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

كلية العلوم الدقيقة **قسم الكيمياء**
رقم الترتيب: .....
رقم التسلسل:.....

مذكرة
مقدمة لنيل شهادة الماجستير في العلوم
تخصص تحاليل فيزيوكيميائية وكيمياء عضوية
تحت عنوان:

فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي لنبتة

Ononis angustissima. (Fabaceae) *لطور خلات الإيثيل*

تقديم الطالب : مزراق عبدالرحمان تحت إشراف الدكتور : بوهروم محمد

لجنة المناقشة:

الدكتورة	**فضيلة بن عياش**	**أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة**	**رئيستا**
الدكتور	**محمد بوهروم**	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**مقررا**
الدكتور	**سمير بن عياش**	**أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**
الدكتور	**نور الدين بغيجة**	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**
الدكتور	**لحسن زعيتر**	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**

2010

الإهداء

إلى من كان خلقه القرآن ، سيدي وحبيبي وقرة عيني ،

"**رسول الله محمد صلىّ الله عليه وسلّم** "

إلى اللذين أخذا بيدي ووفرا لي سبيل التعلم وكانا لي الوجه الطافح حبا وحنانا،

"**والداي الكريمين** "

إلى من تتلمذت على أياذيهم ,وإلى من أمدوني بنصائحهم,وتوجيهاتهم,

" أساتذتي "

إلى من كانوا لي حشدا لهمتي كلما رأوا ضجرا أو توان مني في بحثي ,

"إخوتي "

إلى كل أفراد دفعتي دون إستثناء ,

و إلى السيد أحمد عبد الرحيم يحياوي ,

إلى كل هؤلاء أهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع .

تشكرات

الحمد لله الذي علم بالقلم، علم الإنسان ما لم يعلم، و الصلاة و السلام على معلم البشر، و على أله و صحبه أجمعين.

أولا و قبل كل شيء أتقدم بأسمى عبارات الشكر و الامتنان و التقدير إلى من يعجز لساني عن إيجاد العبارات المناسبة لشكره، إلى من سدد خطاي و أنار طريقي، إلى واهبي الحياة، إلى ربي، ربي العزة جلّ جلاله.

أتقدم بالشكر و الثناء و العرفان للأستاذ **سمير بن عياش** على التوجيهات و النصائح التي قدمها إلي خلال كل مراحل إنجاز هذا العمل الذي تم بمخبر " تثمين الثروات الطبيعية ذات الأصل النباتي واصطناع الجزيئات الفعالة بيولوجيا " بقسم الكيمياء جامعة منتوري قسنطينة .

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

و أتقدم بالشكر الجزيل إلى الأستاذ الغالي **بوهروم محمد** ، الذي لم يبخل علي بتوجيهاته و نصائحه القيمة و الثمينة طوال مراحل إنجازنا لهذا العمل.

كذلك أتوجه بشكري إلى الأستاذ **بغيجة نورالدين** و الأستاذ **زعيتر لحسن** على قبولهما المشاركة في لجنة المناقشة.

كما أتقدم بالشكر الخالص إلى جميع أفراد مخبرنا على ما قدموه لي من نصائح و مساعدات، خاصة بلوم زهية , وهيبة بن عيسى ، صغيري رمضان ، دون أن أنسى الذين أعتبرهم بمثابة اخوتي و أخواتي الأعزاء أفراد دفعتي محمد, سهام ,رضوان, فيروز, لبيب مجدة, عمار, سميرة, فريد ,سيف الدين,حنان, لويزة و أتمنى لهم جميعا كل التوفيق و النجاح.

كما لا أنسى كل من ساعدني من قريب أو بعيد.

الفهرس

المقدمة.....1
المراجع.....4

الفصل الأول: المركبات الفلافونيدية

I – الفلافونيدات.....6
II – الاصطناع الحيوي للفلافونيدات.....7
II –1- طريق الشيكيميك.....7
II – 2- طريق الخلات.....10
II – 3- طريق الشالكون.....10
III –الاصطناع المخبري.....13
III –1 - تصنيع الشالكون.....13
III – 2- تصنيع ثنائي هيدرو شالكون.....14
III – 3- تصنيع الفلافونول و الأورون.....15
III – 4- تصنيع الأورون.....15
IV – تثبيت المجموعات الإستبدالية على الهيكل الفلافونيدي.....16
IV –1- تثبيت مجموعة الهيدروكسيل.....16
IV –2- تثبيت مجموعة الميثيل.....16
IV –3- تثبيت السكريات.....18
V – أقسام الفلافونيدات 19
VI – أهمية الفلافونيدات 24
VI–1- دورها الفيسيولوجي.....24
VI–2 دورها البيولوجي و العلاجي.....24
VII–3- خواص الفلافونيدات المضادة للأكسدة.....25
VIII–الفلافونيدات المعزولة من الجنس*Ononis*.....27
المراجع.....33

الفصل الثاني: طرق دراسة المركبات الفلافونيدية

I – عملية الإستخلاص.....37

II – طرق الفصل.....40

II – 1- كروماتوغرافيا العمود(CC).....40

II – 2- كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (CP).....41

II –3- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(CCM).....42

II –4 - كروماتوغرافية نظام السائل عالي الآداء(HPLC).....45

III –التنقية.....45

III –1 - التنقية على عمود من متعدد الأميدSC_6 45

III –2 - التنقية على عمود من السيفاداكس.....45

IV– التحديد البنيوي للفلافونويدات.....45

IV–1- الخواص الكروماتوغرافية.....45

IV–1-1- معامل الإنحباس R_f.....45

IV–1-2- اللون الإستشعاعي.....48

IV–2 - طرق التحليل الفيزيوكيميائية 48

IV–2-1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV.....48

IV -2-1- أ- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV للشالكونات و الاورونات.....48

IV -2-1- أ-1- طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي.....49

IV -2-1- أ-2- طيف الامتصاص في وجود NaOH أو NaOMe.....52

IV -2-1- أ-3- طيف الامتصاص في وجود NaOAc 52

IV -2-1- أ-4- طيف الامتصاص في وجود $NaOAc + H_3BO_3$ 52

IV -2-1- أ-5- طيف الامتصاص في وجود $AlCl_3$ و $AlCl_3$+HCl.....54

IV–2-2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسيRMN.....58

IV–2-2- أ- مطيافية الرنين النووي المغناطيسيRMN-^1H.....58

IV–2-2- ب- مطيافية الرنين النووي المغناطيسيRM-^{13}C.....61

IV–2-3- مطيافية الكتلة.....63

IV–2-3- أ- تقنية القذف الإلكتروني (EI).....63
IV–2-3- ب- تقنية القذف السريع بالذرات (F.A.B).....68
IV–2-3- ج- تقنية الرش الإلكتروني.....68
V- الإماهة الحمضية.....68
V-1-الطريقة العملية.....69
V-2-تحضير العينة.....70
المراجع.....71

الفصل الثالث: الدراسة النباتية و الكيميائية للنبتة

I – الدراسة النباتية للنبتة 74
I –1- المادة النباتية 74
I – 2- وصف النبتة 74
I – 3- الوضع ضمن التصنيف النباتي 75
II–الدراسة الكيميائية للنبتة.....75
II –1 - استخلاص النبتة 75
II – 2- الفصل و التنقية 78
II – 3- معالجة الكسور المتحصل عليها 82

الفصل الرابع : النتائج والمناقشة

I- التحليل البنيوي للمركب F-2.....85
II- التحليل البنيوي للمركب F9-1.....96
III- التحليل البنيوي للمركب F9-2.....105
IV- التحليل البنيوي للمركب F-C1..... 115
الخاتمة.....129
الملخص.....

المقــدمة :

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

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

مع تطور الكيمياء و الطب المعاصر أعتمد على التداوي بالعقاقير والأدوية المصنعة [5] و قد اعتقد الكثيرون أن هذه الأدوية المصنعة سوف تحل محل النباتات الطبية المستعملة في الطب والطب الشعبي، وكان من المتوقع أن يتراجع المرض أمام هذه الثورة الكاسحة في علم العقاقير ، لكن الذي حدث هو العكس تماما ، فقد عرف الإنسان الحديث أمراضا لم تكن معروفة أو منتشرة من قبل ، بل دخل عصر الأمراض المزمنة ، ويرجع ذلك إلى التقدم الرهيب في علم الكيمياء العضوية التي أدخلت مواد كيميائية في جميع ميادين الحياة ، ولوثت بيئة الإنسان ، وبالتالي أثرت عل صحته وقوته ، ومناعته في مقاومة الأمراض ، كذلك فان الأدوية المصنعة ما زال الكثير منها يفتقر إلى معلومات أوفى ، ومازال البحث العلمي يحمل لنا الكثير من الآثار الجانبية الضارة لبعض الأدوية المصنعة ، إما بسبب نقصان المعرفة عنها وإما لأنها مواد كيميائية مركزة ، تم تحضيرها في المعمل تحت ظروف تفاعلات كيميائية قاسية ، بينما أبت حكمة الخالق عز وجل إلا أن تجعل هذه المواد الفاعلة في النباتات بتركيزات مخفضة سهلة ، يمكن للجسم البشري التفاعل معها برفق في صورتها الطبيعية.

و ثبت أن استخدام الأدوية الصناعية قد يسبب آثارا جانبية ضارة، كما أوصت المؤتمرات الدولية بالعودة إلى الطبيعة أي إلى النباتات الطبية والاهتمام بها بصفتها مصدر آمن لصناعة الأدوية.
ولقد قال أبو قراط منذ 4500 عام (ليكن غذاؤك دواءك ، وعالجوا كل مريض بنبات أرضه ، فهي أجلب لشفائه).

لدى الأقطار العربية (لإتساع رقعتها واعتدال جوها) ثروة طبيعية وأخرى اقتصادية هائلة من الأعشاب الطبية والعطرية ، استخدمها قدماء المصريين والعرب من قديم الزمان ، ويشهد على ذلك ما دونه المصريون في برديا تهم ، والعرب في مذكراتهم وموسوعاتهم عن النباتات الطبية ، وكذلك ما تحويه أسواق العطارين من الأعشاب والثمار والبذور التي يستخدمها العامة في علاج أمراضهم ، وما يزال تجار العطارة يستخدمون موسوعة ابن سيناء وغيرهما من كتب علماء العرب لعلاج المرضى الذين ما يزالون يؤمنون بالعطارة وذخيرته.

ولا يتسع المجال هنا لذكر فضل المصريين القدماء والعرب على الطب والعقاقير والتداوي بها ، والمصريون أول من استخدم زيت الحلبة لإزالة تجاعيد الوجه ، وزيت الخروع لعلاج الإمساك ، ودهانا للشعر ، وأول من استخدم الخشخاش لعلاج التهاب الأمعاء ، وتسكين الآلام، والنعناع والمر لعلاج القروح والالتهابات الجلدية والاضطرابات المعوية وقشر الرمان لطرد الديدان والحنظل لعلاج الإسهال وطرد الديدان .

من هنا وقع اختيارنا على العائلة البقولية لدراستها إذ تعتبر من أرقي العائلات النباتية حيث أنها تضم ما يقارب 700 جنس و 1700 نوع. لها أهمية اقتصادية كبيرة حيث تعتبر ثالث اكبر عائلة زهرية غنية بالفلافونويات . و من أشهر أنواعها نباتات السنط و السلم و االلبح و السنامكي و الفول و البازلا و الحمص و عرق السوس ....إلخ . وهي تمثل عدد كبير من الأجناس ندكر منها جنس *Acacia ,Alibizia ,Bauhinia, Ceratonia , Cercis, Colivillea, Erythrina, Gliricidia, .Labumum, Maackia, Ougeinia, Ononis ,*

نركز اهتمامنا في هذا البحث على فصيلة البقوليات (*Fabaceae*) الذي يضم الجنس ***ononis*** والذي يشتهر بالمركبات الفلافونيدية . يبدو أن الفلافونيدات لها دورا مهما في التداوي من أمراض القلب و الأوردة, يمكن أن تتفاعل مع الكثير من أنواع المتفاعلات الأكسيجينية. [6, 7]

تعتبر الفلافونيدات مركبات فعالة ضد السرطان و الضغط و غيرها, من جهة و تعتبرهذه عائلة *Fabaceae* غنية بمثل هذه المركبات . و مالدراسة السابقة لها لدليل على ذلك بحيث أربع فلافونات قد فصلت منها في هذا المخبر" مخبر تثمين الثروات الطبيعية ذات الأصل النباتي واصطناع المركبات الفعالة بيولوجيا " بقسم الكيمياء جامعة منتوري قسنطينة [8].

و قد تم تقسيم هذه الرسالة إلى أربعة فصول و خاتمة:

- في الفصل الأول تمت فيه دراسة المركبات الفلافونيدية.
- في الفصل الثاني تمت فيه دراسة طرق فصل و دراسة المركبات الفلافونيدية.
- في الفصل الثالث تمت فيه الدراسة النباتية والكميائية للنبتة.
- في الفصل الرابع وضعت فيه النتائج المتحصل عليها متبوعة بتحديد الصيغ البنيوية للمركبات المفصولة بإستعمال الطرق الطيفية (UV ,RMN)
- و أخيرا الخاتمة: قيمنا فيه نتائج هذا البحث.

المراجع

[1] Cooper, E. (2004). Evid. based complement altern. med.1, 215-217.

[2] Tsao, G. C. I., Zeltzer, L. K. (2005). Evid. based complement altern med.2, 149-159.

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

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

[5] Farnsworth, N. R., Morris, R.W. (1976). Am. J. pharm. Sci. support public health. 148, 46-52.

[6] Remesy, C., Manach, C., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F. (1998), « Polyphenols 96», Edition INRA, Paris, 251-265.

[7] Erlund, I. (2004). Nutrition Research, 24, 851–874.

[8] Bouheroum, M., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Bermejo, J. B., Leon, F., Garcia, V. (2009). Chemistry of Natural Compounds, 45, 6.

الفصل الأول

المركبـــــــات الفلافونـــويديـــــة

I – الفلافونيدات:

- **تعريفها:**

هي عبارة عن مركبات طبيعية من ناتج الأيض الثانوي، و هي صبغات نباتية تتواجد في مختلف أجزاء النبتة (جذور، أوراق، أزهار).

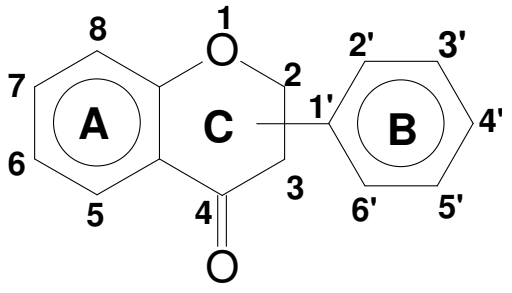
أشتق إسمها من flavus التي تعني أصفر في اللاتينية، وهو المصطلح العام لمجموعة كبيرة من المركبات الفينولية التي عرفت لأول مرة من قبل العالم "Albert Szent-györgyi"

و الذي صنفها على أساس أنها فيتامين P [1] ، حيث تتواجد بتراكيز عالية في القسم الهوائي للنبات. توجد في معظم الأصناف النباتية خاصة الراقية منها، و هي واسعة الانتشار عند كاسيات البذور، متوسطة الحضور عند عاريات البذور و شبه منعدمة عند الطحالب[2] كما وجدت عند الحزازيات[3]، كذلك عند نباتات أحادية الفلقة، و تعتبر كأداة تشخيصية لذوات الفلقتين[2].

كما تتواجد على مستوى الخلية النباتية في صورة إيتروزيدات دوابة في الماء متمركزة في حويصلة الخلية أما الفلافونيدات التي تنحل في المذيبات غير القطبية (كالفلافونيدات عديدة الميتوكسيل) فتتواجد في سيتوبلازما الخلية [4] ، وتتوضع الفلافونيدات حالة وجودها في صورة أجليكونات (aglycones) على الأنسجة السطحية للأوراق حيث تكون ملازمة لمواد مفرزة هي الأخرى ليبوفيلية وهو حال نباتات المناطق الجافة و شبه الجافة[5] ، و عموما توجد أغلب الفلافونيدات في النباتات بشكل محمي (إيتروزيدات) بينما توجد الأجليكونات في الأنسجة النباتية الميتة (نتيجة التميه الحمضي المحفز بواسطة الإنزيمات) و كدلك في خشب الأشجار.[4]

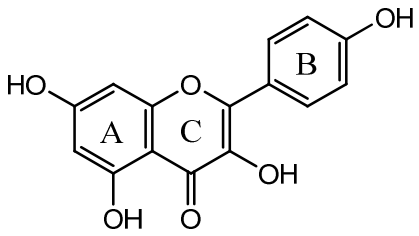
جميع الفلافونيدات تحتوي على 15 ذرة كربون و ذلك في هيكلها الأساسي موزعة على الشكل C_6-C_3-C_6 بحيث تتصل حلقتا البنزين "A" و "B" بحلقة غير متجانسة "C" تحتوي على عنصر الأكسجين.[4]

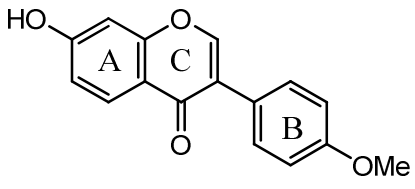
الشكل –1– يبين الهيكل العام للفلافونيدات.



شكل - 1 -

كما أن هناك منتجات طبيعية وثيقة الصلة بالتركيب البنائي للفلافونات وهي الإيزوفلافونات مثل : (Formononetine) كما في الشكل(2) أدناه ، و فلافونويدات سلفاتية وهي عبارة عن مركبات إستر سولفاتي للعديد من هيدروكسيلات الفلافون أوالفلافونول(kaempferole) أو مثيلاتهم الإيثيرية ، وهي أقل إنتشارا في الطبيعة بخلاف الفلافونات و الفلافونولات المنتشرة على نطاق واسع. [6]





Kaempferole Formononetine

شكل - 2 –

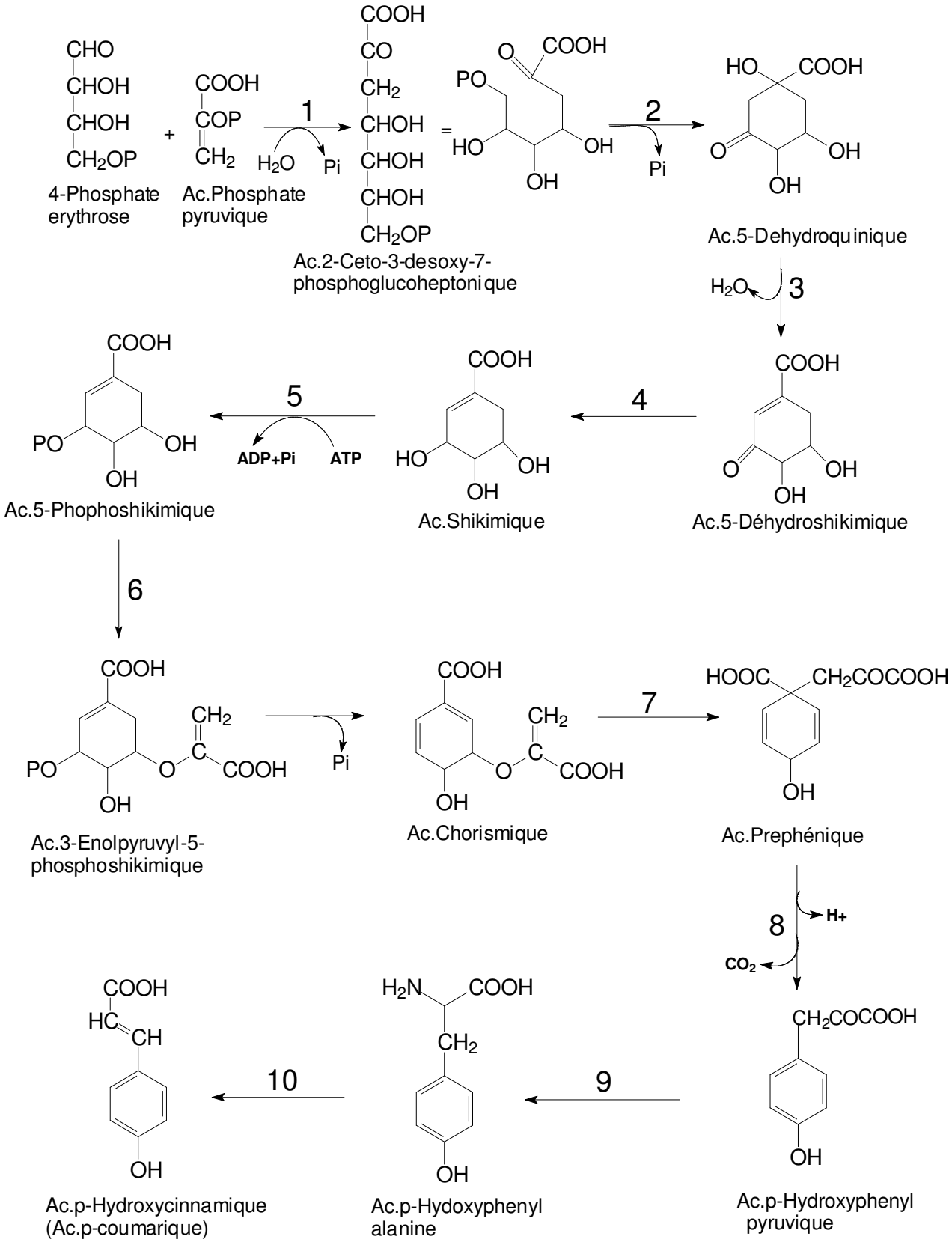
II – الاصطناع الحيوي للفلافونيدات:

تعتمد الخلية في اصطناع منتجاتها الطبيعية على مجموعة من الوحدات الأساسية، كالماء و ثاني أكسيد الكربون، حمض النمل، و حمض الخل عبر تفاعلات الأكسدة، الاختزال، الألكلة، الأسيلة.....الـــخ. و يتم ذلك بوجود إنزيمات خاصة لذلك.

حيث انه تم إجراء تجارب عديدة و ذلك باستعمال النظائر الموسومة بـــ ^{14}C المـــشع، فقـــد لاحـــظ الباحث " Robinson " سنة 1936 [7] أن النواتين البنزينية للمركبات الفلافونيدية لـــيس لهمـــا نفـــس الأصل الوراثي الحيوي و عليه فإن عملية الاصطناع الحيوي تتم خلال ثلاثة طرق:

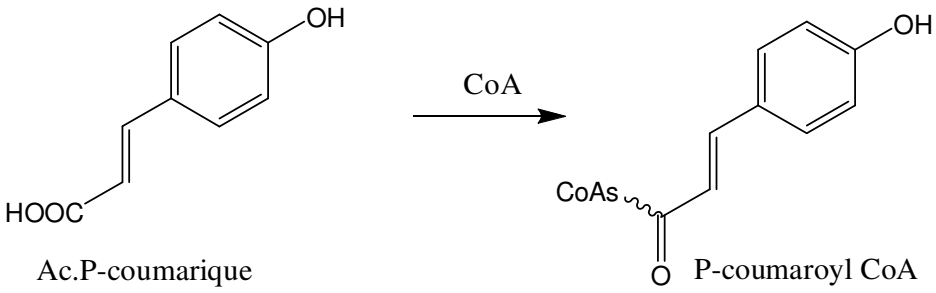
II – 1– طريق الشيكيميك:

و هي المرحلة الأولى حيث أن الباحث " Davis " أثبت سنة 1955 [8] دور حمض الـــشيكيميك فـــي تكوين الحلقـــة B و كذلك السلسلة الكربونية الثلاثية C_3 و ذلك بدءا بالغلوكوز، كما هو مبـــين فـــي الشكل – 3– :



شكل- 3- تشكيل Ac.P-Coumarique انطلاقا من الغلوكوز مرورا بحمض الشيكيميك

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



Ac.P-coumarique P-coumaroyl CoA

شكل -4-

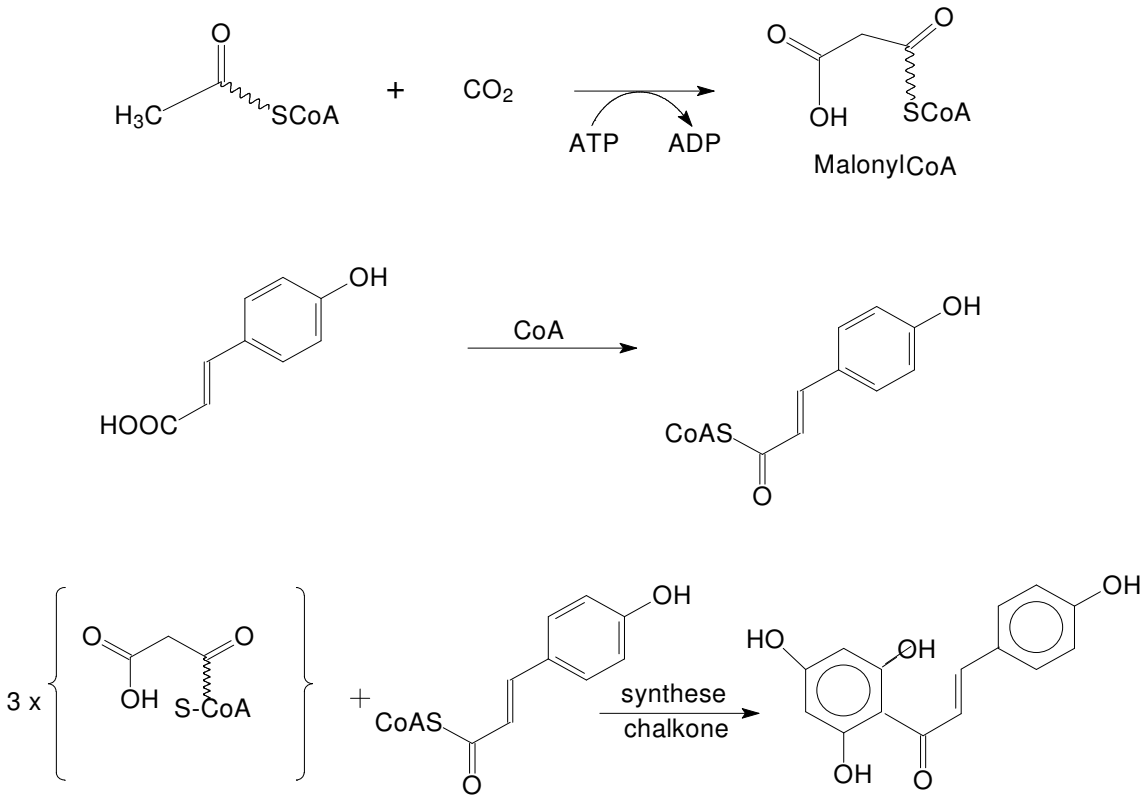
جدول -1- قائمة الإنزيمات الداخلة في تكوين حمض Ac.p-Coumarique

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

جدول -1- الإنزيمات الداخلة في تكوين حمض Ac.p-Coumarique

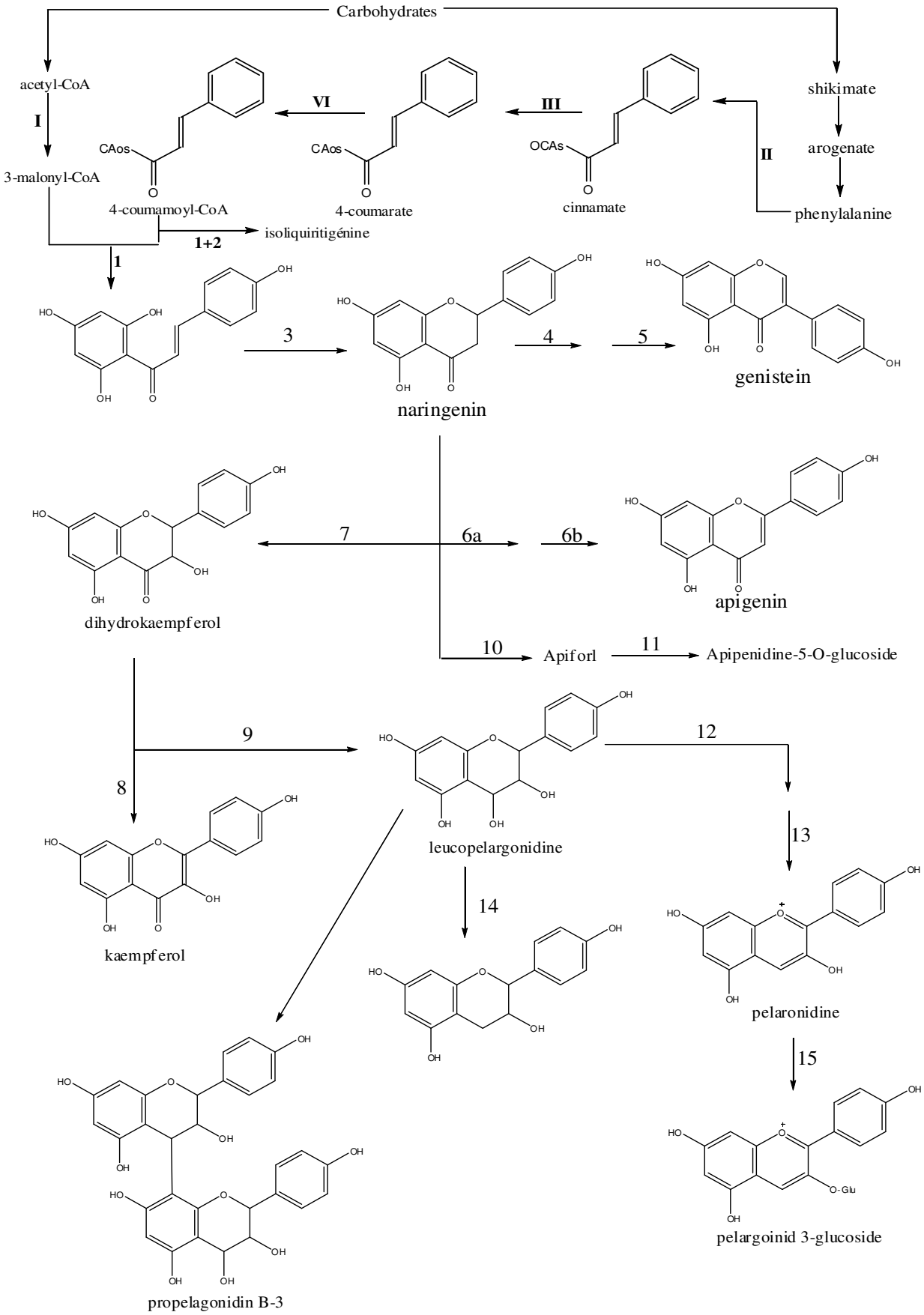
II- 2- طريق الخلات:

الحلقة A تتشكل من تكاثف رأس – ذيل لثلاث وحدات من الخلات على شكل Malonyl-CoA مع حمض Ac.P-Coumarique. الشكل رقم- 5-. [4-6-7]



الشكل – 5- تكوين الشالكون

II- 3- طريق الشالكون: و هي المرحلة الثالثة، حيث يعتبر الشالكون النواة الرئيسية التي تنحدر منها مختلف الهياكل الفلافونويدية



الشكل –6– الإصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية انطلاقا من الشالكون

الجدول – 2- يبين قائمة الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوى :

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

الجدول – 2- الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوى

III- الاصطناع المخبري: [2]

III- 1- تصنيع الشالكــون:[2]

يمكننا الحصول على الشالكونات و ذلك بالتكاثف الألدولي لـــ :

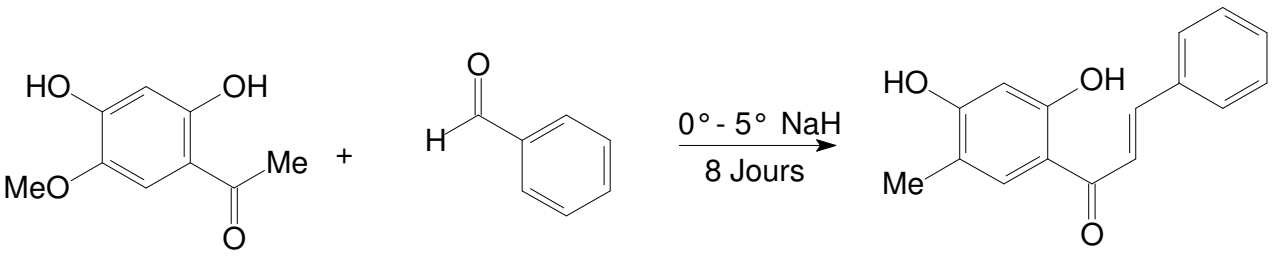
2-hydroxyacetophenone مع المشتقات البنزينية الألدهيدية (benzenaldehydes) و ذلك في الوســـط الحمضي أو القاعدي.

