02/2
0026 | 2006 ماج | الو Cop5

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المركز الجامعي العربي بن مهيدي

أم البواقي

معهد علوم الطبيعة

مذكرة لنيل شهادة الماجستير

تخصص

المواد الحيوية الفعالة:المنتجات الطبيعية من أصل نباتي

دراسة بيولوجية وكيمياتية لأحد النباتات الطبية الجزائرية من نوع الخياطة *Teucrium polium* من العائلة الشفوية Labiatae

تقديم: جحيشي سماح

أعضاء المناقشة

يحي عبد الوهاب	أستاذ محاضر المركز الجامعي أم البواقي	رئيسا.
مالك رسول ياسين الحلو	أستاذ جامعة المركز الجامعي أم البواقي	مقررا.
بوزرزور أحمينة	أستاذ جامعة جامعة سطيف	ممتحنا.
أحسن بوشمة	أستاذ محاضر المركز الجامعي أم البواقي	ممتحنا.
كريبع محمد	أستاذ محاضر المركز الجامعي أم البواقي	ممتحنا.

2005-2004

الجمهـوريـة الجـزائريـة الديمقـراطيـة الشعبيـة

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المركز الجامعي العربي بن مهيدي

أم البواقـي

معهـد علـوم الطبيعـة

مذكرة لنيل شهادة المـاجستير

تخصص

المواد الحيوية الفعالة:المنتجات الطبيعية من أصل نباتي

دراسة بيولوجية وكيميائية لأحد النباتات الطبية الجزائرية من نوع الخياطة *Teucrium polium* من العائلة الشفوية Labiatae

تقـديم: جحيشي سماح

أعضاء المناقشة

يحي عبد الوهاب	أستاذ محاضر	المركز الجامعي أم البواقي	رئيسا.
مالك رسول ياسين الحلو	أستاذ جامعة	المركز الجامعي أم البواقي	مقررا.
بوزرزور أحمنة	أستاذ جامعة	جامعة سطيف	ممتحنا.
أحسن بوشمة	أستاذ محاضر	المركز الجامعي أم البواقي	ممتحنا.
كريبع محمد	أستاذ محاضر	المركز الجامعي أم البواقي	ممتحنا.

2005-2004

الفهرس

المقدمة 01

الفصل الأول :الوصف النباتي

03

I-الوصف النباتي

I-1-الصفات العامة للعائلة الشفوية 03

I-2-التصنيف والوصف النباتي لنبتة *Teucrium polium* 04

I-3-المنتجات الطبيعية لنبات *Teucrium polium* 06

I-4-الاستعمال الطبي لنبتة *Teucrium polium* 06

الفصل الثاني: الغليكوزيدات

11

I-مقدمة عن الغليكوزيدات

I-1-التخليق والهدم 11

I-2-الخواص العامة للغليكوزيدات 12

II-تصنيف الغليكوزيدات 13

II-1- الغليكوزيدات السيانيدية 14

II-2-الغليكوزيدات الكبريتية 15

II-3- الغليكوزيدات الستيرويدية 15

II-4- الغليكوزيدات الصابونينية 16

II-5- الغليكوزيدات الفينولية 17

II-5-1-غليكوزيدات الفينولات البسيطة 17

II-5-2-غليكوزيدات الانتراسينية 17

II-5-2-غليكوزيدات الكومارينية 18

II-5-3- غليكوزيدات الفلافونية 18

III-الدور العام للغليكوزيدات والفلافونويدات 23
III-1- بالنسبة للنبات 23
III-2- الأهمية البيولوجية 24

الفصل الثالث: الوسائل والطرق

28
I-طرق استخلاص فصل وتحليل الفلافونويدات الغليكوزيدية
I-1-الطرق العامة للاستخلاص 28
I-2-كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة 28
I-3-كروماتوغرافيا العمود 28
I-4-درجة الانصهار 29
I-5-المطيافية 29
I-5-1- طيف الأشعة تحت الحمراء 29
I-5-2- طيف الاشعة فوق البنفسحية 29
I-5-3- الرنين النووي المغناطيسي 29
I-5-4- طيف الكتلة 30
I-6-اعادة البلورة 30
II-الدراسة الكيميائية للنبتة 30
II-1-جمع العينات النباتية 30
II-2-اختبارات الحصر الكيميائي 31
II-3-استخلاص الغليكوزيدات الفلافونية 35
II-4-تنقية وتحديد المركبات 36
II-4-2- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة 36
II-4-3-اعادة البلورة 36
II-4-4-درجة الانصهار 36
II-4-4- اختبار مجموعة الكربونيل 37

III-الفعالية البيولوجية للغليكوزيدات 38
III-1-الخواص العامة للسلالات البكتيرية 38
III-2-اختبار النشاط المضاد للبكتيريا 40
III-2-1-عزل وتحديد السلالات البكتيرية 40
أ- دراسة الخواص المجهرية 40
ب- اختبار الخواص البيوكيميائية 41
III-2-2-طريقة الانتشار في وسط مغذي 44

الفصل الرابع : النتائج والمناقشة

47
I-1- الدراسة الكيميائية
I-1-1-الحصر الكيميائي 47
I -1-2-الاستخلاص والعزل 48
II-2- الدراسة البيولوجية 57
II-2-1-عزل وتحديد السلالات البكتيرية 57
أ-دراسة الخواص المجهرية للبكتيريا 57
ب-اختبار الخواص البيوكيميائية للبكتيريا 57
II-2-2- نتائج الانتشار في وسط مغذ 58
الاستنتاج 65
قائمة المراجع 67
الملحق 79

الملخص

شـــكر و تقـــدير

الحمد لله رب العالمين و الصلاة والسلام على سيد الخلق أجمعين .

بداية أتوجه بجزيل الشكر و فائق الاحترام إلى من شرفني أن يكون أستاذي قبل أن يكون مؤطرا لي ،الذي كان معي نعم المرشد والناصح و الأستاذ ،ولم يبخل لا بوقته ولا بجهده لمساعدتي للوصول إلى بر الأمان .

أستاذي الفاضل و الأفضل: مالك رسول ياسين الحلو.

كما أشكر الأساتذة المحترمين الأستاذ يحي عبد الوهاب، الأستاذ بوشمة أحسن و الأستاذ كريبع محمد و الأستاذ بوزرزور أحمينة على كرمهم وقبول مناقشة هذا العمل.

أشكر كل عمال مخبر الميكروبيولوجيا بمستشفى بريكة وعلى رأسهم سعيدي السعيد على كل المساعدات المقدمة لانجاز اختبار الفعالية البيولوجية.

كما لايفوتني أن أشكر الأساتذة الكرام أعضاء مخبر:

Les resources naturelles et amenagement des milieux sensibles (RNAMS)

خاصة الأساتذة: مالك رسول، تامرابط ، خياري ، كريبع على المساعدة .

كما أتوجه بالشكر إلى عمال مخبر البيولوجيا و الكيمياء .

و الشكر الجزيل إلى الآنسة بركاني فوزية على المساعدة القيمة.

وأخيرا أشكر كل من ساعدني من قريب أو من بعيد .

المقدمة

المقدمة

رغم النجاحات و التطورات الكبيرة في مجال إنتاج الأدوية الكيميائية, إلا أن هذا لا يمنع خلوها من التأثيرات السلبية الضارة, لذلك فليس من الغريب أن يعود الإنسان من حيث بدأ أول مرة إلى الطبيعة ليتداوى بنباتاتها التي كان استعمالها قديما دون أي تفسير علمي؛ لكن العودة هذه المرة كانت على أسس علمية, فقد أثبت العلم أن المواد الكيميائية الطبيعية –المتواجدة في النبات بكميات قليلة–والتي تعزى إليها الخاصية الطبية, أكثر أمانا من مثيلاتها المخلقة كيميائيا.فحديثا أصبحت مختلف المواد الصيدلانية من أصل نباتي.

الغليكوزيدات الفلافونية إحدى هذه المنتجات الطبيعية المميزة لمختلف أفراد العائلة الشفوية, والمسؤولة عن عدد من التأثيرات الطبية, حيث تتميز بقدرتها على تقوية الأوعية الدموية, تثبيط بعض الإنزيمات, إضافة إلى نشاطها المضاد للأكسدة و الميكروبات؛ وتعتبر نبتة*Teucrium polium* من بين الأنواع النباتية المنتمية لهذه العائلة والتي يمكنها إنتاج مختلف مركبات الأيض الثانوي, و قد اعتمدت مجمل الدراسات على الاستعمال الشعبي لهذه النبتة التي يفيد مغلى ومستحلب المجموع الخضري في مداواة المعدة, الحمى, البرد, المرارة والسكري, أما المسحوق فيساعد على التئام الجروح وتطهيرها؛ لذلك كان لا بد من خلق نوع من التعاون بين الكيمياء و البيولوجيا لاستخلاص ,عزل وتحديد أنواع المركبات المسؤولة عن هذه التأثيرات واختبار فعاليتها الطبية , الشيء الذي شجعنا على محاولة دراسة هذه النبتة و تحديدا *Teucrium polium ssp capitatum* من الجانبين الكيميائي و البيولوجي.

وقد تركز عملنا على استخلاص, عزل الغليكوزيدات الفلافونية اعتمادا على الطرق الكيميائية من ثلاث عينات لنبتة *Teucrium polium ssp capitatum* و اختبار فعاليتها المضادة للبكتيريا.

و يقسم هذا العمل إلى 04 فصول :

❖ الفصل الأول :يتضمن تعريفا لنبتة*Teucrium polium ssp capitatum* موضوع الدراسة, مركبات الأيض الثانوي التي تنتجها إلى جانب خواصها الطبية.

❖ الفصل الثاني : يشمل عموميات عن الغليكوزيدات.

❖ الفصل الثالث : يتمثل في الجزء العملي والذي يتطرق إلى :

-الدراسة الكيميائية للمجموع الهوائي للنبتة (الحصر الكيميائي لمركبات الأيض الثانوي و استخلاص الغليكوزيدات).

-الدراسة البيولوجية المتمثلة في اختبار الفعالية المضادة للبكتيريا للمركبات المعزولة.

❖ الفصل الرابع :يشمل النتائج والمناقشة.

الفصل الأول

الوصف النباتي

I- الوصف النباتي:

I-1- الصفات العامة للعائلة الشفوية:

العائلة الشفوية (Lamiales نسبة إلى الجنس *Lamium*)، من الفصائل النباتية الضخمة، عبارة عن نباتات عشبية معمرة أو حولية و نادرا ما تكون شجيرات، تضم 200 جنس و 3200 نوع، و من هذه الأجناس، *Organum, Thymus, Lavandula, Teucrium, Mentha, Lamium* المنتشرة في أنحاء العالم، و إن كانت أكثر انتشارا في حوض البحر المتوسط، و نادرة التواجد في المناطق القطبية و الجبال المرتفعة (Guinard, 1983).

تعتبر Lamiaceae عائلة متجانسة، حيث يمكن التعرف على أفرادها بسهولة، و التي تتميز بأوراقها، المتوضعة على ساق قائمة، بصورة متقابلة و متعامدة، نصلها بسيط كما يمكن أن يكون مفصصا، و في بعض الأحيان يلتف إلى الداخل. النورة عنقودية أو سنبلية، الزهرة خنثى، يكون الكأس مكون من 05 سبلات ملتحمة و مستديمة، تأخذ الشكل الأنبوبي، الشفوي أو المسنن، أما التويج فيضم 05 بتلات ملتحمة على شكل شفتين واضحتين تختلفان من حيث عدد البتلات، و غالبا تتركب الشفة العليا من بتلتين ملتحمتين، و السفلى من 03 بتلات، الطلع مكون من سدا تين قصيرتين و أخريين طويلتين، و أحيانا يتكون من سداتين فقط و الميسم مكون من فصين، أما الثمرة فمنشقة، تتكون من أربع بنيدقات، تمثل كل منها أحد أنصاف غرفة المبيض، و يحيط بالثمرة الكأس المستديم. (فوزي، 1994).

العائلة الشفوية واحدة من الفصائل النباتية الغنية بالأنواع ذات الخاصية الطبية، و تعرف أفراد هذه العائلة من الناحية الكيميائية باحتوائها على الزيوت الأساسية، ومن هذه النباتات: *Ajuga orientalis, Teucrium multicaule, Teucrium polium, Mellissa officinalis ssp inodora* (Kocobas et karman, 2001) ، كما تنتج أنواع Lamiales كميات معتبرة من الفلافونويدات الحرة و غليكوزيداتها ذات النشاط البيولوجي الهام مثل فعاليتها المضادة للأكسدة.

و عليه فإن وجود مركبات الأيض الثاني (الفلافونويدات، الغليكوزيدات، التربينات...) في نباتات العائلة الشفوية (Lamiaceae) جعلها تأخذ أهمية طبية مثل نبتة *Ajuga iva* المستعملة في طرد الديدان البطنية، كما تتميز بتأثيرها الفعال على المرحلة اليرقية لأنواع *Spodoptera fragiperda*، *Spodoptera littoralis*، في حين يملك نوع *Teucrium polium* الخاصية المضادة للميكروبات، الالتهابات، ارتفاع السكري (Francisco et Barberan 1993 ; Bondi et al., 2000).

I-2- التصنيف و الوصف النباتي لنوع *Teucrium polium*:

الجنس *Teucrium* (Lamiaceae) من الأجناس النباتية المنتشرة في العالم، و بالخصوص مناطق حوض البحر المتوسط، شمال إفريقيا، و التي تشترك في تواجدها كل من إيران-تركيا و الجزائر- المغرب (kocobas et Karaman, 2001 ; Merzouki et Ed-derfoufi, 2000).

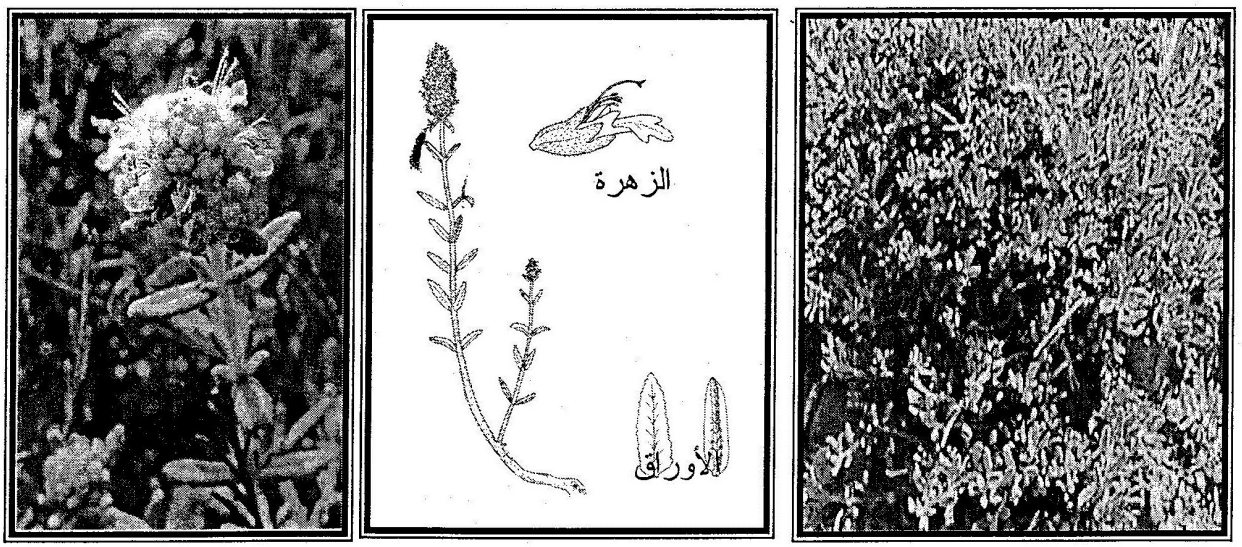
و في الجزائر يوجد 20 نوعا من جنس *Teucrium* أغلبها منتشرة في منطقة التل، و من هذه الأنواع *T.mauritanum.,T.boxifolium,T.chamaedrys. T.montanum, ,T. flavium* والنوع *Teucrium polium* الذي أختير في دراستنا (Ozenda, 1977).

- الموقع التصنيفي للنبات
- الاسم الشائع للنبات:خياطة الجراح
  - الشعبة مغلفات البذور .Angeospermes
  - الطائفة ثنائيات الفلقة Dicotylédones
  - الرتبة أنبوبيات الأزهار Tubiflores
  - العائلة الشفوية Lamiales
  - الجنس *Teucrium*
  - النوع *polium*
  - تحت النوع *capitatum*. (INA, EL-HARACH, Algeria AC-AG6)

Teucrium polium نبات معمر صغير، طوله 30 سم، كثير التفرع، السيقان قائمة أو شبه زاحفة، اسطوانية، بيضاء مصفرة، تحمل شعيرات ناعمة دقيقة، الأوراق بيضوية متطاولة، خضراء باهتة أو مبيضة، تحمل شعيرات كثيفة، غالبا ما تلتف حواف الأوراق على الوجه السفلي، كما أن هذه الحواف مسننة بأسنان مستديرة. الأزهار متجمعة في نورة نهائية، الكأس أخضر مبيض، يشبه الأوراق ينتهي بخمسة (05) أسنان، التويج أبيض مصفر أو مائل نوعا ما إلى الوردي، و ينتهي بشفة واحدة كبيرة مفصصة، الأسدية أطول من الكأس و تخرج هي و الميسم إلى الخارج.

يزدهر هذا النبات في الربيع، عندما يميل الجو إلى الدفء، و ينمو في المناطق المشمسة التلية و الجبلية قليلة الارتفاع، يتم الإزهار في مارس و أفريل أما في الشتاء فيكون نمو هذا النبات محدودا جدا. ينتشر هذه النبات خاصة تحت النوع:

Thymoides (pomol) Batt في الهضاب العليا، الأوراس و حتى الأطلس الصحراوي، هذا و توجد تحت أنواع أخرى مثل *helichrysoides marie* في الصحراء (Ozenda 1977; Quezel et Santa, 1963).



نبتة *Teucrium polium ssp capitatum*

I-3- المنتجات الطبيعية لنبات *Teucrium*:

تعد *Teucrium polium* و الأنواع المقاربة لها من النباتات العطرية، وقد أظهرت الدراسة الكيميائية لهذا النبات احتوائه على مركبات الأيض الثاني التي تم التعرف على عدد كبير منها في مختلف أنواع هذا النبات، فالغليكوزيدات الفلافونويدية واحدة من أهم هذه المركبات المميزة لأنواع *Teucrium* مثل Lavandulifoloside, Poliumoside المعزولة من *Teucrium polium ssp. aurasianum* (Ladjel et al., 1997). كما أن نبات *Teucrium* أغنى المصادر بـ: neoclerodanes، حيث تم عزل أكثر من 200 مركب من الجزء الهوائي لحوالي 80 نوع أو تحت نوع لهذا الجنس، فانطلاقا من المجموع الهوائي لنوع *Teucrium maghribinum* . أمكن تحديد بنية 8 أنواع من neoclerodanes مثل 12-epi-teucjaponinA, nontanum D, Teucjaponin A (Piozzi et al., 2000,2001).

أما النوع *Teucrium polium ssp aurasiaunun* فقد عزل منه 05 أنواع من neoclerodanes diterpenoides مثل Teumicoropodine (Ladjel et al., 1994). وإلى جانب الفلافونويدات والتربينات، فإن أنواع *Teucrium* تحتوي أيضا على الستيرويدات، الإيريويدويد و Crosiol (Shakhanbeh et Atrouse, 2001).

I-4- الاستعمال الطبي لنبتة *Teucrium polium*:

تتميز *T. polium* باستعمالها الواسع في الطب الشعبي، نظرا لخواصها الطبية. ففي آسيا، أجرى كل من Erol و Tuzlaei بجامعة مرمرة (تركيا) عام 1998، دراسة حول النباتات الطبية المتداولة في إحدى المناطق التركية، التي أظهرت أن عددا من الأنواع النباتية مثل *Teucrium polium, Teucrium chamaedrys, Quercus coccifera, Pinus nigra*، تشترك في توزعها و استعمالها بين تركيا، إيران و حوض البحر المتوسط. فمثلا يفيد أكل أوراق نبات *T. chamaedrys* في تسكين مختلف الآلام و في علاج المعدة . كما أن الاستعمال الداخلي لمستحلب الجزء الهوائي لنبتة *Teucrium polium* يفيد في آلام الرأس، و يكون للمغلى المائي لهذا الجزء مع مسحوق الصنوبر تأثير المسكن، علاج المعدة يكون سواء بأكل أوراق نبتة *Teucrium polium* أو

بشرب مستحلب الأوراق الطازجة، الذي يمكن أن يشرب بعد الأكل لعلاج القصور الشرياني. كما يشرب مغلى الأوراق باردا مرة واحدة في اليوم بعد الأكل لعلاج البرد، و السكري، أما مسحوق الأوراق فيخلط مع صفار البيض ليستعمل خارجيا في طرد الريح. أما في إفريقيا و تحديدا في حوض البحر المتوسط فقد أظهرت دراسة Merzouki و آخرين 1998 على إحدى المناطق بالمغرب أن نبتة *Teucrium polium* من الأنواع النباتية المتداولة الاستعمال, حيث يستخدم سكان المنطقة الجزء الهوائي منها بصورة مغلى لمداواة آلام الرأس، و الضغط الدموي. و في تونس، الجزائر تعد هذه النبتة من الأنواع النباتية المنتشرة في هذا الإقليم و المستعملة في الاستطباب الشعبي، حيث يمكن شرب مستحلب النبتة 03 مرات في اليوم لعلاج آلام المعدة، الأمعاء و التهابها، الحمى، احتقان المرارة، النبتة ككل مصفية للدم، مطهرة مضادة للمكروبات و قابضة، أما مسحوق الأوراق الجافة فيستخدم في إيقاف النزيف و التئام الجروح و اختفاء أثارها و علاج السكري(Piozzi et al., 1999[a, b] ,2000; Maatoug).

كما تتميز *T. polium* و أنواع أخرى من نفس الجنس *(T. oliverianum, T. mascatense)* بخواصها المضادة للالتهابات، القرحة، التشنجات (Khleifat et al., 2002).

أما في أوروبا فتستخدم أنواع *Teucrium* في التخسيس، و ذلك بشرب شاي النبتة، كما تصنع كبسولات من مسحوق المجموع الهوائي لنوع *Teucrium chamaedrys* وتستخدم لذات الغرض (Vessal et al., 2001).

و مجمل الأبحاث المتعلقة بالنوع *Teucrium polium* توجهت إلى دراسة خواصها العلاجية من الناحية العلمية، فقد أوضح اختبار فعالية نبتة *Teucrium polium* (منطقة كيرامن إيران) على نسبة السكر و علاقته بالتسمم الكبدي أن المستخلص المائي للمجموع الهوائي لهذه النبتة ذو تأثير إيجابي بانخفاض نسبة السكر في الدم بصورة ملحوظة و ذلك عند الفئران التي تعاني من ارتفاع السكر نتيجة حقن 40 ملغ/كلغ وزن الفرد من مادة Streptozocine.

