4-OH)
أزرق مشع	أصفر مشع، أخضر أو أخضرمزرق مشع	فلافانونوفلافون تفتقر ل(5-OH) فلافانول تفتقر ل (5-OH) مع (3-OH)
	تغير طفيف في اللون أو عدم حدوث تغير او أزرق مشع	ايزوفلافون يفتقر ل(5-OH)
غير مرئي	أزرق مشع	ايزوفلافون يفتقر ل(5-OH)
أصفر باهت وأصفرأو برتقالي مشع	تغير طفيف في اللون أو عدم حدوث تغير او أزرق مشع	فلافانول(3-OH) و/أوبدون(5-OH)
أصفر مشع، أصفر مخضر، أزرق مخضر أو أخضر	برتقالي أو أحمر	اورون(4'-OH)
	تغير طفيف في اللون أو عدم حدوث تغير	Aurones تفتقر ل(4'-OH)وفلافانون تفتقر ل(5-OH) أو فلافونول(3-OH) و/أو بدون(5-OH)
أصفر باهت	أصفر مشع-بنفسجي	ثنائي هيدروفلافانولتفتقر(5-OH)

6.3.II. طرق فصل وتشخيص الفلافونيدات:

تتعدد تقنيات الفصل الكروماتوغرافي للمركبات الفلافونيدية بتعدد طرق التشخيص.

- ✓ كروماتوغرافياالورقيةCP
- ✓ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقةCCM
- ✓ كروماتوغرافيا ذات الكفاءة العالية HPLC
- ✓ كروماتوغرافيا التبادل الايونيCCA
- ✓ كروماتوغرافيا العمود CC

اما طرق تشخيص المركبات الفلافونيدية فهي:

- ✓ الاشعة فوق البنفسجية والأشعة المرئية UV - VIS
- ✓ الرنين النووي المغناطيسي RMN بأنواعه
- ✓ مطيافية الكتلة MS[19].

7.3.II.دور الفلافونيدات:

للفلافونيدات دور مهم لكل من الانسان والنبات ويتجلى هذا في:

❖ **بالنسبة للنبات**:

- تحمي النباتات من الأشعة فوق البنفسجية.
- مسئولة على تلوين مختلف أجزاء النبات من زهور وأوراق.
- تقوم بدور النبات في ايض النبات حيث تشارك في تنظيم نمو النبات بتأثيرها على الهرمونات النباتية.
- أداة حماية ودفاع عن النبات فهي تعيق نمو الجراثيم والبكتيريا والفطريات المسببة للأمراض الوراثية.
- تعمل على جلب الحشرات لضمان حدوث الألقاح[20].

❖ **بالنسبة للإنسان**:

- يعمل على حماية الكبد
- يحمي الاوردة من القصور اي منشط للشرايين والأوردة
- مضاد للأكسدة
- مضاد للفطريات والفيروسات والبكتيريا
- مضاد للالتهابات
- انخفاض حدوث السكة الدماغية [21].

الفصل الثالث:

الفاعلية المضادة للبكتيريا

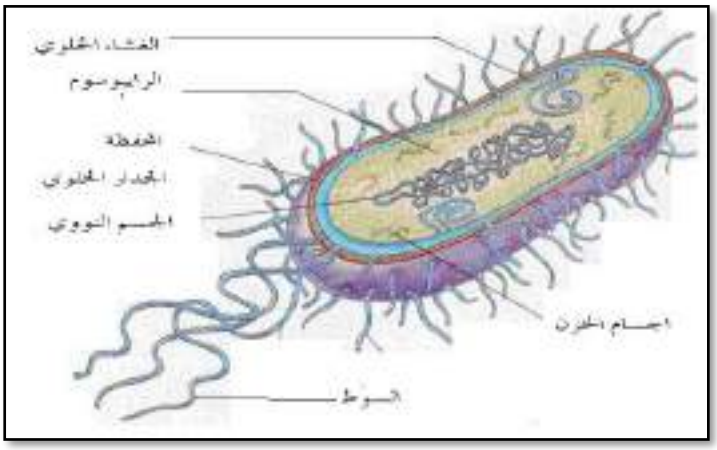
1.III. مدخل:

تشكل البكتيريا مجموعة الكائنات بدائية النوى تعامل معها الانسان دون ان يراها، فقد عرف انها تسبب الامراض حيث استعمل بعضها في عمليات تخمر مختلفة، ولقد كان الكشف المجهري الاثر الكبير في التعرف عليها.

ولقد ارتبط اسم البكتيريا كثيرا بالأمراض التي تسببها للإنسان ادى الى اكتشاف المضادات لهذه البكتيريا تسمى المضادات الحيوية التي تعمل على مقاومة البكتيريا [22].

2.III. تعريف البكتيريا:

هي كائنات حية دقيقة مجهرية تعيش بأعداد هائلة في كل البيئة تقريبًا على سطح الأرض، من فتحات أعماق البحار إلى القنوات الهضمية للبشر وتكون وحيدة الخلية تنتمي إلى مجموعة البدائيات تعتبر من اصغر الكائنات الحية، ولا تحتوي على الكلوروفيل يتراوح قطر معظمها من 0،3 و 2 ميكرون، وهي ذات أشكال مختلفة.للبكتيريا قدرات استقلابية متنوعة للغاية ويمكنها استخدام أي مركب عضوي تقريبًا وبعض المركبات غير العضوية كمصدر للغذاء .يمكن أن تسبب بعض أنواع البكتيريا أمراضًا للإنسان أو الحيوانات أو النباتات، ولكن معظمها غير ضار وهي عوامل بيئية نافعة تحافظ أنشطتها الأيضية على أعلى أشكال حياة [24][23].



الشكل (8): بنية البكتيريا

3.III. تصنيف البكتيريا:

يمكن تصنيف البكتيريا اعتمادا على الخصائص التالية:

1. الشكل الخارجي للخلية وتجمعها
2. الاستجابة لتلوين غرام (موجبة وسالبة الغرام)
3. طريقة التغذية (تكافلية، رمامية، تطفلية)
4. تكوين الابواغ [24]

4.III. السلالات البكتيرية المدروسة:

تم الحصول على السلالات البكتيرية المرجعية من المخابر البيداغوجية بكلية علوم الطبيعة والحياة في جامعة قاصدي مرباح ورقلة. تمت دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا بمخبر الخاص بدراسة البكتيريا في مستشفى محمد بوضياف بمساعدة أخصائين في المجال، ونعرف العينات المدروسة كالتالي:

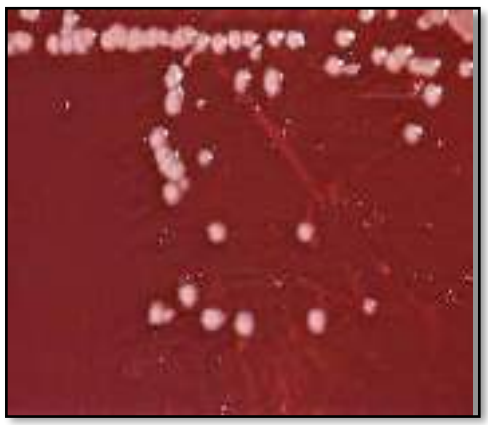
- ✓ **المكورات العنقودية الذهبية(*Staphylococcus aureus*):**

هي بكتيريا إيجابية الغرام غيرمتحركة، توجد في مجموعات وتنتج سموم خارجية فهي عامل ممرض انتهازي، ومسؤول عن مجموعة من الالتهابات [32].

الشكل (9): المكورات العنقودية الذهبية

- ✓ **الزائفة الزنجارية(*Pseudomonas aeruginosa*):**

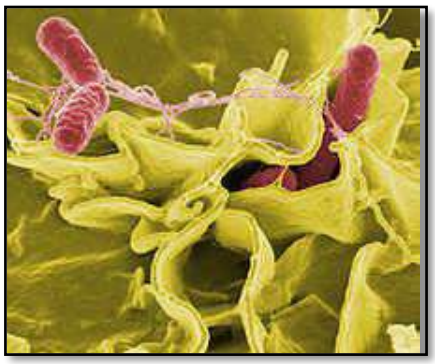
هي بكتيريا سالبة الغرام، تكون على شكل قضيب ومتحركة، تمتلك واحدة أو أكثر من سوط قطبي وهي عادة بكتيريا تتواجد في التربة، تسبب أمرض انتهازية للبشر الذين يعانون من نقص المناعة وهو سبب رئيسي للإصابة بعدوى المستشفيات. يمكنها أن تصيب الجروح بحروق شديدة، مما يتسبب في تكوين القيح الأزرق [25].



الشكل (10): الزائفة الزنجارية

✓ **سالمونيلا(*TyphiSalmonella*):**

هي بكتيريا سالبة الغرام، متحركة لا هوائية، تكون على شكل كريات. إذا كانت غازية تسبب حمى معوية مثل التيفوئيد، سيئة السمعة لتلوث الدواجنوتسمم الدم في بعض الأحيان في الأنسجة غير المعوية.



الشكل (11):سالمونيلا

✓ **المكورات المعوية(*Enterococcusfaecalis*):**

هي بكتيريا إيجابية الغرام،لا هوائية، اختيارية. تتواجد منفردة أو في أزواج أو في سلاسل قصيرة. يعيش معظمها في الجهاز الهضمي وهي سبب فيمعظم الالتهابات المعوية التي تصيب الإنسان.

الشكل (12): المكورات المعوية

✓ العصوية الرقيقة (***Bacillus subtilis***):

هي بكتيريا إجابية الغرام، عصوية رقيقة تتواجد في التربة والنباتات. غير مسببة للأمراض يمكن أن تلوث الطعام فإنها نادرا ما تؤدي الى التسمم الغذائي يتم استخدامها على النباتات كمبيد للفطريات [27][26].

الشكل (13): العصوية الرقيقة

5.III. المضادات الحيوية:

تعرف المضادات الحيوية بأنها مركبات كيماوية منتجة بواسطة كائنات حية دقيقة، لها تأثيرات سامة اختيارية ضد كائنات حية دقيقة أخرى. في المجال التطبيقي العملي،فإن المضادات الحيوية يقتصر اطلاقها على المواد الكيماوية المنتجة بواسطة الكائنات الحية الدقيقة والتي تمنع نمو وتكشف البكتيريا والفطريات. هناك مئات المضادات الحيوية قد تم تعريفها وتحديد هويتها.نصف هذه المضادات تقريبا،ينتج بواسطة الفطريات.يبدو واضحا أن مثل هذه المواد المنتجة طبيعيا تلعب دورا هاما في المقاومة الحيوية لأمراض النبات الكامنة في التربة.[28]

1.5.III. تأثير المضادات الحيوية:

تعمل المضادات الحيوية على قتل الميكروب أو تثبيط الميكروبات وقد يكون مفعول المضاد على الغلاف الخارجي للخلية أو على الغلاف الداخلي أو يعمل على مستوى الخلية لايقاف تصنيع البروتين.

الفصل الرابع:
الدراسة الفيتوكيميائية للنبات

1.IV. المادة النباتية:

تم قطف النبات الطبي في شهر أواخر شهرماي2017 من منطقة الجنوب الجزائري. ثم جففت النبتة تحت ظروف خاصة (في الظل وبعيدا عن الرطوبة).حيث استعملت الأجزاء الهوائية للنبتة بوزن قُدرب g 100 للدراسة الفيتوكيميائية.

2.IV. الأدوات والمواد المستعملة:

- ✓ **الأدوات:** جهاز التبخير الدوار، دورق التبخير بحجم منml 100 الى 1000، قمع الفصل، بيشر، ورق الترشيح من نوع واتمان رقم 3، ميزان الكتروني، مصباح الاشعة الفوق البنفسجية.
- ✓ **المواد:** ماء مقطر، ايثانول، ايثر البترول، كلوريد الميثيلين، خلات الايثيل، البيتانول، حمض الخليك، حمض كلور الماء، كبريتات الصوديوم، الكحول الأميلي.

3.IV. الاختبارات الفيتوكيميائية الأولية للمركبات الفلافونيدية:

نزن 10غرام من مسحوق النبتة وننقعه في 150ml من حمض كلور الماء لمدة 48 h من أجل الكشف على الفلافونيدات[29].

1) الفلافونيدات العامة:

نأخذ 10ml من الراشح المحظر سابقا ونضعها في بيشر ونعايره بواسطة محلول النشادر2N حيث يتم مراقبة المعايرة بواسطة ورق pH بعد قاعدية الوسط نلاحظ ظهور اللون الأصفر الفاتح مما يدل على وجود الفلافونيدات العامة.

2) الفلافونيدات الحرة:

نأخذ5ml من الراشح المحظر سابقا ونضعها في أنبوب اختبار ونضيف له 2،5ml من الكحول الأميلي فنلاحظ بعد الرج والتوازن تلوين الطور الكحولي (الطبقة العلوية) باللون الأصفر مما يدل على تواجد الفلافونيدات الحرة.

3) الفلافونيداتالجليكوزيدية:

نأخذ الطور الكحولي المحصل عليه من إختبارالفلافونيدات الحرة وذلك بفصله عن الطور المائي ثم نقوم بتبخيره تحت الضغط والراسب المحصل عليه نقوم بتذويبه في 3ml من حمض كلور الماء المخفف (1%) ثم يسخن المحلول في حمام مائي لمدة دقيقتين.بعد التبريد نضيف له 2.5 ml من الكحول الأميلي بعد الرج والتوازن نلاحظ تلوين الطور الكحولي (العلوي) باللون الأصفر مما يدل على تواجد الفلافونيداتالجليكوزيدية.

1.3.IV. النتائج و المناقشة:

الجدول (8): نتائج الكشف عن الفلافونيدات

المركبات الفعالة	الملاحظة	النتيجة
الفلافونيدات العامة	أصفر	+
الفلافونيدات الحرة	أصفر فاتح	+
الفلافونيداتالجليكوزيدية	أصفر	+

(+): إيجابي

الشكل (14): الاختبارات الفيتوكيميائية الاولية للفلافونيدات

من خلال النتائج الموضحة في الجدول (8) والشكل (14) نلاحظ أن جميع الاختبارات الفيتوكيميائيةإيجابية مما يعني أن النبات الطبي غني بالمركبات الفلافونيدية.

