

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة منتوري قسنطينة

قسم الكيمياء

كلية العلوم

رقم الترتيب

رقم التسلسل

رسالة

مقدمة لنيل شهادة الدكتوراه في العلوم

تخصص كيمياء عضوية

شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان

فصل و تحديد منتوجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لبعض نباتات

العائلة الريزيدية (*Resedaceae*)

تحت إشراف الأستاذة:

زهية كعبوش

تقديم

برحال جمعة

أعضاء لجنة المناقشة:

رئيسا

مقررة

ممتحنا

ممتحنا

ممتحنا

ممتحنا

أستاذ بجامعة قسنطينة

أستاذة بجامعة قسنطينة

أستاذ بجامعة عنابة

أستاذ بجامعة أم البواقي

أستاذ محاضر بجامعة ورقلة

أستاذ بجامعة قسنطينة

د. مجروبي كمال

د. كعبوش زهية

د. عوف نور الدين

د. لعمارة قدور

د. دندوقي حسين

د. عكال صالح

إهداء

أهدي ثمرة جهدي هذه إلى:

أبي و أمي حفظهما الله

جدتاي أطال الله في عمرهما

أختاي نوال و فيروز

أختي هشام و حمزة و كروم و زوجته حنان.

إلى من أدخلت الفرحة في بيتنا و قلوبنا الجميلة

❤️ **أميرة نور الهدى** ❤️

إلى من رافقتني و ساندتني خلال كل مراحل إنجاز هذا العمل آسيا.

إلى الدكتورة بالخيري على كل ما قدمته لي من دعم معنوي

وإلى كل من تمنى لي النجاح

تشكرات

الشكر الأول و الأخير إلى من يسر لي أمري و وفقني لإنجاز هذا العمل، فلك الشكر و الحمد ربي حتى ترضي.

ثم أريد أن أقدم جزيل الشكر إلى الأستاذة كعبوش زهية التي فتحت لي بابها و شجعتني و قدمت لي كل الدعم المادي و المعنوي لإنهاء هذا العمل في هذه الفترة، كما أشكرها على كل ما قدمته لي من توجيهات و معلومات خلال تواجدي بالمخبر و في كل مراحل البحث.

أتشرف بحضور أعضاء لجنة المناقشة و أتوجه بالشكر إلى الأستاذ مجروبي كمال على قبوله رئاسة لجنة المناقشة. و الأساتذة عوف نور الدين و لعمارة قدور و دندوقي حسين و عكال صالح على قبولهم المشاركة في مناقشة هذه الرسالة.

كما أتقدم بالشكر إلى الأستاذ عكال صالح و الأستاذ بوعصيدة سفيان على مساعدتهما لي في إنجاز بعض الأطياف، أذكر منها الأشعة X .

أشكر كل أعضاء مخبر L.O.S.T : نعيمة، فيروز، وسيلة، آسيا زغيب، حبيبة، الأستاذ أحمد كعبوش، طارق و هشام.

كما أشكر كل الزملاء و الأصدقاء الذين شجعوني أذكر منهم: سليمة، منى، سهيلة، أحلام، حنان، لامية، مالك و رؤوف و شكر خاص إلى لطفي.

1	مقدمة
3	المراجع
		الفصل الأول
		أولاً: الفلافونويدات
4	مدخل
4	I. عموميات على الفلافونويدات.....
4	II. توزيعها و تواجدها في النباتات و المملكة النباتية
5	III. دورها في النباتات.....
5	IV. أهميتها في التغذية.....
5	V. كيمياء الفلافونويدات.....
8	VI. الإصطناع الحيوي للفلافونيدات
9	VII. الأهمية البيولوجية للفلافونيدات.....
9	VIII. علاقة الهيكل الفلافونيدي بالفعالية البيولوجية
9	1. علاقة الهيكل الفلافونيدي بالفعالية المثبطة للأنزيمات
10	2. العلاقة البنوية مع الفعالية المضادة للأكسدة
		ثانياً: الدراسة الكيميائية للفلافونيدات
12	I. طرق إستخلاص و فصل و تنقية الفلافونيدات
13	II. الكشف عن الفلافونيدات
		ثالثاً: الدراسة البنوية للفلافونيدات
13	I- الخواص الكروماتوغرافية
14	II. طرق التحليل الطيفي للفلافونيدات
14	1.II مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV.....
18	2.II مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-NMR}$
21	3.II مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C
22	4.II تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد

22 5.II مطيافية الكتلة
24 III. الإمَاهة الحمضية
25 المراجع
الفصل الثاني	
مسح مكتبي على جنس النبتتين المدروستين	
27 مدخل إلى العائلة <i>Resedaceae</i>
28 أولاً: الجنس <i>Reseda</i>
28	I. الأهمية الإقتصادية و البيولوجية للنبات الريزيدا
29	II. الدراسة الكيميائية للعائلة الريزيدية
35	III. تصنيف و توزيع فلافونيدات الجنس <i>Reseda</i>
38 ثانيًا: الجنس <i>Randonia</i>
39 المراجع
الفصل الثالث	
الجزء الأول	
42 أولاً- الدراسة النباتية و الكيميائية للنبتة <i>Reseda arabica</i>
42	1- المادة النباتية
42	2- وصف النوع
43	3- الوضع ضمن التصنيف النباتي
43	4 الإستخلاص
44	2- طرق الفصل
ثانيا -التعيين البنيوي للمركبات المفصولة	
52	- التعيين البنيوي للمركبات a ₁
57	- التعيين البنيوي للمركبات a ₂
65	- التعيين البنيوي للمركبات a ₃
71	- التعيين البنيوي للمركبات a ₄
82	- التعيين البنيوي للمركبات a ₅

الجزء الثاني

96 أولاً- الدراسة النباتية و الكيميائية للنبتة <i>Reseda villosa</i>
96 1- المادة النباتية
96 2- وصف النوع
97 3- الوضع ضمن التصنيف النباتي
97 4 الإستخلاص
98 5- طرق الفصل
	ثانياً- التعيين البنوي للمركبات المفصولة
101 - التعيين البنوي للمركبات V_4
	ثالثاً- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للنبتة <i>Reseda villosa</i> و مقارنتها بنظيرتها <i>Reseda duriaeana</i>
106 أولاً: تعريف النبتة <i>Reseda duriaeana</i>
	ثانياً: بعض المفاهيم
108 1. الجذور الحرة
108 2. أنواع الجذور الحرة
108 3. ذرة الأكسجين الحرة
109 4. أسباب زيادة الجذور الحرة
109 5. مصير الجذور الحرة
110 6. مضادات الأكسدة
111 7. التعرف على تقنية RPE
112 8. قياس الفعالية المضادة للأكسدة بتقنية RPE
112 أ. المبدأ
113 ب. طريقة العمل
114 ج. النتائج و المناقشة
115 المراجع

الجزء الثالث

أولاً- الدراسة النباتية و الكيميائية للنبتة *Randonia africana*

116	1- المادة النباتية
116	2- وصف النوع
117	3- الوضع ضمن التصنيف النباتي
117	4 الإستخلاص
119	5- طرق الفصل
ثانيا - التعيين البنوي للمركبات المفصولة		
124f ₁	- التعيين البنوي للمركبات
129f ₂	- التعيين البنوي للمركبات
134f ₃	- التعيين البنوي للمركبات
138f ₄	- التعيين البنوي للمركبات
143f ₅	- التعيين البنوي للمركبات
151f ₆	- التعيين البنوي للمركبات
162f ₇	- التعيين البنوي للمركبات
156f ₈	- التعيين البنوي للمركبات
166f ₉	- التعيين البنوي للمركبات
170	الخاتمة
الملخص		

Neu	Diphenylboric acid 2-amino-ethyl ester
AcAc	Acétylacetone
AcOH	Acide acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
MEC	Méthyléthylcétone
CCM	Chromatographie sur couche mince
CC	Chromatographie sur colonne
CP	Chromatographie sur papier
UV	Spectrophotométrie UV-Visible
RMN-H ¹	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
¹³ C-NMR	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
COSY	Correlation Spectroscopy
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
ROESY	Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
EI	impact électronique
FAB	Fast atome bombardement
ES	Eléctrospray
CI	Ionisation chimique
J	Constante de couplage
Hz	Hertz
ppm	parties par million.
s	Singulet
sl	Singulet large
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
R _f	Rapport frontal
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picryl-Hydrazyl

مقدمة

مقدمة

هناك مصدران أساسيان للعقاقير، أحدهما المركبات الكيميائية التي انتشرت و تنوعت نتيجة للتطور الكبير في فروع الكيمياء، و الآخر المواد الفعالة المستخلصة من النباتات الطبية البرية و البستانية و تاريخها أسبق من المصدر الأول، و تحمل في طياتها و صفاتها ما يجعل لها مميزات قد لا تتوفر في المصدر الأول.

عرف الإنسان منذ فجر التاريخ الأعشاب الطبية و فوائدها العلاجية المختلفة، فمن خلال المشاهدة و التجربة و البحث عبر آلاف و مئات السنين ازدادت المعارف عن النباتات الطبية و خصائصها العلاجية، فقد برع الصينيون و المصريون القدماء في علم التداوي بالأعشاب، حيث استخدموا العديد من هذه الأعشاب في علاج الكثير من الأمراض بالإضافة إلى استخدامها في التحنيط و كذلك في أمور الزينة و التجميل، و كان المصريون أول من استخدم زيت الحلبة لإزالة تجاعيد الوجه، و زيت الخروع لعلاج الإمساك و دهان للشعر، و النعناع المر لعلاج القروح و الالتهابات الجلدية و الاضطرابات المعوية و قشور الرمان لطرد الديدان... الخ^{2:1}.

ويعود الفضل لعلماء عرب مسلمين في تعميق المعارف حول الخصائص العلاجية للنباتات، إذ انتشر علم التداوي بالأعشاب في العصور الإسلامية، و ظهرت خلال ذلك الزمن الكثير من الكتب و المخطوطات التي تشرح بصورة واضحة أنواع الأعشاب الطبية المختلفة و طرق استخدامها و أنواع الأمراض المختلفة التي تستخدم فيها مثل هذه العقاقير الطبية، فقد وضع الرازي كتابا عن الأعشاب أسماه (الأبنية عن حقائق الأدوية) و وصف فيه ما يقرب من 500 نبات طبي، و سجل ابن سينا عبر كتابه "القانون" ما يزيد عن 760 دواء، ووضح ابن البيطار في كتابه "الجامع الكبير" الذي احتوى على ألفي وصفة طبية، ثم كتاب "المغني في الأدوية المفردة" و كتاب "الدرة البهية في منافع الأبدان". و غيرهم من العلماء الأكفاء الذين كانت تدرس كتبهم لعدة قرون في المعاهد العلمية الأوروبية^{2:1}.

كما أثبتت الدراسات الحديثة العلاقات الوثيقة بين الوصفات الشعبية و الأدوية الحديثة، فالصير مثلا يستعمل في الطب الشعبي مع زيت الزيتون لتقوية الشعر و علاج سقوطه و حديثا توجد مستحضرات صيدلية مستخلصة من الصير لنفس الأغراض، و حبة البركة تستخدم في الطب الشعبي لعلاج الكحة و السعال و أمراض الصدر و اليوم يستخدم الطب الحديث مادة النيجلين المستخلصة من البذور لنفس الأغراض.

نتيجة لارتفاع الوعي الصحي و العلاجي بين الشعوب زاد الطلب على العقاقير الطبية التي ازدادت المعارف المتراكمة عن خصائصها العلاجية أين تم استخراج مستخلصاتها في صورة أدوية مثل الأسبرين و البنسلين ... و بدأ التصنيع الدوائي للمركبات الكيميائية العلاجية، و كان من المتوقع أن تتراجع نتيجة لذلك الأمراض و تزداد السيطرة عليها، و لكن العكس هو الذي حدث، حيث أدى استخلاص الجزء الفعال من بعض النباتات ثم تصنيعه كيميائيا ثم تناوله إلى ظهور آثار جانبية على جسم الإنسان في كثير من الحالات. بينما تظهر قدرة الله عز و جل في أن تجعل

تركيزات هذه المواد الفعالة متوازنة و مخففة في النباتات، و يمكن للجسم البشري أن يتفاعل معها برفق في صورتها الطبيعية، إضافة إلى أن النبات الواحد قد يحتوي على العديد من المواد الفعالة التي تتعاون معا في معالجة المرض^{2,1}.

إذا فبالرغم من التطور الكبير في علم الأدوية و ظهور أعداد هائلة من المستحضرات الدوائية خاصة خلال القرن الماضي، فإن الحقبة الأخيرة شهدت عودة إلى استخدام الأعشاب الطبية كوحدة من أهم أفرع الطب البديل، و تتنوع طرق استخدام الأعشاب الطبية من استخدام منقوع أو مغلي النبات الكامل إلى استخلاص المواد الفعالة و استخدامها في صور تراكيب صيدلانية مختلفة. تعد العودة لاستخدام هذه النباتات الطبية في العلاج عودة للطبيعة.

و نظرا لما تتميز به بلادنا الجزائر من اتساع رقعتها و تنوع مناخها، ما يعكس تنوع الغطاء النباتي فيها. و بغرض تبيين الثروة النباتية في الجزائر و المناطق الصحراوية خاصة. قمنا في هذه الرسالة بدراسة كيميائية تركزت على نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي لنبتين تنتميان إلى العائلة الريزيدية إحداهما أصلية في صحراء الجزائر و هي *Reseda arabica* و ثانية تنتشر في بعض المناطق الصحراوية العربية في شمال إفريقيا *Randonia africana*. كلا من النبتين تدرس لأول مرة، كما قمنا بدراسة بقية الكسور المتبقية من النبتة المدروسة في رسالة الماجستير وهي *Reseda villosa* إضافة إلى دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لهذا النوع الصحراوي و مقارنتها بنظيرتها الشمالية *Reseda duriaeana*.

قسمنا الرسالة إلى مقدمة و ثلاث فصول تناولنا في الأول: عموميات على الفلافونيدات و توزيعها و تواجدها و دورها في النباتات و أهميتها في التغذية إضافة إلى كيمياء الفلافونيدات و اصطناعها الحيوي ثم أهميتها البيولوجية، بعدها تطرقنا بإيجاز إلى طرق الاستخلاص و الفصل و التنقية، و في الأخير استعرضنا مختلف الطرق المتبعة في التعرف على الهيكل الفلافونيدي. قمنا بتقديم دراسة شاملة في الفصل الثاني عن العائلة المدروسة (*Resedaceae*) و كذا الجنسين *Reseda* و *Randonia*، أما الفصل الثالث فقد خصص للطريقة العملية المتبعة خلال هذا البحث من الاستخلاص إلى التنقية، فالتعيين النيوي للمركبات المفصلة إضافة إلى دراسة الفعالية المضادة للأكسدة، حيث استعرضنا كل نبتة مدروسة في جزء خاص بها. أهينا الرسالة بخاتمة لخصنا فيها كل النتائج المتحصل عليها مرفوقة بقراءة كيميائية- تصنيفية للجنسين *Reseda* و *Randonia*.

1. Maarouf A.M. (2002) R d couverte des plantes médicinales. Expérience du Qatar.
2. Ibrahim S. S, Abdallah E, Abdelkareem M.S. (1988) Plantes médicinales aromatiques et toxiques du monde arabe. Ed. OADA, Egypte.

الفصل الأول

الفلافونيدات

أولاً: الفلافونيدات

اهتم الباحثون في السنوات الأخيرة بالمركبات الطبيعية التي تتميز بصفات علاجية واقتصادية مهمة و من بينها المركبات الفينولية. إذ استغلّت هذه العائلة بصفة واسعة في مجال العلاج النباتي « phytothérapie » و في بعض الاختصاصات الأخرى نظراً لخواصها العلاجية المتعددة، فهي مضادة للمخس و حامية للشرين¹ ... و لعل أهم فعالية تميزت بها هذه المركبات و لفتت انتباه الباحثين هي الفعالية المضادة للأكسدة.

المركبات الفينولية هي مركبات غير أزوتية تشمل الآلاف من الجزيئات مقسمة إلى عدة أقسام كيميائية تشترك في أنها تتكون على الأقل من حلقة عطرية تحتوي على 6 كربونات؛ هذه الأخيرة تكون مرتبطة بمجموعات وظيفية قد تكون هيدروكسيل حر أو وظيفة أستر، إيثر أو جزيئة سكر، كما أن أصل الإصطناع الحيوي لهذه الأقسام متقارب إذ كلها تتبع من حمض الشيكيميك. و من الأقسام التي تنتمي إلى عائلة الفينولية أو متعددة الفينول:

«Phloroglucinols, quinones, stilbénoïdes, coumarines, acides phénolique, flavonoides, anthocyanes, tanins...» ، عادة ما تكون هياكل هذه المركبات acylées أو glycosylées الأمر الذي يجعل وجود تنوع كبير في بناها، كما يعطي تنوع في قطبيتها.

كان اهتمامنا في هذا العمل على إحدى أقسام المركبات متعددة الفينول ألا و هي الفلافونيدات التي أظهرت عدّة ميزات علاجية سنطرق إليها لاحقاً.

I. عموميات على الفلافونيدات:

الفلافونيدات أحد أهم أقسام المركبات الفينولية و أصل هذه الكلمة يرجع إلى اللاتينية والذي يعني أصفر (flavus)، أول مكتشف للمركبات الفلافونيدية تحصل على جائزة نوبل سنة 1936 و منذ ذلك العام تم التعرف على حوالي 9000 بنية فلافونيدية²

II. توزيعها و تواجدها في النباتات و المملكة النباتية:

تعد الفلافونيدات من نواتج الأيض الثانوي في جميع النباتات الراقية كما تتواجد في النباتات الدنيا لكن بصيغ بنيوية بسيطة. تتوزع المركبات الفلافونيدية في كل أجزاء النبتة حيث تتواجد على شكل إيتيروزيدات أكثر ذوبانية في الماء هذا ما يسمح بتخزينها و تمركزها في الخلية النباتية للزهرة و الأوراق و الساق و الجذور³ كما تتواجد على شكل أجليكونات في الأنسجة السطحية

للأوراق، و تتواجد في أوراق بعض النباتات على شكل بلورات في الخلية مثل *Cactaceae* و نباتات المناطق الجافة⁴

أما متعددة الميثوكسي فتتواجد في سيتوبلازم الخلية^{5,6} كما تتواجد الفلافونيدات في قشور الفواكه الحمضية مثل البرتقال و الليمون و كذلك الخضروات و الجوز و البذور بشتى أنواعها و البقوليات الخضراء و الشاي و القهوة و الكاكاو.

III. دورها في النباتات:

تعرف الفلافونيدات كذلك على أنها صبغات ملونة متواجدة في النباتات، فهي المسؤولة إذن عن ألوان الأزهار و البذور و الثمار، مثل اللون البنفسجي الداكن في التوت، و الأحمر في الفرولة. و نتيجة للألوان الزاهية التي تعطيها للأزهار فإنها تلعب دورا هاما في جذب و جلب الحشرات و الطيور المؤبرة لتساعد في عملية التلقيح و الإخصاب و بالتالي في المحافظة على الأنواع النباتية، و من أهم الفلافونيدات المسؤولة على هذه الخاصية هي الأنثوسيانان و الفلافونولات^{7,8}. كما لها دور حماية النباتات من الجراثيم، كذلك تحمي أنسجة الخلية من التلف بسبب أشعة الشمس الخطرة، كما تعتبر مواد دفاعية لبعض النباتات إذ تقيها من أخرى متطفلة^{9,10}.

IV. أهميتها في التغذية:

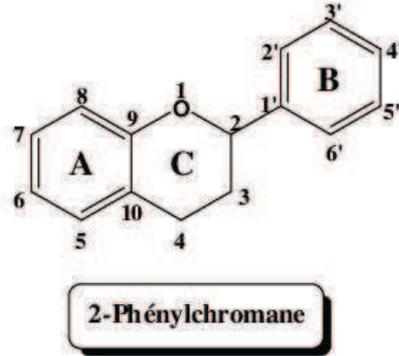
للفلافونيدات دور هام في النظام الغذائي للإنسان، إذ بينت الدراسات أننا نحصل على كمية من الفلافونيدات تقدر من 50 إلى 800 مغ في اليوم راجعة إلى تناول كميات من الفواكه و الخضروات و البقوليات الخضراء و المشروبات مثل الشاي¹¹.

كما يمكننا الحصول على الفلافونيدات كذلك من خلال النباتات و الأعشاب المتداولة عند عامة الناس، إذ تعد أغلب النباتات المستعملة في الطب الشعبي عبر العالم غنية بالمركبات الفلافونيدية¹².

V. كيمياء الفلافونيدات:

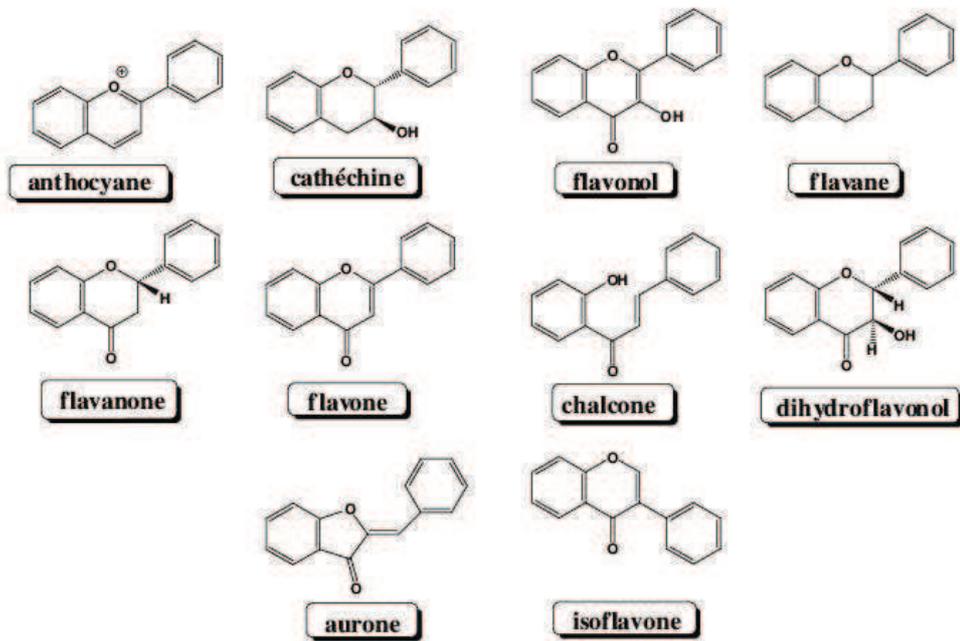
عموما تحتوي بنية المركبات الفلافونيدية على 15 ذرة كربون موزعة على حلقيتين بنزينيتين A و B مرتبطتين بجسر يحتوي على ثلاث كربونات، تطلق هذه الأخيرة على شكل

البيران يشكل الحلقة C و يعطي الهيكل القاعدي للفلافونيدات التي تنحدر أساسا من الوحدة الأساسية المسماة 2-phénylchromane كما في الشكل 1



الشكل 1: الوحدة الأساسية للفلافونيدات

و تبعا لدرجة أكسدة الحلقة C^{13,14} تتفرع الفلافونيدات إلى عدة أقسام و الشكل 2 يبين بعضها منها



الشكل 2: مختلف أقسام الفلافونيدات

تعتبر الفلافونات و الفلافونولات الأكثر انتشار في النباتات إذ تقدر نسبة وجودها بـ 80% من مجموع كل أقسام الفلافونيدات، و تكون الحلقة A في هذا الصنف مستبدلة بنسبة 90 % في الموضعين 5 و 7، أما الموقع 6 أو/و 8 فاحتمال استبدالها يكون بدرجة متفاوتة. في حين تكون الحلقة B هي الأخرى مستبدلة بنسبة 80% في الموضع 4، أو تكون ثنائية الإستبدال في 3 و 4، أو ثلاثية الإستبدال أحيانا في 3، 4، 5. أما الموقعين 2 و 6 فنادرًا ما يكونا مستبدلين.

هذه المستبدلات قد تكون مجموعات هيدروكسيل حر أو ممثلة أو acylée أو prényles أو sulfatés و تسمى عندئذ بالفلافونيدات الأجليكونية

أما إذا كانت المجموعة الإستبدالية سكر فتسمى بالفلافونيدات الإيثيروزيدية³، إذ من الممكن أن تكون هذه الأخيرة أحادية أو ثنائية أو ثلاثية أو رباعية و هي حالة نادرة جدا.

تم التعرف على أكثر من 80 تركيبة سكرية مختلفة، ترتبط بالمركبات الفلافونيدية المعزولة من النباتات. و من أهم السكريات المتعرف عليها في الفلافونيدات الأحادية:

على شكل Hexoses مثل: D-mannose, D-galactose, D-glucose

على شكل pentoses مثل: L- arabinose, D-xylose, L-rhamnose, D-apiose

أو على شكل حمض Uroniques و غالبا ما يكون D-glucuronique .

أما بالنسبة للسكريات الثنائية، فإما أن تكون موزعة على موضعين مختلفين علي الهيكل الفلافونيدي، أو يرتبط سكر الثاني بالسكر الأول المرتبط بالأجليكون، و أهم التشكيلات ثنائية السكر Rutinose (6-O-rhamnosylglucose) و Neohesperidose (2-O-rhamnosylglucose)

كما تم التعرف على حوالي 30 نوع من السكريات الثلاثية و بعض رباعيات السكر النادرة الوجود.

من الممكن أن تكون هذه السكريات مستبدلة بمجموعة acyle مثل malonate أو acetate¹²

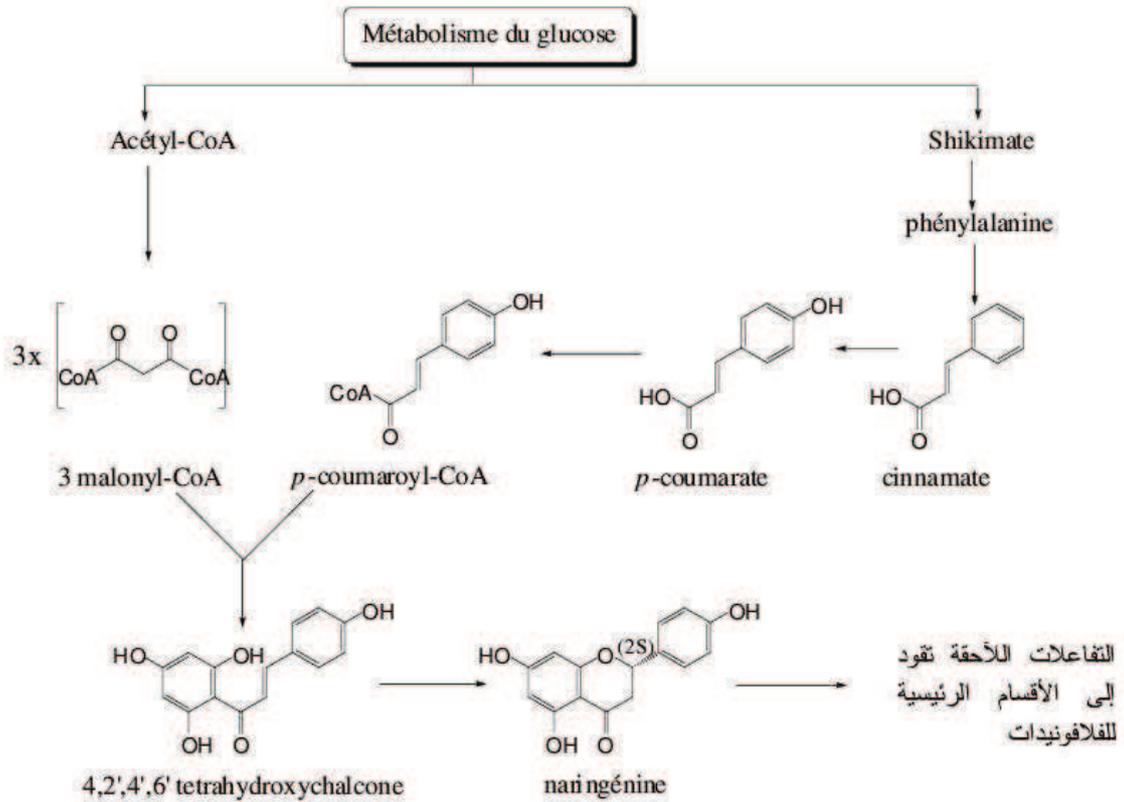
أما عن موضع السكر في الأجليكون فيكون في أي موقع من مواقع الهيدروكسيلات الحرة، و عادة ما يكون في C-7 عند الفلافون و C-3 عند الفلافونول؛ هذا إذ كان ارتباط السكر بالأجليكون من نوع O-glycoside . أما إذا كان ارتباط الكربون الأنوميري للسكر بكربون الجزء الأجليكوني مباشرة فيكون هذا الإرتباط من نوع C-glycoside، و عادة ما يكون على مستوى الحلقة A في الموقع 8 و/أو 6 للفلافونات خاصة. و من بين أهم السكريات المتعرف عليها في هذا النوع هي

rhamnose, xylose, glucose...

.VI الإصطناع الحيوي للفلافونيدات :

كل الفلافونيدات لها نفس الهيكل القاعدي لأنها آتية من أصل إصطناعي حيوي مشترك. فالحلقة A تتكون من إتحاد ثلاث جزيئات من مالونيل كونزيم A (malonyl-CoA)، أما الحلقة B و السلسلة الكربونية الثلاثية فنتشكل عن طريق الشيكيمات الذي يتحول إلى حمض باراكومارويل كونزيم A (Acide *P*-coumaroyl-CoA).

تتكاتف 3 وحدات من malonyl-CoA مع Acide *P*-coumaroyl-CoA فيما بينها و في مرحلة أنزيمية واحدة لتشكل نواة الشالكون (4,2',4',6' tetrahydroxychalcone) التي تتحلل على شكل البيران لتتبعق منها كل أقسام الفلافونيدات و التي تحدث لها تغيرات أخرى مثل مثيلة الهيدروكسيلات (methylation) أو تثبيت السكريات ¹⁵... مخطط -1- يلخص هذه المراحل



مخطط 1 : الإصطناع الحيوي للفلافونيدات

VII. الأهمية البيولوجية للفلافونيدات^{16،17}:

يعزى إلى هذه المجموعة الكيميائية تأثيرات عدة، إذ غالباً ما نصف الفلافونيدات النشطة حيويًا ببيوفلافونيدات وأحياناً بفيتامين P.

بينت مئات الدراسات على الفلافونيدات قدرتها الكبيرة من الناحية الدوائية فهي مضادة للفيروسات و للسرطان و الالتهابات و مضادة للهيستامين و مقتنصة للجذور الحرة و مثبطة للإنزيمات و مضادة للأكسدة؛ و قد كثر الاهتمام بالفلافونيدات في السنوات الأخيرة بسبب خواصها المضادة للأكسدة، و أهم الفلافونيدات التي تمت دراستها في هذا المجال هي: Genistéine, Naringine, Rutine, Quercétine, Hesperidine, Baicaline, Catechine ...

بينت التجارب التي أجريت على الإنسان على أن الفلافونيدات تمنع النزيف و تورم الساقين نتيجة لإحتجاز الماء بالجسم، كما أنها تقي من إعتلال الشبكية المصاحبة لداء السكري، و تقي من ارتفاع ضغط الدم. كما بينت الدراسات قدرة الفلافونيدات و نشاطها كمضادة للفيروسات و خاصة تلك المسببة لشلل الأطفال و الأنفلونزا و الالتهاب الكبدي و الفيروس المسبب لسرطان الدم في بعض الخلايا للمفاوية و الفيروس المسبب لنقص المناعة المكتسبة إذ تم اكتشاف أن مادة البيكالين و الـ Quercétine يمنعان تقسام فيروس الإيدز بنسبة 100% .

كما أن تناول كميات من الأغذية الغنية بالفلافونيدات يقلل من خطر الإصابة بأمراض القلب و الشرايين، تناول الطحالب الخضراء المزرقة الغنية بالـ Quercétine يقي من أعراض الربو، و عادة ما تستعمل الفلافونيدات مع الفيتامين C لأنها تزيد من إمتصاصه.

VIII. علاقة الهيكل الفلافونيدي بالفعالية البيولوجية:

بينت العديد من الدراسات أن للبنية الفلافونيدية علاقة بزيادة أو نقصان الفعالية البيولوجية، و سنتطرق لبعض الأمثلة:

1. علاقة الهيكل الفلافونيدي بالفعالية المثبطة للإنزيمات:

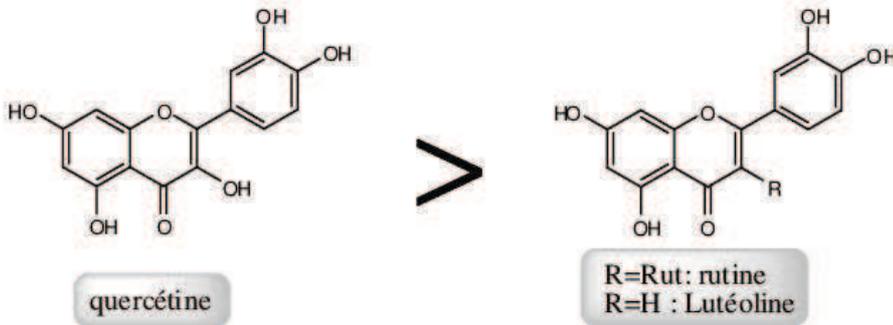
من الشروط الأساسية للحصول على فعالية مثبطة للإنزيمات بدرجة عالية هي وجود الرابطة الثلاثية بين C-2 و C-3 و كربونيل في موقع C-4، أو وجود OH حر في المواقع 3، 4، 5¹⁶.

2. العلاقة البنيوية مع الفعالية المضادة للأكسدة^{19,18}:

أجريت عدة أبحاث و دراسات مستعملة طرق مختلفة لقياس الفعالية المضادة للأكسدة على عدد كبير من الفلافونيدات لأجل تحديد البنية الأكثر فعالية. و سنتطرق بالتفصيل إلى بعض الخصائص و الميزات التي يجب أن يتصف بها الهيكل الفلافونيدي الفعال :

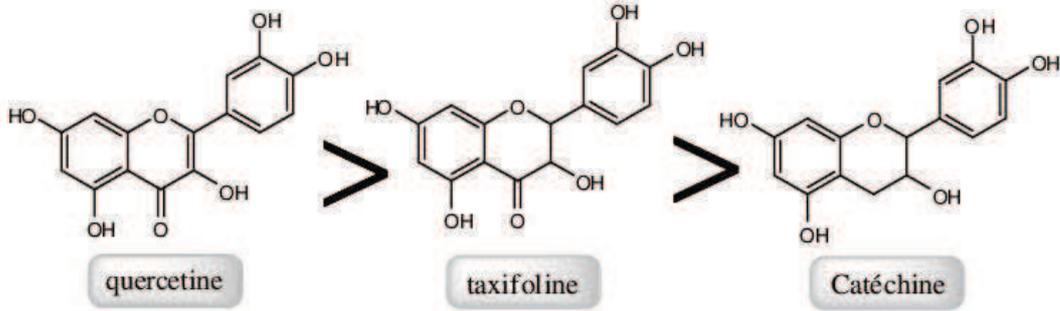
ضرورة وجود OH حر في C-3 على مستوى الحلقة C:

عند مقارنة فعالية Quercétine (3,5,7,3',4'-pent-OH) مع Lutéoline (5,7,3',4'-tetra-OH) نلاحظ إنخفاضاً واضحاً جداً للفعالية المضادة للأكسدة. كما نلاحظ إنخفاضاً مماثل عند مقارنة Quercétine بـ rutine (OH في C-3 مستبدل بـ rutinoside). إذا فغياب هيدروكسيل حر في الموضع 3 ينقص من الفعالية ضد المؤكسدة بدرجة مهمة.



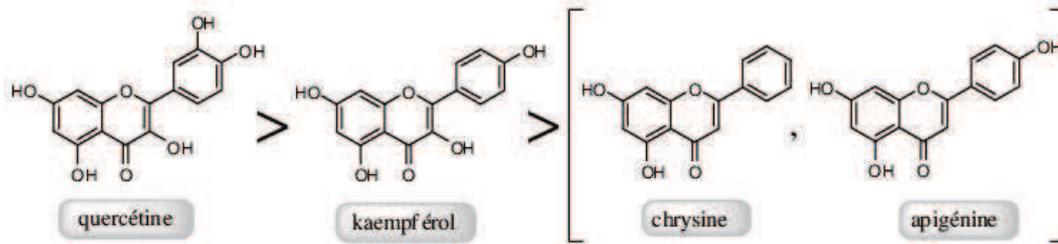
ضرورة وجود الرابطة الثنائية بين C-2 و C-3 و المجموعة الكربونيلية (4-one) :

عند مقارنة فعالية Quercétine مع taxifoline (لا يحتوي على رابطة ثنائية بين C₂ و C₃) أو مع Catéchine (لا يحتوي على الرابطة الثنائية و لا وظيفة الكربونيل) نلاحظ تراجع واضح في قيمة الفعالية المضادة للأكسدة.



ضرورة وجود ثنائي OH على الحلقة B في الموضعين 3' و 4' :

غياب أحد الهيدروكسيلات المتواجدة على الحلقة B في الموضعين 3' و 4' يخفض كثيرا من الفعالية المضادة للأكسدة للجزيئة، و نلاحظ هذا من خلال مقارنة Quercétine بـ Kaempférol و كذلك عند مقارنة قيمة فعالية Kaempférol بـ chrysin (5,7-di-OH) و Apigénine (5,7,4'-tri-OH). إذن فوجود OH منفرد أو غيابه تماما من الحلقة B لا يساهم في ارتفاع الفعالية المضادة للأكسدة.



ثانيا: الدراسة الكيميائية للفلافونيدات

I. طرق إستخلاص و فصل و تنقية الفلافونيدات 21-20 :

عموما تتبع الخطوات التالية إلا في بعض الحالات الخاصة التي يحتاج فيها إلى تغيير لغرض تحقيق أفضل النتائج:

v بعد قطف و تجفيف و طحن المادة النباتية تتقع في مزيج هيدروكولي يتكون عادة من الميثانول أو الإيثانول و الماء بنسبة (3/7) أو (8/2) و تترك مدة 24 ساعة؛ و تكرر هذه العملية ثلاث مرات متتابة على الأقل ثم ترشح، و الرشاحة المحصل عليها تبخر و تركز تحت الضغط المنخفض حتى الجفاف ليحصل على المستخلص الخام للنبتة أين يعالج بالماء المقطر المغلى و يترك مدة ليلة كاملة للراحة، ثم يرشح للتخلص من بقايا الشوائب لتبدأ عملية الاستخلاص من نوع سائل- سائل باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية و عادة ما يستعمل ثنائي كلور الميثان ثم خلاص الإيثيل و أخيرا البوتانول النظامي. بعد ذلك تركز الأطوار الثلاثة لنحصل على:

الفلافونيدات عديدة الميثوكسي في مستخلص الكلوروفورم

الأجليكونات القطبية و كذا أحادية السكر في مستخلص خلاص الإيثيل

أما مستخلص البوتانول فيحتوي على الفلافونيدات متعدد السكريات و كذا الفلافونيدات من

نوع C-glycoside

v قبل البداية بعمليات الفصل للمستخلصات المحصل عليها تجرى عدة تحاليل كروماتوغرافية أحادية و ثنائية البعد في عدة أنظمة كل حسب الدعامة الثابتة المختارة. سواء كانت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية CCM على السيليكاجال أو متعدد الأמיד أو كروماتوغرافيا الورق، و هذا لأجل أخذ فكرة عامة عن عدد و نوعية المركبات الموجودة. عادة ما تكون أولى عمليات الفصل باستعمال عمود من السيليكاجال بالنسبة لمستخلص الكلوروفورم و خلاص الإيثيل و متعدد الأמיד بالنسبة لمستخلص البوتانول، أين يستعمل الطولين و الميثانول كملص في هذه الحالة.

الكسور المحصل عليها عند نهاية العمود تركز و تجمع المتشابهة منها لتفصل مجددا باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية CCM على شرائح من السيليكاجال أو متعدد الأמיד أو باستعمال كروماتوغرافيا الورق، كما أن الكسور المعقدة و ذات الكميات الكبيرة يمكن أن تفصل مرة ثانية في عمود كروماتوغرافي.

v و أخيرا المركبات المفصولة تنقي عادة في عمود صغير من الـ LH-20 Sephadex أو من البولي أميد لنحصل على فلافونيدات نقية و جاهرة لدراستها بنيويا.

II. الكشف عن الفلافونيدات ²²:

تتميز المركبات الفلافونيدية بأنها تتلون مع الكثير من الكواشف لذلك تستعمل هذه الأخيرة للكشف عنها؛ ونذكر منها :

محلول كلوريد الألومنيوم 5 % : يعطي بقع صفراء خاصة بالفلافونيدات التي تحمل OH حر في الموضع 5.

هيدروكسيل الصوديوم : يعطي ألوانا صفراء أو برتقالية مع جميع الفلافونيدات.

حمض الكبريتيك المركز : تعطي جميع الفلافونيدات ألوانا صفراء أو برتقالية في وجوده.

محلول الفانيلين - HCl 5% : يحضر بإضافة HCl المركز إلى محلول الفانيلين في الإيثانول بنسبة 1 : 4 على التوالي، و يكشف عن جميع الفلافونيدات إذ تظهر بقع حمراء في الحال أو بعد التسخين، كما أن الفلافونونات تعطي إيجابية اتجاه هذا الكاشف ولكن بصورة أبطء من الفلافونيدات الأخرى.

كاشف Neu: يعطي هو الآخر ألوانا صفراء وبرتقالية مع المركبات الفلافونيدية خاصة الفلافونولات والفلافونات.

ثالثا: الدراسة البنيوية للفلافونيدات

I- الخواص الكروماتوغرافية :

تعطي الخواص الكروماتوغرافية للفلافونيدات معلومات مهمة تقودنا إلى أخذ فكرة أولية عن بنية الفلافونيد و بعض مستبدلاته و تتمثل هذه الخواص في ²³⁻²⁶:

اللون الإستشعاعي تحت الأشعة فوق البنفسجية: يمكن تمييز الفلافون و الفلافونول مستبدل في

الموضوع 3 عن الفلافونول حيث يظهر الأول بلون بنفسجي والثاني بلون أصفر عند طول

موجة 365 نم.

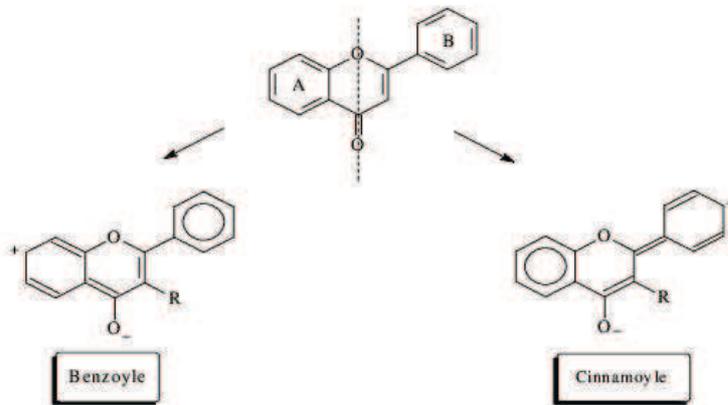
ثابت الإنجاس : وهو نسبة المسافة المقطوعة من طرف المركب على المسافة المقطوعة من طرف المذيب، وترتبط قيمته بطبيعة المجموعات الإستبدالية الموزعة على الأجليكون وتشكيله الفراغي، فالسلوك الكروماتوغرافي للفلافونيدات كل حسب بنيته يتأثر ويتغير حسب طبيعة المملص، ما إذا كان عضويا أو مائيا، ويسمح لنا هذا التغير بتمييز المركب الأجليكوني عن الجليكوزيدي بل نصل إلى حد معرفة ما إذا كان أحادي أو ثنائي أو ثلاثي السكر من خلال المقارنة بشواهد.

-II طرق التحليل الطيفي للفلافونيدات :

تلعب التقنيات الطيفية دورا مهما في التعرف على البنى الفلافونيدية وأهمها :

1-II مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV :

تعتبر مطيافية UV أهم التقنيات التي تساعدنا في تحديد بنية الفلافونيد والتي لا يمكن الإستغناء عنها. وعادة ما يسجل طيف UV للفلافونيد في محلول الميثانول أو الإيثانول؛ و يتميز هذا الطيف بحزمتي إمتصاص، يختلف مكان إمتصاص هاتين الحزمتين باختلاف نوع المركب الفلافونيدي، إذا فلكل فلافونيد طيف إمتصاص خاص به في الميثانول. و يشار إلى هاتين الحزمتين بالحزمة I والحزمة II حيث تمتص الأولى عند طول موجة أعلى لأنها غالبا ما تكون الأكثر كثافة وهي ناتجة عن إمتصاص الشكل Cinnamoyl الناتج عن ترافق الحلقة B مع مجموعة الكاربونيل أما الثانية فتكون نتيجة إمتصاص الشكل Benzoyl الناتج عن ترافق مجموعة الكاربونيل مع الحلقة A²⁷ (مخطط-2).



مخطط-2- ترافق الحلقة A والحلقة B مع مجموعة الكاربونيل

يعتمد مكان إمتصاص الحزمتين على عدد ومواقع مجموعات الهيدروكسيل، فمن الملاحظ أنه كلما زاد عدد مجموعات OH ينزاح مكان الإمتصاص إلى طول موجي أعلى ويحدث العكس إذا ما وجدت مجموعات ميثوكسيل أو وحدة سكر²²

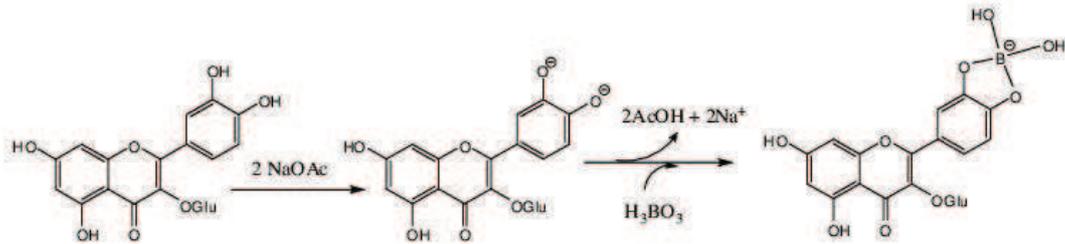
ويتغير مكان إمتصاص حزم طيف UV في وجود كواشف معينة وهذا نتيجة لتكوين معقدات بين الفلافونيد والكاشف أو تأيين هيدروكسيلات الفلافونيد. مقدار إزاحة هذه الحزم يعطى دلالات جيدة على نوع ومكان إرتباط مستبدلات المركب الفلافونيدي لذا نجري سلسلة من الأطياف بإستعمال الكواشف التالية:

أ. مع NaOH أو NaOMe : نكشف من خلاله عن OH-4' و هذا نتيجة لتأيين الهيدروكسيلات الحرة بالقاعدة القوية.

ب. مع NaOAc : تعتبر كاشف نوعي لـ OH حر في الموضع 7 نتيجة لتأيينه.

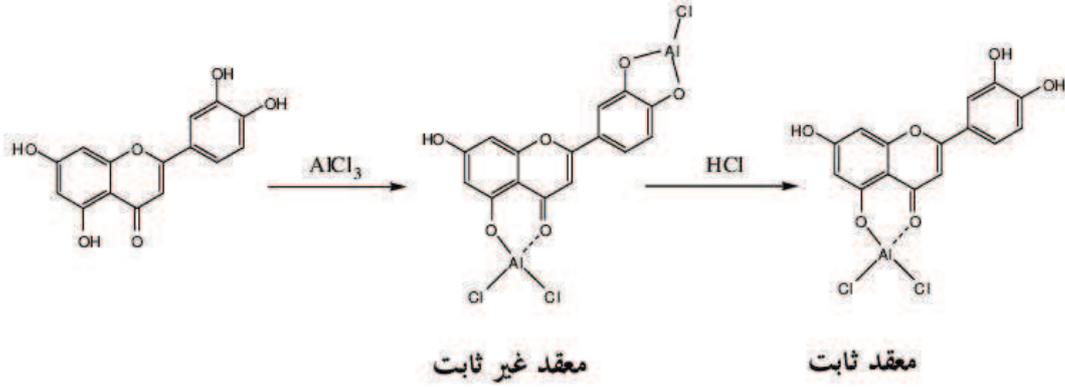
ج. مع NaOAc+H₃BO₃ : يستعمل للكشف عن أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B نتيجة

لتكوين معقد بين H₃BO₃ و الهيدروكسولين المتجاورين على الحلقة B. (مخطط 3)



مخطط-3- تأثير خلات الصوديوم مع حامض البوريك على بنية الفلافونيد

د. AlCl_3 و $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$: عند مقارنة طيفي AlCl_3 و $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ نستدل على وجود أو غياب نظام أو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B خاصة، و نستدل عن 5-OH عند مقارنة طيف $\text{HCl} + \text{AlCl}_3$ بطيف الميثانول. كل هذه التغيرات راجعة إلى تشكل معقدات ثابتة و/أو غير ثابتة على الهيكل الفلافونيدي. (مخطط 4)



المخطط-4- تأثير AlCl_3 و HCl على بنية الفلافونيد

و جدول 1 يلخص و يبين تأثير الكواشف على الهيكل الفلافونيدي و تغيرات قيم الحزمتين I و II

جدول - 1 - تأثير الكواشف على طيف UV :

الدليل	الإزاحة الكيميائية		الكاشف
	العصبة II	العصبة I	
Flavone	280-250	350-310	MeOH
Flavonol(3-OR)	280-250	360-330	
Flavonol(3-OH)	280-250	385-350	
OH ثلاثية أو الحلقة A أو ثلاثة OH متجاورة على الحلقة B 4'-OH 3-OH, 4'-OR 7-OH	استمرار تناقص شدة الإمتصاص بمرور الزمن (تفكك الطيف) 45+ إلى 60 دون نقصان في شدة الإمتصاص 45+ إلى 60 مع نقصان في شدة الإمتصاص عصبة جديدة بين 335-320		NaOMe / NaOH
7-OH 7-OH مع مستبدل أكسجيني في C ₆ و/أو في C ₈ (5,6,7 ; 5,7,8 ; 3,3',4') tri-OH 7-OR (حالة flavonols و 4'-OH flavones فقط)	5 + إلى 20 إزاحة صغيرة طيف يتفكك بمرور الوقت	$\Delta\lambda(I) < \Delta\lambda(II)$ NaOMe NaOAc	NaOAc
أرثوا ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثوا ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (6, 7 أو 8)	12+ إلى 36 إزاحة باتوكرومية ضعيفة		NaOAc + H ₃ BO ₃
أرثوا ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثوا ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (إضافة إلى أرثوا di-OH على الحلقة B)	30+ إلى 40+ مقارنة بطيف HCl+ AlCl ₃ 20+ إلى 25+ مقارنة بطيف HCl +AlCl ₃		AlCl ₃
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 prenyl في C ₆	17+ إلى 20+ 35+ إلى 55+ 50+ إلى 60+ دون تغير		AlCl ₃ + HCl

II-2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-NMR}$:

تقدم هذه التقنية معلومات مهمة على الهيكل الفلافونيدي إذ يمكن إستنتاج من طيف $^1\text{H-NMR}$:
 أ- من خلال التكامل: نحدد عدد بروتونات الجزئي و منه معرفة نوع الهيكل الفلافونيدي و عدد المجموعات المستبدلة سواء كانت مجموعات ميثوكسيلية أو مثيلية أو سكرية.
 ب- من خلال النزواج و الإزاحة الكيميائية: نتعرف على نوع المجموعات المستبدلة و مكان و طبيعة ارتباط السكريات بالأجليكون و نوع الرابطة بينها.
 إن بروتونات المركب الفلافونيدي في طيف $^1\text{H-NMR}$ تتوزع في مجموعات محددة كما يلي:

1 البروتونات العطرية²⁸:

- بروتونات الحلقة A: في حالة الفلافون و الفلافونول أين يكون الموضعين 5 و 7 يحتويان على مجموعات مستبدلة سواء كانت مجموعة هيدروكسيل حرة أو ميثوكسيل أو سكر ... يظهر البروتونين H-6 و H-8 على شكل ثنائي بثابتة تزواج من نوع *Meta* لكل منهما، و الجدول 2 يبين الإزاحة الكيميائية لكل بروتون.
 جدول - 2 - الإزاحة الكيميائية للبروتونين H-6 و H-8 :

H-8 (δ ; ppm)	H-6 (δ ; ppm)	نوع الفلافونيد
6.3-6.5	6.0-6.2	5,7-dihydroxy flavone
6.5-6.9	6.2-6.4	5-hydroxy-7-glycosyl

وجود مجموعة ميثوكسيل أو سكر مرتبط بـ OH الكربون 7 يغير في إزاحة البروتونين إلى مجال أخفض. أما إذا كان هيدروكسيل الموضع 5 مستبدل بمجموعة ميثوكسي أو سكر فإنه يؤثر كثيرا على إنزياح هاتين الإشارتين.

في حالة الحلقة A ثلاثية الإستبدال في الموضع 5 و 7 و 6 أو 8 يظهر الطيف إشارة أحادية متداخلة مع H-3 حالة الفلافون

- بروتونات الحلقة B: ترن بروتونات الحلقة B في المجال (6.5-8.1 ppm) و تتغير هذه القيم حسب المستبدلات الموجودة على الحلقة و كذلك درجة تأكسد الحلقة C.
 و قد تكون الحلقة B أحادية أو ثنائية أو ثلاثية الإستبدال:

ففي الحالة الأولى يظهر طيف RMN إشارتين ثنائيتين بثابتة تزواج من نوع *Ortho* بتكامل 2H لكليهما موافقتين لـ (H-6',H-2') و (H-3',H-5') و يرجع هذا التطابق إلى الدوران الحر للحلقة B، و الجدول 3 يبين قيم إنزياح هاتين الإشارتين.

جدول 3 الإزاحة الكيميائية لبروتونات الحلقة B أحادية الإستبدال:

H-6', H-2' (δ ; ppm)		H-3', H-5' (δ ; ppm)	نوع الفلافونيد
7.89-7.96	d (J = 8.5 Hz)	6.90-6.96	flavone
7.79-8.10		6.92-6.95	flavonol

في حالة الحلقة B ثنائية الإستبدال (3',4'-di-OH) تظهر ثلاث إشارات بتكامل 1H لكل واحدة إذ يظهر H-2' على شكل ثنائي بثابت إقتران من نوع *Meta* متزواج مع H-6'، الذي يأتي على شكل ثنائي - ثنائي بثابت إقتران من نوع *Ortho* مع H-5' و *Meta* مع H-2'. أما البروتون H-5' يتزوج مع H-6' فيظهر على شكل ثنائي بثابت إقتران *Ortho*. و الجدول 4 الموالي يوضح قيم الإزاحة الكيميائية لهذه البروتونات

جدول 4 الإزاحة الكيميائية لبروتونات الحلقة B ثنائية الإستبدال (δ ; ppm):

H-6'	H-5'	H-2'	نوع الفلافونيد
7.3-7.5	6.7-7.1	7.2-7.3	5,7,3',4'-tetra OH flavone
7.6-7.9	6.7-7.1	7.5-7.7	3,5,7,3',4'-penta OH flavone
7.3-7.7	6.7-7.1	7.2-7.5	3,5,7,4'-tetra OH-3'-OMe

في حالة الحلقة B ثلاثية الإستبدال (3',4',5' tri-OH) يظهر الطيف إشارة أحادية بين (6.5 ، 7.5) خاصة بالبروتونين H-2' و H-6'.

و نشير أن وجود سكر أحادي في الموضع C-3 يؤثر على قيم إنزياح بروتونات الحلقة B و هذا التأثير يتعلق بطبيعة السكر، فمثلا لوحظ أن سكر الـ rhamnose له تأثير أكبر من بقية السكريات.

• بروتونات الحلقة C :

في حالة الفلافون تتداخل إشارة H-3 مع بروتونات الحلقة A أين ترن في حدود 6.3 ppm، أما في حالة الفلافونولات لا تظهر هذه الإشارة.

2) البروتونات الأليفاتية:

- بروتونات الميثوكسي $O-CH_3$ ²⁹:

ترن في المجال بين (3.5 و 4.5 ppm) على شكل إشارة أحادية بتكامل 3H لكل إشارة

- بروتونات الميثيل $C-CH_3$:

ترن في مجال (2.31-2 ppm) بالنسبة للفلافون، أما حالة الفلافونول عادة ما تكون مرتبطة في

C-6 ترن عند (2.1-2 ppm) أو C-8 أين ترن عند (2.3 -2.2 ppm)

- بروتونات السكر:

أ- بالنسبة للإثيروزيدات أحادية السكر:

ترن أغلب بروتونات السكريات في المجال بين (4-3 ppm) عدا البروتون الأنوميري

"H-1" الذي يرن في مجال أدنى على شكل إشارة ثنائية بتكامل 1H ناتجة عن تزاوج بروتون

الكربون "C-1" و بروتون الكربون "C-2" و بثابت إقتران تختلف قيمته حسب نوع السكر. و لهذه

القيمة أهمية كبيرة، فمن خلالها يمكن معرفة نوع السكر و نوع الرابطة بينه و بين الأجليكون

(α أو β). فمثلا سكر الـ glucose يكون في الغالب رابطة من نوع β و يتميز بثابت إقتران يقدر

بـ 7 هرتز ناتجة عن إقتران محوري-محوري بين "H-1" و "H-2". أما في حالة سكر الـ

rhamnose فغالبا ما تكون الرابطة من نوع α و يتميز بثابت إقتران 2 هرتز ناتجة عن إقتران

إستوائي - إستوائي بين "H-1" و "H-2". كما يمكن التعرف على سكر الـ rhamnose من خلال

إشارة مجموعة الميثيل المرتبطة بالكربون "C-6" التي تظهر على شكل إشارة ثنائية ($J=6\text{Hz}$)

و تختلف إزاحتها الكيميائية حسب موقع السكر في C-7 أو C-3. يمكن أن نستبدل كذلك على مكان

إرتباط السكر بالأجليكون خاصة إذا كان مرتبط بـ C-7 أو C-3، و هذا من خلال قيمة الإزاحة

الكيميائية للبروتون الأنوميري. و الجدول 5 يبين قيمة الإزاحة الكيميائية لسكري الـ rhamnose

و الـ glucose كلا حسب موقعه و كذا ميثيل سكر الـ rhamnose.

