

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة منتوري قسنطينة

قسم الكيمياء

كلية العلوم الدقيقة

رقم الترتيب

رقم التسلسل

مذكرة

مقدمة لنيل شهادة الماجستير في العلوم
تخصص تحاليل فيزيوكيميائية
و كيمياء عضوية

تحت عنوان

فصل و تحديد منتجات الأيض الفلافونيدى

لنبات *Mentha arvensis*

تحت إشراف الأستاذ:

د. احسن بورنجة

تقديم:

تبوبه عمر

لجنة المناقشة:

- | | | |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|
| رئيسة | أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة | - د. فضيلة بن عياش |
| مقررا- د. | أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة | - د. احسن بورنجة |
| ممتحنا | أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة | سمير بن عياش |
| ممتحنا | أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة | - د. محمد بوهروو |
| ممتحنا | أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة | - د. بهلول الشريف |

2010.....

باسم الله الرحمن الرحيم
والصلاة والسلام على أشرف المرسلين

الإهداء

أهدي ثمرة جهدي هذا إلى أغلى
الأحباب إلى :

أمي وأبي و جدتي حفظهم الله
وإلى إخوتي الأعمام والى كل أفراد
العائلتين:

تبرج و كمال:
و إلى كل الأهل والأحباب.

تشكرات

الحمد لله الذي بيده الملك و الملكوت، و له الأسماء الحسنى و النعوت، العالم فلا يعزبه عنه شيء، في السماوات و الأرض و لا يفوت ، علم بالقلم، علم الإنسان ما لم يعلم، و الصلاة و السلام على معلم البشر و آله، ما اتصل بالإسلام جده المبحوث و انقطع بالكفر حبله المبتوث و سلم كثيرا .

أتوجه بالشكر الخاص إلى الأستاذة الفاضلة فضيلة بن عياش على كل الصائح و المساعدات، و التي لم تقصر في حقنا و لم تبخل علينا بشيء، و لو على حساب صحتها حفظها الله.

كما أشكرها على قبولها رئاسة لجنة المناقشة

أتقدم بالشكر الجزيل وكل العرفان للأستاذ بن عياش سمير لاستقباله لنا في مخبره " تثمين الثروات الطبيعية ذات الأصل النباتي و اصطناع الجزيئات الفعالة بيولوجيا VAREN و توفيره لمختلف الوسائل و التجهيزات لإنجاز هذا العمل و كذا على اهتمامه بإنجاز هذا البحث إضافة إلى قبوله المشاركة في لجنة المناقشة

أتقدم بجزيل الشكر والامتنان للأستاذ المشرف بورنجة احسن الذي كان لي المشرف و الموجه و المعين خلال مراحل إنجاز هذا العمل.

كما أشكر كل من الأساتذة : بوهروم محمد و بملول الشريف على قبولهما المشاركة في لجنة المناقشة.

كما أشكر كل أفراد مخبر VAREN فالبداية الشكر الخالص للأساتذة : مشعود ، زهية ، وهيبة و أحمد و كل أفراد دفعتي عبد الرحمان، سهام، رضوان، حنان، محمد، سميرة، لبيب، مجدة، فريد، فيروز، سيف، لويظة.

كما أشكر كل من سهام ونوال

و الشكر إلى كل من ساعدنا من قريب أو بعيد في إنجاز هذا البحث من البداية إلى غاية الانتهاء. و أجدد شكري إلى الله ربي و الحمد لله ربي العالمين.

الفهرس

1.....	المقدمة
الفصل الأول:	
4.....	I الفلافونيدات
4.....	I-1 مفاهيم اساسية
4.....	I-1-1 التعريف بالفلافونيدات
5.....	I-1-2 اقسام الفلافونيدات
6.....	I-2 الاصطناع الحيوي
7.....	I-2-1 طريق الشيكيميك
9.....	I-2-2 طريق الخلايا
10.....	I-2-3 الاصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية بدءا من الشالكون
12.....	I-2-4 تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونويدي
12.....	I-2-4-1 تثبيت مجموعات الهيدروكسيل
12.....	I-2-4-2 تثبيت مجموعات الميثيل
13.....	I-2-4-3 تثبيت جزيئات السكر
15.....	I-3 الاصطناع المخبري
16.....	I-3-1 تصنيع الشالكون
17.....	I-3-2 تصنيع ثنائي هيدرو شالكون
18.....	I-3-3 تصنيع الفلافون
19.....	I-3-4 تصنيع الفلافانول
21.....	I-3-5 تصنيع الفلافونول و الأورون
21.....	I-3-6 تصنيع ثنائي هيدرو الفلافونول
22.....	I-3-7 تصنيع الأورون
22.....	I-3-8 تصنيع إيزوفلافون
24.....	I-4 خصائص و أهمية الفلافونيدات
24.....	I-4-1 الدور البيولوجي

- I - 2-4 - الدور الفسيولوجي..... 26
- I - 3-4 - الدور العلاجي..... 27

الفصل الثاني

- II - 1 - طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية..... 29
- II - 1 - 1 - طرق الاستخلاص..... 29
- II - 1 - 2 - طرق الفصل..... 32
- II - 1 - 2 - 1 - كروماتوغرافيا العمود (CC)..... 32
- II - 1 - 2 - 2 - كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (CP)..... 33
- II - 1 - 2 - 3 - كروماتوغرافيا الورقة الرقيقة (CCM)..... 34
- II - 1 - 2 - 4 - كروماتوغرافية نظام السائل عالي الأداء (HPLC)..... 37
- II - 1 - 3 - التنقية..... 38
- II - 1 - 3 - 1 - التنقية على عمود من متعدد الأميد SC_6 38
- II - 1 - 3 - 2 - التنقية على عمود من السيفاداكس..... 38
- II - 2 - الدراسة البنوية للمركبات الفلافونويدية..... 38
- II - 1 - 2 - اللون الإستشعاعي تحت مصباح UV..... 39
- II - 2 - 2 - معامل الإنحباس R_f 40
- II - 3 - 2 - مطيافية الأشعة فوق البنفسجية..... 41
- II - 1 - 3 - 2 - طيف امتصاص الميثانول..... 42
- II - 2 - 3 - 2 - طيف الإمتصاص في وجود الكواشف..... 44
- (أ) وجود NaOH..... 45
- (ب) وجود NaOAc..... 45
- (ج) وجود $H_3BO_3 + NaOAc$ 45
- (د) وجود $AlCl_3$ 46
- (هـ) وجود $HCl + AlCl_3$ 46
- II - 4 - 2 - مطيافية الرنين النووي المغناطيسي..... 50
- II - 1 - 4 - 2 - مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN-^1H$ 50
- (أ) بروتونات الحلقة العطرية A..... 51

- 51..... (ب) بروتونات الحلقة العطرية B
- 52..... (ج) بروتونات الوحدة غير المتجانسة C
- 53..... 2-4-2-II مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C RMN
- 54..... 3-4-2-II مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد
- 55..... 5-2II التحليل البنيوي للفلافونيدات عن طريق مطيافية الكتلة
- 55..... 1-5-2-II عناصر التحديد البنيوي للفلافونيدات عن طريق مطيافية الكتلة
- 55..... 2-5-2-II تقنية القذف الإلكتروني (I.E)
- 55..... أ- في حالة أجليكون الفلافون
- 57..... ب- في حالة أجليكون الفلافونول
- 59..... 3-5-2-II تقنية الـ FAB
- 59..... 4-5-2-II تقنية الإلكتروليت سبراي- electrospray
- 59..... 6-2-II الإمهاء الحمضية

الفصل الثالث

- 61..... 1-III-1 الدراسة الكيميائية النباتية لنبتة *Menthaarvensis*
- 62..... III-1-1 مقدمة
- 63..... III-1-2 بعض المركبات المفصولة من الجنس *Mentha*
- 67..... III-1-3 التصنيف النظامي للنبتة
- 68..... III-1-4 وصف النبتة
- 68..... III-1-5 خصائصها
- 69..... III-1-6 - الدور العلاجي
- 70..... III-2 المادة النباتية
- 70..... III-1-2-1 إستخلاص النبتة
- 73..... III-2-2 طريقة الفصل والتنقية
- 74..... III-3 الطريقة العملية للنتائج الكيميائية

الفصل الرابع

IV! التعيين البنوي للمركبين

77.....B₂ 1-!IV تحديد بنية المركب

87.....B_{2/2} 2-!IV تحديد بنية المركب

98.....الخاتمة

99.....المراجع

المقدمة

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

قديمًا كانت تستعمل الأعشاب كمصدر رئيسي في معظم العقاقير، [2,1] فمملكة النبات تزود الطب بصفة مستمرة فتستعمل في شكلها الخام على شكل شايات، شراب، منقوع، مراهم، دهان أو مساحيق حيث اعتمد الإنسان في الحضارات القديمة خاصة بلاد الرافدين و بابل و آشور و حضارة مصر القديمة على الأعشاب الطبية في معالجة الأمراض بجانب طرق أخرى منها الرقي و التعاويذ و السحر ،لقد كان للعرب السبق في الترجمة و الدراسة و التجربة لكل ما جاء في كتب الأقدمين عن المعالجة بالأعشاب وقد برع منهم الكثيرون في هذا الفن حتى ان مؤلفاتهم ظلت لقرون عديدة مرجعا للطب و العلاج في أوروبا وذلك لما تضمنته من معلومات مهمة عن العلاج بالإعشاب والوقاية من الأمراض المختلفة [3]

مع تطور الكيمياء و الطب الغربي أعتمد على التداوي بالعقاقير والأدوية المصنعة [4] إلا أن صناعة بعض هذه الأدوية غير عملية اقتصاديا، ناهيك عن السليبات الناجمة عنها من مضاعفات وأمراض سرطانية و أعراض جانبية، عانى منها الكثير من المرضى، و مع بداية السبعينات بدأت العودة بالتدريج إلى الاهتمام بالأعشاب الطبية لما أثبتت الدراسات أن تلك الأدوية آثارا جانبية خطيرة في معظم الأحيان ، بينما تكون تراكيز هذه المواد الفعالة متوازنة و مخففة في النبات و تتفاعل برفق مع الجسم البشري في صورتها الطبيعية ، إضافة إلى تعاون بعض المواد الموجودة في النبات معها حتى و لو كانت على شكل آثار فقط. مما أدى بكثير من سكان العالم اليوم بالعودة إلى استعمال النباتات الطبية في مختلف علاجاتهم ، الأمر الذي جعل الهيئات المختصة تبذل جهودا لمسيرة الوضع الجديد حيث أخذت بعض المنظمات خطوات مهمة لتشجيع العلماء على البحث في هذا المجال و تطويره كمنظمة الصحة العالمية و الإتحاد الأوروبي [5،6] مما نتج عنه أن:

- 40 % من الأدوية المستعملة عبارة عن عناصر طبيعية.
- 50 % من الوصفات الطبية في الولايات المتحدة الأمريكية- حسب إحصائيات 1995- تحتوي على الأقل على دواء مستخرج من أصل طبيعي.
- من مجموع الأدوية الجديدة التي طرحت في السوق ما بين: 1981 - 2002 م ، 14 % لمعالجة الأمراض السرطانية ، 7 % ضدّ الحساسية و 15 % ضد بعض الطفيليات هي عبارة عن مركبات طبيعية [7، 8].

و نظرا لتربع الجزائر على مساحات شاسعة فقد أكسبها ذلك وجود تضاريس و ظروف مناخية متعددة و قد انعكس ذلك على النمط النباتي، مما جعلها من البيئات النباتية النادرة حيث تنوع الغطاء النباتي و تدرجه من الغابات الرطبة الكثيفة إلى النباتات الجافة الصحراوية المبعثرة والمحدودة الانتشار، و انعكس ذلك بدوره على وجود العديد من الفصائل، الأجناس و الأنواع النباتية (تنوع الفلورا نفسها) و على وجود العديد من الأنماط البيئية Ecotypes و الأنماط الحيوية Biotypes، وترتب عن هذا كله نمو مئات من الأنواع النباتية البرية المختلفة و التي بدورها تضم العديد من النباتات الطبية، و رغم هذا التنوع في مناخ الجزائر ما يعني الوفرة في الغطاء النباتي خاصة بالنسبة للنباتات الطبية، حيث يصل عدد النباتات إلى 3000 نبتة تنتمي إلى مختلف العائلات النباتية، 15% منها محلية [9]، لكن تبقى الأبحاث بخصوصها قليلة سواء على مستوى الفيتوكيمياء أو في مجال الفارماكولوجيا.

و في الوقت الحالي بدأ الباحثون الجزائريون و حتى الأجانب في استغلال الثروة النباتية في الجزائر في مجال الكيمياء والطب. لذا كان الهدف من بحثنا استخلاص الأيض الثانوي الفلافونيدي لإحدى النباتات الشمالية *Mentha arvensis*.

يضم هذا العمل اربعة فصول:

الفصل الأول: تطرقنا فيه إلى التعريف بالفلافونيدات ، الاصطناع الحيوي لها و أخيرا فعاليتها بيولوجيا.

الفصل الثاني: خصصناه لكيفية الاستخلاص و تحديد بنى الفلافونيدات بواسطة الطرق الفيزيوكيميائية و الكروماتوغرافية المعروفة.

الفصل الثالث: عرضنا فيه معلومات نباتية و كيميائية عن العائلة و النبتة المدروسة وكذا الطريقة العملية التي أنجز بها هذا العمل المتمثل في استخلاص، فصل و تنقية الفلافونيدات إضافة إلى النتائج الكيميائية

الفصل الرابع: قمنا بتحديد الصيغ البنوية للمركبات المفصولة.

.

الفصل الأول

المركبات الفلافونويدية



I الفلافونويدات :

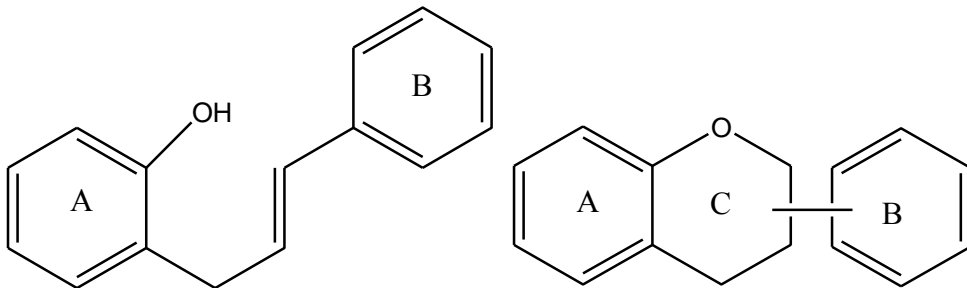
I-1 مفاهيم أساسية :

I-1-1 التعريف بالفلافونويدات :

الفلافونويدات عبارة عن مركبات طبيعية من نواتج الأيض الثانوي، و هي صبغات نباتية تتواجد في مختلف أجزاء النبتة (جذور، أوراق، أزهار)، غير أنها تتواجد بتركيز عالية في القسم الهوائي. توجد في معظم الأصناف النباتية خاصة الراقية منها، و هي واسعة الانتشار عند كاسيات البذور، متوسطة الحضور عند عاريات البذور و شبه منعمة عند الطحالب [10] كما وجدت عند الحزازيات [11]، كذلك عند نباتات أحادية الفلقة، و تعتبر كأداة تشخيصية لذوات الفلقتين [10].

تتواجد بصفة عامة في الخلايا السطحية للأنسجة النباتية، حيث تؤمن لها الحماية من الأشعة فوق البنفسجية المضرة [12]. كما أنها تتواجد منحلة في الفجوات على شكل إيتيروزيدات *hétéroside* (أي الفلافونويدات التي تتحلل في الماء) أما بقية الفلافونويدات التي تتحلل في مذيبات غير قطبية (أي الفلافونويدات عديدة الميثوكسيل) فنجدها في سيتوبلازما الخلية [13]، بالنسبة للأجليكونات فتتوضع على سطح النبات بخاصة الأوراق، حيث تكون ملازمة لمواد هي الأخرى لبيوفيلية و تلاحظ هذه الظاهرة خصوصا عند نباتات المناطق الجافة و شبه الجافة [14].

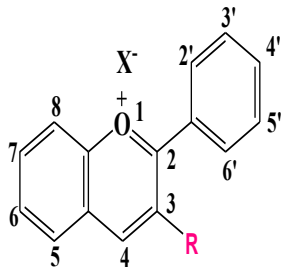
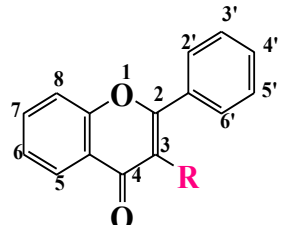
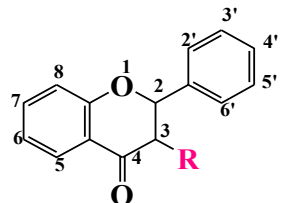
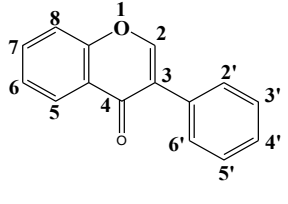
جميع الفلافونويدات تحتوي على 15 ذرة كربون و ذلك في هيكلها الأساسي موزعة على الشكل $C_6-C_3-C_6$ بحيث تتصل الحلقة البنزينيتان "A" و "B" بسلسلة من 3 كربونات و التي تشكل عموما حلقة غير متجانسة "C" بعد الالتحام مع ال OH الفينولي للحلقة A [15]



الشكل -1- يبين مختلف الهياكل الفلافونويدية

I-1-2 أقسام الفلافونيدات :

نستطيع أن نقسم الفلافونويدات انطلاقاً من الاصطناع الحيوي لها، فبعضها يعتبر وسائط ومركبات نهائية في الاصطناع الحيوي مثل الشالكونات، الفلافانو-3-أول، فلافان-3,4-ديول. بعضها الآخر تعرف فقط بالمركبات النهائية في الاصطناع الحيوي كأنثوسيانينات، الفلافانونات، الفلافونولات معظم الفلافونويدات ملخصة في الهياكل في الجدول المبين التالي [16]

أهم المركبات		مختلف أقسام الفلافونيدات		
التسمية	مواقع OH	إسم العائلة	البنية	المشتقات
apegenidine luteolidine	5,7,4' 5,7,3',4'	R= H Flavylum (Anthocyane)		2-phényl- benzopyrilium s
cyanidine	5,7,3',4'	R=OH Anthocyanidine		
apeginine luteoline	5,7,4' 5,7,3',4'	R= H Flavone		2-phényl- chromones
kaempférol quercetine	5,7,4' 5,7,3',4'	R= OH Flavonol		
narengine butine	5,7,4' 7,3',4'	R= H Flavanone (dihydroflavone)		
fustine taxifoline	7,3',4' 5,7,3',4'	R=OH Flavanonol		
daidzein orobo	7,4' 5,7,3',4'	Isoflavone		Phényl- 3chromone
		*		

الجدول (1): أنواع الفلافونيدات

أهم المركبات		مختلف أقسام الفلافونيدات		
التسمية	مواقع OH	إسم العائلة	البنية	المشتقات
galocatechine catechine	5,7,3',4', 5'	R= H Catechine (flavanol-3)		2-phényl- chromanes
leucocyanidine	5,7,3',4'	R=OH Leucoanthocyanid (flavandioli- 3,4)		
galocatechine catechine	5,7,3',4', 5'	R= H Catechine (flavanol-3)		2-phényl- chromanes
leucocyanidine	5,7,3',4'	R=OH Leucoanthocyanid (flavandioli- 3,4)		
sulphuretime maritimetin	6,3',4', 6,7,3',4'	Aurone		2-benzylidène- coumaranones (aurone)

الجدول (2): أنواع الفلافونيدات (تابع)

1-2 الاصطناع الحيوي :

نظرا لأهمية الفلافونويدات وانتشارها الواسع ، فقد أثارت إهتمام الباحثين في تطويرها وتحويلها إلى مركبات جديدة وحتى علماء الوراثة وقاموا بتوجيه أبحاثهم لمعرفة أصل التطور الوراثي لهذه المركبات ، أي كيف يتم تصنيعها داخل النبات . فالاصطناع الحيوي للفلافونويدات يتبع عدة مسالك لتكوين النظام الحلقي داخل النباتات الراقية ، حيث انه تم إجراء تجارب عديدة و ذلك باستعمال النظائر الموسومة بـ ^{14}C المشع، فقد لاحظ الباحث " Robinson " سنة 1936 [17] أن النواتج البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي و عليه فإن عملية الاصطناع الحيوي تتم خلال ثلاثة مراحل :

1-2-1 طريق الشيكيميك :

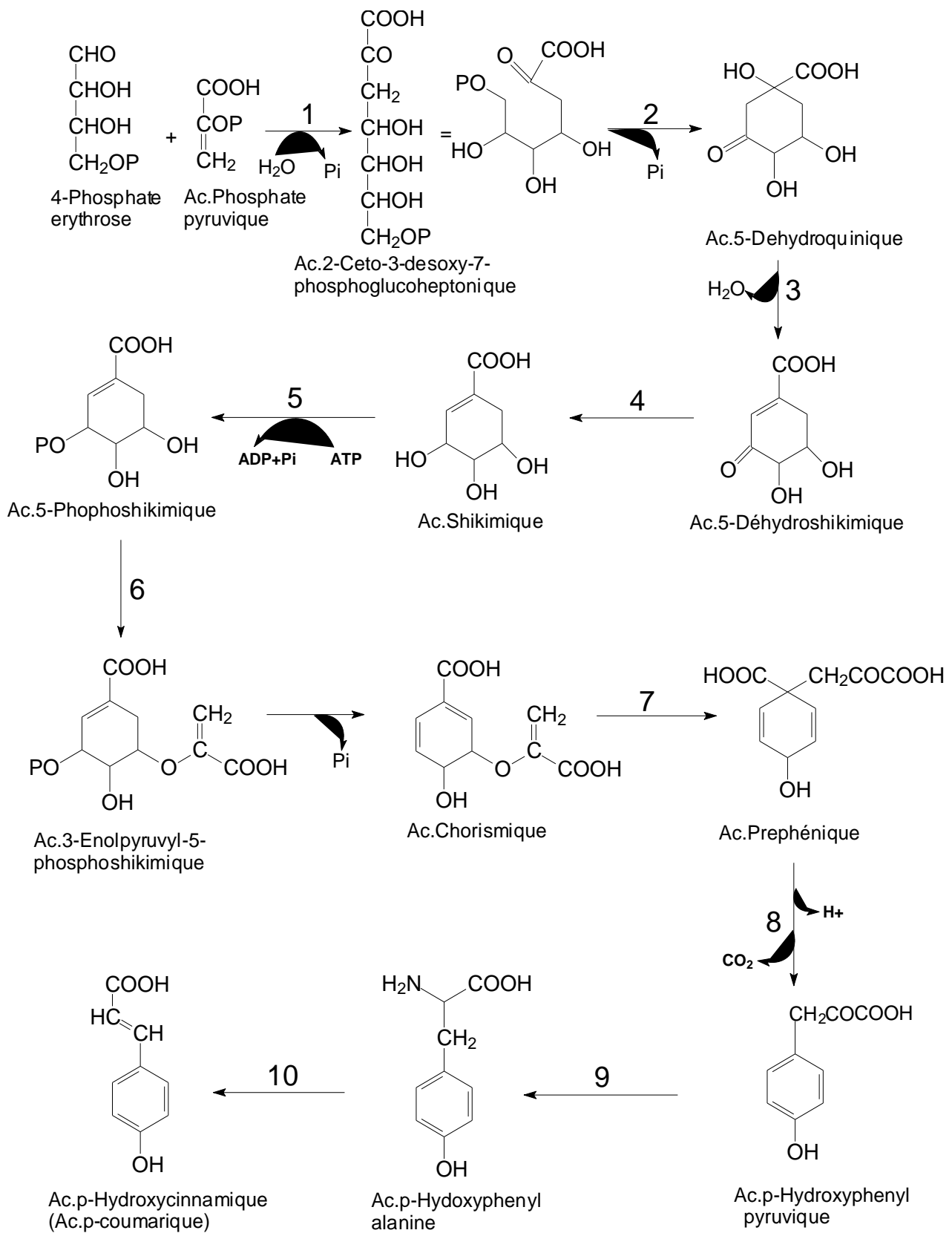
و هي المرحلة الأولى حيث أن الباحث " Davis " أثبت سنة 1955 [18] دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة B و كذلك السلسلة الكربونية الثلاثية C₃ و ذلك بدءا بالغلوكوز، كما هو مبين في الشكل-

-2

يعينم الجدول التالي يبين الأنزيمات الداخلة في تكوين حمض Ac.p-Coumarique

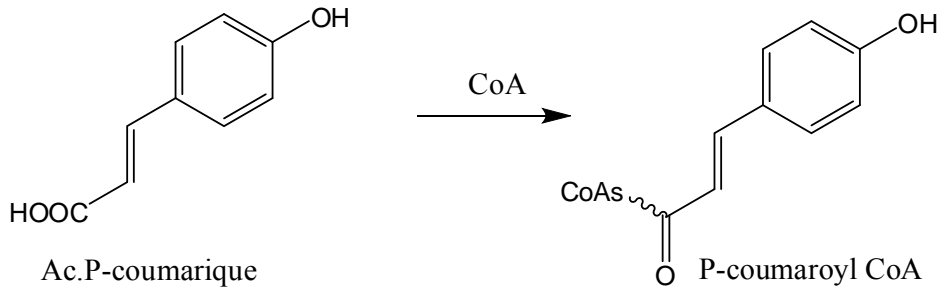
الرقم	الإنزيم
1	Aldolase, 3-désoxy-O-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase ou DHAP synthase
2	Déshydroquinate synthase
3	Déshydroquinate déshydratase
4	Shikimate déshydrogénase
5	Complexe shikimate kinase
6	Ac.Phosphate pyruvique
7	Chorismate mutase
8	Préphénate déshydrogénase
9	Aminitrensférases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

الجدول-3- الأنزيمات الداخلة في تكوين حمض Ac.p-Coumarique



الشكل 2: تكوين حمض Ac.p-coumarique انطلاقاً من الجلوكوز مروراً بحمض الشيكيميك

ثم يتحول Ac.p-coumarique الى p-coumaroyl-CoA



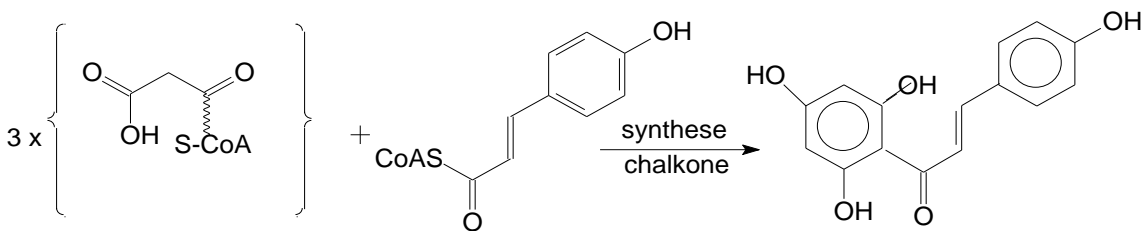
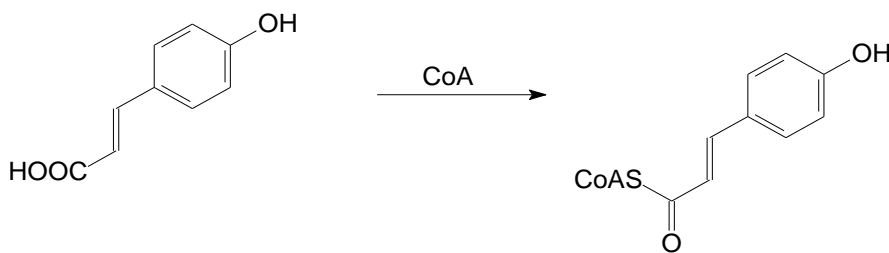
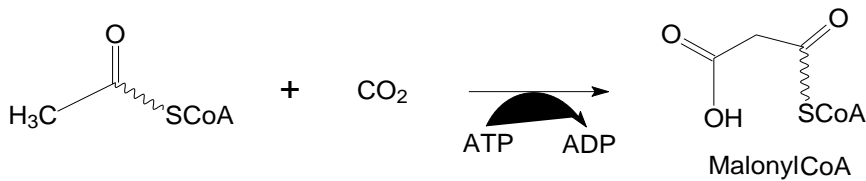
الشكل 3 : تحول Ac.p-coumarique الى p-coumaroyl-CoA

1-2-2 طريق الخلات :

الحلقة A تتشكل من تكاثف رأس - ذيل لثلاث وحدات من الخلات على شكل

Malonyl-CoA مع حمض Ac.P-Coumarique. كما هو موضح في الشكل -4- [19-20-

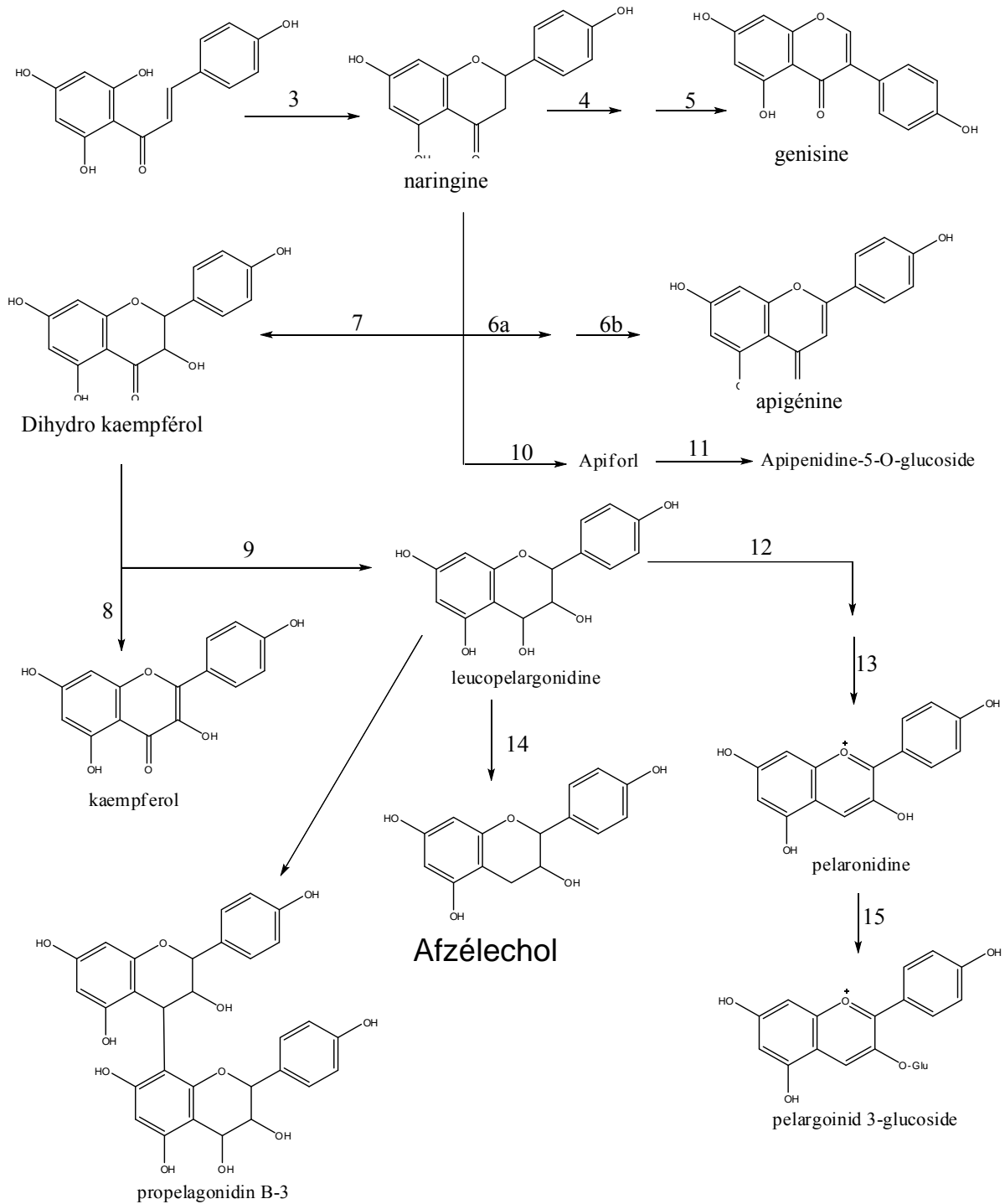
21-22].



