

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية و الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة منتوري - قسنطينة

قسم الكيمياء

كلية العلوم الدقيقة

رقم الترتيب:

رقم التسلسل:

رسالة

مقدمة لنيل درجة دكتوراه علوم في الكيمياء العضوية

تخصص كيمياء النباتات

تحت عنوان

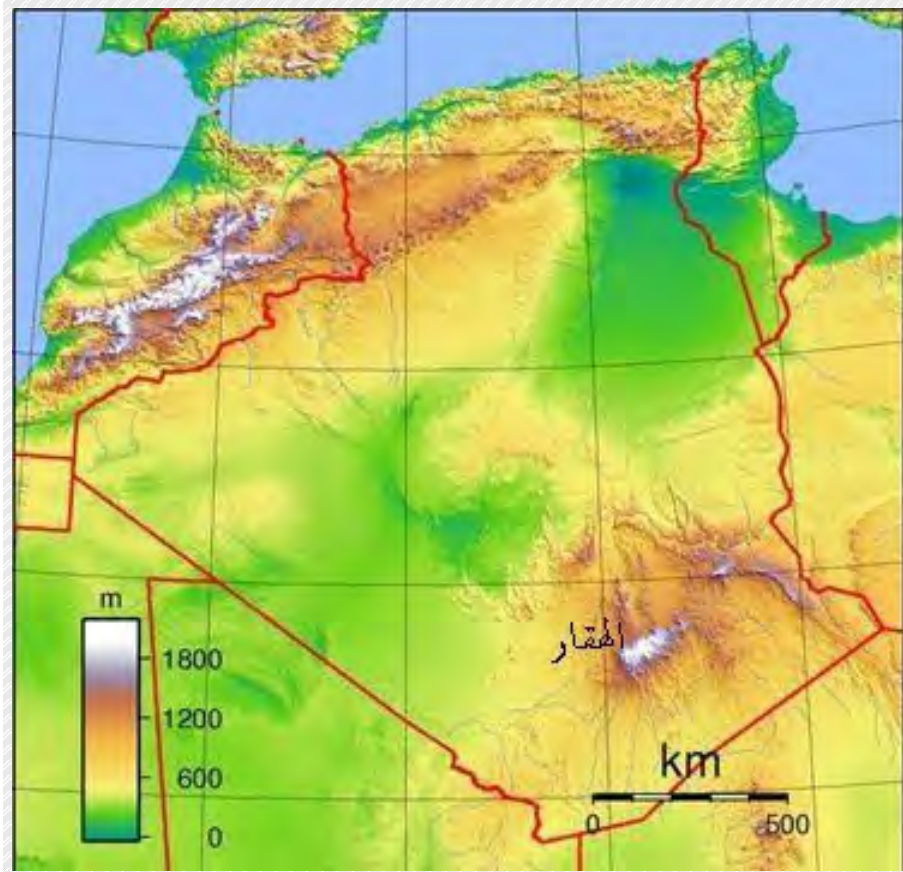
دراسة نواتج الميثابوليزم الثانوي لبعض نباتات منطقة الهقار

تحت إشراف الأستاذ: صالح غواطي

تقديم: أحمد طويل

أمام أعضاء لجنة المناقشة المكونة من:

رئيسا	أستاذة بجامعة منتوري - قسنطينة	السيدة / فضيلة بن عياش
مقررا	أستاذ بجامعة منتوري - قسنطينة	السيد / صالح غواطي
ممتحننا	أستاذ بجامعة بشار	السيد / عبد الكريم شريتي
ممتحننا	أستاذ محاضر بجامعة ورقلة	السيد / حسين دندوقي
ممتحننا	أستاذ محاضر بجامعة سطيف	السيد / فاروق زايدي
ممتحننا	أستاذ محاضر بجامعة منتوري - قسنطينة	السيد / علي بلفيتح



خريطة للجزائر تبين موقع منطقة الهقار

الإهداء

إلى روح والدي رحمهما الله و أسكناهما فسيح جنانه

إلى أرواح شهداء حرب غزة

إلى من تقر بهم الأعين زوجتي و بناتي العزيزات

إلى أخي و أختي و عائلتيهما

و جميع الأهل و الأصدقاء

أهدي هذا العمل المتواضع

تشكرات

الحمد و الشكر لله أولا و أخيرا على توفيقه لي في انجاز هذا العمل و بعد...

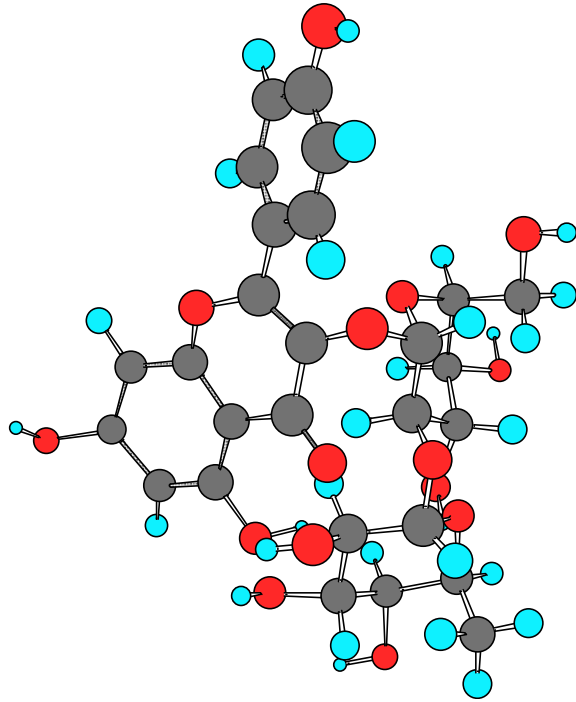
أتقدم بالشكر و العرفان للأستاذ صالح غواطي بإشرافه على هذه الرسالة و تقديمه كل التسهيلات الممكنة بمخبر المركبات الطبيعية ذات الأصل النباتي و الإصطناع الحيوي بقسم الكيمياء، جامعة منتوري- قسنطينة، و إذ أشرف بحضور أعضاء لجنة المناقشة فإنني أتقدم بالشكر للأستاذة فضيلة بن عياش على قبولها ترأس لجنة المناقشة و إلى الأستاذ حسين دندوقي من جامعة ورقلة على قبوله حضور و مناقشة هذه الأطروحة التي لطالما أنتظرها فأتمنى أن يجد فيها ما كان يتمناه شاكرا له تشجيعه لي.

أوجه شكري إلى الأساتذة: فاروق زايدي من جامعة سطيف، علي بلفيتح على قبولهم عضوية هذه اللجنة و مناقشة هذه الرسالة و على تشجيعهم لي لإتمامها.

أوجه شكري للأستاذ عبد الكريم شريتي من جامعة بشار على قبوله أيضا عضوية هذه اللجنة و مناقشة هذه الرسالة.

أتقدم بالشكر الخالص و الإمتنان لأخي و صديقي الأستاذ أحسن بومنجل على حسن الضيافة و تقديمه كل التسهيلات أثناء وجودي بمخبره بجامعة غرونوبل (بفرنسا) و أتمنى له كل التوفيق، و للأستاذة ذهبية بورويس أستاذة الأدب العربي في جامعة الأمير عبد القادر للعلوم الإسلامية على مساعدتها.

و في الأخير أتقدم بالشكر إلى كل الأصدقاء الذين شجعوني من قريب أو بعيد أو قدموا لي نصائح لإنجاز هذه الرسالة و أحص بالذكر الأصدقاء عمار ناصر، رشيد بن كينيوار، علي بن ثامن، صالح عكال و عمار زلاقي.



مقدمة

مقدمة

يتميز الغطاء النباتي للجزائر و المغرب العربي عموما بالتنوع و ذلك بسبب تنوع المناخ السائد في هذه المنطقة فمن نباتات مناخ الأبيض المتوسط في الشمال إلى نباتات المناطق الصحراوية جنوبا مرورا بنباتات الهضاب العليا و المناطق السهلية مع وجود مناطق هنا و هناك متميزة مناخياً و نباتياً.

جلب هذا التنوع النباتي للجزائر و المغرب العربي اهتمام العديد من الباحثين و المستكشفين، كان أولهم العالم النباتي الأندلسي ابن البيطار في أثناء رحلته من الأندلس إلى المشرق العربي مرورا بشمال إفريقيا حوالي سنة 1220م، إذ يعد أول من كتب حول الموضوع و دون ذلك في كتابه "الجامع لمفردات الأدوية و الأغذية" [1] حيث يذكر العديد من الأسماء الأمازيغية و العربية للنباتات مع وصفها و لقد اعتمد من بعده "المستكشفون" الأوروبيون و الفرنسيون بالخصوص قبل بداية الاحتلال الفرنسي و أثناءه على ما ذكره ابن البيطار إضافة إلى المعلومات الشفوية التي تم الحصول عليها من السكان و يذكر هؤلاء "المستكشفون" أنهم تفاجأوا للكلم الهائل من الأسماء و المعلومات لدى غالبية السكان حول النباتات إذ كانوا يعرفون أسماء غالبية النباتات المحيطة بهم، استعمالها المختلفة، فوائدها و أضرارها و كانت أسماء النباتات تشتق من الصفة الغالبة و الميزة للنبات حتى أن بعض هذه الأسماء أصبحت شائعة و طغت حتى على الاسم اللاتيني [2] أما حالياً في الجزائر فقد تراجعت معرفة الناس بالنباتات عموماً و الطبية خصوصاً حتى في الأرياف سواءً من حيث التسمية أو الاستعمال بسبب الاعتماد على الأدوية الحديثة و ارتباط التداوي بالأعشاب غالباً بالمشعوذين.

فالمعروف أن أغلب الأدوية المستعملة في الطب الحديث تم و يتم اشتقاقها من الطب الشعبي التقليدي لمختلف الأمم و قد حاولت الدول المتقدمة عموماً بأن تفرض على الجميع منطلق الاعتماد على هذه الأدوية الحديثة و الابتعاد عن الطب التقليدي لأسباب اقتصادية لكن و بداية من النصف الثاني من القرن العشرين و بسبب ظهور ميكروبات و بكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية الموجودة و كذلك تنوع و خطورة الأعراض الجانبية لأغلب الأدوية فقد عاد الاهتمام بالطب الشعبي كمساعد أو بديل للطب الحديث حتى في الدول المتقدمة و هناك محاولات لتقنينه بشكل علمي حتى يفى بالغرض المتوخى منه.

جغرافياً تقع منطقة الهقار في جنوب غرب الصحراء الجزائرية يعبرها مدار السرطان و تبعد مدينة تمنراست (عاصمة الهقار) بحوالي 2000 كلم عن الجزائر العاصمة و تتربع هذه المنطقة على مساحة شاسعة تعادل ربع مساحة الجزائر، سطحها صخري تتخلله بعض الكثبان الرملية و مكون في غالبية من جبال صخرية عالية يصل ارتفاع جبالها حتى 3003م (قمة تاهات).

تعتبر منطقة الهقار متميزة من عدة نواحي جيولوجياً بتضاريسها الجبلية ذات الأصل البركاني و تاريخياً برسوماتها الصخرية و بأساطير سكانها المتوارثة عن أصولهم و بطولاتهم و بشريا بسكانها الزرق و عادتهم و تقاليدهم و أخيراً تميزها نباتياً إذ بسبب وجود جبال عالية في وسط الصحراء فإن النباتات الصحراوية أو

المدارية تنتشر في سفوح الجبال مثل أشجار *Acacias* و *Calotropis* وغيرهما لكن مع زيادة الارتفاع يلاحظ اختفاء هذه النباتات الصحراوية و ظهور نباتات متوسطة (نسبة إلى البحر الأبيض المتوسط) مثل نباتات العائلة الشفوية (*Labiaceae*) وغيرها، يتكاثف هذا الغطاء النباتي المتوسطي كلما ارتفعنا نظرا للانخفاض الحاد لدرجة الحرارة مما يؤدي إلى نقصان النتج (التبخر) مع العلم أن المناخ السائد في أعالي الجبال هو مناخ جاف بارد ليلاً و شتاءً و فارق درجة الحرارة اليومي و الفصلي معتبر و بالتالي فلا علاقة له بمناخ البحر الأبيض المتوسط و يعتقد أن نباتات جبال الهقار (المتوسطية) تشترك مع نباتات البحر الأبيض المتوسط فقط في أصلها و أنها تختلف عنها بيولوجيا و أنها انتقلت إلى هناك في عصر ما و من ثمة تأقلمت مع ظروف التصحر المتعاقبة [3].

في هذه الرسالة حاولنا تمييز الغطاء النباتي لمنطقة الهقار بدراسة كيميائية تركزت على نواتج الميتابوليزم الفلافونيدي لمجموعة من النباتات و رغم كثرة النباتات الأصلية أو المستعملة في الطب التقليدي بهذه المنطقة فإن قلة الغطاء النباتي و صعوبة المنطقة و اتساعها كانت أكبر من إمكانياتنا حيث تم قطف مجموعة من النباتات المختلفة و لكن بكميات متفاوتة حدث من أهدافنا.

قسمت الرسالة إلى جزئين الأول نظري تم تقسيمه إلى فصلين تناولت بإيجاز في الفصل الأول مركبات الفلافونيدات من حيث ماهيتها و اصطناعها الحيوي و خصائصها الطبية و أخيرا طرق و تقنيات الاستخلاص و الفصل بينما في الفصل الثاني تطرقت إلى مختلف التقنيات الفيزيائية و الكيميائية المستعملة في التعرف على البنى الكيميائية للفلافونيدات.

و في الجزء الثاني و الذي سميت بالجزء العملي فقد تم تقسيمه إلى فصلين تناولت في الفصل الثالث النباتات المدروسة من حيث وصف للنبات و الدراسات الكيميائية السابقة حوله أو حول صنفه و أخيرا طريقة استخلاص المركبات من النباتات ثم في الفصل الرابع و الأخير تناولت كيفية التعرف على البنى الكيميائية للمركبات المفصلة بتحليل مختلف النتائج المتوصل إليها فيما يخص كل مركب مع اقتراح مخطط للاصطناع الحيوي لفلافونيدات كل نبات مما قد يساهم مستقبلا مع أبحاث أخرى حول هذه النباتات في وضع خريطة فلافونيدية لها تساعد على تعريف النبات و تمييزه و كان آخر مطاف هذا العمل خاتمة لخصت فيها بشكل موجز ما تم إنجازه في هذه الرسالة و قد ارتأت في هذه الرسالة تسمية المركبات الكيميائية و استعمال المصطلحات باللغة الإنجليزية كما ألحقت بالرسالة جدولاً يشمل بعض المصطلحات العربية المستعملة و ترجمتها إلى اللغة الإنجليزية و خريطة في أول الرسالة للجزائر توضح موقع منطقة الهقار.

الفهرس

1	الإهداء
2	تشكرات
3	مقدمة
5	الفهرس
10	جدول المصطلحات المستعملة

الجزء النظري

الفصل الأول 1- الفلافونويدات

11	1-1- ماهية الفلافونويدات
12	1-1-1- الأجليكونات
12	1-1-2- الجليكوزيدات
12	أ) O-glycosides
14	ب) C-glycosides
15	2-1- الاصطناع الحيوي للفلافونويدات
18	3-1- الخصائص الطبية للفلافونويدات
18	1-3-1- الفعالية ضد المؤكسدة
18	2-3-1- تثبيط الأنزيمات
18	3-3-1- أمراض القلب و الشرايين
18	4-3-1- مضادة للالتهابات
18	4-1- استخلاص الفلافونويدات
19	5-1- فصل الفلافونويدات
19	1-5-1- الكروماتوغرافيا الورقية
19	أ- الكروماتوغرافيا الورقية ثنائية البعد
20	ب- الكروماتوغرافيا الورقية أحادية البعد
20	2-5-1- كروماتوغرافيا العمود
22	3-5-1- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
22	أ- السيليلوز Cellulose

- 22..... ب- متعدد الأميد Polyamide
- 23..... ج- السيليكا جل Silica gel
- 23..... 1-4-5- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (HPLC)

الفصل الثاني 2- الدراسة البنيوية للفلافونيدات

- 25..... 1-2- ثابت الانحباس R_f و لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية
- 25..... 2-2- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و المرئية
- 26..... 1-2-2- طيف الفلافون و الفلافونول في الميتانول
- 27..... 2-2-2- طيف الفلافون و الفلافونول في وجود كواشف
- 27..... أ- تحضير الكواشف
- 27..... 1-أ- هيدروكسيد الصوديوم NaOH
- 27..... 2-أ- حالات الصوديوم NaOAc
- 27..... 3-أ- كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$
- 27..... 4-أ- حمض كلور الماء HCl
- 27..... 5-أ- حمض البوريك H_3BO_3
- 27..... ب- الطريقة العملية لتحقيق السلسلة الطيفية لأشعة ما فوق البنفسجية و المرئية
- 28..... ج- تأثير الكواشف و تفسيراتها
- 28..... ج-1- طيف NaOH (أو NaOMe)
- 28..... ج-2- طيف NaOAc
- 28..... ج-3- طيف $NaOAc+H_3BO_3$
- 28..... ج-4- طيف $AlCl_3$ و طيف $AlCl_3+HCl$
- 31..... 2-3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H-NMR
- 31..... 1-3-2 البروتونات الأروماتية
- 31..... أ- بروتونات الحلقة A
- 31..... ب- بروتونات الحلقة B
- 32..... ج- بروتون الحلقة C
- 32..... 2-3-2 البروتونات الأليفاتية
- 32..... 1-2-3-2 بروتونات السكر
- 32..... أ- جليكوزيدات أحادية السكر

- 33.....ب- جليكوزيدات ثنائية السكر
- 34.....2-2-3-2- بروتونات مجموعات كيميائية أخرى
- 35.....4-2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ¹³C-NMR
- 36.....5-2- تجارب الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد
- 37.....6-2- مطيافية الكتلة
- 37.....1-6-2- تقنية التأين بالقذف الإلكتروني (EI)
- 37.....2-6-2- تقنية التأين الكيميائي (CI)
- 37.....3-6-2- تقنية التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI)
- 37.....4-6-2- تقنية التأين بالقذف السريع بالذرات (FAB)
- 38.....5-6-2- تقنية التأين بالرذاذ الكهربائي Electrospray
- 38.....7-2- التمييز الحمضي للفلافونيدات
- 41.....مراجع الجزء النظري

الجزء العملي

الفصل الثالث 3- النباتات المدروسة

- 42.....مقدمة
- 42.....1-3- نبات *Pituranthos chloranthus*
- 42.....1-1-3- وصف النبات
- 43.....2-1-3- الدراسات الكيميائية السابقة حول نباتات الصنف *Pituranthos*
- 46.....3-1-3- الدراسة الكيميائية لنبات *Pituranthos chloranthus*
- 50.....2-3- نبات *Solenostemma argel*
- 50.....1-2-3- وصف النبات
- 50.....2-2-3- الدراسات الكيميائية السابقة حول نباتات الصنف *Solenostemma*
- 53.....3-2-3- الدراسة الكيميائية لنبات *Solenostemma argel*
- 56.....3-3- نبات *Marrubium deserti*
- 56.....1-3-3- وصف النبات
- 57.....2-3-3- الدراسات الكيميائية السابقة لنباتات الصنف *Marrubium*
- 62.....3-3-3- الدراسة الكيميائية لنبات *Marrubium deserti*

64	4-3- نبات <i>Ballota hirsuta</i>
64	1-4-3- وصف النبات
65	2-4-3- الدراسات الكيميائية السابقة لنباتات الصنف <i>Ballota</i>
70	3-4-3- الدراسة الكيميائية لنبات <i>Ballota hirsuta</i>

الفصل الرابع 4- النتائج و المناقشات

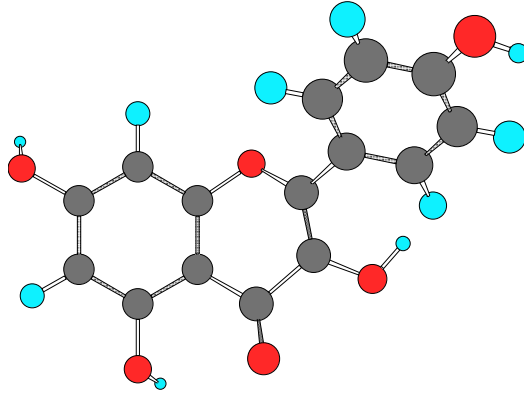
72	مقدمة.....
73	1-4- المركبات المفصولة من نبات <i>Pituranthos chloranthus</i>
73	1-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P1
73	2-1-4- التعيين البنوي للمركب P1
78	3-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P2
78	4-1-4- التعيين البنوي للمركب P2
82	5-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P3
82	6-1-4- التعيين البنوي للمركب P3
86	7-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P4
86	8-1-4- التعيين البنوي للمركب P4
91	9-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P5
91	10-1-4- التعيين البنوي للمركب P5
93	11-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P6
95	12-1-4- التعيين البنوي للمركب P6
102	2-4- المركبات المفصولة من نبات <i>Solenostemma argel</i>
102	1-2-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S1
102	2-2-4- التعيين البنوي للمركب S1
106	3-2-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S2
106	4-2-4- التعيين البنوي للمركب S2
110	5-2-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S3
110	6-2-4- التعيين البنوي للمركب S3
115	7-2-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S4

115.....	8-2-4- التعيين البنيوي للمركب S4
119.....	3-4- المركبات المفصولة من نبات <i>Marrubium deserti</i>
119.....	1-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M1
119.....	2-3-4- التعيين البنيوي للمركب M1
123.....	3-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M2
123.....	4-3-4- التعيين البنيوي للمركب M2
128.....	5-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M3
128.....	6-3-4- التعيين البنيوي للمركب M3
133.....	7-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M4
133.....	8-3-4- التعيين البنيوي للمركب M4
141.....	9-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M5
141.....	10-3-4- التعيين البنيوي للمركب M5
147.....	11-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M6
147.....	12-3-4- التعيين البنيوي للمركب M6
150.....	4-4- المركبات المفصولة من نبات <i>Ballota hirsuta</i>
150.....	1-4-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب B1
151.....	2-4-4- التعيين البنيوي للمركب B1
155.....	3-4-4- التعيين البنيوي للمركب B2
155.....	4-4-4- التعيين البنيوي للمركب B3
156.....	5-4-4- التعيين البنيوي للمركب B4
157.....	6-4-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب B5
157.....	7-4-4- التعيين البنيوي للمركب B5
160.....	8-4-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب B6
160.....	9-4-4- التعيين البنيوي للمركب B6
162.....	10-4-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب B7
162.....	11-4-4- التعيين البنيوي للمركب B7
166.....	الخاتمة.....
168.....	مراجعة الجزء العملي

جدول يشمل أهم المصطلحات المستعملة

المصطلح الإنجليزي	المصطلح العربي	المصطلح الإنجليزي	المصطلح العربي
Inflammation	الالتهاب	Absorption	امتصاص
Infra-family	تحت العائلة	Absorption maxima	قمة الامتصاص
Inhibitors	مثبطات	Absorption spectra	طيف الامتصاص
Isomeration	التماكب	Adsorption	ادمصاص
Linear	الخطية	Acid hydrolysis	التميه الحمضي
Low field	المجال المنخفض	Acylation	أسيلة
Mass spectroscopy (MS)	مطيافية الكتلة	Acetylation	أستلة
Metabolism	المتابوليزم (الأبيض)	Anomeric proton	البروتون الأنوميري
Metallic sodium	الصوديوم المعدني	Antifungal	ضد الفطريات
Methoxyl	ميثوكسيل	Antimicrobial	ضد الجراثيم
Methylation	مثيلة	Antioxidant	ضد مؤكسدة
Methyl donor	مانح للميثيل	Band	عصابة (شريط)
Molecular weight	الوزن الجزيئي	Base	قاعدة (أساس)
NMR	الرنين النووي المغناطيسي	Base peak	القمة الأساسية
Optic density	الشدة الضوئية	Bathochromic shift	انزياح باثوكرومي
Orange	برتقالي	Bleu green	أزرق مخضر
Overlaps	تداخل	Branched	متفرعة
Permethylated derivatives	المشتقات الميثيلية	Brown	بني
Phase	الطور	Carbonyl group	مجموعة كربونيل
Phenolic	الفينولية	Chemical shift	الانزياح الكيميائي
Pic	قمة	Chlorophyll	البيخضور
Plates	ألواح	Chromophore	حامل للون
Precursors	بشائر	Column	عمود
Purification	تنقية	Conjugated	ترافق
Purple	بنفسجي غامق	Correlation	تعانق
Qausi-molecular	شبه جزيئية	Coupling constant (J)	ثابت الاقتران
Reagents	كواشف	Cristal	البلورة
Rearrangement	إعادة ترتيب	Cultured	مستنبتات
Samples	شواهد	Cytoplasme	سيتوبلازم
Secondary metabolism	المتابوليزم (الأبيض) الثانوي	Cytotoxic activity	الفعالية السمية
Separation	فصل	Dark	أسود
Shift	انزياح	Doublet	ثنائية
Shoulder	انثناء	Electrospray	الرداذ الكهربائي
Signal	إشارة	Eluent	المملص
Singlet	أحادية	Endemic	أصيلة
Species	نبات (نوع)	Enzyme	أنزيم
Spectra	الطيف	Ethyl acetate	خلات الإيثيل
Spot	البقعة	Extract	مستخلص
Squeleton	هيكل	Extraction	استخلاص
Stationary phase	الطور الثابت	Family	العائلة
Substituent	مستبدل	Filter	مرشح
Sugar donor	مانح للسكر	Filtration	الترشيح
Systems	جمل (أنظمة)	Fraction	الكسر
Ultra violet	فوق البنفسجية	Fragments	الشظايا
Vacuole	فجوة الخلية	Fragmentation	التشظية
Volatile	متطاير	Frontal rapport	ثابت الانحباس
Yellow green	أصفر مخضر	Genre (Genus)	الصنف
Yellow pale	أصفر باهت	High field	المجال الأعلى
		Hybridation	تهجين
		Hypsochromic shift	انزياح هيبسوكرومي

الفصل الأول

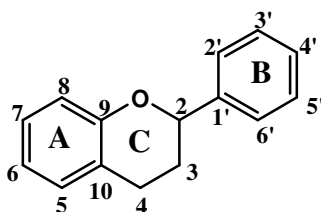


الغلافونيدات

1-1- ماهية الفلافونويدات:

هي مركبات طبيعية من نواتج الميتابوليزم الثانوي حيث تشكل أحد أكبر أقسام مركبات البولي-فينول (Polyphenols) الموجودة في المملكة النباتية، تم التعرف على حوالي 9000 بنية فلافونيدية [4] بنيتها الكيميائية مشتقة من مركب الفلافان (Flavan) شكل-1 و الذي يتشكل من حلقتين بترنيتين (A) و (B) مرتبطين بحلقة غير متجانسة (C) بها ثلاث ذرات كربون و بالاعتماد على درجة تأكسد هذه الأخيرة نحصل على مختلف أقسام الفلافونويدات كما هو مبين في الشكل-3.

يعود السبب في التنوع الكبير في صيغ الفلافونويدات إلى التغييرات التي يمكن أن تطرأ على الهيكل الأساسي لنوع معين من الفلافونويدات بتأثير أنزيمات مختلفة [5].



شكل-1- مركب الفلافان Flavan

تتواجد الفلافونويدات في جميع النباتات الراقية كما تتواجد في النباتات الدنيا لكن بصيغ بنوية بسيطة و المؤكد حالياً أن للفلافونويدات وظائف و أدواراً هامة في حياة النبات نذكر منها:

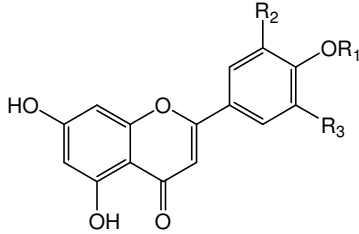
- دورها في تلوين الأزهار و الثمار و البذور لجلب الملقحات و تشتيت البذور.
- دورها في حماية النبات من الأشعة فوق البنفسجية و بالخصوص أشعة UV-B التي يتراوح طول موجتها بين (280-315nm) و التي تمر عبر طبقة الأوزون حيث تعمل الفلافونويدات كمرشحات و بالتالي تحمي أنسجة النبات من الضرر.
- دورها في حماية النبات من الميكروبات بخصائصها المضادة للميكروبات أو كمنبهات لأي هجوم ميكروبي.
- دورها في حماية النبات ضد الحشرات و الحيوانات [6].

تتواجد الفلافونويدات في جميع أجزاء النبات و تتركز غالباً في الأجزاء الهوائية أما على مستوى الخلية النباتية فإن الفلافونويدات الجليكوزيدية (glycosides) الذوابة في الماء تتواجد في فجوة الخلية النباتية بينما الفلافونويدات غير القطبية (أجليكونات aglycones) فتتواجد في سيتوبلازم الخلية أو تتوضع على الأنسجة السطحية للنبات لأنها تعتبر سامة للخلية [7].

من أكثر أقسام الفلافونويدات انتشاراً في النباتات الفلافونول (Flavonols) و الفلافون (Flavones) [4] كلا هذين النوعين من الفلافونويدات يتواجد كما هو الحال مع بقية أنواع الفلافونويدات في صورتين:

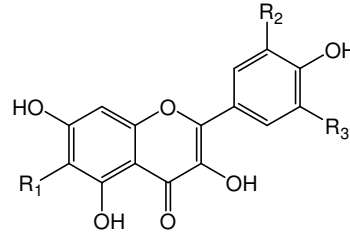
1-1-1- الأجليكونات (Aglycones):

يتعدى عددها حاليا 1100 مركب (حوالي 500 فلافون و أكثر من 600 فلافونول) [4] و تتميز بوجود مجموعات مثل OH، C-Me، OMe،... الخ على هيكل الفلافون أو الفلافونول و أكثر المركبات الشائعة منهما مدونة بالشكل-2.



Flavone:

R ₁ = H,	R ₂ = H,	R ₃ = H,	<u>Apigenin</u>
R ₁ = H,	R ₂ = OH,	R ₃ = H,	<u>Luteolin</u>
R ₁ = H,	R ₂ = OH,	R ₃ = OH,	<u>Tricetin</u>
R ₁ = H,	R ₂ = OCH ₃ ,	R ₃ = H,	<u>Chrysoeriol</u>
R ₁ = CH ₃ ,	R ₂ = OH,	R ₃ = H,	<u>Diosmetin</u>



Flavonol:

R ₁ = H,	R ₂ = H,	R ₃ = H,	<u>Kaempferol</u>
R ₁ = H,	R ₂ = OH,	R ₃ = H,	<u>Quercetin</u>
R ₁ = H,	R ₂ = OH,	R ₃ = OH,	<u>Myricetin</u>
R ₁ = H,	R ₂ = OCH ₃ ,	R ₃ = H,	<u>Isorhamnetin</u>
R ₁ = OH,	R ₂ = OH,	R ₃ = H,	<u>Quercetagenin</u>

شكل- 2- الصبغ الكيميائية لأجليكونات الفلافون و الفلافونول الأكثر انتشارا

2-1-1- الجليكوزيدات (Glycosides):

يتعدى عددها 2000 مركب (حوالي 1300 فلافونول و 700 فلافون) [4] تتميز بارتباط سكر (أو عدة سكريات) بالهيكل الأساسي لها عبر نوعين من الروابط هي:

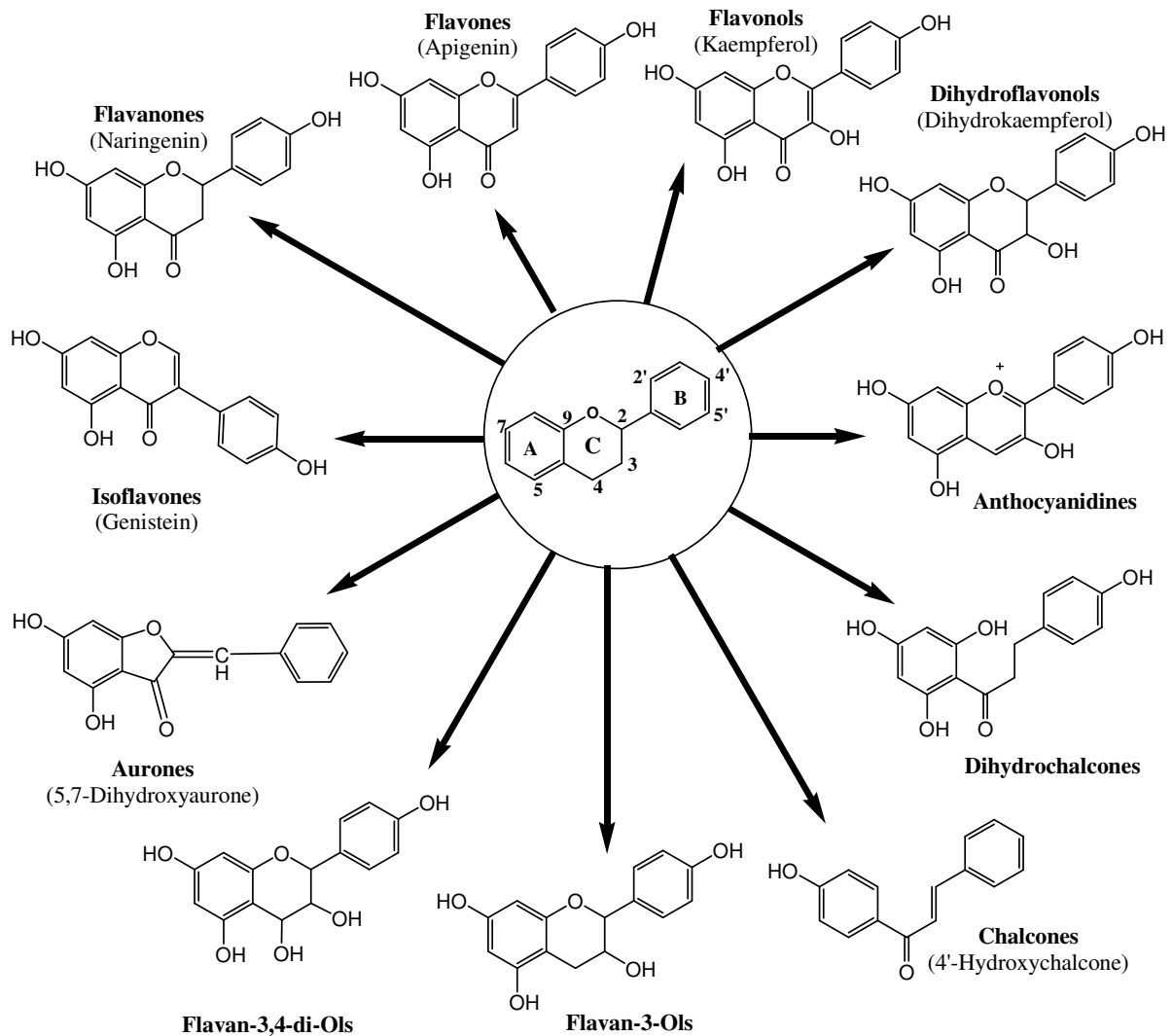
أ) O-glycosides:

حيث يرتبط السكر بالأجليكون برابطة أو كسيجينية عبر إحدى الهيدروكسيلات الفينولية، ففي حالة الفلافون يكون هيدروكسيل الموضع 7 هو الأكثر استبدالاً يليه و بنسبة قليلة هيدروكسيلات الموضع 5 و 4 أما في حالة الفلافونول فأكثر الهيدروكسيلات استبدالاً هو هيدروكسيل الموضع 3 يليه هيدروكسيل الموضع 7 أما بقية المواقع فاستبدالها نادر، كما يمكن الحصول على فلافونيدات ثنائية أو متعددة السكر عبر ارتباط عدة سكريات بعدة مواقع على الفلافونيد أو بارتباط سكريات بعضها ببعض بموضع واحد و الجدول-1- يعطي مختلف السكريات التي يمكنها أن ترتبط بالفلافونيد وحيدة أو في تشكيلات سكرية [8]، جميع هذه السكريات تتواجد في الشكل البيروني pyranose ماعدا سكر arabinose فإنه يتواجد في الشكلين البيروني (pyranose) و الفيراني (furanose) أما سكر apiose فيتواجد في الشكل الفيراني فقط [8].

Pentoses	Hexoses	Uronic acid
D-Apiose	D-Allose	D-Galacturonic acid
L-Arabinose	D-Galactose	D-Glucuronic acid
L-Rhamnose	D-Glucose	
D-Xylose	D-Mannose	

جدول-1- أغلب السكريات التي تصادفها مع الفلافونيدات

ذكرنا من قبل أنه يمكن أن يرتبط سكر ثان بالسكر الأولي المرتبط بالفلافونيد و أهم التشكيلات ثنائية السكر التي تم التعرف عليها مع الفلافونيدات مدونة بالجدول-2- مع أسمائها الشائعة [8] مع العلم أن ارتباط سكر بالفلافونيد يزيد من قطبية المركب.



شكل-3- يبين مختلف أقسام الفلافونيدات

يمكن أن ترتبط ثلاثة سكريات بعضها ببعض (Trisaccharides) [8] و في هذه الحالة يُميز بين ثلاثية السكر الخطية، مثل $O\text{-}\beta\text{-glucosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}O\text{-}\beta\text{-glucosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}O\text{-}\beta\text{-glucoside}$ المعروف بـ Sophorotriose و ثلاثية السكر المتفرعة، مثل $O\text{-}\beta\text{-glucosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}O\text{-}\alpha\text{-[rhamnosyl-(1}\rightarrow\text{6)-glucose]}$ و اختصارا يكتب $2^G\text{-Glucosylrutinose}$.
 يمكن أيضا أن ترتبط مجموعات أسيل (acyl) بهيدروكسيل السكر و نذكر منها: succinic, malonic, acetic.
 gallic, caffeic, ferulic, *p*-coumaric, *p*-hydroxybenzoic, و [8] benzoic.
 للتعرف على السكر (أو السكريات) المرتبط بالفلافونيد نقوم بالتمييز الحمضي للمركب و بعد استخلاصه يتم التعرف عليه بالطرق الكروماتوغرافية.

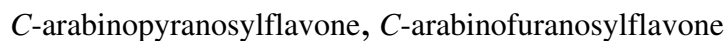
ب) C-glycosides:

في هذه الحالة يرتبط السكر مباشرة بالأجليكون برابطة "كربون-كربون" و يكون هذا الارتباط في الموضعين 6 و/أو 8 من الحلقة A و يلاحظ هذا النوع من الجليكوزيدات مع الفلافونات (Flavones) بالخصوص.

تشكيلة السكريات	الاسم الشائع
6- <i>O</i> -rhamnosylglucose	Rutinose
2- <i>O</i> -rhamnosylglucose	Neohesperidose
3- <i>O</i> -rhamnosylglucose	Rungiose
2- <i>O</i> -rhamnosylgalactose	
6- <i>O</i> -rhamnosylgalactose	Robinobiose
2- <i>O</i> -glucosylglucose	Sophorose
6- <i>O</i> -glucosylglucose	Gentiobiose
2- <i>O</i> -mannosylglucose	
2- <i>O</i> -allosylglucose	
4- <i>O</i> -galactosylglucose	Lactose
6- <i>O</i> -arabinosylglucose	Vicianose
4- <i>O</i> -glucosylrhamnoside	

جدول-2- التشكيلات ثنائية السكر مع أسمائها الشائعة

يمكن أن يرتبط سكر واحد بأحد الموضعين 6 أو 8 كما و يمكن أن يرتبط سكرين بالموضعين 6 و 8 أما أنواع السكريات التي نصادفها مع هذا النوع من المركبات فهي: galactose ، rhamnose ، xylose ، glucose و arabinose و يكون هذا النوع من الجليكوزيدات مقاوم للتمييز الحمضي (على عكس *O*-glycosides) و يتميز بحدوث إضافة إلى تفاعل إعادة ترتيب Wessely- Moser التي تحدث مع الفلافونيدات التي لها هيدروكسيل في الموضع 5 على تفاعل تماكب آخر يتم على مستوى السكر نفسه كما هو الحال في حالة سكر الأرابينوز (arabinose) حيث يحدث تفاعل تماكب فنحصل على خليط من مماكين [8] هما:



للتعرف على السكر (أو السكريات) في هذا النوع من المركبات يتم الاستعانة بمطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون كما تستعمل كذلك مطيافية الكتلة لمشتقاتها المثلية (Permethyated-C-glycosides) [9] و الشكل-4- يعطي بعض الصيغ الكيميائية لبعض أنواع هذه الفلافونيدات.

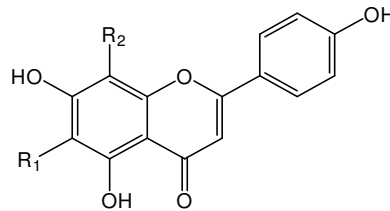
2-1- الاصطناع الحيوي للفلافونيدات:

ينحدر الهيكل الأساسي للفلافونيدات ($C_6-C_3-C_6$) ذو 15 ذرة كربون من مسلكين هما:

- مسلك malonyl-CoA

- مسلك *p*-coumaroyl-CoA

فبتحفيز من أنزيم CHS يتم تكاثف ثلاث جزيئات من (malonyl-CoA) مع جزيئه من (*p*-coumaroyl-CoA) للحصول على مركب وسيط هو الشالكون (chalcone) الذي يحتوي على حلقتين عطريتين تفصل بينهما ثلاث ذرات كربون، في أغلب النباتات لا يكون مركب الشالكون هو الناتج النهائي (شكل-5) بل هو أحد البشائر لأنواع أخرى من الفلافونيدات مثل flavanones، dihydroflavonols حتى نصل في نهاية الاصطناع الحيوي إلى مركبات الأنتوسيانين anthocyanins الذوابة في الماء و التي تعتبر من المكونات الأساسية لصبغ الأزهار و الثمار و يتم ذلك بتحفيز أنزيمات مختلفة، أما الأقسام الأخرى من الفلافونيدات مثل: isoflavones، auronos، flavones، flavonols،... الخ، فهي تكون نتاج تفاعلات جانبية (مُحفزة هي الأخرى بأنزيمات) في المسلك العام لتكوين مركبات الأنتوسيانين anthocyanins [5].



R₁ = Glucose, R₂ = H, Isovitexin

R₁ = H, R₂ = Glucose, Vitexin

R₁ = Xylose, R₂ = Glucose, Vicenin-1

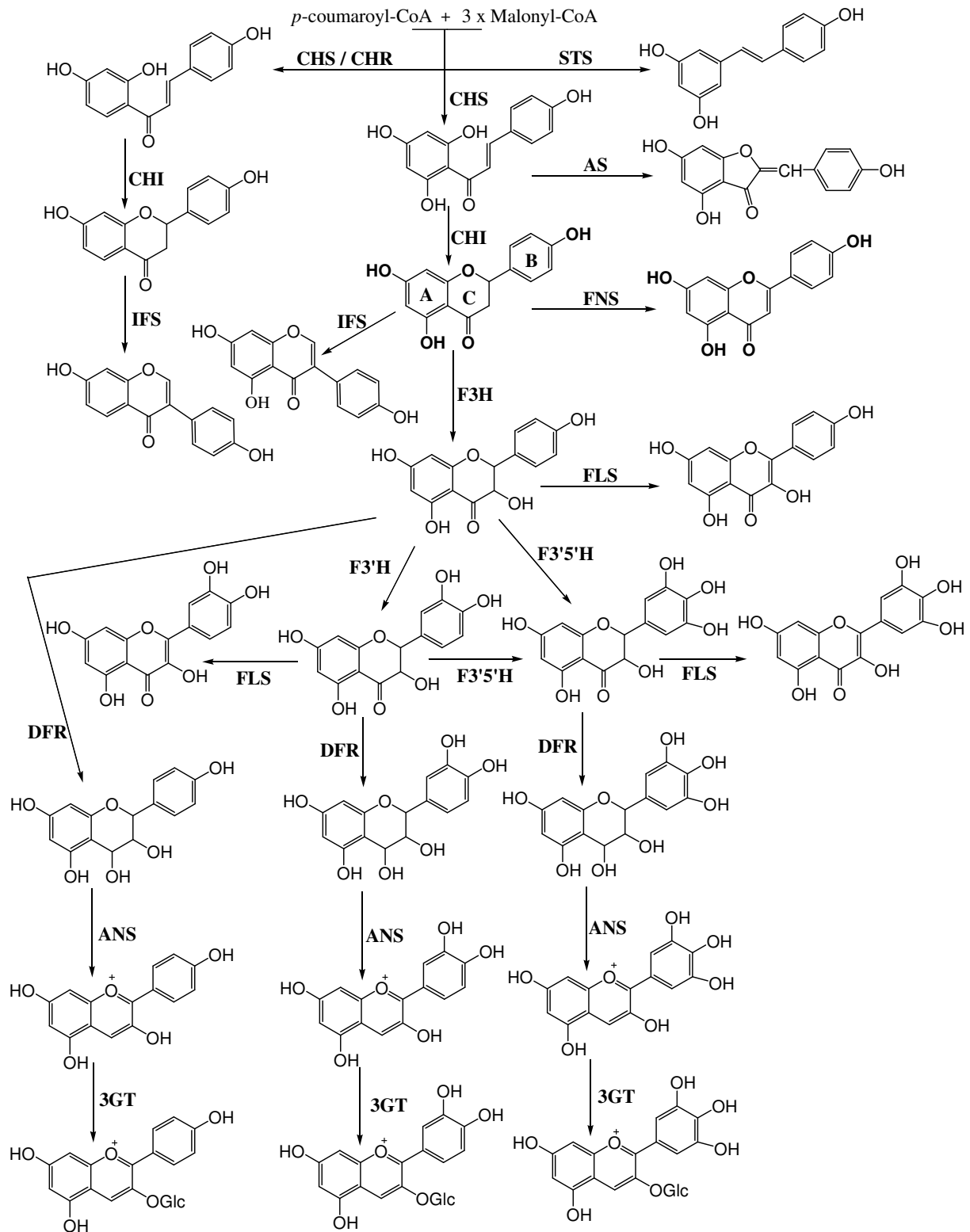
R₁ = Glucose, R₂ = Glucose, Vicenin-2

R₁ = Glucose, R₂ = xylose, Vicenin-3

شكل-4- الصيغ الكيميائية لبعض مركبات C-glycosylflavones

يلي تكوين الهياكل الأساسية لمختلف أقسام الفلافونيدات تغييرات أخرى تتم على مستوى كل قسم مثل: مثيلة الهيدروكسيلات (methylation)، تثبيت سكريات (glycosylation)،... الخ بالهيكل الفلافونيدي لكن هناك تغييرات أخرى مثل C-glycosylation، sulfation، prenylation فإنها تكون محدودة و مميزة لأقسام معينة من الفلافونيدات [5] و تتم جميع هذه التغييرات غالبا في نهاية الاصطناع الحيوي.

تتابع التفاعلات الأنزيمية لتكوين جليكوزيدات الفلافون و الفلافونول موضحة بالشكل-6- مع العلم أن أغلب هذه الخطوات تمت دراستها على مستنبتات (*Petroselinum*) و يعتقد أنها مشابهة لما يحدث في أي نبات آخر

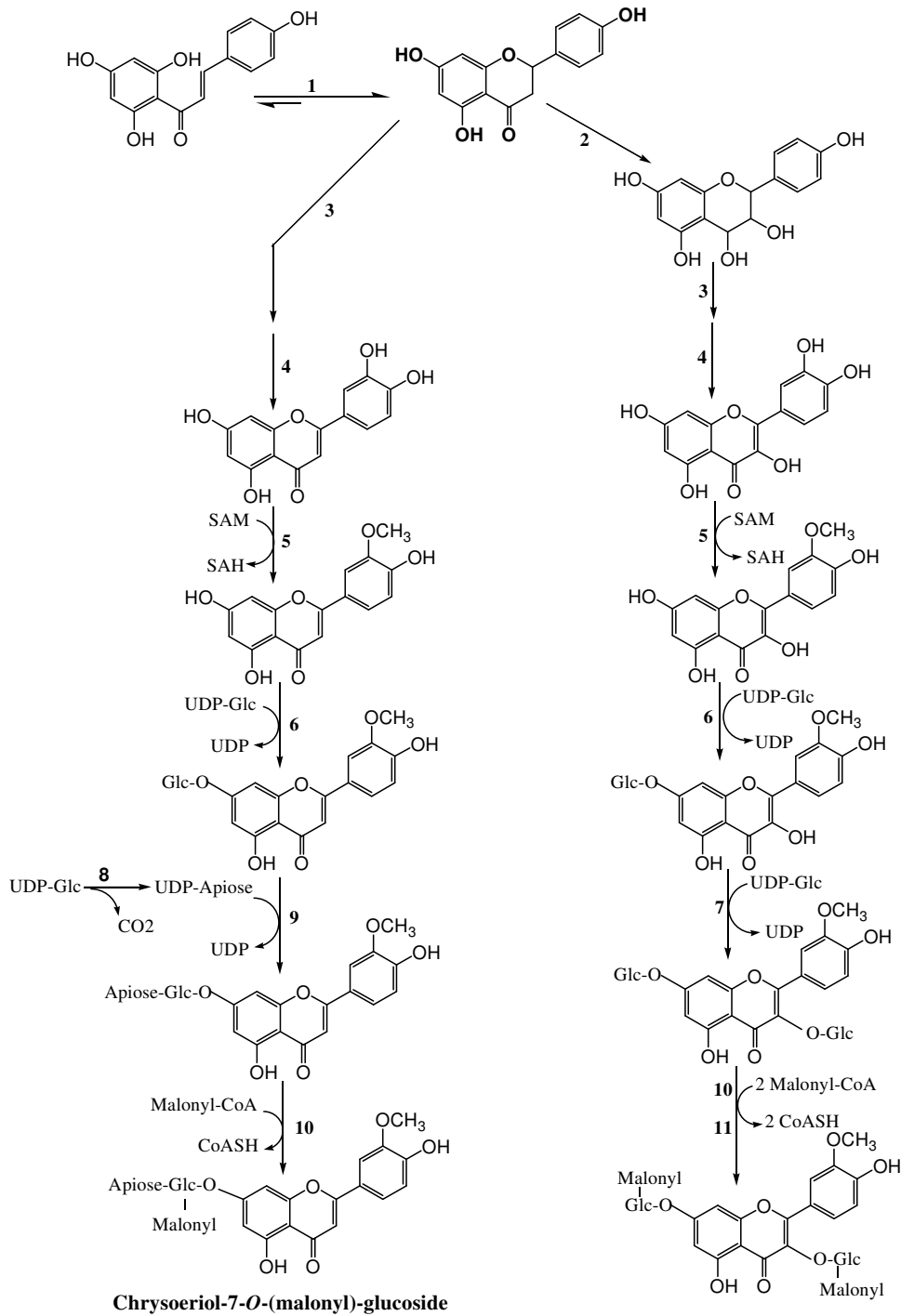


CHS : Chalcone synthase
CHR : Chalcone reductase
CHI : Chalcone isomerase
STS : Stilbene synthase
AS : Aureusidin synthase

F3H : Flavanone hydroxylase
FNS : Flavone synthase
IFS : Isoflavone synthase
FLS : Flavonol synthase
F3'H : Flavonoid-3'-hydroxylase

F3',5'H : Flavonoid-3',5'-hydroxylase
DFR : Dihydroflavonol-4-reductase
ANS : Anthocyanidin synthase
ANR : Anthocyanidin reductase
3GT : Flavonoid-3-glycosyltransferase

شكل-5- مخطط الاصطناع الحيوي لمختلف أقسام الفلافونيدات في النباتات [5]



- 1 : Chalcone isomerase
 2 : Flavonoid 3-hydroxylase
 3 : Flavonoid oxydase
 4 : Flavonoid 3'-hydroxylase
 5 : S-adenosyl-L-methionine: flavonoid 3''-O-methyltransferase
 6 : UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase

- 7 : UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase
 8 : UDP-Apiose / UDP-xylose synthase
 9 : UDP-Apiose: flavone 7-O-glucoside 2''-O-apiosyltransferase
 10 : Malonyl-CoA: flavonoid 7-O-glycosidomalonyltransferase
 11 : Malonyl-CoA: flavonoid 3-O-glycosidomalonyltransferase

شكل-6- مخطط الاصطناع الحيوي يوضح تتابع التفاعلات الأنزيمية لتكوين جليكوزيدات الفلافون و الفلافونول [8]

كما أن بعض التفاعلات في الفلافون و الفلافونول يتم تحفيزها بنفس الإنزيم و البعض الآخر خاصة بكل نوع على حدة، أخيرا نشير إلى أن تثبيت مثيل أو سكر يتطلب وجود مانح للمثيل أو مانح للسكر إضافة إلى الإنزيم المثبت [8].

3-1- الخصائص الطبية للفلافونيدات:

ذكرت في بداية هذا الفصل بعض الخصائص البيولوجية للفلافونيدات تجاه النباتات و سنتطرق بإيجاز فيما يلي إلى بعض خصائصها الطبية [6]:

1-3-1- الفعالية ضد المؤكسدة:

أظهرت العديد من الأبحاث مقاومة الفلافونيدات للعوامل المؤكسدة حيث تعمل كفخاخ (مصايد) للعديد من الجذور الحرة (radicals)، الشوارد المؤكسدة مثل O_2^- و OH^- حيث لوحظ أن وجود رابطة مضاعفة بين ذرتي الكربون C2 و C3 و مجموعة كربونيل C4 يكون ضروري لفعالية المركب الفلافونيدي [6].

2-3-1- تثبيط الأنزيمات:

بينت الدراسات أن الفلافونيدات هي مثبطات للعديد من الأنزيمات إذ أن وجود رابطة مضاعفة بين C2, C3 و كربونيل C4 أو وجود مجموعات هيدروكسيل في المواضع C4', C5', C3' من الشروط الأساسية لفعالية المركبات [6].

3-3-1- أمراض القلب و الشرايين:

هناك علاقة عكسية بين تناول الغذاء الغني بالفلافونيدات و الوفيات الناتجة عن أمراض القلب و الشرايين عند الأشخاص المسنين مما يعني أن تناول الأغذية الغنية بالفلافونيدات يقلل من خطر الإصابة بهذه الأمراض [10].

4-3-1- مضادة للالتهابات:

أظهرت العديد من الفلافونيدات فعالية ضد الالتهابات، نذكر منها:

- بين المركب kaempferol فعالية جيدة لكنها تناقصت بارتباط سكر الجليكوز بالموضع 3 (astragalinal) لكن عند إضافة مجموعة *p*-coumaroyl إلى الجليكوز بالموضع "6" تضاعفت فعاليته بأكثر من 8 مرات و عند إضافة مجموعة *p*-coumaroyl أخرى إلى الموضع "2" زادت فعاليته بـ30 مرة مقارنة بمركب astragalinal [6].

- وجد أيضا أن مركب apigenin يثبط عند تراكيز مختلفة نمو الخلايا الجلدية المعروفة بـ fibroblast التي تؤدي دورا مهما في تثبيت و عدم تشوه الأنسجة المصابة أثناء إعادة تكوينها (غالبا يعزى التأخر في اندمال الجروح إلى نقصان أو زيادة نشاط هذا النوع من الخلايا الجلدية) [6]، كما أن للفلافونيدات عديدة الميتوكسل (Polymethoxyflavones) فعالية معتبرة ضد الالتهابات [6].

4-1- استخلاص الفلافونيدات:

يكون للفلافونيدات التي لها هيدروكسيولات أو ترتبط بها سكريات قطبية معتبرة لذا يتم استخلاصها باستعمال مذيبات مثل الإيثانول (EtOH)، الميتانول (MeOH)، البيوتانول (BuOH) و الماء (H_2O) و يفضل في غالب

الأحيان استعمال محلول كحولي أما في حالة الفلافونيدات غير القطبية فبحكم قطبيتها الضعيفة و تواجدتها على مستوى الأنسجة الخارجية للنبات فيتم استخلاصها بمذيبات مثل الإيثر و الكلوروفورم و الهكسان [9].
فبعد قطف النبات و تجفيفه بعيدا عن أشعة الشمس (يمكن أيضا تجفيفه بسرعة في فرن كهربائي عند 100م° لتثبيت عمل الأنزيمات بسرعة) يتم تقطيعه أو طحنه ثم تستخلص الفلافونيدات بمحلول كحولي بالنسب MeOH:H₂O (7:3, 8:2) عدة مرات على أن يغمر المذيب المادة النباتية كلية (كما يمكن استخلاصها بمحلول MeOH:H₂O (9:1) ثم بمحلول MeOH:H₂O(1:1) لمدة ليلة كاملة في كل مرة [9])، نرشح ثم يركز المحلول الكحولي الناتج إما حتى الحصول على مستخلص جاف تتم إذابته بعد ذلك في الماء المقطر أو حتى التأكد من عدم بقاء آثار من مذيب الميثانول، يترك المحلول المائي في مكان بارد لليلة كاملة ثم يرشح و بالتالي نتخلص من جزء كبير من المواد الليبوفيلية (شحوم نباتية، كلوروفيل، . . الخ).

المحلول المائي يتم تجزئته في قمع فصل (عمليات فصل سائل- سائل) مع مذيبات مختلفة القطبية بداية بالكلوروفورم (CH₃Cl) فمذيب خلات الإيثيل (EtOAc) و أخيرا 1- بيوتانول (1-BuOH) على أن تكرر العملية مع كل مذيب مرتان أو ثلاث، تركز المستخلصات و بالتالي تكون جاهزة لعمليات فصل لاحقة. بالنسبة للفلافونيدات ضعيفة القطبية مثل الفلافونيدات عديدة الميتوكسيل يمكن استخلاصها مباشرة من النبات الغض بغمسه لدقائق في مذيب مثل الهكسان (Hexane) أو الكلوروفورم، ثم يركز المحلول المحصل عليه [9].

1-5- فصل الفلافونيدات:

يتم فصل و تنقية الفلافونيدات بالاستعانة بالتقنيات الكروماتوغرافية المختلفة مثل الكروماتوغرافيا الورقية (PC)، كروماتوغرافيا العمود (CC)، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) و الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (HPLC).

1-5-1- الكروماتوغرافيا الورقية (Paper chromatography):

نستعمل هذه التقنية للكشف عن الفلافونيدات وأيضا في عمليات الفصل و يستعمل لهذا الغرض ورق سيليلوز (عال النقاوة) مثل ورق Whatman[®] N°1، Whatman[®] 3MM و بالخصوص هذا الأخير الذي يتميز بقدرة ادمصاص عالية و سهولة في الكشف عن الفلافونيدات باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 365 nm و يفضل أن يكون المصباح أسفل الورقة مع أخذ الاحتياطات الأمنية اللازمة (نظرات واقية من أشعة UV) كما يمكن تعريضها لأبخرة الأمونياك أو أي كاشف آخر للكشف عن الفلافونيدات أما عيوبها فهي سهولة تمزق الورقة و هي مبتلة بالمذيب و كذا وجود كمية كبيرة من جزيئات السيليلوز الذوابة في الميثانول مع المركبات المفصولة مما يتطلب تنقيتها.

أ) الكروماتوغرافيا الورقية ثنائية البعد:

توضع كمية قليلة من المستخلص بشكل بقعة دائرية في أحد أركان الورقة ذات الأبعاد (46x57cm) ثم تملص في الإتجاه الأول بمذيب كحولي غالبا هو (BAW) بعد إخراج الكروماتوغرام و تجفيفه يملص في الإتجاه الثاني

بشكل عمودي على الأول مع مذيب آخر مائي (HOAc15%) يخرج الكروماتوغرام، يجفف ثم تحدد مختلف البقع الموزعة على مساحة الورقة بقلم رصاص بالاستعانة دائما بمصباح للأشعة فوق البنفسجية، مواقع هذه البقع على الورقة (شكل-7) تعطي معلومات أولية عن البنية الكيميائية للمركبات (كروماتوغرافيا تحليلية) و من جهة أخرى يمكن قص كل بقعة على حدى و تملئها في المذيب المناسب للحصول على المركب (أو المركبات) المدمص عليها (كروماتوغرافيا تحضيرية) [9].

ب) الكروماتوغرافيا الورقية أحادية البعد:

يوضع المستخلص بشكل خط عريض في حالة الكروماتوغرافيا التحضيرية (أو بشكل نقاط تفصل بينها مسافة 3سم في حالة كروماتوغرافيا تحليلية) على طول عرض الورقة مع ترك هامش (5cm) عند كل طرف منها ثم يملص في اتجاه واحد باستعمال مذيب مناسب (جدول-3)، بعد انقضاء الوقت اللازم، يخرج و يجفف ثم تحدد الأشرطة (مستعنين بمصباح للأشعة فوق البنفسجية)، تقطع ثم تملص بالميتانول للحصول على المركبات المدمصة عليها.