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 فـــي حالة وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4 بالنسبة للشالكون.

التفاعل في الوسط القاعدي يتطلب الشروط التالية:

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

و قد لوحظ أن انعدام مجموعات المثيل يؤدي إلى مردود جيد حسب الشكل 7 .

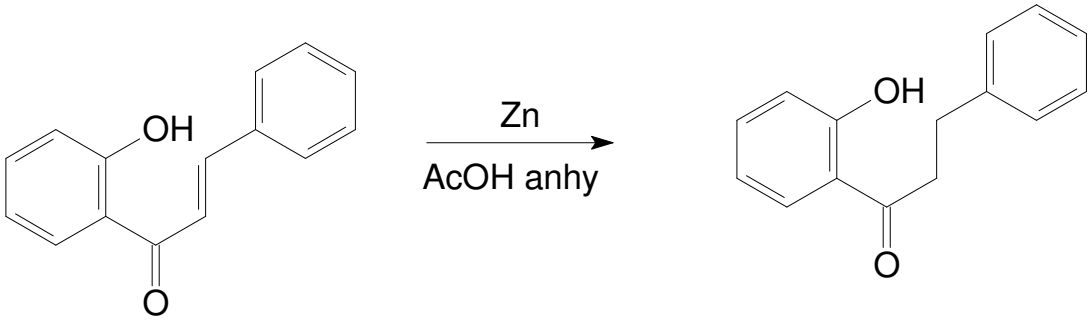


الشكل – 7–

من أجل الحصول على الشالكونات ذات مجموعات المثيل 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.

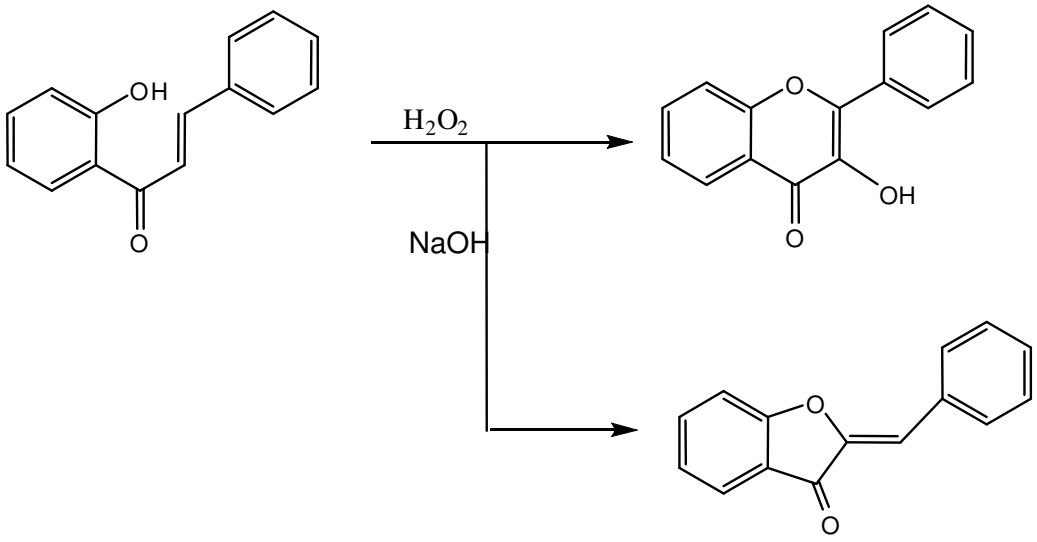
III-2- تصنيع ثنائي هيدروشالكون:[2]

نتحصل على ثنائي هيدروشالكون وذلك من تكاثف الفينولات مع مشتقات حمض ثنائي هيدرو سيناميك (acide dihydrocinnamique) أو بهدرجة الشالكون أو الفلافانون حسب الشكل 8.



الشكل - 8-

III- 3- تصنيع الفلافونول و الأورون:[2]



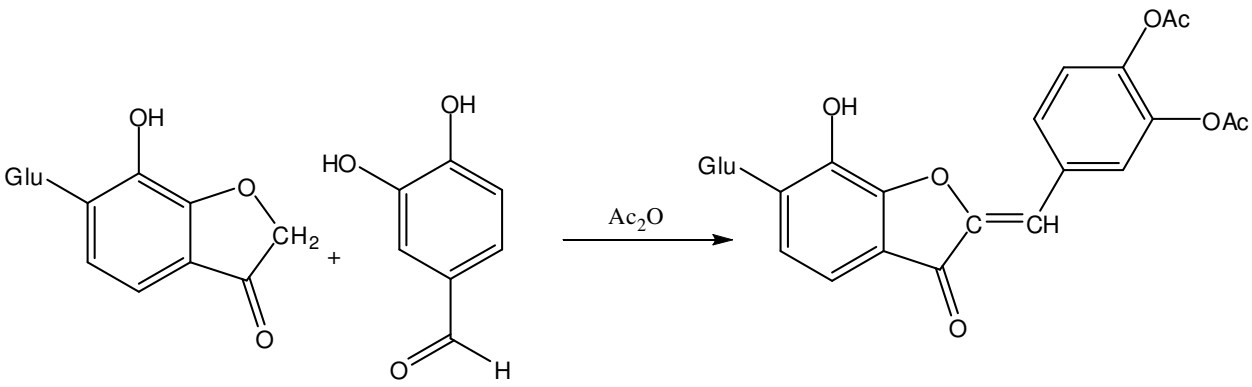
الشكل - 9-

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 ميتوكسيل في الموضع 6´ فإن مردود التفاعل يزيد باتجاه الحصول على الفلافونول المطلوب.

الشروط المثالية: H_2O_2 5% - 30%، NaOH 20%

III-4- تصنيع الأورون: [2]

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.



الشكل – 10–

IV –تثبيت المجموعات الإستبدالية على الهيكل الفلافونيدي:

إن تثبيت مجموعات الهيدروكسيل, الميتوكسيل أو السكر, بصورة عامة يتم عند نهاية الاصطناع الحيوي للفلافونيدات لأن عملية تثبيت هذه المجموعات تؤثر في بعض الفلافونيدات ولا تؤثر على البعض الآخر[9] .

IV–1–تثبيت مجموعة الهيدروكسيل : [10]

إن تثبيت المجموعات الهيدروكسيلية في الموضعين 5 و 7 يتم قبل تشكيل الحلقة A ، و لهذا فهي تعتبر مجموعات أصلية، نفس الأمر بالنسبة لهيدروكسيل الموقع 4 للحلقة B .

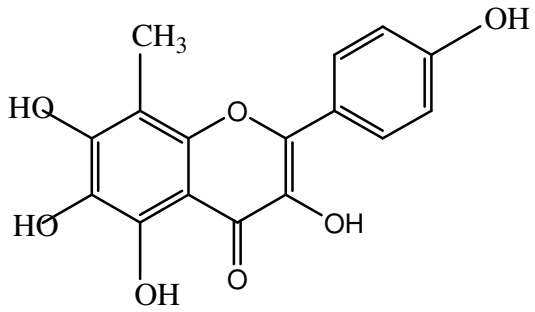
أما تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في الموضع 3 يتم في مرحلة تكوين الشالكون على خلاف الموضع 3' الذي يتم فيه تثبيت مجموعة الهيدروكسيل بعد مرحلة الشالكون أي بعد غلق الحلقة C .

IV–2–تثبيت مجموعة المثيل :

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

الحالة الأولى:

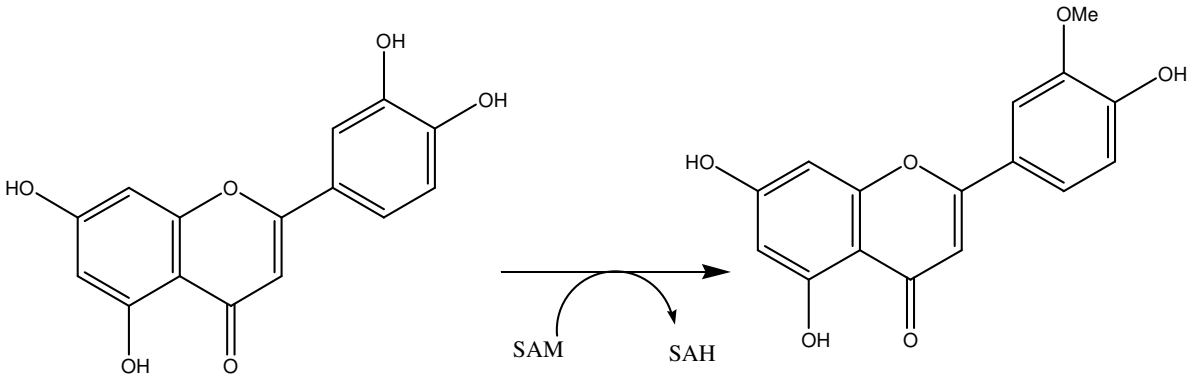
تكون الرابطة بين كربون المثيل و كربون النواتين A و(أو) B و مثال على ذلك المركب



8-C-méthylgalangine

الحالة الثانية:

هي مثيلية المجموعات الهيدروكسيلية التي تم تثبيتها من قبل (O-methylation) و هذا في وجود أنزيم O-methyltransférase كمانح للمثيل [10] و الشكل التالي يبين ذلك.



Lutéoline

Chrysoériol

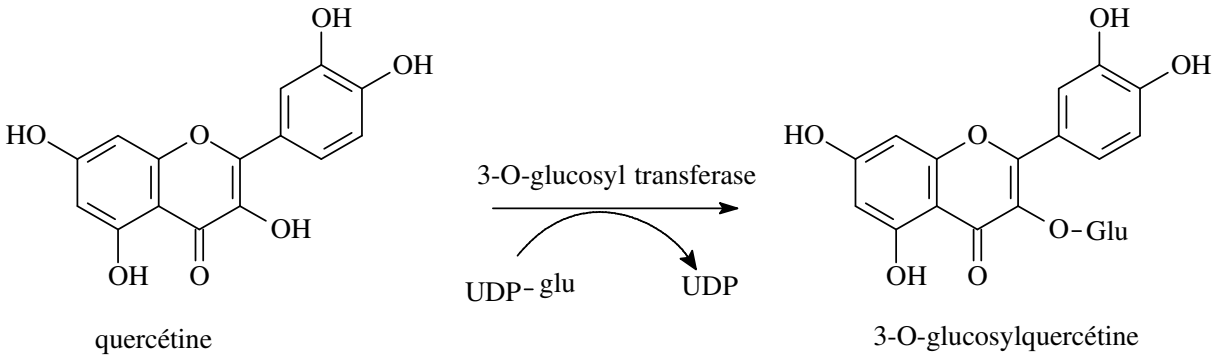
SAM: S – adénosyl méthionine SAH: S – adénosyl homocysteine

التحول الإنزيمي لـــ *lutéoline* إلى chrysoériol

IV-3-تثبيت السكريات:

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 مباشرة أي من نوع (O-heterosidique) إما تكون في الموضع 7 للفلافونات أو في الموضع 3 للفلافونولات و يتم تثبيت السكر في وجود إنزيم" O -glucosyl transférase" و مانح للسكر مثل :

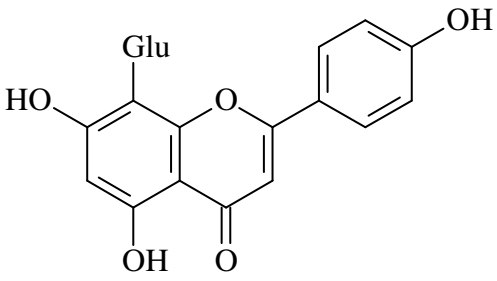
"UDP-glu" (Uridine diphosphate glucose) [12] والشكل التالي يوضح ذلك.



quercétine

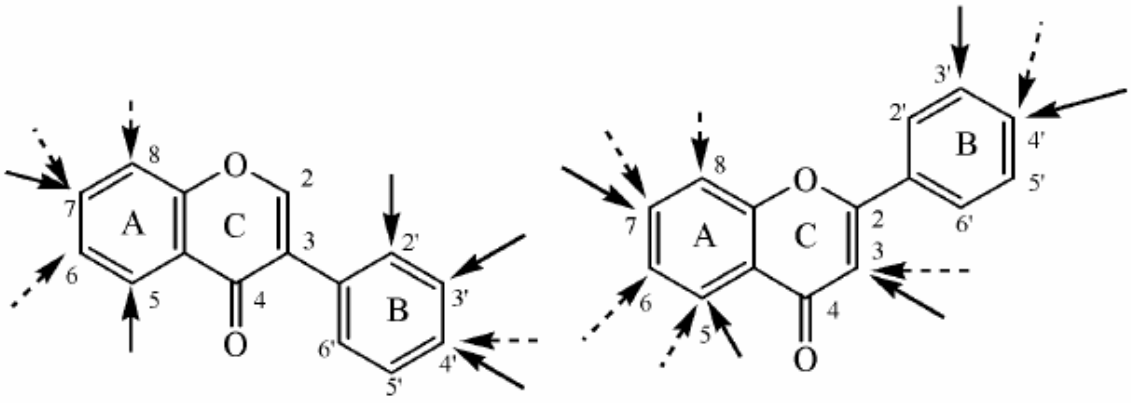
3-O-glucosylquercétine

و 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 [11] ، و مثال على ذلك المركب vitexine .



vitexine

والصورة التالية توضح مواقع الأكثر إرتباط مجموعات الهيدروكسيل (سهم ممتلئ)بالهيكل الفلافونيدي, وكذلك مجموعات السكر من نوع O- glycosylation و/أو *C*- glycosylation (سهم المتقطع) [10].



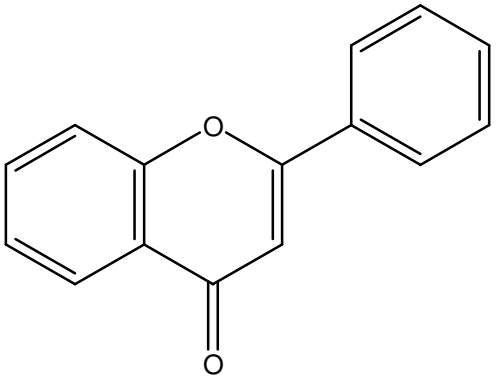
V- أقسام الفلافونيدات:

يمكن تقسيمها اعتمادا على درجة تأكسد الحلقة C, وعلى حسب جهة ارتباط الحلقة C بالحلقة A.

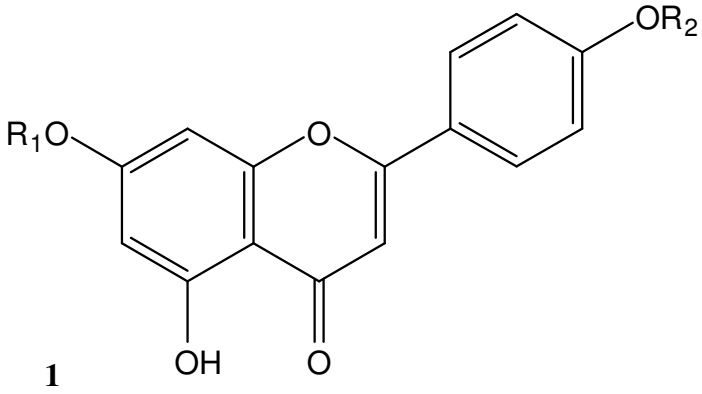
كما نستطيع تقسيمها إنطلاقا من الإصطناع الحيوي لها, فبعضها يعتبر وسائط ومركبات نهائية في الإصطناع الحيوي مثل الشالكونات, الفلافانو-3- أول , فلافان-3,4- ديول. بعضها الآخر تعرف فقط بالمركبات النهائية في الإصطناع الحيوي كالفلافانونات, الفلافونولات[6].

و يمكن تلخيصها فيمايلي :

الفلافون: يمكن للحلقة B أن تتواجد في الموضع 2، وإذا كانت الرابطة 2ـــ3 غير مشبّعة واستبدل الموقع 4 بمجموعة كربونيل، سمّى المركب حينئذ فلافون، وتتضمن هذه المركبات مجوعات بديلة في الغالب هي مجموعة هيدروكسيل أو ميتوكسيل وقد يحوي بناؤها على وحدات سكرية على هيئة سكر أحادي أو ثنائي أو أكثر، وقد ترتبط هذه الوحدات بذرة أكسجين المكونة لمجموعة الهيدروكسيل أو ترتبط مباشرة بإحدى ذرات الكربون للهيكل الفلافونيدي و من أشهرهذه السكريات نجد : الهكسوزات Hexoses (D-glucose، D-galactose أوD-allose)، L-arabinose ، L-rhamnose، D-apioses. D-xylose).



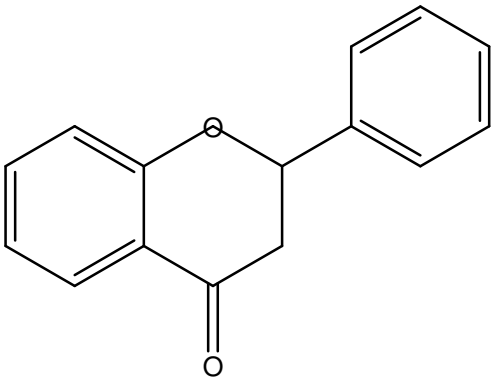
flavone



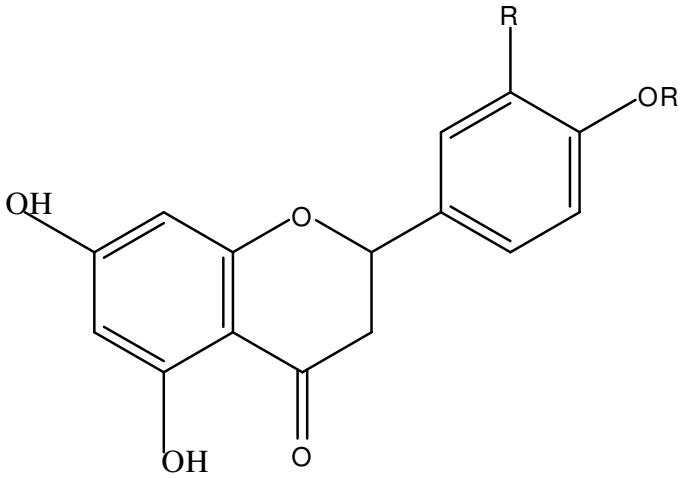
1

1	R_1	R_2
Genkwanine	CH_3	H
Ácacétine	H	CH_3
Apigénine	H	H
7,4'diméthoxyapigénine	CH_3	CH_3

الفلافانون: إذا كانت الرابطة C_3-C_2 في هيكل الفلافون مشبعة يسمى المركب فلافانون.



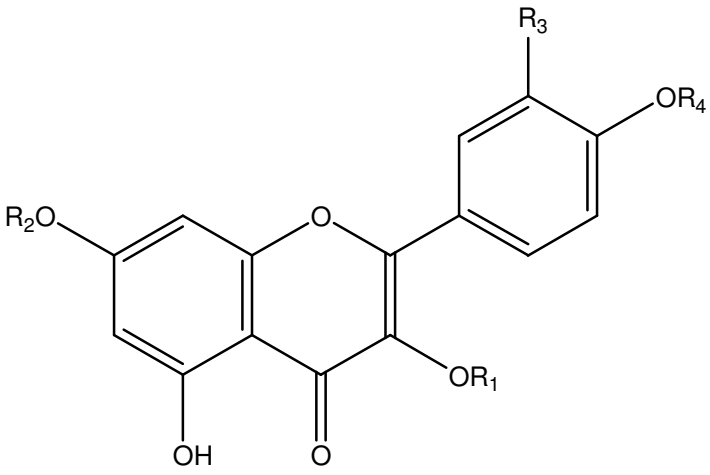
Squelette Flavonone

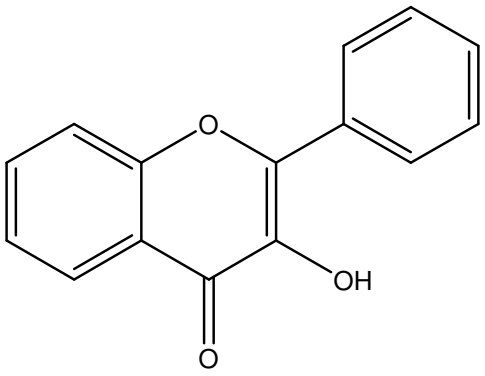


Naringenine (R=H)

Eriodictyole (R=OH)

الفلافونول: إذا وجدت مجموعة هيدروكسيل(OH) حرة أو مستبدلة (OR) في الموقع(3) لمركب الفلافون سمي المركب بالفلافونول وهو يشكّل نواة أساسية للعديد من المركبات الفلافونيدية.

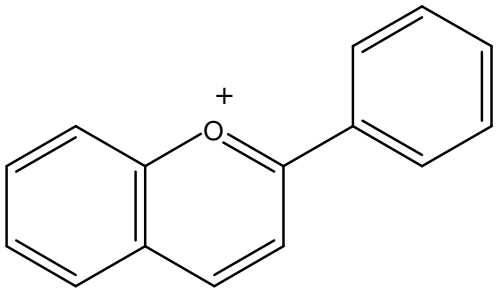




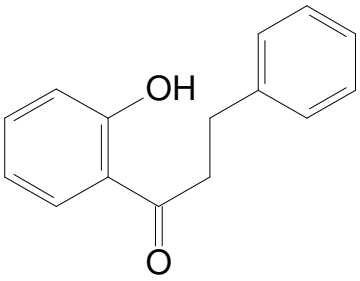
Squelette Flavonole

	R_1	R_2	R_3	R_4
Quercétine	H	H	OH	H
Quercétine -3-glycoside	Gluc	H	OH	H
Kaempferole	H	H	H	H

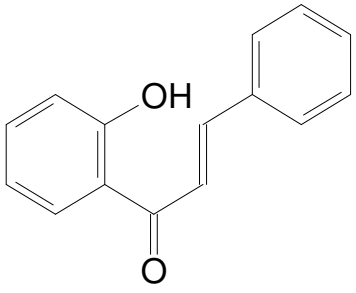
انطوسينيدين: تتميزهده المركبات بغياب الوضيفة السيتونية في الموقع4. و وجود رابطة ثنائيـــة فـــي الموقع O_1-C_2 و كذلك في الموقع C_3-C_4. وتتواجد على شكل أملاح .



الشالكـــــــــــون: هي مركبات تكون مخايلة للفلافونويدات و تكون مفتوحة أي غياب الحلقة C كما يمكن أن تكون فيها الرابطة C_3-C_2 مشبعة لتعطي تنائي الهيدروشالكونات .

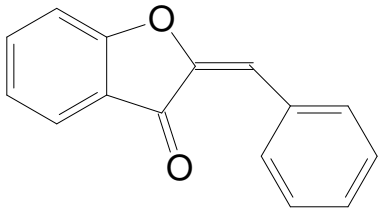


DIHYDROCHALCONE



CHALCONE

الأورون: و هي مركبات تتميز بكون الحلقة C خماسية .

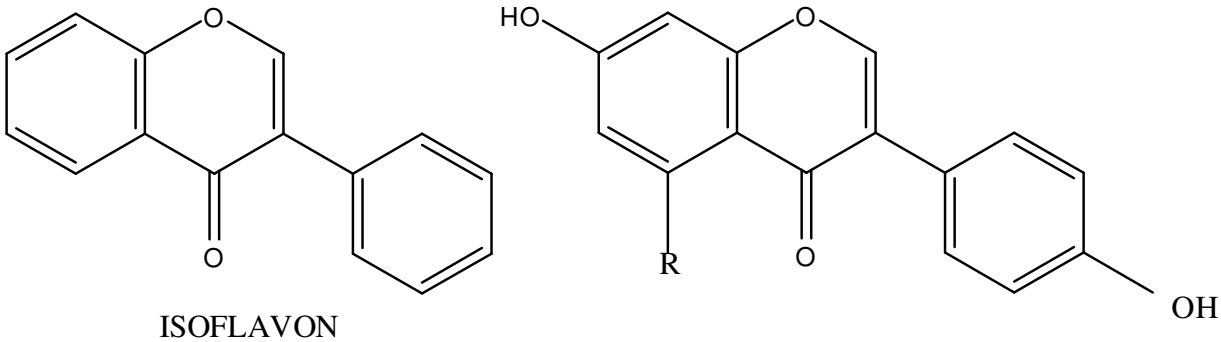


AURONE

نيوفلافون: إذا وجد استبدال بين مجموعة الكربونيل والمجموعة B في هيكل الفلافون سُمّي المركب نيوفلافون والذي تمّ عزله من عدّة أنواع للعائلة البقولية [13]. فهو يشكّل مع الإيزوفلافون الفلافونيدات النادرة وذلك لقلة انتشارها في الطبيعة خلافا عن الفلافونات والفلافونولات المنتشرة على نطاق واسع .[14]

- إيزوفلافون : وهي لا تختلف في بنائها عن الفلافونات إلاّ باختلاف ارتباط الحلقة B حيث تتواجد في الموضع رقم 3. ويعود تاريخ إكتشاف أول إيزوفلافون formononetine كمركب طبيعي إلى منتصف القرن التاسع عشر [15].من جذور النبتة البقولية *Ononis spinosa L* .
ومع نهاية 2004 تم إحصاء ما يزيد عن 1600 إيزوفلافون أغلبها مفصول من العائلة البقولية[16] التي تعتبر ثالث أهم عائلة زهرية .

كما يشهد محدودية الإيزوفلافونات عند العائلات غير البقولية إذ فصل منها أول إيزوفلافون في أواخر القرن التاسع عشر من النوع(Iridaceae) *Iris florentina* [17] . وفي ماي 2007 تم إحصاء 225 إيزوفلافون مفصول من 59 عائلة غير بقولية مع العلم أن أغلب هذه المركبات تم الكشف عنها لدى العائلة البقولية.[18]



ISOFLAVON

	R
Daidzeine	H
Ǵenisteine	OH

VI- أهمية الفلافونيدات:

VI – 1- دورها الفيسيولوجي:

بفضل تركيبها المتعدد الفينولي تستطيع الفلافونيدات أن تلعب دورا هاما في سلاسل الأكسدة الإرجاعية، فبعضها ضد مؤكسدات، إذ يظهر سلوكها في الترابط المعقد للمعادن الداخلة في تفاعل الأكسدة [19] ويتوقف هدا الترابط على كربونيل الموضع4 ووجود مجموعة هيدروكسيل في الموضع5 أو3 وكدا وجود 3'،4'أرثو ثنائي هيدروكسي. [19] ، **[20]**

وبحكم غنى المركبات الفلافونيدية بمجاميع فينولية فهي قادرة على أن تتثبت على بعض البروتينات و الإنزيمات ومن ثم تغير التوازنات الإنزيمية، وتتدخل في المراحل المختلفة للتطور و بخاصة عند التلقيح ،هدا عند النبات.أما تأثيرها على وضائف خلايا الثدييات فإن بعضا مما عرف من الفلافونيدات لحد الأن فقط يستعمل في علاجها.

VI-2- دورها البيولوجي و العلاجي :

هناك العديد من المنشورات المتعلقة بفعاليات الفلافونيدات البيولوجية و التي تبرز تصنيفها ك bioflafonoides و في هذا الإطار يمكن حصر بعض الفعاليات البيولوجية الهامة منها:

– الفلافونيدات لها تأثير مضاد للإلتهاب ودلك أن بعض الأمراض المتميزة بزيادة النفادية أو بضعف الشعيرات يمكن أن تعالج بمستخلصات اليمون الغنية بالفلافونيدات. [23]
– كما تعتبر أدوية للعجزالوريدي ، إذ تعتبر منشطات للأوردة ، و في نفس الوقت تقلل نفادية الأوعية الدموية ، فتأثيرها على جدار الأوعية و كذا خواصها المضادة للإلتهاب هي أصل استعمالها في التطبيب كحاميات أوعية أو مقومات وريدية. [24]

مضادة للتشنج إذ يعتبر Luteoline، Kaemférole، Quercétine وبعض مشتقاتها مؤثرة على العضلات الملساء. [25]

– كما لها تـــأثيرات مضادة للسرطان فالفلافونات و الفلافونولات الميثوكسيلية تأثيرات مضادة لسرطان البلعوم الأنفي و لأورام لويس(الخاصة باللسان) . [26]

– بالإضافة إلى ذلك كشفت الدراسات على كون الفلافونيدات مضادة لارتفـــاع الضغـــط [25] ، للحساسية [26–27] ، ومضادة للتسمم الكبدي [28] وذات فعالية ضد الملاريا [29]. كما تستعمل الفلافونيدات لأغراض أخرى، فنظرا لكون الأنتوسيانوزيدات حساسة للضوء والحرارة وتغير الـــ pH فهي تستعمل في المعلبات كمواد حافظة. وتضاف الفلافونيدات إلى بعض المواد الغذائية كالخمور (30 mg/l anthocyanoside) والمربى، وإلى الحلويات لتنويع ألوانها والتحسين من طعمها [30]. كما توجد بعض الفلافونولات في الشكولاطة. [31]

VII– خواص الفلافونيدات المضادة للأكسدة:

تمتاز الفلافونيدات بخواصها المقاومة للتأكسد لوجود مجموعات (OH) و يتلخص ذلك في :

- حماية الأنظمة المضادة للأكسدة داخل الخلية (In Vitro) .
- التثبيط الإنزيمي و مخلبة الأثار المعدنية المولدة لـــROS المسؤولة عن إتلاف الأحماض النووية و ظهور الأورام السرطانية كما تتسبب تفاعلاتها المستمرة مع الفوسفولبيد الغشائي في إتلاف الخلية. [28]

- أسر الجذور الأكسجينية النشطة ROS كـــ $OH^{\cdot}$, O^{-}_{2} ,$NO^{\cdot}$...ويتوقف هذا على مدى قابلية تحرير البروتونات من طرف الفلافونيد [32]، وعلى العموم يتوقف اصطياد هذه الجذور على الصيغة الكيميائية للفلافونيدات و مستبدلاتها الهيدروكسيلية . [23]
- تعتبر الفلافونيدات كعوامل مرجعة قوية وتعمل على تكسير تسلسل التفاعلات الجذرية نتيجة لبنيتها المستقرة الناتجة عن ظاهرة الرنين الإلكتروني الناشئة عن الحلقات الأروماتية [35,34]، وقد بينت الدراسات أن فعالية الفلافونيدات المضادة للأكسدة متعلقة بعدد وموقع مجاميع الهيدروكسيل [35] خاصة منها تلك المستبدلة في الموقع 3 للحلقة C [36] و اورثوثنائي هيدروكسي'3',4 للحلقة B، كما تعود مقاومتها للتأكسد لاحتوائها على الرابطة المضاعفة في الحلقة C بين $C_3 - C_2$ المترافقة مع 4-الكربونيل [35]، وجود OH في الموقع 3 و 5 بالإتحاد مع مجموعة الكربونيل 4 و الرابطة المضاعفة بين C_2-C_3 يزيد من فعالية أسر الجذور الحرة. [37]

وفي دراسة لـــ Gwan-sub Sim و آخرون أثبت فيها أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل في البنية الفلافونيدية زادت القدرة على أسر الجذور الحرة، ففي اختبار للفلافونيدات الحاوية على الرابطة المضاعفة المترافقة مع مجموعة الكربونيل C-4 في الحلقة C لكل من الفلافونات : Chrysine ,Apigenine,Luteoline. و الفلافونولات : Kaempferole, Quercetine, Myricetine

