الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة قاصدي مرباح ورقلة

كلية العلوم التطبيقية

قسم هندسة الطرائق

مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماستر

الميدان :علوم وتكنولوجيا

شعبة : هندسة الطرائق

تخصص :هندسة كيميائية

من إعداد :زكري روضة و ساسوي رشيدة

الموضوع :

تقييم قلويدات نبات Retama raetam النامي بضواحي الحجيرة - ورقلة

نوقشت يوم: 2019/07/06

أمام لجنة المناقشة المكونة من :

الأستاذة هقم خضرة	**(أستاذ محاضر ب - معهد التكنولوجيا جامعة قاصدي مرباح ورقلة)**	رئيسا
الأستاذة بن زاهي خديجة	**(أستاذ محاضر ب - المدرسة العليا للأساتذة جامعة قاصدي مرباح ورقلة)**	**مناقشا**
الأستاذ بن فرج الله السعيد	**(أستاذ مساعد أ - جامعة قاصدي مرباح ورقلة)**	**مشرفا**

2019/2018

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة قاصدي مرباح ورقلة

كلية العلوم التطبيقية

قسم هندسة الطرائق

مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماستر

الميدان :علوم وتكنولوجيا

شعبة : هندسة الطرائق

تخصص :هندسة كيميائية

من إعداد :زكري روضة و ساسوي رشيدة

الموضوع :

تقييم قلويدات نبات Retama raetam النامي بضواحي الحجيرة - ورقلة

نوقشت يوم: 2019/07/06

أمام لجنة المناقشة المكونة من :

الأستاذة هقم خضرة	**(أستاذ محاضر ب** - معهد التكنولوجيا **جامعة قاصدي مرباح ورقلة)**	رئيسا
الأستاذة بن زاهي خديجة	**(أستاذ محاضر ب** - المدرسة العليا للأساتذة **جامعة قاصدي مرباح ورقلة)**	**مناقشا**
الأستاذ بن فرج الله السعيد	**(أستاذ مساعد أ - جامعة قاصدي مرباح ورقلة)**	**مشرفا**

2019/2018

بسم الله الرحمن الرحيم

الإهـــــداء

باسم الخالق العظيم الهادي لمن اراد الهدى، اسلم واصلي على حبيب قلبي محمد وعلى آله وصحبه اجمعين .

الحمد الله الذي أنار دربه العلم و المعرفة و أعاننا على أداء الواجب و وفقنا إلى انجاز هذا العمل.

أشكر الله تعالى على فضله الذي أنار لنا دربنا و يسر لنا أمرنا و أعاننا على الصبر و الشكر لله أولا و أخيرا و الحمد الله ربي العالمين.

اهدي ثمرة عملي هذا

إلى من تعجز كلماتي و تنحني هامتي لعظيم عطائها، شمس حياتي التي لا تغيب و سبيلي إلى الجنة أشد أمة الأرض بأسا، و اسماها نفسها، أرسخها في المكرمات أقداما، و ارفعها في الحادثات أعلاما.

إلى من علمني الصبر و النجاح

إلى مشعة النور في الظلمات، نعم الجليس، و خير الأنيس إليك. "أمي"

إلى من كد و تعب و كافح في دنياه فتحمل ويلات الزمان و أخفى آلامه عنا كي لا نشعر بقسوة الحياة ،إلى من سهر الليالي.

إلى أغلى و أعظم و أروع رجل عرفته في الحياة "أبي"

أطال الله في عمركما في صحة و خير حال

إلى رفقاء دربي في هذه الحياة، معكم أكون أنا وبدونكم أكون مثل أي شيء، إلى من أرى التفاؤل في عيونهم و السعادة في ضحكتهم إخوتي و أخواتي: كريمة، انتصار، أية، عبد الحق، مراد و أبنته رانيم ، حمزة،.

إلى رفيق دربي عبد الكريم، إلى عائلة " باديجة" و"ساسوي"

الى أخواتي التي لم تلدهن أمي...إلى من تحلو بالإخاء و تميز بالوفاء و العطاء.

ربيعة طبة، جمعة بونقاب، نسيمة جديرة ، هدى لكحل، سارة باديجة.

خاصة إلى زميلة الميشوار روضة زكري شكرا.

رشيدة

إهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

الصلاة والسلام على خاتم الانبياء حبيبنا محمد وعلى اله وصحبه أجمعين

عدد خلقه من يوم خلقهم الى يوم يبعثون

احمد الله الذي وفقني وأنار دربي بنور العلم واعانني على انجاز هذا العمل

اهدي ثمرة جهدي الى احب مالدي بعد الله نور عيني وشمعة طريقي، الى رحيق سعادتي وشهد حياتي

"والداي الكريمين"

الى اخواتي العزيزات "فتيحة .بشرى.نادية.حورية .سليمة .رحاب. مارية "

الى اخي الغالي "إسحاق"وحرمه العزيزة "كوثر"

الى البرعمين"عبدالرحمان"و "وعبد الشكور"

الى كل عائلة "زكري "و "حليمي"

الى خالاتي الكريمات"جمعة"و"فتيحة"

والى عائلة"سالمي" واخص بالذكر الإنسان الذي ساندني "مسعود"

الى صديقة المشوار "ساسوي رشيدة"

الى صديقاتي العزيزات : "رجاء . ابتسام.

فهيمة .خولة.نرجس. منال.مبروكة . الخاوية"

والى جميع صديقات الدراسة

ولمنة

شكر وتقدير

"الحمد لله سبحانه و تعالى الذي أكرمنا بنعمة الوالدين ، و أعزنا بنعمة الدين و أمدنا بنعمة العقل و الصحة و أتم علينا بنعمة القلم اليقين و سخر لنا كل شيء"

نتقدم بالشكر الجزيل والثناء للأستاذ المشرف على هذا البحث:

السيد "بن فرج الله السعيد "لقبوله الإشراف على هذا العمل، وعلى ونصائحه وتوجيهاته القيمة .

كما نتوجه بخالص الشكر للأستاذة الفاضلة "مقدم خضرة" لقبولها رئاسة لجنة المناقشة.

و نتوجه بخالص الشكر و التقدير إلى الأستاذة الفاضلة "بن زاهي خديجة " مناقشة.

كما نشكر المدير السابق لمدرسة العليا للأساتذة، ورئيس مخابر المدرسة العليا للأساتذة "روابح قدور"على ما قدمه لنا من المساعدة و تسهيلات.

نتقدم بالشكر الخاص إلى عمال مخبر الكيمياء بكلية المحروقات وعلى رأسهم "فضيلة شادو"

و لا يفوتنا إلا أن نشكر عمال مخبر تثمين الموارد البشرية (VPRS) بورقلة وعلى رأسهم "أسيا بلفار و طواهرية تاتو"

ونتقدم بالشكر كذلك لمخبر جيولوجيا الصحراء بورقلة بلاخص "عمر قاجة"

قائمة الجداول

الجدول		الصفحة
1	يوضح المركبات الحلقية الغير متجانسة وأهم قلويداتها	4
2	ملف تعريفي لمحتوى قلويدات*Retama raetam*	17
3	قلويدات الأنواع الثلاثة لنبات *Retama*	18
4	أجزاء النبات قبل وبعد السحق	23
5	مردود قلويدات أجزاء النبات(طريقة 1)	27
6	مردود قلويدات أجزاء النبات (طريقة 2)	28
7	مردود قلويدات أجزاء النبات (طريقة 3)	29
8	مردود القلويدات لمستخلص الثمار(القلويدية و الكحولية)	29
9	نتائج اختبار الكشف عن المواد الفعالة في النبات	35
10	مقارنة مردود عمليات الاستخلاص	36
11	نتائج اختبار DPPH	37

قائمة الأشكال

المخططات	العنوان	الصفحة
المخطط 1	الاستخلاص بالمذيبات العضوية	11
المخطط 2	الاستخلاص بمذيب عضوي قطبي	12
المخطط3	تصنيف نبات*Retama raetam*	16
المخطط4	بنية قلويدات نبات *Retama raetam*	18

قائمة الصور

الأشكال	العنوان	الصفحة
الشكل 1	صورة لنبات*Retama raetam*	22
الشكل 2	صورة توضح عملية التجفيف	22
الشكل3	نقع مساحيق (الجذور و الأزهار و الثمار) في الايثانول 80%(ح/ح)	24
الشكل 4	الصورة توضح عملية النقع في الايثانول	25
الشكل5	الصورة توضح عملية الترشيح (الطريقة 1)	26
الشكل6	نقع مساحيق أجزاء النبات في الماء المحمض	27
الشكل 7	الصورة توضح نقع مسحوق النبات في الامونياك	28
الشكل8	الصورة توضح مستخلصات RFRALK (A) RFRETO(E)	31
الشكل 9	التراكيز المخففة بعد إضافة DPPH	31
الشكل10	صورة توضح نتيجة اختبار دراجندورف	33
الشكل11	صورة توضح نتيجة اختبار بوشاردا	33
الشكل12	صورة توضح نتيجة اختبار ماير	34
الشكل 13	نتائج الكشف عن الصابونيات	34
الشكل 14	نتائج الكشف عن العفصيات	34
الشكل 15	نتائج الكشف عن الفلافانويدات	35
الشكل 16	النتيجة النهائية لطرق الاستخلاص	36
الشكل17	الأعمدة البيانية لمردود قلويدات الطرق الثلاثة	37
الشكل18	منحنى اختبار DPPH لمستخلص RFRALK(A)	38
الشكل19	منحنى اختبار DPPH لمستخلص RFRETO(E)	39

قائمة الرموز والاختصارات

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

IC_{50}: تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50% من الجذر الحر

RFR ALK : الخلاصة القلويدية للثمار

RFR ETO: الخلاصة الكحولية للثمار

$K_2[Hg\ I_4]$:رابع يودوزئبقات البوتاسيوم

$K[I_3]$: محلول يود البوتاسيوم

طريقة1 :الاستخلاص بالكحول –ايثانول

طريقة2:الاستخلاص بالماء المحمض

طريقة3:الاستخلاص بجهاز Soxhlet

مل: مللتر

مغ: ملغرام

µl: ميكرو لتر

$CHCl_3$: كلوروفورم

C_2H_5OH: ايثانول

H_2SO_4:حمض الكبريت

CH_3OH: ميثانول

NH_3: النشادر(الامونيك)

Mg: مغنيزيوم

DPPH: الجذر الحر 2,2-diphényle-1-picrylhydrazy

$FeCl_3$: كلور الحديديك

NaOH : هيدروكسيد الصوديوم

mg/ml: ملغرام / مللتر

M: مول / لتر

مقدمة

المقدمة:

منذ سنوات عديدة كان الإنسان يستخدم النباتات لغرض العلاج والتغذية. حيث تحتوي بعض هذه النباتات على مركبات كيميائية ذات فائدة وأهمية كبيرة تكون نواتج ثانوية من عمليات الايض داخل النباتات التي تستخدمها لأغراض ديمومة حياتها. ما يطلق عليها بالمواد الفعالة ومنذ القدم استخدمت هذه المركبات (بشكل مستخلصات خام) كعقاقير إلا أن تنقية وتشخيص العديد من هذه المواد الفعالة لازال يشغل الباحثين في مجال الصيدلة والكيمياء**[1]**.

يتناول بحثنا تقييم قلويدات نبات*Retama raetam*من عائلة البقوليات الذي يمتاز بأهميته الطبية والعلاجية التي أكدتها الكتب ونشريات البحث العلمي لمحتواه العالي من مركبات القلويدات والمواد الفعالة الأخرى.

حيث تتضمن هذه الدراسة استخلاص القلويدات من أجزاء نبات*Retama raetam* بعدة طرق مختلفة ودراسة فعاليتهالمضادة للأكسدة، ونعتقد أننا السباقون في الجزائر في تقييم قلويدات هذا النبات، حيث انقسمت هذه الدراسة إلى خمس فصول أساسية تمثلت في:

الفصل الأول:الدراسة النظرية للقلويدات

الفصل الثاني: الدراسة النظرية لنبات الرتم و دراسة فاعلية مضادة للأكسدة

الفصل الثالث:الدراسة العملية

الفصل الرابع:النتائج و المناقشة.

الفصل الأول

الدراسة النظرية للقلويدات

1- عموميات حول القلويدات:

المواد الفعالة هي المركبات النباتية التي لديها فعالية حيوية في شفاء بعض الأمراض أو الحد منها**[2]**.

ومن أهمها القلويدات (*Alkaloids*) التي تعد من أقدم المركبات العضوية التي تم فصلها بصورة نقية لأهميتها في مجال الطب **[3]**.