أما الدراسة النسيجية لمقطع في الكبد بينت تضررها بحدوث استسقاء السيتوبلازم الذي مس ثلثي الكبد، مع ظهور ثقوب منتشرة في هذه المنطقة. هذه الأعراض الضارة ظهرت أيضا عند الإنسان. (Vessal et al., 2001 ;A-Ansari et al.,2000)، و في تجربة أخرى تهدف إلى معرفة ميكانيزم الفعالية المخفضة للسكر لمستخلص المجموع الهوائي لنبتة *T. polium* في طور الإزهار و تأثيره على الخلايا البنكرياسية و نشاط إنزيمات Hexokinase, glucokinases الكبدية, تم التوصل فيها إلى أن المستخلص له تأثير مخفض للسكر عند الفئران نتيجة لزيادة في عدد الخلايا β بجزر لنجرهانس المسؤولة عن إفراز الأنسولين المخفض للسكر و ذلك بملاحظة مقاطع نسيجية في البنكرياس، كما يصاحب هذا التغيير في بنية البنكرياس عند الفئران المعاملة بالمستخلص النباتي بزيادة في نشاط الإنزيمات في الكبد (hexokinase, glucokinase، الإنزيمات المحفزة لإفراز الأنسولين)(Vessal et al. ,2003).

الحقن الموضعي لمستخلص *T. polium* في عصب الفخذ عند الفئران يثبط انتقال السيالة العصبية فيه، كما أن هذا المستخلص يملك خاصية مضادة للالتهابات الجلدية عند هذه الفئران (Shakhanbeh et Atrouse, 2001).في حين لا يكون لمستخلص هذه النبتة أي تأثير على مختلف خلايا الدم و مكوناته الكيميائية غير أن الاستعمال المطول لهذا النبات يسبب زيادة في نسبة اليوريا و الكولسترول في الدم مع تضرر الكبد و الكلى(Khleifat et al., 2002).

يعود التأثير المخفض للسكر في الدم لنبتة *T. polium* إلى محتواها من الفلافونويدات، حيث أن هذه المركبات و خاصة Quercetine تحفز تكوين خلايا جديدة في جزر لنجرهانس و تحديدا الخلايا β، إفراز الأنسولين، أو أنها تملك خواصا مماثلة لهذا الهرمون، في حين يرجع التأثير الضار على الكبد إلى وجود neoclerodanes diterpenoides في النبتة لذلك يجب أن يكون استعمال هذه النبتة تحت مراقبة طبية (Esmaili et Yazdanparast, 2004 ;Vessal et al., 2003).

هذا و تتميز مستخلصات نبتة *T. polium* بخواص بيولوجية أخرى مثل:

فعاليتها المضادة للأكسدة (مسك الجذور البيروكسيدية، الهيدروجين بيرو كسيد...) إضافة إلى الخاصية المضادة للميكروبات و ذلك من خلال نتائج التجارب المجراة *invitro* على عدد من هذه الأحياء الدقيقة مثل الفطريات(*Aspergillus condidus*) (Sharifian et al., 2004).

الفصل الثاني

الفليكوزيدات

I- مـــقدمـــة:

تعرف الغليكوزيدات بالسكريات غير المتجانسة، و تنتج من ارتباط جزيئة سكرية مع مركب غير سكري يعرف بالجنين أو aglycone، و تشكل مع القلويدات مركبات الأيض الثانـــوي التي عرفت منـــذ القـــدم، و تعتبـــر المواد الفعالة عند الكثير من النباتات، فمثلا عزل salicine من قلف الصفصاف Salix alba عام 1830 (Guignard,1979). تنتشر هذه المركبات بصورة كبيرة في الطبيعة حيث تتواجد عند معظم النباتات الراقية و حتى النباتات الدنيا، كما تحتوي جميع الأعضاء النباتية على الغليكوزيدات، التي تخزن على مستوى الفجوات الخلوية، و في بعض الحالات تتركز في خلايا معينة (هيكل1981; Balbaa,et al, 1981.).

يأتي التنوع الكبير للسكريات غير المتجانسة من طبيعة الرابطة بين الجنين و السكر أو السكريات التي تكون من نوع:

- O غليكوزيد: $-O\boxed{H \quad H-O}-C_6H_{11}O_5 \longrightarrow O-C_6H_{11}O_5 + H_2O$
- S غليكوزيد: $-S\boxed{-H \quad H-O}-C_6H_{11}O_5 \longrightarrow S-C_6H_{11}O_5 + H_2O$
- C غليكوزيد: $-C\boxed{-H \quad H-O}-C_6H_{11}O_5 \longrightarrow C-C_6H_{11}O_5 + H_2O$
- N غليكوزيد: $-C\boxed{-H \quad H-O}-C_6H_{11}O_5 \longrightarrow N-C_6H_{11}O_5 + H_2O$

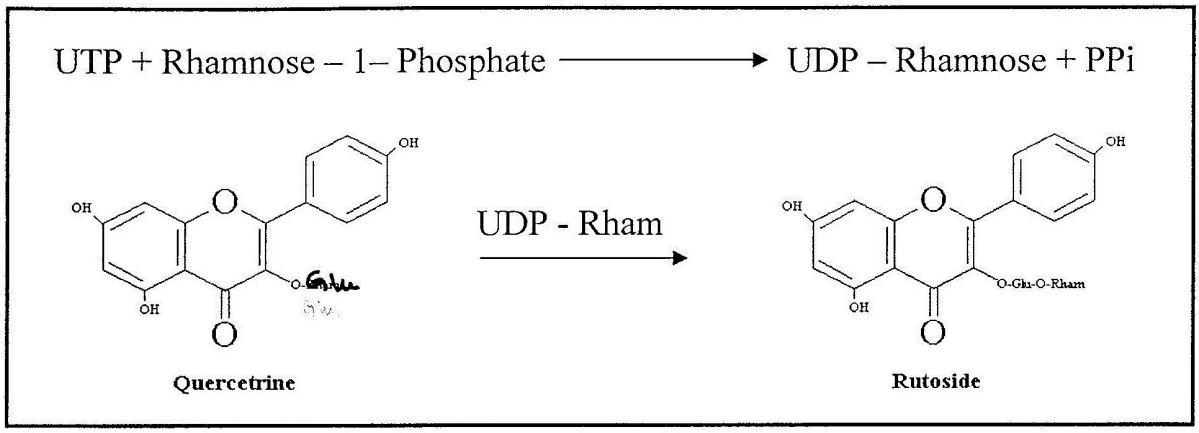
كما تشترك طبيعة الجزء الكربوهيدراتي للغليكوزيدات في هذا التنوع، فهي من نوع β و تتمثل عموما في سكريات سداسية، D-glucose، D-Fructose،....، خماسية: Rhamnose, D-arabinose، أحماض اليورونيك، و يزداد هذا التنوع البنيوي في حالة السكريات الثنائية gentiobiose، الثلاثية sciltatriose (Agherib, 1980).

I-1- التخليق و الهدم:

بناء الغليكوزيدات يتم على مرحلتين، فأولا يخلق كل جزء سواء الجنين أو الكربوهيدرات لوحده، ثم تتبع بتفاعلات ربط بينها بتشكل رابطة أوزيدية بين مجموعة الهيدروكسيل الأنوميرية للسكر و النتروجين N، الكربون C، الأوكسجين O أو الكبريتS للجنين، و يكون هذا الاتحاد في موقع واحد أو مواقع مختلفة منه، إلا أن أغلبية الحالات

تكون في موضع واحد، مشكلة بذلك سلسلة طويلة متعددة السكر متفرعة أو خطية (Guignard,2000).

و الطريقة الأساسية لتكوين الغليكوزيدات عموما تكون بتحويل مجموعة اليورديل من اليوردين ثلاثي الفوسفات (UTP) إلى سكر 1- فوسفات، بتدخل إنزيم uridyl transferase، ثم تتبع بتحويل السكر من اليورديل ثنائي الفوسفات (UPD-OSE) إلى الجنين، بواسطة إنزيم glycosyl transferase (Balbaa, 1981).



من جهة أخرى تخضع هذه المعقدات إلى عملية الاماهة (كسر الروابط السكرية) و ذلك بتدخل إنزيمات خاصة، ففي الأنسجة النباتية أغلب الغليكوزيدات مرتبطة بإنزيمات تشترك في انتمائها لنفس المجموعة المتمثلة في α, β-glycosidases (Balbaa , 1981) تتميز عملية الهدم بكونها نوعية، وجزئية حيث يفصل الإنزيم الجنين عن السكر، و لا يفصل الوحدات السكرية المكونة لهذا الأخير(هيكل, 1981), و في أغلب الحالات يتركز إنزيم الهدم في خلايا تختلف عن تلك المحتوية على الغليكوزيد التابع له، لكنهما يكونان في نفس النسيج النبات (Guignard, 1985)..

I-2- الخواص العامة للغليكوزيدات:

الغليكوزيدات عموما مركبات متبلورة، عديمة اللون، غير طيارة، أغلبها مر الطعم، لا يمكنها إرجاع محلول فهلنغ إلا بعد إماهتها. يمكنها الذوبان في الماء و المحاليل الكحولية (الإيثانول-الميثانول) لوجود المجموعة القطبية التي يضيفها الجزء السكري للجنين، و تشكل مع الماء محاليل Levorotatory المتميزة بتدوير الضوء المستقطب،

(مركبات نشطة ضوئيا). بعض الأنواع الغليكوزيدية تذوب في أسيتات الإثيل، الكلوروفورم، الأستون، و عدد من الغليكوزيدات الستيرويدية يمكنها الذوبان في الأيثر مختلفة بذلك عن بقية الغليكوزيدات. (الحازمي, 1995).

يتم استخلاص الغليكوزيدات غالبا بالتسخين، باستعمال الأسيتون، أو كحول الإيثانول أو الميثانول المخفف بالماء (20-50%)، ثم يبخر المحلول الكحولي، و يخضع الراسب لسلسلة من الاستخلاصات بالمذيبات العضوية.

تتم عملية عزل، تنقية، و معرفة المركبات المستخلصة من المادة النباتية بتطبيق عدد من التقنيات التي تشمل مختلف أنواع الكروماتوغرافيا (الطبقة الرقيقة، العمود، HPLC) لعزل المركبات بصورة نقية، وتقنيات التحليل الضوئي كالأشعة تحت الحمراء IR، الأشعة فوق البنفسجية UV، الرنين المغناطيسي النووي RMN، للتعرف على المجاميع الوظيفية، الارتباطات و نوعها، لاستخلاص البنية الكيميائية للمركبات النقية المستخلصة. (Merkhem, 1982 ; Beecher, 2002). إضافة إلى تقنيات أخرى مثل، RIA (Radioimmunoassay) التي تستعمل الأجسام المضادة، يمكن استخدامها في دراسة الفلافونويدات، فقد طبق Barthe et al (1988) طريقة RIA في التقدير الكمي لمركب hesperidine في البرتقال (Robinson, 1991; Dey et Harborn ,1989).

II-تصنيف الغليكوزيدات:

نظرا للبنية المعقدة للغليكوزيدات الطبيعية، فإن هناك عدة مقاييس التي على أساسها تصنف، و تسمى هذه المنتجات و التي تكون:

1- مرتبطة بمجموعة معينة في الجزيئة مثل الغليكوزيدات السيانوفورية المحتوية على مجموعة cyanogène، أو الغليكوزيدات الراتنجية .

2- حسب الخصائص الطبية، و الأهمية الفيزيولوجية، مثل الغليكوزيدات المنشطة للقلب.

3- على أساس طبيعة الغليكوزيد:

← غليكوزيد أولي: الشكل الثابت للغليكوزيد، أين يتواجد بصورة طبيعية في النبات و لا يكون نتيجة لأي عملية إماهة.

← غليكوزيد ثانوي: ناتج عن إماهة غليكوزيدات أخرى عموما بالنشاط الإنزيمي بعد انشطار باقي سكري أو أكثر.

4- في بعض الحالات يكون التصنيف و التسمية موافقا للمصدر النباتي:

Coniferae ← Coniferine, Salix ← Salicine

5- حسب طبيعة الجزء غير السكري يمكن تقسيمها إلى مجموعتين:

← Heterosides: و تمثل السكريات غير المتجانسة التي يكون aglycone فيها مركب غير سكري مثل: digitoscine, rutine.

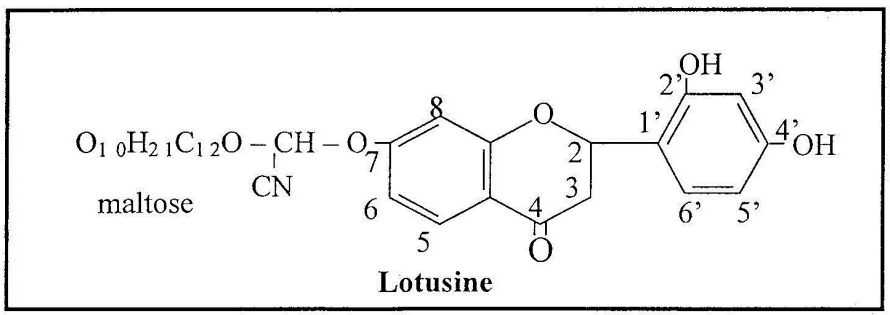
Holosides: و تشمل الغليكوزيدات ذات الجنين السكري مثل lactose (هيكل, 1983 ; Robinson,1999).

ومن ضمن الغليكوزيدات الأكثر شيوعا و التي تصنف اعتمادا على الطبيعة الكيميائية للشق غير السكري نذكر:

II-1-الغليكوزيدات السيانيدية:

وصل عدد هذه المركبات إلى 2000 مركب موزعة على مئات العائلات النباتيةمنها : Liguminosae, fabalesو Rosales، كما تلاحظ أيضا عند عدد قليل من أنواع الفطريات، و تعتبر الأحماض الأمينية البوادر الأولى التي منها تشتق الغليكوزيدات السيانيدية المحتوية على النيتروجين (Guinard, 1995 ; هيكل 1983).

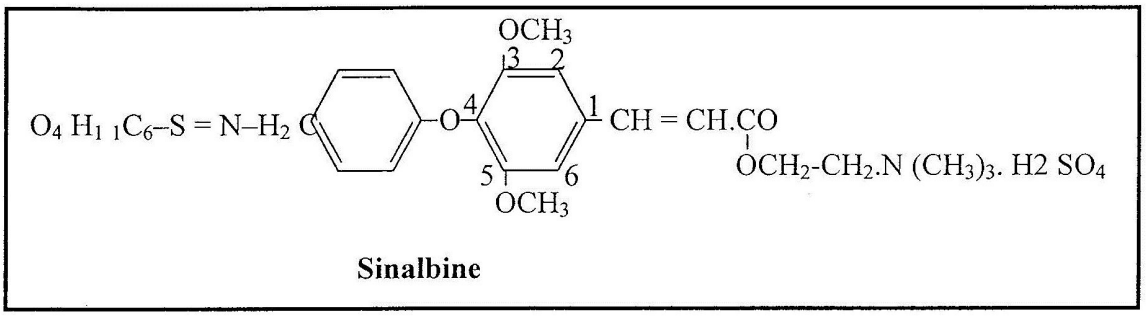
- phenyl alanine بادئ (Prunus) amygdaline.
- Tryptophane بادئ (Sorgho) dhurine.



Lotusine

II-1- الغليكوزيدات الكبريتية:

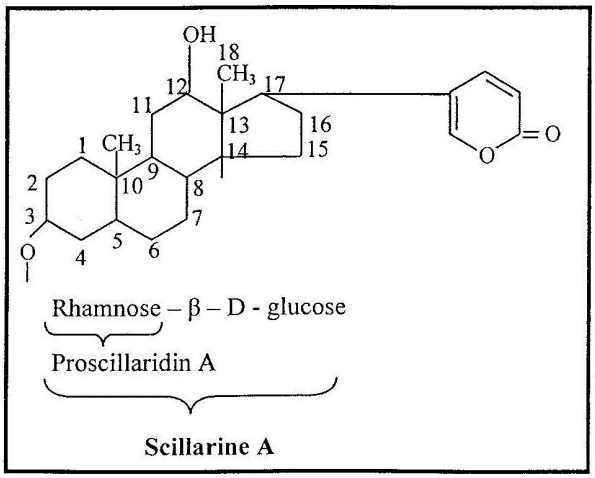
تميز هذه المركبات عددا من النباتات ذات العطور الكبريتية و من بين العائلات المحتوية عليها: Brassicacées, Résédacées, capparidacées, تعطي هذه المركبات للعديد من النباتات مثل، الفجل المذاق الحار و اللاذع نظرا لتحريرها مركبات طيارة تعرف sénévols, تشترك الغليكوزيدات الكبريتية مع نظيرتها السيانيدية في المصدر المتمثل في الأحماض الأمينية (Balbaa, 1981 ;Guignard, 2000, 1985)



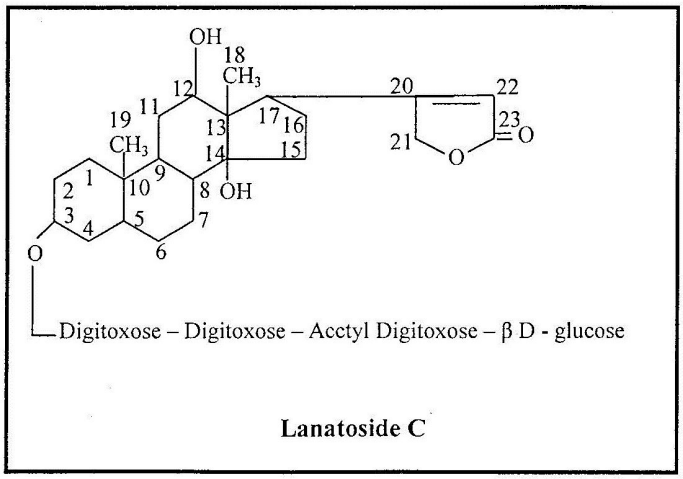
Sinalbine

II-2- الغليكوزيدات الستيرويدية:

تتواجد عند النباتات المنتمية إلى عائلات:Scrophulariaceae, Apocyanaceaeو Liliaceae (Allain, 2000).تتشابـــه هـــذه الغليكوزيدات في التركيب الكيميائي للجنين ذو النواة الستيرويدية (4حلقات مشبعة)، وتقسم الجنين حسب بنية حلقة اللاكتون إلى: Cardinolides (23 ذرة كربون) و Scilladienolides (24 ذرة كربون) و يتشكـــل الغليكـــوزيد بـــارتبـــاط هيـــدروكسيل ذرة الكـــربـــون (C_3) للنـــواة الستيـــرويديـــة مع الهيدروكسيل C_1 للجزء السكري (Balbaa, 1981 ; الحازمي, 1995).



Scillarine A



Lanatoside C

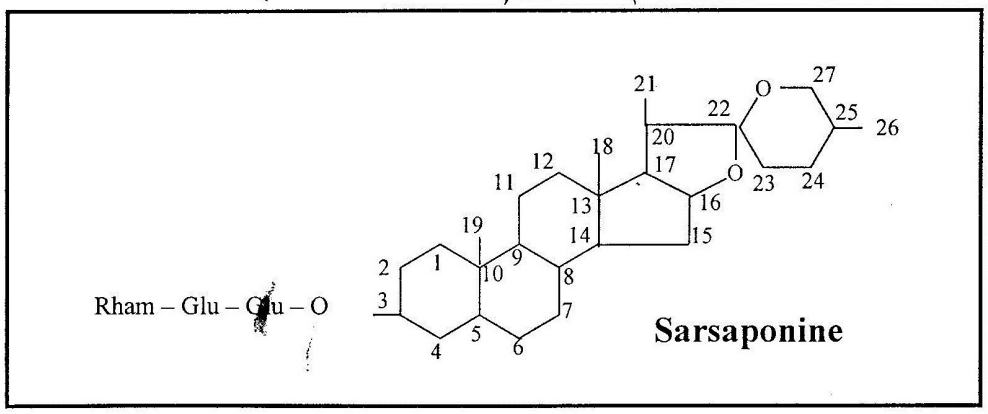
II-3- الغليكوزيدات الصابونينية:

تتميز هذه الغليكوزيدات المعقدة بخاصيتين: تكوين رغوة في المحاليل المائيةو قدرتها على إماهة كريات الدم الحمراء كما تشترك هذه المركبات مع الغليكوزيدات الستيرويدية في المنشأ الذي يكون انطلاقا من حمض الميفالونيك و وحدات إيزوبرينية لتكون sapoginine (Guignard, 1979, 2000) .

و على أساس بنية الجنين تقسم الغليكوزيدات إلى:

II-4-1 الستيرويدات الصابونينية:

تتوزع بصورة أساسية عند النباتات أحادية الفلقة و خاصة العائلات Amarylliaceae, Dioscoriceae و Liliaceae، و يكون عدد وحدات الجزء السكري فيها من وحدة إلى 5 وحدات سكرية أو حمض يورونيك, ويرتبط السكر مع هيدروكسيل ذرة الكربون رقم 3للجنين(Chandler, 1985).



II-4-2 الصابونيات ثلاثية التربين:

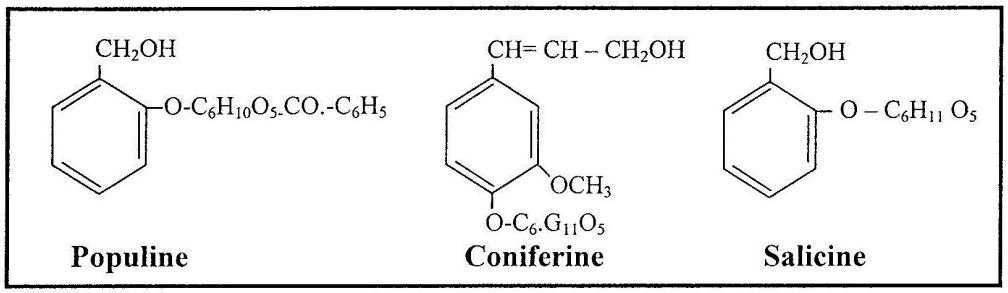
على عكس سابقتها، فإن هذه الفئة نادرة التواجد عند أحاديات الفلقة، غير أنها تنتشر عند عدد من العائلات النباتية ثنـــائية الفلقة خاصة: Caryophyllaceae Polygalaceae ، إلى جانب عائلة Zygophylaceae Papoviraceae. (Guignard, 1985; الحازمي, 1995).

II-4- الغليكوزيدات الفينولية:

تشكل الفينولات البسيطة منها و المتعددة الفينول مجموعة من المركبات الواسعة الانتشار حيث تتوزع على جميع أعضاء النبات بصورة حرة أو مرتبطة إلى جزيئات سكرية أو وحدات إيزوبرينية (Stahl, 2000).

