الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعلي العالي والبحث العلمي

جامعة منتوري ـ قسنطينة

كلية العلوم الدقيقة **قسم الكيمياء**

أطروحـــــة

مقدمة لنيل شهادة دكتوراه في العلوم

شعبة: الكيمياء العضوية

فرع : كيمياء النبات

عنوان البحث

تقييم كيميائي وحيوي لنوعين نباتيين من عائلتي الخيميات والبقوليات

تقديـــم الطالبـــة :
الواعـــــر سهيلـــة

تحت إشراف :
الدكتور صالح عكال

لجنـــة المناقشـة

د. كمال مجروبي	أستاذ بجامعـــة منتوري ـ قسنطينـــــــــــة	رئيسا
د. صالح عكـــال	أستاذ بجامعـــة منتوري ـ قسنطينـــــــــــة	مقررا
د. لعمـــارة قدور	أستاذ بجامعـــة العربي بن مهيدي ـ ام البـواقي	ممتحنا
د. غراف نورالدين	أستاذ محاضر بجامعة العربي بن مهيدي ـ ام البواقي	ممتحنا
د. خنوف الصديق	أستاذ محاضر بجامعة فرحات عباس ـ سطيـف	ممتحنا

السنة الدراسية: 2009/2008

الإهداء

أهدي ثمرة جهدي هذا إلى :
أمي وأبي حفظهما الله
وإلى روح أخي العزيز محمد رحمه الله
وباقي إخوتي:
عليمة، فاتح، فيروز، هشام، جلال
وإلى كل الأهل والأحباب.

تشكرات

الحمد والشكر لله العلي العظيم الذي وفقني وأعانني على إنجاز هذا العمل المتواضع .

أتقدم بأسمى معاني الشكر و العرفان بالجميل إلى أستاذي الفاضل الدكتور عكال صالح الذي أدار هذا البحث ولم يقصر ولم يدخر أدنى جهد في سبيل السير الحسن لهذا العمل.

كما أعبر عن عظيم امتناني و تقديري لأستاذي الدكتور مجروبي كمال على النصائح و المساعدات التي قدمها لي خلال إنجاز هذا العمل كما أشكره على قبوله رئاسة لجنة المناقشة.

وأوجه خالص شكري إلى الأساتذة: الدكتور لعمارة قدورمن جامعة أم البواقي و الدكتور خنوف الصديق من جامعة سطيف على قبولهما المشاركة في مناقشة هذه الرسالة .

كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى أستاذي القدير الدكتور غراف نورالدين من جامعة أم البواقي علي كل النصائح و المساعدات التي قدمها لي خلال مشواري الدراسي، كما أشكر له قبوله الحسن للمشاركة في مناقشة هذه الرسالة .

وأتقدم بكل معني الشكر إلى الدكتور لعور حسين على مساعداته و تعاونه معنا سواء في التعرف على النبتات المدروسة أو التحاليل البيولوجية المجرات.

وأوجه شكري الجزيل إلى الأستاذ بن احمد رياض والأستاذ لخضر جري على ما قدماه لي من عون و مساعدة. كما لا أنسى شكر الهاني، مصطفى لفحل و خالي كمال على مساعداتهم و نصحهم لي في الإعلام الألي.

و لا يسعني في الأخير إلا أن أثني على الزملاء وما أكثرهم ممن ساهم من قريب أو بعيد في تقديم عون أو مساعدة ،وأخصهم بالذكر رفيقات دربي سليـــمة وأحلام، كما لا أنسى أسيا، نجوى، منى، منيرة، نريمان، حسينة، نعيمة، حنان، لمياء، مـالك، صابرو رؤوف .

و زملاء الأسرة المخبرية : نبيلة1، نبيلة2، نجاة، نجاح، راضية، مونية وزين العبدين.

الفهرس

قائمة المختصرات

مقدمة 2

المراجع 4

الفصل الأول

دراسة المركبات الفلافونيدية

I.أ– **دراسة المركبات الفلافونيدية** 6

أ– 1. تعريف الفلافونيدات 6

أ– 2. تصنيف الفلافونيدات 7

أ– 2 –1.الفلافون 7

أ– 2 –2.الفلافونول 7

أ– 2 –3.الفلافانون 7

أ– 2 –1.نيوفلافون 9

أ– 2 –5.إيزوفلافون 9

أ– 2 –5–1.توزيع الإيزوفلافونات في العائلة البقولية 9

أ– 2 –5–2.الإصطناع الحيوي للإيزوفلافونات عند البقوليات 10

أ– 3. توزيع الفلافونيدات 12

أ– 4. الفعالية البيولوجية للفلافونيدات 13

أ– 4. 1. الفعالية الضد مكروبية 13

أ–4–1–1. الفعالية ضد البكتيرية 13

أ–4–1–2. الفعالية ضد الفطرية 14

أ– 4. 2. الفعالية ضد الفيروسات 14

أ– 5. 3. الفعالية المضادة للأكسدة 15

I. ب– **الدراسة الكيميائية للفلافونيدات** 18

ب–1. الاستخلاص 18

ب–2. الفصل والتنقية 18

ب–3. التعيين البنيوي للفلافونيدات 19

ب–3. 1. ثابت الانحباس 19

ب–3. 2. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) 19

ب–3. 2. 1. طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي 19

ب–3. 2. 2. طيف الامتصاص في وجود الكواشف 20

ب– 3. 3. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $NMR^{1}H$ 25

ب– 3. 4. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $NMR\ ^{13}C$ 28

ب– 3. 5. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد 28

ب-3. 6. مطيافية الكتلة 29
ب-3. 7. الإماهة الحمضية 31
المراجع 33

الفصل الثاني

الدراسة الكيمياوية للنبتتين *Ammoides atlantica , Retama sphaerocarpa*

II.أ- **الدراسة الكيمياوية لنبات** *Retama sphaerocarpa* 40
أ-1 التصنيف النظامي للنبتة 40
أ-2. وصف النوع 40
أ-3. توزع النوع 42
أ- 4. المسح البيولوجي للنبتة 42
أ-5. المسح الكيميائي للجنس *Retama* 45
II.ب- **الدراسة الكيمياوية لنبات** *Ammoides atlantica* 49
ب-1 التصنيف النظامي للنبتة 49
ب-2. وصف النوع 49
ب-3. المسح البيولوجي للجنس *Ammoides* 50
ب-4. المسح الكيميائي للجنس *Ammoides* 51
المراجع 53

الفصل الثالث

المادة النباتية :الاستخلاص ،الفصل ،التنقية و الالدراسة البيولوجية

III .أ- **الدراسة الكيمياوية العملية لنبات** *Retama sphaerocarpa* 56
أ- 1. المادة النباتية 56
أ- 2. الاستخلاص 56
أ- 3. طرق الفصل والتنقية 58
أ- 4. الفعالية ضد البكتيرية 62
III .ب- **الدراسة الكيمياوية العملية لنبات** *Ammoides atlantica* 64
ب - 1. المادة النباتية 64
ب - 2. الاستخلاص 64
ب- 3. طرق الفصل والتنقية 66
المراجع 69

الفصل الرابع

التعيين البنيوي للمركبات المفصولة

IV. أ- **التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Retama sphaerocarpa*** 71

أ- 1. التحليل البنيوي للمركب F_3 71

أ- 2. التحليل البنيوي للمركب F_1 78

أ-3. التحليل البنيوي للمركب F_9 82

أ- 4. التحليل البنيوي للمركب $F_{10}G$ 91

IV.ب- **التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Ammoides atlantica*** 96

ب - 1. التحليل البنيوي للمركب AF_6 96

ب - 2. التحليل البنيوي للمركب AF_7 100

ب -3. التحليل البنيوي للمركب AF_{10} 103

ب - 4. التحليل البنيوي للمركب AF_{11} 110

ب - 5. التحليل البنيوي للمركب AF_{12} 115

المراجع 119

الخاتمة 121

المراجع ..... 125.

الملخصات.

قائمة المختصرات

CC : Column Cromatography.

TLC : Thin-Layer Chromatography .

PC : Paper Cromatography.

^{13}C-NMR : ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance.

^{1}H-NMR : ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance.

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

COSY : Correlation Spectroscopy .

J : Coupling constant.

Hz : Hertz.

ppm : pats per million.

s : singlet.

d : doublet.

dd : doublet of doublet.

Rf : Ration to solvent front.

EI : Electron Impact ionization.

ES : Electro Spray.

FAB : Fast Atom Bonbardment.

GC-MS : Gaz chromatography-Mass Spectrometry.

HPLC : High Performance Liquid Cromatography.

UV : Ultraviolet.

ROS : Reactive Oxygen species.

CoA : Co-enzyme.

المقدمة

المقدمة : من المشاهد في واقعنا اليومي زيادة اهتمام الناس بالطب والعلاج الطبيعي، والتداوي بالأغذية الطبيعية و الأعشاب و النباتات الطبية و الوصفات الشعبية المجربة من أهل الخبرة .

قديما كانت تستعمل الأعشاب كمصدر رئيسي في معظم العقاقير ، [2,1] فمملكة النبات تزود الطب بصفة مستمرة إذ تستعمل في شكلها الخام على شكل شايات و شراب ومنقوع و مراهم و دهان أو مساحيق . ويعود ظهور طب الأعشاب إلى حوالي 60000 سنة باكتشاف قبر في مغارة شمال العراق سنة (1960)، [3] إذ أسفرت التحاليل المجراة على التربة المحيطة بالهيكل العظمي على وجود حبوب طلع لثماني نبتات سبعة منها طبية لا تزال تستعمل في كل أنحاء العالم [4] .

مع تطور الكيمياء و الطب الغربي أعتمد على التداوي بالعقاقير والأدوية المصنعة [5] إلا أن صناعة بعض هذه الأدوية غير معروفة أو غير عملية اقتصاديا، ناهيك عن السلبيات الناجمة عنها من مضاعفات وأمراض سرطانية و أعراض جانبية، عانى منها الكثير من المرضى، لذا تتواصل الأبحاث عن النبتات الطبية للتصدي للأمراض الحالية . فمشتقات الأعشاب تمثل نسبة عالية من الأدوية المسوقة المستعملة حاليا في علاج إرتفاع ضغط الدم و الربو و الأوجاع ...

فـــ٪ 25 من الوصفات الطبية تحوي على الأقل أهم دواء ذو أصل نباتي [6] .

وفي هذا السياق وبغية المساهمة في تطور هذه الأبحاث عمدنا إلى دراسة فيتوكيميائية لمنتوجات الأيض الثانوي الفلافونيدي للنبتتين طبيتين تنحدران من قاموس ا لثروة النباتية الجزائرية، أولاهما *Retama sphaerocarpa* من العائلة البقولية (Fabaceae) التي تعتبر من أرقى وأوسع العائلات الزهرية بعد العائلة المركبة (Compositae) لاحتوائها على أكثر من 650 جنس وقرابة 17000 نوع [7]. وقد عمد المختصون إلى تقسيمها إلى ثلاث عائلات تحتية : Caesalpinioideae، Mimosoideae، Papilionoideae وهذه الأخيرة هي الأكثر اتساعًا باحتوائها على 10400 نوع [7].

تحظى العائلة بأهمية اقتصادية عظمى لاحتوائها على نباتات صيدلانية، فلاحية، صناعية وأخرى للزينة. كما تجدر الإشارة إلى أنها تحتوي على عدد مهم م ن النباتات السامّة حيث تضمّ رتبتها أكثر من 16000 نوع سام [7]. لذا كانت هدفاً للكثير من الدراسات الفيتوكيميائية، العائلة البقولية في الجزائر تضم حوالي 53 جنساً و 337 نوعاً [8]، فالجنس رتم (*Retama*) الذي نحن بصدد دراسته ممثل في الجزائر بثلاثة أنواع : *Retama reatam*، *Retama monosperma*، *Retama sphaerocarpa*.أما النبتة الثانية فهي *Ammoides atlantica* النبتة الأصلية المنحدرة من العائلة

الخيمية المعروفة بأهميتها الصناعية حيث تستعمل كطعام و توابل و دواء ونباتات للزينة . تقسم هذه العائلة إلى ثلاث عائلات تحتية : Apioideae, Saniculoideae, Hydrocotyloideae و تضم حوالي 200 جنس و 2900 نوع تنمو معظمها في نصف الكرة الشمالية، أما في الجزائر فهي ممثلة بـــ55 جنس و130 نوع[8] .من بينها جنس *Ammoides* الذي يظم النوعين *Ammoides atlantica* و *Ammoides pusilla* .

أما من الناحية الكيميائية فتشير الأبحاث إلى غنى هذه العائلة بالكومارينات ، [9] الفلافونيدات [11,10]، و القلويدات البيريدينية [12] . فبحثنا هذا يعد الأول من نوعه في دراسة المحتوى الفلافونيدي للنبتة *Ammoides atlantica* و كتكملة لرسالة الماجستير في دراسة للنبتة *Retama sphaerocarpa* وقد قسمنا هذا البحث إلى مقدمة وأربع فصول و خاتمة، ففي الفصل الأول استعرضنا منتوجات الأيض الثانوي الفلافونيدي من تعريف وتصنيف وأهمية بيولوجية لتليها كيفية الفصل والطرق التحليلية المتبعة للتعرف عليها . أما الفصل الثاني فخصصناه للتعريف بالنبتتين والتنويه بمزاياها البيولوجية بالإضافة إلى إحصاء الفلافونيدات المفصولة من جنسيهما . لتأتي الطريقة العملية المتبعة خلال هذه الدراسة من فصل و تنقية للمركبات الفلافونيدية بالإضافة إلى دراسة بيولوجية لمستخلصات النبتة *Retama sphaerocarpa* في الفصل الثالث ، في حين خصص الفصل الرابع للتعين البنيوي للمركبات المفصولة باستعمال مختلف الطرق الفيزيوكيميائية .

المراجع

[1] Cooper,E. (2004). Drug discovery,CAM and natural products, Evid. based complement altern. med.1, 215-217.

[2] Tsao, G.C.I., Zeltzer, L.K., (2005). Complementary and alternative medicine approaches for pediatric pain, a review of the state-of-the-science, Evid. based complement altern med.2.149-159.

[3] Solecki, R., Shanidar, I.V. (1975). A neanderthal flower burial in northern Iraq , Science, 190,880-881 .

[4] Bensky, D., Gamble, A. (1993). Chinese herbal medicine,materia medica, Revised edition, seattle, W.A., Eastland press, Inc. 13-17.

[5] Farnsworth, N.R. and Morris, R.W. (1976). Higher plants-the sleeping giant of drug development, Am. J. pharm. Sci. support public health. 148,46-52.

[6] Bashar, S., Hassan, A. and Omar, S. (2005).Tradition and perspectives of Arab herbal medicine, a review, The Author . Published by oxford university, 1-5.

[7] Bruneton, J. (2001). Plantes toxiques et végétaux dangeureux pour l'homme et les animaux.

[8] Quezel, P. and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

[9] El hazimi, H. (1995). Natural product, 149-190.

[10] Harborne, J.B. (1988). The flavonoids ,advances in research since 1980, eds. chapman and hall, New york .

[11] Bep, O.B. (1986). Medical plants in tropical west Africa, eds. Cambridge university press.

[12] Mann, J. (1987). Secondary metabolism, eds. Clarendon press, Oxford.

الفصل الأول

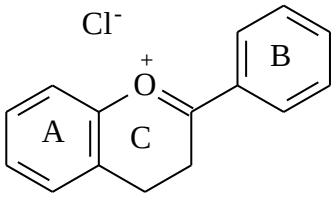
دراسة المركبات الفلافونيدية

I - أ - دراسة المركبات الفلافونيدية :

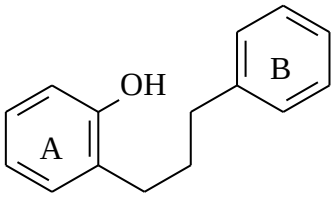
أ - 1 - تعريف الفلافونيديات :

يعود أصل كلمة فلافونيد إلى (Flavus) وهي كلمة لاتينية تعني اللون الأصفر [1]. فالفلافوندات هي صبغات نباتية تسمى أحيانا أنتوزانتينات (Anthoxantines) تنتشر في مختلف أجزاء النبتة من أزهار وأوراق وسيقان وجذور ... وتجدر الإشارة إلى أن هناك صبغات نباتية أخرى تسمى أنتوسيانينات (Anthocyanines) وهي وثيقة الصلة من الناحية الكيميائية بالفلافونيدات. والنواة الأم للأنتوسيانينات هي كلوريد 2 فنيل بتروبير اليوم المعروفة بكلوريد فلافيليوم (1)، ويتمّ عزل هذه الأملاح على هيئة أملاح كلوريد [2] تؤمن الحماية للنسيج الخلوي للنبات من تأثير الأشعة فوق البنفسجية [1]. وتعدّ الفلافونيدات من المركبات البولي فينولية، فهي تتكون من حلقتي بنزين تربطهما سلسلة بثلاث ذرات كربون الصيغة (2) التي تشكل عموماً حلقة غير متجانسة بعد الالتحام مع OH الفينولي للحلقة A [3].

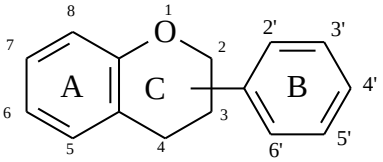
تعتمد الصيغة الكيميائية للفلافونيدات على هيكل ذو 15 ذرة كربون ممثلة بحلقة كرومـــان (Chromane) وحلقة بنزينية وهي ثاني حلقة عطرية ترتبط في المواقع 2، 3، 4 الصيغة (3).



الصيغة (1)



الصيغة (2)



الصيغة (3)

أ - 2 - **تصنيف الفلافونيدات** :

تصنف الفلافونيدات إلى عدّة أقسام، حسب درجة تأكسد الحلقة البيرانية التي يمكن أن تفتح أو تتحلق لتعطي حلقة فيران [4].

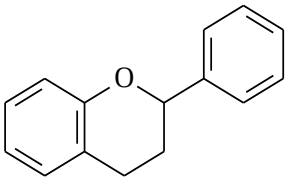
أ - 2 -1 - **الفلافون:** يمكن للحلقة B المشار إليها سابقا أن تتواجد في الموضع 2، وإذا كانت الرابطة 2ـ3 غير مشبّعة واستبدل الموقع 4 بمجموعة كربوكسيل، سمّي المركب حينئذ فلافون ، وتتضمن هذه المركبات مجوعات بديلة تكون في الغالب مجموعة هيدروكسيل أو ميتوكسيل وقد يحوي بناؤها على وحدات سكرية على هيئة سكر أحادي أو ثنائي أو أكثر، وقد ترتبط هذه الوحدات بذرة أكسجين المكونة لمجموعة الهيدروكسيل أو ترتبط مباشرة بإحدى ذرات الكربون للهيكل الفلافونيدي و من أشهرهذه السكريات نجد : الهكسوزات Hexoses (D-glucose، D-galactoseأو D-allose) والبنتوزات Pentoses (D-apioses، L-arabinose، L-rhamnose، D-xylose).

أ - 2 -2 - **الفلافونول:** إذا وجدت مجموعة هيدروكسيل (OH) حرة أو مستبدلة (OR) في الموقع(3) لمركب الفلافون حيث يتم تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في مرحلة الشالكون سمي المركب بالفلافونول وهو يشكّل نواة أساسية للعديد من المركبات الطبيعية.

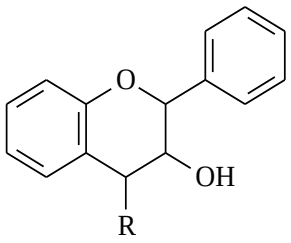
تنتشر كل من الفلافونات و الفلافونولات بشكل واسع في الطب يعة إذ تمثل حوالي ٪ 80 من الفلافونيدات حيث تكون الحلقة A مستبدلة بأكثر من ٪90 بواسطة مجموعة هيدروكسيل حرة في الموضعين C-5,C-7 أو ممثيلة أو مرتبطة بسكريات، كما أن هناك استبدالات أخرى تتم بواسطة مجموعات هيدروكسيلية حرة بنسب متفاوتة في الموقعين C-6,C-8 وقد تكون مرتبطة بمثيل أو بمجموعات سكرية أو بجذور أخرى كما يمكن لهذا الإرتباط أن يكون من نوع C-C.

الحلقةB تكون مستبدلة بحوالي ٪ 80 في الموقع'C-4 ويتم ذلك قبل مرحلة تكوين الشالكون ،أو ثنائية الإستبدال في الموقعين 'C-3',C-4 بعد غلق الحلقة (C) أي بعد تكوين الشالكون، وتكون ثلاثية الإستبدال في المواقع'C-3',C-4 و 'C-5 بنسبة ضعيفة.أما الموقعين 'C-2و'C-6 فنادرا ما تكون مستبدلة [1].

أ - 2 - 3- **الفلافانون** :إذا كانت الرابطة 2-3 في هيكل الفلافون مشبعة يسمى المركب فلافانون . كما هو موضح في الشكل (1) الذي يبيّن مختلف الهياكل الأساسية للفلافونيدات.

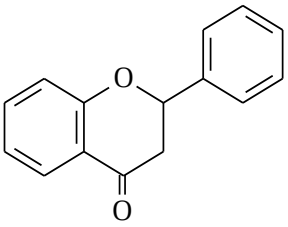


Flavane

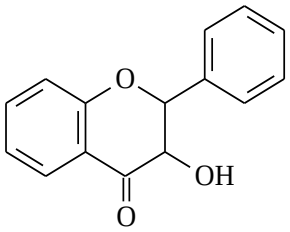


R=H : Flavan_3_ ol

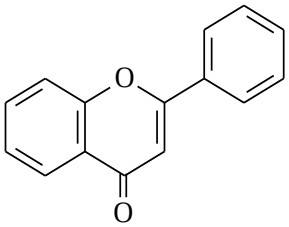
R=OH : Flavan_3,4_di-ol



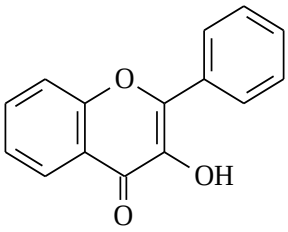
Flavanone



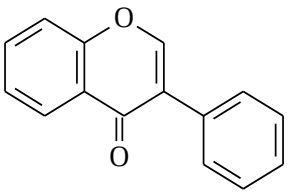
Dhydroflavonol



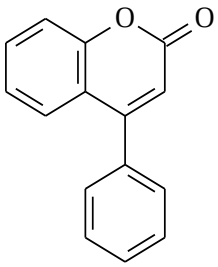
Flavone



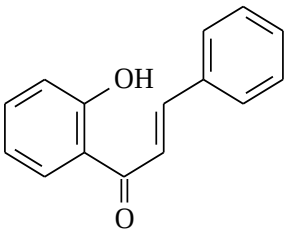
Flavonol



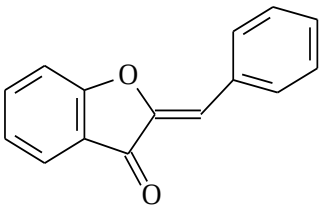
Isoflavone



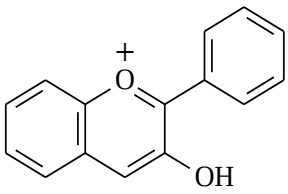
Neoflavone (4–phenyl–coumarine)



Chalcone



Aurone



Anthocyanidol

الشكل (1) : الهياكل الأساسية لمختلف الفلافونيدات

أ - 2 - 4 - **نيوفلافون:** إذا وجد استبدال بين مجموعة الكربوكسيل والمجموعة B في هيكل الفلافون سُمّي المركب نيوفلافون والذي تمّ عزله من عدّة أنواع للعائلة البق ولية [5]. فهو يشكّل مع الإيزوفلافون الفلافونيدات الشاذّة وذلك لقلة انتشارها في الطبيعة خلافا عن الفلافونات والفلافونولات المنتشرة على نطاق واسع [2].

أ - 2 -5 - **إيزوفلافون** : وهي لا تختلف في بنائها عن الفلافونات إلاّ باختلاف ارتباط الحلقة B حيث تتواجد في الموضع رقم 3. ويعود تاريخ إكتشاف أول إيزوفلافون formononetin كمركب طبيعي إلى منتصف القرن التاسع عشر [6].من جذور النبتة البقولية *Ononis spinosa L* .

ومع نهاية 2004 تم إحصاء ما يزيد عن 1600 إيزوفلافون أغلبها مفصول من العائلة البقولية [8] التي تعتبر ثالث أهم عائلة زهرية .

كما يشهد محدودية الإيزوفلافونات عند العائلات غير البقولية إذ فصل منها أول إيزوفلافون في أواخر القرن التاسع عشر من النوع(Iridaceae) *Iris florentina* [9] . وفي ماي 2007 تم إحصاء 225 إيزوفلافون مفصول من 59 عائلة غير بقولية مع العلم أن أغلب هذه المركبات تم الكشف عنها لدى العائلة البقولية[10] .

أ - 2 - 5 -1- **توزيع الإيزوفلافونات في العائلة البقولية :**

تتمركز الإيزوفلافونات في تحت العائلة الفراشية (papilionoideae)، و قبل سنة 1982 تم الكشف عن الإيزوفلافونات عن ـــد ثلاث أنواع فقط من العائ ـــلات التحتي ـــة الأخرى [11]*Apuleia leiocarpa* (Caesalpinioideae),*Albizia procera,Prosopis juliflora*(Mimosoideae)

ومؤخرا تم إكتشاف isoflavone C-glycoside عند *Cassia javanica* و*Senna siamea* من العائلة Caesalpinioideae[13,12]

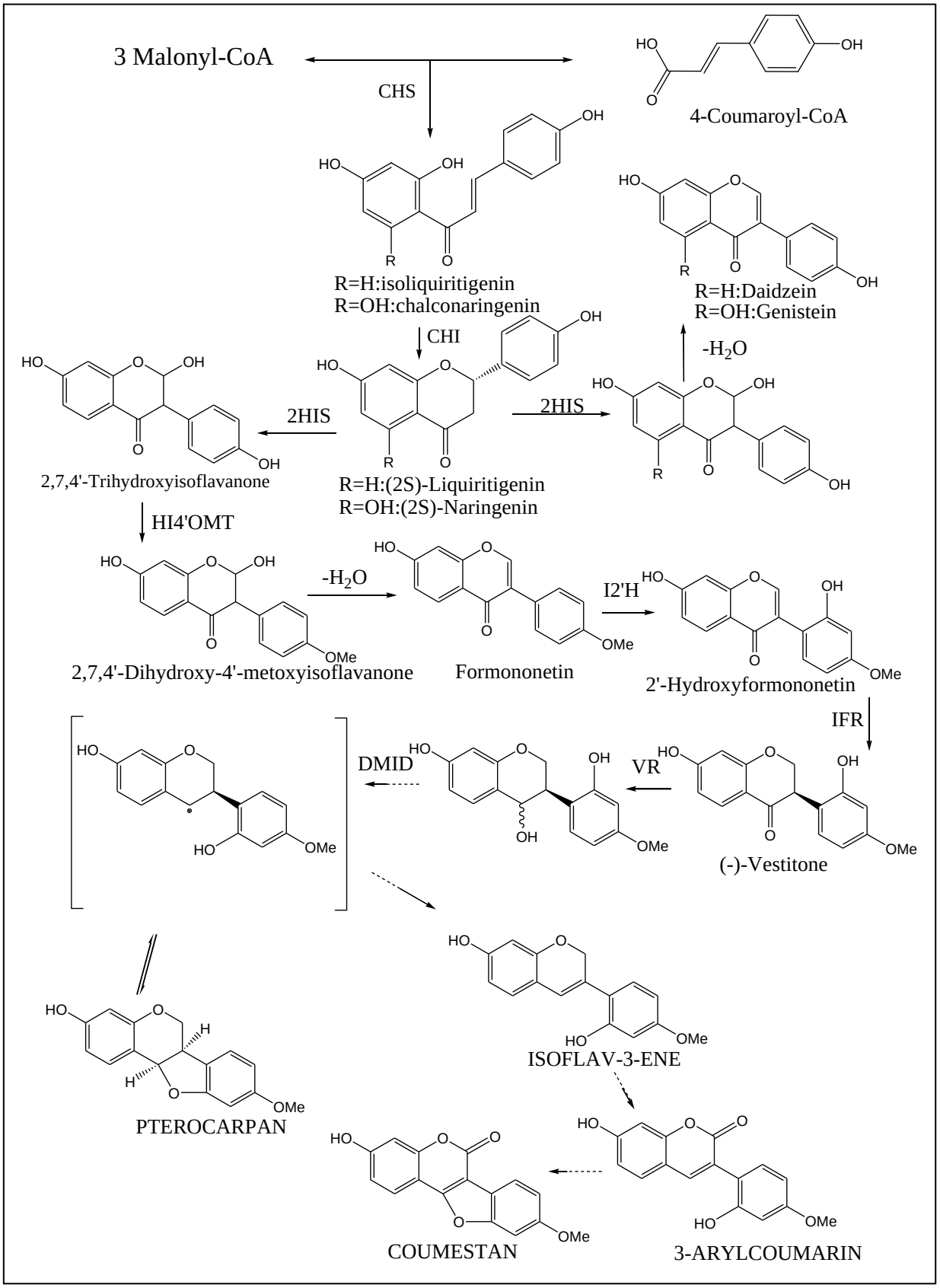
ومن بين 423 إيزوفلافون جديد التي أحصاها Veitch في بحثه، إيزوفلافون واحد فقط لا ينتمي إلى تحت العائلة الفراشية [14].وهذا الغناء الهائل للإيزوفلافونات يعد من الخصائص الكيميائية للعائلة الفراشية .

أ - 2- 5 - 2 - الاصطناع الحيوي للإيزوفلافونات عند البقوليات:

يعتمد الإصطناع الحيوي للإيزوفلافونات عند البقوليات على البشائر الفلافونيدية الأساسية إما chalconaringenin(2',4',6',4-tetrahydroxychalcone أوisoliquiritigenin(2'4'4-trihydroxychalcone النابجة عن إتحاد ثلاث وحدات منmalonyl-CoA و4-coumaroyl بتحفيز من chalcone syntase ليخضع هذا ا لأخير إلى تحوير فراغي نوعي ليعطي الفلافانون(flavanone)بتحفيز من chalcone isomerase(CHI) والذي يمثل أهم الفروع الفلافونيدية، وإعادة الترتيب لهذا الفلافانون بحضور إنزيم2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS) يقود إلى مختلف الهياكل الإيزوفلافونيدية[15,16,17] حسب الشكل (2) وذلك بتحفيز من الإنزيمات المدونة في الجدول (1)

جدول (1) : قائمة الإنزيمات المستخدمة في الاصطناع الحيوي للإيزوفلافونيدات

الرمز	الإنزيم
CHS	Chalcone synthase
CHI	Chalcone isomerase
2HIS	2-hydroxyisoflavanone syntase
HI4'OMT	hydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase
I2'H	Isoflavone2'-hydroxylase
IFR	Isoflavone reductase
VR	Vestitone reductase
DMID	7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase



الشكل (2) : مخطط يوضح الاصطناع الحيوي لمختلف الإيزوفلافونيدات لدى البقوليات

أ - 3 - توزيع الفلافونيدات :

تتوزّع الفلافونيدات عند الطحالب بشكل ضعيف، فهي تتواجد عند الحزازيات والكبديات على شكل إتيروزيدات C أو O فلافون ،كما تتواجد عند مستورات الأزهار الوعائية على شكل ثنائي فلافونيد وبروأونتوسيانيد ول.وعند السرخسيات تكون Hétéroside-O-flavonolsعلى غرار بعضها الآخر الذي يكتفي بتصنيع الشالكونات والبروأونتوسيانيدولات . هذه الأخيرة كثيرة الانتشار عند عاريات البذور كما لوحظ ذلك عند السكاسيات والصنوبريات (باستثناء عائلة Pinaceae) [4].

وعلى عكس ذلك تتواجد الفلافونيدات بشكل واسع عند كاسيات البذور أين يبلغ التنوع النباتي أقصاه [4].

قد لوحظ تواجد بعض أقسام الفلافونيدات في مجموعات نباتية معينة تكون مميزة لها، كالإيزوفلافونات المميزة للعائلة البقولية [17] مما جعل مؤخراً علماء النبات يربطون بين انتشار هذه الجزيئات الفلافونيدية والتصنيف النظامي للنّبات (taxonomic Systèms) [18، 19].

أما على مستوى الخلية تكون الفلافونيدات الإتيروزيدية الذائبة في الماء متمركزة داخل الفجوة وعند الأزهار في خلايا البشرة [4].

أما الفلافونيدات التي تنحلّ في المذيبات غير القطبية، ك الفلافونيدات عديدة الميتوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية [21] حيث تتوضع الفلافونيديات حالة وجودها في صورة أجليكونات على الأنسجة السطحية للأوراق، وتكون ملازمة لمواد مفرزة هي الأخرى ليبوفيلية وهو حال المناطق الجافة وشبه الجافة [4، 21]. وعموما توجد الفلافوني دات بشكل محمي (إتيروزيدات)، بينما تتواجد الأجليكونات في الأنسجة النباتية الميتة (نتيجة التميه الحمضي المحفز بواسطة الإنزيمات) وكذا في خشب الأشجار [20].

أ -4 - الفعالية البيولوجية للفلافونيدات :

أ - 4- 1- الفعالية ضد المكروبية :

منذ قرون و المعقدات ا لغنية بالفلافونيدات تستعمل من طرف الأطباء في شكل ترتيبات شافية مجربة في معالجة الأمراض [22] مثل استعمال النبتة *Tagetes minuta* الحاوية على quercetagetin-7-arabinosyl-galactoside و التي تستعمل بكثرة في الطب الشعبي الأرجنتيني لمعالجة الأمراض المعدية المتعفنة[23]. وكمثال أخر النبتة *Scutellaria baicalensis* التي تستعمل في الصين لمعالجة الدمل و الجروح بطريقة موضعية منتظمة، والتأثير ضد الميكروبي لهذه النبتة راجع بنسبة عالية إلى الفلافونيد Baicalein[25]، كما تعزى الخاصية العلاجية لعكبر النحل المعروفة منذ الأزل والذي يستعمل في الطب اليوناني في علاج القروح إلى غناها بالفلافونيدات خاصة galangin ,pinocembrin [25-28].

أ -4- 1-1- الفعالية ضد البكتيرية:

عمدت الكثير من الأبحاث في تجارب in vitro إلى دراسة الفعالية ضد البكتيرية لمستخلصات الفلافونيدات للنبتات المستعملة في الطب الشعبي، ومن الأجناس المشهورة بهذه الفعالية، نذكر *Hypericum* [29]، *capsella* [30] و*Cromolaena* [30].

حيث إتجهت الأبحاث إلى فصل وتحديد البنى الفلافونيدية المسؤولة عن الفعالية الضد بكتيرية مثل : apigenin[31-39]، galangin [40-42]]، pinocembrin [43,44]، ponciretin [45]، genkwanin [46] Sophoraflavanone G ومشتقاته[47]، naringenin، naringin[48]، epigallocatechin gallate [49] ، luteolin [39]، luteolin7-glucoside [50]، quercetin glycosides [48]، kaemferol [52,51] و flavone glycosides [54,53] ، isoflavones، isoflavanones [55].

في حين إتجهت أبحاث أخرى إلى إضافة الفلافونيدات إلى مركبات معروفة بفاعليتها ضد بعض السلالات البكتيرية مثل Epicatechin gallate [57,56] وSophoraflavanone G [47] فتزيد من فعاليتها [58].كما عمدت أبحاث أخرى إلى إضافة مستبدلات اصطناعية على الفلافونيدات الطبيعية وتحليل مدى فعاليتها المضادة للبكتيرية [59] ومثال ذلك إتجاه Wang وأخرون إلى خلق معقدات بين الفلافونيد 5hydroxy-7,4'-dimethoxy flavone و عدد من المعادن الانتقالية وأثبتو ا أن هذه الطريقة تزيد من الفعالية ضد البكتيرية [60].والبعض الأخر رفع من هذه الفعالية لـــ3-methyleneflavanone بادخال البرومين أو الكلورين على الحلقةB [61].

يوجد فريقي بحث اتجها إلى التحاليل in vivo، ففي بحث Vijayaو Ananthan توصلا إلى أنه بإطعام عن طريق الفم لـــ 142.9mg/kg أو 214.3mg/kg من الـــ Quercetin للفئران من نوع خنزير الهند (guinea pigs) يحميها من البكتيريا *shigella* الممرضة، والتي تقتل الفئران المأخوذة كشاهد أي التي لم تطعم بالـــ Quercetin [62]، وفي 2004 أثبت Dastidar و Co-wokers أن الحقن تحت الجلد لـــ1.58mg/kgمن sophoraisoflavone و3.16mg/kg من 6,8-diprenylgenistein أعطى حماية للفئران(من نوع challenged) ضد *Salmonella typhimurium* [63].

أ - 4 - 1 - 2 - الفعالية ضد الفطرية :

بسبب الإنتشار الواسع لعائلة الفلافونيدات التي تثبط بوغة الإنبات بالنسبة للنباتات المولدة للأمراض، أقترح إستعمالها ضد الأمراض الفطرية المصيبة ل لإنسان [64] الفلافون المفصول لأول مـــرة من النبتـــــة *Eysenhardtia texana* المعـــــروف بـــ 5,7,4'-trihydroxy-8-methyl-6(-3-methyl-[2-butenyl])-(2s)-flavanone. أبدى فعالية ضد المرض الطفيلي الناتج عن الخميرة *candida albicans* [65].الفلافونيـــــد 7-hydroxy-3',4'-(methylenedioxy)flavan المعزول من قشور بذور النبتة *Terminalia bellerica* هو الأخر أبدى فعالية على المرضCalbicams [66].

فعالية عكبر النحل ضد الأمراض الجلدية يرجع ولو بجزء ضئيل إلى المركبات الفلافونيدية التي يحويها بكميات كبيرة مثل اللافونول galangin الذي أظهر فعالية تثبيطية ضد :

Aspergillus tamarii, A.flavus, Cladosporium sphaerospermum, Penicillium digitatum, Penicillium italicum. [67]

أ - 4 - 2 - الفعالية ضد الفيروسات:

بينت بعض الدراسات الدور الذي تلعبه الفلافونيدات في مقاومة الفيروسات إذ اتجهت الأبحاث الجديدة نحو إظهار الفعالية التثبيطية لبعض الفلافونيدات ضد السيدا (HIV)

human immunodeficiency virus فمعظم هذه الأبحاث غارقة في العمل ضد داء HIV-1 الوراثي و أنزيماته إذ تبين الدراسة أن الفلافون baicalin يثبط العمل الدفاعي لـــHIV-1 وكذا انتقال العدوى[68] ،كما تظهر كلا منbaicalin [68] ،hinokiflavone، robustaflavone [69]فعالية تثبيطية على إنزيم النسخ لـــ HIV-1 ويذكر أن الفلافونيدات acacetin, chrysin و apigenin تمنع

نشاط الـــHIV-1 [70] ،ومن الأهمية أن نشير إلى أعمال Hu وآخرون التي تؤكد كو ن chrysin يمتاز بقوة علاجية عالية من أصل 21 فلافونيد طبيعي و 13 مصنع المستعملة ضد HIV-1 [71].

وللفلافونيدات فعالية ضد أنواع أخرى من الفيروسات مثل أبحاث selway التي تثبت أن catechin, ,quercetin,morin,rutin,dihydroquercetin,dihydrofisetin,leucocyanidin, pelargonidin chloride تملك فعالية ضد سبعة أنواع من الفيروسات بما فيها herpes simplex virus(HSV) وفيروس syncytial التنفسي وفيروس الشلل polio وفيروس sindbis [73,72]

بالإضافة إلى المركبين chrysin وkaempferol المفصولين من عكبر النحل والتي تثبط الدور الدفاعي لـــHSV وكذا فيروس crona وrota [74] والأكثر فعالية الفلافونول galangin المعروف بفاعليته ضد الفيروساتHSV وcoxsackie B [75]

تجدر الإشارة إلى أن الدور التأزري بين مختلف الفلافونيدات مثل kaempferol وluteolin يبدي فعالية ضدHSV وهذا ما يفسر الدور الفعال لعكبر النحل مقارنة بمركباته كلا على حدا [76] هذا التعاون محقق أيضا بين الفلافونيدات والعامل المضاد للفيروسات م ثل Quercetin الذي يزيد من فعالية 5-ethyl-2'-dioxyuridine [72]وacyclovir[77]ضد HSVكما يرفع apigenin أيضا من فعالية acyclovir[77] .

أ -4 - 3 - الفعالية المضادة للأكسدة:

تمتاز الفلافونيدات بخواصها المقاومة للتأكسد و يتلخص ذلك في :

- حماية الأنظمة المضادة للأكسدة الداخل خلوية .
- التثبيط الإنزيمي و مخلبة الأثار المعدنية المولدة لـــ ROS (المسؤولة عن إتلاف الأحماض النووية و ظهور الأورام السرطانية كما تتسبب تفاعلاتها المستمرة مع الفوسفولبيد الغشائي في إتلاف الخلية [78]).
- أسر الجذور الأكسجينية النشطة ROS كـــ $NO^{\cdot}$, O^{-}_{2} , $OH^{\cdot}$...ويتوقف هذا على مدى قابلية تحرير البروتونات من طرف الفلافونيد [79]، وعلى العموم يتوقف اصطياد هذه الجذور على الصيغة الكيميائية للفلافونيدات و مستبدلاتها الهيدروكسيلية [80] .

تعتبر الفلافونيدات كعوامل مرجعة قوية وتعمل على تكسير تسلسل التفاعلات الجذر ية نتيجة لبنيتها المستقرة الناتجة عن ظاهرة الرنين الإلكتروني الناشئة عن الحلقات الأروماتية [82,81]، وقد بينت الدراسات أن فعالية الفلافونيدات المضادة للأكسدة متعلقة بعدد وموقع مجاميع الهيدروكسيل

[82] خاصة منها تلك المستبدلة في الموقع 3 للحلقة C [83] و اورثوثنائي هيدروكسي'3',4 للحلقة B، كما تعود مقاومتها للتأكسد لإحتوائها على الرابطة المضاعفة في الحلقة C بين C_3-C_2 المترافقة مع 4-سيتون [82]، وجود OH في الموقع 3 وOH في الموقع 5 بالإتحاد مع مجموعة 4-كربونيل و الرابطة المضاعفة بين C_2-C_3 يزيد من فعالية أسر الجذور الحرة [84].

وفي دراسة لـــ Gwan-sub Sim و أخرون أثبت فيها أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل في البنية الفلافونيدية زادت القدرة على أسر الجذور الحرة ، ففي إختبار للفلافونيدات الحاوية على الرابطة المضاعفة المترافقة مع مجموعة الكربو نيل C-4 في الحلقة C لكل من الفلافونات : Chrysin .Apigenin,Luteolin, و الفلافونولات : Kaempferol, Quercetin, Myricetin

لوحظ عند الفلافونات أن Apigenin وChrysin أبدا فعالية أقل من Luteolin وعند الفلافونولات لوحظ أن Myricetin الحاوية على 6 مجاميع OH أظهر فعالية أكبرمن Quercetin ذو الخمس مجاميع OH وهدا الأخير أكبر من Kaempferol ذو الأربع مجاميع . والجدول (2) يبيّن فعالية بعض المركبات الفلافونيدية [80] .

بالإضافة إلى ذلك كشفت الدراسات على كون الفلافونيدات مضادة لارتفـــاع الضغـــط [85] مضادة للالتهاب [86-88] مضادة للحساسية [89، 90] مضادة للتسرمم الكبدي [78] وذات فعالية ضد الملاريا [91]. كما تستعمل الفلافونيدات لأغراض أخرى ، فنظرا لكون الأنتوسيانوزيدات حساسة للضوء والحرارة وتغير الـــ pH فهي تستعمل في المعلبات كمواد حافظة. وتضاف الفلافونيدات إلى بعض المواد الغذائية كالخمور (30 mg/l anthocyanosides) والمربى، وإلى الحلويات للتنويع في ألوانها والتحسين من طعمها [4]. كما أُثبت وجود بعض الفلافونولات في الشكولاطة [92].

الجدول(2) يوضح الصيغ الكيميائية لبعض المركبات الفعالة بيولوجيا.

المركب	الإستبدال على مواقع الكربون											
	2	3	4	5	6	7	8	2’	3’	4’	5’	6’
Flavones and their glycosides												
Acacetin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OCH_3	-	-
Apigenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Baicalin	-	-	-	OH	OH	OR_1	-	-	-	-	-	-
Baicalein	-	-	-	OH	OH	OH	-	-	-	-	-	-
Chrysin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Luteolin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Luteolin7-glucoside	-	-	-	OH	-	OR_2	-	-	OH	OH	-	-
5-hydroxy-7,4’-dimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	OCH_3	-	-	-	OCH_3	-	-
Isoflavones												
6,8-diprenylgenistein	-	-	-	OH	R_3	OH	R_3	-	-	OH	-	-
Sophoraisoflavone A	-	-	-	OH	-	OH	-	*	*	OH	-	-
Flavonol and their glycosides												
Galangin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Kaempherol	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Myricetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Morin	-	OH	-	-	-	OH	-	OH	-	OH	-	-
Quercetagetin-7arabinosyl-galactoside	-	OH	-	OH	OH	OR_4	-	-	OH	OH	-	-
Quercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Rutin	-	OR_5	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavan-3-ols												
Catechin	-	OH	OH	-	-	OH	-	-	OH	-	OH	-
Epicatechin gallate	-	R_6	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanon-3-ols												
Dihydrofisetin	-	OH	-	-	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Dihydroquercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanones and their glycosides												
Naringenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Naringin	-	-	-	OH	-	OR_5	-	-	-	OH	-	-
Pinocembrin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Sophoraflavanone G	-	-	-	OH	-	OH	R_7	OH	-	OH	-	-
3-Methyleneflavanone	-	CH_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,7,4’-Trihydroxy-8-methyl-6-(3-methyl-[2-butenyl]-(2s)-flavanone	-	-	-	OH	R_3	OH	CH_3	-	-	OH	-	-
Flavan-3,4-diols and anthocyanidins												
Leucocyanidin	-	OH	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Pelargonidin chloride	-	Cl	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Flavan												
7-Hydroxy-3’,4’-(methylenedioxy)flavan	-	-	-	-	-	OH	-	-	#	#	-	-

-:no substitution; R_1:Glucuronic acid; R_2:Glucose; R_3:prenyl group; R_4:arabinose-galactose; R_5:rhamnose-glucose; R_6:gallic acid; R_7: lavandulyl; *:pyran ring between position 2’and3’; #:O-CH_2-O between positions 3’and 4’.

I_ب_الدراسة الكيميائية للفلافونيدات :

ب_1_الاستخلاص :

قبل الشروع في عملية الاستخلاص يشترط تجفيف النبتة جيدا في أماكن خاصة تسمح بالتهوية وبعيدا عن أشعة الشمس والرطوبة، تفاديا للتفاعلات الإنزيمية التي قد تحدث تغيرات على المركبات المستخلصة . وفي هذا النوع من المركبات الفينولية يستحب الاستخلاص بمحاليل كحولية، كالميثانول والإيثانول مع إضافة الماء بنسب 20 إلى 50% [1، 4، 93] بعد التركيز والتخلص من الكحول المستعمل، يعمد إلى استخلاص انتقائي من نوع سائل /سائل، باستعمال مجموعة من المذيبات كإيثر البترول لنزع الكلوروفيل والليبيدات، وثنائي إثيل إيثر (diethyl ether) لاستخلاص الأجليكونات الحرة [4] وأكثر المذيبات استعمالا أسيتات الإثيل (AcOEt) لاستخلاص الأجليكونات عديدات الهيدروكسيل والجليكوزيدات أحادية السكر كما يستعمل البيوتانول العادل (n-BuOH) في استخلاص الجليكوزيدات عديدة السكر.

ب_2_الفصل والتنقية :

يعتمد على التقنيات الكروماتوغرافية بمختلف أنواعها في فصل وتنقية المركبات الفلافونيدية، فتعتبر كروماتوغرافيا العمود الطريقة الأنجع في فصل الكميات الكثيرة والأكثر تعقيدا، إذ تعتمد هذه الطريقة على الأطوار الثابتة : السليكاجل (Silicagel) والسليلوز(Cellulose) ومتعدد الأميد، SC_6 (Polyamide, eg. Machry Nagel) الذي يعتبر الأفضل لكونه مناسبا لفصل جميع المركبات الفلافونيدية خاصة الجليكوزيدية منها وذلك لاحتوائه على الوظيفة الأميدية السامحة بتشكيل روابط هيدروجينية قوية مع المجاميع (OH) الهيدروكسيلية [94]، وتعتبر كروماتوغرافيا الورق التحضيرية (PC) الطريقة الأفضل في تحليل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي، ومن أشهر المذيبات المستخدمة في هذه التقنية نجد :

S_1 : حمض الخل CH_3-COOH بتراكيز مختلفة.

S_2 : البيوتانول النظامي : حمض الخل : الماء (W:A:B) (4 : 1 : 5) (الطبقة العضوية).

بالإضافة إلى هذه الطرق يستعان أيضا بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ذات دعامة متعدد الأميد (DC_6)، ومن أشهر الجمل المستخدمة في هذه التقنية نجد :

S_3 : 13.3.3.1 (أستيل استون ـ مثيل إيثيل سيتون ـ ميثانول ـ ماء).

S_4 : 4.3.3 (مثيل إيثيل سيتون ـ ميثانول ـ طولوين).

S_5 : 18.1.1 (ماء ـ حمض الخل ـ ميثانول).

S_6 : 60.28.7.7 (مثيل إيثيل سيتون ـ ميثانول ـ إيثير البترول ـ طولوين).

يتم تنقية المركبات المفصولة بالاستعانة بعمود صغير من متعدد الأميد (SC_6) باستعمال طوليان كمذيب وإغنائه بالقليل من الميثانول، ثم عمود من Séphadex LH 20 باستخدام الميثانول كمملص.

ب ـ 3 ـ التعيين البنيوي للفلافونيدات :

ب-3-1-ثابت الانحباس :

Rf هو قيمة مميزة للمركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، طبيعة المادة الدامصة، والمملص). وتتأثر هذه القيمة بالمستبدلات ومواقعها على الجزئي . فمن خلال Rf يمكن التمييز بين الجليكوزيدات أحادية، ثنائية، متعددة السكر [94] وبين الأجليكونات البسيطة، ومتعددة الهيدروكسيل أو متعددة الميتوكسيل.

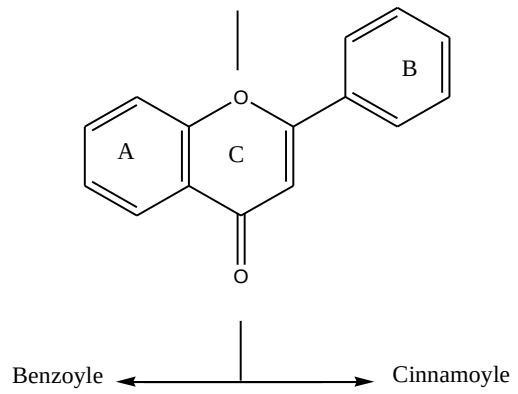
كما أن لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) يعطي معلومات أولية عن البنية الكيميائية للمركب.

ب-3-2-مطيافية الاشعة فوق البنفسجية (UV) :

تعتبر مطيافية الأشعة فوق البنفسجية من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على البنى الكيميائية للفلافونيدات، نظرا للمعلومات الوافية التي تقدمها ولكونها لا تتطلب كم ية كبيرة من المركب.

ب-3-2-1-طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي :

يعطي طيف الفلافونيدات الحاوية على مجموعة كربونيل في C_4 (فلافون، فلافونول)، عصابتين I و II [95] تبعا للشكل الموالي :



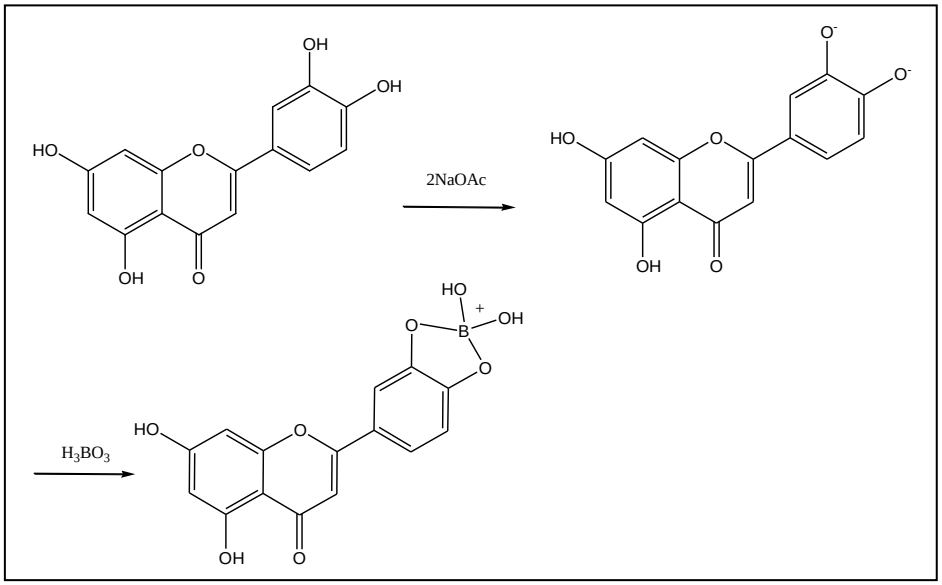
العصابة I : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (300-400 nm)، و هي راجعة إلى امتصاص الصورة Cinnamoyle الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل C_4 مع الرابطة الثنائية والحلقة B. إذ تسمح بتمييز الفلافونول عن الفلافون وتعطي معلومات عن التغيرات البنيوية للحلقتين B و C [95].

العصابة II : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (250-280 nm)، و هي ناتجة عن الشكل Benzoyle الناجم عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة العطرية A. وهذا ما يمكننا من الكشف عن الهياكل الفلافونيدية المختلفة.

يعتمد مكان الحزمتين على عدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فمن الملاحظ أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل، فإن حز مة الامتصاص تزداد إلى طول موجي أعلى "انزياح باتوكرومي". وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميتوكسيل، أو وحدات سكر تزاح حزمتا الامتصاص إلى طول موجي أقل "انزياح هيبسوكرومي" [2].

ب-3-2-2-طيف الامتصاص في وجود الكواشف :

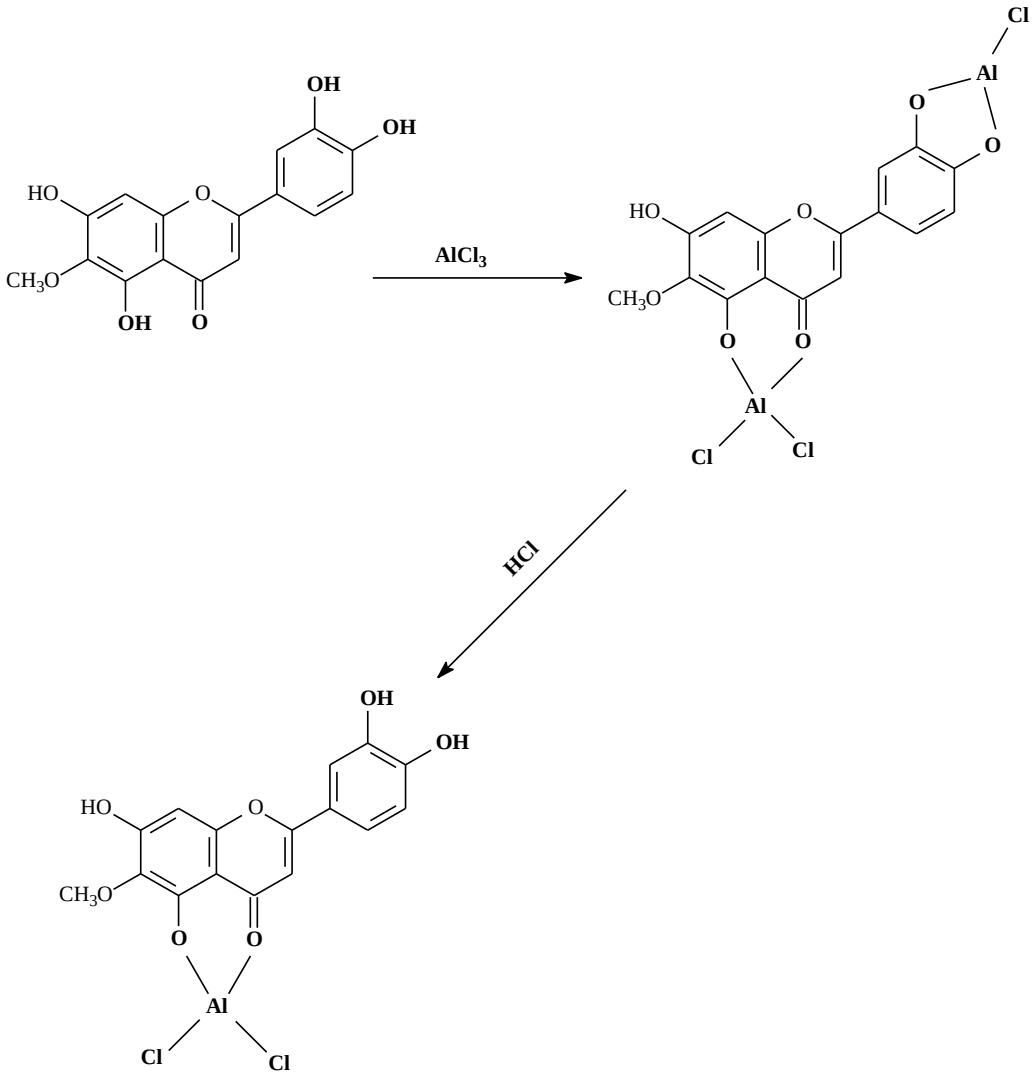
* في وجود NaOH (NaOMe) : NaOH قاعدة قوية تؤين كل هيدروكسيلات الفلافونويد إذ تُحْدِث انزياح Bathocrome للطيف يكون واضحا على الحزمة I.
* في وجود NaOAc : NaOAc أساس ضعيف مقارنة بـــ NaOH فهي تؤين فقط الهيدروكسيلات الأكثر حامضية C_7، C_3، C_4'، ويعتبر NaOAc كاشفا نوعيا لهيدروكسيل C_7.
* في وجود $NaOAc+H_3BO_3$: يستعمل هذا المحلول للكشف عن أورثو ثنائي الهيدروكسيل، إذ يشكل حمض البوريك في وجود خلات الصوديوم معقدات مع الهيدروكسيلات الفينولية في الموضع أورثو حسب الشكل (3).



الشكل (3) : يوضح المعقد المتكوّن بين الفلافونويد ومحلول ($NaOAc+H_3BO_3$)

* في وجود $AlCl_3$، $AlCl_3+HCl$: يشكل كلوريد الألومنيوم معقدات ثابتة في الوسط الحمضي مع مجموعة الكربونيل، وهيدروكسيلات المواقع 3 أو 5، ومعقدات غير ثابتة مع جملة أورثو ثنائي الهيدروكسيل مثل 3'، 4' كما هو موضح في الشكل (4).

والجدول (3) يبيّن أهم الانزياحات الملاحظة بإضافة مجموعة من المتفاعلات على الحزمتين I وII [94، 96، 97].



الشكل (4) : المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$

قبل وبعد إضافة HCl

الطريقة العملية: لتسجيل أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمركب فلافونيدي، يتم قياس وتسجيل الطيف الميثانولي لكل مرحلة.

المرحلة 1 : بعد تسجيل طيف الإمتصاص في الميثانول يضاف لخلية المركب قطرات من NaOH بتركيز 0.5 عياري ثم يسجل الطيف مباشرة، وبعد مرور5 دقائق يعاد تسجيل نفس الطيف.

المرحلة 2 : يعاد تحضير الخلية الحاوية على المركب، ويضاف إليه ا بعض القطرات من $AlCl_3$ بتركيز1٪ في الميثانول، ثم يسجل طيف الإمتصاص بعدها تضاف قطرات من HCl (4 عياري) ثم يسجل الطيف .

المرحلة 3: تحضر خلية جديدة للمركب المدروس ويضاف لها NaOAc (الصلب) حتى التشبع ثم يسجل الطيف، لتضاف بعدها إلى نفس الخلية قطرات من حمض البوريك H_3BO_3 المحضر في الماء بتركيز1٪ ثم يسجل طيف الإمتصاص.

الجدول (3) : يوضح أهم الانزياحات الملاحظة بإضافةمجموعة من المتفاعلات

المفاعلات	الإزاحة الملاحظة بـــ (nm)		التحليل الموجه
	الحزمة I	الحزمة II	
MeOH	350 ـ 304	280 ـ 250	***فلافون***
	385 ـ 352	280 ـ 250	فلافونول
	357 ـ 328	280 ـ 250	OR في الموضع 3
	320^{Ep}	275 ـ 245	إيزوفلافون
NaOMe (NaOH)	+45 إلى +65 1 ـ استقرار الشدة الضوئية/MeOH 2 ـ نقصان الشدة الضوئية/MeOH		OH في 4' OR في 4'، OH في 3
	استمرار النقص في الشدة الضوئية، طيف يتحلل مع الوقت		OH في 3، 4' أو Orthodi-OH على الحلقة A مثلاً 7، 6 أو 8، 7 أو Orthodi-OH على الحلقة B
	استمرار النقص في شدة الامتصاص مع تفكك سريع للطيف		Tri OH 3'، 4'، 3 أو Tetra OH في 3، 3'، 4'، 5'
	عصابة جديدة بين 320 ـ 335		OH في 7
NaOAc		+5 إلى +20	OH في 7 مع ملاحظة أن هذا الانزياح يتراجع في وجود مستبدلات 6 أو 8
		عدم وجود أي انزياح أو ظهور انزياح ضعيف	OR في 7
		طيف يتفكك بمرور الزمن	Di OH في 7، 6 أو 8، 7 أو 4، 3 Tri OH في 7، 6، 5 أو 8، 7، 5 أو 4'، 3'، 3
NaOAc + H_3BO_3	+12 إلى +36		Orthodi OH على الحلقة B
MeOH/ NaOAc + H_3BO_3		+10 - 15	Orthodi OH على الحلقة A (6-7 أو 7-8) إيزوفلافون
$AlCl_3$	قمة وحيدة عند 420 ـ 430		Orthodi OH على الحلقة B (فلافون) مع OH في 5
	قمة وحيدة عند 440 ـ 460		Orthodi OH على الحلقة B (فلافونول) مع OH في 5

تابع للجدول (3)

المفاعلات	الإزاحة الملاحظة بـــ (nm)		التحليل الموجه
	الحزمة I	الحزمة II	
MeOH/ $AlCl_3$ +HCl	+17 إلى +20		5-OH مع مجموعة أكسجينية في 6
	+35 إلى +55		OH في 5 فلافون و OCH_3 في 3 فلافون
	+50 إلى +60		OH في 3 مع أو عدم وجود OH في 5
		+10-14	OH في 5 إيزوفلافون
$AlCl_3$/ ($AlCl_3$+HCl)	-20 إلى -40 مع نتوء أو قمة من [350 ـ 360]		Orthodi OH على الحلقة B
	-20 إلى -25		إمكانية وجود Orthodi OH على الحلقة A أكثر من Orthodi OH على الحلقة B أو Tri OH على الحلقة B

(+) : باتوكروم ؛ (−) : هبسوكروم ؛ / : بالنسبة Ep: نتوء

ب ـ 3 ـ 3 ـ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H N.M. R :

يعتمد التحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي على الخواص المغناطيسية لأنوية بعض الذرات مثل الهيدروجين H^1، الكربون C^{13}، الفلورF^{19}، الفوسفورP^{31}. ويمثل ^1H N.M.R حوالي 80٪ من دراسات الرنين النوو ي المغناطيسي وذلك لما لهذه الأنوية من خواص مغناطيسية قوية وإنتشار واسع في الطبيعة.

ففي الرنين النووي المغناطيسي للبروتون توضع الجزيئات تحت تأثير مجال مغناطيسي خارجي ،فيحدث انفصال لمستويات الطاقة الفردي الخاص بالحركة المغزلية لأنوية ذرات الهيدروجين إلى مستويين، ويزداد الفرق في الطاقة (δE) بين هذه المستويات بزيادة شدة المجال المغناطيسي الخارجي ،كما أن هذا الفرق في الطاقة لكل نوع من أنوية الهيدروجين يتوقف على الظروف الإلكترونية المحيطة بكل نواة والتي تحدد بنوع الرابطة ونوع الذرات الأخرى المرتبطة بهذه النواة، فأنوية ذرات الهيدروجين تمتص طاقة الأشعة الكهرومغناطيسية على ترددات مختلفة وهو ما يعبر عنه بالإنتقال

الكيميائي (δ)، فتظهر عدة إمتصاصات يتوقف عددها على عدد أنوية الهيدروجين المختلفة في الجزيئ .

كثافة الإمتصاص لكل نوع من الهيدروجين تتناسب مع عدد الذرات الموجود ة في هذا النوع . و بالتالي يمكن تحديد العدد النسبي لذرات الهيدروجين في الجزيئ وكذا عددها في كل مجموعة .

يلاحظ أيضا حدوث إنقسامات داخلية في كل إمتصاص رئيسي ويتوقف عدد هذه الانقسامات على عدد ذرات الهيدروجين المجاورة، والفرق في الطاقة بين هذه الانقسامات بوحدة التردد يسمى ثابت التزاج(*J*) [98].

تستعمـــل هذه التقنيـــة في التحليل الكيفي للفلافونيدات لمعرفة درجة تأكسد الحلقـــات A، B، C ، وكذا عدد ومواقع المجموعات الميتوكسيلية وعدد وطبيعة السكريات الموجودة في المركب. ولتحقيق هذه التقنية تستخدم الكثير من المذيبات أشهره ا : $CDCl_3$ ديوتروكلوروفورم الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونيدات غير القطبية، و $DMSO\text{-}d_6$ (Hexadeuterodimethyl sulfoxide) الذي يستخدم في حالة الفلافونيدات الجليكوزيدية خاصة وكذا الأجليكونات [2، 99]، تظهر بروتونات الفلافونيدات في المجال (0-9 ppm)، وتوزع في مجمو عات محددة، وفيما يلي جداول (4-6) تبيّن الانزياح الكيميائي لمختلف بروتونات الحلقتين A، B [96، 100].

الجدول (4) : الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A

نوع الفلافونيد	**H-5**	**H-6**	**H-7**	***H-8***
5,7-OH	-	d(*J*=2.5 Hz) 6.2 –6.0 ppm	-	d(*J* =2.5 Hz) 6.5 –6.3 ppm
5-OH,7-OR (R=Glc)	-	d(*J* =2.5 Hz) 6.1 –5.9 ppm	-	d(*J* =2.5 Hz) 6.4 –6.1 ppm
5,6,7-OR (R=H, Glc)	-	-	-	6.3 ppm (S)
5,7,8-OR (R=Glc,H)	-	6.3 ppm (S)	-	-
7-OR (R=H, Glc)	d(*J* =9 Hz) 8,0 ppm	d,d(9 Hz, 2.5 Hz) 7.1 –6.7 ppm	-	d(*J* =2.5 Hz) 7 –6.7 ppm

الجدول (5) : الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B في حالة C_4' = OR

H-6' , H2' d(J = 8.5 Hz)	H-5' , H3' d(J = 8.5 Hz)	الفلافونيد
7.,9 – 7.7 ppm	7.1 – 6.5 ppm	فلافون
8.1 – 7.9 ppm	7.1 – 6.5 ppm	فلافونول

الجدول (6) : الإزاحة الكيميائية للبروتونات 2'، 6' للحلقة B

H-6' dd(J= 8.5; 2.5 Hz)	H2' d(J = 2.5 Hz)	نوع الفلافونيد
7.5 – 7.3 ppm	7,3 - 7,2 ppm	Flavone (3',4' OH; 3' OMe, 4' OH; 3'-OH, 4' OMe)
7.9 – 7.6 ppm	7,7 - 7,5 ppm	Flavonol (3',4' OH; 2'-OH, 4' OMe)
7.6 – 7.4 ppm	7,8 - 7,6 ppm	Flavonol (3',4' OH; 3' OMe, 4'-OH)

بروتونات الحلقة C :

يتأثر بروتون C_3 في الفلافون بمستبدلات كلتا الحلقتين العطريتين، ويعطي إشارة أحادية في المنطقة (6.2-6.4 ppm) تتداخل مع إشارة برتوني الحلقة A(H8, H6) [100].

يعطي بروتون C_2 في الإيزوفلافون إشارة أحادية حادة في حدود 8-8.5 ppm [100].

بروتونات الميتوكسيل :

تظهر بروتونات الميتوكسيل في المجال 3.8-4.5 ppm [100].

بروتونات السكريات :

يمكن التعرف على نوع السكر من خلال بروتونه الأنوميري، ذو انزياح كيميائي يعتمد أساسا على طبيعة الفلافونيد وموقع ونوع الرابطة بين السكر والأجليكون، والجدول (7) يعطي قيم الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري "H_1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر.

الجدول (7) : يبيّن قيم الانزياح الكيميائي لـــ "H_1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر

δ "H_1 ppm	الفلافونيد
5.2 – 4.8	7-O-glucosyl flavonol
6.0 – 5.7	3-O-glucosyl flavonol
5.3 – 5.1	7-O-rhamnosyl flavonol
5.1 – 5.0	3-O-rhamnosyl flavonol

يمكن التعرف على نوع الرابطة α أو β بين السكر والأجليكون من خلال ثابت الاقتران لـــ "H_1"، "H_2" حيث يمتاز الجليكوز بالرابطة β ويظهر "H_1" بإشارة ثنائية بثابت تزاوج (J=7 Hz) ناتج عن تزاوج ثنائي محور ي (diaxial) مع "H_2". كما يمتاز الرامنوز برابطة قـــد تكون α بإشـــارة ثنائية لـــ "H_1" بثابت تزاوج (J=2 Hz) نتيجة الاقتران استوائي-استوائي. [96].

ب-3-4-مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C N.M. R :

نظرا لإنخفاض طاقة الامتصاص للكربون 13 بالإضافة إلى نسبة وجوده في الطبيعة 1.1٪ فإن كثافة الإمتصاص الناتج عن ^{13}C تكون حولي 0.01٪ بالنسبة لإمتصاص البروتون، لذلك فإن معظم التقديرات الخاصة بـــ^{13}C تجري باستخدام FTNMR(Fourier Transformation NMR) للتغلب على الحساسية المنخفضة للكربون، ومن ناحية أخرى فإنه لا يحدث ازدواج بين ذرة الكربون ^{13}C و ^{12}C أخرى لأن احتمال وجود ذرتي كربون 13 متجاورتين ضعيف جدا حوالي 1 لكل10^4 ذرة ،لكن في نفس الوقت يحدث إزدواج بين ^{13}C و ذرات الهيدروجين المجاورة، وقد يصل مدى الإزدواج ليشمل أربع روابط كيميائية، فيكون الطيف المتحصل عليه معقدا للغاية. وللتغلب على هذا الازدواج تستخدم طريقة إزالة الازدواج Sping decoupling و ذلك بإشعاع العينة بحزم من أشعة الراديو، تحتوي على جميع الترددات الخاصة بأنوية البروتونات في العينة .

وتحت هذه الظروف فإن طيف الرنين النووي المغناطيسي لـــ^{13}C يظهر في صورة إمتصصات فردية ،ويعبر كل امتصاص عن ذرة كربون واحدة في ظروف إلكترونية معينة.

وباستخدام هذه التقنية يمكن الحصول على صورة واضحة عن الهيكل الكربوني العام للجزيئ، كما يمكن الكشف عن بعض المجموعات الكيميائية مثل $C=O$, OCH_3 ,$C=NR$ وغيرها [98].

ب-3-5-مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد:

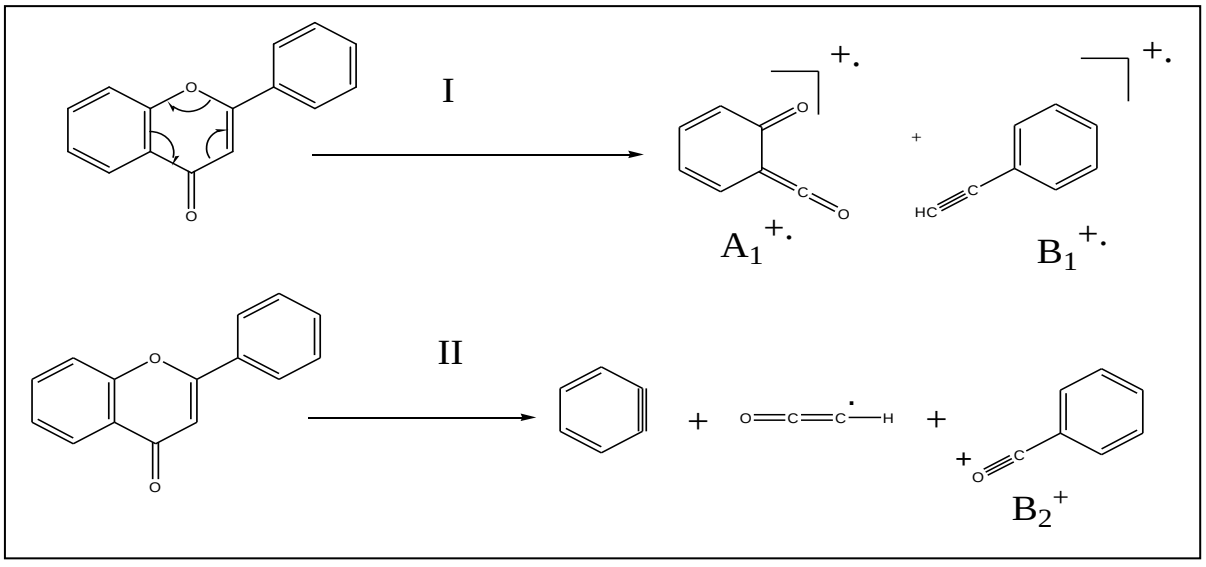
قد تعجز كل من مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون N.M.R ^1H وللكربون N.M.R ^{13}C على تحديد موضع الإستبدال بالدقة اللازمة فنلجئ إلى مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد، التي تعطي تعلقات بين:

- أنويه متجانسة مثل Cosy ^1H-^1H والتي تظهر نقاط تعلق بين البروتونات المتزاوجة فيما بينها أي المفصولة برابطتين أو ثلاث J^2,J^3 .

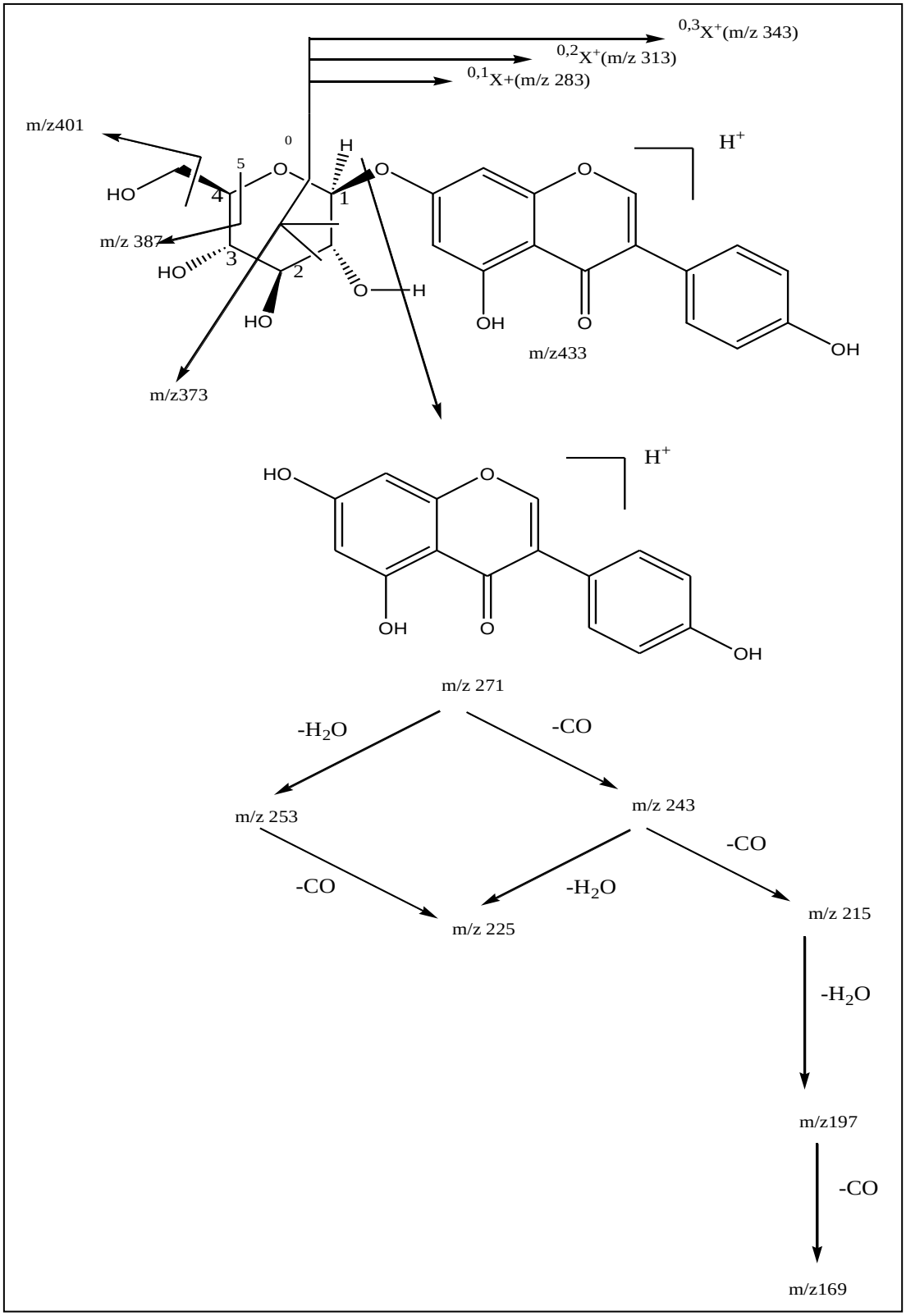
- أنوية غير متجانسة مثل HSQC والتي تعطي نقاط تعلق بين كل بروتون و الكربون الحامل له، ولكن هذه الأخيرة لا تسمح بمعرفة الكربونات الرباعية . فتستعمل تقنية HMBC التي تعطي تعلقات بعيدة المدى تصل إلى الكربونات الرباعية، فيتم تحديدها[98].

ب ـ **3 ـ 6 ـ مطيافية الكتلة** : تقدم مطيافية الكتلة خدمة واسعة للتعرف على البنى الفلافونيدية ،خاصة كونها لا تتطلب كمية كبيرة من المركب إذ يكفي جزء من ملغ، فمن خلالها يمكن معرفة الوزن الجزيئي وبالتالي معرفة الصيغة المجملة للمركب الذي يبين نوعية المستبدلات ميتوكسيلية كانت أو هيدروكسيلية، كما تمكن قيم الشظايا من معرفة توزع هذه المستبدلات على الحلقتين A وB .وتعتمد هذه التقنية على عدة طرق أهمها: طريقة القذف الإلكتروني (IE) [101] التي تكون صالحة خاصة مع الأجليكونات . فالشكل(5) يوضح الإنشطارات الواقعة على الحلقة C عبر الطريقين I وII.

مع تطور مطيافية الكتلة ظهرت تقنيات جديدة، كتقنية الإلكتروسبراي Electro-spry، وتقنية القذف بالذرات المسرعة FAB، والتي تتميز بتأيّن المركبات السهلة الانكسار بالحرارة دون تسخين، كالجليكوزيدات مما يسمح بشباتها ودراستها [102، 103]، وتؤدي هاتان التقنيتان إلى تكوين أيونات شبه جزئية مثل $(M+Na)^+$، $(M+Ca)^+$، $(M+H)^+$، $(M-H)^-$ ....فالشكل(6) يوضح تقنية تشضية المركب genistein 7-*O*-β-D-glucose بإستعمال طريقة (Es^+) [104]



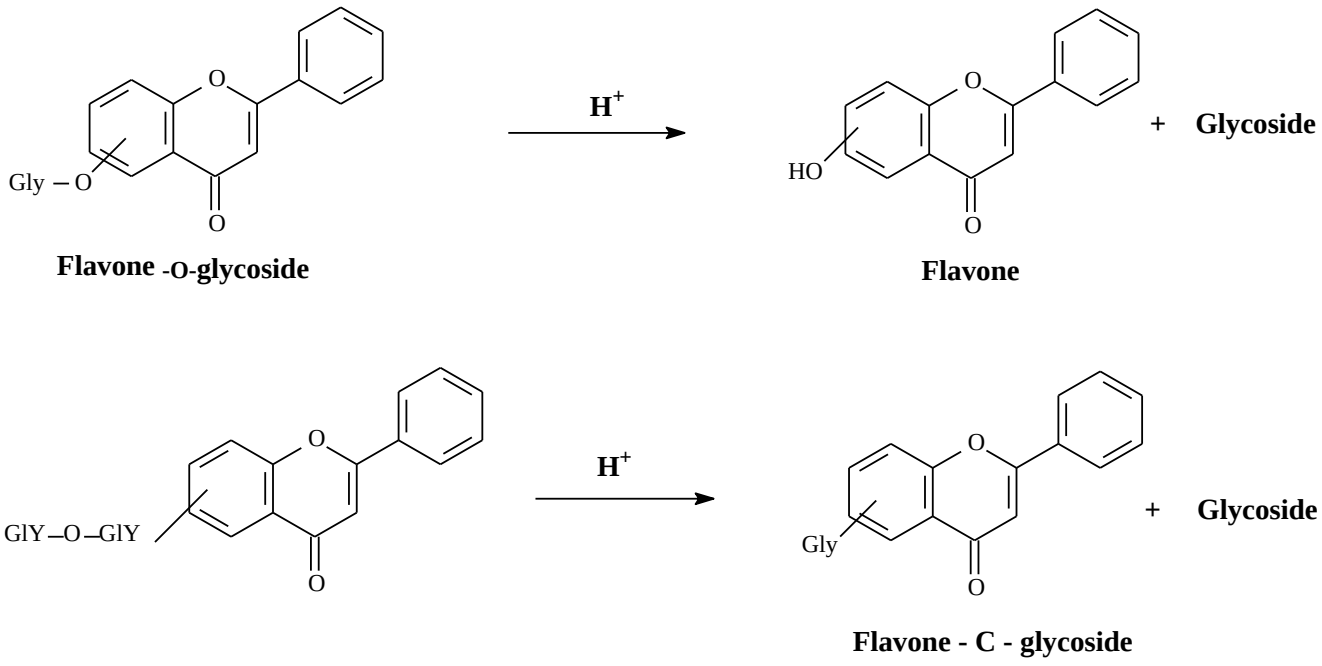
الشكل(5): الإنشطارات الواقعة على الحلقة C عبر الطريقين I وII.



الشكل (6) : أهم الانشطارات الملاحظة على genistein 7-*O*-*β*-D-glucoside

ب_3_7_الإماهة الحمضية :

بالإضافة إلى التقنيات السابقة يمكن الاستعانة بالتميّه الحمضي للتع رف على عدد ونوع السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية إذ تعمل هذه التقنية على تحطيم الرابطة (كربون_ أكسجين) الجامعة بين السكر والأجليكون . والشكل (7) يبيّن الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية في حالة O– جليكوزيل و C– جليكوزيل [105].



الشكل (7) : الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية

تتم عملية التميه الحمضي في أنبوب اختبار بأخذ كمية قليلة من الجليكوزيد مذاب في حوالي (1 مل) من الميثانول ويضاف له (1 مل) من حمض كلور الماء HCl (4N) ثم يسخن في حمام مائي 100 م° لمدة 15 إلى 120 دقيقة.

بعد تبريد الأنبـــوب يعمـــد إلى استخلاص من نوع سائل /سائل بدءًا بإيثر الإيثيـــل (éthylic ether) بعد الرج الجيد يترك الأنبوب للراحة لتفصل بعدها الطبقة العضوية عن المائية، تكرر العملية مرة أخرى مع أسيتات الإيثيل (éthyl acétate) ثم البيوتانول العادي (n-butanol).

تركـــز الطبقة العضوية الحاوية علـــى الأجليكون الذي يمكن التعرف عليه بتسجيل طيف (UV) وكذا بإجراء كروماتوغرافي (TLC) مع شواهد أجليكونية، أما الجزء السكري من الجليكوزيد فيبقى مذابًا في الطبقة المائية التي يتم تجفيفها ثم يعاد غسلها بالماء لتجفف من جديد تكرر هذه العملية عدة مرات للتخلّص من HCl وأخيرا تغسل بالميثانول للتخلص من أثار الطبقة العضوية ثم يعاد إذابتها في الماء لتكون جاهزة للتحليل، وللتعرف على نوع السكر المنفصل يعمد إلى تحضير ألواح كروماتوغرافية من silica gel $60F_{254}$ ترش بمحلول NaH_2PO_4 (0,2M) تترك لتجف في الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100 م° لمدة ساعة كاملة.

بعدها توضع نقطة من الطبقة المائية الحاوية على الجزء السكري بالموازاة مع بعض الشواهد السكرية المعروفة، يغمس اللوح الكروماتوغرافي في المملص : أستون : ماء (90 : 10)، بعد هجرة البقع السكرية يستخرج اللوح الكروماتوغرافي ليجف في الهواء لمدة ساعة بعدها يرش بكاشف مالونات الأنيلين ويسخن عند 100° لمدة 5 دقائق حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور بلون داكن وتأخذ اللون الأصفر تحت (UV). والجدول (8) يبيّن قيم Rf لبعض السكريات الشائعة [94].

الجدول (8) : قيم Rf لبعض السكريات الشائعة

السكريات الشواهد	Rf
α(L) rhamnose	0,88
D(+)-xylose	0,79
L(+) arabinose	0,66
b-D(+) glucose	0,53
D(+) galactose	0,33

المراجع

[1] Ribereau-Gayou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetals, Dundo, Paris.
[2] El hazimi, H. (1995). Natural product, 149-190.
[3] Guignard, J.L., Cosson, L., henzy, M.J. (1985). Abrégé de phytochimie, Paris, New york, Barcelone.
[4] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, ed. 3, lavoisier, Paris.
[5] Eyton, W.B., Ollis, W.D., Sutherland, I.O., Gottlieb, O.R., Tavira Magalhaes, M. (1965). Proc. Tetrahedron, 21, 2683.
[6] Reinsch,H., Repert. (1842). Pharm. 26, 12-31. Reinsch, H., Repert. (1842). Pharm. 28, 18-25.
[7] Andersen, M.Ø. (2006). In Flavonoids, chemistry, Biochemistry and Application, Andersen, M.Ø. and Markham,K. RCRC Press, Boca raton, pp.1129-1197.
[8] De Laire, G., Tiemann, F. (1893). Iridin, the glucoside of the iris root, J. Am. Chem. Soc. 15, 400-411.
[9] Lapčĭk, O. (2007). Isoflavonoids in non-leguminous taxa:Ararity or a rule?, Phytochemistry, 68, 2909-2916.
[10] Ingham, J.L. (1983). Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 43, 1–266.
[11] Ilyas, M., Parveen, M. and Khan, M.S. (1994). J. Chem. Res. (M), 601–617.
[12] Shafiullah, P. M., Kamil, M. and Ilyas, M. (1995). Fitoterapia, 66, 439–441.
[13] Veitch N.C. (2007). Isoflavonoids of the leguminosae, Nat. Prod. Rep. 24, 417-464.
[14] Dixon, R.A. (1999). In Comprehensive Natural Products Chemistry, ed. Barton, D., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, Elsevier, O. Amsterdam, vol. 1, pp.773–823 .
[15] Aoki, T., Akashi, T. and Ayabe, S.I. (2000) J. Plant Res. 113, 475–488.
[16] Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999). Trends Plant , Sci. 4, 394–400.
[17] Mann, J. (1987). Secondary metabolisme, ed. 2, Clarendon press, Oxford.
[18] Cronquist, A. (1988). Anintegrated System of Classification of Flawring Plants, 2nd ed. New york, Botanical Garden.
[19] Thorme, R.F. (1992). Classification and Geography of Flawring Plants, Bot. Rev. 58, 225-348.
[20] Harbone, J.B. (1973). In Phytochemstry, Lowrence, P.L.ed. vol. 2.
[21] Wollenweber, E. and Dietz, V.H. (1980). Biochem. Syst. Eco. 8,21.
[22] Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem .Pharmacol, 32, 1141–1148.
[23] Tereschuk, M.L., Riera, M.V., Castro, G.R.and Abdala, L.R. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*, J. Ethnopharmacol , 56, 227–232.
[24] Tsao, T.F., Newman, M.G., Kwok, Y.Y. and Horikoshi ,A.K. (1982). Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria, J. Dent. Res. 61, 1103–1106.
[25] Grange, J.M.and Davey, R.W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). J. R. Soc. Med. 83, 159–160.
[26] Bosio, K. Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino , O. and Savoia, D. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*, Lett. Appl. Microbiol, 31, 174–177.

[27] Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K. and Abd Allah, F.A. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis, Z. Naturforsch, 55, 70–75.
[28] Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I. and Maysinger, D. (1982). Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts, Pharmazie, 37, 864–865.
[29] Dall'Agnol, R., Ferraz, A. and Bernardi, A.P. et al. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species, Phytomedicine, 10, 511–516.
[30] El-Abyad, M.S., Morsi, N.M., Zaki, D.A.and Shaaban, M.T. (1990). Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity, Microbios, 62, 47–57.
[31] Khanna, P., Sharma, O.P. and Sehgal, M. et al. (1980). Antimicrobial principles from tissue culture of some plant species, Indian, J. Pharm .Sci. 42, 113–117.
[32] Palacios, P., Gutkind, G., Rondina, R.V. De torres, R. and Coussio, J.D. (1983).Genus *Baccharis*, II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notosergila*, Planta, Med. 49, 128.
[33] Oksuz, S., Ayyildiz, H. and Johansson ,C. (1984). 6-Methoxylated and *C*-glycosyl flavonoids from *Centaurea* species, J. Nat. Prod. 47,902–903.
[34] Ohemeng, K.A., Schwender, C.F., Fu, K.P. and Barrett, J.F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1), Bioorg. Med. Chem. Lett .3, 225–230.
[35] Bashir , A.K., Abdalla ,A.A., Wasfi, I.A., Hassan, E.S., Amiri, M.H. and Crabb, T.A. (1994). Flavonoids of *Limonium axillare*, Int. J .Pharmacogn. 32, 366–372.
[36] Aljancic ,I. Vajs, V.and Menkovic, N. et al. (1999). Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *Multifida*, antimicrobial activity, J. Nat. Prod. 62, 909–911.
[37] Basile, A., Giordano, S., Lopez-Saez, J.A. and Cobianchi, R.C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses, Phytochemistry, 52, 1479–1482.
[38] Basile, A., Sorbo, S. and Giordano, S. et al. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves, Fitoterapia,71, 110–116.
[39] Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata ,H.and Higuti, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Ethnopharmacol. 72, 483–488.
[40] Afolayan, A.J. and Meyer, J.J. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*, J. Ethnopharmacol. 57, 177–181.
[41] Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K. and Fukushima, M. (1987). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium, Agric. Biol .Chem. 51, 139–143.
[42] Pepeljnjak, S. and Kosalec, I.(2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria, MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*, FEMS Microbiol, Lett. 240, 111–116.
[43] Fukui, H., Goto, K. and Tabata, M. (1988). Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 36, 4174–4176.
[44] Hufford, C.D. and Lasswell, W.L. (1978). Antimicrobial activities of constituents of *Uvaria chamae*, Lloydia. 41, 156–160.
[45] Bae, E.A., Han, M.J. and Kim, D.H. (1999). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites, Planta .Med. 65, 442–443.

[46] Cottiglia, F., Loy, G. and Garau, D. et al. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L,Phytomedicine, 8, 302–305.
[47] Sakagami ,Y., Mimura, M. and Kajimura, K. et al. (1998). Anti-MRSA activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents, Lett. Appl . Microbiol. 27, 98–100.
[48] Rauha, J.P., Remes, S. and Heinonen, M. et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J. Food. Microbiol, 56, 3–12.
[49] Stapleton, P.D., Shah, S. and Hamilton-Miller, J.M.T. et al. (2004). Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-*O*-acyl-catechins, Int. J. Antimicrob Agents, 24, 374–380.
[50] Arima, H and Danno, G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava(*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation, Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 1727–1730.
[51] El-Lakany, A.M., Abdel-Kader, M.S., Hammoda, H.M., Ghazy, N.M.and Mahmoud ,Z.F. (1997) . A new flavone glycoside with antimicrobial activity from *Carduus pycnocephalus* L, Pharmazie, 52, 78–79.
[52] Verma, D.K., Singh, S.K. and Tripathi, V. (1997). A rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*, Indian. Drugs. 34, 32–35.
[53] Chacha, M., Bojase-Moleta, G. and Majinda, R.R. (2005). Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*, Phytochemistry, 66, 99–104.
[54] Deng, Y., Lee, J.P. Tianasoa-Ramamonjy, M. et al. (2000). New antimicrobial flavanones from *Physena madagascariensis*, J. Nat. Prod. 63, 1082–1089.
[55] Osawa, K., Yasuda, H., Maruyama, T., Morita, H., Takeya, K. and Itokawa, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 40, 2970–2974.
[56] Hamilton-Miller, J.M.T. and Shah, S. (2000). Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Antimicrob. J .Chemother. 46, 852–853.
[57] Stapleton, P.D., Shah, S., Anderson, J.C., Hara,Y., Hamilton-Miller, J.M.T. and Taylor, P.W. (2004). Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and Gallates, Int .J. Antimicrob. Agents, 23, 462–467.
[58] Arima, H., Ashida, H. and Danno, G. (2002). Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*, Biosci. Biotechnol . Biochem. 66, 1009–1014.
[59] Bozdag-Dundar, O., Tuncbilek, M., Altanlar, N. and Ertan ,R. (2003). Synthesis and antimicrobial activity of flavone-3-carboxaldehyde oxime ether derivatives, Arzneimittelforschung, 53, 522–525.
[60] Wang ,S.X., Zhang, F.J., Feng, Q.P. and Li, Y.L. (1992). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of transition metal complexes with 5-hydroxy-7,4- dimethoxyflavone, J. Inorg. Biochem. 46, 251–257.
[61] Ward, F.E., Garling, D.L., Buckler, R.T., Lawler, D.M. and Cummings, D.P. (1981). Antimicrobial 3-methyleneflavanones, J. Med .Chem. 24, 1073–1077.
[62] Vijaya, K. and Ananthan, S. (1996). Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs, Indian. J. Pharm. Sci.58, 191–193.