الشكل - 4- تكوين الشالكون

1-2-3 الاصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية بدءا من الشالكون :

يعتبر الشالكون النواة الرئيسية التي تنحدر منها مختلف هياكل الفلافونيدات [23] و الذي يتكون من تكاثف ثلاث وحدات من Malonyl-CoA مع p-coumaroyl-CoA كما هو موضح في (الشكل 5-).



الشكل 5- الاصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية انطلاقا من الشالكون

تم تلخيص قائمة الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوي في الجدول التالي:

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

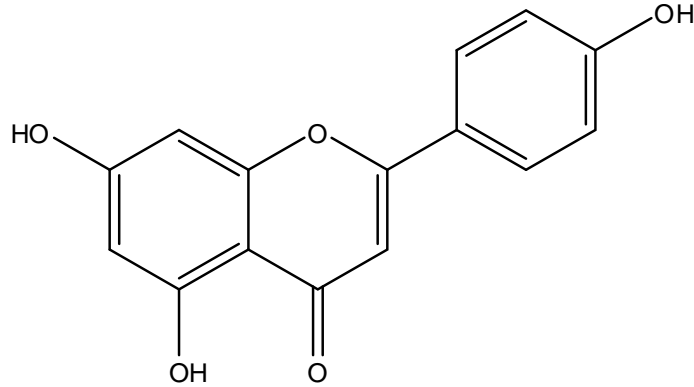
الجدول -4- الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوي

4-2-1 تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونويدي:

I - 4-2-1 تثبيت مجموعات الهيدروكسيل:

يعود تثبيت مجموعات هيدروكسيل الحلقة A إلى نمط تكوين الهيكل الفلافونويدي، فتكون ثنائية الاستبدال في الموضعين 5 و 7 بنسبة 90 % إذ تعد كمجموعات هيدروكسيلية أصلية. ويعود وجود ثلاث هيدروكسيلات أو هيدروكسيل واحد على الحلقة A في بعض الفلافونيدات إلى كون هذه الأخيرة تتبع اصطناعا حيويا مغايرا للأول. أما بالنسبة لهيدروكسيلات الحلقة B، فيعتبر هيدروكسيل الموضع 4' هو الوحيد الذي يتم تثبيته قبل تكوين الفلافونيد، في حين تكون المواقع 2'، 6' نادرة الاستبدال [24].

على سبيل المثال 2 l'apigénine



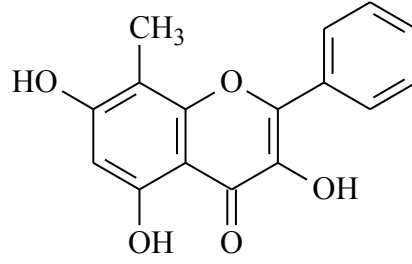
الشكل -6- Apigénine 2

I - 4-2-2 تثبيت مجموعات الميثيل:

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

الحالة الأولى:

تكون الرابطة بين كربون الميثيل و كربون النواتين A و(أو) B و مثال على ذلك المركب

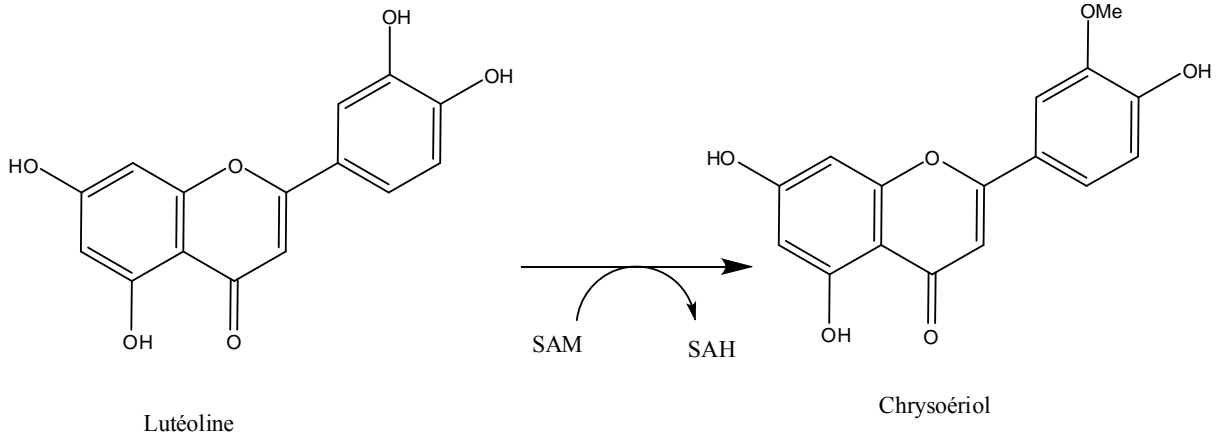


8-C-méthylgalangine

الشكل -7-

الحالة الثانية:

هي مثيلية المجموعات الهيدروكسيلية التي تم تثبيتها من قبل (*O*-methylation) و هذا في وجود أنزيم *O*-methyltransférase كمانح للمثيل [25] والشكل التالي يبين ذلك.



SAM : S – adénosyl méthionine

SAH : S – adénosyl homocysteine

الشكل -8- التحول الإنزيمي لـ lutéoline إلى chrysoériol

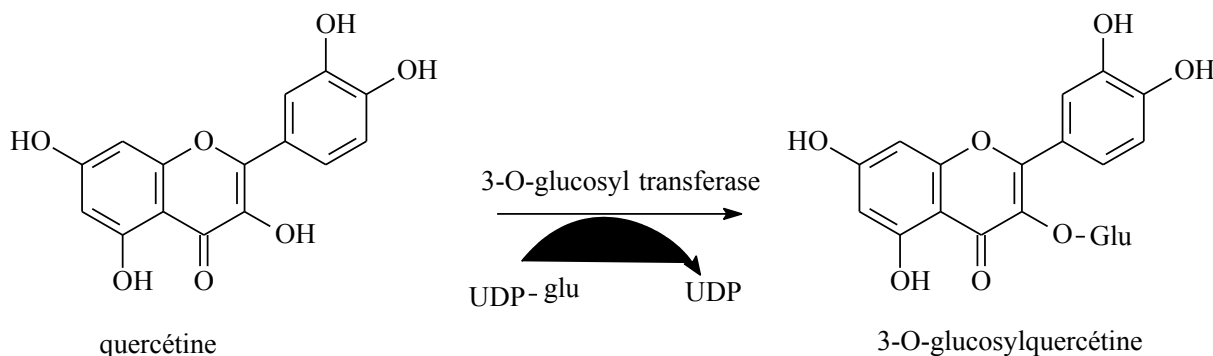
كما يمكن ظهور مجموعات ميثوكسي عن طريق المثيلية المباشرة على الحلقة البنزينية [26].

I - 2-4-3 تثبيت جزيئات السكر:

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

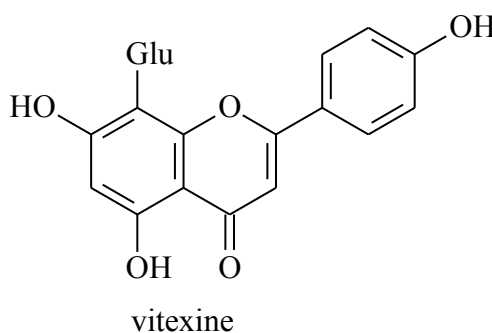
و ترتبط وحدة السكر بذرة أكسجين مجموعة الهيدروكسيل مباشرة أي من نوع (*O*-heterosidique) و عادة يكون هيدروكسيل الموضع 7 للفلافونات و هيدروكسيل الموضع 3 للفلافونولات و يتم تثبيت السكر في وجود إنزيم "*O*-glucosyl transférase" و مانح للسكر مثل :

"UDP-glu" (Uridine diphosphate glucose) [27] والشكل التالي يوضح ذلك.



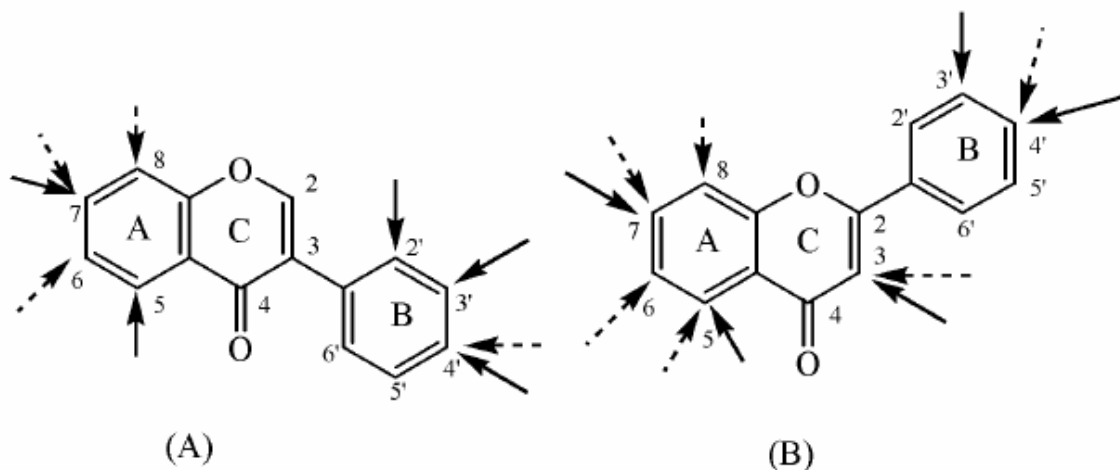
الشكل-9-

كما قد ترتبط وحدة السكر بإحدى ذرات كربون الحلقة العطرية للهيكل الفلافونيدي أي من نوع (*C*-hétérosidique) و تتشكل الرابطة في هذه الحالة بين ذرة الكربون الأنوميري C_1 لجزيء السكر و أحد الموضعين C_6 أو C_8 للأجليكون، و تنشأ رابطة من نوع كربون - كربون ، و تتم بعد تكوين الشالكون مباشرة [28] ، و مثال على ذلك المركب *vitexine*



الشكل-10-

و الشكل التالي يوضح المواقع الأكثر تكرارا لارتباط مجموعات الهيدروكسيل بالهيكل الفلافونيدي، وكذلك مجموعات السكر من نوع *O*- glycosylation (سهم ممتلئ) و/أو *C*- glycosylation (سهم المنقطع) [29].



الشكل -11-

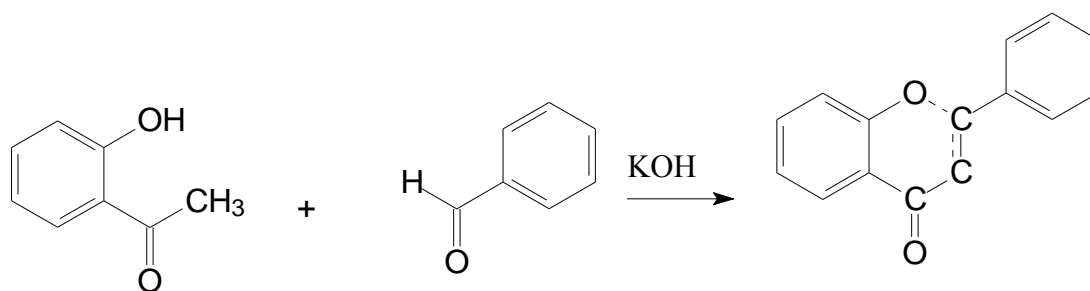
3-1 الاصطناع المخبري :

من أجل تصنيع الفلافونويدات مخبريا، فنظريا توجد أربعة طرق تم اعتماد طريقتان و هما:

1-التكاثف الألدولي:

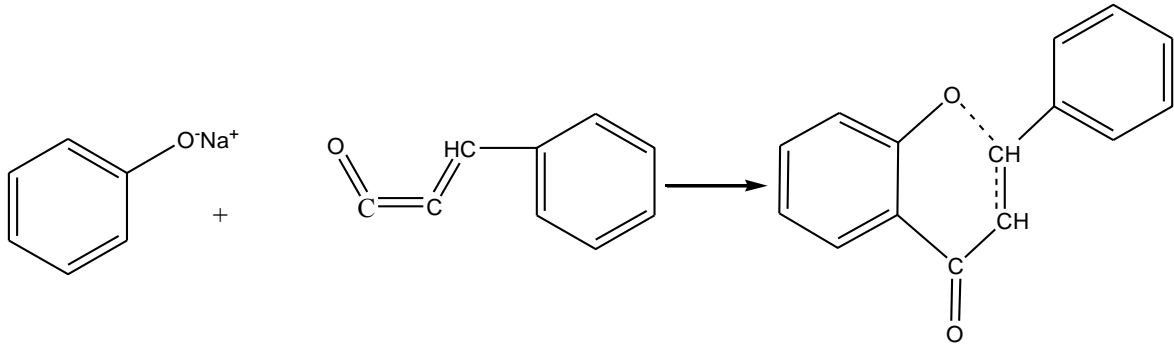
الدراسات المجرات بينت أنه يمكن الحصول على الفلافونويدات عن طريق التكاثف الألدولي بين 2-

هيدروكسي أسيتوفينون مع مشتقات البنزالدهيد في وجود هيدروكسيد البوتاسيوم.



الشكل - 12 -

ب- أسالة الفينولات:



الشكل - 13 -

I - 3 - 1- تصنيع الشالكون:

يمكننا الحصول على الشالكونات و ذلك بالتكاثف الألدولي لـ :
2-hydroxyacetophenone مع المشتقات البنزينية الألهيدية (benzaldehydes) و ذلك في
الوسط الحمضي أو القاعدي. [10]

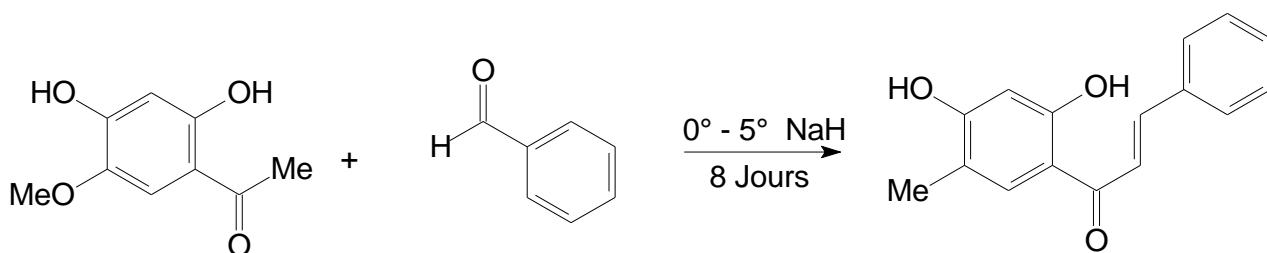
تحدث عملية تحلق للشالكون و ذلك في الوسط الحمضي الذي يؤدي إلى ظهور الفلافانون وفق تفاعل
متوازن (شالكون - فلافانون)، إلا أن هذا التوازن ينزاح بشكل شبه كلي إلى جهة الشالكون و هذا في حالة
وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4 بالنسبة للشالكون.

التفاعل في الوسط القاعدي يتطلب الشروط التالية:

الزمن اللازم للتفاعل	تركيز القاعدة	درجة حرارة التفاعل
15 - 48 ساعة	50% - 60% KOH	0° م - 20° م

ل جدول-5-

و قد لوحظ أن انعدام مجموعات الميثيل يؤدي إلى مردود جيد.

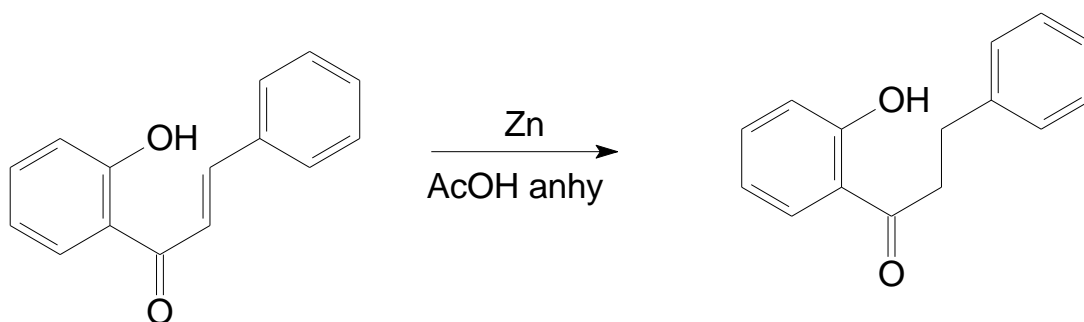


الشكل - 14 -

من أجل الحصول على الشالكونات ذات مجموعات الميثيل انطلاقا من الفلافانون و ذلك بفتح الحلقة في الوسط القاعدي الكحولي ثم الترسيب بالحمض الممدد و تحت حرارة منخفضة و للحصول على مردود جيد ينبغي عدم وجود هيدروكسيل حر في الوضع 5 بالنسبة للفلافانون.

I - 3-2 - تصنيع ثنائي هيدروشالكون:

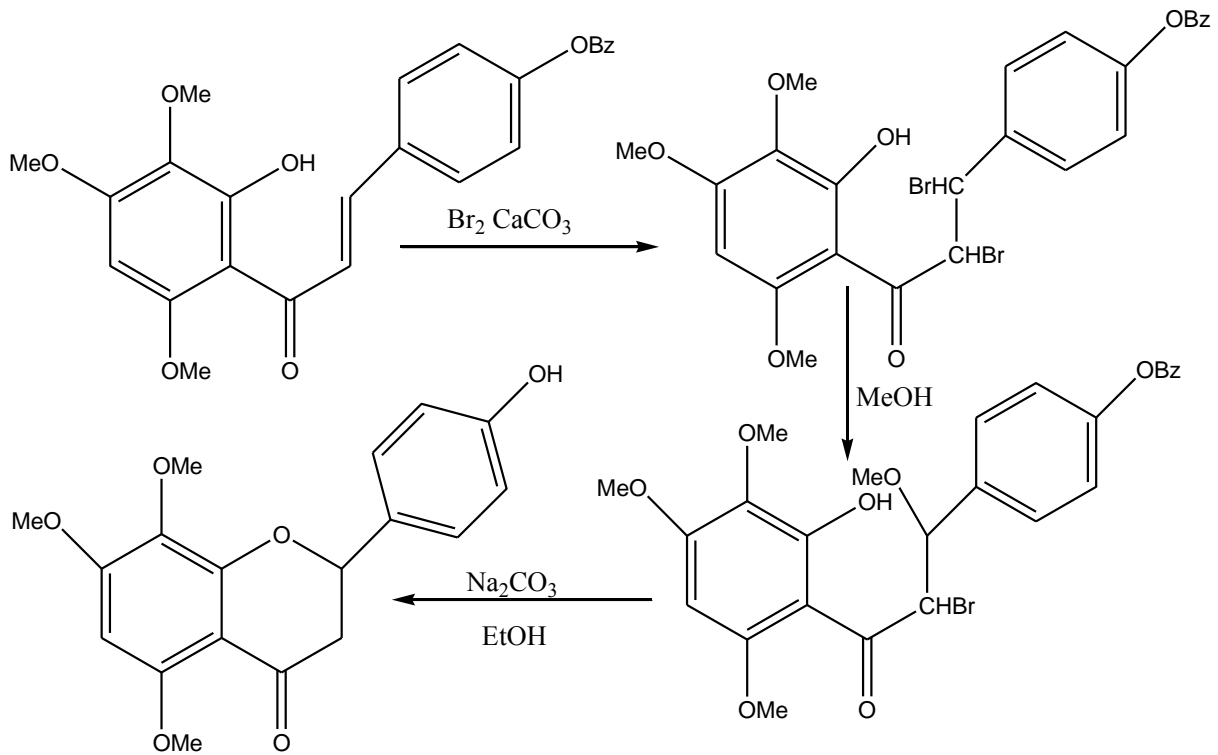
نتحصل على ثنائي هيدروشالكون وذلك من تكاثف الفينولات مع مشتقات حمض ثنائي هيدرو سيناميك (acide dihydrocinnamique) أو بهدرجة الشالكون أو الفلافانون. [10]



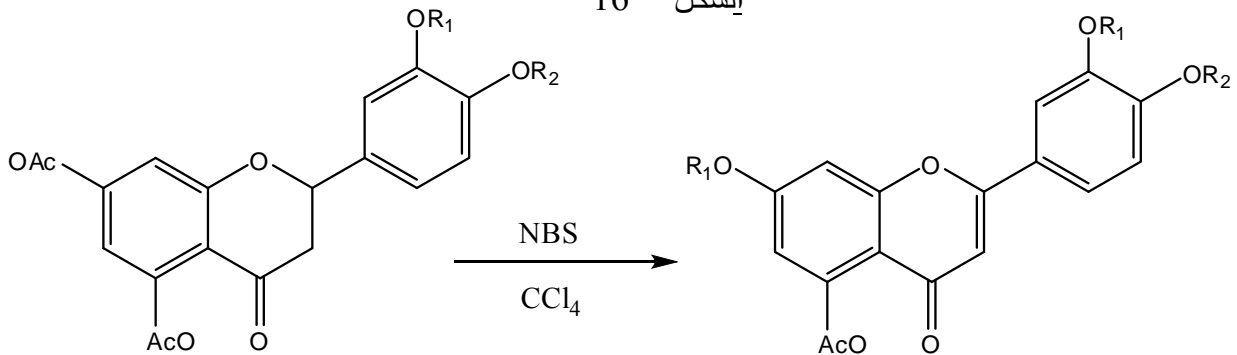
الشكل - 15 -

I-3-3- تصنيع الفلافون:

يمكننا الحصول على الشالكونات وفق المخطط التالي: [10]



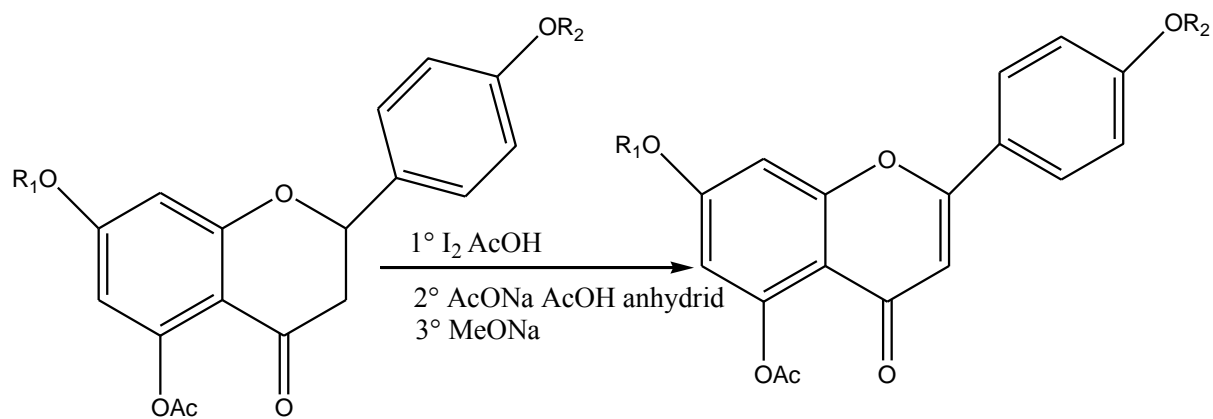
الشكل - 16 -



	R_1	R_2
A	Ac	H
b	Me	Ac
c	Ac	Me

	R_1	R_2
a	H	H
b	Me	H
c	H	Me

الشكل - 17 -



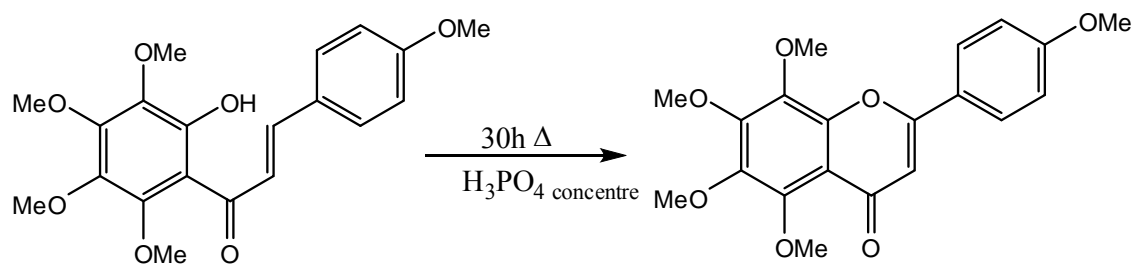
R₁ = Sucre
R₂ = Ac ou Me

R₁ = Sucre
R₂ = H ou Me

الشكل -18-

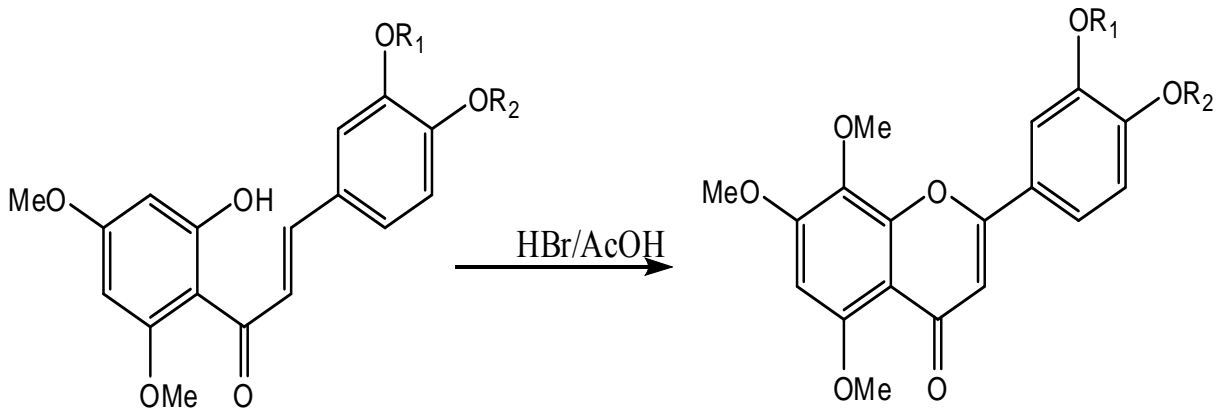
I-3-4- تصنيع الفلافانون:

انطلاقاً من الشالكون يتم الحصول على الفلافانون و هذا بغلق الحلقة و قد لوحظ أن وجود هيدروكسيل حر في الموضع '6' بالنسبة للشالكون يؤدي إلى مردود جيد و يمكن أن نذكر أيضاً أن الفلافانون المستبدل في الموضع 8 لا يمكن الحصول عليه إلا تحت شروط قاسية. [10]



الشكل - 19 -

بعض التفاعلات الخاصة التي تمكننا من الحصول على فلافونون خاص:

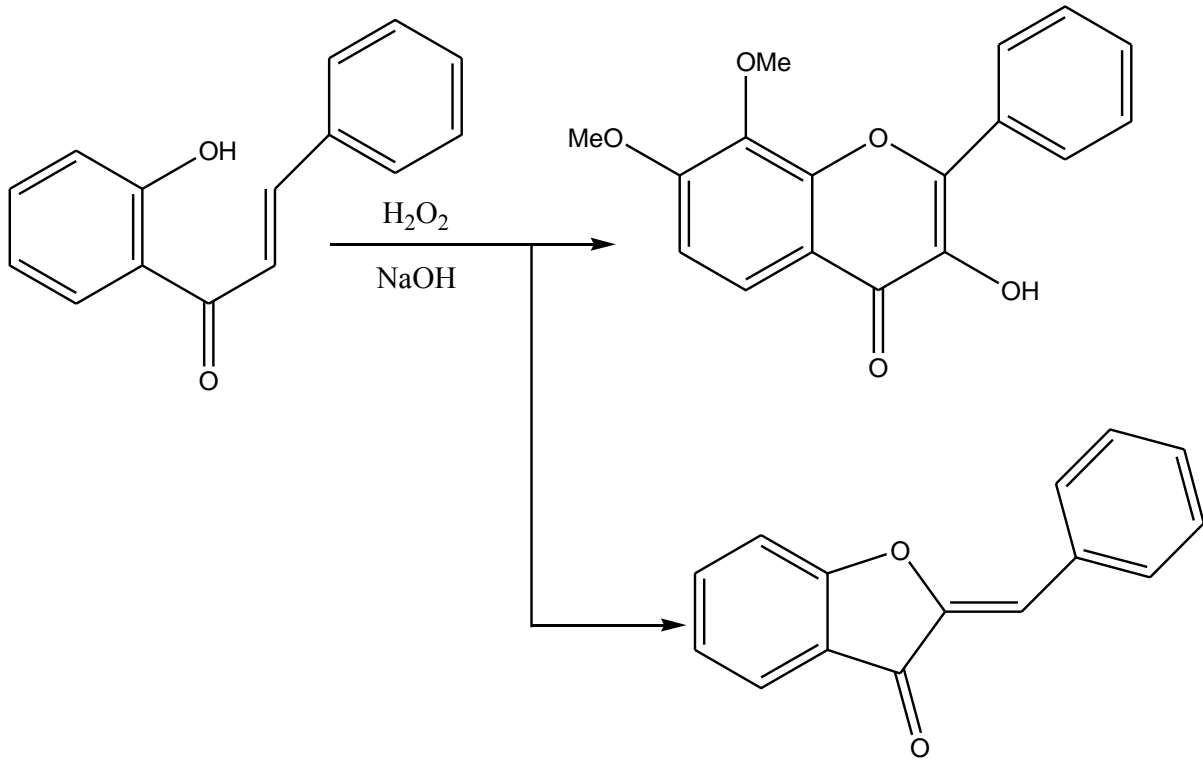


	R ₁	R ₂
A	Bz	Me
b	Me	Bz

	R ₁	R ₂
a	H	Me
b	Me	H

الشكل - 20 -

I - 3-5- تصنيـع الفلافونول و الأورون:

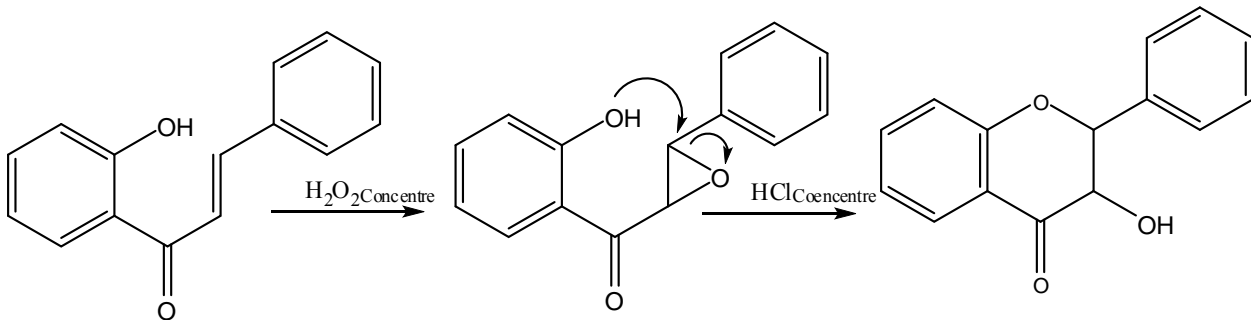


الشكل - 21 -

لوحظ أن شروط التفاعل و وجود المستبدلات لها تأثير كبير على مردودية التفاعل، فبالنسبة للمستبدلات لوحظ أن وجود هيدروكسيل في الموقع 2 و الموقع 4 بالإضافة إلى مجموعة ميثوكسيل في الموقع 6 فإن مردود التفاعل يزيد باتجاه الحصول على الفلافونول المطلوب.