جملة المذيبات	الاستعمال المفضل
BAW(<i>n</i> -BuOH:HOAc:H ₂ O (4:1:5)) *	Glycosides, aglycones
CAW (CHCl ₃ :HOAc:H ₂ O (30:15:2))*	Methylated aglycones, acylated glycosides
H ₂ O	Glycosides
HOAc 5%	Polyglycosides
HOAc 15%	Glycosides (mon-, di-, tri-)
HOAc 50%	Aglycones

* يستعمل الطور العضوي منه

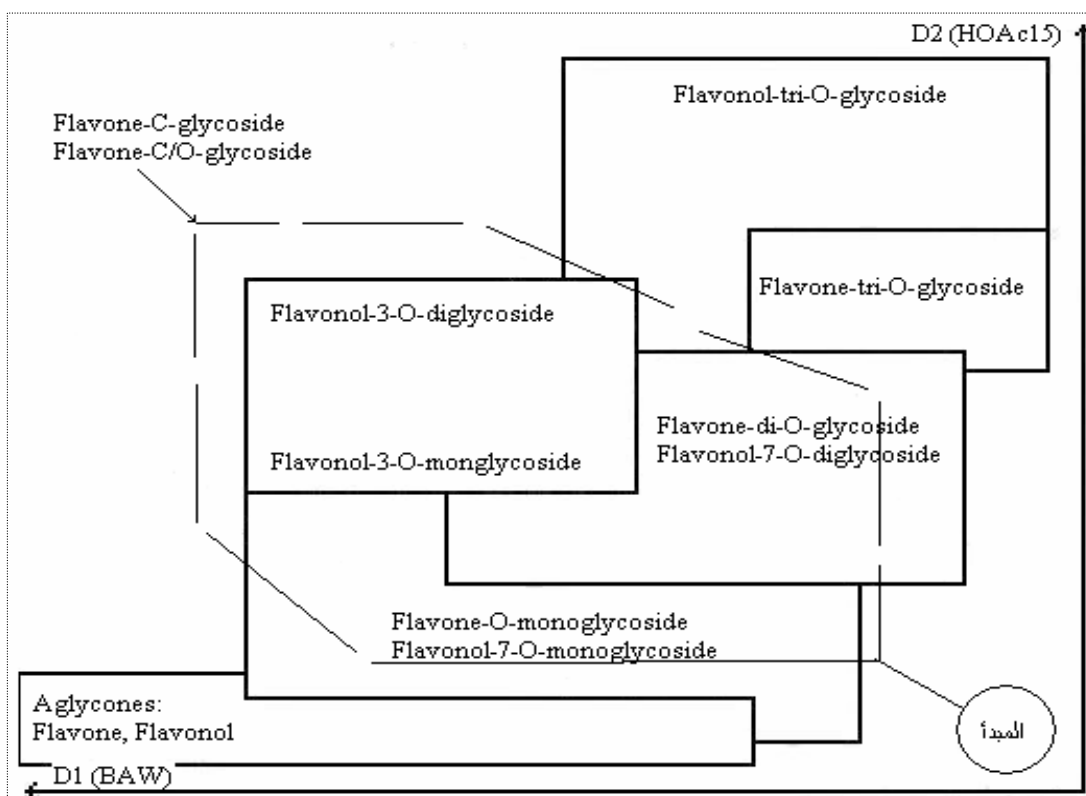
جدول-3- جمل المذيبات المستعملة في الكروماتوغرافيا الورقية [9]

1-5-2- كروماتوغرافيا العمود (Column chromatography):

تستعمل عموماً هذه التقنية في فصل كمية كبيرة من المستخلص و تستخدم العديد من المواد الدامصة كطور ثابت منها: Sephadex gel, Cellulose, Silica gel, Polyamide .

بملاً عمود كروماتوغرافي (أنبوبة زجاجية مزودة في أحد طرفيها بجنفية) بالمادة الدامصة (الممزوجة في المذيب الأقل قطبية) في دفعة واحدة و بهدوء، بعد توضع الطور الثابت يغسل بدفعات من المذيب السابق للتخلص من الشوائب و من الحبيبات الدقيقة للمادة الدامصة التي يعيق وجودها عملية الفصل.

يوضع المستخلص (المذاب في أقل كمية من أحد المذيبات أو الذي تم ادمصاصه على كمية قليلة من الطور الثابت) أعلى العمود برفق حتى لا يتشوه السطح الأفقي للطور الثابت، بعدها نبدأ التمليص بالمذيب الأقل قطبية و يغذى تدريجياً بمذيب قطبي، تتم مراقبة العمود الكروماتوغرافي باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية حيث بالإمكان رؤية الأشرطة المتتابعة و لكن ليس في كل الحالات و بالتالي يمكن مراقبتها من خلال مراقبة الكسور (Fractions) المحصل عليها بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).



شكل-7- يبين تموقع مركبات الفلافون و الفلافونول على ورق Whatman® [9]

يعد (Polyamide) أفضل مادة دامصة مستعملة مع الفلافونيدات المختلفة (جليكوزيدات و أجليكونات) و يفضل غسله قبل استعماله بالماء المقطر و الميثانول للتخلص من شوائبه الذوابة في الميثانول و لتجانس حجم حبيباته، تكون النسبة بين كمية المستخلص إلى كمية Polyamide المستعملة في حدود 25 / 1 (بمعنى لفصل غرام واحد من مستخلص يلزم استعمال على الأقل 25 غرام من مادة Polyamide).

يستعمل أيضا كمادة دامصة غبرة السيليلوز (Cellulose) و يمكننا من فصل الأجليكونات عن الجليكوزيدات كما يفصل مختلف أنواع الجليكوزيدات بعضها عن بعض (يتشابه استعماله مع الكروماتوغرافيا الورقية).

تستعمل أيضا مادة السيليكا جل (Silica gel) و تكون جيدة مع الفلافونيدات ضعيفة القطبية و لكن يمكن استعمالها أيضا مع الجليكوزيدات و بالخصوص إذا تم تنظيفها من الشوائب المعدنية التي تجعل الفلافونيدات تلتصق بقوة بالطور الثابت، تكون النسبة بين كمية المستخلص إلى كمية Silica gel هي (1 / 50).

كما نستعمل مادة (Sephadex LH20) في فصل المستخلصات الفلافونيدية لكن يفضل استعماله في نهاية عمليات الفصل لتنقية المركبات المفصولة و يستخدم الميثانول النقي أو محلول ميثانولي لتمليص المركب [9] أما جمل المذيبات المستعملة مع هذه المواد الدامصة فهي مدونة بالجدول-4.

المادة الدامصة	جملة المذيبات	تستعمل مع
Cellulose	MeOH:H ₂ O (95:5) → H ₂ O	Flavonoides
	H ₂ O → HOAc15%	Glycosides
Polyamide	H ₂ O → MeOH	Glycosides
	CH ₃ Cl:MeOH → MeOH	Glycosides
	Toluene → MeOH	Flavonoides
Sephadex LH20	MeOH	Aglycones
	MeOH → MeOH:H ₂ O (7:3)	Glycosides

جدول-4- حمل المذيبات المستعملة في كروماتوغرافيا العمود

3-5-1- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin-layer chromatography): تستعمل هذه التقنية لكشف

و فصل الفلافونيدات تتميز بأنها تتطلب كمية قليلة من المستخلص و سرعة في التنفيذ، تعتمد هذه التقنية في التحليل الكيفي للفلافونيدات لـ:

- متابعة مجربات التفاعلات الكيميائية مثل التمييز الحمضي.

- التعرف على المركبات بوجود شواهد (Co-chromatography).

- دراسة غني مستخلص.

تستعمل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أيضا في التحليل الكمي لفصل المركبات الفلافونيدية و المواد الدامصة الأوسع استعمالا هي: [9] cellulose, polyamide, silica gel.

فلتحضير خمسة ألواح زجاجية ذات أبعاد (20x20cm) و التي يتم تنظيفها بالماء و بمذيب عضوي مثل الأسيتون أو الميثانول مسبقا بحيث يكون سمك الطور الثابت (0.25mm) من المواد الدامصة السابقة يلزم ما يأتي:

أ) السيليلوز (Cellulose):

نمزج (20g) من غبرة السيليلوز مع (70ml) من الماء المقطر ونخلط المزيج بقوة لبعض الوقت ثم يوزع على الألواح الزجاجية [9] و نستعمل معها حمل المملصات الخاصة بالكروماتوغرافيا الورقية (الجدول-3).

ب) متعدد الأميد (Polyamide):

نمزج (10g) من غبرة متعدد الأميد مع (55ml) من الإيتانول ثم توزع على الألواح الزجاجية كما يمكن تحضيرها بمزج (85g) من متعدد الأميد مع (15g) من السيليلوز مذابة في الميثانول و توزع على 14 لوح زجاجي (20x20cm) بسمك (0.25mm) و تكون هذه الألواح أفضل من حيث الفصل و ظهور الألوان تحت أشعة UV [8] و الجدول-5- يشمل بعض الحمل المملصة المستعملة معه.

الجليكوزيدات	الأجليكونات
H ₂ O:MeOH:MeCOEt:Acetylacetone (13:3:3:1)	Toluene:MeCOEt:MeOH (4:3:3)
H ₂ O:EtOH:MeCOEt:Acetylacetone (60:15:15:5)	Toluene:MeCOEt:MeOH (60:25:15)
H ₂ O:BuOH:Acetone:HOAc (16:2:2:1)	Toluene:Petrol:MeCOEt:MeOH (60:26:7:7)*
MeOH:HOAc:H ₂ O (90:5:5)	// (30:60:5:5)*
	Toluene:MeOH:MeCOEt:Acetylacetone (40:30:20:10)

* Petrol ether (100-140 C°)

جدول-5- جمل المذيبات المستعملة لفصل الفلافونيدات على Polyamide-t.l.c.

ج) السيليكا جل (Silica gel):

نمزج (30g) من غبرة السيليكا جل مع (60ml) من الماء المقطر و يرج المزيج جيدا لدقائق لتوزع بعدها على الألواح الزجاجية و الجدول-6- يعطي بعض من الحمل المملصة المستعملة معه. بعد عملية التمليص تعين البقع أو الأشرطة بالاستعانة بمصباح الأشعة فوق البنفسجية كما يمكن تعريض الألواح إلى أبخرة الأمونياك أو كواشف أخرى.

الجليكوزيدات	الأجليكونات
BuOH:HOAc:H ₂ O (65:15:2,5)	CHCl ₃ :MeOH (15:1) → (3:1)
BuOH:HOAc:H ₂ O (3:1:1)	EtOAc:CHCl ₃ (60:40)
EtOAc:MeOH:H ₂ O (50:3:10)	Toluene:CHCl ₃ :MeCOEt (8:5:7)
EtOAc:MeOH:HCOOH:H ₂ O (50:2:3:6)	Toluene:EtOAc:HCOOH (10:4:1)
EtOAc:HCOOH:H ₂ O (9:1:1)	EtOAc:pyridine:H ₂ O:MeOH (80:20:10:5)
EtOAc:HCOOH:H ₂ O (6:1:1)	
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (40:10:1)	
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (65:45:12)	

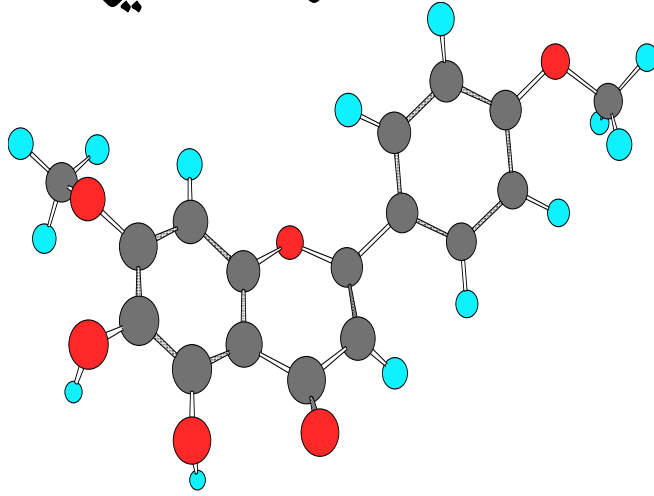
جدول-6- جمل المذيبات المستعملة لفصل الفلافونيدات على Silica gel-t.l.c.

1-5-4- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة (HPLC):

تستعمل في التحليل الكيفي و الكمي [6] و هي أساسا عبارة عن كروماتوغرافيا العمود لكن يستعمل معها عمود مصنوع بدقة عالية بحيث تكون مكوناته (الطور الثابت) متجانسة في شكلها و أبعادها و أكثرها استعمالا مع الفلافونيدات يتم فيها ربط مركب هيدروكربوني إلى مادة السيليكا جل فنحصل على ما يعرف بـ Reversed phase column تتم عملية التمليص آليا و تستعمل جمل مثل H₂O/MeOH/HOAc ، H₂O/MeOH و H₂O/Acetonitril بنسب متغيرة وفق برنامج محدد و يكون زمن خروج (t_R) مركب ما من الطرف الثاني من العمود الكروماتوغرافي ذا قيمة مميزة للمركب في ظروف معينة.

من ميزات هذه التقنية إمكانية ربطها بجهاز تحليل مثل مطياف الكتلة أو مطيافية الرنين النووي المغناطيسي بالتالي الحصول على طيف الكتلة أو طيف الرنين النووي المغناطيسي للمركبات الخارجة من العمود الكروماتوغرافي و يتم فصل المركبات و التعرف عليها في وقت قصير جدا مع اقتصاد في كمية المذيبات المستعملة.

الفصل الثاني



الدراسة البنيوية للفلافونيدات

تعتمد الدراسة البنيوية للفلافونيدات على الخصائص الكروماتوغرافية للمركب و هي أساسا قيمة ثابت الانحباس، لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية ثم الخصائص الطيفية كتحليل أطيف الأشعة فوق البنفسجية و المرئية فأطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و للكربون و مطيافية الكتلة و أخيرا التمييز الحمضي.

2-1- ثابت الانحباس R_f و لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية:

يعرف R_f بأنه النسبة بين المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية إلى المسافة المقطوعة من طرف المذيب من نفس النقطة، تعتمد قيمته على طبيعة المستبدلات في المركب و بنيته الفراغية و هو قيمة مميزة للمركب في شروط معينة (درجة الحرارة، طبيعة المادة الدامصة، المذيب، درجة الرطوبة، ... الخ).

و بالاعتماد على قيم R_f يمكننا التمييز بين الجليكوزيدات و الأجليكونات كما يمكن التمييز بين الجليكوزيدات الأحادية، الثنائية أو المتعددة، .. الخ.

إن لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) قبل و بعد تعرضها لأبخرة الأمونياك أو إلى كواشف أخرى (باستعمال طول الموجة $\lambda=365\text{nm}$) يعطي معلومات أولية عن البنية الكيميائية للمركب كما هو مبين في الجدول-7- الذي يعطي بعض الحالات الخاصة بالفلافون و الفلافونول على طور ثابت من السيليلوز [11].

نوع الفلافونيد	لون بقعة المركب تحت أشعة UV	
	وجود أبخرة NH_3	بدون أبخرة NH_3
Flavones (5-OH, 4'-OH), Flavonols(3-OR, 5-OH, 4'-OH)	أصفر، أصفر مخضر أو بني	بنفسجي غامق
Flavones Flavonols (5-OH, 3-OR, 4'-OR)	عدم تغير اللون أو تغير طفيف	
Flavones (5-OR), Flavonols (3-OR, 5-OR)	أصفر مخضر، أزرق مخضر	أزرق مشع
Flavonols (3-OH)	عدم تغير اللون	أصفر باهت أو أصفر أو برتقالي

جدول-7- يبين العلاقة بين البنية الكيميائية و لون الفلافون و الفلافونول تحت أشعة UV

2-2- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و المرئية:

هي أهم تقنية طيفية مستعملة للتعرف على البنية الكيميائية للفلافونيدات إذ تمكننا من معرفة نوع الفلافونيد و عدد المستبدلات على المركب.

مبدأها مؤسس على أنه لكل مركب فلافونيدي طيف امتصاص مميز في وسط كحولي و يتغير هذا الطيف بإضافة كواشف معينة بحيث أن طبيعة الكاشف و تأثيره على طيف الامتصاص يعطينا معلومات على بنية المركب و تكمن أهميتها في:

1) سهولة في تحقيقها، 2) تتطلب كمية قليلة من المركب أقل من 0.1 ملغ، 3) تعطي بالمقابل معلومات وافية عن البنية الكيميائية للمركب.

2-2-1- طيف الفلافون و الفلافونول في الميتانول:

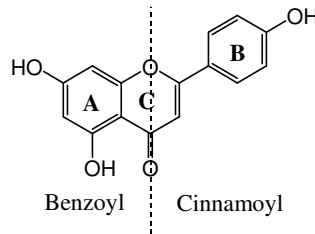
طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية للفلافونيدات و بالتحديد الفلافون و الفلافونول في وسط ميتانولي يتكون من عصائبي امتصاص بحيث أن موقعهما و شدتهما النسبية يعطيان معلومات عن طبيعة المركب:

العصبة I: تكون قمة الامتصاص العظمى في حدود (300-400nm) و تنتج عن الشكل الريني cinnamoyl الناتج من ترافق مجموعة كربونيل C-4 مع الحلقة B (شكل-8).

تعتبر قيمة العصبة I لطيف المركب المنجز في الميتانول كاشف لنوع الفلافونيد حيث تكون في حالة الفلافون (Flavone) بين (304-350nm) بينما الفلافونول (Flavonols) يمتص بين (352-385nm) أما في حالة الفلافونولات التي لها مستبدل في C3 أي (Flavonol-3-OR) فإن شكل الطيف و مجال الامتصاص يتشابهان مع تلك للفلافون (جدول-8).

العصبة II: تكون قمة الامتصاص العظمى في حدود (250-280nm) و يكون المسؤول عنها الشكل الريني benzoyl الناتج من ترافق مجموعة الكربونيل C-4 مع الحلقة A (شكل-8).

تظهر العصبة II كقمة واحدة (في حدود 270nm) في المركبات التي تحتوي على مستبدل وحيد في الحلقة B و تظهر بصورة قمتين أو قمة واحدة عند حوالي 258nm و انثناء عند حوالي 272nm عندما تكون الحلقة B ثنائية أو ثلاثية الاستبدال [9]، [12].



شكل-8- الصيغ الرينية للفلافونيد

نشير هنا إلى أن:

1) تغير عدد المستبدلات على الحلقة A يؤثر في العصبة II بينما تغير المستبدلات على الحلقة B و الحلقة C يظهر على العصبة I.

2) إضافة مجموعة أو كسيجينية و بالخصوص مجموعة هيدروكسيل يؤدي إلى زيادة طول موجة العصبة الموافقة (انزياح باثو كرومي).

3) ارتباط مثيل أو سكر بأحد مجموعات الهيدروكسيل و بالخصوص هيدروكسيلات المواضع 3، 5، 7 و 4 يؤدي إلى نقصان طول موجة العصبة الموافقة (انزياح هيبسوكرومي).

4) أسيلة مجموعات الهيدروكسيل يلغي تأثير هذه الأخيرة، بينما نستدل على ارتباط حمض السيناميك (cinnamic acid). مجموعة هيدروكسيل بظهور عصابة في حدود 320nm في طيف المركب [9].

نوع الفلافونيد	العصابة II	العصابة I
Flavone	250-280 nm	304-350 nm
Flavonol (3-OH)	250-280 nm	352-385 nm
Flavonol (3-OR)	250-280 nm	330-360 nm

جدول-8- يحدد مجال امتصاص الفلافونيات و الفلافونولات في وسط ميثانولي

2-2-2- طيف الفلافون و الفلافونول في وجود كواشف:

أ- تحضير الكواشف [6]:

أ-1) هيدروكسيد الصوديوم NaOH: يحضر محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) بتركيز (1M) و ذلك بإذابة (4g) من NaOH بجذر في (100 ml) من الماء المقطر و يمكن استعمال بدله محلول NaOMe بتركيز (0.5M) بإضافة (2.5g) من الصوديوم المعدني (يجب التعامل معه بجذر و من الأفضل أن يقطع و يتم وزنه في وجود الهكسان أو إيتير البترول) ويضاف كقطع صغيرة و بجذر شديد إلى (100ml) من الميثانول الخالص و يحفظ في قارورة زجاجية ذات غطاء بلاستيكي.

أ-2) خلاص الصوديوم NaOAc: يتم استعمال مسحوق خلاص الصوديوم (NaOAc) الجاف.

أ-3) كلوريد الألومنيوم $AlCl_3$: نذيب بجذر (5g) من كلوريد الألومنيوم الجاف ($anhydrous AlCl_3$) إلى (100ml) من الميثانول الخالص و يحفظ في قارورة بلاستيكية ذات غطاء (عملية الذوبان قد تأخذ وقت).

أ-4) حمض كلور الماء HCl: نضيف (50ml) من حمض كلور الماء المركز (HCl) إلى (100ml) من الماء المقطر.

أ-5) حمض البوريك H_3BO_3 : يتم استعمال مسحوق جاف من حمض البوريك (H_3BO_3) [6] أو استعمال محلول حمض البوريك في الماء بتركيز 1 %.

ب- الطريقة العملية لتحقيق السلسلة الطيفية لأشعة ما فوق البنفسجية:

في البداية يتم تحضير محلول للفلافونيد بإذابة كمية قليلة منه (أقل من 5mg) في (10ml) من الميثانول الخالص و يعدل تركيز المحلول بحيث أن الشدة الضوئية لعصابة الامتصاص الكبرى (المحصورة عمليا بين 230-480nm) تكون محصورة بين (0.6-0.8).

عمليا يتم تحقيق السلسلة الطيفية للأشعة فوق البنفسجية لمركب فلافونيدي على ثلاث مراحل، نقوم في بداية كل مرحلة بقياس و تسجيل الطيف الميثانولي للمركب.

المرحلة الأولى: نسجل طيف الامتصاص للمركب في الميثانول الخالص بعدها نضيف 3 قطرات من محلول NaOH للخلية المحتوية على المركب بعد الخلط نسجل طيف المركب من جديد ثم نعيد تسجيله بعد 5 دقائق للتأكد من ثبات المركب أو تحلله.

المرحلة الثانية: نحضر من جديد خلية القياس المحتوية على الفلافونيد و نضيف لها 6 قطرات من محلول $AlCl_3$ بعد الخلط نسجل طيف الامتصاص، نضيف بعدها 3 قطرات من حمض HCl بعد الخلط نسجل طيف الامتصاص.

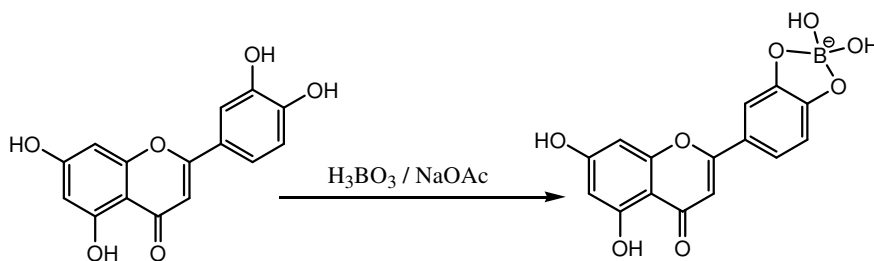
المرحلة الثالثة: نحضر خلية جديدة تحتوي على الفلافونيد و نضيف لها مسحوق خلات الصوديوم $NaOAc$ (الصلب و الجاف) حتى التشبع و نرج جيدا ثم نسجل طيف الامتصاص، نضيف للخلية السابقة مسحوق حمض البوريك (أو محلوله المائي) بحيث تكون الكمية المضافة نصف كمية خلات الصوديوم بعد الخلط الجيد نسجل طيف الامتصاص [11] أما في حالة محلول حمض البوريك (1%) فنضيف بضع قطرات منه و بعد الخلط نسجل طيف الامتصاص.

ج- تأثير الكواشف و تفسيراتها:

ج-1) طيف $NaOH$ (أو $NaOMe$): يعتبر هيدروكسيد الصوديوم قاعدة قوية تأين جميع هيدروكسيولات الفلافونيد، بالخصوص الأكثر حمضية منها.

ج-2) طيف $NaOAc$: تعتبر خلات الصوديوم قاعدة ضعيفة تأين الهيدروكسيولات الأكثر حمضية و تعتبر كاشف نوعي لهيدروكسيل الموقع 7.

ج-3) طيف $NaOAc+H_3BO_3$: يُكون هذا الخليط معقدًا مع الهيدروكسيولات الفينولية في وضع أورثو (*ortho*) لذا يستعمل للكشف عنها (شكل-9).

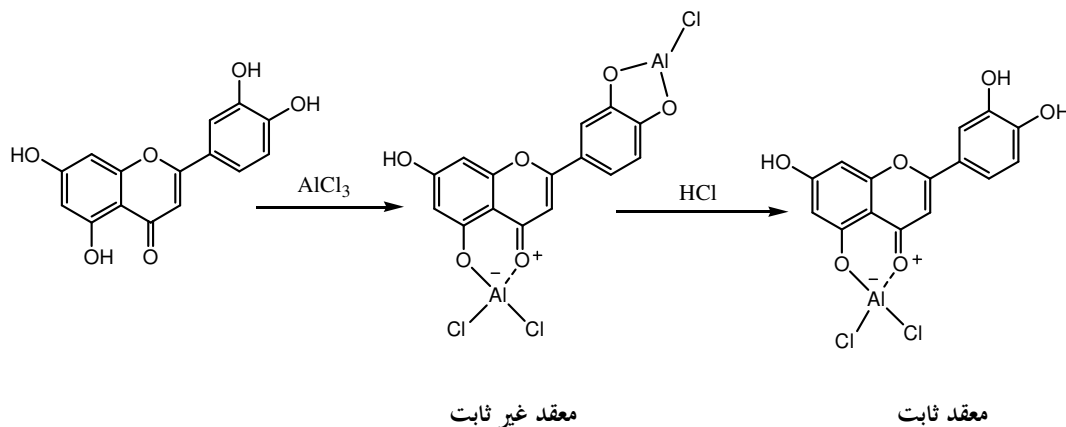


شكل-9- يمثل المعقد المتشكل بوجود $H_3BO_3 / NaOAc$

ج-4) طيف $AlCl_3$ و طيف $AlCl_3+HCl$: يكون كلوريد الألومنيوم $AlCl_3$ مع الفلافونيدات التي لها هيدروكسيل في C-3 و / أو C-5 و مجموعة كربونيل (C-4) معقدات ثابتة و يكون معقدات غير ثابتة مع الفلافونيدات التي لها مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل و هذا بعد إضافة حمض كلور الماء (HCl).

طيف الامتصاص للمركب بوجود $AlCl_3$ يمثل تأثير كل المعقدات (الثابتة و غير الثابتة) بينما طيف الامتصاص في وجود ($AlCl_3 + HCl$) يمثل تأثير المعقدات الثابتة فقط (شكل-10).

يتكون طيف (AlCl₃ + HCl) للمركبات التي لها هيدروكسيل حر بالموقع 5 من أربع قمم رئيسية هي **Ib, Ia** و **IIb, IIa** ولكن في حالة مركبات 3-hydroxyflavone أو 3,5-dihydroxyflavone فإن العصبتان **IIa, Ia** تظهران عموما بشكل انثناء (shoulder).



شكل-10- المعدن الثابت و غير الثابت بين الفلافونيد و AlCl₃ قبل و بعد إضافة HCl

أخيرا نؤكد أنه يجب أن لا تأخذ هذه القواعد بشكل صارم بحيث لا يمكن التعدي عليها إنما يجب التعامل معها على أنها دلالات للتعرف على البنية الكيميائية للمركبات و الجدول-9، يعطي مختلف التأثيرات الممكنة مع تفسيراتها.

التأثير الملاحظ	الإزاحة (nm)		المفاعل
	للعباية II	I للعباية	
Flavones		304-350	MeOH
Flavonols (3-OR)		330-360	
Flavonols (3-OH)		352-385	
4'-OH		من 60-40+ مع زيادة في الشدة الضوئية أو ثباتها.	NaOH
3-OH, 4'-OR		من 65-45+ مع نقصان في الشدة الضوئية.	
3, 4'-di-OH		تحلل بطيء للطيف	
3,3',4'-tri-OH		تحلل سريع للطيف	
3,3',4',5'-tetra-OH			
7-OH		قمة جديدة بين 320-335 nm	
7-OH	من 20-5+		NaOAc
7-OH, 6-R / 8-R (R= CH ₃ , OCH ₃)	إزاحة ضعيفة		
5, 6, 7-tri-OH		تحلل للطيف مع الوقت	
5, 7, 8-tri-OH			
3, 3', 4'-tri-OH		تحلل سريع للطيف	
3, 4'-OH, 3'-OMe			
أورثو ثنائي هيدروكسيل على B		36-12+	NaOAc + H ₃ BO ₃
أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة (7، 6)A أو (8، 7)		10-5+	
3-OH تكون معقد ثابت مع		60+	AlCl ₃
5-OH تكون معقد ثابت مع		55-35+	
3, 5-di-OH		من 60-50+	
5, 6-di-OH ;		20+	
5-OH, 3, 6-di-OMe			
أورثو ثنائي هيدروكسيل على B		40-30 - مقارنة بـ AlCl ₃	AlCl ₃ + HCl
tri-OH على الحلقة B		20- مقارنة بـ AlCl ₃	
5-OH, 6-OH		* 30-25+ مقارنة بـ MeOH	
5-OH, 6-OMe		* 20+ مقارنة بـ MeOH	
5-OH, 8-OMe		* 57-55+ مقارنة بـ MeOH	

* في حالة مركبات (Flavonol-3-OR و Flavones) فقط.

الإشارات (+) و (-) تدلان على انزياح باثوكرومي و انزياح هيسوكرومي على الترتيب للعباية المناسبة أو الطيف كله و المقارنة تتم بالنسبة للطيف الميتانولي إلا إذا ذكر غير ذلك.

جدول-9- خصائص و تفسيرات تغيرات أطيايف الأشعة فوق البنفسجية للفلافون و الفلافونول مع مختلف الكواشف

3-2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-NMR}$:

تستعمل مطيافية $^1\text{H-NMR}$ في التحليل الكيفي للفلافونيدات للتعرف على [9]:

- درجة تأكسد الحلقات A, B, C.

- موقع و عدد السكريات المرتبطة بالأجليكون و نوع الرابطة بينهما.

- موقع و عدد مجموعات الميتوكسيل و غيرها من المجموعات الكيميائية في المركب.

تستعمل مع الفلافونيدات العديد من المذيبات: CDCl_3 , CD_3OD و غيرها لكن المذيب المفضل و بالخصوص مع الفلافونيدات الجليكوزيدية هو DMSO-d_6 كما يمكن استعماله مع الأجليكونات، تظهر إشارة DMSO-d_6 عند 2.49ppm و بالتالي يمكن استعماله مرجعاً داخلياً في طيف $^1\text{H-NMR}$ و نظراً لارتفاع درجة تبخره (190°C) فإنه من الصعوبة استرجاع المركب عن طريق التبخير مما يتطلب اللجوء إلى طرق أخرى كما أنه يعطي إشارة عند 3.5ppm تغطي بعض إشارات السكر المرتبط بالفلافونيد [12] ناتجة عن جزيئات الماء التي يمتصها من الجو لذا يفضل استعماله جافاً، تتوزع إشارات البروتونات في حالة استعمال هذا المذيب حسب ما يأتي:

2-3-1- البروتونات الأروماتية:

أ- بروتونات الحلقة A:

يتمتع بروتوني الحلقة A في حالة الفلافون و الفلافونول في المجال (6.16-6.25ppm) بالنسبة لـ H_6 و في المجال (6.39-6.56ppm) بالنسبة لـ H_8 ، وجود ميتوكسيل أو سكر مرتبط بهيدروكسيل C-7 يزيح إشارتي البروتونين السابقين نحو مجال أخفض (6.33-6.48ppm) بالنسبة لـ H_6 و عند (6.71-6.93ppm) بالنسبة لـ H_8 بينما وجود ميتوكسيل أو سكر مرتبط بهيدروكسيل C-5 يؤثر بشكل كبير في انزياح إشارتي H_8 , H_6 . وجود مستبدل على ذرات الكربون C-6 أو C-8 لا يؤثر على انزياح إشارة البروتون الآخر الذي تتداخل إشارته مع إشارة بروتون H_3 في حالة الفلافون و يتطلب تحديده اللجوء إلى تقنيات طيفية أخرى.

ب- بروتونات الحلقة B:

تمتع بروتونات الحلقة B في المجال (6.80-8.10ppm) و ترتبط قيم الانزياح على عدد المستبدلات في الحلقة B و درجة تأكسد الحلقة C.

حالة $-\text{OH}$: الحلقة B لها أربع بروتونات (H_6' , H_2') و (H_5' , H_3') و بسبب الدوران الحر للحلقة فإن كل زوج من هذه البروتونات يعطي إشارة ثنائية ($J=8-9\text{Hz}$)، تكون إشارة الزوج (H_5' , H_3') في المجال (6.90-6.96ppm) أعلى من مجال إشارة الزوج (H_6' , H_2') عند (7.79-8.10ppm) بسبب فعل حجب مستبدل C_4' و التعرية الناشئة عن الحلقة C و الجدول 10- يعطي قيم انزياح هذه البروتونات في حالة الفلافون و الفلافونول.

H2', H6'	H3', H5'	الفلافونيد
7.89 – 7.96	6.90 – 6.96	Flavone
7.79 – 8.10	6.92 – 6.95	Flavonol

جدول-10- قيم انزياح بروتونات الحلقة B أحادية الاستبدال

حالة **3',4'-di-OH**: الحلقة B لها ثلاثة بروتونات حيث يظهر H6' كإشارة ثنائية-ثنائية (J=8.5, 2.5Hz) نتيجة ترافقه مع H5' و H2' في المجال (7.65-7.20ppm) بينما يظهر H2' كإشارة ثنائية (J=2.5Hz) في المجال (7.60-7.2ppm) و بالتالي تتداخل غالباً مع إشارة H6'، أما إشارة H5' فتظهر كثنائية (J=8.5Hz) في المجال (6.83-6.93ppm).

حالة **3',4',5'-tri-OH**: في هذه الحالة الحلقة B لها بروتونين H6', H2' متكافئان و يظهران كإشارة أحادية عند 6.98ppm.

في حالة ارتباط مجموعة ميتوكسيل بأحد الهيدروكسيولات فإن إشارات البروتونات *ortho* و *para* تتزاح بـ (0.15ppm) إلى مجال أخفض أما في حالة ارتباط سكر فتكون قيم الانزياح بمقدار 0.2, 0.1, 0.3ppm لإشارة بروتون الموقع *ortho*، *meta* و *para* على التوالي.

من جهة أخرى فإن وجود سكر أحادي (ماعد سكر الراموز) بالموقع C-3 له تأثير ضعيف على بروتونات الحلقة B بينما في حالة وجود سكر الراموز فإنه يكون هناك انزياح بين (0.2-0.25ppm) لإشارات بروتوني H6', H2' نحو مجال أعلى.

ج- بروتون الحلقة C:

تتأثر إشارة H3 بالمستبدلات الموجودة على الحلقتين A, B و تتركز في منطقة إشارات بروتوني الحلقة A.

2-3-2- البروتونات الأليفاتية:

2-3-2-1- بروتونات السكر:

أ- الجليكوزيدات أحادية السكر:

يعطي البروتون الأنوميري "H-1" للجزء السكري إشارة في مجال أخفض من بقية بروتونات السكر الأخرى و يحدد لنا ثابت الاقتران (J) نوع الرابطة α أو β بين السكر و الأجليكون و طبيعة السكر جدول-11، كما أن قيمة انزياح إشارة "H-1" في طيف المركب تعطي معلومات عن طبيعة السكر و موقع ارتباطه بالأجليكون حيث يمكن معرفة موقع ارتباط السكر بالموقعين 3 أو 7 من خلال قيمة انزياح إشارة البروتون الأنوميري "H1" حسب الجدول-12، بينما تمتص بقية بروتونات السكر في المنطقة (3-4ppm).

يمكن التعرف على سكر الراموز (rhamnose) من خلال إشارة مجموعة المثلث ("H6") التي تعطي إشارة ثنائية

($J=6\text{Hz}$) تتغير قيمة انزياحها الكيميائي حسب موقع ارتباط الراموز بالأجليكون، ففي حالة ارتباطه بـ C-3 فإن إشارة المثل تظهر بين (0.72-0.86ppm) بينما في حالة ارتباطه بـ C-7 فتظهر بين (1.04-1.21ppm). بالنسبة للجليكوزيدات من النوع 6-C-glucosides أو 8-C-glucosides فإن البروتون الأنوميري لكليهما يمتص في المنطقة (4.58-4.90ppm) بحيث لا يمكن التمييز بينهما، نشير هنا إلى أنه بسبب الإعاقاة الفراغية بين الحلقة B و سكر الموضع 8 في المركبات 8-C-glycosides و 6,8-di-C-glycosides فإننا نحصل على مراكبات دورانية (rotamers) [12] و يتجلى ذلك في تضاعف إشارات بروتونات الحلقة B و بالخصوص (H_2' , H_6') و إشارة البروتون الأنوميري لسكر الموقع 8.

السكر	Pyranoside, J (Hz)	Furanoside, J (Hz)
β -glucose, galactose, xylose	7-8	0-2
α -glucose, galactose, xylose	3-4	4-4.5
β -rhamnose	1	-
α -rhamnose	2	-
β -arabinose	2.5	4
α -arabinose	8	1

جدول-11- قيم ثابت الاقتران (J) لمختلف السكريات

عند وجود مجموعة أسيل (acyl) على إحدى هيدروكسيالات السكر فإن موقعها يتحدد من انزياح إشارة بروتون ذرة الكربون المرتبط بها نحو مجال أخفض بمقدار يتراوح بين (0.5-1.6ppm) و انزياح بروتونات ذرات الكربون المجاورة نحو مجال أعلى.

الجليكوزيد	$H_{1''}$, δ (ppm)
3-O-glucoside	5.35-5.56
7-O-glucoside	4.9-5.25
3-O-rhamnoside	4.96-5.36
7-O-rhamnoside	5.22-5.75
3-O-glucuronide	5.48
7-O-glucuronide	5.10-5.18

جدول-12- يعطي مجال امتصاص البروتون الأنوميري للسكريات الشائعة

ب- الجليكوزيدات ثنائية السكر:

في حالة كون الجزء السكري من الجليكوزيد مكون من سكرين فإن البروتون الأنوميري للسكر الأولي (المرتبط مباشرة بالأجليكون) يمتص في مجال أخفض من البروتون الأنوميري للسكر النهائي (المرتبط بالسكر الأولي) لكن عندما يكون السكر الأولي من النوع C-glycoside فإن البروتون الأنوميري له يمتص في مجال أعلى من البروتون الأنوميري للسكر النهائي المرتبط به برابطة أو كسيجينية كذلك في حالة كون السكر النهائي هو سكر

apiofuranoside فإن البروتون الأنوميري له يمتص في مجال أخفض من مجال البروتون الأنوميري للسكر الأول المرتبط بالأجليكون.

إذا كان الجزء السكري مكون من الجليكوز كسكر أولي و الرامنوز كسكر نهائي (rhamnoglucoside) فإنه يمكن التمييز بين الشكل (1→6)rhamnoglucoside والمعروف بـ rutinoides و الشكل (1→2)rhamnoglucoside والمعروف بـ neohesperidosides من الانزياح الكيميائي لإشارتي البروتون الأنوميري لسكر الرامنوز و الجليكوز.

ففي الحالة الأولى فإن إشارتي البروتون الأنوميري للجليكوز و الرامنوز يظهران عند 5.3ppm و 4.4ppm على التوالي بينما في الحالة الثانية فيظهران عند 5.7ppm و 5ppm على الترتيب، هذا التحليل صحيح أيضا في حالة كون الجزء السكري هو (1→2) rhamnagalactosides أو (1→6) rhamnagalactosides [12].

2-2-3-2- بروتونات مجموعات كيميائية أخرى:

أخيرا فإن قيم الانزياح الكيميائي لبقية المجموعات الكيميائية التي يمكن أن ترتبط بالفلافونيدات ملخصة في الجدول-13.

المستبدل	$\Delta(\text{ppm})$
5-OH	12- 13*
OCH ₃	3.75-3.95
CO ₂ CH ₃	3.65
C-CH ₃	Flavone: 2.0-2.31 Flavonol: 6-C-CH ₃ (2.0-2.1), 8-C-CH ₃ (2.2-2.3)
OCH ₂ O	5.67-6.15

* يظهر في حالة استعمال مذيب DMSO-d₆ الجاف

جدول-13- قيم انزياح بروتونات بعض المجموعات الكيميائية في مذيب DMSO-d₆

4-2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون $^{13}\text{C-NMR}$:

تستعمل مطيافية $^{13}\text{C-NMR}$ في التحليل الكيفي للفلافونيدات للتعرف على [9]:

- (1) عدد ذرات الكربون في المركب.
 - (2) نوع الرابطة بين السكر و الأجليكون.
 - (3) موقع ارتباط سكرين ببعضهما في حالة جليكوزيدات عديدة السكر.
 - (4) موقع و طبيعة مجموعات الأسيل (acyl) المرتبطة بالمركب.
 - (5) تهجين ذرات الكربون عند استعمال تجارب DEPT.
- الجدول-14- يعطي قيم الانزياح الكيميائي لذرات الكربون للفلافون و الفلافونول [9] التي تم قياسها في مذيب DMSO-d_6 مع العلم أن هذا المذيب يعطي إشارة سباعية متمركزة عند 39.5ppm بالنسبة لمرجع TMS. و يمكننا ذكر الملاحظات الآتية:
- (1) تتراوح إشارات ذرات الكربون للفلافونيد التي ارتبط بها سكر إلى مجال أعلى بينما تتراوح إشارات ذرات الكربون في الموقعين *ortho* و *para* إلى مجال منخفض.
 - فارتباط سكر بـ C7 يؤدي إلى انزياح إشارتها إلى مجال أعلى بمقدار (1-4ppm) و انزياح إشارة ذرتي الكربون C6 و C8 نحو مجال منخفض بمقدار (1ppm) و انزياح إشارة C10 (موقع *para* بالنسبة لـ C7) بحوالي (1.7ppm) إلى مجال منخفض.
 - أما ارتباط سكر بـ C3 فيزيح إشارة هذه الأخيرة نحو مجال أعلى بحوالي (2ppm) و إشارة ذرة الكربون C2 المجاورة بمقدار (9.2ppm) نحو مجال منخفض [9].
 - (2) إذا كان الجزء السكري مكون من الجليكوز كسكر أولي و الرامنوز كسكر نهائي (rhamnoglucoside) فإنه يمكن التمييز بين الشكل *rutinosides* و الشكل *rhamnoglucoside* (4→1) من انزياح إشارة ذرات كربون الجليكوز C6 و C4 نحو مجال منخفض بحوالي (4.5-6.0ppm) بينما تتراوح إشارة ذرة الكربون C2 للجليكوز في الشكل *neohesperidosides* بحوالي (3-4ppm) و تتراوح إشارة ذرات الكربون المجاورة نحو مجال أعلى بحوالي (1-3ppm).
 - بينما في حالة كون الجزء السكري هو *gluco(1→2)glucoside* و المعروف بـ *sophoroside* فإنه يزيح إشارة ذرة الكربون المستبدلة من سكر الجليكوز الأولي نحو مجال أخفض بمقدار يتراوح بين (8-10ppm) و يزيح إشارات ذرات الكربون المجاورة لها نحو مجال أعلى بحوالي (1-3ppm).
 - (3) عند أسيلة (acylation) ذرة كربون من الجزء السكري فمن السهولة تحديدها في طيف $^{13}\text{C-NMR}$ بانزياح إشارتها نحو مجال أخفض بحوالي (2ppm) و انزياح إشارات ذرات الكربون المجاورة إلى مجال أعلى بحوالي (1-3ppm).

δ (ppm)	ذرة الكربون الموافقة
17-22	C- <u>C</u> H ₃
55-57	O- <u>C</u> H ₃ (أروماتية مع وضع أورثو واحد على الأقل غير مشغول)
58-59	3-O <u>C</u> H ₃ (3-methoxyflavone)
59-63	O- <u>C</u> H ₃ (أروماتية مع وجود مستبدلين في وضع أورثو)
60-83	<u>C</u> HOH, <u>C</u> H ₂ OH (سكريات), C-1 (C-glycoside)
90-110	C-1 (الكربون الأنوميري للسكريات)
90-135	ذرات كربون أروماتية غير مرتبطة بمجموعة أوكسيجينية
103-112	C-3 (Flavone)
136-139	C-3 (Flavonol)
130-160	ذرات كربون أروماتية مرتبطة بمجموعة أوكسيجينية
145-150	C-2 (Flavonol)
160-165	C-2 (Flavone)
166-172	كربو نيل أستر CO
172-177	C-4 (Flavonol)
176-184	C-4 (Flavone)

جدول-14- يعطي قيم انزياح ذرات الكربون للفلافون و الفلافونول في طيف ¹³C-NMR

4) يمكن من طيف ¹³C-NMR معرفة طبيعة الجزء السكري من الفلافونيد و بالخصوص مع المركبات C-glycosides التي يصعب تحديد نوع السكر فيها بتقنيات أخرى مع العلم أن الكربون الأنوميري في هذه الحالة يمتص في المنطقة نفسها لبقية الكربونات السكرية، كما أن ارتباط سكر مباشرة بذرة كربون الفلافونيد برابطة C-C غالبا في الموقعين C6 و / أو C8 يسبب انزياح إشارات ذرتي الكربون لهذين الموقعين بمقدار (10ppm) نحو المجال المنخفض و لا تأثير له على بقية ذرات الكربون للفلافونيد.

2-5- تجارب الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد:

تستعمل عند الحاجة مختلف تقنيات تجارب الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد في التحليل البنيوي للفلافونيدات، منها:

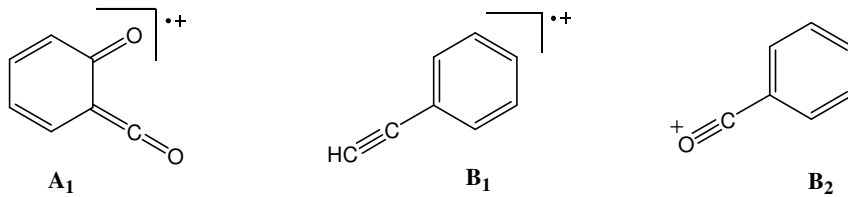
- تجارب **H,H-COSY**: تسمح بتعيين البروتونات المتزاوجة مع بعضها البعض.
- تجارب **HMQC**: تسمح هذه التقنية عبر تعانقات قريبة (J^1) من تحديد أي ذرة كربون يرتبط بها أي بروتون (أو بروتونات).
- تجارب **HMBC**: تسمح بتحديد من خلال التعانقات البعيدة (ذرتين و أكثر J^2, J^3) بين بروتون و ذرات الكربون المجاورة لذرة الكربون المتصل بها.

2-6- مطيافية الكتلة:

تستعمل مطيافية الكتلة في التحليل الكيفي للفلافونيدات و ذلك بالتعرف على الوزن الجزيئي للمركب و التعرف على مختلف الروابط الكيميائية في المركب بدراسة الشظايا الناتجة عن انقسام المركب، يتطلب هذا التحليل كمية قليلة من المركب و يعطي بالمقابل معلومات كثيرة عن بنيته و تستعمل العديد من تقنيات التأين حسب نوع المركب و درجة ثباته الحراري.

2-6-1- تقنية التأين بالقذف الإلكتروني (EI):

تستعمل تقنية القذف الإلكتروني مع الأجليكونات بالخصوص حيث نحصل على الأيون الجزيئي الذي يكون غالبا هو القمة الأساسية و على الشظايا المميزة لكل نوع من الأجليكونات (Flavone, flavonol) أهمها:



بينما في حالة الجليكوزيدات و التي تعتبر قليلة التطاير و ذات وزن جزيئي كبير و قليلة الثبات فإنه باستعمال التقنية السابقة معها لوحظ غياب للقمة الجزيئية و بالتالي لا يمكننا تحديد الوزن الجزيئي للمركب لذا تستعمل مع الجليكوزيدات تقنيات أخرى للتأين منها:

2-6-2- تقنية التأين الكيميائي (CI):

تعتمد على التفاعلات (أيون- جزيئي) [13] و يتم اختيار الغاز المتفاعل حسب ألفة المركب المدروس للبروتونات و من الغازات المتفاعلة المستعملة الميثان (CH_4) حيث يلاحظ تكون الأيونات ذات الكتل $M+1$, $M+29$, $M+41$ الموافقة للأيونات MH^+ , $M-C_2H_5^+$, $M-C_3H_5^+$ على الترتيب أما مع غاز (NH_3) فيلاحظ وجود الأيونات ذات الكتل $M+1$, $M+18$, $M+35$ الموافقة للأيونات MH^+ , $M-NH_4^+$, $M-NH_3NH_4^+$.

2-6-3- تقنية التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (API):

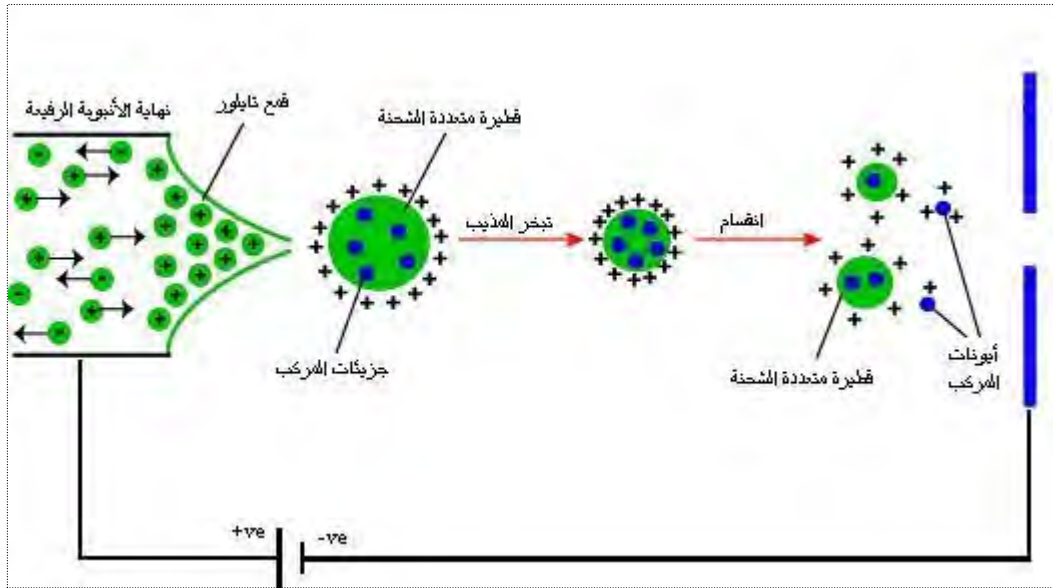
مبدأها هو مبدأ تقنية التأين الكيميائي و لكن يتم العمل تحت الضغط الجوي و تستعمل بالخصوص في تحليل المركبات المفصولة عند استعمال الكروماتوغرافيا السائلة [13].

2-6-4- تقنية التأين بالقذف السريع بالذرات (FAB):

باستعمال سيل من ذرات الأرجون (Ar) السريعة يتم تأين العينة المدروسة و قلعها و تسريعها و من ميزات هذه التقنية عدم تسخين العينة، تكوين أيونات شبه جزيئية موجبة و سالبة مثل $[M+H]^+$ و $[M-H]^-$ و تكون للشظايا المميزة [13].

5-6-2- تقنية التأين بالرذاذ الكهربائي Electro spray:

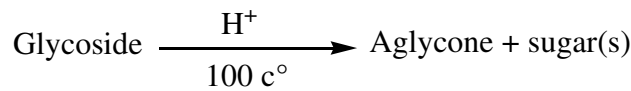
تعتمد هذه التقنية [13] على تشتيت باستعمال حقل كهربائي قوي للمحلول السائل المحتوي على المركب بشكل قطرات متناهية في الصغر و مشحونة كهربائياً عبر أنبوبة رقيقة جداً (إبرة حقنة)، هذه القطرات المتناهية في الصغر يتناقص حجمها مرة أخرى نتيجة تبخر المذيب بتعرضها إلى تيار غازي ثم انقسامها (انفجارها) نتيجة التنافر الكهربائي للشحن التي تحملها (شكل-11) وبالتالي و نتيجة تكرر هاتين العمليتين نحصل على أيونات للمركب في حالتها الغازية، ما يعاب على هذه التقنية هو ندرة أو إنعدام أيونات التَشْطِية.



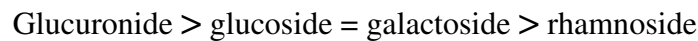
شكل- 11- مبدأ تقنية التأين بـ Electro spray

7-2- التمييه الحمضي للجليكوزيدات:

لتحديد نوع السكر (السكريات) المرتبط بالأجليكون و طبيعة الرابطة و مواقع الارتباط نلجأ إلى التمييه الحمضي للفلافونيدات الجليكوزيدية و يكون الوقت اللازم لعملية التمييه الحمضي دليلاً هاماً في هذه الحالات.



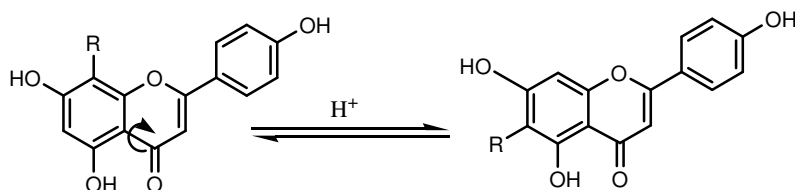
فعندما تتم عملية التمييه الحمضي وفق الطريقة المحددة حسب [9] فإن الوقت اللازم لحدوثه لا يعتمد فقط على قوة الحمض المستعمل بل و على طبيعة السكر حيث يكون:



و كذلك على موضع ارتباط السكر بالفلافونيد حيث يكون:



في حالة كون الرابطة بين السكر و الأجليكون هي رابطة "كربون-كربون" فإنه لا يحدث تمييه حمضي للمركب و يحدث انفتاح على مستوى الحلقة غير المتجانسة (C) أو ما يعرف بتفاعل إعادة ترتيب ويسلي-موزر (Wessely-Moser) للفلافونيدات المحتوية على هيدروكسيل في الموضع 5 و بالتالي الحصول على مماكبين في حالة وجود سكر واحد في أحد الموقعين (6 أو 8) أو في حالة وجود سكرين مختلفين في الموقعين 6 و 8 و اللذان يمكن فصلهما بالطرق الكروماتوغرافية (شكل-12).



شكل-12- تفاعل إعادة ترتيب وسلي-موزر (سكر = R)

يتم التمييه الحمضي بإذابة المركب (1mg) في حوالي (5 ml) من محلول (HCl(2N):MeOH(1:1) و تسخين الخليط في حمام مائي عند 100م° لمدة 60 دقيقة، بعد انتهاء الوقت المحدد تتم إذابة الخليط في أقل كمية من محلول ميثانولي (MeOH:H₂O(1:1)) و إجراء اختبار كروماتوغرافي (PC) باستعمال ورق Whatman® أو TLC باستعمال ألواح السيليلوز و في كلتا الحالتين تستعمل الجملعة 15% HOAc كمصلص و من الأفضل أن يكون الشاهد هو المركب الأصلي فإذا كان هناك نقصان في قيمة R_f فهذا يؤكد حدوث تمييه حمضي [9].

في حالة حدوث تمييه حمضي ولفصل السكر عن الأجليكون الموجودين في الخليط فإنه يتم تبخير هذا الأخير حتى التأكد من عدم بقاء آثار للميتانول ثم يتم استخلاص الأجليكون بإضافة مذيب خللات الإيثيل (EtOAc) عدة مرات للخليط (مع الرج بشدة) الطور العضوي المحتوي على الأجليكون يتم تجميعه و تبخيره و يتم التعرف على الأجليكون بإجراء اختبار كروماتوغرافي له مع شواهد ثم تسجيل طيف الأشعة فوق البنفسجية له، أما الطور المائي المحتوي على السكر (السكريات) فيتم تبخيرها ثم من جديد إذابتها في الماء المقطر و تبخيره من جديد و تكرر العملية عدة مرات حتى التأكد من عدم بقاء آثار للحمض و أخير يتم إضافة الماء.

للتعرف على السكريات المنفصلة عن المركب نحضر لوحاً كروماتوغرافيا (TLC) من Silica gel GF₂₅₄ و يرش بمحلول (NaH₂PO₄ (0.2M)) يترك ليحجف في الهواء ثم يوضع في فرن عند درجة حرارة 100م° لمدة ساعة بعدها توضع نقاط من الطور المائي مع بعض الشواهد السكرية المعروفة و يغمس اللوح الكروماتوغرافي في المصلص (Acetone:H₂O (9:1)) يستخرج اللوح الكروماتوغرافي و يترك ليحجف في الهواء لمدة ساعة ثم يعاد غمسه مرة ثانية و أخيرة، يستخرج اللوح و يترك ليحجف بعدها يرش بكاشف "مالونات الأنيلين" الذي يتكون من 1g من حمض المالونيك (malonic acid) و 1cm³ من الأنيلين (aniline) و 3cm³ من حمض الفوسفوريك (phosphoric acid) و 100cm³ من الإيتانول (80-90%).

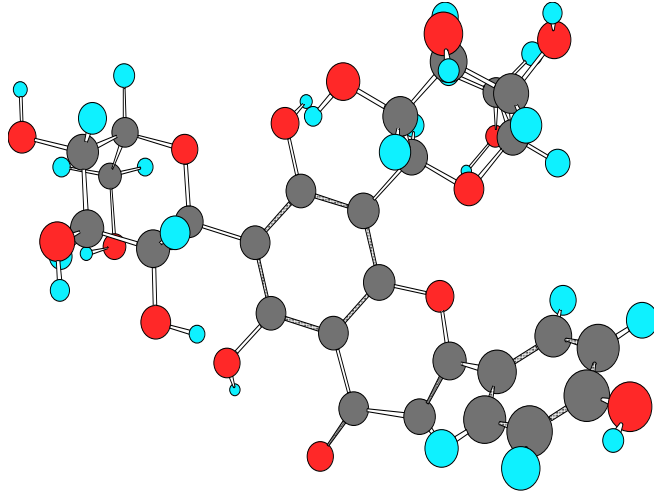
يوضع اللوح الكروماتوغرافي في فرن عند 100م° لمدة خمس دقائق حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور بلون أصفر تحت الأشعة فوق البنفسجية و بلون بني تحت الضوء المرئي، فيكون ترتيب R_f للسكريات الشائعة هو كالتالي:

L-Rhamnose > D-Xylose > L-Arabinose > D-Glucose > D-Galactose

مراجع الجزء النظري

- [1] ابن البيطار (1891)، "الجامع لمفردات الأدوية و الأغذية"، القاهرة، مصر
- [2] Trabut L., (1935), "*Flore du Nord de l'Afrique- Répertoire des noms indigènes des Plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique*", Collection du Centenaire de l'Algérie, Alger
- [3] Ozenda P., (1958), "*Flore du Sahara septentrional et central*", CNRS, Paris, France
- [4] Martens S., Mithöfer A., (2005), "Flavones and flavone synthases", *Phytochemistry*, 66 (19), 2399-407
- [5] Schijlen Elio G.W.M., Ric de Vos C.H., Tunen Argen J.Van, Bovy Arnaud G, (2004), "Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants", *Phytochemistry*, 65(19), 2631-48
- [6] Harborne J. B., Williams C. A., (2000), "Advances in flavonoids research since 1992", *Phytochemistry*, 55(6), 481-504
- [7] Harborne J.B., (1973), "Flavonoids" in « *Phytochemistry*, Vol.II », eds: Lawrence P.M., pp.344, Litton Educational Publishing Inc.
- [8] Harborne J. B., Mabry T.J., (1982), "*The Flavonoids: Advances in Research*", Chapman and Hall, London, NewYork
- [9] Markhame K.R., (1982), "*Techniques of flavonoids identification*", Academic Press, London
- [10] Leake D.S., (1997), "The possible role of antioxidants in fruit and vegetables in protecting against coronary heart disease", *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, Clarendon Press, Oxford, pp. 287-311
- [11] Mabry, T. J. Markham, K. R., Thomas, M. B., (1970), "*The Systematic Identification of Flavonoids*", Spring-Verlag, Berlin
- [12] Harborne, J.B., (1993), "*The flavonoids: Advances in Research since 1986*", Chapman and Hall, London
- [13] Constantin E., Schnell A., (1986), "*Spectroscopie de masse: principes et applications*", Technique et Documentation-Lavoisier, Paris

الفصل الثالث



النباتات المدروسة

مقدمة:

أشرت في مقدمة هذه الرسالة أنه رغم كثرة النباتات التي تستعمل في الطب الشعبي هناك أو هي خاصة بهذه المنطقة فقط (أصلية endemic) و التي جاء ذكرها في المراجع [1، 2] فإن الامكانيات و الظروف حدت من امكانية الحصول عليها و بكميات كافية و كان من بين النباتات التي تم قطفها هذه الأنواع الأربعة موضوع الرسالة و التي تتوزع على ثلاث عائلات نباتية إذ تمت دراسة نواتج الميثابوليزم الفلافونيدي لها.