اقترح هذا المصطلح لأول مرة سنة 1818م من طرف الباحث(*MEISSER*) وهذه الكلمة تطلق على كل مركب عضوي قاعدي له الصفات القلوية ومنها اشتقت وتحولت إلى كلمة القلويد وهي القاعدة النباتية**[3]**.

وهي عموما مواد بلورية عديمة اللون و الرائحة وهي حساسة لدرجات الحرارة العالية التي تتحلل بها ومن النادر أن يحتوي النبات على مركب قلويدي واحد، بل يحتوي عموما على مجموعة من المواد الفعالة المترابطة كيميائيا**[4]**.

2- نبذة تاريخية حول القلويدات:

تعتبر القلويدات من أهم المركبات الكيميائية المستخلصة من المواد النباتية ذات الأهمية العلاجية حيث احتلت مكانة هامة في علم الصيدلة و يعد المورفين أول قلويد مستخلص بصفة نقية من الأفيون عام 1906م من طرف الألماني سيرتيانار (Serturner)وعرف بطبيعته القاعدية ثم توالت عملية الفصل **[5]**. و بعد استخدام طرق الفصل والتنقية الحديثة خاصة الطرق الكورماتوغرافية تمكن العلماء من فصل العديد من القلويدات حتى بلغ عدد المفصول منها حوالي 4959 قلويدا عام 1973م، في حين أمكن التعرف على التركيب الكيميائي لحوالي 3293 قلويدا منها، إلى أن وصل في عام 1978 م إلى 4000 قلويدا معروف التركيب الكيميائي **[3]**.

3- تعريف القلويدات:

مبدئيا تعرف القلويدات بأنها مركبات عضوية نباتية، قاعدية، آزوتية ذات بنية معقدة تترسب ببعض الكواشف المسماة بالكواشف العامة للقلويدات**[5]**، وتحتوي القلويدات على واحد أو أكثر من ذرات النيتروجين كجزء من نظامها الحلقي وهي واحدة من منتجات الايض الثانوي للنبات وتوجد في معظم أجزاء النبات **[6]**.

4-طبيعتها وتواجدها:

لقد كان المصدر الرئيسي للقلويدات في الماضي النباتات الزهرية إلا أنه في الوقت الحاضر قد تم عزل الكثير من هذه المركبات من مصادر مختلفة مثل الحشرات والكائنات البحرية الدقيقة، ولا يزال عدد القلويدات التي تم استخلاصها من النباتات الزهرية يفوق عدد القلويدات التي تم استخلاصها من المصادر الأخرى**[3]**.

القلويدات تتواجد في النباتات ثنائية الفلقة ونادرة في أحادية الفلقة وتكثر في العائلة البقولية و الشقيقية و العائلة المركبة و العائلة الباذنجانية و الخشخاشية حيث تمتاز كل عائلة بوجود مواد قلويدية خاصة تميز ها**[7]**.

القلويدات تتواجد في النباتات عادة في حالة حرة أو على شكل أملاح لبعض الأحماض النباتية وهي تتواجد عادة في الأنسجة الصغيرة وفي عصير الخلايا ولكنها تتحول إلى الحالة الصلبة في طور النضج كما في الحبوب و الثمار و الجذور، ويختلف توزيع القلويدات في الأنسجة النباتية حسب نوع و سن النسيج النباتي، حيث تكون في جميع أجزاء النبات مثل نبات السكران و في الأوراق كما في التبغ و في الجذور مثل نبات البلادونا، في البذور مثل البن و الثمار مثل نبات الشوكران أو نبات الشطة أو في الثمار مثل نبات الخشخاش **[7]**.

5- بنية القلويدات :

تحتوي القلويدات على حلقة أو أكثر وغالبا ما يكون النتروجين فيها على هيئة أمين ثانوي أو ثالثي، ونادرا ما تحتوي على ذرة أزوت غير حلقية ومجموعة الأمين غالبا ما تكون ثانوية،وقد تكون أولية،وبعض القلويدات تحتوي على ذرتي أزوت في حلقات مختلفة و الكافين هو مشتق من الحلقات المتغايرة يحتوي على 4 ذرات أزوت **[3]**.

6-تصنيف القلويدات واهم مظاهرها البنائية :

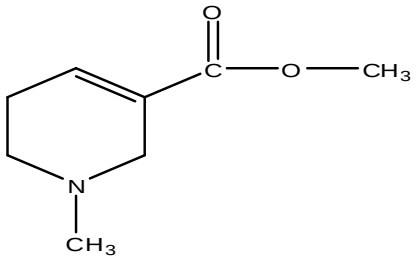
يختلف تصنيف المؤلفين للقلويدات، فتصنف حسب بنية القلويدات أو توزيعها النباتي أو حسب خواصها الصيدلانية أو تركيبها الحيوي أو حسب بنيتها الكيميائية **[5]**.وهناك العديد من المحاولات لوضع نظام تقسيمي يضم أغلب القلويدات. وقد كانت أكثر المحاولات قبولا و انتشارا هو نظام التقسيم الذي وضعه هيجانور(Heganauer) **[3]**.

6-1- قلويدات حقيقية و غير حقيقية:

6-1-1-القلويدات الحقيقة(Truealkloids):

هي قلويدات سامة ولها تأثيرات فيزيولوجية متباينة ومختلفة في القاعدة وتحتوي على ذرة نيتروجين واحدة أو أكثر في حلقات متغايرة وهي مشتقات من الأحماض الأمنية **[3]**.

مثل:الاتروبين و الاريكولين

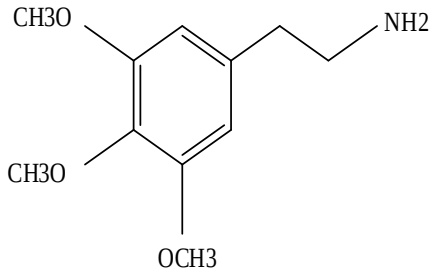


Arécoline

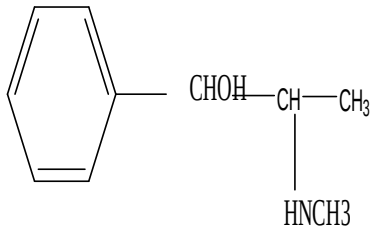
6-1-2-القلويدات الاولية(Protoalkaloids):

هذه القلويدات عبارة عن أمينات بسيطة تكون فيها ذرة الازوت خارج الحلقة وهي قلويدات قاعدية**[3]**، ويتم اصطناعها في الكائن الحي انطلاقا من أحماض امينية**[5]**.

مثل:مساكالين، افيدرين



Mescaline

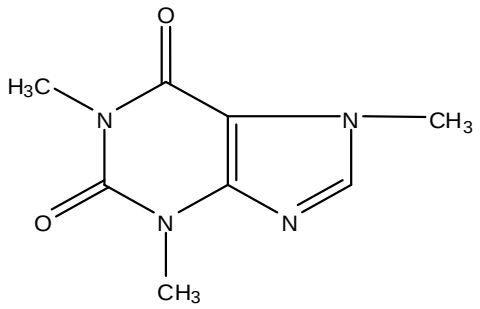


Ephédrine

6-1-3قلويدات غير حقيقية(Pseudoalkaloids):

هي قلويدات قاعدية والتي لا تشتق من الحموض، يندرج تحت هذا القسم القلويدات السيتيرودية و القلويدات بيورينات**[6]**.

مثل:الكافيين



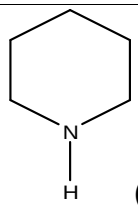
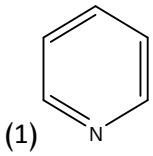
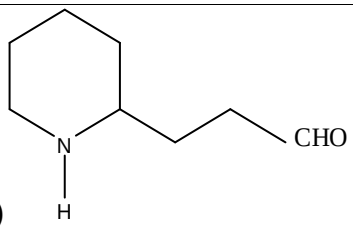
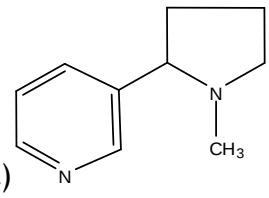
Caféine

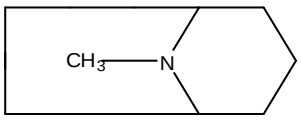
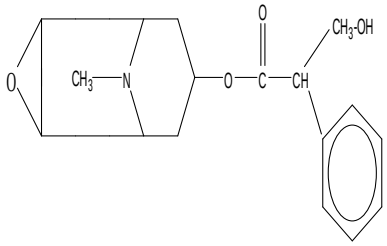
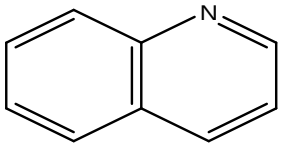
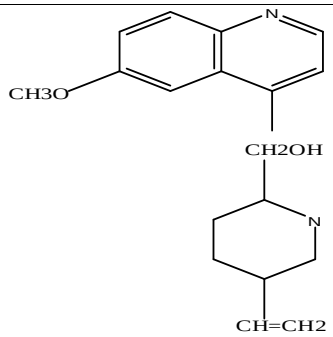
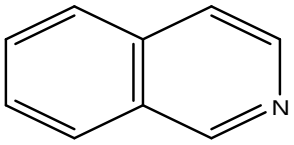
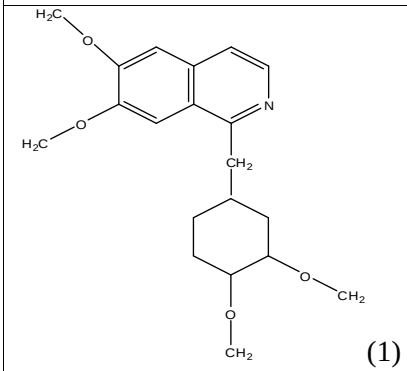
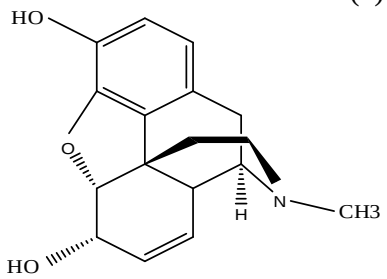
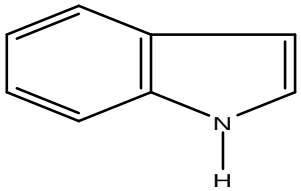
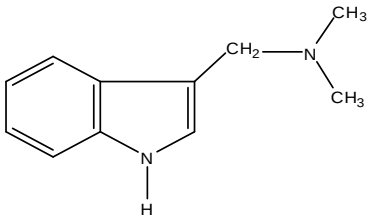
غير أن هذا التصنيف ليس من السهل تطبيقه، حيث يعد أهم تصنيف للقلويدات هو التصنيف الذي يعتمد على تقسيمها إلى مركبات حلقية غير متجانسة و مركبات حلقية متجانسة**[5]**.

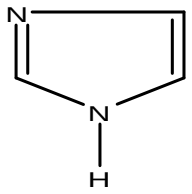
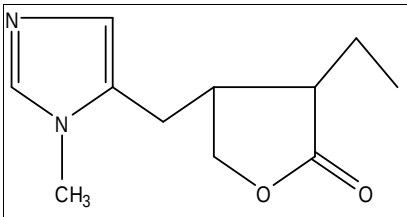
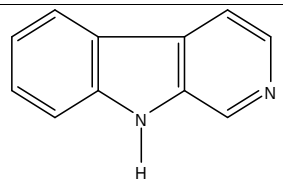
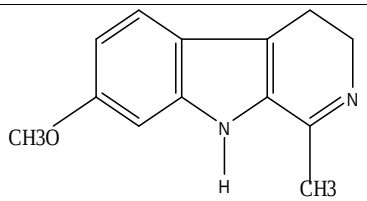
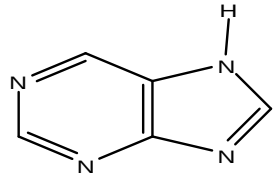
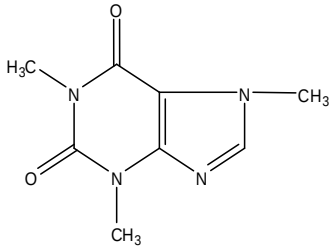
6-2-مركبات حلقية غير متجانسة ومركبات حلقية متجانسة:

6-2-1-مركبات حلقية غير متجانسة:

تنقسم بدورها إلى عدة مجموعات:

اسم المجموعة	المركبات المجموعة	أهم قلويداتها	المركبات القلويدات
البيبيريدين(2) Piperdine البيريدين(1) Pyridine	 (2)  (1)	البيلتيرين (2) Pelletiérine النيكوتين (1) Nicotine	 (2)  (1)

التروبان Tropane		Scopolamine السكوبلامين	
الكينولين Quinoléine		الكينين Quinine	
الايزوكينولين Izoquinoléine		البابافيرين (1) Papavérine المورفين (2) Morphine	 (1)  (2)
الاندول Indole		الجرمين Gramine	

الايميدازول Imidazole		البيلوكاربين Pilocarpine	
الكاربولين Carboline		الحرملين Harmaline	
البيورين Purine		الكافيين Caféine	

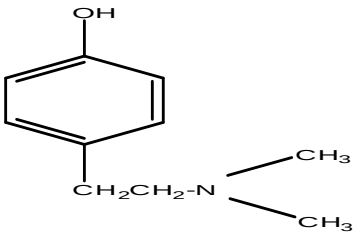
الجدول(1) : يوضح المركبات الحلقية الغير متجانسة واهم قلويداتها

6-2-2- مركبات حلقية متجانسة:

تتميز القلويدات متجانسة الحلقة بكون ذرات الآزوت خارج الحلقة، حيث تنقسم إلى مجموعات:

6-2-2-1-الأمينات القلويدية:

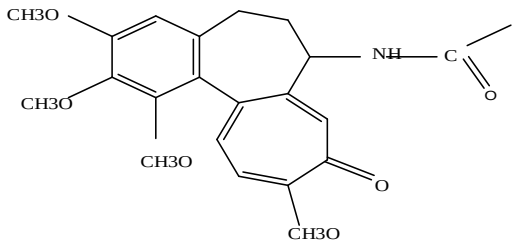
نذكر منها مسكالين و هردينين المستخرجان من نبات البتول



Hordénine

6-2-2-2- مشتقات النواة التروبولونية:

نواتها تتشكل من ثلاثة حلقات، سباعيتان وسداسية والازوت موجود خارج النواة، منها الكولشيسين**[4]**.