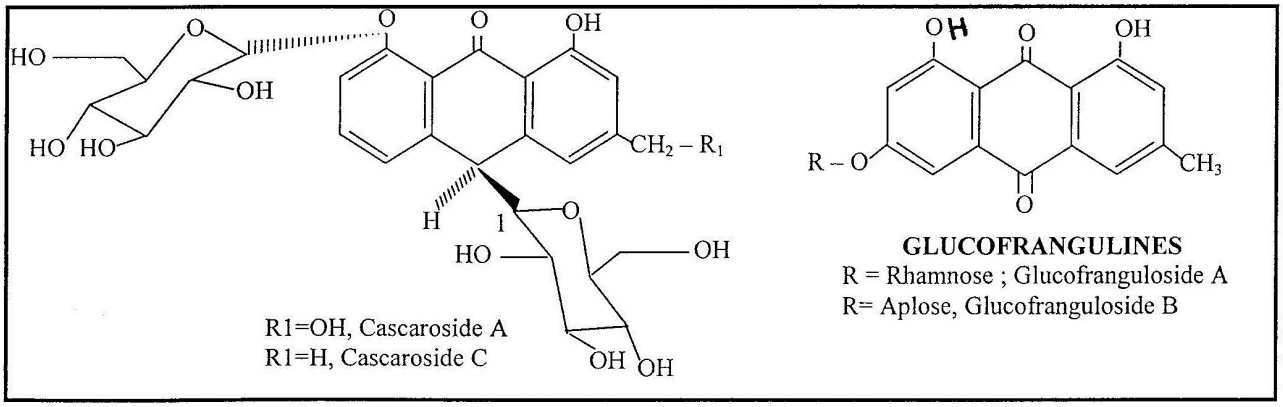
II-5-1 غليكوزيدات الفينولات البسيطة:

تتواجد عند عدد من العائلات النباتية مثل Ericacea,Rosaceae Salicaceae, وتتدخل أنواع glycoside de monolignole في تركيب الجدار الخلوي حيث تمثل بوادئ lignine مثل syringosides, coniferosides. (Gayon., 1968; Guignard,2000).



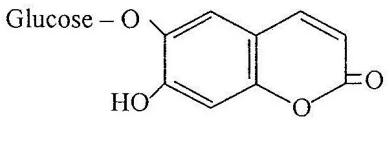
II-5-2 الغليكوزيدات الأنتراسينية (Anthracénosides):

تنتشر عند ثنائيات الفلقة مثل عائلةRubiaceae،Leguminosea، Polygonaceae و حتى عند الفطريات و الاشنات, أغلب الغليكوزيدات من النوع O- غليكوزيد (الحازمي,1995 ; Harborn, 1980).

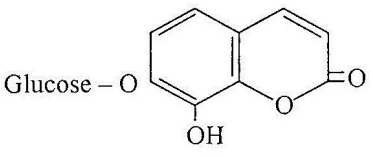


II-5-3 الغليكوزيدات الكومارينية:

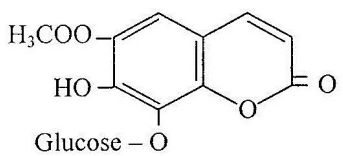
الكومارينات عبارة عن لاكتون حمض O- هيدروكسي سيناميك، معظمها يملك الاوكسجين في ذرة الكربون C7، (Mann, 1998). تتواجد الكومارينات و غليكوزيداتها في مختلف الأعضاء النباتية، كما تنتشر بكثرة في المملكة النباتية خاصة عائلة Leguninosae، Rosaceae (Robinson, 1991).



Aesculine



Daphnine



Fraxine

II-5-4 الغليكوزيدات الفلافونويدية:

تشكل الفلافونويدات مجموعة من المركبات الطبيعية النباتية، و المسؤولة على تلوين مختلف أجزاء النبات، تتكون من 15 ذرة كربون ($C_6.C_3C_6$) و تقسم إلى ما يقارب 12 نوعا مختلفا، تتمايز عن بعضها بعدد, مواضع و طبيعة الاستبدالات على الحلقتين B, A و السلسلة الوسطية(C_3) . (Mann et al., 1996)إلا أنها تشترك في المنشأ، فحسب Sirpobinson (1921) فان النواةB تأتي من أيض الاسيتات أما الحلقة A فمن الفنيل ألانين. تتواجد عموما بشكل غليكوزيدات (Haslam, 1993).

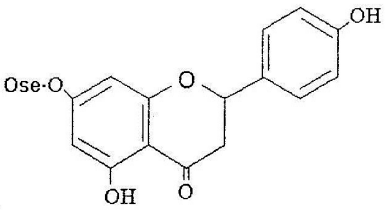
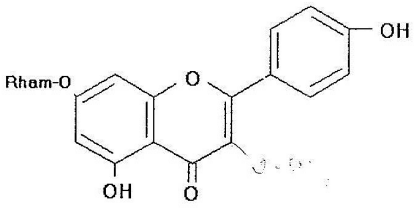
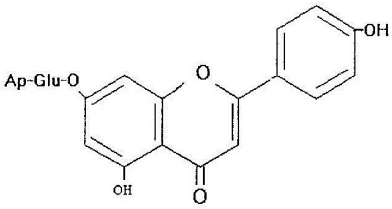
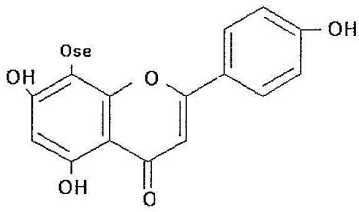
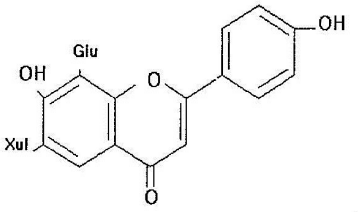
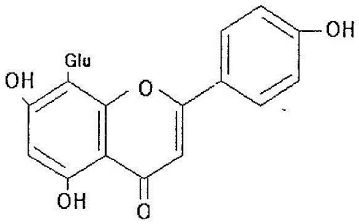
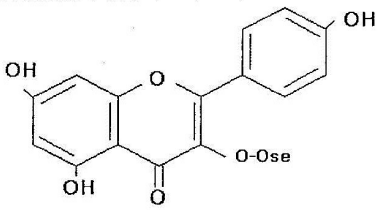
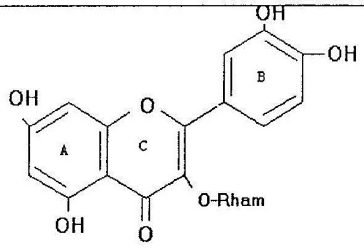
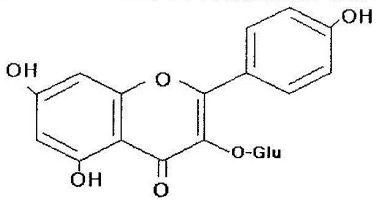
أ- الفلافون و الفلافونول:

الفلافونات و الفلافونولات و غليكوزيداتها، مركبات واسعة الانتشار في المملكة النباتية و بصورة خاصة عند النباتات ذات الصبغات الصفراء(Robinson, 1991)، و رغم غيابها عند الطحالب و الفطريات، إلا أنه وجد نوع من الفلافون C- غليكوزيد عند الطحلب الأخضر Nitella، وكلوروفلافونين عند الفطر Aspergillus candidus و بالمقابل فإن (40-50%) من الأشنات تتخصص بتكديس بعض هذه المركبات (Markham, 1989).

غليكوزيدات هذه المركبات تكون من النوعين O- غليكوزيد حيث تتشكل هذه الرابطة عموما بين هيدروكسيل ذرة الكربون الأنوميرية (C1)للسكر و الهيدروكسيل الفينولي في الكربون 7 عند الفلافون و الكربون 3 بالنسبة للفلافونول كما تتواجد أيضا بصورة C-غليكوزيد(Haslam, 1993; Brunetin, 1999).

جدول 01: بعض الغليكوزيدات الفلافونية و الفلافونولية

(Markham, 1989 in « methods in plant »)

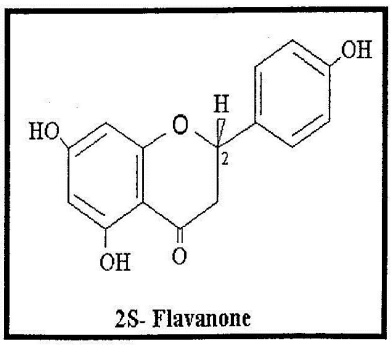
البنية العامة	الغليكوزيدات
 Flavone -O-Glu	 **Diosmine**  Apiine
 **Flavones-C glycosides**	 **Vecenine**  **Vitexine**
 **Flavonols-O glycosides**	 Quercetine  **Astragaline**
Glu : glucose, Rham : Rahmnose, Xyl : Xylose. , Ap :Apiose	

ب- الفلافانون، دي هيدروفلافونول، دي هيدروشالكون:

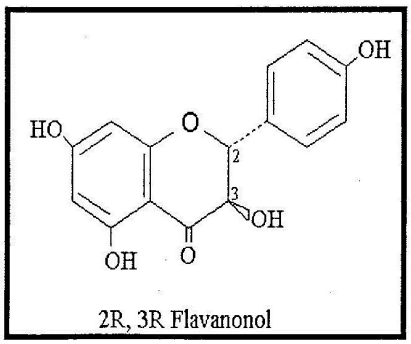
تتراكم عند النباتات الدنيا كبعض السراخس، أما عند النباتات الراقية فإلى جانب Leguminosea و Compositea اللتان تعتبران أغنى العائلات بهذه الفلافونويدات نجـد أن كل من العـائلة السذبية التي تتميز بتلات أزهارها بالمظهر الصدفـي، الشفوية و الوردية تحتوي على بنيات مختلفة من الفلافانون (Mann et al. ,1996). أما دي هيدروفلافونول فهي تميز كل من Anacardiaceae, Coniferae. و التنوع الكبير للدي هيدروشالكون يظهر عند Legumisosae، كما تتواجد أيضا عند الطحالب مثل (*Phallus impudicus*) (Gayon., 1968; Dey et Harborn, 1989).

وما يميز هذه المركبات التماكب الضوئي، حيث تعتبر ذرة الكربون C_2 مركزا كيراليا للفلافانون لتأخذ بذلك الحلقة B هيئة المتمارئين (2R) أو (2S) إلا أن هذا الفلافونويد يتواجد طبيعيا بالهيئة (2S) (Robinson, 1991;Haslam, 1993). أما الفلافانونول فيملك مركزين كيراليين C_2, C_3، و النتيجة بذلك أربع متماكبات ضوئية محتملة لهذه البنية (2R, 3R), (2R, 3S), (2S, 3R), (2S, 3S) لكنها في الصورة الطبيعية تأخذ الهيئة (2R, 3R) و تكون مجموعتي الفينول و الهيدروكسيل الوضعية trans و بالمقابل نجد أن دي هيدروشـالكون لا يـتميز بالفعـالية الضـوئيـة(Dey et Harborn, 1989).

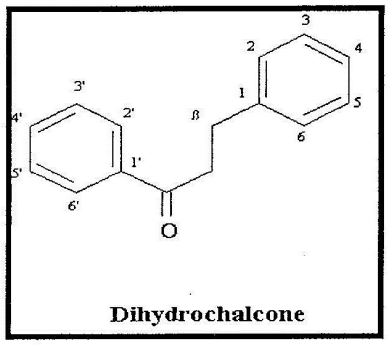
غليكوزيدات هذه المركبات من النوع (0-غليكوزيد) تختلف في مواقع ارتباط السكر مع الجنين الذي يكون مع الهيدروكسيل في الموقع C_7 عند الفلافانون، C_3 عند دي هيدروفلافونول، و $C_{2'}$ أو $C_{4'}$ بالنسبة لدي هيدروشالكون. (Mann, 1998).



2S- Flavanone



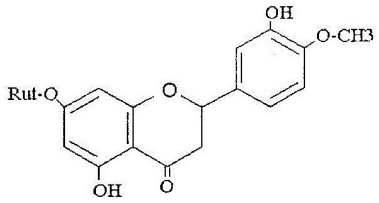
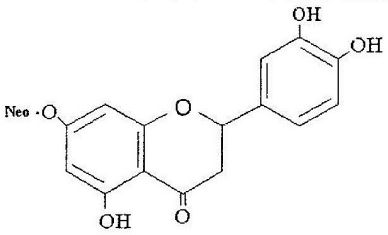
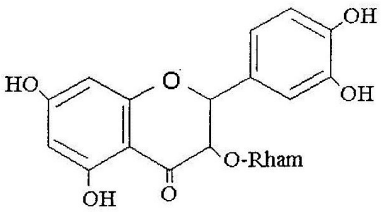
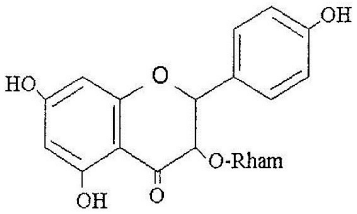
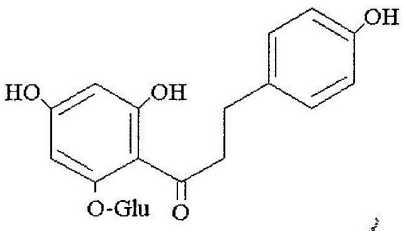
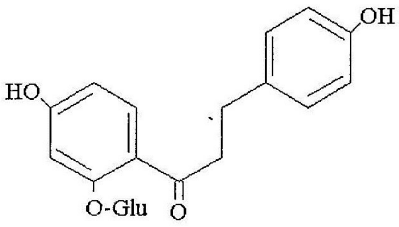
2R, 3R Flavanonol



Dihydrochalcone

جدول2 :بعض الغليكوزيدات دي هيدروفلانويدية

(Robinson,1991;Dey et Harborn, 1989)

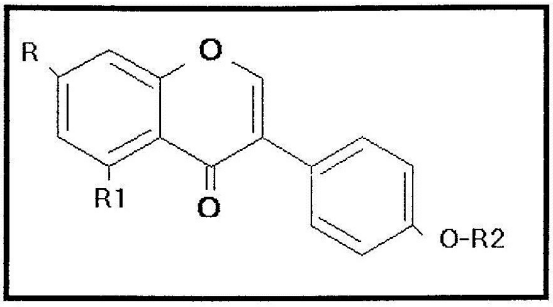
الفلافونويد	الغليكوزيد
Flavanones	 Hesperidine  Naringine
Flavanonols	 Atelbine  Engelitine
Dihydrochalcone	 Phloridzine  Davidioside
Rham :Rhamnose,Rut :Rutoside,Neo :Neohesperoside,Glu:Glucose	

ب- الايزوفلافونويد:

على خلاف بقية أنواع الفلافونويدات الأخرى، فإن توزع الأيزوفلانويدات في المملكة النباتية محدود، إلا أنها تنتشر عند عدد من العائلات منها: Rosaceae, Amaranthaceae, compositae(Williams et Harborn,1989). و رغم توزعها المحدود إلا أن هذا لا يلغي التنوع البنيوي لها و الذي وصل إلى 870 مركب (1990) مقسمة إلى 12نوع مختلف (Haslam, 1993).

و بالمقارنـــة مع التنـــوع الهائل لغليكوزيدات الفلافون و الفلافونول المعروفة فإن عدد الغليكوزيدات الإيزوفلافونويدية قليل إلى حد ما، و أغلب هذه

الغليكوزيدات من نوع 7-0 غليكوزيد إيزوفلافون، أما C-غليوكوزيد إيزوفلافون فتعتبر نادرة، لكن وجد: orobol-8-6-c-glycosides , gluisterie في قشور *Dalbergia nitudula* و daigreine-c-glycoside في نسيج كالوس نبات *Pueraria lobata* (Harborn, 1986; Bruneton, 1999; Guignard, 2000).

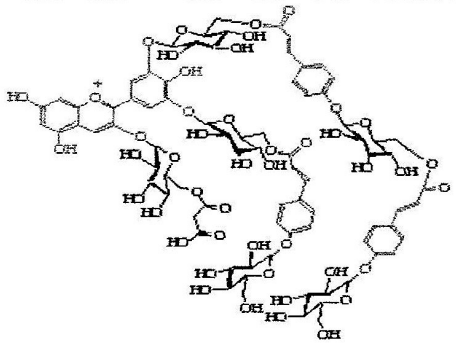


R= Glu, $R_1 = R_2 = H$	Daidzeine
R= Glu, $R_1 = OH$, $R_2 = H$	Genisteine
R= R_2 = Glu, $R_1 = H$	Daidzeine 7,4'- diglu
R= R_2 = Glu, $R_1 = OH$	Genisteine 7,4'- diglu

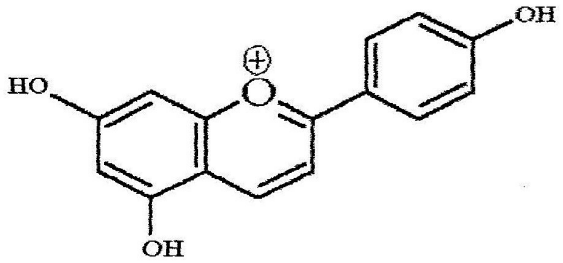
II-5-5 الأنثوسيانين:

إلى جانب الألوان الناتجة عن الكاروتينويدات و البيتالان القابلة للذوبان في الماء، فإن الأنثوسيانين تنتشر عند النباتات، و هي المسؤولة عن تلوين بتلات الأزهار و ثمار النباتات الراقية (Haslam, 2000). حيث تشكل هذه المركبات 30% من الوزن الجاف لبعض الأزهار، كما تتواجد في الأجزاء النباتية الأخرى، و يتم تكديسها على مستوى فجوات خلايا البشرة. كما يمكن أن تكون في ميزوفيل الأوراق مما يجعلها مرئية أكثر خاصة لقدرتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية (Bruniton, 1999 ; Robinson.,1999)

تكون مجموعة الهيدروكسيل في الموقع C_3 لجزيئة الأنثوسيانيدول دائما مرتبطة بجزيئة سكر مشكلة بذلك غليكوزيد انتوسيانوزيد، مع أسيلة السكريات بمجاميع الأحماض العطرية (حمض سيناميك، باراكوماريك....) مما يزيد من تعقيد البنية، فمثلا يعتبر Ternatine A_1 (أزهار Clitoria ternatea) من أعقد الأنتوسيانوزيد المعرفة من طرف Noria saito (Harborn, 1980, Robinson, 1991).



Ternatine A_1



2- فينيل بنزوبيريليوم

III- الدورالعام للغليكوزيدات و الفلافونويدات

III-1- بالنسبة للنبات:

عموما يبقى الدور الفيزيولوجي لمركبات الأيض الثانوي عند النبات غير معروف بدقة لكن هناك بعض الظواهر ساعدت على شرح الفائدة التي يجنيها النبات من هذه المنتجات.

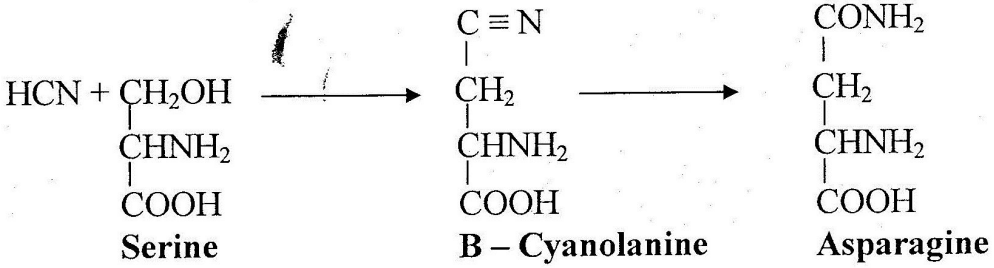
- فالصفة الملونة للفلافونويدات و قدرتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية المرئية للحشرات تعمل على جذب هذه الأخيرة إلى النبات فتنقل بذلك حبوب الطلع و تضمن حدوث الالقاح و بالتالي استمرار النوع (Guignard, 2000).
- الدفاع عن النبات ضد القوارض و الحشرات، فتواجد glycoflavanes في نسغ الأرز يقي هذه النبتة من هجوم نوع من الجراد(Niloparavata lugens) (AitMoussa, 2003)كما تحتوي بعض النباتات على نوع من المركبات التي تكون بصورة مرتبطة و غير نشطة إلا أنها تتحرر مباشرة بعد تعرض النبات لهجوم بكتيري أو فطري، و تشكل ما يعرف بـــ: phytoalaxineهذه الظاهرة تخص الغليكوزيدات السيانيدية التي تحرر Acide cyahydrique السام لعدد كبير من الفطريات (Roland, 2000).

تعتبر الغليكوزيدات الصابونينية مواد مهيجة للأغشية المخاطية للعين و الأنف، لذلك تعد مواد سامة خاصة للحيوانات ذات الدم البارد(Gayon, 1968)، كما ينتج عدد من النباتات مواد فينولية

علـــى مستـــوى الأوراق و تتنقـــل مع ميـــاه المطـــر أو علـــى مستوى الجذور مثبطة بذلك انتاش أبواغ النباتات الضارة .(Robinson, 1991)

- تؤثر على الهرمونات النباتية فمثلا يعمل Kaempferol على تنشيط Auxine oxydase أما Quercetol فيثبطه (Guignard, 1997, 1985).
- تعتبر الغليكوزيدات مركبات وسطية أثناء التخليق الحيوي للكربوهيدات في النبات، حيث تزداد نسبة الغليكوزيدات بصورة واضحة خلال نشاط التمثيل الضوئي، و تنخفض هذه النسبة خلال المساء. كما أن وجودها في البذور يمنحها خاصية المخزون الغذائي الذي يعطي البادرات الطاقة لكي تزيد من نشاطها و نموها إلى أن تصل إلى مرحلة تعتمد فيها على التربة كمصدر غذائي بعد اكتمال المجموع الجذري(هيكل1981).

كما تساهم الغليكوزيدات في أيض الأحماض الأمينية فانطلاقا من حمض Cyanohydrique ناتج إمـــاهة الغليكوزيدات السيانيدية والحمض الأميني Serine يتكون حمض أميني آخر Asparagine لتلعـــب بذلـــك دور نـــازع السمية و مصدر تخزين للآزوت (Guignard, 1979; Dey et Harborn, 1989).



II-2-الخواص البيولوجية:

تعود التأثيرات الفيزيولوجية للغليكوزيدات أساسا إلى الجنين، في حين يضمن الجزء السكري ذوبانية و استقرار الغليكوزيد.

و من أهم خواص الفلافونويدات و غليكوزيداتها، قدرتها على تقليل نفاذية الأوعية الدموية و تعزيز مقاومتها، و ذلك بتأثيرها على بناء الكولجين المكون لأغشية الأوردة الدموية، حيث تعمل الفلافونويدات على تثبيط عملية هدم هذا البروتين، و تقلل من نشاط

إنزيم Catechol-O-methyl transférase مما يزيد من كمية Catecholamine الذي يرفع من مقاومة الأوعية (Bruniton, 1999; Ait Moussa, 2003).

تعد الفلافونويدات من أهم المواد المرجعة، ذات الفعالية المضادة للأكسدة، فعند مرورها في الدم تعمل على مسك الجذور الحرة المحتوية على الأوكسجين، تثبط نشاطها، و بالتالي تحمي اللبيدات الغشائية (Aurousseau, 2002).

كما يعمل عدد من الفلافونويدات الموجودة في الغذاء مثل Quercetine, و مشتقات Kaempferol على التقليص من تخثر الصفائح الدموية.وقد أظهرت نتائج أبحاث Brodburg و White (1954)، إضافة إلى ما توصل إليه Bickoff (1968) أن Coumestrol, genisteine ، ذات خاصية إستروجينية، بتثبتها على مستقبلات هرمون الإستروجين نظرا لبنيتها المتماثلة.