الجدول 5 : قيم الإزاحة الكيميائية لسكري الـ rhamnose و الـ glucose

نوع السكر و مكان إرتباطه	H-1" (δ ; ppm)	CH ₃ لسكر الـ rhamnose (δ ; ppm)
7-O-Glucoside	4.8-5.2	-
3-O-Glucoside	5.7-6.0	-
7-O-Rhamnoside	5.1-5.3	1.04-1.21
3-O-Rhamnoside	5.0-5.1	0.72-0.86

ب- بالنسبة للإشعيرات ثنائية السكر:

عادة ما نرى البروتون الأنوميري للسكر الأول المرتبط مباشرة بالأجليكون من نوع O-glycoside في مجال أني من البروتون الأنوميري للسكر الثاني المرتبط بالسكر الأول و يسمى بالسكر النهائي. والجدول 6 يبين قيم الإزاحة الكيميائية للبروتون الأنوميري لبعض التشكيلات الثنائية.

الجدول 6 : قيم الإزاحة الكيميائية للبروتون الأنوميري لبعض التشكيلات الثنائية

H-1''' (δ ; ppm)	السكر النهائي	H-1'' (δ ; ppm)	السكر الأول
6.63-4.65	2 ^G -O-β-D-Glucosyl	5.25-5.56	3-O-β-D-Glucoside
4.90-5.10	2 ^G -O-α-L-Rhamnosyl	5.72-5.75	
4.58-4.62	2 ^G -O-β-D-xylosyl	5.40-5.66	
3.96-4.02	6 ^G -O-β-D-Glucosyl	5.65-5.72	
4.37-4.39	6 ^G -O-α-L-Rhamnosyl	5.28-5.46	
4.10-4.23	2 ^R -O-β-D-Glucosyl	5.28	
4.17-4.73	2 ^R -O-β-D-xylosyl	5.56	3-O-α-L-Rhamnoside
4.32-4.48	3 ^R -O-β-D-Glucosyl	5.39-5.56	
4.25	3 ^R -O-β-D-Galactosyl	5.21-5.50	
4.81	3 ^R -O-α-L-Rhamnosyl	5.33-5.44	
4.43-4.68	2 ^G -O-β-D-Glucosyl	5.31	
5.56	2 ^G -O-α-L-Rhamnosyl	4.90-5.25	7-O-β-D-Glucoside
4.48-4.6	6 ^G -O-α-L-Rhamnosyl	5.05-5.56	
		4.80-5.10	

II-3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ¹³C :

تعتبر هذه التقنية مكملة لتقنية ¹H-RMN ، فمن خلالها يمكن معرفة عدد ذرات الكربون للمركب و الوسط المحيط بها و نوع الرابطة بين السكر و الأجليكون ... و الجدول 7 الموالي يوضح قيم الإزاحة الكيميائية لكربونات بعض السكريات الأحادية.

الجدول 7 : قيم الإزاحة الكيميائية لكربونات بعض السكريات الأحادية

C-6	C-5	C-4	C-3	C-2	C-1	السكر
61.3	72.1	70.4	73.4	72.1	92.7	β-D-Glucoside
18.0	69.4	73.3	71.1	71.9	95.0	α-L-Rhamnoside
-	66.3	70.3	76.9	75.1	97.6	β-D-Xylopyranose

II-4- تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد:

أدى التطور التكنولوجي إلى الجمع بين أطراف البروتون و الكربون للحصول في الأخير على طيف ثنائي البعد. و تستعمل التقنيات ثنائية البعد عندما لا نتوصل إلى البنية الدقيقة للمركب المفصول. و من أهم هذه التقنيات ^{31,32}:

COsY (H¹-H¹) (Correlation Spectroscopy) :

تظهر نقاط تعالق بين البروتونات المترابطة مع بعضها البعض

TOCSY (H¹-H¹) (Total Correlation Spectroscopy) :

تظهر نقاط تعالق بين البروتونات عبر تعانقات بعيدة إذ تسمح هذه التقنية بمعرفة سلسلة البروتونات المتتابعة على الهيكل البنوي.

ROESY (H¹-H¹) (Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) :

تفيد هذه التقنية أكثر في التشكيل الفراغي.

NOESY (H¹-H¹) (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)

تظهر نقاط تعالق بين البروتونات، إذ تسمح هذه التقنية من ملاحظة الجزيئي في الفضاء.

HSQC (H¹J_{H,C}) (Heteronuclear Single Quantum Coherence) :

تظهر نقاط تعالق قريبة بين البروتون و ذرة الكربون المرتبط بها.

HMBC (H²J_{H,C}, H³J_{H,C}) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)

تظهر نقاط تعالق بعيدة بين بروتون ما و ذرات الكربون المجاورة لذرة الكربون المتصل بها. هذا التعالق لا يتعدى 3 كربونات متسلسلة.

II-5- مطيافية الكتلة ³³⁻³⁵:

هي طريقة فيزيائية تسمح لنا بتحديد الوزن الجزيئي للمركب و بالتالي معرفة الصيغة الكيميائية المجملة، كما تبين لنا عدد و نوعية المستبدلات من خلال الشظايا الناتجة عن إنشطار المركب، توجد عدة تقنيات تستعمل في المركبات الفلافونيدية إذ تختلف التقنية المختارة حسب طبيعة الفلافونيد (أجليكون أو جليكوزيد) و نذكر منها:

1. بالنسبة للأجلكونات :

تقنية القذف الإلكتروني (EI): تعتبر الأفضل في حالة الأجلكونات و يظهر طيف الكتلة هنا قيمة الأيون الجزيئي M^+ و يكون غالبا القمة الأساسية خاصة في حالة الفلافون و الفلافونول.

2. بالنسبة للجلكوزيدات : من أهم التقنيات المستعملة في هذه الحالة

تقنية القذف السريع بالذرات FAB : تفضل هذه التقنية في حالة الإيثيروزيدات فمن خلالها يتم تأيين المركب دون تسخين و تسمح لنا من معرفة الأيون الجزيئي من خلال تكوين الأيونات $[M+K]^+$ ، $[M+Na]^+$ ، $[M+H]^+$ ، $[M-H]^+$ و هذا في حالة تقنية FAB^+ . و تكون أيونات سالبة في حالة تقنية FAB^- . و تعطي هذه التقنية معلومات فيما يخص طبيعة الجزء السكري.

تقنية التأين بالرداذ الكهربائي (الإلكروسبراي ES): تستعمل خاصة للمركبات التي تتكسر بسهولة مثل O-glycoside، و هي تشبه تقنية FAB إذ تختلف في الطريقة العملية فقط.

تقنية التأين الكيميائي (CI) و تقنية التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI):

لهما نفس المبدأ إذ تتركز أساسا على تفاعلات (أيون-جزيئي) و غالبا ما يكون الأيون عبارة عن غاز مثل NH_3 أو CH_4 ، و يكمن الاختلاف في أن تقنية APCI يتم العمل فيها تحت الضغط الجوي.

III- الإمَاهة الحمضية:

أحيانا يصعب علينا تحديد طبيعة السكر و بالتالي البنية النهائية للمركب، لذلك نلجأ إلى الإمَاهة الحمضية، و التي تعتبر مهمة لإتمام بنية المركب المفصول.

خلال هذه العملية يتم تحلل الجليكوزيدات الفلافونيدية من النوع أكسجين- سكر تحت ظروف حمضية بواسطة حمض HCl (2N) في حمام مائي تحت 100°م، مدة ساعة كاملة إذ ينشط الجزء السكري عن الأجليكون الذي نتحصل عليه بعملية الإستخلاص بإستعمال الإيثر ثنائي الإثيل يتبع بإستخلاص ثاني للطبقة المائية بواسطة خلاص الإيثيل ثم البوتانول النظامي، و بتركيز الطبقة العضوية نتعرف على الأجليكون بإجراء طيف UV في الميثانول مع إستعمال بعض الكواشف الأخرى و هذا لمعرفة مواقع تحرر السكر. نقوم أيضا بمقارنة كروماتوغرافية بـ CCM مع شواهد أجليكونية إن وجدت.

و لأجل التعرف على الشق السكري المذاب في الطبقة المائية فنقوم أولا بتحضير صفيحة كروماتوغرافية من نوع السليكاجال و ذلك برشها بمحلول NaH_2PO_4 (0.1 نظامي) و نترك لتجف ثم نوضع مدة ساعة في الفرن تحت 100°م بعدها نضع نقاط من الطبقة المائية مع شواهد سكرية معروفة و تملص الشريحة في النظام أسيتون- ماء (9: 1) بعدما تجفف ترش بكاشف مالونات الأنيلين و نترك لتجف مرة أخرى ثم نوضع في الفرن تحت درجة حرارة 100°م حتى تبدأ بقع السكريات بالظهور بلون بني في الضوء المرئي، من هنا يمكن تحديد نوع السكر عن طريق مقارنة ثابت الإنحباس لأن كل سكر له R_f خاص به.

1. Hennebelle T. (2006) Investigation Chimique, Chimiotaxonomique Et Pharmacologique De Lamiales Productrices D'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de Doctorat, Université des sciences et technologies de Lille – Lille 1, Ecole doctorale sciences de la matière, du rayonnement et de L'environnement.
2. Martens S., Mithöfer A. (2005) « Flavones and flavone synthases ». *Phytochemistry*, 66(19), 2399-407.
3. Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Technique & Documentation. Paris.
4. Iwashina T (2000) The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J. Plant Res.* 113(3), 287-299.
5. Wollenweber, E., Dietz, V. H. (1980) *Biochem. Syst. & Ecol.* 8, 21.
6. Harborne J. B. (1973) In «Phytochemistry» . Ed. Lawrence, P. L. Litton Educational Publishing Inc. Vol II, 334.
7. Harborne J. B., Smith, D. M. (1978a) Anthochlor and other flavonoids as honey guides in the compositae. *Biochem. Syst. & Ecol.* 6(4), 287-291.
8. Harborne J. B., Smith, D. M. (1978b) Correlations between anthocyanin chemistry and pollination ecology in the Polemoniaceae. *Biochem. Syst. & Ecol.* 6(2), 127-130.
9. Mc Lure J. W. (1975) Physiology and function of flavonoids Ed. Harborne J. B., Mabry T. J. M. the flavonoids. Chapman and Hall, London. 970-1055.
10. Brehm B. G., Krell D. (1975) Flavonoid localization in epidermal Papillae of flower petals, a specialized adaptation for ultra-violet absorption. *Science*, New York, 190, 1221-1223.
11. Pietta P. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63(7), 1035-1042.
12. Hollman P.C.H., Arts I.C.W (2000) Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80(7), 1081-1093.
13. Harborne J.B. (1988) The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman & Hall. London.
14. Riberau-gayou J. B (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.
15. Heller W., Forkmann G. (1993) Biosynthesis of Flavonoids. In *The Flavonoids: Advances in research since (1986)* Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. pp 499.
16. Harborne J. B., Williams C. A. (2000) "Advances in flavonoids research since 1992". *Phytochemistry*, 55(6), 481-504
17. Leake D.S. (1997) " The possible role of antioxidants in fruit and vegetables in protecting against coronary heart disease", *Phytochemistry of fruit and vegetables*, Clarendon press, Oxford, pp. 287-311.
18. Rice-Evans C. A., Miller N. J. (1996) Antioxydant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. T.*, 24, 790-795.
19. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1996) Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20 (7), 933-956.
20. Lebreton P. et al. (1967) Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides. *Chim. Anal. France*, 49(7), 375-383.

21. Gonnet J. F., Jay M., Voirin B., Lebreton P. (1973) Récent développement dans l'analyse des aglycones flavoniques. Assemblée générale du « groupe polyphénols». Le pont de la Morge, suisse.
22. El hazimi H. (1995) Les produits naturels. Université du Roi Saoud, Djeddah. Ed. arabe.
23. Markham K. R. (1989) Flavones, Flavonols and their glycosides in « methods in plant biochemistry». Academic Press. Vol I (Chapiter 6), 197-232.
24. Markham K. R. (1982) Techniques of flavonoid identification. Academic Press London.
25. Randerath K. (1971) Chromatographie sur couches minces. Ed. Gauthier-Villars. Paris-6ème.
26. Berthillier A. (1972) La chromatographie et ses applications. Dunod.
27. Jurd L., Horwitz R. (1962) Spectral properties of flavonoid compounds. In « the chemistry of flavonoid compounds», (Geissman T. A). Pergamon Press, New-York. 107-155.
28. Ulubelen A., Topcu G., Kolak U. (2005) Labiatae flavonoids and their bioactivity. Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 30. Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam.
29. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. (1970) The systematic identifications of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin.
30. Markham K. R., Geiger H. (1993) ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In The Flavonoids: Advances in research since 1986. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. pp 441.
31. Croasmun W. R., Carlson, R.M.K. (1987) Two-dimensional NMR spectroscopy – applications for chemists and biochemists. VCH, New-York.
32. Lambert J. B., Mazzola E. P. (2003) Nuclear magnetic resonance spectroscopy—an introduction to principles, applications and experimental methods. Pearson/Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
33. Audier H. (1966) Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse, Bull. Soc. Chim. Fr. 9, 2892-2899.
34. Becchi M., Fraise D. (1989) Fast atom bombardment and fast atom bombardment, a lision Activated-dissociation /mass-analysis ion Kinetic energy analysis of C-Glycosidic flavonoids. Biomed. Environm. mass electrom. 18, 122-130.
35. Constantin E., Schnell A. (1986) « Spectroscopie de masse : principes et applications », Technique et Documentation-Lavoisier, Paris

الفصل الثاني

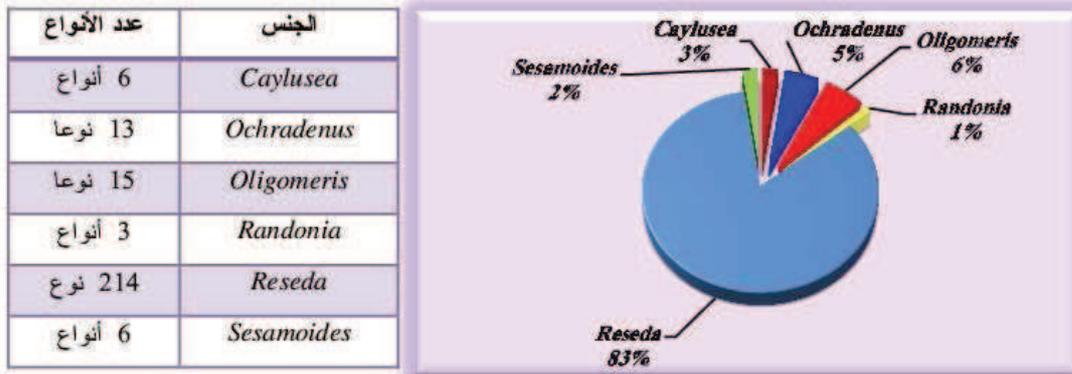
مسح مكّي على جنس البنين المدروسين

مدخل إلى العائلة *Resedaceae*:

العائلة الريزيدية هي من أرقى العائلات ثنائية الفلقة¹ و تنتمي إلى رتبة الروديات Rhoadales أو Capparales و تعتبر الأهم من بين خمس عائلات (فصائل) هذه الرتبة:

1. العائلة الدخانية Fumaraceae (Fumaroideae)
2. العائلة الكبرى Capparidaceae
3. العائلة الصليبية Cruciferae
4. العائلة الخشخاشية Papaveraceae
5. العائلة الريزيدية Resedaceae

تضم العائلة الريزيدية أو فصيلة الخزامى كما تسمى 6 أجناس و أكثر من 250 نوع و هذا حسب الدراسة المكتبية لسنة 2009 بعدما كانت 70 نوع فقط، معظمها ينتمي إلى جنس الريزيدا تتوزع هذه الأنواع كالآتي :



الشكل-1- توزيع أنواع العائلة الريزيدية حسب الجنس

تنتشر نباتات العائلة الريزيدية في المناطق الصحراوية خصوصا خاصة الأجناس الخمسة: *Reseda*, *Caylusea*, *Oligomeris*, *Ochradenus*, *Randonia*². تنتشر الأجناس الثلاثة *Reseda*, *Caylusea*, *Oligomeris* في مصر¹ و الأجناس *Oligomeris*, *Ochradenus*, *Randonia* في قطر³ و الأجناس *Reseda* و *Randonia* في مناطق البحر الأبيض المتوسط خاصة بالجزائر.

تتميز نباتات العائلة الريزيدية بأنها أعشاب حولية أو معمرة و قد تكون شجيرات و تحتوي أنسجتها عصيرا مائيا. كما تحتوي نباتات هذه الفصيلة من 4 إلى 8 سبلات و من 2 إلى 8 بتلات غالبا ما تكون زائلة غير دائمة، تحتوي في بعض الأحيان على حشفة أو وريقة لحماية البرعم في قاعدة النصل كما تحتوي كذلك من 3 إلى 40 سداة أو عضو تكبير، أحيانا يكون حرا و عادة ما يكون مثبتا على قرص لحمي، أما المدقة فتتكون من 2 إلى 7 وحدات التي عادة ما تكون بدورها مبيضا بفص واحد (ما عدا في *Astrocarpus*)، الثمار تكون كبسولة مجتمعة، أما البذور فتكون كلوية أو ذات شكل كلوي²

إختصارا فالصفات المميزة للفصيلة الريزيدية تتمثل في:

وجود الأنثى الغدية، الأزهار وحيدة تناظر، البتلات مفصصة، المبيض ذو حجرة واحدة مشقوق من أعلى.

أولا: الجنس *Reseda* :

يعتبر الجنس ريزيدا من أهم أجناس العائلة الريزيدية، إذ يتواجد أصلا في منطقة البحر الأبيض المتوسط، و قد أدخلت عدة أنواع منه في جنوب أوروبا، كما يتواجد في شمال إفريقيا و الجنوب الغربي من آسيا. و يتواجد في الجزائر إذ ينتشر بصفة كبيرة في المناطق الجنوبية؛ حيث يعتبر النوعين *R. villosa* و *R. arabica* أكثر الأنواع انتشارا في الصحراء، على عكس باقي الأنواع إذ أنها تعد نادرة الوجود، كما تنتشر *R. duriaeana* في المناطق الداخلية الشمالية للجزائر.

I. الأهمية الاقتصادية و البيولوجية لنباتات الريزيدا:

من الناحية الاقتصادية فجنس الريزيد ذو قيمة قليلة و نذكر أهمها⁴ :

أ- صناعة العطور: يعد النوع *R. odorata* أكثر أنواع الريزيدا استعمالا في صناعة العطور،

و يسمى كذلك نبات الخزامى إذ كان يزرع منذ مدة طويلة لأزهاره العطرة.

ب- صناعة المنسوجات: كان يزرع في الماضي عشب الصباغ *R. luteola* على نطاق واسع كمصدر

لصبغة صفراء تستعمل في صباغة المنسوجات خاصة الصوف لتستعمل أخيرا في حياكة الزرابي.

و من الناحية البيولوجية:

فأصل كلمة ريزيدا يعود إلى الاتينية إذ اشتقت من الفعل *Resedare* بمعنى مسكن *Calmer*⁵ أو *guérir* بمعنى شفي، تعافى⁶، نتيجة لاستعمالها لتخفيض آلام الجروح من قبل الرومانيون كما استعملوا نبات *Reseda blanc (alba)* لتطهير أماكن تكس القيح و ضد الإلتهاب. و لنبات هذا الجنس عدة استعمالات بيولوجية أخرى أهمها:

تستعمل القلويدات المفصولة من *R. luteola* ضد بعض أمراض القلب⁷ تتميز كل نباتات العائلة بفعالية مضادة للإلتهاب⁸ و نخص مستخلص الإيثر لنبات *R. phyteuma L.*، كما استعمل مستخلص *R. phyteuma* في الطب الشعبي و لقد أثبتت هذه الفعالية و أكدت بعد عدة دراسات⁹.

و لنبات الريزيدا فعالية مضادة للبكتيريا¹¹ و أخرى مضادة للميكروبات¹² استعمل مستخلص *R. muricata* في الطب الشعبي لعلاج الأمراض الداخلية خاصة آلام المعدة و الإسهال و الدوالي (البواسير)¹³.

II. الدراسة الكيميائية للعائلة الريزيدية:

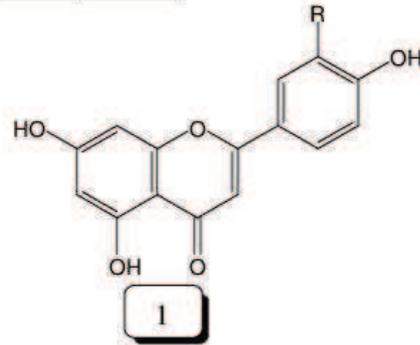
تحتوي نباتات الريزيدا على المركبات الجليكوزينولية *glucosinolates*^{14,15,16} فصلت من *R. alba*، و الأحماض الأمينية^{17,18,19} و بعض الأمينات^{20,21,22} و القلويدات البسيطة مثل: *Lutinine*، *Lutine*²³، *Resedine*^{23,24,25} و *Resedinine*^{23,25,26} تم عزلها من *R. luteola*، أما *Luteanine* فعزل من *R. Lutea*²⁰. إضافة إلى الكومارينات و الستيرويدات التي عزلت من أنواع أخرى^{19,27,28,29}. كما بينت الدراسات إحتواء نبات الريزيدا على المركبات الفينولية و الفلافونيدية^{30,31,32} إلا أنه لم يستغل هذا الجنس بصفة واسعة من قبل الباحثين فمن 214 نوع تم دراسة 10 أنواع فقط حتى الآن. من الملاحظ أن مركبات هذا الجنس تتميز بأنها بسيطة في بنيتها و عددها قليل مقارنة بما تحتويه أجناس أخرى. و يمكن أن نقسم الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Reseda* إلى:

1. الفلافونيات:

أ. الفلافونيات الأجليكونية: تضم Apigénine و Lutéoline و أشير لهما في ثلاث أنواع نباتية فقط كما هو موضح في الجدول:

الفلافونيد	النوع	البنية	المرجع
Apigénine	<i>R. luteola</i>	1.a	33
	<i>R. luteola</i> L.		34
	<i>R. muricata</i>		29
Lutéoline	<i>R. muricata</i>	1.b	29
	<i>R. luteola</i>		33,35
	<i>R. luteola</i> L.		34

	R
a	H
b	OH



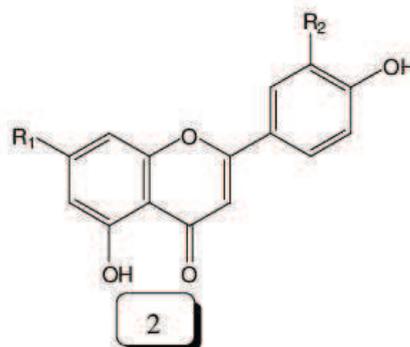
ب. الفلافونيات الإيثيروزيدية:

الفلافونيات أحادية السكر: يوجد Apigénine واحد أحادي السكر فصل من *R. pruinosa* Del

و مركبين من هيكل Lutéoline أشير إليهما في 3 أنواع:

الفلافونيد	النوع	البنية	المرجع
Apigénin-7-O-β-glucoside	<i>R. pruinosa</i> Del.	2a	28
Lutéolin-3'-O-β-glucoside	<i>R. luteola</i>	2.b	33
	<i>R. luteola</i> L.		34
	<i>R. pruinosa</i>		28
Lutéolin-7-O-β-glucoside	<i>R. luteola</i>	2.c	33
	<i>R. luteola</i> L.		34
	<i>R. pruinosa</i>		28

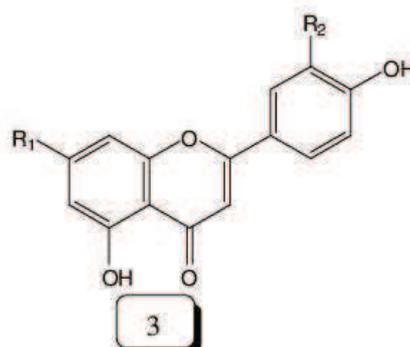
	R ₁	R ₂
a	Oglu	H
b	OH	Oglu
c	Oglu	OH



الفلافونيات ثنائية السكر: يوجد مركبين من هيكل Lutéoline

الفلافونيد	النوع	البنية	المرجع
Lutéolin-3',7-di-O-β- glucoside	<i>R. luteola</i>	3.a	33
	<i>R. luteola</i> L.		34
Lutéolin-7-O-rutinoside	<i>R. gredensis</i>	3.b	36

	R ₁	R ₂
a	Oglu	Oglu
b	Oruti	OH

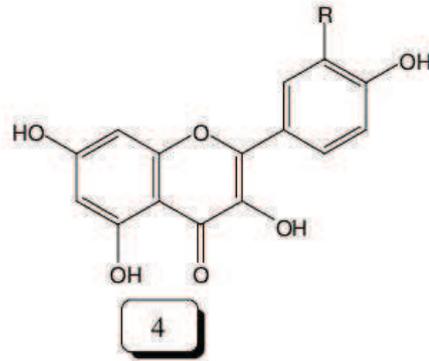


2. الفلافونولات:

أ. الفلافونولات الأجليكونية: تم فصل 3 مركبات بسيطة تدرج ضمن هيكل Kaempférol و Quercétine حيث أشير إليهما في ثلاث أنواع نباتية مختلفة، و Isorhamnétine يتواجد في نوعين فقط.

المرجع	البنية	النوع	الفلافونيد
19		<i>R. phyteuma</i> L.	Kaempférol
37	4a	<i>R. odorata</i>	
29		<i>R. muricata</i>	
29		<i>R. muricata</i>	Quercétine
37	4b	<i>R. odorata</i>	
19		<i>R. phyteuma</i> L.	
37	4c	<i>R. odorata</i>	Isorhamnétine
38		<i>R. lutea</i>	

	R
a	H
b	OH
c	OMe

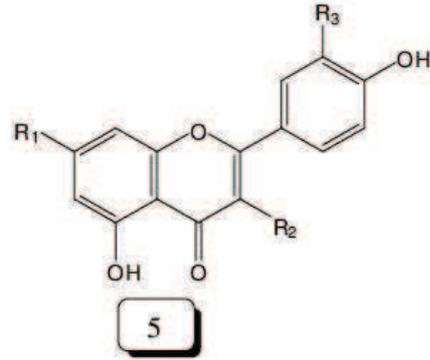


ب. الفلافونولات الإيثروزيدية:

الفلافونولات أحادية السكر: و تتمثل في ثلاث هياكل تدرج تحت بنية Kaempférol و مركب واحد لبنية Quercétine.

الفلافونيد	النوع	البنية	المرجع
Kaempférol-7-O- α - rhamnoside	<i>R. pruinosa</i> Del.	5.a	28
	<i>R. villosa</i>		39
Kaempférol-7-O - β - glucoside	<i>R. muricata</i>	5.b	29
Kaempférol-3-O- α - rhamnoside	<i>R. muricata</i>	5.c	29
Quercétin-7- O- β - glucoside	<i>R. muricata</i>	5.d	29

	R ₁	R ₂	R ₃
a	O-Rha	OH	H
b	O-Glu	OH	H
c	OH	O-Rha	H
d	O-Glu	OH	OH

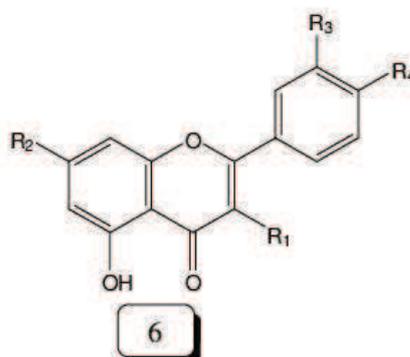


الفلافونولات ثنائية السكر: تم فصل ستة فلافونولات ثنائية السكر إثنان لبنية Kaempférol

واحد لهيكل Quercétine و ثلاث منها من هيكل Isorhamnétine.

الفلافونيد	النوع	البنية	المرجع
Kaempférol -3,7-di-O- α - rhamnoside	<i>R. villosa</i>	6a	39
Kaempférol -3-O- β - glucoside-7-O- α - rhamnoside	<i>R. luteola</i>	6b	40
	<i>R. villosa</i>		39
Quercétin-3-O- β - glucoside -7-O - α - rhamnoside	<i>R. lutea</i>	6c	41
	<i>R. villosa</i>		39
Isorhamnétin-3-O- β -glucoside -7-O - α - rhamnoside	<i>R. odorata</i>	6d	42
	<i>R. lutea</i>		39
	<i>R. villosa</i>		
Isorhamnétin-3- O- β -glucoside-4'- O - α -rhamnoside	<i>R. gredensis</i>	6e	36
Isorhamnétin-3-O-rutinoside	<i>R. pruinosa</i> Del.	6f	28

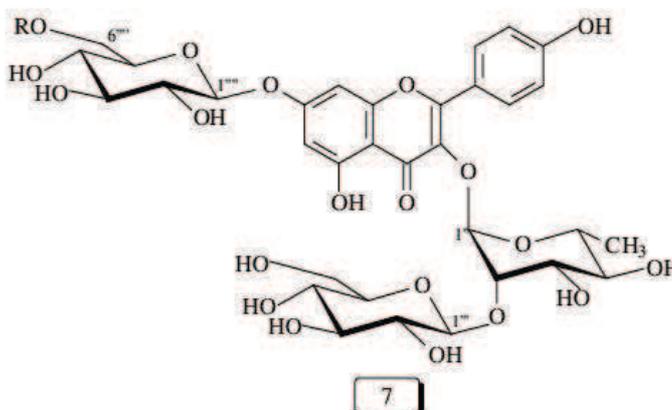
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	O-Rha	O-Rha	H	OH
b	O-Glu	O-Rha	H	OH
c	O-Glu	O-Rha	OH	OH
d	O-Glu	O-Rha	OMe	OH
e	O-Glu	OH	OMe	O-Rha
f	O-Ruti	OH	OMe	OH



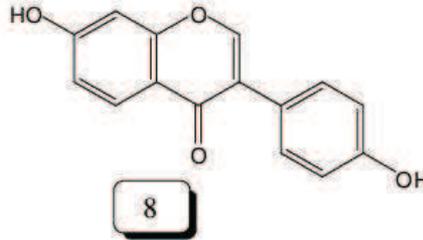
الفلافونولات ثلاثية السكر: تم فصل مركبين من *R. muricata* لهيكل Kaempférol ثلاثي السكر إذ يحتوي أحدهم على مجموعة كومارويل مرتبطة بكاربون أحد السكريات.

الفلافونيد	النوع	البنية	المرجع
Kaempférol-3-O-β-glucosyl-(1''-2'')-O-α-L-rhamnoside-7-O-β-glucoside	<i>R. muricata</i>	7.a	29
Kaempférol-3-O-β-glucosyl-(1''-2'')-O-α-L-rhamnoside-7-O-β-(6'''-O-E-coumaryl)glucoside	<i>R. muricata</i>	7.b	29

	R
a	H
b	



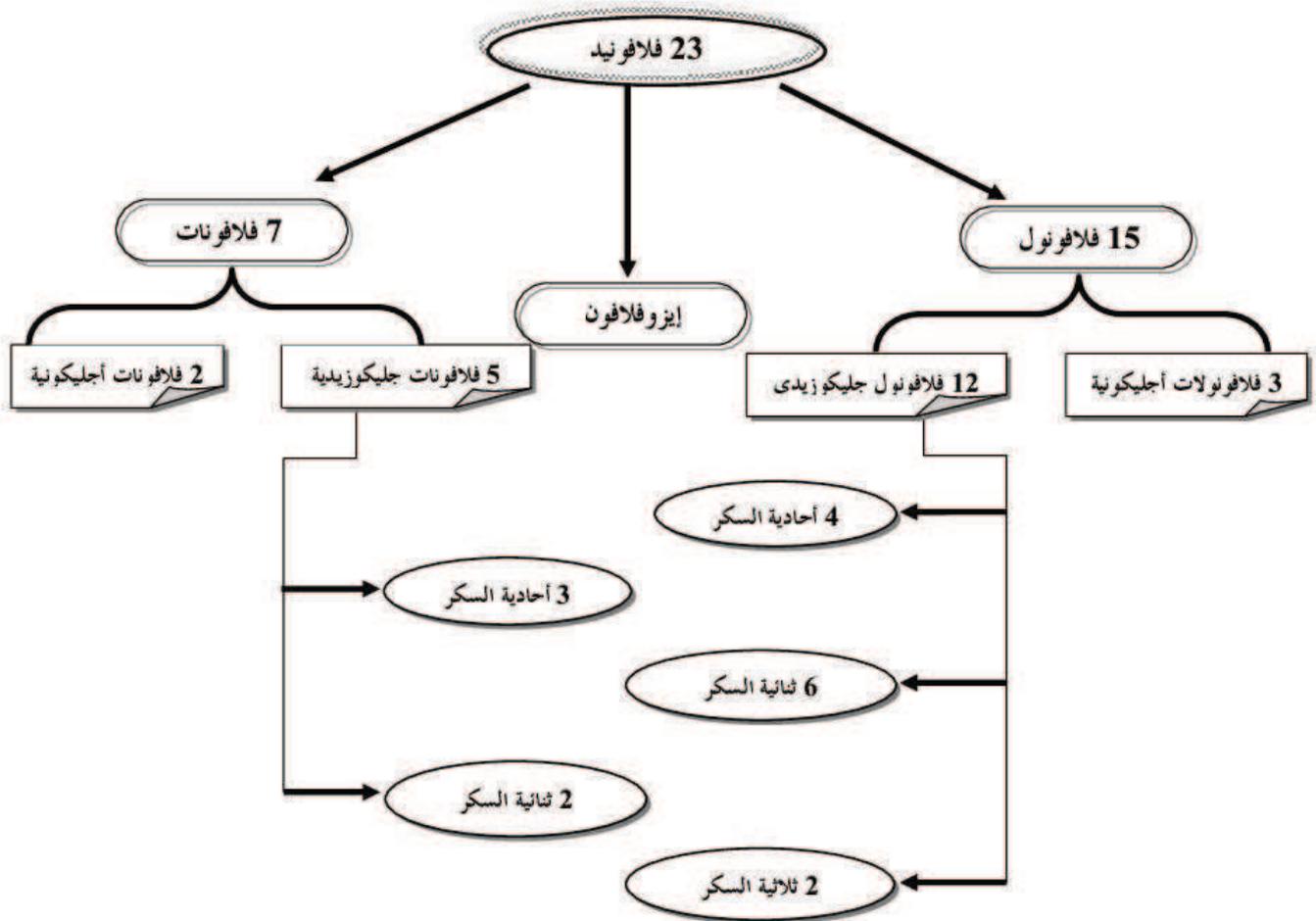
3. إيزوفلافونيدات: فصل إيزوفلافونيد واحد فقط من *R.luteola* وهو ⁴⁰Daidzeine (الشكل 8)



III- تصنيف و توزيع فلافونيدات الجنس *Reseda* :

بعد التصنيف الكيميائي الذي قمنا به حول المركبات الفلافونيدية المفصولة من الجنس ريزيدا أحصينا³⁹ 23 فلافونيد منهم إيزوفلافون واحد (Daidzeine المفصول من *R.luteola*)²⁵ و 7 فلافونات منها إثنان أجليكونية و ثلاثة جليكوزيدية أحادية السكر و إثنان إيثيروزيدية ثنائية السكر. كما فصل 15 فلافونول منهم 3 أجليكونية و 4 جليكوزيدية أحادية السكر و 6 جليكوزيدات ثنائية السكر و مركبين ثلاثي السكر (مخطط-1).

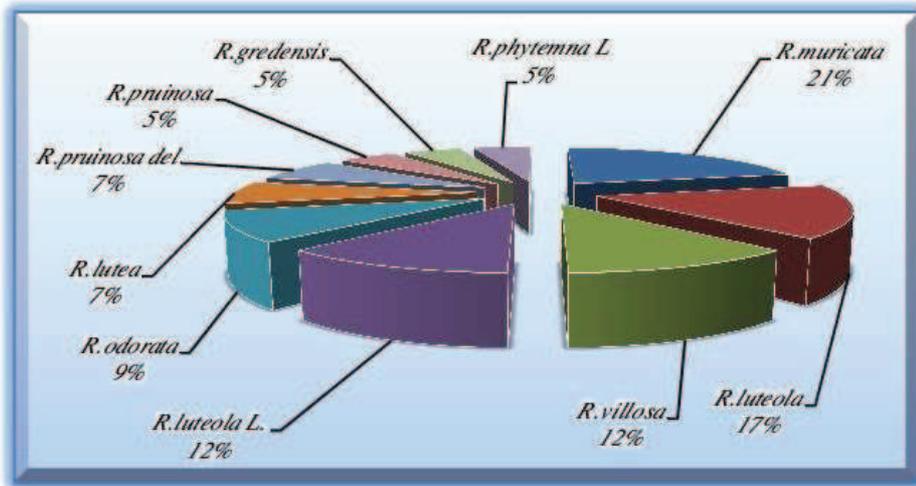
من الملاحظ أن كل الفلافونيدات المفصولة بسيطة في هيكلها البنوي (Apigénine ، Lutéoline ، Quercétine ، Kaempférol ، Isorhamnétine). أغلبها جليكوزيدية إذ يوجد 5 أجليكونات إذا استثنينا Daidzeine. و 17 جليكوزيد من نوع O-سكر (O-glycoside) منها 7 أحادية السكر و 8 ثنائية السكر، إثنان ثلاثية السكر و أغلب الإيثيروزيدات الثنائية سكرياتها موزعة في موضعين على الهيكل الفلافونيدي فمن ثمانية توجد ستة منها سكرياتها موزعة في المواقع (7 و/أو 3 و/أو 4)، و إثنان يحتويان على تشكيلات ثنائية في الموضع 3 أو 7³⁹. جميع السكريات المرتبطة بالهياكل الفلافونيدية في جنس الريزيدا من نوع glucose أو rhamnose أو rutinose بالنسبة للإيثيروزيدات ذات التشكيلات الثنائية.



المخطط-1- تصنيف فلافونيدات الجنس *Reseda*

fl أكثر أنواع نبات الجنس *Reseda* دراسة من حيث عدد الفلافونيدات:

من بين 214 نوع تم دراسة 10 أنواع فقط أي أستغلت 21% من نبات الريزيدا. حسب الدراسة المكتبية السابقة نلاحظ أن *R. muricata* تعتبر أكثر أنواع الريزيدا دراسة و هذا من حيث عدد الفلافونيدات المفصولة إذ تم فصل 9 مركبات منها، يليها النوع *R. luteola* سبعة مركبات ثم *R. villosa* و *R. luteola L.* بخمسة 5 مركبات، بعدها *R. odorata* بأربع مركبات ثم *R. lutea* و *R. pruinosa Del* بثلاث مركبات و أخيرا *R. pruinosa*, *R. gredensis*, *R. phytemna* بفلافونيين فقط (الشكل-2-).



الشكل-2- أكثر أنواع نباتات الجنس *Reseda* دراسة

ثانيا: الجنس *Randonia* :

يضم جنس *Randonia* ثلاث أنواع نباتية و هي:

Randonia africana Coss.

Randonia Somalensis Schinz

Randonia spartioides Schiwarz

يتوزع النوع *Randonia africana* في عدة مناطق شمال إفريقيا إذ يمتد من الغرب تحديدا بالسينغال و موريتانيا باتجاه الشرق تحديدا بإثيوبيا و الصومال كما تعد النبتة صحراوية-عربية إذ تتواجد خاصة في السودان و في منطقة مرسى مطروح المصرية، كما ينتشر النوع *R. africana* في المناطق الصحراوية الجزائرية خاصة في منطقة غرداية^{44,43}. أما النوع *R. Somalensis* فهو أصلي في منطقة الصومال و أما *R. spartioides* فينتشر أكثر في اليمن⁴⁵.

لا توجد أي دراسة علمية سواء كيميائية أو بيولوجية على أي نوع من الأنواع الثلاثة. إلا أنه تم دراسة *R. africana* من الناحية النباتية فقط⁴⁶.

حسب الدراسة التي قمنا بها وجدنا أن *R. africana* تستعمل منذ القدم و حتى يومنا هذا ضد لسعات العقارب خاصة في منطقة الجنوب الجزائري. كما تستعمل من الناحية الرعوية فهي المفضلة لدى الجمل وحيد السنام².

1. Ibrahim Saad C. (1994) Les plantes à fleurs, leur croissance, classification. Maison de la pensée arabe.
2. Ozenda P. (1958) Flore du Sahara septentrional et central. Ed. C.N.R.S. Paris.
3. Rizk A. M. (1986) The Phytochemistry of the Flora of Qatar. King-print of Richmond, Great Britain.
4. Lawrence J. H. M (1969) in « Taxonomy of vascular plants ». Arabic Edition translated by Ahmed, M.M., Tadress, M., Mohamed, A. A. Franklin. New York and El Fikre-El Arabi, press.
5. Beniston N. T., et W. S. (1984) Fleurs d'Algérie. E.N.L. Alger.
6. Fournier P. (1948) Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. Lechevalier Paris, Tome III.
7. Fumadzhiev G., Paskov D. (1966) Effect of the total alkaloids of the plant *Reseda luteola*, upon the cardiovascular system. Farm. (Sofia) 16(5), 60-3.
8. Masse J. P. (1986) Anti-inflammatory plant extract. FR. Patent 2581310 AI 11.
9. Susplugas C., Taillade C., Susplugas P., Michel F. (1988) Anti-inflammatory activity of an ether extract of *Reseda phyteuma* L. Pharm. Acta Helv. 63(2), 59-63.
10. Susplugas P., Mongold J. J., Taillade C., Serrano J. J. (1993) Anti-inflammatory and analgesic activity of *Reseda phyteuma*. Plant. Medi. et Phytother. 26(4), 375-82.
11. Kumarasamy Y., Cox P. J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S. D. (2002) Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity, J. Ethnopharmacol. 83(1-2), 73-7.
12. Watt J. M., Breyer M. G. (1962) The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, 2nd Edition. Livingstone, E.S., Edinburgh and London.
13. Boulos L. (1983) Medicinal Plants of North Africa. Reference Publications, Algonac, MI
14. Olsen O., Soerensen H. (1980) Glucosinolates and amines in *Reseda media*. Phytochemistry. 19(8), 1783-7.
15. Olsen O., Soerenson H. (1979) Isolation of glucosinolates and the identification of O-(α -L-rhamnopyranosyloxy) benzylglucosinolate from *Reseda odorata*. Phytochemistry. 18(9), 1547-52.
16. Gmelin R., Kjaer A. (1970) 2-Hydroxy-2-methylpropyl glucosinolate in *Reseda alba*. Phytochemistry. 9(3), 599-600.
17. Meier L. K., Olsen O., Soerensen H. (1979) Acidic amino acids in *Reseda luteola*. Phytochemistry. 18(9), 1505-9.
18. Soerensen H. (1976) Saccharopine and 2-amino adipic acid in *Reseda odorata*. Phytochemistry. 15(10), 1527-9.
19. Susplugas C., Susplugas P., Masse J. P., Bertez C. (1984) The chemical composition of *Reseda phyteuma* L. Plant. Med. Phytother. 18(2), 62-7.
20. Nakhatov I. K., Tadzhibaev M. M., Malikov V. M., Yunusov S. Yu. (1977) Alkaloid of *Reseda lutea*. Inst. Khim. Rast. Soedin. (3), 424-5.
21. Sultankhodzhaev M. N., Tadzhibaev M. M. (1976) Phenyl- β -naphthylamine from three species of plants. Khim. Prir. Soedin. (3), 406-7.
22. Sorensen H. (1970) O-(α -L-Rhamnopyranosyloxy) benzylamine and O- hydroxybenzylamine in *Reseda odorata*. Phytochemistry. 9(4), 865-70.
23. Lutfullin K. L., Tadzhibaev M. M., Malikov V. M., Abdullaev U. A., Rakhmankulov U.

- (1977) Dynamics of alkaloid accumulation in *Reseda luteola*, Structure of lutine and lutinine. *Khim. Prir. Soedin.* (6), 826-30.
24. Tadzhibaev M. M., Lutfullin K. L., Malikov V. M., Yunusov S. Yu. (1976) Study of alkaloids from *Reseda luteola*. *Khim. Prir. Soedin.* (2), 270-1.
25. Lutfullin, K. L., Tadzhibaev, M. M., Abdullaev, U. A., Malikov, V. M., Yunusov, S. Yu. (1976) Alkaloids from *Reseda luteola*. *Khim. Prir. Soedin.* (5), 625-30.
26. Tadzhibaev M. M., Lutfullin K. L., Malikov V. M., Yunusov S. Yu. (1976) Structure of resedinine. *Khim. Prir. Soedin.* (2), 271-2.
27. Urones J. G., De Pascual Teresa J., Sanchez Marcos I., Diez Martin D. (1987) ent-Isolariciresinol in *Reseda suffruticosa*. *Phytochemistry.* 26(5), 1540-1.
28. Makboul M. A., Abdel-Baky A. M., Ramadan M. A. (1989) Flavonoids of *Reseda pruinosa* del. *Bull. Fac. Sci.* 18(2), 1-7.
29. El-Sayed N. H., Omara N. M., Yousef A. K., Farag A. M., Mabry T. J. (2001) Kaempferol triosides from *Reseda muricata*. *Phytochemistry.* 57(4), 575-578.
30. Goris A., Dubreuil A., Moniez R. (1961) Dyer's Weid, *Reseda luteda* L. Distribution of flavones between the various parts of the plant. *Ann. Pharm. Fr.* 19, 648-650.
31. Jacquin-Dubreuil A. (1972) Direct densitometric determination by absorption of flavonoids of the yellow-weld (*Reseda luteda* L.). *J. Chromato.* 71, 487-498.
32. Pagani F. (1983) Caffeic acid choline ester: a new plant constituent from *Reseda luteola*. *Planta Medica* 48, 128.
33. Geiger H., Krumbein B. (1973) Two new luteolin glycosides from *Reseda luteola*. *Z. Naturforsch. C.* 28 (11-12), 773.
34. Cristea D., Bareau I., Vilarem G. (2003) Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola* L). *Dyes and Pigments.* 57(3), 267-272.
35. Batirov E. Kh., Tadzhibaev M. M., Malikov V. M. (1979) Flavonoids of *Reseda luteola*. *Khim. Prir. Soedin.* (5), 728-9.
36. Granda P. E., Gomez-Serranillos M. (1970) Flavone components of *Reseda gredensis*. *Galenica Acta.* 23 (6), 205-14.
37. Guyonnet C. (1973) Nature and distribution of *Reseda odorata* polyphenols (phenolic acids and flavonoids). *C. R. Acad. Sci., Ser. D.* 277(19).
38. Plouvier V. (1966) Flavone heterosides: kaempferol 3-rhamnoglucoside, myricitrin, linarin and saponarin. *Compt. Rend., Ser D.* 262 (12), 1368-71.
39. Berrehal D., Kabouche A., Kabouche Z., Bruneau C. (2006) Flavonoid glycosides from *Reseda villosa* (Resedaceae). *Biochem. Syst. & Ecol.* 34, 777-779.
40. Yuldashev M. P., Batirov E. Kh., Malikov V. M., Yuldasheva N. P. (1996) Flavonoids of *Psoralea drupaceae* and *Reseda luteola*. *Khim. Prir. Soedin.* (6), 949-951.
41. Rzadkowska-Bodalska H. (1969) Flavonoids in flowers of weld (*Reseda lutea*). III. Identification of compound C. *Pharm. Pharmacol.* 21(2), 169-72.
42. Kerria R. S., Plouvier V. (1970) Structure of flavone glycosides by nuclear magnetic resonance. Compounds of the genera *Centaurea*, *C. R. Acad. Sci., Ser. D.* 270 (22), 2710-13.

43. Fahmy A. G. (1990) Studies on threatened plant species in Egypt: woody perenials. M. Sc. Thesis, Cairo University.
44. Quezel P. (1978) Analysis of the flora of Mediterranean and Saharian Africa. Ann. Miss Bot. Gard. 65, 479–534.
45. Miller A G., Cope., T A., Nyberg J. A, Flora of the Arabian Peninsula and Socotra Royal Botanic Garden, Edinburgh, Scotland.
46. Monier M., Abd El-Ghani, Abdou H. Marei. (2006) Vegetation associates of the endangered *Randonia africana* Coss. and its soil characteristics in an arid desert ecosystem of western Egypt. Acta Bot. Croat. 65 (1), 83–99.

الفصل الثالث

الجزء الأول

الدراسة النباتية و الكيميائية للنبات

Reseda arabica

الدراسة النباتية و الكيميائية للنبتة :

1. المادة النباتية:

قطفت المادة النباتية من ضواحي مدينة غرداية في الصحراء الشمالية الشرقية الجزائرية في شهر أفريل من سنة 2003. بعدها تمت عملية التجفيف تحت الظل و بعيدا عن الرطوبة في مكان جيد التهوية إذ كان وزن النبتة المتكونة من سيقان و أوراق و أزهار حوالي 1700 غ.

2. وصف النوع *Reseda arabica* Boiss. :

يتصف النوع *R. arabica* Boiss. بثمار كبسولية غير عنقية و غالبا ما تكون دائرية، و بكأس غير مبنق يحتوي على فص قد يتعدى طوله ثلث طول الكبسولة و عادة ما يكون قصيرا. أما البذور فتكون محببة. و ينتشر النوع *arabica* في منطقة المغرب العربي خاصة في الجزائر و المغرب أين يتمركز في المناطق الصحراوية.



صورة فوتوغرافية لـ *Reseda arabica*

3. الموضع ضمن التصنيف النباتي:

Division	Magnoliophytes	القسم
Classe	Magnoliopsides	الصف
Sous classe	Dilleniidae	تحت الصف
Ordre	Capparidales	الرتبة
Famille	Resedaceae	العائلة
Genre	<i>Reseda</i>	الجنس
Espèce	<i>Reseda arabica</i>	النوع

4. الإستخلاص:

بعد طحن المادة النباتية الجافة نفعت في محلول هيدروكولي يتكون من ماء / ميثانول بنسبة (70:30) مدة 24 ساعة ثم رشح المحلول و ركز تحت الضغط المنخفض أما الرشاحة فأعيدت من جديد في المحلول الهيدروكولي، كررت العملية ثلاث مرات متتابة. بعد نهاية عملية تبخير الراشح تحصلنا على المستخلص الخام الذي عولج بحوالي 1 لتر من الماء المقطر المغلي و ترك ليلة كاملة للراحة ثم رشح للتخلص من بقايا الأتربة و الشوائب لتتحصل على الطبقة المائية.

الخطوة الثانية تتمثل في عمليات الإستخلاص من نوع سائل - سائل للطبقة المائية، استعمالنا لأجل ذلك ثلاث مذيبات متفاوتة القطبية، بداية مع ثنائي كلور الميثان (300 مل x 3)، ثم خلاص الإيثيل (300 مل x 3) و أخيرا البوتانول النظامي (300 مل x 5) لنحصل في الأخير على ثلاث مستخلصات و هذا بعد عملية التبخير و هم على التوالي:

مستخلص ثنائي كلور الميثان بوزن 2 غ

مستخلص خلاص الإيثيل بوزن 2 غ

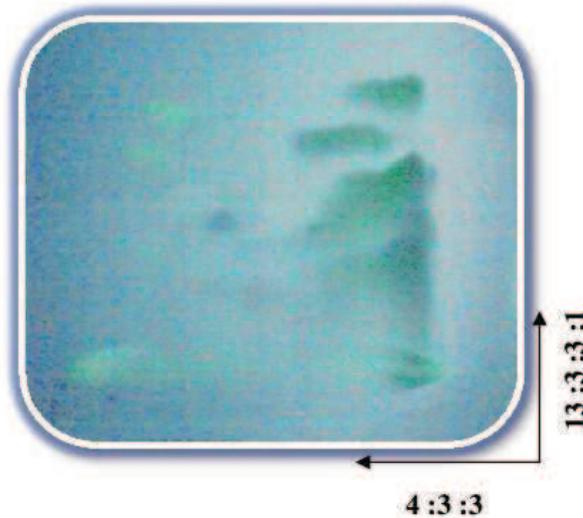
مستخلص البوتانول بوزن 20 غ.

بعد ذلك أذبنا كل مستخلص في كمية من الميثانول لإزالة آثار المذيبات السابقة، و تركناه عرضة للتبخر الهوائي، و لاحظنا بمجرد ترك المستخلص البوتانولي للراحة تشكل راسب على شكل دقائق ذات لون أصفر باهت تم فصله بالترشيح و غسله بدفوعات متتالية من الميثانول ثم أعيدت بلورته بمزيج من الميثانول و الماء أين تم الحصول عليه على شكل صلب أصفر اللون في صورته النقية و سميناه بالمركب R. و المخطط -1- يلخص كل الخطوات التي اتبعناها.

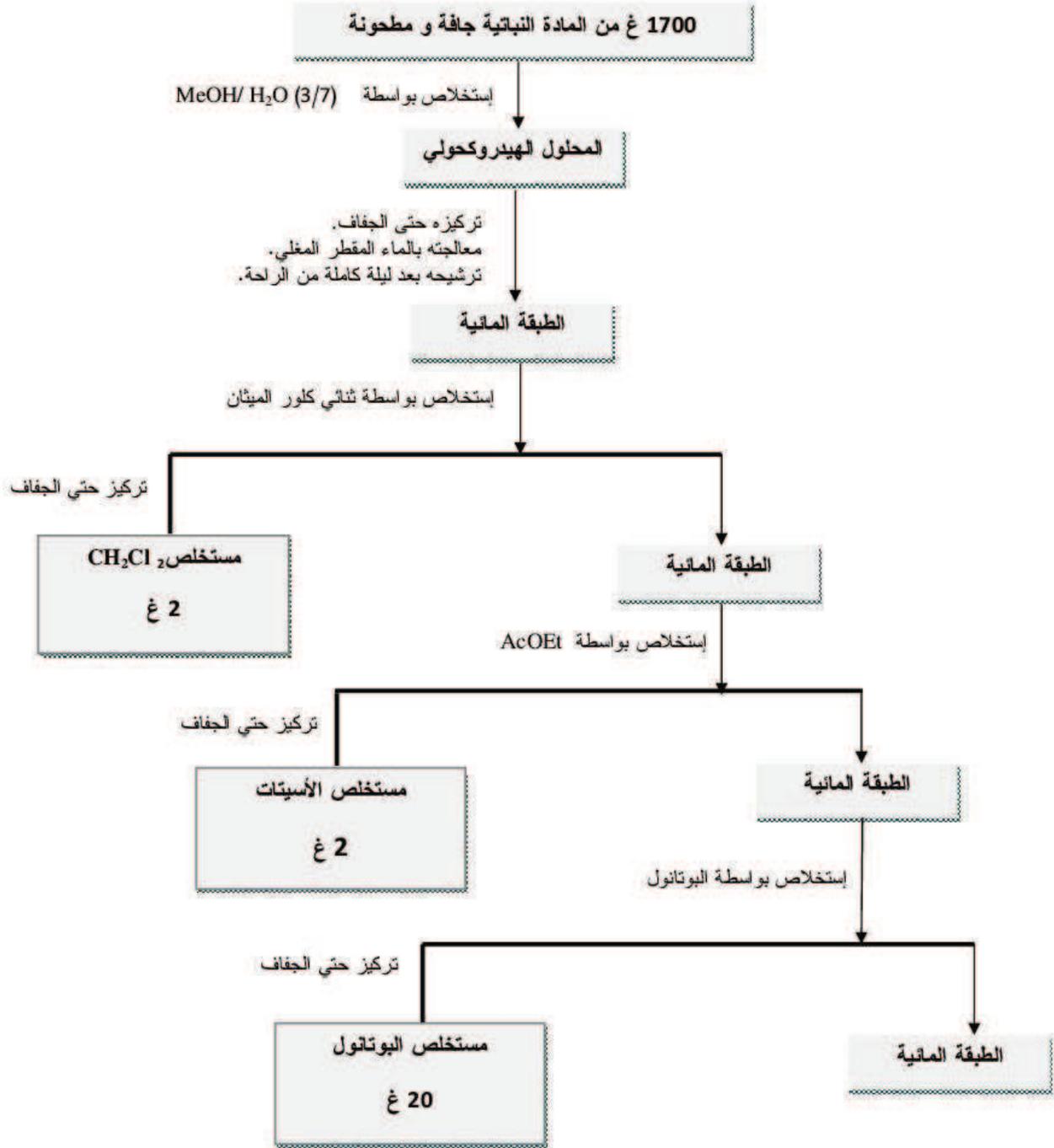
5. طرق الفصل:

قبل البدء بأي عملية فصل لا بأس أن نذكر أن الهدف الأساسي من هذا البحث هو فصل مركبات فلافونيدية و على هذا الأساس قمنا بعدة تحاليل كروماتوغرافية على كل المستخلصات و ذلك باستعمال كل من السيليكاجال و متعدد الأميد و كذا ورق Whatman في أنظمة مختلفة، و إضافة إلى ذلك قمنا باستعمال بعض الكواشف الخاصة بالفلافونيدات، إذ تبين أن مستخلص الكلوروفورم و مستخلص الأسيتات لا يحتويان على مركبات فلافونيدية على عكس مستخلص البوتانول الذي تم اختياره للدراسة لهذا الاعتبار و كذا لوجود كمية كافية منه. و على إثر التحاليل الكروماتوغرافية ثنائية البعد على متعدد الأميد في النظامين S_1 و S_2 ، و باستعانة بالأشعة فوق البنفسجية تم تصوير الخريطة الكروماتوغرافية لمستخلص *R. arabica* كما هو موضح في الكروماتوغرام I .