4.IV. طرق الاستخلاص:

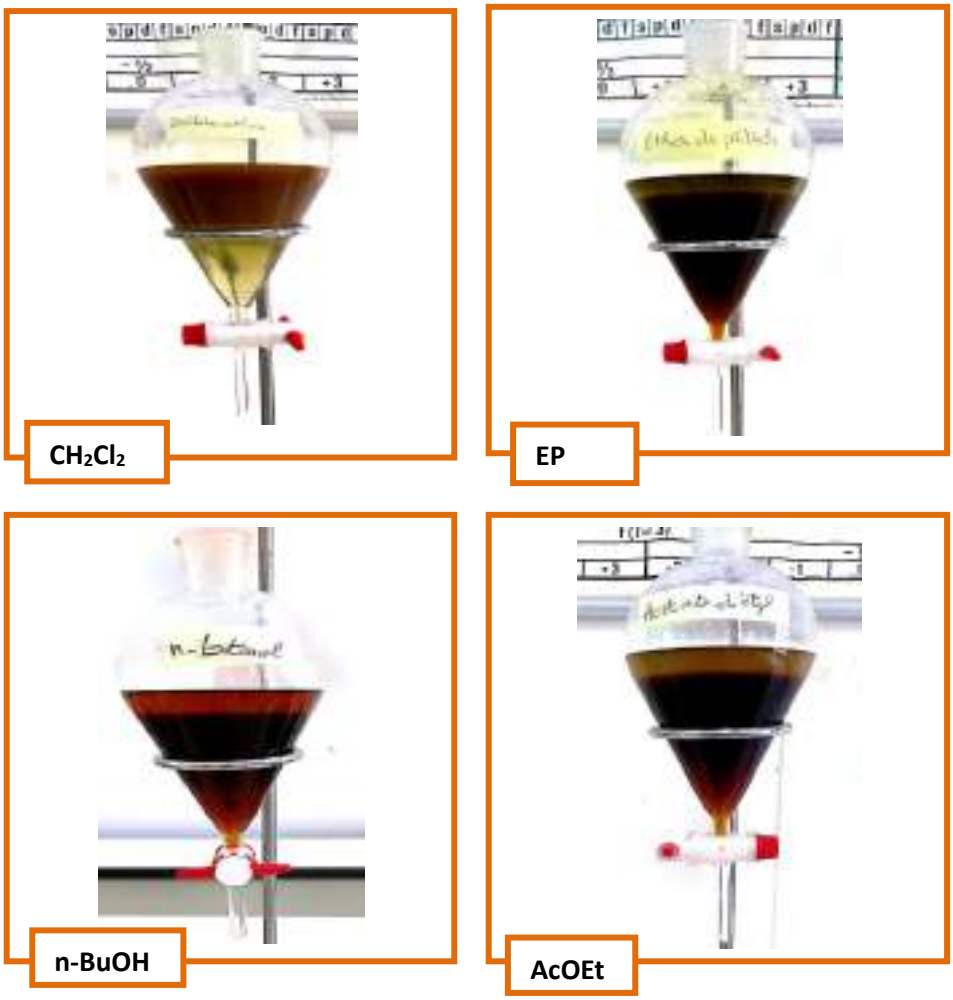
1.4.IV. استخلاص صلب- سائل:

قمنا بطحن الأجزاء الهوائية للنبتة ثم أخذنا 100غرام ووضعناها في قارورة معتمة ومحكمة الاغلاق وقمنا بنقعها ب ماء/اثانول (70/30) مدة 24 ساعة ثم قمنا بترشيحها. كررت العملية ثلاث مرات بنفس الخطوات السابقة.

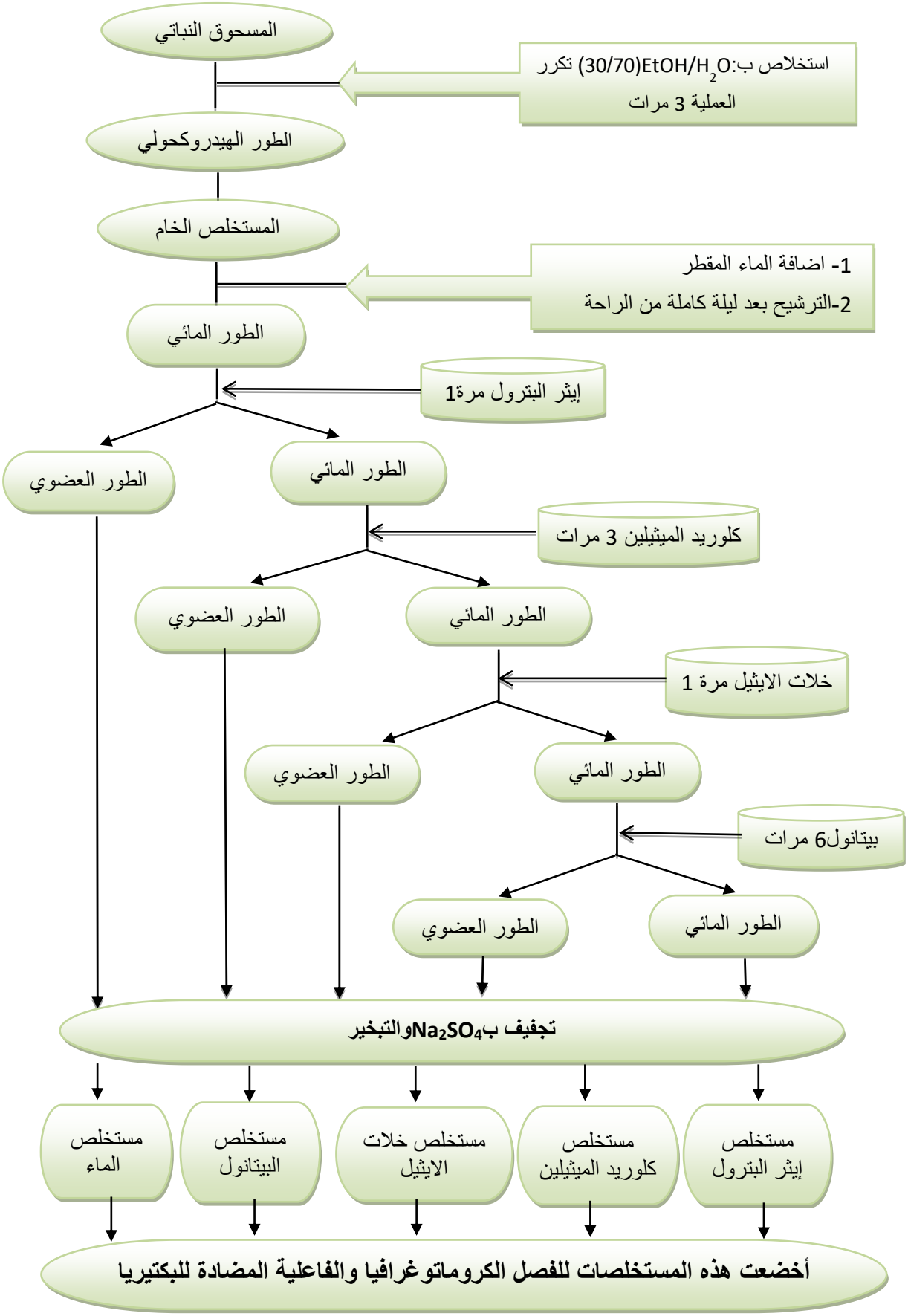
IV.4. 2. استخلاص سائل- سائل:

بعد جمع الرشاحة (الطور الهيدروكحولي) نقوم بتركيزها في جهاز التبخير الدوار في درجة حرارة 39C° ثم نضيف حجم معين من الماء المقطر(1kg نضيف من400mlالى 600)حتى تذوب الرشاحة المتحصل عليها، ثم باشرنا عملية استخلاص انتقائية بمذيبات متزايدة القطبية:

ايثرالبترول(مرة واحدة)، كلوريد الميثيلين(ثلاث مرات)، خلات الايثيل(مرة واحدة)، البيتانول(ستة مرات) على التوالي بالاستعانة بحبابة الابانة كما هو موضح في الشكل التالي:



الشكل (15): إستخلاص سائل- سائل


المسحوق النباتي
استخلاص ب:$EtOH/H_2O$(30/70) تكرر العملية 3 مرات
الطور الهيدروكحولي
المستخلص الخام
1- اضافة الماء المقطر
2-الترشيح بعد ليلة كاملة من الراحة
الطور المائي
إيثر البترول مرة1
الطور العضوي
الطور المائي
كلوريد الميثيلين 3 مرات
الطور العضوي
الطور المائي
خلات الايثيل مرة 1
الطور العضوي
الطور المائي
بيتانول6 مرات
الطور العضوي
الطور المائي
تجفيف بNa_2SO_4والتبخير
مستخلص الماء
مستخلص البيتانول
مستخلص خلات الايثيل
مستخلص كلوريد الميثيلين
مستخلص إيثر البترول
أخضعت هذه المستخلصات للفصل الكروماتوغرافيا والفاعلية المضادة للبكتيريا

الشكل (16): مخطط يوضح مراحل الاستخلاص بواسطة ماء/ايثانول (30/70)

3.4.IV. النتائج و المناقشة:

✓ **حساب المردودية**

لحساب مردود الاستخلاص قمنا بتركيزالاطوار السابقة (ثنائي كلور الميثان، خلات الاثيل، البيتانول) بالاعتمدعلى العلاقة التالية:

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

حيث:

R: مردود الاستخلاص

m: الكتلة الناتجة من عملية الاستخلاص

m_0: كتلة النبتة الجافة والتي تقدر ب 100g

الجدول (9): مردود الاستخلاص

المستخلصات	الكتلة m (g)	المردود R(%)
كلوريد الميثيلين		
خلات الايثيل		
البيتانول		

نلاحظ من خلال الجدول (9)أن أصغر مردود للاستخلاص كان لمستخلص خلات الايثيل و يقدر ب **%**.

5.IV. طرق التحليل الكروماتوغرافي:

تختلف أنواع الكروماتوغرافيا في طريقة فصل وتنقية المواد الكيميائية المختلطة حيث يتم اعتماد أحد تقنياتها على طبيعة مكونات الخليط وطبيعة الأطوار (المتحرك والثابت) [30].

حيث عالجنا مستخلص كلوريد الميثيلين بكروماتوغرافيا الغازية المرفقة بمطيافية الكتلة ومستخلص خلات الايثيلوالبيتانولبكروماتوغرافيا الورق والطبقة الرقيقة بالإضافة الى كروماتوغرافيا العمود بالنسبة للمستخلص البيتانولي.

1.5.IV. الكروماتوغرافيا الغازية المرفقة بمطيافية الكتلة:

هي تقنية من التقنيات التي تطبق في الدراسات التحليلية للمركبات العضوية وخاصة تلك القابلة للتبخر، مقدار العينة المدروسة يتراوح من mg الى µg ازدواجية هذه التقنية بمطيافية الكتلة ادى الى التسريع والتدقيق في تحديد الصيغ الكيميائية للمركبات المفصولة **[22]**.

جرى تحليل مستخلص ثنائي كلور الميثان لنبات الطبي عند الشروط التجريبية المذكورة أدناه بجهاز كروماتوغرافيا الغازية المرفقة بجهاز مطيافية الكتلة فتحصلنا على الكروماتوغرام الموضح في الشكل (18).

الشروط التجريبية:

- ✓ نوع جهاز الكروماتوغرافيا:Clarus 600T
- ✓ نوع عمود الكروماتوغرافيا: RTx-5ms
- ✓ أبعاد عمود الكروماتوغرافيا: طول 30 m،قطر0.25mm
- ✓ الغاز الناقل: الهيليوم(He)
- ✓ تقنية الحقن: PFlow-He
- ✓ درجة الحرارة عند الحقن:°45C
- ✓ سرعة التدفق: عادية
- ✓ برنامج الحرارة:
  1) C°45 لمدة 1 min.
  2) C°155 لمدة 2min ، بزيادة C°15لكل دقيقة.
  3) C°270 لمدة 10 min ، بزيادةC° 5 لكل دقيقة.
- ✓ معدل التدفق: 1ml/min
- ✓ الكمية المحقونة: 1l µ
- ✓ نوع الكاشف: مطيافية الكتلةPEAutoSystem GC withbuilt-in Autosampler
- ✓ كمون التأين: 5mV

الشكل (17): كروماتوغرام مستخلص كلوريد الميثيلين

IV.1.1.5. النتائج والمناقشة:

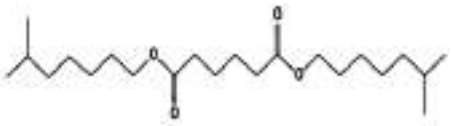
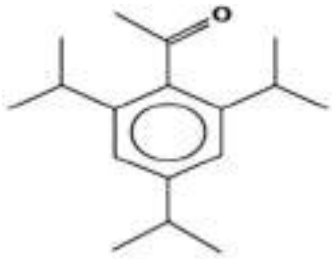
الجدول (10): نتائج الفصل الكروماتوغرافيا الغازية المرفقة بمطيافية الكتلة GC-MSلمستخلص كلوريد المثيلين

أسماء المركبات المرجعيةالمقترحة	نسب احتمال المركبات الناتجة(%)	زمن الاحتجاز RT
(1S،2S،3R،5S)-(+)-Pinanediol		
2-Cyclohexen-1-ol، 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-،trans		
2-Cyclohexen-1-one، 4-hydroxy-3-methyl-6-(1 methylethyl)-،trans		
2-Cyclohexen-1-one، 3-(hydroxymethyl)-6-(1 methlethyl)-		
α،2،6،6-Tetramethyl-1-Cyclohexene-1-methanol		
2’،4’،6’-Triisopropylacetophenone		
3H-Naphtho[2، 3-b]furan-2-one، 4-hydroxy-4a،5-dimethyl-3-methylene-3a،4،4a،5،6،7،9،9a-octahydro-		
Senecionine		
Diisooctyladipate		
Integerrimine		

الدراسة التحليلية بواسطة كروماتوغرافيا الغازية المرفقة بمطيافية الكتلةلمستخلص ثنائي كلور الميثان للنبات الطبي الممثلة في الجدول(10) أظهرت وجود10 مركبات كيميائية.

تم الحصول على مركبين كيميائيين من المستخلص المدروس كما هو مبين في الجدول (11)، حيث كانت الذروة لزمن الاحتجاز() لها طيف كتلة عند ذروة أساس () ينسب الى المركب Diisooctyladipate. أما الذروة المميزة الثانية عند زمن الاحتجاز() فكان طيف كتلتها له ذروة أساس () ينسب الى المركب 6'-Triisopropylacetophenone[31][30]،4'،2'.

الجدول (11): بعض المركبات المرجعية ذات اعلى نسبة تواجد

زمن الاحتجاز RT	النسبة (%)	ذروة أساس المركبات المرجعية(M/Z)	الوزن الجزيئي (M)	الصيغة الكيميائية المجملة	الصيغة الكيميائية المفصلة
			370،566	$C_{22}H_{42}O_4$	
			246 ،39	$C_{17}H_{26}O$	

الشكل (18): طيف الكتلة للمركب الناتج عند زمن احتجاز( )

الشكل (19): طيف الكتلة للمركب الناتج عند زمن احتجاز( )

IV.2.5. كروماتوغرافيا الورق CP:

يمكن استعمال هذه التقنية مباشرة على المستخلص في حالة عدم غنائه بالمركبات الفلافونيدية. كما تستعمل لجمع وفصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي.

يكون الورق المستعمل من نوع وتمان رقم 1 أو 3 حيث يوضع الخليط بواسطة ماصة على كامل عرض الورق على مسافة 2cm من الحافة السفلية للورق، وبعد ان تجف تغمس في المملص اين تبدأ الحزم في الصعود تدريجيا حتى الوصول الى الحافة العلوية للورقة.

بعد جفاف الورقة يتم الاستعانة بمصباح وود لدراسة الحزم [14].

قمنا في عملنا هذا باستعمال الانظمة التالية في نوعين من الكروماتوغرافيا الورق احادية البعد وثنائية البعد:

1) BAW: قمنا بمزج (الماء: حمض الخليك: البيتانول) بالنسب التالية على الترتيب (5/1/4)
2) حمض الخليك 20%

IV.2.5.1. كروماتوغرافيا الورق احادية البعد:

- ✓ **تحضير الورق:**

نأخذ ورق وتمان رقم 3 ذو الابعاد20cm×10 نترك 3 سم على الحافة السفلية للورقة ونرسم خط رفيع بالقلم الرصاص ثم نحدد مكان وضع البقع بحيث توضع البقع على شكل خط بطول 1cm. ونترك مسافة 2 cm بين بقعة و اخرى و نتركها لتجف.