[63] Dastidar, S.G., Manna, A. and Kumar, K.A. et al. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones, Int .J. Antimicrob. Agents. 23, 99–102.
[64] Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since1992, Phytochemistry, 55, 481–504.
[65] Wachter, G.A., Hoffmann, J.J., Furbacher, T., Blake, M.E. and Timmermann, B.N. (1999). Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*, Phytochemistry, 52, 1469–1471.
[66] Valsaraj, R., Pushpangadan, P. and Smitt, U.W. et al. (1997). New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*,J .Nat .Prod . 60, 739–742.
[67] Afolayan, A.J. and Meyer, J.J. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*, J. Ethnopharmacol. 57, 177–181.
[68] Ono, K., Nakane, H., Fukushima ,M., Chermann, J.C. and Barre-Sinoussi, F. (1989). Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7- Trihydroxyflavone, Biochem. Biophys .Res .Commun. 160, 982–987.
[69] Lin,Y.M., Anderson, H. and Flavin, M.T. et al. (1997). *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*, J. Nat. Prod. 60, 884–888.
[70] Critchfield, J.W., Butera, S.T. and Folks, T.M. (1996). Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds, AIDS. Res. Hum .Retroviruses,12, 39–46.
[71] Hu, C.Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R.E., Cheng, Y.C. and Lee, K.H. (1994) Anti-AIDS agents,10. Acacetin-7-*O*-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure–activity correlation with some related Flavonoids, J. Nat. Prod. 57, 42–51.
[72] Middleton, J.E. and Chithan, K. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In, Harborne, J.B. Editor, The flavonoids, advances in research since (1986). London, UK.Chapman and Hall.
[73] Selway, J.W.T. (1986). Antiviral activity of flavones and flavans. In, Cody, V. Middleton, E. Harborne, J.B. editors. Plant flavonoids in biology and medicine, biochemical, pharmacological, and structure–activity relationships, New York, NY, Alan R. Liss.Inc.
[74] Cheng, P.C. and Wong, G. (1996). Honey bee propolis, prospects in medicine, Bee. World. 77, 8–15.
[75] Meyer, J.J., Afolayan , A.J., Taylor,M.B.and Erasmus, D. (1997). Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*, J. Ethnopharmacol.56, 165–169.
[76] Amoros,M., Simoes, C.M., Girre, L., Sauvager, F. and Cormier, M.(1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture, Comparison with the antiviral activity of propolis, J. Nat. Prod . 55, 1732–1740.
[77] Mucsi, I., Gyulai, Z. and Beladi, I. (1992). Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures, Acta. Microbiol. Hung.39, 137–147.
[78] Wagner, H. Wirer, M., Bauer, R. (1986). Planta Med. 184-187.
[79] Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants, J. Nat.Prod. 63, 1035-1042.
[80] Sim, G.S., Lee, B.C.,Cho, H.S. et al. (2007). Structure activity relationship of Antioxidative proprety of flavonoids and inhibitory effect on matrix

metalloproteinase activity in UVA-Irradiated human dermal fibroblast, Arch. Pharm. Res. Vol.30, No.3, 290-298.
[81] Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants, determination of radical scavenging efficiencies methods enzymol,186, 343-355.
[82] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga,G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids, Free Radi. Biol. Med. 20, 933-956.
[83] VanAcker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H.V., Bennekom, W.P.,Van der vijgh, W.J.F. and Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, Free Radi. Biol. Med. 20, 331-342.
[84] Heijnen, C.G.M., Haenen,G.R.M.M., Van Acker, F.A.A., Van der Vijgh, W.J.F. and Bast, A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers, the role of the hydroxyl groups, Toxicol. In vitro, 5, 3-6.
[85] Elber, G. and Wagner, H. (1992). Planta Med. 57, 137-141.
[86] Middleton, E.J.R. and Kandasuwami, C. (1992). Biochem. Pharmacol. 43, (6), 1167-1179.
[87] Nakajima, T. Manishi, M.I., Yamamoto, K. Cyong, J.C. and Hirai, K. (2001). Inhibitory effects of baicalein, A Flavonoid in Scutellaria Root, on Eotascin production by human Dermal Fibroblasts, planta Med. 67, 132-135.
[88] Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994). Pharmacological evaluation of the anti- inflammatory activity of acitrus Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Duartin and Clausse quinone in rats and mice, J.Pharm. Pharmacol. 46, 118-122.
[89] Sankawa, U. and Chum, Y.T. (1985). Advances in Chinese.
[90] Matsuda, H. Yano, M., Kubo, M., Linuma, M., Oyama, M. and Mizuno, M. (1991). Pharmacological study on citrus fruits unshiu markovich (2) on flavonoid components, Yakugata Zasshi, 111, 193-198.
[91] Murakami, N. Mostaqul, H.M., Tamura, S. Itagak, S. and Horü, T.T. (2001). A new anti- malarial flavonol glycoside from hydrangeae dulcis folium (Hydrangea macrophylla) Bivorg. Med. Chem. Lett. 11, 2445-2447.
[92] Hammerstone, J.F., lazarus, S., Mitchell, A., Rucker, R. and Schmitz, H. (1999). Identification of procyanidir (Theobroma cacao) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass, sp. Agric. Food chem. 47, 490-496.
[93] Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H. and Danno, G. (1995). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 410-414.
[94] Markham, K.R. (1982). Technique of flavonoid identification, Academic press, London.
[95] Jurd, L. and Horowitz, R. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
[96] Mabry, T.J., Markham, K. R. and Thomas, M.B. (1970). The systimatic identification of flavonoids, Springer, New york, 45-126.
[97] Wollenweber, E. (1982). Occurrence and localization of flavonoid aglycones, In the flavonoids-Advances in Research (Harborne, J.B. and Mabry, J.J. eds. Chapman and Hall, London, New York).
[98] Silverstein, R.M., Webster, F.X. and Kiemle, D.J. (2007). Identification spectrométrique de composes organiques, ed.2,De Boeck Université.
[99] Lacaille-Dubois, M.A. and Wagner, H. (1992). 20ème Aniversaire du groupe polyphenols(book of abstacts) vol I(16), 217, 13-16.

[100] Markham, K.R. and Geiger, H. (1994). ^{1}HRMN spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuteurodimethyl-sulfoxide, In the flavonoids, edited by Harborne, J.B. (1993). Chapman and Hall, London.
[101] Audier, H. (1966). Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
[102] Constantin, E. and Schenelle, A. (1986). Spectrométrie de masse principe et application. Lavoisier, Paris.
[103] Williams, D.H., Bradley, O., Bojesen, G. Santikarn, S. and Taylor, C.E. (1981). Fast Atom Bombardement mass spectrometry, J. Am. Chem. Soc. 103, 5700-5704.
[104] March, R.E., Miao, X.S., Metcalfe, C.D., Stobiecki, M.and Marczak, L. (2004). A fragmentation study of isoflavone glycoside , genistein 7-O- glucoside , using electrospray quadrupole time –of-flight mass spectrometry at high mass resolution, international journal of mass spectrometry, 232, 171-183.
[105] Gonnet, J.F. (1973). A propos de la photographie en couleur de chromatographie sur couches minces en lumière de Wood. J. of cromato. 86, 192.

الفصل الثاني
الدراسة الكيميائية للنبتتين:

Retama sphaerocarpa

و

Ammoides atlantica

II ـ أ ـ الدراسة الكيميائية لنبات *Retama sphaerocarpa*

II ـ أ ـ 1 ـ التصنيف النظامي للنبتة حسب Messaili [1]

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
Sous classe	Diapétales	تحت الصف
Série	Caliciflores	السلسلة
Ordre	Rosales	الرتبة
Famille	Fabacées	العائلة
Sous famille	Papilionacées	تحت العائلة
Tribu	Genisteae	القبيلة (الفصيلة)
Genre	Retama	الجنس
Espèce	Sphaerocarpa	النوع

II ـ أ ـ 2 ـ وصف النوع :

Retama sphaerocarpa عبارة عن شجيرة إبرية بأغصان صلبة رطبة الملمس، يبلغ طولها من 1 إلى 2 م، ذات أوراق صغيرة ملساء، السفلى تكون ثلاثية الوريقة أمّا الأخريات فأحادية الوريقة، سهلة السقوط، ذات أزهار صفراء صغير ة جدا (5 ـ 6 ملم) تتجمع في عناقيد جانبية تحوي من 8 إلى 15 زهرة متوضعة على الفروع حسب الشكل (1).

الشكل (1) : صور فوتوغرافية للنبتـــة *Retama sphaerocarpa*

تمتاز هذه الأزهار بكأس ثنائي الشّفة أو الشق، ذو شفة علوية ثنائية السّن من الأسفل، أمّا التويج فيحوي 5 بتلات ملتحمة بالأنبوب السدائي، فالبتلة الخلفية هي أكبر البتلات وتُعرف بالعلم والبتلتان الجانبيتان تُعرفان بالجناحين، أمّا البتلتان الأماميتان فملتحمتان التحاماً خفيفا على شكل زورق، مع وجود 10 أسدية ملتحمة الخيوط مشكّلة حزمة واحدة، أما الثمار فهي عبارة عن قرون كروية وحيدة أو ثنائية البذرة، ذات ملمس ناعم ولون أصفر داكن [2].

تتميز هذه الشجيرة بجذور عميقة تفوق 20م، بحثا عن المياه الجوفية بحكم نموها في المناطق الجافة والشبه الجافة [3].

II ـ أ ـ 3 ـ توزّع النوع :

تتوزّع *Retama sphaerocarpa* في المناطق الجافة وشبه الجافة [4] خاصة قرب المناطق الملحية فهي تتواجد في :

ـ إفريقيا [5] في كل من الجزائر والمغرب وتونس (أصلية).

ـ أوروبا [5، 6] في كل من البرتغال وإسبانيا (أصلية) وبلغاريا (منقولة).

ـ جنوب أمريكا [7] في الأرجنتين (منقولة).

أما على المستوى الجزائري فهي تتوزّع في قطاع التل القسنطيني وتحت قطاع مرتفعات هضاب الجزائ العاصمة ووهران [2].

II ـ أ ـ 4 ـ المسح البيولوجي للنبتة :

يستخدم الرتم في الطب الشعبي لأغراض شتى ، إذ يستعمل منقوعه المائي ضد داء الكلب، كما يعهد إلى أغصانه علاج الروماتيزم وتستعمل الأوراق والسيقان في التخفيف من السمنة، كما يستخدم في الطب الشعبي الإسباني في علاج الأورام الغدّية (الثؤلول) [8].

كما أثبتت الدراسات الدور الفعال الذي تلعبه هذه الشجيرة في المناطق الجافة والشبه الجافة، إذ تعمل على تلطيف الجو من رطوبة ودرجة حرارة ، كما أنها تساعد على تخصيب التربة بإغنائها بالمواد العضوية وتثبيتها للأزوت .فهي تخلق وسطا تحت مجموعها الخضري ملائما لتوزع وتنوع حشائش دائمة وحولية، وهذه الأخيرة توفر سمادا كافيا لبقاء الشجيرة [9].

كما أظهرت التحاليل السمية التأثير التثبيطي لكل من مستخلص$CHCl_3$ و AcOEt وBuOH على كل من خلايا سرطان الثدي Breast adenocarcinoma (MCF-7) وسرطان الكلى renal adenocarcinoma (TK-10) وسرطان الجلد melanoma(UACC-62)

كما تعمقت هذه الأبحاث في تفسير إختلاف التأثير البيولوجي لهذه المستخلصات بإعادة نفس التجارب على المركبات الفلافونيدية المفصولة من كل مستخلص .

فالتأثير التثبيطي لمستخلص البيوتانول على خلاي ا MCF-7 راجع لاحتوائه على الفلافونيدات الميتوكسيلية **7,6,5** أما بالنسبة لخلايا UACC-62, TK-10 فتتأثر بمستخلص الأسيتات الغني بالإيزوفلافون genistin أكثر منه بمستخلص الكلورفورم

الفعل التثبيطي للمركب **2** أكثر من **3** راجع لوجود OH في الموقع 5 بالنسبة للمركب **2** وهذا يؤكد كون C_5-OH هو المسؤول عن الفعالية السمية للإيزوفلافون عند كل الخلايا السرطانية .

كما تعزى الفعالية السمية للأجليكونات على غرار جليكوزيداتها عند الثلاث أنواع من الخلايا السرطانيا، وهذا راجع إلى الطبيعة الهيدروفيلية أو إلى الحجم الكبير لهذه الجليكوز يدات الذي يعيق إختراقها للجدار الخلوي .

ويعود التأثير التثبيطي للمركبات **7, 6,5, 1** وetoposide على خلايا MCF-7 إلى الفعل التثبيطي الإنتقائي لمجموعة الميتوكسيل لهذا النوع من الخلايا السرطانيا [10].

جدول يوضح النسب المئوية للمركبات المفصولة من كل مستخلص [10].

	$CHCl_3$	AcOEt	ButOH
6-methoxypseudobaptigenin-7-β-o-gllucoside(**1**)	1٪	4.5٪	-
Genistin(**2**)	0.2٪	5٪	-
Daidzin(**3**)	0.2٪	-	-
Orientin(**4**)	--	0.2٪	-
Rhamnazin-triglycoside(**5**)	-	-	0.3٪
Rhamnazin-diglycoside(**6**)	-	-	1.3٪
Rhamnazin(**7**)	-	-	0.3٪

جدول يوضح التراكيز بµg/ml للمستخلصات والمركبات المفصولة منها المثبطة لنصف عدد الخلايا السرطانية IC_{50}:

	TK-10	MCF-7	UACC-62
$CHCl_3$ AcOEt BuOH	87 49 >250	76 52 51	42 36 65
Isoflavones 6-methoxypseudobaptigenin-7-*β*-*O*-gllucoside(**1**) Genistin(**2**) Daidzin(**3**)	>100 27 >100	62 69 >100	>100 27 57
Flavone Orientin(**4**)	>100	>100	57
Flavonols Rhamnazin-triglycoside(**5**) Rhamnazin-diglycoside(**6**) Rhamnazin(**7**)	>100 >100 52	62 49 9.7	50 73 17
Positive controls Etoposide Genistein	6.1 5.9	0.42 6.9	1 4.1

كما أظهرت دراسة أخرى لــ Lopez l'azaro و مساعديه فعالية كل من المركبين **5**،**6** ضد الخلايا السرطانية، وذلك بتنظيم عمل الإنزيم Topoisomerase I وبالتالي الحد من الانقسام العشوائي غير المنتظم لــ DNA الخاص بالخلايا السرطانية [11].

قد أظهرت تحاليل سمية أخرى التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لــ*R. sphaerocarpa* بجرعة تقدر بـــ 30 µg/ml يكون بنسبة 34.2% لخلايا النمو Hep2 المأخوذة مـــن ورم سرطـــان الحنجـــرة (epidermoide carcinoma de larynx) مقارنة بـــ 6-mercaptopurine الذي يمتاز بنسبة تثبيط تقـــدر بـــ 54.2% علاوة على ذلك فهي تبدي سمّية في التحارب الحيوية للإقريدس الملحي تقدر بـــ LC_{50} = 454µg/ml [8] مع العلم أن LC_{50} < 1000 µg/ml يعتبر عاملا فعالا حسب Meyer [12].

أمّا بالنسبة للنسيج النباتي فيعمل المستخلص المائي بتركيز (1%) على تثبيط كامل (100%) لعامل الانقسام الخلوي MI (Index mitotique) لنوع من البصل (Allium cepa) خلال 48 ساعة، كما يعمل على تثبيط يقدر بـــ 24% للبقع القرحية للبطاطا المعاملة بنوع من البكتيريا الزراعية الممرضة (Agrobacterium tumfacienx) [8، 13].

II ـ أ ـ 5 ـ المسح الكيميائي للنبتة :

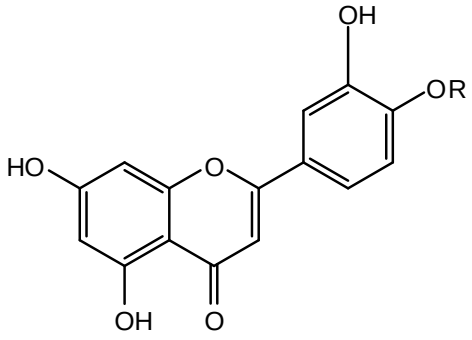
أكد المسح البيبليوغرافي الكيميائي للنبتة *R. sphaerocarpa* احتوائها على كل من الفلافونيدات و القلاويدات مما جعلها مؤخرا محل بحث عدد من الباحثين .

فقد تمّ التعرف على ثمان قلاويدات كينوليزيدينية (quinolizidine) وقلويد واحد بيبردين (bipiperidine) : Ammodendrine، Déhydrolupanine، Oxospartéine، Lupanine، Spartéine، Génistéine، Retamine [14] وCytisine، Méthyl cytisine [15].

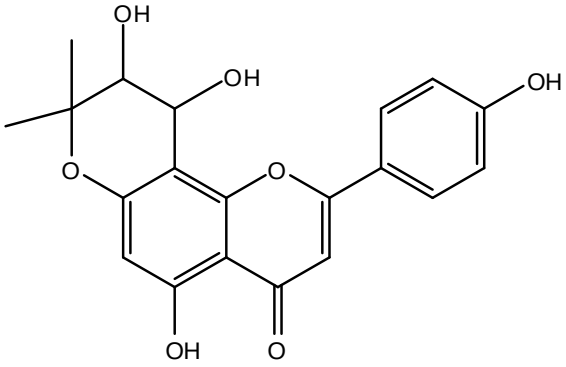
أما عن الفلافونيدات ونظرا لكونها محل بحثنا فإننا ندرج ما فصل منها قي جنس *Retama* في الجدول (1)

الجدول (1) :الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Retama*

نوع النبتة	اسم المركب	الصيغة المجملة	رقم الصيغة	رقم المرجع
Retama raetam	Luteolin 4'-O-neohesperidoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	1	[16]
	5, 4'-dihydroxy-(3'',4''-didydro-3'',4''-dihydroxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'' : 7,8)-flavone	$C_{20}H_{18}O_7$	2	[17,16]
	Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	3a	[17]
	Genistin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	3b	
	6 hydroxy genistein	$C_{15}H_{10}O_6$	3c	
	6 hydroxy apigenin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	4	
	Luteolin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	5	
	Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	6	
	Biochanin A	$C_{16}H_{12}O_5$	7a	
	Pratensein	$C_{16}H_{12}O_6$	7b	
	3'-methylorobol	$C_{16}H_{12}O_6$	7c	
Retama sphaerocarpa Boissier	Rhamnazin-3-O-β-glucopyranosyl-(1→5)- α-arabinofuranoside	$C_{28}H_{32}O_{16}$	8a	[18]
	7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxyisoflavone-7-O-β-glucoside	$C_{23}H_{22}O_{11}$	9	[19]
	Genistein 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	3b	
	Daidzein 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_9$	10	
	Orientin ou Lutexin (8-β-D-glucopyranosyl luteolin)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	11	[10]
	Rhamnazin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→5)-[β-D-apiofirranosyl-(1→2)] α-L-arabinofuranoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	8b	
	Rhamnazin	$C_{17}H_{14}O_7$	12	
	Vitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	13	[20]
	Vicenin-2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	14	
	Quercetin 3,7-di-O-β-glucoside	$C_{27}H_{29}O_{17}$	15	

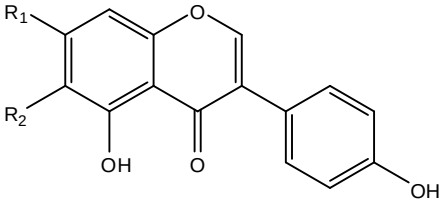


1



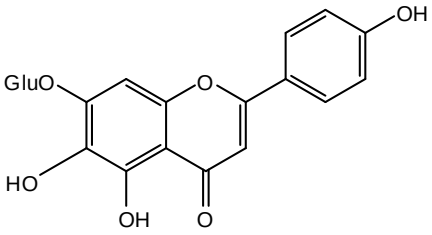
2

R=neohesperidosyl

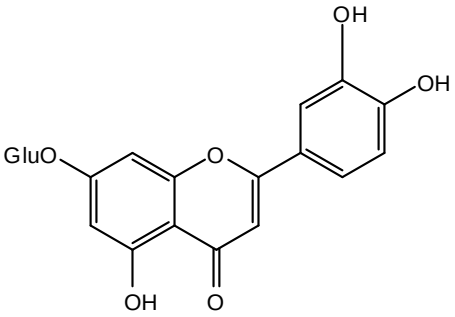


3

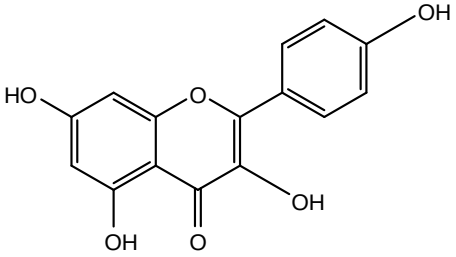
	R1	R2
a	OH	H
b	OGlu	H
c	OH	OH



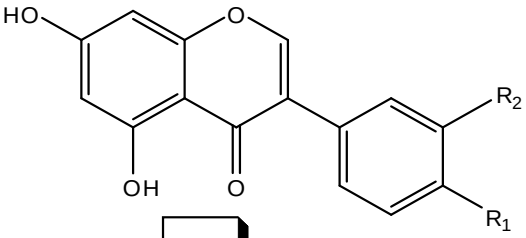
4



5

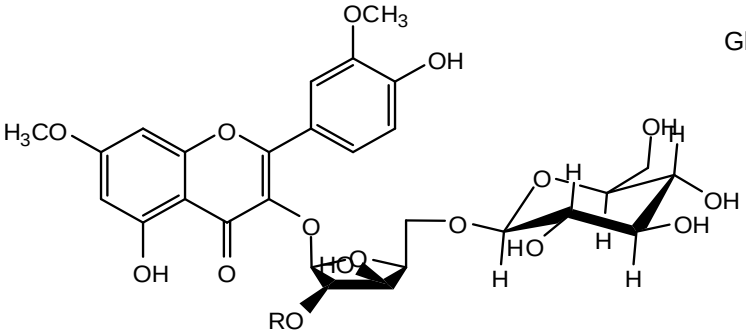


6



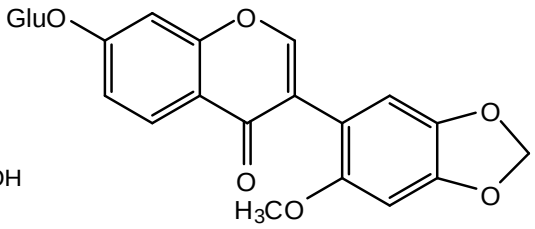
7

	R1	R2
a	OCH3	H
b	OCH3	OH
c	OH	OCH3

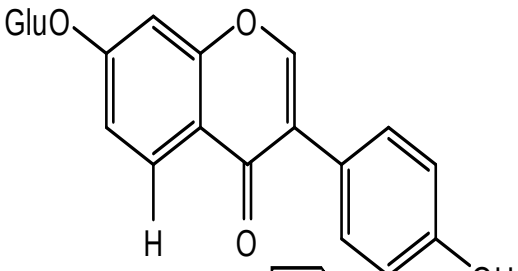


8

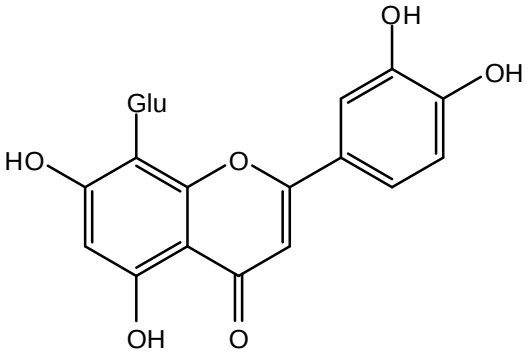
	R
a	H
b	B-D-apiof uranosyl



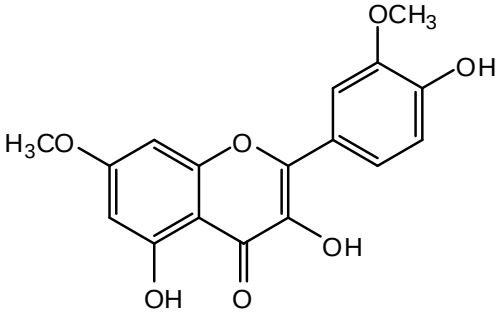
9



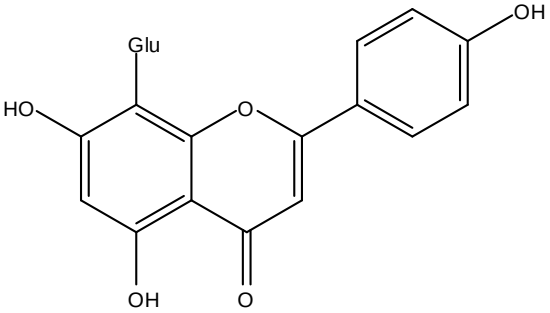
10



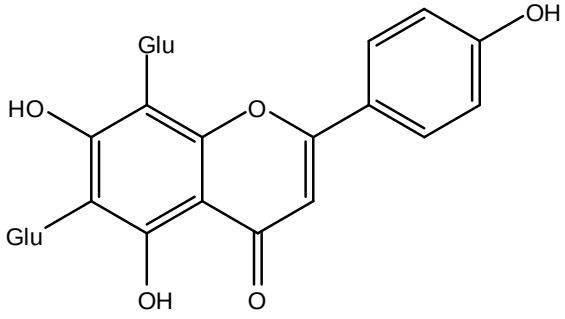
11



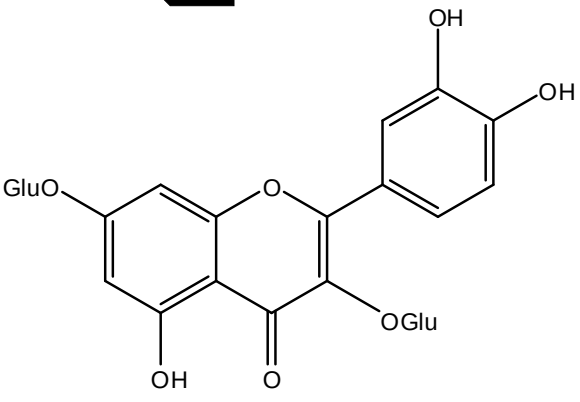
12



13



14



15

II ـ ب ـ الدراسة الكيميائية لنبات *Ammoides atlantica*

II ـ ب ـ 1 ـ التصنيف النظامي للنبتة :

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
Sous classe	Rosida	تحت الصف
Ordre	Apiales	الرتبة
Famille	Apiaceae	العائلة
Sous famille	Apioïdeae	تحت العائلة
Genre	***Ammoides***	الجنس
Espèce	***Ammoides atlantica***	النوع

II ـ ب ـ 2 ـ وصف النوع :

Ammoides atlantica : نبات حولي أو معمر ذات حزم كثيفة فقيرة إلى الوريدات في الأوراق القاعدية .

سيقانها أقل تشعبا مقارنة بالنوع الأخر *Ammoides pusilla* ، تتميز بخيمات ذات 3 إلى 6 أشعة ،أما الثمار فذات شعاع بيضوي بطول 2-2.5 ملم، تنمو بالجبال في المرتفعات الأكثر من 1000 م و هي نبتة أصلية بالجزائر . [2]

الشكل (2) : صورة فوتوغرافية للنبتـــة *Ammoides atlantica*

II ـ ب ـ 3 ـ المسح البيولوجي للجنس *Ammoides* :

تستعمل كل من نوعي ***Ammoides*** : *A.pusilla* و *A.atlantica* في الطب الشعبي كمضاد للبكتيريا و الإسهال .كما تستعمل *A.pusilla* لمعالجة الحمى، الإنفلونزة و تداوي أوجاع الرأس كما تنقع في الكحول أو حمض الخل وتمزج مع الحناء لمعالجة التخلف العقلي لدى الأطفال، بالإضافة إلى استعمالها كتوابل في الأطعمة [21] وقد ذكرها ابن البيطار في كتابه الجامع لمفردات الأدوية والأغذية باسم أطريلال وهي كلمة بربرية تعني رجل طائر ، يعرف بالديار المصرية برجل الغراب و بعضهم يسمونه بجزر الشيطان، وقد نوه بعظيم فائدتها في علاج البرص. وأول ما ظهر استعمال هذه النبتة كان عند قبيلة بربرية تعرف ببني أبي شعيب من بني وجهان من بجاية [22] .

كما يستعمل المستخلص المائي لهذه النبتة في الطب الشعبي شرق المغرب كعلاج لداء السكري وهذا ما أثبتته التحاليل البيولوجية التي أجريت بطريقتي: OGTT (Oral glucose ToleranceTeste)و , IVGTT (Injection vasculaire glucose Tolerance Teste) والتي أثبتت التأثير التثبيطي للمستخلص المائي للنبتة *A.pusilla* على إمتصاص السكر بنسبة 28.5٪ بجرعة250 mg/Kg وقد طمأنت التحاليل السمية من عدم وجود مضاعفات أو مخاطر من إستعمال هذه النبتة [23] .

كما أثبت حسين لعور وفرقه التأثير التثبيطي للزيت الطيار ل ـــ*A.pusilla* على كل من نوعي البكتيريا الممرضة :

Pseudomonas syringae pv. syringae و *Pseudomonas syringae pv.morsprunorum* [24]

كما أظهر هذا الزيت فعالية ضد ميكروبية معتبرة على كل من السلالات :

Serratia marcescens, Salmonilla enteritidis, Escherichia coli(ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853), *Staphylococcus aureus*(ATCC25923), *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas syringae pv.morsprunorum, Pseudomonas syringae pv.syringae,Aspergillus niger* **,***Candida albicans* [21]

أما بالنسبة للنوع الثاني *A.atlantica* فقد أظهر التشخيص البيولوجي لزيته الطيار فعالية ضد ميكروبية على كل من الأنواع : Escherichia coli(ATCC25922),

Staphylococcus aureus(ATCC25923) و *Enterococcus faecalis* (ATCC29212)

كما سجل هذا الزيت تأثيرا تثبيطيا جد فعال على النوع النباتي *Bacillus subtilis*(ATCC6633) بمقدار أقل من6.25mg/l [25] .

II ـ ب ـ 4 ـ المسح الكيميائي للجنس *Ammoides* :

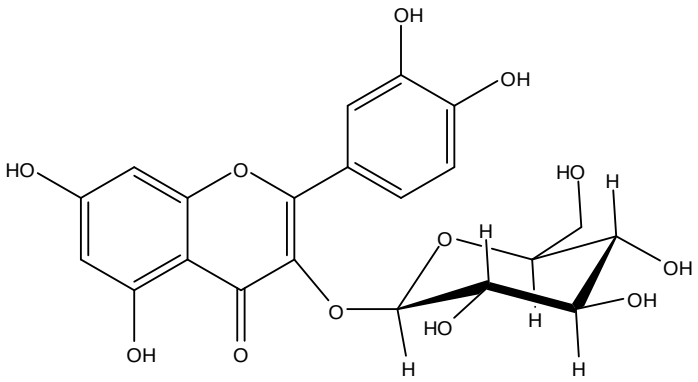
باستعمالGC, GC/Ms للزيت الطيار لكل من *A.pusilla* [21] و *A.atlantica* [25] أثبت إحتوائها على نفس المركبات الأعظمية و بنسب متقاربة كما هوموضح في الجدول التالي:

المركبات الأعظمية	Thymol	γ-terpinene	p-cymene
A.atlantica	53.2٪	19.4٪	10.6٪
A.pusilla	44.5٪	32.9٪	13.5٪

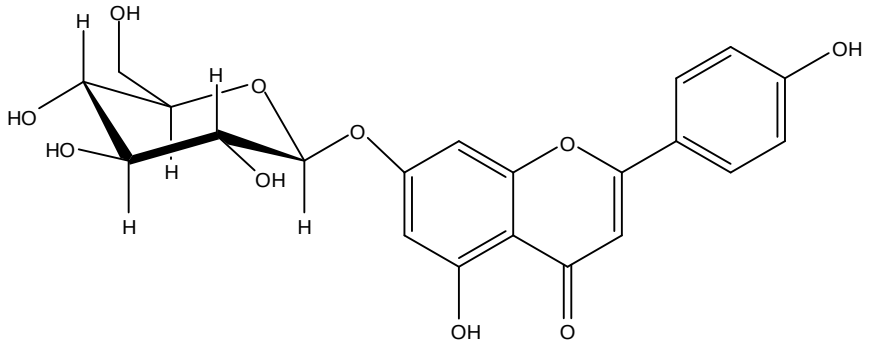
وبالنسبة للمركبات الفلافونيدية لم تحض *A.atlantica* بأي دراسة مسبقة على هذا النوع من مركبات الأيض الثانوي .

أما عن *A.pusilla* فكل ما تم فصله مدرج في الجدول التالي :

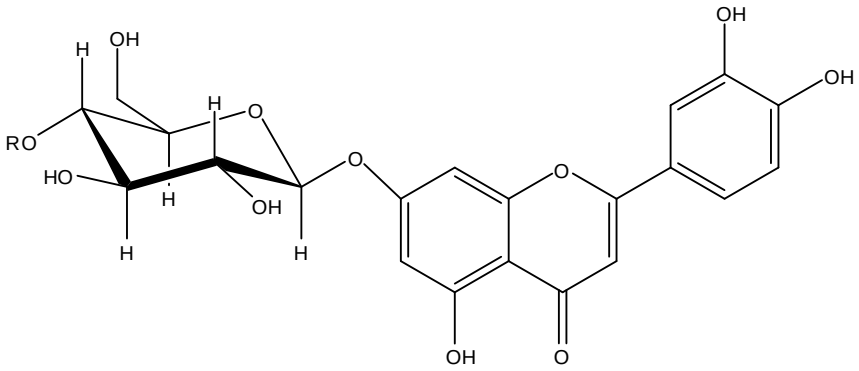
اسم المركب	الصيغة المجملة	رقم الصيغة	رقم المرجع
Quercetin 3 -O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	16	[26]
Apigénine 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	17	
Luteoline 7-O-Rhamnoglucoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	18b	
Luteoline 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	18a	[27]
Quercetin 3 -O-β-glucuronide.	$C_{21}H_{18}O_{13}$	19	



16

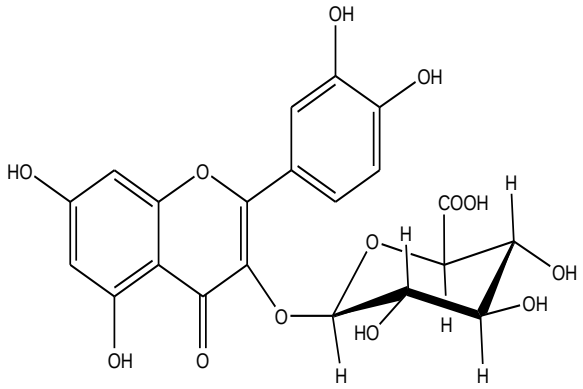


17



18

	R
a	H
b	Rhamnosyl



19

المراجع

[1] Messaili, B. (1995). Systématique des spermaphytes, ed. office des publications universitaires, Alger, 75.

[2] Quezel, P. and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

[3] Haas, P., Pugnaire, F.I., Fernandez, E.M., Puigdefabregas, J., Clark, S.C. and Incoll, L.D. (1996). Investigation of rooting depth in the semi aride sharb *Retama sphaerocarpa*(L)Boiss. by lablling of ground water with a chemical tracer, Journal of Hydrology ,177,23-31.

[4] Shokri Ibrahim, S. (1994). The Flower plants, 173.

[5] Grenter, W. and al. (1989). (eds). Med-Chencklist, vol.4 (published).

[6] Heywood, V.H. (1968). Leguminosae in Flora Europaea, Heywood, V.H. Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds). Cambridge University press, London, 101.

[7] Burkart, A. (1952). Acme Agency, Buenons Aires, Las Leguminosas argentinas, 569.

[8] Martin-Cordero, Saeng, M.T. Auguso, M.J. (1995). Cytotoxic activity of *Retama sphaerocarpa*, Fitoterapia, vol. LXVI, N° .6.

[9] Moro, M.J., Pugnaire,F.I., Haas,P. and Puigdefàbregas,J. (1997). Effect of the canopy of *Retama sphaerocarpa* on its understorey in semiarid environment, Functional Ecology,11,425-431.

[10] Lopez l'azaro, M., Martin-Cordero, C .,Cortés,F.,Pińero,J. and Jesús Ayuso, M. (2000).Cytotoxic activity of flavonoids and extracts from *Retama sphaerocarpa* Boisie,Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 55c, 40-43.

[11] Lopez l'azaro, M., Martin-Cordero, C . and Jesús Ayuso, M. (2000). Two new flavonol glycosides as DNA topoisomeraseI poisons,Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 55c, 898-902.

[12] Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and Melauhlin, J.L. (1982). Planta Med. 45, 31.

[13] Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Aderson, B.J., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Moore, D.S. and Mclauglin, J.L. (1982). J. Nat. prod. 45, 679.

[14] Martin-Cordero, C ., Gil-serrano, A.M. and Ayuso Gonzalez, M.J. (1991). Plantes med. Et phytother. 25, 157.

[15] Ribas, I. and Vega, J. (1953). – Ion. 13, 140, 148.

[16] Kassem, M., Mosharrafa, S.A., Saleh, N.A.M.and Abdel-Wahab, S.M. (2000). Two new flavonoids from *Retama raetam* Fitoterapia, 71, 649-654.

[17] Djeddi, S., Karioti, A. and Skaltsa, H.(2008). Flavonoids of *Retama raetam*Webb. from Algeria , Planta Med.74.

[18] Martin-Cordero, C., L'opez Lazàro, M., Gil-Serrano, A., Rodriguez Carvajal, M.A. and Ayuso Gonzàlez, M.J. (1999). Novel flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, 51, 1129-1131.

[19] L'opez Lazaro, M., Martin-Cordero, C., Iglesias-Guerra, F. and Ayuso Gonzàlez, M.J. (1998). An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, vol. 48 N° . 2, 401-402.

[20] Louaar, S., Akkal, S., Bousetla, A., Medjroubi, K., Djarri, L. and Seguin, E. (2005). Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*, Chemistry of natural compound, Vol. 41, No.1.

[21] Laouer, H., Zerroug, M.M., Sahli, F., Chaker, A.N., Valentini, G., Ferretti, G., Grande, M. and Anaya, J. (2003). Composition and antimicrobial activity of Ammoides pusilla (Brot.) Breistr. essential oil, Journal of Essential Oil Research,15(2),135-138.

[22] IbnAlbitar, Dam. (1874). Aljame Li-Mofradat al adwiyah wal aghthiyah(The collection of medical and food items), Dar Sader Publishing,Beirut, Lebanon(in Arabic), Vol.1.

[23] Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maallem, S. and Ziyyat, A.(2007). Antihyperglycemic activity of Arbutus unedo, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsute* Pharmazie , 62(8), 630-632.

[24] Laouer, H., Zerroug, M. M., Chaker, A. N. and Bouzerzour, H. (2004) **.** Study of the effect of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breist, essential oil against *Pseudomonas sp*., Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 69(4), 619-624.

[25] Laouer, H., Boulaacheb, N., Akkal, S., Singh, G., Marimuthu, P.,de Heluani, C., Catalan, C. and Baldovini, N. (2008). Composition and antibacterial activity of the essential oil of Ammoides atlantica (Coss. et Dur.) Wolf., Journal of Essential Oil Research, 20(3), 266-269.

[26] Bousetla, A., Akkal, S., Medjroubi, K., Louaar, S., Azouzi, S., Djarri, L., Zaabat, N., Laouer, H., Chosson, E.and Seguin, E. (2005). Flavonoid glycosides from *Ammoides pusilla*, Chemistry of Natural Compounds, 41(1), 95-96.

[27] Nabiel, A.M.S., Sabry, I.E.N., Mohamed, N.EH. and Hasnaa, A.H. (1983). Comparative study of the flavonoids of some local members of the umbelliferae, Phytochemistry,Vol.22, N^{o}.6, pp.1417-1420.

الفصل الثالث

المادة النباتية: الإستخلاص،الفصل،التنقية و الدراسة البيولوجية

III - أ- الدراسة الكيميائية للنبتة *Retama sphaerocarpa*

1ـ المادة النباتية :

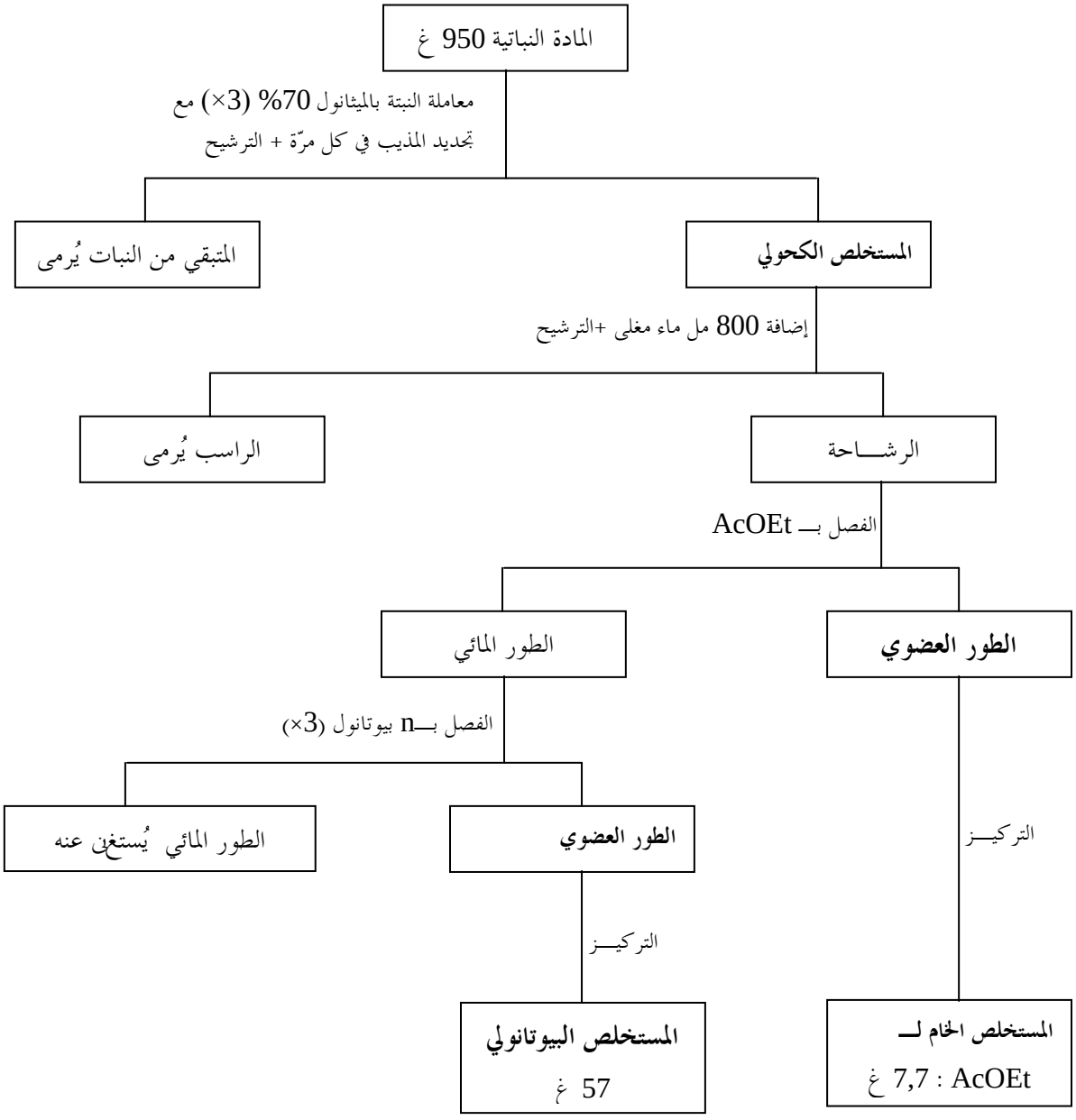
تم جمع *R. sphaerocarpa* في الأشهر ماي، جوان، جويلية 2002 من جبال سوق نعمان ولاية أم البواقي بالشرق الجزائري حيث تم جمع الجزء الهوائي من النبتة وهي في مرحلة الإزهار في شهر ماي ثم مرحلة الإثمار في شهر جويلية . أجريت عملية تجفيف النبتة في أماكن خاصة تحت الظلّ وبعيدا عن الرطوبة حيث كان الوزن المستعمل من مجموع خضري وثمارٍ وأزهار 950 غ.

2ـ الاستخلاص :

بعد تجفيف النبتة اكتفينا بأخذ الأوراق والأزهار والثمار مع الفروع الدقيقة دون السيقان الغليظة وبعد تقطيعها إلى قطع صغيرة جدًّا تم نقع المادة النباتية في محلول كحولي (MeOH :H_2O / 30: 70) ساخن إلى درجة الغليان وتركت لمدّة 48 ساعة، رشح المحلول وا ستقبل المترشح الكحولي في دورق . تمّ تكرير العملية مرتين أخريين لمدة 24 ساعة، وبعد الترشيح جمعت المستخلصات الكحولية وركّزت عند درجة حرارة c^0 40 للتخلص من الكحول بعدها أُذيبت في 800 ملل من الماء المقطر عند درجة الغليان ثم تركت للراحة ليلة كاملة بعدها رشحت لل تخلص من الأتربة وبعض المركبات الليبوفيلية (كلوروفيل، دهون نباتية... الخ).

في الخطوة الثانية وضعت الرشاحة في قمع فصل وأضيف لها 340 ملل من خلات الإثيل (AcOEt) وبعد الرج الجيّد تُركت للراحة لمدّة 24 ساعة بعدها فُصلت الطبقة العضوية عن المائية ثم أُعيدت نفس ا لعملية للمرة الثانية على الطبقة المائية، وبعدها ركّز المستخلص العضوي لطور AcOEt فكان وزنه 7,7 غ. الطبقة المائية السابقة أضيف لها مذيب جديد وهو البيوتانول النظامي بحجم 345 ملل وبعد الرج الجيّد تركت لمدّة 24 ساعة بعدها فُصلت الطبقة العضوية عن المائية ثم أُعيدت العملية مرّتين أخريين مع تركها للراحة 3 ساعات فقط ثم ركّز الطور العضوي للبيوتانول فكان وزنه 57 غ.

كلا المستخلصين يذاب في القليل من الميثانول للتخلص من أثار البيوتانول والأسيتات ويمثل الشكل (1) مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص.



الشكل (1) : مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص

3 ـ طرق الفصل والتنقية :

قبل شروعنا في عمليات الفصل أجرينا بعض الفحوص التحليلية على كل من المستخلص البيوتانولي ومستخلص الأسيتات، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6 ثنائي البعد :

البعد الأول : 4:3:3 ـ ميثانول : مثيل إيثيل سيتون : طوليان.

البعد الثاني : 13:3:3:1 ـ أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.

من خلال مقارنة التح اليل المبنية في الكروماتوغرام (I) و (II) اتضح أنه لا توجد فوارق تستدعي دراسة مقارنة لكل من المستخلصين، فللحصول على أكبر عدد ممكن من المركبات الفلافونيدية عمدنا إلى جمع المستخلصين.

زيادة على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة قمنا بإنجاز كروماتوغرافيا سائلة عالية الكفـــاءة (HPLC) لكل من مستخلص الأسيتات والبي وتانول باستعمال : عمود Kromasil C18 100 A° (250 x 4.6 mm) وجملة مملصة تتكوّن من مذيبين :

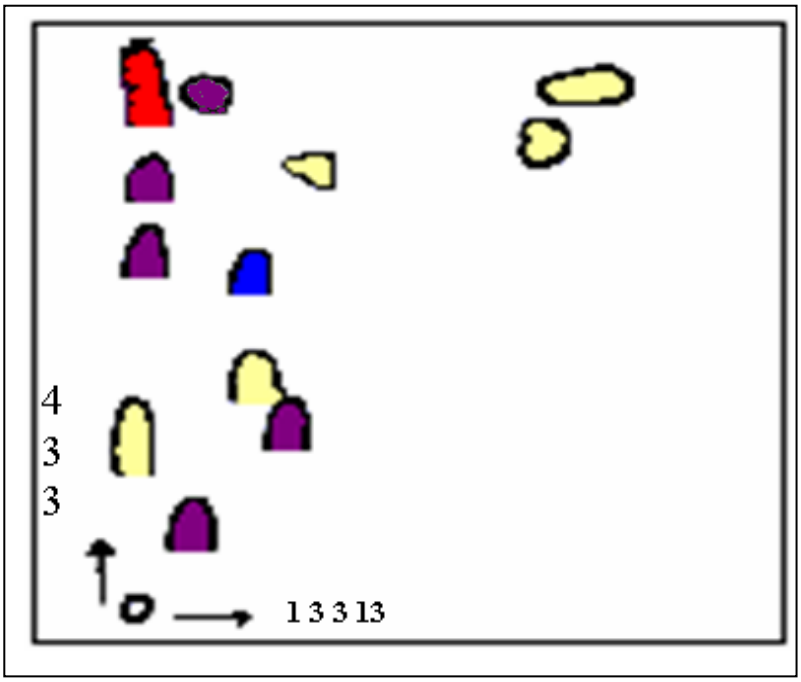
المذيب A : الماء / حمض الخل : 20/1000.

المذيب B : أسيتونتريل /الماء /حمض الخل : 20/200/800.

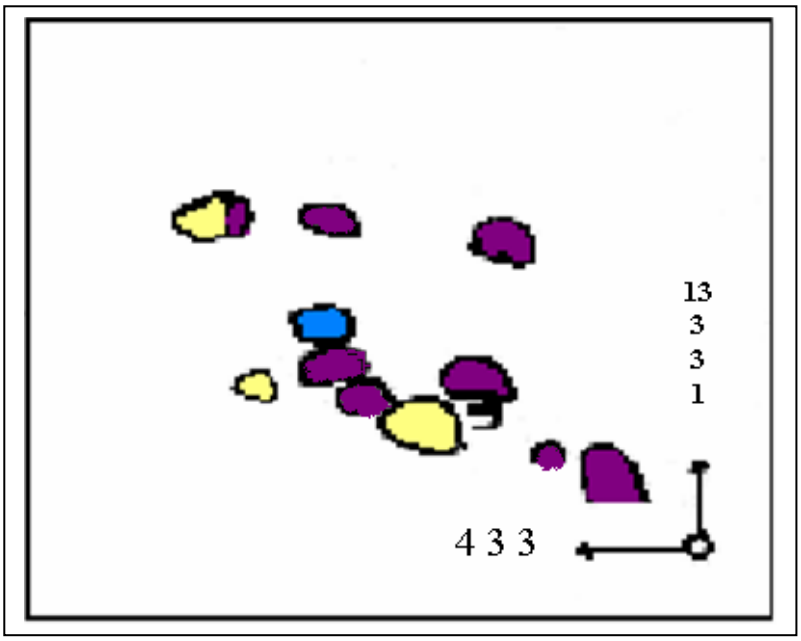
حيث يغيَّر المملص آليا، ويتم التمليص تحت طول موجة مقدارها $\lambda = 350$ nm.

نظرا لما يبينه الكروماتوغرام III و IV من غنى النبتة بالمكونات الفلافونيدية ومدى تداخلها لجأنا إلى فصل أولي بكروماتوغرافيا العمود لـــ(11,15 غ من خليط المستخلصين مستعملين لهذا الغرض متعدد الأميد (SC_6 polycaprolactone) كطور ثابت.

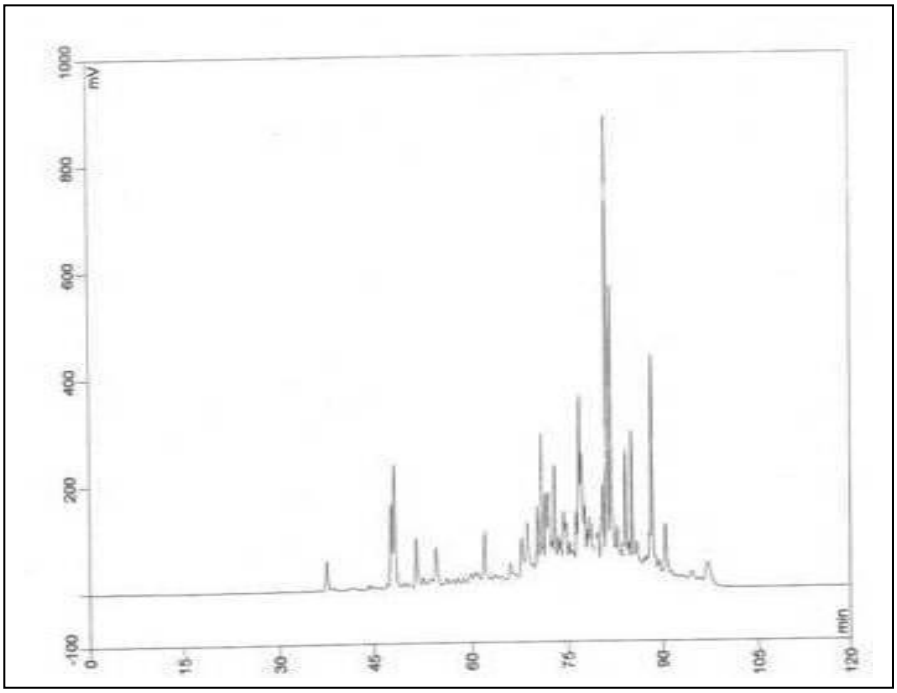
قد تم تحضير المستخلص بإذابة الكمية المراد فصلها في القليل من الميثانول مـــع إضافة حوالي 2 غ من متعدد الأميد SC_6 وبعد التركيز والتجفيف الجيد وضع المسحوق ا لمتحصل عليه بحذر كبير في أعلى العمود الذي كان قد غُسل جيّداً بالطوليان وتُرك للراحة لليلة كاملة، وقد استعمل التولوين كمملص مع تغير القطبية بالإضافة التدريجية للمياثنول إلى غاية الوصول إلـــى 100% ميثانول وتم مراقبة الحزم النازلة باستعمال مصباح الأشعة فوق البـنفسجية والكسور المحصل عليها مدونة في الجدول (1).



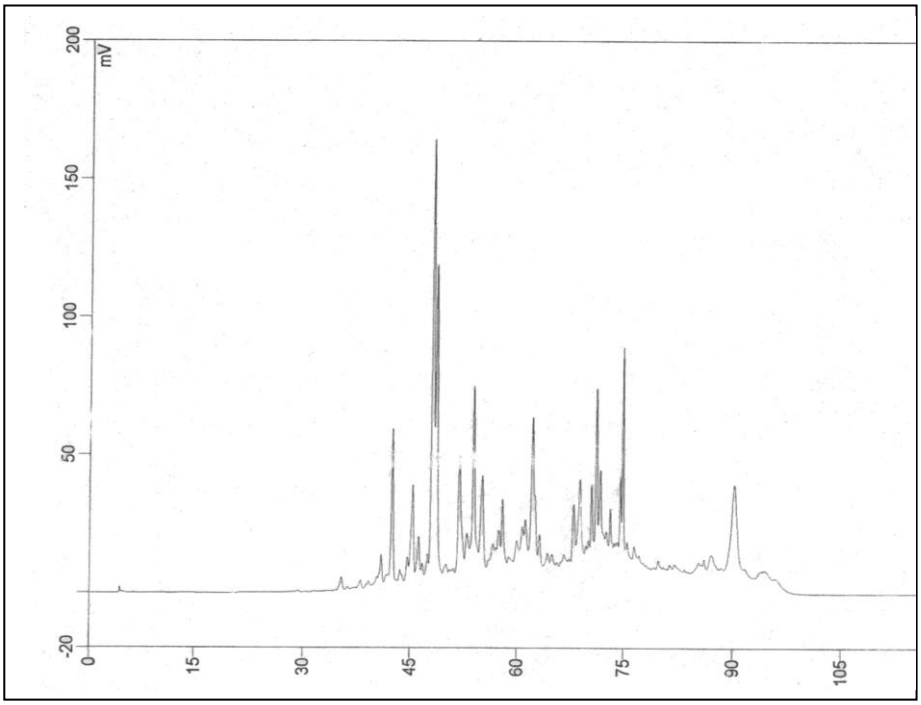
كروماتوغرام (I) ثنائي البعد لمستخلص الأسيتات لنبات ***Retama sphaerocarpa***



كروماتوغرام (II) ثنائي البعد لمستخلص البيوتانول لنبات ***Retama sphaerocarpa***



كروماتوغرام (III) (H.P. LC.) لطور الأسيتات



كروماتوغرام (IV) (H.P. L C.) لطور البيوتانول

الجدول (1) : الكسور المتحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي

رقم الكسر	الطوليان %	الميثانول %	الملاحظة
1	100	0	F_1 ظهور مركب في شكل راسب أبيض
2	98	2	
3	95	5	
4	95	5	F_2 خليط لم يعالج
5	93	7	
6	90	10	
7	90	10	F_3 ظهور مركب نقي في شكل راسب أبيض يختلف عن المركب السابق
8	85	15	
9	80	20	
10	80	20	F_4 خليط لم يعالج مع ظهور الراسب F_3
11	80	20	F_5 خليط لم يعالج
12	75	25	
13	75	25	F_6 ظهور مركب نقي في شكل راسب أبيض
14	75	25	F_7 خليط لم يعالج
15	70	30	F_8 خليط
16	70	30	F_9 خليط
17	60	40	F_{10} خليط
18	50	50	
19	50	50	F_{11} خليط
20	50	50	F_{12} خليط
21	0	100	

تم جمع الكسور المتشابهة باستعمال كروماتوغرافيا الورق (Whatman N°3) ذات البعد الواحد بواسطة نظامين مختلفين :

S_1 : حمض الخل 15%.

S_2 : الطبقة العضوية لـــ BAW (4:1:5) .

فتم الحصول على الكسور الجديدة ($F_1 \leftarrow F_{12}$).

قمنا باختيار F_1 , F_3 ,F_9,F_{10} من بين الكسور المتبقية من العمل المنجز خلال رسالة الماجستير , لسهولة فصلها مقارنة بالكسور الأخرى . إذ تمت معالجة F_9,F_{10}بواسطة كروماتوغرافيا الورق (Whatman N°1, 3) التحضيرية مستخدمينا حمض الخل 15% كمملص، لتتبع بعدها بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC لمتعدد الأميد DC_6 مع النظام S_3 : 1 : 3 : 3 : 13 أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.

تنقية المركبات المحصل عليها تمت باستعمال عمود كروماتوغرافي صغير من متعدد الأميد SC_6 وذلك بالاستعانة بالطوليان كمذيب وإغنائه بالميثانول، كما استعملنا أيضا عمود صغير من السيفاداكس (Sephadex LH20) باستخدام الميثانول كمذيب . لنخلص أخيرا إلى المركبين النقيين F_9, F_{10G}.

أما الكسران F_1 وF_3 فكانا يحويان راسبين أبيضين تم غسلهما بومضات متتالية من الميثانول البارد لنحصل على المركبين الأعظميين في صورتهما النقية F_1 , F_3 .

4 ـ الفعالية الضد بكتيرية :

- **سلالات الإختبار**: تم الحصول على الأنواع البكتيرية , *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و *Echerichia Coli* ATCC 25922 من مخبر علم البكتيريا و الطفيليات بالمستشفى الجامعي بسطيف .
- **الإختبار البيولوجي** :تمت دراسة الفعالية الضد بكتيرية باستعمال تقنية الأقراص كما هو معمول به في إدارة الغذاء و الدواء بالولايات المتحدة الإمريكية [1]، زراعة البكتيريا تمت باستعمال محلول ملحي معقم للحصول على اضطراب أو غباشة (turbidity) مساوية للكثافة الضوئية 0.1-0.08 عند طول الموجة 625 nm.

تستعمل أقراص ورق واتمان رقم 1 بقطر6mm مشبعة بـــ 10µl من كل تخفيف من المستخلصات المحضرة بتركيز 1.25g/l ، بعد التجفيف توضع الأقراص على سطح أطباق

بتري الحاوية على الأجار المغذي بسمك 4mm المزروع بمختلف أنواع البكتيريا المحضرة من مزرعة فتية (18 ساعة) ،وذلك باستعمال طريقة المسح. و يستعمل gentamycin و الإيثانول كشاهد، تحضن الأطباق في درجة حرارة 37 ^{0}C .

بعد 18 ساعة من التحضين تسجل النتائج بقياس متوسط قطر منطقة التثبيط حول كل قرص كما هو موضح في الجدول(2). ولمعرفة مدى تأثير المستخلصات على البكتيريا تأخذ عينات من منطقة التثبيط لتوضع في وسط مغذي ليعاد حضنها في الدرجة 37 ^{0}C لمدة 18 ساعة. من خلال النتائج المحصل عليها نلاحظ التأثير القاتل للمستخلص البيوتانولي في حين أبدى مستخلص الأسيتات تأثيرا تثبيطيا على النوع S. aureus ATCC 43300 في حين لم تتأثر *E. coli* ATCC 25922 بأي مستخلص أي أن هذه المستخلصات ذات فعالية على البكتيريا موجبة الغرام .

الجدول(2): يوضح قطر التثبيط لمستخلصي النبتة *Retama sphaerocarpa*

سلالات الإختبار	المستخلص	منطقة التثبيط بـــ (mm)							
		1/5v/v			**1/10v/v**			**ethanol**	**Gent.**
		R1	R2	R3	R1	R2	R3		
S. aureus ATCC 43300	A	12S	11S	12S	8S	7S	8S	-	16
	B	20C	20C	20C	15C	15C	15C	-	16
S. aureus ATCC 29213	A	11S	11S	13S	8S	7S	8S	-	35
	B	11S	10S	11S	9S	9S	8S	-	35
E. coli ATCC 25922	A	-	-	-	-	-	-	-	30
	B	-	-	-	-	-	-	-	30

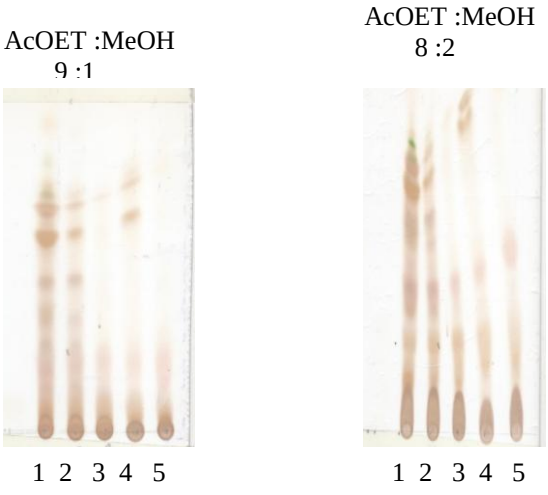
B:butanolic extract
A: AcOEt extract
R1= repetition n°1, R2= repetition n°2, R2= repetition n°3.
Gent.= Gentamycin
S= Bacteriostatic C= Bactericidal .

III-ب -الدراسة الكيميائية للنبتة ***Ammoides atlantica***

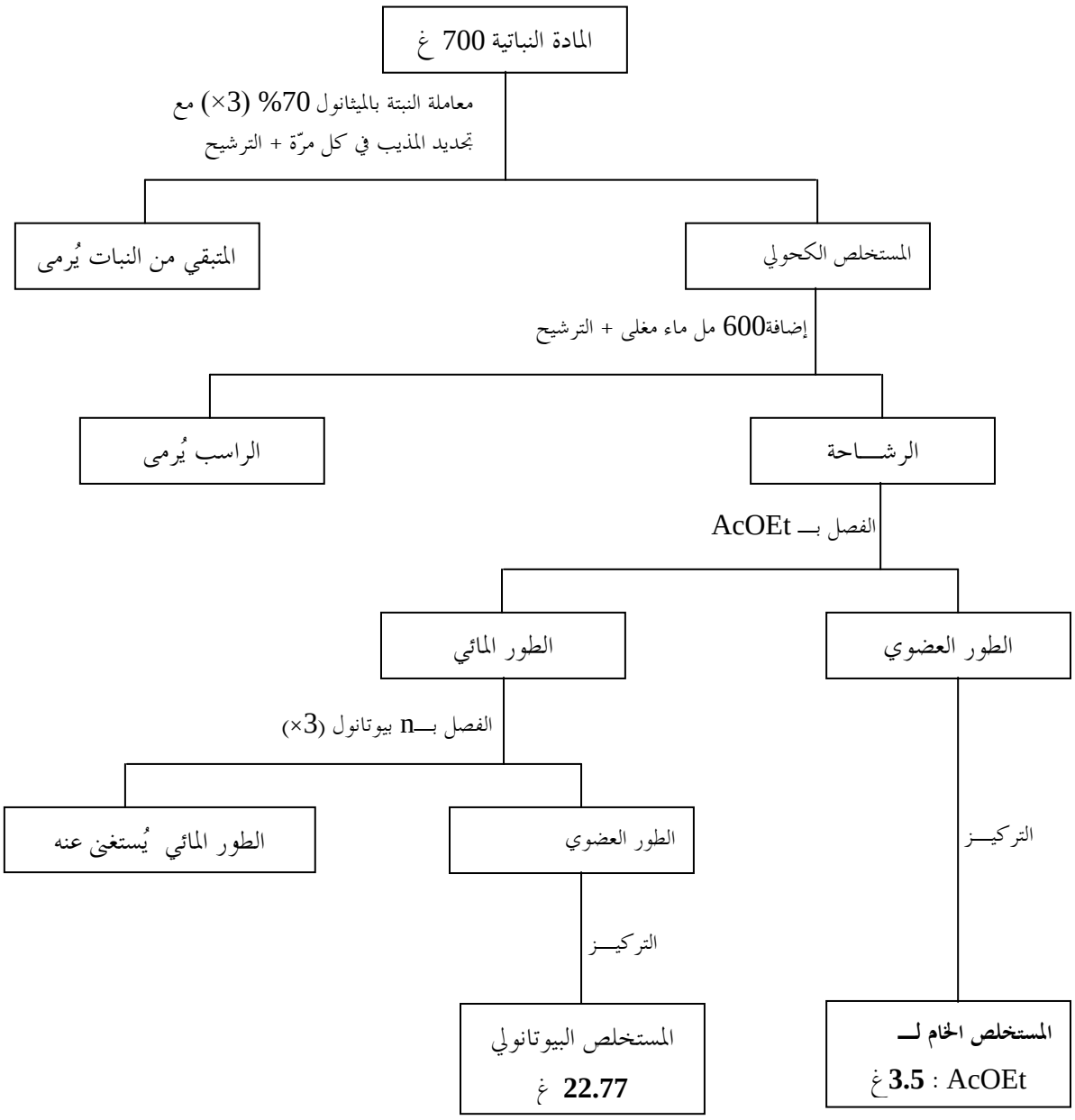
1-المادة النباتية:جمعت النبتة من ضواحي ولاية سطيف بالشرق الجزائري (جبل مغرس) في جوان 2004 وخلال تجميع النبتة تم تخليصها من كل الشوائب العالقة بها, بعدها تمت عملية التجفيف في الظل بعيدا عن الرطوبة .

2 _ الاستخلاص:

بعد قطع النبتة إلى أجزاء دقيقة (700 غ) تم نقعها في محلول كحولي (H_2O: MeOH / 30: 70) ساخن إلى درجة الغليان وتركت لمدة 24 ساعة .رشح المحلول واستقبل المرشح في دورق وبغية الحصول على مستخلص كاف ومعتبر أعيدت العملية ثلاث مرات و في كل مرة يعاد تجديد المذيب .بعدها جمعت المستخلصات الكحولية وركزت عند 35^0c -50^0c حتى الجفاف للتخلص نهائيا من الكحول ليعاد إذابتها في حوالي 600 ملل ماء ملغى . ثم تركت للراحة لمدة ليلة كاملة بعدها رشحت للتخلص من الأتربة و الشوائب. قمنا بالاستخلاص من نوع سائل _ سائل في قمع الفصل واستخدمنا لهذا الغرض مذيبين عديمي الإمتزاز مع الماء هما على التوالي أسيتات الإيثيل [5×200ملل] و البيوتانول العادي [3×200ملل] ليتم بعدها تجفيف المستخلصات تحت ضغط منخفض لتذاب في كميات ضعيفة من الميثانول، بعدها أجريت بعض التحاليل الكروماتوغرافية على المستخلصات الخمسة للأسيتات، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من السيليكاجل فتبين تشابهها حسب كروماتوغرام (V) وقصد زيادة كميتها تم جمعها فكان وزنها بعد التجفيف 3.5 غ وبنفس الطريقة تم جمع مستخلصات البيوتانول فكان وزنها 22.77 غ.و الشكل (2) يمثل مختلف خطوات الإستخلاص .



كروماتوغرام (V) الطبقة الرقيقة المستخلص الأسيتات لنبات *Ammoides atlantica*



الشكل (2): مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص

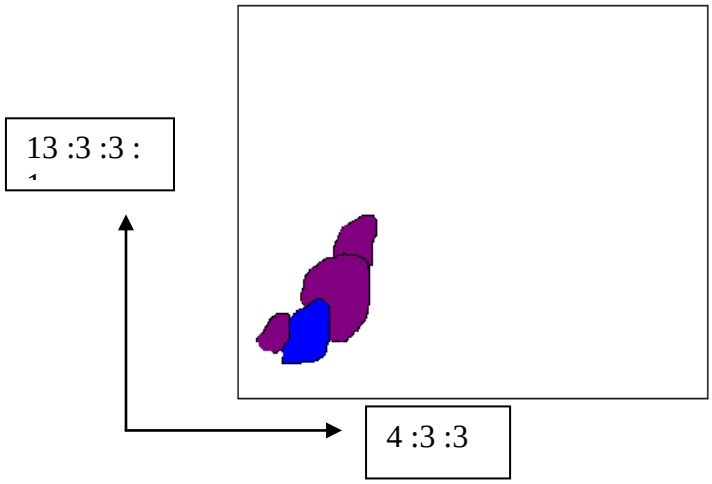
3 –طرق الفصل والتنقية :

قبل شروعنا في عمليات الفصل قمنا بإجراء فحوصات تحليلية أولية لكل من مستخلص الأسيتات و البيوتانول ودلك بإستعمال الجملة الكروماتوغرافية التالية :

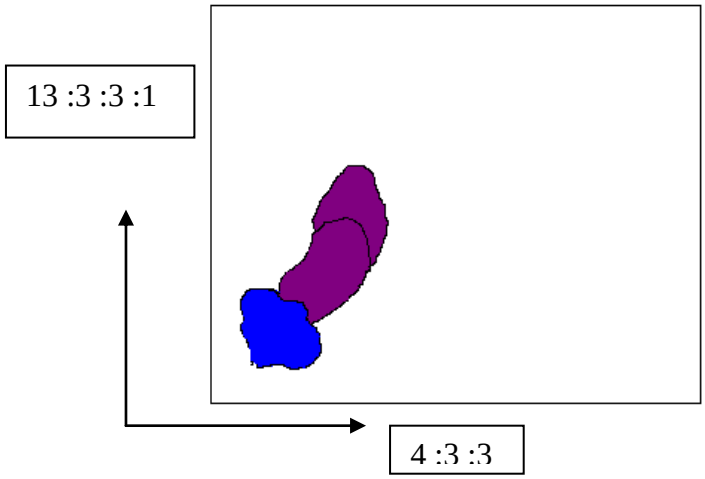
كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6 ثنائي البعد :

البعد الأول : 4:3:3 ـ ميثانول : مثيل إيثيل سيتون : طوليان.

البعد الثاني : 13:3:3:1 ـ أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.



كروماتوغرام (VI) ثنائي البعد لمستخلص الأسيتات لنبات *Ammoides atlantica*



كروماتوغرام (VII) ثنائي البعد لمستخلص البيوتانول لنبات *Ammoides atlantica*

نلاحظ تشابه كبير بين الكروماتوغرامين (**VI**) و(**VII**) مما يعني عدم الجدوى من دراسة مقارنة كما نلاحظ فقر النبتة للمركبات الفلافونيدية و على الرغم من ذلك قررنا دراسة هذه النبتة لأصالتها ,ومن خلال الكروماتوغرام (**V**) نلاحظ أن هذا النظام مناسب لفصل أكبر قدر ممكن من مركبات النبتة, ولذلك عمدنا إلى إجراء عمود كروماتوغرافي لـــ 3.5غ من طور الأسيتات مستعينين بـــ سليكا جال (60 ;0.04-0.063 nm Merk) كدعامة و الهكسان العادي كمملص ورفع القطبية بأسيتات الإثيل ليليها الميثانول .

وتم إستقبال الحزم النازلة في دوارق سعتها 100ملل ليتم جمع المتشابه منها بالاعتماد على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (أوراق اللألمنيومMerk,gel de silice $60F_{254}$ بسمك0.2 ملم) والنتائج المحصل عليها مدونة في الجدول(3):

الجدول (3) : الكسور المتحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي

رقم الكسر	الهكسان %	أسيتات الإثيل %	الملاحظة
1-3	100	0	لا شيء
4-5	95	5	**F_1** خليط لم يعالج
6-10	90	10	
11-14	85	15	**F_2** خليط لم يعالج
15-17	80	20	
18-24	80	20	**F_3** خليط لم يعالج
24-27	75	15	
28-44	75	15	**F_4** خليط لم يعالج
45-59	70	30	**F_5** خليط لم يعالج
60-79	65	35	**F_6** ظهور راسب أصفر نقي
80-92	60	40	
93-97	60	40	**F_7**

98-103	50	50	F_7 خليط ممكن الفصل
104-108	50	50	
109-115	50	50	F_8 خليط صعب الفصل
116-123	40	60	
124-141	40	60	F_9 خليط لم يعالج
142-171	30	70	
172-174	20	80	
175-177	20	80	F_{10} ظهور مركب نقي
178-209	10	90	
210-217	0	100	F_{11} خليط يظهرعلى شكل راسب
218-250	0	100	F_{12} ظهور مركب نقي
رقم الكسر	**الميثانول %**	**أسيتات الإثيل %**	
251-263	5	95	
264-269	10	90	F_{13} خليط يحوي المركب السابق

خلال جمع هذه الكسور لاحظنا ظهور رواسب في البعض منها، ليتم غسلها بالميثانول البارد ثم يعاد بلورتها في الميثانول الساخن لنحصل على (32mg)من المركب **AF_{10}** على شكل بلورات صفراء، نقية جدا، وعلى (40mg)**AF_{11}** و (10mg) **AF_6** **في** شكل مساحيق صفراء نقية .أما الراسب الذي يظهر في الكسر**F_{12}** فتم غسله بالميثانول لنحصل على بلورات بيضاء ذوابة في الماء (15mg) **AF_{12}**.

إخترنا الكسر **F_7** للدراسة لكميته المعتبرة، ولاحتوائه على مركب أعظمي **AF_7** والمركب السابق **AF_6**، فكان النظام المستعمل (5 :5) n-hexane : èthyl acètate ،لتتم تنقيته بعد ذلك بإستعمال عمود صغيرمن السيفاداكس (Sephadex LH20) باستخدام الميثانول كملص.

أما الكسور المتبقية فهي جد معقدة وتتواجد بكميات ضعيفة لا جدوى من دراستها .

المرجع

[1] Lennette , H.E., Balows, A., Hausler J.W., Shadomy H.J. (1985) . Manual of clinical microbiology. 4th ed. American Society for microbiology, Washington DC.

الفصل الرابع

التعيين البنيوي للمركبات المفصولة

IV - أ- **التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Retama sphaerocarpa*** :

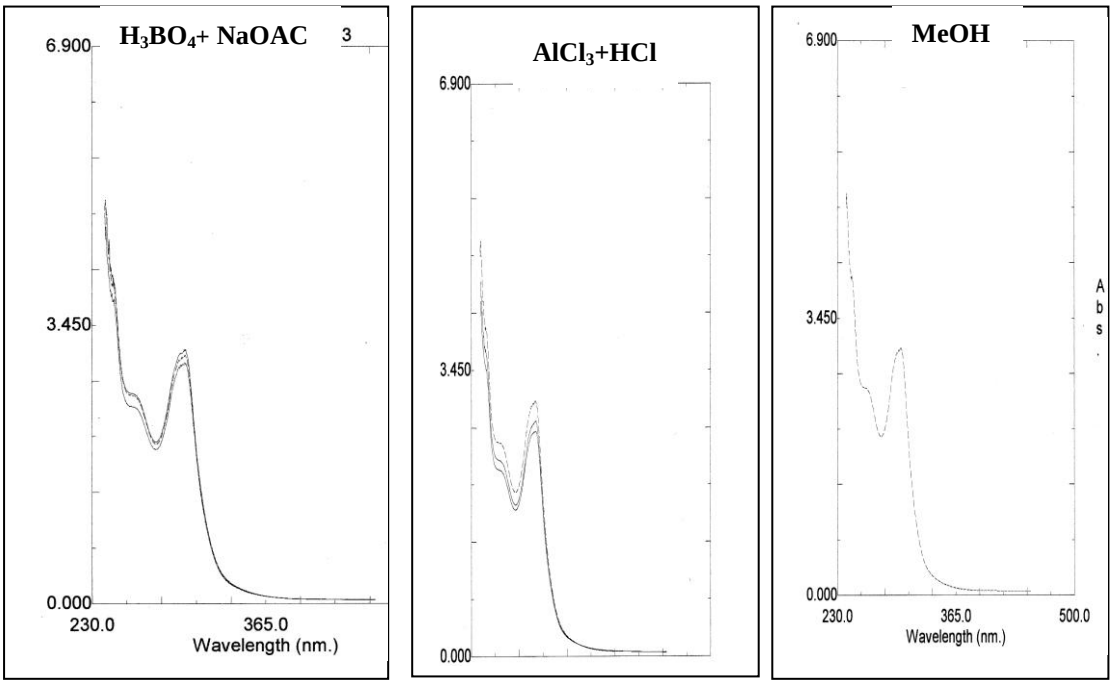
بالإضافة إلى المركبات الأربع المكتشفة خلال رسالة الماجستير فقد تم التعرف على أربع أخرى، وذلك بالاستعانة بالسلوك ا لكروماتوغرافي وكذا المعطيات الطيفية (UV) , NMR^{1}H , NMR ^{13}C , HSQC, HMBC , Ms,Cosy .

أـ 1 ـ التحليل البنيوي للمركب F_3

ـ السلوك الكروماتوغرافي :

الجملة	S_1	S_2	S_3
Rfx100	78	37	50
اللون الاستشعاعي	أصفر		

$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
S_2 = BAW
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1



الشكل (1) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_3

طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول كما هو موضح في الشكل (1) يكشف على كون المركب **F_3** عبارة عن إيزوفلافون .

غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** :

عند مقارنة طيف **NaOAC** بطيف **MeOH** دليل على غياب OH في الموقع 7.

وعند مقارنة طيف **$NaOAC+H_3BO_4$** بطيف **MeOH** دليل على غياب أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A .

عند مقارنة طيف **$AlCl_3+HCl$** بطيف **MeOH** دليل على غياب OH في الموقع 5

أما مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون حسب الشكل(2) فتظهر:

إشارة أحادية عند $\delta = 8,25$ ppm موافقة لـــ H_2 و المميزة للإيزوفلافون.

وإشارة ثنائية ($J = 8,9$ Hz) عند $\delta = 8,00$ ppm موافقة لـــ H_5.

وإشارة ثنائية ($J = 2,3$ Hz) عند $\delta = 7,25$ موافقة لـــ H_8.

إشارة ثنائي ثنائي ($J = 8,9\text{-}2,3$ Hz) عند $\delta = 7,15$ موافقة لـــ H_6.

إشارة أحادية عند $\delta = 6,87$ ppm موافقة لـــ $H_{5'}$.

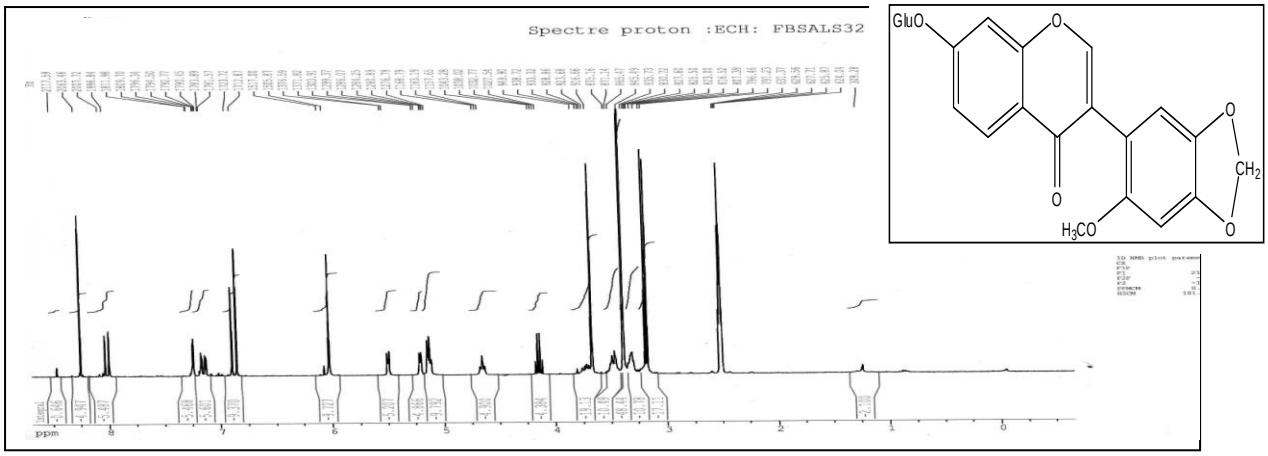
إشارة أحادية عند $\delta = 6,82$ ppm موافقة لـــ $H_{2'}$.

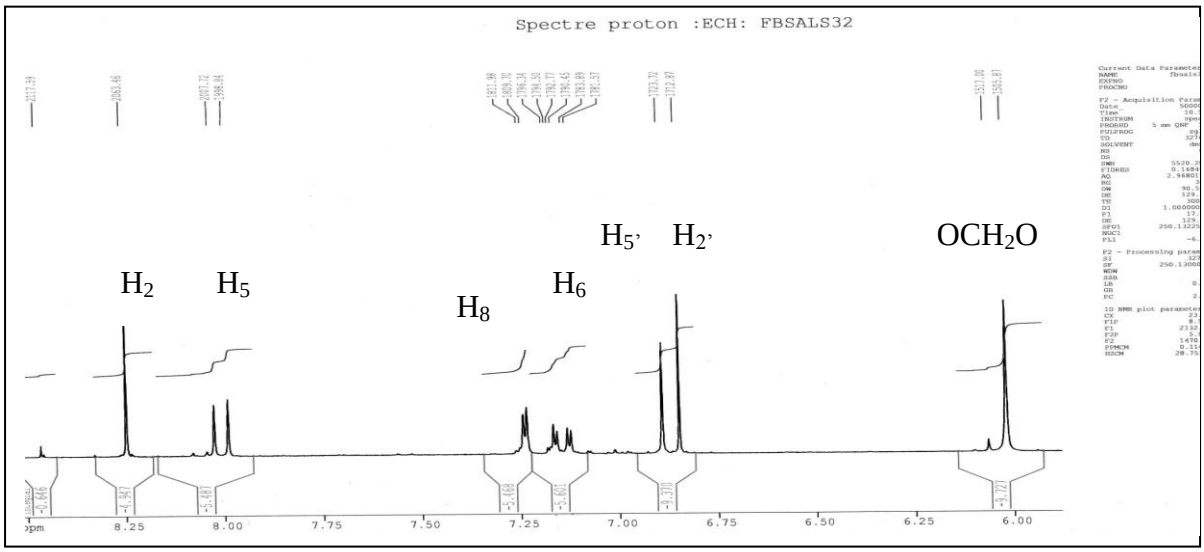
إشارة أحادية عند $\delta = 6,00$ ppm موافقة لـــ OCH_2O.

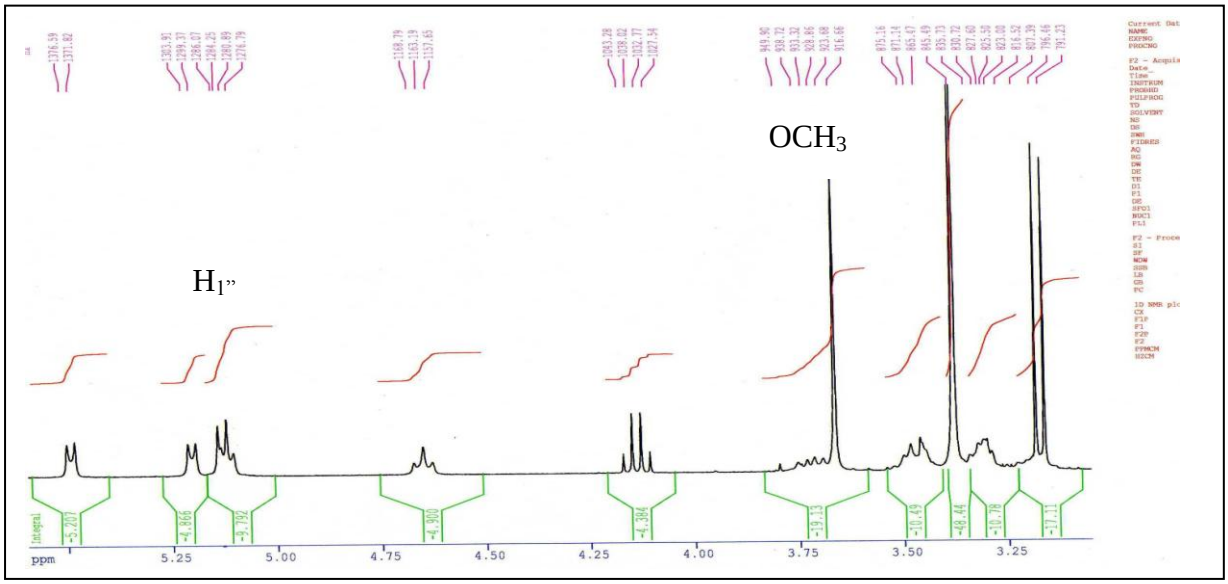
إشارة أحادية عند $\delta = 3,7$ ppm موافقة لـــ OCH_3 .

وإشارة ثنائية ($J = 7,5$Hz) عند $\delta = 5,12$ppm موافقة للبروتون الأنوميري $H_{1''}$ للجليكوزالذي تم التعرف عليه من خلال الإماهة الحمضية لهذا المركب و المطابقة الكروماتوغرافية للسكر المتحرر مع الشواهد المعروفة حسب الشكل(19)

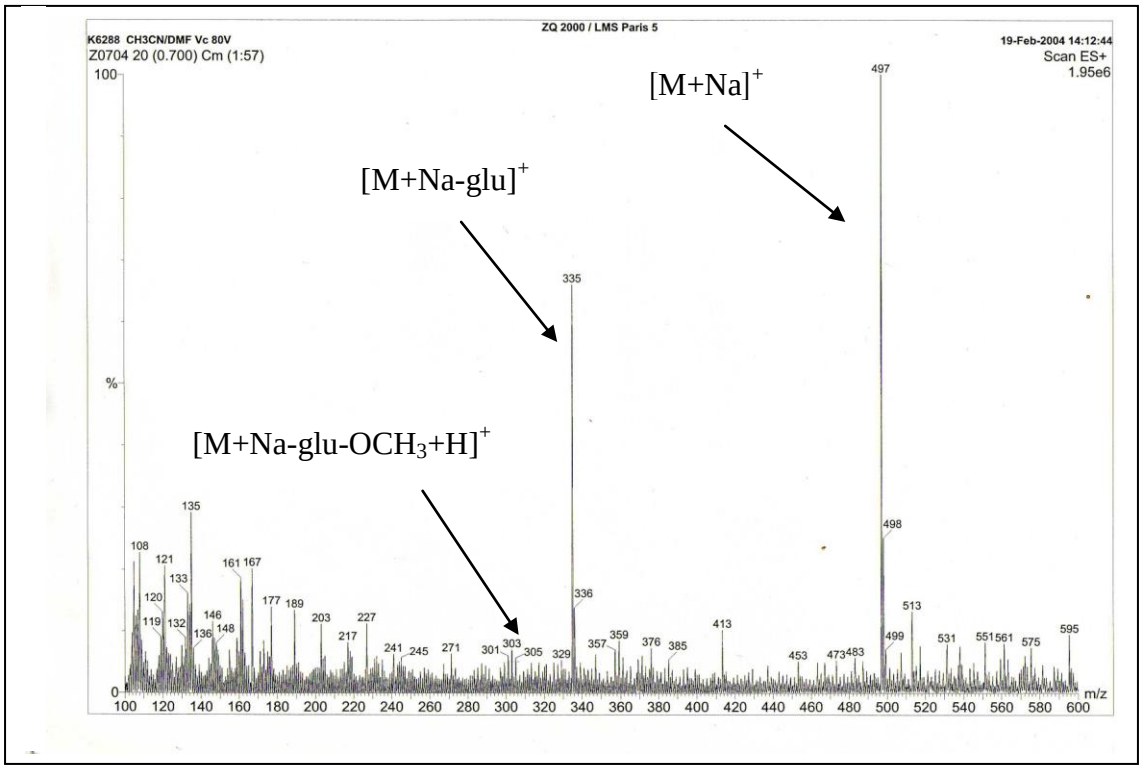
أما مطيافية الكتلة ES^+ فأعطت قيمة عظمى عند 497 ممثلة لـــ$[M+Na]^+$ بنسبة100% توافق الصيغة المجملة $C_{23}H_{22}O_{11}$، و قيمة عند 335 موافقة لـــ $[M+Na\text{-}glu]^+$ و قيمة عند 305 موافقة لـــ $[M+Na\text{-}glu\text{-}OCH_3+H]^+$ وهي قيمة مميزة للإيزوفلافونات الحاملة لمجموعة OCH_3 في الموقع $6'$ على الحلقة B [1] كما هو موضح في الشكل(5)





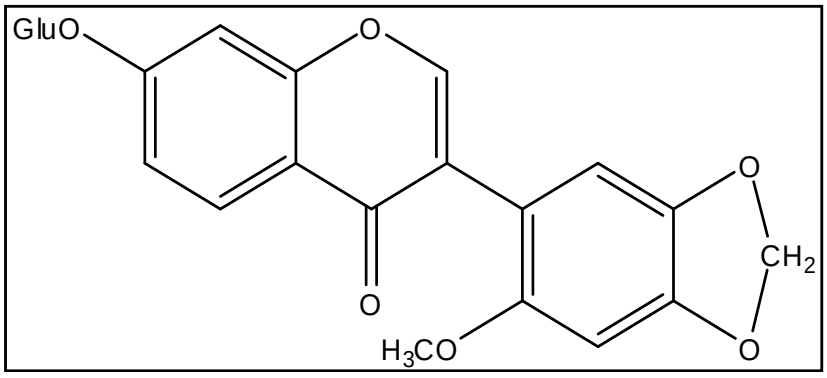


الشكل (2) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (DMSO-d_6،250MHz) للمركب F_3

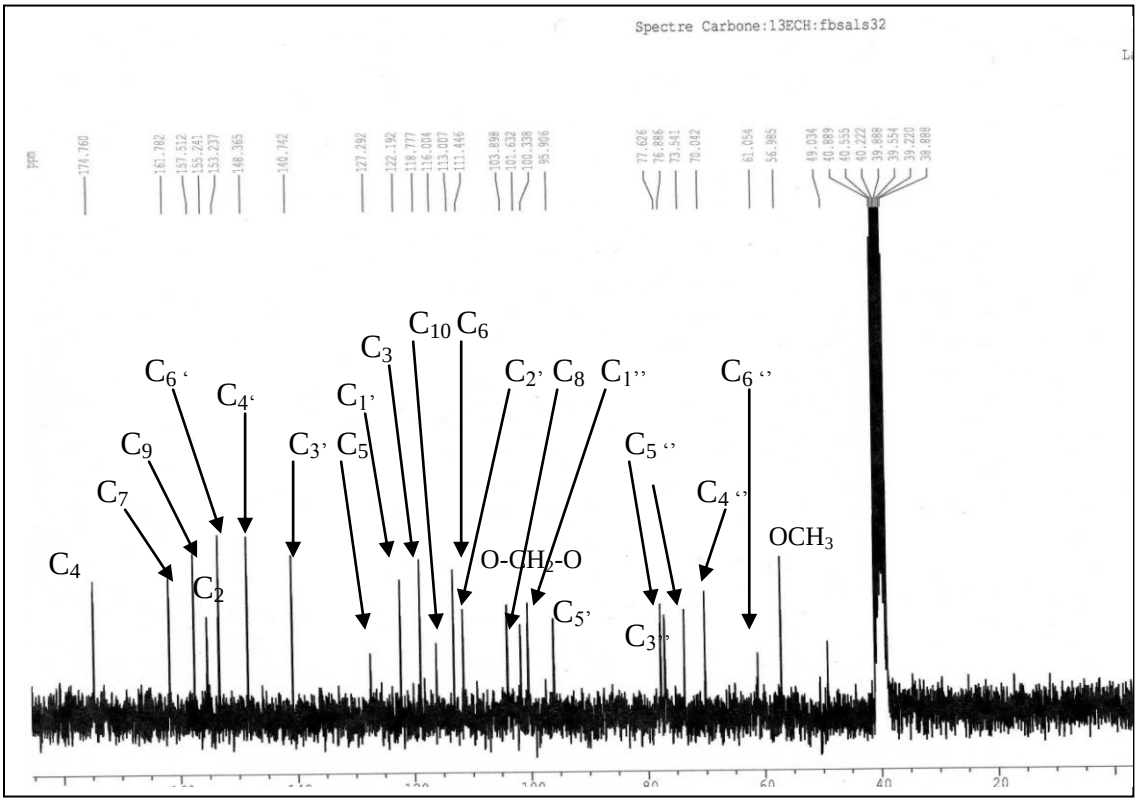


الشكل (4)طيف الكتلة (ES^+) للمركب F_3

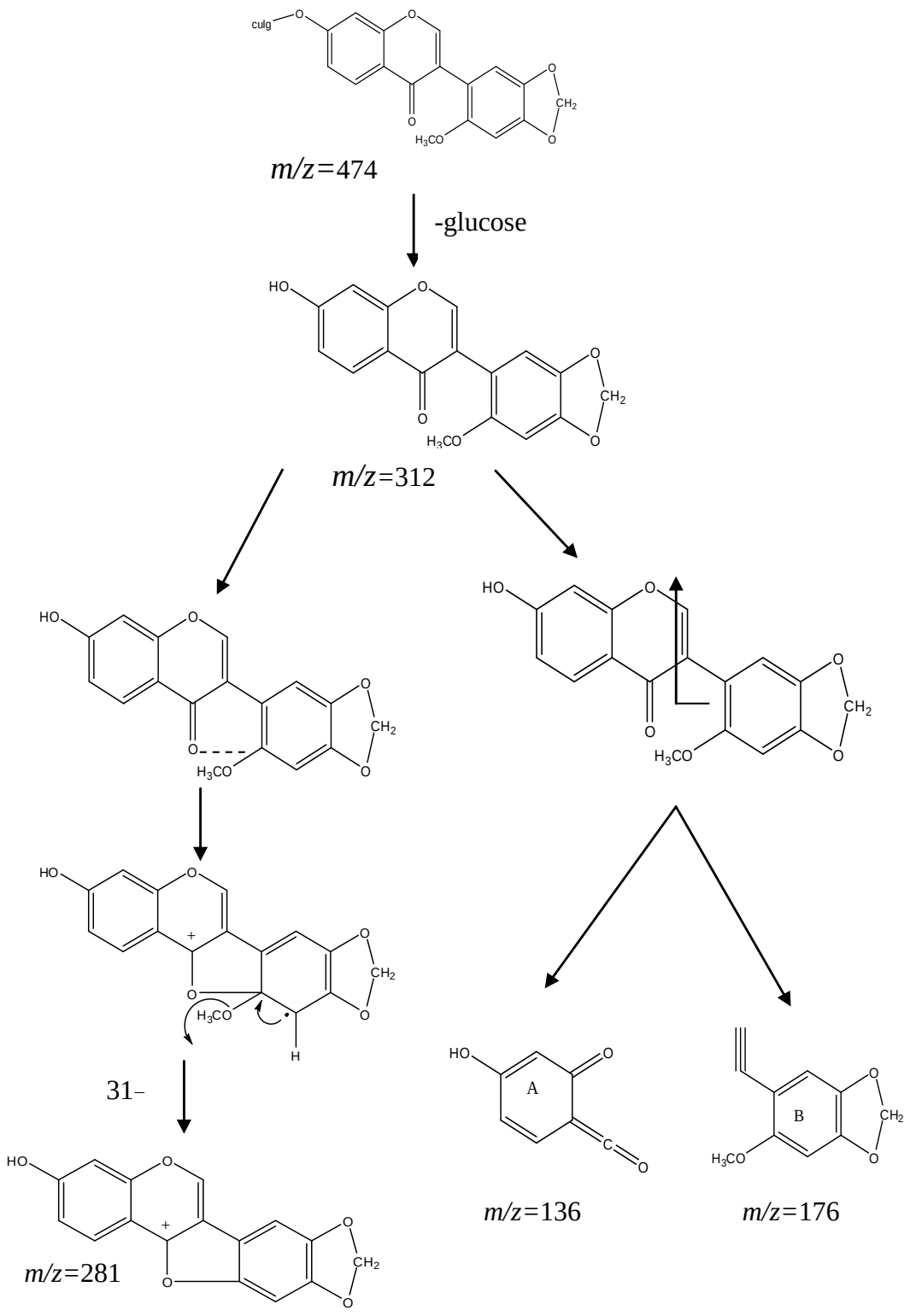
وجاءت نتائج مطيافية الرنين النووي ا لمغناطيسي للكربون **$NMR^{13}C$** كما هو موضح في الشكل(3) مؤكدة وموافقة للنتائج السابقة، ومطابقة للنتائج الببليوغرافية[2]. و عليه يمكن إقتراح صيغة المركب F_3 كالتالي:



6′-methoxypseudobaptigenin7-*O*-β-glucoside :7-hydroxy-6′-methoxy-3′,4-′ methylenedioxyisoflavone 7-*O*-β-glucoside.