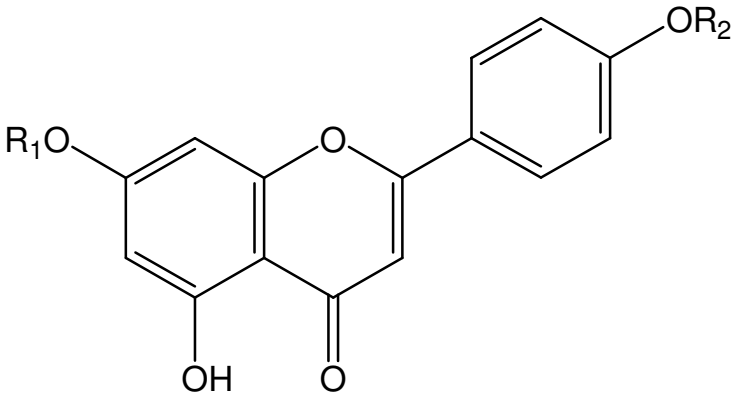
لوحظ عند الفلافونات أن Apigenine و Chrysine أبدى فعالية أقل من Luteoline وعند الفلافونولات لوحظ أن Myricetine الحاوية على 6 مجاميع OH أظهر فعالية أكبرمن Quercetine ذو الخمس مجاميع OH وهدا الأخير أكبر من Kaempferole ذو الأربع مجاميع. [33]

VIII- الفلافونيدات المفصولة من الجنس *Ononis*:

تمت دراسات لمختلفة أنواع هذه الجنس *Ononis* ولقد فصلت أنواع مختلفة من الفلافونيدات الموجودة يمكن تلخيص في الجدول التالي :

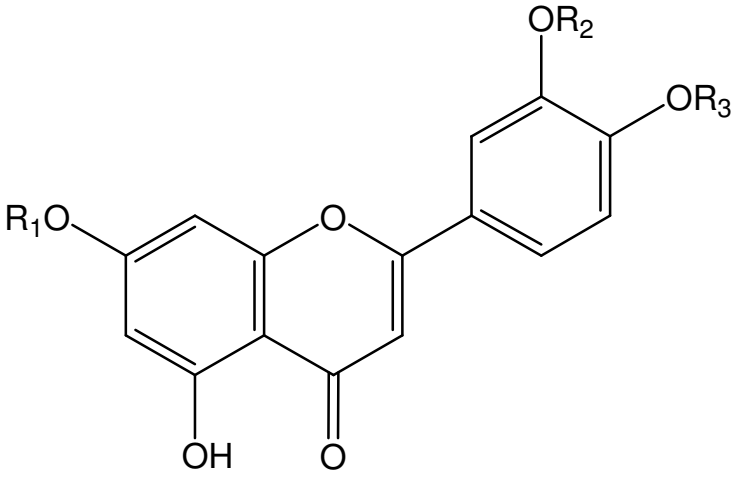
الفلافونيدات	*النوع*	المرجع	البنية
Apigénine	*O. natrix ssp ramosissime* *O. fruticosa* *O. natrix(2coll)* *O. sicula spinosa* *O. vaginalis* *O. ronindifolia* *O. spinosa*	[38]	A1
Genkwanine	*O. fruticosa* *O. natrix(2coll)* *O. ronindifolia* *O. spinosa*	[38]	A2
Acacétine	*O. ronindifolia* *O. spinosa* *O. fruticosa*	[38]	A3
7,4'-diméthoxyapigénine	*O .fruticosa* *O .spinosa*	[38]	A4
Lutéoline	*O .natrix(2coll)* *O .fruticosa* *O .tridentate* *O .spinosa*	[38]	B1
Chrysoériole	*O .spinosa* *O .tridentate* *O .natrix(2coll)* *O .natrix ssp ramosissime*	[38]	B2
Velutine	*O .natrix(2coll)* *O .tridentate* *O .spinosa*	[38]	B3
Hispiduline	*O .natrix(2coll)* *O .ronindifolia* *O . sicula* *O . spinosa*	[38]	C1
Cirsimaritine	*O . sicula* *O .tridentate* *O .vaginalis*	[38]	C2

Pectolinarigénine	*O .fruticosa* *O .natrix ssp ramosissime* *O . ronindifolia*	[38]	C3
Salvigénine	*O .fruticosa* *O .tridentate* *O . ronindifolia*	[38]	C4
Quercétine	*O .fruticosa* *O . spinosa*	[38]	D1
Quercétine -3-glycoside	*O .speciosa* *O .fruticosa*	[38]	D2
5,3',4'-triOH-6, 7,8-triOMe flavone	*O .natrix ssp ramosissime*	[38]	E1
5,7, 3'-triOH-6,8, 4'-triOMe flavone	*O .natrix ssp ramosissime*	[38]	E2
5,4'-diOH-6, 7, 8,3'-tetraOMe flavone	*O .natrix ssp ramosissime* *O .tridentate*	[38]	E3
5,7-diOH-6, 8,3,4'-tetraOMe flavone	*O .natrix ssp ramosissime* *O .natrix ssp natrix*	[38]	E4
5-hydroxy-6,7,8-tetraOMe flavone	*O .angustissima*	[39]	E5
5-hydroxy-6,7 -tetraOMe flavone	*O .angustissima*	[39]	E6
5,6-dihydroxy-,7-OMe flavone	*O .angustissima*	[39]	E7
5,7-dihydroxy flavone	*O .Angustissima*	[39]	E8
5,7,4'-triOH-3,6, 8-triOMe flavonole	*O . spinosa*	[38]	F1
5,7,4'-triOH-3,6, 8,3'-tetraOMe flavonole	*O . spinosa*	[38]	F2
Chalcone	*O .natrix ssp ramosissime*	[38]	G
dihydrochalcone	*O .natrix ssp ramosissime*	[38]	H



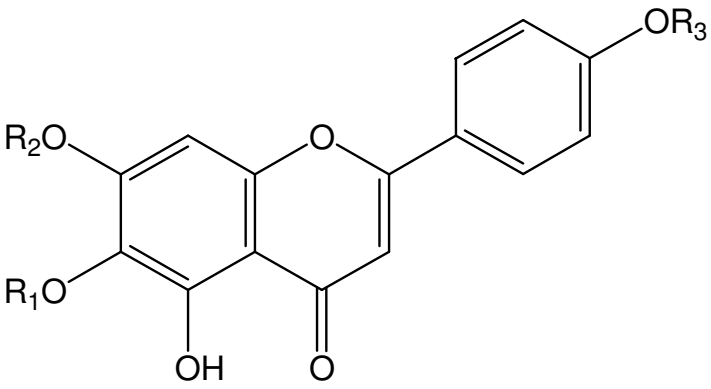
A

A	R_1	R_2
1	H	H
2	CH_3	H
3	H	CH_3
4	CH_3	CH_3



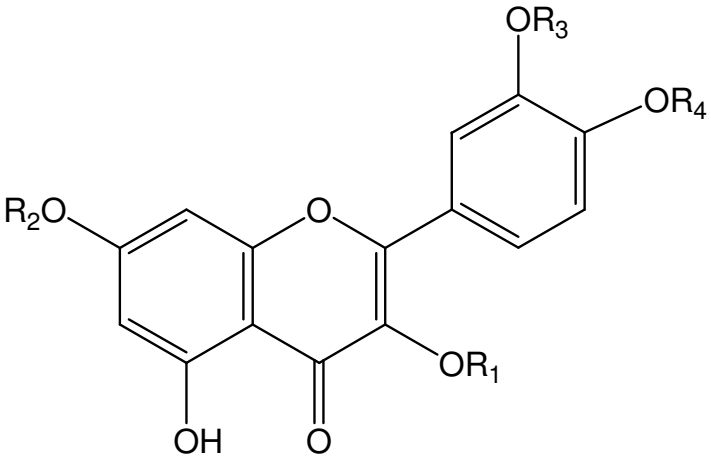
B

B	R_1	R_2	R_3
1	H	H	H
2	H	CH_3	H
3	CH_3	OH	CH_3



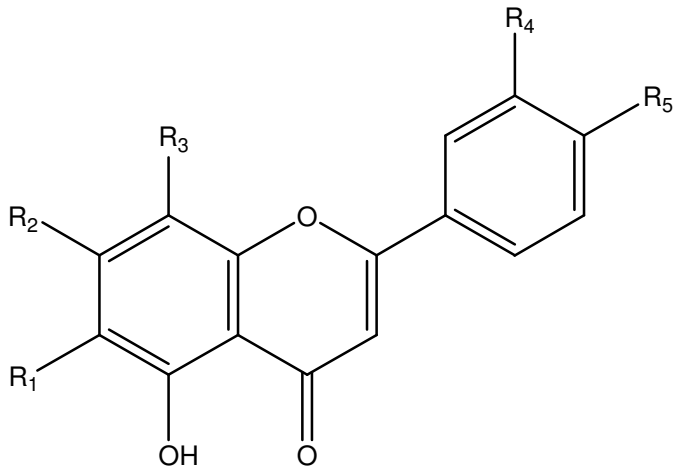
C

C	R_1	R_2	R_3
1	H	H	CH_3
2	CH_3	H	CH_3
3	H	CH_3	CH_3
4	CH_3	CH_3	CH_3



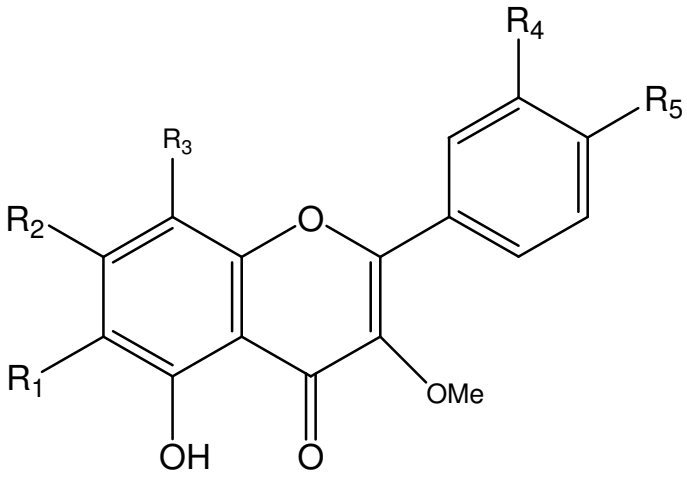
D

D	R_1	R_2	R_3	R_4
1	H	H	H	H
2	Gluc	H	H	H



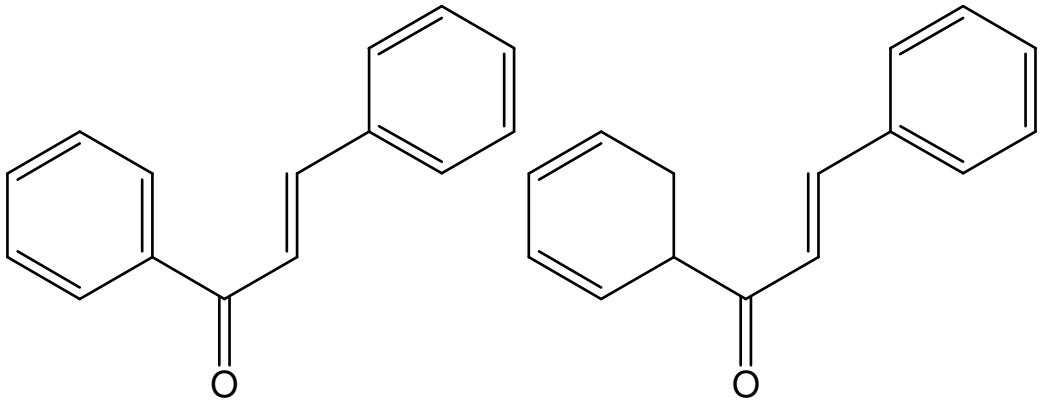
E

E	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**
1	OMe	OMe	OMe	OH	OH
2	OMe	OH	OMe	OH	OMe
3	OMe	OMe	OMe	OMe	OH
4	OMe	OH	OMe	OMe	OMe
5	OMe	OMe	OMe	H	H
6	OMe	OMe	H	H	H
7	OH	OMe	H	H	H
8	H	OH	H	H	H



F

F	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**
1	OMe	OH	OMe	H	OH
2	OMe	OH	OMe	OH	OH



H G

مراجع الفصل الأول

[1] Mabry T. J., Thomas M. B., Markham K. R. *(1970),* the systhematic identification of flavonoids, 13.

[2] Harborne J. B. (1989). The flavonoids, advances in research since 1980, eds. Chapman and Hall, New York.

[3] Harborne J. B. (1975). Progress in phytochemistry, V. 5, eds. Swin, T, Pregamon press.

[4] Harborne J. B. (1973). phytochemistry, 2, 334.

[5] Wollenweber, E. and Dietz, V. H. (1980). Biochem. Syst.Eco, 8, 21

[6] Satyajit, D. (2007). Chemistry for Pharmacy Students, John Wiley & Sons Ltd, England.

[7] Robinson, R. (1936). Nature, 137, 1172.

[8] Davis, B. D. (1955). Advances in Enzymology, 16, 227.

[9] Nazemiyeh, H., Shoeb, M., Movahhedin, N., Kumarasamy, Y., Talebpour, A. H., Delazar, A., Lutfun, N., Satyajit D. Sarker, (2000). Biochem. Syst. And.

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

[11] Jay, M. (1983). Z.Naturforsch, 38c, 413.

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

[13] Eyton, W. B., Ollis, W. D., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R., Tavira Magalhaes, M. (1965). Proc. Tetrahedron, 21, 2683.

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

[15] Reinsch, H., Repert, (1842). Pharm. 26, 18-25.

[16] De Laire, G., Tiemann, F., (1893). Iridin, the glycoside of the iris root, J. Am. Chem. Soc. 15, 400-411.

[17] Lapčík, O., (2007). Phytochemistry, 68, 2909-2916.

[18] Ingham, J. L. (1983). Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 43, 1–266.

[19] Pincemail, J., Debby, C., Lion, Y., Braquet, P., Hans, P., Drieu, K., Goutier R. (1986). Stud. Org. Chem, 23, 423.

[20] Robak, J., Gyglewsky, R. J. (1988). Biochem. Phrmacol, 37, 838.

[21] Szent-Gyorgyi, A., Rusznyak, S. (1936). Nature, 138, 27.

[22] Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., hollman, P.C.H., Katan, M.B., Krombout D. (1993). Lancet, 342, 1007.

[23] Ferraro, G. E. (1983). Acta Farm. Bonaerense, 2, 97.

[24] Wagner, H. (1977). Biology and Chemestry of Compositae, 1, 411.

[25] Elber, G., Wagner, H. (1992). Planta Med, 57, 137-141.

[26] Sankawa, U., Chum, Y.T. (1985). Advances in Chinese.

[27] Matsuda, H. Yano, M., Kubo, M., Linuma, M., Oyama, M. and Mizuno, M. (1991).Pharmacological study on citrus fruits unshiu markovich (2) on flavonoid components, Yakugata Zasshi, 111, 193-198.

[28] Wagner, H., Wirer, M., Bauer, R. (1986). Planta Med, 184-187.

[29] Murakami, N., Mostaqul, H. M., Tamura, S., Itagak, S., Horü, T.T. (2001). Bivorg. Med. Chem. Lett, 11, 2445-2447.

[30] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, éd. 3, Lavoisier, Paris.

[31] Hammerstone, J. F., lazarus, S., Mitchell, A., Rucker, R., Schmitz, H. (1999). Agric. Food chem, 47, 490-496.

[32] Pietta, P.G., (2000). Flavonoids as antioxidants, J. Nat. Prod, 63, 1035-1042.

[33] Sim, G.S., Lee, B.C., Cho, H.S., Lee, J.W., Kim, J.H., Lee, D.H., Pyo, H. B., Moon, D. C. (2007). Arch. Pharm. Res, 30, 290-298.

[34] Bors, W., Heller, W., Michel, C. Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants, determination of radical scavenging efficiencies methods enzymol,186, 343-355.

[35] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Free Radi. Biol. Med, 20, 933-956.

[36] VanAcker, S.A.B.E., van den Berg, D. J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H.V., Bennekom, W.P.,Van der vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). Free Radi. Biol. Med, 20, 331-342.

[37] Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., Van Acker, F.A.A., Van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (2001). Toxicol. In vitro, 5, 3-6.

[38] Wollenweber, E., Dorra, M., Rivera, D., Roitman, J. N., Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung, Tubingen, http://www.znaturforsch.com.

[39] Bouheroum, M., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Bermejo, J. B., Leon, F., Garcia,V. (2009). Chemistry of Natural Compounds, 45, 6.

الفصل الثاني

طرق دراسة المركبات الفلافونيدية

I- عملية الاستخلاص:

قبل القيام بعملية الاستخلاص لا بد من تحضير النبتة المراد إجراء دراستها و ذلك بتنقيتها و تجفيفها جيدا في أماكن خاصة تسمح بالتهوية وبعيدا عن أشعة الشمس والرطوبة، تفاديا للتفاعلات الإنزيمية التي قد تحدث تغيرات على المركبات الطبيعية الأصلية المراد استخلاصها، بعدها نقوم بطحنها ووزنها. قد تستعمل النبتة بجميع أجزائها، كما قد يؤخذ الجزء الهوائي لوحده أو الجذور أو الثمار فقط، و عموما تتواجد الفلافونيدات في الجزء الهوائي في معظم الحالات الذي يتم الاصطناع الحيوي للفلافونيدات و ذلك لارتباطه بالعامل الضوئي.

تعامل الأجزاء المراد استخلاص الأيض الثانوي منها بمذيب مناسب، و يعتبر المذيب (كحول/ماء) أكثر المذيبات استعمالا و ذلك بنسب معينة (3/7) أو (2/8) و هذا في حالة المادة النباتية الجافة، و يستعمل الكحول لوحده في حالة ما إذا كانت المادة النباتية غضة (خضراء)، الكحولات المستعملة هي الإيثانول و الميثانول .

و تتم عملية الاستخلاص على مراحل :

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

يؤخذ المستخلص الخام و يعامل بالماء المقطر الساخن ثم يترك مدة ليلة كاملة بعدها يرشح على ورق الترشيح ويحتفظ بالرشاحة.

تعامل الرشاحة المائية بإيثر البيترول أو الهكسان و ذلك من أجل التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون، و الكلوروفيل.
يعامل الطور المائي بالكلوروفورم ثلاث مرات لنحصل على طور الكلوروفورم الذي يبخر تحت ضغط منخفض.

يعامل الطور المائي بخلات الإيثيل ثلاث مرات لنحصل على طور الخلات الذي يبخر تحت ظغط منخفض.

يعامل كذلك الطور المائي بالبوتانول العادي و تكرر هذه العملية ثلاث مرات أو أكثر، لنحصل على طور البوتانول و ذلك بعد التبخير تحت ضغط منخفض.

يكون لدينا في النهاية:

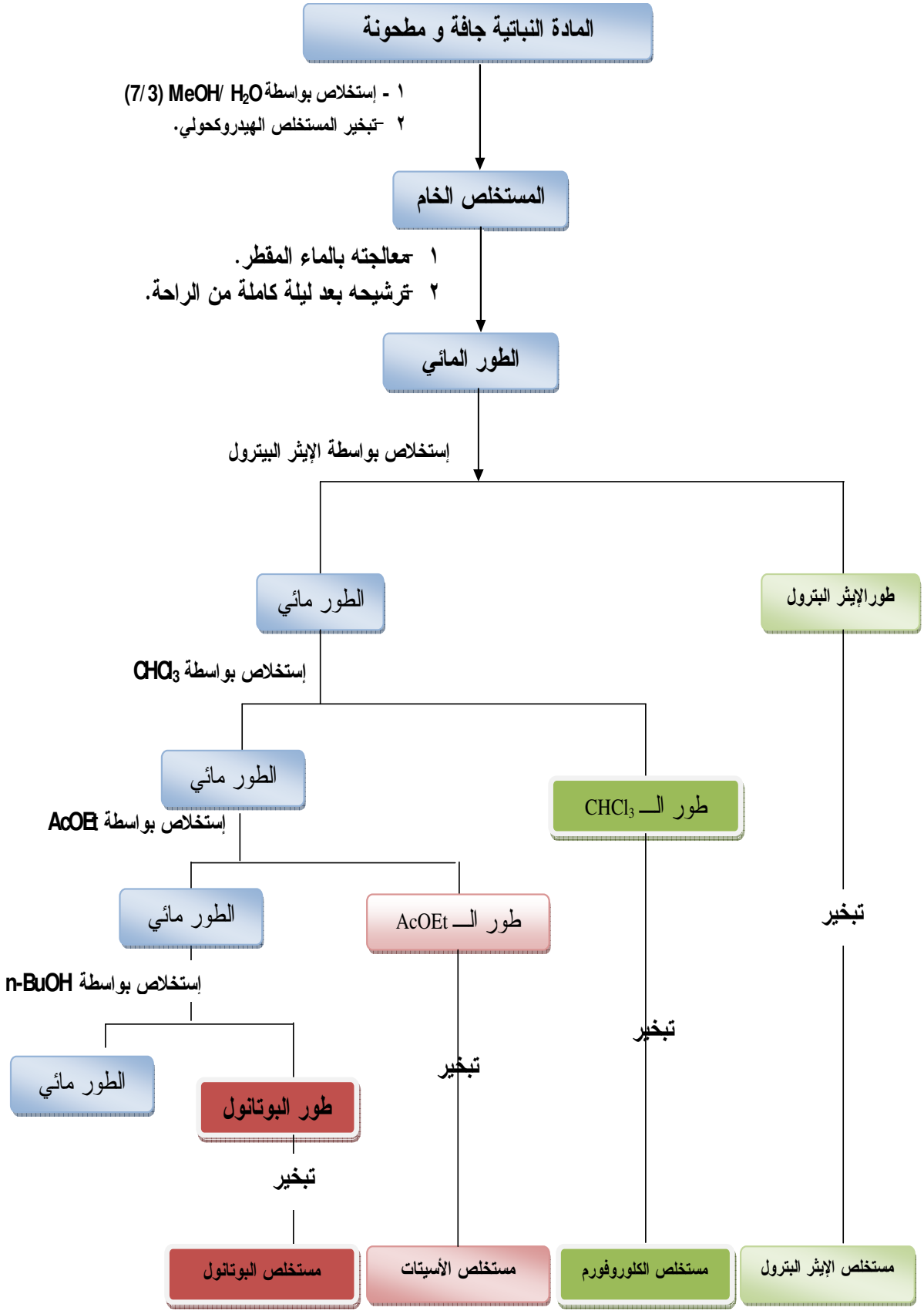
المستخلص الجاف للإيثر البيترولي.

المستخلص الجاف للكلوروفورم.

المستخلص الجاف لخـــــلات الإيثيل .

المستخلص الجاف للبوتانول العادي.

و الشكل التالي يبين لنا المراحل المتبعة في ذلك :



الشكل-1- مخطط عام لإستخلاص الفلافونيدات.

II- - طرق الفصل:

التقنية الأساسية المستعملة لذلك هي الكروماتوغرافيا بمختلف أنواعها، 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 جامدا أو سائلا محملا على الدعامة جامدة، أما الطور المتحرك فعادة يكون مذيبا عضويا[1].

- إن هدف الفيتو كيميائي 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-كروماتوغرافيا العمود(CC):

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

السيليكاجال، السيليلوز، و متعدد الأميد.

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

و يتلخص طريق إجراء هذه التقنية فيما يلي :

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

- بعد ترصيص الطور الثابت جيدا داخل العمود توضع طبقة من رمل خاص يدعى **Sable de fontainebleau** بسمك 0.5 سم، بعدها تحضر العينة حيث يذاب المستخلص المراد فصله في أقل كمية ممكنة من الميثانول، و بواسطة ماصة باستور يتم توزيعه على سطح الرمل مع الحرص على عدم إتلافه، أو باتباع طريقة أخرى و التي تستعمل في حالة ما إذا تطلبت إذابة المستخلص الجاف كمية كبيرة من الميثانول، ففي هذه الحالة نضيف لمحلول المستخلص كمية من مسحوق البولي أميد SC_6 و نركز هذا الخليط حتى نحصل على مسحوق جاف الذي يضاف إلى العمود الكروماتوغرافي، بعد ذلك يضاف المملص الذي يكون في البداية مذيب أقل قطبية ثم نغير قطبيته بإضافة مذيب قطبي تدريجيا إلى غاية الوصول إلى قطبية عالية، و يتم مراقبة الحزم باستعمال مصباح وود (Wood) للأشعة فوق البنفسجية UV حيث تستقبل أسفل العمود و تركز حتى الجفاف أو عن طريق الطبقة الرقيقة CCM.

II - 2-كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية(CP):

يمكن استعمال هذه التقنية مباشرة على المستخلص في حالة عدم غنائه بالمركبات الفلافونويدية. كما تستعمل لجمع و فصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي.

يكون الورق المستعمل من نوع Whatman رقم I أو III، حيث يوضع الخليط بواسطة ماصة على كامل عرض الورقة على مسافة 2 سم من الحافة العلوية للورقة، و بعد أن تجف تغمس الورقة في المملص أين تبدأ الحزم في الهبوط تسلسليا، حتى وصول المملص إلى مسافة قصيرة من الحافة السفلية للورقة.

بعد جفافها و بالاستعانة بمصباح (Wood) يتم تحديد الحزم التي تقص على شكل قطع صغيرة و تغمس في الميثانول، أين ترشح ليجف الراشح، ثم تجرى له عملية فحص متعددة بواسطة كروماتواغرافيا الطبقة الرقيقة للتأكد من نقاوة المركبات الذي تم فصلها، و الأنظمة المستعملة في هذه التقنية عادة هي: [2]

الماء المقطر : حمض الخل : البيوتانول العادي. (BAW)

5 1 4

الماء المقطر : حمض الخل

90 10

75 25

حمض الخل

تراكيز مختلفة (30,25,20,15,10....)

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 بزاوية 90° و تغمس في مذيب آخر، حيث يكون البعد الأول عادة عضوي مثل الطبقة العضوية للنظام BAW و البعد الثاني مائيا كالنظام $ACOH/H_2O$.

BAW: **الماء المقطر: حمض الخل: البيوتانول العادي.**

5 1 4

$ACOH/H_2O$: **الماء المقطر : حمض الخل**

75 25

***II*-3- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM):**

تستعمل في هذه التقنية شرائح من الزجاج أو البلاستيك ذات الأبعاد (20x20 سم) لتثبت عليها دعامة صلبة ثم يوضع الخليط المراد فصله عرضيا على بعد 1.5 سم من خط الانطلاق، بعدها توضع الصفائح في حوض به مملص، و أثناء هجرته يمر بالعينة الموضوعة أين يجر معه مختلف المركبات في شكل حزم التي يتم تحديدها بواسطة مصباح (Wood) ، بعد أن تجف الصفائح تكشط الحزم كلا" على حدى و توضع في قمع زجاجي لتغسل جيدا بالميثانول، يركز الرشيح و تجرى له عمليات فحص متعددة للتأكد من نقاوته و الأنظمة المستعملة كمملصات هي :

بالنسبة لمتعدد الأميد (كدعامة صلبة) :

H_2O / MeOH / MEC / Acétylacétone : (13 /3 / 3 / 1)

Toluène / MEC / MeOH : (4 / 3 / 3)

MeOH / H_2O / AcOH : (18 / 1 / 1)

أما بالنسبة لـــ : السيليكاجال (كدعامة صلبة) فهي ملخصة في الجدول (1)[3]:

جدول –1– :

نوع الفلافونويد	الممـلص
Flavonoides aglycones	EtOAc–i-PrOH–H2O, 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*
Flavonoides glycosides	n-BuOH–HOAc–H2O, 65:15:25 n-BuOH–HOAc–H2O, 3:1:1 EtOAc–MeOH–H2O, 50:3:10 EtOAc–MeOH–HCOOH–H2O, 50:2:3:6 EtOAc–EtOH–HCOOH–H2O, 100:11:11:26 EtOAc–HCOOH–H_2O, 9:1:1 EtOAc–HCOOH–H_2O, 6:1:1 EtOAc–HCOOH–H_2O, 50:4:10 EtOAc–HCOOH–HOAc–H_2O, 100:11:11:26 EtOAc–HCOOH–HOAc–H_2O, 25:2:2:4 THF–Toluène–HCOOH–H_2O, 16:8:2:1 $CHCl_3$–MeCOMe–HCOOH, 50:33:17 $CHCl_3$–EtOAc–MeCOMe, 5:1:4 $CHCl_3$–MeOH–H_2O, 65:45:12 $CHCl_3$–MeOH–H_2O, 40:10:1 MeCOMe–butanone–HCOOH, 10:7:1 *MeOH–butanone–H_2O, 8:1:1*
Flavonoides glucuronides	EtOAc–Et_2O–dioxane–HCOOH–H_2O, 30:50:15:3:2 *EtOAc–EtCOMe–HCOOH–H_2O, 60:35:3:2*

Flavanone aglycones	*CH_2Cl_2–HOAc–H_2O, 2:1:1*
Flavanone glycosides	$CHCl_3$–HOAc, 100:4 $CHCl_3$–MeOH–HOAc, 90:5:5 *n-BuOH–HOAc–H2O, 4:1:5 (la couche supérieur)*
Chalcones	*Hexane –EtOAc, 1:1*
Isoflavones	$CHCl_3$–MeOH, 92:8 *$CHCl_3$–MeOH, 3:1*
Isoflavone glycosides	*n-BuOH–HOAc–H_2O, 4:1:5 (couche supérieure)*
Dihydroflavonoles	*$CHCl_3$–MeOH–HOAc, 7:1:1*
Biflavonoides	$CHCl_3$–MeCOMe–HCOOH, 75:16.5:8.5 *Toluène–HCOOEt–HCOOH, 5:4:1*
Anthocyanidines et anthocyanines	EtOAc–HCOOH–2 M HCl, 85:6:9 n-BuOH–HOAc–H_2O, 4:1:2 EtCOMe–HCOOEt–HCOOH–H_2O, 4:3:1:2 *EtOAc–butanone–HCOOH–H_2O, 6:3:1:1*
Proanthocyanidines	EtOAc–MeOH–H_2O, 79:11:10 *EtOAc–HCOOH–HOAc–H_2O, 30:1.2:0.8:8*

II-4-كروماتوغرافيا نظام السائل عالي الآداء(HPLC):

تسمح هذه التقنية بتحديد المحتوى الفينولي للعينة المراد تحليلها، و هي أيضا نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي التجزيئي الذي يتطلب استخدام ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمود، و تعتبر التقنية الأفضل لفصل و تحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير [4]، و أهم المذيبات المستعملة هي:

الماء المقطر: الأسيتونتريل : حمض الخل

- يجر المملص معه المركبات في العمود بصفة انتقائية فتنزل المركبات ثنائية السكر قبل أحادية السكر، و هذه الأخيرة قبل الأجليكونات [5].

III-التنقية:

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

III-1- التنقية على عمود من متعدد الأميد SC6

يتم مزج متعدد الأميد SC_6 بالطولوين، ثم يصب في العمود الكروماتوغرافي و بعد استقرار المزيج فيه يوضع المركب المفصول و المذاب في اقل كمية من الميثانول على سطح الدعامة. بعد وضعه يغسل بالطولين ثم يغير المملص تدريجيا بإضافة الميثانول حتى يتم نزول المركب كليا.

III-2-التنقية على عمود السيفاداكس:

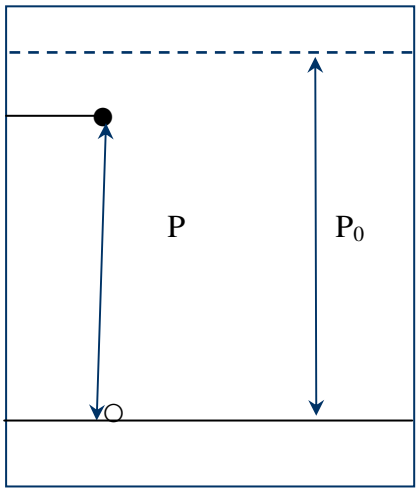
تستعمل هذه التقنية في المراحل الأخيرة من عمليات الفصل و التنقية. و لتحقيق عمود من Sephadex LH20 يتم نقع جال السيفاداكس في الميثانول، ثم يصب المزيج بلطف في العمود، و بعد استقراره يتم وضع المركب المفصول و المذاب في أقل كمية ممكنة من الميثانول على السطح بعناية، يملص بعدها بدفعات متتالية من الميثانول، حيث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

IV- التحديد البنيوي للفلافونيدات:

IV -1- الخواص الكروما توغرافية :

IV-1-1- معامل الانحباس (معامل الإعاقة):R_F

وهو النسبة بين المسافة المقطوعة من طرف المركب P انطلاقا من نقطة البداية والمسافة المقطوعة من طرف المذيبP_0 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 [6] , [7] .



$$R_f = P/P_0$$

و يتم قياس R_f للمركبات النقية عادة من ثلاثة أنظمة لمذيبات مختلفة:

النظام 1: (4/3/3): **toluène /méthanol / méthyléthylcétone**

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

النظام3: 15% **acide acetique**

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 [6][8]

والجدول-2- يبين العلاقة بين الفلافونيد وقيمة R_f.