- ✓ **وضع البقع:**

بواسطة انابيب شعرية يتم وضع بقعة من كل مستخلص على شكل خط بطول 1cm حتى تجف جيدا.

- ✓ **تحضير الطور المتحرك:**

- الطور المتحرك1(BAW):

نأخذ 40 ml من البيتانول و10ml من حمض الخل و50ml من الماء المقطرنقوم بمزجها جميعا في قمع الفصل (حبابة ابانة). بعد الرج والتوازن تتشكل طبقتين متمايزتين (محلول غير متجانس) يفصل الطور الذي يكون في الاعلى.

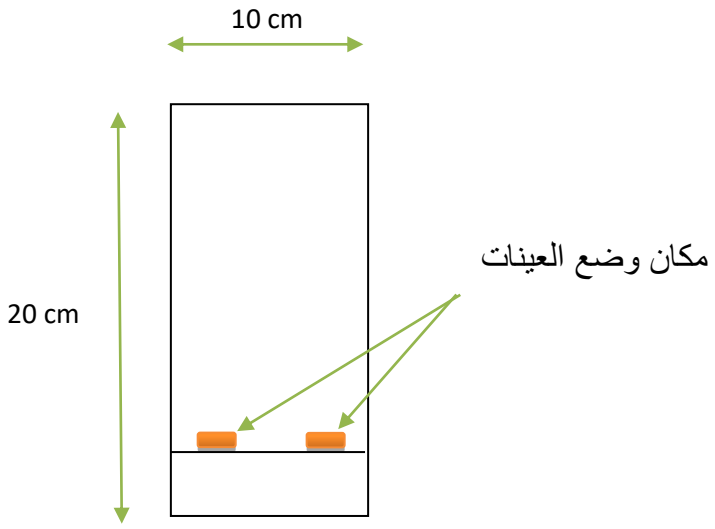
- الطور المتحرك 2 (AcOH):

يأخذ 20 ml من حمض الخل و80 ml من الماء المقطر وتمزج مع بعض نتحصل على محلول متجانس.

✓ **عملية الفصل:**

يوضع الورق الكروماتوغرافياCP المحضرة سابقا في الخلية التي تحوي الطور المتحرك 1 بشكل عمودي، تغلق الخلية باحكام وتترك دون تحريك فتبدأ عملية الفصل بصعود الطور المتحرك بالخاصية الشعرية على طول الورق آخذا معه المركبات المماثلة له في القطبية وبهذه الطريقة يتم فصل مختلف المركبات حسب قطبيتها.

بعد مرور مدة زمنية الى ان يصل الطور المتحرك الى خط الوصول المحدد يتم استخراج الورقة ووضعها تجف جيدا في الهواء ثم توضع تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية (وود).



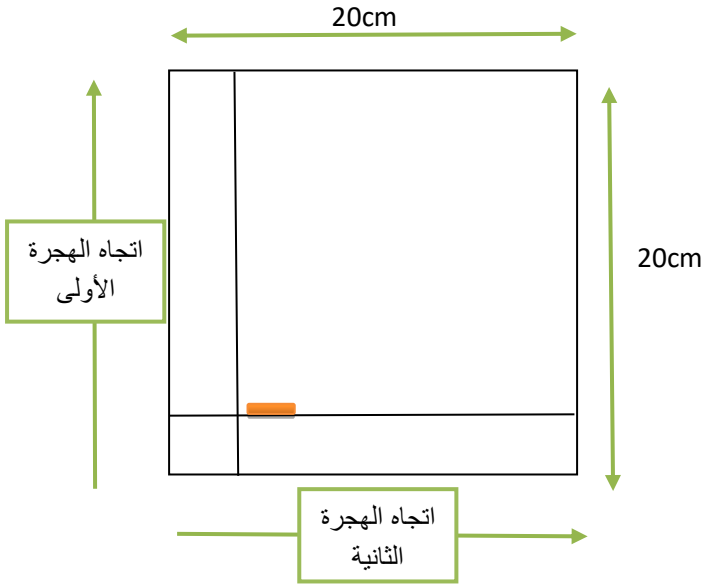
الشكل (20): تحضير كروماتوغرافيا الورق أحادية البعد

الشكل (21): كروماتوغراماتCP أحادية البعد

IV.2.5. 2. كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد:

نأخذ ورق وتمان رقم 3 ذو الابعاد (20×20cm) بحيث نترك مسافة 5cm من جهة و 5cm من الجهة العمودية عليها ثم نرسم خط رفيع بالقلم رصاص على بعد 1cm من نفس الجهتين ونحدد مكان وضع البقع حيث 2cm بين البقع كما موضح في الشكل التالي:

ندخل الورقة في الخلية ونتركها حتى يصل الطور المتحرك (1) الى خط النهاية نخرج الورق ونتركها تجف ثم ندخلها في الطور المتحرك (2) بالاتجاه الاخر المحدد نتركها ليصل الطور المتحرك للأعلى ثم نخرجها لتجف جيدا.



الشكل (22): تحضير كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد

الشكل (23): كروماتوغرام CP ثنائية البعد

IV.2.5. 3. النتائج والمناقشة:

- ✓ **كروماتوغرافيا احادية البعد**

الجدول(12): نتائج الفصل بكروماتوغرافيا الورق أحادية البعد

المستخلص	الاطوار	اللون	عدد البقع
البيتانول Ex. But	BAW		1
			1
			1
			1
			1
	AcOH		1
			2
			1
خلات الايثيل Ex. Ac	BAW		1
			1
	AcOH		1
			1
			1
			1
			1
			1
			1

من خلال النتائج الموضحة في الشكل(21) والجدول(12) تبين بأن المركبات الفلافونيدية الموجودة في مستخلص البيتانولي تختلف عن تلك الموجودة في مستخلص خلات الايثيل ولتأكيد هذه الملاحظة يتوجب علينا اجراء كروماتوغرافيا ثنائية البعد

- ✓ **كروماتوغرافيا ثنائية البعد**

الجدول(13): نتائج الفصل بكروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد

المستخلص	عدد البقع	لون البقع
البيتانول Ex. But	1	
	2	
	1	
	1	
	1	
خلات الايثيل Ex. Ac	1	
	1	
	1	
	1	

	1	

من خلال النتائج الموضحة في الشكل(23) والملخصة في الجدول(13)، نجد أن أغلب البقع الظاهرة في كروماتوغرافيا الورقية أحادية البعد اغلبها ظهرت في الكروماتوغرافيا ثنائية البعد لكلا المستخلصين، وهذا يؤكد الاختلاف البنيوي للفلافونيدات الموجودة في المستخلص البيتانولي و مستخلص خلات الايثيل للنبات الطبي.

3.5.IV. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC):

كرواتوغرافيا الطبقة الرقيقة من ابسط انواع الكروماتوغرافيا، تكون المركبات المفصولة منتشرة بين الطور الثابت والمتحرك، عموما الطور الثابت يكون مشكل من صفيحة زجاجية، بلاستيكية او الالمنيوم مغطاة بطبقة رقيقة من مادة بيولوجيا ماصة (gel de celluloseأو gel de silice) الطور المتحرك هو سائل مذيب للعينة المراد تحليل مكوناتها، حيث يهاجر الطور المتحرك على طول الطور الثابت فيجذب العينة معه. المواد المكونة للعينة تفصل وتنتشر بفضل صعود وارتقاء الطور المتحرك على طول الطور الثابت. يعتمد فصل المكونات على درجة امتصاص الطور الثابت ونسبة ذوبان العينة في الطور المتحرك. يتم الكشف على الجزيئات المكونة للعينة اما بعرض الصفيحة تحت مصباح الاشعة فوق البنفسجية (وود) او برش بعض الكواشف[32].

قمنا بدراسة المستخلصين (البتانولي وخلات الايثيل) بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في عدة أنظمة مختفلة بهدف اختيار أحسن نظام لفصل المركبات الفعالة في كلا المستخلصين.

- ✓ **تحضير صفيحة TLC:**

قطعنا صفيحة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بالأبعاد(5cm×10cm) حيث الطور الثابت هو السيليكاجال(Silica gel). نرسم على بعد 1cmمن الجهة السفلية خط رفيع بقلم الرصاص ونعين عليه مكان وضع البقع ب0.5cm لكل بقعة ونترك مسافة 2cm بين كل بقعة وأخرى ثم بواسطة أنابيب شعرية نضع بقعة بعرض 1cm من كل مستخلص في مكانها المحدد على ألصفيحة اذا كانت البقع غير مركزة فتكرر العملية بعد أن تجف البقعة.

- ✓ **تحضير الطور المتحرك:**

من أجل اختيار أحسن الأنظمة التي تفصل كلا من مكونات المستخلص البيتانولي وخلات الايثيل تم اختبار عدة أنظمة منها:

- هيكسان/كلوروفورم/ميثانول (4:1:1)
- خلات الايثيل/ميثانول(1:4)(2:3) (3:2) (4:1)

- خلات الايثيل/ميثانول/ماء (1:1:20)
- خلات الايثيل/حمض النمل/حمض الخل/ماء (100:11:11:27)

وتوصلنا الى أحسن الأنظمة لفصل كلا المستخلصين تتجلى في:

- **بالنسبة للمستخلص البيتانولي:**

- كلوريد الميثيلين/ميثانول/ماء (70:30:3)
- كلوروفورم/خلات الايثيل/ميثانول(1:1:5)

- **بالنسبة لمستخلص خلات الايثيل:**

- خلات الايثيل/ميثانول/ماء(2،0:2:0:2)
- هكسان/كلوروفورم/ميثانول(2/3/1)

- **بالنسبة لكلا المستخلصين:**

- كلوروفورم/ميثانول(3:1)
- خلات الايثيل/ميثانول/ماء(3،0:3:0:2)
- خلات الايثيل/ميثانول/ماء/حمض الخل(1:1:1:20)

IV.3.5. 1. النتائج والمناقشة:

كلوروفورم/ميثانول (1:3)	خلات الايثيل/ميثانول/ماء (0,3:0,3:2)	خلات الايثيل/ميثانول/ماء/حمض الخل (20:1:1:1)

الشكل (24): كروماتوغرامات TLC مستخلص البيتانولوخلات الايثيل في وجود كاشف حمض الكبريت

من خلال نتائج الفصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة توصلنا الى أن نظام كلوروفورم/ميثانول (3:1)هو الأفضل لفصل مكونات المستخلص البيتانوليو خلاتالايثيل معا.

IV.4.5. كروماتوغرافيا العمود CC:

هي طريقة كلاسيكية الهدف منها هو فصل خليط معقد من المركبات وخاصة المركبات الفلافونيدية ويستعمل لهذا الغرض السيليكاجال، السيليلوز ومتعدد الاميد كدعامة ثابتة.

حيث يستخدم السيليكاجال لفصل الفلافونيدات الاقل قطبية، اما السيليلوز فقد اثبتت فعاليته في فصل الفلافونيداتالغليكوزيدية غير ان متعدد الاميد لقي تطبيق واسع النطاق في فصل الفلافونيداتالغليكوزيدية عن بعضها البعض. ويتلخص اجراء هذه التقنية في مايلي:

اختيار العمود والذي تختلف ابعاده باختلاف كمية المستخلص الذي تجرى عليه هذه التقنية، ويثبت بواسطة حامل ويعبأ بالطور الثابت مشبع بالمذيب الاقل قطبية [33].

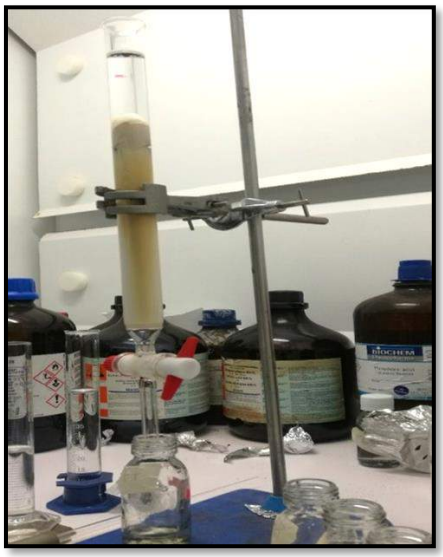
اخترنا طريقة كروماتوغرافيا العمود لفصل مكونات مستخلص البيتانول؛ وذلك لوجود عدد معتبر من المركبات الفلافونيدية حسب كروماتوغرافيا الورق والطبقة الرقيقة.

- ✓ **تحضيرالعينة:**

نأخذ المستخلص البيتانولي ونضيف اليه نصف الكمية من متعدد الاميد الخاص بالكروماتوغرافيا التحضيرية ثم نذيب الخليط في كمية من الميثانول، بعدها نقوم بتركيزه في جهاز التبخير الدوار لنتحصل في الاخير على مسحوق مكون من مستخلص ممتز على متعدد الأميد.

- ✓ **تحضير العمود:**

1. تم تحضير عمود بطول 51 سم وقطره 3 سم.نقوم بغسل العمود بالماء المقطر ثم الميثانول.
2. ثم نقوم بتعبئة العمود بمتعدد الاميد المذاب في الطوليين حتى نصل الى 3/2 من طول العمود.
3. ندخل ورق ترشيح قطرها بقطر فتحة العمود ثم قطن بعدها ورق ترشيح مكان الرمل.
4. نترك كمية من الطوليين بمسافة 3cm ونضيف العينة الى 1/3 المتبقية من طول العمود.
5. نضيف القطن ونرصه فوق المستخلص مع اضافة حجم معين من الطوليين لكي لا يجف العمود.



الشكل (25): تقنية كروماتوغرافيا العمود

IV.4.5. 1. النتائج والمناقشة:

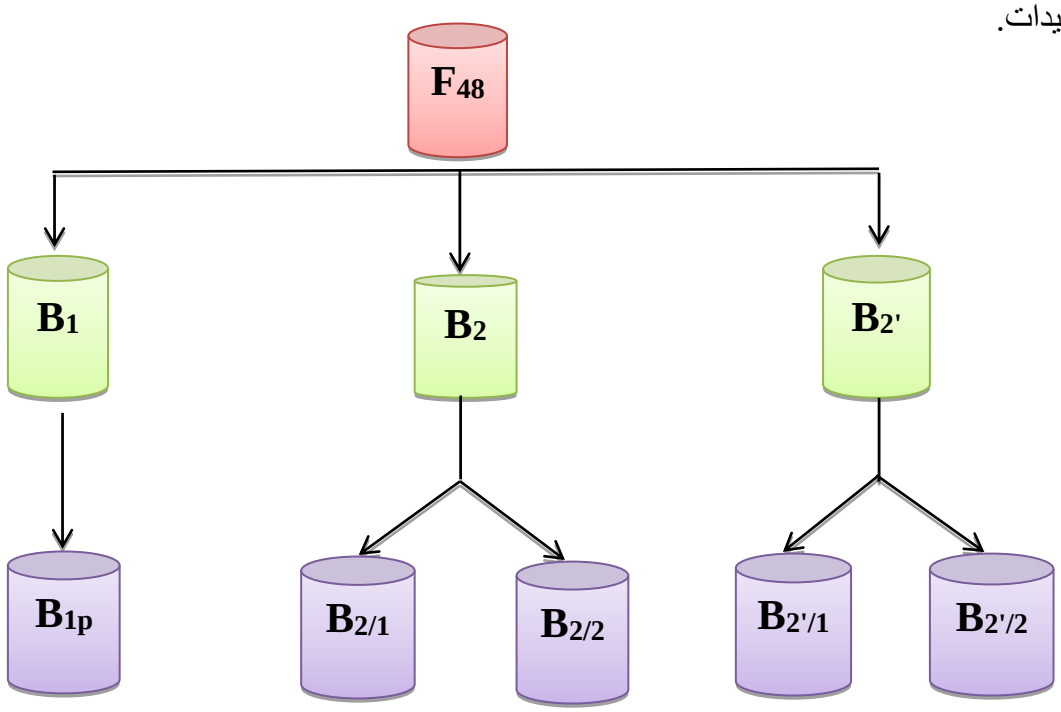
تحصلنا بعد الفصل الأولي بكروماتوغرافيا العمود لمستخلص البيتانول على 96 كسرتم تجميعها الى 15 كسر بالاستعانة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة. الجدول (14) يوضح الكسور المتحصل عليها.