النظام المائي	$H_2O : MeOH : MEC : Acétylacetone$	13:3:3:1	: S_1
النظام العضوي	$Toluene : MeOH : MEC$	4:3:3	: S_2



الكروماتوغرام I: الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البوتانولي لـ *R. arabica*



مخطط-1- مخطط الإستخلاص *R. arabica*

من خلال الكروماتوغرام 1 يمكن أخذ فكرة أولية على المستخلص البوتانولي للنبعة *R. arabica*، إذ يتبين أنه يحتوي على عدد من المركبات الفلافونيدية، أغلبها من نوع فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3 و قلة الفلافونولات من نوع 3-OH و هذا حسب اللون الظاهر تحت الأشعة UV كما أن أغلب المركبات جليكوزيدية لأنها هاجرت في النظام المائي. كذلك نلاحظ تدخل كبير لهذه المركبات لذلك اتجهنا إلى اختيار تقنية كروماتوغرافيا العمود كخطوة أولى لفصل مكونات 15 غ من المستخلص البوتانولي، و لأن متعدد الأמיד يعتبر الأمثل لفصل الفلافونيدات و خاصة الجليكوزيدية منها و هذا نظرا لقدرة إدمصاصه العالية. قمنا بتعبئة العمود إلى تثنيه و هذا باستعمال التولين كملص أولي بعدها وضع المستخلص على شكل صلب بعد ترصيص العمود جيدا. ثم اتجهنا إلى رفع قطبية العمود بإضافة مذيب الميثانول تدريجيا إلى غاية الوصول إلى 100% ميثانول، و يتم تغيير قطبية المذيبات في كل مرة تبعا لهجرة الحزم المفصولة و هذا بالملاحظة بمصباح الأشعة فوق البنفسجية. تستقبل الحزم النازلة أسفل العمود في دوارق يتراوح حجمها حوالي 100 مل، بعدها قمنا بتبخيرها تحت الضغط المنخفض و إعادة تدويرها في أقل كمية ممكنة من الميثانول، و في نهاية الفصل الأولي على العمود تحصلنا على 163 كسر كما هو مدون في الجدول -1-

ثلث هذه العملية تجميع الكسور المتشابهة بالاستعانة بتقنية كروماتوغرافيا الورق على ورق whatman و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية على السليكاجال و هذا لغياب متعدد الأמיד الخاص بهذه التقنية و من بين الأنظمة المستعملة.

على السليكاجال

CHCl₃ : MeOH : (8 : 2), (7 : 3), (6 : 4)

AcOEt : H₂O : AcOH : (8 : 1 : 1)

على ورق Whatman رقم 3

الطور العضوي n-BuOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 5)

AcOH : (15%)

و في الأخير تحصلنا على 16 كسرا تم توضيحها في الجدول -2-

الجدول -1- الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي:

رقم الكسور المحصل عليها	نسبة التولدين	نسبة الميثانول
04 - 01	100	0
14 - 05	98	2
25 - 15	96	4
42 - 26	92	8
70 - 43	88	12
84 - 71	85	15
115 - 85	80	20
134 - 116	75	25
145 - 135	70	30
153 - 146	60	40
156 - 154	30	70
163 - 157	00	100

الجدول -2- يوضح النتائج المحصل عليها بعد الجمع:

ملاحظة	الكسور بعد الجمع	ملاحظة	الكسور بعد الجمع
وجود مزيج من بلورات و صلب	F ₉ 89 - 85	مركبات غير فلافونيدية	F ₁ 11 - 01
كل هذه الكسور متشابهة إذ يمكن الإختلاف في تقاوت تراكيز المركبات من كسر إلى آخر	F ₁₀ 101 - 090		F ₂ 20 - 12
	F ₁₁ 117 - 102		F ₃ 27 - 21
	F ₁₂ 139 - 118		F ₄ 44 - 28
	F ₁₃ 148 - 140		F ₅ 49 - 45
	F ₁₄ 154 - 149		F ₆ 62 - 50
غير واضحة تلغى	F ₁₅ 159 - 155 F ₁₆ 162 - 160	متشابهان يكمن الإختلاف في تراكيز المركبات	F ₇ 72 - 63 F ₈ 84 - 73

تقييم العمود :

نتائج الفصل في العمود السابق لم تكن جيدة، إذ أن كل المركبات تقريبا اجتمعت في الكسور من F₁₀ إلى F₁₄ حيث كان الإختلاف في الكسرين F₇ و F₈ فقط، إذ يحتوي هذان الكسران على راسب أصفر اللون تبين فيما بعد أنه مزيج من مركبين أساسيين، و هما متواجدان في بقية الكسور لذلك تم اللجوء إلى جمع الكسور من F₁₀ إلى غاية F₁₄ و فصلها مجددا في عمود كروماتوغرافي لكن هذه

المرّة باستعمال السليكاجال كدعامة ثابتة و اختيار CH_2Cl_2 كمحلص مع تشييعه تدريجيا بالميثانول و نتائج العمود مدونة في الجدول -3-

جدول -3- نتائج العمود الكروماتوغرافي الثاني:

الملاحظة	% MeOH	% CH_2Cl_2	رقم الكسر
مركبات غير فلافونيدية	0	100	1
	05	95	8 - 2
	10	80	11 - 9
	15	85	23 - 12
مركبين أساسيين	15	85	F_1' 34-23
خليط قابل للفصل	15	85	F_2' 36-35
خليط قابل للفصل	15	85	F_3' 41-37
	20	80	44-42
خليط قابل للفصل	20	80	F_4' 49-45
خليط قابل للفصل	20	80	F_5' 59-50
خليط معقد	25	75	71-60
	30	70	83-72
	100	0	87-84

و كتحقيق للعمود الثاني نلاحظ أن هذا الأخير تجزأ إلى خمسة كسور قابلة للفصل. تلت هذه المرحلة عمليات فصل متعددة بتقنيات مختلفة منها كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية و كذا كروماتوغرافيا العمود على السليكاجال، و قد توصلنا إلى نظام فصل جيد لمعالجة هذه الكسور و يتكون هذا الأخير من جملة من المذيبات بنسب مختلفة:

§ عند الفصل بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (CCM) نستعمل:

AcOEt / MeOH / H_2O : S_3 : (10 : 1 : 1) ; S_4 : (10 : 2 : 1)

§ أما عند الفصل بتقنية كروماتوغرافيا العمود (CC) نستعمل:

AcOEt / MeOH / H_2O : S_5 : (10 : 1 : 0.5) (colonne isocratique)

معالجة الكسور المحصل عليها :1. معالجة الكسر 'F₁':

عولج هذا الكسر بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال النظام S₃. إذ تم فصل مركبين:

الأول عبارة عن بلورات صفراء سمي F₉، و الثاني تم تنقيته في عمود صغير في النظام S₅ لنحصل على المركب F₈

2. معالجة الكسر 'F₃':

عولج هذا الكسر بواسطة كروماتوغرافيا العمود باستعمال النظام S₅. تحصلنا في نهاية العمود على 19 تحت كسر، تم اختيار تحت الكسور التالية للدراسة:

أ. تحت الكسر 9 و 10: فصل مركب أساسي منهما و ذلك باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال النظام S₃، ثم قمنا بتنقية هذا الأخير في عمود صغير في النظام S₅ لنحصل على المركب R5 في صورته النقية.

ب. تحت الكسر 18: بنفس الطريقة السابقة تم فصل مركب أساسي باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية في النظام S₃، تلتها تنقيته في عمود صغير باستعمال النظام S₅ أين تم الحصول على المركب R40 في صورته النقية.

- بقية تحت الكسور لم تدرس لأن مكوناتها موجودة في الكسور السابقة أو اللاحقة لها.

3. معالجة الكسر 'F₄':

باستعمال تقنية الطبقة الرقيقة التحضيرية تم فصل مركب أساسي و هذا في النظام S₄

4. معالجة الكسر 'F₅':

بنفس الطريقة السابقة و باستعمال نفس النظام تم فصل مركب آخر من هذا الكسر.

إلا أننا لم نتمكن من تنقية هذين الأخيرين بصورة جيدة و بالتالي لم نتوصل إلى تحديد البنى الكيميائية لهما.

- أما الكسر F_2' لم يدرس لأن مركباته موجود في الكسور الأخرى
- المركب R الذي فصل مباشرة من المستخلص البوتانولي تم الحصول عليه تقريبا في كل الكسور

خلاصة :

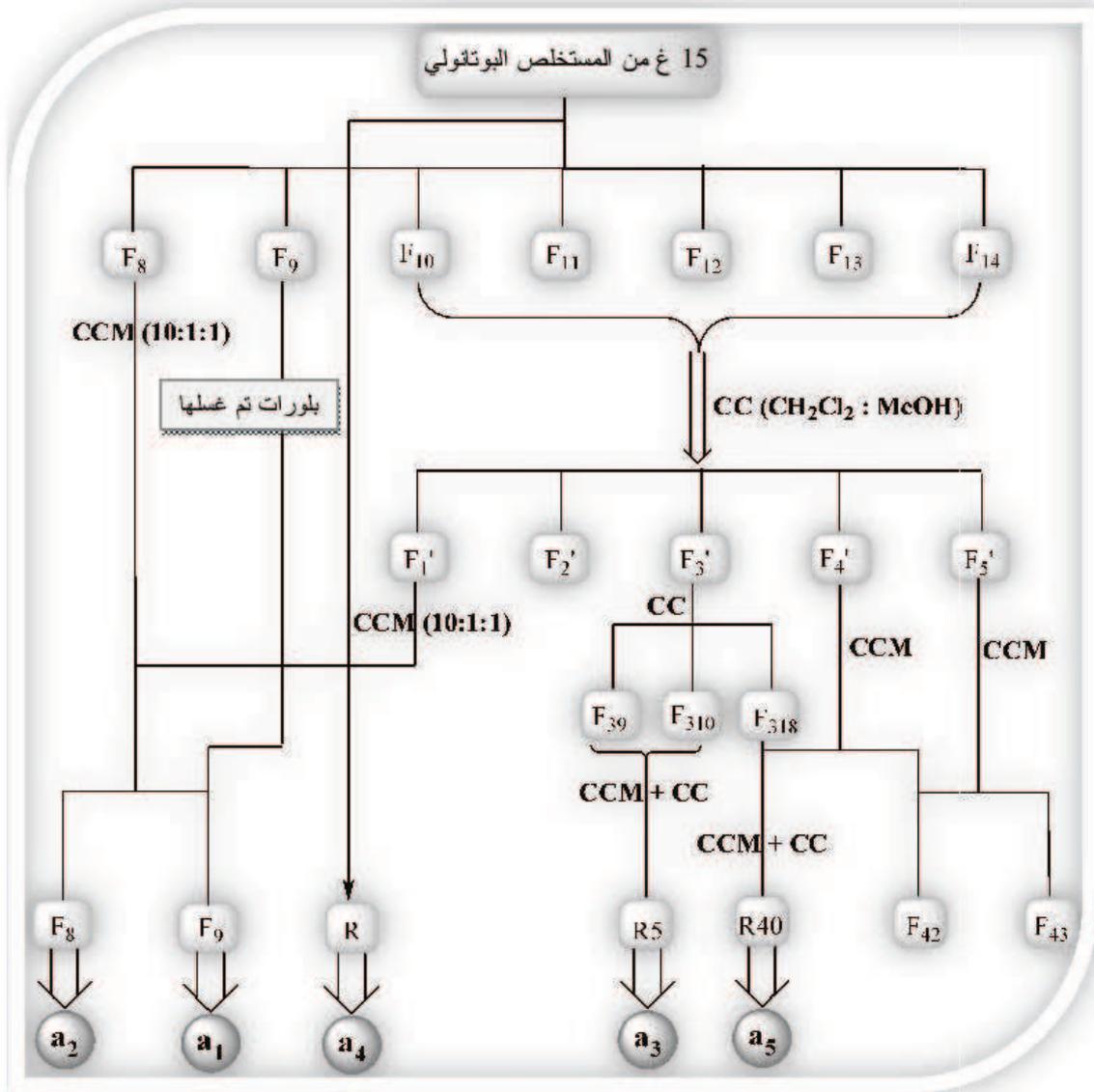
حصلنا في نهاية عمليات الفصل التي قمنا بها على خمس مركبات مختلفة في صورتها النقية. جاهزة لتحديد بنياتها و المخطط -2- يلخص كل هذه المراحل.

- اعتمدنا لأجل التعرف و تحديد بنى المركبات المتحصل عليها إلى طرق متعددة نخص منها مطيافة الأشعة فوق البنفسجية و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و الكربون أحيانا و تقنيات مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد لبعض المركبات التي تحتاج لذلك و كذلك مطيافية الكتلة، و هذا دون إهمال الخواص الكروماتوغرافية التي لا تقل أهمية عن سابقتها. لما تعطيه الخواص الكروماتوغرافية من اللون الإستشعاعي و قيمة ثابت الإنحباس من معلومات مهمة في تحديد البنى الكيميائية للفلافونيدات قمنا بحساب قيم R_f في ثلاث جمل مختلفة و هي :

H ₂ O/ MeOH/MEC/AcAc	13 : 3 : 3 : 1	الجملة S1 على متعدد الأميد
Toluène/MeOH/MEC	4 : 3 : 3	الجملة S2 على متعدد الأميد
AcOEt/MeOH/H ₂ O	10 : 1 : 1	الجملة S3 على السليكاجال

وعلى ضوء هذه الكروماتوغرامات نلاحظ أن المركبات الخمسة المفصلة من *R.arabica* هي من نوع فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3، كما يبدو أنها إيثرزيدات. و لأجل تحديد بنية الفلافونيدات بدقة اعتمدنا على الطرق الطيفية المذكورة سابقا و للتأكيد أكثر أتمنا العمل بالإمهاء الحمضية لكل المركبات.

نشير إلى أننا قمنا بترتيب المركبات الخمسة حسب قيمة R_f في النظام S_3 .



المخطط-2- طرق الفصل للنباتة *R. arabica*

التعین النبوی للمركبات المفصلة من النبتة

Reseda arabica

التعيين البنوي للمركب $a_1 = F_9$

أولا: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول a_1-1 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب a_1

I) $H_2O/ MEC/ MeOH/ AcAc$	13 : 3 : 3 : 1
II) Toluène/ MEC/ MeOH	4 : 3 : 3
III) AcOEt / MeOH/ H_2O	10 : 1 : 1

13 : 3 : 3 : 1	4 : 3 : 3	10 : 1 : 1	الجملة
0.55	0.54	0.69	ثابت الإنحباس R_f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول a_1-2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (a_1-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	345	266
NaOH	391	265
NaOAc	360	266
NaOAc + H_3BO_3	350	266
$AlCl_3$	399 (347 sh)	273 (299 sh)
$AlCl_3 + HCl$	398 (343 sh)	274 (296 sh)

2. جدول a₁-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعا للشكل (a₁-2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	8.8	2H	7.83
H-5' , H-3'	d	8.8	2H	6.97
H-8	d	2.1	1H	6.76
H-6	d	2.1	1H	6.50
H-1'''(7-O-Rha)	d	1.5	1H	5.59
H-1''(3-O-Rha)	d	1.5	1H	5.42
CH ₃ (7-O-Rha)	d	6.0	3H	1.29
CH ₃ (3-O-Rha)	d	5.5	3H	0.96

III. نتائج الإمهاء الحمضية:

1. نوع السكر: rhamnose.

2. نوع الأجليكون: Kaempférol و هذا حسب المعطيات:

أ- اللون الإستشعاعي: أصفر

ب- نتائج مطيافية UV:

جدول a₁-4: نتائج مطيافية UV بعد الإمهاء الحمضية للمركب a₁

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	367	267
NaOAc	387	275

ثانيا: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب $F_9 = a_1$:

السلوك الكروماتوغرافي للمركب يشير إلى أنه إيثيروزيد ثنائي السكر، و اللون البنفسجي تحت الأشعة UV و قيمة العصابة I في الميثانول المقطرة بـ 345 نم دليل على أن الفلافونيد إما فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3، عند إضافة NaOH نلاحظ إزاحة باتوكرومية للعصابة I قيمتها 46 نم دليل على وجود OH حر في الموقع 4، عدم ظهور عصابة جديدة مع نفس الكاشف في المجال (320-335) تدل على أن الموقع 7 مستبدل و يؤكد هذا عدم إنزياح العصابة II عند مقارنة

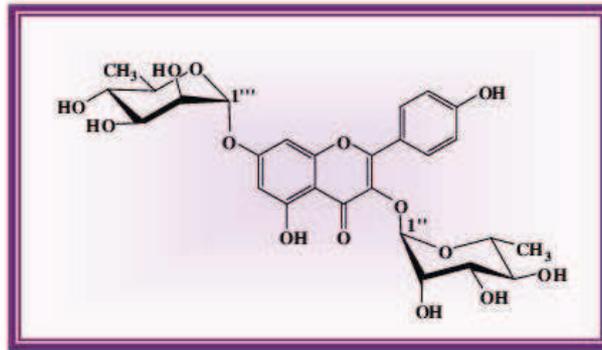
طيفي MeOH و NaOAc، الإزاحة الباتوكرومية المقدرة بـ 53 نم الناتجة عن مقارنة طيف الميثانول بطيف HCl + AlCl₃ دليل وجود OH حر في الموقع 5، الإزاحة الباتوكرومية الضعيفة للعصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيف NaOAc + H₃BO₃ تدل على غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B و يؤكد هذا عدم تغير طيف AlCl₃ عند إضافة HCl، كل هذه المعلومات تؤدي بنا إلى بنية الـ kaempférol مستبدل في الموقعين 3 و 7 أو apigénine مستبدل في الموقع 7.

طيف ¹H-RMN يبين غياب H-3 الخاص بالـ apigénine أي أن الاقتراح الأول هو الأصح، إذ أعطت نتائج هذه التقنية بروتونات الحلقة B على شكل إشارتين ثنائيتين بثابتة تزاوج تقدر بـ 8.8 هرتز و بتكامل 2H لكل واحدة منهما، ترن الأولى عند 7.83 ppm و الثانية عند 6.97 ppm موافقتين لـ (H-2',H-6') و (H-3',H-5') على الترتيب. بروتونات الحلقة A جاءت على شكل إشارتين ثنائيتين بتكامل 1H موافقتين للبروتون H-8 الذي يرن عند 6.67 ppm والأخرى للبروتون H-6 عند 6.5 ppm. طيف ¹H-RMN بين أيضا وجود سكرين من نوع الـ rhamnose و هذا بظهور إشارة البروتون الأنوميري الأول و المرتبط بالموقع 7 بثابتة تزاوج 1.5 هرتز وإزاحة تقدر بـ 5.59 ppm مرفوق بإشارة ثنائية أخرى بثابتة تزاوج 6 هرتز ترن عند 1.29 ppm خاصة بالمثل الموافق له، أما إشارة البروتون الأنوميري للـ rhamnose الثاني و المتواجد في الموقع 3 ظهرت عند 5.42 ppm بثابتة تزاوج 1.5 هرتز و المثل المرافق له بثنائية عند 0.96 ppm بثابتة تزاوج 5.5 هرتز. طيف ¹³C أعطى إشارتين عند 16.64 ppm و 16.23 ppm موافقتين لكاربونات مجموعتي الميثيل لسكري الـ rhamnose، كما أظهر بقية كاربونات المركب.

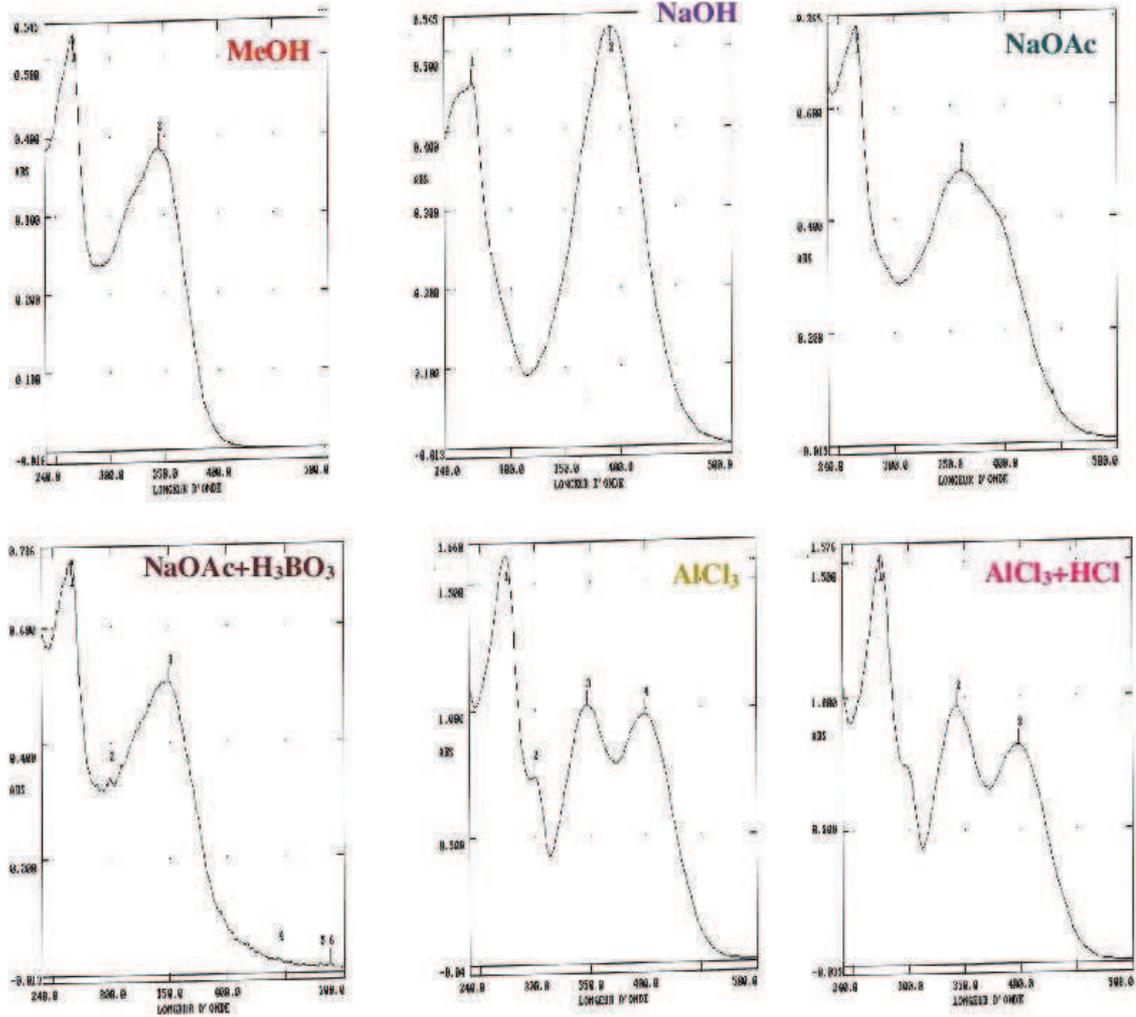
الحمهة الحمضية أكدت كل النتائج إذ حررت سكر الـ rhamnose و أجليكون ذو لون أصفر،

كما بينت أطياف UV الخاصة به تحرر الموضعين 3 و 7.

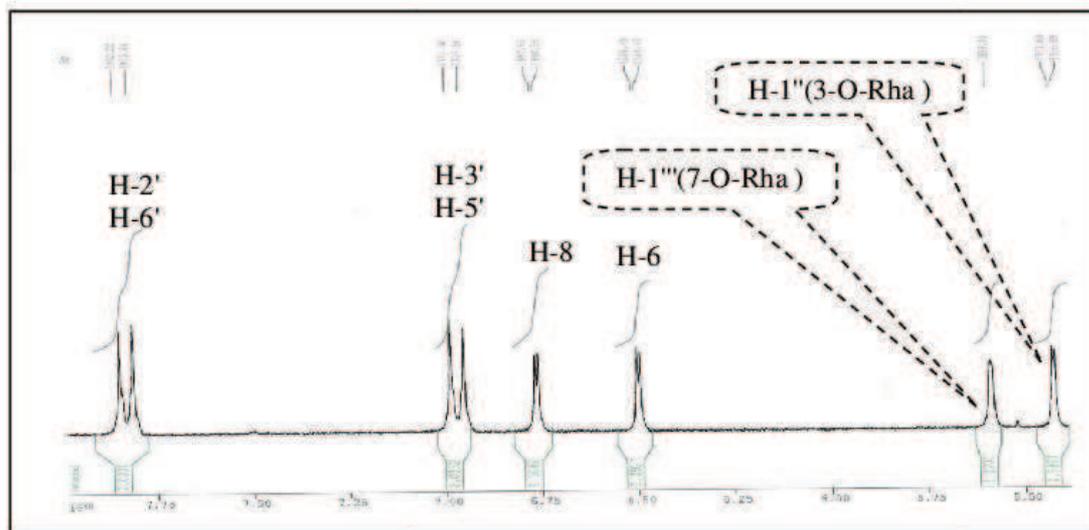
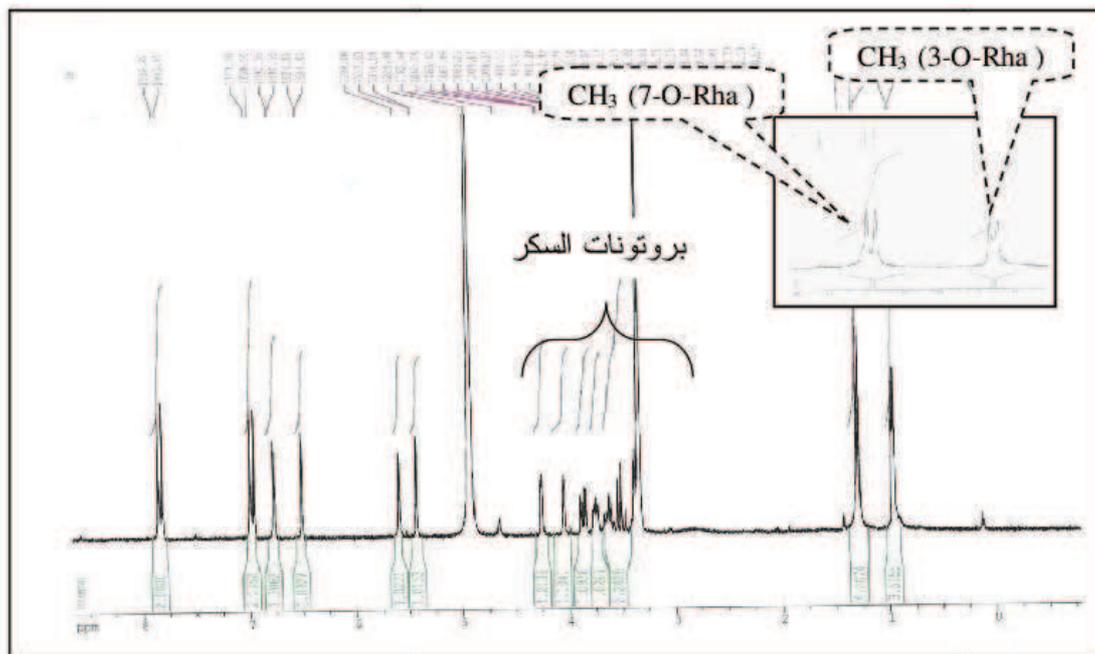
إذن فالبنية النهائية للمركب a₁ هي:



Kaempférol-3,7-di-O-α-rhamnoside



الشكل 1- a_1 : سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب a_1



الشكل 2- a₁: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب a₁

التعيين البنوي للمركب F₈ = a₂:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول a₂-1: الخصائص الكروماتوغرافية للمركب a₂

13:3:3:1	4:3:3	10:1:1	الجملة
0.65	0.64	0.65	ثابت الإنحباس R _f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول a₂-2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (a₂-1):

العصابة II (نم)	العصابة I (نم)	الكاشف
253(265 sh)	349	MeOH
265	407	NaOH
256	402	NaOAc
255	349	NaOAc + H ₃ BO ₃
270	361 (403 sh)	AlCl ₃
270	354 (399 sh)	AlCl ₃ + HCl

2. جدول a₂-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعاً للشكل (a₂-2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H2'	sl	-	1H	7.49
H6'	dd	8.5 , 1.9	1H	7.47
H5'	d	8.5	1H	6.96
H8	d	1.9	1H	6.77
H6	d	1.9	1H	6.50
H-1'''(7-O-Rha)	d	1.5	1H	5.59
H-1''(3-O-Rha)	d	1.5	1H	5.42
CH ₃ (7 -O-Rha)	d	6.2	3H	1.28
CH ₃ (3 -O-Rha)	d	6.0	3H	0.97
O-CH ₃	s	-	3H	3.97

3. جدول a₂-4: نتائج طيف الكتلة تبعاً للشكل (a₂-4) و (a₂-5) :

ES ⁺			ES ⁻		
m/z	الشظية	الشدة %	m/z	الشظية	الشدة %
632.2	[M + H + Na] ²⁺	12.3	608.2	[M] ⁻	31
631.2	[M + Na] ⁺	35	607.2	[M - H] ⁻	100
426.4	[M - ORha - H - H ₂ O] ⁺	28			
425.4	[M - 2H - ORha - H ₂ O] ²⁺	100			

III. نتائج الإمهاء الحمضية:

1. نوع السكر: rhamnose.

2. نوع الأجليكون: Isorhamnétine وهذا حسب المعطيات:

أ- اللون الإستشعاعي: أصفر

ب- نتائج مطيافية UV :

جدول a₂-5: نتائج مطيافية UV بعد الإمهاء الحمضية للمركب a₂

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	372	252
NaOAc	390	266

ثانياً: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب a₂ = F₈

السلوك الكروماتوغرافي للمركب يدل على أنه جليكوزيد ثنائي السكر، لونه البنفسجي و قيمة العصابة II في الميثانول المقطرة بـ 349 نم ترجح على أنه فلافونول مستبدل في الموقع 3، وجود إنثناء عند 265 نم بجانب العصابة II يدل على أن الحلقة B ثنائية الإستبدال على الأقل. الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I عند إضافة NaOH (58 نم) مع زيادة في شدة امتصاصها تدل على وجود 4'-OH، عدم ظهور عصابة جديدة مع نفس المفاعل و الإزاحة الباثوكرومية الضعيفة للعصابة II عند مقارنة طيفي الميثانول و NaOAc يؤكدان على وجود 7-OR، و نستدل على غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل من التغيير الطفيف لطيف AlCl₃ عند إضافة HCl و كذلك من ثبات قيمة العصابة I عند مقارنة طيفي الميثانول بطيف NaOAc + H₃BO₃، الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف الميثانول مع AlCl₃ + HCl تدل على وجود 5-OH. إذن فبنية المركب الأولية حسب المعطيات السابقة هي فلافونول مستبدل في الموقعين 3 و 7 و كذلك 3.

جاءت نتائج طيف¹ RMN-H لتأكد أن الحلقة B ثلاثية الإستبدال أي أن الموقع 3 مشغول و هذا بظهور ثلاث إشارات بتكامل 1H لكل واحدة، حيث ترن الأولى عند 7.49 ppm على شكل أحادي عريض موافقة للبروتون H-2' و إشارة ثانية على شكل ثنائي-ثنائي بثابتي تزواج (8.5 و 1.9 هرتز) ترن عند 7.47 ppm موافقة للبروتون H-6'، أما الثالثة فظهرت على شكل ثنائي بتزواج من نوع Ortho قيمته 8.5 هرتز عند 6.96 ppm موافقة للبروتون H-5'، كما رن البروتونين H-6 و H-8 للحلقة A عند 6.77 ppm و 6.5 ppm على التوالي على شكل إشارة ثنائية لكل منهما بثابته تزواج 1.9 هرتز. طيف¹ RMN-H أعطى كذلك إشارة أحادية بتكامل 3H عند 3.97 ppm موافقة لمجموعة ميثوكسي، كما بين وجود سكرين من نوع الـ rhamnose و هذا بظهور البروتونين الأنوميريين لهما و كذا مجموعتي الميثيل الموافقة لكل سكر (جدول 3-a₂). نتائج الإمهاء الحمضية أكدت نوع السكر و أعطت أجليكون موافق لبنية الـ Isorhamnétine و ذلك بتحرر السكرين من الموقعين 3 و 7 .

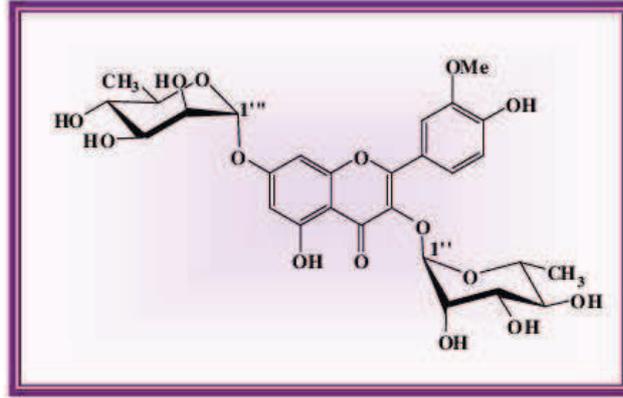
معطيات طيف الكتلة دعم النتائج السابقة إذ أعطى قمة الأيون الجزيئي عند m/z = 608.2 موافقة للصيغة الجزيئية المجملة C₂₈H₃₂O₁₅، التي تؤكد وجود مجموعة الميثوكسي و سكري الـ rhamnose إضافة إلى الهيكل الأجليكوني، بقية الشظايا المحصل عليها و مدونة في الجدول (5; 4-a₂).

طيف RMN ذو بعدين بتقنية ROESY أعطى (الشكل 3-a₂) :

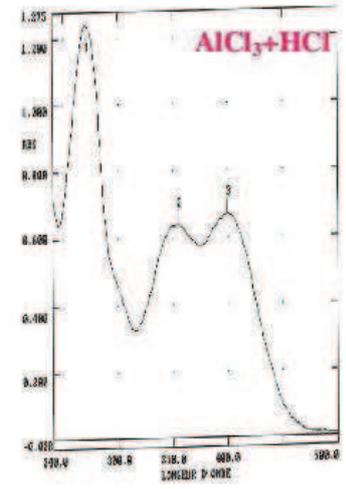
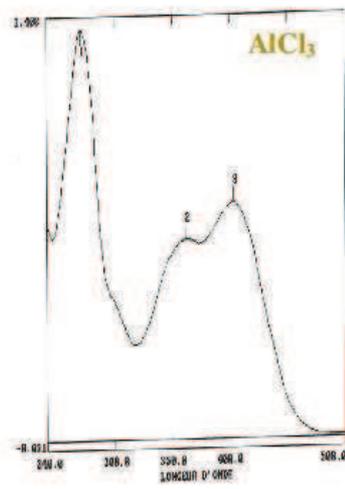
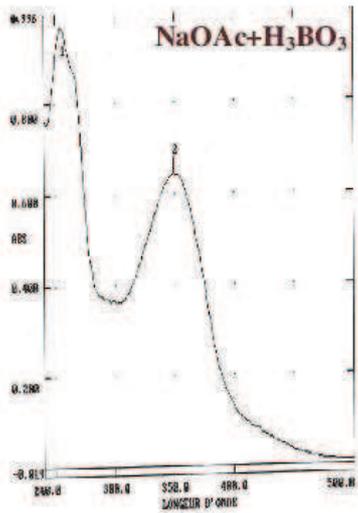
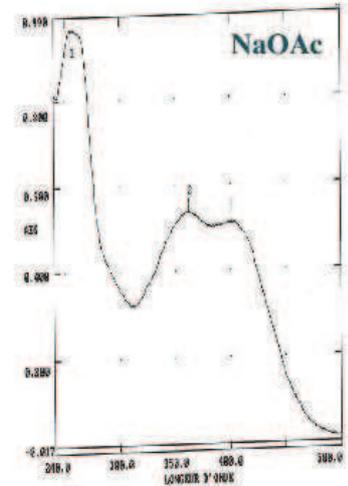
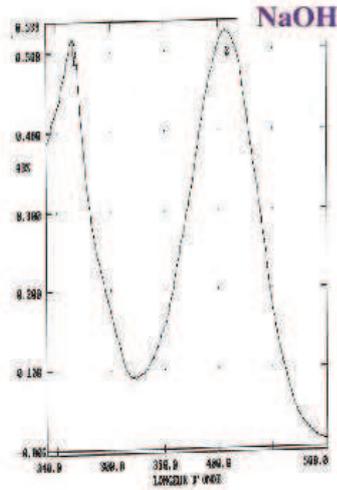
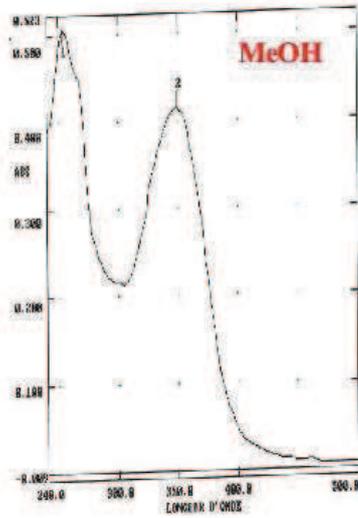
نقاط تعالق بين البروتونين H-8 و H-6 مع البروتون الأنوميري ذي الإزاحة 5.59 ppm لتؤكد على ارتباط السكر بالكربون 7.

يقع تعالق بين H-2' و بروتونات سكر الـ rhamnose ذو البروتون الأنوميري الذي يرن عند 5.42 ppm، كذلك البروتون H-6' يشكل نقطة تعالق بعيدة مع أحد بروتونات هذا السكر مما يدل على أن هذا الأخير متواجد في الموقع 3، كما نلاحظ أن بروتونات الحلقة B الثلاثة تشكل نقاط تعالق مع مجموعة الميثوكسي و جاء هذا التعالق واضح أكثر مع البروتون H-2' عن طريق بقعة عريضة مما يدل على أن OMe متواجد في الموقع 3.

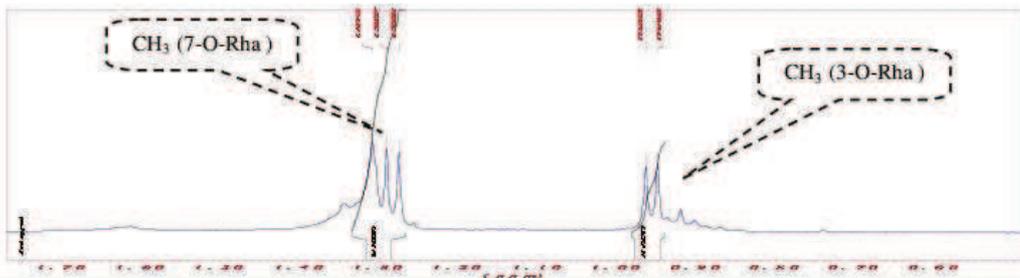
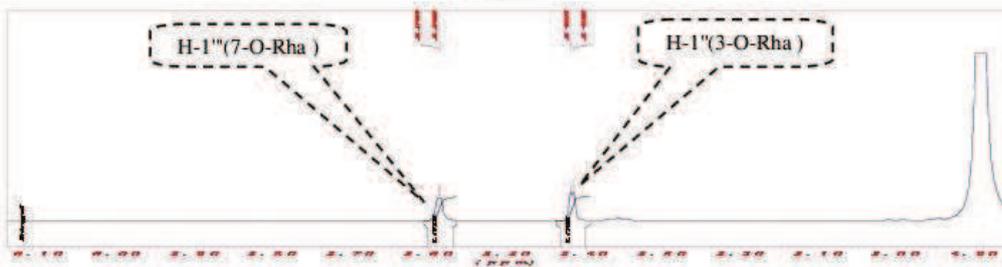
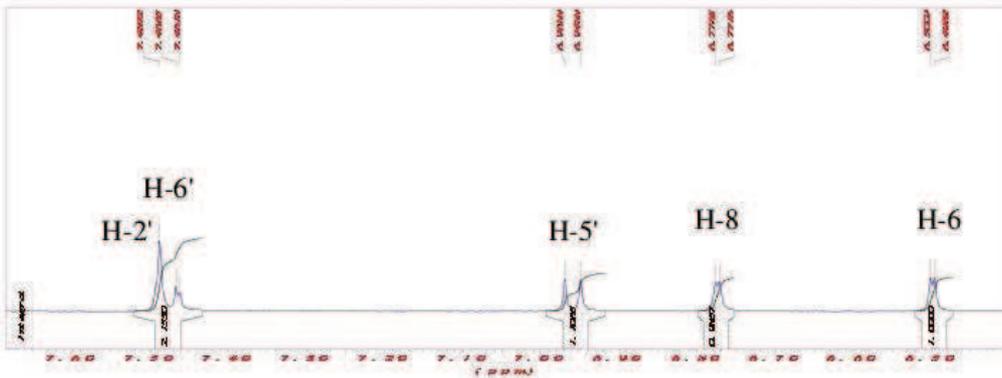
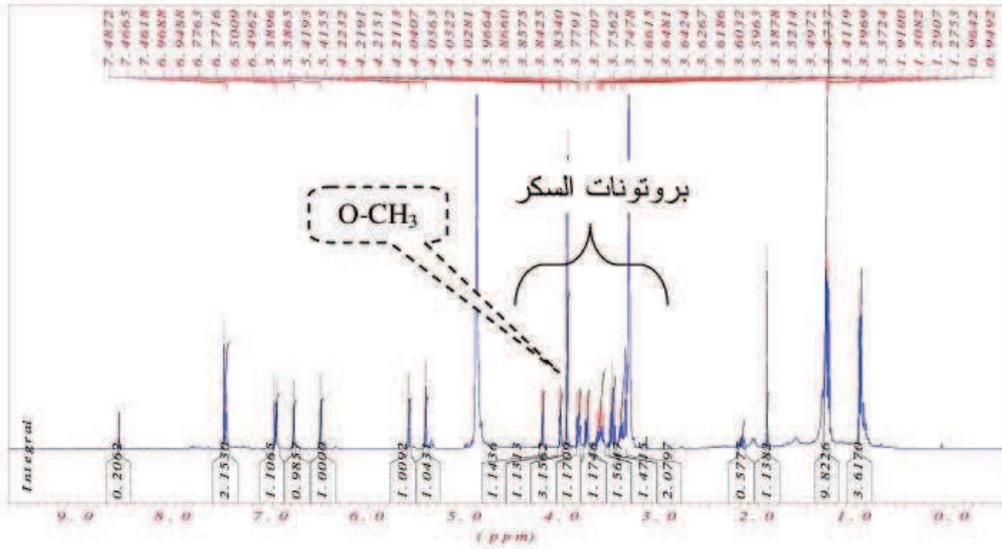
كل هذه المعطيات تقودنا إلى كتابة و رسم البنية النهائية للمركب a₂:



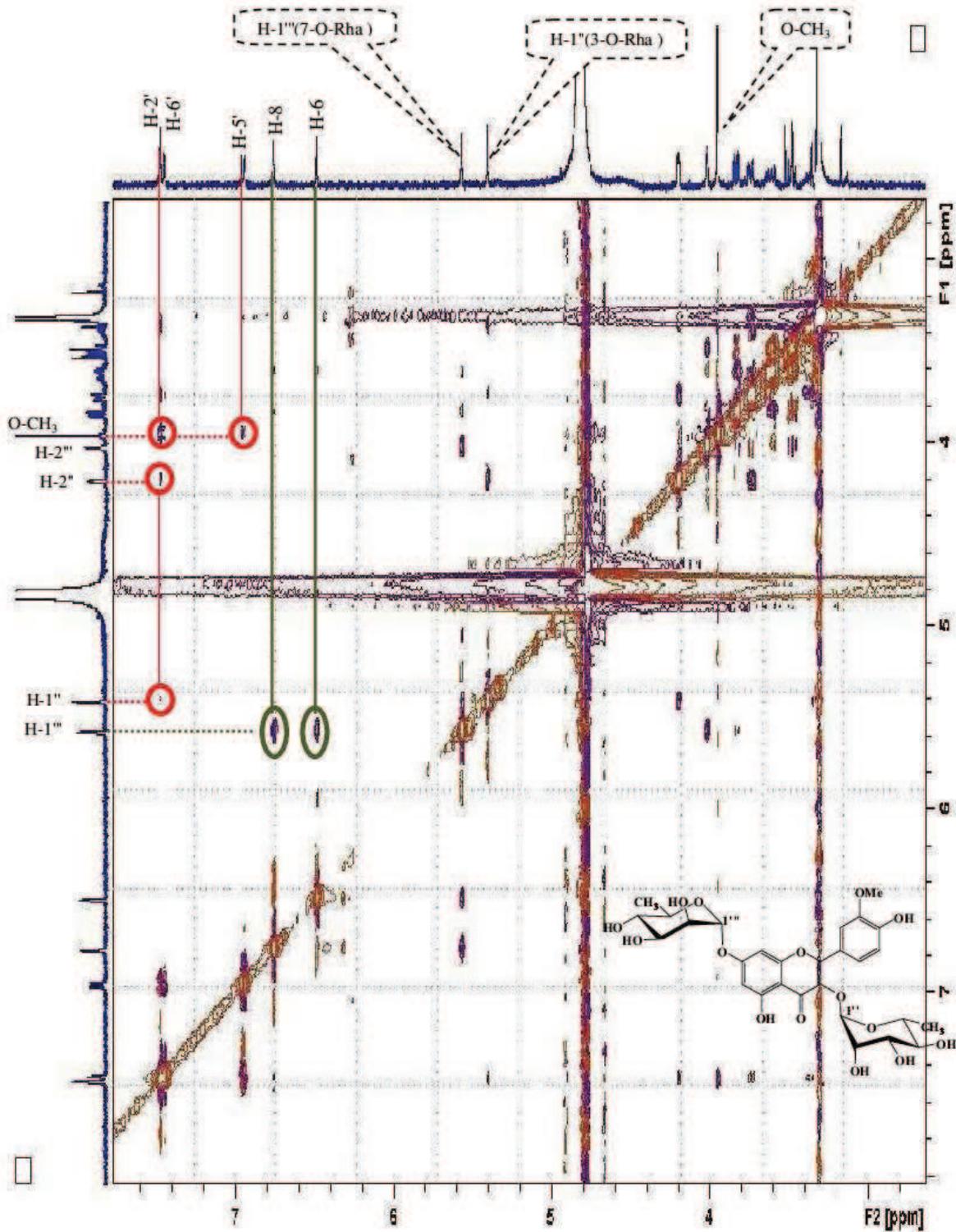
Isorhamnétin -3,7-di-O-α- rhamnoside



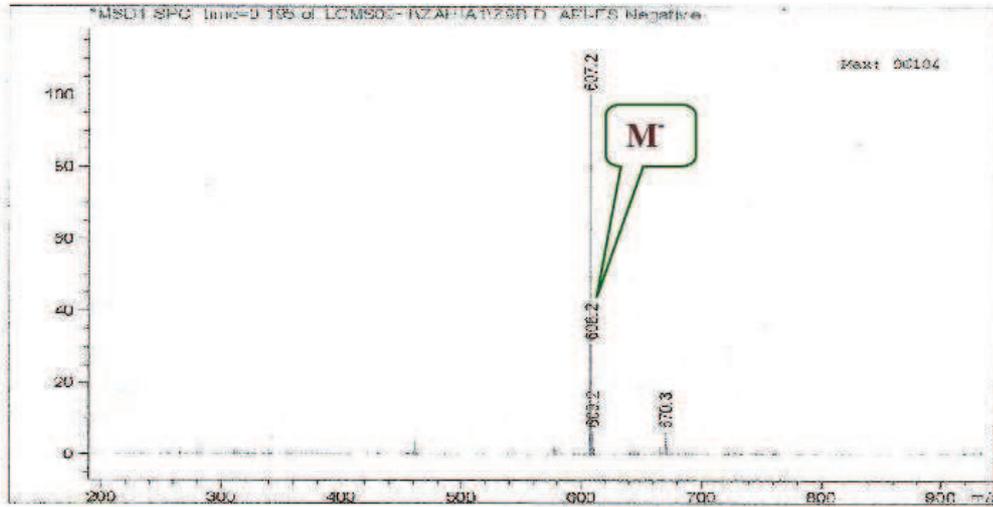
الشكل a₂-1: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب a₂



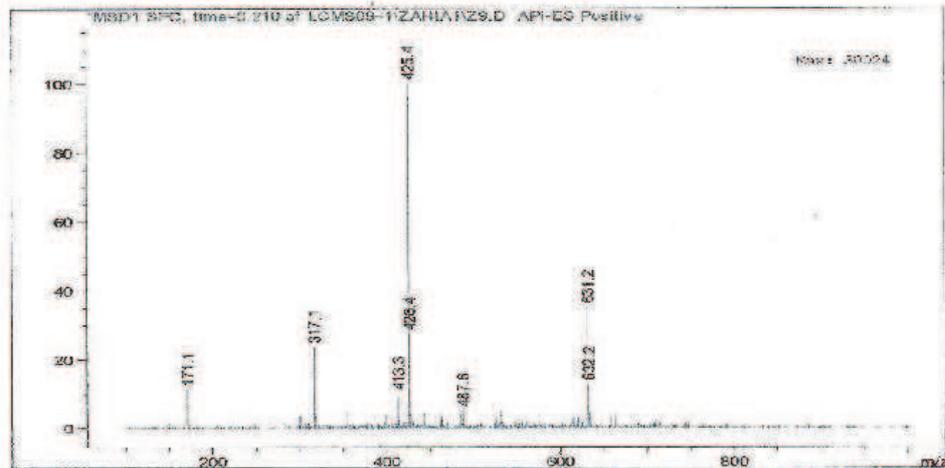
الشكل 2- a₂: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب a₂ مع التكبيرات اللازمة



الشكل 3-a₂: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *Raesy* للمركب a₂



الشكل 4-a₂: طيف الكتلة للمركب a₂ بتقنية API-ES⁻



الشكل 5-a₂: طيف الكتلة للمركب a₂ بتقنية API-ES⁺

التعيين البنوي للمركب R5 = a₃:

أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول a₃-1: الخصائص الكروماتوغرافية للمركب a₃

13:3:3:1	4:3:3	10:1:1	الجملة
0.62	0.29	0.49	ثابت الإنجاس R _f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول a₃-2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (a₃-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	348	267
NaOH	399	269
NaOAc	399	267
NaOAc + H ₃ BO ₃	353	267
AlCl ₃	396 (300 sh)	273 (348 sh)
AlCl ₃ + HCl	397 (300 sh)	275 (347 sh)

2. جدول a₃-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعا للشكل (a₃-2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	8.9	2H	8.11
H-3' , H-5'	d	8.9	2H	6.92
H-8	d	2.1	1H	6.79
H-6	d	2.1	1H	6.50
H-1'''(7-O-Rha)	d	2.0	1H	5.59
H-1''(3-O- Glu)	d	7.5	1H	5.37
CH ₃ (7 -O-Rha)	d	6.0	3H	1.27

III. نتائج الإماهة الحمضية:

1. نوع السكر: rhamnose.

2. نوع الأجليكون: kaempférol و هذا حسب المعطيات:

أ- اللون الإستشعاعي: أصفر

ب- نتائج مطيافية UV :

جدول a₃-4: نتائج مطيافية UV بعد الإماهة الحمضية للمركب a₃

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	375	267
NaOAc	385	275

ثانيا: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب R5 = a₃:

اللون الإستشعاعي البنفسجي للمركب a₃ و قيمة العصابة II في الميثانول المقطرة بـ 348 نم يدلان على أنه فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3، أما سلوكه الكروماتوغرافي فيؤكد على أنه جليكوزيد ثنائي السكر.

إزاحة طيف الميثانول عند إضافة NaOH على مستوى العصابة I بقيمة 51 نم تدل على وجود 4'-OH، عدم تغير قيمة العصابة II عند مقارنة طيف الميثانول بطيف NaOAc دليل على غياب هيدروكسيل حر في الموقع 7، و يؤكد عدم ظهور عصابة جديدة في طيف NaOH، كما نرى غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B من خلال عدم تغير طيف AlCl₃ تقريبا بعد إضافة HCl و كذلك من الإزاحة الباتوكرومية الضعيفة للعصابة I عند مقارنة طيفي الميثانول و NaOAc + H₃BO₃ و عليه فإن الفلافونيد يتميز بحلقة B أحادية الإستبدال مع وجود مستبدلين في الموضعين 7 و 3 إذا رجحنا الفلافونول على الفلافون.

طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون أعطى إشارات بروتونات الحلقة B على شكل مجموعتين ثنائيتين كل واحدة منهما ذات تكامل 2H و ثابتة تزاوج 8.9 هرتز حيث ترن الأولى عند 8.11 ppm و هي موافقة للبروتونين (H-6' , H-2') و الثانية ترن عند 6.92 ppm موافقة للبروتونين (H-3' , H-5')، كما جاءت بروتونات الحلقة A على شكل إشارتين ثنائيتين كذلك و بثابتة تزاوج 2.1 هرتز لكل منهما عند 6.79 و 6.5 ppm موافقتين للبروتونين H-8 و H-6 على الترتيب، و أظهر كذلك طيف ¹H-RMN نوع المستبدلات و المتمثلة في سكرين: الأول rhamnose تميز بظهور إشارة البروتون الأنوميري الذي جاء على شكل ثنائي بثابتة تزاوج 2 هرتز عند 5.59 ppm متبوع بإشارة أخرى ثنائية خاصة بالمثل الموافق له و ترن عند 1.27 ppm بثابتة تزاوج 6.03 هرتز، أما السكر الثاني فهو الـ glucose المميز بالبروتون الأنوميري ذو الإشارة الثنائية بثابتة تزاوج 7.5 هرتز ترن عند 5.37 ppm.

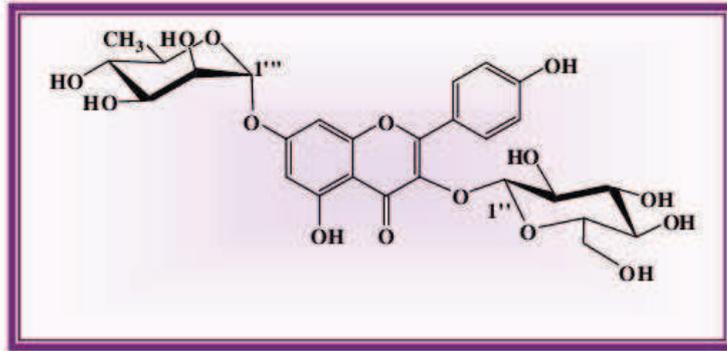
نتائج الإمارة الحمضية أكدت طبيعة السكرين rhamnose و glucose ، و كذا الأجليكون الذي جاء بلون أصفر و سجل طيف في الميثانول قدرت قيمة العصابة I فيه بـ 375 نم دليل على تحرر سكر من الموقع 3، و نستدل على أن الموقع 7 كان مستبدل من الإزاحة الباتوكرومية المقطرة بـ 8 نم للعصابة II عند مقارنة طيفي الميثانول و NaOAc الدالة على وجود 7-OH

طيف C^{13} بين إشارة مثيل الـ rhamnose عند 18.4 ppm و إشارة CH_2-O المميزة لـ C-6 لسكر الـ glucose عند 61.2 ppm.

