



الجمهورية العربية السورية  
جامعة دمشق  
كلية العلوم - قسم الكيمياء

# تعيين التركيب الكيميائي للزيت العطري الأساسي في أوراق نبات المليسة و تعيين المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات من منقوع أوراقها

دأرة مقدمة لنيل درجة الماجستير في الكيمياء

إعداد

**محمد غياث ناصر الدين**

إشراف

الأستاذة المساعدة الدكتوراة

**ريتا منصور**

كلية الزراعة- قسم العلوم الأساسية

الأستاذة الدكتوراة

**ملك الجبة**

كلية العلوم- قسم الكيمياء

2015 م - 1436 هـ

Syrian Arab Republic  
Damascus university  
Faculty of Science  
Department of Chemistry



*Determination of the chemical composition of essential oil from leaves of  
lemon verbena (*lippia citriodora*) and determination of total phenolic  
compounds and total flavonoids from its infusion*

A study for Chemistry Master Degree

By:

*Mohammad Ghiath Naser AL-Deen*

Supervised by:

*Prof. Malak Aljoubbeh*

*Damascus university- Faculty of Science*

*Dr. Rita Mansoor*

*Damascus university- Faculty of Agriculture*

2015 – 1436



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية العلوم - قسم الكيمياء

## تصريح

أنا الموقع أدناه محمد غياث ناصرالدين أصرح بأن هذا البحث :  
تعيين التركيب الكيميائي للزيت العطري الأساسي في أوراق نبات المليسة و تعيين المحتوى  
القلي للفينولات و الفلافونويدات من منقوع أوراقها  
هو نتيجة بحث علمي قمت به في كلية العلوم بجامعة دمشق - قسم الكيمياء بإشراف  
الأستاذة الدكتورة ملك الجبة والأستاذة المساعدة الدكتورة ريتا منصور، ولم يسبق لهذا البحث  
أن قبل لأي شهادة وغير مقدم حالياً للحصول على أي شهادة أخرى.

المرشح

محمد غياث ناصر الدين



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية العلوم - قسم الكيمياء

## شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح محمد غياث ناصر الدين ، تحت إشراف الأستاذة الدكتورة ملك الجبة والأستاذة المساعدة الدكتورة ريتا منصور في مخابر قسم الكيمياء في كلية العلوم بجامعة دمشق.

الدكتور المشرف

أ.د. ملك الجبة

الدكتور المشارك

أ.م.د. ريتا منصور

المرشح

محمد غياث ناصر الدين

الجمهورية العربية السورية  
مجلس الوزراء  
كلية العلوم  
دمشق

## إلى من يهمه الأمر

تمت مناقشة هذه الرسالة وأجيزت بتاريخ 2015/9/30 من قبل لجنة التحكيم المؤلفة من الأساتذة:

عضواً مشرفاً



الأستاذ الدكتور ملك الجبة

الأستاذ في قسم الكيمياء بكلية العلوم جامعة دمشق

عضواً



الأستاذ الدكتور جمال محفوض

الأستاذ في قسم الكيمياء بكلية العلوم جامعة دمشق

عضواً



الدكتورة عماد القاضي

المدرس في قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم جامعة دمشق

## إلى من يهمه الأمر

إن طالب الماجستير محمد غياث محمود ناصر الدين قد أنهى التعديلات على رسالة الماجستير المحكمة بتاريخ 2015/9/30 و التي تحمل عنوان "تعيين التركيب الكيميائي للزيت العطري الأساسي في أوراق نبات المليسة وتعيين المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات من منقوع أوراقها" و تم اعتماد التعديل المطلوب.

د. عماد القاضي



أ.د. جمال محفوض



أ.د. ملك الجبة



بداية أحمد الله و أشكره على فضله و منه و إتمام نعمته علي علي إنجاز هذا العمل وما توفيقني إلا بالله.

كما أتقدم بالشكر الجزيل لأساتذتي الكرام الذين بذلوا أكبر الجهود لبلوغنا هذه الدرجة العالية و خاصة الأستاذة الدكتورة ملك الجبة و التي لم تبخل علي بأي جهد وكانت الناصح لي و الأخذ بيدي في كل مراحل العمل .

كما أتقدم بالشكر لمن كان له الدور الفاعل في إتمام هذا المنجز أ.د.م ريتا منصور و التي مدت لي يد العون زودتي بالمعلومات اللازمة

كما أتقدم بالشكر للسادة أعضاء لجنة التحكيم المتمثلة بالأستاذ الدكتور جمال محفوظ و الدكتور عماد القاضي على ملاحظاتهم القيمة التي أغنت العمل المنجز .

كما أشكر رئاسة جامعة دمشق المتمثلة بالأستاذ الدكتور محمد حسان الكردي و عمادة كلية العلوم السابقة المتمثلة بالأستاذ الدكتور عزات قاسم و عمادة كلية العلوم الحالي المتمثلة بالأستاذ الدكتور عدنان ديب و رئيس قسم الكيمياء أ.د. محمد جمال الخطيب لما قدموه من دعم للوصول لهذا العمل و لا أنسى بالاعتراف بفضل كل من ساهم بإنجاح و إتمام هذا العمل و أخص بالذكر الأستاذة ميساء الزيات على ما قدمته من دعم علمي و مخبري في التحاليل الحيوية المنجزة و الأستاذ يحيى محظية و أ. هبة سعيد و سعيد عبد السلام.

كما أنني أتوجه بخالص الشكر للهيئة العامة للتقانة الحيوية و المتمثلة بالأستاذ الدكتور عصام قاسم و د. لينا الأمير و د. نورس الأبرص و د. بسام العقلة و د. رضوان بدر الدين و أ. سمر العيسى لصبرهم و لما قدمه لي من تعاون لإنجاح هذا العمل .

كما أتقدم بالشكر إلى أساتذتي في قسم الكيمياء و خاصة الأستاذ الدكتور وليد البزرة

و لا أنسى أخوتي وزملائي من ساندوني و ساندتهم والذين أتمنى لهم كل التوفيق و النجاح و المستقبل الزاهر فلهم مني التحية وأخص منهم : قاسم مراد – ميسون الحافظ – ميادة عيسى – امتسال حمادة .

و أهدي هذا العمل لأبي الذي لا يمكنني أن أوفي حقه علي و أمي التي كانت لي في نوائب و عقبات الدهر و لأخوتي الذين وقفوا خلفي ودعموني في كل عمل أقوم به و ساندوني بدعائهم و قلوبهم .

الصفحة	فهرس المحتويات
V	فهرس الجداول
VIII	فهرس الأشكال
X	الاختصارات
2	تمهيد
	الفصل الأول : المليسة توصيفها و فوائدها و استخداماتها
6	1. المقدمة
7	2.التسمية و الانتشار الجغرافي
7	3.التصنيف النباتي
7	4.الوصف المورفولوجي
10	5.الوصف و التراث التاريخي
10	6. استخدامات و فوائد المليسة
11	7. الأثار الجانبية و التداخلات و المحاذير
12	8. الشروط البيئية و الزراعية
12	9. التركيب الكيميائي للمليسة
12	1.9.الزيت الأساسي العطري :
13	1.1.9.كيمياء الزيوت العطرية الأساسية
13	1.1.1.9.المجموعات الهيدروكربوني
13	1.1.1.1.9.الترينات
13	2.1.1.1.9.السيكوتريينات
14	3.1.1.1.9.الديتريينات
14	2.1.1.9.المجموعات العضوية المؤكسجة
14	1.2.1.1.9.الكحولات
14	2.2.1.1.9.الألدهيدات
15	3.2.1.1.9.الكيتونات
15	4.2.1.1.9.الفينولات
16	5.2.1.1.9.الإسترات

16	6.2.1.1.9. الأكسيدات و فوق الأكسيدات
16	7.2.1.1.9. اللاكتونات
17	8.2.1.1.9. المركبات الكبريتية
17	2.1.9. الدراسات المرجعية للزيت العطري الأساسي في المليسة
31	2.9. متعددات الفينول
31	1.2.9. كيمياء الفينولات
35	2.2.9. الدراسة المرجعية للفينولات في المليسة
43	10. الفعالية الحيوية لنبات المليسة
43	1.10. السلالات البكتيرية المستخدمة
43	1.1.10. المكورات العنقودية الذهبية
43	2.1.10. الإيشريشيا الكولونية
44	3.1.10. السالمونيلا التيفية
44	2.10. الدراسات المرجعية للفعالية الحيوية لنبات المليسة
48	أهمية البحث
48	أهداف البحث
	<b>الفصل الثاني : مواد البحث وطرائقه</b>
50	1. المواد الكيميائية المستخدمة
51	2. الأجهزة والأدوات المستخدمة
52	3. العوامل الممرضة المستخدمة
52	4. جمع عينات المليسة
52	5. استخلاص الزيت الأساسي العطري
53	6. طرائق تحضير المستخلصات المائية
53	1.6. النقع بدون غليان
53	2.6. النقع المستمر
54	7. تعيين المحتوى الكلي للفينولات
55	8. تعيين المحتوى الكلي للفلافونويدات
56	9. الدراسة الإحصائية
57	1.9. تحليل Univariate
58	2.9. تحليل الانحدار Regression

59	10- دراسة الفعالية الحيوية للمستخلصات المحضرة
59	1.10. تحضير العامل المضاد للنمو الجرثومي
59	2.10. تحضير وسط الأغار الزرعي ( البيئة )
60	3.10. تحضير المعلق الجرثومي
60	4.10. تحضير أطباق بتري الحاوية على الجرثوم الممتحن
60	5.10. إجراء اختبارات الحساسية باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص
	<b>الفصل الثالث : جمع النبات و تعيين الرطوبة</b>
63	1. موقع جمع النبات
63	2. زمن و شروط جمع الأوراق
64	3. تعيين الرطوبة في النبات
	<b>الفصل الرابع : الزيت الأساسي العطري للمليسة</b>
66	1. استخلاص الزيت العطري الأساسي
66	2. تحليل الزيت العطري باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية الموصول بمطياف الكتلة
67	1.1. نتائج تحليل الزيت العطري المستخلص في الطور الخضري من شهر أيار
71	2.2. نتائج تحليل الزيت العطري المستخلص في الطور الخضري من شهر تموز
76	2.2. نتائج تحليل الزيت العطري المستخلص في طور الإزهار من شهر تشرين الأول
84	3. مناقشة تغير التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص خلال أشهر الحصاد
85	1.3. السيترال
86	2.3. أكسيد بيتا- كاريفيلين
86	3.3. إر- كوركومين
86	4.3. بيتا- كاريفيلين
86	5.3. الليمونين
87	6.3. $\gamma$ - الإلمنين
87	7.3. د- الجرمانسين
87	8.3. 1،8- سينول
87	9.3. $\alpha$ - السيدرین
87	10.3. تاو- الكادينول
88	11.3. أسيئات الجيرانيال
88	12.3. بقية المركبات

---

الفصل الخامس: تعيين المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات في منقوع المليسة خلال مراحل النمو

- 91 1. طريقة النقع بدون غليان
- 91 1.1. الطور الخضري من شهر أيار ( أعلى معدل نمو )
- 93 2.1. الطور الخضري من شهر تموز ( منتصف الموسم )
- 94 3.1. الطور الخضري من شهر تشرين الأول ( الإزهار الكامل )
- 96 2. طريقة النقع المستمر
- 96 1.2. الطور الخضري من شهر أيار ( أعلى معدل نمو )
- 97 2.2. الطور الخضري من شهر تموز ( منتصف الموسم )
- 99 3.2. الطور الخضري من شهر تشرين الأول ( طور الإزهار )
- 100 3. مقارنة تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات بين طريقة النقع المستمر و طريقة النقع بدون غليان
- 101 4. مقارنة تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات خلال أشهر النمو
- الفصل السادس : الفعالية الحيوية للمليسة اتجاه الأحياء الدقيقة
- 108 الفعالية الحيوية اتجاه الأحياء الدقيقة للزيت العطري و منقوع المليسة
- 112 الاستنتاجات
- 113 التوصيات
- 114 المراجع
- 122 الملخص
- 123 Abtract

## فهرس الجداول

الصفحة

- 7 الجدول(1) التصنيف النباتي لنبات المليسة
- 18 الجدول(2) النسبة المئوية لمكونات الزيت العطري لشاي و أوراق المليسة في فرنسا  
[Carnat et al , 1999]
- 19 الجدول(3) النسبة المئوية للمجموعات الكيميائية للزيت العطري لنبات المليسة المستخلص في البرتغال  
[Gomes et al,2005]
- 20 الجدول( 4 ) التركيب المئوي للزيت العطري لنبات المليسة المستخلص في البرتغال  
[Gomes et al , 2005]
- 21 الجدول (5) التركيب الكيميائي للمكونات للزيت العطري في ساق وأوراق المليسة في البرتغال  
[Gomes et al ,2006]
- 22 الجدول ( 6 ) النسب المئوية للمجموعات المكونة للزيت العطري في ساق وأوراق المليسة في البرتغال  
[Gomes et al ,2006]
- 22 الجدول( 7 ) التركيب الرئيسي للزيت العطري في أوراق المليسة المستخلص بطريقة (SFE) في البرازيل  
[Pereira et al,2006]
- 23 الجدول(8) النسبة المئوية للزيت العطري في أوراق المليسة في اليونان المستخلص في شهري أيار و أيلول  
[Argyropoulou et al,2007]
- 24 الجدول( 9 ) النسب المئوية للمجموعات الوظيفية في زيت أوراق المليسة في اليونان المستخلص في شهري  
أيار و أيلول [Argyropoulou et al,2007]
- 26 الجدول( 10 ) مقارنة بين تركيبي الزيت العطري لكل من المليسة والزعتر في إيران  
[Alavi et al ,2008]
- 27 الجدول( 11 ) تركيب زيت المليسة العطري بطريقة UA-HS-SPME في إيران  
[Meshkatalasadat et al ,2010]
- 27 الجدول( 12 )مردود زيت المليسة العطري بطريقة UA-HS-SPME  
[Meshkatalasadat et al ,2010]
- 28 الجدول ( 13 ) التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري في إيران قبل فترة الإزهار باختلاف طرق التجفيف  
[Agah et al , 2012 ]
- 29 الجدول ( 14 ) التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري في إيران خلال الإزهار الكامل باختلاف طرق  
التجفيف [Agah et al , 2012 ]
- 30 الجدول ( 15 ) التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري من كيوم في إيران

- [Yousefzadeh et al, 2013]
- 31 الجدول ( 16 ) مقارنة التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري في المغرب حسب مياه الري  
[Bensabah et al, 2013]
- 36 الجدول (17) النسب المئوية للفينولات والزيت العطري في منقوع وأوراق المليسة  
[Carnat et al,1999]
- 37 الجدول (18) المحتوى الكيميائي للمكونات الرئيسية في أوراق المليسة بإيطاليا [Bilia et al , 2007]
- 41 الجدول (19) تغيرات الفينولات في المستخلصات المائية للمليسة تبعاً لتطور الورقة  
[ Ricco et al ,2011 ]
- 42 الجدول (20) محتوى الفينولات في منقوع ومغلي المليسة بالأرجنتين [Portmann et al ,2012]
- 46 الجدول (21) الفعالية الحيوية للمستخلص الميثانولي لأوراق و أزهار المليسة في إيران  
[Zare et al , 2011 ]
- 47 الجدول (22) الفعالية المضادة للجراثيم لزيت المليسة العطري باختلاف مياه الري  
[Bensabah et al, 2013]
- 47 الجدول (23) الفعالية المضادة للجراثيم للمستخلص الإيثانولي في إيران لأوراق المليسة  
[Koohsari et al , 2013]
- 50 الجدول (24) المواد الكيميائية المستخدمة في البحث
- 63 الجدول (25) أبعاد الأوراق والساق لنبات المليسة في مراحل النمو
- 64 الجدول (26) نسبة الرطوبة للأوراق الطازجة و المجففة %
- 67 الجدول (27) التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر أيار
- 69 الجدول (28) التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر أيار
- 71 الجدول (29) التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تموز
- 74 الجدول (30) التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تموز
- 76 الجدول (31) التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تشرين الأول
- 78 الجدول (32) التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تشرين الأول
- 81 الجدول (33) مقارنة الشطايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركب المدروس+الشظية العائدة للوزن  
الجزئي مع طيفه من مكتبة الجهاز
- 58 الجدول (34) النسب المئوية للمكونات الرئيسية للزيت العطري المستخلص خلال مراحل النمو
- 92 الجدول (35) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر أيار بطريقة النقع بدون  
غليان وفق أزمنة النقع المختلفة
- 93 الجدول (36) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تموز بطريقة النقع بدون  
غليان خلال أزمنة النقع المختلفة
- 94 الجدول (37) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تشرين الأول بطريقة

- 
- النقع بدون غليان خلال أزمنة النقع المختلفة
- 96 الجدول (38) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر أيار بطريقة النقع المستمر خلال أزمنة النقع المختلفة
- 98 الجدول (39) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تموز بطريقة النقع المستمر خلال أزمنة النقع المختلفة
- 99 الجدول (40) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تشرين الأول بطريقة النقع المستمر خلال أزمنة النقع المختلفة
- 100 الجدول (41) تدرج انخفاض درجة الحرارة أثناء النقع بدون غليان خلال أزمنة النقع
- 105 الجدول (42) تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في منقوع أوراق المليسة المجففة خلال مراحل النمو
- 106 الجدول (43) تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في منقوع أوراق المليسة الطازجة خلال مراحل النمو
- 109 الجدول (44) الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري لنبات المليسة خلال مراحل النمو
- 111 الجدول (45) الفعالية المضادة للجراثيم لمنقوع المليسة
-

## فهرس الأشكال

- 6 الشكل ( 1 ) . العقدة الورقية للمليسة ثلاثية الورقة
- 8 الشكل ( 2 ) المليسة في الطور الخضري من شهر أيار
- 8 الشكل ( 3 ) المليسة في الطور الخضري من شهر تموز منتصف الموسم
- 9 الشكل ( 4 ) المليسة في طور الإزهار الكامل من شهر تشرين الأول
- 13 الشكل ( 5 ) بنية بعض مركبات التربينات [الحكيم و أخرون، 2012 ]
- 14 الشكل ( 6 ) البنية الكيميائية لبعض مركبات الزيوت العطرية الكحولية [الحكيم و أخرون، 2012 ]
- 15 الشكل ( 7 ) البنية الكيميائية لبعض مركبات الزيوت العطرية: (a) الألهيدية و (b) الكيتونية [الحكيم و أخرون، 2012]
- 16 الشكل ( 8 ) البنية الكيميائية لبعض مركبات الزيوت العطرية الفينولية [الحكيم و أخرون، 2012]
- 17 الشكل ( 9 ) بعض مركبات الزيوت العطرية الأوكسجينية: (a) الإسترات و (b) الأوكسيدات و (c) اللاكتونات [الحكيم و أخرون، 2012]
- 17 الشكل ( 10 ) البنية الكيميائية للسيرنجين [الحكيم و أخرون، 2012]
- 25 الشكل ( 11 ) طيف FT-IR للسيترال و الليمونين و للزيت العطري المستخلص في أيار و أيلول [Argyropoulou et al, 2007]
- 32 الشكل ( 12 ) الأصناف الرئيسية للفينولات [Bravo, 1998]
- 33 الشكل ( 13 ) أقسام الحموض الفينولية [Tsao, 2010]
- 34 الشكل ( 14 ) الأقسام الرئيسية للفلافونويدات [Dai et al, 2010]
- 34 الشكل ( 15 ) أصناف التانينات [Dai et al, 2010]
- 35 الشكل ( 16 ) الستلبيينات و الليغنانات [Dai et al, 2010]
- 35 الشكل ( 17 ) الفينولات الأמידية في الأطعمة [Tsao, 2010]
- 38 الشكل ( 18 ) البنية الكيميائية للمكونات الرئيسية في المستخلص المائي لأوراق المليسة في إيطاليا [Bilia et al , 2007]
- 38 الشكل ( 19 ) البنية الكيميائية للفيتكسين و الإيزوفيتكسين [Becker et al , 2005]
- 39 الشكل ( 20 ) البنية الكيميائية للأرتيميتين و الهيسبيردين [Qnais et al , 2009]
- 39 الشكل ( 21 ) كروماتوغرام HPLC للمركبات الفينولية بالمليسة في اليونان [Piné et al , 2009]
- 40 الشكل ( 22 ) البنية الكيميائية للمركبات الفينولية في المستخلص المائي للمليسة في اليونان [Piné et al , 2009]
- 52 الشكل ( 23 ) جهاز التقطير الزيوت الطيارة وفق دستور الأدوية الأوروبي

- 55 الشكل (24) : منحني معايرة حمض الغاليك
- 55 الشكل (25) : أنماط الفراغية للمعقد المتشكل للألمنيوم مع الفلافونويدات
- 56 الشكل (26) : منحني معايرة الكيرستين
- 57 الشكل ( 27 ) جداول نتائج المعالجة الإحصائية باستخدام تحليل Univariate
- 58 الشكل ( 28 ) جداول نتائج المعالجة الإحصائية باستخدام تحليل الانحدار Regression
- 59 الشكل (29) جهاز مكفارلند Mc Farlende
- 60 الشكل (30) حجرة الزرع الجرثومي Laminar Flow
- 61 الشكل ( 31 ) A : الحاضنة ، B : الأوتوغلاف ، C : الحمام المائي
- 64 الشكل (32) جهاز قياس الرطوبة
- 66 الشكل ( 33 ) جهاز التقطير
- 69 الشكل (34) كرماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر أيار
- 71 الشكل (35) كرماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر أيار
- 73 الشكل (36) كرماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تموز
- 76 الشكل (37) كرماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تموز
- 78 الشكل (38) كرماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تشرين الأول
- 80 الشكل (39) كرماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تشرين الأول
- 92 الشكل (40) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر أيار بطريقة النقع بدون غليان
- 94 الشكل (41) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تموز بطريقة النقع بدون غليان
- 95 الشكل (42) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تشرين الأول بطريقة النقع بدون
- 97 الشكل (43) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر أيار بطريقة النقع المستمر
- 98 الشكل (44) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تموز بطريقة النقع المستمر
- 100 الشكل (45) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تشرين الأول بطريقة النقع المستمر
- 101 الشكل (46) الارتباط بين TP و TF في منقوع الأوراق المجففة خلال مراحل النمو
- 102 الشكل (47) الارتباط بين TP و TF في منقوع الأوراق الطازجة خلال مراحل النمو
- 103 الشكل (48) مخطط الاصطناع الحيوي للفينولات داخل النبات [Tohge et al , 2013]
- 104 الشكل (49) دورة اصطناع الفلافونويدات في النبات [ Mato et al , 2000 ]
- 108 الشكل (50) هالات التنشيط للزيت العطري على السلالات الجرثومية بالتركيز المختلفة
- 110 الشكل (51) مقارنة هالات التنشيط للزيت العطري على السلالات الجرثومية خلال مراحل النمو
- 110 الشكل (52) تغير نسبة المكونات الرئيسية بالزيت العطري خلال مراحل النمو

---

## الاختصارات

Di Methyl Sulfoxide	<b>DMSO</b>	ثنائي متيل سلفوكسيد
Total Phenols	<b>TP</b>	المحتوى الكلي للفينولات
Total Flavonoids	<b>TF</b>	المحتوى الكلي للفلافونويدات
Solid Phase Micro Extraction	<b>SPME</b>	الاستخلاص الميكروني بالطور الصلب
Gallic acid Equivalent	<b>GaE</b>	مكافئات حمض الغاليك
Quercetin Equivalent	<b>QE</b>	مكافئات الكيرستين
Standard deviation	<b>SD</b>	الانحراف المعياري
High Performance Liquid Chromatography	<b>HPLC</b>	كروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي
Gas Chromatography -Mass spectrometry	<b>GC-MS</b>	كروماتوغرافيا الغازية المربوطة بمطياف الكتلة
supercritical fluid extraction	<b>SFE</b>	الاستخلاص بالموائع فوق الحرجة
Thin Layer Chromatography	<b>TLC</b>	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

## تكميل

لقد جذب اهتمام الإنسان منذ بداية وجوده على الأرض أمور عديدة , وكان للصحة و الجمال قدر هام في حياته وقد دفعاه للبحث عن السبل التي تؤدي إليهما في كل ما حوله. وقد ربط الإنسان الأول بين النباتات البرية التي تعيش حوله و بين الأمراض التي يصاب بها ، فاستعمل هذه النباتات أو أجزاء منها في التداوي من هذه الأمراض, كما انتخب من هذه النباتات تلك المفيدة له من النواحي الغذائية و الدوائية بسبب معرفته النباتات السامة والضارة . إن استعمال النباتات الطبية في المداواة قديم قدم الإنسان فقد أثبتت العديد من الدراسات الحديثة الفعالية العلاجية للعديد من النباتات التي استعملتها الشعوب المختلفة في التداوي مثال ذلك جذور الراولفيا *Rauwolfia* الذي استعمله الهنود منذ أكثر من ألفي عام حيث تبين حديثاً نجاعته في علاج ضغط الدم وذلك في منتصف القرن العشرين ، وكذلك بذور نبات الستروفانثوس *Strophanthus* التي استخدمتها بعض الشعوب الإفريقية في تحضير ما يسمى سم السهم في علاج الأمراض القلبية ونبات الجنسنغ المعروف في الطب الصيني حيث يستخرج منه حالياً العديد من الأدوية المنشطة للجملعة العصبية وللدورة الدموية . ومن أكثر الشعوب التي اهتمت بالتداوي بالأعشاب الصين و الفيتنام و الهند إضافة للإغريق و للمصريين القدماء و العرب [العودات , 2001] .

لقد بلغ المصريون القدماء درجة عالية من المهارة في الطب و العلاج كما جاء في البرديات التي تركوها منذ آلاف السنين , ووجدت في نقوشهم صور كثير من الأعشاب الطبية التي استعملوها في علاج مرضاهم , ومن البرديات التي عثر عليها بردية ايبيرس التي تعتبر من أهم البرديات الطبية التي كتبت سنة 1550 قبل الميلاد وشملت 877 وصفة طبية من بينها فقط 12 وصفة أساسها التعاويذ السحرية [العودات , 2001]. وإن فضل الأطباء العرب كبير في هذا المجال ولا بد من تأكيد أهمية الشيخ ابن سينا الذي أوثق الإنسانية مؤلفات كثيرة في الطب ,من كتب ورسائل وقد جاءت معالجته لأمر التداوي بالنباتات بالكتاب الثاني من سفره الطبي الضخم المعروف باسم القانون في الطب و إن الكتاب يدرس في بعض المعاهد الطبية الأوروبية ,وإن أجيالاً من الأطباء تتخرج من الطب عليه, وقد خرج إضافة إلى الشيخ ابن سينا من العرب عشابون عظام أمثال ابن البيطار وداود الأنطاكي و الطبيب القرطبي الغافقي وغيرهم الكثير . ونجد في قراءة التاريخ العربي الإسلامي قصصاً كثيرة عن اهتمام أجدادنا العرب المسلمين الأوائل في المعالجة الناجعة و التعلق بكل ما هو طبيعي ونافع وفطري و البعد ما أمكن عن كل ما هو ضار ومعقد فكان الرازي يقول : ((لا تعالج بالدواء إن استطعت أن تعالج بالغذاء وحده , ولا تعطي دواء مركباً إذا استطعت أن تعالج بدواء بسيط)). وكما نرى فإن أطباءنا العرب

---

كانوا يبدؤون العلاج بأقرب الأشياء إلى طبيعة الإنسان وفطرته وذلك بمجرد تعديل قائمة غذائه ، فإذا لم يفلحوا لجؤوا إلى وصف أعشاب من بيئته يقدمونها له من غير أي تغيير في طبيعتها ، من غير إضافة أو استخلاص أو تجزئة. ولا يعني هذا أنهم لم يقوموا بالتجارب عليها بل أرادوا عدم التدخل إلا للضرورة ، ذلك أنهم كانوا ينظرون باحترام كبير إلى الطبيعة ومنتجاتها باعتبارها صناعة يد إلهية حكيمة لا تخطئ [ياسين،1993] .

ولقد تعرضت النباتات الطبية ، مع الأسف الشديد ، في العصر الحديث لمتوجات متضاربة ومتناقضة فتراجعت أمام تكاثر السكان وزيادة وتوسع العمران ، ومن ثم تدهور الغطاء الأخضر النباتي و الزراعي ليحل محله الامتداد السرطاني البشع لجشع البناء محولة الحياة إلى أجواء ملوثة خانقة بدلاً من حياة الأشجار وثمارها وظلالها وعملها الطبيعي في تنقية الجو وبث الأكسجين [ياسين،1993] ، واعتقد البعض بأن العودة لاستعمال النباتات الطبية في التداوي هو ضرب من التخلف أو الردة إلا أن الواقع عكس ذلك فقد أوضحت البحوث الحديثة أن الاعتماد على المواد العلاجية الصناعية له الكثير من السلبيات التي تجلت في التأثيرات الجانبية وسميتها المزمنة [العودات،2001] ، إضافة للصحة العالمية اتجاه شطر النباتات الطبية لما تحويه من مركبات كيميائية يمكن أن تعتبر خامات أولية لم تكن معروفة وليس لها بديل في المركبات الصناعية [سيد ،2006] مما عزز القناعة بأنه ما زال هناك متسع لاستعمال النباتات الطبية جنباً إلى جنب مع الأدوية الصناعية [العودات،2001]. وقد تبين في آخر الدراسات الصادرة حديثاً في عدد من جامعات أوروبا أن تياراً يطالب بالعودة إلى الطبيعة حيث أعيد تدريس مادة العلاج بواسطة النباتات و زيوتها و عطور الزهور وورق الأعشاب و التي تعتبر بدائل مفيدة للأدوية المركبة الكيميائية [ياسين،1993] .

أخذت الحكومات في العالم تستجيب لتنظيم أدوية الطب الشعبي\* ، وارتفع عدد الدول التي وضعت تنظيمات وضوابط تتعلق بالأدوية العشبية من 52 دولة في عام 1994 إلى 69 دولة في عام 2000، وازدادت في الوقت نفسه في الدول المتطورة شعبية الطب البديل و التكميلي و ازداد في العديد من الدول تركيبات الطب الشعبي و التدريب عليه . حيث يتميز الطب الشعبي و التكميلي و البديل بكثير من الجوانب الإيجابية كتنوعه ووفرتة و القبول الواسع به من قبل الشعوب النامية ، وزيادة شعبيته في الدول المتطورة وانخفاض كلفته النسبية ، وعدم احتياجه للمقدرة التكنولوجية العالية، ولكن

---

\*-عرفت منظمة الصحة العالمية الطب الشعبي بأنه ممارسات طبية متفاوتة تستعمل أساليب ومعارف وعقائد متنوعة، كما تشمل استعمال النباتات و الحيوانات أو الأدوية ذات القاعدة المعدنية أو جميع ذلك ، هذا إضافة إلى معالجات اليدوية أو التمارين بقصد المحافظة على الصحة .

هناك الكثير من المواضيع التي يجب الوقوف عندها , ولعل أهمها :

1. تطوير السياسة الوطنية في هذا المجال وضرورة وضع آليات ضابطة ومنظمة ومشجعة للمحافظة على ممارسة جيدة في هذا المجال.

2. التأكد من تعليم وتدريب مقدمي الخدمات الطبية الشعبية على درجة كافية .

3. بالرغم من أن كثير من معالجات الطب الشعبي ذات قدرات واعدة ويزداد استعمالها غير أنها في كثير من الحالات لم تخضع لاختبار ولم يراقب استعمالها ولم تعرف تأثيراتها الجانبية .

4. يتطلب الإعداد الجيد للمنتجات ذات الجودة العالية و المضمونة مراعاة جملة من الضوابط من جمع و تغليف و حفظ وغيرها كما يتطلب اتباع إجراء ضبط الجودة [العودات, 2010] .

ومن الضروري في النهاية أن نذكر هنا بأن التداوي بالنباتات سيف ذو حدين, فهناك الفائدة الكبرى من جهة , يقابلها خطورة كامنة في سوء استعمالها من جهة ثانية مما قد يسبب التسمم أحياناً أو الضرر الصحي الكبير. وهذا ما يحدث عند استعمال وصفة شعبية في غير محلها , كالاتباس في نوع النبات وأخذ غيرها مكانها , أو استعمال نباتات سامة لبعض أنواع الفطور أو الإكثار من مشروب الأعشاب المغلية الذي يعطي مفعولاً معاكساً للهدف , واستعمال غلي الأوراق بدلاً من الأزهار أو العكس وذلك بسبب الجهل أو عدم المعرفة , أي بمعنى آخر لكل نبتة أو عشبة خصائص معينة إما في جذورها أو ثمارها أو أوراقها , ولا فائدة تجنى في استعمال جزء منها بدل الآخر . ولهذا يجب على المريض الذي يود استعمال هذه الطريقة في المعالجة , بعد أن أصبحت المعالجة بالأعشاب طريقة علمية معترف بها , أن يستشير طبيباً متمرساً و ذا خبرة في هذه العلوم [ياسين , 1993] .

يوجد في سوريا عديد من الأنواع النباتية الطبية التي تنمو في بيئات شديدة التنوع (الحقول والمزارع والجبال و البادية) . كما أن ظروف المناخ المعتدل والمتنوع في بلادنا تجعل البيئة مناسبة لزراعة كثير من الأنواع النباتية الطبية ,سواء لاستهلاك المحلي أو لأغراض التصدير, والتقدير الأولي للأنواع النباتية الطبية في سورية يزيد عن 300 نوع وهي تستعمل شعبياً لكن دون دراية كافية في الغالب بالأساس العلمي الذي يبين مكوناتها الفعالة وفوائدها وتحضيرها وجرعاتها العلاجية والفترة الزمنية اللازمة لتناول الدواء [العودات, 2001] , مما أوضح الحاجة من إجراء دراسات عدة لإيضاح ما فيها من فوائد ومحاذير , و قد سعينا في بحثنا هذا لتسليط الضوء على أحد هذه النباتات العطرية الطبية وهو نبات المليسة *Lippia citriodora* المنتمي للفصيلة الفربيونية (*Verbenacea*) و المعروف بغناه بالزيوت الأساسية essential oil و التربينات Terpene وغناه بالفينولات كالفلافونويدات Flavonoid [Barnes,2007] و الفينيل بريانوئيد phenylpropanoid و الإيروويدات iridoid [Bilia,2007]

## الفصل الأول

# المليسة توصيفها و فوائدها و

# استخداماتها



## المليسة توصيفها و فوائدها و استخداماتها

### 1. مقدمة:

يشتمل جنس الليبيا *Lippia* على 200 نوع من الأعشاب و الجنبات و الأشجار الصغيرة وهذه الأنواع تنتشر وتتوزع بشكل أساسي في جميع أنحاء بلدان أمريكا الجنوبية و الوسطى و إفريقيا الاستوائية [Terblanche' et al, 1996]. وقد أشار بعض المصنفين إلى أن هذا الجنس يحتوي أكبر عددٍ من الأنواع حيث يتباين عدد الأنواع التي يضمها هذا الجنس من باحث لأخر فذكر R. A. Howard أنه يضم نحو 400 نوعاً ، في حين يذكر Judd أنه يضم 200 نوع نظراً لاختلافهم في حدود هذا الجنس . و قد قام المصنف Moldenke بالمقارنة بين الأوصاف العامة التي تعطى لهذا الجنس من قبل مصنفين عدة خلال السنوات (1849-1969) وخلص إلى أن جميع هؤلاء المؤلفين أدرجوا الأجناس *Acantholippia* و *Aloysia* و *Phyla* ضمن جنس *Lippia* . إلى جانب ذلك فقد تم نقل بعض الأنواع من جنس *Lantana* إلى جنس الليبيا *Lippia* [Munir, 1993]. و سنتناول في هذا البحث نبات المليسة الذي ينتمي لهذا الجنس *Lippia* من الفصيلة الفرينينية (*Verbenaceae*) .

### 2. التسمية و الانتشار الجغرافي :



إن الاسم العلمي للمليسة هو *Lippia Citriodora* حيث يسمى الجنس *Lippia* تخليداً للعالم الإيطالي Augustin Lippi [ Doglas , 2001 ; Loe , 2009 ] أما الاسم الواسف لنوعها *Citriodora* فهو ليموني الرائحة [Doglas,2001]، كما يطلق عليها أسماء عدة مثل *Aloysia citrodora* و *Aloysia triphylla* وذلك على شرف ماريا لويزا أميرة بارما زوجة تشارلز الرابع ملك إسبانيا أما *triphylla* فيعني ثلاثي الأوراق، الشكل (1) [ الحكيم وآخرون، 2012] .

الشكل ( 1 ) . العقدة الورقية للمليسة

ثلاثية الورقة

للمليسة عدة أسماء شائعة ، حيث تسمى أيضاً اللوزة الليمونية أو نبات رعي الحمام كما يطلق عليها بالإنكليزية *Lemon verbena* في حين بالفرنسية *Verveine citronnée* ، وهي ذات استخدام واسع في الطب الشعبي و التطبيقات الطبية [ الحكيم وآخرون ، 2012 ]

إن الموطن الأصلي للمليسة في أمريكا الجنوبية في تشيلي و الأرجنتين و البيرو و الأورغوي و قد تم نقلها إلى أوروبا في أواخر القرن السابع عشر، وهي تزرع حول حوض البحر المتوسط [Doglas,2001]. حيث انتشرت جنوب أوروبا، خاصة إيطاليا و إسبانيا و فرنسا و في جنوب إفريقيا و خاصة المغرب إضافة للهند و تونس [Bruneton, 1999] . وقد أدخلت إلى سورية و لبنان و فلسطين منذ فترة طويلة [الحكيم وآخرون،2012] .

### 3.التصنيف النباتي: [GRIN Taxonomy, 2010 ; Pascual et al, 2001 ]

تنتمي المليسة للعائلة الفربيونية *Verbenaceae* و يوضح الجدول (1) التصنيف النباتي لها.

الجدول(1) التصنيف النباتي لنبات المليسة

<i>Plantae</i>	Kingdom	المملكة
<i>Magnoliophyta</i>	phylum	الشعبة
<i>Magnoliopsida</i>	Class	الصف
<i>Lamiales</i>	Order	رتبة
<i>Verbenaceae</i>	Family	الفصيلة
<i>Lippia</i>	Genus	الجنس
<i>L.citriodora</i>	Species	النوع

### 4.الوصف المورفولوجي:

إن نبات المليسة هو عبارة عن جنية صغيرة متساقطة الأوراق في المناطق الاستوائية ذات الشتاء البارد أو الجاف ، طولها 1-4 م . الأفرع مخططة خشنة . الأوراق : رمحية ، سوارية ( تتوضع غالباً في الدورة الواحدة ثلاثة أوراق ) تنشر رائحة الليمون و لاسيما عندما تترك باليد ، تامة الحافة ، قصيرة المعلاق ، طولها من 5-10 سم ، تحمل في وجهها السفلي غدد لاطئة مفرزة لزيت طيار ، الأعصاب الجانبية التي

تنبت عن العصب الرئيسي تأخذ وضعاً شبه متعامد معه . النورة شبه سنبلية ، مترخية الأزهار انتهائية ، طولها نحو 10 سم. ويظهر الشكلان (2) و (3) المليسة في الطور الخضري من شهري أيار و تموز.



الشكل ( 2 ) المليسة في الطور الخضري من شهر أيار



الشكل ( 3 ) المليسة في الطور الخضري من شهر تموز منتصف الموسم

الأزهار: بيضاء أو وردية أو ليلكية صغيرة الحجم.[الحكيم وآخرون ، 2012 ] تزهر في أواخر الصيف في أيلول و تشرين الأول [ Loe،2009 ].الكأس أنبوبية ، موبرة ، طولها 3 مم، تنتهي بأربعة أسنان . تلتحم بتلات التويج الخمسة في أنبوب طوله 4-5 مم . المذكر أربع أسدية بطولين مختلفين ( شفع طويل وآخر قصير )، متضمنة في أنبوب التويج غالباً . الثمرة نووية لا تبلغ دائماً مرحلة النضج [ الحكيم وآخرون ، 2012 ] ويظهر الشكل (4) المليسة في طور الإزهار الكامل .



الشكل ( 4 ) المليسة في طور الإزهار الكامل من شهر تشرين الأول

## 5. الوصف و التراث التاريخي:

إن أول عالم لاحظ هذا النبات هو عالم النبات الفرنسي فيليبرت كوميرسون Philibert Commerson حيث قام بجمعه من بيونس أيرس وذلك في العام 1784 م ، وفي العام 1785 م تم نقلها إلى حديقة الملكية بمدريد في إسبانيا [ Armada, 1992 ] حيث وصفه كل من البروفسور Casimiro Gómez Ortega و البروفسور Antonio Palau yVerdera و أطلقوا عليه اسم *Aloysia citrodora* على شرف ماريا لويزا أميرة بارما و زوجة تشارلز الرابع ملك إسبانيا [Loe, 2009 ; Armada , 1992]. وقد كان العالم L'HERITIER Brutelle هو أول من وصفها وصنفها [Armada, 1992]، كما وجد النبات فيما بعد في أدغال أميركا الجنوبية من قبل عالم نبات الذي أطلق اسم الليبيا *Lippia* على هذا الجنس تخليداً لذكرى عالم النبات الإيطالي Augustin Lippi الفرنسي الولادة والذي قتل في الحبشة في العام 1709 م [ Loe ،2009 ].

## 6. استخدامات و فوائد المليسة:

يستخدم نبات المليسة في الطب الشعبي لتهدئة الشعب الهوائية واحتقان الأنف [ Loe , 2009 ; Rogers , 2007] و لعلاج الربو و التشنجات والبردية و الإسهال و انتفاخ البطن والقلق و الأرق [Hellemont , 1986 ; Newal et a, 1996; Graça et al, 1996] وذلك بتحضير المغلي ( النقع المستمر ) و شاي الأعشاب ( المنقوع ) من أوراقها كما يوصى به كمسكن ومضاد للالتهاب وخافض للحرارة [Pascual et al, 2001] وتم التأكد من خواصه المهدئة والمسكنة بتجارب وطرائق دوائية حيث يعود الفعل المسكن لها لوجود مادة *verbascoside* التي تم عزلها من النبات باستخلاصها بالميتانول ثم بعد ذلك بخلات الإيثيل [Nakamura et al, 1997] و التي تعد من أهم الفينولات الرئيسية وخاصة الفلافونويدات الموجودة في شاي الأعشاب المحضر من المليسة والتي تعد إلى جانب زيتها الأساسي المسؤولة عن هذه الخصائص [Carnat et al, 1999]. كما تبدي المليسة فعالية مضادة للالتهاب وتستخدم في علاج السرطانات و الزهايمر و هذا يعود لوجود المركب الرئيسي للفلافونويدات فيها *Luteolin 7-digluconide* [ Sawmiller el at , 2014 ; Carnat et al , 1995 ] [الحكيم وأخرون ، 2012].

إن المليسة مفيدة جداً للنساء ، حيث استخدمت في الطب المصري القديم من قبل القابلات لتحفيز تقلصات الرحم في المراحل الأخيرة من الحمل بتقديم الشاي المحضر منها للمرأة الحامل ، وقد تم اليوم عزل مادة *verbaline* منها و التي تستخدم كمنشط لتقلصات الرحم . و لا يستخدم زيتها العطري داخلياً

أثناء الحمل بل على شكل كمادات باردة أو بخور للرائحة فهي ذات رائحة منعشة منبهة و تساعد في عملية الحمل التي تتطلب قدرةً على التحمل . كما أنها تحفز إنتاج الحليب و مفيدة لبعض حالات العقم [ Rogers, 2007 ] .

كما أظهر زيتها العطري فعالية مضادة للجراثيم و الفطور وذلك خاصة عند تطبيقه على العوامل الممرضة مثل الإيشريشيات الكولونية *Escherichia coli* والمتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis* والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* و الملوية البوابية *Helicobacter pylori* وفطر المبيضة البيضاء *Candida albicans* وعصيات القيق الأزرق *Pseudomonas aeruginosa* (الزائفة الزنجارية) [ Bensabah et al, 2013; Ansari et al, 2012; Sartoratto et al, 2004 ] [ Ohno , 2003 ; Cowan ,1999] بالإضافة لفعالية مضادة للأكسدة و الخواص المضادة للحشرات [Khani et al ,2012;Alavi , 2011; Pereira et al , 2006] ، ودوراً مسكناً على الجهاز الهضمي فهو يفتح الشهية ويحفز إفراز المادة الصفراء وله فعل مسكن على الكبد كما يقلل من الالتهابات و الإنتانات, كما يسكن الزيت خفقان القلب ويساعد في حالات القلق والسهاد الناجمة عن بعض الحالات العصبية [Doglas,2001] ، و يستخدم موضعياً للعناية بالجلد حيث يعمل على شد أنسجته حيث يستخدم زيتة العطري و الكريمات الحاملة له في مساجات التدليك للتخلص من التشنجات و في حمامات طبيعية لتحقيق طراوة ونعومة للبشرة ,كما أن مكثف مستخلص الأوراق يساعد على التقليل من الانتفاخ حول العينين [Cooke ,2010]. كما تستخدم أوراقها في صناعة العطور و كإضافات للأغذية والأطعمة[Pascual et al, 2001].

### 7. الأثار الجانبية و التداخلات و المحاذير:

يمكن أن يؤدي استخدام زيتها الطيار خارجياً إلى ظهور حساسية جلدية لاسيما عند التعرض لأشعة الشمس . لذلك يفضل دهن الجلد به مساءً. يتعارض استعمال النبات مع المهدئات و أدوية الدرق و بالتالي لا يستعمل إذا أخذت المهدئات لاضطرابات النوم أو الاكتئاب أو الأدوية المنظمة للدرق , كما لا يعطى في حالات الحمل و الإرضاع دون مراقبة طبية . [ الحكيم وأخرون ، 2012 ] .

## 8. الشروط البيئية و الزراعية :

تنمو المليسة طبيعياً في المناطق المعتدلة و شبه المدارية حيث يتطلب النبات مناخاً رطباً دافئاً مع إمكانية تحمله لانخفاض درجة الحرارة لفترات قصيرة . كما يتطلب مكاناً مشمساً محمياً من البرودة والرياح و يفضل الترب الخفيفة و تتجح زراعته في الأراضي المتوسطة الخصوبة إذا كانت جيدة الصرف . إن الأكثر شيوعاً في الإكثار من النبات هو استخدام العقل للفروع الفتية أو نصف المتخشبة والتي تجذر في المشاتل في نهاية الربيع و بداية الصيف ثم تنقل بعد عام إلى الأرض و حمايتها من الصقيع و تقديم العناية اللازمة لها من تسميد وري معتدل . [ الحكيم وآخرون ، 2012 ]

## 9. التركيب الكيميائي لنبات المليسة:

إن أهم مكونات المليسة هي الزيت العطري و متعددات الفينول ، خاصة الحموض الفينولية و الفينيل بروبانويد و الفلافونويدات و مشتقاتها، حيث تعزى الخواص الطبية و العلاجية التي تتمتع بها المليسة لهذه المكونات و سنتناول كل مجموعة على حدا بالترتيب .