3-1- نبات *Pituranthos chloranthus*:

يعرف شعبيا بـ"قزرع"، "زازه" و "جيدة" [3] و يتواجد فقط في منطقة شمال إفريقيا (endemic) [1] يأكل التوارق السيقان الفتية منه و الجذور بعد تقشيرها كما يتم نقع الفروع المزهرة في الماء للحصول على محلول حلو يشربونه كمنشط، يستعمل نوع آخر قريب منه هو *P.Scoparius* في مناطق من تونس في مداواة الربو كما يستخدم مستخلصه المائي في علاج لسعات الأفاعي و لدغات العقارب، كما يضع سكان الصحراء فروع من النبات في الفرن أو على الجمر أثناء طهي الخبز أو شوي اللحم و ذلك لإعطاء نكهة لهما، من جهة أخرى يسبب غبار الطلع لهذين النوعين حساسية في أعين الحيوانات و بالخصوص الماشية يصل إلى حد فقدان البصر لذا يتفاداه الرعاة وقت الإزهار و في حالة الإصابة تتم المعالجة تقليديا بوضع كمية من الملح تحت جفونها.

3-1-1- وصف النبات:

نبات حولي ينمو بشكل باقة تتفرع بداية من القاعدة له رائحة طيبة تشبه رائحة نبات البسباس، الأوراق مقسمة إلى 2 أو 3 قطع رقيقة، تجتمع الأزهار التي تحمل تويج يميل لونه للأخضر في شكل نورة أما الثمار فهي مكسوة بشعيرات دقيقة (شكل-13) ينتمي النبات إلى العائلة الخيمية (Apiaceae (Umbelliferae) و يحتوي الغطاء النباتي للجزائر على 55 صنف [1] منها الصنف *Pituranthos* الممثل في الجزائر بالأنواع النباتية التالية إضافة للنبات المدروس:

P. scoparius (Coss. & Dur.), *P. battandieri* (Maire), *P. reboudii* (Coss. & Dur.)

و التصنيف النباتي له هو:

Plantae	المملكة
Spermatophytae	الشعبة
Angiospermae	تحت الشعبة
Dicotyledones	القسم
Cornidae	تحت القسم
Araliales	الرتبة
Apiaceae (Umbelliferae)	العائلة
<i>Pituranthos</i>	الصنف
<i>P. chloranthus</i> (Bent. & Hook.)	النوع



شكل-13- صور لنبات *Pituranthos chloranthus*

3-1-2- الدراسات الكيميائية السابقة حول نباتات الصنف *Pituranthos*:

تعد هذه الدراسة الأولى من نوعها إذ لم يدرس هذا النبات كيميائياً من قبل أما نباتات هذا الصنف فتتميز كيميائياً بتصنيعها لمجموعات من المركبات الطبيعية أهمها:

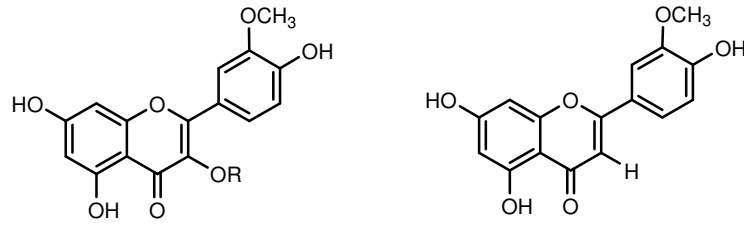
Volatile oils	الزيوت الطيارة
Coumarins	الكومارينات
Flavonoids	الفلافونيدات
Phenolic acids	الأحماض الفينولية

الملاحظ فيما يخص الفلافونيدات التي تم التعرف عليها في نباتات هذا الصنف و عددها ستة مركبات فقط منها مركبين أجليكونيين و أربعة جليكوزيدات (الجدول-15) أن:
 - أغلب الفلافونيدات هي جليكوزيدات (67%).
 - هيكل الفلافونول (Flavonol) هو الغالب (84%) حيث نلاحظ أن مركب isorhamnetin هو الهيكل الأساسي للفلافونيدات المفصولة.

- وجود مركبين أجليكونيين فقط هما chrysoeriol, isorhamnetin تم فصلهما من نبات *P. tortuosus* و يعطي الشكل-14- الصيغ الكيميائية لهذه الفلافونيدات.

النبات	الفلافونيدات المفصولة	المرجع
<i>P. tortuosus</i>	Chrysoeriol, isorhamnetin, isorhamnetin 3- <i>O</i> -glucoside, isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside, isorhamnetin 3- <i>O</i> -apiosyl-(1→2)-[rhamnosyl-(1→6)]-glucoside	[4]
<i>P. triradaitus</i>	Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside, isorhamnetin 3- <i>O</i> -rhamnosyl-(1→6)-galactoside	[5]

جدول-15- الفلافونيدات المفصولة من نباتات الصنف *Pituranthos*

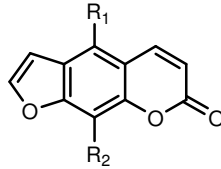


R = H, glucosyl, rutinosyl, robinbiosyl,
apiosyl(1→2)-[rhamnosyl(1→6)]glucosyl

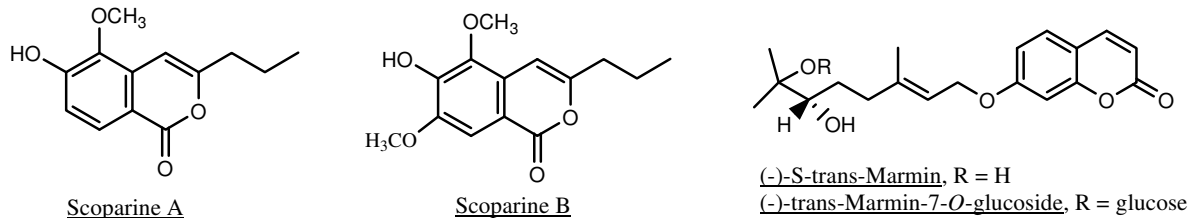
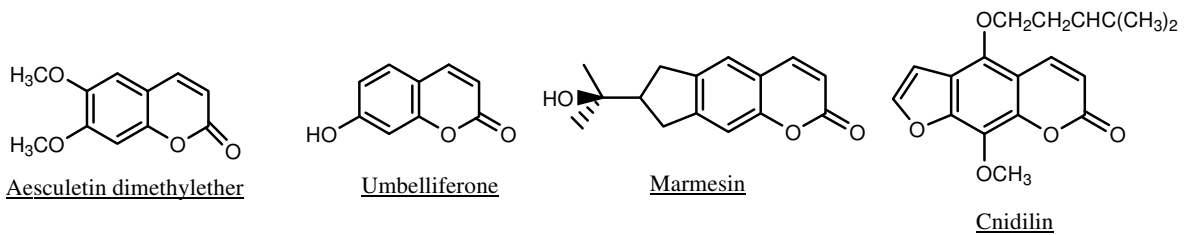
Chrysoeriol

شكل-14- صيغ الفلافونيدات المفصولة من نباتات الصنف *Pituranthos*

أما الأنواع الأخرى من المركبات المفصولة من نباتات هذا الصنف فهي تتوزع بين الكومارينات و الزيوت الطيارة و الأحماض الفينولية و هي مدونة بالجدول-16 و يعطي الشكلان-15 و 16 بعض الصيغ الكيميائية لهذه المركبات، كما اهتمت دراسات أخرى بدراسة فعالية الزيوت الطيارة لنباتات الصنف تجاه الميكروبات [6-8].



R ₁	R ₂	إسم المركب
H	OH	Xanthotoxol
OCH ₃	H	Bergapten
OCH ₃	OCH ₃	Isopimpinellin
H	OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	Imperatorin
OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	H	Isoimperatorin
OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	OCH ₃	8-Methoxyisoimperatorin

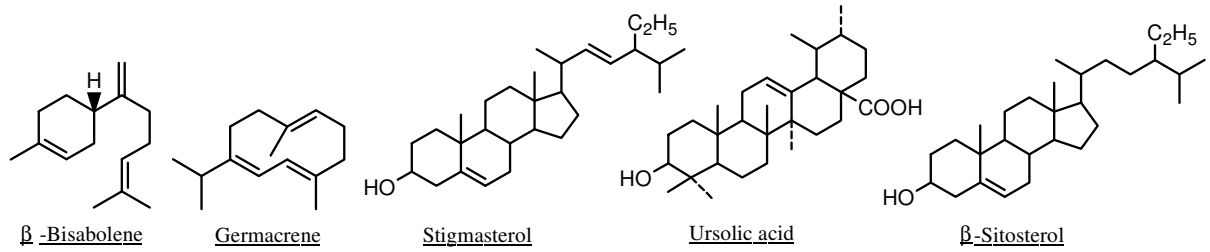
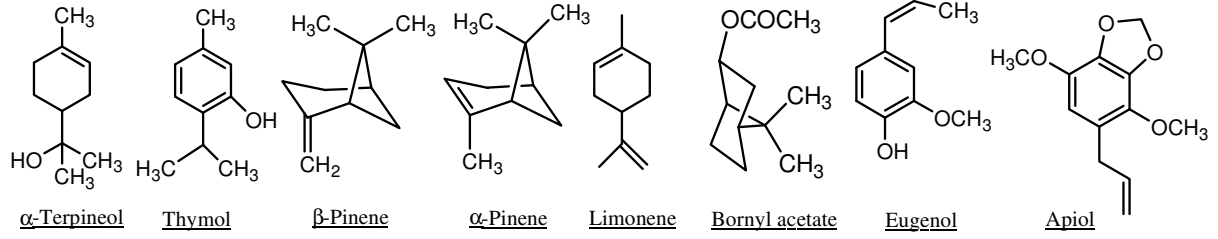
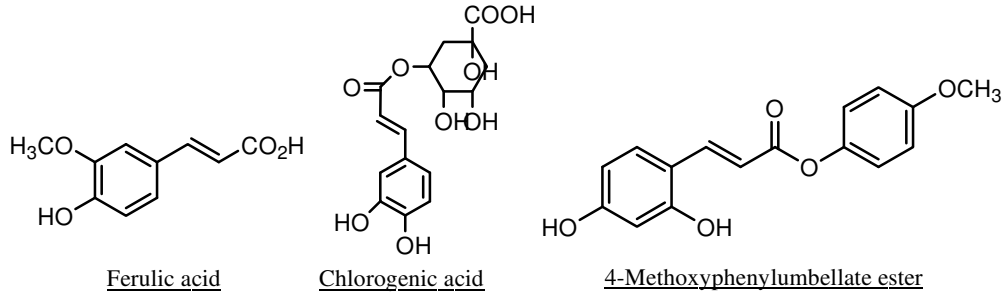


شكل-15- صيغ بعض الكومارينات المفصولة من نباتات الصنف *Pituranthos*

المرجع	المركبات المفصولة	العضو النباتي	النبات
Coumarins:			
[9]	3-n-Propyl-5-methoxy-6-hydroxyisocoumarin (scoparine A), 3-n-propyl-5,7-dimethoxy-6-hydroxyisocoumarin (scoparine B)	الجزور	<i>P. scoparius</i>
[10]	Bergapten, isopimpinellin, xanthotoxin	الجزور	<i>P. tortuosus</i>
[11]	Bergapten, graveolone, xanthotoxin, isopimpinellin, aesculetin-dimethylether	الجزور	
[12]	Xanthotoxol, umbelliferone, isopimpinellin, bergapten, (-)-S-trans-marmin-7'-O-β-D-glucopyranoside, (-)-S-trans-marmin	الأجزاء الهوائية	<i>P. triradiatus</i>
[13]	Imperatorin, bergapten, umbelliferone, xanthotoxol	السيقان	
[14]	Marmesin, (-)-S-trans-marmin, umbelliferone, xanthotoxol, bergapten, imperatorin, isoimperatorin, isopimpinellin	الجزور	
[15]	Isoimperatorin, cnidilin, imperatorin, bergapten, isopimpinellin	الأجزاء الهوائية	
Volatile oils, phenolic acids:			
[16]	Apiole, bornyl acetate, α-pinene	السيقان	<i>P. scoparius</i>
[17]	α-Pinene, β-pinene, p-cymene, limonene, thymol, myristicin, dill apiole	البذور	
[17]	α-Pinene, α-phellandrene, limonene, Me-eugenol, germacrene D, myristicin, spathulenol, β-eudesmol	السيقان	
[8]	Dill apiol	الأجزاء الهوائية	<i>P. tortuosus</i>
[18]	Ligustilide, ligusticum, β-bisabolene, myristicin	الأجزاء الهوائية	
[10]	Campesterol*, stigmasterol*	الأجزاء الهوائية	
[19]	trans- and cis-Heptadeca-1,8-diene-4,6-diyne-3-ol-10-one, falcarinone	الجزور	
[20]	β-Pinene, β-eudesmol, α-phellandrene, α-thujene, oleic acid, β-sitosterol*, ursolic acid*	الأجزاء الهوائية	
[11]	4-Methoxyphenylumbellate ester, stigmasterol glucoside*, mannitol‡	الجزور	
[5]	Ferulic acid†, chlorogenic acid†	الأجزاء الهوائية	<i>P. triradiatus</i>
[21]	5-Me-psoralen	البذور	
[20]	Terpinen-4-ol, α-terpineol, p-cymen-8-ol, Me-eugenol, 5, 7, 8-triMe-dihydrocoumarin, oleic acid, β-sitosterol*, ursolic acid*	الأجزاء الهوائية	

* Triterpenes, † phenolic acids, ‡ sugar

جدول-16- المركبات الأخرى المفصولة من نباتات صنف *Pituranthos*



شكل-16- صيغ بعض الأحماض الفينولية و مركبات تريينية مفصولة من نباتات الصنف *Pituranthos*

3-1-3- الدراسة الكيميائية لنبات *Pituranthos chloranthus*

تم قطف النبات من منطقة الهقار بعد تجفيف النبات بعيدا عن أشعة الشمس و الرطوبة كانت الكمية المحصل عليها من المادة النباتية الجافة (350g).

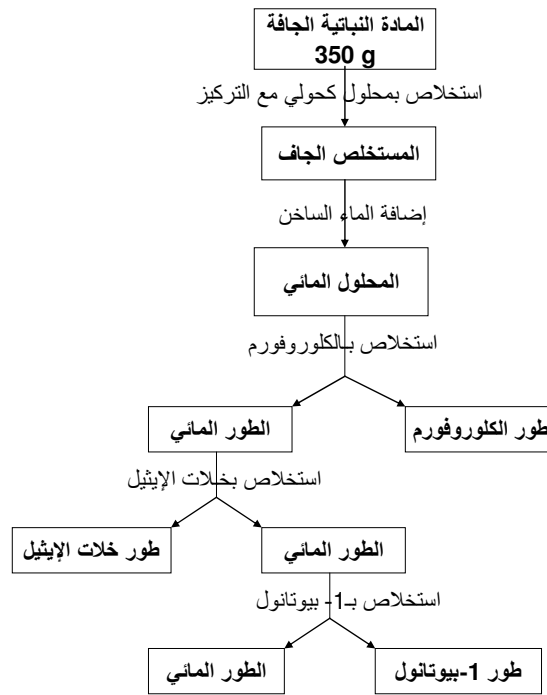
عمليات الاستخلاص تمت على (350g) من النبات باستعمال محلول ميثانول/ ماء (20:80) لثلاث مرات على البارد لمدة ليلة و مرة أخيرة باستعمال محلول ساخن بعد الترشيح تجمع الرشاحات المحصل عليها و يتم تبخيرها تحت ضغط منخفض حتى الحصول على مستخلص جاف.

المستخلص الجاف تمت إذابته في ماء مغلي (350ml) ثم ترك لمدة ليلة في مكان بارد بعدها نرشح للتخلص من الأتربة و المواد الليوفيلية و اليخضور(الكلوروفيل) و نحتفظ بالرشاحة (الشكل-17).

الرشاحة تتم معالجتها بعمليات الفصل سائل- سائل مع مذيبات مختلفة القطبية بداية بالكلوروفورم لثلاث مرات ثم خللات الإيثيل مرتان و أخيرا 1- بيوتانول لثلاث مرات حيث يتم تجفيف كل طور على حدة، فكانت الكميات المحصل عليها من كل طور هي:

مستخلص	الوزن (غ)
الكلوروفورم	2
خلات الإيثيل	1
1- بيوتانول	14

قبل بدء عمليات الفصل تم إجراء اختبارات كروماتوغرافية تحليلية على المستخلصات المحصل عليها فأظهرت أن مستخلص الكلوروفورم و مستخلص خللات الإيثيل لا يحتويان على فلافونيدات بينما طور 1- بيوتانول يحتوي على فلافونيدات جليكوزيدية لذا تم البدء بفصل مركباته باستعمال عمود كروماتوغرافي من (Polyamide SC6) و الجملة المملصة $H_2O \rightarrow MeOH$ بحيث كان علو الطور الثابت 45cm و قطره 3.5cm نبدأ عمليات التمليص بإضافة الماء المقطر أولاً و الذي تتم تغذيته بالميتانول تدريجياً حتى الوصول إلى الميتانول الخالص في النهاية حصلنا على أكثر من أربعين كسر، تم تجميع الكسور المتشابهة كروماتوغرافياً بعد اختبارات باستعمال الجملتين 15% HOAc و BAW على ورق Whatman 3MM[®] فأحتزل عدد الكسور إلى عشرة كسور جديدة فقط.



شكل- 17- مخطط الاستخلاص لنبات *Pituranthos choranthus*

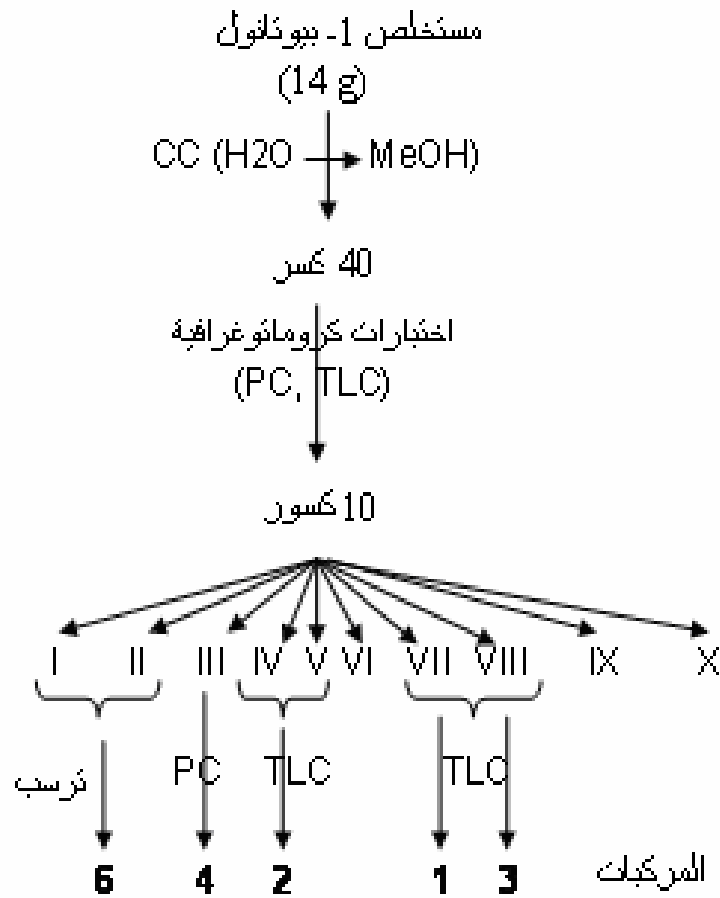
تلي ذلك عمليات فصل للكسور المحصل عليها باستعمال تقنيات كروماتوغرافية أخرى منها كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) على ألواح Silica gel GF₂₅₄ و كجملة مملصة (CH₂Cl₂ / MeOH) بعدة نسب، الكروماتوغرافيا الورقية باستعمال ورق Whatman 3MM[®] و كجمل مملصة 15% HOAc أو BAW، فتم فصل

سنة مركبات تمت تنقيتها إما بإعادة بلورتها في المذيب المناسب أو بتمريرها عبر عمود من Sephadex LH20 لتكون جاهزة لمختلف التحاليل الفيزيائية و الكيميائية.

تم أيضا فصل و تنقية المركب L-Iditol (**P6**) بعد ترسبه في الكسور الأولى من العمود الكروماتوغرافي بينما المركب scopoletin (**P5**) تم فصله من المستخلص الكلوروفورمي باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على ألواح من Silica gel GF₂₅₄.

و بالاعتماد على قيم R_f للمركبات مع مختلف جمل المذيبات و على نتائج التمييه الحمضي و أطياف الأشعة فوق البنفسجية في الميثانول و مع مختلف الكواشف و أطياف ¹H-NMR و ¹³C-NMR و أخيرا أطياف الكتلة (MS) مع مقارنة النتائج بالمراجع تم تحديد البنى الكيميائية للمركبات المفصولة و هي:

Isorhamnetin 3-O-β-glucoside (**P1**), isorhamnetin 3-O-(6''-O-α-rhamnosyl)-β-glucoside (**P2**), tamarixetin 3-O-β-glucoside (**P3**), apigenin 6,8-di -C-β-glucoside (vicenin-2) (**P4**), scopoletin (**P5**), L-Iditol (**P6**)



شكل -18- مخطط فصل مركبات طور 1- بيوتانول لنبات *Pituranthos chloranthus*

من جهة أخرى تم انجاز كروماتوغرام HPLC لمستخلص 1- بيوتانول (شكل-19) حيث نلاحظ من هذا الكروماتوغرام قلة عدد الفلافونيدات (عدد محدود من القمم) التي يحتويها مستخلص 1- بيوتانول لهذا النبات و كانت خصائص العمود الكروماتوغرافي المستعمل و الجملة المملصة و البرنامج المغير لها [22] هي:

Column: Nucleosil 120 C₁₈ (25 cm x 0.46 cm)

Detection: 280 nm

Solvents: A (Phosphoric acid 0.01M), B (Methanol)

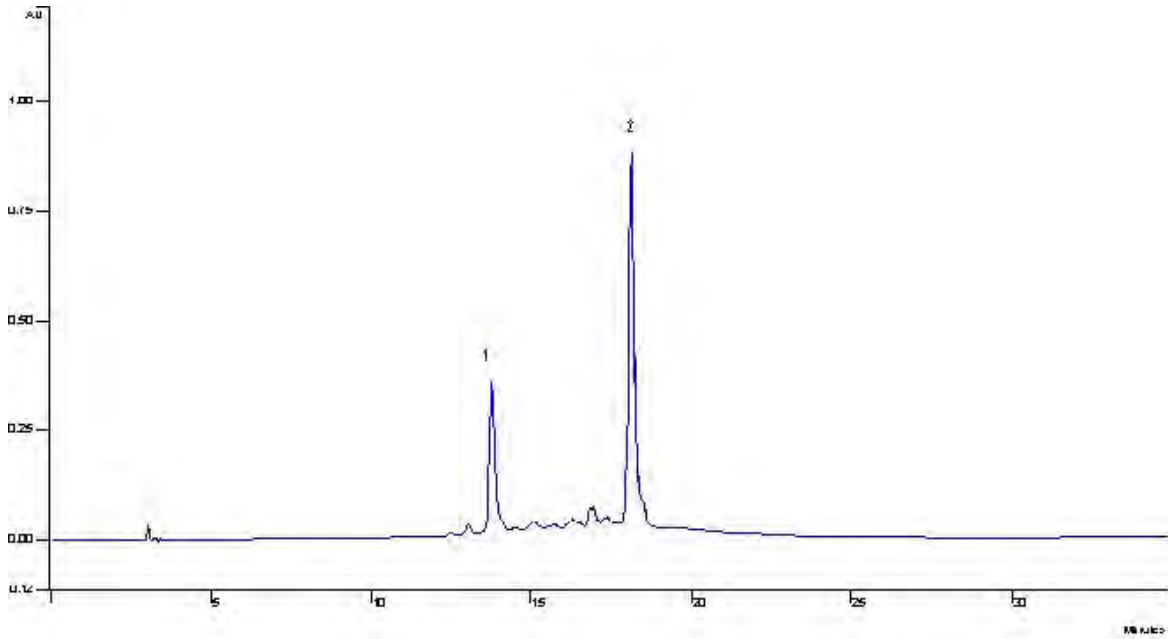
Elution gradient: 5% B to 50% B at 10 min, 70% B at 15 min, 80% B at 20min, 100% B at 25 min

Flow rate: 1 ml / min

أعتمادا على طيف الأشعة فوق البنفسجية المنجزة للقمم يمكننا أن نستنتج أن القمم المرقمة تعود إلى المركبات الآتية:

1- Apigenin 6,8-di-C-β-glucoside ($t_R = 13.779$ min)

2- Isorhamnetin 3-O-rutinoside / Isorhamnetin 3-O-glycoside/ Tamarixetin 3-O-glucoside



شكل- 19- كروماتوغرام HPLC لمستخلص 1- بيوتانول لنبات *P. chloranthus*

2-3- نبات *Solenostemma argel*:

يعرف شعبيا في المشرق العربي بـ "العرجل" و يعرف عند التوارق بـ "خلاشم" و "أرلاشم" يستعمل في مداواة العديد من الأمراض حيث يكسرون فروع النبات ليخرج منه سائل شفاف طعمه مر هو علاج شاف من السعال [3] كما يستعمل هذا السائل كمنظف للعيون بوضع قطرة منه في العين، يستعمل النبات أيضا في مداواة الجروح و الحروق بتغطيتها بأوراقه بوضعها كدمضات بعد عجنها، من جهة أخرى يستعمل لتطهير مياه الشرب بوضع فروع منه في السواقي و البرك المخصصة للشرب للقضاء على الطفيليات و الجراثيم، يتداوى أيضا بشراب الأوراق في حالة أمراض المعدة و الأمعاء و الجهاز البولي و للأمراض الجنسية إذا استعمل لمدة طويلة [23] كما يستعمل في مداواة الأمراض الصدرية [2].

3-2-1- وصف النبات:

نبات صحراوي يبلغ طوله 60سم أزهاره بيضاء ذات رائحة و ثماره غريبة الشكل و ذات لون بنفسجي غامق، أثناء الإثمار فإن فروع النبات تكاد تلامس الأرض بسبب ثقل الثمار (الشكل-18) هو وحيد صنفه، ينتمي إلى عائلة Asclepiadaceae الممثلة في الجزائر بـ 10 أصناف منها الصنف *Solenostemma* [1]، تصنيفه النباتي هو:

Plantae	المملكة
Spermatophytae	الشعبة
Angiospermae	تحت الشعبة
Dicotyledones	القسم
Lamiidae	تحت القسم
Gentiananae	الرتبة
Asclepiadaceae	العائلة
<i>Solenostemma</i>	الصنف
<i>S. argel</i> (Del.) Hayne	النوع

3-2-2- الدراسات الكيميائية السابقة لنباتات الصنف *Solennostemma*:

تمت دراسة هذا النبات المتواجد أيضا في مناطق من الصحراء العربية كمصر و شبه الجزيرة العربية و يتميز كيميائيا باحتوائه على مركبات من النوع:

Pregnanes, pregnane glycosides, triterpenes
 Flavonoids
 Monoterpene glycosides
 Acylated phenolic glycosides

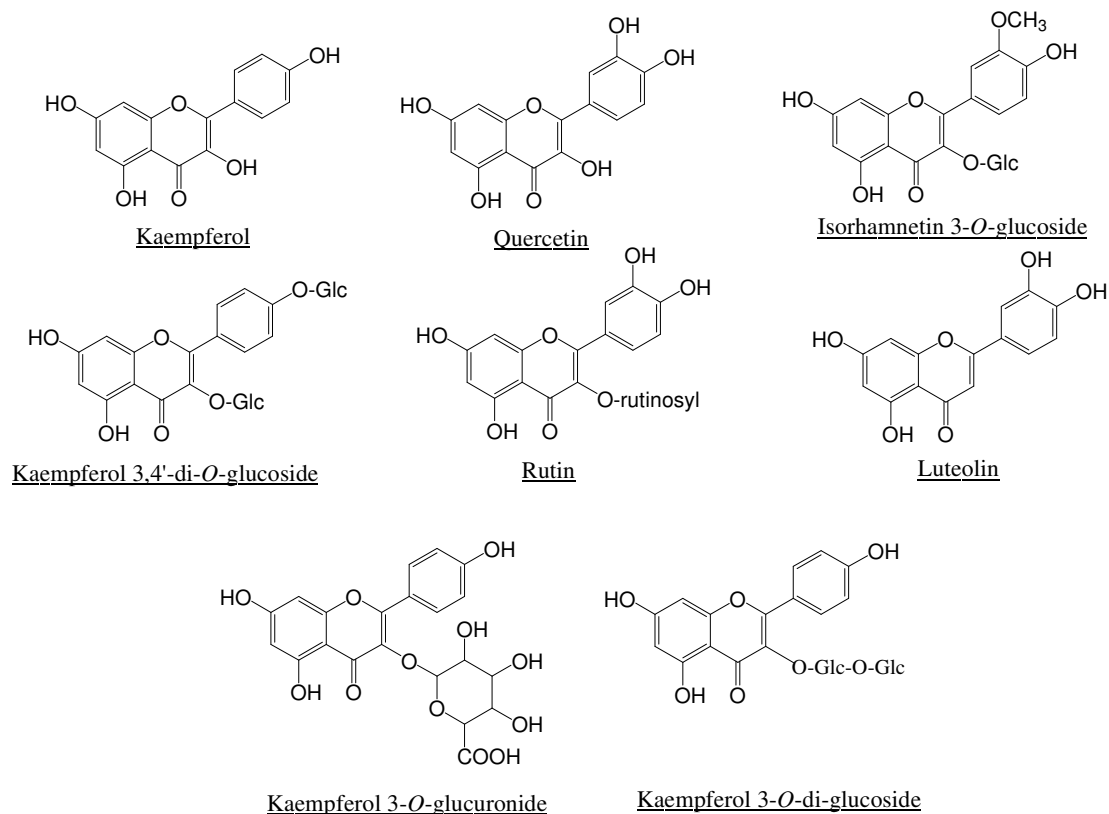


شكل -20- صور لنبات *Solenostemma argel*

بالنسبة للفلافونيدات المفصولة من هذا النبات (جدول-17، الشكل-21) نلاحظ أن جلها فلافونولات (95%) كما أن مسلك هيكل kaempferol هو الغالب (حوالي 60%) يليه مسلك هيكل quercetin (حوالي 30%) و أخيرا وجود ثلاثة أجليكونات هي: luteolin, quercetin, kaempferol.

المرجع	الفلافونيدات المفصولة
[26]	Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside, kaempferol 3- <i>O</i> -neohesperidoside
[27]	Kaempferol, kaempferol 3- <i>O</i> -glucuronide, kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside, kaempferol 3,4'-di- <i>O</i> -glucoside, kaempferol 7,4'-di- <i>O</i> -glucoside
[28]	Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside, kaempferol 3- <i>O</i> -di-glucoside
[25]	Kaempferol
[29]	Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside, kaempferol 3- <i>O</i> -neohesperidoside, quercetin 3- <i>O</i> -glucoside, luteolin
[24]	Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside, kaempferol 3- <i>O</i> -neohesperidoside, quercetin 3- <i>O</i> -glucoside, quercetin 3- <i>O</i> -neohesperidoside, isorhamnetin 3- <i>O</i> -glucoside, isorhamnetin- <i>O</i> -di-rhamnoside-hexoside
[30]	Kaempferol 3- <i>O</i> -neohesperidoside, rutin
[31]	Kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside, kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside

جدول-17- يشمل الفلافونيدات المفصولة من نبات *Solenostemma argel*



شكل- 21- الصيغ الكيميائية لبعض فلافونيدات نبات *Solenostemma argel*

المركبات المفصولة	العضو النباتي	المرجع
6,7-Dihydroxy-dihydrolinalool 3-O-β-glucoside, 3,6-dihydroxy-dihydrolinalool 7-O-β-glucoside, 14β-dihydroxy-5-pregnene-7,20-dione-3-O-β-glucoside, benzyl alcohol -O-β-apiofuranosyl-(1→6)-β-glucoside, 2-phenylethyl-O-α-arabinopyranosyl-(1→6)-glucoside	الأجزاء الهوائية	[26]
Stemmoside A, stemmoside B, stemmin C	الأوراق	[32]
14β,15α-Dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione, 3β,14β,15α,16α-hydroxy-20-oxo-Δ ⁵ -pregnene-tetra-ol, β- amyrin, campesterol, β-sitosterol, stigmasterol, α- amyrin	الأوراق	[33]
Solargin I, II, III, IV	الأجزاء الهوائية	[34]
Stemmoside C, D	الثمار	[35]
Argeloside A, B	الثمار	[36]
Lupeol, β-sitosterol, β-sitosterol-3-O-glucoside	الأجزاء الهوائية	[29]
Argeloside K, L, M, N, O	الأوراق	[37]
Stemmoside E, F, G, H, I, J, K	الأوراق	[38]
Argeloside C, D, E, F, G, H, I, J	البنور	[39]
14-β-Dihydroxy-5- pregnene-7,20-dione-3-O- [β-D- glucopyranosyl-(1→4)-β-D-oleandropyranosyl-(1→4)-β-D- thetopyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropyranosyl-(1→4)-β-D- cymaropyranoside], 6,7-dihydroxy-dihydro-linalool	الأوراق، الأزهار	[30]
Solenoside A, 14β, 15α-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione	الأوراق	[31]

جدول-18- المركبات الأخرى المفصولة من نبات *Solenostemma argel*

المركبات المفصولة من النبات تم الاستدلال عليها من قيم t_R مع مجموعة من الشواهد و كأقصى تحليل طيف الكتلة [24] كما لم يشر [28] إلى طريقة التعرف على المركبات المفصولة أما مركب kaempferol فقد تم التعرف عليه من قياس R_f فقط [25].

تناولت المراجع [40-42] دراسة الفعالية السمية (cytotoxic activity) و الفعالية ضد الأورام الخبيثة (antitumor) لمركبات السترويدات الجليكوزيدية التي تميز هذا النبات و المدونة بالجدول-18- و يعطي الشكل-22، الصيغ الكيميائية للبعض منها.

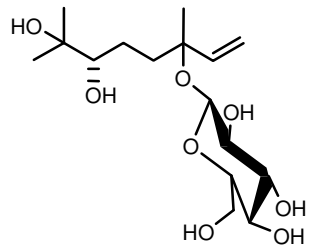
كذلك تناولت مراجع أخرى [29-31، 36-39] دراسة الفعالية ضد المؤكسدة و الفعالية ضد الالتهابات لمركبات أخرى يحتويها هذا النبات فمثلا أظهرت دراسة أن المركب Kaempferol 3-O-rutinoside ذا فعالية ضد الالتهابات معادلة لفاعلية دواء Indomethacin المأخوذ كمرجع [39] و أخيرا تناولت دراسات أخرى فعالية مستخلصاته تجاه الجراثيم و الفطريات [43-45].

3-2-3- الدراسة الكيميائية لنبات *Solenostemma argel*:

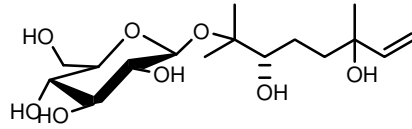
عملية القطف تمت بمنطقة الهقار و بعد تخفيف النبات و تصفيفه قمنا بعملية الاستخلاص لـ (800g) من الأوراق و السيقان باستعمال محلول ميتانول/ ماء (3:7) لمدة 24 ساعة و كررت العملية أربع مرات آخرها تمت باستعمال محلول ساخن، بعد الترشيح تبخر الرشاحة حتى الجفاف تحت ضغط منخفض.

المستخلص الكحولي الجاف المحصل عليه يضاف له الماء الساخن (400 ml) يرج جيدا ثم يترك في مكان بارد ليلية كاملة بعدها نرشح لتبدأ عمليات الفصل سائل- سائل بمذييات متدرجة في قطبيتها بداية بإيثر البترول مرة واحدة، الكلوروفورم لثلاث مرات، خلالات الإيثيل مرة واحدة و أخيرا 1- بيوتانول لثلاث مرات، يينخر كل مستخلص على حدة حتى الجفاف و الشكل-23- يعطي مخطط الاستخلاص لهذا النبات، فكانت الكميات المحصل عليها هي:

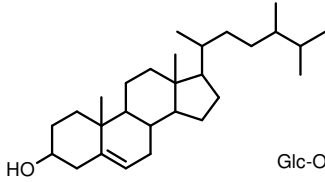
الوزن (غ)	المستخلص الجاف
3	إيثر البترول
50	الكلوروفورم
1	خلالات الإيثيل
65	1- بيوتانول



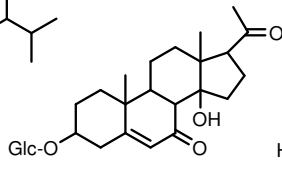
6,7-Dihydroxy-dihydrolinalool 3-O-glucoside



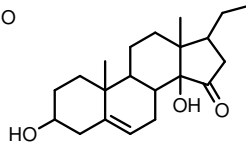
3,6-Dihydroxy-dihydrolinalool 7-O-glucoside



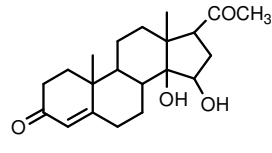
Campesterol



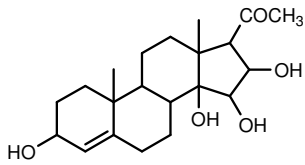
14β-Hydroxy-5-pregnene-7,20-dione 3-O-β-glucoside



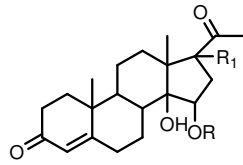
Stemmin C



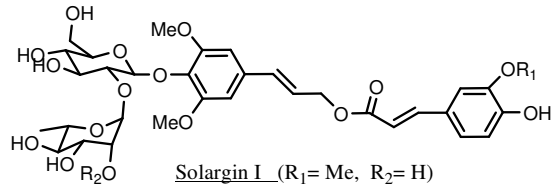
14β,15α-Dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione



3β,14β,15α,16α-Hydroxy-20-oxo-Δ⁵-pregnene-tetra-ol



Stemmoside A (R=β-D-glucosyl, R₁=αH)

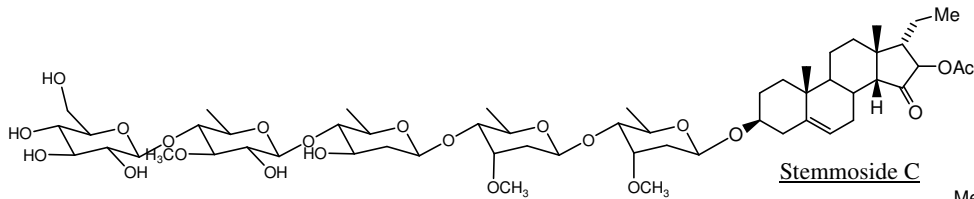


Solargin I (R₁= Me, R₂= H)

Solargin II (R₁= H, R₂= H)

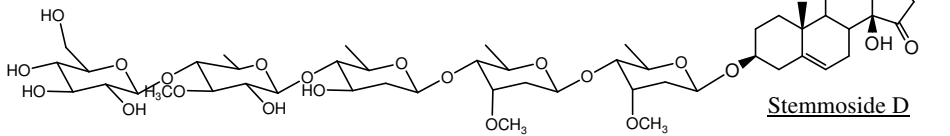
Solargin III (R₁= Me, R₂=Rha.)

Solargin IV (R₁= H, R₂= Rha.)

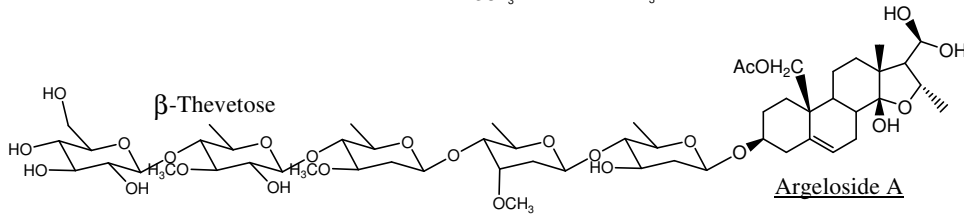


Stemmoside C

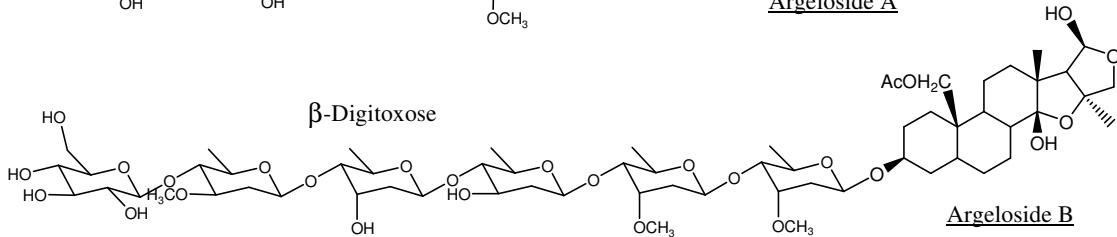
β-Glucose β-Oleandrose β-Canarose β-Cymarose β-Cymarose



Stemmoside D



Argeloside A



Argeloside B

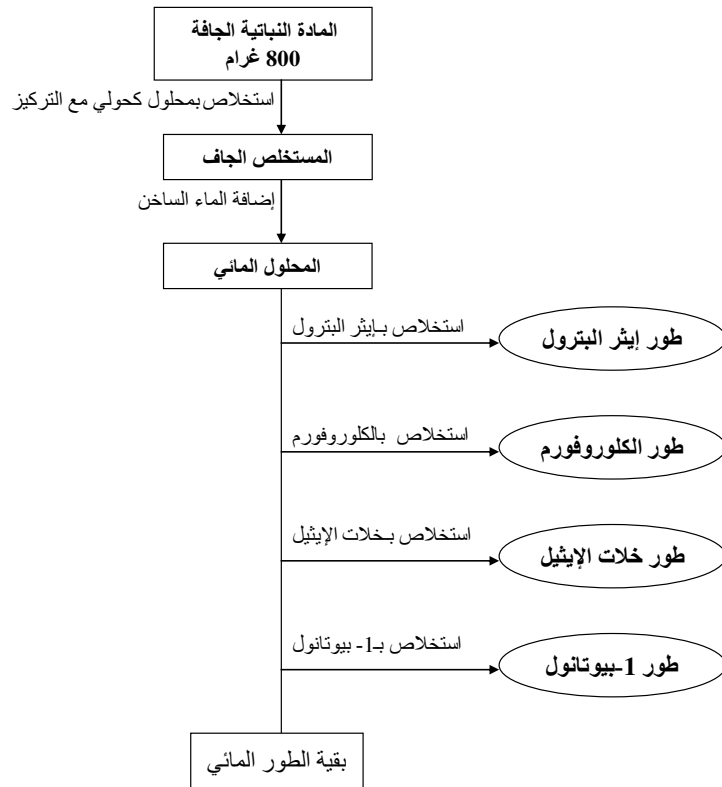
شكل- 22- بعض صيغ المركبات المفصولة من نبات *Solenostemma argel*

عمليات الفصل تمت على مستخلص خلالات الإيثيل (1g) باستعمال عمود من متعدد الأميد (Polyamide 6) و الحملة (H₂O → MeOH) كمملص حيث تم الحصول على 30 كسرا تم اختزالها بعد اختبارات كروماتوغرافية إلى 8 كسور فقط و تم فصل مركبين (S1) و (S2) باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) و الكروماتوغرافيا الورقية (PC) بعدها تم فصل مستخلص 1-بيوتانول (20g) باستعمال نفس الطور الثابت و نفس جملة المذيبات حيث تم الحصول على حوالي 50 كسر تقلص عددها إلى 11 كسرا بعد اختبارات كروماتوغرافية.

عدد من هذه الكسور تم فصل مركباتها بالاستعانة بتقنيات كروماتوغرافية أخرى (TLC, PC) فحصلنا على ثلاثة مركبات أحدهم هو المركب (S2) الذي تم فصله من طور خلالات الإيثيل.

المركبات المفصولة من هذا النبات تم تنظيفها بإعادة بلورتها أو بتمريرها خلال عمود من Sephadex LH20 و تم التعرف عليها بمختلف التحاليل الفيزيائية و الكيميائية و هي:

Kaempferol (S1), kaempferol 3-O-β-glucoside (S2), kaempferol 3-O-(2''-O- α-rhamnosyl)-β-glucoside (S3), methyl-(E)-ferulate (S4)



شكل- 23- مخطط الاستخلاص لنبات العرجل *Solenostemma argel*

3-3- نبات *Marrubium deserti* :

يعرف شعبيا بـ"الجعيدة"، "مخزومة" و عند التوارف بـ "ناهرار"، "أبركاكو" [3] و يتواجد بمنطقة الصحراء فقط (endemic) [1].

3-3-1- وصف النبات:

نبات يتراوح طوله بين 20 إلى 30 سم، جد متفرع ذو شعيرات قطنية يميل لونه إلى البياض، الأوراق صغيرة و متقابلة محملية الملمس إبرية الشكل مسننة في نهايتها، الأزهار أنبوبية الشكل و ذات لون وردي فاتح محاطة بكأس أخضر اللون (الشكل-24) ينتمي النبات إلى العائلة الشفوية (Lamiaceae) و هي عائلة جد هامة في الغطاء النباتي للجزائر حيث أنهما ممثلة بـ31 صنف و العديد من الأنواع النادرة.

تنتشر نباتات الصنف *Marrubium* بصورة خاصة في منطقة البحر الأبيض المتوسط إذ يوجد حوالي 40 نوعا أما في الجزائر فتوجد بها خمسة أنواع إضافة إلى النبات المدروس [1] و هي:

M. vulgare (L.), *M. spinum* (L.), *M. peregrinum* (L.), *M. alysson* (L.), *M. alyssoides* (Pomel)
التصنيف النباتي له هو:

Plantae	المملكة
Spermatophytae	الشعبة
Angiospermae	تحت الشعبة
Dicotyledones	القسم
Gamopetales	تحت القسم
Lamiales	الرتبة
Lamiaceae	العائلة
Lamioideae	تحت العائلة
<i>Marrubium</i>	الصنف
<i>M. deserti</i> (de Noé)	النوع



شكل- 24- صور لنبات *Marrubium deserti*

أشهر هذه الأنواع و المعروف منذ القدم و أكثرها استعمالا في الطب الشعبي هو *M. vulgare* المعروف شعبيا بأسماء مثل: "ماريوت"، "فرايسون"، "مريوا"، "تامريوت"، "تيمراست" حيث يتداوى به في جنوب و شرق البحر الأبيض المتوسط من عدة أمراض منها مرض السكر، التيفوئيد، الملاريا، الأمراض الصدرية، آلام الرأس، فقر الدم، الروماتيزم، نزلات البرد كما يعتبر منظماً للدورة الدموية و مفرزاً للصفراء، فاتحاً للشهية، مهضماً، مدرراً للبول، مضاداً للحمى، مسكناً ومخدرًا، مبيدًا للجراثيم، مطهرًا للشعب التنفسية و القنوات الهضمية، منظماً للدورة الدموية، مقويًا لعضلات القلب... إلخ [23]، [50].

3-2-3- الدراسات الكيميائية السابقة لنباتات الصنف *Marrubium* :

حسب علمنا لم يحظ هذا النبات بأي دراسة سابقة لكن نباتات تحت العائلة Lamioideae التي تشمل نباتات الأصناف *Ballota, Marrubium* و *Phlomis* تتميز كيميائيا باصطناعها للمركبات التالية:

Labdane diterpenes

Flavonoids

Phenylpropanoids

Volatil oils

بالنسبة للمركبات الفلافونيدية المفصولة من نباتات الصنف *Marrubium* المدونة بالجدول-19، فنلاحظ أنها أغلبها (70%) هي جليكوزيدات و البقية أحليكونات من جهة أخرى 70% من الفلافونيدات يكون الجزء الأحليكوني منها هو الفلافون (Flavone) و 27% الجزء الأحليكوني هو flavonol و البقية يكون الجزء الأحليكوني هو flavanol كما أن 40% من الفلافونيدات الجليكوزيدية سكرياتها ترتبط بها مجموعات أسيل (acylated glycoside) و الشكل-25- يعطي الصيغ الكيميائية للبعض منها.

تتميز نباتات هذا الصنف أيضا بتصنيعها للترينينات الثنائية من النوع furane labdane diterpenes و أشهرها مركب marrubiin الذي تم فصله أول مرة من نبات *M. vulgare* (جدول-20 و الشكل-26) و حظي بعدة دراسات أظهرت أنه يحد من التوتر في الأوعية الدموية (vasorelaxant) و يقلل من الحساسية لمحفزات مؤلمة (antinociceptive) [52-54] كما أظهر مركب marrubenol دوره في تثبيط تشنج العضلات الملساء [55].

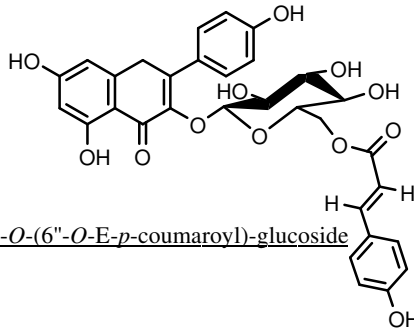
بينت أبحاث أخرى أن مستخلصات نبات *M. vulgare* تحمي من أمراض القلب و الشرايين لوجود مركبات ضد مؤكسدة فيها [46، 47] كما أن العديد من الدراسات اهتمت بمركبات الزيوت الطيارة و الملاحظ هو أن غالبيتها هي سيسكوتربينات و يشمل الجدول-20- أهم الزيوت الطيارة المفصولة.

من جانب آخر أظهرت مركبات phenylpropanoids (الشكل-26) و على رأسها مركب مفصول من نفس النبات السابق و المعروف بـ acetoside فعالية ضد الالتهابات [58]، مع العلم أن أغلب النباتات التي تستعمل في الطب التقليدي ضد الالتهابات يكون فيها هذا المركب (أو أحد المركبات الشبيهة به) هو أحد المركبات الأساسية فيها إذ يعمل على تثبيط أنزيم 5-Lipoxygenase و على أسر الجذور الحرة (in vitro) [48، 49].

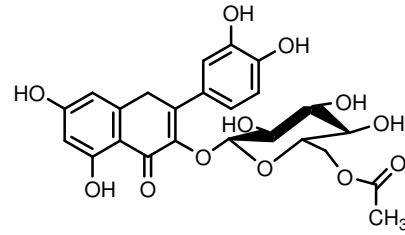
النبات	المركبات المفصولة	المرجع
Flavonoids:		
<i>M. alysson</i>	Apigenin, apigenin 7-O-glc, apigenin 7-O-arabinoside	[59]
<i>M. cylleneum</i>	Ladanein	[60]
	Pilloin	[61]
	5,6,7,8,4'-Pentamethoxyflavone, quercetin, luteolin 7-O-glc, kaempferol 3-O-glc, kaempferol 3-O-(6''-O-E-p-coum)glc, quercetin 3-O-(6''-O-E-p-coum)-glc, apigenin 7-O-(6''-O-E-p-coum)-glc	[51]
<i>M. friwaldskyanum</i>	Ladanein	[62]
<i>M. globosum ssp libanoticum</i>	Kaempfeol 3-O-glc, quercetin 3-O-glc, apigenin 7-O-glc, isorhamnetin 3-O-glc, kaempferol 3-O-rut, quercetin 3-O-rut, isorhamnetin 3-O-rut, naringenin 7-O-glc, apigenin 7-O-(3''-O-E-p-coum)-glc	[63]
<i>M. parviflorum</i>	Apigenin 7-O-glc	[64]
<i>M. peregrinum</i>	Salvigenin	[65]
	5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone	[66]
	Apigenin, kaempferol, apigenin 7-O-glc, luteolin 7-O-glc	[67]
<i>M. polydon</i>	Apigenin 7-O-(6''-O-E-p-coum)-glc, apigenin 7-O-(3'', 6''-O-di-E-p-coum)-glc	[68]
<i>M. trachyticum</i>	Ladanein	[69]
<i>M. velutinum</i>	Apigenin 7-O-(3''-O-E-p-coum)-glc, apigenin 7-O-glc, apigenin 7-O-(3'', 6''-O-di-E-p-coum)-glc, chrysoeriol, chrysoeriol 7-O-(3'', 6''-O-di-E-p-coum)-glc, quercetin 3-O-glc, quercetin 3-O-(6''-O-acetyl)-glc, isorhamnetin 7-O-glc, isorhamnetin 7-O-rut, isorhamnetin 7-O-(6''-O-E-p-coum)-glc, isorhamnetin 7-O-(6''-O-Z-p-coum)-glc, kaempferol 3-O-rut	[70]
	Apigenin, chrysoeriol, ladanein, 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyscutellarein, isorhamnetin 3-O-glc, kaempferol 3-O-rut, isorhamnetin 3-O-rut, quercetin 3-O-rut, 6-OH-kaempferol 3-O-rut, kaempferol 3-O-(6''-O-E-p-coum)-glc, isorhamnetin 3-O-(6''-O-acetyl)-glc, isorhamnetin 3-O-(6''-O-E-p-coum)-glc, apigenin 7-O-(3'', 6''-O-di-E-p-coum)-glc, isorhamnetin 7-O-(3'', 6''-O-di-E-p-coum)-glc	[51]
<i>M. vulgare</i>	Ladanein, 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone, 5,6,4'-trimethoxyscutellarein	[60]
	Apigenin, luteolin, luteolin 7-O-glc, apigenin 7-O-glc, quercetin 3-O-glc, quercetin 3-O-rut	[71]
	Apigenin 7-O-glc	[72]
	Chrysoeriol, apigenin, luteolin, luteolin 7-O-glc, apigenin 7-O-glc, vitexin, vicenin-2, apigenin 7-lactate, luteolin 7-lactate, apigenin 7-(2-glucosyllactate), apigenin 7-(2-glucuronosyllactate), luteolin 7-(2-glucosyllactate), luteolin 7-(2-glucuronosyllactate), apigenin 7-O-(6''-O-E-p-coum)glc	[73]
Phenylpropanoids, phenolic acids:		
<i>M. alysson</i>	Alyssonoside, acetoside, leucosceptoside A, matynoside, forsythoside B, leucosceptoside B	[74]
<i>M. cylleneum</i>	Martynoside-6'-glucoside, E-p-coumaric acid, E-ferulic acid, E-isoferulic acid	[51]
<i>M. peregrinum</i>	Acetoside	[67]
<i>M. globosum ssp libanoticum</i>	Acetoside, p-methoxycinnamic acid	[63]
<i>M. velutinum</i>	Acetoside, leucosceptoside A, echinacoside, forsythoside, alyssonoside, velutinoside I, velutinoside II, stachysoside D, 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl-O-[α-L-rhamnosyl-(1→3)]-O-[β-D-glucosyl-(1→6)]-4-O-E-feruloyl-β-D-glucoside	[70]
	Velutinoside III, velutinoside IV	[75]
	Acetoside, leucosceptoside A, martynoside, echinacoside, 6'-glucosyl-martynoside, forsythoside B, alyssonoside, lavandulifolioside, stachysoside D, lamiophlomiside A, velutinoside I-IV, cistanoside F, chlorogenic acid, phaselic acid (2-O-caffeol-L-malate)	[51]
<i>M. vulgare</i>	Marruboside	[76]
	Acetoside, forsythoside B, arenarioside, ballotetroside, (+)-E-caffoyl-1-malic acid	[58]

* glc (glucoside), coum (coumaroyl), rut (rutinoside)

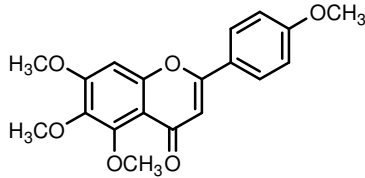
جدول-19- الفلافونيدات و مركبات أخرى المفصولة من نباتات الصنف *Marrubium*



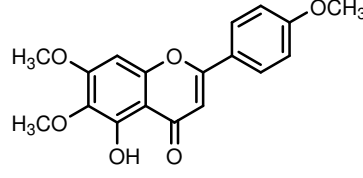
Kaempferol 3-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside



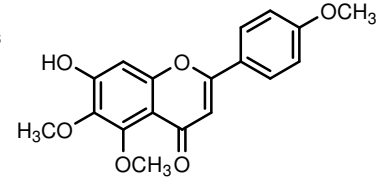
Quercetin 3-O-(6''-O-acetyl)-glucoside



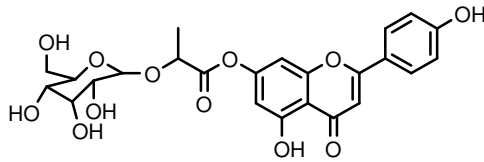
5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone



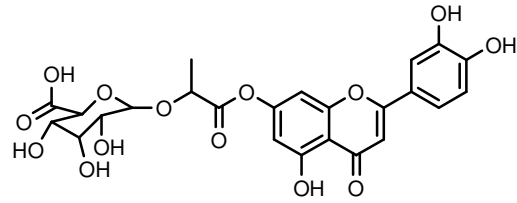
Salvigenin



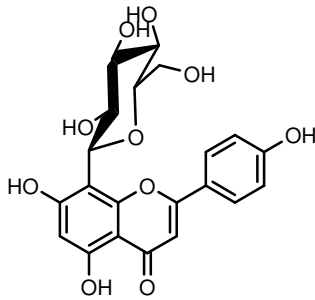
7-Hydroxy, 5,6,4'-trimethoxyflavone



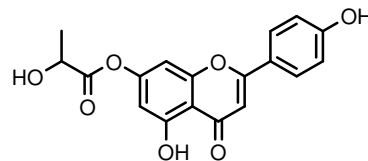
Apigenin 7-O-[2-O-beta-glucosyl-lactate]



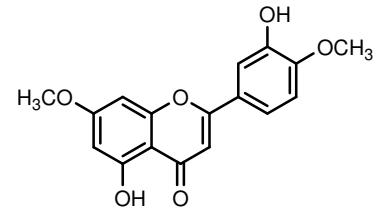
Luteolin 7-O-[2-O-beta-glucuronosyl-lactate]



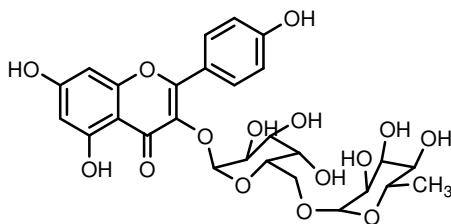
Vitexin



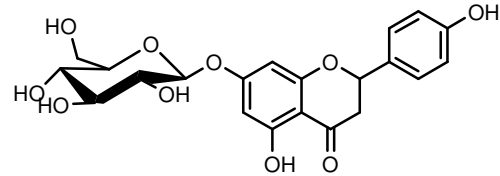
Apigenin 7-lactate



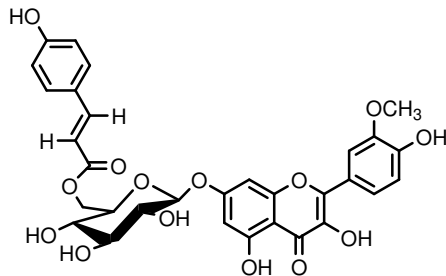
Pilloin (7,4'-dimethoxyluteolin)



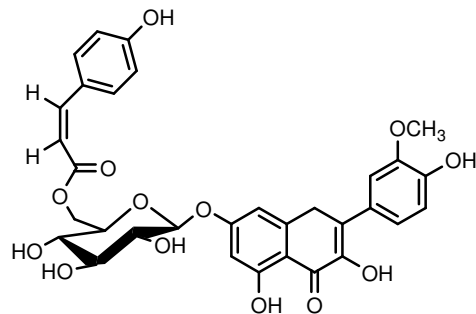
Kaempferol 3-O-rutinoside



Naringenin 7-O-glucoside



Isorhamnetin 7-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside



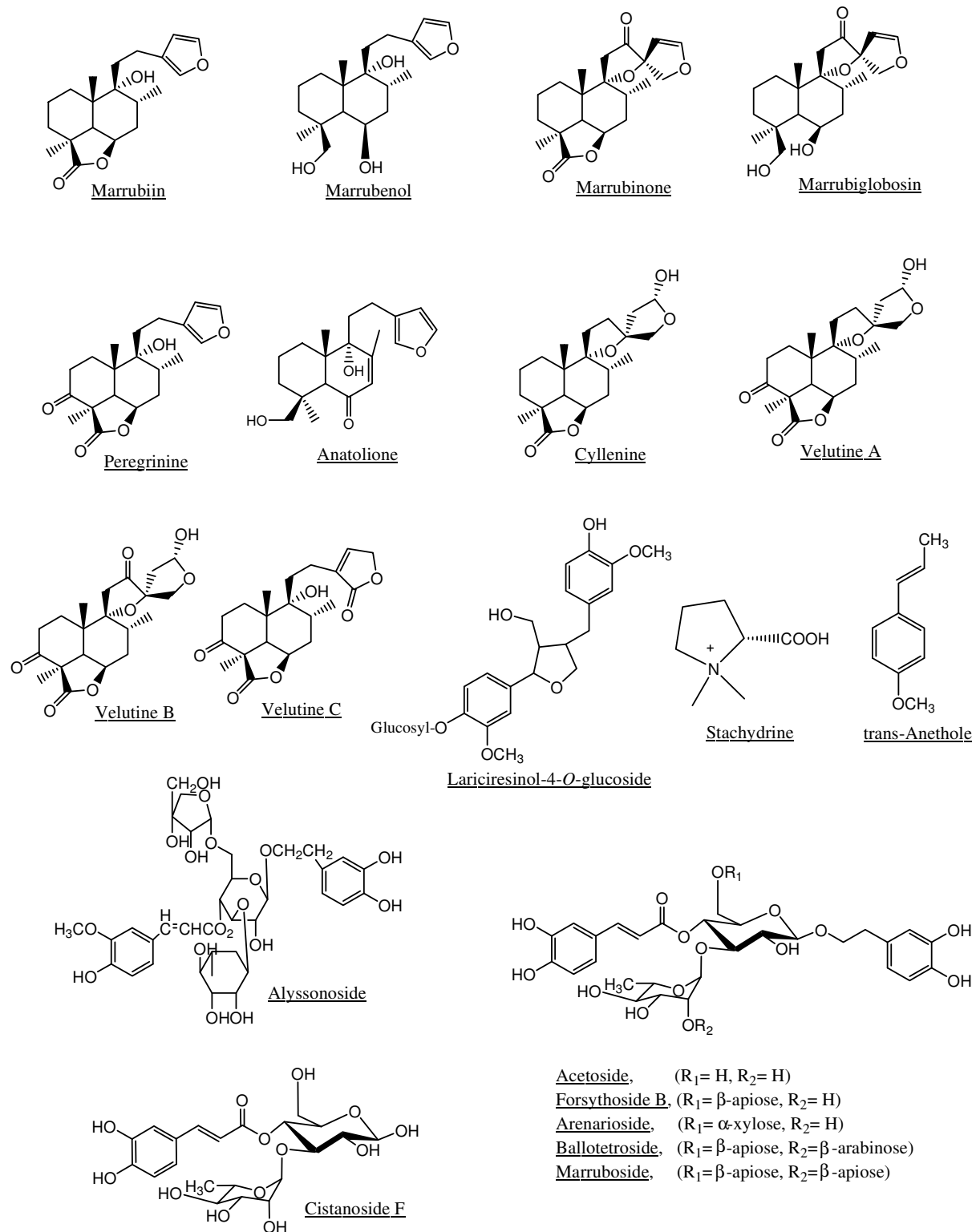
Isorhamnetin 7-O-(6''-O-Z-p-coumaroyl)-glucoside

شكل-25- الصيغ الكيميائية لفلافونيدات نباتات الصنف *Marrubium*

النبات	المركبات المفصولة	المرجع
Diterpenes:		
<i>M. anisodon</i>	Vulgarol, marrubiin	[77]
<i>M. alysson</i>	Marrubiin	[78]
<i>M. astracanicum</i>	Marrubinone A, B	[79]
<i>M. cylleneum</i>	Marrubiin, cyllenine A, 15-epi-cyllenine A	[60]
<i>M. friwaldskyanum</i>	Preperegrinine, peregrinine	[62]
<i>M. globosum</i>	Marrubiin, marrubinone B, marrubiglobosin	[80]
<i>M. globosum ssp libanoticum</i>	Marrulibanoside	[81]
	(13R)-9 α ,13 α -Epoxy λ 6 β (19),16(15)-diol dilactone, deacetylvitexilactone, marrulanic acid, (13S)-9 β ,13 β -epoxy λ 6 β (19),16(15)-diol dilactone, cyllenin A, 15-epi-cyllenin A, marrulibanoside	[82]
<i>M. parviflorum</i>	Anatolione	[83]
<i>M. polydon</i>	Polyodonin, 3-O-(β -D-glucopyranosy-3- β -hydroxystigmat-5-ene.	[68]
<i>M. sericeum</i>	Marrubenol, marrubiin	[78]
<i>M. supinum</i>	Marrubenol, marrubiin	[78]
<i>M. trachyticum</i>	Marrubiin	[69]
<i>M. velutinum</i>	Marrubinone B, velutine B, 15-epi-velutine B, velutin C, peregrinine, velutine A, 15-epi-velutine A	[60]
<i>M. vulgare</i>	Marrubiin, vulgarin	[72]
Volatil oils, triterpenes, lignan glycosides, alkaloids:		
<i>M. alysson</i>	β -Sitosterol glucoside \dagger , choline \dagger	[59]
<i>M. astracanicum</i>	Caryophyllene oxide, citronellol, β -caryophyllene	[84]
	Methylcyclopentane, thymol, n-heptane	[85]
<i>M. bourgaei ssp. caricum</i>	β -Caryophyllene, (Z)- β -farnesene, germacrene D	[86]
<i>M. bourgaei ssp. bourgaei</i>	Hexadecanoic acid, hexahydrofarnesylacetone	[87]
<i>M. cuneatum</i>	Bicyclogermacrene, germacrene D	[88]
	β -Caryophyllene, hexadecanoic acid, spathulenol, bicyclogermacrene, germacrene D	[89]
<i>M. cylleneum</i>	Caryophyllene oxide, β -caryophyllene	[90]
	Stachydrine \ddagger	[51]
<i>M. globosum ssp libanoticum</i>	β -Caryophyllene, hexadecanoic acid, spathulenol	[89]
<i>M. parviflorum</i>	Hexadecanoic acid, germacrene D, β -caryophyllene, (E)- β -farnesene	[91]
	β -Sitosterol \dagger , α -amyrin \dagger	[64]
	Bicyclogermacrene, germacrene D, β -caryophyllene	[92]
<i>M. peregrinum</i>	(Z)- β -Farnesene, (E)- β -farnesene	[93]
	β -Caryophyllene, germacrene D, bicyclogermacrene	[94]
<i>M. velutinum</i>	γ -Muurolene, β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide	[94]
	Stachydrine \ddagger , 4-O-lariciresinol-glucoside*, 4'-O-lariciresinol-glucoside*, 4,4'-O-lariciresinol-bis-glucoside*	[51]
<i>M. vulgare</i>	β -Caryophyllene, germacrene D	[65]
	(Z)- β -Farnesene, β -caryophyllene, (E)-hex-2-enal, α -humulene, germacrene D	[95]
	β -Sitosterol \dagger , lupeol \dagger	[72]
	Eugenol, β -bisabolene	[56]
	Caryophyllene oxide, trans-caryophyllene, germacrene D, bicyclogermacrene, trans-anethole	[57]
	β -Bisabolene, β -caryophyllene, germacrene D, (E)- β -farnesene	[93]

* Lignan glycoside, \dagger triterpene, \ddagger alkaloid

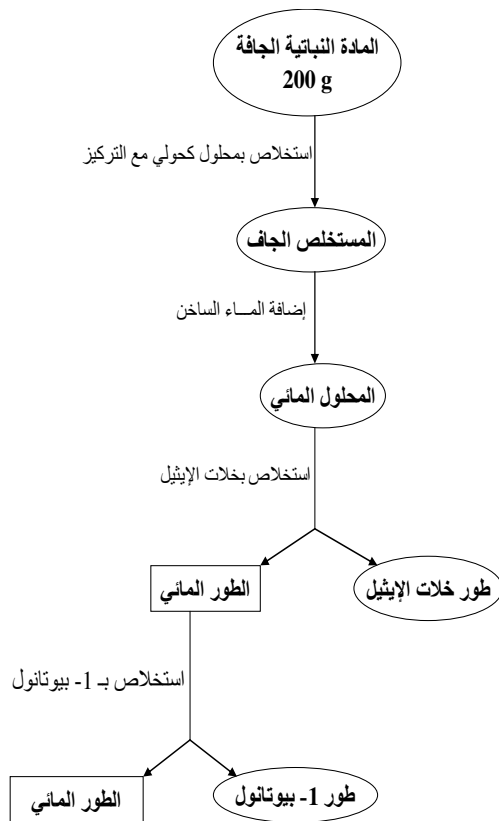
جدول-20- مركبات التربينات الثنائية و مركبات أخرى مفصولة من نباتات الصنف *Marrubium*



شكل -26- صيغ بعض المركبات الأخرى المفصولة من نباتات الصنف *Marrubium*

3-3-3- الدراسة الكيميائية لنبات *Marrubium deserti* :

قطف النبات من منطقة الهقار بعد تجفيفه كانت الكمية المحصل عليها هي (200g) تم استخلاصها بمحلول كحولي ميثانول/ ماء (3:7) لمدة يوم كامل و لعدة مرات بعد تبخير المذيب تحت ضغط منخفض يضاف الماء الساخن (200ml) إلى المستخلص الجاف و يترك لليلة كاملة في مكان بارد بعدها يرشح و تحتفظ بالرشاحة التي يتم استخلاصها أولاً بمذيب خلات الإيثيل (150ml) يجفف تحت ضغط منخفض ثم بمذيب 1- بيوتانول (150ml) عدة مرات يجمع ويجفف هو الآخر (شكل-27).



