الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة منتوري قسنطينة

كلية العلوم الدقيقة — قسم الكيمياء

رقم الترتيب .....

رقم التسلسل .....

مذكرة

مقدمة لنيل شهادة الماجستير في العلوم

تخصص تحاليل فيزيوكيميائية و كيمياء عضوية

شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان

فصل و تحديد منتجات الأيض الثانوي للمستخلص البوتانولي لنبات "*Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae) "

من تقديم الطالب: لموى رضوان

تحت إشراف الأستاذة: وهيبة بومعزة

لجنة المناقشة:

فضيلة بن عياش	أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة	رئيسة
وهيبة بومعزة	أستاذة محاضرة بجامعة منتوري قسنطينة	مشرفة
سمير بن عياش	أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة	ممتحنا
رتيبة مكيو	أستاذة محاضرة بجامعة منتوري قسنطينة	ممتحنة
رمضان صغيري	أستاذ محاضربجامعة منتوري قسنطينة	ممتحنا

الإهداء

إلـــــى عائلتـــــي الكريمـــة

إلـــــى كل أساتذتي

إلـــــى كل زملائي و أفراد دفعتي

التشكرات

الحمد لله على كل نعمه الصغيرة منها قبل الكبيرة، الحمد لله الذي وفقني لإنجاز هذا العمل.

أتقدم بالشكر الخاص إلى الأستاذة وهيبة بومعزة التي كانت لي المشرف و الموجه و المعين خلال مراحل إنجاز هذا العمل.

كما أتقدم بتشكراتي الخالصة للسيدة الغالية فضيلة بن عياش أستاذة بجامعة منتوري على تفضلها بقبول رئاسة لجنة مناقشة هذه الرسالة التي لم تبخل علي بتوجيهاتها و نصائحها القيمة و الثمينة طوال مراحل إنجازنا لهذا العمل .

أتقدم بالشكر و الثناء و العرفان للأستاذ سمير بن عياش على التوجيهات و النصائح التي قدمها إلي خلال كل مراحل إنجاز هذا العمل.

كما أعبر عن عظيم امتناني و تقديري الى كل من الأساتذة : الدكتور رمضان صغيري و الدكتورة رتيبة مكيو و زهية بلوم على النصائح و المساعدات التي قدماها لي خلال إنجاز هذا العمل

كما أتوجه بالشكر إلى الأستاذ رمضان صغيري و الأستاذة رتيبة مكيو على قبولهما المشاركة في لجنة المناقشة.

كما أتقدم بالشكر الخالص إلى جميع أفراد مخبرنا على ما قدموه لي من نصائح و مساعدات.

كذلك إلى كل أفراد دفعتي متمنيا لهم النجاح و التوفيق في جميع الميادين.

شكرا لكل من ساعدني و لو بالكلمة الطيبة.

الفهرس

مقدمة تاريخية

أهمية النباتات الطبية تجارياً وإقتصادياً

تأثير وقت جمع النبات على المادة الفعالة

فساد النباتات الطبية = Deterioratian of Medicinal Plants

الفصل الأول:

الفلافونيدات

1- تعريفها 9
2- خواصها..... 10
3- طرق تحضير الفلافونيدات..... 10
4- الاصطناع الحيوي..... 12
5- تثبيت المجموعات..... 19
5-1- تثبيت مجموعات الهيدروكسيل..... 19
5-2- تثبيت مجموعات الميثيل..... 19
5-3- تثبيت جزيئات السكر..... 20
6- أهمية الفلافونيدات..... 22
6-1 الدور البيولوجي..... 22
6-2 الدور الفيزيولوجي..... 23
6-3 الدور العلاجي..... 23

الفصل الثاني

طرق إستخلاص, فصل وتنقية المركبات الفلافونيدية

1- طرق الاستخلاص..... 26
2- طرق الفصل والتنقية..... 29
2-1-الفصل..... 29
2-1- 1 - كروماتوغرافيا العمود(CC)..... 29
2-1 - 2 - كروماتوغرافيا الورقة الرقيقة (CP)..... 30
2-1 - 3 - كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (CCM)..... 30
2-1 - 4 - كروماتوغرافية نظام السائل عالي الآداء(HPLC)..... 31

2-2- التنقية 32
2-2- 1 - التنقية على عمود من متعدد الأميدSC_6..... 32
2-2- 2 - التنقية على عمود من السيفاداكس..... 32

الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونيدية..... 33
الخصائص الكروماتوغرافية..... 33
1. اللون الاستشعاعي..... 33
2. معامل الاعاقة Rf..... 34
طرق التحليل الطيفي :..... 36
أ- مطيافية الأشعة فوق بنفسجية..... 36
ب- مطيافية الكتلة 42
ج- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي..... 46
د- الإماهة الحمضية..... 51

الفصل الثالث

الدراسة الكيميائية النباتية لنبتة *Haloxylon scoparium* (Chénopodiaceae)
عائلة (chenopodiacees):..... 55
الأهمية الاقتصادية لعائلة (chenopodiacea)..... 56
وصف النبتة 56
إستخلاص النبتة 57
الفصل والتنقية 59
معالجة الكسور المتحصل عليها 61

الفصل الرابع

النتائج الكيميائية و المناقشاتت للنبتة Haloxylon Scoparium (Chénopodiaceae)
النتائج الكيميائية و المناقشاتت للنبتة 64
I -1- دراسة للمركب H42 64
I -2- دراسة للمركب H22..... 78
المراجع

الخاتمة
الملخص

I-مقدمة

I-1-مقدمة تاريخية

خلال الآلاف العديدة من السنين التى عاش فيها الإنسان على وجه الارض جرب النباتات التي تنمو من حوله وخبر صفاتها وأحوالها باحثا عن الطعام في معظم الاحيان، لكنه تعلم أيضاً خلال تذوقه للنباتات أن بعضها يسبب له المرض وبعضها الآخر يمكن أن يشفيه ويجتث الالم منه وقد أعطى الله سبحانه وتعالى الحيوان خصائص غريزية يهتدي بها الى هذه النباتات دون مرشد او دليل. مما جعل الإنسان يفكر كيف يستفيد من هذه الغريزة ومن تلك الخصائص وذلك بمرافقة الحيوانات وتتبعها فى مأكلها ومشربها كلما احتاج الى الدواء او الغذاء. وفي الصين ظهر عام 2700 ق[1]. م أول كتاب طبي للاعشاب وأصبح هذا الكتاب اساساً لجميع المعلومات الصينية التى كتبت بعد ذلك عن النباتات ، وأشهرها كتاب الاعشاب الكبير The Great Herbal [1]. وفي بابل القديمة كانت المعلومات التى تتعلق بالنباتات المستعملة فى الطب تسجل على الاسطوانات الحجرية والطينية وهناك الواح مدون عليها ما يزيد على 250 نباتاً من بينها الكاسيا والهندباء والكمون والكركم والمر. وقانون حمورابى المحفور على الصخر والذي يرجع تاريخه الى 1728 ق. م ينص على استعمال النباتات الطبية لشفاء الكثير من الامراض. وفي مصر تدل الكتابات القديمة والصور الملونه على جدران المعابد والقبور وكذلك بقايا الاعشاب التي وجدت في المقابر بجانب الجثث المحنطة، على استعمال هذه النباتات منذ 3000 سنة ق. م وأهم مصادر المعلومات عن الطب المصري القديم والعقاقير والتداوي بها جاء عن طريق مجموعات من لفائف البردى، اكتشفت في المقابر المصرية القديمة واهم هذه البرديات : برديات ايبرز George Ebers` وبرديات إدوين سميث Edwin Smith` ويعتبر " ايمحتب " أول طبيب فى العالم وقد استخدم الكثير من الاعشاب كالمر والافيون والصبار والشوكران في علاج المرضى. وظل العالم كله يعالج مرضاه بنفس الطرق الفرعونية القديمة حتى حدثت ثورة الطب في بداية القرن التاسع عشر الميلادي. أما عن العرب فيمكن تقسيم التاريخ الطبي عندهم الى أربعة عصور: ا- عصر ما قبل الاسلام. 2- العصر الاسلامي الأول. 3- عصر العباسيين. 4- العصر الاندلسي. ولم يكن لدى العرب قبل الاسلام معلومات كثيرة عن الطب والتداوي حيث انهم اعتمدوا في علاجهم على

نصائح شيوخ القبائل. وقد نالوا بعض المعرفة من البلاد المجاورة مثل بلاد الشام والفرس خلال رحلاتهم الى هذه البلاد. وبعد ظهور الاسلام وفتوحاته التي امتدت من اسبانيا غرباً الى حدود الصين شرقاً، جاب علماء العرب هذه الاقطار والتحموا مع العلماء فى هذه البلاد ودونوا ملاحظاتهم على الطبيعة عن النباتات، كما ترجموا الى العربية جميع الاعمال المصرية والفارسية والهندية، ويعزى اليهم الفضل فى تأسيس مزاخر الادوية (الصيدليات) في بغداد التى كانت تمتلىء بالاوراق والجذور والازهار والثمار والبذور والتى كانوا يستخدمونها لعلاج الكثير من الامراض. وكانت بغداد عاصمة الخلافة اكبر المراكز العلمية في العالم وكان الخلفاء محبين للعلم والعلماء وخاصة ما يتصل منها بالعلوم الطبية، فشجعوا العلماء على ترجمة المراجع الى العربية وفي عصر الرشيد انشئت مدارس الطب التي كانت تحوي المكتبات الزاخره بالمراجع الطبية. ومن اشهرعلماءالعرب[1]

- الرازي (865- 925 م)- الف ما يزيد على 250 كتاباً في مختلف المواضيع الطبية اهمها (الحاوي في الطب والاقربازين)
- ابن سينا (.980- 1036 م)- كان فيلسوفاً وطبيباً وكتب كتابه عن النباتات الطبية والعقاقير .
- البيروني (965 1038 - م) - الذي كتب كتابه ودون فيه اسماء النباتات الطبية و استعما لاتها .
- الادريسي (1100- 1166 م) أمير عربي كتب كتابه عن العقاقير .
- أحمد الغافقي (1164 م) اشهر اطباء الاسلام كتب كتابه عن العقاقير (الادوية المفردة) واعتمد فيه على تجاربه الشخصية .
- ابن البيطار- يعتبر من اهم علماء العرب في علم النبات عاش فى القرن 13 م ، وسافر الى بلاد الاغريق والروم والمغرب ليجمع كل ما جمعه العلماء من معرفة عن النباتات وعلومها. ألف عدداً من الكتب اهمها (الجامع من مفردات الادوية والاغذية) وصف فيه 1400 نوع من العقاقير منها 300 نوع لم يسبقه احد الى وصفها ترجم كتابه الى اللغة اللاتينية وكان العلماء في اوروبا يعتمدون عليه .
- داود الانطاكي- وكان ضريراً لا يبصر ومع ذلك سمى بالبصير واشهر مؤلفاته تذكرته المشهورة. وجزءاً كبيراً مما كتبه منقول عن كتب اليونان وخاصة (العقاقير المبسطة) لجالينوس .

- ويعتبر ابقراط- من اعظم علماء اليونان القدماء ومن علماء الاغريق ثيوفراستس- عالم النباتات والاعشاب وكتب كتاب (الموسم). - الرومان لم يزيدوا شيئاً عن النباتات الطبية عما كتبه الاغريق

لكن ديوسقوريدس الف كتاباً عن الاعشاب هو Materia medica ذكر فيه 9958 عقاراً مع شرح فوائدها. - في القرن الثاني الميلادي كتب- جالينوس - اكثر من المؤلفات الطبية حيث كلمة جالينوس تستعمل في وصف العقار المحتوى على مركبات عضوية غير كيميائية خالصة. ثم جاء عصر العشابين Herbalis حيث بقيت النباتات تزرع وتستعمل لعلاج المرضى . وبعد اختراع الطباعة أخذت كتب الاعشاب تطبع فى كل البلاد الاوروبية ثم اضيفت اليها النباتات المكتشفة فى امريكا حيث استفادوا في هذا المجال من تجارب الهنود الحمر فتعرفوا على نباتاتهم وعلى صفاتها الطبيعة. فى القرن التاسع عشر حدث تطور مذهل في علم الكيمياء حيث بدء في استخلاص المركبات الفعالة من النباتات المختلفة مثل الكينين من قلف شجر السنكونا والستركنين من نبات جوز المقيء والايميتين من نبات عروق الذهب والاتروبين من نبات ست الحسن والايفيدرين من الايفيدرين وسرعان ما استخلصت من النباتات عدة مئات من المواد الفعالة[1].

I-2-أهمية النباتات الطبية تجارياً وإقتصادياً

تعتمد أدويتنا اليوم على الخصائص العلاجية للنباتات في نحو 75%. فقد طورت مجتمعات العالم على مر السنين تقاليدها المأثورة الخاصة بها لفهم النباتات الطبية و استخدامها [2]
فالنباتات الطبية فى الوقت الحاضر تحتل مكانة كبيرة في الانتاج الزراعي والصناعي فهي المصدر الرئيسي للعقاقير الطبية النباتية او مصدر المواد الفعالة التي تدخل في تحضير الدواء على شكل خلاصات او مواد فعالة او تستعمل كمادة خام تنتج بعض المركبات الكيميائية التي تعتبر النواة للتخليق لبعض المواد الدوائية الهامة كمادة الكوريتزون Cortisone وبديل بلازما الدم[1]. وتعتبر النباتات الطبية من اهم المواد الاستراتيجية فى صناعة الدواء وكذلك فى صناعة مواد التجميل حيث تلعب اقتصادياً دوراً مهماً بالنسبة لبعض الدول. كذلك تلعب دوراً استراتيجياً لبعض الصناعات العسكرية كنبات الهوهوبا JoJoba حيث يعتبر نبات استراتيجى في بعض الدول الغربية و يستخرج منه زيت لا يمكن تحضيره مخبرياً بطرق التحضير الكيميائية المعتادة حيث أن له درجة غليان عالية فيستخدم في عمليات تشحيم الصواريخ بعيدة المدى. كذلك يدخل في صناعة التجميل[1].ان أهمية النباتات الطبية تزداد بإزدياد الاستثمار والأموال المبذولة في سبيل

انتاجه وتحسين جودته.وهناك عوامل عدة أدت الى زيادة الاهتمام بالنباتات الطبية وزراعتها واستثمارها الى ما يلى:
اولأ: زوال الاعتقاد بالاستغناء عن النباتات الطبية كمصدر طبيعى لصناعة الدواء، واستبدالها بالمواد الفعالة المصطنعة كيميائيآ. وذلك للأسباب التالية:

أ- أن التجارب اثبتت أن تأثير المادة الفعالة المنتجة كيميائيآ لا تؤدي الى التأثير الفسيولوجي الذي تؤديه نفس المادة الفعالة المستخلصة من النباتات الطبية.

ب- المواد المنتجة كيميائيآ يكون لها تأثيرات جانبية كثيرة بجانب التأثير الطبي الاساسي الذى تستعمل من أجله وهذه التأثيرات تكون اغلب الاحيان ضارة حتى ولو ظهرت بعد فترة من استعمال الدواء. وذلك للازدياد الكبير فى السكان وإزدياد الطلب على الادوية المكونه من مركبات محضره كيميائيآ لسهولة الحصول عليها بسرعة. وكذلك للتطور السريع في علوم الكيمياء العضوية التحضيرية دون الاستعانة بالنباتات الطبية وذلك لإرتفاع اسعارها وتأثرها بالاحتكارات الدولية. جاء إعلان المؤئمرات الصيدلية الحديثة بأن استعمال المواد المصطنعة كيميائيآ للعلاج على مدى سنوات طويلة خلفت كثيرآ من الآثار الجانبية الخطيرة. وتأسيسآ على ذلك اعلنت منظمة الصحة العالمية ضرورة العودة الى العلاج بالحشائش والاعشاب الطبيعية والحد من ئتاول الكيميائيات المصنعة فى مصانع الصيدلية وكذلك فإنها حذرت من استخدام كئير من الادوية المتداوله والمعدة في المعامل حيث ثبت ضررها مع مرور الوقت. واصبحت قائمة الممنوعات فى إزدياد يومآ بعد يوم، محذرة ومطالبة بالعودة الى الطبيعة والاعشاب الطبية الطازجه ولقد ظهرت في امريكا واوروبا وروسيا والصين مستشفيات لاقت رواجاً وائبتت نجاحات كبيرة تعتمد على الاعشاب فى علاج المرضى كذلك في الوطن العربي حيث يوجد مركز الطب الاسلامي في الكويت والامارات العربية لعلاج المرضى بالاعشاب الطبية. وتعزى هذه الاسباب الى أن الله سبحانه وتعالى قد أوجد فى النبات الواحد محتويات وصفة طبية كامله من اكئر من مادة فعالة واحدة وان هذه المواد تعمل مع بعضها متعاونة في علاج المرض وأن الحصول على بعضها في حالة نقية واستعماله بمفرده هو الذي يؤدي الى قلة الفاعلية او الى التأئيرات الجانبية الضارة.

ثانياً: أن الوطن العربي يوجد فيه كثير من النباتات الطبية المتنوعة صحراوية او اعشاب برية تنتشر في الحقول او المزارع والاودية وقد شجع هذا على جمعها والاستفادة منها في مصانع الادوية، ومما ادى الى زيادة استزراعها وكذلك استزراع اصناف اخرى بجوار صناعة جمع النباتات.

ثالثاً: اثبتت التجارب أن كثيراً من النباتات الطبية والعطرية تصلح زراعتها في الوطن العربي في حين يصعب زراعتها فى بعض المناطق في أوروبا وخصوصاً في فصل الشتاء. مثال على ذلك نبات البردقوش Marguram ونبات العتر Geranium [1].

رابعاً: استعمال بعض النباتات العطرية في اغراض اخرى اقتصادية غير صناعة الادوية مثل التوابل ونباتات الزينة و في صناعة مواد ومستحضرات التجميل الطبيعية و كذلك في صناعة العطور و المبيدات الحشرية.

I-3- تأثير وقت جمع النبات على المادة الفعالة :

من الامور التى تؤثر على النبات من الناحية الإقتصادية هو وقت جمع النبات الطبى، حيث أن نسبة المادة الفعالة في النبات تختلف حسب فصول السنة بل حسب ساعات النهار [1]. حيث أن نباتات العائلة الباذنجانية تختلف المادة الفعالة نسبتها حسب ساعات النهار. فالديجلتاليس تزيد نسبة المادة الفعالة بعد اشتداد حرارة الشمس وتقل فى الليل ولذلك فإنه افضل وقت لجمعها هو بعد الظهر بقليل[1] .وقد عرفت اوقات جمع النبات المناسبة لمعظم النباتات الطبية.ست الحسن (بلادونا) تجمع عندما يكون عمرها 3- 4 سنوات. درنات اللحلاح فى اول الصيف. والاجزاء المتماثلة من النبات تجمع فى اوقات متشابهة فالقشور واللحاء تجمع بعد انتهاء الامطار لان الماء والرطوبة يجعل فصلها ميسوراً. والارواق تجمع فى الجو الجاف قبل ظهور الازهار والثمار. والسوق الارضية والجذور والدرنات (ريزومات وكورمات) تجمع في فصل الخريف بعد أن ينتهى النمو الخضري وتذبل الاجزاء العليا. فتكون الاجزاء الارضية قد اختزنت اكبر قدر من المواد الفعالة.الازهار فتجمع في اوقات إخصاب النبات، اي تلقيحة اذ تكون قوتها على

اتمها.الثمار تجمع اذا اكتمل نموها ولكن قبل أن يتم نضجها.اما البذور فتجمع بعد اتمام النضج. اما البلاسم والصموغ والرتنجات تجمع في الجو الجاف اي غير الرطب[1].

I-4-تلف النباتات الطبية = Deterioratian of Medicinal Plants

تتلف النباتات الطبية أثناء عملية التخزين ويرجع هدا للعوامل التالية:

1- **الرطوبة**: حيث تعمل الانزيمات أثناء عملية التخزين على تحلل المكونات الفعالة وبالتالى تفقد هذه النبته قيمتها الطبية. وعمل الانزيمات ونشاطها يعتمد على وجود الماء في خلايا النبات.ولذلك يجب أن يتم التخلص من الرطوبة تماماً اثناء عملية التخزين، وذلك لوقف مفعول الانزيمات بالاضافة الى ذلك فإن الكائنات الحية الدقيقة تجد مجالاً للنمو فى وجود الرطوبة حيث تسبب فساد النبات[1].

2- درجة الحرارة: يؤثر الارتفاع فى درجات الحرارة الى درجات معينة أثناء عملية التخزين على نشاط الانزيمات وزيادة التفاعلات الكيميائية، كما أن الحرارة تؤثر على النباتات المحتوية على زيوت طيارة مثل نورات البابونج وثمار نباتات الفصيلة الخيمية مثل الينسون والكراوية فتفقد محتوياتها من هذه الزيوت كلياً او جزئياً[1].

3- الأكسجين: يؤثر الاكسجين على اكسدة بعض مكونات النباتات الطبيعية أثناء عملية التخزين خصوصاً التي تحتوي على زيوت طيارة مثل زيت الليمون او زيوت ثابتة مثل زيت الزيتون ، حيث يجب تخزين هذه الزيوت المحتوية عليها بمعزل عن الهواء او فى وجود غاز خامل مثل النيتروجين[1].

4-الضوء: الضوء يغير لون النباتات الطبية من لونها الطبيعى او اللون الناتج بعد عملية التجفيف وتغير اللون يقلل من القيمة التجارية. مثل نبات الورد- الكركديه. وتغيير اللون يمكن أن يكون ناتجاً عن تغيير في المكونات الفعالة نفسها مثل الشيح البلدي - إذ تتغير مادة السانتونين Santonin الصفراء اللون الى اللون البرتقالي ثم الاسود[2] .

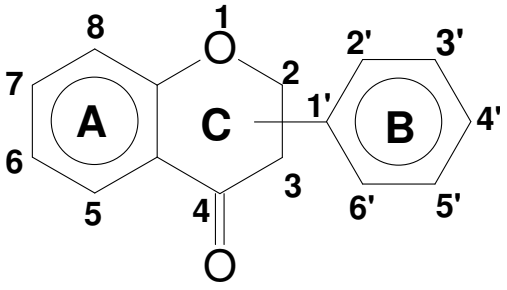
الفلافونويدات

1 - تعريف

يرجع اكتشاف الفلافونويدات الى العالم الحيوي (Albert Szent-Gyorgyi) ،حيث قام بتصنيفها على أساس أنها فيتامينp مدركا دورها فى تعزيز و تزايد الفيتامين c [3].

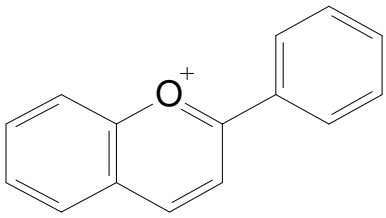
والمعروف على الفلافونويدات أنها صبغ نباتية تنتشر فى الأجزاء المختلفة من النبتة ، حيث أنها عبارة عن مركبات طبيعية من نواتج الأيض الثانوي، تكون معظم مركباتها صفراء اللون ،وهى المسؤولة عن ألوان الأزهار و الفواكه و أحيانا الأوراق **[4].**

جميع الفلافونويدات تحتوي على 15 ذرة كربون ،و ذلك في هيكلها الأساسي موزعة على الشكل C_6-C_3-C_6 بحيث تتصل الحلقتان البنزينيتان "A" و "B" بحلقة غير متجانسة "C" تحتوي على عنصر الأكسجين **[5]** .



الشكل -1- يبين الهيكل الفلافونويدي.

كماأنه هناك صيغات نباتية أخرى تسمى الأنثوسيانات ،و هى وثيقة الصلة من الناحية الكيميائية بالفلافونويدات.



ANTHOCYANIDINE

الشكل -2- يبين الهيكل الأنثوسيانى

2- خواص الفلافونويدات

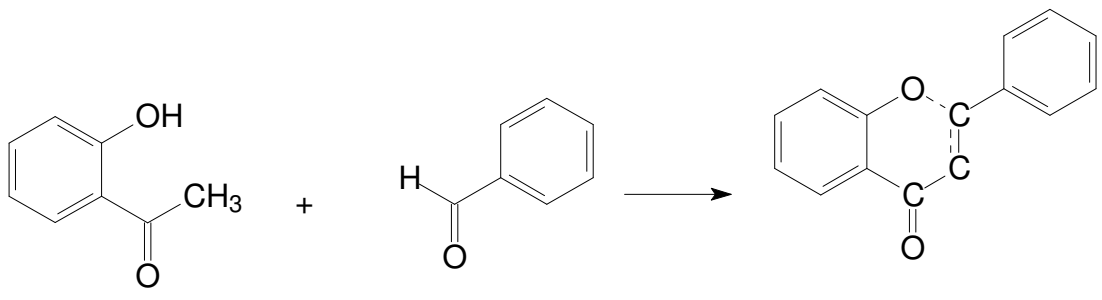
المركبات الفلافونيدية هى مركبات هيدروكسيلية، و لهذا فهي تتمتع بخواص و صفات الفينولات، حيث أنها مركبات ذات خاصية حمضية ضعيفة تذوب فى القواعد القوية .

و الفلافونويدات ذات الخاصية القطبية هى التي تحمل أكبر عدد من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو التي تحوي بقية سكر ذو خاصية قطبية ،ومنه فهى تذوب فى المذيبات القطبية كالميثانول و الايثانول و الأسيتون و الماء ، أما الفلافونويدات الأقل قطبية فهي التى تحمل اكبر عدد من مجموعات الميثوكسيل وهي تذوب فى الكلوروفورم و الايثر **[6].**

3- طرق اصطناع الفلافونيدات:

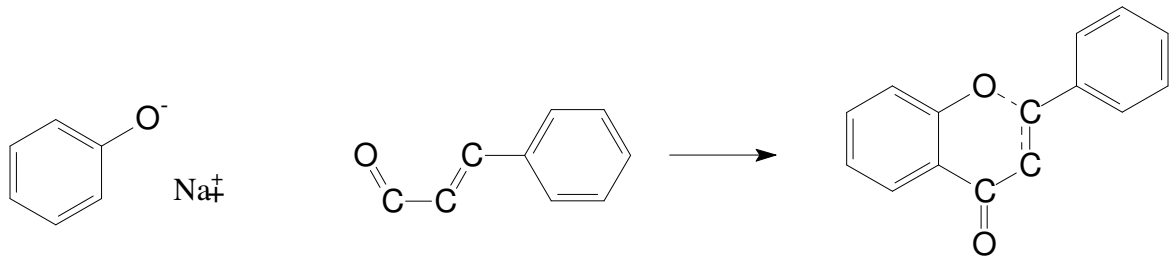
لقد تم اصطناع العديد من الفلافونيدات من أجل مقارنة خواصها بالفلافونيدات الطبيعية، و ذالك بعدة طرق مخبرية أدت الى اصطناع عدد كبير من هذه المركبات، حيث لا يمكن اعتبار أيا من هذه الطرق الطريقة الأساسية لتحضير المركبات الفلافونيدية، لأنها تؤدي جميعا الى تكوين الهيكل الفلافونيدي لكن نظريا يمكن اعتبار طريقة التكاثف الألدولي **الشكل – 3-** و طريقة أسألة الفينولات **الشكل - 4-** الطريقتان الأساسيتان فى تحضير الهيكل الفلافونيدي .

- **التكاثف الألدولي:**



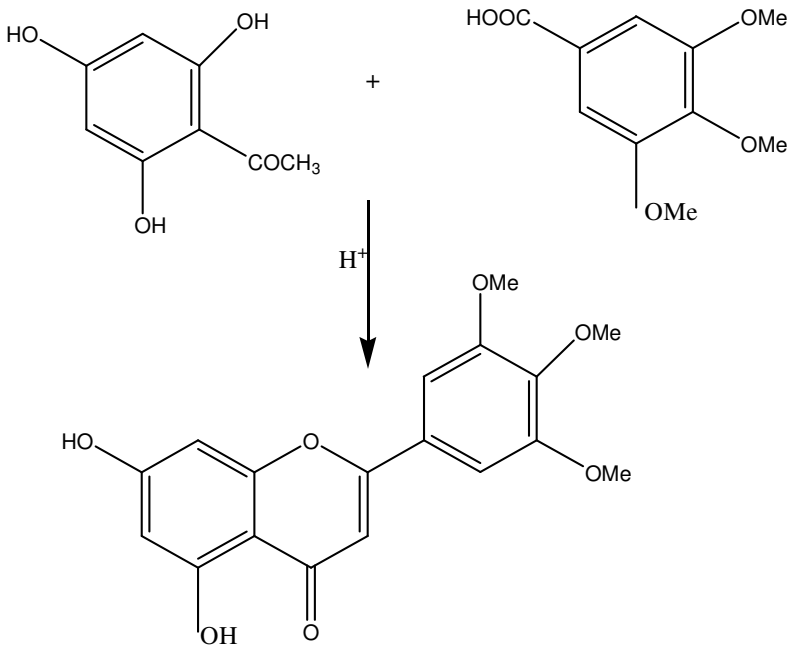
الشكل – 3-

- **اسألة الفينولات:**



الشكل - 4-

كما توجد بعض الطرق الأخرى كطريقة روبنسون التي تتمثل فى تسخين مشتق أرثوهيدروكسي أسيتوفنيون مصدر الحلقة -A- مع خليط من الملح الصوديومي و حمض عطري مستبدل لا مائي مصدر الحلقة - B - **[6].** كما هو موضح في الشكل -5- .