### 1.9. الزيت الأساسي العطري :

تعرف الزيوت الأساسية بأنها الزيوت التي تتبخر أو تتطاير دون أن تتحلل ، وهذا ما يميزها عن الزيوت الثابتة Fixed oils ، حيث أن هذه الأخيرة لا تتطاير وإذا عرضت للتبخير أو التسخين فإنها تتحلل. و يطلق عليها اسم الزيوت العطرية لرائحتها العطرية الجميلة ، و هي لا تذوب بالماء بل بالمذيبات العضوية كالكلوروفورم و الإيثانول و في الإيثير لذلك يطلق عليها الزيوت الإيثيرية Ethereal oils [الحكيم و آخرون ، 2012] .

تواجد الزيوت الأساسية في أكثر من ألفي نبات تمثل حوالي ستين فصيلة نباتية و تكثر بصفة خاصة في بعض الفصائل مثل الفصيلة الغارية Lauraceae و الفصيلة الشفوية Labiatae و الفصيلة الخيمية Umbelliferae و الفصيلة الأسيية Myrtaceae و الفصيلة المركبة Compositae و الفصيلة الصنوبرية Pinaceae توجد الزيوت الأساسية في كافة الأجزاء إما في كافة أجزاء النبات أو في بعض منها كالأوراق مثل أوراق نبات النعنع أو في بتلات الأزهار كما في الياسمين أو في قلف الشجر كالقرفة أو في الثمار كما في الينسون و قد توجد في أكثر من جزء من أجزاء النبات و تتباين نسبتها في كل جزء و من نبات لأخر فقد تصل لنسبة 16% كما الحال في القرفة في حين تتضاءل هذه النسبة إلى 0.02% كأزهار الورد و الياسمين [ العودات ، 2001] .

**1.1.1.9. كيمياء الزيوت العطرية الأساسية :**

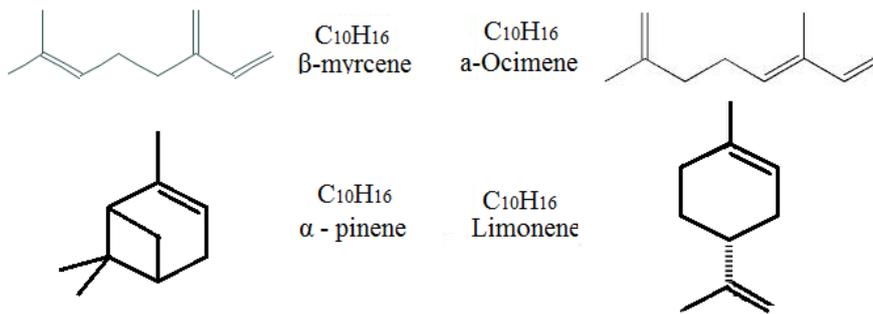
تعد الزيوت الأساسية من منتجات الأيض الثانوي في النباتات و يمكن تقسيمها إلى قسمين رئيسيين :

- 1- أوليوبتين Oleoptene : يشمل هذا القسم الجزء السائل من الزيت الطيار ويتكون من مركبات هيدروكربونية  $(C_nH_n)$  و تكون الجزء الأساسي من الزيت الأساسي.
- 2- ستيروبتين Stearoptene : يشمل هذا القسم مجموعة من المواد الصلبة المنتشرة في الجزء السائل من الزيت وتتكون من مركبات مؤكسجة مشتقة من الهيدروكربونات المكونة للجزء الصلب [الحكيم و آخرون، 2012].

**1.1.1.9. المجموعات الهيدروكربونية Hydrocarbons :**

تتكون هذه المركبات من وحدات رمزها الكيميائي  $(C_5H_8)_n$  , تتركب فيها كل وحدة من 5 ذرات كربون , تدعى إيزوبرين **Isoprene** أو **Methyl-1,3butadiene** تتجمع هذه الوحدات مع بعضها عند تكوين الزيوت العطرية في النبات إما على صورة مركبات أليفاتية أو عطرية حلقة وعند تجميع الوحدات ينتج :

**1.1.1.1.9. التربينات  $(C_5H_8)_2$  Terpenes :** تتكون من اندماج وحدتي إيزوبرين وقد ينتج عن اندماجها مركبات أليفاتية مفتوحة، الشكل (5)، كالميرسين الموجود في حشيشة الدينار و الأوسيمين الموجود في زيت الريحان ، أو ينتج مركبات حلقة إما ذات حلقة واحدة كالليمونين الموجود في زيت البرتقال والكرابوية أو ذات حلقتين مثل البينين الموجود في الصنوبريات [الحكيم و آخرون، 2012].



الشكل ( 5 ) بنية بعض مركبات التربينات [الحكيم و آخرون، 2012]

**2.1.1.1.9. السيسكوترينبات  $(C_{15}H_{24})_3$  Sesquiterpenes :** تتكون من اندماج ثلاث وحدات منها

الأليفاتي كالفرانسين الموجود في زيت السترونيلا أو أحادية الحلقة كالزنجبرين الموجود في زيت الزنجبيل

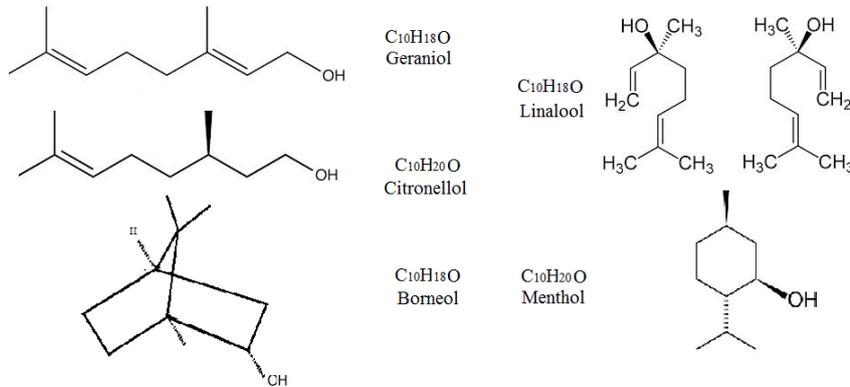
أو ثنائي الحلقة كما في الكادينين الموجود زيت الكاد أو ثلاثي الحلقة كالسدرين الموجود في شجرة الأرز اللبانية .

**3.1.1.1.9. الديترينات<sub>4</sub> (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) Diterpenes** : وهي كثيرة الانتشار وتتميز الزيوت التي توجد بها بدرجة عالية من اللزوجة ومثالها مركب الكامفورين .

#### 2.1.1.9. المجموعات العضوية المؤكسجة :

تقسم الزيوت العطرية على أساسها إلى زيوت غني بالكحولات ، مثل المانثول في النعناع ، وزيوت غنية بالفينولات مثل التيمول و الكارفاكروول في الزعتر ، وزيوت غنية بالمركبات الألهيدية ، مثل ألهيد القرقة، زيوت كبريتية مثل الأليسین في الثوم [الحكيم و آخرون، 2012]. و أهم هذه المجموعات هي :

**1.2.1.1.9. الكحولات** : تتميز برائحتها الجميلة مما جعلها تستخدم في العطور وتتمتع بخواص مضادة لآلام الأعصاب منها الأليفاتي مثل الجيرانيلول ( زيت الورد ،زيت العتر ) اللينانول ( زيت الكزبرة ) السترونيلول و الذي يوجد دوماً مع الجيرانيلول في زيت الورد و العتر. أو حلقة مثل المنترول الموجود في النعناع و البورنيول الموجود في زيت الحصابان . ويظهر الشكل (6) البنية الكيميائية لهذه المركبات .



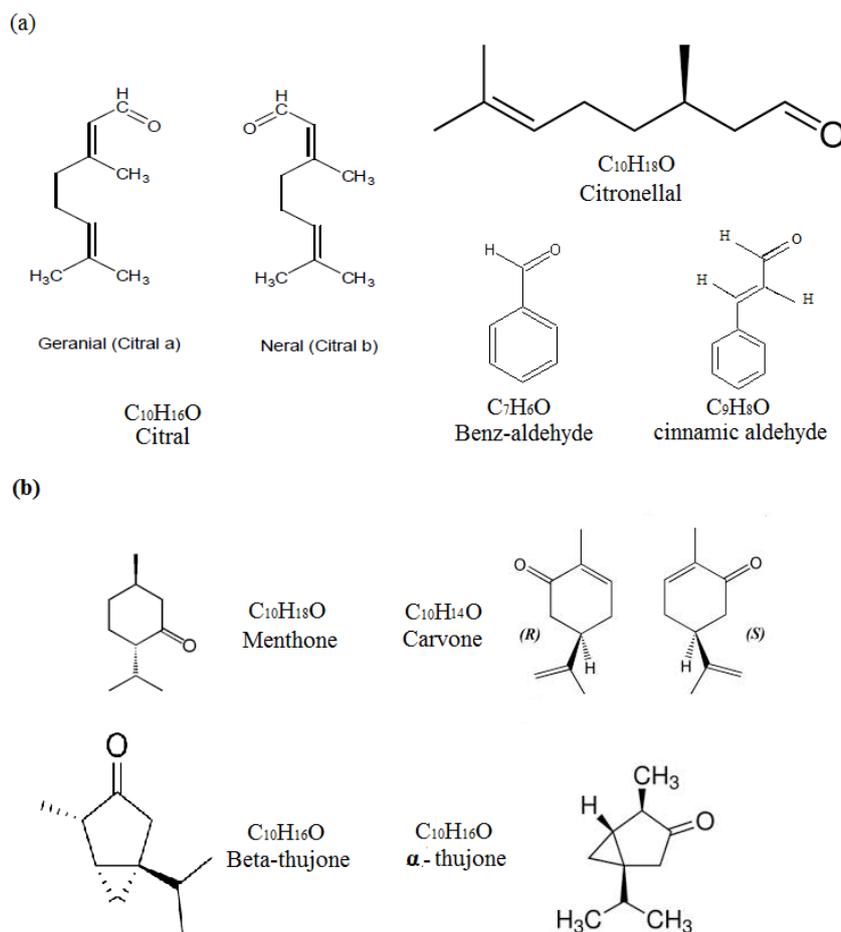
الشكل ( 6 ) البنية الكيميائية لبعض مركبات الزيوت العطرية الكحولية [الحكيم و آخرون، 2012]

#### 2.2.1.1.9. الألهيدات :

هي أقل المكونات ثباتاً و سرعان ما تتأكسد بالهواء متحولة إلى مشتق حمض الألهيد منها غير حلقة مثل السترونيلال الموجود في الورد و السيترال الموجود في حشيشة الليمون .أو ألهيدات حلقة مثل ألهيد السيناميك الموجود في قلف نبات القرقة و البنزألهيد الموجود في ثمار اللوز المر، الشكل (7).

### 3.2.1.1.9. الكيتونات :

ذات فعالية عالية إلا أن كميتها قليلة في الزيت و تقسم إلى ألفتية و هي نادرة أما الحلقية فمنها أحادية الحلقة مثل الكارفون في زيت الكراوية (50%) و المنتون الموجود في النعنع ومنها ثنائية الحلقة مثل التوجون الموجود في زيت الميرمية ويظهر الشكل (7) البنية الكيميائية لهذه المركبات .

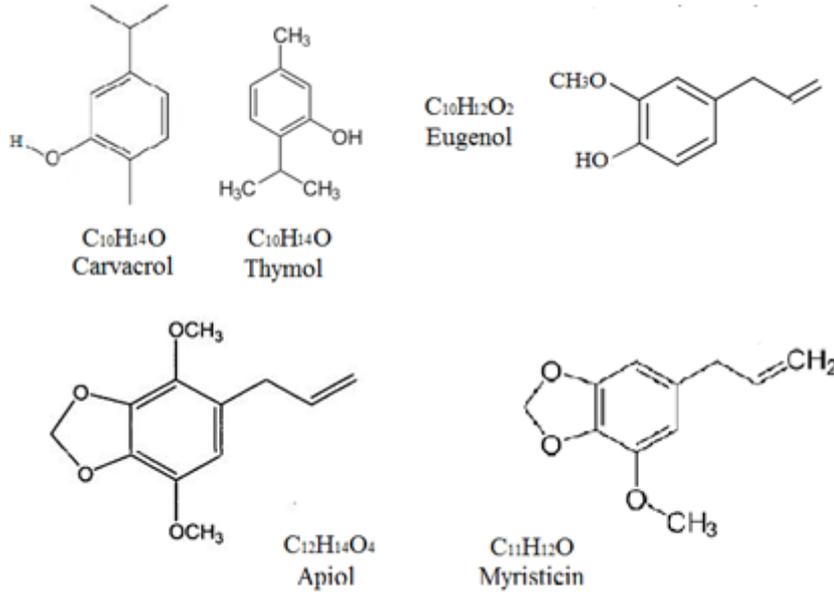


الشكل ( 7 ) البنية الكيميائية لبعض مركبات الزيوت العطرية: (a) الألهيدية و (b) الكيتونية [الحكيم و أخرون، 2012]

### 4.2.1.1.9. الفينولات : تمتع برائحة و نكهة قويتين و تقسم عادة إلى قسمين ( الشكل 8 ) :

1.4.2.1.1.9. فينولات أحادية الحلقة : مثل التيمول و نظيره الكارفارول في زيت الزعتر و الذي يستخدم كمطهرات لما لها من تأثير قاتل للميكروبات ، و الأوجنيول الموجود في زيت القرنفل و القرفة والذي يتمتع بتأثير مخدر موضعي .

2.4.2.1.1.9. فينولات ثنائية الحلقة : ومنها الميرستين الموجود في زيت جوزة الطيب و الكرفس و الشبث , كذلك الأبيول الموجود في زيت ثمار البقدونس .



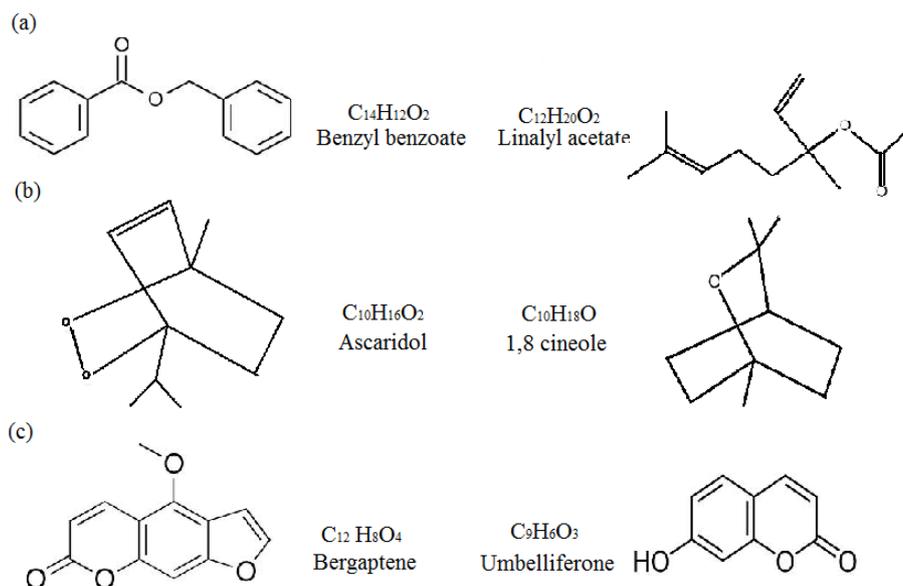
الشكل ( 8 ) البنية الكيميائية لبعض مركبات الزيوت العطرية الفينولية [الحكيم و أخرون،2012]

5.2.1.1.9. الإسترات : وتقسم إلى إسترات ألفاتية و إسترات عطرية ، فمن أمثلة الإسترات الأليفاتية أسيتات الليناليل في زيت اللافندو و من الإسترات العطرية بنزيل البنزوات في زيت التيرروز و الذي يستعمل كمثبت في صناعة العطور .

6.2.1.1.9. الأكسيدات و فوق الأكسيدات : ومثالها المركب ثنائي الحلقة 1، 8 سينيول و هو من الأكسيدات الموجودة في زيت الكافور . ومركب فوق الأكسيدي الاسكاريدول في زيت الزمرام الطارد للديدان .

7.2.1.1.9. اللاكتونات : ومنها الأمبيليفرون الموجود في ثمار بعض أنواع الفصيلة الخيمية و البيرجابتين الموجود في ثمار البرجموت .

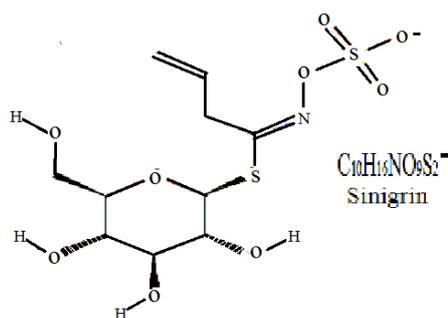
ويبين الشكل (9) البنية الكيميائية لبعض مركبات الإسترات و الأوكسيدات و اللاكتونات التي تظهر في الزيوت العطرية .



الشكل ( 9 ) بعض مركبات الزيوت العطرية الأوكسيجينية: (a) الإسترات و (b) الأوكسيدات و (c) اللاكتونات

[الحكيم و آخرون،2012]

**8.2.1.1.9. المركبات الكبريتية :** ترتبط بعض الزيوت الطيارة بالمركبات الكبريتية على شكل غليكوزيدات , تتحلل بفعل الانزيمات الخاصة بوجود الماء وتتفصل المادة الكبريتية مثلها غليكوزيد السنجرين في بذور الخردل الأسود .



الشكل ( 10 ) البنية الكيميائية للسيرنجين [الحكيم و آخرون،2012]

### 2.1.9. الدراسات المرجعية للزيت العطري الأساسي في المليسة :

أجريت العديد من الدراسات لتعيين تركيب الزيت العطري لمختلف أجزاء المليسة وقد وضعت العديد من القوائم الموصفة له و المختلفة عن بعضها وذلك يعود لاختلاف الشروط المناخية و البيئية و الجغرافية و الزراعية لكل دراسة .

- فقد أجريت عام 1999 دراسة في تشيلي لمعرفة التغيرات الموسمية لمحتوى الزيت العطري لأوراق النباتات، حيث تم جمع العينات خلال سنتين من شهر تشرين الأول وحتى شهر نيسان واستخلص الزيت العطري بالتقطير بالبخار و باستخدام GC. وتم دراسة تأثير زمن الحصاد في اليوم والسنة على تركيز الزيت العطري ومحصوله والنسبة المئوية لمكونه الرئيسي من السيترال وقد وجد أن التركيز الأعظمي للزيت العطري في الأوراق الفتية في شهر تشرين الأول ويتناقص بعد ذلك من كانون الأول وحتى نيسان و يزداد مردود الزيت العطري من شهر تشرين الأول وحتى آذار، وكانت أعلى نسبة لمحتوى السيترال في شهر تشرين الثاني 64% ثم تتناقص لحد 34% من كانون الأول و لا يوجد أي اختلاف في تركيز الزيت العطري بين الأوقات المختلفة لليوم الواحد لكن محتوى السيترال يزداد خلال اليوم [Vogel,1999].

- تم تعيين تركيب الزيت العطري كماً ونوعاً في الشاي المعد من أوراق المليسة ، و ذلك بعد نقع أوراق المليسة المجففة ثم عزل الزيت العطري من المنقوع المحضر جرفاً بالبخار ، وفي الأوراق قبل عملية النقع وبعده بتقنية GC – MS . و يوضح الجدول ( 2 ) النسب المئوية لمكونات الزيت بالنسبة للوزن الجاف في المنقوع وفي الأوراق قبل النقع و بعده [Carnat et al , 1999] .

الجدول ( 2 ) النسبة المئوية لمكونات الزيت العطري لشاي و أوراق المليسة في فرنسا [Carnat et al , 1999]

Constituents	Infusion	Leaf before infusion	Leaf after infusion
$\alpha$ -Pinene <sup>a</sup>	-	0.76	0.18
Sabinene <sup>a</sup>	-	1.10	-
Limonene <sup>a</sup>	1.34	12.82	1.67
Cineole <sup>b</sup>	3.44	5.73	-
Linalol <sup>c</sup>	0.89	0.60	-
$\beta$ -Caryophyllene <sup>a</sup>	0.73	0.94	1.78
Neral <sup>d</sup>	31.33	17.64	6.08
$\alpha$ -Terpinyl acetate <sup>e</sup>	1.98	1.03	0.20
Geranial <sup>d</sup>	45.59	23.48	10.35
Citronellol <sup>c</sup>	-	5.29	15.17
Nerol <sup>c</sup>	0.73	0.37	0.20
Geraniol <sup>c</sup>	0.40	0.31	-
Caryophyllene oxide <sup>b</sup>	2.52	6.27	13.89
cis-Nerolidol <sup>c</sup>	0.27	1.13	3.10
Spathulenol <sup>c</sup>	3.95	5.12	10.64
Hydrocarbons <sup>a</sup>	2.07	15.62	3.63
Oxides <sup>b</sup>	5.96	12.00	13.89
Alcohols <sup>c</sup>	6.24	12.82	29.11
Aldehydes <sup>d</sup>	76.82	41.12	16.43
Esters <sup>e</sup>	1.98	1.03	0.20
Total	93.07	82.59	63.26

- تمت دراسة في البرتغال لتعيين تركيب الزيت العطري للمليسة 2005 م ، حيث جمع أوراق و قمم أزهار طازجة من شجيرات المليسة من مزرعة تجريبية في ميرليم Merelim في فترة الإزهار ، كما تم جمع أوراق المليسة من مزرعة في منطقة أركوس فالديفيس Arcos de Valdevez و التي تبعد 40 كم عن ميرليم بعدة أشهر . تم الاستخلاص بجهاز كلفنجر Clevenger ، وتم التحليل باستخدام GC و GC-MS و يبين الجدول (3) النسب المئوية للمجموعات الكيميائية للزيت العطري في حين يظهر الجدول (4) مكونات الزيت المستخلص لعدة مناطق من البرتغال [Gomes et al,2005] .

الجدول (3) النسبة المئوية للمجموعات الكيميائية للزيت العطري لنبات المليسة المستخلص في البرتغال [Gomes et al,2005]

Compound group	Merelim		Arcos de Valdevez			
	(F)	(L)	(L)July	(L)Sept.	(L)Dec.	(L)June
Monoterpene hydrocarbons	29.9	22.3	20.8	12.2	9.1	14.5
Oxygen-containing monoterpenes:	56.9	59.0	59.4	66.4	72.6	65.2
- oxides	5.9	3.9	1.4	1.3	1.8	1.9
- alcohols	1.8	1.7	1.1	1.2	1.1	1.9
- aldehydes	48.0	52.5	55.7	63.1	68.5	60.3
- esters	1.2	0.9	1.2	0.8	1.2	1.1
Sesquiterpene hydrocarbons	6.5	6.8	12.7	15.2	10.4	10.9
Oxygen-containing sesquiterpenes	3.0	4.8	2.9	2.5	3.8	3.2
Others	3.7	7.1	4.2	3.7	4.1	6.2

F الأزهار ، L الأوراق

الجدول ( 4 ) التركيب المئوي للزيت العطري لنبات المليسة المستخلص في البرتغال [Gomes et al , 2005]

Compound	Merelim		Arcos de Valdevez**			
	(F)	(L)	(L)July	(L)Sept.	(L)Dec.	(L)June
1-octene	0.1	-	-	-	-	-
2-hexenal	t	t	t	t	t	t
$\alpha$ -thujene	0.1	0.1	0.1	0.1	t	0.1
$\alpha$ -pinene	1.1	1.1	0.7	0.4	0.2	0.4
$\beta$ -citronellene	-	0.1	t	t	t	t
sabinene	2.7	2.9	1.9	1.2	0.5	1.2
$\beta$ -pinene	-	0.4	0.3	0.5	0.8	1.0
1-octen-3-ol	0.9(!)	-	-	-	-	-
6-methyl-5-hepten-2-one	0.8	1.0	0.5	0.5	0.4	0.9
myrcene	0.7	0.5	0.4	0.2	0.1	0.2
3-octanol	0.1	t	t	t	t	t
$\alpha$ -terpinene	0.1	0.1	t	t	t	t
p-cymene	0.1	-	0.1	t	t	t
limonene	20.6	15.4	14.7	8.2	5.7	9.8
1,8-cineole	4.5	1.6	0.2	0.1	0.1	0.1
(Z)- $\beta$ -ocimene	0.3	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -ocimene	4.0	1.5	2.6	1.6	1.8	1.8
$\gamma$ -terpinene	0.1	0.1	t	t	t	t
cis-sabinene hydrate	0.3	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3
terpinolene	0.1	0.1	t	t	t	t
eucarvone (tentatively) (?)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
linalool	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
$\alpha$ -thujone	0.3	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4
cis-limonene oxide	0.4	0.7	0.2	0.2	0.3	0.3
trans-limonene oxide	0.6	1.0	0.7	0.7	0.9	1.0
citronellal	0.4	0.1	0.5	0.6	0.6	0.7
terpinen-4-ol	0.1	0.3	t	t	t	t
$\alpha$ -terpineol	0.7	0.5	0.3	0.2	0.3	0.2
trans-carveol	0.1	-	0.1	0.5	0.3	1.0
neral	20.8	22.9	23.3	26.1	29.6	25.9
methyl citronellate	0.5	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2
geranial	26.8	29.5	31.9	36.4	38.3	33.7
$\delta$ -elemene	0.1	0.3	0.4	0.4	0.3	0.5
2-phenylethyl propionate	0.1	0.3	t	t	t	t
eugenol	0.1	0.2	t	t	t	0.1
neryl acetate	-	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2
$\alpha$ -copaene	0.1	0.3	t	t	t	t
geranyl acetate + $\beta$ -bourbonene	0.7	0.8	0.9	1.0	1.3	1.2
methyl eugenol	0.1	t	t	t	t	t
$\alpha$ -cedrene	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
$\beta$ -caryophyllene	1.3	1.3	2.4	2.8	1.7	1.8
$\beta$ -gurjunene	0.1	t	0.1	0.1	0.1	0.1
aromadendrene	t	0.1	t	t	t	t
$\alpha$ -humulene	0.2	t	0.2	0.2	0.1	0.1
(E)- $\beta$ -farnesene	t	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
allo-aromadendrene	0.1	0.1	t	t	t	t
geranyl propionate	0.2	0.2	0.3	t	t	0.1
germacrene D	0.8	0.4	2.5	3.4	1.9	2.2
ar-curcumene	1.5	2.2	1.1	1.1	1.2	1.3
zingiberene	0.8	0.3	3.0	3.9	2.4	2.9
$\alpha$ -muurolene	0.1	0.1	t	t	0.1	t
$\beta$ -bisabolene	0.5	0.5	t	0.1	t	t
$\gamma$ -cadinene	0.2	0.2	1.0	1.2	0.3	0.8
$\delta$ -cadinene	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
trans-calamenene	-	-	t	t	t	t
(E)-nerolidol	0.3	0.4	t	t	t	t
germacrene D-4-ol	0.1	t	1.0	0.9	1.2	1.2
spathulenol	1.0	2.2	0.1	0.1	0.1	0.1
caryophyllene oxide	1.1	1.8	2.5	2.1	3.3	2.7
epi- $\alpha$ -cadinol + epi- $\alpha$ -muurolol	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1
$\alpha$ -cadinol	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3

F الأزهار ، L الأوراق ، \*\* جمعت العينات في الأيام (7 تموز ، 10 أيلول ، 10 كانون الأول ، 7 حزيران) ،  $t > 0.05$

- أجريت دراسة في البرتغال عام 2006 لتعيين تغير تركيب الزيت العطري لنبات المليسة lemon verbena لكل من الأوراق والساق ، حيث أخذت العينات للنبات الطازج كل مدة شهرين خلال العام و تم الاستخلاص تقطيراً بالبخار باستخدام جهاز كليفنجر لمدة ساعة وقد تم تعين أكثر من سبعين مركب منها 13 مركب من الألكانات بواسطة GC و GC – MS في الأوراق أما بالنسبة لتركيب الزيت العطري المستخلص من الساق فقد تم تعين عدد أقل من المركبات وهذا يتعلق بالعينة و بتغير التركيب خلال السنة ، ويمثل الجدول (5) النسب المئوية لمكونات الزيت العطري .

## الجدول (5) التركيب الكيميائي للمكونات للزيت العطري في ساق وأوراق المليسة في البرتغال

[Gomes et al ,2006]

Compound	July 20, 1999		Sept. 14, 1999		Nov. 17, 1999		April 17, 2000		Jun. 7, 2000	
	Leaves	Stems	Leaves	Stems	Leaves	Stems	Leaves	Stems	Leaves	Stems
2-Hexenal	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
$\alpha$ -Thujene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	0.1	-
$\alpha$ -Pinene	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	0.4	0.3	0.2	0.5	0.3
$\beta$ -Citronellene	tr	-	tr	0.4	tr	-	tr	-	tr	-
Sabinene	1.1	0.2	0.8	0.8	0.7	0.4	0.7	0.5	1.1	0.6
$\beta$ -Pinene	0.5	0.4	0.6	1.6	0.9	1.5	0.7	0.5	0.5	2.2
6-Methyl-5-hepten-2-one	0.3	0.3	0.3	0.3	0.7	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3
Myrcene	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.6
3-Octanol	tr	0.2	tr	0.3	tr	1.4	tr	0.1	tr	0.9
$\alpha$ -Terpinene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
<i>p</i> -Cymene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
Limonene	9.6	3.3	5.6	5.4	7.3	3.2	7.3	4.1	9.8	4.9
1,8-Cineole	0.1	tr	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.1	0.3
<i>E</i> - $\beta$ -Ocimene	2.0	0.7	2.6	2.4	2.7	1.5	3.1	1.8	1.5	0.9
$\gamma$ -Terpinene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	tr
Terpinolene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
Eucarvone (?)	0.1	tr	tr	-	0.1	tr	tr	-	0.1	tr
Linalool	0.3	0.7	0.3	1.1	0.3	0.4	0.3	0.5	0.3	0.6
<i>cis</i> -Thujone	0.2	-	0.1	-	0.4	-	0.2	-	0.4	-
<i>cis</i> -Limonene oxide	0.2	0.1	0.1	tr	0.3	tr	0.2	0.1	0.3	0.3
<i>trans</i> -Limonene oxide	0.7	0.5	0.5	0.3	1.0	0.8	0.7	0.4	1.1	0.9
Citronellal	0.5	0.4	0.6	0.3	0.9	0.4	0.6	0.4	0.7	0.6
4-Terpineol	tr	-	tr	-	0.1	-	tr	-	tr	-
$\alpha$ -Terpineol	0.3	1.3	0.1	1.8	0.2	3.0	0.3	3.4	-	1.5
Neral	25.8	26.6	26.2	24.4	27.4	23.0	25.7	26.2	25.7	24.6
Methyl citronellate	0.2	0.5	0.1	1.6	0.2	2.9	0.4	2.4	0.2	0.6
Geranial	36.3	37.3	38.5	39.6	35.0	26.6	36.2	38.2	33.7	30.3
$\delta$ -Elemene	0.3	0.2	0.8	0.5	0.4	0.1	0.9	0.5	0.6	0.3
Phenyl ethyl propanonate	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
Eugenol	0.1	0.6	0.1	0.2	0.1	tr	tr	tr	tr	-
Neryl acetate	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.4	0.2	0.1	0.3	0.3
$\alpha$ -Copaene	tr	0.2	tr	-	tr	0.4	tr	-	tr	0.3
Geranyl acetate + $\beta$ -Bourbonene	0.9	1.2	1.1	1.4	1.3	1.3	1.3	1.8	1.2	0.9
Methyl eugenol	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
$\alpha$ -Cedrene	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.2	0.3
<i>E</i> -Caryophyllene	2.3	2.5	2.1	1.3	1.8	2.1	1.5	1.1	2.5	2.3
$\beta$ -Gurjunene	0.1	tr	0.1	tr	0.1	tr	0.1	tr	0.1	tr
Aromadendrene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
$\alpha$ -Humulene	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	tr	0.2	tr
<i>E</i> - $\beta$ -Farnesene	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3
<i>allo</i> -Aromadendrene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
Geranyl <i>n</i> -propanonate	tr	tr	tr	tr	tr	0.3	tr	tr	0.1	0.1
Germacrene D	2.7	3.2	3.9	2.6	2.0	1.7	3.1	2.4	2.8	2.0
AR-Curcumene	1.0	2.3	0.6	1.3	1.0	6.1	0.8	1.4	1.7	3.5
$\alpha$ -Zingiberene	2.8	3.1	4.4	3.7	3.0	1.9	5.7	3.4	3.7	2.3
Germacrene A (?)	tr	-	1.1	-	tr	-	tr	-	tr	-
$\alpha$ -Muurolole	tr	-	tr	-	0.1	-	tr	-	tr	-
$\beta$ -Bisabolene	tr	0.1	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	0.5	0.3
$\gamma$ -Cadinene	1.0	1.9	1.0	1.4	0.6	1.5	0.9	1.4	1.1	2.0
$\delta$ -Cadinene	0.2	0.4	0.1	0.3	0.1	tr	0.1	0.3	0.1	0.3
(1 <i>s</i> , <i>trans</i> )-Calamenene	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
<i>E</i> -Nerolidol	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
4- $\beta$ -Hydroxygermacra-1(10),5-Diene	1.1	0.9	1.1	0.7	1.3	1.5	1.2	1.1	1.0	0.6
Spathulenol	0.1	0.1	0.1	0.1	3.3	0.1	0.8	-	2.2	-
Caryophyllene oxide	2.5	2.7	1.6	1.3	3.3	5.1	0.8	1.6	2.2	2.6
<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol + <i>epi</i> - $\alpha$ -Muurolol	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3
$\alpha$ -Cadinol	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.8	0.2	0.4	0.2	0.6
<i>n</i> -Heptadecane	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	tr
<i>n</i> -Octadecane	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
<i>n</i> -Nonadecane	tr	0.5	tr	0.5	tr	0.4	tr	0.3	tr	0.9
<i>n</i> -Eicosane	tr	-	tr	-	tr	-	tr	0.2	tr	tr
<i>n</i> -Heneicosane	tr	0.1	0.1	-	0.1	-	0.1	-	0.1	0.2
<i>n</i> -Docosane	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-
<i>n</i> -Tricosane	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	0.1
<i>n</i> -Tetracosane	tr	-	tr	-	tr	0.1	tr	-	tr	-
<i>n</i> -Pentacosane	tr	0.1	tr	0.3	tr	1.6	tr	0.1	-	-
<i>n</i> -Hexacosane	tr	0.1	0.1	tr	tr	0.6	0.1	0.2	tr	0.2
<i>n</i> -Octacosane	0.1	1.3	0.1	0.5	0.1	2.5	0.1	0.4	0.1	1.5
<i>n</i> -Nonacosane	tr	0.3	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	tr	0.2
<i>n</i> -Triacotane	tr	0.2	tr	tr	tr	0.4	tr	-	tr	tr

tr النسبة المئوية للمركب &gt; 0.06%

و تبين من الدراسة أن المركبات الرئيسية geranial و neral و limonene كانت نسبها تتراوح ما بين 69-72% و 53-69% من التركيب للأوراق والساق على التوالي . إلا أن التغير في تركيب الزيت العطري في الساق أكثر وضوحاً منه في الزيت المستخلص من الأوراق ، ففي المستخلص من الساق كانت نسبة geranial تتناقص من 40% في أيلول إلى 27% تشرين الثاني ثم تزداد بعدئذ بعلاقة عكسية مع مستوى caryophyllene oxide و AR-curcumene , كما أن مستوى  $\alpha$ -terpineol يزداد من 1.3% في methyl citronelate بينما مستوى methyl citronelate يزداد من 0.5% في نيسان إلى 2.9% في تشرين الثاني . أما بالنسبة للزيت المستخلص من الأوراق بقي مستوى كل من  $\alpha$ -terpineol و methyl citronelate دون إظهار أي تغيير. ويبين الجدول ( 6 ) التركيب المثوي لمجموعات المركبات في الزيت العطري المستخلص من الأوراق و الساق [Gomes,2006].

الجدول (6) النسب المئوية للمجموعات المكونة للزيت العطري في ساق وأوراق المليسة في البرتغال

[Gomes et al ,2006]

Compound group	July 20, 1999		Sept. 14, 1999		Nov. 17, 1999		April 17, 2000		Jun. 7, 2000	
	Leaves	Stems	Leaves	Stems	Leaves	Stems	Leaves	Stems	Leaves	Stems
Monoterpene hydrocarbons	13.7	4.8	8.5	10.9	12.1	7.4	12.3	7.3	13.7	9.5
Oxygen-containing monoterpenes:	65.8	69.0	67.7	70.4	67.4	59.7	65.9	72.9	64.0	60.6
- oxides	1.3	0.6	0.8	0.5	2.0	1.2	1.4	0.6	2.2	1.5
- alcohols	1.0	2.8	0.7	3.2	0.9	3.8	0.7	4.1	0.5	2.1
- aldehydes	62.6	64.3	65.3	64.3	63.3	50.0	62.5	64.8	60.1	55.5
- esters	0.9	1.3	0.9	2.4	1.2	4.7	1.3	3.4	1.2	1.5
Sesquiterpene hydrocarbons	12.4	16.1	16.2	13.0	10.9	16.7	15.3	12.8	15.4	14.9
Oxygen-containing sesquiterpenes	3.1	3.3	2.0	1.8	7.0	6.2	1.9	2.2	4.7	3.5
n-Alkanes	0.1	2.6	0.3	1.3	0.2	5.6	0.3	1.2	0.2	3.1
Others	4.9	4.2	5.3	2.6	2.4	4.4	4.3	3.6	2.0	8.4

- كما تمت دراسة في البرازيل لتعيين تركيب و مردود مستخلص أوراق المليسة حيث تم الاستخلاص بطريقة الموائع فوق الحرجة supercritical fluid extraction (SFE) باستخدام غاز CO2 في ضغوط (100 150 200 250 300 350 ) بار وعند درجتي حرارة °C 35-45, ثم حلت المستخلصات بطريقة الكروماتوغرافيا الغازية مزود بكاشف التأين باللهب GC-FID, فكان المردود الأعظمي (1.49%) لنبات المليسة عند 350 bar/ 45 °C في حين أن المردود الأدنى عند 100 bar/ 45 °C حيث يمثل الجدول(7) التركيب الرئيسي لمستخلص المليسة عند هاتين الدرجتين .

الجدول(7) تركيب الزيت العطري في أوراق المليسة المستخلص بطريقة(SFE) في البرازيل [Pereira et al,2006]

Component	350 bar/ 35 °C	350 bar/ 45 °C
Neral (or Z-citral)	3.4	.03
Geranial (or E-citral)	1.0	1.0

Geranyl acetate	1.3	1.0
Trans-caryophyllene	3.8	2.3
Germacrene D	0.7	-
$\alpha$ -Curcumene	5.9	2.2
Nerolidol	3.9	3.3
Spathulenol	1.9	0.9
Caryophyllene oxide	9.1	4.6
EPI-alpha-cadinol	-	-
MM_286	44.1	79.3
MM_314	3.5	3.8

و تم تعين الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات و التي تقدر بالاختبار المزدوج للمركبين  $\beta$ -carotene / linolenic acid و كانت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص أكبر من فعالية مركب  $\beta$ -carotene في كبح أكسدة مركب linolenic acid [Pereira et al,2006] .

- كما تمت دراسة في اليونان لتعيين الزيت العطري لنبات المليسة لأوراقها الطازجة وذلك في مرحلتي نمو وذلك خلال شهر أيار May الذي يوافق النمو الأعظمي للمليسة و في شهر أيلول September الذي يوافق الإزهار الكامل لها بطريقة الاستخلاص بالتقطير البخار باستخدام طريقة Likense- Nickerson و تم تحليل الزيت باستخدام جهاز تقنية GC و GC – MS و مطيافية FT-IR ، حيث يظهر الشكل ( 11 ) طيف FT-IR للزيت العطري بالمقارنة مع طيف كل من السيترال و الليمونين . و يعبر الجدول (8) عن المكونات الكلية للزيت العطري المستخلص.

الجدول ( 8 ) النسبة المئوية للزيت العطري في أوراق المليسة في اليونان المستخلص في شهري أيار و أيلول

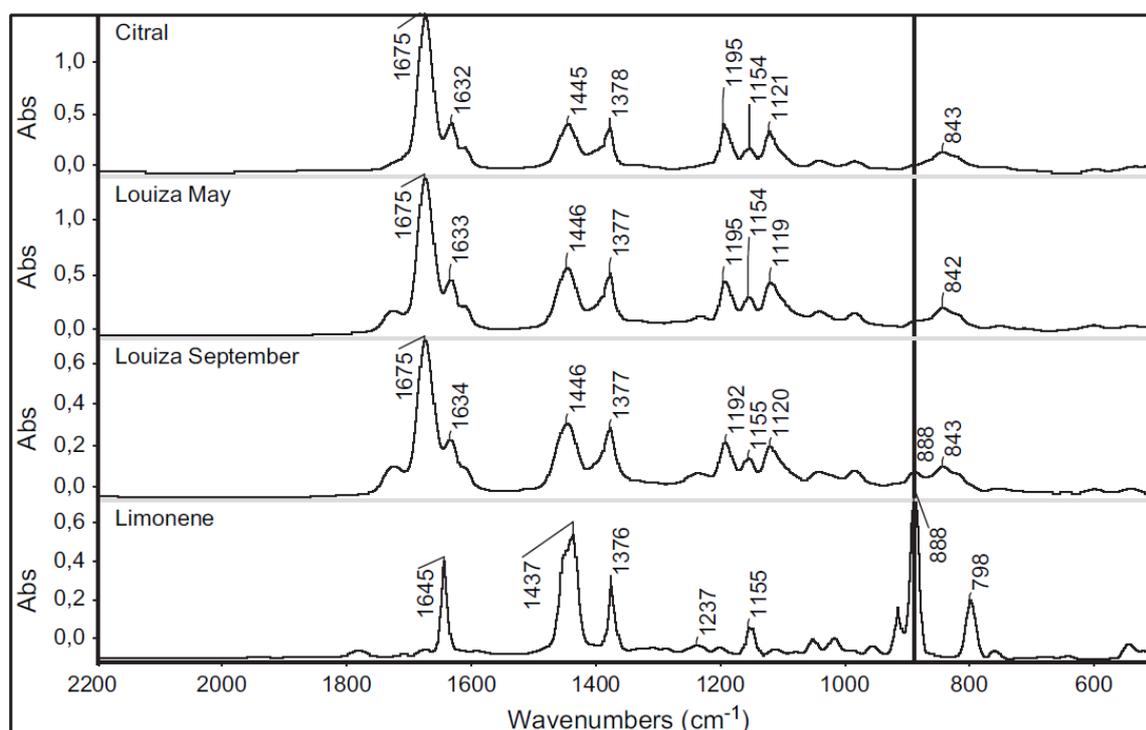
[Argyropoulou et al,2007]

Compounds	Composition (%) in May	Composition (%) in September
a-Pinene	0.4 $\pm$ 0	1.0 $\pm$ 0.1
Sabinene	0.7 $\pm$ 0	1.8 $\pm$ 0
6-Methyl-5-hepten-2-one	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0
Myrcene	0.6 $\pm$ 0	0.7 $\pm$ 0
Limonene	5.8 $\pm$ 0.1	17.7 $\pm$ 0.5
(Z)-b-Ocimene	1.3 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1
$\gamma$ -Terpinene	-	0.1 $\pm$ 0
cis-Sabinene hydrate <sup>d</sup>	0.2 $\pm$ 0	0.4 $\pm$ 0
Linalool	0.3 $\pm$ 0	0.4 $\pm$ 0

trans-Sabinene hydrate	0.3 ±0.1	0.3 ±0.1
trans-Chrysanthemal	0.3 ± 0.1	0.5 ±0
cis-Chrysanthenol	0.5 ± 0	0.6 ±0
Terpinen-4-ol	-	0.2 ±0
trans-Chrysanthenol	0.6 ±0	1.0 ±0
α-Terpineol	0.9 ±0	1.8 ±0
Nerol	0.9 ±0.1	0.8 ±0.3
Neral	24.5 ±5.5	21.8 ±0.6
Geraniol	6.0 ±5.5	0.8 ±0.1
Geranial	38.7 ±0.4	26.8 ±0.1
δ-Elemene	0.3 ± 0	0 0.2 ±0
α-Cubebene	tr <sup>c</sup>	-
α-Copaene	0.1 ± 0	tr <sup>c</sup>
Geranyl acetate	1.1 ±0	0.8 ±0
β-Cubebene	0.1 ±0	0.2 ± 0
cis- α-Bergamotene	0.1 ±0	-
α-Cedrene	0.2 ±0	0.3 ±0
β-Caryophyllene	1.8 ±0	1.6 ±0
β-Copaene	0.1 ± 0	tr <sup>c</sup>
b-Gurjunene	tr <sup>c</sup>	-
α-Caryophyllene	-	0.1 ±0
Aromadendrene	0.1 ±0	-
<<Allo>>-aromadendrene	0.2 ±0	0.1 ±0
β-Acoradiene	0.2 ±0	-
Geranylpropanoate	0.2 ±0	0.1 ±0
Germacrene D		
α-Curcumene	3.1 ±0	2.5 ±0
α-Zingiberene	0.6 ±0	0.3 ±0
Bicyclogermacrene	2.4 ±0	1.2 ±0
δ-Cadinene	0.3 ±0	0.2 ±0
Cadina-1(2)-4-diene	0.1 ± 0	tr <sup>c</sup>
α-Cadinene	0.1 ±0.1	0.2 ±0.1

(E)-Nerolidol	0.9 ±0.2	0.9 ±0.1
Germacrene-D-4-ol	1.0 ±0.1	2.0 ±0.2
Spathulenol	0.9 ±0	3.1 ±1.2
Caryophyllene oxide	0.8 ±0.1	0.9 ±1.2
epi- $\alpha$ -Cadinol <sup>d</sup>	0.7 ±0	0.8 ±0.1
$\alpha$ -Cadinol	-	0.5 ±0
Total	97.8	95.1

<sup>c</sup> النسبة المئوية للمركب > 0.06%



الشكل ( 11 ) طيف FT-IR للسيترال و الليمونين و للزيت العطري المستخلص في أيار و أيلول

[Argyropoulou et al,2007]

ولوحظ أنه في كلا المرحلتين كانت المكونات الرئيسية هي النيرال و الجيرانيال و الليمونين وشكلت نسبتها معاً من الزيت 66.3% في أيار و تزداد حتى 69% في أيلول . و يتناقص تركيز الجيرانيال و النيرال من 38.7% إلى 26.8% ومن 24.5% إلى 21.8% على الترتيب ، في حين تزداد نسبة الليمونين من 5.8% إلى 17.7% . و تبقى بقية المكونات ثابتة تقريباً كما ونوعاً في حين يوضح الجدول (9) عن تركيبه بحسب المجموعات الوظيفية للمكونات [Argyropoulou et al,2007].