كما أن الأيزوفلافونويدات لها فعالية وقائية ضد سرطانات الثدي، البروستات و القولون، إضافة إلى استعمال المستخلصات التي تحتوي على هذه المركبات كترياق مضاد لسم الأفاعي و العناكب في أمريكا الجنوبية (Robinson, 1991).

in vitro، تتميز مختلف أنواع الفلافونويدات الحرة و المرتبطة بفعلها المثبط للإنزيمات، حيث:

- تثبط إنزيم lipoxygenase 5 و/أو طريق cyclo-oxygenase في أيض حمض الأراشيدونيك، الشيء الذي يمنع تكوين Lucotriénes وسائط الالتهابات و الحساسية.
- تثبط إنزيم aldoses reductase التي تظهر عند إصابات العين بما يعرف بالماء الأبيض Cataracte (Dey et Harborn, 1989).

إن تواجد المجموعة الفينولية في الجزيئة الفلافونويدية يمنحها نشاطا مضادا للبكتيريا و الميكروبات، مثل baicalaine المضاد للفيروسات خاصة السيدا، هذا و قد استعملت الفلافونويدات النباتية في علاج الإصابات الفطرية (Ait Moussa,2003).

تعتبر معظم السكريات غير المتجانسة خاصة الأنتراكينون مواد مسهلة تستعمل عادة في حالات الإمساك، حيث تزيد من نشاط المعي و جزء من القولون، و في علاج الاكزيما،

الالتهابات الجلدية الناتجة عن الفطريات و كمواد مطهرة في الطب البيطري، في حين تعمل الغليكوزيدات الستيرويدية كمواد مطهرة للمجاري البولية، غير أن التأثير الأساسي لهذه المركبات يكمن في تنظيم ضربات القلب و انقباضات عضلاته(Allain,2000) ، و على الرغم من سمية المواد الصابونية إذا ما حقنت في الدم لأنها تزيل غشاء كريات الدم الحمراء مسببة تحللها، إلا أن الستيرويدات الصابونية تستعمل كمواد أولية في بناء هرمون الكورتيزون و عدد من الهرمونات الجنسية الأخرى. (Robinson, 1991).

الفصل الثالث

الوسائل و الطرق

I- طرق الإستخلاص، الفصل و التحليل:

I-1 الطرق العامة لاستخلاص الفلافونويدات الغليكوزيدية:

يتم استخلاص الفلافونويدات و غليكوزيداتها من المادة النباتية، بالتسخين، و ذلك باستعمال جهاز السوكسلي (soxlet)، أو النظام الراد (reflux) الذي تكون فيه المادة النباتية منقوعة مباشرة في المذيب- غالبا عبارة عن أسيتون، أو مزيج من الماء و الإيثانول أو الميثانول- و يسمح هذا النظام بحدوث التفاعل في درجة حرارة ثابتة، قريبة لدرجة غليان المذيب، الذي يكثف باصطدامه بجدار المكثف ليعود مرة أخرى للتفاعل مع المادة النباتية. (Gazengel et Orecchioni, 2001)

1-2- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM):

طريقة تحليلية مهمة في فصل الفلافونويدات، و تسمح بتحديد مكونات خليط من المركبات، و اختيار أحسن نظام فصل, كما تستعمل في مراقبة نقاوة المركبات المفصولة، لذلك تعتبر هذه الطريقة مكملة لكروماتوغرافيا العمود. و تتطلب هذه التقنية نوع من الصفائح الزجاجية أو الألمنيومية الدعامة فيها عبارة عن بولي أميد، السليس أو السليلوز. (Stahl, 1975 ; Markham, 1989)

I- 3- كروماتوغرافيا العمود:

كروماتوغرافيا العمود، تقنية تسمح بفصل، عزل و تنقية مكونات عينة يصل وزنها إلى عدد من الغرامات، و على خلاف كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، فإن صفائح الزجاج أو الألمنيوم تعوض بعمود زجاجي يحتوي على البولي أميد، السليس أو السليلوز (Chavane et al., 1991).

إضافة إلى: Gaz liquid chromoatography (GLC), High performance liquid chromrtography (HPLC) (Robinson, 1991; Dey et Harborni 1989).

I-4- درجة الإنصهار:

درجة الإنصهار، إحدى الثوابت الفيزيائية المميزة للمركبات الصلبة، و تحديدها يسمح بإعطاء فكرة عن درجة نقاوة المركب، و تعريفه، حيث أن لكل مركب درجة إنصهار معينة، و إذا كان لمركبين نفس قيمة الإنصهار فهذا لا يعني أنهما متماثلين.

و لإعطاء قيمة صحيحة لدرجة انصهار مركب ما لا بد من أن يكون المركب: نقيا، خاليا من الشوائب, جافا و صلبا(Arnaud, 1990) .

I-5- المطيافية: « Spectroscopie »

المطيافية أو التحليل الطيفي يشمل دراسة الظواهر الناتجة عن الفعل المتبادل بين المادة و الإشعاع الكهرومغناطيسي، مما يساعد على تحديد بنية مختلف المركبات.

I -5-1- طيف الأشعة تحت الحمراء « IR »:

طيف الأشعة تحت الحمراء في المجال [600-4000 سم$^{-1}$]، يعطي صورة عن مجمل المجاميع الوظيفية في المركب المدروس (N-H, C=N ,C=C ,C=O ,O-H)، حيث يسبب امتصاص المادة لطاقة هذه الأشعة إلى اهتزاز الروابط بين الذرات المكونة للمركب (Williams et Fliming, 1980).

I-5-2-طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV):

يعتبر طيف الأشعة فوق البنفسجية أحد أكثر التقنيات استعمالا في تحليل بنية الفلافونويدات و يؤخذ طيف UV لهذه المركبات في الإيثانول أو الميثانول و في وجود عدد من الكواشف مثل(أستيات الصوديوم,HCl,$AlCl_3$).

و عن طريقها يمكن تحديد عدد مواقع المجاميع الهيدروكسيلية، الجزيئات السكرية و الاستبدالات الأخرى على النواتين B, A للجزيئة الفلافونويدية. (الحازمي 1995 ; Robinson, 1991).

I-5-3- طيف الطنين المغناطيسي النووي « RMN »:

هذا النوع أيضا له أهمية في تحديد التركيب الكيميائي للفلافونويدات، حيث يسمح (RMN H, RMN ^{13}C) بتعيين:

- العدد الكلي لذرات الكربون في الجزيئة.
- عدد ذرات كربون السكر.
- الروابط O, C-غليكوزيد.(الحازمي, 1995)

I-4-5- طيف الكتلة « SM »:

إحدى التقنيات المستعملة في دراسة بنية الفلافونويدات، حيث تساعد على التأكد من بنية المركب من خلال:

- إعطاء الكتلة المولية للمادة و بالتالي الصيغة العامة.
- توزع الاستبدالات على النواتين B, A.
- طبيعة و مواقع ارتباط الجزيئات السكرية.

I-6- إعادة البلورة:

إحدى تقنيات تنقية المركبات الصلبة، و تعتمد هذه الطريقة على الاختلاف في الذوبان بين المركب المراد تنقيته و الشوائب في مذيب معين، و ذلك عن طريق التسخين باستخدام أقل كمية من المذيب تسمح بالحصول بعد التبريد على محلول مشبع بالمركب المنقى (Blanchard, 1987).

II-الدراسة الكيميائية:

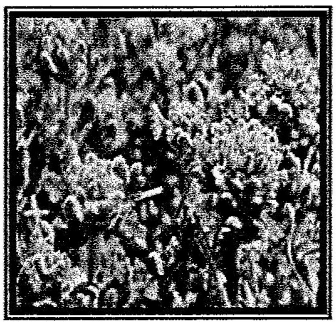
II-1- جمع العينات النباتية:

تعرف نبتة *Teucrium polium* في مدينة بريكة بالخياطة، وقد تم جمع العينات النباتية المكونة أساسا من المجموع الخضري، و ذلك خلال فترات مختلفة من عام 2003 تبعا لمراحل نمو هذا النبات، فالمرحلة الخضرية للنمو (أوراق-سيقان-و نورات خضرية) أخذت في شهر مارس، و خلال الفترة الممتدة بين شهري أفريل-ماي قطفت النبتة و هي في مرحلة الإزهار التام أين تكون النورات الزهرية متفتحة، أما المرحلة الخاصة بالنضج التام للبذور فقد حصلنا عليها مع بداية شهر جويلية لنفس السنة.

و الملاحظ أثناء جمع العينات أن هذا النوع النباتي يكون بشكل شجيرات صغيرة ذات أزهار صفراء مبيضة يتراوح ارتفاعها بين 20-35سم محبة للشمس تنمو في

التربة الصخرية للجبال قليلة الارتفاع وفي سفوحها يتميز مجموعها الجذري بوجود الأوبار الماصة على مستوى التربة السطحية في حين تلتف الجذور مشكلة جذر متخشب عديم التفرع يتراوح طوله بين 30-50سم.

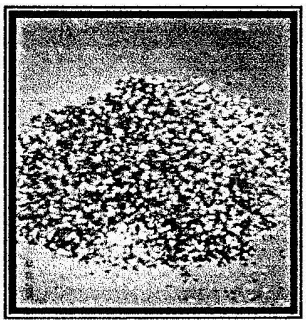
أما الأنواع النباتية التي تنمو بجوار *Teucrium polium* :الشندقورة *Ajuga iva*، المريوة *Marrubium vulgare* ، الزعيترة *Thymus serpyllum* , إكليل الجبل *Rosmarinus officinal*, الحلفة *Lavondula stoechas* , الريحان *Myrtus communis*، السدرة *Zizyphus lotus*, العرعار *Tetraclinis articulata*. هذا وتنمو نبتة *Teucrium polium* جنبا إلى جنب مع نبات الشيح *Artimisia herba alba* ويتطفل عليها نبات الهالوك.



شكل(1) المرحلة الخضرية لنبتة *Teucrium polium*

شكل(2)مرحلة الازهار لنبتة *Teucrium polium*

شكل(3) مرحلة البذورلنبتة *Teucrium polium*



بعد جمع العينات النباتية لكل مرحلة، تجفف في الظل، و تطحن لتحول بعدها إلى مسحوق يحفظ في علب، يخضع المسحوق النباتي لسلسلة من الاختبارات لغرض التعرف على المنتجات الطبيعية النشطة التي تنتجها نبتة *Teucrium polium*، و تتبع بعملية استخلاص أحد هذه المركبات.

وقد تم إجراء الجزء العملي على مستوى مخبر البيولوجيا ماجستير بالمركز الجامعي العربي بن مهيدي أم البواقي.

II-2- اختبارات الحصر الكيميائي:

مختلف هذه الاختبارات أجريت على العينات النباتية الثلاث:المرحلة الخضرية، الإزهار ، نضج البذور.

- **التنينات** « Tanins »:

ينقع 10 غرام من المسحوق النباتي في الإيثانول (50%)، بعد الترشيح، يكشف عن التنينات بإضافة قطرات من محلول كلوريد الحديد ($Fe\ Cl_3$) إلى الراشح .

=> ظهور لون أخضر يدل على وجود هذه المركبات.

- **الكردينوليدات:**
  - تفاعل killer – killiani:

- تنقع 1غ من المادة الجافة في 20 مل من الماء المقطر، ثم ترشح.

– تأخذ10مل من الراشح و يضاف لها10مل من مزيج الكلورفورم: الميثانول (1:1).

– تبخر الطبقة العضوية حتى الجفاف.

– يضاف للراسب 2مل من حمض الخل الثلجي، ثم قطرات من محلول $FeCl_3$ ليتبع مباشرة بإضافة 1 مل حمض الكبريت المركز، بحذر على جدار الأنبوب.

=> النتيجة الإيجابية تكون بظهور لون أخضر مزرق في الطبقة الحمضية.

  - تفاعل Peljet:

– يضاف إلى 1 مل من الخلاصة الكحولية 1 مل من كاشف Peljet

=> اللون البرتقالي دلالة على وجود الكردينوليدات.

- **السيترولات غير المشبعة، التربينات الثلاثية:**

– تنقع 5 غرام من المادة النباتية الجافة في الميثانول (70%).

– بعد الترشيح، و تبخير الكحول، يذاب الراسب في 20 مل من الكلوروفورم.

– يرشح، و يقسم الراشح إلى قسمين:

  - تفاعل Liberman – Bucchard:

– يضاف للجزء الأول 1 مل من حمض الخل الثلجي، يتبع بـ 1 مل من حمض الكبريت المركز بحذر على جدار الأنبوب.

=> تشكل لون أحمر بنفسجي في منطقة اتصال الطبقتين ثم يتحول إلى الأخضر.

- تفاعل Salkawski:

– يضاف للجزء الثاني حجم مساو له من حمض الكبريت.

=> ظهور لون أصفر يتحول إلى الأحمر.

- **القلويدات:**

– تستخلص 5 غ من المادة الجافة 50 مل من HCl المخفف.

– يرشح المستخلص الحمضي، و يجعل قلويا بالأمونيا.

– يستخلص بالكلوفورم ثلاث مرات.

– تجمع المستخلصات، و تبخر حتى الجفاف، الراسب يذاب في 2 مل من HCl المخفف و تضاف قطرات من كاشف ماير.

=> تشكل راسب أبيض مؤشر على وجود القلويدات (Balbaa 1981).

- **الغليكوزيدات:**

– يضاف إلى 1 مل من المسحوق النباتي، 25 مل من حمض الطرطريك 2% في الإيثانول.

– يسخن الخليط في حمام مائي تحت مكثف راد لمدة ساعتين.

– يرشح، و يغسل الراشح على ورق الترشيح عدة مرات بالإيثانول.

– يضم الراشح لبعضه في جفنه خزفية، و يبخر في حمام مائي حتى الجفاف.

– يذاب الراسب في أقل كمية ممكنة من الماء المقطر الساخن.

– يضاف إلى 2 مل من المستخلص المائي قطرات من محلول فهلنغ و يسخن في حمام مائي.

=> حدوث اختزال محلول فهلنغ يدل على وجود الغليكوزيدات.

- **الفلافونويدات:**

❖ تنقع 10غ من المادة الجافة في 150 مل من HCl (1%) ليلة كاملة ترشيح.

– يجعل 5 مل من الراشح قلويا باستعمال NH_4OH.

=> ظهور لون أصفر فاتح دلالة على وجود الفلافونويدات.

– نضيف إلى 5 مل من الراشح، 2,5 مل من الكحول الأميلي.

=> تلون الطبقة الكحولية بالأصفر دلالة على وجود الفلافونويدات الحرة.

– تبخر الطبقة المائية للاختبار السابق، يذاب الرا سب في 2 مل من HCl (1%) مع التسخين اللطيف، يبرد و تضاف له 2,5 مل من الكحول الأميلي.

=> ظهور لون أصفر، مؤشر لوجود الغليكوزيدات الفلافونويدية(Adjel,2002).

❖ تنقع 10غ من المادة النباتية في الإيثانول مع التسخين اللطيف ليلة كاملة، ترشح، و يبخر المحلول الكحولي تحت ضغط منخفض.

– الراسب يضاف له 5 مل من ماء مقطر بارد و يرشح.

– يبلل شريطين من ورق الترشيح بالمحلول الناتج و تجفف.

– يغمس أحد الشريطين في محلول كحولي من البوتاسيوم تتبع بالتجفيف.

=> ظهور لون أصفر فاقع.

–الشريط الثاني يغمس في محلول $FeCl_3$ و يجفف.

=> ظهور لون أخضر – زيتوني.

- **الصابونيات:**

– تغلى 2غ من المادة النباتية مع 86 مل من الماء الماء المقطر، يرشح و يبرد الراشح.

– يرج الراشح رجا قويا.

=> ظهور رغوة ثابتة، يدل على وجود هذه المركبات(حمية, 2003)

- **الزيوت الأساسية:**

توضع كمية من الماء المقطر في حوجلة، و يضاف لهـا مـسحوق المـادة النباتية و يتم استخلاص الزيوت الأساسية بالتبخير.

=> ظهور طبقة زيتية يدل على وجود الزيوت الطيارة. (Luccheronie, 1996)

II-3- استخلاص الغليكوزيدات:

في حوجلة (2 لتر) تنقع 250 غرام من مـسحوق نبتـة *Teucrium polium* لكـل مرحلة في 1,5 لتر من الإيثانول 98% مع التسخين بلطف مدة 20 ساعة .بعد الترشـيح عن طريق التفريغ بالهواء يبخر المحلول الكحولي تحت ضغط منخفض، حتى الحـصول على كمية من راسب أخضر (35,35 غرام، 30,06 غرام، 21,3 غرام لكل مرحلة على الترتيب).

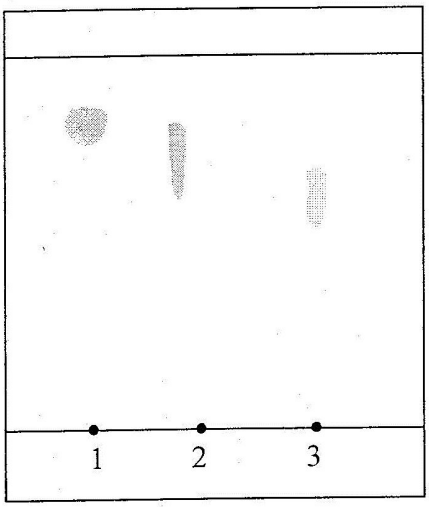
يستخلص الراسب بالكلوروفورم، الأسيتون بصورة متتالية، والبـاقي يـذاب فـي الميثانول، للحصول على محلول نهائي أخضر، يضاف له الأيثر الإثيلي، ليتشكل راسـب متبلور في كل مرحلة. بعد مدة يلاحظ ترسب مركب آخر في محلول المرحلـة الثالثـة (مرحلة البذور)(Praksh et Roa , 1999).

II-4-تنقية و تحديد المركبات:

II-4-1- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة:

لمعرفة عدد المركبات المستخلصة، تذاب كمية من كل راسب في أقـل كميـة ممكنة من الميثانول لتجري لها كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، باسـتعمال مـذيب: الميثانول: ماء (10 :2). بعد صعود المذيب مع المركبات تجفف الصفائح و تلاحظ البقع باستخدام مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV.

نتيجة الكروماتوغرافيا أظهرت وجود بقعة صفراء واحـدة لكـل عينـة, ذات معامل استبقاء مختلف.



1: الراسب الأول

2: الراسب الثاني

3: الراسب الثالث

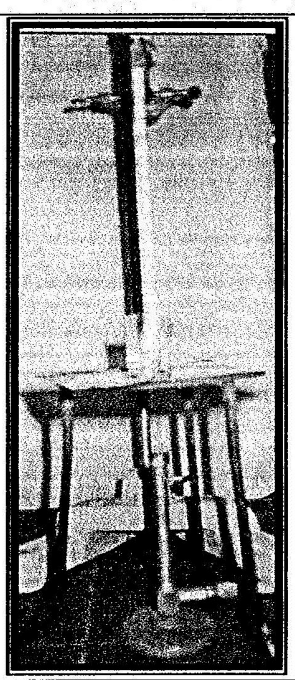
الشكل (4):كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمركبات

II-4-2- إعادة البلورة:

نظرا لعدم ذوبان المركبات المستخلصة في الإيثانول على البارد فقد تم اختياره لتنقية هذه المركبات بإتباع طريقة إعادة البلورة التي تتم بتسخين المركب في كمية من الإيثانول، ثم يرشح و تعاد بلورته بالتبريد.

II-4-3-تحديد درجة الإنصهار:

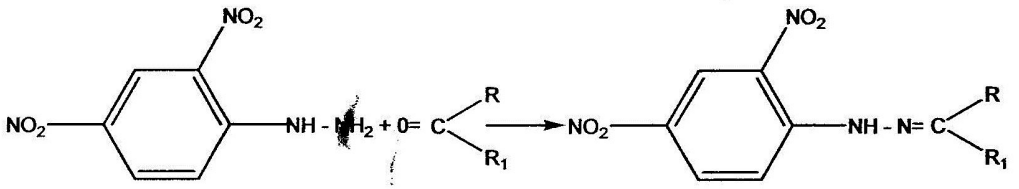
يتم تحديد هذا الثابت الفيزيائي للمركبات الثلاثة المحصل عليها، حيث نضع كمية قليلة من كل ناتج متبلور في أنبوب شعري بالناتج المتبلور، و يشد إلى محرار، و يغمس الكل في زيت الغليسيرين، و يسخن باستعمال موقد بنزن، لتقرأ درجة الحرارة عند ذوبان المركب.



الشكل(5): تركيب قياس درجة الانصهار

II-4-4-اختبار الوظيفة الكربونيلية:

يكشف عن وجود مجموعة الكربونيل في المركب بالتفعال مع 4,2 ثنائي نتروفنيل هيدرازين (2,4DNPH) .



– يذاب 0,1 غرام من 4,2 ثنائي نتروفنيل هيدرازين في 2,5 مل من الإيثانول و يضاف له 0,25 مل من حمض الكبريت المركز.

– من جهة أخرى، تذاب 0,1 غرام من الغليكوزيد في أقل كمية من الإيثانول و يضاف له المحلول السابق مع التسخين.

– يترك المحلول ليبرد مدة 10 دقائق.

– إذا لم يظهر راسب يضاف له الماء المقطر حتى يتشكل الراسب.

– يرشح، و يغسل المركب بمزيج من الماء، الميثانول (1:1) ليعاد بلورته بالإيثانول.

IV- الفعالية البيولوجية:

الأبحاث المتعلقة بدراسة الأهمية البيولوجية لنبات *Teucrium polium* تظهر أن هذه النبتة تملك خواص مضادة للبكتيريا. و لتسليط الضوء على هذه الخاصية البيولوجية للمواد المستخلصة من نبتة: *Teucium polium ssp capitatum*، اتبعنا طريقة الانتشار في وسط مغذي (باستعمال الأقراص).وقد تم إجراء هذا الاختبار على مستوى مخبر الميكروبيولوجيا ببريكة.

1-III. الخواص العامة للسلالات البكتيرية:

- ***Staphyllococcus aureus*:**

اكتشفت *Staphyllococcus* في القيح من طرف باستور عام 1880، تنتمي إلى عائلة Micrococcaceae، و هي عبارة عن بكتيريا كروية، موجبة الغرام (+ Gram)، قطرها من 0,5-2,5 نانومتر، تتجمع في شكل عنقود غير منتظم، و إليه تعود التسمية Staphyllocoque حسب Ogston عام 1883. يمكن لهذه البكتيريا النمو بسهولة في مختلف الأوساط المغذية، و معظمها يتواجد طبيعيا على مستوى الجلد و الأغشية المخاطية للإنسان.