الشكل -5- طريقة روبنسون

4- الاصطناع الحيوي للفلافونيدات:

يختلف الاصطناع الحيوي للمنتجات الطبيعية عن الاصطناع المخبري، حيث ان المنتجات الطبيعية تتكون داخل مصادرها الطبيعية ، بواسطة تفاعلات لا تتعدى أن تكون تفاعلات أكسدة أو اختزال أو ألكلة ذرة النتروجين أو الأكسجين أو أسيلة ، انتزاع ثاني أكسيد الكربون من مجموعة كربوكسيل ....الخ .

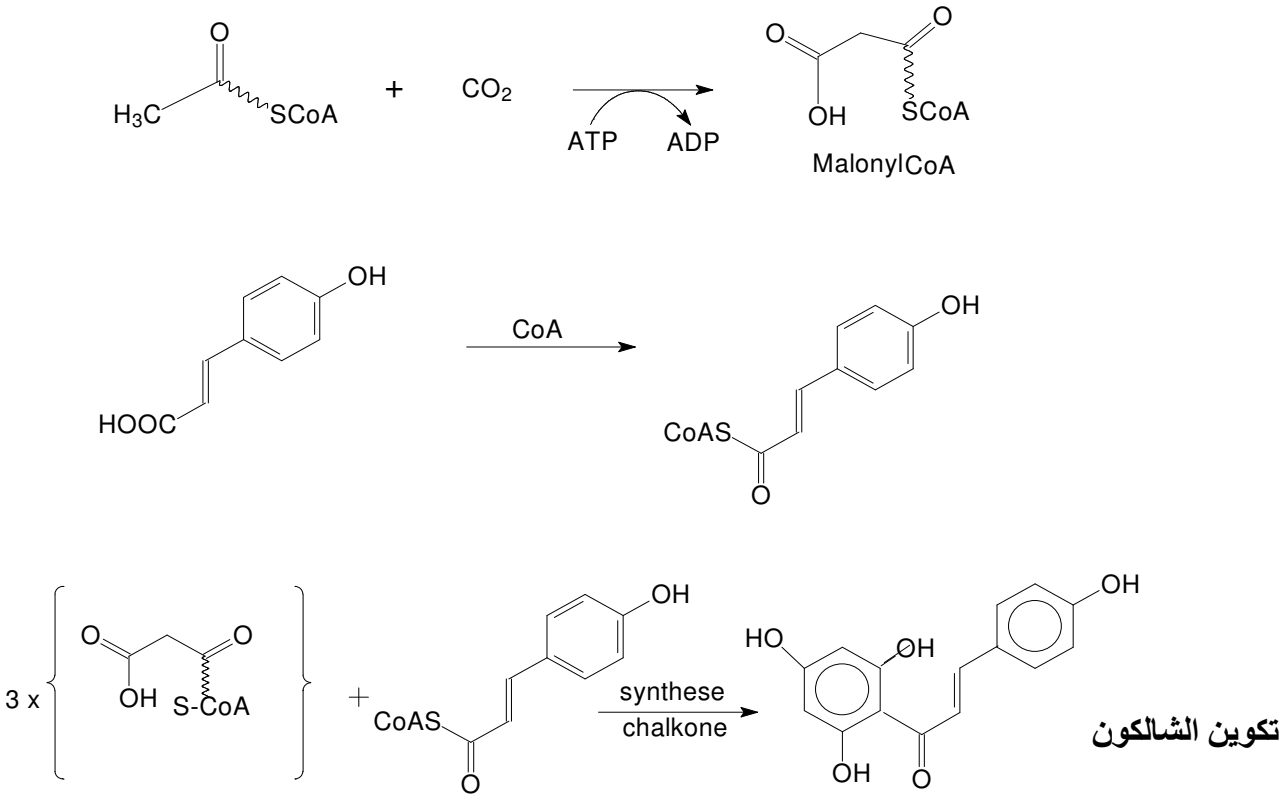
أخذت الدراسات فى هذا المجال تتطور و تعطي نتائج هامة بعد اعتماد تجارب الوسم باستعمال ^{14}C و التي بينت طريق الاصطناع الحيوي للفلافونيدات حيث تبين ان الهيكل الفلافونيدي آت من طريقين و هما :

*طريق الخلات

*طريق الشيكميك

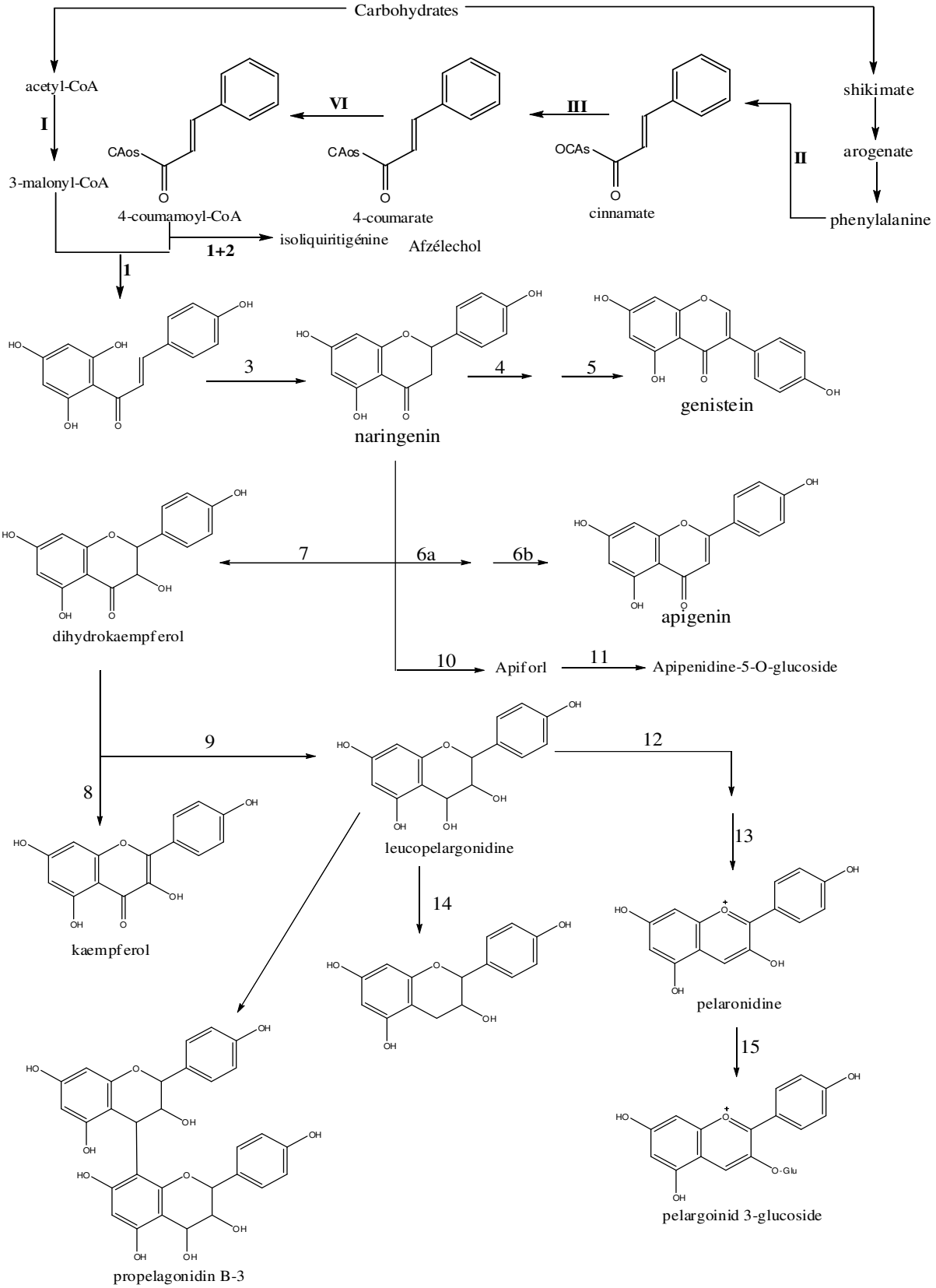
4- 1- طريق الخلات:

الحلقة A تتشكل من تكاثف رأس – ذيل لثلاث وحدات من الخلات على شكل Malonyl-CoA مع حمض Ac.P-Coumarique. الشكل - 6- [7- 10].



الشكل - 6- طريق الخلات

<u>طريق الشالكون:</u> و هي المرحلة الثالثة، حيث يعتبر الشالكون النواة الرئيسية التي تنحدر منها مختلف الهياكل الفلافونويدية.



الشكل -7- الإصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية انطلاقا من الشالكون

الجدول – 1- يبين قائمة الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوى:

العامل المساعد(CO-FACTEUR)	الإنزيم(ACRONYME)	الرقم
-	*Acétyl-CoA*	I
-	*Phénylalanine ammonia-lyase(PAL)*	II
NADPH	*Cinnimate 4- hydroxylase (C_4H)*	III
CO-Sh ATP	*4-Coumarate:CoA ligase (4CL)*	VI
-	*Chalcone synthase (CHS)*	1
NADPH	*Polyketide réductase (PKR)*	2
-	*Chalcone isomérase*	3
NADPH	*2-Hydroxyisoflavone synthase (IFS)*	4
-	*2-Hydroxyisoflavanol déshydrathase*	5
NADPH	*6-a Flavone synthase I (FNSI)*	6
NADPH	*6-b Flavone synthase II (FNSI)*	6
2-Oxoglutarate Fe^{2+} ascoparate	*Flavanone 3-hydroxylase (FHT)*	7
2-Oxoglutarate Fe^{2+} ascoparate	*Flavonol synthase (FLS)*	8
NADPH	*Dihydroflavanol 4- réductase (DFR)*	9
NADPH	*Flavanone 4-réductase (FNR)*	10
NADPH	*Leucoanthocyanidine 4-réductase*	11
Inconnu	*Anthocyanine synthase (ANS)*	12
-	*Flavonoid 3-O-glucosyltransférase (FGT)*	13
-	*Flava-3,4-cis-diol-reductase*	14
-	*Anthocyanidine / flavonol 3-O-glucosyltransférase*	**15**

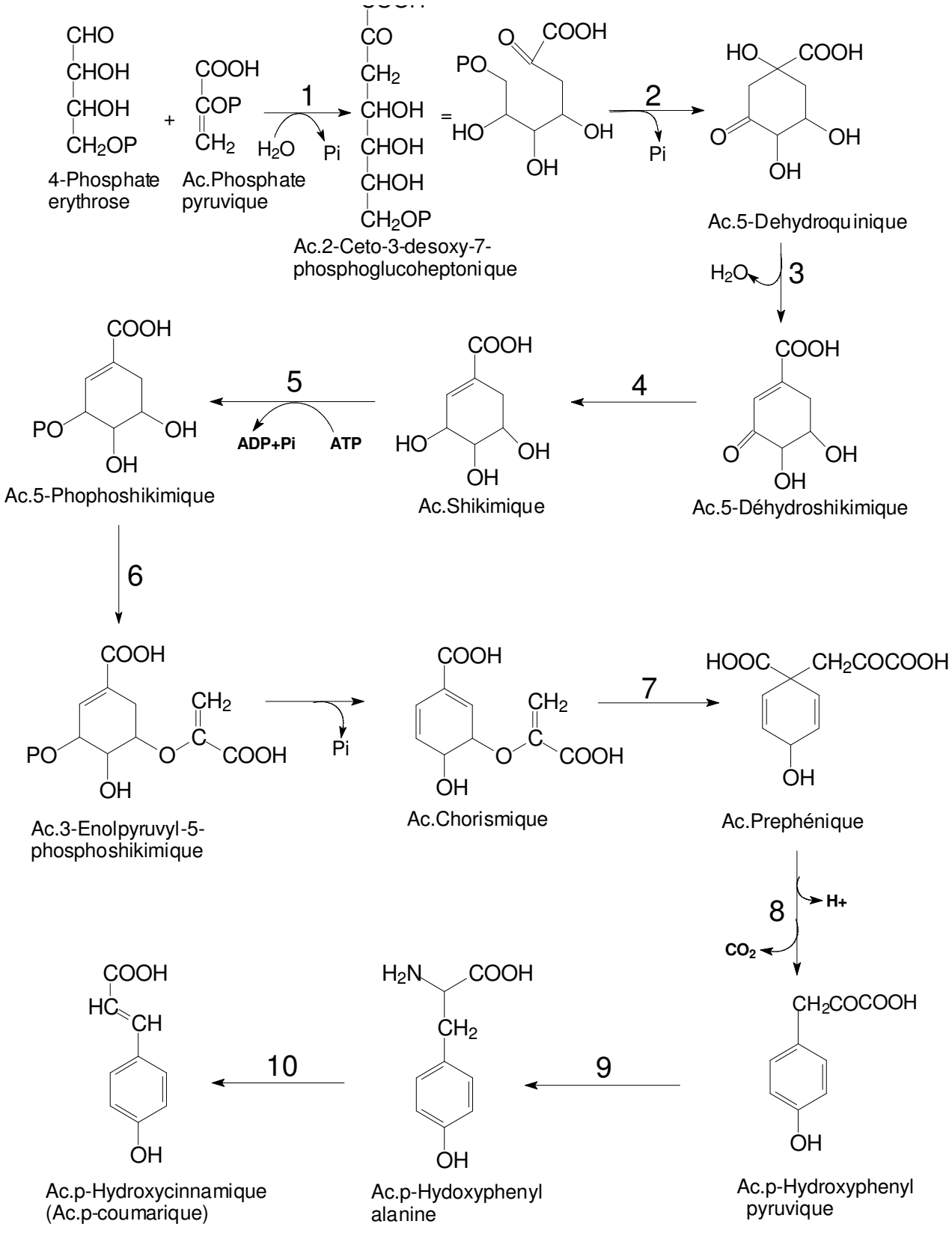
4- 2- طريق الشيكيميك:

أثبت الباحث " Davis " سنة 1955 [11]. دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة B ،و كذلك السلسلة الكربونية الثلاثية C_3 و ذلك بدءا بالغليوكوز، حيث تم عزله لأول مرة من نبتة يابانية Illicium anisatum , shikimi-no-ki و منه اشتق اسمه [12]

كما هو مبين في الشكل - 8- .

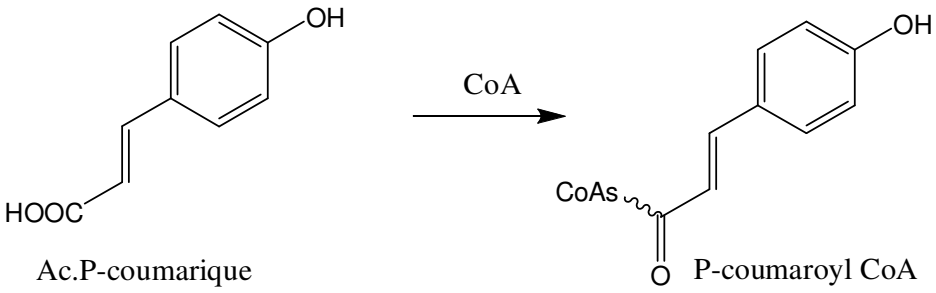
جدول -2- قائمة الإنزيمات الداخلة في تكوين حمض Ac.p-Coumarique

الرقم	الإنزيم
1	Aldolase, 3-désoxy-O-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase ou DHAP synthase
2	Déshydroquinate synthase
3	Déshydroquinate déshydratase
4	Shikimate déshydrogénase
5	Complexe shikimate kinase
6	Ac.Phosphate pyruvique
7	Chorismate mutase
8	Préphénate déshydrogénase
9	Aminitrensférases
10	**Tyrosine ammonia-lyase**



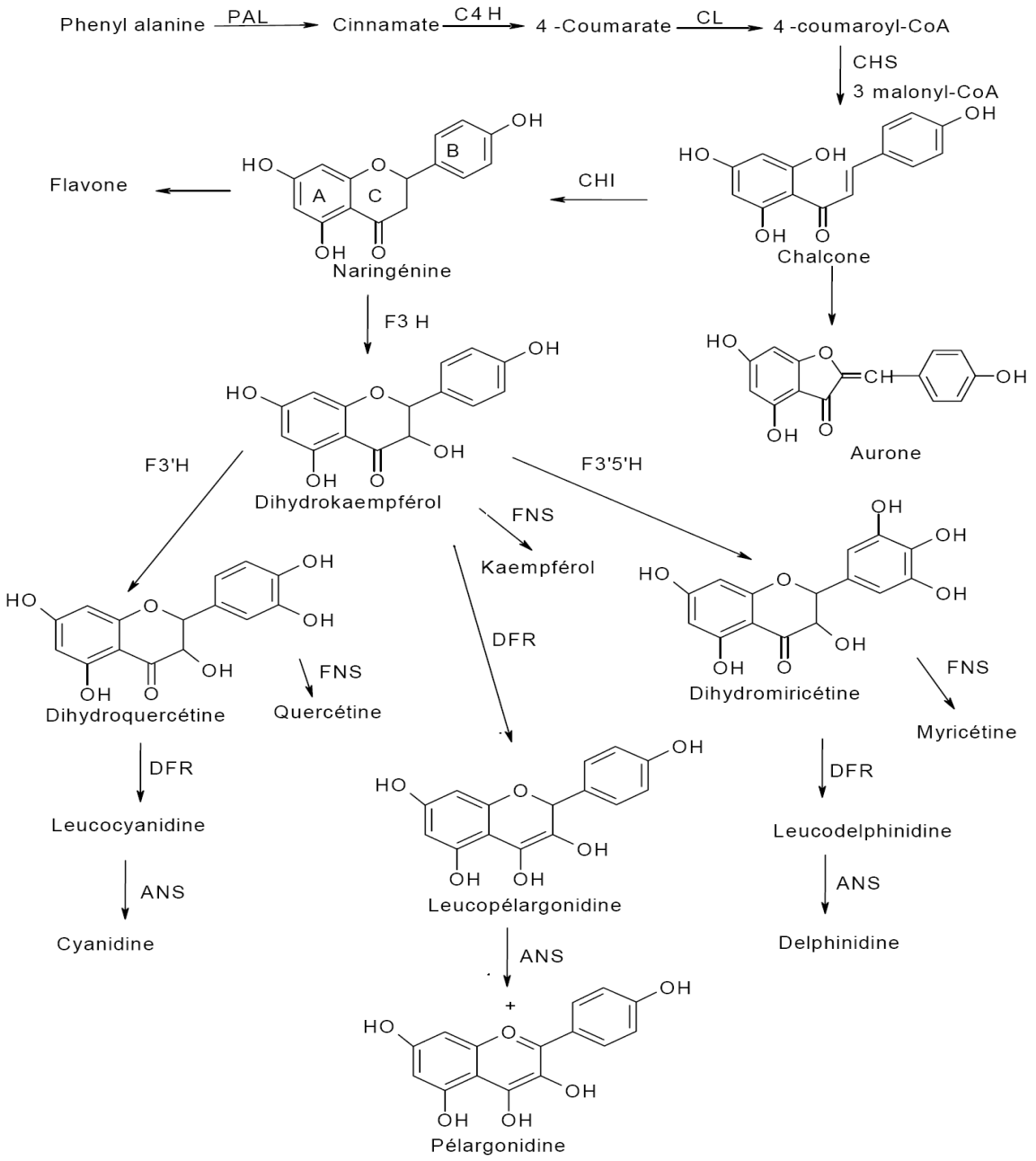
شكل- 8- تشكيل Ac.P-Coumarique انطلاقا من الغلوكوز و مرورا بحمض الشيكيميك

يليه تحول الناتج و المتمثل في Ac.4-coumaroyl (Ac.P-Coumarique) إلى 4-coumaroyl-CoA الذي يكون جاهزا للاتحاد مع Malonyl-CoA في مرحلة قادمة. كما هو مبين في **الشكل -9-**



Ac.P-coumarique P-coumaroyl CoA

الشكل -9-



مخطط-1- :مخطط الإصطناع الحيوي للفلافونويدات [13]

الإنزيمات الداخلة في التصنيع

PAL : phénylalanine ammoniac-lyase ; C4H : *para*-coumarate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate CoA ligase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone flavanone isomerase ; F3H : flavanone hydroxylase ; F3'H :flavonoïde-3'-hydroxylase ; F3'5'H : flavonoïde-3',5'-hydroxylase ; FNS :flavone synthase ; DFR :dihydroflavonol-4-reductase ; ANS : anthocyanidine synthase.

5- تثبيت المجموعات:

5-1- تثبيت مجموعات الهيدروكسيل :

إن تثبيت المجموعات الهيدروكسيلية في الموضعين 5 و 7 يتم قبل تشكيل الحلقة A، و لهذا يعتبران من المجموعات الأصلية للحلقة A [5]. أما بالنسبة للحلقة B فإن هيدروكسيل الموقع 4' يظهر قبل تكوين نواة الشالكون [5]. أما تثبيت مجموعة هيدروكسيل في الموقع 3' و 5' فيتم بعد غلق الحلقة C.[14-15]

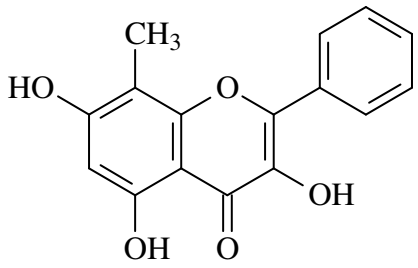
تثبيت مجموعة هيدروكسيل الموقع 3 يتم في مرحلة تشكيل الشالكون.

5-2- تثبيت مجموعات الميثيل

إن تثبيت المثيل يأتي بعد تثبيت الهيدروكسيل، و يتم هذا الأخير على هيكل الأجليكون في حالتين :

- **الحالة الأولى:**

تكون الرابطة بين كربون المثيل و كربون النواتين A و(أو)B و مثال على ذلك المركب **شكل -11-**

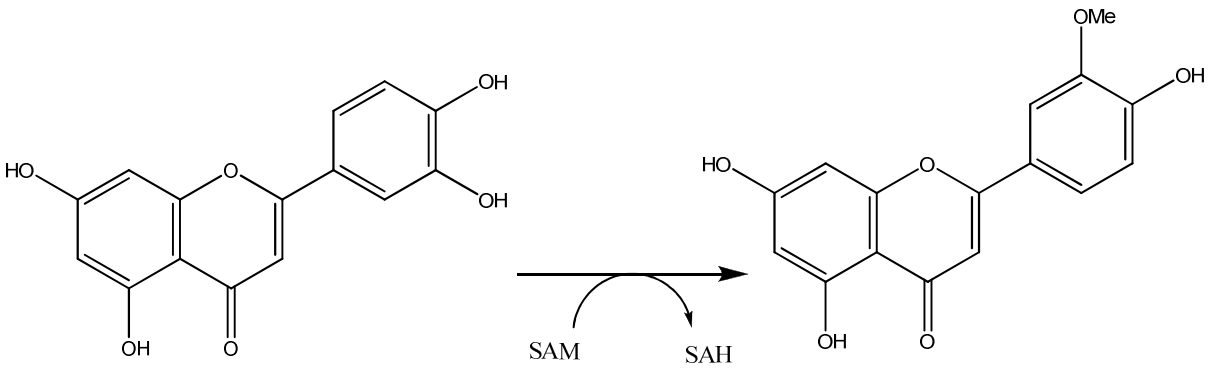


8-C-méthylgalangine

شكل -11-

الحالة الثانية:

هي مثيلية المجموعات الهيدروكسيلية التي تم تثبيتها من قبل (O-methylation) و هذا في وجود أنزيم O-methyltransférase كمانح للمثيل [16] و الشكل -12- يبين ذلك.



Lutéoline

Chrysoériol

SAM : S – adénosyl méthionine SAH : S – adénosyl homocysteine

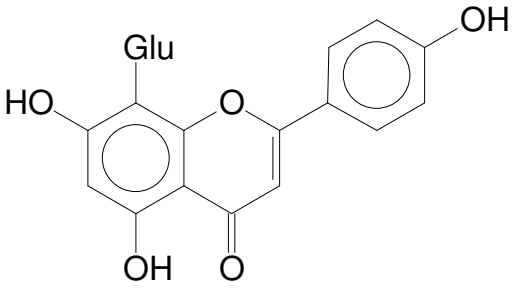
الشكل -12- التحول الإنزيمي لـ *lutéoline* إلى chrysoériol

5-3- تثبيت جزيئات السكر:

توجد المركبات الفلافونويدية على هيئة جليكوزيدات، أي أن بناءها يحتوي على وحدات سكرية قد تكون أحادية أو ثنائية كما يمكن أن يدخل في بناء المركب أكثر من مستبدل سكري.

- **الحالة الأولى:**

تثبيت جزيئية السكر على الأجليكون حيث الرابطة بين كربون السكر و كربون الحلقتين A و B (أو) [10]،[17] (C-glucoside) و هي مقاومة للأحماض والارتباط عادة ما يكون في الموقعين 6 و 8 . و الشكل -13- يبين ذلك.



vitexine

الشكل – 13-

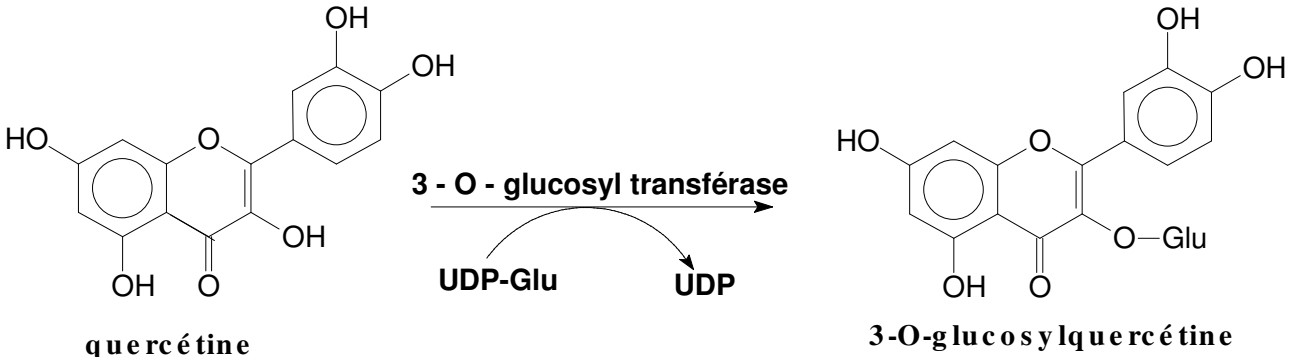
الجدول-3- بعض الاسماء الشائعة لبعض تراكيب الفلا فونيدات من نوع C-glycoside

الاسم الشائع	الاجليكون	الرابطة السكرية C-C	
		C6	C8
Vitexine	Apigénine	_	Glucose
IsoVitexine	Apigénine	Glucose	_
Vicenin-1	Apigénine	Xylose	Glucose
Vicenin-2	Apigénine	Glucose	Glucose
Vicenin-3	Apigénine	Glucose	Xylose
Orientine	Lutéoline	_	Glucose
Isorientine	Lutéoline	Glucose	_
Paniculatine	Génistine	Glucose	Glucose

- **الحالة الثانية:**

و فيه ترتبط جزيئية السكر بذرت أكسجين مجموعة الهيدروكسيل مباشرة أي من نوع (O-heterosidique) و عادة يكون هيدروكسيل الموقع 7 للفلافونات و هيدروكسيل الموقع 3 للفلافونولات و يتم تثبيت السكر في وجود أنزيم "O-glucoside-transférase" و مانح للسكر مثل : "UDP-glu" (Uridine diphosphate glucose) [16].

و الشكل -14- يبين ذلك.



الشكل – 14 – تثبيت جزيئات السكر

السكريات شائعة الإرتباط بالهيكل الفلافونويدي تكون عادة إما هيكسوز (D-galactose، D-glucose) أو بنتوزات (D-Xylose, L-Arabinose).

الجدول-4- يمثل بعض السكريات الشائعة الارتباط بالهيكل الفلافونيدي

الاسم الشائع	البنية
Neohesperidose	***O- α*-Lrhamnosyl (1→2)-glucose**
Rutinose	***O- α*-Lrhamnosyl (1→6)-glucose**
Sophorose	***O- β-D*-glucosyl (1→2)-glucose**
Gentiobose	***O- β-D*-glucosyl (1→6)-glucose**

6 - أهمية الفلافونيدات

تعتبر الفلافونويدات من أكثر المركبات الفينولية انتشارا في المملكة النباتية، إذ حظيت بدراسات كثيرة لمعرفة السبب الرئيسي الذي يجعل النبات ينتج مثل هذه المركبات، بعد أبحاث و تجارب كثيرة، أسندت إليها بعض الأدوار نذكر منها:

6-1 الدور البيولوجي

أ- **الحماية ضد الأشعة فوق البنفسجية:**

* تتراكم الفلافونيدات في الطبقات السطحية للنباتات، لتلتقط ما يصل إلى 90 ٪ من الأشعة فوق البنفسجية التي تصل إلى النبات، لمنع الآثار الضارة لهذه الإشعاعات على الأنسجة الداخلية.

ب - طرد وجلب آكلات الأعشاب:

بعض الفلافونيدات و الطنينات تحمي النباتات من خلال الطعم المر، الشيء الذي يؤدي بآكلات الأعشاب إلى إختيار نباتات أخرى. في حين بعض الفلافونيدات الأخرى تضفي لونا وعبيرا على النباتات و الفواكه خاصة و بذلك تجلب إليها آكلات الأعشاب التي تساهم في عملية تحرير البذور [18].

د – إعطاء اللون للنباتات:

الفلافونيدات هي المركبات الملونة للأزهارو الخضارو الفواكه ، على سبيل المثال الأزرق و الأحمر والبرتقالي بذلك فإن لها دورا مهما في جذب الحشرات التي تساعد في عملية التلقيح، و نقل البذور [19].