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

والجدولين 3 و4 يبينان قيمة R_f لبعض الشالكونات و الأورونات[9][10][11].

الشالكونات	R_f (HOAc)	R_f (TBA)
3,4-Dihydroxychalcone	0.26	0.87
Dihydroxychalcone', 4-'2	0.11	0.93
Trihydroxychalcone'-',4',3'2	0.16	0.84
Tetrahydroxychalcone'-',3,4,4'2	0.07	0.7

الجدول-3- قيمة R_f لبعض الشالكونات

الأورونات	R_f (HOAc)	R_f (TBA)
-Dihydroxyaurone',4'3	0.06	0.85
6,7-Dihydroxyaurone	0.9	0.87
Tetrahydroxyaurone (Maritimetin)',7-6,',4'3	0.02	0.39
Leptosidine	0.02	0.64

الجدول-4- قيمة R_f لبعض الأورونات

TBA: *Tertio Butyl Alcool*

اللون الإستشعاعي: IV-2-1-

إن المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية يعطينا معلومات أولية تخص صيغته البنيوية المحتملة و الجدول – 5 – الموالي يوضح ذلك[6]

لون المركب تحت الأشعة (UV)	التراكيب البنيوية المحتملة
بنفسجي مسود	فلافون, فلافون مع (**5-OH**). فلافون مستبدل في الموضع 3. 7,6,5 أو 8,7,5 ثلاثي هيدروكسي فلافون.
أزرق(بنفسجي نيلي)	فلافون أو فلافانون بدون (**5-OH**). فلافونول مستبدل في 3 وبدون (**5-OH**).
أصفر أو أصفر باهت	فلافونول غير مستبدل مع أو بدون (**5-OH**)
برتقالي لامع	إيزوفلافون.
أصفر مخضر	أورون.
أخضر	بعض الشالكونات

جدول–5– يوضح العلاقة بين لون المركب تحت (UV)وبنيته الكيميائية.

IV-2-: طرق التحليل الفيزيوكيميائية

IV–2– 1– مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV :

الفلافونويدات واحدة من المركبات القادرة على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية، و ذلك لاحتوائها على مجموعات مسؤولة عن ذلك تدعى بـــ chromophores (و هذه الأخيرة عبارة عن مواقع غنية بالإلكترونات كما قد تكون عبارة عن مجموعات كيميائية مثل مجموعة الهيدروكسيل" OH" و مجموعة الميتوكسيل "OCH_3 "...).

و تعتبر مطيافية الأشعة فوق البنفسجية من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على بنية المركبات الفلافونويدية، و قد نشرت أبحاث كثيرة بهذا الصدد [5] [12-13-14-15].
و تكمن أهميتها في:

- لا تحتاج إلى كمية كبيرة من المركب لإنجازها (0،1 ملغ).
- سهولة و سرعة تحقيقها.
- تعطي معلومات معتبرة عن البنية المحتملة للمركب.

ويعتمد أساس هذه التقنية في كون كل مركب فلافونويدي له طيف امتصاص مميز و خاص في الوسط الميثانولي، و يتغير هذا الطيف بإزاحات معينة بعد إضافة كواشف معروفة: إما قواعد (هيدروكسيد الصوديوم NaOH، أسيتات الصوديوم NaOAc) أو أحماض لويس ($AlCl_3$ كلوريد الألمنيوم، حمض البوريك H_3BO_3) حيث أن طبيعة الكاشف و تأثيره على طيف الامتصاص يوفران معلومات حول بنية المركب [16].

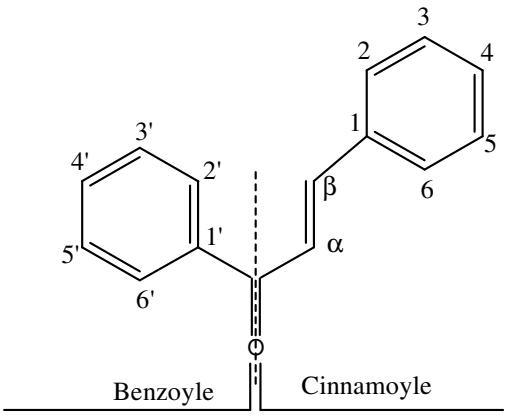
IV -2- 1- أ- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV للشالكونات و الاورونات :

طيف الاشعة الفوق البنفسجية لكل من الشالكونات و الاورونات مميز بشدة(حدة) امتصاص العصابة I وضعف (نقص- شبه انعدام) العصابة II [9][17].

IV -2- 1- أ- 1- طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي: [9]

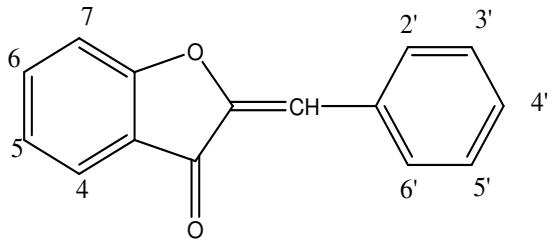
طيف امتصاص الشالكونات في الوسط الميثانولي يعطي عصابتين :
العصابة I : تتميز بطول موجة أعظمية مابين (340-390 نم) و تعود إلى امتصاص الشكل cinnamoyle و ذلك نتيجة للرنين الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة البنزينية B .

العصابة II : : تتميز بطول موجة أقل شدة من العصابة I تقع مابين (220-270 نم) و تعود إلى امتصاص الشكل Benzoyle للمركب و ذلك نتيجة للرنين الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقة البنزينية A . كما هو موضح في الشكل -2- :



الشكل –2– ترافق مجموعة الكربونيل مع كل من الحلقتين A وB *للشالكون*

– إن التمييز بين بنية (شالكون) و (أورون) يكون من خلال وضعية العصابة I في الطيف الميثانولي.



Aurone

فالحزمة I تظهر بين (340 – 390) بالنسبة للشالكون و بين (370 –430 نم) بالنسبة للأورون.

- تثبيت مجموعة OH على الحلقة B يغير إزاحة العصابة I أكثر ممًا لو كان تثبيت المجموعة على الحلقة A.

الجدول– 6– أهم الإنزياحات الملاحظة للعصابتين (I) و (II) في الوسط الميثانولي للفلافونيدات:

نوع الفلافونويد	العصابة II (nm)	العصابة I (nm)
فلافون	280 – 250	350 – 310
فلافونول3-OH مستبدل	280 – 250	360 – 330
فلافونول 3-OH حر	280 – 250	385 – 350
ايزوفلافون	275 – 245	330 – 310
فلافانون وdihydroflavonol	295 – 275	330 – 300
شالكون	270 – 220 شدة منخفضة	390 – 340
اورون	270 – 220 شدة منخفضة	430 – 380
انثوسيانيدين و انثوسيانين	270 – 230	560 – 465

الجدول– 6– أهم الإنزياحات الملاحظة للعصابتين (I) و (II) في الوسط الميثانولي للفلافونيدات

IV-2- 1- أ- 2 - طيف الامتصاص في وجود NaOH أو NaOMe:

NaOH : هي عبارة عن قاعدة قوية تؤين كل هيدروكسيلات الفلافونويد، و إضافتها لـــــ (مركب + ميثانول) تحدث إزاحة باثوكرومية لكل الطيف، أي إنزياح في اتجاه (λ) طول الموجي الأعظمي و يظهر تأثيرها خاصة على العصابة (I) أشد منه على العصابة (II) ، و مثال ذلك وجود OH حرة في الموقع **4** لـــ شالكون يؤدي إلى إزاحة باثوكرومية بمقدار [+60 إلى +100 نم] للعصابة (I) مع زيادة في الشدة الضوئية.أما إذا كان الشالكون يحتوي على OH حر في الموقع **2 أو(و) '4** فإنه يعطي نفس الإزاحة الباثوكرومية السابقة بدون زيادة في الشدة الضوئية[9]11].

أما في حالة الأورونات فإذا كانت تحتوي على OH حر في الموقع**'4** فإنها تعطي إزاحة باثوكرومية للعصابة (I) بمقدار [+80 إلى +95 نم].وإذ كانت تحتوي على OH حر في الموقع**6** فإنها تعطي إزاحة باثوكرومية لكن بمقدار أصغر من [+70 نم] . أما إذا كانت كلتا المجموعتين**6 و'4** (OH) موجودتين فإن الإزاحة الباثوكرومية تنخفض إلى حد كبير[10].

IV-2- 1- أ-3- طيف الامتصاص في وجود NaOAC :

بخصوص تأثير الـــ NaOAc على طيف uv للشالكونات و الأورونات الإزاحة الباثوكرومية للعصابة (I) (أو ظهور كتف على جانب الطول الموجي الطويل للعصابة(I) يمكن ربطه بوجود مجموعة هيدروكسيل (OH) حر في الموقع**'4** أو(و) **4** في الشالكونات أو في الموقع**6** أو(و) **'4** في الأورونات.

مجموعة هيدروكسيل (OH) في الموقع **2** على نواة الشالكون لاتظهر بواسطة NaOAc.
الشالكون مع ثلاث مجموعات هيدروكسيل متجاورة قد يتفكك في NaOAc.

IV-2- 1- أ-4- طيف الامتصاص في وجود H_3BO_3 + NaOAc:

يضاف H_3BO_3 على العينة في وجود NaOAc للكشف عن مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB فتتشكل معقدات مخلبية و الشكل-3- يوضح ذلك. و يلغى في حالة استبدال أحدهما فقط.

وجود مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B في الشالكونات والأورونات تظهرعند اضاف H_3BO_3 على العينة في وجود NaOAc إنزياح باثوكرومي للعصابة I بمقدار [+28 إلى +36 نم] .

مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةA ايضا قابل للكشف بهذا الإجراء بالرغم أن الإزاحة الملاحظة تكون أصغر بعض الشئ.

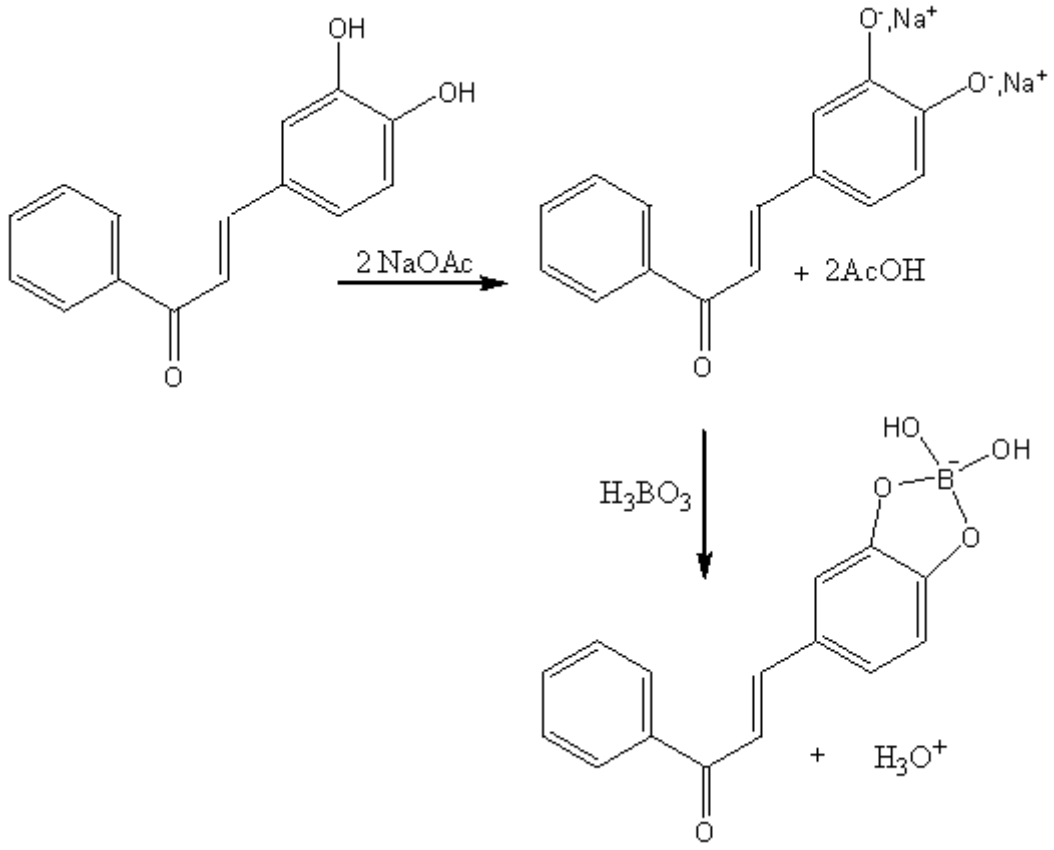
والجدولين7و8 يبينان مقدارالإزاحة الباثوكرومية ($+\Delta\lambda$) للعصابة I في وجود (H_3BO_3 +NaOAc) *بالمقارنة مع طيف* الميثانول لمجموعة من المركبات:

الشالكونات	$+\Delta\lambda$
3,4-Dihydroxychalcone	36
-Trihydroxychalcone',4',3'2	10
Trihydroxychalcone'-',3,4'2	30
Tetrahydroxychalcone'-',3,4,4'2	36

الجدول-7-

الأورونات	$+\Delta\lambda$
-Dihydroxyaurone',4'3	32
6,7-Dihydroxyaurone	22
Tetrahydroxyaurone',7-6,',4'3	33
Leptosidine	28

الجدول-8-



الشكل –3–تشكيل المعقد في وجود H_3BO_3 + NaOAc

IV–2– 1– أ–5–طيف الامتصاص في وجود $AlCl_3$ و ($AlCl_3$ + HCl) :

كلوريد الألمنيوم ($AlCl_3$) يكون معقدات ثابتة مع الكربونيل و هيدروكسيل الموضع C_2، و تبقى هذه المعقدات ثابتة بعد إضافة حمض HCl. كما يشكل نفس الكاشف$AlCl_3$ مع مجموعة أرثو ثنائي هيدروكسيل معقدات تكون غير ثابتة بعد إضافة حمض HCl [8] و الشكل–4–يوضح هذه المعقدات.

وجود مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B لكل من الشالكونات والأورونات يظهر إنزياح باثوكرومي للعصابة I بمقدار [+40 إلى +70 نم] .

مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةA أيضا قابل للكشف بهذا الإجراء بالرغم أن الإزاحة الملاحظة تكون أصغر بعض الشئ.

والجدولين التاليين يبينان مقدارالإزاحة الباثوكرومية (+Δλ) للعصابة I في وجود ($AlCl_3$) *بالمقارنة مع طيف* ($AlCl_3 + HCl$) لمجموعة من المركبات:

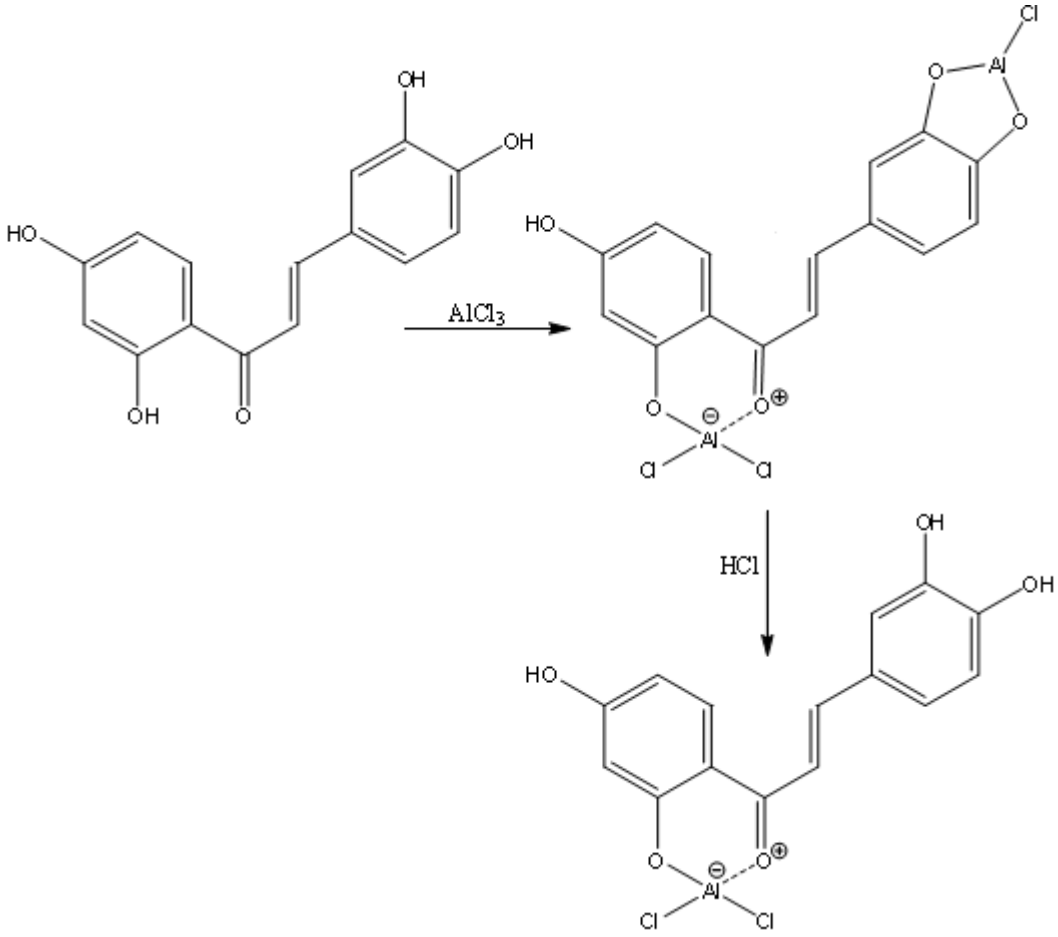
الشالكونات	+Δλ
3,4-Dihydroxychalcone	48
-Trihydroxychalcone',4',3'2	22
Trihydroxychalcone'-',3,4'2	67
Tetrahydroxychalcone'-',3,4,4'2	63

الجدول-9-

الأورونات	+Δλ
-Dihydroxyaurone',4'3	50
6,7-Dihydroxyaurone	39
Tetrahydroxyaurone'-6,7 ,',4'3	48
Leptosidine	44

الجدول-10-

أما في حالة الشالكونات المستبدلة في الموقع 2' فإنها تعطي في وجود ($AlCl_3$+ HCl) إزاحة باثوكرومية للعصابة I بالمقارنة مع طيف الميثانول. أما إذا كانت مستبدلة في المواقع 4',3',2' فإنها تعطي إزاحة بمقدار +40 نم .



الشكل-4-المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين الفلافونيد و$AlCl_3$ قبل وبعد إضافةHCl

والجدول التالي يوضح مختلف التأثيرات المحتملة على طيف UV و تفسيراتها قبل وبعد إضافة الكواشف[9, 10, 11] [17,18].

الكاشف	الإزاحة الملاحضة(نم)		التعليل
	العصابة(I)	العصابة(II)	
MeOH	340-390 430−370	220-270 220−270	شالكون أورون
NaOMe (NaOH)	+60 إلى 100 للعصابة(I) مع زيادة في شدة الإمتصاص +60 إلى 100 للعصابة(I) مع نقصان في شدة الإمتصاص		4-OH (شالكون) 2-OH أو(و) 4'-OH(شالكون)
	+80 إلى 95 للعصابة(I) مع ثبات في شدة الإمتصاص +70 للعصابة(I) مع ثبات في شدة الإمتصاص		4'-OH(أورون) 6-OH(أورون)
NaOAc	إزاحة باثوكرومية للعصابة(I)		OH حر في الموقع4' أو(و) 4 في الشالكونات أو في الموقع6 أو(و) '4 في الأورونات
$NaOAc + H_3BO_3$	+28 إلى 36 للعصابة(I)		أرتو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B للشالكونات و الأورونات أرتو ثنائي الهيدروكيل على الحلقة A
$AlCl_3$	+40 إلى +70 مقارنة بطيف $HCl+ AlCl_3$ +20 إلى +25 مقارنة بطيف $HCl +AlCl_3$		أرتو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B للشالكونات و الأورونات أرتو ثنائي هيدروكسيل على الحلقةA (إضافة إلى أرتو ثنائي الهيدركسيل على الحلقةB)

الجدول−11 −

IV-2- 2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسيRMN:

يعتبرمطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN من أهم الوسائل التحليلية المستخدمة في تشخيص التركيبة الكيميائية للمركبات و توجد عدة تقنيات هي :

طيف RMN للبروتون ^{1}H.

طيف RMN للكربون ^{13}C.

طيف RMN ثنائي الإتجاه .

IV -2- 2-أ- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي^{1}H-RMN:

يتم الحصول على طيف ^{1}H-RMN باستعمال مذيبات مختلفة حسب قطبية المركبات مثل $CDCl_3$ مع الفلافونويدات غير القطبية و مذيب CD_3OD و DMSO-d_6 مع معظم الغليكوزيدات و الجليكونات [5].

و فيما يلي جداول تبين بعض الإزاحات الكيميائية لبروتونات الحلقات A, B, C[19-20] [5]

الجدول – 6 – الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة A [19]

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

الجدول – 6 –

الجدول – 7 – الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة B [20][5]

بروتونات الحلقة B طبيعة الفلافونيد	(H-2' / H-6') *J*,Hz δ,ppm	(H-3' / H-5') *J*,Hz δ,ppm
فلافون (4'-OR)	8,5 7,7-7,9(d)	8,5 6,5-7,1(d)
فلافونول (4'-OR)	8,5 7,9-8,1(d)	8,5 6,5-7,1(d)
الأورون (4'-OR)	8,567, -7,8(d)	8,5 6,5-7,1(d)
الشالكون (4-OR)	(H-2 / H-6) 8,5 7,4-7,6(d)	(H-3 / H-5) 8,5 6,5-7,1(d)

الجدول – 7 –

بروتونات الحلقة B طبيعة الفلافونيد	H-2' *J*,Hz δ,ppm	H-6' *J*,Hz δ,ppm
فلافون (4'-OMe 3'-OH و 3',4'-OH)	2,53-7,27, (d)	2,55-7,3,7 (q) و 8.5
فلافول (4'-OMe 3'-OH و 3',4'-OH)	2,5 7,5-7,7(d)	2,59-7,6,7 (q) و 8.5
فلافول (4'-OH, 3'-OMe)	2,567, -7,8(d)	2,56-7,4,7 (q) و 8.5

الجدول – 7 –

بروتونات الحلقة C :

يعطي البروتون H-3 في الفلافون إشارة أحادية حادة في المجال [6,2-6,4ppm] و تتداخل مع إشارة بروتوني الحلقة A (H-8, H-6).

بروتونات الميتوكسيل OMe- :

وجود مجموعة ميتوكسيل أو عدة ميتوكسيلات في الجزيء يظهر مجموعة من الإشارات الأحادية بين [3,8 – 4,5ppm]. [21]

بروتونات السكر:

بروتونات السكر تتميز بالبروتون الأنوميري، إذ يختلف إزاحة هذا البروتون حسب طبيعة السكر وكذا موقع و نوع الرابطة بين السكر و الأجليكون و تتواجد إشارته عموما في مجالات أدنى من مجال إشارات بقية بروتونات الأجليكون[5] و الجدول –11 – يعطينا قيم الإزاحات للبروتون الأنوميري لبعض الجليكوزيدات في $DMSO-D_6$

الجدول– 8 – قيم الإنزياح للبروتون الأنوميري لبعض الجليكوزيدات في $DMSO-D_6$

طبيعة السكر	H-1 (δ,ppm)
3-O-β-D-Glucoside	5,25 – 5,56
3-O-β-D-Galactoside	5,6
8-O-β-D-Glucoside	4,64 – 4,88
6-O-β-D-Rhamnoside	4,85 – 5,26

الجدول– 8 –

البروتونات المميزة للشالكونات و الأورونات:[23-22]

الشالكونات				الأورونات
Hβ		Hα		H ايثيليك
δ,ppm	*J*,Hz	δ,ppm	*J*,Hz	δ,ppm
7,3-7,7(d)	15	6,7-7,4(d)	15	6,75 (s)

IV-2- 2-ب- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون $RMN^{13}C$:

تعتبر مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 تقنية مكملة لمطيافية البروتون و تستعمل مع مختلف أنواع الفلافونويدات

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

معرفة العدد الإجمالي لذرات الكربون للفلافونيد .

معرفة عدد كربونات السكر .

معرفة عدد الكربونات الأوكسيجينية داخل أنوية الفلافونيدات .

طبيعة ومكان ارتباط الوحدة السكرية.

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

يوضح الجدول التالي الإزاحات الكيميائية لذرات الكربون 2، 3، 4 للفلافونات والفلافونولات من خلال تقنية الرنين النووي المغناطيسي $RMN^{13}C$ [22-24].

*** الجدول-9- الإزاحة الكيميائية لبعض ذرات الكربون للفلافونات و الفلافونولات وللشالكونات**

طبيعة الكربون	الإزاحة الكيميائية ppm بالنسبة لـــ TMS
Aromatique C-CH_3	7 – 22
Aromatique O-CH_3	59 – 63
3-Methoxyflavone (3-OCH_3)	58 – 59
Sucre CH_2OH, CH-OH, C-glycoside	56 -78
5,7-Dihydroxyflavonoide (C_6-C_8)	90 -110
Flavone (C-3)	90 -135
Flavanol (C-3) 3-Methoxyflavone (C-3)	135 -144
Flavanol (C-2) 3-Methoxyflavone (C-2)	136 -158
Flavone (C-2)	155 -168
Flavone (C-4) Flavanol (C-4) 3-Methoxyflavone (C-4)	172 -186
chalcone(Cβ)	143
chalcone(Cα)	129

الجدول-9-

IV-2- 3- مطيافية الكتلة:

و تستعمل هذه التقنية للتعرف على البنية الكيميائية للمركب بمعرفة الوزن الجزيئي، و بدراسة مختلف الشظايا الناتجة عن إنشطاره ، و تكمن أهمية هذه التقنية في كون أنها لا تحتاج إلى كميات كبيرة من العينة، و من بين التقنيات المستعملة في هذا المجال

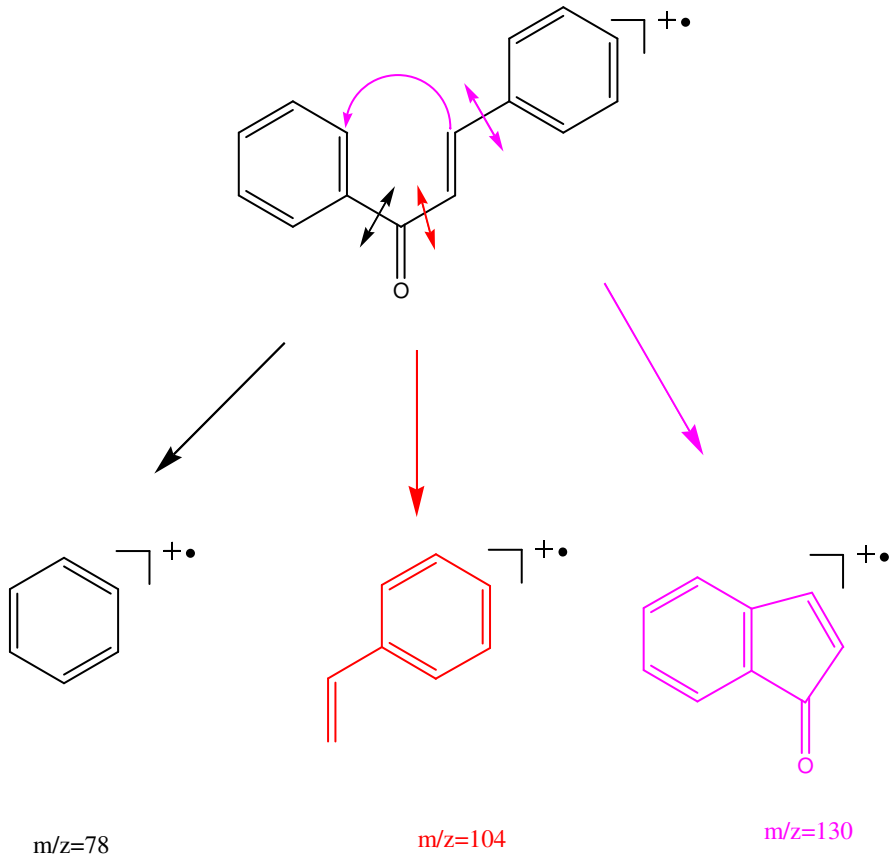
- تقنية القذف الإلكتروني (EI).
- تقنية القذف السريع (F.A.B).
- تقنية الإلكتروسبراي (ES).

IV -2-3-أ-تقنية القذف الإلكتروني (EI):

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

$$M + 1e^- \longrightarrow M^+ + 2e^-$$

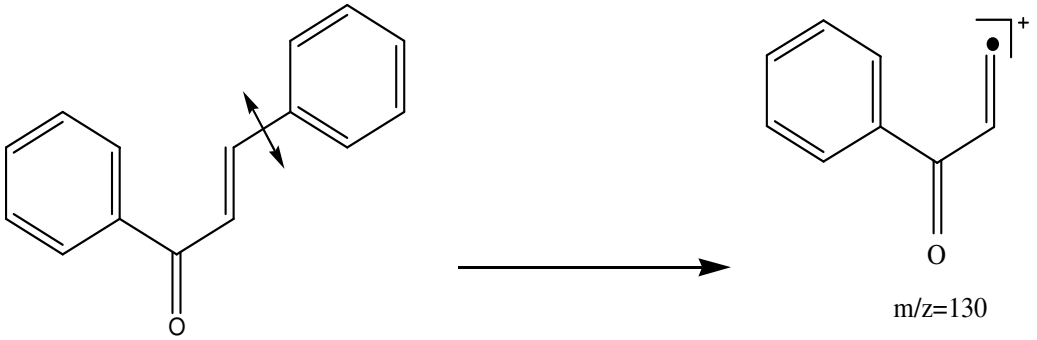
فيما يلي شرح لأهم شظايا الشالكون المقترحة من قبل العالم Van De Sand [25]



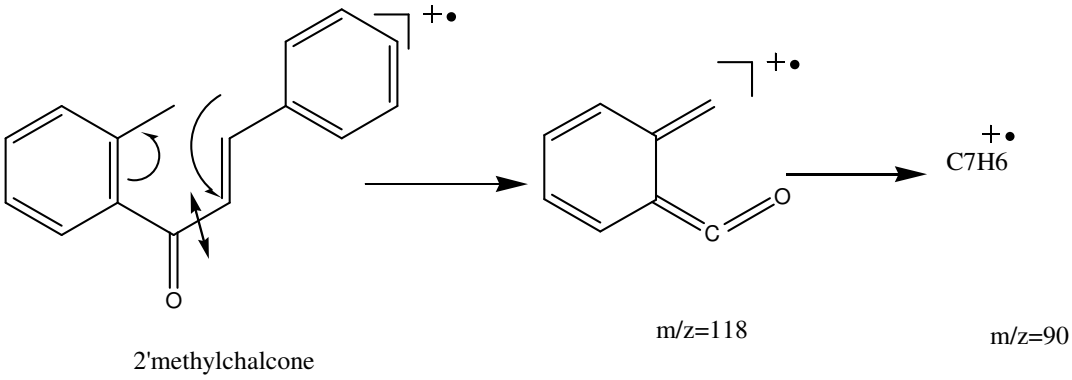
أهم شظايا الشالكون المقترحة من قبل العالم Van De Sand et al 1972

بالنسبة للشظية m/z=130 فسرت من قبل العالم Van De San et al 1972 [25] بأنها ناتجة عن اعادة ترتيب للبروتونH في *الموقعOrtho و تشكيل حلقة خماسية*.