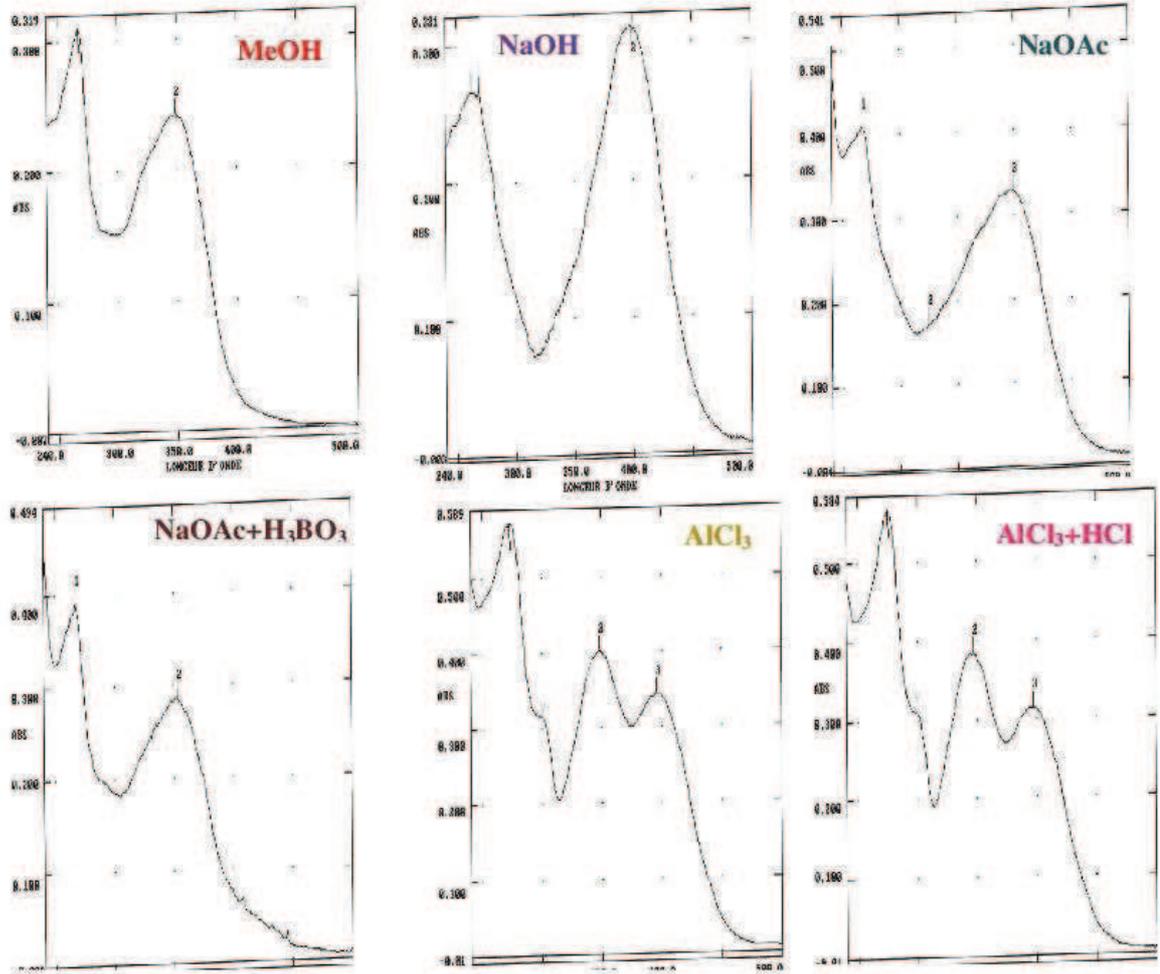
و لأجل تحديد موضع السكرين اعتمدنا على المراجع المكتبية التي تؤكد على أن:

- البروتون الأنوميري للـ glucose ذو الإزاحة 5.37 ppm لا يكون إلا في الموضع 3
- البروتون الأنوميري لسكر الـ rhamnose ذو الإزاحة 5.59 ppm لا يكون إلا في الموضع 7

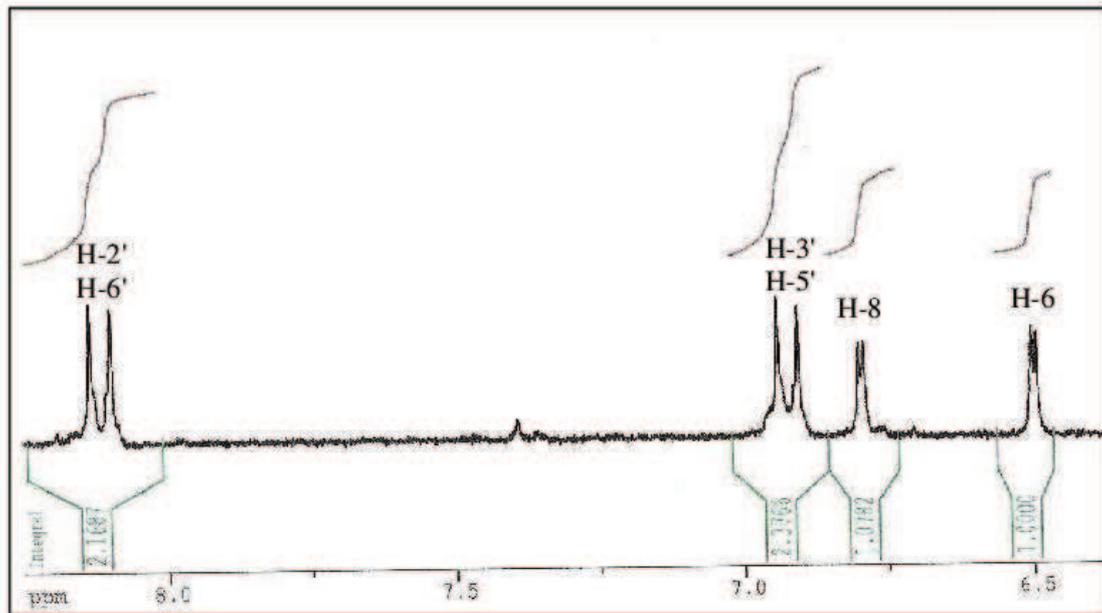
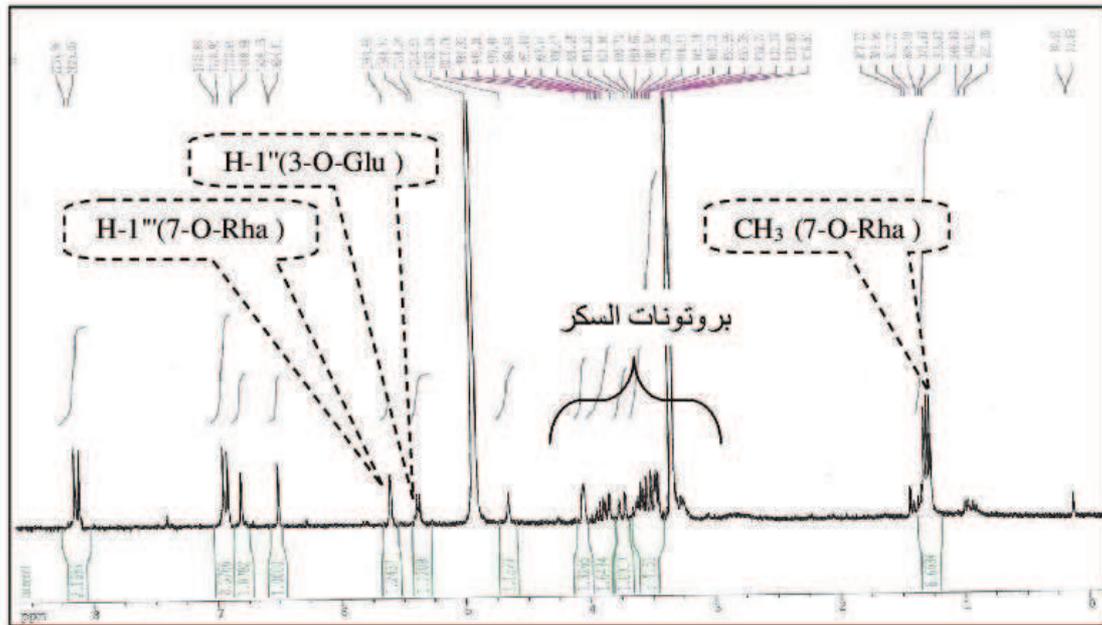
و عليه فالبنية النهائية للمركب هي:



Kaempférol-3-O-β-glucoside-7-O-α-rhamnoside



الشكل a₃-1: سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب a₃



الشكل 2-a₃: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب a₃

التعيين البنوي للمركب R = a₄:

أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول a₄-1: الخصائص الكروماتوغرافية للمركب a₄

13:3:3:1	4:3:3	10:1:1	الجملة
0.63	0.33	0.47	ثابت الإنحباس R _f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول a₄-2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعاً للشكل (a₄-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	355	255 (266 sh)
NaOH	410	264
NaOAc	412	265
NaOAc + H ₃ BO ₃	356	257
AlCl ₃	403 (365 sh)	270
AlCl ₃ + HCl	401 (355 sh)	270

2. جدول a₄-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعا للشكل (a₄-2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2'	d	2.0	1H	7.98
H-6'	dd	8.5 , 2.0	1H	7.65
H-5'	d	8.5	1H	6.94
H-8	d	2.1	1H	6.79
H-6	d	2.1	1H	6.49
H-1''(7-O-Rha)	d	2.0	1H	5.60
H-1'''(3-O-Glu)	d	7.6	1H	5.51
CH ₃ (7-O-Rha)	d	6.0	3H	1.27
O-CH ₃	s	-	3H	3.97

III. نتائج الإماهة الحمضية:

1. نوع السكر: glucose + rhamnose.

2. نوع الأجليكون: Isorhamnétine و هذا حسب المعطيات:

أ- اللون الإستشعاعي: أصفر

ب- نتائج مطيافية UV :

جدول a₄-4: نتائج مطيافية UV بعد الإماهة الحمضية للمركب a₄

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	369	254
NaOAc	397	273

ثانياً: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب a₄ :

هجرة المركب a₄ في النظام المائي بنسبة 63% تدل على أنه جليكوزيد ثنائي السكر، لونه البنفسجي و قيمة العصابة I في الميثانول المقطرة بـ 355 نم تؤكد على أنه فلافونول مستبدل في الموقع 3، ظهور إنثناء عند 266 نم بجانب العصابة II يدل على أن الحلقة B ثنائية الإستبدال، الإزاحة الباثوكرومية عند إضافة NaOH قدرت بـ 55 نم مع زيادة في شدة الإمتصاص دليل وجود 4'-OH، غياب عصابة جديدة مع هذا المفاعل في المجال (220-235 نم) تدل على عدم وجود OH حر في الموقع 7، إذ يلاحظ العكس عند مقارنة طيف الميثانول بطيف NaOAc و الإزاحة الباثوكرومية على مستوى العصابة II التي قدرت بـ 10 نم و التي تدل على وجود هيدروكسيل حر في الموقع 7. و نستدل على غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على مستوى الحلقة B من ثبات العصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيف NaOAc بعد إضافة حمض البوريك، و يثمن هذه النتيجة عدم تغيير طيف AlCl₃ تقريباً عند إضافة HCl، وجود 5-OH نلاحظه من الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I المقطرة بـ 46 نم عند مقارنة طيف الميثانول بطيف HCl + AlCl₃، كل هذه المعطيات تقودنا إلى بنية الفلافونول ثنائي الإستبدال في الموقعين 3 و 3' أو ثلاثي الإستبدال في المواقع 3 و 3' و 7.

طيف ¹H-RMN أظهر بروتوني الحلقة A (H-6 و H-8) على شكل ثنائي بثابتة تزواج 2.1 هرتز لكل منهما حيث ترن الأولي عند 6.79 ppm و الثانية عند 6.49 ppm على التوالي، بروتونات الحلقة B جاءت على شكل ثلاث إشارات بتكامل 1H لكل واحدة، حيث ظهرت الأولى على شكل ثنائي بثابتة تزواج موافقة لتزواج من نوع *Meta* بقيمة 2 هرتز و هي موافقة للبروتون H-2' ترن عند 7.98 ppm، الإشارة الثانية موافقة للبروتون H-6' أين ظهرت على شكل ثنائي ثنائي بثابتة تزواج (8.5-2 هرتز) ترن عند 7.65 ppm، أما البروتون H-5' ظهر على شكل ثنائي بثابتة تزواج من نوع *Ortho* قدرت بـ 8.5 هرتز ترن عند 6.94 ppm، و يبين أيضاً طيف ¹H-RMN إشارة أحادية بتكامل 3H ترن عند 3.97 ppm موافقة لمجموعة ميثوكسي، كما أكد هذا الطيف أن المركب a₄ يحتوي على سكرين و هذا من خلال وجود إشارات سكر الـ rhamnose المميزة له و المتمثلة في البروتون الأنوميري و المثل المرافق له، و إشارة سكر الـ glucose المميزة بالبروتون الأنوميري الخاص به.

الإماهة الحمضية حررت سكري الـ rhamnose و الـ glucose و أعطت أجليكون موافق

لبنية Isoramnéline.

بقي لنا أن نؤكد ما إذا كان السكرين موزعين على الموقعين 3 و 7 أو على الموقع 3 فقط إذا اعتبرنا أن الموقع 7 حر (كما بين طيف UV في وجود NaOAc). و لكي نفصل في الأمر لجأنا إلى تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد.

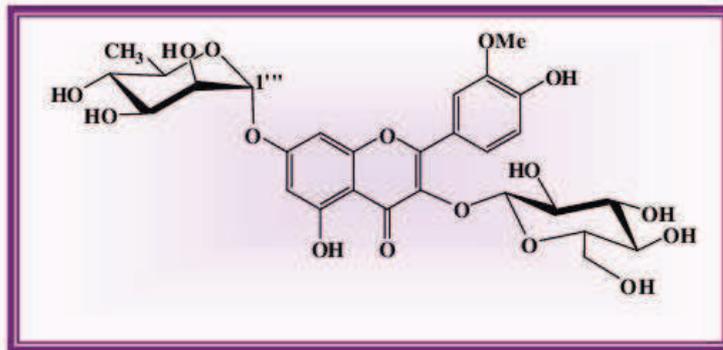
1. تقنية ROESY (H¹-H¹) (الشكل 3- a₄): بين طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بتقنية ROESY:

بقعة تعالق كبيرة بين البروتون H-2' و O-Me ليؤكد على أن الميثوكسي مرتبط بالموضع H-3'، كما أعطى البروتون H-2' بقع تعالق مع بعض بروتونات الـ glucose بما فيها بروتونه الأنوميري ليبين أن هذا الأخير مرتبط بالموضع 3. بقع تعالق متفاوتة بين بروتونات الحلقة A و بروتونات سكر الـ rhamnose أهمها البقعة الكبيرة التي ظهرت بين هذين البروتونين و البروتون الأنوميري للـ rhamnose مما يدل على أنه مرتبط بالموقع 7.

2. تقنية HMQC و HMBC (الشكل 5.6، 7- a₄): من خلال طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بتقنية HMQC تم رفق أهم البروتونات بالكربونات الموافقة لها، و من خلال طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بتقنية HMBC تم رفق هذه البروتونات بالكربونات المجاورة لها، و على ضوء هذه المعطيات تمكنا من تحديد بنية المركب بدقة و هذا من خلال: ظهور بقعة تعالق بين البروتون الأنوميري لسكر الـ rhamnose H-1" و الكربون C-7 ذو الإزاحة 162.0 ppm ليؤكد على ارتباط الـ rhamnose بالموضع 7. ظهور بقعة تعالق بين البروتون الأنوميري للـ glucose H-1" و الكربون C-3 ذو الإزاحة 133.7 ppm ليؤكد على أن سكر الـ glucose مرتبط بالموضع 3.

و جدول 5- a₄ يبين بقية التعالقات حسب طيف HMBC

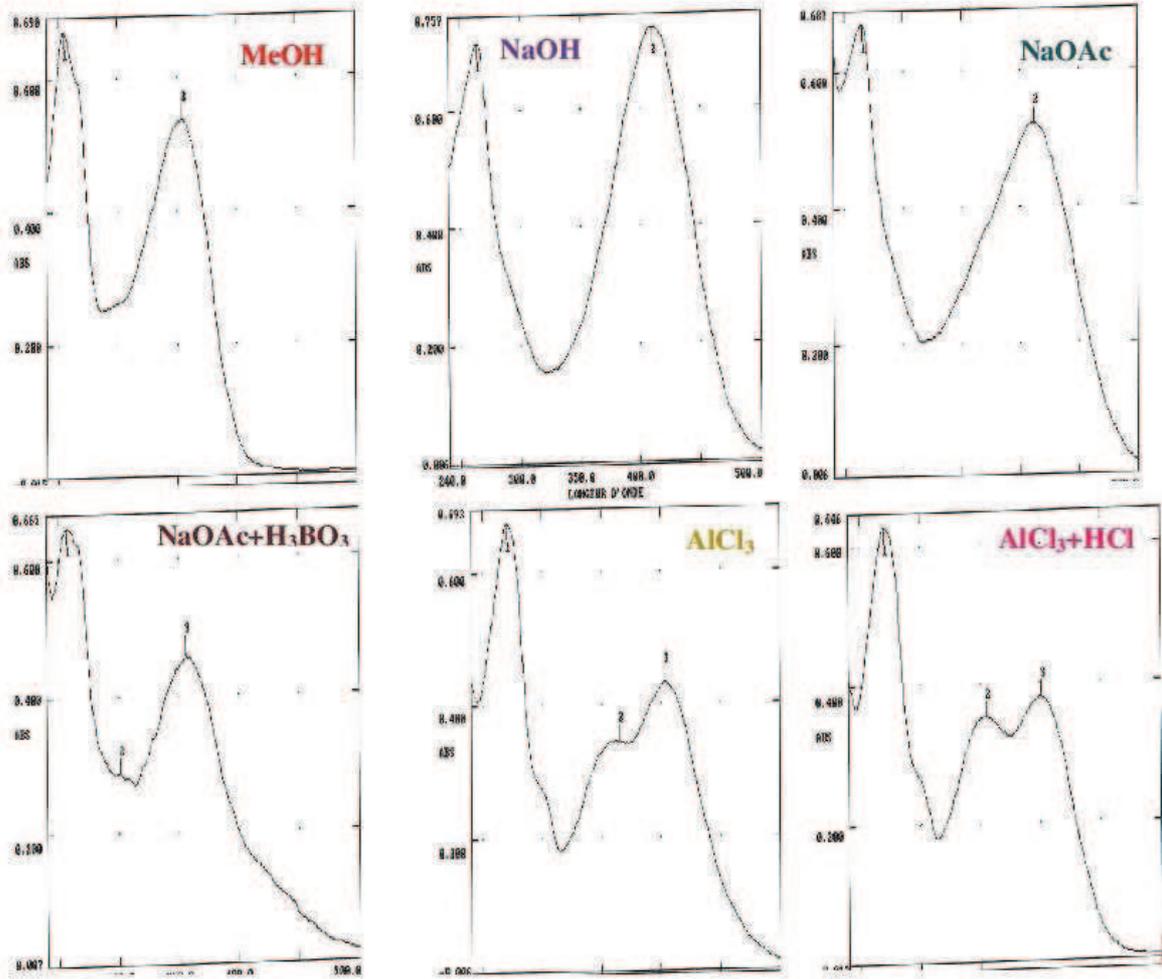
و عليه فالبنية النهائية للمركب a₄ هي:



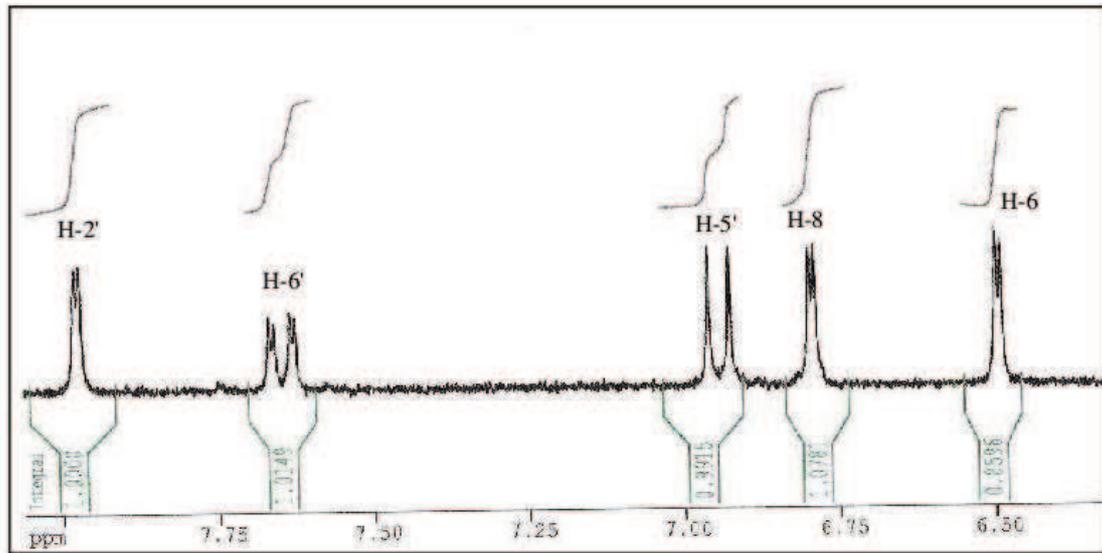
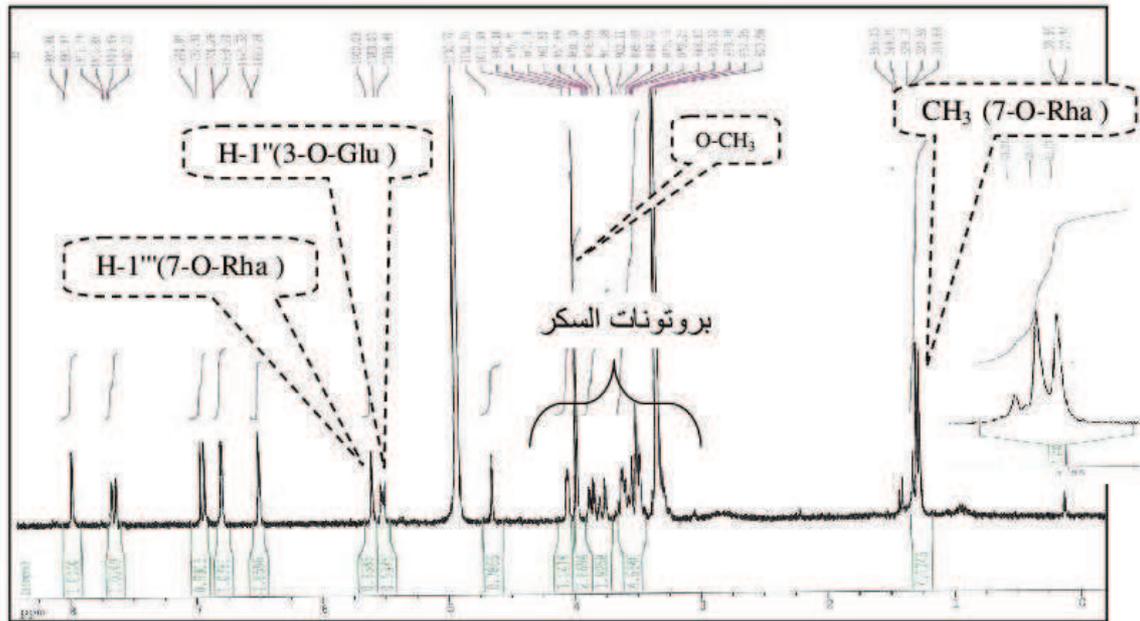
Isoramnetin-3-O-β-glucoside-7-O-α-rhamnoside

جدول 5-a₄: يبين نتائج الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد موضحا أهم العلاقات بروتون-كربون:

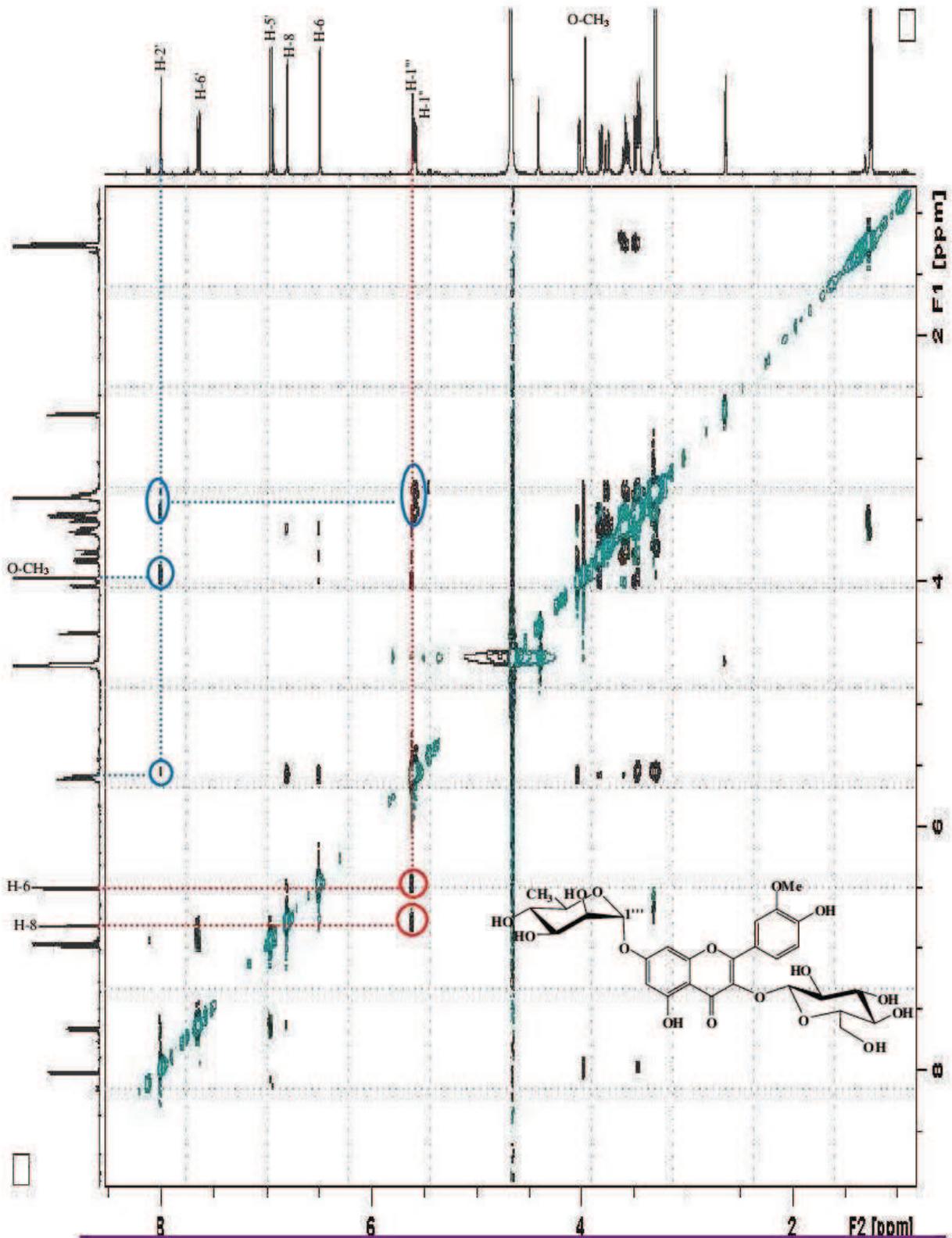
البروتون	δ (ppm)	قيم C ¹³ اعتمادا على طيف HMQC	مختلف تعالقات البروتونات و الكربونات المجاورة لها حسب طيف HMBC
H-2'	7.98	113.9	C-6', C-4' (150.1), C-3' (147.4), C-2 (157.2), C-1'(121.4)
H-6'	7.65	122.7	C-2', C-4' (150.1), C-3' (147.4), C-2 (157.2)
H-5'	6.94	115	C-1'(121.4), C-4' (150.1), C-3' (147.4), C-2 (157.2)
H-8	6.79	95.0	C-6, C-4 (178.0), C-7 (162.0), C-9(156.4), C-10(106.1)
H-6	6.49	99.8	C-8, C-4 (178.0), C-7 (162.0), C-5(161.3), C-10(106.1)
H-1'''(7-O-Rha)	5.60	98.8	C-7 (162.0)
H-1'' (3-O-Glu)	5.51	101.2	C-3 (133,7)
CH ₃ (7-O-Rha)	1.27	18.4	-
O-Me	3.97	56.1	C-3' (147.4)



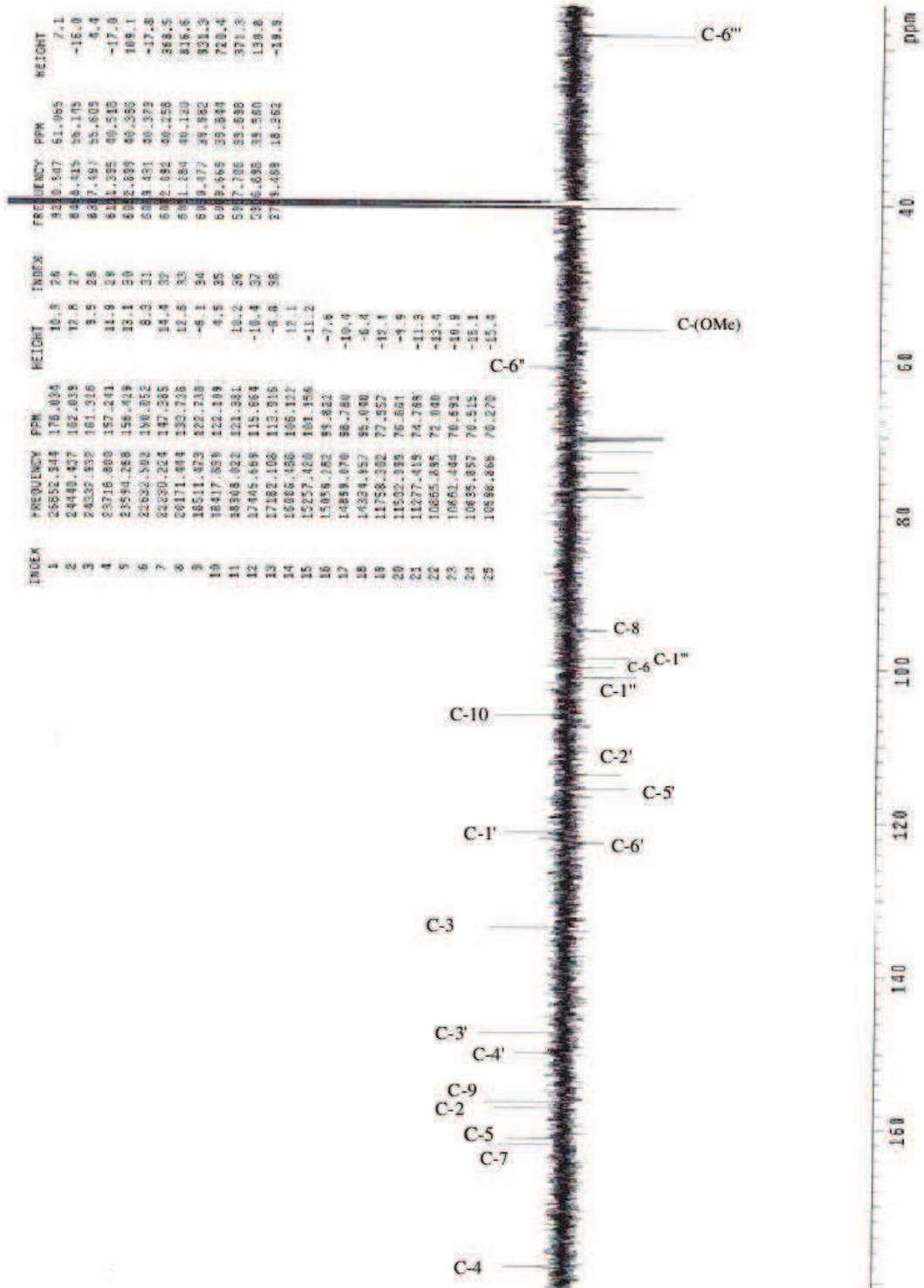
الشكل a₄-1: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب a₄



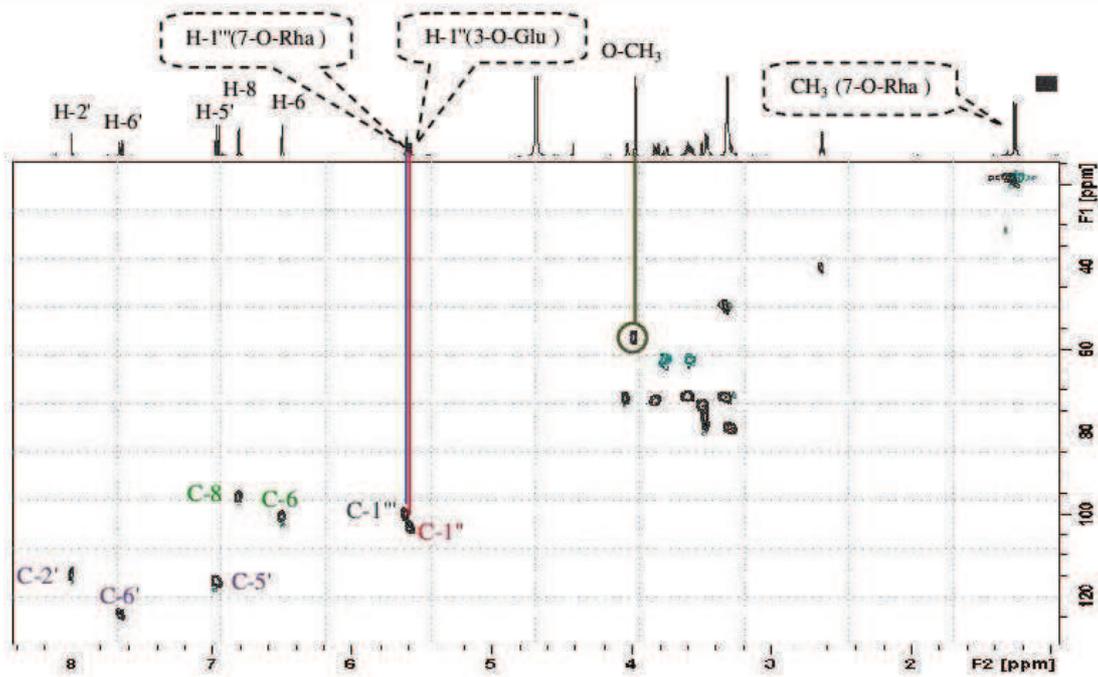
الشكل 2-a4: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب a4



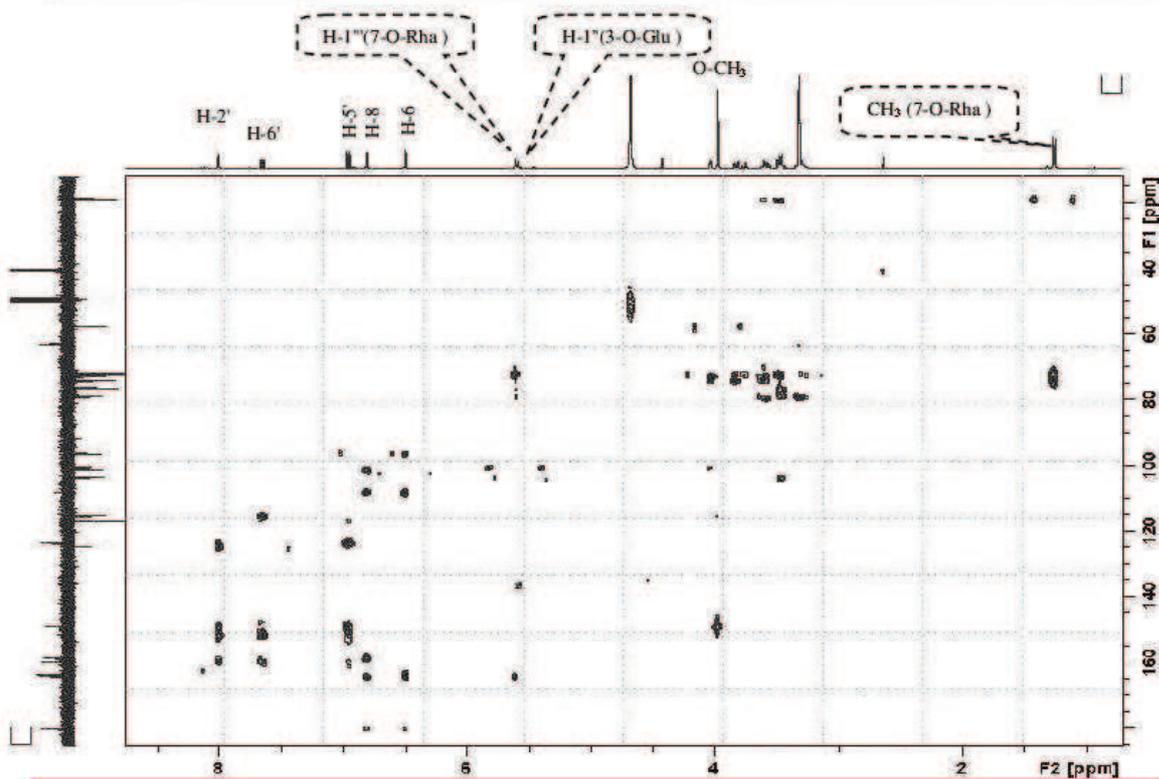
الشكل 3- a₄: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *Raesy* للمركب a₄



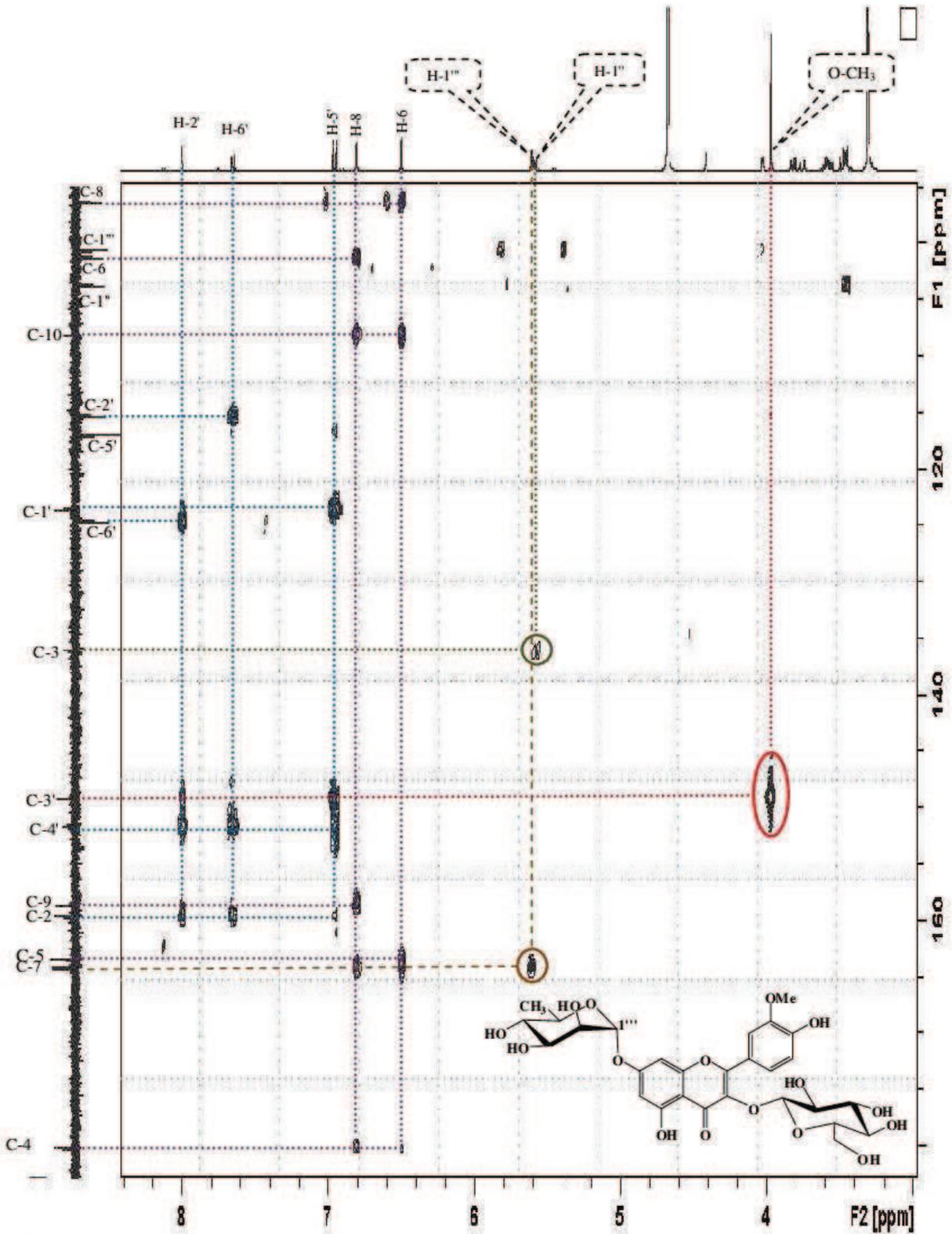
الشكل 4- a₄: طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب a₄ بتقنية J- made



الشكل 5-a₄: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *HMQC* للمركب a₄



الشكل 6-a₄: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *HMBC* للمركب a₄



الشكل a4-7: تكبير طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *HMBN* للمركب **a4**

التعيين البنوي للمركب R40 = a₅:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول a₅-1: الخصائص الكروماتوغرافية للمركب a₅

13:3:3:1	4:3:3	10:1:1	الجملة
0.78	0.39	0.28	ثابت الإتحباس R _f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول a₅-2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (a₅-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	342	266
NaOH	387	266
NaOAc	378	266
NaOAc + H ₃ BO ₃	345	266
AlCl ₃	398 (346 sh)	275 (301 sh)
AlCl ₃ + HCl	396 (339 sh)	276 (302 sh)

2. جدول a₅-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعا للشكل (a₅-2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	8.8	2H	7.77
H-3' , H-5'	d	8.8	2H	6.95
H-8	d	2.1	1H	6.69
H-6	d	2.1	1H	6.43
H-1 ^{'''} (7-O-Rha)	d	1.6	1H	5.58
H-1 ^{''} (3-O-Rha)	d	1.6	1H	5.46
H-1 ['] (3-O-Xylose)	d	7.4	1H	4.33
CH ₃ (7-O-Rha)	d	6.1	1H	1.29
CH ₃ (3-O-Rha)	d	6.6	3H	1.03

III. نتائج الإماهة الحمضية:

نوع الأجليكون: kaempférol و هذا حسب المعطيات:

أ- اللون الإستشعاعي: أصفر

ب- نتائج مطيافية UV :

جدول a₅-4: نتائج مطيافية UV بعد الإماهة الحمضية للمركب a₅

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	367	268
NaOAc	390	275

ثانيا: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب R40 = a₅:

قيمة R_f للمركب a₅ في النظام المائي (1 : 3 : 3 : 13) وصلت إلى 78%، تدل على أنه يحتوي على أكثر من سكرين. قيمة العصابة I في الميثانول المقطرة بـ 342 نم و لونه الإستشعاعي البنفسجي يدل على أنه فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3، عند إضافة NaOH إنزاحت العصابة I بقيمة 45 نم دليل وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4، عدم ظهور عصابة جديدة مع هذا المفاعل و كذا ثبوت قيمة العصابة II عند مقارنة طيف NaOAc بطيف الميثانول تدل على أن الموقع 7 مستبدل، عدم تغيير طيف AlCl₃ عند إضافة HCl خاصة على مستوى العصابة I يعني غياب نظام أرثو ثنائي الهيدروكسيل على مستوى الحلقة B، و تؤكد هذه المعلومة الإزاحة الباثوكرومية الضعيفة للعصابة I عند مقارنة طيفي MeOH و NaOAc + H₃BO₃، أما الإزاحة الباثوكرومية لطيف HCl + AlCl₃ على مستوى العصابة I مقارنة بطيف الميثانول و المقطرة بـ 54 نم فتدل على وجود هيدروكسيل حر في الموقع 5، و عليه و حسب كل هذه المعطيات فالبنية الأولية المقترحة للمركب a₅ هي kaempférol مستبدل في الموقعين 7 و 3. إذ اعتبرنا أن المركب فلافونول، أو apigénine مستبدل في الموقع 7 إذا أخذنا بالإقتراح الثاني أي أن المركب فلافون.

طيف ¹H-RMN يبين غياب H-3 الخاصة بالفلافون ليؤكد أن صيغة الجزء الأجليكوني عبارة عن فلافونول مستبدل في الموضع 3 يندرج تحت هيكل الـ kaempférol و هذا من خلال ظهور إشارات الحلقة B و A حيث الأولى جاءت بشكل مجموعتين ثنائيتين على شكل ثنائي بتكامل 2H و بثابتة تزاوج 8.8 هرتز لكل منهما، إذ ترن الأولى و الخاصة بالزوج (H-2', H-6') عند 7.77 ppm و الثانية الخاصة بالزوج (H-3', H-5') ترن عند 6.95 ppm، أما بروتوني الحلقة A (H-6 و H-8) فقد ظهرا على شكل إشارتين ثنائيتين بتكامل 1H و بثابتة تزاوج 2.1 هرتز لكل إشارة عند 6.69 ppm و 6.43 ppm على التوالي. أظهر هذا الطيف أيضا وجود سكرين من نوع الـ rhamnose و هذا بظهور إشارة البروتون الأنوميري الأول المرتبط بالموقع 7 بثابتة تزاوج 1.6 هرتز وإزاحة تقدر بـ 5.58 ppm مرفوق بإشارة ثنائية أخرى بثابتة تزاوج 6.1 هرتز ترن عند 1.29 ppm خاصة بالمثيل الموافق له، أما إشارة البروتون الأنوميري للـ rhamnose الثاني و المتواجد في الموقع 3 ظهرت عند 5.46 ppm بثابتة تزاوج 1.6 هرتز و المثل المرافق له بثابتة عند 1.03 ppm بثابتة تزاوج 6.6 هرتز. كما أظهر طيف ¹H-RMN إشارة ثنائية بتكامل 1H و ثابتة تزاوج 7.4 هرتز مميزة للبروتون الأنوميري لسكر ثالث (حسب هذه القيمة قد يكون هذا السكر β-galactose أو β-glucose أو

α -arabinose أو β -xylose) ترن هذه الإشارة عند 4.33 ppm، قيمة هذه الإزاحة الكيمائية تتل على أنه غير مرتبط مباشرة بالأجليكون إذ أن هذه القيمة مميزة لسكر نهائي. أما بقية بروتونات السكريات الثلاثة فجاءت محصورة في المجال بين (3-4.3 ppm).

طيف للكتلة بتقنية ES (الشكل 5-5) لهذا المركب أعطى قمة جزيئية قيمتها 710 موافقة للصيغة المجملية $C_{32}H_{38}O_{18}$ والتي تؤكد وجود سكري الـ rhamnose و هيكل الـ kaempférol. أما عن السكر الثالث فيتبين من خلال هذا الطيف أنه يتكون من خمسة كربونات، و بالتالي يمكن إستبعاد سكري الـ glucose و الـ galactose و يبقى التنافس بين سكري الـ xylose و الـ arabinose. أظهر نفس الطيف قمة قاعدية ذات قيمة $m/z = 709$ الموافقة للشظية $[M-H]$.

في غياب بعض الشواهد السكرية خاصة xylose، الإماهة الحمضية أكدت أن السكر الثالث ليس galactose و لا glucose ولا arabinose، إذا بقي احتمال سكر الـ xylose.

طيف C^{13} (الشكل 4، 3-5) بين وجود مجموعتي المثل الخاصة بسكري الـ rhamnose عند 16.71 ppm (CH_3 (7-O-Rha)) و 16.3 ppm (CH_3 (3-O-Rha)) و إشارة عند 65.66 ppm الخاصة بمجموعة $O-CH_2$ المميزة للكربون C-5 لسكر xylose، إضافة إلى ذلك فقد أظهر الطيف مختلف كربونات الهيكل الفلافونيدي و كذا بقية كربونات السكريات الثلاثة.

و لأجل التأكد من كل المعطيات السابقة و تحديد بنية المركب بدقة لجأنا إلى أطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بمختلف تقنياتها:

(1) تقنية (H^1-H^1) COSY: تمكنا من خلالها من توزيع بروتونات المركب و هي موضحة في الشكل (2-5) و الشكل (6-5).

(2) تقنية (H^1-H^1) ROESY (الشكل (7-5)): مكنتنا هذه التقنية من التأكد من أغلب المعلومات السابقة، إذ بين الطيف: بقع تعالق كبيرة و صغيرة بين بروتونات الحلقة A (H-6 و H-8) و بروتونات الـ rhamnose المميز بالبروتون الأنوميري ذو الإزاحة 5.58 ppm ($H-1''$)، مما يؤكد على أنه مرتبط بالكربون 7 للأجليكون.

كما أظهر الطيف تعالقات بين بروتونات الحلقة B و بروتونات الـ rhamnose المميز بالبروتون الأنوميري ذو الإزاحة 5.46 ppm ($H-1''$)، مما يؤكد على أنه فعلا مرتبط بالكربون 3 للأجليكون.

عدم وجود أي بقع تعالق بين الأجليكون و البروتون الأنوميري لسكر xylose ($H-1'''$) يؤكد على أنهما غير مرتبطين مع بعض و إنما يرتبط xylose بالـ rhamnose و تحديدا المتواجد في

الموضع 3، و يتبين هذا من خلال التعالقات التي ظهرت بين البروتون الأنوميري لسكر الـ rhamnose المتواجد في الموضع 3 (H-1'') و بروتونات سكر xylose. ظهور بقعة تعالق عريضة بين البروتون الأنوميري لـ xylose (H-1''') و البروتون الأنوميري للـ rhamnose (H-1'') تدل على أنه قريب منه. و الجدول a₅-4 و الشكل (a₅-7) يوضحان كل التعالقات.

(3) تقنية HMQC و HMBC: من خلال هذين التقنيتين تم رفع أهم البروتونات بالكربونات الموافقة و المجاورة لها (الجدول a₅-4 و الأشكال (a₅-8,9,10))، كما تمكنا من تحديد مكان ارتباط سكر xylose النهائي بالـ rhamnose من خلال التعالقات التالية:

أ. بالنسبة للبروتون الأنوميري للـ rhamnose المرتبط بالموضع 3 (H-1''):

H-1'' (δ= 5.46) يشكل بقعة تعالق مع C-1'' (δ= 101.7) و يظهر هذا من خلال طيف HMQC
H-1'' (δ= 5.46) يشكل بقعة تعالق مع C-3 (δ= 135.6) و C-2'' (δ= 81.2) و يتبين هذا من خلال طيف HMBC

ب. بالنسبة للبروتون الأنوميري لـ xylose (H-1'''):

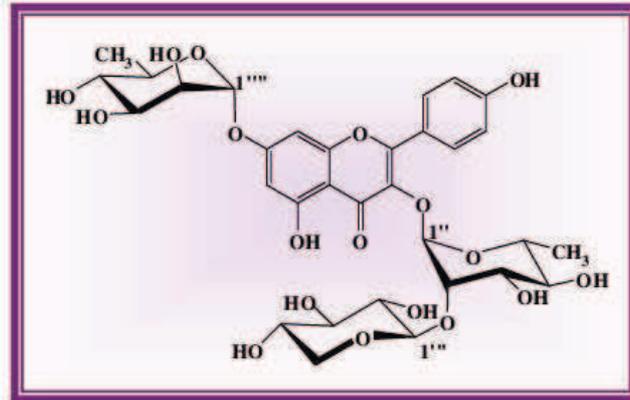
H-1''' (δ= 4.33) يشكل بقعة تعالق مع C-1''' (δ= 106.3) و يظهر هذا من خلال طيف HMQC
كما يشكل H-1''' بقعة تعالق مع C-2'' (δ= 81.2) كما هو موضح في طيف HMBC

ج. بالنسبة للبروتون H-2'':

H-2'' (δ= 4.25) يشكل بقعة تعالق مع C-1''' (δ= 106.3)

كل هذه التعالقات تدل على أن الكربون C-1''' لـ xylose النهائي مرتبط بالكربون C-2'' للـ rhamnose

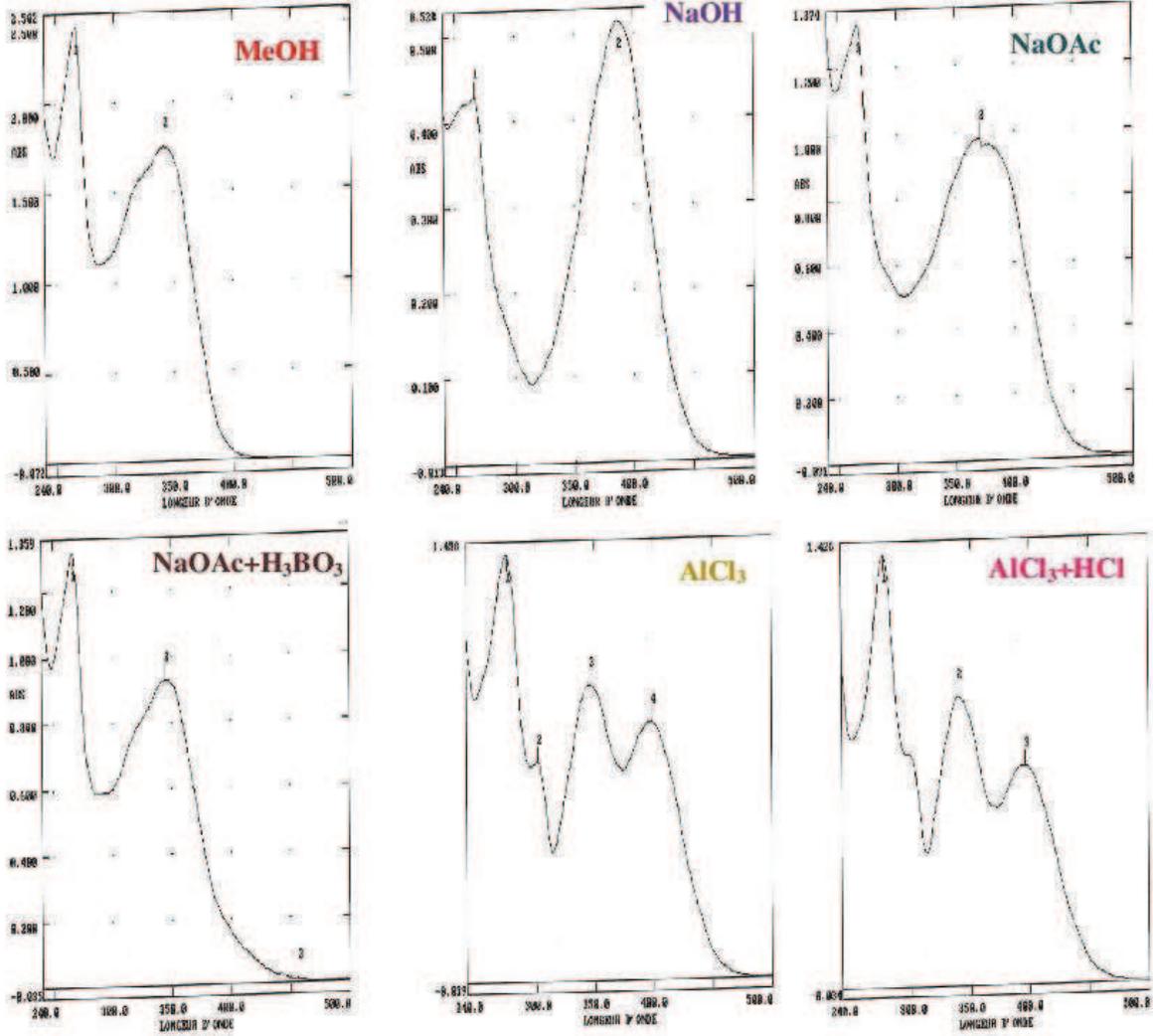
و عليه فالبنية النهائية للمركب a₅ هي:



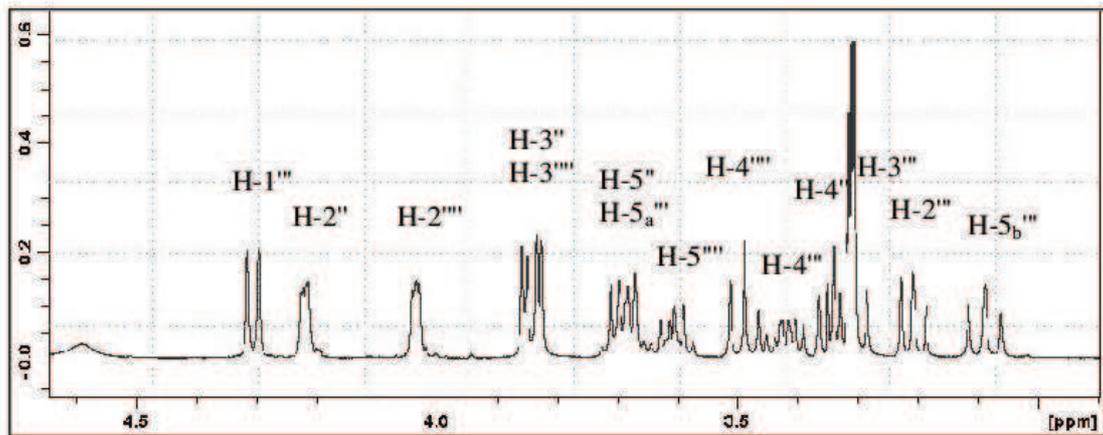
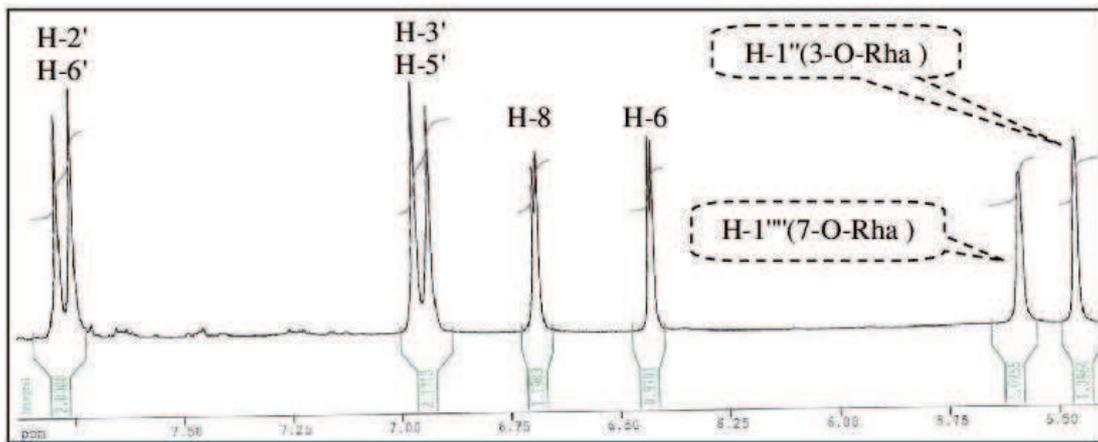
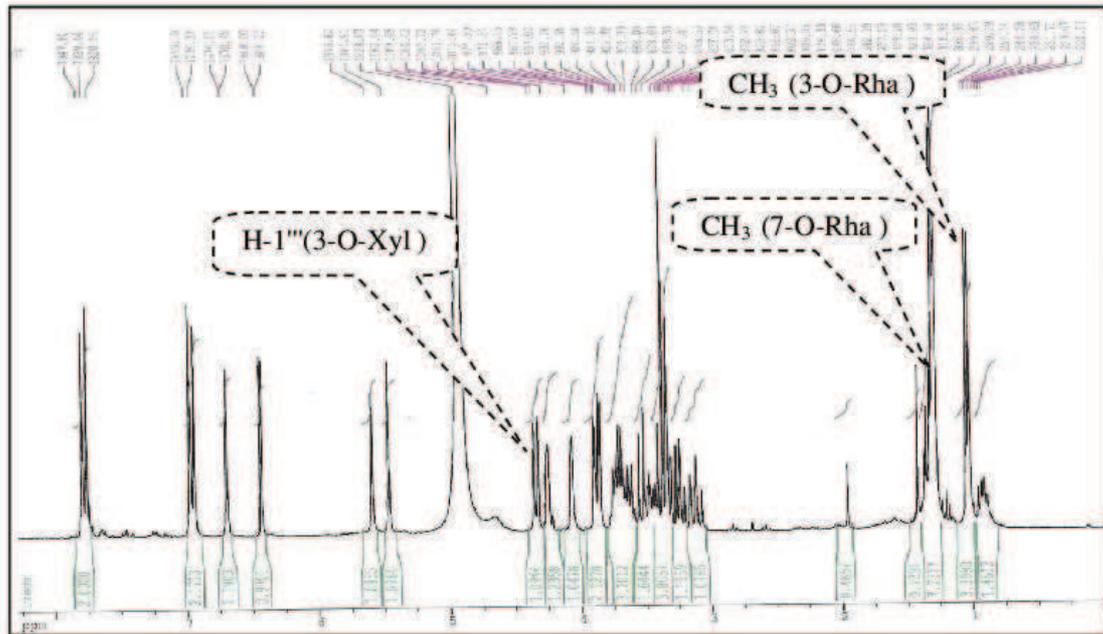
Kaempférol-3-O-β-xylopyranosyl-(1''' → 2'')-O-α-rhamnoside-7-O-α-rhamnoside (Sagittatin A)