زيادة على هذا فالفلافونيدات تدخل أيضا في عمليات التحسس للضوء، نقل الطاقة، و كذلك في عمليات التمثيل الضوئي [20،21].

2-6 الدورالفيزيولوجي

تلعب الفلافونويدات دورا مهما في فيسيولوجيا النبات، كما أن لها تأثير على بعض وظائف خلايا الثدييات، كما يعتقد أن لها صلة بالتنفس، النمو و الأكسدة الإرجاعية[22]

تركيبتها متعددة الفينول تؤثر في عمليات الأكسدة و ذلك بتكوين معقدات مع المعادن chélation des métaux [23-24] ، و بسبب تعدد المجموعات الهيدروكسيلية فهي قادرة على الارتباط بسطح الإنزيمات و من ثم تستطيع تغير التوازنات الإنزيمية و ذلك بتثبيث أو تحفيز البعض منها مثل:

Kaempférol يحفز أنزيم l'auxine-oxydase في حين quercétine يثبثه[25].

3-6 الدورالعلاجي

لجأ الناس إلى النبات من أجل محاولة العلاج للأمراض التي تصيبهم ،وتلعب النباتات الطبية دورا هاما في الأبحاث الصيدلانية و العلاجية، وبالقرب من هذا العالم الطبيعي وبتحسين المعارف حول بنياتها اكتشف الباحثون الفلافونيدات التي كانت :

-تقوي و تحسن أداء عضلة القلب و تقلل من مخاطر أمراض القلب خاصة cardiovasculaire [26، 27].

-تزيد من مقاومة إنكسار الشعيرات الدموية وتمنع حدوث النزيف.

-تحمي من الجلطات الدموية وتخفض نسبة الكولسترول في الدم.

-تحمي الغشاء المخاطي للجهاز الهضمي.

-مسكنة و مضادة للإلتهابات مثل إلتهاب المفاصل [18].

- تمنع حدوث مرض السكري [28].

-مضادات للجراثيم و الفيروسات.

- مضادة للحساسية [21-29]

- مضادة للتشنج [4-29]

- مضادة للتسمم الكبدي [25-29]

- مضادة للبكتيريا [30]

الفصل الثاني

طرق إستخلاص, فصل وتنقية المركبات الفلافونيدية

1- طرق الاستخلاص

عادة ما تجرى عملية استخلاص الفلافونيدات على الجزء الهوائي من النبات، لأن اصطناعها يتعلق بالضوء، وبذلك التراكيز العالية لهذه المركبات تتواجد في الأجزاء النباتية المعرضة للشمس كالأزهار، الأوراق و قشر الفاكهة.

بعد تجفيف و طحن الأجزاء النباتية المراد استخلاص الفلافونيدات منها ، تعامل بمذيب مناسب للاستخلاص ، و أكثر المذيبات استخداما بهذا الصدد هو الميثانول المائى الذى يستخدم باحدى النسب التالية :

(كحول / ماء) بنسب معينة (3/7) أو (2/8) و ذلك في حالة المادة النباتية الجافة، و يستعمل الكحول لوحده في حالة ما إذا كانت المادة النباتية غضة (خضراء)، الكحولات المستعملة هي الإيثانول و الميثانول و يتفادى استعمال الماء المقطر لوحده لأنه قد يؤدي إلى استخلاص مواد غير فلافونيدية كالدهون هذا من جهة و من جهة أخرى الصعوبات التي نصادفها أثناء عملية التركيز.

نأخذ الأجزاء النباتية المطحونة و نسكب عليها المحلول الهيدروكحولي على البارد و نتركها لمدة لا تقل عن 24سا مع التحريك من حين لآخر، بعدها نرشح و نركز الراشح، تكرر العملية3 مرات أو أكثر و في كل مرة نرشح و نركز الراشح و ذلك بتبخير أكبر كمية ممكنة من المحلول الهيدروكحولي أين نتحصل على المستخلص الخام ، و من ثم يرشح المستخلص الخام و يغسل بالمذيب المستخدم للاستخلاص .

يختزل حجم الرشاحة ، و ذالك بتبخير أكبر كمية ممكنة من الميثانول و من ثم تعامل الرشاحة بالماء المقطر في درجة الغليان ثم تترك ليلة كاملة بعدها يتم استخلاص أولي بواسطة الهكسان كي يتم التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون و التربينات و الكلوروفيل (قد تحوي رشاحة الهكسان بعض الفلافونيدات و على الأخص تلك التي لا تتصف بقطبية ، و عليه فان هذه الرشاحة لا تهمل ، و يكشف عن وجود الفلافونيدات فيها) . الرشاحة المائية تعامل بخلات الأيثيل في خطوة ثانية ، تجمع المستخلصات و تركز تحت ضغط منخفض أما الطور المائي تجرى له هو الآخر عملية استخلاص بواسطة البوتانول العادي ، تجمع كذالك مستخلصات البوتانول و من ثم يتم فصل و تنقية هذه المركبات الطبيعية .

يكون لدينا في النهاية :

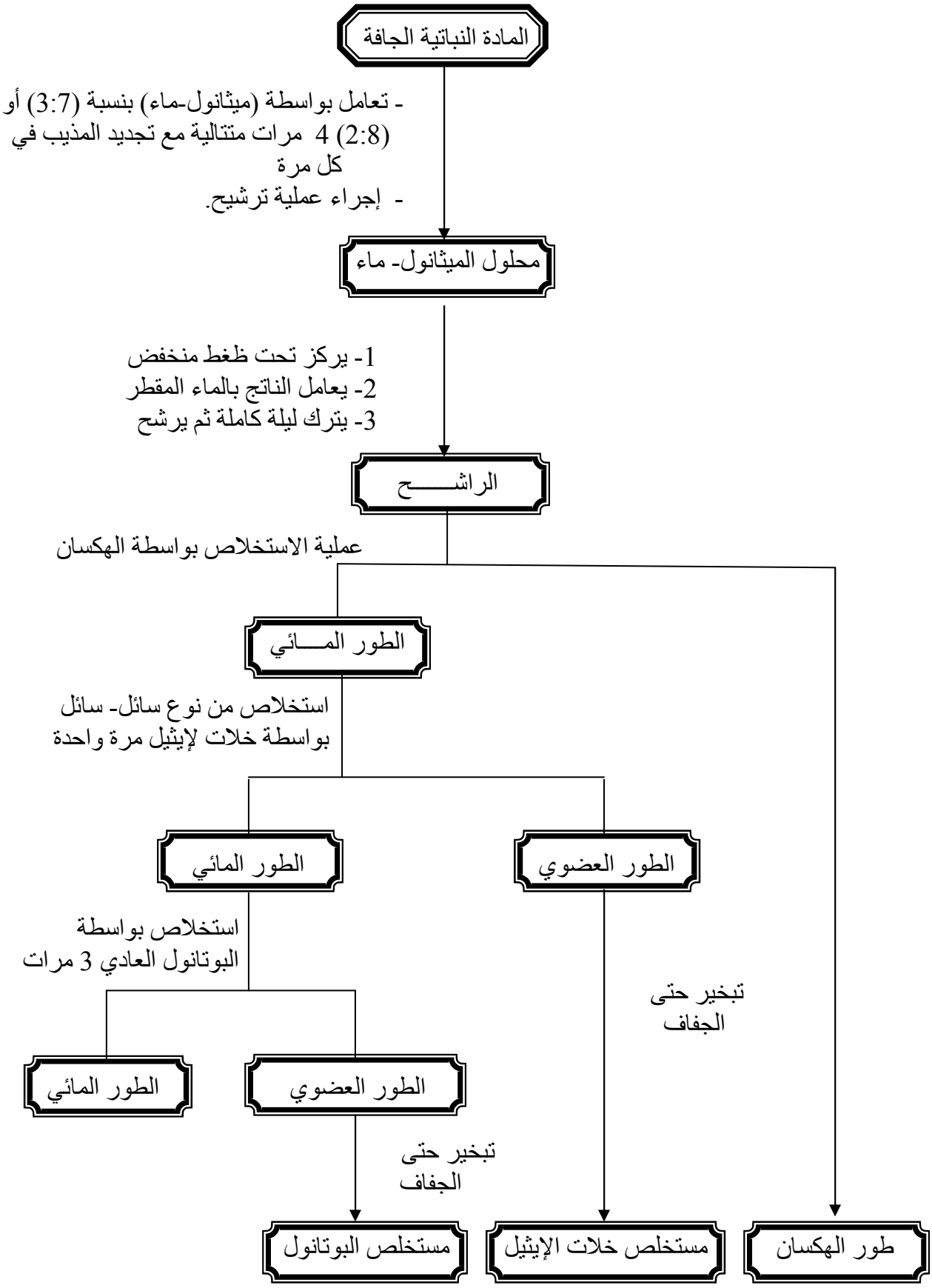
المستخلص الجاف للإيثر البيترول.

المستخلص الجاف لخلاّت الإثيل.

المستخلص الجاف للبوتانول العادي.

المستخلص المائي.

و يمكن أن تتبع بعد ذلك الخطوات الواردة في **الشكل15** [31 ،32]. الذي يبين الطريقة الأساسية لعملية استخلاص الفلافونويدات.



الشكل15 الطريقة الأساسية لعملية استخلاص الفلافونويدات.

2- طرق الفصل والتنقية

2-1-الفصل

* فصل الفلافونيدات مؤسس على التقنيات الكروماتوغرافية المعتادة نذكر منها:

كروماتوغرافيا العمود(CC).

كروماتوغرافيا الورق (CP).

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).

كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC).

2-1- 1 - كروماتوغرافيا العمود(CC)

هي طريقة كلاسيكية، الهدف منها هو فصل خليط معقد من المركبات الفلافونيدية و يستعمل لهذا الغرض كدعامة ثابتة :

السيليكاجال، السيليلوز، و متعدد الأميد.

حيث يستخدم السيليكاجال لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية، أما السيليلوز فقد أثبت فعاليته في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر؛ غير أن متعدد الأميد لقى تطبيقا واسع النطاق في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية بعضها عن بعض.

و يتلخص طريق إجراء هذه التقنية فيما يلي :

- يؤخذ العمود الذي تختلف أبعاده باختلاف كمية المستخلص و يثبت بواسطة حامل و يعبأ بالطور الثابت المشبع بالمذيب الأقل قطبية.

-بعد ترصيص الطور الثابت جيدا داخل العمود توضع من رمل خاص يدعى **Sable de fontainebleau** بسمك 0.5 سم، بعدها تحضر العينة حيث يذاب المستخلص المراد فصله في أقل كمية ممكنة من الميثانول، و بواسطة ماصة باستور يتم وضعه على سطح الرمل مع الحرص على عدم إتلافه، أو باتباع طريقة أخرى و التي تستعمل في حالة ما إذا تطلبت إذابة المستخلص الجاف كمية كبيرة من الميثانول، ففي هذه الحالة نضيف لمحلول المستخلص كمية من مسحوق البولي أميد SC_6 و نركز هذا الخليط حتى نحصل على مسحوق جاف الذي يضاف إلى العمود الكروماتوغرافي، بعد ذلك يضاف المملص الذي يكون في البداية مذيب أقل قطبية ثم ترفع قطبيته بإضافة مذيب قطبي تدريجيا إلى غاية

الوصول إلى قطبية عالية، و يتم مراقبة الحزم باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV حيث تستقبل أسفل العمود و تركز حتى الجفاف.

1-2 - 2 - كروماتوغرافيا الورقة الرقيقة (CP)

- تستعمل كروماتوغرافيا الورق في فصل الفلافونيدات خاصة القطبية منها مثل الفلافونيدات ذات المستبدلات السكرية، إذ تساعد على فصل العدد الأكبر من الأحماض الفينولية [33] ، كما تستعمل على المستخلص مباشرة في حالة عدم غناه بالمركبات الفلافونيدية أو لجمع و فصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي، و تستخدم فيها عدة جمل مملصة أساسها حمض الخل لتحسين عمليات الفصل [34] منها:

4 / 1 / 5 : (الماء/حمض الخل/ البوتانول العادي) B.A.W (16-18سا).

30 /10/ 3 : (حمض الكلور/ الماء/ حمض الخل) Forestal (15ساعة).

3 / 1 / 1 : (الماء / حمض الخل/ البوتانول الثالثي) T.A.W.

1/ 1 : (البوتانول العادي/حمض الكلور2N) (24 ساعة).

4/ 1 / 2.2 : (الماء/ الإيثانول/البوتانول العادي) B.A.W .

حمض الخل بتراكيز مختلفة من 5 إلى 70 ٪ (من 6 إلى 8 ساعات).

1-2 - 3 - كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (CCM)

تحضر طبقة رقيقة من دعامة صلبة على شريحة من الزجاج (20 سم x 20 سم) ثم يوضع الخليط عرضيا على بعد 1.5سم من خط الانطلاق ثم توضع الشريحة في حوض به المملص المناسب، و أثناء هجرته يمر بالعينة الموضوعة أين يجر معه مختلف المركبات في شكل حزم التي يتم تحديدها بواسطة مصباح UV، بعد أن تجف الصفائح تكشط الحزم كلا على حدا و توضع في قمع زجاجي لتغسل مرتين، الأولى بالمملص المستعمل و الثانية بالميثانول، يركز الراشح و تجرى له عمليات فحص متعددة للتأكد من نقاوته و للأنظمة المستعملة كمملصات [35]

الجدول- 5- و - 6- يبين أهم المملصات المستخدمة في تقنية CCM حسب طبيعة الفلافونويد:

الجدول -5- بالنسبة لمتعدد الأميد (كدعامة صلبة):

نوع الفلافونويد	جملة المملصات
الغليكوزيدية	(اسيتيل أسيتون , ميثيل إيثيل سيتون,الميثانول,الماء المقطر) (13,3 ,3,1)
الأجليكونية قليلة الهيدروكسيل	(المياثانول ,ميثيل إيثيل سيتون , الإيثر,الطولوين) (60,2 ,10, 10) (المياثانول,ميثيل إيثيل سيتون,الهكسان ,الطولوين) (30, 90 ,2 ,1.5) (المياثانول ,ميثيل إيثيل سيتون , الطولوين) (4,3,3)
الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل	(الماء المقطر, حمض الخل , الميثانول) (18,1,1) (حمض الخل,البوتانول العادي,الإيثانول,الماء المقطر) (50 , 25 ,20 , 2)

الجدول -6- بالنسبة للسيليكاجال (كدعامة صلبة):

نوع الفلافونويد	جملة المملصات
الغليكوزيدية	(الميثانول,الماء المقطر,البيريدين,خلات الإيثيل) (80 , 20 , 10, 5)
الأجليكونية قليلة الهيدروكسي	(الميثانول, الكلوروفورم) (15, 1)
الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل	(الطولوين,أسيتون,الكلوروفورم) (7, 5 , 8) (الماء المقطر , الميثانول, خلات الإيثيل) (63, 12,9)

2-1 - 4 - كروماتوغرافية نظام السائل عالي الآداء(HPLC)

تسمح هذه التقنية بتحديد المحتوى الفينولي للعينة المراد تحليلها، و هي نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي التجزيئي الذي يتطلّب استخدام ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمود، و

هي التقنية الأفضل لفصل و تحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير [36] ، و أهم المذيبات المستعملة هي :

المذيب 1 : الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : (900 / 100 / 40).

المذيب 2 : الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : (200 / 800 / 40).

- يجر المملص معه المركبات في العمود بصفة انتقائية فتنزل المركبات ثنائية السكر قبل أحادية السكر؛ و هذه الأخيرة قبل الأجليكونات [37] .

- و بالنسبة للأجليكونات التي تحتوي على الأكسجين في الحلقة B فيملص المركب الذي يحتوي على ثلاث مجموعات (OH) في الحلقة B قبل الذي يحتوي على مجموعتي (OH) و هذا الأخير قبل الذي يحتوي على (OH) واحدة دائما على الحلقة B [38] .

2-2- التنقية

الهدف من تنقية المركبات المفصولة بتقنيات الكروماتوغرافية السابقة تنقية جيدة، هو التخلص من الشوائب العالقة بالمركبات المعزولة و هذا باستعمال دعامات مختلفة: متعدد الأميد SC6 ، السيليلوز ، gel de Séphadex، السيلكاجال، كما تختلف جمل المذيبات المستعملة.

و للحصول على نتائج جيدة نستعمل عمود بطول 20سم و قطر 1سم ثم نتبع الخطوات التالية:

2-2- 1 - التنقية على عمود من متعدد الأميد SC_6

يفضل في حالة الفلافونيدات ذات القطبية العالية لاحتوائه على وظيفة carbonyle-amide التي تكوّن روابط هيدروجينية مع الهيدروكسيلات في المركبات الفينولية [39، 40]. مما يسمح بفصل الفلافونيدات، وتكون عادة الجمل المملصة في هذه الحالة:

* Toluène ⟶ Méthanol

* Eau ⟶ Méthanol

2-2- 2 - التنقية على عمود من السيفاداكس

تستعمل هذه التقنية في المراحل الأخيرة من عمليات الفصل و التنقية. و لتحقيق عمود من Sephadex LH20 يتم نقع جال السيفاداكس في الميثانول، ثم يصب المزيج بلطف في

العمود، و بعد استقراره يتم وضع المركب المفصول و المذاب في أقل كمية ممكنة من الميثانول على السطح بعناية، يملص بعدها بدفعات متتالية من الميثانول، حيث يخرج المركب أسفل العمود نقيا و جاهزا لمختلف الدراسات البنيوية.

الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونيدية

التحليل البنيوي للفلافونيدات لا يمكن أن يتم إلا على المركبات النقية، بحيث يتطلب ذلك تقنيات فيزيائية-كيميائية لتحديدها مثل

-الخواص الكروماتوغرافية:

اللون الإستشعاعي و هو لون المركب عند تعرضه للأشعة فوق البنفسجية.

ثابت الإحتباس Rf.

كذلك على التقنيات الفيزيوكيميائية المختلفة:

مطيافية الاشعة فوق البنفسجية UV.

مطيافية الكتلة SM.

مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ($RMN-^{1}H$, $RMN-^{13}C$)

الإماهة الحمضية

1- الخصائص الكروماتوغرافية

1-1 اللون الاستشعاعي

اللون الإستشعاعي للمركبات تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية (lumière de Wood) يمثل المرحلة الأولية للتحليل، ويلعب دورا مهما في التحديد البنيوي للمركبات الفلافونيدية والجدول **(7)** يلخص بعضها [41،42].

*** الجدول (7)**: اللون الإستشعاعي للفلافونيدات تحت مصباح UV .*

لون المركب تحت أشعة UV	نوع الفلافونيد
بنفسجي-أسود.	. فلافون. . 5،6،7 أو 8،7،5 ثلاثي هيدروكسيل فلافون. . فلافونول مستبدل في الموضع 3. . بعض الشالكونات.
بنفسجي-نيلي.	. فلافونول أو فلافانول يملك هيدروكسيل في الموضع3. . فلافون أو فلافانون دون OH في الموضع5. . فلافونول مستبدل في 3 أو دون OH في الموضع 5.
أصفر أو أصفر باهت.	. فلافونول مع OH حر في3 و/أو دون OH حر في 5.
برتقالي لامع.	.إيزوفلافون.
أصفر مخضر.	. أورون.
أخضر.	. بعض الشالكونات.
أزرق مخضر.	. فلافانون دون OH في الموضع 5.
أزرق فاتح (مشع)	. فلافون دون OHحر في الموضع 5 .فلافونول دون OHحر في الموضع 5 مع OH-3 مستبدل

2-1 معامل الانحباس Rf

1 - من خلال قيم معامل الإحتباس R_f في نظام مذيب معين يمكن معرفة طبيعة الفلافونيد الذي بحوزتنا .

و يعرف هذا الأخير (أي R_f) بأنه النسبة بين المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية والمسافة المقطوعة من طرف المذيب من نفس النقطة، و هو قيمة مميزة لكل مركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، المذيب،) و ترتبط قيمة R_f بطبيعة المجموعات الاستبدالية على المركب [43 , 44] .

و يتم قياس R_f للمركبات النقية عادة في ثلاث أنظمة لمذيبات مختلفة :

النظام 1 : (4 / 3 / 3) (Toluène / méthanol / méthyléthylcétone

النظام 2 : (13 / 3 / 3 / 1) : . Acétylacétone /méthyléthylcétone /

eau/méthanol

النظام 3 : Acide acétique: 15 %

ومن خلال قيم R_f في مختلف الأنظمة يمكن معرفة ما إذا كان المركب أجليكونا أو إيتيروزيدا، كذلك معرفة ما إذا كان أحادي، ثنائي أو ثلاثي السكر [43، 45] . فمثلا :

قيمة R_f تزداد لأن مجموعات الهيدروكسيل الحرة قليل في نظام مذيب عضوي، و العكس في نظام مذيب مائي [44] .

إذا كان المذيب مستبدل بسكر واحد أوأكثر ، فإن قيمة R_f تزداد في نظام مائي و تنقص في نظام عضوي

والجدول (8) يبين العلاقة بين الفلافونيد وقيمة R_f.

* **الجدول (8)**: العلاقة بين قيمة R_f وبنية الفلافونيد.*

بنية الفلافونيد	قيمة R_f
زيادة عدد مجموعات OH	تنقص قيمة R_f في الأنظمة العضوية(4/3/3) (T/MEC/MeOH)
زيادة عدد مجموعات OCH_3	تزيد قيمة R_f في الأنظمة العضوية
وجود السكر	تنقص قيمة R_f في الأنظمة العضوية تزيد قيمة R_f في الأنظمة المائية (H_2O/EtOH/MEC/Acétylacétone 13/3/3/1)
مثألة OH الموضع 5	تزيد قيمة R_f في الأنظمة العضوية تنقص قيمة R_f في الأنظمة المائية
وجود مجموعات أستيل	تزيد قيمة R_f في الأنظمة العضوية تنقص قيمة R_f في الأنظمة المائية

2- طرق التحليل الطيفي :

2-1 مطيافية الأشعة فوق بنفسجية

تعتبر مطيافية الأشعة فوق البنفسجية من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على البنية الكيميائية للمركبات الفلافونويدية، و قد نشرت أبحاث كثيرة بهذا الصدد [45-48] .

و تكمن أهميتها في أنها :

-لا تحتاج إلى كمية كبيرة من المركب لإنجازها (0،1 ملغ).

-سهولة و سرعة تحقيقها.

-تعطي معلومات معتبرة عن البنية المحتملة للمركب.

أ-طيف إمتصاص الميثانول:

يؤخذ طيف الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية (UV) في العادة للمركب الفلافونيدي في محلول الميثانول أو الايثانول . و بصورة عامة فان طيف (UV) يتميز بحزمتي طيف في جميع الفلافونيدات الا أنه يختلف مكان امتصاص هاتين الحزمتين باختلاف نوع المركب الفلافونيدي . و يشار الى هاتين الحزمتين بالحزمة I (التي تمتص عند طول موجة أعلى) و الحزمة II ، و يبدو مكان امتصاصها للمركبات الفلافونيدية المختلفة في الجدول (9)

الجدول -9- طيف إمتصاص الميثانول

نوع المركب الفلافونيدي	الحزمة I	الحزمة II
فلافون	350-320	270-250
فلافونول	385-352	280-250
فلافونون	330-300	275-245

من الملاحظ انه كلما زاد عدد مجموعات الهيدروكسيل فان حزمة الامتصاص تنزاح الى طول موجي أعلى . و عند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات الميتوكسيل أو وحدات سكر تنزاح حزمتا الامتصاص الى طول موجي أقل [43].

كما يمكن أن يفيد طيف الميثانول في إعطاء عدة معلومات حول بنية الفلافونيد بحيث:

تدل الشدة الضوئية الكبيرة للعصابة I مقارنة بالعصابة II على وجود مجموعة هيدروكسيل حر في الموقع 4'.

قيمة العصابة I تساعد على الحكم بأن الفلافونيد من النوع فلافون أو فلافونول.

قيمة العصابة II تساعد على تحديد وجود OH أو أكثر على الوحدة B. بحيث إذا ظهرت العصابة II عند 270 ن.م فهذا دليل وجود OH في الموقع 4' [38] ، أما إذا ظهرت قمتين أو قمة و نتوء عند 258 ن.م و 278 ن.م على الترتيب فيدل على وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل أو متعدد الهيدروكسيل على الوحدة B [38].

بإضافة كواشف معينة إلى محلول الميثانول مثل: NaOH ، NaOAc أو $AlCl_3$ + HCl يمكننا من التعمق أكثر في الدراسة البنيوية حيث تتوضح لنا مستبدلات الهيكل الفلافونويدي.

فالمعلومات المستخلصة من طيف امتصاص الميثانول تكون مكملة للتي تعطيها لنا الأطياف المأخوذة بوجود هذه الكواشف، لأنها في الغالب تعطي ألوانا مميزة إذا ما أضيفت إلى المحلول الميثانولي.

هذه الألوان تظهر نتيجة تغير مكان امتصاص حزم طيف UV و ذلك بسبب تكوين معقدات مع تلك الكواشف.

أ- في وجود NaOH:

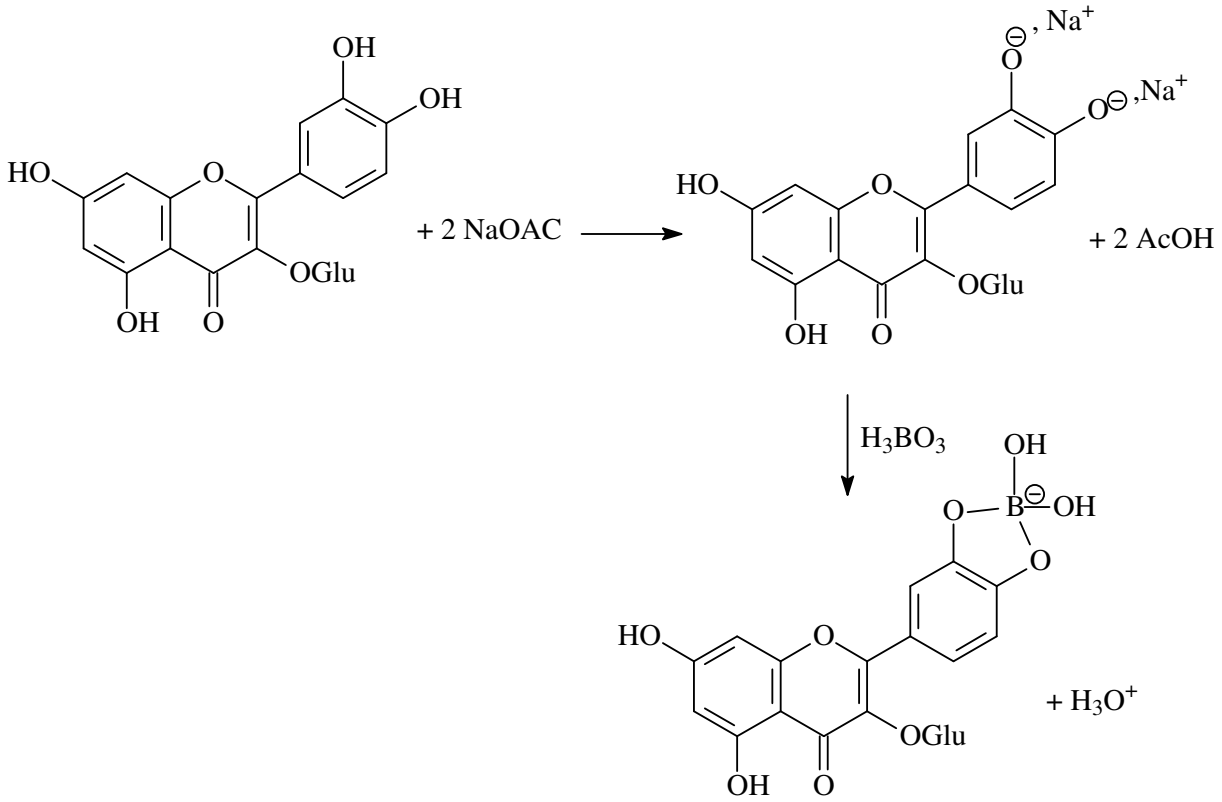
يعتبر NaOH أو (NaOMe) أساس قوي يؤين كل هيدروكسيلات الفلافونيد، و إضافتها لـ (مركب + ميثانول) تحدث إزاحة باثوكرومية لكل الطيف، و تأثيرها يظهر خاصة على العصابة I.

ب- في وجود NaOAc:

تؤين NaOAc مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حمضية مثل هيدروكسيلات المواقع 7،3 و4' باعتبارها قاعدة أضعف من NaOH . ، و يظهر ذلك جليا على العصابة (II) للطيف المسجل إذ انه يحدث فعل باثوكرومي [+5 إلى +20 نم] للعصابة (II)، و يشير ذلك إلى وجود OH حر في الموضع C_7 [49].

ج- في وجود H_3BO_3 + NaOAc:

يضاف H_3BO_3 على العينة في وجود NaOAc للكشف عن أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB في الموقع '3 ،'4 بالانزياح الباثوكرومي للعصابة I(12-36 ن.م) [43] ، و يلغى في حالة استبدال أحدهما. و على الحلقة A في المواقع 6،7 أو 7،8 من خلال المعقدات التي يشكلها، و الفعل الذي يظهره هو فعل باثوكرومي للعصابة I مقارنة بالطيف المسجل في الميثانول [50].أنظر الشكل16 .