الجدول ( 9 ) النسب المئوية للمجموعات الوظيفية في زيت أوراق المليسة في اليونان المستخلص في شهري أيار و أيلول

[Argyropoulou et al,2007]

Compound group	Percentage (%) in May	Percentage (%) in September
Monoterpenes	83.3	79.5
Monoterpene hydrocarbons	8.8	23.2
Oxygen-containing monoterpenes	74.5	56.3
Sesquiterpenes	14.1	15.1
Sesquiterpene hydrocarbons	9.8	6.9
Oxygen-containing sesquiterpenes	4.3	8.2
Other	0.4	0.5

- تمت دراسة في إيران عام 2008 على الأجزاء الهوائية من نباتي المليسة *lippia citriodora* و الزعتر *thymus daenensis* و قورن بينهما حيث تم الاستخلاص بالتقطير المائي وتم التحليل باستخدام GC و GC – MS . ويبين الجدول (10) التركيب الكيميائي للزيت العطري لكل منهما.

الجدول ( 10 ) مقارنة بين تركيبتي الزيت العطري لكل من المليسة و الزعتر في إيران [Alavi et al ,2008]

Plant	Components	Component (%)
L.citriodora	limonene	3.82
	β-caryophyllene	3.93
	Caryophyllene oxide	6.59
	Ar-curcumene	14.11
	carvacrol	1.59
	E-citral	5.99
	spathulenol	7.02
T. daenensis	thymol	54.68
	gama-terpinene	12.9
	carvacrol	5.01
	β-caryophyllene	2.59
	P-cymene	11.25

كما وقورنت الخواص المضادة للأوكسدة لكلا النباتين بطريقة DPPH وتبين أن نبات الزعتر يتمتع بخواص مضادة للأوكسدة أكثر من نبات المليسة [Alavi et al ,2008] .

- تمت دراسة في إيران عام 2010 لتعيين التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة لنبات المليسة عند الإزهار الكامل . حيث تم الاستخلاص الميكروئي بطور صلب و بتعريض العينة للأموح الصوتيةUltrasonic assisted headspace solid phase microextraction (UA-HS-SPME) والموصولة بجهاز GC و GC- MS . و يظهر الجدول المكونات (11) الرئيسية للزيت العطري .

الجدول ( 11 ) تركيب زيت المليسة العطري بإيران بطريقة UA-HS-SPME [Meshkatsadat et al ,2010]

No.	Component	<i>L. citriodora</i>
1	$\alpha$ -Pinene	1.50
2	Sabinene	0.74
3	Limonene	13.46
4	1,8-Cineole	23.66
5	Trans-Sabinene hydrate	1.25
6	Trans-Limonene oxide	0.62
7	$\alpha$ -Terpineol	1.76
8	Geranial	13.74
9	Neryl acetate	2.81
10	$\alpha$ -Copaene	2.87
11	$\beta$ -Bourbonene	2.56
12	$\beta$ -Caryophyllene	4.52
13	$\gamma$ -Gurjunene	2.15
14	$\alpha$ -Curcumene	14.83
15	Caryophyllene oxide	6.60

حيث أظهرت الطريقة UA - HS - SPME إمكانية استخدامها بكميات صغيرة للعينة وزمن استخلاص أقل إضافة لكونها أكبر قدرة على استخلاص مقدار أكبر من المكونات الطيارة و الحساسة للحرارة و يظهر الجدول (12) مردود العملية و النسب المئوية لمجموعات المكونات .

الجدول ( 12 ) مردود زيت المليسة العطري بطريقة UA-HS-SPME [Meshkatsadat et al ,2010]

Total content fraction of determinated compounds	93.07
Yield % (w/w)	1.22
Monoterepen	15.70
Oxygenated monoterepen	43.84
Sesquiterepen	26.93
Oxygenated Sesquiterepen	6.60

- و أجريت دراسة أخرى في إيران عام 2012 م لتحديد تركيب الزيت العطري للأجزاء الهوائية للمليسة المجموعة قبل فترة الإزهار و تأثير طرق التجفيف على تكوينه ، حيث جففت الأجزاء النباتية بالظل و تحت أشعة الشمس وفي الفرن عند الدرجة 60°C. حيث استخلص الزيت العطري تقطيراً بالماء جرفاً بالبخار hydro-distillation بجهاز كلفنجر Clevenger apparatus و حدد التركيب بتقنية GC و GC-MS و يظهر الجدول (13) تركيب الزيت وفق كل طريقة تجفيف . وقد لوحظ بأن التجفيف بالظل يوفر زيتاً عطرياً أكثر جودةً و تركيزاً من النيرال و الجيرانيال و الليمونين [ Agah et al , 2012 ]

الجدول ( 13 ) التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري في إيران قبل فترة الإزهار باختلاف طرق التجفيف

[Agah et al , 2012 ]

shade drying			oven drying		sun drying	
N	Compounds	Area,%	Compounds	Area,%	Compounds	Area,%
1	$\alpha$ - thujene	0.03	$\alpha$ - thujene	0.04	Sabinene	1.1
2	$\alpha$ -pinene	0.2	$\alpha$ -pinene	0.4	5-hepten-2-one-6-methyl	1.0
3	Sabinene	1.1	Sabinene	1.3	limonene	3.8
4	1- octen-3-ol	0.4	B- pinene	0.05	1,8-cineol	1.6
5	5-hepten-2-one-6-methyl	2.3	5-hepten-2-one-6-methyl	1.6	(E)- $\beta$ -ocimene	1.7
6	3-octanol	0.07	limonene	7.0	Linalool	1.0
7	limonene	7.0	1,8-cineol	2.9	Cis-Limonene oxide	1.4
8	1,8-cineol	2.9	(E)- $\beta$ -ocimene	2.9	$\beta$ - pinene oxide	1.6
9	(E)- $\beta$ -ocimene	2.9	cis-sabinene hydrate	0.3	iso-Isopulegol	2.0
10	cis-sabinene hydrate	0.3	Linalool	0.4	Rosefuran epoxide	2.2
11	Linalool	0.4	Cis-Limonene oxide	0.1	trans-p-mentha 1(7),8-dien-2-ol	2.6
12	Cis-Limonene oxide	0.1	$\beta$ - pinene oxide	0.3	$\alpha$ -terpineol	2.9
13	$\beta$ - pinene oxide	0.2	iso-Isopulegol	0.5	Nerol	1.8
14	iso-Isopulegol	0.6	Rosefuran epoxide	1.2	Neral	16.9
15	Rosefuran epoxide	0.3	trans-p-mentha 1(7),8-dien-2-ol	0.7	Geranial	19.1
16	trans-p-mentha 1(7),8-dien-2-ol	0.8	$\alpha$ -terpineol	0.8	$\delta$ -Elemene	1.9
17	$\alpha$ -terpineol	0.9	Neral	23.5	$\alpha$ -copaene	1.3
18	Neral	24.1	Geranial	31.3	Geranyl acetate	2.7
19	Geranial	31.9	$\delta$ -Elemene	0.5	$\alpha$ -cedrene	1.2
20	$\delta$ -Elemene	0.4	$\alpha$ -copaene	0.3	(E)-caryophyllene	3.9
21	Eugenol	0.1	Geranyl acetate	1.1	allo-Aromadendrene	1.0
22	$\alpha$ -copaene	0.3	$\alpha$ -cedrene	0.2	Geranyl propanoate	1.2
23	Geranyl acetate	1.1	(E)-caryophyllene	3.3	Germacrene D	5.5
24	$\alpha$ -cedrene	0.1	$\alpha$ -humulene	0.3	$\alpha$ -zingiberene	3.6
25	(E)-caryophyllene	3.1	allo-Aromadendrene	0.2	bicyclogermacrene	5.1
26	$\alpha$ -humulene	0.2	Geranyl propanoate	0.2	$\beta$ -curcumene	4.0
27	allo-Aromadendrene	0.2	Germacrene D	5.2		
28	Geranyl propanoate	0.2	$\alpha$ -zingiberene	0.9		
29	Germacrene D	4.8	bicyclogermacrene	3.8		
30	$\alpha$ -zingiberene	0.9	$\beta$ -curcumene	1.0		
31	bicyclogermacrene	3.4	$\delta$ -cadinene	0.4		
32	$\beta$ -curcumene	0.9	(E)-Nerolidol	1.5		
33	$\delta$ -cadinene	0.4	Spathulenol	1.1		
34	(E)-Nerolidol	1.3	caryophyllene oxide	1.7		
35	Spathulenol	1.0	$\alpha$ -epi-cadinol	1.0		
36	caryophyllene oxide	1.9	$\alpha$ -cadinol	0.1		
37	$\alpha$ -epi-cadinol	0.9				

- في حين أجريت دراسة أخرى في إيران بنفس العام لتحديد تركيب الزيت العطري للأجزاء الهوائية للمليسة المجموعة في فترة الإزهار الكامل و تأثير طرق التجفيف على تكوينه ، حيث جففت الأجزاء النباتية بالظل و تحت أشعة الشمس وفي الفرن عند الدرجة  $60^{\circ}\text{C}$ . استخلص الزيت العطري باستخدام جهاز كلفنجر Clevenger apparatus وحدد التركيب بتقنية GC و GC-MS ويظهر الجدول (14) تركيب الزيت وفق كل طريقة تجفيف. و لوحظ بأن التجفيف بالظل و تحت أشعة الشمس يوفر زيتاً عطرياً أكثر كمية و تركيزاً من النيرال و الجيرانيال و الليمونين [Agah et al , 2012] .

الجدول ( 14 ) التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري في إيران خلال الإزهار الكامل باختلاف طرق التجفيف

[Agah et al , 2012 ]

sun drying		Shade drying		oven drying	
Compounds	Area ,%	Compounds	Area ,%	Compounds	Area ,%
$\alpha$ -pinene	0.3	$\alpha$ -pinene	0.3	$\alpha$ -thujene	0.03
Sabinene	0.7	Sabinene	0.9	$\alpha$ -pinene	0.3
1-Octen-3-ol	0.2	1-Octen-3-ol	0.3	Sabinene	1.1
5-hepten-2-one-6-methyl	1.4	5-hepten-2-one-6-methyl	1.6	5-hepten-2-one-6-methyl	2.8
3-octanol	0.1	3-octanol	0.1	limonene	6.7
limonene	4.1	limonene	5.2	1,8-cineol	2.8
1,8-cineol	1.9	1,8-cineol	2.1	trans- $\beta$ -ocimene	3.2
trans- $\beta$ -ocimene	3.3	trans- $\beta$ -ocimene	3.5	cis-sabinene hydrate	0.3
cis-sabinene hydrate	0.2	cis-sabinene hydrate	0.2	Linalool	0.5
Linalool	0.3	Linalool	0.3	$\beta$ - pinene oxide	0.2
$\beta$ - pinene oxide	0.2	Cis - Limonen oxide	0.1	iso-Isopulegol	0.1
iso-Isopulegol	0.1	$\beta$ - pinene oxide	0.3	Rosefuran epoxide	1.1
Rosefuran epoxide	0.2	iso-Isopulegol	0.1	trans-p-mentha 1(7),8-dien-2-ol	0.1
trans-p-mentha 1(7),8-dien-2-ol	0.2	Rosefuran epoxide	0.2	$\alpha$ -terpineol	1.0
$\alpha$ -terpineol	0.8	trans-p-mentha 1(7),8-dien-2-ol	0.2	Nerol	0.3
Nerol	0.7	$\alpha$ -terpineol	0.8	Neral	19.2
Neral	24.8	Nerol	0.3	Geraniol	0.2
Geraniol	0.9	Neral	24.8	Geranial	28.3
Geranial	34.2	Geraniol	0.3	$\delta$ -Elemene	0.4
$\delta$ -Elemene	0.6	Geranial	34.3	$\alpha$ -copaene	0.4
Eugenol	0.1	$\delta$ -Elemene	0.6	Geranyl acetate	1.4
$\alpha$ -copaene	0.3	Eugenol	0.1	$\alpha$ -cedrene	0.2
Geranyl acetate	1.1	$\alpha$ -copaene	0.3	(E)-caryophyllene	3.9
$\alpha$ -cedrene	0.2	Geranyl acetate	1.1	$\alpha$ -humulene	0.3
(E)-caryophyllene	2.9	$\alpha$ -cedrene	0.3	allo-Aromadendrene	0.3
$\alpha$ -humulene	0.2	(E)-caryophyllene	2.9	Geranylpropanoate	0.3
allo-Aromadendrene	0.2	$\alpha$ -humulene	0.2	Germacrene D	
Geranylpropanoate	0.2	allo-Aromadendrene	0.2	$\alpha$ -zingiberene	0.8
Germacrene D	4.9	Geranylpropanoate	0.2	Bicyclogermacr	4.5

				ene	
$\alpha$ -zingiberene	0.8	Germacrene D	4.9	$\beta$ -curcumene	1.0
bicyclogermacrene	4.0	$\alpha$ -zingiberene	0.8	$\delta$ -cadinene	0.6
$\beta$ -curcumene	1.0	bicyclogermacrene	4.0	(E)-Nerolidol	2.2
$\delta$ -cadinene	0.5	$\beta$ -curcumene	1.0	Spathulenol	1.4
(E)-Nerolidol	1.7	$\delta$ -cadinene	0.5	caryophyllene oxide	3.3
Spathulenol	0.8	(E)-Nerolidol	1.7	$\alpha$ -epi-cadinol	1.4
caryophyllene oxide	2.3	Spathulenol	0.8	$\alpha$ -Cadinol	0.1
$\alpha$ -epi-cadinol	0.8	caryophyllene oxide	2.3		
$\alpha$ -Cadinol	0.1	$\alpha$ -epi-cadinol	0.8		

-كما تمت دراسة في كيووم في إيران لتعيين التركيب الزيت العطري المستخلص من الأجزاء الهوائية للمليسة و المكونة من الأزهار و الأوراق و الفروع بالتقطير المائي بجهاز كلفنجر و المزروعة بالظل بعيداً عن أشعة الشمس باستخدام تقنية GC-MS و يوضح الجدول (15) التركيب الكيميائي للزيت المتضمن 55 مركب [Yousefzadeh et al , 2013].

الجدول ( 15 ) التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري من كيووم في إيران [Yousefzadeh et al, 2013]

name of compound	Content(%)	name of compound	Content(%)
$\alpha$ -pinene	0.7	aromadendrene	0.4
Camphene	0.06	$\alpha$ - himachallene	1.46
$\beta$ -pinene	3.46	Allo aromadendrene	0.12
Myrcene	0.38	Geranyl propionate	0.42
2-octanol	1.93	$\beta$ - selinene	0.52
$\alpha$ -terpinene	0.28	Zingiberene	0.14
$\gamma$ -terpinene	0.44	(+)cuparene	6.81
Cis sabinene hydrate	38.99	$\gamma$ -cadinene	0.2
Linalool	1.29	$\delta$ -cadinene	0.33
Trans sabinene hydrate	2.0	Nerolidol Z	0.35
Trans pinene hydrate	0.34	$\alpha$ - cadinene	0.06
Trans limonene oxide	0.41	Nerolidol E	0.45
Cis sabinol	0.07	Geranyl butyrate	0.07
Trans verbenol	0.57	Spathulenol	10.4
Camphor	0.12	Hexyl benzoate	0.95
Thujol	0.53	Caryophyllene oxide	0.16
Rose furane epoxide	1.19	Salvia4(14)en-1-one	0.07
Terpinene- 4-ol	1.65	$\beta$ - oplophenone	0.19
$\alpha$ - terpineol	5.05	Humulene epoxide	0.32
Pulegone	1.13	$\delta$ - cadinol	0.43
Carvone	1.43	Acorenone B	0.1
piperitone	0.64	Juniper camphor	0.04
E citral	3.4	Longifolol	1.26
Butyl heptanoate	0.05	unknown	0.82
Perilla alchole	0.05	Monoterpene hydrocarbons	5.32
Trans carvyl acetate	0.05	Oxygenated monoterpenes	62.77
$\alpha$ - cubebene	0.05	Sesquiterpene hydrocarbons	11.22
unknown	0.17	Oxygenated sesquiterpenes	13.77
Geranyl acetate	3.91	Unknown compounds	0.99
$\beta$ - bourbonene	0.98	Other compounds	3.47
Metyl eugenol	0.15	Total	97.54

- أجريت دراسة في المغرب لتعيين تركيب الزيت العطري لأوراق لنبات المليسة المروية بمياه الصرف الصحي لمدينة سطات المغرب ومقارنتها بنبات مروى من مياه بئر. حيث تم الاستخلاص من الأوراق الطازجة بالتقطير المائي لمدة ثلاث ساعات وتم تحليل الزيت باستخدام GC-MS ، و يبين الجدول (16) التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري حسب مياه الري [Bensabah et al, 2013].

الجدول ( 16 ) مقارنة التركيب الكيميائي لزيت المليسة العطري في المغرب حسب مياه الري

[Bensabah et al, 2013]

Compounds	<i>Lippia</i> (1)	<i>Lippia</i> (2)	<i>Lippia</i> (3)
$\alpha$ -Pinene	0,94	-	1,06
Sabinene	2,22	2,33	2,42
Limonene	23,39	25,86	28,32
Trans- Ocimene	2,40	2,67	-
Nerol	1,64	1,50	1,40
Neral	15,29	14,34	13,85
Geranial	15,63	14,75	14,06
$\beta$ -Caryophyllene	3,52	3,98	3,35
$\alpha$ -Curcumene	9,37	10,81	11,36
Neryl acetate	4,84	6,64	2,38
Copaene	2,60	3,42	2,38
$\alpha$ -Cadinene	1,52	-	-
Spathulenol	6,28	5,43	8,29
Caryophyllene oxide	6,37	4,23	7,07
$\gamma$ -Cadinene	3,86	3,75	3,86

Lippia (1) :أوراق نبات مليسة طازجة مروية من بئر ، Lippia (2) : أوراق نبات مليسة طازجة مروية من الصرف

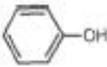
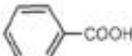
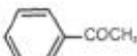
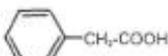
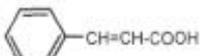
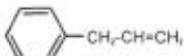
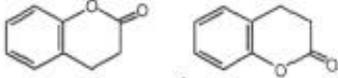
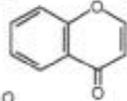
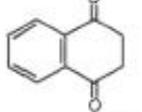
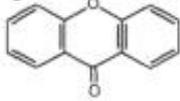
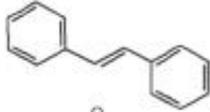
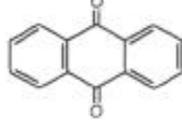
الصحي ، Lippia (3) : أوراق نبات مليسة مجففة مروية من الصرف الصحي

## 2.9. الفينولات :

أظهرت الدراسات المنجزة غنى المليسة بالفينولات وخاصة الحموض الفينولية Phenolic acids و الفلافونويدات flavonoids و مشتقاتها و الفينيل بروبانويدات phenylpropanoids ومشتقاتها.

### 1.2.9. كيمياء الفينولات:

إن الفينولات هي عبارة عن مستقلبات ثانوية تنتج في النبات ، وتقسم بالاعتماد على البنية الكيميائية إلى عشرة أصناف مختلفة ، الشكل ( 12 ) [Bravo,1998] .

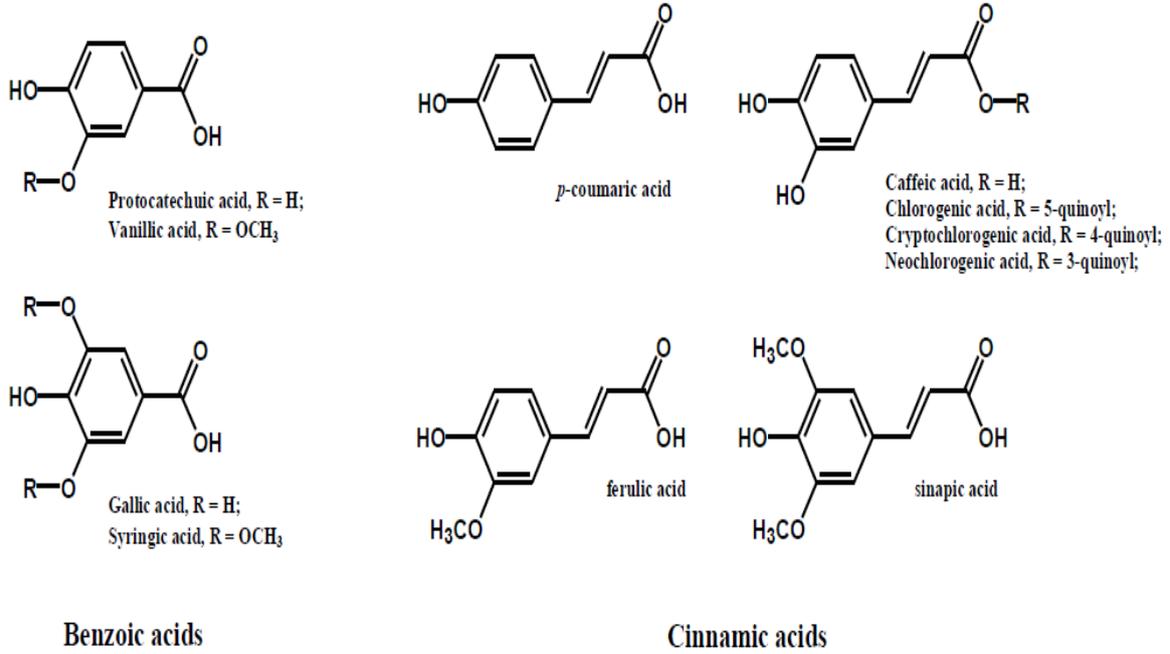
Class	Basic Skeleton	Basic Structure
Simple phenols	C <sub>6</sub>	
Benzoquinones	C <sub>6</sub>	
Phenolic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acetophenones	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Phenylacetic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Hydroxycinnamic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Phenylpropenes	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Coumarins, isocoumarins	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Chromones	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Naftoquinones	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	
Xanthenes	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	
Stilbenes	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Anthraquinones	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Flavonoids	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	
Lignans, neolignans	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
Lignins	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	

الشكل (12) الأصناف الرئيسية للفينولات [Bravo,1998]

تشتمل الفينولات في النباتات بشكل رئيسي على الحموض الفينولية و الفلافونويدات و التانينات و بعض المركبات الشائعة للمستالبيبات stilbenes و الليغنينات lignans [Dai et al ,2010].

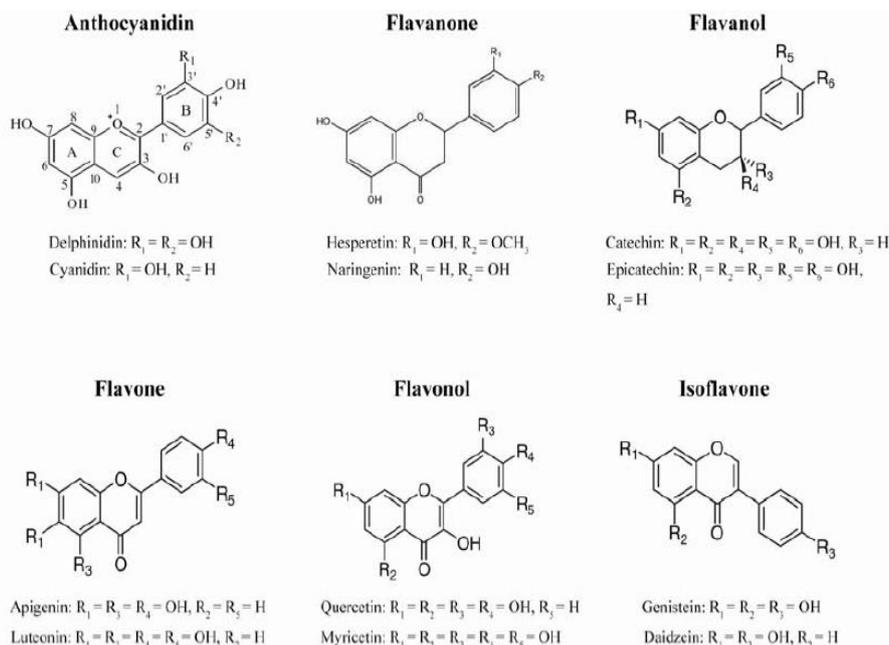
و يمكن أن تقسم الحموض الفينولية ، الشكل (13) ، إلى صنفين مشتقات حمض البنزويك ، مثل حمض الغاليك ، و مشتقات حمض السيانييميك منها حمض الكوماريك coumaric acid و حمض الكافيك

Caffeic acid ، و الذي يعتبر من الحموض الفينولية الأكثر وفرة في الفواكه والخضراوات كما يؤسّر مع حمض الكينيك quinic acid ليشكل حمض الكلوروجينيك chlorogenic acid الذي يعد المركب الفينولي الرئيسي في البن ، و حمض الفيروليك ferulic acid الموجود في الحبوب كإستر مع هيموسيللوز في جدار الخلية [Dai et al ,2010].



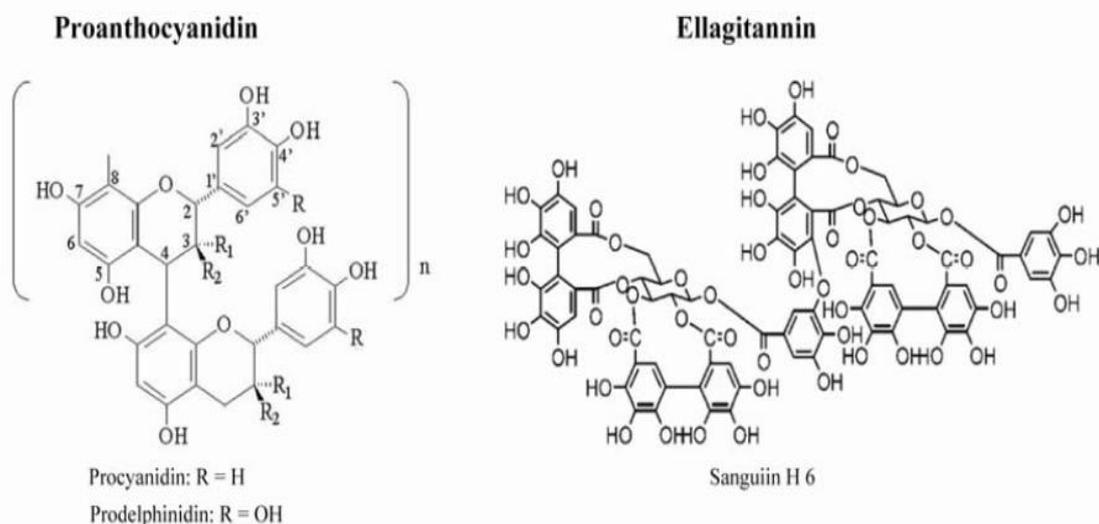
الشكل ( 13 ) أقسام الحموض الفينولية [Tsao,2010]

تعتبر الفلافونويدات من أكثر متعددات الفينول وفرة في غذائنا، تتكون البنية الرئيسية لها من وحدة الفلافان ، و التي تحتوي 15 ذرة كربون متحلقة في ثلاثة حلقات (C6-C3-C6) و التي تصنف على الترتيب A , B ,C ، و تقسم الفلافونويدات إلى ستة مجموعات رئيسية ، حسب الشكل (14) ، وفقاً لحالة الأكسدة للحلقة C ويعود اختلاف بنية هذه المجموعات لاختلاف درجة وموقع زمر الهيدروكسيلية أو المتيلية أو البرينيلية (Prenyl) أو الغليكوزية .حيث يوجد الكيرستين الذي ينتسب للفلافونولات بكثرة في البصل و التفاح ،في حين يوجد السياندين غليكوزيد والذي ينتسب للأنتوسيانان في فاكهة التوت [Dai et al.,2010]



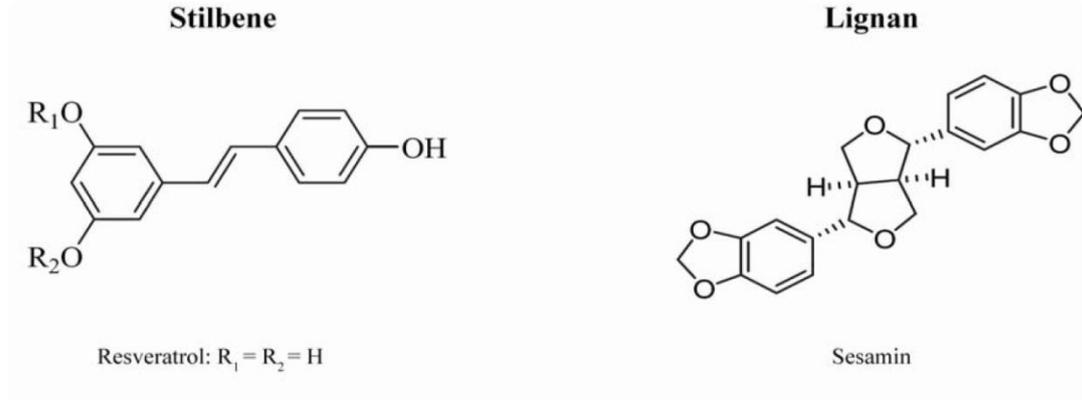
الشكل ( 14 ) الأقسام الرئيسية للفلافونويدات [ Dai et al ,2010 ]

تحتوي التانينات على مجموعتين رئيسيتين هي : التانينات القابلة للحلمهة hydrolysable tannins ، وهي مركبات تتكون من جزيئة غلوكوز مركزية تشكل روابط إستيرية مع حمض الغاليك وتسمى الغالوتانينات أو مع حمض سداسي هيدروكسيل ثنائي فينيل hexahydroxydiphenic acid وتسمى إليلاجيتانينات ellagitannins، والتانينات المتكاثفة condensed tannins، وهي عبارة عن بوليمير من flavan-3-ol ترتبط من خلال رابطة كربونية داخلية ، و يشار لها باسم البروانتوساينيدات [Dai et al.,2010]. ويبين الشكل (15) بنية التانينات.



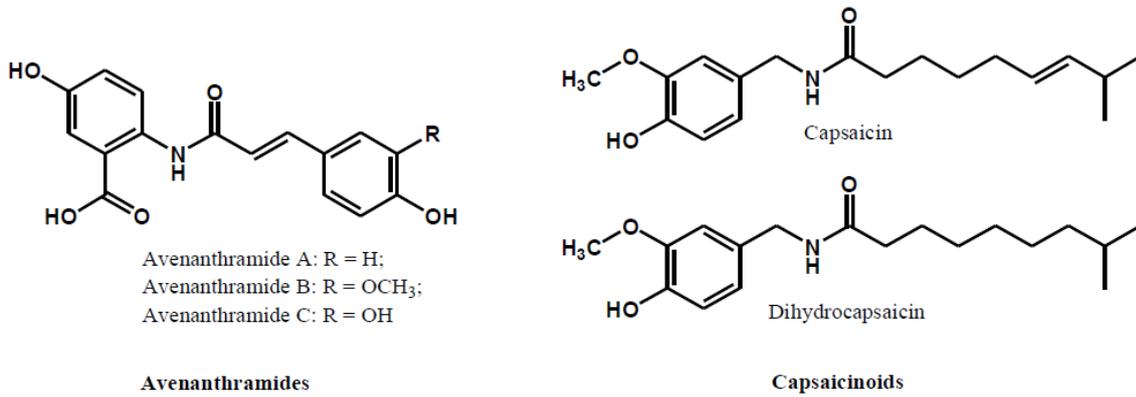
الشكل (15) أصناف التانينات [ Dai et al ,2010 ]

كما يتواجد resveratrol والذي ينتمي للاستلبيينات بشكل فريد في أنواع العنب ،كما تتواجد الليغنانات في الروابط المشكلة للكتان والسوسم و العديد من الحبوب [Tsao,2010] ويظهر الشكل (16) بنيتهما الكيميائية .



الشكل (16) الاستلبيينات و الليغنانات [Dai et al ,2010]

كما تحتوي بعض الفينولات على النتروجين حيث تحتوي الأطعمة على مجموعتين مهمتين من الفينولات الأמידية polyphenolic amides وهي capsacinoids الموجودة في الفلفل ، حيث يعد المسؤول عن الحمو في الفلفل الحار وامتلاكه خواص مضادة للأكسدة و للالتهاب ، وأيضاً avenanthramides الموجود في الشوفان [Tsao,2010] ويظهر الشكل (17) بنيتهما الكيميائية .



الشكل ( 17 ) الفينولات الأמידية في الأطعمة [Tsao,2010]

### 2.2.9. الدراسة المرجعية لفينولات في المليسة :

- تمت دراسة عام 1987 م في اليونان لتعيين الفلافونويدات في أوراق المليسة وذلك بعد عزل زيتها العطري تقطيراً بالبخار ثم رشح الماء المتبقي عن عملية التقطير وتم تجفيفه تحت الفراغ . ثم تم استخلاص الفلافونويدات من الباقي بواسطة عمود كروماتوغرافيا السائلة ثم قسمت المستخلصات إلى

مجموعات كل على حدا وتم تحديد و تنقية المكونات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC وتم تعيين الفلافونويدات التالية : salvigenin و eupatorin و eupafolin و luteolin و -7-O-luteolin و  $\beta$ -glucosid و hispidutin و cirsimaritin و diosmeti و chrysoerio و apigenin و pectolarigenin و cirsiliol . وتم التأكد من هوية المكونات من خلال الأطياف MS و UV-Vis و <sup>1</sup>H-NMR [Skaltsa et al,1988].

- أجريت دراسة في فرنسا 1995 م على مستخلص الأوراق بالماء الحار ، تم فيها تحديد luteolin -7-O- $\beta$ -Diglucuronide بأنه المركب الرئيسي للفلافونويدات في الأوراق المجففة حيث بلغت نسبته 0.8 % من الوزن الجاف [Carnat et al,1995].

- و قد تم تعيين متعددات الفينول كما ونوعاً في الشاي المعد من أوراق المليسة بتقنية HPLC و ذلك بعد نقع أوراق المليسة المجففة ثم عزل الزيت العطري من المنقوع المحضر جرفاً بالبخار . كما تم تعيين المحتوى الكلي للفلافونويدات و لمشتقات حمض السيانيك فيها و يوضح الجدول ( 17 ) النسب المئوية للمكونات بالنسبة للوزن الجاف لكل من الزيت العطري و الفينولات في المنقوع وفي الأوراق قبل النقع و بعده .

الجدول ( 17 ) النسب المئوية للفينولات والزيت العطري في منقوع وأوراق المليسة [Carnat et al,1999]

Constituents	Infusion	Leaf before infusion	Leaf after infusion
Essential oil	0.42	0.82	0.35
Limonene	0.01	0.11	0.01
Cineole	0.02	0.05	-
Neral	0.13	0.15	0.02
Geranial	0.19	0.20	0.03
Citronellol	-	0.04	-
Caryophyllene oxide	0.01	0.05	0.05
Spathulenol	0.02	0.04	0.03
Total flavonoids	1.64	2.31	0.60
Luteolin 7-diglucuronide	1.06	1.44	0.31
Total hydroxycinnamic derivatives	5.12	8.15	2.16
Verbascoside	3.94	6.52	1.93

وكان تركيز الفينولات في المنقوع المحضر 675 mg/l ( مردود الاستخلاص بنسبة 65 % ) تشمل على 400mg/l من verbascoside و على 100 mg/l من اللوتولين Luteolin 7-diglucuronide كما تم تعيين الخواص المضادة للأكسدة للمستخلصات المليسة بطريقة DPPH [Carnat et al,1999].

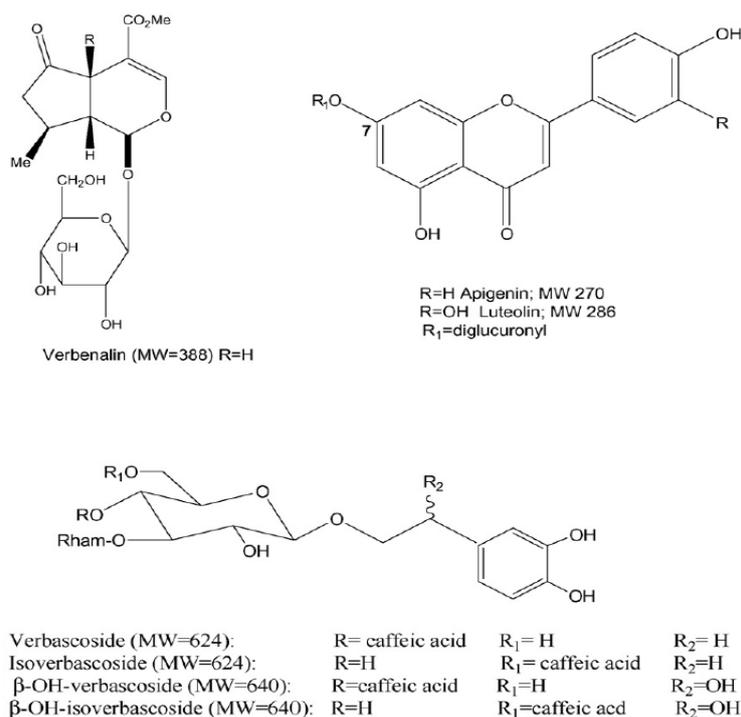
- أجريت في إيطاليا عام 2007 م دراسة لتعيين المحتوى الكيميائي لمستخلصات المائبة لأوراق المليسة Lemon verbena (LV) المجففة باستخدام تقنية HPLC حيث حضر مغلي (Decoction) LVdec1 أخذ 100 غ من الأوراق المجففة وغليت لمدة 20 دقيقة ، ثم حضر منقوع LV tea و مغلي LVdec2 من 5 غ من المليسة المحضرة عند زمني النقع 5 و 20 دقيقة وقورنت مع المسخلص الإيتانولي (Ethanol Extract) LVEtEx لها . ويعبر الجدول ( 18 ) المحتوى الكيميائي الذي تم التعرف عليه في المستخلصات .

الجدول ( 18 ) المحتوى الكيميائي للمكونات الرئيسية في أوراق المليسة بإيطاليا [Bilia et al , 2007]

Composition	LV dec1	LV EtEx	LV tea
I Verbenalin	+	+	+
Fl Luteolin 7-O-diglucuronide	+	-	+
Fl Apigenin 7-O-diglucuronide	-	-	+
Ph Verbascoside	+	+	+
Ph Isoverbascoside	+	+	+
Ph β-OH verbascoside	+	-	Traces
Ph β-OH isoverbascoside	+	-	Traces
Ph Eukovoside or isomer	+	+	+
Ph Eukovoside or isomer	-	+	Traces
Ph Eukovoside or isomer	+	+	Traces

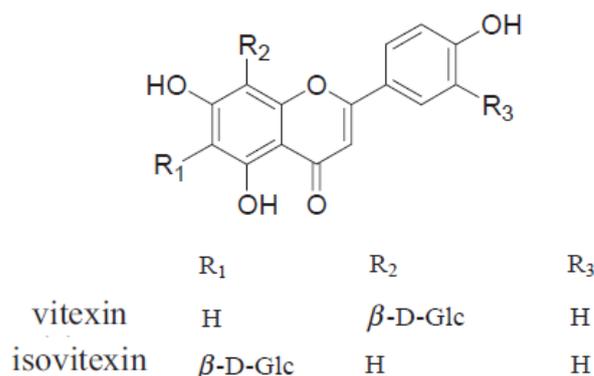
I=iridoid compound; Fl=flavonoid derivatives; Ph=phenylpropanoids derivatives; I  
+=presence of the compound;- =absence of the compound.\*Compound present only in dec2

بلغت نسبة الفيرياسكوسيد Verbascoside 97 % من مركبات الفينيل بروبانويد في المستخلصات ، حيث بلغت نسبه في المنقوع 8.3 % ، في حين تراوحت في المغلي 1.7- 4.4 % ، أما في المستخلص الإيتانولي 12 % . وقد لوحظ غياب للفلافونويدات في المستخلص الإيتانولي [Bilia et al , 2007] ويظهر الشكل (18) البنية الكيميائية للمكونات الرئيسية للفينولات في أوراق المليسة .



الشكل ( 18 ) البنية الكيميائية للمكونات الرئيسية في المستخلص المائي لأوراق المليسة في إيطاليا [Bilia et al , 2007]

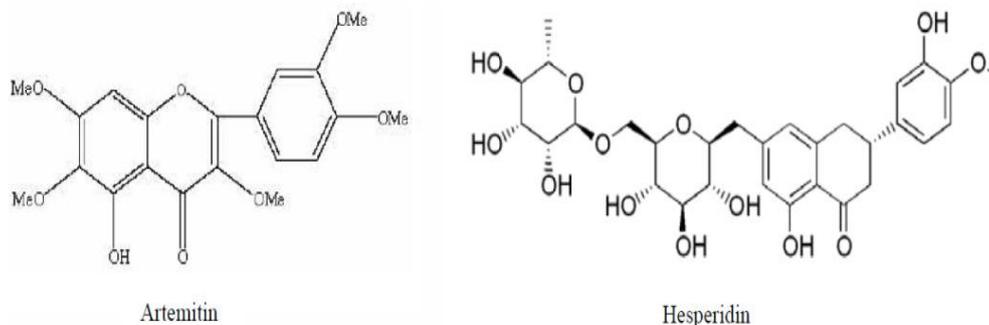
- تمت دراسة في الأرجنتين لتعيين الفعالية المضادة للتشنج للمستخلص المائي للمليسة المحضر لمدة 20 دقيقة و تبين بأن فلافونويد الفيتكسين vitexin هو المسؤول عن هذا الفعل و ليس الإيزوفيتكسين Isovitexin ، الشكل (19) و اللذان تم تعيينهما بتقنية HPLC [Ragone et al , 2007]



الشكل ( 19 ) البنية الكيميائية للفيتكسين و الإيزوفيتكسين [Becker et al , 2005]

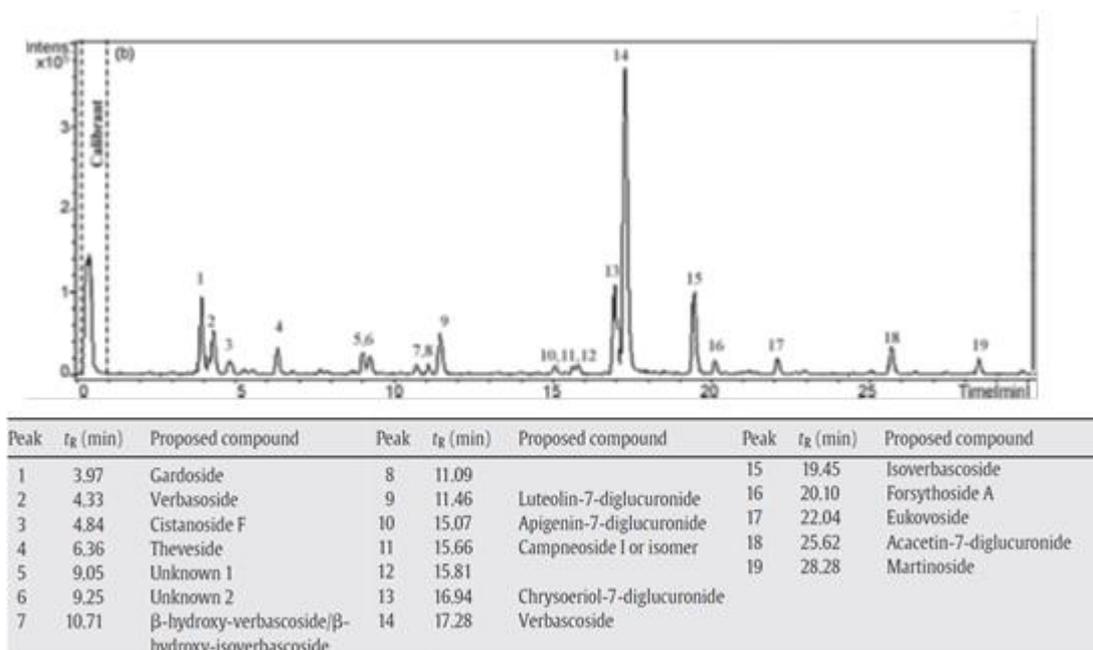
- تمت دراسة في الأردن لمعرفة سبب استخدام نبات المليسة المسكن أو المضاد للألم ، حيث تم عزل مركبين من الفلافونويدات وهما الأرتيميتين و الهيسبيردين من الأجزاء العلوية لها حيث يظهر الشكل

(20) بنيتها، وقد أحدث إعطاء هذين المركبين عن طريق التجويف البطني زيادة في فترة تحمل الألم عند الحيوانات وأن الزيادة معتمدة على التركيز. و تبين أن هذين المركبين يمتلكان فعلاً مسكناً ولهذا يستخدم هذا النبات في الطب الشعبي كمادة مسكنة [Qnais et al,2009].

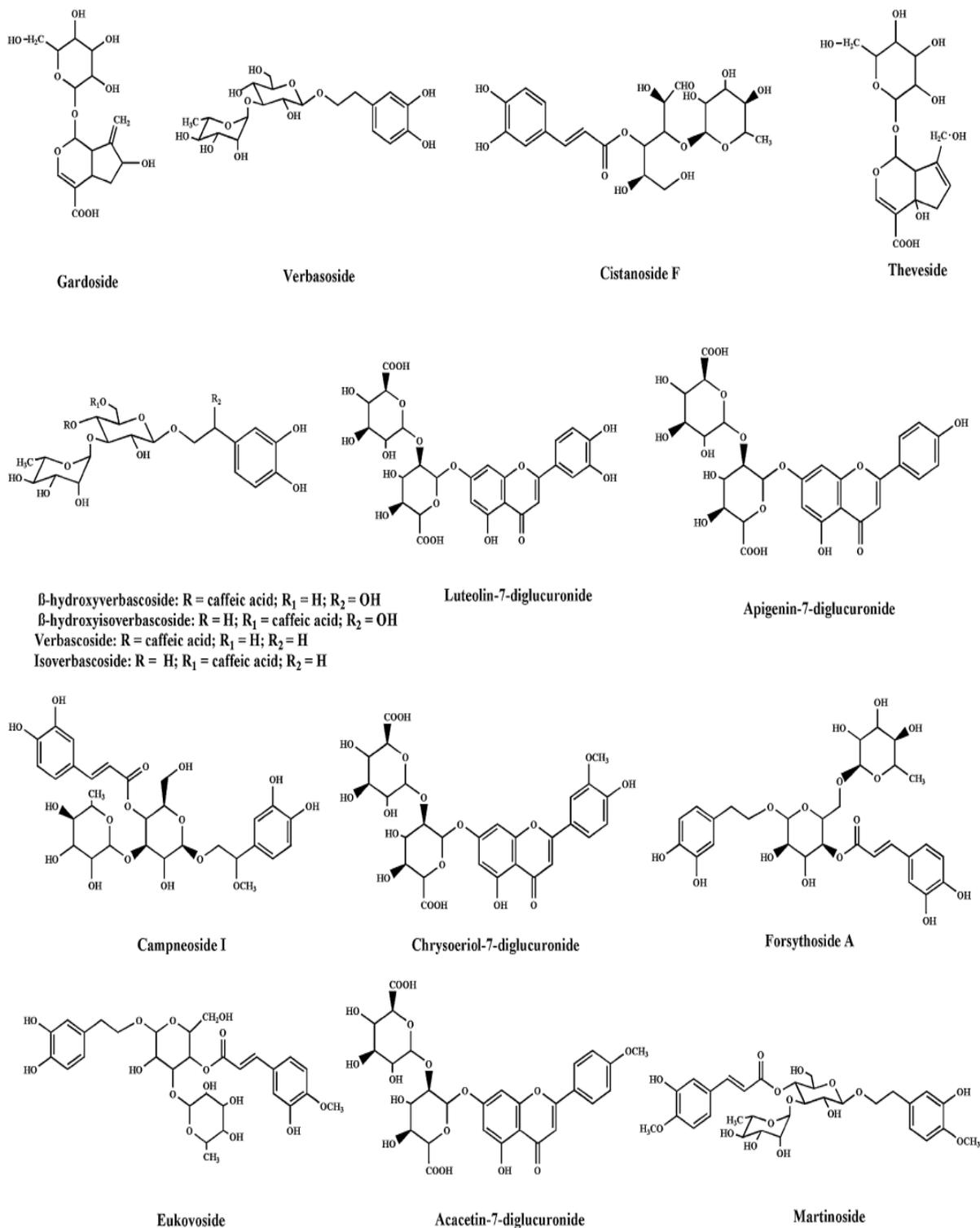


الشكل ( 20 ) البنية الكيميائية للأرتيميتين و الهيسبيردين [Qnais et al ,2009]

- تمت دراسة في اليونان عام 2009 م لتعيين المركبات الفينولية في المليسة حيث تم الاستخلاص المائي للأجزاء الهوائية المجففة و عينت المركبات باستخدام تقنية HPLC حيث يظهر الشكل (21) كروماتوغرام هذه المكونات [Piné et al ,2009] ويوضح الشكل (22) البنية الكيميائية لها.