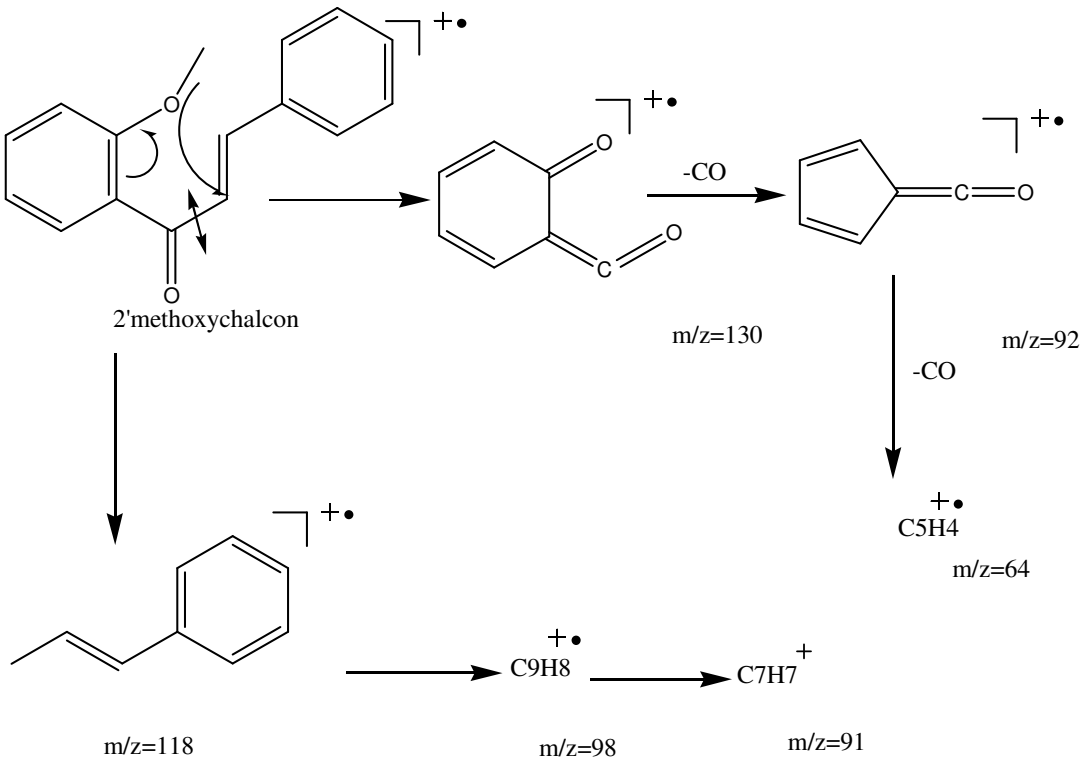
لكن العالم Ardanaz et al أظهر أن هذه الشظية تنتج عن إعادة ترتيب [26] :



في حالة شالكون مستبدل بميتيل فى الحلقة A في الموقع 2' أهم الشظايا الظاهرة في الطيف هي : [25]

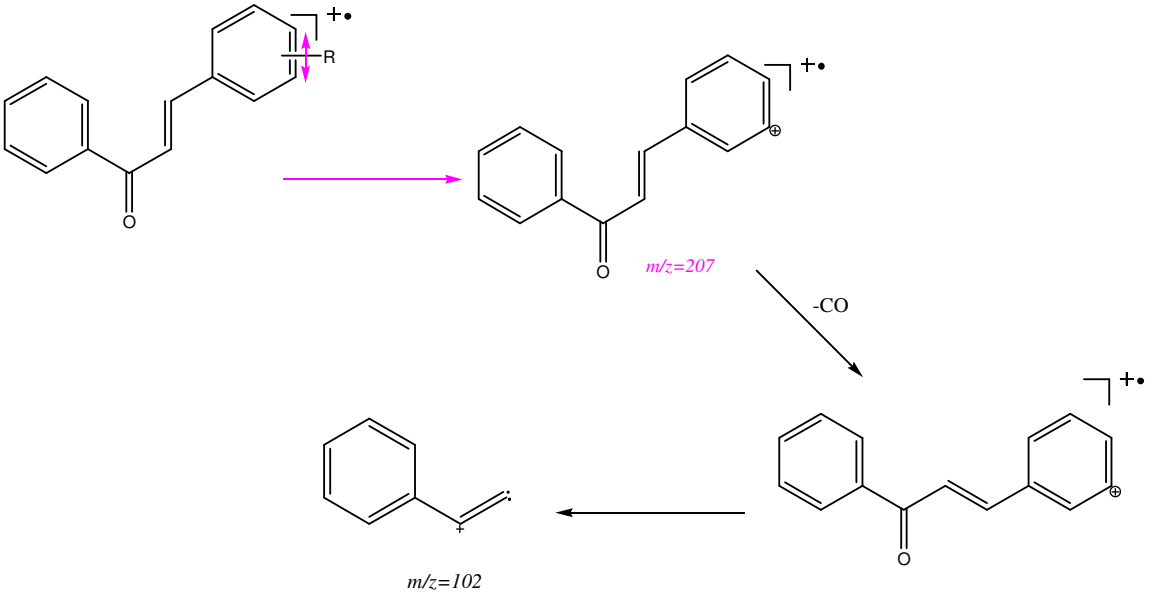


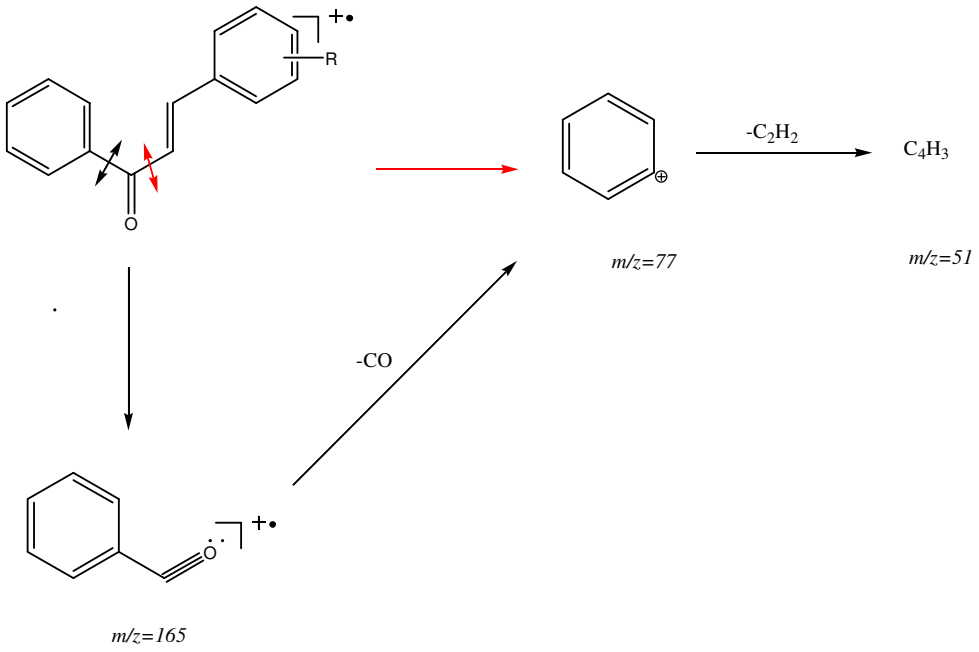
في حالة شالكون مستبدل بميتوكسي فى الحلقة A في الموقع 2' أهم الشظايا الظاهرة في الطيف هي :[25]



العالم Van De Sand et al 1972

أما اذا كانت الحلقة B مستبدلة أهم الشظايا الظاهرة في الطيف هي [25]:


R
O
m/z=207
-CO
O
m/z=102


R
O
-C2H2
C4H3
m/z=77
m/z=51
-CO
O
m/z=165

IV -2- 3- ب- تقنية القذف السريع بالذرات (FAB) [27]:

تستعمل هذه التقنية مع المركبات الجليكوزيدية، حيث يتم تأين المركبات دون تسخين و من مميزات هذه التقنية:

تكوين أيونات موجبة و سالبة

مدة حياة طويلة للعينة

تكوين أيونات شبه جزيئية (quasi moléculaires)

تطبيق هذه التقنية (F.A.B) مع الجليكوزيدات يمكننا من الحصول على معلومات فيما يخص الجزء السكري منها، و إضافة إلى أيونات التشظية العادية المميزة للفلافونويدات نحصل على قيم موافقة للأيونات شبه الجزيئية من الشكل: $^{+}[M+H]$، $^{+}[M+Na]$، $^{+}[M+K]$....

IV -2- 3- ج- تقنية الرش الإلكتروني :

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

أما بالنسبة للفلافونويدات فتستعمل تقنية (ES^{+}) لدراسة المركبات سهلة التكسير مثل:

. O-glycosides

V- الإماهة الحمضية :

تستعمل هذه الأخيرة لمعرفة طبيعة السكرالمرتبط بالمركبات الغليكوزيدية المعزولة. كما أنها تعطينا فكرة عن ما إذا كان المركب غليكوزيدا من نوع (O-glycosyl)أو(C -glycosyl) لأن الرابطة من النوع الثاني أي(C-glycosyl) مقاومة للإماهة في الوسط الحمضي؛ فيستفاد من هذه الخاصية في تمييز هذا النوع من الروابط عن النوع الأول (أي O-glycosyl).

V-1-الطريقة العملية :

تؤخذ كمية قليلة من الغليكوزيد المذابة في مذيب معين، و يضاف إليها 2 ملل من حمض كلور الماء (*HCl , 4N*) في أنبوب اختبار، يسخن الخليط في حمام مائي (*100* ° م) لمدة ساعة، بعد التبريد يستخرج الأنبوب و يضاف له حوالي (2 ملل) من ثنائي إيثيل الإثير، و يرج جيدا ثم يترك ليهدأ حتى ظهور خط الفصل بين الطورين المائي و العضوي، و تفصل الطبقة العضوية (ثنائي إيثيل الإثير).

تكرُر العملية مرة أخرى مع ثنائي إيثيل الإثير، و مرتين مع أسيتات الإثيل ؛ حيث دائما تفصل الطبقة العضوية عن المائية، ليضاف إلى هذه الأخيرة (2 ملل) من البوتانول العادي مرة أولى ثم مرة ثانية.

بعد تجميع الطبقات العضوية كلا على حدى يتم تجفيفها ليصبح لدينا :

- الطبقة العضوية الخاصة بثنائي إيثيل الإثير .
- الطبقة العضوية الخاصة بأسيتات الإيثيل .
- الطبقة العضوية الخاصة بالبوتانول العادي .

عموما الطبقة العضوية لثنائي إيثيل الإيثر هي التي تحتوي على الأغليكون ، أما الجزء السكري من الغليكوزيد فيبقى مذابا في الطبقة المائية التي يتم تجفيفها.

التعرف على الأغليكون يكون بواسطة تسجيل الطيف (UV) له في الميثانول كما يمكن التعرف عليه بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستعمال شواهد.

أما الجزء السكري فيتم التعرف عليه باتباع الخطوات التالية:

V-2- تحضير العينة:

نقوم بتبخير الطور المائي المتحصل عليه و الذي يحتوي على الجزء السكري حتى الجفاف و ذلك باستعمال مضخة خاصة (pompe à palettes)، لنعيد تذويبه في كمية قليلة جدا من الماء و بذلك يكون جاهزا للإستعمال فيما بعد.

V-3- تحضير اللوح الكروماتوغرافي من نوع (Gel de silice 60F 254):

يرش هذا الأخير بمحلول من (NaH_2PO_4 (0.2 M ، ثم يترك ليجف في الهواء بضع دقائق قبل وضعه في فرن تحت درجة حرارة 100°م لمدة ساعة، بعدها وباستعمال ماصة توضع نقاط من الطور المائي المحتوي على السكر (المحضر سابقا) مع بعض شواهد سكرية معروفة، ليغمس اللوح في مملص يحتوي على (أسيتون : ماء) بنسبة (9 : 1)، و بعد 150-180 دقيقة يستخرج الكروماتوغرام و يترك ليجف مدة ساعة، ليعاد وضعه مرة ثانية في نفس المملص السابق و لنفس المدة السابقة، يستخرج بعدها ليجف مدة ساعة، عندها يرش بواسطة كاشف مالونات الأنيلين (حمض المالونات 1غ – حمض الفوسفوريك 3ملل – الأنيلين 1ملل – الإيثانول 100ملل) ويترك بضع دقائق ليجف في الهواء بعد ذلك يوضع في الفرن تحت درجة حرارة 100°م لمدة 5 دقائق، حيث تبدأ بقع السكريات في الظهور فتكون بنية اللون بالعين المجردة و صفراء عند رؤيتها تحت أشعة UV ، عندها يتم التعرف على السكريات التي بحوزتنا و ذلك بمقارنتها مع الشواهد السكرية المستعملة.

مراجع الفصل الثاني

[1] Abd Elchakour, A. S. (1987). Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abd Elaziz, Djedda, 173.

[2] Randerah, (1971). Chromatographie sur couche mince, eds Gautier Villard.

[3] Andersen Øyvind, M., Markham, Kenneth R. (2006). Flavonoid chemistry, biochemistry, and applications. CRC Press Taylor & Francis Group.

[4] Francisco, A., Tomas-Barberan, F. (1990). Phytochem. Anal. 1, 44.

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

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

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

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

[9] Jurd, L. (1962).,The chemestry of the flavonoid compounds (edited by I.A.Geissman), 107-155.

[10] Geissman, T.A., Harbone, J. B. (1956). J. Am. Chem. Soc. 78, 832.

[11] Jurd, L., Horowitz, R.M. (1961). J. Org. Chem, 26, 2561.

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

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

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

[15] Jurd, L. (1962). the chemistry of flavonoids compounds. Pergamon press, New – York.

[16] Elhazemi, H. (1995). Natural products, eds University of King Saoud.

[17] Geissman, T.A., Harbone, J, B. (1955). J. Am. Chem. Soc, 77, 4622.

[18] Harbone, J.B. (1967). Comparative biochemestry of the flavonoids, 78-83.

[19] Mabry, T. J. (1969). perspectives in phytochemistry, 45, eds Chapman and Hall. London.

[20] Mabry, T. J. (1963). Perspectives in phytochemistry, eds, Harborne, J. B. Academic press. London.

[21] Mabry, T. J. (1969). Perspectives in phytochemistry,. eds, Harborne J. B. 1-45. Academic press. London.

[22] Huk M., Gorlizter K., (1969). Arch. Pharm. 302, 423

[23].Harborne, J. B., 1993. The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman & Hall/CRC, London

[24] Markham,K,R.,Tenai,B., Geiger H.,Mabry,T.J. (1978)" Tetrahedron" Carbon-13 NMR.Studies of flavonoids, 3, 1389-1397.

[25] Van De Sande, C., Serum, J. W., Vandewalle, M. (**1972)**. Organic mass spectrometry.6, 1333-1346.

[26] Ardanaz et al, (1991), Rapid Communications in Mass Spectrometry 5, 569-573.

[27] Becchi, M., Fraisse, D.(1989). . Biomed. & environmental mass spectromet. 18, 122.

الفصل الثالث

الدراسة النباتية والكميائية لنبتة

Ononis angustissima

الدراسة النباتية والكيميائية للنبتة :

I-الدراسة النباتية للنبتة:

I-1- المادة النباتية:

تم قطف و جمع النبتة في شهر أفريل من سنة 2007 من طرف الأستاذ بوهروم محمد من من ضواحي ولاية بسكرة بالجنوب الجزائري, وقد تعرف عليها البروفسور كعباش (جامعة سطيف) ، أجريت لها عملية التجفيف بوضعها في أماكن خاصة تحت الظل وبعيدا عن الرطوبة، بعد ذلك طحنت فكانت الكتلة المتحصل عليها 980 غ.

صورة فوتوغرافية لنبتة *Ononis angustissima*

I-2- وصف النبتة:

نبتة ذات أزهار صفراء, تمتد على سيقان طويلة, ذات شكل عنقودي, يتراوح طولها ما بين 30 – 100 سم تزهر في فصل الربيع بين شهري أفريل و ماي .تنمو في شمال الصحراء الجزائرية و تمتد من بسكرة إلى بشارمرورا بغرداية.

I-3- الوضع ضمن التصنيف النباتي:

Royaume	Plantes	المملكة
Embranchement	Spermatophytes	تحت المملكة
Sous Embranchement	Angiospermes	الفرع
Classe	Dicotylédones	الصنف
Ordre	Rasales(Fabales)	الرتبة
Famille	Léguminoseae(Fabaceae)	العائلة
Sous Familles	Papilionacées	تحت العائلة
Genre	*Ononis*	الجنس
Espèce	*angustissima*	النوع

II - الدراسة الكميائية للنبتة :

II-1- استخلاص النبتة:

اتبعنا في عملية الاستخلاص البروتوكول التالي :

بعد تجفيف الجزء الهوائي للنبتة قمنا بتنقيتها و تقطيعها (980غ)، نقعت في خليط من الايثانول والماء المقطر بنسبة (2:8) على الترتيب مدة 24 ساعة ، رشح و ركز المحلول تحت ضغط منخفض و 40 درجة مئوية. ثم أعيدت العملية مرتين لمدة زمنية 36 ساعة، 72 ساعة على الترتيب وهذا لاستنفاذ النسيج النباتي والحصول على مردود معتبر و كاف.

خفف المحلول الناتج بالماء المقطر (890 مل) ترك ليلة كاملة ثم رشح للتخلص من الأتربة و الشوائب. قمنا بعد ذلك باستخلاص من نوع سائل- سائل في قمع فصل باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية: إيثير البترول، كلوروفورم، خلات الإيثيل، البيوتانول العادي.

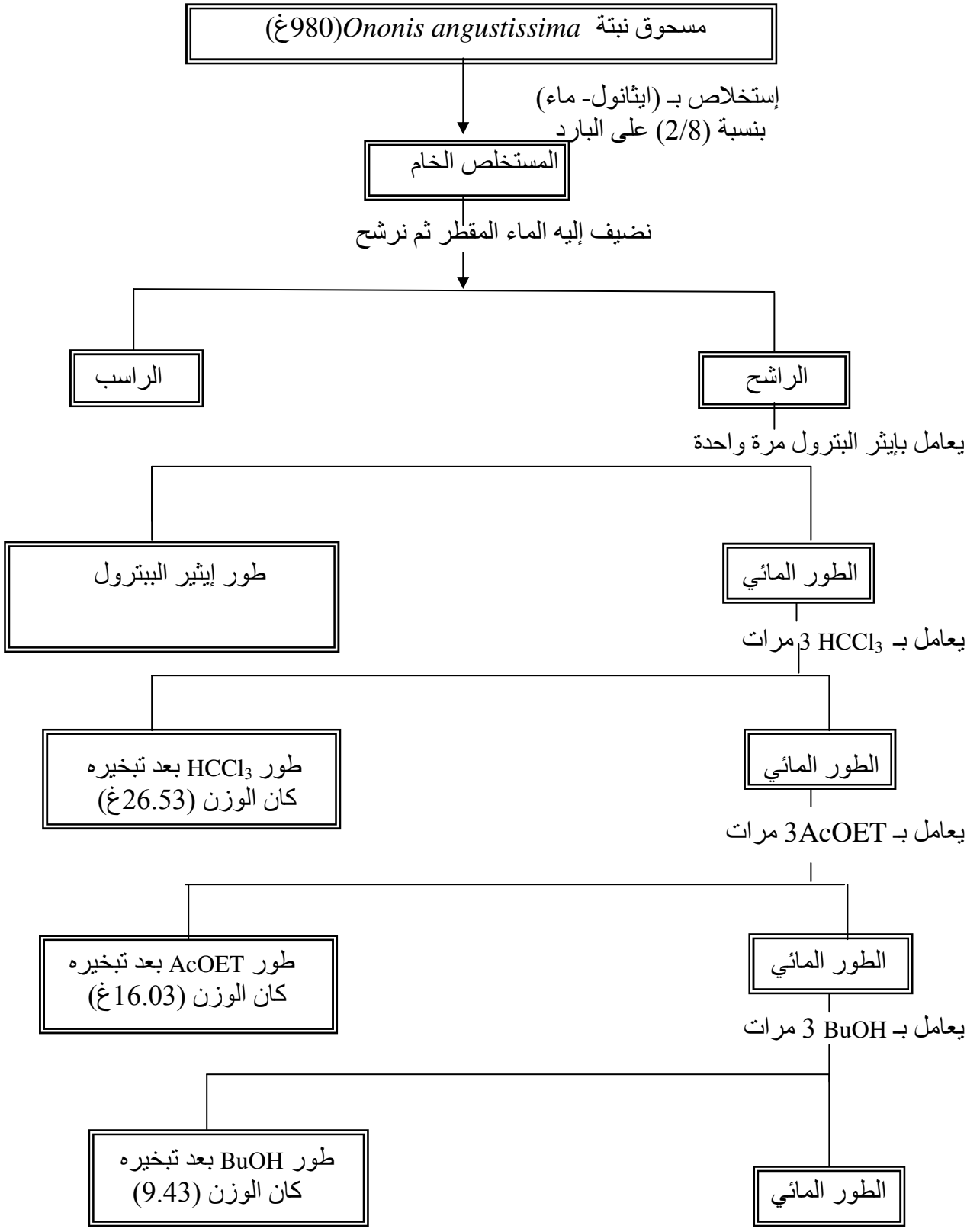
إيثر البترول مرة واحدة 300 مل للتخلص من الدهون و بعض الكلوروفيل.

الكلوروفورم أعيدت العملية ثلاث مرات (3 x 300مل) حيث كان الرج خفيفا في بداية الأمر لتفادي تشكل أي مستحلب، الطور العضوي جمع و ركز تحت درجة حرارة لم تتعد35°م. فحصلنا على طور كلوروفورمي بوزن25.06غ.

خلات الإيثيل حيث أنجزت العملية ثلاث مرات (300مل كل مرة) والطور العضوي جمع و ركز تحت درجة حرارة لا تتعدى 35°م. فحصلنا على طور خلات الايثيل بوزن 16.03غ مع وجود راسب أبيض ، وهو الجزء الذي تمت عليه الدراسة.

البوتانول العادي حيث أعيدت العملية ثلاث مرات (300مل كل مرة) والطور العضوي جمع و ركز، فحصلنا على طور البوتانول بوزن 9.34 غ.

و المخطط -1- يمثل مختلف خطوات الاستخلاص:



المخطط-1- خطوات عملية إستخلاص المادة النباتية النبتة *Ononis angustissima*

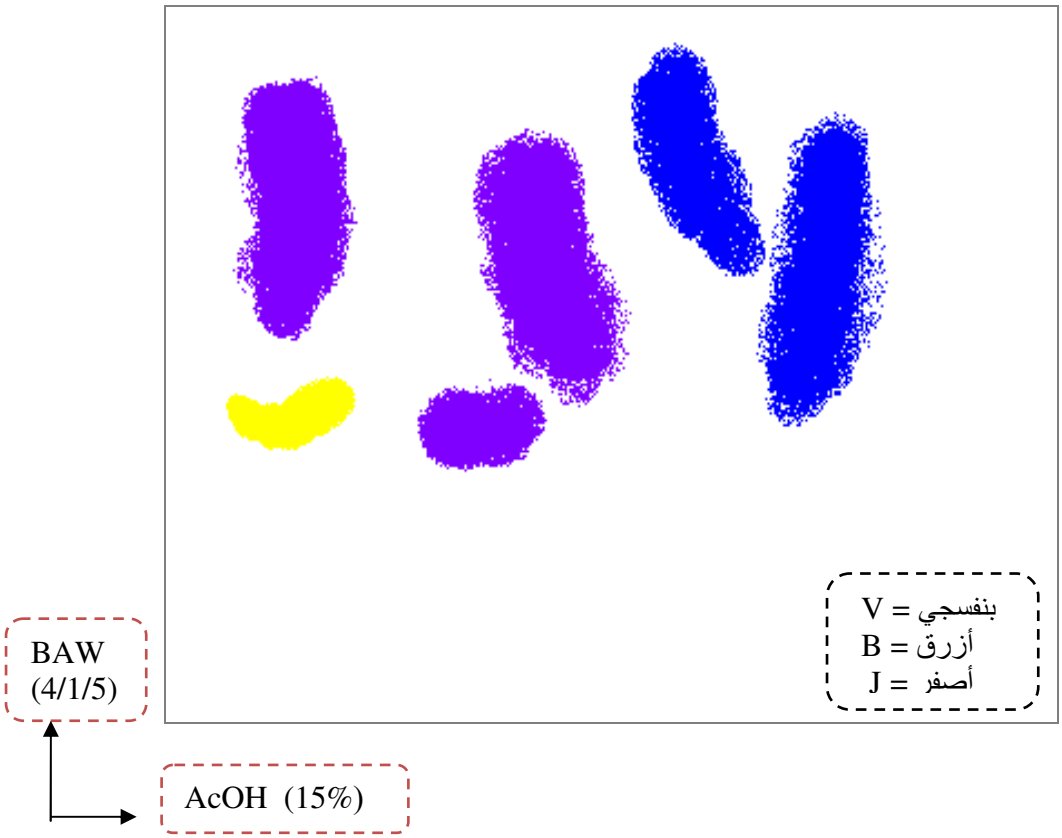
II-2-الفصل و التنقية:

قبل شروعنا في إنجاز عمليات الفصل أجرينا فحوصات تحليلية تمهيدية للمستخلص الأسيتاتي باستعمال جمل الكروماتوغرافيا التالية :

الجملة **I** : كروماتوغرافيا الورق **(CP WHATMAN N°3)** تنائية البعد باستعمال المديبات التالية :

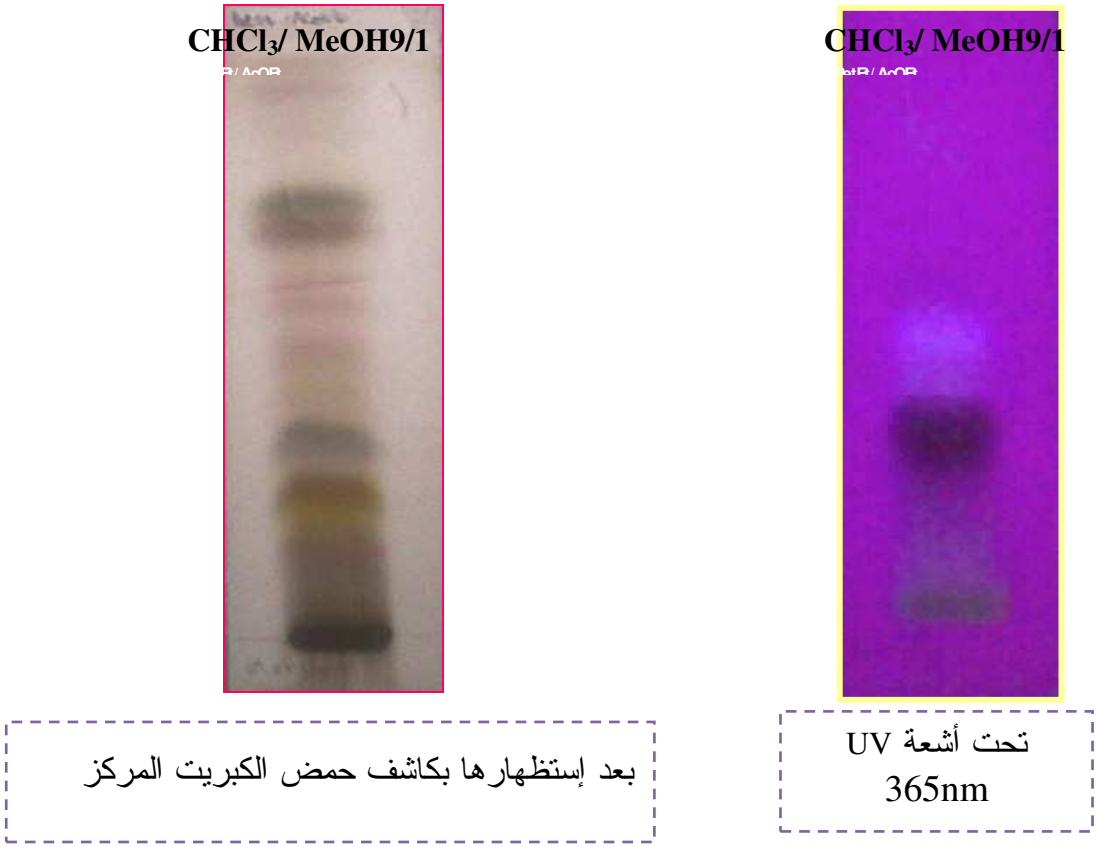
(1) n− BuOH : HOAc : H_2O (BAW) 4 : 1 : 5 (**الطور العضوية**)

(2) AcOH 15 %



الجملة **II** : الطبقة الرقيقة التحليلية من السيليكاجال 60(CCM)، وتم الكشف عنهـــا بمـــصباح **UV** (245nm و365nm).

وهذا للبحث عن الجملة المناسبة لتمليص و فصل أكبر عدد من المركبات. وبعد عدة اختبارات تحصلنا على الجملة المناسبة للتمليص و هي $CHCl_3$/MeOH والصفائح الكروماتوغرافية المرفقة في الشكل (1) توضح ذلك.



الشكل (1): الصفائح الكروماتوغرافية للمستخلص الأسيتاتي، تحت مصباح (Wood 365nm)وبعد إستظهارها بكاشف (H_2SO_4).

تم إختيار تقنية كروماتوغرافيا العمود لغرض فصل مكونات مستخلص خلات الإيتيل (13غ), و ذلك باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة أما الطور المتحرك السائل(المملص) يتكون من الكلوروفورم و الميثانول .

* تمت عملية التمليص باستعمال الكلوروفورم بنسبة 100% ثم نرفع قطبيتـــه بإضـــافة الميثـــانول بالتدريج إلى غاية الوصول إلى 100%.

* اعتمدنا في تغيير قطبية المذيبات على فحوص كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية لمختلف الكسور، بعد معاينتها بمصباح**UV** (245nm و365nm) .

* جمعت الكسور المتماثلة اعتمادا على نفس الطريقة السابقة من فحوص كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية، والجدول (1) التالي يبين ذلك .

رقم الكسور قبل التجميع	رقم الكسور بعدالتجميع	$\%CHCl_3$	%MeOH	كتلة الكسر (g)
15-1	F1	100	00	0.256
56-16	F2	95	05	0.970
80-57	F3	90	10	0.320
100-81	F4	88	12	0.346
121-100	F5	85	15	0.650
140-122	F6	80	20	0.485
165-141	F7	77	23	0.360
182-166	F8	75	25	0.280
250-183	F9	70	30	0.850
272-251	F10	70	30	0.420
335-273	F11	65	35	2.30
365-336	F12	60	40	0.340
397-366	F13	55	45	0.780
410-398	F14	50	50	0320
430-411	F15	45	55	0.490
445-431	F16	40	60	0.560
457-446	F17	35	65	0.480
469-458	F18	30	70	0.730
483-470	F19	20	80	0.565
496-484	F20	10	90	0.380
500-497	F21	00	100	0.340
المجموع	21 كسر			12.222

الجدول(1): نتائج الفصل بكروماتوغرافيا العمود للمستخلص الأسيتاتي

تم اختيار الكسور غير متماثلة المظهر في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) لدراستها، كما اعتمدنا أيضا على فحصها ومقارنتها في عدة أنظمة، و على الوزن المتحصل عليه لكل كسر، ومن ثم تحديد نوع الكروماتوغرافيا المطبقة على كل منهم.

II-3- معالجة الكسور المتحصل عليها :

دراسة الكسر F2:

أخضع هدا الكسرلعملية الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) لسيليكاجال60 مستعملين في ذلك النظام: Hexane/AcOEt/ Acétone 6/2/1 على التوالي. تم فصل المركب النقي F_2.

دراسة الكسر F9:

تضمن هذا الكسر مركبات عديدة ذات قطبية متقاربة جدا و ذات ألوان مختلفة، وقد تم فصلها بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (HF)، مستعملين في ذلك النظام: Hexane/AcOEt/ $CHCl_3$/ Acétone 6/2/1/1.

الفصل الأولي لهدا الكسر أعطى خمس مركبات ذات قطبية متقاربة. أخضعت هده المركبات لعملية فصل جديدة بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لسيليكاجال60 و ذلك بإستعمال النظام: Hexane/AcOEt 6/4 فتحصلنا على مركبين نقيين F_{9-1} و F_{9-2}.

دراسة الكسر F11:

الوزن المعتبر لهذا الكسر(2.30غ) أدى بنا لفصله مرة أخرى عن طريق كروماتوغرافيا العمود ،استخدمنا فيه طور ثابت من السيليكاجال، وطور متحرك يتكون من الهكسان و خلات الإيثيل مع التدرج في التركيز إلى غاية الوصول 100 % من هذا الأخير.