الجدول(14):نتائج الفصل بكروماتوغرافيا العمود

الكسور قبل التجميع	الكسور بعد التجميع	تولوين	ميثانول
1	F_1	100	0
4----2	F_2	100	0
8----5		98	02
14----9		95	05
16----15	F_{15}	95	05
19----17		93	07
20	F_{20}	93	07
32----21	F_{21}	90	10
36----33		85	15
39----37		80	20
40	F_{40}	80	20
47----43	F_{43}	80	20
52----48	F_{48}	80	20
55----53	F_{53}	70	30
64----56	F_{56}	70	30
68----65		50	50
72----69	F_{69}	50	50
73	F_{73}	50	50
74	F_{74}	50	50
76----75	F_{75}	50	50
88----77		80	20
93----89		0	100
96----94	F_{94}	0	100

IV.5.5. الفصل والتنقية:

بغرض فصل المركبات الفلافونيدية تم دراسة الكسر F_{48} الذي حددت كتلته ب g بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام نظام كلوروفورم/ميثانول (9/1). كان اعتمدنا في اختيار الكسرF_{48} على لون البقعة تحت الأشعة الفوق البنفسجية والتي تظهر بلون بنفسجي مسود الذي يدل على وجود الفلافونيدات.



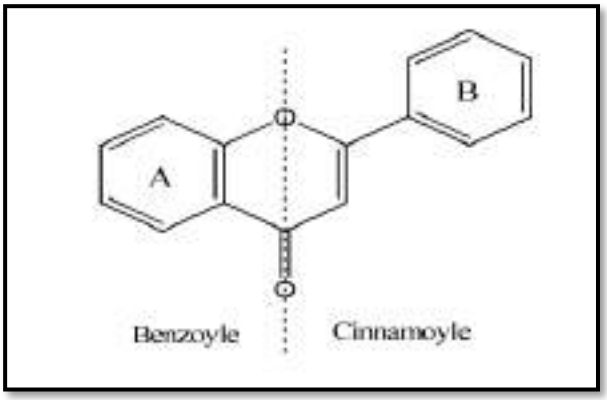
الشكل (26): مراحل الفصل والتنقية للكسر F48 بواسطةكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية

IV.6. مطيافية الأشعة المرئية وفوق البنفسجية (UV-Vis):

تعتبر مطيافية الاشعة الفوق البنفسجية تقنية سهلة الاستعمال ولا تتطلب كمية كبيرة من المركب المراد تحليله، تلعب الاطياف المحصل عليها دورا هاما في التعرف على مختلف بنى المركبات الفلافونيدية، وهذا راجع الى المعلومات الوافرة التي تقدمها حيث تسمح بمعرفة الهيدروكسيلات الحرة وموقعها على الهيكل الفلافونيدي وذلك بتشكيل ايونات او معقدات مع مختلف الكواشف التي تترجم على طيف UVبازاحةباتوكرومية او هبسوكرومية للحزم الممتصة بالنسبة الى طيف مرجعي ممتص في الوسط الميثانولي، ويتميز هذا الاخير بعصابتين امتصاص اساسيتين العصابة I العصابة II[16][18] .

IV.6.1 . طيف الامتصاص للفلافونيدات في الوسط الميثانولي:

يعطي طيف الفلافونويدات الحاوية على مجموعة الكربونيل في الموقع C_4 (فلافون او فلافانول)عصابتين Iو II تبعا للشكل الموالي [34]:



الشكل(27): ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقتين البنزنيتينAوB

العصابة I: تكون ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود nm (400 - 300) والمميزة لامتصاص الصورة Cinnamoyle الناتج عن مجموعة الكربونيلC_4 مع الرابطة الثنائية للحلقةB .اذ تسمح بتمييز الفلافون عن الفلافونول وتعطي معلومات عن التغيرات البنيوية للحلقتين B وC.

العصابة II: ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود(nm 280 - 250)وهي ناتجة عن الشكل Benzoyle الناجم عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة العطرية وهذا ما يمكننا من الكشف عن الهياكل الفلافونيدية المختلفة حسب الجدول التالي:

الجدول (15): الانزياحات الملاحظة للعصابتين I و II في الميثانول

نوع الفلافونويد	العصابة II nm	العصابة I (nm)
فلافون	280 – 250	**350 – 310**
فلافونول 3-OH مستبدل	280 – 250	**360 – 330**
فلافونول 3-OH حر	280 – 250	**385 – 350**
ايزوفلافون	275 – 245	**330 - 310**
فلافانون وDihydroflavonol	295 – 257	**330 – 300**
شالكون	270 – 220 شدة منخفضة	**390 – 340**
اورون	270 – 220 شدة منخفضة	**430 - 380**
انثوسيانيدين وانثوسيانين	270 – 230	**560 – 465**

يعتمد الطول الموجي للحزمتين على عدد و موقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فمن الملاحظ أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل زاد الطول الموجي (انزياح باثوكرومي). وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميثوكسيل، أووحدات سكر تنزاح حزمتا الامتصاص إلى طول موجي أقل (ايبسوكرومي) [20].

IV.6. 2. طيف الامتصاص للفلاقونيدات في وجود الكواشف:

- ✓ **في وجود NaOH (NaOMe):**

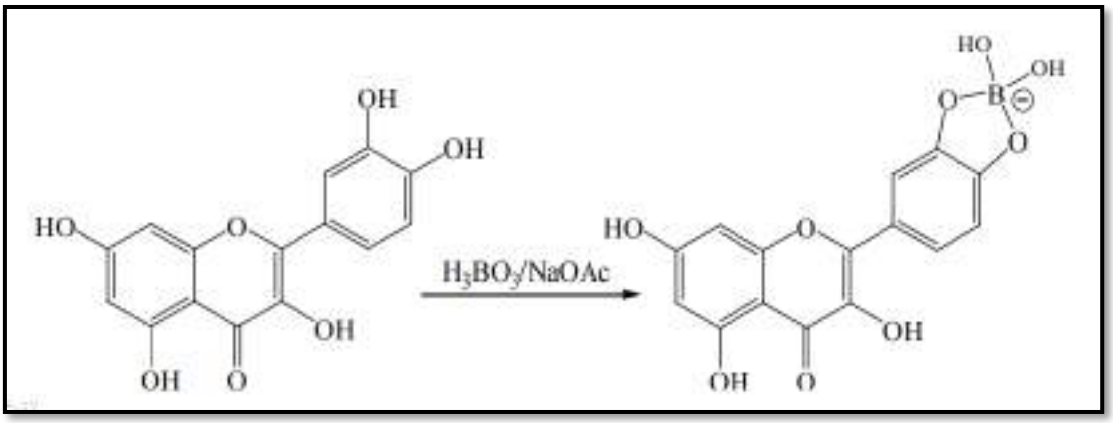
NaOH قاعدة قوية تؤين كل هيدروكسيلاتالفلافونويد اذ تحدث انزياح باثوكرومي للطيف يكون واضح في العصابة I.

- ✓ **في وجود NaOAc:**

تعتبر قاعدة ضعيفة مقارنة بNaOHفهي تاين فقط الهيدروكسيلات الاكثر حامضية C_7، C_3، C_4’ ويعتبر NaOAc كاشفا نوعيا لهيدروكسيل الموضع C_7.

- ✓ **في وجود $NaOAc+H_3BO_3$:**

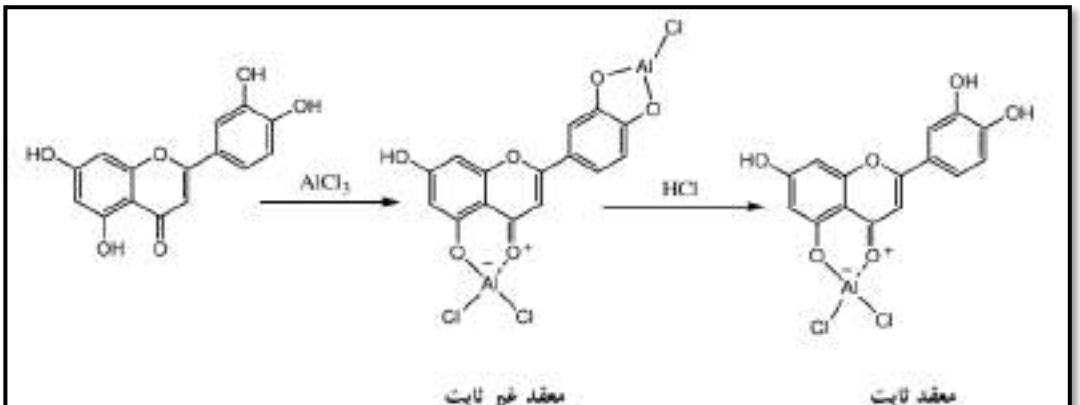
يستعمل هذا المحلول في للكشف عن اورثو ثنائي هيدروكسيل، فيتشكل حمض البوريك في وجود خلات الصوديوم معقدات مع الهيدروكسيلاتالفينولية في الموضع اورثو الموضح في الشكل التالي:



الشكل(28): يوضح المعقد المتكون بين الفلافونيد والمحلول (NaOAc+H3BO3)

- ✓ **في وجود $AlCl_3$ + HCl:**

يؤديإضافةكلوريد الالمنيوم الى العينة (مركب+ميثانول) فيالوسط الحمضي إلىتشكيل 3 معقداتثابتةمعمجموعةالكربونيل، و هيدروكسيلات المواقع تشكل 3 او 5 معقدات غير ثابتة معجملةأورثوثنائيالهيدروكسيلمثل '3 و'4 كما هو موضح في الشكل التالي[35]:



الشكل (29): المعقد الثابت ومعقد غير ثابت بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل وبعد اضافة HCl

الجدول (16): أهم الانزياحات الملاحظة على العصابة Iو II بعد اضافة الكواشف[39][18]

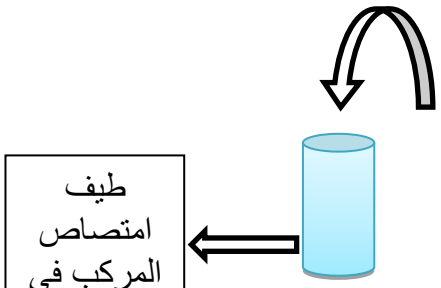
الكواشف	الانزياحات الكيميائية		التفسير
	العصابةI	العصابة II	
MeOH	350-304 385-352 380-350	280-250 280-250 280-250	فلافون فلافونول(3-OH) فلافونول(3-OR)
NaOH	+44 الى 65 1. بستقرارأو ارتفاع الشدة 2. انخفاض الشدة 3. عصابة جديدة (335-320)		4'-OH 3-OH و 4'-OR 7-OH
$AlCl_3$/MeOH	+20 الى 45 60+		5-OH 3-OH
$AlCl_3$+HCl/ $AlCl_3$	-20الى -40 -20 الى -25		أورثو ثنائيOH (B) أورثو ثنائيOH (A) + أورثو ثنائيOH (B)
$AlCl_3$+HCl/ MeOH	+17 الى 20 +35 الى 55 +50 الى 60		5-OH مع (6-O) 5-OH فلافون و3-OHفلافون 3-OH مع/أوبدون5-OH
NaOAc/MeOH	+5 الى 20 1. انزياح ضعيف جدا 2. نقصان في الشدة مع الوقت 3. تجزء الطيف مع الوقت		7-OH 7-OR 7-6 أو7-8 أو'4-'3 ثنائي OH 5-6-7 أو5-7-8 أو3-'3-'4 ثلاثيOH
NaOAc+H_3BO_3/ MeOH	+12 الى 36 +5 الى 10		'3-'4 ثنائيOH 7-6 أو7-8ثنائي OH

الجدول (17): أهم الانزياحات الملاحظة على العصابة I وII بعد اضافة الكواشف[39][18]

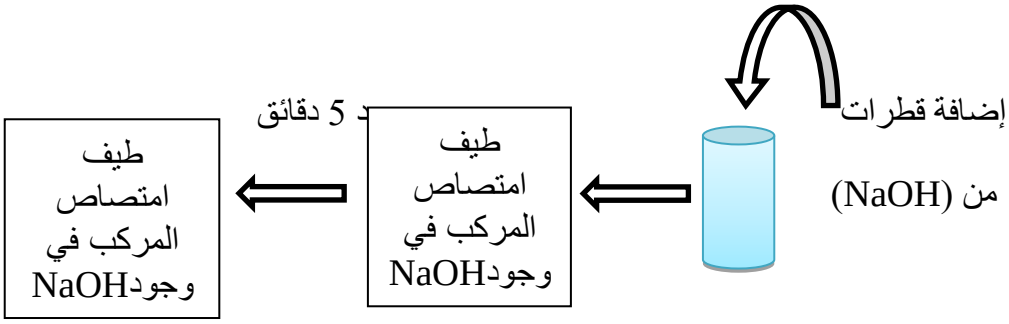
الكاشف	الازاحة الكيميائية (nm)		التفسير
	العصابة I	العصابة II	
MeOH	-	245-270	ايزوفلافون **(ISO)**
	-	270-295	فلافانون **(FLN)**
	-	270-295	ثنائي هيدروفلافونول**(Dihflvol)**
NaOMe/MeOH	انخفاض في الشدة مع مرورالوقت		3'.4' diOH **(ISO)**
	34-40		5.7 diOH**(Dihflvol)**
	55-60		7-OH **(Dihflvol)**
	35		5.7diOH**(FLN)**
	60		7-OH **(FLN)**
	انقسام الطيف مع مرور الوقت		5.6.7 triOHأو6.7.8 triOH**(FLN)**
NaOAc/MeOH	(تفكك الطيف مع الزمن) 6-20		7-OH **(ISO)**
	34-37		5.7diOH**(FLN)**
	51-58		5.7 diOH**(Dihflvol)**
	انقسام الطيف مع مرور الوقت		5.6.7 triOH
$NaOAc+H_3BO_3/MeOH$	10-15		6.7 diOH
$AlCl_3$/ $AlCl_3$+HCl	إزاحة باتوكرومية		6.7 diOH أو 7.8diOH
$AlCl_3$+HCl/MeOH	10-14		5-OH **(ISO)**
	20-26		5-OH**(FLN)(Dihflvol)**