الشكل (3) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون في (DMSO-d_6 250MHz) للمركب F_3



الشكل (5):ألية تشظية المركب F_3 حسب طيف ($SM\ ES^+$)

الجدول(1) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis

المفاعلات	الحزمة I	الحزمة II
MeOH	302	270
NaOAC	302	270
H_3BO_4	302	270
$AlCl_3$	302	270
$AlCl_3$+HCl	302	270

جدول(2) ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركبF_3

الهيدروجين الموافق	التعددية	التكامل	δ(ppm)
H_2	S	1H	8,25
H_5	d(J=8,9)	1H	8
H_8	d(J=2,3)	1H	7,25
H_6	dd(J=8,9-2,3)	1H	7,15
H_5’	S	1H	6,87
H_2’	S	1H	6,82
O-CH_2-O	S	2H	6,00
O-CH_3	S	1H	3.7
H_1’’	d(J=7,5)	1H	5,12

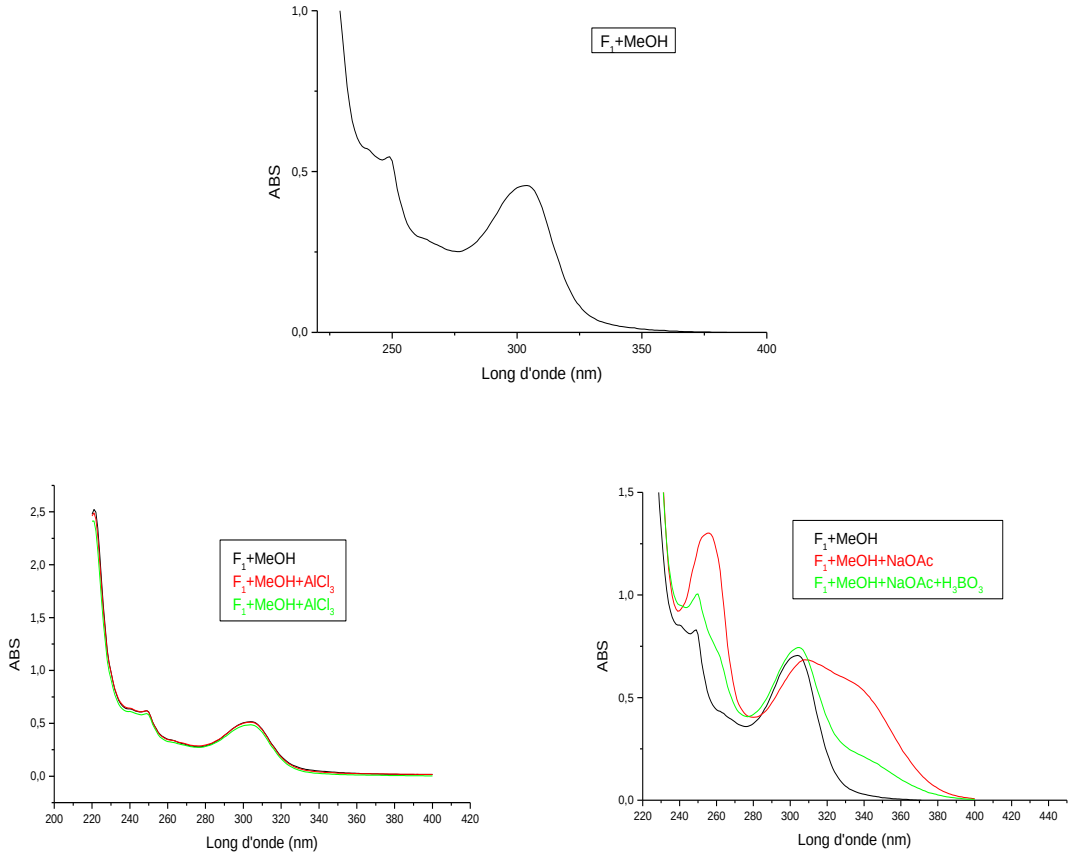
جدول(3) ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (في DMSO-d_6) للمركب F_3

الكربون الموافق	δ(ppm)	الكربون الموافق	δ(ppm)
C_2	155.24	$C_{4'}$	148.36
C_3	118.77	$C_{5'}$	95.91
C_4	174.76	$C_{6'}$	153.24
C_5	127.29	$C_{1''}$	100.34
C_6	113.00	$C_{2''}$	73.54
C_7	161.78	$C_{3''}$	77.63
C_8	103.89	$C_{4''}$	70.04
C_9	157.51	$C_{5''}$	76.88
C_{10}	116.00	$C_{6''}$	61.05
$C_{1'}$	122.19	O-CH_2-O	101.63
$C_{2'}$	111.45	O-CH_3	56.98
$C_{3'}$	140.74		

أ ــ 2 ـ التحليل البنيوي للمركب F_1

S_2 = BAW
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1
S_4 = 4:3:3

S_4	S_3	S_2	الجملة
86	10	90	**Rfx100**
أصفر			**اللون الاستشعاعي**

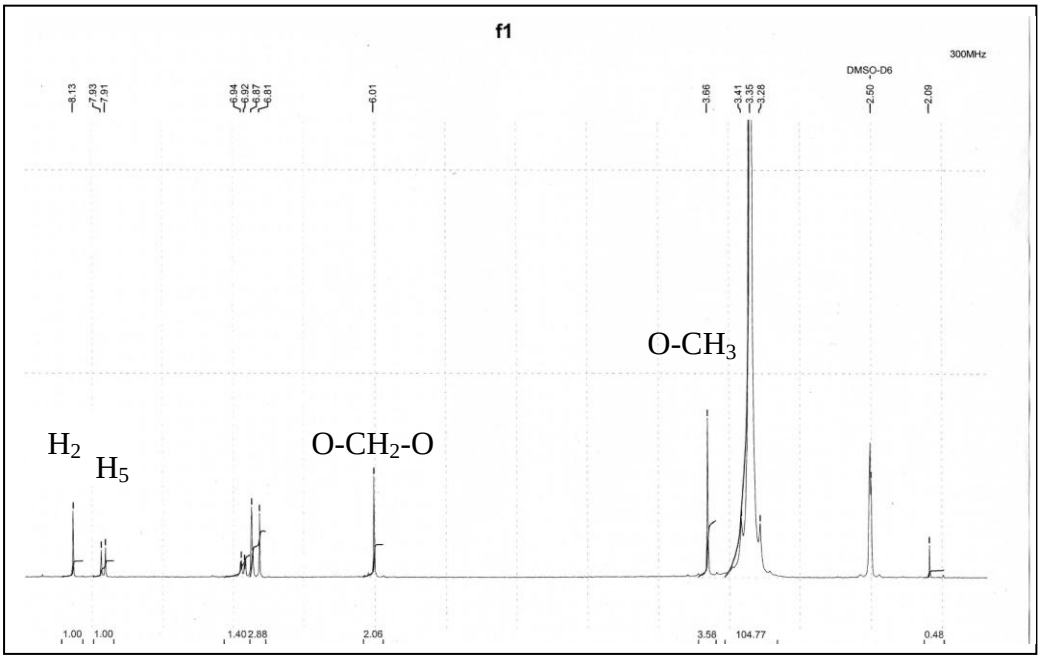


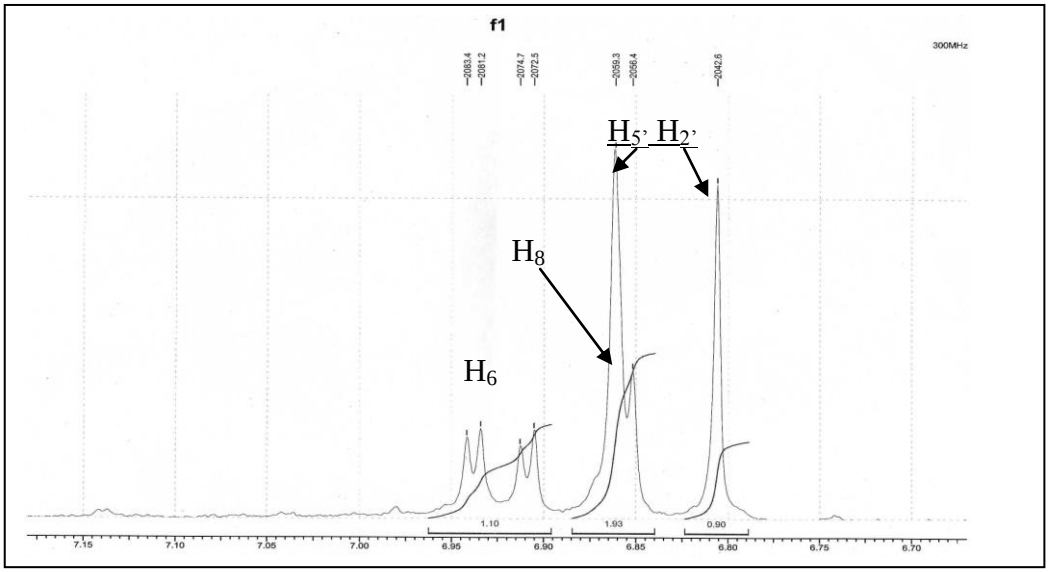
الشكل (6) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_1

طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول يكشف على كون المركب **F_3** عبارة عن إيزوفلافون .

الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** $\Delta\lambda_2$= 6 nm عند مقارنة طيف **NaOAC** بطيف **MeOH** دليل على وجود OH في الموقع 7.

غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** عند مقارنة طيف **$NaOAC+H_3BO_4$** بطيف **MeOH** دليل على غياب أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A .كما نستدل على غياب OH في الموقع 5 بغياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** عند مقارنة طيف **$AlCl_3+HCl$** بطيف **MeOH** .





الشكل (7) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب F_1 (300MHz,DMSO-d_6)

تبين لنا مطياقية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون كما هو موضح في الشكل(7) أن المركب **F_1** عبارة عن إيزوفلافون والمميز بالإشارة الأحادية عند 8.13 ppm الموافقة لـــH_2. و نلاحظ تطابق تقريبي لكل الإشارات مع المركب السابق F_3 مع غياب الإشارات الخاصة بالسكر إذ تظهر:

إشارة ثنائية (J = 8,70 Hz) عند δ = 7.9 ppm موافقة لـــ H_5.

إشارة ثنائي ثنائي (J = 8,70-2,2 Hz) عند δ = 6.9ppm موافقة لـــ H_6.

وإشارة ثنائية (J = 2.2Hz) عند δ = 6.87 ppm موافقة لـــH_8

إشارة أحادية عند δ = 6.87 ppm موافقة لـــ $H_{5'}$.

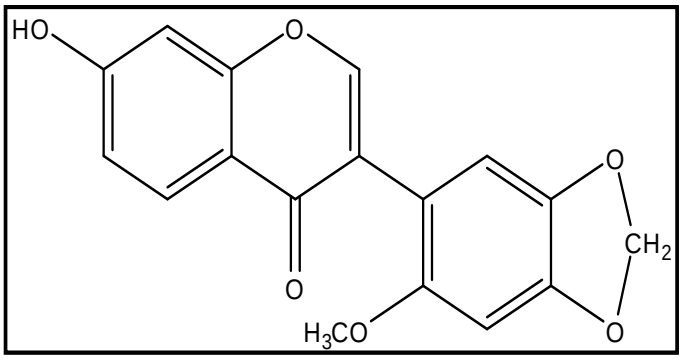
إشارة أحادية عند δ = 6.81 ppm موافقة لـــ $H_{2'}$.

إشارة أحادية ثنائية التكامل عند δ = 6.01 ppm موافقة لـــ OCH_2O.

إشارة أحادية ثلاثية التكامل عند δ = 3.66 ppm موافقة لـــ OCH_3 .

وبالتالي يمكن القول أن المركب F_1 عبارة عن أجليكون للمركب F_3 فنخلص إلى كون هذا المركب عبارة عن: 7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone.

والذي تم إكتشافه لأول مرة في النبتة *Tephrosia maxima* [1].



7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone.

الجدول(1) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis

المفاعلات	الحزمة I		الحزمة II
MeOH	303		249
NaOAc	336	308	255
H_3BO_4	305		249
$AlCl_3$	303		249
$AlCl_3$+HCl	303		249

جدول(4) ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركبF_1

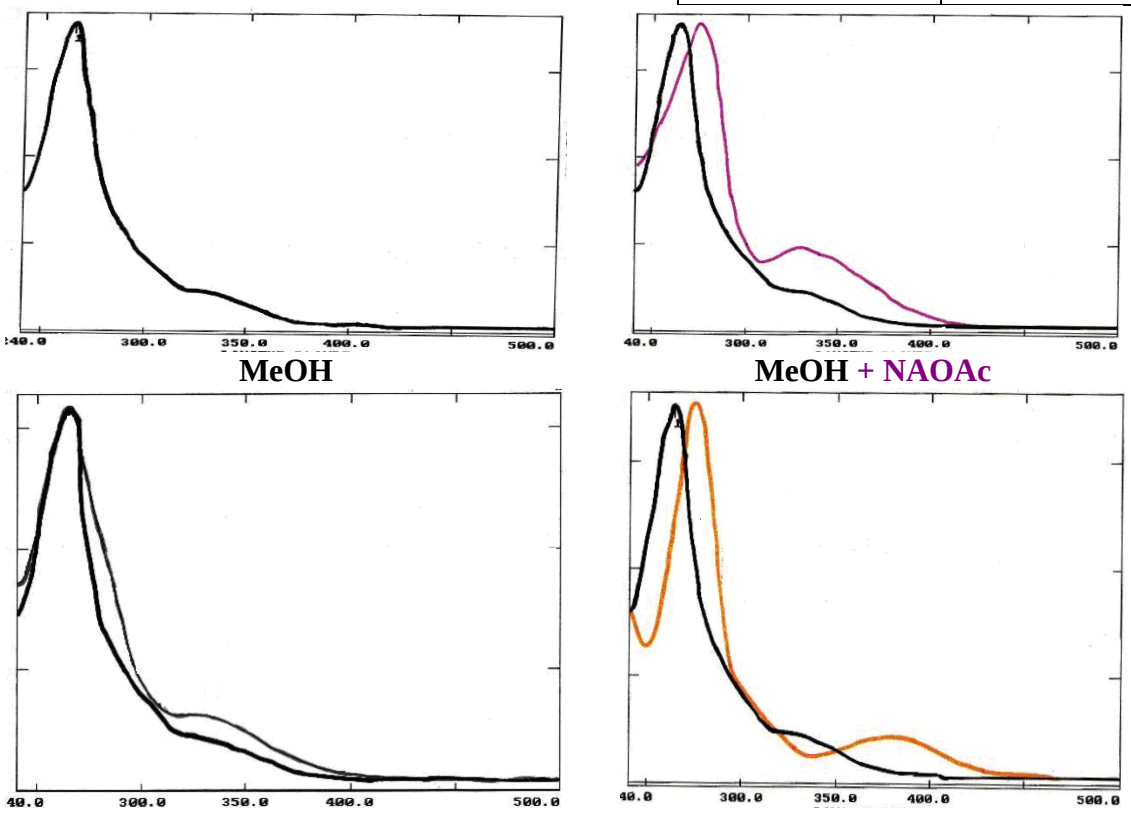
δ(ppm)	التكامل	التعددية	الهيدروجين الموافق
8,13	1H	S	H_2
7.90	1H	d(J=8,7)	H_5
6.90	1H	dd(J=8,7-2,2)	H_6
6.87	1H	d(J=2.2)	H_8
6,87	1H	S	H_5’
6,81	1H	S	H_2’
6,01	2H	S	O-CH_2-O
3.66	3H	S	O-CH_3

أ - 3 _ التحليل البنيوي للمركب F_9 :

_ السلوك الكروماتوغرافي :

S_1 = CH_3COOH (15%)
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1
S_4 = 4:3:3

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rfx100	68	32	30
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		



الشكل (7) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_9

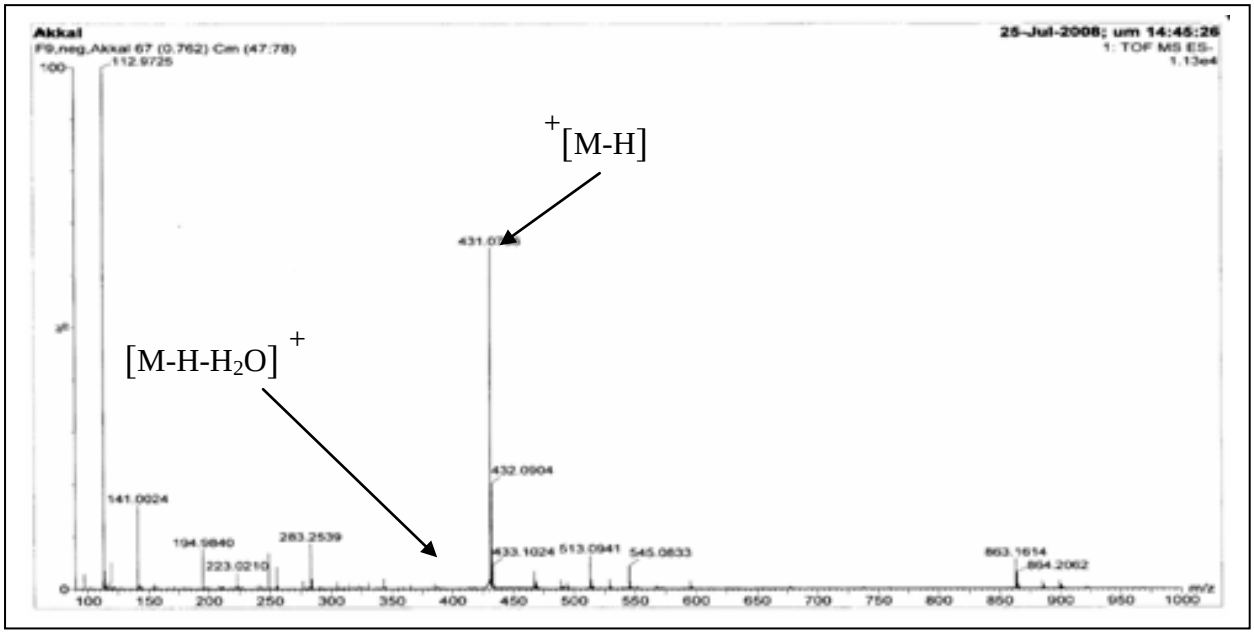
طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول يكشف على كون المركب **F_9** عبارة عن إيزوفلافون ،ويدل سلوكه الكروماتوغرافي في الأنظمة القطبية على كونه إتيروزيد أحادي السكر الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** بـ :

$\Delta\lambda_2$=11nm عند مقارنة طيف MeOH بطيف NaOAc دليل على وجود OH في الموقع 7.

$\Delta\lambda_2$=13nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH إشارة لوجود OH في الموقع 5 .

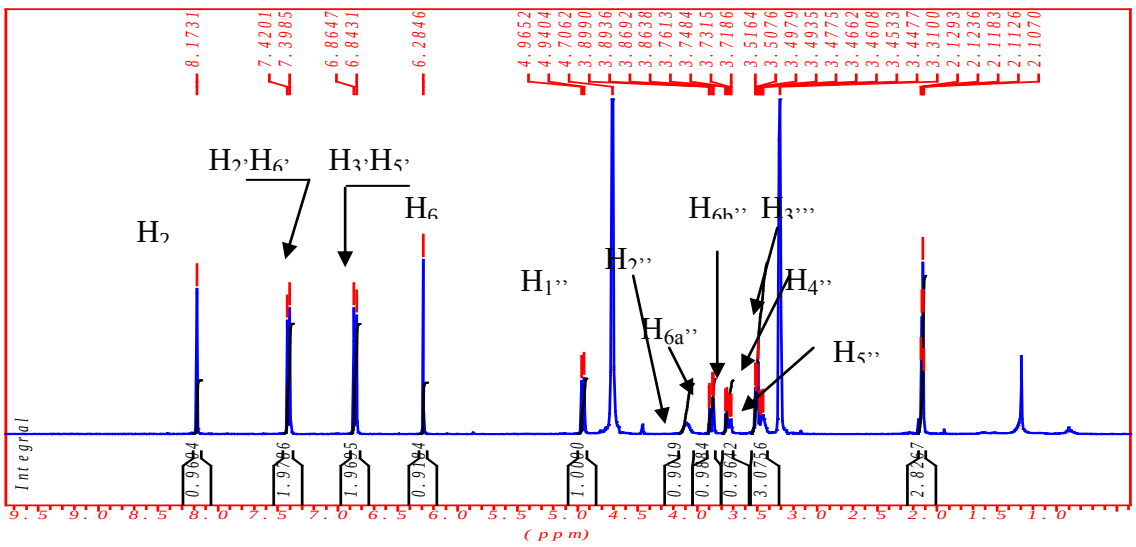
والذي تؤكده الإشارة الأحادية عند 13.2 ppm بإعادة تسجيل طيف RMN ^1H في DMSO.

غياب أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A تترجمه الإزاحة الباتوكرومية الضعيفة $\Delta\lambda_2$=2nm عند مقارنة طيف MeOH بطيف NaOAc +H_3BO_3 .



الشكل (8) طيف الكتلة (ES⁻) للمركب F_9

أعطت مطيافية الكتلة قيمة للأيون الجزيئي عند $m/z=$ 432 موافقة للصيغة المجملة $C_{21}H_{20}O_{10}$ وكذا القيمة $m/z=$ 431 الموافقة لـــ $[M-H]^+$ و بالتالي يتأكد وجود السكر ولك ن عدم تأثر المركب بالإماهة الحمضية يؤكد الإرتباط C-glycose، أما الظهور الضعيف للإشارة $m/z=$ 413 الموافقة لفقدان الماء $[M-H-H_2O]^+$ يعزز إحتمال إرتباطه بـــ C-8 [3].



الشكل (9) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب F_9 في (DC_3OD,400MHz).

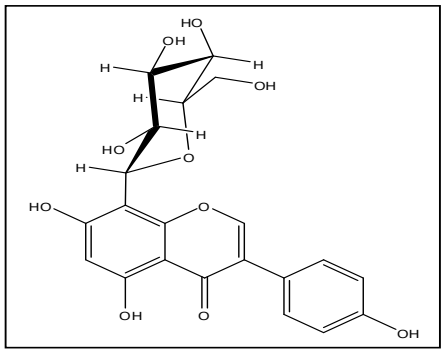
فمطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تظهر إشارة أحادية عند 8.17 ppm وإشارة ثنائية عند 4.95ppm بثابت تزاوج $J=9.9Hz$ موافقة لـــ H_2 , $H_{1''}$ على التوالي مميزة لإيزوفلافون مستبدل β -C-glucoside ، من خلال HMBC كلا البروتونين يظهران تعالقا مع C_9 عند 157ppm كما يظهر $H_{1''}$ تعالق ب C_7 عند 164ppm وكذا بـــ C_8عند 105ppmوبالتالي يتأكد إستبدال الإيزوفلافون في الموقع 8 بـC-glucose ، في حين يتعالق البروتون H_6 الذي يظهر على شكل أحادي عند 6.28ppm بـ C_{10} عند 105.9ppmو بـــC_5 عند 163ppm وكذا بـــ C_7 .

وفيما يخص الحلقة C، فيظهر البروتون H_2 تعالقا بـــ C_4 عند 181.6ppm وبـــC_3 عند 121ppmوبـ $C_{1'}$ عند 122ppm.

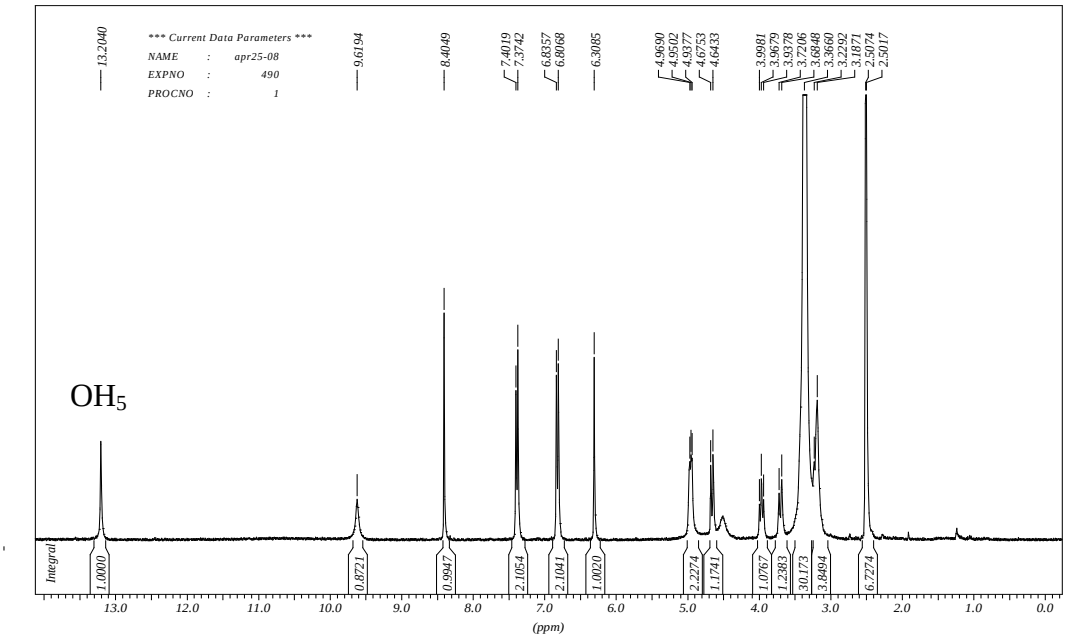
أما الحلقة B فيظهر البروتونين $H_{2'}H_{6'}$ تعلقا بالكربونين الحاملين لهما عند 130.5ppm كما يظهران تعالقا بـــ$C_{1'}$ وبـــ$C_{4'}$ عند 158 ppm

كما يتعالق البروتونين $H_{3'}H_{5'}$ بالكربونين الحاملين لهما عند 115.5ppm وبـــ $C_{4'}$ وكذا $C_{1'}$.

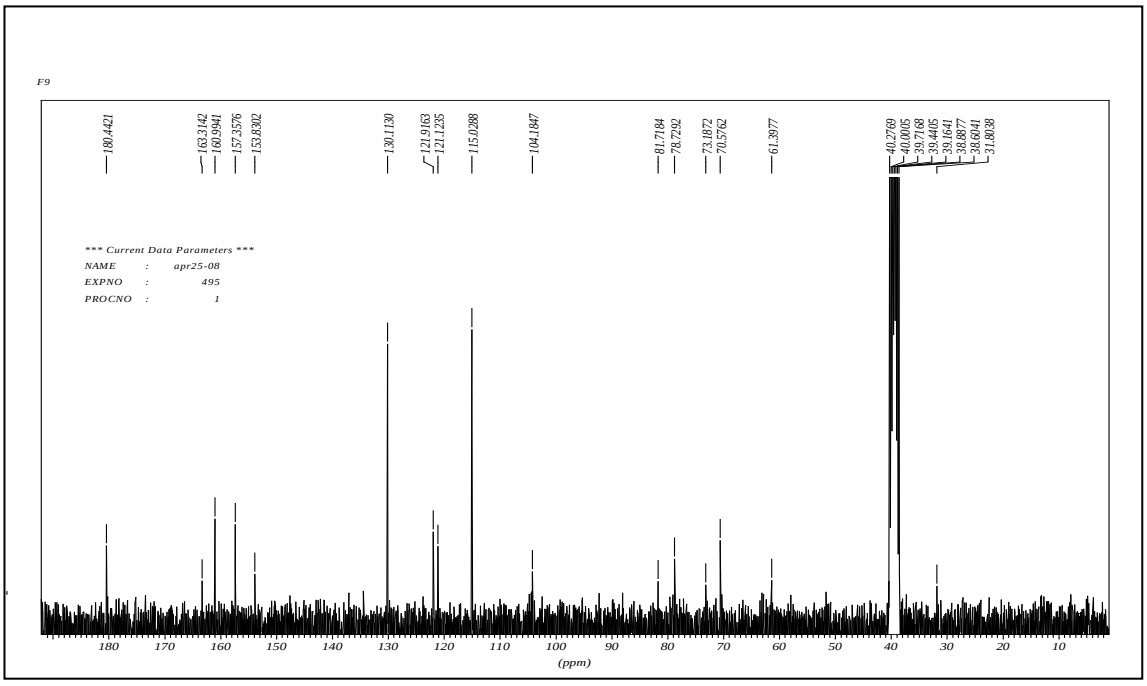
وبالتالي تقود معطيات ^{13}C RMN ,^{1}H RMN جدول وتعالقات Cosy H-H ,(HMQC,HMBC) في الجدولين (7,6) على التوالي إلى إستنتاج البنية النهائية للمركب F_9 على أنها :



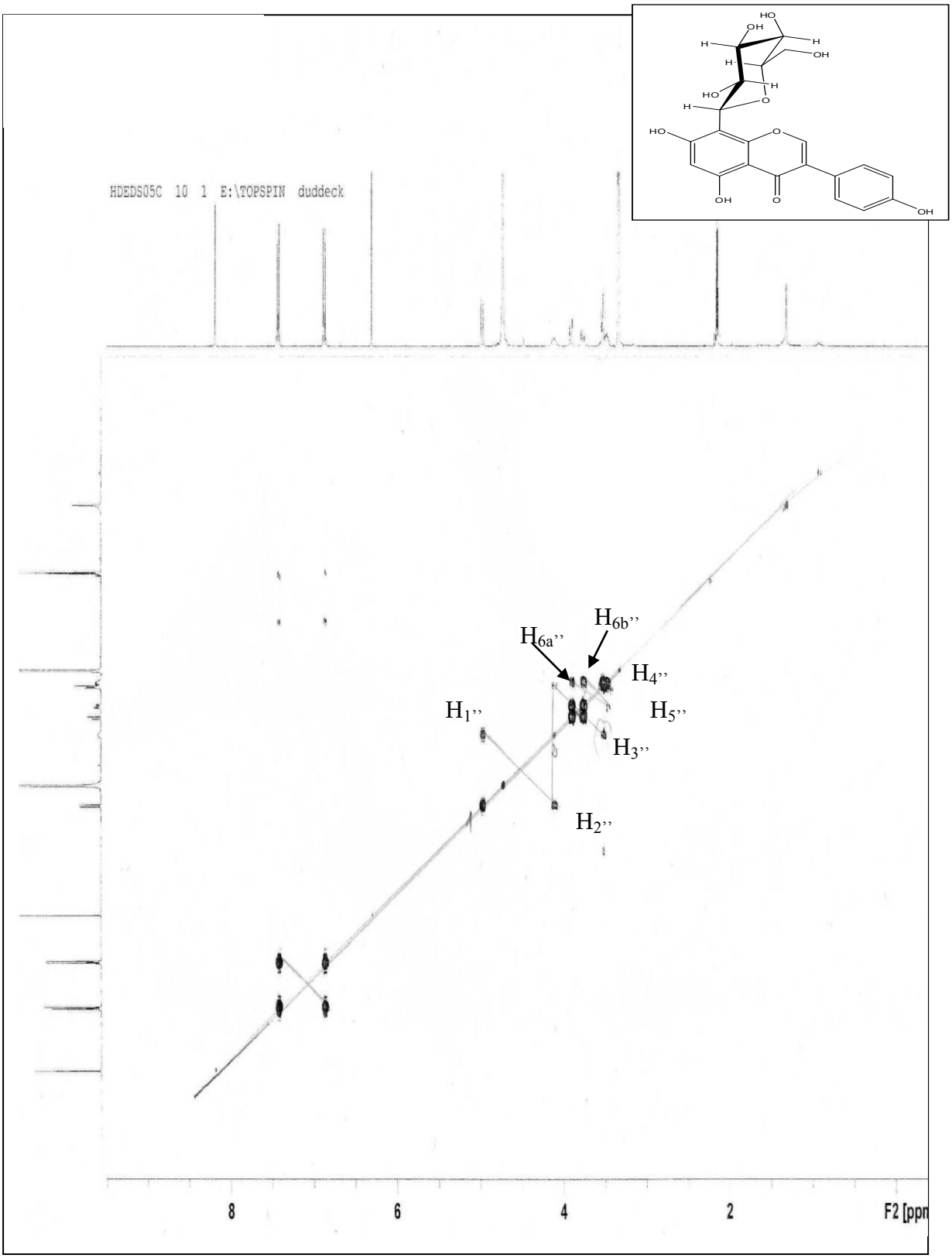
5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-C-glucoside



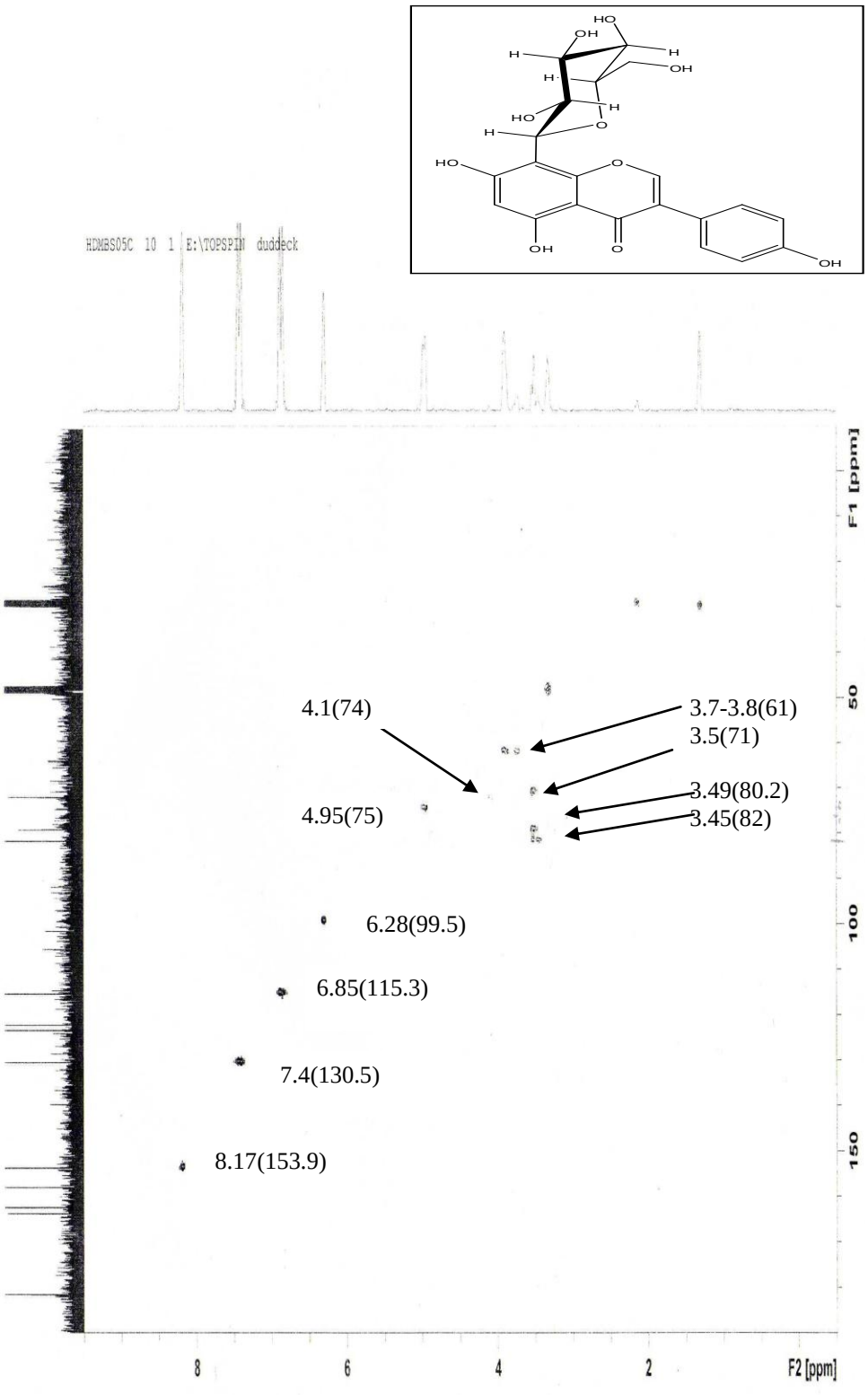
الشكل (10) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب F_9 **في (DMSO).**



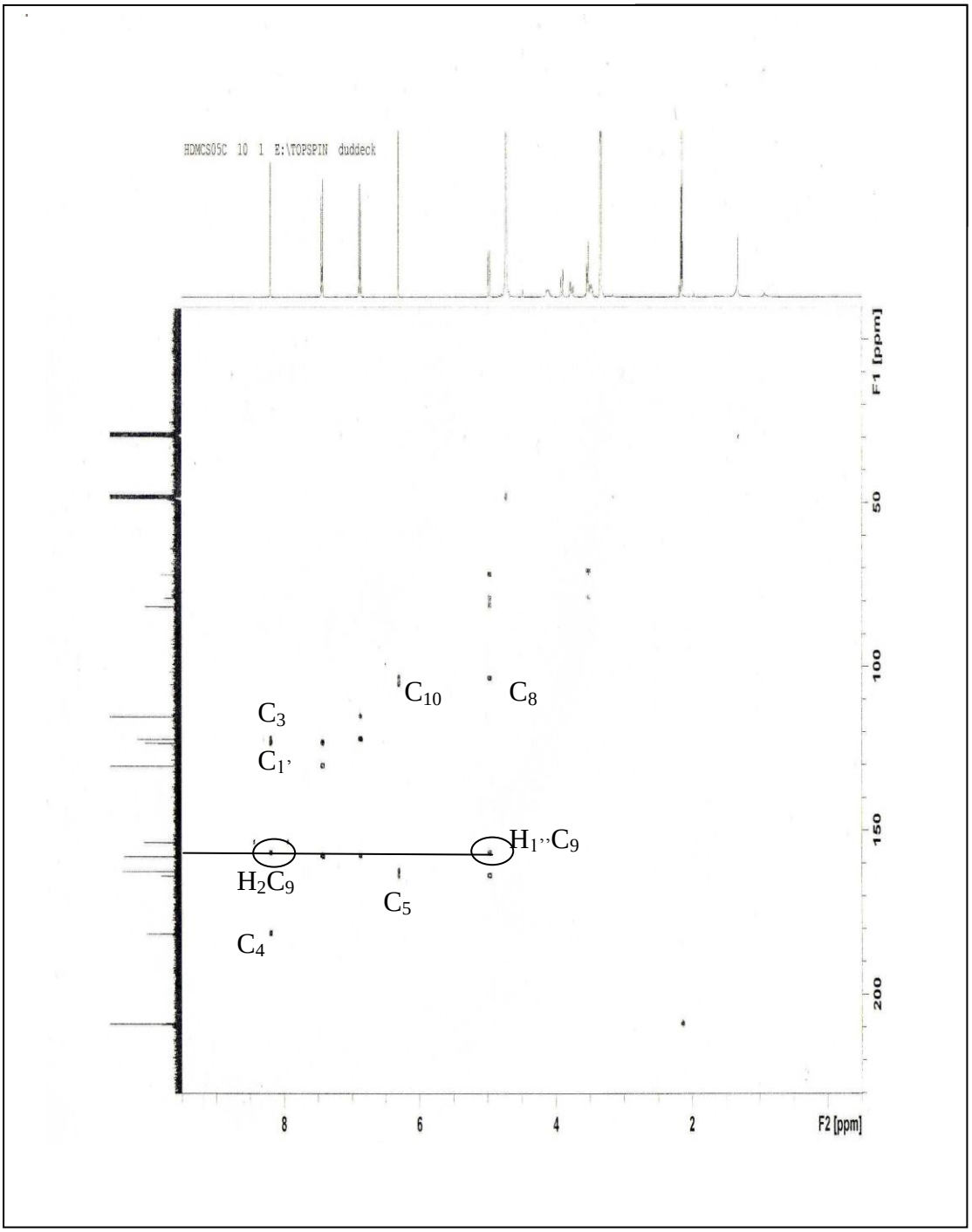
الشكل (11) : **مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب F_9 في (300MHz,DMSO)**



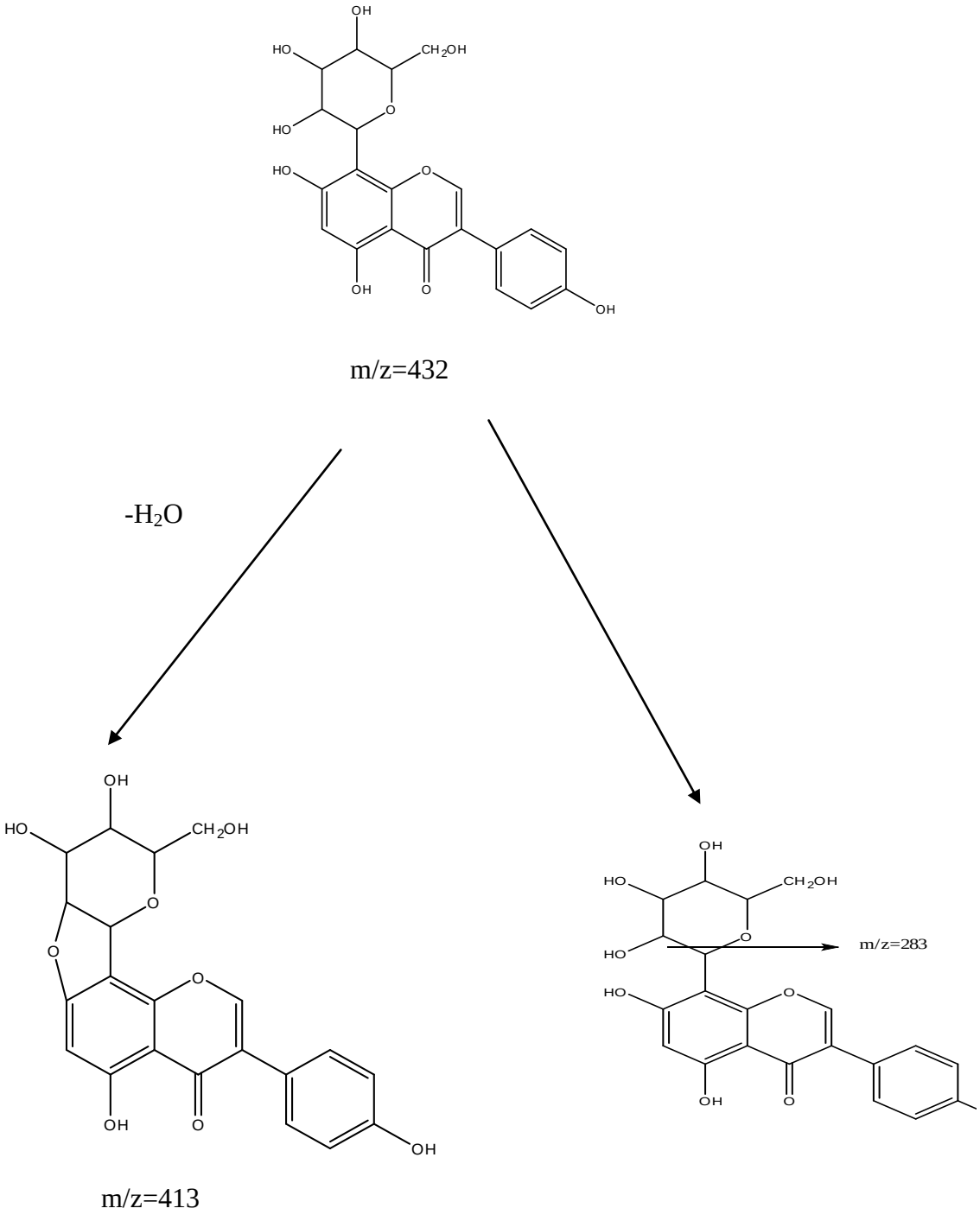
الشكل (12) **طيف (cosy) للمركب** F_9



الشكل (14) طيف(**HMQC**) للمركب **F_9**



الشكل (15) طيف(HMBC) للمركب F_9



الشكل(16) أهم شظايا المركب F_9

الجدول(5) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

المفاعلات	الحزمة I	الرتوء	الحزمة II
MeOH		331	262
$AlCl_3$		311,378.6	272.8
$AlCl_3$+HCl		311,378.8	275
NaOAc		333	273
$NaOAC+H_3BO_3$		332.8	264

الجدول(6) تعالقات Cosy H-H (CD_3OD 400 MHz) **للمركب** F_9

proton	δ(ppm)	Signal *J*(Hz)	**Cosy**
2	8.17	s	2
2',6'	7.41	d(8.6)	2',6',3',5'
3',5'	6.85	d(8.6)	2',6',3',5'
6	6.28	s	6
1''	4.95	d(9.9)	1'',2''
2''	4.1	m	1'',2'',3''
3''	3.50	m	2'',3'',4 ''
4''	3.49	m	3'',4 '',5''
5''	3.45	m	4'',5'',6''a
6''a	3.88	dd(11.9,2.2)	5'', 6''a,6''b
6''b	3.74	dd(11.9,5.16)	5'', 6''a,6''b

الجدول(7) تعالقات HMQC,HMBC (CD_3OD 400 MHz) للمركب F_9 **مع الإزاحة الكيميائية الموافقة لكل كربون** δ(ppm)

proton	**HMBC**	**HMQC**
2	C_3(122), C_4(181.6), C_9(-)	C_2(153.9)
2',6'	$C_{1'}$(121), $C_{4'}$(158),	$C_{2'}C_{6'}$(130.5)
3',5'	$C_{4'}$, $C_{1'}$	$C_{3'}C_{5'}$(115.3)
6	C_5(163), C_7(164), C_8(105), C_{10}(105.9)	C_6(99.5)
1''	C_8, C_7, C_9, $C_{2''}$, $C_{3''}$	$C_{1''}$ (75)
2''	-	$C_{2''}$(74)
3''	$C_{1''}$, $C_{5''}$	$C_{3''}$(71)
4''	$C_{1''}$, $C_{5''}$	$C_{4''}$(80. 2)
5''	-	$C_{5''}$(82)
6''		$C_{6''}$(61)

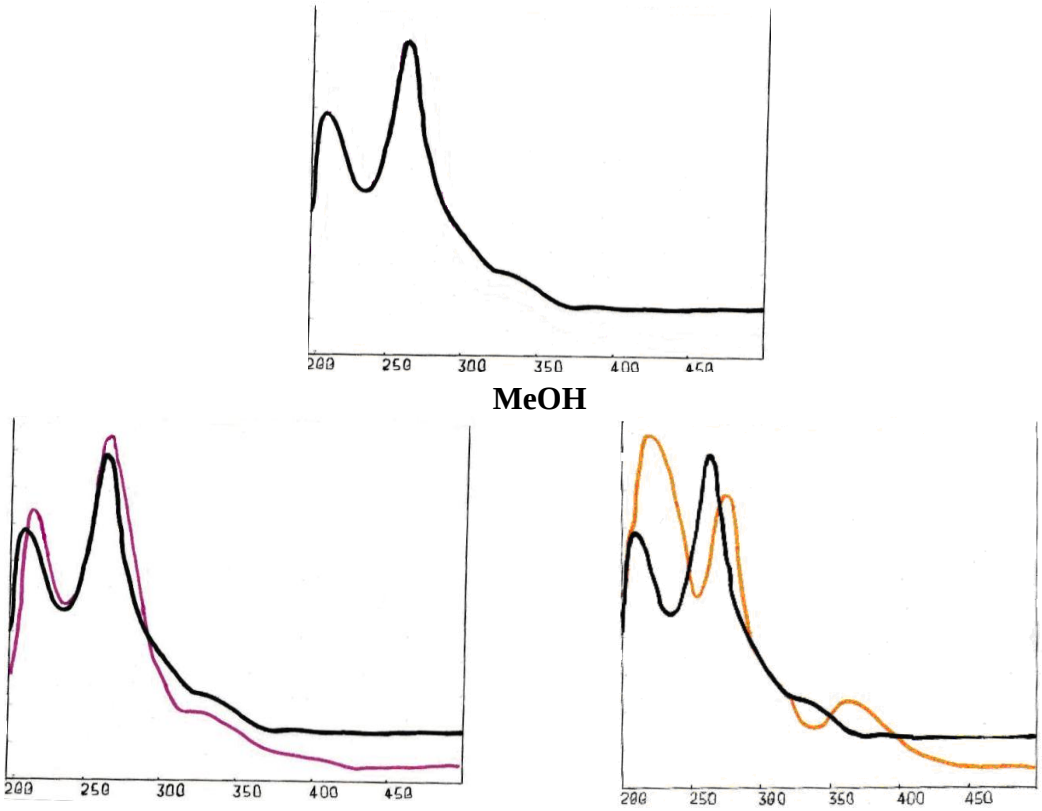
أ- 4 ـ التحليل البنيوي للمركب $F_{10}G$:

السلوك الكروماتوغرافي :

$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
S_2 = BAW
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1

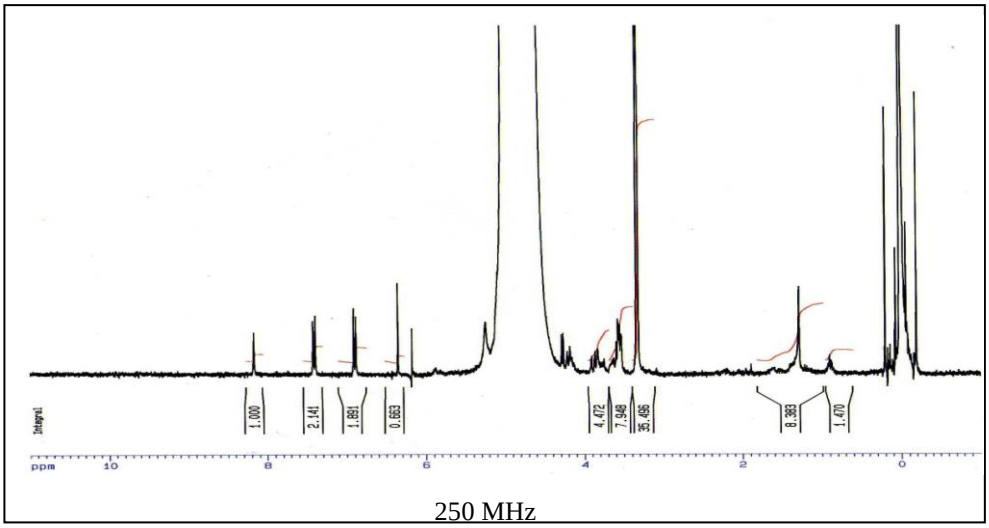
الجملة	S_1	S_2	S_3
Rf	68	54	64
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

تدل قيمة Rf في الأنظمة القطبية أن المركب $F_{10}G$ أكثر قطبية من F_9 وهذا يعني إحتمال وجود سكر إضافي .

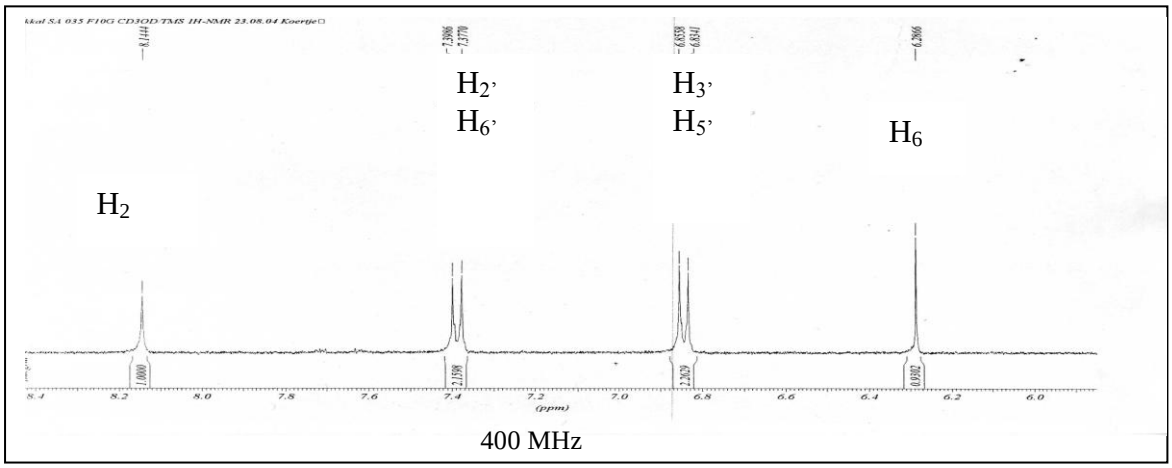


الشكل (16) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_9

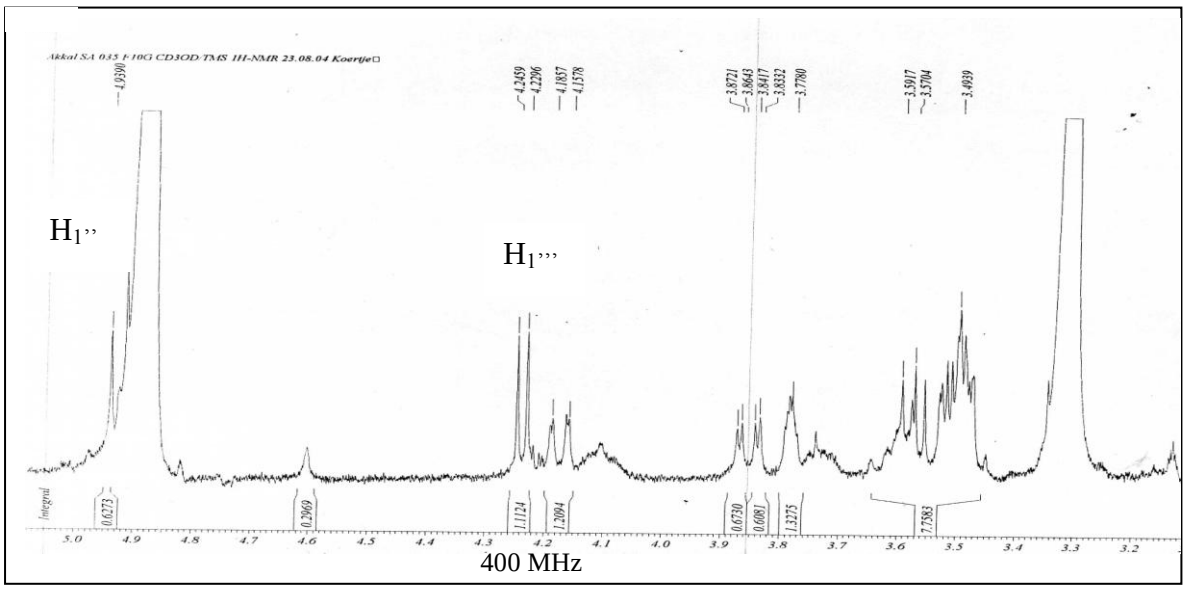
من خلال طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول يتبين كون المركب $F_{10}G$ عبارة عن إيزوفلافون . غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** عند مقارنة طيف NaOAc بطيف MeOH دليل على غياب OH في الموقع 7 ونستدل على وجود OH في الموقع 5 بالإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** $\Delta\lambda_2$=11nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$ +HCl بطيف MeOH .



250 MHz



400 MHz

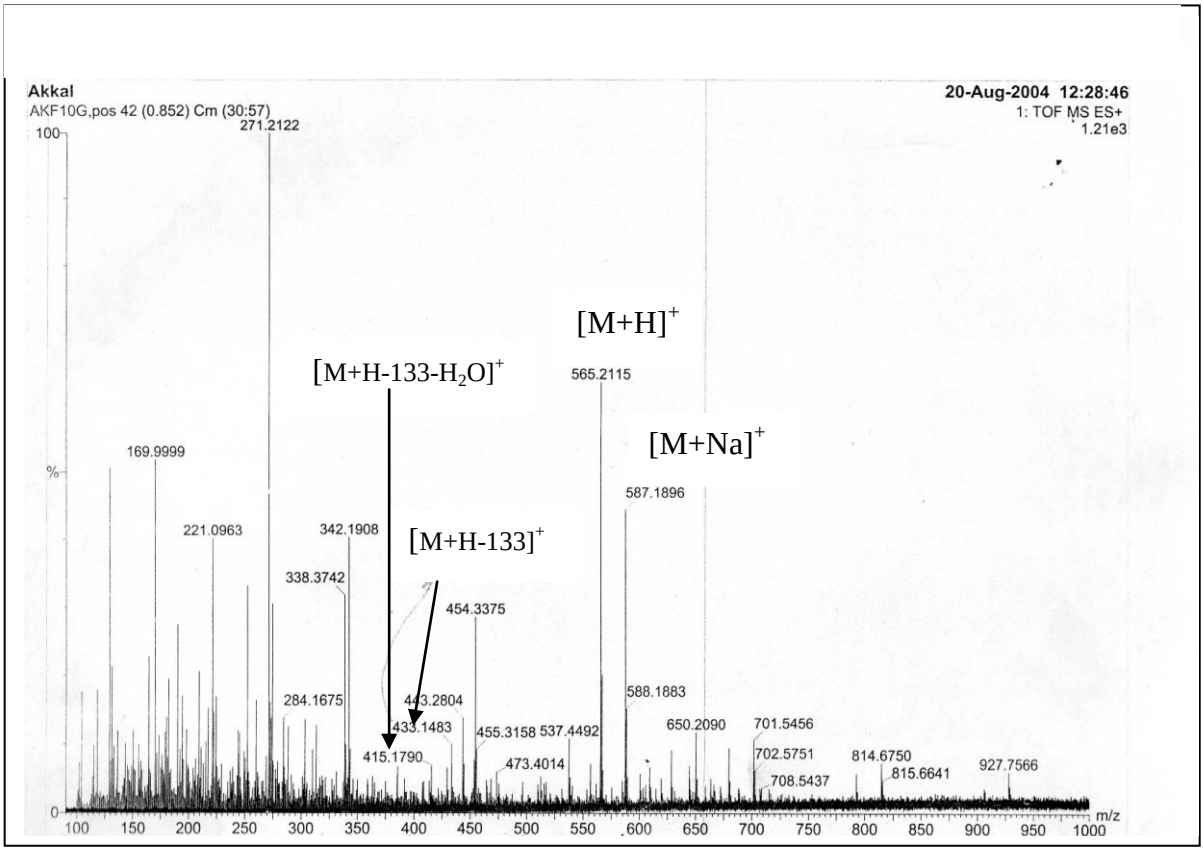


400 MHz

الشكل(17) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $F_{10}G$

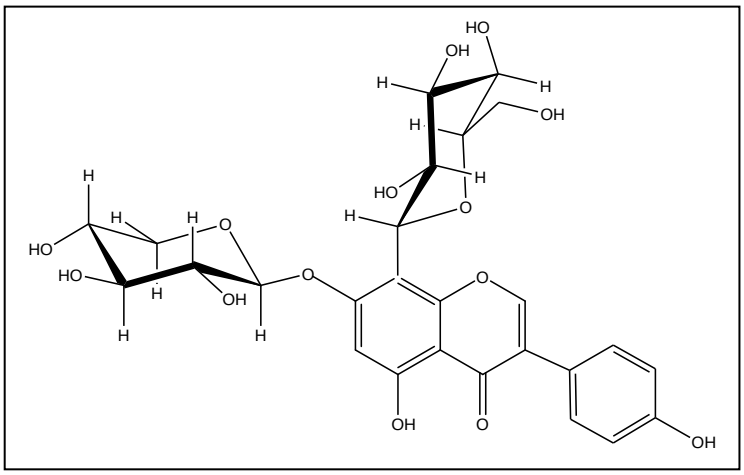
عند مقارنة طيف ^{1}H NMR للمركب $F_{10}G$ بـــ F_9 نلاحظ تطابق كل الإشارات. مع وجود أخرى إضافية في المجال [4.3-3.5ppm] هذا إن دل على شيء إنما يدل على وجود سكر ثاني، يكون قد حددت مطيافة الأشعة فوق البنفسجية موضعه ، بغياب OH في الموقع 7 . وللتعرف على طبيعته لجأنا إلى الإماهة الحمضية التي حررته بسهولة بحكم ارتباطه ب C-O R وبمقارنته كروماتوغرافيا بالسكريات المعروفة يتأكد كونه Xylose. أما الشق العضوي الناتج عن هذا المركب بعد الإماهة الحمضية، فيتطابق كروماتوغرافيا مع المركب F_9 .

جاءت مطيافية الكتلة ES^+ (MS) لتؤكد النتائج السابقة، إذتعطي القيمة m/z=587 موافقة لـ $[M+Na]^+$ و m/z= 565 موافقة لـ $[M+H]^+$ والتي تؤكد الصيغة المجملة $C_{26}H_{28}O_{14}$ ،أما الشضية m/z=433 فتؤكد نوعية السكر فهي موافقة لـ $[M-133(Xylose)+H]^+$



الشكل **(18)طيف الكتلة (ES^+) للمركب** $F_{10}G$

ومن خلال ما توصلنا إليه من نتائج و مقارنتها مع الببلوغرافيا [4] يمكن التعرف على بنية المركب $F_{10}G$ على أنه:



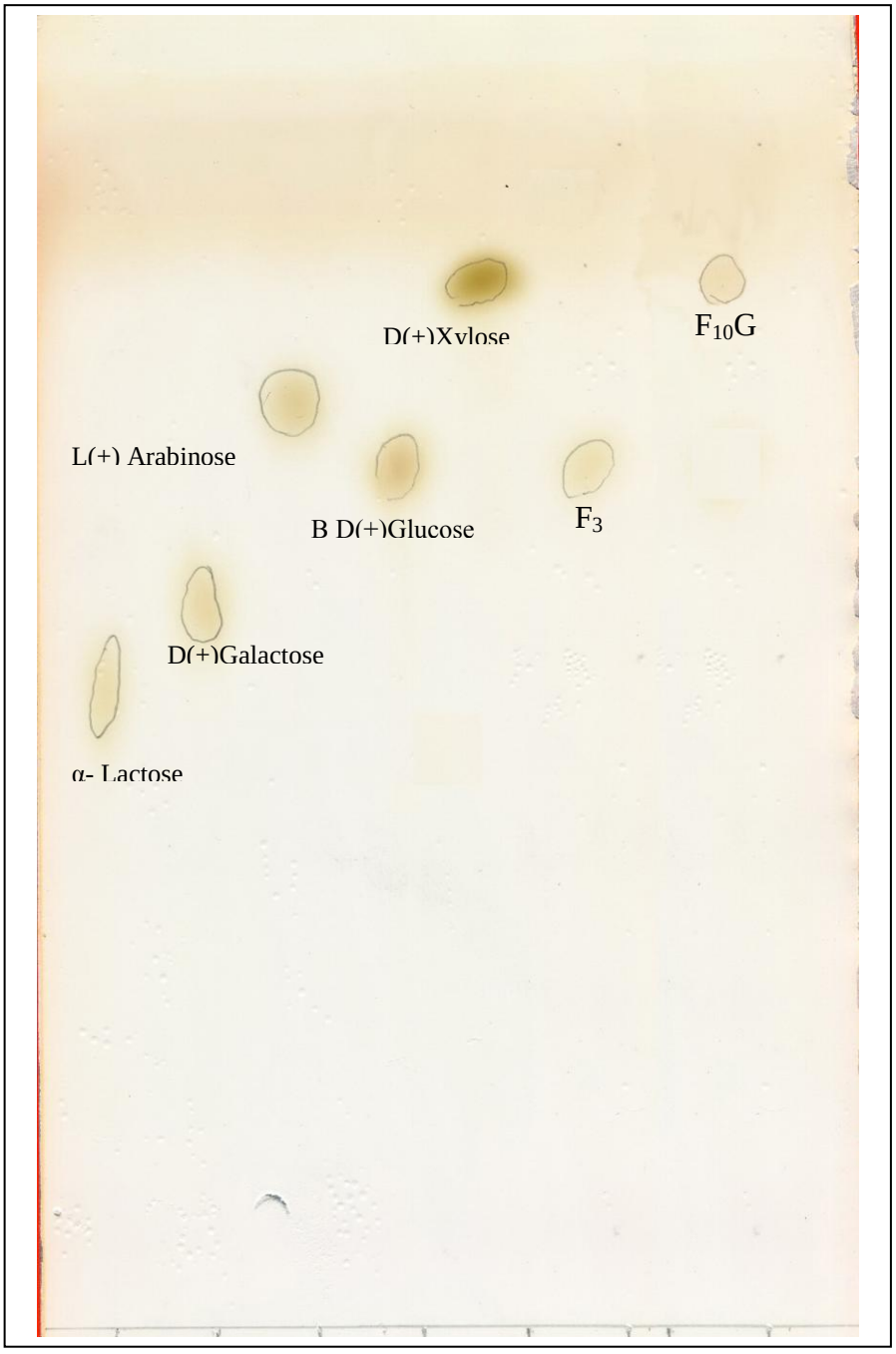
genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside

الجدول(8) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

المفاعلات	الحزمة I	النتوء	الحزمة II
MeOH		324	263
$AlCl_3$		307	273
$AlCl_3$+HCl		364،307	274
NaOAc		327	263

جدول(9)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $F_{10}G$:

δ(ppm)	التكامل	التعددية Hz	الهيدروجين الموافق
8,2	1H	S	H_2
7.40	2H	d(*J*=8,6)	$H_{2'}$ $H_{6'}$
6.85	2H	d (*J*=8,6)	H_3' H_5'
6.28	1H	S	H_6
4.9	1H	d (*J*=9.9)	$H_{1''}$(glucose)
4.2	1H	d (*J*=6.6)	$H_{1'''}$(Xylose)
3.4-4.16	11H	-	بروتونات Xylose+glucose



الشكل (19) : كروماتوغرام يبين السكريات الناتجة عن الإماهة الحمضية مع بعض الشواهد المعروفة.

IV_ ب _ التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Ammoides atlantica* :

إستطعنا خلال دراسة مستخلص الأسيتات لهذه النبة من فصل وتحديد أربع مركبات فلافونيدية ،وهي مركبات أعظمية في الطور البيوتانولي ، لذا لم نجد جدوى من فصل مركباته .وهذا دليل على مدى فقر هذ ه النبتة لمثل هذا النوع من مركبات الأيض الثانوي .وقد إستعنا بالسلوك الكروماتوغرافي وكذا المعطيات الطيفية (UV) و NMR^1H و $NMR^{13}C$. Ms لتحديد بنى هذه المركبات .

ب - 1 _ التحليل البنيوي للمركب AF_6 :

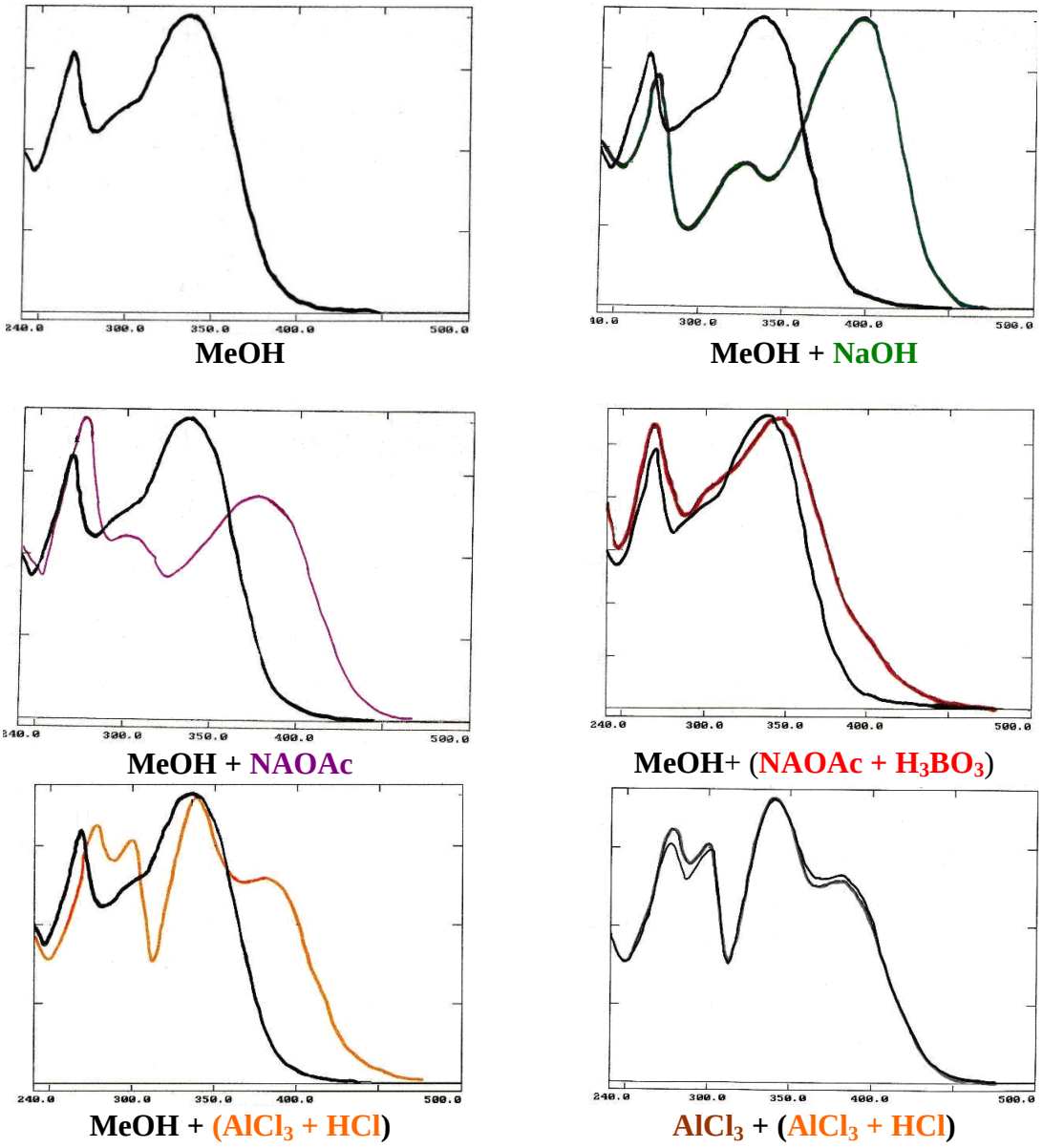
السلوك الكروماتوغرافي :

$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
$S_3 = 13 : 3 : 3 : 1$
$S_4 = 4:3:3$

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rfx100	7.8	1. 7	65.7
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

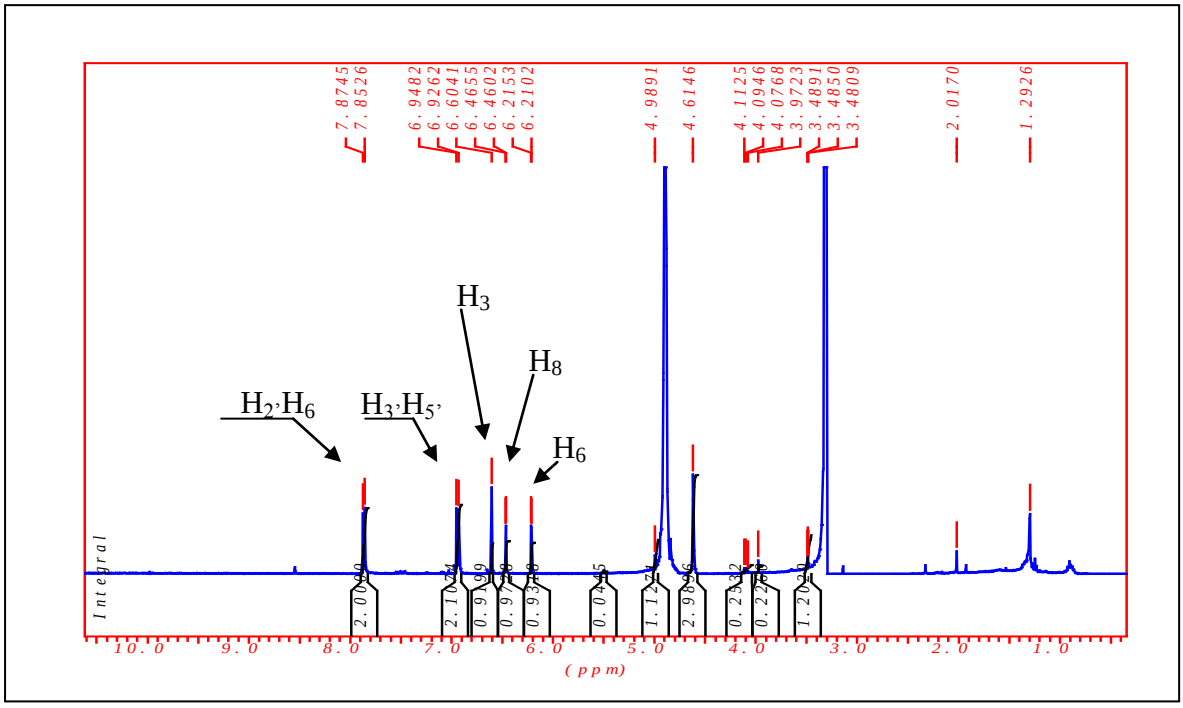
يدل طيف إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية و المرئية المسجلة في الميثانول على كون هذا المركب عبارة عن فلافونويد. والسلوك الكروماتوغرافي يشير إلى كونه أجليكونا.

أما اللون البنفسجي وطول العصابة λ_1 =336nm تشير إلى كون المركب **AF_6** عبارة عن فلافون أي غياب OH في الموضع 3.



الشكل (21) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب AF_6

الإزاحة الباتوكرومية للحزمةI $\Delta\lambda_1$ = 63nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع إستقرار الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموضع 4'، مع ظهور نتوء جديد عند 325nm يدل على وجود OH في الموضع 7 والذي يتأكد بالإزاحة الباتوكرومية للعصابة II. بمقدار $\Delta\lambda_{II}$ = 6 nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOAC. غياب الإزاحة الهبسوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف $AlCl_3$ بـ $AlCl_3$+HCl دليل على غياب أرثو ثنائي هيدروكسيل الحلقة B. أما الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ = 45nm الناتجة عن المقارنة الطيفية لـ $AlCl_3$+HCl بـ MeOH دليل على وجود OH في الموضع 5 .



الشكل (22) : **مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_6 في $(DC_3OD,400MHz)$.**

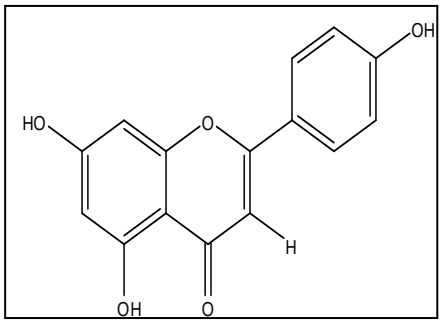
وتأتي مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون لتؤكد النتائج السابقة حيث تظهر :

إشارة ثنائية (J=8.8 Hz) عند δ =7.86 ppm موافقة لــ $H_{2'}H_{6'}$.

والأخرى بنفس ثابت التزاوج عند δ = 6.93 ppm موافقة لــ $H_{3'}H_{5'}$

وإشارةأحادية عند δ = 6.60 ppm موافقة لــ H_3. وإشارتين ثنائيتين عند 6.46 ppm و6.21 ppm بثابت تزاوج (J=2.1 Hz) موافقتين لــH_8 و H_6 على الترتيب .

كما نلاحظ إختفاء البروتونات الخاصة بالسكر وبالتالي يمكن الخلاص إلى الصيغة التالية. 5 ,7,4'Trihydroxy flavone .



(Apigénine)

الجدول(11) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV-Vis)للمركبAF_6

المفاعلات	الحزمة I			الحزمة II
MeOH	336			269
NaOH	399		325	275
$AlCl_3$	381	341	301	276
$AlCl_3$+HCl	381	339	300	277
NaOAc	371		301	275
NaOAc+H_3BO_3	341			269

جدول(12)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_6 في (DC_3OD).

الهيدروجين الموافق	التعددية Hz	التكامل	δ(ppm)
$H_{2'}$ $H_{6'}$	d(*J*=8.8)	2H	7.86
H_3' H_5'	d (*J*=8.8)	2H	6.93
H_3	S	1H	6.6
H_8	d (*J*=2.1)	1H	6.46
H_6	d (*J*=2.1)	1H	6.21

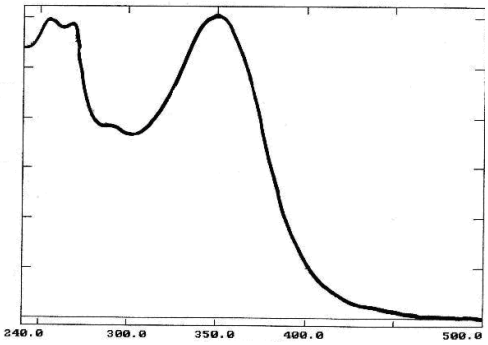
ب ـ 2 ـ التحليل البنيوي للمركب AF_7 :

السلوك الكروماتوغرافي :

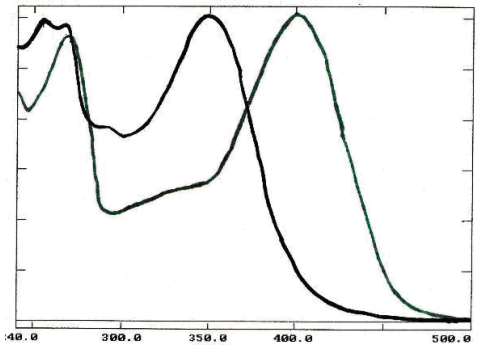
$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
$S_3 = 13 : 3 : 3 : 1$
$S_4 = 4:3:3$

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rf X100	4.7	2. 3	26.4
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

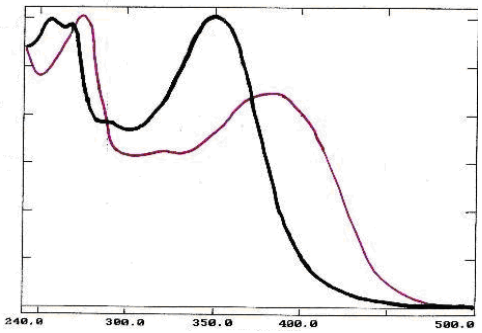
بالنظر إلى طيف إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية و المرئية المسجلة في الميثانول يمكن تصنيف هذا المركب ضمن الفلافونيدات، و يدل سلوكه الكروماتوغرافي على كونه أجليكونا، أما لونه البنفسجي وطول العصابة I λ_1=351nm فيشيران إلى كونه فلافون أي غياب OH في الموقع 3.



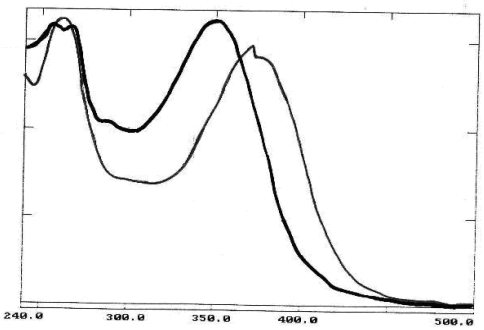
MeOH



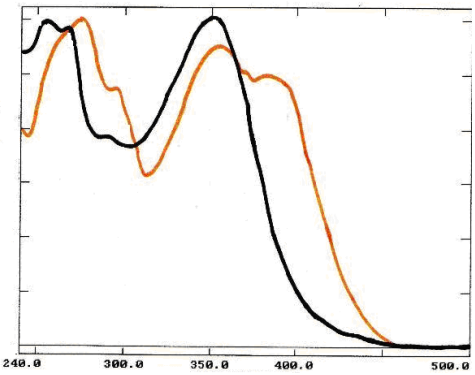
MeOH + NaOH



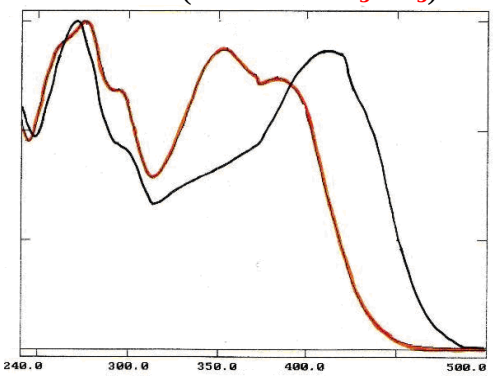
MeOH + NAOAc



MeOH+ (NAOAc + H_3BO_3)



MeOH + ($AlCl_3$ + HCl)



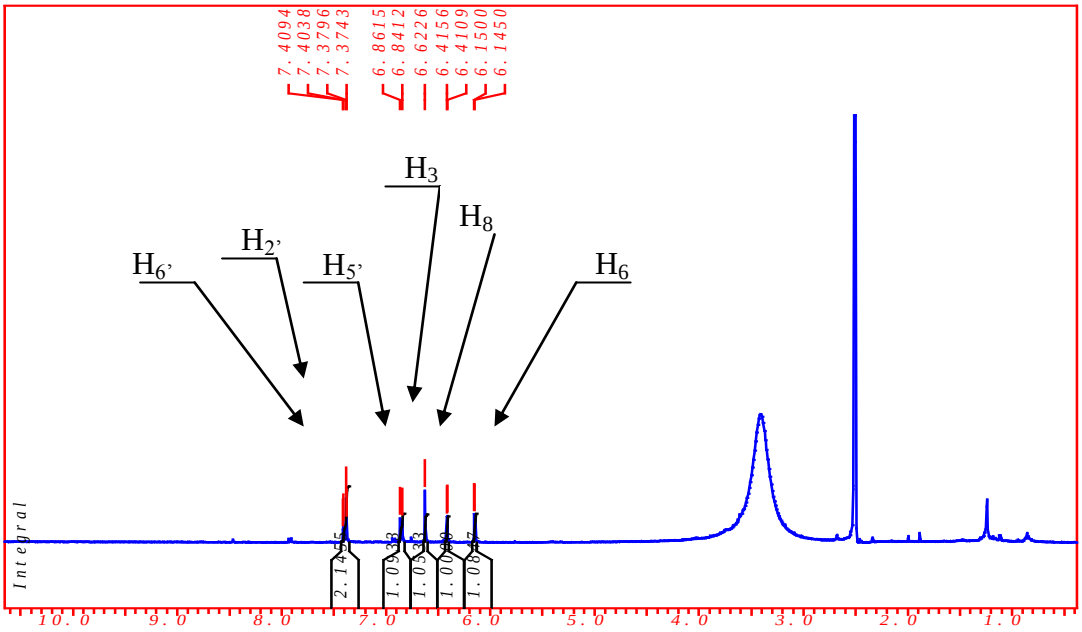
$AlCl_3$ + ($AlCl_3$ + HCl)

الشكل (23) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب AF_7

الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I $\Delta\lambda_1$ = 50nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع إستقرار الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموضع '4، مع ظهور نتوء جديد عند 329 nm يدل على وجود OH في الموضع 7 والذي يتأكد بالإزاحة الباتوكرومية للعصابة II .بمقدار 18 nm = $\Delta\lambda_{II}$ الناتجة عن إضافة الكاشف NaOAC .

ظهور الإزاحة الهبسوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ = -27nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$ بـ$AlCl_3$+HCl مع ظهور نتوء عند 354nm دليل على وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B.

في حين تؤكد الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ =32nm وجود OH في الموضع 5. عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH .



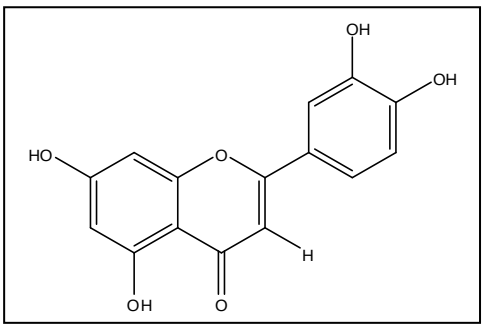
الشكل (24) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_7 في (DMSO,400MHz).

وبفضل معطيات مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون التي جاءت مكملة للنتائج السابقة حيث تظهر:

إشارة ثنائي ثنائي (J= 8.1-2.2Hz) عند 7.39ppm = δ موافقة لــ $H_{6'}$.

وإشارة ثنائية (*J*=2.2 Hz) عند 7.37 ppm = δ موافقة لــ $H_{2'}$. والأخرى ثنائية أيضا (*J*=8,1 Hz) عند 6.85ppm = δ موافقة لــ $H_{5'}$ ، كما نلاحظ إشارتين ثنائيتين عند 6.41 ppm و6.14ppm بنفس ثابت التزاوج (J=2 Hz) موافقتين لـــH_8 و H_6 على التوالي.

وتكون صيغة المركب من خلال كل هذه المعطيات عبارة عن .5,7,3',4'-Tetrahydroxy flavone .



بنية المركب AF_7 (Luteoline)

الجدول(13) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

الحزمة II			الحزمة I	المفاعلات
255	268		351	**MeOH**
269		329	401	**NaOH**
270			410	**$AlCl_3$**
276	294	354	383	**$AlCl_3$+HCl**
273	319	371	384	**NaOAc**

جدول(14)ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_7 :

الهيدروجين الموافق	التعددية Hz	التكامل	δ(ppm)
$H_{6'}$	dd(*J*=8.1-2.2)	1H	7.39
$H_{2'}$	d(*J*=2.2)	1H	7.37
$H_{5'}$	d (*J*=8.1)	1H	6.85
H_3	S	1H	6.62
H_8	d (*J*=2)	1H	6.41
H_6	d (*J*=2)	1H	6.14

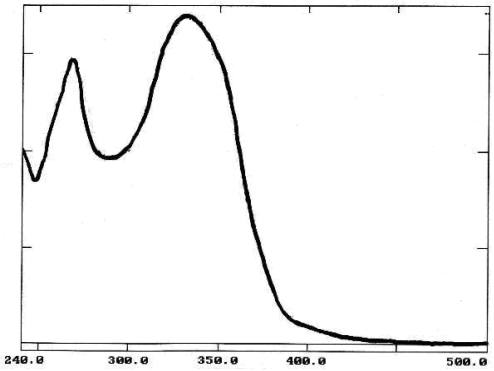
ب ـ 3 ـ التحليل البنيوي للمركب AF_{10} :

ـ السلوك الكروماتوغرافي :

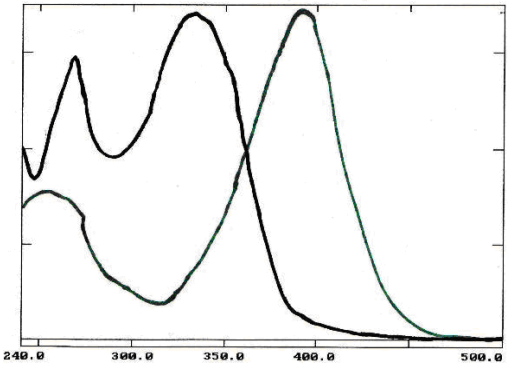
S_4	S_3	S_1	الجملة
42.7	18	20.6	**Rfx100**
بنفسجي			اللون الاستشعاعي

S_1 = CH_3COOH (15%)
S_3= 13 : 3 : 3 : 1
S_4 = 4:3:3

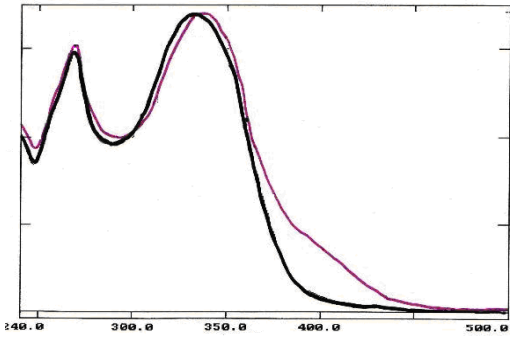
اللون البنفسجي القاتم و طول الحزمة λ_1 = 333 nm المأخوذة في الميثانول يؤكدان كون المركب AF_{10} عبارة عن فلافون والسلوك الكروماتوغرافي يشير إلى كونه جليكوزيد .



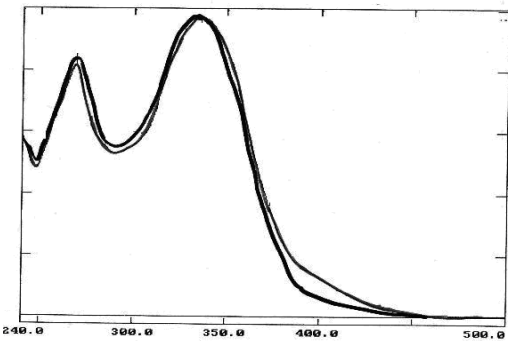
MeOH



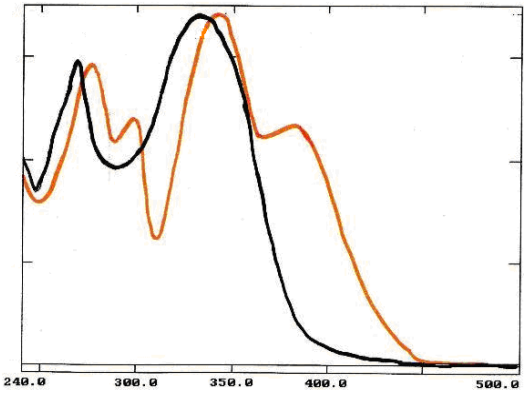
MeOH + NaOH



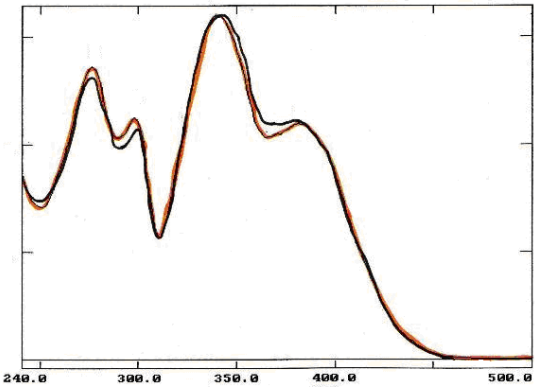
MeOH + NAOAc



MeOH+ (NAOAc + H_3BO_3)



MeOH + ($AlCl_3$ + HCl)

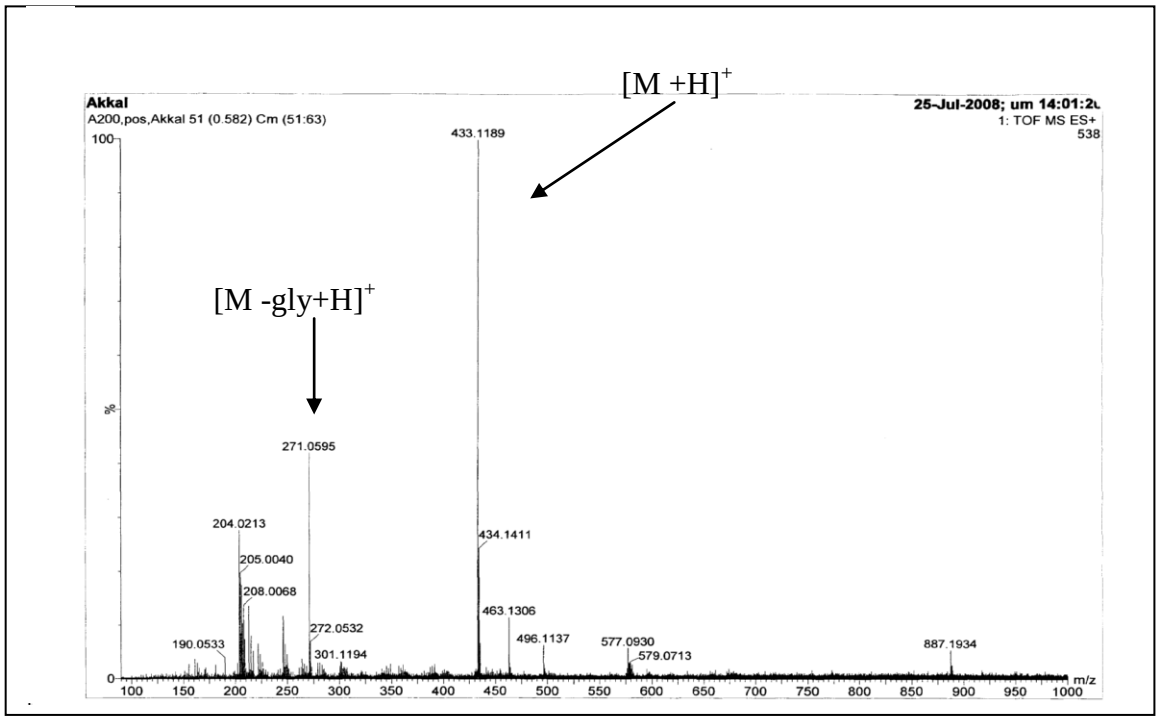


$AlCl_3$ + ($AlCl_3$ + HCl)

الشكل (25) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب AF_{10}

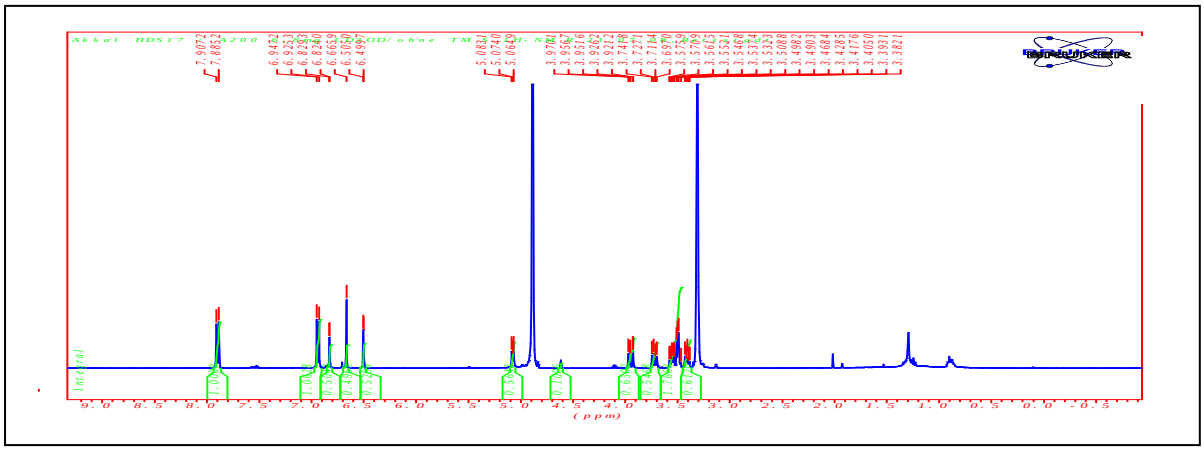
الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I $\Delta\lambda_1$ = 58 nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع الزيادة في الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموضع 4'، مع غياب نتوء جديد بين 335-320nm دليل على غياب OH في الموضع 7 وهذا ما تؤكده غياب الإزاحة الباتوكرومية للعصابة II عند مقارنة طيف NaOAc. بطيف MeOH.