* جمعت الكسور المتماثلة اعتمادا على نفس الطريقة السابقة من فحوص كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية، و الجدول (2) يبين ذلك :

رقم الكسر	الهكسان %	أسيتات الإثيل %	الملاحظة
1-10	100	0	**FC1** راسب أبيض
11-21	90	10	خليط معقد
22-32	85	15	
33-43	80	20	خليط معقد
44-54	75	25	
55-65	70	30	خليط معقد
66-76	70	30	
77-88	60	40	خليط معقد
89-99	50	50	خليط معقد
100-110	0	100	خليط معقد

الجدول(2): نتائج الفصل بكروماتوغرافيا العمود لـــ F 11

الفصل الرابع

النتائج و المناقشة

I-التحليل البنيوي للمركب : F_{-2}

بعد فصل و تنقية هذا المركب نلاحظ أنه يظهر على شكل إبر صغيرة صفراء اللون تذوب في كل من الميثانول و الكلوروفورم .

اللون الإستشعاعي:

اللون الإستشعاعي لهذا المركب تحت مصباح ووود Wood (365nm) أعطى لونا بنفسجيا .

معامل الاحتباس (R_f) :

قيم معامل الإحتباس للمركب F_{-2} مبينة في الجدول (1) .

الدعامة	الجملة المستعملة	R_f
ك. ط. ر على متعدد الأميد DC.6.6	AcOH	0.14

*** الجدول (1): قيم معامل الإحتباس (R_f) للمركب F_{6-2}. ***

المعطيات الطيفية:

1- أطياف الأشعة فوق البنفسجية:

إن دراسة طيف الاشعة الفوق البنفسجية لهذا المركب في الميثانول يتميز بشدة(حدة) امتصاص العصابة I عند *طول موجي أعظمي* λmax *350 نم* وضعف (نقص) العصابة II عند *طول موجي أعظمي* λmax *223 نم* .

2- طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون $RMN\ ^{13}C$

تبن مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون $RMN\ C^{13}$ (أنظر الطيف 1) المسجلة في جهاز ذو تردد (65.5 MHz)، (باستعمال المذيب $CDCl_3$) ، وجود حوالي **13** ذرة كربون غير متكافئة مغناطيسيا،وبعد فحص الإزاحة الكيميائية لمختلف أنويه ^{13}C أمكننا توزيع أهمها كالتالي:

وظيفة كربو نيلية واحدة (1C=O) تظهر عند (δ=192.036 ppm)

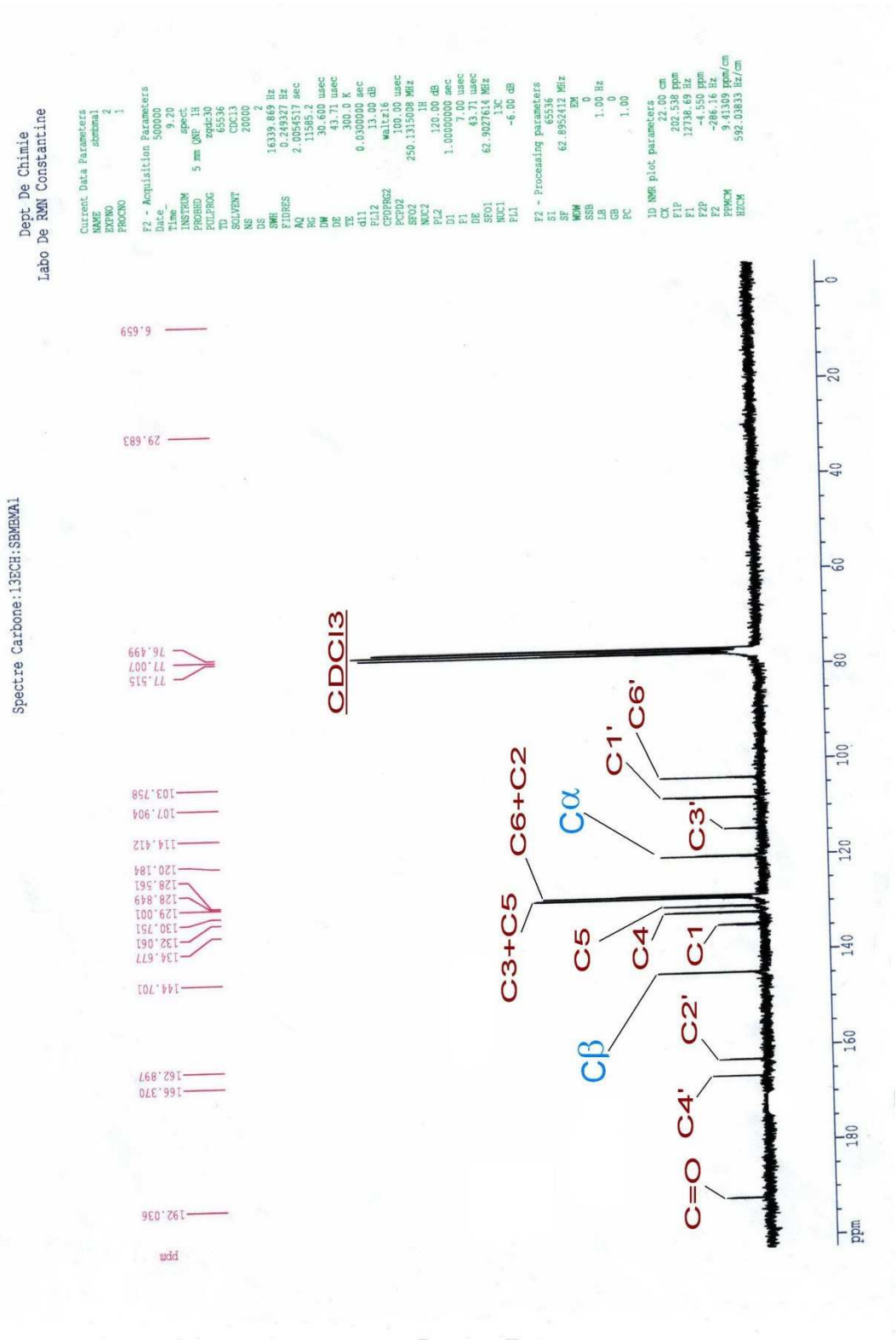
4 كربونات رباعية تظهر عند ($\delta_{c1'}$=107.9 ppm، $\delta_{c2'}$=162.89 ppm و $\delta_{c4'}$=166.37ppm و δ_{c1}=134.67 ppm).

مجموعتين إيثيلنيتين (CH=) تهجينها sp^2 عند ($\delta_{c\beta}$=144.70 ppm و $\delta_{c\alpha}$=120.18 ppm).

يبدو أن المركب يحتوي سوى على 15 ذرة كربون و الجدول 2 يوضح مختلف الإزاحات الكيميائية للكربونات الموجودة في الطيف 1 (أنظر جدول 2)

الكربونات	الانزياح الكيميائي PPm
C1	134.67
C2+ C6	128.56
C3+ C5	129.01
C4	132.06
C=o	192.03
Cα	120.18
Cβ	144.70
C1’	107.90
C2’	162.89
C3’	114.41
C4’	166.37
C5’	130.75
C6’	103.75

*** الجدول(2): معطيات طيف الكربون للمركب F_2.***



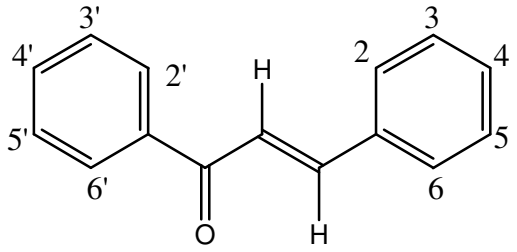
طيف-1- ^{13}C -RMN للمركب F-2

3- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H

تبين مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN- $\mathbf{H^1}$(أنظر الطيف 2) :

إشارة ثنائية بتكامل 1H بثابت تزاوج J=15.6 Hz عند الإزاحة $\delta_{H\alpha}$=7.65 ppm خاصة بالبروتون H_α وهي ميزة الشالكونات[2].

إشارة ثنائية بتكامل 1H عند الإزاحة $\delta_{H\beta}$=7.86 ppm بثابت تزاوج J=15.6 Hz خاصة بالبروتون H_β وهي مايؤكد أن المركب المدروس شالكون. ومنه هيكل هذا المركب يكون من الشكل (1):[2]



الشكل (1)

كما نلاحظ ظهور 10 بروتونات فقط عوض 12 في الطيف RMN- $\mathbf{H^1}$ ، هذا مايدل على أن المركب ثنائي الاستبدال .

- بالنسبة للحلقة A نلاحظ وجود (أنظر الطيف 2) :

إشارة أحادية بتكامل 1H عند δ=13.48 ppm خاصة ب (′OH-2) ميزة الرابطة الهيدروجينية بين مجموعة الفينول و الوظيفة الكربونيلية .[2]

إشارة ثنائي ثنائي بتكامل 1H عند δ=6.52 ppm بثابت تزاوج (J =2.4 Hz J =6.5 Hz) خاصة بالبروتون ′H-5 مما يدل على وجود كل من ′H-3 و ′H-6.

إشارة ثنائي بتكامل 1H عند δ=6.48 ppm بثابت تزاوج J =2. 2 Hz خاصة بالبروتون H-3′ مما يدل على وجود ′H-5.

إشارة ثنائية بتكامل 1H بثابت تزاوج J =6.5 Hz عند δ=7.79 ppm خاصة بالبروتون ′H-6.

بالنسبة للحلقة B نلاحظ من خلال دراسة الطيف أنها غير مستبدلة إذ يظهر لنا :

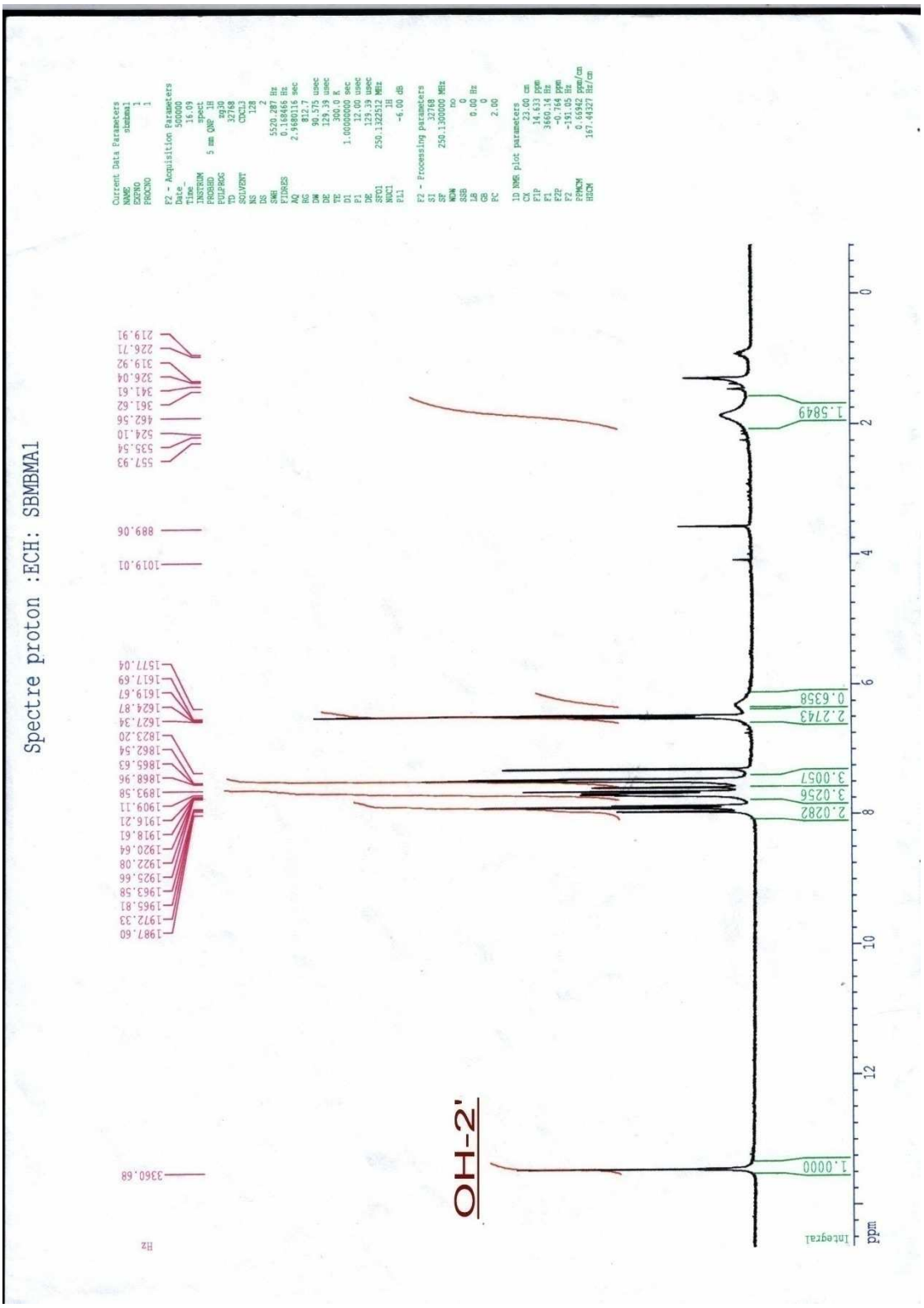
إشارة تعددية بتكامل 2H عند δ=7.72 ppm خاصة بالبروتون H-2 و H-6.

إشارة تعددية بتكامل 3H عند δ=7.48 ppm خاصة بكل من البروتون H-3 و H-4 و H-5 .

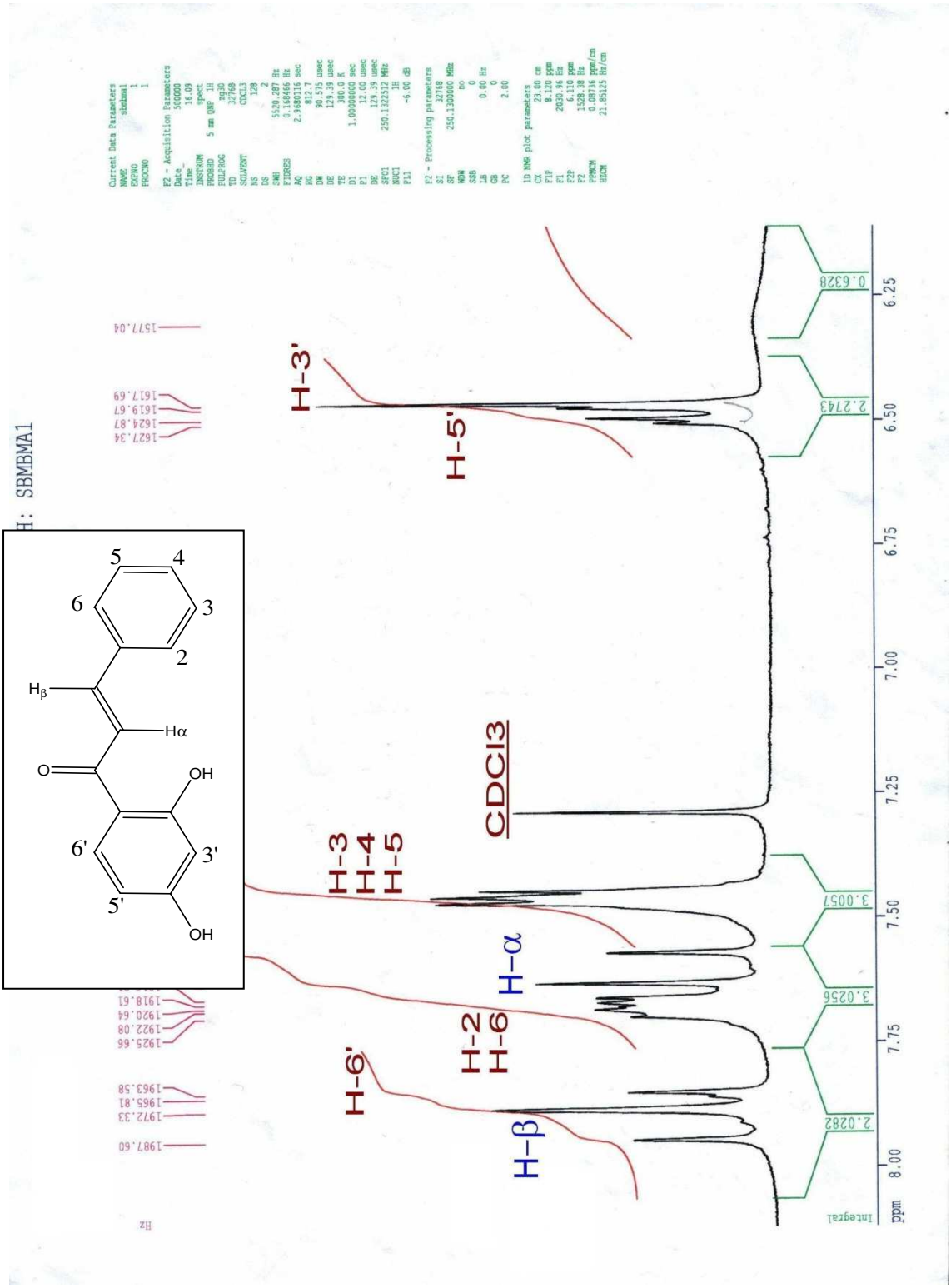
ونتائج طيف ^1H -RMN المسجل في ($CDCl_3$, 250 MHz) كلها مدونة في الجدول 3 :

البروتونات	الانزياح الكيميائي (δ_H ppm)	التعددية	ثابت التزاوج J (Hz)
H-3’	6.48	*d*	2.2
H-5’	6.52	*dd*	6.5 ; 2.4
H-6’	7.79	*d*	6.5
H_β	7.86	*d*	15.6
H_α	7.65	*d*	15.6
H-3-4-5	7.48	*m*	/
H-2 و H-6	7.72	*m*	/

*** الجدول(3): معطيات طيف البروتون للمركب F_{-2}.***



طيف RMN-^{1}H للمركب F-2



تكبير المجال ppm(8.00-6.25) للطيف -2-

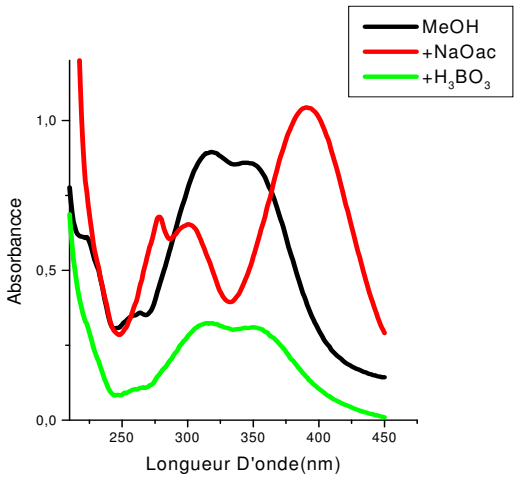
بينما تبين دراسة الاشعة الفوق البنفسجية لهذا المركب مايلي و كل النتائج مدونة في الجدول (4).

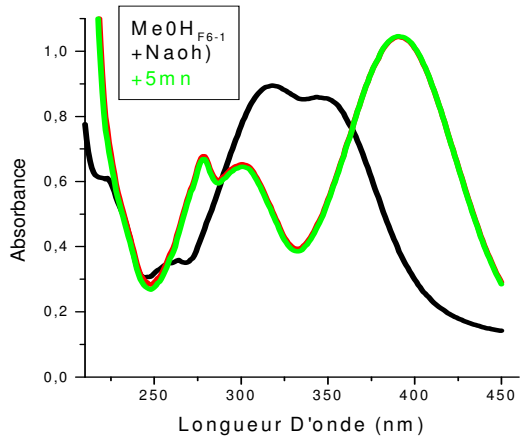
الكواشف	العصابة II (nm)	العصابة I (nm)	الملاحظات
MeOH	223	316-349	شالكون
NaOH	278	390	$\Delta\lambda_{maxI}$ (NaOH / MeOH) = +41 nm مع زيادة في الشدة
$AlCl_3$	263	407	$\Delta\lambda_{maxI}$ ($AlCl_3$/ $AlCl_3$+HCl) مستقر مع زيادة في الشدة
$AlCl_3$+HCl	263	407	$\Delta\lambda_{maxI}$ ($AlCl_3$+HCl/MeOH) =+58nm.
NaOAc	277	388	$\Delta\lambda_{maxII}$ (NaOAc / MeOH) = +39 nm
NaOAc+H_3BO_3	223	349	$\Delta\lambda_{maxI}$ (NaOAc+H_3BO_3/MeOH) مستقر مع نقصان في الشدة
الطيف المسجل في **NaOH** بقي مستقرا بعد 5 دقائق			

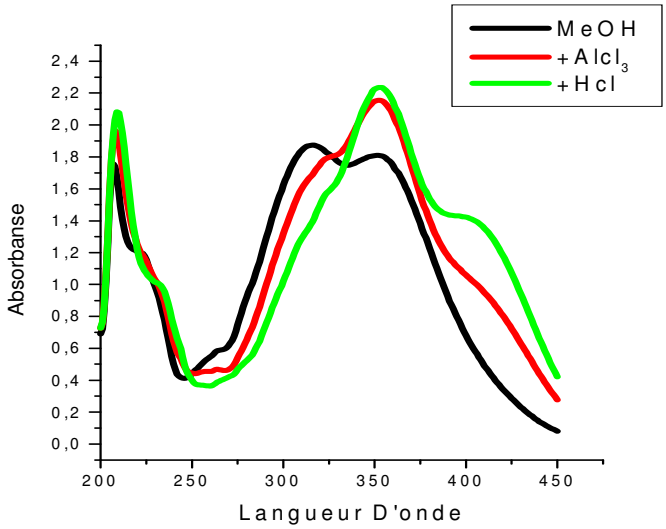
*** الجدول(4): معطيات أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب F_{-2} .***

وجود إزاحة باثوكرومية للعصابة I بـــ+39 مقارنة بطيف NaOAc مع طيف الميثانول تدل على وجود OH حر في الموقع 4'.

وجود إزاحة باثوكرومية للعصابة I بـــ+58 مقارنة بطيف $AlCl_3$+HCl مع طيف الميثانول تدل على وجود OH حر في الموقع 2'. (أنظر الطيف 3)

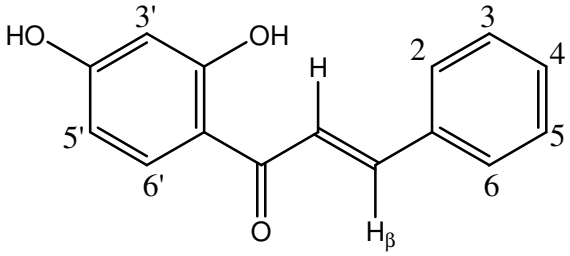






طيف (3) يبين إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب F_{-2}

ومنه صيغة هذا المركب تكون :



2',4'-Dihydroxychalcone

II- التحليل البنيوي للمركب : F9-1

بعد فصل هذا المركب و تنقيته نلاحظ أنه يظهر على شكل راسب أبيض اللون يذوب في الميثانول .

اللون الإستشعاعي:

يظهر لون هذا المركب تحت مصباح وود Wood (365nm) لونا أخضر مصفر .

معامل الاحتباس (R_f) :

قيم معامل الإحتباس للمركب F_{9-1} مبينة في الجدول (5) .

الدعامة	الجملة المستعملة	R_f
ك. ط. ر على متعدد الأميد DC.6.6	AcOH	0.03

الجدول (5): قيم معامل الإحتباس (R_f) للمركب F_{9-1}.

المعطيات الطيفية:

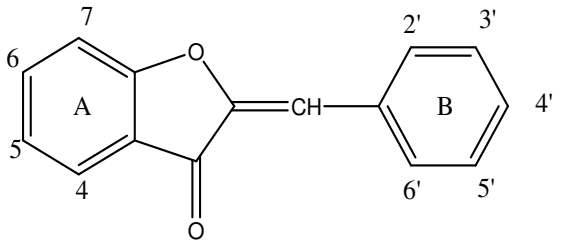
1-أطياف الأشعة فوق البنفسجية:

طيف الاشعة فوق البنفسجية لهذا المركب في الميثانول يبين وجود عصابتين هذا دليل على أن المركب المدروس من نوع الفلافونويدات.

2-طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H

أهم ملاحظة يمكن إستخلاصها من هذا الطيف وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند الإزاحة δ=6.72ppm (Hα إيتيلينيك) وهي إشارة مميزة لنوع من الفلافونويدات و المتمثل في الأورونات. (أنظر الطيف 4).[3]

ومنه الهيكل العام لهذا المركب يكون من الشكل :



Aurone

- تتميز بروتونات الحلقة A للأورونات بإزاحة كيميائية أصغر نوعا ما مع خاصية مميزة للبروتون H-4 بإزاحة كيميائية أكبر.[3]

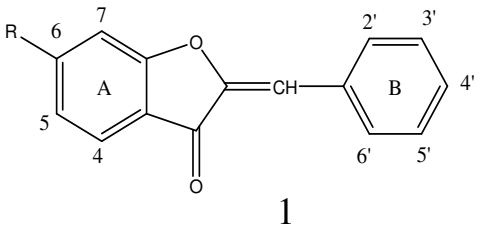
- كما نلاحظ ظهورثمان بروتونات فقط عوض عشرة في هذا الطيف مايدل على أن المركب ثنائي الإستبدال.

- من خلال طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H نلاحظ:

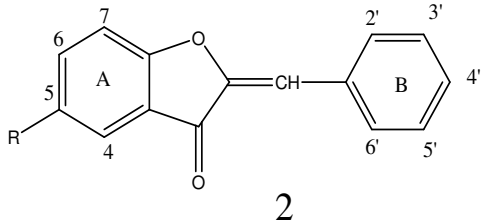
<u>بالنسبة للحلقة A</u> :

إشارة ثنائي ثنائي بتكامل 1H عند الإزاحة δ =6.92 ppm بثـــابت تزاوج(J=9.0 Hz; J=2.2 Hz) يمكن نسبها لـــ H-5 أوH-6 .

إشارة ثنائية فقط بتكامل 1H بثابت تزاوج J=2.2 Hz عند الإزاحة 6.94 ppm=δ يمكن نسبها لـــ H-4 أو H-7 ومنه الحلقة A مستبدلة مرة واحد على الشكل 1 أو2 :



1



2

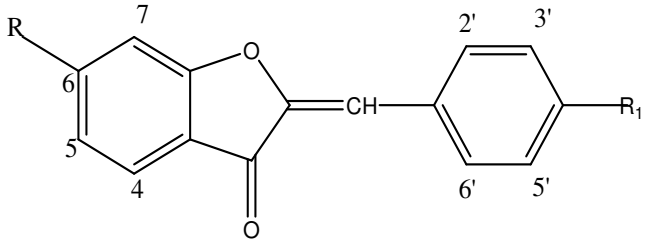
إشارة ثنائية فقط بتكامل 1H بثابت تزاوج J=9.2 Hz عند δ=7.98ppm خاصة بالبروتون H-4، مما يدل على وجود H-5 بجواره ومنه الحلقة A مستبدلة مرة واحد على الشكل 1 .[3]

بالنسبة للحلقة B : عدد البروتونات الباقية هي أربعة ومنه الحلقة B مستبدلة مرة واحدة .

من خلال طيف RMN-^{1}H نجد في المنطقة الخاصة بالبروتونات العطرية للحلقة B أنها مستبدلة مرة واحدة على شكل *para* حيث ظهرت البروتونـــات H-3' و H-5' متطابقتين و كذلك H-2' و H-6' إذ نجد:

إشارة ثنائية بتكامل 2H عند δ=7.13 ppm بثابت تزاوج J=9.0 Hz خاصة بالبروتونين H-3' و H-5'.

إشارة ثنائية بتكامل 2H بثابت تزاوج J=9.0 Hz عند الإزاحة δ=8.03 ppm خاصة بـــالبروتونين H-2' و H-6'. ومنه نستطيع كتابة F_{9-1} من الشكل :

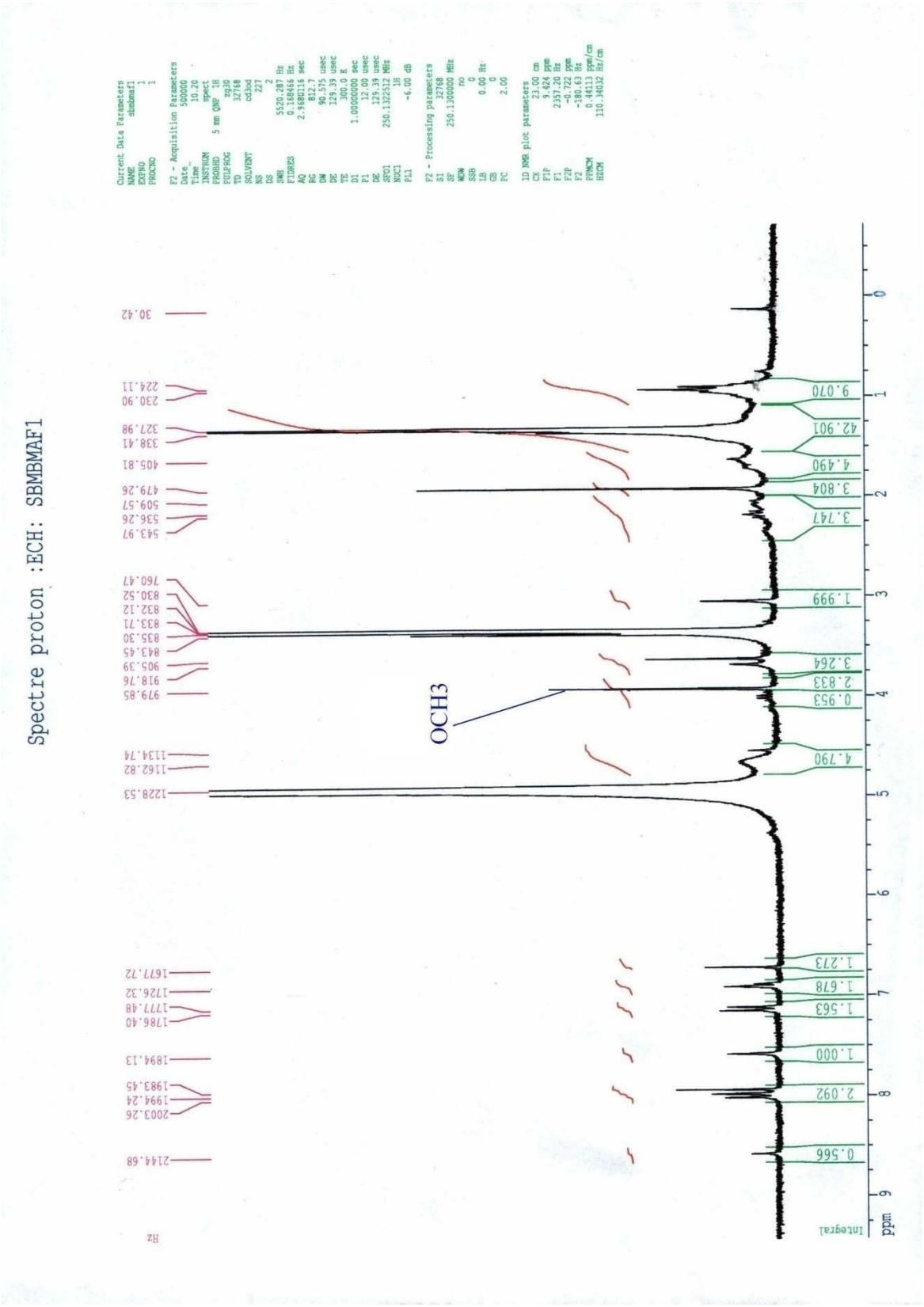


إشارة أحادية عند الإزاحة δ=3.94 ppm بتكامل ثلاث بروتونات تلحق لمجموعة الميثوكسي.