شكل- 27- مخطط الاستخلاص لنبات *Marrubium deserti*

فكانت الكميات المحصل عليها من هذه الأطوار هي:

المستخلص	الوزن(غ)
خلات الإيثيل	3
1- بيوتانول	9

لإختبارات عملية و بعد اختبارات كروماتوغرافية تم جمع هذين المستخلصين معا، عمليات الفصل تمت في البداية بعمود كروماتوغرافي من Polyamide SC6 مع الجملة المملصة (Toluene→ MeOH) حيث نبدأ التمليص بالتولوين ثم تدريجيا تتم تغذيته بالميتانول حتى الوصول إلى الميتانول النقي، فحصلنا في النهاية على 17 كسرا.

بعد اختبارات كروماتوغرافية جديدة باستعمال الكروماتوغرافيا الورقية مع الحمل (BAW , HOAc15%) اختزل عددها إلى ثمانية كسور فقط، تلتها بعد ذلك عمليات فصل لبعض الكسور باستعمال تقنيات كروماتوغرافية مثل كروماتوغرافيا العمود و كطور ثابت مادة Silica gel و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على ألواح من Silica gel GF₂₅₄ أيضا حيث تم فصل ستة مركبات و التي تم تنظيفها إما بإعادة بلورتها أو بتمريرها عبر عمود صغير من Sephadex LH20 و هي:

Apigenin 7-*O*-β-glucoside (**M1**), apigenin 7-*O*-(6''-*O*-*E-p*-coumaroyl)-β-glucoside (**M2**),
apigenin 7-*O*-(3''-*O*-*E-p*-coumaroyl)-β-glucoside (**M3**), apigenin 7-*O*-(3'', 6''-*O*-*di-E-p*-
coumaroyl)-β-glucoside (**M4**), 5,6-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone (ladanien) (**M5**),
apigenin 6,8-*di-C*-β-glucoside (vicenin-2) (**M6**)

4-3- نبات *Ballota hirsuta*:

يعرف بـ " مغروي "، " مروثة " و عند التوارف بـ " أفرغقي "، " تيمرسات "، " أفيس " [3] هو أحد نباتات البحر الأبيض المتوسط و يتواجد في منطقة الصحراء الوسطى و الهقار.

3-4-1- وصف النبات:

نبات يتراوح طوله من 50سم إلى متر و نصف المتر، متفرع حولي أو معمر، تكسوه شعيرات قصيرة جداً (زغب)، الأوراق بيضوية أو دائرية الشكل مسننة قليلاً بها أحادييد عميقة، الوجه الداخلي ذو لون رمادي و ملمس قطني، أزهاره وردية أو أرجوانية اللون، ينتمي إلى العائلة الشفوية (Lamiaceae) [2] و إلى تحت العائلة Lamioideae التي تشمل كما سبق الذكر الأصناف *Phlomis*، *Ballota*، *Marrubium*.
الصنف *Ballota* ممثل على مستوى مناطق البحر الأبيض المتوسط بـ 33 نوع يوجد منها نوعان فقط بالجزائر [1] هما: *B. hirsuta* (Benth.)، *B. nigra* (L.) و التصنيف النباتي لهذا النبات هو:

Plantae	المملكة
Spermatophytae	الشعبة
Angiospermae	تحت الشعبة
Dicotyledones	القسم
Gamopetales	تحت القسم
Lamiales	الرتبة
Lamiaceae	العائلة
Lamioideae	تحت العائلة
<i>Ballota</i>	الصنف
<i>B. hirsuta</i> (Benth.)	النوع



شكل - 28- صور لنبات *Ballota hirsuta*

3-4-2- الدراسات الكيميائية السابقة لنباتات الصنف *Ballota*:

كيميائيا تتميز نباتات هذا الصنف المنتمي إلى تحت العائلة Lamioideae بتصنيعها للمركبات الكيميائية من النوع:

Labdane diterpenes

Flavonoids

Phenylpropanoids

Volatile oils

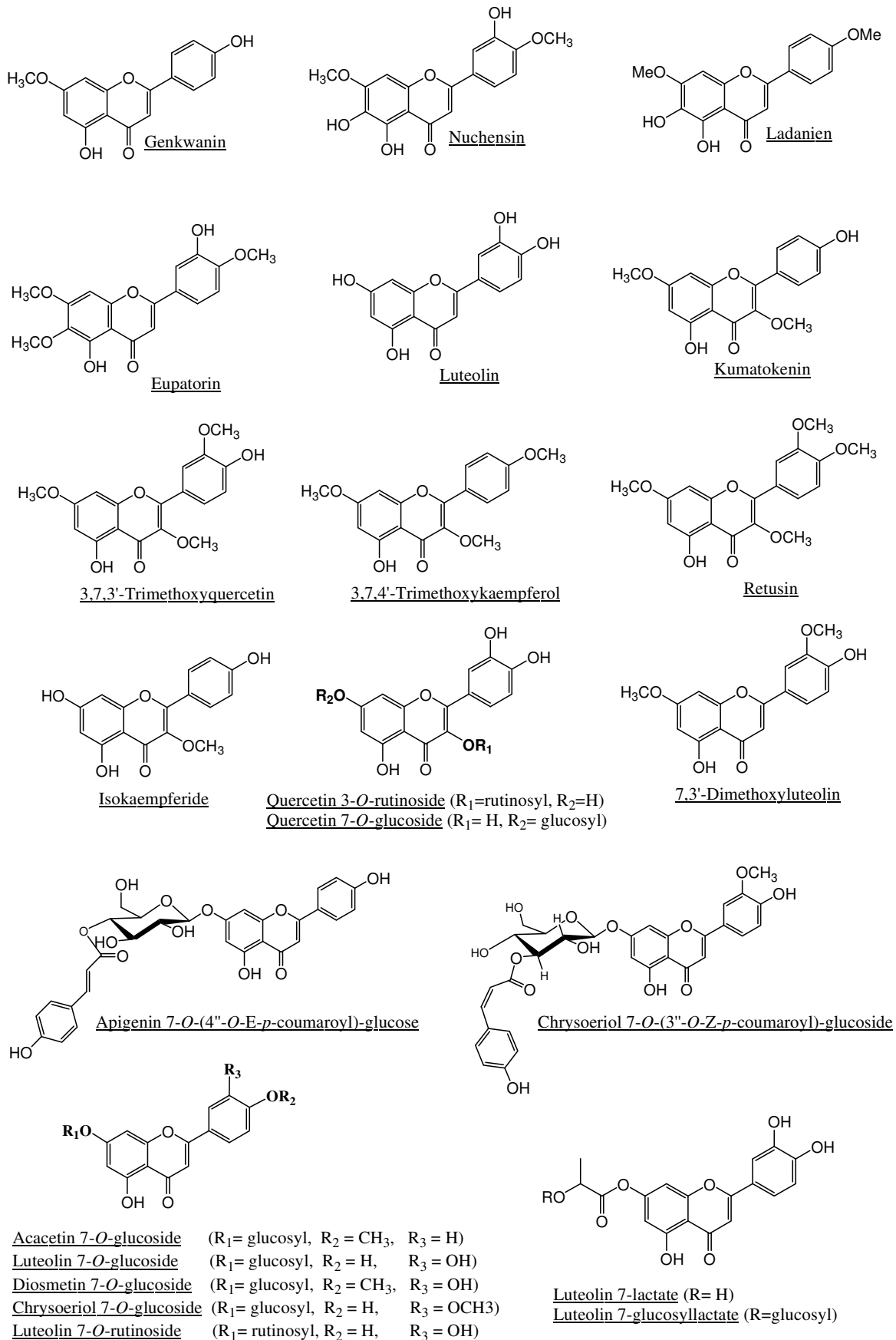
تم فصل مجموعة من الفلافونيدات من نباتات الصنف *Ballota* (الجدول-21) و الملاحظ منه العدد الكبير من الأجليكونات المفصولة مقارنة بالصنف *Marrubium* حيث تمثل حوالي 50% منها أما بالنسبة للجليكوزيدات فإن مسلك هيكل flavone هو الغالب 80% ثم مسلك هيكل flavonol بـ 20% (الشكل-29). هناك دراسة سابقة وحيدة لنبات *Ballot hirsuta* تم فيها فصل 14 مركب فلافونيدي منهم ثمانية أجليكونات و ستة جليكوزيدات (جدول-21 و الشكل-29) منها مركب وحيد ترتبط به مجموعة coumaroyl على إحدى ذرات سكر الجليكوز دون تحديد موقعها وقد تم التعرف على أغلب المركبات بدراسة أطياف الأشعة فوق البنفسجية و أطياف الكتلة [97].

يشمل الجدول-22- مركبات التربينات الثنائية المفصولة من مختلف أنواع هذا الصنف أما الدراسات التي اهتمت بالزيوت الطيارة فهي قليلة حيث توجد دراستان فقط تناولت المحتوى من الزيوت الطيارة لنباتي *B. aucheri* و *B. pseudodictamnus* مع الإشارة إلى ندرة التربينات الأحادية و تواجد السيسكويترينينات بشكل خاص. حظيت العديد من مستخلصات نباتات هذا الصنف و بعض مركباته بعدة دراسات تناولت فعاليتهم البيولوجية منها من تناولت الفعالية ضد المؤكسدة [98-99] كما تناولت دراسة أخرى [141] الفعالية ضد المؤكسدة لمستخلصات 16 نوع من الصنف *Ballota* تنمو بتركيا و أظهرت أن كل الأنواع تثبط تكوين أيون superoxide و لكن بدرجات متفاوتة لكن البعض منها فقط يثبط تكوين lipid peroxide و كان أفضل هذه الأنواع النوع *B. glandulosissima*.

دراسات أخرى تناولت الفعالية ضد الجراثيم و الفطريات [100-102] و دراسات أخرى اهتمت بالفعالية المثبطة للإنزيمات [103-104] كما تدخل مستخلصات نباتات هذا الصنف في تركيبة عدة أدوية تستعمل كمهدئات.

النبات	المركبات المفصولة	المرجع
Flavonoids:		
<i>B. acetobulosa</i>	Chrysoeriol 7- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> - <i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside, chrysoeriol 7- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside, chrysoeriol 7- <i>O</i> -glucoside, apigenin 7- <i>O</i> -glucoside, apigenin 7- <i>O</i> -(4''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	[105]
	Ladanien, apigenin 7- <i>O</i> -glucoside, acacetin 7- <i>O</i> -glucoside, chrysoeriol 7- <i>O</i> -glucoside, luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	[106]
<i>B. foetida</i>	Apigenin 7- <i>O</i> -glucoside, vicenin-2	[107]
<i>B. glandulosissima</i>	Kumatakenin, pachypodol, 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone, velutin, salvigenin, retusin, corymbosin	[100]
<i>B. hirsuta</i>	Salvigenin, kumatakenin, genkwanin, ladanein, nuchensin, isokaempferide, apigenin, luteolin, vicenin-2, apigenin 7- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)-glucoside, apigenin 7- <i>O</i> -glucoside, luteolin 7- <i>O</i> -glucoside, luteolin 7- <i>O</i> -rutinoside, quercetin 3- <i>O</i> -glucoside	[97]
<i>B. inaequidens</i>	5-Hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone, retusin, pachypodol, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone, 5-hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavone, 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone	[101]
<i>B. larendana</i>	Apigenin 7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside, apigenin 7- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside, apigenin 7- <i>O</i> -glucoside, luteoline 7- <i>O</i> -glucoside	[109]
<i>B. limbata</i>	Eupatorin	[110]
<i>B. nigra</i>	Ladanien	[111]
	Tangeretin	[112]
	Luteolin 7- <i>O</i> -glucosyl-lactate, luteolin 7-lactate	[113]
<i>B. pseudodictamnus</i>	Chrysoeriol 7- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside, chrysoeriol 7- <i>O</i> -glucoside, apigenin 7- <i>O</i> -glucoside	[109]
	Ladanien	[115]
<i>B. saxatilis</i>	Ladanein, 3,7,4'-trimethoxykaempferol, retusin	[116]
<i>B. undulata</i>	Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside, diosmetin 7- <i>O</i> -glucoside, chrysoeriol 7- <i>O</i> -(6''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside, 3,7,3'-trimethoxyquercetin, 3,7,4'-trimethoxykaempferol, 7,3'-dimethoxyluteolin, retusin	[98]
	Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside, apigenin 7- <i>O</i> -glucoside, quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside	[117]
Phenylpropanoids:		
<i>B. acetobulosa</i>	Eutigoside A	[105]
<i>B. nigra</i>	Martynoside, forsythoside B, 7 α -acetoxyroyleanone	[111]
	Acetoside, forsitoside B, arenarioside	[118]
	Ballotetroside	[119]
	Ballotetroside, forsythoside B, acetoside, allysonoside	[99]
	Alyssonoside, lavandulifolioside, angoroside A, (E)-caffeoylmalic acid	[120]
<i>B. pseudodictamnus</i>	Acetoside, forsythoside B, (E)-caffeoylmalic acid	[109]
<i>B. undulata</i>	Forsythoside B, lysionotoside, acetoside, betonyoside F	[98]

جدول-21- مركبات البولي- فينول المفصولة من نباتات الصنف *Ballota*

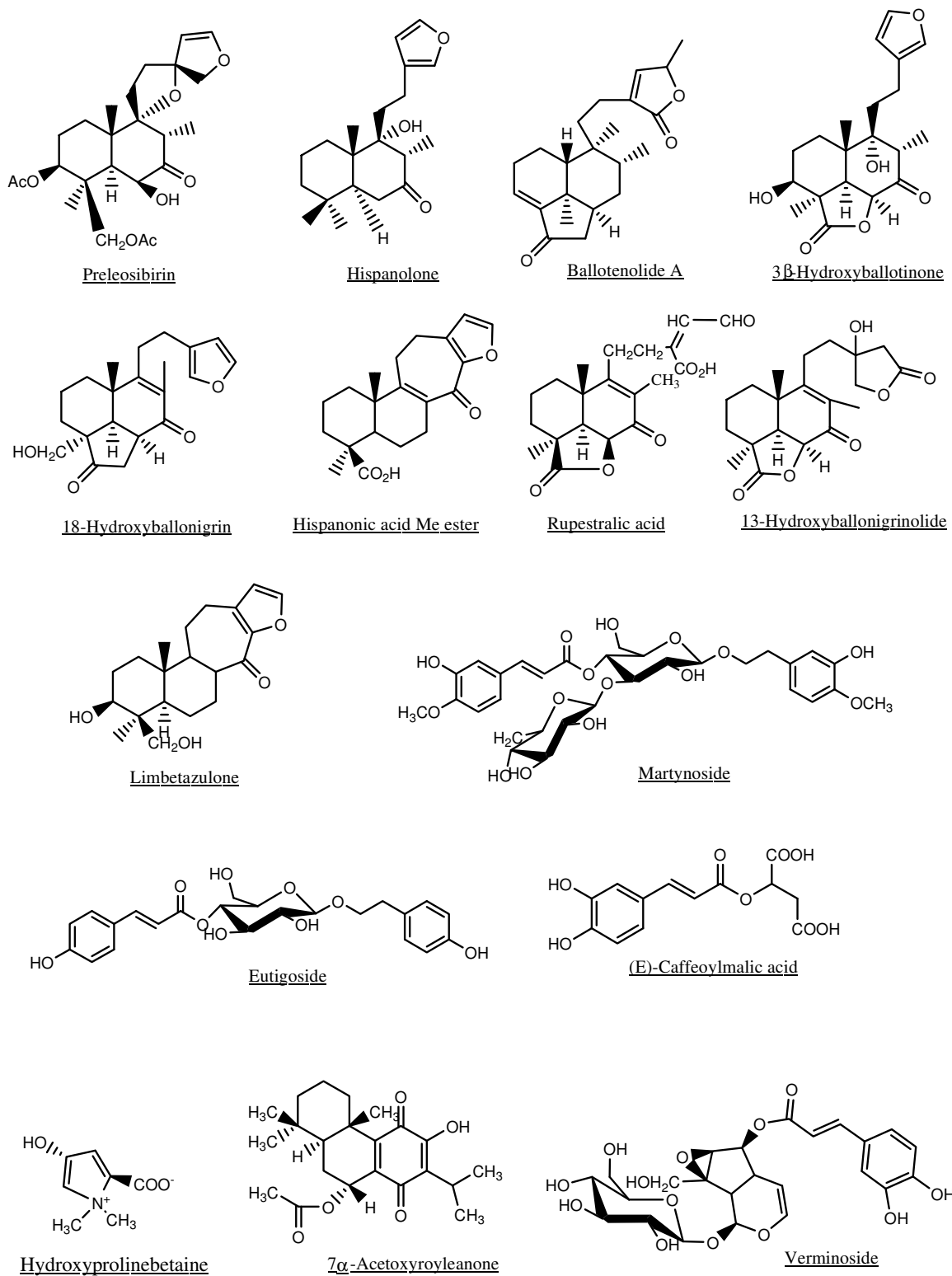


شكل -29- الصيغ الكيميائية لبعض فلافونيدات نباتات الصنف *Ballota*

النبات	المركبات المفصولة	المرجع
<u>Diterpenes:</u>		
<i>B. acetobulosa</i>	18-Hydroxyballonigrolide	[121]
<i>B. andreuzziana</i>	Hispanolone	[115]
<i>B. aucheri</i>	Perisianone	[122]
	Ballonigrin, ballotinone, balloaucherolide, secolabdane, 14-dien-6-one, 7 β -hydroxy-9 β ,13,15, 16-bis-epoxilabd-14-en-6-one, 6 β -hydroxy-15-methoxy-9 α ,13,15, 16-bis-epoxilabdan-7-one, 15-epi-6 β -hydroxy-15-methoxy-9 α ,13,15,16-bis-epoxilabdan-7-one, 6 β -hydroxy-15-ethoxy-9 α ,13,15, 16-biepoxi-labdan-7-one, 6 β -hydroxy-15,16-epoxy-labda-8,13(16), 14-trien-7-one	[123]
<i>B. hispanica</i>	Hispanolone	[124]
	Hespaninic acid, hispanonic acid	[125]
	Hespanonic acid methyl ester	[126]
<i>B. inaequidens</i>	Hispanolone, ballonigrine	[101]
<i>B. lanata</i>	Ballonigrin, 13-hydroxyballonigrolide	[127]
<i>B. larendana</i>	Ballonigrin, dihydrohispanolene	[128]
<i>B. limbata</i>	Ballotenolide A, limbatenolide A-C	[103]
	Limbetazulon	[129]
	Ballotenic acid, ballodiolic acid	[104]
<i>B. nigra</i>	Ballotinone	[130]
	Ballonigrin, 7 α -acetoxymarrubiin, ballotenol	[131]
	Ballotenol	[132]
	Preleosibirin	[133]
	13-Hydroxyballonigrolide	[134]
<i>B. pseudodictamnus</i>	Ballonigrin, 18-hydroxyballonigrin, marrubenol	[115]
	Hispanolone, dihydrohispanolone	[128]
<i>B. rupestris</i>	Ballonigrin, ballonigrinone	[131]
	Rupestralic acid	[135]
<i>B. saxatilis</i>	18-Hydroxyballonigrin	[114]
	Hispanolone, dehydrohespanolone, ballonigrin	[102]
<i>B. undulata</i>	3 β -Hydoxyballotinone, ballotinone, ballonigrin, ballonigrinone	[108]
<u>Volatile oils, phenolic acids, betaines, iridoide:</u>		
<i>B. aucheri</i>	α -Cadinol, dehydroaromadendrane	[137]
<i>B. nigra</i>	Chlorogenic, caffeic, oxalic, aconitic, citric, ascorbic, malic, quinic, shikimic and fumaric acids	[99]
<i>B. pseudodictamnus</i>	Caryophyllene oxide, phytol, γ -muurolene, α -copaene, β -caryophyllene, β -cubebene	[136]
<i>B. undulata</i>	Verminoside*, prolinebetaine**, hydroxyprolinebetaine**	[98]

*iridoide, ** betaine

جدول-22- يشمل التربينات الثنائية و مركبات أخرى مفصولة من نباتات الصنف *Ballota*

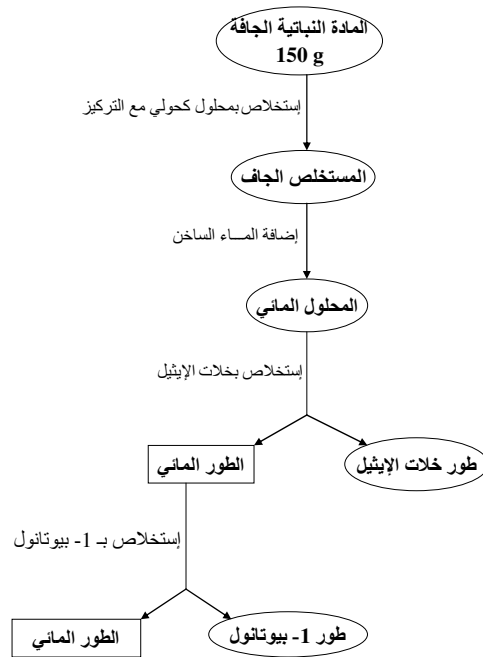


شكل -30- الصيغ الكيميائية لبعض المركبات المفصولة من نباتات الصنف *Ballota*

3-4-3- الدراسة الكيميائية لنبات *Ballota hirsuta*:

تم قطف النبات من منطقة الهقار بالجنوب الجزائري بعد تجفيف النبات كان وزن المادة النباتية الجافة حوالي (150g)، تم استخلاصها بمحلول ميثانولي (3/7) عدة مرات، في كل مرة يتم تبخير المذيب، المستخلص الكحولي الجاف يضاف له الماء الساخن (200ml) ويترك لمدة ليلة في مكان بارد بعدها يرشح و تحتفظ بالرشاحة (شكل-31).

هذه الأخيرة تم استخلاصها بمذيبي خللات الإيثيل لمرتين و بمذيب 1- بيوتانول لثلاث مرات و بسبب التشابه في المحتوى الفلافونيدي للمستخلصين بعد اختبارات كروماتوغرافية فقد تم جمعهما معا (9g)، تلي ذلك عمليات فصل بداية بعمود كروماتوغرافي من (Polyamide SC6) و كجملعة مملصة ($H_2O \rightarrow MeOH$)، حيث بدأنا عملية التمليص بالماء المقطر و الذي نغذيه بالميتانول تدريجيا حتى الوصول إلى الميتانول الصافي، فحصلنا على 21 كسر و بعد اختبارات كروماتوغرافية تم اختزالها إلى تسعة كسور فقط.

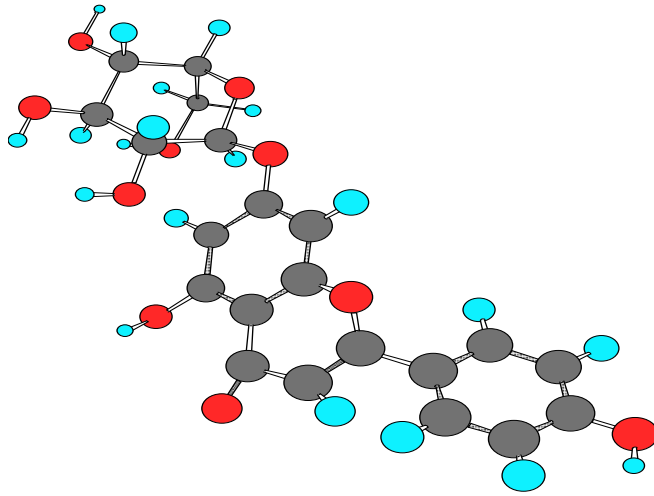


شكل-31- مخطط الاستخلاص لنبات *Ballota hirsuta*

باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية و بالخصوص كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC ، كروماتوغرافيا العمود باستخدام مادة Silica gel كمادة دامصة، تم فصل سبعة مركبات تمت تنقيتها باستخدام عمود من Sephadex LH20 أو بإعادة بلورتها في المذيب المناسب و المركبات التي تم التعرف عليها هي:

Apigenin 7-*O*- β -glucoside (**B1**), apigenin 7-*O*- β -(6''-*O*-*E-p*-coumaroyl)-glucoside (**B2**), apigenin 7-*O*- β -(3''-*O*-*E-p*-coumaroyl)-glucoside (**B3**), apigenin 7-*O*- β -(3'', 6''-*O*-di-*E-p*-coumaroyl)-glucoside (**B4**), chrysoeriol 7-*O*- β -glucoside (**B5**), apigenin 6,8-di-*C*-glucoside (vicenin-2) (**B6**), luteolin 7-*O*- β -glucoside (**B7**).

الفصل الرابع



النتائج و المناقشات

مقدمة:

اعتمدنا في التعرف على المركبات الكيميائية المفصولة من مختلف النباتات على تحديد قيم ثابت الانحباس R_f و لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية و على نتائج التمييه الحمضي ثم تحليل أطياف الأشعة فوق البنفسجية في الميثانول و مع كواشف معينة، تحليل أطياف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ($^1\text{H-NMR}$)، أطياف الرنين النووي المغناطيسي للكربون ($^{13}\text{C-NMR}$)، أطياف تجارب الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد (COSY، HMBC، HMQC) و أخيرا أطياف الكتلة (MS) مع مقارنة النتائج المحصل عليها مع مراجع ذات مصداقية.

استعملنا في قياس ثابت الانحباس العديد من جمل المذيبات المدونة بالجدول-23- و ذلك حسب طبيعة المركب و توفر الإمكانيات كما تم تحديد ألوان المركبات تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 365nm كما تم قياس نقطة الانصهار (m.p.) لبعض المركبات. أخيرا و نظرا لتشابه بعض المركبات المفصولة من هذه الأنواع المدروسة (خصوصا مع *Marrubium deserti* و *Ballota hirsuta*) فإننا سنعرض النتائج مرة واحدة فقط إلا عند الضرورة.

الجملة المملصة	المذيبات المكونة لها	الطور الثابت
BAW*	1-Butanol (4)/ acetic acid (1)/ H ₂ O (5)	Celulose
HOAc15%	HOAc (15)/ H ₂ O (85)	//
HOAc50%	HOAc (50)/ H ₂ O (50)	//
13/3/3/1	H ₂ O (13) / MeOH (3)/ methylethylcetone (3)/ acetylacetone (1)	Polyamide
4/3/3	Toluene(4) / MeOH(3) / methylethylcetone(3)	//
EtOAc	Ethylacetate	Silica gel
D3M1	CH ₂ Cl ₂ (3)/ MeOH (1)	//
D5M1	CH ₂ Cl ₂ (5)/ MeOH (1)	//
D6M1	CH ₂ Cl ₂ (6)/ MeOH (1)	//
D9M1	CH ₂ Cl ₂ (9)/ MeOH (1)	//
D15M1	CH ₂ Cl ₂ (15)/ MeOH (1)	//

* الطور العضوي منه

جدول-23- يشمل الجمل المملصة التي تم استعمالها لتحديد قيم ثابت الانحباس R_f

1-4- المركبات المفصولة من نبات *Pituranthos chloranthus*:

تم التعرف على ستة مركبات طبيعية في هذا النبات كلها جديدة بالنسبة للنوع و أربعة منها **P6, P5, P4, P3** تفصل لأول مرة من الصنف *Pituranthos* و ربما بعض منها من العائلة و الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية و كذا البنية الكيميائية للمركبات التي تم التعرف عليها هي:

1-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب **P1**:

Isorhamnetin 3-O-β-glucoside

1) **m.p.** 184-186 C°

2) **Colour under UV:** Dark purple (on cellulose-tlc) بنفسجي مسود

3) **R_f:** 0.74(D3M1), 0.40 (BAW), 0.36 (HOAc15%)

4) **UV-Visible:**

MeOH 356 300sh 267sh 254, +NaOH 412 328 271, +AlCl₃ 398sh 358 298 267,
+HCl 398 358 298 267, +NaOAc 378 321 274, +H₃BO₃ 358 305sh 267sh 255

5) **¹H-NMR** (CD₃OD, 400MHz, δ, ppm):

7.94 (1H, d, J=2Hz, H2'), 7.59 (1H, dd, J=8.5, 2Hz, H6'), 6.91 (1H, d, J=8.5Hz, H5'), 6.40 (1H, d, J=2Hz, H8), 6.20 (1H, d, J=2Hz, H6), 5.41 (1H, d, J=7.5Hz, H1''), 3.95 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.75 (1H, dd, J=12, 2.3Hz, H6''a), 3.57 (1H, dd, J=12, 5.6Hz, H6''b), 3.50-3.22 (H2'', H3'', H4'', H5'')

6) **¹³C-NMR, DEPT135** (CD₃OD, 100MHz, δ, ppm):

178.01 (Cq, C4), 164.58 (Cq, C7), 161.65 (Cq, C5), 157.24 (Cq, C9)*, 157.04 (Cq, C2)*, 149.43 (Cq, C3'), 146.98 (Cq, C4'), 133.93 (Cq, C3), 122.42 (CH, C6'), 121.68 (Cq, C1'), 114.58 (CH, C5'), 112.98 (CH, C2'), 104.36 (Cq, C10) 102.27 (CH, C1''), 98.48 (CH, C6), 93.35 (CH, C8), 77.12 (CH, C5''), 76.67 (CH, C3''), 74.53 (CH, C2''), 70.10 (CH, C4''), 61.16 (CH₂, C6''), 55.37 (CH₃, 3'-OCH₃)

7) **M.S-ESI⁺** (m/z):

501.17 [M+Na]⁺, 479.18 [MH]⁺, 317.11 [MH-glucose]⁺

* ذرات كربون يمكن أن تحل مكان بعضها البعض

2-1-4- التعيين البنوي للمركب **P1**:

قيمة متوسطة لـ R_f للمركب مع الجملة HOAc15% تدل على أنه جليكوزيد، التمييه الحمضي حرر سكر الجليكوز و مركب isorhamnetin بلون أصفر تحت الأشعة فوق البنفسجية (على طور ثابت من السيليلوز)

بعدها كان لون المركب الأصلي بنفسجي مسود يؤكد ارتباط السكر بهيدروكسيل الموضع 3، طيف الأشعة فوق البنفسجية (شكل-32) للمركب في الميتانول أعطى قيمة للعصابة I عند 356nm مما يؤكد مرة أخرى على أن المركب هو فلافونول مستبدل بالموضع 3 (Flavonol 3-OR)، وجود انثناء عند 267nm بجانب العصابة II يدل على أن الحلقة B ثنائية الاستبدال على الأقل و ظهور إزاحة باثو كرومية للعصابة I مع زيادة في الشدة الضوئية بعد إضافة NaOH يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4.

ظهور قمة جديدة عند 328nm بعد إضافة NaOH و حدوث إزاحة باثو كرومية للعصابة II بعد إضافة NaOAc بمقدار 20nm مقارنة بقيمتها في الميتانول يدلان على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7 بينما الإزاحة الباثو كرومية الناتجة بعد إضافة (AlCl₃ + HCl) مقارنة بطيف المركب في الميتانول دليل وجود هيدروكسيل في الموقع 5.

من جهة أخرى نلاحظ غياب إزاحة هيسوكرومية عند مقارنة طيفي المركب مع (AlCl₃) و (AlCl₃ + HCl) و كذا غياب إزاحة باثو كرومية عند مقارنة طيف المركب مع (NaOAc + H₃BO₃) بطيفه في الميتانول مما يدل على غياب نظام أورثو- ثنائي الهيدروكسيل بالمركب.

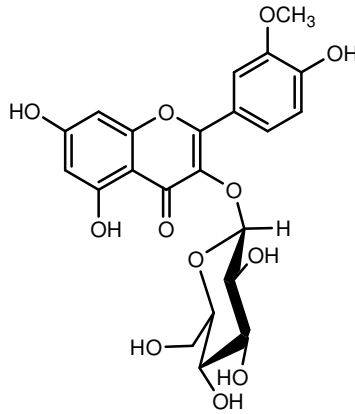
أظهر طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون في الشكل-33 وجود حلقة B ثنائية الاستبدال حيث أعطى إشارة ثنائية (J=2Hz) عند 7.94ppm موافقة لـ H₂'، إشارة ثنائية- ثنائية (J=8.5, 2Hz) عند 7.59ppm موافقة لـ H₆'، إشارة ثنائية (J=8.5Hz) عند 6.91ppm موافقة لـ H₅'.

عدم تداخل إشارتي H₂' و H₆' يدل على وجود مجموعة ميتوكسيل في الموقع 3 هذه الأخيرة أعطت إشارة أحادية عند 3.95ppm و ظهر بروتوني الحلقة A كإشارتين ثنائيتين بثابت تزاوج (J=2Hz) عند 6.4ppm و 6.2ppm لكل من H₈ و H₆ على التوالي.

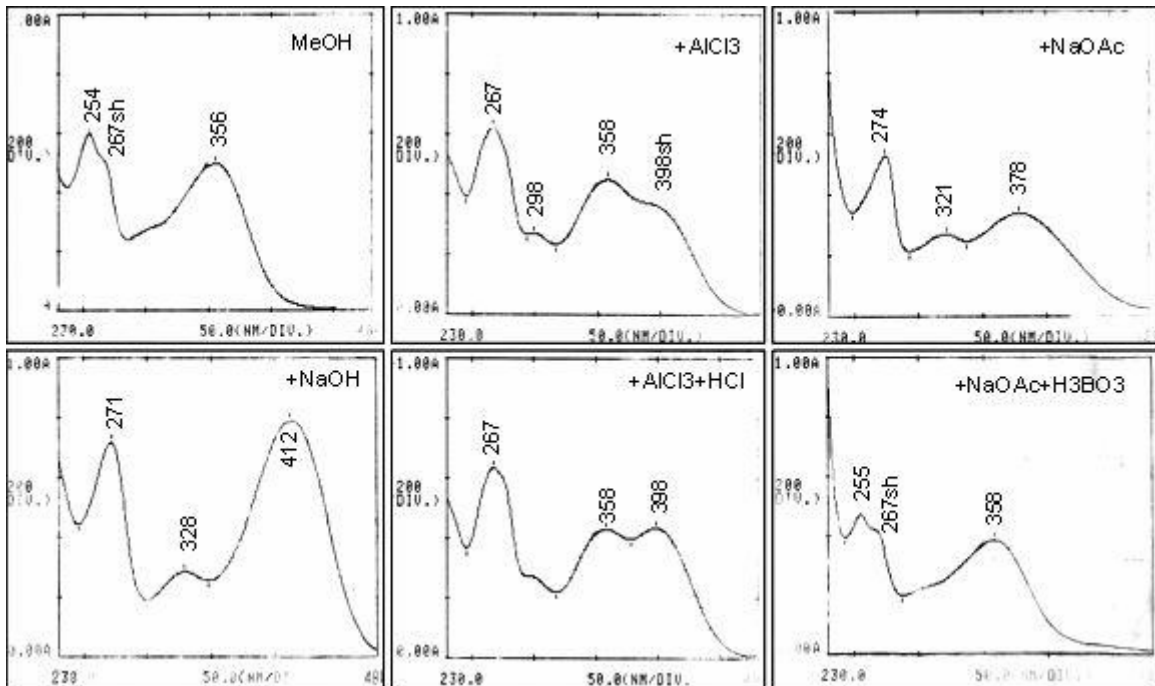
البروتون الأنوميري للجليكوز أعطى إشارة ثنائية عند 5.41ppm بثابت اقتران (J=7.5Hz) مما يدل على أن الرابطة بين السكر و الأجليكون هي رابطة β و ظهر H₆'a عند 3.75ppm بشكل إشارة ثنائية- ثنائية (J=12, 2.3Hz) بينما ظهر H₆'b عند 3.57ppm بشكل إشارة ثنائية- ثنائية (J=12, 5.6Hz).

طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون (شكل-34) و طيف DEPT135 للمركب (شكل-35) أكدت صيغة المركب عبر ظهور 22 قمة موافقة لـ 22 ذرة كربون و قد تم تحديد انزياحاتها بمقارنة هذه النتائج مع المراجع [138].

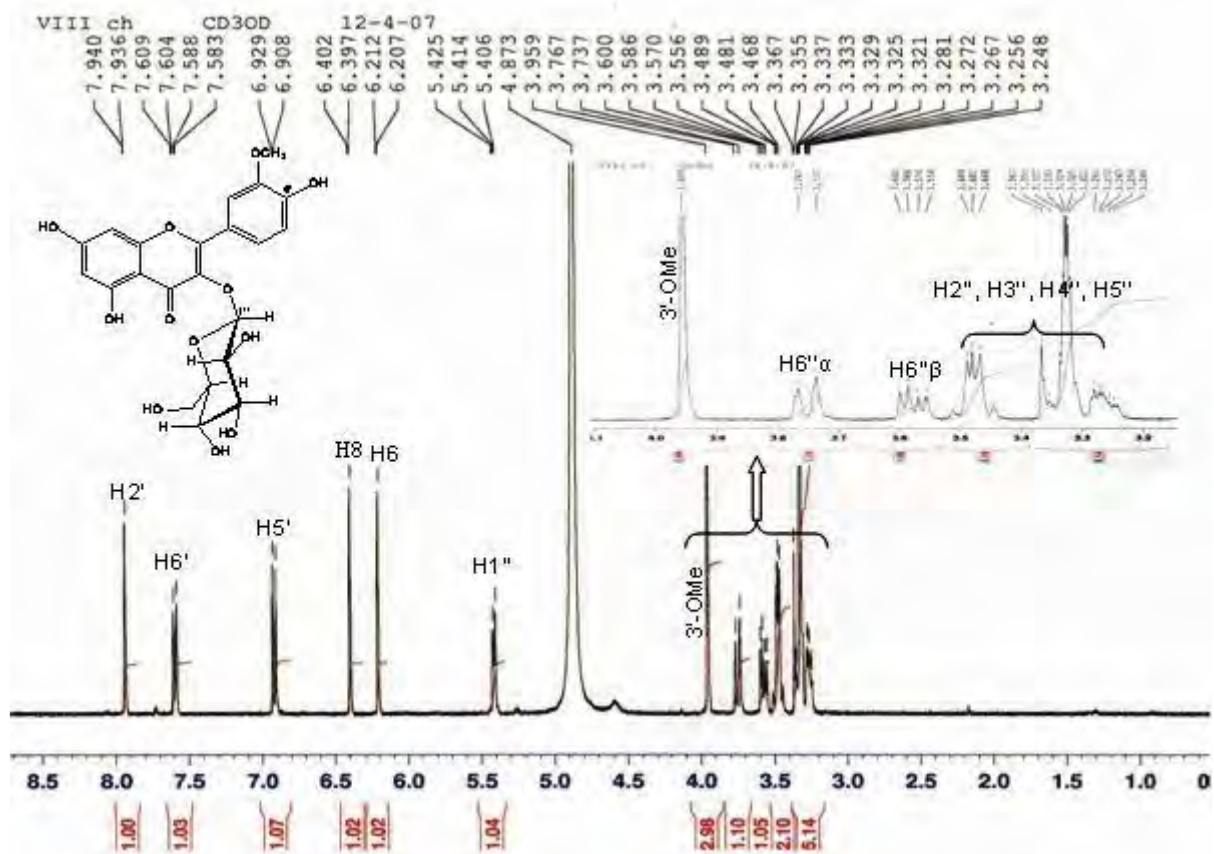
أخيرا من جهته طيف الكتلة SM-ESI⁺ أعطى قما شبه جزيئية عند m/z=501 موافقة لـ [M+Na]⁺ و أخرى عند m/z=479 موافقة لـ [MH]⁺ و موافقتين لصيغة بمحملة C₂₂H₂₂O₁₂ و كذلك قمة تشظية عند m/z=317 موافقة لـ [MH-glucose]⁺ (شكل-36)، جميع هذه النتائج تؤكد أن المركب P1 هو:



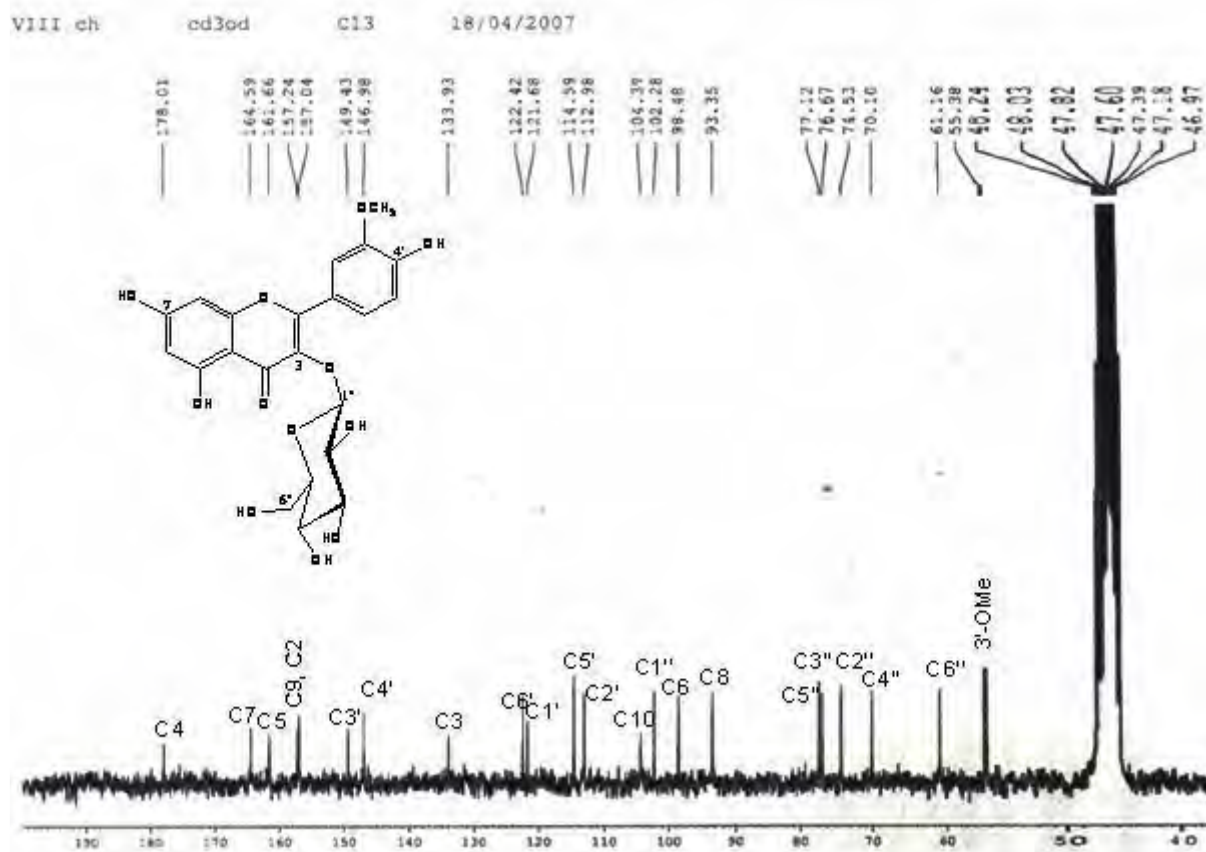
Isorhamnetin 3-O-β-glucoside



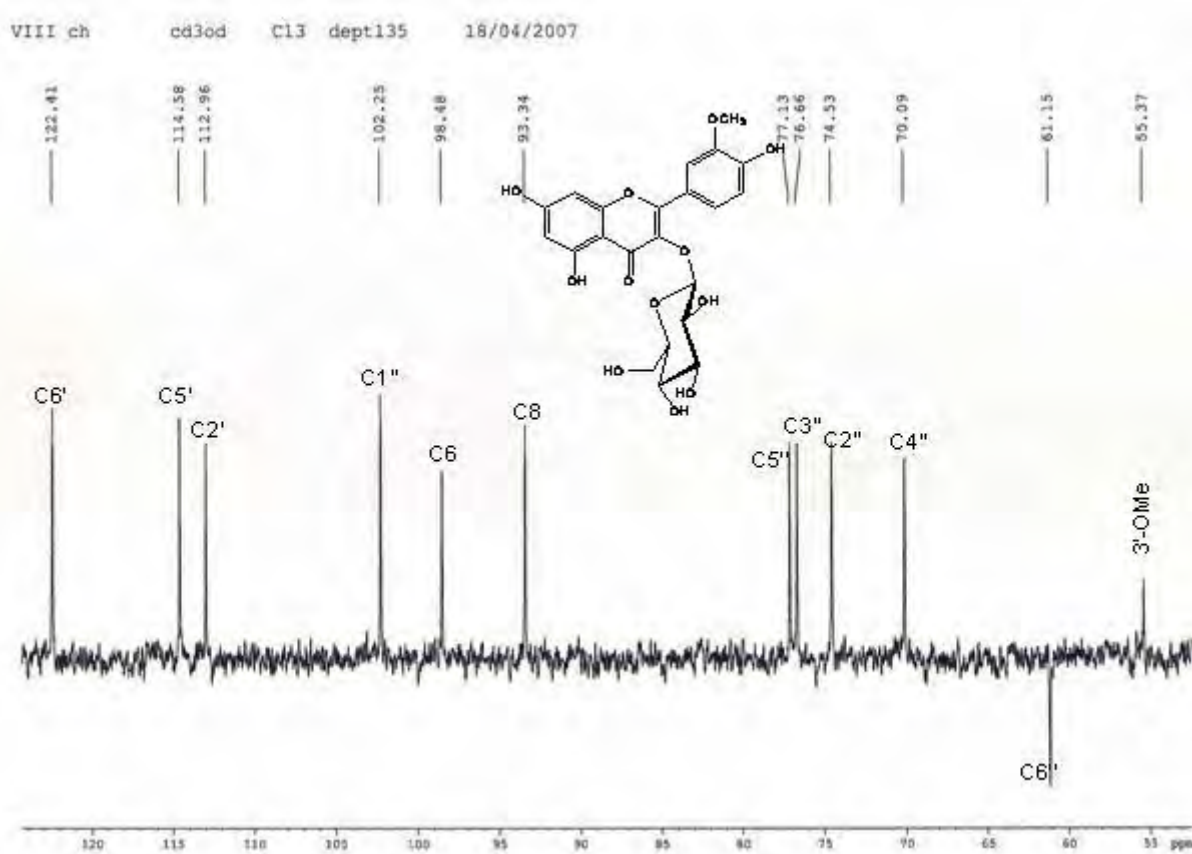
شكل-32- السلسلة الطيفية UV للمركب P1



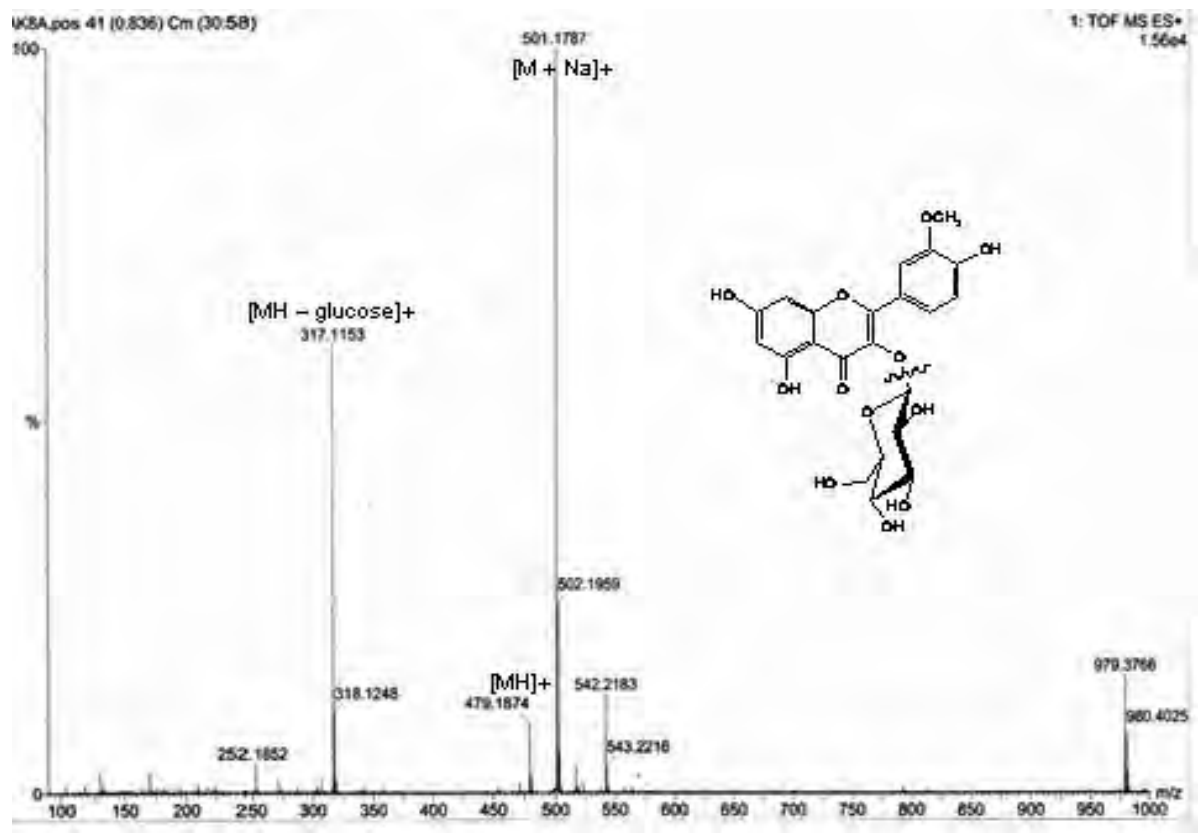
شكل-33- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب P1 (CD_3OD , 400MHz)



شكل-34- طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب P1 (CD_3OD , 100MHz)



شكل-35- طيف تجربة DEPT 135 للمركب P1



شكل-36- طيف الكتلة MS-ESI+ للمركب P1

3-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P2:

Isorhamnetin 3-O-rutinoside

1) **Colour under UV** : Dark purple (on cellulose-tlc) بنفسجي مسود

2) **R_f**: 0.30 (D3M1), 0.35 (BAW), 0.55 (HOAc15%)

3) **UV-Visible** :

MeOH 357 300sh 267sh 254, +NaOH 415 329 271, +AlCl₃ 398sh 361 300 267,
+HCl 398 359 300sh 267, +NaOAc 384 320 274, +H₃BO₃ 359 304sh 267sh 255.

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 400MHz, δ, ppm):

7.96 (1H, d, J=2Hz, H2'), 7.65 (1H, dd, J=8.4, 2Hz, H6'), 6.94 (1H, d, J=8.4Hz, H5'),
6.37 (1H, d, J=2Hz, H8), 6.18 (1H, d, J=2Hz, H6), 5.19 (1H, d, J=7.6Hz, H1''), 4.54 (1H,
d, J=1.2Hz, H1'''), 3.95 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.83 (1H, d, J=10.4Hz, H6''a), 3.64 (1H, dd,
J=3.2, 1.6Hz, H2'''), 3.50 (1H, dd, J=10.4, 3.6Hz, H6''b), 3.23-3.50 (H2'', H3'', H4'',
H5'', H3''', H4''', H5'''), 1.12 (3H, d, J=6Hz, H6''').

5) **¹³C-NMR** (CD₃OD, 100MHz, δ, ppm):

178.20 (C4), 165.0 (C7), 162.05 (C5), 157.30 (C2)*, 157.04 (C9)*, 149.40 (C3'), 146.97
(C4'), 133.75 (C3), 122.59 (C6'), 121.54 (C1'), 114.75 (C5'), 113.11 (C2'), 103.26(C1'',
C10) 101.13 (C1'''), 98.50 (C6), 93.25 (C8), 76.79 (C5'')†, 75.93 (C3'')†, 74.47 (C2''),
72.44 (C2'''), 70.85 (C4'')‡, 70.67 (C3''')‡, 70.19 (C4''')‡, 68.39 (C5'''), 67.17 (C6''),
55.35 (3'-OCH₃), 16.49 (C6''')

6) **MS-ESI⁺(m/z)**:

647.16 [M+Na]⁺

* أو † أو ‡ تعني أن ذرات الكربون المؤشر عليها بنفس الرمز يمكن أن تحل بعضها مكان بعض

4-1-4- التعيين البنوي للمركب P2:

بتحليل مماثل للمركب السابق P1 بالنسبة لأطياف الأشعة فوق البنفسجية (شكل-37) نستخلص أن المركب هو فلافونول مستبدل بالموضع 3 (Flavonol-3-OR) مع وجود هيدروكسيلاات حرة في المواضع 5، 7، 4' بينما هيدروكسيل الموضع 3' مستبدل.