غياب الإزاحة الهبسوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف $AlCl_3$ بـ $AlCl_3$+HCl دليل على غياب أرثو ثنائي هيدروكسيل الحلقة B. و الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I بمقدار $\Delta\lambda_1$ = 48 nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH تعني وجود OH في الموضع 5.

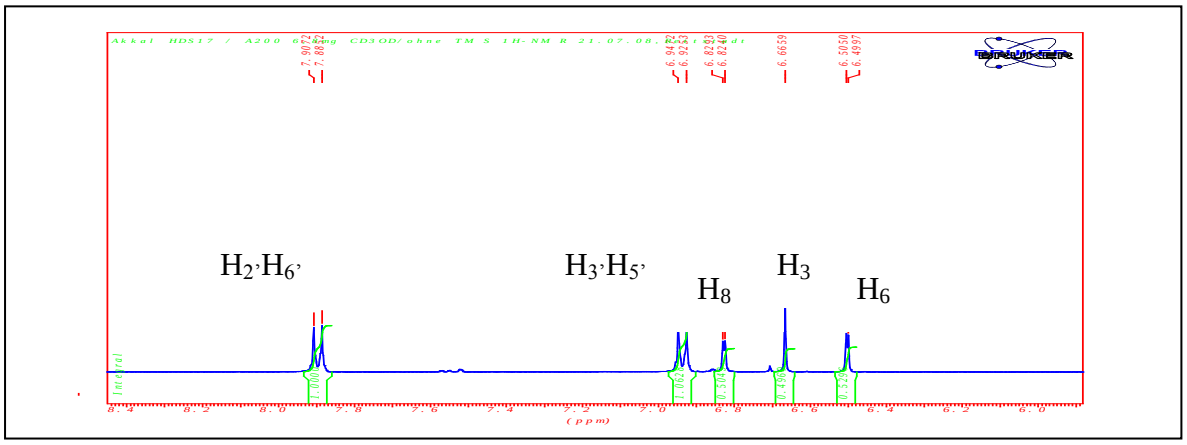


الشكل (26) طيف الكتلة (ES^+) للمركب AF_{10}

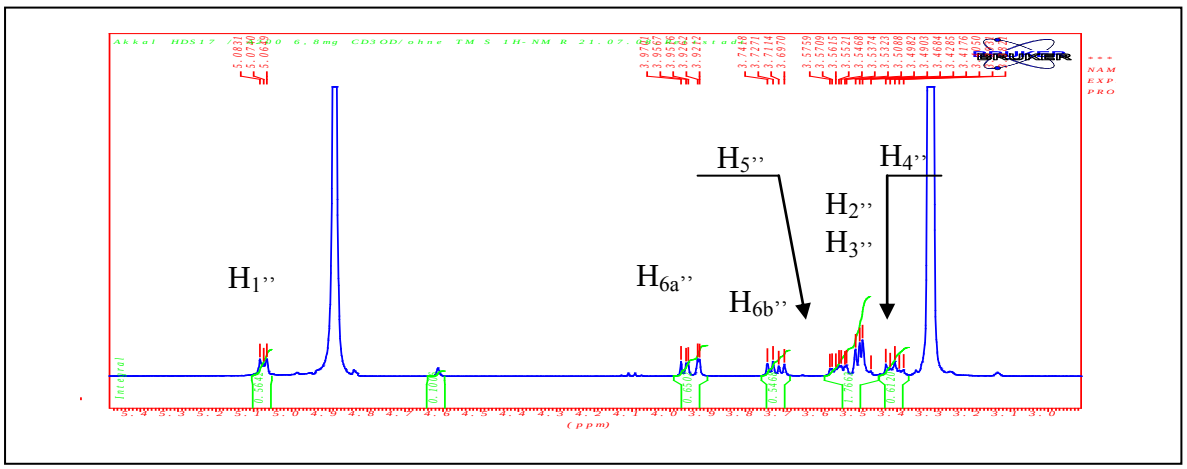
من جهة أجرى مطيافية الكتلة أعطت قيمة للأيون الجزيئي عند *m/z*= 433 موافقة للصيغة المجملة $C_{21}H_{20}O_{10}$ التي تدل على وجود هيكل فلافونيدي مستبدل بسكر لا يمكن أن يكون إلا في الموقع 7 كما أشارت إليه مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (الشكل25) والشظية *m/z*=271 تدل على ذلك فهي موافقة لـــ $[M -gly+H]^+$.



الشكل (27) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{10} في ($400MHz,CD_3OD$).



الشكل(28): تكبير المجال (δ=(5,59–8,4 ppm) للمركب AF_{10}

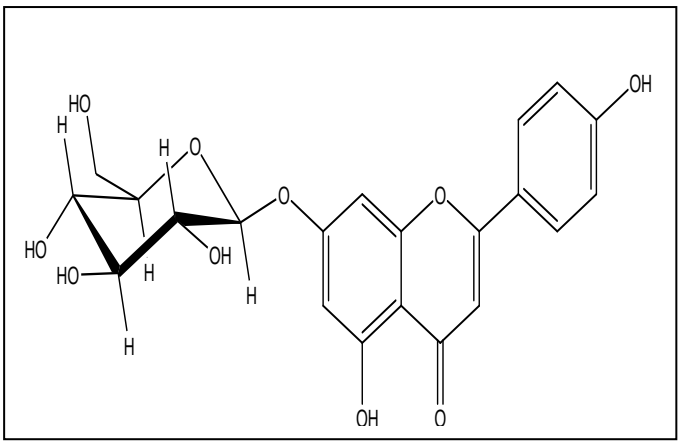


الشكل (29): تكبير المجال(δ=(2,8–5,3 ppm للمركب AF_{10}

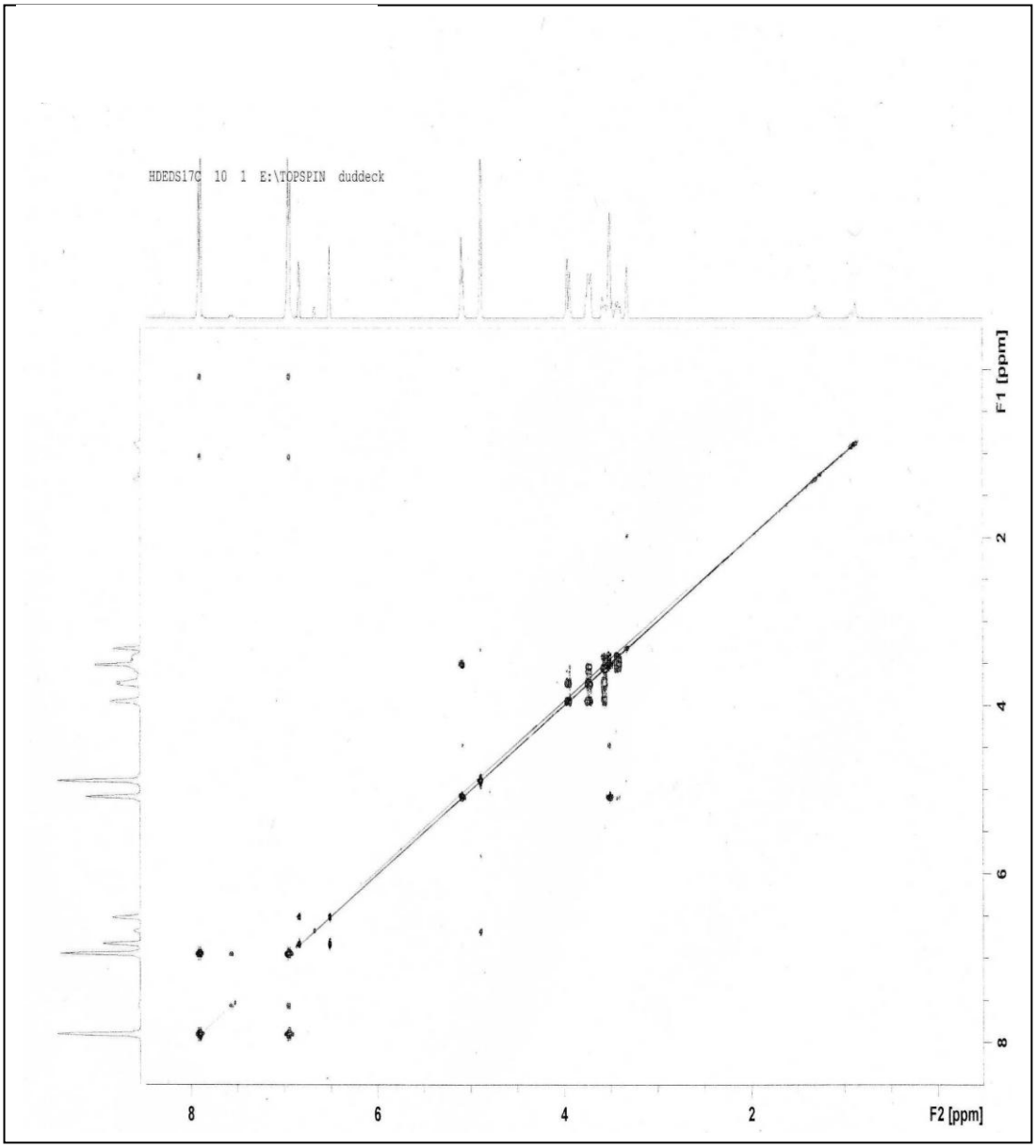
وقد تم التأكد من طبيعة السكر بالإعتماد على الإماهة الحمضية، حيث تحرر سكر الجليكوز الذي تم التعرف عليه من خلال المطابقة الكروماتوغرافية مع الشواهد المعروفة الشكل (39) إلى جانب الأجليكون الذي يظهر بلون بنفسجي وبثابت إنحباس Rf =0.65 قي النظام 4 :3: 3 والمطابق لـــ apigenine .

وقد جاءت مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والكربون موافقة ومؤكدة للنتائج السابقة حسب الجداول (16,17) وقد تم تحديد و إرفاق البروتونات بكربوناتها الموافقة بالإعتماد على نتائج Cosy ، HSQC والنتائج الببليوغرافيا [5] .

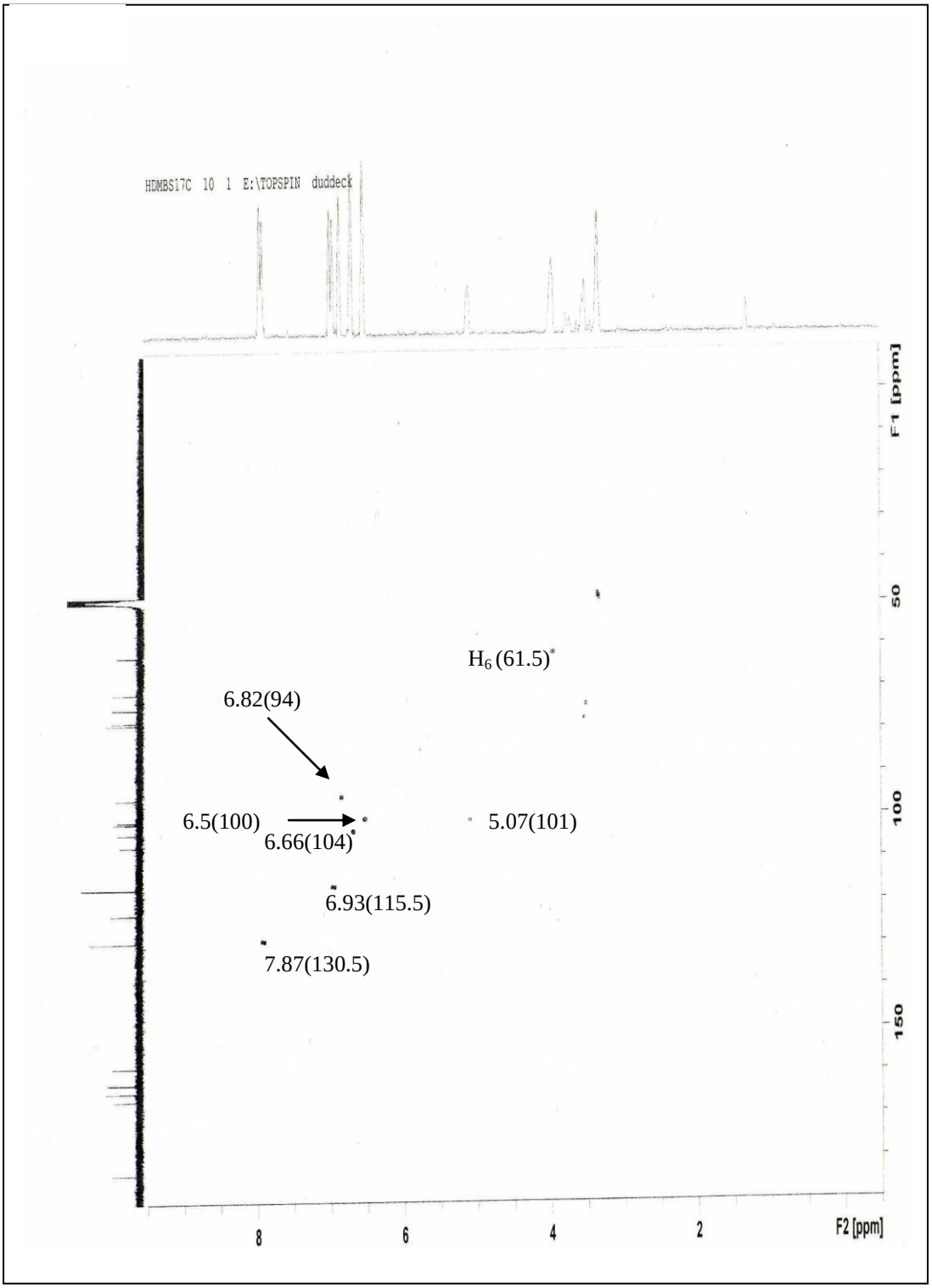
وبالتالي نكون قد تأكدنا من كون المركب **AF_{10}** عبارة عن :



Apigénine 7-*O*-*β* glucoside(apigétrine)



الشكل(30)طيف (COSY) للمركب AF_{10}



الشكل(31)طيف (HSQC) للمركب AF_{10}

الجدول(15) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

المفاعلات	الحزمة I			الحزمة II
MeOH	333			269
NaOH	391		269	254
$AlCl_3$	381	341	298	275
$AlCl_3$+HCl	381	341	298	276
NaOAc	335			268
NaOAc+H_3BO_3	336			269

جدول(16)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{10} :

الهيدروجين الموافق	التعددية Hz	التكامل	δ(ppm)
$H_{2'}$ $H_{6'}$	d(*J*=8.8)	2H	7.87
H_3' H_5'	d (*J*=8.8)	2H	6.93
H_8	d (*J*=2.1)	1H	6.82
H_3	S	1H	6.66
H_6	d (*J*=2.1)	1H	6.50
$H_{1''}$	d (*J*=7.3)	1H	5.07
$H_{6a''}$	dd (*J*=12.2-2)	1H	3.95
$H_{6a''}$	dd (*J*=12.2-5.7)	1H	3.71
$H_{5''}$	m	1H	3.57
$H_{2''}$ $H_{3''}$	m	2H	3.55
$H_{4''}$	m	1H	3.41

جدول(17)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون $NMR^{13}C$ باستعمال CD_3OD كمذيب:

الكربون الموافق	الإزاحة δ (ppm)	الكربون الموافق	الإزاحة δ (ppm)
C_{10}	106,5	C_4	182
C_6	100	C_5	163,43
$C_{1''}$	101	C_7	162,0
C_8	94	$C_{4'}$	157,92
$C_{5''}$	77,60	C_9	157,6
$C_{3''}$	76,816	C-2	156
$C_{2''}$	73,491	$C_{6'}$, $C_{2'}$	130,5
$C_{4''}$	69,970	C_3	104
$C_{6''}$	61,5	$C_{1'}$	121,4
		$C_{5'}$, $C_{3'}$	115,5

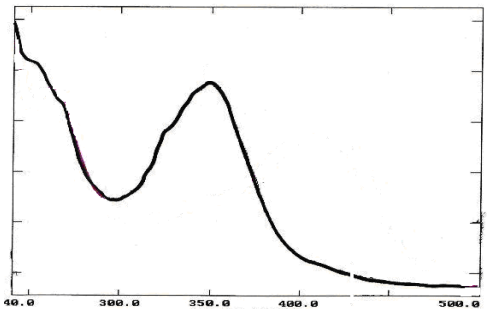
ب ـ 4 ـ التحليل البنيوي للمركب AF_{11} :

ـ السلوك الكروماتوغرافي :

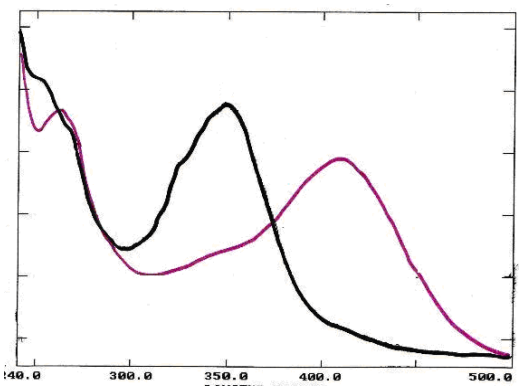
$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
$S_3 = 13 : 3 : 3 : 1$
$S_4 = 4:3:3$

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rfx100	20.6	18	22.3
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

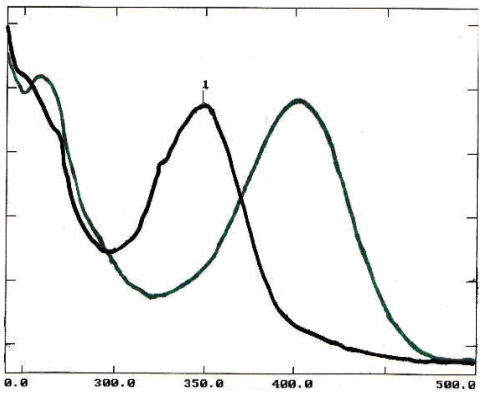
اللون البنفسجي تحت الأشعة UV و قيمة العصابة المسجلة في الميثانول $\lambda_1 = 348nm$ يدلان على كون المركب عبارة عن فلافون .



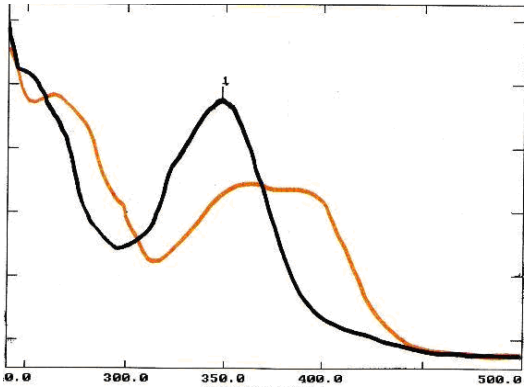
MeOH



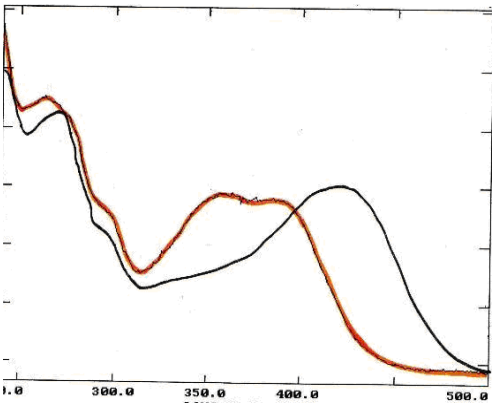
MeOH + NAOAc



MeOH + NaOH



MeOH + ($AlCl_3$ + HCl)



$AlCl_3$ + ($AlCl_3$ + HCl)

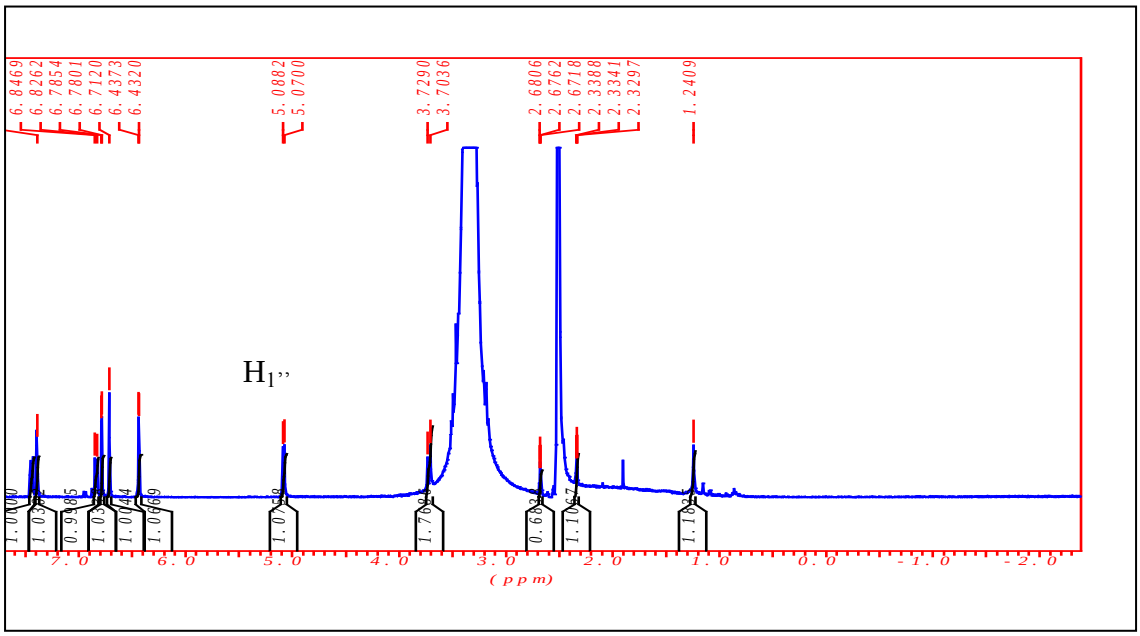
الشكل(32) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية للمركب AF_{11}

الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ = 54 nm المترتبة عن مقارنة طيف NaOH بطيف MeOH مع إستقرار الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموقع 4’

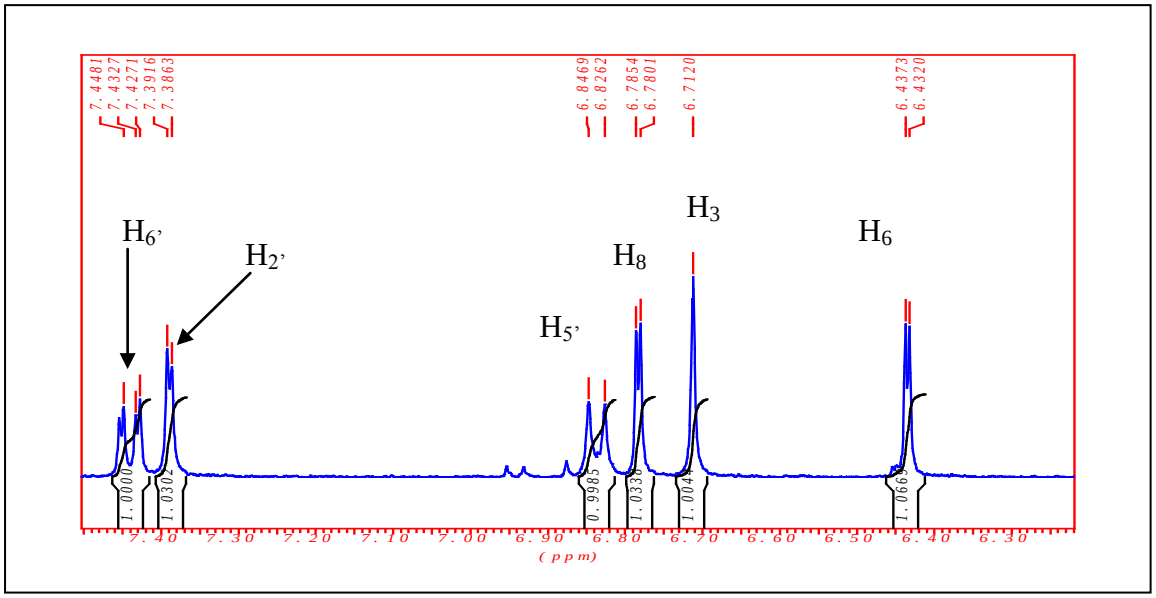
وعدم ظهور حزمة جديدة بين 320-335nm ينفي وجود OH في الموقع 7، وهذا ما تؤكده غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة II عند مقارنة طيف NaOAc بطيف MeOH

قيمة الحزمة I λ_1 = 422nm في الطيف المسجل عند إضافة الكاشف $AlCl_3$ والإزاحة الهبسوكرومية للحزمة I بـ $\Delta\lambda_1$ = -30 nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف $AlCl_3$ دليل على وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB .

الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I بمقدار $\Delta\lambda_1$ = 44 nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH دليل على وجودOH في الموقع 5



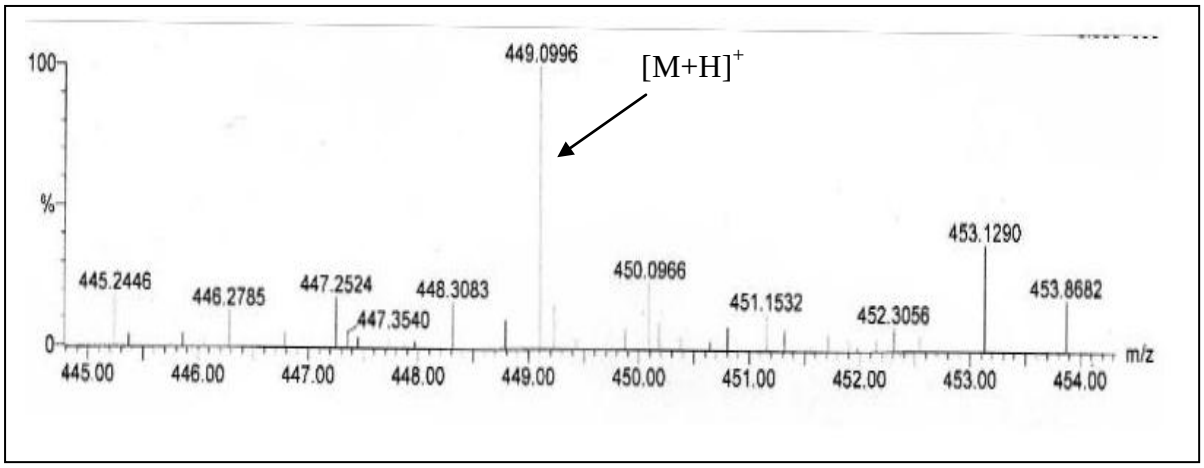
الشكل(33) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{11} (DMSO,400MHz)



الشكل(34): تكبير المجال (6.3–7.5 ppm)=δ للمركب AF_{11}

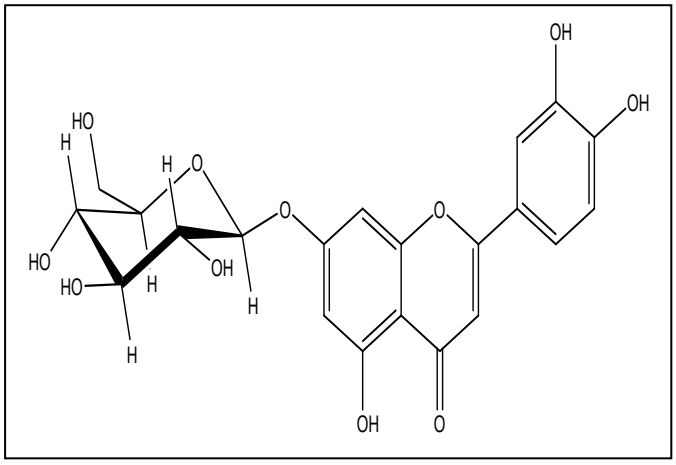
من مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون نلاحظ تطابق تقريبي لمعظم الإشارات مع المركب السابق (Luteoline)، مع وجود إشارات إضافية في المنطقة 3.5-4ppm المميزة للسكر وظهور البروتون الأنوميري عند 5.07ppm بثابت تزاوج J=7.3Hz الخاص بسكر الجليكوز، هذا الأخير تم التأكد منه من خ لال الإماهة الحمضية و المطابقة الكروماتوغرافية للسكر الناتج مع الشواهد المعروفة الشكل (39)، وحسب ما قدمته مطيافية UV من نتائج فإن الجليكوز يحتل الموقع 7 .

أما الجانب الأجليكوني الذي يظهر بلون بنفسجي وبثابت إنحباس Rf = 0.26 في النظام 3: 3: 4 فهو مطابق لـــLuteoline



الشكل (35)**طيف الكتلة** (ES^+) **للمركب** AF_{11}

مطيافية الكتلة عالية الكفاءة لهذا المركب تظهر إشارة عند m/z=449 موافقة للصيغة $C_{21}H_{20}O_{11}$ وبالتالي نكون قد تأكدنا من كون المركب AF_{11} عبارة عن :



Luteoline 7-*O*-*β* glucoside

الجدول(18) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئيةUV-Vis للمركب AF_{11} :

المفاعلات	الحزمة I			الحزمة II
MeOH	348			268
NaOH	402			259
$AlCl_3$	422		298	270
$AlCl_3$+HCl	392	354	298	265
NaOAc	408			264

جدول(19)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{11} :

δ(ppm)	التكامل	التعدديةHz	الهيدروجين الموافق
7.44	1H	dd(*J*=8.3-2.2)	$H_{6'}$
7.38	1H	d(*J*=2.2)	$H_{2'}$
6.83	1H	d (*J*=8.3)	H_5’
6.7	1H	S	H_3
6.78	1H	d (*J*=2.1)	H_8
6.4	1H	d (*J*=2.1)	H_6
5.1	1H	d (*J*=7.3)	$H_{1''}$

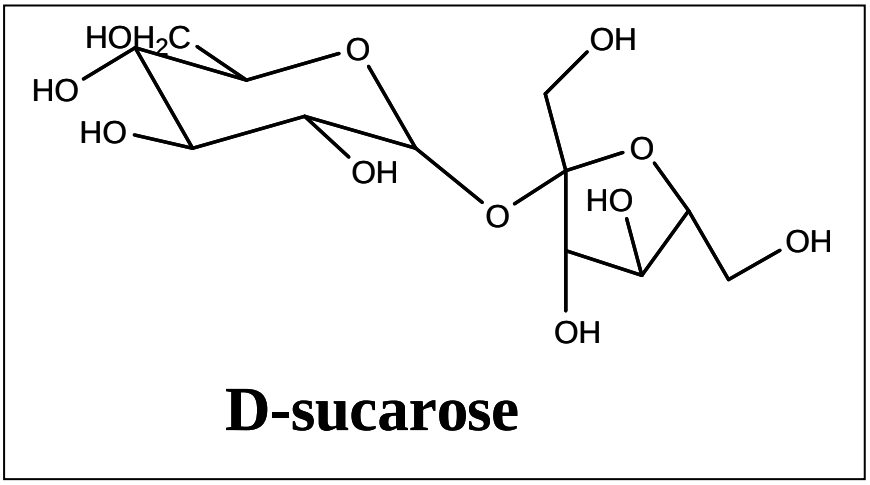
ب ـ 5 ـ **التحليل البنيوي للمركبAF_{12}** :

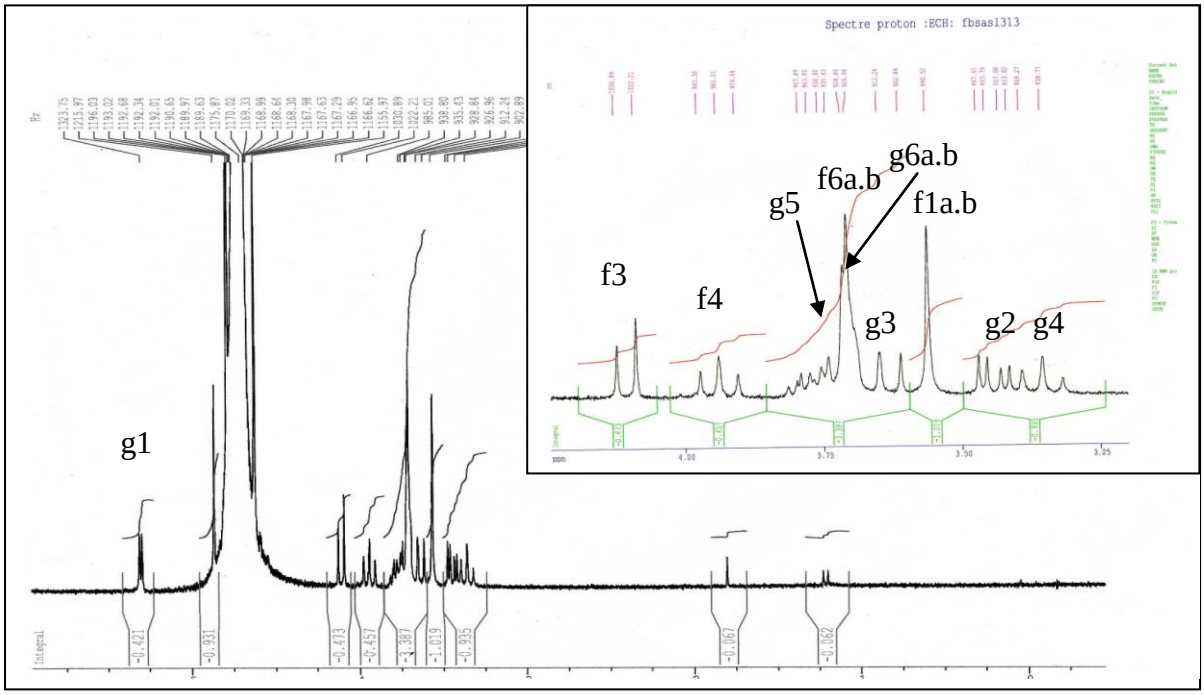
يظهر المركب **AF_{12}** في صورة بلورات شفافة ضعيفة الذوبان في الميثانول، وتذوب كلية في الماء تظهر بلون أسود قاتم بعد معاملة الورقة الكروماتوغرافية بمحلول محضر من:

(H_2SO_4: CH_3COOH: H_2O/1:1:8) ثم التسخين إلى الدرجة 100^0

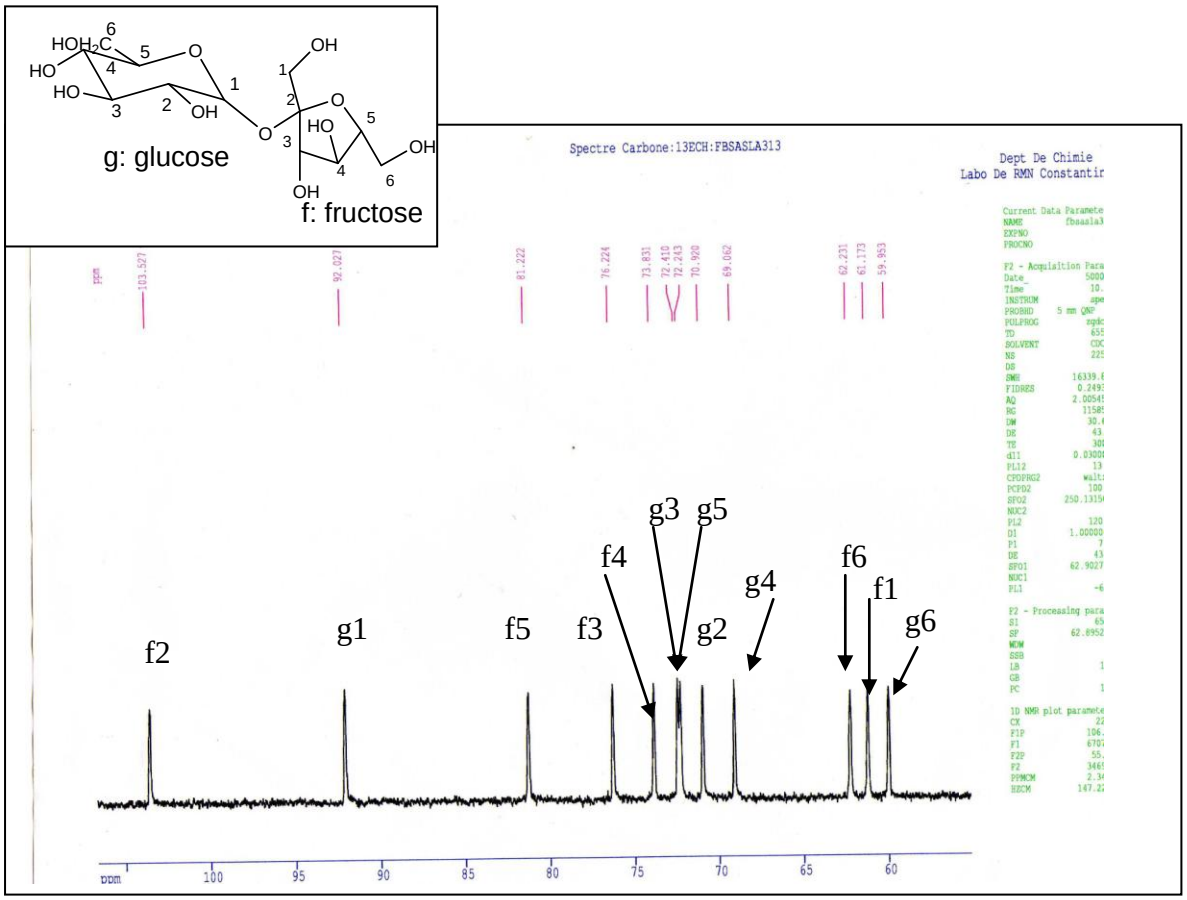
عدم رؤية هذا المركب تحت الأشعة UV ينفي كونه فلافونيد، وهذا ما أكده طيف NMR^1H حيث تعدم الإشارات بين 6-9ppm المميزة للفلافونيدات. مع ظهور إشارة ثنائية عند 5.2ppm بثابت تزاوج J=3.8 Hz ، وإشارات بين 3.5-4ppm المميزة للسكر [6]. ويتأكد إرتباطها بمطيافية COSY .وفي محاولة للتعرف على طبيعة هذا السكر تم مطابقته مع الشواهد ا لسكرية المعروفة فكان مميز بقيمة لـــ Rf مطابقة لسكر الأرابينوز، ولكن بعد تسجيل طيف $NMR^{13}C$ وظهور 12 كربون يتضح كون هذا المركب عبارة عن سكرين مرتبطين ببعض، بعد مطابقة كل من $NMR^{13}C$ وNMR^1H مع النتائج الببليوغرافية [6] يتضح أنه:

D-sucarose (glucopyranosyl-(1→2) fructofuranoside)

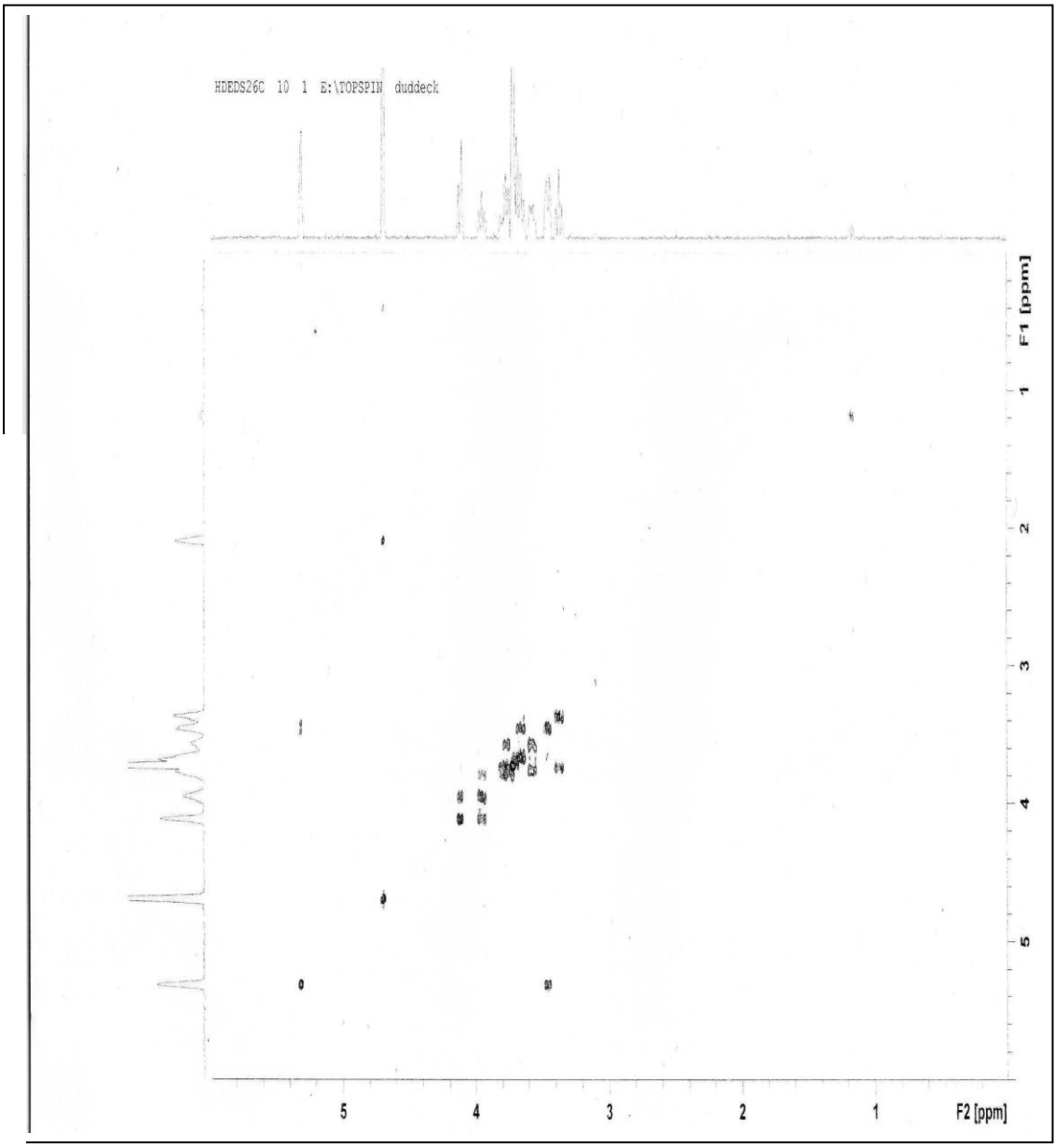




الشكل(36)مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{12} (D_2O)



الشكل(37) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب AF_{12} (D_2O)



الشكل(38) طيف (COSY) للمركب AF_{12}

الشكل (39) : كروماتوغرام يبين السكريات الناتجة عن الإماهة الحمضية مع بعض الشواهد المعروفة

المراجع

[1] Venkata Rao, E., Sree, R., Murthy, M. and Ward, R.S. (1984). Nine Isoflavones from *Tiphrosia Maxima*, Phytochemistry, vol. 23, No. 7, 1493-1501.

[2] Lopez L'azaro, M., Martin-Cordero,C., Iglisias-Gurra,F.and Ayuso Gonzalez ,M.J. (1998). An Isoflavone Glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, vol. 48, No. 2, 401-402.

[3] Cuyckens, F. and Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, Journal of mass spectrometry, 39,1-15.

[4] Leosvaldo, V.S.M., Marcelo, F.J.P., Maria,I.S.S., Davyson, M.E.F., Guimarães, V.E.P., Maria A.K.C. (2008). C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda* Fitoterapia .

[5] Mabry, T.J. Markham, K. R. and Thomas, M.B. (1970). The systimatic identification of flavonoids, Springer, New york, 45-126.

[6] Agrawal, P.K.(1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, Phytochemistry, Vol. 31, 3307-3330.

الخـــاتمـــة

الخـــاتمـــة

يعد هذا العمل كامتداد لابحاث بدأها مخبرنا في إطار الكشف عن المواد الفعالة للنبتات الطبية الجزائرية، وقد انصب اهتمامنا حول منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لما تحضى به من فعالية بيولوجية عظمى .

نهدف من خلال هذا البحث إلى فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي للنبتتين : *Retama sphaerocarpa* و *Ammoides atlantica*.

فبغية استكمال البحث حول الجنس *Ammoides*. الممثل بالنوعين *A atlantica* و*A pusilla* هذه الأخيرة التي حضت بدراسة مسبقة في مخبرنا لما تلقاه من استعمال واسع في الطب الشعبي، أما النوع الثاني فهي نبتة أصلية لذا كانت محور بحثنا، فكانت الحصيلة الفلافونيدية أربع مركبات تنحدر ضمن نظام وراثي حيوي واحد، ذو مسلك الفلافون الذي يضم هيكلين بنيويين أساسيين:

هيكل Apigénine والذي يضم Apigénine نفسه و مشتق واحد له هو Apigénine 7-*O*-*β* glucoside

هيكل Luteoline والذي يضمLuteoline نفسه و مشتقه Luteoline 7-*O*-*β* glucoside .

نلاحظ أن كلا المشتقين بسيطي الإستبدال فهي تضم 7-*O*-glucosyl وهو المستبدل الأكثر شيوعا الراجع إلى مانح السكر UDP-Glu(glucose Uridine diphosphate) والإنزيم Glucosyl transférase الجد متخصص إذ يدخل في المرحلة الأخيرة في الإصطناع الحيوي لتحويل مجموعة الهيدروكسيل إلى جليكوزيل . هذين الجليكوزيدين تم فصلهما من الجنس *Ammoides* . أما الأجليكونين فلأول مرة يتم الكشف عنهما في هذا الجنس ، على الرغم من كونهما البنية الأساسية لتكوين مشتقاتها الجليكوزيدية . وهذا قد يرجع إلى توفرهما في هذه النبتة بنسبة عالية أو لقلة الإنزيمات المسؤولة عن خلق مشتقات جديدة. ومن خلال هذه النتائج يمكن تشكيل النظام الحيوي الوراثي لهذه النبتة حسب الشكل (1).

وكتكملة لما توصلنا إليه في رسالة الماجستير فقد تمكنا من فصل أربع إيزوفلافونات من *Retama sphaerocarpa* :

7-hydroxy -6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-*O*-*β*-glucoside.(F_3)
7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (F_1)
5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-*C*-glucoside. (F_9)
genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(F_{10G})

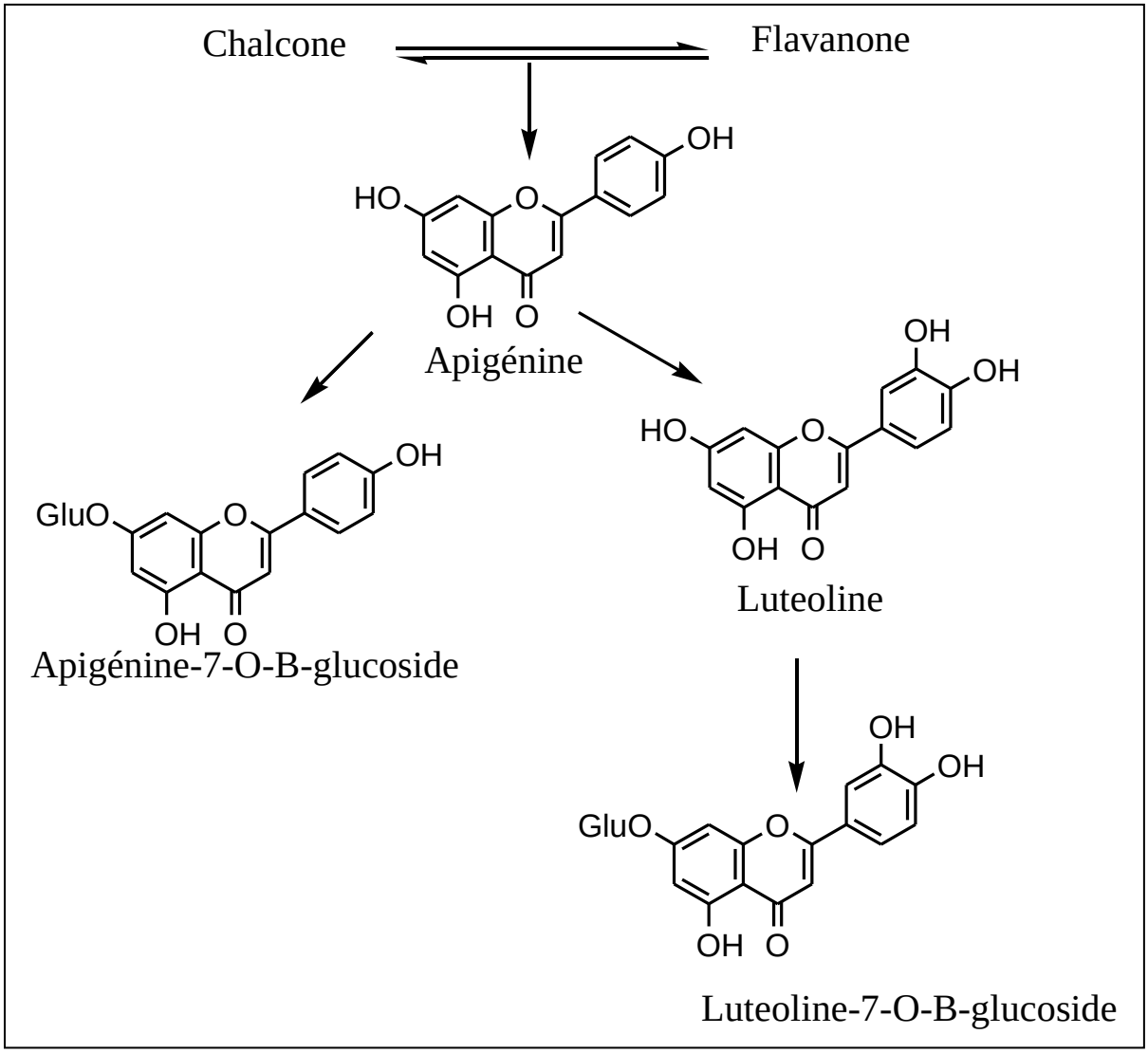
فالمركبين F_1،F_9 تم فصلهما لأول مرة من هذا الجنس أما المركب F_{10G} فلم يسبق فصله.

وقد جاءت هذه النتائج معززة لإنتماء النبتة إلى العائلة البقولية المشهورة بهذا النوع من المركبات، وقد تميزت هذه النبتة بصناعة المشتقات من النوع C-glu التي يتم تكوينها مباشرة بعد الشالكون [1] في كل من هيكل الفلافون [2] والإيزوفلافون بالإضافة إلى الممشتقات الميتوكسيلية و الجليكوزيدية O-glycose التي يتم إشتقاقها من الفلافا نون.فالشكل يوضح المخطط الوراثي لهذه النبتة إذ تظهر المركبات المفصولة خلال رسالة ا لماجستير بين حاضنتين والمركبات المعني بها هذا البحث داخل مستطيل أما البنى المتبقية فلم يتم فصلها وهذا راجع لعدة أسباب ، إما لو جودها بكميات ضعيفة لم يتسنى فصلها وإما هي موجودة في الكسور المعقدة التي لم تدرس أو لكون بعض تلك الجزيئات لا تتراكم في مثل تلك الصو ر، إذ بعد تكوينها تتحول مباشرة إلى إحدى مشتقاتها البنيوية عن طريق تثبيت مجموعة مستبدلة .

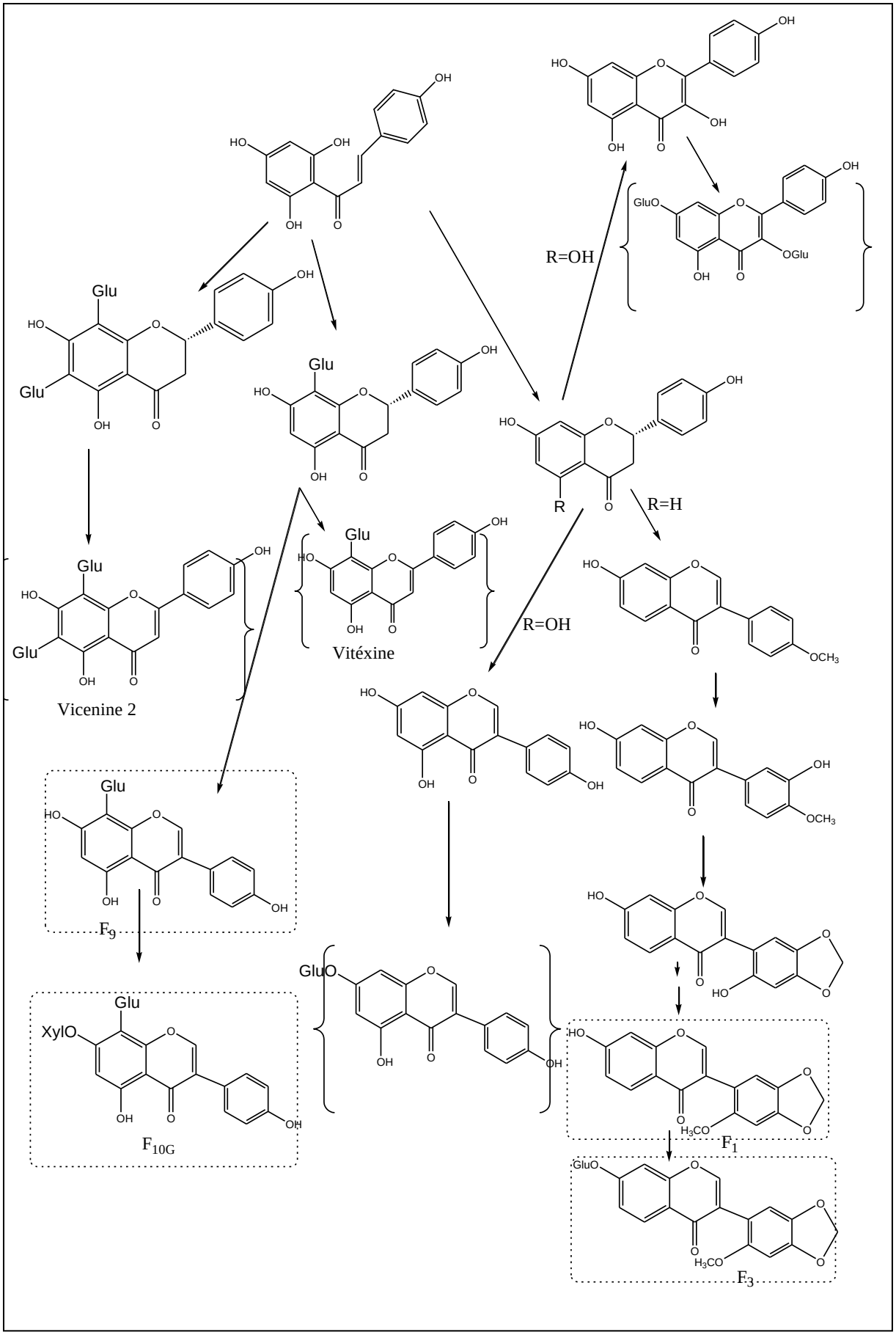
وقد اعتدمنا في فصل هذه المركبات على تقنيات الكروماتوغرافيا بأنواعها المختلفة؛ كروماتوغرافيا العمود، كروماتوغرافيا الورق، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، وتمت تنقية المر كبات المفصولة باستعمال عمود كروماتوغرافي صغير من الـــ Sephadex LH20.

كما تم تحديد البنى الجزيئية للمركبات المفصولة باستعمال الطرق الفيزيوكيميائية : مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV)، ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (NMR^1H) وللكربون ($NMR\ ^{13}C$)، ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد (Cosy,HMQC,HMBC), ومطيافية الكتلة والإماهة الحمضية HCl (4N) .

وبغية الكشف عن مدى الفعالية البيولوجية للنبتة *Retama sphaerocarpa* أجريت بعض التحاليل ضد البكتيرية، والتي توصلت إلى فعالية المستخلص البيوتانولي على النوع البكتيري *S. aureus* ATCC 43300 وهذا يفتح المجال لدراسات أخرى لأنواع بكتيرية موجبة الغرام سواء كان على المستخلص أو على المركبات المفصولة .



الشكل(1): المخطط الحيوي الوراثي لفلافونيدات *Ammoides atlantica*



الشكل (2): المخطط الحيوي الوراثي لفلافونيدات النبتة *Retama sphaerocarpa*

المراجع

[1] Louaar, S., Akkal, S., Bousetla, A., Medjroubi, K., Djarri, L. and Seguin, E. (2005). Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*, Chemistry of natural compound, Vol. 41, No.1.

[2] Harbone, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (1975). The Flavonoids 2nd part, Academic press, New york, Sanfrancisco

.

الملخص

في إطار البحث عن المواد الفعالة عند النبتات الطبية الجزائـــرية ، وباعتبار أن الفلافونيدات منتجـــــات طبيعية مؤهلة لدور وقائي و علاجي لما تتميز به من فعالية بيولوجية، لذا كان بحثنا موجها نحو تثمين المحتوى الفلافونيدي للنبتتين الطبيتين: *Retama sphaerocarpa* (Fabaceae) *Ammoides atlantica* (Apiaceae) فبالاعتماد على طرق الاستخلاص و الفصل و التنقية تمكنا من فصل أربع مركبات فلافونيدية من النبتة *Ammoides atlantica* كلها من عائلة الفلافون وتم التعرف عليها بالاستعانة بالطرق الفيزيوكيميائية.

Apigénine(1) Luteoline (2) **,** Apigénine 7-*O*-*β* glucoside(3)**,** Luteoline 7-*O*-*β* glucoside(4) بالإضافة إلى سكر السيكاروز.

كما تمكنا من فصل أربع إيزوفلافونات و التي جاءت معززة لانتماء النبتة *Retama sphaerocarpa* إلى العائلة البقولية

7-hydroxy -6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-*O*-*β*-glucoside.(1)
7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (2)
5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-*C*-glucoside. (3)
genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(4)

فللمركبين 2 و3 تم فصلهما لأول مرة من هذا الجنس أما المركب **4** فلأول مرة يتم فصله في المملكة النباتية.

ونظرا لما لاقته النبتة *Retama sphaerocarpa* من رواج في الطب الشعبي وبغية التعرف على المركبات المسؤولة عن هذه الفعالية تم إجراء بعض التحاليل البيولوجية الضد بكتيرية فأبدى المستخلص البيوتانولي إستجابة فعالة ضد السلالة *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 .

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes médicinales algérienne des familles Fabaceae et Apiaceae.

les flavonoides sont des substances naturelle qui jouent un rôle protecteur vu leur activités biologiques. de ce fait. Nos travaux sont orientés vers l'extraction, la séparation ,la purification et l'identification des composés flavonoidiques de deux espèces : *Retama sphaerocarpa* (Fabaceae) et une espece endémique *Ammoides atlantica* (Apiaceae).La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation de toute la batterie chromatographique en phase liquide ainsi que le recours aux méthodes modernes d'analyses les plus performantes notamment, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ($NMR^{1}H$, $NMR^{13}C$, Cosy, HMQC, HMBC), la spectroscopie d'absorption ultraviolette et la spectroscopie de masse.

Toutes ces méthodes nous ont permis d'établir les structures de quatre isoflavones isolés de l'espèce *Retama sphaerocarpa* : 7-hydroxy -6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-*O*-*β*-glucoside.(1) 7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (2) 5,7,4`-Tri hydroxy isoflavone-8-C-glucoside. (3) genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(4).Ce denier composé a été isolé pour la premier fois, et quatre flavones et un sucre isolés de l'espece endémique *Ammoides atlantica :*Apigénine(1), Luteoline (2) , Apigénine 7-*O*-*β* glucoside(3), Luteoline 7-*O*-*β* glucoside(4) et sucarose .

Lactivité anti bacterienne de l'éxtrait Butanolique de la plante *Retama sphaerocarpa* a donné des résultats positifs sur l' espèces *staphylococcus aureus* ATCC43300 .

Ce travail a fait l'objet de deux publications internationales .

Mots-cles : *Ammoides atlantica* , *Retama sphaerocarpa* , Flavonoides .

Abstract

This work is a part of our research program on the Algerian medicinal plants of Fabaceae and Apiaceae families

The flavonoids are a natural substancs,that play a protective role considering their Biological activity, for this reason our research was interested in the extraction, separation ,purification and determination of flavonoid contents of two species *Retama sphaerocarpa* (Fabaceae) and *Ammoides atlantica* (Apiaceae), the latter one is endemic. The achievement of this work required the use of several methods in the liquid phase chromatography as well as recourse to modern methods of the most effective analysis namely the spectroscopy of nuclear magnetic resonance ($NMR^{1}H$, $NMR^{13}C$,Cosy ,HMQC,HMBC), the ultraviolet absorption spectroscopy and the mass spectrometry. All this methods enabled the establishment the structures of four isoflavones which isolated from *Retama sphaerocarpa* specie: 7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-O-β-glucoside.(1) 7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (2) 5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-C-glucoside. (3) genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(4).this latter is new isoflavone. and four flavone has been isolated from *Ammoides atlantica* : Apigénine(1), Luteoline (2) , Apigénine 7-*O-β* glucoside(3), Luteoline 7-*O-β* glucoside(4) and arabinose .

Antibacterial activity was assessed using the disk diffusion method , The n-BuOH crude extract was the most active against *staphylococcus aureus* ATCC43300.

This results were published in two international journals.

Key words : *Retama sphaerocarpa, Ammoides atlantica*, flavonoids.

الإهداء

أهدي ثمرة جهدي هذا إلى :
أمي وأبي حفظهما الله
وإلى روح أخي العزيز محمد رحمه الله
وباقي إخوتي:
عليمة، فاتح، فيروز، هشام، جلال
وإلى كل الأهل والأحباب.

تشكرات

الحمد والشكر لله العلي العظيم الذي وفقني وأعانني على إنجاز هذا العمل المتواضع .

أتقدم بأسمى معاني الشكر و العرفان بالجميل إلى أستاذي الفاضل الدكتور عكال صالح الذي أدار هذا البحث ولم يقصر ولم يدخر أدنى جهد في سبيل السير الحسن لهذا العمل.

كما أعبر عن عظيم امتناني و تقديري لأستاذي الدكتور مجروبي كمال على النصائح و المساعدات التي قدمها لي خلال إنجاز هذا العمل كما أشكره على قبوله رئاسة لجنة المناقشة.

وأوجه خالص شكري إلى الأساتذة: الدكتور لعمارة قدورمن جامعة أم البواقي و الدكتور خنوف الصديق من جامعة سطيف على قبولهما المشاركة في مناقشة هذه الرسالة .

كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى أستاذي القدير الدكتور غراف نورالدين من جامعة أم البواقي علي كل النصائح و المساعدات التي قدمها لي خلال مشواري الدراسي، كما أشكر له قبوله الحسن للمشاركة في مناقشة هذه الرسالة .

وأتقدم بكل معني الشكر إلى الدكتور لعور حسين على مساعداته و تعاونه معنا سواء في التعرف على النبتات المدروسة أو التحاليل البيولوجية المجرات.

وأوجه شكري الجزيل إلى الأستاذ بن احمد رياض والأستاذ لخضر جري على ما قدماه لي من عون و مساعدة. كما لا أنسى شكر الهاني، مصطفى لفحل و خالي كمال على مساعداتهم و نصحهم لي في الإعلام الألي.

و لا يسعني في الأخير إلا أن أثني على الزملاء وما أكثرهم ممن ساهم من قريب أو بعيد في تقديم عون أو مساعدة ،وأخصهم بالذكر رفيقات دربي سليـــمة وأحلام، كما لا أنسى أسيا، نجوى، منى، منيرة، نريمان، حسينة، نعيمة، حنان، لمياء، مـالك، صابرو رؤوف .

و زملاء الأسرة المخبرية : نبيلة1، نبيلة2، نجاة، نجاح، راضية، مونية وزين العبدين.

الفهرس

قائمة المختصرات

مقدمة 2

المراجع 4

الفصل الأول

دراسة المركبات الفلافونيدية

I.أ– **دراسة المركبات الفلافونيدية** 6

أ– 1. تعريف الفلافونيدات 6

أ– 2. تصنيف الفلافونيدات 7

أ– 2 –1.الفلافون 7

أ– 2 –2.الفلافونول 7

أ– 2 –3.الفلافانون 7

أ– 2 –1.نيوفلافون 9

أ– 2 –5.إيزوفلافون 9

أ– 2 –5–1.توزيع الإيزوفلافونات في العائلة البقولية 9

أ– 2 –5–2.الإصطناع الحيوي للإيزوفلافونات عند البقوليات 10

أ– 3. توزيع الفلافونيدات 12

أ– 4. الفعالية البيولوجية للفلافونيدات 13

أ– 4. 1. الفعالية الضد مكروبية 13

أ–4–1–1. الفعالية ضد البكتيرية 13

أ–4–1–2. الفعالية ضد الفطرية 14

أ– 4. 2. الفعالية ضد الفيروسات 14

أ– 5. 3. الفعالية المضادة للأكسدة 15

I. ب– **الدراسة الكيميائية للفلافونيدات** 18

ب–1. الاستخلاص 18

ب–2. الفصل والتنقية 18

ب–3. التعيين البنيوي للفلافونيدات 19

ب–3. 1. ثابت الانحباس 19

ب–3. 2. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) 19

ب–3. 2. 1. طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي 19

ب–3. 2. 2. طيف الامتصاص في وجود الكواشف 20

ب– 3. 3. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $NMR^{1}H$ 25

ب– 3. 4. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $NMR\ ^{13}C$ 28

ب– 3. 5. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد 28

ب-3. 6. مطيافية الكتلة 29
ب-3. 7. الإماهة الحمضية 31
المراجع 33

الفصل الثاني

الدراسة الكيمياوية للنبتتين *Ammoides atlantica , Retama sphaerocarpa*

II.أ- **الدراسة الكيمياوية لنبات** *Retama sphaerocarpa* 40
أ-1 التصنيف النظامي للنبتة 40
أ-2. وصف النوع 40
أ-3. توزع النوع 42
أ- 4. المسح البيولوجي للنبتة 42
أ-5. المسح الكيميائي للجنس *Retama* 45
II.ب- **الدراسة الكيمياوية لنبات** *Ammoides atlantica* 49
ب-1 التصنيف النظامي للنبتة 49
ب-2. وصف النوع 49
ب-3. المسح البيولوجي للجنس *Ammoides* 50
ب-4. المسح الكيميائي للجنس *Ammoides* 51
المراجع 53

الفصل الثالث

المادة النباتية :الاستخلاص ،الفصل ،التنقية و الالدراسة البيولوجية

III .أ- **الدراسة الكيمياوية العملية لنبات** *Retama sphaerocarpa* 56
أ- 1. المادة النباتية 56
أ- 2. الاستخلاص 56
أ- 3. طرق الفصل والتنقية 58
أ- 4. الفعالية ضد البكتيرية 62
III .ب- **الدراسة الكيمياوية العملية لنبات** *Ammoides atlantica* 64
ب - 1. المادة النباتية 64
ب - 2. الاستخلاص 64
ب- 3. طرق الفصل والتنقية 66
المراجع 69

الفصل الرابع

التعيين البنيوي للمركبات المفصولة

IV. أ- **التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Retama sphaerocarpa*** 71

أ- 1. التحليل البنيوي للمركب F_3 71

أ- 2. التحليل البنيوي للمركب F_1 78

أ-3. التحليل البنيوي للمركب F_9 82

أ- 4. التحليل البنيوي للمركب $F_{10}G$ 91

IV.ب- **التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Ammoides atlantica*** 96

ب - 1. التحليل البنيوي للمركب AF_6 96

ب - 2. التحليل البنيوي للمركب AF_7 100

ب -3. التحليل البنيوي للمركب AF_{10} 103

ب - 4. التحليل البنيوي للمركب AF_{11} 110

ب - 5. التحليل البنيوي للمركب AF_{12} 115

المراجع 119

الخاتمة 121

المراجع ..... 125.

الملخصات.

قائمة المختصرات

CC : Column Cromatography.

TLC : Thin-Layer Chromatography .

PC : Paper Cromatography.

^{13}C-NMR : ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance.

^{1}H-NMR : ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance.

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

COSY : Correlation Spectroscopy .

J : Coupling constant.

Hz : Hertz.

ppm : pats per million.

s : singlet.

d : doublet.

dd : doublet of doublet.

Rf : Ration to solvent front.

EI : Electron Impact ionization.

ES : Electro Spray.

FAB : Fast Atom Bonbardment.

GC-MS : Gaz chromatography-Mass Spectrometry.

HPLC : High Performance Liquid Cromatography.

UV : Ultraviolet.

ROS : Reactive Oxygen species.

CoA : Co-enzyme.

المقدمة

المقدمة : من المشاهد في واقعنا اليومي زيادة اهتمام الناس بالطب والعلاج الطبيعي، والتداوي بالأغذية الطبيعية و الأعشاب و النباتات الطبية و الوصفات الشعبية المجربة من أهل الخبرة .

قديما كانت تستعمل الأعشاب كمصدر رئيسي في معظم العقاقير ، [2,1] فمملكة النبات تزود الطب بصفة مستمرة إذ تستعمل في شكلها الخام على شكل شايات و شراب ومنقوع و مراهم و دهان أو مساحيق . ويعود ظهور طب الأعشاب إلى حوالي 60000 سنة باكتشاف قبر في مغارة شمال العراق سنة (1960)، [3] إذ أسفرت التحاليل المجراة على التربة المحيطة بالهيكل العظمي على وجود حبوب طلع لثماني نبتات سبعة منها طبية لا تزال تستعمل في كل أنحاء العالم [4] .

مع تطور الكيمياء و الطب الغربي أعتمد على التداوي بالعقاقير والأدوية المصنعة [5] إلا أن صناعة بعض هذه الأدوية غير معروفة أو غير عملية اقتصاديا، ناهيك عن السلبيات الناجمة عنها من مضاعفات وأمراض سرطانية و أعراض جانبية، عانى منها الكثير من المرضى، لذا تتواصل الأبحاث عن النبتات الطبية للتصدي للأمراض الحالية . فمشتقات الأعشاب تمثل نسبة عالية من الأدوية المسوقة المستعملة حاليا في علاج إرتفاع ضغط الدم و الربو و الأوجاع ...

فـــ٪ 25 من الوصفات الطبية تحوي على الأقل أهم دواء ذو أصل نباتي [6] .

وفي هذا السياق وبغية المساهمة في تطور هذه الأبحاث عمدنا إلى دراسة فيتوكيميائية لمنتوجات الأيض الثانوي الفلافونيدي للنبتتين طبيتين تنحدران من قاموس ا لثروة النباتية الجزائرية، أولاهما *Retama sphaerocarpa* من العائلة البقولية (Fabaceae) التي تعتبر من أرقى وأوسع العائلات الزهرية بعد العائلة المركبة (Compositae) لاحتوائها على أكثر من 650 جنس وقرابة 17000 نوع [7]. وقد عمد المختصون إلى تقسيمها إلى ثلاث عائلات تحتية : Caesalpinioideae، Mimosoideae، Papilionoideae وهذه الأخيرة هي الأكثر اتساعًا باحتوائها على 10400 نوع [7].

تحظى العائلة بأهمية اقتصادية عظمى لاحتوائها على نباتات صيدلانية، فلاحية، صناعية وأخرى للزينة. كما تجدر الإشارة إلى أنها تحتوي على عدد مهم م ن النباتات السامّة حيث تضمّ رتبتها أكثر من 16000 نوع سام [7]. لذا كانت هدفاً للكثير من الدراسات الفيتوكيميائية، العائلة البقولية في الجزائر تضم حوالي 53 جنساً و 337 نوعاً [8]، فالجنس رتم (*Retama*) الذي نحن بصدد دراسته ممثل في الجزائر بثلاثة أنواع : *Retama reatam*، *Retama monosperma*، *Retama sphaerocarpa*.أما النبتة الثانية فهي *Ammoides atlantica* النبتة الأصلية المنحدرة من العائلة

الخيمية المعروفة بأهميتها الصناعية حيث تستعمل كطعام و توابل و دواء ونباتات للزينة . تقسم هذه العائلة إلى ثلاث عائلات تحتية : Apioideae, Saniculoideae, Hydrocotyloideae و تضم حوالي 200 جنس و 2900 نوع تنمو معظمها في نصف الكرة الشمالية، أما في الجزائر فهي ممثلة بـــ55 جنس و130 نوع[8] .من بينها جنس *Ammoides* الذي يظم النوعين *Ammoides atlantica* و *Ammoides pusilla* .

أما من الناحية الكيميائية فتشير الأبحاث إلى غنى هذه العائلة بالكومارينات ، [9] الفلافونيدات [11,10]، و القلويدات البيريدينية [12] . فبحثنا هذا يعد الأول من نوعه في دراسة المحتوى الفلافونيدي للنبتة *Ammoides atlantica* و كتكملة لرسالة الماجستير في دراسة للنبتة *Retama sphaerocarpa* وقد قسمنا هذا البحث إلى مقدمة وأربع فصول و خاتمة، ففي الفصل الأول استعرضنا منتوجات الأيض الثانوي الفلافونيدي من تعريف وتصنيف وأهمية بيولوجية لتليها كيفية الفصل والطرق التحليلية المتبعة للتعرف عليها . أما الفصل الثاني فخصصناه للتعريف بالنبتتين والتنويه بمزاياها البيولوجية بالإضافة إلى إحصاء الفلافونيدات المفصولة من جنسيهما . لتأتي الطريقة العملية المتبعة خلال هذه الدراسة من فصل و تنقية للمركبات الفلافونيدية بالإضافة إلى دراسة بيولوجية لمستخلصات النبتة *Retama sphaerocarpa* في الفصل الثالث ، في حين خصص الفصل الرابع للتعين البنيوي للمركبات المفصولة باستعمال مختلف الطرق الفيزيوكيميائية .

المراجع

[1] Cooper,E. (2004). Drug discovery,CAM and natural products, Evid. based complement altern. med.1, 215-217.

[2] Tsao, G.C.I., Zeltzer, L.K., (2005). Complementary and alternative medicine approaches for pediatric pain, a review of the state-of-the-science, Evid. based complement altern med.2.149-159.

[3] Solecki, R., Shanidar, I.V. (1975). A neanderthal flower burial in northern Iraq , Science, 190,880-881 .

[4] Bensky, D., Gamble, A. (1993). Chinese herbal medicine,materia medica, Revised edition, seattle, W.A., Eastland press, Inc. 13-17.

[5] Farnsworth, N.R. and Morris, R.W. (1976). Higher plants-the sleeping giant of drug development, Am. J. pharm. Sci. support public health. 148,46-52.

[6] Bashar, S., Hassan, A. and Omar, S. (2005).Tradition and perspectives of Arab herbal medicine, a review, The Author . Published by oxford university, 1-5.

[7] Bruneton, J. (2001). Plantes toxiques et végétaux dangeureux pour l'homme et les animaux.

[8] Quezel, P. and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

[9] El hazimi, H. (1995). Natural product, 149-190.

[10] Harborne, J.B. (1988). The flavonoids ,advances in research since 1980, eds. chapman and hall, New york .

[11] Bep, O.B. (1986). Medical plants in tropical west Africa, eds. Cambridge university press.

[12] Mann, J. (1987). Secondary metabolism, eds. Clarendon press, Oxford.

الفصل الأول

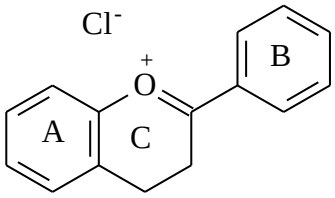
دراسة المركبات الفلافونيدية

I - أ - دراسة المركبات الفلافونيدية :

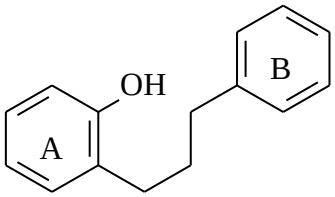
أ - 1 - تعريف الفلافونيديات :

يعود أصل كلمة فلافونيد إلى (Flavus) وهي كلمة لاتينية تعني اللون الأصفر [1]. فالفلافوندات هي صبغات نباتية تسمى أحيانا أنتوزانتينات (Anthoxantines) تنتشر في مختلف أجزاء النبتة من أزهار وأوراق وسيقان وجذور ... وتجدر الإشارة إلى أن هناك صبغات نباتية أخرى تسمى أنتوسيانينات (Anthocyanines) وهي وثيقة الصلة من الناحية الكيميائية بالفلافونيدات. والنواة الأم للأنتوسيانينات هي كلوريد 2 فنيل بتروبير اليوم المعروفة بكلوريد فلافيليوم (1)، ويتمّ عزل هذه الأملاح على هيئة أملاح كلوريد [2] تؤمن الحماية للنسيج الخلوي للنبات من تأثير الأشعة فوق البنفسجية [1]. وتعدّ الفلافونيدات من المركبات البولي فينولية، فهي تتكون من حلقتي بنزين تربطهما سلسلة بثلاث ذرات كربون الصيغة (2) التي تشكل عموماً حلقة غير متجانسة بعد الالتحام مع OH الفينولي للحلقة A [3].

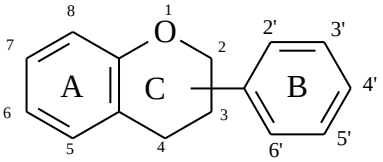
تعتمد الصيغة الكيميائية للفلافونيدات على هيكل ذو 15 ذرة كربون ممثلة بحلقة كرومـــان (Chromane) وحلقة بنزينية وهي ثاني حلقة عطرية ترتبط في المواقع 2، 3، 4 الصيغة (3).



الصيغة (1)



الصيغة (2)



الصيغة (3)

أ - 2 - **تصنيف الفلافونيدات** :

تصنف الفلافونيدات إلى عدّة أقسام، حسب درجة تأكسد الحلقة البيرانية التي يمكن أن تفتح أو تتحلق لتعطي حلقة فيران [4].

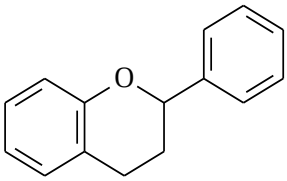
أ - 2 -1 - **الفلافون:** يمكن للحلقة B المشار إليها سابقا أن تتواجد في الموضع 2، وإذا كانت الرابطة 2ـ3 غير مشبّعة واستبدل الموقع 4 بمجموعة كربوكسيل، سمّي المركب حينئذ فلافون ، وتتضمن هذه المركبات مجوعات بديلة تكون في الغالب مجموعة هيدروكسيل أو ميتوكسيل وقد يحوي بناؤها على وحدات سكرية على هيئة سكر أحادي أو ثنائي أو أكثر، وقد ترتبط هذه الوحدات بذرة أكسجين المكونة لمجموعة الهيدروكسيل أو ترتبط مباشرة بإحدى ذرات الكربون للهيكل الفلافونيدي و من أشهرهذه السكريات نجد : الهكسوزات Hexoses (D-glucose، D-galactoseأو D-allose) والبنتوزات Pentoses (D-apioses، L-arabinose، L-rhamnose، D-xylose).

أ - 2 -2 - **الفلافونول:** إذا وجدت مجموعة هيدروكسيل (OH) حرة أو مستبدلة (OR) في الموقع(3) لمركب الفلافون حيث يتم تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في مرحلة الشالكون سمي المركب بالفلافونول وهو يشكّل نواة أساسية للعديد من المركبات الطبيعية.

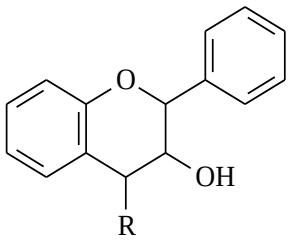
تنتشر كل من الفلافونات و الفلافونولات بشكل واسع في الطب يعة إذ تمثل حوالي ٪ 80 من الفلافونيدات حيث تكون الحلقة A مستبدلة بأكثر من ٪90 بواسطة مجموعة هيدروكسيل حرة في الموضعين C-5,C-7 أو ممثيلة أو مرتبطة بسكريات، كما أن هناك استبدالات أخرى تتم بواسطة مجموعات هيدروكسيلية حرة بنسب متفاوتة في الموقعين C-6,C-8 وقد تكون مرتبطة بمثيل أو بمجموعات سكرية أو بجذور أخرى كما يمكن لهذا الإرتباط أن يكون من نوع C-C.

الحلقةB تكون مستبدلة بحوالي ٪ 80 في الموقع'C-4 ويتم ذلك قبل مرحلة تكوين الشالكون ،أو ثنائية الإستبدال في الموقعين 'C-3',C-4 بعد غلق الحلقة (C) أي بعد تكوين الشالكون، وتكون ثلاثية الإستبدال في المواقع'C-3',C-4 و 'C-5 بنسبة ضعيفة.أما الموقعين 'C-2و'C-6 فنادرا ما تكون مستبدلة [1].

أ - 2 - 3- **الفلافانون** :إذا كانت الرابطة 2-3 في هيكل الفلافون مشبعة يسمى المركب فلافانون . كما هو موضح في الشكل (1) الذي يبيّن مختلف الهياكل الأساسية للفلافونيدات.

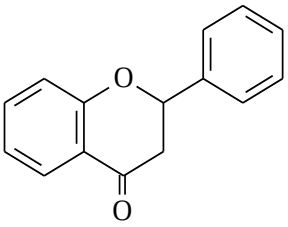


Flavane

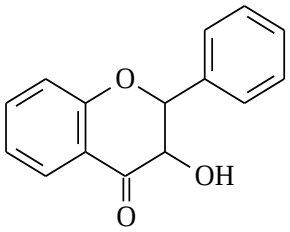


R=H : Flavan_3_ ol

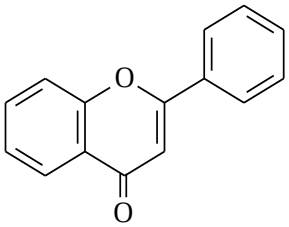
R=OH : Flavan_3,4_di-ol



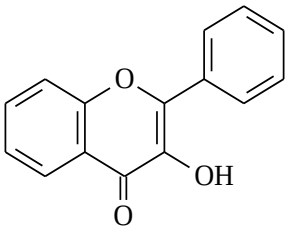
Flavanone



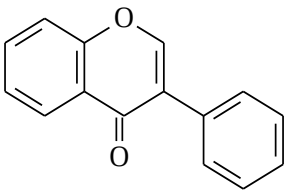
Dhydroflavonol



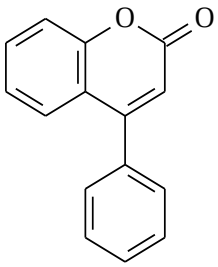
Flavone



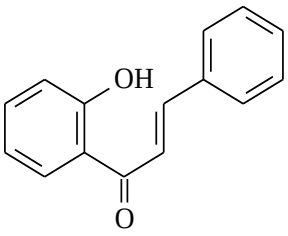
Flavonol



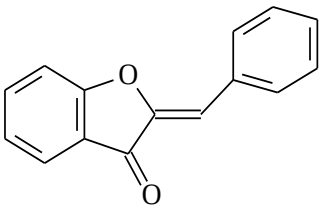
Isoflavone



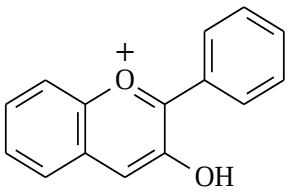
Neoflavone (4–phenyl–coumarine)



Chalcone



Aurone



Anthocyanidol

الشكل (1) : الهياكل الأساسية لمختلف الفلافونيدات

أ - 2 - 4 - **نيوفلافون:** إذا وجد استبدال بين مجموعة الكربوكسيل والمجموعة B في هيكل الفلافون سُمّي المركب نيوفلافون والذي تمّ عزله من عدّة أنواع للعائلة البق ولية [5]. فهو يشكّل مع الإيزوفلافون الفلافونيدات الشاذّة وذلك لقلة انتشارها في الطبيعة خلافا عن الفلافونات والفلافونولات المنتشرة على نطاق واسع [2].

أ - 2 -5 - **إيزوفلافون** : وهي لا تختلف في بنائها عن الفلافونات إلاّ باختلاف ارتباط الحلقة B حيث تتواجد في الموضع رقم 3. ويعود تاريخ إكتشاف أول إيزوفلافون formononetin كمركب طبيعي إلى منتصف القرن التاسع عشر [6].من جذور النبتة البقولية *Ononis spinosa L* .

ومع نهاية 2004 تم إحصاء ما يزيد عن 1600 إيزوفلافون أغلبها مفصول من العائلة البقولية [8] التي تعتبر ثالث أهم عائلة زهرية .

كما يشهد محدودية الإيزوفلافونات عند العائلات غير البقولية إذ فصل منها أول إيزوفلافون في أواخر القرن التاسع عشر من النوع(Iridaceae) *Iris florentina* [9] . وفي ماي 2007 تم إحصاء 225 إيزوفلافون مفصول من 59 عائلة غير بقولية مع العلم أن أغلب هذه المركبات تم الكشف عنها لدى العائلة البقولية[10] .

أ - 2 - 5 -1- **توزيع الإيزوفلافونات في العائلة البقولية :**

تتمركز الإيزوفلافونات في تحت العائلة الفراشية (papilionoideae)، و قبل سنة 1982 تم الكشف عن الإيزوفلافونات عن ـــد ثلاث أنواع فقط من العائ ـــلات التحتي ـــة الأخرى [11]*Apuleia leiocarpa* (Caesalpinioideae),*Albizia procera,Prosopis juliflora*(Mimosoideae)

ومؤخرا تم إكتشاف isoflavone C-glycoside عند *Cassia javanica* و*Senna siamea* من العائلة Caesalpinioideae[13,12]

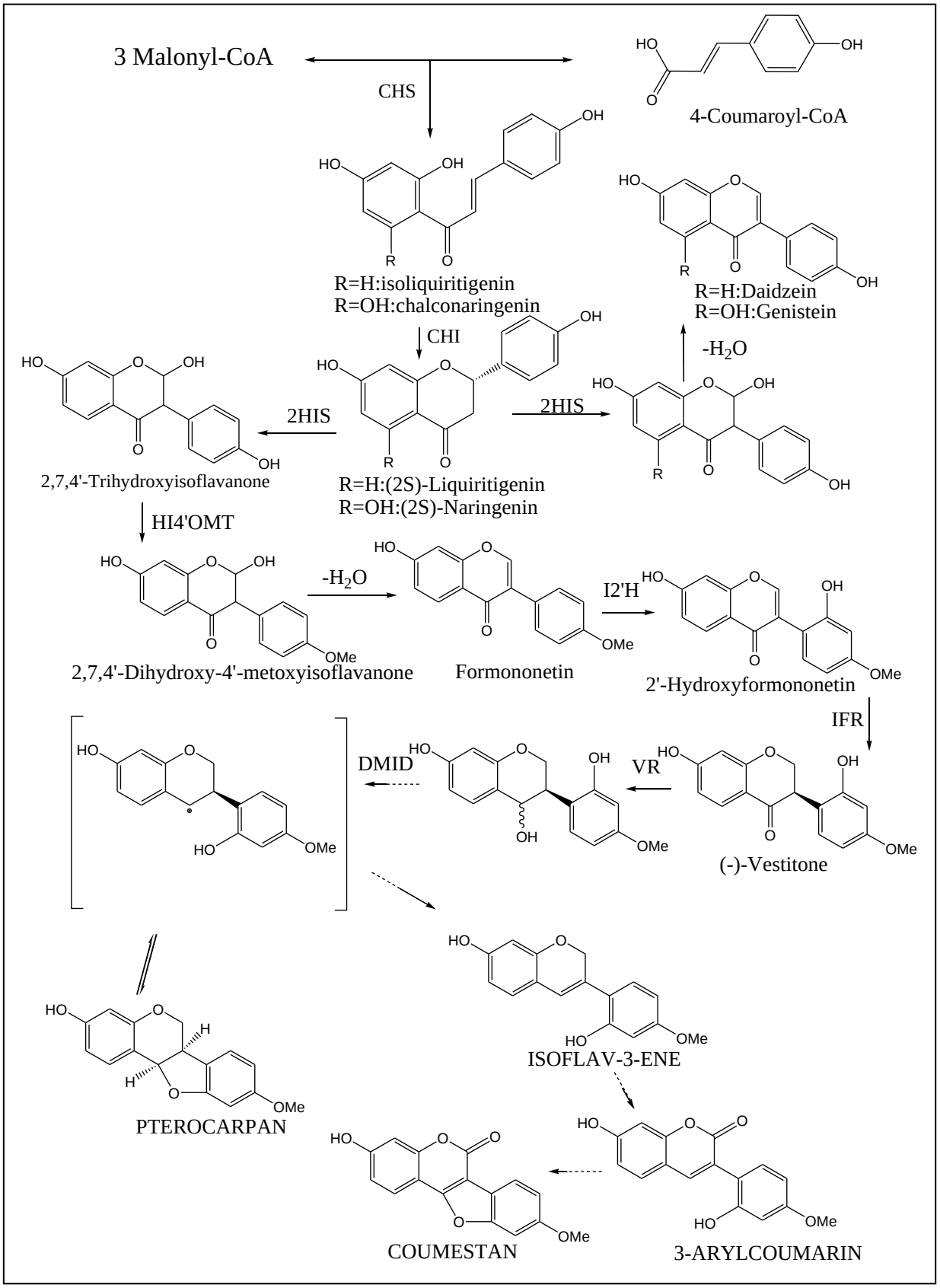
ومن بين 423 إيزوفلافون جديد التي أحصاها Veitch في بحثه، إيزوفلافون واحد فقط لا ينتمي إلى تحت العائلة الفراشية [14].وهذا الغناء الهائل للإيزوفلافونات يعد من الخصائص الكيميائية للعائلة الفراشية .

أ - 2- 5 - 2 - الاصطناع الحيوي للإيزوفلافونات عند البقوليات:

يعتمد الإصطناع الحيوي للإيزوفلافونات عند البقوليات على البشائر الفلافونيدية الأساسية إما chalconaringenin(2',4',6',4-tetrahydroxychalcone أوisoliquiritigenin(2'4'4-trihydroxychalcone النابجة عن إتحاد ثلاث وحدات منmalonyl-CoA و4-coumaroyl بتحفيز من chalcone syntase ليخضع هذا ا لأخير إلى تحوير فراغي نوعي ليعطي الفلافانون(flavanone)بتحفيز من chalcone isomerase(CHI) والذي يمثل أهم الفروع الفلافونيدية، وإعادة الترتيب لهذا الفلافانون بحضور إنزيم2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS) يقود إلى مختلف الهياكل الإيزوفلافونيدية[15,16,17] حسب الشكل (2) وذلك بتحفيز من الإنزيمات المدونة في الجدول (1)

جدول (1) : قائمة الإنزيمات المستخدمة في الاصطناع الحيوي للإيزوفلافونيدات

الرمز	الإنزيم
CHS	Chalcone synthase
CHI	Chalcone isomerase
2HIS	2-hydroxyisoflavanone syntase
HI4'OMT	hydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase
I2'H	Isoflavone2'-hydroxylase
IFR	Isoflavone reductase
VR	Vestitone reductase
DMID	7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase



الشكل (2) : مخطط يوضح الاصطناع الحيوي لمختلف الإيزوفلافونيدات لدى البقوليات

أ - 3 - توزيع الفلافونيدات :

تتوزّع الفلافونيدات عند الطحالب بشكل ضعيف، فهي تتواجد عند الحزازيات والكبديات على شكل إتيروزيدات C أو O فلافون ،كما تتواجد عند مستورات الأزهار الوعائية على شكل ثنائي فلافونيد وبروأونتوسيانيد ول.وعند السرخسيات تكون Hétéroside-O-flavonolsعلى غرار بعضها الآخر الذي يكتفي بتصنيع الشالكونات والبروأونتوسيانيدولات . هذه الأخيرة كثيرة الانتشار عند عاريات البذور كما لوحظ ذلك عند السكاسيات والصنوبريات (باستثناء عائلة Pinaceae) [4].

وعلى عكس ذلك تتواجد الفلافونيدات بشكل واسع عند كاسيات البذور أين يبلغ التنوع النباتي أقصاه [4].

قد لوحظ تواجد بعض أقسام الفلافونيدات في مجموعات نباتية معينة تكون مميزة لها، كالإيزوفلافونات المميزة للعائلة البقولية [17] مما جعل مؤخراً علماء النبات يربطون بين انتشار هذه الجزيئات الفلافونيدية والتصنيف النظامي للنّبات (taxonomic Systèms) [18، 19].

أما على مستوى الخلية تكون الفلافونيدات الإتيروزيدية الذائبة في الماء متمركزة داخل الفجوة وعند الأزهار في خلايا البشرة [4].

أما الفلافونيدات التي تنحلّ في المذيبات غير القطبية، ك الفلافونيدات عديدة الميتوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية [21] حيث تتوضع الفلافونيديات حالة وجودها في صورة أجليكونات على الأنسجة السطحية للأوراق، وتكون ملازمة لمواد مفرزة هي الأخرى ليبوفيلية وهو حال المناطق الجافة وشبه الجافة [4، 21]. وعموما توجد الفلافوني دات بشكل محمي (إتيروزيدات)، بينما تتواجد الأجليكونات في الأنسجة النباتية الميتة (نتيجة التميه الحمضي المحفز بواسطة الإنزيمات) وكذا في خشب الأشجار [20].

أ -4 - الفعالية البيولوجية للفلافونيدات :

أ - 4- 1- الفعالية ضد المكروبية :

منذ قرون و المعقدات ا لغنية بالفلافونيدات تستعمل من طرف الأطباء في شكل ترتيبات شافية مجربة في معالجة الأمراض [22] مثل استعمال النبتة *Tagetes minuta* الحاوية على quercetagetin-7-arabinosyl-galactoside و التي تستعمل بكثرة في الطب الشعبي الأرجنتيني لمعالجة الأمراض المعدية المتعفنة[23]. وكمثال أخر النبتة *Scutellaria baicalensis* التي تستعمل في الصين لمعالجة الدمل و الجروح بطريقة موضعية منتظمة، والتأثير ضد الميكروبي لهذه النبتة راجع بنسبة عالية إلى الفلافونيد Baicalein[25]، كما تعزى الخاصية العلاجية لعكبر النحل المعروفة منذ الأزل والذي يستعمل في الطب اليوناني في علاج القروح إلى غناها بالفلافونيدات خاصة galangin ,pinocembrin [25-28].

أ -4- 1-1- الفعالية ضد البكتيرية:

عمدت الكثير من الأبحاث في تجارب in vitro إلى دراسة الفعالية ضد البكتيرية لمستخلصات الفلافونيدات للنبتات المستعملة في الطب الشعبي، ومن الأجناس المشهورة بهذه الفعالية، نذكر *Hypericum* [29]، *capsella* [30] و*Cromolaena* [30].

حيث إتجهت الأبحاث إلى فصل وتحديد البنى الفلافونيدية المسؤولة عن الفعالية الضد بكتيرية مثل : apigenin[31-39]، galangin [40-42]]، pinocembrin [43,44]، ponciretin [45]، genkwanin [46] Sophoraflavanone G ومشتقاته[47]، naringenin، naringin[48]، epigallocatechin gallate [49] ، luteolin [39]، luteolin7-glucoside [50]، quercetin glycosides [48]، kaemferol [52,51] و flavone glycosides [54,53] ، isoflavones، isoflavanones [55].