الكولشيسين

7- الخواص الكيميائية والفيزيائية للقلويدات:

-القلويدات هي مركبات لها وزن جزيئي يتراوح من 100 إلى 900 غ/مول**[3]**.

-في الحالة النقية معظم القلويدات وأملاحها مواد صلبة متبلورة وذات درجات انصهار محددة ماعدا القلويدات التي لا تحتوي على عنصر الأكسجين فإنها سائلة، متطايرة يمكن جرفها بالبخار مثل النيكوتين.

- معظم القلويدات عديمة اللون والرائحة ومرة الطعم، ومنها الملونة مثل Colchicine، وكذلك قد تكون القلويدات الحرة عديمة اللون وأملاحها ملونة مثل Hydrastinine.

- حيث تشترك القلويدات كيميائيا بالصفات التالية:

- سلوكها اتجاه المذيبات بدلالة pH

- تشكل راسب مع بعض الكواشف المعروفة ب "الكواشف العامة للقلويدات"

- تتكون من عناصر الكربون و الأكسجين و الهيدروجين و النيتروجين. **[3،5،6]**.

7-1- ذوبانية القلويدات:

القلويدات الحرة قاعدية ومحلول أملاحها حامضي، أي أن ذوبانية القلويدات تختلف باختلاف طبيعتها (القاعدية أو ملحية)

7-1-1- في شكلها القاعدي:

تذوب القلويدات في المذيبات العضوية اللاقطبية (الايثر، الكلوروفورم...) و في المذيبات العضوية القطبية (الكحولات العضوية)، و لا تذوب في الماء.

7-1-2- في شكلها الملحي:

تذوب القلويدات في الماء، و في المذيبات العضوية القطبية (الكحولات العضوية) و لا تذوب في المذيبات العضوية اللاقطبية.

7-2- ترسيب القلويدات:

القلويدات تترسب مع بعض الكواشف الخاصة تسمى بكواشف القلويدات، تفاعلات الترسيب مرتبطة بوسط الحمض المخفف.

توجد عدة أنواع من الكواشف أهمها **[3]**:

7-2-1- كاشف ماير (Mayer):

عبارة عن رابع يودوزئبقات البوتاسيوم$K_2[HgI_4]$حيث يعطي مع القلويدات راسب أبيض ضارب للصفرة .

7-2-2-كاشف دراجندورف(Dragendorff):

هو المحلول الحمضي لرابع يودوبيزموثات البوتاسيوم $K[BiI_4]$ حيث يعطي مع القلويدات راسب أحمر برتقالي.

7-2-3- كاشف بوشاردا(Bouchardat):

عبارة عن المحلول المائي لليود $K[I_3]$ و الذي يعطي راسبا بنيا مع القلويدات

8- استخلاص القلويدات:

إن الفكرة الأساسية في عملية استخلاص القلويدات من النباتات هي عزل مادة أو مجموعة من المواد المراد دراستها من المصدر النباتي، بطرق كيميائية باستعمال المحاليل والمذيبات العضوية. ومن المعلوم أن القلويدات عموما موجودة بهيئة أملاح ذائبة في الماء وعدم ذوبانها يعني وجودها بهيئة قاعدة حرة، ولهذا فان الخطوة الأولى بعد تحويل أجزاء النبات إلى مسحوق هي عملية الاستخلاص التي تتضمن تحرير القواعد الحرة وترسيب الأحماض العضوية **[4]**.

هناك ثلاثة طرق عامة لاستخلاص القلويدات**[5]**.

8-1-الاستخلاص بالمذيبات العضوية اللاقطبية:

أهم طريقة هي طريقة سطاس-أتو (stas-otto) وتتم في عدة مراحل نلخصها في ما يلي :

المرحلة الأولى: تحرير القلويدات بشكلها القاعدي و استخلاصها

مسحوق النبات الجاف يعالج في أغلب الحالات بقاعدة ضعيفة مثل النشادر NH_3 أو كربونات الصوديوم Na_2CO_3، بهده الطريقة تتحرر القلويدات ثم تستخلص بمذيب عضوي لا قطبي مثل CH_2Cl_2,$CHCl_3$, EtOEt ..... الخ ويفضل ذو درجة الغاليان المنخفضة ،الاستخلاص يتم على

البارد متقطعا بالنقع macération أو التنقيط percolation، أو على الساخن متواصلا باستخدام جهاز صوكسلي (Soxhlet)إذا كانت درجة غليان المذيب لا تؤثر على بنية القلويدات.

نحصل في كل الحالات على حثالة (مسحوق نبات مستنفد) ومحلول عضوي للقلويدات في صورها القاعدية .

المرحلة الثانية:التنقية

المحلول العضوي السابق ذكره يحتوي على شوائب عديدة بالإضافة للقلويدات و لتنقيتها تمررالقلويدات من الطور العضوي إلى طور مائي (حمضي) للتخلص من الشوائب الذائبة في المذيب العضوي.

(كلوروفيل، دهون، صمغ...) ثم تنقل القلويدات مجددا من الطور المائي إلى طور عضوي قاعدي للتخلص من الشوائب الذائبة في الماء (سكريات، أملاح،...) ومراحل هذه الطريقة تتلخص في (المخطط1).

8-2-الاستخلاص بالمذيبات العضوية القطبية:

تتم في مرحلتين أساسيتين:

المرحلة الأولى: الاستخلاص

مسحوق النبات الجاف يعالج بالكحول ثم تبخير الرشاحة للجفاف والراسب الناتج يذاب في المحلول حمضي ممدد، أو يعالج مسحوق النبات الجاف بمحلول كحول حمضي أو بمحلول كحول-الماء حمضي ثم يليه تبخير كحول الرشاحة والناتج يمدد بمحلول حمضي مخفف إذا لزم الأمر.

المرحلة الثانية: التنقية

يستخلص المحلول الحمضي الصافي الناتج بمذيب عضوي لا قطبي ($CHCl_3$،CH_2Cl_2EtOEt،...) ويبخر للجفاف لنحصل على راسب للقلويدات الكلية (القواعد) مرحلة هذه الطريقة تتلخص في (المخطط2).

8-3- الاستخلاص بالمحاليل الحمضية الممددة:

تتم على مرحلتين أساسيتين:

المرحلة الأولى: الاستخلاص

تستخلص القلويدات من مسحوق النبات الجاف بالمحاليل الحمضية حتى النفاد، فنحصل على محلول قلويدات ملحية.

المرحلة الثانية:التنقية

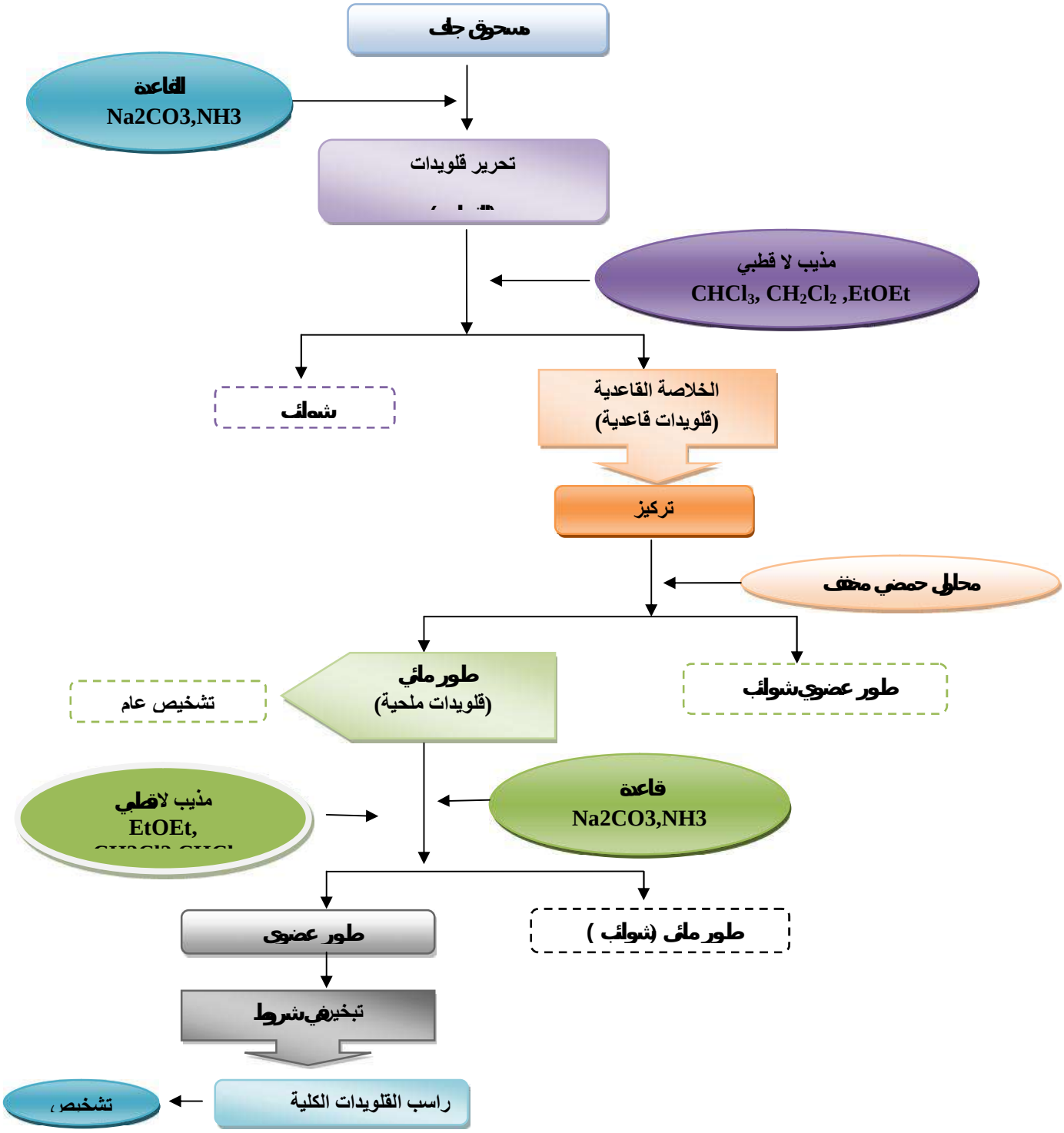
يوجد طريقتين :

الطريقة الأولى:

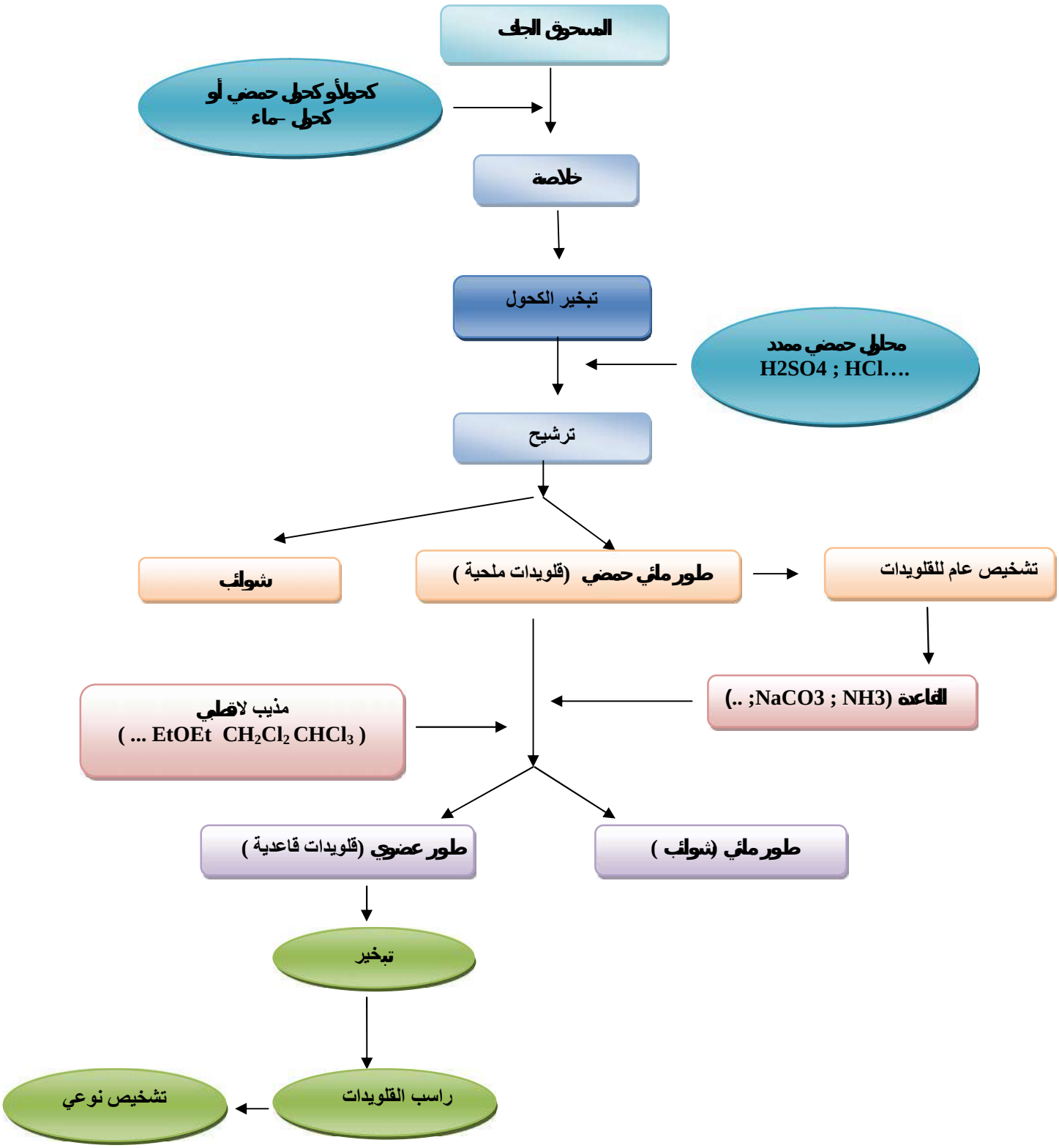
يحول المحلول إلى محلول قاعدي بإضافة قاعدة (Na_2CO_3،NH_3،.....) ويستخلص بمذيب عضوي لا قطبي ($CHCl_3$،CH_2Cl_2،EtOEt،...)ثم تبخر لنحصل على راسب من القلويدات الكلية (القاعدية).

الطريقة الثانية:

يضاف كاشف ترسيب القلويدات ثم تحرر القلويدات من الراسب بهدم المعقد مثل ترسيب ذرة الأيون المركزي للأيون المعقد.



المخطط (1) الاستخلاص بالمذيبات العضوية اللاقطبية



(المخطط 2): الاستخلاص بمذيب عضوي قطبي

9- فوائد القلويدات للنبات:

هنالك عدة نظريات تفسر وجود المواد القلويدية في النبات وفوائدها له وأهم هذه النظريات هي:

- تمتاز القلويدات بكونها مواد ذات تأثير سام لذلك فإن وجودها بالنبات يحميها من الحيوانات والحشرات أكلة الأعشاب فلا تأكلها **[8]**.
- يفسر بعض العلماء وجود المواد القلويدية على أنها نواتج نهائية تصير إليها المواد السامة بالنبات فيتخلص منها بتحويلها إلى قلويدات غير ضارة تخزن بأجزائه المختلفة**[8]**.
- تؤثر بعض القلويدات في حياة النبات كمنظمات نمو **[8]**.
- القلويدات تحمي النباتات من التلف التي تسببها الأشعة فوق البنفسجية(UV)**[9]**.

10 -الأهمية العلاجية للقلويدات :

تكمن أهمية القلويدات للإنسان في تأثيرها العلاجي للأمراض التي تصيبه فهي تعمل على تسكين الآلام مثل Morphine ومضيقة لحدقة العين مثلPilocarpine، رافعة للضغط مثل Ephedrine وخافضة للضغط مثل Reserpine ومضاد للملاريا مثلQuin،موسعة لحدقة العين مثل Atropineومضاد للسرطان مثلLaukocristine ومنشطة للجهاز العصبي المركزي مثل Strchaine**[10]**.

الفصل الثاني

الدراسة النظرية للنبات

Retama raetam

فعالية مضادات الأكسدة

1-عموميات حول نبات*Retama*:

الرتم*Retama*جنس نباتي ينتمي إلى فصيلة البقوليات يضم هذا الجنس سبعة أنواع مقبولة وبعض الأنواع موضع الشك**[11]**، فهي شجيرات أحادية، والتي يمكن أن يصل طولها إلى 3 أمتار، وتتميز بجذع ممتلئ وقصير، ويحمل الكثير من الأغصان الكثيفة،مقوسة، مرنة وتدلى أوراق الشجرة الصغيرة جدا ومتساقطة تبقى لعدة أيام فقط ويوجد لونين من الأزهار وفقا للأنواع التالية:

- أزهار بيضاء بالنسبة*Retama raetam* و *Retama monosperma*
- أزهار صفراء بالنسبة*Retama sphaerocarpa*

الثمرة هي قرنة ضيقة طولها اقل من 2 سم ,وتتألق بنهاية حادة تحمل من 1 – 2 من البذور .

- أنواع جنس*Retama*تنمو تلقائيا في جنوب أوروبا وحول البحر الأبيض المتوسط: المغرب، الجزائر، مصر، اسبانيا **[12]**.

في الجزائر جنس الرتم يوجد على 3 أنواع وهي:

1-*Retama raetam*

2-*Retama monosperma*

3- *Retama sphaerocarpa***[13]**.

2-تعريف ووصف نبات*Retama raetam* :

*Retama raetam*هو نوع من الشجيرات الصحراوية التي تستخدم في الأغراض العلاجية، يصل ارتفاعها إلى حوالي مترين، و يتميز بلونه الأخضر و قدرته على تحمل الجفاف، حيث تمتد جذوره داخل التربة للحصول على الماء **[2]**.

ومن مميزات هذه الشجرة أن أوراقها صغيرة وسريعة التساقط لتقليل من عملية لنتح حيث يكتفي بالتمثيل الضوئي بواسطة الفروع والسيقان التي ترتفع بمقدار قامة الإنسان كما يوجد بعضها صغيرة و لينة تتخلى عنها الشجرة في فترات الجفاف**[2]**.

كما له أزهار بيضاء تظهر في أواخر فصل الشتاء وبداية الربيع، وثماره خضراء على شكل خرزة محدودة من الأعلى**[2]**.

3-الانتشار الجغرافي لنبات*Retama raetam*:

ينتشر نبات *Retama raetam*في شمال أفريقيا و الشرق الأوسط حيث ينمو في الشعاب و الأودية و المناطق الصحراوية، وهو من بين النباتات الأصلية في جنوب الجزائر، له دور كبير في الحفاظ على التوازن البيئي و مقاومة التصحر **[2]**.

4-استعمالاته العلاجية:

يستعمل الرتم في علاج الجروح حيث يدهن المكان المصاب بمغلي السيقان،ويستعمل لوقف النزيف وذلك بسحق السيقان الجافة و يرش منها على المكان المصاب **[14]**.أو تنقع أوراق النبات بالماء المغلي يصفى الناتج ويستخدم كمادات توضع يوميا على العضو المصاب **[15]**.

في الطب التقليدي، يستخدم*Retama raetam* في علاج العديد من الأمراض مثل الإكزيما،

وكما يستخدم في الجنوب في حالة لدغات الأفعى**[16]**.

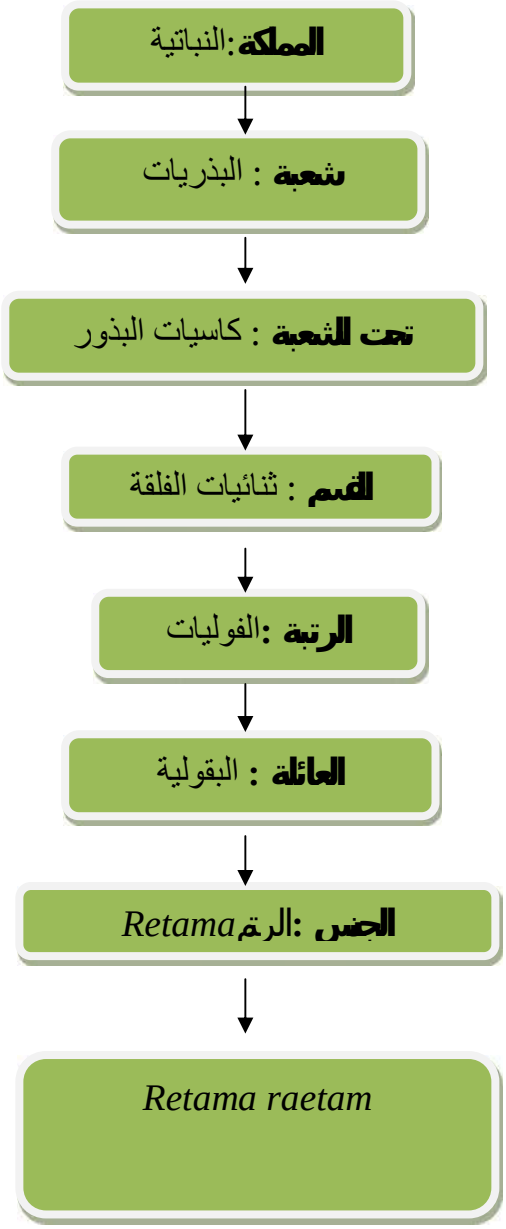
5- الأهمية الاقتصادية و الصناعية لنبات *Retama raetam* :

نبات*Retama raetam* له أهمية اقتصادية مهمة حيث تستخدم أخشابه الجافة للتدفئة في المناطق الصحراوية **[17]**. و يعتبر من العلف الممتاز **[18]**.

تحتوي بذور *Retama raetam*على البروتينات المثيرة للحساسية، التي يستخدمها النبات في آليات الدفاع ضد الحشرات وبالتالي يمكن استعمالها في صناعة المبيدات الحيوية**[18]**.

6-تصنيف نبات *Retama raetam* :

يصنف نبات*Retama raetam* حسب المخطط التالي:



المخطط 3 : تصنيف نبات الرتم

7- محتوى نبات *Retama raetam* من القلويدات:

هناك العديد من الدراسات أكدت على وجود القلويدات في نبات *Retama raetam*:

-حيث يحتوي نبات*Retama raetam* على القلويدات منها الريتامين و السبارتين**[19]**،

-الريتامين، السبارتين واللوبانين تمثل المكون الرئيسي للجذور و الأجزاء الهوائية (الأزهار و البدور) **[20]**. كما تحتوي بذور الثمار على Cytisine وهو قلويد سام**[13]**.

الجدول 2 :ملف تعريفي لمحتوى القلويدات لنبات *Retama raetam*[20].