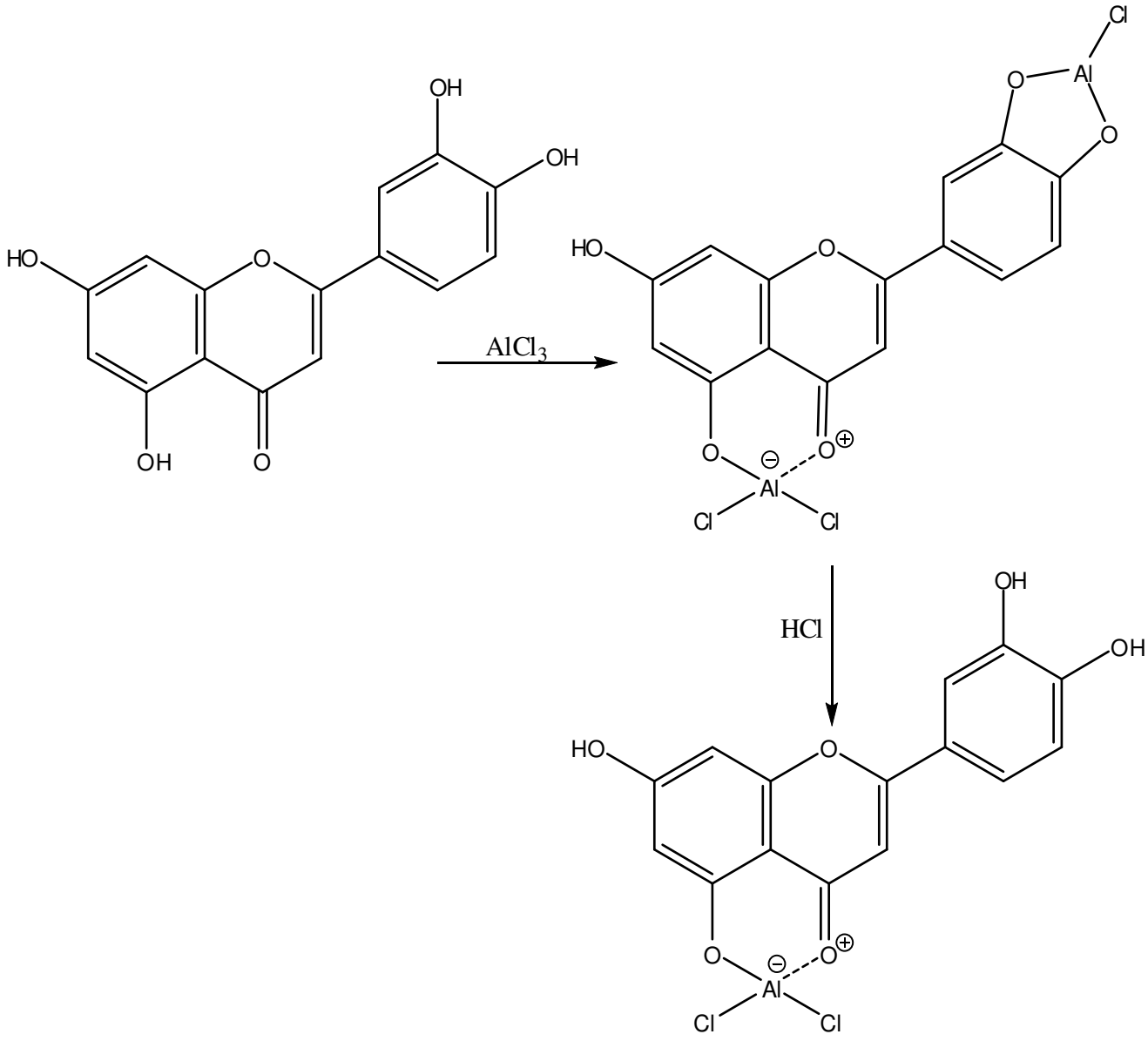
الشكل-16-: المعقد المتشكل بين الفلافونيد و (H_3BO_3 + NaOAc)

د- في وجود $AlCl_3$:

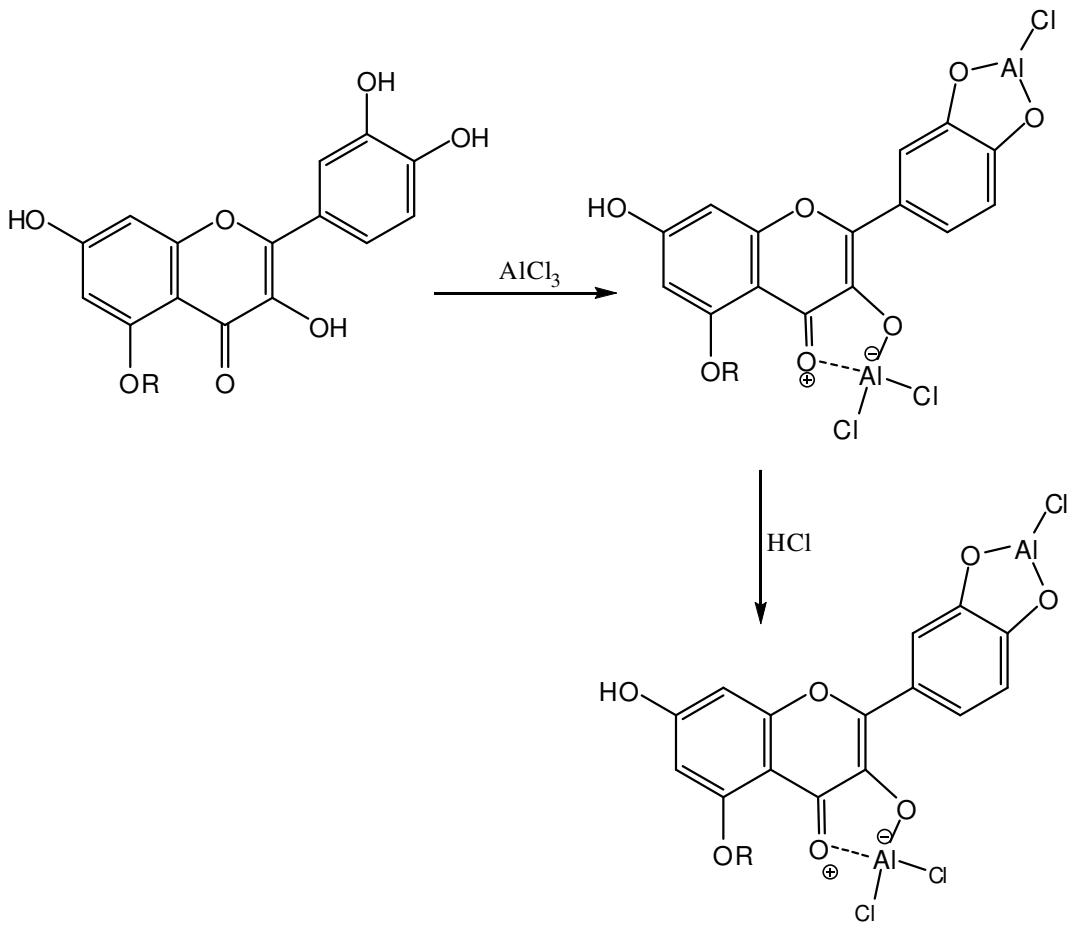
يشكل $AlCl_3$ معقدات ثابتة بين كربونيل الموضع 4 و هيدروكسيل الموضع 3 أو الموضع 5 في الوسط الحمضي أي بعد إضافة HCl، و معقدات غير ثابتة في الوسط الحمضي مع المركبات المحتوية على مجموعتي هيدروكسيل حرة في ('3 ، '4)؛ (7 ، 8)؛ (6 ،7) كما هو موضح في الشكل (17-18).

ه- في وجود $AlCl_3$+ HCl:

نقارن الطيف المسجل في وجود $AlCl_3$ مع المسجل بعد إضافة HCl فتكون الإزاحة إيبسوكرومية بـ (30-40 ن.م) للعصابة I في حالة وجود معقد غير مستقر و هذا معناه وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A وB و بذلك يكون طيف $AlCl_3$ الممثل لتأثير كل المعقدات الثابتة و غير الثابتة ، أما طيف $AlCl_3$ +HCl فطيف المعقدات الثابتة فقط.



شكل-17- المعقدات الثابتة و الغير ثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد اضافة HCl



شكل-18- المعقدات الثابة و الغير ثابة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد اضافة HCl (تابع)

والجدول **10** يوضح مختلف التأثيرات المحتملة على طيف UV و تفسيراتها قبل وبعد إضافة الكواشف[43] , [51- 53]

الجدول- 10 مختلف التأثيرات المحتملة على طيف UV

الكاشف	الإزاحة الملاحضة(نم)		التعليل
	العصابة(I)	العصابة(II)	
MeOH	350-310	280-250	فلافون
	360-330	280-250	فلافونول(3-OR)
	385-350	280-250	فلافونول(3-OH)
NaOMe (NaOH)	استمرار تناقص شدة الإمتصاص بمرور الزمن (تفكك الطيف)		3,4'-OH أو أرثو ثنائي OH على الحلقةA أو ثلاثةOH متجاورة على الحلقة B
	+45 إلى 60 دون نقصان في شدة الإمتصاص		4'-OH
	+45 إلى 60 مع نقصان في شدة الإمتصاص		3-OH, 4'-OR
	عصابة جديدة بين 335-320		7-OH
NaOAc	$\Delta\lambda(I) < \Delta\lambda(I)$ NaOMe NaOAc	+ 5إلى + 20	7-OH
		إزاحة صغيرة	7-OH مع مستبدل أكسجيني فيC_6 و/أو في C_8
		طيف يتفكك بمرور الوقت	5,6,7 ; 5,7,8 ; 3,3',4' tri-OH
$NaOAc + H_3BO_3$	+12 إلى + 36		أرتو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرتو ثنائي الهيدروكيل على الحلقة A(6,7-7,8)
$AlCl_3$	+30 إلى +40 مقارنة بطيف $HCl+ AlCl_3$ +20 إلى +25 مقارنة بطيف $HCl +AlCl_3$		أرتو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرتو ثنائي هيدروكسيل على الحلقةA (إضافة إلى أرتو ثنائي الهيدركسيل على الحلقةB)
$AlCl_3$+HCl	+17 إلى +20 +35 إلى +55 +50 إلى +60 بدون تغيير		5-OH مع وجود مجموعة أكسجينية في C_6 5-OH مع عدم وجود مجموعة أكسجينية في C_6 3-OH أو 3-OH و 5-OH إمكانية 5-OH و مجموعة برينيل في C_6

2-2- مطيافية الكتلة

تعتبر مطيافية الكتلة من أهم الطرق الفيزيائية التي تقدم معلومات عن بنية المركبات الفلافونيدية اذ تمكن من التعرف على الأوزان الجزئية بالاضافة الى عدد و نوعية المستبدلات المرتبطة بالأجليكون كما أن تحديد قمم الشظايا الناتجة عن انقسام المركب يعطي معلومات جد هامة على كيفية توزيع هذه المستبدلات بالنسبة للحلقتين A و B .

هناك العديد من هذه المركبات تم استخلاصها و فصلها بكميات صغيرة جدا ، و قد تم التعرف عليها بمساعدة طيف الكتلة الذي يتطلب اجراؤه كمية من رتبة النانوغرام . و تجدر الاشارة الى أن طابع التجزؤ فى أطياف الكتل لكثير من هذه المركبات مميز .

و من بين التقنيات المستعملة في هذا المجال :

- تقنية القذف الإلكتروني (EI).
- تقنية القذف السريع بالذرات (F.A.B).
- تقنية الإلكتروسبراي (ES).

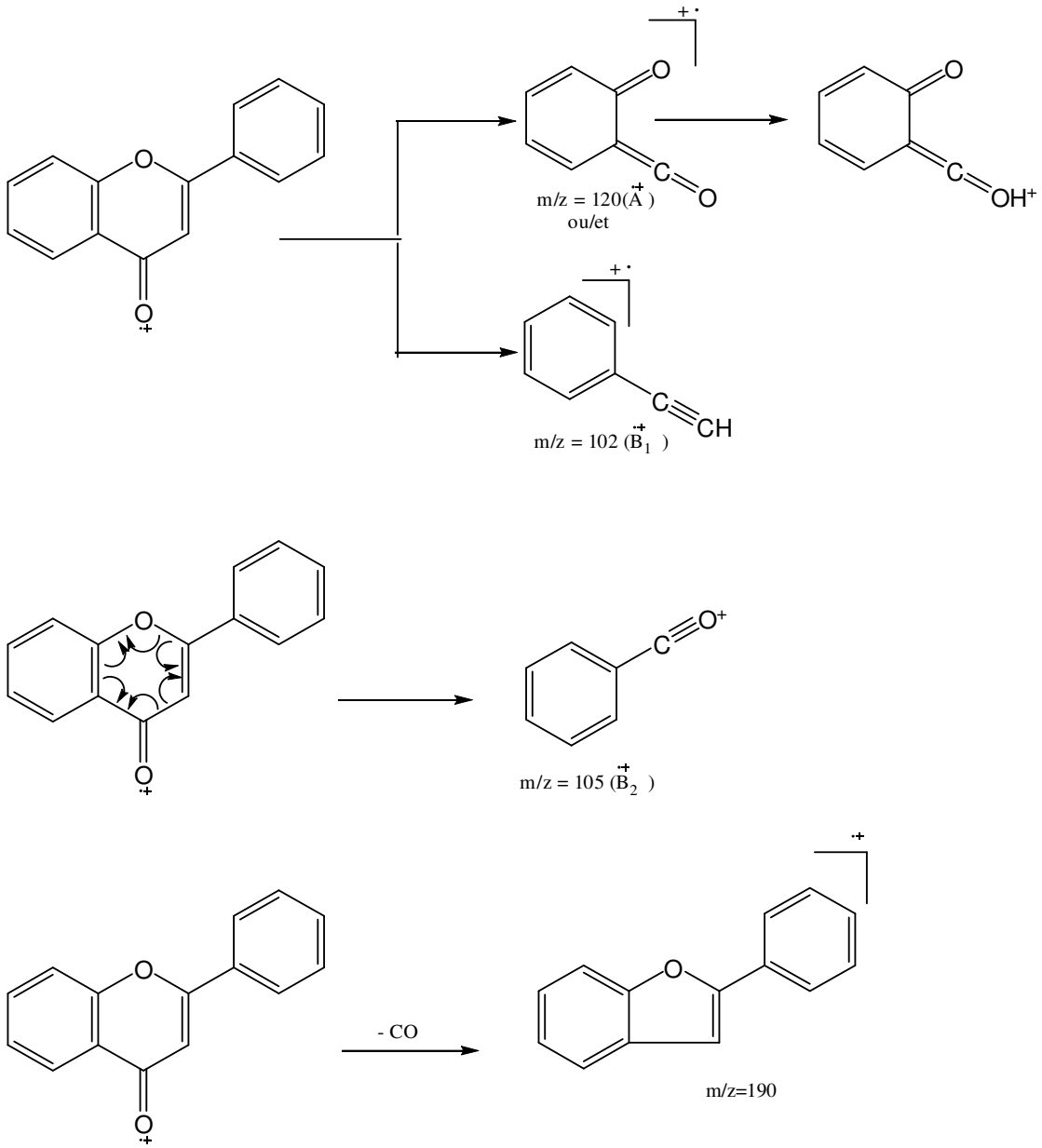
أ- تقنية القذف الإلكتروني (EI) [54،55] .

تستعمل تقنية القذف الإلكتروني (I.E) في حالة الأجليكونات فقط لأن المستبدلات السكرية للجليكوزيدات لا تتحمل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية، كما أن الجليكوزيدات لا تتميز بخاصية التطاير و التي تعتبر مبدأ للعمل أين تنتج المعادلة [56، 57].

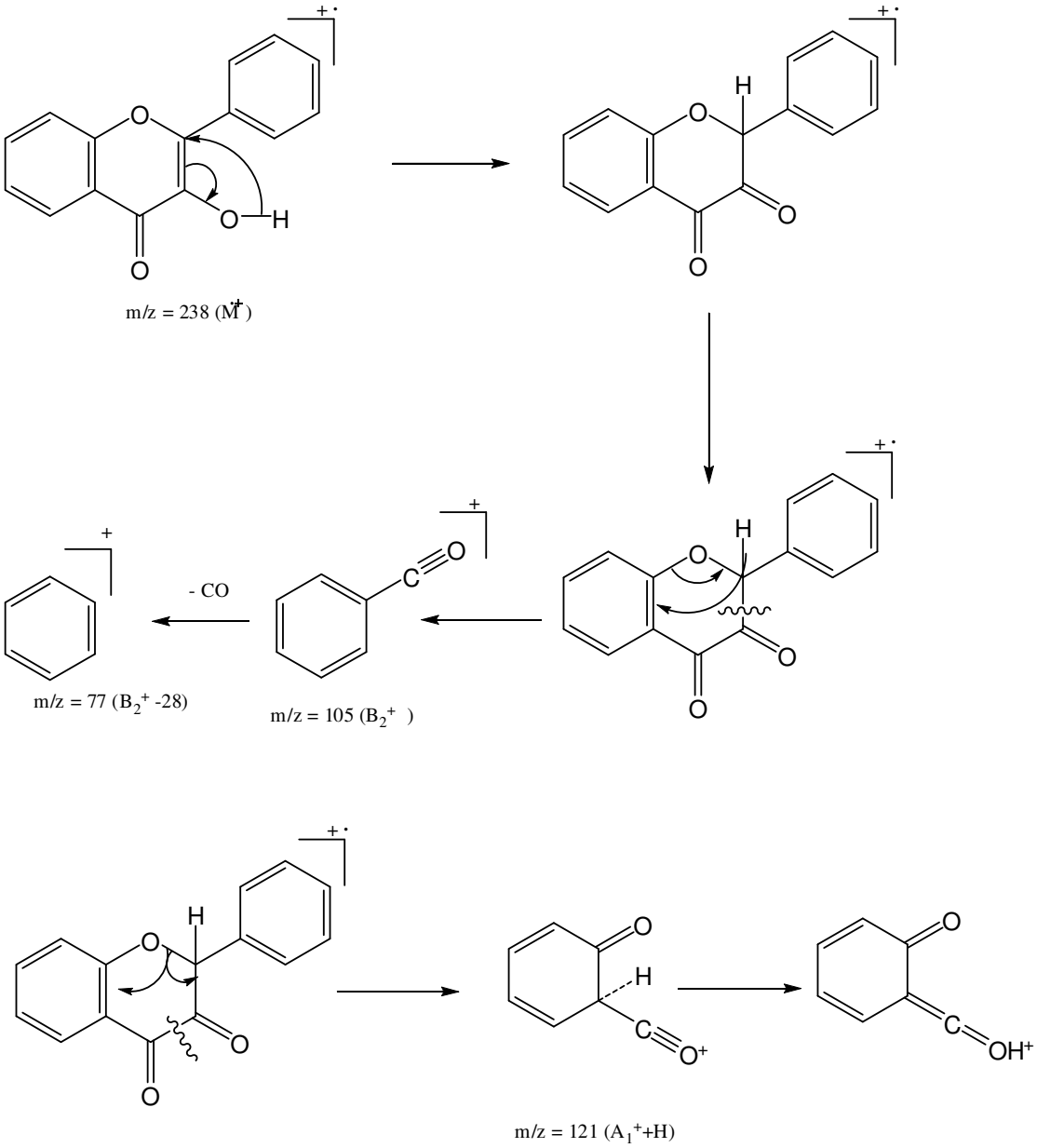
$$M + 1e^- \longrightarrow M^{+\cdot} + 2e^-$$

و تتم هذه التقنية بقذف المركب بسيل من الإلكترونات داخل غرفة التأين عند درجة الحرارة المناسبة (100 – 300 °م)

فيما يلي شرح لأهم الشظايا على بعض الأقسام الفلافونويدية بشكل عام شكل (19،20)



شكل-19- اهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافون



شكل-20- أهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافون (تابع)

ب- تقنية القذف السريع بالذرات (F.A.B).

تعتبر تقنية القذف السريع بالذرات (F.A.B) تقنية حديثة تسمح بمعرفة الأيون الجزيئي وطبيعة السكر[58] . بالنسبة للمركبات الإيتيروزيدية القطبية ذات الأوزان الجزيئية المرتفعة، التي لا نستطيع دراستها بواسطة تقنية (EI) [56,54] .

فباستعمال تفريغ (كاثود) يتم تأيين ذرات غاز الأرغون لنحصل على أيونات (Ar^+)

$$\overrightarrow{Ar}^+ + 1e^- \qquad\qquad Ar$$

بعدها تدخل هذه الأيونات غرفة الصدم المحتوية هي الأخرى على غاز الأرغون تحت ضغط معين فيحدث إنتقال الشحنة بين Ar و Ar^+ حسب التفاعل :

$$Ar + \overrightarrow{Ar}^+ \longrightarrow Ar^+ + \overrightarrow{Ar}$$

حيث تبقى الذرات الناتجة $\overrightarrow{Ar}$ محافظة على طاقتها و عند الخروج من غرفة الصدم نحصل على خليط من (Ar , Ar^+)، يتم بعدها عزل (Ar^+) باستعمال لوحي مكثفة لنحصل في النهاية على سيل من ذرات الأرغون (Ar) التي تدخل غرفة التأيين لتصدم ذرات العينة (المركب المدروس) الموضوعة على لوح معدني فنحصل على أيونات للمركب التي يتم قلعها و تسريعها و تحليلها بعد ذلك، و من مميزات هذه التقنية.[56].

- تكوين أيونات المركب دون تشحين العينة.
- تكوين أيونات شبه جزيئية (Quasi moléculaires).
- تكوين أ يونات موجبة و سالبة.
- مدة حياة طويلة للعينة.

تطبيق هذه التقنية (FAB) مع الغليكوزيدات يمكننا من الحصول على معلومات فيما يخص الجزء السكري منها، و إضافة" إلى أيونات التشظية العادية المميزة للفلافونيدات نحصل على قمم موافقة للأيونات شبه الجزيئية من الشكل، $[M+H]^+$ ، $[M+Na]^+$ ، $[M+K]^+$، $[M-H]^-$...

ج- تقنية الإلكتروسبراي (ES).

تعتبر هذه التقنية أحدث من (F.A.B) و تختلف عنها في الطريقة العملية، حيث تسمح بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الكبيرة مثل البروتينات و الجزيئات الصغيرة سهلة التكسير مثل المضادات الحيوية و المبيدات [59].

أما بالنسبة للفلافونويدات فتستعمل تقنية (ES^+) لدراسة المركبات سهلة التكسير مثل:-O glycosides [60].

2-3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي

تتطلب مطيافية الرنين النووي المغناطيسي كمية معتبرة من العينة ، رغم هذا فهي من بين طرق التحليل البنيوي للفلافونيدات التي تحتل مكانة مهمة ، حيث أستخدمت على نطاق واسع في دراسة مثل هذه المنتجات الطبيعية ، خاصة وأنه يمكن استرجاع المركب بعد تحليله، و من أهم الطرق المتاحة للحصول على التركيبة الكيميائية للمركبات توجد عدة تقنيات هي :

- طيف RMN للبروتون ^1H
- طيف RMN للكربون ^{13}C

أ طيف RMN للبروتون ^1H

ان خاصية أطياف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون لا تختلف عموما عن الأطياف الخاصة بالمركبات الآروماتية التي تحمل مجموعات أكسيجينية بديلة . فالبروتونات المجاورة لمجموعة هيدروكسيلية أو ميثوكسيلية تمتص عند قيمة تتراوح بين 6.6 ppm و7.7 ppm بينما تمتص البروتونات المحاطة بمجموعتي هيدروكسيل أو ميتوكسيل عند 6.1 ppm [6] .

أما إذا وجدت مجموعة أكسيجينية على الموضع رقم 6، و كان الموضع رقم 5 غير مستبدل فإن بروتون هذا الموضع يظهر عند قيمة 7.4ppm تقريبا و ليس ضمن المجال 6.6 ppm و 7.1ppm

ومن التطبيقات النموذجية لهذه التقنية على هذا القسم من المركبات مايلي :

-درجة تأكسد الحلقات A، B ، C.

-عدد السكريات و نوع الرابطة α أوβ. [5]

و فيما يلي **جدولين (12,11)** يبينان بعض الانزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة A و B [61].

الجدول - 11 - الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة A

(H-8) δ,ppm *J*,Hz	(H-6) δ,ppm *J*,Hz	(H-5) δ, *J* ppm ,Hz	بروتونات الحلقة A طبيعة الفلافونيد
6,3-6,5(d) 2,5	6,0-6,2(d) 2,5	-	5,7-OH
6,5-6,9(d) 2,5	6,2-6,4(d) 2,5	-	5-OH, 7-OR (R: Glu)
6,7-7,0(d) 2,5	6,7-7,1(dd) 2,5-9	8,0(d) 9,0	7-OR (R = H, sucre)
6,3(s)	-	-	5,6,7-OR (R = H,sucre)
-	6,3(s)	-	5,7,8-OR

الجدول – 12 - الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة B

(H-3' / H-5') δ,ppm *J*,Hz		(H-2' / H-6') δ,ppm *J*,Hz		بروتونات الحلقة B طبيعة الفلافونيد
6,5-7,1(d)	8,5	7,7-7,9(d)	8,5	فلافون (4'-OR)
6,5-7,1(d)	8,5	7,9-8,1(d)	8,5	فلافونول (4'-OR)

بروتونات الوحدة غير المتجانسة C:

يظهر البروتون H-3 في بنية الفلافون على شكل إشارة أحادية بين (6-7 ppm) [62] حيث لا يمكن تمييزه من بين البروتونات H-6 و H-8 هذا في حالة (5،6،7)، (5،7،8) أو 5,7-OH [63] ، وينزاح هذا البروتون نحو 4.2 ppm في حالة dihydroflavonol، في حين يظهر في شكل إشارة متعددة في حالة flavane .

البروتون H-2 في هيكل dihydroflavonol يظهر في شكل ثنائية عند(5.2ppm)، أما في حالة هيكل flavanone فيظهر ثنائي ثنائي بين 5 ppm و5.5 ppm .

بروتونات الميتوكسيل OMe- :

عندما يكون الفلافونيد يحتوي على ميتوكسيل أو عدة ميتوكسيلات تظهر في شكل إشارات أحادية ما بين (3.8-4.5ppm) [61].

بروتونات السكر:

بروتونات السكر تتميز بالبروتون الأنوميري، إذ يختلف انزياح هذا البروتون حسب طبيعة الفلافونويد وكذا موقع و نوع الرابطة بين السكر و الأجليكون و تتواجد إشارته عموما في مجالات أدنى من مجال إشارات بقية بروتونات الأجليكون[38]. و الجدول التالي يعطي قيم الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري "H-1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر.

الجدول-13- : قيم الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري "H-1 لبعض الفلافونيدات أحادية السكر

الفلافونيد	(δ .ppm) H-1"
7-O-glucosylflavonoide	5.2 - 4.8
3-O- glucosylflavonoide	6.0 - 5.7
7-O-rhamnosylflavonoide	5.3 - 5.1
3-O- rhamnosylflavonoide	5.1 - 5.0

يمكن التعرف على نوع الرابطة α أو β بين السكر و الأغليكون من خلال ثابت اللإقتران لـ"H-1 ،"H-2 حيث يمتاز الغلوكوز بالرابطة β ويظهر "H-1 بإشارة ثنائية بثابت تزاوج (J = 7 Hz)ناتج عن تزاوج ثنائي محوري مع"H-2 كما يمتاز الرامنوز برابطة قد تكون α بإشارة ثنائية لـ"H-1 بثابت تزاوج (J=2 Hz)نتيجة الإقتران إستوائي-إستوائي. كما يمكن التعرف على سكر الرامنوز بظهور إشارة ثنائية لميثيل السكر بثابت تزاوج(J = 6 Hz) في المجال(0.8-1.2ppm) [45]. بالإضافة إلى الغليكوزيدات الأحادية، فهناك غليكوزيدات ثنائية السكر،أغلب هذه المركبات يكون الجزء السكري فيها إما Rutineأو Neohesperidine، و يمكن التفريق بينهما بظهور إشارة (7,3-O-rutinosides) في المجال (4.2 - 4.4 ppm) بثابت تزاوج (J=2 Hz) مع إشارة ميثيل الرامنوز في المنطقة(0.7 - 1 ppm)، في حين تظهر إشارة 7,3-O-neohespiridine في المجال (4.9 - 5 ppm) بثابت تزاوج (J = 2 Hz) مع ظهور إشارة ميثيل الرامنوز في المنطقة(1.1-1.3) و الجدول التالي يعطي قيم الإنزياح الكيميائي للبروتونات الأنوميرية "H-1 ، '''H-1 لبعض من الغليكوزيدات ثنائية السكر [64].

الجدول-14- : قيم الإنزياح الكيميائي للبروتونات الأنوميرية "H-1 ، "'H-1 لبعض الغليكوزيدات ثنائية السكر في DMSO-d6

السكر الأول	H-1" (ppm)	السكر النهائي	H-1"' (ppm)
3-*O*- *β*-*D*- Glucoside	5.72 - 5.75	2-*O*- *β*-*D*- Glucoside	4.63 - 4.65
	5.28 - 5.46	6-*O*-*β*-*D*- Glucoside	3.96 - 4.02
	5.40 - 5.66	2-*O*-*α*-*L*- Rhamnoside	4.90 - 5.10
	5.28	6-*O*-*α*-*L*- Rhamnoside	4.37 - 4.39
3-*O*-*α*-*L*- Rhamnoside	5.56	2-*O*- *β*-*D*- Glucoside	4.10 - 4.23
	5.21 - 5.50	3-*O*- *β*-*D*- Glucoside	4.32 - 4.48
	5.33 - 5.44	3-*O*- *β*-*D*- Galactoside	4.25
	5.31	3-*O*-*α*-*L*- Rhamnoside	4.81

ب- طيف RMN للكربون ^{13}C

تستخدم أطياف الكربون في التعرف على جليكوزيدات الفلافونات و الفلافونولات حيث تؤدي إلى معلومات مهمة عن طبيعة و مكان إرتباط الوحدة السكرية كما تفيد أيضا في:

معرفة العدد الإجمالي لذرات الكربون للفلافونيد .