أما قيمة R_f للمركب مع HOAc15% فتدل على أنه جليكوزيد متعدد السكر و التمييز الحمضي حرر لنا سكري الجليكوز و الراموز إضافة إلى مركب isorhamnetin.

طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ¹H-NMR للمركب (شكل-38 و 39) أظهر التشابه الكلي بين هذا المركب و المركب P1 في الجزء الأجليكوني منهما و يتجلى الاختلاف في الجزء السكري حيث نلاحظ وجود

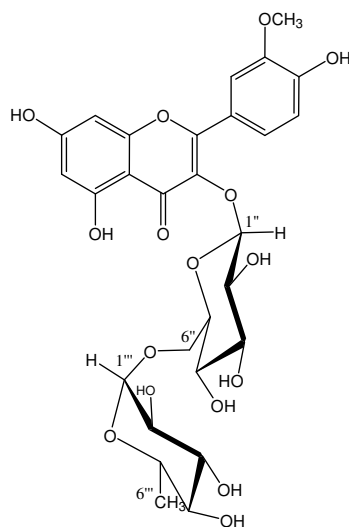
إشارتين لبروتونين أنوميريين، الأولى لسكر الجليكوز عند 5.26ppm بثابت اقتران ($J=7.5\text{Hz}$) يدل على أنه مرتبط بالأجليكون برابطة β و الثانية لسكر الرامنوز عند 4.54ppm بثابت اقتران ($J=1.2\text{Hz}$) يدل على أن الرابطة بين هذا الأخير و الجليكوز هي رابطة α و ظهر مثل الرامنوز بإشارة ثنائية ($J=6\text{Hz}$) عند 1.12ppm. ظهور إشارة $H1''''$ عند 4.54ppm و إشارة $H6''''$ عند 1.12ppm يؤكد أن الرابطة بين الرامنوز و الجليكوز [139] هي (1→6) ببقية إشارات بروتونات الجليكوز و الرامنوز تركزت في المنطقة [3.2-3.8].

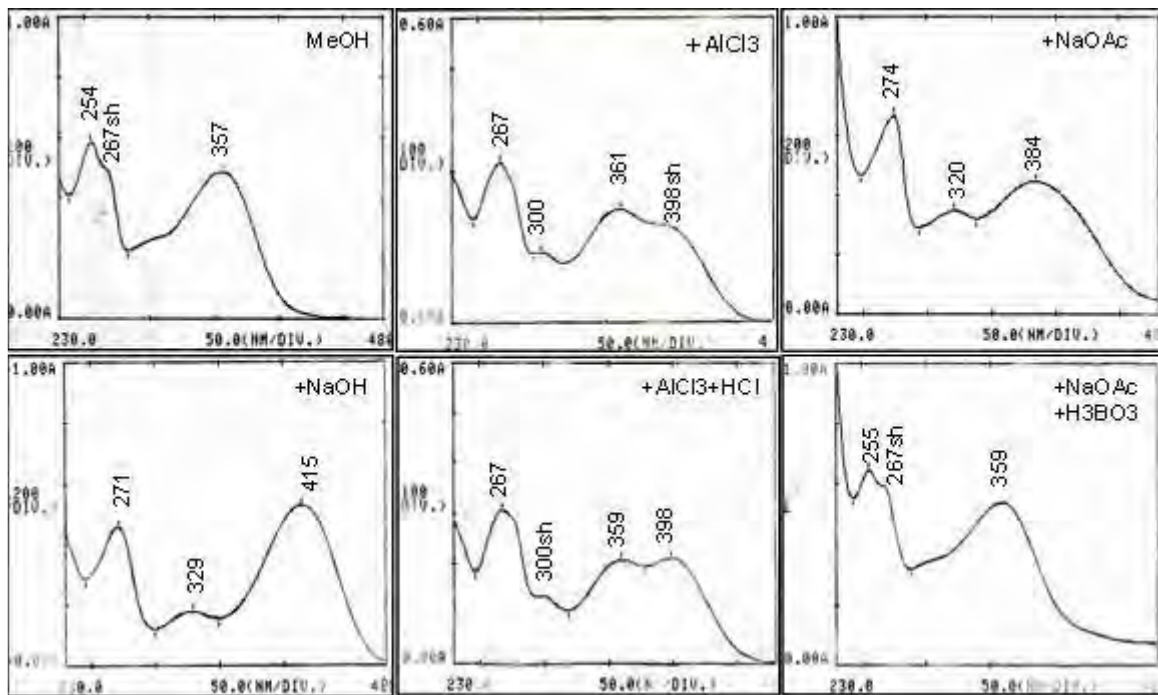
طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب أكد صيغة الجزء الأجليكوني من المركب أيضا كما أكد وجود سكري الجليكوز و الرامنوز من خلال الإشارات المميزة لهما و نلاحظ في قيم هذا الطيف انزياح إشارة كربون $C6''$ إلى مجال أخفض 67.17ppm (مقارنة بقيمتها مع المركب P1) مما يؤكد ارتباط سكر الرامنوز بهيدروكسيل هذا الموضع أي أن الجزء السكري من المركب هو rutinoyl.

طيف الكتلة MS-ESI^+ أعطى قمة شبه جزئية عند $m/z=647$ موافقة لـ $[M+\text{Na}]^+$ (شكل-40) و موافقة لصيغة مجملة $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ و مؤكدة أن المركب P2 هو:

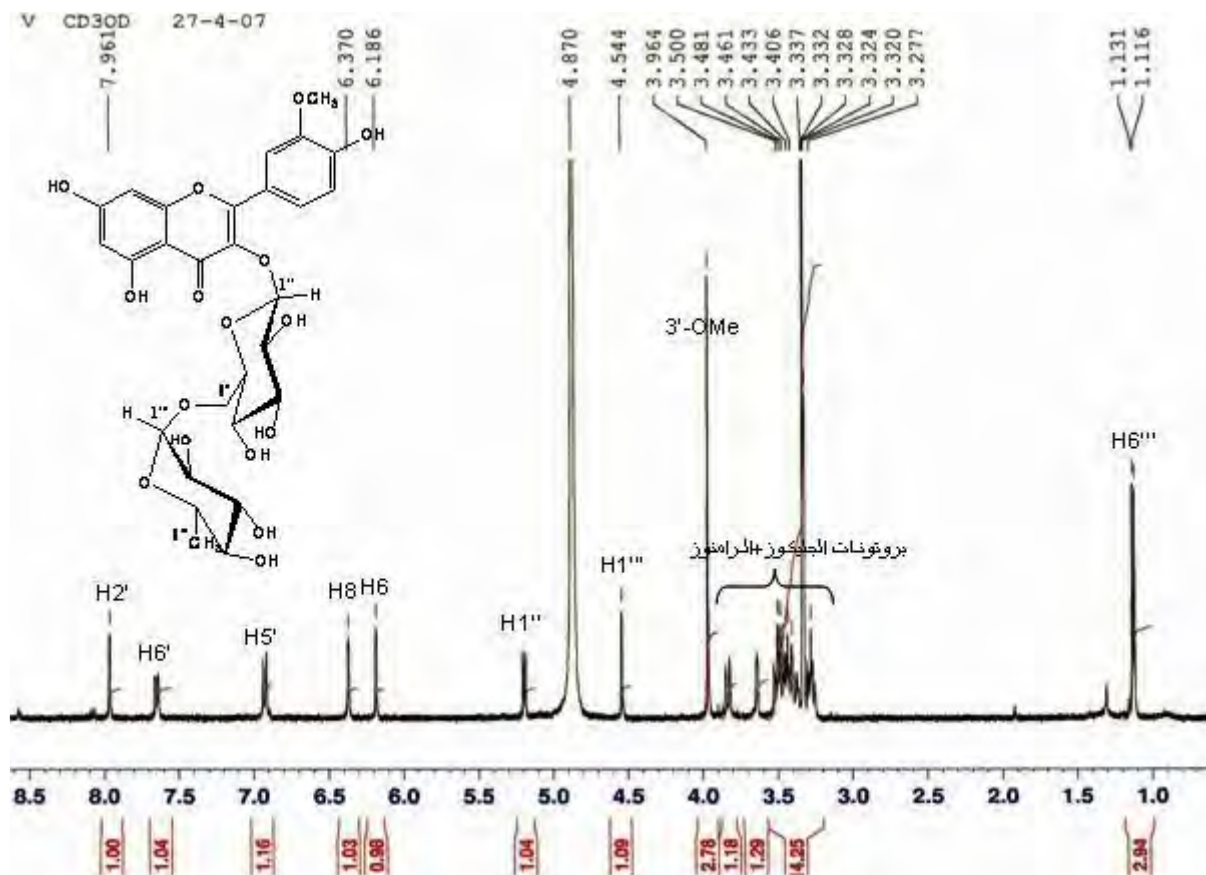
Isorhamnetin 3-O-(6''-O- α -rhamnosyl)- β -glucoside

(Isorhamnetin 3-O-rutinoside)

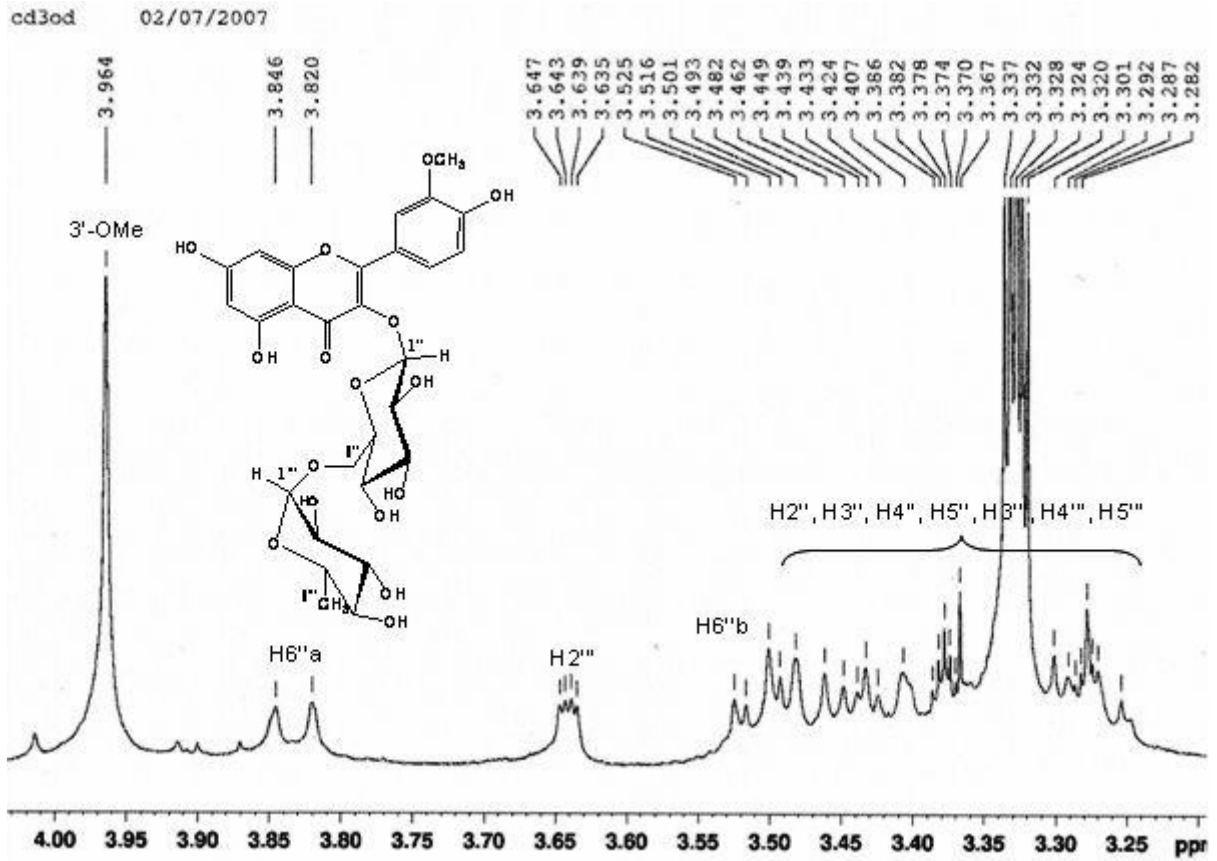




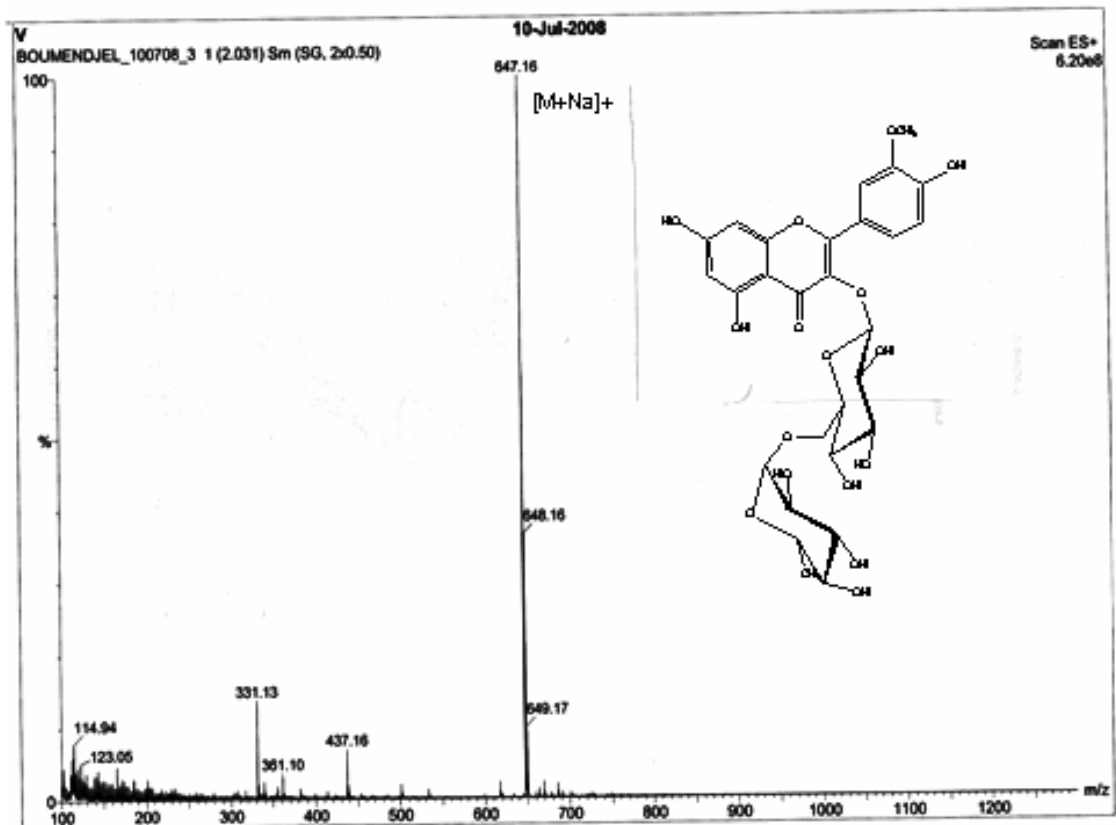
شكل-37- السلسلة الطيفية UV للمركب P2



شكل-38- طيف ¹H-NMR للمركب P2 (CD₃OD, 400MHz)



شكل-39- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب P2 في المنطقة (3-4 ppm)



شكل-40- طيف الكتلة MS-ESI⁺ للمركب P2

5-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P3:

Tamarixetin 3-O-β-glucoside

1) **Colour under UV** : Dark purple (on cellulose-tlc) بنفسجي مسود

2) **R_f**: 0.76 (D3M1), 0.25 (BAW), 0.32 (HOAc15%)

3) **UV-Visible**:

MeOH 349 267sh 255, +NaOH 391* 315sh 272, +AlCl₃ 395sh 356 300sh 267, +HCl 396
355 300sh 268, +NaOAc 369 322 274, +H₃BO₃ 355 267sh 256

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 250MHz, δ, ppm):

7.71 (2H, m, H2', H6'), 7.06 (1H, d, J=9.1Hz, H5'), 6.25 (1H, d, J=1.9Hz, H8), 6.10 (1H,
d, J=1.9Hz, H6), 5.16 (1H, d, J=7.2Hz, H1''), 3.95 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.25-3.80 (H2'',
H3'', H4'', H5'', H6'')

5) **M.S-ESI⁺** (m/z):

501.15 [M+Na]⁺, 338.37 [M+Na-glucose]⁺

* مع نقصان في الشدة الضوئية للعصابة I

6-1-4- التحين البنوي للمركب P3:

قيمة R_f للمركب مع الحملة HOAc15% تدل على أنه جليكوزيد، التمييه الحمضي أعطى سكر الجليكوز، طيف الأشعة فوق البنفسجية (شكل-41) للمركب في الميتانول أعطى قيمة للعصابة I عند 349nm مما يدل على أن المركب هو إما فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3.

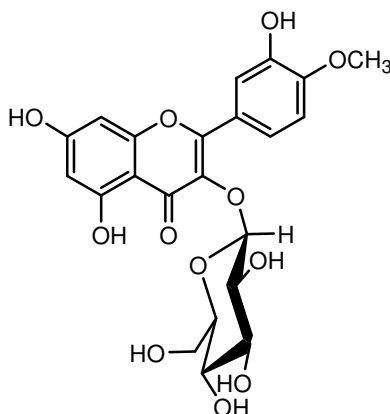
وجود اثناء عند (267sh) بجانب العصابة II يدل على أن الحلقة B ثنائية الاستبدال و ظهور إزاحة باثو كرومية للعصابة I مع نقصان في الشدة الضوئية بعد إضافة NaOH يؤكد عدم وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4، حدوث إزاحة باثو كرومية للعصابة II بعد إضافة NaOAc بمقدار 20nm مع وجود اثناء عند 312nm في طيف المركب مع NaOH يدلان على وجود هيدروكسيل حر في الموقع 7، وجود إزاحة باثو كرومية للعصابة I عند مقارنة طيف المركب في وجود (AlCl₃ + HCl) مع طيفه في الميتانول يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموقع 5.

غياب إزاحة هيسوكرومية عند مقارنة طيفي المركب مع (AlCl₃) و (AlCl₃ + HCl) من جهة و غياب انزياح باثو كرومي عند مقارنة طيف المركب مع (NaOAc + H₃BO₃) بطيفه في الميتانول من جهة أخرى يدل على غياب مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل في المركب.

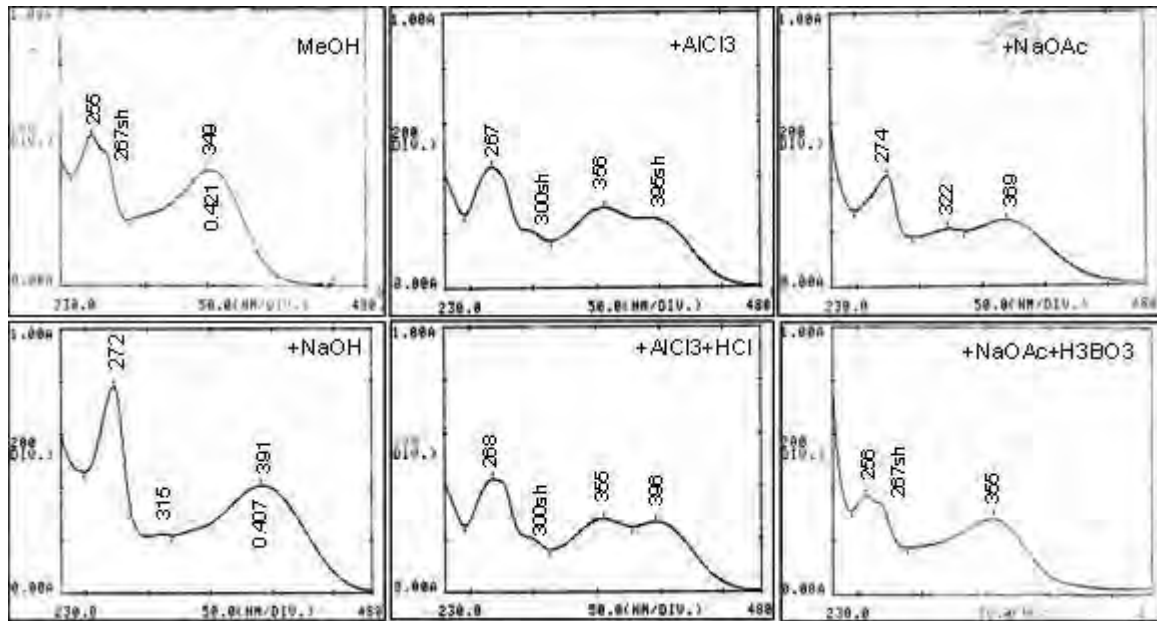
طيف $^1\text{H-NMR}$ المنجز في مذيب CD_3OD (شكل-42) أظهر وجود حلقة B ثنائية الاستبدال حيث تداخلت إشارتي البروتونين $\text{H}2'$ و $\text{H}6'$ عند 7.71ppm مما يدل على وجود مجموعة ميتوكسيل في $4'$ ، حيث أن تداخلهما هو مؤشر على وجود إما مجموعتي هيدروكسيل في الموقعين $4'$ و $3'$ أو هيدروكسيل في الموقع $3'$ و ميتوكسيل في الموقع $4'$ و هو الأرجح حسب نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و التمييز الحمضي، ثم إشارة ثنائية ($J=9.1\text{Hz}$) موافقة لبروتون $\text{H}5'$ عند 7.06ppm، كما ظهر $\text{H}6$ و $\text{H}8$ كل واحد بشكل إشارة ثنائية ($J=1.9\text{Hz}$) عند 6.25ppm و 6.1ppm على التوالي و أعطت مجموعة الميتوكسيل في $4'$ إشارة أحادية عند 3.95ppm.

البروتون الأنوميري للجليكوز أعطى إشارة ثنائية ($J=7.2\text{Hz}$) عند 5.16ppm مؤكدة وجود رابطة من النوع β بين الجليكوز و الأجليكون بينما تركزت بقية إشارات بروتونات سكر الجليكوز في المجال [3.80-3.25ppm]. أخيراً طيف الكتلة (MS-ESI^+) للمركب أعطى قمة شبه جزيئية عند $m/z=501$ موافقة للأيون $[\text{M}+\text{Na}]^+$ مؤكدة أن المركب له الصيغة الجزيئية $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ (الشكل-43) و قمة تشظية عند $m/z=338$ موافقة لـ $[\text{M}+\text{Na}-\text{glucose}]^+$ و بالتالي فإن المركب **P3** هو:

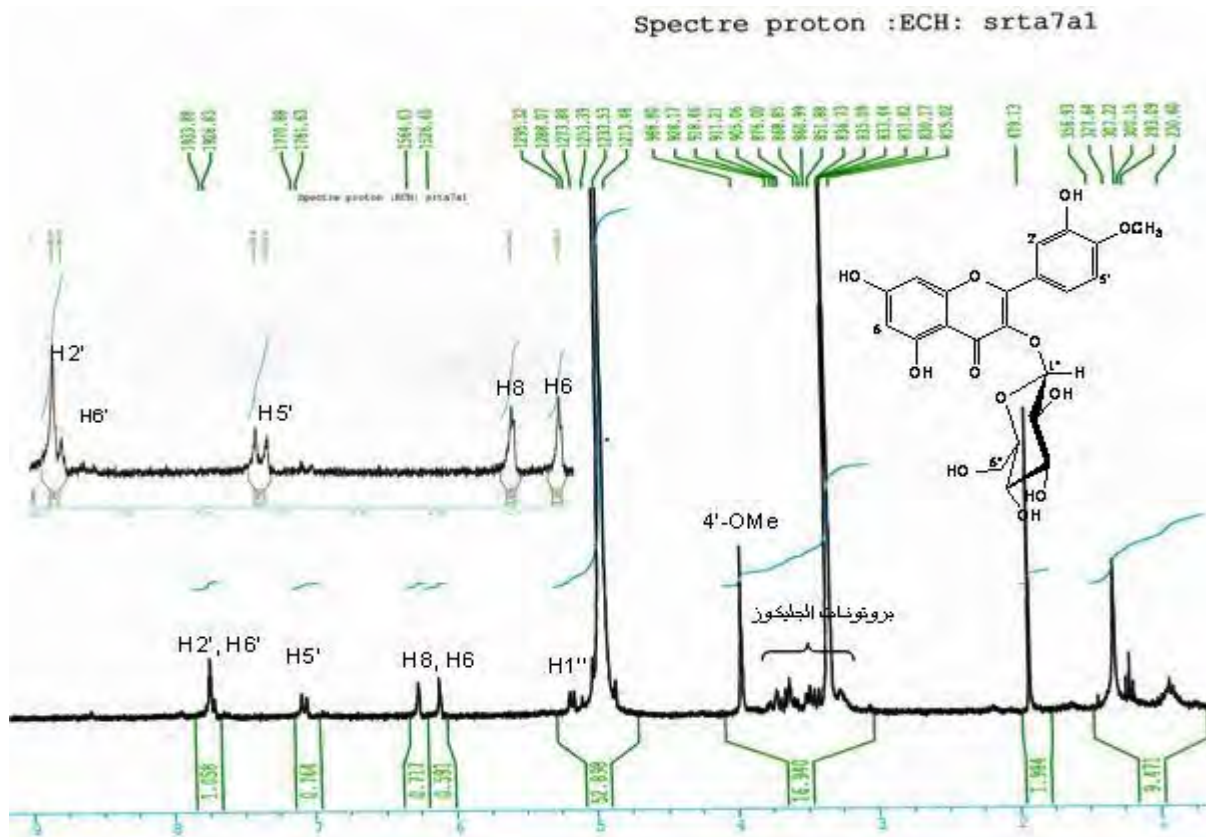
Tamarixetin 3-O- β -glucoside



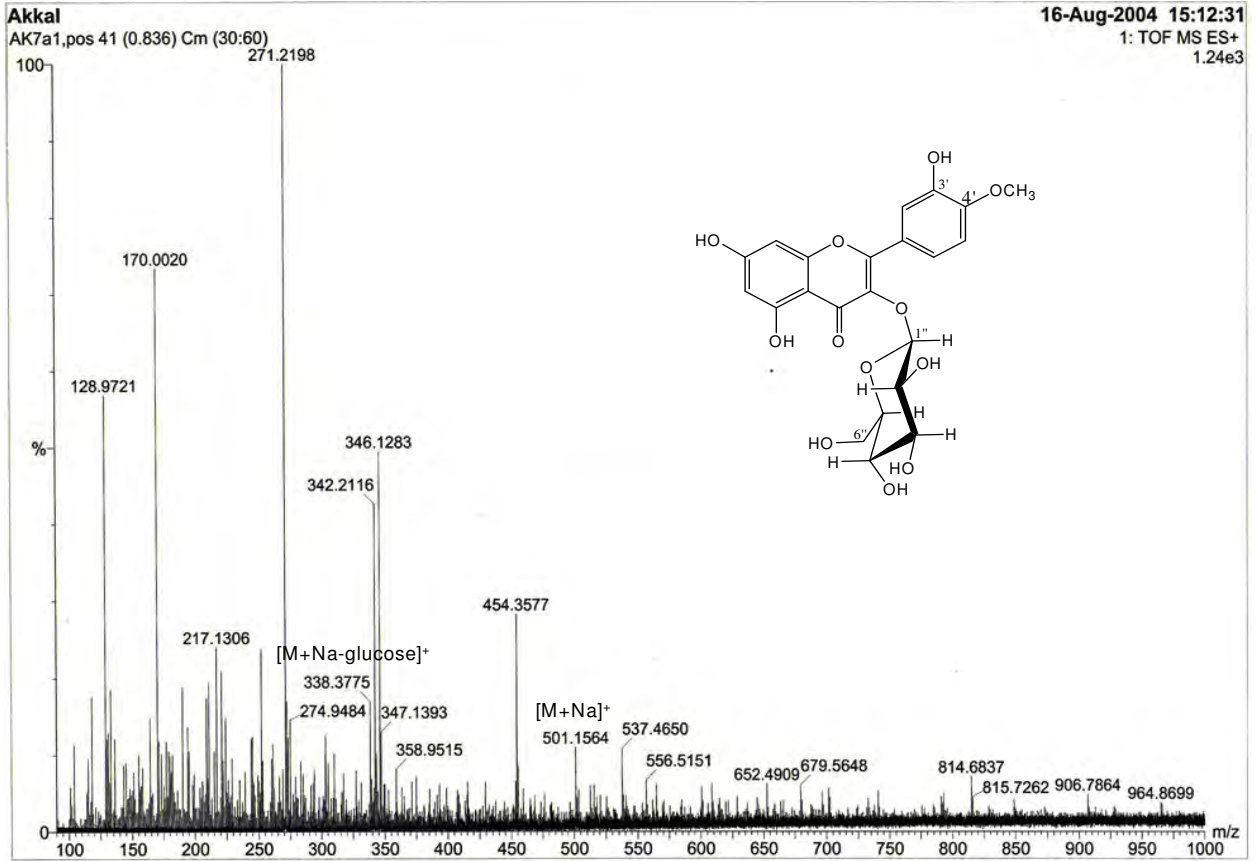
مع العلم أن المركب **P3** كان موجوداً بنسبة لا تتعدى 20% في خليط مع المركب **P1** و قد تم فصله بعد عدة عمليات تلميص باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) من Silica gel GF₂₅₄ مع الجاملة (D5M1) و حسب علمنا فهذه أول مرة يتم فصل هذا المركب من الجنس *Pituranthos*.



شكل-41- السلسلة الطيفية UV للمركب P3



شكل-42- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب P3 (CD_3OD , 250MHz)



شكل-43- طيف الكتلة MS-ESI⁺ للمركب P3

7-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P4:

Apigenin 6,8-di-C-β-glucoside

- 1) **Colour under UV** : Purple (on cellulose-tlc) بنفسجي
- 2) **R_f**: 0.04 (BAW), 0.02 (4/3/3), 0.06 (D3M1), 0.45 (HOAc15%), 0.67 (13/3/3/1)
- 3) **UV-Visible** :
MeOH 333 274, +NaOH 401 334 283, +AlCl₃ 392sh 342 305 277, +HCl 396sh 345 304
280, +NaOAc 400sh 383sh 347 308sh 280, +H₃BO₃ 400sh 383 347 308sh 276
- 4) **¹H-NMR** (DMSO-d₆, 250MHz, δ, ppm):
8.01 (2H, d, J=8.7Hz, H2', H6'), 6.91 (2H, d, J=8.6Hz, H3', H5'), 6.78 (1H, s, H3),
4.80 (1H, d, J=9.7Hz, H1''/ H1'''), 4.75 (1H, d, J=9.8Hz, H1'''/ H1''), 3.1-4.9 (12H,
glucoses)
- 5) **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 62.5MHz, δ, ppm):
182.72 (C4), 164.55 (C2), 161.42(C7), 161.0 (C4'), 158.0 (C5), 155.54 (C9), 129.46
(C2', C6'), 121.91 (C1'), 116.27 (C3', C5'), 107.58 (C6), 105.54 (C10), 104.30 (C8),
103.09 (C3), 60- 82 ppm (12 carbons of glucoses)
- 6) **M.S-ESI⁺(m/z)**:
617.24 [M+Na]⁺, 595.26 [MH]⁺, 271.22 [MH-2xglucose]⁺

8-1-4- التعيين النيوي للمركب P4:

قيمة مرتفعة لـ R_f للمركب في الحملتين (HOAc15%) و (13/3/3/1) تدل على أننا أمام جليكوزيد متعدد السكر، عدم حدوث تمييه حمضي يدل على أن المركب من النوع (C-glycoside) كما أن عدم تغير ثابت الانحباس للمركب قبل و بعد التمييه الحمضي مع الحملة (HOAc15%) يدل على أن المركب يحتوي على السكر نفسه في الموضعين 6 و 8.

طيف الكتلة (MS-ESI⁺) للمركب أعطى قما شبه جزئية عند $m/z=595$ موافقة لـ [MH]⁺ و أخرى عند $m/z=617$ موافقة لـ [M+Na]⁺ مؤكدين أن للمركب الصيغة الحملة C₂₇H₃₀O₁₅ إضافة إلى قمم تشظية أخرى منها قمة عند $m/z=271$ موافقة للجزء الأجليكوني من المركب (شكل-47).

طيف الأشعة فوق البنفسجية (شكل-44) للمركب في الميتانول أعطى عصابة امتصاص I عند 333nm تدل على أن الجزء الأجليكوني من المركب هو فلافون (Flavone).

حدوث إزاحة باثو كرومية مع زيادة في الشدة الضوئية للعصابة I بعد إضافة NaOH يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4' من جهة أخرى فإن ظهور قمة جديدة عند 334nm مع هذا المفاعل و كذا حدوث إزاحة

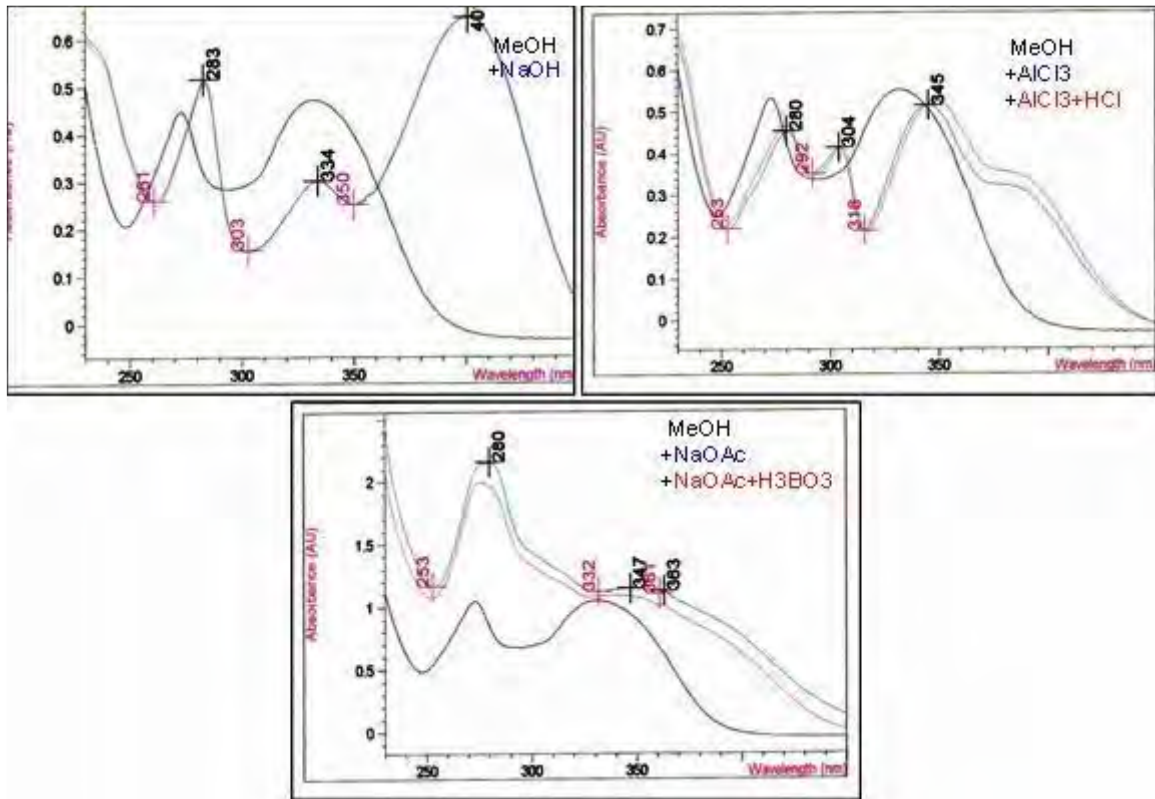
بأثو كرومية (8nm) للعصبة II بعد إضافة NaOAc مقارنة بقيمتها في طيف المركب في الميتانول كليهما يؤكداً وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7.

إزاحة بأثو كرومية للعصبة I بمقدار (63nm) عند مقارنة طيف المركب مع (AlCl₃ + HCl) و طيفه في الميتانول يدل على وجود هيدروكسيل حر أيضاً في الموضع 5.

غياب إزاحة هيبسوكرومية للعصبة I عند مقارنة طيف المركب مع (AlCl₃ + HCl) و طيفه مع (AlCl₃) من جهة و من جهة أخرى عدم وجود إزاحة بأثو كرومية للعصبة I بعد إضافة (NaOAc + H₃BO₃) مقارنة بالطيف الميتانولي للمركب فيؤكداً غياب مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل على المركب.

مطيافية ¹H-NMR (شكل-45) أكدت صيغة الجزء الأجليكوني من المركب عبر ظهور إشارة أحادية عند 6.78ppm موافقة لبروتون H3 و كذلك ظهور إشارتين ثنائيتين (J=8.7Hz) عند 6.91, 8.01ppm موافقتين لـ (H2', H6') و (H3', H5') على الترتيب و مؤكدة وجود هيكل apigenin.

أما الجزء السكري من المركب فيتجلى من خلال إشارتي البروتونين الأنوميريين عند 4.75, 4.80ppm لسكري الجليكوز بثابت تراوح (J=9.7Hz)، انزياح إشارتي H1'', H1''' نحو المجال القوي يدل على ارتباطهما برابطة (C-C) بالأجليكون في الموقعين 6 و 8 على التوالي، أما بقية البروتونات فتمركزت إشاراتها في المنطقة [4.9-3.1ppm].

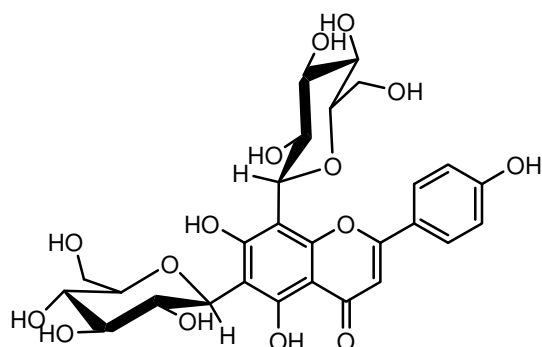


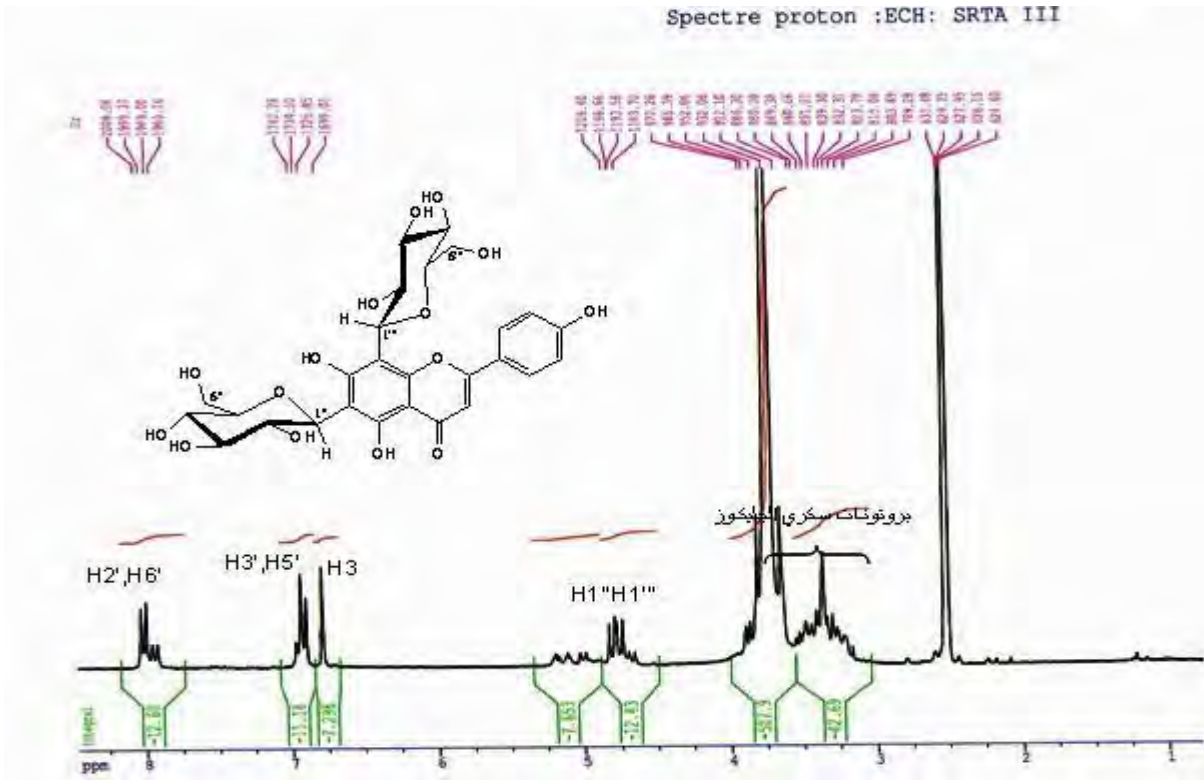
شكل-44- أطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب P4

مقارنة طيف $^{13}\text{C-NMR}$ المنجز في مذيب DMSO-d_6 مع المراجع [138] أكدت صيغة المركب عبر ظهور إشارات ذرات الكربون للجزء الأجليكوني من المركب في المنطقة [103-182.72ppm] و نلاحظ أن كل من إشارتي C8, C6 انزاحتا إلى مجال أخفض و بالتحديد عند 105.54, 107.58ppm على التوالي مما يدل على أنهما مستبدلتان و نلاحظ انزياح إشارتي C7, C5 إلى مجال أعلى 161.42, 158ppm نتيجة وضع أورثو مع C6 و C8 (شكل-46).

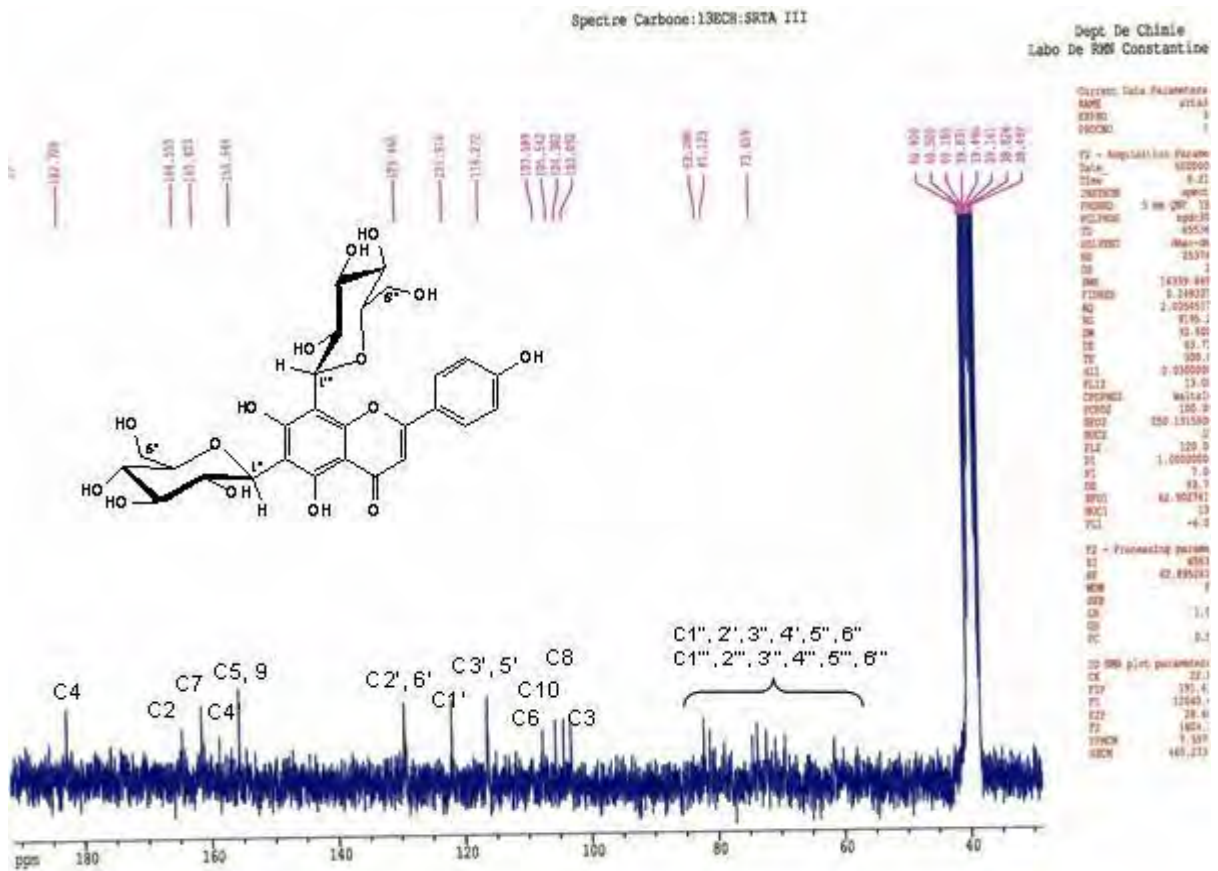
كما نلاحظ أن جميع إشارات ذرات الكربون لسكري الجليكوز بما فيها ذرات الكربون الأنوميرية تركزت في المنطقة [60-82.08ppm] مما يؤكد مرة أخرى أن الرابطة بين الأجليكون و سكري الجليكوز هي من النوع (C-C) و بالتالي فالمركب P4 هو:

Apigenin 6,8-di-C- β -glucoside (Vicenin-2)

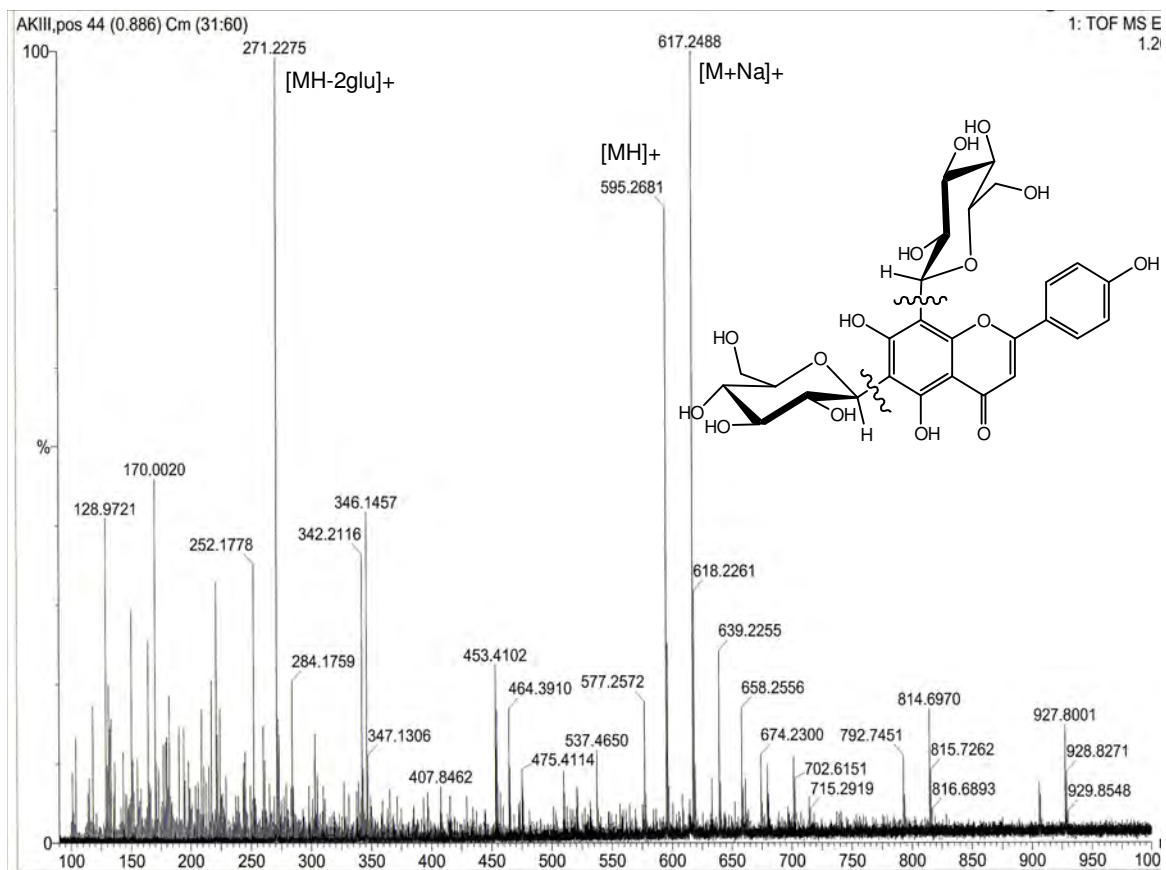




شكل-45- طيف ¹H-NMR للمركب P4 (DMSO-d₆, 250MHz)



شكل-46- طيف ¹³C-NMR للمركب P4 (DMSO-d₆, 62.5MHz)



شكل-47- طيف الكتلة MS-ESI⁺ للمركب P4

9-1-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P5:

Scopoletin

- 1) **Colour under UV** : Blue bright (on silica gel-tlc under 365nm) أزرق لامع
- 2) **¹H-NMR** (CDCl₃, 400MHz, δ, ppm):
7.61 (1H, d, J=9.5Hz, H4), 6.94 (1H, s, H8), 6.86 (1H, s, H5), 6.29 (1H, d, J=9.5Hz, H3)
3.98 (3H, s, 7-OCH₃)
- 3) **M.S-ESI⁺** (m/z):
193 .06 [MH]⁺

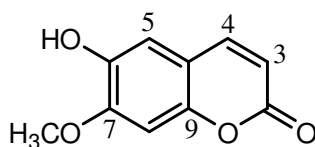
10-1-4- التعيين البنوي للمركب P5:

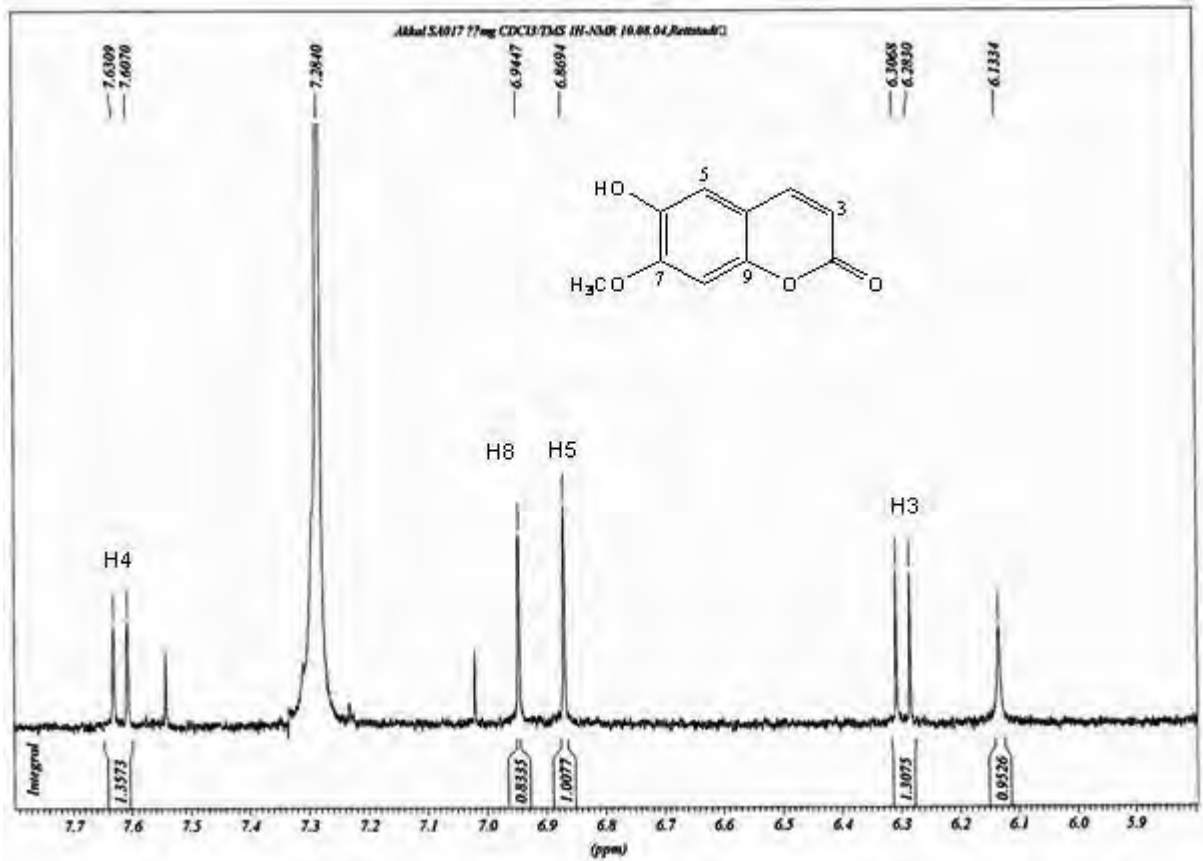
تم فصل هذا المركب من طور الكلوروفورم باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من Silica gel GF₂₅₄ مع مذيب CH₂Cl₂ كمخلص.

بالاعتماد على لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (أزرق لامع) و استشعاعه عند تعرضه لأبجزة الأمونياك (على طور ثابت من Silica gel)، إضافة إلى غنى نباتات هذا الصنف بالكومارينات رجحنا أن يكون المركب كومارين (Coumarin)، طيف الكتلة (MS-ESI⁺) أعطى قمة شبه جزيئية (شكل-49) هي نفسها القمة الأساسية عند m/z=193 موافقة لـ [MH]⁺.

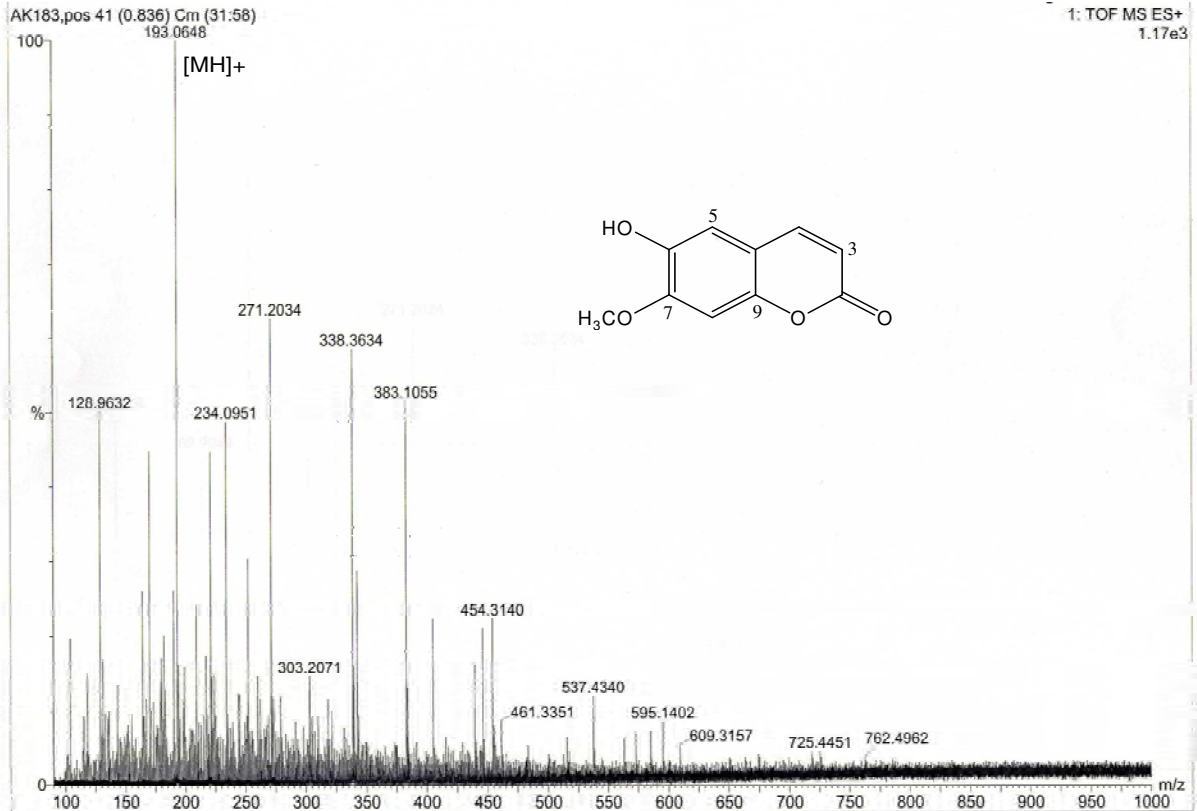
طيف ¹H-NMR (شكل-48) أعطى إشارة ثنائية (J=9.3Hz) عند 7.61ppm موافقة لـ H4 الذي يتزواج مع بروتون H3 الذي يظهر هو الآخر كثنائية (J=9.5Hz) عند 6.29ppm مع وجود إشارتين أحاديتين عند 6.94ppm و 6.86ppm مكافئتين لبروتوني H5, H8 على التوالي و أخيرا إشارة مجموعة ميتوكسيل عند 3.98ppm. نظرا لأن إشارة بروتون H8 تقع في مجال أدنى من 7ppm فنرجح ارتباط مجموعة الميتوكسيل بالموضع 7 و يكون المركب P5 هو:

Scopoletin





شكل-48- طيف ¹H-NMR للمركب P5 (CDCl₃, 400MHz)



شكل-49- طيف الكتلة MS-ESI⁺ للمركب P5

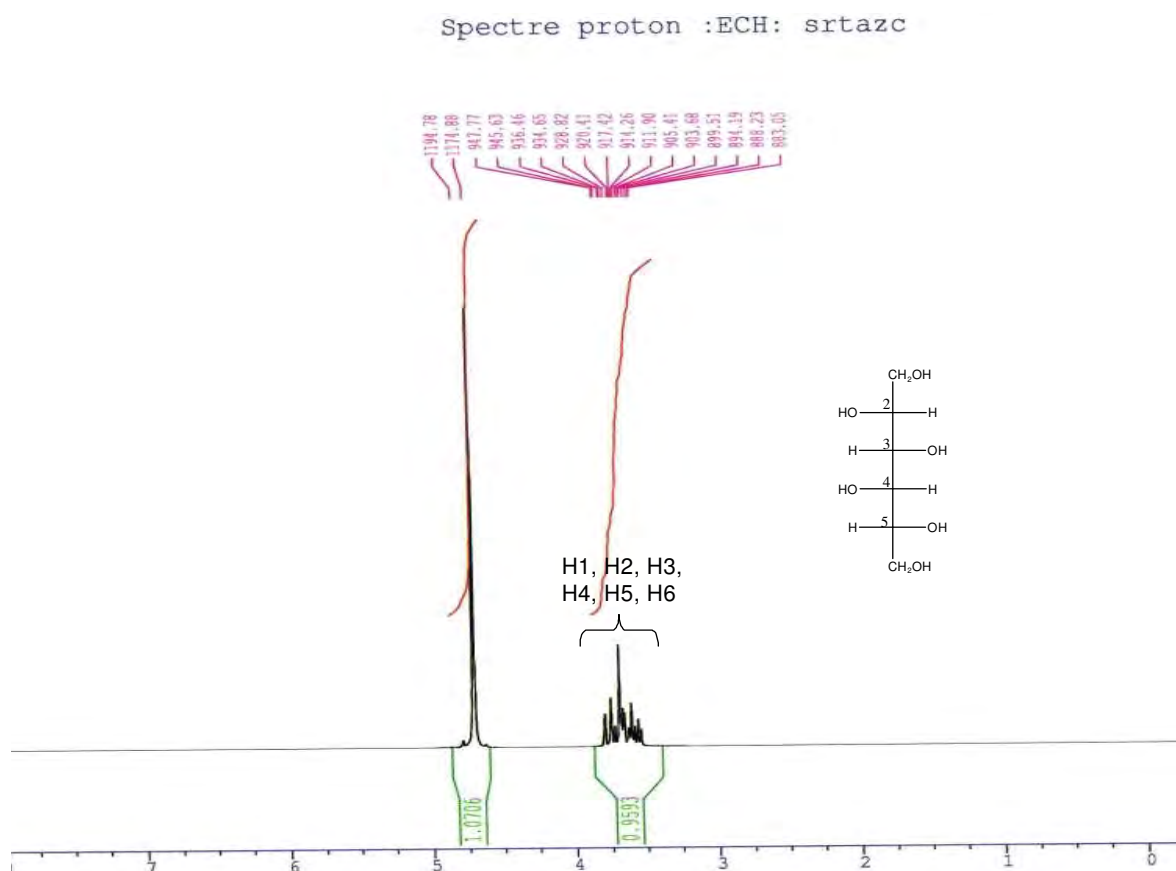
4-11-11- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب P6:

Hexane-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexol

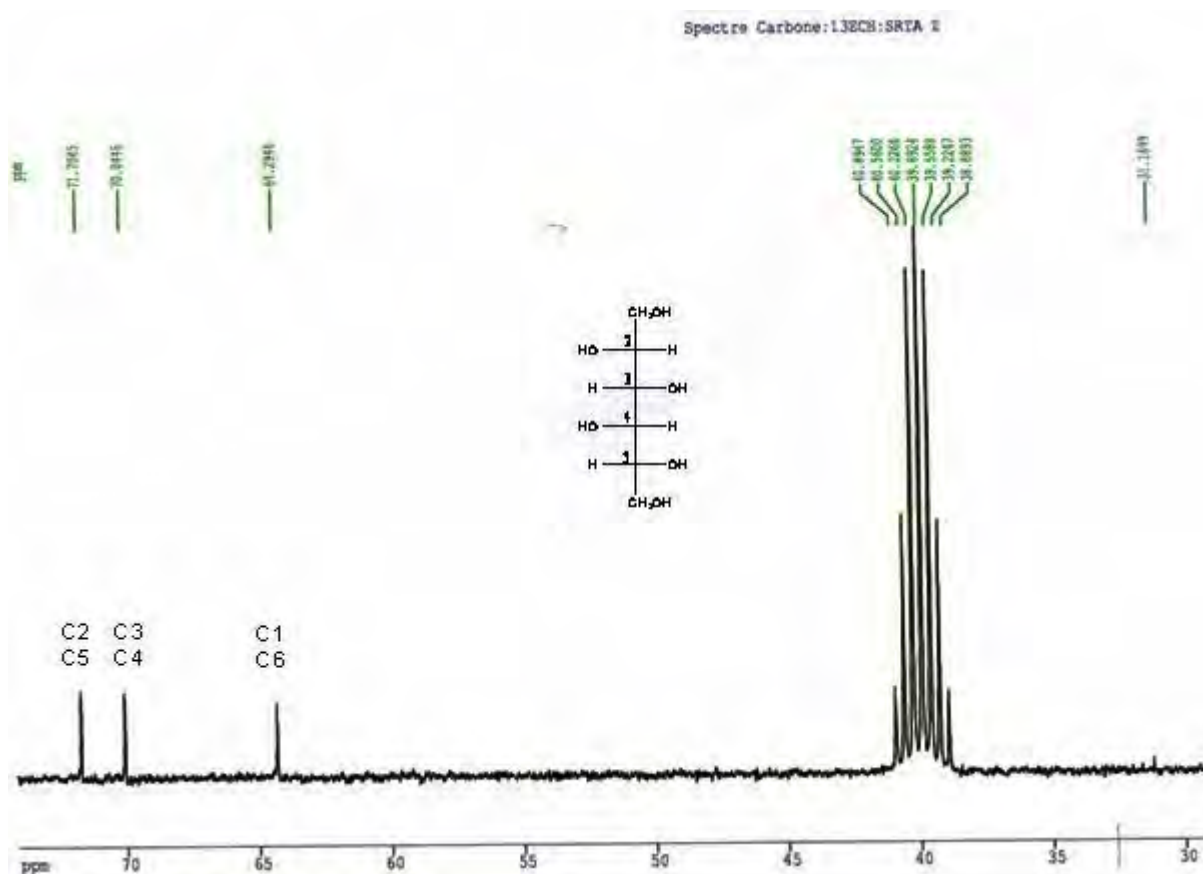
(L-Iditol)

- 1) m.p. 161- 164c°
- 2) ¹H-NMR (D₂O, 250MHz, δ, ppm):
3.52-3.82
- 3) ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 62.5MHz, δ, ppm):
71.7, 70.0, 64.21

تم الحصول عليه بشكل راسب متبلور في طور 1- بيوتانول و قد دلت خصائصه الكروماتوغرافية على أنه ذو طبيعة غير فلافونيدية، تركزت إشارات بروتونات المركب في طيف ¹H-NMR المنجز في مذيب D₂O (شكل-50) في المجال [3.52-3.82ppm] متداخلة فيما بينها في حين أن طيف الكربون المنجز في مذيب DMSO-d₆ (شكل-51) أعطى ثلاث قمم عند 71.7, 70, 64.21ppm هذا يدل على أن جميع بروتونات المركب ترتبط بذرات كربون عليها مجموعات هيدروكسيل و أننا أمام مركب متعدد الهيدروكسيل (Polyols).