الشكل ( 21 ) كروماتوغرام HPLC للمركبات الفينولية بالمليسة في اليونان [Piné et al ,2009]



الشكل (22) البنية الكيميائية للمركبات الفينولية في المستخلص المائي للمليسة في اليونان [Piné et al ,2009]

- عين تغير متعددات الفينول تبعاً لتطور الورقة في عينات من المليسة في الأرجنتين حيث تم اعتيان عينات الورق الفتية ، بحيث لا يتجاوز طولها 3 سم ، و الأوراق البالغة ، التي يبلغ طولها 6 سم ، في نفس مرحلة النمو التي يمر بها النبات و حضر منقوع الأوراق بتركيز 5 % . ثم عزل كل من اللوتولين و الأبيجينين و الفيرباسكوسيد ومشتقاتها بتقنية TLC و يبين الجدول (19) عن تغير محتوى الفينولات تبعاً لتطور الورقة . وقد لوحظ بأن محتوى الفينولات في الأوراق الفتية يكون أكبر منها في البالغة [Ricco et al, 2011]

الجدول (19) تغيرات الفينولات في المستخلصات المائية للمليسة تبعاً لتطور الورقة [ Ricco et al ,2011 ]

	Total Phenols	Total Tannins	Total Flavonoids	Total hydroxycinnamic acid
	mg gallic acid /g dried plant material	mg tannic acid/gdried plant material	mg rutin /g dried plant material	mg chlorogenic acid /g dried plant material
<b>Adults leaf</b>	50,02 ± 3,84	15,90 ± 1,85	24,91 ± 1,90	35,01 ± 2,84
<b>Young leaf</b>	26,43 ± 2,49	16,12 ± 1,60	20,51 ± 1,15	19,72 ± 1,72

- تمت دراسة في الأرجنتين لتعيين تأثير منقوع ومغلي المستخلصات المائية لأجزاء الهوائية المجففة للمليسة و خواصها المضادة للأكسدة على تلف الشفرة الوراثية الدنا DNA . حيث حضر المنقوع و المغلي لأجزاء الهوائية المجففة للمليسة عند الزمن 10 دقيقة ، كما حدد المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات و التانينات و مركبات الفينيل بريانونيد فيها، الجدول ( 20 ) ، و تم تعيين الفاعلية المضادة للأكسدة لكل مستخلص على حدا و في الأنظمة الحيوية بعدة طرق . ووجد بأن الفعالية المضادة للأكسدة للمغلي كانت أكبر منها في المنقوع حيث أبدى المغلي فعالية أكبر وأنه من الآمن استخدام هذا النبات الطبي كعقار و عامل كيميائي للعلاجات [ Portmann et al ,2012 ] .

الجدول ( 20 ) محتوى الفينولات في منقوع ومغلي المليسة بالأرجنتين [Portmann et al ,2012]

Phytochemistry Analysis	Infusion, X $\pm$ SD	Decoction, X $\pm$ SD
Total phenols quantification (mg tannic acid/g of dry material)	51.85 $\pm$ 3.17	51.35 $\pm$ 3.49
Total tannins quantification (mg tannic acid/g of dry material)	5.95 $\pm$ 0.65	8.90 $\pm$ 0.90
Condensed tannins quantification (proanthocyanidins; mg tannic acid/g of dry material)	Not detected	Not detected
Total flavonoids quantification (mg tannic acid/g of dry material)	20.82 $\pm$ 1.80	20.67 $\pm$ 1.70

- تمت دراسة في البرتغال لتعين المحتوى الكيميائي و الخواص المضادة للأكسدة للمليسة حيث تم تحضير مستخلصين في الماء و الإيتانول من أوراقها لمدة 10 دقائق . و تم تحديد المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات فكان محتوى الفينولات على الترتيب للمستخلص المائي 32.05 $\pm$ 2.99 mg GAE/100g sample وللمستخلص الإيتانولي 41.56 $\pm$ 4.08 mg GAE/100g sample في حين كان محتوى الفلافونويدات للمستخلص المائي 30.24 $\pm$ 2.97 mg CE/100g sample وللمستخلص الإيتانولي 22.38 $\pm$ 1.54 mg CE/100g sample كمكافئ للكاتشين catechin .

و كان المحتوى الكلي للكافئين فيها (2340.01 $\pm$ 1.46 Caffeine mg/100g dry weight) ، كما تم دراسة الخواص المضادة للأكسدة باستخدام طريقة DPPH فكانت الفعالية المضادة للأكسدة في المستخلص الإيتانولي أكبر من المستخلص المائي لها [ Vinha et al ,2013 ] .

**10.الفعالية الحيوية لنبات المليسة :**

إن احتواء المليسة في تركيبها العديد من المركبات مثل السيترال و الليمونين و 1،8 سينول و الليتولين وغيرها التي تضعف من فعالية ونمو العديد من السلالات البكتيرية جعلها تمتلك فعلاً حيوياً مضاداً للبكتريا و سنذكر لمحة عامة عن السلالات البكتيرية المستخدمة في البحث إضافة لبعض الدراسات المنجزة عليها.

**1.10. السلالات البكتيرية المستخدمة:****1.1.10. المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* :**

هي من فصيلة المكورات *Micrococcaceae* و تضم هذه الفصيلة جنسين هما جنس المكورات الدقيقة *Micrococcus* و جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* . تضم العنقوديات 25 نوعاً منها العنقودية الذهبية *Staph.aureus* و العنقودية البشرية *Staph. Epidermidis* و العنقودية الصفراء *Staph.Citrus* و العنقودية البشرية *Staph.hominis* و العنقودية الحالة للدم *Staph.haemolyticus* . العنقودية الذهبية هي مكورات مستديرة أبعادها بين 0.8-1 ميكرون ، تجتمع أفرادها بشكل عناقيد مكون من 20 - 50 مكورة ، غير متحركة و غير متبوعة ، غير محاطة بمحفظة ظاهرة ، هوائية لاهوائية مخيرة تنمو بسهولة على المستنبتات الزرعية العادية بدرجات حرارة من 10- 45 °C ، إيجابية الغرام . مقاومة للجفاف و الملوحة ودرجات الحرارة المرتفعة مما يجعلها واسعة الانتشار في الطبيعة .

إن أكثر من 30-40 % من الأصحاء قد يحملون العنقوديات الذهبية على الجلد و الأنف و الأغشية المخاطية . وهي تعد سبباً لحدوث الكثير من الأخماج وخاصة عند وجود اضطراب في المناعة أو وجود رض في الأنسجة كالجلد أو الحروق أو المخاطيات المتأذية ، ومن أمراضها : الدامل و الجمرة الخبيثة و الخراجات و خمج الدم و التهاب العظام و النقي و بعض التسممات الغذائية [ عبيد ، 1997 ; عبيد ، 2000 ] .

**2.1.10. الإيشريشيا الكولونية *Escherichia coli* :**

تتنتمي الإيشريشيا الكولونية إلى الأمعائيات ، و هي عصيات بطول 1-3 ميكرون و عرض 0.5 ميكرون ، غير متبوعة ، نادراً ما يكون لها محفظة ( باستثناء بعض السلالات ) ، 57 % منها متحركة بفضل سياط محيطية وتكون مفردة أو مزدوجة أو تجتمع على شكل سلاسل في العينات المرضية ، هوائية لاهوائية مخيرة ، سلبية الغرام وغالباً ذات تلون قطبي . حيويتها كبيرة جداً لكنها حساسة للحرارة ( فهي

تموت خلال ساعة بدرجة حرارة  $56^{\circ}\text{C}$  وحساسة للكlor و مشتقاته وتقاوم حمض الفينيك 1% ويمكن حفظها بالتجفيد .

تسكن الأمعاء حيث تشكل 80% من فلورا الجراثيم الهوائية فيه وتنتشر في البيئات المختلفة و توجد بالمخاطيات المختلفة وتنتقل بالأغذية حيث يوجد حوالي 170 نوعاً منها . تكون مسؤولة عن الإنتانات البولية و الهضمية خاصة عند الأطفال و التهاب الطرق الصفراوية ( الكبد و المرارة ) و التناسلية كما يمكن أن تكون مسؤولة عن خمج الدم و التهاب الصفاق و التهاب السحايا ( و خاصة عند الأطفال ) [ عبيد ، 1997 ; عبيد ، 2000 ] .

### 3.1.10. السالمونيلا التيفية *Salmonella Typhimurium* :

تتنتمي للأمعائيات و هي عصيات مستقيمة طولها حوالي 3 ميكرون وعرضها 0.5 ميكرون عديمة المحفظة ، معظمها متحركة بواسطة سياط محيطية و تصادف منفردة أو بشكل كتل صغيرة وبشكل عصيات طويلة في المستنبتات الهرمة ، هوائية لاهوائية مخيرة ، سلبية الغرام وغالباً تبدي تلوناً قطبياً . حيويتها كبيرة لكنها تتأثر للحرارة ( فهي تموت خلال ساعة بدرجة حرارة  $56^{\circ}\text{C}$  ) وتتأثر بالمطهرات ، تقاوم البرودة و التجميد وبعض العوامل الكيميائية مثل الملونات ، الأملاح الصفراوية ، سترات البزموت و سيلانيت الصوديوم .

تنتشر في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان ، ويمكن أن تتواجد في البيئة بسبب التلوث و لكنها لا تستطيع التكاثر في البيئة الخارجية رغم أنها تقاوم و تحافظ على بقائها في التربة لعدة أسابيع و أحياناً لعدة شهور إذا كانت الحرارة و الرطوبة و pH التربة مناسبة . إجبارية الأمراض تسبب خمج الدم ، و بالتالي الحمى التيفية ، و الإنتانات المعوية و التهاب الطرق الصفراوية و التسممات الغذائية [ عبيد ، 1997 ; عبيد ، 2000 ] .

### 2.10. الدراسات المرجعية للفعالية الحيوية لنبات المليسة :

- تمت دراسة في اليمن على الفعالية الحيوية لبعض النباتات الطبية حيث تم تحضير المستخلص الميثانولي بواسطة جهاز سوكسيليه تم أخذ المتبقي بالخرطوشة و استخلص بالماء الساخن عند الدرجة  $70^{\circ}\text{C}$  و تم اختبار الفعالية للمستخلصين بطريقة الانتشار بالأقراص على عدة سلالات جرثومية بعضها متعدد متكرر المقاومة فأبدت المليسة فعالية عالية اتجاه العصوية الرقيقة *Bacillus subtilis* (13 mm) و العنقودية الذهبية *Staph.aureus* (17 mm) و العنقودية البشرية

متعددة المقاومة *Staph.epidermidis* (20 mm) و العنقودية الحالة للدم *Staph. haemolyticus* متعددة المقاومة (20 mm) إضافة للمكورة فلافوس الدقيقة *Micrococcus flavu* (17 mm) [ Mothana et al , 2010 ] .

- تمت دراسة في المغرب لمعرفة تأثير المستخلص الإيتانولي لعدة نباتات طبية على الليستيرية المستوحدة *Listeria monocytogenes* و بعض السلاسلات الممرضة فكانت المليسة أقلها فعالية عليها في حين أبدت فعالية اتجاه العنقودية الذهبية و الراكدة البومانية *Acinetobacter baumannii* في حين كان التثبيط ضعيفاً اتجاه الأمعائية المذرقية *Enterobacter cloacae* [ Bayoub et al , ] 2010.

- تمت دراسة في إيران 2011 م لمعرفة التأثير المضاد للجراثيم للمستخلص الميتانولي لأوراق وأزهار المليسة بطريقة الانتشار بالأقراص disk diffusion method و حدد التركيز الأدنى القاتل للجراثيم. فأبدى المستخلص الميتانولي لها فعالية مضادة للجراثيم التالية : العصوية الرقيقة *Bacillus subtilis* , العصوية الشمعية *Bacillus cereus* والمكورات *Micrococcus luteus* و العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* ، الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* ، الكلبسيلا أوكسينوكا *Klebsiella oxytoca* ، الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumonia* ، الإيشريكية الكولونية *Escherichia coli* . إضافة للفطور الرشاشية السوداء *Aspergillus niger* و المبيضة البيضاء *candida albicans* وتبين أن الفطور أكثر حساسية من الجراثيم و الجراثيم إيجابية الغرام أكثر حساسية من السلبية . وتعود هذه الفعالية للتربينات و الفلافونويدات ومركبات أخرى موجودة في المليسة. وقد قورنت الفعالية مع مضادات التهاب جنتاميسين و النيساتين مدرجة وفق الجدول (21) [Zare et al, 2011]

الجدول (21) الفعالية الحيوية للمستخلص الميثانولي لأوراق و أزهار المليسة في إيران [Zare et al , 2011 ]

leaves Methanolic extract of <i>Lippia citriodora</i> (mg/ml*)								
Microorganism	Mean zone of inhibition(mm)±SE				DMSO	Gentamycin	Nistatin	Mic*
	50%	25%	12.5%	6.25%				
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.66±0.88	15.33±1.20	10.66±2.40	5.00±0.57	-	33		0/0625
<i>Bacillus subtilis</i>	27.00±2.08	18.66±2.18	19.66±1.20	13.00±2.08	-	35		0/0625
<i>Bacillus cereus</i>	33.00±1.52	27.00±1.85	22.00±1.52	16.00±1.52	-	39		0/0312
<i>Micrococcus luteus</i>	20.66±1.20	9.66±1.20	6.00±1.52	2.66±0.88	-	34		0/0625
<i>Kelebsiella</i>								
<i>oxytoca</i>	19.33±1.45	11.66±2.18	10.66±0.88	3.00±1.15	-	34		0/0625
<i>Kelebsiella pnunonea</i>	3.00±2.08	22.00±1.52	19.66±0.33	13.33±2.33	-	28		0/0312
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24.66±0.66	19.66±1.45	15.33±0.88	11.00±1.52	-	9		0/0312
<i>Escherichia coli</i>	25.66±2.60	19.66±0.88	14.33±1.76	11.33±0.88	-	41		0/0312
<i>Aspergillus niger</i>	37.33±0.88	30.00±1.15	25.33±0.88	20.33±0.33	-		34	0/0156
<i>Candida albicans</i>	35.00±2.51	28.33±0.88	17.33±1.45	13.00±2.08	-		32	0/0312
Flowers Methanolic extract of <i>Lippia citriodora</i> (mg/ml*)								
Microorganism	Mean zone of inhibition(mm)±SE				DMSO	Gentamycin	Nistat	Mic*
	50%	25%	12.5%	6.25%				
<i>Staphylococcus aureus</i>	19.33±1.52	15.33±1.52	9.66±4.16	2.66±2.08	-	32		0/0625
<i>Bacillus subtilis</i>	27.66±2.51	19.33±1.52	18.33±1.52	11.33±4.1	-	34		0/0312
<i>Bacillus cereus</i>	34.33±2.08	28.00±2.00	22.00±2.00	17.33±2.0	-	38		0/0312
<i>Micrococcus luteus</i>	19.66±2.51	10.66±1.52	7.00±1.00	2.66±2.08	-	33		0/0625
<i>Kelebsiella oxytocal</i>	19.33±1.52	12.00±2.64	6.00±2.00	-	-	34		0/125
<i>Kelebsiella pnunonea</i>	29.66±1.52	26.00±1.00	21.00±1.00	10.66±2.0	-	28		0/0312
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23.33±1.52	19.66±1.52	14.66±3.21	11.33±3.5	-	28		0/0312
<i>Escherichia coli</i>	27.86±9.53	21.66±2.08	20.00±3.00	14.33±1.5	-	41		0/0625
<i>Aspergillus niger</i>	36.66±1.52	30.00±1.00	25.33±4.04	12.33±5.5	-		32	0/0625
<i>Candida albicans</i>	33.33±4.16	29.66±3.05	22.33±4.72	10.66±3.0	-		30	0/0625

- تمت دراسة في إيران لفعالية المليسة على العنقودية الذهبية المقاومة للميتسلين *Staphylococcus aureus* methicillin resistance (MRSA) وقد اختبرت بطريقة الانتشار بالأقراص و حدد التركيز الأدنى المثبط ، حيث وجد أن نسبة التثبيط تزداد بازدياد التركيز حتى تركيز ( 55 µl/ml ). في حين أن التركيز التثبيطي الأدنى MIC لجرثومة MRSA كان ( 15 µl/ml ) من الزيت العطري [Ansari et al , 2012 ] .

- أجريت دراسة في المغرب لتحديد القدرة المضادة للميكروبات للزيت العطري المستخلص من أوراق الطازجة و المجففة للمليسة المروية بمياه بئر و مياه الصرف الصحي لمدينة صيقات ضد العنقودية الذهبية و الزائفة الزنجارية و الإشريكية الكولونية . و يظهر الجدول ( 22 ) أن المليسة لم تبدي أي فعالية

اتجاه الزائفة الزنجارية في حين أن الأوراق الطازجة للمليسة المروية بالصرف الصحي ذات فعالية عالية على الإشريكية الكولونية والعنقودية الذهبية [Bensabah et al , 2013] .

الجدول ( 22 ) الفعالية المضادة للجراثيم لزيت المليسة العطري باختلاف مياه الري [Bensabah et al , 2013]

Microorganism species	Inhibition zone diameter in (mm)		
	<i>Lippia</i> (1)	<i>Lippia</i> (2)	<i>Lippia</i> (3)
<i>St. Aureus</i> ATCC 29213	14.5 ± 0.7	18.66 ± 1.52	14 ± 0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15.33 ± 0.57	22 ± 2.64	15 ± 0
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

(1) *Lippia* : أوراق نبات مليسة طازجة مروية من بئر ، (2) *Lippia*: أوراق نبات مليسة طازجة مروية من الصرف الصحي ، (3) *Lippia* : أوراق نبات مليسة مجففة مروية من الصرف الصحي .

- أظهرت دراسة في إيران تأثير المستخلص الإيتانولي و المائي للمليسة على الإشريكية القولونية و السالمونيلا التيفية الفأرية *S. typhimurium* و الشيغلا الزحار *Shigella dysenteriae* و العصوية الشمعية *Bacillus cereus* و المكورات العنقودية الذهبية و المكورات العنقودية البشرية و يرسينيا المعوية *Yersinia entocolitica* و الزائفة الزنجارية و المكورة المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* بطريقة الانتشار بالحفر Well diffusion وطريقة الانتشار بالأقراص Disk diffusion بأن المستخلص الإيتانولي أكثر فعالية من المستخلص المائي ، ويظهر الجدول(23) أقطار هالات التثبيط للمستخلص الإيتانولي بطريقتي الانتشار [ Koohsari et al , 2013 ]

الجدول ( 23 ) الفعالية المضادة للجراثيم للمستخلص الإيتانولي لأوراق المليسة في إيران [Koohsari et al , 2013]

ORGANISMS	Well method				Disk method			
	1000mg/ml	500mg/ml	250mg/ml	125mg/ml	1000mg/ml	500mg/ml	250mg/ml	125mg/ml
<i>E.coli</i>	9	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.aureus</i>	18	16	14	13	11	8	0	0
<i>P.aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E.feacalis</i>	24	22	21	20	0	0	0	0
<i>S.epidermidis</i>	22	21	19	17	15	12	10	8
<i>S.dysentry</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.thyphimorium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Y.entocolitica</i>	14	12	0	0	0	0	0	0
<i>B.cereus</i>	18	15	13	11	10	8	0	0

## أهمية البحث

يتميز نبات المليسة بغناه بمتعددات الفينول و الزيت العطري ، وكونها تستعمل كمنقوع ومغلي للأوراق الطازجة و المجففة منها في الطب الشعبي و العربي كان لابد من تعيين محتواها الأعظمي من مركباتها و التي تعزى لها هذه الفعالية وتأثير مراحل النمو مع تغير فترات حصادها وقطفها .

ونظراً لعدم وجود دراسة سابقة حددت تغير محتوى الفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة خلال مراحل النمو ، بالتالي فإن أمثلة شروط استخدامها بتحديد الحد المسموح من استخدامها وزمن النقع اللازم عند تحضيرها وزمن حصادها و قطافها ضرورة ملحة ، كونها عقاراً طبياً دوائياً ذو أهمية عالية في علاج العديد من الأمراض ووصفها أيضاً كمضاد للبكتريا وللتهاب و للتأكسد، وخاصة لدى استخدامها بشكل واسع من الناس عامةً كمشروب شعبي .

## أهداف البحث

1- تعيين تركيب الزيت العطري في أوراق نبات المليسة و تغيره خلال مراحل النمو، التي جمعت بها الأوراق وذلك خلال الطور الخضري من شهر أيار الذي يحقق أعلى معدل للنمو وشهر تموز منتصف الموسم و طور الإزهار الكامل في شهر تشرين الأول، وتأثير زمن الحصاد و التجفيف على محتواه من المكونات الفعالة .

2- تعيين المحتوى الكلي لمتعددات الفينول و الفلافونويدات في منقوع أوراق نبات المليسة المحضر بطريقتي النقع المستمر و النقع بدون غليان و تغيرها خلال مراحل النمو وتأثير عملية التجفيف و زمن الحصاد على محتواه من المكونات الفعالة.

3- تحديد الزمن اللازم للنقع و الذي يحقق أعلى محتوى للفينولات و الفلافونويدات عند تحضير منقوع المليسة بطريقتي النقع المستمر و النقع بدون غليان من 5 إلى 20 دقيقة .

4- دراسة الفعالية الحيوية للزيت العطري المستخلص والمنقوع المحضر من الأوراق الطازجة و المجففة على سلالات جرثومية . سلالتين سالبة الغرام هما الإيشريكية الكولونية و السالمونيلا التيفية و سلالة إيجابية الغرام هي المكورات العنقودية الذهبية وتأثيرها بزمن الحصاد.

## الفصل الثاني

# مواد البحث و طرائقه



## مواد البحث وطرائقه

**1. المواد الكيميائية المستخدمة :**

أدرجت المواد الكيميائية المستخدمة في الجدول (24).

الجدول ( 24 ) المواد الكيميائية المستخدمة في البحث

المادة	الصيغة	الوزن الجزيئي	الشركة	النقاوة
كاشف الفولين Folin –Ciocalteu	-	-	Sigma	-
حمض الغاليك	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.12	Sigma	للمعايرة % 102.5-97.5
كربونات الصوديوم اللامائية	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105.99	Tekkim	99 %
كلوريد الألمنيوم اللامائي	AlCl <sub>3</sub>	133.34	Merck	%98<
خلات الصوديوم اللامائية	CH <sub>3</sub> COONa	82.03	Panreac	% 101-99
كيرستين	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.24	Sigma	(HPLC) %98 ≤
ميتانول	CH <sub>3</sub> OH	32.04	Panreac	(HPLC) % 99.99
كبريتات الصوديوم اللامائية	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	112	Merck	% 99
نظامي الهكسان	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86.16	Sigma	grade(HPLC) % 99
حمض الخل الثلجي	CH <sub>3</sub> COOH	60	Panreac	% 100.5-99.5
Muller – Hinton Agar	-	-	Himedia	-
محاليل مكفارلند	-	-	BIO MER'IEUX	-
DMSO	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	78.13	Sigma	%99.9 ≤

2. الأجهزة والأدوات المستخدمة :

جهاز مطيافية ضوئي T80+ UV/Vis Spectrometer من شركة PG-Instruments Ltd مزود بمثبت درجة حرارة PTC-2 Peltier temperature controller مربوط بحاسب ألي مزود ببرنامج UV WIN Spectrophotometer software Ver 5.1.1 .

جهاز قياس للرطوبة من Sartorius – MA35 مزود بميزان حساس .

جهاز كروماتوغرافيا غازية GC-MS ( Agilent نموذج 7890A ) في الهيئة العامة للتقانة الحيوية مزود بمطياف كتلة MS ( Agilent نموذج 5975C ) وحاقن ألي ( Agilent نموذج 7683B ) باستخدام مكتبيتي NIST و Wiley و العامود الشعري من النوع DB-1 ( 30 م × 0.25 مم × 0.20 μm )

سخانات كهربائية مزودة بمحرك مغناطيسي من شركة Brand Stuart®.

جهاز تقطير للزيوت الطيارة محلي الصنع وفق دستور الأدوية الأوروبي .

أدوات زجاجية مختلفة مصنفة ( أرلينات و بياشر و دوارق متعددة القياسات , مقاييس مدرجة, بوالين معايرة سعة 50 , 25 , 100 مل , مكثف حلزوني مرتد , أنابيب اختبار مزودة بأغطية محكمة الإغلاق بجوان , فيولات للحقن الألي عاتمة سعة 1.5مل )

عبوات بلاستيكية بولي إيتلن شفافة سعة 100 مل .

أطباق بترية – إبرة زرع .

غرفة الزرع الجرثومي Laminar Flow من شركة M.L.E. Lap Equipment

حاضنة جرثومية Incubator من شركة Memmert

معقم Autoclave ( الصاد الموصل ) من شركة Memmert

جهاز مكفارلند Mc.Farland لقراءة المعلقات الجرثومية من شركة BIO MER'IEUX .

ماصات ميكرونية من نوع Socorex : 100-1000 μl ، 10 - 100 μl ، 1 - 10 μl

**3. العوامل الممرضة المستخدمة :**

تم تأمين السلالات الجرثومية من مخبر الأحياء الدقيقة في قسم العلوم البيئية ، سلالتان سالبة الغرام -Gram وهي الإشريكية الكولونية *Escherichia coli* و *salmonella* وسالمة إيجابية الغرام +Gram هي المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* .

**4. جمع عينات الملية :**

جمعت عينات النبات من منطقة العدوي في مدينة دمشق . نقلت العينات بأحواضها ( أصصها ) إلى الحديقة التجريبية في كلية العلوم قسم الكيمياء في جامعة دمشق لحين وقت الحصاد . يبدأ ظهور البراعم لفروع النبات في أواخر شهر آذار و قد تم جمع الأوراق الطازجة لنبات الملية في ثلاث مراحل : الطور الخضري وذلك في شهر أيار الذي يحقق أعلى معدل نمو للنبات ، حيث بلغ طول أفرع النبات 50 سم تقريباً ، وفي شهر تموز منتصف الموسم . و في شهر تشرين الأول و ذلك بعد الإزهار الكامل وذلك في تمام الساعة 7:30 صباحاً من الأيام 21 - 30 من كل شهر من العام

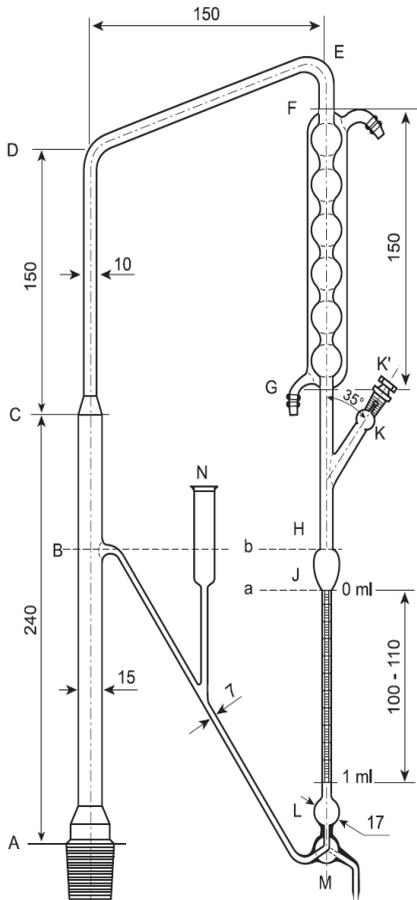
2013 . جفف قسم من الأوراق من كل قطعة في الظل لمدة ثلاثة أيام ثم حفظت العينات المجففة في أوعية مغلقة جيداً في الظل بالدرجة ( 4 °C ) .

**5. استخلاص الزيت الأساسي العطري :**

1.5. مبدأ الاستخلاص :

تتم عملية استخلاص الزيت العطري جرفاً بالبخر باستخدام جهاز التقطير للزيوت الطيارة وفق دستور الأدوية الأوروبي ، الشكل (23) .

بما أن تركيب الزيت العطري من التربينات و السيستوتربينات و مشتقاتها الأكسجينية فإن درجة غليانها تتراوح بين 150-300°C لذا تحرر الحرارة قطرات الزيت من الأنسجة النباتية وحتى يتبخر الزيت يجب أن يتلقى حرارة أقل من درجة غليانه و يكون ضغط بخاره مساوياً للضغط الجوي



الشكل ( 23 ) جهاز التقطير الزيوت الطيارة وفق

دستور الأدوية الأوروبي [Cooke et al , 2000]

الخارجي و بالتالي تبخر الماء يرفع الضغط الكلي لبخار السائل ليساوي الضغط الجوي و بالتالي يغلي و يتبخر الزيت العطري تحت الضغط الجوي 760 مم زئبقي في درجة حرارة (99.3°C) أقل من درجة غليانه دون تفككه [Handa et al , 2008] .

### 2.5. طريقة العمل :

يؤخذ 50 غ من أوراق النبات الجافة أو الطازجة وتوضع في دورق الغليان ثم يضاف إليها 600 مل من الماء ثنائي التقطير , تركيب قطعة الجهاز ويملى بالماء من الفتحة N حتى يبلغ مستوى الماء إلى العنق B ثم يتم التسخين. يتكاثف البخار المتصاعد من دورق الغليان في المكثف (F,G) وينفصل الزيت الأساسي عن الماء ويتجمع في الحجرة L ويعود الماء لدورق الغليان عن طريق الجسر BM [Cooke et al , 2000]. تستمر عملية التقطير لمدة ثلاثة ساعات وبعد ذلك يتم جمع الزيت العطري في قبال عاتم سعة 1.5 مل وتجفف باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية. تحفظ عينات الزيت المستخلصة في الدرجة (-20°C) لحين وقت التحليل في جهاز GC- MS.

## 6. طرائق تحضير المستخلصات المائية:

### 1.6. النقع بدون غليان Infusion ( شاي الأعشاب ):

يغلى 100 مل من ماء ثنائي التقطير في بيشر زجاجي مغطى بورقة قصدير حتى الغليان ثم يرفع البيشر عن سخان الكهربيائي و يوضع على قطعة قماشية لمنع التبادل الحراري مع سطح الطاولة و يضاف له 5 غ من أوراق المليسة مع التحريك الخفيف لترطيب الأوراق التي تطفو على السطح و تغطي بورقة قصدير و تترك لمدة 5 دقائق . تقاس درجة الحرارة بعد انتهاء زمن النقع و ترشح العينة ويتم الحجم حتى 100 مل ثم تحفظ بعبوة بولي إيثيلن شفافة محكمة الإغلاق في الدرجة (-20 °C) حتى وقت تعيين المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات (الفقرتان 2.7 و 2.8 الفصل الثاني) . كررت الخطوات السابقة من أجل أزمنة نقع مختلفة 10, 15 , 20 دقيقة وبتكرارية أربعة عينات لكل زمن وذلك للأوراق الطازجة و المجففة .

### 2.6. النقع المستمر Continues infusion :

طريقة 1 : يغلى 100 مل من ماء ثنائي التقطير في بيشر زجاجي يضاف له 5 غ من أوراق المليسة مع التحريك الخفيف لترطيب الأوراق التي تطفو على السطح و تغطي بورقة قصدير و تترك لمدة 5 دقائق بالغليان. ترشح العينة بعد انتهاء زمن النقع و ويتم الحجم حتى 100 مل و تحفظ بعبوة بولي إيثيلن شفافة محكمة الإغلاق في الدرجة (-20 °C) حتى وقت تعيين المحتوى الكلي للفينولات و

الفلافونويدات (الفقرتان 2.7 و 2.8 الفصل الثاني) . كررت الخطوات السابقة من أجل أزمنة نقع مختلفة 10, 15 , 20 دقيقة وبتكرارية أربعة عينات لكل زمن .

### 7. تعيين المحتوى الكلي للفينولات (TP) :

#### 1.7. مبدأ الطريقة:

تعتمد الطريقة على إرجاع كاشف الفولين - سيكالتو Folin -Ciocalteu والذي هو عبارة عن مزيج من حمض فوسفو تنغستين ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) وحمض فوسفو موليبدك ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) إلى أكسيد الموليبدين ( $Mo_8O_{23}$ ) و أكسيد التنغستين ( $W_8O_{23}$ ) زرقاء اللون وذلك خلال أكسدة الفينولات في وسط قلوي من كربونات الصوديوم . تقاس امتصاصية المحلول عند طول الموجة  $\lambda_{max} = 764 \text{ nm}$  و تعكس شدة اللون الأزرق المحتوى الكلي للفينولات والتي يعبر عنها عادة كمكافئات لحمض الغاليك [Conforti et al., 2006] .

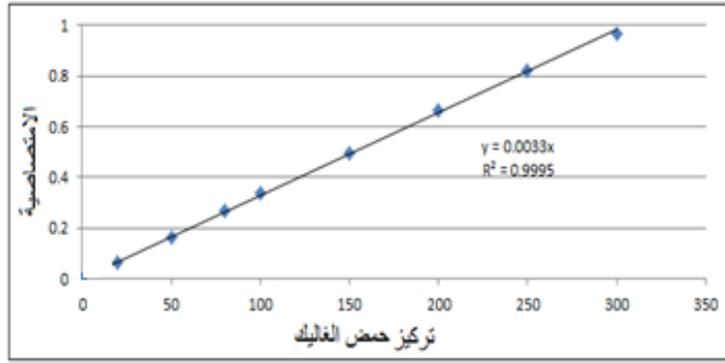
#### 2.7. طريقة العمل:

يوضع 50 ميكرو لتر من المستخلص المائي المحضر\* في أنبوب اختبار و يكمل الحجم حتى 0.5 مل من الماء المقطر ثم يضاف 0.25 مل من كاشف الفولين و ينتظر مدة 3 دقائق ثم يضاف 1.25 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم ( 7 % w/v ) . ثم يحرك الأنبوب و يترك في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة  $23 \pm 2$  درجة مئوية لمدة 40 دقيقة . و بعد ذلك تقاس امتصاصية المحلول عند طول الموجة الأعظمي  $\lambda_{max} = 764 \text{ nm}$  [Maksimovic et al , 2005] يتم تحضير سلسلة عيارية من حمض الغاليك و تحسب كمية الفينولات من منحنى المعايرة كمكافئ لحمض الغاليك بالنسبة لعينة شاهدة.

#### 3.7. منحنى المعايرة :

يحل 100 مغ من حمض الغاليك بماء ثنائي التقطير في بالون معايرة 50 مل ثم يحضر سلسلة عيارية من حمض الغاليك حسب التراكيز ( 20 , 50 , 100 , 150 , 200 , 250 , 300 ) مغ / ل و يكمل الحجم لكل تركيز حتى 50 مل بماء ثنائي التقطير . وبعد ذلك تقاس الامتصاصية عند طول الموجة الأعظمي  $\lambda_{max} = 764 \text{ nm}$  و ذلك بالنسبة للعينة الشاهدة . ويرسم منحنى المعايرة لحمض الغاليك كما في الشكل (24) .

\* أجريت عدة تجارب للتأكد من ثبات تركيز محتوى TP للعينات مع طول زمن التخزين في الدرجة  $(-20^\circ\text{C})$ .

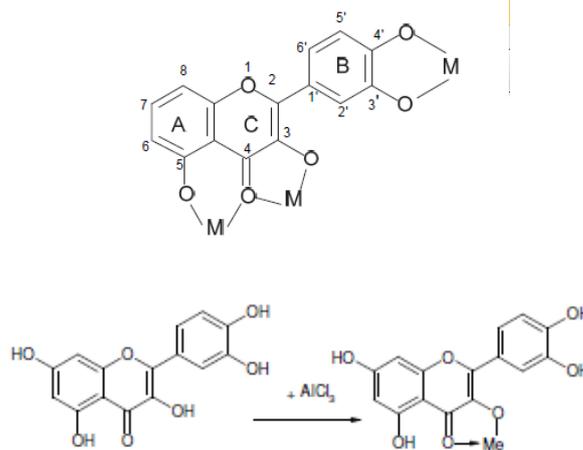


الشكل (24) : منحنى معايرة حمض الغاليك

### 8. تعيين المحتوى الكلي للفلافونويدات (TF):

#### 1.8. مبدأ الطريقة:

تعتمد هذه الطريقة على تشكيل الألمنيوم معقد لوني حمضي ثابت مع الزمرة الكيتونية في الموقع C-4 و زمرة الهيدروكسيل في الموقع C-3 مع الفلافونولات flavonols مثل الكيرستين quercetin أو في الموقع C-5 في الفلافونات flavones مثل الأبيجينين apigenin واللوتيولين luteolin , كما يشكل معقد حمضي غير ثابت مع أورتو زمرتي هيدروكسيد في الحلقة A أو B للفلافونويدات , كما في اللوتيولين luteolin , في محلول موقى من الخلات. ويظهر الشكل (25) مواقع الارتباط بين الألمنيوم و الفلافونويد. وتقاس امتصاصية المعقد الأصفر المتشكل عند طول الموجة  $\lambda_{max} = 415$  nm بعد 30 دقيقة [Symonowicz et al, 2012 ; Chang et al ,2002; Sava et al ,2010].



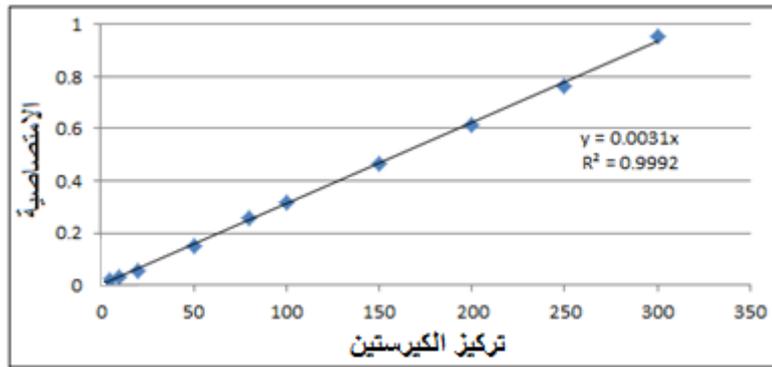
الشكل (25) : أنماط الفراغية للمعقد المتشكل للألمنيوم مع الفلافونويدات

**2.8. طريقة العمل :**

يوضع 100 ميكروليتر من المستخلص المائي\* في أنبوب اختبار ويضاف له 1.4 مل من الماء المقطر و 0.5 مل من كاشف الفلافونويدات و الذي يحضر بحل 133 مغ من كلوريد الألمنيوم اللامائي و 400 مغ من خلات الصوديوم اللامائية في 100 مل من محلول الاستخلاص ( 140 مل من الإيتانول و 50 مل ميتانول و 10 مل من حمض الخل الثلجي )، ثم يحرك الأنبوب و يترك في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة  $23 \pm 2$  درجة مئوية لمدة 30 دقيقة. وبعد ذلك تقاس امتصاصية المحلول عند طول الموجة الأعظمي  $\lambda_{max} = 415 \text{ nm}$  [Portmann et al,2012]. تحضر السلسلة العيارية من الكيرستين ثم تحسب كمية الفلافونويدات من منحنى المعايرة كمكافئ للكيرستين وذلك بالنسبة لعينة شاهدة .

**3.8. منحنى المعايرة :**

يحل 100 مغ من الكيرستين في الميتانول في بالون معايرة 50 مل ثم يحضر سلسلة عيارية من الكيرستين ، حسب التراكيز ( 5 , 10 , 20 , 50 , 100 , 150 , 200 , 250 , 300 ) مغ / ليتر ويكمل الحجم لكل تركيز بالميتانول 70% حتى 50 مل . وبعد ذلك تقاس الامتصاصية عند طول الموجة الأعظمي  $\lambda_{max} = 415 \text{ nm}$  بالنسبة للعينة الشاهدة . ويرسم منحنى المعايرة الكيرستين كما في الشكل (26) .



الشكل (26) : منحنى معايرة الكيرستين

**9. الدراسة الإحصائية:**

يعبر عن كافة النتائج [ المتوسط  $\pm$  الانحراف المعياري (SD) ] حيث تجرى التجارب بتكرارية  $n = 4$  لكل مستخلص، تدخل البيانات للقيم المقاسة من TP و TF لكل عينة على أساس شهر الحصاد وطبيعة العينة النباتية ( طازجة أو مجففة ) و طريقة تحضير المستخلص وزمنه و تعالج القيم

\* أجريت عدة تجارب للتأكد من ثبات تركيز محتوى TF للعينات مع طول زمن التخزين في الدرجة  $(-20^{\circ}\text{C})$ .

إحصائياً باستخدام البرنامج الإحصائية (Sciences Statistica I Package for the Social) IBM SPSS Statistics 20 وفق طريقتين:

### 1.9. تحليل التباين Univariate :

تحلل القيم المستقرة لمعرفة تأثير زمن النقع على كمية الفينولات و الفلافونويدات المتحررة حيث يعبر الاختلاف المعنوي ( $sig < 0.05$ ) عن وجود تأثير لزمن الاستخلاص على المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات أما ( $sig > 0.05$ ) عن عدم وجود تأثير للعامل الزمني باستخدام معادلة Bonferroni . يوضح الشكل (27) جداول المعالجة الإحصائية لقيم TP لعينات منقوع أوراق المليسة الطازجة المجموعة في شهر أيار وفق أزمنة النقع المختلفة . حيث يبين الجدول الثاني في الشكل معرفة قيم الدالة الإحصائية sig في حين يظهر الجدول الثالث الاختلافات و الفروقات المعنوية بين القيم لكل زمن نقع حيث يعبر الرمز \* عن القيم التي تختلف معنوياً عن بعضها

#### Univariate Analysis of Variance

[DataSet1] C:\Users\ASUS-NB\Desktop\Untitled 1.sav

month = May, Extract = Infusion

#### Between-Subjects Factors<sup>a</sup>

	Value	Label	N
time	0	5 min	4
	1	10 min	4
	2	15 min	4
	3	20 min	4

a. month = May, Extract = Infusion

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: TOTAL PHENOL

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significance
Corrected Model	12.761 <sup>b</sup>	3	4.254	22.170	.000
Intercept	2861.980	1	2861.980	14916.634	.000
time	12.761	3	4.254	22.170	.000
Error	2.302	12	.192		
Total	2877.043	16			
Corrected Total	15.063	15			

a. month = May, Extract = Infusion

b. R Squared = .847 (Adjusted R Squared = .809)

#### Post Hoc Tests

time

#### Multiple Comparisons<sup>a</sup>

Dependent Variable: TOTAL PHENOL

Bonferroni

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Significance	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5 min	10 min	-1.1806 <sup>*</sup>	.30973	.015	-2.1570	-.2041
	15 min	-1.6035 <sup>*</sup>	.30973	.001	-2.5800	-.6271
	20 min	-2.4811 <sup>*</sup>	.30973	.000	-3.4575	-1.5046
10 min	5 min	1.1806 <sup>*</sup>	.30973	.015	.2041	2.1570
	15 min	-.4230	.30973	1.000	-1.3995	.5535
	20 min	-1.3005 <sup>*</sup>	.30973	.007	-2.2770	-.3240
15 min	5 min	1.6035 <sup>*</sup>	.30973	.001	.6271	2.5800
	10 min	.4230	.30973	1.000	-.5535	1.3995
	20 min	-.8775	.30973	.091	-1.8540	-.0990
20 min	5 min	2.4811 <sup>*</sup>	.30973	.000	1.5046	3.4575
	10 min	1.3005 <sup>*</sup>	.30973	.007	.3240	2.2770
	15 min	.8775	.30973	.091	-.0990	1.8540

Based on observed means.

\*. Mean difference is significant at 0.05 ...

a. month = May, Extract = Infusion

الشكل ( 27 ) جداول نتائج المعالجة الإحصائية باستخدام تحليل Univariate

## 2.9. تحليل الانحدار Regression :

يُعين الارتباط الخطي R و معامل الانحدار  $R^2$  بين محتوى الفينولات و الفلافونويدات لنفس العينة باختلاف الزمن. يوضح الشكل (28) جداول المعالجة الإحصائية لقيم TP و TF لعينات منقوع أوراق المليسة الطازجة المجموعة في شهر أيار وفق أزمنة النقع المختلفة .

## Regression

[DataSet1] C:\Users\ASUS-NB\Desktop\Untitled 1.s

month = May, Extract = Infusion

Variables Entered/Removed<sup>a,b</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	TOTAL FLAVONOID <sup>c</sup>	.	Enter

- a. month = May, Extract = Infusion  
b. Dependent Variable: TOTAL PHENOL  
c. All requested variables entered.

Model Summary<sup>a</sup>

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.923 <sup>b</sup>	.852	.842	.39877

- a. month = May, Extract = Infusion  
b. Predictors: (constant) TOTAL FLAVONOID...

ANOVA<sup>a,b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significance
1	Regression	12.837	1	12.837	80.726	.000 <sup>c</sup>
	Residual	2.226	14	.159		
	Total	15.063	15			

- a. month = May, Extract = Infusion  
b. Dependent Variable: TOTAL PHENOL  
c. Predictors: (constant) TOTAL FLAVONOID...