أما الشروط المثالية فهي: H_2O_2 5% - 30% ، $NaOH$ 20% . [10]

I - 3-6- تصنيـع ثنائي هيدرو الفلافونول:

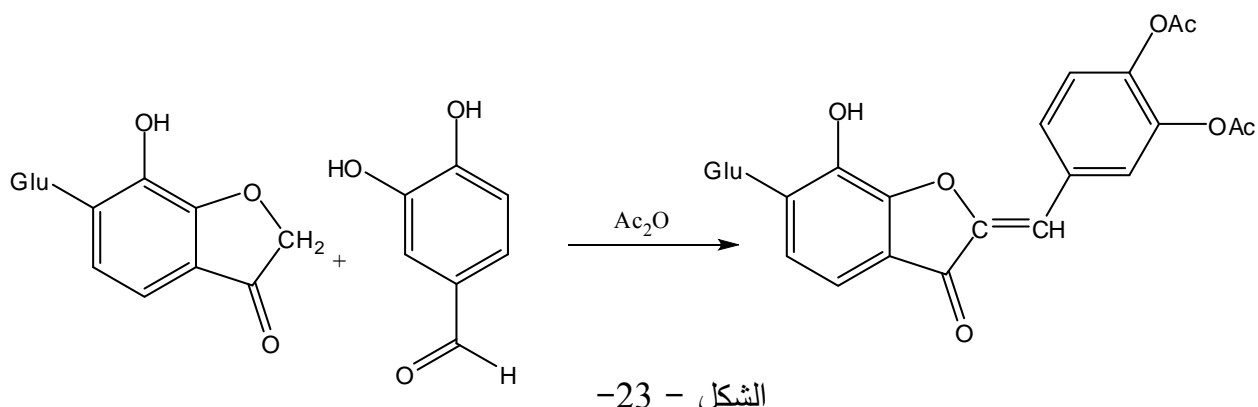


الشكل - 22 -

يمكن إجراء الخطوة الثانية من هذا التفاعل في وجود حمض HCl المركز أو يمكن استعمال HCl النقي و حمض الخل البلوري و هذا بوجود BF_3 و الإيثر كمذيب. [10]

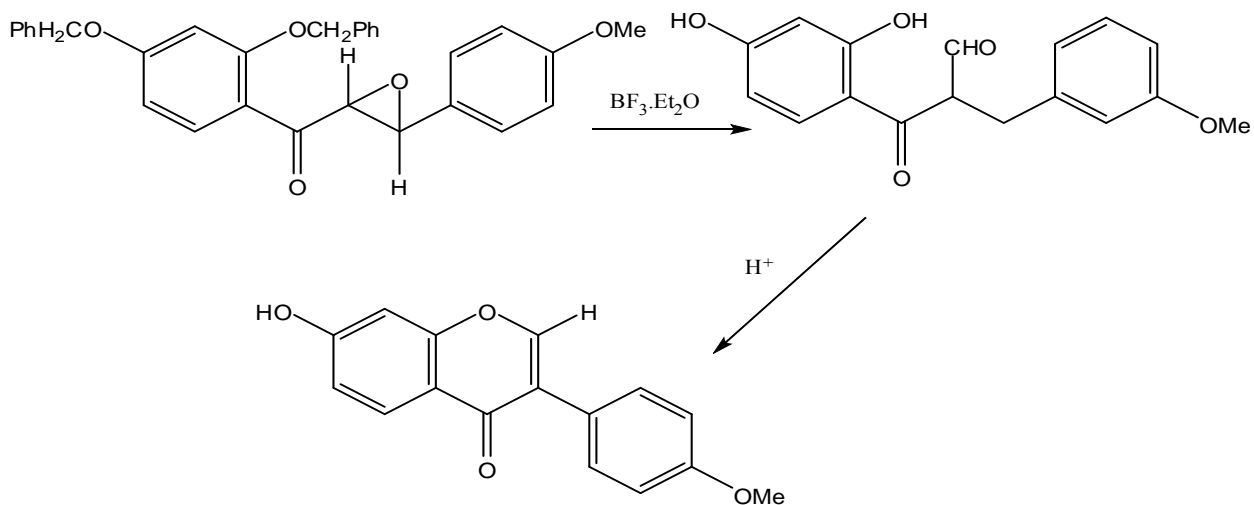
I- 3-7- تصنيع الأورون:

الطرق العملية المستعملة تقريبا كلها تعتمد أساسا على تكاثف الكومارين مع الألدهيدات العطرية في وسط حمضي إلا أنه في حالة وجود سكريات كمستبدلات لا يمكن استعمال هذه الطريقة التي تتطلب وجود حمض HCl لذا فإننا نلجأ إلى تفاعلات أخرى. [10]

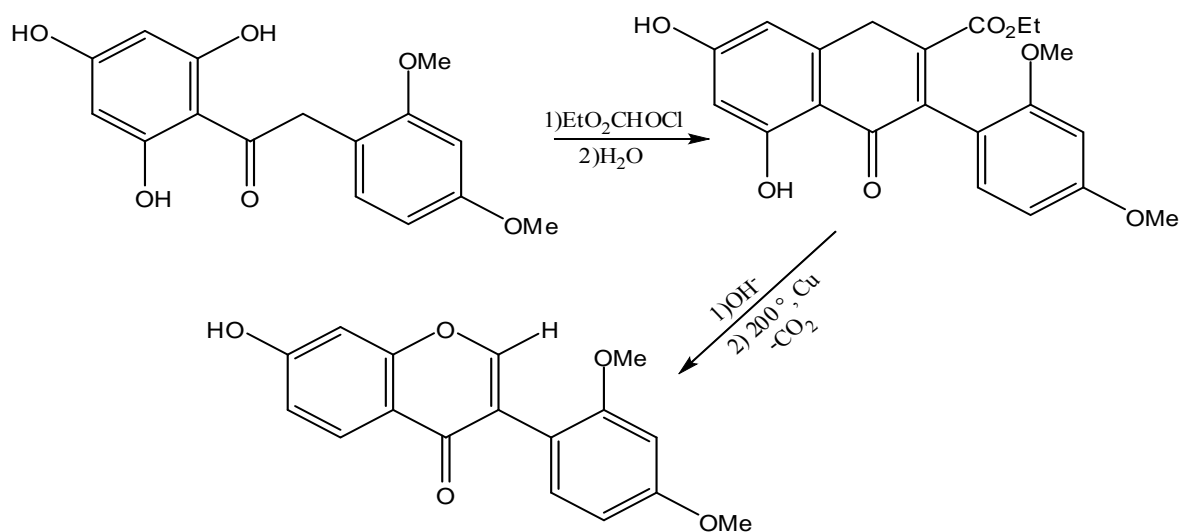


I- 3-8- تصنيع إيزوفلافون:

الطريقة الأولى: [10]

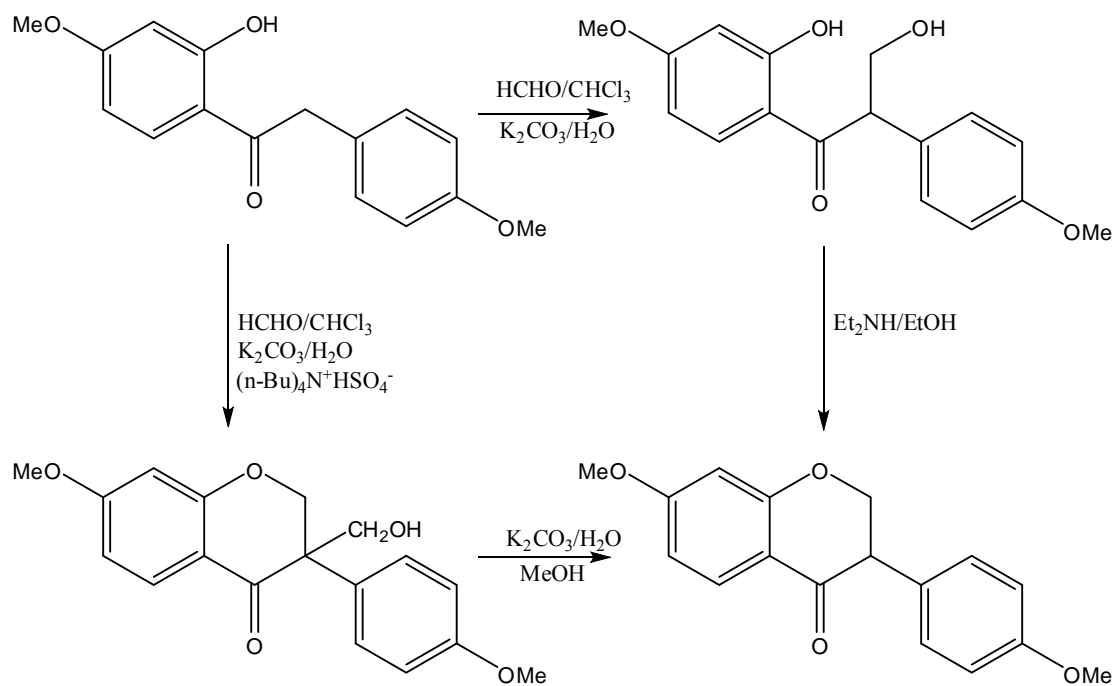


الطريقة الثانية: [10]



الشكل - 25 -

الطريقة الثالثة: [30]



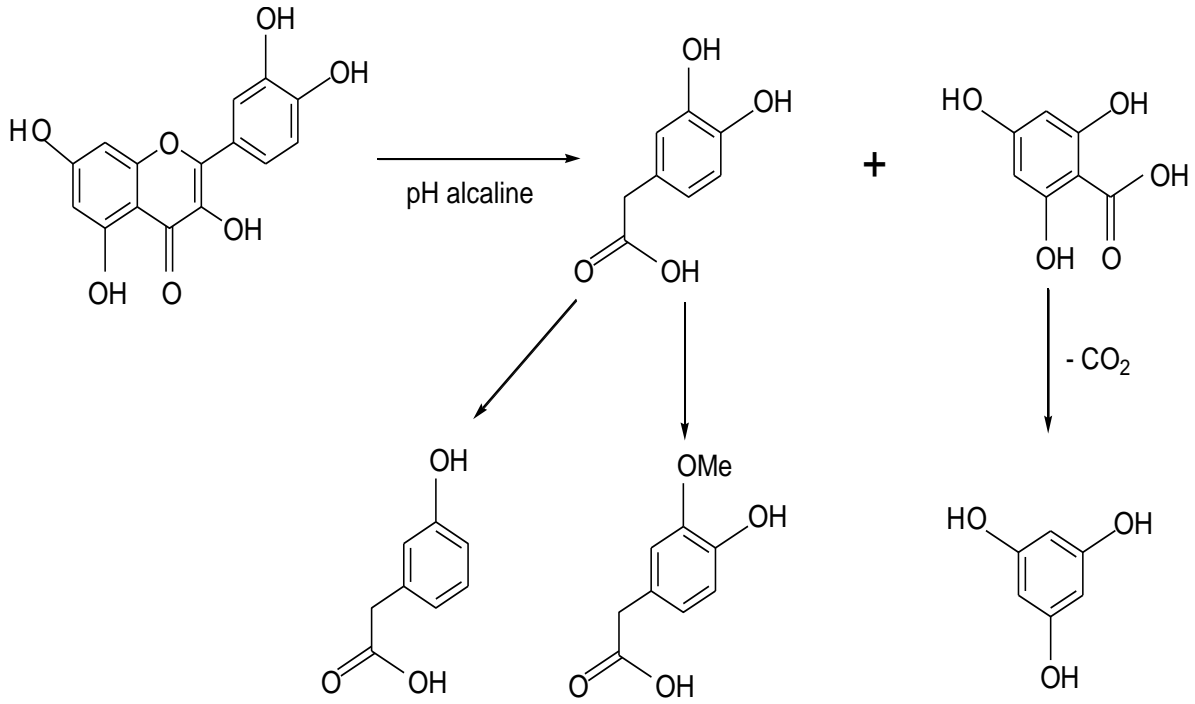
الشكل - 26 -

4-1 خصائص و أهمية الفلافونيدات :

- ترتبط خصائصها بنوع و قسم الفلافونيد و بحالة وجوده (فلافونيدات حرة ،جليكوزيدية ، كبريتية...) لكن يمكن تلخيص أهمها في النقاط التالية:
- تتغير ألوان الفلافونيدات باختلاف أنواعها فمثلا: الفلافونات ، الفلافونولات و الأورونات تتواجد بألوان تتدرج من الأصفر حتى الأحمر أما الأنتوسيانيدات فلها ألوان متعددة كالأحمر الغامق، البنفسجي و الأزرق.
 - تتعلق ذوبانيتها بشكل توажدها و مستبدلاتها فالفلافونيدات الجليكوزيدية ،الكبريتية و الأنتوسيانيدات تذوب في الماء و الكحول، الفلافونيدات الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل تذوب في الكحول(إيثانول، ميثانول، بوتانول) بينما الأقل استبدالا تذوب في الإيثر، خلات الإيثيل، الأسيتون، و بالنسبة للفلافونيدات الأجليكونية متعددة الميثوكسيل فتذوب في المحاليل الأقل قطبية كإيثر البترول و الكلوروفورم[31].

I - 4-1 - الدور البيولوجي :

- الفلافونيدات هي العناصر المسؤولة عن إعطاء اللون للنبتة و بصفة خاصة للأزهار مما يمنحها الصفة الجاذبة للحشرات و الطيور التي تنقل حبات الطلع و بذلك تمنح دورة جديدة لحياة هذه النباتات، كما تلعب دور حماية لها إذ تعطي طعاما مميزا للنبتة مما يبعد الحشرات الضارة عنها.
- لها دور في مراقبة نمو و تطور النبات و هذا بتفاعلها بطريقة معقدة مع مختلف هرمونات النمو النباتية كما تتكامل فيما بينها لتساهم فيما يسمى بـ: Phytoalexines و هو إنتاج النبتة لأبيض يعالج الإصابات التي تسببها البكتيريا و الفطريات[32].
- تحمي نسيج النبات لكونها تمتص الأشعة فوق البنفسجية (250-270 ن.م) و عليه فهي تحمي المواد الأساسية (البروتينات و الأحماض النووية) من الآثار السامة لهذه الإشعاعات[33] ، كما تساعد على الإنفاص من ظاهرة النتح في المناطق الجافة[34].
- تعتبر مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة ، ذوابة في القواعد القوية مثل: هيدروكسيل الصوديوم. و يتم هدم معظمها في ظروف قاعدية قوية و هذا بتكسير الحلقة C، من أجل هذا ثبت أنها ليست سامة للإنسان و الثدييات حيث يتم هدمها على مستوى الأمعاء. فمثلا يتم هدم الكرسيتين على النحو الموضح في الشكل-27:-

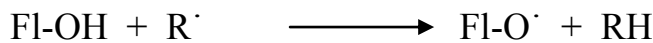


الشكل -27- هدم جزيئة الكرسيتين

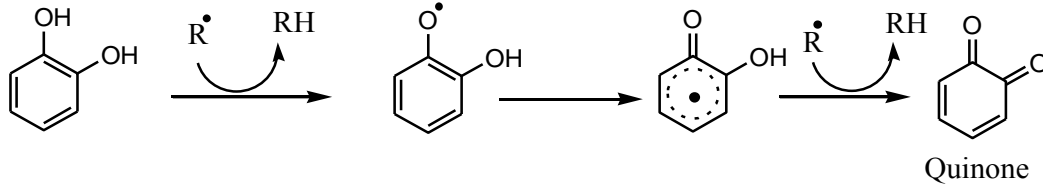
- إن من أهم ميزات الفلافونيدات كونها عناصر ضد مؤكسدة ، و يتمثل فعل ' ضد-الأكسدة ' حسب العالم Halliwell [35] في الفعاليات التالية:

- الإحاطة بـ: (Reactive Oxygen Species) ROS و تثبيطها و هي عناصر أوكسجينية تتولد في الخلية عند دخول أكسجين التنفس إليها و التي تسمى بالجذور الحرة للأكسجين و هي عناصر فعّالة في الجسم لكن ارتفاع نسبة إنتاجها يحدث عدم توازن بين بنائها و هدمها مما يسبب ضررا كبيرا بسبب قدرتها على إتلاف الخلايا و الأنسجة و بالتالي الأعضاء مما يجعلها المسبب الرئيسي لعدة أمراض، لكن الدراسات أثبتت تأثير الفلافونيدات عليها كأعمال

Pietta [36] Dugas [37] حيث يرتبط الفلافونيد مع الجذر (R[·]) حسب المعادلة التالية:



و الجذر الفلافونوكسي (Fl-O \cdot) يمكن أن يتفاعل مع آخر و يعطي صيغة الكينون المستقرة، و يمكن تلخيص ذلك في الشكل -28-:

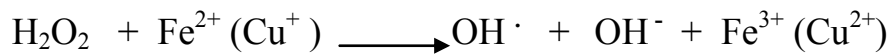


الشكل -28- تأثير الفلافونيدات على ROS (R \cdot)

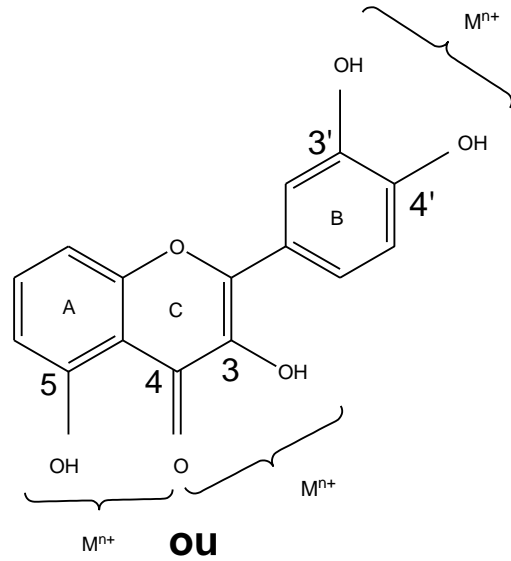
- تثبيط بعض الأنزيمات ك: XO (La xanthine oxydase) و الذي يعتبر المصدر البيولوجي الأكثر أهمية للجذر فوق المؤكسد superoxyde

I-4-2- الدور الفيسيولوجي:

- إنّ لبعض الشوارد المعدنية ك: Fe²⁺ و Cu⁺ دورا هاما في بعض الوظائف الفيزيولوجية إذ تدخل في تركيب بعض البروتينات المتجانسة Hémoprotéines أو كونها Cofacteurs لمختلف أنزيمات الدفاع الذاتي ضدّ المؤكسد ، لكنّها في نفس الوقت تساعد على إنتاج بعض الجذور الحرّة كما في التفاعل التالي:



و لذلك فإنّ ارتباط بعض الفلافونيدات بهذه العناصر يحدّ من إنتاج الجذور الحرّة ، و الشكل-29- يعطي أهمّ المواقع لتشكل معقدات (complexes) بين الأيونات المعدنية كالحديد و الألمنيوم مع الفلافونيدات[38]:

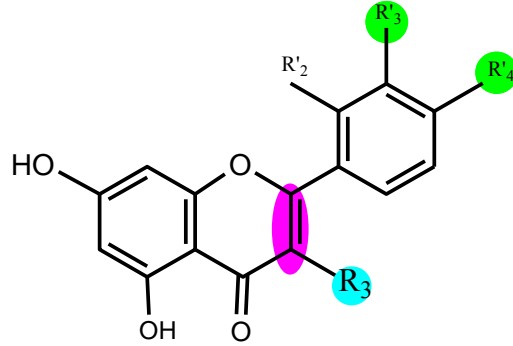


الشكل -29- أهم مواقع المخالب لأيونات المعنوية

I- 4-3- الدور العلاجي أو الإستشفائي:

- أثبتت الدراسات المكثفة حول الفلافونويدات متعددة الميوكسيل أن لها فعالية ضد الخلايا السرطانية [39] وهذا من خلال تقوية الجهاز المناعي و ذلك بمساعدته على مقاومة و تدمير الخلايا السرطانية.
- البعض منها له تأثيرات مضادة للالتهاب [40].
- مضادة لارتفاع الضغط [41].
- مضادة للحساسية [42].
- تستعمل أيضا كمسكنات و مدرات للبول و مخفضات لنسبة الكوليسترول [43].
- و قد لوحظ وجود علاقة بين التركيبة الكيميائية للفلافونويد و تأثيراته العلاجية. حيث توصلت الأبحاث إلى أن الزيادة في مجاميع الهيدروكسيل على الحلقة (A) و (B) ينتج عنه زيادة في النشاط المضاد للورم، كما تعتبر الرابطة المضاعفة بين C₂-C₃ ضرورية لإحداث هذا النشاط [44]. أما بعض الفلافونويدات الجليكوزيدية فلها فعالية ضد الفطريات [45]. ، و قد أثبتت دراسات العالم Hanasaki و مساعدوه [46] حول مرض La goutte (و هو مرض ناتج عن ارتفاع نسبة حمض اليوريك في الدم) أن بعض الفلافونويدات تؤثر على XO و بالتالي تخفض تركيز حمض

اليوريك مما يساعد على السيطرة على هذا المرض. و قد تأكدت هذه النتائج بأعمال Cos و مساعده [47] الذين أثبتوا دور الرابطة C_2-C_3 بالنسبة للفلافونات و الفلافونولات في تثبيط أنزيم XO بالإضافة إلى العناصر الفعّالة الأخرى و الموضحة في الشكل -30-



الشكل -30- أهم الوظائف الفعّالة في خاصية ضد الأكسدة

الفصل الثاني

طرق دراسة المركبات الفلافونيدية

|

II - 1 - طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية :

II - 1 - 1 طرق الاستخلاص :

- قبل القيام بعملية الاستخلاص لا بد من تجهيز النبتة المراد إجراء عليها العملية و ذلك بـ :
1. تجفيفها في الظل و بعيدا عن الرطوبة تفاديا للتفاعلات الإنزيمية التي قد تحدث تغيرات على المركبات المراد استخلاصها
 2. تنقيتها.
 3. طحنها.
- قد تستعمل النبتة بجميع أجزائها، كما قد يؤخذ الجزء الهوائي لوحده أو الجذور أو الثمار فقط، و عموما تتواجد الفلافونيدات في الجزء الهوائي؛ إذ في هذا الأخير بالذات يتم الاصطناع الحيوي للفلافونيدات و ذلك لارتباطه بالعامل الضوئي.

وتتم عملية الإستخلاص بنقع الأجزاء النباتية المراد استخلاص الفلافونيدات منها في مذيب مناسب و أكثر المذيبات استعمالا خليط من الكحول / الماء بنسب معينة (3/7) أو (2/8) [49،48، 50] في حالة المادة النباتية الجافة، و يفضل الكحول لوحده في حالة المادة النباتية الغضة (الخضراء)، و أغلب الكحولات المستعملة هي الميثانول و الإيثانول.

و تتم عملية الاستخلاص على مراحل :

المرحلة الأولى :

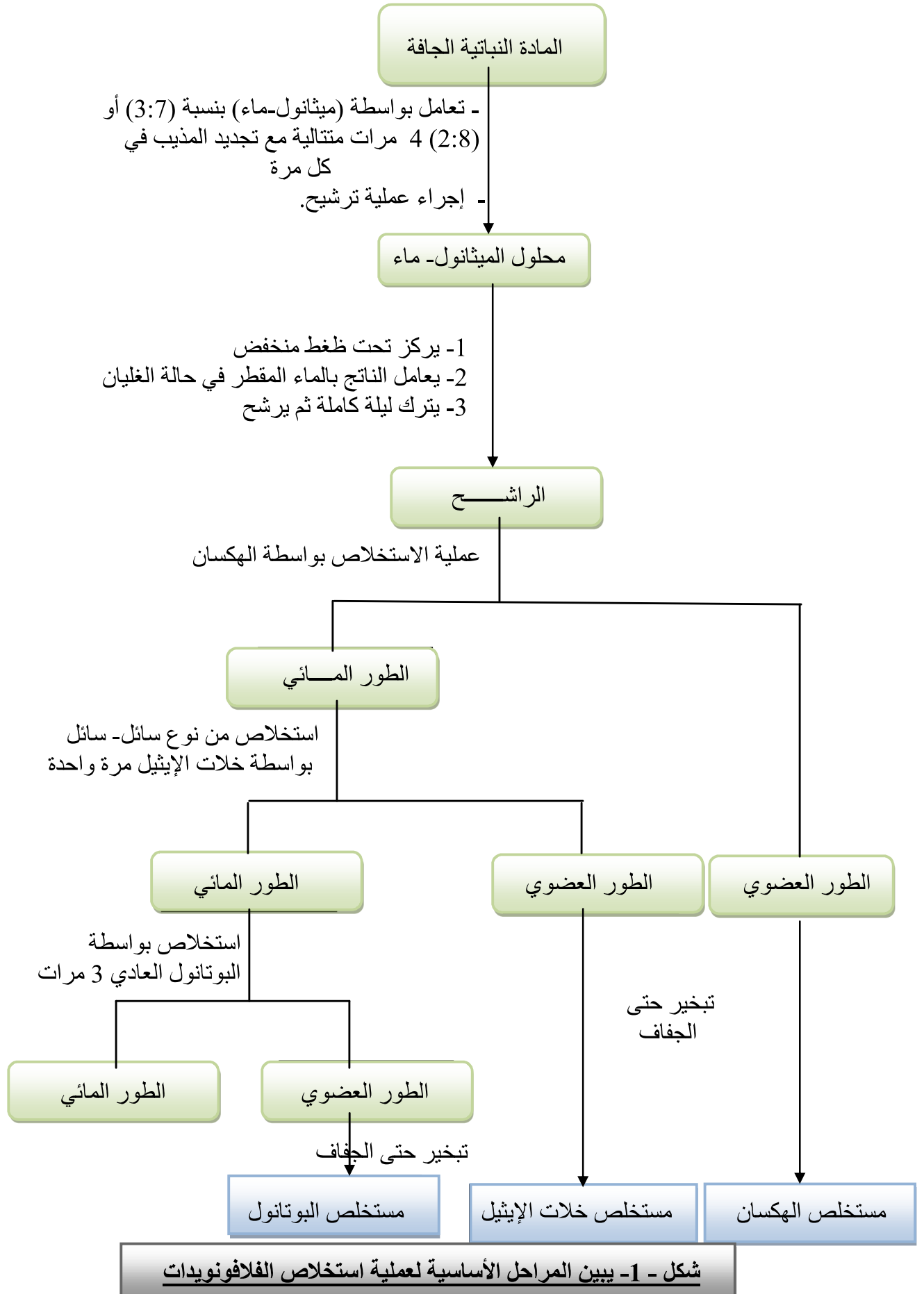
نأخذ الأجزاء النباتية المطحونة و نسكب عليها المحلول الهيدروكحولي على البارد و نتركها لمدة لا تقل عن يوم واحد مع التحريك من حين لآخر، بعدها نرشح و نركز الراشح، تكرر العملية 3 مرات أو أكثر و في كل مرة نرشح و نركز الراشح و ذلك بتبخير أكبر كمية ممكنة من المحلول الهيدروكحولي ان الى نتحصل على المستخلص الخام.

المرحلة الثانية :

يؤخذ المستخلص الخام و يعامل بالماء المقطر المغلي ثم يترك مدة ليلة كاملة بعدها يرشح على ورق الترشيح ويحتفظ بالراشح

المرحلة الثالثة :

- بعد ترشيح المستخلص تركز الرشاحة للتخلص من الكحول المستعمل، ثم يعمد إلى استخلاص انتقائي من نوع سائل/سائل، باستعمال مجموعة من المذيبات منها:
- ✓ بالإيثربيتترول كي يتم التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون و التربينات و الكلوروفيل].
 - ✓ الهكسان العادي (C_6H_6) او ثلاثي كلور الميثان ($CHCl_3$) لاستخلاص الأجليكونات الميثوكسيلية.
 - ✓ خلات الإيثيل (AcOEt) لاستخلاص الأجليكونات متعددة الهيدروكسيل و الإيتيروزيدات أحادية السكر .
 - ✓ البوتانول النظامي (n-ButOH) في استخلاص الإيتيروزيدات عديدة السكر.
- و هذين الأخيرين من أكثر المذيبات استعمالا.
- ويمكن تلخيص هذه المراحل في المخطط التالي:



II-1-2- طرق الفصل :

التقنية الأساسية المستعملة لذلك هي الكروماتوغرافيا بمختلف أقسامها، حيث تستعمل كلمة كروماتوغرافيا للإشارة إلى تقنيات فصل مختلفة، تعتمد جميعها على توزيع المادة تحت الدراسة بين طورين أحدهما ثابت و الآخر متحرك، و الطور الثابت قد يكون جامداً أو سائلاً محملاً على الدعامة الجامدة، أما الطور المتحرك فعادة يكون سائلاً عضوياً [51].

إن هدف الفيتوكيميائي هو الحصول على مركبات نقية لأجل ذلك يستعمل طرق فصل متتالية أهمها:

- ✓ كروماتوغرافيا العمود (CC).
- ✓ كروماتوغرافيا الورق (CP).
- ✓ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).
- ✓ كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC).

II-1-2-1- كروماتوغرافيا العمود (CC) :

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

- ✓ السيليكا جال يستخدم لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية.
- ✓ السيليلوز و أثبتت فعاليته في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر.
- ✓ متعدد الأמיד الذي لقي تطبيقاً واسع النطاق في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية بعضها عن بعض.

و يتلخص طريق إجراء هذه التقنية فيما يلي:

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

- بعد ترصيص الطور الثابت جيدا داخل العمود توضع طبقة من رمل خاص يدعى **Sable de fontaine bleu** بسمك 0.5 سم، بعدها تحضر العينة حيث يذاب المستخلص المراد فصله في أقل كمية ممكنة من الميثانول، و بواسطة ماصة باستور يتم وضعه على سطح الرمل مع الحرص على عدم إتلافه، أو بإتباع طريقة أخرى و التي تستعمل في حالة ما إذا تطلبت إذابة المستخلص الجاف كمية كبيرة من الميثانول، ففي هذه الحالة نضيف لمحلول المستخلص كمية من الجال و نركز هذا الخليط حتى نحصل على مسحوق جاف الذي يضاف إلى العمود الكروماتوغرافي، بعد ذلك يضاف المملص الذي يكون في البداية مذيّب أقل قطبية ثم ترفع قطبيته بإضافة مذيّب قطبي تدريجيا إلى غاية الوصول إلى قطبية عالية، و يتم مراقبة الحزم باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV حيث تستقبل أسفل العمود و تركز حتى الجفاف.

II- 1-2-2-1 كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (CP)

تعد من أفضل التقنيات المستعملة لفصل الفلافونيدات خاصة القطبية كالفلافونيدات السكرية [52] كما تستعمل على المستخلص مباشرة في حالة عدم غناه بالمركبات الفلافونيدية أو لجمع و فصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي.

الدعامة المستخدمة في هذه التقنية هي ورق واتمان رقم 3 (Papier Whatman3) و تتم العملية كالتالي:

- تحضير الورقة بأبعاد تتلاءم مع الحوض (La cuve).
 - وضع المستخلص بواسطة ماصة باستور على كامل عرض الورقة على بعد 2 سم عن الهامش.
 - تترك الورقة لتجف ثم تغمس في المملص الذي يبدأ في إنزال الحزم تسلسليا.
 - تستمر العملية من 8 إلى 16 ساعة حسب نوع المملص ، نخرج بعدها الورقة لتجف.
 - يتم تحديد الحزم بمصباح الأشعة فوق البنفسجية ثم تقص الحزم إلى قطع صغيرة و توضع في الميثانول المغلي، بعدها ترشح و تركز الرشاحة.
 - في حالة الحصول على مركب نقي تتوقف العملية و إلا تستمر بنفس التقنية أو بتقنيات أخرى.
- و أهم المذيبات المستعملة في هذه التقنية:

✓ حمض الخل بتركيز مختلفة من 5 إلى 70 % (من 6 إلى 8 ساعات)

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

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

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

✓ 4 / 1 / 2 : (الماء / الإيثانول / البوتانول العادي) B.E.W .