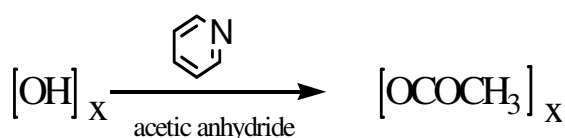


شكل-50- طيف ¹H-NMR للمركب P6 (D₂O, 250MHz)



شكل- 51- طيف ^{13}C -NMR للمركب P6 (DMSO-d₆, 62.5MHz)

للحصول على طيف واضح و تقليل التداخلات الحاصلة بين بروتونات المركب قمنا بأستلة (acetylation) كمية من المركب عند درجة حرارة الغرفة حسب التفاعل:



فحصلنا على مشتق متبلور P6a على صورة ألياف قطن زجاجي ذواب في الكلوروفورم يتميز بالخصائص الفيزيائية التالية:

Hexacetyl-L-iditol

1) m.p. 120-122C°

2) ^1H -NMR (CDCl₃, 250MHz, δ , ppm):

5.40 (2H, d, J=8.7Hz, H3, H4), 5.02 (2H, m, H2, H5), 4.20 (2H, dd, J=12.5, 2.7Hz, H1a, H6a), 4.06 (2H, dd, J=12.5, 5.1Hz, H1b, H6b), 2.04 (6H, s, 3-CH₃, 4-CH₃), 2.03 (6H, s, 2-CH₃, 5-CH₃), 2.0 (6H, s, 1-CH₃, 6-CH₃)

3) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5MHz, δ , ppm):

170.49 (Cq, 1-CO, 6-CO), 169.83 (Cq, 2-CO, 5-CO), 169.62 (Cq, 3-CO, 4-CO),
67.74 (CH, C2, C5), 67.29 (CH, C3, C4), 61.75 (CH_2 , C1, C6), 20.79 (CH_3 , 2- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 5-
 $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.61 (CH_3 , 1- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 6- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.51 (CH_3 , 3- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 4- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

4) **M.S-ESI⁺** (m/z):

457.17 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 375.15 [$\text{MH}-\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$]⁺

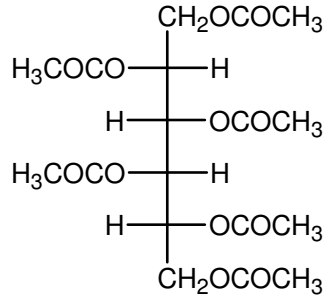
12-1-4- التعيين البنوي للمركب P6:

بعد عملية أستلة (acetylation) المركب، فإن طيف الكتلة MS-ESI^+ له (الشكل-57) أعطى قمة شبه جزيئية عند $m/z=457$ موافقة لـ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ مؤكدة الصيغة المحملة للمركب $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ و قمة تشظية موافقة لـ [$\text{MH}-\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$]⁺ عند $m/z=375$.

كما ظهرت بروتونات المشتق الناتج **P6a** متباعدة عن بعضها البعض في طيف $^1\text{H-NMR}$ في الشكل-52- و متكافئة مثنى مثنى حيث أعطى بروتوني (H4, H3) إشارة ثنائية ($J=8.7\text{Hz}$) عند 5.4ppm نتيجة الاقتران الحاصل بينهما و بين بروتوني (H5, H2) هذين الأخيرين ظهرا بشكل إشارة متعددة عند 5.02ppm نتيجة اقترانها أيضا مع بروتونات (H6a, H1a) و (H6b, H1b). و ظهر بروتوني (H6a, H1a) المتكافئين عند 4.2ppm بشكل إشارة ثنائية- ثنائية ($J=12.5, 2.7\text{Hz}$) بسبب اقترانها مع (H5, H2) و (H6b, H1b) و ظهر الزوج الأخير عند 4.06ppm بشكل إشارة ثنائية- ثنائية ($J=12.5, 5.1\text{Hz}$)، أخيرا ظهرت ثلاثة إشارات موافقة لستة مجموعات مثيل (خاصة بمجموعات الأستيل المرتبطة بهيدروكسيلات المركب).

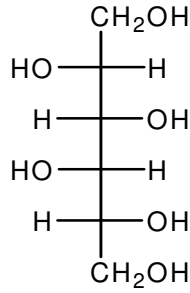
طيف $^{13}\text{C-NMR}$ المنجز في مذيب CDCl_3 (شكل-53) أعطى ثلاث إشارات موافقة لذرات كربون المركب الأصلي إحداها لذرتي كربون أولية (CH_2) عند 61.75ppm موافقة لـ (C1, C6) و الأخيرتان ثانويتان (CH) عند 67.74, 67.29ppm موافقة لـ (C3, C4) و (C2, C5) على الترتيب بحسب طيف تجارب DEPT135 و إضافة لها هناك ثلاث إشارات لمثيلات مجموعات الأستيل عند (20.79, 20.61, 20.51ppm) و ثلاث إشارات أخرى لكربونيات مجموعات الأستيل عند (170.49, 169.83, 169.62ppm).

بالاعتماد على أطراف تجارب الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد COSY(H, H) في الشكل-54- و طيف HMQC في الشكل-55- و طيف HMBC في الشكل-56- تمكنا من تحديد صيغة المركب و أخيرا تم تحديد البنية الفراغية للمركب و تأكيد صيغته النهائية بطيف للأشعة السينية (RX) في الشكل-58- و بالتالي تكون صيغة المركب **P6a** النهائية هي:

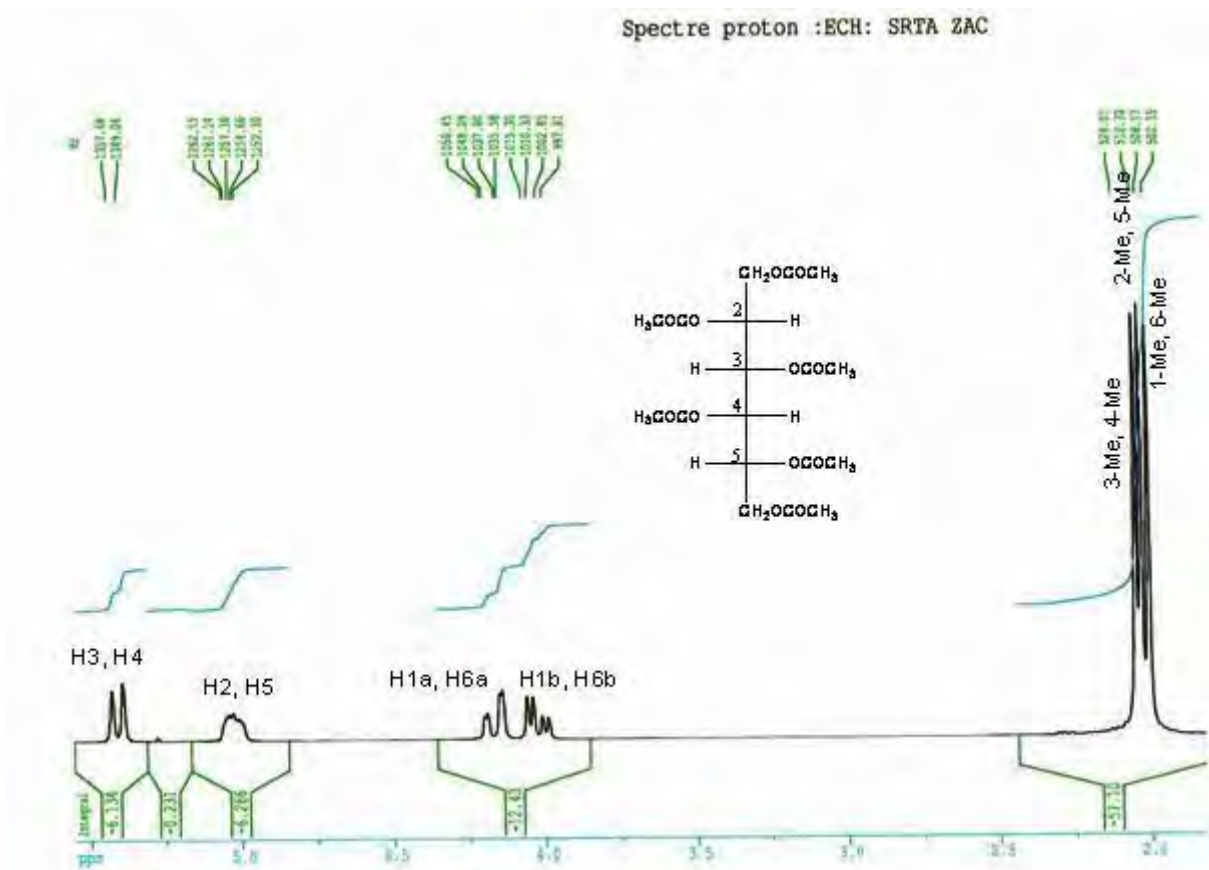


Hexacetyl-L-Iditol

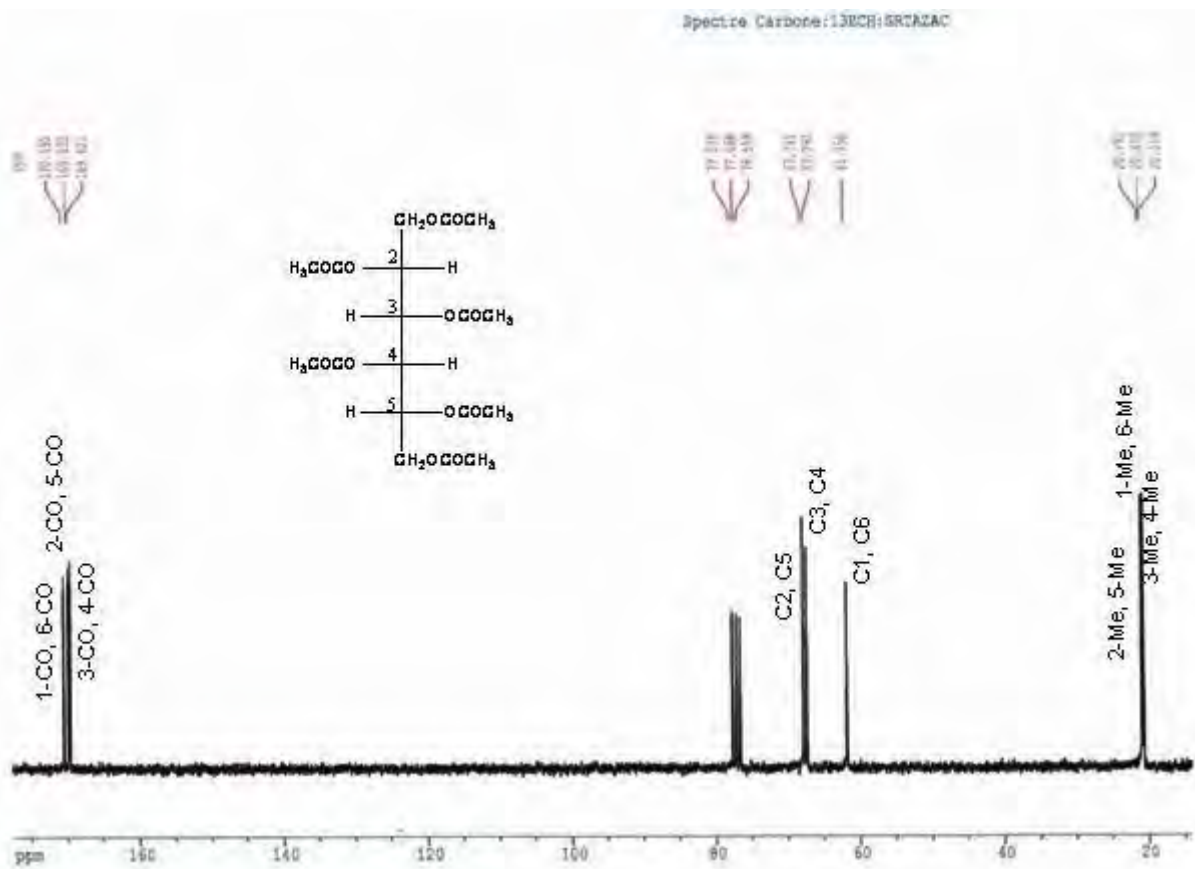
مما يؤكد أن المركب الأصلي P6 الذي تم فصله من النبات المدروس يكون هو سكر (L-Iditol).



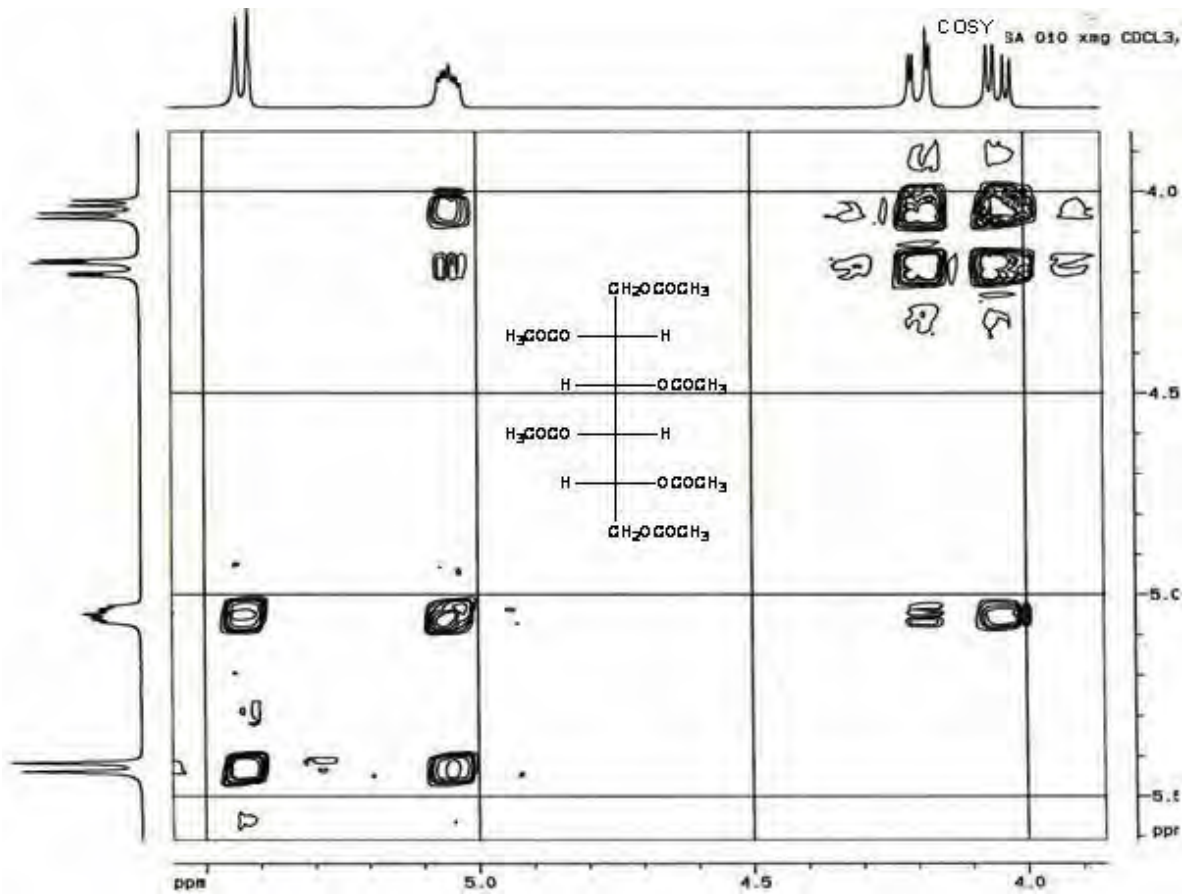
مركب L-Iditol يفصل لأول مرة من العائلة ككل مع العلم أنه تمت الإشارة إلى وجود سكر mannitol في نبات *Pituranthos tortuosus* [11] لكن بدون ذكر لكيفية التعرف عليه. وجود هذا المركب ذا الطعم الحلو في النبات يفسر استعماله من طرف التوارق إذ يقومون بمضغ فروع أو نقع النبات في الماء و استهلاك المحلول الحلو الناتج.



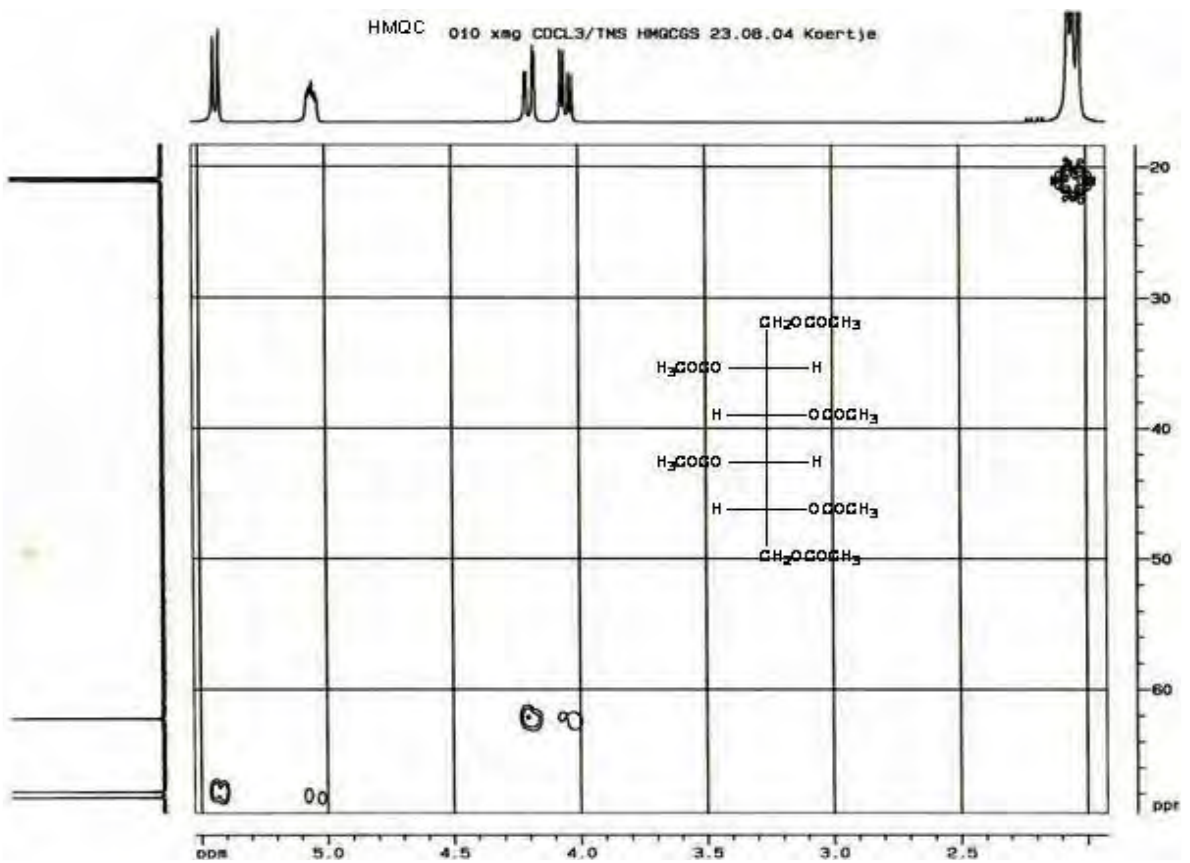
شكل-52- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب P6a (CDCl_3 , 250MHz)



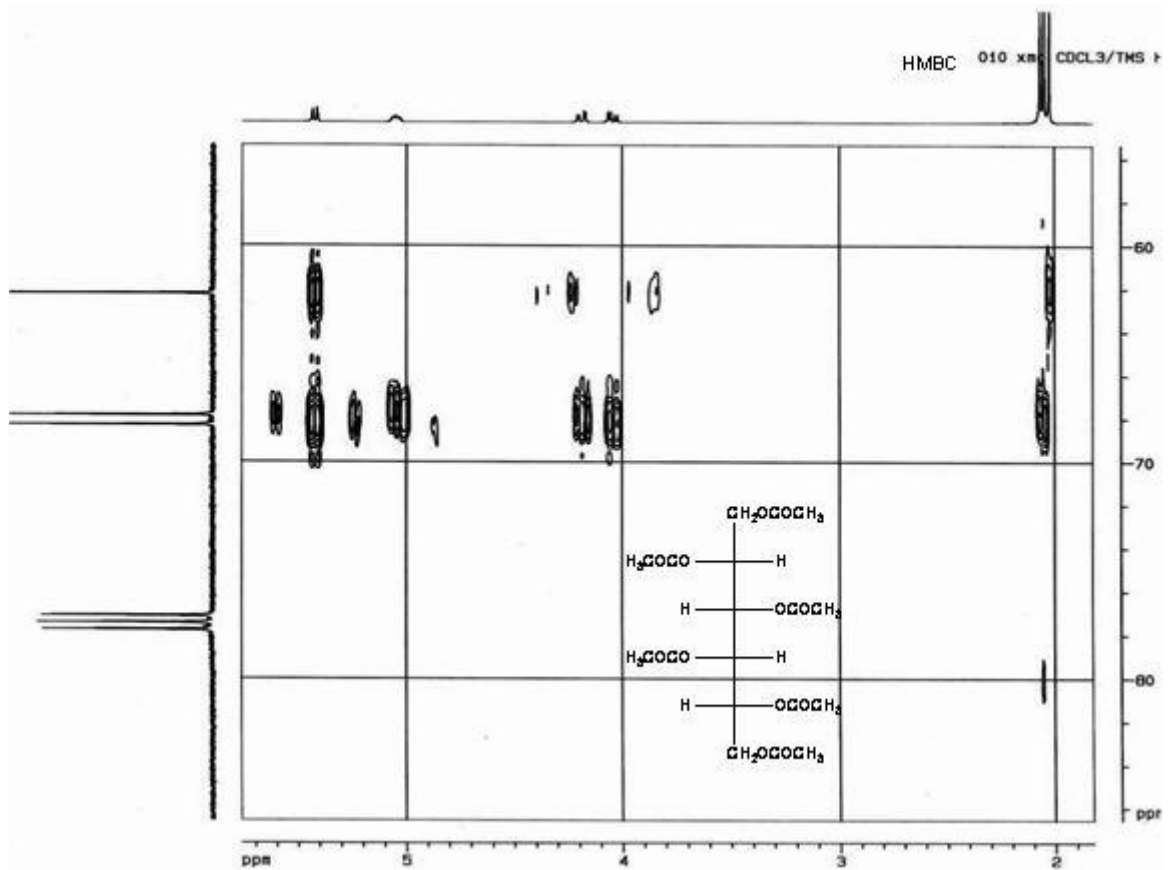
شكل-53- طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب P6a (CDCl_3 , 62.5MHz)



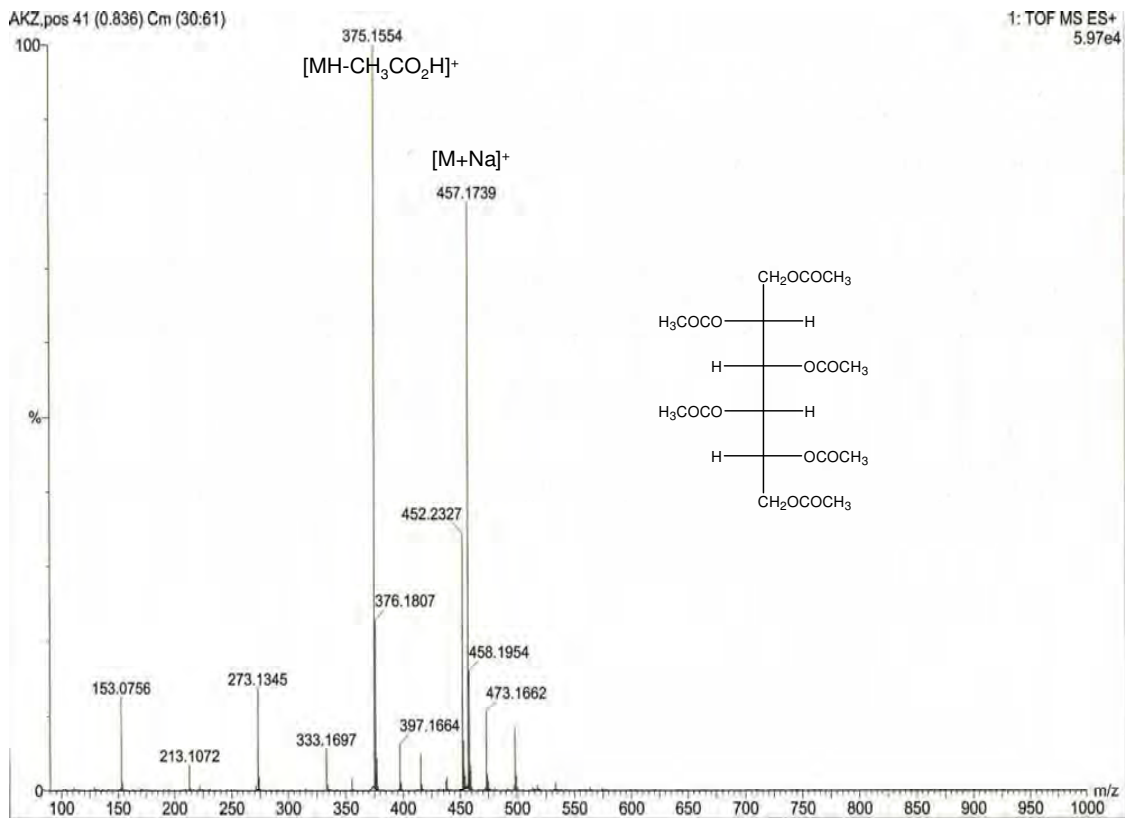
شكل-54- طيف تجارب H,H-COSY للمركب P6a



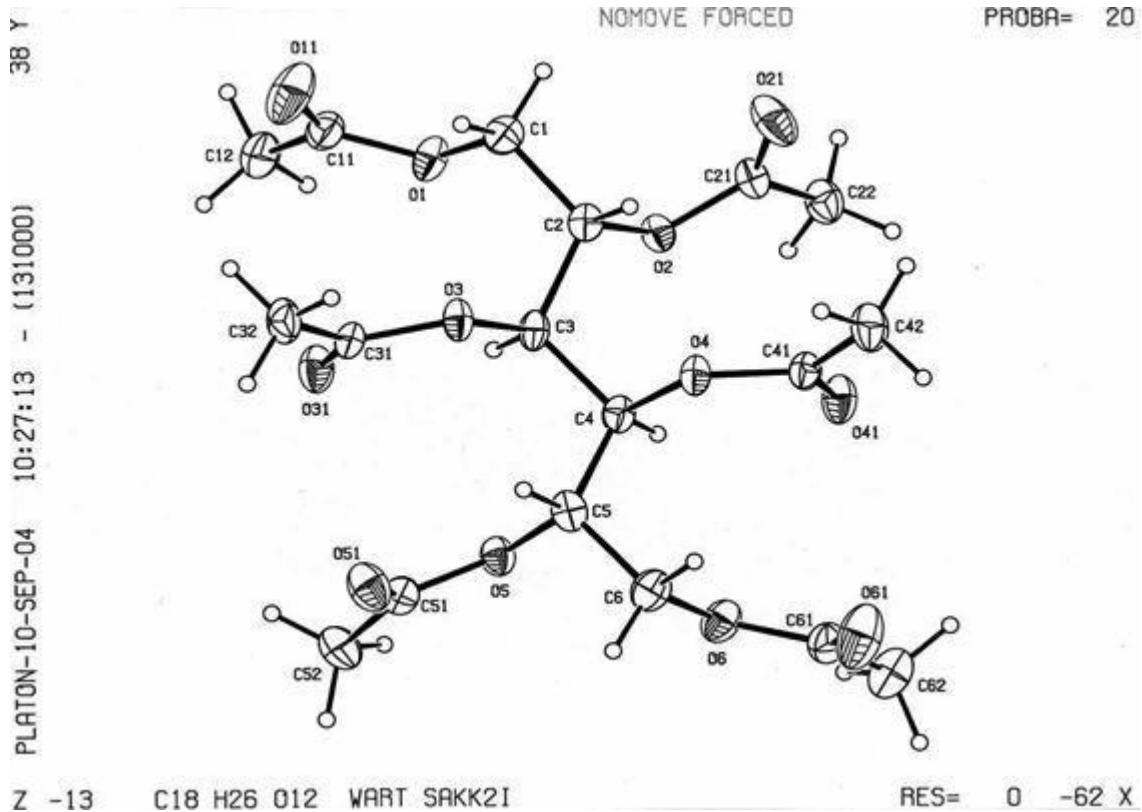
شكل-55- طيف تجارب HMQC للمركب P6a



شكل-56- طيف تجارب HMBC للمركب P6a

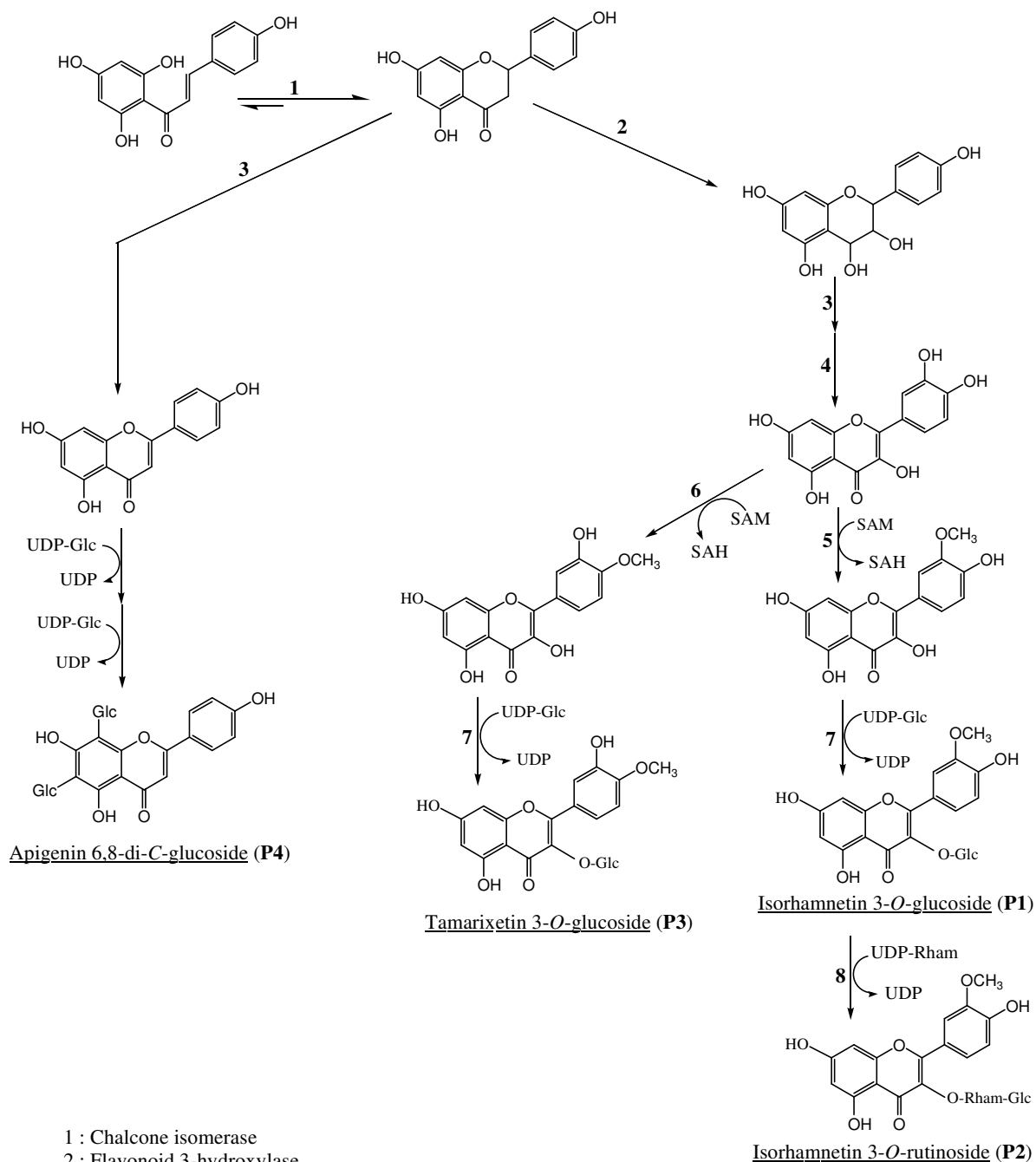


شكل-57- طيف الكتلة MS-ESI⁺ للمركب P6a



شكل-58- صيغة المركب P6a بعد التحليل بأشعة RX

بالاعتماد على هذه النتائج تم اقتراح مخططا للاصطناع الحيوي للفلافونيدات (الشكل-59) المفصولة من نبات *Pituranthos chloranthus* و قد إستعنت بالمراجع [5] و [8] المذكورة في الجزء النظري من هذه الرسالة في تحديد الأنزيمات المصاحبة للتفاعلات.



شكل-59- المخطط المقترح للاصطناع الحيوي لفلافونيدات نبات *Pituranthos chloranthus*

2-4- المركبات المفصولة من نبات *Solenostemma argel*:

تم فصل و التعرف على ثلاثة فلافونيدات S3, S2, S1 و على أستر لحمض فينولي S4 يفصل لأول مرة من هذا الصنف.

1-2-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S1:

Kaempferol

1) **Colour under UV:** Yellow (on cellulose-tlc) أصفر

2) **R_f** : 0.63 (BAW), 0.04 (HOAc15%), 0.9 (D9M1), 0.45 (D15M1)

3) **UV-Visible:**

MeOH 367 325 300sh 267 250sh, +NaOH 421 316 279, + AlCl₃ 424 350 304 269,

+ HCl 425 349 304 269, +NaOAc 375 309 271, +H₃BO₃ 368 324 267

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 270MHz, δ, ppm):

8.06 (2H, d, J=8.9Hz, H2', H6'), 6.88 (2H, d, J=8.9Hz, H3', H5'), 6.37 (1H, d, J=1.8Hz, H8), 6.15 (1H, d, J=1.6Hz, H6)

5) **¹³C-NMR** (CD₃OD, 67.5MHz, δ, ppm):

177.27 (C4), 165.52 (C7), 162.45 (C5), 160.49 (C4'), 158.16 (C9), 147.92 (C2), 132.37 (C3), 130.64 (C2', C6'), 123.67 (C1'), 116.25 (C3', C5'), 104.50 (C10), 99.21 (C6), 94.41 (C8)

6) **MS-ESI**(*m/z*):

284.7 [M-H]⁺

2-2-4- التعيين البنوي للمركب S1:

اللون الأصفر للمركب تحت الأشعة فوق البنفسجية إضافة إلى قيمة العصابة I في الميتانول عند 367nm يدلان على أنه فلافونول يحتوي على هيدروكسيل حر في الموضع 3.

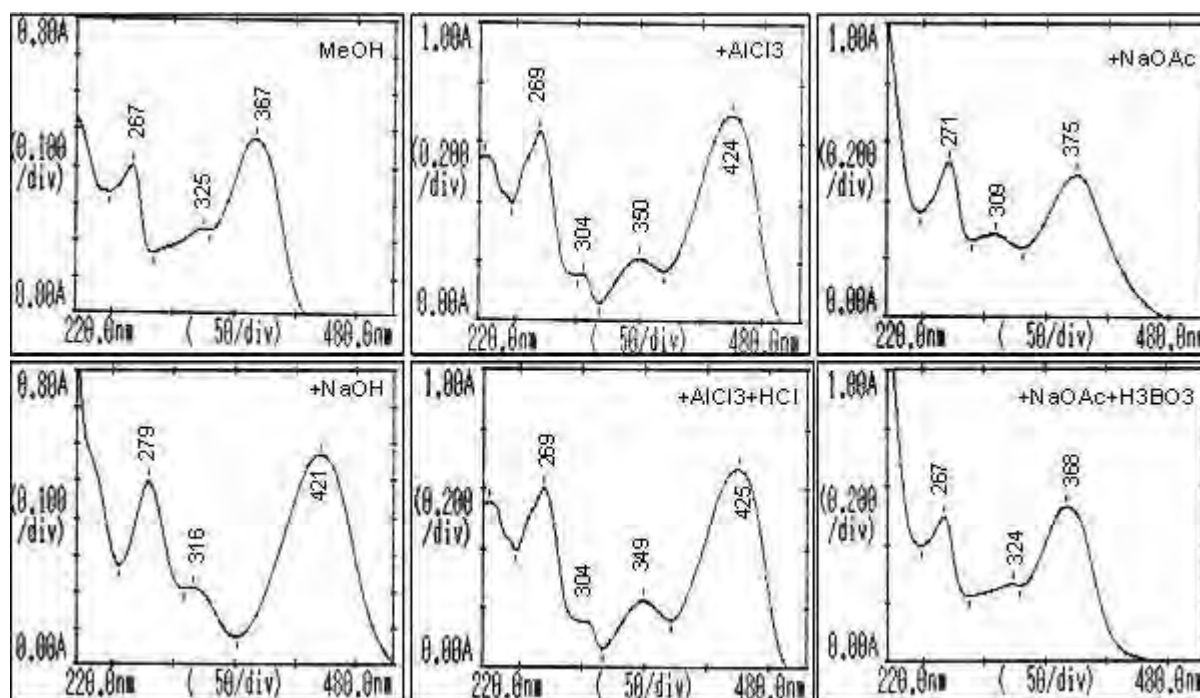
مطيافية الكتلة (شكل-63) بتقنية MS-ESI أعطت قمة شبه جزيئية عند *m/z*=285 للأيون [M-H]⁺ و موافقة لصيغة مجملة للمركب C₁₅H₁₀O₆.

انزياح طيف المركب و خاصة العصابة I مع زيادة في الشدة الضوئية بعد إضافة NaOH يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4 و ظهور قمة جديدة عند 316nm مع هذا الكاشف يدل على وجود هيدروكسيل حر أيضا في الموضع 7 و يتأكد هذا بانزياح العصابة II بعد إضافة NaOAc مقارنة بقيمتها في الميتانول الخالص.

انزياح طيف المركب و بالخصوص العصابة I بعد إضافة (AlCl₃+HCl) مقارنة بطيفه في الميتانول يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5.

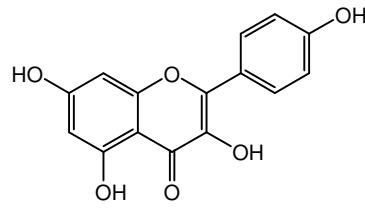
غياب لانزياح هيسوكرومي للعصابة I عند مقارنة طيفي المركب مع (AlCl₃) و مع (AlCl₃ + HCl) و كذا عند مقارنة طيفي المركب على مستوى العصابة I في الميثانول و بعد إضافة (NaOAc + H₃BO₃) فيدلان على غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل (شكل-60).

طيف ¹H-NMR للمركب (شكل-61) أظهر وجود إشارتين ثنائيتين لبروتونات الحلقة B عند 8.06ppm بثابت اقتران (J=8.9Hz) موافقة لـ (H2', H6') و عند 6.88ppm بالنسبة لـ (H3', H5'). إشارتين ثنائيتين لبروتوني الحلقة A عند 6.15, 6.37ppm بثابت تزاوج (J=1.6Hz) موافقة لـ H6 و H8 على التوالي مما يعني أننا أمام مركب kaempferol.

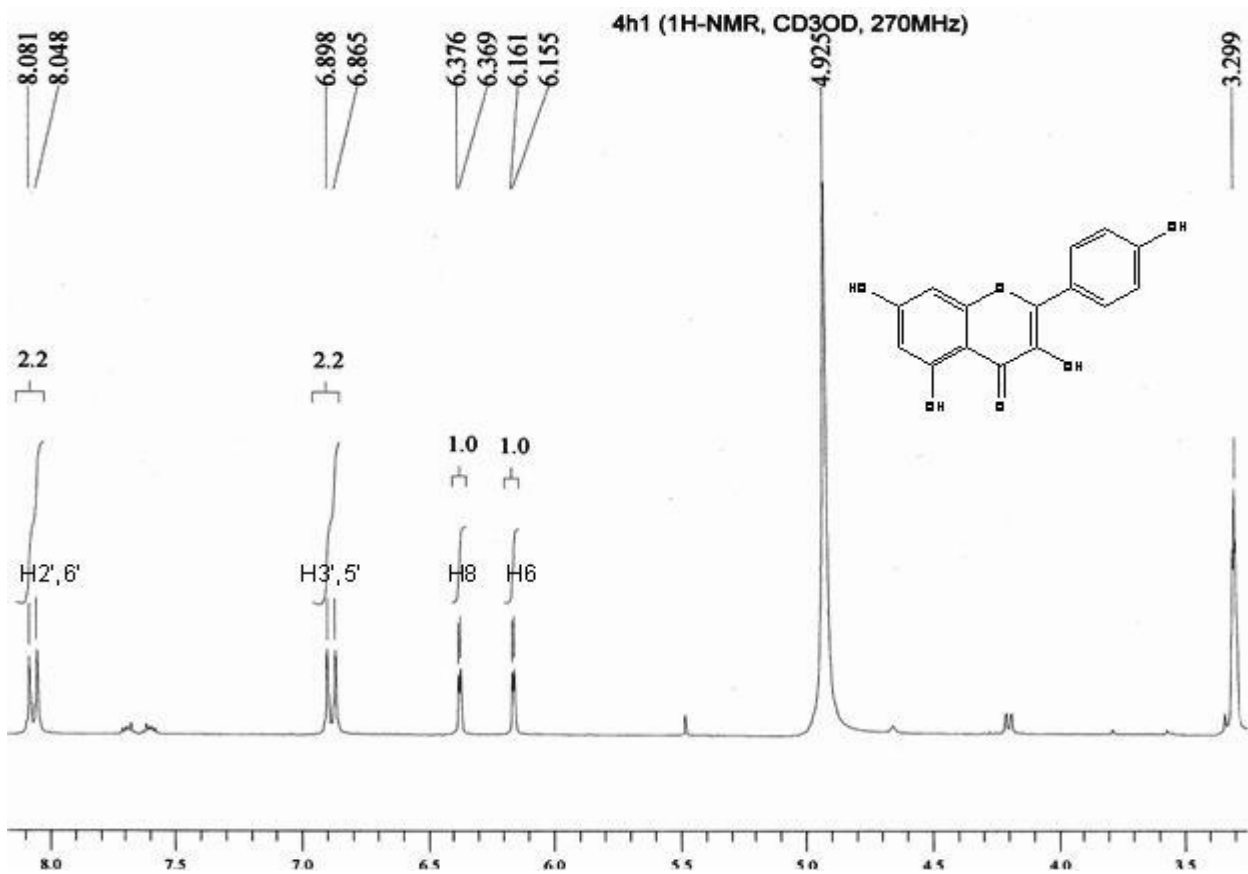


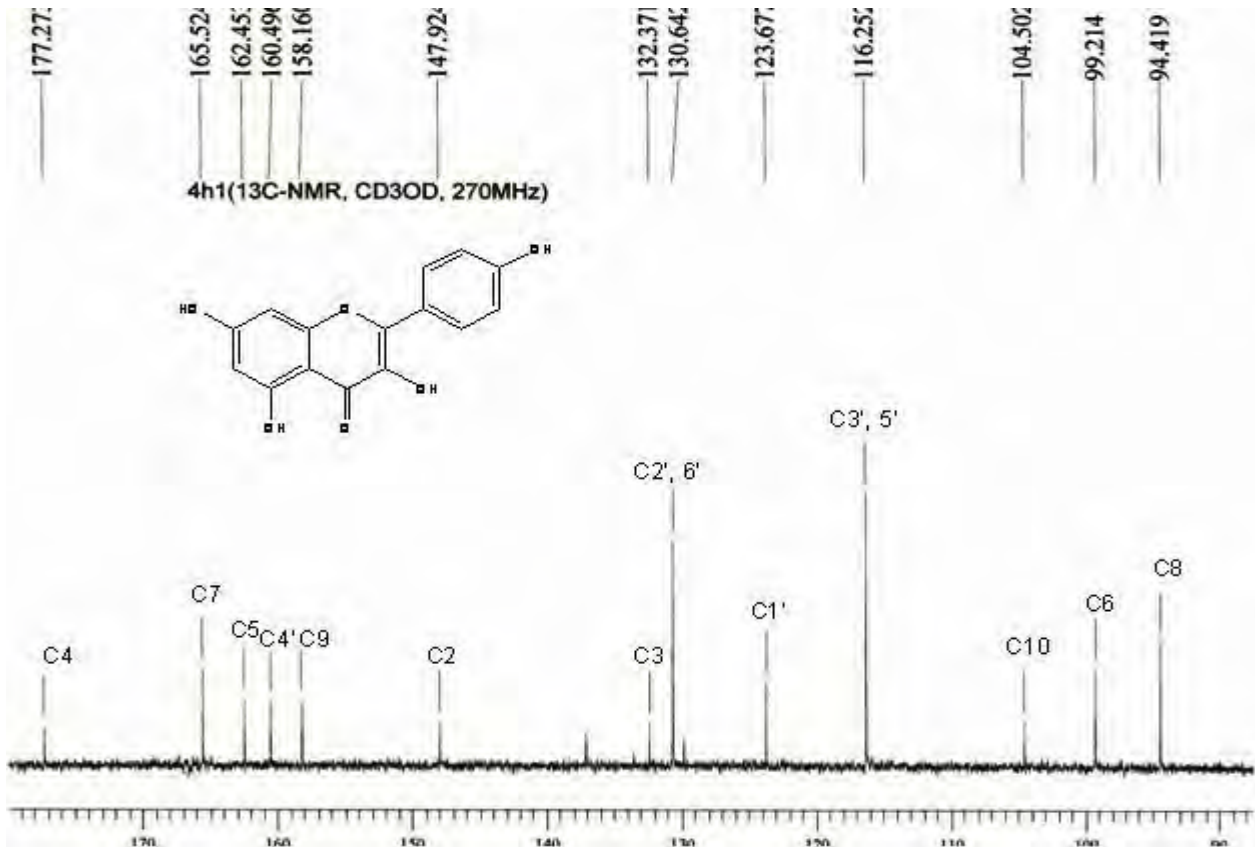
شكل-60- السلسلة الطيفية UV للمركب S1

من جهتها أكد طيف ¹³C-NMR (شكل-62) الصيغة الكيميائية للمركب عبر ظهور مختلف قمم ذرات الكربون لمركب kaempferol و قد تم تحديد انزياحاتها في الطيف بالاعتماد على المراجع [138] و بالتالي فالمركب S1 هو:

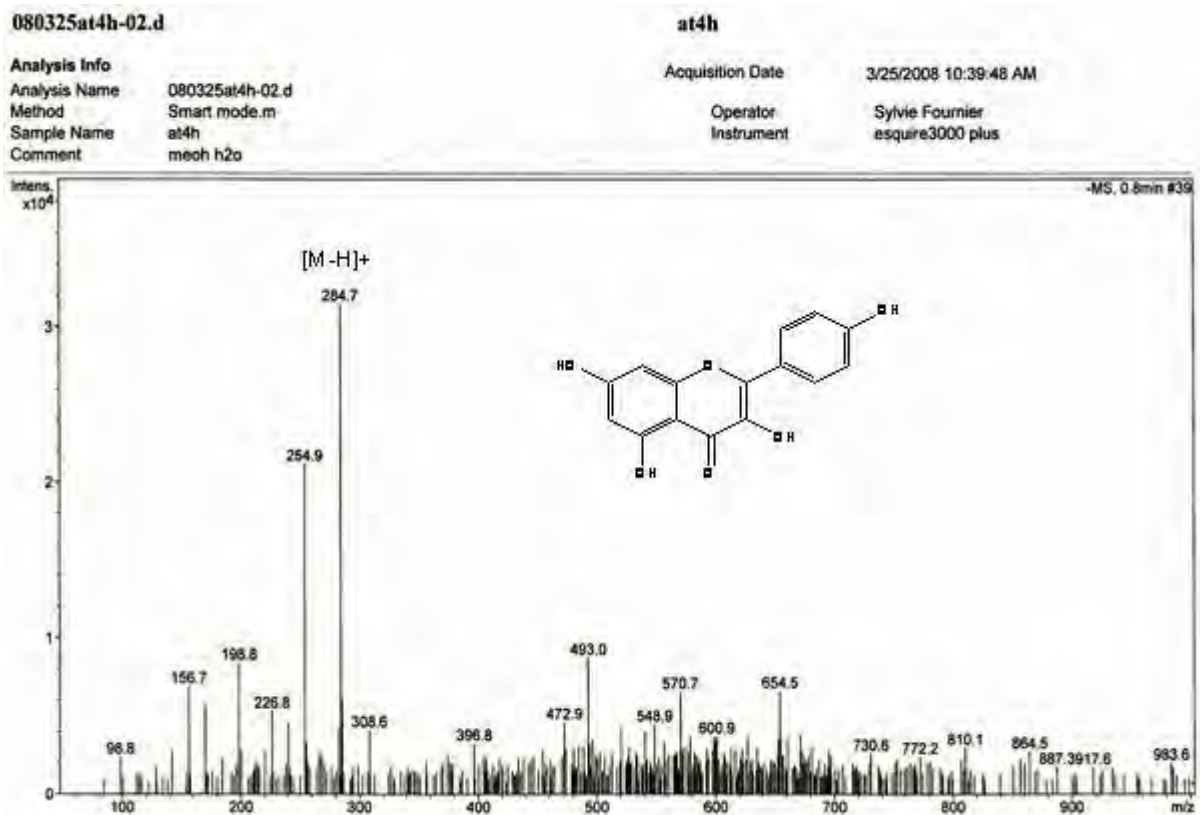


Kaempferol





شكل-62- طيف ^{13}C -NMR للمركب S1 (CD₃OD, 67.5MHz)



شكل-63- طيف الكتلة (MS-ESI) للمركب S1

3-2-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S2:

Kaempferol 3-O-β-glucoside

1) **Colour under UV** : Dark-purple (on cellulose-tlc) بنفسجي مسود

2) **R_f**: 0.70 (BAW), 0.50 (HOAc15%), 0.54 (D5M1)

3) **UV Visible** :

MeOH 348 326sh 300sh 267, +NaOH 402 322 275, +AlCl₃ 395sh 348 304 269, +HCl 392
348 304 273, +NaOAc 374 304 274, +H₃BO₃ 353 329sh 267

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 250MHz, δ, ppm):

8.07 (2H, d, J=9Hz, H2', H6'), 6.91 (2H, d, J=9Hz, H3', H5'), 6.42 (1H, d, J=2.1Hz, H8), 6.22 (1H, d, J=2.1Hz, H6), 5.24 (1H, d, J=7.5Hz, H1''), 3.72 (1H, dd, J=11.9, 2.1Hz, H6''a), 3.55 (1H, dd, J=11.9, 5.2Hz, H6''b), 3.2 – 3.8 (4H, H2'', H3'', H4'', H5'')

5) **¹³C-NMR** (CD₃OD, 62.5MHz, δ, ppm):

178.08 (C4), 164.62 (C7), 161.57 (C5), 160.11 (C4'), 157.69 (C2)*, 157.05 (C9)*, 133.99 (C3), 130.86 (C2', C6'), 121.34 (C1'), 114.69 (C3', C5'), 104.27 (C10), 102.60 (C1''), 98.52 (C6), 93.38 (C8), 76.75 (C5''), 76.54 (C3''), 74.27 (C2''), 69.86 (C4''), 61.13 (C6'')

* ذرات كربون يمكن أن تحمل مكان بعضها البعض

4-2-4- التعيين البنوي للمركب S2:

قيمة مرتفعة لـ R_f في الجملة (HOAc15%) تدل على أن المركب جليكوزيد، اللون البنفسجي للمركب تحت الأشعة فوق البنفسجية و قيمة العصابة I في الميتانول عند 348nm تدل على أنه فلافون (Flavone) أو فلافونول (Flavonol) مستبدل في الموضع 3.

انزياح باثو كرومي لطيف المركب و بالخصوص العصابة I بـ(54nm) بعد إضافة NaOH مع زيادة في الشدة الضوئية يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4' و ظهور قمة جديدة مع هذا المفاعل عند 322nm وكذا انزياح باثو كرومي للعصابة II بـ(7nm) بعد إضافة NaOAc يؤكداً وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7.

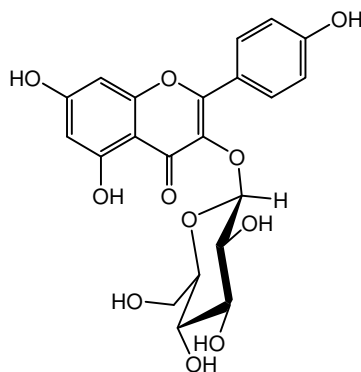
المقارنة بين طيف المركب مع (AlCl₃) و طيفه مع (AlCl₃ + HCl) من جهة و كذا مقارنة طيف المركب في الميتانول مع طيفه بوجود المفاعل (NaOAc + H₃BO₃) تبين غياب أي انزياح للطيف مما يؤكد عدم وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على المركب (شكل-64).

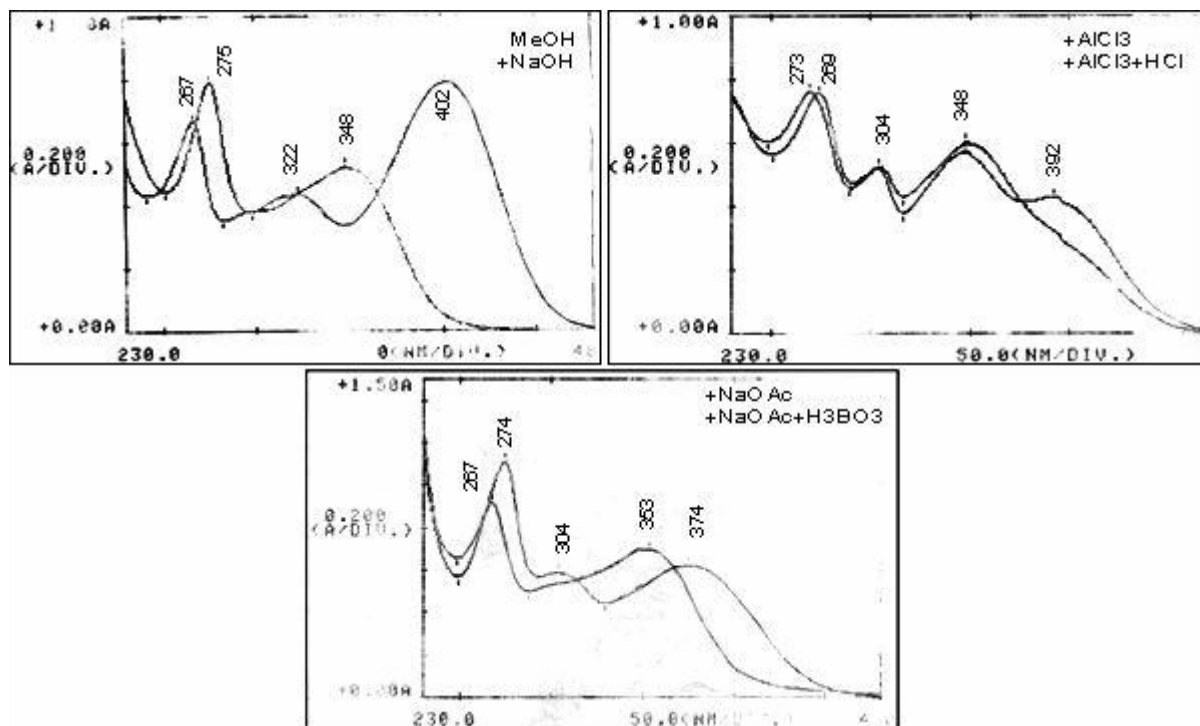
من جهة أخرى نلاحظ انزياح للعصابة I بمقدار (44nm) عند مقارنة طيف المركب مع المفاعل (AlCl₃ + HCl) مع طيفه في الميتانول مما يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5.

طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب (شكل-65، 66) أكد صيغة الجزء الأجليكوني من المركب هي فلافونول و ليس فلافون عبر ظهور إشارات مركب kaempferol و ظهور إشارات الجزء السكري بداية بإشارة البروتون الأنوميري ($\text{H}1''$) لسكر الجليكوز عند 5.24ppm بثابت اقتران ($J=7.5\text{Hz}$) مما يدل على وجود رابطة β بين سكر الجليكوز و الأجليكون أما بقية بروتونات سكر الجليكوز فتمركزت في المنطقة [3.2-3.8ppm].

طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب (شكل-67) أكد من جهته صيغة المركب فإلى جانب ظهور القمم الخاصة بـ kaempferol ظهرت ست قمم لذرات الجليكوز تم تحديد انزياحاتها في الطيف بالاعتماد على المراجع [138]. موضع ارتباط سكر الجليكوز بـ kaempferol يتحدد في طيف $^{13}\text{C-NMR}$ من ملاحظة انزياح إشارة C-3 بمقدار (2ppm) نحو مجال أعلى و انزياح إشارة C2 نحو مجال ضعيف بحوالي (10ppm) مقارنة بالمركب السابق مما يؤكد ارتباط سكر الجليكوز بذرة الكربون C3 للأجليكون و يكون المركب S2 بالتالي هو:

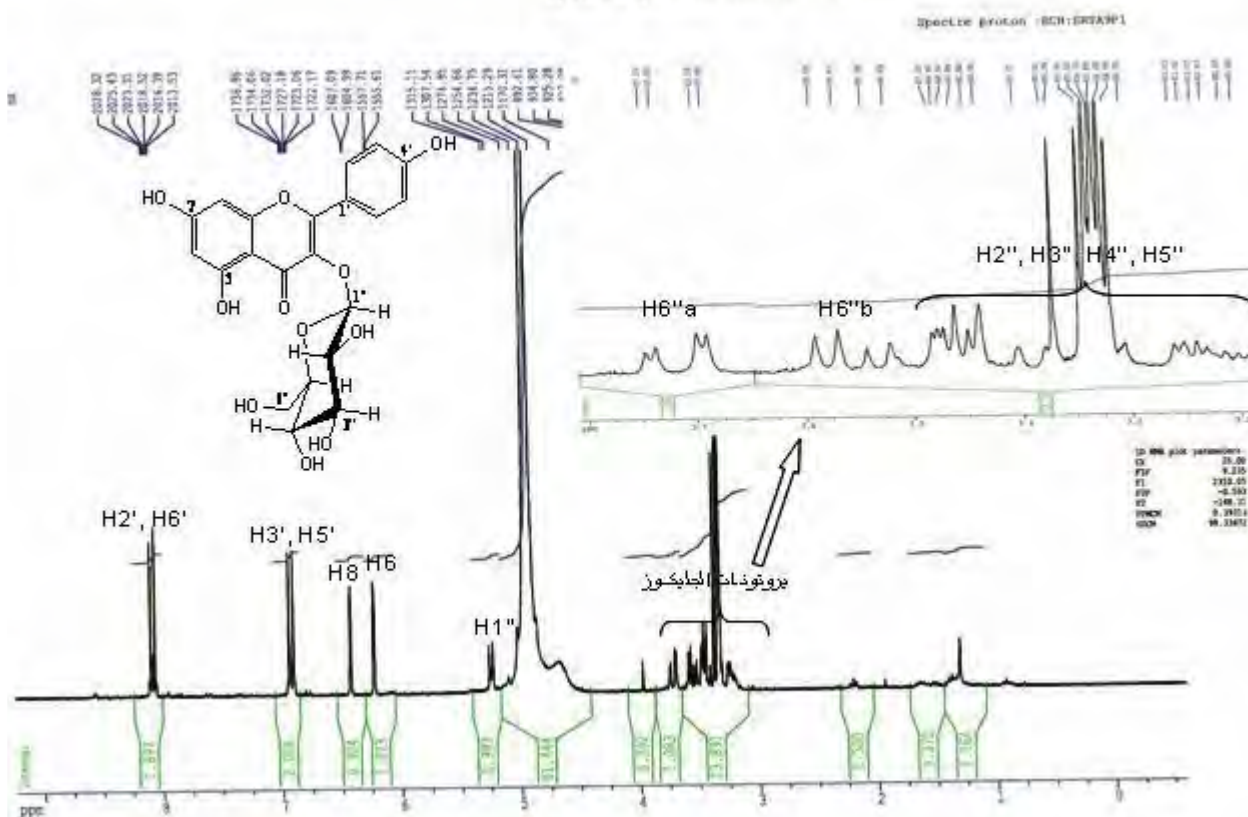
Kaempferol 3-O- β -glucoside (Astragalin)



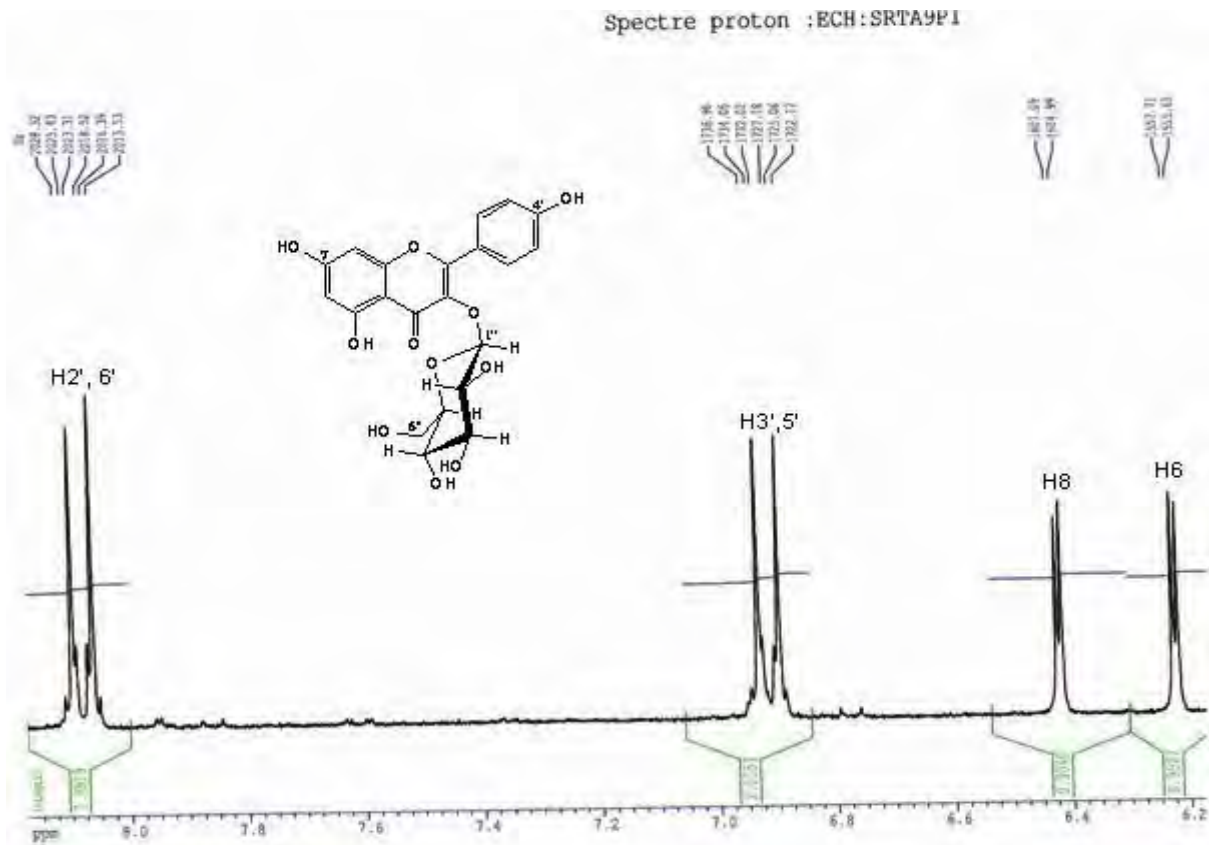


شكل-64- السلسلة الطيفية UV للمركب S2

Spectre proton :ECH:SRTA9P1



شكل-65- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب S2 (CD_3OD , 250MHz)



4-2-5- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S3:

Kaempferol 3-O-(2''-O- α -rhamnosyl)- β -glucoside

- 1) **Colour under UV:** Dark purple (on cellulose-tlc) بنفسجي مسود
- 2) **R_f:** 0.67 (BAW), 0.85 (HOAc15%), 0.21 (D3M1), 0.13 (D5M1)
- 3) **UV-Visible:**
MeOH 348 324sh 266, +NaOH 396 324 274, +AlCl₃ 391 348 304 274, +HCl 396
348 303 275, +NaOAc 362 304 273, +H₃BO₃ 348 317 267
- 4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 270MHz, δ , ppm):
8.0 (2H, d, J=8.9Hz, H2', H6'), 6.84 (2H, d, J=8.6Hz, H3', H5'), 6.33 (1H, d, J=2.1Hz, H8), 6.13 (1H, d, J=2.1Hz, H6), 5.71 (1H, d, J=7.3Hz, H1''), 5.19 (1H, d, J=1.3Hz, H1'''), 3.20 – 4.08 (10H, protons of glucose + rhamnose), 0.92 (3H, d, J=5.6Hz, H6''').
- 5) **¹³C-NMR** (CD₃OD, 67.5MHz, δ , ppm):
179.59 (C4), 165.85(C7), 163.41 (C5), 161.55 (C4'), 158.70 (C2)*, 158.63 (C9)*, 134.66 (C3), 132.38 (C2', C6'), 123.35 (C1'), 116.35 (C3', C5'), 106.22 (C10), 102.91 (C1''), 100.49 (C1'''), 99.94 (C6), 94.84 (C8), 80.33 (C2''), 79.24 (C5''), 778.69 (C3''), 74.31 (C4'''), 72.68 (C4'')[‡], 72.57 (C3''')[‡], 72.09 (C2''')[‡], 70.23 (C5'''), 62.91 (C6''), 17.90 (C6''')
- 6) **MS-ESI** (*m/z*):
ESI⁺: 595.0 [MH]⁺, 448.9 [MH-rhamnose]⁺, 286.9 [MH -(glucose+rhamnose)]⁺
ESI: 593.0 [M-H]⁺

* أو ‡ تعني أن ذرات الكربون المؤشر عليها بنفس الرمز يمكن أن تخل بعضها مكان بعض

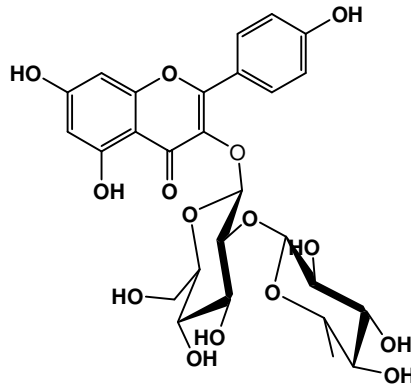
4-2-6- التعيين البنوي للمركب S3:

قيمة مرتفعة لثابت الانحباس في الجملة HOAc15% تدل على أننا أمام جليكوزيد متعدد السكر، تحليل أطيف الأشعة فوق البنفسجية (الشكل-68) هو نفسه التحليل المذكور مع المركب السابق S2. بمعنى أن الجزء الأجليكوني هو مركب Kaempferol مستبدل بالموضع 3. طيف ¹H-NMR لهذا المركب يختلف عن سابقه (المركب S2) فقط في الجزء السكري (شكل-69) حيث يظهر سكر جديد هو سكر الرانوز (rhamnose) عبر إشارة ثنائية (J=1.3Hz) للبروتون الأنوميري عند 5.19 ppm و الإشارة الثنائية (J=5.6Hz) لمثيل الرانوز عند 0.92ppm أما بقية إشارات بروتونات السكر فتمركزت في المجال (3.2– 4.08ppm).

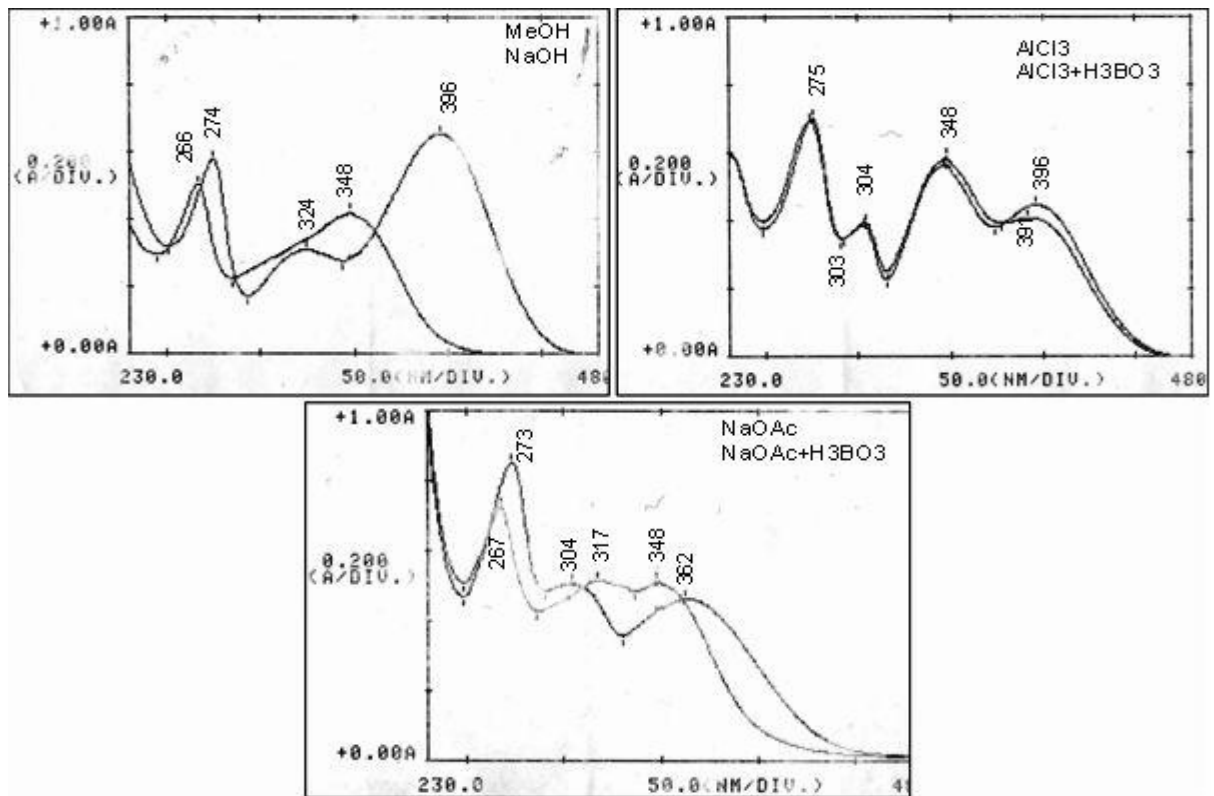
بينما في طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب فيإلى جانب القمم الخاصة بـkaempferol و التي تؤكد انزياحاتها على أنه مستبدل بالموضع 3 أعطى إثني عشر قمة في جزئه السكري مؤكدا وجود سكري الجليكوز و الرامنوز من خلال إشارتهما المميزة كما هو موضح بالشكل-70.

لتحديد موقع ارتباط الرامنوز بالجليكوز استعنا بطيف $^{13}\text{C-NMR}$ حيث نلاحظ أن ذرة الكربون $\text{C6}''$ للجليكوز تمتص عند 62.91ppm مما يدل على أن مجموعة الهيدروكسيل المرتبطة به غير مستبدلة و بالمقابل نلاحظ انزياح إشارة $\text{C2}''$ إلى مجال أخفض عند 80.33ppm مقارنة بقيمتها مع المركب S2 مؤكدة ارتباط الرامنوز بالجليكوز عبر هيدروكسيل C2 و بالرجوع إلى طيف $^1\text{H-NMR}$ فأن انزياحات إشارتي $\text{H1}''$ و $\text{H6}''$ تؤكد أن الجزء السكري من المركب هو neohesperidosyl [139].

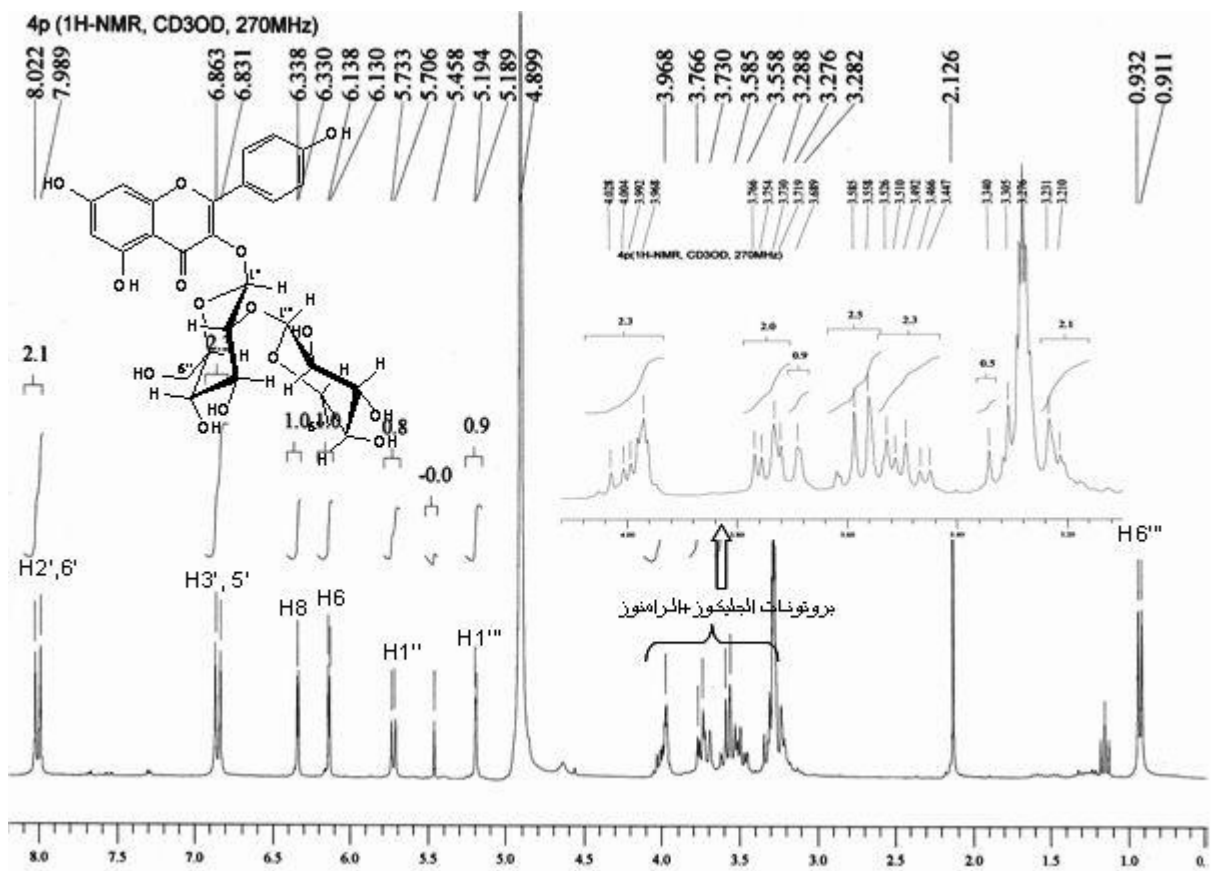
طيف الكتلة MS-ESI^+ (شكل-71) أعطى قمة شبه جزئية عند $m/z=595$ موافقة لـ $[\text{M}+\text{H}]^+$ كما أعطى طيف الكتلة MS-ESI^- في الشكل-72- قمة شبه جزئية عند $m/z=393$ موافقة لـ $[\text{M}-\text{H}]^+$ و كلاهما موافقين لصيغة مجملة للمركب $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$ كما أعطى قمم (شكل-71) موافقة لأيونات المركب بعد فقده جزئية سكر الرامنوز عند $m/z=449$ مما يعني أنه سكر نهائي ثم فقده لسكري الرامنوز و الجليكوز عند $m/z=287$ و بالتالي فالمركب S3 هو:



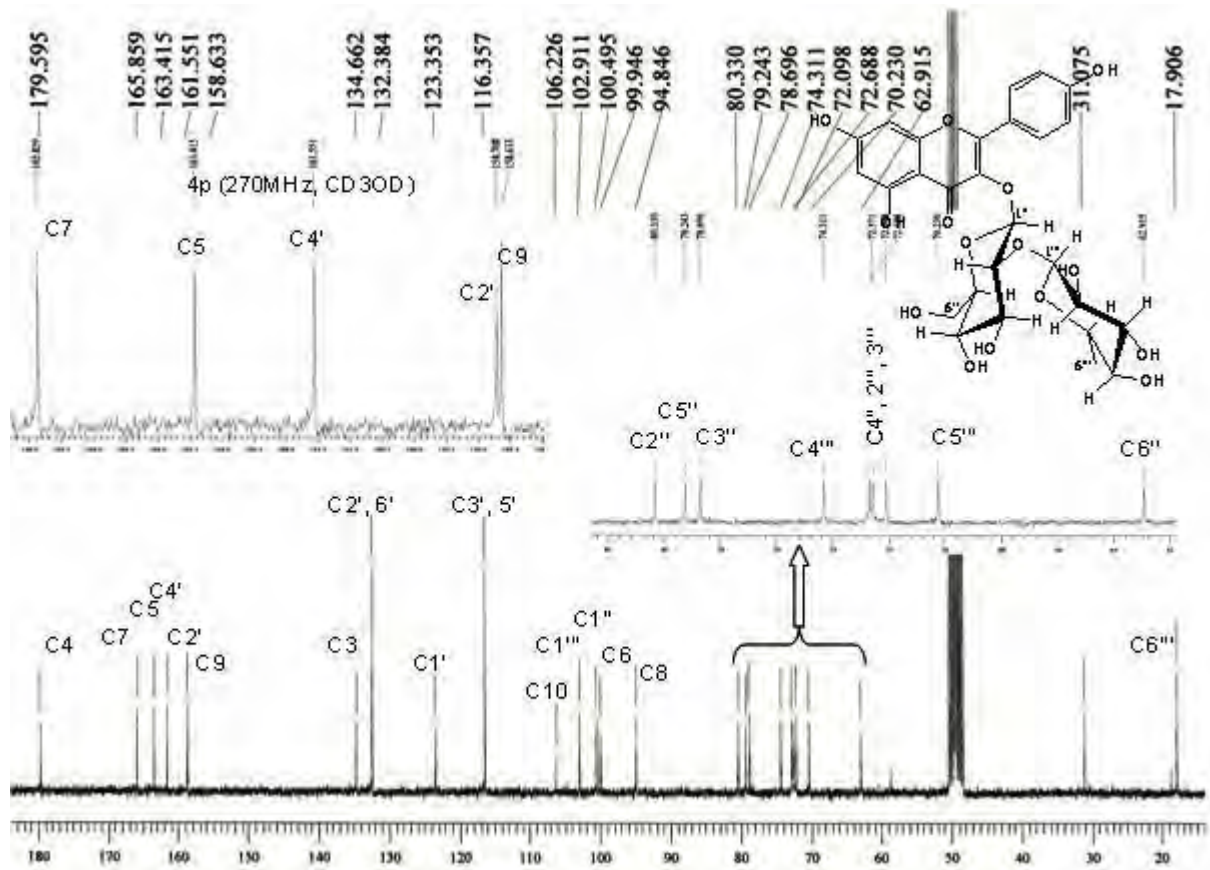
Kaempferol 3-O- β - (2''-O- α -rhamnosyl) glucoside
(Kaempferol 3-O-neohesperidoside)



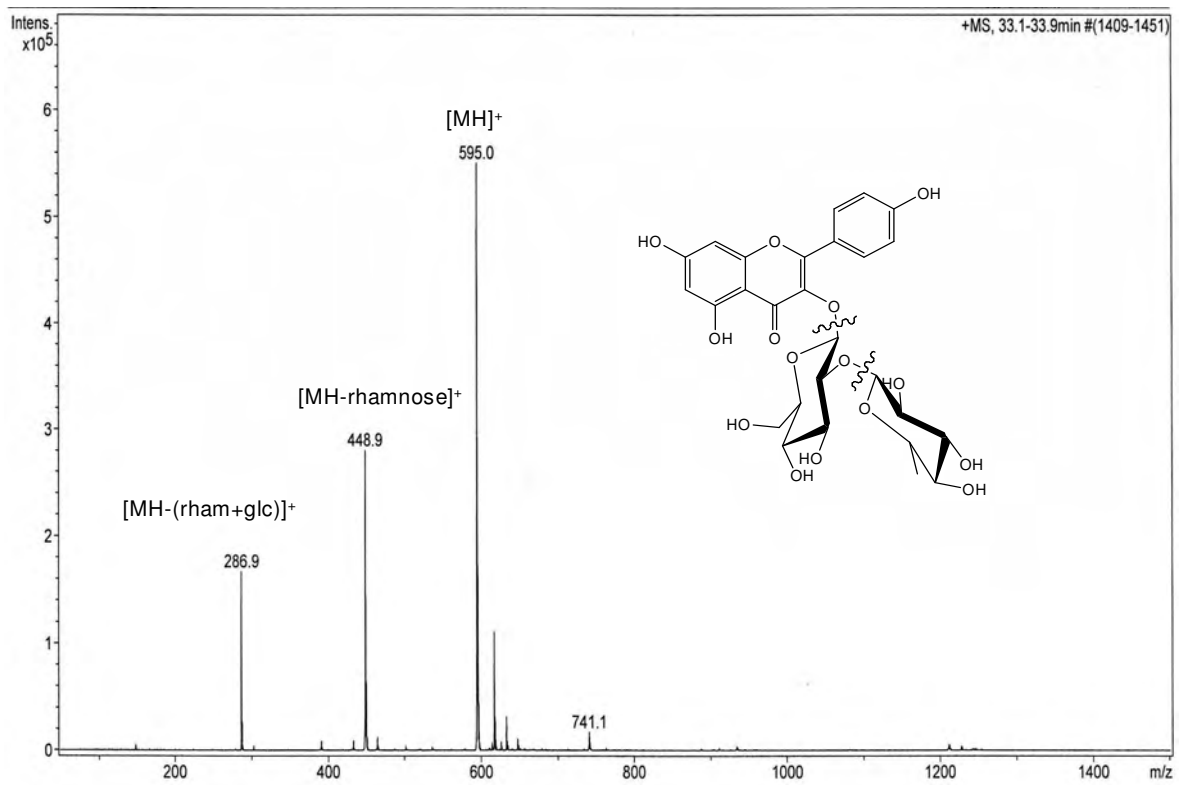
شكل-68- السلسلة الطيفية UV للمركب S3



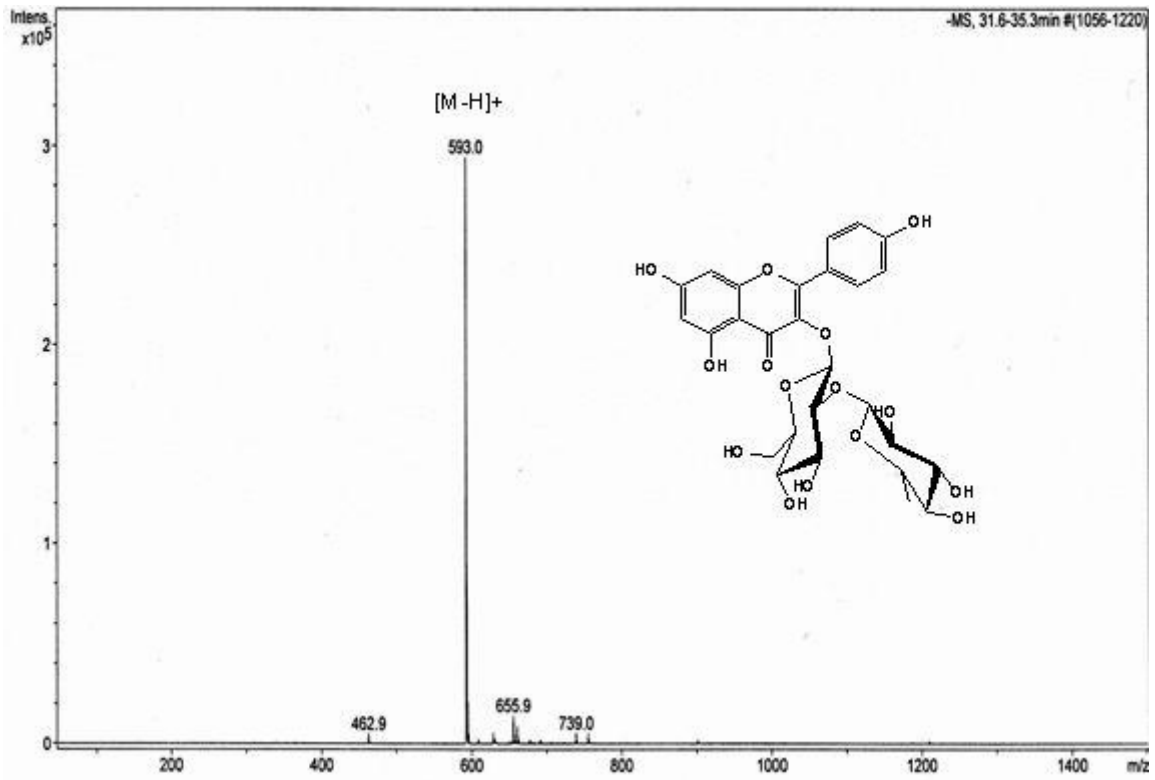
شكل-69- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب S3 (CD_3OD , 270MHz)



شكل-70- طيف ^{13}C -NMR للمركب S3 (CD_3OD , 67.5MHz)



شكل-71- طيف الكتلة MS-ESI+ للمركب S3



شكل-72- طيف الكتلة MS-ESI للمركب S3

4-2-7- الخصاص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب S4:

3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)-acrylic acid methyl ester

1) **Colour under UV:** Purple (on silica gel-tlc under 365nm) بنفسجي

2) **¹H-NMR** (CD₃OD, 250MHz, δ , ppm):

7.62 (1H, d, J=15.9Hz, H7), 7.19 (1H, d, J=1.9Hz, H2), 7.08 (1H, dd, J=8.2, 1.9Hz, H6),
6.81 (1H, d, J=8.2Hz, H5), 6.36 (1H, d, J=15.9Hz, H8), 3.90 (3H, s, 3-OCH₃), 3.78 (3H, s,
COOCH₃).

3) **¹³C-NMR** (CD₃OD, 62.5MHz, δ , ppm):

168.38 (C9), 148.09 (C4), 145.52 (C3), 133.0 (C7), 125.80 (C1), 122.86 (C6), 115.15
(C8), 113.43 (C5), 110.04 (C2), 54.94 (3-OCH₃), 50.58 (9-OCH₃)

4-2-8- التعيين البنوي للمركب S4:

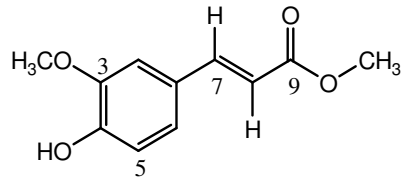
طيف ¹H-NMR للمركب (شكل-73) يبين وجود رابطة ثنائية في وضع (trans) من خلال ظهور إشارتين ثنائيتين بثابت اقتران (J=15.9Hz) عند 7.62ppm و 6.36ppm موافقتين لـ H7 و H8 على الترتيب، هذه الرابطة المضاعفة ترتبط بحلقة بترينية ثنائية الاستبدال عبر ظهور إشارة ثنائية (J=1.9Hz) موافقة لـ H2 عند 7.19ppm وإشارة أخرى ثنائية (J=8.2Hz) موافقة لـ H5 عند 6.81ppm وأخيرا إشارة ثنائية-ثنائية (J=8.2, 1.9Hz) موافقة لـ H6 عند 7.08ppm.

كما ظهرت إشارة لمجموعة ميتوكسيل عند 3.9ppm مرتبطة بالحلقة البترينية و أخرى عند 3.78ppm في مجال أقوى و بالتالي افترضنا ارتباطها بهيدروكسيل الوظيفة الحمضية مشكلة أستر فينولي.

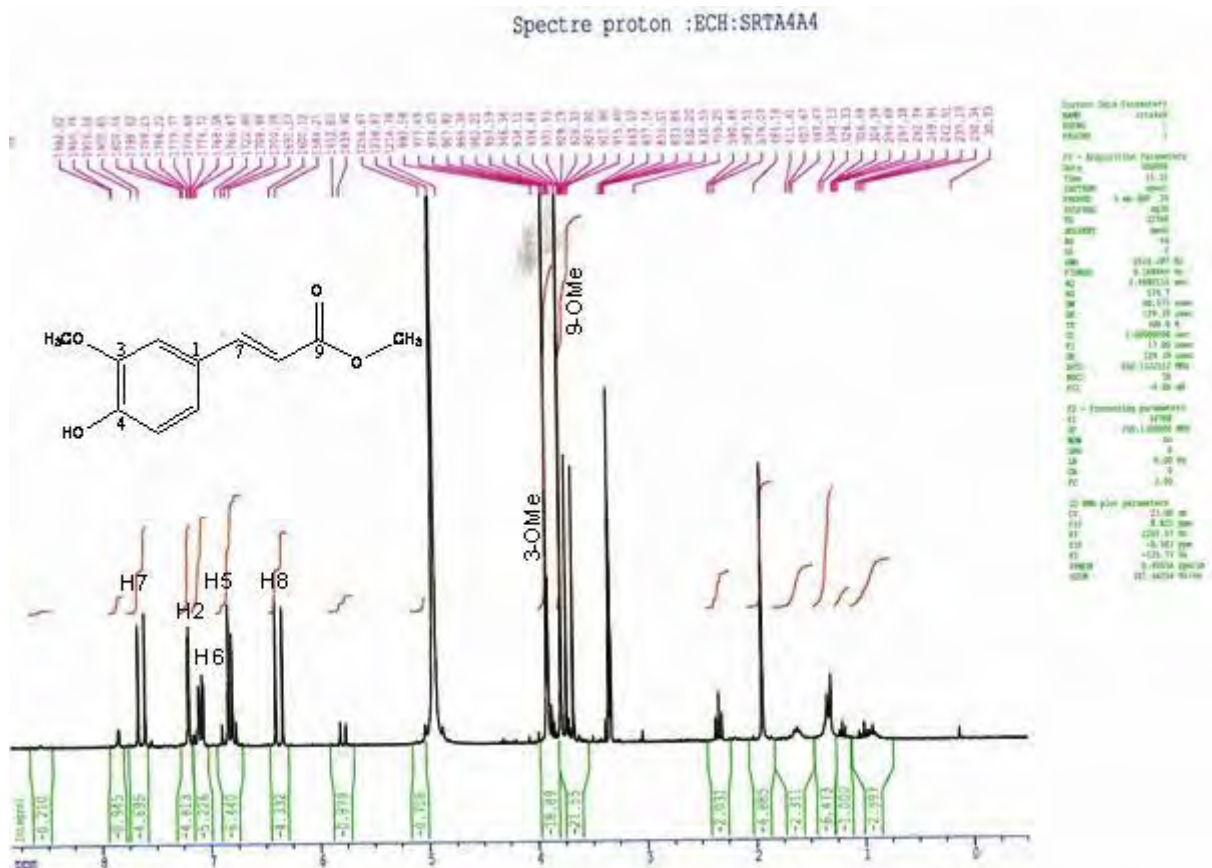
طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون (شكل-74) يبين وجود 11 ذرة كربون منها ستة ذرات خاصة بالحلقة البترينية، اثنتان لمجموعتي ميتوكسيل إحداهما عند 54.94ppm مرتبطة بالحلقة البترينية و الأخرى انزاحت نحو مجال مرتفع عند 50.58ppm و بالتالي يؤكد ارتباطها بهيدروكسيل الوظيفة الحمضية.

كما بين وجود مجموعة كربونيل عند 168.38ppm خاصة بالوظيفة الحمضية و ذرتي رابطة ثنائية عند 133ppm و 115.15ppm لكل من C7, C8 على الترتيب.

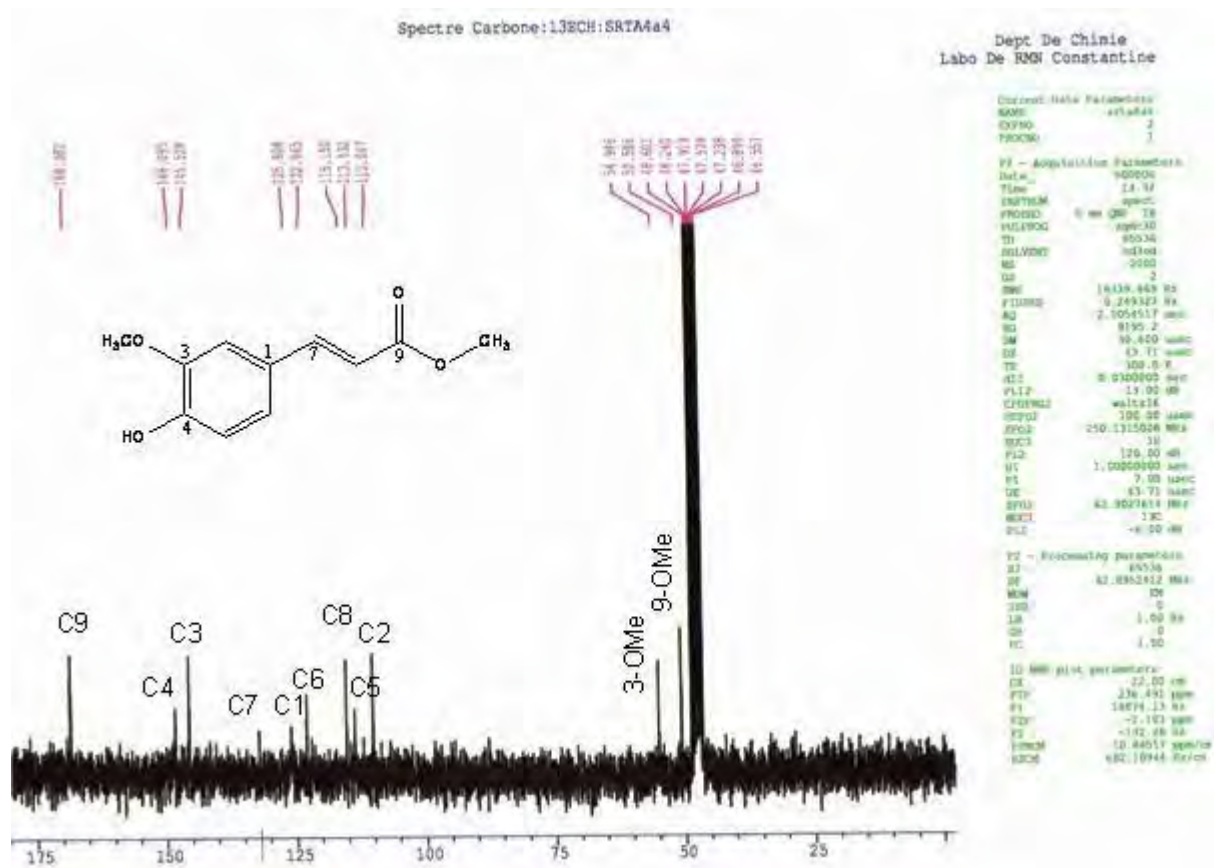
من هذه النتائج الطيفية اقترحنا أن يكون المركب هو أستر لحمض فينولي، و مقارنة هذه النتائج الطيفية مع المراجع أكد صيغة المركب S4 التالية:



**3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)-acrylic acid methyl ester
(Methyl-trans-ferulate / Methyl-(E)-ferulate)**

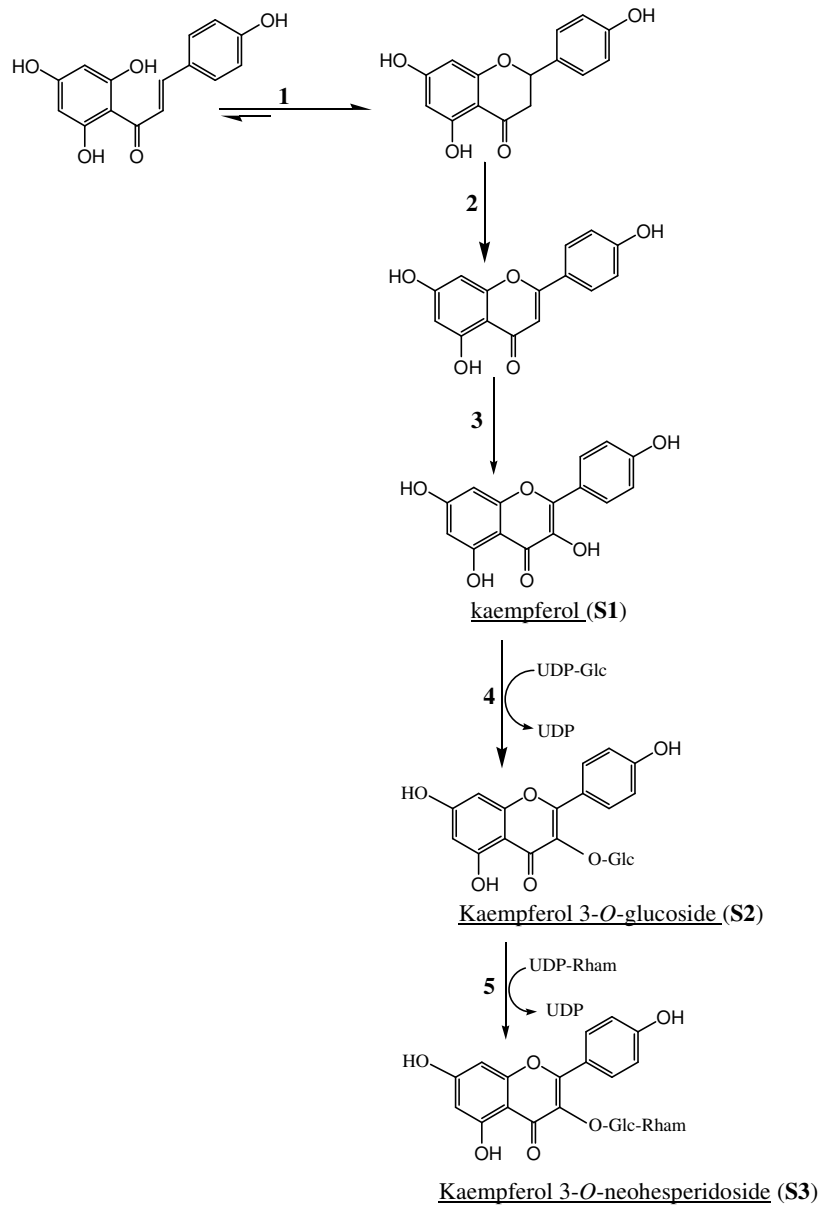


شكل-73- طيف ¹H-NMR للمركب S4 (CD₃OD, 250 MHz)



شكل-74- طيف ^{13}C -NMR للمركب S4 (CD_3OD , 62.5 MHz)

بالاعتماد على هذه النتائج يمكننا القول إن النبات يتبع مسلكا وحيدا هو مسلك مركب kaempferol في تصنيع فلافونيداتها رغم قلتها و على ضوء هذه النتائج تم اقتراح مخططا للاصطناع الحيوي لفلافونيدات نبات *Solenostemma argel* كما هو مبين في الشكل-75 و قد اعتمدت على المراجع [5] و [8] المذكورة في الجزء النظري من هذه الرسالة في تحديد و تسمية الأنزيمات المميزة لكل تفاعل.



شكل-75- مخطط الاصطناع الحيوي المقترح لفلافونيدات نبات *Solenostemm argel*

3-4- المركبات المفصولة من نبات *Marrubium deserti*:

تم الفصل و التعرف على ستة مركبات كلها جديدة بالنسبة للنبات كما أنها المرة الأولى التي يتم فيها فصل المركبات M2، M3 و M4 مجتمعة من النبات نفسه مع العلم أن هذه المركبات الثلاثة هي من المركبات النادرة إذ أن هذه ثالث مرة يتم فيها فصل المركب M3 من الصنف *Marubium* و هي رابع مرة يتم الحصول عليه من مصدر طبيعي حيث تم فصله لأول مرة من نبات *Stachys aegyptiaca* (Labiatae) [140] أما المركب M4 فهذه ثالث مرة يتم فصله من الصنف *Marrubium* و سادس مرة يتم الحصول عليه من مصدر طبيعي حيث فصل لأول مرة من *Anisomeles ovata* (Labiatae) [96] بينما المركب M2 فهذه أيضا رابع مرة يتم فصله من الصنف *Marrubium* بينما المركب M6 فهذه المرة الثانية التي يتم التعرف عليه في الصنف *Marrubium* أما المركبان M1 و M5 فهما من المركبات المميزة لنباتات هذا الصنف.

4-3-1- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M1:

Apigenin 7-O-β-glucoside

1) **Colour under UV:** Purple (on silica gel-tlc) بنفسجي

2) **R_f** : 0.25 (HOAc15%), 0.30 (D6M1)

3) **UV-Visible:**

MeOH 328 268, +NaOH 386 265sh 248sh, +AlCl₃ 379 346 298 275, +HCl 379 338 298 276, +NaOAc 398sh 331 267, +H₃BO₃ 331 267

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 400MHz, δ, ppm):

7.89 (2H, d, J=8.8Hz, H2', H6'), 6.95 (2H, d, J=8.8Hz, H3', H5'), 6.82 (1H, d, J=2Hz, H8), 6.66 (1H, s, H3), 6.51 (1H, d, J=2Hz, H6), 5.09 (1H, d, J=7.5Hz, H1''), 3.95 (1H, dd, J=12, 1.5Hz, H6a''), 3.74 (1H, dd, J=12, 5.6Hz, H6''b), 3.3-3.6 (H2'', H3'', H4'', H5'')

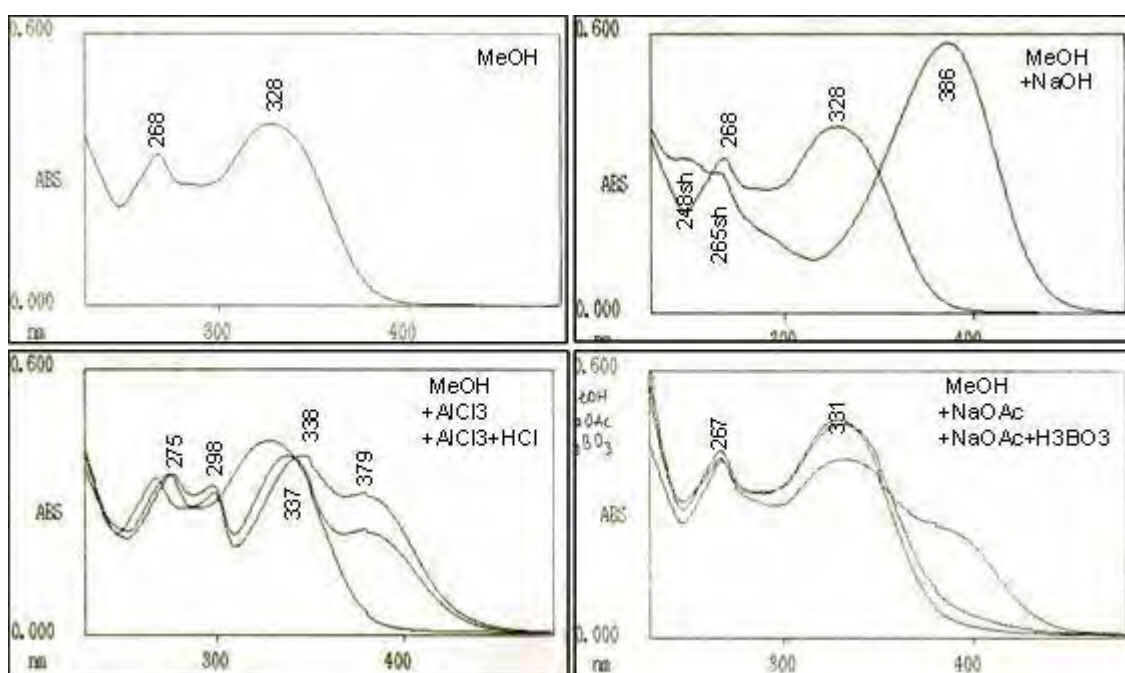
5) **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 100MHz, δ, ppm):

182.02 (C4), 164.29 (C2), 162.97 (C7), 161.48 (C4')*, 161.13 (C5)*, 156.96 (C9), 128.64 (C2', 6'), 120.97 (C1'), 116.04 (C3', 5'), 105.35 (C10), 103.10 (C3), 99.91 (C1''), 99.53 (C6), 94.86 (C8), 77.19 (C5''), 76.45 (C3''), 73.12 (C2''), 69.56 (C4''), 60.61 (C6'')

* ذرات كربون يمكن أن تحل مكان بعضها البعض

4-3-2- **التعيين البنوي للمركب M1:** اللون البنفسجي للمركب تحت الأشعة فوق البنفسجية و قيمة العصابة I في الميتانول يؤكدان أن المركب هو فلافون (flavone) و سلوكه الكروماتوغرافي في الجملة HOAc15% يدل على أن المركب هو جليكوزيد.

انزياح باثو كرومي للعصابة I بمقدار (58nm) مع زيادة في الشدة الضوئية بعد إضافة NaOH يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4، غياب هيدروكسيل حر في الموضع 7 يتأكد من عدم ظهور عصابة جديدة بين 330-320nm و كذا عدم انزياح العصابة II بعد إضافة NaOAc (شكل-76)، غياب انزياح باثو كرومي للعصابة I عند مقارنة طيفي المركب مع $(AlCl_3)$ و $(AlCl_3+HCl)$ من جهة و من جهة أخرى وجود انزياح طفيف للعصابة I عند مقارنة طيف المركب مع $(NaOAc + H_3BO_3)$ مع طيفه في الميتانول تؤكدان غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل في المركب، أما المقارنة بين طيف المركب في الميتانول و طيفه مع $(AlCl_3+HCl)$ حيث نلاحظ انزياح باثو كرومي للعصابة I بمقدار (61nm) فتدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5، مما سبق نستنتج أن المركب هو apigenin مستبدل في الموضع 7.

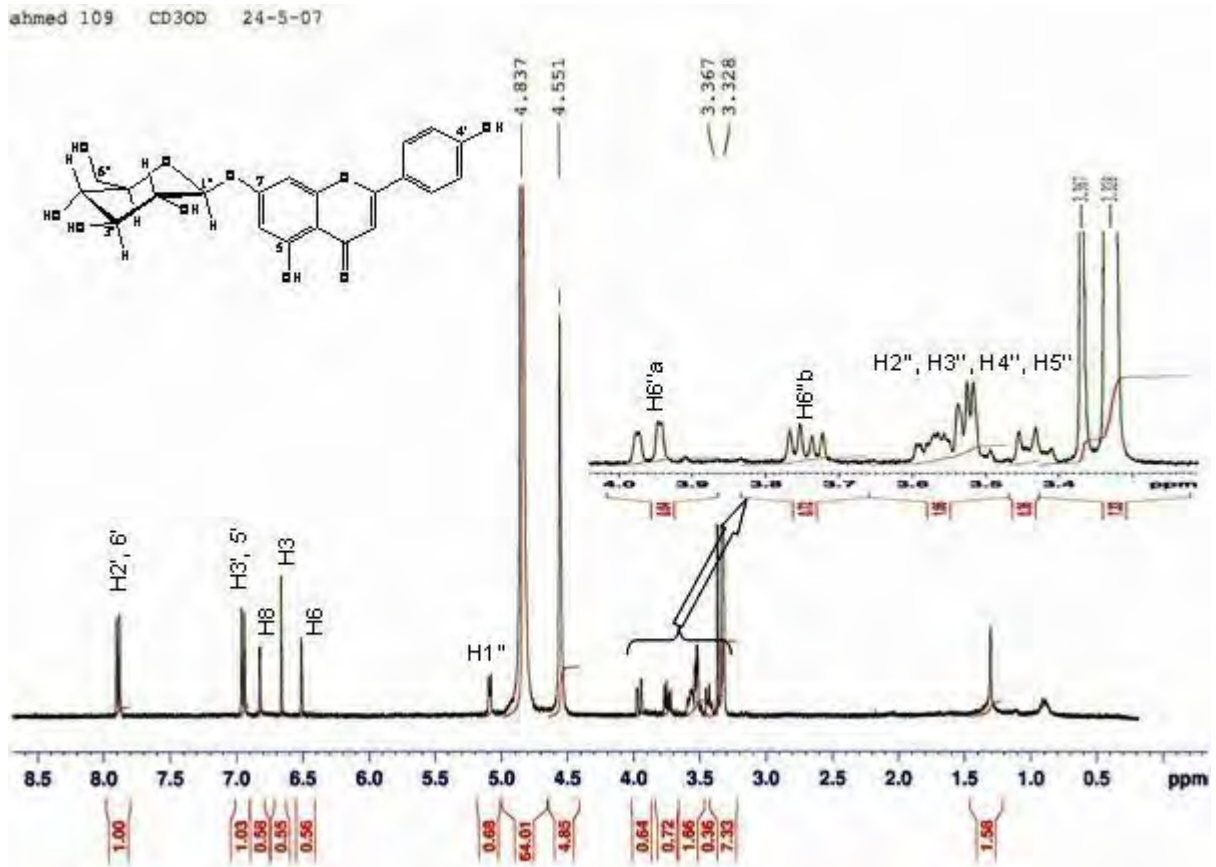
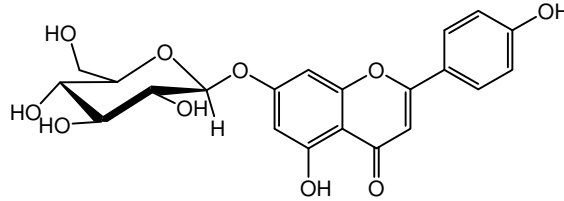


شكل-76- السلسلة الطيفية UV للمركب M1

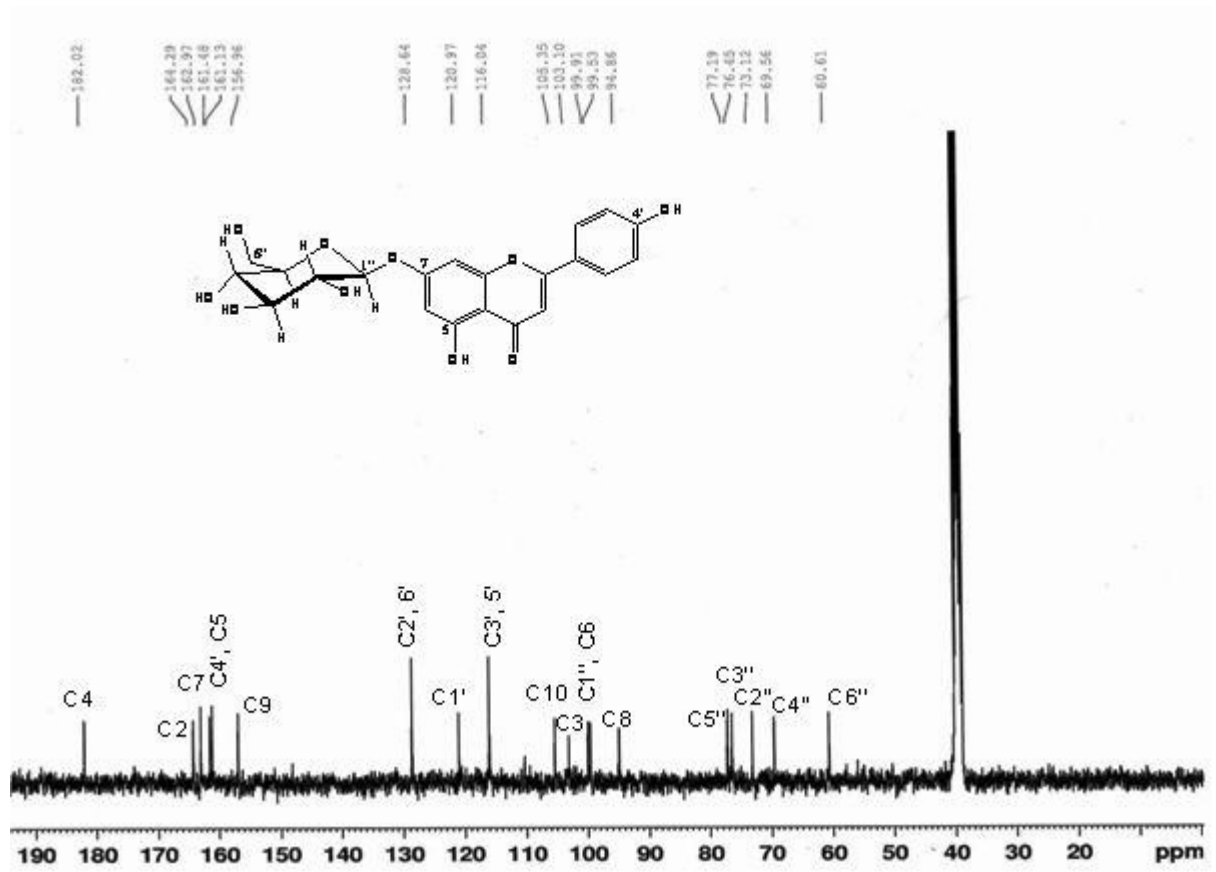
طيف ^1H-NMR للمركب في الشكل 77، أعطى إشارتين ثنائيتين ($J=8.8Hz$) تكامل كل واحدة بروتونين عند 7.89ppm و 6.95ppm موافقة لـ (H_6', H_2') و (H_5', H_3') على التوالي و إشارتين ثنائيتين ($J=2Hz$) تكامل كل واحدة بروتون عند 6.82ppm و 6.51ppm موافقتين لـ H_6, H_8 على الترتيب ثم إشارة أحادية موافقة لـ H_3 عند 6.66 ppm هذه النتائج تدل على أن الجزء الأجليكوني من المركب هو مركب apigenin. الجزء السكري ظهر عبر إشارة البروتون الأنوميري للجليكوز الذي ظهر عند 5.09ppm كإشارة ثنائية ($J=7.5Hz$) مما يدل على ارتباطه برابطة β مع الأجليكون كما ظهر H_{6a}' بشكل ثنائية- ثنائية عند 3.95ppm بثابت اقتران ($J=12, 1.5Hz$) و ظهر أيضا H_{6b}' بشكل ثنائية- ثنائية ($J=12, 5.6Hz$) عند 3.74ppm، بقية بروتونات الجليكوز تركزت إشاراتها بين [3.6-3.3ppm].

من جهته طيف ^{13}C -NMR في الشكل-78 أعطى إضافة إلى القمم الموافقة لذرات كربون الجزء الأجليكوني من المركب ستة قمم أخرى موافقة لذرات كربون الجليكوز و تم نسب مختلف القمم إلى ذراتها الموافقة اعتمادا على المراجع [138] و يكون بالتالي المركب M1 هو:

Apigenin 7-O- β -glucoside



شكل-77- طيف ^1H -NMR للمركب M1 (CD₃OD, 400MHz)



شكل-78- طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب M1 (DMSO- d_6 , 100MHz)

3-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M2:

Apigenin 7-O-β-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside

1) **Colour under UV:** Purple (on silica gel-tlc) بنفسجي

2) **R_f** : 0.49 (EtOAc) 0.40 (D9M1)

3) **UV-Visible:**

MeOH 316 290sh 270, +NaOH 375 265sh, +AlCl₃ 379 323sh 299 277, +HCl 379 322
298 278, +NaOAc 380 315 286 269, +H₃BO₃ 315 290sh 269

4) **¹H-NMR** (DMSO-d₆, 400MHz, δ, ppm):

7.93 (2H, d, J=8.8Hz, H2', 6'), 7.49 (1H, d, J=16Hz, H7'''), 7.35 (2H, d, J=8.8Hz, H2''', 6'''), 6.92 (2H, d, J=8.8Hz, H3', H5'), 6.80 (2H, br.s, H8, H3), 6.67 (2H, d, J=8.8Hz, H3''', 5'''), 6.47 (1H, d, J=2Hz, H6), 6.33 (1H, d, J=16Hz, H8'''), 5.15 (1H, d, J=7.2Hz, H1''), 4.47 (1H, d, J=12Hz, H6''a), 4.16 (1H, dd, J=12, 7.2Hz, H6''b), 3.83 (1H, t, J=8.5 Hz, H5''), 3.33 (1H, H3''), 3.30 (1H, H2''), 3.25 (1H, H4'')

5) **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 100MHz, δ, ppm):

183.22 (C-4), 167.71 (C-9'''), 165.55 (C-2), 163.97 (C-7), 162.66 (C-4'), 162.40 (C-5), 161.04 (C-4'''), 158.17 (C-9), 146.18 (C-7'''), 131.33 (C-2''', 6'''), 129.80 (C-2', 6'), 126.16 (C-1'''), 122.23 (C-1'), 117.28 (C-3', 5'), 116.94 (C-3''', 5'''), 115.01 (C-8'''), 106.65 (C-10), 104.27 (C-3), 100.78 (C-1'', C-6), 96.00 (C-8), 77.51 (C-3''), 75.11 (C-5'), 74.23 (C-2''), 71.30 (C-4''), 64.70 (C-6'')

4-3-4- التعيين البنوي للمركب M2:

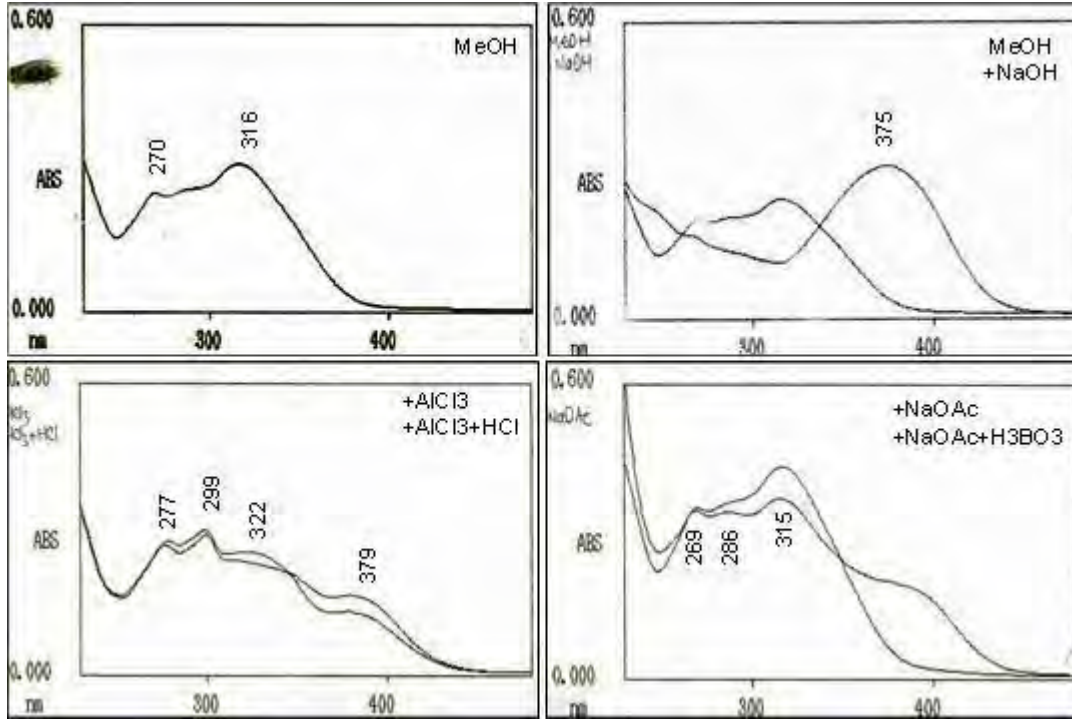
اللون البنفسجي للمركب تحت الأشعة فوق البنفسجية و قيمة العصابة I في الميتانول عند 316nm يدلان على أن المركب فلافون (Flavone).