جدول (5-a5): يبين نتائج الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد موضحا أهم التفاعلات بروتون-بروتون و بروتون-كربون:

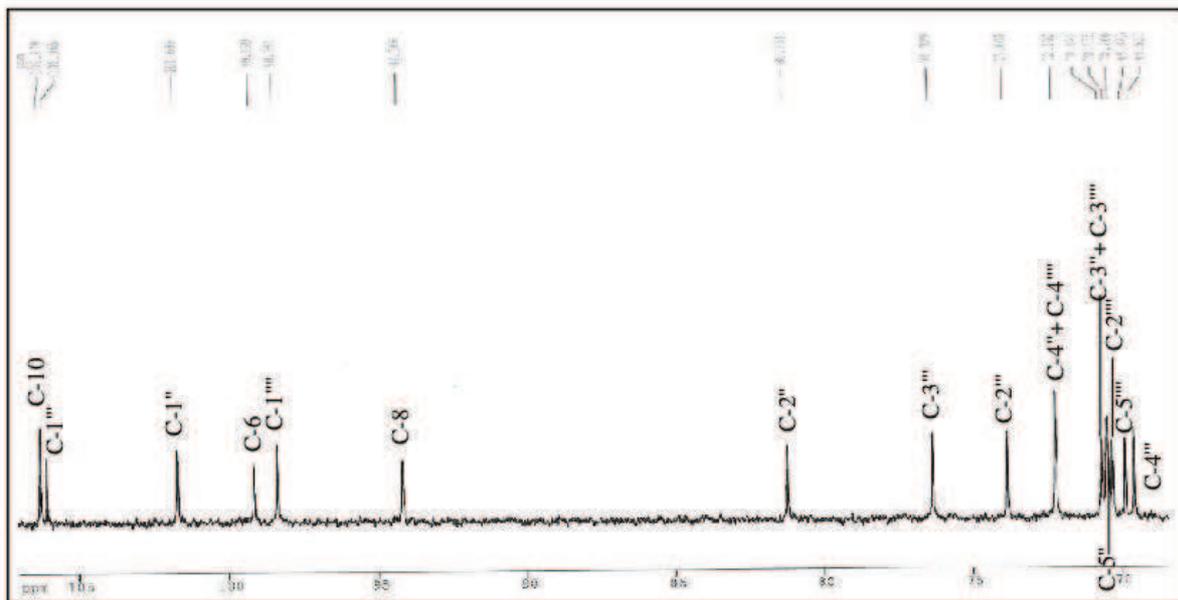
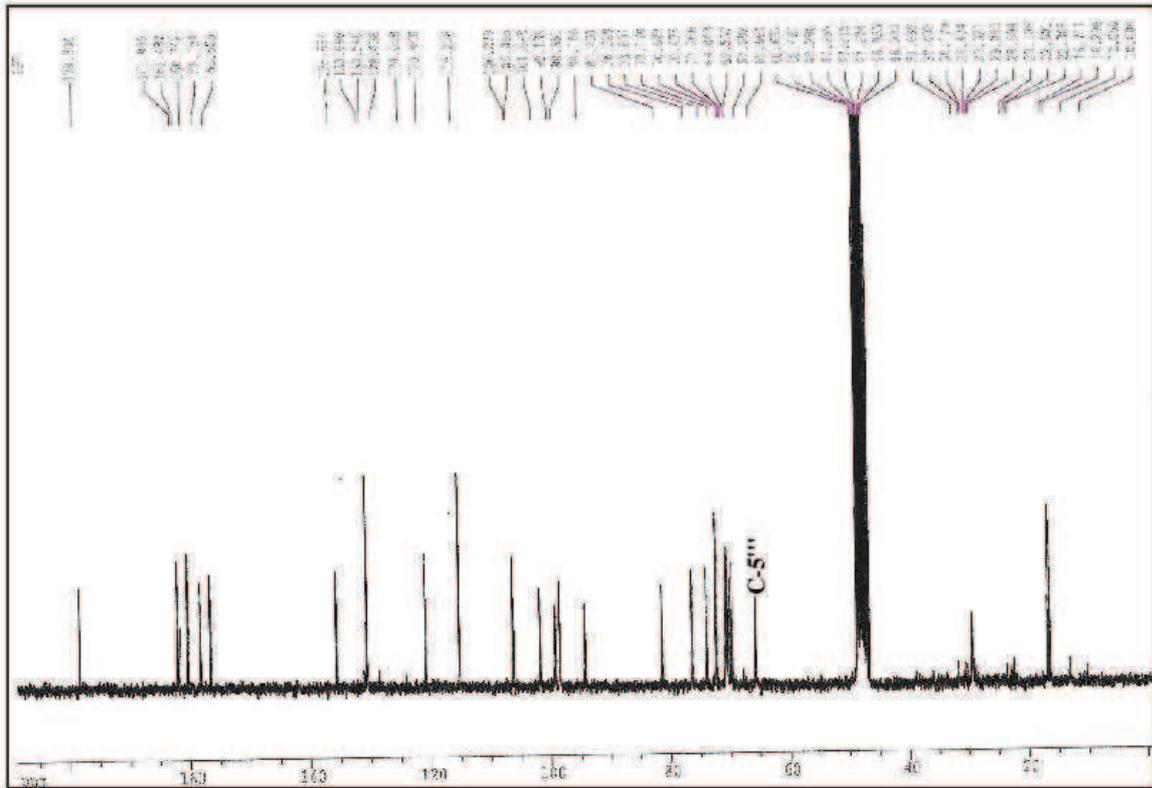
البروتون	δ (ppm)	قيم ^{13}C اعتمادا على طيف HMQC	مختلف تفاعلات البروتونات حسب طيف Roesy	مختلف تفاعلات البروتونات و الكربونات المجاورة لها حسب طيف HMBC
H-2' , H-6'	7.77	130.5	H-1'', H-2'', H-3'', H-5'', (H-3', H-5')	C-2', C-6', C-2 (158.2), C-4' (160.3)
H-3' , H-5'	6.95	115.2	H-1'', H-2'', H-3'', H-5'', (H-2', H-6')	C-3', C-5', C-2 (158.3), C-4' (160.3), C-1' (120.8)
H-8	6.69	94.2	H-1''', H-3''', H-4''', H-5''', H-6'''	C-6, C-4 (178.3), C-7 (162.0), C-9 (156.51) , C-10 (106.1), C-5 (161.49)
H-6	6.43	99.1	H-1''', H-2''', H-3''', H-5''', H-6'''	C-8, C-4 (178.3), C-7 (162.0), C-10 (106.1)
H-1''''(7-O-Rha)	5.58	98.4	H-8, H-6, H-2''', H-3''', H-4''', H-5''', H-6'''	C-7 (162.0)
H-1'' (3-O-Rha)	5.46	101.7	(H-2', H-6'), (H-3', H-5') H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-1''', H-1''', H-2''', H-3''', H-5''', H-5''''	C-3 (135.6), C-2'' (81.2)
H-1''' (3-O-Xyl)	4.33	106.3	H-2''', H-3''', H-4''', H-5''', H-1''	C-2''(81.2)
CH ₃ (7-O-Rha)	1.29	16.7	H-8, H-6, H-1''', H-5''', H-4'''	-
CH ₃ (3-O-Rha)	1.03	16.3	H-1'', H-4'', H-5'',	-
H-2''(7-O-Rha)		81.2	H-1'', H-3'', H-3''', (H-2', H-6'), (H-3', H-5')	C-1'''



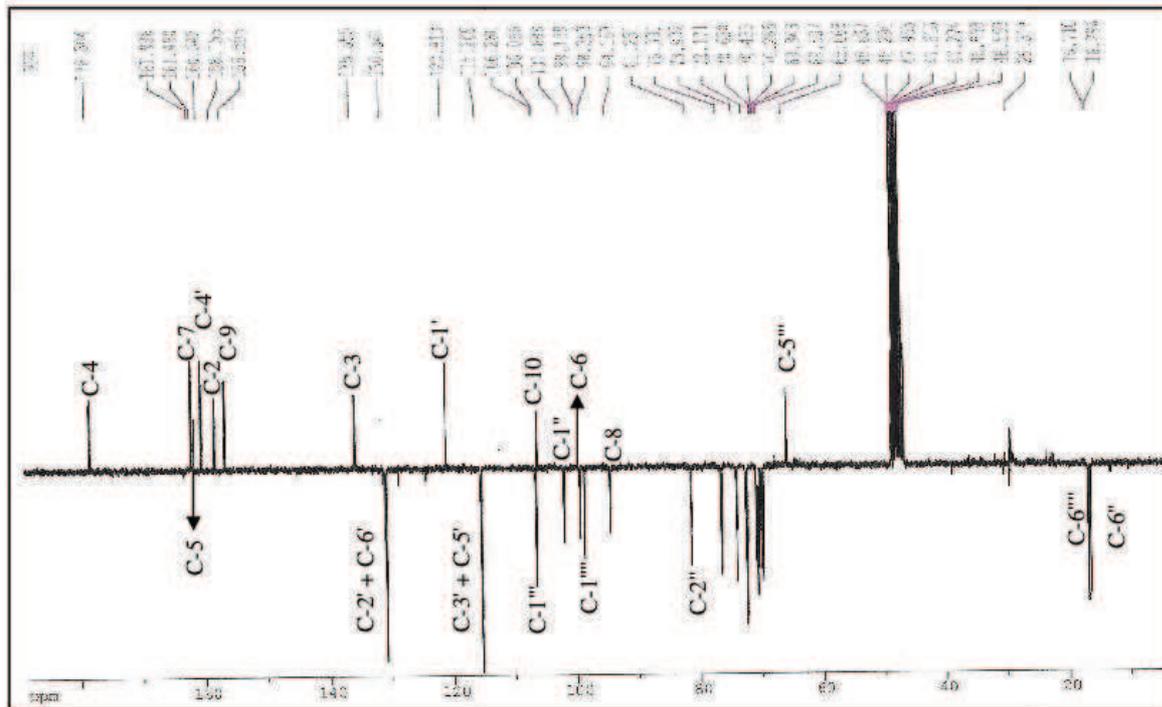
الشكل a5-1: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب a5



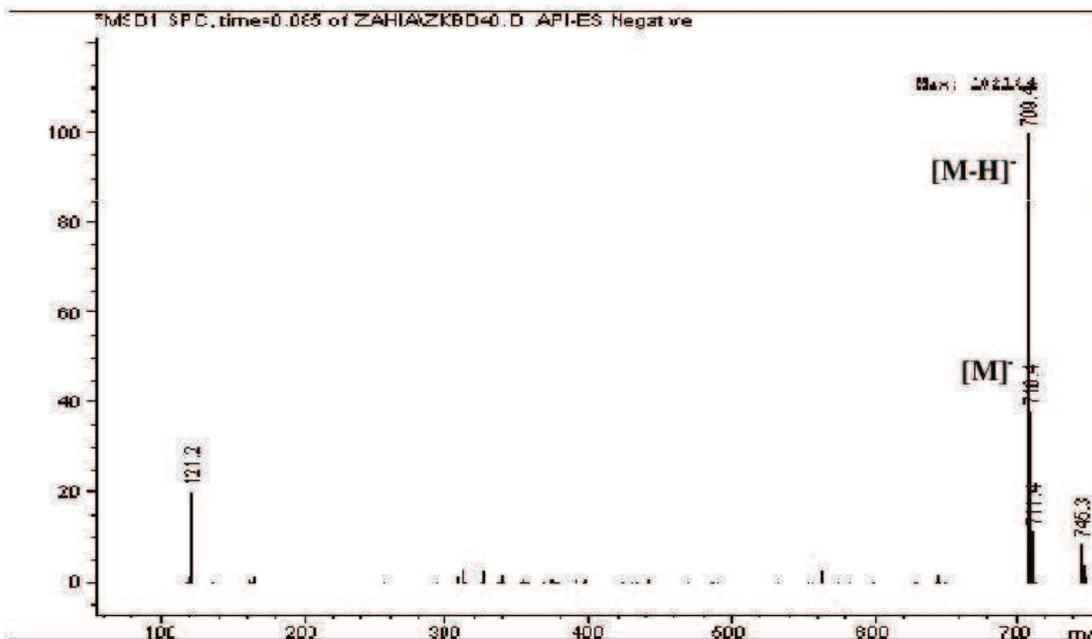
الشكل a₅-2: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب a₅ مع التكبيرات اللازمة



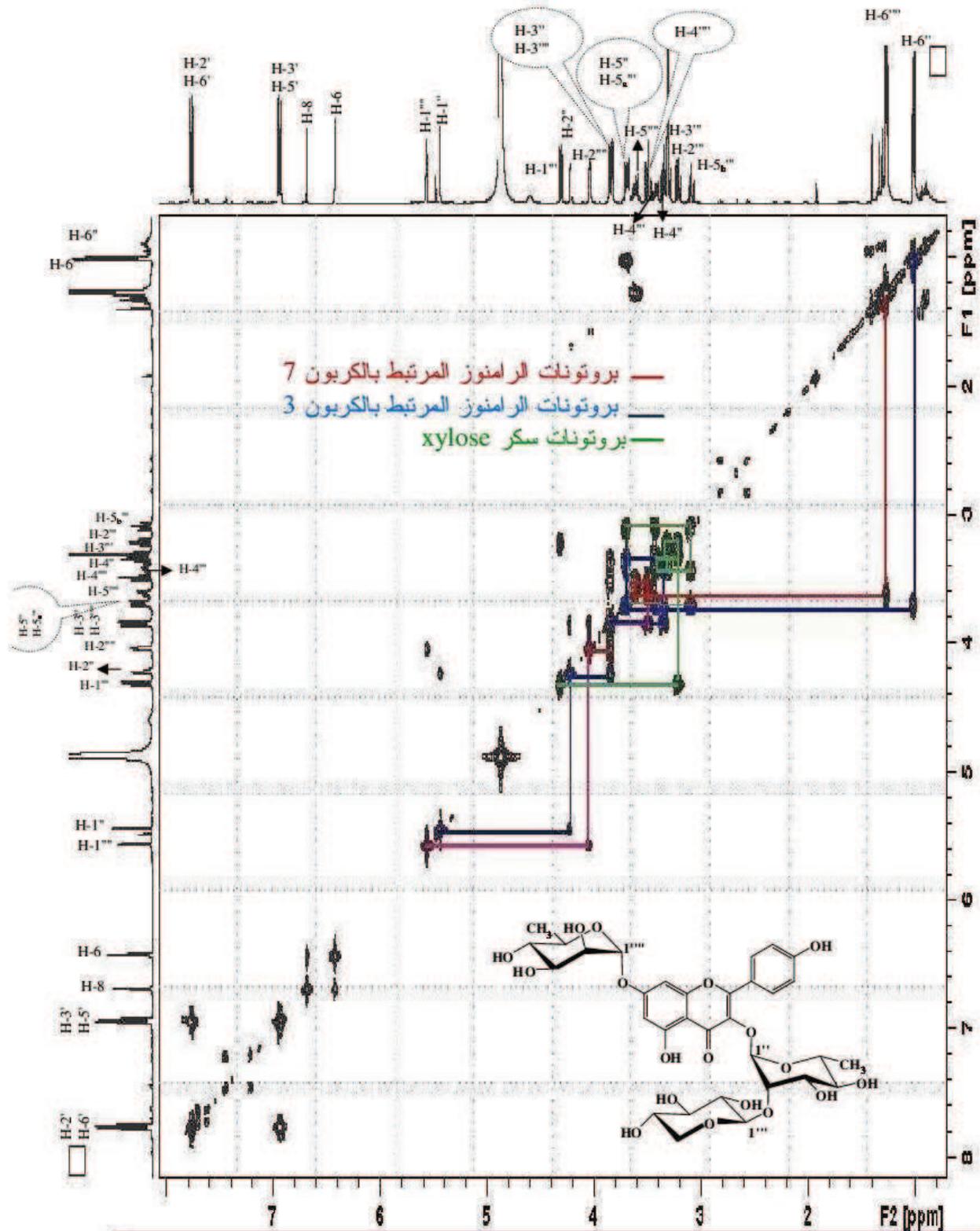
الشكل 3- a₅: طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب a₅ مع التكبيرات



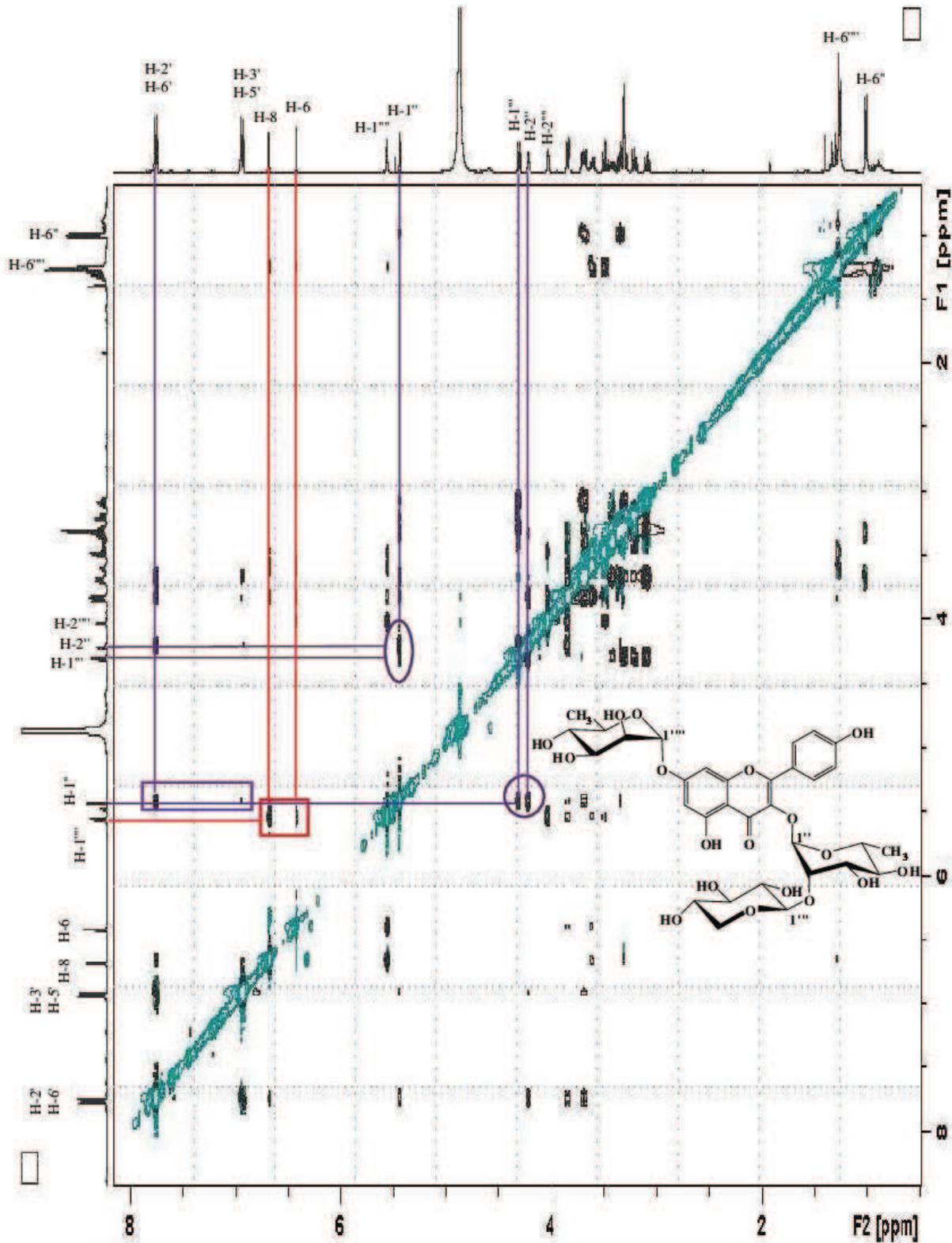
الشكل 4- a₅: طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب a₅ بتقنية *J*-mode



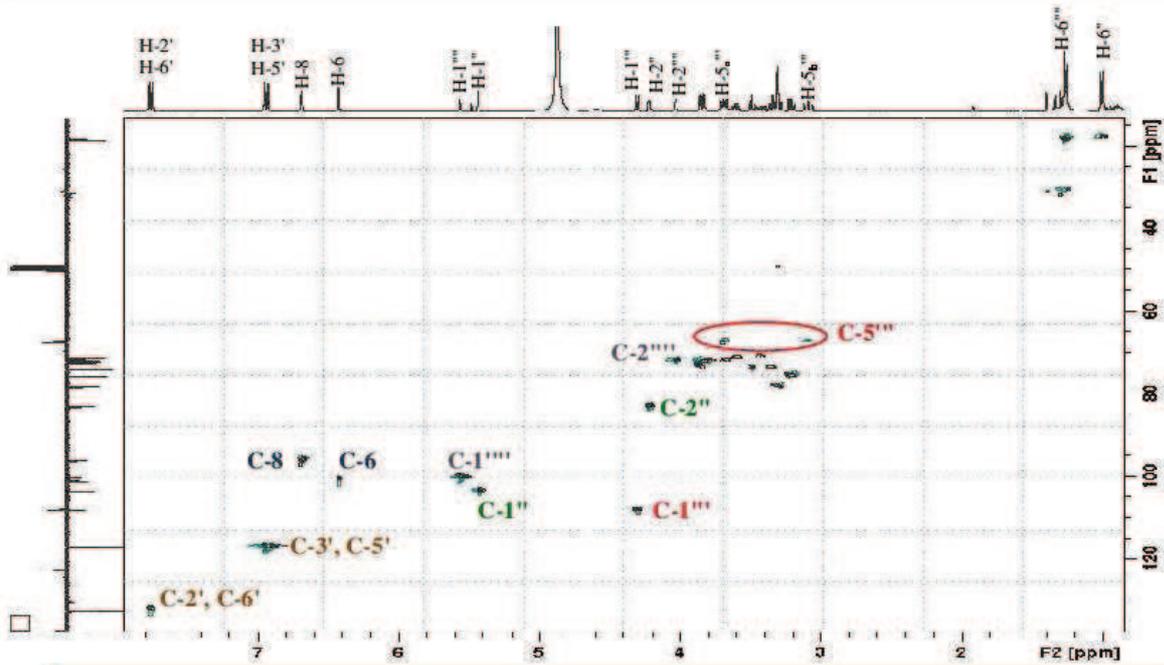
الشكل 5- a₅: طيف الكتلة للمركب a₅ بتقنية API-ES



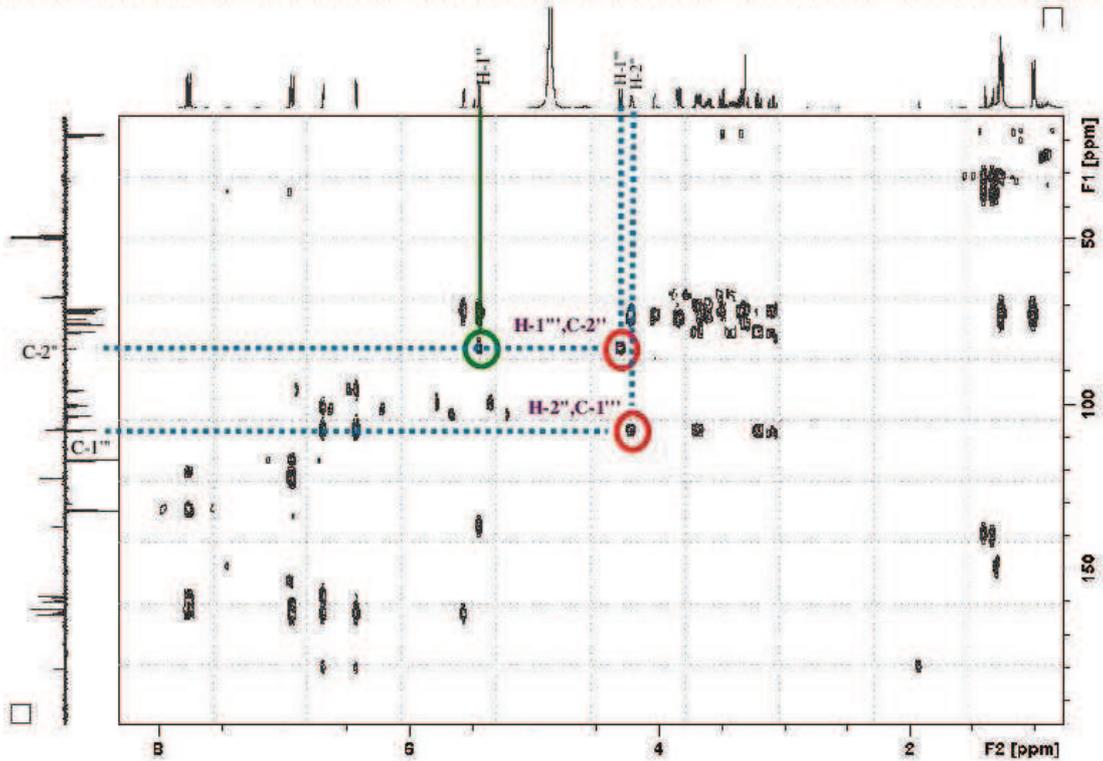
الشكل 6-a₅: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *Easy* للمركب a₅



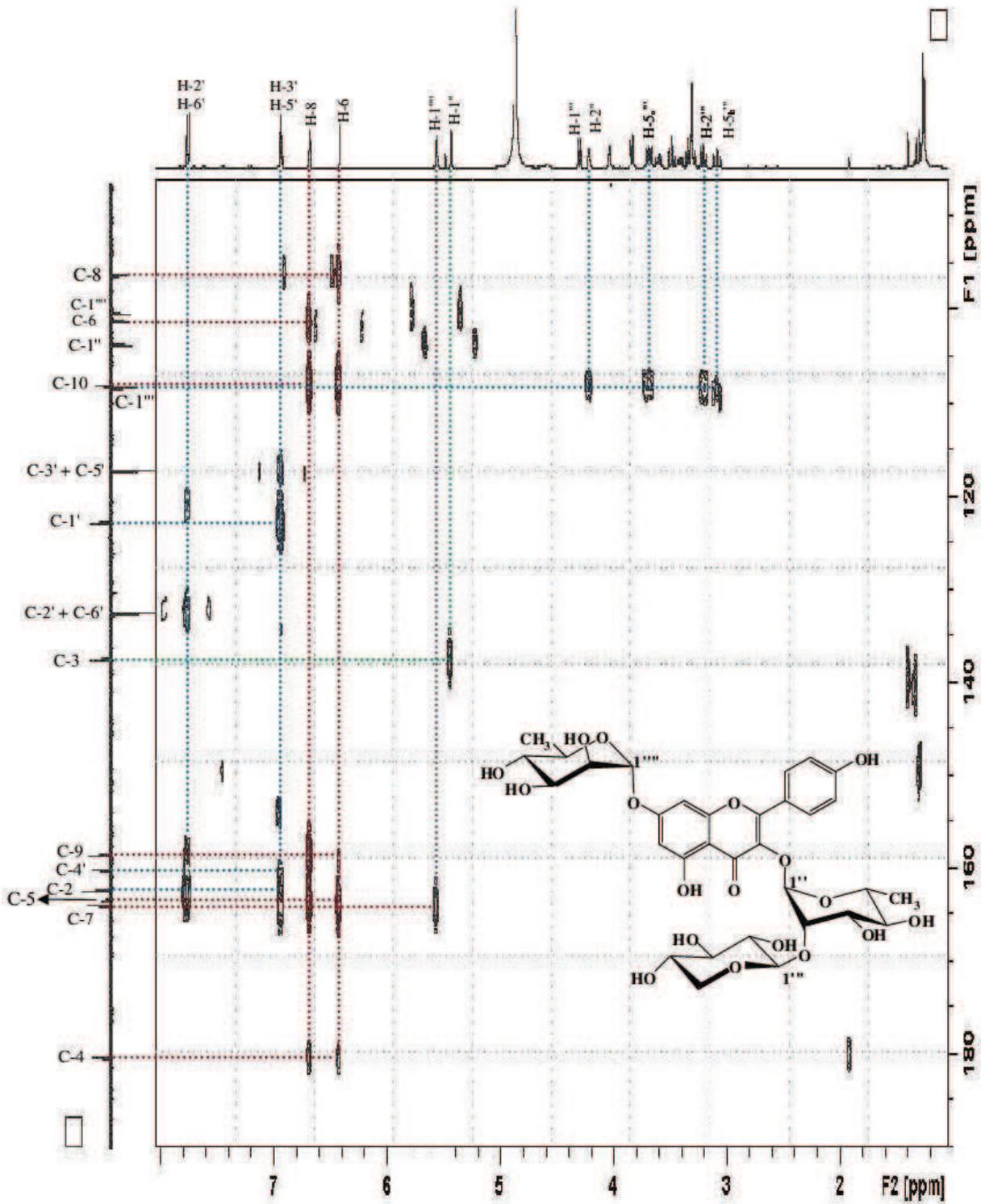
الشكل 7- a₅: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *Raesy* للمركب a₅



الشكل 8- a₅: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *HMQC* للمركب a₅



الشكل 9- a₅: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *HNBC* للمركب a₅



الشكل 10-a₅: تكبير طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *HMBC* للمركب a₅

الجزء الثاني

الدراسة النباتية و الكيميائية للنبات

Reseda villosa

الدراسة النباتية و الكيميائية للنبتة1. المادة النباتية:

جمعت المادة النباتية في شهر أبريل من سنة 2003 من ضواحي مدينة غرداية بالجنوب الشرقي الجزائري، حيث تم قطفها و هي بعد نبتة فتية. جففت النبتة تحت الظل و بعيدا عن الرطوبة، بعدها جمعت الأوراق و الأزهار فكان وزنها 1000 غ.

2. وصف النوع *Reseda villosa* Cass. :

Reseda villosa نبتة ذات ساق قليل التفرع قد يصل علوه 1.5 م، الأوراق سهمية طويلة مسننة قليلا على الحواف. بها نورة سنبلية كثيفة الأزهار، و هذه الأخيرة محمولة على محور أسطواني صغير، و تحتوى على عدد كبير من الأسدية ذات الخيوط البيضاء و المنبر الأصفر اللون. الثمرة عليية واقفة لا تميل و البذور حبيبية. و هي نبتة حولية تزهر في فصل الشتاء و الربيع، تسمح بإطلاق سيقان جديدة كل عام، تبدو خضراء مائلة إلى البياض و جاءت تسمية *villosa* بمعنى *Villex* أي مكتسية نتيجة لوجود شعيرات قطنية بيضاء تكسو الساق و الأوراق.

يعد النوع *villosa* أصلي في الصحراء (Endémique)، و تتموضع في المناطق الصحراوية الجزائرية كالتاسيلي و تيبستي و بالأخص بمنطقة ميزاب، تنمو هذه النبتة تلقائيا في الفضاءات الرملية الخشنة أو بين الصخور، تتواجد في الهضاب و كذا في سفوح الجبال، كما تحتل المنحدرات الصخرية مثل تلك الملاحظة في جانت.

صورة فوتوغرافية لـ *Reseda villosa*

3. الموضع ضمن التصنيف النباتي:

Division	Magnoliophytes	القسم
Classe	Magnoliopsides	الصف
Sous classe	Dilleniidae	تحت الصف
Ordre	Capparidales	الرتبة
Famille	Resedaceae	العائلة
Genre	<i>Reseda</i>	الجنس
Espèce	<i>Reseda villosa</i>	النوع

4. الإستخلاص:

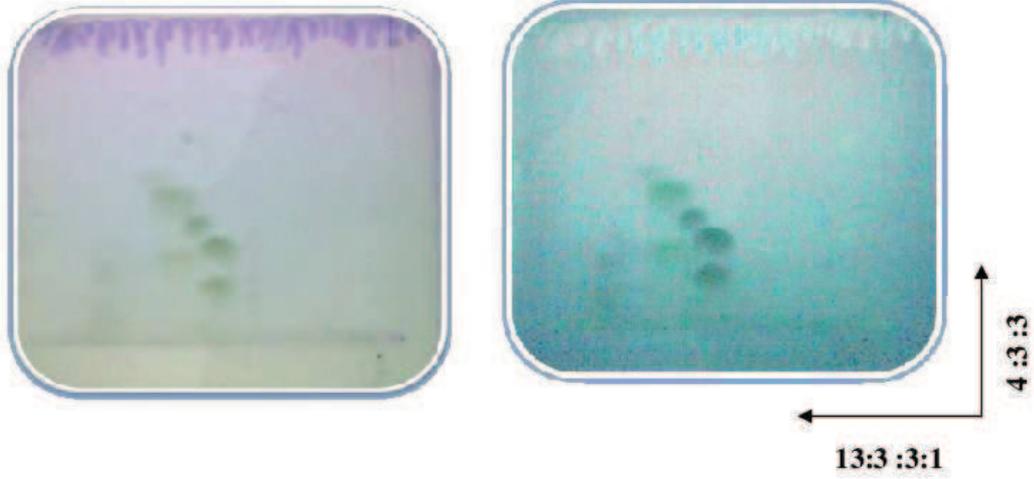
بعد تجفيف النبتة و تنقيتها تم طحن الأزهار و الأوراق معا، بعدها نقعت في خليط من ميثانول / ماء (3 / 7) و تركت لمدة 24 ساعة، رشح المحلول الهيدروكولي و ركز تحت الضغط المنخفض، كررت هذه العملية ثلاث مرات متتالية، بعدها تمت معالجة المستخلص الخام بواحد لتر من الماء المقطر المغلي و تركه ليلة كاملة، ثم رشح و بدأت عملية الاستخلاص من نوع سائل - سائل بـ:

(1) استخلاص بواسطة ثنائي كلور الميثان مرتين (300 مل x 2) بعد تبخير الطور حصلنا على 1.5 غ من المستخلص.

(2) استخلاص بواسطة أستات الإيثيل ثلاث مرات (300 مل x 3) بعد تبخير الطور حصلنا على 3.63 غ من المستخلص.

(3) استخلاص بواسطة البوتانول النظامي ثلاث مرات كذلك (300 مل x 3) فحصلنا على 45.43 غ من المستخلص بعد التبخير.

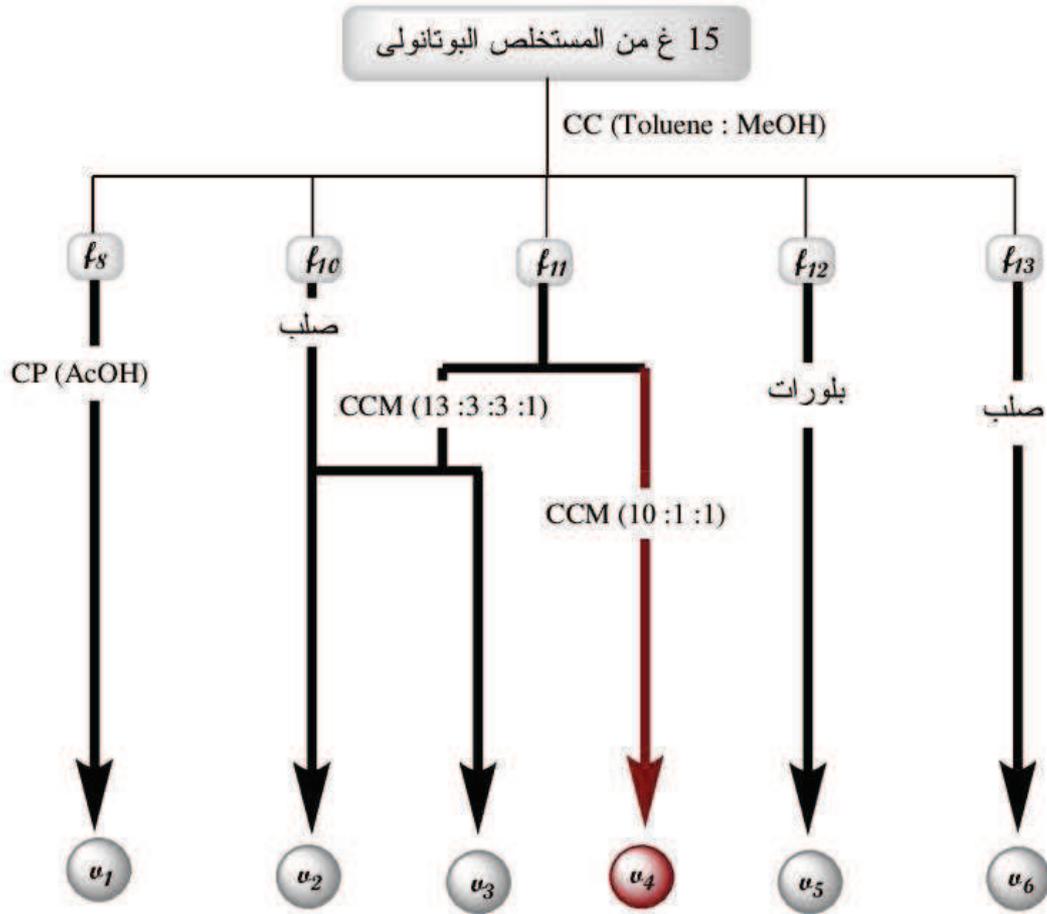
v قبل البدء بأي عملية فصل تم إجراء تحاليل كروماتوغرافية ذات بعد واحد على ورق whatman و بعدين على متعدد الأמיד لمستخلصي البوتانول و الأستات. و على إثر هذه التحاليل تم تصوير الخريطة الكروماتوغرافية للمستخلص البوتانولي كما هو مبين في الشكل 1. إذ تم إختياره للدراسة لغناه بالمركبات الفلافونيدية مقارنة بطور الأستات وكذا لوجود كمية كافية منه.



الكروماتوغرام 1: الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البوتانولي لـ *R. villosa*

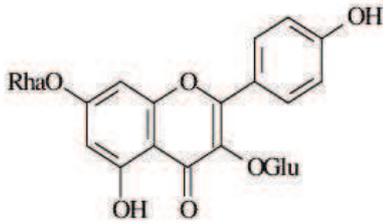
5. طرق الفصل:

تم فصل مكونات 15 غ من المستخلص البوتانولي بتقنية كروماتوغرافيا العمود باستعمال متعدد الأמיד كدعامة ثابتة باستعمال التولين كمملص مع إشباعه تدريجيا بالميثانول، و قد إتبعنا نفس الخطوات المستعملة في دراسة النبتة السابقة، حيث خلصنا إلى 13 كسر تمت دراسة 6 كسور منها خلال تحضيرنا لشهادة الماجستير أين توصلنا إلى التعرف على خمسة مركبات فلافونيدية. و إتماما لهذا العمل قمنا بإعادة دراسة الكسر 11 بطريقة أخرى للحصول على المركب 4 حيث فصل من قبل في النظام S₁ و لم نتمكن من الحصول عليه في صورته النقية حينها، أعدنا عملية الفصل في النظام S₃ بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال شرائح من السيليكاجال تلتها تقوية المركب في عمود صغير في النظام S₅ أين تحصلنا عليه في صورته النقية جاهزا لدراسته بنيويا. يمكن تلخيص عمليات الفصل المختلفة لكل الكسور في المخطط-2-

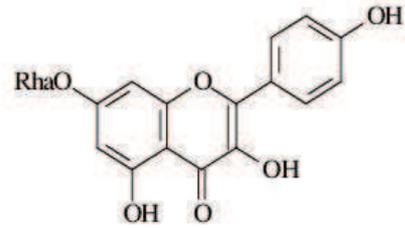


المخطط-2- طرق الفصل للنباتة *R. villosa*

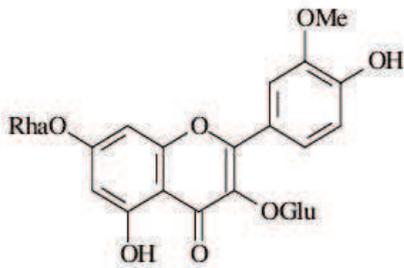
تذكير بالمركبات المفصولة من النبتة *Reseda villosa* سابقا:



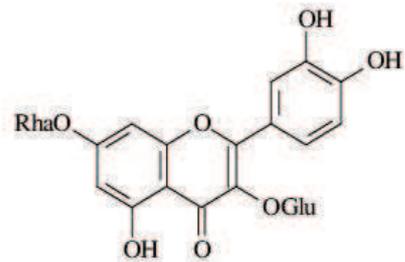
Kaempférol-3-O-β-glucoside-7-O-α-rhamnoside



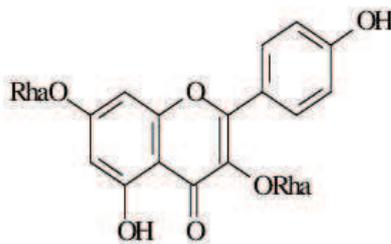
Kaempférol-7-O-α-rhamnoside



Isorhamnétin-3-O-β-glucoside-7-O-α-rhamnoside



Quercétin-3-O-β-glucoside-7-O-α-rhamnoside



Kaempférol-3,7-di-O-α-rhamnoside

التعین البیوی للمریک المفصولة من النبتة

Reseda villosa

التعيين البنوي للمركب α_4 :

أولا: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول 1- α_4 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب α_4

13:3:3:1	4:3:3	10:1:1	الجملة
0.71	0.37	0.39	ثابت الإنحباس R_f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول 2- α_4 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (1- α_4):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	358	272
NaOH	406	272
NaOAc	364	271
NaOAc + H ₃ BO ₃	362	271
AlCl ₃	413	278
AlCl ₃ + HCl	414	278

2. جدول μ_4 -3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعاً للشكل (2- μ_4):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة الإقتران (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	9.0	2H	8.18
H-3' , H-5'	d	9.0	2H	6.93
H-6	s	-	1H	6.70
H-1'''(7-O-Rha)	d	2.0	1H	5.61
H-1''(3-O- Glu)	d	7.5	1H	5.39
8-OMe	s	-	1H	3.94
CH ₃ (7-O-Rha)	d	6.1	3H	1.30

ثانياً: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب $\mu_4 = 928$:

الخصائص الكروماتوغرافية للمركب μ_4 و قيمة العصابة I في الميثانول 358 نم تدل على أنه فلافونول ثنائي السكر مستبدل في الموقع 3، الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I بعد إضافة NaOH بلغت 48 نم لتدل على وجود 4'-OH، عدم ظهور عصابة جديدة بين 320-335 نم مع هذا المفاعل و كذلك عدم تغير قيمة العصابة II تقريباً في NaOAc مقارنة بقيمتها في الميثانول تعني وجود 7-OR، و نستدل على غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل من الإنزياح الضعيف للعصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيف NaOAc + H₃BO₃ و يؤكد هذا عدم تغير طيف AlCl₃ تقريباً بعد إضافة HCl، كما نلاحظ إزاحة باثوكرومية مقدرة بـ 56 نم عند مقارنة طيف AlCl₃ + HCl مع الميثانول دليل وجود 5-OH مع عدم وجود مجموعة أكسجينية في الموضع 6.

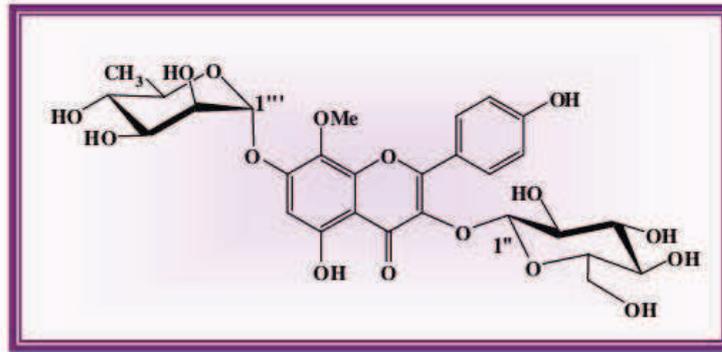
طيف ¹H-RMN بين أن الحلقة B أحادية الإستبدال بظهور البروتونات (H-2',H-6') و (H-3',H-5') على شكل ثنائي بثابتة إقتران 9.0 هرتز لكل زوج حيث يرن الأول عند 8.18 ppm و الثاني عند 6.93 ppm كما بين طيف البروتون أن الحلقة A أحادية الإستبدال بظهور إشارة أحادية عند 6.70 ppm، و اعتماداً على نتائج UV تنسب هذه الإشارة إلى البروتون H-6.

ظهرت إشارة أحادية بتكامل 3H عند 3.94 ppm مميزة لمجموعة ميثوكسي، كذلك تبين وجود سكر الـ glucose من خلال البروتون الأنوميري الخاص به الذي ظهر على شكل ثنائي بثابتة إقتران 7.5 هرتز يرن عند 5.39 ppm، هذه القيمة تدل على أن الـ glucose مرتبط بالكربون 3

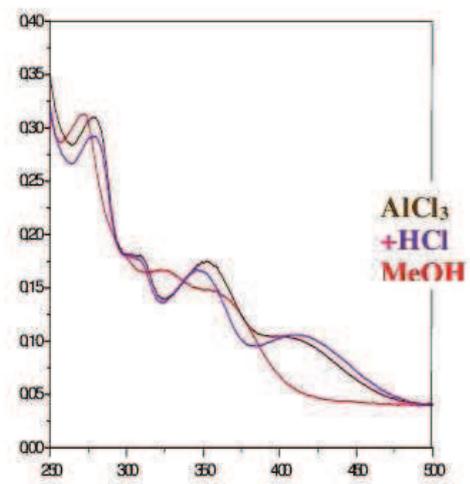
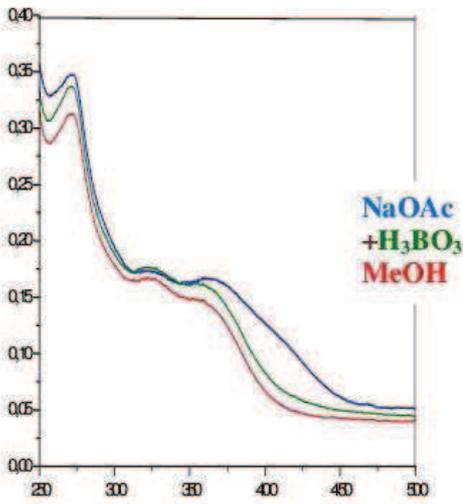
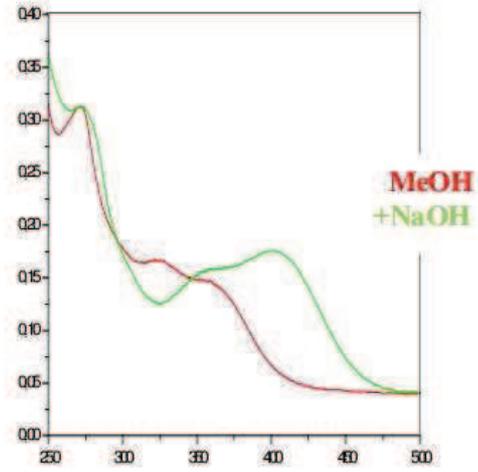
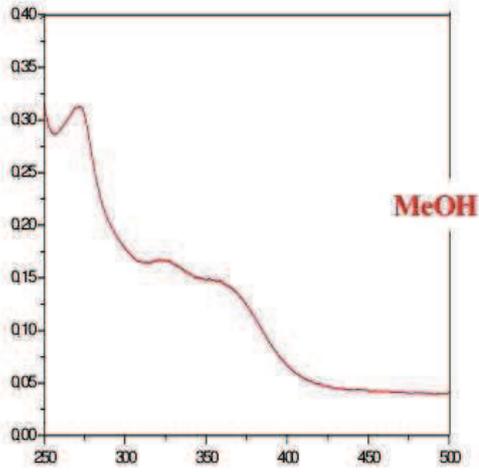
للأجليكون، أما السكر الثاني فهو rhamnose كما يبين الطيف، إذ رن بروتونه الأنوميري عند ppm 5.61 متبوع بمثيله الذي يرن عند 1.30 ppm على شكل إشارة ثنائية بثابتة إقتران 6.1 هرتز، هذه القيم تدل على أن هذا الـ rhamnose مرتبط بالكربون 7 للأجليكون.

الحمهة الحمضية أكدت كل هذه المعطيات إذ بينت تحرر سكرين من الموقعين 3 و 7.

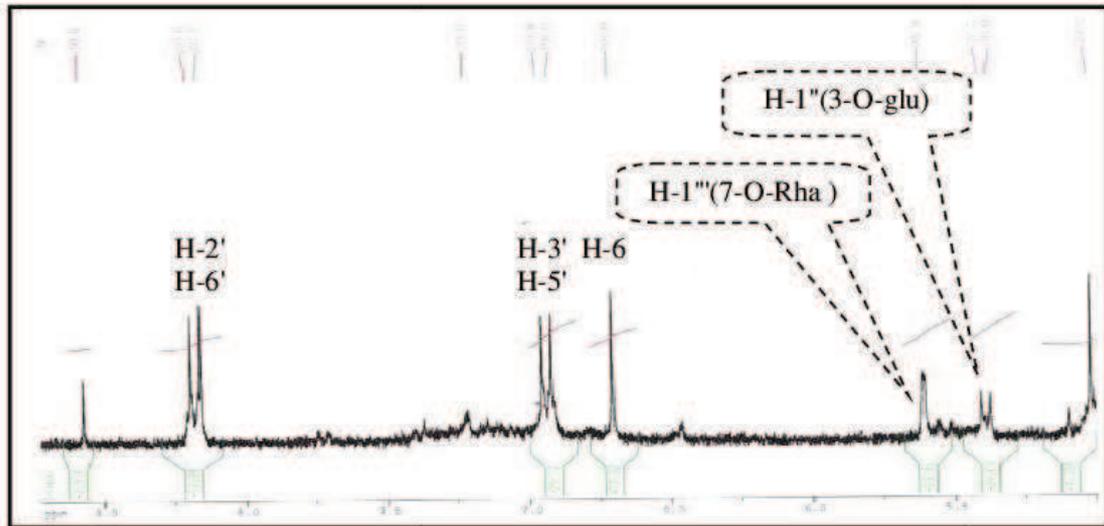
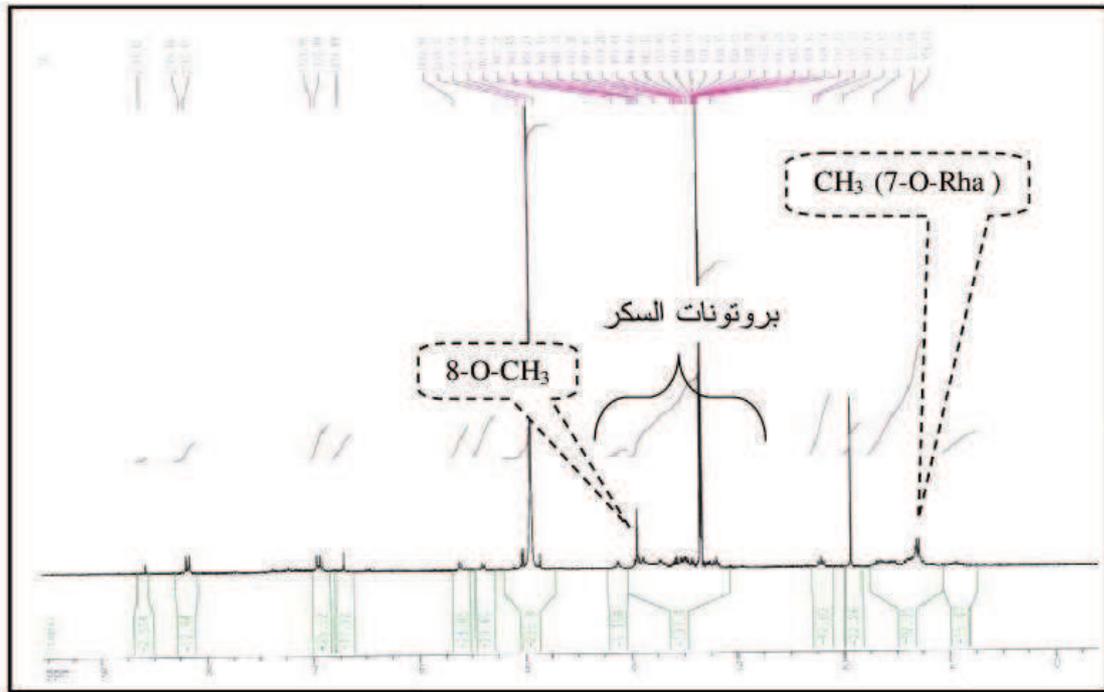
و عليه تم اقتراح البنية النهائية للمركب 4



8- Methoxykaempférol -3-O-β- glucoside-7-
O-α-rhamnoside



الشكل 1- α_4 : سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب α_4



الشكل 2-44: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب 44

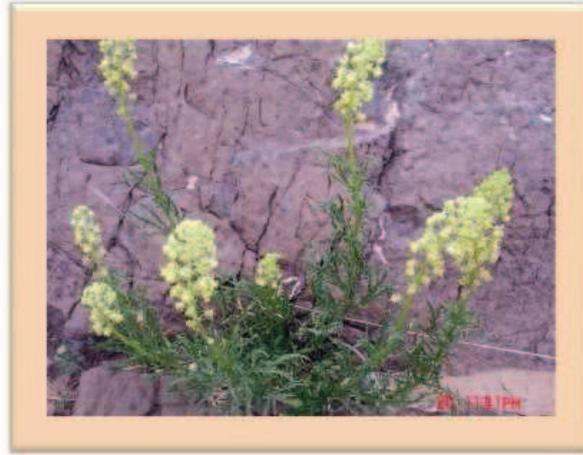
دراسة الفعالية المضادة للأكسدة

دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للنبته *R. villosa* و مقارنتها بنظيرتها *R. duriaeana* :

قمنا بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي و البوتانولي للنبته *R. villosa* و قارناها بنظيرتها *R. duriaeana*، في هذا الجزء الثاني من الفصل الثالث إرتأينا أن نعرف أولا بالنبته الثانية ثم اتجهنا إلى بعض المفاهيم المتعلقة بالفعالية المضادة للأكسدة و كذا الطريقة العملية المتبعة لقياس هذه الفعالية و أنهينا بعرض النتائج و قراءتها.

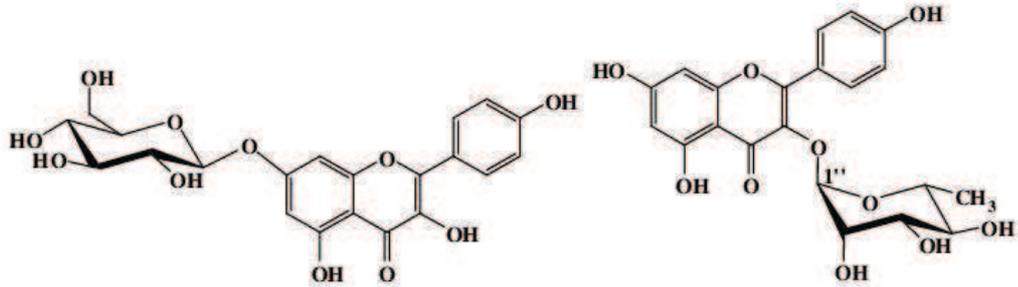
أولا: تعريف النبتة *R. duriaeana* J. Gay :

R. duriaeana J. Gay نبتة تنتمي إلى العائلة الريزيدية و تعد واحدة من نباتات جنس الرزيذا الأصلية بالجزائر المدروسة بمخبرنا. قطفت المادة النباتية من منطقة جبل الوحش بقسنطينة سنة 2004.



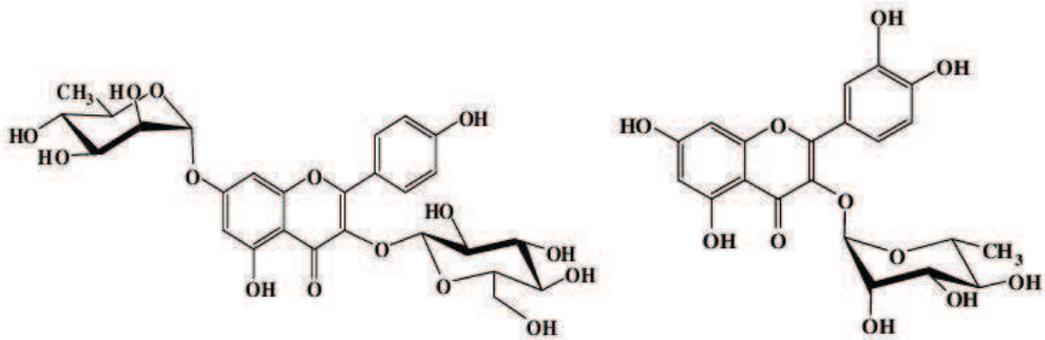
صورة فوتوغرافية لـ *Reseda duriaeana*

بعد عمليات الإستخلاص المتعددة و التحليل الكروماتوغرافية اختير المستخلص البوتانولي للنبته لفصل مكوناته، و بعد عمليات الفصل الكروماتوغرافية بمختلف تقنياتها تم الحصول على خمسة فلافونيدات جليكوزيدية من بينهم المركبين 4 و 5 يشار إليهما لأول مرة في جنس الرزيذا من خلال هذه النبتة.



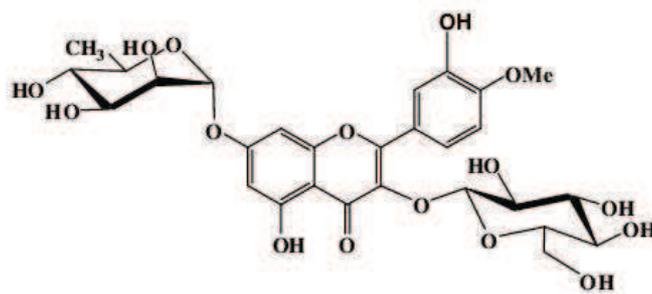
(1) Kaempferol -7-O- β -glucoside

(2) Kaempferol-3-O- α -rhamnoside



(3) Kaempferol-3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside

(4) Quercetin -3-O- α -rhamnoside



(5) 4'-Methoxykaempferol-3-O- β -glucopyranoside-7-O- α -rhamnopyranoside

ثانياً: بعض المفاهيم:1. الجذور الحرة :

عندما تتلاقى الرطوبة مع الحديد فإنه يخضع لعملية كيميائية تسمى الأكسدة و التي تنتج عنها القشرة الحمراء التي تعرف باسم الصدأ. عملية الأكسدة هذه التي تجعل المعدن يصدأ تعمل بنفس الطريقة داخل أجسامنا، و الأكسدة تعني تفاعل مادة ما مع الأكسجين، أين يفقد حينها O_2 إلكترونات أثناء تفاعلاته مع الجزيئات الأخرى حيث تصبح هذه الجزيئات نشطة و طليقة و تسمى بالجذور الحرة.