معرفة عدد كربونات السكر .

معرفة عدد الكربونات المؤكسجة داخل أنوية الفلافونيدات .

طبيعة ومكان ارتباط الوحدة السكرية.

التمييز بين هياكل الفلافونيدات إعتمادا على الإنزياح الكيميائي للكربونات 2 ،3 و 4.

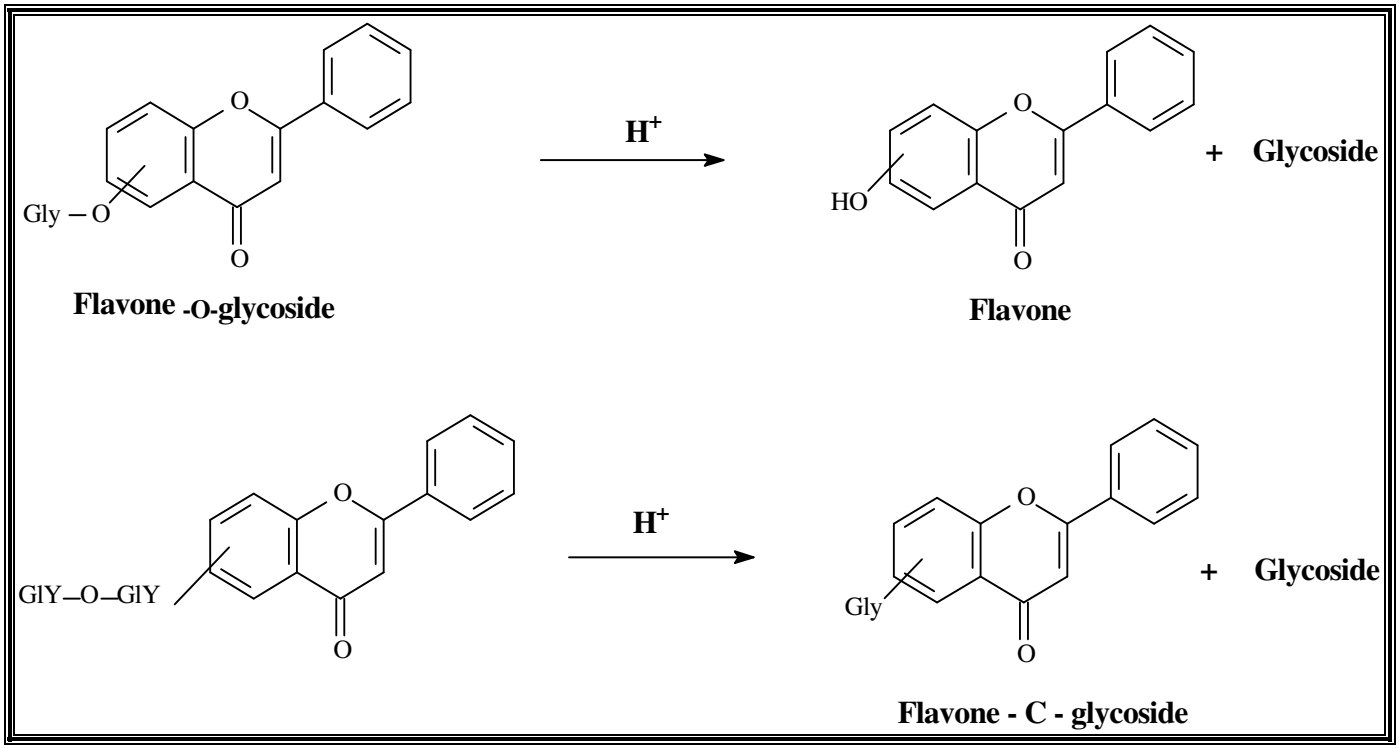
يوضح الجدول التالي الإزاحات الكيميائية لذرات الكربون 2، 3، 4 للفلافونات والفلافونولات من خلال تقنية الرنين النووي المغناطيسي $RMN^{13}C$ [65].

الجدول(15): الإزاحة الكيميائية لبعض ذرات الكربون للفلافونات و الفلافونولات .*

نوع الفلافونيد	الكربون	الإزاحة الكيميائية (δ ppm)
الفلافونات	C-2	165-160.5
	C-3	130.0-111.8
	C-4	184.0-176.3
الفلافونولات	C-2	150.0-145.0
	C-3	139-136.0
	C-4	177.0-172.0

2-4- الإماهة الحمضية

بالإضافة إلى التقنيات السابقة يمكن الاستعانة بالتميّه الحمضي للتعرف على عدد ونوع السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية إذ تعمل هذه التقنية على تحطيم الرابطة (كربون - أكسجين) الجامعة بين السكر والأجليكون. والشكل (21) يبيّن الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية في حالة O– جليكوزيل و C– جليكوزيل [32].



الشكل(21) : 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 (2N) ثم يسخن في حمام مائي 100 م° لمدة 15 إلى 120 دقيقة.

بعد تبريد الأنبوب يعمد إلى استخلاص من نوع سائل/سائل بدءًا بإيثر الإيثيل (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).

تركز الطبقة العضوية الحاوية على الأجليكون الذي يمكن التعرف عليه بتسجيل طيف (UV) وكذا بإجراء كروماتوغرافي (CCM) 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 Gel de silice $60F_{254}$ 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 (15) يبيّن قيم Rf لبعض السكريات الشائعة [43].

الجدول (15) : 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

الفصل الثالث

الدراسة الفيتوكيميائية للمستخلص البوتانولي لنبتة

Haloxylon scoparium (Chenopodiaceae)

عائلة (chenopodiacees)

تعرف عائلة (chenopodiacees) بأزهارها التي لا تحتوي على بتلات كما تتميز أيضا ببعض الأنواع التي يمكن زرعها و أنواع أخرى تنبت ، تحتوي على حوالي 1500 نوع تتفرع الى 100 جنس موجودة في أنحاء العالم ، أزهارها صغيرة تتكون من 2 الى 5 سبلات معظمها لونها أخضر و البعض الآخر يميل إلى الأبيض أو الأحمر ، أوراقها غالبا ما تكون صغيرة جدا أو مكتملة أو مقصوصة قليلا ، وأخرى لها شكل أقدام الإوز حيث جاء إسمها من اليونانية khempous [66،67].

كثيرا ما تنموا (chenopodiacea) على حافة البحار والمستنقعات أو الصحاري المالحة ،

تنتمي chenopodiacea إلى قسم من النباتات التي تستعمر المناطق الساحلية حيث المد والجزر يترك بقايا الطحالب أو االنباتات المائية أو الحيوانية .والتي تعتبر بالنسبة لعائلة (chenopodiacea) مصدر أزوت .

الجدول (16) تصنيف النبتة

régne	Plantea	المملكة
Sous- régne	Tracheobionta	تحت المملكة
Division	Magnoliophyta	القسم
Classe	Magnoliopsida	الرتبة
Sous- Classe	Caryophyllidae	تحت الرتبة
Ordre	Caryophyllale	الصنف
Famille	Chenopodiaceae	العائلة
Genre	Haloxylon	الجنس
Espèce	Scoparium	**النوع**

الأهمية الاقتصادية لعائلة (chenopodiacea)

هي عائلة تحتوي على نباتات غذائية ، حيث المزروعة منها تكون أكثر مقاومة للملح وتحتاج عموما الى الأرض الغنية بالآزوت . ومن بين النباتات المعروفة في مناطقنا نجد الأنواع المختلفة للبنجر (bettes) والشمندر (betteraves) (Beta vulgaris) [68] والسبانخ (Spinacia aleracea) كما نذكر أيضا (atriplex hotensis) والسبانخ البرية (chenopodium bonus-henricus) والتي يمكن استهلاكها كسبانخ وأيضا (chenopodium quinoa) والذي يزرع في أمريكا الجنوبية كحبوب ، و(Kochia scoparia) الذي يعرف بالسرو الصيفي وهو نوع يستعمل للزينة ، قسم آخر من (Chenopodiacea) يعتبر من النباتات الضارة مثل (*Chenopodium album*) [66]

وصف النبتة :

عبارة عن شجيرة صغيرة كثيفة ومضلمة ، في اللغة العربة تعرف بـ " الرمت " تتواجد بكثرة في المناطق ذات التربة الجبسية .أزهارها خفية تتغطى نهاية فروعها بثمار ذات ألوان زاهية وردية أو حمراء ، وهذا في أواخر الخريف عندما تتوفر الرطوبة الكافية .

Haloxylon Scoparium (chenopodiaceae)

انجز هذا العمل في اطار مشروع بحث اجراه فريقنا بهدف دراسة تصنيفية لنباتات طبية مستوطنة ’تتكون من استخلاص و فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي.

اقترنت هذه الدراسة بمتابعة البحت الفيتوكميائي حول *Haloxylon scoparium* وهي نبتة تستعمل في الطب الشعبي ضد لسعات العقارب في الشرق و الجنوب الجزائري وهي تنتمي الى عائلة Chenopodiaceae .

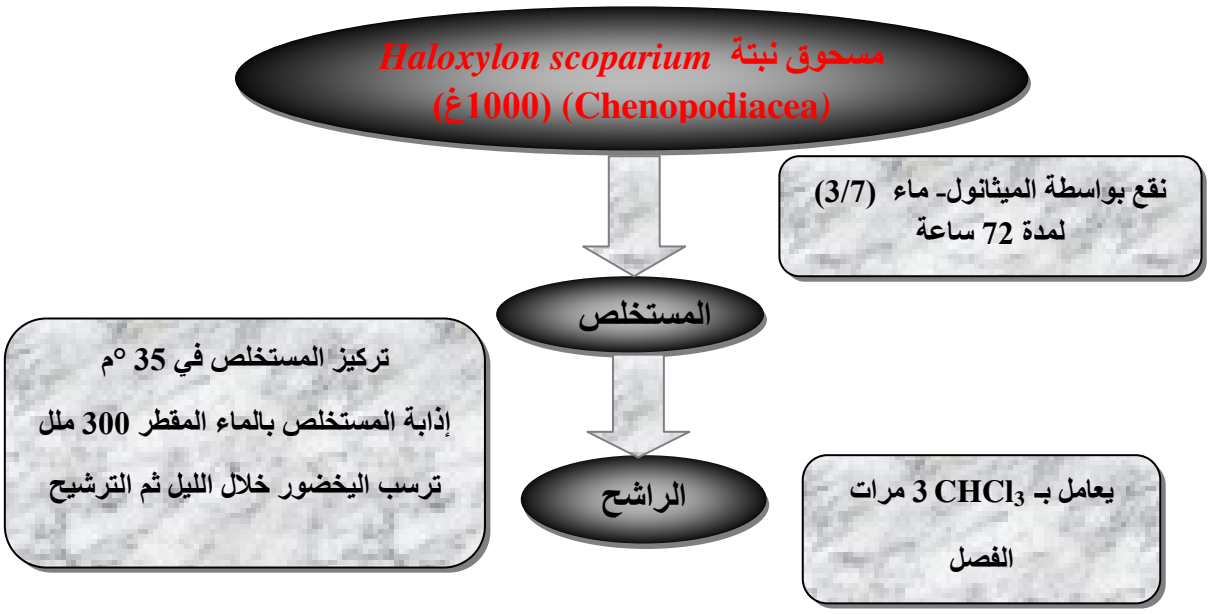
إستخلاص النبتة

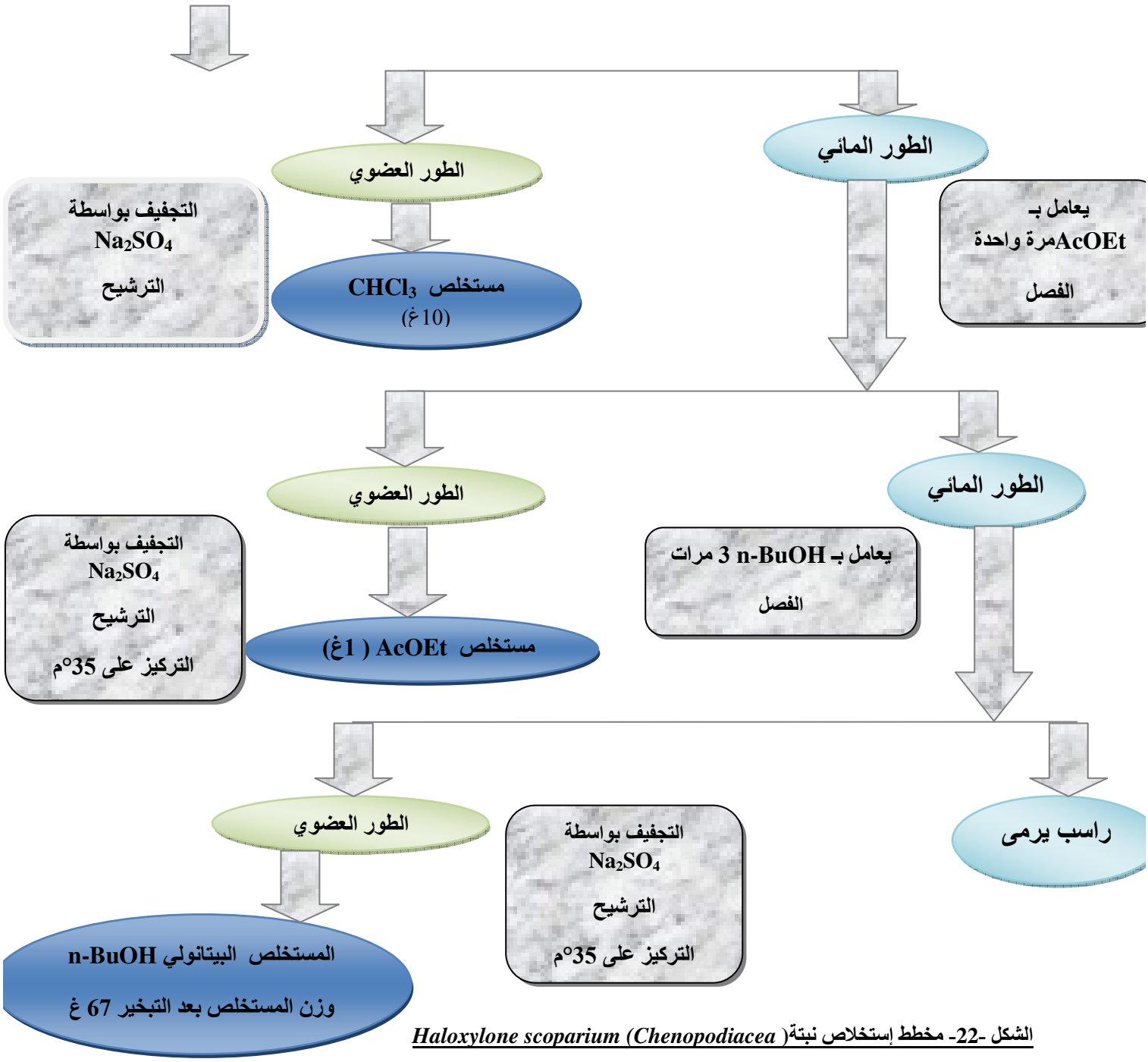
بعد تجفيف 1 كغ من النبتة تم تقطيعها إلى قطع صغيرة جدًّا، حيث نقعت المادة النباتية في محلول كحولي (H_2O: MeOH / 30: 70) وتركت لمدّة 72 ساعة، أعيدت هذه العملية 3 مرات مع تجديد المذيب كل 24 ساعة. ، وهذا لاستنفاذ النسيج النباتي ،نركزه في درجة حرارة 35°م ، نعالج المستخلص الخام بالماء المقطر تدريجيا (300مل) نضيف اليه رباعي خلالت الرصاص ($(CH_3COO)_4Pb$) مع الرج الجيد ثم نتركه ليلة كاملة بعدها نرشحه للتخلص من البقايا المترسبة غير الذائبة في الماء، نضع الرشاحة في قمع فصل ونضيف لها الكلوروفورم ($CHCl_3$) حيث يكون حجمه مساويا لثلث حجم الرشاحة المائية، وبعد الرج الجيّد نتُركه مدّة 24 ساعة ثم نفصل الطبقة العضوية عن المائية ثم نُعيد نفس العملية ثلاث مرات. نجفف الطبقة العضوية السابقة من الماء باستعمال كبريتات الصوديوم (Na_2SO_4) نركزها ثم نزنها فنحصل على طور كلوروفورمي بوزن (10غ).

نضيف للطبقة المائية السابقة خلات الإثيل (AcOEt) وبنفس الطريقة السابقة نستخلص طور خلات الايثيل بوزن (1غ).

نضيف البيوتانول النظامي وبنفس الطريقة السابقة أيضا نحصل على طور البوتانولي بوزن (67غ).

و الشكل -22- يمثل مختلف خطوات الاستخلاص:





الشكل -22- مخطط إستخلاص نبتة(*Haloxylone scoparium (Chenopodiacea*

في مرحلة سابقة قمنا بدراسة المستخلص الكلوروفورمي لهذه النبتة ، و استطعنا عزل عدد من المركبات المختلفة منها : coumarine, Alcaloide …[69]

أما في هذه المرحلة فقد قمنا باختيار المستخلص البوتانولي.

الفصل و التنقية:

قمنا باختيار المستخلص البوتانول. لأننا نهدف الى فصل المركبات ذات القطبية العالية و منها الفلافونيدات، أخضعنا المستخلص لفحوص تحليلية تمهيدية باستعمال كروماتوغرافيا

الطبقة الرقيقة التحليلية من السيليكاجال 60، و باستخدام جملة من المملصات ، وبعد عدة اختبارات تحصلنا على الجملة المناسبة للتمليص و هي: **(ميثانول ، كلروفورم)** ، لجأنا إلى كروماتوغرافيا العمود لفصل هذه المركبات.

<u>الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود:</u>

أخذنا 18غ من المستخلص البوتانولي. لنبتة ***Haloxylon Scoparium (Chenopodiacea)***

مستعينين بـ سليكا جال **(**60 ;0.04-0.063 nm Merk**)** كدعامة و الكلوروفورم كمملص ورفع القطبية بالميثانول بالتدريج إلى غاية الوصول إلى 100% منه.

إستقبلنا الحزم النازلة في عينات سعتها 100ملل ليتم جمع المتشابه منها بالاعتماد على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية **(**أوراق اللألمنيوم $60F_{254}$Merk,gel de silice بسمك0.2 ملم**)** وذلك بالاستعانة بمصباح الأشعة فوق البنفسجية (254nm,366nm) **أو** باستظهارها بعد تعرضها للرش بواسطة احدى الكواشف منها كاشف حمض الكبريت (H_2SO_4) أو Anisaldehyde ، بعد تسخينها لمدة 3 دقائق عند $100c^0$ والنتائج المتحصل عليها دوناها في الجدول 17.

الجدول (17) تتابع تمليص العمود الكروماتوغرافي للمستخلص البوتانولي لنبتة *Haloxylon scoparium (Chenopodiacea)*

رقم الكسور قبل التجميع	رقم الكسور بعد التجميع	CHCl %	MeOH %	كتلة الكسر (g)	الملاحضات

كمية قليلة	0.05	00	100	F1	12-1
كمية قليلة	0.15	01	99	F2	25-13
خليط غير قابل للفصل	0.18	01	99	F3	56-26
خليط غير قابل للفصل	0.18	2.5	97.5	F4	103-57
خليط غير قابل للفصل	0.51	06	94	F5	159-104
على شكل بلورات	0.83	10	90	F6	195-160
خليط قابل للفصل	0.92	13	87	F7	237-196
خليط غير قابل للفصل	1.09	13	87	F8	248-238
خليط قابل للفصل	1.17	20	80	F9	263-249
خليط غير قابل للفصل	1.33	25	75	F10	290-264
خليط قابل للفصل	1.13	30	70	F11	301-291
خليط غير قابل للفصل	1.55	40	60	F12	324-302
خليط غير قابل للفصل	2.05	50	50	F13	340-325
خليط غير قابل للفصل	2.67	80	30	F14	360-341
خليط غير قابل للفصل	3.56	100	00	F15	370-361
	17.37			15 كسرا	المجموع:

معالجة الكسور المتحصل عليها

قمنا بأخذ الكسور F_6 ، F_7 ، F_9 و F_{11} لأنها ذات كتل مهمة وهي غير معقدة للفصل، ثم أخضعناها لعملية الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية على السيليكاجال للحصول على مملصات مناسبة لكل كسر:

F_6 : (MeOH -$CHCl_3$) (1-9)

F_7 : (MeOH -$CHCl_3$) (2-8)

F_9: (H_2O- MeOH -$CHCl_3$)(0.2-2-8)

أما F_{11} فاستعملنا لها كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة (CCM) على متعدد الأميد فى النظام:
(Toluéne-MeOH-MEC) (4-3-3)

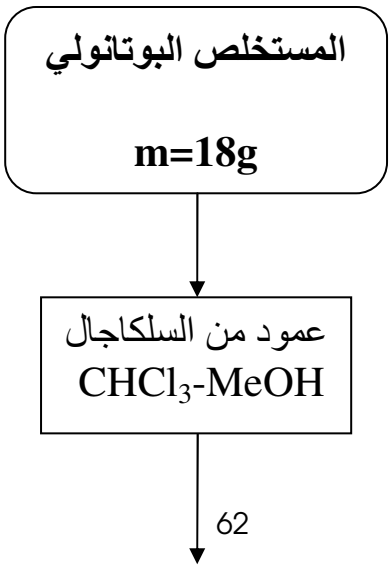
تم أخذ الكسر F_6 وبإستعمال عمود السيفادكس,مع اعادة بلورة الناتج . تم التحصل على المركب النقي H_{22}

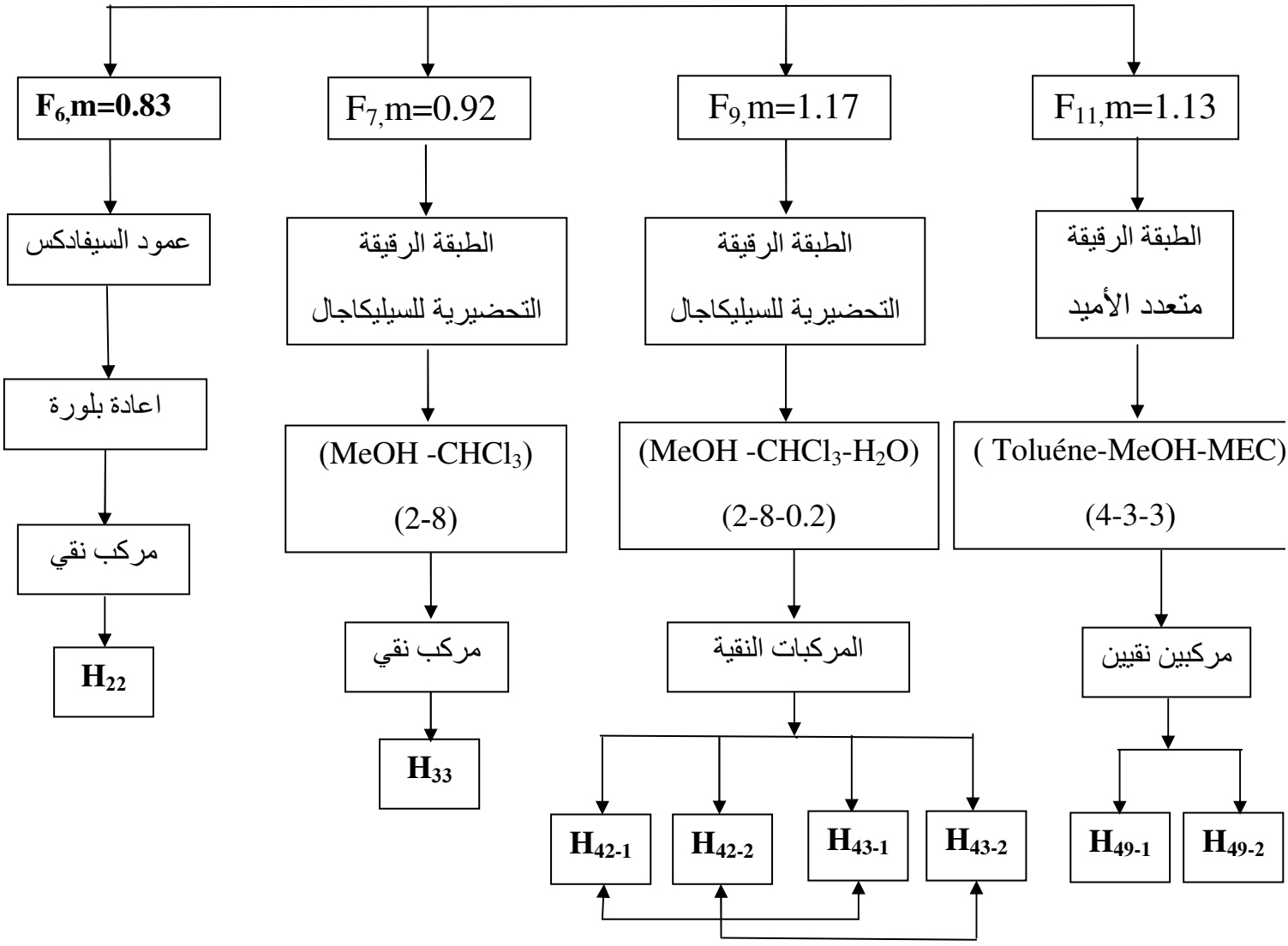
تم أخذ الكسر F_7 وبإستعمال الطبقة الرقيقة التحضيرية للسيليكاجال،مستعملين في ذلك النظام(2-8) (MeOH -$CHCl_3$). تم فصل المركب النقي H_{33}

تم أخذ الكسر F_9 وبإستعمال الطبقة الرقيقة التحضيرية للسيليكاجال،مستعملين في ذلك النظام(0.2-2-8) (H_2O- MeOH -$CHCl_3$). تم فصل المركبات النقية H_{42-1} وH_{42-2} و H_{43-1} وH_{43-2}

تم أخذ الكسر F_{11} وبإستعمال الطبقة الرقيقة (CCM) على متعدد الأميد،مستعملين في ذلك النظام (4-3-3) (Toluéne-MeOH-MEC). تم فصل المركبين النقيين H_{49-1} و H_{49-2}

و الشكل -23- يمثل مختلف خطوات الاستخلاص:





الشكل-23- يمثل مختلف خطوات استخلاص الطور البوتانولي

خلاصة :

بعد فصل المركبات H_{22} ، H_{33} ، H_{42-1} ، H_{42-2} ، H_{43-1} ، H_{43-2} ، H_{49-1} و H_{49-2}.

تبين لنا بعد دراسة الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والمقارنة مع كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أن :

المركب H_{42-1} هو نفسه المركب H_{43-1} و المركب H_{42-2} هو نفسه المركب H_{43-2}.

أما المركب H_{33} هو عبارة عن phtalate .

بينما المركبات H_{49-1} و H_{49-2} و H_{42-2} فالدراسة لمعرفة صيغهم تستلزم تعمق في الطرق التحليلية.

الفصل الرابع

التحليل البنيوي للمركبات المفصولة لنبتة

Haloxylon scoparium (Chenopodiaceae)

I النتائج الكيميائية و المناقشات لـنبتة

Haloxylon scoparium (Chénopodiaceae)

I -1- دراسة للمركب H42-1

I-1-1- اللون الإستشعاعي:

تحت مصباح WOOD (365nm) أعطى هذا المركب لونا إستشعاعيا بنفسجيا غامق مما يوحي بأن المركب H_{42-1} إما فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3.

I-1-2- أطياف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H RMN :

من خلال طيف الرنين النووي المغناطيسي $RMN\ H^1$(250MHZ) ، والمسجل في الميثانول CD_3OD طيف (1) والأطياف الممددة (2-5) نلاحظ وجود :

إشارة ثنائي ثنائي (J= 2 Hz، J=8.41 Hz) عند (δ_H= 7.6 ppm)، خاصة بالبروتون H-6' مما يدل على وجود كل من H-2' و H-5'.

إشارة ثنائية (J= 1.92 Hz) عند (δ_H= 8.1 ppm) خاصة بالبروتون H-2' .

إشارة ثنائية (J= 8.40 Hz) عند (δ_H= 6.80 ppm) خاصة بالبروتون H-5' .

يبين هذا الطيف كذالك نظام AB (بتكامل 1H لكل إشارة) ومتميز بـــ:

إشارة أحادية عريضة عند (δ_H= 6.20 ppm) خاصة بالبروتون H-8 .

إشارة ثنائية (J= 1.87 Hz) عند (δ_H= 6.05 ppm) خاصة بالبروتون H-6.

يبين هذا الطيف أيضا وجود إشارة على شكل أحادي عند (δ_H= 3.98 ppm) بتكامل 3 بروتونات تلحق لمجموعة الميثوكسيل.