✓ 1 / 1 : (البوتانول العادي / حمض الكلور 2N) (24 ساعة).

كما يمكن استعمال كروماتوغرافيا الورق التحضيرية ذات البعدين إذا كان البعد الواحد غير كاف لفصل الخليط فصلا كاملا.

حيث يكون البعد الأول عمودي على البعد الثاني، فبعد إجراء البعد الأول تسحب الورقة و تترك لتجف ثم تدار بمقدار 90° و تغمس في مذيب آخر، حيث يكون البعد الأول عادة عضوي مثل الطبقة العضوية للنظام BAW و البعد الثاني مائيا كالنظام ACOH/H₂O.

BAW : الماء المقطر : حمض الخل : البيوتانول العادي.

5 1 4

ACO H₂O : الماء المقطر : حمض الخل

75 25

II - 1 - 2 - 3 - كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) :

نقوم بتحضير الدعامة بالرّج الجيّد لمتعدد الأميد مع الإيثانول ، السيليكاجال أو السيليلوز مع الماء المقطر ثم نضعها بواسطة Etaleur على صفائح من زجاج أو بلاستيك (20×20سم) بسمك منتظم و نتركها تجف ثم نضعها في درجة حرارة 100°م على الأقل لمدة ساعة بالنسبة للسيليكاجال و السيليلوز. بعد أن تبرد نضع عليها العينة بطريقة عرضية على بعد 1.5 سم من خط الانطلاق ونغمسها عموديا في حوض به المملص المناسب و بانتشار هذا الأخير تفصل المركبات على شكل أحزمة نحددها بمصباح UV. نقوم بكشط كل منها على حدى و نغسلها بالميثانول جيّدا في أقماع زجاجية ، نركز بعدها الرشاحة و تفحص لمعرفة درجة نقاوتها.

و تعد هذه التقنية الأكثر استعمالا لتعدد ميزاتها كسرعتها حيث تستغرق من 30 دقيقة إلى 3 ساعات و حساسيتها حيث يمكن الحصول على كميات برتبة 1 إلى 100 مغ كما لا تستهلك كميات كبيرة من المذيبات و الأنظمة المستعملة كمصاصات هي :

بالنسبة لمتعدد الأמיד (كدعامة صلبة) :

H₂O / MeOH / MEC / Acétylacétone : (13 / 3 / 3 / 1)

Toluène / MEC / MeOH : (4 / 3 / 3)

MeOH / H₂O / AcOH : (18 / 1 / 1)

أما بالنسبة لـ : السيليكا جال (كدعامة صلبة) فهي ملخصة في الجدول (1)[53]:

نوع الفلافونويد	المملص
<i>Flavonoides aglycones</i>	EtOAc-i-PrOH-H ₂ O, 100:17:13 EtOAc-CHCl ₃ , 60:40 CHCl ₃ -MeOH, 96:4 Toluène-CHCl ₃ -MeCOMe, 8:5:7 Toluène-HCOOEt-HCOOH, 5:4:1 Toluène-EtOAc-HCOOH, 10:4:1 Toluène-EtOAc-HCOOH, 58:33:9 Toluène-EtCOMe-HCOOH, 18:5:1 Toluène-dioxane-HOAc, 90:25:4
<i>Flavonoides glycosides</i>	n-BuOH-HOAc-H ₂ O, 65:15:25 n-BuOH-HOAc-H ₂ O, 3:1:1 EtOAc-MeOH-H ₂ O, 50:3:10 EtOAc-MeOH-HCOOH-H ₂ O, 50:2:3:6 EtOAc-EtOH-HCOOH-H ₂ O, 100:11:11:26 EtOAc-HCOOH-H ₂ O, 9:1:1 EtOAc-HCOOH-H ₂ O, 6:1:1 EtOAc-HCOOH-H ₂ O, 50:4:10 EtOAc-HCOOH-HOAc-H ₂ O, 100:11:11:26 EtOAc-HCOOH-HOAc-H ₂ O, 25:2:2:4 THF-Toluène-HCOOH-H ₂ O, 16:8:2:1 CHCl ₃ -MeCOMe-HCOOH, 50:33:17 CHCl ₃ -EtOAc-MeCOMe, 5:1:4 CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, 65:45:12 CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O, 40:10:1 MeCOMe-butanone-HCOOH, 10:7:1 MeOH-butanone-H ₂ O, 8:1:1
<i>Flavonoides glucuronides</i>	EtOAc-Et ₂ O-dioxane-HCOOH-H ₂ O, 30:50:15:3:2 EtOAc-EtCOMe-HCOOH-H ₂ O, 60:35:3:2
<i>Flavanones aglycones</i>	CH ₂ Cl ₂ -HOAc-H ₂ O, 2:1:1
<i>Flavanones glycosides</i>	CHCl ₃ -HOAc, 100:4 CHCl ₃ -MeOH-HOAc, 90:5:5 n-BuOH-HOAc-H ₂ O, 4:1:5 (la couche supérieur)

جدول - 1 : الأنظمة المستعملة كمملصات بالنسبة لانسليكاچال

نوع الفلافونويد	المملص
<i>Chalcones</i>	EtOAc–hexane, 1:1
<i>Isoflavones</i>	CHCl ₃ –MeOH, 92:8 CHCl ₃ –MeOH, 3:1
<i>Isoflavones glycosides</i>	n-BuOH–HOAc–H ₂ O, 4:1:5 (couche supérieure)
<i>Dihydroflavonoles</i>	CHCl ₃ –MeOH–HOAc, 7:1:1
<i>Biflavonoides</i>	CHCl ₃ –MeCOMe–HCOOH, 75:16.5:8.5 Toluène–HCOOEt–HCOOH, 5:4:1
<i>Anthocyanidines</i> <i>et</i> <i>anthocyanines</i>	EtOAc–HCOOH–2 M HCl, 85:6:9 n-BuOH–HOAc–H ₂ O, 4:1:2 EtCOMe–HCOOEt–HCOOH–H ₂ O, 4:3:1:2 EtOAc–butanone–HCOOH–H ₂ O, 6:3:1:1
<i>Proanthocyanidines</i>	EtOAc–MeOH–H ₂ O, 79:11:10 EtOAc–HCOOH–HOAc–H ₂ O, 30:1.2:0.8:8

جدول -2- الأنظمة المستعملة كمملصات بالنسبة لالسليكا جال (تابع)

II-1-2-4 - كروماتوغرافية نظام السائل عالي الأداء (HPLC)

تسمح هذه التقنية بتحديد المحتوى الفينولي للعينة المراد تحليلها، و هي نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي التجزيئي الذي يتطلب استخدام ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمود، و هي التقنية الأفضل لفصل و تحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير [54] ، و أهم المذيبات المستعملة هي :

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

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

- يجر المملص معه المركبات في العمود بصفة انتقائية فتتزل المركبات ثنائية السكر قبل أحادية السكر؛ و هذه الأخيرة قبل الأجليكونات [55]

- و بالنسبة للأجلكونات التي تحتوي على الأوكسجين في الحلقة B فيملص المركب الذي يحتوي على ثلاث مجموعات (OH) في الحلقة B قبل الذي يحتوي على مجموعتي (OH) و هذا الأخير قبل الذي يحتوي على (OH) واحدة دائما على الحلقة B [56] .

II-1-3-التنقية :

من أجل تنقية المركبات المفصولة بالتقنيات الكروماتوغرافية السابقة تنقية جيدة، و الهدف منها هو التخلص من الشوائب العالقة بالمركبات المعزولة (متعدد الأميد، سيليلوز ... الخ) و للحصول على نتائج جيدة نستعمل عمود بطول 20سم و قطر 1سم ثم نتبع الخطوات التالية :

II-1-3-1-التنقية على عمود من متعدد الأميد SC₆:

يتم مزج متعدد الأميد SC₆ بالطولين، ثم يصب في العمود الكروماتوغرافي و بعد استقرار المزيج فيه يوضع المركب المفصول و المذاب في اقل كمية من الميثانول على سطح الدعامة. بعد توضع يغسل بالطولين ثم يغير المملص تدريجيا بإضافة الميثانول حتى يتم نزول المركب كليا.

II-1-3-2-التنقية على عمود من السيفاداكس :

تستعمل هذه التقنية في المراحل الأخيرة من عمليات الفصل و التنقية. و لتحقيق عمود من Sephadex LH20 يتم نقع جال السيفاداكس في الميثانول، ثم يصب المزيج بلطف في العمود، و بعد استقراره يتم وضع المركب المفصول و المذاب في أقل كمية ممكنة من الميثانول على السطح بعناية، يملص بعدها بدفعات متتالية من الميثانول، حيث يخرج المركب أسفل العمود نقياً و جاهزاً لمختلف الدراسات البنيوية.

II-2-الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونويدية :

التحليل البنيوي للفلافونيدات لا يمكن أن يتم إلا على المركبات النقية، بحيث يتطلب ذلك تقنيات فيزيوكيميائية لتحديد مثل مطيافية الكتلة، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية باستخدام كواشف خاصة.

II-2-1-اللون الإستشعاعي تحت مصباح UV :

اللون الإستشعاعي للمركبات تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية (lumière de Wood) يمثل المرحلة الأولية للتحليل، ويلعب دورا مهما في التحديد البنيوي للمركبات الفلافونيدية والجدول التالي يلخص بعض منها [57،56]:

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

الجدول (3): اللون الإستشعاعي للفلافونيدات تحت مصباح UV

II-2-2-معامل الانحباس: R_f :

من خلال قيم معامل الانحباس R_f في نظام مذيب معين يمكن معرفة طبيعة الفلافونيد الذي بحوزتنا .
و يعرف هذا الأخير (أي R_f) بأنه النسبة بين المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية والمسافة المقطوعة من طرف المذيب من نفس النقطة، و هو قيمة مميزة لكل مركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، المذيب،...) و ترتبط قيمة R_f بطبيعة المجموعات الاستبدالية على المركب [58] , [59]



الشكل-1

المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية [h]

$= R_f$

المسافة المقطوعة من طرف المملص (المذيب) من نفس النقطة [H]

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

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

النظام 2 : (13 / 3 / 3 / 1) : eau / méthanol / méthyléthylcétone / Acétylacétone

النظام 3 : 15 % : Acide acétique

ومن خلال قيم R_f في مختلف الأنظمة يمكن معرفة ما إذا كان المركب أجليكونا أو إيتيروزيدا، كذلك معرفة

ما إذا كان أحادي، ثنائي أو ثلاثي السكر [58] [60].

فمثلا :

قيمة R_f تزداد لأن مجموعات الهيدروكسيل الحرة قليل في نظام مذيب عضوي، و العكس في نظام مذيب

مائي [59].

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

الجدول التالي يبين العلاقة بين R_f و البنية الفلافونويدية:

البنية الفلافونويدية	قيم R_f
الزيادة في مجاميع OH	◆ نقصان قيم R_f في الأنظمة العضوية ◆ زيادة قيم R_f في الأنظمة المائية
استبدال OH بـ OMe	◆ زيادة قيم R_f في الأنظمة العضوية ◆ نقصان قيم R_f في الأنظمة المائية
إدخال مجموعة السكر	◆ نقصان قيم R_f في الأنظمة العضوية ◆ <u>زيادة</u> قيم R_f في الأنظمة المائية

الجدول-4- العلاقة بين R_f و البنية الفلافونويدية

II-2-3- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:

الفلافونويدات واحدة من المركبات القادرة على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية، و ذلك لاحتوائها على مجموعات مسؤولة عن ذلك تدعى بـ chromophores (و هذه الأخيرة عبارة عن مواقع غنية بالإلكترونات كما قد تكون عبارة عن مجموعات كيميائية مثل مجموعة الهيدروكسيل "OH" و مجموعة الميتوكسيل "OCH₃" (...).

و تعتبر مطيافية الأشعة فوق البنفسجية من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على البنية الكيميائية للمركبات الفلافونويدية، و قد نشرت أبحاث كثيرة بهذا الصدد [56،25،29،62،63]

العصاية I : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (300-400 nm)، وهي راجعة إلى امتصاص الصورة Cinnamoyl الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل C₄ مع الرابطة الثنائية والحلقة B. إذ تسمح بتمييز الفلافونول عن الفلافون وتعطي معلومات عن التغيرات البنوية للحلقتين B و C [67].

العصاية II : ذات قيمة امتصاص عظمى في حدود (250-280 nm)، وهي ناتجة عن الشكل Benzoyl الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة العطرية A. وهذا ما يمكننا من الكشف عن الهياكل الفلافونيدية المختلفة.

يعتمد مكان الحزمتين على عدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فمن الملاحظ أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل، فإن حزمة الامتصاص تزداد إلى طول موجي أعلى "انزياح باتوكرومي". وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميتوكسيل، أو وحدات سكر تتراح حزمنا الامتصاص إلى طول موجي أقل "انزياح هيبسوكرومي" [66].

و الجدول-5- يبين مجالات امتصاص الفلافونيدات من خلال UV-vis (في الميثانول).

نوع الفلافونويد	العصابة II (nm)	العصابة I (nm)
فلافون	280 – 250	350 – 310
فلافونول-3-OH مستبدل	280 – 250	360 – 330
فلافونول 3-OH حر	280 – 250	385 – 350
ايزوفلافون	275 – 245	330 – 310
فلافانول و dihydroflavonol	295 – 275	330 – 300
شالكون	270 – 230 شدة منخفضة	390 – 340
اورون	270 – 230 شدة منخفضة	430 – 380
انثوسيانيدين و انثوسيانين	270 – 230	560 – 465

الجدول-5:- مجالات امتصاص الفلافونيدات من خلال UV-Vis (في الميثانول).

II-2-3-2-طيف الإمتصاص في وجود الكواشف :

بإضافة كواشف معينة إلى محلول الميثانول مثل: NaOH ، NaOAc أو $AlCl_3+HCl$ يمكننا من التعمق أكثر في الدراسة البنوية حيث تتضح لنا مستبدلات الهيكل الفلافونويدي. فالمعلومات المستخلصة من طيف امتصاص الميثانول تكون مكملة للتي تعطى لنا الأطياف المأخوذة بوجود هذه الكواشف، لأنها في الغالب تعطي ألوانا مميزة إذا ما أضيفت إلى المحلول الميثانولي. هذه الألوان تظهر نتيجة تغير مكان امتصاص حزم طيف UV و ذلك بسبب تكوين معقدات مع تلك الكواشف.

⦿ في وجود NaOH:

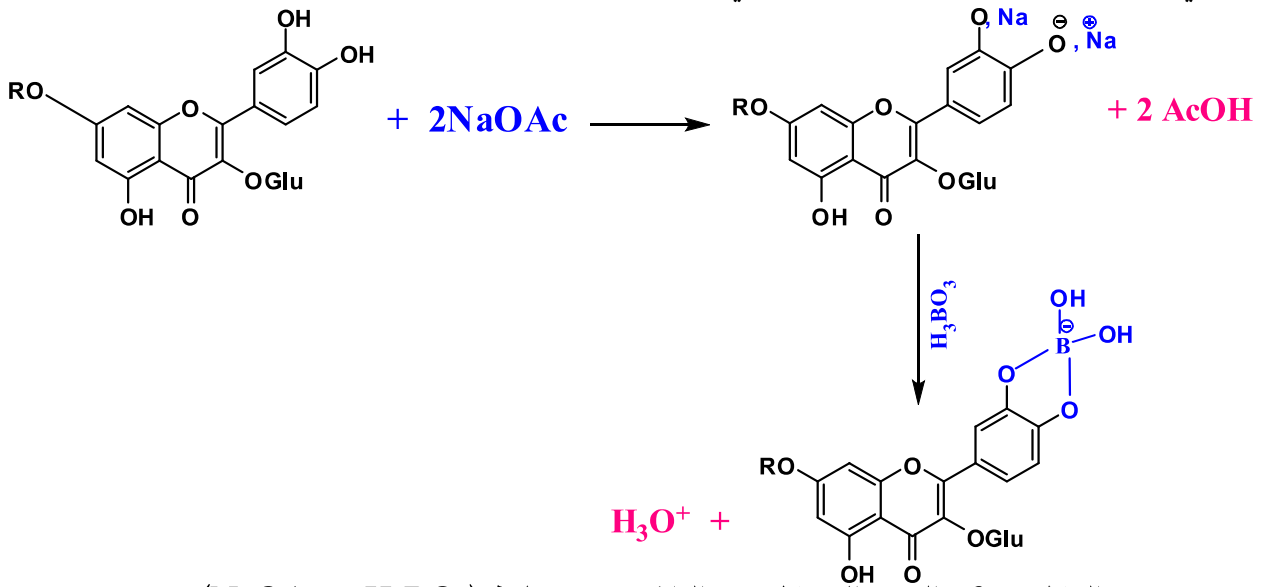
NaOH : هي عبارة عن قاعدة قوية تؤين كل هيدروكسيلات الفلافونويد، و إضافتها لـ (مركب + ميثانول) تحدث إزاحة باثوكرمومية لكل الطيف، أي إنزياح في اتجاه (λ) الطويلة و يظهر تأثيرها خاصة على العصابة (I) أشد منه على العصابة (II) مما يؤدي إلى انزياح بمقدار [40+ إلى 65+ نم] بدون نقصان في الشدة الضوئية ما يبين وجود مجموعات OH حرة خاصة في المواقع 3،4 و7.

⦿ في وجود NaOAc :

NaOAc : هي قاعدة ضعيفة لذا فهي تؤين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حامضية فقط C₃، C₄، و C₇ و تعتبر كاشف نوعيا لهيدروكسيل الموقع (C₇) ، و يظهر ذلك جليا على العصابة (II) للطيف المسجل إذ انه يحدث فعل باثوكرومي [+5 إلى +20 نم] للعصابة (II)، و يشير ذلك إلى وجود OH حر في الموضع C₇. [69]

⦿ في وجود H₃BO₃ + NaOAc

يضاف H₃BO₃ على العينة في وجود NaOAc للكشف عن أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B في الموقع 3'، 4' بالانزياح الباثوكرومي للعصابة I (12-36 ن.م) [58]، و يلغى في حالة استبدال أحدهما. و على الحلقة A في المواقع 6،7 أو 7،8 من خلال المعقدات التي يشكلها، و الفعل الذي يظهره هو فعل باثوكرومي للعصابة I مقارنة بالطيف المسجل في الميثانول [68].



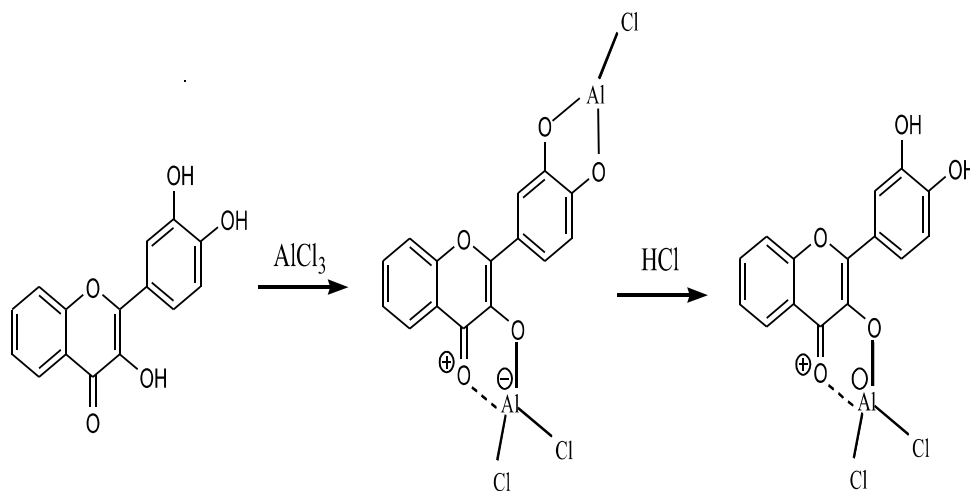
⦿ في وجود AlCl₃ :

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

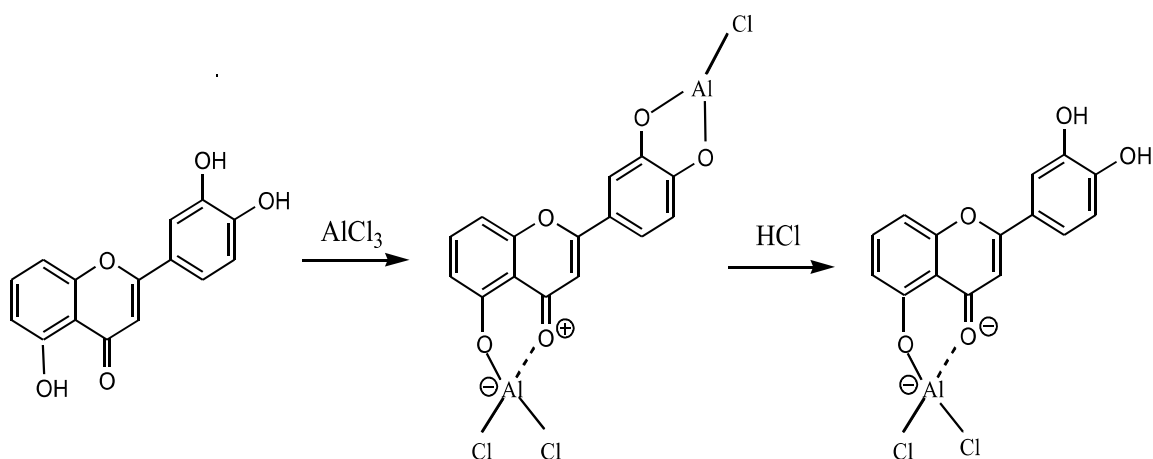
في وجود $HCl+AlCl_3$:

يشكل $AlCl_3$ مع الكربونيل C_4 و هيدروكسيل الموضع C_3 أو الموضع C_5 معقدات و كذلك مع أرثو ثنائي الهيدروكسيل، إلا أن الأول معقد ثابت و الثاني غير مستقر في الوسط الحمضي. التحليل يبدأ أولاً بمقارنة الطيف المسجل في الميثانول $MeOH$ مع الطيف المسجل في $(AlCl_3 + HCl)$ و في حالة وجود انزياح باتوكرومي للعصابة (I) يدل على وجود هيدروكسيل في الموضع C_3 أو C_5 .

في المرحلة الثانية تتم مقارنة الطيف المسجل في وجود $(AlCl_3+HCl)$ مع الطيف المسجل في وجود $AlCl_3$ ففي حالة وجود انزياح هيبسوكرومي للعصابة (I) بعد إضافة HCl إلى طيف $AlCl_3$ دل على وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A أو B ، و هذا ما سيوضحه المخطط الآتي: [56]



شكل-4- المعقدات الثابتة و الغير ثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد اضافة HCl



شكل -5- المعقدات الثابتة و الغير ثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد اضافة HCl (تابع)

والجدول التالي يلخص قيم إزاحات الإمتصاص الخاصة بالفلافونيدات في وجود الكواشف المختلفة.

ملاحظة:

(+) : باتوكروم ؛ (-) : هيسوكروم ؛ / : بالنسبة ؛ Ep : نتوء

التحليل الموجه	الإزاحة الملاحظة بـ (nm)		المفاعلات
	الحزمة II	الحزمة I	

فلافون	280 . 250	350 . 304	MeOH
فلافونول	280 . 250	385 . 352	
OR في الموضع 3	280 . 250	357 . 328	
إيزوفلافون	275 . 245	320 ^{Ep}	
OH في 4' OR في 4'، OH في 3		45+ إلى 65+ 1 . استقرار الشدة الضوئية/MeOH 2 . نقصان الشدة الضوئية/MeOH	
OH في 3، 4' أو Orthodi-OH على الحلقة A مثلاً 7، 6 أو 8، 7 أو Orthodi-OH على الحلقة B		استمرار النقص في الشدة الضوئية، طيف يتحلل مع الوقت	NaOMe (NaOH)
Tri OH 3، 4'، 3 أو Tetra OH في 3، 3، 4'، 5'		استمرار النقص في شدة الامتصاص مع تفكك سريع للطيف	
OH في 7		عصابة جديدة بين 320 . 335	
OH في 7 مع ملاحظة أن هذا الانزياح يتراجع في وجود مستبدلات 6 أو 8	5+ إلى 20+		
OR في 7	عدم وجود أي انزياح أو ظهور انزياح ضعيف		NaOAc
Di OH في 7، 6 أو 8، 7 أو 4، 3 Tri OH في 7، 6، 5 أو 8، 7، 5 أو 4، 3، 3	طيف يتفكك بمرور الزمن		

Orthodi OH على الحلقة B		12+ إلى 36+	NaOAc + H ₃ BO ₃
Orthodi OH على الحلقة A (7-6 أو 8-7) إيزوفلافون	+10 - 15		MeOH/ NaOAc + H ₃ BO ₃
Orthodi OH على الحلقة B (فلافون) مع OH في 5		قمة وحيدة عند 430 . 420	AlCl ₃
Orthodi OH على الحلقة B (فلافونول) مع OH في 5		قمة وحيدة عند 460 . 440	
5-OH مع مجموعة أكسجينية في 6		17+ إلى 20+	MeOH/ AlCl ₃ +HCl
OH في 5 فلافون و OCH ₃ في 3 فلافون		35+ إلى 55+	
OH في 3 مع أو عدم وجود OH في 5		50+ إلى 60+	
OH في 5 إيزوفلافون	+10-14		
Orthodi OH على الحلقة B		20- إلى 40- مع نتوء أو قمة من [360 . 350]	AlCl ₃ / (AlCl ₃ + HCl)
إمكانية وجود Orthodi OH على الحلقة A أكثر من Orthodi OH على الحلقة B أو Tri OH على الحلقة B		20- إلى 25-	

الجدول - 6 - التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية

II-2-4- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي:

يعتبر طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN من أهم الطرق المتاحة للحصول على التركيبة الكيميائية للمركبات و توجد عدة تقنيات هي :

○ طيف RMN للبروتون ¹H

○ طيف RMN للكربون ^{13}C

كما ظهرت للوجود تقنيات جديدة أمكن بها الجمع بين أطيايف البروتون ^1H و الكربون ^{13}C للحصول على طيف ثنائي البعد، و يمكن بهذه التقنيات معرفة:

○ درجة تأكسد الحلقات A, B, C

○ عدد مجموعات الميتوكسيل

○ عدد السكريات و نوع الرابطة α أو β .

II-2-4-1 مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H -RMN:

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

كثافة الامتصاص لكل نوع من الهيدروجين تتناسب مع عدد الذرات الموجودة في هذا النوع. و بالتالي يمكن تحديد العدد النسبي لذرات الهيدروجين في الجزيء وكذا عددها في كل مجموعة .

يلاحظ أيضا حدوث انقسامات داخلية في كل امتصاص رئيسي ويتوقف عدد هذه الانقسامات على عدد ذرات الهيدروجين المجاورة، والفرق في الطاقة بين هذه الانقسامات بوحدة التردد يسمى ثابت التزاج (J) [69].

يتم الحصول على طيف ^1H -RMN باستعمال مذيبات مختلفة مثل CDCl_3 الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونويدات غير القطبية و مذيب CD_3OD و DMSO-d_6 الذي يعطي نتائج جيدة مع معظم الغليكوزيدات و الجليكونات [43].

أ- بروتونات الحلقة العطرية A :

من أجل الحلقة A ثنائية الإستبدال في الموقعين 5 و 7، البروتونين H-6 و H-8 يظهران في شكل ثنائيتين.

حيث يظهر البروتون H-6 عند (6 حتى 7.1 ppm) بثابت تزاج $J= 2.5\text{Hz}$

و حسب طبيعة مستبدلات C-5 و C-7 إشارة البروتون H-8 تظهر دائما في المجالات أضعف (6.3-6.50 ppm) من تلك الخاصة بالبروتون H-6 [70]. و الجدول التالي يبين بعض قيم الانزياح لبروتونات الحلقة A.

H-8	H-6	H-5	الفلافونيد
$d (J=2.5\text{Hz})$ 6.3-6.5ppm	$d (J=2.5\text{Hz})$ 6.0-7.1ppm	-	5,7- OH
$d (J=2.5\text{Hz})$ 6.5-6.9ppm	$d (J=2.5\text{Hz})$ 6.2-6.4ppm	-	5-OH, 7-OR (R = sucre)
$s (6.3\text{ppm})$	-	-	5,6,7- OR (R = H, sucre)
-	$s (6.3\text{ppm})$	-	5,7,8- OR (R = H, sucre)
$d(J=2.5\text{Hz})$ 6.7-7.0ppm	$dd(J=9\text{Hz};2.5\text{Hz})$ 6.7-7.1ppm	$d(J=9\text{Hz})$ 8.0ppm	7-OR (R=H;sucre)

الجدول-7-إزاحة و ثابت تزاوج بروتونات A في بعض الفلافونيدات

ب- بروتونات الحلقة العطرية B :

- الإنزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B تظهر بين (6.7 - 7.9 ppm)، حيث يتركز هذا الإنزياح على مستبدلات الحلقة B ودرجة أكسدة الحلقة C.
- في حالة الحلقة B أحادية الاستبدال في الموضع 4، البروتونات H₂'، H₃'، H₅' و H₆' تظهر في شكل ثنائيين على شكل نظام AB بثابت تزاوج متماثل (8.5Hz).
- دائما يظهر البروتونين H-2' و H-6' في المجالات الأدنى من تلك الخاصة بالبروتونات H₃' و H₅'، قيم انزياحها على الترتيب (7.7-8.1 ppm) و (6.5- 7.1 ppm) في حالة kaempférol و apigénine على سبيل المثال. والجدول الموالي يبين بعض الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة B.

H-5' – H-3'	H-6' – H-2'	الفلافونيد
6.5-7.1 ppm $d (J=8.5\text{Hz})$	7.7-7.9 ppm $d (J=8.5\text{Hz})$	Flavones (4'-OH)
6.5-7.1 ppm $d (J=8.5\text{Hz})$	7.9-8.1 ppm $d (J=8.5\text{ Hz})$	Flavonols(4'-OH)

6.7-7.1 ppm d (J=8.5Hz)	-	7.3-7.9ppm d(J=2.5 ;8.5Hz)	7.2-7.3 ppm d (J=2.5Hz)	3',4'-di-OH
-		6.5-7.5 ppm (s)		3',4',5'-tri-OH

الجدول -8- الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B

ج- بروتونات الوحدة غير المتجانسة C:

يظهر البروتون H-3 في بنية الفلافون على شكل إشارة أحادية بين (6-7 ppm) [71] حيث لا يمكن تمييزه من بين البروتونات H-6 و H-8 هذا في حالة (7,6,5)، (8,7,5) أو 5,7-OH [72]، وينزاح هذا البروتون نحو 4.2 ppm في حالة dihydroflavonol، في حين يظهر في شكل إشارة متعددة في حالة flavane .

البروتون H-2 في هيكل dihydroflavonol يظهر في شكل ثنائية عند (5.2ppm)، أما في حالة هيكل flavanone فيظهر ثنائي ثنائي بين 5 و 5.5 ppm .

نميز أنواعا أخرى من البروتونات تظهر في أطراف الفلافونيدات منها:

✓ بروتونات هيدروكسيلية: تظهر بروتونات OH للمواقع 7,5,3 عند: ppm (12.4,9.7 و 10.93) على الترتيب.

✓ بروتونات ميثوكسيلية: تظهر في شكل إشارات أحادية ما بين (3.8-4.5ppm) [71].

✓ بروتونات أوزيدية: والتي تظهر في مجال (3.5-4 ppm) حيث يظهر البروتون الأنوميري H-1" عند المجالات الأدنى من تلك الخاصة بالشق السكري (4.2-6 ppm)، عدد هذه البروتونات يبين عدد السكريات المتواجدة في الفلافونيد كما تبين من خلال ثابت التزاوج نوع الأنومير α أو β والجدول الموالي يبين بعض قيم الانزياح الكيميائي لبروتونات أنوميرية خاصة بسكريات أحادية.