الجذور الحرة ليست أحد الغزاة الغرباء مثل الفيروسات و البكتيريا، و إنما هي جزيئات يتم تصنيعها داخل الجسم بشكل طبيعي خلال إستقلاب البروتينات و الدسم و عندما يولد الجسم الطاقة. إذ أن O_2 الذي نتنفسه حوالي 1% منه يتسرب و يكون السبب في إنشاء الجذور الحرة، كذلك خلايا الدم البيضاء تولد جذورا حرة لكي تقتل البكتيريا و الكائنات الحية الدقيقة التي تغزو الجسم. يمكن تعريف الجذور الحرة باختصار على أنها ذرات أو جزيئات غير ثابتة كيميائياً أو غير مستقرة بإمكانها أن تتفاعل بسرعة و بسهولة مع مركبات أخرى أو مع الخلايا الحية محاولة اقتناص ما ينقصها من إلكترونات لتصل إلى الثبات الكيميائي و بالتالي تخريب الخلايا الحية. عندما تسعى الجذور الحرة للحصول على إلكترونات من الجزيئات السليمة الأقرب إليها فإنها تخلق المزيد من الجذور الحرة التي تبحث عن استقرارها لتبدأ سلسلة من التفاعلات إلى أن تتفاهم لتهاجم غشاء الخلية الحية و مكوناتها بما فيها جزيء ADN مما يسبب طفرات قد تؤدي إلى حدوث السرطان و أمراض أخرى خطيرة مثل تصلب الشرايين و أمراض ضعف البصر و كذلك الشيخوخة.

2. أنواع الجذور الحرة:

من بينها المركبات البترولية و المواد الملونة و كذا المواد الحافظة و المواد المنظفة و الكحول و القطران في التبغ و شوارد المعادن الثقيلة.

3. ذرة الأكسجين الحرة:

إن وجود الجذور الحرة يعد مخرب و ذرة O_2 الحرة من أشدها تخريباً لأنها تفضل أن تشارك ذرة أخرى بإلكترونين على أن تأخذ منها إلكترونين و هذا يؤدي إلى أكسدة الكثير من البنى الطبيعية المفيدة

في الجسم و تحويلها إلى بنى ضارة يصعب التخلص منها. و أحسن مثال على ذلك هو تشكل جزيء الكولسترول عالي الكثافة: يحول O_2^- الحر جزيء الكولسترول منخفض الكثافة و هو شديد الأهمية لبناء كافة الحلقات الهرمونية في الجسم إلى جزيء عالي الكثافة و ذلك بأكسدته، هذا الجزيء الجديد غير فعال في بناء حلقات الهرمونات لكنه سرعان ما يتسرب نظرا لكبر حجمه على جدار الشرايين مؤديا إلى تصلبها و فقدان مرونتها مسببا سلسلة من الأمراض.

4. أسباب زيادة الجذور الحرة:

يزيد تشكل الجذور الحرة بازدياد سرعة الإستقلاب كما يحدث في حالة التوتر "Stress oxydant" و كذلك يزيد بزيادة عوامل التلوث البيئي المختلفة التي يتم تحطيمها في الجسم لتتحول إلى جذور حرة، كما تزيد أشعة الشمس والأشعة السينية والتدخين بجميع أنواعه من إنتاج الجذور الحرة. كذلك كثرة استهلاك الدهون والسكريات تحفز من إنتاجها. كما يزيد الإجهاد وزيادة استهلاك الأوكسجين خلال التمارين الرياضية العنيفة من إنتاجها.

5. مصير الجذور الحرة:

تبين أن الجذور الحرة بعد أن تأخذ حاجتها من الإلكترونات فإنها إما أن تطرح بشكل مباشر من الجسم و هذا أحسن ما يكون، أو تلتهمها الكريات البيضاء كأجسام أجنبية و هذا أيضا سليم، أو أن ترتص إلى بعض المستقبلات الخلوية على شكل قفل و مفتاح معطلة بذلك وظيفة هذا المستقبل في أن يتصرف على الجزيء الخاص به و هذا أخطر ما يمكن أن يحصل، و كمثال على ذلك إرتصاص الجذور الحرة على المستقبل الخلوي الخاص بجزيء الأنسولين إذ يمنع هذا الأخير من إدخال جزيء السكر إلى داخل الخلية بسبب أنها لم تستطع التعرف على جزيء الأنسولين و هذا ما يحصل أحيانا، فيصبح المريض لا يستجيب حتى للأنسولين البشري لأن خليته البدنية مرتصة بقل يمنعها من التعرف على الأنسولين

أما عن الآلية الطبيعية كي يتخلص الإنسان من الجذور الحرة المتشكلة فتتمثل في أن الكريات البيضاء تستعمل هذه الجذور الحرة لقتل بعض الجراثيم و الفيروسات الغازية، كما أن الكبد يستعملها ليزيل سمية بعض الكيمياويات.

عدا ذلك فإذا ازدادت نسبة الجذور الحرة إنقلبت إلى سلاح مدمر يهاجم جدار الخلايا و الميتوكوندريا و الليزوزوم الممتلئة بالأنزيمات بل و يهاجم حتى جزيء الـ ADN كما سلف الذكر.

6. مضادات الأكسدة:

مضادات الأكسدة هي مركبات كيميائية تستطيع الإرتباط بجذور الأكسجين الحرة وتمنعها من الضرر بالخلايا الطبيعية. و من بين الشروط التي يجب أن تتوفر في مضادات الأكسدة المناسبة للجسم هي تعديل الجذر الحر دون أن تتحول بنفسها إلى جذر حر و فصل الجذر الحر المرتص على مستقبلات معينة عن هذا المستقبل و ألا تكون مؤذية للجسم و قابلة للإنطراح من الجسم و غير قابلة للتخزين، إلا أنه في الحقيقة فإن مواد قليلة تحقق هذه الشروط مجتمعة.

تعتبر الفيتامينات C و A و E مضادات أكسدة لا يتم إنتاجها من قبل الجسم بل يجب الحصول عليها من الغذاء إذ تحتوي الفواكه و الخضروات على كميات وفيرة منها، حيث أن هذه الفيتامينات تعطي إلكتروناتها دون أن تتحول إلى جذور حرة. إلا أنها تجد أمامها صعوبات عديدة في الجسم، كونها فيتامينات و بالتالي لها دور متمم أنزيم أي لها دور خاص و البعض منها قد تتسبب زيادته للتسمم، كما أن جرعتها اليومية كفيتامين هي أقل بكثير من أن تلعب دور مضاد أكسدة. ومن مضادات الأكسدة الأخرى الموجود في الأطعمة: natrol الذي يوجد في العنب، البيتاكاروتين (β carotène) الذي يوجد في كثير من الأغذية مثل الجزر. و يعتبر الليكوبين (lycopène) مضاد للأكسدة شديد الفعالية وهو موجود في الطماطم خاصة، إضافة إلى السيلينيوم و هو معدن و يوجد في الأغذية النباتية مثل الأرز و القمح، أما المركبات الفلافونيدية فتعد عائلة من مضادات الأكسدة و هي أكثر فعالية من الفيتامينات في تأثيرها. و من بين الفلافونيدات التي لها تأثير جيد مضاد للسرطان Catechine المتوفر في الشاي الأخضر و genisteine الموجود في الصويا و quercétine المتوفر في الخضار التي لها لون أصفر. و لهذه الإعتبارات اهتم الباحثون في السنوات الأخيرة كثيرا بالفلافونيدات و نتيجة لهذا تم اختراع عدة طرق و تقنيات مختلفة لقياس الفعالية المضادة للأكسدة. و لأجل كل هذا استعملنا واحدة من الطرق المتعددة لقياس الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص البوتانولي و الميثانولي للنبذة *R. villosa* و قارناها بنظيرتها *R. duriaeaana*، و هي طريقة الرنين بارا المغناطيسي الالكتروني

.Résonance Para Electronique (RPE)

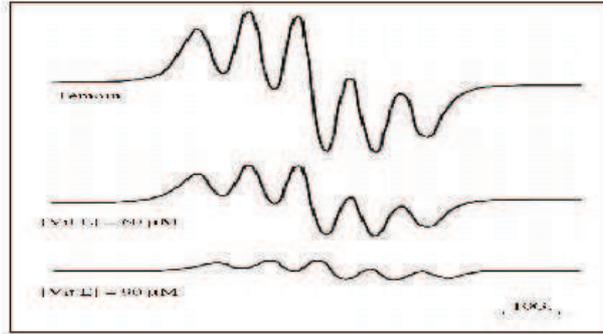
7. التعرف على تقنية RPE:

تقنية RPE هي طريقة طيفية تسمح لنا بالكشف على المركبات الجذرية و التعرف عليها. و تصل حساسية الجهاز إلى 10^{-8} M، مما يعني أن لها القدرة على كشف الجذور الحرة ذات التراكيز الضعيفة. دقة هذه التقنية تجعلنا من بين أحسن و أفضل الطرق المستعملة في قياس الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات البيولوجية أو الجزيئات¹. هناك تقنيتين مختلفتين تعتمد في القياسات بطريقة RPE هما:

أ. طريقة Spin-Labeling²:

تقاس الفعالية المضادة للأكسدة لمركب ما حسب قدرة المركب على اقتناص أو التقاط الجذر Spin-Label و تحويله إلى مركب غير جذري لا يكشف عنه جهاز RPE.

إختزال الـ Spin-Label يلاحظ من خلال إنخفاض في قيمة الطيف المقاس (الشكل 1)

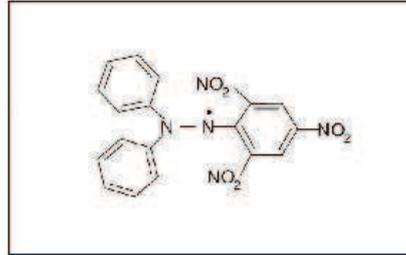


الشكل 1: تطور طيف RPE لجذر DPPH في الأيثانول على حسب مختلف تراكيز الفيتامين C

عادة ما يستعمل DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-Hydrazyl) (الشكل 2) كجذر حر في تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لمختلف المركبات، و من بينها المركبات الفلافونيدات. يتميز DPPH بالاستقرار و سهولة الكشف عنه في جهاز RPE.

يمكن استعمال جذر DPPH من أجل الحصول على معلومات كمية على هذه الفعالية و ذلك عن طريق المطيافية المرئية (Spectrophotométrie visible) عند طول موجة 517 nm، إرجاع

الجذر DPPH يؤدي إلى تغير لونه من البنفسجي إلى الأصفر و إنخفاض في شدة الإمتصاص، إلا أن هذه الطريقة تستهلك كمية أكبر من العينة مقارنة بطريقة RPE^{5,3,4}.



الشكل 2: الصيغة الجذرية لـ DDPH

ب. طريقة Spin-trapping⁶

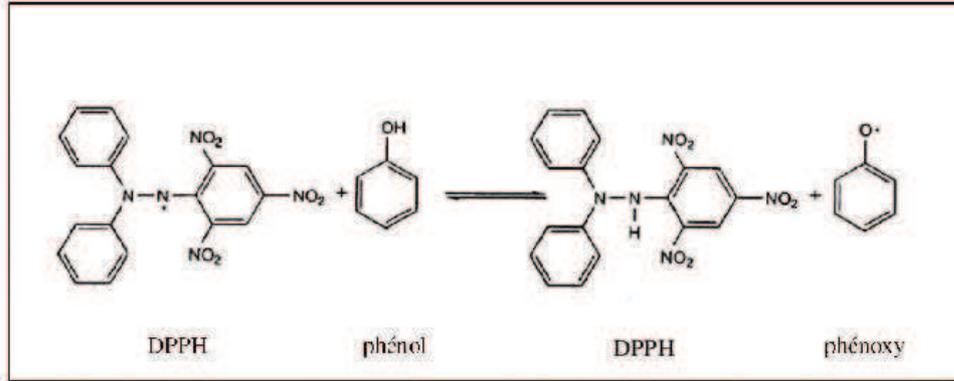
تستعمل هذه الطريقة في حالة الجذور الحرة الغير مستقرة مثل الجذور الأوكسجينية والتي مدة حياتها جد قصيرة^{8,7}، حيث يستلزم إضافة مركب عضوي قنّاص يسمى Piégeur de spin (SP) إلى وسط الدراسة (العينة)، هذا المركب يتفاعل بسرعة مع الجذر الحر ليعطي مركب جديد يدعى Spin adduit هذا الأخير تكون مدة حياته أطول من الجذر الذي إنقطه والذي يمكن الكشف عنه في جهاز RPE.

8. قياس الفعالية المضادة للأكسدة بتقنية RPE :

استعملنا في دراستنا الطريقة الأولى

أ. المبدأ:

يتم تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص النبات. حيث يعتمد المبدأ على قياس قدرة المستخلص النباتي على تثبيط الجذر المستقر DDPH. أين يتم التقاط ذرة الهيدروجين من المركب الفينولي لجذر DPPH كي يعطي Diphénylpicrylhydrazine و جذر Phénoxy كما في الشكل 3.



الشكل 3: تفاعل DPPH مع الفينول

ب. طريقة العمل⁹:

نمزج 50 µl من محلول إيثانولي لـ DPPH مع 50 µl من محلول مستخلص النبات يحرك الخليط بشدة مدة 5 ثواني ثم يوضع داخل أنبوب صغير حجمه 100 ميكرو لتر بعد ذلك يوضع في جهاز RPE. ثم نقرأ قيمة الطيف الخاص بمستخلص النبات على شاشة الحاسوب، و هذا بعد قراءة القيمة الخاصة بـ DPPH و حده.

من خلال كل هذه المعطيات يمكن حساب نسبة التثبيط (pourcentage d' inhibition) حسب المعادلة التالية:

$$\text{rapport d'inhibition} = \frac{(\text{ref} - \text{extrait})}{(\text{ref} - \text{bg})}$$

ref : قيمة طيف DPPH

extrait : قيمة طيف مستخلص النبات

bg : قيمة طيف المثيب بدون DPPH (blanc)

يتم تحديد قيمة الفعالية المضادة للأكسدة بقراءة قيمة IC₅₀ من خلال المنحنى.

ج. النتائج و المناقشة:

قمنا بتحليل بيولوجية على المستخلص البوتانولي (BERD ; BERV) و الميثانولي (MERD ; MERV) للنبتين *R. villosa* و *R. duriaeana* على التوالي بغرض دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الأربعة، و النتائج المحصل عليها مدونة في الجدول I الموالي:

جدول I : نتائج الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصي *R. villosa* و *R. duriaeana*

Extract	IC ₅₀ (mg/ml)
MERD	76.3 ± 2.29
BERD	99 ± 3.6
MERV	100.1 ± 1.7
BERV	209 ± 0.6
Quercetin ^b	12 ± 0.5
Picnogenol ^b	25 ± 1

^b Référence

يتبين من خلال النتائج المحصل عليها أن مستخلصي *R. duriaeana* لديهما فعالية مضادة للأكسدة أحسن من مستخلصي *R. villosa*، و قد يعود هذا إلى طبيعة المركبات الموجودة في كل نبتة.

1. Rimbach G., Höhler D., Fischer A., Roy S., Virgili F., Pallauf J., Packer L. (1999) Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch. Anim. Nutr.*, 52, 203-222.
2. Jost P. C., Griffith O. H. (1984) The spin-labeling technique. *Method. Enzymol.*, 105, 369-418.
3. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25-30.
4. Soares J. R., Dinis T. C. P., Cunha A. P., Almeida L. M. (1997) Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free rad. Res.*, 26, 469-478.
5. Tseng T. H., Kao ES., Chu C. Y., Chou F. P., Lin Wu. H. W., Wang C. J. (1997) Protective effect of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 1159-1164.
6. Janzen E. (1984) Spin trapping. *Method. Enzymol.*, 105, 188-198.
7. Rimbach G., Höhler D., Fischer A., Roy S., Virgili F., Pallauf J., Packer L. (1999) Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch. Anim. Nutr.*, 52, 203-222.
8. Halliwell B., Aeschbach R., Löliger J., Aruoma O. I. (1995) The characterization of antioxidants. *Food. Chem. Toxicol.*, 33 (7), 601-617.
9. Trouillasa P., Callista C. A., Allais D. P., Simonb A., Marfaka A., Delageb C., Durouxa J. L. (2003) Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem.*, 80, 399-407.

الجزء الثالث

الدراسة النباتية والكيميائية للنبات

Randonia africana

الدراسة النباتية و الكيمائية للنبتة :1. المادة النباتية:

جمعت المادة النباتية في شهر أفريل سنة 2006 من ضواحي مدينة غرداية ثم جففت في الشروط الضرورية لنحصل على 1200 غ من وزن النبتة.

2. وصف النوع *Randonia africana* Coss. :

Randonia africana Coss أو القضم أو الطقطاق كما يسميها سكان المناطق الصحراوية الجزائرية، هي نبتة شجيرية ذات فروع متشعبة يتراوح طولها من 50 إلى 100 سم، تتميز بسيقان صلبة مرتفعة و أوراق مستطيلة و ضيقة متساقطة و متجددة، و بأزهار عنقودية جد صغير صفراء اللون يتراوح طولها من 2 إلى 10 مم ساقطة نهائية، و تحتوي على 8 بتلات و 16 سداة (عضو التذكير)، البويضة مغلقة على صفيين أما الكبسولة فليست عنقية، تنمو في المناطق الصحراوية و تزهر في شهر مارس إلى أفريل أين يقطف نبات القضم و يجفف و يحفظ على مدار السنة عند سكان منطقة غرداية خاصة لتستعمل أوراقها و فروعها كمنقوع ضد لسعات العقارب، أما من الناحية الرعوية فالقضم يعتبر المفضل عند الجمل و حيد السنام.



صورة فوتوغرافية لـ *Randonia africana*

3. الموضع ضمن التصنيف النباتي:

Division	Magnoliophytes	القسم
Classe	Magnoliopsides	الصف
Sous classe	Dilleniidae	تحت الصف
Ordre	Capparidales	الرتبة
Famille	Resedaceae	العائلة
Genre	<i>Randonia</i>	الجنس
Espèce	<i>Randonia africana</i>	النوع

4. الإستخلاص:

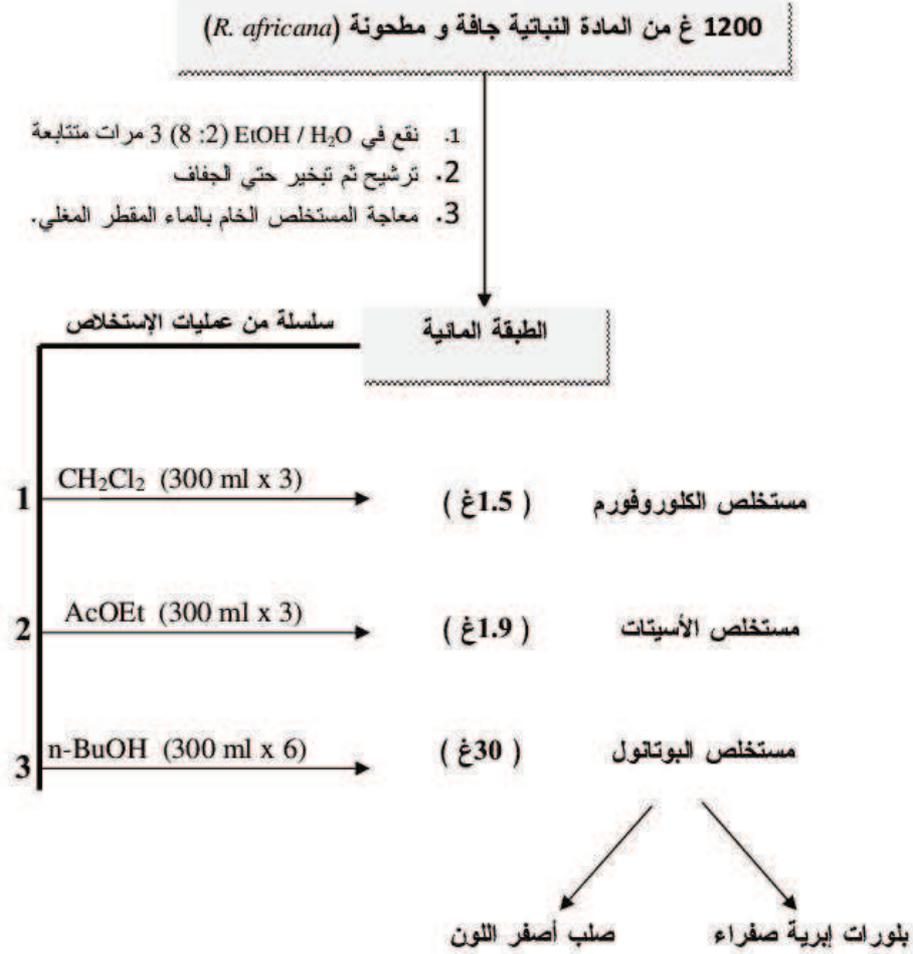
نقعت المادة النباتية الجافة و المطحونة و البالغ وزنها 1200 غ في خليط من EtOH / H₂O بنسبة (2 : 8) ثلاث مرات متتابة دامت كل واحدة 24 ساعة، بعد الترشيح ركزت الرشاحات تحت الضغط المنخفض حتى الجفاف ثم ذوب المستخلص الجاف في 1 لتر من الماء المقطر المغلي ليترك مدة ليلة كاملة بعدها رشح و هذا للتخلص من بقايا الأتربة و الشوائب، لنصل إلى الطبقة المائية التي استخلصت بواسطة ثلاث مذيبات مختلفة القطبية.

بداية ثنائي كلورالميثان (3 x 300 مل) بعد تجفيف المذيب كان وزن المستخلص الكلوروفورمي 1.5 غ

تلته عملية إستخلاص بواسطة خلات الإثيل (3 x 300 مل) لنحصل بعد التجفيف على 1.9 غ من مستخلص الأسيتات

وأخيرا مع البوتانول النظامي حيث كررت العملية 6 مرات و هذا للحصول على أكبر كمية ممكنة. في البداية لم نجمع المستخلصات الستة حيث جفف كل طور على حدى و أعيد تدويبه في الميثانول و ترك عرضة للتبخير الهوائي، و كان وزن مجموع المستخلصات الستة حوالي 30 غ و المخطط 1 يلخص كل الخطوات المتبعة.

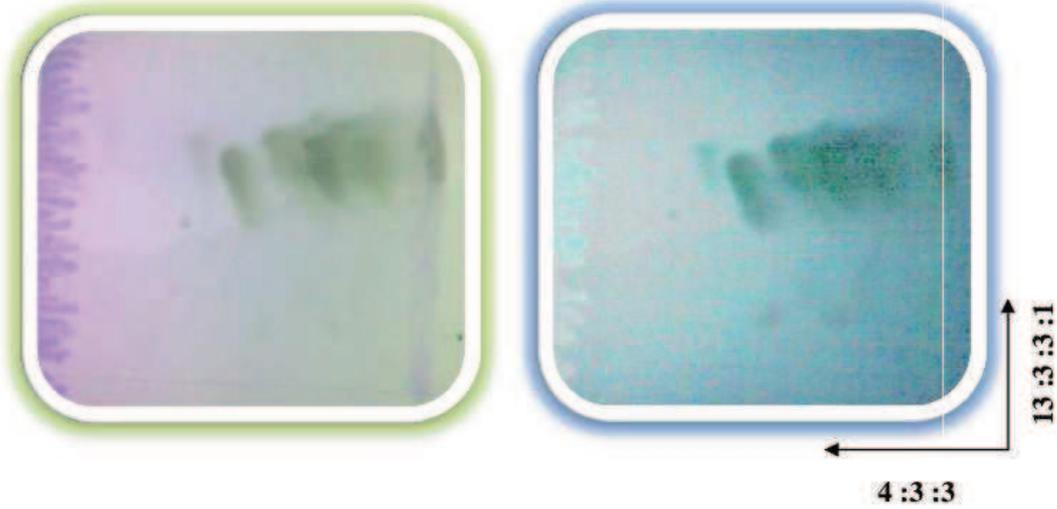
٧ بعد أيام لاحظنا تشكل راسب على شكل صلب أصفر اللون في الأطوار الستة مع إختلاف في كمية هذا الصلب من طور لآخر، كما تشكلت بلورات إبرية صفراء اللون و في الطور البوتانولي رقم 3 خاصة، و في أطوار أخرى بكمية ضئيلة و عليه تم غسل كل من الصلب و البلورات جيدا.



مخطط-1- مخطط الإستخلاص *R. africana*

5. طرق الفصل:

بداية جمعنا الأطوار البوتانولية الستة، و أجرينا اختبارات كروماتوغرافية على المستخلصات الثلاث فظهر أن مستخلص الكلوروفورم و مستخلص الأسيتات لا يحتويان على المركبات الفلافونيدية. و عليه تركز اهتمامنا مباشرة على المستخلص البوتانولي.



الكروماتوغرام 1: الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البوتانولي لـ *R. africana*

بينت نتائج التحليل الكروماتوغرافي ذات بعدين في النظامين S_1 و S_2 على متعدد الأميد كما هو موضح في الكروماتوغرام 1 أن مستخلص البوتانول للنبته *R. africana* يحتوي على فلافونيدات أغلبها من نوع فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3 و هذا حسب اللون الإستشعاعي تحت الأشعة فوق البنفسجية. وكما نلاحظ أن كل مركبات المستخلص تقريبا هاجرت في النظام المائي مما يدل على أنها مركبات إيثيروزيدية. و عليه إختارنا تقنية كروماتوغرافيا العمود للفصل الأولي باختيار متعدد الأميد كدعامة ثابتة و الطولين كملص مع إشباعه تدريجيا بالميثانول إلى أن نصل إلى 100% ميثانول لفصل مكونات 18 غ من المستخلص البوتانولي. في النهاية حصلنا على 184 كسر تم تجميع الكسور المتشابهة منها باستعمل النظام S_3 على السليكاجال فاخترت عدد الكسور إلى 14 كسرا يحتوي على مركبات فلافونيدات إذ أن هذه الأخيرة بدأت في الظهور في الكسر 65 أين كانت نسبة الميثانول 15 %، جمعنا نتائج تمليص العمود و جمع الكسور في الجدول -1-

الجدول -1- الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي:

ملاحظة	الكسور بعد الجمع	% MeOH	رقم الكسر	ملاحظة	الكسور بعد الجمع	% MeOH	رقم الكسر
خليط قابل للفصل	f ₉	20	120 - 113	مركبات غير فلافونيدية	f ₀	14 ..1	64 - 01
خليط قابل للفصل	f ₁₀	20	130 - 121	مركب أساسي	f ₁	15	70 - 65
تشبه السابقة و اللاحقة لا تدرس	f ₁₁	25	132 - 131	مركب أساسي	f ₂	15	80 - 71
مركب أساس على شكل بلورات	f ₁₂	25	151 - 133	تكون بلورات	f ₃	15 20	84 - 81 88 - 85
خليط معقد	f ₁₃	25	156 - 152	كمية قليلة تشبه f ₃	f ₄	20	91 - 89
		30	164 - 157				
		40	166 - 165				
خليط معقد	f ₁₄	40	172 - 167	خليط قابل للفصل	f ₅	20	95 - 92
		50	180 - 173	كمية قليلة تشبه f ₆	f ₆	20	102 - 96
		100	184 - 181	تكون راسب على شكل صلب	f ₇	20	107 - 103
					f ₈	20	112 - 108

نشير أن كل الكسور عولجت باستعمال السليكاجال كدعامة ثابتة سواء كان الفصل عن طريق كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة التحضيرية (CCM) أو كروماتوغرافية العمود (CC) ما عدا الكسر f₁

معالجة الكسور المحصل عليها:

(1) معالجة الكسر f₁:

وجود مركب أساسي أصفر اللون ظهر في ورق Whatman تم فصله في النظام (AcOH 15%) و ثلثه تنقية في عمود صغير في النظام S₅ لم تتمكن من تحديد بنيته .

(2) معالجة الكسر f₂:

وجود مركب أساسي تم فصله بتقنية كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة التحضيرية في النظام S₃ تلت عملية الفصل تنقية في عمود صغير في النظام S₅

(3) معالجة الكسر f₃ :

وجود بلورات ذات لون أصفر باهت تم غسلها بدفعات متتالية من الميثانول لنحصل عليها في صورتها النقية

(4) معالجة الكسر f₅ :

عولج هذا الكسر بتقنية كروماتوغرافيا العمود في النظام S₅ إذ تحصلنا في نهاية الفصل على 22 تحت كسرا و بعد الجمع إختزلت إلى 10 تحت كسور مختلفة رقت من f₅₁ إلى f₅₁₀ إختزنا تحت الكسور التالية للدراسة:

أ. تحت الكسر f₅₁: بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية و في النظام S₃ تم فصل مركب أساسي (921) و الحصول عليه في صورة نقية بعد تمريره على عمود صغير في النظام S₅
ب. تحت الكسر f₅₇ و f₅₈: باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية و في النظام S₃ تم فصل المركب 928 و تمت تنقيته في عمود صغير في النظام S₅

v تشكلت البلورات التي فصلت من الكسر f₃ في تحت الكسر f₅₅ في صورة نقية أما بقية الكسور لم نرى ضرورة لمعالجتها.

(5) معالجة الكسر f₆ :

عولج هذا الكسر بتقنية كروماتوغرافيا العمود في النظام S₅ و في نهاية الفصل تحصلنا على 45 تحت كسر ذات حجم 20 مل، ثم جمعت المتشابهة منها لنحصل على 17 تحت كسر مختلفة، إختزنا تحت الكسور التالية للدراسة:

أ. تحت الكسر f₆₁ و f₆₂: تحصلنا على المركب 971 في صورته النقية على شكل بلورات صغيرة
ب. تحت الكسر f₆₁₅ و f₆₁₄ : بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية و في النظام S₃
دائما تم فصل المركب 972
ج. تحت الكسر f₆₁₂: تشكل راسب على شكل صلب أصفر اللون تم غسله بالميثانول و هو نفسه المتحصل عليه في الكسر f₈

نشير أنه تم الحصول على المركبين المفصولين من الكسر f_5 لكن بتركز أقل، كذلك البلورات التي فصلت من الكسر f_3 إلا أنها أقل نقاوة من السابقة.

(6) معالجة الكسرين f_9 و f_{10} :

الكسر f_9 و f_{10} يحويان نفس عدد المركبات أما الاختلاف فيمكن في تراكيزها. في البداية تم اختيار f_9 للدراسة و لقلة كمية بعض المركبات قمنا بدراسة f_{10} بنفس الطريقة و حصلنا على نفس النتائج. و سنوضح هنا طريقة دراسة f_9 ، حيث عولج الكسر بتقنية كروماتوغرافيا العمود في النظام S_3 على السليكاجال إذ تحصلنا في آخر العمود على 32 تحت كسر ذات حجم (20-30 ملل) و بعد الجمع خلصنا إلى 12 تحت كسر تم اختيار التالية منها للدراسة:

أ. تحت الكسر f_{92} : بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية في النظام S_3 تم الحصول

على المركب $f_{9(1)}$

ب. تحت الكسر f_{95} و f_{96} : بنفس الطريقة السابقة تحصلنا على المركب $f_{9(2)}$

ج. تحت الكسر f_{98} : بواسطة كروماتوغرافيا العمود و في النظام S_5 عولج هذا الأخير أين تحصلنا

على 12 تحت كسرا اخترنا من بينهم تحت الكسر رقم 16 الذي يحتوي على المركب المسمى

(3) f_9 في صورته النقية

د. تحت الكسر f_{912} : تشكل راسب أصفر على شكل صلب و هو نفسه المفصول من الكسر f_8

(7) معالجة الكسر f_{12} :

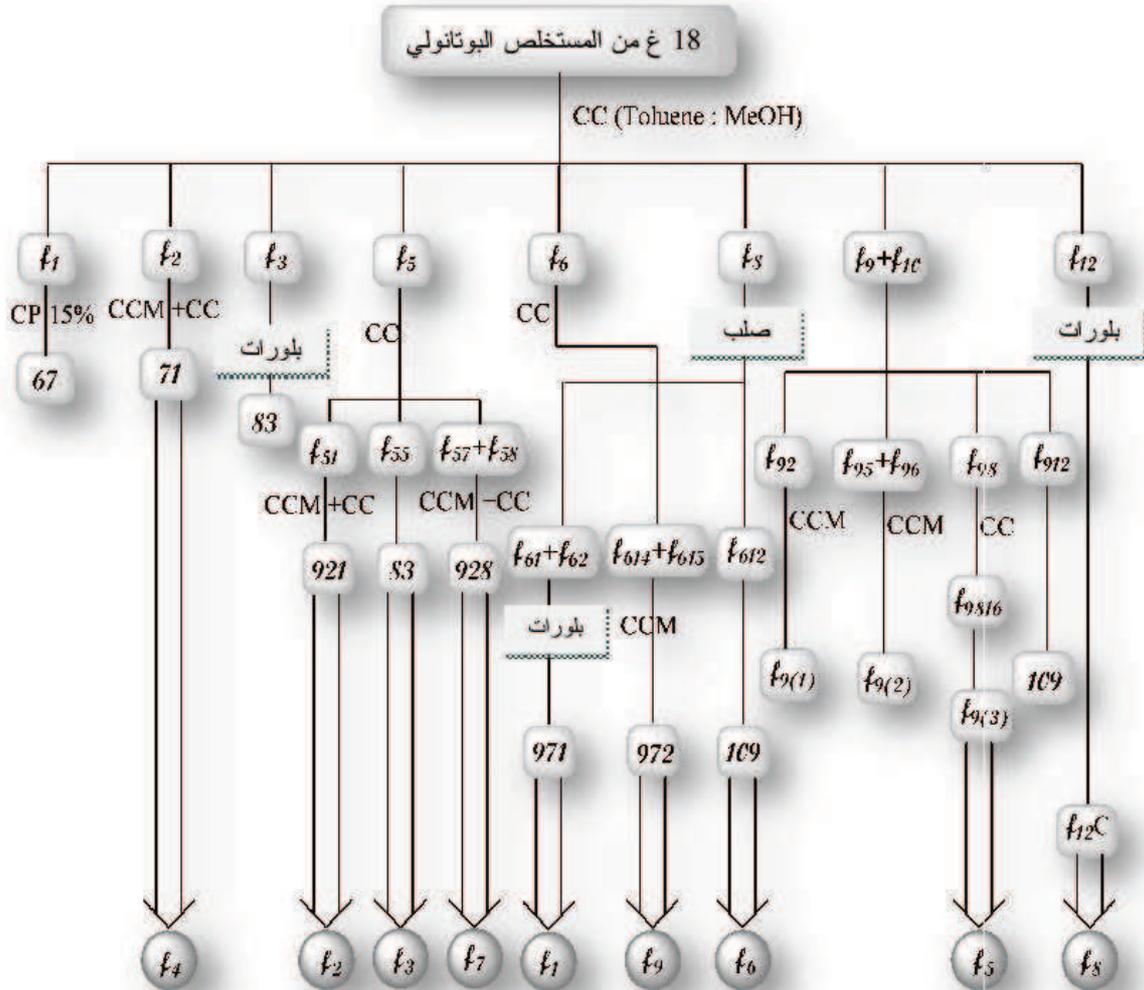
وجود بلورات إيرية دقيقة ذات لون أصفر قاتم تم غسلها بالميثانول.

يمكن تلخيص كل هذا العمل في المخطط 2

في نهاية العمل قمنا بحساب قيمة ثابت الإنحباس R_f في الأنظمة الثلاث S_1 و S_2 و S_3 أين خلصنا

إلى 9 فلافونيدات إيثيروزيدية مختلفة، كلها من نوع فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3 و هذا حسب اللون الإستشعاعي وقيمة R_f في الأنظمة المختلفة.

٧ رتبت المركبات حسب قيمة R_f في النظام S_3 .



المخطط-2- طرق الفصل للنباتة *R. africana*

التعريف البيئي للمركبات المفصلة من النبتة

Randonia africana

التعيين البنوي للمركب $f_1 = 971$:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول f_1-1 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_1

13:3:3:1	4:3:3	10:1:1	الجملة
0.27	0.36	0.79	ثابت الإنحباس R_f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول f_1-2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعاً للشكل (f_1-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	351	267
NaOH	402 (327)	274
NaOAc	385	274
NaOAc + H ₃ BO ₃	360	270
AlCl ₃	398 (344 sh)	274 (302 sh)
AlCl ₃ + HCl	396 (343 sh)	274 (300 sh)

2. جدول f1-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعا للشكل (f1-2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج J (Hz)	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	8.9	2H	8.08
H-3' , H-5'	d	8.9	2H	6.91
H-8	d	2.1	1H	6.43
H-6	d	2.1	1H	6.23
H-1" (3-O-Glu)	d	7.5	1H	5.28

ثانيا: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب f1 = 971:

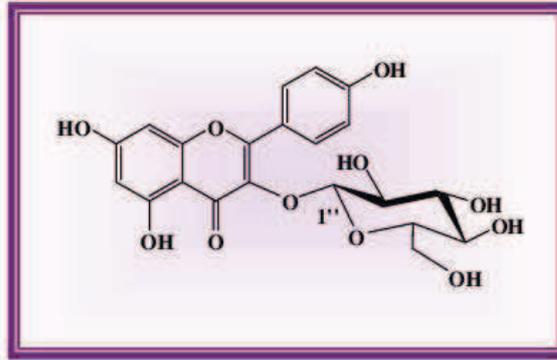
السلوك الكروماتوغرافي للمركب f1 خاصة في النظام المائي 1:3:3:13 المقدر بـ 27% تدل على أنه جليكوزيد أحادي السكر، اللون الإستشعاعي البنفسجي وقيمة العصابة I المقدر بـ 351 نم في الميثانول دليل على أنه فلافونول مستبدل في الموضع 3، إنزياح قيمة العصابة I بـ 51 نم بعد إضافة NaOH دليل وجود 4'-OH، ظهور عصابة جديدة مع نفس المفاعل عند 327 نم دليل وجود 7-OH و يؤكد هذا الإزاحة الباثوكرومية للعصابة II و المقدر بـ 7 نم عند مقارنة طيف MeOH بطيف NaOAc، إنزياح طيف H₃BO₃ + NaOAc بـ 9 نم على مستوى العصابة I مقارنة بطيف الميثانول، و عدم تغير طيف AlCl₃ عند إضافة HCl تقريبا دليل غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على مستوى الحلقة B، و نستدل عن وجود 5-OH من الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيف AlCl₃ + HCl و المقدر بـ 45 نم .

و عليه فالبنية الأولية للمركب f1 هي عبارة عن Kaempférol مستبدل في الموضع 3.

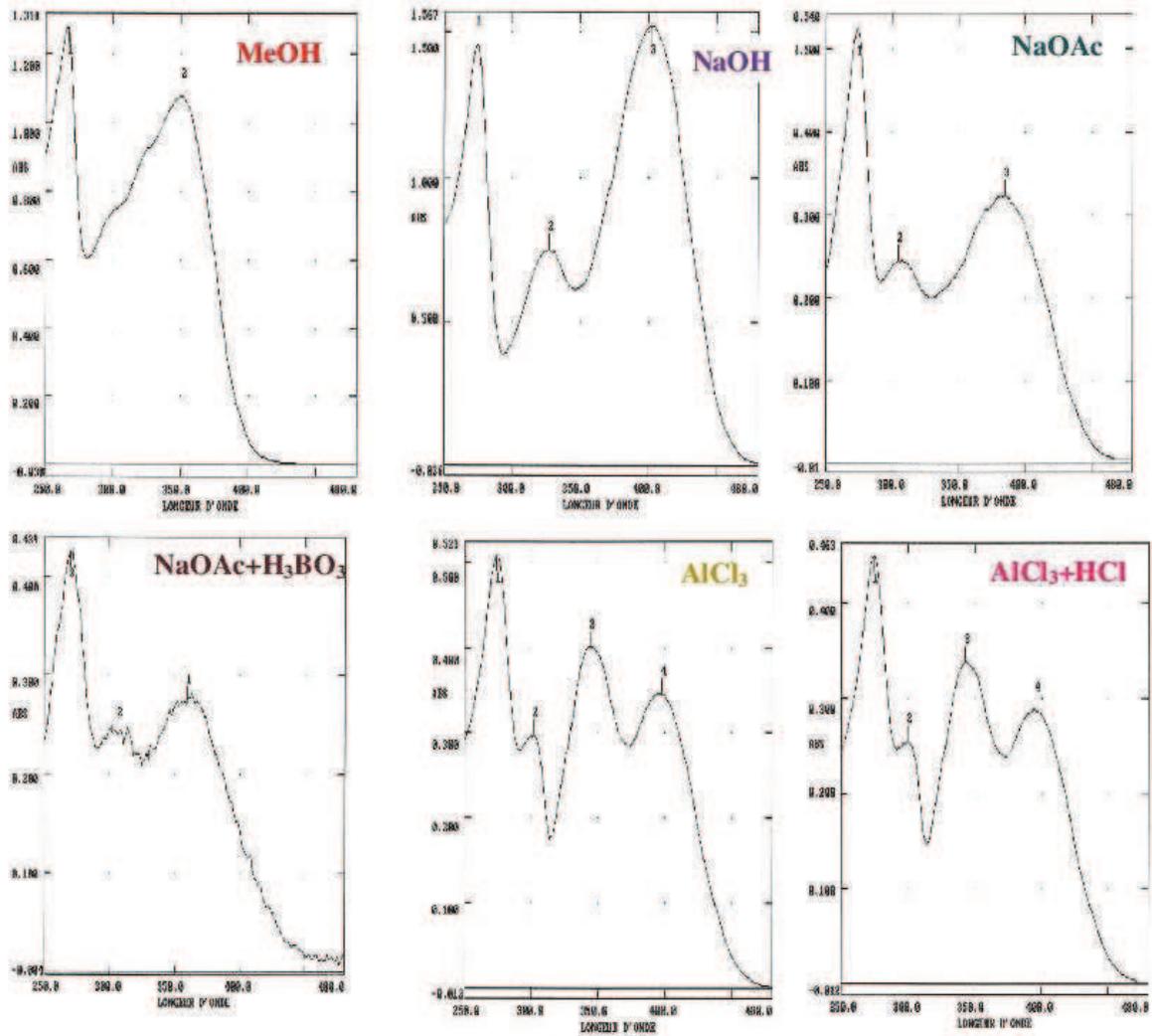
طيف ¹H-RMN جاء ليؤكد كل المعلومات السابقة إذ ظهرت بروتونات الهيكل الأجليكوني الموافقة للـ Kaempférol من خلال ظهور إشارات الحلقة B (H-2', H-6') و (H-3', H-5') على شكل إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H و ثابتة تزاوج 8.9 هرتز لكليهما حيث ترن الأولى عند 8.08 ppm و الثانية عند 6.91 ppm. إشارتي الحلقة A (H-8 و H-6) ظهرت على شكل إشارتين ثنائيتين بتكامل 1H و ثابتة تزاوج 2.1 هرتز لكل منهما، عند 6.43 و 6.23 ppm على التوالي.

أما عن الجزء السكري فيتبين من طيف $^1\text{RMN-H}$ أنه glucose و هذا من خلال بروتونه الأوميري الذي رن عند 5.28 ppm و تميز بثابتة تزاوج 7.5 هرتز مما يدل على أن ارتباطه بالأجليكون من نوع β . أما بقية بروتونات السكر فتمركزت في المجال من (3.2 – 3.7 ppm). الإماهة الحمضية حررت سكر الـ glucose من الموقع 3 إذ أعطت أجليكونا أصفر اللون.

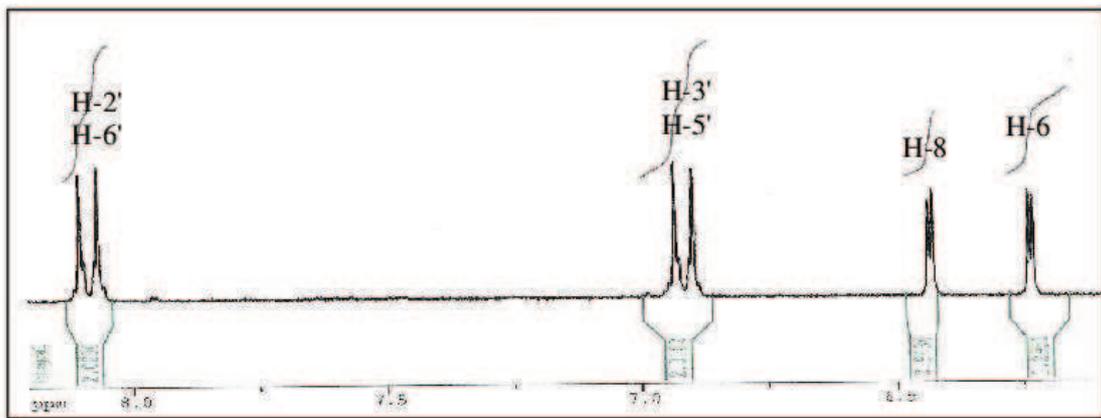
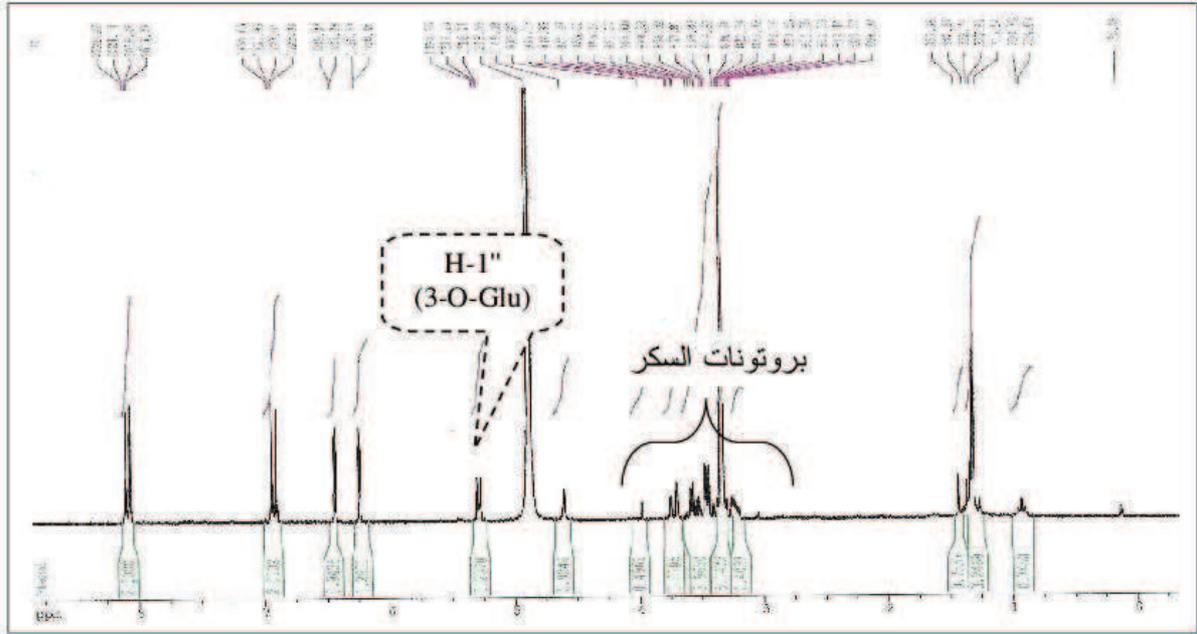
و عليه فالبنية النهائية للمركب f_1 هي :



Kaempférol-3-O- β -glucoside



الشكل 1- f1: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f1



الشكل 2-f1: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب f1

التعيين البنوي للمركب $f_2 = 921$:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول f_2-1 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_2

الجملة	10 : 1 : 1	4 : 3 : 3	13 : 3 : 3 : 1
ثابت الإنحباس R_f	0.74	0.21	0.55
اللون الإستشعاعي	بنفسجي		

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول f_2-2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (f_2-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	353	254 (266 sh)
NaOH	413 (328)	272
NaOAc	384	274
NaOAc + H ₃ BO ₃	364	270
AlCl ₃	396 (357 sh)	268 (300 sh)
AlCl ₃ + HCl	397 (357 sh)	269 (302 sh)

2. جدول f2-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعاً للشكل (2-f2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2'	d	1.9	1H	7.96
H-6'	dd	8.5 , 1.9	1H	7.61
H-5'	d	8.5	1H	6.93
H-8	d	1.7	1H	6.42
H-6	d	1.7	1H	6.23
H-1'' (3-O-Glu)	d	7.3	1H	5.43
O-CH ₃	s	-	3H	3.97

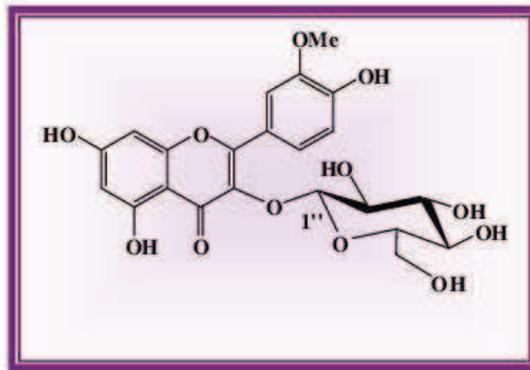
ثانياً: قراءة النتائج وتحديد البنية النهائية للمركب 921 = f2:

السلوك الكروماتوغرافي للمركب في الجمل الثلاثة يدل على أنه جليكوزيد أحادي السكر، قيمة العصابة I في الميثانول 353 نم و لونه البنفسجي دليل على أنه فلافونول مستبدل في الموقع 3، ظهور إنثناء عند 266 نم بجانب العصابة II دليل على أن الحلقة B ثنائية الاستبدال على الأقل، كما نلاحظ ظهور عصابة جديدة عند 328 نم بعد إضافة NaOH و كذلك إزاحة باثوكرومية على مستوى العصابة II بعد إضافة NaOAc مقارنة بطيف الميثانول و المقدرة بـ 20 نم دليل وجود OH حر في الموضع 7، الإزاحة الباثوكرومية (+11 نم) للعصابة I عند مقارنة طيفي NaOAc + H₃BO₃ و الميثانول تدل على غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل و يؤكد هذا غياب إزاحة هيبسوكرومية لطيف AICl₃ + HCl مقارنة بطيف AICl₃، أما الإزاحة الباثوكرومية عند مقارنة طيف AICl₃ + HCl بطيف الميثانول و المقدرة بـ 44 نم فتدل على وجود 5-OH .

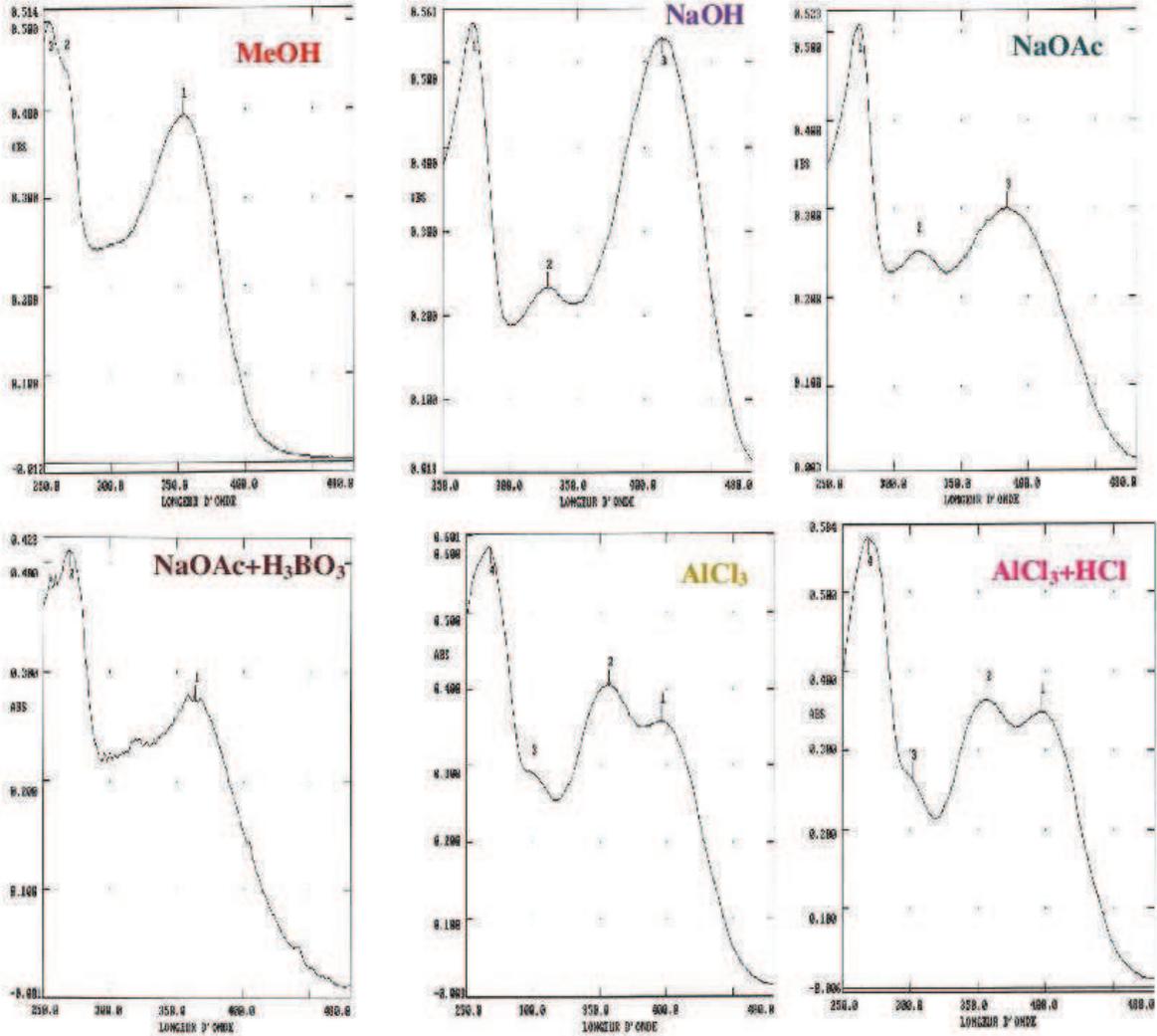
طيف ¹H-RMN بين أن الحلقة B ثنائية الاستبدال و هذا من خلال ظهور إشارات البروتونات الثلاثة. حيث يرن البروتون H-2' عند 7.96 ppm على شكل ثنائي بثابتة تزاوج 1.9 هرتز، و يظهر البروتون H-6' عند 7.61 ppm على شكل ثنائي ثنائي بثابتة تزاوج 8.5 و 1.9 هرتز، أما البروتون H-5' فيرن عند 6.93 ppm بثابتة تزاوج 8.5 هرتز، كما ظهرت إشارتي البروتونين H-8 و H-6 للحلقة A على شكل ثنائي بثابتة تزاوج 1.7 هرتز لكل منهما، ترن الأولى عند 6.42 ppm و الثانية

عند 6.23 ppm، أظهر نفس الطيف إشارة أحادية بتكامل 3H عند 3.97 ppm خاصة بمجموعة ميثوكسي. و يبين أيضا إشارة ثنائية بتكامل 1H و بثابتة تزاوج 7.3 هرتز ترن عند 5.43 ppm خاصة بسكر الـ glucose، الإماهة الحمضية حررت سكر glucose من الموقع 3 إذ أعطت أجليكونا أصفر اللون.