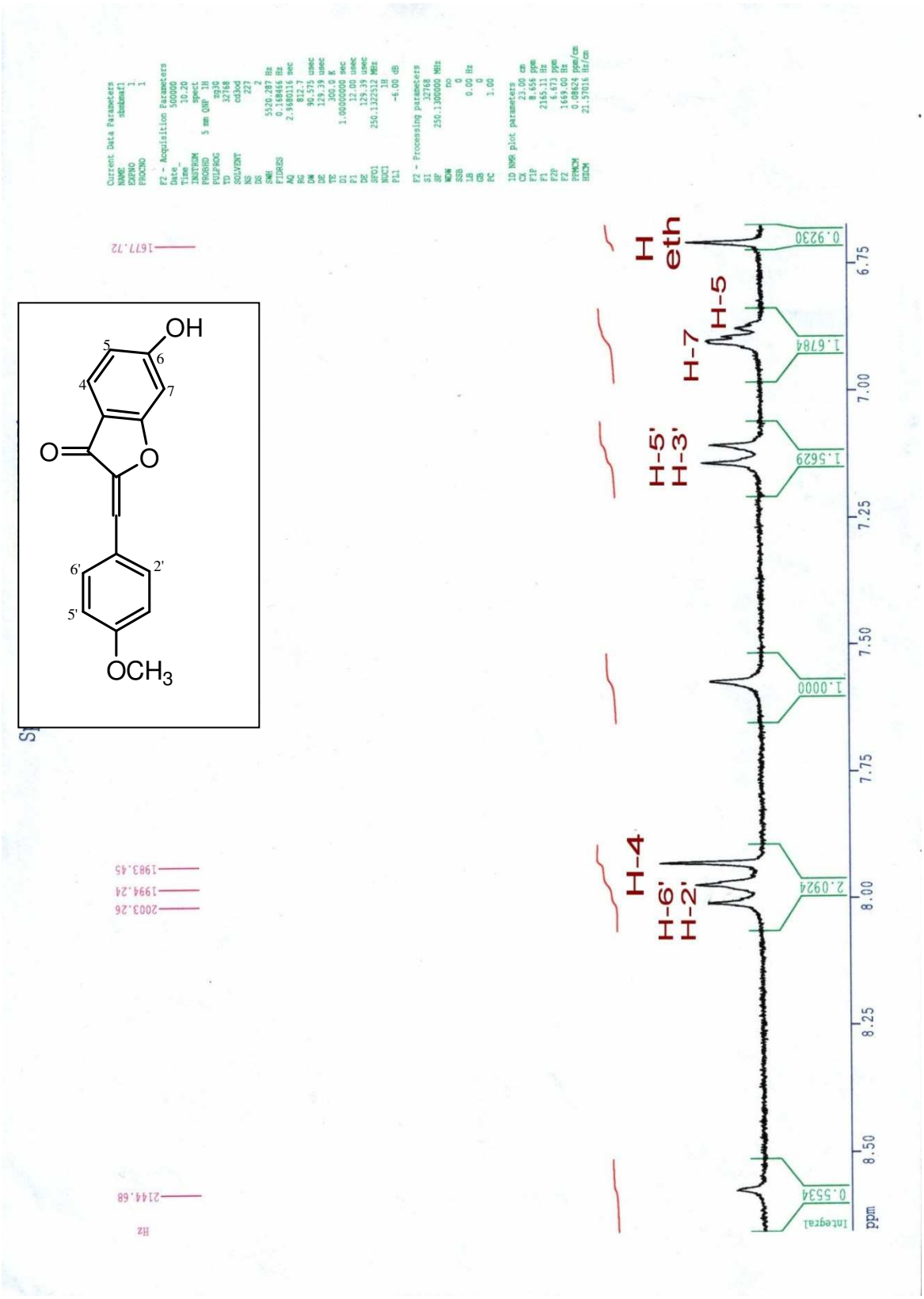
ونتائج طيف RMN- ^1H المسجل في (CD_3OD, 250 MHz) كلها مدونة في الجدول 6

البروتونات	الإنزياح الكيميائي (δ_H ppm)	التعددية	ثابت التزاوج J (Hz)
Hα	6.72	*s*	/
H-5وH-3'	7.13	*d*	9.02
H-6وH-2'	8.03	*d*	9.02
H-4	7.98	*d*	9.24
H-5	6.92	*dd*	9.0 ;2.2
H-7	6.94	*d*	2.2
OCH_3	3.94	*S*	/

*** الجدول(6): معطيات طيف البروتون للمركب $F_{9\text{-}1}$.***



طيف-4- RMN-^{1}H للمركب $F_{9\text{-}1}$



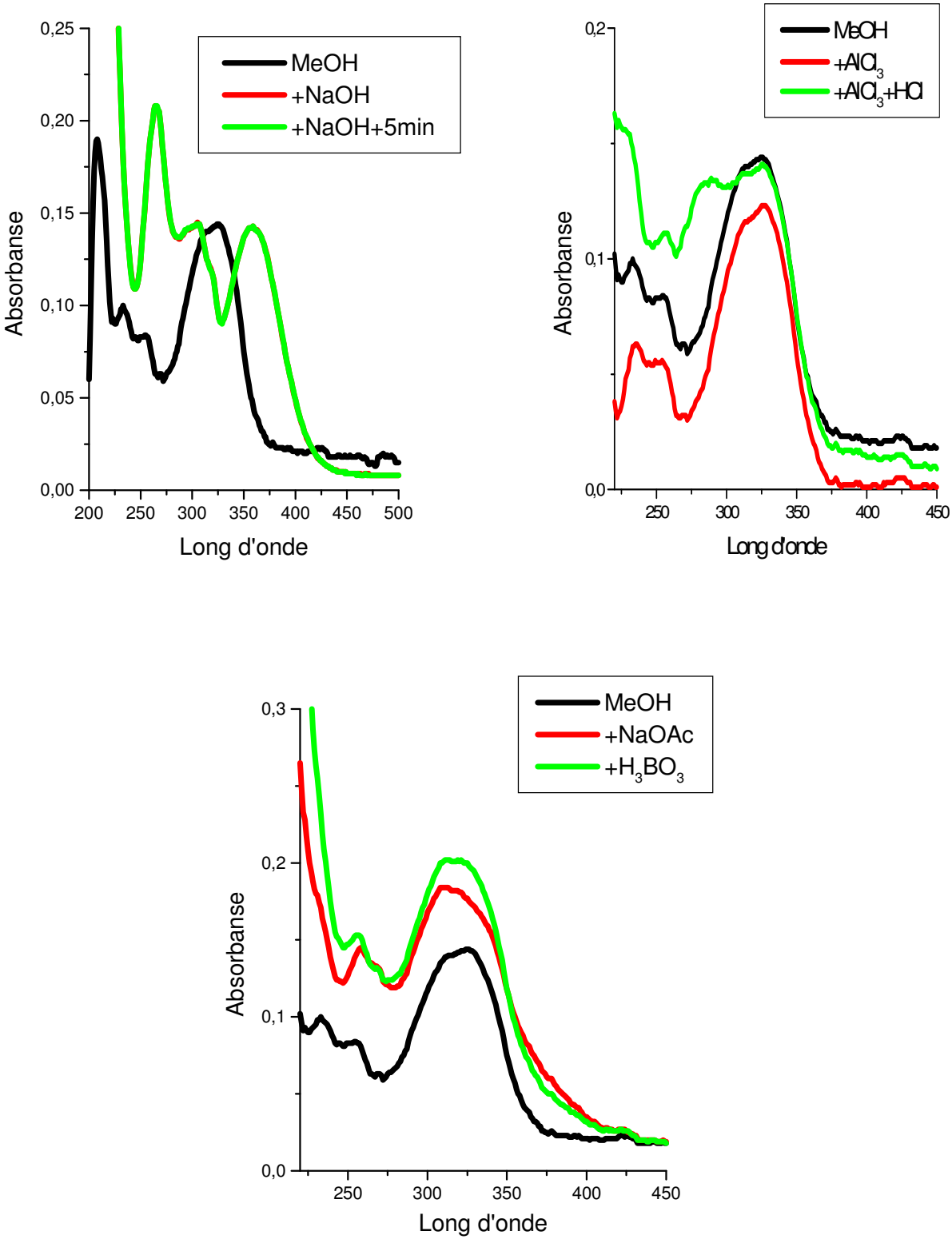
تكبير المجال (8.50-6.50) ppm للطيف -4-

بينما تبين دراسة الاشعة الفوق البنفسجية لهذا المركب مايلي و كل النتائج مدونة في الجدول (7).

الكواشف	العصابة II (nm)	العصابة I (nm)	الملاحظات
MeOH	266sh,233	325, 311sh	وجود عصابتين
NaOH	266	305,318sh,360	$\Delta\lambda_{maxI}$ (NaOH / MeOH) =+35 مع زيادة في شدة العصابتين
$AlCl_3$	235	314sh, 325	$\Delta\lambda_{maxI}$ ($AlCl_3$/ $AlCl_3$+HCl) مستقر مع نقصان في شدة العصابتين
$AlCl_3$+HCl	236 , 255	314sh,325	$\Delta\lambda_{maxI}$ ($AlCl_3$+HCl/MeOH) مستقر
NaOAc	270, 258	315sh,325	$\Delta\lambda_{maxI}$ (NaOAc / MeOH) مستقر مع زيادة في شدة العصابتين
NaOAc+H_3BO_3	270, 258	321	$\Delta\lambda_{maxI}$ (NaOAc+H_3BO_3 /MeOH) مستقر مع زيادة في شدة العصابتين
الطيف المسجل في **NaOH** بقي مستقرا بعد 5 دقائق			

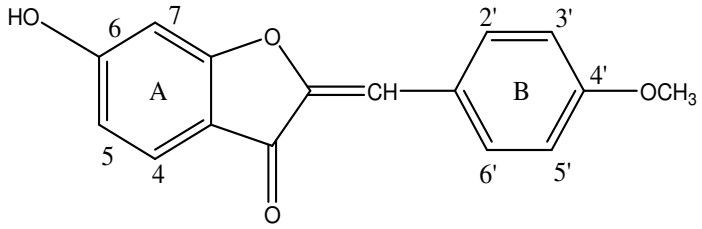
*** الجدول(7): معطيات طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب $F_{9\text{-}1}$.***

بمقارنة الطيف المسجل في هيدروكسيد الصوديوم مع الطيف المسجل في الميثـــانول نجـــد أن إزاحة باثوكرومية للعصابة I بمقدار (+35 نم) أقل بكثير من (+70 نم) دلالة علـــى وجـــود ميثوكسي في الموضع 4' وهيدروكسيل حر في الموضع 6. (أنظر الطيف 5)



طيف (5) إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب F_{9-1}

ومنه يكون المركب على الشكل :



6 ,Hydroxy - 4'-methoxyaurone.

III- التحليل البنيوي للمركب : F9-2

بعد فصل هذا المركب و تنقيته نلاحظ أنه يظهر على شكل راسب أبيض اللون يذوب في الميثانول .

اللون الإستشعاعي:

يظهر لون هذا المركب تحت مصباح وود Wood (365nm) لونا أصفرا .

معامل الاحتباس (R_f) :

قيم معامل الإحتباس للمركب F_{9-2} مبينة في الجدول (1) .

الدعامة	الجملة المستعملة	R_f
ك. ط. رعلى متعدد الأميدDC.6.6	AcOH	0.05

الجدول (8): قيم معامل الإحتباس (R_f) للمركب F_{9-2}.

المعطيات الطيفية:

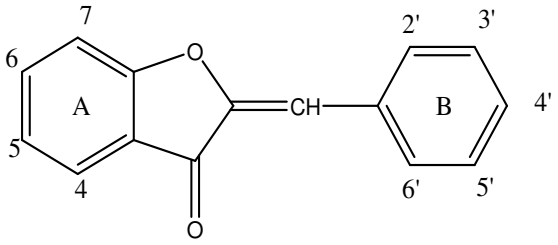
1-أطياف الأشعة فوق البنفسجية:

طيف الاشعة الفوق البنفسجية لهذا المركب في الميثانول يبين وجود عصابتين هذا دليل على أن المركب المدروس من نوع الفلافونيدات.

2-طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H

نلاحظ في هذا الطيف وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند الإزاحة δ=6.79 ppm (Hαإيتيليك) وهي إشارة مميزة لنوع من الفلافونيدات و المتمثل في الأورونات . (أنظر الطيف 6).[3]

ومنه الشكل العام لهذا المركب يكون



Aurone

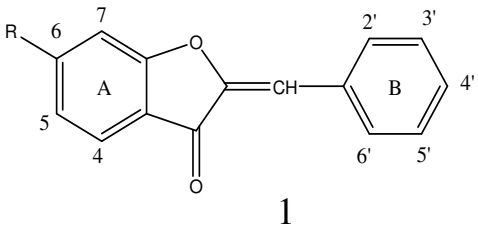
- تتميز بروتونات الحلقة A للأورونات بإزاحة كيميائية أصغر نوعا ما مع خاصية مميزة للبروتون H-4 بإزاحة كيميائية أكبر.[3]
- كما نلاحظ ظهور سبع بروتونات فقط عوض عشرة في الطيف، هذا مايدل على أن المركب ثلاثي الإستبدال.

من خلال طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN-^{1}H : (أنظر الطيف 6)

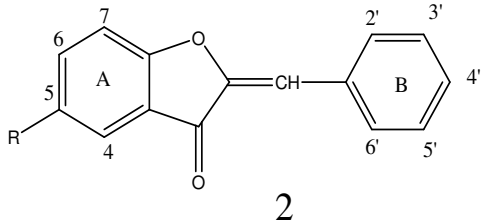
بالنسبة للحلقة A :

نلاحظ إشارة ثنائي ثنائي بتكامل 1H عند الإزاحة δ=6.98 ppm بثابت تزاوج (J=8.4 Hz ; J=2.0 Hz) يمكن نسبها لـ H-5 أوH-6 .

نلاحظ إشارة ثنائية فقط بتكامل 1H بثابت تزاوج J=2.0Hz عند الإزاحة δ=7.05 ppm يمكن نسبها لـــ H-4 أو H-7 ومنه الحلقة A مستبدلة مرة واحد على الشكل 1 أو2 :

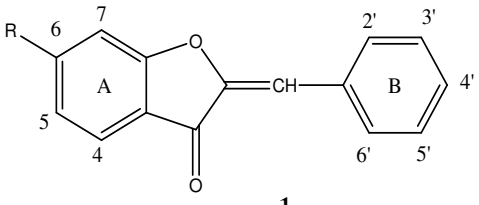


1



2

نلاحظ إشارة ثنائية فقط بتكامل 1H بثابت تزاوج J_{ortho}=8.4 Hz عند الإزاحة δ=8.03ppm خاصة بالبروتون H-4، مما يدل على وجود H-5 بجواره ومنه الحلقة Aمستبدلة مرة واحد على الشكل 1 .



1

بالنسبة للحلقة B : عدد البروتونات الباقية هي ثلاثة ومنه الحلقة B مستبدلة مرتين.

نلاحظ إشارة ثنائي ثنائي بتكـــامل 1Hعند الإزاحة δ=8.10 ppm بثـــابت تزاوج (J=7.8Hz; J=2.2 Hz) يمكن نسبها لـــ H-6' .

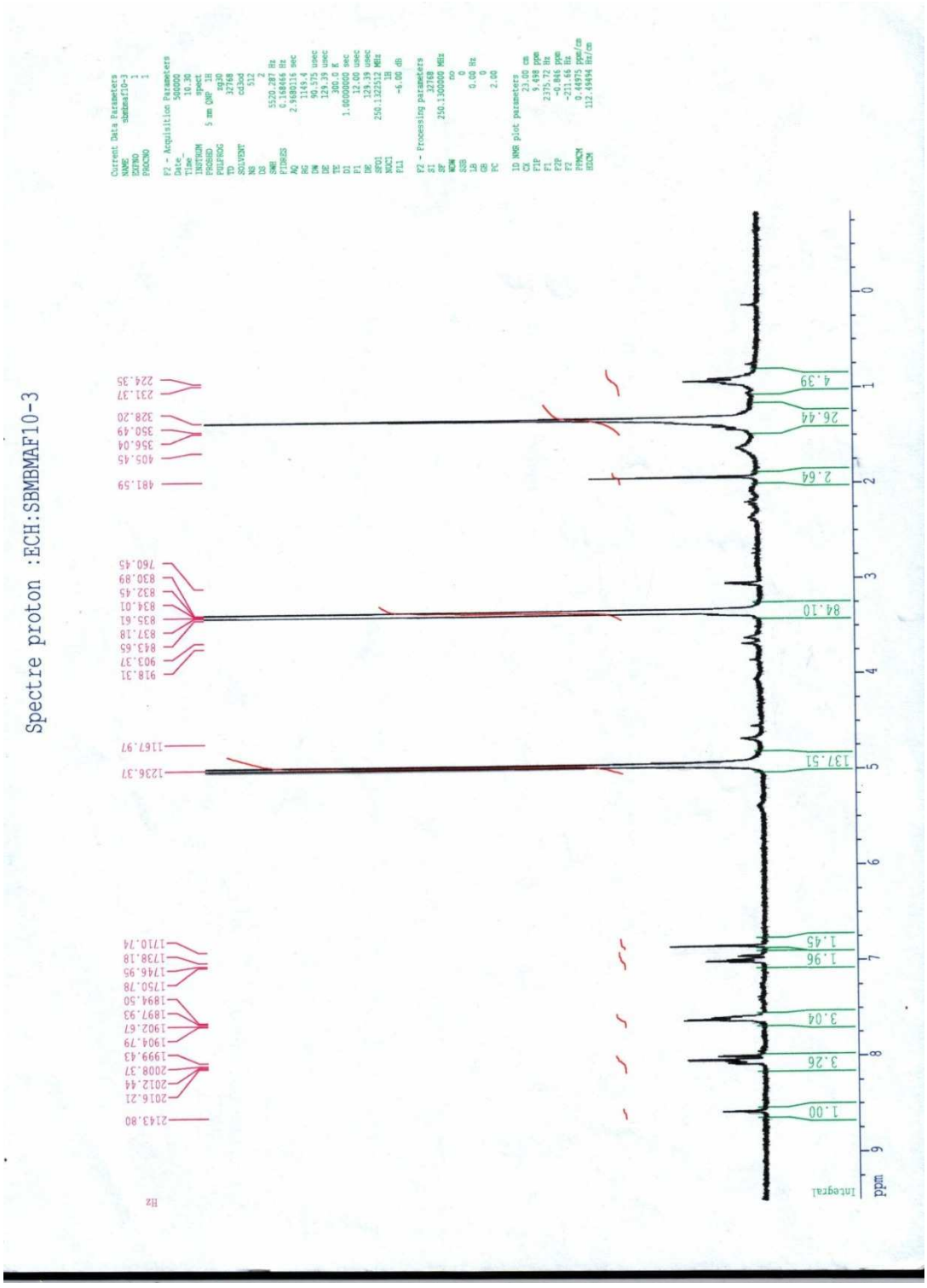
نلاحظ إشارة ثنائية بتكامل 1H بثابت تزاوج J=7.8 Hz عند الإزاحة δ=7.57 ppm يمكن نسبها لـــ H-5' .

نلاحظ إشارة ثنائية بتكامل 1H بثابت تزاوج J=2.1Hz عند الإزاحة δ=7.61 ppm يمكن نسبها لـــ H-2' .

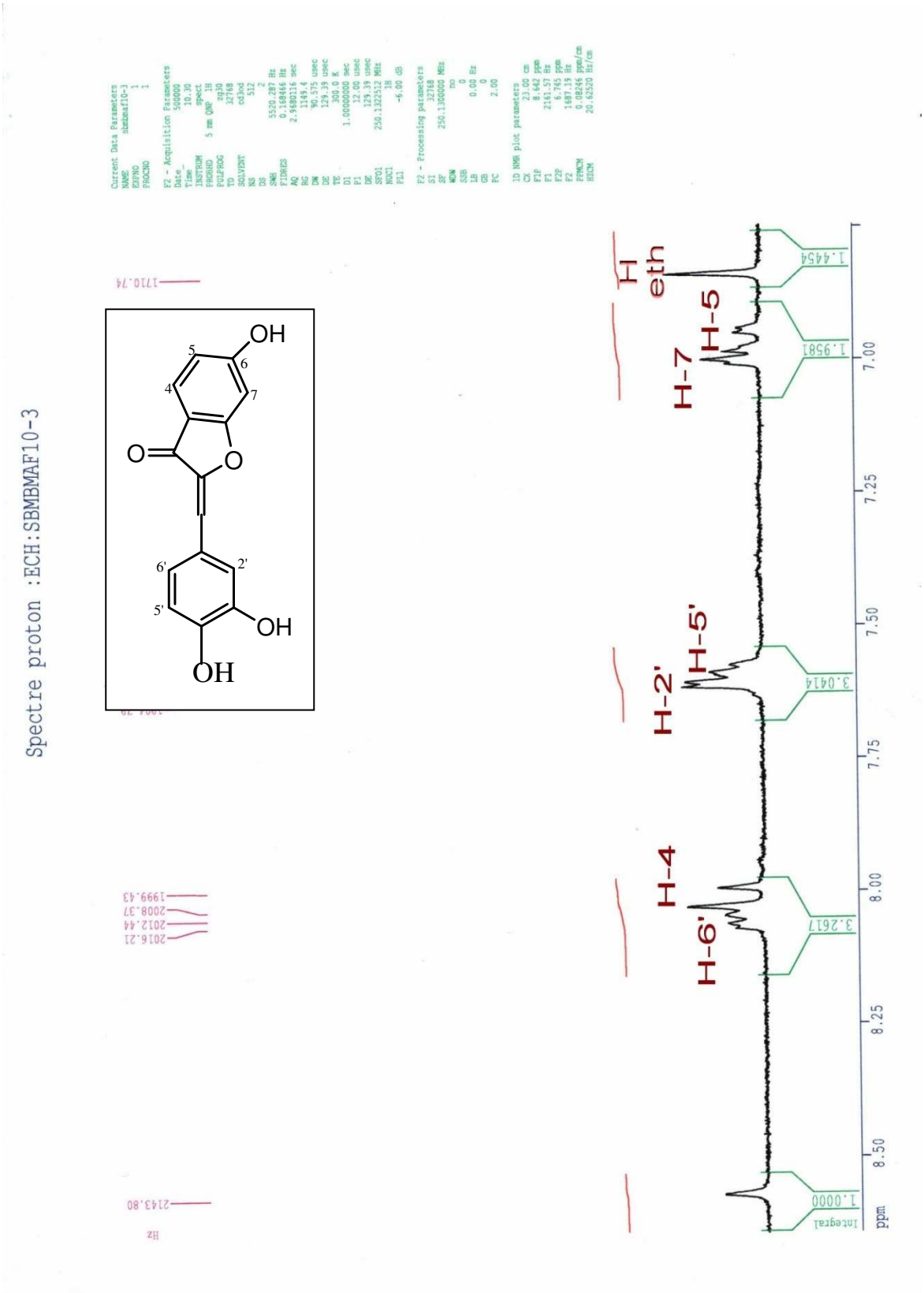
ونتائج طيف ^{1}H -RMN المسجل في (CD_3OD, 250 MHz) كلها مدونة في الجدول9 (أنظر الطيف 6) :

البروتونات	الإنزياح الكيميائي (δ_H ppm)	التعددية	ثابت التزاوج (J (Hz
Hα	6.79	*s*	/
H-6'	8.10	*dd*	7.8 ; 2.2
H-2'	7.61	*d*	2.1
H-5'	7.57	*d*	7.8
H-4	8.03	*d*	8.4
H-5	6.98	*dd*	8.4 ; 2.0
H-7	7.05	*d*	2.0

*** الجدول(9): معطيات طيف البروتون للمركب $F_{9\text{-}2}$.***



طيف-6- RMN-^{1}H للمركب F_9



تكبير المجال ppm(8.25-6.50) للطيف-6-

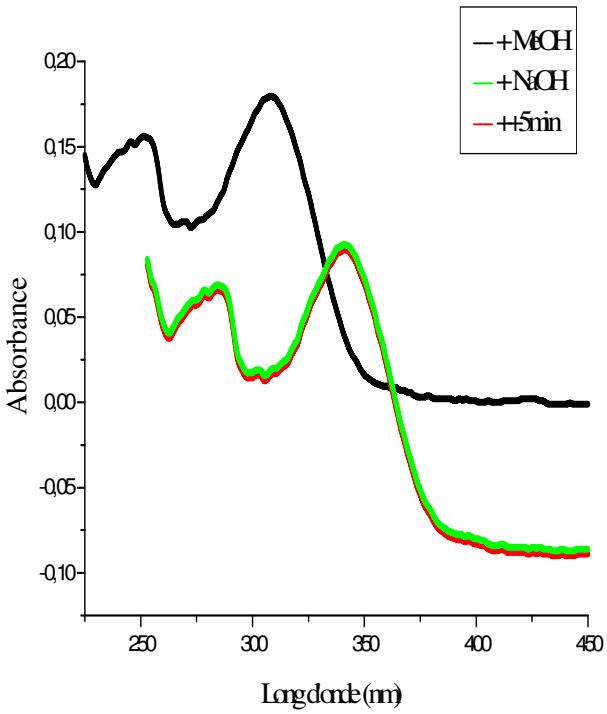
بينما تبين دراسة الاشعة الفوق البنفسجية لهذا المركب مايلي و كل النتائج مدونة في الجدول (10).

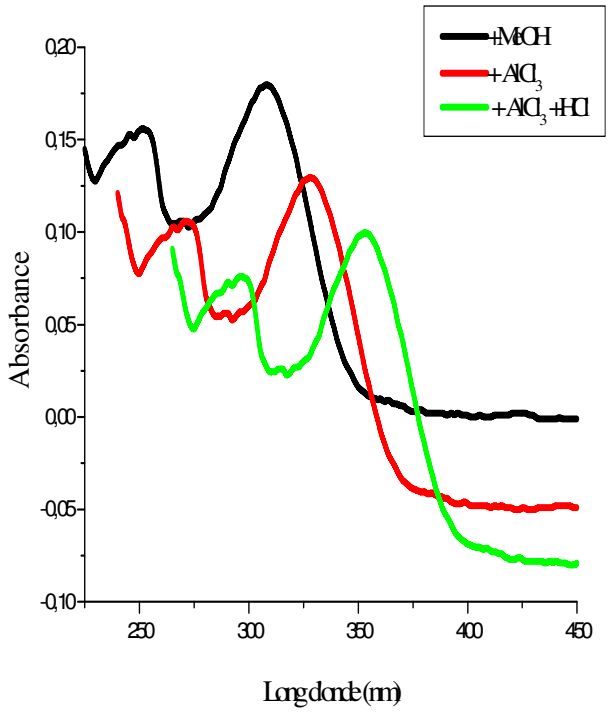
الملاحظات	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	*الكواشف*
وجود عصابتين	310	254	MeOH
$\Delta\lambda_I$ (NaOH / MeOH) =+29 مع نقصان في شدة العصابتين	341	286	NaOH
$\Delta\lambda_I$ ($AlCl_3$/ $AlCl_3$+HCl) =+27 مع نقصان في شدة العصابتين	327	270	$AlCl_3$
$\Delta\lambda_I$ ($AlCl_3$+HCl/MeOH) =+44 مع نقصان في شدة العصابتين	354	298	$AlCl_3$+HCl
$\Delta\lambda_I$ (NaOAc / MeOH) =+8 مع نقصان في شدة العصابتين	318	263	NaOAc
$\Delta\lambda_I$ (NaOAc+H_3BO_3 / MeOH) =+30 مع نقصان في شدة العصابتين	340	283	NaOAc+H_3BO_3
الطيف المسجل في **NaOH** بقي مستقرا بعد 5 دقائق			

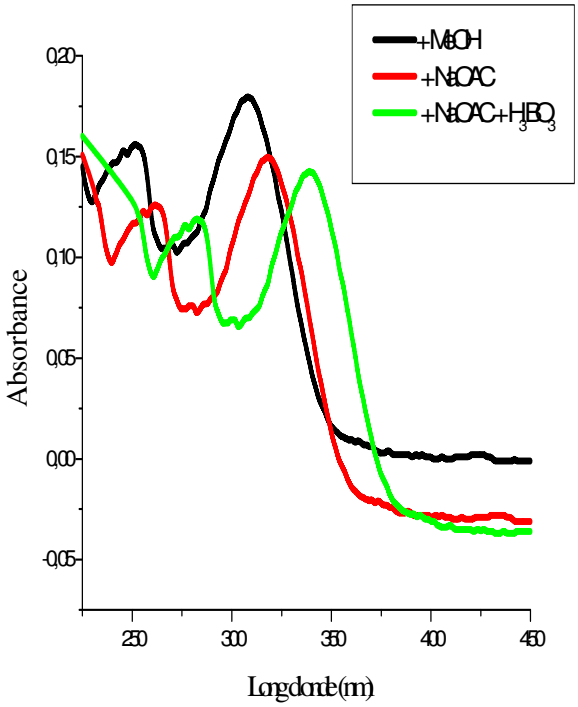
*** الجدول(10): معطيات أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب F_{9-2} .***

بمقارنة الطيف المسجل في هيدروكسيد الصوديوم مع الطيف المسجل في الميثـــانول نجـــد أن إزاحة باثوكرومية للعصابة I بطول موجي أعظمي بمقدار (29نم) أقل بكثير من (+70 نـــم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع'4 أو(و) في الموضع 6. (أنظر الطيف 7).

الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I بـــ $\Delta\lambda_{maxI}$ ($AlCl_3$/ $AlCl_3$+HCl) = 17+nm عند مقارنة الطيفين المسجلين في ($AlCl_3$) و ($AlCl_3$+HCl) تدل على وجود نظام أرثو ثنائي الهيدروكسيل في الحلقة B (أنظر الطيف 7).

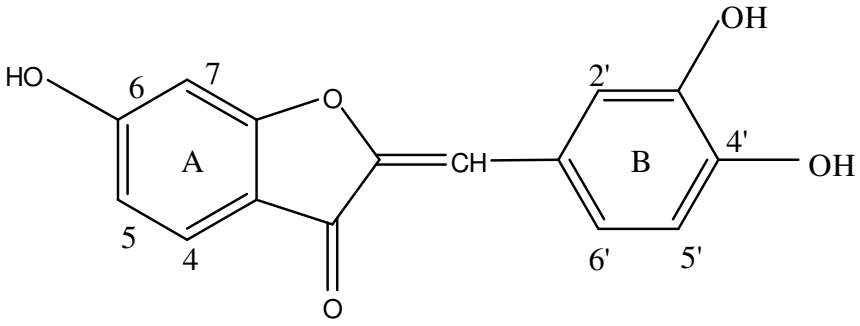






طيف (7) إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب F_{9-2}

ومنه يكون المركب على الشكل :



6 ,3’,4’ -Trihydroxyaurone.

IV- التحليل البنيوي للمركب : Fc-1

بعد فصل و تنقية هذا المركب نلاحظ أنه يظهر على شكل إبر صغيرة بيضاء اللون تذوب في الميثانول .

اللون الإستشعاعي:

اللون الإستشعاعي لهذا المركب تحت مصباح وود Wood (365nm) أعطى لون أسود بنفسجي .

معامل الاحتباس (R_f) :

قيم معامل الإحتباس للمركب F_{c-1} مبينة في الجدول (1) .

الدعامة	الجملة المستعملة	R_f
ك. ط. ر على متعدد الأميد DC.6.6	AcOH	0.26

الجدول (11): قيم معامل الإحتباس (R_f) للمركب F_{c-1}.

المعطيات الطيفية:

1-طيف الأشعة فوق البنفسجية:

طيف الاشعة فوق البنفسجية لهذا المركب في الميثانول يبين وجود عصابتين هذا دليل على أن المركب المدروس من نوع الفلافونويدات.

2- طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون $RMN\ ^{13}C$

تبين مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون $RMN\ C^{13}$ (طيف 8) المسجلة في جهاز ذو تردد (MHZ 65.5)، (باستعمال المذيب CD_3OD)، وجود حوالي **13** ذرة كاربون غير متكافئة مغناطيسيا،وبعد فحص الإزاحة الكيميائية لمختلف أنوية ^{13}C أمكننا توزيع أهمها كالتالي:

كربون حامل وظيفة كربونيلية واحدة (1C=O) تظهر عند (δ_C=170.11 ppm)

3 كربونات رباعية تظهر عند $\delta_{C1'}$=120.27 ppm $\delta_{C2'}$=165.02 ppm و δ_{C1}=131.25.