قيم δ لـ H-1" ب (ppm)	الفلافونيد
6.0 - 5.7	3-O glucoside flavonol
5.2 - 4.8	7-O glucoside flavonol
5.3 - 5.1	3-O rhamnosyl flavonol
5.1 - 5.0	7-O rhamnosyl flavonol

الجدول-9:- الإنزياح الكيميائي لبعض البروتونات الأنوميرية.

II-2-4-2 مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C RMN :

نظرا لإنخفاض طاقة الامتصاص للكربون 13 بالإضافة إلى نسبة وجوده في الطبيعة 1.1% فإن كثافة الإمتصاص الناتج عن ^{13}C تكون حوالي 0.01% بالنسبة لإمتصاص البروتون، لذلك فإن معظم التقديرات الخاصة بـ ^{13}C تجري باستخدام FTNMR(Fourier Transformation NMR) للتغلب على الحساسية المنخفضة للكربون، ومن ناحية أخرى فإنه لا يحدث تزاوج بين ذرة الكربون ^{13}C و ^{12}C أخرى لأن احتمال وجود ذرتي كربون 13 متجاورتين ضعيف جدا حوالي 1 لكل 10^4 ذرة، لكن في نفس الوقت يحدث تزاوج بين ^{13}C و ذرات الهيدروجين المجاورة، وقد يصل مدى التزاوج ليشمل أربع روابط كيميائية، فيكون الطيف المتحصل عليه معقدا للغاية. وللتغلب على هذا التزاوج تستخدم طريقة إزالة التزاوج Sping decoupling و ذلك بإشعاع العينة بحزم من أشعة الراديو، تحتوي على جميع الترددات الخاصة بأنوية البروتونات في العينة . وتحت هذه الظروف فإن طيف الرنين النووي المغناطيسي لـ ^{13}C يظهر في صورة إمتصاصات فردية ، ويعبر كل امتصاص عن ذرة كربون واحدة في ظروف إلكترونية معينة. وباستخدام هذه التقنية يمكن الحصول على صورة واضحة عن الهيكل الكربوني العام للجزيء، كما يمكن الكشف عن بعض المجموعات الكيميائية مثل $\text{C}=\text{O}$, OCH_3 , $\text{C}=\text{NR}$ وغيرها [69].

يوضح الجدول التالي الإزاحات الكيميائية لذرات الكربون 2، 3، 4 للفلافونات والفلافونولات من خلال تقنية الرنين النووي المغناطيسي ^{13}C RMN [73] .

طبيعة الكربون	الإزاحة الكيميائية ppm بالنسبة لـ TMS
Aromatique C-CH ₃	7 - 22
Aromatique O-CH ₃	59 - 63
3-Methoxyflavone (3-OCH ₃)	58 - 59
Sucre CH ₂ OH, CH-OH, C-glycoside	56 - 78

90 -110	5,7-Dihydroxyflavonoide (C ₆ -C ₈)
90 -135	Flavone (C-3)
135 -144	Flavonol (C-3) 3-Methoxyflavone (C-3)
136 -158	Flavonol (C-2) 3-Methoxyflavone (C-2)
155 -168	Flavone (C-2)
172 -186	Flavone (C-4) Flavanol (C-4) 3-Methoxyflavone (C-4)

- الجدول 10- يبين أهم الإنزياحات المختلفة لذرات الكربون للفلافونات و الفلافونولات

في أطياف ¹³C-RMN

II-2-4-3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد:

قد تعجز كل من مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ¹H R.M.N و للكربون ¹³C R.M.N على تحديد موضع الإستبدال بالدقة اللازمة فنلجأ إلى مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد، التي تعطي تعالقات بين:

- أنوية متجانسة مثل ¹H-¹H Cosy والتي تظهر نقاط تعالق بين البروتونات المتزاوجة فيما بينها أي المفصولة برابطتين أو ثلاث ²J, ³J .
- أنوية غير متجانسة مثل HSQC والتي تعطي نقاط تعالق بين كل بروتون و الكربون الحامل له، ولكن هذه الأخيرة لا تسمح بمعرفة الكربونات الرباعية. فتستعمل تقنية HMBC التي تعطي تعالقات بعيدة المدى تصل إلى الكربونات الرباعية، فيتم تحديدها [72].

II-2-5- التحليل البنيوي للفلافونيدات عن طريق مطيافية الكتلة:

تقدم مطيافية الكتلة خدمة واسعة للتعرف على البنى الفلافونيدية، خاصة كونها لا تتطلب كمية كبيرة من المركب إذ يكفي جزء من ملغ، فمن خلالها يمكن معرفة الوزن الجزيئي وبالتالي معرفة الصيغة المجملة للمركب الذي يبين نوعية المستبدلات ميتوكسيلية كانت أو هيدروكسيلية، كما تمكن قيم الشظايا من معرفة توزع هذه

المستبدلات على الحلقتين A و B. وتعتمد هذه التقنية على عدة طرق أهمها: طريقة القذف الإلكتروني (IE) [74] التي تكون صالحة خاصة مع الأجليكونات.

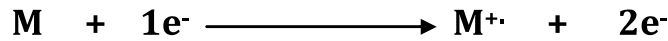
II-2-5-1 عناصر التحديد البنوي للفلافونيدات عن طريق مطيافية الكتلة:

يعتمد أساسا لدراسة الفلافونيدات تقنيتين أساسيتين لمطيافية الكتلة هما: تقنية القذف الإلكتروني (I.E) و تقنية القذف السريع بالذرات (F.A.B) و بتفسير الإشارات الجزئية للفلافونيدات الناتجة يمكن الاقتراب من البنية الكلية للفلافونيد وتوزيع المستبدلات على الهيكل الأساسي له.

زيادة على الإشارات المميزة لأنواع الفلافونيدات تظهر قمم مميزة ناتجة عن فقد جزيئات متعادلة أو جذور مثل: CO (-28 u)، CO₂ (-44 u) أو C₂H₂O (-42 u) أو الفقد المتتابع لها مثل: CO -H₂O (-46u)، حيث وجودها ينبئ عن وجود مستبدلات خاصة على الهيكل الفلافونيدي [75].

II-2-5-2 تقنية القذف الإلكتروني (I.E) :

تعتمد هذه التقنية على تطهير المركب في غرفة التأين في درجة حرارة 100-300 °م، ليُقذف بعدها بسيل من الإلكترونات لتأيينه و بالتالي نحصل على أيونات موجبة حسب المعادلة التالية :



و كنتيجة للطاقة التي يكسبها الأيون الجزيئي (M⁺) برتبة (70 eV) تحدث له تشظيات من خلالها نحصل على الأيونات المميزة للمركب تحت الدراسة، و تعتبر هذه التقنية صالحة مع الأجليكون فقط لأن الإبتيروزيديات تفتقر إلى خاصية التطهير و كذلك لاحتوائها على المستبدلات السكرية التي لا تتحمل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية.

أ- في حالة أجليكون الفلافون:

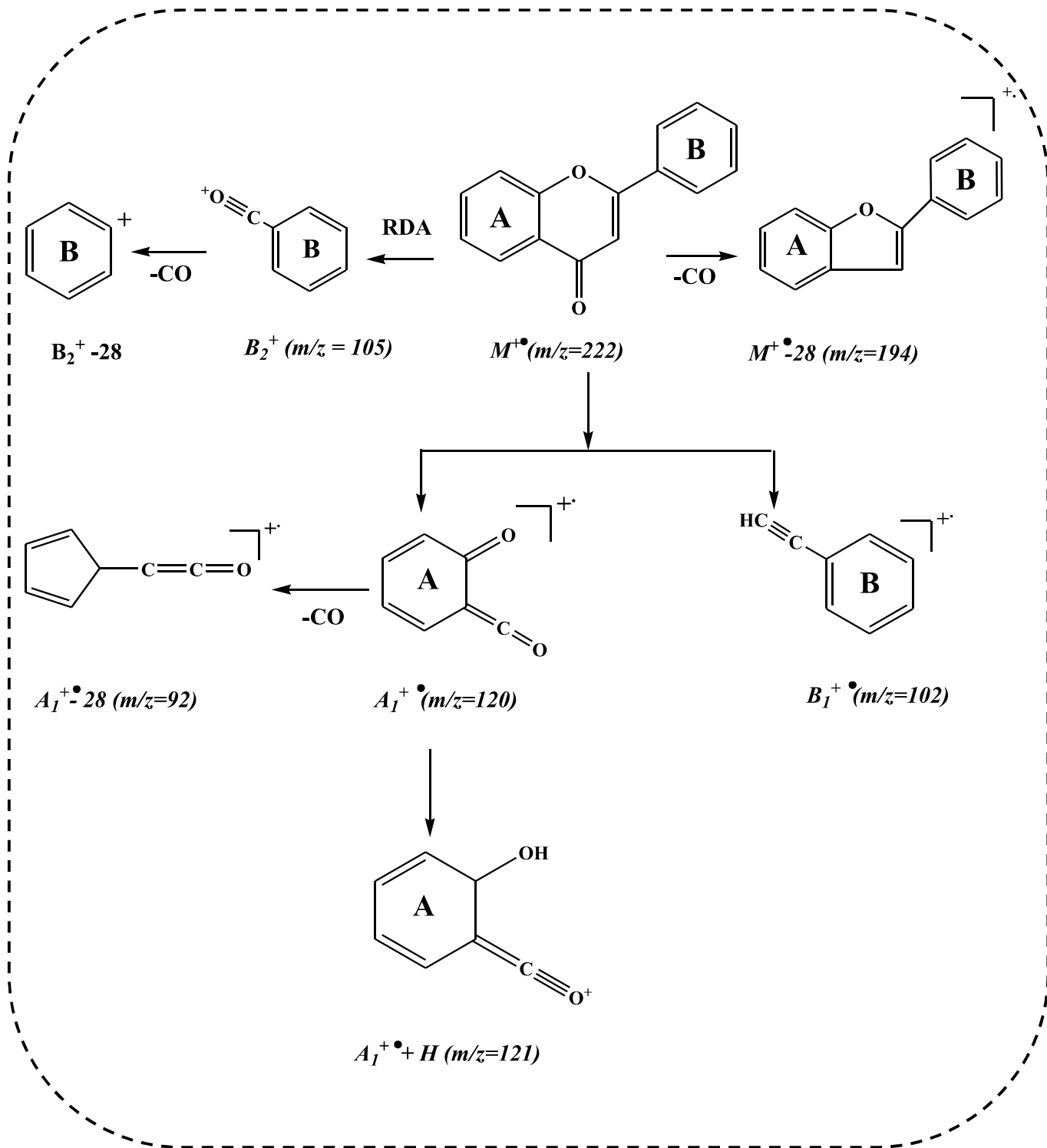
حسب دراسة Audier [74] فإن الانشطار يكون من نوع (RDA) Retro-Diels-Alder

على مستوى الحلقة C ينتج عنه قمة A₁⁺ مميزة للحلقة A و قمتين B₁⁺، B₂⁺ مميزتين للحلقة B.

ويظهر الجدول و الشكل التاليين أهم الإنشطارات لأجليكونات الفلافون و آلياتها على التوالي عن طريق تقنية القذف الإلكتروني (I.E)

التعليل	القيمة (m/z)	الشرط
الحلقة A غير مستبدلة.	120	A^+
الحلقة A أحادية أو متعددة الهيدروكسيل.	121	$[A+H]^+$
الحلقة A ثنائية أو متعددة الهيدروكسيل.	153-152	
الحلقة A أحادية الهيدروكسيل ، أحادية الميثوكسيل .	167-166	
الحلقة A ثنائية الهيدروكسيل ، أحادية الميثوكسيل .	183-182	
الحلقة B غير مستبدلة.	102	
الحلقة B أحادية الهيدروكسيل.	118	
الحلقة B ثنائية الهيدروكسيل.	134	
الحلقة B أحادية الهيدروكسيل ، أحادية الميثوكسيل .	148	
الحلقة B ثلاثية الهيدروكسيل.	150	
الحلقة B ثنائية الميثوكسيل.	162	
الحلقة B تكون O-méthoxylée.	(15-B)87	
مشتق غير مؤكسج على B.	القيمة A أكبر من B	
الحلقة B لها ميثوكسيل.	القيمة B أكبر من A	

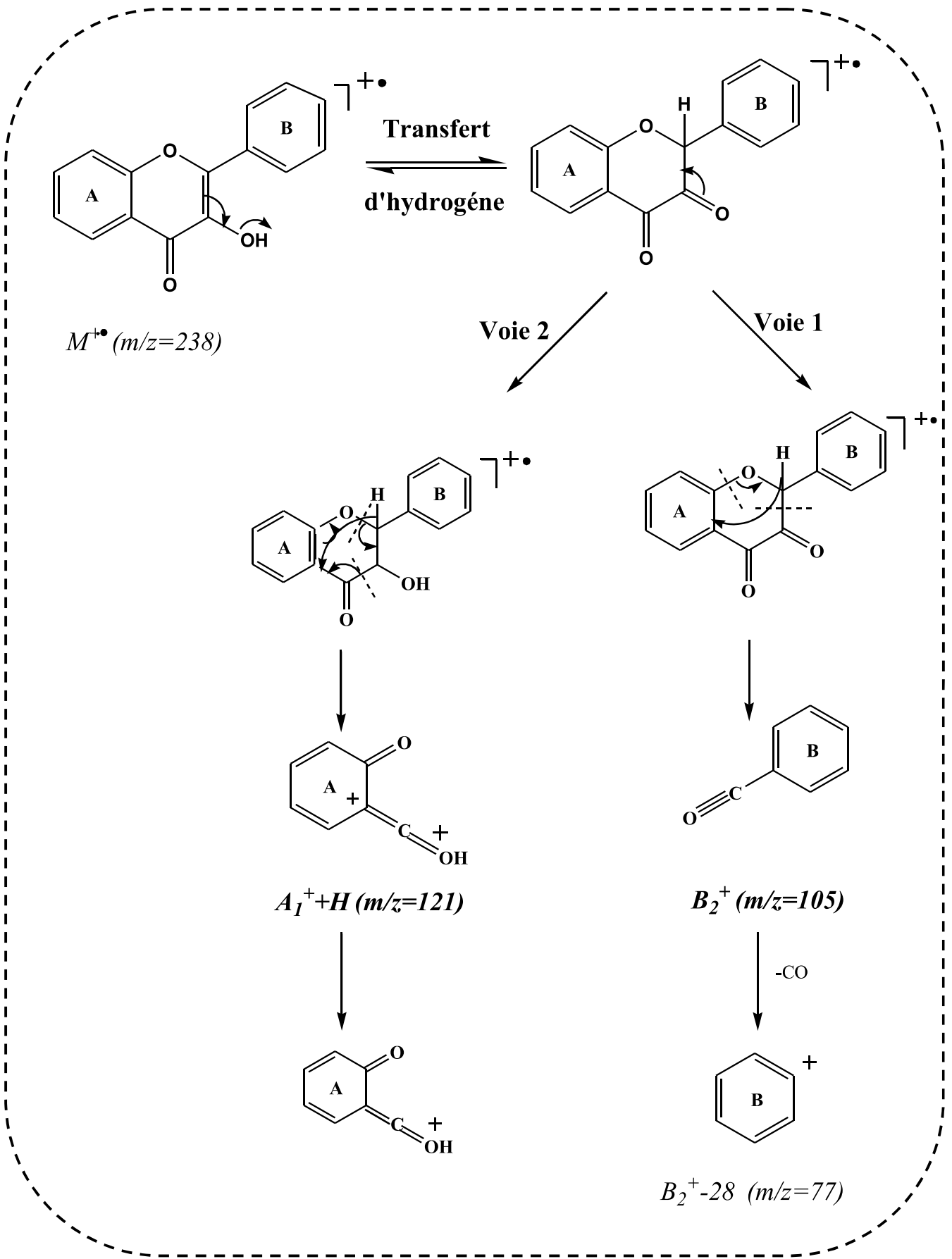
الجدول-11- : أهم انشطارات أجليكون الفلافون



الشكل-6:- آلية إنشطار أجليكونات الفلافون

ب- في حالة أجليكون الفلافونول :-

يحدث انشطار Diels-Alder و يتبعه ظهور أيونين مهمين هما : B_2^+ (C) ، $[A_1+H]^+$ (D) حيث الأول يعبر عن الحلقة B و الثاني عن A بالإضافة إلى القمة الأساسية و هي للأيون الجزيئي $M^{+\bullet}$.



الشكل 7- أهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافونول.

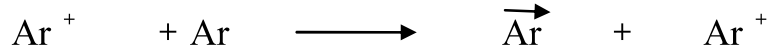
II-2-5-3 تقنية الـ FAB:

تعد من التقنيات الحديثة، تستعمل لتأيين المركبات الطيارة و الجزيئات التي تتكسر بالحرارة دون تسخين كالجليكوزيدات (O-glycosides) و التي نتحصل منها على طيف به معلومات تخص الجزء السكري إضافة إلى الأيونات المميزة للفلافونيدات .

و تعتمد هذه التقنية على وجود منبع تفريغ (كاثود) و الذي يؤين ذرات الأرجون فنحصل على (Ar⁺):



و التي تدخل إلى غرفة الصدم المحتوية هي الأخرى على غاز الأرجون و تحت ضغط معين يحدث إنتقال الشحنة بين Ar و Ar⁺ كما يلي:



تبقى الذرات الناتجة (Ar) محافظة على طاقتها و عند خروجها من غرفة الصدم نحصل على الخليط (Ar⁺:Ar)، نعزل منه Ar⁺ بلوحي مكثفة و بذلك نحصل على سيل من ذرات Ar تدخل إلى غرفة التأين لتصدم ذرات المركب المدروس الموضوع على لوح معدني فنحصل على أيونات المركب التي يتم قلعها ، تسريعها و تحليلها بعد ذلك [76].

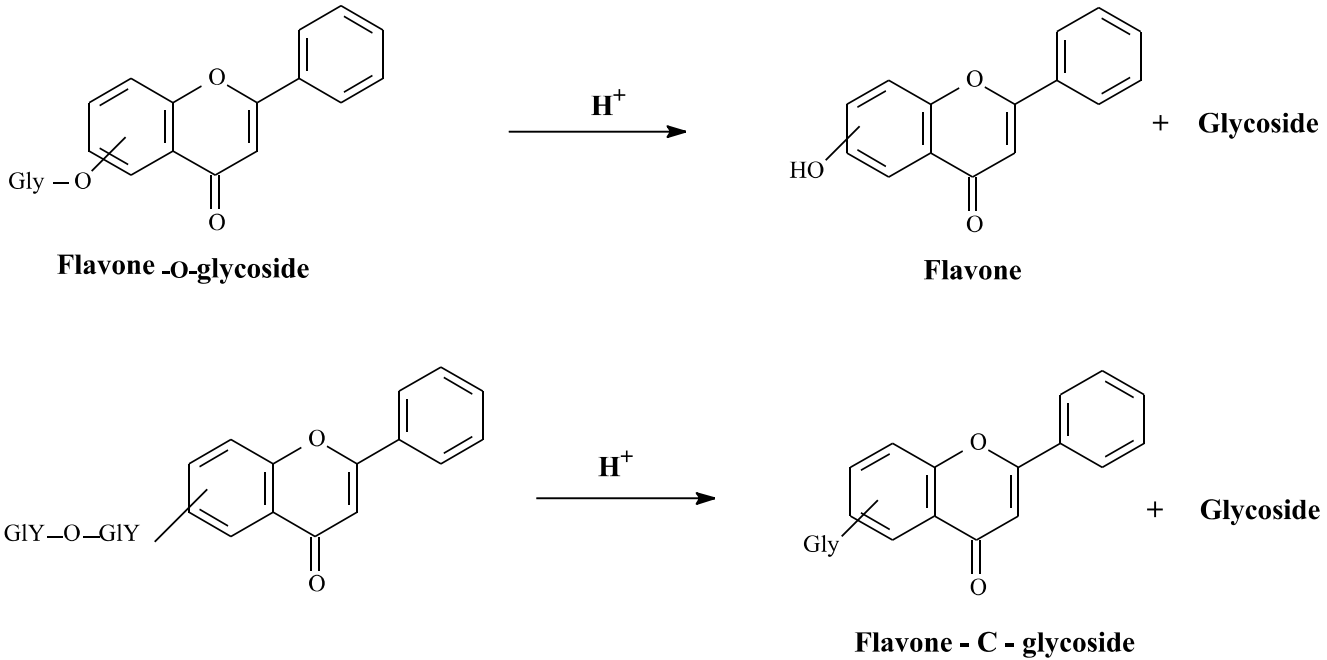
II-2-5-4- تقنية الإلكتروسبراي electro spray:

تعتبر هذه التقنية أحدث من (F.A.B) و تختلف عنها في الطريقة العملية، حيث تسمح بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة كالبروتينات و الجزيئات الصغيرة سهلة التكسير مثل المضادات الحيوية و المبيدات [77].

أما بالنسبة للفلافونيدات فتستعمل تقنية الإلكتروسبراي (ES) لدراسة المركبات سهلة التكسير مثل : O-glycosides و يتميز طيف الكتلة المحصل عليه بوجود قمة الأيون الجزيئي [MH]⁺ و قمم موافقة للأيونات شبه الجزيئية من الشكل [M+Li]⁺، [M+Na]⁺ ... [78]

II-2-6- الإمهاء الحمضية :

بالإضافة إلى التقنيات السابقة يمكن الاستعانة بالتميه الحمضي للتعرف على عدد ونوع السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية إذ تعمل هذه التقنية على تحطيم الرابطة (كربون - أكسجين) الجامعة بين السكر والأجليكون. والشكل (8) يبيّن الإمهاء الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية في حالة O- جليكوزيل و C- جليكوزيل [71].



الشكل -8- : الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية

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

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

تركز الطبقة العضوية الحاوية على الأجليكون الذي يمكن التعرف عليه بتسجيل طيف (UV) وكذا بإجراء كروماتوغرافي (CCM) مع شواهد أجليكونية، أما الجزء السكري من الجليكوزيد فيبقى مذابًا في الطبقة المائية التي يتم تجفيفها ثم يعاد غسلها بالماء لتجفف من جديد تكرر هذه العملية عدة مرات للتخلص من HCl وأخيرًا تغسل بالميثانول للتخلص من أثار الطبقة العضوية ثم يعاد إذابتها في الماء لتكون جاهزة للتحليل، وللتعرف على نوع السكر المنفصل يعمد إلى تحضير ألواح كروماتوغرافية من Gel de silice 60F₂₅₄ ترش

بمحلول $(0,2M) NaH_2PO_4$ تترك لتجف في الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100° لمدة ساعة كاملة.

بعدها توضع نقطة من الطبقة المائية الحاوية على الجزء السكري بالموازاة مع بعض الشواهد السكرية المعروفة، يغمس اللوح الكروماتوغرافي في المملص : أستون : ماء (90 : 10)، بعد هجرة البقع السكرية يستخرج اللوح الكروماتوغرافي ليحجف في الهواء لمدة ساعة بعدها يرش بكاشف مالونات الأنيلين ويسخن عند 100° لمدة 5 دقائق حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور بلون داكن وتأخذ اللون الأصفر تحت (UV). والجدول (11) يبيّن قيم R_f لبعض السكريات الشائعة [58].

السكريات الشواهد	R_f
$\alpha(L)$ rhamnose	0,88
L(+) arabinose	0,66
D(+)-xylose	0,79
b-D(+) glucose	0,53
D(+) galactose	0,33

الجدول-11- : قيم R_f لبعض السكريات الشائعة

الفصل الثالث

الدراسة الكيميائية لنبته

sisnevra ahtneM

III-1- الدراسة الكيميائية النباتية لنبته *Mentha Arvensis*:

III-1-1- مقدمة :

تعتبر العائلة الشفوية (**Lamiaceae**) من النباتات التي تستعمل لعدة أغراض في حياتنا اليومية، وميزتها الزيوت الطيارة التي تفرزها الغدد المنتشرة على كافة الأجزاء النباتية، والتي تستعمل في عدة مجالات صناعية من بينها صناعة العطور .

ومن بين هذه الأنواع الخزامة : *Lavande* ؛ الجعدة : *Phlomis* ؛ النعناع: *Menthe* ؛ الإكليل: *Romarin*.

ويعود أصل تسميتها إلى الكلمة اللاتينية **Labium**، والتي تعني الشفتين. معظم هذه النباتات أعشاب حولية أو معمرة، أو شجيرات سيقانها قائمة. أما أوراقها فتكون متقابلة متعامدة بسيطة بلا أذنيات، نوارتها غير محدودة، وقد تكون النواراة لولبية، أو بسيطة ذات شعبتين أو عقربية وهي عند كل عقدة، تكون ما يشبه السوار. ويكون شكل النواراة إما سنبلية أو عنقودي أو هامية. زهراتها خنثى وحيدة التناظر سفلية، ويتألف الكأس من خمسة سبلات ملتحمة ومستديمة وهو أنبوبي الشكل أو شفوي أو مسنن. يتألف التويج من خمسة بتلات ملتحمة على شكل شفتين، أما الطلع فيتألف من أربعة أسدية، ويتكون المتاع من كربلتان ملتحمتان وقلم واحد ينتهي بميسمين. أما القرص الغدي فيقع في أسفل المبيض وأحيانا يكون بشكل غدة كبيرة على الجانب الأمامي، يوجد في المبيض حجرتان لكل واحدة منهما بويضتان. أما الثمرة فتتكون من أربع ثميرات تقع بداخل الكأس، وتكون البذرة أندوسبيرمية وكثيرا ما يمتصها الجنين.

تشمل هذه الفصيلة حوالي 200 جنس و 6000 نوع تنتشر في جميع أنحاء العالم خصوصا حوض

البحر الأبيض المتوسط. تحتوي هذه العائلة على جنس **MENTHA**

حيث يشمل هذا الجنس على 69 نوع منتشرة في حوض البحر الأبيض وجنوب القارة الآسيوية و أمريكا اللاتينية.

يتميز جنس *Mentha* بغناه بالمركبات الطبيعية التالية : التربينات *terpen* الفلافونيدات *flavonoides*

كزانتونات *xentons* التانين *tanins* الستيرويدات *steroides* و الاحماض الفينولية

Acide phénolique كما ان هذا الجنس معروف بزيتوته الأساسية حيث يحتوي على % 70 مانتول

menthol اللذي يستخدم في صناعة العطور، السجائر و في الصناعة الصيدلانية

III-1-2- بعض المركبات المفصولة من الجنس *Mentha* :

تم عزل العديد من الفلافونيدات مختلفة البنية الكيميائية من الجنس *Mentha* منها الأجليكونية و الإيتيروزيدية من خلال مجموعة من الأعمال أنجزت، يمكن ان تلخص بعضها في الجدول التالي:

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R ₃	R ₂	R ₁	
80	eriocitrine	OH	OH	rut	
80	narirutine	OH	H	rut	
80	hesperidine	OMe	OH	rut	
81	naringenine	OH	H	OH	
80	luteolin-7-O-rutinoside	OH	OH	rut	
80	Isorhoifoline	OH	H	rut	
80	diosmine	OMe	OH	rut	
82	Tricetin 7-O-methoxy-3-O-β-D-glucosyl-5'-O-α-L-rhamnosyl	rha-O	glu-O	OMe	
82	tricetin 3'-O-β-D glycosyl - 5'-O-α-L-rhamnosyl	rha-O	glu-O	OH	
82	Tricetin 3'-di-O-rhamnosyl	H	dirha	OH	
83	5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone	OMe	OMe	OH	
83	5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone	OMe	OMe	OMe	

الجدول (1): الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Mentha*.

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R ₃	R ₂	R ₁	
83	5,4'-di hydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	OH	OMe	OH	
83	5,6-di hydroxy-7,8,4'-trimethoxyflavone	OMe	OMe	OH	
83	5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone	OMe	H	OMe	
83	5-hydroxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone	OMe	OMe	OMe	
83	5,6,4'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	OH	OMe	OH	
83	apiginine	OH	OH	OH	
83	acacetine	OMe	OH	OH	
84	acacetin-7-O-rutinosyl	OMe	-O rut	OH	
83	sorbifoline	H	OMe	OH	
83	luteoline	OH	OH	H	

الجدول (2) الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Mentha* (تابع)

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R ₃	R ₂	R ₁	
83	thymonine	OMe	OMe	OH	
83	sideritoflavone	OH	OMe	OMe	
83	5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone	OMe	H	OH	
83	cirsilinol	OMe	H	OMe	
83	5, 4'-dihydroxy-6,7,8, 3'-tetramethoxyflavone	OMe	OMe	OMe	
83	5, 6-dihydroxy-7,3', 4'-trimethoxyflavone	OMe	H	OH	
83	5, hydroxy-6,7,3', 4'-tetramethoxyflavone	OMe	H	OMe	
83	ladaneine	H	H	OH	
83	Gardenine D	OH	OMe	OMe	
85	Keampférol -3-O-glucosyl (1→2) rhamnosyde-7-O-glycoside		H	H	
85	Keamférol -3-O-(6''-p-coumaroylglucosyl) (1→2) rhamnosyde-7-O-glycoside		H	<i>p</i> -coumaroyl	
85	Keampférol -3-O-(4''-p-coumaroylglucosyl) (1→2) rhamnosyde-7-O-glycoside		<i>p</i> -coumaroyl	H	

الجدول (3) الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Mentha* (تابع)

المرجع	التسمية	المستبدلات			صيغة الفلافونيد
		R ₃	R ₂	R ₁	
86	kaempferol-3-O-glucosyl	H	OH	O-glu	
86	Luteolin-7,3'-diglucosyle	O-glu	O-glu	H	
86	Luteolin-3-O-glucosyle	OH	OH	O-glu	
86	Luteolin-7-O-glucopyranosyl	OH	O-glu	H	
83	Lutiolin-7-O-rutinosyl	OH	rut-O	H	
83	Apigenin-7-O-rutinosyl	H	rut-O	H	
83	Apigenin-7-β-O-glycopyranosyl	H	glu-O	H	
83	jaceidine				
83	6-hydroxykaempferol-3,5,7-trimethoxy				
83	artemetine				

الجدول (4) الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Mentha* (تابع)

III-1-3- التصنيف النباتي للنباتة:



الصورة-1- *Mentha arvensis* صورة فوتوغرافية لنباتة

Royaume	Plantes	المملكة
Sous royaume	Tracheobiontes	تحت المملكة
Embranchement	Spermatophytes	الفرع
Division	Magnoliophytes	القسم
Classe	Magnoliopsides	الصف
Sous classe	Asteridae	تحت الصف
Ordre	Lamiales	الرتبة
Famille	Lamiaceae	العائلة
Genre	<i>Mentha</i>	الجنس
Espèce	<i>Mentha arvensis</i>	النوع

الجدول-5-التصنيف النظامي لنبات *M.arvensis*.

III-1-4- وصف النبتة:

اشتق اسم *arvensis* من الاسم اللاتيني *arvum* والذي يعني الحقل ويمكن وصف النبتة كالتالي :

هي نبتة يتراوح طولها ما بين 10سم الى 60سم ذات أوراق بيضاوية الشكل ذات رائحة عطرية متقابلة تتوضع على الجذع رباعي الشكل لونه أخضر و في بعض الأحيان بنفسجي قادرة على بث شعيرات ماصة في حالة ملامستها للأرض، أزهارها ذات ألوان بنفسجية أو زهرية تتجمع في كؤوس في نقطة التقاء الورقة مع الساق نزه ما بين شهري جويلية و أكتوبر.