تنتج بعض أنواع Staphyllocoque صبغة بيضاء، و البعض ينتج صبغة صفراء، هذه الأخيرة تميز *Staphyllococcus aureus* (aureus = ذهبي)، المتواجدة في الأنسجة الجلدية، الهواء، المجاري التنفسية و البولية، و تفرز مواد خارج خلوية منها Exo- toxique تساعدها على اختراق الأعضاء و الأنسجة مسببة بذلك ثقب و تخرب موضعي للجلد، كما تحدث الالتهابات على مستوى الرئة، الجروح مع تشكل الدمل، و التقيحات الموضعية التي تمس الأنف، الوجه، اليد و جميع أنحاء الجسم، كما يمكن لهذا النوع من البكتيريا أن يكون سببا في التسممات الغذائية. (Jawets et al, 1973)

- ***Pseudomanas aerugenase*:**

عزلت *Pseudamonas* عام 1882 من قبل Gessard. و النوع *Pseudomanas aerugenosa* عبارة عن بكتيريا عصوية، سالبة الغرام (- Gram)، تنمو بسهولة في

الأوساط المغذية، مكونة مستعمرات ملساء، دائرية، ذات رائحة عطرية، و لون أخضر مزرق، حيث أن هذه البكتيريا تنتج صبغة صفراء تذوب في الماء و أخرى زرقاء تذوب في الكلوروفورم.

تتواجد *Pseudamanas aerugenosa* في التربة، الماء، و على مستوى الجلد و تسبب التهاب السحايا، الأذن الخارجية و الجروح، و ينتج عنها قيح بلون أخضر مزرق، كما تحدث عدوى للجهاز البولي، و الجهاز التنفسي. و يعتبر كل من Gentamycine و Polymyxine من المضادات الحيوية المؤثرة بشدة على هذه البكتريا. (Lecler, 1995)

- ***Proteus vulgarus*:**

تنتمي إلى عائلة Enterobacteriaceae، عبارة عن عصيات متحركة، سالبة الغرام (- Gram)، تأخذ الشكل الخيطي و المتطاول الذي يمكنه أن يختفي ليعطي عصيات صغيرة طولها (0,5 – 3) نانومتر.

تتواجد في المياه، أمعاء الإنسان، الجلد و الأغشية المخاطية، و تعتبر من مسببات التهابات المجاري البولية، كما تم عزلها أيضا من الحروق، الجروح، و تقيحات مختلفة، كما تحدث التهاب السحايا لدى الأطفال. تتميز *Proteus* بحساسيتها للمضاد الحيوي Kanamycine و Nitrofuratoine. (Frobisher, 1976)

- ***Escherichia-Coli*:**

عزلت *Escherichia-Coli* أو مرة من قبل Escherich عام 1885، و هي بكتيريا عصوية، قصيرة، متحركة، سالبة الغرام (- Gram)، تنتمي إلى عائلة Enterobacteriaceae، تنمو بسهولة في الأوساط المغذية مكونة مستعمرات مرنة قطرها (2–3 ملم)، تتواجد في الحليب، الماء و في الجهاز الهضمي عند الإنسان و الحيوان، و في بعض الحالات تسبب الأمراض المعوية كالإسهال، كما تعزى إليها بعض الأمراض الخطيرة ذات المصدر الغذائي، هذا و تحدث *Escherichia-Coli* التهابات الجروح و الجهاز الهضمي و يمكن عزلها من التقيحات الجلدية.

تتميـــز *Escherichai-Coli* بحساسيتهـــالعدد من المضادات الحيوية مثل: Tetracyclines, Sulfamides, Ampicilline. (Tortora, 2003, Jawetz et al, 1973)

III-2.اختبار النشاط المضاد للبكتيريا:

III-2-1.عزل وتحديد السلالات البكتيرية:

قبل إجراء اختبار فعالية الغليكوزيدات، لابد من الحصول على السلالات البكتيرية بصورة نقية انطلاقا من عينات أخذت من جروح جلدية، و تقيحات أخرى وقد تم إجراء العملية في ظروف معقمة بالقرب من موقد بنزن:

- بواسطة écouvillon تؤخذ مسحة من منطقة الجرح، أو التقيح، و توضح في وسط مغذي (bouillon nutritif) و تحفظ في الحاضنة 37م°.
- بعد 24 ساعة، و باستعمال ماصة باستور معقمة تزرع البكتيريا في أطباق بتري بإتباع طريقة التخطيط في أوساط مغذية مختلفة.

←جيلوز مغذي : تنمو فيه كل الأنواع البكتيرية.

←وسط Chapman: خاص بـــ Staphyllocoques (+ Gram).

←وسط Hektoen: الذي تنمو فيه أنواع Enterobactérie.

ثم تحفظ علب بتري في الحاضنة (37م°، 24 ساعة). بعد ذلك يلاحظ نمو البكتيريا في الأوساط المغذية ليتـــم التعـــرف علـــى الأنواع البكتيرية من خلال الدراسة المجهرية و اختبار الخواص البيوكيميائية لمختلف المستعمرات النامية في المزارع البكتيرية.

أ- دراسة الخواص المجهرية:

نأخذ بواسطة ماصة باستور معقمة, مستعمرة بكتيرية وذلك انطلاقا من المزارع البكتيرية السابقة, نضعها على شريحة زجاجية, نضيف لها قطرة ماء مقطر و نقوم بمسحة. تصف الشرائح الزجاجية المحضرة على الحامل و تخضع لعملية الصبغ(صبغة الغرام) التي تتم كالتالي:

➢ التلوين باستخدام violet de gentiane لمدة دقيقة.

- تثبيت اللون البنفسجي باستعمال lygolمدة 30ثانية إلى دقيقة ونصف.
- إزالة اللون البنفسجي باستعمال الكحول الذي يبقى 30ثانية.
- إعادة الصبغ بواسطة صبغة fushine مدة 1-2دقائق.
- تتبع كل مرحلة بعملية الغسل بالماء.
- تجفف الشرائح باستعمال موقد بنزن.
- تتم الدراسة المجهرية باستعمال المجهر الضوئي، حيث توضع قطرة من الزيت على الشرائح، و تلاحظ بعدسة ذات تكبير ×100.
  - ✓ اللون لبنفسجي دلالة على أن البكتيريا من النوع +Gram.
  - ✓ اللون الوردي يدل على أن البكتيريا من النوع - Gram .

ب- اختبارالخواص البيوكيميائية

تؤخذ مستعمرات بكتيرية متماثلة من كل وسط زرع، و ذلك بكشطها بواسطة ماصة باستور معقمة، و توضع في 10 مل من ماء فيزيولوجي للحصول على معلقات لكل نوع بكتيريا، ثم تحفظ في الحاضنة (2-3) دقائق في حرارة 37 م°.

تخضع هذه المعلقات البكتيرية لاختبارات الكشف عن بعض الخواص البيوكيميائية التي تسمح بالتعرف و تحديد الأنواع البكتيرية(Djelouat ,1990).

1- البحث عن B غليكوزيداز:

يسمح هذا الاختبار بالكشف عن وجود إنزيم B-غلاكتوزيداز عند البكتيريا باستعمال أقراص ONPG: Ortho-nitro-phenyl-galactoside.

توضع 0,5 مل من كل معلق بكتيري على أقراص ONPG، و تحفظ مدة30 دقيقة في حرارة 37م°.

-> ظهور لون أصفر دلالة على وجود الإنزيم.

2- استعمال الستراث من قبل البكتيريا:

من خلال هذا الاختبار يمكن التعرف على إمكانية استعمال البكتيريا للسترات كمصدر للكربون في وجود إنزيم (citrate permiase). و يستخدم في هذا الاختبار وسط Citrate de Simons.

يتم زرع البكتيريا انطلاقا من المعلقات المحضرة مسبقا في الوسط ثم تحفظ في الحاضنة (37م°، 24 سا).

-> تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دلالة على وجود إنزيم citrate permiase.

3- البحث عن يوري-أندول:

من خلال هذا الاختبار يتم الكشف عن إمكانية استعمال البكتيريا لليوري كمصدر للآزوت و ذلك بزرع البكتيريا في وسط urée-indol، ثم يحفظ في حاضنة (37م°، 18-24 سا).

-> و تكون النتيجة الإيجابية بتحول لون الوسط الأصفر إلى الأحمر.

*** البحث عن الأندول:**

تضاف قطرات من Kowacs-Ehrlicheإلى وسط يوريا-أندول السابق وذلك بحذر على جدار الأنبوب.

-> تشكل حلقة حمراء على السطح دلالة على وجودانزيم Tryptophanase.

4- الكشف عنDécarboxylase:

يتم استعمال نوعين من الكواشف:

- ADH: Argenine dihydrolase.
- ODC: Ornithine décarboxylase.

توضع 5 قطرات من معلق بكتيري محضـــر من مزرعة بكتيرية ذات (18-24سا) في أنابيب اختبار تحتوي ODCو أخرى بهاADH . و تحفظ في الحاضنة (37م°، 18-24 سا).

-> ظهور لون بنفسجي دلالة على وجود هذه الإنزيمات.

5- الزرع في وسط Manitol-mobilité:

يستعمل في هذا الاختبار manitol-mobilité، لمعرفة استخدام البكتيريا للمانيتول وحركتها, حيث يتم زرع البكتيريا بطريقة الحقن المركزي في الوسط ثم يحفظ في الحاضنة (37م°، 18-24 سا).

-> التحول إلى اللون الأصفر دلالة على هدم D-mannose من قبل البكتيريا.

->ظهور تموج عريض حول خط الوسط دلالة على حركة البكتيريا.

6-الزرع في وسط TSI :

TSI وسط ثلاثي السكريات, توضعها يكون ابتداء من الغلوكوز, اللاكتوز ثم السكروز من أسفل الأنبوب إلى أعلاه.وذلك للكشف عن إمكانية تحطيم الغلوكوز من قبل البكتيريا في وجود أو غياب الأوكسجين, وامتلاكها إنزيمات Lactose و Invertase كما يستعمل هذا الوسط للكشف عن تحرير H_2S و بالتالي يمكن للبكتيريا التنفس لا هوائيا و تحرير الغاز انطلاقا من الغلوكوز.

- يتم الزرع في وسط TSI بخط منحني على سطح الجيلوز من الأسفل إلى الأعلى ثم الحقن المركزي مع عدم إحكام غلق الأنبوب التي تحفظ في الحاضنة (37م°, 18- 24 سا).

->تحول موضع الغلوكوز, اللاكتوز و السكروز إلى الأصفر نتيجة ايجابية

->ظهور لون أسود دلالة على إنتاج غاز الكبريت.

->ظهور غاز ثاني أو كسيد الكربون سواء في أسفل الأنبوب أو وسطه.

7-البحث عن L'Oxydase:

توضع مسحة بكتيرية على شريحة زجاجية معقمة, ونضيف لها قطرة من ماء مقطر, ونضع فوقها قرص oxydase.

->تلون القرص بالبنفسجي دلالة على إنتاج البكتيريا لإنزيم oxydase.

•لحفظ السلالات البكتيرية بصورة نقية، تؤخذ مستعمرات من مزارع نقية و تزرع في الجيلوز المغذي، ثم تحفظ في الحاضنة 37م° إلى استعمالها.

Antibiogramme.2-2-III بطريقة الانتشار في وسط مغذي:

•تحضير الأقراص و الأوساط المغذية:

تكون المضادات الحيوية المستعملة في مخابر الميكروبيولوجيا بشكل أقراص قطرها 6 ملم، لذلك تم تحضير عدد من الأقراص المتجانسة بنفس القطر انطلاقا من ورق وتمان 3 (Papier wattman N°3)، ثم تعقم بوضعها في علبة بتري زجاجية بها 10 مل من الماء المقطر، و تحفظ في autoclave مدة 20 دقيقة في حرارة 120م°.

أما أوساط الزرع التي تطبق عليها الأقراص فتحضيرها يكون بإذابة جيلوز Milleur Hinton (MH) في حمام مائي، ثم يسكب في علب بتري، حيث لا يزيد سمك الجيلوز عن 4 ملم، تترك العلب لتجف مدة 30 دقيقة في حرارة 37م°.

•زرع السلالات البكتيرية:

- بواسطة ماصة باستور معقمة أو لقينة، تكشط من 4-5 مستعمرات بكتيرية معزولة ابتداء من المزارع البكتيرية النقية المحضرة مسبقا.
- تحـــمل البكتيـــريا في 10 مل من الماء الفيزيولوجي و تحفظ في الحاضنة (37م°، 15 دقيقة).
- تغمس écouvillon في المعلق البكتيري المحضر مسبقا و تمسح على سطح الجيلوز (MH) من الأعلى إلى الأسفل بشكل خطوط مستمرة و متراصة، مع تدوير طبق بتري 60° في كل مرة، و إعادة تحميل écouvillon عند الزرع في عدة أطباق بترية.

• تطبيق الأقراص على المزارع البكتيرية:

انطلاقا من نواتج الاستخلاص المحصل عليها و المتمثلة في:

- المستخلصات الخامة الناتجة عن تبخير الإيثانول.

- المركبات الغليكوزيدية الثلاثة للعينات النباتية.

يتم تحضير عدة تخفيفات بإذابة 0,25 غرام من كل ناتج في 5مل ماء مقطر ثم تخفف المحاليل الناتجة إلى النصف، الربع و الثمن.

تشبع الأقراص المعقمة بالمحاليل الناتجة و ذلك بوضع قطرة قطرة من كل تخفيف على كل قرص يترك ليجف و بواسطة ملقط معقم يوضع في كل علبة بتري مزروعة مسبقا بالبكتيريا 04 أقراص مختلفة التركيز لنفس المركب.

تترك علب بتري مدة 15 دقيقة في جو المختبر قبل حفظها في الحاضنة (37م°، 18-24 ساعة) بشكل مقلوب. ليلاحظ بعدها ظهور مناطق التثبيط حول الأقراص ثم قياس أقطارها عموديا وأفقيا ونأخذ المتوسط بالمليمتر (ملم).(Adjel,2002) .

الفصل الرابع

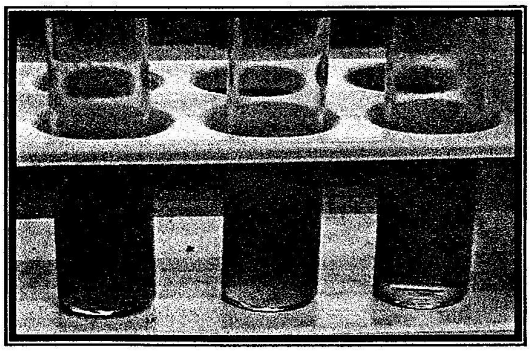
النتائج و المناقشة

I-1-الدراسة الكيميائية

I-1- 1. اختبارات الحصر الكيميائي

جدول 3: نتائج الحصر الكيميائي

		المرحلة الخضرية م	مرحلة الإزهار IIم	مرحلة البذور IIIم
التنينات		+	+	+
الكردينوليدات	Killer Kiliani	+	+	+
	Peljet	+	+	+
التربينات + الستيرولات غير المشبعة	Liberman - Bucchard	+	+	+
	Salkawski	+	+	+
القلويدات		−	−	−
الغليكوزيدات		+	+	+
الفلافونويدات		+	+	+
الصابونيات		+	++	++
الزيوت الأساسية		+	+	++



3 2 1

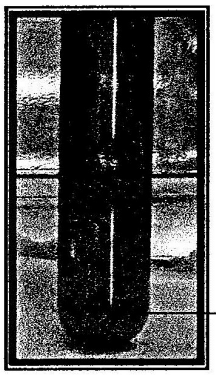
1 المرحلة الخضرية
2 مرحلة الإزهار
3 مرحلةالبذور

الشكل(6): ناتج الكشف عن الفلافونات

مجمل نتائج الاختبارات المجرات على المجموع الهوائي لنبتة *Teucrium polium* تظهر أن هذه النبتة يمكنها تخليق مختلف المنتجات الطبيعية فيما عدا القلويدات التي تغيب كليا.

III-1- 2.الاستخلاص و العزل:

طريقة الاستخلاص المطبقة على المادة الجافة للمجموع الهوائي لنبتة *Teucrium polium* خلال مراحل نموها، و المعتمدة على اختلاف الذوبان في عدد من المذيبات (الإيثانول، الكلوروفورم، الأسيتون، الميثانول و الإيثر الأثيلي)، أعطت ناتج في صورة راسب متبلور لكل عينة، و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستعمال المذيب الميثانول: الماء (2:10) بينت أن كل راسب عبارة عن مركب وحيد يختلف من عينة لأخرى.



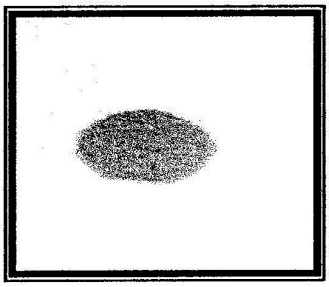
شكل(7): تشكل الراسب

و عليه تم الحصول على أربع مركبات، أمكن تعيين بعض خواصها الفيزيائية و الكيميائية:

المركب الأول:

يمثل ناتج المرحلة الخضرية، يصل وزنه إلى 1,22 غرام، يظهر بشكل مسحوق متبلور، يأخذ اللون الأصفر-البني، ذو معامل استبقاء $R_F = 0,90$، و درجة انصهار 120°م.

يتميز هذا المركب بعدم الذوبان في الإيثانول إلا في حالة التسخين، و يذوب في الميثانول و الماء المقطر.



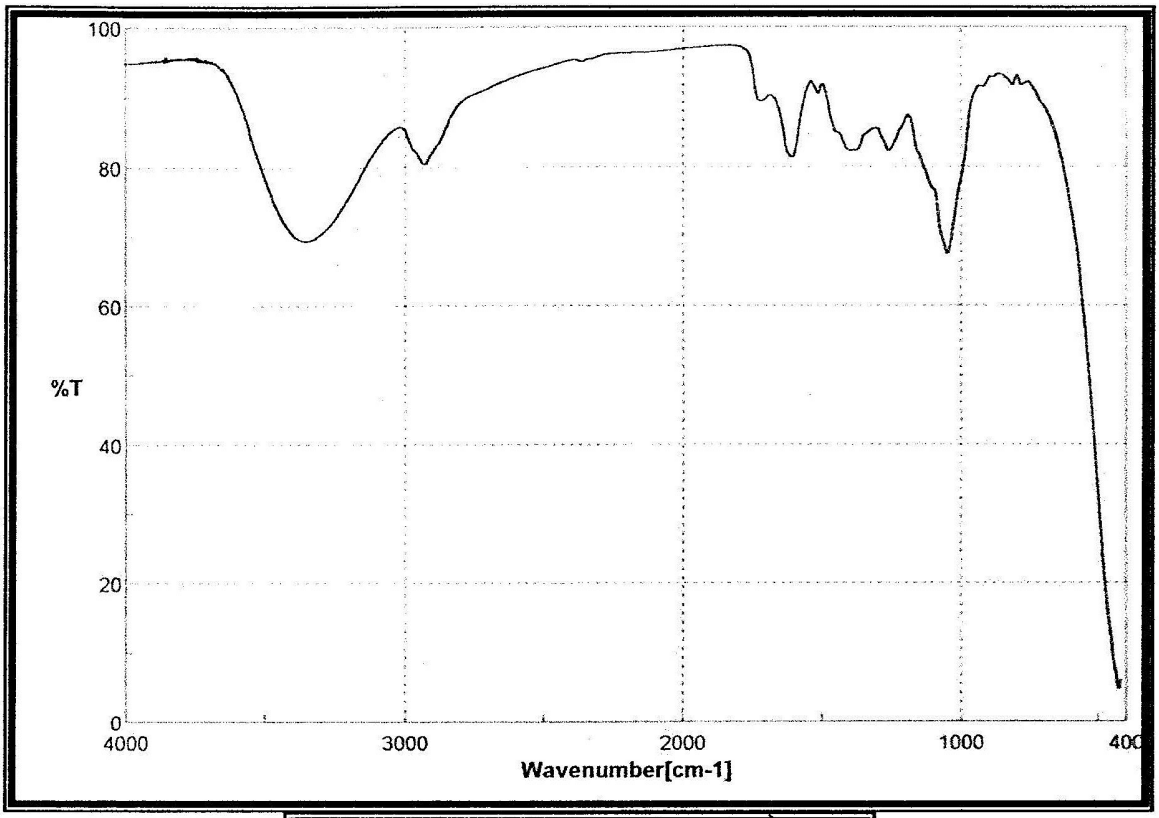
الشكل(8) المركب الأول

بين طيف الأشعة تحت الحمراءIR شكل (9)، و ذلك باستعمال المركب ذائبا في الميثانول، وجود المجاميع الوظيفية:

- الوظيفة الهيدروكسيلية (O-H) توافق الحزمة الامتصاصية في المنطقة 3367,1 سم$^{-1}$.
- المجموعة (C-H) الحلقية تظهر حزمة امتصاصها في المجال [2921,63 – 2979,48]سم$^{-1}$.
- أما المجموعة الوظيفية (C=O) الكربونيلية تظهر حزمة امتصاص في المنطقة 1716,34 سم$^{-1}$.
- المجموعة (C=C) العطرية توافق الحزمة الامتصاصية في المنطقة1616,06 سم$^{-1}$.
- في حين توافق الوظيفة (C-O) الحزمة الامتصاصية في المنطقة 1054,87 سم$^{-1}$.

اختبار الكشف عن مجموعة الكربونيل بتفاعل المركب مع 2، 4 دي نترو فنيل هيدرازين أعطى راسب برتقالي ذو درجة انصهار تساوي 145 م° تختلف عن درجة انصهار الكاشف (2,4 DNPH) التي تقدر بـ (198–200) م°من جهة ،وعن درجة انصهار المركب لوحده والمقدرة بـ120 م° من جهة أخرى.نتيجة تشكل مشتق الهيدرازون الذي ينتج من تفاعل المجموعة H–N للكاشف 2,4DNPH مع مجموعة C=O للمركب المعزول.و بالتالي فان المركب الأول المستخلص من المرحلة

الخضرية لنمو نبتة *Teucrium polium ssp capitatum* يحتوي على مجموعة الكربونيل التي ظهرت أيضا في طيف IR لهذا المركب.