Coefficients<sup>a,b</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Significance
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1.309	1.347		.972	.348
	TOTAL FLAVONOID	5.117	.570	.923	8.985	.000

- a. month = May, Extract = Infusion  
b. Dependent Variable: TOTAL PHENOL

الشكل ( 28 ) جداول نتائج المعالجة الإحصائية باستخدام تحليل الانحدار Regression

حيث يمكننا الجدول الثاني في الشكل(28) من معرفة معامل الارتباط R ( correlation coefficient) ومعامل الانحدار  $R^2$  بين محتوى الفينولات و الفلافونويدات في حين تدل قيمة الدالة الإحصائية sig

في الجدول الثالث ANOVA على مدى معنوية التفاعل المشترك و الترابط الداخلي بين المتغيرين (TP و TF) حيث يعبر الاختلاف المعنوي (  $\text{sig} < 0.05$  ) عن وجود الترابط الداخلي بين المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات أما (  $\text{sig} > 0.05$  ) عن عدم وجود ترابط داخلي بينها . ويعبر الجدول الرابع عن إمكانية كتابة نموذج خطي (Liner model) ورسمها و يعطي ثوابت المعادلة في الخانة B حيث من الشكل تكون المعادلة :  $TP = 5.117 TF + 1.309$  .

## 10- دراسة الفعالية الحيوية للمستخلصات المحضرة:

### 1.10. تحضير العامل المضاد للنمو الجرثومي:

تم تحضير تراكيز متسلسلة من الزيت العطري المستخلص باستخدام مذيب DMSO لأنه لا يؤثر على نمو الجراثيم و ينحل به الزيت وهي كالتالي:

التركيز الأول 100 % الزيت العطري كما هو .

التركيز الثاني 50% (2/1): يحوي  $150 \mu\text{m}$  من الزيت العطري +  $150 \mu\text{m}$  من المذيب DMSO .

التركيز الثالث 25% (4/1): يحوي  $150 \mu\text{m}$  من التركيز الثاني +  $150 \mu\text{m}$  من DMSO .

التركيز الرابع 12.5% (8/1): يحوي  $150 \mu\text{m}$  من التركيز الثالث +  $150 \mu\text{m}$  من DMSO .

أما بالنسبة للمنقوع و المغلي فيستخدم كما هو دون أي تخفيف حيث يحضر المنقوع و المغلي وفق الفقرات 1.6 و 2.6 و ذلك عند الزمن 10 دقائق للورق المجفف .



### 2.10. تحضير وسط الأغار الزرعي ( البيئية ) :

استخدم وسط مولر-هينتون Muller-Hinton المتوفر تجارياً والمدعم بالشوارد الموجبة (المغنيزيوم  $Mg^{++}$  أو الكالسيوم  $Ca^{++}$  ) أي المثبت بشاردة موجبة . حيث يؤخذ 38 غ من الوسط المغذي في أربينة و يصب فوقها لتر من الماء المقطر وتوضع في حمام مائي حتى تتفتح حبات الأغار لمدة، ثم يعقم الوسط بالأوتوغلاف عند الدرجة (  $121^{\circ}\text{C}$  )

(حسب التعليمات الواردة على العبوة)

الشكل (29) جهاز مكفراند Mc Farlende

**3.10. تحضير المعلق الجرثومي :**

حضر المعلق في الماء الفيزيولوجي المعقم بتركيز 0.85% من NaCl باستخدام جهاز مكفارلند، الشكل (29) حيث كان عمر الجرثوم المستخدم 24 ساعة .

**4.10. تحضير أطباق بتري الحاوية على الجرثوم الممتحن (المدرّوس):**

يضاف المعلق الجرثومي إلى وسط Muller – Hinton المعقم والمصهور بدرجة حرارة 42 – 45°م ، وبعد مجانسة الوسط جيداً يوزع على أطباق بتري بمقدار 20 مل لكل طبق ثم ترك ليتصلب ( أي تم استخدام مزرعة متساوية التوزيع ) أي بمعدل 0.5 Mc F \* لكل 20 مل بيئة [ حمد و آخرون ، 2011 ] [ Baron et al,1994] و يظهر الشكل (30) حجرة الزرع التي تم بها الزرع .



الشكل (30) حجرة الزرع الجرثومي Laminar Flow

**5.10. إجراء اختبارات الحساسية باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص (Disk Diffusion):**

حضرت أقراص معقمة من ورق ترشيح قطرها 0.6 سم . ثم يشرب القرص من العامل المضاد لنمو الأحياء الدقيقة بالتراكيز المحددة سابقاً و يوضع على سطح طبق بتري الحاوي على الجرثوم الممتحن. يتم عمل ثلاثة مكررات من المعلق الجرثومي الواحد ( ثلاثة أطباق بتري من كل جرثوم تحوي أربع أقراص للتراكيز في الطبقة الواحد ) لكل عينة زيت وتخفيفاتها ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة تم يقاس قطر التثبيط (مم) وتعتبر المضاد الذي يبلغ قطر التثبيط له 12 مم فما فوق ذو فعالية عالية مضادة للجرثوم الممتحن

[Koohsari et al ,2013;Zare et al , 2011; Baron et al,1994].

\*حيث 0.5 Mc F تعادل  $10 \times 1.5$  خلية جرثومية . وقد تم استخدام جهاز ماكفارلند Mc.Farland المصمم خصيصاً لقراءة المعلقات الجرثومية وتقدير عدد الخلايا الجرثومية في الوسط السائل.



الشكل ( 31 ) A : الحاضنة ، B : الأوتوغلاف ، C : الحمام المائي

## الفصل الثالث

# جمع النباتات و تعيين الرطوبة



## جمع النباتات - تعيين الرطوبة

### 1. موقع جمع النبات :

جمعت عينات النبات من منطقة العدوي في مدينة دمشق و ذلك في بداية شهر أيار. ثم نقلت بأحواضها (أصصها) إلى الحديقة التجريبية بقسم الكيمياء في كلية العلوم بجامعة دمشق .

### 2. زمن و شروط جمع الأوراق :

تم قطف الأوراق الطازجة من أحواض النبات المليسة من حديقة الجامعة وذلك خلال :

1. الطور الخضري لكل من شهر أيار والذي يوافق أعلى معدل لنمو النبات [Argyropoulou et al 2007], حيث بلغ طول أفرع النبات 50 cm تقريباً ومن شهر تموز و الذي يوافق منتصف الموسم .
2. طور الإزهار من شهر تشرين الأول و الذي يوافق الإزهار الكامل للنبات .

جمعت الأوراق الطازجة عند الساعة 7:30 صباحاً من الأيام 21 - 30 من كل شهر حصاد من العام 2013. ويوضح الجدول (25) أبعاد الأوراق و طول الساق بين كل عقدتين ورقيتين خلال زمن الحصاد من كل شهر على النحو التالي:

الجدول (25) أبعاد الأوراق والساق لنبات المليسة في مراحل النمو

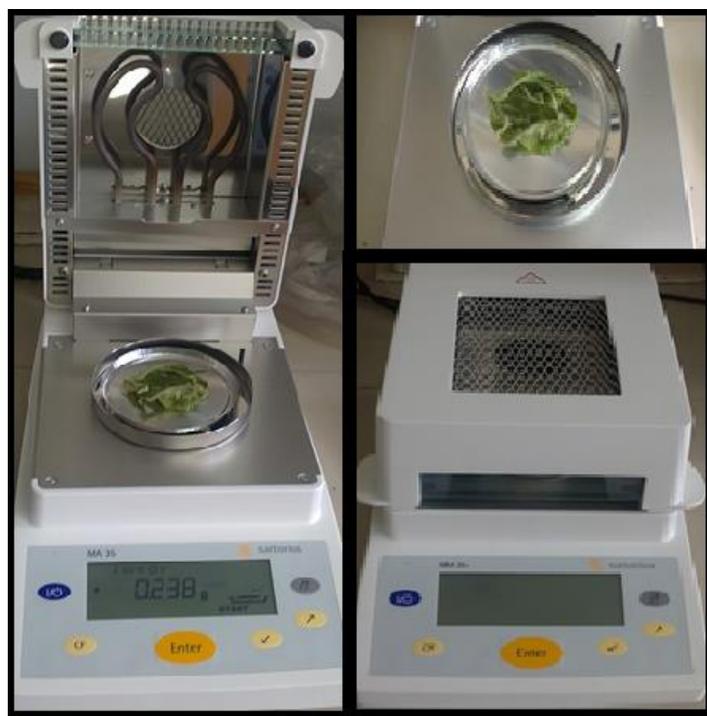
الموسم	طول الورقة	عرض الورقة	طول الساق
أيار	0.12 ± 4.9	0.17 ± 1.35	0.29 ± 5.75
تموز	0.33 ± 5.98	0.17 ± 1.33	0.3 ± 1.93
تشرين الأول	0.48 ± 3.38	0.1 ± 0.75	0.24 ± 1.25

وحدة الأبعاد سم . يعبر عن النتائج : المتوسط ± الانحراف المعياري ، n=14 .

ويجدر الإشارة إلى أن مساحة الورقة تتناقص تدريجياً في شهر تشرين الأول حتى ظهور العنقود المزهرو المدرج في الجدول . كما تم تجفيف عينات من الأوراق في الظل لمدة ثلاثة أيام وحفظت بالدرجة (4°C).

### 3. تعيين الرطوبة في النبات :

تقدر نسبة الرطوبة في الأوراق الطازجة و المجففة و ذلك باستخدام جهاز قياس الرطوبة من نوع Sartorius - MA35 مزود بميزان حساس عند الدرجة 105°C الشكل (32).



الشكل (32) جهاز قياس الرطوبة

و يظهر الجدول (26) مقدار الرطوبة في عينات الورق عند كل شهر بتكرارية أربعة مرات عند كل قطعة .

الجدول (26) نسبة الرطوبة للأوراق الطازجة و المجففة %

تشرين الأول	تموز	أيار	
2.5 ± 65.4	3.3 ± 57.6	2.2 ± 68.6	الأوراق الطازجة
0.6 ± 13.8	0.4 ± 9.73	0.9 ± 9.23	الأوراق المجففة

يعبر عن النتائج : المتوسط ± الانحراف المعياري ، n=4 .

## الفصل الرابع

# الزيت الأساسي العطري للمليسة





## الزيت الأساسي العطري للمليسة

### 1. استخلاص و تعيين مردود الزيت :

تم استخلاص الزيت العطري للأوراق المجففة و الطازجة في الظل باستخدام جهاز تقطير الزيوت الطيارة وفق دستور الأدوية الأوروبي [Cooke et al , 2000] لمدة 3 ساعات و جمع في الحجرة J الشكل (33) ، جففت عينات الزيت باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية و حفظت بعد الاستخلاص في فيالات زجاجية عاتمة في الدرجة (-20°C) .

يمتاز زيت المليسة باللون الأصفر و رائحة ليمونية منعشة و ذلك لاحتوائه على نسبة عالية من السيترال [Vogel,1999]. و بلغ مردود الزيت للأوراق الطازجة نسبة 0.8 % تقريباً في حين بلغت 1.8% للأوراق المجففة .

الشكل ( 33 ) جهاز التقطير

### 2. تحليل الزيت العطري باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية الموصول بمطياف الكتلة :

حدد التركيب الكيميائي للزيت العطري في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية باستخدام جهاز GC ( Agilent نموذج 7890A ) المزود بمطياف كتلة MS ( Agilent نموذج 5975C ) وحاقن ألي ( Agilent نموذج 7683B ) باستخدام مكتبيتي NIST و Wiley .

استخدم العمود الشعري من النوع DB-1 ( 30 م × 0.25 مم × 0.20 µm )

شروط التحليل :

البرنامج الحراري : ° 60 س مدة 4 دقائق ثم 60 ← ° 64 س بمعدل 1 س/د ثم 64 ← ° 155 س بمعدل 2.5 س/د ثم 155 ← ° 250 س بمعدل 5° س/د .

واستخدم الهليوم كغاز حامل بمعدل تدفق 1 مل/دقيقة.

وضبطت درجة حرارة الحاقن عند ° 250 س

كمية العينة المحقونة 1 ميكرو لتر بمعدل تجزئة 1 : 80 [ بدر الدين و آخرون ، 2013 ]

تم الاعتماد على مركبات عيارية محقونة سابقاً وهي : Citral (Z+E) ، D-limonene ، α-pinene ،

β-pinene ، β-linalool ، α-terpineol ، AR-Curcumene .

وكانت شروط التحليل بطيف الكتلة كما يأتي:

درجة حرارة مصدر الأيونات ° 230 س، درجة حرارة رباعي الأقطاب ° 150 س، مجال المسح 30-450 ، طاقة مصدر الأيونات 70 إلكترون فولت.

وقد تم التحليل وفق نسبة التمديد بالهكسان ( زيت : هكسان / 20 : 80 ميكرو ليتر ) .

1.2. نتائج تحليل الزيت العطري المستخلص في الطور الخصري من شهر أيار :

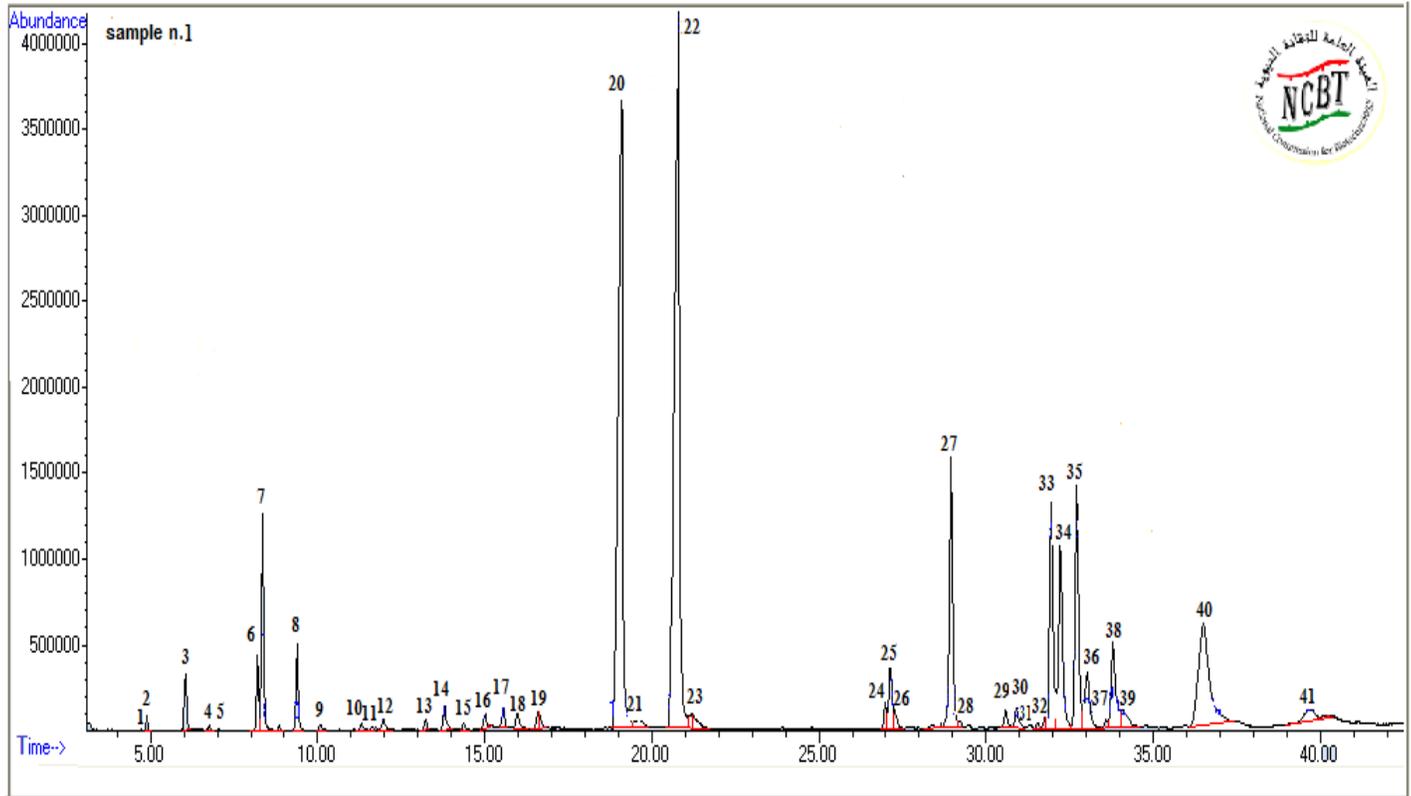
بعد حقن الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة و المجففة في مرحلة النمو الأعظمي تم التعرف على 41 مركب من كروماتوغرام الزيت العطري للأوراق الطازجة ، الشكل (34) ، و المدرجة في الجدول (27) .

الجدول ( 27 ) . التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر أيار

الرقم	المركب	RT	النسبة
1	<b><math>\alpha</math>-Thujene</b>	4.712	tr
2	<b>1R-<math>\alpha</math>-Pinene</b>	4.895	0.14 $\pm$ 0.01
3	<b>6-methy-5-Hepten-2-one</b>	6.054	0.99 $\pm$ 0.37
4	<b>L-<math>\beta</math>-pinene</b>	6.775	0.08 $\pm$ 0.01
5	<b><math>\beta</math>-Cymene</b>	7.95	tr
6	<b>1,8-Cineol</b>	8.212	1.11 $\pm$ 0.43
7	<b>Limonene</b>	8.361	3.3 $\pm$ 1.33
8	<b><math>\beta</math>--trans-Ocimene</b>	9.391	1.62 $\pm$ 0.3
9	<b>cis-<math>\beta</math>-Terpineol</b>	10.095	0.14 $\pm$ 0.01
10	<b><math>\beta</math>-Pinene oxide</b>	11.316	0.16 $\pm$ 0.03
11	<b>1-Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl</b>	11.643	tr
12	<b><math>\beta</math>-Linalool</b>	11.979	0.27 $\pm$ 0.03
13	<b>Limonene oxide, cis-</b>	13.241	0.19 $\pm$ 0.01
14	<b>trans-Chrysanthemal</b>	13.804	0.38 $\pm$ 0.21
15	<b><math>\beta</math>-Citronellal</b>	14.385	0.15 $\pm$ 0.02
16	<b>Berbenol (d-Verbenol )</b>	15.022	0.29 $\pm$ 0.03
17	<b>1-Cyclohexene-1-acetaldehyde, 2,6,6-trimethyl-</b>	15.563	0.34 $\pm$ 0.05
18	<b>(S)-cis-Verbenol</b>	15.988	0.42 $\pm$ 0.03
19	<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	16.628	0.54 $\pm$ 0.04
20	<b>Neral ( <math>\beta</math>-Citral )</b>	19.04	19.4 $\pm$ 2.86

21	Nerol	19.602	0.51 ± 0.01
22	Geranial ( $\alpha$ -Citral )	20.808	25.6 ± 2.6
23	Geraniol	21.237	0.5 ± 0.17
24	$\alpha$ -Copaene	26.975	0.52 ± 0.06
25	Geranyl acetate	27.126	1.4 ± 0.07
26	$\beta$ -Bourbonene	27.265	0.35 ± 0.08
27	$\beta$ -Caryophyllene	28.941	5.89 ± 0.71
28	$\beta$ -Cubebene	29.201	0.35 ± 0.32
29	$\alpha$ -Humulene	30.581	0.41 ± 0.02
30	Allo-Aromadendrene	30.898	0.48 ± 0.16
31	$\alpha$ -Longipinene	31.539	0.13 ± 0.01
32	Geranyl n-propionate	31.756	0.28 ± 0.08
33	Germacrene D	31.937	5.91 ± 0.01
34	Ar-Curcumene	32.219	4.95 ± 0.28
35	$\gamma$ -Elemene	32.705	5.84 ± 0.36
36	$\alpha$ -Zingiberene	33.021	1.78 ± 0.3
37	$\gamma$ -Cadinene	33.59	0.18 ± 0.06
38	$\alpha$ -Cedrene	33.788	3.17 ± 0.18
39	(+)- $\delta$ -Cadinol	34.103	0.69 ± 0.19
40	$\beta$ -Caryophyllene oxide	36.502	8.74 ± 0.7
41	tau.-Cadinol	39.678	0.92 ± 0.01
<b>Total</b>		98.12	
<b>Monoterpenes</b>		5.14	
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		51.34	
<b>Sesquiterpenes</b>		29.96	
<b>Oxygenated Sesquiterpenes</b>		10.35	
<b>Other Compounds</b>		1.33	

tr : عندما يكون نسبة المركب  $\geq 0.06$  ، يعبر عن النتيجة : Mean  $\pm$  SD



الشكل ( 34 ) . كروماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر أيار

في حين تم التعرف على 44 مركب من كروماتوغرام الزيت العطري للأوراق المجففة ، الشكل ( 35 ) ، و المدرجة في الجدول (28) .

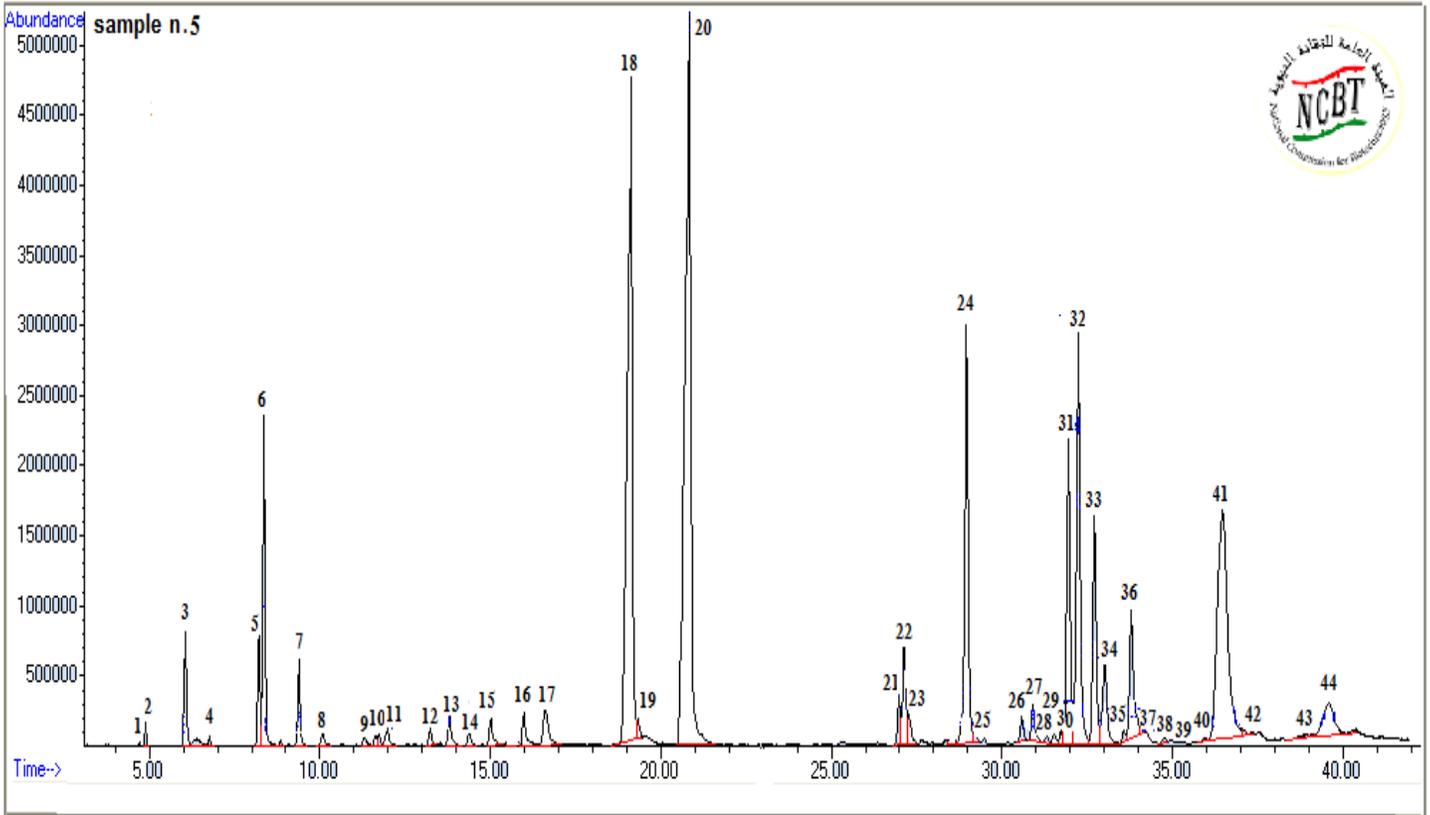
الجدول (28) . التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر أيار

الرقم	المركب	RT	النسبة
1	$\alpha$ -Thujene	4.712	tr
2	1R- $\alpha$ -Pinene	4.894	0.17 $\pm$ 0.01
3	6-methyl-5-Hepten-2-one	6.071	1.42 $\pm$ 0.02
4	L- $\beta$ -pinene	6.773	0.09 $\pm$ 0.01
5	1,8-Cineol	8.217	1.32 $\pm$ 0.08
6	Limonene	8.371	3.78 $\pm$ 0.27
7	$\beta$ -cis-Ocimene	9.392	0.94 $\pm$ 0.03
8	cis- $\beta$ -Terpineol	10.09	0.2 $\pm$ 0.01
9	$\beta$ -Pinene oxide	11.32	0.16 $\pm$ 0.03
10	1-Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl	11.635	0.12 $\pm$ 0.02

11	<b><math>\beta</math>-Linalool</b>	11.983	0.64	±	0.43
12	<b>Limonene oxide, cis-</b>	13.248	0.22	±	0.04
13	<b>trans-Chrysanthemal</b>	13.807	0.39	±	0.16
14	<b><math>\beta</math>-Citronellal</b>	14.391		tr	
15	<b>Berbenol (d-Verbenol)</b>	14.987	0.5	±	0.01
16	<b>(S)-cis-Verbenol</b>	15.96	0.58	±	0.02
17	<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	16.561	1.04	±	0.03
18	<b>Neral ( <math>\beta</math>-Citral )</b>	19.150	15.3	±	1.93
19	<b>Nerol</b>	19.344		tr	
20	<b>Geranial ( <math>\alpha</math>-Citral )</b>	20.727	20.4	±	2.04
21	<b><math>\alpha</math>-Copaene</b>	26.974	0.73	±	0.03
22	<b>Geranyl acetate</b>	27.129	1.61	±	0.04
23	<b><math>\beta</math>-Bourbonene</b>	27.269	0.49	±	0.01
24	<b><math>\beta</math>-Caryophyllene</b>	28.955	7.3	±	0.31
25	<b><math>\beta</math>-Cubebene</b>	29.428		tr	
26	<b><math>\alpha</math>-Humulene</b>	30.574	0.44	±	0.09
27	<b>Allo-Aromadendrene</b>	30.894	0.61	±	0.05
28	<b>(Z)-<math>\beta</math>-Farnesene</b>	31.311	0.15	±	0.06
29	<b><math>\alpha</math>-Longipinene</b>	31.526	0.18	±	0.04
30	<b>Geranyl n-propionate</b>	31.759	0.32	±	0.08
31	<b>Germacrene D</b>	31.942	6.49	±	1.38
32	<b>Ar-Curcumene</b>	32.236	7.14	±	0.64
33	<b><math>\gamma</math>-Elemene</b>	32.706	4.69	±	1.04
34	<b><math>\alpha</math>-Zingiberene</b>	33.014	2.19	±	0.42
35	<b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>	33.571	0.17	±	0.06
36	<b><math>\alpha</math>-Cedrene</b>	33.783	3.79	±	0.66
37	<b>(+)-<math>\delta</math>-Cadinol</b>	34.104	0.16	±	0.02
38	<b>Spathulenol</b>	34.162	0.07	±	0.01
39	<b><math>\alpha</math>-Muurolene</b>	34.701	0.07	±	0.01
40	<b>Nerolidyl acetate</b>	35.94	0.07	±	0.1
41	<b><math>\beta</math>-Caryophyllene oxide</b>	36.469	12.3	±	0.24
42	<b>trans-Longipinocarveol</b>	37.514	0.11	±	0.05
43	<b>Isoaromadendrene epoxide</b>	39.148	0.11	±	0.04
44	<b>tau.-Cadinol</b>	39.581	1.61	±	0.41
<b>Total</b>		98.07			
<b>Monoterpenes</b>		4.98			
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		42.68			

Sesquiterpenes	34.37
Oxygenated Sesquiterpenes	14.5
Other compound	1.54

tr : عندما يكون نسبة المركب  $\geq 0.06$  ، يعبر عن النتيجة : Mean  $\pm$  SD



الشكل (35) . كروماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر أيار

2.2. نتائج تحليل الزيت العطري المستخلص في الطور الخصري من شهر تموز :

بعد حقن الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة و المجففة في منتصف الموسم تم التعرف على 47 مركب من كروماتوغرام الزيت العطري للأوراق الطازجة ، الشكل (36) ، و المدرجة في الجدول (29).

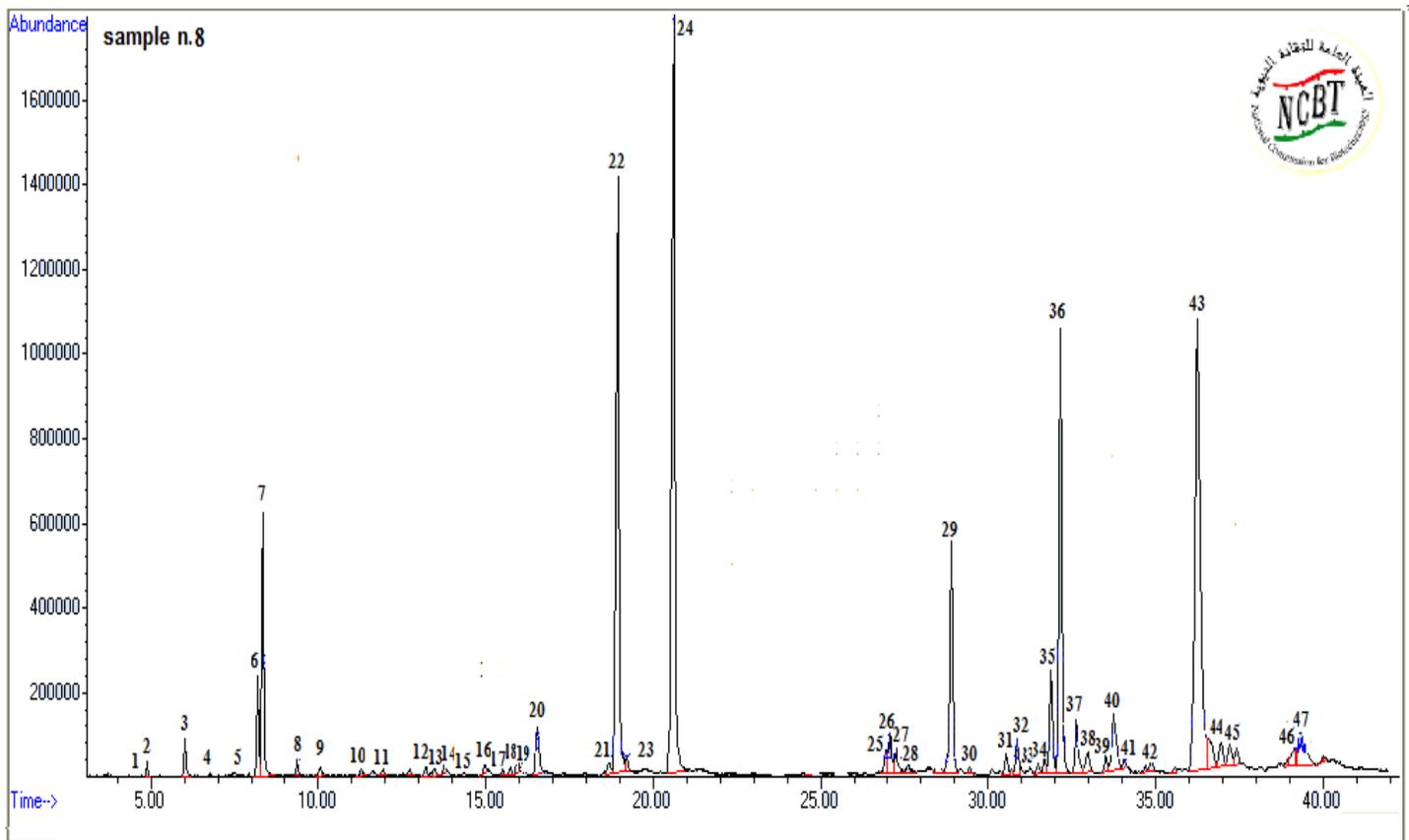
الجدول (29) . التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تموز

الرقم	المركب	RT	النسبة
1	$\alpha$ -Thujene	4.712	tr
2	1R- $\alpha$ -Pinene	4.888	0.21 $\pm$ 0.07
3	Sabinen	6.022	0.75 $\pm$ 0.18

4	L- $\beta$ -pinene	6.767	tr
6	1,8-Cineol	8.195	1.68 $\pm$ 0.15
7	Limonene	8.345	6.07 $\pm$ 0.92
8	$\beta$ -trans-Ocimene	9.382	0.39 $\pm$ 0.14
9	cis- $\beta$ -Terpineol	10.062	0.19 $\pm$ 0.03
10	$\beta$ -Pinene oxide	11.304	0.16 $\pm$ 0.02
11	$\beta$ -Linalool	11.946	0.17 $\pm$ 0.03
12	Limonene oxide, cis-	13.221	0.16 $\pm$ 0.01
13	Limonene oxide	13.481	0.18 $\pm$ 0.02
14	trans-Chrysanthemal	13.778	0.26 $\pm$ 0.14
15	$\beta$ -Citronellal	14.365	tr
16	d-Verbenol	14.988	0.22 $\pm$ 0.09
17	1-Cyclohexene-1-acetaldehyde, 2,6,6-trimethyl	15.533	0.12 $\pm$ 0.02
18	4-Terpineol	15.76	0.14 $\pm$ 0.01
19	(S)-cis-Verbenol	15.955	0.4 $\pm$ 0.09
20	$\alpha$ -Terpineol	16.545	1.19 $\pm$ 0.13
21	D-(+)-Carvone	18.689	0.25 $\pm$ 0.05
22	Neral ( $\beta$ -Citral )	19.04	13.9 $\pm$ 0.73
23	p-Menth-1en-3-one	19.255	0.28 $\pm$ 0.05
24	Geranial ( $\alpha$ -Citral )	20.632	19.3 $\pm$ 1.46
25	$\alpha$ -Copaene	26.944	0.64 $\pm$ 0.1
26	Geranyl acetate	27.06	0.97 $\pm$ 0.05
27	$\beta$ -Bourbonene	27.241	0.62 $\pm$ 0.11
28	O-Methyleugenol	27.596	0.29 $\pm$ 0.01
29	$\beta$ -Caryophyllene	28.888	5.15 $\pm$ 1.17
30	$\beta$ -Cubebene	29.428	0.13 $\pm$ 0.01
31	$\alpha$ -Humulene	30.531	0.39 $\pm$ 0.13
32	Allo-Aromadendrene	30.852	0.75 $\pm$ 0.05
33	$\alpha$ -Longipinene	31.479	0.23 $\pm$ 0.01
34	Geranyl n-propionate	31.682	0.35 $\pm$ 0
35	Germacrene D	31.866	3.15 $\pm$ 1.17
36	Ar-Curcumene	32.149	9.85 $\pm$ 1.71
37	$\gamma$ -Elemene	32.627	1.85 $\pm$ 0.81
38	$\alpha$ -Zingiberene	32.976	1.4 $\pm$ 0.4
39	$\gamma$ -Cadinene	33.51	0.33 $\pm$ 0.05
40	$\alpha$ -Cedrene	33.73	2.48 $\pm$ 0.87

41	(+)- $\delta$ -Cadinol	34.053	0.4 $\pm$ 0.3
42	Spathulenol	36.532	0.15 $\pm$ 0.03
43	$\beta$ -Caryophyllene oxide	36.236	17.8 $\pm$ 2.31
44	Dihydrocurcumene	36.556	1.12 $\pm$ 0.19
45	E-Nuciferol	37.204	0.96 $\pm$ 0.22
46	Isoaromadendrene epoxide	39.194	0.39 $\pm$ 0.53
47	tau.-Cadinol	39.361	2.62 $\pm$ 0.67
<b>Total</b>		98.04	
<b>Monoterpenes</b>		7.41	
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		40.07	
<b>Sesquiterpenes</b>		28.08	
<b>Oxygenated Sesquiterpenes</b>		22.35	
<b>Other compound</b>		0.12	

tr : عندما يكون نسبة المركب  $\geq 0.06$  ، يعبر عن النتيجة : Mean  $\pm$  SD



الشكل (36) . كروماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تموز

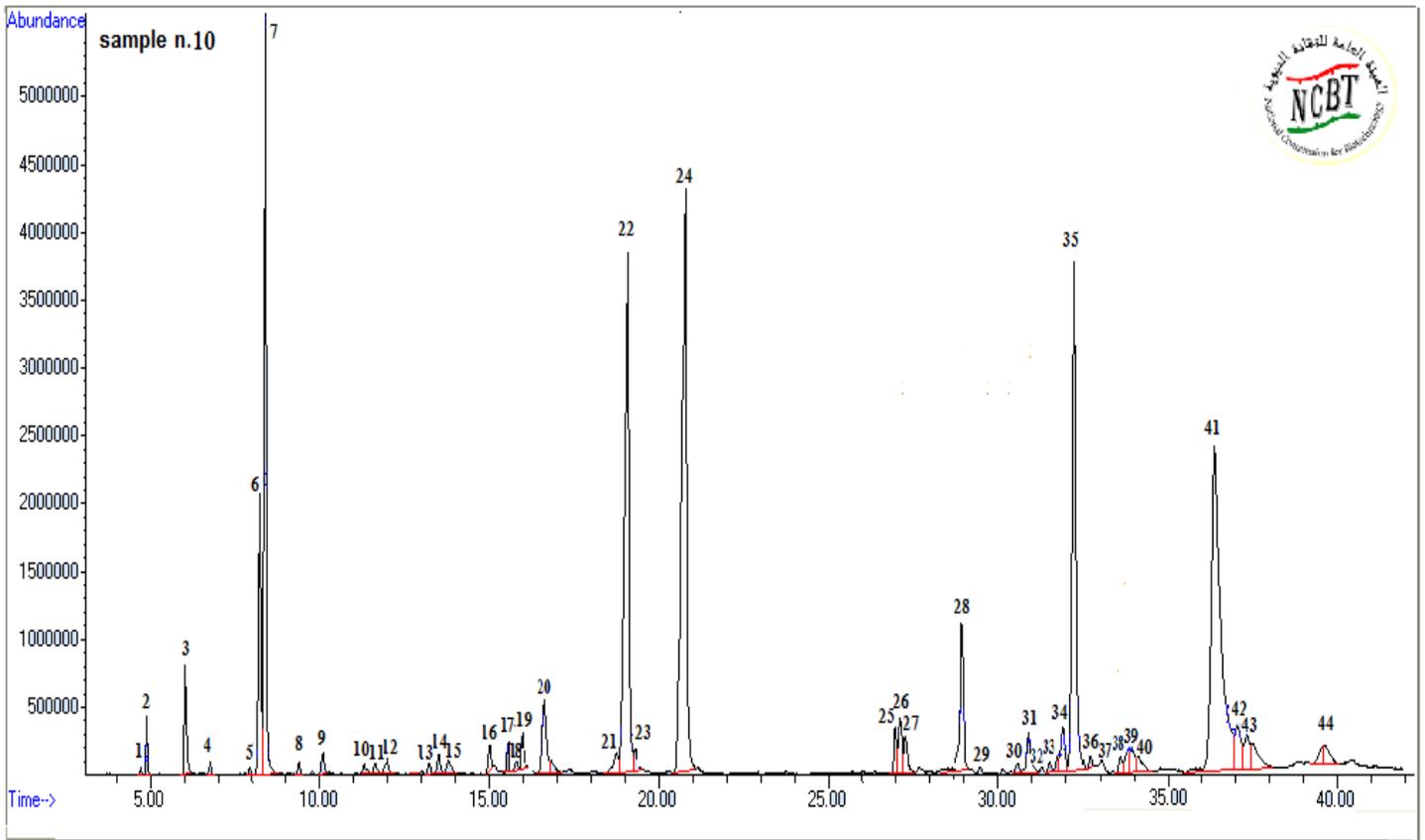
في حين تم التعرف على 44 مركب من كروماتوغرام الزيت العطري للأوراق المجففة ، الشكل (37) ، و المدرجة في الجدول (30) .