III-1-5 خصائصها:-

تشتهر نبتة *Mentha arvensis* كباقي انواع النعناع بزيتها الأساسية و اللتي تمتاز بفعالية بيولوجية عالية حيث يتكون زيتها الأساسي من -7- المركبات الملخصة في الجدول

	المركب	نسب وفرتها
Monoterpènes	béta-pinène	1.09%
	alpha-pinène	0.97%
	myrcène	0.39%
	sabinène	0.39%
	limonène	3.87%
Monoterpénols	: menthol	42.43%
	néo-menthol	4.74%
	linalol	0.19%
Monoterpénones	menthone	21.76%
	iso-menthone	9.25%
	pipéritone	0.94%
	pulégone	0.96%
Esters terpéniques	acétate de menthyle	4.38%
Sesquiterpènes	béta-caryophyllène	0.84%

جدول 6- يبين مكونات الزيوت الأساسية لنبتة *Mentha arvensis*

III - 1 - 6 - الدور العلاجي:

لنبات *Mentha arvensis* خصائص علاجية هامة مرتبطة أساسا بزيوتها الأساسية التي تحتوي على المانتول الذي يعطيها قيمة علاجية كبيرة لمكافحة عدة أمراض منها:

- صداع الرأس
- يسكن الام الأسنان
- يسكن الألام العصبية
- مضاد للجراثيم
- مضاد للعدوى
- يستخدم لعلاج الاكزيما والقوباء
- يعالج القيء في حالة الحمل وعسر الهضم
- توفر شعور كبيراً بالنضارة
- يحفز نشاط القلب
- يعالج الحيوب الأنفية
- يعالج البرد و التعب
- يخفف من مشاكل الجهاز الهضمي
- يعالج المغص الكلوي والمغص الكبدي

III - 2 - المادة النباتية:

جمعت النبتة من ضواحي ولاية جيجل بالشرق الجزائري في ماي 2009 وخلال تجميع النبتة تم تخليصها من كل الشوائب العالقة بها, بعدها تمت عملية التجفيف في الظل بعيدا عن الرطوبة فتحصلنا على 437 غ من المادة النباتية

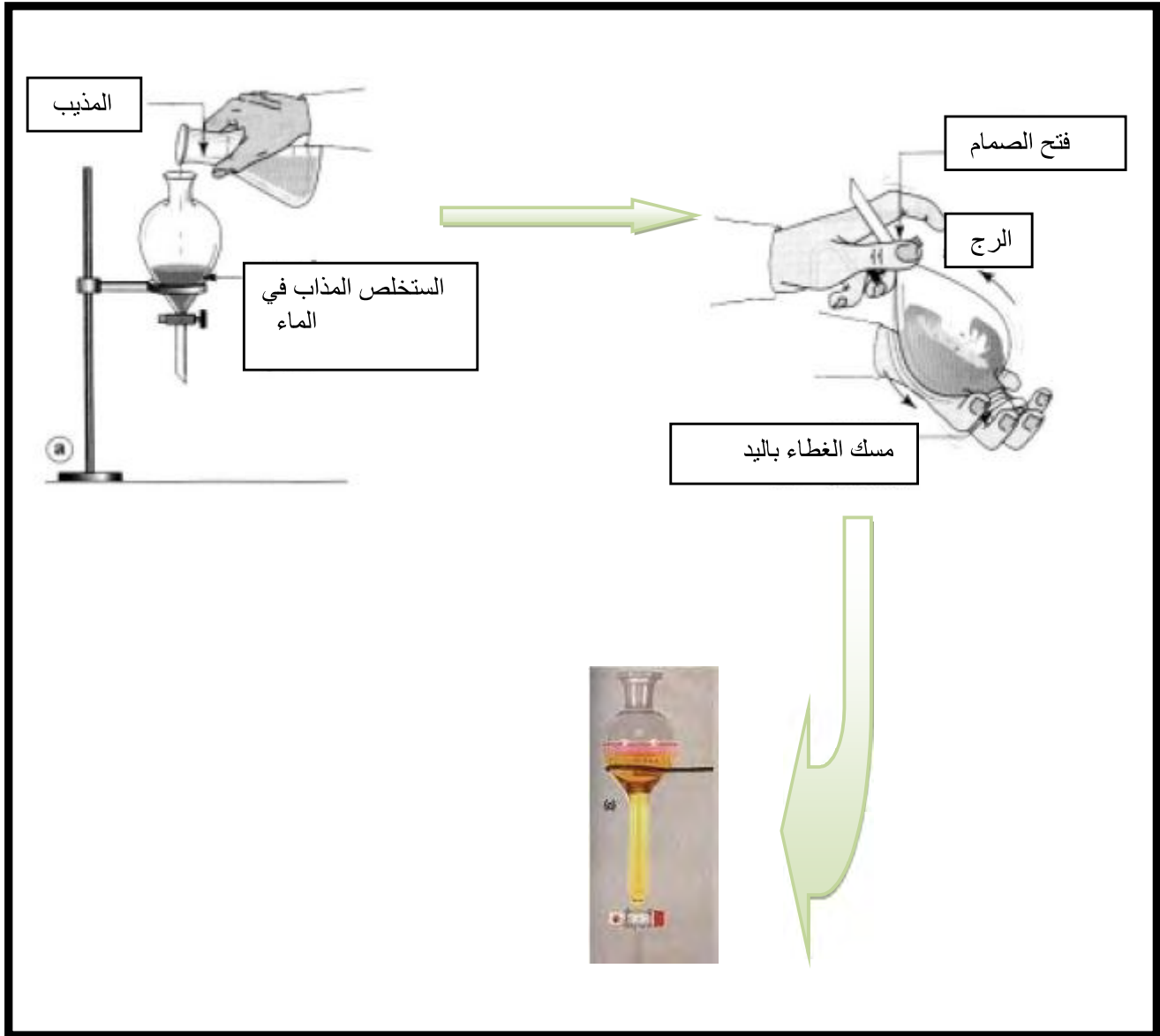


III-2-1- استخلاص النبتة :

وَضَعْنَا المَادَّةَ النَبَاتِيَّةَ فِي أَوَانِي مَجْهُزَةٍ لِهَذِهِ العَمَلِيَّةِ وَ غَمَرْنَاهَا بِمَحْلُولٍ بِهِ : ماء / ميثانول (3/7) وَ تَرَكْتِ لِمُدَّةِ 24 سَاعَةٍ، لِيَرشَحَ بَعْدَهَا وَ يَرَكُزَ الرَاشِحَ أَمَّا المَحْلُولُ المِستَرَجِعُ بَعْدَ التَّركِيزِ فَيُجَدِّدُ بِالكَمِيَّةِ الكَافِيَّةِ لِعَمْرِ المَادَّةِ النَبَاتِيَّةِ وَ هَذَا لِإِعَادَةِ العَمَلِيَّةِ حَتَّى يَضَعْفَ تَركِيزَ لَوْنِ الرَاشِحِ أَيْ اسْتِخْلَاصَ أَكْبَرَ كَمِيَّةٍ مُمكِنَةٍ وَ لِذَلِكَ فَقد كَررْنَا العَمَلِيَّةَ 4 مَرَاتٍ عَلى ان يَسْتَبَدِلَ المَحْلُولُ كَلى 36 سَاعَةٍ. أَذْبَنَّا المِستَخْلَصَ الخَامَ المَرَكِزَ المَتَحَصَّلَ عَليهِ فِي حِوَالِي 250 مِل مِنَ المَاءِ المَقْطَرِ الدَافِئِ (400-500 مِل مَاءٍ مَقْطَرٍ لِكُلِّ 1 كِغ مِنَ المَادَّةِ النَبَاتِيَّةِ الجَافَةِ) ثَم تَرَكْنَاهُ لَيْلَةً كَامِلَةً لِلرَاحَةِ وَ أَخذْنَا فَقطِ الجِزءَ السَائِلَ وَ تَخَلَّصْنَا مِنَ الرَاسِبِ الذِي بَقِيَ فِي أَسْفَلِ الإِنَاءِ لِنَبْدَأَ بَعْدَهَا بِفِصْلِ الأَطْوَارِ حَيْثُ أَضْفَنَّا أَوَّلًا الكَلُورُوفُورْمَ بِنِسبَةِ 1/3 مِنَ حِجْمِ المِستَخْلَصِ المَذَابِ فِي المَاءِ المَقْطَرِ وَ نَتَّبِعُهُ أَنْ لا نَرَجَّ جَيِّدًا مَخَافَةَ تَشَكُّلِ مِستَحْلَبٍ وَ تَرَكْنَاهُ مَدَّةً زَمَنِيَّةً كَافِيَّةً حَتَّى انْفِصَلَ الطُورَانِ حَيْثُ يَكُونُ الطُورُ الكَلُورُوفُورْمِي هُوَ الأَثْقَلُ أَيْ الأَسْفَلُ وَ هُوَ الذِي قَمْنَا بِتَركِيزِهِ وَ كَررْنَا العَمَلِيَّةَ حَتَّى غَابَ اللَوْنُ المُمِيزُ لِهَذَا الطُورِ، وَ فِي الأَخِيرِ نَقَلْنَا المِستَخْلَصَ المَرَكِزَ بِإِذَابَتِهِ فِي القَلِيلِ مِنَ الكَلُورُوفُورْمِ وَ وَضَعْنَاهُ فِي قَارُورَةٍ صَغِيرَةٍ مَعْلُومَةِ الوِزْنِ وَ هَذَا لِمَعْرِفَةِ وَزْنِ هَذَا الطُورِ. بِنِفسِ الطَّرِيقَةِ عَامَلْنَا الطُورَ المَائِيَّ بِخَلَاتِ الإِيثِيلِ ثَم بِالْبُوتَانُولِ النِظَامِي وَ اللِّذَانِ يَكُونُ فِيهِمَا الطُورُ العَضُويُّ هُوَ الأَخْفُ أَيْ إِلَى الأَعْلَى قَمْنَا بِتَكْرِيرِ العَمَلِيَّةِ ثَلَاثَ مَرَاتٍ لِكُلِّ طُورٍ وَ فِي كَلى مَرَّةٍ نَنقُلُ المِستَخْلَصَ المَرَكِزَ بِقَلِيلٍ مِنَ المِيثَانُولِ ثَم نَزْنُ فَحَصَلْنَا بِذَلِكَ عَلى:

- ✓ وَزْنُ طُورِ الكَلُورُوفُورْمِ يَسَاوِي 2.1 غ.
- ✓ وَزْنُ طُورِ خَلَاتِ الإِيثِيلِ يَسَاوِي 4.82 غ.
- ✓ وَزْنُ طُورِ البُوتَانُولِ العَادِي يَسَاوِي 12.67 غ.

وَ قد قَمْنَا بِتَلْخِيصِ العَمَلِيَّاتِ السَّابِقَةِ فِي المِخْطَطِ المُمِيزِ فِي الشِكْلِ 2-



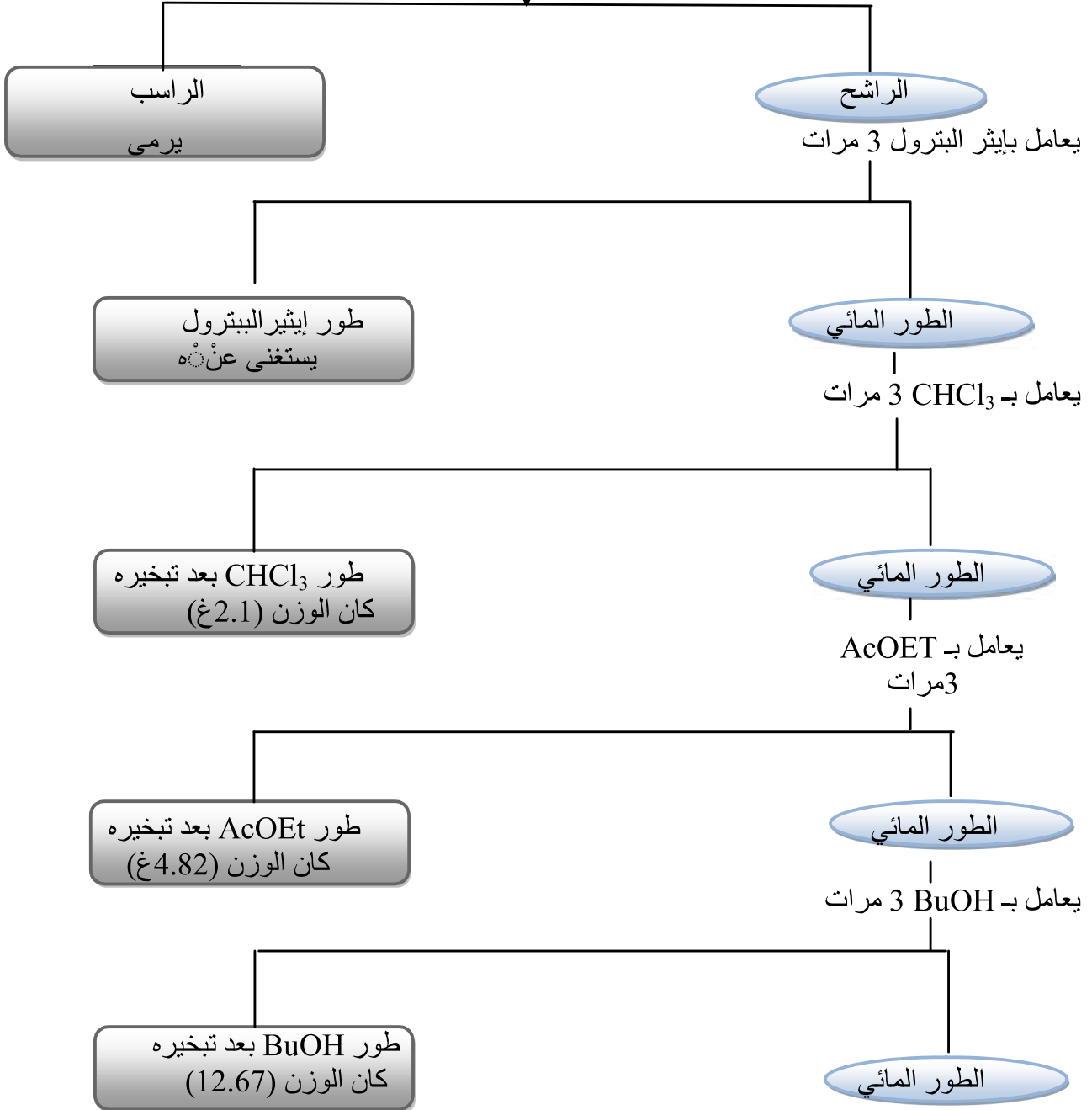
الشكل -1- عملية الاستخلاص من النوع سائل/ سائل .

مسحوق نبتة *Mentha arvensis* (437 غ)

إستخلاص بـ (ميثانول- ماء)
بنسبة (7/3) على البارد

المستخلص الخام

نضيف إليه الماء المقطر ثم نرشح



شكل - 2- خطوات عملية إستخلاص المادة النباتية النبتة *Mentha arvensis*

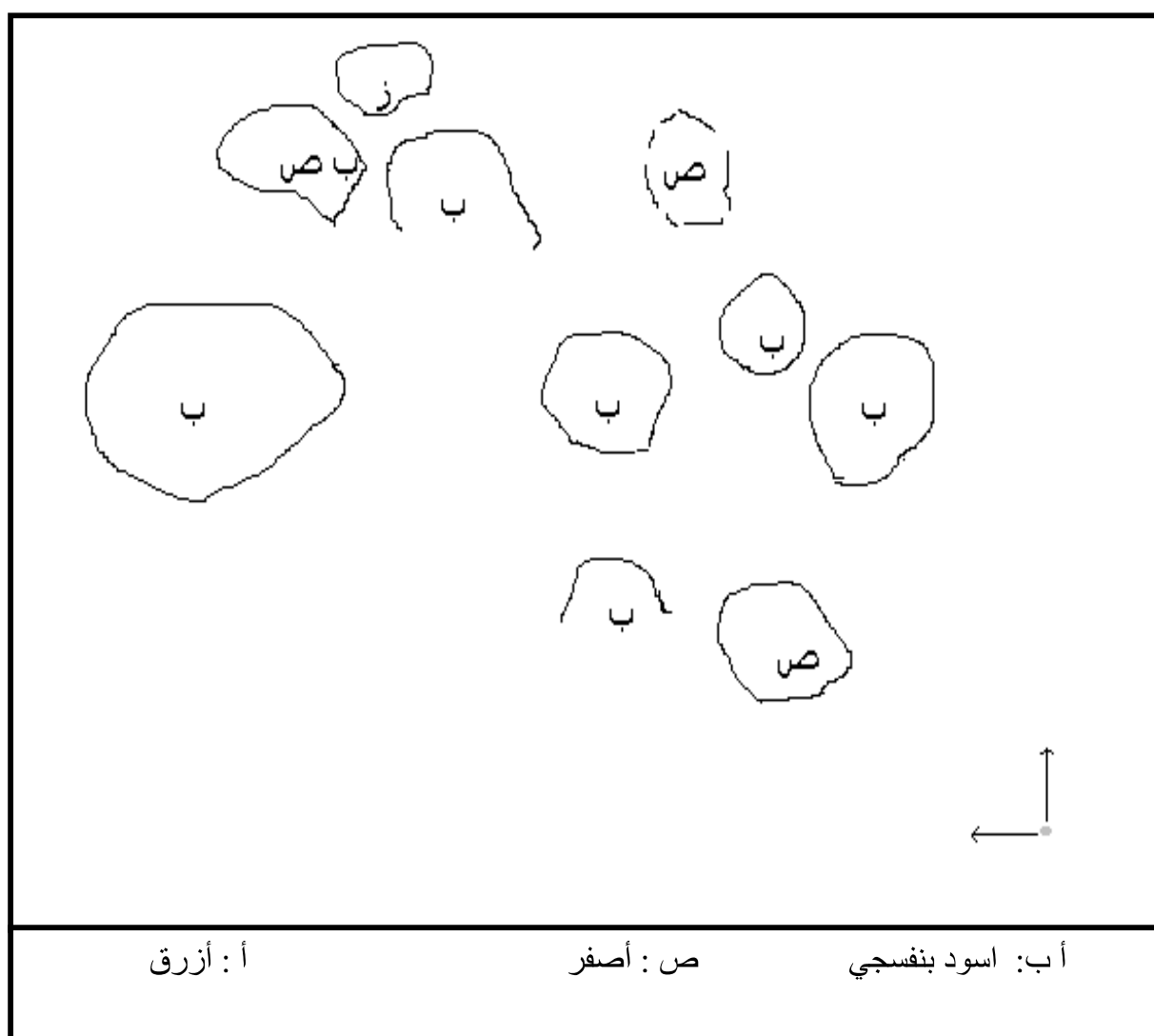
III - 2-2 - طريقة الفصل والتنقية:

بما أن الهدف الأساسي من بحثنا هو فصل المركبات الفلافونيدية، قمنا باختيار المستخلص الأسيتاتي. وأجرينا له فحص كروماتوغرافي على الورق حيث في البعد الأول D_1 كان الممصل هو المذيب العضوي

: 4/1/5 B.A.W (n-BuOH, Acetic acid, Water)

في البعد الثاني الممصل كان D_2 الممصل المذيب المائي acide acétique 30% فتحصلنا على

الكروماتوغرام التالي



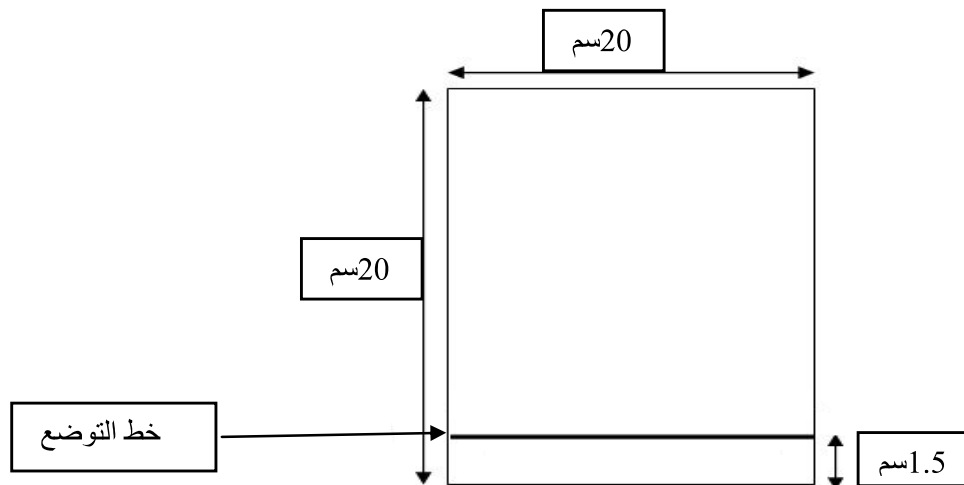
الشكل -3- كروماتوغرام ثنائي البعد على ورق واطمان لطور خلاص الايثل *M. arvensis*

نظرا لنتائج الفحص الكروماتوغرافي قررنا استخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (CCM) وذلك للاستفادة من مزايا هذه الطريقة

III -3- الطريقة العملية النتائج الكيميائية :

في خطوة اولية قمنا بتحضير 50 شريحة تحضيرية على ثلاث مراحل حيث قمنا بتحضير الدعامة بالزجاج الجيد للسيليكاجال مع الماء المقطر ثم وضعناه بواسطة Etaleur على صفائح من زجاج ذات ابعاد (20×20سم) بسبك منتظم و نتركها تجف بعدها نضعها في درجة حرارة 100° م على الأقل لمدة ساعة. بعد أن تبرد نضع عليها العينة بطريقة عرضية على بعد 1.5 سم من الحافة ونقعها عموديا في حوض به المملص المناسب كما هو موضح في الصورة-2- و بانتشار هذا الأخير الذي دام ثلاث ساعات تفصل المركبات على شكل أحزمة حددناها بمصباح UV. نقوم بكشط كل منها على حدى و نغسلها بالميثانول جيدا في أقماع زجاجية ، نركز بعدها الرشاحة حيث كانت الدعامة عبارة عن السيليكاجال HF₂₅₄.

استهلكنا من خلال هذه العملية 2 غ من المستخلص الاسيتاتي بينما كان المملص النظام التالي: كلوروفورم /الاسيتون/ميثانول بنسب 0.5/4.5/5 على الترتيب



الشكل -4-



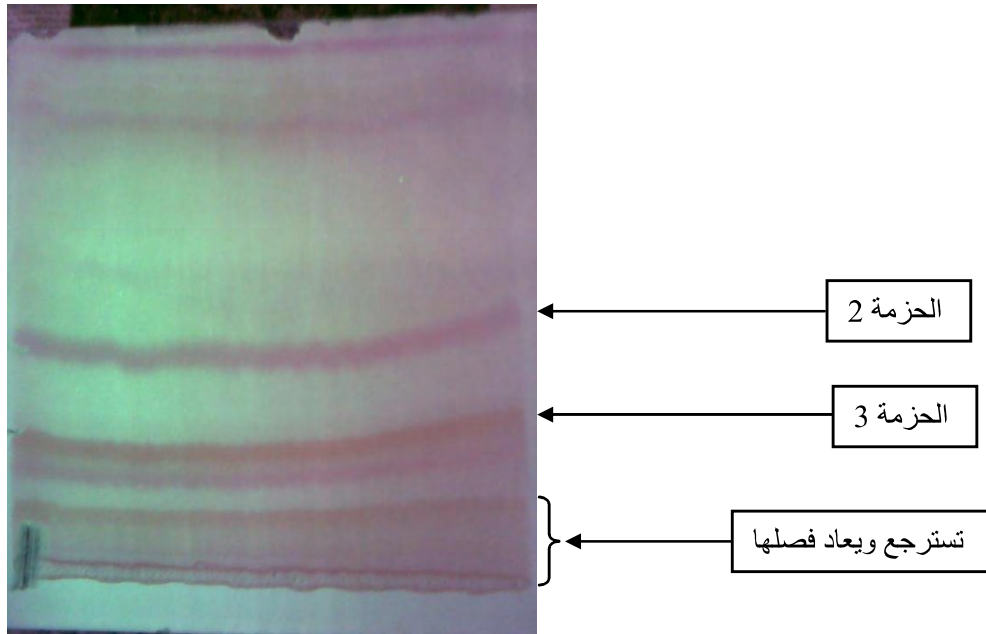
تحضير المملص



نقع الطبقة التحضيرية

الصورة-2-

فتحصلنا على حزم تظهر بواسطة مصباح UV كما هو موضح في الصورة-3- استطعنا فصل المركبين B_2 ، B_3 حيث تمت تنقية المركب B_2 بواسطة عمود السيفاداكس Sephadex LH20. أما المركب B_3 تمت تنقيته باستعمال كروماتوغرافيا العمود مع السيليكاجال كدعامة (flashe colonne) بينما المملص كان الكلوروفورم مع أغنائه تدريجيا بالأسيتون .



الصورة-3-

عند فصل المركبين B_2 ، B_3 لاحظنا ان المستخلص لم يهاجر كله من مستوى التوضع الابتدائي و لهذا ارتأينا أن نسترجعه من الجال ونفصله بنفس الطريقة ولكن هذه المرة غيرنا المملص فاستعملنا النظام التالي:

هكسان/خلات الايثيل/الاسيتون/ميثانول بنسب 0,5/4,5/5/3 على الترتيب .

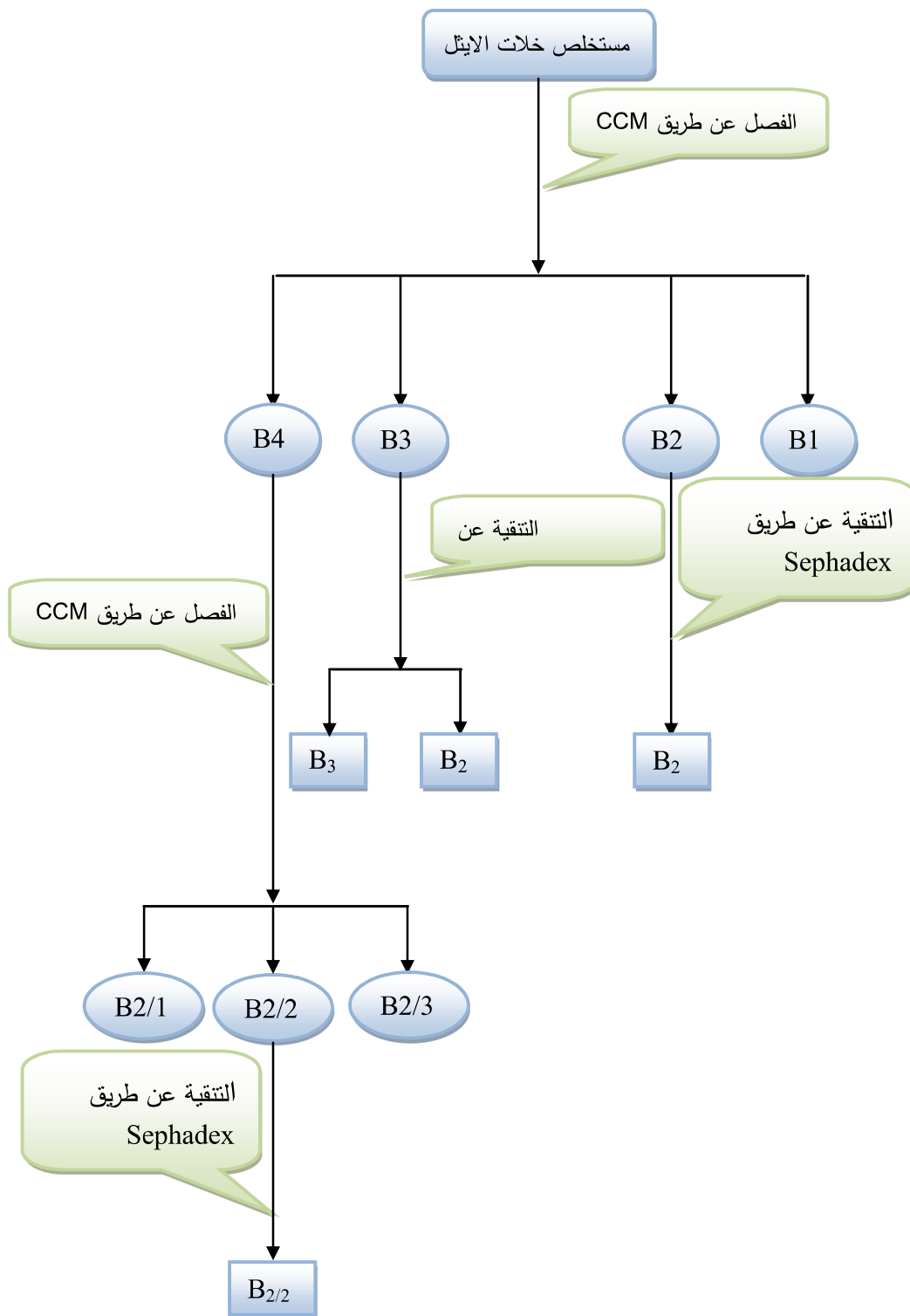
بعد ان قمنا بعملية التمليص مرتين تحصلنا على ثلاث حزم احداها تظهر تحت مصباح UV في الموجة 365 ولا تظهر تحت الموجة 254 اما الحزمتين الاخرتين تظهران تحت الموجتين



الصورة-4-

- ✓ الحزمة الأولى: هي $B_{2/1}$ لم يتم دراستها لعدم توفر الكمية الكافية لتحليلها
- ✓ أما الثانية وهي $B_{2/2}$ تم تحديد بنيته وذلك بعد تنقيته عن طريق عمود السيفاداكس .Sephadex LH20
- ✓ بينما الحزمة الثالثة هي $B_{2/3}$ فكانت تحوي خليط معقد من المركبات لم يتم فصلها.

و لقد قمنا بتلخيص عملية الفصل والتنقية ضمن المخطط التالي:



شكل - 5 - مخطط الفصل و التنقية

ومنہ خلال عملنا هذا تم فصل ثلاث مركبات فلافونيدية B_2 ، B_3 ، $B_{2/2}$ ولكن تم تحديد بنية مركبين فقط

و هما:

• المركب B_2

• المركب $B_{2/2}$

انقطاع الراجع

مناقشة النتائج الكيميائية

|

IV . التعيين النيوي للمركبين

1-IV التحليل النيوي للمركب B₂:

اعتمدنا في التعرف على البنى الكيميائية للمركبات النقية المتحصل عليها على:

- السلوك الكروماتوغرافي بالاستعانة بالشواهد و لتعيين الجزء السكري في حالة الجليكوزيدات
نستخدم الحلمهة الحمضية .

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية . المرئية . UV

- الرنين النووي المغناطيسي . (¹H) RMN

1-1-IV سلوكة الكروماتوغرافي:

توضح قيم معامل الاحتباس في الجدول (1).

SII	SI	الجملة
16	25	$R_f \times 100$
اسود بنفسجي		اللون الإستشعاعي

الجدول (1) : السلوك الكروماتوغرافي

SI : Toluène/MEC/MeOH (4 / 3 / 3)

SII : H₂O/MeOH/MEC/Acétyl acétone (13 / 3 / 3 / 1)

1-1-IV - 2 - مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب B₂ موضحة بالجدول - 2 -

الكواشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	قمة (nm)
MeOH	354	266	
NaOH	396	266	323
AlCl ₃	351	269	396-303
AlCl ₃ +HCl	349	275	396-303
NaOAc	382	275	304
NaOAc+H ₃ BO ₃	360	269	364-303
NaOH بعد 5 دقائق : مستقر			

الجدول 2: مطابقة الأشعة فوق البنفسجية-المرئية

اللون الأسود تحت الأشعة فوق البنفسجية وطول العصابة (I) في الميثانول عند $\lambda_1 = 354 \text{ nm}$

يدلان على أن المركب عبارة عن فلافونول مع 3-OR (أي عدم وجود OH حر في الموضع 3).

قيم ثابت الاحتباس (R_f) تدل على أن المركب هو جليكوزيدي احادي السكر.