IV.6. 3. مراحل السلسلة الطيفية

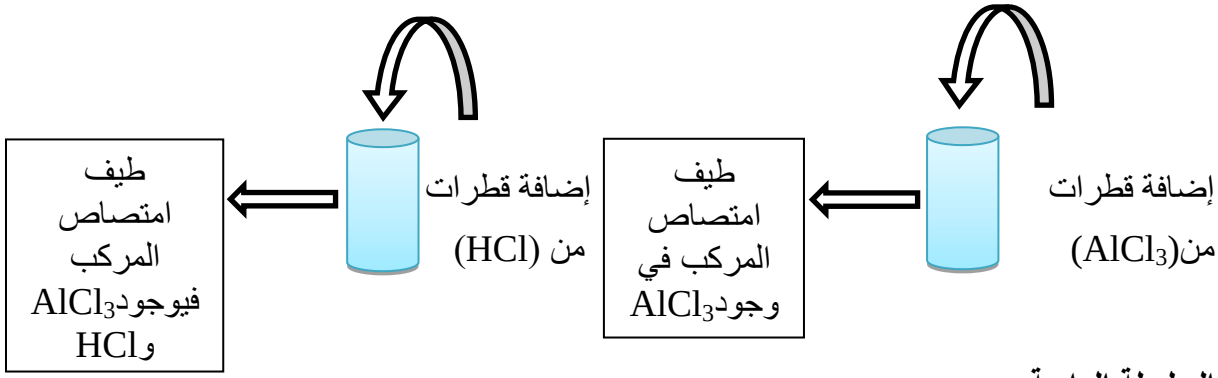
السلسلة الأولى:



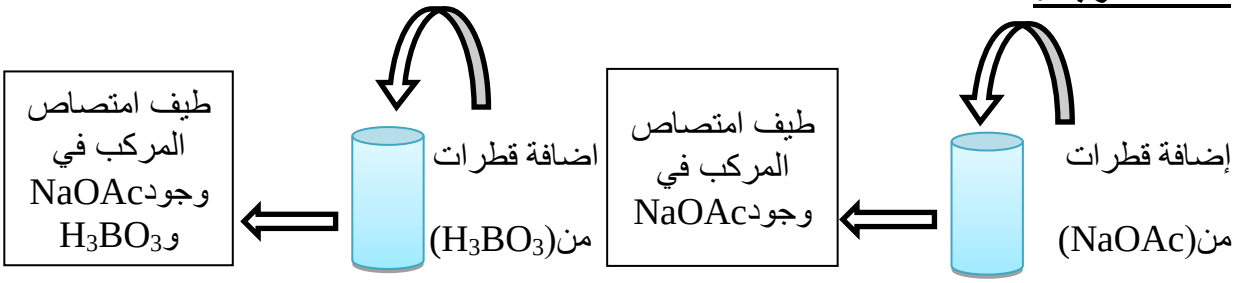
السلسلة الثانية:



السلسة الثالثة:

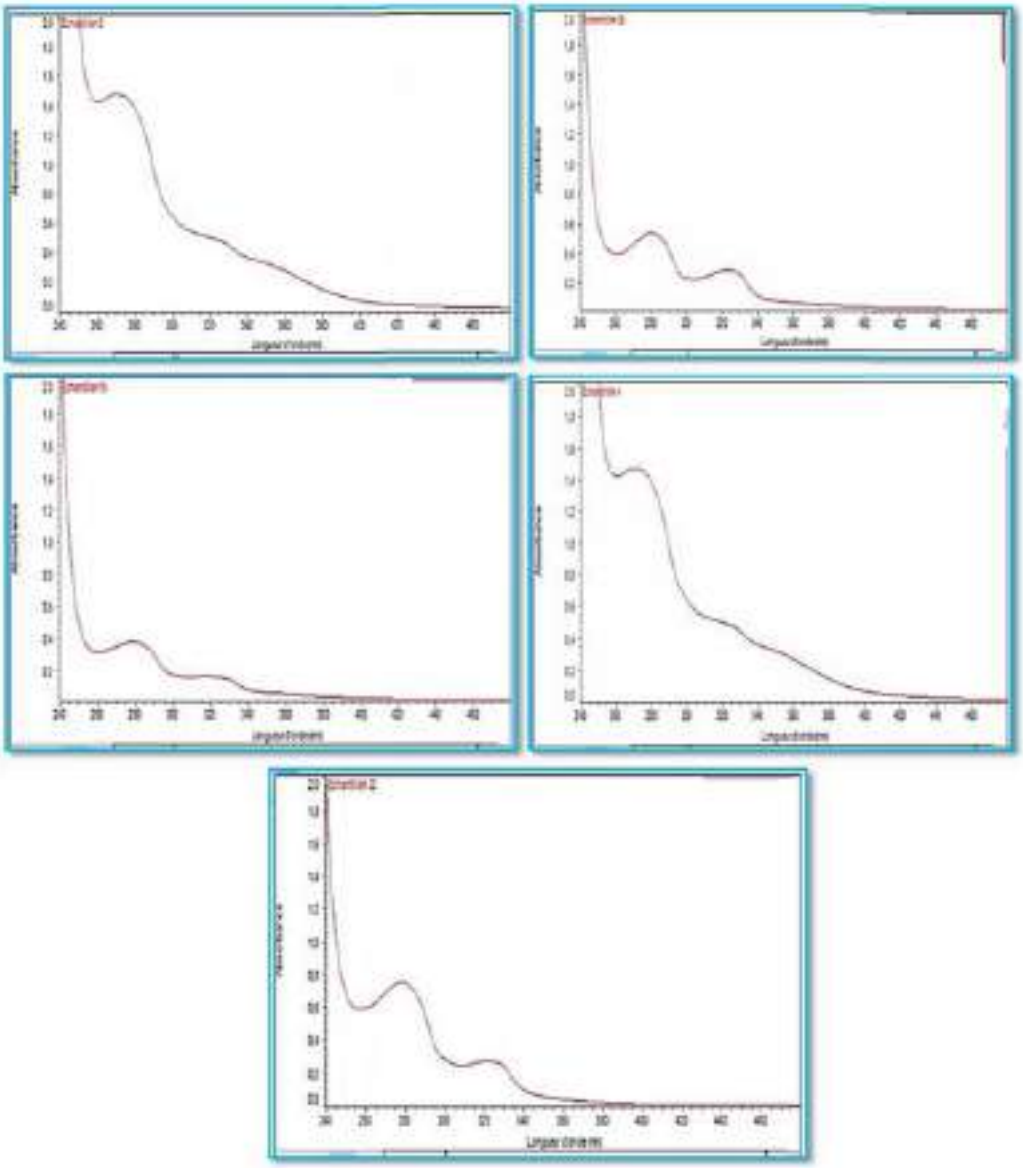


السلسلة الرابعة:



الشكل (30): مراحل الدراسة الطيفية (UV-Vis)للفلافونيدات

IV.6. 4. النتائج والمناقشة:



الشكل(31): أطياف الامتصاص في الميثانول للمركبات المفصول

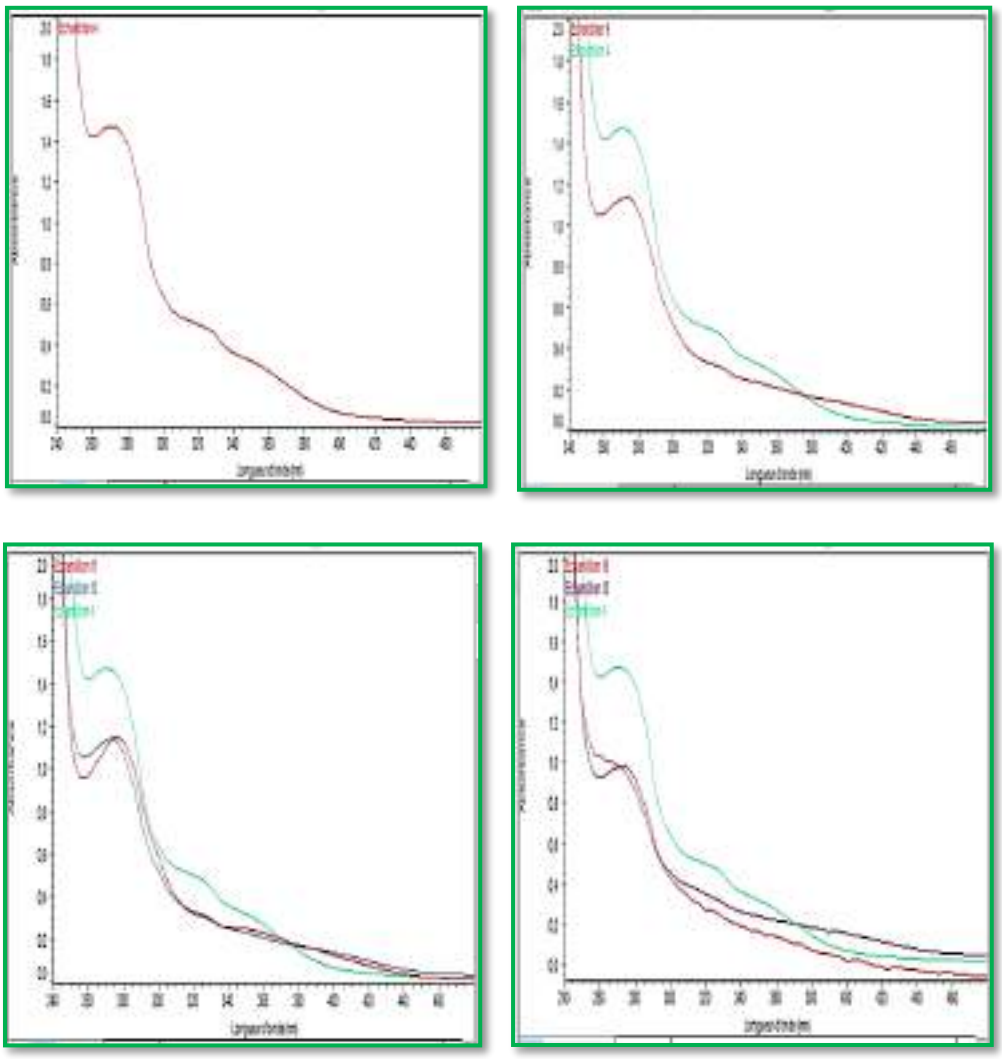
الجدول(18): الانزياحات الملاحظة للمركبات المفصولة في الميثانول

MeOH	العصابة I (nm)	العصابة II(nm)	نوع الفلافونيد
B_{1p}			
$B_{2/1}$			
$B_{2/2}$			
$B_{2'/1}$			

$B_{2'/2}$			

من خلال الجدول (17) والشكل (32) تبين لنا أن هناك تطابق في الأطوال الموجية للعصابتين I وII وهذا يدل على أن المركب B_{1p} نفسه المركب $B_{2'/1}$.

IV.6. 4. 1. السلسلة الطيفية لامتصاص المركب $B_{2'/1}$ في وجود الكواشف



الشكل (32): سلسلة أطياف الامتصاص للمركب $B_{2'/1}$ في وجود الكواشف

الجدول (19): معطيات UV-Vis بالنسبة للمركب $B_{2'/1}$

الكواشف	الازاحة الملاحظة (nm)		التفسير
	العصابة I	العصابة II	
MeOH			
NaOH	-		-
NaOH بعد 5 دقائق	-	-	-

$AlCl_3$	-		
$AlCl_3$+HCl	-		
NaOAc	-		
NaOAc+H_3BO_3	-		

يظهر المركب $B_{2'/1}$ فيTLC بقعة بلون بنفسجي مسود تحت مصباح الأشعة الفوق بنفسجية مما يدل على أن المركب فلافونيدي. كما تعطي سلسلة أطياف الامتصاص في وجود الكواشف المعلومات التالية:

1) طيف امتصاص الميثانول تظهر عصابةIIعند طول موجي nm( )مما يدل على أن المركب فلافونيد من نوع () لأن العصابة I تظهر امتصاص جد ضعيف على شكل نتوء داخل المجال (330-310nm).

2) نلاحظ في طيف امتصاص NaOH غياب العصابة I و انخفاض في الشدة للعصابة IIالا يدخل في المجال المحدد من (44+ الى 65) وهذا لا يمكننا من تحديد وضعية المستبدلات التي يظهرها هذا الكاشف.

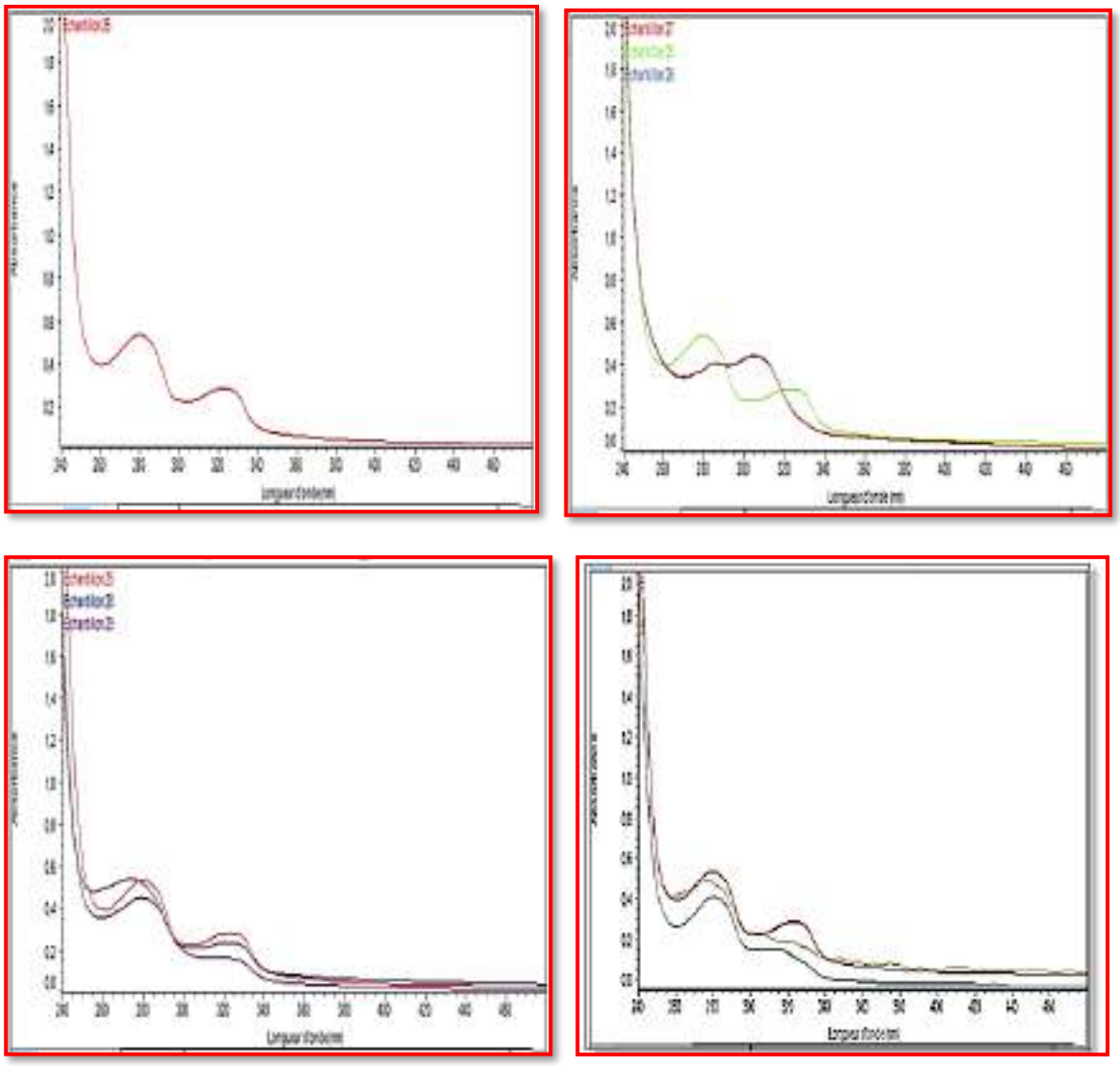
3) في وجود الكاشف $AlCl_3$حدثت إزاحة باثوكرومية للعصابة IIقيمتهاتقدربnm ( ) مما يدل على وجود ثنائي هيدروكسيل في الموضعين () أو ().