الجدول (30) . التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تموز

الرقم	المركب	RT	النسبة
1	$\alpha$ -Thujene	4.72	tr
2	1R- $\alpha$ -Pinene	4.895	0.4 $\pm$ 0.1
3	Sabinen	6.031	1.18 $\pm$ 0.28
4	L- $\beta$ -pinene	6.777	0.13 $\pm$ 0.01
5	$\beta$ -Cymene	7.948	0.11 $\pm$ 0.01
6	1,8-Cineol	8.232	3.61 $\pm$ 0.53
7	Limonene	8.407	9.3 $\pm$ 1.56
8	$\beta$ -cis-Ocimene	9.389	0.16 $\pm$ 0.03
9	cis- $\beta$ -Terpineol	10.066	0.36 $\pm$ 0.05
10	$\beta$ -Pinene oxide	11.317	0.19 $\pm$ 0.03
11	Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl-	11.643	0.21 $\pm$ 0.04
12	$\beta$ -Linalool	11.978	0.34 $\pm$ 0.04
13	Limonene oxide, cis-	13.245	0.18 $\pm$ 0.03
14	Limonene oxide	13.517	0.36 $\pm$ 0.02
15	trans-Chrysanthemal	13.806	0.33 $\pm$ 0.03
16	d-Verbenol	15.019	0.35 $\pm$ 0.08
17	1-Cyclohexene-1-acetaldehyde, 2,6,6-trimethyl	15.567	0.46 $\pm$ 0.05
18	4-Terpineol	15.811	0.19 $\pm$ 0.01
19	(S)-cis-Verbenol	15.988	0.49 $\pm$ 0.07
20	$\alpha$ -Terpineol	16.627	2.24 $\pm$ 0.21
21	D-(+)-Carvone	18.763	0.67 $\pm$ 0.11
22	Neral ( $\beta$ -Citral )	19.107	12.3 $\pm$ 1.4
23	p-Menth-1en-3-one	19.325	0.4 $\pm$ 0.02
24	Geranial ( $\alpha$ -Citral )	20.805	15.7 $\pm$ 1.63
25	$\alpha$ -Copaene	26.97	0.88 $\pm$ 0.1
26	Geranyl acetate	27.118	1.09 $\pm$ 0.03
27	$\beta$ -Bourbonene	27.272	0.79 $\pm$ 0.04
28	$\beta$ -Caryophyllene	28.925	2.63 $\pm$ 0.57
29	$\beta$ -Cubebene	29.454	tr

30	<b><math>\alpha</math>-Humulene</b>	30.568	0.17 $\pm$ 0.03
31	<b>Allo-Aromadendrene</b>	30.891	1.04 $\pm$ 0.05
32	<b><math>\alpha</math>-Longipinene</b>	31.521	0.24 $\pm$ 0.04
33	<b>Geranyl n-propionate</b>	31.758	0.3 $\pm$ 0.08
34	<b>Germacrene D</b>	31.911	1.02 $\pm$ 0.28
35	<b>Ar-Curcumene</b>	32.236	12.5 $\pm$ 1.26
36	<b><math>\gamma</math>-Elemene</b>	32.685	0.19 $\pm$ 0.01
37	<b>Cubenol</b>	32.903	0.33 $\pm$ 0.28
38	<b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>	33.564	0.28 $\pm$ 0.06
39	<b><math>\alpha</math>-Cedrene</b>	33.771	1.78 $\pm$ 0.15
40	<b>(+)-<math>\delta</math>-Cadinol</b>	34.094	0.5 $\pm$ 0.07
41	<b><math>\beta</math>-Caryophyllene oxide</b>	36.38	20.8 $\pm$ 3.6
42	<b>E-Nuciferol</b>	37.059	2.8 $\pm$ 0.13
43	<b>trans-Longipinocarveol</b>	37.514	1.05 $\pm$ 0.15
44	<b>tau.-Cadinol</b>	39.577	1.45 $\pm$ 0.47
<b>Total</b>		99.52	
<b>Monoterpenes</b>		11.28	
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		39.10	
<b>Sesquiterpenes</b>		21.52	
<b>Oxygenated Sesquiterpenes</b>		26.93	
<b>Other compound</b>		0.67	

tr : عندما يكون نسبة المركب  $\geq 0.06$  ، يعبر عن النتيجة : Mean  $\pm$  SD



الشكل (37) . كروماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تموز

3.2. نتائج تحليل الزيت العطري المستخلص في طور الإزهار من شهر تشرين الأول :

بعد حقن الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة و المجففة في منتصف الموسم . تم التعرف على 45 مركب من كروماتوغرام الزيت العطري للأوراق الطازجة، الشكل (38)، والمدرجة في الجدول (31)

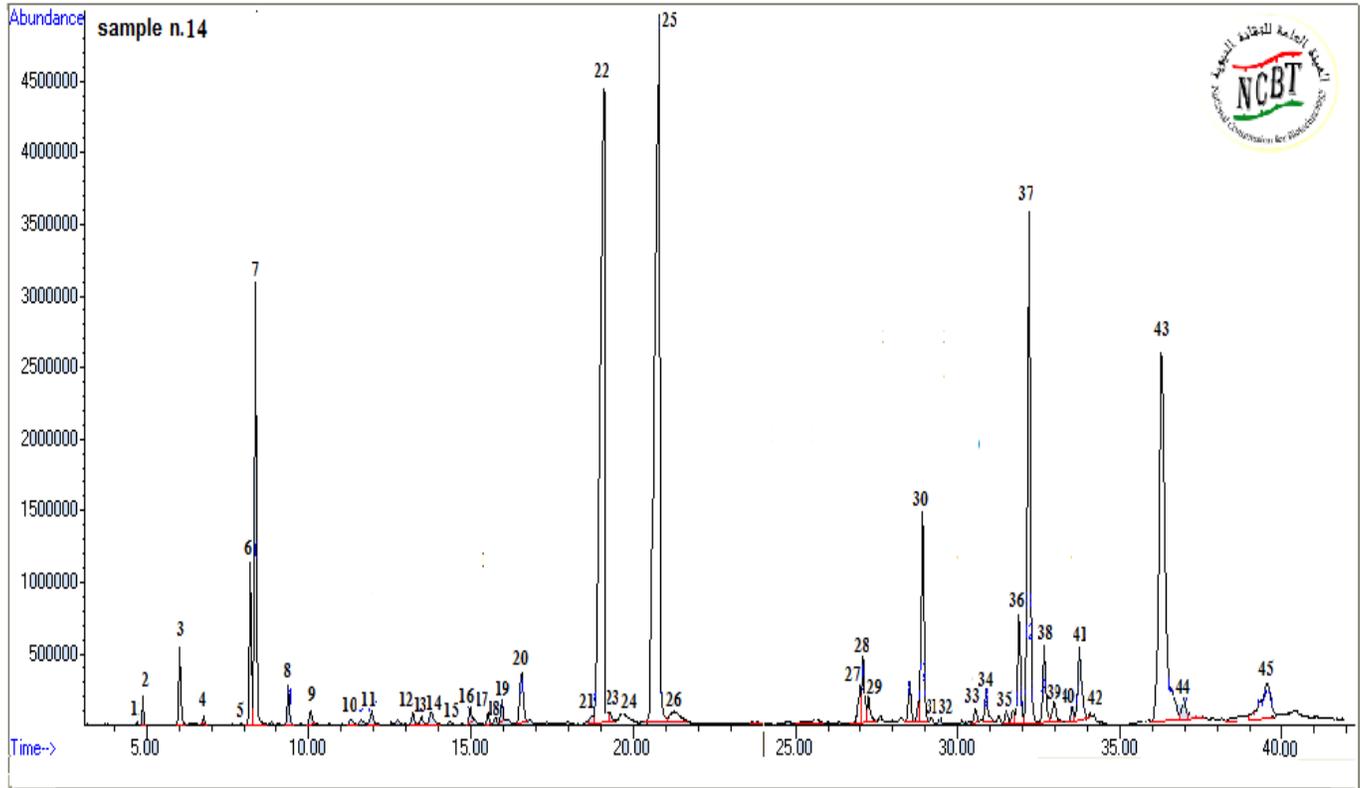
الجدول (31) . التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تشرين الأول

الرقم	المركب	RT	النسبة
1	$\alpha$ -Thujene	4.712	tr
2	1R- $\alpha$ -Pinene	4.888	0.24 $\pm$ 0.06
3	Sabinen	6.025	0.96 $\pm$ 0.26
4	L- $\beta$ -pinene	6.767	0.1 $\pm$ 0.03
5	$\beta$ -Cymene	7.939	tr
6	1,8-Cineol	8.209	2.12 $\pm$ 0.55
7	Limonene	8.382	5.92 $\pm$ 1.69
8	$\beta$ -trans-Ocimene	9.375	0.5 $\pm$ 0.1

9	<b>cis-<math>\beta</math>-Terpineol</b>	10.063	0.26 $\pm$ 0.05
10	<b><math>\beta</math>-Pinene oxide</b>	11.313	0.17 $\pm$ 0.02
11	<b><math>\beta</math>-Linalool</b>	11.952	0.25 $\pm$ 0.04
12	<b>Limonene oxide, cis-</b>	13.221	0.17 $\pm$ 0.04
13	<b>Limonene oxide</b>	13.487	0.18 $\pm$ 0.04
14	<b>trans-Chrysanthemal</b>	13.782	0.41 $\pm$ 0.07
15	<b><math>\beta</math>-Citronellal</b>	14.376	tr
16	<b>d-Verbenol</b>	14.991	0.31 $\pm$ 0.13
17	<b>1-Cyclohexene-1-acetaldehyde, 2,6,6-trimethyl</b>	15.548	0.15 $\pm$ 0.04
18	<b>4-Terpineol</b>	15.79	0.12 $\pm$ 0.01
19	<b>(S)-cis-Verbenol</b>	15.96	0.4 $\pm$ 0.1
20	<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	16.561	1.28 $\pm$ 0.18
21	<b>D-(+)-Carvone</b>	18.734	0.2 $\pm$ 0.03
22	<b>Neral ( <math>\beta</math>-Citral )</b>	19.106	17 $\pm$ 0.81
23	<b>p-Menth-1en-3-one</b>	19.294	0.17 $\pm$ 0.05
24	<b>Nerol</b>	19.668	0.61 $\pm$ 0.01
25	<b>Geranial ( <math>\alpha</math>-Citral )</b>	20.813	22.2 $\pm$ 1.04
26	<b>Geraniol</b>	21.267	0.75 0.17
27	<b><math>\alpha</math>-Copaene</b>	26.95	0.61 $\pm$ 0.12
28	<b>Geranyl acetate</b>	27.08	1.15 $\pm$ 0.1
29	<b><math>\beta</math>-Bourbonene</b>	27.248	0.49 $\pm$ 0.06
30	<b><math>\beta</math>-Caryophyllene</b>	28.906	3.56 $\pm$ 0.72
31	<b>Di-epi-<math>\alpha</math>-cedrene</b>	29.185	tr
32	<b><math>\beta</math>-Cubebene</b>	29.454	tr
33	<b><math>\alpha</math>-Humulene</b>	30.538	0.26 $\pm$ 0.06
34	<b>Allo-Aromadendrene</b>	30.859	0.64 $\pm$ 0.01
35	<b>Geranyl n-propionate</b>	31.69	0.24 $\pm$ 0.01
36	<b>Germacrene D</b>	31.880	2.35 $\pm$ 0.98
37	<b>Ar-Curcumene</b>	32.192	9.64 $\pm$ 0.13
38	<b><math>\gamma</math>-Elemene</b>	32.652	2.43 $\pm$ 1.13
39	<b><math>\alpha</math>-Zingiberene</b>	32.97	0.87 $\pm$ 0.38
40	<b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>	33.519	0.28 $\pm$ 0.03
41	<b><math>\alpha</math>-Cedrene</b>	33.737	3 0.43
42	<b>(+)-<math>\delta</math>-Cadinol</b>	34.06	0.17 $\pm$ 0.11
43	<b><math>\beta</math>-Caryophyllene oxide</b>	36.276	15.7 $\pm$ 0.49
44	<b>E-Nuciferol</b>	36.958	1.37 $\pm$ 0.2

45	tau.-Cadinol	39.678	2.63 ± 0.55
<b>Total</b>		99.86	
<b>Monoterpenes</b>		7.72	
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		47.99	
<b>Sesquiterpenes</b>		24.13	
<b>Oxygenated Sesquiterpenes</b>		19.87	
<b>Other compound</b>		0.15	

tr : عندما يكون نسبة المركب  $\geq 0.06$  ، يعبر عن النتيجة : Mean  $\pm$  SD



الشكل (38) . كروماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق الطازجة خلال شهر تشرين الأول

في حين تم التعرف على 46 مركب من كروماتوغرام الزيت العطري للأوراق المجففة ، الشكل (39) ، و  
المدرجة في الجدول (32)

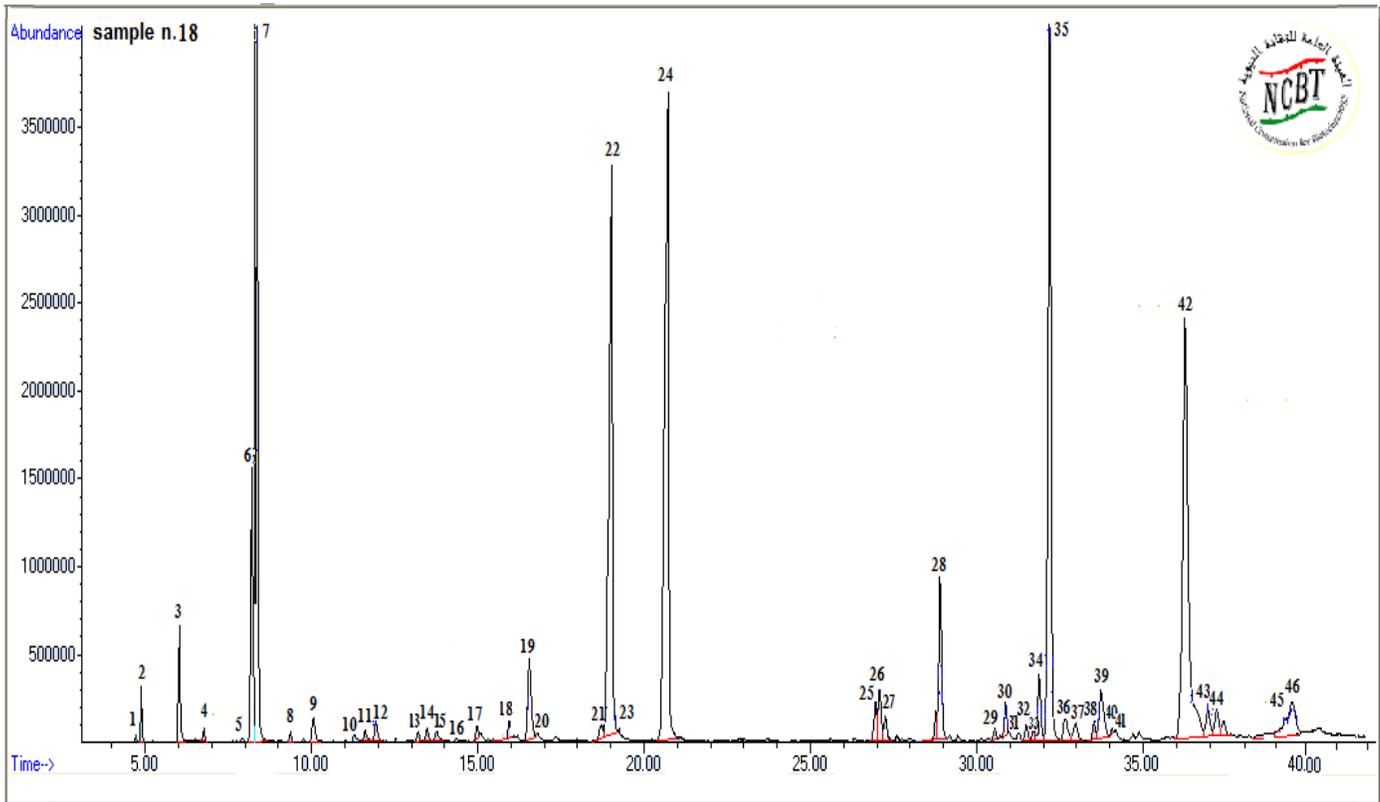
الجدول (32) . التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تشرين الأول

الرقم	المركب	RT	النسبة
1	$\alpha$ -Thujene	4.712	tr
2	1R- $\alpha$ -Pinene	4.888	0.38 ± 0.07

3	<b>Sabinen</b>	6.022	1.38 ± 0
4	<b>L-β-pinene</b>	6.767	0.66 ± 0.72
5	<b>β-Cymene</b>	7.939	tr
6	<b>1,8-Cineol</b>	8.207	3.29 ± 0.52
7	<b>Limonene</b>	8.382	8.15 ± 1.59
8	<b>β-trans-Ocimene</b>	9.375	0.15 ± 0.03
9	<b>cis-β-Terpineol</b>	10.066	0.4 ± 0.08
10	<b>β-Pinene oxide</b>	11.313	0.32 ± 0.19
11	<b>1-Cyclohexene-1-acetaldehyde, 2,6,6-trimethyl</b>	11.625	0.21 ± #####
12	<b>β-Linalool</b>	11.95	0.34 ± 0.09
13	<b>Limonene oxide, cis-</b>	13.221	0.17 ± 0
14	<b>Limonene oxide</b>	13.484	0.24 ± 0.06
15	<b>trans-Chrysanthemal</b>	13.778	0.28 ± 0.01
16	<b>β-Citronellal</b>	14.365	tr
17	<b>(S)-cis-Verbenol</b>	14.987	0.36 ± 0.14
18	<b>Berbenol</b>	15.96	0.38 ± 0.1
19	<b>α-Terpineol</b>	16.561	1.84 ± 0.46
20	<b>3-Carene</b>	16.82	0.15 ± 0
21	<b>D-(+)-Carvone</b>	18.712	0.36 ± 0.05
22	<b>Neral ( β-Citral )</b>	19.04	13.7 ± 0.12
23	<b>p-Menth-1en-3-one</b>	19.255	0.14 ± 0
24	<b>Geranial ( α-Citral )</b>	20.727	17.4 ± 0.25
25	<b>α-Copaene</b>	26.947	0.81 ± 0.08
26	<b>Geranyl acetate</b>	27.071	1.06 ± 0.03
27	<b>β-Bourbonene</b>	27.244	0.56 ± 0.06
28	<b>β-Caryophyllene</b>	28.895	3.4 ± 0.56
29	<b>α-Humulene</b>	30.532	0.25 ± 0
30	<b>Allo-Aromadendrene</b>	30.856	0.71 ± 0.03
31	<b>(Z)-β-Farnesene</b>	31.256	0.2 ± 0
32	<b>α-Longipinene</b>	31.486	0.31 ± 0
33	<b>Geranyl n-propionate</b>	31.69	0.21 ± 0
34	<b>Germacrene D</b>	31.937	1.62 ± 0.26
35	<b>Ar-Curcumene</b>	32.219	14 ± 0.12
36	<b>γ-Elemene</b>	32.705	0.98 ± 0.33
37	<b>α-Zingiberene</b>	33.021	0.73 ± 0
38	<b>γ-Cadinene</b>	33.515	0.38 ± 0.22
39	<b>α-Cedrene</b>	33.735	2.44 ± 1.47

40	(+)- $\delta$ -Cadinol	34.059	0.25 $\pm$ 0.03
41	Spathulenol	34.162	0.22 $\pm$ 0.01
42	$\beta$ -Caryophyllene oxide	36.26	16 $\pm$ 0.17
43	Dihydrocurcumene	36.556	1.19 $\pm$ 0
44	E-Nuciferol	36.945	1.44 $\pm$ 0.01
45	Isoaromadendrene epoxide	39.148	0.62 $\pm$ 0.08
46	tau.-Cadinol	39.678	1.78 $\pm$ 0.25
<b>Total</b>		99.46	
<b>Monoterpenes</b>		10.72	
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		40.64	
<b>Sesquiterpenes</b>		26.39	
<b>Oxygenated Sesquiterpenes</b>		21.5	
<b>Other Compound</b>		0.21	

tr : عندما يكون نسبة المركب  $\geq 0.06$  ، يعبر عن النتيجة : Mean  $\pm$  SD



الشكل (39) . كرماتوغرام تحليل الزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة خلال شهر تشرين الأول

في حين يبين الجدول (33) الشظايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركبات المدروسة مقارنة بالشظايا العشرة الأكثر وفرة الموجودة في مكتبة الجهاز . وقد وضع الوزن الجزيئي ضمن قوسين عندما لا يكون من الشظايا الأكثر وفرة .

الجدول (33) مقارنة الشظايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركب المدروس+الشظية العائدة للوزن الجزيئي مع طيفه من مكتبة الجهاز

المركب	الشظايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركب المدروس+ الشظية العائدة للوزن الجزيئي * للمركب M أو M+1	الشظايا العشر الأكثر وفرة في طيف المركب نفسه من مكتبة الجهاز+ الشظية العائدة للوزن الجزيئي * للمركب M أو M+1	نسبة التوافق %
<b><math>\alpha</math>-Thujene</b>	93 - 91- 77 - 92 -79 - <b>136</b> - 94 - 105 - 78- 53	93 - 91- 77 - 92 - 41 - 39 - 79 - 94 - 27 - <b>136</b>	32.5
<b>1R-<math>\alpha</math>-Pinene</b>	93 - 91 - 92 -79 - 121 - 105 - 94 - 41 - 80 - ( <b>136</b> )	93 - 92 - 91 -77 - 79 - 41 - 39 - 121 - 27 - 105 - ( <b>136</b> )	12.1
<b>6-methy-5-Hepten-2-one</b>	108 -55 - 69 - 93 - 111 - 67 - 58 - 71 - 68 - 83 - ( <b>126</b> )	43 - 41 - 69 - 55 - 108 - 58 - 111 - 68 - 39 - 71 - ( <b>126</b> )	84.8
<b>Sabinen</b>	93 - 91- 77 - 79 - <b>136</b> - 94 - 92 - 80 - 69 - 78	94 - 41 - 91 - 77 - 79 - 39 - 27 - 69 - 94 - 43 - ( <b>136</b> )	29.2
<b>L-<math>\beta</math>-pinene</b>	93 - 69 - 91 - 79 - 77 - 67 - 53 - 92 - 94 - 80 - ( <b>136</b> )	94 - 41 - 91 - 69 - 79 - 77 - 39 - 92 - 94 - 67 - ( <b>136</b> )	27.1
<b><math>\beta</math>-Cymene</b>	119 - <b>134</b> -91 - 117 - 120 -77 - 115 - 65 - 103 - 79	119 - 91 - <b>134</b> - 117 - 65 - 77 - 120 - 39 - 115 - 51	30.6
<b>1,8-Cineol</b>	81 - 108 -111- 71 -84 - 93 - 69 - <b>154</b> - 39 - 55	43 - 81 - 108 - 71 - 111- 84 - 69 - 55 - 93 - <b>154</b>	93
<b>Limonene</b>	68 - 93 - 67 -79 -94 - 92 - 91 - 121 - 107 - 77 - ( <b>136</b> )	68 - 93 - 67 - 41 - 79 - 39 - 94 - <b>136</b> - 53 - 121	25.2
<b><math>\beta</math>- Ocimene</b>	93- 91 - 79 -77 - 80 - 92 - 105 - 121 - 53 - 67 - ( <b>136</b> )	93- 91 - 79 - 80 - 77 - 41 - 92 - 39 - 53 - 105 - ( <b>136</b> )	24.6
<b>cis-<math>\beta</math>-Terpineol</b>	71 - 93 - 111 - 81 - 121 - 69 - 55 - 79 - 67 - 91 - ( <b>154</b> )	43 - 71 - 41 - 55 - 93 - 69 - 81 - 111 - 79 - 67 - ( <b>154</b> )	35.4
<b><math>\beta</math>-Pinene oxide</b>	76 - 69 - 41 - 82 - 81 - 79 - 123 - 83 - 55 - 39 - ( <b>152</b> )	81 - 69 - 55 - 109 - 83 - 123 - 79 - 137 - 67 - 95 - ( <b>152</b> )	10.8
<b>1-Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl</b>	135 - <b>150</b> - 91 - 79 - 95 - 71 - 81 - 107 - 77 - 93	135 - 93 - 107 - 79 - 41 - <b>150</b> - 55 - 91 - 39 - 77	13.7

<b><math>\beta</math>-Linalool</b>	71 - 93 - 55 - 69 - 80 - 121 - 76 - 92 - 83 - 79 - (154)	71 - 93 - 55 - 43 - 41 - 69 - 80 - 121 - 67 - 39 - (154)	62.4
<b>cis-Limonene oxide</b>	79 - 94 - 67 - 109 - 81 - 92 - 108 - 134 - 91 - 95 - (152)	42 - 67 - 41 - 79 - 109 - 92 - 55 - 71 - 137 - 44 - (152)	25.4
<b>Trans - Limonene oxide</b>	79 - 67 - 82 - 94 - 81 - 93 - 109 - 108 - 91 - 134 - 95 - (152)	42 - 67 - 41 - 93 - 109 - 79 - 71 - 39 - 137 - 81 - (152)	32
<b>trans-Chrysanthemal</b>	123 - 81 - 95 - 67 - 109 - 79 55 - 91 - 53 - 93	123 - 41 - 81 - 43 - 67 - 55 - 79 - 69 - 53 - 95	23
<b><math>\beta</math>-Citronellal</b>	69 - 95 - 55 - 67 - 121 - 111 -- 56 - 57 - 81 - 70	41 - 69 - 55 - 95 - 43 - 56 - 67 - 29 - 39 - 27	28.6
<b>(S)-cis-Verbenol</b>	67 - 81 - 94 - 109 - 79 - 82 - 91 - 95 - 55 - 93 - (152)	94 - 109 - 41 - 79 - 81 - 59 - 91 - 69 - 95 - 43 - (152)	24.6
<b>L-<math>\alpha</math>-terpineol</b>	59 - 81 - 93 - 67 - 136 - 96 - 55 - 79 - 95 - 68	59 - 93 - 121 - 136 - 81 - 43 - 67 - 92 - 41 - 95	36.1
<b>2,6,6-trimethyl-1-Cyclohexene-1-acetaldehyde</b>	95 - 151 - 79 - 123 - 166 - 94 - 67 - 96 - 77 - 65	107 - 151 - 81 - 95 - 41 - 123 - 133 - 67 - 79 - 91 - (166)	12.5
<b>Berbenol</b>	69 - 71 - 93 - 55 - 67 - 109 - 91 - 94 - 84 - 83 -	41 - 94 - 59 - 39 - 109 - 43 - 55 - 81 - 91 - 67	9.9
<b>D-(+)-Carvone</b>	82 - 93 - 108 - 54 - 107 - 91 - 109 - 79 - 53 - 106 - (150)	82 - 54 - 39 - 93 - 108 - 53 - 107 - 41 - 79 - 91 - (150)	44.1
<b>Neral ( <math>\beta</math>-Citral )</b>	69 - 94 - 109 - 84 - 95 - 67 - 83 - 81 - 82 - 53 - (152)	41 - 69 - 39 - 94 - 109 - 84 - 67 - 53 - 95 - 83 - (152)	79.3
<b>p-Menth-1en-3-one</b>	82 - 110 - 95 - 41 - 39 - 137 - 109 - 43 - 54 - 152	82 - 110 - 95 - 41 - 39 - 137 - 109 - 43 - 54 - 152	56.1
<b>Geranial ( <math>\alpha</math>-Citral )</b>	69 - 84 - 94 - 109 - 69 - 137 - 67 - 83 - 53 - (152)	69 - 41 - 84 - 39 - 94 - 53 - 83 - 67 - 109 - 27 - (152)	76.9
<b><math>\alpha</math>-Copaene</b>	119 - 161 - 105 - 93 - 91 - 92 - 120 - 77 - 81 - 79 - (204)	119 - 105 - 161 - 93 - 41 - 91 - 92 - 81 - 55 - 77 - (204)	37.1
<b>Geranyl acetate</b>	69 - 68 - 92 - 121 - 67 - 126 - 80 - 53 - 91 - 119	69 - 41 - 43 - 68 - 93 - 67 - 121 - 136 - 53 - 80	37.5
<b><math>\beta</math>-Bourbonene</b>	81 - 80 - 123 - 161 - 79 - 41 - 105 - 91 - 77 - 55 - (204)	81 - 80 - 123 - 161 - 79 - 41 - 105 - 91 - 77 - 55 - (204)	73.3
<b><math>\beta</math>-Caryophyllene</b>	93 - 133 - 91 - 79 - 69 - 105 -	93 - 133 - 91 - 41 - 79 - 69 -	41.5

	77 - 120 - 107 - 119 - (204)	105 - 107 - 120 - 77 - (204)	
<b><math>\alpha</math>-Humulene</b>	93 -80 - 121 -79 - 91 - 147 - 77 -92 - 67 - 107 - (204)	93 - 41 - 80 - 121 - 91 - 79 - 67 - 53 - 77 - 92 - (204)	60.6
<b>Allo-Aromadendrene</b>	91 -105 - 161 - 93 - 107 -79 - 133 - 119 - 81 - 77 -(204)	161 - 41 - 91 - 93 - 105 - 107 - 69 - 79 - 133 - 81 - (204)	13.1
<b>(Z)-<math>\beta</math>-Farnesene</b>	69 - 93 - 79 - 91 - 67 - 133 - 81 - 161 - 120 - 77 -(204)	41 - 69 - 93 - 39 - 67 - 79 - 81 - 91 - 53 - 133 - (204)	18.1
<b>Di-epi-<math>\alpha</math>-cedrene</b>	119 - 121 - 93 -91 - 79 - 105 - 204 - 77 - 81 -107	119 - 93 - 105 - 91 - 41 - 92 - 69 - 161 - 121 - 55 - (204)	12
<b>Geranyl n-propionate</b>	69 - 57 - 68 - 93 - 121 - 67 80 - 136 - 17 - 107	41 - 69 - 57 - 29 - 68 - 93 - 27 - 136 - 28 - 43	38.7
<b>Germacrene D</b>	161 - 105 - 91 -119 -79 - 81 - 77 - 93 - 120 - 133 - (204)	161 - 105 - 91 - 41 - 119 - 79 - 81 - 93 - 77 - 27 - (204)	23.3
<b>Ar-Curcumene</b>	119 - 132 - 105 - 131 - 145 - 91 - 202 - 117 - 120 - 133 -	132 - 119 - 41 - 105 - 91 - 202 - 131 - 55 - 117 - 145	88.4
<b><math>\gamma</math>-Elemene</b>	121 - 93 - 107 - 91 - 79 - 105 - 119 - 77 - 161 - 81 - (204)	121 - 93 - 41 - 107 - 67 - 55 - 105 - 53 - 91 - 79 - (204)	23.1
<b><math>\alpha</math>-Zingiberene</b>	119 - 93 - 91 - 77 - 69 - 105 - 92 - 55 - 56 - 120 - (204)	91 - 119 - 41 - 69 - 77 - 91 - 56 - 55 - 92 - 105 - (204)	53.4
<b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>	161 - 105 -91 - 119 - 79 - 93 - 133 - 77 - 204 - 81	161 - 105 - 93 - 91 - 41 - 119 - 79 - 204 - 81 - 133	39.2
<b><math>\alpha</math>-Cedrene</b>	119 - 93 - 105 - 41 - 69 - 161 - 91 - 204 - 120 - 55	119 - 93 - 105 - 41 - 69 - 161 - 91 - 204 - 120 - 55	43.7
<b><math>\delta</math>-Cadinol</b>	161 - 55 - 204 - 105 - 81 - 91 - 79 - 95 - 119 - 69	161 - 43 - 119 - 41 - 105 - 204 - 79 - 95 - 81 - 93	17.2
<b>Spathulenol</b>	55 - 91 - 119 - 69 - 105 - 67 - 81 - 93 - 79 - 57 - (220)	43 - 41 - 91 - 105 - 119 - 93 - 205 - 79 - 159 - 55 - (220)	22.6
<b><math>\beta</math>-Caryophyllene oxide</b>	79 - 91 - 106 - 81 - 93 - 105 - 69 - 67 - 77 - 95	43 - 41 - 79 - 93 - 91 - 95 - 69 - 55 - 67 - 81	55
<b>Dihydrocurcumene</b>	119 - 91 - 120 - 117 - 77 - 69 - 79 - 135 - 105 - 93	119 - 105 - 41 - 120 - 91 - 204 - 55 - 93 - 94 - 28	30.1
<b>E-Nuciferol</b>	119 - 132 - 145 -118 -117 - 135 -91 105 -131 -77 - (118)	119 - 132 - 105 - 91 - 43 - 41 - 93-120 - 121 -117-(118)	73.7

<b>Isoaromadendrene epoxide</b>	91 - 69 - 121 - 93 - 15 - 95 - 105 - 79 - 119 - 81 - (220)	41 - 43 - 55 - 93 - 27 - 81 - 107 - 29 - 39 - 67 - (220)	24.2
<b>tau.-Cadinol</b>	161 - 204 - 105 - 119 - 162 - 81 - 91 - 95 - 79 - 93 - (222)	161 - 43 - 41 - 204 - 105 - 95 - 81 - 79 - 119 - 121 - (222)	33.8

\*وضع الوزن الجزيئي للمركب بين قوسين عندما لا يكون بين الشظايا الأكثر وفرة

### 3. مناقشة تغير التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص خلال أشهر الحصاد :

عكس تحليل التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخرج من المليسة عن مجموعة من المركبات بلغ حد 47 مركباً تم التعرف عليها في الزيت المستخلص من الأوراق المجففة في تشرين الأول طور الإزهار . و قد اتضح أن التركيب الرئيسي للزيت مكون من 11 مركباً رئيساً هي : السيترال Citral ( بمماكيه النيرال Neral و الجيرانيال Geranial ) و أكسيد بيتا- كاريفيلين  $\beta$ -Caryophyllene oxide و بيتا - كاريفيلين  $\beta$ -Caryophyllene و إر- كوركومين Ar-Curcumene و الليمونين Limonene و غما- الإلمنين  $\gamma$ -Elemene و د- الجرمانسين Germacrene D و 1، 8- السينول 1,8Cineol و ألفا السيدرلين  $\alpha$ -Cedrene و تاو - الكادينول tau.-Cadinol و أسيتات الجيرانيل Geranyl acetate . وبحسب زمن الحصاد فقد تراوحت النسبة المئوية للمركبات التي تم التعرف عليها من 98.04% إلى 99.86% و من 98.07% إلى 99.52% للورق الطازج و المجفف على الترتيب. وقد تم الرمز للمكونات التي كانت نسبتها أقل أو تساوي 0.06% برمز الأثر tr . وجدنا أن أعلى نسبة مئوية للترينات كانت في تموز حيث بلغت 7.41% و 11.28% للطازج و المجفف على الترتيب ، في حين كانت أعلى نسبة للترينات الأوكسجينية في أيار حيث بلغت 51.34% و 42.68% للطازج و المجفف على الترتيب ، كذلك السيسكوترينات بلغت نسبته 29.96% و 34.37% للطازج و المجفف على الترتيب. أما بالنسبة للسيسكوترينات الأوكسجينية فكانت أعلى نسبة في تموز حيث بلغت 22.08% و 26.93% للطازج و المجفف على الترتيب . وسيتم مناقشة تركيب المكونات الرئيسية للزيت العطري خلال مراحل النمو كلاً على حدا كما يظهر في الجدول (34) .

الجدول (34) النسب المئوية للمكونات الرئيسية للزيت العطري المستخلص خلال مراحل النمو

	compound	Fresh leaves			Dried leaves		
		May	July	October	May	July	October
1	6-methy-5-Hepten-2-one	0.99 ± 0.37	-	-	1.42 ± 0.02	-	-
2	Sabinen	-	0.75 ± 0.18	0.96 ± 0.26	-	1.18 ± 0.28	1.38 ± 0.02
3	1,8-Cineol	1.11 ± 0.43	1.68 ± 0.15	2.12 ± 0.55	1.32 ± 0.08	3.61 ± 0.53	3.29 ± 0.52
4	Limonene	3.3 ± 1.33	5.07 ± 0.92	5.92 ± 1.69	3.78 ± 0.27	9.3 ± 1.56	8.15 ± 1.59
5	α-Terpineol	0.54 ± 0.04	1.19 ± 0.13	1.28 ± 0.18	1.04 ± 0.03	2.24 ± 0.21	1.84 ± 0.46
6	Neral ( β-Citral )	19.4 ± 2.86	13.17 ± 0.73	17 ± 0.81	15.3 ± 1.93	12.3 ± 1.4	13.7 ± 0.12
7	Geranial ( α-Citral )	25.6 ± 2.6	18.28 ± 1.46	22.2 ± 1.04	20.4 ± 2.04	15.7 ± 1.63	17.4 ± 0.25
8	Geranyl acetate	1.4 ± 0.07	0.97 ± 0.05	1.15 ± 0.1	1.61 ± 0.04	1.09 ± 0.03	1.06 ± 0.03
9	β-Caryophyllene	5.89 ± 0.71	5.15 ± 1.17	3.56 ± 0.72	7.3 ± 0.31	2.63 ± 0.57	3.4 ± 0.56
10	Germacrene D	5.91 ± 0.01	3.15 ± 1.17	2.35 ± 0.98	6.49 ± 1.38	1.02 ± 0.28	1.62 ± 0.26
11	Ar-Curcumene	4.95 ± 0.28	8.87 ± 1.71	9.64 ± 0.13	7.14 ± 0.64	12.5 ± 1.26	14 ± 0.12
12	γ-Elemene	5.84 ± 0.36	1.86 ± 0.81	2.43 <sup>b</sup> ± 1.13	4.69 ± 1.04	0.19 ± 0.01	0.98 ± 0.33
13	α-Zingiberene	1.78 ± 0.3	1.4 ± 0.4	0.87 ± 0.38	2.19 ± 0.42	-	0.73 ± 0.03
14	α-Cedrene	3.17 ± 0.18	2.48 ± 0.87	3 ± 0.43	3.79 ± 0.66	1.78 ± 0.15	2.44 ± 1.47
15	β-Caryophyllene oxide	8.74 ± 0.7	17.83 ± 2.31	15.7 ± 0.49	12.3 ± 0.24	20.8 ± 3.6	16 ± 0.17
16	E-Nuciferol	-	0.96 ± 0.22	1.37 ± 0.2	-	2.8 ± 0.13	1.44 ± 0.01
17	tau.-Cadinol	0.92 ± 0.01	2.62 ± 0.67	2.63 ± 0.55	1.61 ± 0.41	1.45 ± 0.47	1.78 ± 0.25

يعبر عن النتيجة : SD ± المتوسط

**1.3 السيترال Citral** : يحتوي السيترال على مابين النيرال (β - السيترال ، Z-السيترال ) و الجيرانيال (α - السيترال ، E-السيترال ) حيث كانت النسبة المئوية للجيرانيال دوماً أعلى من النيرال في كل المستخلصات المجففة و الطازجة وهذا يتفق مع [ Argypoulou et al,2007; Agah et al , 2012 ] و مع [ Carnat et al , 1999 ] و الذي قام بتحديد تركيبهما في المنقوع ، حيث بلغت نسبة الزيادة بالنسبة لكمية السيترال للأوراق الطازجة و المجففة 13.78% و 14.3% من أيار وبلغت في تموز 14.34% و 12.16% في حين بلغت في طور الإزهار

الكامل 13.28% و 11.9% على الترتيب . وبلغت أعلى نسبة للسيترال للأوراق الطازجة و المجففة في أيار و الذي يوافق أعلى مدة للنمو 45% و 35.7% ثم في الإزهار الكامل 39.2% و 31.1% في حين بلغت في شهر تموز 31.98% و 28% على الترتيب وهذا يتفق مع [Gomes et al , 2005; Gomes et al, 2006; Argyropoulou et al, 2007] . وكانت أعلى نسبة للجيرانيال في شهر أيار حيث بلغت 25.6% و 20.4% ، أما بالنسبة للنيرال بلغت 19.4% و 15.3% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب من تركيب الزيت. كما لوحظ دوماً بأن نسبة الجيرانيال أو النيرال تكون في الورق الطازج أعلى منه في المجفف و ذلك في كافة المستخلصات وقد يعود ذلك لتطاييرهما نتيجة لعملية التجفيف مع الزمن .

**2.3. أكسيد بيتا- كاريفيلين  $\beta$ -Caryophyllene oxide**: كانت نسبته أعلى ما يمكن في تموز حيث بلغت 17.83% و 20.8% ثم في طور الإزهار بلغت 15.3% و 16% ثم بلغت في أيار 8.74% و 12.3% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب وهذا يتفق مع [Gomes et al , 2006] ، وهذه الدراسة الأولى التي يظهر فيها أكسيد بيتا الكاريفيلين بهذه النسبة العالية مقارنة مع الدراسات المرجعية السابقة . كما لوحظ بأن نسبته في المجفف كانت دوماً أعلى منها في الطازج.

**3.3. إر- كوركومين Ar-Curcumene** : لوحظ ازدياد نسبة الكوركومين مع الإقتراب من فترة الإزهار حيث كانت نسبته أعلى ما يمكن في تشرين الأول فبلغت 9.64% و 14% ثم في تموز حيث بلغت 8.87% و 12.5% ثم في أيار حيث بلغت 4.95% و 7.14% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب ، حيث تقاربت نسبتها مع بقية الدراسات المرجعية [Alavi et al , 2011 ; Alavi et al , 2008] و في فترة الإزهار [Meshkatalasadat et al , 2010].

**4.3. بيتا- كاريفيلين  $\beta$ -Caryophyllene** : كانت نسبته أعلى ما يمكن في أيار فبلغت 5.89% و 7.3% ثم في تموز بلغت 5.15% و 2.63% ثم في تشرين الأول حيث بلغت 3.56% و 3.4% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب ، حيث تجاوزت نسبتها في كل من أيار وتموز نسبتها في بقية الدراسات المرجعية السابقة .

**5.3. الليمونين Limonene** : كانت نسبته متقاربة في كل من شهري تموز وتشرين الأول حيث بلغت في مرحلة الإزهار 5.92% و 8.15% لكن في تموز فبلغت 5.06% و 9.3% في حين لوحظ هبوط في

نسبتها في أيار مرحلة النمو الأعظمي حيث بلغت 3.78% و 3.3% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب وهذا ينسجم مع [Argyropoulou et al, 2007] .

**6.3.  $\gamma$  - الإلمنين  $\gamma$ -Elemene**: كانت نسبته أعلى ما يمكن في شهر أيار حيث بلغت 5.82% و 4.92% ولوحظ هبوط في بقية الأشهر حيث بلغت في تشرين الأول 2.43% و 0.98% في حين بلغت في شهر تموز 1.8% و 0.19% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب ، وهذه الدراسة الأولى التي يظهر فيها الإلمنين بهذه النسبة العالية مقارنة مع الدراسات المرجعية [Gomes et al,2006; Agah et al, 2012] .

**7.3. د- الجرمانسين Germacrene D** : كانت نسبته أعلى ما يمكن وذلك في شهر أيار فبلغت 5.91% و 6.49% وهذا ينسجم مع [Agah et al , 2012] ولوحظ هبوط نسبته مع الاقتراب من مرحلة الإزهار حيث بلغت في شهر تموز 3.15% و 1.02% ثم في شهر تشرين الأول فبلغت 2.35% و 1.62% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب.

**8.3. 1,8- سينول 1,8-Cineol**: كانت نسبته متقاربة في كل من تموز وتشرين الأول فبلغت في الإزهار 2.12% و 3.29% لكن في تموز فبلغت 1.67% و 3.61% في حين لوحظ هبوط في نسبتها في شهر أيار فبلغت 1.11% و 1.32% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب، وتفاوتت نسبته مع بقية الدراسات المرجعية [Meshkatalasadat et al, 2010;Argyropoulou et al, 2007 ;Gomes et al , 2005]

**9.3.  $\alpha$  - السيدرین  $\alpha$ -Cedrene** : كانت كميته متقاربة نسبياً في جميع الأشهر حيث بلغت في أيار 3.17% و 3.79% أما شهر تموز 2.46% و 1.78% في حين بلغت نسبته في تشرين الأول 3% و 2.44%. و ظهر ارتفاع بنسبته بالمقارنة مع بقية الدراسات [Gomes et al , 2006; Khani et al , 2012]

**10.3. تاو- الكادينول tau.-Cadinol** : كانت نسبته متقاربة في كل من شهري تموز وتشرين الأول فبلغت في مرحلة الإزهار خلال شهر تشرين الأول 2.63% و 1.78% لكن بلغت في شهر تموز 2.6% و 1.45% في حين لوحظ هبوط في نسبتها في أيار حيث بلغت 0.9% و 1.61% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب، وهذه أول دراسة يظهر فيها الماكب تاو للكادينول بنسبة عالية بالمقارنة مع بقية

الدراسات المرجعية مع [Alavi et al , 2011; Agah et al, 2012; Khani et al ,2012; Gomes et al , 2006] .

**11.3. أسيتات الجيرانيال Geranyl acetate** : كانت نسبته أعلى ما يمكن في شهر أيار حيث بلغت 1.4% و 1.61% في حين كانت نسبته متقاربة في كل من شهري تموز وتشيرين الأول فبلغت في مرحلة الإزهار 1.15% و 1.06% أما في شهر تموز بلغت 0.97% و 1.09% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب ،وهذا ينسجم مع [Gomes et al , 2006; Agah et al , 2012; Khani et al ,2012]

### 12.3. بقية المركبات :

أبدت النتائج نسبة عالية لمركب ألفا الزنجبارين  $\alpha$ -Zingiberene حيث بلغت نسبته 1.78% و 2.19% في أيار وتناقصت حتى الإزهار الكامل فبلغت 0.87% و 0.73% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب.

لوحظ ظهور لمركب 6-methy-5-Hepten-2-one في شهر أيار و الذي يوافق النمو الأعظمي حيث بلغت نسبته 0.99% و 1.42% وغيابه في تموز و تشيرين الأول في حين خالفه Sabinen في السلوك حيث لم يظهر في شهر أيار و كانت نسبته في شهر تموز 0.75% و 1.18% في حين كانت نسبته في تشيرين الأول 0.96% و 1.38% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب ، وتفاوتت نسبته مع بقية الدراسات المرجعية.

كما دلت النتائج على وجود مركب الفيريبيول بمماكيه d-Verbenol و (S)-cis-Verbenol وهذا يتفق مع [Khani et al, 2012] وقد يعود ظهورها لتحرر الفيريبيول من غليكوزيده الفيريبيالين Verbenalin أثناء الاستخلاص و الذي ينتمي للإيريدويدات Iridioids [Bilia et al , 2007] التي تنتمي للترينات (حلقة بنتان مرتبطة بحلقة بيران) .

إن نسبة مركب ألفا التربينول  $\alpha$ -Terpineol كانت متقاربة نسبياً حيث بلغت في شهر تموز 1.19% و 2.24% وكانت نسبته في شهر تشيرين الأول 1.28% و 1.84% بينما لوحظ هبوط لنسبتها في شهر أيار حيث بلغت 0.54% و 1.04% للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب.

كما أبدت النتائج ظهور مركب إي- نوكفيرول E-Nuciferol لأول مرة في تركيب زيت المليسة فكانت نسبه متقاربة نسبياً حيث بلغت النسبة في تموز 0.96% و 2.8% و في تشيرين الأول 1.37% و 1.44% لكن لوحظ غيابه في شهر أيار عند مرحلة النمو الأعظمي .

إن سبب الاختلاف بين مكونات الزيت العطري المستخلص خلال مراحل النمو، كما في حالة السيترال و الليمونين مثلاً (حيث لوحظ تناقص السيترال في الإزهار بينما ازدادت كمية الليمونين فيه) ، ربما يعود إلى أن إنتاج الزيت العطري داخل الغدد يتأثر بالحالة الفيزيولوجية للنبات في كل مرحلة على حدٍ [Sangwan et al, 2001] حيث أن مرحلة الإزهار هي مرحلة حرجة في نمو النبات و يحدث فيها تطورات مثيرة و هامة فالانتقال من مرحلة الطور الخضري إلى مرحلة الطور المزهري هي عملية معقدة . كما يمكن أن يعود الاختلاف في النسبة الدفاع الذي يقوم به النبات ضد الجراثيم و الفطور التي قد تهاجم النبات أو جذب أو ردع الحشرات عن النبات في هذه المرحلة [Argyropoulou et al, 2007]. و يمكن أن يؤدي المناخ دوراً هاماً في تفسير هذا الاختلاف حيث ارتفاع الحرارة في تموز وانخفاض الرطوبة قد يؤدي لتناقص بعض المكونات أو تطايرها مثلاً .

وقد يعزى هذا الاختلاف إلى عمر الورقة ففي شهر أيار لا تكون الأوراق قد اتسعت و نمت نمواً كاملاً و مع تقدم الزمن تبلغ نموها الكامل وبالتالي نمو الغدد المفرزة للزيت العطري، مع العلم أن الأوراق يتناقص حجمها في أعلى فرع النبات مع الاقتراب من العنقود الزهري، الجدول (25) .

أما اختلاف التركيب الكيميائي للمكونات ونسبتها في زيت المليسة المزروعة في سوريا عن الدراسات المرجعية السابقة فيمكن أن يعود ذلك لعدة عوامل منها اختلاف الشروط المناخية و الجغرافية في كل بلد (نوع التربة مثلاً) و عمر النبات و الشروط التي تم فيها حصاد الأوراق إضافة إلى اختلاف طريقة استخلاص الزيت العطري .

## الفصل الخامس

# المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات

## في منقوع المليسة خلال مراحل النمو



## تعيين المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في منقوع المليسة خلال

### مراحل النمو

تزرع المليسة في سوريا ويستخدم منقوعها بالطب الشعبي والعربي كما يفضل الناس تحضير شاي الأعشاب من أوراقها خلال السنة وذلك قبل وقت الإزهار ، وقد تم في هذا البحث تعيين ومقارنة المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات بالطريقة الطيفية اللونية في منقوع أوراق المليسة الطازجة و المجففة المحضرة بطريقة النقع المستمر وطريقة النقع دون غليان خلال مراحل النمو وذلك في الطور الخضري و طور الإزهار .

#### **1. طريقة النقع بدون غليان Infusion :**

حضرت عينات المنقوع من أوراق المليسة الطازجة والمجففة بإضافة 5 غ أوراق بعد غلي الماء وتركها منقوعة فيه من 5 إلى 20 دقيقة على الترتيب كما سرد في الفقرة ( 1.6 ) في الفصل الثاني و ذلك للأشهر أيار و تموز من الطور الخضري و تشرين الأول من طور الإزهار .

#### **1.1. الطور الخضري من شهر أيار ( أعلى معدل نمو ) :**

أدرجت قيم محتوى الفينولات و الفلافونويدات لعينات منقوع الأوراق الطازجة و المجففة في الجدول (35) و حسب النسب المئوية للوزن الجاف.

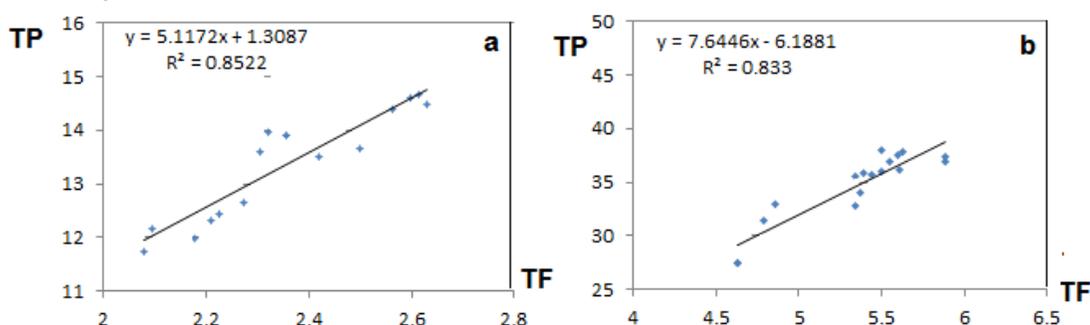
يلاحظ من الجدول (35) أن محتوى كل من TP و TF المستخلصة بطريقة النقع بدون غليان لأوراق المليسة كان أكبر في المنقوع المحضر من الأوراق المجففة من محتواها في منقوع الأوراق الطازجة فقد ازداد محتوى TP في منقوع الأوراق المجففة عن الطازجة بنسبة 61.25 %، أما من أجل TF فكانت نسبة الزيادة 54.39 % و ذلك عند 20 دقيقة. إلا أن النسبة المئوية بحسب الوزن الجاف لكل من الفينولات و الفلافونويدات في منقوع الأوراق الطازجة كان أكبر منها في منقوع الأوراق المجففة حيث يعود هذا لنسبة الرطوبة الموجودة قبل التجفيف .

الجدول (35) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر أيار بطريقة النقع بدون غليان وفق أزمنة النقع المختلفة

الزمن (دقيقة)				المستخلص		
20	15	10	5			
0.14 ± 14.54 <sup>c</sup>	0.16 ± 13.66 <sup>b</sup>	0.81 ± 13.24 <sup>b</sup>	0.25 ± 12.06 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق الطازجة
4.69	4.41	4.27	3.89	% النسبة		
0.02 ± 2.60 <sup>c</sup>	0.08 ± 2.40 <sup>b</sup>	0.06 ± 2.29 <sup>b</sup>	0.06 ± 2.14 <sup>a</sup>	الكمية	TF	
0.84	0.77	0.74	0.69	% النسبة		
0.43 ± 37.52 <sup>b</sup>	1.87 ± 35.00 <sup>b</sup>	0.18 ± 35.77 <sup>b</sup>	2.77 ± 29.38 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق المجففة
4.12	3.86	3.93	3.23	% النسبة		
0.18 ± 5.70 <sup>c</sup>	0.13 ± 5.47 <sup>b,c</sup>	0.07 ± 5.42 <sup>b</sup>	0.11 ± 4.73 <sup>a</sup>	الكمية	TF	
0.63	0.6	0.6	0.52	% النسبة		

يعبر عن النتيجة: المتوسط ± SD، تحسب TP كمكافئ ( مغ / GE ) في حين تحسب TF كمكافئ (مغ/ QE / ا غ مليسة) ، وضعت النسبة % لقيمة المتوسط و ذلك للوزن الجاف ، تدل الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد على وجود فرق معنوي في التركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة %95.