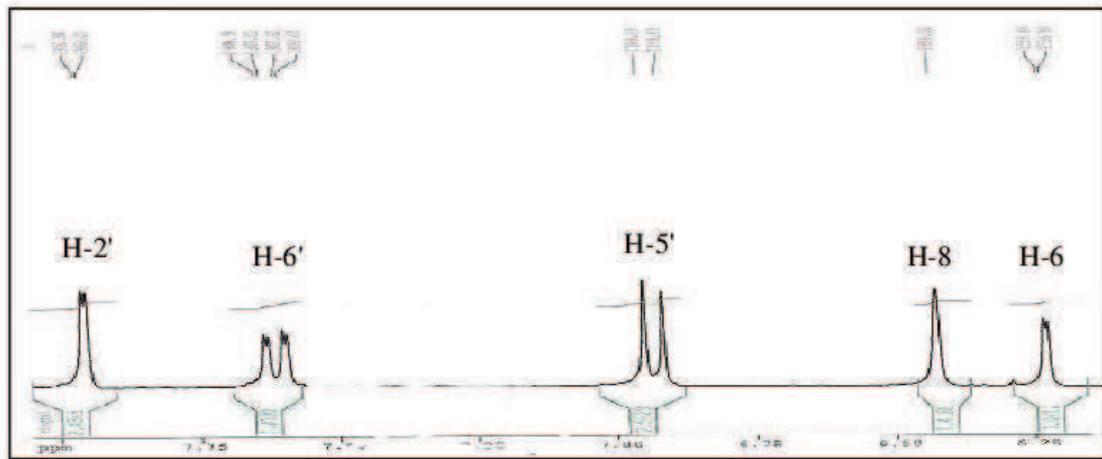
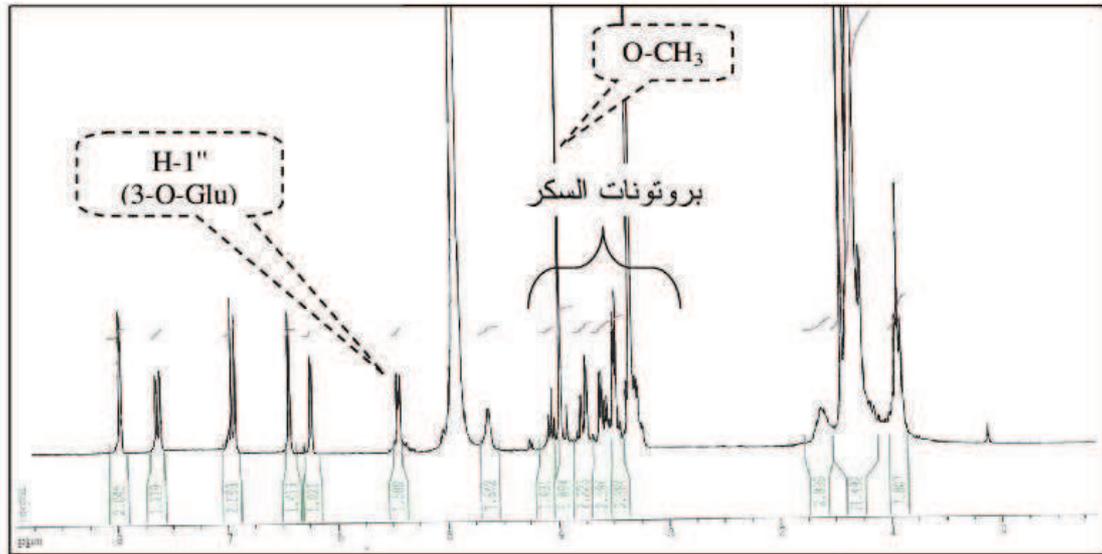
و عليه فالبنية النهائية للمركب f2 هي:



Isorhamnétin-3-O-β- glucoside



الشكل 1-f2: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f2



الشكل 2-f2: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب f2

التعيين البنوي للمركب $f_3 = 83$:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول f_3-1 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_3

الجملة	10 : 1 : 1	4 : 3 : 3	13 : 3 : 1
ثابت الإنحباس R_f	0.69	0.54	0.55
اللون الإستشعاعي	بنفسجي		

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول f_3-2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (f_3-1):

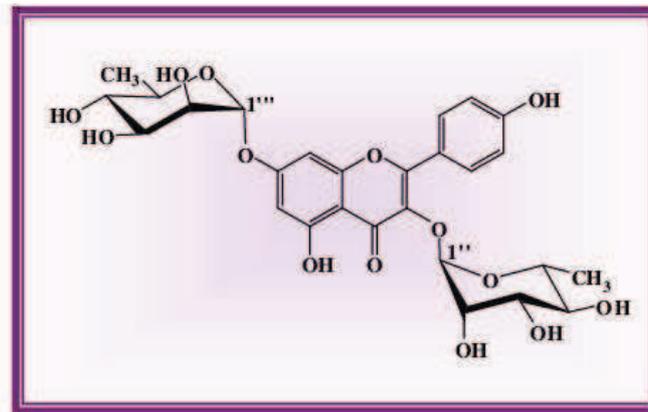
الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	343	266
NaOH	389	266
NaOAc	362	266
NaOAc + H ₃ BO ₃	345	266
AlCl ₃	397 (340 sh)	269 (298 sh)
AlCl ₃ + HCl	396 (239 sh)	274 (298 sh)

2. جدول 3-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعا للشكل (2-3):

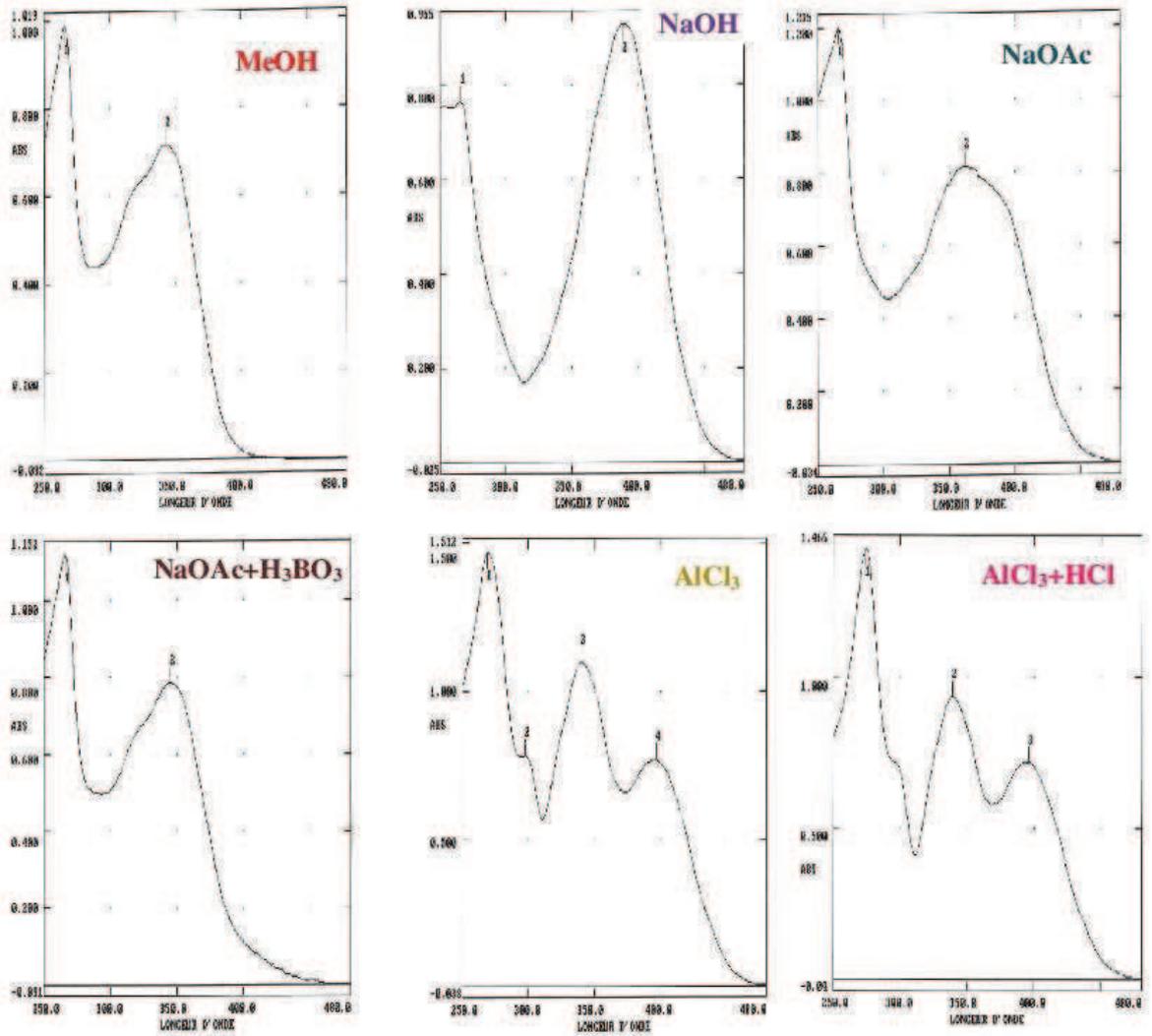
الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج J (Hz)	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	8.9	2H	7.83
H-3' , H-5'	d	8.9	2H	6.97
H-8	d	2.1	1H	6.76
H-6	d	2.1	1H	6.50
H-1'''(7-O-Rha)	d	1.7	1H	6.59
H-1''(3-O-Rha)	d	1.7	1H	5.42
CH ₃ (7-O-Rha)	d	6.1	3H	1.29
CH ₃ (3-O-Rha)	d	5.7	3H	0.96

ثانيا: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب 83 = 3:

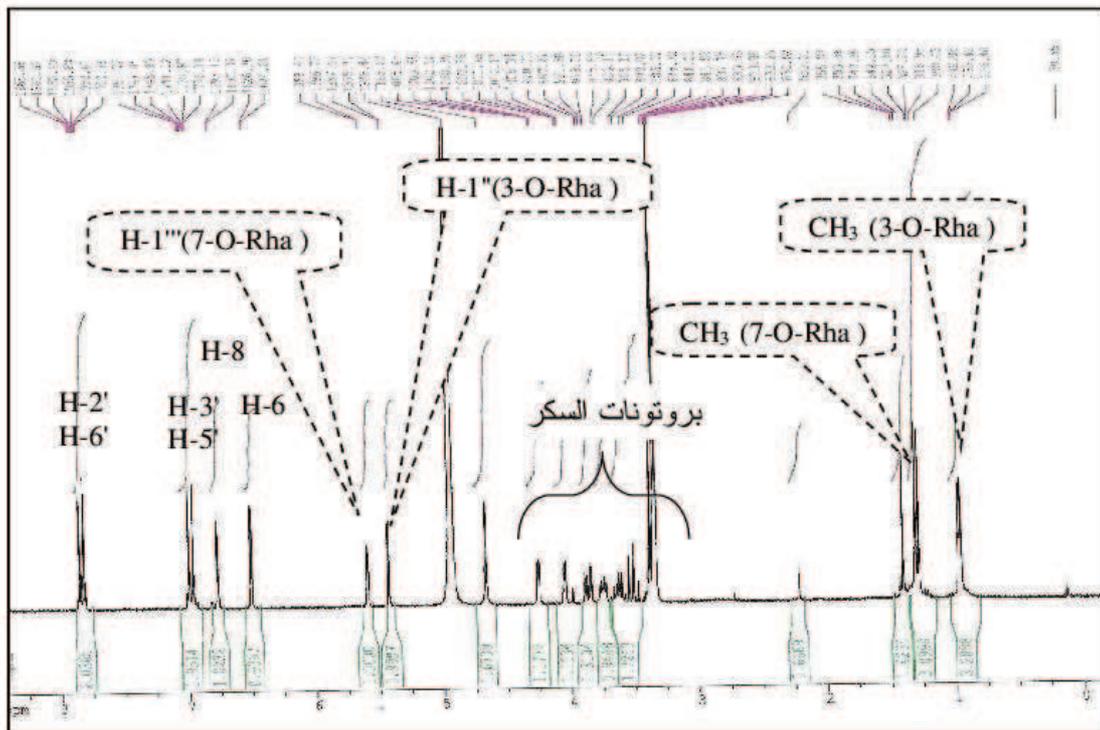
الخصائص الكروماتوغرافية من لون إستشعاعي و ثابت الإنحباس R_f و كذا المعطيات الطيفية و المتمثلة في سلسلة الأشعة فوق البنفسجية مع مختلف المفاعلات و طيف $^1\text{H-NMR}$ مطابقة للمركب المفصول من النبتة *R. arabica* و يتعلق الأمر بـ a₁.
و عليه فالمركب 3 هو :



Kaempférol-3,7-di-O- α -rhamnoside



الشكل 1-f3: سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f3



الشكل 2-f3: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب f3

التعيين البنوي للمركب $f_4 = 71$:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول -1-f4 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f4

الجملة	10 : 1 : 1	4 : 3 : 3	13 : 3 : 3 : 1
ثابت الإنحباس R_f	0.65	0.64	0.65
اللون الإستشعاعي	بنفسجي		

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول -2-f4: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (1-f4):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	349	254 (265)
NaOH	405	264
NaOAc	403	257
NaOAc + H ₃ BO ₃	352	254
AlCl ₃	399 (351 sh)	268
AlCl ₃ + HCl	398 (352 sh)	269

2. جدول 3-4: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون:

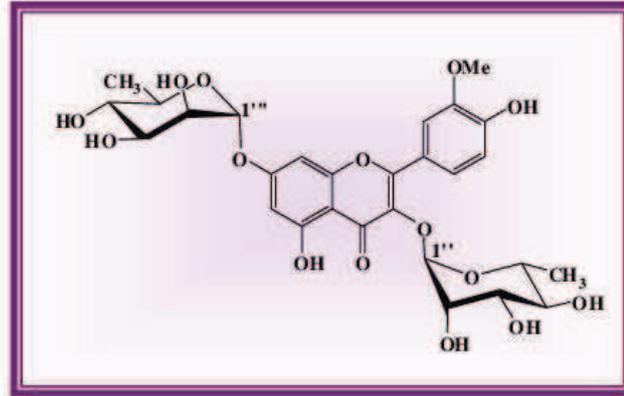
الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2'	sl	-	1H	7.50
H-6'	dd	8.0 , 1.9	1H	7.47
H-5'	d	8.0	1H	6.96
H-8	d	1.9	1H	6.78
H-6	d	1.9	1H	6.52
H-1'''(7-O-Rha)	d	1.5	1H	5.58
H-1''(3-O-Rha)	d	1.5	1H	5.41
CH ₃ (7 -O-Rha)	d	6.2	3H	1.28
CH ₃ (3 -O-Rha)	d	6.2	3H	0.95
O-CH ₃	s	-	3H	3.97

3. جدول 4-4: نتائج طيف الكتلة تبعاً للشكل (2-4):

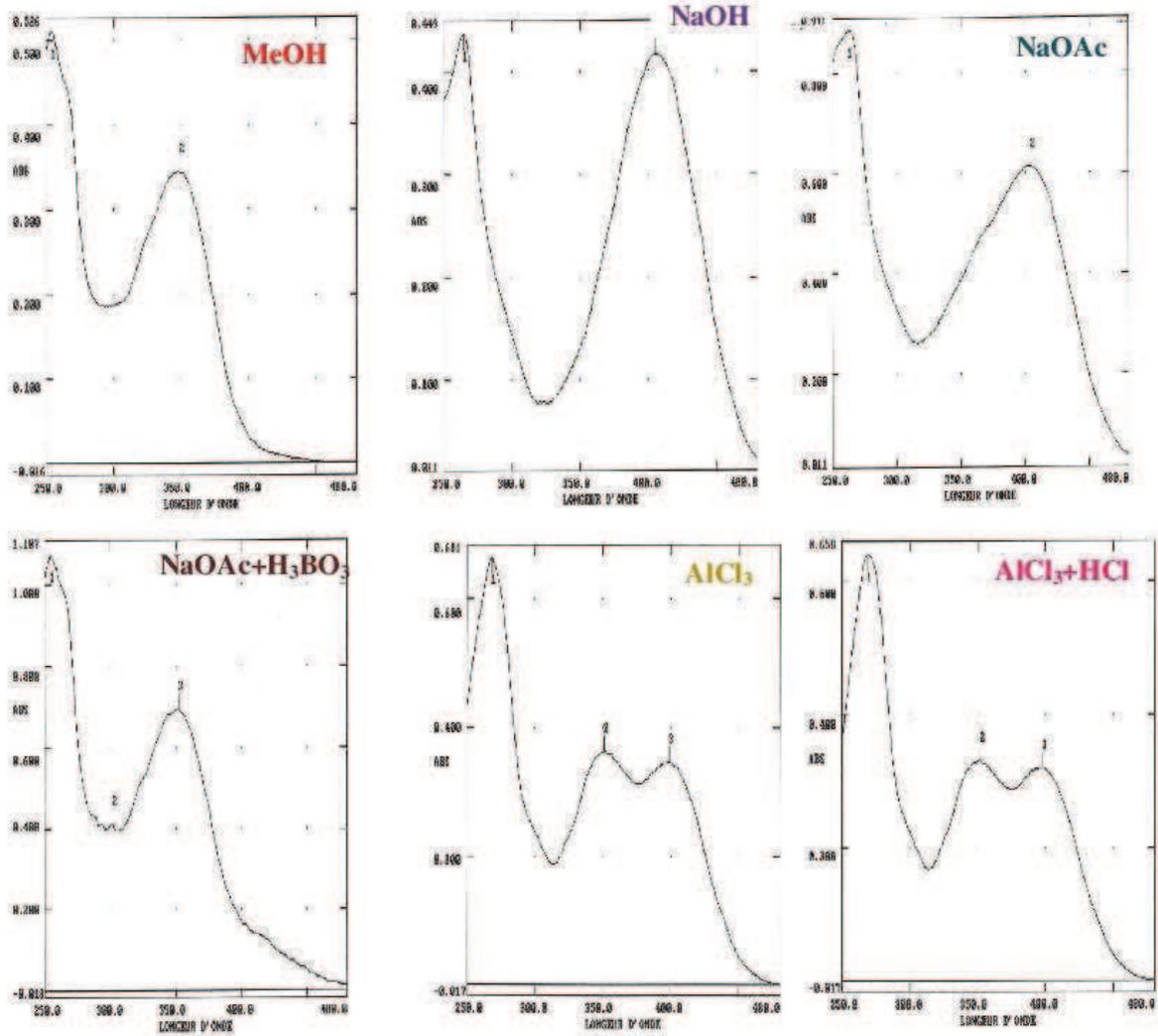
الشظية	% الشدة	m/z
[M + 2Na + K] ³⁺	24.09	673.3
[M-H + 2Na + K] ³⁺	70.8	672.3
[M + H] ⁺	65.69	609.3
[M + R - ORha] ⁺	27.73	464.0
[M + K-H- ORha] ⁺	100	463.2
[M-2H-ORha-H ₂ O] ⁺	89.78	425.3
[M-2H-ORha-Rha] ⁺	7.3	299.2
[M-ORha-Rha-OMe] ⁺	21.89	266.2

ثانياً: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب $f_4 = 71$:

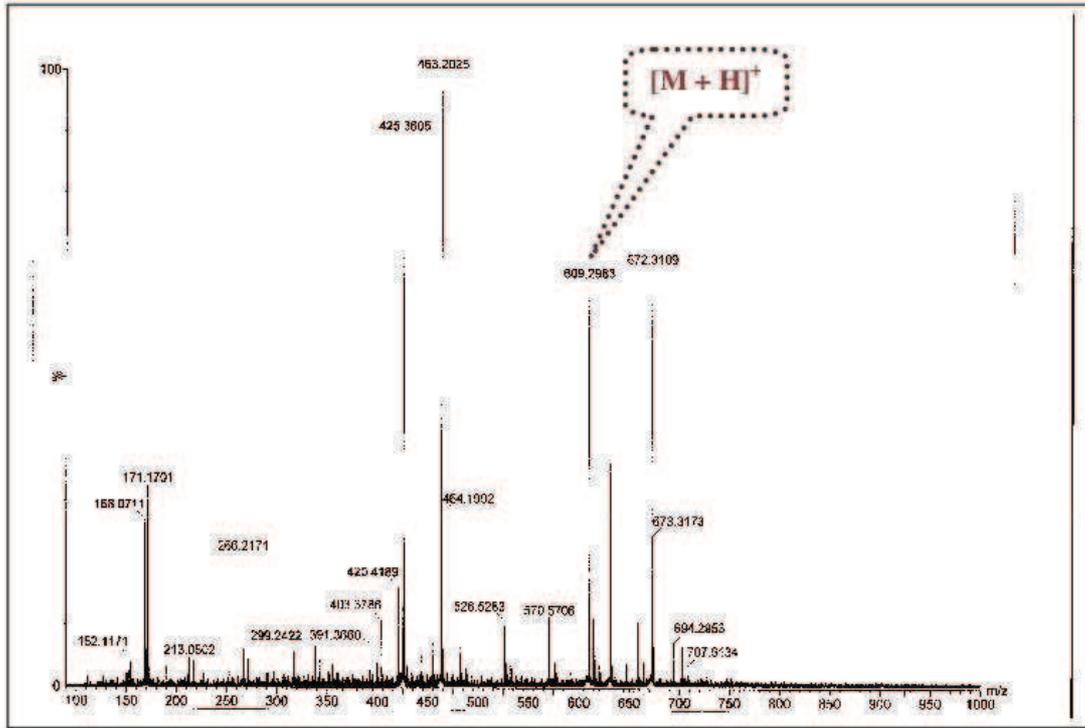
الخصائص الكروماتوغرافية و كل النتائج الطيفية مطابقة للمركب a_2 المفصول من *R. arabica* و عليه فالمركب f_4 هو:



Isorhamnétin -3,7-di-O- rhamnoside



الشكل 1-f4: سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f4



الشكل 2-f4: طيف الكتلة للمركب f4 بتقنية ES⁺

التعيين البنوي للمركب $f_5 = F_9_3$

أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول -1- f_5 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_5

الجملة	10 : 1 : 1	4 : 3 : 3	13 : 3 : 3 : 1
ثابت الإنحباس R_f	0.51	0.31	0.59
اللون الإستشعاعي	بنفسجي		

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول -2- f_5 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (1- f_5):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	352	255 (265)
NaOH	401	264
NaOAc	395	262
NaOAc + H ₃ BO ₃	369	262
AlCl ₃	421 (345 sh)	273
AlCl ₃ + HCl	399 (354 sh)	271

2. جدول f_5-3 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعاً للشكل (2- f_5):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2'	d	2.0	1H	7.39
H-6'	dd	2.0 , 8.2	1H	7.37
H-5'	d	8.2	1H	6.94
H-8	d	2.1	1H	6.75
H-6	d	2.1	1H	6.49
H-1'''(7-O-Rha)	d	2.0	1H	5.58
H-1''(3-O-Rha)	d	2.0	1H	5.40
CH ₃ (7 -O-Rha)	d	6.7	3H	1.29
CH ₃ (3 -O-Rha)	d	6.0	3H	0.97

ثانياً: قراءة النتائج وتحديد البنية النهائية للمركب $f_5 = F9_3$:

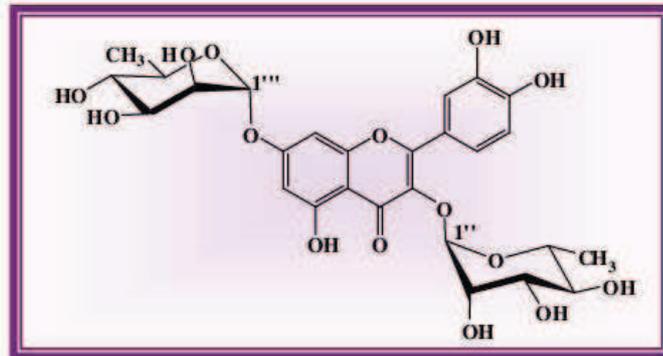
اللون البنفسجي للمركب f_5 تحت الأشعة فوق البنفسجية و قيمة العصابة I في الميثانول 352 نم تدل على أن المركب فلافونول مستبدل في الموقع 3. ظهور إنتناء عند 265 نم بجانب العصابة II يدل على أن الحلقة B ثنائية الإستبدال على الأقل، الإزاحة الباثوكرومية للمركب على مستوى العصابة I عند إضافة NaOH المقطرة بـ 49 نم مع زيادة في شدة الإمتصاص تدل على وجود 4'-OH و نستدل على وجود 7-OR من الإزاحة الباثوكرومية الضعيفة للعصابة II عند مقارنة طيف الميثانول بطيف NaOAc، الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I لطيف NaOAc + H₃BO₃ مقارنة بقيمتها في الميثانول وصلت إلى + 17 نم دليل وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على مستوى الحلقة B، و تؤكد الإزاحة الهيبسوكرومية لطيف HCl + AlCl₃ مقارنة بطيف المقطرة بـ 22 نم، و نستدل على وجود 5-OH من الإزاحة الباثوكرومية المقطرة بـ 47 نم للعصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيف HCl + AlCl₃

هذه النتائج تقودنا إلى أن البنية الأولية للمركب f_5 هي Quercétine مستبدل في الموضع 3 و 7 بسكرين و هذا و حسب قيمة R_f في الجمل الثلاث التي تدل على أن المركب ثنائي السكر.

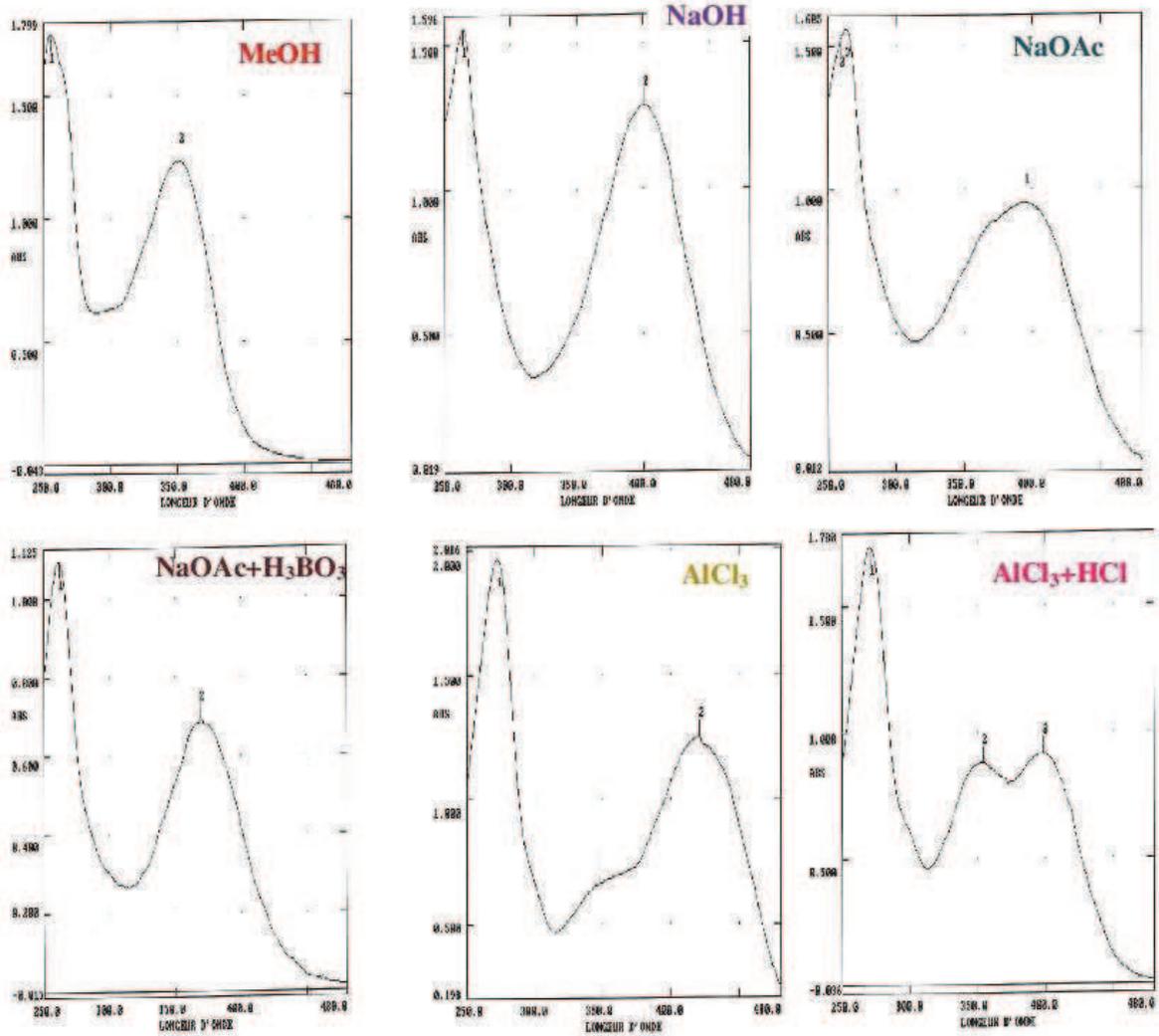
طيف $^1\text{H-NMR}$ جاء ليؤكد كل النتائج السابقة إذ أظهر البروتونات الثلاثة للحلقة B، حيث يرن $\text{H-2}'$ عند 7.39 ppm على شكل ثنائي بثابتة تزاوج تقدر بـ 2 هرتز و $\text{H-6}'$ عند 7.37 ppm على شكل ثنائي ثنائي بثابتة تزاوج (8.2 , 2 هرتز) و البروتون $\text{H-5}'$ عند 6.94 ppm على شكل ثنائي بثابتة تزاوج 8.2 هرتز. و ظهر البروتون H-8 للحلقة A على شكل ثنائي عند 6.75 ppm بثابتة تزاوج 2.1 هرتز، و جاء البروتون H-6 على شكل ثنائي بنفس ثابتة التزاوج و رن عند 6.49 ppm، كما أثبت طيف $^1\text{H-NMR}$ وجود سكرين من نوع الـ rhamnose حيث ظهر البروتون الأنوميري الأول و المرتبط بالكربون 7 عند 5.58 ppm على شكل ثنائي و بثابتة تزاوج 2 هرتز مرفوق بمثيله الذي رن عند 1.29 ppm على شكل إشارة ثنائية بثابتة تزاوج 6.7 هرتز، أما الـ rhamnose الثاني و المرتبط بالكربون 3 فظهر بروتونه الأنوميري على شكل إشارة ثنائية بثابتة تزاوج 2 هرتز عند 5.4 ppm مرفوق بإشارة ثنائية أخرى ذات ثابتة تزاوج 6 هرتز ترن عند 0.97 ppm خاصة بمثيله.

طيف $^1\text{H-NMR}$ ثنائي البعد بتقنية ROESY (شكل (3-5)) أعطى: نقاط تعالق بين البروتونين H-6 و H-8 مع البروتون الأنوميري ذو الإزاحة 5.58 ppm لتؤكد على أنه مرتبط بالكربون 7، كما ظهرت نقاط تعالق بين البروتونين $\text{H-2}'$ و $\text{H-6}'$ و البروتون الأنوميري لسكر الـ rhamnose الذي يرن عند 5.4 ppm و كذلك مع بقية بروتوناته مما يدل على أن هذا الأخير متواجد في الموقع 3. نلاحظ نقطتي تعالق صغيرة بين البروتون الأنوميري المتواجد في الموقع 7 و المثل ذو الإزاحة 1.29 ppm مما يؤكد أنه خاص بالـ rhamnose المرتبط بـ C-7، كما نلاحظ نقطة تعالق بعيدة بين البروتون الأنوميري المتواجد في الموقع 3 و المثل ذو الإزاحة 0.97 ppm مما يؤكد أنه خاص بالـ rhamnose المرتبط بـ C-3.

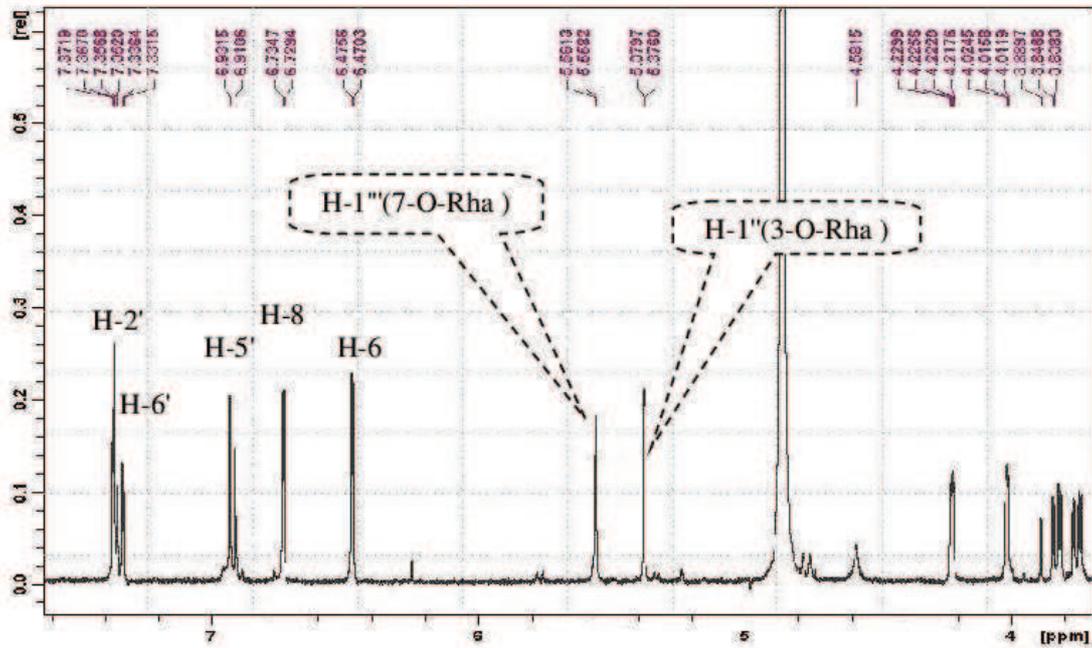
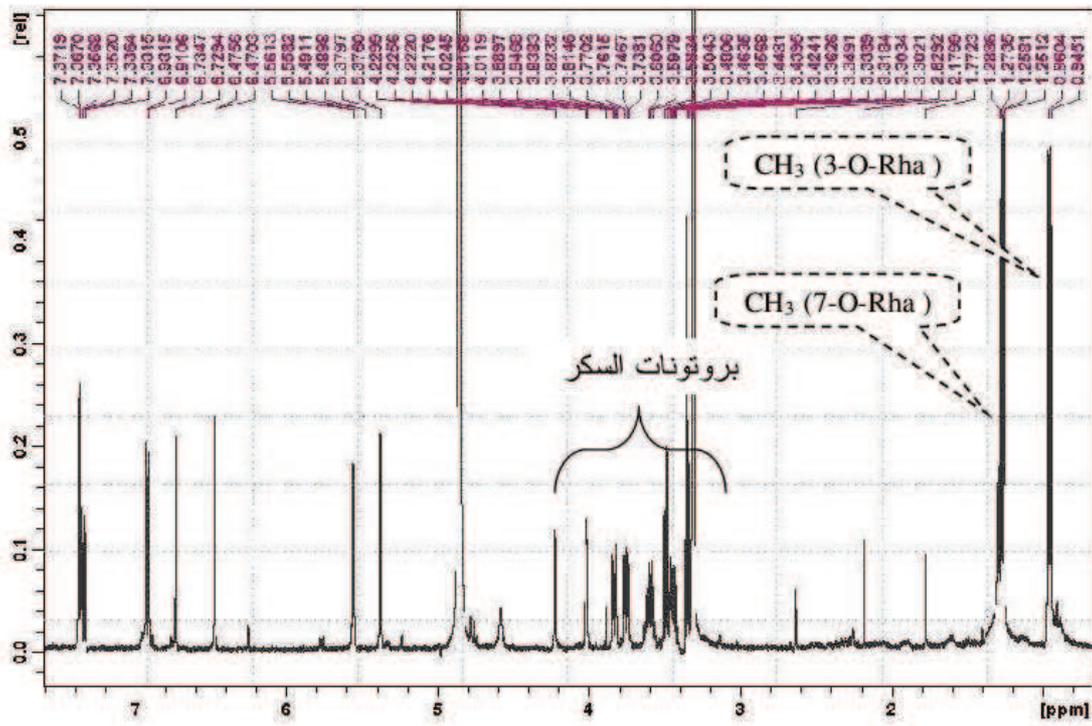
وعليه فينية المركب 5 النهائية هي :



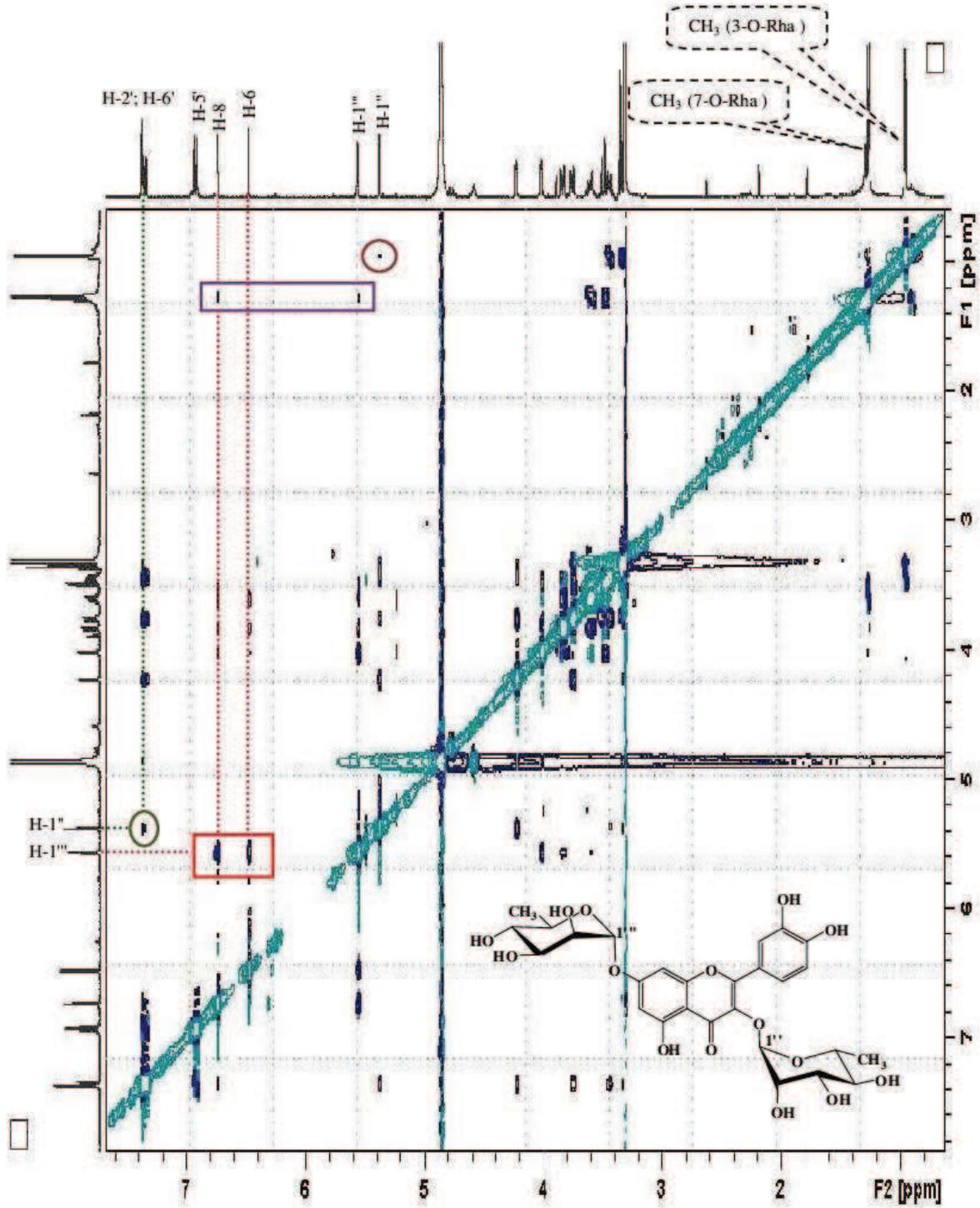
Quercétin -3,7-di-O- α -rhamnoside



الشكل 1-f5: سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f5



الشكل 5-2: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب 5

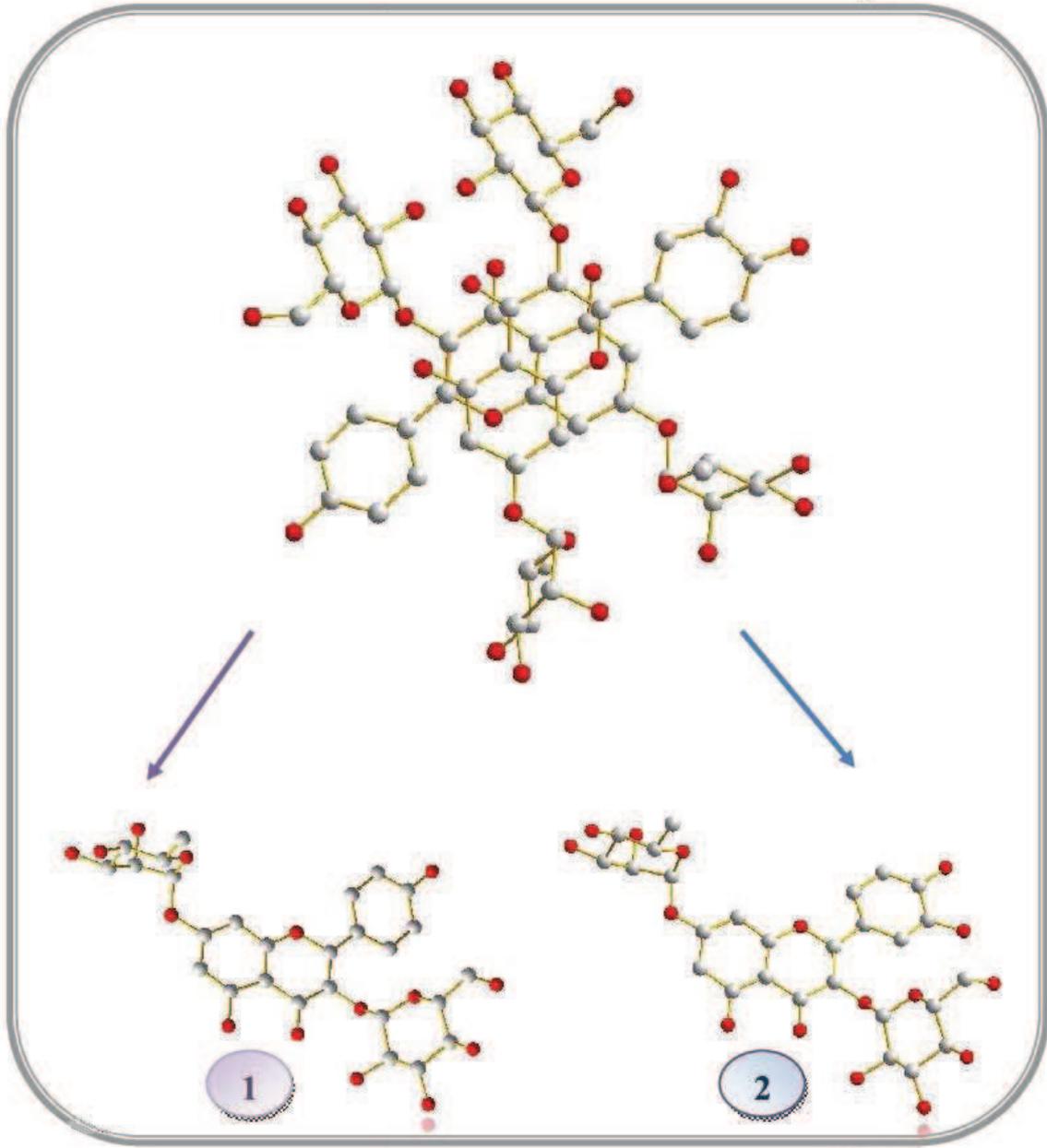


الشكل 3-f5: طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية *Raesy* للمركب f5

التعرف على البلورات المفصولة من الطور البوتانولي:

نعود و نذكر عن تشكل بلورات إيرية في الطور البوتانولي الثالث بعد عملية الإستخلاص حيث تم غسلها بدفعات متتالية من الميثانول و الحصول عليها في صورة نقية.

قمنا بتسجيل طيف الأشعة X لهذه البلورات إذ أعطى خلية من نوع trigonal تحمل جزيئتين مترافقتين كما في الشكل 1 :



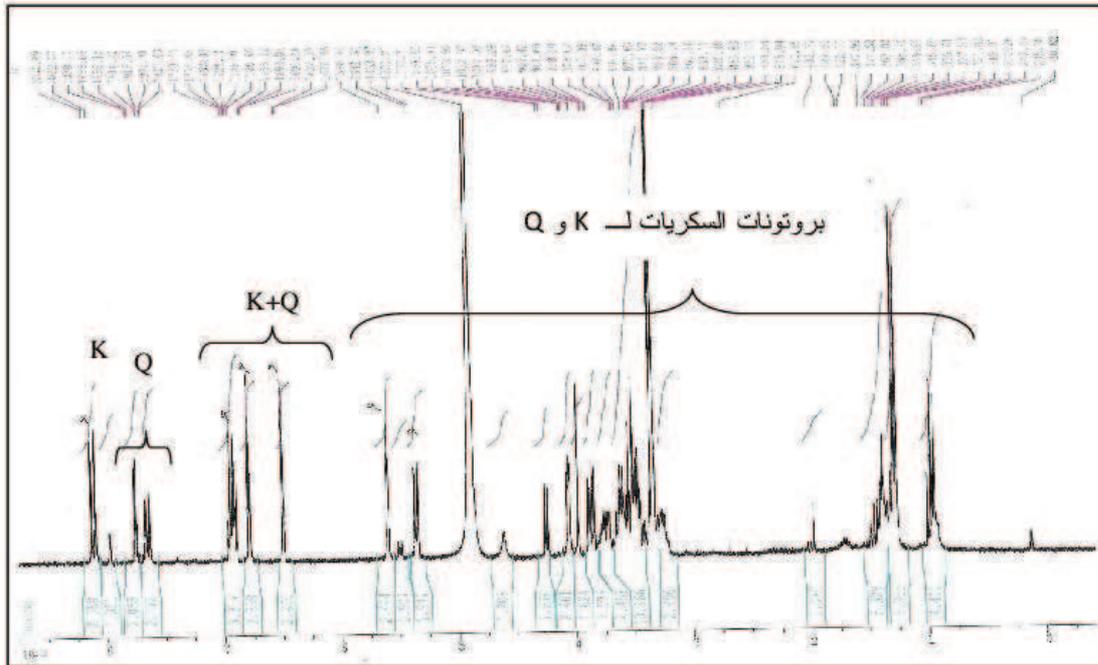
الشكل 1: طيف الأشعة X للبلورات المفصولة من المستخلص البوتانولي

الجزئتين عبارة عن مركبين ذو طبيعة فلافونيدية

الجزئية الأولى: **Kaempférol-3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside**

الجزئية الثانية: **Quercétin-3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside**

طيف $^1\text{H-NMR}$ بين فعلا أن البلورات عبارة عن خليط من مركبين إذ يحمل بروتونات الكمبفرول و الكرسيتين أما عن بروتونات السكريات فجاءت إشاراتهما متداخلة و أحيانا متطابقة فيما بينها (الشكل 2).



الشكل 2: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للبلورات المفصولة من المستخلص البوتانولي

بعد عملية الفصل بالعمود الكروماتوغرافي على متعدد الأميد تم الحصول على المركب الأول على شكل صلب في عدة كسور من بينها الكسر f_8 ، إذ تم تسميته المركب f_6

أما عن الكرسيتين ثنائي السكر حصلنا عليه من الكسر f_{12} على شكل بلورات دقيقة تم تسميته f_8 . سنوضح فيما يلي المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركبين و التي جاءت متطابقة مع الهيكلين الفلافونيديين.

التعيين البنيوي للمركب $f_6 = \text{solide}$:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :**I. الخصائص الكروماتوغرافية:**جدول f_6-1 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_6

13 : 3 : 3 : 1	4 : 3 : 3	10 : 1 : 1	الجملة
0.62	0.29	0.49	ثابت الإنحباس R_f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:1. جدول f_6-2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (f_6-1):

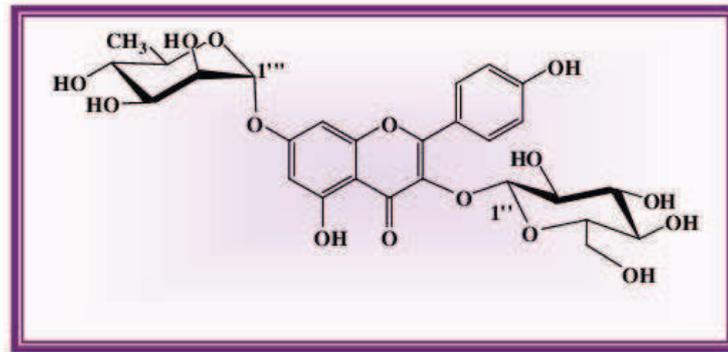
الكاشف	العصاية I (نم)	العصاية II (نم)
MeOH	350	265
NaOH	402	265
NaOAc	400	267
NaOAc + H ₃ BO ₃	352	267
AlCl ₃	398 (346 sh)	270 (300 sh)
AlCl ₃ + HCl	397 (345 sh)	275 (298 sh)

2. جدول f6-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعاً للشكل (f6-2):

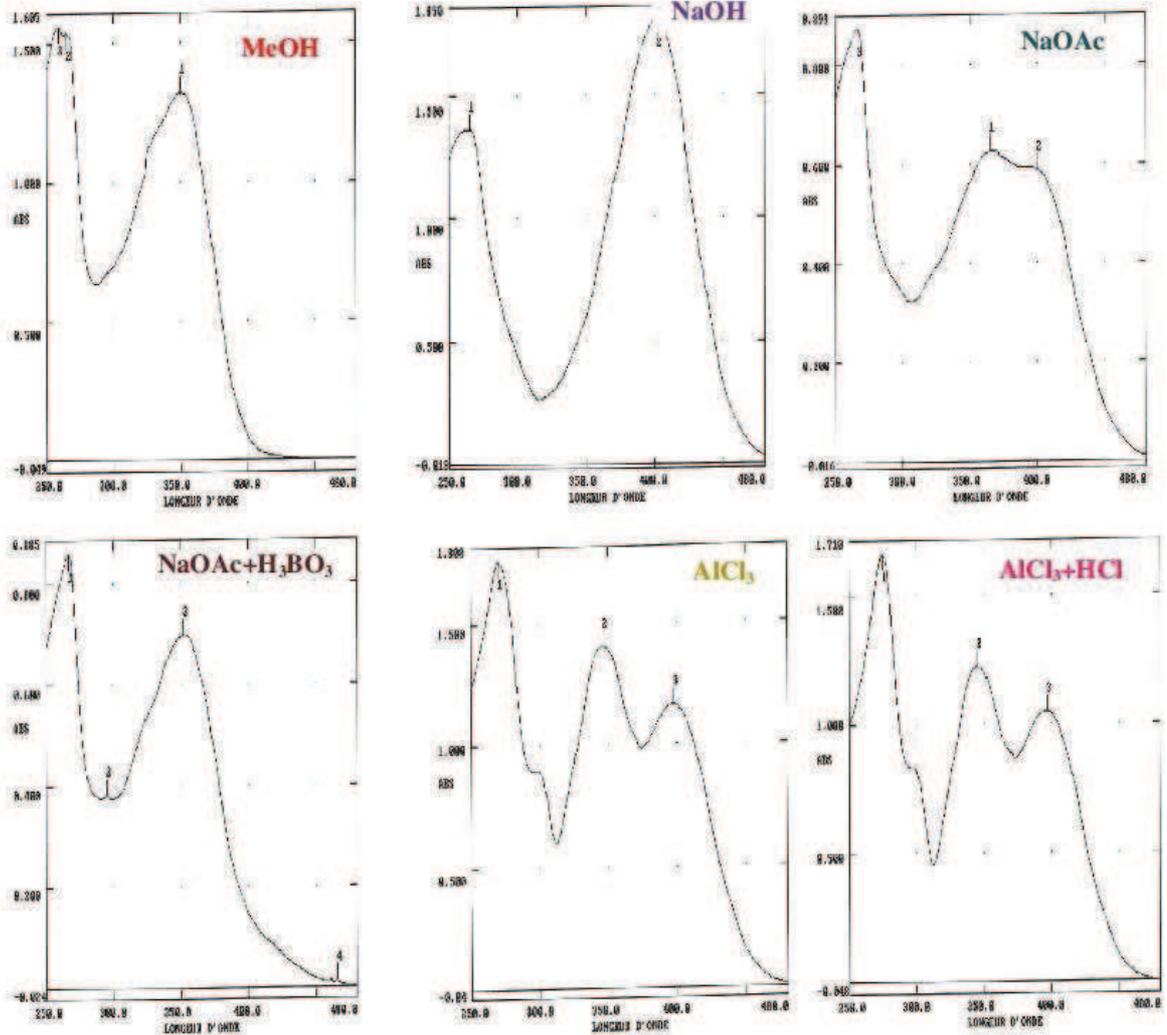
الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة الإقتران (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	8.7	2H	8.10
H-3' , H-5'	d	8.7	2H	6.92
H-8	d	2.0	1H	6.78
H-6	d	2.0	1H	6.48
H-1'''(7-O-Rha)	d	1.1	1H	5.59
H-1''(3-O-Glu)	d	7.5	1H	5.35
CH ₃ (7-O-Rha)	d	6.1	3H	1.27

ثانياً: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب f6 = solide:

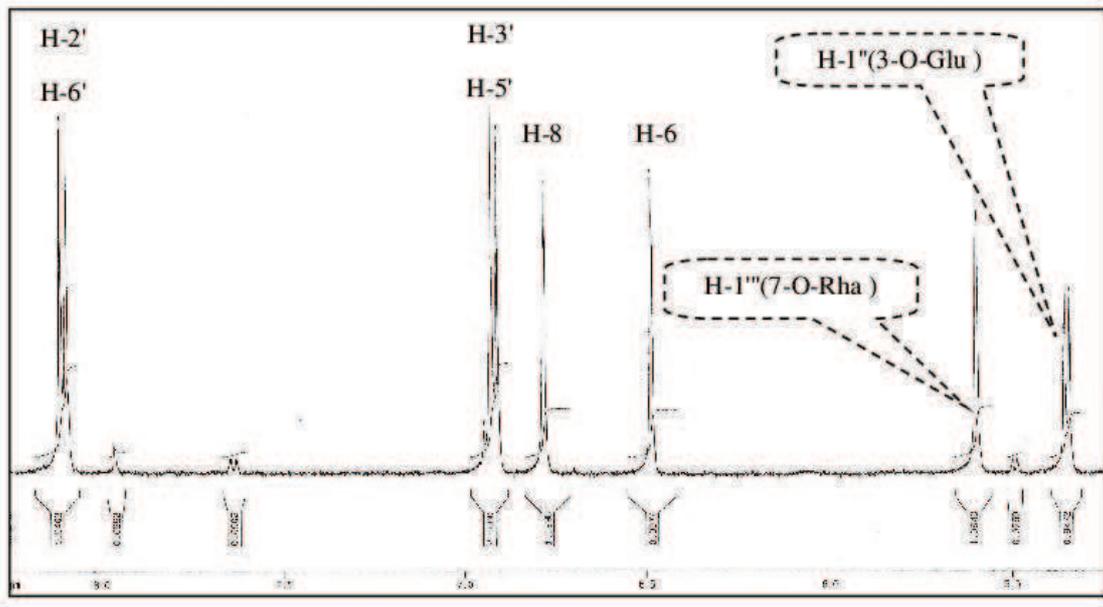
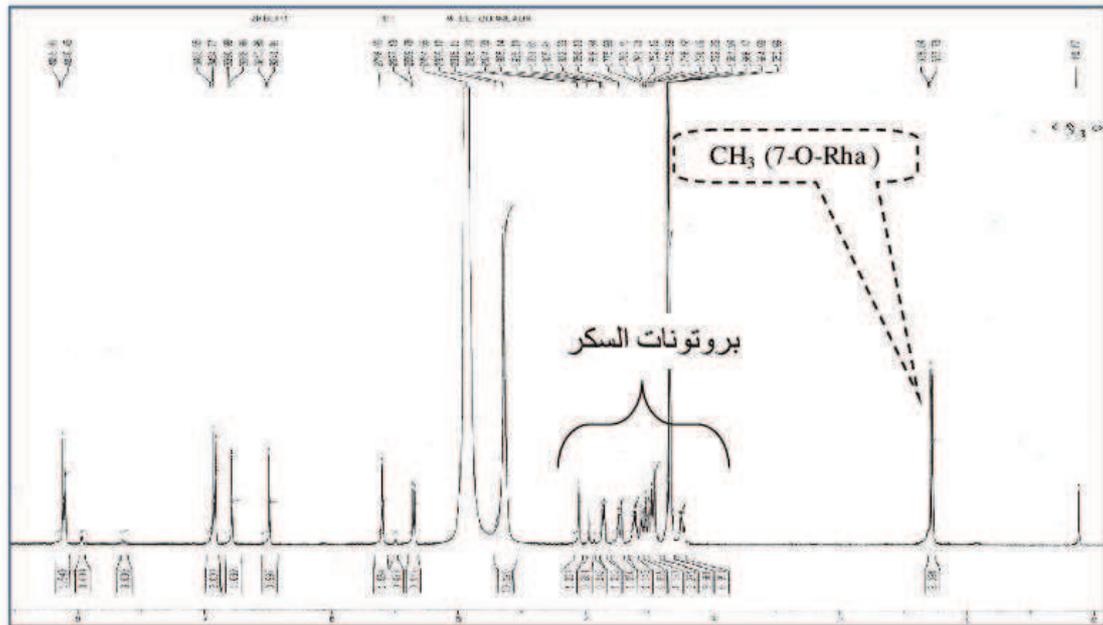
كل النتائج الطيفية مطابقة للمركب المفصول من *R. arabica* و يتعلق الأمر بـ a₃. إضافة إلى أن طيف الكتلة (شكل 3- f6) أعطى الصيغة الجزيئية C₂₇H₂₀O₁₅ و هذا من خلال القيمة 617 = [M + Na]⁺ التي تتمن كل المعطيات السابقة .
و عليه فبنية المركب f6 هي:



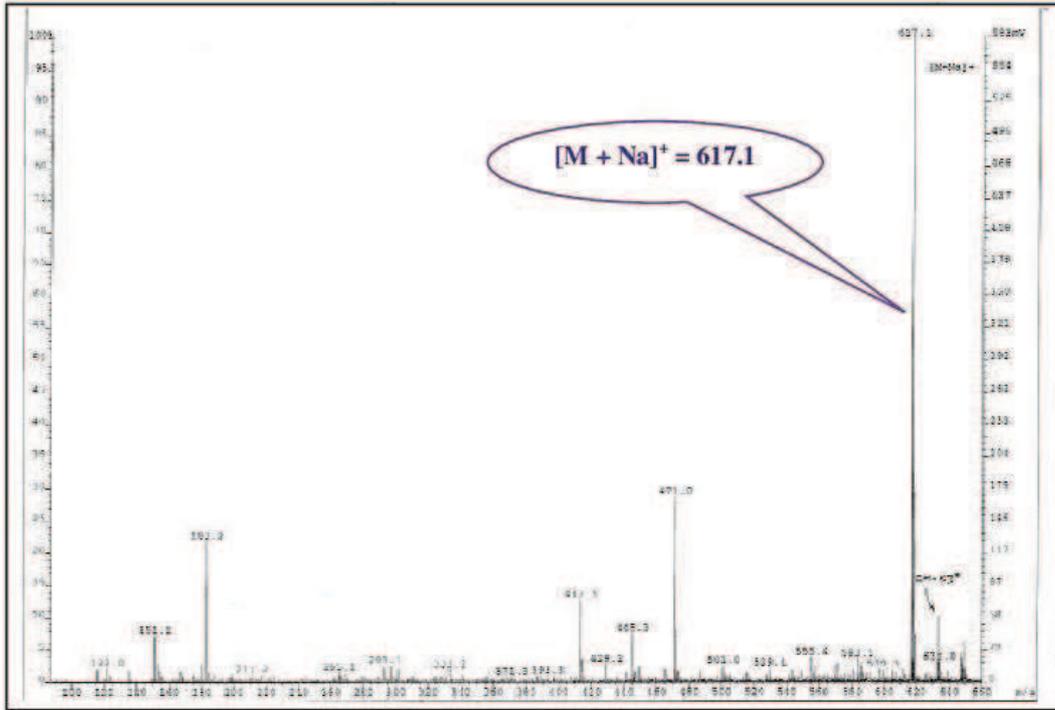
Kaempférol -3-O-β- glucoside-7-O-α-rhamnoside



الشكل 1-f6: سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f6



الشكل 2-f6: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب f6



الشكل 3- f_6 : طيف الكتلة للمركب f_6

التعيين البنوي للمركب $f_8 = \text{crystal}$:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول f_8-1 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_8

13 : 3 : 3 : 1	4 : 3 : 3	10 : 1 : 1	الجملة
0.59	0.17	0.33	ثابت الإنحباس R_f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

3. جدول f_8-2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (f_8-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	355	257
NaOH	410	269
NaOAc	359	161
NaOAc + H ₃ BO ₃	375	262
AlCl ₃	423	274
AlCl ₃ + HCl	403	269

4. جدول f_8-3 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعاً للشكل (f_8-2):

الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة الإقتران (J (Hz)	التكامل	δ (ppm)
H-2'	d	2.2	1H	7.74
H-6'	dd	8.5 , 2.2	1H	7.62
H-5'	d	8.5	1H	6.89
H-8	d	2.2	1H	6.75
H-6	d	2.2	1H	6.46
H-1'''(7-O-Rha)	d	1.5	1H	5.58
H-1''(3-O-Glu)	d	7.4	1H	5.34
CH ₃ (7-O-Rha)	d	6.1	3H	1.27

ثانياً: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب $f_8 = \text{crystal}$:

الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_8 و قيمة العصابة II في الميثانول المقطرة بـ 355 نم تبرهن على أن المركب فلافونول ثنائي السكر مستبدل في الموضع 3، نستدل على وجود 7-OR من طيف NaOAc مقارنة بطيف الميثانول على مستوى العصابة II و الإزاحة الباثوكرومية الضعيفة. طيف NaOAc + H₃BO₃ أظهر إزاحة باثوكرومية مقطرة بـ 20 نم للعصابة I مقارنة بقيمتها في الميثانول، كذلك نلاحظ إزاحة مقطرة بـ 20 نم للعصابة I أيضاً عند مقارنة طيف AlCl₃ بطيف HCl + AlCl₃ كل هذا يبين وجود نظام الأرتو ثنائي الهيدروكسيل على مستوى الحلقة B، و نستدل على 4'-OH من طيف NaOH و الإزاحة الباثوكرومية المقطرة بـ 55 نم على مستوى العصابة I مقارنة بطيف الميثانول. أما 5-OH فيظهر من خلال طيف HCl + AlCl₃ مقارنة بطيف الميثانول و قيمة الإزاحة الباثوكرومية المقطرة بـ 48 نم

إذا فنتائج UV تبرهن هيكل الكرسيتين مستبدل في الموقعين 7 و 3 .