4) في وجود الكاشف NaOAc حدثت إزاحة باثوكرومية للعصابة IIقيمتها تقدر ب nm() ممل يثبت وجود مجموعة هيدروكسيل في الموضعين () و ().

5) في وجود الكاشف NaOAc مع H_3BO_3حدثت إزاحتين باثوكروميتين للعصابة الثانية قيمتها تقدربnm() بالنسبة لطيف امتصاص الميثانول والأخرى بقيمةnm() بالنسبة لطيف امتصاص NaOAc وهذا يؤكد وجود مجموعتي هيدروكسيل في الموضع () و().

تسمح النتائج المتحصل عليها من مطيافية الأشعة المرئية والفوق البنفسجية (UV-VIS) باقتراح الصيغة الكيميائية التالية للمركب B2'/1:

IV.6. 4. 2. السلسلة أطياف امتصاص المركب $B_{2/1}$ في وجود الكواشف:



الشكل (33): سلسلة أطياف الامتصاص للمركب$B_{2/1}$في وجود الكواشف

الجدول (20): معطيات UV-Vis بالنسبة للمركب $B_{2/1}$

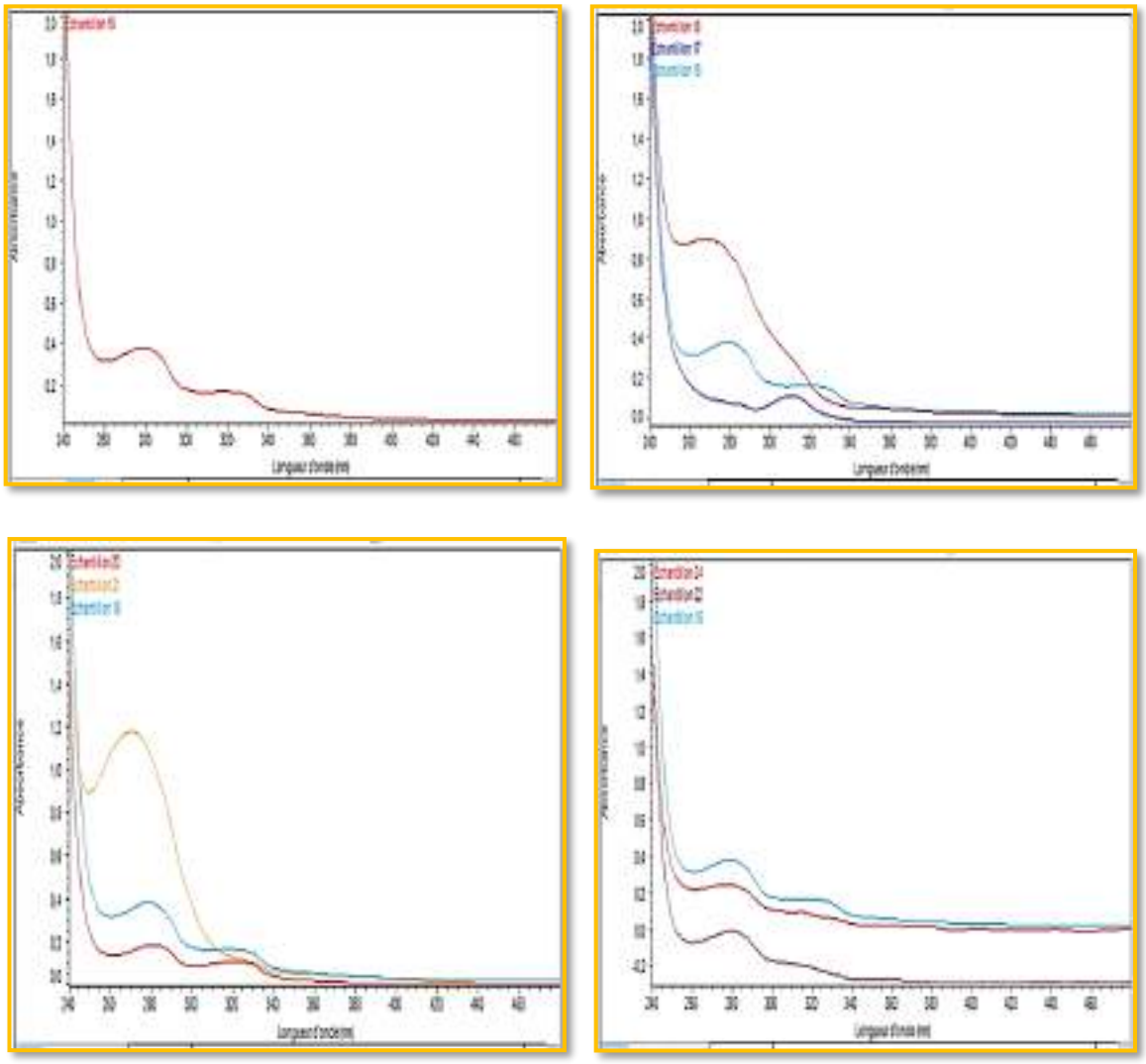
الكواشف	الازاحة الملاحظة (nm)		التفسير
	العصابةI	العصابة II	
MeOH			
NaOH			
NaOH بعد 5 دقائق			
$AlCl_3$			
$AlCl_3$+HCl			

NaOAc			
$NaOAc+H_3BO_3$			

تظهرالعينة **$B_{2/1}$** فيكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بقعة بلون(بنفسجي مسود) تحت مصباح الأشعة الفوق بنفسجية مما يدل على أن المركب فلافونيدي. كما تعطي سلسلة أطياف الامتصاص في وجود الكواشف المعلومات التالية:

1) طيف امتصاص الميثانول تظهر العصابةI عند طول موجي nm () وعصابة II عند الطول الموجي nm () مما يدل على أن المركب فلافونيد من نوع ().
2) في وجود الكاشف NaOH وبعد 5دقائق تظهر إزاحة ابسوكرومية .
3) في وجود الكاشف $AlCl_3$حدثت إزاحة بسوكرومية في العصابةI مما يدل على وجود ثنائي هيدروكسيل في الموضعين () أو ().
4) في وجود الكاشف $AlCl_3/HCl$حدثت إزاحة هيبسوكرومية في العصابةI مما يثبت وجود ثنائي هيدروكسيل في الموضعين () أو ().
5) في وجود الكاشف NaOAc حدثت إزاحة باثوكرومية في العصابة I قيمتهاnm () مما يثبت وجودهيدروكسيل في الموضع.
6) في وجود الكاشفNaOAcمع H_3BO_3حدثت إزاحة باثوكرومية يدل على وجود ثنائي هيدروكسيل في الموضع () أو ().
7) من هذه النتائج نتوصل الى الصيغة التالية:

IV.6. 4. 3. سلسلة أطياف امتصاص المركب $B_{2/2}$ في وجود الكواشف



الشكل (34): سلسلة أطياف الامتصاص للمركب $B_{2/2}$في وجود الكواشف

الجدول(21): معطيات UV-Vis بالنسبة للمركب$B_{2/2}$

الكواشف	الازاحة الملاحظة (nm)		التفسير
	العصابةI	العصابة II	
MeOH			
NaOH			
NaOH بعد 5 دقائق			
$AlCl_3$			
$AlCl_3$+HCl			
NaOAc			
NaOAc+H_3BO_3			

تظهرالعينة$B_{2/2}$ في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بقعة بلون(بنفسجي مسود) تحت مصباحالأشعة الفوق بنفسجية مما يدل على أن المركب فلافونيدي. كما تعطي سلسلة أطياف الامتصاص في وجود الكواشف المعلومات التالية:

1) طيف امتصاص الميثانول تظهر العصابة I عند طول موجيnm ()وعصابة II عند الطول الموجي nm ( ) مما يدل على أن المركب فلافونيد من نوع ().

2) في وجود الكاشف NaOH لاحظنا انخفاض في الشدة مما يفسر وجود ( )؛ وغياب ( )راجع الى طيف الميثانول الذي أثبت أن المركب ().

3) في وجود الكاشف NaOH بعد 5 دقائق لاحظنا ارتفاع في الشدة مع مرور الوقت و هذا ما يفسر وجود OH في الموضع( ).

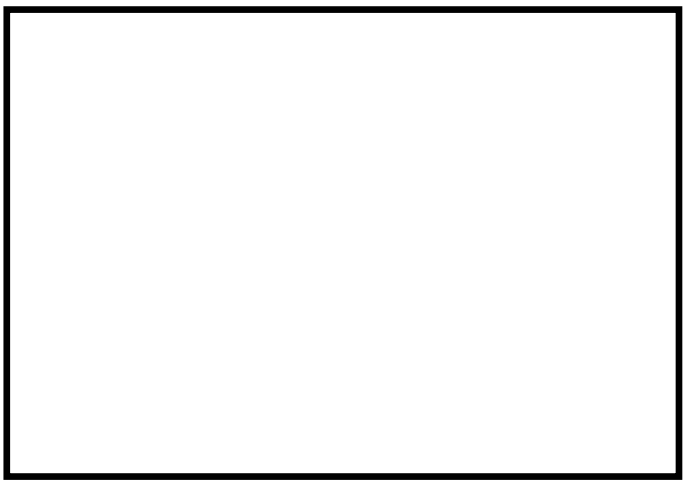
4) في وجود الكاشف $AlCl_3$ حدثت إزاحة هيبسوكرومية في العصابة I

5) في وجود الكاشف NaOAc حدثت إزاحة في العصابة I مما يثبت وجود OH في الموضع( ).

وحدوث انخفاض في الشدة مع مرور الوقت مما يدل على وجود ( ) أو( ) أو ( ) ثنائي OH.

6) في وجود الكاشف NaOAc مع H_3BO_3 حدثت ازاحة قيمتها تقدر بnm( ) وهذا ما يثبت وجود ثنائيهيدروكسيل ( ).

7) من هذه النتائج نتوصل الى الصيغة التالية:



الفصل الخامس:
تقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا

V. تقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا لمستخلصات النبات الطبي

من أجل انجاز هذه الدراسة اتبعنا الخطوات الموالية[36] .

V.1.1. تحضير الاقراص:

تم احضار ورق وتمان رقم 3 وقمنا بقص اقراص صغيرة بقطر 6 mm وتم وضعها في انبوب اختبار من اجل التعقيم في درجة حرارة 120 C° لمدة 20 min.

V.2.1.تحضيرأوساط الزرع:

استعملنا وسط ملائم لعيش كل السلالات البكتيرية (Muller Hinton) حيث قمنا باذابة الوسط في درجة حرارة مرتفعة وتحت ضغط 200 KPa. قمنا بملأ أطباق بيتري بسمك 3 ml و تم حضنها في الحاضن.

V.3.1. زرع السلالات البكتيرية:

تم زرع البكتيريا في الاطباق المحضرة سابقا بالاستعانة بماصة باستور بشكل خطوط غير متوازية ومتباعدة، ثم قمنا بحضن الأطباق في حاضن درجة حرارته 37 C° لمدة 24h.

V.4.1. تحضير تراكيز المستخلصات:

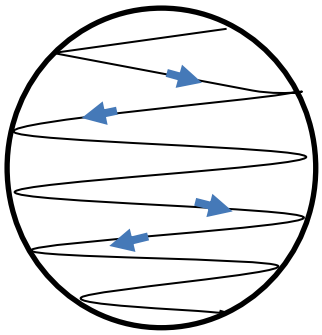
قمنا بتحضير تراكيز مختلفة لكل مستخلص(البيتانول، كلوريد الميثيلين، المائي و الهيدروكحولي)انطلاقا من التركيزالأم المقدر بـ (200mg/ml) ماعدا مستخلص خلات الايثيل فكان التركيز الام لديه يساوي (120mg/ml) نظرا لندرة كتله المستخلصة.

V.5.1. تحضير المعلق البكتيري:

بعد مرور 24 ساعة قمنا بتحضير المعلق البكتيري وذلك بأخذ مستعمرات بواسطة ماصة باستور من البكتيريا التي تكاثرت ثم وضعت في أنبوب اختبار يحتوي على 10 ml من الماء الفيزيولوجي المعقم.

V.6.1. تلقيح أوساط الزرع:

قمنا بمسح اطباق بيتري المحظرة سابقا بواسطة المعلق البكتيري بطريقة متجانسة بحيث لا نترك فراغات كما هو موضح في الشكل (36).



الشكل (35): طريقة تلقيح أوساط الزرع بالمعلق البكتيري

V.7.1. الزرع و الحضن:

ناخد الاقراص المحضرة سابقا ونضعها في المستخلصات، ثم نأي بعلب بتري السابقة وبواسطة ملقط نضع الاقراص بحيث يكون وضعها منظم، نغلق العلب ونتركها داخل الحاضن لمدة 24h تحت درجة حرارة 37 C°.

V.8.1. قراءة النتائج:

قراءة النتائج تكون من خلال ملاحظة مناطق دوائر التثبيط حول الأقراص حيث أنه اذا كان محيط القرص لاتوجد به نقاط فهذا يعني أن المستخلص قاتل للبكتيريا أما اذا كان به نقاط فهذا يعني أن المستخلص مثبط لنمو البكتيريا ثم نحسب قطر هذه الدوائر، والنتائج موضحة في الجداول والصور أدناه.

الشكل (36): مخطط دراسة نشاط التثبيط للمستخلصات على سلالات البكتيريابطريقة الانتشار المباشر للأقراص[38]

الجدول(22): درجة الفاعلية المضادة للبكتيريا بدلالة قطر التثبيط[37]

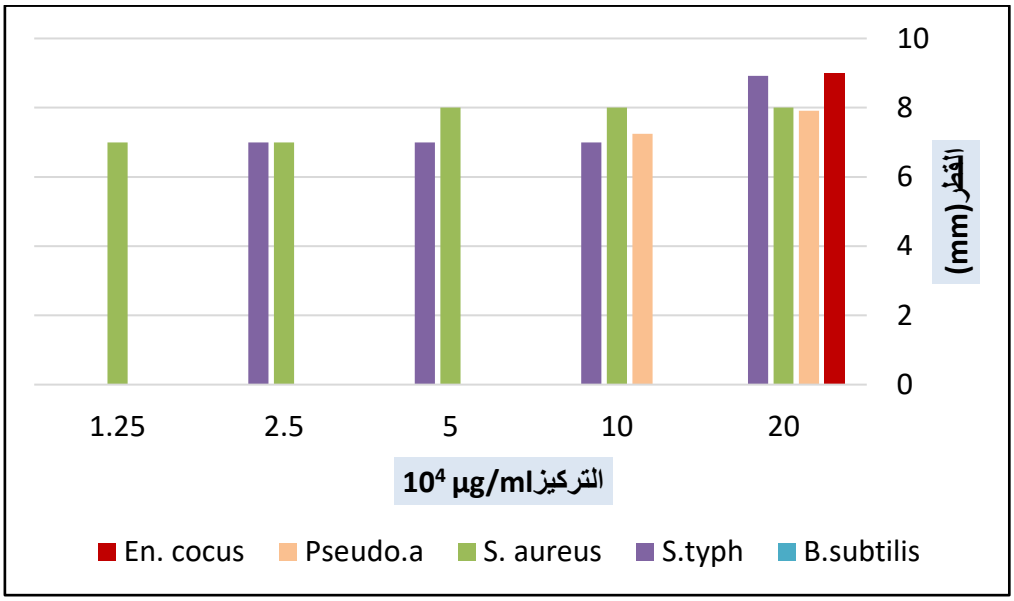
قطردائرة التثبيط (mm)	الفاعلية المضادة للبكتيريا	النتائج
أقل من 7	لا توجد	-
من 7 الى 9.9	ضعيفة	+
من 10 الى 11.9	متوسطة	++
من 12 الى 15	عالية	+++
أكبر من 15	قوية	++++

V.9.1.النتائج والمناقشة

تم التعبير عن النتائج التجريبية للفاعلية المضادة للبكتيريا على شكل متوسط حسابي لدائرة التثبيط لكل مستخلص ضد خمس سلالات بكتيرية مع تحديد الانحراف المعياري لكل تجربة (كل تجربة كررت 3مرات).