في حين إتجهت أبحاث أخرى إلى إضافة الفلافونيدات إلى مركبات معروفة بفاعليتها ضد بعض السلالات البكتيرية مثل Epicatechin gallate [57,56] وSophoraflavanone G [47] فتزيد من فعاليتها [58].كما عمدت أبحاث أخرى إلى إضافة مستبدلات اصطناعية على الفلافونيدات الطبيعية وتحليل مدى فعاليتها المضادة للبكتيرية [59] ومثال ذلك إتجاه Wang وأخرون إلى خلق معقدات بين الفلافونيد 5hydroxy-7,4'-dimethoxy flavone و عدد من المعادن الانتقالية وأثبتو ا أن هذه الطريقة تزيد من الفعالية ضد البكتيرية [60].والبعض الأخر رفع من هذه الفعالية لـــ3-methyleneflavanone بادخال البرومين أو الكلورين على الحلقةB [61].

يوجد فريقي بحث اتجها إلى التحاليل in vivo، ففي بحث Vijayaو Ananthan توصلا إلى أنه بإطعام عن طريق الفم لـــ 142.9mg/kg أو 214.3mg/kg من الـــ Quercetin للفئران من نوع خنزير الهند (guinea pigs) يحميها من البكتيريا *shigella* الممرضة، والتي تقتل الفئران المأخوذة كشاهد أي التي لم تطعم بالـــ Quercetin [62]، وفي 2004 أثبت Dastidar و Co-wokers أن الحقن تحت الجلد لـــ1.58mg/kgمن sophoraisoflavone و3.16mg/kg من 6,8-diprenylgenistein أعطى حماية للفئران(من نوع challenged) ضد *Salmonella typhimurium* [63].

أ - 4 - 1 - 2 - الفعالية ضد الفطرية :

بسبب الإنتشار الواسع لعائلة الفلافونيدات التي تثبط بوغة الإنبات بالنسبة للنباتات المولدة للأمراض، أقترح إستعمالها ضد الأمراض الفطرية المصيبة ل لإنسان [64] الفلافون المفصول لأول مـــرة من النبتـــــة *Eysenhardtia texana* المعـــــروف بـــ 5,7,4'-trihydroxy-8-methyl-6(-3-methyl-[2-butenyl])-(2s)-flavanone. أبدى فعالية ضد المرض الطفيلي الناتج عن الخميرة *candida albicans* [65].الفلافونيـــــد 7-hydroxy-3',4'-(methylenedioxy)flavan المعزول من قشور بذور النبتة *Terminalia bellerica* هو الأخر أبدى فعالية على المرضCalbicams [66].

فعالية عكبر النحل ضد الأمراض الجلدية يرجع ولو بجزء ضئيل إلى المركبات الفلافونيدية التي يحويها بكميات كبيرة مثل اللافونول galangin الذي أظهر فعالية تثبيطية ضد :

Aspergillus tamarii, A.flavus, Cladosporium sphaerospermum, Penicillium digitatum, Penicillium italicum. [67]

أ - 4 - 2 - الفعالية ضد الفيروسات:

بينت بعض الدراسات الدور الذي تلعبه الفلافونيدات في مقاومة الفيروسات إذ اتجهت الأبحاث الجديدة نحو إظهار الفعالية التثبيطية لبعض الفلافونيدات ضد السيدا (HIV)

human immunodeficiency virus فمعظم هذه الأبحاث غارقة في العمل ضد داء HIV-1 الوراثي و أنزيماته إذ تبين الدراسة أن الفلافون baicalin يثبط العمل الدفاعي لـــHIV-1 وكذا انتقال العدوى[68] ،كما تظهر كلا منbaicalin [68] ،hinokiflavone، robustaflavone [69]فعالية تثبيطية على إنزيم النسخ لـــ HIV-1 ويذكر أن الفلافونيدات acacetin, chrysin و apigenin تمنع

نشاط الـــHIV-1 [70] ،ومن الأهمية أن نشير إلى أعمال Hu وآخرون التي تؤكد كو ن chrysin يمتاز بقوة علاجية عالية من أصل 21 فلافونيد طبيعي و 13 مصنع المستعملة ضد HIV-1 [71].

وللفلافونيدات فعالية ضد أنواع أخرى من الفيروسات مثل أبحاث selway التي تثبت أن catechin, ,quercetin,morin,rutin,dihydroquercetin,dihydrofisetin,leucocyanidin, pelargonidin chloride تملك فعالية ضد سبعة أنواع من الفيروسات بما فيها herpes simplex virus(HSV) وفيروس syncytial التنفسي وفيروس الشلل polio وفيروس sindbis [73,72]

بالإضافة إلى المركبين chrysin وkaempferol المفصولين من عكبر النحل والتي تثبط الدور الدفاعي لـــHSV وكذا فيروس crona وrota [74] والأكثر فعالية الفلافونول galangin المعروف بفاعليته ضد الفيروساتHSV وcoxsackie B [75]

تجدر الإشارة إلى أن الدور التأزري بين مختلف الفلافونيدات مثل kaempferol وluteolin يبدي فعالية ضدHSV وهذا ما يفسر الدور الفعال لعكبر النحل مقارنة بمركباته كلا على حدا [76] هذا التعاون محقق أيضا بين الفلافونيدات والعامل المضاد للفيروسات م ثل Quercetin الذي يزيد من فعالية 5-ethyl-2'-dioxyuridine [72]وacyclovir[77]ضد HSVكما يرفع apigenin أيضا من فعالية acyclovir[77] .

أ -4 - 3 - الفعالية المضادة للأكسدة:

تمتاز الفلافونيدات بخواصها المقاومة للتأكسد و يتلخص ذلك في :

- حماية الأنظمة المضادة للأكسدة الداخل خلوية .
- التثبيط الإنزيمي و مخلبة الأثار المعدنية المولدة لـــ ROS (المسؤولة عن إتلاف الأحماض النووية و ظهور الأورام السرطانية كما تتسبب تفاعلاتها المستمرة مع الفوسفولبيد الغشائي في إتلاف الخلية [78]).
- أسر الجذور الأكسجينية النشطة ROS كـــ $NO^{\cdot}$, O^{-}_{2} , $OH^{\cdot}$...ويتوقف هذا على مدى قابلية تحرير البروتونات من طرف الفلافونيد [79]، وعلى العموم يتوقف اصطياد هذه الجذور على الصيغة الكيميائية للفلافونيدات و مستبدلاتها الهيدروكسيلية [80] .

تعتبر الفلافونيدات كعوامل مرجعة قوية وتعمل على تكسير تسلسل التفاعلات الجذر ية نتيجة لبنيتها المستقرة الناتجة عن ظاهرة الرنين الإلكتروني الناشئة عن الحلقات الأروماتية [82,81]، وقد بينت الدراسات أن فعالية الفلافونيدات المضادة للأكسدة متعلقة بعدد وموقع مجاميع الهيدروكسيل

[82] خاصة منها تلك المستبدلة في الموقع 3 للحلقة C [83] و اورثوثنائي هيدروكسي'3',4 للحلقة B، كما تعود مقاومتها للتأكسد لإحتوائها على الرابطة المضاعفة في الحلقة C بين C_3-C_2 المترافقة مع 4-سيتون [82]، وجود OH في الموقع 3 وOH في الموقع 5 بالإتحاد مع مجموعة 4-كربونيل و الرابطة المضاعفة بين C_2-C_3 يزيد من فعالية أسر الجذور الحرة [84].

وفي دراسة لـــ Gwan-sub Sim و أخرون أثبت فيها أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل في البنية الفلافونيدية زادت القدرة على أسر الجذور الحرة ، ففي إختبار للفلافونيدات الحاوية على الرابطة المضاعفة المترافقة مع مجموعة الكربو نيل C-4 في الحلقة C لكل من الفلافونات : Chrysin .Apigenin,Luteolin, و الفلافونولات : Kaempferol, Quercetin, Myricetin

لوحظ عند الفلافونات أن Apigenin وChrysin أبدا فعالية أقل من Luteolin وعند الفلافونولات لوحظ أن Myricetin الحاوية على 6 مجاميع OH أظهر فعالية أكبرمن Quercetin ذو الخمس مجاميع OH وهدا الأخير أكبر من Kaempferol ذو الأربع مجاميع . والجدول (2) يبيّن فعالية بعض المركبات الفلافونيدية [80] .

بالإضافة إلى ذلك كشفت الدراسات على كون الفلافونيدات مضادة لارتفـــاع الضغـــط [85] مضادة للالتهاب [86-88] مضادة للحساسية [89، 90] مضادة للتسرمم الكبدي [78] وذات فعالية ضد الملاريا [91]. كما تستعمل الفلافونيدات لأغراض أخرى ، فنظرا لكون الأنتوسيانوزيدات حساسة للضوء والحرارة وتغير الـــ pH فهي تستعمل في المعلبات كمواد حافظة. وتضاف الفلافونيدات إلى بعض المواد الغذائية كالخمور (30 mg/l anthocyanosides) والمربى، وإلى الحلويات للتنويع في ألوانها والتحسين من طعمها [4]. كما أُثبت وجود بعض الفلافونولات في الشكولاطة [92].

الجدول(2) يوضح الصيغ الكيميائية لبعض المركبات الفعالة بيولوجيا.

المركب	الإستبدال على مواقع الكربون											
	2	3	4	5	6	7	8	2’	3’	4’	5’	6’
Flavones and their glycosides												
Acacetin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OCH_3	-	-
Apigenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Baicalin	-	-	-	OH	OH	OR_1	-	-	-	-	-	-
Baicalein	-	-	-	OH	OH	OH	-	-	-	-	-	-
Chrysin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Luteolin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Luteolin7-glucoside	-	-	-	OH	-	OR_2	-	-	OH	OH	-	-
5-hydroxy-7,4’-dimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	OCH_3	-	-	-	OCH_3	-	-
Isoflavones												
6,8-diprenylgenistein	-	-	-	OH	R_3	OH	R_3	-	-	OH	-	-
Sophoraisoflavone A	-	-	-	OH	-	OH	-	*	*	OH	-	-
Flavonol and their glycosides												
Galangin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Kaempherol	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Myricetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Morin	-	OH	-	-	-	OH	-	OH	-	OH	-	-
Quercetagetin-7arabinosyl-galactoside	-	OH	-	OH	OH	OR_4	-	-	OH	OH	-	-
Quercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Rutin	-	OR_5	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavan-3-ols												
Catechin	-	OH	OH	-	-	OH	-	-	OH	-	OH	-
Epicatechin gallate	-	R_6	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanon-3-ols												
Dihydrofisetin	-	OH	-	-	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Dihydroquercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanones and their glycosides												
Naringenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Naringin	-	-	-	OH	-	OR_5	-	-	-	OH	-	-
Pinocembrin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Sophoraflavanone G	-	-	-	OH	-	OH	R_7	OH	-	OH	-	-
3-Methyleneflavanone	-	CH_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,7,4’-Trihydroxy-8-methyl-6-(3-methyl-[2-butenyl]-(2s)-flavanone	-	-	-	OH	R_3	OH	CH_3	-	-	OH	-	-
Flavan-3,4-diols and anthocyanidins												
Leucocyanidin	-	OH	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Pelargonidin chloride	-	Cl	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Flavan												
7-Hydroxy-3’,4’-(methylenedioxy)flavan	-	-	-	-	-	OH	-	-	#	#	-	-

-:no substitution; R_1:Glucuronic acid; R_2:Glucose; R_3:prenyl group; R_4:arabinose-galactose; R_5:rhamnose-glucose; R_6:gallic acid; R_7: lavandulyl; *:pyran ring between position 2’and3’; #:O-CH_2-O between positions 3’and 4’.

I_ب_الدراسة الكيميائية للفلافونيدات :

ب_1_الاستخلاص :

قبل الشروع في عملية الاستخلاص يشترط تجفيف النبتة جيدا في أماكن خاصة تسمح بالتهوية وبعيدا عن أشعة الشمس والرطوبة، تفاديا للتفاعلات الإنزيمية التي قد تحدث تغيرات على المركبات المستخلصة . وفي هذا النوع من المركبات الفينولية يستحب الاستخلاص بمحاليل كحولية، كالميثانول والإيثانول مع إضافة الماء بنسب 20 إلى 50% [1، 4، 93] بعد التركيز والتخلص من الكحول المستعمل، يعمد إلى استخلاص انتقائي من نوع سائل /سائل، باستعمال مجموعة من المذيبات كإيثر البترول لنزع الكلوروفيل والليبيدات، وثنائي إثيل إيثر (diethyl ether) لاستخلاص الأجليكونات الحرة [4] وأكثر المذيبات استعمالا أسيتات الإثيل (AcOEt) لاستخلاص الأجليكونات عديدات الهيدروكسيل والجليكوزيدات أحادية السكر كما يستعمل البيوتانول العادل (n-BuOH) في استخلاص الجليكوزيدات عديدة السكر.

ب_2_الفصل والتنقية :

يعتمد على التقنيات الكروماتوغرافية بمختلف أنواعها في فصل وتنقية المركبات الفلافونيدية، فتعتبر كروماتوغرافيا العمود الطريقة الأنجع في فصل الكميات الكثيرة والأكثر تعقيدا، إذ تعتمد هذه الطريقة على الأطوار الثابتة : السليكاجل (Silicagel) والسليلوز(Cellulose) ومتعدد الأميد، SC_6 (Polyamide, eg. Machry Nagel) الذي يعتبر الأفضل لكونه مناسبا لفصل جميع المركبات الفلافونيدية خاصة الجليكوزيدية منها وذلك لاحتوائه على الوظيفة الأميدية السامحة بتشكيل روابط هيدروجينية قوية مع المجاميع (OH) الهيدروكسيلية [94]، وتعتبر كروماتوغرافيا الورق التحضيرية (PC) الطريقة الأفضل في تحليل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي، ومن أشهر المذيبات المستخدمة في هذه التقنية نجد :

S_1 : حمض الخل CH_3-COOH بتراكيز مختلفة.

S_2 : البيوتانول النظامي : حمض الخل : الماء (W:A:B) (4 : 1 : 5) (الطبقة العضوية).

بالإضافة إلى هذه الطرق يستعان أيضا بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ذات دعامة متعدد الأميد (DC_6)، ومن أشهر الجمل المستخدمة في هذه التقنية نجد :

S_3 : 13.3.3.1 (أستيل استون ـ مثيل إيثيل سيتون ـ ميثانول ـ ماء).

S_4 : 4.3.3 (مثيل إيثيل سيتون ـ ميثانول ـ طولوين).

S_5 : 18.1.1 (ماء ـ حمض الخل ـ ميثانول).

S_6 : 60.28.7.7 (مثيل إيثيل سيتون ـ ميثانول ـ إيثير البترول ـ طولوين).

يتم تنقية المركبات المفصولة بالاستعانة بعمود صغير من متعدد الأميد (SC_6) باستعمال طوليان كمذيب وإغنائه بالقليل من الميثانول، ثم عمود من Séphadex LH 20 باستخدام الميثانول كمملص.

ب ـ 3 ـ التعيين البنيوي للفلافونيدات :

ب-3-1-ثابت الانحباس :

Rf هو قيمة مميزة للمركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، طبيعة المادة الدامصة، والمملص). وتتأثر هذه القيمة بالمستبدلات ومواقعها على الجزئي . فمن خلال Rf يمكن التمييز بين الجليكوزيدات أحادية، ثنائية، متعددة السكر [94] وبين الأجليكونات البسيطة، ومتعددة الهيدروكسيل أو متعددة الميتوكسيل.

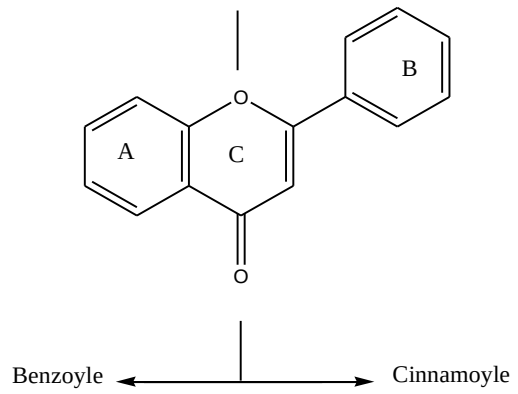
كما أن لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) يعطي معلومات أولية عن البنية الكيميائية للمركب.

ب-3-2-مطيافية الاشعة فوق البنفسجية (UV) :

تعتبر مطيافية الأشعة فوق البنفسجية من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على البنى الكيميائية للفلافونيدات، نظرا للمعلومات الوافية التي تقدمها ولكونها لا تتطلب كم ية كبيرة من المركب.

ب-3-2-1-طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي :

يعطي طيف الفلافونيدات الحاوية على مجموعة كربونيل في C_4 (فلافون، فلافونول)، عصابتين I و II [95] تبعا للشكل الموالي :



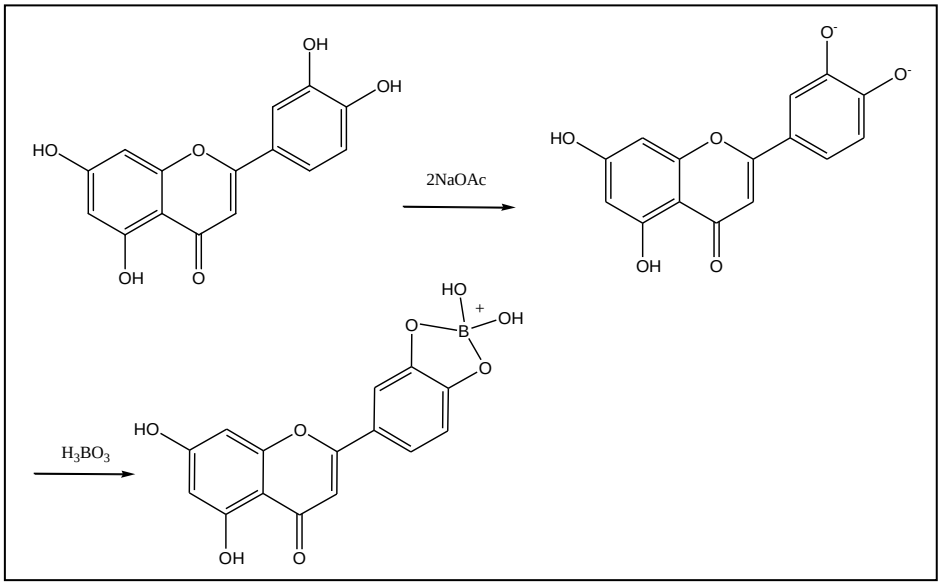
العصابة I : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (300-400 nm)، و هي راجعة إلى امتصاص الصورة Cinnamoyle الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل C_4 مع الرابطة الثنائية والحلقة B. إذ تسمح بتمييز الفلافونول عن الفلافون وتعطي معلومات عن التغيرات البنيوية للحلقتين B و C [95].

العصابة II : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (250-280 nm)، و هي ناتجة عن الشكل Benzoyle الناجم عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة العطرية A. وهذا ما يمكننا من الكشف عن الهياكل الفلافونيدية المختلفة.

يعتمد مكان الحزمتين على عدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فمن الملاحظ أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل، فإن حز مة الامتصاص تزداد إلى طول موجي أعلى "انزياح باتوكرومي". وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميتوكسيل، أو وحدات سكر تزاح حزمتا الامتصاص إلى طول موجي أقل "انزياح هيبسوكرومي" [2].

ب-3-2-2-طيف الامتصاص في وجود الكواشف :

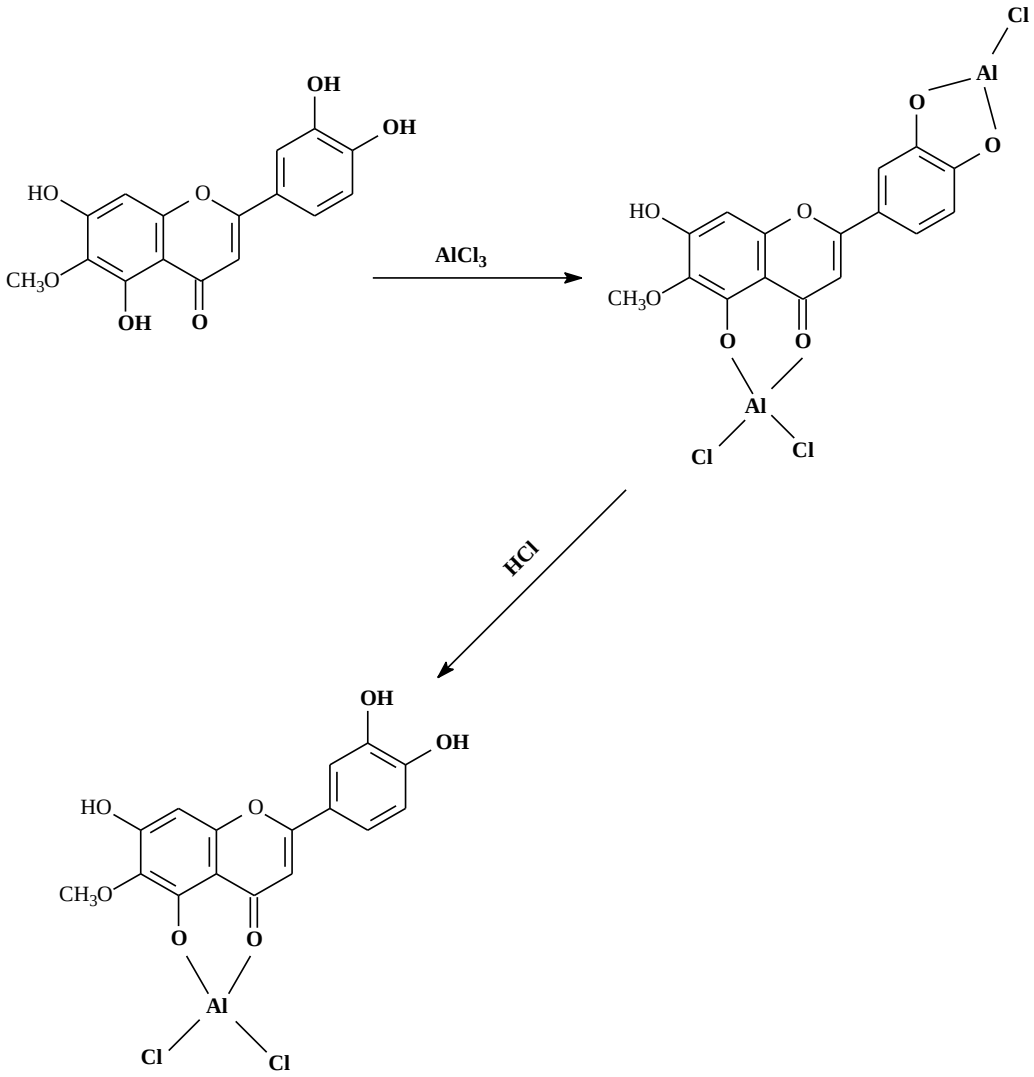
* في وجود NaOH (NaOMe) : NaOH قاعدة قوية تؤين كل هيدروكسيلات الفلافونويد إذ تُحْدِث انزياح Bathocrome للطيف يكون واضحا على الحزمة I.
* في وجود NaOAc : NaOAc أساس ضعيف مقارنة بـــ NaOH فهي تؤين فقط الهيدروكسيلات الأكثر حامضية C_7، C_3، C_4'، ويعتبر NaOAc كاشفا نوعيا لهيدروكسيل C_7.
* في وجود $NaOAc+H_3BO_3$: يستعمل هذا المحلول للكشف عن أورثو ثنائي الهيدروكسيل، إذ يشكل حمض البوريك في وجود خلات الصوديوم معقدات مع الهيدروكسيلات الفينولية في الموضع أورثو حسب الشكل (3).



الشكل (3) : يوضح المعقد المتكوّن بين الفلافونويد ومحلول ($NaOAc+H_3BO_3$)

* في وجود $AlCl_3$، $AlCl_3+HCl$: يشكل كلوريد الألومنيوم معقدات ثابتة في الوسط الحمضي مع مجموعة الكربونيل، وهيدروكسيلات المواقع 3 أو 5، ومعقدات غير ثابتة مع جملة أورثو ثنائي الهيدروكسيل مثل 3'، 4' كما هو موضح في الشكل (4).

والجدول (3) يبيّن أهم الانزياحات الملاحظة بإضافة مجموعة من المتفاعلات على الحزمتين I وII [94، 96، 97].



الشكل (4) : المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$

قبل وبعد إضافة HCl

الطريقة العملية: لتسجيل أطياف الأشعة فوق البنفسجية لمركب فلافونيدي، يتم قياس وتسجيل الطيف الميثانولي لكل مرحلة.

المرحلة 1 : بعد تسجيل طيف الإمتصاص في الميثانول يضاف لخلية المركب قطرات من NaOH بتركيز 0.5 عياري ثم يسجل الطيف مباشرة، وبعد مرور5 دقائق يعاد تسجيل نفس الطيف.

المرحلة 2 : يعاد تحضير الخلية الحاوية على المركب، ويضاف إليه ا بعض القطرات من $AlCl_3$ بتركيز1٪ في الميثانول، ثم يسجل طيف الإمتصاص بعدها تضاف قطرات من HCl (4 عياري) ثم يسجل الطيف .

المرحلة 3: تحضر خلية جديدة للمركب المدروس ويضاف لها NaOAc (الصلب) حتى التشبع ثم يسجل الطيف، لتضاف بعدها إلى نفس الخلية قطرات من حمض البوريك H_3BO_3 المحضر في الماء بتركيز1٪ ثم يسجل طيف الإمتصاص.

الجدول (3) : يوضح أهم الانزياحات الملاحظة بإضافةمجموعة من المتفاعلات

المفاعلات	الإزاحة الملاحظة بـــ (nm)		التحليل الموجه
	الحزمة I	الحزمة II	
MeOH	350 ـ 304	280 ـ 250	***فلافون***
	385 ـ 352	280 ـ 250	فلافونول
	357 ـ 328	280 ـ 250	OR في الموضع 3
	320^{Ep}	275 ـ 245	إيزوفلافون
NaOMe (NaOH)	+45 إلى +65 1 ـ استقرار الشدة الضوئية/MeOH 2 ـ نقصان الشدة الضوئية/MeOH		OH في 4' OR في 4'، OH في 3
	استمرار النقص في الشدة الضوئية، طيف يتحلل مع الوقت		OH في 3، 4' أو Orthodi-OH على الحلقة A مثلاً 7، 6 أو 8، 7 أو Orthodi-OH على الحلقة B
	استمرار النقص في شدة الامتصاص مع تفكك سريع للطيف		Tri OH 3'، 4'، 3 أو Tetra OH في 3، 3'، 4'، 5'
	عصابة جديدة بين 320 ـ 335		OH في 7
NaOAc		+5 إلى +20	OH في 7 مع ملاحظة أن هذا الانزياح يتراجع في وجود مستبدلات 6 أو 8
		عدم وجود أي انزياح أو ظهور انزياح ضعيف	OR في 7
		طيف يتفكك بمرور الزمن	Di OH في 7، 6 أو 8، 7 أو 4، 3 Tri OH في 7، 6، 5 أو 8، 7، 5 أو 4'، 3'، 3
NaOAc + H_3BO_3	+12 إلى +36		Orthodi OH على الحلقة B
MeOH/ NaOAc + H_3BO_3		+10 - 15	Orthodi OH على الحلقة A (6-7 أو 7-8) إيزوفلافون
$AlCl_3$	قمة وحيدة عند 420 ـ 430		Orthodi OH على الحلقة B (فلافون) مع OH في 5
	قمة وحيدة عند 440 ـ 460		Orthodi OH على الحلقة B (فلافونول) مع OH في 5

تابع للجدول (3)

المفاعلات	الإزاحة الملاحظة بـــ (nm)		التحليل الموجه
	الحزمة I	الحزمة II	
MeOH/ $AlCl_3$ +HCl	+17 إلى +20		5-OH مع مجموعة أكسجينية في 6
	+35 إلى +55		OH في 5 فلافون و OCH_3 في 3 فلافون
	+50 إلى +60		OH في 3 مع أو عدم وجود OH في 5
		+10-14	OH في 5 إيزوفلافون
$AlCl_3$/ ($AlCl_3$+HCl)	-20 إلى -40 مع نتوء أو قمة من [350 ـ 360]		Orthodi OH على الحلقة B
	-20 إلى -25		إمكانية وجود Orthodi OH على الحلقة A أكثر من Orthodi OH على الحلقة B أو Tri OH على الحلقة B

(+) : باتوكروم ؛ (−) : هبسوكروم ؛ / : بالنسبة Ep: نتوء

ب ـ 3 ـ 3 ـ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H N.M. R :

يعتمد التحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي على الخواص المغناطيسية لأنوية بعض الذرات مثل الهيدروجين H^1، الكربون C^{13}، الفلورF^{19}، الفوسفورP^{31}. ويمثل ^1H N.M.R حوالي 80٪ من دراسات الرنين النوو ي المغناطيسي وذلك لما لهذه الأنوية من خواص مغناطيسية قوية وإنتشار واسع في الطبيعة.

ففي الرنين النووي المغناطيسي للبروتون توضع الجزيئات تحت تأثير مجال مغناطيسي خارجي ،فيحدث انفصال لمستويات الطاقة الفردي الخاص بالحركة المغزلية لأنوية ذرات الهيدروجين إلى مستويين، ويزداد الفرق في الطاقة (δE) بين هذه المستويات بزيادة شدة المجال المغناطيسي الخارجي ،كما أن هذا الفرق في الطاقة لكل نوع من أنوية الهيدروجين يتوقف على الظروف الإلكترونية المحيطة بكل نواة والتي تحدد بنوع الرابطة ونوع الذرات الأخرى المرتبطة بهذه النواة، فأنوية ذرات الهيدروجين تمتص طاقة الأشعة الكهرومغناطيسية على ترددات مختلفة وهو ما يعبر عنه بالإنتقال

الكيميائي (δ)، فتظهر عدة إمتصاصات يتوقف عددها على عدد أنوية الهيدروجين المختلفة في الجزيئ .

كثافة الإمتصاص لكل نوع من الهيدروجين تتناسب مع عدد الذرات الموجود ة في هذا النوع . و بالتالي يمكن تحديد العدد النسبي لذرات الهيدروجين في الجزيئ وكذا عددها في كل مجموعة .

يلاحظ أيضا حدوث إنقسامات داخلية في كل إمتصاص رئيسي ويتوقف عدد هذه الانقسامات على عدد ذرات الهيدروجين المجاورة، والفرق في الطاقة بين هذه الانقسامات بوحدة التردد يسمى ثابت التزاج(*J*) [98].

تستعمـــل هذه التقنيـــة في التحليل الكيفي للفلافونيدات لمعرفة درجة تأكسد الحلقـــات A، B، C ، وكذا عدد ومواقع المجموعات الميتوكسيلية وعدد وطبيعة السكريات الموجودة في المركب. ولتحقيق هذه التقنية تستخدم الكثير من المذيبات أشهره ا : $CDCl_3$ ديوتروكلوروفورم الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونيدات غير القطبية، و $DMSO\text{-}d_6$ (Hexadeuterodimethyl sulfoxide) الذي يستخدم في حالة الفلافونيدات الجليكوزيدية خاصة وكذا الأجليكونات [2، 99]، تظهر بروتونات الفلافونيدات في المجال (0-9 ppm)، وتوزع في مجمو عات محددة، وفيما يلي جداول (4-6) تبيّن الانزياح الكيميائي لمختلف بروتونات الحلقتين A، B [96، 100].

الجدول (4) : الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A

نوع الفلافونيد	**H-5**	**H-6**	**H-7**	***H-8***
5,7-OH	-	d(*J*=2.5 Hz) 6.2 –6.0 ppm	-	d(*J* =2.5 Hz) 6.5 –6.3 ppm
5-OH,7-OR (R=Glc)	-	d(*J* =2.5 Hz) 6.1 –5.9 ppm	-	d(*J* =2.5 Hz) 6.4 –6.1 ppm
5,6,7-OR (R=H, Glc)	-	-	-	6.3 ppm (S)
5,7,8-OR (R=Glc,H)	-	6.3 ppm (S)	-	-
7-OR (R=H, Glc)	d(*J* =9 Hz) 8,0 ppm	d,d(9 Hz, 2.5 Hz) 7.1 –6.7 ppm	-	d(*J* =2.5 Hz) 7 –6.7 ppm

الجدول (5) : الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B في حالة C_4' = OR

H-6' , H2' d(J = 8.5 Hz)	H-5' , H3' d(J = 8.5 Hz)	الفلافونيد
7.,9 – 7.7 ppm	7.1 – 6.5 ppm	فلافون
8.1 – 7.9 ppm	7.1 – 6.5 ppm	فلافونول

الجدول (6) : الإزاحة الكيميائية للبروتونات 2'، 6' للحلقة B

H-6' dd(J= 8.5; 2.5 Hz)	H2' d(J = 2.5 Hz)	نوع الفلافونيد
7.5 – 7.3 ppm	7,3 - 7,2 ppm	Flavone (3',4' OH; 3' OMe, 4' OH; 3'-OH, 4' OMe)
7.9 – 7.6 ppm	7,7 - 7,5 ppm	Flavonol (3',4' OH; 2'-OH, 4' OMe)
7.6 – 7.4 ppm	7,8 - 7,6 ppm	Flavonol (3',4' OH; 3' OMe, 4'-OH)

بروتونات الحلقة C :

يتأثر بروتون C_3 في الفلافون بمستبدلات كلتا الحلقتين العطريتين، ويعطي إشارة أحادية في المنطقة (6.2-6.4 ppm) تتداخل مع إشارة برتوني الحلقة A(H8, H6) [100].

يعطي بروتون C_2 في الإيزوفلافون إشارة أحادية حادة في حدود 8-8.5 ppm [100].

بروتونات الميتوكسيل :

تظهر بروتونات الميتوكسيل في المجال 3.8-4.5 ppm [100].

بروتونات السكريات :

يمكن التعرف على نوع السكر من خلال بروتونه الأنوميري، ذو انزياح كيميائي يعتمد أساسا على طبيعة الفلافونيد وموقع ونوع الرابطة بين السكر والأجليكون، والجدول (7) يعطي قيم الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري "H_1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر.

الجدول (7) : يبيّن قيم الانزياح الكيميائي لـــ "H_1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر

δ "H_1 ppm	الفلافونيد
5.2 – 4.8	7-O-glucosyl flavonol
6.0 – 5.7	3-O-glucosyl flavonol
5.3 – 5.1	7-O-rhamnosyl flavonol
5.1 – 5.0	3-O-rhamnosyl flavonol

يمكن التعرف على نوع الرابطة α أو β بين السكر والأجليكون من خلال ثابت الاقتران لـــ "H_1"، "H_2" حيث يمتاز الجليكوز بالرابطة β ويظهر "H_1" بإشارة ثنائية بثابت تزاوج (J=7 Hz) ناتج عن تزاوج ثنائي محور ي (diaxial) مع "H_2". كما يمتاز الرامنوز برابطة قـــد تكون α بإشـــارة ثنائية لـــ "H_1" بثابت تزاوج (J=2 Hz) نتيجة الاقتران استوائي-استوائي. [96].

ب-3-4-مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C N.M. R :

نظرا لإنخفاض طاقة الامتصاص للكربون 13 بالإضافة إلى نسبة وجوده في الطبيعة 1.1٪ فإن كثافة الإمتصاص الناتج عن ^{13}C تكون حولي 0.01٪ بالنسبة لإمتصاص البروتون، لذلك فإن معظم التقديرات الخاصة بـــ^{13}C تجري باستخدام FTNMR(Fourier Transformation NMR) للتغلب على الحساسية المنخفضة للكربون، ومن ناحية أخرى فإنه لا يحدث ازدواج بين ذرة الكربون ^{13}C و ^{12}C أخرى لأن احتمال وجود ذرتي كربون 13 متجاورتين ضعيف جدا حوالي 1 لكل10^4 ذرة ،لكن في نفس الوقت يحدث إزدواج بين ^{13}C و ذرات الهيدروجين المجاورة، وقد يصل مدى الإزدواج ليشمل أربع روابط كيميائية، فيكون الطيف المتحصل عليه معقدا للغاية. وللتغلب على هذا الازدواج تستخدم طريقة إزالة الازدواج Sping decoupling و ذلك بإشعاع العينة بحزم من أشعة الراديو، تحتوي على جميع الترددات الخاصة بأنوية البروتونات في العينة .

وتحت هذه الظروف فإن طيف الرنين النووي المغناطيسي لـــ^{13}C يظهر في صورة إمتصصات فردية ،ويعبر كل امتصاص عن ذرة كربون واحدة في ظروف إلكترونية معينة.

وباستخدام هذه التقنية يمكن الحصول على صورة واضحة عن الهيكل الكربوني العام للجزيئ، كما يمكن الكشف عن بعض المجموعات الكيميائية مثل $C=O$, OCH_3 ,$C=NR$ وغيرها [98].

ب-3-5-مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد:

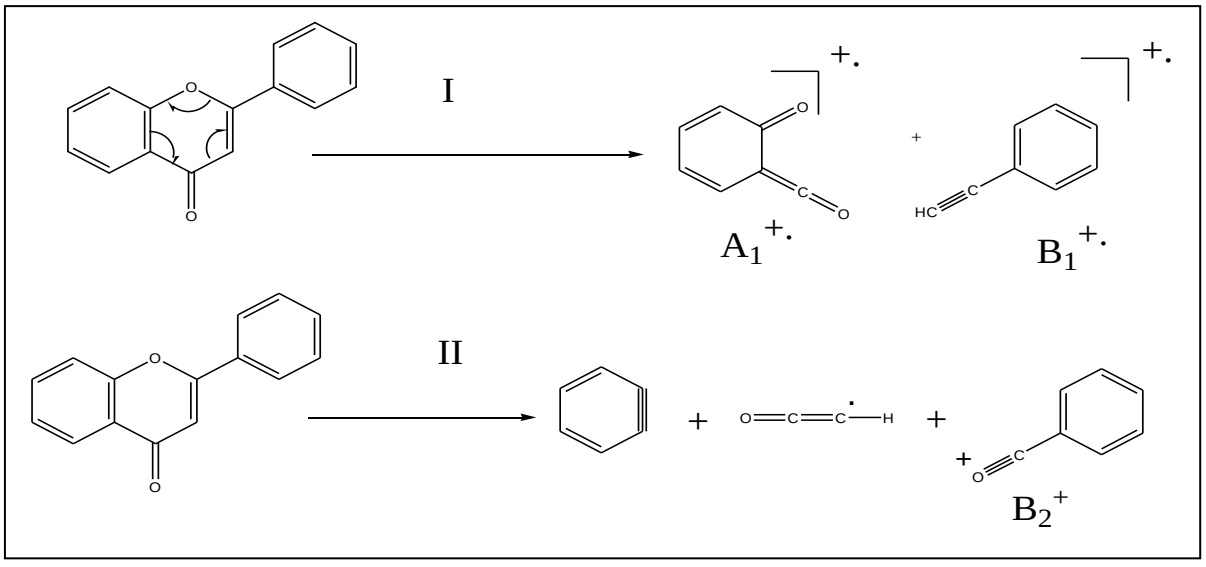
قد تعجز كل من مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون N.M.R ^1H وللكربون N.M.R ^{13}C على تحديد موضع الإستبدال بالدقة اللازمة فنلجئ إلى مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد، التي تعطي تعلقات بين:

- أنويه متجانسة مثل Cosy ^1H-^1H والتي تظهر نقاط تعلق بين البروتونات المتزاوجة فيما بينها أي المفصولة برابطتين أو ثلاث J^2,J^3 .

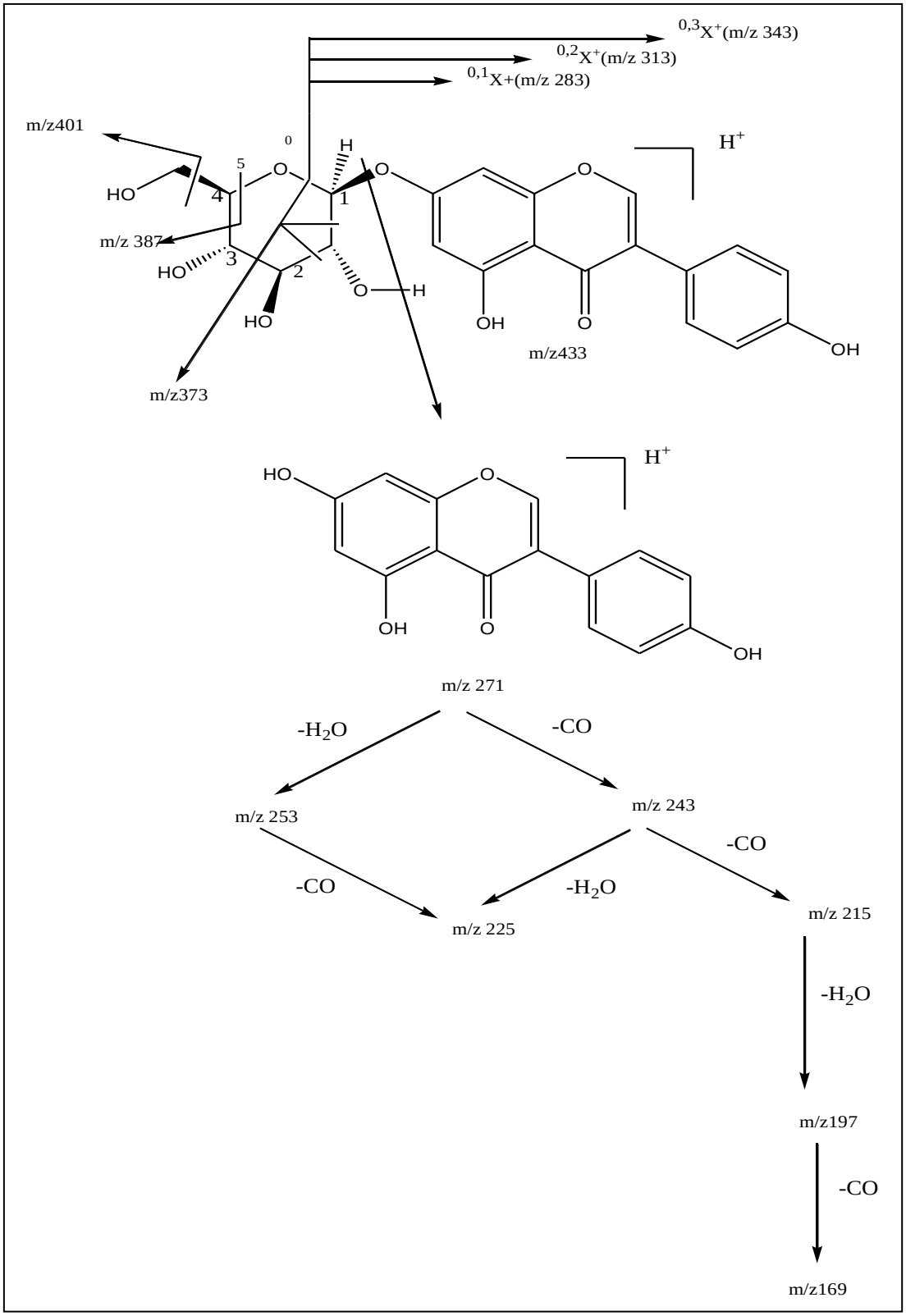
- أنوية غير متجانسة مثل HSQC والتي تعطي نقاط تعلق بين كل بروتون و الكربون الحامل له، ولكن هذه الأخيرة لا تسمح بمعرفة الكربونات الرباعية . فتستعمل تقنية HMBC التي تعطي تعلقات بعيدة المدى تصل إلى الكربونات الرباعية، فيتم تحديدها[98].

ب ـ **3 ـ 6 ـ مطيافية الكتلة** : تقدم مطيافية الكتلة خدمة واسعة للتعرف على البنى الفلافونيدية ،خاصة كونها لا تتطلب كمية كبيرة من المركب إذ يكفي جزء من ملغ، فمن خلالها يمكن معرفة الوزن الجزيئي وبالتالي معرفة الصيغة المجملة للمركب الذي يبين نوعية المستبدلات ميتوكسيلية كانت أو هيدروكسيلية، كما تمكن قيم الشظايا من معرفة توزع هذه المستبدلات على الحلقتين A وB .وتعتمد هذه التقنية على عدة طرق أهمها: طريقة القذف الإلكتروني (IE) [101] التي تكون صالحة خاصة مع الأجليكونات . فالشكل(5) يوضح الإنشطارات الواقعة على الحلقة C عبر الطريقين I وII.

مع تطور مطيافية الكتلة ظهرت تقنيات جديدة، كتقنية الإلكتروسبراي Electro-spry، وتقنية القذف بالذرات المسرعة FAB، والتي تتميز بتأيّن المركبات السهلة الانكسار بالحرارة دون تسخين، كالجليكوزيدات مما يسمح بشباتها ودراستها [102، 103]، وتؤدي هاتان التقنيتان إلى تكوين أيونات شبه جزئية مثل $(M+Na)^+$، $(M+Ca)^+$، $(M+H)^+$، $(M-H)^-$ ....فالشكل(6) يوضح تقنية تشضية المركب genistein 7-*O*-β-D-glucose بإستعمال طريقة (Es^+) [104]



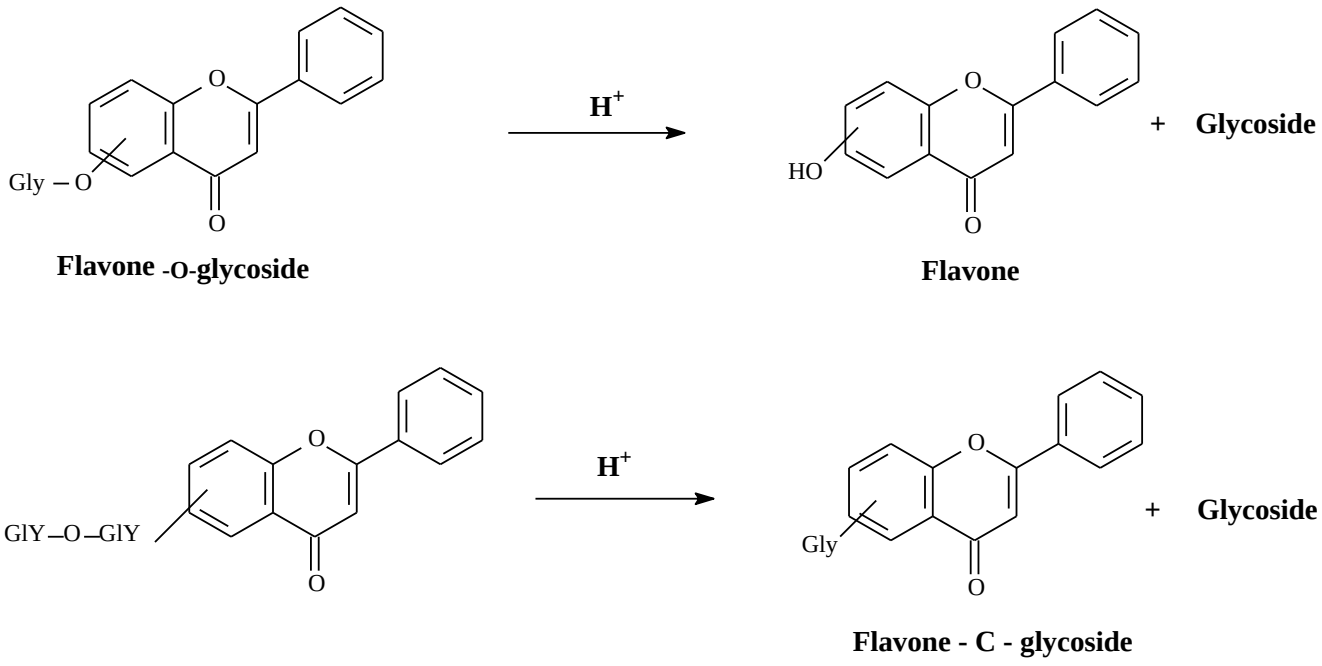
الشكل(5): الإنشطارات الواقعة على الحلقة C عبر الطريقين I وII.



الشكل (6) : أهم الانشطارات الملاحظة على genistein 7-*O*-*β*-D-glucoside

ب_3_7_الإماهة الحمضية :

بالإضافة إلى التقنيات السابقة يمكن الاستعانة بالتميّه الحمضي للتع رف على عدد ونوع السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية إذ تعمل هذه التقنية على تحطيم الرابطة (كربون_ أكسجين) الجامعة بين السكر والأجليكون . والشكل (7) يبيّن الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية في حالة O– جليكوزيل و C– جليكوزيل [105].



الشكل (7) : الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية

تتم عملية التميه الحمضي في أنبوب اختبار بأخذ كمية قليلة من الجليكوزيد مذاب في حوالي (1 مل) من الميثانول ويضاف له (1 مل) من حمض كلور الماء HCl (4N) ثم يسخن في حمام مائي 100 م° لمدة 15 إلى 120 دقيقة.

بعد تبريد الأنبـــوب يعمـــد إلى استخلاص من نوع سائل /سائل بدءًا بإيثر الإيثيـــل (éthylic ether) بعد الرج الجيد يترك الأنبوب للراحة لتفصل بعدها الطبقة العضوية عن المائية، تكرر العملية مرة أخرى مع أسيتات الإيثيل (éthyl acétate) ثم البيوتانول العادي (n-butanol).

تركـــز الطبقة العضوية الحاوية علـــى الأجليكون الذي يمكن التعرف عليه بتسجيل طيف (UV) وكذا بإجراء كروماتوغرافي (TLC) مع شواهد أجليكونية، أما الجزء السكري من الجليكوزيد فيبقى مذابًا في الطبقة المائية التي يتم تجفيفها ثم يعاد غسلها بالماء لتجفف من جديد تكرر هذه العملية عدة مرات للتخلّص من HCl وأخيرا تغسل بالميثانول للتخلص من أثار الطبقة العضوية ثم يعاد إذابتها في الماء لتكون جاهزة للتحليل، وللتعرف على نوع السكر المنفصل يعمد إلى تحضير ألواح كروماتوغرافية من silica gel $60F_{254}$ ترش بمحلول NaH_2PO_4 (0,2M) تترك لتجف في الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100 م° لمدة ساعة كاملة.

بعدها توضع نقطة من الطبقة المائية الحاوية على الجزء السكري بالموازاة مع بعض الشواهد السكرية المعروفة، يغمس اللوح الكروماتوغرافي في المملص : أستون : ماء (90 : 10)، بعد هجرة البقع السكرية يستخرج اللوح الكروماتوغرافي ليجف في الهواء لمدة ساعة بعدها يرش بكاشف مالونات الأنيلين ويسخن عند 100° لمدة 5 دقائق حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور بلون داكن وتأخذ اللون الأصفر تحت (UV). والجدول (8) يبيّن قيم Rf لبعض السكريات الشائعة [94].

الجدول (8) : قيم Rf لبعض السكريات الشائعة

السكريات الشواهد	Rf
α(L) rhamnose	0,88
D(+)-xylose	0,79
L(+) arabinose	0,66
b-D(+) glucose	0,53
D(+) galactose	0,33

المراجع

[1] Ribereau-Gayou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetals, Dundo, Paris.
[2] El hazimi, H. (1995). Natural product, 149-190.
[3] Guignard, J.L., Cosson, L., henzy, M.J. (1985). Abrégé de phytochimie, Paris, New york, Barcelone.
[4] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, ed. 3, lavoisier, Paris.
[5] Eyton, W.B., Ollis, W.D., Sutherland, I.O., Gottlieb, O.R., Tavira Magalhaes, M. (1965). Proc. Tetrahedron, 21, 2683.
[6] Reinsch,H., Repert. (1842). Pharm. 26, 12-31. Reinsch, H., Repert. (1842). Pharm. 28, 18-25.
[7] Andersen, M.Ø. (2006). In Flavonoids, chemistry, Biochemistry and Application, Andersen, M.Ø. and Markham,K. RCRC Press, Boca raton, pp.1129-1197.
[8] De Laire, G., Tiemann, F. (1893). Iridin, the glucoside of the iris root, J. Am. Chem. Soc. 15, 400-411.
[9] Lapčĭk, O. (2007). Isoflavonoids in non-leguminous taxa:Ararity or a rule?, Phytochemistry, 68, 2909-2916.
[10] Ingham, J.L. (1983). Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 43, 1–266.
[11] Ilyas, M., Parveen, M. and Khan, M.S. (1994). J. Chem. Res. (M), 601–617.
[12] Shafiullah, P. M., Kamil, M. and Ilyas, M. (1995). Fitoterapia, 66, 439–441.
[13] Veitch N.C. (2007). Isoflavonoids of the leguminosae, Nat. Prod. Rep. 24, 417-464.
[14] Dixon, R.A. (1999). In Comprehensive Natural Products Chemistry, ed. Barton, D., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, Elsevier, O. Amsterdam, vol. 1, pp.773–823 .
[15] Aoki, T., Akashi, T. and Ayabe, S.I. (2000) J. Plant Res. 113, 475–488.
[16] Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999). Trends Plant , Sci. 4, 394–400.
[17] Mann, J. (1987). Secondary metabolisme, ed. 2, Clarendon press, Oxford.
[18] Cronquist, A. (1988). Anintegrated System of Classification of Flawring Plants, 2nd ed. New york, Botanical Garden.
[19] Thorme, R.F. (1992). Classification and Geography of Flawring Plants, Bot. Rev. 58, 225-348.
[20] Harbone, J.B. (1973). In Phytochemstry, Lowrence, P.L.ed. vol. 2.
[21] Wollenweber, E. and Dietz, V.H. (1980). Biochem. Syst. Eco. 8,21.
[22] Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem .Pharmacol, 32, 1141–1148.
[23] Tereschuk, M.L., Riera, M.V., Castro, G.R.and Abdala, L.R. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*, J. Ethnopharmacol , 56, 227–232.
[24] Tsao, T.F., Newman, M.G., Kwok, Y.Y. and Horikoshi ,A.K. (1982). Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria, J. Dent. Res. 61, 1103–1106.
[25] Grange, J.M.and Davey, R.W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). J. R. Soc. Med. 83, 159–160.
[26] Bosio, K. Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino , O. and Savoia, D. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*, Lett. Appl. Microbiol, 31, 174–177.

[27] Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K. and Abd Allah, F.A. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis, Z. Naturforsch, 55, 70–75.
[28] Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I. and Maysinger, D. (1982). Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts, Pharmazie, 37, 864–865.
[29] Dall'Agnol, R., Ferraz, A. and Bernardi, A.P. et al. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species, Phytomedicine, 10, 511–516.
[30] El-Abyad, M.S., Morsi, N.M., Zaki, D.A.and Shaaban, M.T. (1990). Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity, Microbios, 62, 47–57.
[31] Khanna, P., Sharma, O.P. and Sehgal, M. et al. (1980). Antimicrobial principles from tissue culture of some plant species, Indian, J. Pharm .Sci. 42, 113–117.
[32] Palacios, P., Gutkind, G., Rondina, R.V. De torres, R. and Coussio, J.D. (1983).Genus *Baccharis*, II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notosergila*, Planta, Med. 49, 128.
[33] Oksuz, S., Ayyildiz, H. and Johansson ,C. (1984). 6-Methoxylated and *C*-glycosyl flavonoids from *Centaurea* species, J. Nat. Prod. 47,902–903.
[34] Ohemeng, K.A., Schwender, C.F., Fu, K.P. and Barrett, J.F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1), Bioorg. Med. Chem. Lett .3, 225–230.
[35] Bashir , A.K., Abdalla ,A.A., Wasfi, I.A., Hassan, E.S., Amiri, M.H. and Crabb, T.A. (1994). Flavonoids of *Limonium axillare*, Int. J .Pharmacogn. 32, 366–372.
[36] Aljancic ,I. Vajs, V.and Menkovic, N. et al. (1999). Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *Multifida*, antimicrobial activity, J. Nat. Prod. 62, 909–911.
[37] Basile, A., Giordano, S., Lopez-Saez, J.A. and Cobianchi, R.C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses, Phytochemistry, 52, 1479–1482.
[38] Basile, A., Sorbo, S. and Giordano, S. et al. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves, Fitoterapia,71, 110–116.
[39] Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata ,H.and Higuti, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Ethnopharmacol. 72, 483–488.
[40] Afolayan, A.J. and Meyer, J.J. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*, J. Ethnopharmacol. 57, 177–181.
[41] Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K. and Fukushima, M. (1987). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium, Agric. Biol .Chem. 51, 139–143.
[42] Pepeljnjak, S. and Kosalec, I.(2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria, MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*, FEMS Microbiol, Lett. 240, 111–116.
[43] Fukui, H., Goto, K. and Tabata, M. (1988). Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 36, 4174–4176.
[44] Hufford, C.D. and Lasswell, W.L. (1978). Antimicrobial activities of constituents of *Uvaria chamae*, Lloydia. 41, 156–160.
[45] Bae, E.A., Han, M.J. and Kim, D.H. (1999). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites, Planta .Med. 65, 442–443.

[46] Cottiglia, F., Loy, G. and Garau, D. et al. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L,Phytomedicine, 8, 302–305.
[47] Sakagami ,Y., Mimura, M. and Kajimura, K. et al. (1998). Anti-MRSA activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents, Lett. Appl . Microbiol. 27, 98–100.
[48] Rauha, J.P., Remes, S. and Heinonen, M. et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J. Food. Microbiol, 56, 3–12.
[49] Stapleton, P.D., Shah, S. and Hamilton-Miller, J.M.T. et al. (2004). Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-*O*-acyl-catechins, Int. J. Antimicrob Agents, 24, 374–380.
[50] Arima, H and Danno, G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava(*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation, Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 1727–1730.
[51] El-Lakany, A.M., Abdel-Kader, M.S., Hammoda, H.M., Ghazy, N.M.and Mahmoud ,Z.F. (1997) . A new flavone glycoside with antimicrobial activity from *Carduus pycnocephalus* L, Pharmazie, 52, 78–79.
[52] Verma, D.K., Singh, S.K. and Tripathi, V. (1997). A rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*, Indian. Drugs. 34, 32–35.
[53] Chacha, M., Bojase-Moleta, G. and Majinda, R.R. (2005). Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*, Phytochemistry, 66, 99–104.
[54] Deng, Y., Lee, J.P. Tianasoa-Ramamonjy, M. et al. (2000). New antimicrobial flavanones from *Physena madagascariensis*, J. Nat. Prod. 63, 1082–1089.
[55] Osawa, K., Yasuda, H., Maruyama, T., Morita, H., Takeya, K. and Itokawa, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 40, 2970–2974.
[56] Hamilton-Miller, J.M.T. and Shah, S. (2000). Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Antimicrob. J .Chemother. 46, 852–853.
[57] Stapleton, P.D., Shah, S., Anderson, J.C., Hara,Y., Hamilton-Miller, J.M.T. and Taylor, P.W. (2004). Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and Gallates, Int .J. Antimicrob. Agents, 23, 462–467.
[58] Arima, H., Ashida, H. and Danno, G. (2002). Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*, Biosci. Biotechnol . Biochem. 66, 1009–1014.
[59] Bozdag-Dundar, O., Tuncbilek, M., Altanlar, N. and Ertan ,R. (2003). Synthesis and antimicrobial activity of flavone-3-carboxaldehyde oxime ether derivatives, Arzneimittelforschung, 53, 522–525.
[60] Wang ,S.X., Zhang, F.J., Feng, Q.P. and Li, Y.L. (1992). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of transition metal complexes with 5-hydroxy-7,4- dimethoxyflavone, J. Inorg. Biochem. 46, 251–257.
[61] Ward, F.E., Garling, D.L., Buckler, R.T., Lawler, D.M. and Cummings, D.P. (1981). Antimicrobial 3-methyleneflavanones, J. Med .Chem. 24, 1073–1077.
[62] Vijaya, K. and Ananthan, S. (1996). Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs, Indian. J. Pharm. Sci.58, 191–193.

[63] Dastidar, S.G., Manna, A. and Kumar, K.A. et al. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones, Int .J. Antimicrob. Agents. 23, 99–102.
[64] Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since1992, Phytochemistry, 55, 481–504.
[65] Wachter, G.A., Hoffmann, J.J., Furbacher, T., Blake, M.E. and Timmermann, B.N. (1999). Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*, Phytochemistry, 52, 1469–1471.
[66] Valsaraj, R., Pushpangadan, P. and Smitt, U.W. et al. (1997). New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*,J .Nat .Prod . 60, 739–742.
[67] Afolayan, A.J. and Meyer, J.J. (1997). The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*, J. Ethnopharmacol. 57, 177–181.
[68] Ono, K., Nakane, H., Fukushima ,M., Chermann, J.C. and Barre-Sinoussi, F. (1989). Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7- Trihydroxyflavone, Biochem. Biophys .Res .Commun. 160, 982–987.
[69] Lin,Y.M., Anderson, H. and Flavin, M.T. et al. (1997). *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*, J. Nat. Prod. 60, 884–888.
[70] Critchfield, J.W., Butera, S.T. and Folks, T.M. (1996). Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds, AIDS. Res. Hum .Retroviruses,12, 39–46.
[71] Hu, C.Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R.E., Cheng, Y.C. and Lee, K.H. (1994) Anti-AIDS agents,10. Acacetin-7-*O*-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure–activity correlation with some related Flavonoids, J. Nat. Prod. 57, 42–51.
[72] Middleton, J.E. and Chithan, K. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In, Harborne, J.B. Editor, The flavonoids, advances in research since (1986). London, UK.Chapman and Hall.
[73] Selway, J.W.T. (1986). Antiviral activity of flavones and flavans. In, Cody, V. Middleton, E. Harborne, J.B. editors. Plant flavonoids in biology and medicine, biochemical, pharmacological, and structure–activity relationships, New York, NY, Alan R. Liss.Inc.
[74] Cheng, P.C. and Wong, G. (1996). Honey bee propolis, prospects in medicine, Bee. World. 77, 8–15.
[75] Meyer, J.J., Afolayan , A.J., Taylor,M.B.and Erasmus, D. (1997). Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*, J. Ethnopharmacol.56, 165–169.
[76] Amoros,M., Simoes, C.M., Girre, L., Sauvager, F. and Cormier, M.(1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture, Comparison with the antiviral activity of propolis, J. Nat. Prod . 55, 1732–1740.
[77] Mucsi, I., Gyulai, Z. and Beladi, I. (1992). Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures, Acta. Microbiol. Hung.39, 137–147.
[78] Wagner, H. Wirer, M., Bauer, R. (1986). Planta Med. 184-187.
[79] Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants, J. Nat.Prod. 63, 1035-1042.
[80] Sim, G.S., Lee, B.C.,Cho, H.S. et al. (2007). Structure activity relationship of Antioxidative proprety of flavonoids and inhibitory effect on matrix

metalloproteinase activity in UVA-Irradiated human dermal fibroblast, Arch. Pharm. Res. Vol.30, No.3, 290-298.
[81] Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants, determination of radical scavenging efficiencies methods enzymol,186, 343-355.
[82] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga,G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids, Free Radi. Biol. Med. 20, 933-956.
[83] VanAcker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H.V., Bennekom, W.P.,Van der vijgh, W.J.F. and Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, Free Radi. Biol. Med. 20, 331-342.
[84] Heijnen, C.G.M., Haenen,G.R.M.M., Van Acker, F.A.A., Van der Vijgh, W.J.F. and Bast, A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers, the role of the hydroxyl groups, Toxicol. In vitro, 5, 3-6.
[85] Elber, G. and Wagner, H. (1992). Planta Med. 57, 137-141.
[86] Middleton, E.J.R. and Kandasuwami, C. (1992). Biochem. Pharmacol. 43, (6), 1167-1179.
[87] Nakajima, T. Manishi, M.I., Yamamoto, K. Cyong, J.C. and Hirai, K. (2001). Inhibitory effects of baicalein, A Flavonoid in Scutellaria Root, on Eotascin production by human Dermal Fibroblasts, planta Med. 67, 132-135.
[88] Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994). Pharmacological evaluation of the anti- inflammatory activity of acitrus Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Duartin and Clausse quinone in rats and mice, J.Pharm. Pharmacol. 46, 118-122.
[89] Sankawa, U. and Chum, Y.T. (1985). Advances in Chinese.
[90] Matsuda, H. Yano, M., Kubo, M., Linuma, M., Oyama, M. and Mizuno, M. (1991). Pharmacological study on citrus fruits unshiu markovich (2) on flavonoid components, Yakugata Zasshi, 111, 193-198.
[91] Murakami, N. Mostaqul, H.M., Tamura, S. Itagak, S. and Horü, T.T. (2001). A new anti- malarial flavonol glycoside from hydrangeae dulcis folium (Hydrangea macrophylla) Bivorg. Med. Chem. Lett. 11, 2445-2447.
[92] Hammerstone, J.F., lazarus, S., Mitchell, A., Rucker, R. and Schmitz, H. (1999). Identification of procyanidir (Theobroma cacao) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass, sp. Agric. Food chem. 47, 490-496.
[93] Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H. and Danno, G. (1995). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 410-414.
[94] Markham, K.R. (1982). Technique of flavonoid identification, Academic press, London.
[95] Jurd, L. and Horowitz, R. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
[96] Mabry, T.J., Markham, K. R. and Thomas, M.B. (1970). The systimatic identification of flavonoids, Springer, New york, 45-126.
[97] Wollenweber, E. (1982). Occurrence and localization of flavonoid aglycones, In the flavonoids-Advances in Research (Harborne, J.B. and Mabry, J.J. eds. Chapman and Hall, London, New York).
[98] Silverstein, R.M., Webster, F.X. and Kiemle, D.J. (2007). Identification spectrométrique de composes organiques, ed.2,De Boeck Université.
[99] Lacaille-Dubois, M.A. and Wagner, H. (1992). 20ème Aniversaire du groupe polyphenols(book of abstacts) vol I(16), 217, 13-16.

[100] Markham, K.R. and Geiger, H. (1994). ^{1}HRMN spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuteurodimethyl-sulfoxide, In the flavonoids, edited by Harborne, J.B. (1993). Chapman and Hall, London.
[101] Audier, H. (1966). Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
[102] Constantin, E. and Schenelle, A. (1986). Spectrométrie de masse principe et application. Lavoisier, Paris.
[103] Williams, D.H., Bradley, O., Bojesen, G. Santikarn, S. and Taylor, C.E. (1981). Fast Atom Bombardement mass spectrometry, J. Am. Chem. Soc. 103, 5700-5704.
[104] March, R.E., Miao, X.S., Metcalfe, C.D., Stobiecki, M.and Marczak, L. (2004). A fragmentation study of isoflavone glycoside , genistein 7-O- glucoside , using electrospray quadrupole time –of-flight mass spectrometry at high mass resolution, international journal of mass spectrometry, 232, 171-183.
[105] Gonnet, J.F. (1973). A propos de la photographie en couleur de chromatographie sur couches minces en lumière de Wood. J. of cromato. 86, 192.

الفصل الثاني
الدراسة الكيميائية للنبتتين:

Retama sphaerocarpa

و

Ammoides atlantica

II ـ أ ـ الدراسة الكيميائية لنبات *Retama sphaerocarpa*

II ـ أ ـ 1 ـ التصنيف النظامي للنبتة حسب Messaili [1]

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
Sous classe	Diapétales	تحت الصف
Série	Caliciflores	السلسلة
Ordre	Rosales	الرتبة
Famille	Fabacées	العائلة
Sous famille	Papilionacées	تحت العائلة
Tribu	Genisteae	القبيلة (الفصيلة)
Genre	Retama	الجنس
Espèce	Sphaerocarpa	النوع

II ـ أ ـ 2 ـ وصف النوع :

Retama sphaerocarpa عبارة عن شجيرة إبرية بأغصان صلبة رطبة الملمس، يبلغ طولها من 1 إلى 2 م، ذات أوراق صغيرة ملساء، السفلى تكون ثلاثية الوريقة أمّا الأخريات فأحادية الوريقة، سهلة السقوط، ذات أزهار صفراء صغير ة جدا (5 ـ 6 ملم) تتجمع في عناقيد جانبية تحوي من 8 إلى 15 زهرة متوضعة على الفروع حسب الشكل (1).

الشكل (1) : صور فوتوغرافية للنبتـــة *Retama sphaerocarpa*

تمتاز هذه الأزهار بكأس ثنائي الشّفة أو الشق، ذو شفة علوية ثنائية السّن من الأسفل، أمّا التويج فيحوي 5 بتلات ملتحمة بالأنبوب السدائي، فالبتلة الخلفية هي أكبر البتلات وتُعرف بالعلم والبتلتان الجانبيتان تُعرفان بالجناحين، أمّا البتلتان الأماميتان فملتحمتان التحاماً خفيفا على شكل زورق، مع وجود 10 أسدية ملتحمة الخيوط مشكّلة حزمة واحدة، أما الثمار فهي عبارة عن قرون كروية وحيدة أو ثنائية البذرة، ذات ملمس ناعم ولون أصفر داكن [2].

تتميز هذه الشجيرة بجذور عميقة تفوق 20م، بحثا عن المياه الجوفية بحكم نموها في المناطق الجافة والشبه الجافة [3].

II ـ أ ـ 3 ـ توزّع النوع :

تتوزّع *Retama sphaerocarpa* في المناطق الجافة وشبه الجافة [4] خاصة قرب المناطق الملحية فهي تتواجد في :

ـ إفريقيا [5] في كل من الجزائر والمغرب وتونس (أصلية).

ـ أوروبا [5، 6] في كل من البرتغال وإسبانيا (أصلية) وبلغاريا (منقولة).

ـ جنوب أمريكا [7] في الأرجنتين (منقولة).

أما على المستوى الجزائري فهي تتوزّع في قطاع التل القسنطيني وتحت قطاع مرتفعات هضاب الجزائ العاصمة ووهران [2].

II ـ أ ـ 4 ـ المسح البيولوجي للنبتة :

يستخدم الرتم في الطب الشعبي لأغراض شتى ، إذ يستعمل منقوعه المائي ضد داء الكلب، كما يعهد إلى أغصانه علاج الروماتيزم وتستعمل الأوراق والسيقان في التخفيف من السمنة، كما يستخدم في الطب الشعبي الإسباني في علاج الأورام الغدّية (الثؤلول) [8].

كما أثبتت الدراسات الدور الفعال الذي تلعبه هذه الشجيرة في المناطق الجافة والشبه الجافة، إذ تعمل على تلطيف الجو من رطوبة ودرجة حرارة ، كما أنها تساعد على تخصيب التربة بإغنائها بالمواد العضوية وتثبيتها للأزوت .فهي تخلق وسطا تحت مجموعها الخضري ملائما لتوزع وتنوع حشائش دائمة وحولية، وهذه الأخيرة توفر سمادا كافيا لبقاء الشجيرة [9].

كما أظهرت التحاليل السمية التأثير التثبيطي لكل من مستخلص$CHCl_3$ و AcOEt وBuOH على كل من خلايا سرطان الثدي Breast adenocarcinoma (MCF-7) وسرطان الكلى renal adenocarcinoma (TK-10) وسرطان الجلد melanoma(UACC-62)

كما تعمقت هذه الأبحاث في تفسير إختلاف التأثير البيولوجي لهذه المستخلصات بإعادة نفس التجارب على المركبات الفلافونيدية المفصولة من كل مستخلص .

فالتأثير التثبيطي لمستخلص البيوتانول على خلاي ا MCF-7 راجع لاحتوائه على الفلافونيدات الميتوكسيلية **7,6,5** أما بالنسبة لخلايا UACC-62, TK-10 فتتأثر بمستخلص الأسيتات الغني بالإيزوفلافون genistin أكثر منه بمستخلص الكلورفورم

الفعل التثبيطي للمركب **2** أكثر من **3** راجع لوجود OH في الموقع 5 بالنسبة للمركب **2** وهذا يؤكد كون C_5-OH هو المسؤول عن الفعالية السمية للإيزوفلافون عند كل الخلايا السرطانية .

كما تعزى الفعالية السمية للأجليكونات على غرار جليكوزيداتها عند الثلاث أنواع من الخلايا السرطانيا، وهذا راجع إلى الطبيعة الهيدروفيلية أو إلى الحجم الكبير لهذه الجليكوز يدات الذي يعيق إختراقها للجدار الخلوي .

ويعود التأثير التثبيطي للمركبات **7, 6,5, 1** وetoposide على خلايا MCF-7 إلى الفعل التثبيطي الإنتقائي لمجموعة الميتوكسيل لهذا النوع من الخلايا السرطانيا [10].

جدول يوضح النسب المئوية للمركبات المفصولة من كل مستخلص [10].

	$CHCl_3$	AcOEt	ButOH
6-methoxypseudobaptigenin-7-β-o-gllucoside(**1**)	1٪	4.5٪	-
Genistin(**2**)	0.2٪	5٪	-
Daidzin(**3**)	0.2٪	-	-
Orientin(**4**)	--	0.2٪	-
Rhamnazin-triglycoside(**5**)	-	-	0.3٪
Rhamnazin-diglycoside(**6**)	-	-	1.3٪
Rhamnazin(**7**)	-	-	0.3٪

جدول يوضح التراكيز بـµg/ml للمستخلصات والمركبات المفصولة منها المثبطة لنصف عدد الخلايا السرطانية IC_{50}:

	TK-10	MCF-7	UACC-62
$CHCl_3$ AcOEt BuOH	87 49 >250	76 52 51	42 36 65
Isoflavones 6-methoxypseudobaptigenin-7-*β*-*O*-gllucoside(**1**) Genistin(**2**) Daidzin(**3**)	>100 27 >100	62 69 >100	>100 27 57
Flavone Orientin(**4**)	>100	>100	57
Flavonols Rhamnazin-triglycoside(**5**) Rhamnazin-diglycoside(**6**) Rhamnazin(**7**)	>100 >100 52	62 49 9.7	50 73 17
Positive controls Etoposide Genistein	6.1 5.9	0.42 6.9	1 4.1

كما أظهرت دراسة أخرى لـــ Lopez l'azaro و مساعديه فعالية كل من المركبين **5**،**6** ضد الخلايا السرطانية، وذلك بتنظيم عمل الإنزيم Topoisomerase I وبالتالي الحد من الانقسام العشوائي غير المنتظم لـــ DNA الخاص بالخلايا السرطانية [11].

قد أظهرت تحاليل سمية أخرى التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لـــ*R. sphaerocarpa* بجرعة تقدر بـــ 30 µg/ml يكون بنسبة 34.2% لخلايا النمو Hep2 المأخوذة مـــن ورم سرطـــان الحنجـــرة (epidermoide carcinoma de larynx) مقارنة بـــ 6-mercaptopurine الذي يمتاز بنسبة تثبيط تقـــدر بـــ 54.2% علاوة على ذلك فهي تبدي سمّية في التجارب الحيوية للإقريدس الملحي تقدر بـــ LC_{50} = 454µg/ml [8] مع العلم أن LC_{50} < 1000 µg/ml يعتبر عاملا فعالا حسب Meyer [12].

أمّا بالنسبة للنسيج النباتي فيعمل المستخلص المائي بتركيز (1%) على تثبيط كامل (100%) لعامل الانقسام الخلوي MI (Index mitotique) لنوع من البصل (Allium cepa) خلال 48 ساعة، كما يعمل على تثبيط يقدر بـ 24% للبقع القرحية للبطاطا المعاملة بنوع من البكتيريا الزراعية الممرضة (Agrobacterium tumfacienx) [8، 13].

II ـ أ ـ 5 ـ المسح الكيميائي للنبتة :

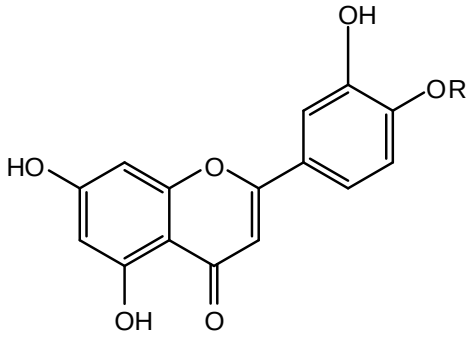
أكد المسح البيبليوغرافي الكيميائي للنبتة *R. sphaerocarpa* احتوائها على كل من الفلافونيدات و القلاويدات مما جعلها مؤخرا محل بحث عدد من الباحثين .

فقد تمّ التعرف على ثمان قلاويدات كينوليزيدينية (quinolizidine) وقلويد واحد بيبردين (bipiperidine) : Ammodendrine، Déhydrolupanine، Oxospartéine، Lupanine، Spartéine، Génistéine، Retamine [14] وCytisine، Méthyl cytisine [15].

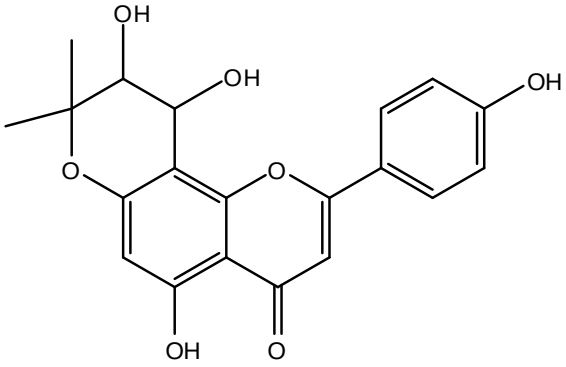
أما عن الفلافونيدات ونظرا لكونها محل بحثنا فإننا ندرج ما فصل منها قي جنس *Retama* في الجدول (1)

الجدول (1) :الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Retama*

نوع النبتة	اسم المركب	الصيغة المجملة	رقم الصيغة	رقم المرجع
Retama raetam	Luteolin 4'-O-neohesperidoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	1	[16]
	5, 4'-dihydroxy-(3'',4''-didydro-3'',4''-dihydroxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'' : 7,8)-flavone	$C_{20}H_{18}O_7$	2	[17,16]
	Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	3a	[17]
	Genistin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	3b	
	6 hydroxy genistein	$C_{15}H_{10}O_6$	3c	
	6 hydroxy apigenin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	4	
	Luteolin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	5	
	Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	6	
	Biochanin A	$C_{16}H_{12}O_5$	7a	
	Pratensein	$C_{16}H_{12}O_6$	7b	
	3'-methylorobol	$C_{16}H_{12}O_6$	7c	
Retama sphaerocarpa Boissier	Rhamnazin-3-O-β-glucopyranosyl-(1→5)- α-arabinofuranoside	$C_{28}H_{32}O_{16}$	8a	[18]
	7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxyisoflavone-7-O-β-glucoside	$C_{23}H_{22}O_{11}$	9	[19]
	Genistein 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	3b	
	Daidzein 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_9$	10	
	Orientin ou Lutexin (8-β-D-glucopyranosyl luteolin)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	11	[10]
	Rhamnazin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→5)-[β-D-apiofirranosyl-(1→2)] α-L-arabinofuranoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	8b	
	Rhamnazin	$C_{17}H_{14}O_7$	12	
	Vitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	13	[20]
	Vicenin-2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	14	
	Quercetin 3,7-di-O-β-glucoside	$C_{27}H_{29}O_{17}$	15	

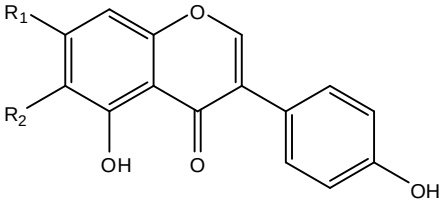


1



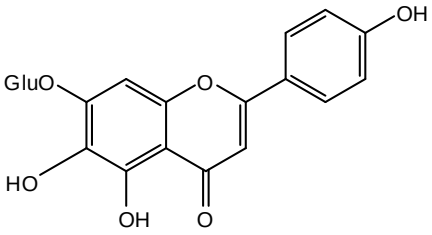
2

R=neohesperidosyl

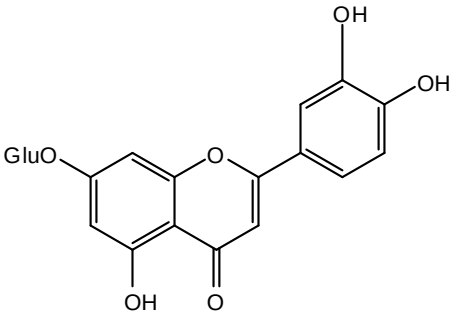


3

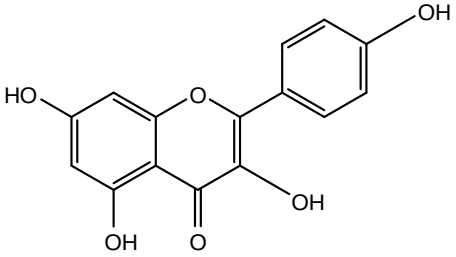
	R1	R2
a	OH	H
b	OGlu	H
c	OH	OH



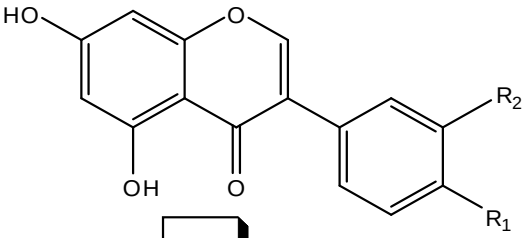
4



5

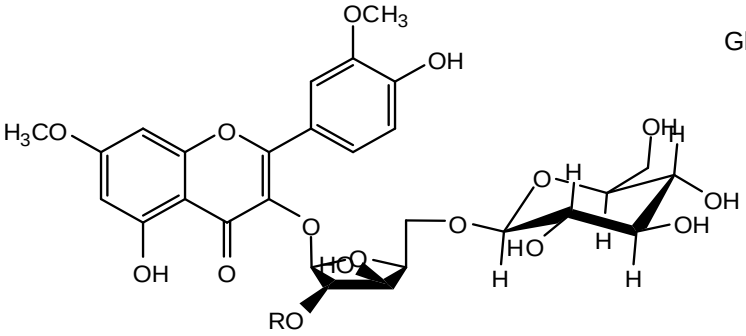


6



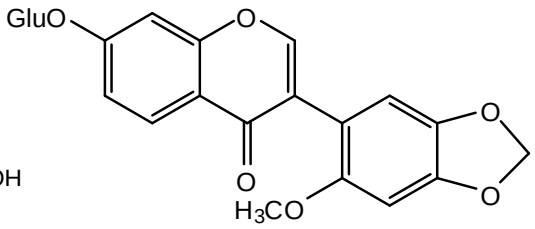
7

	R1	R2
a	OCH3	H
b	OCH3	OH
c	OH	OCH3

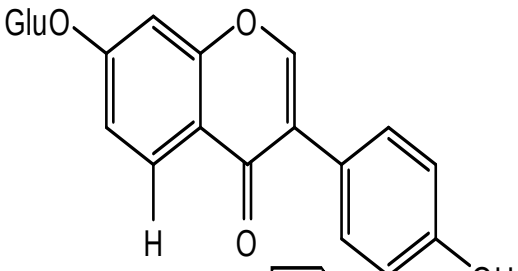


8

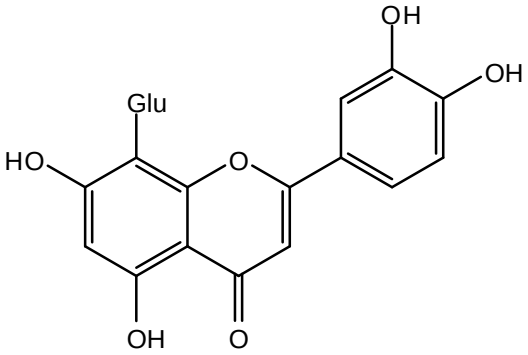
	R
a	H
b	B-D-apiof uranosyl



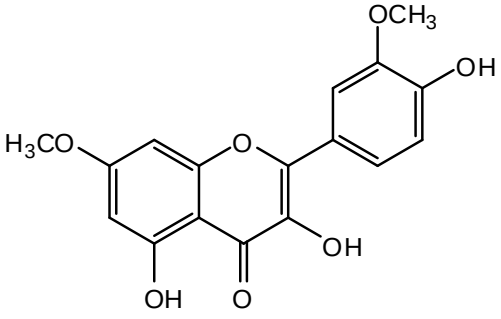
9



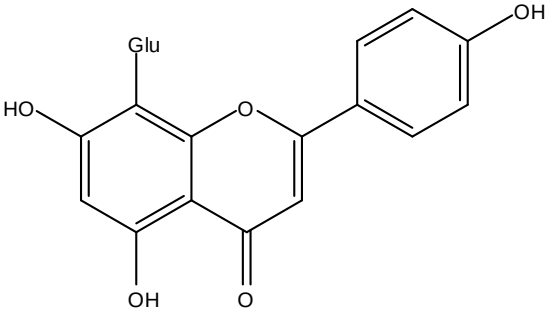
10



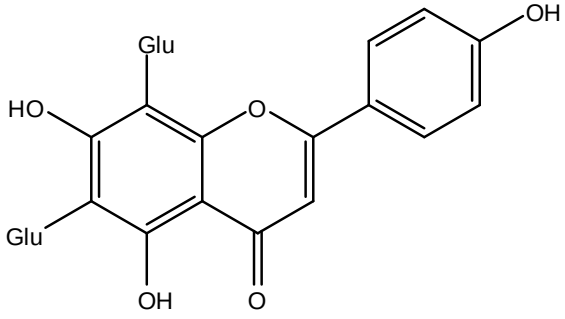
11



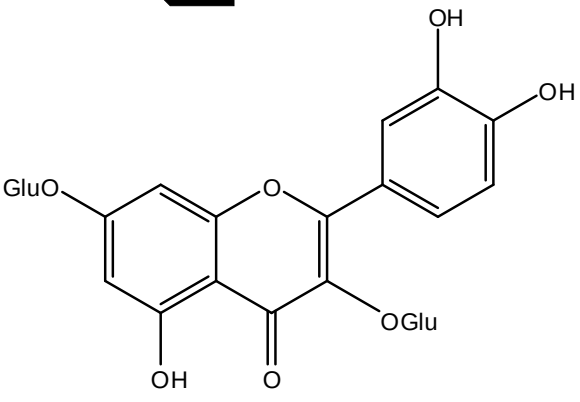
12



13



14



15

II ـ ب ـ الدراسة الكيميائية لنبات *Ammoides atlantica*

II ـ ب ـ 1 ـ التصنيف النظامي للنبتة :

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
Sous classe	Rosida	تحت الصف
Ordre	Apiales	الرتبة
Famille	Apiaceae	العائلة
Sous famille	Apioïdeae	تحت العائلة
Genre	***Ammoides***	الجنس
Espèce	***Ammoides atlantica***	النوع

II ـ ب ـ 2 ـ وصف النوع :

Ammoides atlantica : نبات حولي أو معمر ذات حزم كثيفة فقيرة إلى الوريدات في الأوراق القاعدية .

سيقانها أقل تشعبا مقارنة بالنوع الأخر *Ammoides pusilla* ، تتميز بخيمات ذات 3 إلى 6 أشعة ،أما الثمار فذات شعاع بيضوي بطول 2-2.5 ملم، تنمو بالجبال في المرتفعات الأكثر من 1000 م و هي نبتة أصلية بالجزائر . [2]

الشكل (2) : صورة فوتوغرافية للنبتـــة *Ammoides atlantica*

II ـ ب ـ 3 ـ المسح البيولوجي للجنس *Ammoides* :

تستعمل كل من نوعي ***Ammoides*** : *A.pusilla* و *A.atlantica* في الطب الشعبي كمضاد للبكتيريا و الإسهال .كما تستعمل *A.pusilla* لمعالجة الحمى، الإنفلونزة و تداوي أوجاع الرأس كما تنقع في الكحول أو حمض الخل وتمزج مع الحناء لمعالجة التخلف العقلي لدى الأطفال، بالإضافة إلى استعمالها كتوابل في الأطعمة [21] وقد ذكرها ابن البيطار في كتابه الجامع لمفردات الأدوية والأغذية باسم أطريلال وهي كلمة بربرية تعني رجل طائر ، يعرف بالديار المصرية برجل الغراب و بعضهم يسمونه بجزر الشيطان، وقد نوه بعظيم فائدتها في علاج البرص. وأول ما ظهر استعمال هذه النبتة كان عند قبيلة بربرية تعرف ببني أبي شعيب من بني وجهان من بجاية [22] .

كما يستعمل المستخلص المائي لهذه النبتة في الطب الشعبي شرق المغرب كعلاج لداء السكري وهذا ما أثبتته التحاليل البيولوجية التي أجريت بطريقتي: OGTT (Oral glucose ToleranceTeste)و , IVGTT (Injection vasculaire glucose Tolerance Teste) والتي أثبتت التأثير التثبيطي للمستخلص المائي للنبتة *A.pusilla* على إمتصاص السكر بنسبة 28.5٪ بجرعة250 mg/Kg وقد طمأنت التحاليل السمية من عدم وجود مضاعفات أو مخاطر من إستعمال هذه النبتة [23] .

كما أثبت حسين لعور وفرقه التأثير التثبيطي للزيت الطيار ل ـــ*A.pusilla* على كل من نوعي البكتيريا الممرضة :

Pseudomonas syringae pv. syringae و *Pseudomonas syringae pv.morsprunorum* [24]

كما أظهر هذا الزيت فعالية ضد ميكروبية معتبرة على كل من السلالات :

Serratia marcescens, Salmonilla enteritidis, Escherichia coli(ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853), *Staphylococcus aureus*(ATCC25923), *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas syringae pv.morsprunorum, Pseudomonas syringae pv.syringae,Aspergillus niger* **,***Candida albicans* [21]

أما بالنسبة للنوع الثاني *A.atlantica* فقد أظهر التشخيص البيولوجي لزيته الطيار فعالية ضد ميكروبية على كل من الأنواع : Escherichia coli(ATCC25922),

Staphylococcus aureus(ATCC25923) و *Enterococcus faecalis* (ATCC29212)

كما سجل هذا الزيت تأثيرا تثبيطيا جد فعال على النوع النباتي *Bacillus subtilis*(ATCC6633) بمقدار أقل من6.25mg/l [25] .

II ـ ب ـ 4 ـ المسح الكيميائي للجنس *Ammoides* :

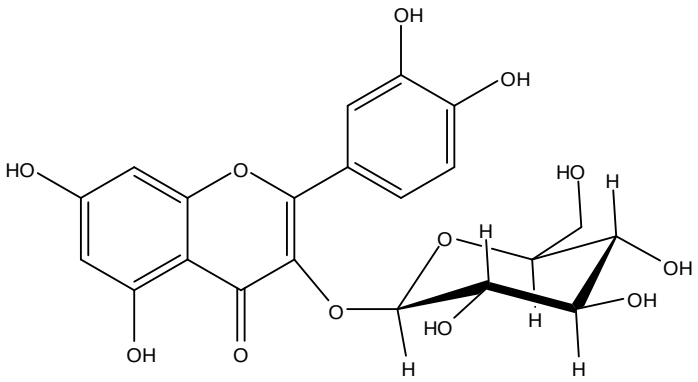
باستعمالGC, GC/Ms للزيت الطيار لكل من *A.pusilla* [21] و *A.atlantica* [25] أثبت إحتوائها على نفس المركبات الأعظمية و بنسب متقاربة كما هوموضح في الجدول التالي:

المركبات الأعظمية	Thymol	γ-terpinene	p-cymene
A.atlantica	53.2٪	19.4٪	10.6٪
A.pusilla	44.5٪	32.9٪	13.5٪

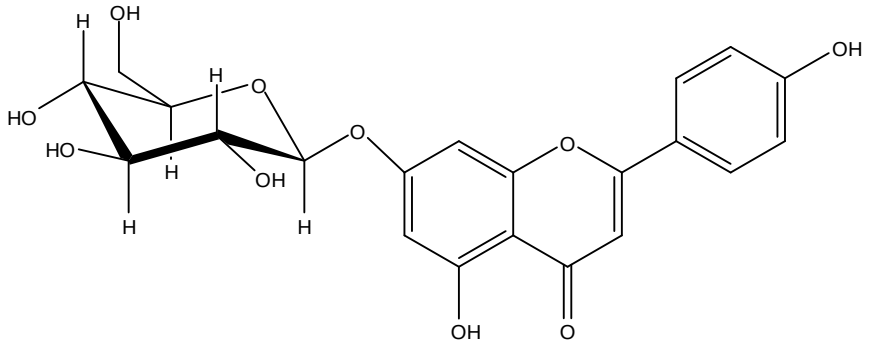
وبالنسبة للمركبات الفلافونيدية لم تحض *A.atlantica* بأي دراسة مسبقة على هذا النوع من مركبات الأيض الثانوي .

أما عن *A.pusilla* فكل ما تم فصله مدرج في الجدول التالي :

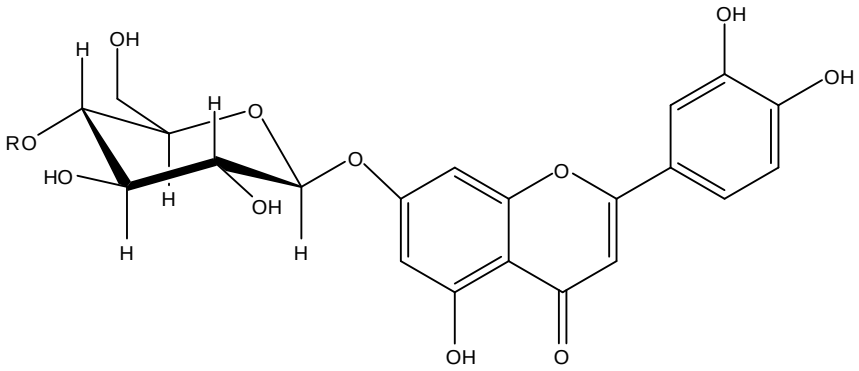
اسم المركب	الصيغة المجملة	رقم الصيغة	رقم المرجع
Quercetin 3 -O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	16	[26]
Apigénine 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	17	
Luteoline 7-O-Rhamnoglucoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	18b	
Luteoline 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	18a	[27]
Quercetin 3 -O-β-glucuronide.	$C_{21}H_{18}O_{13}$	19	



16

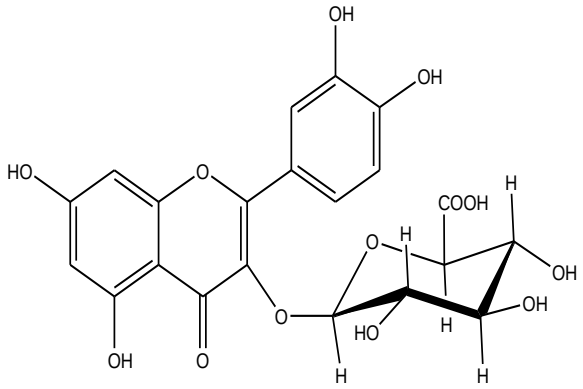


17



18

	R
a	H
b	Rhamnosyl



19

المراجع

[1] Messaili, B. (1995). Systématique des spermaphytes, ed. office des publications universitaires, Alger, 75.

[2] Quezel, P. and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

[3] Haas, P., Pugnaire, F.I., Fernandez, E.M., Puigdefabregas, J., Clark, S.C. and Incoll, L.D. (1996). Investigation of rooting depth in the semi aride sharb *Retama sphaerocarpa*(L)Boiss. by lablling of ground water with a chemical tracer, Journal of Hydrology ,177,23-31.

[4] Shokri Ibrahim, S. (1994). The Flower plants, 173.

[5] Grenter, W. and al. (1989). (eds). Med-Chencklist, vol.4 (published).

[6] Heywood, V.H. (1968). Leguminosae in Flora Europaea, Heywood, V.H. Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds). Cambridge University press, London, 101.

[7] Burkart, A. (1952). Acme Agency, Buenons Aires, Las Leguminosas argentinas, 569.

[8] Martin-Cordero, Saeng, M.T. Auguso, M.J. (1995). Cytotoxic activity of *Retama sphaerocarpa*, Fitoterapia, vol. LXVI, N° .6.