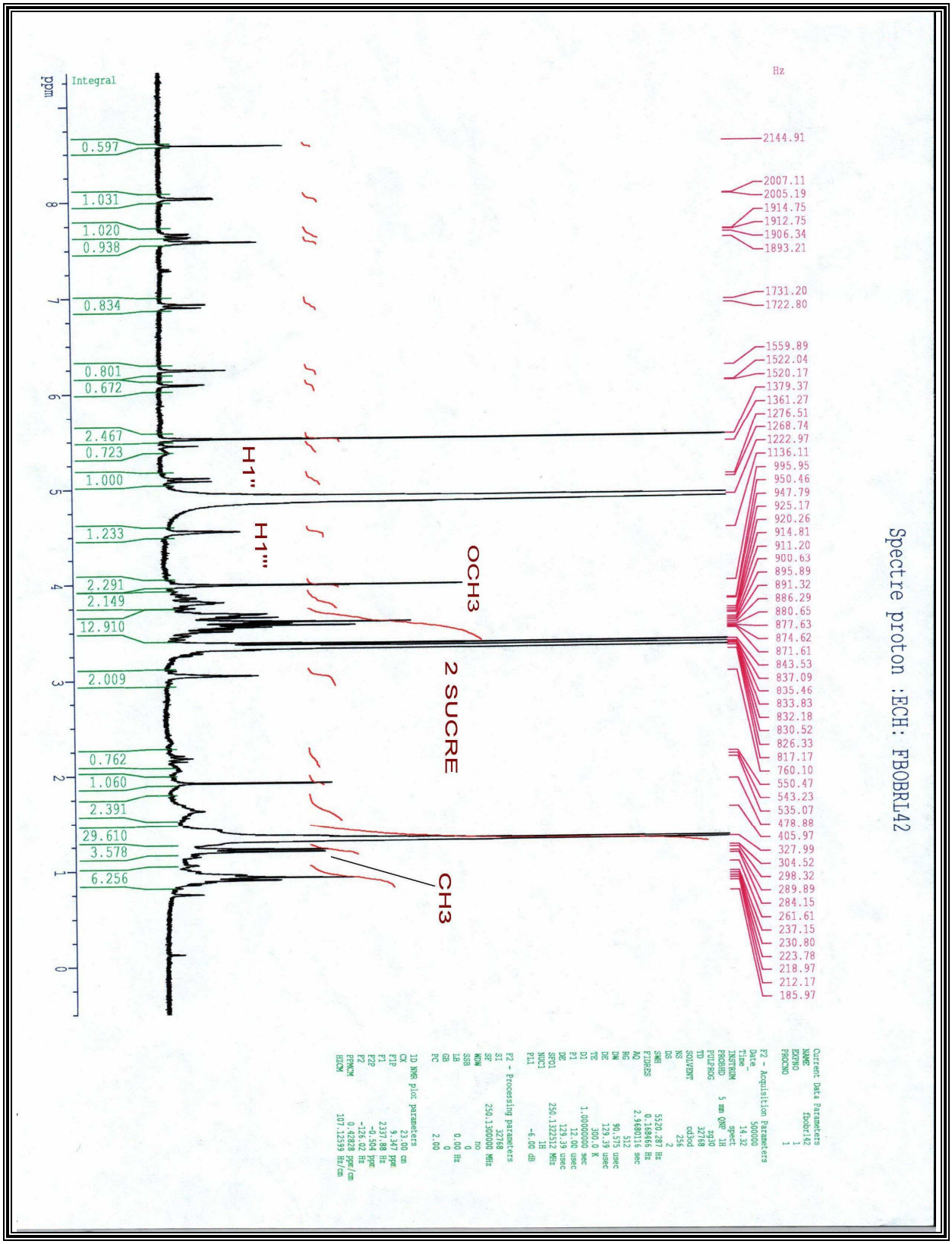
نلاحظ إشارة ثنائية (J= 7.77 Hz) عند (δ_H= 5.09 ppm) و هي إزاحة خاصة ببروتون الأنوميري $H_{1''}$ نظرا لقيمة ثابت الإزاحة قد يكون هذا السكر إما جليكوز أو جلاكتوز .

.إشارة أحادية عريضة بتاكمل 1H عند(δ_H= 4.6 ppm). وهي تلحق ببروتون الأنوميري الثاني $H_{1'''}$ يمكن نسبها لـــ رامنوز وذلك لوجود إشارة ثنائية (J= 6.2 Hz) عند (δ_H= 1.05 ppm) بتكامل ثلاث بروتونات تلحق لمجموعة الميثيل الخاصة بـ ***Rhamnose*** .

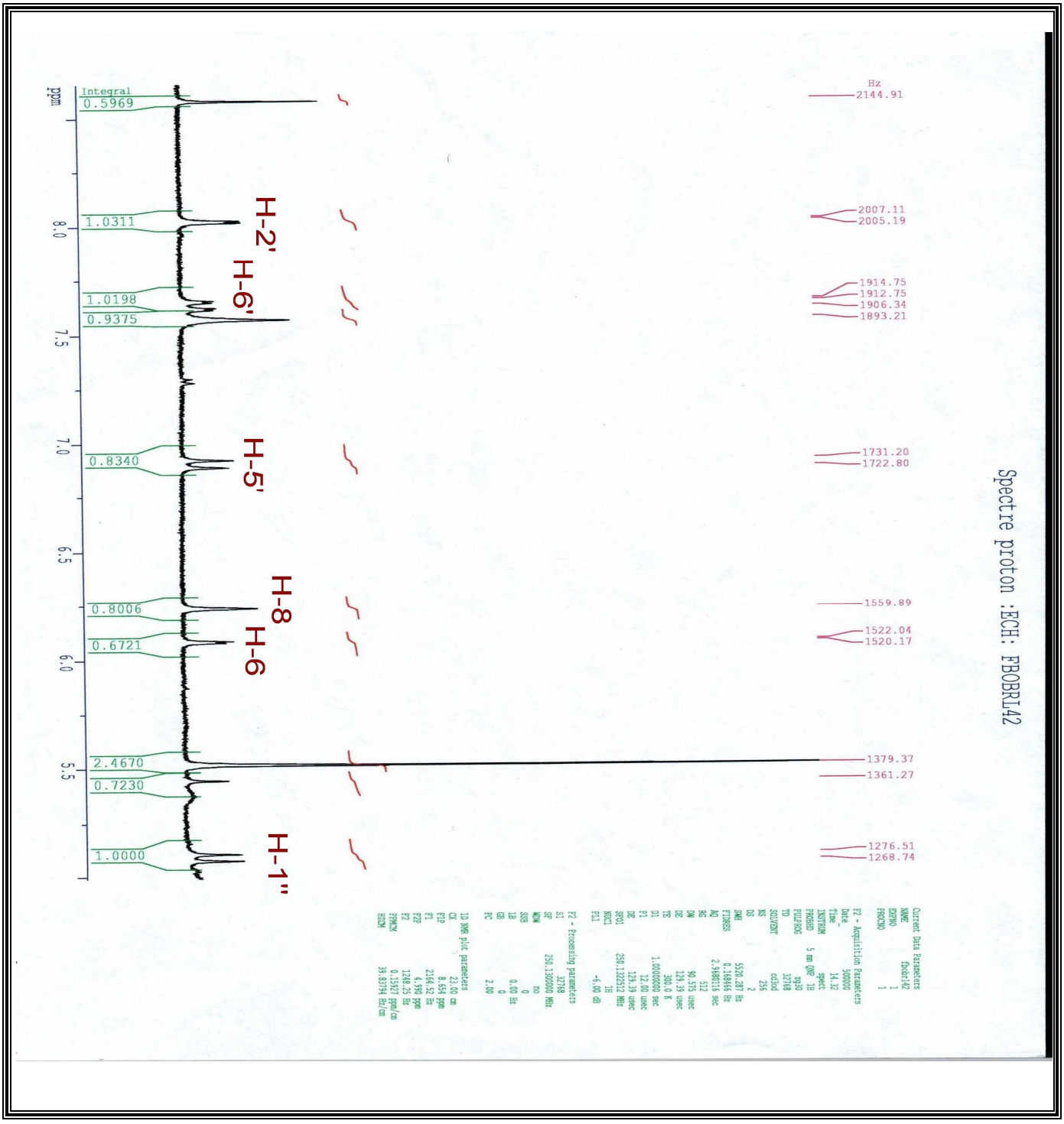
إشارة تعددية في المجال (δ_H= [3-4] ppm)وبتكامل 12بروتون خاصة بالسكر.
نتائج طيف ^1H RMN المسجل في (CD_3OD, 250 MHz) كلها مدونة في الجدول (19).

* الجدول(19): معطيات طيف البروتون للمركب H_{42-1} .*

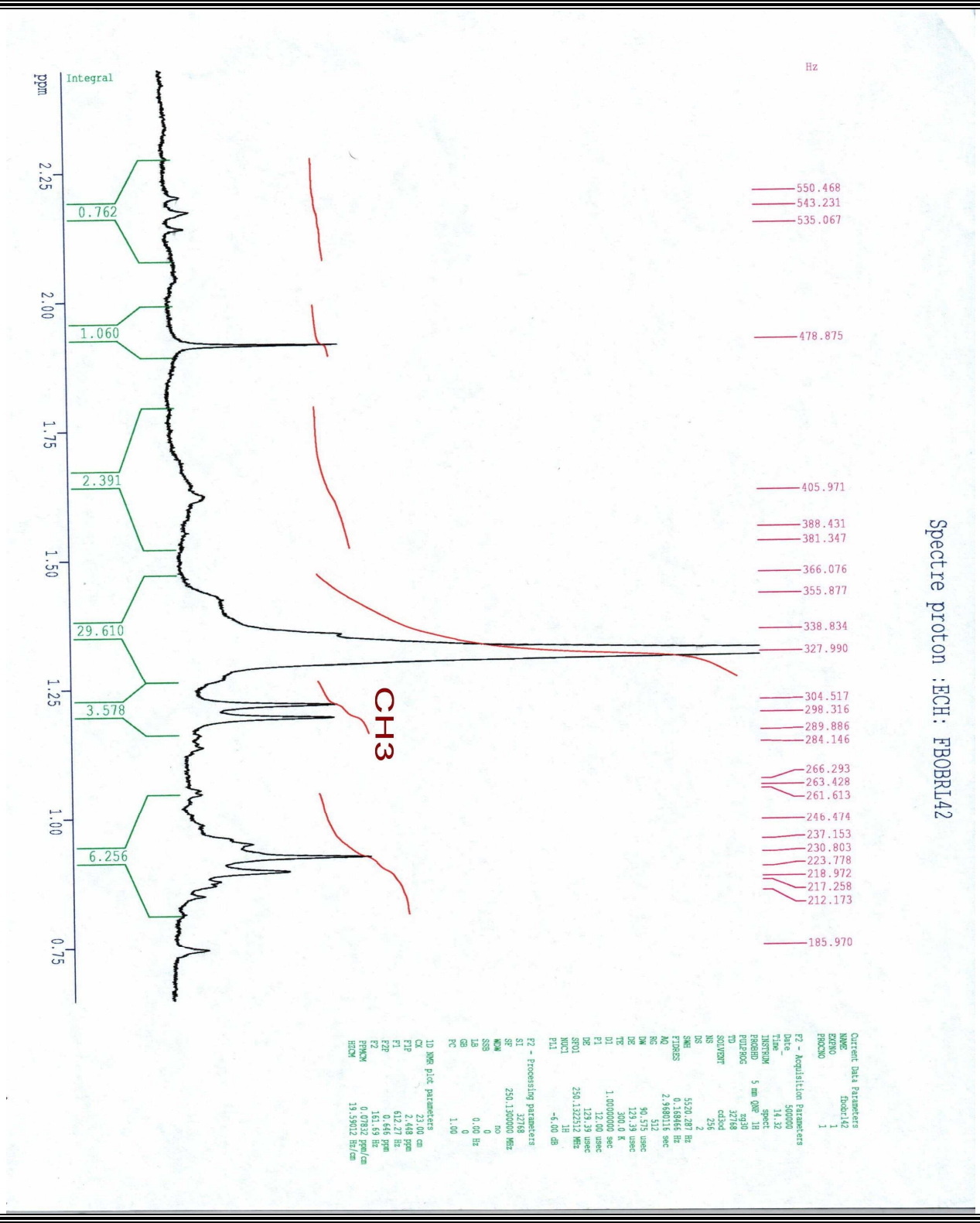
البروتونات	الإنزياح الكيميائي(δ_H=ppm)	التعددية	ثابت التزاوج J (Hz)
H-2’	8.1	*d*	1.92
H-6’	7.6	*dd*	8.41 ; 2
H-5’	6.8	*d*	8.4
H-8	6.20	*s large*	-
H-6	6.05	*d*	1.87
$H_{1"}$	5.09	*d*	7.77
$H_{1'''}$	4.6	*s large*	-
OCH_3	3.98	*s*	-
CH_3 *Rhamnose*	1.05	*d*	6.2
H^{sucre}	[3-4]	*multi*	-



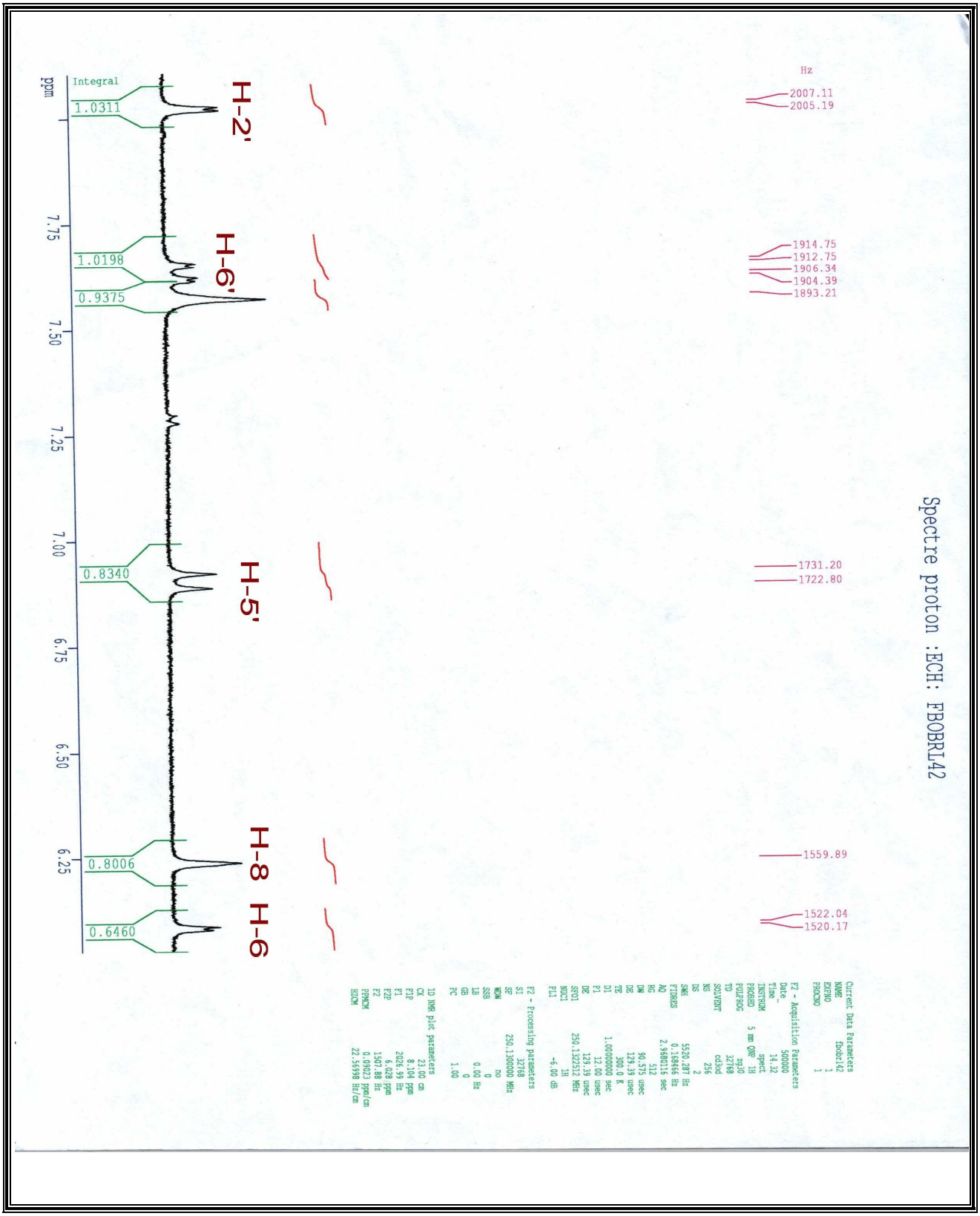
الطيف1 (RMN H^1 الخاص بالمركب H_{42-1})



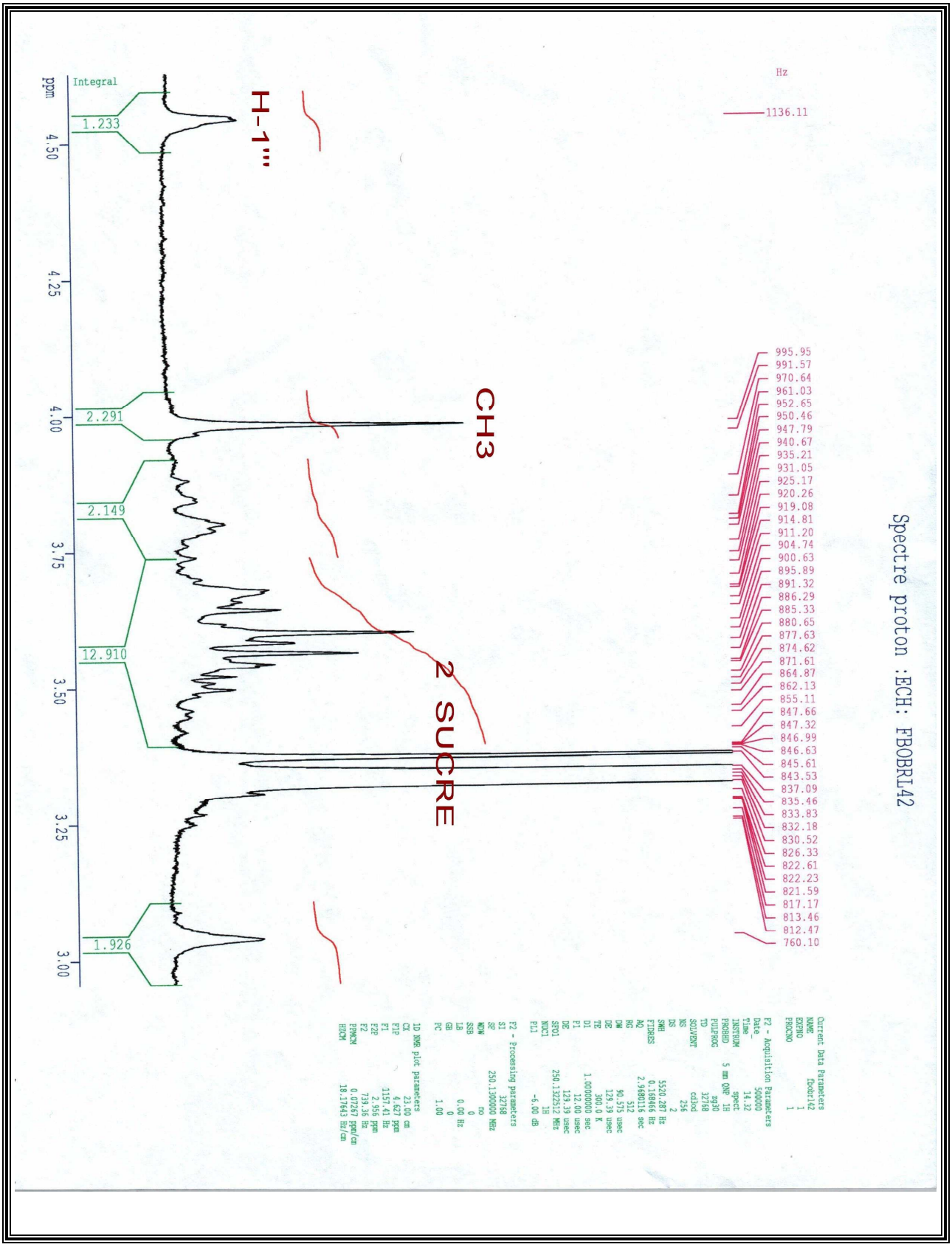
الطيف2 (H^1 RMN الخاص بالمركب H_{42-1})



الطيف3 (H^1 RMN الخاص بالمركب H_{42-1})

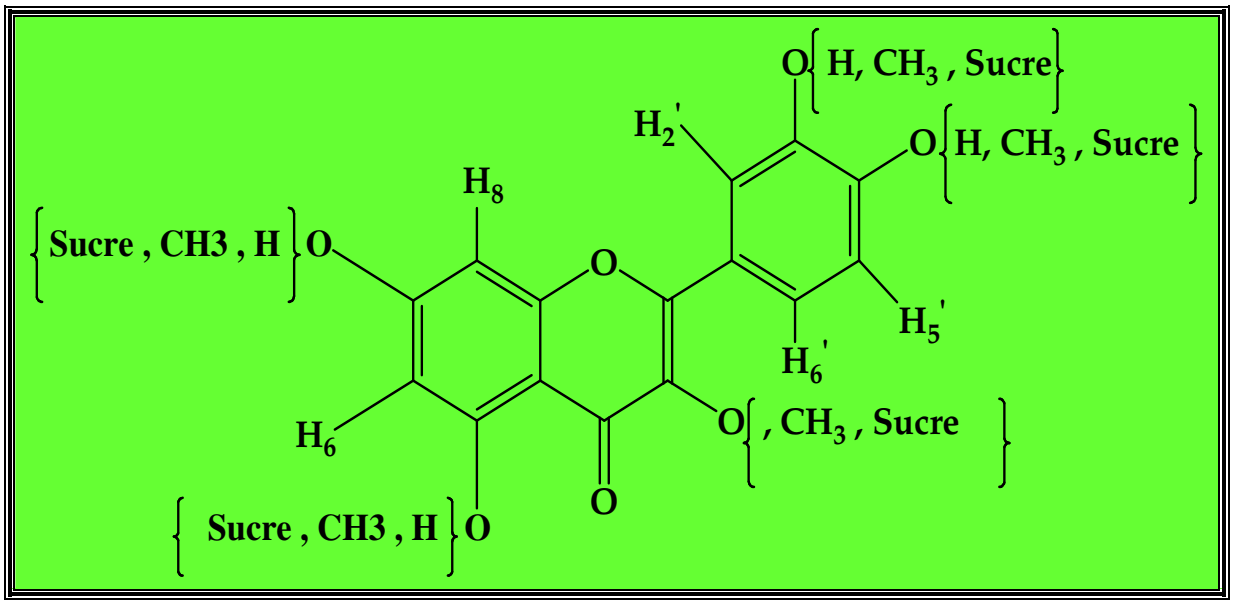


الطيف4 (RMN H^1 الخاص بالمركب H_{42-1})



الطيف5 RMN H^1) الخاص بالمركب (H_{42-1})

ومنه نحصل على البنية الجزئية المحتملة التالية:



I-1-3 المعطيات الطيفية:

أطياف الأشعة فوق البنفسجية وتحليل نتائجها:

المعطيات الطيفية :

بعد مشاهدة اللون الاشعاعي و دراسة سلسلة أطياف إمتصاص أشعة UV المسجلة في الميثانول حيث يبين هذا الأخير عصابتين الأولى عند λ_1=360 nm والثانية عند λ_2=255 nm . تدلان على وجود فلافونول مستبدل في الموقع 3 (OR).

في وجود NaOH

تسبب إنزياح باثوكرومي للعصابة واحد(I) $\Delta\lambda_I$=+56nm (NaOH / MeOH) زيادة في شدة الطيف تدل على وجود OH حر في الموقع 4'

كما يدل ظهور قمة جديدة في هذا الكاشف عند λ= 325 nm على وجود OH حر في الموقع 7.

في وجود NaOAc

يتأكد وجود OH.حر في الموقع 7. وذلك بالإزاحة الباثوكرومية للعصابة II.

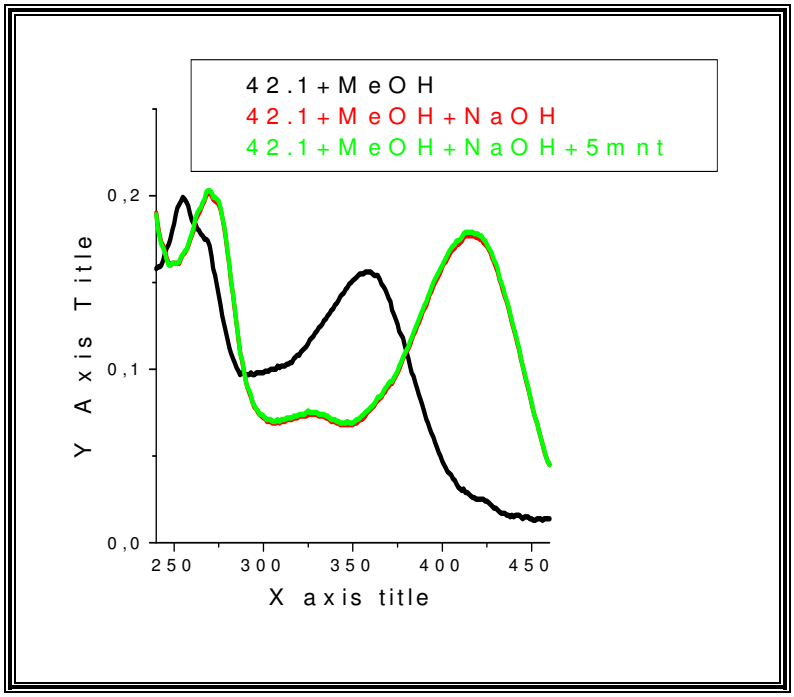
$\Delta\lambda_2$ =+15nm عند مقارنة طيف NaOAc بطيف الميثانول

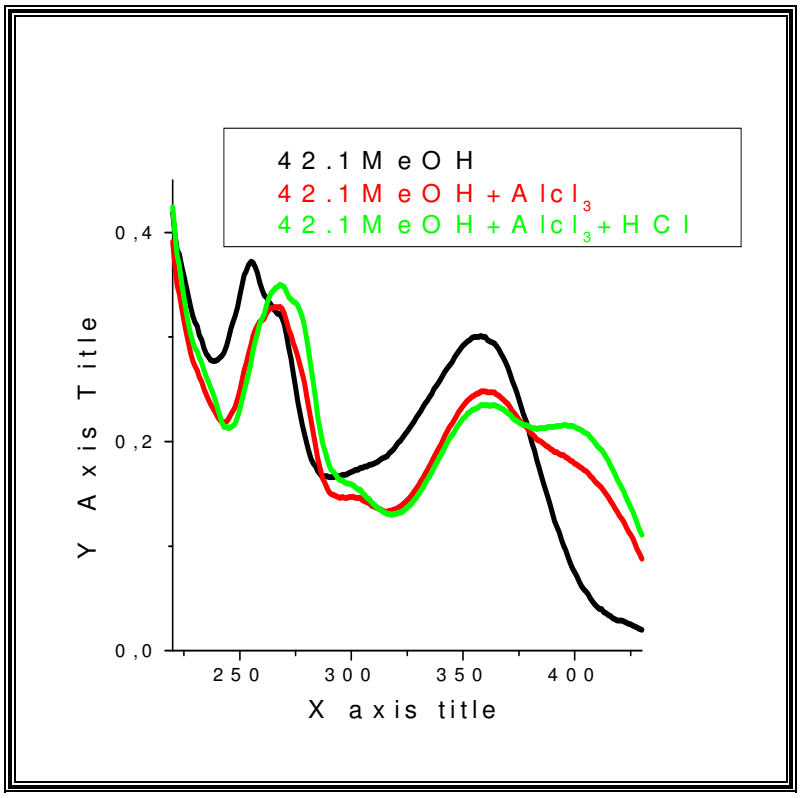
في وجود $Alcl_3$

في هذا الطيف نلاحظ إنزياح باثوكرومي $\Delta\lambda_1$ =+36nm عند إضافة HCl للعصابة I بالنسبة للمحلول الميثانولي مما يدل على وجود OH حر في الموضع 5.

في وجود H_3BO_3

إضافة H_3BO_3 لهذا المحلول لايسبب تغير ملحوظ للعصابة I بالنسبة للطيف المسجل في الميثانول ، مما يؤكد غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل في هذا الجزيئ. كل هذه المعطيات ملخصة في الجدول 20 والأطياف (6-8) لسلسلة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية المرئية .