شكل(9): طيف IR المركب الأول

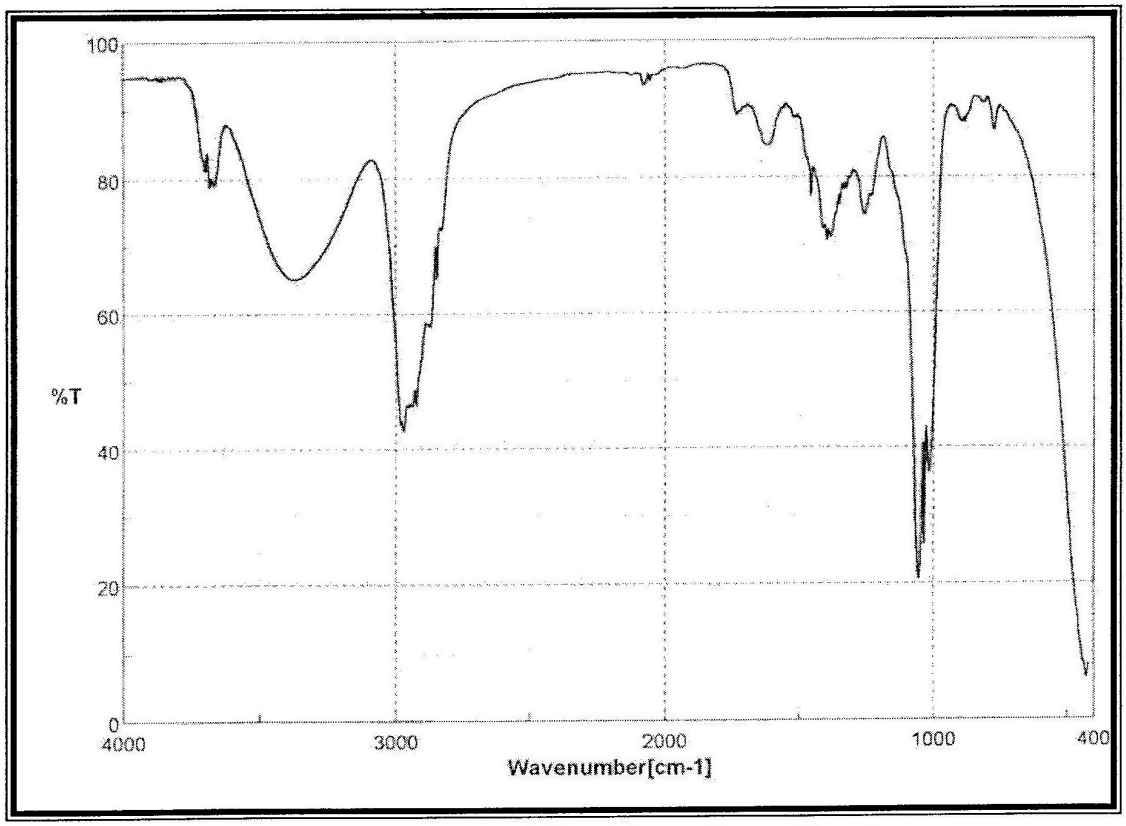
المركب الثاني:

يظهر هذا المركب، ناتج مرحلة الإزهار، بشكل راسب متلاصق، ذو لون بني داكن، يتصلب عند غسله بالإيثر الإثيلي، ليعطي 0,53 غرام من مسحوق متبلور، يتميز باللون البني، درجة انصهار 108°م، و معامل استبقاء R_F= 0,82 يمكن لهذا المركب الذوبان كليا في الميثانول، الماء المقطر و في الإيثانول بعد التسخين.

الشكل (10) : المركب الثاني

يظهر من خلال طيف الأشعة تحت الحمراء IR شكل(11)، بإذابة المركب في الميثانول، وجود الوظائف:

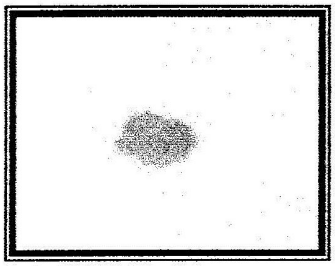
- الوظيفة(O-H)الهيدروكسيلية، التي تظهر حزمة امتصاصها في المنطقة 3360,12 سم$^{-1}$.
- المجموعة (C – H) الحلقية، تكون لها حزمةامتصاصية في المنطقة 2950,55 سم$^{-1}$.
- تظهر الوظيفة الكربونيلية (C = O) في المنطقة 1716,34 سم$^{-1}$.
- الرابطة (C = C) الحلقية، تكون ذات حزمةامتصاصية في المنطقة 161610 سم$^{-1}$.
- أما وظيفة الإيثر (C–O – C) فتظهر في الحزمة الموافقة للمنطقة 1033,66سم$^{-1}$.



الشكل(11): طيف IR المركب الثاني

المركب الثالث:

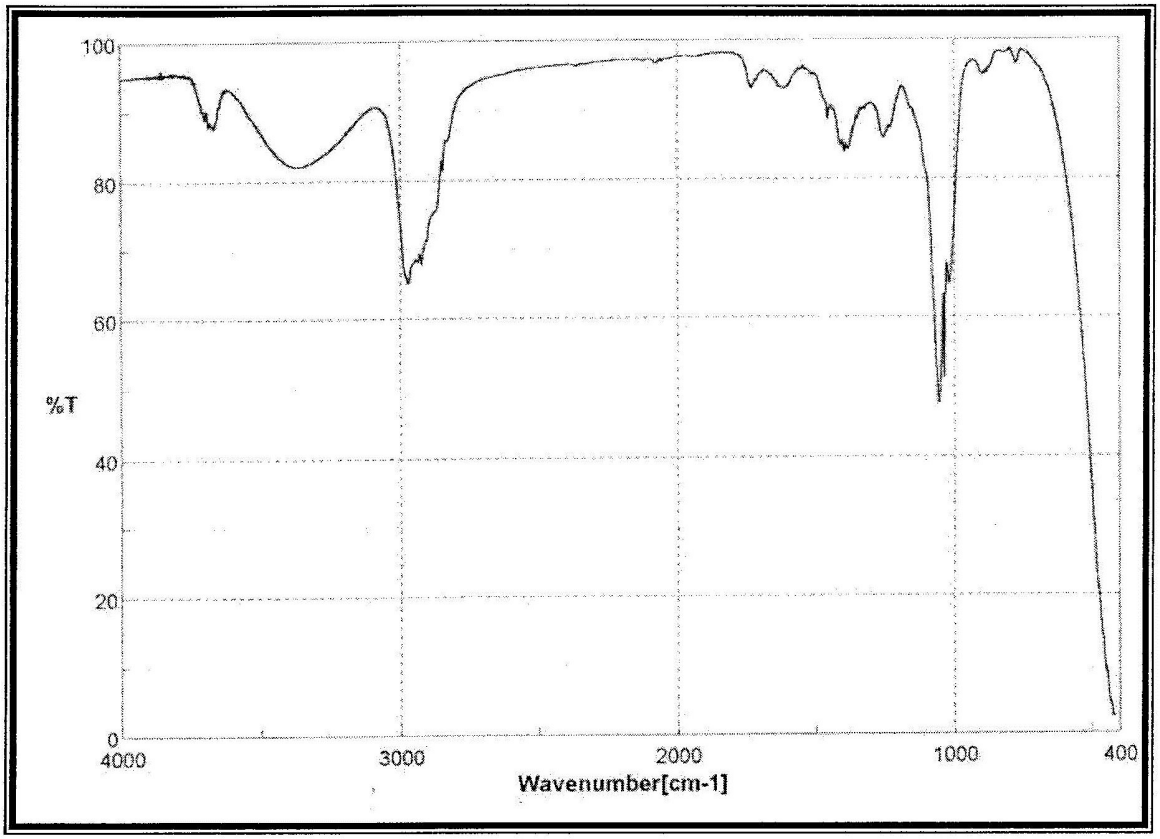
عزل هذا المركب إنطلاقا من مرحلة نضج البذور لنبتة *Teucrium polium*، بكمية تقدر بـ 1,68 غرام من مسحوق متبلور أصفر باهت، ذو درجة انصهار تعادل 150 م° و معامل استبقاء $R_F = 0,75$، يتميز بالذوبان التام في الميثانول و الماء و لا يذوب في الإيثانول البارد إلا بعد التسخين.



الشكل(12) المركب الثاني

مجمل المجاميع الوظيفية لهذا المركب، أمكن التعرف عليها و تحديدها من خلال طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) الموضح في الشكل(13):

- المجموعة الهيدروكسيلية (O-H)، تظهر في منطقة الامتصاص 3365,17 سم$^{-1}$.
- اهتزاز المجموعة (C – H) العطرية توافق حزمة الامتصاص في المجال [2971,77 – 2921,63] سم$^{-1}$.
- تظهر المجموعة (C = O) الحلقية في المنطقة 1729,83 سم$^{-1}$.
- المجموعة الوظيفية (C = C) العطرية تكون حزمة امتصاصها في المنطقة 1616,2 سم$^{-1}$.
- المجموعة الوظيفية (C-O-C) تظهر عند الحزمة الامتصاصية 1054,87 سم$^{-1}$.



الشكل(13) : طيف IR المركب الثالث

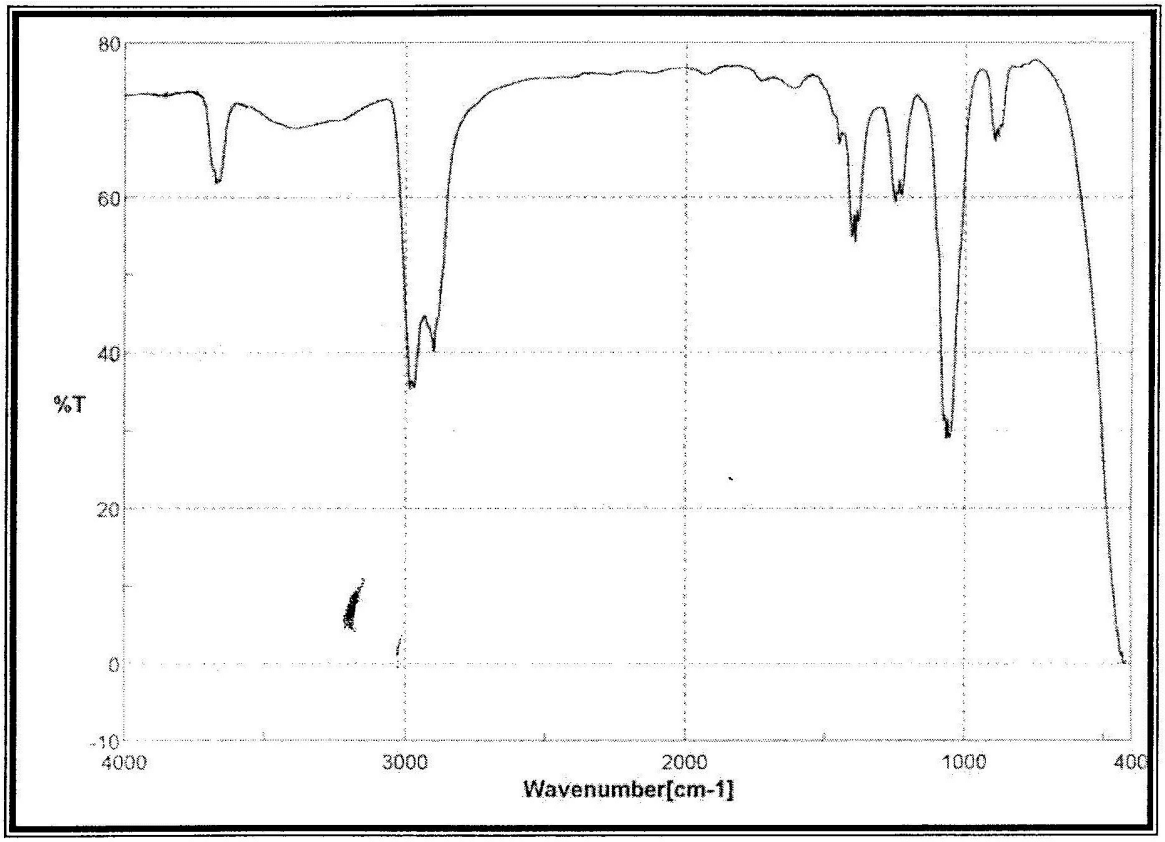
المركب الرابع

يظهر هذا المركب بعد فترة كناتج ثاني من نواتج استخلاص الغليكوزيدات الفلافونويدية انطلاقا من عينة مرحلة نضج البور لنبتة *Teucrium polium* حيث تترسب كمية قليلة من مسحوق متبلور بلون اصفر فاقع كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستعمال الميثانول : ماء (2 : 10) كمذيب بين وجود مركب واحد ذو معامل استبقاء يعادل 0,62.يذوب هذا المركب في الماء و الميثانول .

وقد بين طيف الأشعة تحت الحمراء لهذا المركب بعد إذابته في الميثانول وجود:

- المجموعة الهيدروكسيلية (O-H)التي تظهر حزمة امتصاصها عند 3388,32 سم$^{-1}$.

- اهـتزاز الـرابطة (C-H) الحلقية يكون فـي مجـال الامتـصاص [2 971,77 - 2900,41] سم$^{-1}$.
- المجموعة الوظيفية (C=C)تظهر حزمة امتـصاصها فـي المنطقـة 1617,98 سم$^{-1}$.
- اهتزاز الرابطة (C=O) يوافق الحزمة الامتصاصية 1074,87 سم$^{-1}$



شكل(14): طيف IR المركب الرابع

يظهر من خلال طيف IR وجود المجاميع الوظيفية المميزة للغليكوزيدات الفلافونية مثل(C-O-C, O-H, C=C, C-C) التي تدخل في بنية المركبات الأربعة التي تم عزلها من العينات النباتية الثلاثة.

و رغم تشابه المركبات من حيث خاصية الذوبان في الماء, الايثانول والميثانول, إضافة إلى طيف IR, إلا أن نتائج الاختبارات المجراة عليها تبين اختلافها بصورة واضحة في عدد من الخواص الفيزيائية و الكيميائية و المتمثلة في: كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة إذ تختلف المركبات من حيث معامل الاستبقاء, لون وشكل البقع المرتبطة بالتركيب الكيميائي للمركبات؛ درجة الانصهار التي تصل إلى 150 م° للمركب الثالث, اللون و الكمية التي تكون معتبرة خلال مرحلة نضج البذور (1,86 غرام) التي تتميز بعزل مركب آخر بشكل آثار (كمية ضئيلة) و لم يظهر في العينات الأخرى.

حسب هيكل1981 وGuignard (1979, 1985) فان مركبات الأيض الثاني تتميز بعملية *Turn over*, إضافة إلى أنها تتغير كميا ونوعيا خلال مراحل نمو و تطور النبات, فمثلا : قلويدات نبات Lupin لا تظهر إلا بعد أسبوعين من الانتاش و تبقى حتى الإزهار أين تقل كميتها بصورة واضحة, كما تتميز الإبر الفتية لنوع Picea بوجود الغليكوزيدات الفلافونويدية, في حين تتميز الإبر الناضجة بتكديس glycoside4-hydroxycetophenone.

هذه المعطيات تتوافق مع النتائج المتحصل عليها, و بالتالي يوجد تغير نوعي وكمي لمشتقات الفنيل بروبانويد المنتجة خلال مراحل نمو نبتة *Teucrium polium ssp capitatum*. مع العلم أن عملية استخلاص و عزل المركبات من العينات النباتية تمت في ظروف تجريبية متماثلة (250غرام من المادة النباتية, كمية المذيب 1,5لتر من الايثانول 98% ,درجة حرارة ثابتة ,مدة التسخين20ساعة).

من جهة أخرى, تمت دراسة عام2002 على نبتة *Teucrium polium ssp cylindraceum* خلال مرحلة الإزهار, أخذت من منطقة بسكرة, وذلك بإتباع نفس طريقة الاستخلاص, أمكن من خلالها عزل ثلاث مركبات مختلفة, التحاليل البنيوية لها (IR , UV, RMN) بينت أن أحدها عبارة عن سكر متعدد والآخر يمثل غليكوزيد فلافوني (Adjel ,2002).

هذه النتائج تختلف عن النتائج التي حصلنا عليها, حيث تمكنا من عزل أربع مركبات مختلفة انطلاقا من ثلاث عينات تمثل المرحلة الخضرية, مرحلة الأزهار, مرحلة تكون و نضج البذور لنمو *Teucrium polium ssp capitatum*من منطقة بريكة ,ويمكن إرجاع هذه الفرو قات إلى الاختلاف في المناخ وطبيعة التربة التي تنمو فيها النبتة.

ففي دراسة تم فيها اختبار تأثير مستخلص نفس نبتة *Teucrium polium* أحداهما أخذت من منطقة كيرامن و الأخرى من منطقة شيراز بإيران على نسبة السكر في الدم عند مرضى السكري, بينت أن الأولى لم يكن لها أي تأثير مخفض لنسبة السكر في الدم في حين أظهر المستخلص الثاني تأثيرا مهما, وقد وجد أن هذا الفرق يعود إلى تأثير مكونات التربة من عناصر معدنية مثل (Ca,Cl,K,Fe)على تكوين ونشاط المركبات الفلافونية عند هذا النبات(Vessal 2001;Al-Ansari,2000) .

II-2.الـفعـالية الـبيـولـوجية:

II-2-1.عزل و تحديد السلالات البكتيرية:

أ-دراسة الخواص المجهرية:

جدول 4 : نتائج الدراسة المجهرية للأنواع البكتيرية

البكتيريا	الشكل	صبغ الغرام
Staphyllococcus aureus	كروية	Gram +
Pseudomonas aerugenosa	عصوية	Gram -
Escherichia col	عصوية	Gram -
Proteus vulgarusi	عصوية	Gram -

ب-نتائج اختبارات الخواص البيوكيميائية للبكتيريا:

جدول5: نتائج الخـواص البيـوكيمـيائية للبكتـيريا المعزولة

	Mobilité	Manitol	Oxydase	TSI					ODC	ADH	Indol	Urée	Citrate	ONPG
				H_2S	CO_2	Saccharose	Lactose	Glucose						
Escherchiacoli	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Proteus vulgarus	+	+	+	+	+	+	-	+	/	/	+	+	-	-
Pseudomonas aeruginosea	/	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	/

و الأنواع البكتيرية النقية المحصل عليها، والتي أجريت عليها اختبارات الفعالية البيولوجية للغليكوزيدات المستخلصة هي:

- *Staphyllococcus aureus*.
- *Pseudomanas aerugenosa*.

- *Escherichia-coli*.
- *Proteus vulgarus*.

II-2-2. نتائج الانتشار في وسط مغذ:

جدول6: تأثير المستخلصات على *Pseudomonas aerugenosa*

1/8	¼	½	1	المستخلص / القطر ملم
/	/	9	12	A
8	9	11	12	B
مقـاومة				C
/	10	13	15	I
/	/	11	13	II
/	7	9	10	III

جدول7: تأثير المستخلصات على *Staphyllococcus aureus*

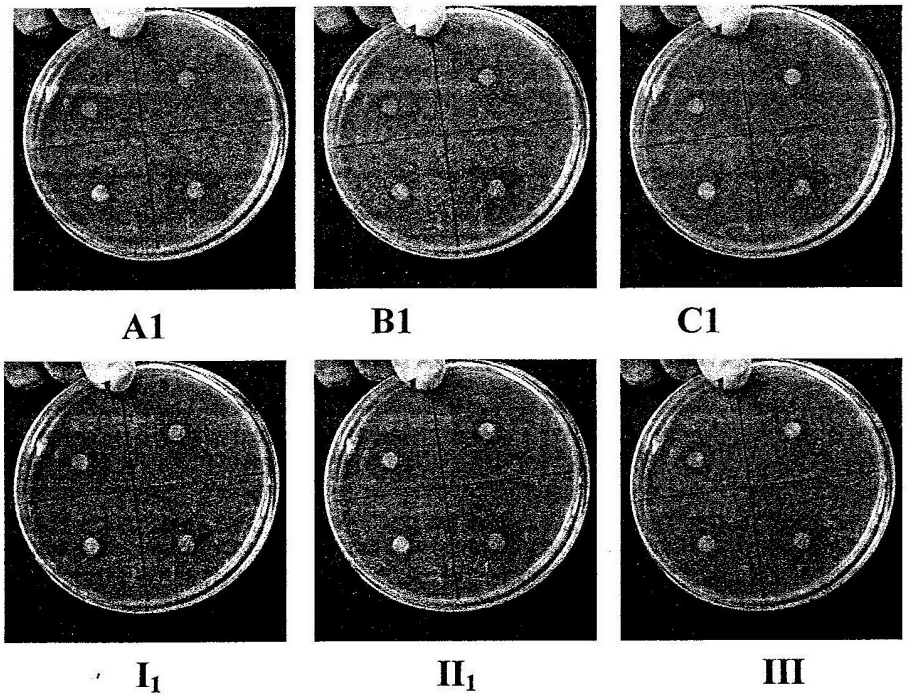
1/8	¼	½	1	المستخلص / القطر ملم
/	/	8	12	A
/	10	10	13	B
/	10	13	15	C
/	9	10	12	I
/	/	11	13	II
/	10	12	15	III

جدول8: تأثير المستخلصات على *Escherichia coli*

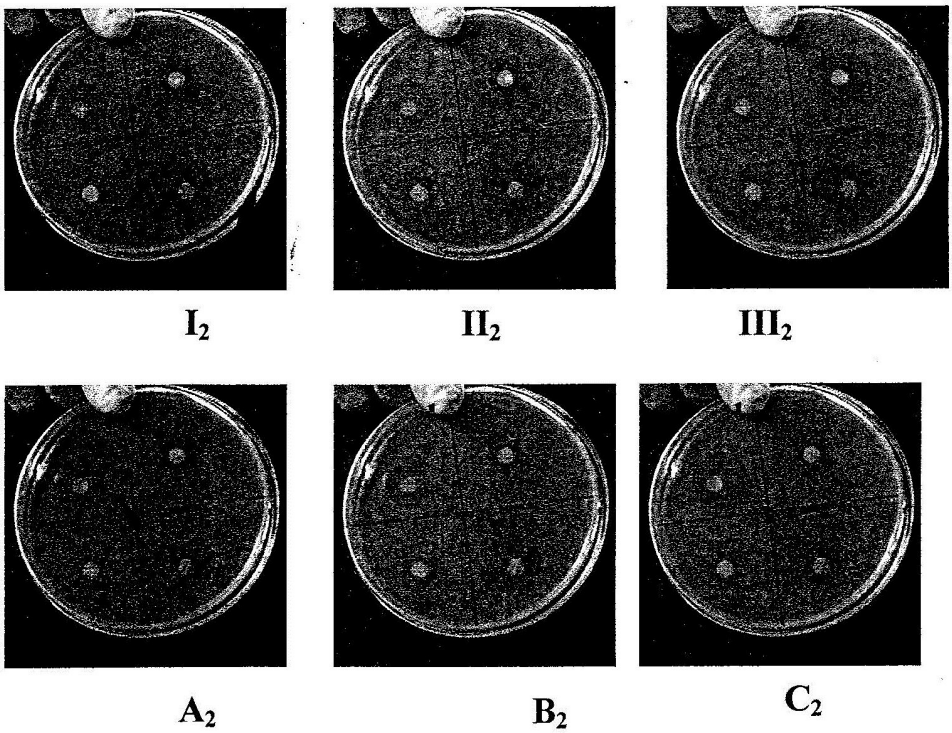
1/8	¼	½	1	المستخلص / القطر ملم
9	10	12	13	A
9	9	10	14	B
/	9	10	11	C
/	10	11	12	I
/	/	11	13	II
9	9	10	11	III

جدول9: تأثير المستخلصات على *Proteus vulgaris*

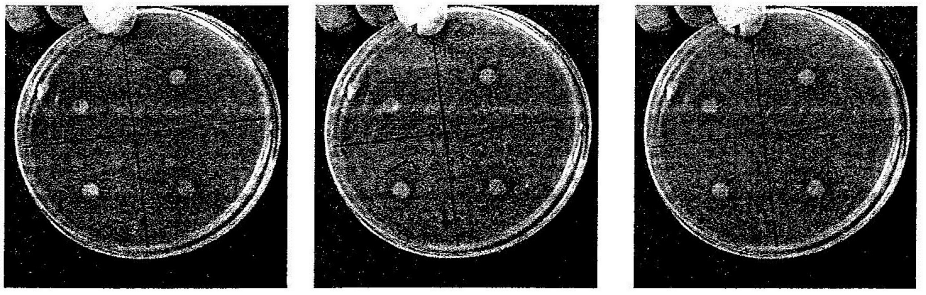
1/8	¼	½	1	المستخلص / القطر ملم
10	10	12	13	A
/	11	12	12	B
/	9	10	11	C
9	11	11	12	I
9	10	11	13	II
9	9	10	11	III



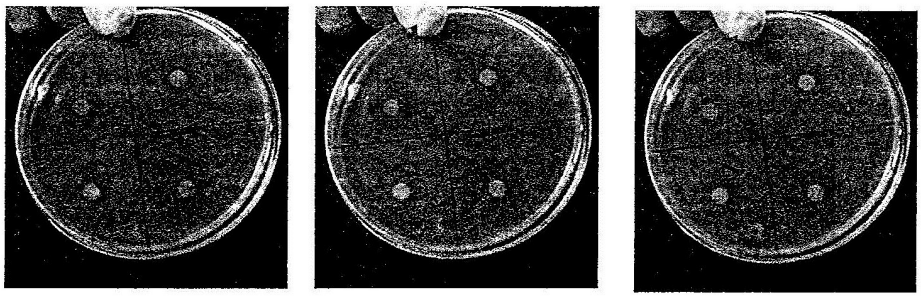
الشكل (15): تأثير المستخلصات والغليكوزيدات على *Pseudomonas aerugenosa*



الشكل (16): تأثير المستخلصات والغليكوزيدات على *Staphyllococcus aureus*

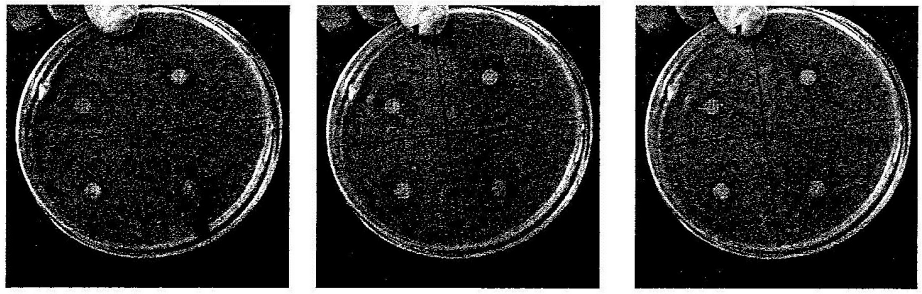


A_3 B_3 C_2

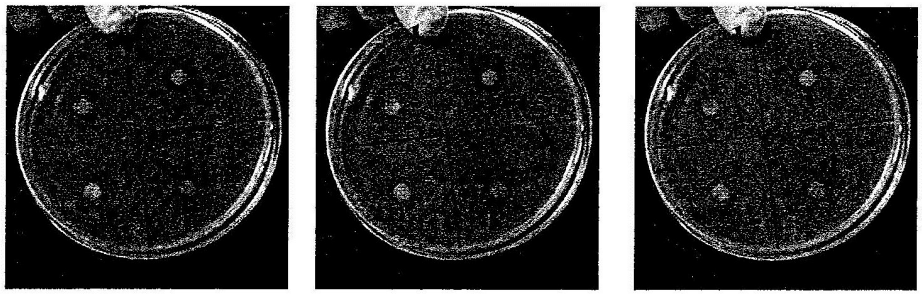


I_3 II_3 III_3

الشكل (17): تأثير المستخلصات والغليكوزيدات على
Escherichia coli



A_4 B_4 C_4



I_4 II_4 III

الشكل (18): تأثير المستخلصات والغليكوزيدات على
Proteus vulgarus

A: غليكوزيد المعزول من المستخلص الخام للمرحلة الخضرية I.