القلويدات	أغصان	جذور	ثمار	بذور	ازهار
α-Isosparteine	Tr	-	-	-	-
Sparteine	35.65	9.09	0.77	Tr	Tr
Dehydrosparteine	Tr	-	-	-	-
ß-Isosparteine	0.80	0.98	0.63	Tr	Tr
11,12-Dehydrosparteine	0.81	-	-	-	Tr
Ammodendrine	0.99	0.87	0.75	Tr	Tr
N-M ethylcytisine	9.91	20.31	4.46	5.63	10.81
Retamine	24.86	45.44	20.10	Tr	Tr
C ytisine	0.91	6.00	36.44	94.37	54.25
Dehydroretamine	Tr	-	-	-	-
17-Oxosparteine	Tr	-	-	-	-
5,6-Dehydrolupanine	3.91	0.50	4.50	Tr	3.62
Rhombifoline	-	0.60	Tr	-	-
Lupanine	8.73	2.15	14.32	Tr	2.26
N -Carbomethoxycytisin	Tr	-	-	-	-
11-Allylcytisine	0.58	1.87	4.95	Tr	6.61
17-O xoretamine	0.50	-	-	-	-
N-Formylcytisine	Tr	-	-	-	-
12a-Hydroxylupanine	Tr	-	-	-	-
Anagyrine	12.35	11.92	13.08	Tr	22.55
Baptifoline	Tr	-	-	-	Tr
Alkaloid content	2.56	1.36	0.55	2.00	0.57

-: لا يوجد قلويد Tr : كمية ضئيلة نسبة القلويدات في نبات الرتم ب mg/100mg

7-1- قلويدات الأنواع الثلاثة لنبات *Retama* :

أظهرت دراسة مقارنة على قلويدات الأنواع الثلاثة *Retama monosperma* (البرتغال)، *Retama raetam* (مصر)، *Retama sphaerocarpa* (البرتغال) خصوصية عالية جدا في تخزين القلويدات. تحتوي السيقان بشكل أساسي علىSparteine وRetamine، بينما في الزهور والقرون يكون Lupanine ،Retamine،N-methylcytesine ،Cytesine وفيرة للغاية، في حين تحتوي البذور على Cytesine بشكل رئيسي **[21،22]**.

- تحتوي الأنواع الثلاثة لجنس الرتم على ثلاث أنواع أساسية من القلويدات وهيCytesine وSparteine و Retamine**[21،20]**.

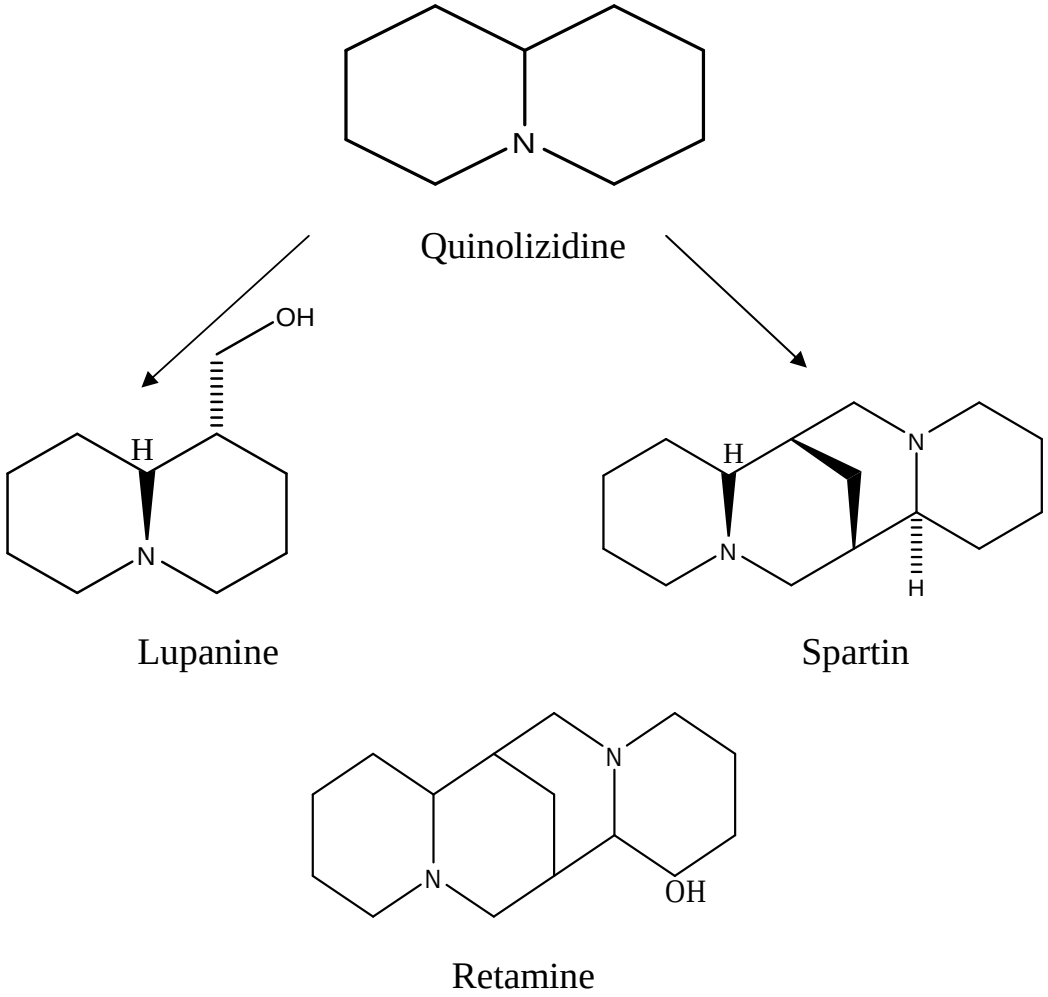
الجدول 3: يوضح بعض قلويدات الأنواع 3 لنبات (*Retama*)[23].

نوع الرتم	القلويدات
Retama monosperma	**Retamine** **Anagyrine** **Cytisine** **Lupanine** **Spherocarpine**
Retama raetam	**N-methylcytesine** **Sparteine** **Cytesine** **Retamine** **Anagyrine** **Lupanine**
Retama sphaerocarpa	**Retamine** **α-sparteine** **Cytisine** **Spherocarpine**

2-7- بنية قلويدات نبات *Retama raetam* :

يحتوي النبات على قلويدات الكينوليزيدين(Quinolizidine)

ومن مركباته: Sparteine و Lupanine



المخطط4: بنية قلويدات نبات *Retama raetam*

8-فعالية مضادات الأكسدة :

8-1- تعريف مضادات الأكسدة :

مضادات الأكسدة هي مجموعة من المواد التي تحمي الخلايا من الأضرار التي تسببها الجزيئات غير المستقرة والتي تعرف بالجذور الحرة، توجد بصورة طبيعية في معظم الخضروات والفواكه والأعشاب الطبية، فهي تعد كمانحات للهيدروجين أو مستقبلات للجذور الحرة وعليه فدورها الأساسي هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة من الأكسدة**[23،25]** أو أنها تتحد مع الجذر وتحوله إلى مركب مستقر،وتقسم مضادات الأكسدة من حيث مصدرها إلى طبيعية و مصنعة **[3]**.

8-2-تقييم الفاعلية المضادة للأكسدة :

الفاعلية المضادة للأكسدة هي قياس لقدرة المستخلص أو المركب لتثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة، ويمكن تقدير الفاعلية بعدة تقنيات تحليلية كلاسيكية مثل(التحليل الطيفي، اللوني، الكروماتوغرافي، مطيافية الكتلة، الأشعة تحت الحمراء). أو بطرق حديثة كالتحليل الكهربائي مثل طرق القياس البولاروغرافي، الفولطامتري**[24]**.

9- الجذور الحرة:

للجذور الحرة دور كبير في الآليات الجزيئية للعديد من الأمراض، كونها تتولد بشكل طبيعي في جسم الإنسان ويزداد تشكلها بفعل عدة عوامل داخلية وخارجية. وعلى ذلك يتركز الاهتمام على دراسة مضادات الأكسدة داخلية و خارجية المنشأ لأنها النظام الذييحمي العضوية من أضرار الجذور الحرة **[25]**.

تعرف الجذور الحرة على بأنها وحدات كيميائية (ذرات أو جزيئات) تمتلك إلكترونا أو أكثر حرا في مدارها الخارجي. ما يجعلها غير مستقرة، وتتفاعل بسرعة مع مركبات أخرى محاولة اقتناص ما ينقصها من الكترونات لتصل إلى الثبات الكيميائي وعادة ما تهاجم الجذور الحرة اقرب جزيء ثابت إليها آخذة الكتروناته التي تحتاجها، وفي هذه الحالة تتحول الجزيئات المهاجمَة بدورها والتي فقدت إلكترونًا إلى جذور حرة تبحث عن الاستقرار، بادئة سلسلة من التفاعلات تتفاقم لتهاجم غشاء الخلية الحية ومكوناتها **[23]**.

9-1-مصادر الجذور الحرة[26]:

-أشعة التأين الصادرة عن الصناعة

- التعرض لأشعة الشمس و الأشعة الكونية

-أشعة X الصينية وغيرها

- التدخين و المشروبات الكحولية

-الأغذية المقلية بالزيوت القديمة.

الفصل الثالث

الجانب التطبيقي

الدراسة العملية

1- المادة النباتية :

الشكل 1 :صور لنبات *Retama raetam*

2- الحصاد :

تم حصد نبات الرتم من ضواحي الحجيرة – ورقلة خلال شهر فيفري 2019 –افريل 2019 .

3- تجفيف أجزاء النبات :

يتم تجفيف أجزاء النبتة (أزهار ، أغصان ، جذور ،ثمار و أغصان مع ازهار) في مكان بعيد عن الشمس و الرطوبة .

الشكل2 :صورة توضح عملية التجفيف

4- سحق و حفظ أجزاء النبات :

تم سحق أجزاء نبتة الرتم (الأغصان، الجذور،الأغصان مع الأزهار و الثمار) في آلة السحق الكهربائية(retscl)، ثم حفظت في أكياس ورقية لحين استعمالها.

الجدول4 :يوضح أجزاء النبات قبل وبعد السحق

الأجزاء	نبات قبل السحق	نبات بعد السحق
الأغصان		
الجذور		
الأزهار		
الثمار		
الأغصان مع الأزهار		

5-الكشف عن القلويدات (الجذور،الثمار، الأزهار):

5-1- تحضير خلاصات الكشف:

نقع 10غ من مسحوق (الجذور، الأزهار و الثمار)في المحلول الكحولي (ايثانول 80%ح/ح) لمدة 24 ساعة ثم نرشحه، تكرر العملية ثلاث مرات .

الشكل3 : نقع مساحيق (الجذور و الأزهار و الثمار) في الايثانول 80%(ح/ح)

تبخر الرشاحة من الايثانول حتى الجفاف في جهاز الدوران البخاري ثم نضيف محلول H_2SO_4 (M0.25)ونرشحه.

يضافNH_3 للرشاحة حتىpH قاعدي(pH=9) ثم تستخلص القلويدات بالكلوروفورم، حيث تكرر العملية 3 مرات.

5-1-1-اختبار دراجندورف:

يضاف لـ2مل من الخلاصات القلويدية لـ(جذور،الأزهار و الثمار) قطرات من كاشف دراجندورف

5-1-2-اختبار بوشاردا:

يضاف لـ2 مل من الخلاصات القلويدية السابقة قطرات من كاشف بوشاردا.

5-1-3- اختبار ماير:

- يضاف لـ2 مل من الخلاصات القلويدية قطرات من كاشف ماير

5-2 -الكشف عن المواد الفعالة :

5-2-1-الكشف عن الصابونيات:

نحضر محلول مائي للمسحوق النباتي (أزهار،أغصان،الجذور و ثمار)، وذلك بوضع10غ من المسحوق النباتي في أنابيب اختبار ونضيف 10مل من الماء المقطر ثم نرج بشدة، فظهور رغوة كثيفة لعدة دقائق دلالة على وجود الصبونين**[2]**.

5-2-2- تحضير الخلاصات الكحولية للكشف عن المواد الفعالة:

تنقع 10 غ من مسحوق النبات الجاف (الجذور،الأغصان،الثمار والأزهار) في 50مل من محلول الايثانول 80% لمدة 48ساعة(كررت العملية مرتين) ثم يرشح.

5-2-2-1-الكشف عن العفصيات:

في أنابيب اختبار يوضع 1 مل من المستخلص الكحولي ونضيف له 2مل من الماء المقطر وقطرات من $FeCl_3$(1%)، فظهور للون الأخضر داكن أو الأزرق داكن يدل على وجود العفصيات**[5]**.

5-2-2-2-الكشف عن الفلافانويدات (اختبار شيباتا):

نضيف لـ1مل من الخلاصة الكحولية القليل من Mg وقطرات من HCl المركز، فظهور اللون الأحمر أو البرتقالي يدل على وجود الفلافانويدات.

6- طرق تحضير الخلاصات القلويدية:

6-1-الاستخلاص بالكحول (الطريقة 1):

6-1-1-عملية النقع (maceration) :

تنقع مساحيق أجزاء النبات(أغصان، جذور، أزهار، أغصان مع أزهار و ثمار) في Etoh(96 %)، ثم توضع في جهاز الرج لمدة 24 ساعة.