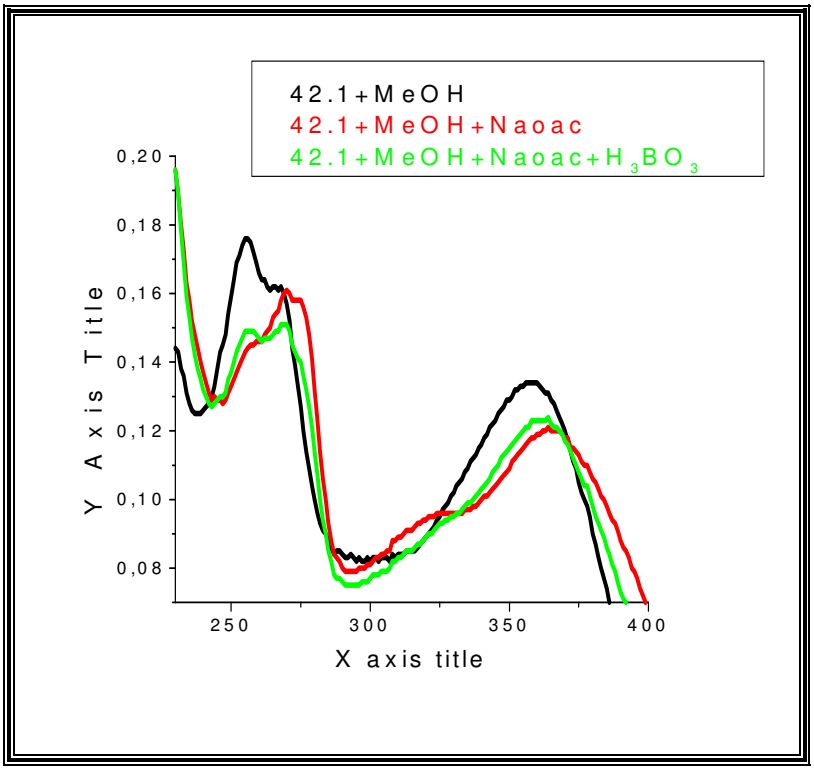




الطيف6

لإمتصاص الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب H_{42-1}

الطيف7 لإمتصاص الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب H_{42-1}

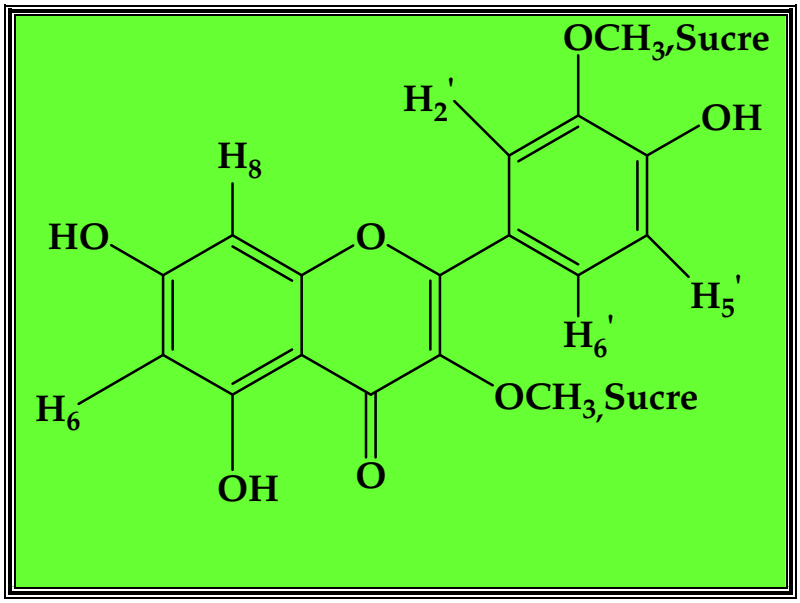


الطيف8 لإمتصاص الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب H_{42}-

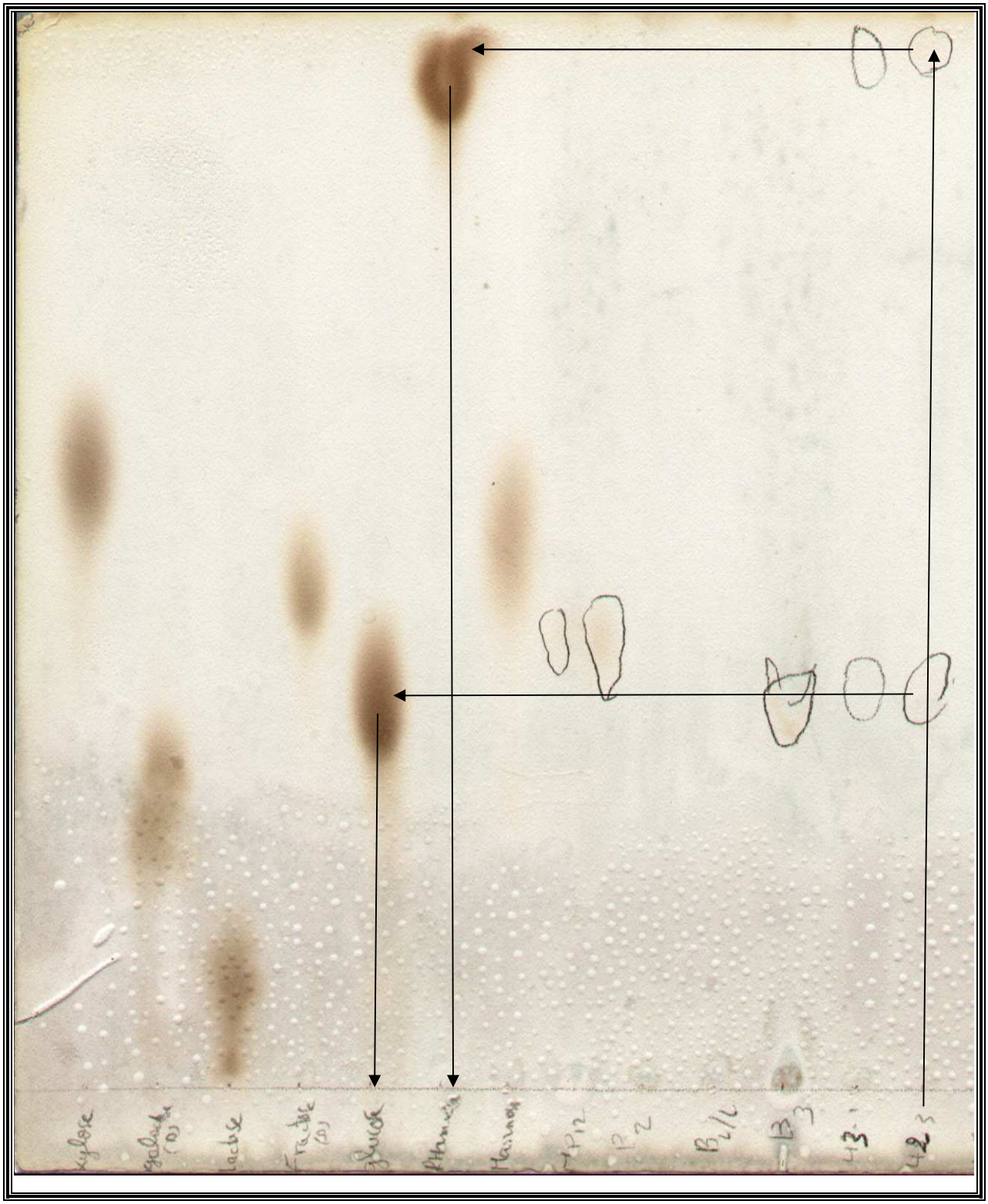
* الجدول(20): معطيات أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب H_{42-1} *.

الكواشف	العصابة I (نم)	عصابات أخري (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	360	269	255
NaOH	416	325	270
$AlCl_3$	360	304-400	266
$AlCl_3$+HCl	396	360-304-400	268
NaOAc	364	258-275-324	270
NaOAc+H_3BO_3	364	258-275-324	270
في NaOH وبعد خمس دقائق : الطيف مستقر			

ومنه نحصل على البنية الجزئية التالية:

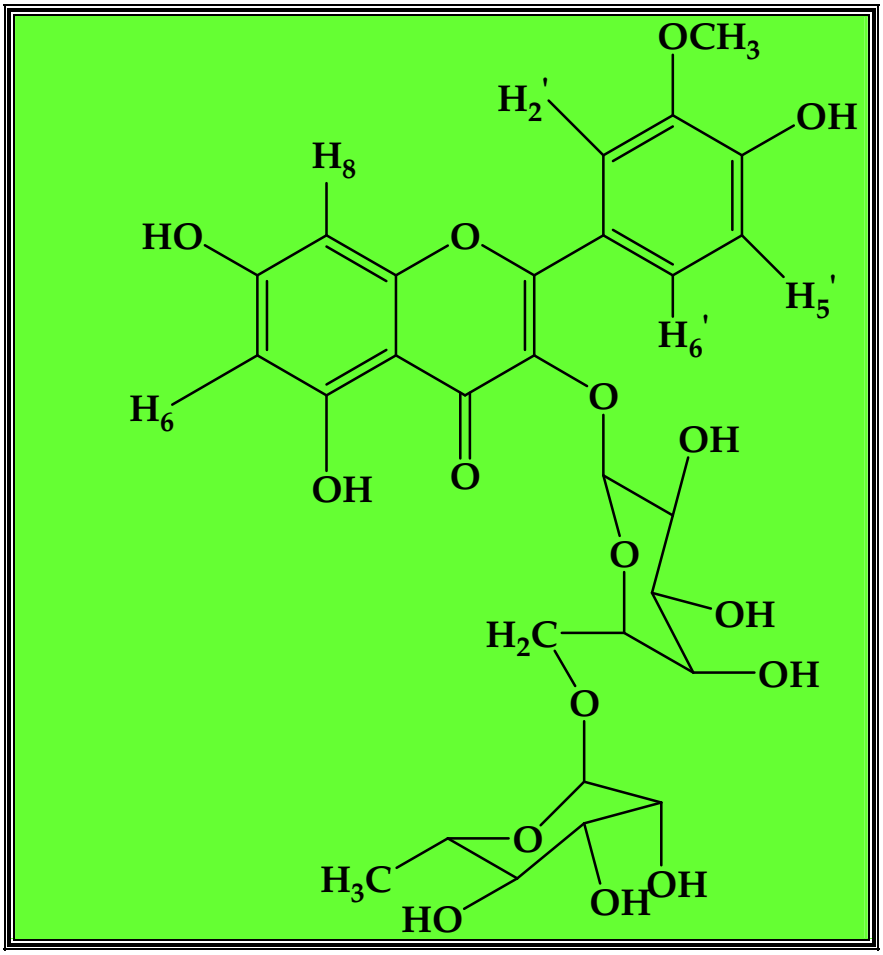


لتحديد موضع و طبيعة السكر إعتمدنا طريقة الحلمهة الحمضية ،و قد أعطت الاماهة الحمضية أجليكون أصفر اللون تحت مصباح UV حينما كان لون المركب بنفسجي غامق قبل الحلمهة و هذا دليل على أن الموقع 3 كان يحتوي على جزء سكري تحرر بعد الحلمهة كما أظهر اللوح الكروماتوغرافي المبين في الشكل(24) أن طبيعة السكر هو galactose وRhamnose.ومنه نستنتج أن $O\text{-}CH_3$ يقع في الموضع'3.



الشكل (24) اللوح الكروماتوغرافي للحلمهة الحمضية

ومنه نحصل على البنية الجزئية التالية:



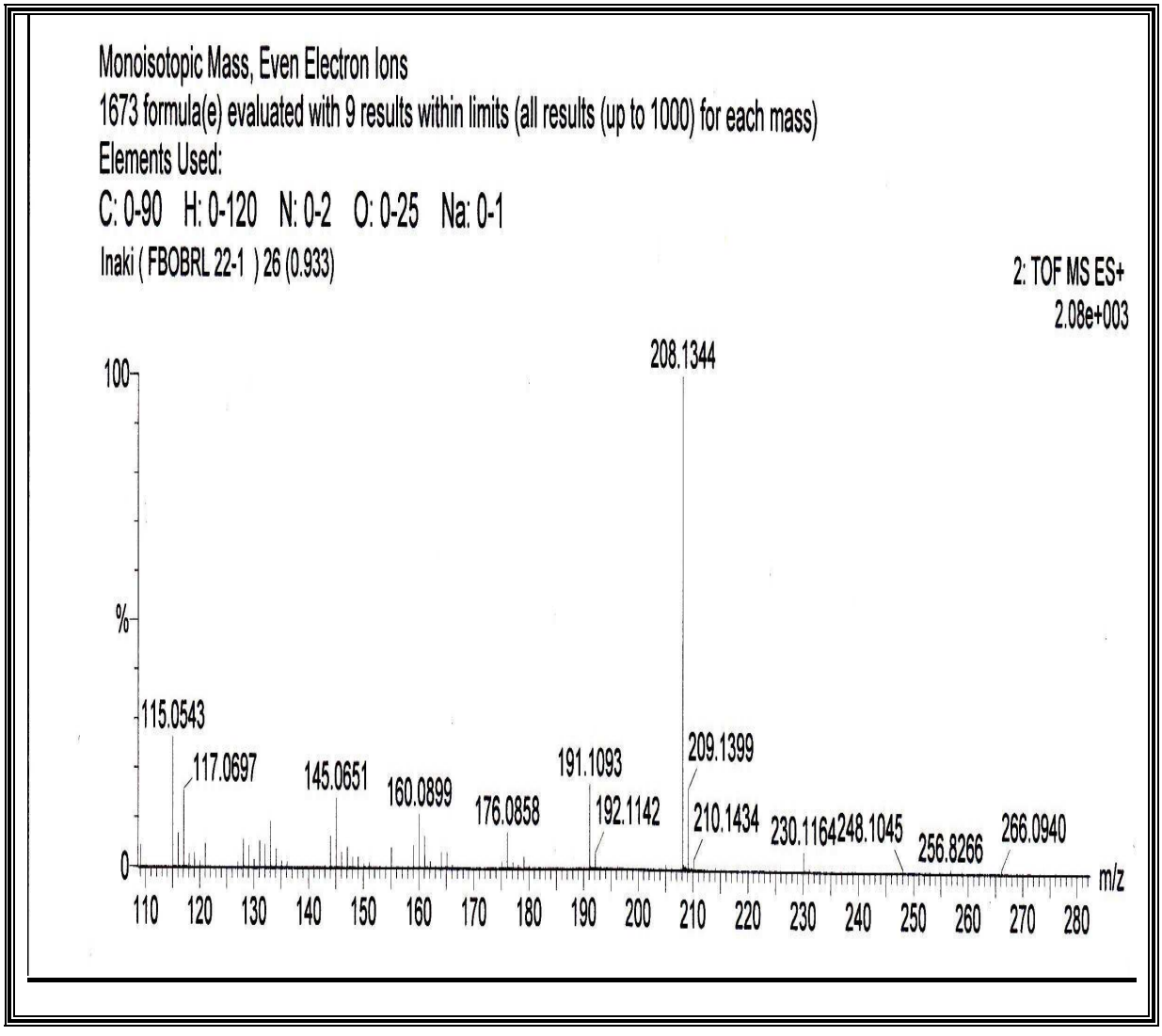
5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy-3-*O*- rutinosyl flavones [70]

I -2- دراسة للمركب H_{22} :

هذا المركب هو على شكل بلورات بيضاء.

I -2-1-طيف الكتلة :

يبين طيف الكتلة ذات الكفائة العالية [$MS\text{-}ES^+$] لهذا المركب و المبين في الطيف رقم (9). والذي يعطي إشارة الأيون شبه الجزيئي عند m/z=208.1344. والتي توافق $[M+H]^+$ ذات الصيغة المجملة ($C_{12}H_{18}O_2N$) . وهذا يقودنا إلى الكتلة المولية لهذا المركب m/z=207.1344 والتي توافق $[M]^+$. ومنه صيغة المركب H_{22} هي ($C_{12}H_{17}O_2N$) . وهو مركب غير مشبع حيث أن Ω=5.



الطيف 9 ([MS-ESI] الخاص بالمركب H_{22})

I -2-2-طيف $RMN\ ^{13}C$ و DEPT (135):

يبين طيف $RMN\ ^{13}C$ وطيف DEPT (135) المبين في الأطياف رقم (10،11) على التوالي لهذا المركب تأكيد وجود 12 ذرة كربون وهي تضم :

- ثلاث مجموعات ميثيل إثنان منها على شكل ($O\text{-}CH_3$). عند (δ=57.6ppm و δ =57.4pmm) .

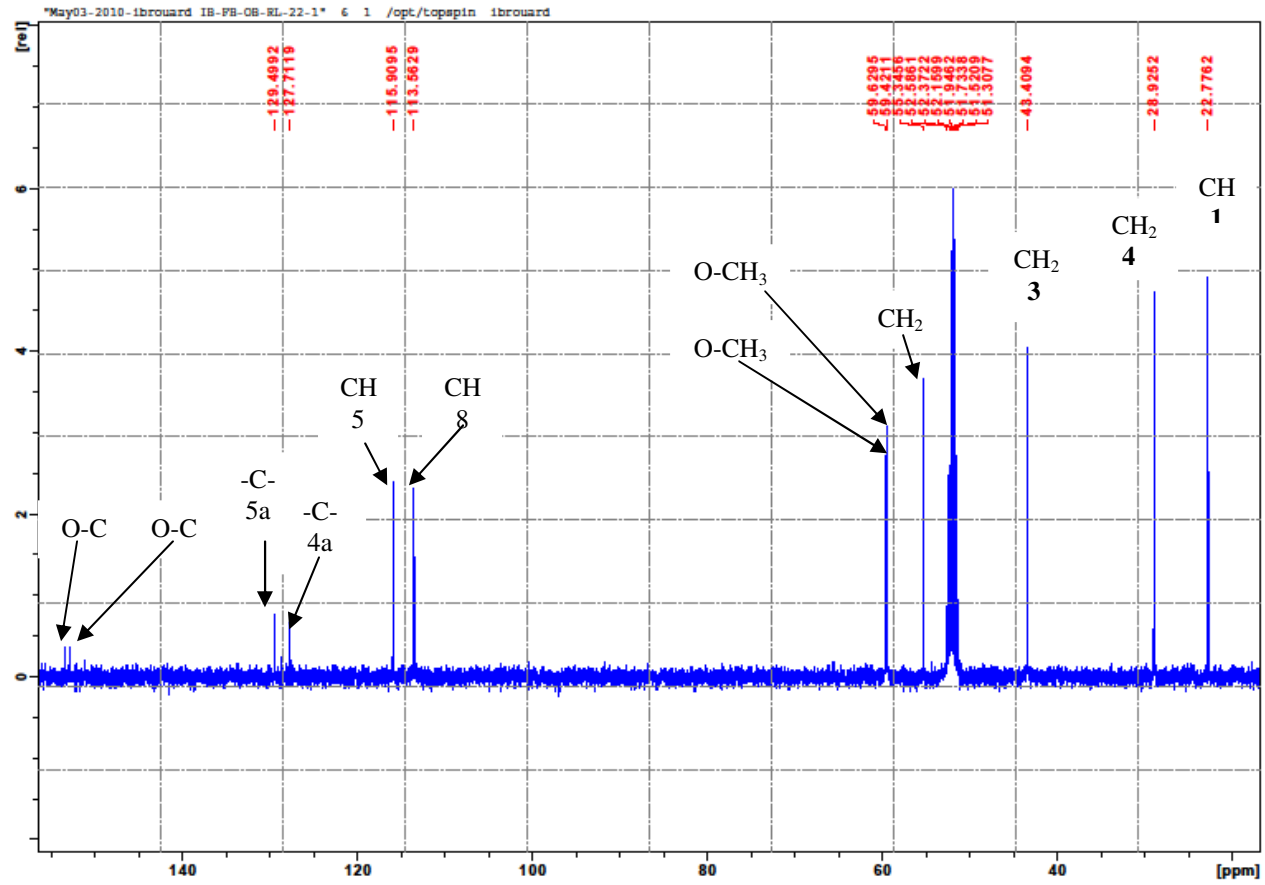
مجموعتين من (CH_2). بتهجين sp^3 عند(δ=41.4ppm و δ=26.9pmm).

- ثلاث مجموعات من (CH) واحدة منها مهجنة sp^3عند (δ=20.8pmm)

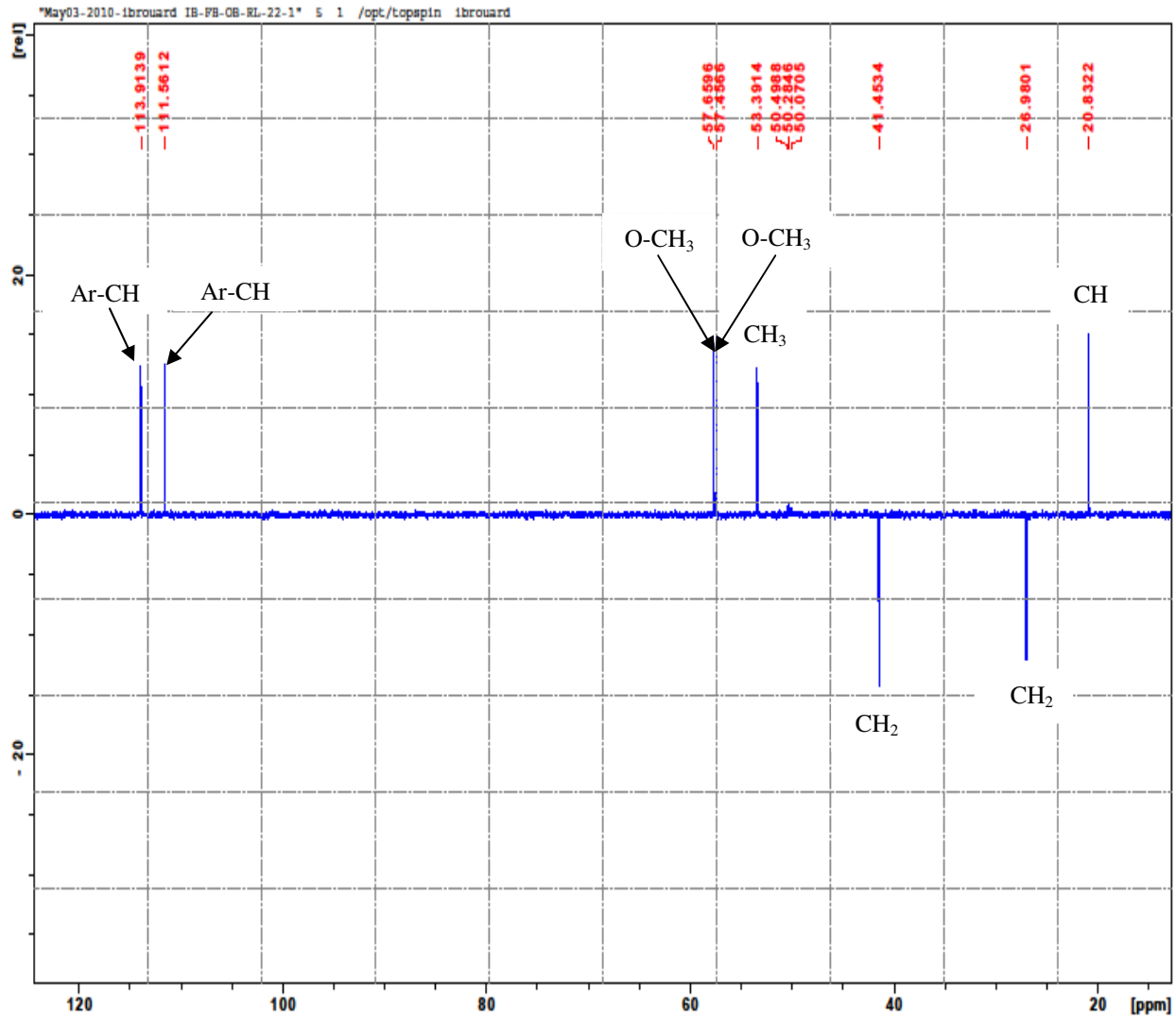
- و مجموعتين عطريتين. عند (δ=113.9ppm وδ =111.5pmm). من خلال هذه المعطيات نستطيع القول أنه توجد نواة رباعية الإستبدال .
- أربع ذرات كربون رباعية منها ذرتين متصلتين بذرتين هيدروجين عند (δ>150pmm).

هذه المعطيات تسمح لنا بوضع مجموعتين ميثوكسيل على النواة العطرية .

بما أن رقم عدم التشبع هو خمسة ولدينا حلقة عطرية وباقي ذرات الكربون بتهجين sp^3. هذا يسمح لنا بإقتراح وجود حلقة في المركب H_{22}.



الطيف 10 ($RMNC^{13}$ الخاص بالمركب H_{22})



الطيف 11 (DEPT (135) الخاص بالمركب (H_{22})

I -3-2-طيف $RMN\ ^1H$:

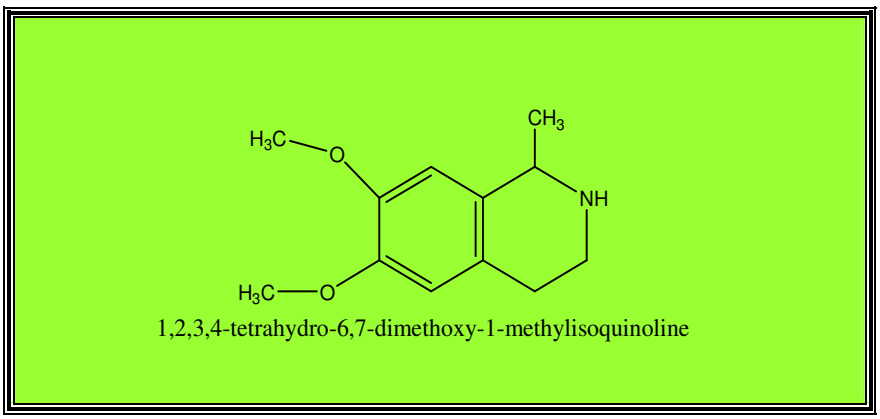
يبين طيف^1H RMN في كل من الأطياف رقم(13،12). على التوالي :

- وجود بروتونين عطريين عند (δ_H=6.6ppm و δ_H=6.7pmm). على شكل إشارة أحادية ما يبين أنهما متموضعين على شكل (para).
- إشارة ثنائية بثابت تزاوج (J=6.8Hz) وتكامل 3H.عند (δ_H=1.5ppm) .
- إشارة رباعية بثابت تزاوج (J=6.8Hz). وتكامل 1H.عند (δ_H=4.4ppm)

هذا يؤدي إلى تسلسل من الشكل $CH-CH_3$. مع غياب بروتونات من شأنها التزاوج مع بروتونات الذرات المجاورة لذرة الـCH .

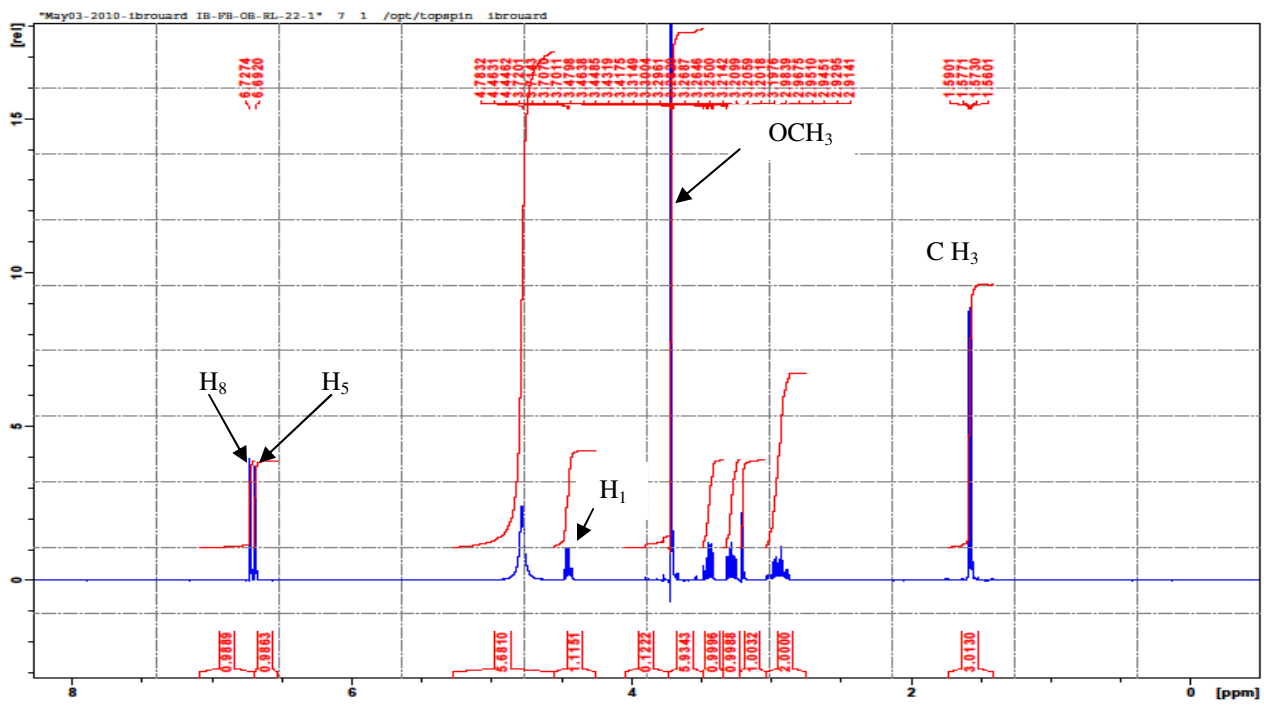
- يبين الطيف كذالك وجود مجموعتي ميثيل تشكل نظام (AA').(BB'). وهذا يقودنا إلى وجود $-CH_2-CH_2-$. مع غياب بروتونات أخرى للذرات المجاورة التي من شأنها التزاوج معها .
- يبين الطيف كذالك عند 3.7ppm اشارة أحادية بتكامل 6H موافقة لوجود 2 ميتوكسيل
- في هذا المركب .

مجموعة هذه المعطيات تعطينا سلسلة متكونة من $CH_2-CH_2-NH-CH-CH_3$. مشكلة حلقة مابين هذه السلسلة وبين ذرتي الكربون في الموضع ortho. من الحلقة العطرية .