[9] Moro, M.J., Pugnaire,F.I., Haas,P. and Puigdefàbregas,J. (1997). Effect of the canopy of *Retama sphaerocarpa* on its understorey in semiarid environment, Functional Ecology,11,425-431.

[10] Lopez l'azaro, M., Martin-Cordero, C .,Cortés,F.,Pińero,J. and Jesús Ayuso, M. (2000).Cytotoxic activity of flavonoids and extracts from *Retama sphaerocarpa* Boisie,Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 55c, 40-43.

[11] Lopez l'azaro, M., Martin-Cordero, C . and Jesús Ayuso, M. (2000). Two new flavonol glycosides as DNA topoisomeraseI poisons,Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 55c, 898-902.

[12] Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and Melauhlin, J.L. (1982). Planta Med. 45, 31.

[13] Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Aderson, B.J., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Moore, D.S. and Mclauglin, J.L. (1982). J. Nat. prod. 45, 679.

[14] Martin-Cordero, C ., Gil-serrano, A.M. and Ayuso Gonzalez, M.J. (1991). Plantes med. Et phytother. 25, 157.

[15] Ribas, I. and Vega, J. (1953). – Ion. 13, 140, 148.

[16] Kassem, M., Mosharrafa, S.A., Saleh, N.A.M.and Abdel-Wahab, S.M. (2000). Two new flavonoids from *Retama raetam* Fitoterapia, 71, 649-654.

[17] Djeddi, S., Karioti, A. and Skaltsa, H.(2008). Flavonoids of *Retama raetam*Webb. from Algeria , Planta Med.74.

[18] Martin-Cordero, C., L'opez Lazàro, M., Gil-Serrano, A., Rodriguez Carvajal, M.A. and Ayuso Gonzàlez, M.J. (1999). Novel flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, 51, 1129-1131.

[19] L'opez Lazaro, M., Martin-Cordero, C., Iglesias-Guerra, F. and Ayuso Gonzàlez, M.J. (1998). An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, vol. 48 N° . 2, 401-402.

[20] Louaar, S., Akkal, S., Bousetla, A., Medjroubi, K., Djarri, L. and Seguin, E. (2005). Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*, Chemistry of natural compound, Vol. 41, No.1.

[21] Laouer, H., Zerroug, M.M., Sahli, F., Chaker, A.N., Valentini, G., Ferretti, G., Grande, M. and Anaya, J. (2003). Composition and antimicrobial activity of Ammoides pusilla (Brot.) Breistr. essential oil, Journal of Essential Oil Research,15(2),135-138.

[22] IbnAlbitar, Dam. (1874). Aljame Li-Mofradat al adwiyah wal aghthiyah(The collection of medical and food items), Dar Sader Publishing,Beirut, Lebanon(in Arabic), Vol.1.

[23] Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maallem, S. and Ziyyat, A.(2007). Antihyperglycemic activity of Arbutus unedo, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsute* Pharmazie , 62(8), 630-632.

[24] Laouer, H., Zerroug, M. M., Chaker, A. N. and Bouzerzour, H. (2004) **.** Study of the effect of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breist, essential oil against *Pseudomonas sp*., Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 69(4), 619-624.

[25] Laouer, H., Boulaacheb, N., Akkal, S., Singh, G., Marimuthu, P.,de Heluani, C., Catalan, C. and Baldovini, N. (2008). Composition and antibacterial activity of the essential oil of Ammoides atlantica (Coss. et Dur.) Wolf., Journal of Essential Oil Research, 20(3), 266-269.

[26] Bousetla, A., Akkal, S., Medjroubi, K., Louaar, S., Azouzi, S., Djarri, L., Zaabat, N., Laouer, H., Chosson, E.and Seguin, E. (2005). Flavonoid glycosides from *Ammoides pusilla*, Chemistry of Natural Compounds, 41(1), 95-96.

[27] Nabiel, A.M.S., Sabry, I.E.N., Mohamed, N.EH. and Hasnaa, A.H. (1983). Comparative study of the flavonoids of some local members of the umbelliferae, Phytochemistry,Vol.22, N^{o}.6, pp.1417-1420.

الفصل الثاني
الدراسة الكيميائية للنبتتين:

Retama sphaerocarpa

و

Ammoides atlantica

II ـ أ ـ الدراسة الكيميائية لنبات *Retama sphaerocarpa*

II ـ أ ـ 1 ـ التصنيف النظامي للنبتة حسب Messaili [1]

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
Sous classe	Diapétales	تحت الصف
Série	Caliciflores	السلسلة
Ordre	Rosales	الرتبة
Famille	Fabacées	العائلة
Sous famille	Papilionacées	تحت العائلة
Tribu	Genisteae	القبيلة (الفصيلة)
Genre	Retama	الجنس
Espèce	Sphaerocarpa	النوع

II ـ أ ـ 2 ـ وصف النوع :

Retama sphaerocarpa عبارة عن شجيرة إبرية بأغصان صلبة رطبة الملمس، يبلغ طولها من 1 إلى 2 م، ذات أوراق صغيرة ملساء، السفلى تكون ثلاثية الوريقة أمّا الأخريات فأحادية الوريقة، سهلة السقوط، ذات أزهار صفراء صغير ة جدا (5 ـ 6 ملم) تتجمع في عناقيد جانبية تحوي من 8 إلى 15 زهرة متوضعة على الفروع حسب الشكل (1).

الشكل (1) : صور فوتوغرافية للنبتـــة *Retama sphaerocarpa*

تمتاز هذه الأزهار بكأس ثنائي الشّفة أو الشق، ذو شفة علوية ثنائية السّن من الأسفل، أمّا التويج فيحوي 5 بتلات ملتحمة بالأنبوب السدائي، فالبتلة الخلفية هي أكبر البتلات وتُعرف بالعلم والبتلتان الجانبيتان تُعرفان بالجناحين، أمّا البتلتان الأماميتان فملتحمتان التحاماً خفيفا على شكل زورق، مع وجود 10 أسدية ملتحمة الخيوط مشكّلة حزمة واحدة، أما الثمار فهي عبارة عن قرون كروية وحيدة أو ثنائية البذرة، ذات ملمس ناعم ولون أصفر داكن [2].

تتميز هذه الشجيرة بجذور عميقة تفوق 20م، بحثا عن المياه الجوفية بحكم نموها في المناطق الجافة والشبه الجافة [3].

II ـ أ ـ 3 ـ توزّع النوع :

تتوزّع *Retama sphaerocarpa* في المناطق الجافة وشبه الجافة [4] خاصة قرب المناطق الملحية فهي تتواجد في :

ـ إفريقيا [5] في كل من الجزائر والمغرب وتونس (أصلية).

ـ أوروبا [5، 6] في كل من البرتغال وإسبانيا (أصلية) وبلغاريا (منقولة).

ـ جنوب أمريكا [7] في الأرجنتين (منقولة).

أما على المستوى الجزائري فهي تتوزّع في قطاع التل القسنطيني وتحت قطاع مرتفعات هضاب الجزائ العاصمة ووهران [2].

II ـ أ ـ 4 ـ المسح البيولوجي للنبتة :

يستخدم الرتم في الطب الشعبي لأغراض شتى ، إذ يستعمل منقوعه المائي ضد داء الكلب، كما يعهد إلى أغصانه علاج الروماتيزم وتستعمل الأوراق والسيقان في التخفيف من السمنة، كما يستخدم في الطب الشعبي الإسباني في علاج الأورام الغدّية (الثؤلول) [8].

كما أثبتت الدراسات الدور الفعال الذي تلعبه هذه الشجيرة في المناطق الجافة والشبه الجافة، إذ تعمل على تلطيف الجو من رطوبة ودرجة حرارة ، كما أنها تساعد على تخصيب التربة بإغنائها بالمواد العضوية وتثبيتها للأزوت .فهي تخلق وسطا تحت مجموعها الخضري ملائما لتوزع وتنوع حشائش دائمة وحولية، وهذه الأخيرة توفر سمادا كافيا لبقاء الشجيرة [9].

كما أظهرت التحاليل السمية التأثير التثبيطي لكل من مستخلص$CHCl_3$ و AcOEt وBuOH على كل من خلايا سرطان الثدي Breast adenocarcinoma (MCF-7) وسرطان الكلى renal adenocarcinoma (TK-10) وسرطان الجلد melanoma(UACC-62)

كما تعمقت هذه الأبحاث في تفسير إختلاف التأثير البيولوجي لهذه المستخلصات بإعادة نفس التجارب على المركبات الفلافونيدية المفصولة من كل مستخلص .

فالتأثير التثبيطي لمستخلص البيوتانول على خلاي ا MCF-7 راجع لاحتوائه على الفلافونيدات الميتوكسيلية **7,6,5** أما بالنسبة لخلايا UACC-62, TK-10 فتتأثر بمستخلص الأسيتات الغني بالإيزوفلافون genistin أكثر منه بمستخلص الكلورفورم

الفعل التثبيطي للمركب **2** أكثر من **3** راجع لوجود OH في الموقع 5 بالنسبة للمركب **2** وهذا يؤكد كون C_5-OH هو المسؤول عن الفعالية السمية للإيزوفلافون عند كل الخلايا السرطانية .

كما تعزى الفعالية السمية للأجليكونات على غرار جليكوزيداتها عند الثلاث أنواع من الخلايا السرطانيا، وهذا راجع إلى الطبيعة الهيدروفيلية أو إلى الحجم الكبير لهذه الجليكوز يدات الذي يعيق إختراقها للجدار الخلوي .

ويعود التأثير التثبيطي للمركبات **7, 6,5, 1** وetoposide على خلايا MCF-7 إلى الفعل التثبيطي الإنتقائي لمجموعة الميتوكسيل لهذا النوع من الخلايا السرطانيا [10].

جدول يوضح النسب المئوية للمركبات المفصولة من كل مستخلص [10].

	$CHCl_3$	AcOEt	ButOH
6-methoxypseudobaptigenin-7-β-o-gllucoside(**1**)	1٪	4.5٪	-
Genistin(**2**)	0.2٪	5٪	-
Daidzin(**3**)	0.2٪	-	-
Orientin(**4**)	--	0.2٪	-
Rhamnazin-triglycoside(**5**)	-	-	0.3٪
Rhamnazin-diglycoside(**6**)	-	-	1.3٪
Rhamnazin(**7**)	-	-	0.3٪

جدول يوضح التراكيز ب$\mu g/ml$ للمستخلصات والمركبات المفصولة منها المثبطة لنصف عدد الخلايا السرطانية IC_{50}:

	TK-10	MCF-7	UACC-62
$CHCl_3$ AcOEt BuOH	87 49 >250	76 52 51	42 36 65
Isoflavones 6-methoxypseudobaptigenin-7-*β*-*O*-gllucoside(**1**) Genistin(**2**) Daidzin(**3**)	>100 27 >100	62 69 >100	>100 27 57
Flavone Orientin(**4**)	>100	>100	57
Flavonols Rhamnazin-triglycoside(**5**) Rhamnazin-diglycoside(**6**) Rhamnazin(**7**)	>100 >100 52	62 49 9.7	50 73 17
Positive controls Etoposide Genistein	6.1 5.9	0.42 6.9	1 4.1

كما أظهرت دراسة أخرى لـــ Lopez l'azaro و مساعديه فعالية كل من المركبين **5**،**6** ضد الخلايا السرطانية، وذلك بتنظيم عمل الإنزيم Topoisomerase I وبالتالي الحد من الانقسام العشوائي غير المنتظم لـــ DNA الخاص بالخلايا السرطانية [11].

قد أظهرت تحاليل سمية أخرى التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لـــ*R. sphaerocarpa* بجرعة تقدر بـــ 30 $\mu g/ml$ يكون بنسبة 34.2% لخلايا النمو Hep2 المأخوذة مـــن ورم سرطـــان الحنجـــرة (epidermoide carcinoma de larynx) مقارنة بـــ 6-mercaptopurine الذي يمتاز بنسبة تثبيط تقـــدر بـــ 54.2% علاوة على ذلك فهي تبدي سمّية في التجارب الحيوية للإقريدس الملحي تقدر بـــ $LC_{50} = 454 \mu g/ml$ [8] مع العلم أن $LC_{50} < 1000$ $\mu g/ml$ يعتبر عاملا فعالا حسب Meyer [12].

أمّا بالنسبة للنسيج النباتي فيعمل المستخلص المائي بتركيز (1%) على تثبيط كامل (100%) لعامل الانقسام الخلوي MI (Index mitotique) لنوع من البصل (Allium cepa) خلال 48 ساعة، كما يعمل على تثبيط يقدر بـــ 24% للبقع القرحية للبطاطا المعاملة بنوع من البكتيريا الزراعية الممرضة (Agrobacterium tumfacienx) [8، 13].

II ـ أ ـ 5 ـ المسح الكيميائي للنبتة :

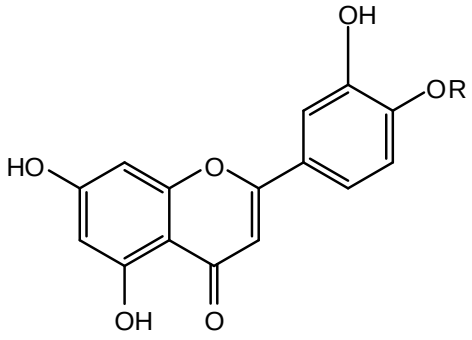
أكد المسح البيبليوغرافي الكيميائي للنبتة *R. sphaerocarpa* احتوائها على كل من الفلافونيدات و القلاويدات مما جعلها مؤخرا محل بحث عدد من الباحثين .

فقد تمّ التعرف على ثمان قلاويدات كينوليزيدينية (quinolizidine) وقلويد واحد بيبردين (bipiperidine) : Ammodendrine، Déhydrolupanine، Oxospartéine، Lupanine، Spartéine، Génistéine، Retamine [14] وCytisine، Méthyl cytisine [15].

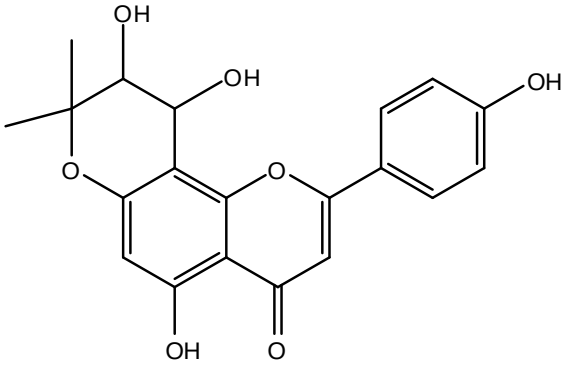
أما عن الفلافونيدات ونظرا لكونها محل بحثنا فإننا ندرج ما فصل منها قي جنس *Retama* في الجدول (1)

الجدول (1) :الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Retama*

نوع النبتة	اسم المركب	الصيغة المجملة	رقم الصيغة	رقم المرجع
Retama raetam	Luteolin 4'-O-neohesperidoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	1	[16]
	5, 4'-dihydroxy-(3'',4''-didydro-3'',4''-dihydroxy)-2'',2''-dimethylpyrano-(5'',6'' : 7,8)-flavone	$C_{20}H_{18}O_7$	2	[17,16]
	Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	3a	[17]
	Genistin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	3b	
	6 hydroxy genistein	$C_{15}H_{10}O_6$	3c	
	6 hydroxy apigenin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	4	
	Luteolin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	5	
	Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	6	
	Biochanin A	$C_{16}H_{12}O_5$	7a	
	Pratensein	$C_{16}H_{12}O_6$	7b	
	3'-methylorobol	$C_{16}H_{12}O_6$	7c	
Retama sphaerocarpa Boissier	Rhamnazin-3-O-β-glucopyranosyl-(1→5)- α-arabinofuranoside	$C_{28}H_{32}O_{16}$	8a	[18]
	7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxyisoflavone-7-O-β-glucoside	$C_{23}H_{22}O_{11}$	9	[19]
	Genistein 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	3b	
	Daidzein 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_9$	10	
	Orientin ou Lutexin (8-β-D-glucopyranosyl luteolin)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	11	[10]
	Rhamnazin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→5)-[β-D-apiofirranosyl-(1→2)] α-L-arabinofuranoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	8b	
	Rhamnazin	$C_{17}H_{14}O_7$	12	
	Vitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	13	[20]
	Vicenin-2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	14	
	Quercetin 3,7-di-O-β-glucoside	$C_{27}H_{29}O_{17}$	15	

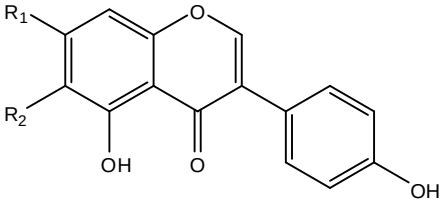


1



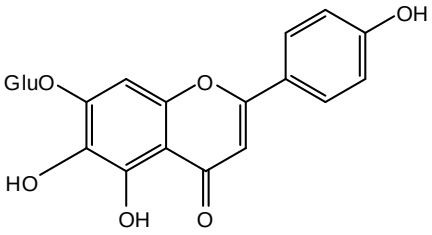
2

R=neohesperidosyl

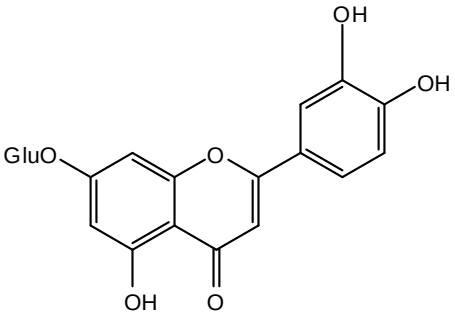


3

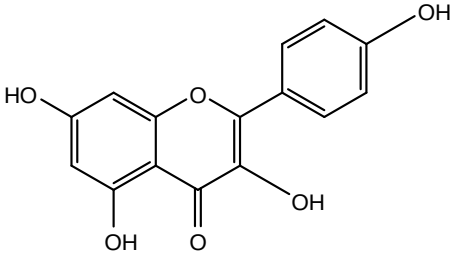
	R1	R2
a	OH	H
b	OGlu	H
c	OH	OH



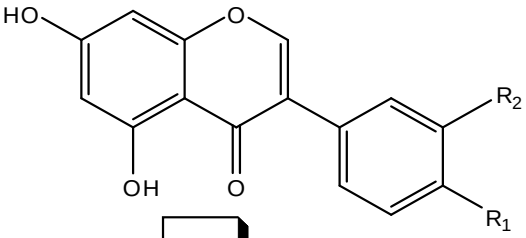
4



5

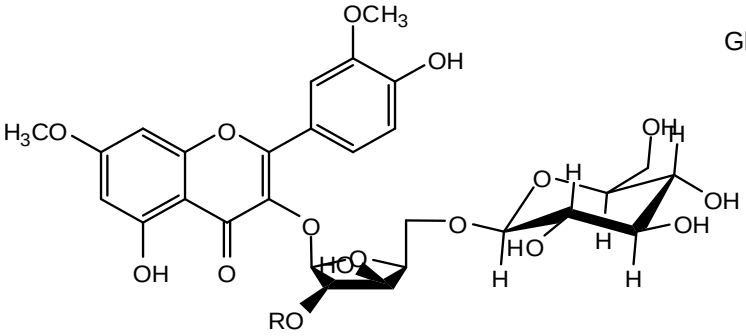


6



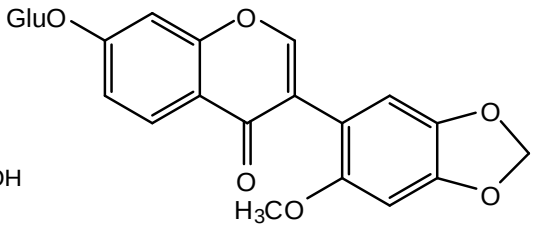
7

	R1	R2
a	OCH3	H
b	OCH3	OH
c	OH	OCH3

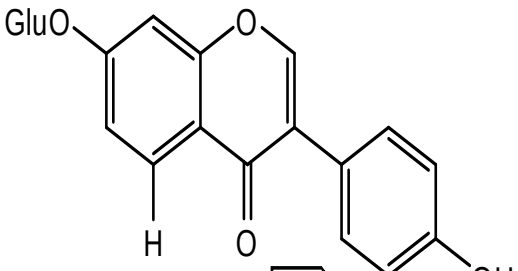


8

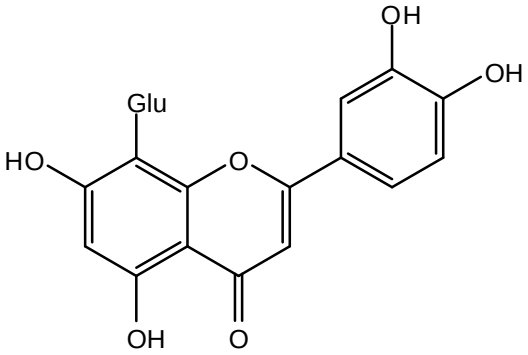
	R
a	H
b	B-D-apiof uranosyl



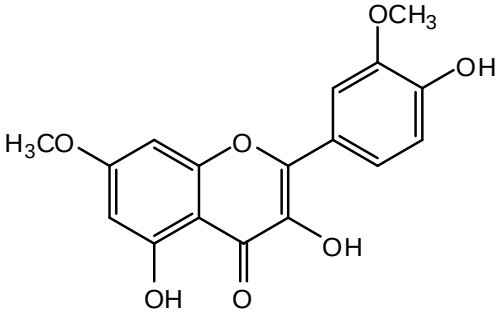
9



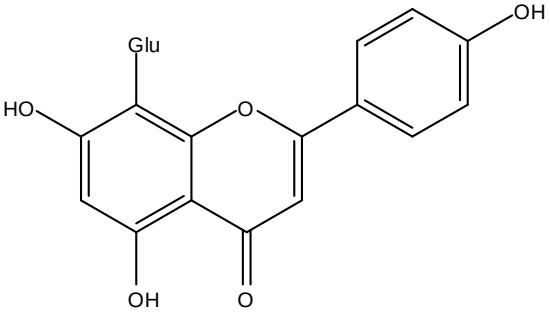
10



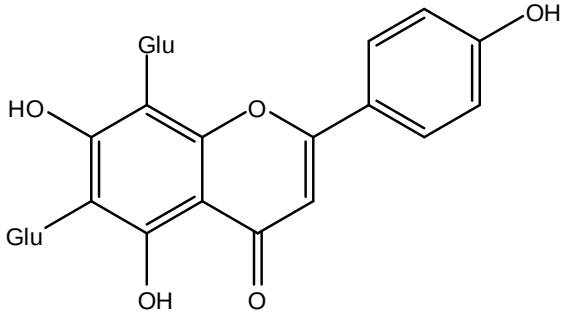
11



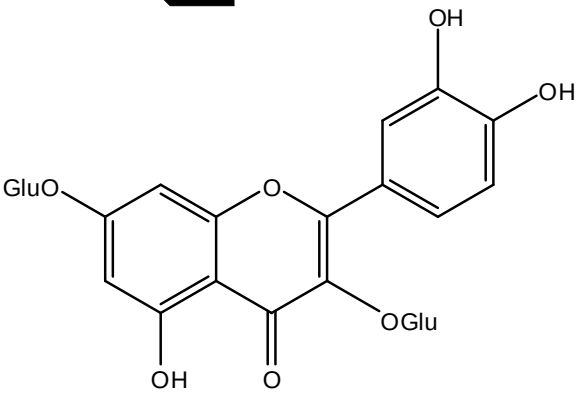
12



13



14



15

II ـ ب ـ الدراسة الكيميائية لنبات *Ammoides atlantica*

II ـ ب ـ 1 ـ التصنيف النظامي للنبتة :

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
Sous classe	Rosida	تحت الصف
Ordre	Apiales	الرتبة
Famille	Apiaceae	العائلة
Sous famille	Apioïdeae	تحت العائلة
Genre	***Ammoides***	الجنس
Espèce	***Ammoides atlantica***	النوع

II ـ ب ـ 2 ـ وصف النوع :

Ammoides atlantica : نبات حولي أو معمر ذات حزم كثيفة فقيرة إلى الوريدات في الأوراق القاعدية .

سيقانها أقل تشعبا مقارنة بالنوع الأخر *Ammoides pusilla* ، تتميز بخيمات ذات 3 إلى 6 أشعة ،أما الثمار فذات شعاع بيضوي بطول 2-2.5 ملم، تنمو بالجبال في المرتفعات الأكثر من 1000 م و هي نبتة أصلية بالجزائر . [2]

الشكل (2) : صورة فوتوغرافية للنبتـــة *Ammoides atlantica*

II ـ ب ـ 3 ـ المسح البيولوجي للجنس *Ammoides* :

تستعمل كل من نوعي ***Ammoides*** : *A.pusilla* و *A.atlantica* في الطب الشعبي كمضاد للبكتيريا و الإسهال .كما تستعمل *A.pusilla* لمعالجة الحمى، الإنفلونزة و تداوي أوجاع الرأس كما تنقع في الكحول أو حمض الخل وتمزج مع الحناء لمعالجة التخلف العقلي لدى الأطفال، بالإضافة إلى استعمالها كتوابل في الأطعمة [21] وقد ذكرها ابن البيطار في كتابه الجامع لمفردات الأدوية والأغذية باسم أطريلال وهي كلمة بربرية تعني رجل طائر ، يعرف بالديار المصرية برجل الغراب و بعضهم يسمونه بجزر الشيطان، وقد نوه بعظيم فائدتها في علاج البرص. وأول ما ظهر استعمال هذه النبتة كان عند قبيلة بربرية تعرف ببني أبي شعيب من بني وجهان من بجاية [22] .

كما يستعمل المستخلص المائي لهذه النبتة في الطب الشعبي شرق المغرب كعلاج لداء السكري وهذا ما أثبتته التحاليل البيولوجية التي أجريت بطريقتي: OGTT (Oral glucose ToleranceTeste)و , IVGTT (Injection vasculaire glucose Tolerance Teste) والتي أثبتت التأثير التثبيطي للمستخلص المائي للنبتة *A.pusilla* على إمتصاص السكر بنسبة 28.5٪ بجرعة250 mg/Kg وقد طمأنت التحاليل السمية من عدم وجود مضاعفات أو مخاطر من إستعمال هذه النبتة [23] .

كما أثبت حسين لعور وفرقه التأثير التثبيطي للزيت الطيار ل ـــ*A.pusilla* على كل من نوعي البكتيريا الممرضة :

Pseudomonas syringae pv. syringae و *Pseudomonas syringae pv.morsprunorum* [24]

كما أظهر هذا الزيت فعالية ضد ميكروبية معتبرة على كل من السلالات :

Serratia marcescens, Salmonilla enteritidis, Escherichia coli(ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853), *Staphylococcus aureus*(ATCC25923), *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas syringae pv.morsprunorum, Pseudomonas syringae pv.syringae,Aspergillus niger* **,***Candida albicans* [21]

أما بالنسبة للنوع الثاني *A.atlantica* فقد أظهر التشخيص البيولوجي لزيته الطيار فعالية ضد ميكروبية على كل من الأنواع : Escherichia coli(ATCC25922),

Staphylococcus aureus(ATCC25923) و *Enterococcus faecalis* (ATCC29212)

كما سجل هذا الزيت تأثيرا تثبيطيا جد فعال على النوع النباتي *Bacillus subtilis*(ATCC6633) بمقدار أقل من6.25mg/l [25] .

II ـ ب ـ 4 ـ المسح الكيميائي للجنس *Ammoides* :

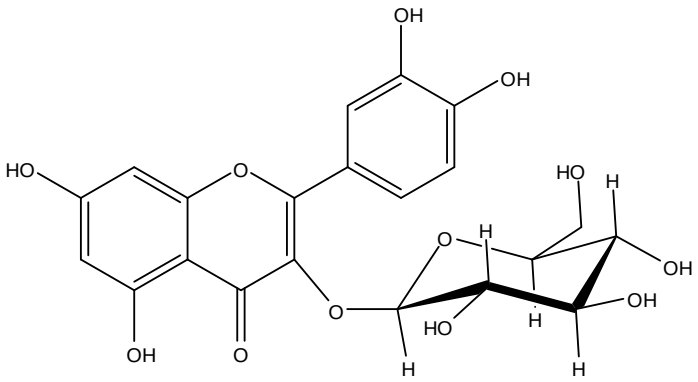
باستعمالGC, GC/Ms للزيت الطيار لكل من *A.pusilla* [21] و *A.atlantica* [25] أثبت إحتوائها على نفس المركبات الأعظمية و بنسب متقاربة كما هوموضح في الجدول التالي:

المركبات الأعظمية	Thymol	γ-terpinene	p-cymene
A.atlantica	53.2٪	19.4٪	10.6٪
A.pusilla	44.5٪	32.9٪	13.5٪

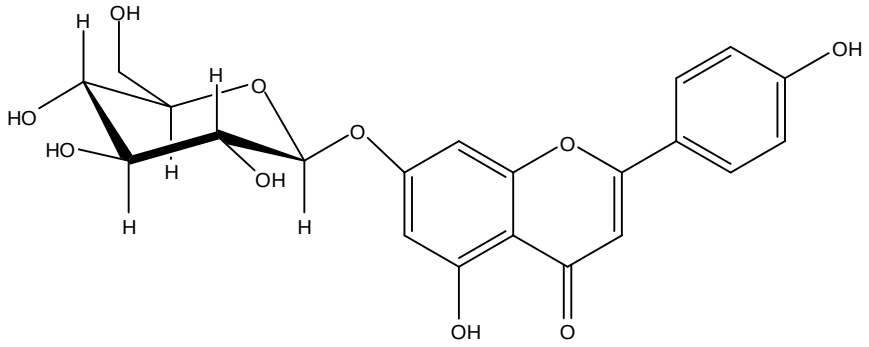
وبالنسبة للمركبات الفلافونيدية لم تحض *A.atlantica* بأي دراسة مسبقة على هذا النوع من مركبات الأيض الثانوي .

أما عن *A.pusilla* فكل ما تم فصله مدرج في الجدول التالي :

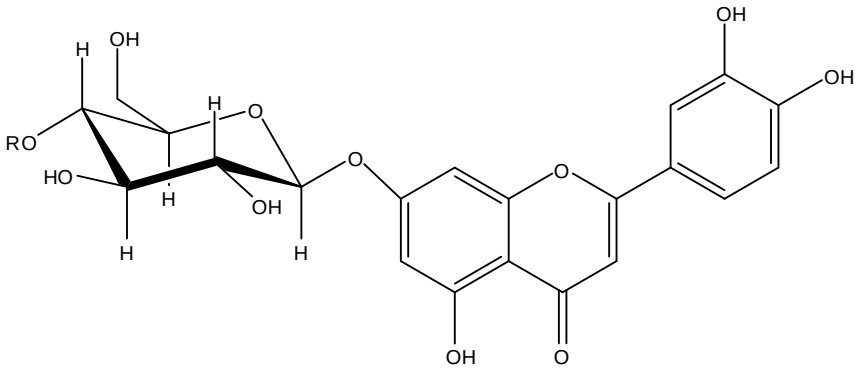
اسم المركب	الصيغة المجملة	رقم الصيغة	رقم المرجع
Quercetin 3 -O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	16	[26]
Apigénine 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	17	
Luteoline 7-O-Rhamnoglucoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	18b	
Luteoline 7-O-β-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	18a	[27]
Quercetin 3 -O-β-glucuronide.	$C_{21}H_{18}O_{13}$	19	



16

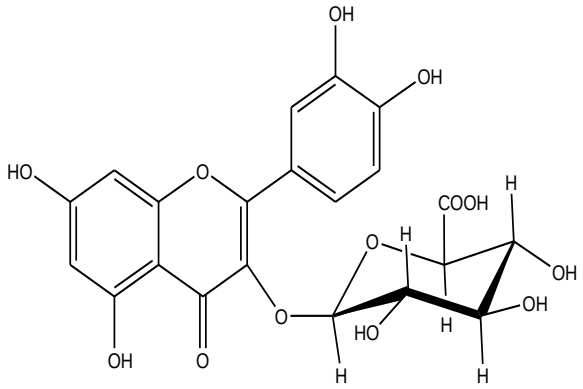


17



18

	R
a	H
b	Rhamnosyl



19

المراجع

[1] Messaili, B. (1995). Systématique des spermaphytes, ed. office des publications universitaires, Alger, 75.

[2] Quezel, P. and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.

[3] Haas, P., Pugnaire, F.I., Fernandez, E.M., Puigdefabregas, J., Clark, S.C. and Incoll, L.D. (1996). Investigation of rooting depth in the semi aride sharb *Retama sphaerocarpa*(L)Boiss. by lablling of ground water with a chemical tracer, Journal of Hydrology ,177,23-31.

[4] Shokri Ibrahim, S. (1994). The Flower plants, 173.

[5] Grenter, W. and al. (1989). (eds). Med-Chencklist, vol.4 (published).

[6] Heywood, V.H. (1968). Leguminosae in Flora Europaea, Heywood, V.H. Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds). Cambridge University press, London, 101.

[7] Burkart, A. (1952). Acme Agency, Buenons Aires, Las Leguminosas argentinas, 569.

[8] Martin-Cordero, Saeng, M.T. Auguso, M.J. (1995). Cytotoxic activity of *Retama sphaerocarpa*, Fitoterapia, vol. LXVI, N° .6.

[9] Moro, M.J., Pugnaire,F.I., Haas,P. and Puigdefàbregas,J. (1997). Effect of the canopy of *Retama sphaerocarpa* on its understorey in semiarid environment, Functional Ecology,11,425-431.

[10] Lopez l'azaro, M., Martin-Cordero, C .,Cortés,F.,Pińero,J. and Jesús Ayuso, M. (2000).Cytotoxic activity of flavonoids and extracts from *Retama sphaerocarpa* Boisie,Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 55c, 40-43.

[11] Lopez l'azaro, M., Martin-Cordero, C . and Jesús Ayuso, M. (2000). Two new flavonol glycosides as DNA topoisomeraseI poisons,Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 55c, 898-902.

[12] Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and Melauhlin, J.L. (1982). Planta Med. 45, 31.

[13] Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Aderson, B.J., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Moore, D.S. and Mclauglin, J.L. (1982). J. Nat. prod. 45, 679.

[14] Martin-Cordero, C ., Gil-serrano, A.M. and Ayuso Gonzalez, M.J. (1991). Plantes med. Et phytother. 25, 157.

[15] Ribas, I. and Vega, J. (1953). – Ion. 13, 140, 148.

[16] Kassem, M., Mosharrafa, S.A., Saleh, N.A.M.and Abdel-Wahab, S.M. (2000). Two new flavonoids from *Retama raetam* Fitoterapia, 71, 649-654.

[17] Djeddi, S., Karioti, A. and Skaltsa, H.(2008). Flavonoids of *Retama raetam*Webb. from Algeria , Planta Med.74.

[18] Martin-Cordero, C., L'opez Lazàro, M., Gil-Serrano, A., Rodriguez Carvajal, M.A. and Ayuso Gonzàlez, M.J. (1999). Novel flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, 51, 1129-1131.

[19] L'opez Lazaro, M., Martin-Cordero, C., Iglesias-Guerra, F. and Ayuso Gonzàlez, M.J. (1998). An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, vol. 48 N° . 2, 401-402.

[20] Louaar, S., Akkal, S., Bousetla, A., Medjroubi, K., Djarri, L. and Seguin, E. (2005). Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*, Chemistry of natural compound, Vol. 41, No.1.

[21] Laouer, H., Zerroug, M.M., Sahli, F., Chaker, A.N., Valentini, G., Ferretti, G., Grande, M. and Anaya, J. (2003). Composition and antimicrobial activity of Ammoides pusilla (Brot.) Breistr. essential oil, Journal of Essential Oil Research,15(2),135-138.

[22] IbnAlbitar, Dam. (1874). Aljame Li-Mofradat al adwiyah wal aghthiyah(The collection of medical and food items), Dar Sader Publishing,Beirut, Lebanon(in Arabic), Vol.1.

[23] Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maallem, S. and Ziyyat, A.(2007). Antihyperglycemic activity of Arbutus unedo, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsute* Pharmazie , 62(8), 630-632.

[24] Laouer, H., Zerroug, M. M., Chaker, A. N. and Bouzerzour, H. (2004) **.** Study of the effect of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breist, essential oil against *Pseudomonas sp*., Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 69(4), 619-624.

[25] Laouer, H., Boulaacheb, N., Akkal, S., Singh, G., Marimuthu, P.,de Heluani, C., Catalan, C. and Baldovini, N. (2008). Composition and antibacterial activity of the essential oil of Ammoides atlantica (Coss. et Dur.) Wolf., Journal of Essential Oil Research, 20(3), 266-269.

[26] Bousetla, A., Akkal, S., Medjroubi, K., Louaar, S., Azouzi, S., Djarri, L., Zaabat, N., Laouer, H., Chosson, E.and Seguin, E. (2005). Flavonoid glycosides from *Ammoides pusilla*, Chemistry of Natural Compounds, 41(1), 95-96.

[27] Nabiel, A.M.S., Sabry, I.E.N., Mohamed, N.EH. and Hasnaa, A.H. (1983). Comparative study of the flavonoids of some local members of the umbelliferae, Phytochemistry,Vol.22, N^{o}.6, pp.1417-1420.

الفصل الثالث

المادة النباتية: الإستخلاص،الفصل،التنقية و الدراسة البيولوجية

III - أ- الدراسة الكيميائية للنبتة *Retama sphaerocarpa*

1ـ المادة النباتية :

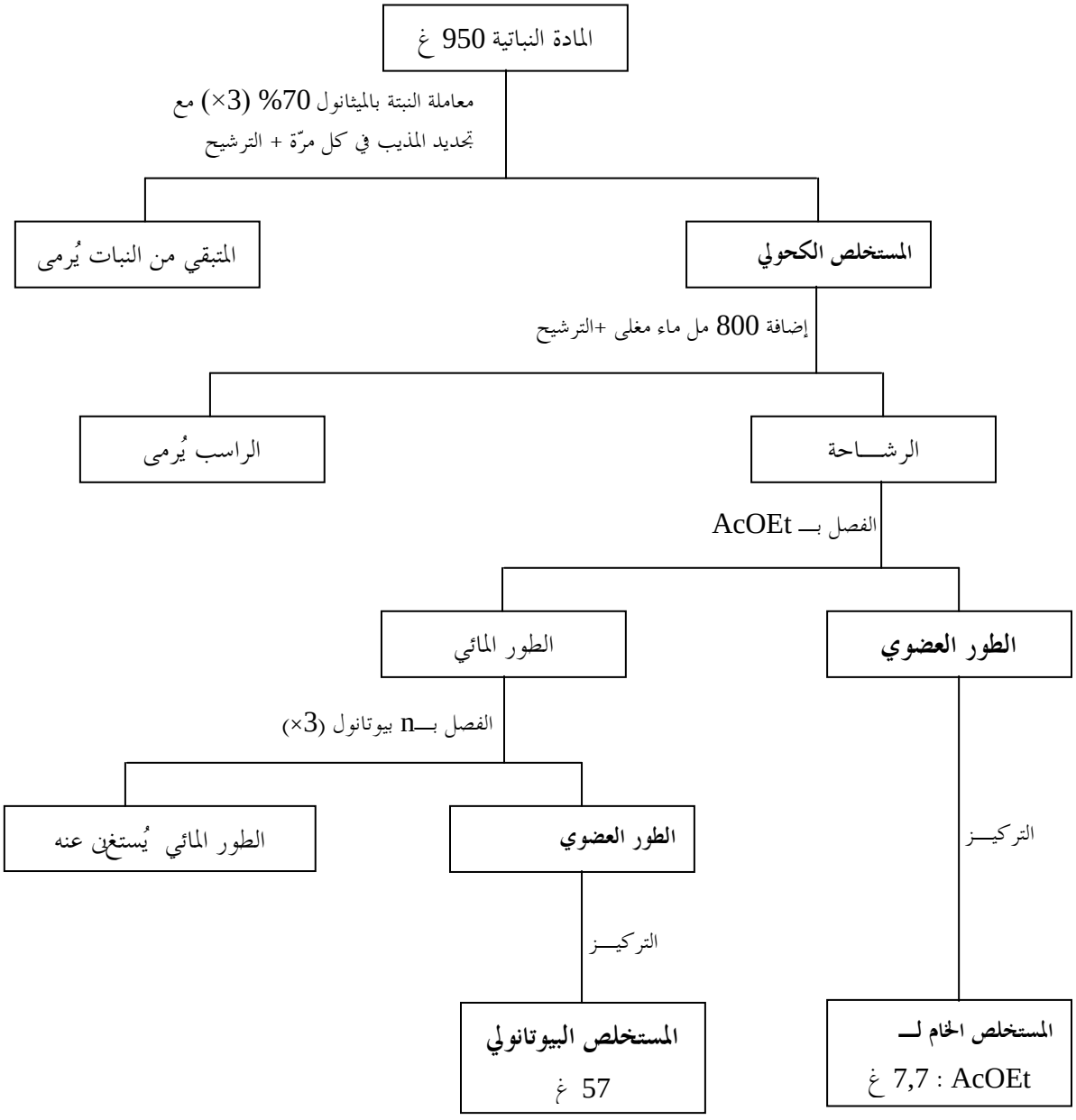
تم جمع *R. sphaerocarpa* في الأشهر ماي، جوان، جويلية 2002 من جبال سوق نعمان ولاية أم البواقي بالشرق الجزائري حيث تم جمع الجزء الهوائي من النبتة وهي في مرحلة الإزهار في شهر ماي ثم مرحلة الإثمار في شهر جويلية . أجريت عملية تجفيف النبتة في أماكن خاصة تحت الظلّ وبعيدا عن الرطوبة حيث كان الوزن المستعمل من مجموع خضري وثمارٍ وأزهار 950 غ.

2ـ الاستخلاص :

بعد تجفيف النبتة اكتفينا بأخذ الأوراق والأزهار والثمار مع الفروع الدقيقة دون السيقان الغليظة وبعد تقطيعها إلى قطع صغيرة جدًّا تم نقع المادة النباتية في محلول كحولي (MeOH :H_2O / 30: 70) ساخن إلى درجة الغليان وتركت لمدّة 48 ساعة، رشح المحلول وا ستقبل المترشح الكحولي في دورق . تمّ تكرير العملية مرتين أخريين لمدة 24 ساعة، وبعد الترشيح جمعت المستخلصات الكحولية وركّزت عند درجة حرارة c^0 40 للتخلص من الكحول بعدها أُذيبت في 800 ملل من الماء المقطر عند درجة الغليان ثم تركت للراحة ليلة كاملة بعدها رشحت لل تخلص من الأتربة وبعض المركبات الليبوفيلية (كلوروفيل، دهون نباتية... الخ).

في الخطوة الثانية وضعت الرشاحة في قمع فصل وأضيف لها 340 ملل من خلات الإثيل (AcOEt) وبعد الرج الجيّد تُركت للراحة لمدّة 24 ساعة بعدها فُصلت الطبقة العضوية عن المائية ثم أُعيدت نفس ا لعملية للمرة الثانية على الطبقة المائية، وبعدها ركّز المستخلص العضوي لطور AcOEt فكان وزنه 7,7 غ. الطبقة المائية السابقة أضيف لها مذيب جديد وهو البيوتانول النظامي بحجم 345 ملل وبعد الرج الجيّد تركت لمدّة 24 ساعة بعدها فُصلت الطبقة العضوية عن المائية ثم أُعيدت العملية مرّتين أخريين مع تركها للراحة 3 ساعات فقط ثم ركّز الطور العضوي للبيوتانول فكان وزنه 57 غ.

كلا المستخلصين يذاب في القليل من الميثانول للتخلص من أثار البيوتانول والأسيتات ويمثل الشكل (1) مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص.



الشكل (1) : مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص

3 ـ طرق الفصل والتنقية :

قبل شروعنا في عمليات الفصل أجرينا بعض الفحوص التحليلية على كل من المستخلص البيوتانولي ومستخلص الأسيتات، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6 ثنائي البعد :

البعد الأول : 4:3:3 ـ ميثانول : مثيل إيثيل سيتون : طوليان.

البعد الثاني : 13:3:3:1 ـ أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.

من خلال مقارنة التح اليل المبنية في الكروماتوغرام (I) و (II) اتضح أنه لا توجد فوارق تستدعي دراسة مقارنة لكل من المستخلصين، فللحصول على أكبر عدد ممكن من المركبات الفلافونيدية عمدنا إلى جمع المستخلصين.

زيادة على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة قمنا بإنجاز كروماتوغرافيا سائلة عالية الكفـــاءة (HPLC) لكل من مستخلص الأسيتات والبي وتانول باستعمال : عمود Kromasil C18 100 A° (250 x 4.6 mm) وجملة مملصة تتكوّن من مذيبين :

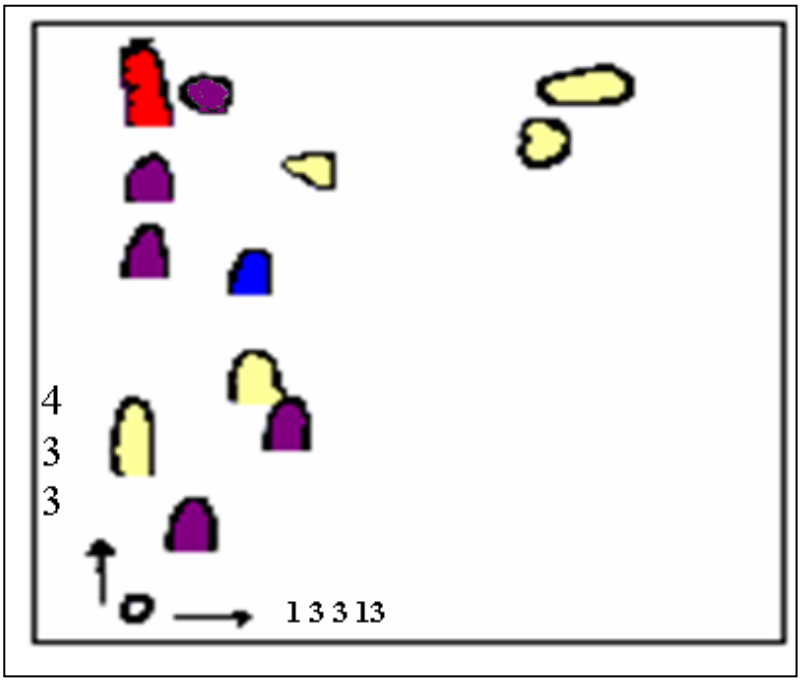
المذيب A : الماء / حمض الخل : 20/1000.

المذيب B : أسيتونتريل /الماء /حمض الخل : 20/200/800.

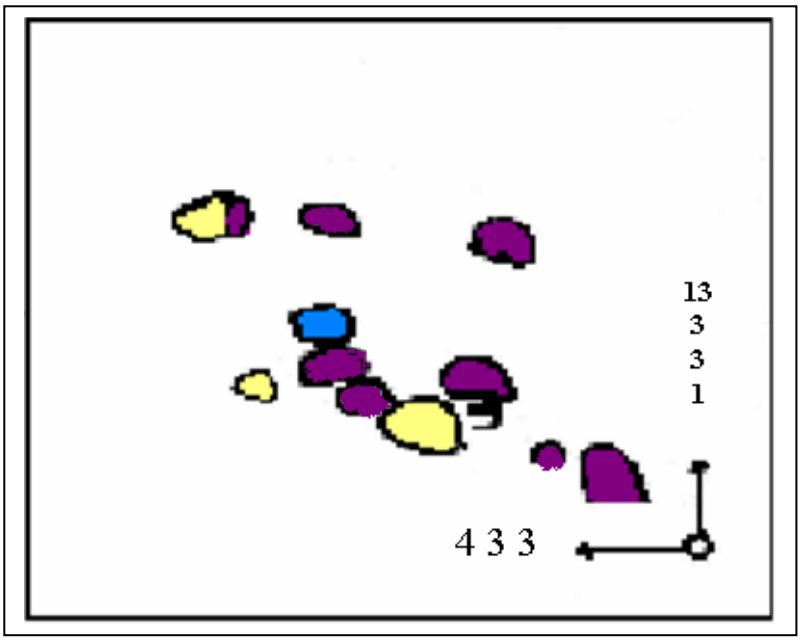
حيث يغيَّر المملص آليا، ويتم التمليص تحت طول موجة مقدارها $\lambda = 350$ nm.

نظرا لما يبينه الكروماتوغرام III و IV من غنى النبتة بالمكونات الفلافونيدية ومدى تداخلها لجأنا إلى فصل أولي بكروماتوغرافيا العمود لـــ(11,15 غ من خليط المستخلصين مستعملين لهذا الغرض متعدد الأميد (SC_6 polycaprolactone) كطور ثابت.

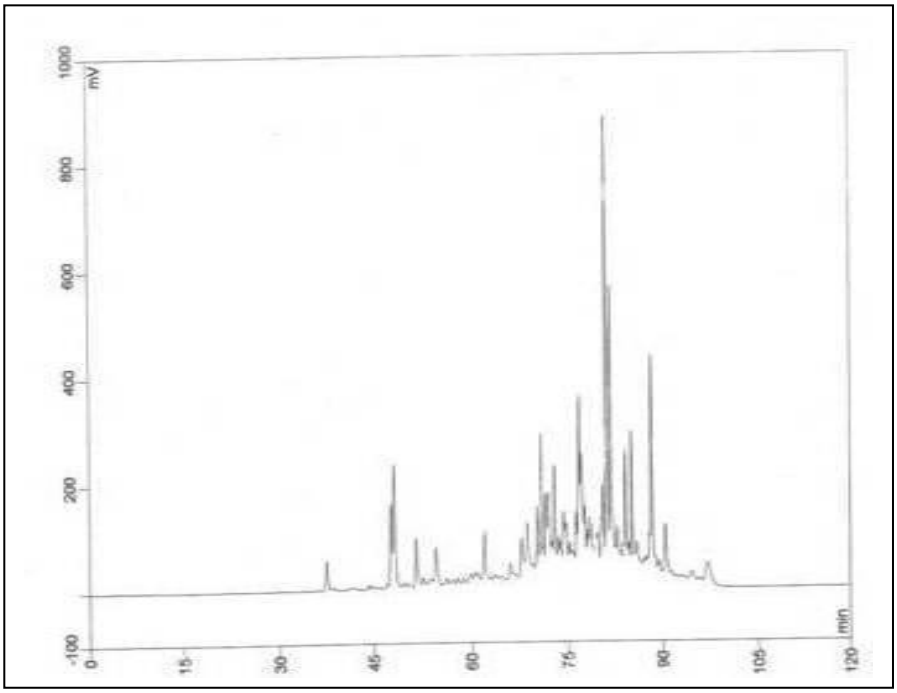
قد تم تحضير المستخلص بإذابة الكمية المراد فصلها في القليل من الميثانول مـــع إضافة حوالي 2 غ من متعدد الأميد SC_6 وبعد التركيز والتجفيف الجيد وضع المسحوق ا لمتحصل عليه بحذر كبير في أعلى العمود الذي كان قد غُسل جيّداً بالطوليان وتُرك للراحة لليلة كاملة، وقد استعمل التولوين كمملص مع تغير القطبية بالإضافة التدريجية للمياثنول إلى غاية الوصول إلـــى 100% ميثانول وتم مراقبة الحزم النازلة باستعمال مصباح الأشعة فوق البـنفسجية والكسور المحصل عليها مدونة في الجدول (1).



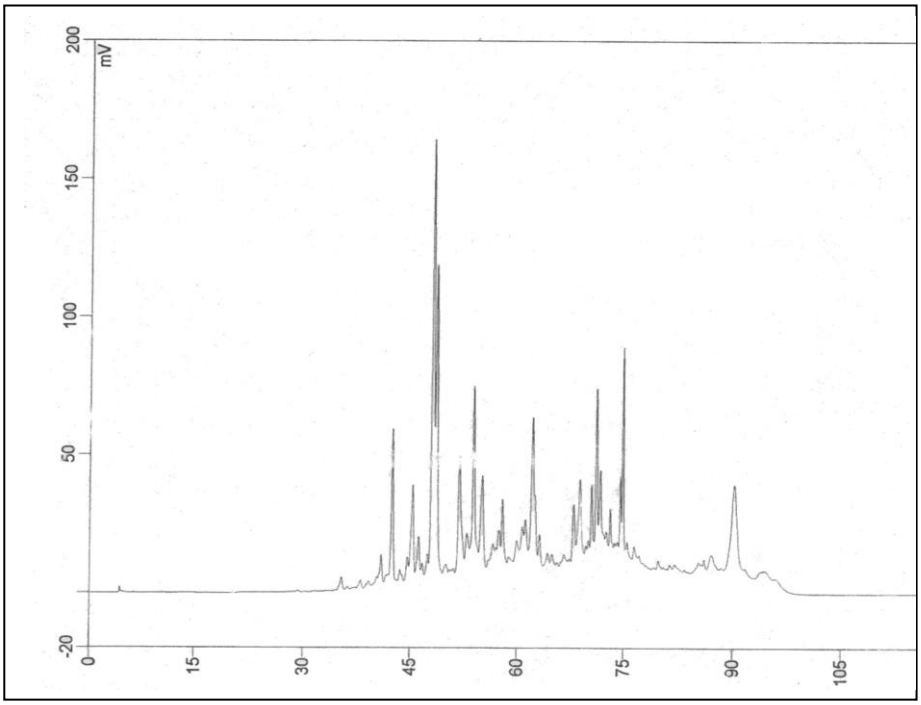
كروماتوغرام (I) ثنائي البعد لمستخلص الأسيتات لنبات ***Retama sphaerocarpa***



كروماتوغرام (II) ثنائي البعد لمستخلص البيوتانول لنبات ***Retama sphaerocarpa***



كروماتوغرام (III) (H.P. LC.) لطور الأسيتات



كروماتوغرام (IV) (H.P. L C.) لطور البيوتانول

الجدول (1) : الكسور المتحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي

رقم الكسر	الطوليان %	الميثانول %	الملاحظة
1	100	0	F_1 ظهور مركب في شكل راسب أبيض
2	98	2	
3	95	5	
4	95	5	F_2 خليط لم يعالج
5	93	7	
6	90	10	
7	90	10	F_3 ظهور مركب نقي في شكل راسب أبيض يختلف عن المركب السابق
8	85	15	
9	80	20	
10	80	20	F_4 خليط لم يعالج مع ظهور الراسب F_3
11	80	20	F_5 خليط لم يعالج
12	75	25	
13	75	25	F_6 ظهور مركب نقي في شكل راسب أبيض
14	75	25	F_7 خليط لم يعالج
15	70	30	F_8 خليط
16	70	30	F_9 خليط
17	60	40	F_{10} خليط
18	50	50	
19	50	50	F_{11} خليط
20	50	50	F_{12} خليط
21	0	100	

تم جمع الكسور المتشابهة باستعمال كروماتوغرافيا الورق (Whatman N°3) ذات البعد الواحد بواسطة نظامين مختلفين :

S_1 : حمض الخل 15%.

S_2 : الطبقة العضوية لـــ BAW (4:1:5) .

فتم الحصول على الكسور الجديدة ($F_1 \leftarrow F_{12}$).

قمنا باختيار F_1 , F_3 ,F_9,F_{10} من بين الكسور المتبقية من العمل المنجز خلال رسالة الماجستير , لسهولة فصلها مقارنة بالكسور الأخرى . إذ تمت معالجة F_9,F_{10}بواسطة كروماتوغرافيا الورق (Whatman N°1, 3) التحضيرية مستخدمينا حمض الخل 15% كمملص، لتتبع بعدها بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC لمتعدد الأميد DC_6 مع النظام S_3 : 1 : 3 : 3 : 13 أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.

تنقية المركبات المحصل عليها تمت باستعمال عمود كروماتوغرافي صغير من متعدد الأميد SC_6 وذلك بالاستعانة بالطوليان كمذيب وإغنائه بالميثانول، كما استعملنا أيضا عمود صغير من السيفاداكس (Sephadex LH20) باستخدام الميثانول كمذيب . لنخلص أخيرا إلى المركبين النقيين F_9, F_{10G}.

أما الكسران F_1 وF_3 فكانا يحويان راسبين أبيضين تم غسلهما بومضات متتالية من الميثانول البارد لنحصل على المركبين الأعظميين في صورتهما النقية F_1 , F_3 .

4 ـ الفعالية الضد بكتيرية :

- **سلالات الإختبار**: تم الحصول على الأنواع البكتيرية , *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و *Echerichia Coli* ATCC 25922 من مخبر علم البكتيريا و الطفيليات بالمستشفى الجامعي بسطيف .
- **الإختبار البيولوجي** :تمت دراسة الفعالية الضد بكتيرية باستعمال تقنية الأقراص كما هو معمول به في إدارة الغذاء و الدواء بالولايات المتحدة الإمريكية [1]، زراعة البكتيريا تمت باستعمال محلول ملحي معقم للحصول على اضطراب أو غباشة (turbidity) مساوية للكثافة الضوئية 0.1-0.08 عند طول الموجة 625 nm.

تستعمل أقراص ورق واتمان رقم 1 بقطر6mm مشبعة بـــ 10µl من كل تخفيف من المستخلصات المحضرة بتركيز 1.25g/l ، بعد التجفيف توضع الأقراص على سطح أطباق

بتري الحاوية على الأجار المغذي بسمك 4mm المزروع بمختلف أنواع البكتيريا المحضرة من مزرعة فتية (18 ساعة) ،وذلك باستعمال طريقة المسح. و يستعمل gentamycin و الإيثانول كشاهد، تحضن الأطباق في درجة حرارة 37 ^{0}C .

بعد 18 ساعة من التحضين تسجل النتائج بقياس متوسط قطر منطقة التثبيط حول كل قرص كما هو موضح في الجدول(2). ولمعرفة مدى تأثير المستخلصات على البكتيريا تأخذ عينات من منطقة التثبيط لتوضع في وسط مغذي ليعاد حضنها في الدرجة 37 ^{0}C لمدة 18 ساعة. من خلال النتائج المحصل عليها نلاحظ التأثير القاتل للمستخلص البيوتانولي في حين أبدى مستخلص الأسيتات تأثيرا تثبيطيا على النوع S. aureus ATCC 43300 في حين لم تتأثر *E. coli* ATCC 25922 بأي مستخلص أي أن هذه المستخلصات ذات فعالية على البكتيريا موجبة الغرام .

الجدول(2): يوضح قطر التثبيط لمستخلصي النبتة *Retama sphaerocarpa*

سلالات الإختبار	المستخلص	منطقة التثبيط بـــ (mm)							
		1/5v/v			**1/10v/v**			**ethanol**	**Gent.**
		R1	R2	R3	R1	R2	R3		
S. aureus ATCC 43300	A	12S	11S	12S	8S	7S	8S	-	16
	B	20C	20C	20C	15C	15C	15C	-	16
S. aureus ATCC 29213	A	11S	11S	13S	8S	7S	8S	-	35
	B	11S	10S	11S	9S	9S	8S	-	35
E. coli ATCC 25922	A	-	-	-	-	-	-	-	30
	B	-	-	-	-	-	-	-	30

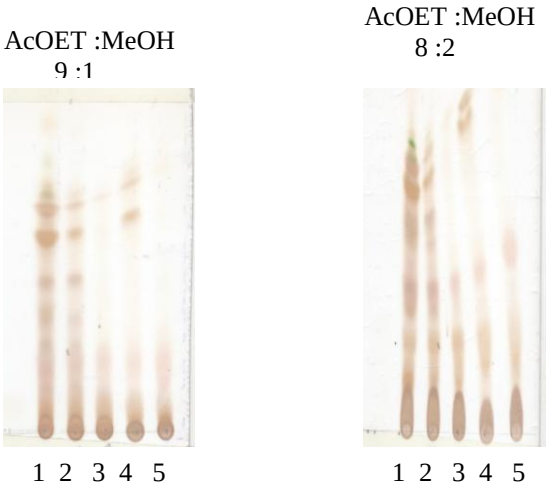
B:butanolic extract
A: AcOEt extract
R1= repetition n°1, R2= repetition n°2, R2= repetition n°3.
Gent.= Gentamycin
S= Bacteriostatic C= Bactericidal .

III-ب -الدراسة الكيميائية للنبتة *Ammoides atlantica*

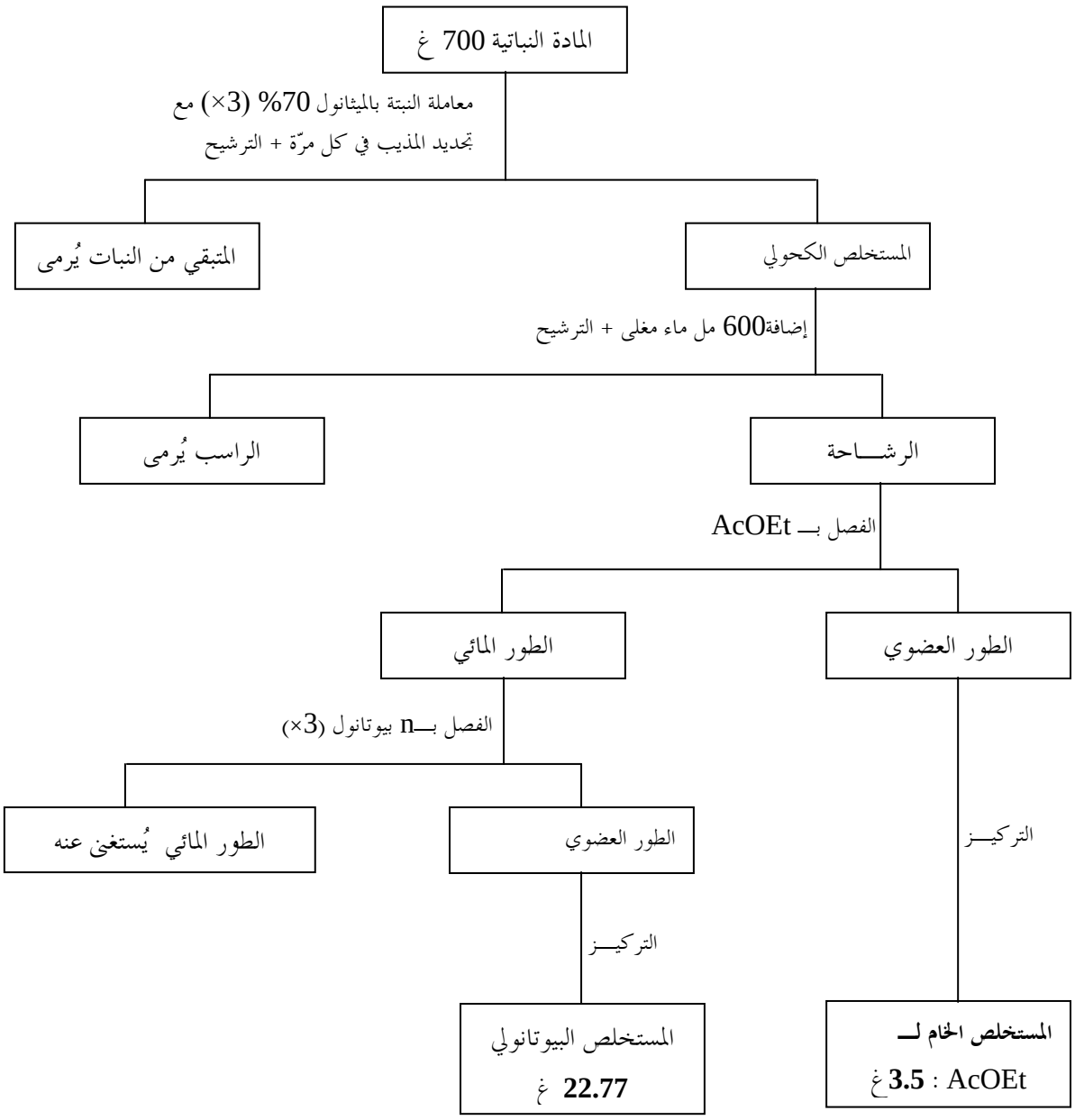
1-المادة النباتية:جمعت النبتة من ضواحي ولاية سطيف بالشرق الجزائري (جبل مغرس) في جوان 2004 وخلال تجميع النبتة تم تخليصها من كل الشوائب العالقة بها, بعدها تمت عملية التجفيف في الظل بعيدا عن الرطوبة .

2 _ الاستخلاص:

بعد قطع النبتة إلى أجزاء دقيقة (700 غ) تم نقعها في محلول كحولي (H_2O: MeOH / 30: 70) ساخن إلى درجة الغليان وتركت لمدة 24 ساعة .رشح المحلول واستقبل المرشح في دورق وبغية الحصول على مستخلص كاف ومعتبر أعيدت العملية ثلاث مرات و في كل مرة يعاد تجديد المذيب .بعدها جمعت المستخلصات الكحولية وركزت عند 35°c -50°c حتى الجفاف للتخلص نهائيا من الكحول ليعاد إذابتها في حوالي 600 ملل ماء ملغى . ثم تركت للراحة لمدة ليلة كاملة بعدها رشحت للتخلص من الأتربة و الشوائب. قمنا بالاستخلاص من نوع سائل _ سائل في قمع الفصل واستخدمنا لهذا الغرض مذيبين عديمي الإمتزاز مع الماء هما على التوالي أسيتات الإيثيل [5×200ملل] و البيوتانول العادي [3×200ملل] ليتم بعدها تجفيف المستخلصات تحت ضغط منخفض لتذاب في كميات ضعيفة من الميثانول، بعدها أجريت بعض التحاليل الكروماتوغرافية على المستخلصات الخمسة للأسيتات، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من السيليكاجل فتبين تشابهها حسب كروماتوغرام (V) وقصد زيادة كميتها تم جمعها فكان وزنها بعد التجفيف 3.5 غ وبنفس الطريقة تم جمع مستخلصات البيوتانول فكان وزنها 22.77 غ.و الشكل (2) يمثل مختلف خطوات الإستخلاص .



كروماتوغرام (V) الطبقة الرقيقة المستخلص الأسيتات لنبات *Ammoides atlantica*



الشكل (2): مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص

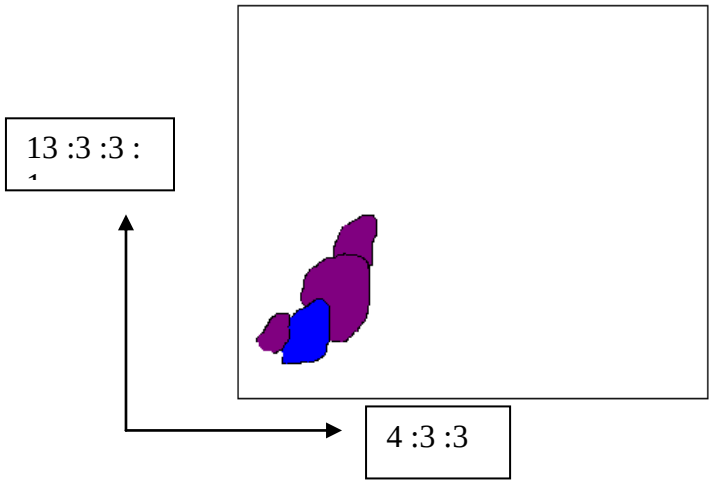
3 –طرق الفصل والتنقية :

قبل شروعنا في عمليات الفصل قمنا بإجراء فحوصات تحليلية أولية لكل من مستخلص الأسيتات و البيوتانول ودلك بإستعمال الجملة الكروماتوغرافية التالية :

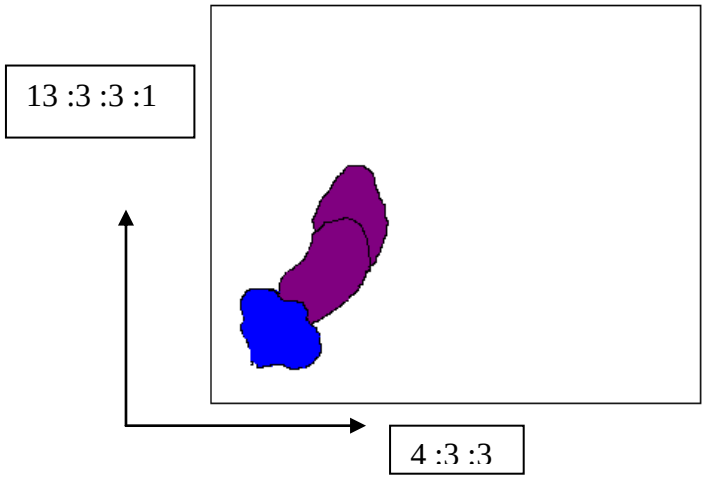
كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6 ثنائي البعد :

البعد الأول : 4:3:3 ـ ميثانول : مثيل إيثيل سيتون : طوليان.

البعد الثاني : 13:3:3:1 ـ أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.



كروماتوغرام (VI) ثنائي البعد لمستخلص الأسيتات لنبات *Ammoides atlantica*



كروماتوغرام (VII) ثنائي البعد لمستخلص البيوتانول لنبات *Ammoides atlantica*

نلاحظ تشابه كبير بين الكروماتوغرامين (**VI**) و(**VII**) مما يعني عدم الجدوى من دراسة مقارنة كما نلاحظ فقر النبتة للمركبات الفلافونيدية و على الرغم من ذلك قررنا دراسة هذه النبتة لأصالتها ,ومن خلال الكروماتوغرام (**V**) نلاحظ أن هذا النظام مناسب لفصل أكبر قدر ممكن من مركبات النبتة, ولذلك عمدنا إلى إجراء عمود كروماتوغرافي لـــ 3.5غ من طور الأسيتات مستعينين بـــ سليكا جال (60 ;0.04-0.063 nm Merk) كدعامة و الهكسان العادي كمملص ورفع القطبية بأسيتات الإثيل ليليها الميثانول .

وتم إستقبال الحزم النازلة في دوارق سعتها 100ملل ليتم جمع المتشابه منها بالاعتماد على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (أوراق اللألمنيومMerk,gel de silice $60F_{254}$ بسمك0.2 ملم) والنتائج المحصل عليها مدونة في الجدول(3):

الجدول (3) : الكسور المتحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي

رقم الكسر	الهكسان %	أسيتات الإثيل %	الملاحظة
1-3	100	0	لا شيء
4-5	95	5	**F_1** خليط لم يعالج
6-10	90	10	
11-14	85	15	**F_2** خليط لم يعالج
15-17	80	20	
18-24	80	20	**F_3** خليط لم يعالج
24-27	75	15	
28-44	75	15	**F_4** خليط لم يعالج
45-59	70	30	**F_5** خليط لم يعالج
60-79	65	35	**F_6** ظهور راسب أصفر نقي
80-92	60	40	
93-97	60	40	**F_7**

98-103	50	50	F_7 خليط ممكن الفصل
104-108	50	50	
109-115	50	50	F_8 خليط صعب الفصل
116-123	40	60	
124-141	40	60	F_9 خليط لم يعالج
142-171	30	70	
172-174	20	80	
175-177	20	80	F_{10} ظهور مركب نقي
178-209	10	90	
210-217	0	100	F_{11} خليط يظهرعلى شكل راسب
218-250	0	100	F_{12} ظهور مركب نقي
رقم الكسر	**الميثانول %**	**أسيتات الإثيل %**	
251-263	5	95	
264-269	10	90	F_{13} خليط يحوي المركب السابق

خلال جمع هذه الكسور لاحظنا ظهور رواسب في البعض منها، ليتم غسلها بالميثانول البارد ثم يعاد بلورتها في الميثانول الساخن لنحصل على (32mg)من المركب **AF_{10}** على شكل بلورات صفراء، نقية جدا، وعلى (40mg)**AF_{11}** و (10mg) **AF_6** **في** شكل مساحيق صفراء نقية .أما الراسب الذي يظهر في الكسر**F_{12}** فتم غسله بالميثانول لنحصل على بلورات بيضاء ذوابة في الماء **AF_{12}** (15mg).

إخترنا الكسر **F_7** للدراسة لكميته المعتبرة، ولاحتوائه على مركب أعظمي **AF_7** والمركب السابق **AF_6**، فكان النظام المستعمل n-hexane : èthyl acètate (5 :5)، لتتم تنقيته بعد ذلك بإستعمال عمود صغيرمن السيفاداكس (Sephadex LH20) باستخدام الميثانول كملص.

أما الكسور المتبقية فهي جد معقدة وتتواجد بكميات ضعيفة لا جدوى من دراستها .

المرجع

[1] Lennette , H.E., Balows, A., Hausler J.W., Shadomy H.J. (1985) . Manual of clinical microbiology. 4th ed. American Society for microbiology, Washington DC.

الفصل الثالث

المادة النباتية: الإستخلاص،الفصل،التنقية و الدراسة البيولوجية

III - أ- الدراسة الكيميائية للنبتة *Retama sphaerocarpa*

1ـ المادة النباتية :

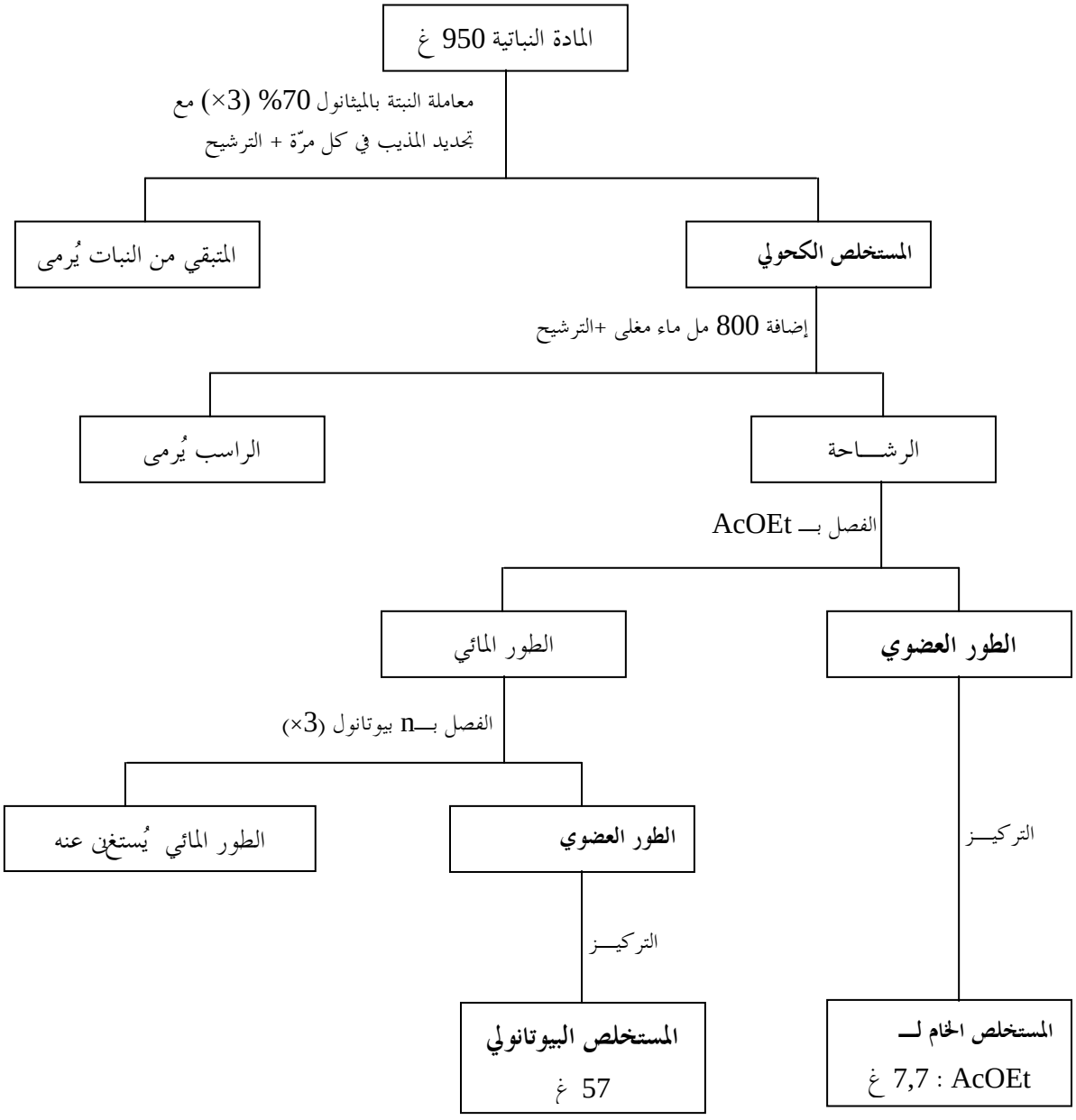
تم جمع *R. sphaerocarpa* في الأشهر ماي، جوان، جويلية 2002 من جبال سوق نعمان ولاية أم البواقي بالشرق الجزائري حيث تم جمع الجزء الهوائي من النبتة وهي في مرحلة الإزهار في شهر ماي ثم مرحلة الإثمار في شهر جويلية . أجريت عملية تجفيف النبتة في أماكن خاصة تحت الظلّ وبعيدا عن الرطوبة حيث كان الوزن المستعمل من مجموع خضري وثمارٍ وأزهار 950 غ.

2ـ الاستخلاص :

بعد تجفيف النبتة اكتفينا بأخذ الأوراق والأزهار والثمار مع الفروع الدقيقة دون السيقان الغليظة وبعد تقطيعها إلى قطع صغيرة جدًّا تم نقع المادة النباتية في محلول كحولي (MeOH :H_2O / 30: 70) ساخن إلى درجة الغليان وتركت لمدّة 48 ساعة، رشح المحلول وا ستقبل المترشح الكحولي في دورق . تمّ تكرير العملية مرتين أخريين لمدة 24 ساعة، وبعد الترشيح جمعت المستخلصات الكحولية وركّزت عند درجة حرارة c^0 40 للتخلص من الكحول بعدها أُذيبت في 800 ملل من الماء المقطر عند درجة الغليان ثم تركت للراحة ليلة كاملة بعدها رشحت لل تخلص من الأتربة وبعض المركبات الليبوفيلية (كلوروفيل، دهون نباتية... الخ).

في الخطوة الثانية وضعت الرشاحة في قمع فصل وأضيف لها 340 ملل من خلات الإثيل (AcOEt) وبعد الرج الجيّد تُركت للراحة لمدّة 24 ساعة بعدها فُصلت الطبقة العضوية عن المائية ثم أُعيدت نفس ا لعملية للمرة الثانية على الطبقة المائية، وبعدها ركّز المستخلص العضوي لطور AcOEt فكان وزنه 7,7 غ. الطبقة المائية السابقة أضيف لها مذيب جديد وهو البيوتانول النظامي بحجم 345 ملل وبعد الرج الجيّد تركت لمدّة 24 ساعة بعدها فُصلت الطبقة العضوية عن المائية ثم أُعيدت العملية مرّتين أخريين مع تركها للراحة 3 ساعات فقط ثم ركّز الطور العضوي للبيوتانول فكان وزنه 57 غ.

كلا المستخلصين يذاب في القليل من الميثانول للتخلص من أثار البيوتانول والأسيتات ويمثل الشكل (1) مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص.



الشكل (1) : مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص

3 ـ طرق الفصل والتنقية :

قبل شروعنا في عمليات الفصل أجرينا بعض الفحوص التحليلية على كل من المستخلص البيوتانولي ومستخلص الأسيتات، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6 ثنائي البعد :

البعد الأول : 4:3:3 ـ ميثانول : مثيل إيثيل سيتون : طوليان.

البعد الثاني : 13:3:3:1 ـ أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.

من خلال مقارنة التح اليل المبنية في الكروماتوغرام (I) و (II) اتضح أنه لا توجد فوارق تستدعي دراسة مقارنة لكل من المستخلصين، فللحصول على أكبر عدد ممكن من المركبات الفلافونيدية عمدنا إلى جمع المستخلصين.

زيادة على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة قمنا بإنجاز كروماتوغرافيا سائلة عالية الكفـــاءة (HPLC) لكل من مستخلص الأسيتات والبي وتانول باستعمال : عمود Kromasil C18 100 A° (250 x 4.6 mm) وجملة مملصة تتكوّن من مذيبين :

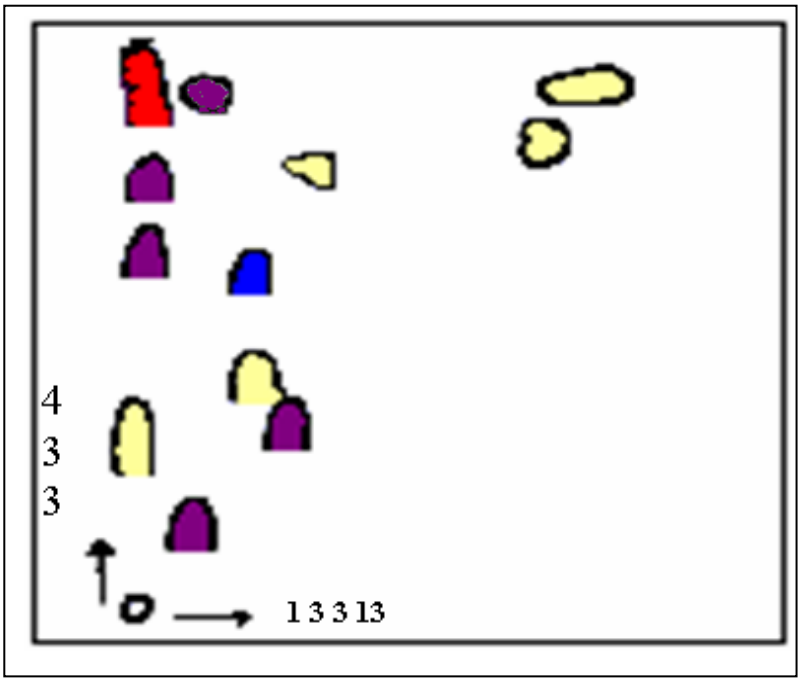
المذيب A : الماء / حمض الخل : 20/1000.

المذيب B : أسيتونتريل /الماء /حمض الخل : 20/200/800.

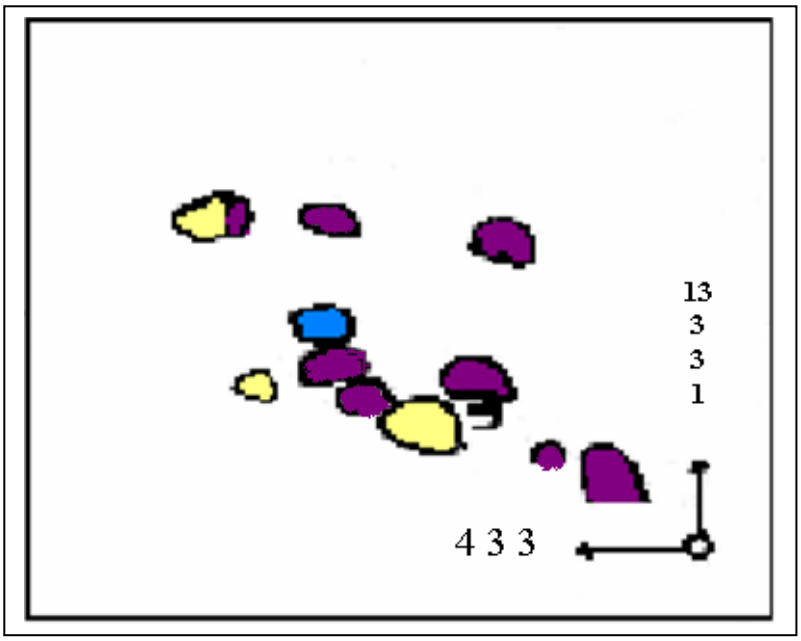
حيث يغيَّر المملص آليا، ويتم التمليص تحت طول موجة مقدارها $\lambda = 350$ nm.

نظرا لما يبينه الكروماتوغرام III و IV من غنى النبتة بالمكونات الفلافونيدية ومدى تداخلها لجأنا إلى فصل أولي بكروماتوغرافيا العمود لـــ(11,15 غ من خليط المستخلصين مستعملين لهذا الغرض متعدد الأميد (SC_6 polycaprolactone) كطور ثابت.

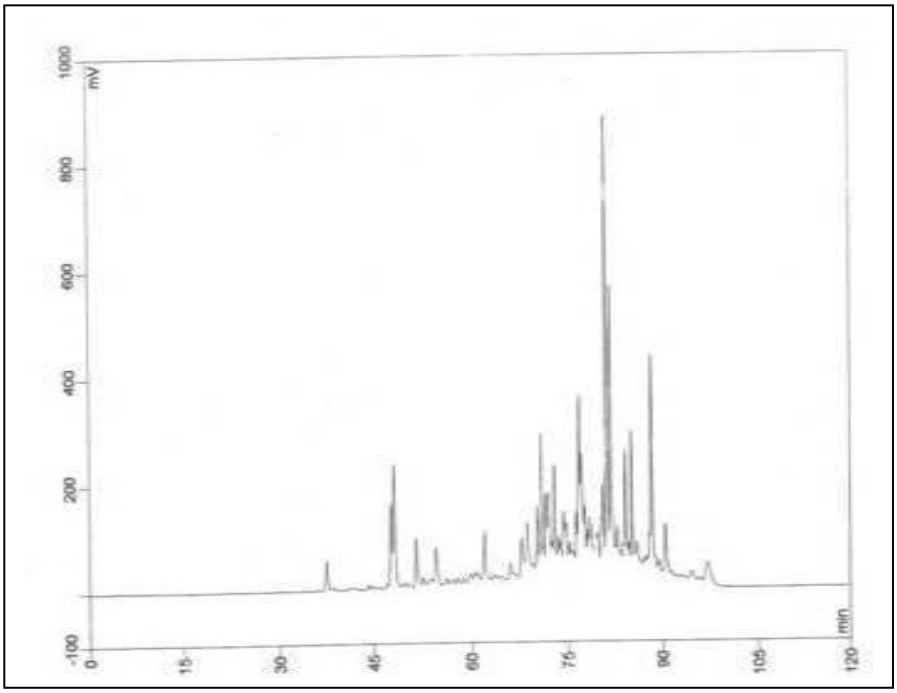
قد تم تحضير المستخلص بإذابة الكمية المراد فصلها في القليل من الميثانول مـــع إضافة حوالي 2 غ من متعدد الأميد SC_6 وبعد التركيز والتجفيف الجيد وضع المسحوق ا لمتحصل عليه بحذر كبير في أعلى العمود الذي كان قد غُسل جيّداً بالطوليان وتُرك للراحة لليلة كاملة، وقد استعمل التولوين كمملص مع تغير القطبية بالإضافة التدريجية للمياثنول إلى غاية الوصول إلـــى 100% ميثانول وتم مراقبة الحزم النازلة باستعمال مصباح الأشعة فوق البـنفسجية والكسور المحصل عليها مدونة في الجدول (1).



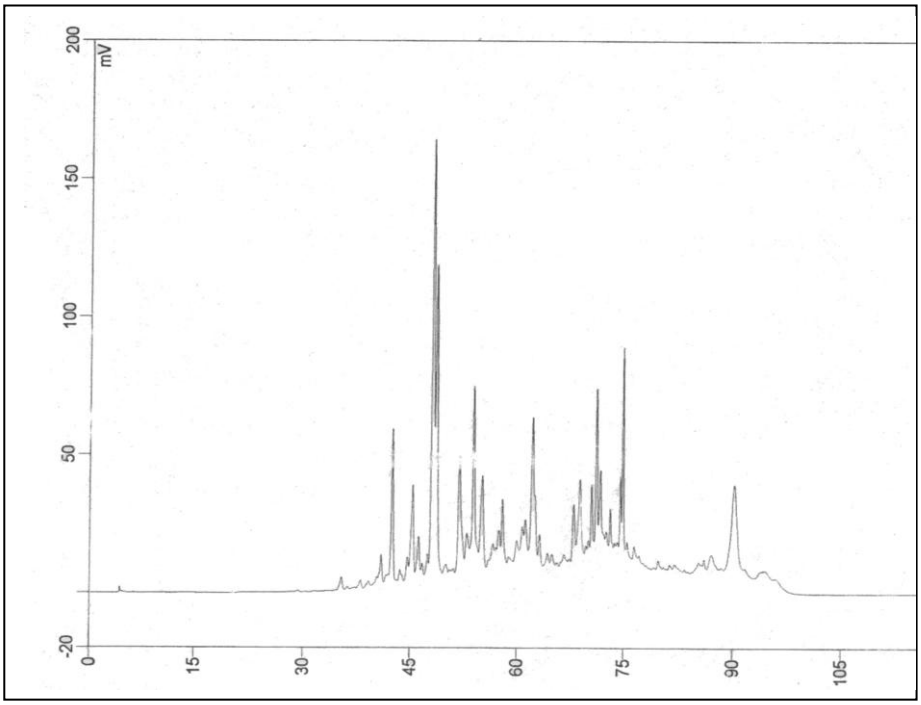
كروماتوغرام (I) ثنائي البعد لمستخلص الأسيتات لنبات ***Retama sphaerocarpa***



كروماتوغرام (II) ثنائي البعد لمستخلص البيوتانول لنبات ***Retama sphaerocarpa***



كروماتوغرام (III) (H.P. LC.) لطور الأسيتات



كروماتوغرام (IV) (H.P. L C.) لطور البيوتانول

الجدول (1) : الكسور المتحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي

رقم الكسر	الطوليان %	الميثانول %	الملاحظة
1	100	0	F_1 ظهور مركب في شكل راسب أبيض
2	98	2	
3	95	5	
4	95	5	F_2 خليط لم يعالج
5	93	7	
6	90	10	
7	90	10	F_3 ظهور مركب نقي في شكل راسب أبيض يختلف عن المركب السابق
8	85	15	
9	80	20	
10	80	20	F_4 خليط لم يعالج مع ظهور الراسب F_3
11	80	20	F_5 خليط لم يعالج
12	75	25	
13	75	25	F_6 ظهور مركب نقي في شكل راسب أبيض
14	75	25	F_7 خليط لم يعالج
15	70	30	F_8 خليط
16	70	30	F_9 خليط
17	60	40	F_{10} خليط
18	50	50	
19	50	50	F_{11} خليط
20	50	50	F_{12} خليط
21	0	100	

تم جمع الكسور المتشابهة باستعمال كروماتوغرافيا الورق (Whatman N°3) ذات البعد الواحد بواسطة نظامين مختلفين :

S_1 : حمض الخل 15%.

S_2 : الطبقة العضوية لـــ BAW (4:1:5) .

فتم الحصول على الكسور الجديدة ($F_1 \leftarrow F_{12}$).

قمنا باختيار F_1 , F_3 ,F_9,F_{10} من بين الكسور المتبقية من العمل المنجز خلال رسالة الماجستير , لسهولة فصلها مقارنة بالكسور الأخرى . إذ تمت معالجة F_9,F_{10}بواسطة كروماتوغرافيا الورق (Whatman N°1, 3) التحضيرية مستخدمينا حمض الخل 15% كمملص، لتتبع بعدها بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC لمتعدد الأميد DC_6 مع النظام S_3 : 1 : 3 : 3 : 13 أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.

تنقية المركبات المحصل عليها تمت باستعمال عمود كروماتوغرافي صغير من متعدد الأميد SC_6 وذلك بالاستعانة بالطوليان كمذيب وإغنائه بالميثانول، كما استعملنا أيضا عمود صغير من السيفاداكس (Sephadex LH20) باستخدام الميثانول كمذيب . لنخلص أخيرا إلى المركبين النقيين F_9, F_{10G}.

أما الكسران F_1 وF_3 فكانا يحويان راسبين أبيضين تم غسلهما بومضات متتالية من الميثانول البارد لنحصل على المركبين الأعظميين في صورتهما النقية F_1 , F_3 .

4 ـ الفعالية الضد بكتيرية :

- **سلالات الإختبار**: تم الحصول على الأنواع البكتيرية , *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و *Echerichia Coli* ATCC 25922 من مخبر علم البكتيريا و الطفيليات بالمستشفى الجامعي بسطيف .
- **الإختبار البيولوجي** :تمت دراسة الفعالية الضد بكتيرية باستعمال تقنية الأقراص كما هو معمول به في إدارة الغذاء و الدواء بالولايات المتحدة الإمريكية [1]، زراعة البكتيريا تمت باستعمال محلول ملحي معقم للحصول على اضطراب أو غباشة (turbidity) مساوية للكثافة الضوئية 0.1-0.08 عند طول الموجة 625 nm.

تستعمل أقراص ورق واتمان رقم 1 بقطر6mm مشبعة بـــ 10µl من كل تخفيف من المستخلصات المحضرة بتركيز 1.25g/l ، بعد التجفيف توضع الأقراص على سطح أطباق

بتري الحاوية على الأجار المغذي بسمك 4mm المزروع بمختلف أنواع البكتيريا المحضرة من مزرعة فتية (18 ساعة) ،وذلك باستعمال طريقة المسح. و يستعمل gentamycin و الإيثانول كشاهد، تحضن الأطباق في درجة حرارة 37 ^{0}C .

بعد 18 ساعة من التحضين تسجل النتائج بقياس متوسط قطر منطقة التثبيط حول كل قرص كما هو موضح في الجدول(2). ولمعرفة مدى تأثير المستخلصات على البكتيريا تأخذ عينات من منطقة التثبيط لتوضع في وسط مغذي ليعاد حضنها في الدرجة 37 ^{0}C لمدة 18 ساعة. من خلال النتائج المحصل عليها نلاحظ التأثير القاتل للمستخلص البيوتانولي في حين أبدى مستخلص الأسيتات تأثيرا تثبيطيا على النوع S. aureus ATCC 43300 في حين لم تتأثر *E. coli* ATCC 25922 بأي مستخلص أي أن هذه المستخلصات ذات فعالية على البكتيريا موجبة الغرام .

الجدول(2): يوضح قطر التثبيط لمستخلصي النبتة *Retama sphaerocarpa*

سلالات الإختبار	المستخلص	منطقة التثبيط بـــ (mm)							
		1/5v/v			**1/10v/v**			**ethanol**	**Gent.**
		R1	R2	R3	R1	R2	R3		
S. aureus ATCC 43300	A	12S	11S	12S	8S	7S	8S	-	16
	B	20C	20C	20C	15C	15C	15C	-	16
S. aureus ATCC 29213	A	11S	11S	13S	8S	7S	8S	-	35
	B	11S	10S	11S	9S	9S	8S	-	35
E. coli ATCC 25922	A	-	-	-	-	-	-	-	30
	B	-	-	-	-	-	-	-	30

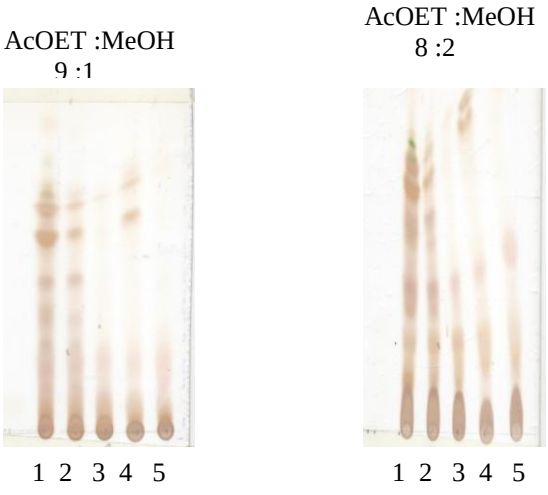
B:butanolic extract
A: AcOEt extract
R1= repetition n°1, R2= repetition n°2, R2= repetition n°3.
Gent.= Gentamycin
S= Bacteriostatic C= Bactericidal .