الشكل:4 صورة توضح عملية النقع في الايثانول

6-1-2- عملية الترشيح:

بعد مرور 24ساعة من الرج نقوم بترشيح العينات، ثم تعاد عملية النقع والترشيح 3مرات.

الشكل :5 عملية الترشيح الطريقة (1)

بعد الانتهاء من عملية النقع و الترشيح تجفف الخلاصات الكحولية في جهاز الدوران البخاري، ثم يضاف لها محلول حمض الكبريت H_2SO4(0.25M) ثم ترشح.

6-1-3- عملية الاستخلاص:

توضع الرشاحة في قمع فصل ويضاف لها الايثر البترولي للتخلص من الشوائب، يفصل الايثر البترولي المحمل بالشوائب، تضاف النشادر NH_3 حتى pH قاعدي (pH = 9) ، ثم نضيف الكلوروفورم لاستخلاص القلويدات و تكرر العملية ثلاث مرات، و تجفف الخلاصة الكلوروفورمية من الماء باستخدام $MgSO_4$ اللامائي ويؤخذ وزنها.

- تبخر الخلاصة الكلوروفورمية في جهاز الدوران البخاري عند درجة حرارة 40˚.

6-1-4- حساب المردود R%:

يتم حساب مردود الخلاصات كالتالي:

$$R\% = (P_1 - P_2 / P_0).\ 100$$

P_0: وزن مسحوق النبات الجاف

P_1:وزن البالون مملوء بالخلاصة القلويدية الجافة

P_2: وزن البالون فارغ.

الجدول 5 : مردود قلويدات أجزاء النبات (الطريقة 1)

جزء النبتة	الكتلة النبات الجافة (غ)	كتلة القلويدات(غ)	المردود R%
الأزهار	25	0.052	0.208
الأغصان	25	0.322	1.288
أزهار مع أغصان	25	0.298	1.192
الجذور	50	0.145	0.29
الثمار	75	0.121	0.16

6-2-طريقة الاستخلاص بالماء المحمض (الطريقة 2):

6-2-1-عملية النقع:

تنقع مساحيق أجزاء النبات في محلول حمض الكبريت 0.25M (H_2SO_4)ثم نخضع العينات إلى عملية الرج لمدة 24 ساعة، بعدها نرشح العينات حيث تكرر العملية ثلاث مرات.

الشكل :6 نقع مساحيق أجزاء النبات في الماء المحمض.

- تستخلص الرشاحة وتعاد نفس خطوات(الطريقة 1) ثم يحسب المردود

6-2-2- حساب المردود(الطريقة2):

الجدول 6 : مردود قلويدات أجزاء النبات (الطريقة 2)

أجزء النبتة	كتلة النبات الجاف غ	كتلة القلويدات غ	المردود R%
الأزهار	50	0.178	0.356
الأغصان	100	0.215	0.215
أغصان مع أزهار	100	1.005	1.005
الجذور	50	0.155	0.31
الثمار	75	0.132	0.176

6-3-استخلاص باستعمال جهازSoxhlet (الطريقة 3) :

6-3-1- عملية النقع :

تنقع مختلف مساحيق أجزاء النبات الموضوعة في أكياس قماشية في الامونياك(NH_3 5M) لمدة 24 ساعة كما هو موضح في الصورة التالية:

الشكل 7: نقع مسحوق النبات في NH_3

يتم الاستخلاص بجهازSoxhlet وباستخدامCH_2Cl_2 كمذيب مع مراعاة التسخين اللطيف، حيث تدوم عملية الاستخلاص حوالي 20 ساعة.

– بعد انتهاء عملية الاستخلاص، نجفف الخلاصة من الديكلوروميثان في جهاز الدوران البخاري على درجة حرارة 40° ثم يضاف له محلولH_2SO_4 0.25M، ثم تعامل بنفس طريقة(1)

6–3–2– حساب المردود:

الجدول7: مردود قلويدات أجزاء النبات (الطريقة 3)

أجزاء النبتة	كتلة النبات الجاف (غ)	كتلة القلويدات (غ)	المردود R%
أزهار	70.24	0.168	0.23
أغصان	70.05	1.05	1.36
أغصان مع أزهار	70.80	0.637	0.89
جذور	70.07	0.352	0.50
ثمار	70.99	0.201	0.28

7– اختبار فعالية مضادات الأكسدة:

تم تقدير الفعالية المضادة للأكسدة في المستخلصات القلويدات لنبات *Retama raetam* بالطريقة الكيميائية DPPH.

7–1–تحضير الخلاصة الكحولية الخامة:

نقع 10غ من مسحوق الثمار في 50مل من محلول الايثانول 80% لمدة 42 ساعة ثم ترشح نكرر العملية مرتين.

ثم يبخر محلول الايثانول في جهاز الدوران البخاري حتى الجفاف،ننقل الخلاصة الجافة إلى القارورة بإضافة القليل من الايثانول وتترك للجفاف (جفت في مدة 7ايام) ثم نعيد وزنها ونحسب المردود.

الجدول8: مردود القلويدات لمستخلص الثمار (القلويدي و الكحولية)

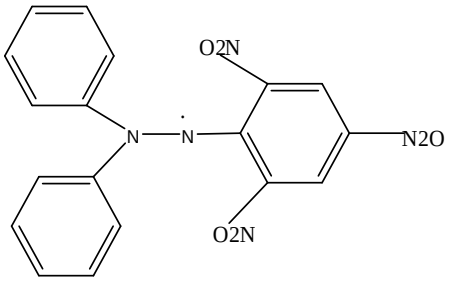
الخلاصة	كتلة القلويدات(غ)	كتلة النبات الجاف (غ)	المردود R%
RFR ETO	0.826	10	8.26
RFR ALK	0.201	70.99	0.28

– RFR ALK : خلاصة القلويدات(الطريقة 3) – RFR ETO: خلاصة الكحولية للقلويدات.

7-2- اختبار الأسر الجذري DPPH:

هو اختبار مضاد للجذور الحرة و قد سبق تعريفه من50 سنة ماضية من طرف العالم Blois سنة 1958و لقد أعتمد في ذلك على توضيح بعض الحسابات الخاصة بمضادات الأكسدة ، وفي السنوات الأخيرة تم تطبيق هذه الطريقة على نطاق واسع لتقدير النشاط المضاد للأكسدة نظرا للخصائص التي تتميز بها بسيطة و سريعة **[27]**.

يتميز اختبار DPPH بتشكيل الجدر الحر و المستقر للمركب الازوتي . Diphenylpicrylhydrazyl و $DPPH^{\bullet}$ هذا الاستقرار ناتج عن تمركز الإلكترون الحر على مستوى الجزيء و يعتمد هذا الاختبار على نسبة إرجاع الجذر $DPPH^{\bullet}$ في وجود مركب مضاد للأكسدة قادر على منح إلكترون أو جذر هيدروجينيا، و يظهر ذلك من خلال التفاعل اللوني للجدر $DPPH^{\bullet}$ ذو اللون البنفسجي الداكن الذي يتحول إلى جزيئة مستقرة DPPH-H وهي مادة صلبة غير جذرية لونها اصفر، و يقاس التغيير اللوني بقياس الانخفاض في قيم الامتصاصية عند طول موجي 517nm**[27]**.



جزيئة DPPH

نحضر محلول DPPH باخد 0.004غ بتركيز 0.1 mM، يذاب في 100مل من الايثانول يعطي لون بنفسجي مسود، يغطى جيدا ويوضع في جهاز الرج لمدة ساعتين.

-تذاب الخلاصات القلويدية الجافة للثمار في الميثانول، يضاف للـ RFR ETO 4مل و للـ RFR 3ALKمل.

-0.1مل من محلول RFR ETO ذو التركيز 2.07 مغ / مل ويضاف له 10مل ميثانول (E).

-0.1 من المحلول RFR ALKالمركز ذو تركيز 1مغ /مل و يضاف له 6.7 مل من الميثانول (A)

الشكل8:صور توضح مستخلصات RFR ALK (A) و RFR ETO (E)

-تحضير العينات:

نحضر عدة تراكيز مخففة في أنابيب اختبار من مستخلصات الثمارEوA حيث ناخذ500µl من المستخلص ونضيف له 500µl من الايثانول .

نضيف للأنابيب 500µl من DPPHالمحضر ثم نرج جيدا ليتجانس المحلول، نضعها فالظلام لمدة 30 دقيقة.

الشكل 9: صورة توضح التراكيز المخففة بعد إضافة DPPH

نقرا الامتصاصية بجهاز(UV-Visible) عند طول موجة 517nm.

تم تعيين القدرة التثبيطية للمستخلصات بحساب النسبة المئوية للتثبيطية(I%) لـ DPPH˙ وذلك من العلاقة التالية :

$$I\% = ((A0 - Ai) / A0)\ 100$$

حيث:

I%: نسبة تثبيط العامل المضاد للأكسدة للجذر الحر DPPH˙

A0: الامتصاصية الضوئية للجذر الحر في غياب المستخلصات النباتية بعد مرور 30 دقيقةعند 517nm

Ai :الامتصاصية الضوئية للخليط (الجذر + المستخلصات النباتية) بعد مرور 30 دقيقةعند nm517

من خلال المعادلة الخطية لمنحنيات تغير نسبة التثبيط بدلالة تركيز المستخلصات و ذلك بالعلاقة التالية

$$I\%=50\%=K\ (C\ )+B$$

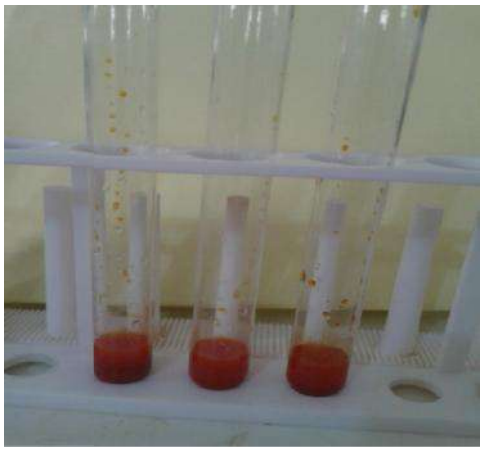
K :ميل المنحى المستخلصات النباتية.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

1-نتائج اختبار القلويدات :

- ظهور راسب البرتقالي بعد إضافة كاشف دراجندورف دليل على وجود القلويدات.



الشكل 10: صورة توضح نتيجة اختبار دراجندورف

- ظهور راسب البني يدل على وجود القلويدات بعد إضافة كاشف بوشاردا

الشكل 11:صورة توضح نتيجة اختبار بوشاردا

- ظهور راسب ابيض دليل على وجود القلويدات بعد إضافة كاشف ماير.

الشكل12 : صورة توضح نتيجة اختبار ماير

2-نتائج الكشف عن بعض المواد الفعالة :

-ظهور رغوة كثيفة على أسطح العينات يدل على وجود الصابونيات

الشكل13: نتائج الكشف عن الصابونيات

ظهور اللون الأزرق الداكن في مستخلص الجذور و الأزهار وظهور اللون الاخصر الداكن في خلاصة الأغصان و الثمار يدل على وجود العفصيات.

الشكل14 : نتائج الكشف عن العفصيات

ظهور اللون الأحمر في خلاصة الأزهار و ظهور اللون البرتقالي في الأغصان و الثمار و الجذور يدل على وجود الفلافانويدات.

الشكل15 : صورة لنتائج الكشف عن الفلافانويدات

-نلخص نتائج الكشف فالجدول التالي :

الجدول9 : نتائج اختبارات الكشف عن المواد الفعالة في النبات

المواد الفعالة		أغصان	جذور	أزهار	ثمار
القلويدات	**ماير**		+	+	+
	دراجندورف		+	+	+
	بوشاردا		+	+	+
العفصيات		+	+	+	+
الفلافانويدات	**شيبانا**	+	+	+	+
الصابونيات		+	+	+	+

– من خلال النتائج الكشف كيميائي تبين أن نبات *Retama raetam* يحتوي على القلويدات في أجزاءه المختلفة (ازهار، الجذور، ثمار).

– أظهرت نتائج الفحص الكيميائي عن بعض المواد الفعالة لنبات *Retama raetam* على وجود الصابونيات، الفلافانويدات، العفصيات ،القلويدات .

تتوافق النتائج المتحصل عليها مع بعض النتائج الدراسات السابقة على نفس النبات مثل الدراسة التي قام بها [2].