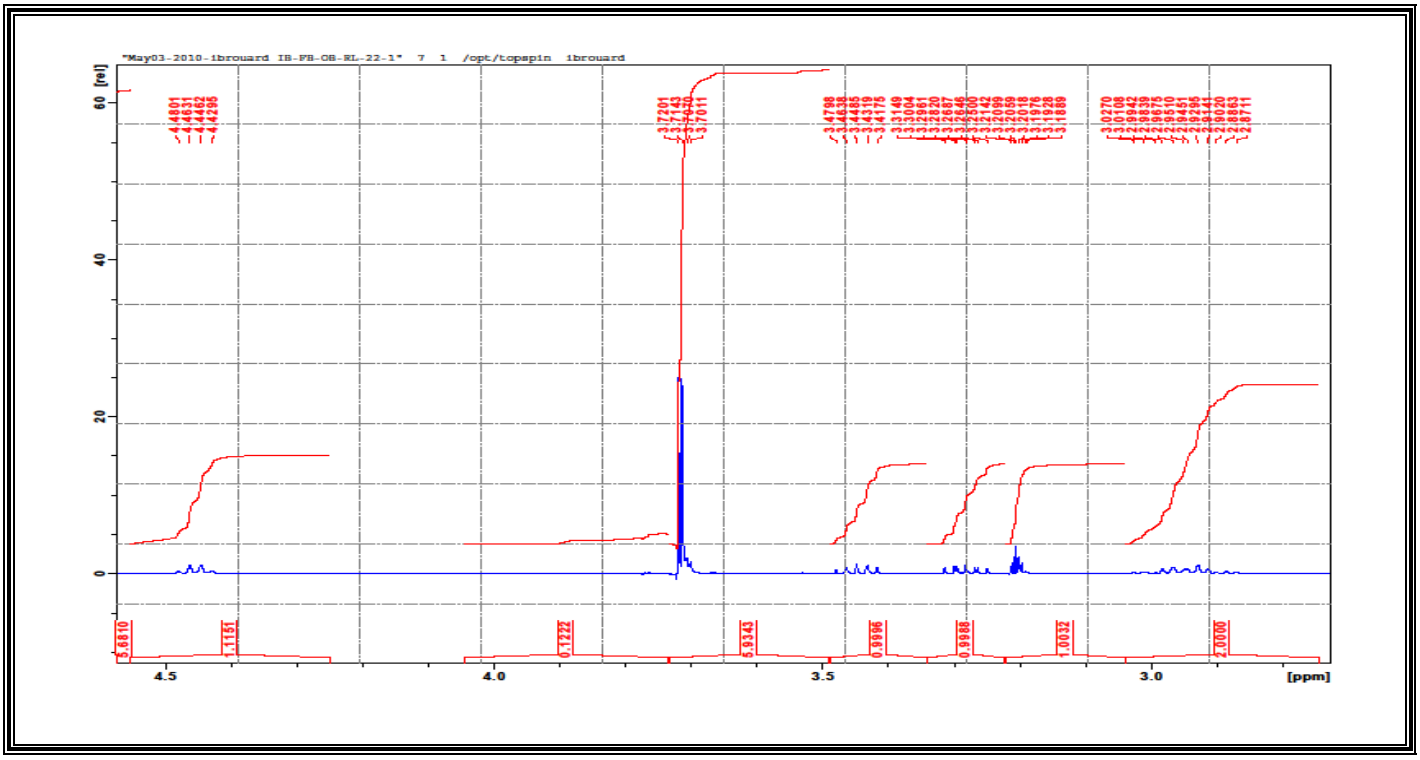


وهذا يسمح لنا بإقتراح الصيغة التالية:

-salsolidine- [69]



الطيف 12 (RMN^1H الخاص بالمركب H_{22})



الطيف 13 (RMN^1H الخاص بالمركب H_{22})

I -4-2-الأطياف ثنائية البعد :

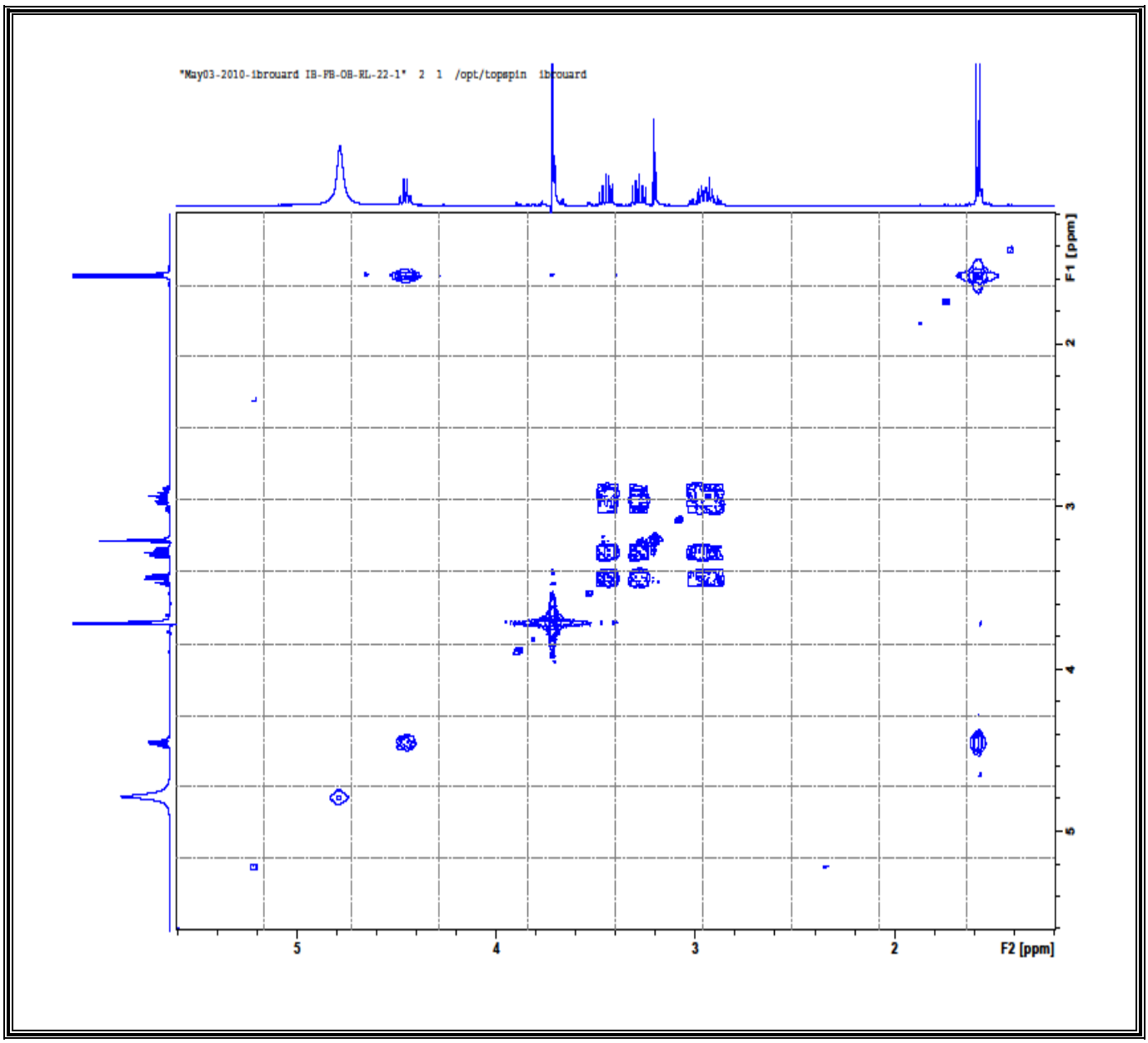
اعتماداً على تجارب مطيافية ثنائية البعد COSY في الطيف رقم (14) . و HSQC في الطيف رقم (15). وHMBC في الطيف رقم (16).

تأكدنا من صحة بنية المركب المقترحة سابقا وذلك :

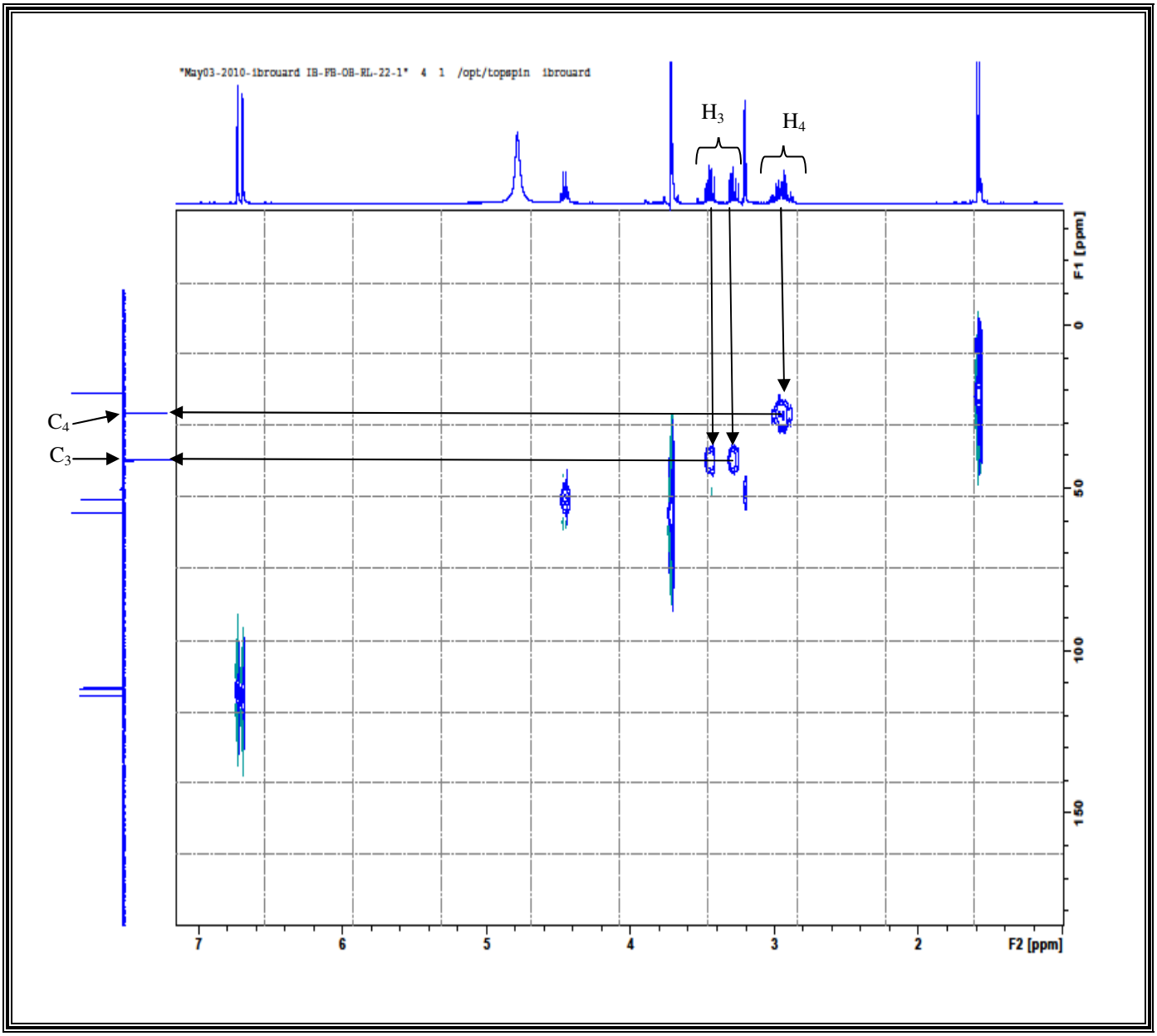
- بوجود نقطة تعالق في طيف HMBC. مابين H_1وC.عند (δ =41.4ppm). الذي يسمح لنا بنسب C_3. واستنتاج C_4 (δ=26.9ppm)
- وجود نقطة تعالق مابين بروتونات الميثيل و c عند (δ=129.4ppm). تسمح لنا بربط C_{5a} واستنتاج C_{4a} عند (δ=127.7ppm).

تجربة طيف HSQC، تسمح لنا بتعيين البروتونات المحمولة على الكربونات ، وتسمح لنا أيضا بنسب H_3 (δ=3.2ppm).و H_4 (δ =4.4ppm).

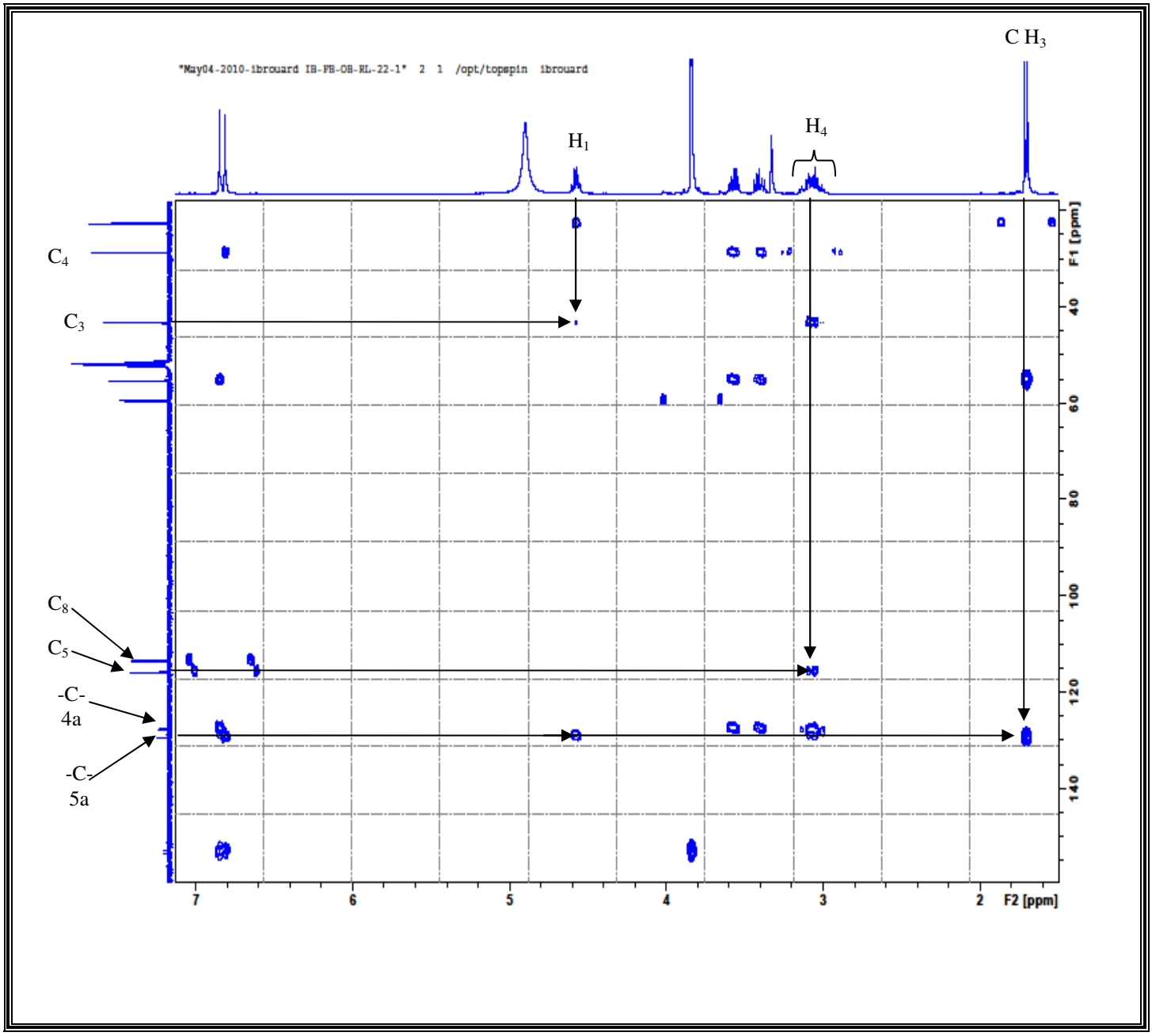
وجود نقطة تعالق في طيف HMBC. مابين H_4وC.عند (δ =113.9ppm). الذي يسمح لنا بنسب C_5. واستنتاج C_8 (δ=111.5ppm)



الطيف 14 (COSY الخاص بالمركب H_{22})



الطيف15 (HSQC الخاص بالمركب H_{22})



الطيف16 (HMBC الخاص بالمركب H_{22})

المعطيات المنسوبة إلى نتائج الأطياف المسجلة مبينة في الجداول رقم (22.21) على التوالي :

الجدول (21) : معطيات طيف البروتون للمركبH_{22}

البروتونات	الإنزياح الكيميائي(δ_H=ppm)	التعددية	ثابت التزاوج J (Hz)
CH_3	1.5	*d*	6.8
H-4	3.2	*m*	-
H-3	3.4	*m*	-
O-CH_3	3.7	*s*	-
H-1	4.4	*qd*	6.8
H-5	6.6	*s*	-
H-8	6.7	*s*	-

الجدول (21) : معطيات طيف الكربون للمركبH_{22} .

الكربونات	الإنزياح الكيميائي(δ_C=ppm)
1	20.8
3	41.4
4	26.9
4a	127.7
5a	129.4
5	113.9
6	>150
7	>150
8	111.5
CH_3	53.39
O-CH_3	57.6-57.4

المراجع

[1]- www.elnabatate.fr

[2] أندروشوفاليه ،(1996م)، ترجمة عمر الأيوبي ، الطب البديل : التداوي بالأعشلب

و النباتات الطبية ، لندن

[3] www.nobel.Se/medicine/laureates/1937/Szent-Gyorgyi-bio.Html

[4] Bruneton , J . (1993), Pharmacogonosie ,phytochimie , plantes medicinales , eds Techniques et documentation , 2éme édition Lavoisier.

[5] Harborne, J. B. (1973). Flavonoids in phytochemistry, eds, J. B. Litton educational publishing inc. London.

[6] El hazemi, (1995), Natural Product, 149-190. H, eds Univesity of King Saoud.

[7] Harborne, J. B. (1975). The flavonoids, V.2, eds Chapman and Hall, London.

[8] Pitshke, L., Grisebach, H. Y. (1965). Naturforsch. 20b, 1039-1042

[9] Grisebash, H., Barz, W. (1969). Naturwiss, 56, 538-544

[10] Harborne, J.B. (1964). Biochemistry of phenolcs compounds Academic press, New York.

[11] Davis, B. D. (1955). Advancedas in Enzymology. 16, 227.

[12] Richter, G. (1993), Metabolism des végéteaux, Physiolgie et biochimie, eds press polytechniques et Universitaire Romandes , Lausanne

[13] Jensen, S.R., Franzyk, H. et Wallander, W. (2002). Phytochemistry, 60, 213-231.

[14] Turner, M. J., Smith, B. W., Haslam, E. J. (1975). Chem. Soc. perkin 52, 5

[15] Deluca, V., Ibrahim, R. K. (1985). Arch. Biochem. Biophs, 606.

[16] Jurd, L . (1962). The chemistry of flavonoid compounds. Geissman, Peragmon press, New- York.

[17] Chopin, J. (1966). Actualités de phytochimie fondamentale, 2eme Série, éds, Masson, Paris, 119.

[18] Palazón, J. , Cusidó, R.M., Morales, y C. Metabolismo y

significación biológica de los polifenoles del vino, Grupo de

Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de

Barcelona.

[19] MARFAK, A.G.(2003). Thèse de doctorat ,Université de Limoges.

[20] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999) Life Sciences Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. 65(4), 337-353.

[21] Pietta P. (2000)."Journal of Natural Products". Flavonoids as Antioxidants. 63(7), 1035-1042.

[22] Melcent, R. (2003). Chimie organique hétérocyclique, eds, EDP sciences.

[23] Bruneton, J. (1987). Elément de phytochimie et de pharmacognosie, eds, technique et documentation, 1ere edition, Lavoisier.

[24] Kelly, E. H., Anthony, R. T., Dennis, T. (2002). The journal of nutritional biochemistry. 13, 572-572.

[25] Medelton, E. Jr. (1984). The flavonoids. 2, 335-338.

[26] Hertog M. G. (1995)." Archives of Internal Medicine" Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Vol. 155 N°4.

[27] Yochum, L. (1999). " American Journal of Epidemiology ". Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. 149:10

.

[28] Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D. (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and Indomethacin Biochem Pharmacol. 32:1995.

[29] Ferraro,G.E. (1983), Acta farm . Bonaerense , V.2 , N°2 , p.97-103.

[30] Dae , S.J., Muriel , C., Michael , E.H . (2002), Phytchemistry , V . 61,N°7 , p . 867- 868.

[31] Lebreton, P., Jay , M., Voirin, B. et Bouchez, M. B. (1967). Sur l'analyse qualitative et quantative des flavonoides . Chim. Analyt. Fr., 49(7), 376

[32] Gonnet, J.F. (1973). A propos de la photographie en couleur de Chromatographie sur couches minces en lumiére de wood. J. of chromato. 68, 192

[33] Harborne, J. B. (1973). Phytochemical Methods, Chapman and Hall London

[34] LOISELEUR, J. (1973). "Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique ", Tome 1, Editeurs MASSON et CIE.

[35] Wang, H. K. Lin, S. Y. Hwang, K. M. Tylor. G and Lee, K. M. (1994), Bioorg, MED chem. 2, 1397.

[36] Francisco, A., Tomas-Barberan, F., et coll.(1990). High performance liquid chromatography, thin layer chromatography and ultra violet behaviour of flavone aglycone with unsubstituted rings . Phytochemistry. Anal. I, 44.

[37] Combier, H., Jay, M., Voirin, B., Lebreton, P.(1974). Influence des 6 et /ou des 8- substitutions sur le comportement spectrométrique et des chromatographique flavonoides. Assemblée annuelle du « Groupe polyphénols ». Lyon, France

[38] Mabry,T. J., Markham, K. R., Thomas, M.B.(1970). The systematic . identification of flavonoids. Springer- Verlag, Berlin

[39] Anderson, R. A., Sowers, J. A. (1968),"Phytochemistry". 7, 115-126 .

[40] Endres, H., Hormann, H. (1963). " Angew. Chem", 2, 254, Ed. intrnatl.

[41] Vernin, G. (1970), La chromatographie en couche mince, Techniques et application en chimie organiques, Dunod, Paris.

[42] Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). " Springer- verlag" The systematic Identification of Flavonoids., New-York

[43] Markham, K.R.(1982). Techniques of flavonoids identification. Academic press. London

[44] Alain, B.(1972). La chromatographic et ses applications. Dunod, Paris.

[45] Harborne J.B. (1988).The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman & Hall.London

[46] Harborne, J. B. (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic press. London

[47] Jay, M. Gonnet, J. F., Wollenweber, E. , Voirin, B. (1975). Phytochemistry. 14, 1605

[48] Voirin, B. (1983). Phytochemistry. 22, 2107

[49] Harborne, J. B. Swain, T. (1969). Prespectives in phytochemistry. Academic press. London.

[50] Bacon, J.D. and Mabry, T. A. (1976)." Rev. Latinoamer, Quim".UV Spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavanols., 7,83-86.

[51] Riberau- Gayon, P.(1968). Les composés phénoliques des végétaux . Dunod, Paris.

[52] Markham, K.R ., Mabry, T.J.(1975). In the flavonoids. Harborne, J.B, Mabry, T.J and Mabry .H, Chapman and Hall, London.

[53] Wollenweber, E., Jay, M.(1971). In the flavonoids. Harborne, J. B. Chapman and Hall, London.

[54] Audier, H.(1966).Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse. Bull. Soc . Chim. Fr., 9, 2892.

[55] Goudard, M ., Bouvin, J. F., Chopin, J .(1978).Phytochemistry., 17, 145.

[56] Constantin, E., Schenell, A.(1986).Spectrométrie de masse, principes et applications, Lavoisier, Paris

[57] Harborne, J.B. (1988). The flavonoids advances in research. since 1980. Chapman and Hall. New-York

[58] Becchi, M., Fraisse, D.(1989). Fast atom Bombardment and Fast atom Bombardment, collision actived- dissociation/ mass- Analysis ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids . Biomed. & environmental mass spectromet. 18, 122.

[59] Markham, R.(1995). Les facteurs anti –nutritionnels (F.A.N) phénoliques de *Pisum sativum* et de *Vica fabal* (Leguminosae) : Aspects structuraux. Thèse de doctorat, univ. Claude Bernard, Lyon I.

[60] Pawank, A. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligo saccharids glycosides phytochemistry. 10, 3307-3330.

[61] Markham, K.R ., Geiger, H .(1994). ^{1}H NMR Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide .In the flavonoids, Harborne, J.B, Chapman and Hall, London .

[62] Nielson, J.G ., Moller, J.(1970). Acta . Chem. Scand., 24, 2665.

[63] Harowitz, R. M., Gentili, B., (1966). Chem. Ind., London p 625.

[64] Rodriguez, E., Carman, N.J ., Mabry, T.J.(1972). Phytochemistry., 11, 409.

[65] Markham,K,R.,Tenai,B., Geiger H.,Mabry,T.J. (1978)" Tetrahedron" Carbon-13 NMR.Studies of flavonoids III., 34,1389-1397.

[66] http :fr.wikipedia.org/wiki/Chenopodiaceae

[67] Quezel,P.and Sanata,S.(1962),Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I , C.N.R.S. Paris

[68] Multon.J.L. (ed) (1992) . Lesucre, les sucre, les educolorants et les glucides de charge dans les I.A.A , Tec. & Doc. Lavoisier, Paris.

[69] These BOUMAZA.O , (2006), recherche et Détermination Structurale des Métablites Secondaires de Haloxylon scoparium (Chenopodiaceae) .

[70] Buchi C.A &Pomilio A.B., J.Nat. (1982) , Prod., , 45, 557-559.

الخاتمة

الخـاتمـة

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 لنبتة *Haloxylon scoparium* (Chénopodiaceae). .

قمنا أولا ببحث بيبليوغرافي عن الفلافونيدات ، وعن الطرق المستخدمة في فصل و تنقية هذه المركبات وكذالك الطرق الفيزيائية لتحديد بنيتها .

اتبعنا في عملية الفصل جملة من الخطوات ابتداءا من الاستخلاص يليه فصل أولي بواسطة كروماتوغرافيا العمود بعدها القيام باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة. و أخيرا عملية التنقية عن طريق استخدام عمود صغير من السيفادكس. و من أجل التحديد البنيوي للمركبات استخدمنا مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي. فكانت الحصيلة استخلاص ثمانية مركبات و تحديد مركبين منها لحد الآن.

5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy-3-*O*- rutinosyl flavones.

1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-1-methylisoquinoline

لقد قمنا بالمشاركة بهذا العمل ،في الملتقى العلمي *اليوم الثامن للصيدلة و اليوم السادس لربيع الألم* بجامعة باتنة.2010/06/03 .

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes médicinales algériennes.

Cette étude portant sur l'investigation phytochimique de ***Haloxylon scoparium*** a été menée dans le but de rechercher les métabolites secondaires de l'extrait *n*-butanol de la plante.

Après extraction hydroalcolique, concentration et affrontements successifs au chloroforme, à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol de 1000g des fleurs et feuilles de cette plante, 67g de l'extrait *n*-butanol recueillis a été soumis à la séparation et la purification par chromatographie sur colonne et sur couche mince de gel de silice 60 HF_{254}. Ce travail a mené à l'obtention de huit produits à l'état pur et natif. L'établissement de leurs structures a été réalisé par la combinaison des méthodes modernes d'analyse et a permis la détermination de deux composés :

5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy-3-*O*- rutinosyl flavones.

1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-1-methylisoquinoline

Mots clés: *Haloxylon scoparium,* métabolites secondaires, flavonoïdes, alcaloïdes.

Summary

This work belongs to our research program on the Algerian medicinal plants.

This study, which concerns the phytochemical investigation of ***Haloxylon scoparium*** in the aim of the research of secondary metabolites of *n*-butanol extract.

After hydroalcholic, concentration and successive extractions with chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol of 1000g of aerial parts of this plant. 67g of *n*-butanol extract was submitted to separation and purification by column and thin layer chromatography on silica gel 60 HF_{254} .This work led to the isolation of eight pur compounds. Their structures were established by the combination of modern analysis methods, which leads to this two compounds:

5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy-3-*O*- rutinosyl flavones.

1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-1-methylisoquinoline.

Key words:: *Haloxylon scoparium,* secondary metabolits, flavonoïds, alcaloïds.

ملخص

يندرج هذا العمل ضمن برنامج بحث النباتات الطبية الجزائرية للجنس ***Haloxylon*** من العائلة (Chénopodiaceae)، بغرض تحديد الأيض الثانوي من النوع **الفلافونيدات** في نبات ***Haloxylon scoparium*** .

بعد عملية الاستخلاص بخليط من الماء و الكحول و التركيز المتبوعين باستخلاص متتالي بواسطة الكلوروفرم، خلات الإثيل و البوتانول (الكحول العادي) لكتلة من الأزهار و الأوراق قدرها 1000 غ، حصلنا على 67 غ من مستخلص البوتانول. خلصت دراسة هذا الأخير بعد الفصل عن طريق كروماتوغرافيا العمود والتنقية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية السيليكاجال على ثمان مركبات نقية. تم التحليل البنيوي لهذه المركبات بواسطة الطرق الطيفية الحديثة حيث سمحت بتحديد صيغة مركبين وهما:

5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy-3-*O*- rutinosyl flavones.

1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-1-methylisoquinoline

الكلمات المفتاحية: *Haloxylon scoparium* ، *الأيض الثانوي* ، *الفلافونيدات* ، *القالويدات*.