B: غليكوزيد المعزول من المستخلص الخام لمرحلة الازهار II.

C: غليكوزيد المعزول من المستخلص الخام لمرحلة البذور III.

1: *Pseudomonas aerugenosa*

2: *Staphyllococcus aureus*

3 : *Escherichia coli*

4 : *Proteus vulgarus*

نلاحظ من خلال النتائج المحصل عليها، أن المركبات المستخلصة من نبتة *Teucrium polium ssp capitatum*، تملك نشاطا مضادا للبكتيريا، مع الاختلاف في درجة تأثيرها على الأنواع البكتيرية، و على النوع الواحد.

فبالنسبة للنوع *Pseudomonas aerugenosa*، تظهر حساسيتها الكبيرة للمستخلص الخام للمرحلة الخضرية (I). حيث وصلت درجة تأثير هذا الأخير إلى ظهور منطقة تثبيط قطرها 15 ملم، التي تتناقص مع انخفاض تركيز المادة.

في حين نجد أن تأثير الغليكوزيد A، المعزول من هذا المستخلص، أقل حيث ظهرت مناطق التأثير في التركيزين الأول و الثاني بمقدار 12 ملم و 9 ملم على الترتيب، هذا و هناك بعض التشابه في درجة تأثير الغليكوزيد B و مستخلصه الخام II وذلك بتشكل مناطق تثبيط متقاربة، غير أن هذا المركب يظهر فعالية في التخفيف الأدنى له كما في الجدول(6).

بالمقابل، نلاحظ أن الغليكوزيد C لم تكن له أي فعالية على *Pseudomanas*التي أظهرت مقاومة لتأثير هذا المركب، على خلاف مستخلصه الخام III الذي كان له تأثير إلا أنه ضعيف مقارنة بالمركبات الأخرى.

و على العكس من ذلك، فإن كل من الغليكوزيد C و مستخلصة الخام III، يكون لهما تأثير متماثل، و الأكبر على النوع *Staphyllococcus aureus*، بتشكل مناطق تثبيط يصل قطرها إلى 15 ملم كحد أقصى و 10 ملم كحد أدنى حسب درجة تخفيف

المستخلصات، أما بقية المركبات، فيلاحظ أن فعالية كل مستخلص خام و المركب المعزول منه متماثلة، و يخص ذلك المستخلص الخام I و الغليكوزيد A من جهة، و المستخلص الخام II و الغليكوزيد B حيث أعطت قيم متشابهة لمناطق التثبيط كما هو موضح في الجدول(7). و ما يلاحظ أيضا أن جميع المركبات كانت لها فعالية سلبية عند تخفيفها إلى الثمن، حيث أن هذا التركيز منخفض لم يؤثر على *Staphyllococcus* و سمح لها بالنمو بصورة طبيعية وذلك بظهور مستعمرات في هذه المنطقة.

وتظهر النتائج الموضحة في الجدول(8) أن النوع *Escherichia-coli* تتأثر بجميع المواد المستخلصة و بدرجة متقاربة، حيث يكون الغليكوزيد B ذو التأثير الأكبر بتشكل مناطق تثبيط باستعمال مختلف التخفيفات ليتبع بالغليكوزيد A، في حين يظهر الغليكوزيد C تأثيرا أقل. أما المستخلصات الخامة فتأثيراتها تتقارب إلى حد ما مع فعالية الغليكوزيدات المعزولة منها.

أما مدى تأثير المركبات على *Proteus vulgarus* فإنه متقارب، حيث أعطت جميع التخفيفات فعالية إيجابية بظهور مناطق تثبيط تتناقص أقطارها بانخفاض التركيز (علاقة طر دية)، ووصلت أقل قيمة لمنطقة التثبيط إلى 9 ملم بالنسبة للمستخلصات الخامة (III, II, I) و منعدمة بالنسبة للمركبات (C, B) و ذلك عند التخفيف إلى الثمن(8) كما في الجدول(9). و بمقارنة تأثير نفس المركب على الأنواع البكتيرية نجد أن كل بكتيريا تتأثر بدرجات مختلفة، فمثلا أعطى الغليكوزيد C فعالية كبيرة على نوع *Staphyllococcus aureus*، في حين كان تأثيره على كل من *Escherichia-coli* و *Proteus vulgarus* متماثل،ويكون سلبيا على *Pseudomanas aerugenosa* التي تعتبر مقاومة لتأثير هذا المركب.

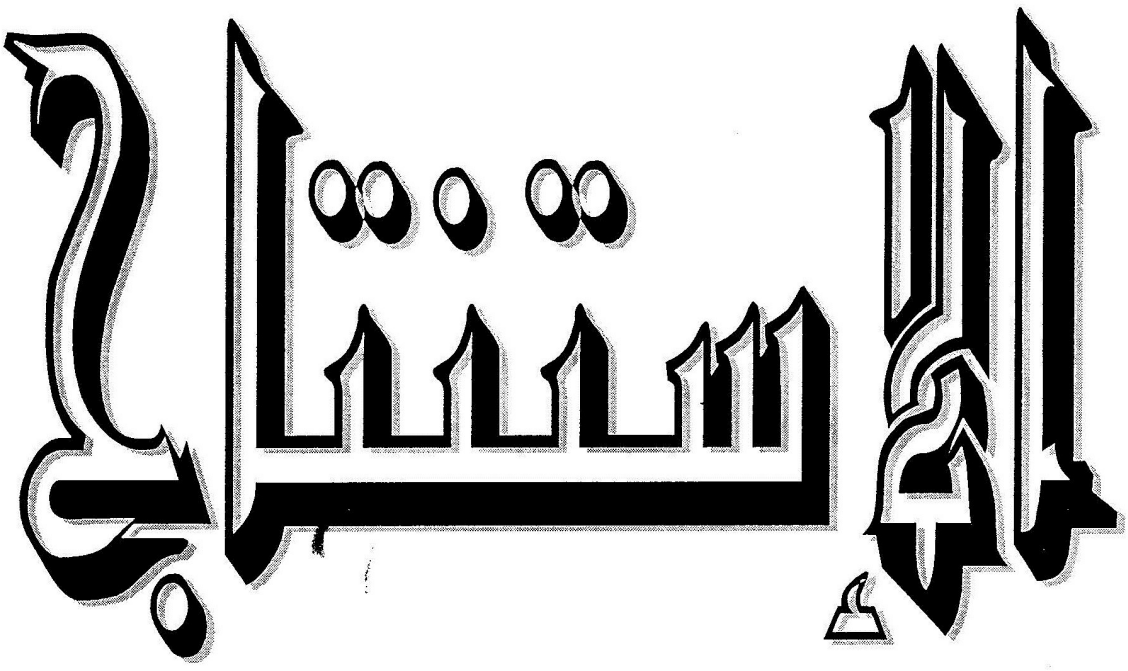
وحسب Gulçin و Uzug و اخرين 2003 قان مستخلصات المجموع الهوائي لنبتة *Teucrium polium* تملك تأثيرا مثبطا لنمو كل من *Staphyllococcus aureus,Proteus vulgarus Pseudomonas aerugenosa*، إلا أن

هذا التأثير يكون سلبيا على *Escherichia coli*.وفي اختبار أخر لفعالية غليكوزيد عزل من نبتة *Teucrium polium ssp cylindraceum*من منطقة بسكرة على كل من:

Escherichia coli و *Staphyllococcus aureus* بينت وجود تأثير جيد لهذا الغليكوزيد على الأنواع البكتيرية السالبة و الموجبة الغرام (Adjel F. 2001).

وعموما فان مجمل هذه المعطيات تتوافق مع النتائج المتحصل عليها و المتعلقة بتأثير مستخلصات نبتة *Teucrium polium* على البكتيريا وكذا الفطريات، وعليه فان الفعالية المضادة للبكتيريا إحدى الخصائص البيولوجية التي تتميز بها نبتة *Teucrium polium*. كما يتضح من خلال كل هذه النتائج, أن المستخلصات الايثانولية والغليكوزيدات المعزولة من نبتة *Teucrium polium ssp capitatum* ذات فعالية و تأثير على البكتيريا *Staphyllococcus aureus*

Proetus vulgarus, Pseudomonas aerugenosa, Eschirichia coli , من خلال ظهور مناطق تثبيط واضحة.


الاستشراق

الاستنتاج

تتميز نبتة *Teucrium polium* بإنتاج عدد من المركبات تعرف بالمنتجات الطبيعية, منها الغليكوزيدات الفلافونية.

تهدف دراستنا إلى اختبار التأثير المضاد للميكروبات لهذا النوع من المواد المستخلصة من نبتة *Teucrium polium ssp capitatum* لمنطقة بريكة. فاعتمادا على الطرق الكيميائية تم عزل أربع غليكوزيدات فلافونية مختلفة في خواصها الكيميائية و الفيزيائية كما تتغير كميتها من عينة لأخرى حسب مراح نمو النبتة, حيث حصلنا على : 1.22 غرام من المرحلة الخضرية و0,53 غرام من مرحلة الإزهار و 1,68 غرام من مرحلة نضج البذور, أما المركب الرابع فظهر بكمية قليلة ,كما بين طيف IR وجود المجاميع الوظيفية المميزة للغليكوزيدات الفلافونية (C-O -C الايثيرية ,OH الهيدروكسيلية,C=C الحلقية ,C=O الكربونيلية).

وقد أظهر اختبار الفعالية البيولوجية لثلاث مركبات و مستخلصاتها الايثانولية للمراحل الثلاثة لنمو نبتة *Teucrium polium ssp capitatum* وذلك بتطبيق طريقة الانتشار في وسط مغذ(تقنية الأقراص), على أربع سلالات بكتيرية نقية معزولة من التقيحات الجلدية *Staphyllococcus aureus, Proteus vulgarus, Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa*, أن هذه المركبات تملك فعالية مضادة للبكتيريا فيما عدا المركب الثالث الذي كان تأثيره سلبيا على *Pseudomonas aerugenosa*.

المراجع

قائمة المراجع:

- **Adjel F., 2001**. *Mémoire de magister, centre universitaire d'Oum El-Bouaghi*, p : 25,28,....
- **Aghirib J., 1980.** *Chimie organique pharmaceutique descriptive Tome III*, p : 33
- **Ait-Moussa S., 2003.** *Mémoire de magister, université de constantine*, p : 33 ,35
- **Allain P., 2000.** *Glucoside cardiotonique.ed.c.dor*, p : 25,27
- **A-Ansari A., Saveid.M, Adzadbakht.M ,Omrani R.,Solimani S.M.,Samani M., 2000.**The effect of extract of *Teucrium polium* on blood sugar and insulin levels of type 2 diabetic patients. *Shiraz E-Medical journal,* 3(2), 55-60.
- **Arnaud P., 1990.** *Cours de chimie organique, 15editionDordas.Paris,* p:129.
- **Aurousseau B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organismes des animaux d'élevage : conséquence sur la reproduction, la physiologie et qualité de leurs produits.*Production animal revue,* 15,67-82.
- **Balbaa S.,Hilal S., Zaki y . A., 1981.** *Medicinal plant constituents third edition*, p: 247-333, 373.
- **Beecher G., Merkhen H., 2002.** *Analysis of flavonoids in botanicals agriculture research sevices.*
- **Ben –Ayach S., 2003.***Memoire de Magister, Université de Constantine*,p:68.
- **Blanchard D.M., Fosset B., Griyot F ., 1987.** *Chimie organique, expérimentale* p :46,51.
- **Bondi M.L., Al-Hillo M.R.Y.,Ladjel S., 2000.**Occurrence of the antifeedant 14,15 di-hydroajugapitin in the aerial parts of Ajuga iva from Algeria. *Biochemical systematics and ecology,* 28, 1023-1025.
- **Bruneton J ., 1999.** *Phytochemie, pharmacognosie, plantes médicinales 3emeedition* , p : 311-313,322-324,347.

قائمة المراجع:

- **Adjel F., 2001**. *Mémoire de magister, centre universitaire d'Oum El-Bouaghi*, p : 25,28.
- **Aghirib J., 1980.** *Chimie organique pharmaceutique descriptive Tome III*, p : 33
- **Ait-Moussa S., 2003.** *Mémoire de magister, université de constantine*, p : 33 ,35
- **Allain P., 2000.** *Glucoside cardiotonique.ed.c.dor*, p : 25,27
- **A-Ansari A., Saveid.M, Adzadbakht.M ,Omrani R.,Solimani S.M.,Samani M., 2000.**The effect of extract of *Teucrium polium* on blood sugar and insulin levels of type 2 diabetic patients. *Shiraz E-Medical journal,* 3(2), 55-60.
- **Arnaud P., 1990.** *Cours de chimie organique, 15editionDordas.Paris,* p:129.
- **Aurousseau B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organismes des animaux d'élevage : conséquence sur la reproduction, la physiologie et qualité de leurs produits.*Production animal revue,* 15,67-82.
- **Balbaa S., 1981.** *Medicinal plant constituents third edition*, p: 247-333, 373.
- **Beecher G., Merkhen H., 2002.** *Analysis of flavonoids in botanicals agriculture research sevices.*
- **Ben –Ayach S., 2003.***Memoire de Magister, Université de Constantine*,p:68.
- **Blanchard D.M., Fosset B., Griyot F ., 1987.** *Chimie organique, expérimentale* p :46,51.
- **Bondi M.L., Al-Hillo M.R.Y.,Ladjel S., 2000.**Occurrence of the antifeedant 14,15 di-hydroajugapitin in the aerial parts of Ajuga iva from Algeria. *Biochemical systematics and ecology,* 28, 1023-1025.
- **Bruneton J ., 1999.** *Phytochemie, pharmacognosie, plantes médicinales 3emeedition* , p : 311-313,322-324,347.
- **Chandler F., 1985.** *Canadian pharmaceutical journal* .118, 420-422.

- **Chavane M., Joulian A., Ordernan G.,Beandoin J.G,Flamand E., 1991.** *Chimie organique expérimentale . 2eme edition,Canada* .p :15-22.
- **Dey P.M., Harborn J.B., 1989.** *Methods in plants biochemistry , volume* 01,*plants phenolics edition Harborn J.B.*,p :201,284-289.
- **Djelowat S., 1990.** La diagnostic biochemique bacterien, Guide pratiques microbiologie medical,editions sciences et techniques , Constantine,p :38-81.
- **Esmaili M.A, Yazdanparast R., 2004.** Hypoglycemic effects of *Teucrium polium* studies with rat pancreatic islets, 95(1), 27-30.
- **FranciscoA.,BarberanT., 1993.**Spanish Labiatae :A source for natural antioxidant compounds , *Lamiales newsletter ,issue number 2,112-116*
- **FrobisherF., 1976.** *Microbiologie clinique*, p : 264-267,319-324.
- **GayonP.R., 1968.** *Les composés phénoliques de végétaux*, p : 55,58.
- **Gazengel J.M., Orecchioni A.M., 2001.** *Le préparation en pharmacie*, p : 02.
- **Guignard J.L., 1979.** *Abrégé de biochimie végétale.2eme edition.Masson.Paris*, p : 63-59.
- **Guignard J.L., 1983.***Abrégé de botanique. 5éme édition. Masson*, p : 212-214.
- **Guignard J.L., Henry M., 1985.** *Abrégé de phytochemie.edition Masson .Paris*, p: 52-55,60.
- **Guignard J.L., 2000.***Biochimie végétale.2eme edition .Paris*, p : 212, 214,216-218.
- **Gŭlçin.I., Uguz M., Oktay M., Beydennir S.,Kufrevioglu I., 2003.** Antioxydant and antimicrobial activities of *Teucrium polium .Journal of food technology* 1(1),9-16.*Grace publication Network.*
- **Harborn J.B., 1980.** *The flavonoids advance in research. Edition Chapman et Hall, London1988*, p: 220.

- **Mann J., Davidson R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V.,Harborne J.B., 1996.** *Natural products, their chemistry and biological significances,first edition* 1994. p: 365-366.
- **Markham K.R., 1989.** *Flavones flavonols and their glycosides in «methods in plants»*, p: 198.
- **Merzouki A., Ed-derfoufi F., 2000.** Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco), *Fitotherapia, The journal for the study of medicinal plants,* 71 (3), 278-307.
- **Ozenda P., 1977.** *Flore du Sahara ,deuxième édition. (NRS).Paris*, p:55-57
- **Piozzi F., Bruno M., Bondi M.L., Rosselli S., Al-Hillo M.R.Y., 1999[a].** *Terpenoids from Teucrium maghrebium, conference 2000 years of natural research 26-30July.Amesterdam.*
- **Piozzi F., Bruno M., Bondi M.L., Rosselli S., Al-Hillo M.R.Y., 1999[b].** *Occurence of pairs of neoclerodane C-12, epimers in Teucrium .International conference on isoprenoids.10-16September, Prachatice,Czel republic.*
- **Piozzi F., Bruno M.,Bondi M.L., Rosselli S., Al-Hillo M.R.Y.,Lamara K.,Ladjel S., 2000.** Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium maghrebium. Journal of natural products, 63 (7), 1029-1031.*
- **Piozzi F., Bruno M.,Bondi M.L., Rosselli S., Al-Hillo M.R.Y.,Lamara K.,Ladjel S., 2001.** Further furoclerodane from *Teucrium maghribium* , *Eur .J.Org.Chem, 1669-1671.*
- **Praksh E.O., Roa J.T., 1999.** A new flavone glycoside from the seeds of Shorea robusta. Fitotherapia, *journal from the study of medicinal plants, 70 (6), 539-541.*

- **Quezel P., Santa S., 1963.** *Nouvelle flore de l'Algérie et des région désertiques méridionales.Tome II, éditions: Centre national de la recherche scientifique (CNRS),* Paris, p : 88.
- **Roland J.C., Roland F ., 2001.** *Atlas : biologie végétale, organisation des plantes à fleurs*, p:420.
- **Robinson T., 1991.** *The organic constituents of high plants, their chemistry and interrelation ship, sixth edition by Robinson T.*, p: 53,192,194.
- **Shakhanbeh J., Atrouse O., 2001.** *Teucrium polium* inhibits nerve conduction and carrageenan induced inflammation in rat skin, *Turkish journal of Medical science, 31, 15-21.*
- **Sharifian Z.,Vadgani M.,hajati J.,Kamalinejad M., 2004.**Immunological effects of *Teucrium polium* on neutrophils.*2nd international congress on traditional and materia medica.October4-7,Tehran ,Iran.*
- **Stahl E.,Dumont E.,Jork H.,Kraus L.J.,Razumek K.E.,Schorn P.J., 1975.** *Analyse chromatographique et microscopique des drogues, manuel pratique pour les pharmacopées Européennes*, p:22.
- **Stahl E., 2000.** *The secondary metabolism of plant, botanyonline*,p: 13-16.
- **Tortora G.J., Fumke B.R., 2003.** *Introduction à la microbiologie*,éditions du Renouveau Pédagogique Inc, p : 226-337, 339,351.
- **Tuzlaie E., Erol M.K., 1999.** Turkish folk medicinal plants II: Eğidir (Isparta), *Fitotherapia,the journal for the study of medicine plants.* 70 (6), 593-610.
- **Vessal M., Zal F.,Vasei M., 2001.** Hepatotoxicity associated with hypoglycemic effects of *Teucrium polium* in diabetic rats, *Archives of Iranian Medicine*4(4),188-192.