3–نتائج طرق الاستخلاص :

الشكل 16:النتيجة النهائية لطرق الاستخلاص

نلخص نتائج مردود القلويدات لطرق الاستخلاص فالجدول التالي :

الجدول 10:مقارنة نسب مردود عملية الاستخلاص

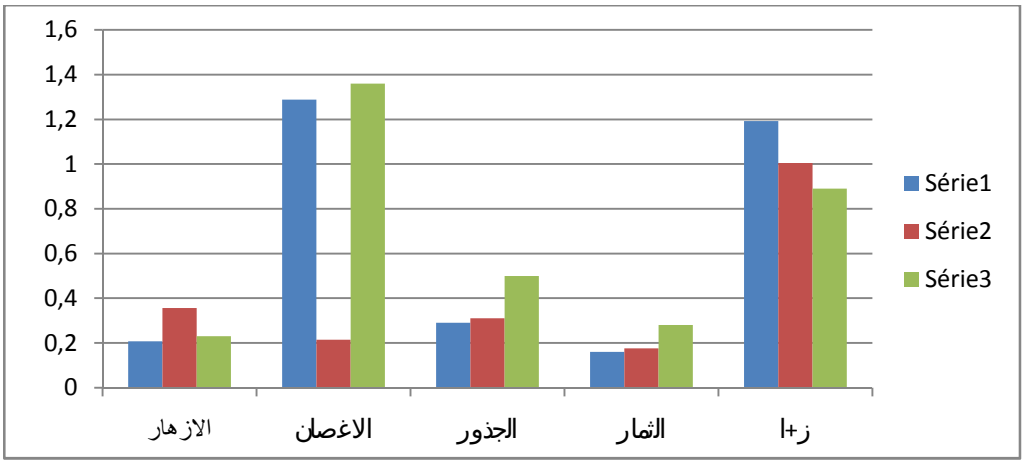
الطريقة	الأزهار %	الأغصان%	الجذور%	الثمار%	الأغصان مع ازهار%
1	0.208	1.288	0.29	0.16	1.192
2	0.356	0.215	0.31	0.176	1.005
3	0.23	1.36	0.50	0.28	0.89

من خلال جدول النتائج نلاحظ أن:

– الطريقة (1) لديها اكبر مردود في الأغصان مع أزهار ويقل في الثمار

– الطريقة (2) لاحظنا أن أكبر مردود للقلويدات في الأغصان مع الأزهار و أقل مردودا في الثمار.

– الطريقة (3) أثبتت النتائج أن أكبر مردود للقلويدات موجود في الأغصان و أقل مردود يتواجد في الأزهار.



مردود استخلاص القلويدات الطرق الثلاثة % بدلالة أجزاء النبات

الشكل17 : الأعمدة البيانية لمردود قلويدات الطرق الثلاثة

- يوضح البيان أن أكبر نسبة قلويدات تتواجد في أغصان نبات *Retama raetam* و أحسن طريقة للاستخلاص القلويدات هي الطريقة(3).

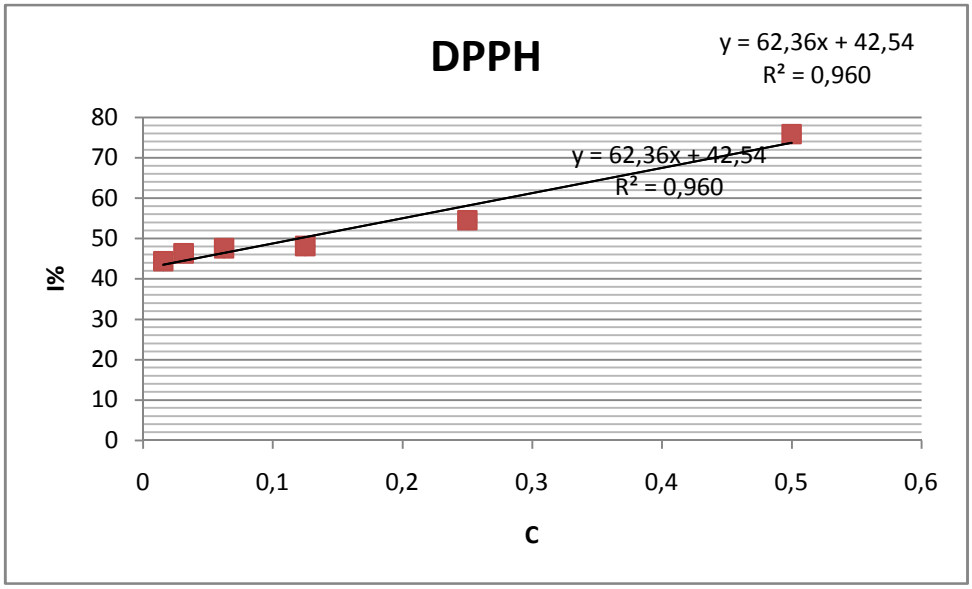
4-نتائج الفعالية المضادة الأكسدة DPPH:

جدول11:يوضح نتائج اختبارDPPH

Contrôle=0.877					
ALK nm517	C mg/ml	I%	ETO517 Nm	C mg/ml	I%
0.212	0.5	75.82	0.026	1.035	97.03
0.399	0.25	54.50	0.332	0.517	74.80
0.455	0.125	48.12	0.410	0.258	63.28
0.460	0.0625	47.55	0.221	0.129	53.25
0.471	0.0312	46.29			
0.488	0.0156	44.36			

نرسم المنحنى البياني للنسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز.

المنحنيات البيانية لنسبة تثبيط الجدر الحر I% بدلالة تركيز لكل مستخلص(I%=f(c



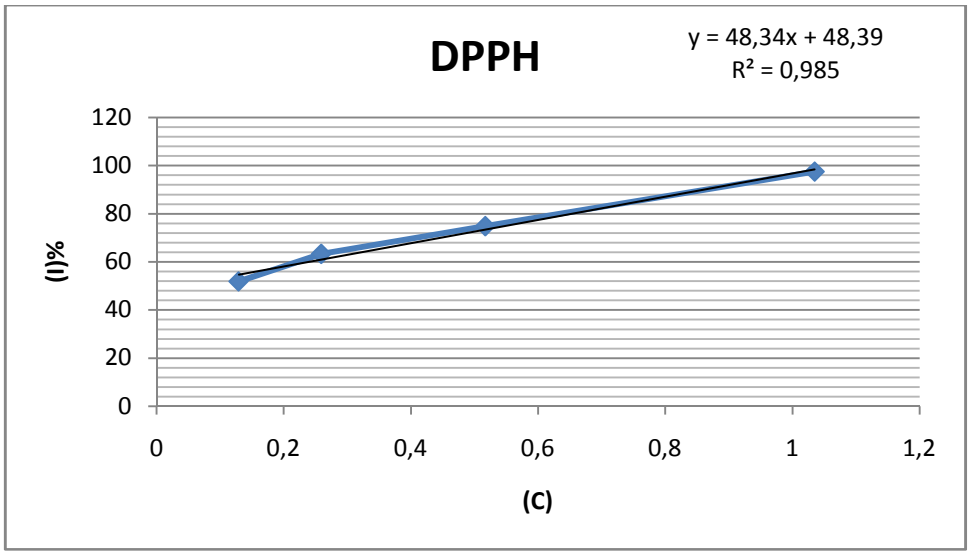
الشكل18: منحنى اختبار DPPH لمستخلص RFR ALK

من خلال المعادلة الخطية I%=63.36 C + 42.54 لمنحنى تغير نسبة التثبيط بدلالة تركيز المستخلصات نحسب IC_{50} التي هي تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50% من الجذر الحر.

IC_{50}=0.80 mg/ml

-

منحنى مستخلص RFR ETO



الشكل 19: منحنى اختبار DPPH لمستخلص RFR ETO

المعادلة الخطية 48.34 C + 48.39 =I%لمنحنى تغير نسبة التثبيط بدلالة تركيز المستخلصات نحسبIC_{50} التي هي تركيز المستخلص اللازم لتثبيط 50% من الجذر الحر.

IC_{50}= 0.03mg/ml

– من خلال النتائج المتحصل عليها لمستخلصات للثمار نلاحظ أن مستخلص الثمار RFR ETO أن له IC_{50}اقل بكثير من IC_{50} لمستخلص الثمار RFR ETO.

من المعلوم انه كلما زادت قيمة IC_{50} قلت الفاعلية المضادة للأكسدة لذلك نستنتج أن مستخلص الثمار RFR ETO له قدرة تثبيطية للجدر الحر $DPPH^{\bullet}$ أكبر من مستخلص الثمار RFR ALK.

الخاتمة

تركز اهتمامنا في هذا البحث على الدراسة فيتو كيميائية للاستخلاص والكشف على القلويدات في أجزاء نبات *Retama raetam*

كانت بداية هذا العمل بالكشف عن القلويدات في ثمار و جذور و أزهار نبات *Retama raetam* والكشف عن بعض المواد الفعالة الأخرى (العفصيات، الصابونيات، الفلافانويدات) فكانت نتائج الكشف ايجابية فتطرقنا بعدها إلى استخلاص القلويدات من أجزاء (أزهار، جذور، أغصان مع ازهار و ثمار) نبات *Retama raetam* بثلاث طرق متمثلة في الاستخلاص بجهاز Soxhlet، الاستخلاص بالماء المحمض و الاستخلاص بالكحول –ايثانول .

حيث بينت نتائج مقارنة مردود الاستخلاص أن أغصان نبات *Retama raetam* تحتوي على اكبر مخزون للقلويدات مقارنة بأجزائه الأخرى. وأفضل طريقة للاستخلاص هي طريقة الاستخلاص بجهاز Soxhlet.

تم تقدير نشاط الفعالية المضادة للأكسدة لنبات *Retama raetam* باستخدام طريقة تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\cdot}$. وذلك في مستخلص الثمار الناتج من الاستخلاص بجهاز Soxhlet و طريقة الاستخلاص بالكحول، حيث تم حساب قيمة IC_{50} لهذا المستخلص فقدرت: IC_{50}= 0.80mg/ml للمستخلص القلويدي و IC_{50}= 0.03mg/ml للمستخلص الكحولي. ومن خلال النتائج استنتجنا أن مستخلص الكحولي للثمار كان له نسبة تثبيط عالية مقارنتا بمستخلص الثمار القلويدي.

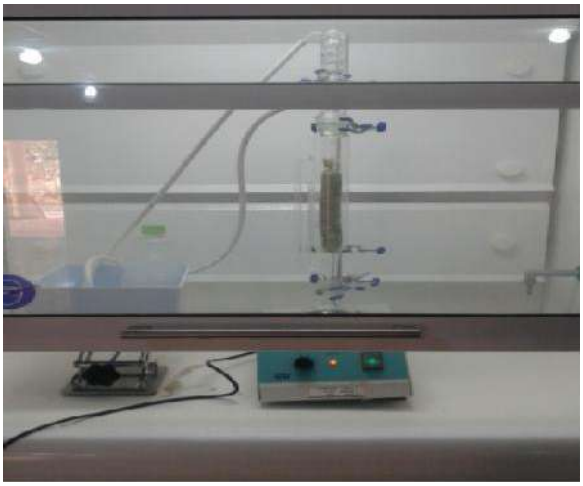
الملاحق

آلة السحق الكهربائية

جهاز الرج

صورة لجهاز الدوران البخاري (Rota vapeur)

جهاز UV-Visible



جهاز Soxhlet

ترشيح ووزن الخلاصة القلويدية الجافة

مراحل عملية الاستخلاص

قائمة المراجع

المراجع العربية:

[1]: علي، ص، م،الدليمي،م، ع، (2009).الكشف عن المركبات الكيميائية و التنقية الجزئية للقلويدات في مستخلصات (ثمار و أوراق و جذور) نبات عنب الذيب (-Solanum nigrum) .رسالة ماجستير. كلية العلوم،كلية ابن الهيثم، كلية الصيدلية، جامعة بغداد، بغداد العراق. ص 303–314

[2]: بن ساسي،ح، (2018). دراسة الفعالية البيولوجية لمستخلصات مختلفة لنتتي الرتم و الدرين. شهادة الدكتوراه علوم في الكمياء. كلية الرياضيات و علوم المادة،جامعة قاصدي مرباح–ورقلة.ص 4–9–14

[3]: العابد،إ ، (2010).دراسة الفعالية المضادة للبكتريا و المضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *(Traganum nudatum)*. شهادة الدكتوراه. كلية العلوم وعلوم المهندس،جامعة قاصدي مرباح ورقلة. ص 15–22–31–32–34

[4]:سراب، عبد الهادي لبمختار، (2008). دراسة أنتاج بعض القلويداتالمورفية من نبات الخشخاش *Papaver somniferum L*خارج الجسم. رسالة ماجستير. كلية الزراعة– جامعة بغداد.ص 18–34

[5]: بن فرج الله،السعيد،(2001). فصل و تحديد صيغة الأتروبين من نبات *Muticus Hyoscyamus* النامي بإليزي. الماجستير. المركز الجامعي بورقلة معهد العلوم الدقيقة.ص6–18

[6]: والي علوان، مد.نباتات طبية وعطرية كلية الزراعية .قسم البستنة و هندسة الحدائق. المرحلة الثالثة.