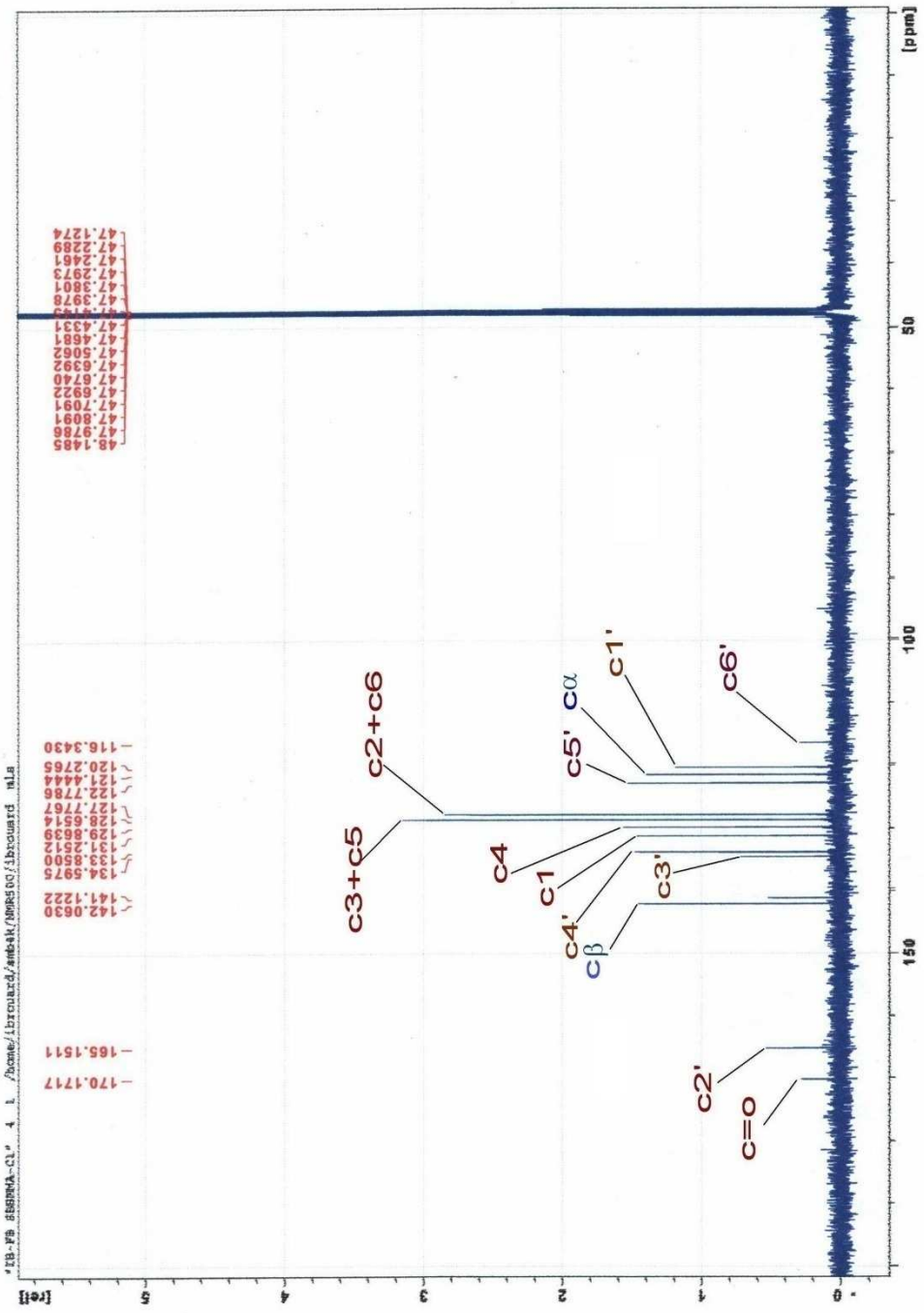
مجموعتين إيثيلنيتين (CH=) تهجينها sp^2 عند ($\delta_{C\beta}$=142.02 ppm و $\delta_{C\alpha}$=121.44) ppm.

هذا المركب لا يحمل سوى على 15 ذرة كربون مما يدل على أن هذا الشالكون لايحمل أي مستبدل كاربوني، وحسب الإزاحة الكيميائية لمختلف هذه الأنوية فإننا نستطيع كتابة الجدول التالي .

(أنظر جدول 12)

الكربونات	الانزياح الكيميائي PPm
C1	131.25
C2+ C6	127.77
C3+ C5	128.65
C4	129.86
C=o	170.11
Cα	121.44
Cβ	142.02
C1’	120.27
C2’	165.02
C3’	134.59
C4’	133.85
C5’	122.77
C6’	116.34

*** الجدول(12): معطيات طيف الكربون للمركب $F\text{-}_{c1}$.***



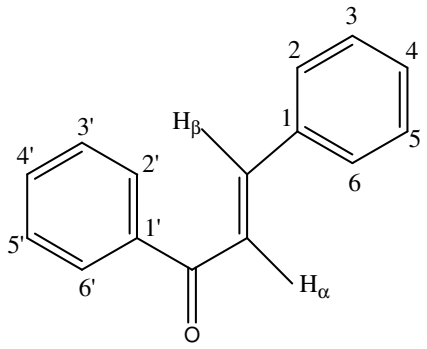
طيف – 8 - RMN-^{13}C للمركب F-$_{C1}$

3-طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN ^{1}H

تبين مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN **H^1** وجود : (أنظر الطيف 9)

إشارة ثنائية بتكامل 1H عند الإزاحة δ=6.52 ppm بثابت تزاوج *J*=15.7 Hz خاصة بالبروتون H_α وهي ميزة الشالكونات .

إشارة ثنائية بتكامل 1H بثابت تزاوج *J*=15.8 Hz عند الإزاحة δ=7.73 ppm خاصة بالبروتون H_β وهي مايؤكد أن المركب المدروس شالكون. ومنه هيكل هذا المركب يكون من الشكل :



كما نلاحظ ظهور 11 بروتونات فقط عوض 12 في الطيف RMN **H^1** ، هذا مايدل على أن المركب أحادي الإستبدال.

بالنسبة للحلقة A نلاحظ من خلال الطيف أنها مستبدلة مرة واحدة إذ يظهر لنا : (أنظر الطيف 9)

إشـــارة ثنائي ثنائي بتكـــامل 1H عـــند الإزاحة δ =8.73 ppm بثـــابت تزاوج (*J*=7.5 Hz، *J*=3.3 Hz) يمكن نسبه لـــ H-6′، مما يدل على وجود كل من H-5′ و H-4′.

إشارة ثنائي ثنائي بتكـــامل 1Hعـــند الإزاحة δ =8.13ppm بثـــابت تزاوج (*J*=7.4 Hz، *J*=3.7 Hz) يمكن نسبه لـــ H-3′، مما يدل على وجود كل من H-4′ و H-5′.

إشارة ثنائي ثنائي ثنائي بتكامل 1Hعـــند الإزاحة δ =7.13 ppm بثابت تزاوج (*J*=7.7 Hz , *J*=3.7 Hz) *J*=7.4Hz يمكن نسبه لـــ H-4′ مما يدل على وجـــود كـــل مـــن H-3′ و H-5′و H-6′،

إشارة ثنائي ثنائي ثنائي بتكامل 1Hعنـــد الإزاحة δ =7.52 ppm بثابت تزاوج (*J*=7.5Hz ,*J*=7.7 Hz، *J*=3.7 Hz) يمكن نسبه لـــ H-5′ مما يدل على وجـــود كل من H-3′ و H-'4 و H-6′،

بالنسبة للحلقة B نلاحظ من خلال الطيف أنها غير مستبدلة إذ يظهر لنا:

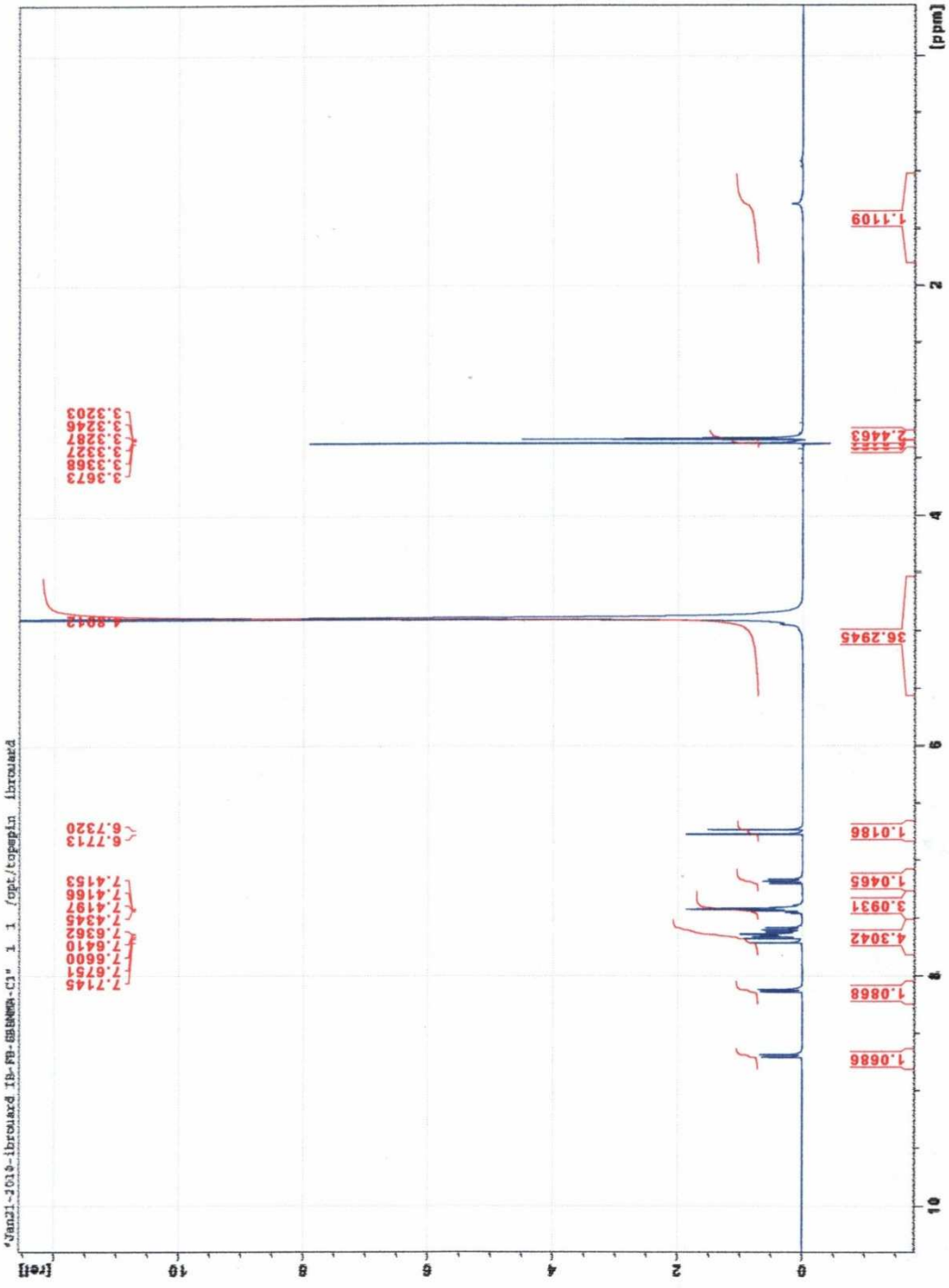
إشارة تعددية بتكامل 2H عند الإزاحة δ=7.63ppm خاصة بالبروتونـــات H-2 و H-6.

إشارة تعددية بتكامل 3H عند الإزاحة δ=7.43 ppm خاصة بكل من البروتـــون H-3 وH-4 وH-5 .

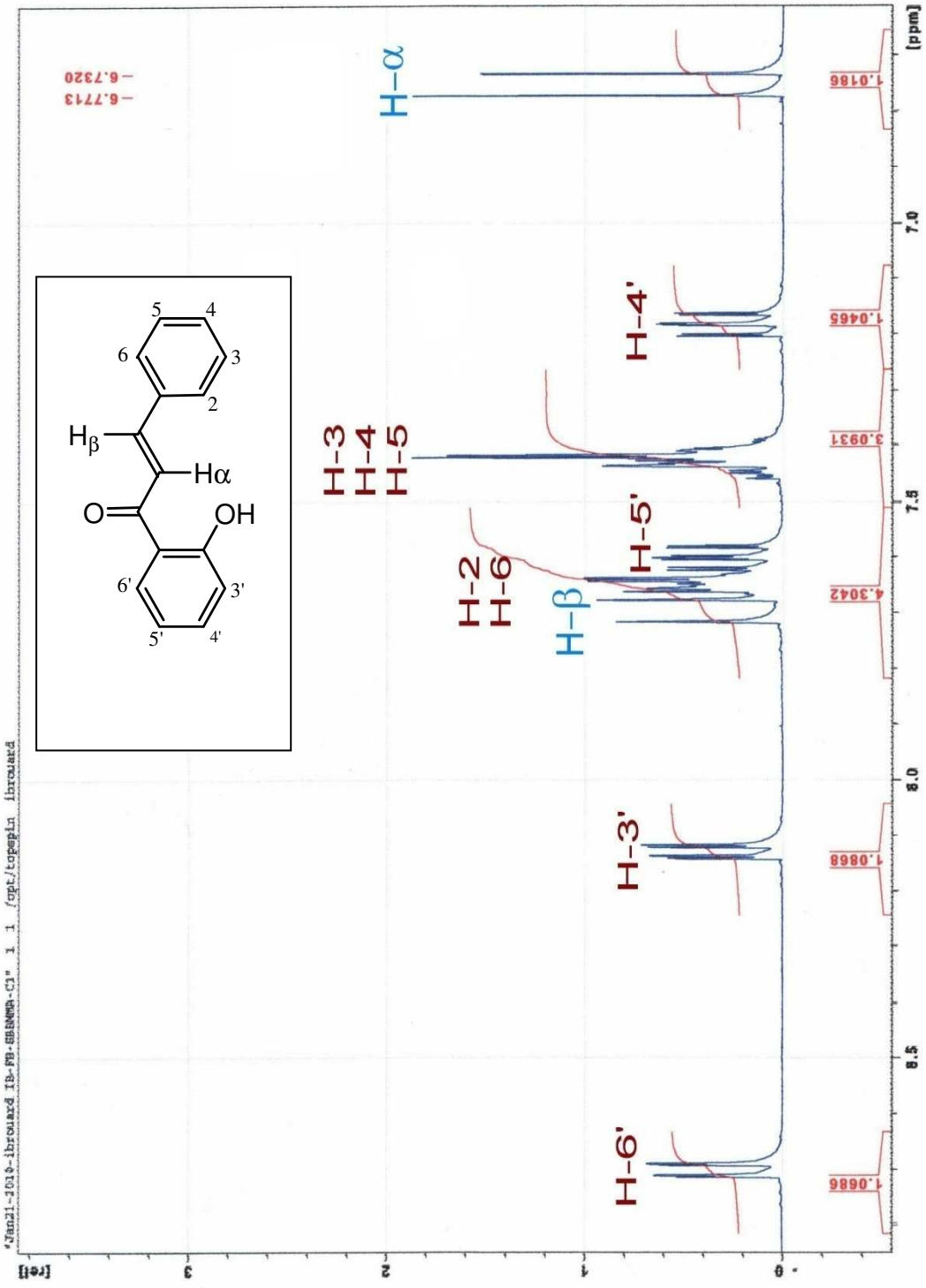
ونتائج طيف الرنين المغناطيسي للبروتون ^{1}H RMN المسجل في (CD_3OD, MHz 450) كلها مدونة في الجدول 13 :

البروتونات	الإنزياح الكيميائي (δ_H ppm)	التعددية	ثابت التزاوج J (Hz)
H-6’	8.73	*dd*	7.5; 3.3
H-3’	8.13	*dd*	7.4 ;3.7
H-4’	7.13	*ddd*	7.4 ;7.7 ;3.7
H-5’	7.52	*ddd*	7.5 ;7.7 ;3.7
H_α	6.52	*d*	15.7
H_β	7.73	*d*	15.8
H-3-4-5	7.43	*m*	/
H-2 و H-6	7.63	*m*	/

*** الجدول(13): معطيات طيف البروتون للمركب F_{-c1}.***



طيف-9- RMN-^{1}H للمركب F-$_{c1}$



تكبير المجال ppm(9.00-6.5) للطيف-9-

ولتأكيد الفرضيات المقترحة في طيف RMN ^1H ندرس طيف cosy H-H : (أنظر الطيف 10)

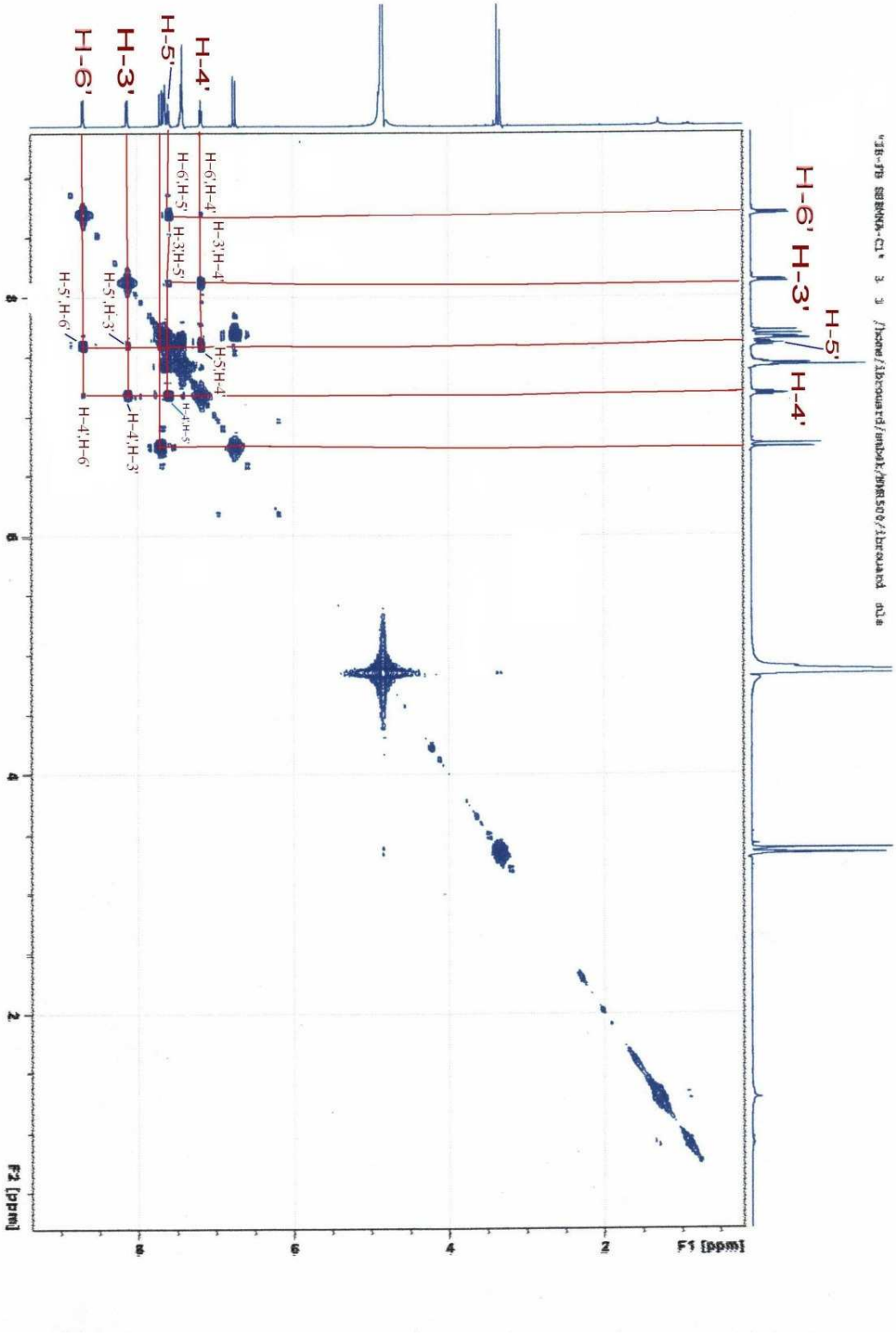
نلاحظ وجود نقطة تعالق كبيرة نوعا ما بين H_α و H_β هذا مايفسر ظهور ثنائي بثابت تزاوج كبير (J_{trans}) لهذه الإشارة والذي يقدر بـــ J=15.8 Hz .

نلاحظ وجود نقاط تعالق بين H-4′ و(H-6′، H-5′. H-3′) لكن نقاط تعالق H-4′ مـــع H-3′ وH-5′ أكبر من نقاط تعالق H-4′ مـــع.H-6′ ومنه فإن ثابت تزاوج H-4′ مـــع H-3′ وH-5′ (J_{ortho})أكبر من ثابت تزاوج H-4′ مـــع.H-6′ (J_{metha}) و هذا مايفسر ظهور ثنائي ثنائي ثنائي للإشارة الخاصة بـــ H-4′ .

نلاحظ وجود نقاط تعالق بين H-5′ و(H-6′، H-4′. H-3′) لكن نقاط تعالق H-5′ مـــع H-4′ وH-6′ أكبر من نقاط تعالق H-5′ مـــع.H-3′ ومنه فإن ثابت تزاوج H-5′ مـــع H-4′ وH-6′ (J_{ortho})أكبر من ثابت تزاوج H-5′ مـــع.H-3′ (J_{metha}) و هذا مايفسر ظهور ثنائي ثنائي ثنائي للإشارة الخاصة بـــ H-5′ .

بالنسبة لـــH-6′ نلاحظ وجود نقاط تعالق بينه و بين كل من H-5′ مع H-4′ لكن نقطة تعالق H-6′ مـــع. H-5′ أكبر نقطة تعالقه مـــع. H-4′ ومنه فإن ثابت تزاوج H-6′ مـــع H-'5 (J_{ortho})أكبر من ثابت تزاوج H-6′ مـــع.H-4′ (J_{metha}) و هذا مايفسر ظهور ثنائي ثنائي للإشارة الخاصة بـــ H-5′ .

بالنسبة لـــH-3′ نلاحظ وجود نقاط تعالق بينه و بين كل من H-4′ مع H-5′ لكن نقطة تعالق H-3′ مـــع. H-4′ أكبر نقطة تعالقه مـــع. H-5′ ومنه فإن ثابت تزاوج H-3′ مـــع H-4′ (J_{ortho})أكبر من ثابت تزاوج H-3′ مـــع.H-5′ (J_{metha}) و هذا مايفسر ظهور ثنائي ثنائي للإشارة الخاصة بـــ H-3′ .



طيف -10- Cosy H^1-^1H للمركب $F\text{-}_{C1}$

بينما تبين دراسة الاشعة الفوق البنفسجية لهذا المركب مايلي و كل النتائج مدونة في الجدول(14).

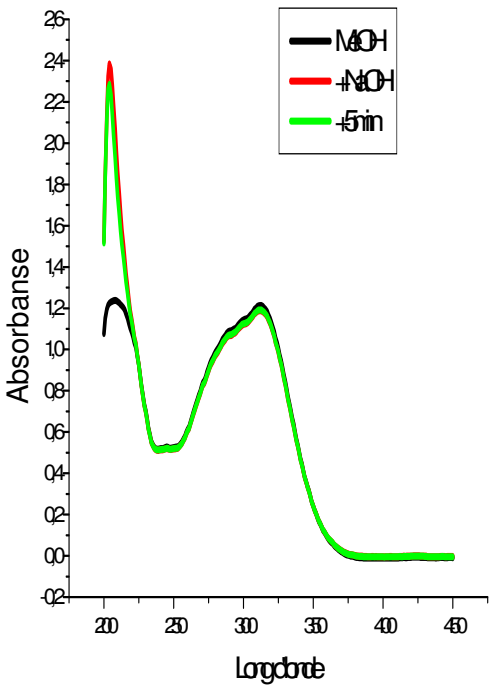
الكواشف	العصابة II (nm)	العصابة I (nm)	الملاحظات
MeOH	210	315	وجود عصابتين
NaOH	210	315	$\Delta\lambda_I$ (NaOH / MeOH) مستقر مع زيادة في شدة العصابة **I**
$AlCl_3$	210	325	$\Delta\lambda_I$ ($AlCl_3$/ $AlCl_3$+HCl) مستقر
$AlCl_3$+HCl	210	325	$\Delta\lambda_I$ ($AlCl_3$+HCl/MeOH) =+10nm.
NaOAc	277	315	$\Delta\lambda_I$ (NaOAc / MeOH) مستقر مع زيادة في شدة العصابة **I**
NaOAc+H_3BO_3	210	315	$\Delta\lambda_I$ (NaOAc+H_3BO_3 / MeOH) مستقر مع زيادة في شدة العصابة **I**
الطيف المسجل في **NaOH** بقي مستقرا بعد 5 دقائق			

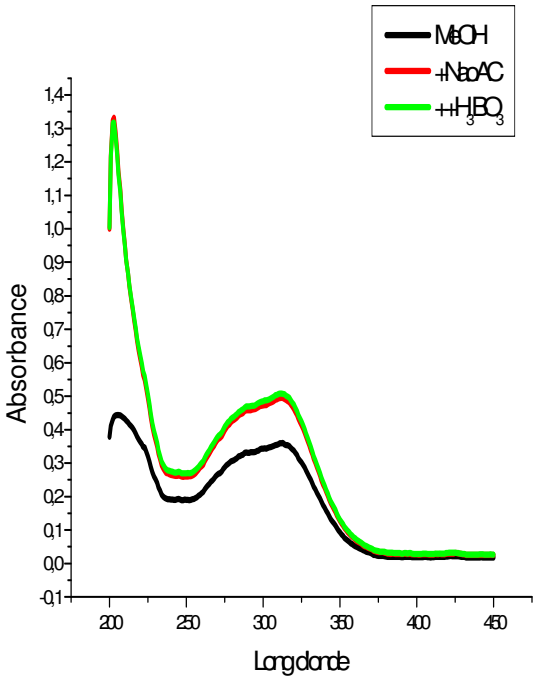
*** الجدول(14): معطيات طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب F_{c1}.**

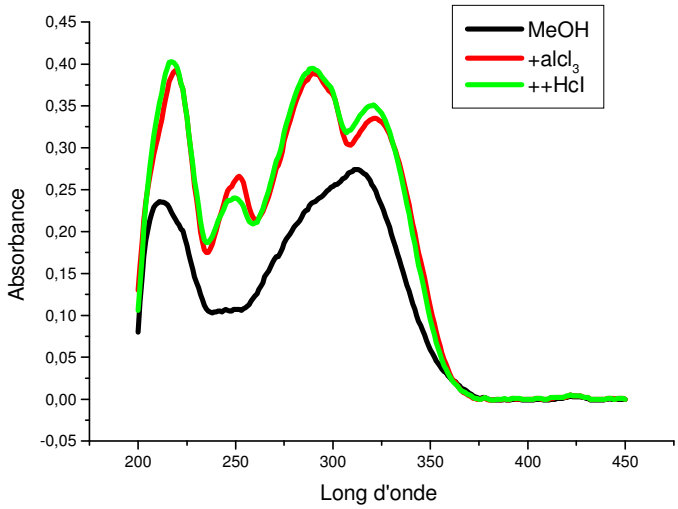
يترتب عن مقارنة طيف ($AlCl_3$ + HCl) بطيف الميثانول إزاحة باثوكرومية للعصابةI قدرها

$\Delta\lambda_{maxI}$ ($AlCl_3$+HCl / MeOH) = +10 nm التي تدل على وجود مجموعة OHحرفي الموقع 2' .

(أنظر الطيف 11)

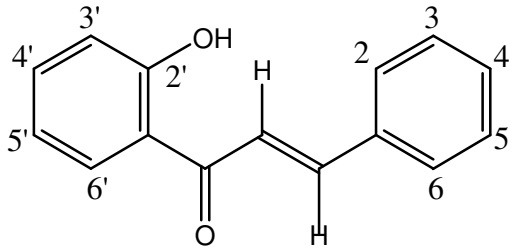






طيف (10) طيف إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية الخاصة بالمركب F_{c-1}

ومنه يكون هذا الشالكون على الشكل :



2’ –Hydroxychalcone

مراجع الفصل الرابع

[1] Jurd, L. (1962).,The chemestry of the flavonoid compounds (edited by I.A.Geissman), 107-155.

[2] Huk, M., Gorlizter K., (1969). Arch. Pharm. 302- 423.

[3].Harborne, J. B., (1993). The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman & Hall/CRC, London.

الخـــاتمـــة

إن الغاية الرئيسية من هذا البحث هي التعرف على نواتج الأيض الثانوي لنبات *Ononis Angustissima.*(*Fabaceae*)

كما قمنا بدراسة ببليوغرافية عن الفلافونويدات، و عن الطـــرق المـــستخدمة فـــي فـــصل و تنقيـــة هذه المركبات و الطرق الفيزيو كميائية لتحديد بنيتها.

اتبعنا في عملية الفصل جملة من الخطوات ابتدءا مـــن الاســـتخلاص يليـــه فـــصل أولـــي بواســـطة كروماتوغرافيا العمود بعدها القيام بعمليـــة الفـــصل باســـتخدام كروماتوغرافيـــا الطبقـــة الرقيقـــة و التحضيرية .

و من أجل التحديد البنيوي للمركبات استخدمنا مطيافية الأشعة فـــوق البنفـــسجية، مطيافيـــة الـــرنين النووي المغناطيسي و قد تم فصل و تحديد أربع مركبات فلافونيدية هي :

- 2',4'-Dihydroxylchalcone.
- 2', -Dihydroxylchalcone.
- 6 ,Hydroxy-4'-methoxyaurone.
- 6 ,3',4' ,Trihydroxyaurone.

وهذه المركبات تعتبر جديدة بالنسبة للنوع مما يشجعنا في الإســـتمرار حـــول متابعـــة دراســـة هـــذا النوع من النباتات.

Summary

This work makes part of our research programm on the Algerian medicinal plants belonging to the (Fabaceae) family which aims to provide actives molecules which my be applied in the pharmaceutical industries. Among this family, we've selected *Ononis angustissima* in order to identify its secondry metabolites.

The use of different chromatographic methods (column, thin layer) permitted the isolation of four (04) compounds flavonoids :

- 2', 4'-Dihydroxychalcone
- 2' -Hydroxychalcone
- 6'-Hydroxy-4'-methoxyaurone
- 6,3',4'-Trihydroxyaurone

These compounds are isolated for the first time from the specie *Ononis angustissima.*

The structures of the isolated compounds were well established using the spectroscopic methods (UV, NMR)

Key words: Fabaceae, *Ononis angustissima*, chalcone, aurone.

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes médicinales algériennes de la famille de la légumineuse (Fabaceae), qui vise à accéder à des molécules actives pouvant trouver des applications dans l'industrie pharmaceutique. Parmi les plantes de cette famille, nous avons choisi l'espèce *Ononis angustissima* dont nous envisageons d'identifier le métabolite secondaire.

L'utilisation de différentes méthodes de séparations chromatographiques (colonne, couche mince) nous a permis d'isoler quatre (04) composés de type flavonoïde qui sont:

- 2', 4'-Dihydroxychalcone
- 2' -Hydroxychalcone
- 6 -Hydroxy-4'-methoxyaurone
- 6,3',4'-Trihydroxyaurone

Ces composés sont isolés pour la première fois de l'espèce *Ononis angustissima.*

Les structures des composes isolés ont été bien établies grâce aux méthodes spectroscopiques (UV, RMN).

Monts clés: Fabaceae, *Ononis angustissima* , chalcone, aurone.

مـلخـــــــــص

يندرج هذا العمل ضمن برنامج بحث على النباتات الطبية الجزائرية للعائلة البقولية، من أجل الحصول على مركبات فعالة قد تساهم في إعطاء نفع للصناعة الصيدلانية. و ضـــمن هــذه العائلة اخترنا النبتة *Ononis angustissima* لغرض التعرف على نواتج الأيض الثانوي.

و قد تمكنا من فــصل أربــع (04) مركبــات فلافونويديــة باســتعمال مختلــف التقنيــات الكروماتوعرافية (العمود CC، الطبقة الرقيقة CCM) و هي:

- 2', 4'-Dihydroxychalcone
- 2' -Hydroxychalcone
- 6 -Hydroxy-4'-methoxyaurone
- 6,3',4'-Trihydroxyaurone

و هي مركبات جديدة في هذا النوع

تم تحديد البنى الجزيئية للمركبات المفصولة باستخدام الطرق الفيزيوكميائية:
مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN

المفتاح: العائلة البقولية ، نبات *Ononis angustissima* ,شالكون , اورون.