- **Vessal M.,Zal F.,Vasei M.D., 2003.**Effects of *Teucrium polium* on oral glucose tolerance test ,regeneration of pancriatic islets and activity of hepatic glucokinase in diabetic rats, *Archives of Iranian Medicine6(1),35-39.*
- **Williams B., Christian A., Harborn B., 1989.** *Isoflavonoids in «methods in plants»*,p:422-424.
- **Williams D.H., Fleming , 1980.** *Spectroscopic methods in organic chemistry, third edition*,p :35

- **الحازمي.ح.م،** 1995. *المنتجات الطبيعية* ص:159-151.
- **حمية. هـ،** 2002. *مذكرة ماجستير المركز الجامعي العربي بن مهيدي أم البواقي*،ص :20-21.
- **هيكل.م.س ،** 1993. *النباتات الطبية ,كيمياؤها, إنتاجها*, ص: 362 -366 ,371.
- **الشحات.ن.د،** 1986. *النباتات والأعشاب الطبية* ص231:-335.
- **قطب. ف. ط،** 1979. *النباتات الطبية.زراعتها و مكوناتها الدار العربية للكتاب*.ليبيا -تونس.
- **فوزي.م.س،** 1994. *مقدمة في تصنيف النباتات الزهرية. كلية العلوم جامعة التحدي ليبيا* ص:189-190.

الملحق

الملحق

المواد الكيميائية:

- الإيثانول
- الميثانول
- الأسيتون
- الكلوروفورم
- الإيثر الإثيلي
- الغليسيرين
- 2,4 ثنائي نتروفنيل هيدرازين
- حمض البكريك

الزجاجيات:

- بيشر
- أنابيب اختبار
- قمع
- أطباق بيتري زجاجية و بلاستيكية
- ماصة باستور
- حوجلة (2ل، 250 مل، 500 مل)
- ماصة مدرجة
- مكثف

الأجهزة و الأدوات:

- Chauffe ballon
- مبخر دوار
- Autoclave
- موقد بنزين
- صفائح الكروماتوغرافيا
- حمام مائي
- مصباح الأشعة فوق البنفسجية (UV)NO36286
- حاضنة
- جهاز طيف الأشعة تحت الحمراء IRJ Jasco FT/IR-460 plus

تحضر الكواشف

الكاشف	التركيب و التحضير		
ماير	- كلوريد الزئبق	1,36 غرام.	
	- إيوديد البوتاسيوم	5 غرام	
	- ماء مقطر	10 مل	
بالجيت	- حمض البكريك	9,5 مل	في الميثانول
	- هيدروكسيد البوتاسيوم	0,5 مل	
فهلنغ	أ: كبريتات النحاس	40غ.1ل	1 ل ماء مقطر
	ب: ترترات الصوديوم- البوتاسيوم	200 غرام	
	- هيدروكسيد البوتاسيوم	150 غرام	
	يخلط المحلولين (أ، ب) بحجم متساو مباشرة قبل الاستعمال		

- **الطريقة الاستخلاص الثانية**

تستعمل هذه الطريقة لاستخلاص المركبات الفلافونويدية انطلاقا من المادة الجافة لمراحل نمو نبتة *Teucrium polium ssp capitatum*.

تنقع 100غ من مسحوق المجموع الهوائي لهذه النبتة في الإيثانول (70%) لمدة 24 ساعة، و تكرر العملية 03 مرات مع تجديد المحلول، و المرة الأخيرة تكون بالتسخين، و تتبع بعملية الترشيح.

يبخر الراشح الإيثانولي (حرارة < 50م°) حتى الحصول على راسب أخضر، يذاب في 200مل ماء مقطر ساخن و يترك ليلة كاملة و ذلك للتخلص من الدهون، الكلوفيل، الأتربة.... التي تترسب في أسفل الإناء الزجاجي، و يرشح بعدها المحلول المائي عدة مرات.

يخضع المحلول المائي لعملية استخلاص بالمذيبات العضوية باستعمال ampoule à décanté، حيث يضاف الكلورفورم أولا على (03 مرات) الذي يجمع مع بعضه و ذلك

لاستخلاص التربينات، ثم يتبع بالبيوتانول (03 مرات) لاستخلاص الغليكوزيدات مع جمع مستخلصات هذا الطور. ويتم التخلص من الماء بإضافة كمية من $MgSo_4$ إلى كل مستخلص، و بعد الترشيح يبخر كل طور لوحده(Ben-Ayach, 2003) .

و أمكن الحصول على 2,49 غرام، 2,42 غرام و 2,58 غرام من مستخلصات خامة لطور البيوتانول لكل مرحلة على التوالي.

وتم إجراء فصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التجريبية على هذه المستخلصات الثلاثة و ذلك لتحديد أفضل نظام فصل للمركبات.(Dey et Harborn, 1989)

المذيبات	النسبة
– كلوروفورم :ميثانول	1: 1
– كلورفورم : حمض الخل : ماء	20 : 15 : 30
– بيوتانول :حمض الخل : ماء	5: 1 : 4
– استيات الإثيل : حمض الخل	2 : 1
ماء : ميثانول	1 : 1
حمض الخل	%5
ميثانول : استيات الإثيل : كلوروفورم	2 : 1: 1

و أحسن نتيجة ظهرت باستعمال النظام ميثانول: أسيتات الإثيل: كلوروفورم (1 : 1 : 2). و ذلك بملاحظة الصفائح الكروماتوغرافية تحت أشعة UV، وعليه تم اختيار هذا النظام لفصل مركبات الطور البيوتانولي لكل مرحلة.

- **كروماتوغرافيا الطبقة الرقية التحضيرية:**

استعمل نوع من صفائح الكروماتوغرافيا الزجاجية من نوع Kisselgel 60 GF_{254} لغرض فصل مركبات الفنيل بروبانويد الموجودة في كل مستخلص.

تذاب 0,70 غرام من المستخلص البيوتانولي لكل مرحلة في أقل كمية من الميثانول، و بواسطة ماصة باستور توضع الكمية بحذر على طول خط يبعد بمسافة 1,5 سم عن

الحافة السفلية للصفيحة، و بعد أن يجف المستخلص، توضع الصفيحة في حوض صغير مشبعة بالمذيب المختار (ميثانول: أسيتات الاثيل: كلورفورم 1: 2:1)، و تترك حتى يصعد المذيب جاذبا معه المركبات، بعدها تجفف الصفيحة و تلاحظ المركبات المفصولة تحت مصباح UV، و النتائج المحصل عليها موضحة كما يلي:

*** المرحلة الأولى**

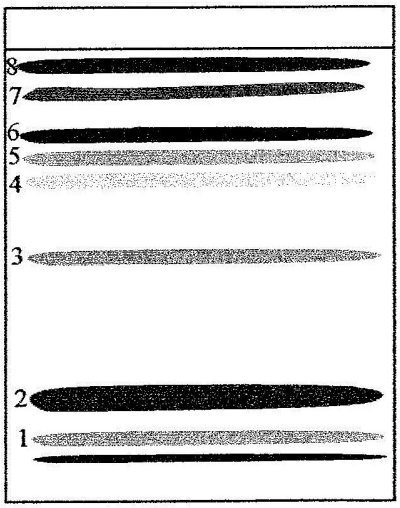
المركبات	اللون	R_f
1	أخضر فاتح مشبع	0,10
2	بني	0,30
3	أزرق بنفسجي	0,60
4	أصفر باهت	0,76
5	وردي	0,82
6	بني	0,87
7	أحمر	0,93
8	أحمر فاتح	0,96

*** المرحلة الثانية**

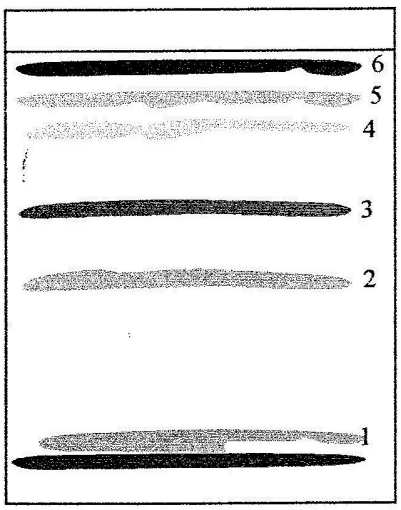
المركبات	اللون	R_f
1	أخضر مزرق فاتح	0,09
2	أزرق بنفسجي	0,55
3	احمر	0,73
4	وردي	0,82
5	أزرق فاتح	0,91
6	أحمر فاتح	0,95

*** المرحلة الثالثة**

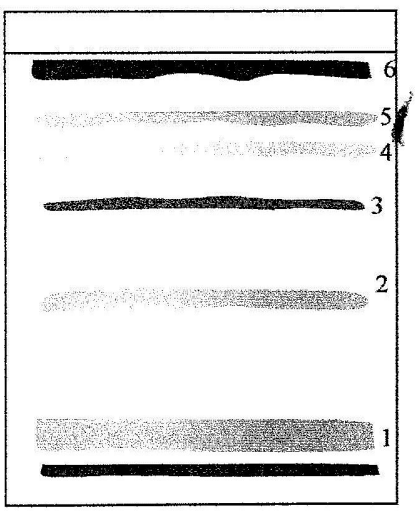
المركبات	اللون	R_f
1	أخضر مزرق فاتح	0,09
2	أزرق بنفسجي	0,5
3	احمر	0,71
4	وردي	0,71
5	أزرق فاتح	0,86
6	أحمر فاتح	0,95



شكل (1) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص n-butanol المرحلة الأولى



شكل (2) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص n-butanol المرحلة الثانية



شكل (3) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص n-butanol المرحلة الثالثة

يتضح من خلال مجمل النتائج وجود تشابه بين المركبات المفصولة من المستخلص البيوتانولي للمرحلة الثانية و الثالثة، و ذلك من حيث العدد، و اللون و حتى

معامل الاستبقاء، في حين تكون المرحلة الأولى مختلفة بعض الشيء، و ذلك بوجود مركبات لم تظهر في مستخلصات كل من المرحلتين الثانية و الثالثة.

كروماتوغرافيا العمود:

يخضع المستخلص الخام الإيثانولي لنبتة *Teucrium polium* الناتج من تبخير الايثانول لطريقة استخلاص الغليكوزيدات(الطريقة الأولى) إلى عملية فصل باستعمال كروماتوغرافيا العمود. يثبت العمود الكروماتوغرافي بصورة عمودية ثم توضع كمية قليلة من الرمل النظيف في أسفله بسمك حوالي نصف سم, و يمزج 25 غرام من السيلس (Kisselgel 40) لكل1 غ من المادة الخام مع كمية من الايثانول، تسكب على مراحل في العمود الزجاجي مع الضرب على الجدار للتخلص من فقاعات الهواء، حتى تتشكل طبقة متراصة من السليس سمكها 2 سم عندها تفتح حنفية العمود للتخلص من المذيب، و تستمر العملية حتى تشغل طبقة السليس ثلثي العمود لتتبع بوضع طبقة أخرى من الرمل، و من جهة أخرى يذاب 1 غ من المستخلص الإيثانولي في أقل كمية من الإيثانول و ينقل بواسطة ماصة باستور، بلطف ويوضع فوق طبقة الرمل، أما الطور المتحرك المستعمل فيتمثل في الإيثانول و الماء، حيث نبدأ بالإيثانول، ثم يضاف له الماء تدريجيا (إيثانول، 90%, 80%، 60%، 50%).

بعد جمع المذيبات الناتجة عن هذا الفصل، تجرى لها كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمراقبة و تحديد المركبات الموجودة في كل مذيب، و ذلك باستعمال النظام ماء: ميثانول (10:2).

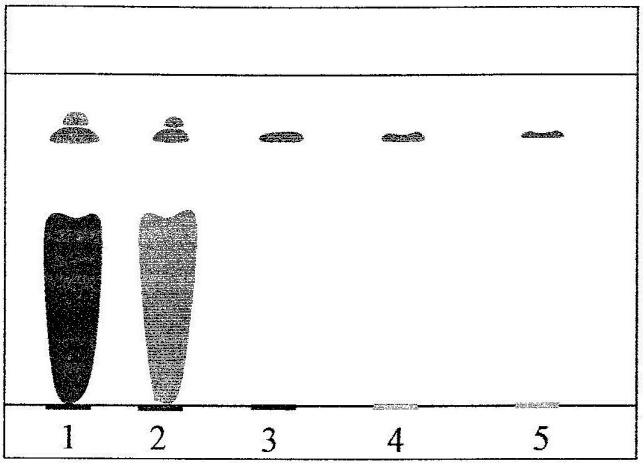
نتائج كروماتوغرافيا العمود (CC):

بعد إجراء كروماتوغرافيا العمود (CC)، المرفقة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) على المستخلصات الإيثانولية الثلاث، أمكن الحصول على النتائج التالية:

- **المرحلة الأولى :**

جدول (1): نتائج CC و CCM المرحلة الأولى:

CC		CCM		
تخفيف الإيثانول	لون المحلول	المركبات	اللون	R_F
إيثانول	أخضر	1	أحمر	0,64
		2	أخضر	0,79
		3	برتقالي	0,84
%90	أصفر	1	أحمر فاتح	0,63
		2	أخضر	0,79
		3	برتقالي	0,84
%80 و %60 و % 50	أصفر فاتح إلى شفاف	1	أخضر	0,79



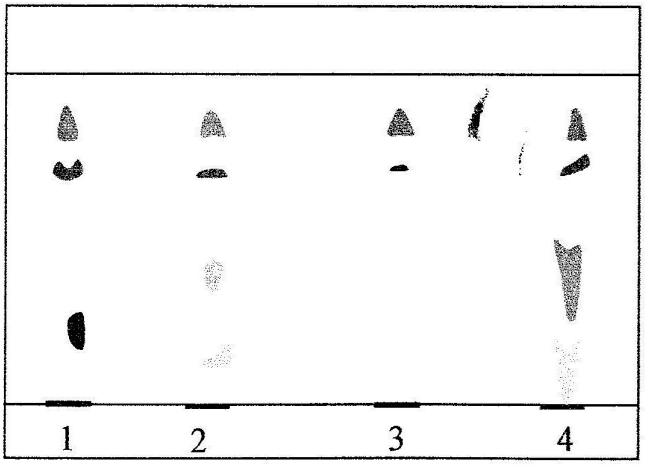
شكل 1: نتائج CCM المرحلة الأولى:

1: إيثانول
2: إيثانول 90%
3: إيثانول 80%
4: إيثانول 60%
5: إيثانول 50%

- **المرحلة الثانية**

جدول (2): نتائج CC و CCM المرحلة الثانية:

CC		CCM		
تخفيف الإيثانول	لون المحلول	المركبات	اللون	R_F
إيثانول	أخضر	1	أحمر	0,16
		2	أخضر	0,77
		3	أخضر مصفر	0,93
%90	بني	4	نيلي فاتح	0,05
		5	أزرق بنفسجي	0,41
		6	برتقالي	0,79
		7	أخضر مصفر	0.97
%80	أصفر	8	برتقالي	0,74
		9	أصفر مخضر	0,93
% 50	بني فاتح	10	أخضر مشع	0,12
		11	أزرق بنفسجي	0,39
		12	برتقالي	0,79
		13	أخضر مصفر	0,91



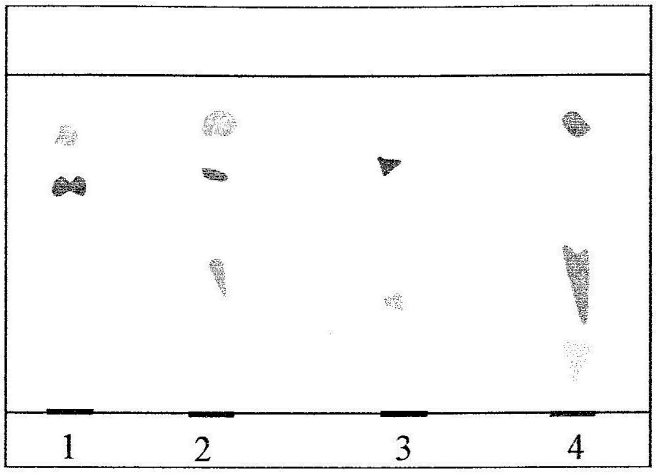
شكل 2: نتائج CCM المرحلة الثانية:

1: إيثانول
2: إيثانول 90%
3: إيثانول 80%
4: إيثانول 50%

- **المرحلة الثالثة**

جدول (3): نتائج CC و CCM المرحلة الثالثة:

CC		CCM		
تخفيف الإيثانول	لون المحلول	المركبات	اللون	R_F
إيثانول	أخضر	1	برتقالي	0,75
		2	أصفر	0,90
%90	بني	3	أزرق	0,49
		4	برتقالي	0,77
		5	أصفر	0,97
%80	بني داكن	6	أزرق	0,42
		7	برتقالي	0,74
% 50	بني مصفر	8	أخضر مشع	0,12
		9	أزرق بنفسجي	0,37
		10	أخضر	0,90



شكل 3: نتائج CCM المرحلة الثالثة:

1: إيثانول 4: إيثانول 50%
2: إيثانول 90%
3: إيثانول 80%

من خلال التقدير الكمي للمركبات الفلافونويدية لمراحل نمو نبتة *Teucrium polium ssp capitatum* ،وذلك باستخدام كروماتوغرافيا العمود(CC) وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) للمستخلص الايثانولي لهذه النبتة ،يظهر وجود بعض الاختلاف من حيث عدد المركبات التي أمكن فصلها والقابلة للذوبان في الايثانول ،الميثانول و الماء(قطبية) ،ويكون هذا الاختلاف واضحا في المرحلة الأولى حيث تم فصل 03 مركبات فقط ،على عكس المرحلتين الثانية والثالثة التي بين CCM وجود بعض الاختلاف بينهما،وذلك بعدم ظهور بعض المركبات في المستخلص الايثانولي للمرحلة الثالثة ،إلا أنه يلاحظ وجود نوع من التشابه بين نتائج المرحلتين.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص و عزل الغليكوزيدات الفلافونية لنبتة *Teucrium polium ssp capitatum* من منطقة بريكة و اختبار إحدى خواصها الطبية.قمنا بعزل أربع مركبات مختلفة، باستعمال المذيبات العضـــوية، وذلـــك انطلاقا من المجموع الهوائي لهذه النبتة (المرحلة الخضرية، مرحلة الإزهار، مرحلة نضج البذور).وقـــد بـــين طيـــف الأشعة تحت الحمراء وجود المجاميع الوظيفية الموافقة للغليكوزيدات الفلافونية.(.....C-O-C,C-H,C=O)

أما اختبار الفعالية البيولوجية، باستعمال طريقة الانتشار في وسط مغذ، فقد بين أن المركبات المعزولة ومستخلصاتها الايثانولية ذات فعالية مضادة لبكتيريا التقيحات الجلدية:

Staphyllococcus aureus, Pseudomonas aeruginosea, Proteus vulgarus, Escherichia coli

الكلمات المفتاحية: استخلاص، الغليكوزيدات الفلافونية،تأثير مضاد للبكتيريا، *Teucrium polium ssp capitatum*

Résume

Dans le but d'extraction et l'isolement des glycosides flavoniques de la plante *Teucrium polium ssp capitatum* ,récoltée de la région de Barika et pour le traitement de l'un des caractéristiques médicinale, nous avons isolé 4 composés différents de la partie aérienne de cette plante (stade végétatif, stade floraiscon et stade maturation des grains) , en utilisant des solvants organiques . Le spectre IR a montre la présence des groupements fonctionnels correspond des glycosides flavonique(C=O ,C-H,C-O-C.....)

En revanche , le teste de l'activité biologique , en utilisant la méthode de diffusion dans un milieu nutritif ,a montré que les composés isolés et leurs extraits ethanolique a un effet antibactérien contre les bactérie des absés cutanés *Pseudomonas aeruginosea ,Staphyllococcus aureus ,Escirichia coli,Proteus vulgarus.*

Mots clés : Extraction, Glycosides flavoniques, effet antibactirien , *Teucrium polioum ssp capitatum*

Summary

The aim of this work is to isolate the active compounds from Algerian medicinal plant using extraction and chromatography methods, then trying to identify their chemical structures and biological activity. For this purpose we have collected *Teucrium polium ssp capitatum* medicinal plant from Barika. This plant has been used for many local diseases treatment. Four compounds were isolated from the aerial parts and their structures studied by chemical reaction and IR, which showed the absorption bands of some functional groups such as C=O, O-H, C-O-C ...etc., this is may be consider as an indication for the presence of flavones glycosides.

Biological activity test was performed using diffusion method in a nutritive medium, raveled that the isolated compounds and their ethanolic extracted have antibacterial effect against the bacteriums of the cutaneous abses *Pseudomonas aeruginosea, Staphylloccus aureus, Escherichia coli, Proteus vulgarus.*

Key words: Extraction, Flavonic glycosides,Antibacterial effect,*Teucrium polium ssp capitatum.*

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص و عزل الغليكوزيدات الفلافونية لنبتة *Teucrium polium ssp capitatum* من منطقة بريكة و اختبار إحدى خواصها الطبية.قمنا بعزل أربع مركبات مختلفة، باستعمال المذيبات العضوية، وذلك انطلاقا من المجموع الهوائي لهذه النبتة (المرحلة الخضرية، مرحلة الإزهار، مرحلة نضج البذور).وقد بين طيف الأشعة تحت الحمراء وجود المجاميع الوظيفية الموافقة للغليكوزيدات الفلافونية.(C=O ,C-H,C-O-C.....)

أما اختبار الفعالية البيولوجية، باستعمال طريقة الانتشار في وسط مغذ، فقد بين أن المركبات المعزولة ومستخلصاتها الايثانولية ذات فعالية مضادة لبكتيريا النّيجات الجلدية:

Staphyllococcus aureus, Pseudomonas aeruginosea, Proteus vulgarus, Escherichia coli

الكلمات المفتاحية: استخلاص، الغليكوزيدات الفلافونية،تأثير مضاد للبكتيريا، *Teucrium polium ssp capitatum*

Résume

Dans le but d'extraction et l'isolement des glycosides flavoniques de la plante *Teucrium polium ssp capitatum* ,récoltée de la région de Barika et pour le traitement de l'un des caractéristiques médicinale, nous avons isolé 4 composés différents de la partie aérienne de cette plante (stade végétatif, stade floraiscon et stade maturation des grains) , en utilisant des solvants organiques . Le spectre IR a montre la présence des groupements fonctionnels correspond des glycosides flavonique(C=O ,C-H,C-O-C.....)

En revanche , le teste de l'activité biologique , en utilisant la méthode de diffusion dans un milieu nutritif ,a montré que les composés isolés et leurs extraits ethanolique a un effet antibactérien contre les bactérie des absés cutanés *Pseudomonas aeruginosea ,Staphyllococcus aureus ,Escirichia coli,Proteus vulgarus.*

Mots clés : Extraction, Glycosides flavoniques, effet antibactirien , *Teucrium polionm ssp capitatum*

Summary

The aim of this work is to isolate the active compounds from Algerian medicinal plant using extraction and chromatography methods, then trying to identify their chemical structures and biological activity. For this purpose we have collected *Teucrium polium ssp capitatum* medicinal plant from Barika. This plant has been used for many local diseases treatment. Four compounds were isolated from the aerial parts and their structures studied by chemical reaction and IR, which showed the absorption bands of some functional groups such as C=O, O-H, C-O-C ...etc., this is may be consider as an indication for the presence of flavones glycosides.

Biological activity test was performed using diffusion method in a nutritive medium, uveled that the isolated compounds and their ethanolic extracted have antibacterial effect against the bacteriums of the cutaneous abses *Pseudomonas aeruginosea, Staphylloccus aureus, Escherichia coli, Proteus vulgarus.*

Key words: Extraction, Flavonic glycosides,Antibacterial effect,*Teucrium polium ssp capitatum.*