III-ب -الدراسة الكيميائية للنبتة *Ammoides atlantica*

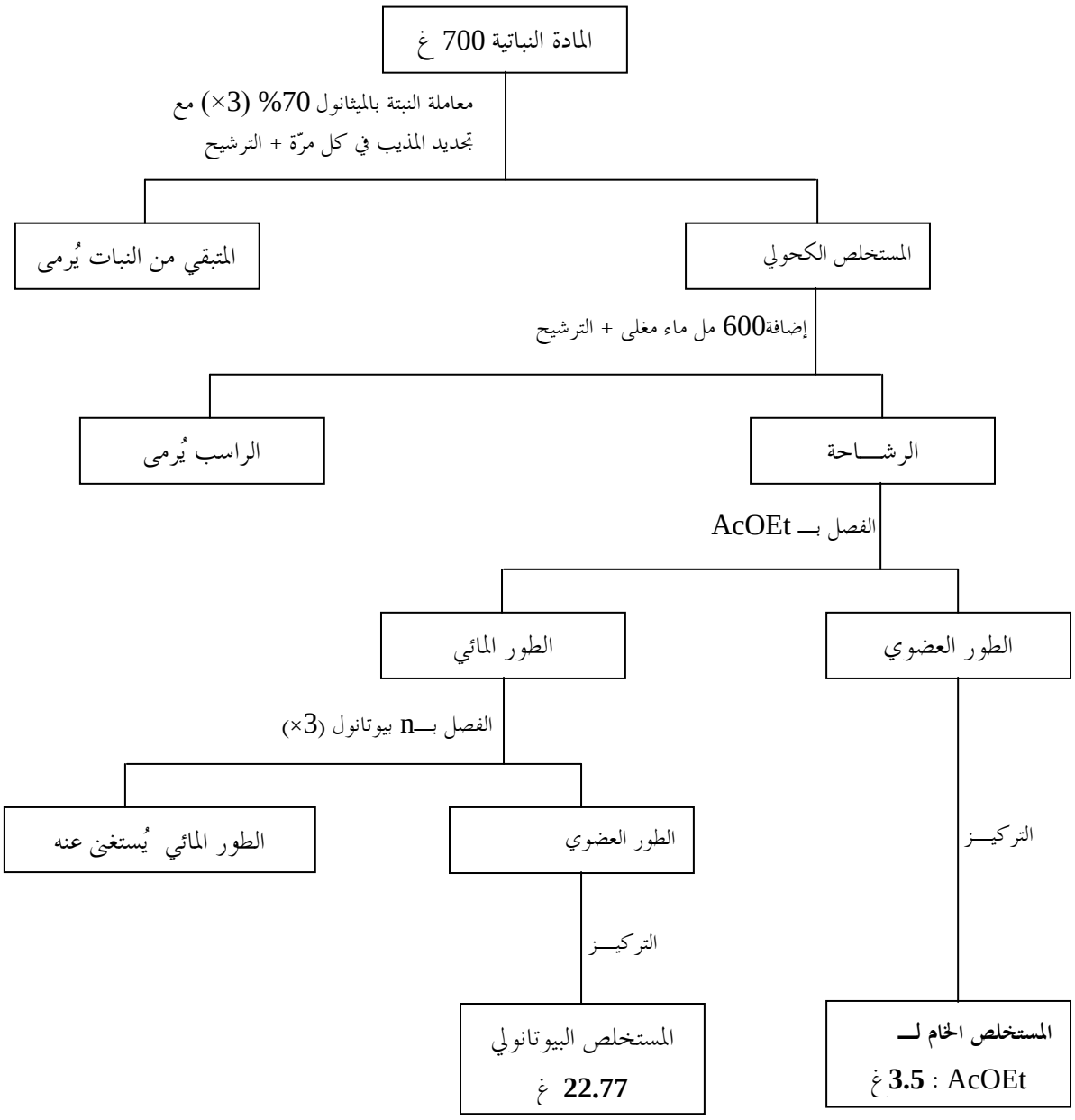
1-المادة النباتية: جمعت النبتة من ضواحي ولاية سطيف بالشرق الجزائري (جبل مغرس) في جوان 2004 وخلال تجميع النبتة تم تخليصها من كل الشوائب العالقة بها, بعدها تمت عملية التجفيف في الظل بعيدا عن الرطوبة .

2 _ الاستخلاص:

بعد قطع النبتة إلى أجزاء دقيقة (700 غ) تم نقعها في محلول كحولي (H_2O: MeOH / 30 :70) ساخن إلى درجة الغليان وتركت لمدة 24 ساعة .رشح المحلول واستقبل المرشح في دورق وبغية الحصول على مستخلص كاف ومعتبر أعيدت العملية ثلاث مرات و في كل مرة يعاد تجديد المذيب .بعدها جمعت المستخلصات الكحولية وركزت عند 35^0c -50^0c حتى الجفاف للتخلص نهائيا من الكحول ليعاد إذابتها في حوالي 600 ملل ماء ملغى . ثم تركت للراحة لمدة ليلة كاملة بعدها رشحت للتخلص من الأتربة و الشوائب. قمنا بالاستخلاص من نوع سائل ــ سائل في قمع الفصل واستخدمنا لهذا الغرض مذيبين عديمي الإمتزاز مع الماء هما على التوالي أسيتات الإيثيل [5×200ملل] و البيوتانول العادي [3×200ملل] ليتم بعدها تجفيف المستخلصات تحت ضغط منخفض لتذاب في كميات ضعيفة من الميثانول، بعدها أجريت بعض التحاليل الكروماتوغرافية على المستخلصات الخمسة للأسيتات، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من السيليكاجل فتبين تشابهها حسب كروماتوغرام (V) وقصد زيادة كميتها تم جمعها فكان وزنها بعد التجفيف 3.5 غ وبنفس الطريقة تم جمع مستخلصات البيوتانول فكان وزنها 22.77 غ.و الشكل (2) يمثل مختلف خطوات الإستخلاص .



كروماتوغرام (V) الطبقة الرقيقة المستخلص الأسيتات لنبات *Ammoides atlantica*



الشكل (2): مختلف الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص

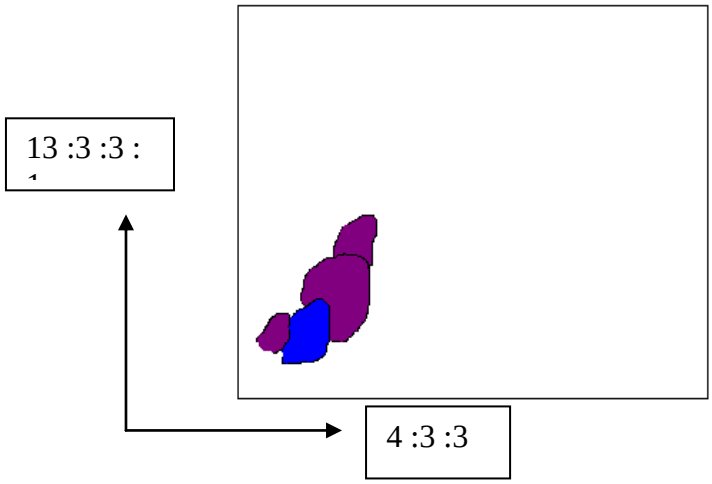
3 –طرق الفصل والتنقية :

قبل شروعنا في عمليات الفصل قمنا بإجراء فحوصات تحليلية أولية لكل من مستخلص الأسيتات و البيوتانول ودلك بإستعمال الجملة الكروماتوغرافية التالية :

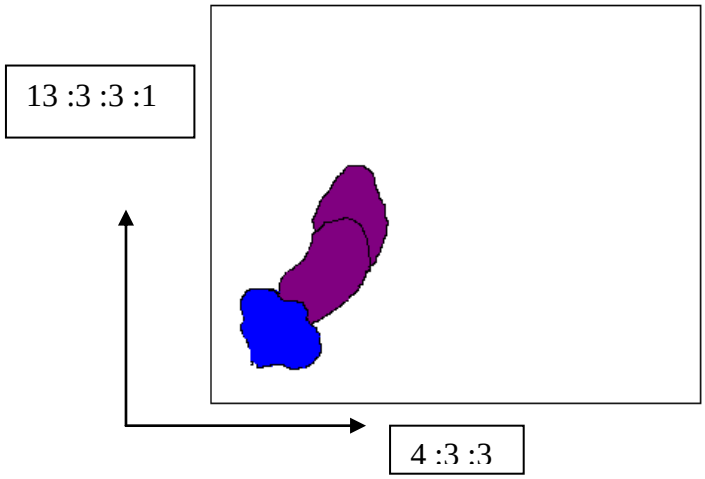
كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6 ثنائي البعد :

البعد الأول : 4:3:3 ـ ميثانول : مثيل إيثيل سيتون : طوليان.

البعد الثاني : 13:3:3:1 ـ أستيل أسيتون : ميثيل إيثيل سيتون : ميثانول : الماء.



كروماتوغرام (VI) ثنائي البعد لمستخلص الأسيتات لنبات *Ammoides atlantica*



كروماتوغرام (VII) ثنائي البعد لمستخلص البيوتانول لنبات *Ammoides atlantica*

نلاحظ تشابه كبير بين الكروماتوغرامين (**VI**) و(**VII**) مما يعني عدم الجدوى من دراسة مقارنة كما نلاحظ فقر النبتة للمركبات الفلافونيدية و على الرغم من ذلك قررنا دراسة هذه النبتة لأصالتها ,ومن خلال الكروماتوغرام (**V**) نلاحظ أن هذا النظام مناسب لفصل أكبر قدر ممكن من مركبات النبتة, ولذلك عمدنا إلى إجراء عمود كروماتوغرافي لـــ 3.5غ من طور الأسيتات مستعينين بـــ سليكا جال (60 ;0.04-0.063 nm Merk) كدعامة و الهكسان العادي كمملص ورفع القطبية بأسيتات الإثيل ليليها الميثانول .

وتم إستقبال الحزم النازلة في دوارق سعتها 100ملل ليتم جمع المتشابه منها بالاعتماد على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (أوراق اللألمنيومMerk,gel de silice $60F_{254}$ بسمك0.2 ملم) والنتائج المحصل عليها مدونة في الجدول(3):

الجدول (3) : الكسور المتحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي

رقم الكسر	الهكسان %	أسيتات الإثيل %	الملاحظة
1-3	100	0	لا شيء
4-5	95	5	**F_1** خليط لم يعالج
6-10	90	10	
11-14	85	15	**F_2** خليط لم يعالج
15-17	80	20	
18-24	80	20	**F_3** خليط لم يعالج
24-27	75	15	
28-44	75	15	**F_4** خليط لم يعالج
45-59	70	30	**F_5** خليط لم يعالج
60-79	65	35	**F_6** ظهور راسب أصفر نقي
80-92	60	40	
93-97	60	40	**F_7**

F_7 خليط ممكن الفصل	50	50	**98-103**
	50	50	**104-108**
F_8 خليط صعب الفصل	50	50	**109-115**
	60	40	**116-123**
F_9 خليط لم يعالج	60	40	**124-141**
	70	30	**142-171**
	80	20	**172-174**
F_{10} ظهور مركب نقي	80	20	**175-177**
	90	10	**178-209**
F_{11} خليط يظهرعلى شكل راسب	100	0	**210-217**
F_{12} ظهور مركب نقي	100	0	**218-250**
	أسيتات الإثيل %	**الميثانول %**	رقم الكسر
	95	5	**251-263**
F_{13} خليط يحوي المركب السابق	90	10	**264-269**

خلال جمع هذه الكسور لاحظنا ظهور رواسب في البعض منها، ليتم غسلها بالميثانول البارد ثم يعاد بلورتها في الميثانول الساخن لنحصل على (32mg)من المركب **AF_{10}** على شكل بلورات صفراء، نقية جدا، وعلى (40mg)**AF_{11}** و (10mg) **AF_6** **في** شكل مساحيق صفراء نقية .أما الراسب الذي يظهر في الكسر**F_{12}** فتم غسله بالميثانول لنحصل على بلورات بيضاء ذوابة في الماء (15mg) **AF_{12}**.

إخترنا الكسر **F_7** للدراسة لكميته المعتبرة، ولاحتوائه على مركب أعظمي **AF_7** والمركب السابق **AF_6**، فكان النظام المستعمل n-hexane : èthyl acètate (5 :5)، لتتم تنقيته بعد ذلك بإستعمال عمود صغيرمن السيفاداكس (Sephadex LH20) باستخدام الميثانول كملص.

أما الكسور المتبقية فهي جد معقدة وتتواجد بكميات ضعيفة لا جدوى من دراستها .

المرجع

[1] Lennette , H.E., Balows, A., Hausler J.W., Shadomy H.J. (1985) . Manual of clinical microbiology. 4th ed. American Society for microbiology, Washington DC.

الفصل الرابع

التعيين البنيوي للمركبات المفصولة

IV - أ- التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Retama sphaerocarpa* :

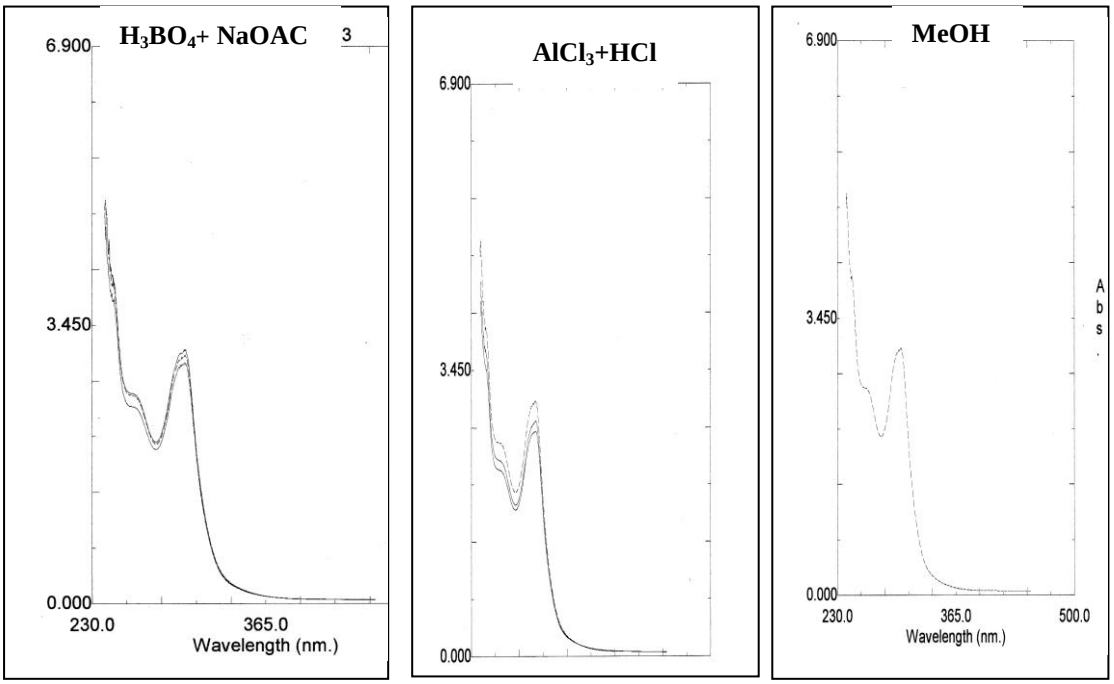
بالإضافة إلى المركبات الأربع المكتشفة خلال رسالة الماجستير فقد تم التعرف على أربع أخرى، وذلك بالاستعانة بالسلوك ا لكروماتوغرافي وكذا المعطيات الطيفية (UV) , NMR[1]H , NMR [13]C , Ms,Cosy , HSQC, HMBC .

أـ 1 ـ التحليل البنيوي للمركب F_3

ـ السلوك الكروماتوغرافي :

الجملة	S_1	S_2	S_3
Rfx100	78	37	50
اللون الاستشعاعي	أصفر		

$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
S_2 = BAW
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1



الشكل (1) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_3

طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول كما هو موضح في الشكل (1) يكشف على كون المركب **F_3** عبارة عن إيزوفلافون .

غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** :

عند مقارنة طيف **NaOAC** بطيف **MeOH** دليل على غياب OH في الموقع 7.

وعند مقارنة طيف **$NaOAC+H_3BO_4$** بطيف **MeOH** دليل على غياب أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A .

عند مقارنة طيف **$AlCl_3+HCl$** بطيف **MeOH** دليل على غياب OH في الموقع 5

أما مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون حسب الشكل(2) فتظهر:

إشارة أحادية عند $\delta = 8,25$ ppm موافقة لـــ H_2 و المميزة للإيزوفلافون.

وإشارة ثنائية ($J = 8,9$ Hz) عند $\delta = 8,00$ ppm موافقة لـــ H_5.

وإشارة ثنائية ($J = 2,3$ Hz) عند $\delta = 7,25$ موافقة لـــ H_8.

إشارة ثنائي ثنائي ($J = 8,9\text{-}2,3$ Hz) عند $\delta = 7,15$ موافقة لـــ H_6.

إشارة أحادية عند $\delta = 6,87$ ppm موافقة لـــ $H_{5'}$.

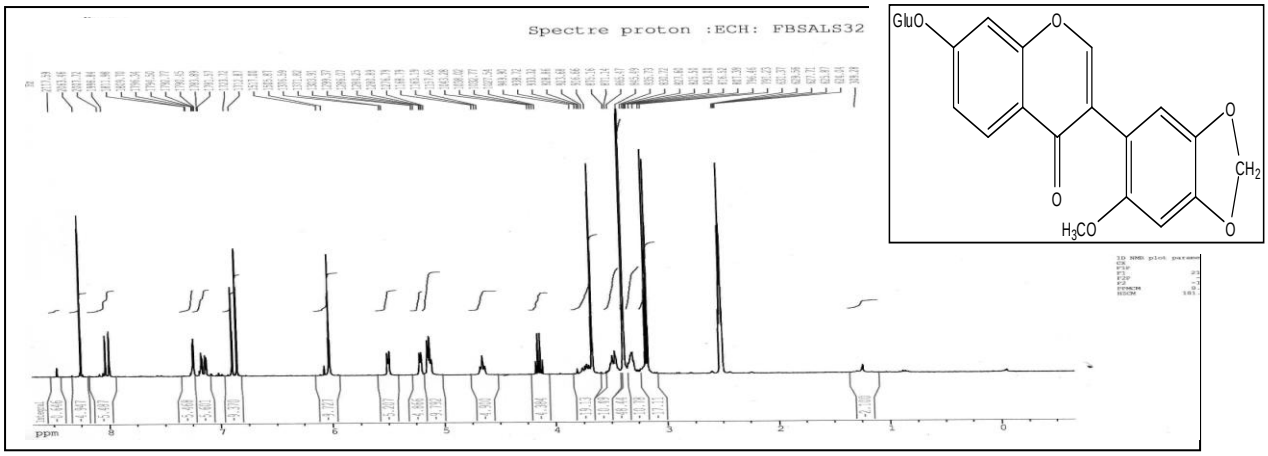
إشارة أحادية عند $\delta = 6,82$ ppm موافقة لـــ $H_{2'}$.

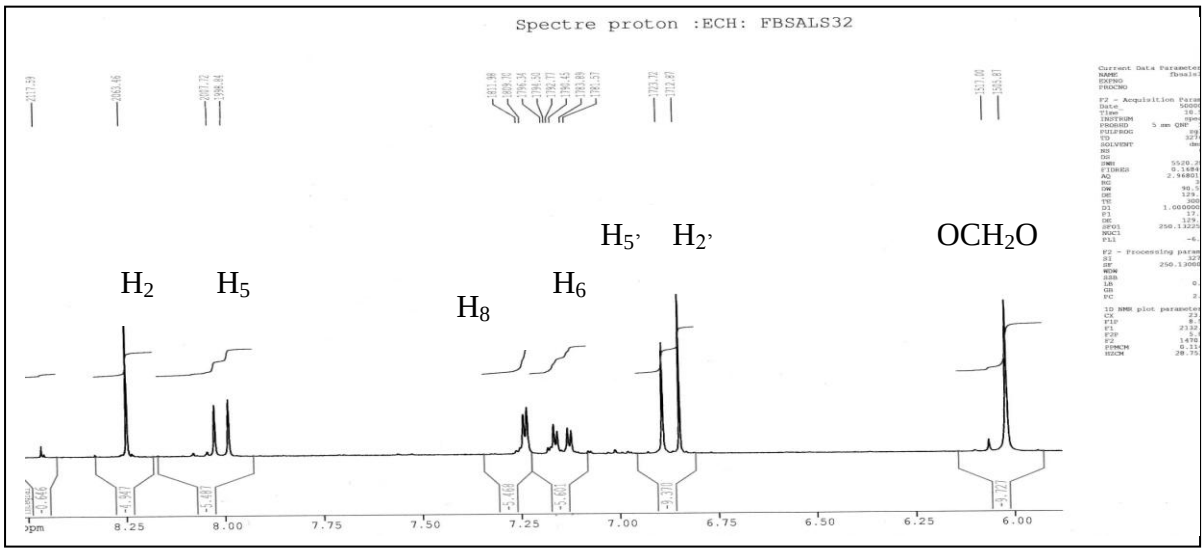
إشارة أحادية عند $\delta = 6,00$ ppm موافقة لـــ OCH_2O.

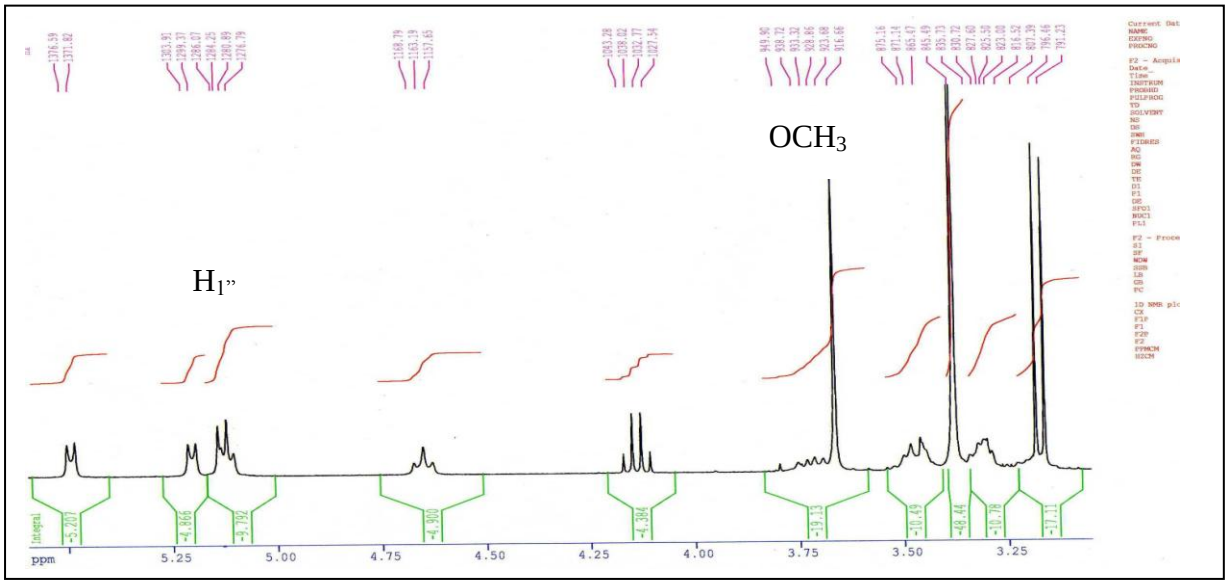
إشارة أحادية عند $\delta = 3,7$ ppm موافقة لـــ OCH_3 .

وإشارة ثنائية ($J = 7,5$Hz) عند $\delta = 5,12$ppm موافقة للبروتون الأنوميري $H_{1''}$ للجليكوزالذي تم التعرف عليه من خلال الإماهة الحمضية لهذا المركب و المطابقة الكروماتوغرافية للسكر المتحرر مع الشواهد المعروفة حسب الشكل(19)

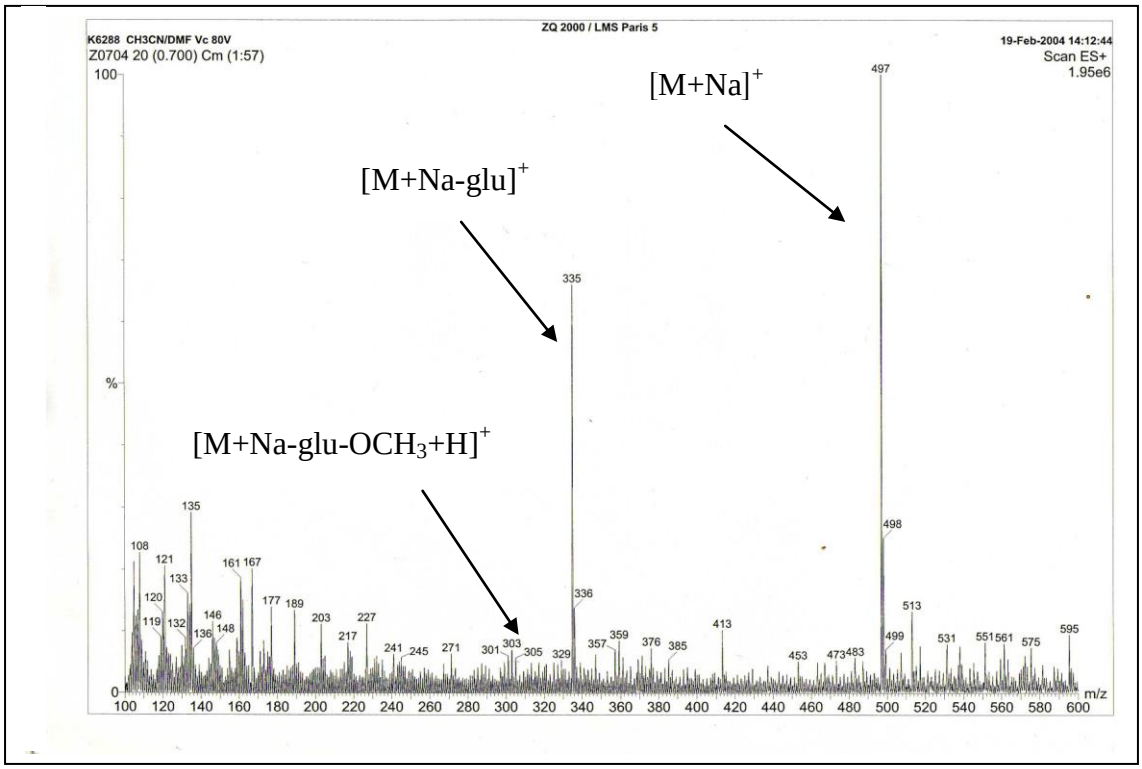
أما مطيافية الكتلة ES^+ فأعطت قيمة عظمى عند 497 ممثلة لـــ$[M+Na]^+$ بنسبة100% توافق الصيغة المجملة $C_{23}H_{22}O_{11}$، و قيمة عند 335 موافقة لـــ $[M+Na\text{-}glu]^+$ و قيمة عند 305 موافقة لـــ $[M+Na\text{-}glu\text{-}OCH_3+H]^+$ وهي قيمة مميزة للإيزوفلافونات الحاملة لمجموعة OCH_3 في الموقع $6'$ على الحلقة B [1] كما هو موضح في الشكل(5)





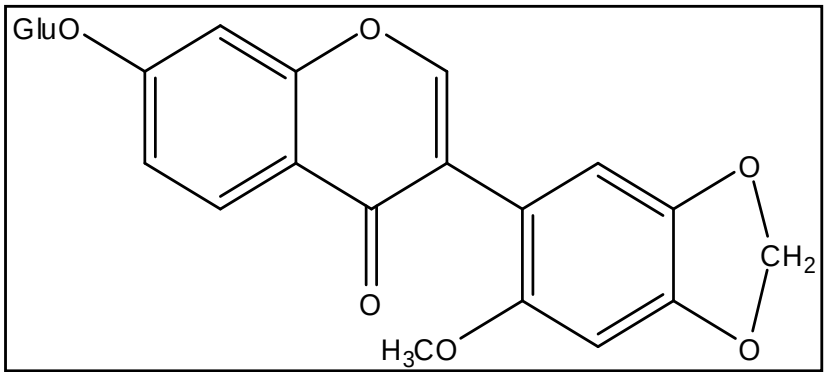


الشكل (2) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (DMSO-d_6،250MHz) للمركب F_3

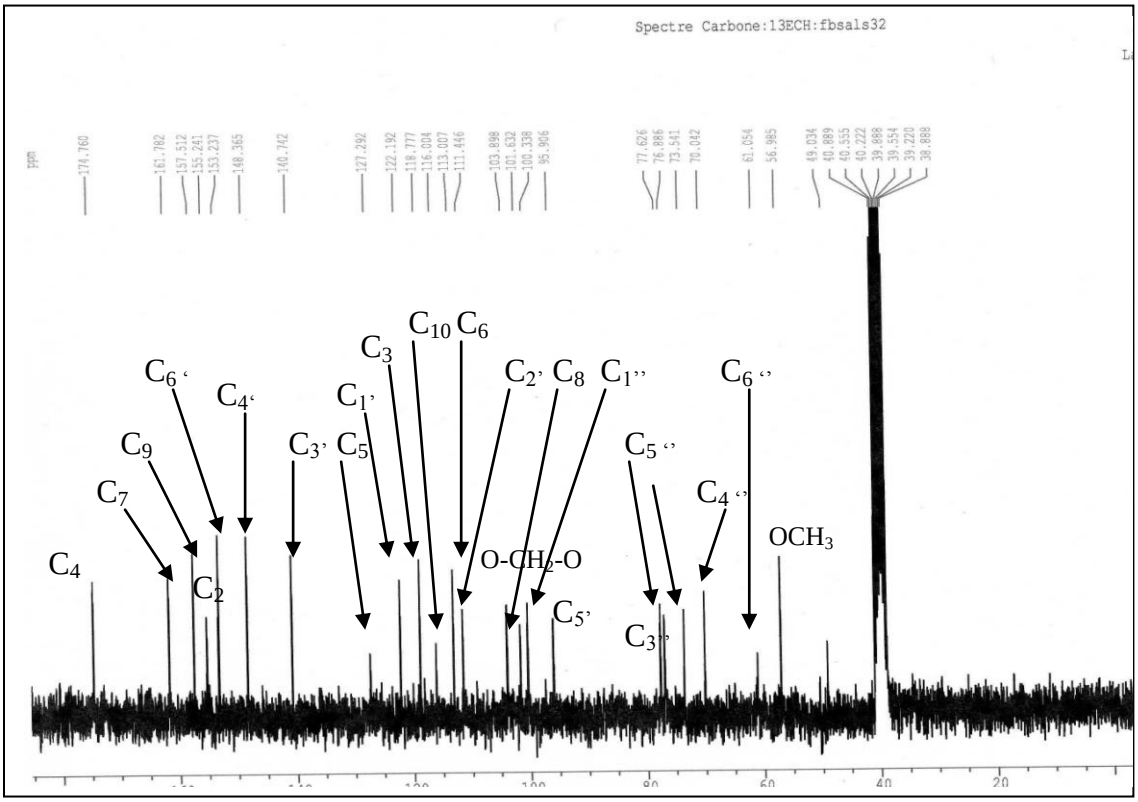


الشكل (4)طيف الكتلة (ES^+) للمركب F_3

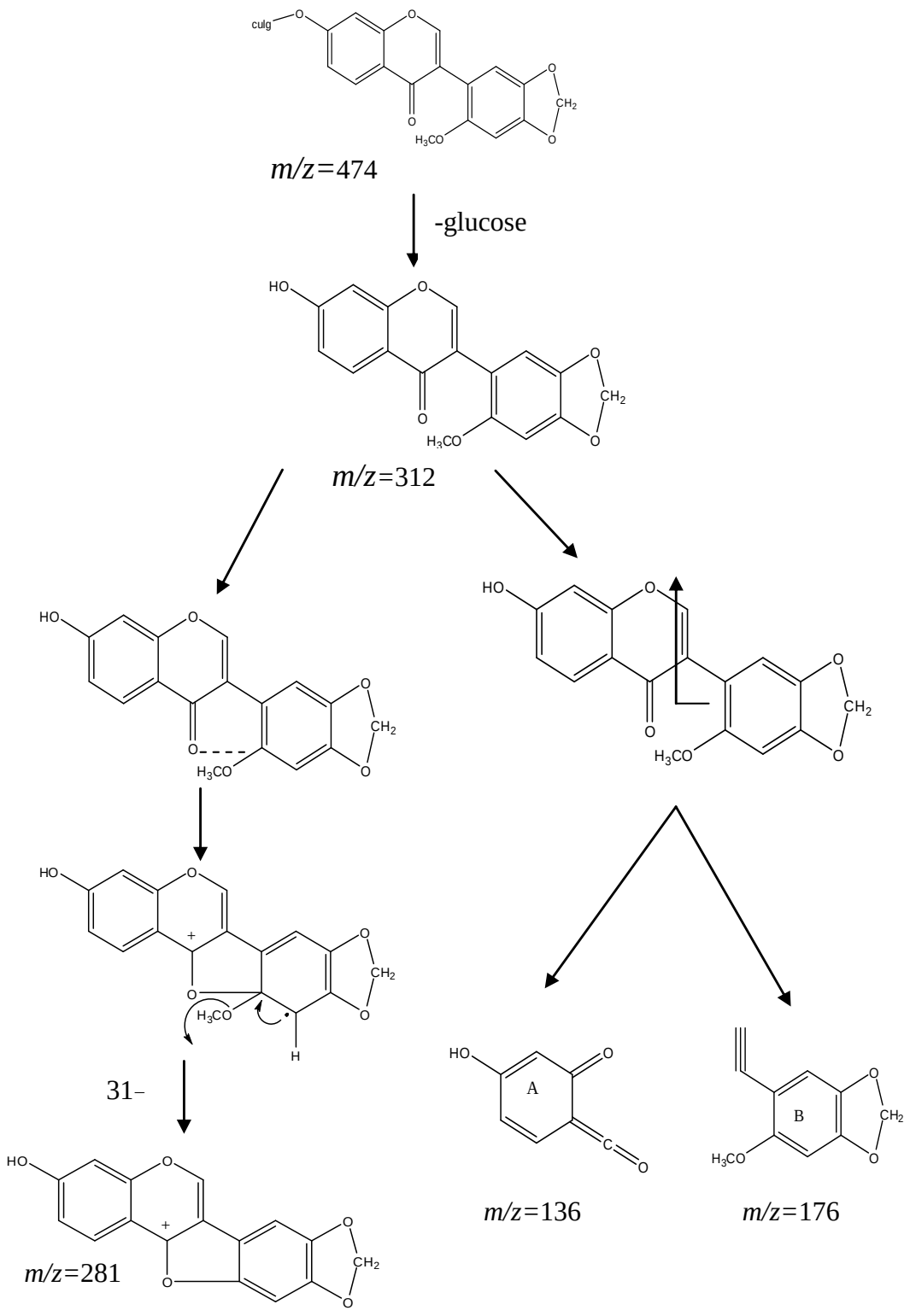
وجاءت نتائج مطيافية الرنين النووي ا لمغناطيسي للكربون **$NMR^{13}C$** كما هو موضح في الشكل(3) مؤكدة وموافقة للنتائج السابقة، ومطابقة للنتائج الببليوغرافية[2]. و عليه يمكن إقتراح صيغة المركب F_3 كالتالي:



6′-methoxypseudobaptigenin7-*O*-β-glucoside :7-hydroxy-6′-methoxy-3′,4-′ methylenedioxyisoflavone 7-*O*-β-glucoside.



الشكل (3) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون في (DMSO-d_6 250MHz) للمركب F_3



الشكل (5):ألية تشظية المركب F_3 حسب طيف ($SM\ ES^+$)

الجدول(1) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis

المفاعلات	الحزمة I	الحزمة II
MeOH	302	270
NaOAC	302	270
H_3BO_4	302	270
$AlCl_3$	302	270
$AlCl_3$+HCl	302	270

جدول(2) ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركبF_3

الهيدروجين الموافق	التعددية	التكامل	δ(ppm)
H_2	S	1H	8,25
H_5	d(J=8,9)	1H	8
H_8	d(J=2,3)	1H	7,25
H_6	dd(J=8,9-2,3)	1H	7,15
H_5’	S	1H	6,87
H_2’	S	1H	6,82
O-CH_2-O	S	2H	6,00
O-CH_3	S	1H	3.7
H_1’’	d(J=7,5)	1H	5,12

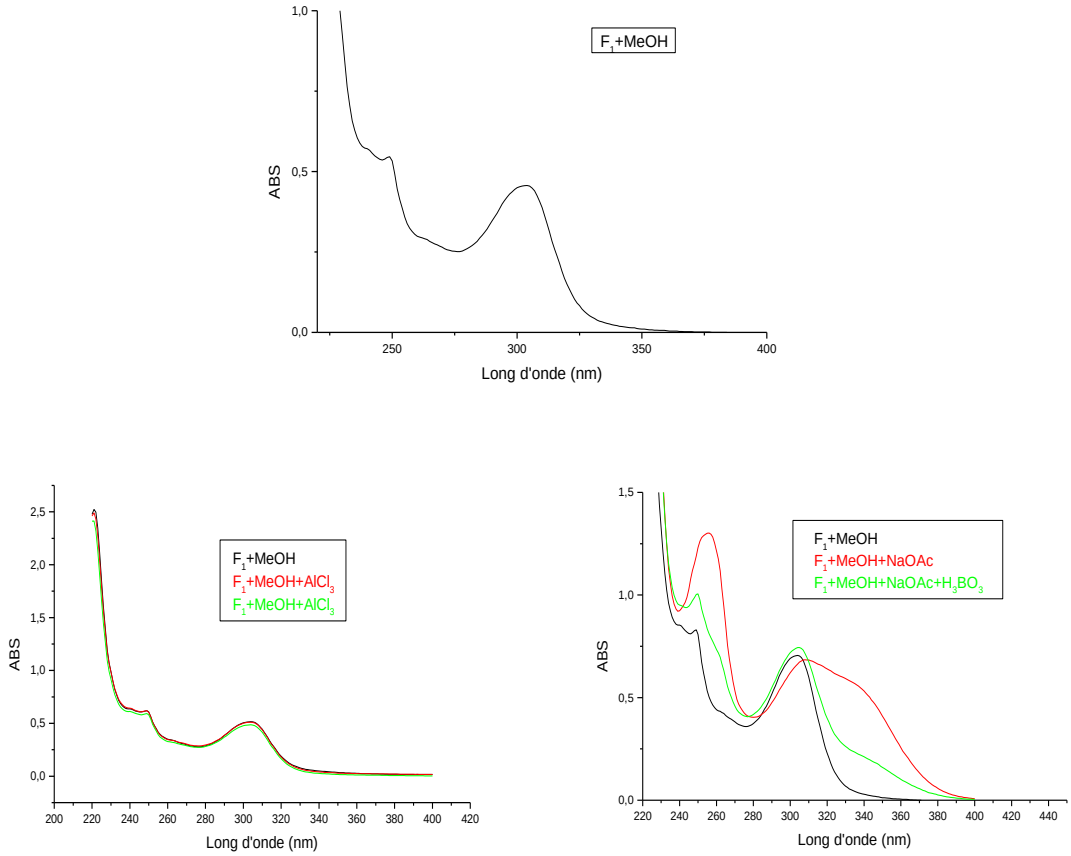
جدول(3) ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (في DMSO-d_6) للمركب F_3

الكربون الموافق	δ(ppm)	الكربون الموافق	δ(ppm)
C_2	155.24	$C_{4'}$	148.36
C_3	118.77	$C_{5'}$	95.91
C_4	174.76	$C_{6'}$	153.24
C_5	127.29	$C_{1''}$	100.34
C_6	113.00	$C_{2''}$	73.54
C_7	161.78	$C_{3''}$	77.63
C_8	103.89	$C_{4''}$	70.04
C_9	157.51	$C_{5''}$	76.88
C_{10}	116.00	$C_{6''}$	61.05
$C_{1'}$	122.19	O-CH_2-O	101.63
$C_{2'}$	111.45	O-CH_3	56.98
$C_{3'}$	140.74		

أ ــ 2 ـ التحليل البنيوي للمركب F_1

S_2 = BAW
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1
S_4 = 4:3:3

S_4	S_3	S_2	الجملة
86	10	90	**Rfx100**
أصفر			**اللون الاستشعاعي**

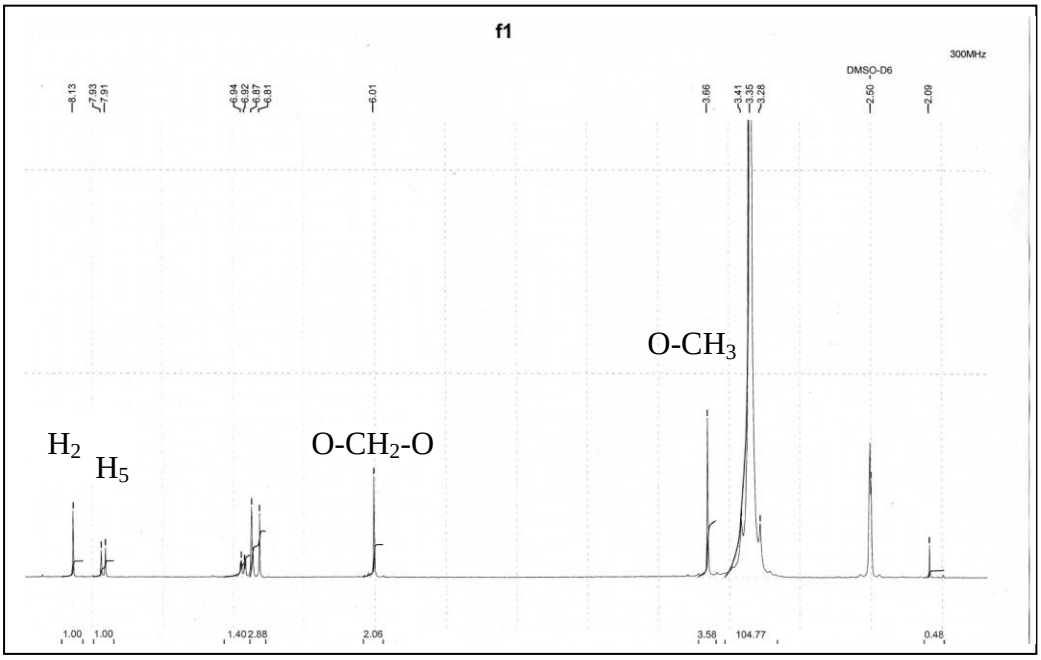


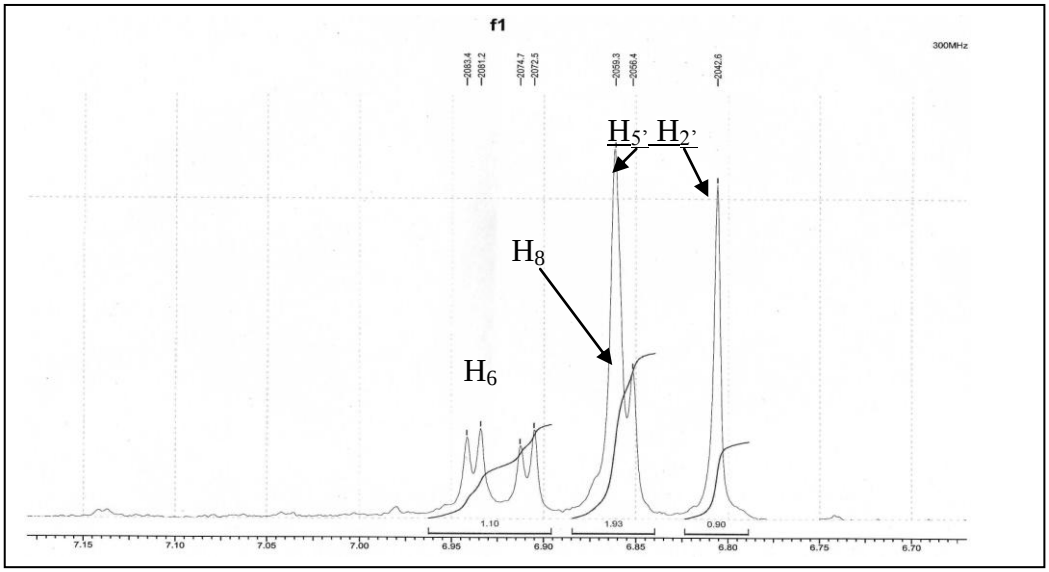
الشكل (6) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_1

طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول يكشف على كون المركب **F_3** عبارة عن إيزوفلافون .

الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** $\Delta\lambda_2$= 6 nm عند مقارنة طيف **NaOAC** بطيف **MeOH** دليل على وجود OH في الموقع 7.

غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** عند مقارنة طيف **$NaOAC+H_3BO_4$** بطيف **MeOH** دليل على غياب أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A .كما نستدل على غياب OH في الموقع 5 بغياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** عند مقارنة طيف **$AlCl_3+HCl$** بطيف **MeOH** .





الشكل (7) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب F_1 (300MHz,DMSO-d_6)

تبين لنا مطياقية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون كما هو موضح في الشكل(7) أن المركب **F_1** عبارة عن إيزوفلافون والمميز بالإشارة الأحادية عند 8.13 ppm الموافقة لـــH_2. و نلاحظ تطابق تقريبي لكل الإشارات مع المركب السابق F_3 مع غياب الإشارات الخاصة بالسكر إذ تظهر:

إشارة ثنائية (J = 8,70 Hz) عند δ = 7.9 ppm موافقة لـــ H_5.

إشارة ثنائي ثنائي (J = 8,70-2,2 Hz) عند δ = 6.9ppm موافقة لـــ H_6.

وإشارة ثنائية (J = 2.2Hz) عند δ = 6.87 ppm موافقة لـــH_8

إشارة أحادية عند δ = 6.87 ppm موافقة لـــ $H_{5'}$.

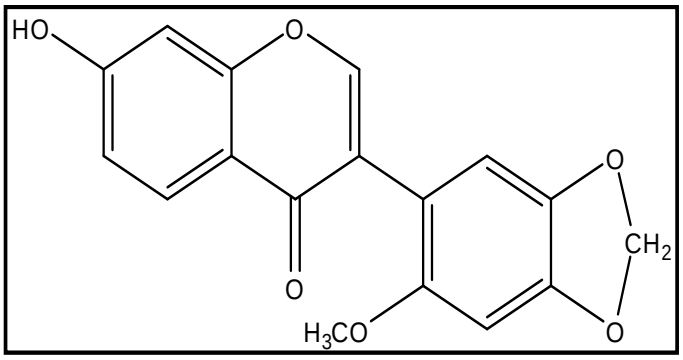
إشارة أحادية عند δ = 6.81 ppm موافقة لـــ $H_{2'}$.

إشارة أحادية ثنائية التكامل عند δ = 6.01 ppm موافقة لـــ OCH_2O.

إشارة أحادية ثلاثية التكامل عند δ = 3.66 ppm موافقة لـــ OCH_3 .

وبالتالي يمكن القول أن المركب F_1 عبارة عن أجليكون للمركب F_3 فنخلص إلى كون هذا المركب عبارة عن: 7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone.

والذي تم إكتشافه لأول مرة في النبتة *Tephrosia maxima* [1].



7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone.

الجدول(1) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis

المفاعلات	الحزمة I		الحزمة II
MeOH	303		249
NaOAc	336	308	255
H_3BO_4	305		249
$AlCl_3$	303		249
$AlCl_3$+HCl	303		249

جدول(4) ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركبF_1

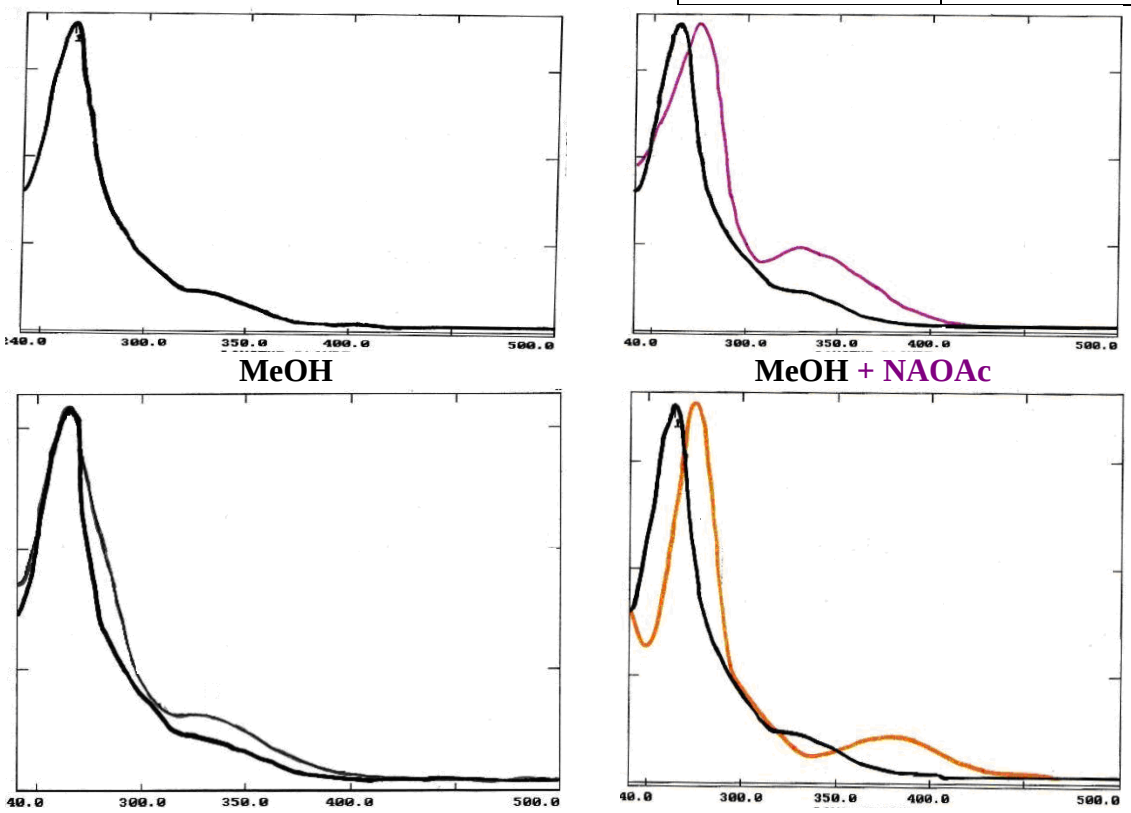
δ(ppm)	التكامل	التعددية	الهيدروجين الموافق
8,13	1H	S	H_2
7.90	1H	d(J=8,7)	H_5
6.90	1H	dd(J=8,7-2,2)	H_6
6.87	1H	d(J=2.2)	H_8
6,87	1H	S	H_5’
6,81	1H	S	H_2’
6,01	2H	S	O-CH_2-O
3.66	3H	S	O-CH_3

أ - 3 _ التحليل البنيوي للمركب F_9 :

_ السلوك الكروماتوغرافي :

S_1 = CH_3COOH (15%)
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1
S_4 = 4:3:3

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rfx100	68	32	30
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		



الشكل (7) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_9

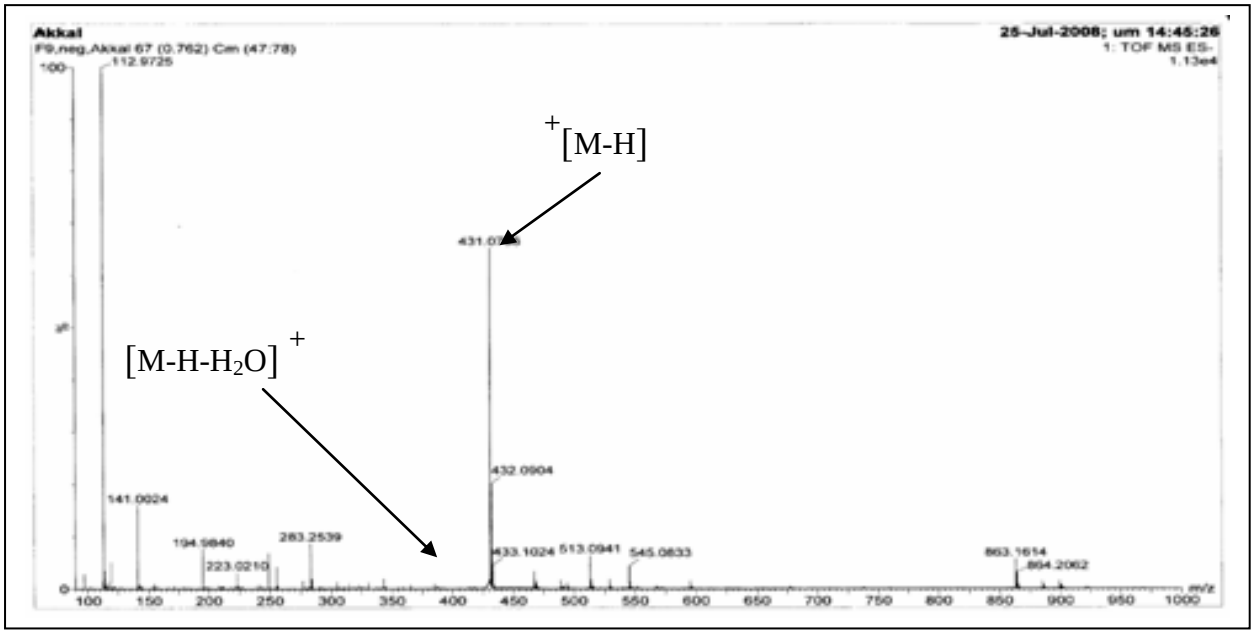
طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول يكشف على كون المركب **F_9** عبارة عن إيزوفلافون ،ويدل سلوكه الكروماتوغرافي في الأنظمة القطبية على كونه إتيروزيد أحادي السكر الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** بـ :

$\Delta\lambda_2$=11nm عند مقارنة طيف MeOH بطيف NaOAc دليل على وجود OH في الموقع 7.

$\Delta\lambda_2$=13nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH إشارة لوجود OH في الموقع 5 .

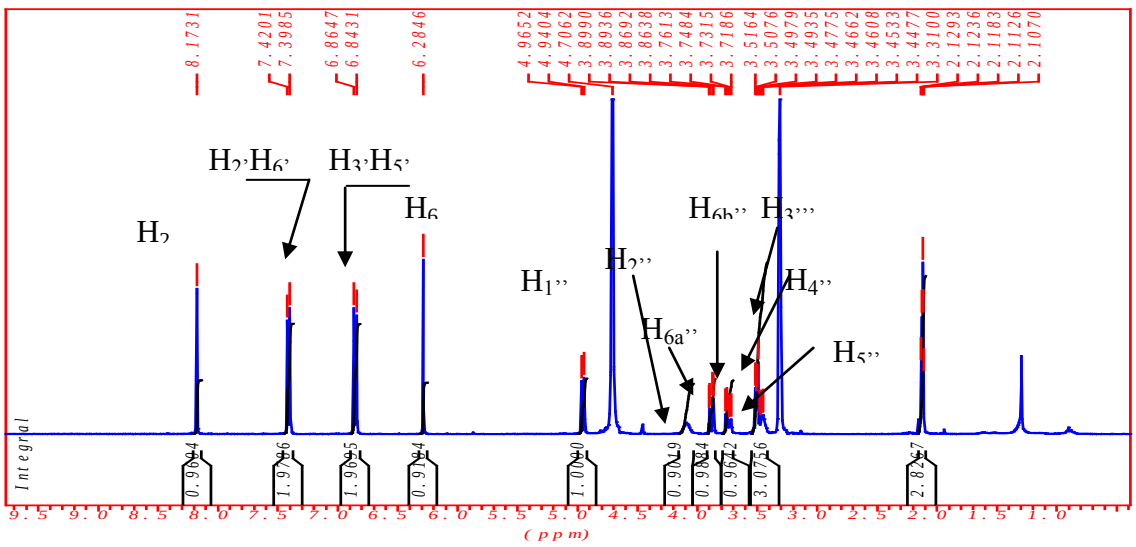
والذي تؤكده الإشارة الأحادية عند 13.2 ppm بإعادة تسجيل طيف RMN ^1H في DMSO.

غياب أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A تترجمه الإزاحة الباتوكرومية الضعيفة $\Delta\lambda_2$=2nm عند مقارنة طيف MeOH بطيف NaOAc +H_3BO_3 .



الشكل (8) طيف الكتلة (ES⁻) للمركب F_9

أعطت مطيافية الكتلة قيمة للأيون الجزيئي عند $m/z=$ 432 موافقة للصيغة المجملة $C_{21}H_{20}O_{10}$ وكذا القيمة $m/z=$ 431 الموافقة لـــ $[M-H]^+$ و بالتالي يتأكد وجود السكر ولك ن عدم تأثر المركب بالإماهة الحمضية يؤكد الإرتباط C-glycose، أما الظهور الضعيف للإشارة $m/z=$ 413 الموافقة لفقدان الماء $[M-H-H_2O]^+$ يعزز إحتمال إرتباطه بـــ C-8 [3].



الشكل (9) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب F_9 في (DC_3OD,400MHz).

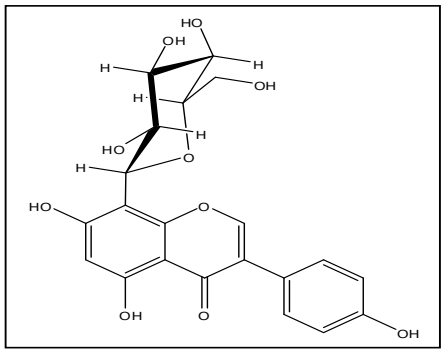
فمطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تظهر إشارة أحادية عند 8.17 ppm وإشارة ثنائية عند 4.95ppm بثابت تزاوج $J=9.9Hz$ موافقة لـــ H_2 , $H_{1''}$ على التوالي مميزة لإيزوفلافون مستبدل β -C-glucoside ، من خلال HMBC كلا البروتونين يظهران تعالقا مع C_9 عند 157ppm كما يظهر $H_{1''}$ تعالق ب C_7 عند 164ppm وكذا بـــ C_8عند 105ppmوبالتالي يتأكد إستبدال الإيزوفلافون في الموقع 8 بـC-glucose ، في حين يتعالق البروتون H_6 الذي يظهر على شكل أحادي عند 6.28ppm بـ C_{10} عند 105.9ppmو بـــC_5 عند 163ppm وكذا بـــ C_7 .

وفيما يخص الحلقة C، فيظهر البروتون H_2 تعالقا بـــ C_4 عند 181.6ppm وبـــC_3 عند 121ppmوبـ $C_{1'}$ عند 122ppm.

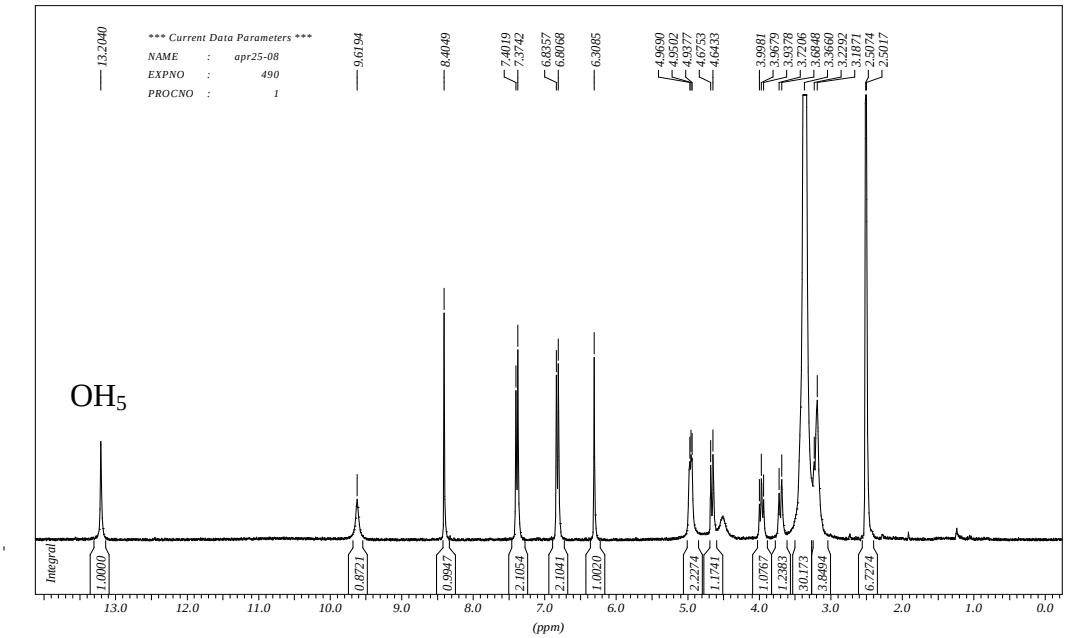
أما الحلقة B فيظهر البروتونين $H_{2'}H_{6'}$ تعلقا بالكربونين الحاملين لهما عند 130.5ppm كما يظهران تعالقا بـــ$C_{1'}$ وبـــ$C_{4'}$ عند 158 ppm

كما يتعالق البروتونين $H_{3'}H_{5'}$ بالكربونين الحاملين لهما عند 115.5ppm وبـــ $C_{4'}$ وكذا $C_{1'}$.

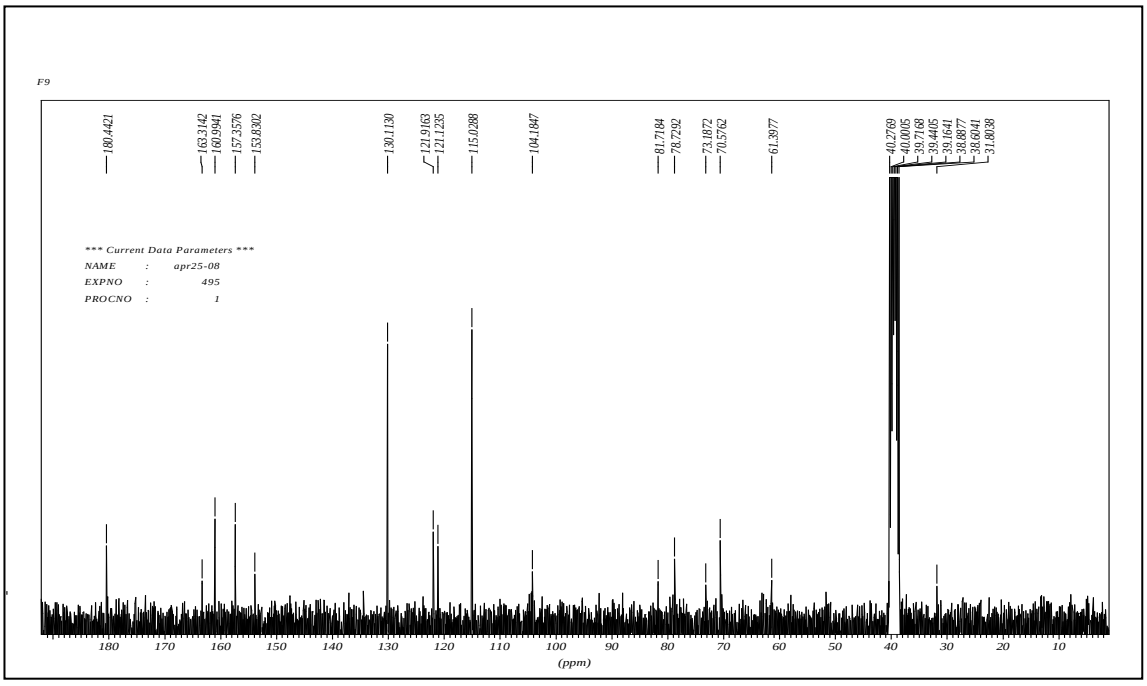
وبالتالي تقود معطيات ^{13}C RMN ,^{1}H RMN جدول وتعالقات Cosy H-H ,(HMQC,HMBC) في الجدولين (7,6) على التوالي إلى إستنتاج البنية النهائية للمركب F_9 على أنها :



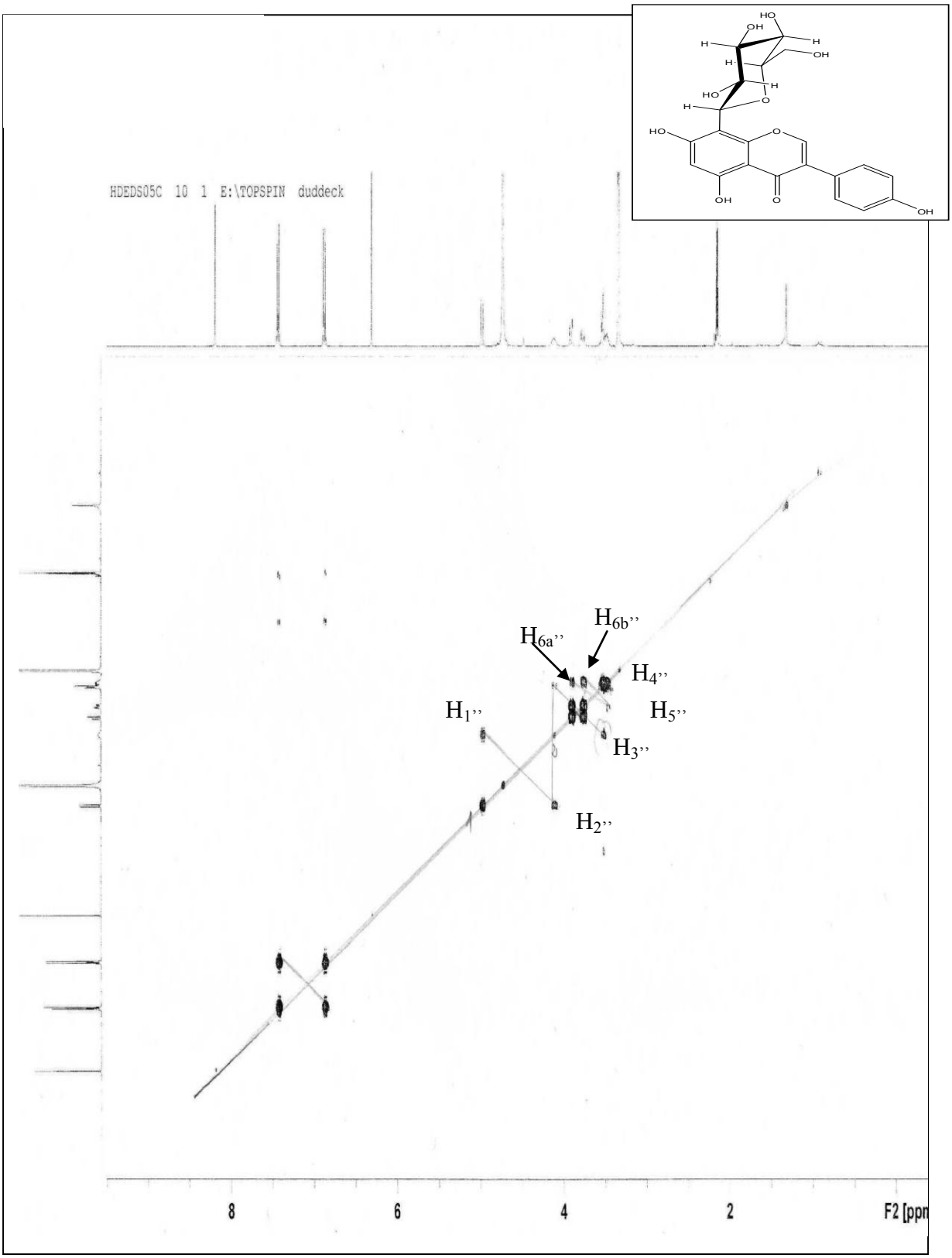
5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-C-glucoside



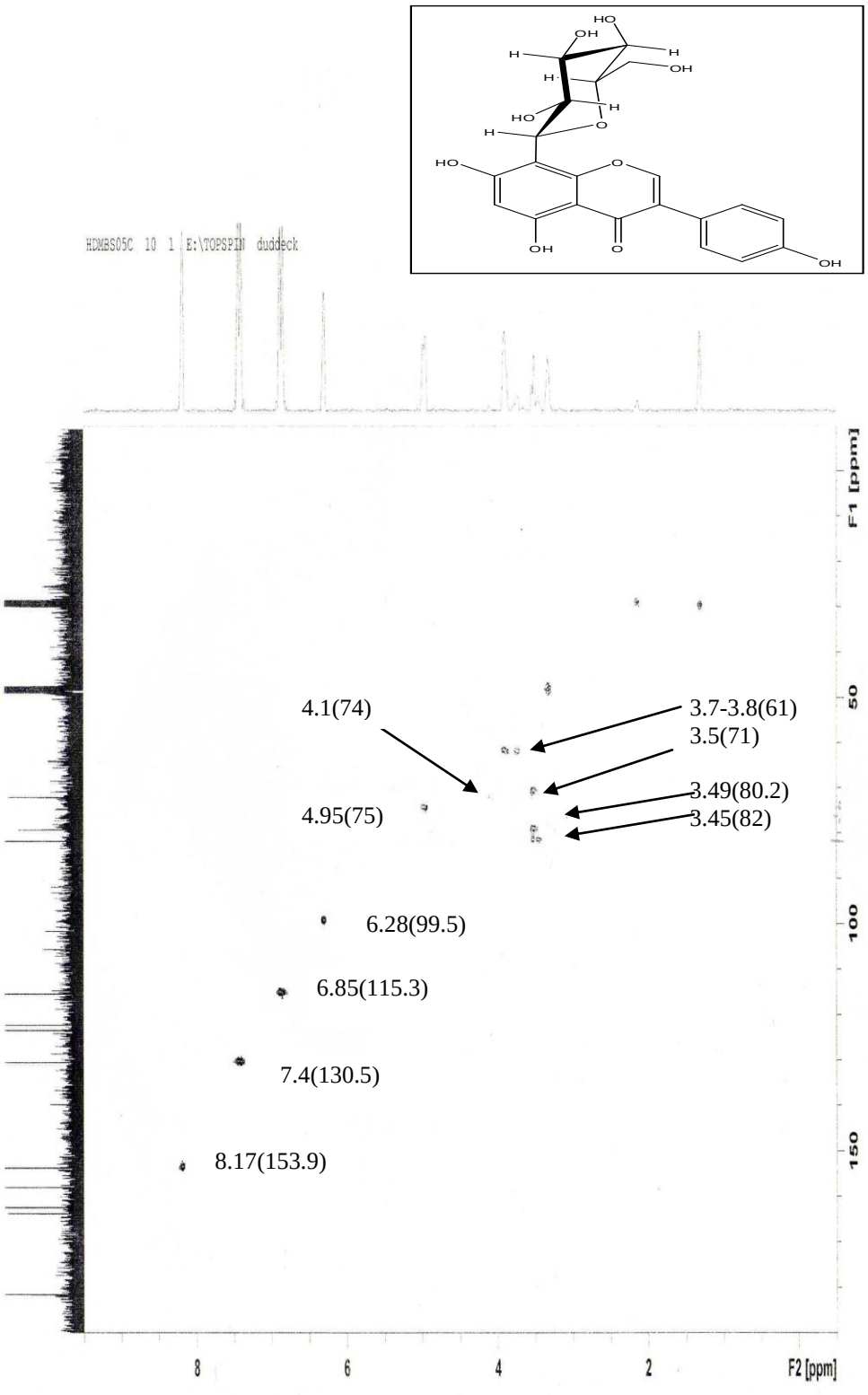
الشكل (10) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب F_9 **في (DMSO).**



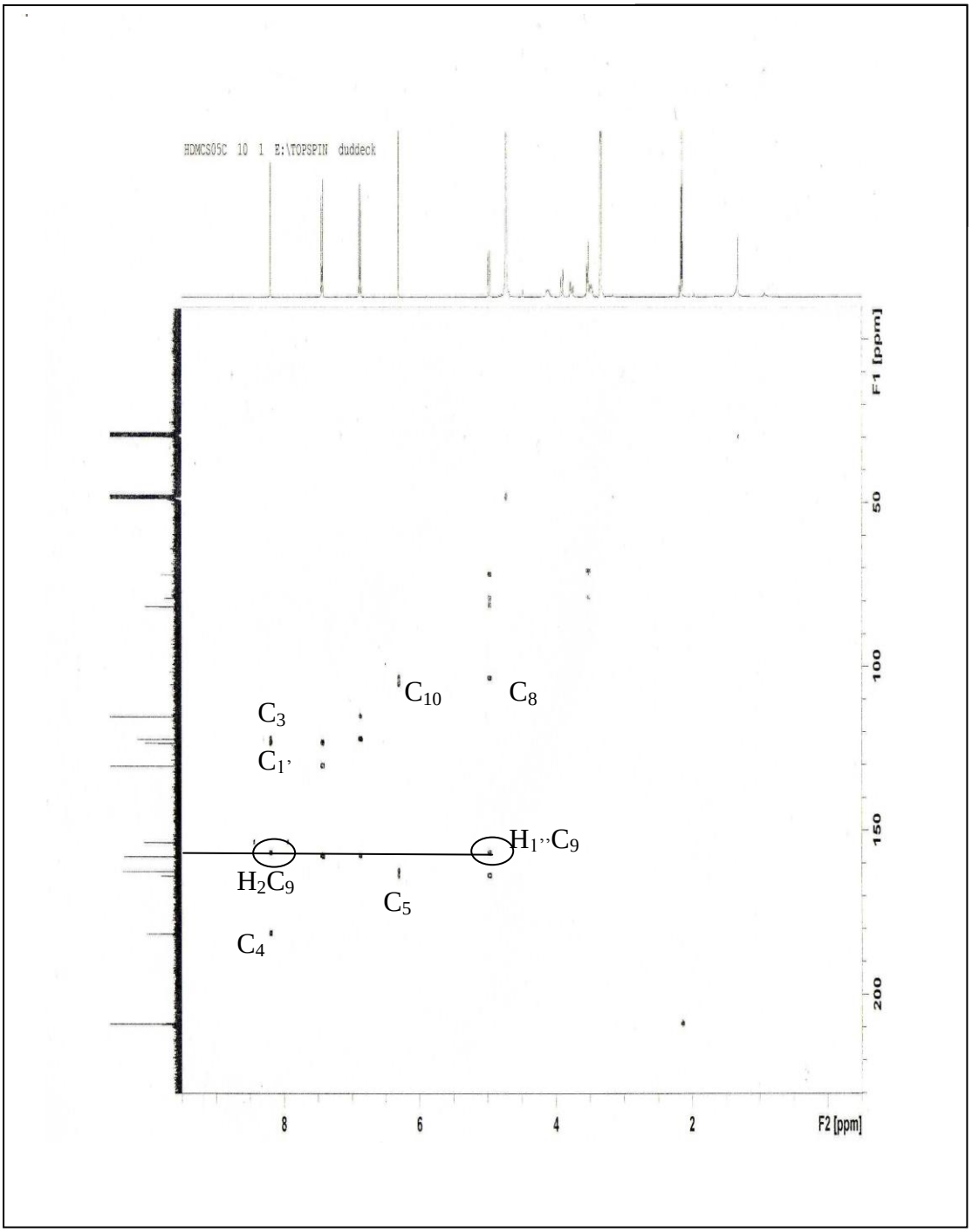
الشكل (11) : **مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب F_9 في (300MHz,DMSO)**



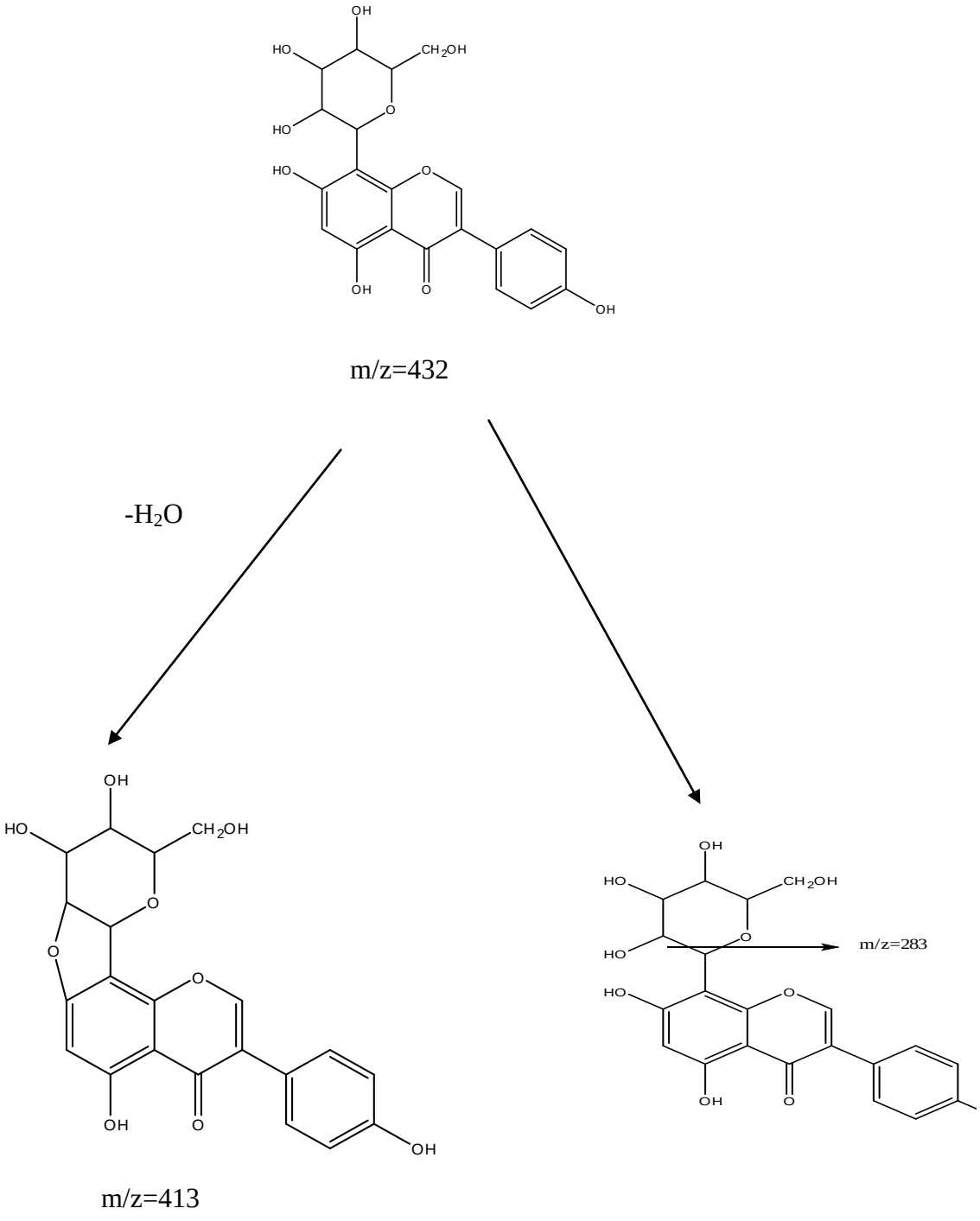
الشكل (12) **طيف (cosy) للمركب** F_9



الشكل (14) طيف(**HMQC**) للمركب **F_9**



الشكل (15) طيف(HMBC) للمركب F_9



الشكل(16) أهم شظايا المركب F_9

الجدول(5) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

المفاعلات	الحزمة I	الرتوء	الحزمة II
MeOH		331	262
$AlCl_3$		311,378.6	272.8
$AlCl_3$+HCl		311,378.8	275
NaOAc		333	273
$NaOAC+H_3BO_3$		332.8	264

الجدول(6) تعالقات Cosy H-H (CD_3OD 400 MHz) **للمركب** F_9

proton	δ(ppm)	Signal *J*(Hz)	**Cosy**
2	8.17	s	2
2',6'	7.41	d(8.6)	2',6',3',5'
3',5'	6.85	d(8.6)	2',6',3',5'
6	6.28	s	6
1''	4.95	d(9.9)	1'',2''
2''	4.1	m	1'',2'',3''
3''	3.50	m	2'',3'',4 ''
4''	3.49	m	3'',4 '',5''
5''	3.45	m	4'',5'',6''a
6''a	3.88	dd(11.9,2.2)	5'', 6''a,6''b
6''b	3.74	dd(11.9,5.16)	5'', 6''a,6''b

الجدول(7) تعالقات HMQC,HMBC (CD_3OD 400 MHz) **للمركب** F_9 **مع الإزاحة الكيميائية الموافقة لكل كربون** δ(ppm)

proton	**HMBC**	**HMQC**
2	C_3(122), C_4(181.6), C_9(-)	C_2(153.9)
2',6'	$C_{1'}$(121), $C_{4'}$(158),	$C_{2'}C_{6'}$(130.5)
3',5'	$C_{4'}$, $C_{1'}$	$C_{3'}C_{5'}$(115.3)
6	C_5(163), C_7(164), C_8(105), C_{10}(105.9)	C_6(99.5)
1''	C_8, C_7, C_9, $C_{2''}$, $C_{3''}$	$C_{1''}$ (75)
2''	-	$C_{2''}$(74)
3''	$C_{1''}$, $C_{5''}$	$C_{3''}$(71)
4''	$C_{1''}$, $C_{5''}$	$C_{4''}$(80. 2)
5''	-	$C_{5''}$(82)
6''		$C_{6''}$(61)

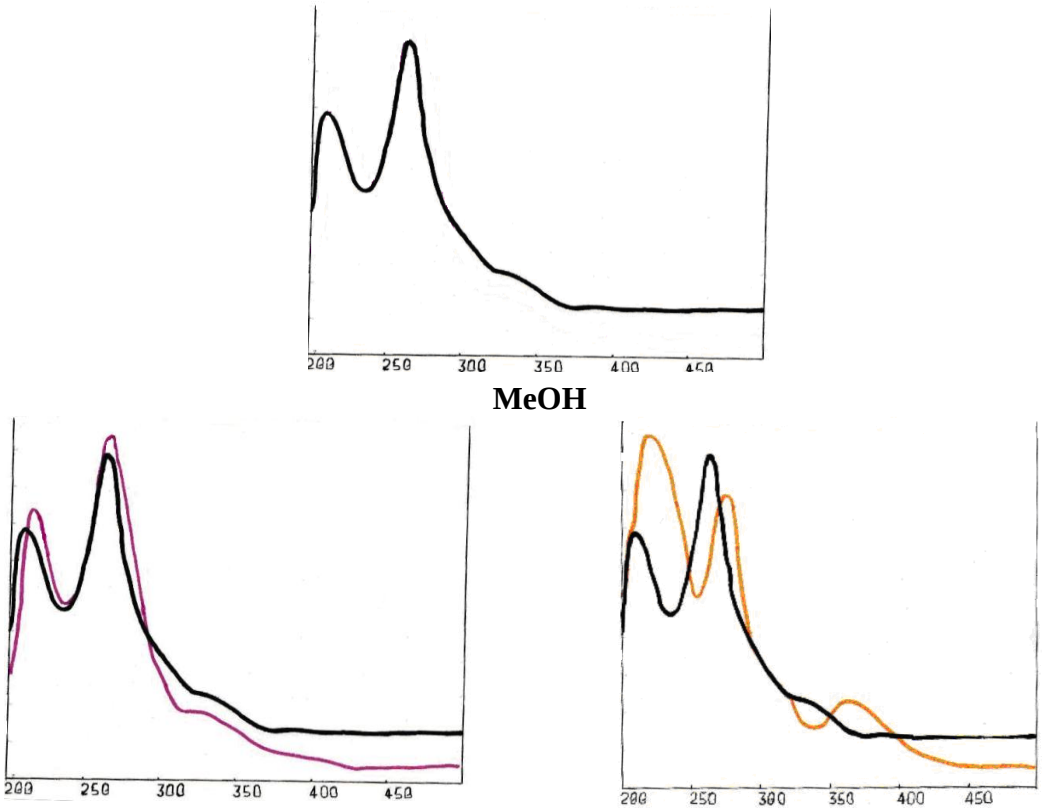
أ- 4 ـ التحليل البنيوي للمركب $F_{10}G$:

السلوك الكروماتوغرافي :

$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
S_2 = BAW
S_3 = 13 : 3 : 3 : 1

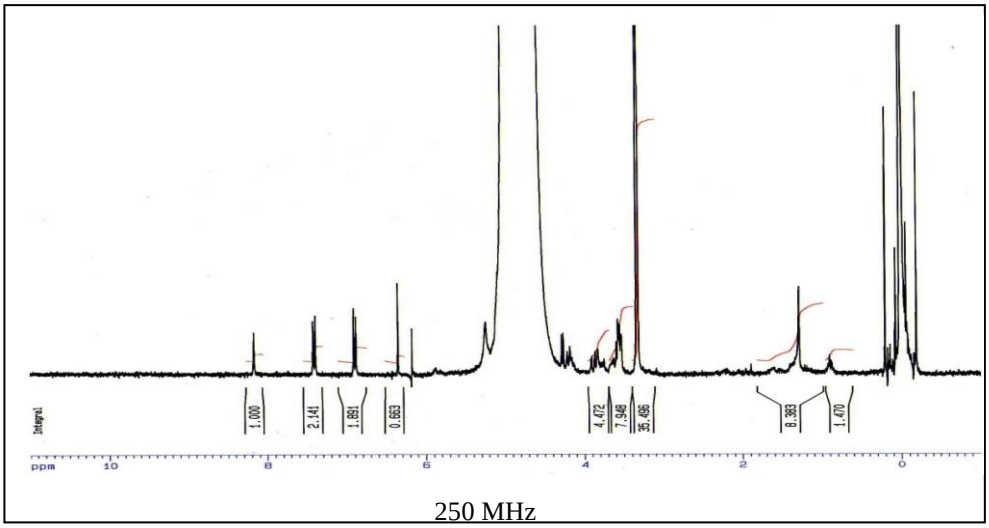
الجملة	S_1	S_2	S_3
Rf	68	54	64
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

تدل قيمة Rf في الأنظمة القطبية أن المركب $F_{10}G$ أكثر قطبية من F_9 وهذا يعني إحتمال وجود سكر إضافي .

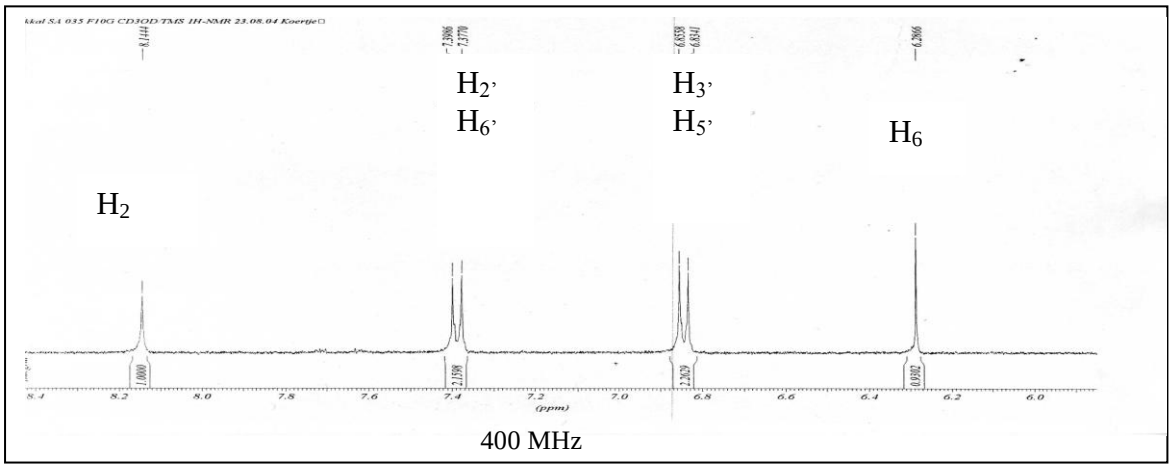


الشكل (16) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب F_9

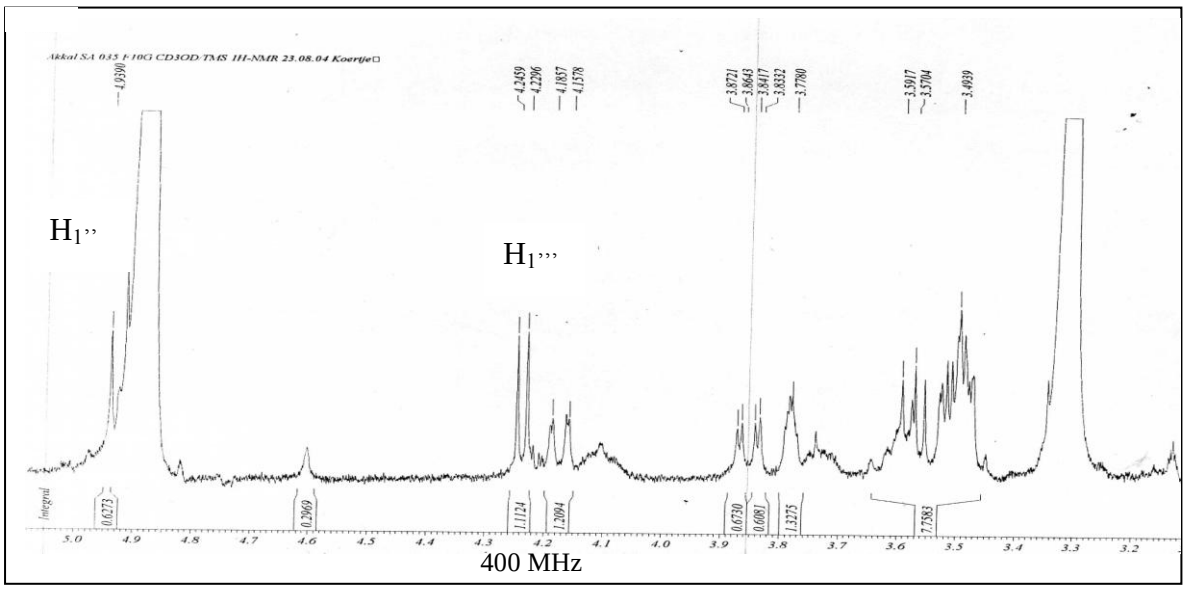
من خلال طيف الأشعة فوق البنفسجية المسجل في الميثانول يتبين كون المركب $F_{10}G$ عبارة عن إيزوفلافون . غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** عند مقارنة طيف NaOAc بطيف MeOH دليل على غياب OH في الموقع 7 ونستدل على وجود OH في الموقع 5 بالإزاحة الباتوكرومية للحزمة **II** $\Delta\lambda_2$=11nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$ +HCl بطيف MeOH .



250 MHz



400 MHz

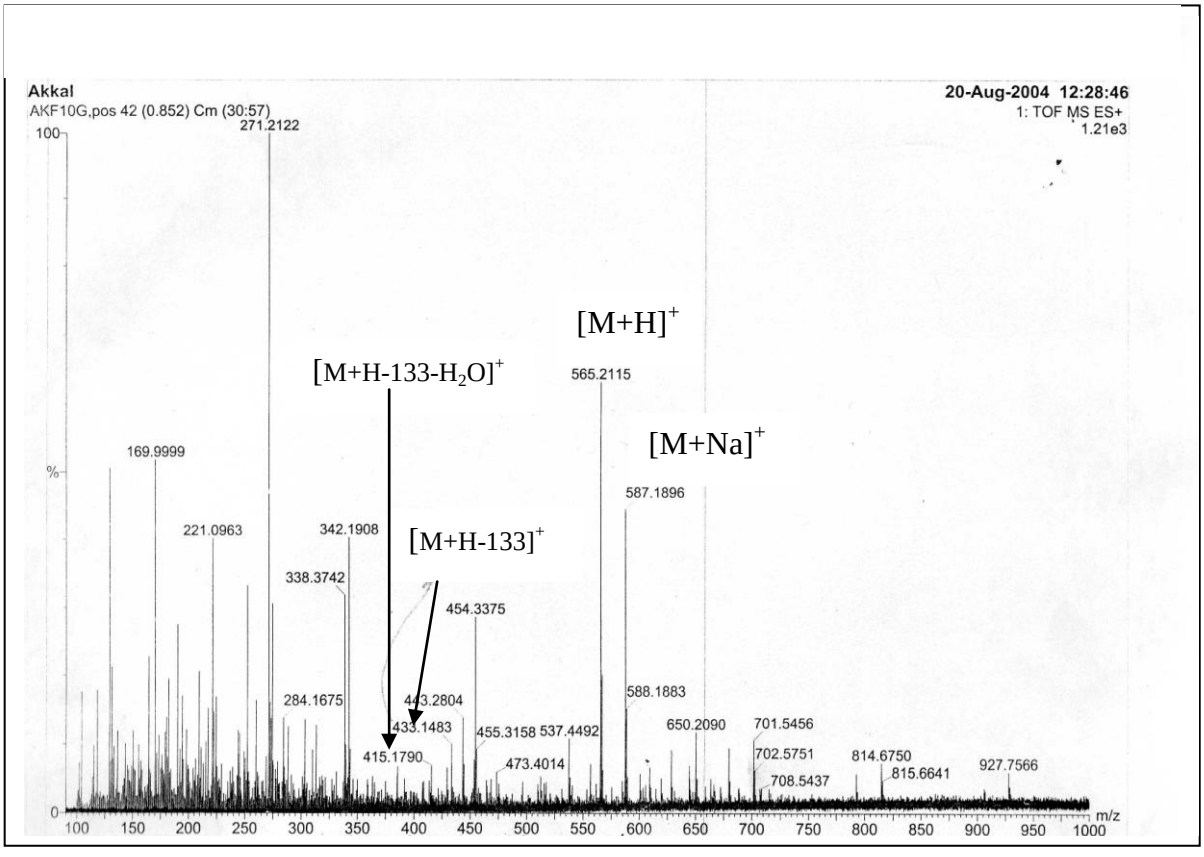


400 MHz

الشكل(17) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $F_{10}G$

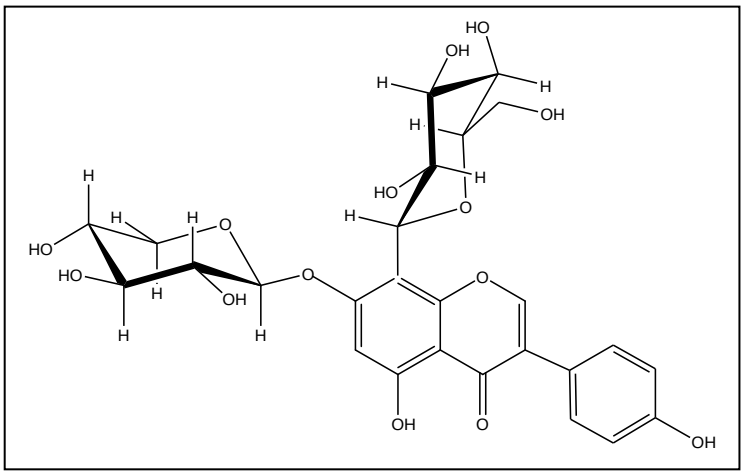
عند مقارنة طيف ^{1}H NMR للمركب $F_{10}G$ بـــ F_9 نلاحظ تطابق كل الإشارات. مع وجود أخرى إضافية في المجال [4.3-3.5ppm] هذا إن دل على شيء إنما يدل على وجود سكر ثاني، يكون قد حددت مطيافة الأشعة فوق البنفسجية موضعه ، بغياب OH في الموقع 7 . وللتعرف على طبيعته لجأنا إلى الإماهة الحمضية التي حررته بسهولة بحكم ارتباطه ب C-O R وبمقارنته كروماتوغرافيا بالسكريات المعروفة يتأكد كونه Xylose. أما الشق العضوي الناتج عن هذا المركب بعد الإماهة الحمضية، فيتطابق كروماتوغرافيا مع المركب F_9 .