الجدول (23): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص البيتانول مع انواع بكتيرية مختلفة

قطر التثبيط (mm)					
مستخلص البيتانول					
B.subtilis ATCC6633	*S.typh ATCC14028*	*S.aureus H3300*	*Pseudo.a ATCC9027*	*En. cocus WDCH0009*	السلالات البكتيرية / التركيز (µg/ml)
					20×10^4
					10×10^4
					5×10^4
					2.5×10^4
					1.25×10^4
					DMSO

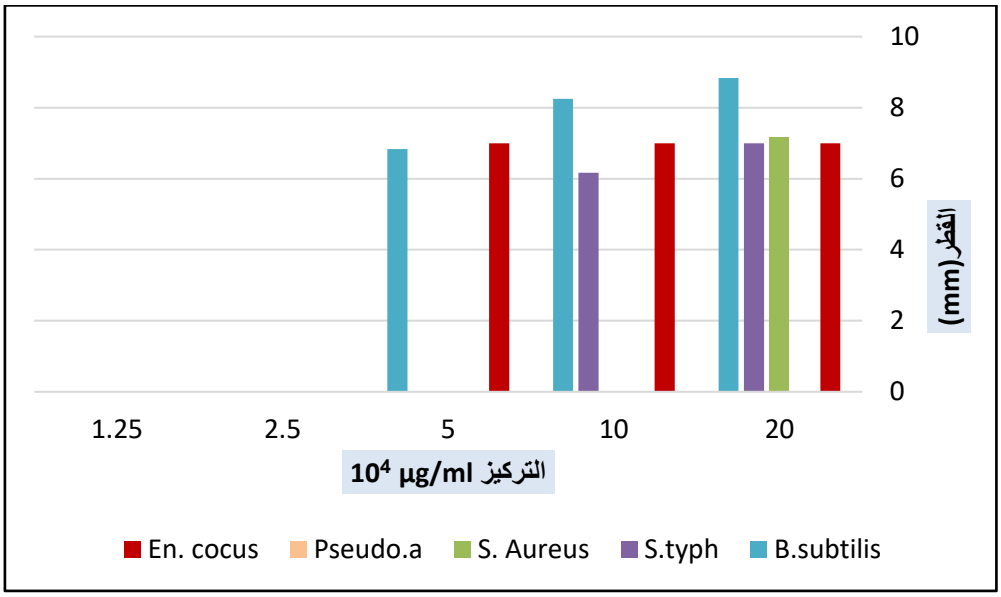


الشكل (37): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص البيتانول مع تراكيز مختلفة ضد السلالات البكتيرية

من خلال النتائج الموضحة في الجدول (22) والشكل (37) نجد ان المستخلص البيتانولي اعطى تثبيط ضعيف ضد كل السلالات البكتيرية المختبرة مع مختلف التراكيز وكان أكبر قطر تثبيط ضد السلالة *En.cocus* مع اكبر تركيز (2×10^5µg/ml) و يقدر ب mm( ).

الجدول (24):تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص ثنائي كلور الميثان مع انواع بكترية مختلفة

قطر التثبيط (mm)					
مستخلص ثنائي كلور الميثان					
B.subtilis ATCC 6633	*S.typh ATCC14028*	*S. aureus H3300*	*Pseudo.a ATCC9027*	*En. cocus WDCH0009*	السلالات البكتيرية / التركيز (µg/ml)
					20×10^4
					10×10^4
					5×10^4
					2.5×10^4
					1.25×10^4
					DMSO

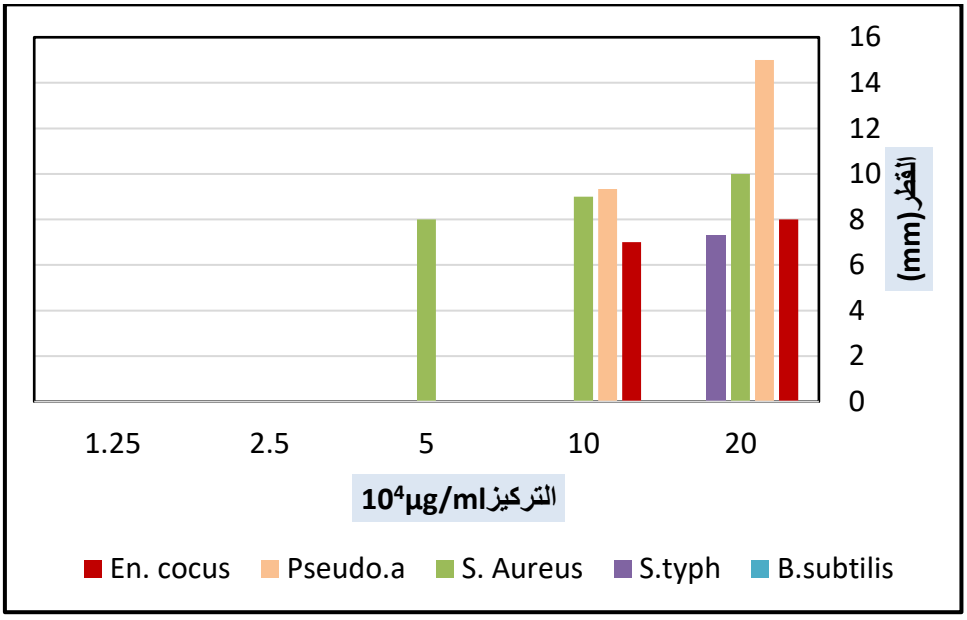


الشكل (38): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص ثنائي كلور الميثان مع تراكيز مختلفة ضد سلالات بكتيرية مختلفة

من خلال النتائج المسجلة في الجدول (23) والشكل (38) نجد ان مستخلص ثنائي كلور الميثان أبدى قدرة تثبيطية ضعيفة ضد كل الانواع البكتيرية المدروسة مع مختلف التراكيز و كان اكبر قطر تثبيط ضد السلالة البكتيرية *B.subtilis* مع اكبر تركيز (2×10^5 µg/ml) و يقدر ب mm ( ).

الجدول (25): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز المستخلص الهيدروكحولي مع انواع بكتيرية مختلفة

قطر التثبيط (mm)					
مستخلص هيدروكحولي					
B.subtilis ATCC 6633	*S.typh ATCC14028*	*S. aureus H3300*	*Pseudo.a ATCC 9027*	*En. cocus WDCH0009*	السلالات البكتيرية / التركيز (µg/ml)
					20×10^4
					10×10^4
					5×10^4
					2.5×10^4
					1.25×10^4
					DMSO



الشكل (39): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص هيدروكحولي مع تراكيز مختلفة ضد سلالات بكتيرية مختلفة

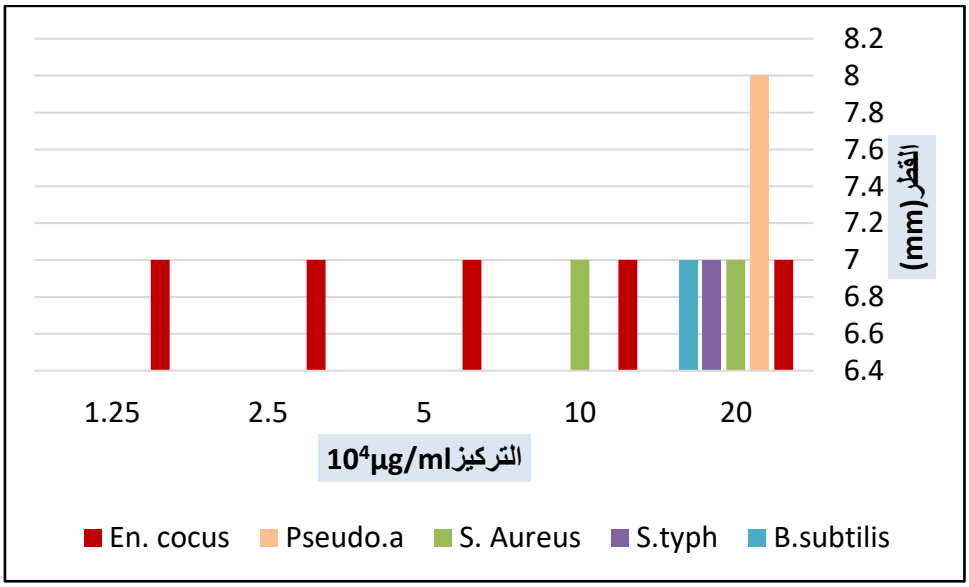
توضح النتائج المسجلة في الجدول(24) والشكل(39)ان الطور الهيدروكحولي اعطى قدرة تثبيطة عالية مع اكبر تركيز و كان قطر التثبيط له مقدر ب mm( )ضد السلالة *Pseudo.a*، اما مع باقي التراكيز فكانت الفاعلية من المتوسطة الى المنعدمة حيث كان قطر التثبيط يساوي mm ( ).

اعطت *S.Aureus* فاعلية مضادة للبكتيريا متوسطة مع اكبر تركيز و قدر قطر التثبيطبmm( )، اما مع باقي التراكيز فكانت اقطار دائرة التثبيط بين mm( ) والمنعدمة.

و كانت الفاعلية المضادة للبكتيريا بين المتوسط و المنعدمة مع باقي الانواع البكتيرية، حيث كانت اقطار التثبيط تتراوح بين mm( ) و المنعدمة.

الجدول (26): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز مستخلص خلات الاثيل مع انواع بكتيرية مختلفة

قطر التثبيط (mm)					
مستخلص خلات الايثيل					
B.subtilis ATCC 6633	*S.typh ATCC14028*	*S. aureus H3300*	*Pseudo.a ATCC 9027*	*En. cocus WDCH0009*	السلالات البكتيرية / التركيز (µg/ml)
					20×10^4
					10×10^4
					5×10^4
					2.5×10^4
					1.25×10^4
					DMSO



الشكل (40): مخطط يوضح قطر تثبيط مستخلص خلات الايثيل مع تراكيز مختلفة ضد السلالات البكتيرية

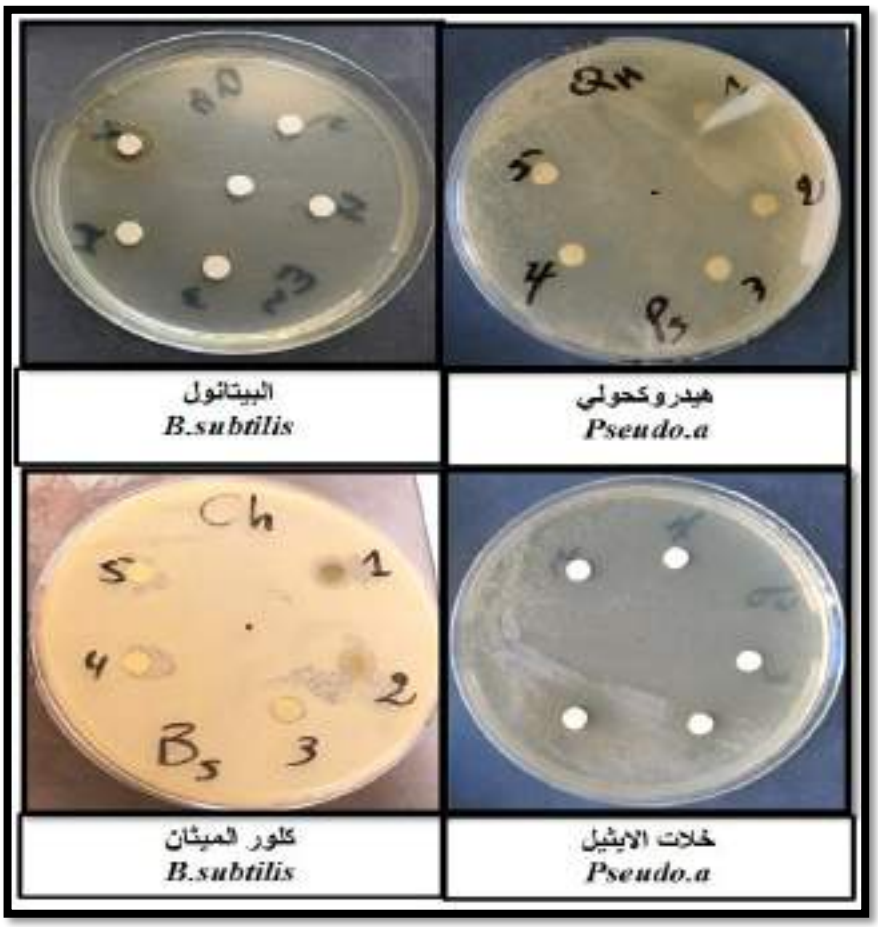
من خلال نتائج الجدول (25) والشكل (40) نلاحظ ان القدرة التثبيطية تتراوح بين الضعيفة و المنعدمة لمختلف السلالات البكتيرية المختبرة و كانت اقطار التثبيط تتراوح بين mm ( ) و المنعدمة مع مختلف التراكيز.

نستنتج ان مستخلص خلات الاثيل اعطى فاعلية ضعيفة مع مختلف السلالات باختلاف التراكيز.

الجدول (27): تغيرات قطر دائرة التثبيط بتغير تركيز المستخلص المائي مع انواع بكتيرية مختلفة

قطر التثبيط (mm)					
مستخلص مائي					
B.subtilis ATCC 6633	*S.typh ATCC14028*	*S. aureus H3300*	*Pseudo.a ATCC 9027*	*En. cocus WDCH0009*	السلالات البكتيرية / التركيز (µg/ml)
					20×10^4
					10×10^4
					5×10^4
					2.5×10^4
					1.25×10^4
					DMSO

المستخلص المائي لم يظهر اي نوع تثبيط ضد السلالات البكتيرية المدروسة مع مختلف التراكيز والنتائج المدونة في الجدول (26) يوضح ذلك.