طيف ¹H-RMN أعطى البروتونات الخمسة للحلقة A و B على شكل :

إشارة ثنائية ($J : 2.2 \text{ Hz}$) عند 7.74 ppm موافقة للبروتون H-2'

إشارة ثنائية ثنائية ($J : 8.5 , 2.2 \text{ Hz}$) عند 7.62 ppm موافقة للبروتون H-6'

إشارة ثنائية ($J : 8.5 \text{ Hz}$) عند 6.89 ppm موافقة للبروتون H-5'

إشارة ثنائية ($J: 2.2 \text{ Hz}$) عند 6.75 ppm موافقة للبروتون H-8

إشارة ثنائية ($J: 2.2 \text{ Hz}$) عند 6.46 ppm موافقة للبروتون H-6

كما ظهرت أهم إشارات بروتونات السكرين على الشكل التالي:

إشارة ثنائية ($J: 1.5 \text{ Hz}$) عند 5.58 ppm موافقة للبروتون الأنوميري H-1'' لسكر الـ

rhamnose المرتبط بالكربون 7.

إشارة ثنائية ($J: 6.1 \text{ Hz}$) عند 1.27 ppm موافقة لبروتونات مجموعة الميثيل الخاصة بسكر الـ

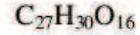
rhamnose

إشارة ثنائية ($J: 7.4 \text{ Hz}$) عند 5.34 ppm موافقة للبروتون الأنوميري H-1'' لسكر الـ

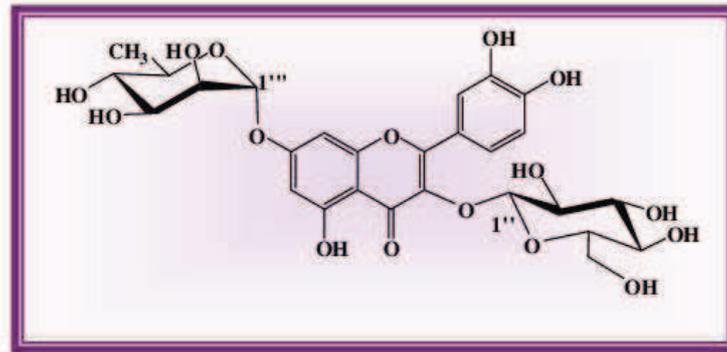
glucose المرتبط بالكربون 3.

أما بروتونات بقية السكريات جاءت في المجال ($4 - 3 \text{ ppm}$)

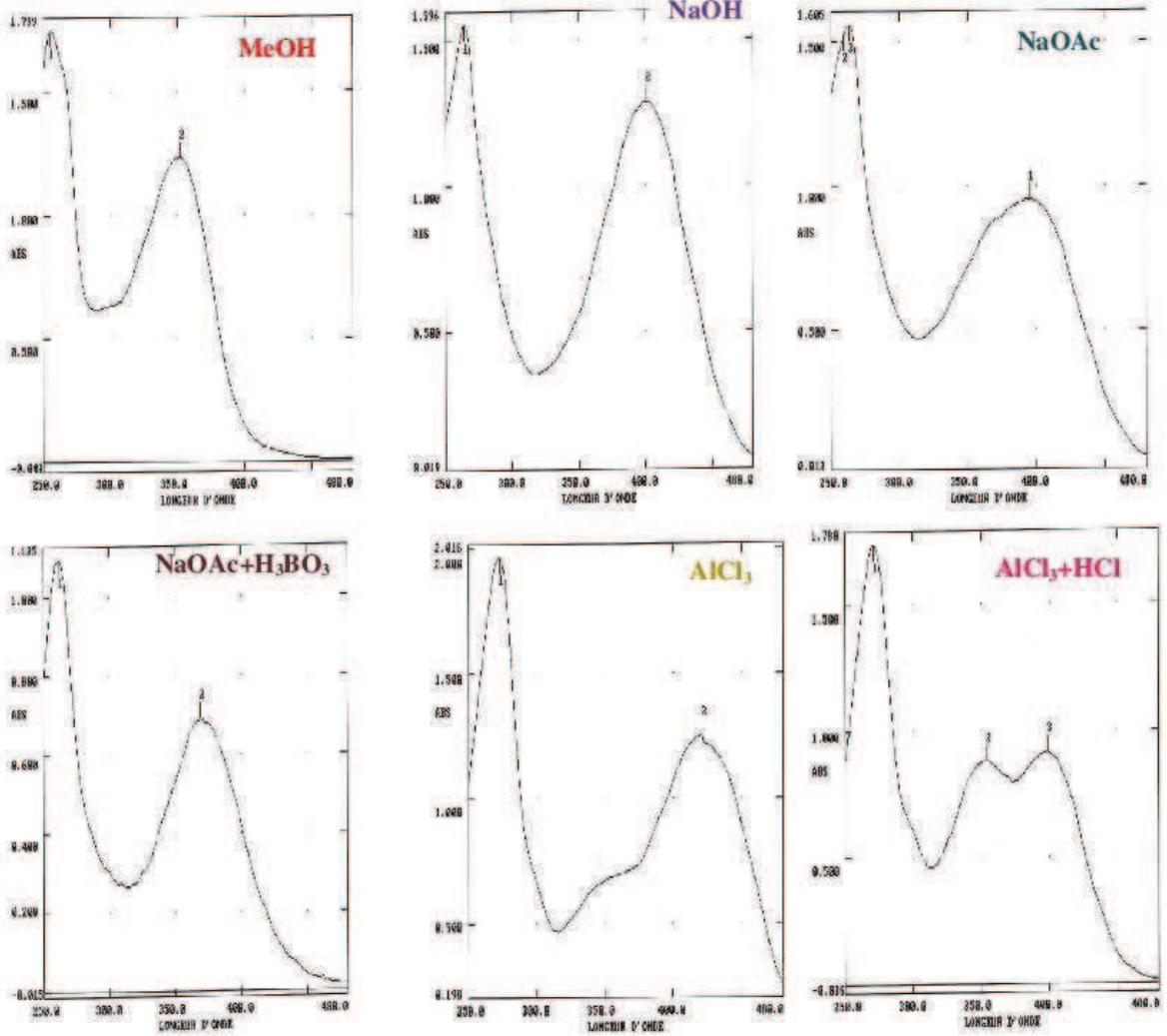
طيف الكتلة أعطى قمة جزيئة عند 633 موافقة لـ $[M+Na]^+$ التي تؤكد الصيغة الجزيئية المجملية



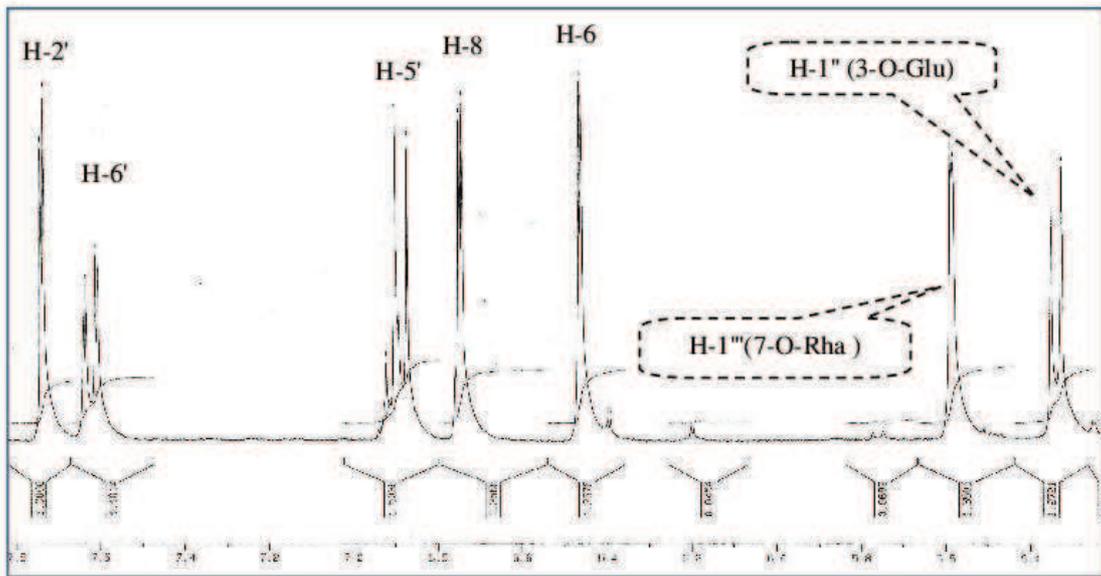
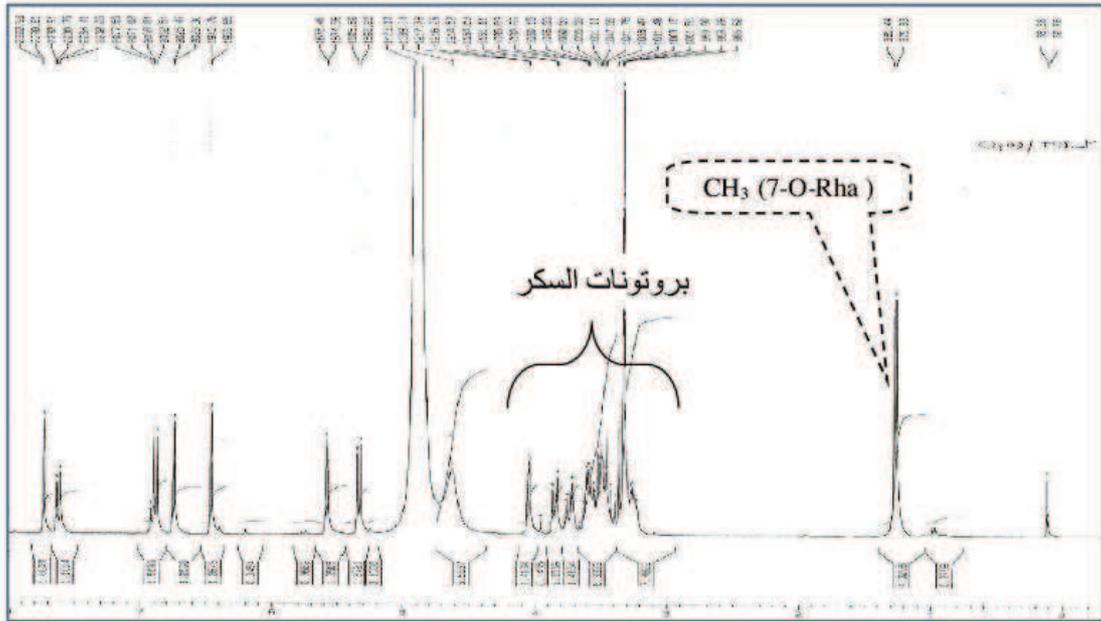
و عليه فكل هذه المعطيات تكمل بعضها البعض لنصل في الأخير إلى البنية المفصلة:



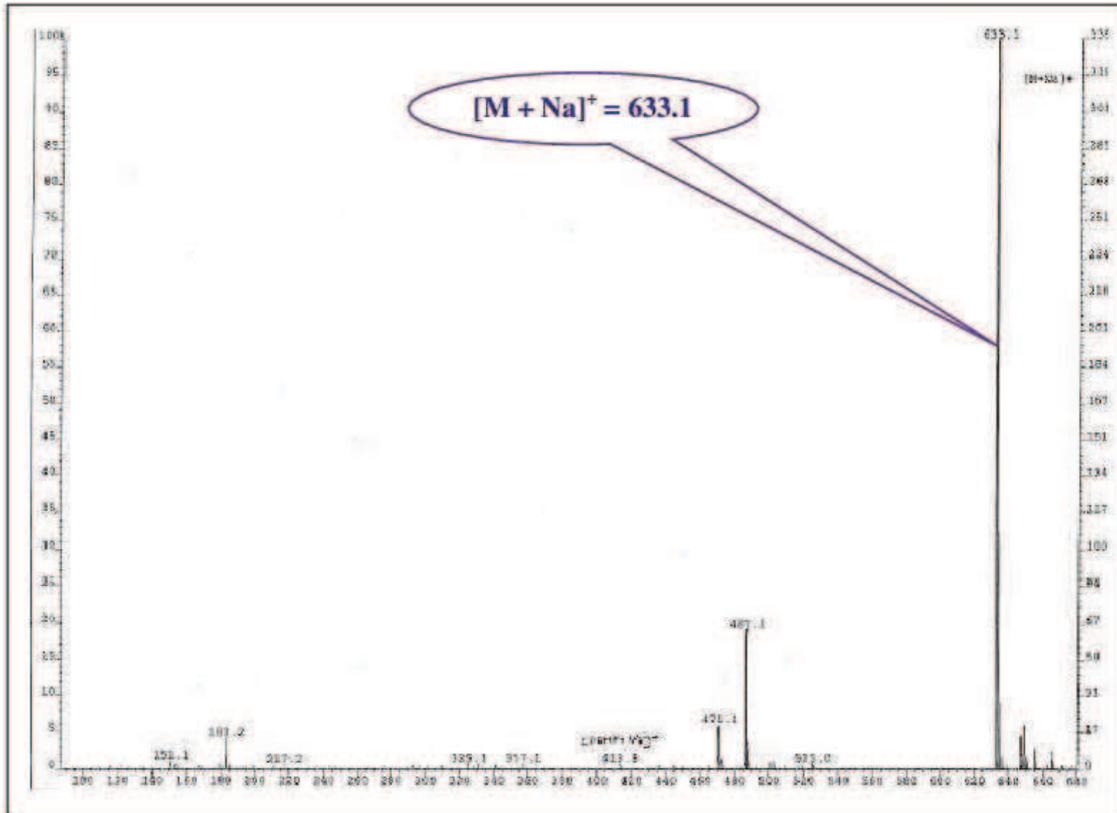
Quercétin-3-O-β- glucoside-7-O-α-rhamnoside



الشكل 1-f₈: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f_8



الشكل 2-f8: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب f8



الشكل 3- f_6 : طيف الكتلة للمركب f_6

التعيين البنوي للمركب $f_7 = 928$:أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول f_7-1 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f_7

13 : 3 : 3 : 1	4 : 3 : 3	10 : 1 : 1	الجملة
0.71	0.37	0.39	ثابت الإنحسار R_f
بنفسجي			اللون الإستشعاعي

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول f_7-2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (f_7-1):

الكاشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	355	271
NaOH	406	265
NaOAc	400	271
NaOAc + H_3BO_3	358	272
$AlCl_3$	410 (351 sh)	275 (310 sh)
$AlCl_3 + HCl$	408 (347 sh)	279 (308 sh)

2. جدول f_7 -3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعاً للشكل (f_7 -2):

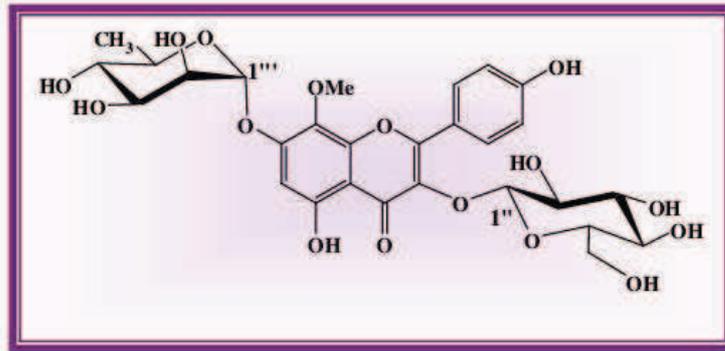
الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج (Hz) J	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	9.0	2H	8.13
H-3' , H-5'	d	9.0	2H	6.72
H-6	s	-	1H	6.64
H-1'''(7-O-Rha)	sl	-	1H	5.57
H-1''(3-O-Glu)	d	7.6	1H	5.20
8-OMe	s	-	1H	3.93
CH ₃ (7-O-Rha)	d	8.4	3H	1.29

ثانياً: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب $f_7 = 928$:

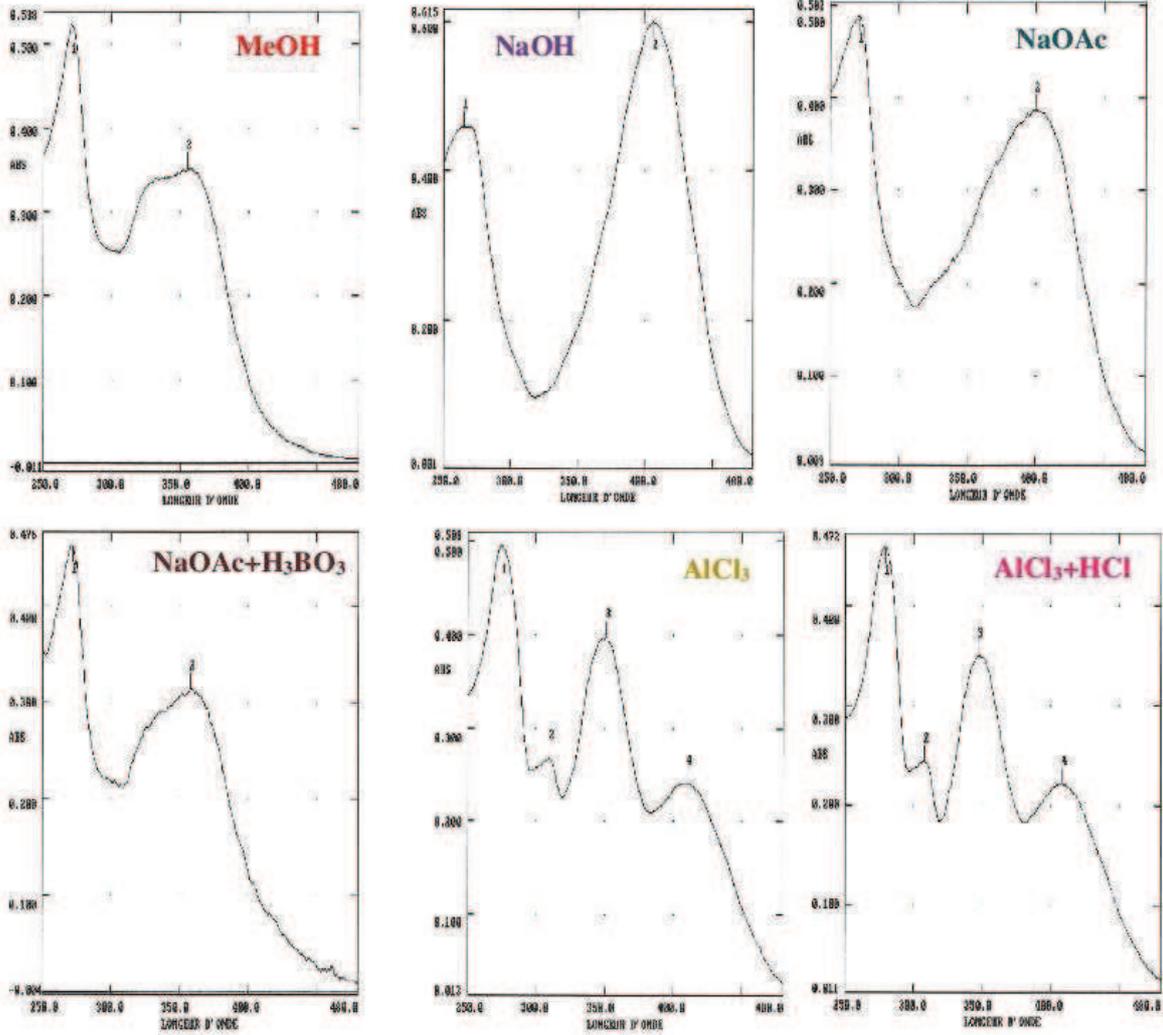
الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب f_7 تبين أنه نفسه المفصول من النبتة

R. villosa و يتعلق الأمر بالمركب f_4 .

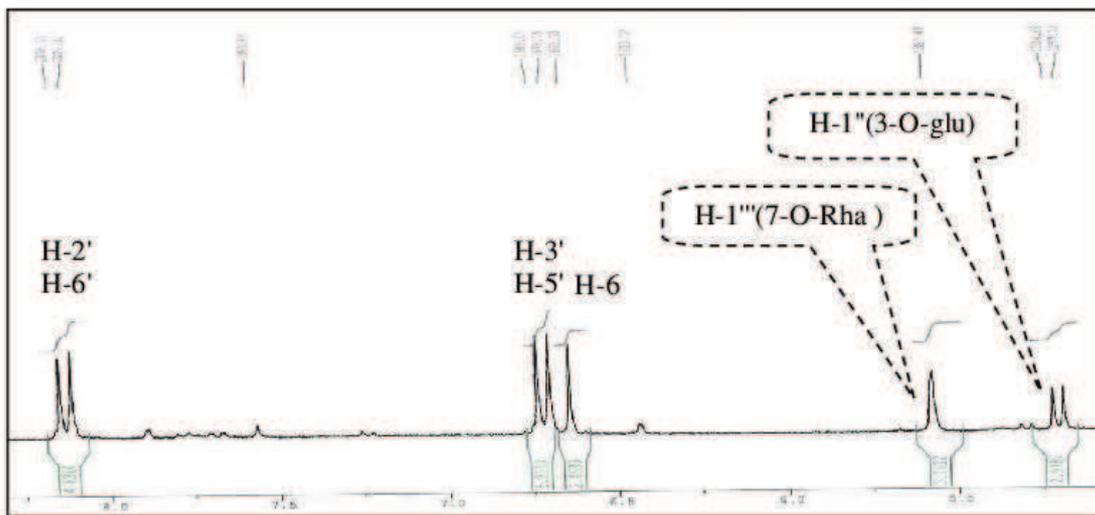
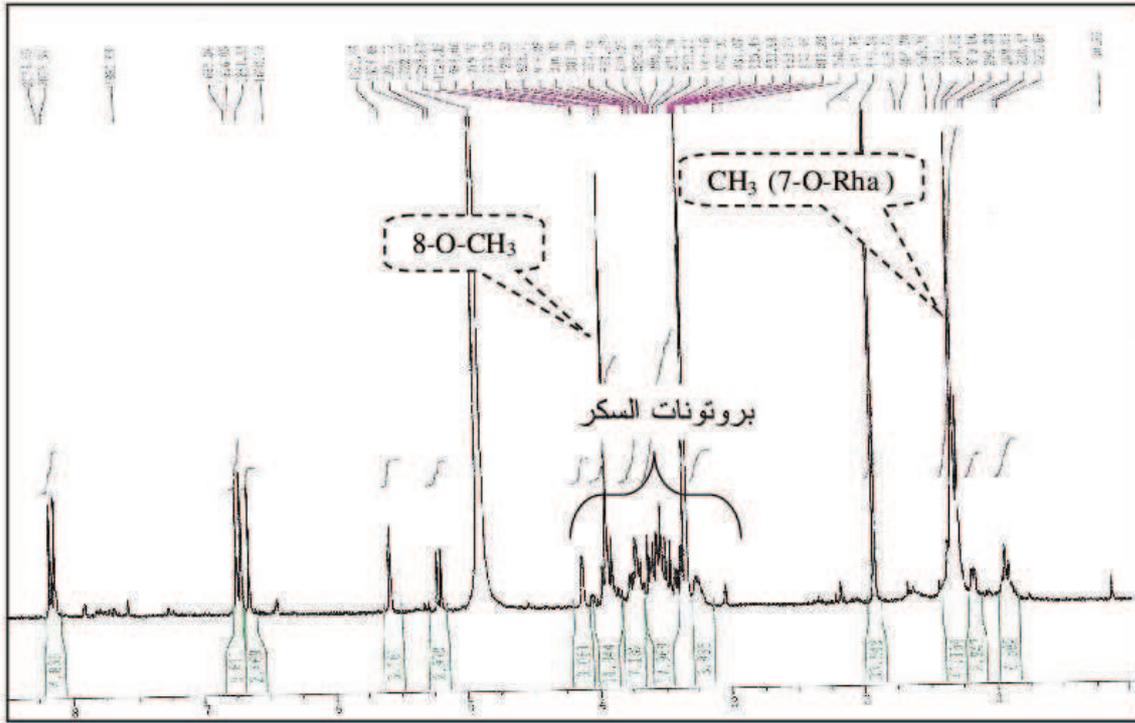
و عليه فالبنية النهائية للمركب f_7 هي:



8-Methoxykaempférol-3-O-β-glucoside-7-O-α-rhamnoside



الشكل 1-f7: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f7



الشكل 2-f7: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب f7

التعيين البنوي للمركب 972 = f2 :أولاً: المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

I. الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول 1-f9 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب f9

الجملة	10 : 1 : 1	4 : 3 : 3	13 : 3 : 3 : 1
ثابت الإنحباس R_f	0.28	0.39	0.78
اللون الإستشعاعي	بنفسجي		

II. المعطيات الطيفية:

1. جدول 2-f9: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (1-f9):

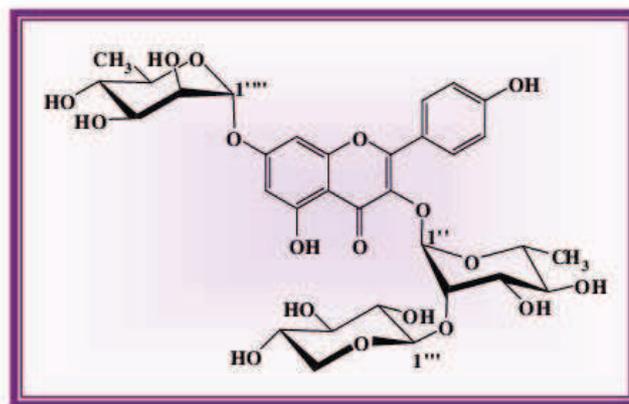
الكاشف	العصاية I (نم)	العصاية II (نم)
MeOH	342	266
NaOH	390	266
NaOAc	383	266
NaOAc + H ₃ BO ₃	345	266
AlCl ₃	393 (340 sh)	268 (298 sh)
AlCl ₃ + HCl	391 (339 sh)	274 (298 sh)

2. جدول β_9 -3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي البروتون تبعا للشكل (2- β_9):

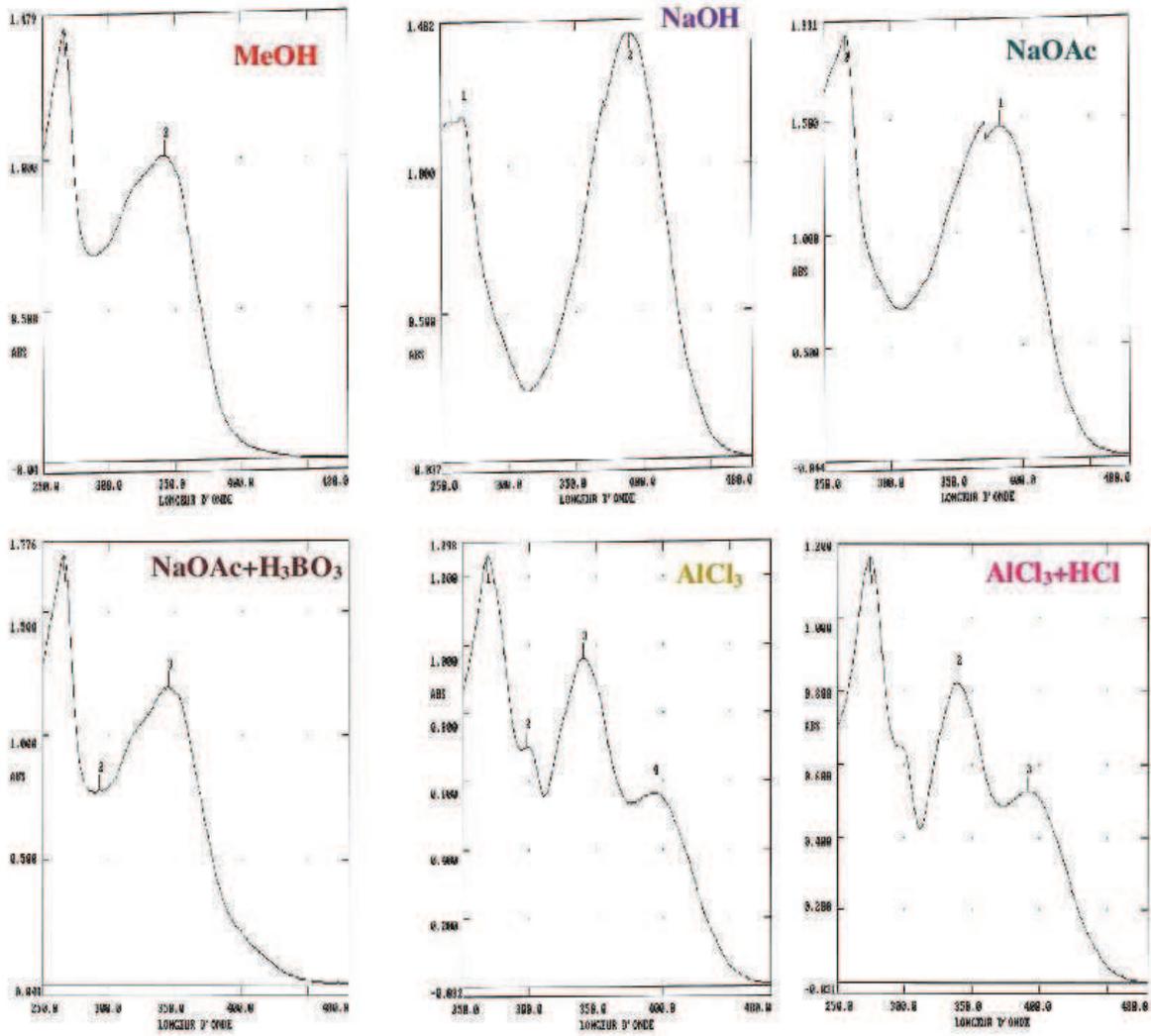
الهيدروجين الموافق	التعددية	ثابتة التزاوج J (Hz)	التكامل	δ (ppm)
H-2' , H-6'	d	8.6	2H	7.77
H-3' , H-5'	d	8.6	2H	6.90
H-8	d	2.1	1H	6.70
H-6	d	2.1	1H	6.44
H-1'''(7-O-Rha)	d	1.6	1H	5.59
H-1''(3-O-Rha)	d	1.6	1H	5.45
H-1'''(3-O-Xylose)	d	7.5	1H	4.32
CH ₃ (7-O-Rha)	d	5.7	3H	1.28
CH ₃ (3-O-Rha)	d	6.1	3H	1.05

ثانيا: قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب $\beta_9 = 972$:

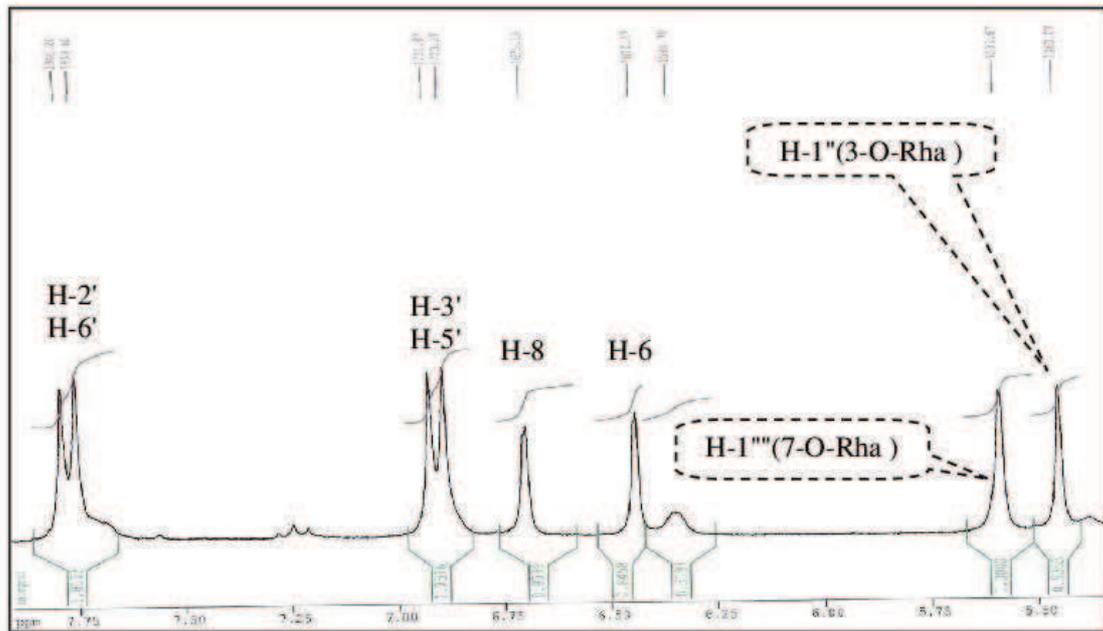
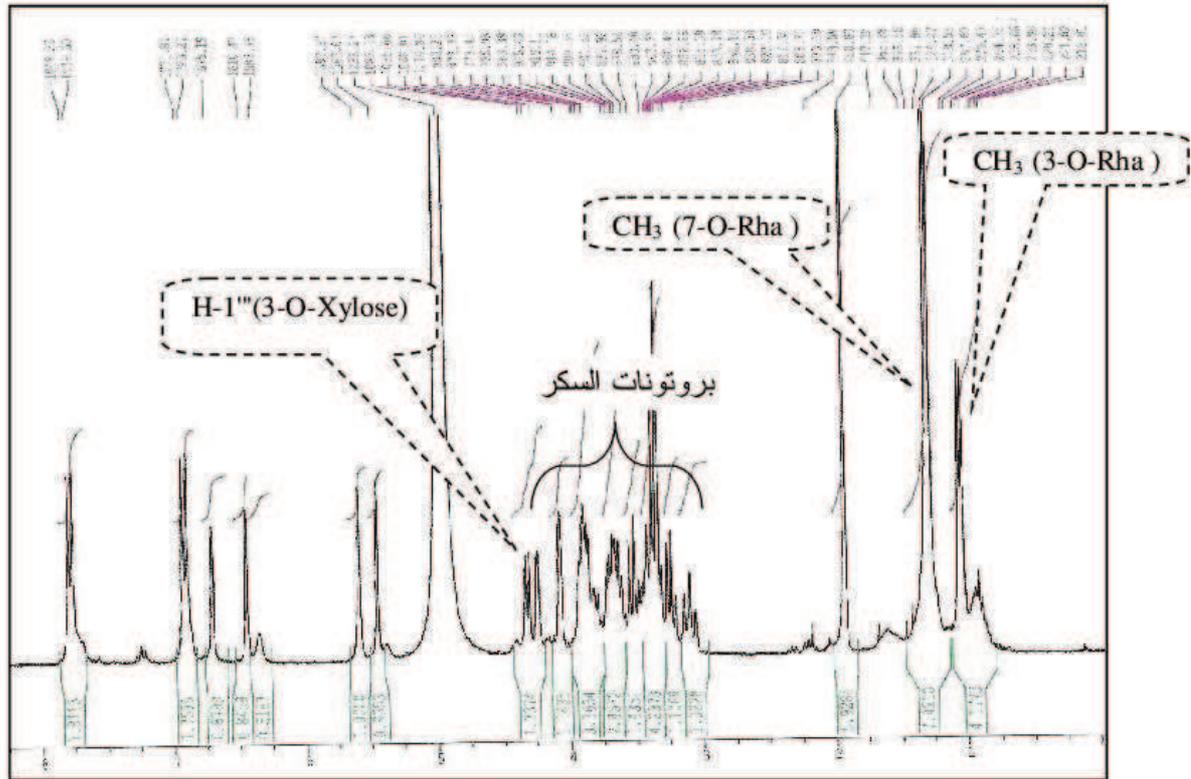
المعطيات الكروماتوغرافية و الطيفية (UV ، $RMN-H^1$) للمركب β_9 مطابقة للمركب المفصول سابقا من النبتة *R. arabica* و يتعلق الأمر بـ a_5 ، و عليه فالمركب β_9 هو:



Kaempferol -3-O- β -xylopyranosyl-(1''' \rightarrow 2'')- O- α -rhamnoside
-7-O- α -rhamnoside (sagittatin A)



الشكل 1-f9: سلسلة أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب f9



الشكل 2-f9: طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب f9

الخلاصة

الخلاصة

كما سلف الذكر فإن مخبرنا اهتم في السنوات الأخيرة بنباتات العائلة الريزيدية، إذ تم دراسة أربعة أنواع نباتية من هذه العائلة ثلاثة منها تنتمي إلى جنس الريزيدا (كلها أصلية بالجزائر) أما النبتة الرابعة فتتنتمي إلى جنس *Randonia*. و نشير إلى أن كل هذه النباتات تدرس لأول مرة بمخبرنا إذ لم يتم الإشارة لها من قبل.

النباتات الأربعة هي :

Reseda villosa Coss.

Reseda duriaeaana J. Gay

Reseda arabica Boiss.

Randonia africana Coss.

تركز اهتمامنا خلال دراسة هذه الأنواع النباتية على التعرف على نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي لكل نبتة، فكان هدفنا تحديد البنى الكيميائية للمركبات الفلافونيدية بعد فصلها و ذلك باستخدام مختلف طرق الإستخلاص و تقنيات الفصل الكروماتوغرافية المتعددة بداية بكروماتوغرافيا العمود ثم كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة و أحيانا كروماتوغرافيا الورق، تلت هذه الخطوات عمليات تنقية متعددة لنحصل في الأخير على مركبات نقية جاهزة لدراستها بنيويا، و لأجل هذا لجأنا إلى الطرق التحليلية منها الفيزيائية و الكيميائية؛ حيث تتمثل الأولى في مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و الكربون و كذلك إلى مختلف تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد و مطيافية الكتلة أحيانا، أما الكيميائية فتتمثل في الإمهاء الحمضية، دون إهمال الخواص الكروماتوغرافية التي تساعدنا كثيرا في إعطاء فكرة عن البنية الأولية للمركب الفلافونيدي خاصة.

و فيما يلي نذكر بكل المركبات المفصولة من كل نبتة مع قراءة بسيطة للنتائج المحصل عليها لكل جنس على حدى:

(1) النبتة *Reseda villosa*

فصل منها:

1. Kaempférol 7-O- α -rhamnoside
2. Kaempférol 3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside
3. Quercétin-3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside
4. Isorhamnétin- 3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside
5. Kaempférol -3,7-di -O- α -rhamnoside
6. 8- methoxykaempférol -3-O- β -glucoside -7-O- α -rhamnoside

المركبين 5 و 6 يفصلان لأول مرة من جنس الريزيدا من خلال النبتة *R. villosa* و هذا حسب الدراسة المكتبية التي قمنا بها.

(2) النبتة *Reseda duriaeana*

فصلت منها المركبات التالية:

1. Kaempférol- 3-O- α -rhamnoside
2. Kaempférol -7-O- β -glucoside
3. Quercétin-3-O- α -rhamnoside
4. 4'- Methoxykaempférol -3-O- β -glucoside -7-O- α -rhamnoside
5. Kaempférol -3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside

المركبين 3 و 4 يشار إليهما لأول مرة في جنس الريزيدا من خلال هذه النبتة.

(3) النبتة *Reseda arabica*

تم دراستها خلال هذه الرسالة و يمكن تلخيص نتائجها فيما يلي:

1. Kaempférol-3,7-di-O- α -rhamnoside
2. Isorhamnétin-3,7 -di-O- α -rhamnoside
3. Kaempférol -3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside
4. Isorhamnétin-3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside
5. Kaempférol -3-O- β - xylopyranosyl -(1" \rightarrow 2")- O- α -rhamnoside -7-O- α -rhamnoside

المركبين 2 و 5 يعزلا لأول مرة من نباتات الجنس رييزيدا من خلال هذه النبتة.

نلاحظ أن أغلب المركبات المفصولة من *Reseda arabica* عبارة عن فلافونولات جليكوزيدية من نوع 7-O- α -rhamnoside، أربعة ثنائية السكر: إثنان منها ثنائية الـ rhamnose و إثنان من نوع 7-O- α -rhamnoside و 3-O- β -glucoside، و مركب ثلاثي السكر (Sagittatin A) يفصل لأول مرة من نباتات هذا الجنس و تعد *Reseda arabica* ثاني نبتة يفصل منها مركب ثلاثي السكر بعد *Reseda muricata*. و تتوزع هذه الفلافونولات علي هيكلين أساسيين هما Kaempférol و يضم ثلاث مركبات و Isorhamnétine و يضم مركبين.

f1 قراءة للنتائج المحصل عليها من الجنس ريزيدا:

أضفنا إلى العائلة اليزيدية عامة و جنس اليزيدا خاصة 16 مركب فلافونيدي (جدول 1) من بينهم 12 مركب مختلف، منهم 6 فلافونيدات لم يشار إليها من قبل في نباتات الجنس.

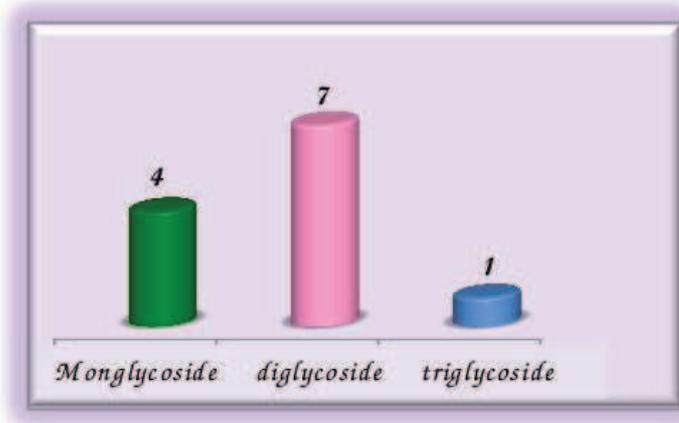
جدول 1: فلافونيدات نباتات الجنس ريزيدا الثلاثة:

المركب	إسم النبتة
Kaempférol- 7-O- α -rhamnoside	<i>Reseda villosa</i>
Kaempférol -3-O- α -rhamnosie	<i>Reseda duriaeana</i>
Kaempférol -7-O- β -glucoside	<i>Reseda duriaeana</i>
Quercétin- 3-O- α -rhamnoside	<i>Reseda duriaeana</i>
Kaempférol- 3,7- di-O- α -rhamnoside	<i>Reseda arabica</i>
	<i>Reseda villosa</i>
Kaempférol- 3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside	<i>Reseda arabica</i>
	<i>Reseda villosa</i>
	<i>Reseda duriaeana</i>
8- Methoxykaempférol -3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside	<i>Reseda villosa</i>
4'-Methoxykaempférol- 3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside	<i>Reseda duriaeana</i>
Quercétin-3-O- β -glucoside -7-O- α -rhamnoside	<i>Reseda villosa</i>
Isorhamnétin-3-O- β -glucoside-7-O- α -rhamnoside	<i>Reseda arabica</i>
	<i>Reseda villosa</i>
Isorhamnétin-3,7-di-O- α -rhamnoside	<i>Reseda Arabica</i>
Kaempférol -3-O- β - xylopyranosyl -(1''' \rightarrow 2'')- O- α -rhamnoside -7-O- α -rhamnoside	<i>Reseda Arabica</i>

و يمكن توزيع هذه المركبات و تصنيفها كالآتي:

أ. تصنيف فلافونيدات الجنس *Reseda*:

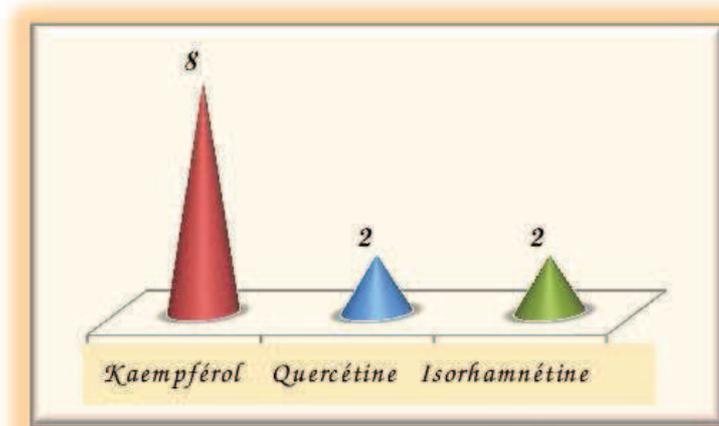
في غياب الأجليكونات تصنف كل المركبات إلى جليكوزيدية من نوع أكسجين-سكر، أما عن طبيعة السكريات فكلها من نوع glucose و rhamnose عدا الفلافونيد ثلاثي السكر فيحتوى على xylose. تضم هذه الأنواع الثلاثة أربعة فلافونيدات أحادية السكر و سبعة ثنائية السكر و مركب واحد ثلاثي السكر (الشكل 1).



الشكل 1: تصنيف فلافونيدات الجنس *Reseda*

ب. توزيع فلافونيدات الجنس *Reseda*:

توزع فلافونيدات الجنس *Reseda* إلى ثلاث أنواع أو هياكل فلافونيدية فقط جلها تدرج تحت بنية الـ Kaempférol إذ يضم ثمانية مركبات، و لعل ما يميز نبات الريزيدا هو أن أغلب فلافونولاتها تدرج تحت هذه البنية. يليها الـ Quercétine إذ يضم مركبين ثم الـ Isorhamnétine بمركبين أيضا (الشكل 2).



الشكل 2: توزيع فلافونيدات الجنس *Reseda*

4) النسبة *Randonia africana*:

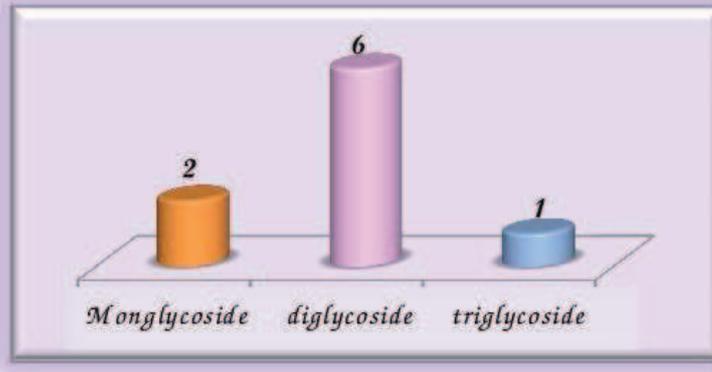
و هي النبتة الثانية المدروسة خلال هذا العمل و نلخص نتائجها فيما يلي:

1. Kaempférol-3-O-β-glucoside
2. Isorhamnétin-3-O-β- glucoside
3. Kaempférol-3,7-di-O- α -rhamnoside
4. Isorhamnétin -3,7-di-O- α -rhamnoside
5. Quercétin -3,7-di-O- α -rhamnoside
6. Kaempférol -3-O-β- glucoside- 7-O-α-rhamnoside
7. 8- Methoxy kaempférol -3-O-β- glucoside-7-O-α-rhamnoside
8. Quercétin-3-O-β- glucoside -7-O-α-rhamnoside
9. Kaempférol -3-O-β- xylopyranosyl -(1" → 2")- O-α-rhamnoside -7-O-α-rhamnoside
(Sagittatin A)

كل هذه المركبات تفصل لأول مرة من النوع و الجنس *Randonia* (لم يسبق و أن درست نباتات هذا الجنس) و من الملاحظ أن فلافونيدات هذا الجنس تشبه إلى حد كبير مركبات جنس الريزيدا سواء من حيث نوع الهيكل الفلافونيدي أو طبيعة السكريات و كذا تموضعها على الأجليكون. و يمكن توزيع هذه المركبات و تصنيفها كالاتي:

أ. تصنيف فلافونيدات الجنس *Randonia*:

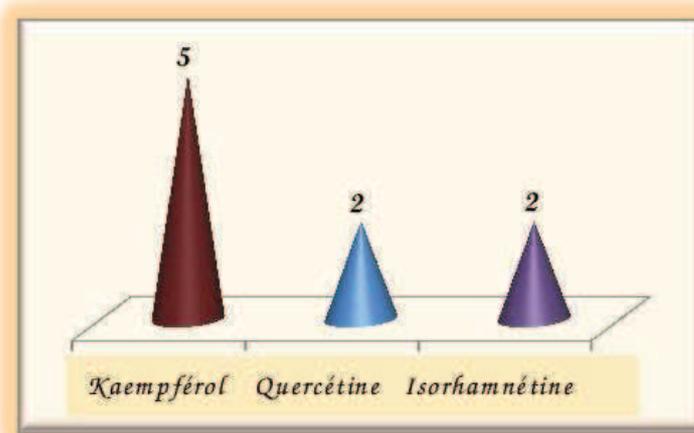
كما نلاحظ كل المركبات عبارة عن فلافونيدات من نوع الفلافونول و كلها جليكوزيدية حيث منها إثنان أحادية السكر و ستة ثنائية السكر و مركب واحد ثلاثي السكر (الشكل 3).



الشكل 3: تصنيف فلافونيدات الجنس *Randonia*

- نشير إلى أن جل السكريات من نوع الـ glucose و الـ rhamnose أما عن موقع السكريات فالـ glucose يتواجد في الموضع 3 في جميع المركبات المفصولة بينما الـ rhamnose فيتواجد في الموقع 7 دائما إلا حالة ثنائيات الـ rhamnose أين يتواجد في الموضعين 3 و 7.
- ب. توزيع فلافونيدات الجنس *Randonia*: يمكن توزيعها كالاتي (الشكل 4):

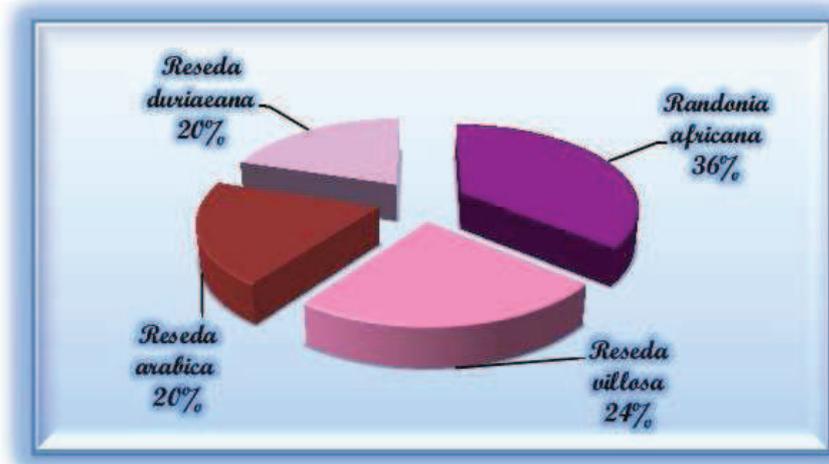
خمسة فلافونولات تدرج تحت هيكل الـ Kaempférol و إثنان تدرج تحت هيكل الـ Isorhamnétine و إثنان تدرج تحت هيكل الـ Quercétine كما نلاحظ مركب واحد فقط يحتوى على الحلقة A ثلاثية الإستبدال.



الشكل 4: توزيع فلافونيدات الجنس *Randonia*

1.1 أغنى الأنواع النباتية الأربعة:

تعتبر *Randonia africana* أغنى الأنواع النباتية التي تنتمي إلى العائلة اليزيدية من حيث عدد الفلافونيدات المفصولة و هذا على مستوى مخبرنا، إذ تم فصل و التعرف على 9 فلافونولات من هذه الأخيرة، تليها *Reseda villosa* بستة فلافونولات ثم *Reseda arabica* و *Reseda duriaeana* بخمسة فلافونيدات لكل منهما (الشكل 5)



الشكل 5: مقارنة إحصائية لفلافونيدات الأنواع النباتية الأربعة

الملخص

كان هدفنا خلال هذا البحث هو التعرف على نواتج الأيض الثانوي الفلافونويدي لنباتات العائلة

الريزيدية.

من أجل الوصول إلى هذا الهدف استعملنا مختلف تقنيات الاستخلاص و الفصل الكروماتوغرافية

المتعددة من عمود و طبقة رقيقة تحضيرية و ورق، التي سمحت لنا من فصل 15 فلافونول جليكوزيدي من

ثلاث أنواع نباتية وهي:

Reseda arabica

Reseda villosa

Randonia africana

تم التعرف على البنى الكيميائية لهذه الفلافونولات باستخدام التقنيات الطيفية و المتمثلة في مطيافية

الأشعة فوق البنفسجية و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية البعد للبروتون و الكربون 13 و ثنائية

البعد بمختلف تقنياتها (*COSY, ROESY, HMQC, HMBC*) إلى جانب مطيافية الكتلة، إضافة إلى

الحملة الحمضية. و في الأخير تم الحصول على:

5 فلافونولات جليكوزيدية من النبتة *Reseda arabica* إثنان منها جديدة في نباتات الجنس.

فلافونول ثنائي السكر من *Reseda villosa* هو كذلك يفصل لأول مرة في نباتات الجنس.

9 فلافونولات جليكوزيدية من *Randonia africana* كلها جديدة في نباتات الجنس.

كما تمت دراسة مقارنة الفعالية المضادة للأوكسدة لكل من النوعين *Reseda villosa*

و *Reseda duriaeaana*

Résumé

L'objectif de ce travail était d'identifier les métabolites secondaires d'espèces appartenant à la famille des *Resedaceae*.

Pour cela, nous avons utilisé différentes méthodes d'extraction et de techniques de séparations chromatographiques variées telles que la CC, CCM et CP.

A l'issue de l'étude phytochimique de 3 espèces de la famille *Resedaceae*, *Reseda arabica*, *Reseda villosa* et *Randonia africana*, nous avons isolé 15 flavonols glycosides qui ont été identifiés grâce à l'utilisation des méthodes spectrales d'analyse telles que l'ultra-violet, la RMN du proton unidimensionnelle, la RMN du C-13, la RMN bidimensionnelle (COSY, ROESY, HSQC, HMBC), en plus de la spectrométrie de masse.

Outre ces techniques spectrales, nous avons utilisé les méthodes chimiques d'analyses telle que l'hydrolyse acide qui nous ont permis d'identifier:

05 flavonols glycosides de l'espèce *Reseda arabica* dont 02 isolés pour la première fois du genre.

01 flavonol diglycoside de l'espèce *Reseda villosa*, isolé pour la première fois du genre.

09 flavonols glycosides de l'espèce *Randonia africana*, tous isolés pour la première fois du genre.

L'étude comparative de l'activité antioxydante des espèces *Reseda villosa* et *Reseda duriaea* a été réalisée.

ABSTRACT

The aim of this work was to identify the secondary metabolites of species belonging to the Resedaceae family.

For that reason, we've used different methods of extraction and various techniques of chromatographic separations eg. CC, TLC, PC.

From the phytochemical study of 3 Resedaceae species namely, *Reseda arabica*, *Reseda villosa* and *Randonia africana*, we've isolated 15 flavonol glycosides which were identified by the use of analytical spectral methods like one-dimensional proton NMR, ¹³C NMR, two-dimensional NMR (ROESY, COSY, HSQC, HMBC) and Mass spectrometry.

Besides these techniques, we've used chemical methods as acid hydrolysis which permitted us to identify :

05 flavonols glycosides from the species *Reseda arabica* from which 2 are isolated for the first time from the genus

01 flavonol diglycoside from the species *Reseda villosa*, isolated for the first time from the genus

09 flavonols glycosides from *Randonia africana*, all isolated for the first time from the genus

The comparative antioxidant activity of both species *Reseda villosa* and *Reseda duriaeanae* has been realized.