كما يتضح من الجدول أيضاً ازدياد في كل TP و TF مع ازدياد زمن النقع ( sig <0.05 ) وذلك في الأوراق الطازجة حيث تزداد النسبة المئوية حتى الوصول لزمن 20 دقيقة. إلا أن نسبة هذا التزايد في منقوع الأوراق المجففة تقل من أجل TP مع الزمن حيث تتقارب التراكيز بعد 10 دقائق حيث لا يلاحظ فرق معنوي بين القيم . ويعبر الشكل (40) عن الارتباط الخطي بين كل من TP و TF لكلا المنقوعين طردياً مع ازدياد زمن النقع .



الشكل (40) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر أيار بطريقة النقع بدون غليان  
a : منقوع الأوراق الطازجة ، b : منقوع الأوراق المجففة

### 2.1. الطور الخصري من شهر تموز ( منتصف الموسم ) :

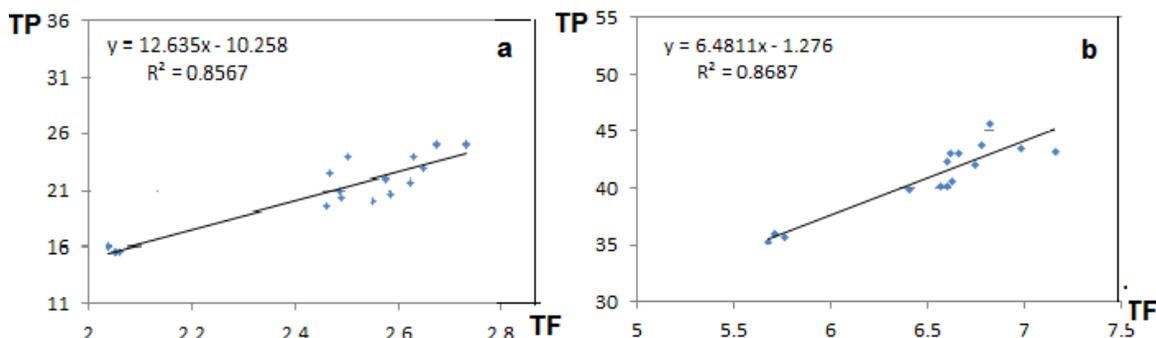
بعد تحضير العينات كما سرد في الفقرة ( 1.6 ) في الفصل الثاني أدرجت قيم في الجدول (36) و حسبت النسب المئوية للمحتوى مع مراعاة نسبة الرطوبة. لوحظ بأن محتوى كل من TP و TF المستخلصة بطريقة النقع بدون غليان لأوراق المليسة كان أكبر في المنقوع المحضر من الأوراق المجفف من محتواها في منقوع الأوراق الطازجة فقد ازداد محتواه TP في منقوع الأوراق المجففة عن الطازجة بنسبة 47 % أما من أجل TF فكانت نسبة الزيادة 61.82 % و ذلك عند 20 دقيقة الذي يوافق أعلى محتوى . في حين كانت النسبة المئوية لأجل TP في منقوع الأوراق الطازجة أكبر منها في منقوع الأوراق المجففة نسبة للوزن الجاف للورقة حيث يعود هذا لنسبة الرطوبة الموجودة قبل التجفيف و بعده .

الجدول (36) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تموز بطريقة النقع بدون غليان خلال أزمنة النقع المختلفة

الزمن (دقيقة)				المستخلص		
20	15	10	5			
1.51 ± 23.34 <sup>c</sup>	1.47 ± 22.88 <sup>c</sup>	0.57 ± 20.14 <sup>b</sup>	0.43 ± 15.72 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق الطازجة
5.56	5.45	4.8	3.37	النسبة %		
0.06 ± 2.65 <sup>c</sup>	0.08 ± 2.52 <sup>b</sup>	0.06 ± 2.50 <sup>b</sup>	0.01 ± 2.05 <sup>a</sup>	الكمية	TF	
0.63	0.60	0.60	0.49	النسبة %		
1.11 ± 44.03 <sup>c</sup>	0.56 ± 42.60 <sup>c</sup>	0.37 ± 40.15 <sup>b</sup>	0.36 ± 35.66 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق المجففة
4.89	4.73	4.46	3.96	النسبة %		
0.18 ± 6.94 <sup>c</sup>	0.07 ± 6.65 <sup>b</sup>	0.10 ± 6.55 <sup>b</sup>	0.03 ± 5.94 <sup>a</sup>	الكمية	TF	
0.77	0.74	0.73	0.66	النسبة %		

يعبر عن النتيجة: المتوسط ± SD، تحسب TP كمكافئ ( مغ GaE / غ مليسة) في حين تحسب TF كمكافئ ( مغ QE / غ مليسة)، وضعت النسبة % لقيمة المتوسط و ذلك للوزن الجاف ، تدل الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد على وجود فرق معنوي في التركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة 95%.

كما يتضح من الجدول أيضاً ازدياد في كل TP و TF مع ازدياد زمن النقع ( sig < 0.05 ) وذلك في الأوراق الطازجة حيث تزداد النسبة المئوية حتى الوصول لزمن 20 دقيقة ، إلا أن نسبة هذا التزايد في TP لمنقوع الأوراق المجففة والطازجة تقل مع الزمن حيث تتقارب التراكيز بعد 15 دقيقة . و يعبر الشكل (41) عن الارتباط الخطي بين كل من TP و TF لكلا منقوعين طردياً مع ازدياد زمن النقع.



الشكل (41) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تموز بطريقة النقع بدون غليان  
a : منقوع الأوراق الطازجة ، b : منقوع الأوراق المجففة

### 3.1. طور الإزهار من شهر تشرين الأول ( الإزهار الكامل ) :

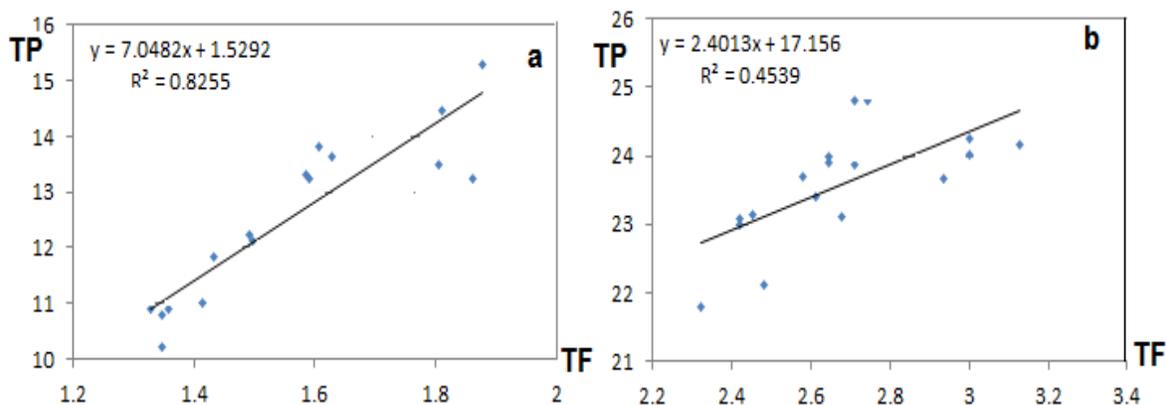
أدرجت قيم محتوى الفينولات و الفلافونويدات لعينات منقوع الأوراق الطازجة و المجففة في الجدول (37) و حسبت النسب المئوية للمحتوى مع مراعاة نسبة الرطوبة.

الجدول (37) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تشرين الأول بطريقة النقع بدون غليان خلال أزمنة النقع المختلفة

الزمن (دقيقة)				المستخلص		
20	15	10	5	الأوراق الطازجة		الأوراق المجففة
0.94 ± 14.12 <sup>b</sup>	0.27 ± 13.50 <sup>b</sup>	0.73 ± 11.55 <sup>a</sup>	0.67 ± 10.97 <sup>a</sup>	الكمية	TP	
4.03	3.86	3.3	3.13	النسبة %	TF	
0.04 ± 1.84 <sup>c</sup>	0.02 ± 1.60 <sup>b</sup>	0.09 ± 1.42 <sup>a</sup>	0.04 ± 1.39 <sup>a</sup>	الكمية	TP	
0.53	0.46	0.41	0.4	النسبة %	TF	
0.23 ± 23.99 <sup>b</sup>	0.45 ± 24.18 <sup>b</sup>	0.47 ± 23.55 <sup>a,b</sup>	0.56 ± 22.50 <sup>a</sup>	الكمية	TP	
2.79	2.81	2.74	2.62	النسبة %	TF	
0.15 ± 2.95 <sup>c</sup>	0.08 ± 2.66 <sup>b</sup>	0.01 ± 2.60 <sup>a,b</sup>	0.07 ± 2.41 <sup>a</sup>	الكمية	TP	
0.34	0.31	0.3	0.28	النسبة %	TF	

يُعبّر عن النتيجة: المتوسط ± SD، تحسب TP كمكافئ (مغ GaE / غ مليسة) في حين تحسب TF كمكافئ (مغ QE / غ مليسة)، وضعت النسبة % لقيمة المتوسط و ذلك للوزن الجاف ، تدل الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد على وجود فرق معنوي في التركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة %95.

يلاحظ بأن محتوى TP و TF كان أكبر في المنقوع المحضر من الأوراق المجففة من محتواها في منقوع الأوراق الطازجة فقد ازداد محتوى TP في منقوع الأوراق المجففة عن الطازجة بنسبة 41.18 % أما من أجل TF فكانت نسبة الزيادة 37.63 % و ذلك عند 20 دقيقة الذي يوافق أعلى قيمة محتوى . تزداد النسبة المئوية للفلافونويدات المحسوبة للوزن الجاف مع ازدياد زمن النقع (  $\text{sig} < 0.05$  ) حتى الوصول لزمن 20 دقيقة. في حين أن محتوى TP تقل مع الزمن حيث تتقارب التراكيز بعد 15 دقيقة في منقوع الأوراق الطازجة وهذا يظهر من النسب المئوية لها ، و يعبر الشكل (42) عن الارتباط الخطي بين كل من TP و TF لكلا المنقوعين مع ازدياد زمن النقع لكل عينة على حدا . يلاحظ بأن الارتباط كان ضعيفاً في حالة المجفف وخاصة مع تقارب تراكيز TP بعد زمن 10 دقائق قد يعود ذلك لدور الفينولات خلال فترة الإزهار و التي توصف أنها مرحلة حرجة ومعقدة [Batygina et al, 2003] .



الشكل (42) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تشرين الأول بطريقة النقع بدون غليان  
a : منقوع الأوراق الطازجة ، b : منقوع الأوراق المجففة

## 2. طريقة النقع المستمر Continuous Infusion :

حضرت عينات المنقوع من أوراق المليسة الطازجة و المجففة حيث أضيفت الأوراق بعد غلي الماء وتم الاستمرار بالغليان من 5 إلى 20 دقيقة بالترتيب كما سرد في الفقرة ( 2.6 ) في الفصل الثاني و ذلك لأشهر أيار و تموز من الطور الخضري و تشرين الأول من طور الإزهار .

### 1.2. الطور الخضري من شهر أيار ( أعلى معدل نمو ) :

أدرجت قيم محتوى الفينولات و الفلافونويدات لعينات النقع المستمر لأوراق الطازجة و المجففة في الجدول (38) و حسب النسب المئوية للمحتوى مع مراعاة نسبة الرطوبة. ازداد منقوع الأوراق المجففة بطريقة النقع المستمر في محتواه من TP و TF عن المحضر من الأوراق الطازجة بمقدار 66 % من أجل TP و بمقدار 58.12 % من أجل TF و ذلك عند 15 دقيقة الذي يوافق أعلى قيمة محتوى.

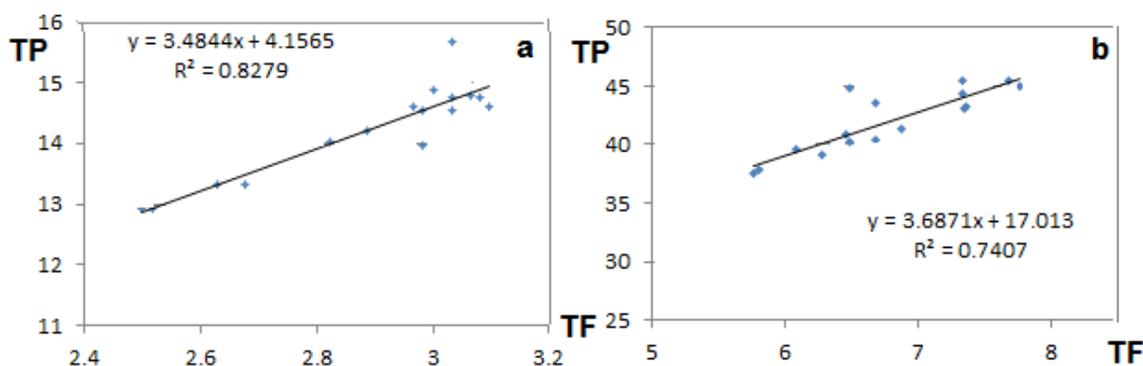
الجدول (38) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر أيار بطريقة النقع المستمر خلال أزمنة النقع المختلفة

الزمن (دقيقة)				المستخلص		
20	15	10	5			
0.17 ± 14.68 <sup>b,c</sup>	<b>0.49 ± 14.96<sup>c</sup></b>	0.29 ± 14.20 <sup>b</sup>	0.23 ± 13.13 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق الطازجة
4.74	4.83	4.58	4.24	النسبة %		
0.02 ± 3.01 <sup>b,c</sup>	<b>0.03 ± 3.07<sup>c</sup></b>	0.07 ± 2.97 <sup>b</sup>	0.09 ± 2.58 <sup>a</sup>	الكمية	TF	الأوراق المجففة
0.97	0.99	0.96	0.83	النسبة %		
2.55 ± 43.05 <sup>b</sup>	1.11 ± 44.00 <sup>b</sup>	2.19 ± 42.39 <sup>b</sup>	0.99 ± 38.48 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق المجففة
4.73	4.84	4.66	4.23	النسبة %		
0.55 ± 7.25 <sup>b</sup>	0.02 ± 7.33 <sup>b</sup>	0.10 ± 6.52 <sup>a</sup>	0.24 ± 5.98 <sup>a</sup>	الكمية	TF	الأوراق المجففة
0.8	0.81	0.72	0.66	النسبة %		

يعبر عن النتيجة: المتوسط ± SD، تحسب TP كمكافئ ( مغ GaE / غ مليسة) في حين تحسب TF كمكافئ ( مغ QE / غ مليسة)، وضعت النسبة % لقيمة المتوسط و ذلك للوزن الجاف ، تدل الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد على وجود فرق معنوي في التركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة %95.

ازدادت النسبة المئوية للفينولات و للفلافونويدات المحسوبة للوزن الجاف في منقوع الأوراق الطازجة مع ازدياد زمن النقع ( sig <0.05 ) حتى الوصول لزمن 15 دقيقة ثم يتناقص ذلك المحتوى وقد يعود ذلك

لحدوث تفكك لبعض المركبات مع استمرار الغليان [Pop et al , 2015] . في حين أن محتوى TP و TF تتقارب التراكيز بعد 15 دقيقة في منقوع الأوراق المجففة وهذا يظهر من النسب المئوية لها ، و يعبر الشكل (43) عن الارتباط الخطي بين كل من TP و TF لكلا المنقوعين مع ازدياد زمن النقع لكل عينة على حدا.



الشكل (43) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر أيار بطريقة النقع المستمر  
a : منقوع الأوراق الطازجة ، b : منقوع الأوراق المجففة

## 2.2. الطور الخصري من شهر تموز ( منتصف الموسم ) :

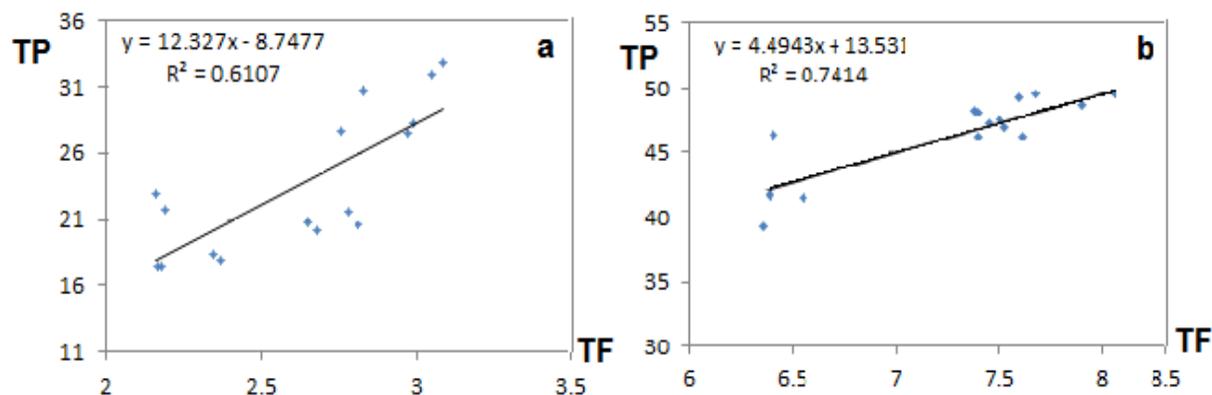
أدرجت قيم محتوى الفينولات و الفلافونويدات لعينات النقع المستمر لأوراق الطازجة و المجففة في الجدول (39) و حسب النسب المئوية للمحتوى مع مراعاة نسبة الرطوبة . ازاد منقوع الأوراق المجففة بطريقة النقع المستمر في محتواه من TP و TF عن المحضر من الأوراق الطازجة بمقدار 37.57 % من أجل TP و بمقدار 60.06 % من أجل TF و ذلك عند 15 دقيقة الذي يوافق أعلى قيمة محتوى وهذا يعود لاختلاف نسبة الرطوبة في الأوراق المجففة و الطازجة ، حيث تزداد النسبة المئوية للفينولات و للفلافونويدات المحسوبة للوزن الجاف في منقوع الأوراق الطازجة مع ازدياد الزمن النقع ( sig < 0.05 ) حتى الوصول لزمن 15 دقيقة ثم يتناقص ذلك المحتوى قد يعود ذلك لحدوث تفكك لبعض المركبات مع استمرار الغليان [Pop et al , 2015] وثبات درجة الحرارة ( 100° C ) . كذلك تقارب محتوى TP و TF بعد 15 دقيقة في منقوع الأوراق المجففة وهذا يظهر من النسب المئوية لها للوزن الجاف .

الجدول (39) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تموز بطريقة النقع المستمر خلال أزمنة النقع المختلفة

الزمن (دقيقة)				المستخلص		
20	15	10	5			
4.19 ± 25.78 <sup>b,c</sup>	2.64 ± 30.10 <sup>c</sup>	0.57 ± 20.81 <sup>a,b</sup>	0.43 ± 17.80 <sup>a,b</sup>	الكمية	TP	الأوراق الطازجة
6.14	7.17	4.95	4.24	% النسبة		
0.36 ± 2.49 <sup>a</sup>	0.05 ± 3.02 <sup>b,c</sup>	0.08 ± 2.76 <sup>b,c</sup>	0.11 ± 2.26 <sup>a</sup>	الكمية	TF	الأوراق المجففة
0.59	0.72	0.66	0.54	% النسبة		
1.35 ± 47.85 <sup>b</sup>	1.35 ± 48.21 <sup>b</sup>	1.14 ± 47.82 <sup>b</sup>	1.13 ± 41.04 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق المجففة
5.32	5.36	5.31	4.56	% النسبة		
0.31 ± 7.31 <sup>a,b</sup>	0.10 ± 7.56 <sup>a,b</sup>	0.25 ± 7.52 <sup>b</sup>	0.09 ± 6.42 <sup>a</sup>	الكمية	TF	الأوراق المجففة
0.81	0.84	0.84	0.71	% النسبة		

يعبر عن النتيجة: المتوسط ± SD، تحسب TP كمكافئ (مغ GaE / غ مليسة) في حين تحسب TF كمكافئ (مغ QE / غ مليسة)، وضعت النسبة % لقيمة المتوسط و ذلك للوزن الجاف ، تدل الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد على وجود فرق معنوي في التركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة %95.

ويظهر الشكل (44) هذا في الارتباط الخطي بين كل من TP و TF لكلا المنقوعين مع ازدياد زمن النقع لكل عينة على حدا.



الشكل (44) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تموز بطريقة النقع المستمر a : منقوع الأوراق الطازجة ، b : منقوع الأوراق المجففة

### 3.2.2. طور الإزهار من شهر تشرين الأول ( طور الإزهار ) :

أدرجت قيم محتوى الفينولات و الفلافونويدات لعينات النقع المستمر لأوراق الطازجة و المجففة في الجدول (40) و حسب النسب المئوية للمحتوى مع مراعاة نسبة الرطوبة . ازداد منقوع الأوراق المجففة بطريقة النقع المستمر في محتواه من TP و TF عن المحضر من الأوراق الطازجة حيث كانت TP للأوراق الطازجة أقل بمقدار 38.23 % من الأوراق المجففة وبمقدار 43.13 % من أجل TF ، وهذا يعود لاختلاف نسبة الرطوبة في الأوراق المجففة و الطازجة ، حيث تزداد النسبة المئوية للفينولات و للفلافونويدات المحسوبة للوزن الجاف في منقوع الأوراق الطازجة مع ازدياد الزمن النقع ( sig <0.05 ) حتى الوصول لزم 15 دقيقة ثم يتقارب بعد ذلك المحتوى.

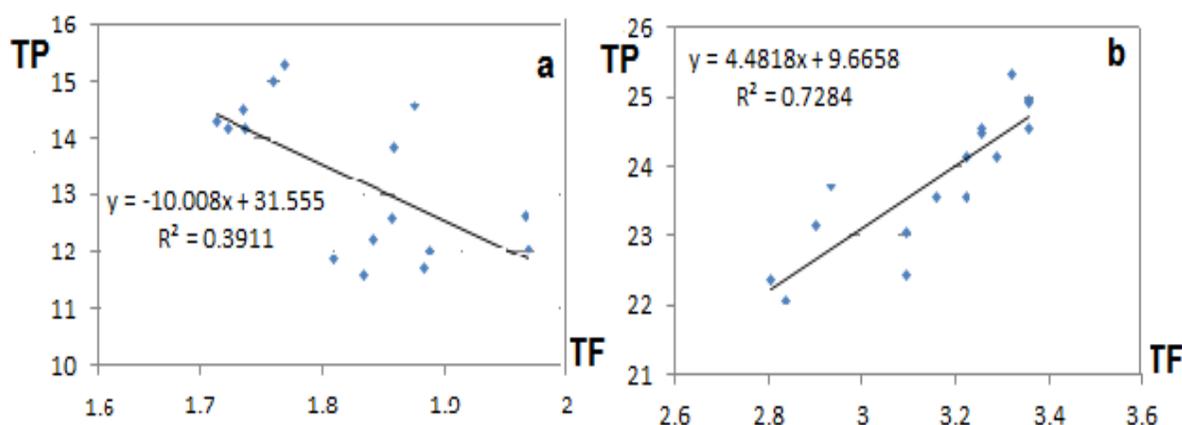
الجدول (40) المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في أوراق المليسة في شهر تشرين الأول بطريقة النقع المستمر خلال أزمنة النقع المختلفة

الزمن (دقيقة)				المستخلص		
20	15	10	5			
0.15 ± 14.26 <sup>b</sup>	0.63 ± 14.66 <sup>b</sup>	0.28 ± 12.38 <sup>a</sup>	0.19 ± 11.79 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق الطازجة
4.26	4.19	3.54	3.37	النسبة %		
0.01 ± 1.73 <sup>b</sup>	0.06 ± 1.82 <sup>a,b</sup>	0.07 ± 1.92 <sup>a</sup>	0.04 ± 1.85 <sup>a</sup>	الكمية	TF	الأوراق المجففة
0.49	0.52	0.55	0.53	النسبة %		
0.49 ± 23.94 <sup>a,b</sup>	1.19 ± 23.73 <sup>a,b</sup>	0.56 ± 24.73 <sup>b</sup>	0.76 ± 22.83 <sup>a</sup>	الكمية	TP	الأوراق المجففة
2.78	2.76	2.88	2.56	النسبة %		
0.04 ± 3.22 <sup>b</sup>	0.13 ± 3.20 <sup>b</sup>	0.03 ± 3.33 <sup>b</sup>	0.06 ± 2.87 <sup>a</sup>	الكمية	TF	الأوراق المجففة
0.37	0.37	0.39	0.33	النسبة %		

يعبر عن النتيجة: المتوسط ± SD، تحسب TP كمكافئ ( مغ GaE / غ مليسة) في حين تحسب TF كمكافئ ( مغ QE / غ مليسة)، وضعت النسبة % لقيمة المتوسط و ذلك للوزن الجاف ، تدل الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد على وجود فرق معنوي في التركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة 95%.

كذلك تقارب محتوى TP و TF بعد 10 دقائق في منقوع الأوراق المجففة وهذا يظهر من النسب المئوية لها للوزن الجاف . وبالتالي هناك اختلاف في سلوك الأوراق الطازجة و المجففة في شهر تشرين الأول قد يعود ذلك لدور الفينولات و الفلافونويدات كما سيذكر لاحقاً (الفقرة 4 من الفصل الخامس) خلال فترة

الإزهار و التي توصف أنها مرحلة حرجة ومعقدة لحدوث الكثير من العمليات المعقدة خلالها [Batygina et al, 2003]



الشكل (45) الارتباط بين الفينولات و الفلافونويدات في منقوع شهر تشرين الأول بطريقة النقع المستمر  
a : منقوع الأوراق الطازجة ، b : منقوع الأوراق المجففة

### 3. مقارنة تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات بين طريقة النقع المستمر و طريقة

#### النقع بدون غليان :

يلاحظ من المقارنة بين الجدول (37) و الجدول (40) و بين الجدول (38) و الجدول (41) و بين الجدول (39) و الجدول (42) أن محتوى الفينولات و الفلافونويدات المستخلصة بطريقة النقع المستمر لأوراق المليسة كان أكبر من محتواها بطريقة النقع بدون غليان حيث أن ثبات درجة الحرارة أثناء تحضير المستخلص بطريقة النقع المستمر (100°C) يزيد من انتاج خلايا الأنسجة النباتية و بالتالي تحرر أكبر للفينولات و الفلافونويدات منها في مقارنة مع انخفاض درجة الحرارة التدريجي عن (100°C) عند تحضير المنقوع بطريقة النقع بدون غليان وفق أزمنة النقع الجدول (41) وهذا ينسجم مع دراسة [Alhafez, 2014] بالنسبة لمنقوع الشاي الأبيض والأخضر والأسود مع ازدياد درجة الحرارة .

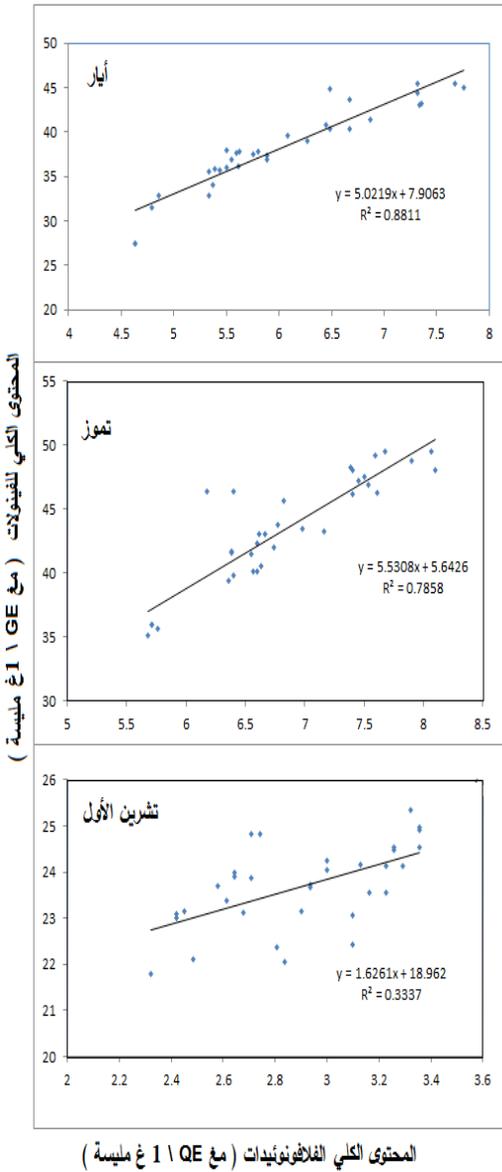
#### الجدول (41) تدرج انخفاض درجة الحرارة أثناء النقع بدون غليان خلال أزمنة النقع

زمن النقع (دقيقة)	5	10	15	20
درجة الحرارة	0.71 ± 66.5	0.71 ± 62.5	0.71 ± 54.5	1.41 ± 49

يعبر عن درجة الحرارة : المتوسط ± SD .

## 4. مقارنة تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات خلال أشهر النمو:

يتغير محتوى الفينولات و الفلافونويدات لاختلاف الحالة الفيزيولوجية للمليسة خلال أطوار نموها ، استجابة لعدة عوامل منها وراثية أو بنوية أو حيوية أو لحيوية حيث يتضح من الجدول (42) والجدول

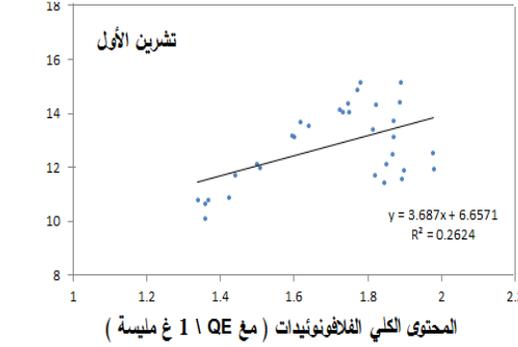
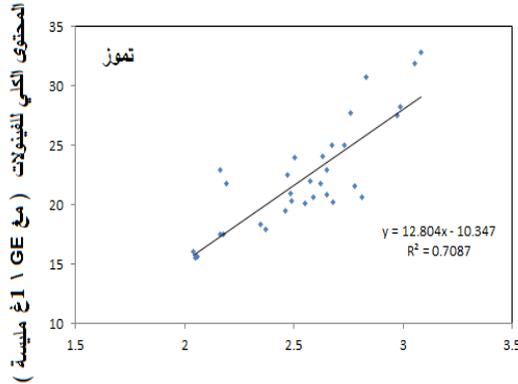
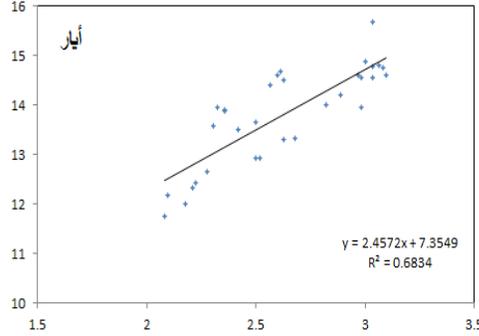


الشكل (46) الارتباط بين TP و TF في منقوع الأوراق المجففة خلال مراحل النمو

(43) أن أعلى محتوى للفينولات في المستخلصات المائية المحضرة من أوراق المليسة وفق طريقتي النقع (نقع مستمر ، نقع بدون غليان) كانت في شهر تموز في حين تقل كميتها في كل من شهر أيار ثم تشرين الأول . أما بالنسبة للفلافونويدات فلو حظ تقارب محتواها في كل شهري أيار وتموز ثم يحدث هبوط في تركيزها في الأوراق خلال تشرين الأول. حيث أن الارتباط بين كل من TP و TF في كل من شهر أيار و تموز كان كبيراً في حين أنه يتناقص بشكل واضح في شهر تشرين الأول عند فترة الإزهار الشكل (46) و الشكل (47) .

وقد يعزى تناقص كمية الفينولات في أوراق المليسة في شهر أيار وخاصة في منقوع الأوراق الطازجة لدخولها في تشكيل الأنسجة الفسيولوجية للنبات على حساب نمو الساق و الأوراق حيث لوحظ حقلياً أنه في شهر أيار ، و الذي يوافق أعلى معدل للنمو ، أن طول الساق بين كل عقدتين ورقيتين (الطول)  $(0.12 \pm 4.9)$  سم ، العرض  $(1.35 \pm 0.17)$  سم في حين تقل طول المسافة بين كل عقدتين ورقيتين خلال شهر تموز إلى  $(1.93 \pm 0.30)$  سم وتتراوح أبعاد الورقة (الطول)  $(5.98 \pm 0.33)$  سم ، العرض  $(1.33 \pm 0.17)$  سم) وذلك وفق الجدول (25) .

حيث تؤدي الفينولات دور منظم فسيولوجي داخلي للنبات، فتعتبر حموض الهيدروسيانميك مثل حمض الكوماريك و حمض الفيروليك و اللذان يواجدان في شكل غير ذواب في جدران الخلايا النباتية على شكل استرات كمخزون احتياطي من وحدات الفينيل بريانوئيد متوفرة من أجل اصطناع اللغنين، إضافة لدورها في توسع خلايا النباتات [ Lattanzio et al ., 2006 ].



الشكل (47) الارتباط بين TP و TF في منقوع الأوراق الطازجة خلال مراحل النمو

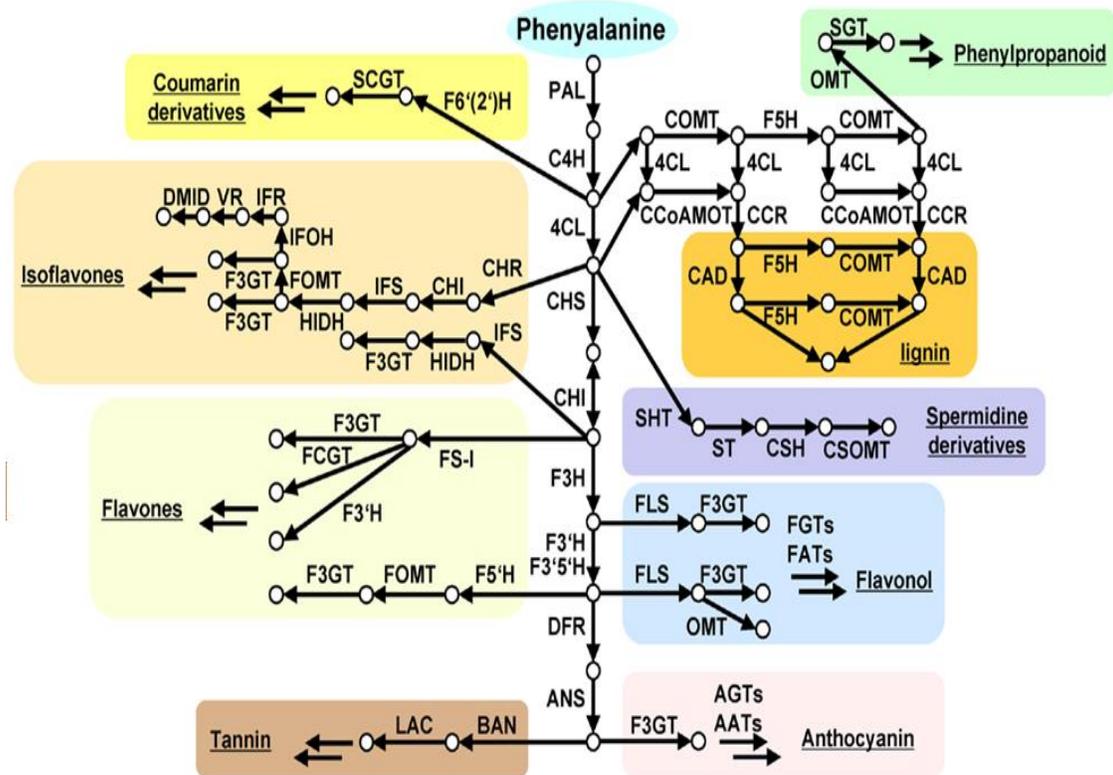
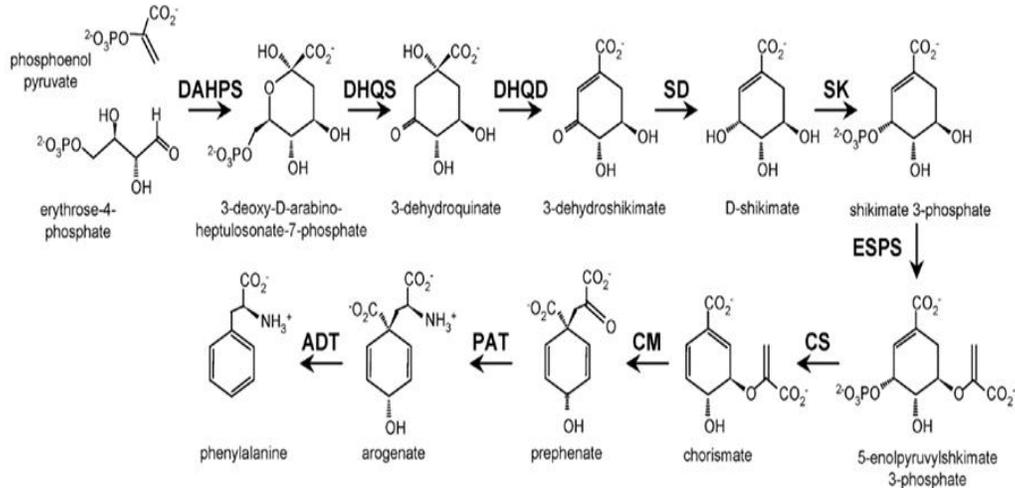
كذلك أيضاً لحدوث التنافس بين اصطناع الفينولات و الفلافونويدات و اصطناع البروتينات ، حيث يعتمد اصطناع كلاهما على الحمض الأميني الفينيل ألانين phenylalanine و الذي يحفز إنتاجه بواسطة أنزيم أمونيا فينيل ألانين phenylalanine ammonia lyase ( PAL ) و هذا ينعكس على العلاقة بين توزع الفينولات والبروتينات داخل الورقة و وفق حاجة النبات يتحقق هذا التوازن [ Jones et al ., 1999 ]

وهكذا فإن اصطناع مركبات الفينيل بريانوئيد ، الشكل(48)، وخاصة الفيربوكسيد verbascoside و الذي يعتبر المركب الفينولي الرئيسي في منقوع نبات المليسة [Bilia et al ., 2007; Piné et al ., 2009] ، يتنافس مباشرة مع اصطناع البروتينات وبالتالي ينعكس ذلك على نمو النبات . و قد يعود ذلك لعمر الأوراق ونضوجها حيث لا تكون كل الأوراق مكتملة النضج في شهر أيار بينما تكون أكثر نضجاً في تموز وبالتالي يؤدي ذلك لتراكم أكبر للفينولات فيها ، الجدول (25) ، حيث

يزداد تمدد الورقة في شهر تموز عن شهر أيار . كما أن تناقص كمية الفينولات في شهر تشرين الأول ، و الذي يوافق الإزهار الكامل ، عن شهر تموز ربما يعود لدخول الفينولات في تركيب الأنسجة الخلوية للعناقيد

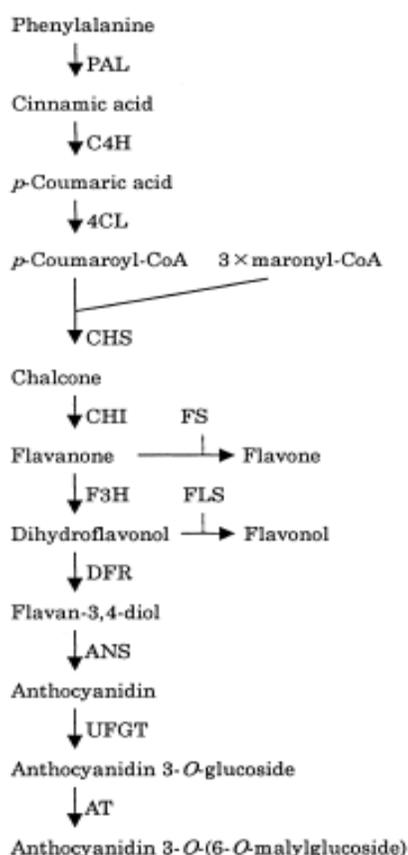
الزهريّة لنبات المليسة كما تمت مناقشته ، إضافة لأن عملية الانتقال من الطور الخضري إلى طور الإزهار

حرجة و معقدة [Batygina et al ,2003]



الشكل (48) مخطط الاصطناع الحيوي للفينولات داخل النبات [Tohge et al , 2013]

و بالمقارنة مع كمية الفلافونويدات التي تعتبر المليسة غنية بها و خاصة الفلافونات (flavones) ، فإن كميتها تبقى ثابتة تقريباً في كل من شهر أيار و تموز حتى فترة الإزهار حيث يلاحظ حدوث هبوط في محتوى الفلافونويدات و قد يعزى هذا التناقص لتركزها بالأزهار حيث تمنح الفلافونات اللون الأبيض للأزهار في حين تمنح الأنتوسيانات اللون الليموني الوردى [ Mato et al , 2000 ; Noori , 2012 ] ، حيث يوضح الشكل (49) دورة اصطناع الفلافونويدات داخل النبات ابتداءً من الفينيل ألانين فعند غياب الأنزيم flavanone 3-hydroxylase فإن دورة الاصطناع تتوقف وتتشكل الفلافونات أما عند توفر هذا



الأنزيم F3H تتشكل الأنتوسيانات وهذا ما يسبب تفاوت لون الأزهار بين الأبيض و الليموني الوردى . كما تقوم الفلافونويدات في الأوراق خلال طور الإزهار بتعزيز الحالة الفسيولوجية للنبات حيث تقوم بحمايته من الإشعاعات فوق البنفسجية و من الالتهابات الفطرية و الميكروبات التي قد تهاجم النبات في هذا الطور و لردع أو جذب الحشرات . بالإضافة إلى ذلك تشارك بنقل الطاقة و التنفس و التحكم في عملية التمثيل الضوئي و التشكل و تحديد الجنس [Cushnie et al, 2005] . إلا أن تناقص الفينولات خلال شهر أيار عن تموز و خاصة في الورق الطازج قد لا ينسجم مع الفلافونويدات وذلك مع تقارب محتواها في كلا من الشهرين فقد يعزى ذلك لمتطلبات التوازن للنمو داخل النبات حيث أن إنتاج الفينولات و الفلافونويدات يحفز من الأشعة فوق بنفسجية .

الشكل (49) دورة اصطناع الفلافونويدات في النبات [ Mato et al , 2000 ]

الجدول (42) تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في منقوع أوراق المليسة المجففة خلال مراحل النمو

الشهر	طريقة النقع	زمن النقع (دقيقة)	TP (مغ GaE \ غ مليسة )	TF (مغ QE \ غ مليسة )
أيار	النقع المستمر	5	0.99 ± 38.48 <sup>a</sup>	0.24 ± 5.98 <sup>a</sup>
		10	2.19 ± 42.39 <sup>b</sup>	0.10 ± 6.52 <sup>a</sup>
		15	1.11 ± 44.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 7.33 <sup>b</sup>
		20	2.55 ± 43.05 <sup>b</sup>	0.55 ± 7.25 <sup>b</sup>
	النقع بدون غليان	5	2.77 ± 29.38 <sup>a</sup>	0.11 ± 4.73 <sup>a</sup>
		10	0.18 ± 35.77 <sup>b</sup>	0.07 ± 5.42 <sup>b</sup>
		15	1.87 ± 35.00 <sup>b</sup>	0.13 ± 5.47 <sup>b,c</sup>
		20	0.43 ± 37.52 <sup>b</sup>	0.18 ± 5.70 <sup>c</sup>
تموز	النقع المستمر	5	1.13 ± 41.04 <sup>a</sup>	0.09 ± 6.42 <sup>a</sup>
		10	1.14 ± 47.82 <sup>b</sup>	0.25 ± 7.52 <sup>b</sup>
		15	1.35 ± 48.21 <sup>b</sup>	0.10 ± 7.56 <sup>a,b</sup>
		20	1.35 ± 47.85 <sup>b</sup>	0.31 ± 7.31 <sup>a,b</sup>
	النقع بدون غليان	5	0.36 ± 35.66 <sup>a</sup>	0.03 ± 5.94 <sup>a</sup>
		10	0.37 ± 40.15 <sup>b</sup>	0.10 ± 6.55 <sup>b</sup>
		15	0.56 ± 42.60 <sup>c</sup>	0.07 ± 6.65 <sup>b</sup>
		20	1.11 ± 44.03 <sup>c</sup>	0.18 ± 6.94 <sup>c</sup>
تشرين الأول	النقع المستمر	5	0.76 ± 22.83 <sup>a</sup>	0.06 ± 2.87 <sup>a</sup>
		10	0.56 ± 24.73 <sup>b</sup>	0.03 ± 3.33 <sup>b</sup>
		15	1.19 ± 23.73 <sup>a,b</sup>	0.13 ± 3.20 <sup>b</sup>
		20	0.49 ± 23.94 <sup>a,b</sup>	0.04 ± 3.22 <sup>b</sup>
	النقع بدون غليان	5	0.56 ± 22.50 <sup>a</sup>	0.07 ± 2.41 <sup>a</sup>
		10	0.47 ± 23.55 <sup>a,b</sup>	0.01 ± 2.60 <sup>a,b</sup>
		15	0.45 ± 24.18 <sup>b</sup>	0.08 ± 2.66 <sup>b</sup>
		20	0.23 ± 23.99 <sup>b</sup>	0.15 ± 2.95 <sup>c</sup>

يعبر عن النتيجة : المتوسط ± الانحراف المعياري (SD) ، تدل الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد على وجود فرق معنوي في تركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة 95%.