الشكل (41): صورة توضيحية لأكبرالأقطار المسجلة للمستخلصات ضد السلالات البكتيرية المدروسة

2.V.المضادات الحيوية

2.V. 1.النتائج والمناقشة:

الجدول (28): الفاعلية المضادة للبكتيريا لبعض المضادات الحيوية

السلالاتالبكتيرية	الشواهدالموجبة	التركيز (µg/ml)	قطر التثبيط (mm)	الشواهدالسالبة	قطر التثبيط (mm)
B.subtilis ATCC6633	**CIP**	**5**		**DMSO**	
	GM	**10**			
	AN	**30**			
	CH	**30**			
S.typh ATCC14028	**CIP**	**5**			
	GM	**10**			
	AN	**30**			
	CH	**30**			
Pseudo.a ATCC9027	**GM**	**10**			
	AN	**30**			
	CIP	**5**			
S.aureus H3300	**AN**	**30**			
	GM	**10**			
	CH	**30**			

نلاحظ من خلال الجدول (27) ان للمضادات الحيوية (CIP، GM ، CH، AN) اقطار تثبيطية كبيرة جدا و بتراكيز صغيرة جدا مقارنة بالمستخلصات المختبرة و هذا يدل على ان الفاعلية التثبيطة للمستخلصات المدروسة اقل بكثير من القدرة التثبيطية للمضادات الحيوية المضادة لنمو الانواع البكتيرية.

الشكل(42): صورة للفاعلية المضادة للبكتيريا لبعض المضادات الحيوية

الخاتـمـة

الخاتمة:

تناولت دراستنا التجريبية قسمين مهمين، الاول تضمن دراسة فيتوكيميائية للجزء الهوائي للنباتالطبي حيث تم استخلاص المركبات الفينولية لهذا النبات وتم الحصول على أربع مستخلصات (مستخلص الايثر البترولي، مستخلص ثنائي كلور الميثان، مستخلص خلات الايثيل، مستخلص البيتانول).

كشفت نتائج الكروماتوغرافيا الغازية المرفقة بجهاز مطيافية الكتلة لمستخلص ثنائي كلور الميثان عن وجود 10 مركبات كيميائية مختلفة.

من خلال نتائج الكشف الاولية الايجابية للفلافونيدات، ارتأينا ان نقوم بدراسة مستخلص خلات الايثيلوالبيتانولبواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وكروماتوغرافيا الورق بنوعيها (احادية وثنائية البعد)، حيث اظهرت هذه الاخيرة غنى الخريطة الفلافونيدية لمستخلص البيتانول مع توفر كتلة معتبرة منه مقارنة بمستخلص خلات الايثيل، ارتأينا ان نقوم بفصل فلافونيداتالبيتانول بواسطة كروماتوغرافيا العمود، حيث تحصلنا على 15 كسرا مختلفا بعد التجميع بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، و بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية تم فصل وتنقية مكونات احد الكسور غير المعقدة و كان التشخيص البنيوي للمركبات الاربعة المتحصل عليها بواسطة السلسلة الطيفية للأشعة المرئية و فوق البنفسجية.

أظهرت نتائج الفاعلية المضادة للبكتيريا للمستخلصات النباتية المدروسة ضد خمس سلالات بكتيرية مرجعية ان اغلب المستخلصات المختبرة اعطت قدرة تثبيطية ضعيفة مقارنة بالمضادات الحيوية.

المراجع

المراجع العربية:

[4]محمد الهادي مخلوف، سرحان لايقه، "دراسة التنوع الحيوي للفصيل النجمية في محافظة اللاذقية/سورية، "مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية،الحجم27،رقم20112.

[13]ب. ع. الوهاب، " رسالة دكتوراه في العلوم: دراسة الزيوت الأساسية،المركبات الفينولية و فعاليتها البيولوجية في بعض الأنواع التابعة للفصيلتين السذبية Rutaceaeوالمركبة، Ateraceae "أم البواقي، جامعة العربي بن مهيدي 2017،ص155.

[14]م. ع. الرحمان، "مذكرة ماجستير: فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي لنبتة لطور خلات خلات الايثيلOninis angustissima (Fabaceae)،" جامعة منتوري،قسنطينة،2010. 129 ص.

[16] ع. ب. مرعاش" ،دراسة نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي والفعالية المضادة للاكسدة لنبتة& .Convolvulus supinus Coss،(Convolvulaceae)Kral"،جامعة منتوري، 2012. 102ص.

[19] ف. ف. الزهراء، "رسالة دكتوراه: دراسة فيتوكيميائية والفعالية البيواوجية لنوعين نباتيين Retamamonosperma(L.)Boiss.(Fabaceae) Blackstonia grandiflora(Viv.) Maire.(Gantianaceae) ،جامعة الاخوة منتوري، قسنطينة 1، 2017. 237 ص.

[20] ع. أمال، "مذكرة ماجستير: فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي، Pulicaria crispa "جامعة منتوري، قسنطينة،97 ص.

[22]ح. ابراهيم، "مذكرة ماجستير: دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة"،كليةالعلوم والتكنولوجيا، ورقلة، 2013. 98 ص.

[24] ا. العابد، "مذكرة ماجستير: دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام من نبات الضمرانTraganum nudatum"،جامعةقاصدي مرباح ، ورقلة، 2009 .

[28]م.م.أ.عرقوب،المضادات الحيوية والمقاومات الثلاثة،القاهرة:شركة مساهمة مصرية،2001، ص605

[29]ع. مسعودة، "مذكرة ماجستير:مساهمة في دراسة بعض المركبات العضوية الفعالة في نبات الرمث"،جامعة قاصدي مرباح،ورقلة، ص21-2003،22.

[30] ح. ن. الدين، "مذكرة دكتوراه: الدراسة الفيتوكيميائة والتقييم البيولوجي للفاقونيا لونجيسبينا (FagoniaLongispina(Zygophyllaceae)نبات من الجنوب الغربي للجزائر"،جامعة ابى بكر بلقايد،تلمسان، 2015 .

[31] ز.محمود عبدالله، ا.ناجي وادي، ه.كريم دحام. مجلة جامعة النهرين. استخلاص بعض المواد العضوية في نبات القريص وتشخيصها بتقنية GC-MS كروماتوغرافيا الغاز-مطيافية الكتلة. كانون الأول 2013، رقم:16، العدد:4. ص14-18.

[32]ب. حبيبة، "ماجستير النباتات الطبية المتداولة في المنطقة الشمالية لولاية سطيف دراسة تشريحية لنوعين من جنس Mentha والنشاطية ضد البكتيرية لزيوتهما الأساسية"، جامعة فرحات عباس، سطيف، 2010 .92 ص.

[33] ا. ك. فريد، "فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي ودراسة الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الايثيل لنبتة Origanum vulgare L. Sbs. glandulosum (Desf letswaart، جامعة منتوري، قسنطينة.

[34]ا. سهيلة، "رسالة دكتوراه: تقييم كيميائي وحيوي لنوعين نباتيين من عائلتي الخيميات والبقوليات" قسنطينة، جامعة منتوري ، 1252009،ص .

[35]أ. طويل، "دراسة نواتج الميتابوليزم الثانوي لبعض نباتات منطقة الهقار" قسنطينة، جامعة منتوري، 2009 . 168ص.

[39]خ.عبد الكريم،"مذكرة ماجستير: فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة(chenopodiaceae).Salsola tetragona del"، جامعة منتوري – قسنطينة، سنة 2011، ص23.

المراجع الأجنبية:

[1] M. M. Zareh، A. M. Faried، and M. H. Mohamed، Revision of Launaea Cass.(Compositae) in Egypt with special references to cypselar diversity، vol. 127، Feddes Repert، 2016، pp. 14-29.

[3] F. Dupont، Les familles de plantes، 15 ed.، Paris، - 62، rue Camille-Desmoulins، 92442 Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson SAS، 2012، p. 226.

[5] G. Burnie، S. Forrester، et autre، Botanica : Encyclopédie de botanique et d'horticulture، plus de 10 000 plantes du monde entier، HF Ullmann، 2011، p. 836.

[6] T. Soukaina، "Etude Phytochimique et Evaluation Biologique de L'espèce Senecio delphinifolius Vahl،" Constantine، UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI، 2016، p. 135.

[7] A. N. M. Alamgir، "Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Phytochemistry and Bioactive Compounds،" vol. 2، Chittagong، Springer International Publishing AG، 2018، p. 124.

[8] K. Meriem، "thèse de doctorat LMD Caractérisation histologique، caryologique، phytochimique et activités biologiques de Senecio giganteus Desf et S. jacobaea L.،" Sétif، Université Ferhat Abbas، 2018، p. 57.

[9]

[10] S. N. S. P. Ltd.، Ed.، Plant Physiology،Development and Metabolism، 1 ed.، 152 Beach Road، #21-01/04 Gateway East، Singapore 189721: Springer، 2018، pp. 1117-1125.

[11] J. Henry، "Advances in food and nutrition research،" Academic press، 2013، pp. 185-186.

[12] E. Grotewold، The Science of Flavonoids، 233 Spring Street، New York، 2006، pp. 47-48.

[15] M. Petre، "Advances in Applied Biotechnology،" Rijeka، InTech، 2011، pp. 100-103.

[17] C.Yakout، thèse de doctorat: "Etude phytochimique et évaluation microbiologique de deux Plantes médicinales saharienne: Zizyphus (mauritiana، lotus) -Ramnaceae- (Sedra) et Ephedra alata - Ephedraceae- (Alinda)،" Ouargla:Université Kasdi Merbah، 2014، 306p.

[18] T. J. Mabry، K. R. Markham، M. B. Thomas، "The Systematic Identification

of Flavonoids،" Berlin· Heidelberg، Springer-Verlag، 1970.

[21] B. Jean، Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales، 3 ed.، 11،rue Lavoisie،Paris: TEC & DOC، 1994.

[23] K. Rogers، "Bacteria and Viruses،" 1 ed.، 29 East 21st Street، New York، NY 10010، Britannica Educational Publishing، 2011، p. 3.

[25] J. Lackie، The Dictionary of CELL AND MOLECULAR BIOLOGY، 5 ed.، 32 Jamestown Road، London NW1 7BY: Elsevier Ltd، 2013.

[26] "Microbe Wiki،" Midia Wiki. [Online]. [Accessed 19 Wednesday June 2019].

[27] Joan L. Slonczewski ،John W. Foster، "Microbiology An Evolving Science،" 4 ed.، B. Twitchell، Ed.، NEW YORK LONDON، W. W. NORTON & COMPANY، 2017.

[36] J. Hudzicki، "Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol،" American society for microbiology، Tuesday، 08 December 2009.

[37] Richard Schwalbe، Lynn Steele-Moore، Avery C.Goodwin، Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols، USA: Taylor & Francis Group، 2007.

[40] Y.-G. Chen، J.-H. Yang، Y. Zhang، and Y. Liu، "Chemical composition of the essential oil of Senecio scandens flowers،" *Chem. Nat. Compd*، vol. 45، no. 1، pp. 114-115، 2009.

[41] Stéphane Andreani، Julien Paolini، Jean Costa، and Alain Muselli، "Essential-Oil Composition and Chemical Variability of Senecio vulgaris L.،" *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*، vol. 12، p. 752، 2015.

[43] A. L. Murari، F. H. De Carvalho، B. M. Heinzmann، T. M. Michelot، R. Hörner، and C. A. Mallmann، "Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Senecio crassiflorus var. crassiflorus،" vol. 31، no. 5، pp. 1081-1084، 2008.

[44] B. Ngameni et al، Flavonoids and related compounds from the medicinal plants of Africa، Elsevier، 2013، pp. 301-350.

[45] A.El-Mouloud,"Viruses and Bacteria", Kingdom of Saudi Arabia:Umm Al-Qura University, 2009

الملحق

جهاز كروماتوغرافيا الغازية المرفقة بجهاز الكتلة

جهاز مطيافية الأشعة المرئية وفوق البنفسجية

جهاز التبخير الدوار

ملخص

تهدف دراستنا التجريبية الى المساهمة في الدراسة الفيتوكيميائية وتقييم الفاعلية المضادة للبكتيريا لاحد نباتات العائلة المركبة. تم الحصول على المستخلصات بعد عملية الاستخلاص للجزء الهوائي للنبات الطبي المدروس. أعطى التحليل الكروماتوغرافي الغازي المرفق بمطيافية الكتلة لمستخلص كلوريد الميثلين عن وجود عشر مركبات كيميائية مختلفة.

قمنا باجراء الكشف الاولي للفلافونيدات على النبات وكانت نتيجة الفحص ايجابية. من اجل عزل و تنقية المركبات الفلافونيدية، تطرقنا الى دراسة مكونات المستخلص البيتانولي بواسطة كروماتوغرافيا العمود لتوفر كمية معتبرة منه و غناه بالمركبات الفلافونيدية مقارنة بمستخلص خلات الايثيل، حيث تم تجزئته الى خمسة عشرة كسرا بعد التجميع، و قد تمكنا من فصل مكونات احد الكسور غير المعقدة و تنقيتها بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية و تم الحصول على اربع مركبات فلافونيدية شخصت بواسطة السلسلة الطيفية للاشعة فوق البنفسجية.

وتم تقييم نتائج اختبار الفاعلية المضادة للبكتيريا ضد خمس انواع من البكتيريا المرجعية على ان مستخلصات النبات الطبي المدروس كانت لها قدرة تثبيطية ضعيفة مقارنة بالمضادات الحيوية الشاهدة.

الكلمات المفتاحية:نبات طبي، الدراسة الفيتوكيميائية،فلافونيدات، المستخلص البيتانولي، الفاعلية المضادة للبكتيريا.

Résumé

Notre étude expérimentale vise à contribuer à l'étude phytochimiques et à évaluer l'efficacité antibactérienne de l'une des plantes de la famille des composites. Les extraits ont été obtenus après extraction de la partie aérienne de plante médicinale. L'analyse par CG-MS de l'extrait de chlorure de méthyle a été effectuée sur la présence de dix composés chimiques différents.

Nous avons indiqué la détection initiale des flavonoïdes sur la plante et le résultat du test était positif. Afin d'isoler et de purifier les composés flavonoïdes, nous avons étudié les composants de l'extrait butanolique par chromatographie sur colonne afin d'en fournir une quantité importante et l'enrichir en composés flavonoïdes par rapport à l'extrait d'acétate d'éthyle, qui a été divisé en 15 fractions après la collecte. Nous avons pu séparer les composants de l'une des fractions non compliquées et les purifier par chromatographie en couche mince préparatoire pour obtenir quatre composés flavonoïdes, identifiés par la série spectrale ultraviolette.

Les résultats du test d'efficacité antibactérien ont été évalués par rapport à cinq bactéries de référence, les extraits de la plante présentaient une faible capacité d'inhibition par rapport à l'antibiotique témoin.

Mots clés: Plante médicinale, Etude phytochimique, Flavonoïdes, Extrait butanolique, Efficacité antibactérienne.

Summary

Our experimentalstudyaims to contribute to the phytochemicalstudy and to evaluate the antibacterialefficacy of one of the plants of the composites family. The extractswereobtainedafter extraction of the aerial part of a medical plant. GC-MS analysis of the methylchlorideextractwasperformed on the presence of tendifferentchemical compounds.

Weindicate the initial detection of flavonoids on the plant and the test resultwas positive. In order to isolate and purify the flavonoid compounds, we have studied the components of butanol extract by columnchromatography in order to provide a large quantity and enrichitwithflavonoid compounds compared to the ethylacetateextract. Whichwasdividedinto 15 fractions after collection. Wewere able to separate the components from one of the uncomplicated fractions and purifythem by preparativethin layer chromatography to obtain four flavonoid compounds, identified by the ultraviolet spectral series.

The results of the antibacterialefficacy test wereevaluatedagainst five referencebacteria, the extracts of the plantshowed a weakcapacity of inhibition compared to the control antibiotic.

Keywords: Medical plant,Phytochemicalstudy, Flavonoids, Butanolicextract, Antibacterialefficacy.