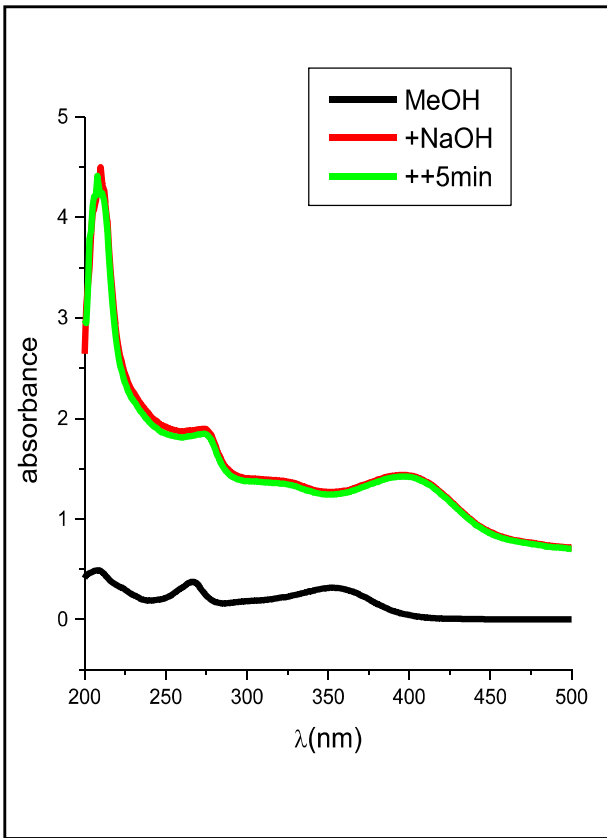
بمقارنة الطيف المسجل في هيدروكسيد الصوديوم مع الطيف المسجل في الميثانول نجد أن إزاحة باثوكرومية للحزمة (I) ب +42 nm مع زيادة في الشدة دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4 ، مع ظهور حزمة جديدة عند 323 nm دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7 مؤكدا بالانزياح الباثوكرومي للعصابة II +9 nm في NaOAc بالنسبة للمركب الميثانولي. ، و استقرار طيف NaOH يؤكد غياب OH حر في الموضع 3 .

الإزاحة الباثوكرومية ب: +45 nm المترتبة عن مقارنة طيف MeOH ب AlCl₃+HCl دليل على وجود OH حر في الموضع 5.

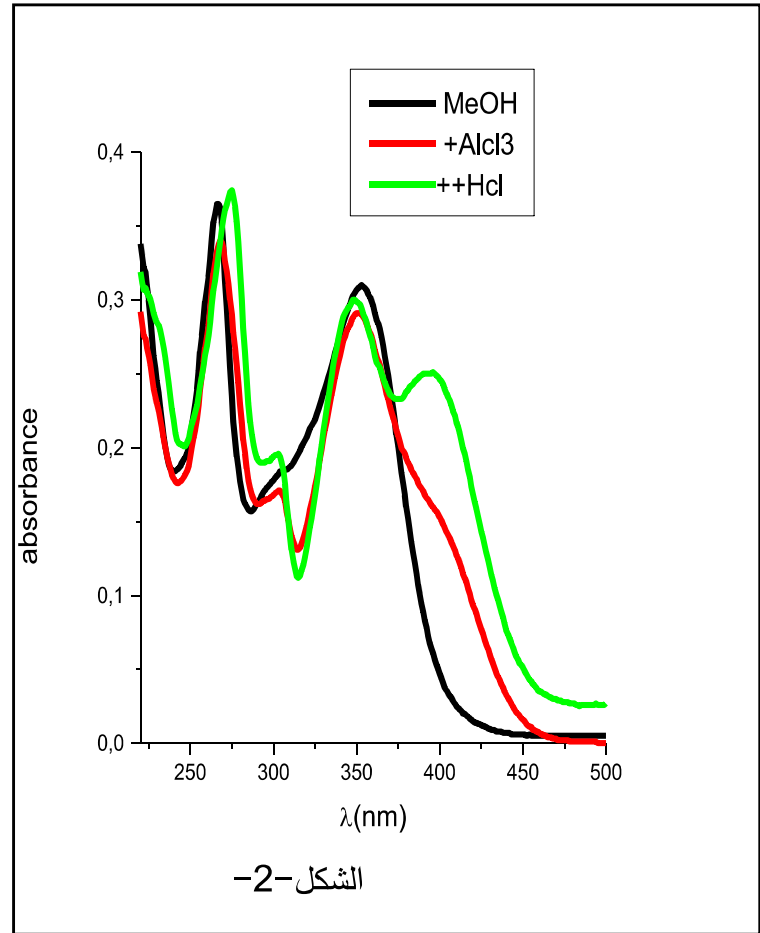
الإزاحة الهيسوكرومية للعصابة (I) ب -2 nm المترتبة عن مقارنة طيف AlCl₃ ب AlCl₃+HCl دليل على عدم وجود نظام أرتو ثنائي هيدروكسيل في الحلقة B .

الطيف المسجل في NaOAc+H₃BO₃ يشير إلى عدم وجود أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A أو الحلقة B و هي نفس الملاحظات المأخوذة من طيف المسجل في AlCl₃+HCl

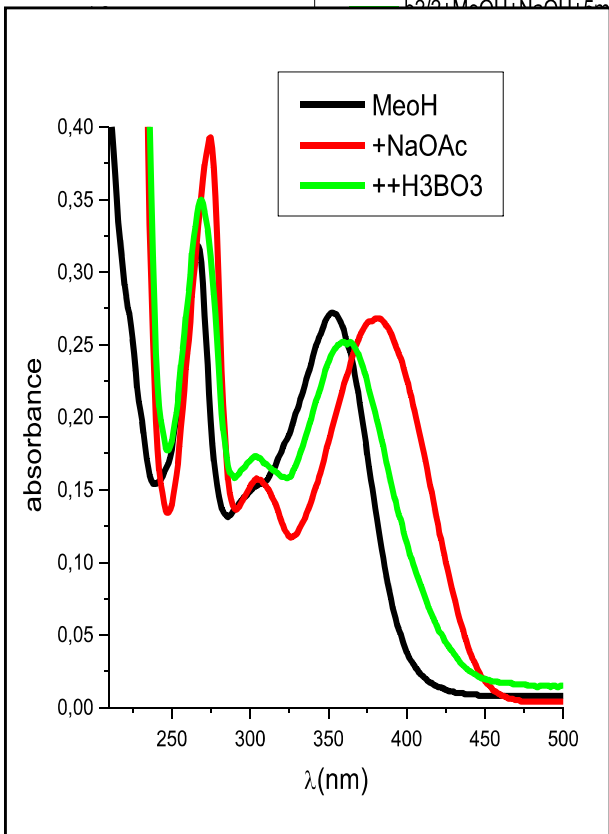
سلسلة أطراف UV للمركب B₂ في مختلف الكواشف



الشكل -1-
 ■ b2/2+MeOH
 ■ b2/2+MeOH+NaOH
 ■ b2/2+MeOH+NaOH+5min



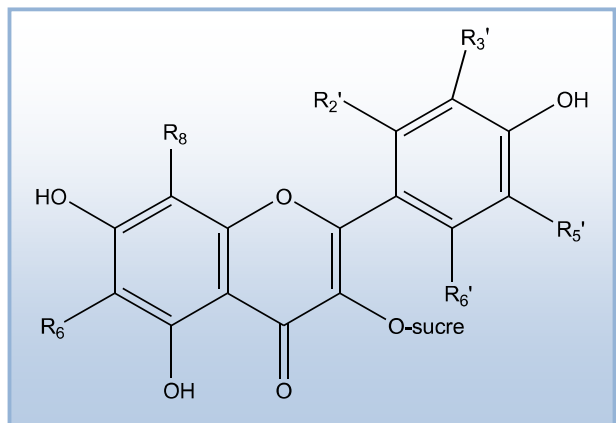
الشكل -2-



الشكل -3-

✓ من هذه المعطيات يمكننا أن نعطي بنية

أولية للمركب B₂ وهي كالتالي :



الشكل -4-

IV-1-3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-RMN}$:

تلخص نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H-RMN}$ (CD₃OD, 250MHz) في الجدول التالي:

البروتون الموافق	ثابت التزاوج J (Hz)	التعددية	التكامل	الازاحة الكيميائية δ (ppm)
H ₆	2,1	d	H1	6,18
H ₈	2,1	d	H1	6,33
H _{3'} .H _{5'}	9,0	d	H2	6,90
H _{2'} .H _{6'}	8,9	d	H2	8,30
H'' ₁	6,9	d	H1	5,20
بروتونات السكر		m		3,40-5,20

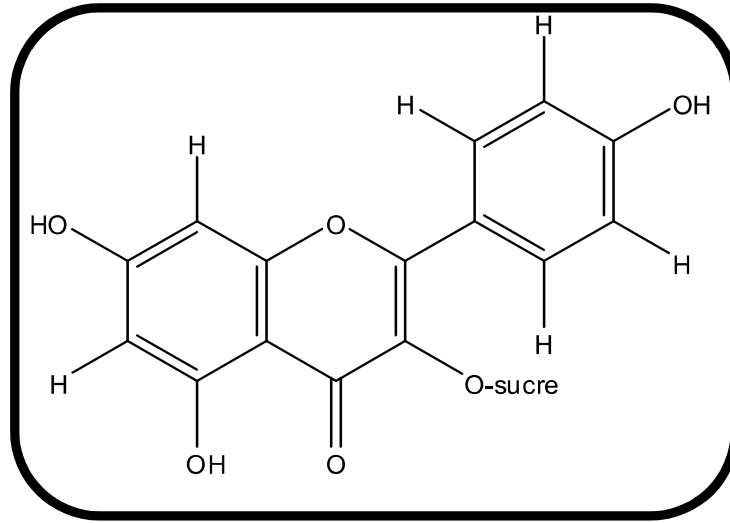
الجدول (3) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب B₂ ($^1\text{H-RMN}$)

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-RMN}$ (للتيف -1) الذي دونت نتائجه في الجدول

- 3 -

- وجود إشارتين ثنائيتين ($d(J = 2,0\text{Hz})$) بتكامل 1H لكل منهما عند $\delta = 6,18\text{ppm}$ و $\delta = 6,33\text{ppm}$ و هي إزاحة خاصة ببروتونات الحلقة A لذا يمكن نسبتها إلى كل من H₆ و H₈ على الترتيب و ذلك تأكيدا لمعطيات مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV).
- وجود إشارة ثنائية بتكامل 2H عند $\delta = 6,90\text{ppm}$ بثابت تزاوج ($d(J = 2,0\text{Hz})$) يمكن نسبتها إلى البروتونين H_{3'} و H_{5'}
- كما يبين نفس الطيف وجود إشارة ثنائية ($d(J = 8.9\text{Hz})$) بتكامل 2H عند $\delta = 8.30\text{ppm}$ يمكن نسبتها إلى البروتونين H_{2'} و H_{6'}
- و نلاحظ وجود إشارة ثنائية ($d(J = 6,9\text{Hz})$) بتكامل 1H عند $\delta = 5,20\text{ppm}$ و هي إزاحة خاصة بالبروتون الانوميري للسكر H_{1''}.

من كل المعطيات الطيفية السابقة (RMN¹H, UV) يمكن ان نخلص إلى أن المركب B₂ هو عبارة عن:



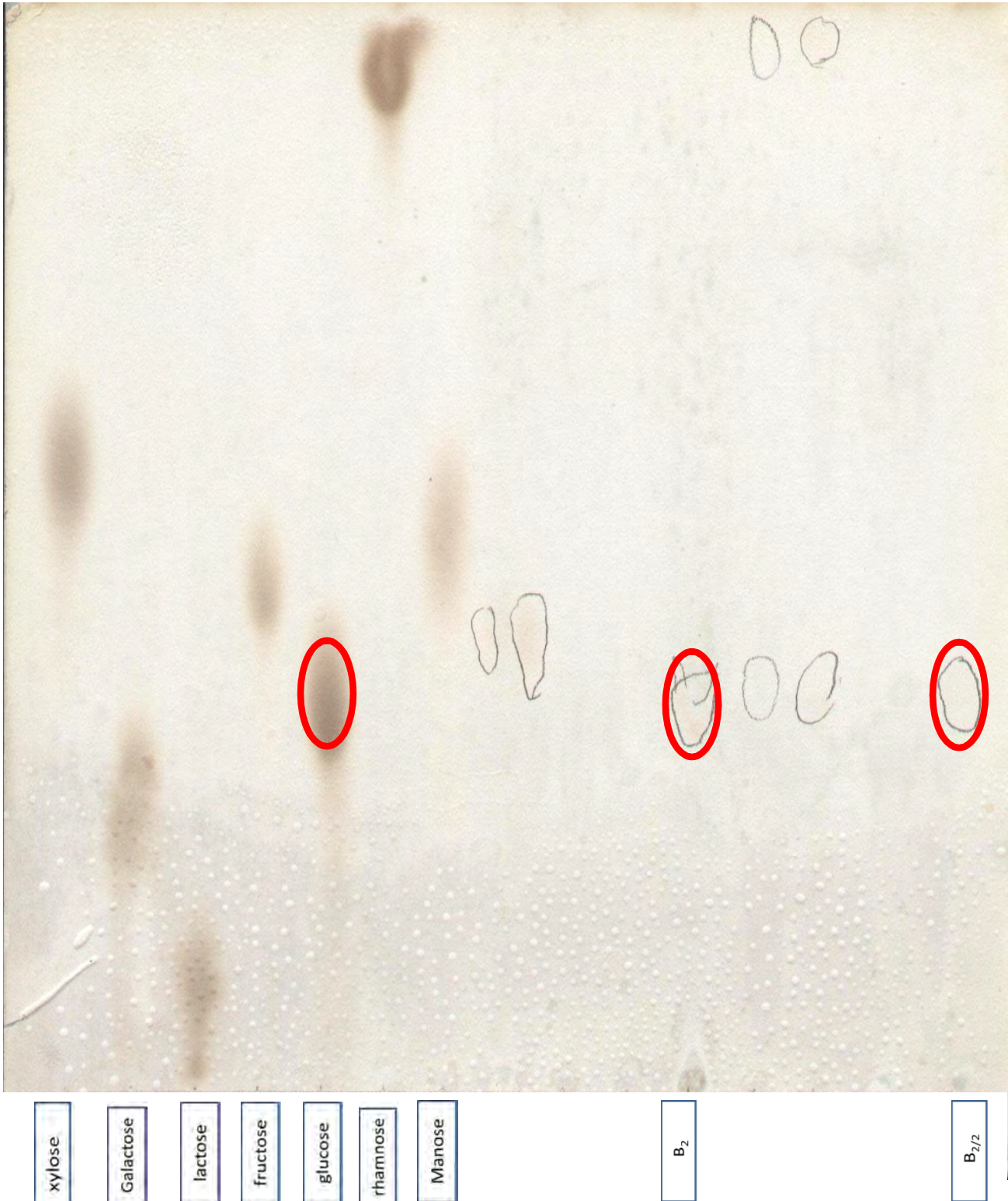
الشكل-5-

ولمعرفة نوع السكر قمنا بعملية الحلمة الحمضية و قارنا الشق السكري لـ:

B₂ بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهد *D*-glucose كما هو موضح في الصورة -1- ونظرا

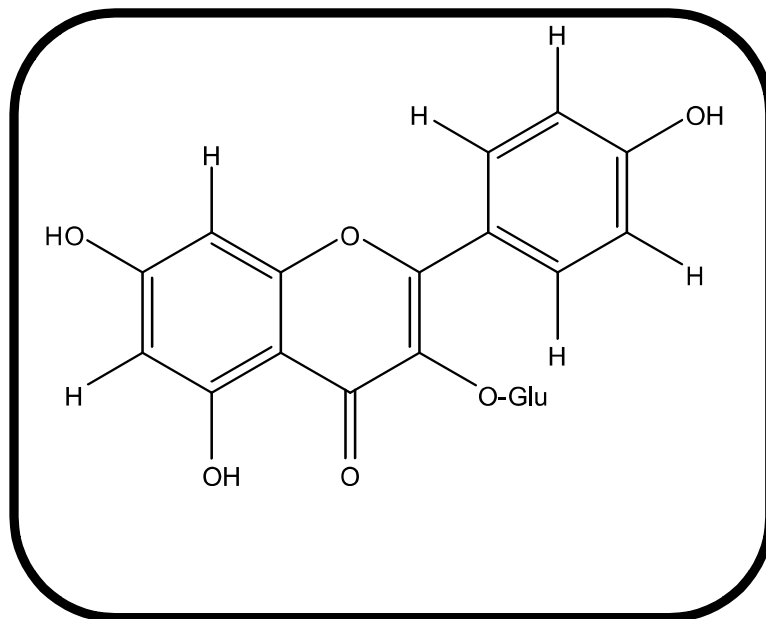
لثابت تزاوج البروتون الأنوميري ($J = 6,98\text{Hz}$) يمكن ان نقول ان السكر هو β -*D*-glucose

وتأكيدا لموقع ارتباط السكر قمنا بتسجيل طيف UV للشق الأجليكوني الذي أصبح لونه الأستشعاعي اصفر فتأكدنا أن الموقع 3 أصبح به OH حر.



الصورة-1- كروماتوغرام السكريات المفصولة من المركبات مقارنة مع شواهد سكرية معروفة

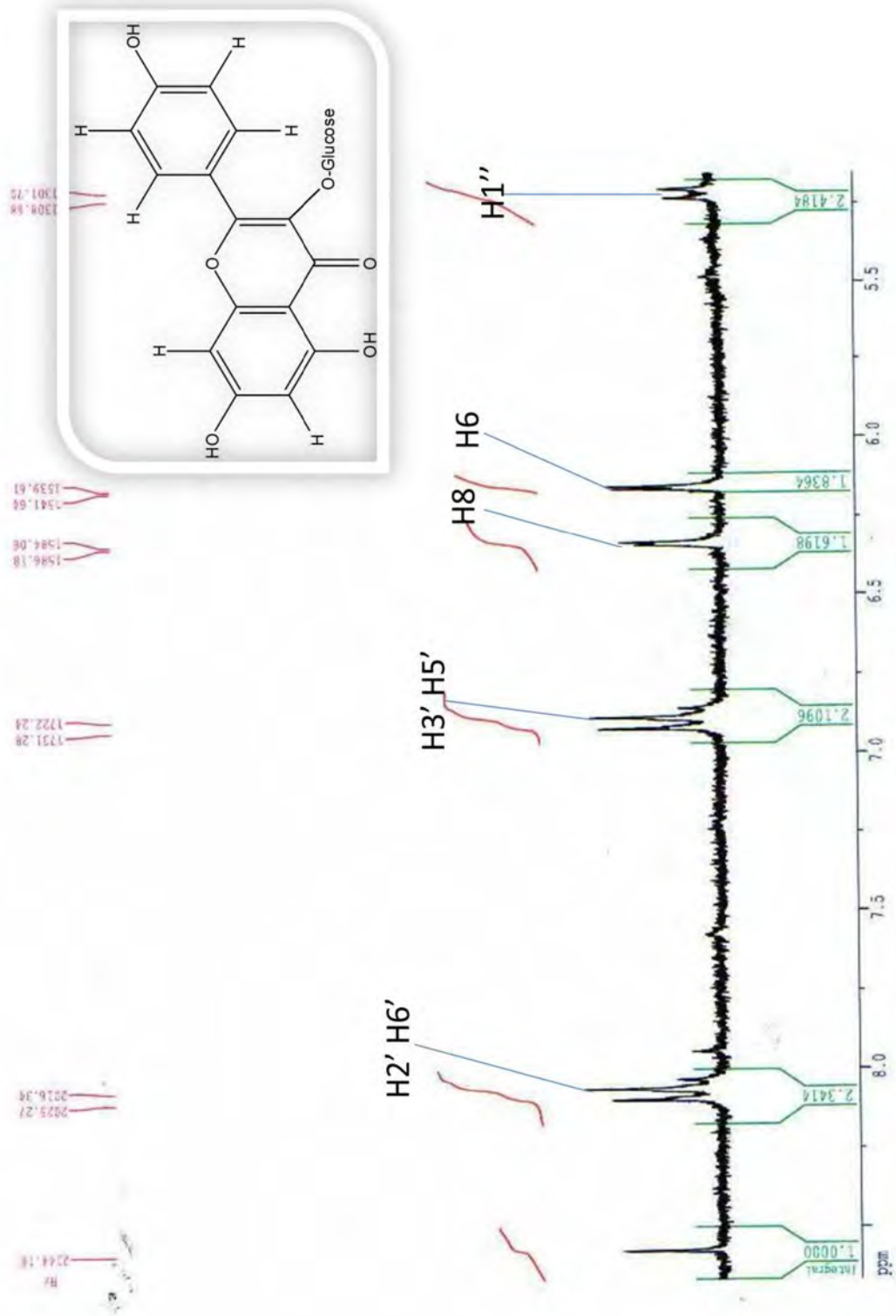
إذن البنية النهائية للمركب B₂ هي



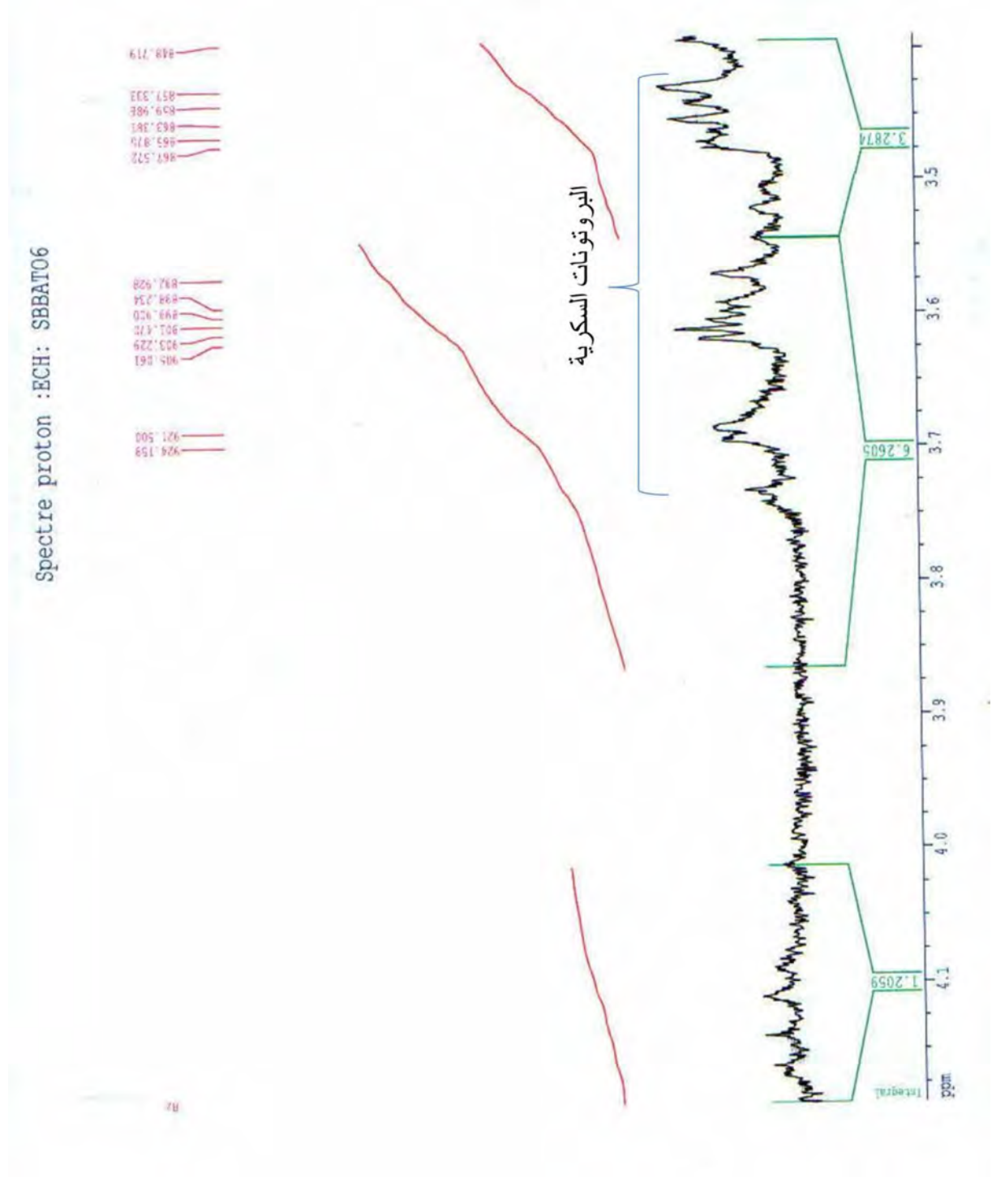
الشكل-6

3-O- β -D-glucosyl kaempférol

Spectre proton :ECH: SBBAT06



الشكل-8-:تمديد طيف ¹H RMN للمركب B₂ في المجال 5-8 ppm



الشكل-9:- تمديد طيف ^1H RMN لبروتونات المستبدل السكري للمركب B_2 في المجال 4.25-3 ppm

2-IV. التحليل البنوي للمركب B_{2/2} :

IV -2-1 - سلوكه الكروماتوغرافي:

توضح قيم معامل الاحتباس في الجدول (4).

SII	SI	الجملة
31	19	$R_f \times 100$
اسود بنفسجي		اللون الإستشعاعي

الجدول (4) : السلوك الكروماتوغرافي

SI : Toluène/MEC/MeOH (4 / 3 / 3)

SII : H₂O/MeOH/MEC/Acétyle acétone (13 / 3 / 3 / 1)

IV -2-2 - مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب B_{2/2} موضحة بالجدول - 5 -

الكواشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	قمم (nm)
MeOH	358	258	
NaOH	408	272	329
AlCl ₃	360	267	406-305
AlCl ₃ +HCl	369	264	426-305
NaOAc	360	264	301
NaOAc+H ₃ BO ₃	378	261	301
NaOH بعد 5 دقائق : مستقر			

الجدول 5: مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية

اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية وطول العصابة (I) في الميثانول عند $\lambda_1 = 358 \text{ nm}$

يدلان على المركب عبارة عن فلافونول مع 3-OR (أي عدم وجود OH حر في الموضع 3).

قيم ثابت الاحتباس (R_f) تدل على أن المركب هو جليكوزيدي أحادي السكر.

- الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_I (\text{NaOH} / \text{MeOH}) = +50 \text{ nm}$ تدل على وجود OH حر في

الموضع 4' ، و استقرار طيف NaOH يؤكد غياب OH حر في الموضع 3 .

- الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_I (\text{AlCl}_3 + \text{HCl} / \text{MeOH}) = +51 \text{ nm}$ دليل على وجود OH

حر في الموضع 5.

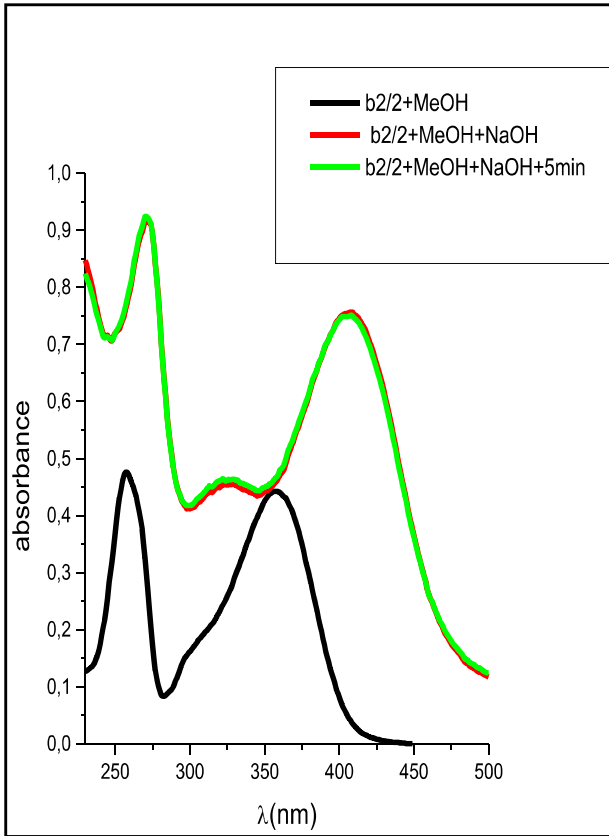
- ظهور قمة جديدة عند 329 nm دليل على وجود OH حر في الموضع 7 في طيف NaOH،

تؤكد الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_{II} (\text{NaOAc} / \text{MeOH}) = +43 \text{ nm}$.

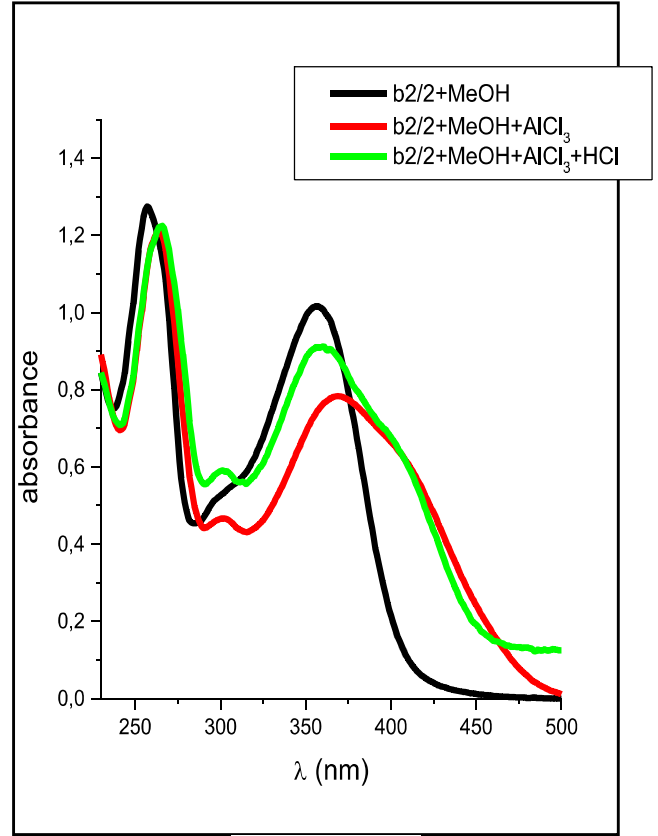
- الإزاحة الباثوكرومية بـ: $\Delta\lambda_I \text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3 = +18 \text{ nm}$ دليل على وجود أورثو ثنائي

الهيدروكسيل على الحلقة B أي الموقع 3' به OH حر .