الجدول (43) تغير المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات في منقوع أوراق المليسة الطازجة خلال مراحل النمو

الشهر	طريقة النقع	زمن النقع (دقيقة)	TP (مغ GaE \ غ مليسة )	TF (مغ QE \ غ مليسة )
أيار	النقع المستمر	5	0.23 ± 13.13 <sup>a</sup>	0.09 ± 2.58 <sup>a</sup>
		10	0.29 ± 14.20 <sup>b</sup>	0.07 ± 2.97 <sup>b</sup>
		15	0.49 ± 14.96 <sup>c</sup>	0.03 ± 3.07 <sup>c</sup>
		20	0.17 ± 14.68 <sup>b,c</sup>	0.02 ± 3.01 <sup>b,c</sup>
	النقع بدون غليان	5	0.25 ± 12.06 <sup>a</sup>	0.06 ± 2.14 <sup>a</sup>
		10	0.81 ± 13.24 <sup>b,c</sup>	0.06 ± 2.29 <sup>b</sup>
		15	0.16 ± 13.66 <sup>b,c</sup>	0.08 ± 2.40 <sup>b</sup>
		20	0.14 ± 14.54 <sup>c</sup>	0.02 ± 2.60 <sup>c</sup>
تموز	النقع المستمر	5	0.43 ± 17.80 <sup>a,b</sup>	0.11 ± 2.26 <sup>a</sup>
		10	20.81 <sup>a,b</sup> ± 0.57	0.08 ± 2.76 <sup>b,c</sup>
		15	2.64 ± 30.10 <sup>c</sup>	0.05 ± 3.02 <sup>b,c</sup>
		20	4.19 ± 25.78 <sup>b,c</sup>	0.36 ± 2.49 <sup>a</sup>
	النقع بدون غليان	5	0.43 ± 15.72 <sup>a</sup>	0.01 ± 2.05 <sup>a</sup>
		10	0.57 ± 20.14 <sup>b</sup>	0.06 ± 2.50 <sup>b</sup>
		15	1.47 ± 22.88 <sup>c</sup>	0.08 ± 2.52 <sup>b</sup>
		20	1.51 ± 23.34 <sup>c</sup>	0.06 ± 2.65 <sup>c</sup>
تشرين الأول	النقع المستمر	5	0.19 ± 11.79 <sup>a</sup>	0.04 ± 1.85 <sup>a</sup>
		10	0.28 ± 12.38 <sup>a</sup>	0.07 ± 1.92 <sup>a</sup>
		15	0.63 ± 14.66 <sup>b</sup>	0.06 ± 1.82 <sup>a,b</sup>
		20	0.15 ± 14.26 <sup>b</sup>	0.01 ± 1.73 <sup>b</sup>
	النقع بدون غليان	5	0.67 ± 10.97 <sup>a</sup>	0.04 ± 1.39 <sup>a</sup>
		10	0.73 ± 11.55 <sup>a</sup>	0.09 ± 1.42 <sup>a</sup>
		15	0.27 ± 13.50 <sup>b</sup>	0.02 ± 1.60 <sup>b</sup>
		20	0.94 ± 14.12 <sup>b</sup>	0.04 ± 1.84 <sup>c</sup>

يعبر عن النتيجة : المتوسط ± الانحراف المعياري ( SD ) ، تدل الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد على وجود فرق معنوي في تركيز خلال أزمنة النقع عند مجال الثقة 95%..

## الفصل السادس

# الفعالية الحيوية للمليسة اتجاه الأحياء

## الدقيقة



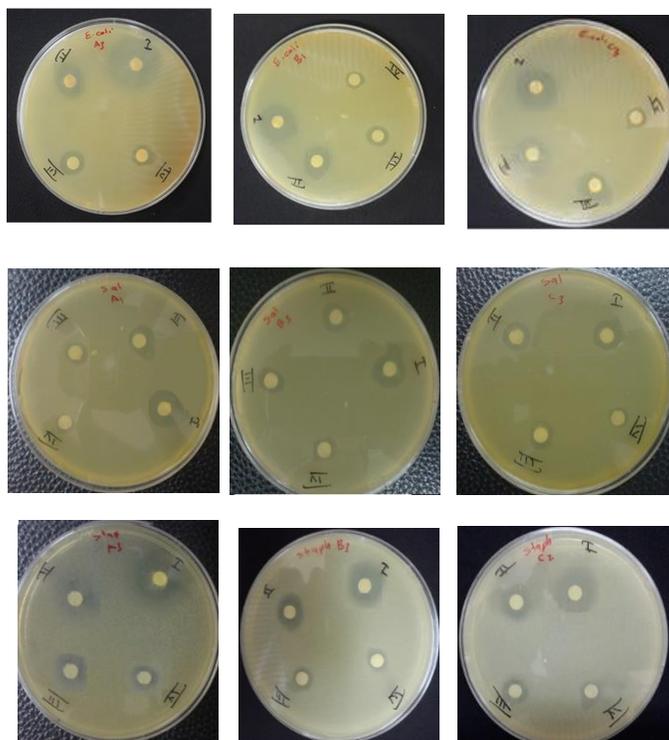
## الفعالية الحيوية للمليسة اتجاه الأحياء الدقيقة

بعد تحضير الأقراص شربت بالعامل المضاد و طبقت على أطباق البتري الملقحة بالجرثوم الممتحن، باستخدام العوامل المضادة التالية :

1. عينات زيت عطري المستخلص من أوراق المليسة المجففة بالتراكيز التالية لكل عينة 100% و 50% و 25% و 12.5% خلال مراحل النمو .
2. منقوع أوراق المليسة المجففة المجموعة في شهر تموز و المحضر بطريقة النقع المستمر بزمان 10 دقائق و النقع بدون غليان بزمان 20 دقيقة.

### الفعالية الحيوية اتجاه الأحياء الدقيقة للزيت العطري و منقوع المليسة:

بعد تطبيق اختبار الحساسية على الزيت العطري يظهر الشكل (50) حالات التثبيط للتركيز المستخدمة على السلالات الجرثومية الممتحنة



الشكل (50) حالات التثبيط للزيت العطري على السلالات الجرثومية بالتركيز المختلفة

I=100% , II= 50% , III= 25% , IV=12.5%

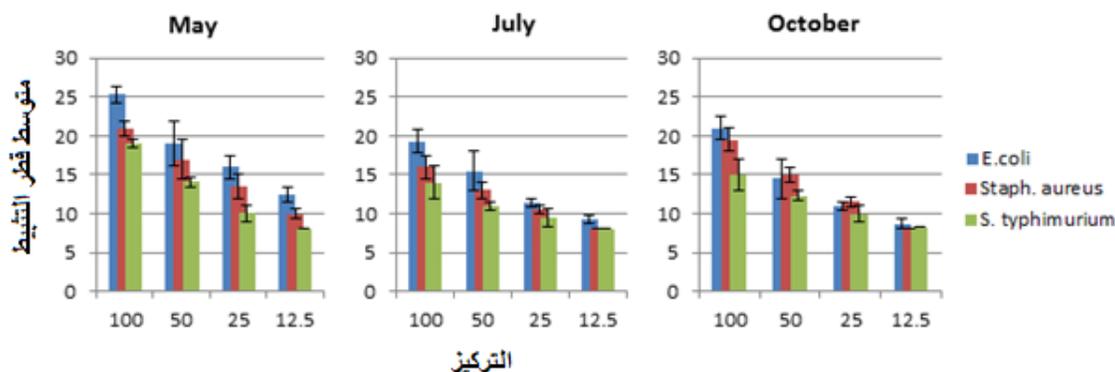
و يبين الجدول (44) أقطار هالات التثبيط للتركيز المستخدمة لعينات الزيت العطري المستخلص من الأوراق المجففة بالملح ، حيث يعتبر المضاد ذو فعالية إذا بلغت هالة التثبيط 12 ملم و أو أكثر .

الجدول (44) الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري لنبات المليسة خلال مراحل النمو

Month	Org.	Essential oil Con.			
		100%	50%	25%	12.50%
May	E.coli	25.3 ± 1.15	19 ± 2.89	16 ± 1.53	12.5 ± 1
	Staph. aureus	21 ± 1	17 ± 2.52	13.5 ± 1.53	10 ± 0.58
	S. typhimurium	19 ± 0.5	14 ± 0.58	10 ± 1.15	8 ± 0
July	E.coli	19.3 ± 1.53	15.5 ± 2.52	11.33 ± 0.58	9.3 ± 0.58
	Staph. aureus	16 ± 1.53	13 ± 1	10.5 ± 0.58	8 ± 0
	S. typhimurium	14 ± 2.08	11 ± 0.58	9.5 ± 1.15	8 ± 0
October	E.coli	21 ± 3.61	14.5 ± 0.71	11 ± 0	8.7 ± 0.58
	Staph. Aureus	19.5 ± 2.65	15 ± 2.31	11.5 ± 2.08	8 ± 1.15
	S. typhimurium	17 ± 2	12.3 ± 0.58	10 ± 0	8.3 ± 0.58

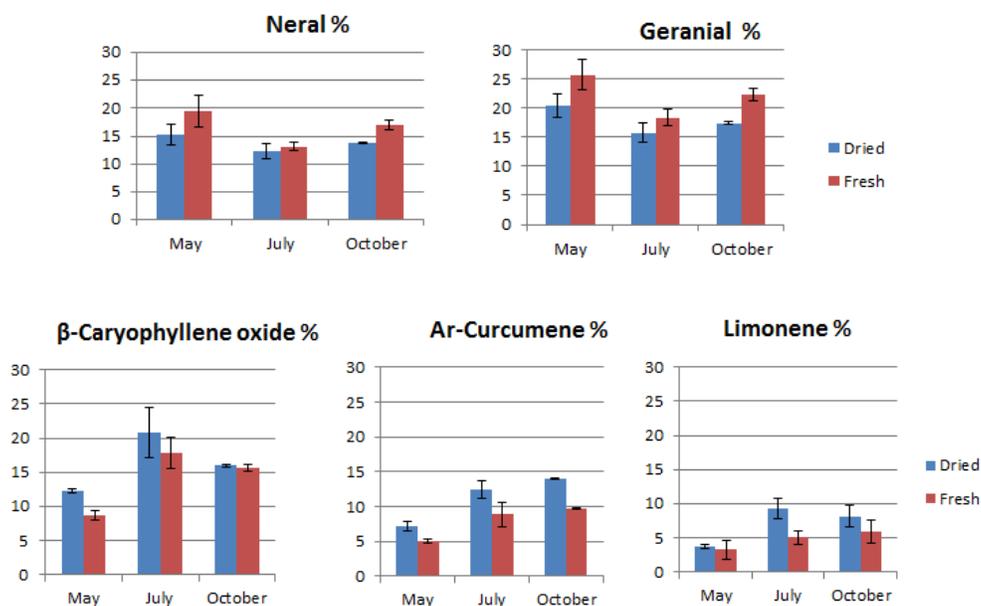
وحدة أقطار الهالة مم ، يعبر عن النتيجة : المتوسط ± الانحراف المعياري

يبين الجدول (44) أن أكثر الجراثيم حساسية هي الإيشرشيا الكولونية ثم العنقودية الذهبية ثم السالمونيلا التيفية وهذا يتوافق مع [ Zare et al, 2011; Bensabah et al, 2013 ] كما يظهر تناقص حساسية السلالات الجرثومية المستخدمة مع تناقص التركيز بالترتيب ويعود هذه الحساسية لاحتواء الزيت العطري على مركبات ذات فعالية مضادة للجراثيم مثل السيترال و الليمونين و 1، 8 سينول و أكسيد بيتا كاريفيلين و بيتا كاريفيلين و ألفا تريينول و البورينول وألفا البينين [Burt, 2004; Bassolé et al, 2012; Jung, 2009] حيث يظهر الفعل المتضافر للمركبات هذه الفعالية العالية .



الشكل (51) مقارنة حالات التثبيط للزيت العطري على السلالات الجرثومية خلال مراحل النمو

يلاحظ من الشكل (51) أن أعلى الأشهر فعالية و تأثيراً على السلالات المختبرة هو شهر أيار ثم شهر تشرين الأول ثم شهر تموز على الترتيب . و بالنظر إلى تركيب الزيت العطري المستخلص وخاصة المركبات الرئيسية الأعلى نسبة وهي السيترال و أكسيد بيتا كاريفيلين و إر-كوركومين و الليمونين، يلاحظ بأن السيترال أعلى نسبة له في شهر أيار ثم شهر تشرين الأول ثم شهر تموز كما يظهر بالشكل (52) . في حين يلاحظ أن أعلى نسبة لمركبي أكسيد بيتا كاريفيلين و الليمونين في شهر تموز أما بالنسبة لمركب إر-كوركومين فكانت أعلى نسبة له في شهر تشرين الأول، وبالتالي قد يكون هذا عائداً إلى أن السيترال بممكبيه النيرال و الجيرانيال هو المركب الأعلى تأثيراً و فاعلية ضد الجراثيم المختبرة [ Saddiq, 2010 ] .



## الشكل (52) تغير نسبة المكونات الرئيسية بالزيت العطري خلال مراحل النمو

أما عند تطبيق اختبار الحساسية باستخدام منقوع المليسة كعامل مضاد فإن الجدول (45) يظهر أقطار هالات التثبيط للمنقوع المحضر بطريقتي النقع على السلالات الجرثومية الممتحنة

## الجدول (45) الفعالية المضادة للجراثيم لمنقوع المليسة

	E.coli	Staph. Aureus	S. typhimurium
Continuous infusion	8.7 ± 0.6	6 ± 0	8 ± 0
infusion	7.3 ± 0.6	6 ± 0	7.17 ± 0.29

وحدة أقطار الهالة مم ، يعبر عن النتيجة : المتوسط ± الانحراف المعياري

يلاحظ أن حساسية السلالات المستخدمة كانت في النقع المستمر أعلى منها بالنقع بدون غليان وهذا يعود لأن محتوى الفينولات و الفلافونويدات المتحرر من الأوراق كان أعلى في المنقوع المستمر ، و تعود الفعالية في المنقوع لاحتواء المليسة على الفلافونويدات [ Pascual et al , 2001 ] إضافة للزيت العطري . كما كانت أكثر الجراثيم حساسية هي الإيشرشيا الكولونية ثم السالمونيلا التيفية في حين لم تبدي العقودية الذهبية حساسية اتجاه المنقوع . يلاحظ أن فعالية المنقوع على السلالات المدروسة كانت أقل بالمقارنة مع فعالية الزيت العطري و يمكن أن يعزى لقلة كمية المادة الفعالة من الفلافونويدات في الأوراق ، إضافة لتطاير الزيت العطري أثناء تحضير المنقوع .

## الاستنتاجات

1. بلغت النسبة الكلية للمكونات الرئيسية بالزيت العطري للمليسة [ Citral (Neral و Geranial) و  $\beta$ -Caryophyllene oxide و Ar-Curcumene و Limonene ] 61.99 % و 58.92 % في الزيت العطري المستخلص في مرحلة النمو الأعظمي ( أيار ) ونسبة 63.22 % و 70.6 % في الزيت العطري المستخلص في منتصف الموسم ( تموز ) و نسبة 70.46 % و 69.25 % في الزيت العطري المستخلص في مرحلة الإزهار التام ( تشرين الأول ) للأوراق الطازجة و المجففة على الترتيب .
2. كانت أعلى نسبة للسيترال في أيار ثم تشرين الأول و تموز على الترتيب وكانت نسبة  $\beta$ -Caryophyllene oxide أعلى ما يمكن في تموز ثم تشرين الأول و أيار على الترتيب و نسبة Ar-Curcumene أعلى ما يمكن في تشرين الأول ثم تموز و أيار على الترتيب و نسبة Limonene أعلى ما يمكن في تموز ثم تشرين الأول و أيار على الترتيب .
3. كان المحتوى الأعظمي للفينولات و الفلافونويدات في شهر تموز ثم أيار و تشرين الأول على الترتيب للأوراق الطازجة و المجففة .
4. احتوى منقوع المليسة بطريقة النقع المستمر لمدة (15 دقيقة) على نسبة أعلى من الفينولات و الفلافونويدات من طريقة النقع بدون غليان .
5. حقق زمن النقع 15 دقيقة أعلى محتوى من الفينولات و الفلافونويدات بطريقة النقع المستمر للأوراق الطازجة في حين يزداد المحتوى حتى 20 دقيقة بطريقة النقع بدون غليان.
6. كان زمن النقع 10 دقيقة كافياً للوصول لأعلى محتوى من الفينولات و الفلافونويدات بطريقة النقع المستمر للأوراق المجففة في حين يزداد المحتوى حتى 20 دقيقة بطريقة النقع بدون غليان.
7. كانت فعالية زيت المليسة العطري عالية ضد السلالات الجرثومية المختبرة لجميع التراكيز على الترتيب  
E.coli < Staph. Aureus < S. typhimurium
8. أظهر منقوع المليسة بطريقتي النقع المستمر فعالية أكبر من النقع بدون غليان اتجاه E.coli و S.Typhimurium

## التوصيات

- I. ينصح الاستخلاص من الأوراق المجموعة في شهر أيار الذي يوافق أعلى معدل نمو للحصول على زيت عطري ذو نسبة عظمى من السيترال .
- II. تحتوي أوراق المليسة على نسبة عالية من الفينولات و الفلافونويدات و يفضل جمع أوراقها قبل طور الإزهار وخاصة في شهر تموز وذلك لتحضير منقوع أكثر غناً بالفينولات و الفلافونويدات من الأوراق الطازجة و المجففة .
- III. تلعب درجة الحرارة والزمن دوراً هاماً في محتوى الفينولات و الفلافونويدات المتحررة ، و بالتالي فإنه للحصول على أعلى تركيز ممكن منها فإنه يفضل غلي الأوراق لمدة 15 دقيقة للأوراق الطازجة في حين يكفي غلي الأوراق المجففة لمدة 10 دقائق عند تحضير منقوع أوراق المليسة بطريقة النقع المستمر
- IV. يفضل نقع الأوراق لمدة 20 دقيقة عند تحضير منقوعها بطريقة النقع بدون غليان (الشاي) للأوراق الطازجة و المجففة .
- V. تظهر المليسة فعالية مضادة للجراثيم بزيتها العطري و منقوعها لذا يمكن استخدامها وتقديمها كعقار طبيعي في الطب البديل عن العقاقير الكيميائية و إجراء دراسات طبية تشمل بقية مكوناتها و على سلاسل جرثومية أخرى .
- VI. يوصى بإجراء دراسات على فعالية المليسة ضد الفطور نظراً لارتفاع نسبة مركب  $\beta$ -Caryophylleneoxide [Linda et al , 2010] الذي بلغت نسبته 21% تقريباً .

## المراجع

## المراجع الأجنبية :

Agah, M.; Najafian, S., (2012). Essential oil content and composition of *Lippa citriodora* affected by drying method before flowering stages, European Journal of Experimental Biology, 2 (5),pp.1771-1777.

Agah, M.; Najafian, S., (2012). Essential oil content and composition of *Lippa citriodora* affected by drying method in full flowering stages, International Research Journal of Applied and Basic Sciences. 3 (2),pp. 371-377,

Alavi . L.; Jabbari, A. ; Barzegar, M.; Hassanali, N. ,(2008) Chemical composition and Antioxidant Properties of Essential Oils (*lippia citriodora*, *thymus daenensis* ) 18 th national congress on food technology .

Alavi , L ; Barzegar M ; Jabbari , A ; Naghdi badi , H . (2011) The Effect of Heat Treatment on Chemical Composition and Antioxidant Property of *Lippia citriodora* Essential Oil Journal of Medicinal Plants ,Volume 10, No. 39,p 65-75 .

Alhafez, M.; Kheder, F.; AlJoubbeh ,M., (2014) . Polyphenols , flavonoids and (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves and in their infusions under various conditions , Nutrition & Food Science ,44(5) .pp. 455-463.

Ansari, M. ; Larijani, K. ; Saber-Tehrani, M .,(2012). Antibacterial activity of *Lippa citriodora* herb essence against MRSA *Staphylococcus aureus*. African Journal of Microbiology Research , 6(1),p 16-19 .

Argyropoulou, C.; Daferera, D.; Tarantilis, P.A.; Fasseas, C.; Fasseas , M., (2007).Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. Biochemical Systematics and Ecology, 35,pp. 831-837.

Armada, J ; Barra , A ., (1992). On *Aloysia* Palau (Verbenaceae). *Taxon* ,41, pp.88–90.

Barnes. J.; Anderson. L. A.; Phillipson, J.D. (2007) . Herbal Medicines , London ,third edition ,p. 405.

---

Baron, E.J.; Peterson, L.R. ; Finegold, S.M. , ( 1994 ) . Diagnostic Microbiology 9th Edition, United State.

Bassolé , I.H.N. ; Juliani , H. R. , (2011) ,Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties, *Molecules*,17, pp. 3989-4006 .

Batygina, T.B.; Vasilyna, V.E. , (2003) .Periodization in the development of flowering plant reproductive structures: critical periods , *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45 (1) , pp . 27–36.

Bayoub, K. ; Baibai , T. ; Mountassif , D. ; Retmane , A. ; Soukri , A. , (2010) . Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains, *African Journal of Biotechnology* , 9 (27), pp. 4251-4258.

Becker, H., Scher, J.M., Speakman J.B. and Zapp, S. , (2005) . Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria* L. , *Fitoterapia* ,76 , PP.580-584.

Bensabab, F.; Sbayou, H.; Amghar, S.; Lamiri, A.; Naja, J., (2013). Chemical Composition And Antibacterial Activity of Essential Oils of Two Aromatic Plants: *Mentha Spicata* and *Lippia Citriodora* Irrigated by Urban Wastewater, *International Journal of Engineering Research & Technology* , 2 ( 12),pp. 1560-1569 .

Bilia , A.R. , Giomi, M. ; Innocenti, M. , Gallori , S. , Vincieri , F.F. , (2007). HPLC DAD –ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 46 (3 ) , pp. 463–470

Bravo, L ., (1998) ,Polyphenols chemistry dietary sources metabolism and nutritional significance , *Nutrition Reviews*, 56( 11), PP . 317-333.

Bruneton, J., (1999). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Intercept, London, U.K.

Burt, S., (2004).Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review *International Journal of Food Microbiology*, 94, pp.223– 253

Carnat, A.; Carnat, A.P.; Fraisse, D.; Lamaison, J. L., (1999) . The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*, 70,pp 44-49.

- Carnat, O.; Carnat, A.P.; Chavignon, O.; Heitz, A.; Wylde, R.; Lamaison, J.L., (1995). Luteolin 7-diglucuronid, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Med.*, 61, pp. 490-491.
- Chang, C.C.; Yang, M.H.; Hwei-mei wen, H.M.; Chern, J.C., (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), P 178-182.
- Conforti, F.; Statti, G.; Uzunov, D.; Menichini, F., (2006). Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *Piperitum* (Ucria) coutinho seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (10), pp. 2056-2064.
- Cooke, M.; Poole, C. F.; Wilson, I.D., (2000). *Encyclopedia of Separation Science*, London, pp. 2744-2746.
- Cowan, M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, pp 564–582.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 26 (5), pp 343-356.
- Dai, J.; Mumper, R. J., (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 15, pp. 7313-7352.
- Doglas R. Thomson H.T., R.A.H.P. (2001) *The Essential Oil Reference Book*. Published by the British Columbia Institute of Holistic Studies, second edition. p 191,192
- Gomes, P. C. S.; Ferreira, M.F., (2005). Composition of the Essential Oils from Flowers and Leaves of Vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] Grown in Portugal, *J. Essent. Oil Res.*, 17, pp. 73-78.
- Gomes, P. C. S.; Oliveira, H. R. C.; Vicente, A. M. S.; Ferreira, M. F., (2006). Production, transformation and essential oils composition of leaves and stems of lemon verbena [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal, *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 8(n. esp), pp.130-135.
- Graca, J.A.B., Henriques, J.M.L., Medina, G., Monteiro, L., Oliveira, L.C., Pereira, T.G.; Ramilo, M.T. (1996), *Guia pratico de remedios e tratamentos naturais*, Seleccoes do Reader's Digest, Lisboa, p. 150.

---

GRIN Taxonomy Germplasm Resources Information Network , (2010) "Aloysia citrodora Palau" (United States Department of Agriculture), 2010-02-04, retrieved 2010-04-12, <http://www.ars-grin.gov>

Handa, S. S. ; Khanuja , S.P.S. ; Longo , G.; Rakesh, D.D., (2008) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plant, Italy .pp. 115-129 .

Hellemont, J.V.(1986),Compendium de Phytotherapie, Service Scientifique de l' APB , Bruxeles , pp. 234-235.

Jones C.G.; Hartley E., (1999) . A protein competition model of phenolic allocation. OIKOS , 86 (1), pp. 27 – 44.

Jung, E.K., (2009) .Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Chrysanthemum indicum Against Oral Bacteria, Journal of Bacteriology and Virology, 39 ( 2 ), pp.61 – 69.

Khani, A., Basav, ., Rakhshani, E., (2012). Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil, J. Crop Prot., 1 (4) , pp. 313-320.

Koohsari , H.; Ghaemi, E. A.; Poli, M.S.S.; Sadegh , A., (2013) . Evaluation of antibacterial activity of Lemon verbena (*Lippiacitriodora*) leaves , Annals of Biological Research, 4 (10), pp. 52-55

Lattanzio, V. , Lattanzio , V.M.T. , Cardinali , A. , (2006) . Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects, In : Imperato. F ,editor . Phytochemicals – Advances in Research,, India , pp. 23-67.

Linda, J.H.; Combrinck, E.S.; Regnie, T.J.C.; Virijevic, R.S., (2010) .Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from south Africa , south African J. Bot, 76, pp. 37-42.

Loe, H., (2009) , Lemon Verbena *Aloysia citriodora* . The Herb Federation of New Zealand . <http://www.herbs.org.nz> or <http://paperzz.com>

Maksimovic, Z. ; Malenc'ic, D. ; Kovac'evic, N ., (2005) . Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts, Bioresource Technology (96) ,pp. 873–877.

---

Mato, M.; Onozaki, T.; Ozeki, Y.; Higeta, D.; Itoh, Y.; Yoshimoto, Y.; Ikeda, H., Yoshidac, H.; Shibata, M., (2000) . Flavonoid biosynthesis in white-flowered Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*), *Scientia Horticulturae* , 84 (3-4), pp. 333-347.

Meshkatalasadat, M. H.; Papzan, A. H.; Abdollahi, A., (2010). Determination of bioactive volatile organic components of *Lippia citriodora* using ultrasonic assisted with headspace solid phase microextraction coupled with GC-MS. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* , 6 (1), pp. 319-323.

Mothana , R.A. A.; Abdo , S. A. A.; Hasson , S. ; Althawab, F.M.N.; Alaghbari, S.A.Z. ; Lindequist , U. , (2010) .Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants , *eCAM* , 7(3) , pp. 323–330.

Munir, A.A., (1993). A taxonomic revision of the genus *Lippia* (Houst.Ex) Linn. (Verbenaceae) in Australia. *Journal of Adelaide Botani Garden* 15, pp.129–14.

Nakamura, T., Okuyama, E., Tsukada, A., Yamazaki, M., Satake, M., Nishibe, S., Deyama, T., Moriya, A., Maruno, M. and Nishimura, H. (1997), Acteoside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant , *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*, 45 (3), pp. 499-504.

Newal, C.A., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D. (1996), *Herbal Medicines:AGuide for Health-Care Professionals*, The Pharmaceutical Press, London, p. 179.

Noori , M., (2012) . Flavonoids in some Iranian Angiosperms, In : Rao , V. ,editor . *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health* ,Croatia .pp.151-166.

Ohno, T.; Kita, M.; Yamaoka, Y.; Imamura, S.; Yamamoto, T.; Mitsufuji, S.; Kodama, T.; Kashima, K.; Imanishi, J., (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8, p 207–215.

Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata. D.S.; Villar, A., (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharm.*, 76 , pp.201-214

Pereira , C. G.; Meireles , M. A. A., (2007) . Evaluation of global yield , composition , antioxedation activity and cost of manufacturing of extracts from

---

lemon verbena [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] and mango (*mangifera indica* L.) Leaves, *Journal of Food Process Engineering* , 30 , pp.150–173.

Piné, R. Q., Funes, L., Micol , V., Carretero, A. S., Gutiérrez, A. F. , (2009) . High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract , *Journal of Chromatography A* , 1216 (28) , pp. 5391–5397 .

Pop, C.; Rotar, A.M.; Salanta, L.; Socaci, S.; Ranga, F.; Socaciu, C.; (2015). Thermal Stability Study of the Grape Seeds Extracts in the Aqueous Solutions, *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 72(1) ,pp. 91-98.

Portmann, E.; Nigro, M.M.L.; Reides, C.G.; Llesuy, S.; Ricco, R . A.; Wagner, M.L.; Gurni, A.A.; Carballo , M.A. , (2012) Aqueous Extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): Assessment of Antioxidant Capacity and DNA damage, *International Journal of Toxicology* ,31(2), pp. 192-202.

Qnais, E.; Abu-Safieh, K.; Abu-Dieyeh, M.H.; Abdulla, F.A., (2009) , Antinociceptive Effect of Two Flavonoids from *Aloysia Triphylla* L., *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2(4), pp. 167 – 170 .

Ricco, R. A.; Wagner, M. L.; Gurni, A. Á. , (2011) . Dinámica de polifenoles de “Cedrón” (*Aloysia citrodora* Palau -Verbenaceae-) en relación al desarrollo foliar , *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (1) , pp . 67-74.

Rogers, M., (2007), *LemonVerbena*, HERBALPEDIA™, <http://www.Herbalpedia.com>

Ragone, M. I.; Sella, M.; Conforti, P., (2007). The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedr´on) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum, *Journal of Ethnopharmacology*, 113, PP. 258–266.

Saddiq , A.A.; Khayyat, S.A.,(2010). Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98 , pp.89–93

Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shabih, F.; Sangwan, R.S., (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* 34, pp. 3-21 .

- Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G., (2004) . Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Braz. J. Microbiol.*, 35, pp. 275-280.
- Sava ,C. ; SÎRBU, R . (2010) .Analytical study of the determination of flavonoids in Black Sea algae, *Ovidius University Annals of Chemistry* , 21 (1) pp. 29-34 .
- Skaltsa , H.; Shamma, G., (1988). Flavonoids from *Lippia citriodora*. *PlantaMed.*, 54, p 465 .
- Sawmiller, D., Li, S., Shahaduzzaman, M., Smith, A.J., Obregon, D., Giunta, B., Borlongan, C.V., Sanberg, P.R. and Tan, J. (2014), Luteolin reduces Alzheimer's disease pathologies induced by traumatic brain injury , *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (1), pp. 895-904.
- Symonowicz , M. ; Kolanek , M., (2012) . Flavonoids and their properties to form chelate Complexes , *Biotechnol Food Sci*, , 76 (1), 35-41.
- Terblanche ´, F.C., Kornelius, G., (1996). Essential oil constituents of the genus *Lippia*(Verbenaceae)-A literature review. *Journal of Essential Oil Research* 8, pp.471-485
- Tohge, T. ; Watanabe, M.;Hoefgen , R. ; Fernie , A. R. , (2013) . Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage . review, *Front. Plant Sci.* , 4(62) , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Tsao, R. ,( 2010) .Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients* , 2, pp.1231-1246.
- Vinha, A.F.; Barreira, S.V.P.; Castro, A.; Machado, M.; (2013) . Comparison between the phytochemical and antioxidant properties of plants used in plant infusions for medicinal purposes” , *Journal of Agricultural Science*, Vol. 5 No. 11, pp. 11-19
- Vogel ,H; Silva ,M,L ; Razmilic ,I; (1999) ,Seasonal fluctuations of essential oil content in lemon verbena,*Acta Horticulturae* , 500 , pp. 75-79 .
- Yousefzadeh, N.; Meshkatalasadat, M.H., (2013). Quantitative and qualitative study of bioactive compounds of essential oils of plant *Lippia citriodora* by use of GC-MS technique , *Journal of Novel Applied Sciences*, 2 (2S),pp. 964-968.

Zare Z. ; Majd , A. ; Sattari , T.N. ; Iranbakhsh , A. ; Mehrabian ,S. , (2010) . The comparative study of antimicrobial activity of leaves and flowers extracts of lippie citriodora H.B.K. (Verbenacea) , American- Eurasian J.Agric. & Environ. Sci., 10(5) , pp. 901-905.

## المراجع العربية :

ابتسام حمد ، ميساء يكور زيات ، عماد سوسان . (2011)، علم الجراثيم - الجزء العملي ، كلية العلوم ، منشورات جامعة دمشق ، سوريا .

الحكيم وسيم ،السعدي محمد بدوي ، أغا عصام ، القاضي عماد ، دركت أحمد ، الشاطر زهير ، إبراهيم ثروت ، قريصة محمد ، (2012). أطلس النباتات الطبية و العطرية في الوطن العربي ، جامعة الدول العربية .المركز العربي لدراسات المناطق الجافة و الأراضي القاحلة ، أكساد ، دمشق، سوريا .

العودات محمد .(2001) . موسوعة التداوي بالنباتات الطبية ، دمشق .الأهالي للطباعة والنشر الطبعة الأولى ، سوريا .

العودات محمد ، (2010) . النباتات الشافية ، دمشق .الأهالي للطباعة والنشر الطبعة الأولى . سوريا .

بدر الدين رضوان ،عقلة بسام ، الأمير لينا . (2013) ، دراسة التركيب الكيميائي والتضاد البكتيري للزيوت العطرية المستخلصة من قشور ثمار الحمضيات، مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية ، المجلد 29 العدد الثاني، ص 83-100.

سيد محمود درويش ، (2006) ، العلاج بالأعشاب الطبية، مصر .

عبيد ، ميخائيل . (1997) . علم الجراثيم - الجزء النظري ، منشورات جامعة دمشق ، سوريا .

عبيد ، ميخائيل . (2000) . علم الجراثيم - الجزء العملي ، منشورات جامعة دمشق ، سوريا .

ياسين عبد اللطيف ،(1993). الضار و النافع وتأثيرات المخدرات و الكحول و التدخين على القدرة الجنسية و الخصب و الصحة العامة عند الرجل و المرأة . دمشق .مؤسسة الرسالة دار المعاجم .سوريا .

## الملخص

تم في هذه الدراسة تعيين تركيب الزيت العطري المستخلص من نبات المليسة *Lippie citriodora* (من الفصيلة الـفربينية *Verbenaceae*) المزروعة في سوريا خلال مراحل النمو وذلك في شهر أيار ( والذي يوافق أعلى معدل للنمو) و في شهر تموز (منتصف الموسم ) و في شهر تشرين الأول ( طور الإزهار الكامل ) وكانت المركبات الرئيسية له على الترتيب السيترال و أكسيد بيتا كارفولين و إر- كوركومين و الليمونين .كان أعلى محتوى للسيترال في أيار أما الليمونين و أكسي بيتا كارفولين في تموز أما إر- كوركومين في تشرين الأول. كما لوحظ ظهور مركب إي-نوكوفيرول لأول مرة في الزيت العطري لنبات المليسة .

عين المحتوى الكلي للفينولات و الفلافونويدات لمنقوع أوراق المليسة الطازجة و المجففة بطريقة النقع بدون غليان و النقع المستمر و ذلك خلال مراحل النمو المختلفة في شهر أيار ( و الذي يوافق أعلى معدل للنمو) و في شهر تموز ( منتصف الموسم ) و في شهر تشرين الأول ( طور الإزهار الكامل ) ، كما تم دراسة تأثير زمن النقع بالطريقتين المذكورتين أعلاه على محتوى الفينولات و الفلافونويدات المتحررة من الأنسجة النباتية. أظهرت النتائج أن أعلى محتوى للفينولات هو في شهر تموز ثم في شهر أيار ثم في شهر تشرين الأول وذلك لدور الفلافونويدات و الفينولات فيها .

و بينت النتائج بأن محتوى الفينولات و الفلافونويدات المتحررة من منقوع الأوراق بطريقة النقع المستمر أعلى من منقوعها بطريقة النقع بدون غليان. حيث يزداد التركيز في المنقوع بازدياد الزمن لكن تقل نسبة مقدار هذا الازدياد مع انخفاض درجة الحرارة وبالتالي للحصول على أعلى محتوى من TP و TF لابد من نقع الأوراق لمدة 20 دقيقة ، أما بالنسبة لطريقة النقع المستمر فإنه لابد من نقع الأوراق لمدة 15 دقيقة و ذلك للأوراق الطازجة في حين يكفي نقع الأوراق المجففة لمدة 10 دقائق للحصول على أعلى نسبة من الفينولات و الفلافونويدات.

تم اختبار الفعالية المضادة للجراثيم للمنقوع و للزيت العطري المستخلص من أوراق المليسة. كانت أعلى السلالات الجرثومية حساسية الإيشريشيا القولونية ثم المكورات العنقودية الذهبية ثم السالمونيلا التيفية بالنسبة لزيته العطري . في حين أبدى المنقوع المستمر فعالية أعلى من النقع بدون غليان و ذلك على كل من الإيشريشيا القولونية ثم السالمونيلا التيفية ، و لم يبدي أي فعالية على المكورات العنقودية الذهبية.

---

# Abstract

The scientific name of Lemon verbena is *Lippia citriodora* belongs to Verbenaceae. Lemon verbena was cultivated in Syria and used in folk and arabian medicine. Essential oil of fresh and dried leaves is determined and analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) whereas no one determined the composition of Syrian origin before. Leaves is harvested in three stages of growth: in May, which approves the highest rate of growth, July, mid-season, and October, full bloom. The major component were citral (geranial and neral), Limonene,  $\beta$ -Caryophyllene, Limonene, Germacrene D, Ar-Curcumene,  $\gamma$ -Elemene, 1,8-Cineol, cedrene and  $\beta$ -Caryophyllene oxide. The study at growth stages showed significant differences showed in the percentages of the main constituents especially citral, Ar-Curcumene,  $\beta$ -Caryophyllene oxide and limonene. geranial and neral decreasing from 17 to 19.4% and from 25.6 to 22.2%, respectively. Also imonene increasing from 3.3 to 6.07% and  $\beta$ -Caryophyllene oxide from 8.74 to 17.8%, while Ar-Curcumene 4.95% to 9.85%. Moreover it's the first time that E-Nuciferol appear in components.

In this study, the total content of phenols and flavonoids of infusion of *Lippia Citriodora* leaves, which prepared in two method: infusion and continuous infusion, are determined in three stages of growth. The effect of the time of soaking on the concentration of phenols and flavonoids free from plant tissue is studied. The results showed that the highest content of phenols is in July, while decrease in May and October concentration due to entry in the metabolic reactions of phasic growth and flowering. As noted the convergence of content flavonoids in May and July, while declined in October also due to its function in flowers.

It was also noted that continuous infusion has the higher concentration of phenols and flavonoids than infusion without boiling. Where infusion without boiling phenols and flavonoids concentration's increase with time ( $p < 0.05$ ). to get the highest concentration of them as possible it is preferred to boil the dried leaves for 10 minutes at least when preparing Lemon verbena drink by continuous infusion or soak the leaves for 20 minutes when preparing by infusion without boiling. But it is preferred to boil the fresh leaves leaves for 15 minutes at least when preparing Lemon verbena drink by continuous infusion or soak the leaves for 20 minutes when preparing by infusion without boiling.

Antimicrobial activity of the essential oil of Lemon verbena were studied by the disk diffusion method. Whereas *E.coli* has more sensitive than *Staph. aureus* and *S.typhimurium* in order and its increase in July because of increasing the citral percentage.

## المقالات المنشورة

The current issue and full text archive of this journal is available on Emerald Insight at:  
[www.emeraldinsight.com/0034-6659.htm](http://www.emeraldinsight.com/0034-6659.htm)

NFS  
45,5

766

Received 14 April 2015  
 Revised 20 May 2015  
 26 May 2015  
 Accepted 27 May 2015

Downloaded by Mr Mohammad Ghiath Naser Aldeen At 08:12 11 September 2015 (PT)

## Fluctuations of phenols and flavonoids in infusion of lemon verbena (*Lippia citriodora*) dried leaves during growth stages

Mohammad Ghiath Naser Aldeen

*Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria*

Rita Mansoor

*Department of Basic Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria, and*

Malak AlJoubbeh

*Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria*

### Abstract

**Purpose** – The purpose of this paper is to determine the total phenol content (TP) and total flavonoid content (TF) fluctuations in different infusions of lemon verbena. Dried leaves were harvested in May, July and October and prepared at various soaking times (5-20 min).

**Design/methodology/approach** – The Folin-Ciocalteu method was used to determine TP, while TF was determined by the aluminum chloride method.

**Findings** – According to the results, the July harvest had the highest content of TP and TF, followed by May and October. Temperature and soaking time play a role in the proportion of released phenols and flavonoids ( $p < 0.05$ ), whereas the content in continuous infusion is higher than infusion (without boiling). TP and TF in infusion increase until 20 min, while concentration is convergent in continuous infusion after 10 minutes, where no significant difference is seen. In the flowering stage, TP is close in comparison with the vegetative stage.

**Originality/value** – Harvest time plays a role in the content, so it is best to prepare infusion from lemon verbena before the flowering period, when people drink it, as the results show. According to the authors' knowledge, this is the first work that studied the variation in phenol and flavonoid content during different stages of growth with soaking time in drenched lemon verbena leaves.

**Keywords** Continuous infusion, Infusion (without boiling), Lemon verbena (*Lippia citriodora*), Total flavonoids, Total phenols

**Paper type** Research paper



Nutrition & Food Science  
 Vol. 45 No. 5, 2015  
 pp. 766-773  
 © Emerald Group Publishing Limited  
 0034-6659  
 DOI: 10.1108/NFS-04-2015-0027

### 1. Introduction

The scientific name of lemon verbena is *Lippia citriodora* and it belongs to the Verbenaceae family. The genus *Lippia* includes approximately 200 species of herbs, shrubs and small trees which are spread widely in South America, Central America and Tropical Africa (Pascual *et al.*, 2001; Terblanche and Kornelius, 1996). It is native in South America in Chile, Argentina, Peru and Uruguay and was transported to Europe at



ChemTech

International Journal of ChemTech Research

CODEN (USA): IJCRGG ISSN: 0974-4280  
Vol.8, No.8, pp 704-710, 2015

## Fluctuations of chemical composition of essential oil and Antimicrobial of Lemon verbena (*Lippia Citriodora*) during growth stages in syria

\*<sup>1</sup>Mohammad Ghiath Naser AL-Deen, <sup>2</sup>Rita Mansoor, <sup>3</sup>Malak ALJoubbeh

<sup>1,3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

<sup>2</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

**Abstract:** Lemon verbena was cultivated in Syria and used in folk and Arabian medicine. Essential oil of fresh leaves is extracted, determined and analyzed with gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) whereas no one determined the composition of Syrian origin before. Leaves is harvested in three stages of growth: in May, which approves the highest rate of growth, July, mid-season, and October, full bloom. The major component were citral (geranial and neral), limonene,  $\beta$ -caryophyllene, limonene, Germacrene D, Ar-curcumene,  $\gamma$ -elemene, 1,8-cineol, cedrene and  $\beta$ -caryophyllene oxide. The study at growth stages showed significant differences in the percentages of the main constituents especially citral, Ar-Curcumene,  $\beta$ -caryophyllene oxide and limonene. geranial and neral range from 17 to 19.4% and from 19.3 to 25.6 %, respectively. In addition limonene ranges from 3.3 to 6.07% and  $\beta$ -caryophyllene oxide from 8.74 to 17.8%, while Ar-Curcumene 4.95% to 9.85%. Moreover it's the first time that E-zaciferol appears along with components. Antimicrobial activity of the essential oil of Lemon verbena were studied by the disk diffusion method. Whereas E.coli has more sensitive than Staph. aureus and S. typhimurium in order and its increase in July because of increasing the citral percentage.

**Keywords:** Lemon Verbena (*Lippia Citriodora*), Essential oil, Antimicrobial Activity , Growth stage , GC-MS.

### 1 - Introduction:

The scientific name of Lemon verbena is *Lippia citriodora* belongs to Verbenaceae . The genus *Lippia* includes approximately 200 species of herbs, shrubs and small trees which spread widely in South America, Central America and tropical Africa [1 ,2] . It's native in South America in Chile ,Argentina , Peru and Uruguay has been transported to Europe in the end of 17<sup>th</sup> century, spreading in southern Europe, especially Italy and Spain, and in South Africa, particularly Morocco. Lemon verbena used in folk medicine for the treatment of asthma, spasms, cold, fever, flatulence, colic, diarrhea , indigestion, insomnia, and anxiety [3,4,5]. It is also recommended as analgesic, anti-inflammatory and antipyretic [1] It is believed that these properties due to its essential oils and polyphenols [6,7], and its sedative and analgesic properties due to the presence of verbascoide, which is present as one of the most important and major polyphenols (phenyl propanoids) in lemon verbena tea, was isolated by methanol extraction, followed by partitioning with ethyl acetate, and identified as being acetoside [8]. As reported in treatment of Alzheimer's disease due to the presence of Luteolin 7-diglucuronideas the major flavonoid compound [9,10] ,it is also used in perfume industry , food additives and flavoring beverages [1].

Many lists in the composition of the essential oil of Lemon verbena have developed which differ from each due to the different geographical, climatic environment and harvest time. The main ingredients in these

## تغيرات المحتوى الكلي للفيتولات و القلافوتونيدات في المستخلصات المائية من أوراق المليسة الطازجة خلال مراحل النمو

محمد غيات ناصر الدين (1) ، ملك الجبة (2)، رينا منصور (3)

### المخلص:

حين في هذه الدراسة المحتوى الكلي للفيتولات و القلافوتونيدات لمقوع أوراق المليسة الطازجة بطريقة القع بدون عليان و القع المستمر خلال مراحل النمو وذلك في شهر أيار ( و الذي يوافق أعلى معدل للنمو) و في شهر تموز ( منتصف الموسم ) و في شهر تشرين الأول ( طور الإزهار الكامل ) ، كما درس تأثير زمن القع بالطريقتين المذكورتين أعلاه في محتوى الفيتولات و القلافوتونيدات المتحررة من الأنسجة النباتية . أظهرت النتائج أن أعلى محتوى للفيتولات هو في شهر تموز (30.10 ± 2.64 GE mg \ 1g مليسة ) في حين قل كميتها بنسبة % 40-41 تقريباً في طوري النمو والإزهار لدخولها في التفاعلات الاستقلابية . كما لوحظ تقارب محتوى القلافوتونيدات (3.07 ± 0.03 QE mg \ 1g مليسة) في شهري أيار و تموز في حين يقل محتواها في شهر تشرين الأول بنسبة % 36.6 - 40 لتركزها في الأزهار . و بينت النتائج بأن محتوى الفيتولات و القلافوتونيدات المتحررة من مقوع الأوراق بطريقة القع المستمر أعلى من مقوعها بطريقة القع بدون عليان. حيث يزداد التركيز في المقوع بازدياد الزمن (  $p > 0.05$  ) لكن قل نسبة مقدار هذا الزيادة مع انخفاض درجة الحرارة أما بالنسبة لطريقة القع المستمر فإن الزيادة تكون كبيرة إلا أن تركيز كلاً من الفيتولات و القلافوتونيدات يقل بعد 15 دقيقة بسبب تفككها الحراري .

الكلمات المفتاحية : نبات المليسة (*Lippie citriodora*) - المحتوى الكلي للفيتولات (TP) - المحتوى الكلي للقلافوتونيدات (TF) - القع المستمر - القع بدون عليان .

(1) طالب ماجستير في قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة دمشق

(2) أستاذ مكتور في قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة دمشق

(3) مكتور في قسم العلوم الأساسية ، كلية الزراعة ، جامعة دمشق