جاءت مطيافية الكتلة ES^+ (MS) لتؤكد النتائج السابقة، إذتعطي القيمة m/z=587 موافقة لـ $[M+Na]^+$ و m/z= 565 موافقة لـ $[M+H]^+$ والتي تؤكد الصيغة المجملة $C_{26}H_{28}O_{14}$ ،أما الشضية m/z=433 فتؤكد نوعية السكر فهي موافقة لـ $[M-133(Xylose)+H]^+$



الشكل **(18)طيف الكتلة (ES^+) للمركب** $F_{10}G$

ومن خلال ما توصلنا إليه من نتائج و مقارنتها مع الببلوغرافيا [4] يمكن التعرف على بنية المركب $F_{10}G$ على أنه:



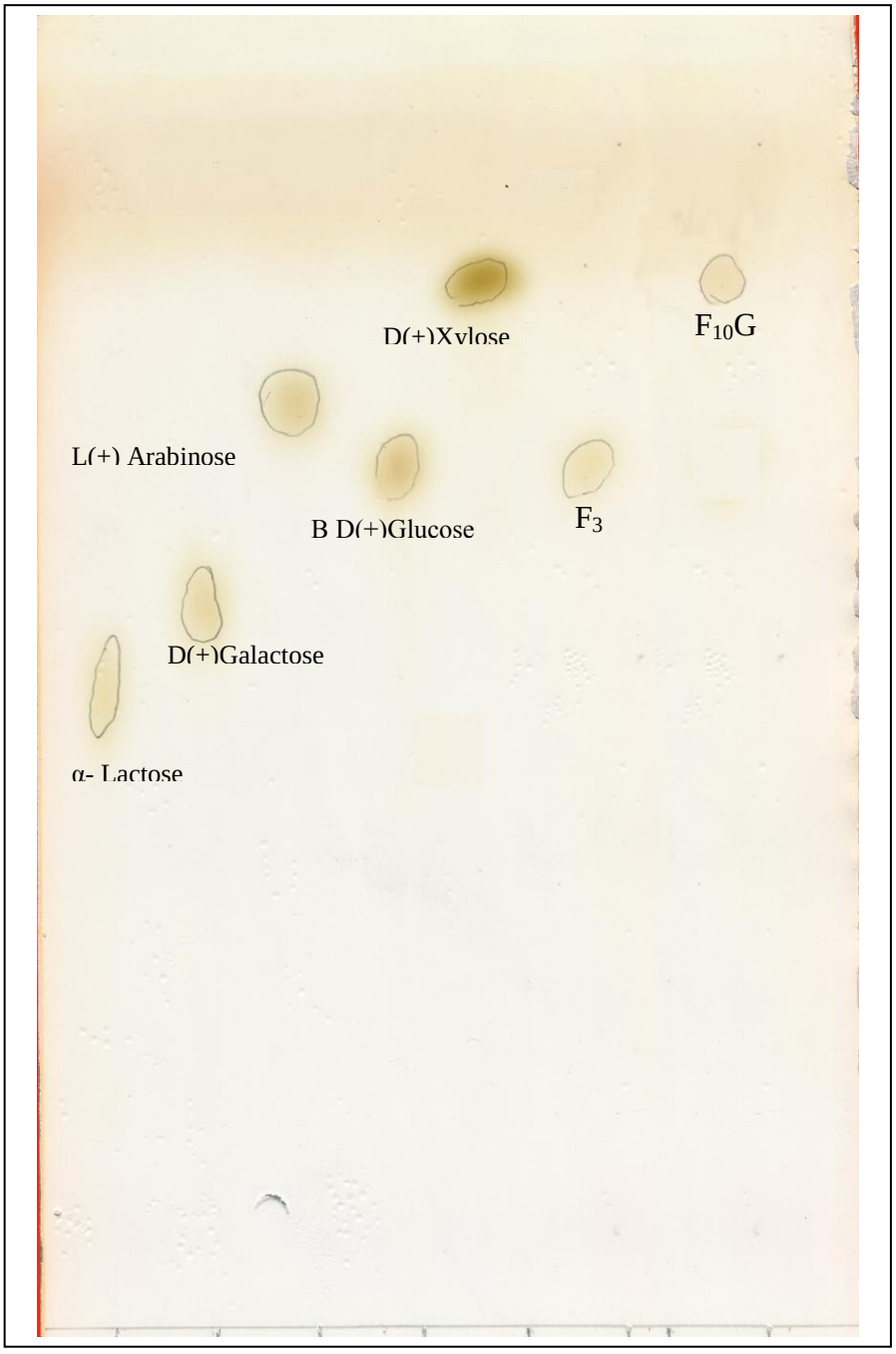
genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside

الجدول(8) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

المفاعلات	الحزمة I	النتوء	الحزمة II
MeOH		324	263
$AlCl_3$		307	273
$AlCl_3$+HCl		364،307	274
NaOAc		327	263

جدول(9)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $F_{10}G$:

δ(ppm)	التكامل	التعددية Hz	الهيدروجين الموافق
8,2	1H	S	H_2
7.40	2H	d(*J*=8,6)	$H_{2'}$ $H_{6'}$
6.85	2H	d (*J*=8,6)	H_3' H_5'
6.28	1H	S	H_6
4.9	1H	d (*J*=9.9)	$H_{1''}$(glucose)
4.2	1H	d (*J*=6.6)	$H_{1'''}$(Xylose)
3.4-4.16	11H	-	بروتونات Xylose+glucose



الشكل (19) : كروماتوغرام يبين السكريات الناتجة عن الإماهة الحمضية مع بعض الشواهد المعروفة.

IV_ ب _ التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من النبتة *Ammoides atlantica* :

إستطعنا خلال دراسة مستخلص الأسيتات لهذه النبة من فصل وتحديد أربع مركبات فلافونيدية ،وهي مركبات أعظمية في الطور البيوتانولي ، لذا لم نجد جدوى من فصل مركباته .وهذا دليل على مدى فقر هذ ه النبتة لمثل هذا النوع من مركبات الأيض الثانوي .وقد إستعنا بالسلوك الكروماتوغرافي وكذا المعطيات الطيفية (UV) و NMR^1H و $NMR^{13}C$. Ms لتحديد بنى هذه المركبات .

ب - 1 _ التحليل البنيوي للمركب AF_6 :

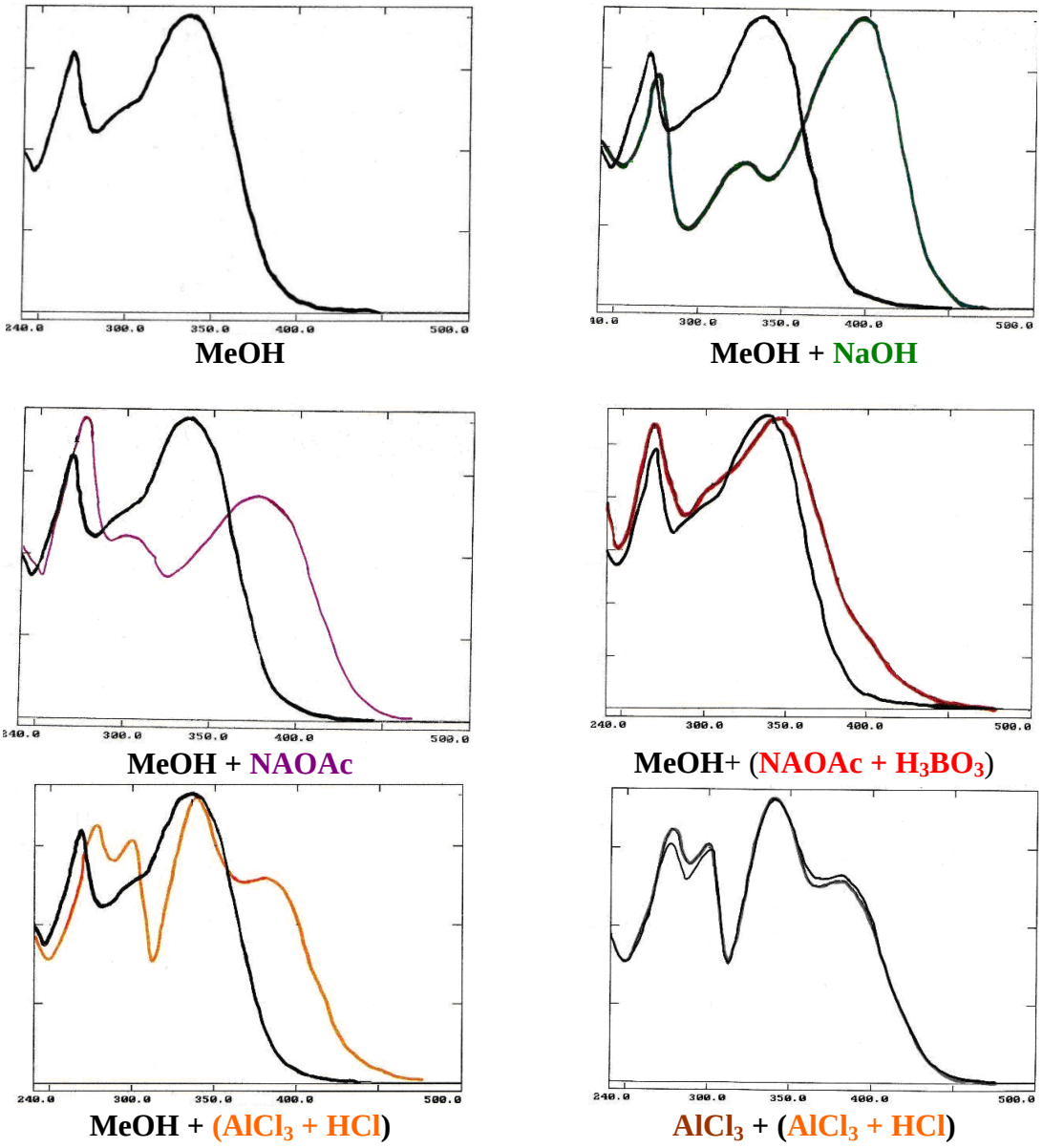
السلوك الكروماتوغرافي :

$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
$S_3 = 13 : 3 : 3 : 1$
$S_4 = 4:3:3$

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rfx100	7.8	1. 7	65.7
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

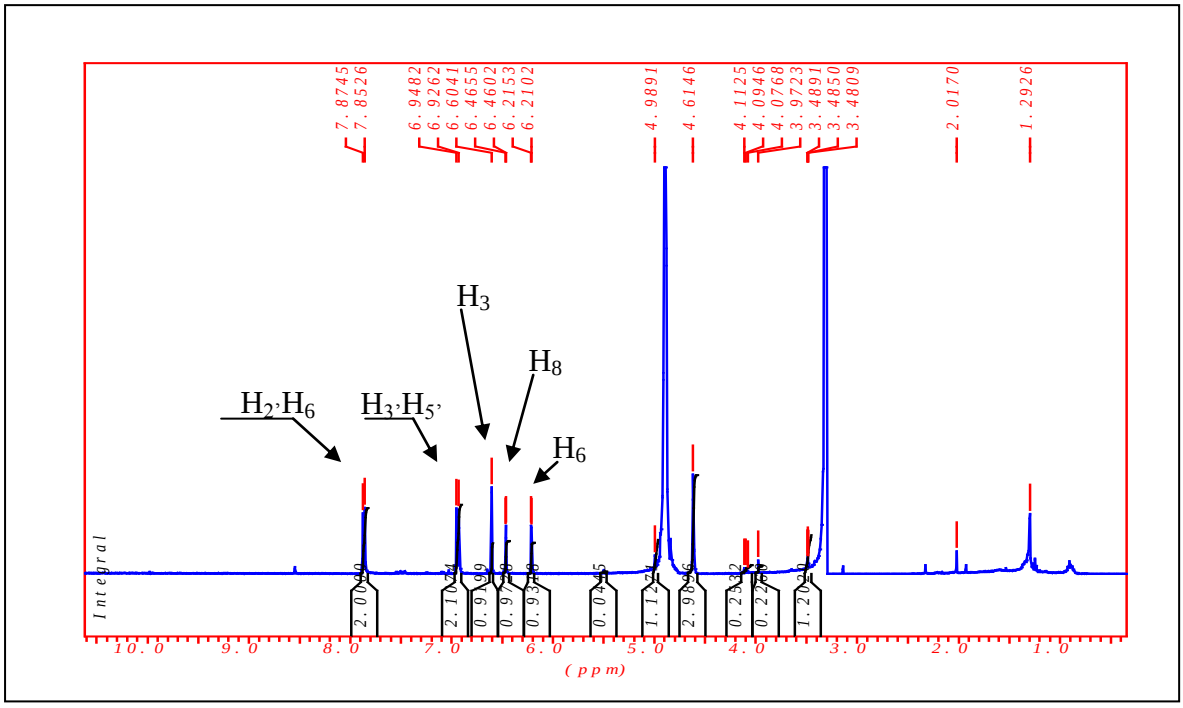
يدل طيف إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية و المرئية المسجلة في الميثانول على كون هذا المركب عبارة عن فلافونويد. والسلوك الكروماتوغرافي يشير إلى كونه أجليكونا.

أما اللون البنفسجي وطول العصابة λ_1 =336nm تشير إلى كون المركب **AF_6** عبارة عن فلافون أي غياب OH في الموضع 3.



الشكل (21) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب AF_6

الإزاحة الباتوكرومية للحزمةI $\Delta\lambda_1$ = 63nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع إستقرار الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموضع 4'، مع ظهور نتوء جديد عند 325nm يدل على وجود OH في الموضع 7 والذي يتأكد بالإزاحة الباتوكرومية للعصابة II. بمقدار $\Delta\lambda_{II}$ = 6 nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOAC. غياب الإزاحة الهبسوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف $AlCl_3$ بـ $AlCl_3$+HCl دليل على غياب أرثو ثنائي هيدروكسيل الحلقة B. أما الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ = 45nm الناتجة عن المقارنة الطيفية لـ $AlCl_3$+HCl بـ MeOH دليل على وجود OH في الموضع 5 .



الشكل (22) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_6 في (DC_3OD,400MHz).

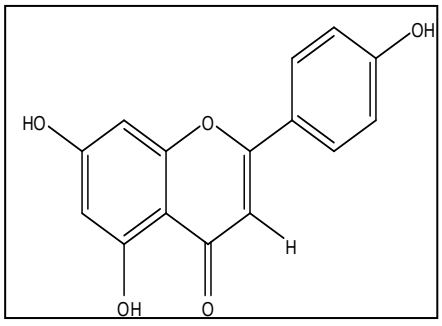
وتأتي مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون لتؤكد النتائج السابقة حيث تظهر :

إشارة ثنائية (J=8.8 Hz) عند δ =7.86 ppm موافقة لــ $H_{2'}H_{6'}$.

والأخرى بنفس ثابت التزاوج عند δ = 6.93 ppm موافقة لــ $H_{3'}H_{5'}$

وإشارةأحادية عند δ = 6.60 ppm موافقة لــ H_3. وإشارتين ثنائيتين عند 6.46 ppm و 6.21 ppm بثابت تزاوج (J=2.1 Hz) موافقتين لــ H_8 و H_6 على الترتيب .

كما نلاحظ إختفاء البروتونات الخاصة بالسكر وبالتالي يمكن الخلاص إلى الصيغة التالية. 5 ,7,4'Trihydroxy flavone .



(Apigénine)

الجدول(11) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية (UV-Vis)للمركبAF_6

المفاعلات	الحزمة I			الحزمة II
MeOH	336			269
NaOH	399		325	275
$AlCl_3$	381	341	301	276
$AlCl_3$+HCl	381	339	300	277
NaOAc	371		301	275
NaOAc+H_3BO_3	341			269

جدول(12)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_6 في (DC_3OD).

الهيدروجين الموافق	التعددية Hz	التكامل	δ(ppm)
$H_{2'}$ $H_{6'}$	d(*J*=8.8)	2H	7.86
H_3' H_5'	d (*J*=8.8)	2H	6.93
H_3	S	1H	6.6
H_8	d (*J*=2.1)	1H	6.46
H_6	d (*J*=2.1)	1H	6.21

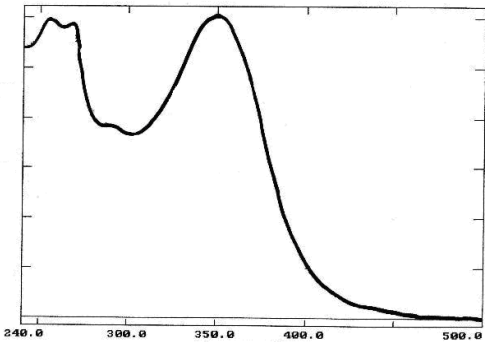
ب ـ 2 ـ التحليل البنيوي للمركب AF_7 :

السلوك الكروماتوغرافي :

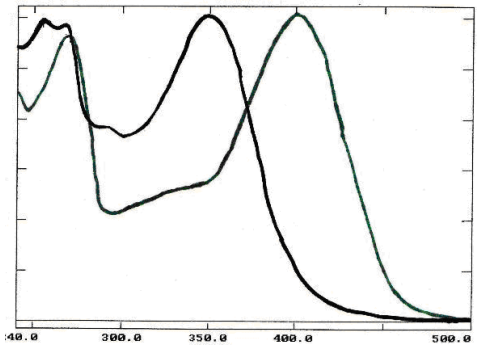
$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
$S_3 = 13 : 3 : 3 : 1$
$S_4 = 4:3:3$

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rf X100	4.7	2. 3	26.4
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

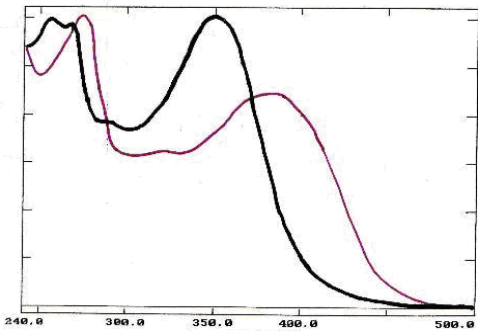
بالنظر إلى طيف إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية و المرئية المسجلة في الميثانول يمكن تصنيف هذا المركب ضمن الفلافونيدات، و يدل سلوكه الكروماتوغرافي على كونه أجليكونا، أما لونه البنفسجي وطول العصابة I λ_1=351nm فيشيران إلى كونه فلافون أي غياب OH في الموقع 3.



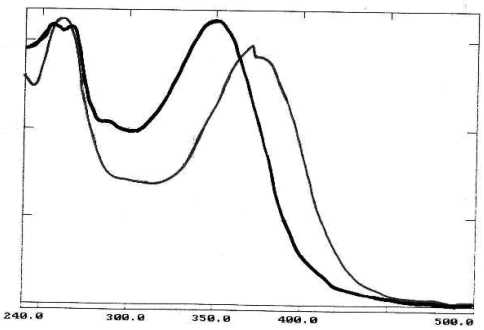
MeOH



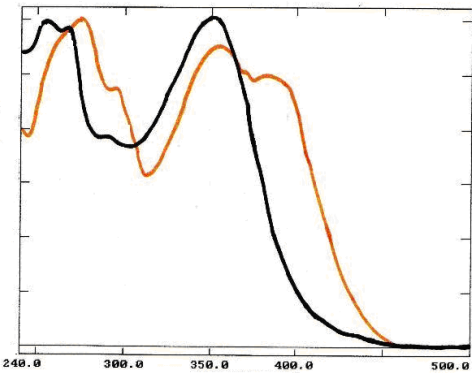
MeOH + NaOH



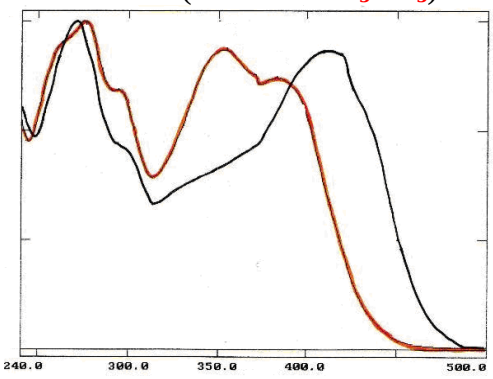
MeOH + NAOAc



MeOH+ (NAOAc + H_3BO_3)



MeOH + ($AlCl_3$ + HCl)



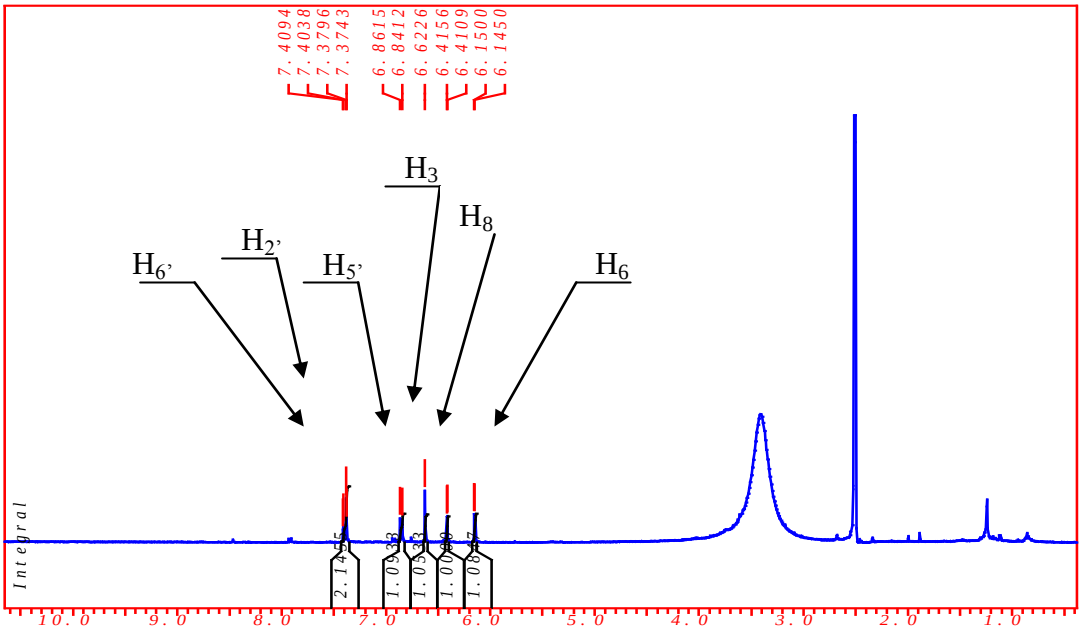
$AlCl_3$ + ($AlCl_3$ + HCl)

الشكل (23) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب AF_7

الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I $\Delta\lambda_1$ = 50nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع إستقرار الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموضع '4، مع ظهور نتوء جديد عند 329 nm يدل على وجود OH في الموضع 7 والذي يتأكد بالإزاحة الباتوكرومية للعصابة II .بمقدار 18 nm = $\Delta\lambda_{II}$ الناتجة عن إضافة الكاشف NaOAC .

ظهور الإزاحة الهبسوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ = -27nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$ بـ$AlCl_3$+HCl مع ظهور نتوء عند 354nm دليل على وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B.

في حين تؤكد الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ =32nm وجود OH في الموضع 5. عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH .



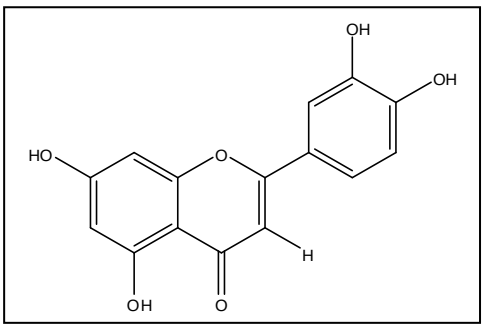
الشكل (24) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_7 في (DMSO,400MHz).

وبفضل معطيات مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون التي جاءت مكملة للنتائج السابقة حيث تظهر:

إشارة ثنائي ثنائي (J= 8.1-2.2Hz) عند δ = 7.39ppm موافقة لـــ H_6'.

وإشارة ثنائية (*J*=2.2 Hz) عند δ = 7.37 ppm موافقة لـــ H_2'. والأخرى ثنائية أيضا (*J*=8,1 Hz) عند δ = 6.85ppm موافقة لـــ H_5' ، كما نلاحظ إشارتين ثنائيتين عند 6.41 ppm و6.14ppm بنفس ثابت التزاوج (J=2 Hz) موافقتين لـــH_8 و H_6 على التوالي.

وتكون صيغة المركب من خلال كل هذه المعطيات عبارة عن .5,7,3',4'-Tetrahydroxy flavone .



بنية المركب AF_7 (Luteoline)

الجدول(13) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

الحزمة II			الحزمة I	المفاعلات
255	268		351	**MeOH**
269		329	401	**NaOH**
270			410	**$AlCl_3$**
276	294	354	383	**$AlCl_3$+HCl**
273	319	371	384	**NaOAc**

جدول(14)ـ نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_7 :

الهيدروجين الموافق	التعددية Hz	التكامل	δ(ppm)
$H_{6'}$	dd(*J*=8.1-2.2)	1H	7.39
$H_{2'}$	d(*J*=2.2)	1H	7.37
$H_{5'}$	d (*J*=8.1)	1H	6.85
H_3	S	1H	6.62
H_8	d (*J*=2)	1H	6.41
H_6	d (*J*=2)	1H	6.14

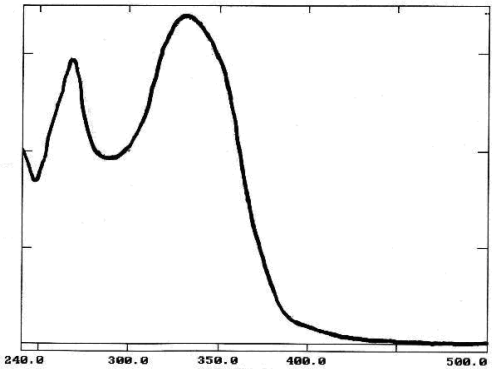
ب ـ 3 ـ التحليل البنيوي للمركب AF_{10} :

ـ السلوك الكروماتوغرافي :

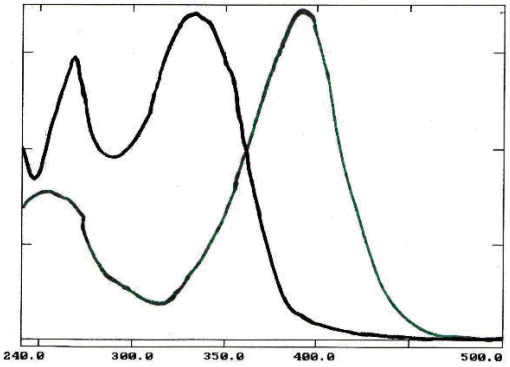
S_4	S_3	S_1	الجملة
42.7	18	20.6	**Rfx100**
بنفسجي			اللون الاستشعاعي

S_1 = CH_3COOH (15%)
S_3= 13 : 3 : 3 : 1
S_4 = 4:3:3

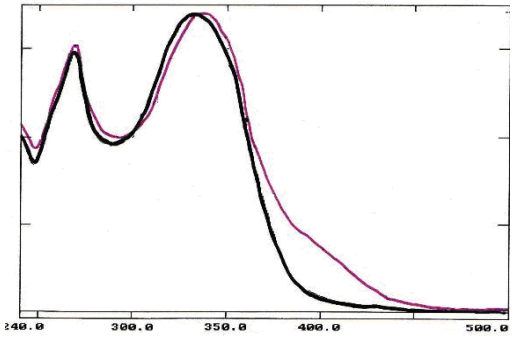
اللون البنفسجي القاتم و طول الحزمة λ_1 = 333 nm المأخوذة في الميثانول يؤكدان كون المركب AF_{10} عبارة عن فلافون والسلوك الكروماتوغرافي يشير إلى كونه جليكوزيد .



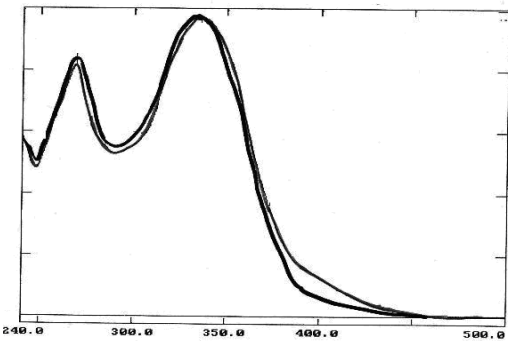
MeOH



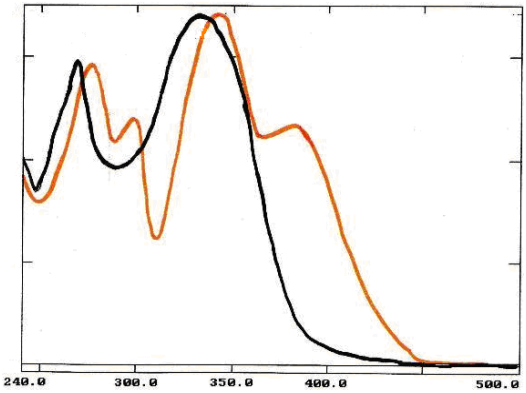
MeOH + NaOH



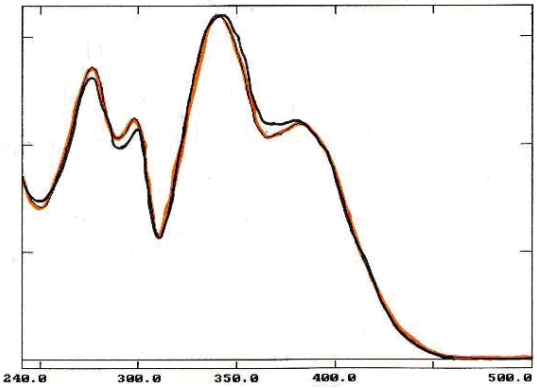
MeOH + NAOAc



MeOH+ (NAOAc + H_3BO_3)



MeOH + ($AlCl_3$ + HCl)

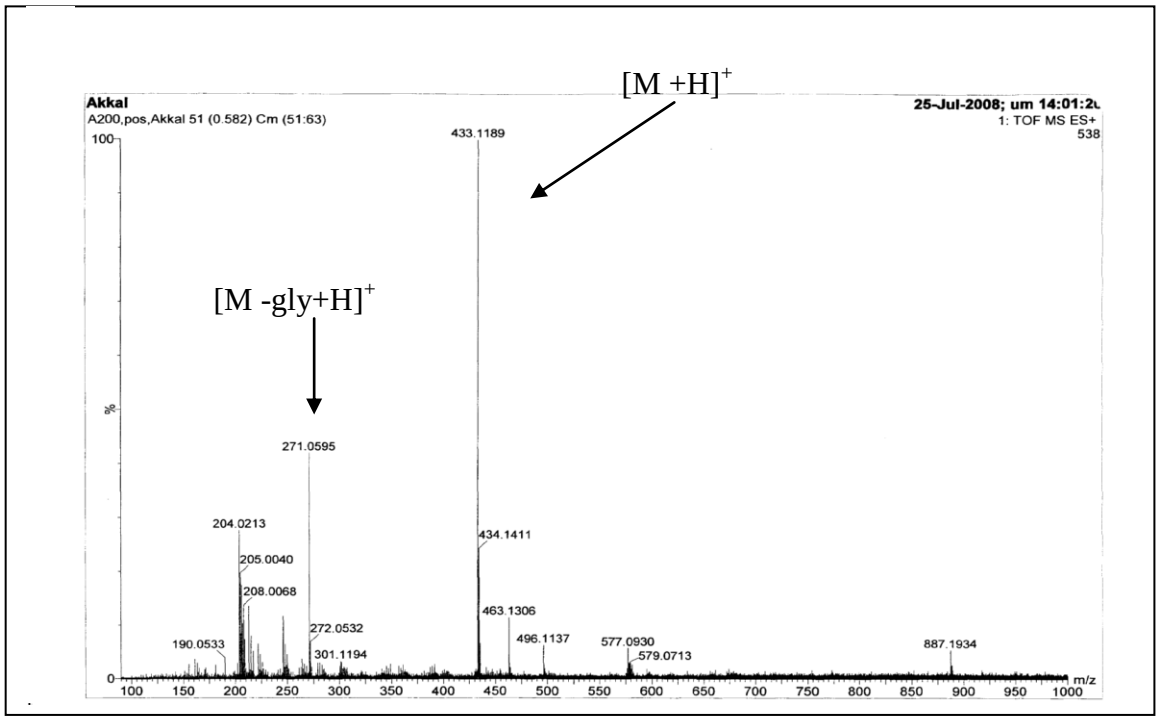


$AlCl_3$ + ($AlCl_3$ + HCl)

الشكل (25) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis للمركب AF_{10}

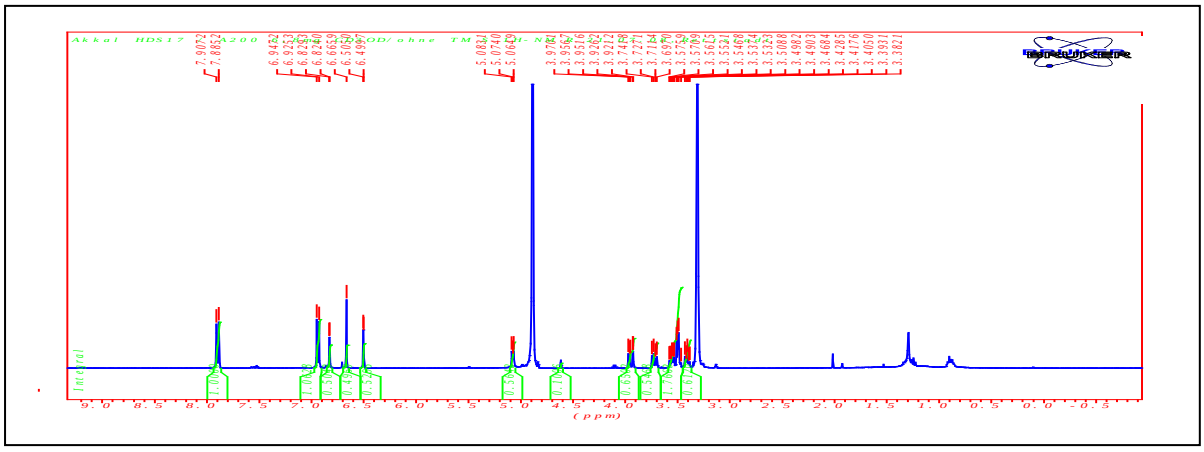
الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I $\Delta\lambda_1$ = 58 nm الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع الزيادة في الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموضع 4'، مع غياب نتوء جديد بين 335-320nm دليل على غياب OH في الموضع 7 وهذا ما تؤكده غياب الإزاحة الباتوكرومية للعصابة II عند مقارنة طيف NaOAc. بطيف MeOH.

غياب الإزاحة الهبسوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف $AlCl_3$ بـ $AlCl_3$+HCl دليل على غياب أرثو ثنائي هيدروكسيل الحلقة B. و الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I بمقدار $\Delta\lambda_1$ = 48 nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH تعني وجود OH في الموضع 5.

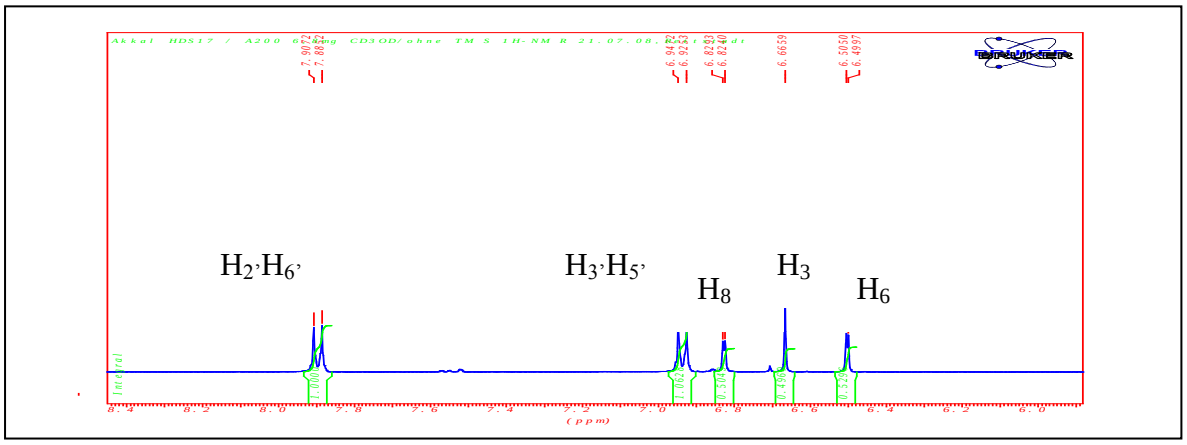


الشكل (26) طيف الكتلة (ES^+) للمركب AF_{10}

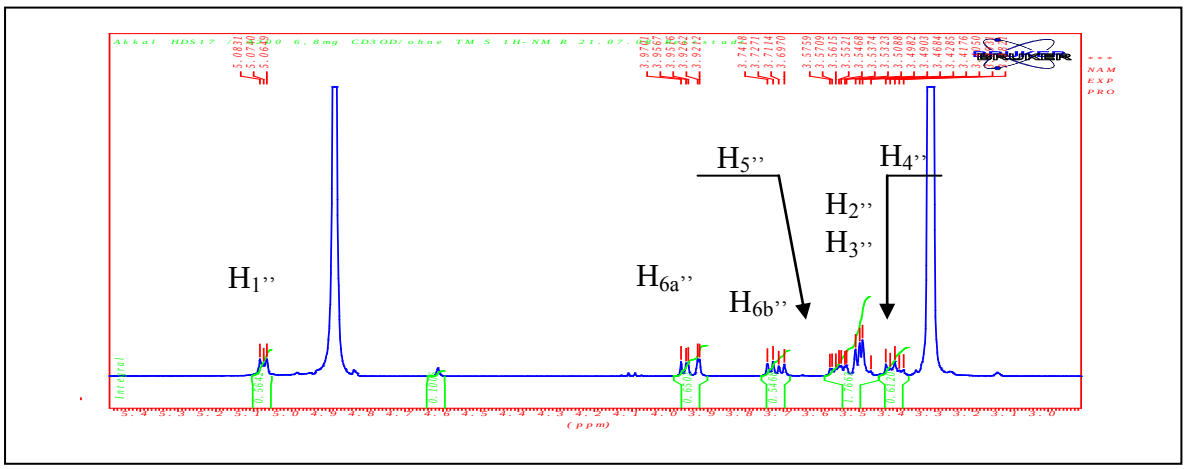
من جهة أجرى مطيافية الكتلة أعطت قيمة للأيون الجزيئي عند *m/z*= 433 موافقة للصيغة المجملة $C_{21}H_{20}O_{10}$ التي تدل على وجود هيكل فلافونيدي مستبدل بسكر لا يمكن أن يكون إلا في الموقع 7 كما أشارت إليه مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (الشكل25) والشظية *m/z*=271 تدل على ذلك فهي موافقة لـــ $[M -gly+H]^+$.



الشكل (27) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{10} في ($400MHz,CD_3OD$).



الشكل(28): تكبير المجال (δ=(5,59–8,4 ppm) للمركب AF_{10}

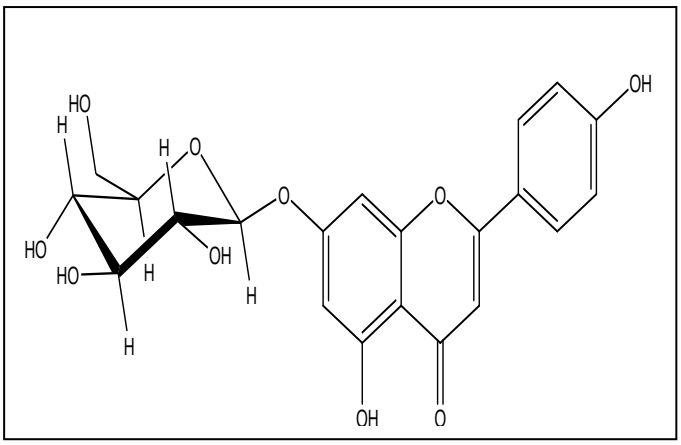


الشكل (29): تكبير المجال(δ=(2,8–5,3 ppm للمركب AF_{10}

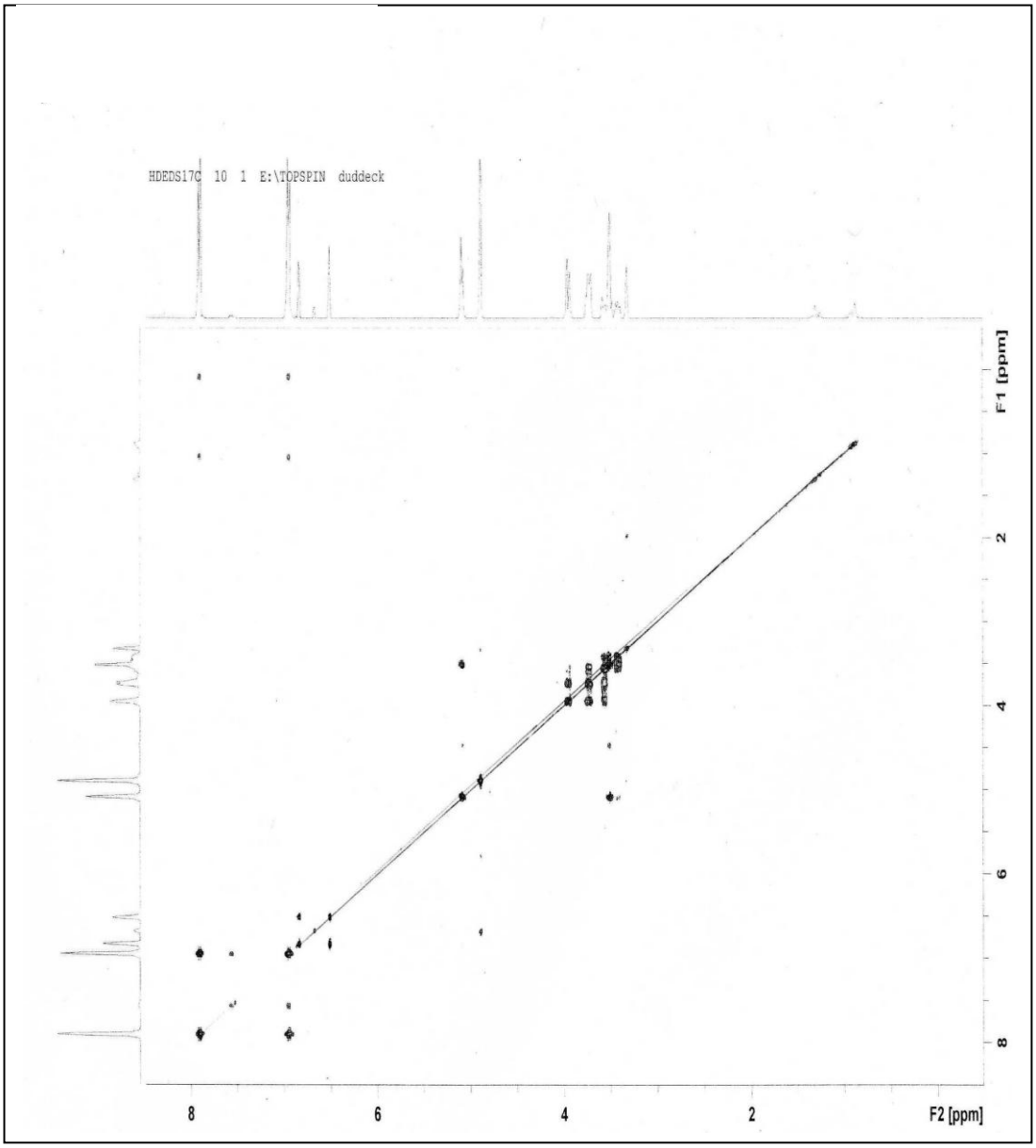
وقد تم التأكد من طبيعة السكر بالإعتماد على الإماهة الحمضية، حيث تحرر سكر الجليكوز الذي تم التعرف عليه من خلال المطابقة الكروماتوغرافية مع الشواهد المعروفة الشكل (39) إلى جانب الأجليكون الذي يظهر بلون بنفسجي وبثابت إنحباس Rf =0.65 قي النظام 4 :3: 3 والمطابق لـــ apigenine .

وقد جاءت مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والكربون موافقة ومؤكدة للنتائج السابقة حسب الجداول (16,17) وقد تم تحديد و إرفاق البروتونات بكربوناتها الموافقة بالإعتماد على نتائج Cosy ، HSQC والنتائج الببليوغرافيا [5] .

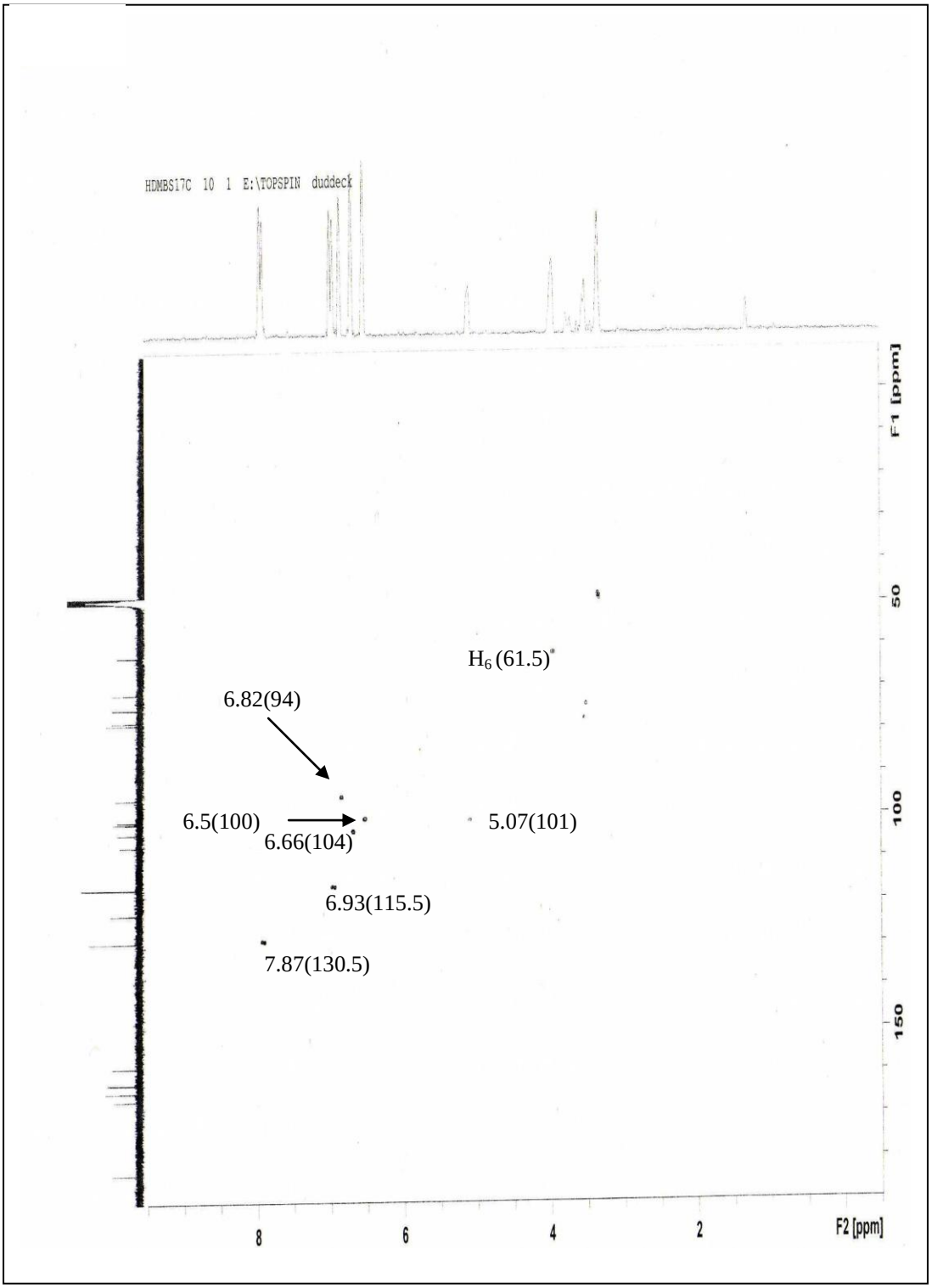
وبالتالي نكون قد تأكدنا من كون المركب **AF_{10}** عبارة عن :



Apigénine 7-*O*-*β* glucoside(apigétrine)



الشكل(30)طيف (COSY) للمركب AF_{10}



الشكل(31)طيف (HSQC) للمركب AF_{10}

الجدول(15) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis:

المفاعلات	الحزمة I			الحزمة II
MeOH	333			269
NaOH	391		269	254
$AlCl_3$	381	341	298	275
$AlCl_3$+HCl	381	341	298	276
NaOAc	335			268
NaOAc+H_3BO_3	336			269

جدول(16)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{10} :

الهيدروجين الموافق	التعددية Hz	التكامل	δ(ppm)
$H_{2'}$ $H_{6'}$	d(*J*=8.8)	2H	7.87
H_3' H_5'	d (*J*=8.8)	2H	6.93
H_8	d (*J*=2.1)	1H	6.82
H_3	S	1H	6.66
H_6	d (*J*=2.1)	1H	6.50
$H_{1''}$	d (*J*=7.3)	1H	5.07
$H_{6a''}$	dd (*J*=12.2-2)	1H	3.95
$H_{6a''}$	dd (*J*=12.2-5.7)	1H	3.71
$H_{5''}$	m	1H	3.57
$H_{2''}$ $H_{3''}$	m	2H	3.55
$H_{4''}$	m	1H	3.41

جدول(17)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون $NMR^{13}C$ باستعمال CD_3OD كمذيب:

الكربون الموافق	الإزاحة δ (ppm)	الكربون الموافق	الإزاحة δ (ppm)
C_{10}	106,5	C_4	182
C_6	100	C_5	163,43
$C_{1''}$	101	C_7	162,0
C_8	94	$C_{4'}$	157,92
$C_{5''}$	77,60	C_9	157,6
$C_{3''}$	76,816	C-2	156
$C_{2''}$	73,491	$C_{6'}$, $C_{2'}$	130,5
$C_{4''}$	69,970	C_3	104
$C_{6''}$	61,5	$C_{1'}$	121,4
		$C_{5'}$, $C_{3'}$	115,5

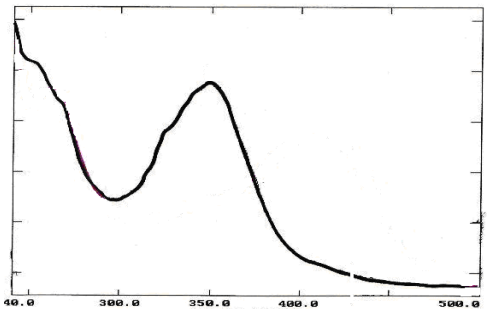
ب ـ 4 ـ التحليل البنيوي للمركب AF_{11} :

ـ السلوك الكروماتوغرافي :

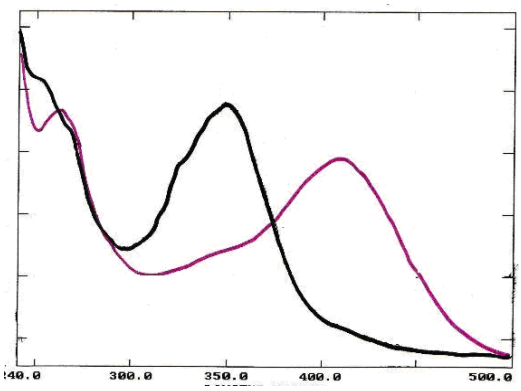
$S_1 = CH_3COOH$ (15%)
$S_3 = 13 : 3 : 3 : 1$
$S_4 = 4:3:3$

الجملة	S_1	S_3	S_4
Rfx100	20.6	18	22.3
اللون الاستشعاعي	بنفسجي		

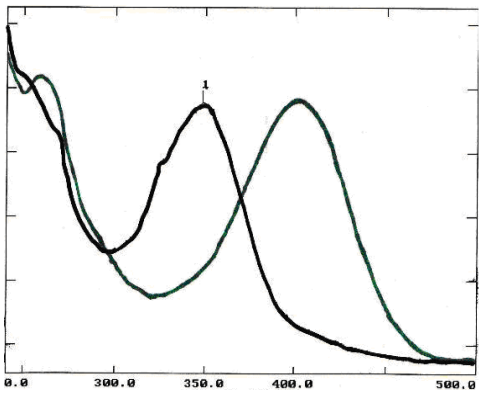
اللون البنفسجي تحت الأشعة UV و قيمة العصابة المسجلة في الميثانول $\lambda_1 = 348nm$ يدلان على كون المركب عبارة عن فلافون .



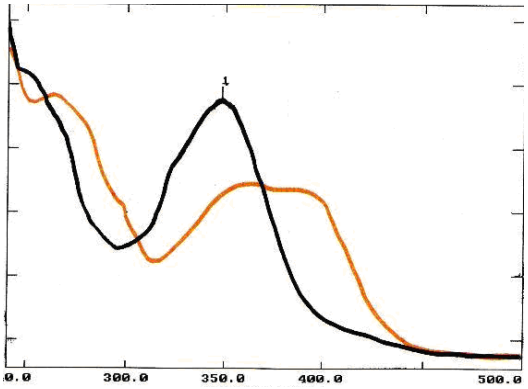
MeOH



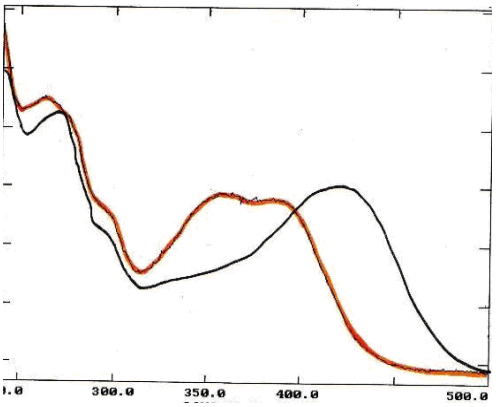
MeOH + NAOAc



MeOH + NaOH



MeOH + ($AlCl_3$ + HCl)



$AlCl_3$ + ($AlCl_3$ + HCl)

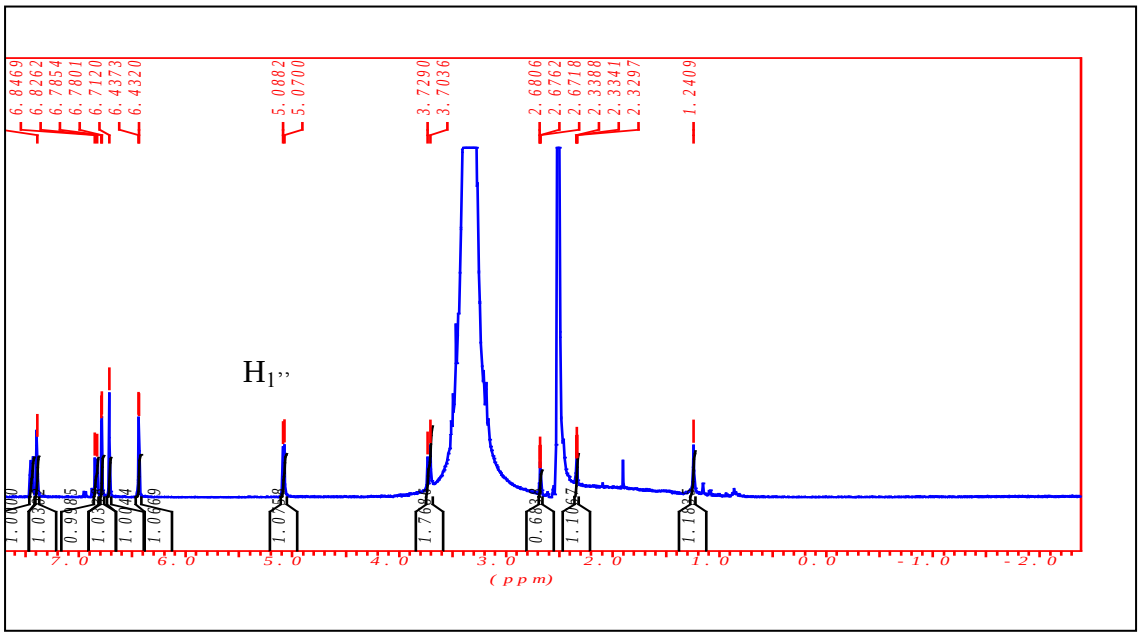
الشكل(32) مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية للمركب AF_{11}

الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I $\Delta\lambda_1$ = 54 nm المترتبة عن مقارنة طيف NaOH بطيف MeOH مع إستقرار الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموقع 4’

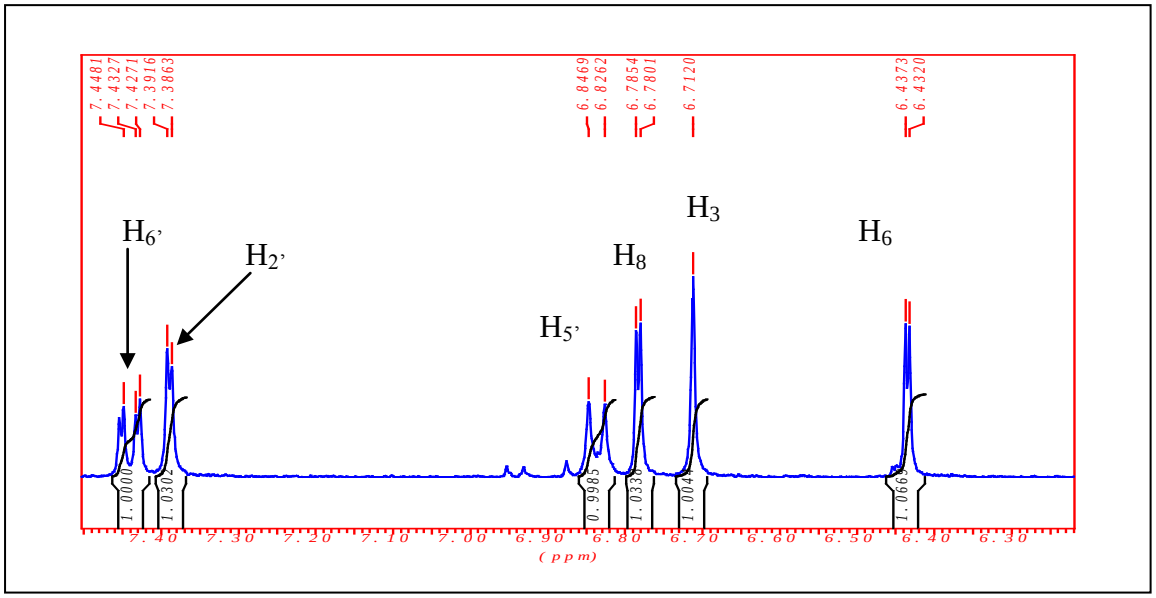
وعدم ظهور حزمة جديدة بين 320-335nm ينفي وجود OH في الموقع 7، وهذا ما تؤكده غياب الإزاحة الباتوكرومية للحزمة II عند مقارنة طيف NaOAc بطيف MeOH

قيمة الحزمة I λ_1 = 422nm في الطيف المسجل عند إضافة الكاشف $AlCl_3$ والإزاحة الهبسوكرومية للحزمة I بـ $\Delta\lambda_1$ = -30 nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف $AlCl_3$ دليل على وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB .

الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I بمقدار $\Delta\lambda_1$ = 44 nm عند مقارنة طيف $AlCl_3$+HCl بطيف MeOH دليل على وجودOH في الموقع 5



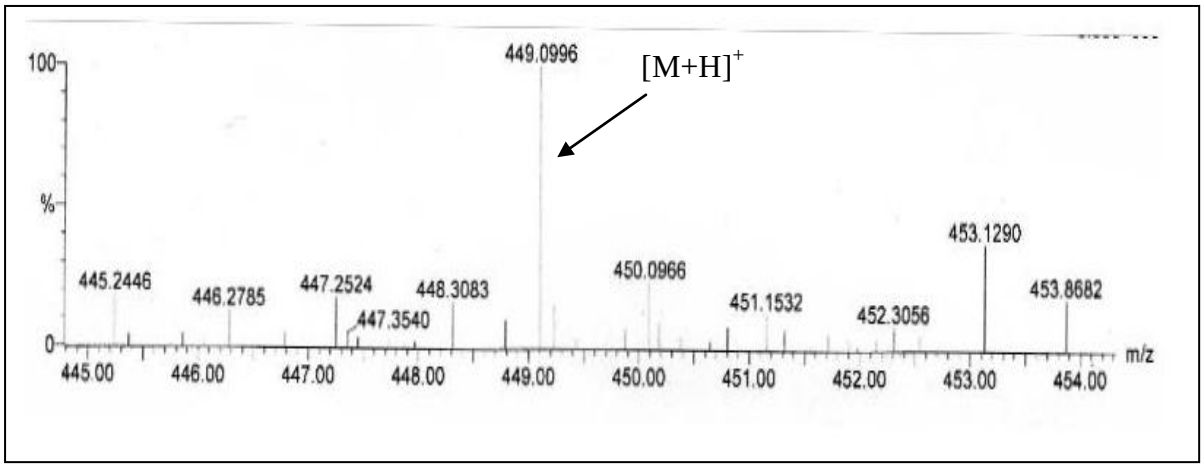
الشكل(33) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{11} (DMSO,400MHz)



الشكل(34): تكبير المجال (6.3–7.5 ppm)=δ للمركب AF_{11}

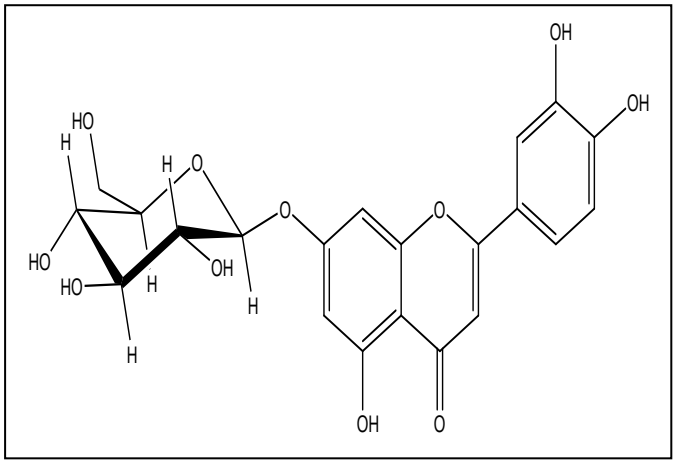
من مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون نلاحظ تطابق تقريبي لمعظم الإشارات مع المركب السابق (Luteoline)، مع وجود إشارات إضافية في المنطقة 3.5-4ppm المميزة للسكر وظهور البروتون الأنوميري عند 5.07ppm بثابت تزاوج J=7.3Hz الخاص بسكر الجليكوز، هذا الأخير تم التأكد منه من خ لال الإماهة الحمضية و المطابقة الكروماتوغرافية للسكر الناتج مع الشواهد المعروفة الشكل (39)، وحسب ما قدمته مطيافية UV من نتائج فإن الجليكوز يحتل الموقع 7 .

أما الجانب الأجليكوني الذي يظهر بلون بنفسجي وبثابت إنحباس Rf = 0.26 في النظام 3: 3: 4 فهو مطابق لـــLuteoline



الشكل (35)**طيف الكتلة** (ES^+) **للمركب** AF_{11}

مطيافية الكتلة عالية الكفاءة لهذا المركب تظهر إشارة عند m/z=449 موافقة للصيغة $C_{21}H_{20}O_{11}$ وبالتالي نكون قد تأكدنا من كون المركب AF_{11} عبارة عن :



Luteoline 7-*O*-*β* glucoside

الجدول(18) نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئيةUV-Vis للمركب AF_{11} :

المفاعلات	الحزمة I			الحزمة II
MeOH	348			268
NaOH	402			259
$AlCl_3$	422		298	270
$AlCl_3$+HCl	392	354	298	265
NaOAc	408			264

جدول(19)- نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{11} :

δ(ppm)	التكامل	التعدديةHz	الهيدروجين الموافق
7.44	1H	dd(*J*=8.3-2.2)	$H_{6'}$
7.38	1H	d(*J*=2.2)	$H_{2'}$
6.83	1H	d (*J*=8.3)	H_5’
6.7	1H	S	H_3
6.78	1H	d (*J*=2.1)	H_8
6.4	1H	d (*J*=2.1)	H_6
5.1	1H	d (*J*=7.3)	$H_{1''}$

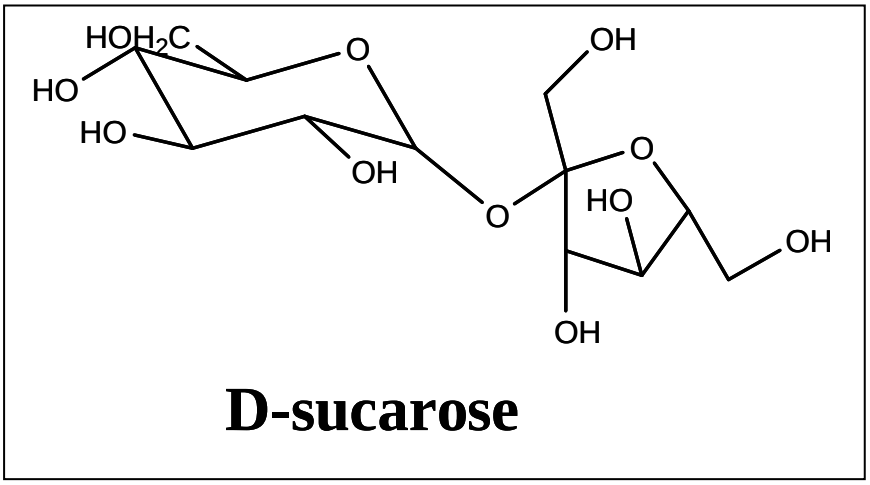
ب ـ 5 ـ **التحليل البنيوي للمركبAF_{12}** :

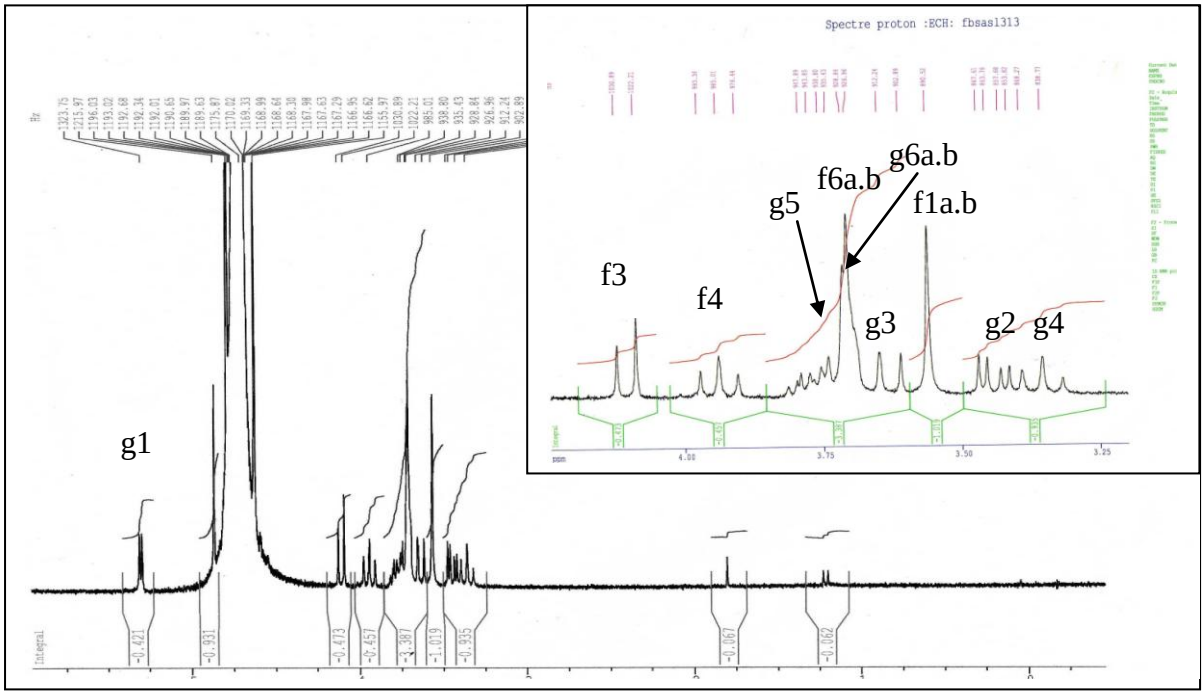
يظهر المركب **AF_{12}** في صورة بلورات شفافة ضعيفة الذوبان في الميثانول، وتذوب كلية في الماء تظهر بلون أسود قاتم بعد معاملة الورقة الكروماتوغرافية بمحلول محضر من:

(H_2SO_4: CH_3COOH: H_2O/1:1:8) ثم التسخين إلى الدرجة 100^0

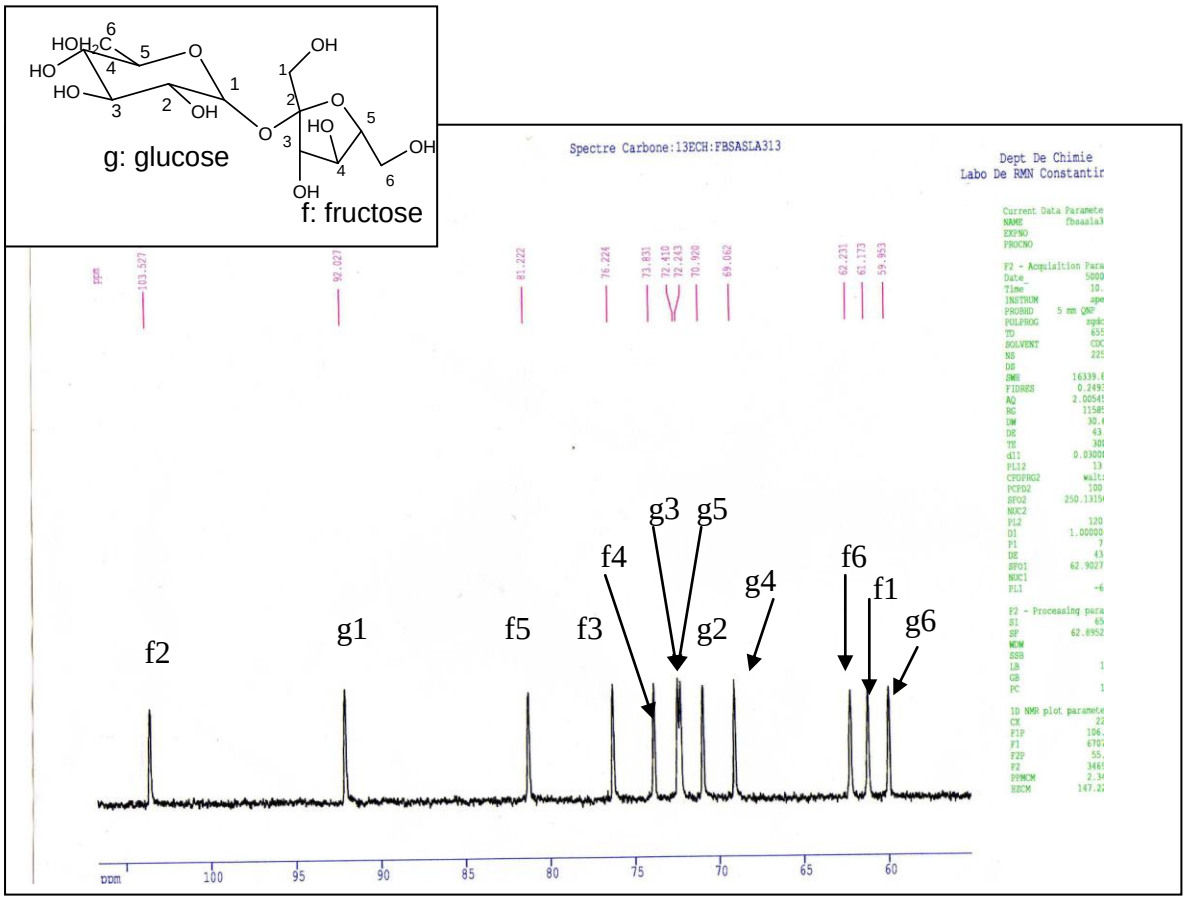
عدم رؤية هذا المركب تحت الأشعة UV ينفي كونه فلافونيد، وهذا ما أكده طيف NMR^1H حيث تعدم الإشارات بين 6-9ppm المميزة للفلافونيدات. مع ظهور إشارة ثنائية عند 5.2ppm بثابت تزاوج J=3.8 Hz ، وإشارات بين 3.5-4ppm المميزة للسكر [6]. ويتأكد إرتباطها بمطيافية COSY .وفي محاولة للتعرف على طبيعة هذا السكر تم مطابقته مع الشواهد ا لسكرية المعروفة فكان مميز بقيمة لـــ Rf مطابقة لسكر الأرابينوز، ولكن بعد تسجيل طيف $NMR^{13}C$ وظهور 12 كربون يتضح كون هذا المركب عبارة عن سكرين مرتبطين ببعض، بعد مطابقة كل من $NMR^{13}C$ وNMR^1H مع النتائج الببليوغرافية [6] يتضح أنه:

D-sucarose (glucopyranosyl-(1→2) fructofuranoside)

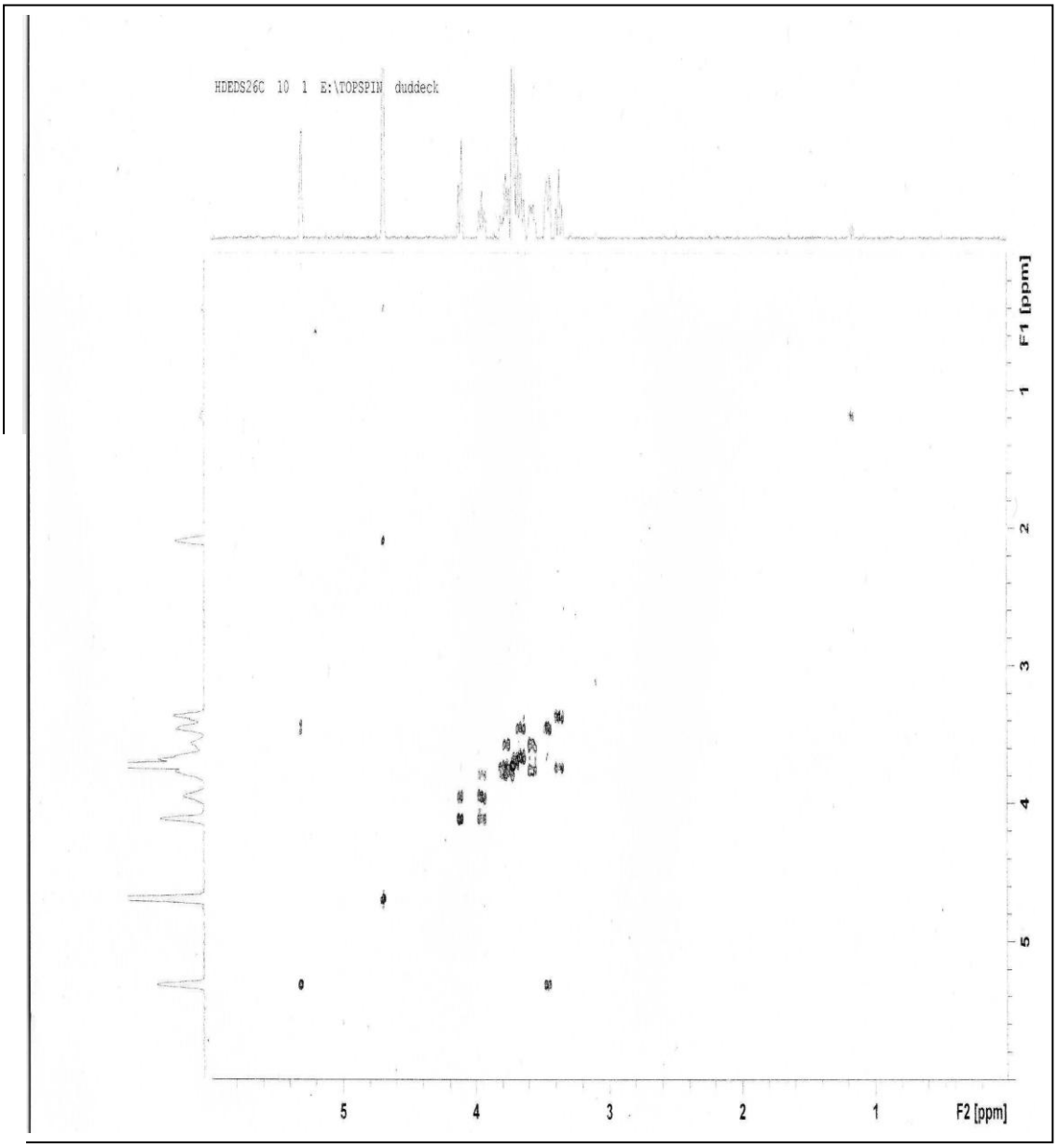




الشكل(36)مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب AF_{12} (D_2O)



الشكل(37) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب AF_{12} (D_2O)



الشكل(38) طيف (COSY) للمركب AF_{12}

الشكل (39) : كروماتوغرام يبين السكريات الناتجة عن الإماهة الحمضية مع بعض الشواهد المعروفة

المراجع

[1] Venkata Rao, E., Sree, R., Murthy, M. and Ward, R.S. (1984). Nine Isoflavones from *Tiphrosia Maxima*, Phytochemistry, vol. 23, No. 7, 1493-1501.

[2] Lopez L'azaro, M., Martin-Cordero,C., Iglisias-Gurra,F.and Ayuso Gonzalez ,M.J. (1998). An Isoflavone Glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, vol. 48, No. 2, 401-402.

[3] Cuyckens, F. and Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, Journal of mass spectrometry, 39,1-15.

[4] Leosvaldo, V.S.M., Marcelo, F.J.P., Maria,I.S.S., Davyson, M.E.F., Guimarães, V.E.P., Maria A.K.C. (2008). C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda* Fitoterapia .

[5] Mabry, T.J. Markham, K. R. and Thomas, M.B. (1970). The systimatic identification of flavonoids, Springer, New york, 45-126.

[6] Agrawal, P.K.(1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, Phytochemistry, Vol. 31, 3307-3330.

الخـــاتمـــة

الخـــاتمـــة

يعد هذا العمل كامتداد لابحاث بدأها مخبرنا في إطار الكشف عن المواد الفعالة للنبتات الطبية الجزائرية، وقد انصب اهتمامنا حول منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لما تحضى به من فعالية بيولوجية عظمى .

نهدف من خلال هذا البحث إلى فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي للنبتتين : *Retama sphaerocarpa* و *Ammoides atlantica*.

فبغية استكمال البحث حول الجنس *Ammoides*. الممثل بالنوعين *A atlantica* و*A pusilla* هذه الأخيرة التي حضت بدراسة مسبقة في مخبرنا لما تلقاه من استعمال واسع في الطب الشعبي، أما النوع الثاني فهي نبتة أصلية لذا كانت محور بحثنا، فكانت الحصيلة الفلافونيدية أربع مركبات تنحدر ضمن نظام وراثي حيوي واحد، ذو مسلك الفلافون الذي يضم هيكلين بنيويين أساسيين:

هيكل Apigénine والذي يضم Apigénine نفسه و مشتق واحد له هو Apigénine 7-*O*-*β* glucoside

هيكل Luteoline والذي يضمLuteoline نفسه و مشتقه Luteoline 7-*O*-*β* glucoside .

نلاحظ أن كلا المشتقين بسيطي الإستبدال فهي تضم 7-*O*-glucosyl وهو المستبدل الأكثر شيوعا الراجع إلى مانح السكر UDP-Glu(glucose Uridine diphosphate) والإنزيم Glucosyl transférase الجد متخصص إذ يدخل في المرحلة الأخيرة في الإصطناع الحيوي لتحويل مجموعة الهيدروكسيل إلى جليكوزيل . هذين الجليكوزيدين تم فصلهما من الجنس *Ammoides* . أما الأجليكونين فلأول مرة يتم الكشف عنهما في هذا الجنس ، على الرغم من كونهما البنية الأساسية لتكوين مشتقاتها الجليكوزيدية . وهذا قد يرجع إلى توفرهما في هذه النبتة بنسبة عالية أو لقلة الإنزيمات المسؤولة عن خلق مشتقات جديدة. ومن خلال هذه النتائج يمكن تشكيل النظام الحيوي الوراثي لهذه النبتة حسب الشكل (1).

وكتكملة لما توصلنا إليه في رسالة الماجستير فقد تمكنا من فصل أربع إيزوفلافونات من *Retama sphaerocarpa* :

7-hydroxy -6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-*O*-*β*-glucoside.(F_3)
7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (F_1)
5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-*C*-glucoside. (F_9)
genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(F_{10G})

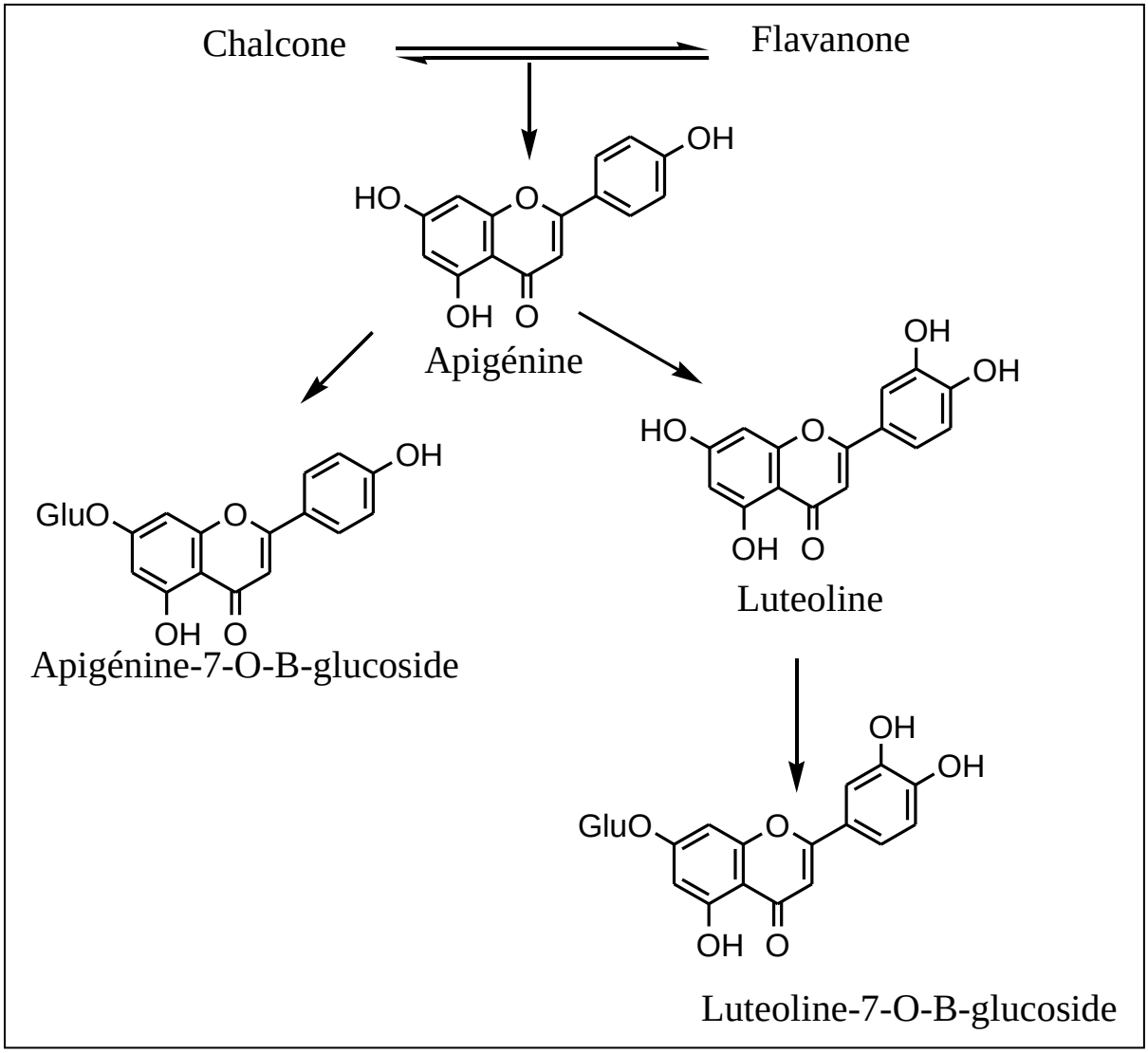
فالمركبين F_1،F_9 تم فصلهما لأول مرة من هذا الجنس أما المركب F_{10G} فلم يسبق فصله.

وقد جاءت هذه النتائج معززة لإنتماء النبتة إلى العائلة البقولية المشهورة بهذا النوع من المركبات، وقد تميزت هذه النبتة بصناعة المشتقات من النوع C-glu التي يتم تكوينها مباشرة بعد الشالكون [1] في كل من هيكل الفلافون [2] والإيزوفلافون بالإضافة إلى الممشتقات الميتوكسيلية و الجليكوزيدية O-glycose التي يتم إشتقاقها من الفلافا نون.فالشكل يوضح المخطط الوراثي لهذه النبتة إذ تظهر المركبات المفصولة خلال رسالة ا لماجستير بين حاضنتين والمركبات المعني بها هذا البحث داخل مستطيل أما البنى المتبقية فلم يتم فصلها وهذا راجع لعدة أسباب ، إما لو جودها بكميات ضعيفة لم يتسنى فصلها وإما هي موجودة في الكسور المعقدة التي لم تدرس أو لكون بعض تلك الجزيئات لا تتراكم في مثل تلك الصو ر، إذ بعد تكوينها تتحول مباشرة إلى إحدى مشتقاتها البنيوية عن طريق تثبيت مجموعة مستبدلة .

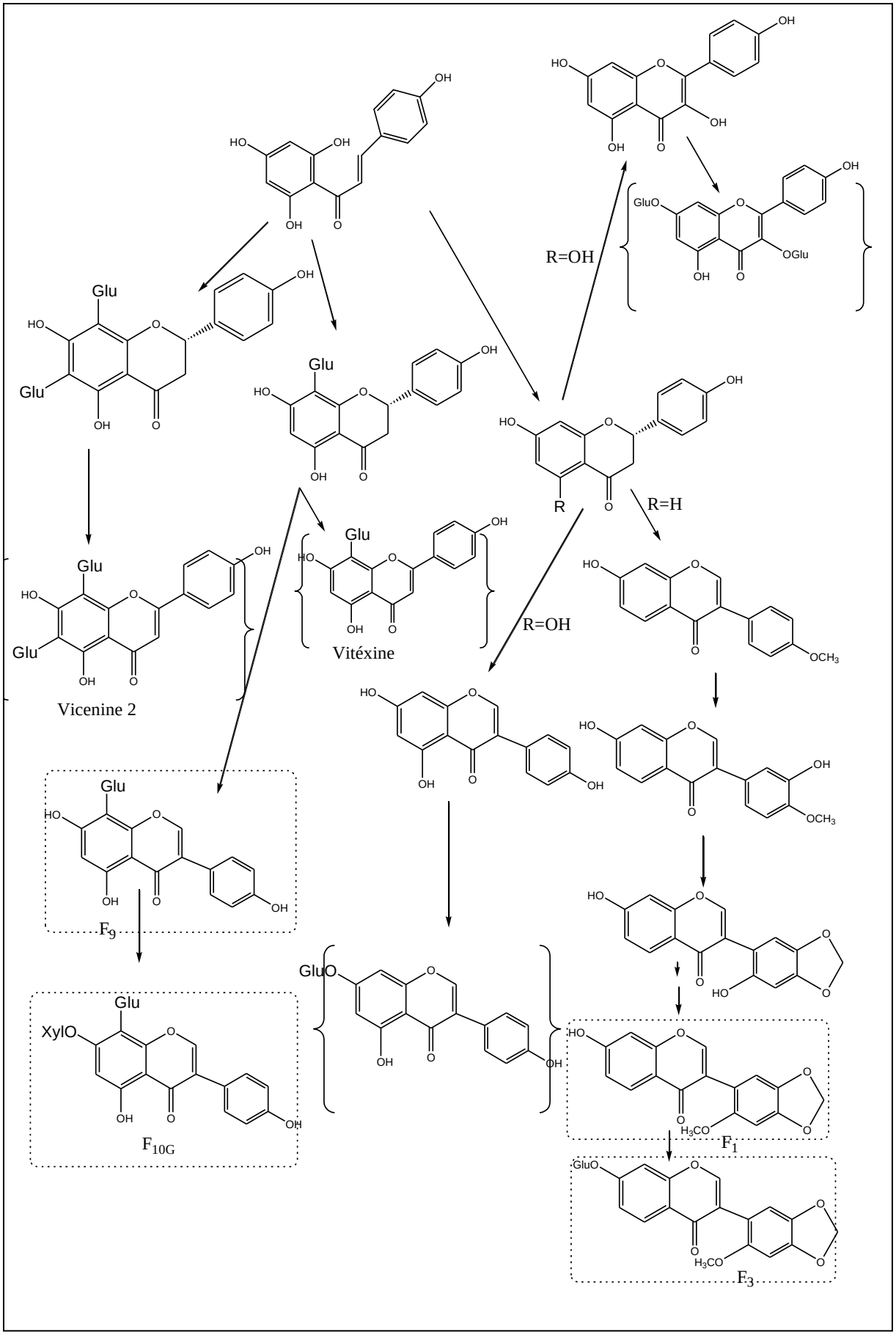
وقد اعتدمنا في فصل هذه المركبات على تقنيات الكروماتوغرافيا بأنواعها المختلفة؛ كروماتوغرافيا العمود، كروماتوغرافيا الورق، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، وتمت تنقية المر كبات المفصولة باستعمال عمود كروماتوغرافي صغير من الـــ Sephadex LH20.

كما تم تحديد البنى الجزيئية للمركبات المفصولة باستعمال الطرق الفيزيوكيميائية : مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV)، ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (NMR^1H) وللكربون ($NMR\ ^{13}C$)، ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد (Cosy,HMQC,HMBC), ومطيافية الكتلة والإماهة الحمضية HCl (4N) .

وبغية الكشف عن مدى الفعالية البيولوجية للنبتة *Retama sphaerocarpa* أجريت بعض التحاليل ضد البكتيرية، والتي توصلت إلى فعالية المستخلص البيوتانولي على النوع البكتيري *S. aureus* ATCC 43300 وهذا يفتح المجال لدراسات أخرى لأنواع بكتيرية موجبة الغرام سواء كان على المستخلص أو على المركبات المفصولة .



الشكل(1): المخطط الحيوي الوراثي لفلافونيدات *Ammoides atlantica*



الشكل (2): المخطط الحيوي الوراثي لفلافونيدات النبتة *Retama sphaerocarpa*

المراجع

[1] Louaar, S., Akkal, S., Bousetla, A., Medjroubi, K., Djarri, L. and Seguin, E. (2005). Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*, Chemistry of natural compound, Vol. 41, No.1.

[2] Harbone, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (1975). The Flavonoids 2nd part, Academic press, New york, Sanfrancisco

.

الملخص

في إطار البحث عن المواد الفعالة عند النبتات الطبية الجزائـــرية ، وباعتبار أن الفلافونيدات منتجـــــات طبيعية مؤهلة لدور وقائي و علاجي لما تتميز به من فعالية بيولوجية، لذا كان بحثنا موجها نحو تثمين المحتوى الفلافونيدي للنبتتين الطبيتين: *Retama sphaerocarpa* (Fabaceae) *Ammoides atlantica* (Apiaceae) فبالاعتماد على طرق الاستخلاص و الفصل و التنقية تمكنا من فصل أربع مركبات فلافونيدية من النبتة *Ammoides atlantica* كلها من عائلة الفلافون وتم التعرف عليها بالاستعانة بالطرق الفيزيوكيميائية.

Apigénine(1) Luteoline (2) **,** Apigénine 7-*O*-*β* glucoside(3)**,** Luteoline 7-*O*-*β* glucoside(4) بالإضافة إلى سكر السيكاروز.

كما تمكنا من فصل أربع إيزوفلافونات و التي جاءت معززة لانتماء النبتة *Retama sphaerocarpa* إلى العائلة البقولية

7-hydroxy -6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-*O*-*β*-glucoside.(1)
7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (2)
5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-*C*-glucoside. (3)
genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(4)

فللمركبين 2 و3 تم فصلهما لأول مرة من هذا الجنس أما المركب **4** فلأول مرة يتم فصله في المملكة النباتية.

ونظرا لما لاقته النبتة *Retama sphaerocarpa* من رواج في الطب الشعبي وبغية التعرف على المركبات المسؤولة عن هذه الفعالية تم إجراء بعض التحاليل البيولوجية الضد بكتيرية فأبدى المستخلص البيوتانولي إستجابة فعالة ضد السلالة *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 .

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes médicinales algérienne des familles Fabaceae et Apiaceae.

les flavonoides sont des substances naturelle qui jouent un rôle protecteur vu leur activités biologiques. de ce fait. Nos travaux sont orientés vers l'extraction, la séparation ,la purification et l'identification des composés flavonoidiques de deux espèces : *Retama sphaerocarpa* (Fabaceae) et une espece endémique *Ammoides atlantica* (Apiaceae).La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation de toute la batterie chromatographique en phase liquide ainsi que le recours aux méthodes modernes d'analyses les plus performantes notamment, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ($NMR^{1}H$, $NMR^{13}C$, Cosy, HMQC, HMBC), la spectroscopie d'absorption ultraviolette et la spectroscopie de masse.

Toutes ces méthodes nous ont permis d'établir les structures de quatre isoflavones isolés de l'espèce *Retama sphaerocarpa* : 7-hydroxy -6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-*O*-*β*-glucoside.(1) 7-hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (2) 5,7,4`-Tri hydroxy isoflavone-8-C-glucoside. (3) genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(4).Ce denier composé a été isolé pour la premier fois, et quatre flavones et un sucre isolés de l'espece endémique *Ammoides atlantica :*Apigénine(1), Luteoline (2) , Apigénine 7-*O*-*β* glucoside(3), Luteoline 7-*O*-*β* glucoside(4) et sucarose .

Lactivité anti bacterienne de l'éxtrait Butanolique de la plante *Retama sphaerocarpa* a donné des résultats positifs sur l' espèces *staphylococcus aureus* ATCC43300 .

Ce travail a fait l'objet de deux publications internationales .

Mots-cles : *Ammoides atlantica* , *Retama sphaerocarpa* , Flavonoides .

Abstract

This work is a part of our research program on the Algerian medicinal plants of Fabaceae and Apiaceae families

The flavonoids are a natural substancs,that play a protective role considering their Biological activity, for this reason our research was interested in the extraction, separation ,purification and determination of flavonoid contents of two species *Retama sphaerocarpa* (Fabaceae) and *Ammoides atlantica* (Apiaceae), the latter one is endemic. The achievement of this work required the use of several methods in the liquid phase chromatography as well as recourse to modern methods of the most effective analysis namely the spectroscopy of nuclear magnetic resonance ($NMR^{1}H$, $NMR^{13}C$,Cosy ,HMQC,HMBC), the ultraviolet absorption spectroscopy and the mass spectrometry. All this methods enabled the establishment the structures of four isoflavones which isolated from *Retama sphaerocarpa* specie: 7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone 7-O-β-glucoside.(1) 7hydroxy-6'-methoxy-3',4'-methylenedioxy isoflavone. (2) 5,7,4'-Tri hydroxy isoflavone-8-C-glucoside. (3) genistein 7-*O*-xylosyl 8-*C*-glucoside(4).this latter is new isoflavone. and four flavone has been isolated from *Ammoides atlantica* : Apigénine(1), Luteoline (2) , Apigénine 7-*O-β* glucoside(3), Luteoline 7-*O-β* glucoside(4) and arabinose .

Antibacterial activity was assessed using the disk diffusion method , The n-BuOH crude extract was the most active against *staphylococcus aureus* ATCC43300.

This results were published in two international journals.

Key words : *Retama sphaerocarpa, Ammoides atlantica*, flavonoids.