[7]: مقبول ا م، بحث أهميةالقلويدات، التأثير الفيزيولوجي للقلويدات ،كتاب النباتات الطبية. ص1–10

[8]:الأسدي،م. أساسيات النبات الطبية،أ،م،د. كلية الزراعية ، جامعة القاسم الخضراء.

[10]:عثمان الحاج، س، مصطفى حسن، م،العبدالحسين،ه، (2014). استخلاص و تعبئة المواد الفعالة من نبات الحرجل و الحنظل و الصبار و استخدامها في التداوي. قسم البيئة و الموارد الطبيعية، كلية العلوم التطبيقية ، جامعة البحر الأحمر. ص 16–17

[11] : ويكيبيديا ،2019/6/7 .

[15]:علي أشتية،م س، جاموس، ر م ،(2008).كتاب النباتات في الطب العربي الفلسطيني التقليدي.مركز أبحاث التنوع الحيوي و البيئة (بيرك) تل .نابلس فلسطين. ص 121

[24]:غيابة، ز،(2015). دراسة تحليلية للبيداتوفينولات ومكونات أخرى لبعض أصناف نخيل التمر المحلية. رسالة دكتوراه، ،مرباح قاصدي جامعة- ورقلة.ص 120-113-106-40

[25] :عباس بن مرعاش،2012 .دراسة نواتج الايض الثانوي الفلافونيديو الفعالية المضادة للاكسدة لنبتة، Convolvulus supinuseae (convolvalace) kralcoss مذكرة ماجستير، جامعة منتوري قسنطينة، ص91

[26]: مصطفى، (2014).النبات الطبية و الغذائية الصحية. دار النشر رفوف- بيروت.

[27]:بلفار،أ، (2018). *Etude du pouvoir Antioxydant, Antibactérien et Anticorrosion des extradite phénoliques da la Plante Lino niastrum)* كلية الرياضيات و علوم المادة،جامعة قاصدي مرباح ورقلة. ص 79

مراجع اللاتينية:

[9]:*MAURO,N M ,(2006).Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs :la(+) anatoxine et la (+,-) comptothécine .l 'approche ethnopharmacologique.170p*

[12]:*Fdil, R, El Hamdani, N, ElKihel, ABD, L, Khadi Sraidi, (2012). Distribution des alcaloïdes dans les parties aériennes de Retama monosperma (L.) Boiss. du Maroc. Laboratoire de Chimie Bioorganique, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Chouaib Doukkali, El Jadida, Maroc.141-139 p*

[13]:*Mahnane ,w,(2010). Appréciation de la diversité génétique du genre Rétama par les marqueurs biochimiques. de magistère. Département de biologie, Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie.14-13 p*

[16] : EL HAMROUNI.A,(2001). *Conservation des zones humides littorales et desecosystèmes côtiers du Cap-bon*. Rapport de diagnostic des sites .partie relative à la flore et la végétation .République Tunisienne .Ministère de l'environnement et de l'aménagement du territoire .agence de protection et d'aménagement du littoral.

[17]:*www.afwp.org 22/5/2019.*

[19]:*WWW tamatart.com,(2010)* .2019/4/12

[21]:*BELMOKHTAR ,Z ,2015.Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de Retama monosperma. L Boiss, intérêt pharmaceutique. Doctorat en Sciences, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.13p*

[22]:*SELAMI,N,2015Etude de Association Symbiotiques de Retama monosperma: Approches Morphologique, Anatomique et Ultra structurale, caractérisation Moléculaire des Isolats. Doctorat en Sciences. Université et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.36p.*

[23]:*Y.MOULAY.2012 Investigation phytochimique de l'Acacia arabica aux propriétés antioxydantes et inhibitrices. Mémoire de Magister. Ouargla : Université Kasdi Merbah, 5-8p,*

مراجع الانجليزية:

[14]: *HOSTETTMAN.K., O. POTERATTE et All, (1998). The potential of higer plants as a Sourse of New Drugs. Chimia International Journal for Chemistry.4p*

[18]: *MAGHRANI.M et ALL, (2004).Effect of Retama raetam on lipidmetabolism in normal and recent-onset diabetic rats. journal of Ethnopharmacologie. Volume 90, Issue 2-3, February 2004,13p*

[20]:*El-Shazlyac, A.-M. Ateya3, L. W itteb, and M. Winkc,1966.Quinolizidine Alkaloid Profiles of Retama raetam, R. sphaerocarpa and R. monosperma. D epartment of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Zagazig University, Zagazig, Egypt, Institutfür Pharm azeutische Biologie der U niversität, Im N euenheimer Feld 364p*

الفهرس

الفهـرس	الصفحة
مقدمة	
الفصل الأول **الدراسة النظرية للقلويدات**	
1- عموميات حول القلويدات	1
2- نبذة تاريخية عن القلويدات	1
3- تعريف القلويدات	1
4- طبيعتها وتواجدها	2
5- بنية القلويدات	2
6-تصنيف القلويدات واهم مظاهرها البنائية	2
6-1- قلويدات حقيقية و غير حقيقية	3
6-1- 1-القلويدات الحقيقة(Truealkloids)	3
6-1-2- القلويدات الاولية (Protoalkaloids)	3
6-1- 3-قلويدات غير حقيقية(Pseudoalkaloids)	3
6-2-مركبات حلقية غير متجانسة ومركبات حلقية متجانسة	4
6-2-1-مركبات حلقية غير متجانسة	4
6-2-2- مركبات حلقية متجانسة	6
6-2-2 -1-الامينات القلويدية	6
6-2-2-2- مشتقات النواة التروبولونية	6
7- الخواص الكيميائية والفيزيائية للقلويدات	7
7-1- ذوبانية القلويدات	7
7-1-1- في شكلها القاعدي	7
7-1-2- في شكلها الملحي	7
7-2- ترسيب القلويدات	8
7-2-1- كاشف ماير: (Mayer)	8
7-2-2-كاشف دراجندورف(Dragendorff)	8
7-2-3- كاشف بوشاردا(Bouchardat)	8
8- استخلاص القلويدات	8
8 -1-الاستخلاص بالمذيبات العضوية اللاقطبية	8
8-2-الاستخلاص بالمذيبات العضوية القطبية	9
8-3- الاستخلاص بالمحاليل الحمضية الممددة	9
I- 9- فوائد القلويدات للنبات	13
I-10 -الأهمية العلاجية للقلويدات	13

الفصل الثاني **الدراسة النظرية للنبات *Retama raetam* ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة**	
1-عموميات حول نبات*Retama*	**14**
2-تعريف ووصف نبات*Retama raetam*	**14**
3-الانتشار الجغرافي لنبات *Retama raetam*	**15**
4-استعمالاته العلاجية	**15**
5- الأهمية الاقتصادية و الصناعية لنبات *Retama raetam*	**15**
6-تصنيف نبات *Retama raetam*	**16**
7- محتوى نبات*Retama raetam* من القلويدات	**17**
7-1- قلويدات الأنواع الثلاثة لنبات *Retama*	**18**
7-2- بنية قلويدات نبات *Retama raetam*	**18**
8-فعالية مضادات الأكسدة	**20**
8-1- تعريف مضادات الأكسدة	**20**
8-2-تقييم الفاعلية المضادة للأكسدة	**20**
9- الجذور الحرة	**20**
9-1-مصادر الجذور الحرة	**21**
الفصل الثالث: الجانب التطبيقي **الدراسة العملية**	
1- المادة النباتية	**22**
2- الحصاد	**22**
3- تجفيف أجزاء النبات	**22**
4- سحق و حفظ أجزاء النبات	**22**
5-الكشف عن القلويدات (الجذور، الثمار، الأزهار)	**23**
5-1- تحضير خلاصات الكشف	**23**
5-1-1-اختبار دراجندورف	**23**
5-1-2-اختبار بوشاردا	**24**
5-1-3- اختبار مايير	**24**
5-2 -الكشف عن المواد الفعالة	**24**
5-2- تحضير الخلاصات الكحولية للكشف عن المواد الفعالة	**24**
5-2-1-1 -الكشف عن الصابونيات	**24**
5-2-1-2-الكشف عن العفصيات	**25**
5-2-1-3-الكشف عن الفلافانويدات (اختبار شيبانا)	**25**

6- طرق تحضير الخلاصات القلويدية	25
6-1-الاستخلاص بالكحول (الطريقة 1)	25
6-1-1-عملية النقع (maceration)	25
6-1-2- عملية الترشيح	25
6-1-3- عملية الاستخلاص	26
6-1-4- حساب المردود R%	26
6-2-طريقة الاستخلاص بالماء المحمض (الطريقة 2)	27
6-2-1- عملية النقع	27
6-2-2- حساب المردود الطريقة 2	28
6-3-استخلاص باستعمال جهاز Soxhlet (الطريقة 3)	28
6-3-1-عملية النقع	28
6-3-2- حساب المردود	29
7- اختبار فاعلية مضادات الأكسدة	29
7-1-تحضير الخلاصة الكحولية الخامة	29
7-2- اختبار الأسر الجذري DPPH	30
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	
1- نتائج اختبار القلويدات	33
2- نتائج الكشف عن بعض المواد الفعالة	34
3- نتائج طرق الاستخلاص	36
4- نتائج الفعالية المضادة الأكسدة DPPH	37
الخاتمة	40

الملخص:

تضمنت هذه الدراسة الكشف الكيميائي واستخلاص القلويدات من أجزاء نبات الرتم*Retama raetam* النامي بضواحي الحجيرة – ورقلة(الجزائر) الذي يمتاز باهميتة الطبية.

أكدت نتائج الكشف الفيتو كيميائي على وجود القلويدات و بعض المواد الفعالة (العفصيات ، الصابونيات ، الفلافانويدات) في الأجزاء المتمثلة(ازهار، أغصان، ازهار مع أغصان، جذور وثمار)

تم استخلاص القلويدات باستعمال ثلاثة طرق مختلفة لكل من الأجزاء المذكور سابقا (الاستخلاص الكحول(الايثانول)، الاستخلاص بالماء المحمض و الاستخلاص بجهاز Soxhlet)، كما قدر مردود القلويدات في كل طريقة وبالنسبة لكل مستخلص كالتالي: طريقة (1)%:(0.208%،1.288%، 1.192%، 0.29 %، 0.16 %)، طريقة (2): (0.356%، 0.215%،% 1.005،0.31%، 0.176%)، طريقة (3)%:(0.23%، 1.36 %، 0.5%،0.89%،0.28%) بالنسبة لكل من مستخلصات (ازهار، أغصان، أغصان مع ازهار،جذور و ثمار)على الترتيب.

تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة لنبات *Retama raetam* باستخدام طريقة تثبيط الجذر الحر $DPPH^{\cdot}$

وذلك في مستخلص الثمار الناتج من الاستخلاص بجهاز Soxhlet و طريقة الاستخلاص بالكحول، حيث تم حساب قيمة IC_{50} لهذا المستخلص فقدرت: IC_{50}= 0.80mg/ml للمستخلص القلويدي و IC_{50}=0.03mg/ml للمستخلص الكحولي.

الكلمات المفتاحية: Retamaraetam، استخلاص القلويدات، فعالية مضادة للأكسدة، DPPH

Abstract :

This study included chemical detection and extraction of alkaloids form parts plant of (Retama raetam) the growing in the suburbs of Elhadjira- Ouargla (Algeria),which is characterized by its medical and importance

The results of the chemical veto confirmed the presence of alkaloids and some active substances (tannins, sawbones, flfafonoide) in the flowing parts (flowers, branches, flowers with branches, roots, fruits).

Alkaloids were extracted using three different methods each of the previously mentioned parts (alcohols extraction-ethanol, acidic extraction, extraction with soxhlet) the yield of alkaloids was estimated in each method and for each extract as follows : method1 (0.16%,0.29% , 1.192%,0.208%,1.288%)method2 :(0.176%,0.31%,1.005%,0.215%,0.356%), method3 % : (0.28%,0.5%,0.89%,1.36%,0.23%) for each extract (flowers , branches ,flowers with branches ,roots ,fruits)in order

Retama raetam antioxidant activity was estimated using the free root inhibitor method DPPH.

In the extract of fruits resulting form the extraction of the soxhlet and method of and the method of extracting alcohol gave ,where the value of $IC_{50}$was calculated for this abstract was estimated IC_{50}=0.80mg/ml for the extract alkaloids and IC_{50} =0.03mg/ml for the extract alcohol.

key words: Extract of alkaloids , Retama raetam, Effectiveness of antioxidant, DPPH