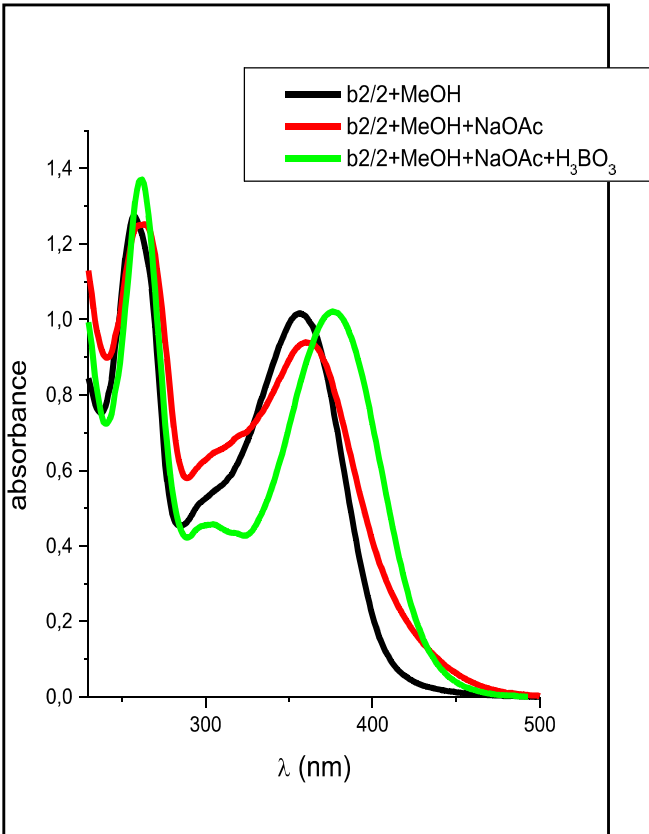
سلسلة أطراف UV للمركب B₂/2 في مختلف الكواشف



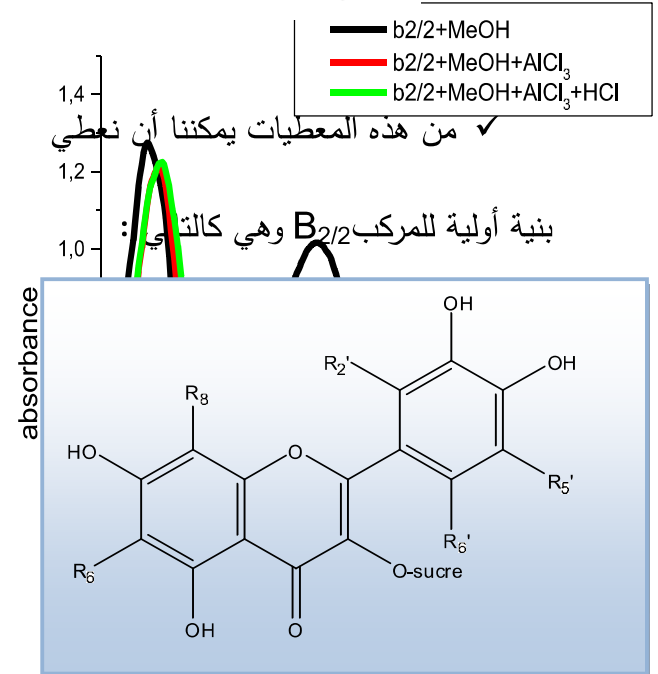
الشكل-10-



الشكل-11-



الشكل-12-



الشكل-13-

IV-2-3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H -RMN:

تلخص نتائج طيف-2- الرنين النووي المغناطيسي ^1H -RMN (CD_3OD , 250MHz) في الجدول التالي:

البروتون الموافق	ثابت التزاوج $J(\text{Hz})$	التعددية	التكامل	الإزاحة الكيميائية $\delta(\text{ppm})$
H_6	1,6	d	H1	6,2
H_8	-	sl	H1	6,40
$\text{H}_{5'}$	8,2	d	1H	6,92
$\text{H}_{6'}$	8,2-2,1	dd	1H	7,63
$\text{H}_{2'}$	2,1	d	H1	7,68
H''_1	7,3	d	H1	5,15
بروتونات السكر		m		5,15-3,40

الجدول (6) : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $\text{B}_{2/2}$ (^1H -RMN)

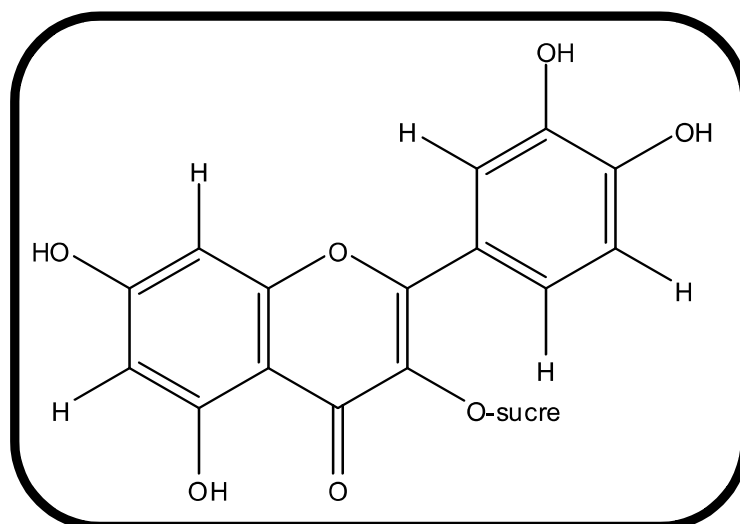
يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H -RMN (لطييف-2-) الذي دونت نتائجه في الجدول -6-

- وجود إشارة ثنائية d ($J = 2,1\text{Hz}$) بتكامل 1H عند الإزاحة الكيميائية $\delta = 6,20\text{ppm}$ و هي خاصة بالبروتون H_6
- وجود إشارة أحادية عريضة sl بتكامل 1H عند $\delta = 6,4\text{ppm}$ يمكن نسبتها إلى البروتون H_8
- كما يبين نفس الطيف وجود إشارة ثنائية d ($J = 8,2\text{Hz}$) بتكامل 1H عند $\delta = 6,92\text{ppm}$ يمكن نسبتها إلى البروتون $\text{H}_{5'}$
- و نلاحظ وجود إشارة ثنائي ثنائي ($J = 8,2, J = 2,1\text{Hz}$) dd بتكامل 1H عند $\delta = 7,63\text{ppm}$ و هي إزاحة خاصة بالبروتون $\text{H}_{6'}$.

➤ كما نلاحظ إشارة ثنائية ($d(J = 2,1\text{Hz})$) بتكامل 1H عند $\delta = 7,68\text{ppm}$ خاصة بالبروتون H_2

➤ و نلاحظ وجود إشارة ثنائية ($d(J = 7,38\text{Hz})$) بتكامل 1H عند $\delta = 5,15\text{ppm}$ و هي إزاحة خاصة بالبروتون الأنوميري للسكر " H_1 ".

من كل المعطيات الطيفية السابقة (RMN^1H , UV) يمكن ان نخلص إلى أن المركب $B_{2/2}$ هو عبارة عن:



الشكل-14-

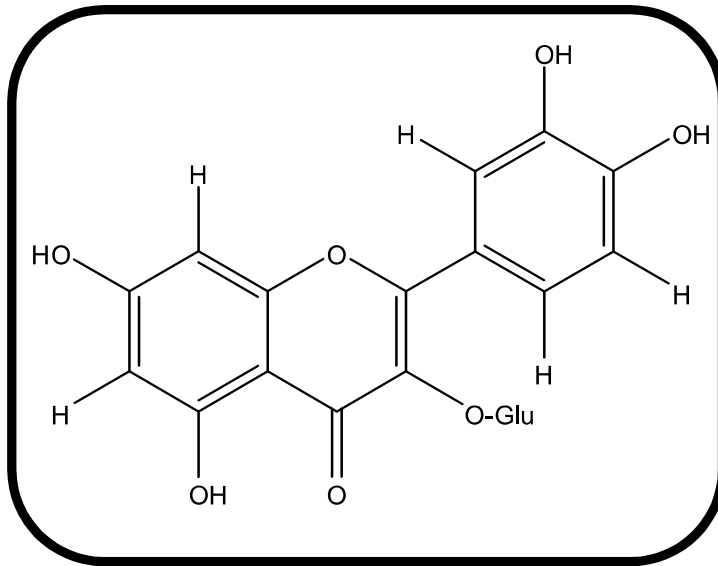
ولمعرفة نوع السكر قمنا بعملية الحلمة الحمضية و قارنا الشق السكري لـ:

$B_{2/2}$ بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهد D - glucose كما هو موضح في الصورة-1 ونظرا

لثابت تزاوج البروتون الأنوميري ($J = 7,38\text{Hz}$) يمكن ان نقول ان السكر هو β -D glucose

وتأكدنا لموقع ارتباط السكر قمنا بتسجيل طيف UV للشق الأجليكوني الذي أصبح لونه الأستشعاعي اصفر فتأكدنا ان الموقع 3 أصبح به OH حر.

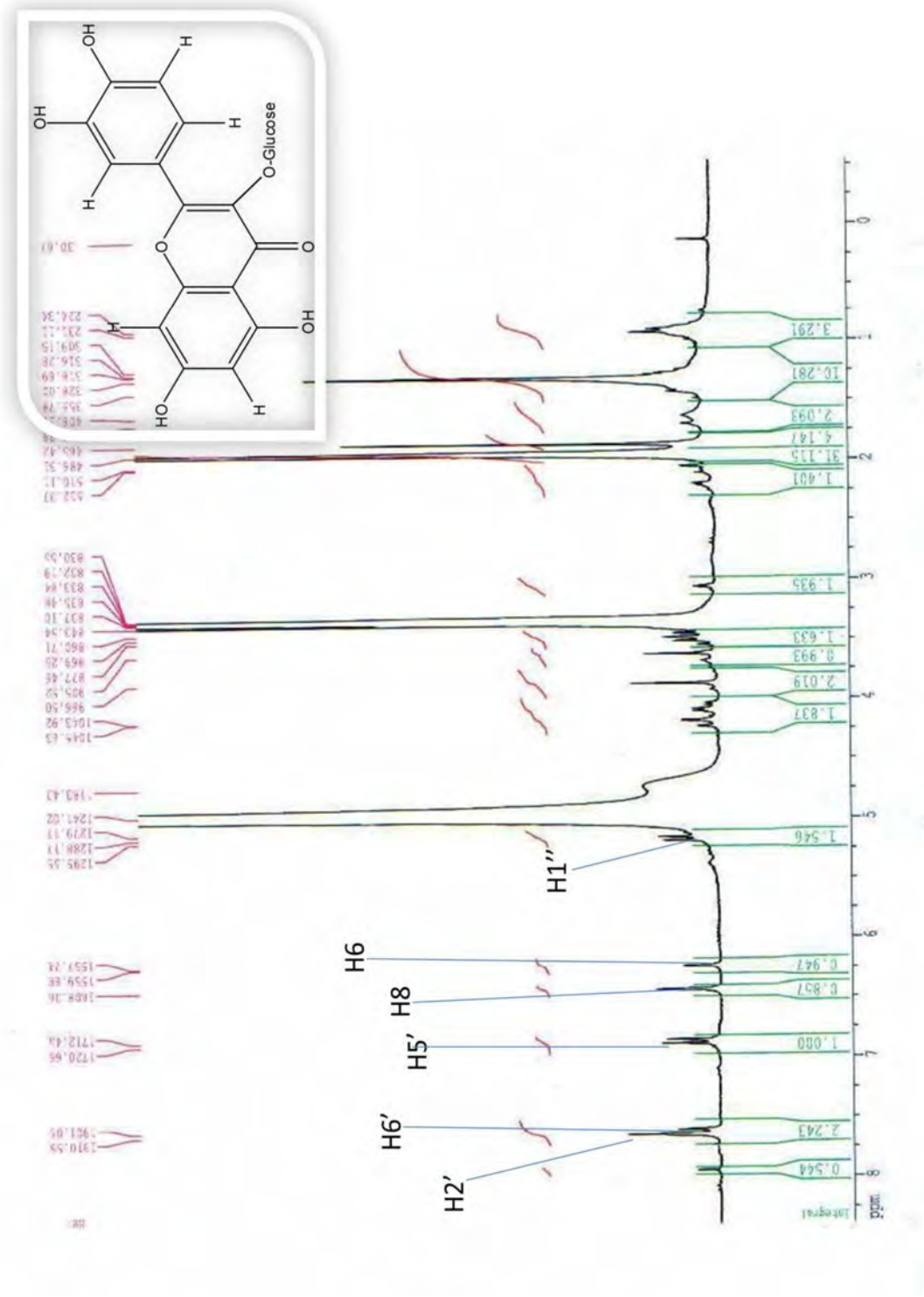
إذن البنية النهائية للمركب B_{2/2} هي:



3-O-β-D- glucosyl quercetine

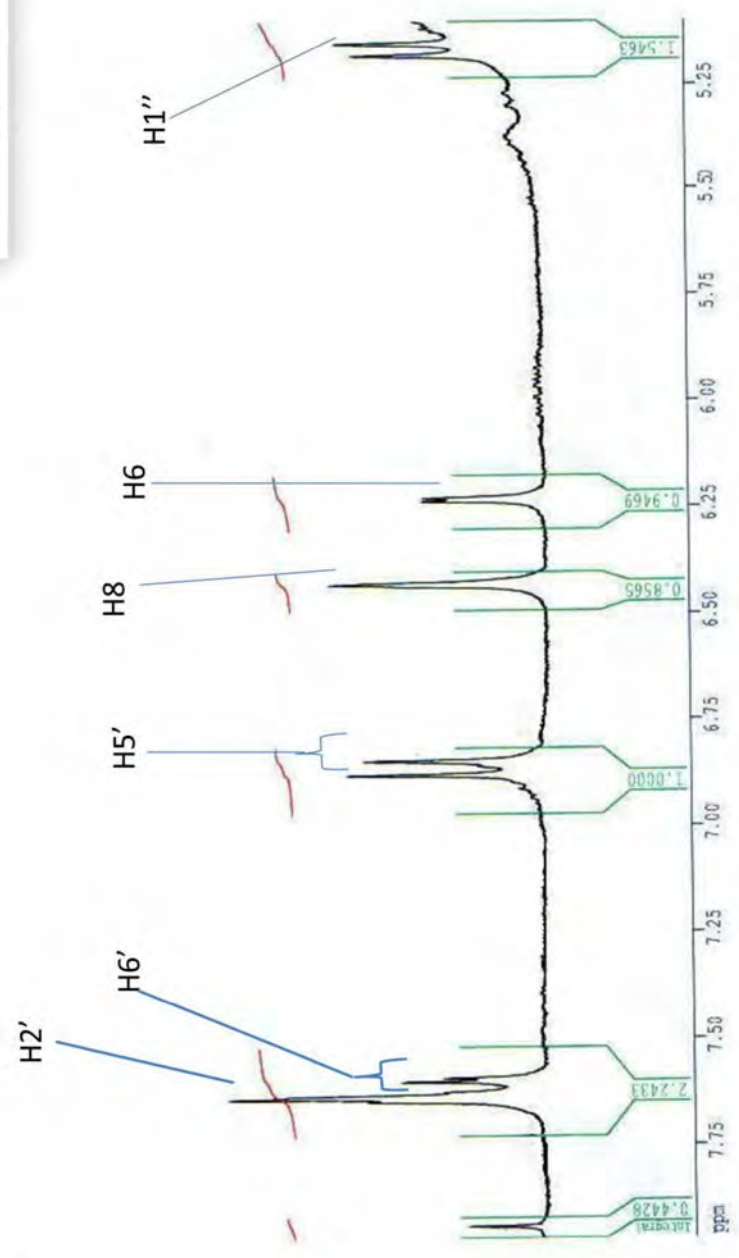
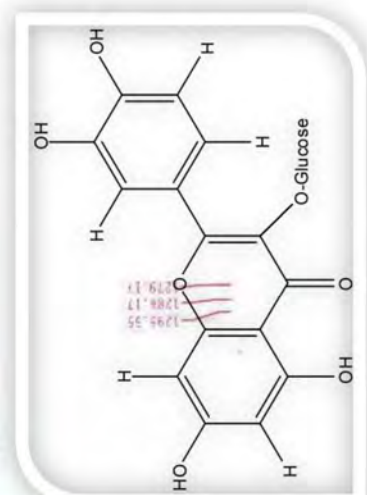
الشكل-15-

Spectre proton :ECH: SBBAT05



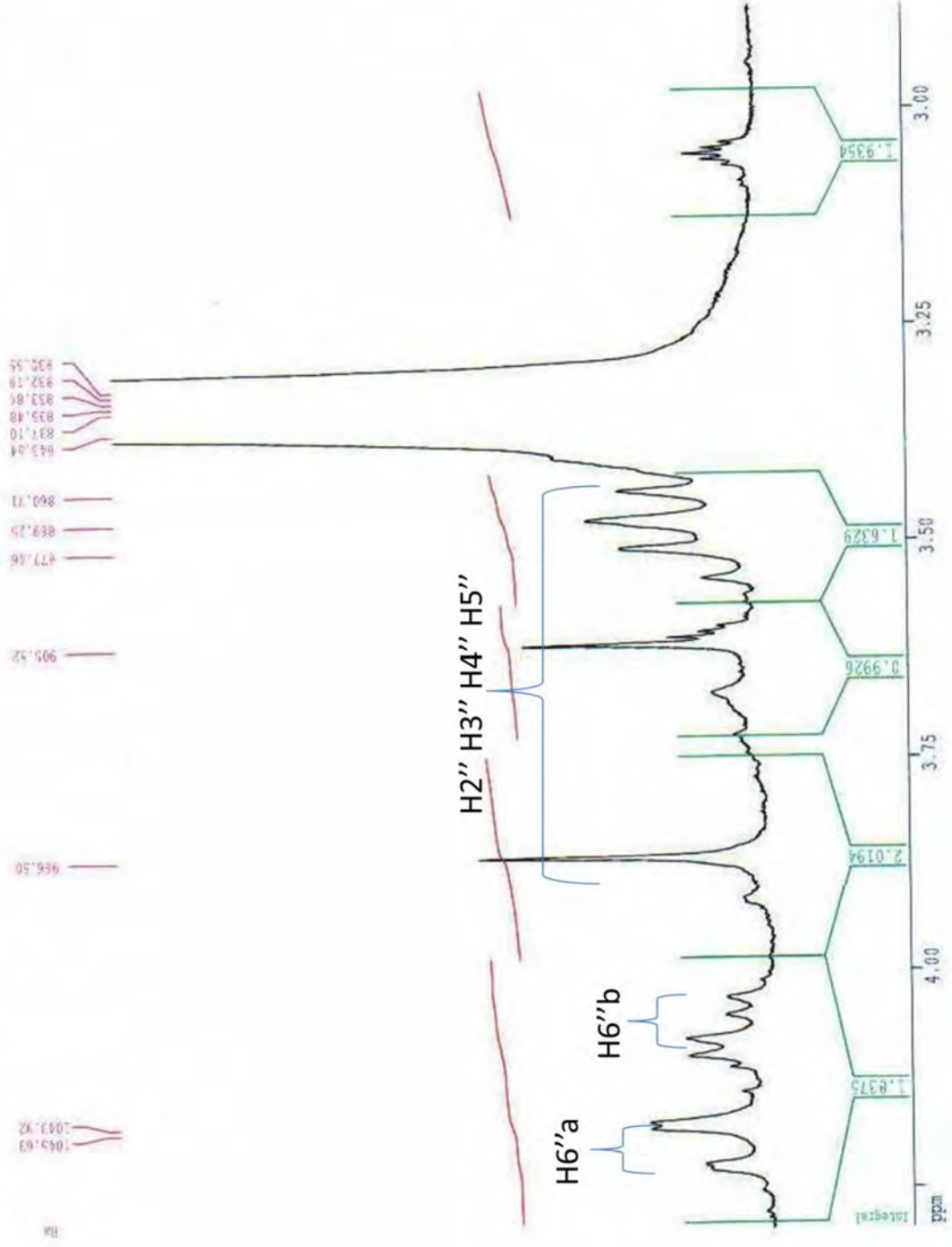
الشكل-16:- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب B_{2/2} (CD₃OD)

Spectre proton :ECH: SBBAT05



الشكل-17:- تمديد طيف ¹H RMN للمركب B_{2/2} في المجال 8-5 ppm

Spectre proton :ECH: SBBAT05



الشكل-18-: تمديد طيف ^1H RMN للمركب $\text{B}_{2/2}$ لبروتونات المستبدل السكري للمركب $\text{B}_{2/2}$ في المجال 4.25-3 ppm

الخاتمة

إن الغاية الرئيسية من هذا البحث هي التعرف على نواتج الأيض الثانوي من الطور
خلات الايثيل لنبات *Mentha arvensis*

خلال إنجازنا لهذا البحث قمنا بدراسة ببليوغرافية عن الفلافونويدات، و عن
الطرق المستخدمة في فصل و تنقية هذه المركبات و الطرق الفيزيو كيميائية لتحديد
بنيتها.

اتبعنا في عملية الفصل جملة من الخطوات ابتداء من الاستخلاص يليه فصل أولي
بواسطة الطبقة الرقيقة التحضيرية بعدها القيام بعملية الفصل باستخدام
كروماتوغرافيا العمود

من أجل التحديد البنوي للمركبات استخدمنا مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و
مطيافية الرنين النووي المغناطيسي.

و قد تم فصل ثلاث مركبات فلافونيدية و تحديد مركبين فلافونيديين هما :

- ❖ 3-O-β -D- glucosyl kaempférol
- ❖ 3-O-β -D-glucosyl quercetine

المراجع

- [1]- Cooper, E. (2004). Drug discovery, CAM and natural products, Evid. based complement altern. med.1, 215-217.
- [2]- Tsao, G.C.I., Zeltzer, L.K., (2005). Complementary and alternative medicine approaches for pediatric pain, a review of the state-of-the-science, Evid. based complement altern med.2.149-159.
- [3]- Bensky, D., Gamble, A. (1993). Chinese herbal medicine, material medica, Revised edition, seattle, W.A., Eastland press, Inc. 13-17.
- [4]- Farnsworth, N.R. and Morris, R.W. (1976). Higher plants-the sleeping giant of drug development, Am. J. pharm. Sci. support public health. 148,46-52.
- [5]- Mills, S.Y.(2002) « ESCOP Research Committee and European Phytotherapy Research Group ». The European Phytojournal, Issue 2.
- [6]- Herbalism, W.)2001(« Clinical Reference, Integrative Medicine Communications ». [www. OneMedicine.com](http://www.OneMedicine.com).
- [7]- Newman and all.(2003). J.Nat.Prod.
- [8]- Tulkens, P. « Les plantes : Découverte des médicaments par criblage de sources naturelles et ethnopharmacologie ».
- [9]- Ozenda, P. (1962), Flore du Sahara. Ed. CNRS, PARIS France.
- [10]- Harborne, J. B. (1989). The flavonoids, advances in research since 1980, eds. Chapman and Hall, New York.
- [11]- Harborne, J.B. (1975). Progress in phytochemistry, V. 5, eds. Swin, T, Pregamon press. Oxford.
- [12]- Melcent, R. (2003). Chimie organique hétérocyclique, eds, EDP sciences.
- [13]- Wollenweber, E., Dietz, V. H. (1980). Biochem. Syst & Ecol. 2, 21.

- [14]-Swain, T. (1982). *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, T. W. Goodwin, ed, Academic press, New York.
- [15]- Guignard, J.L., Cosson, L., Henry, M.J. (1985). *Abrégé de phytochimie*, Paris, New York, Barcelone.
- [16]-Satyajit, D.(2007). *Chemistry for Pharmacy Students*, John Wiley & Sons Ltd, England.
- [17]- Robinson, R. (1936). *Nature*. 137, 1172.
- [18]- Davis, B. D. (1955). *Advanced in Enzymology*. 16, 227.
- [19] Harborne, J. B. (1975). *The flavonoids*, V.2, eds Chapman and Hall, London.
- [20]- Pitshke, L., Grisebach, H. Y. (1965). *Naturforsch*. 20b, 1039-1042
- [21]- Grisebach, H., Barz, W. (1969). *Naturwiss*, 56, 538-544
- [22]- Harborne, J.B. (1964). *Biochemistry of phenolic compounds* Academic press, New York.
- [23]- Richtre, G. (1993), «*Métabolisme des végétaux*» (physiologie et biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- [24]- Ribereau-Gayou, J.B. (1968), «*The phenolic compounds of vegetables*», Dundo, Paris.
- [25]- Jurd, L. (1962). *The chemistry of flavonoid compounds*. Geissman, Peragmon press, New- York
- [26]- Gayon, P. R., (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*, eds, Dunod, Paris
- [27]- Nazemiyeh, H., Shoeb, M., Movahhedine, N., Kumarasamy, Y., Talebpour A.H., Delazar, A., Lutfun, N., Satyajit, D. Sarker. (2000). *Biochem. Syst. And. Ecol*, 34, 721-723
- [28]- Jay, M.(1983). *Z.Naturforsch*, 38c, 413.
- [29]- Harborne, J.B. (1967). *Comparative biochemistry of the flavonoids*.
- [30]- Harborne, J. B. (1980). *The flavonoids*, Academic press. London.
- [31]- Docencia.udea.edu.co/~farmacogfit/Flavonoides/D_main.html - 3k
- [32]- MARFAK, A.G. (2003). *Thèse de doctorat*, Université de Limoges.
- [33]- Mc.Lure, J.W. (1975) In «*Physiology and Function of flavonoids*» (Harborne, J.B. eds)

Chapman and Hall. London, 970-1055.

[34]- Wollenweber, E., Dietz, V.H. (1980). *Biochemical Systematics and ecology*. 8, 21.

[35]- Halliwell, B. (1994). *Nutr. Rev.* 52, 253-265

[36]- Pietta, P. G. (2000). *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042

[37]- Dugas, A. J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G. C., Price, K. L., Fischer, N.H, Winston, G.W. (2000). *J. Nat. Prod.* 63: 327-31.

[38]- Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van

Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). *Free Rad. Biol. Med.* 20, 331-342.

[39]- Ferraro, G. E. (1983). *Acta farm. Bonaerense*, 2, 97-103.

[40]- Middleton, E. J. R., Kandaswami, C. (1992). *Biochem. Pharmacol.* 43,1167.

[41]- Elber, G., Wanger, H. (1992). *Planta med.* 57, 137.

[42]- Ruzicka, L. (1959). *Proc. Chem. Soc.*, 541.

[43]- Bruneton, J. (1997). *Pharmacognosie et phytochimie des plantes medicinales*,

eds Technique et documentation, Paris, 3^{ème} edition, Lavoisier.

[44]- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie et phytochimie des plantes medicinales*,

eds Technique et documentation, Paris, 2^{ème} edition, Lavoisier.

[45]- Arnold, J. V., Roger, A. (1985). *Advances in medicinal plant research*, eds,

Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft mbH, Stuttgart.

[46]- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). *Free Radic. Biol. Med.* 16, 845-850.

[47]- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van-Poel, B., Pieters, L.,

Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D. (1998). *J. Nat. Prod.* 61, 71-76.

[48]- Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B. (1996), *Food Chem.* 57, 43-46.

[49]- Wang, J., Mazza G. (2002), *J. Agric. Food Chem.* 50, 4183-4189.

[50]- Samejima, K., Kanazawa, K. Ashida, H. Danno, G. (1995), *Journal of Agricultural and*

Food Chemistry, 43, 410-414.

[51]- Abd Elchakour, A. S. (1987). *Chimie organique moderne et pratique*. Université du Roi

Abd Elaziz, Djedda, 173.

- [52]- Anderson, R. A., Sowers, J. (1968). *phytochemistry*, 7, 293.
- [53]- Andersen Øyvind, M., Markham, Kenneth, R. (2006). *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*. CRC Press Taylor & Francis Group.
- [54]- Francisco, A., Tomas-Barberan, F. (1990). High performance liquid chromatography, thin layer chromatography and ultra violet behaviour of flavone aglycone with unsubstituted rings . *Phytochemistry. Anal. I*, 44.
- [55]- Combier, H., Jay, M., Voirin, B., Lebreton, P.(1974). Influence des 6 et /ou des 8- substitutions sur le comportement spectrométrique et chromatographique des flavonoides. Assemblée annuelle du « Groupe poly- phénols ». Lyon, France.
- [56]- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M.B.(1970). *The systematic identification of flavonoids*. Springer- Verlag, Berlin
- [57]- Vernin, G. (1970), *La chromatographie en couche mince, Techniques et application en chimie organiques*, Dunod, Paris.
- [58]- Markham, K.R.(1982). *Techniques of flavonoids identification*. Academic press. London.
- [59]- Alain, B.(1972). *La chromatographie et ses applications*. Dunod, Paris.
- [60]- Harborne J.B. (1988).*The flavonoids, Advances in research since (1980)*. Chapman & Hall. London
- [61]- Jurd, L. (1962). *The chemistry of flavonoids compounds*. Pergamon press, New – York.
- [62]- Jay, M., Gonnet, J. F., Wollenweber, E., Voirin, B. (1975). *Phytochemistry*, 14, 1605.
- [63]- Voirin, B. (1983). *Phytochemistry*. 22, 2107
- [64]- Elhazemi, H. (1995). *Natural products*, eds University of King Saoud.
- [65]- Jurd, L., Horowitz, R. (1962). *Spectral properties of flavonoid compounds*, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- [66]- El hazimi, H. (1995). *Natural product*, 149-190
- [67]- Harborne, J. B. Swain, T. (1969). *Perspectives in phytochemistry*. Academic press. London

- [68]- Bacon, J.D., Mabry, T. A. (1976)." Rev. Latinoamer, Quim".UV Spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavanols, 7,83-86.
- [69]- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2007). Identification spectrométrique de composés organiques, ed.2, De Boeck Université.
- [70]- Markham, K. R. , Geiger, H. (1994). The flavonoids, edited by Harborne, J. B., Chapman and Hall, London.
- [71]- Markham, K.R., Mabry, T.J. (1975). In The flavonoids (Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H.eds), p.45, Chapman and Hall . London.
- [72]- Harowitz, R. M., Gentili, B., (1966). Chem. Ind., Londo, 625.
- [73]- Markham, K. R., Tenai, B., Geiger, H., Mabry, T. J. (1978)" Tetrahedron" Carbon-13 NMR.Studies of flavonoids III., 34,1389-1397.
- [74]- Audier, H. (1966). Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
- [75]- Cuyckens, F., Claeys, M. (2004)." Journal of Mass Spectrometry"
Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, 39, 1-15.
- [76]- Zararka, T.C. (1994) « Méthodes spectroscopique d'analyse chimique » .O.P.U
- [77]- Markham, R. (1995). Les facteurs anti –nutritionnels (F.A.N) phénoliques de *Pisum sativum* et de *Vicia faba* (Leguminosae) : Aspects structuraux. Thèse de doctorat, univ. Claude Bernard, Lyon I.
- [78]- Voirin, B. (1970).Thèse de doctorat, université de Lyon.
- [79]- Gonnet, J.F. (1973). A propos de la photographie en couleur de chromatographie sur couches minces en lumière de Wood. J. of cromato. 86, 192
- [80]-Tochio, I., Yuko, S., Hideki, M., chiaki, K. (2002). Biol pharm bull, 25, 256-258.
- [81]-Jäger, A. K., Almqvist, J. P., Vansøe, S. A. K., Stafford, G. I., Adersen, A., Vanstaden, J. (2007). South African journal of botany, 73, 518-521.
- [82]-Sharaf, M., El-ansari, M. A., Saleh, N. A.M. (1999). Fitoterapia, 70, 478-482.
- [83]-Voirin, B., Bayet, C., Faure, O., Jullien, F. (1999). Phytochemistry, 50, 1189-1193.
- [84]-El-Desoky, S.K., El-ansari, M. A., El-Negoumy, S.I. (2001). Fitoterapia, 72, 532-537.
- [85]-Janićijević, J., Tošić, S., Mitrović, T. (2007). flavonoid in plant serbia, 01-03.

[86]-Akroum, S., Bendjaddou, D., Satta, D., Laloui, K. (2009). Americane_rasian journal of scientific research, 4,93-96.

المخلص

هدفنا الرئيسي من هذا البحث هو فصل وتحديد منتجات الأيض الفلافونيدي لطور خلايا الايثيل للنبذة *Mentha arvensis* التي تنتمي إلى العائلة الشفوية، وقد تمكنا من فصل مركبين فلافونيديين باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM كروماتوغرافيا العمود CC، كروماتوغرافيا الورق CP)، و باستعمال الإماهة الحمضية و مختلف الطرق الفيزيوكيميائية من مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ^1H RMN تم تحديد بنى المركبات المفصلة:

- ❖ 3-O- β D glucosyl kaempférol
- ❖ 3-O- β D glucosyl quercetine

Résumé

L'objectif principal de ce travail est d'identifier des métabolites secondaires (flavonoïdes) de la plante *Mentha arvensis* appartenant à la famille de Lamiaceae (Labiées).

L'utilisation des différentes méthodes de séparation chromatographiques (, colonne, papier couche mince) a permis d'isoler deux composés flavonique, et grâce à l'hydrolyse acide et aux méthodes spectroscopiques usuelles (UV et RMN ^1H), les structures de ces flavonoïdes ont été établies comme suivant :

- ❖ 3-O- β D glucosyl kaempférol
- ❖ 3-O- β D glucosyl quercetine

Abstract

The principal aim of the present work consisted to identify the secondary metabolites (flavonoids) of *Mentha arvensis* belonging to the Lamiaceae family.

The use of the different chromatographic methods (thin layer, column, paper) permitted the isolation of two flavonoids and with using acid hydrolysis and usual spectroscopic methods (UV, ^1H NMR), the structures of this compounds were established as:

- ❖ 3-O- β D glucosyl kaempférol
- ❖ 3-O- β D glucosyl quercetine