انزياح باثوكرومي للعصابة I بمقدار (60nm) مع زيادة في الشدة الضوئية (شكل-79) بعد إضافة NaOH يدل على وجود مجموعة هيدروكسيل حر في الموضع 4.

غياب عصابة جديدة بين (320-335nm) و عدم انزياح للعصابة II بعد إضافة NaOAc يؤكدان غياب هيدروكسيل حر في الموضع 7.

غياب انزياح هيسوكرومي للعصابة I عند مقارنة طيف المركب مع (AlCl₃) و طيفه مع (AlCl₃+ HCl) يدل على غياب مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل في المركب و يتأكد هذا من غياب أي انزياح باثوكرومي عند مقارنة طيف المركب مع (NaOAc + H₃BO₃) و طيفه في الميتانول.

انزياح باثو كرومي للعصبة I بمقدار (63nm) عند مقارنة طيف المركب مع (AlCl₃ + HCl) و طيفه في الميتانول يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5. اللافت للانتباه في طيف الأشعة فوق البنفسجية هو قيمة العصبة I لهذا المركب في الميتانول أما بقية نتائجها فتدل على أن المركب عبارة عن مركب apigenin مستبدل بالموضع 7.



شكل-79- السلسلة الطيفية للمركب M2

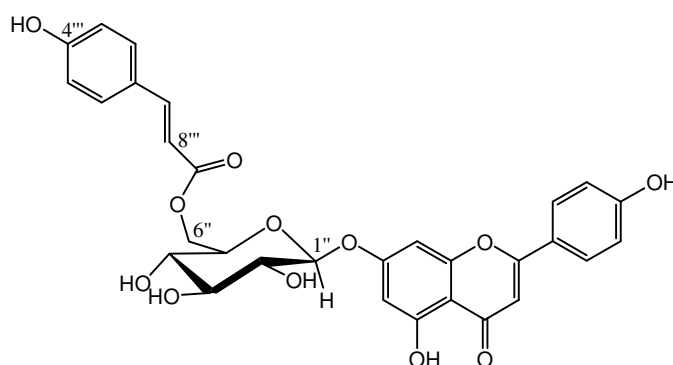
جاء التوضيح من طيف ¹H-NMR في الشكل-80، حيث أكد أن صيغة الجزء الأجليكوني من المركب هو apigenin من خلال ظهور إشارتي بروتونات الحلقة B بشكل ثنائيتين (J=8.8Hz) عند 7.93ppm للزوج (H6', H2') و 6.92ppm للزوج (H5', H3'). ظهور أيضا إشارتي بروتوني الحلقة A بشكل ثنائيتين (J=2Hz) لكل من H6, H8 عند 6.47, 6.80ppm على التوالي و ظهر H3 كإشارة أحادية متداخلا مع إشارة بروتون H8. يتجلى أيضا من طيف ¹H-NMR وجود سكر الجليكوز من خلال إشارة البروتون الأنوميري عند 5.15ppm الذي ظهر بشكل ثنائية (J=7.2Hz) مما يدل على ارتباطه برابطة β مع الأجليكون. تباعد إشارات بقية بروتونات الجليكوز فيما بينها إضافة إلى انزياحها عموما إلى مجال أخفض و بالخصوص انزياح إشارتي H6''a و H6''b إلى مجال أخفض (0.52ppm) مقارنة بانزياحاتها في طيف المركب M1 يدل على أسيلة هيدروكسيل ذلك الموضع.

طبيعة المستبدل المرتبط بهيدروكسيل السكر في الموضع C6'' اتضحت من خلال ظهور إشارات مميزة لمجموعة coumaroyl في طيف المركب حيث نلاحظ إشارتين موافقتين لبروتوني رابطة ثنائية H7''', H8''' عند 6.33, 7.45ppm على الترتيب بثابت اقتران (J=16Hz) مما يؤكد وضع (trans) لهذه الرابطة. كما ظهرت بروتونات الحلقة البنزينية لهذه المجموعة من خلال إشارتين ثنائيتين (J=8.8Hz) تكامل كل واحدة بروتونين موافقتين لكل من (H2'', H6'') و (H3'', H5'').

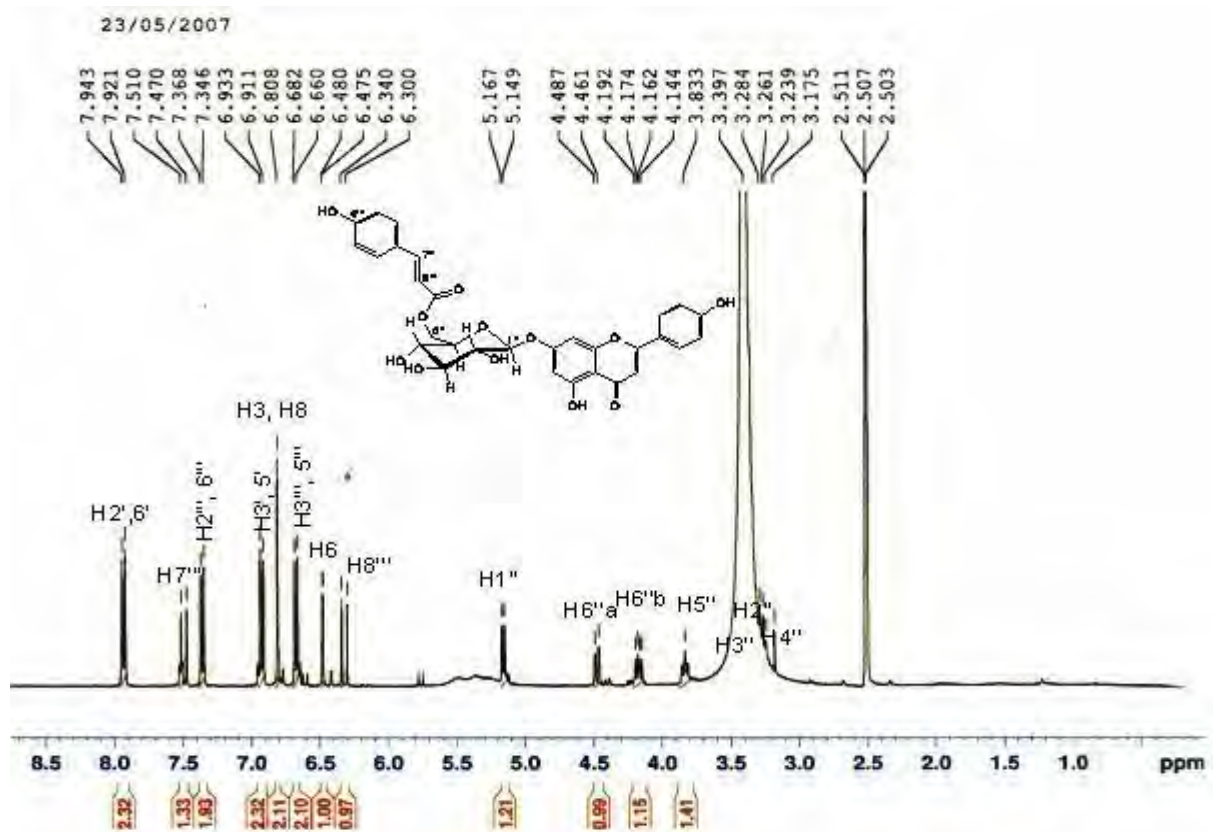
من جهته أكد طيف ¹³C-NMR في الشكل-81- ما ذكرناه سابقا من خلال ظهور القمم الخاصة بالجزء الأجليكوني و التي تتطابق انزياحاتها مع انزياحات قمم الأجليكون للمركب M1 و ظهور القمم المميزة لمجموعة coumaroyl و أخيرا ستة قمم خاصة بذرات كربون سكر الجليكوز و يتضح من قيم انزياحها أن إشارة ذرة C6'' انزاحت بمقدار (4.3ppm) نحو مجال أخفض مقارنة أيضا بقيمتها في طيف المركب M1 بينما انزاحت إشارة C5'' نحو مجال أعلى بمقدار (2ppm) هذا يؤكد مرة أخرى ارتباط مجموعة coumaroyl بهيدروكسيل C6'' أما بقية إشارات ذرات السكر فإنها لم تتأثر.

وجود مجموعة coumaroyl هذه حيث تتوافق مجموعة كربونيل مع رابطة مضاعفة و مع حلقة عطرية و بالتالي تشكل حاملا للون أي كروموفور (Chromophore) أثر على طيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب و خاصة العصابة I بحيث انزاحت مقارنة بقيمتها في طيف المركب M1 نحو 316nm.

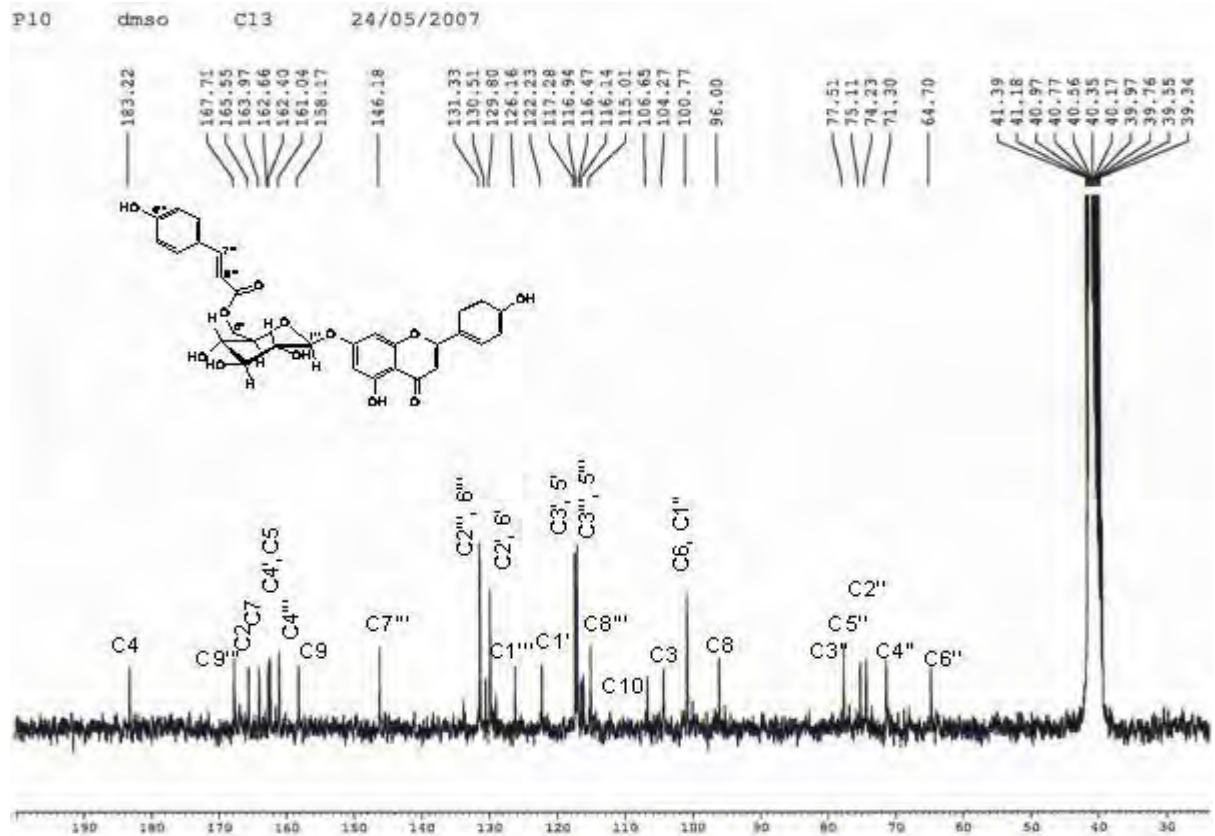
بالاستعانة بتجارب H,H-COSY في الشكل-82، أمكن تحديد البروتونات المتعاقبة مع بعضها البعض و تمييز البروتونات العطرية الخاصة بالحلقة B و تلك الخاصة بالحلقة البنزينية لمجموعة coumaroyl كما أمكننا تحديد مواقع إشارات جميع بروتونات سكر الجليكوز، من جهتها تجارب HMQC سمحت بتعيين مختلف قمم ذرات الكربون الحاملة لبروتونات على الطيف في الشكل-83، مما سبق ذكره نخلص إلى أن المركب M2 هو:



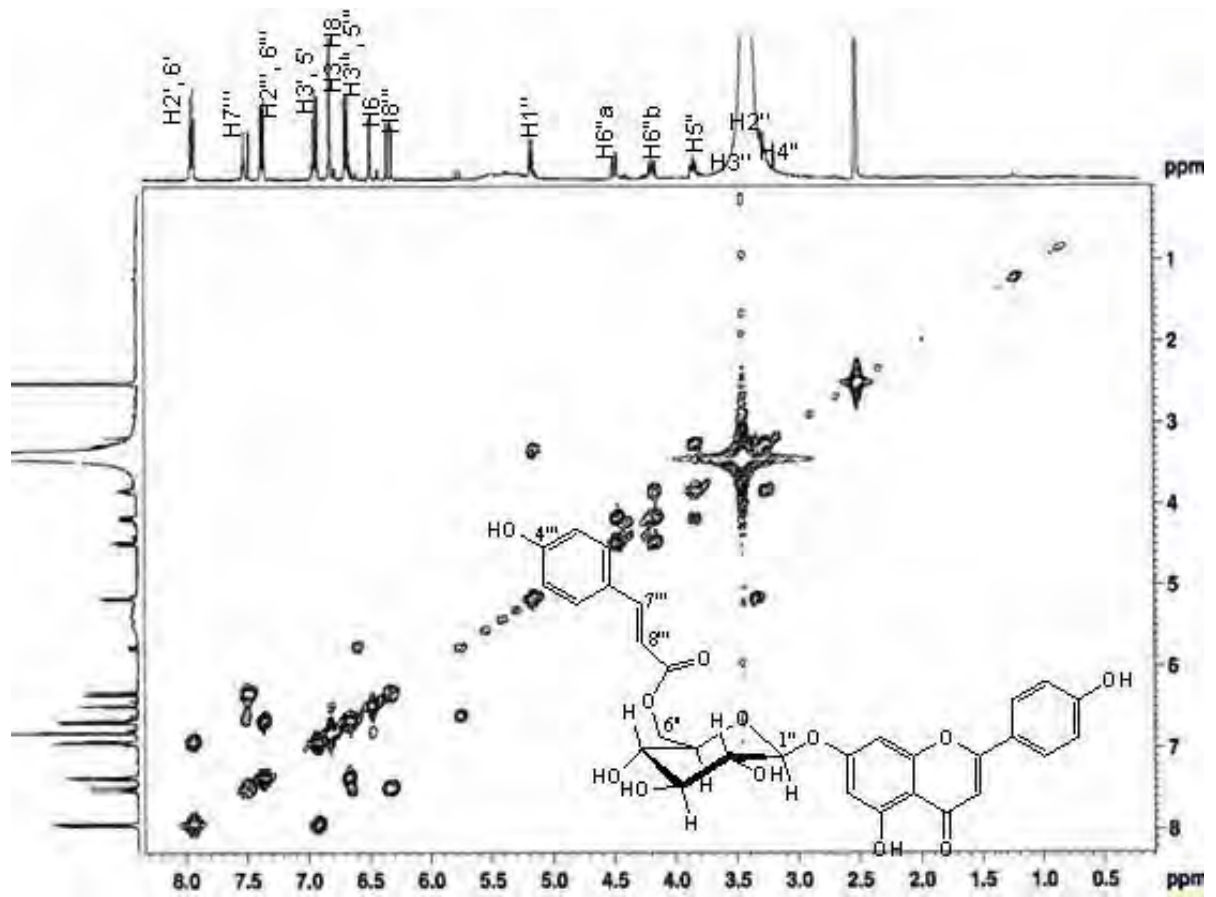
**Apigenin 7-O-β-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside
(Terniflorin)**



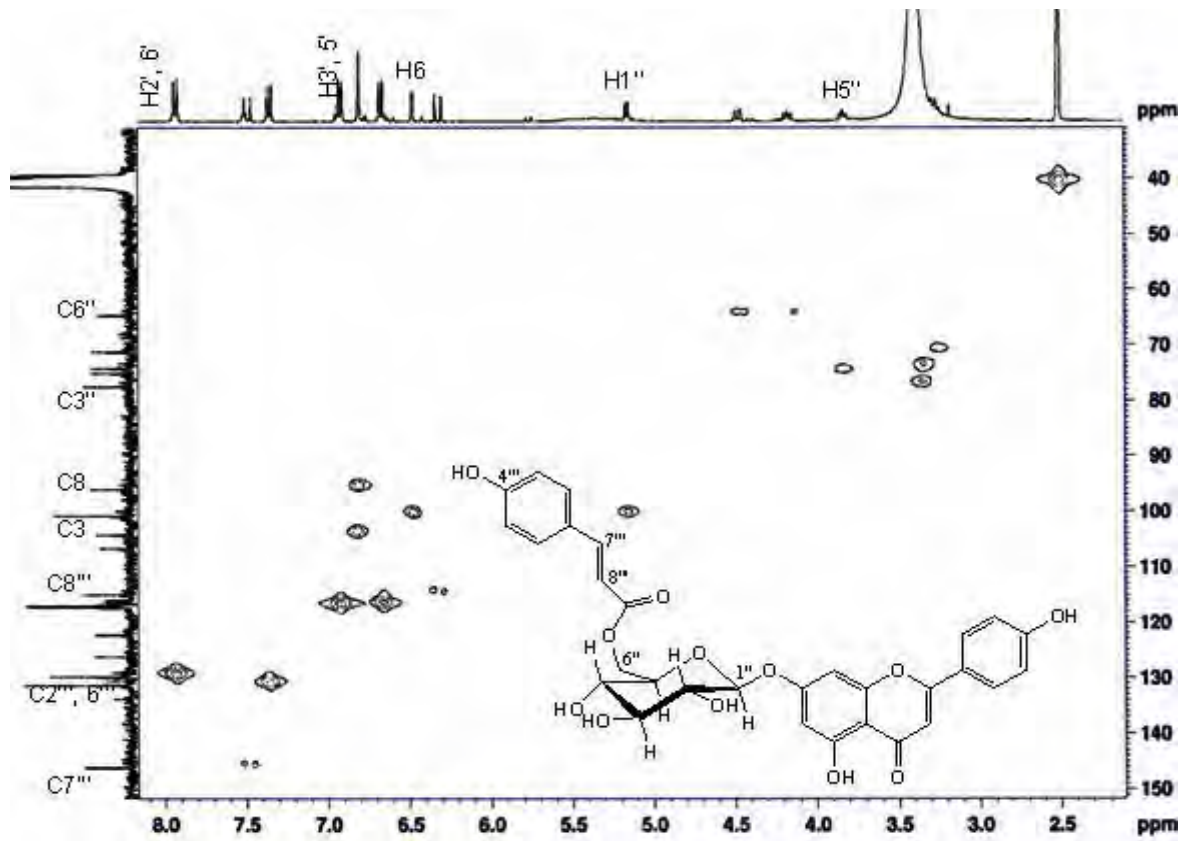
شكل-80- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب M2 (DMSO- d_6 , 400MHz)



شكل-81- طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب M2 (DMSO- d_6 , 100MHz)



شكل-82- طيف H,H-COSY للمركب M2



شكل-83- طيف HMQC للمركب M2

4-3-5- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M3:

Apigenin 7-O-β-(3''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside

1) **Colour under UV:** Purple (on silica gel-tlc) بنفسجي

2) **R_f:** 0.77 (EtOAc), 0.54 (D9M1)

3) **UV-Visible:**

MeOH 316 297sh 270, +NaOH 367 305sh 270sh, +AlCl₃ 383 321 299 277, +HCl 383 320
298 277, +NaOAc 379 314 269, +H₃BO₃ 316 298sh 270

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 400MHz, δ, ppm):

7.89 (2H, d, J=8.4Hz, H2', 6'), 7.71 (1H, d, J=16Hz, H7'''), 7.5 (2H, d, J=8.4Hz, H2''',
6'''), 6.95 (2H, d, J=8.4Hz, H3', H5'), 6.84 (3H, d, J=8Hz, H3''', 5''', H8), 6.67 (1H, s,
H3), 6.52 (1H, br.d, H6), 6.45 (1H, d, J=16Hz, H8''') 5.23 (2H, t, J=7.6Hz, H1'', H3''),
3.95 (1H, d, J=10.8Hz, H6''a), 3.60-3.80 (3H, m, H6''b, H2'', H4'', H5'')

5) **¹³C-NMR** (CD₃OD, 100MHz, δ, ppm):

184.18 (C4), 169.18(C9'''), 166.88(C2), 164.76(C7), 163.11 (C4'), 163.00(C5), 161.42
(C4'''), 159.05 (C9), 146.89 (C7'''), 131.32 (C2''', 6'''), 129.79 (C2', 6'), 127.42 (C1'''),
123.14 (C1'), 117.20 (C3', 5'), 116.99 (C3''', 5'''), 115.57 (C8'''), 107.28(C10), 104.26
(C3), 101.59 (C1'') 101.33 (C6), 96.20 (C8), 78.78 (C3''), 78.37 (C5''), 73.31 (C2''),
69.65(C4''), 62.32(C6'')

6) **MS-ESI⁺(m/z):**

601.15 [M+Na]⁺, 437.18 [M+Na-coumaric acid]⁺, 271.14 [MH-(coumaric acid+glucose)]⁺

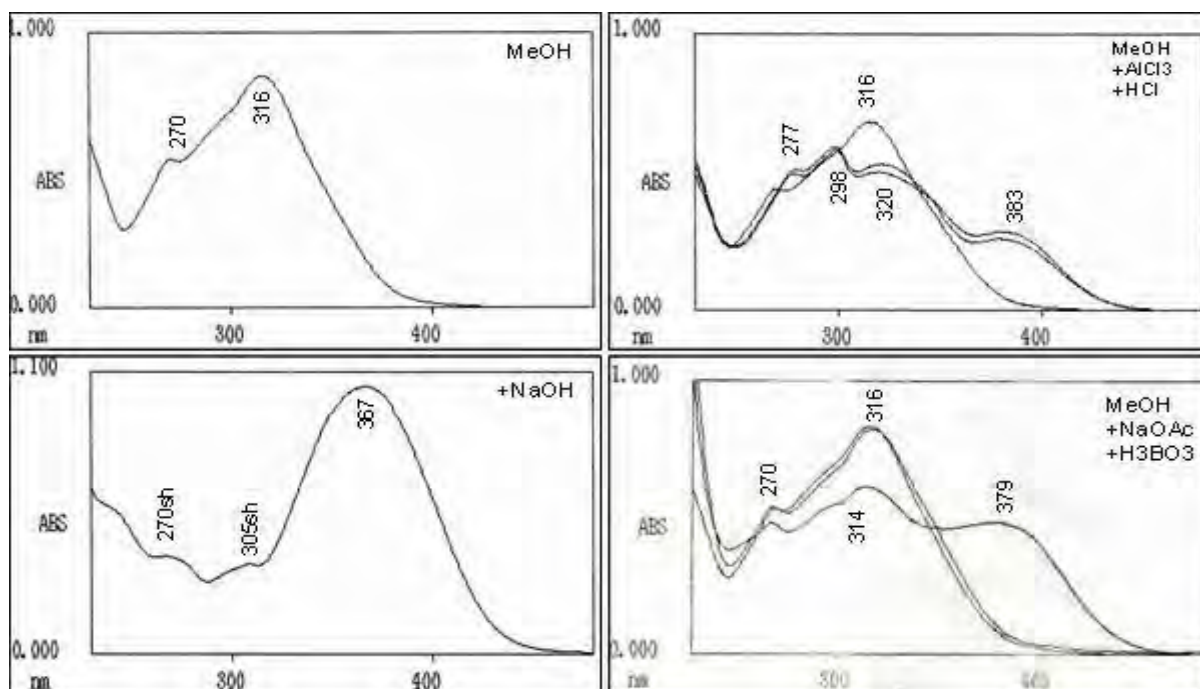
4-3-6- التعيين البنوي للمركب M3:

طيف الكتلة بتقنية MS-ESI⁺ أعطى قمة شبه جزيئية عند $m/z=601$ موافقة لـ [M+Na]⁺ مؤكدة أن الصيغة
المجملة للمركب هي C₃₀H₂₆O₁₂، كما أعطى قمم موافقة لأيونات التنشيطية عند $m/z=437$ الموافقة لتزع جزيئة
acid coumaric ثم عند $m/z=271$ موافقة لتزع جزيئة سكر الجليكوز (شكل-88)،

من جهة أخرى يتشابه هذا المركب مع سابقه M2 في لونه البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية و سلسلته
الطيفية لأشعة ما فوق البنفسجية (شكل-84) و طيف ¹H-NMR في جزئه الأروماتي (شكل-86) حيث نجد
إشارات الجزء الأجليكوني منه و هو apigenin و إشارات مجموعة coumaroyl و أخير يتشابه معه في ارتباط
سكر الجليكوز بالموضع 7، لكنه يختلف عنه أولاً في ثابت الانحباس R_f في عدة جمل و ثانيا يظهر الاختلاف في
الجزء السكري منه في طيف ¹H-NMR بداية من وجود إشارة بروتون تتداخل مع إشارة البروتون الأنوميري

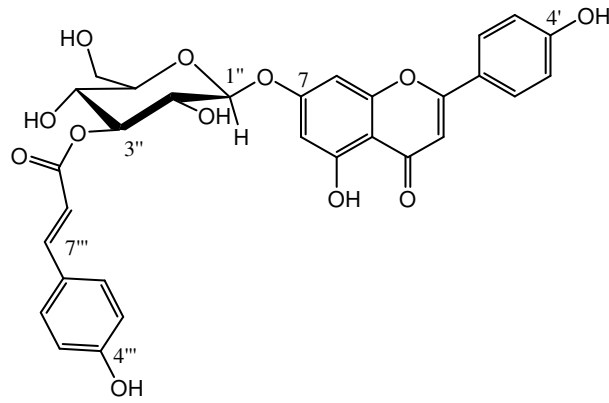
للجليكوز عند 5.23ppm ليعطيا إشارة ثلاثية غير متناظرة (شكل-85) ثم تداخل و تمرکز بقية بروتونات السكر في منطقة ضيقة بين (3.65-3.95ppm) مختلفا عن المركب M2 مما يعني أننا أمام مماكب له و أن مجموعة coumaroyl غير مرتبطة بـ "C6، موقع هذه المجموعة تحدد من دراسة طيف ^{13}C -NMR للمركب (شكل-87) حيث نلاحظ تشابهه مع طيف المركب M2 في جزئه الأروماتي أيضا بينما في جزئه السكري نلاحظ انزياح إشارة "C3 إلى مجال منخفض عند 78.78ppm (بدلا من حوالي 76ppm) مجاورة لإشارة "C5 عند 78.37ppm.

بالرجوع ثانية إلى طيف ^1H -NMR (شكل-85) نستنتج أن الإشارة المتداخلة مع إشارة "H1 هي لبروتون "H3 حيث انزاحت نحو مجال منخفض بحوالي 1.6ppm مقارنة بانزياحها الكيميائي في طيف المركب M1 بينما انزاحت بقية بروتونات المجاورة لها نحو مجال الأعلى.

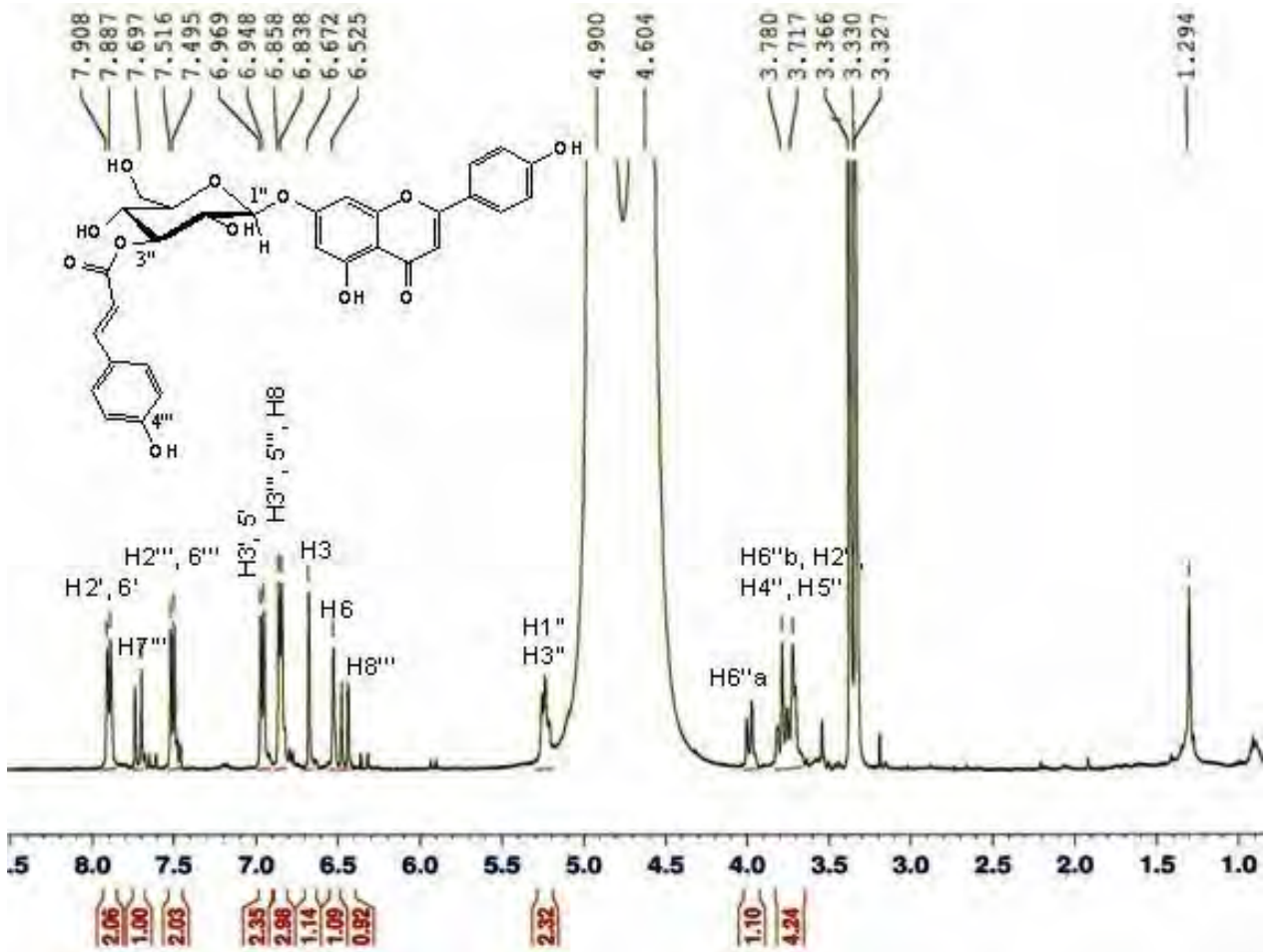


شكل-84- السلسلة الطيفية UV للمركب M3

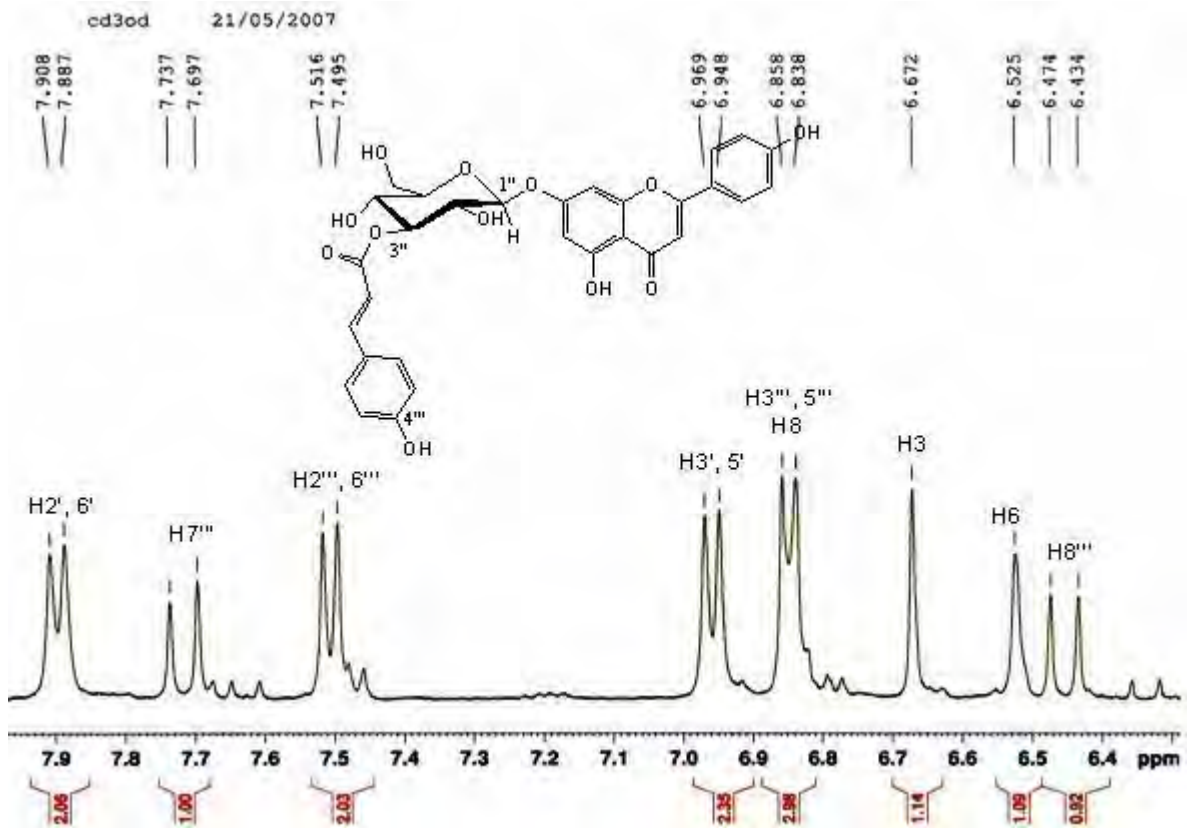
أطياف تجارب الرنين النووي ثنائية البعد COSY و HMQC لهذا المركب و لكن المفصول من نبات آخر هو *Ballota hursita* مكنتنا من تحديد مواقع البروتونات و ذرات الكربون على طيفيهما. بالاعتماد على هذه النتائج فالمركب M3 هو:



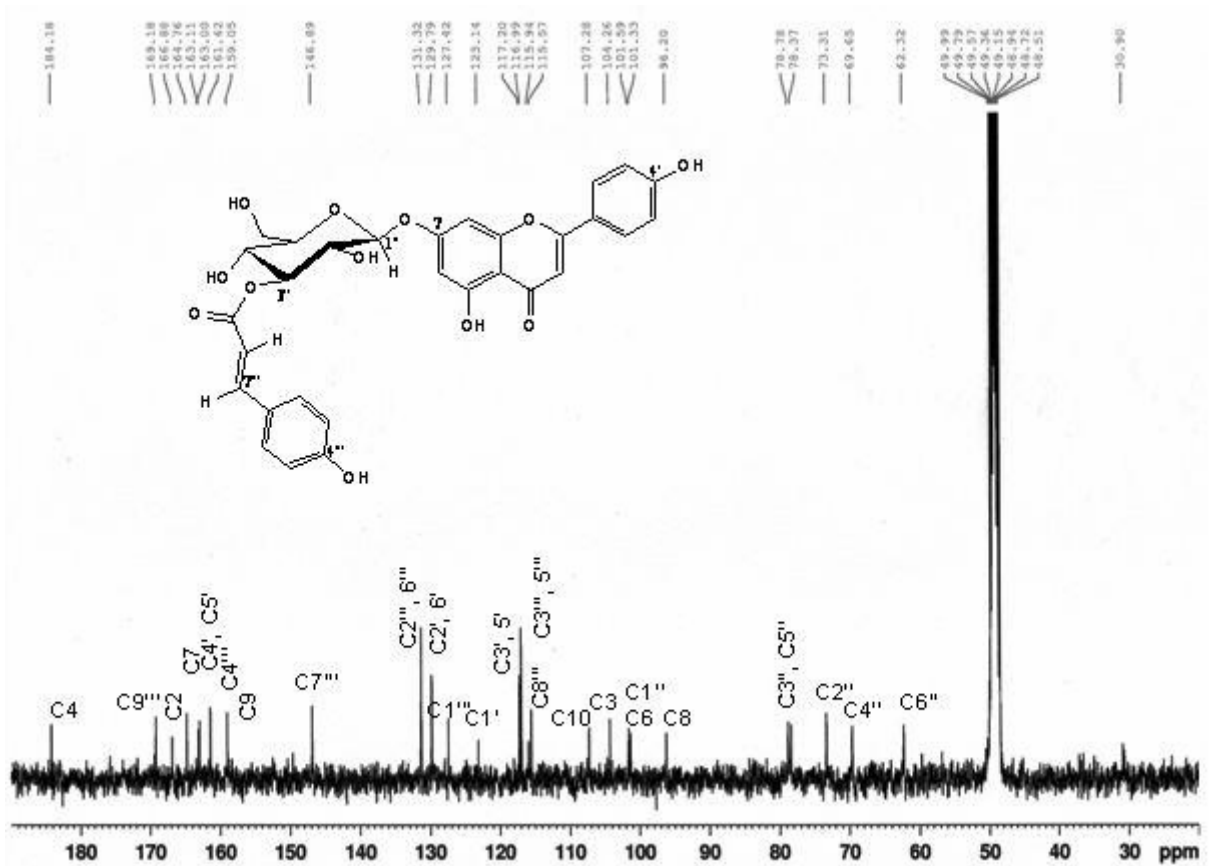
Apigenin 7-O- β -(3''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside



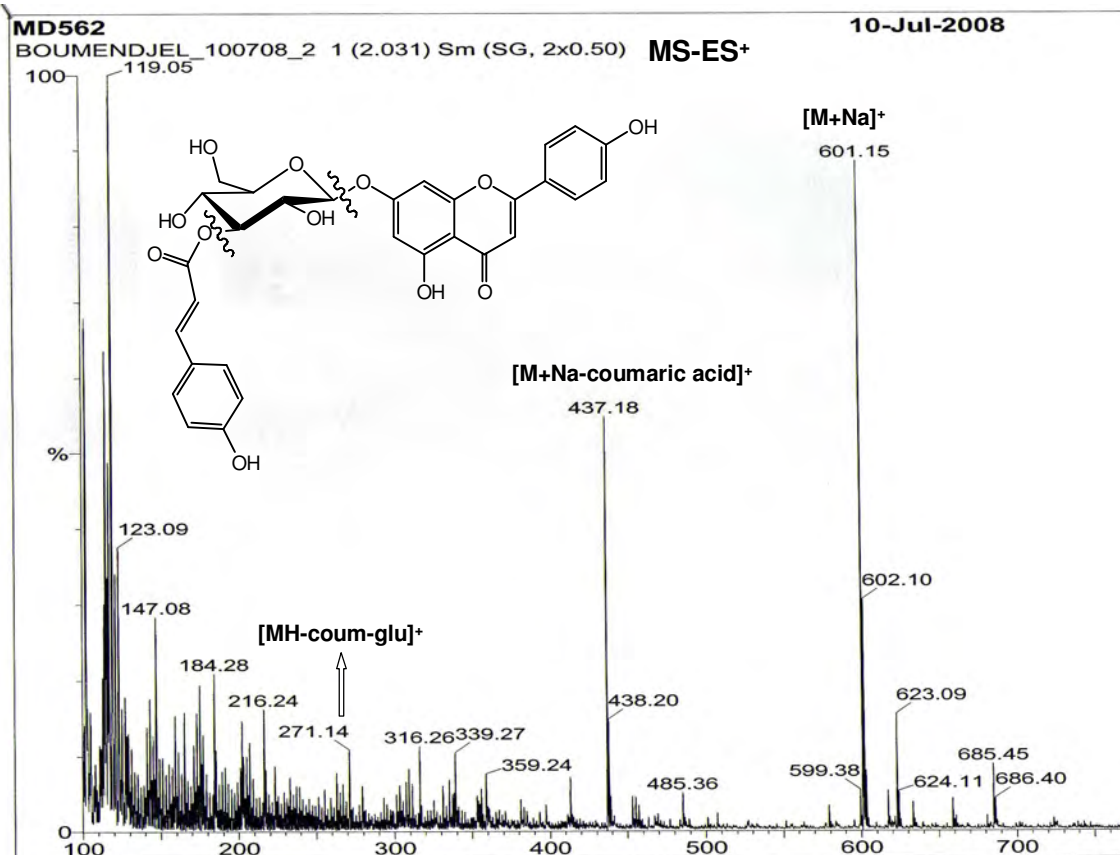
شكل-85- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب M3 (CD₃OD, 400MHz)



شكل-86- تكبير المنطقة الأروماتية من طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب M3



شكل-87- طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب M3 (CD₃OD, 100MHz)



شكل-88- طيف الكتلة MS-ESI⁺ للمركب M3

7-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M4:

Apigenin 7-O-β-(3'', 6''-O-di-E-p-coumaroyl)-glucoside

(Anisofolin-A)

1) **Colour under UV:** Purple (on silica gel-tlc) بنفسجي

2) **R_f** : 0.80 (EtOAc), 0.82 (D9M1), 0.46 (HOAc15%)

3) **UV-Visible:**

MeOH 315 270sh, +NaOH 368 310sh 270sh 250sh, +AlCl₃ 379 316 299 276sh, +HCl
379 316 299 276sh, +NaOAc 474 315 270sh, +H₃BO₃ 316 270sh

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 400MHz, δ, ppm):

7.8 (2H, d, J=8.4Hz, H2', H6'), 7.73 (1H, d, J=16Hz, H7'''), 7.54 (1H, d, J=16Hz, H7'''), 7.49 (2H, d, J=8.4Hz, H2''', H6'''), 7.19 (2H, d, J=8.8Hz, H2''', H6'''), 6.94 (2H, d, J=8.8Hz, H3', H5'), 6.86 (2H, d, J=8.4Hz, H3''', H5'''), 6.75 (1H, br.d, H8), 6.66 (2H, d, J=8.4Hz, H3''', H5'''), 6.56 (2H, br.d, H3, H6), 6.43 (1H, d, J=16Hz, H8'''), 6.27 (1H, d, J=16Hz, H8'''), 5.25 (1H, d, J=7.2Hz, H1''), 5.24 (1H, t, J=8.8Hz, H3''), 4.68 (1H, dd, J=10, 1.5Hz, H6''a), 4.35 (1H, dd, J=11.2, 8Hz, H6''b), 4.04 (1H, t, J=8.4Hz, H5''), 3.83 (1H, t, J=8.8Hz, H2''), 3.6 (1H, t, J=10.8Hz, H4'')

5) **¹³C-NMR** (CD₃OD, 100MHz, δ, ppm):

184.16 (C4), 169.08 (C9''', C9'''), 166.77 (C2), 164.50 (C7), 163.12(C4', C5), 161.47 (C4'''), 161.32 (C4'''), 158.97 (C9), 147.17 (C7'''), 146.99 (C7'''), 131.34 (C2''', 6'''), 131.19 (C2''', 6'''), 129.71 (C2', 6'), 127.42 (C1'''), 127.04 (C1'''), 123.08 (C1'), 117.19 (C3', 5'), 117.00 (C3''', 5'''), 116.87 (C3''', 5'''), 115.49 (C8'''), 114.75 (C8'''), 107.33 (C10), 104.16 (C3), 101.40 (C6), 101.14 (C1''), 96.04 (C-8), 78.64 (C3''), 75.63 (C5''), 73.17 (C2''), 70.67 (C4''), 64.71 (C6'')

* جميع البروتونات و ذرات الكربون الحاملة لـ ' ' أو لـ ' ' يمكن أن يحل بعضها مكان بعض.

8-3-4- التعيين البنوي للمركب M4:

يتشابه هذا المركب مع سابقه في لونه تحت الأشعة فوق البنفسجية و سلسلته الطيفية لأشعة ما فوق البنفسجية (شكل-89) إلى حد كبير لكنه يختلف عنهما في ثابت الانحباس R_f في عدة جمل حيث يظهر أنه أقل قطبية منهما مما يشير إلى احتمال وجود أكثر من مجموعة coumaroyl واحدة.

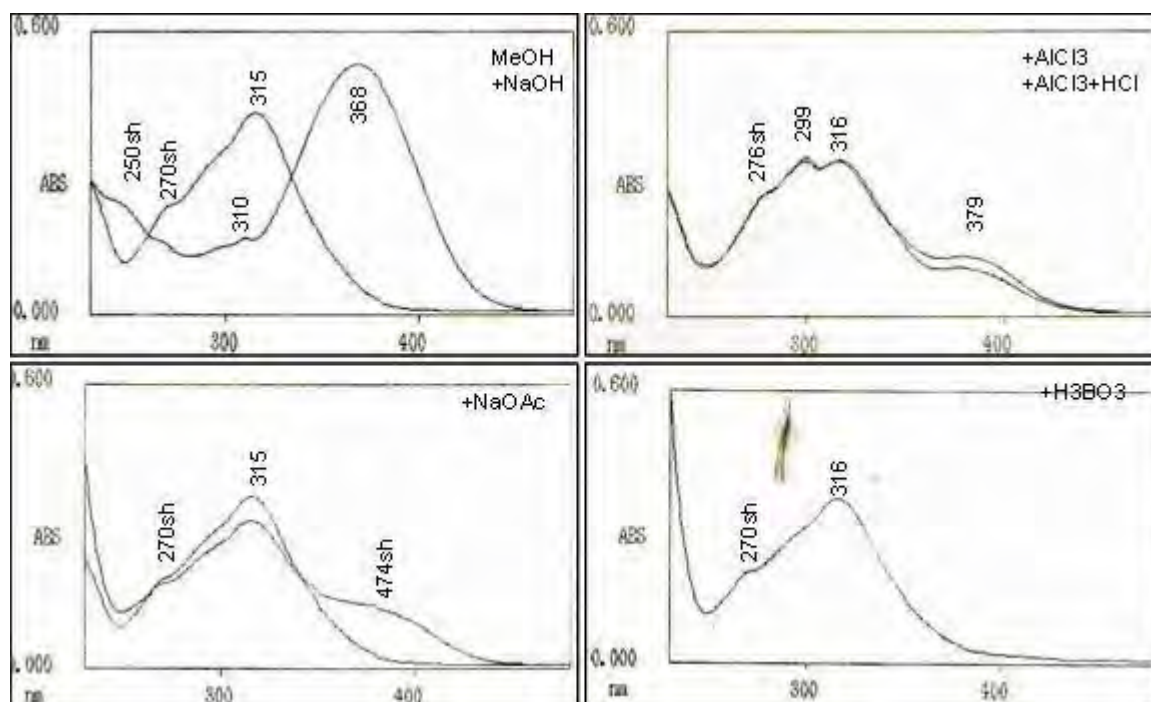
يتضح هذا من طيف ¹H-NMR للمركب في الشكل-90، حيث نلاحظ أنه إضافة إلى وجود إشارات الجزء الأجليكوني منه (apigenin) هناك أربع إشارات ثنائية (J=16Hz) تكامل كل واحدة بروتون نسبت لبروتونات

رابطتين ثنائيتين (ذات هندسة فراغية trans) و أربع إشارات ثنائية ($J=8.4\text{Hz}$) تكامل كل واحدة بروتونين مما يؤكد وجود مجموعتي coumaroyl أخيرا وجود لإشارات بروتونات سكر الجليكوز و التي نلاحظ تباعدها بعضها عن بعض (مقارنة بالمركبين السابقين) مما يؤكد أسيلة أكثر من هيدروكسيل واحد.

فوجد إشارة ثلاثية (غير متناظرة) تكاملها بروتونين (كما في المركب M3) موافقة لـ $H1''$ و $H3''$ ثم إشارات كل من $H5''$, $H6''b$, $H6''a$ التي ظهرت بشكل ثنائية عريضة ثم ثنائية-ثنائية و أخيرا إشارة ثلاثية على التوالي (كما في المركب M2) ثم إشارة أخرى ثلاثية موافقة لـ $H2''$ و أخيرا إشارة ثلاثية موافقة لـ $H4''$.

انزياح إشارة $H3''$ نحو مجال أخفض متداخلة مع إشارة البروتون الأنوميري هو دليل على ارتباط مجموعة coumaroyl الأولى بهيدروكسيل $C3''$ كما أن انزياح إشارتي $H6''b$, $H6''a$ إلى مجال أخفض أيضا هو دليل على ارتباط مجموعة coumaroyl الثانية بهيدروكسيل $C6''$.

أما في طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب (الشكل-91) فنلاحظ أنه إضافة إلى القمم المميزة للجزء الأجليكوني من المركب و القمم الخاصة بالجزء السكري و التي نلاحظ تباعدها عن بعضها مما يدعم ما ذكرناه سابقا على وجود أكثر من مجموعة أسيل مرتبطة بهيدروكسيلات السكر، تواجد لعدد آخر من القمم يوافق وجود مجموعتي coumaroyl مرتبطتين بالجليكوز من خلال هيدروكسيلي $C3''$, $C6''$ نتيجة انزياح قممها إلى مجال



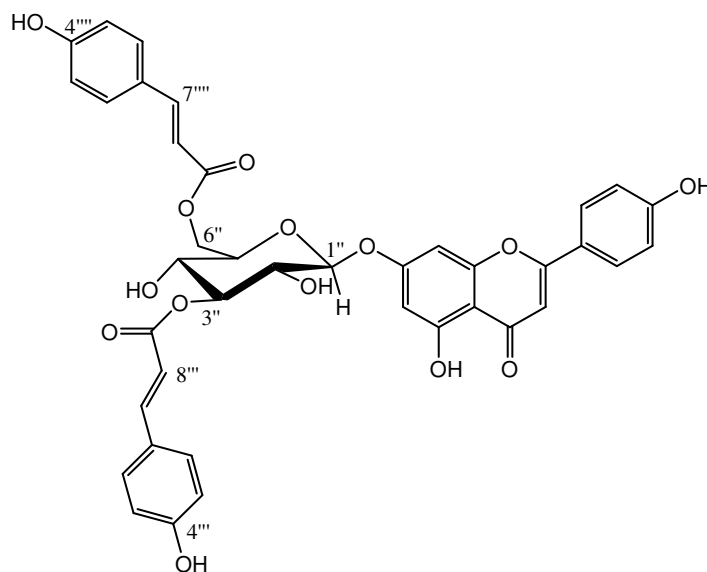
شكل-89- السلسلة الطيفية UV للمركب M4

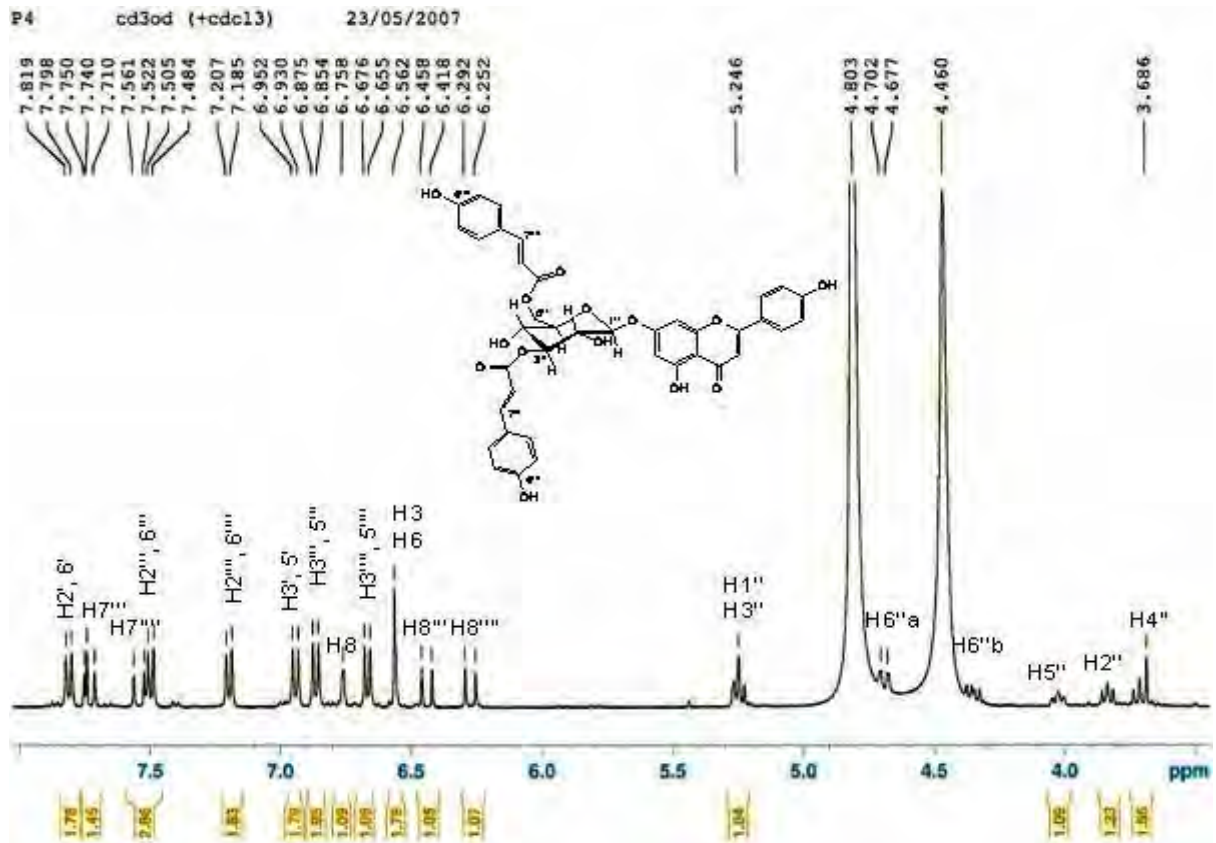
أعلى عند 64.71, 78.64ppm على التوالي و انزياح بالمقابل لقمم ذرات $C2''$, $C4''$, و $C5''$ المجاورة نحو مجال أعلى.

أطياف تجارب الرنين النووي ثنائي البعد H,H-COSY مكنتنا تحديد البروتونات المتعاقبة مع بعضها البعض كما هو واضح من الشكلين-92، 93 بالنسبة للجزء السكري فإن التعانقات بين مختلف البروتونات كانت جد واضحة و لا تحتاج إلى تعليق، من جهتها أطياف تجارب HMQC في الشكلين-94 و 95 مكنتنا من ربط كل بروتون بذرة الكربون المرتبط بها و نذكر هنا تعانق الإشارة عند 5.25ppm الموافقة لـ (H3'', H1'') مع ذرتي كربون إحداهما عند 101.14ppm موافقة لـ C1'' و الثانية عند 78.64ppm موافقة لـ C3'' و كذلك تعانق الإشارة عند 64.71ppm (C6'') مع إشارتي بروتونين أحدهما عند 4.68ppm نسبت لـ H6''a و الآخر عند 4.35ppm نسبت لـ H6''b، أيضا تعانق الإشارة عند 6.56ppm مع قمتين الأولى عند 104.16ppm موافقة لـ C3 و الثانية عند 101.40ppm موافقة لـ C6.

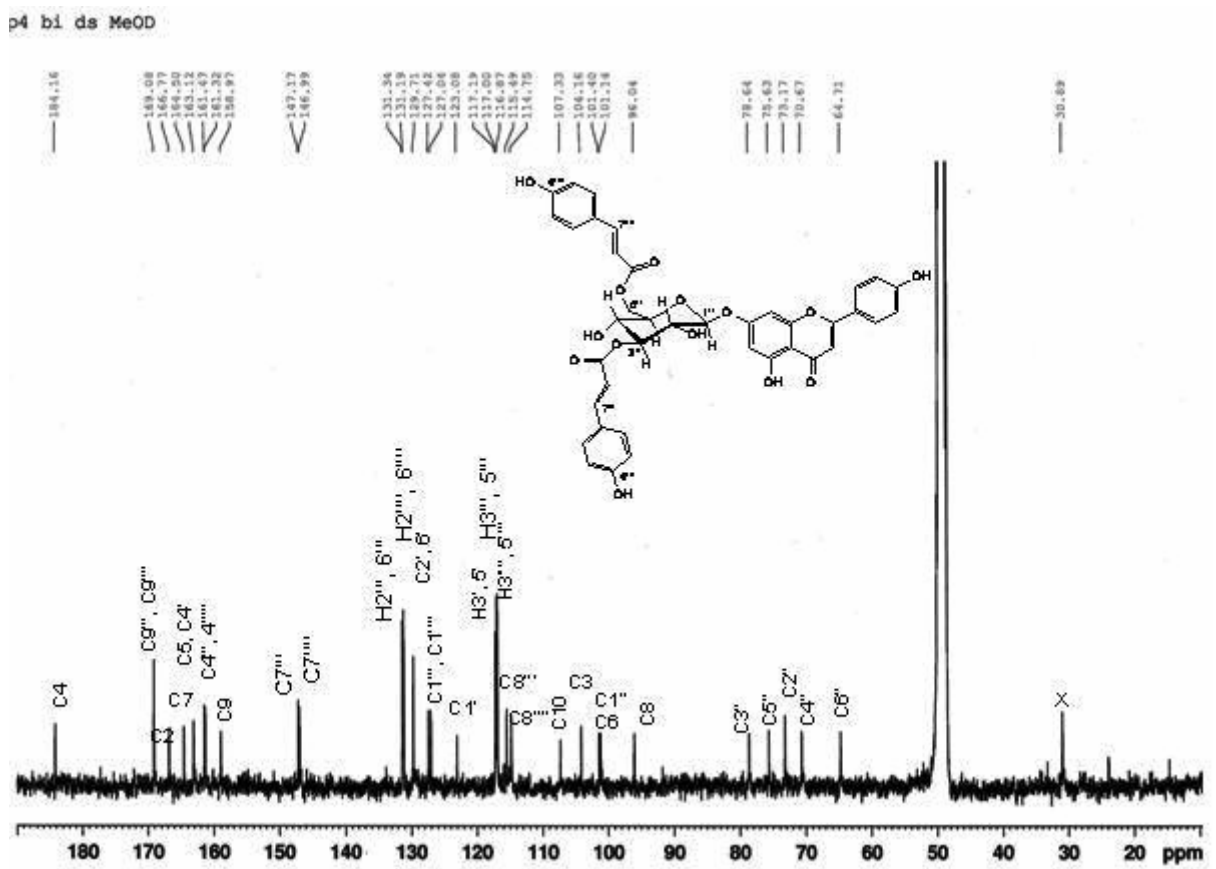
أما أطياف تجارب HMBC في الشكلين-96 و 97 فسمحت بتعيين بقية القمم على طيف ¹³C-NMR و الشكل-98 يوضح التعانقات بين مختلف البروتونات و ذرات الكربون مع الإشارة هنا إلى أنه نظرا لكون ذرتي كربون مجموعتي كربونيل لحمضي الكوماريك (C9''', C9''') لها نفس الإنزياح الكيميائي فإنه من غير الممكن تأكيد أيهما يرتبط بالموضع 3 و 6 و لكن المؤكد أنهما يرتبطان بمذيين الموضعين، بالاعتماد على هذه النتائج فإن المركب M4 هو:

**Apigenin 7-O-β-(3'', 6''-O-di-E-p-coumaroyl)-glucoside
(Anisofolin-A)**

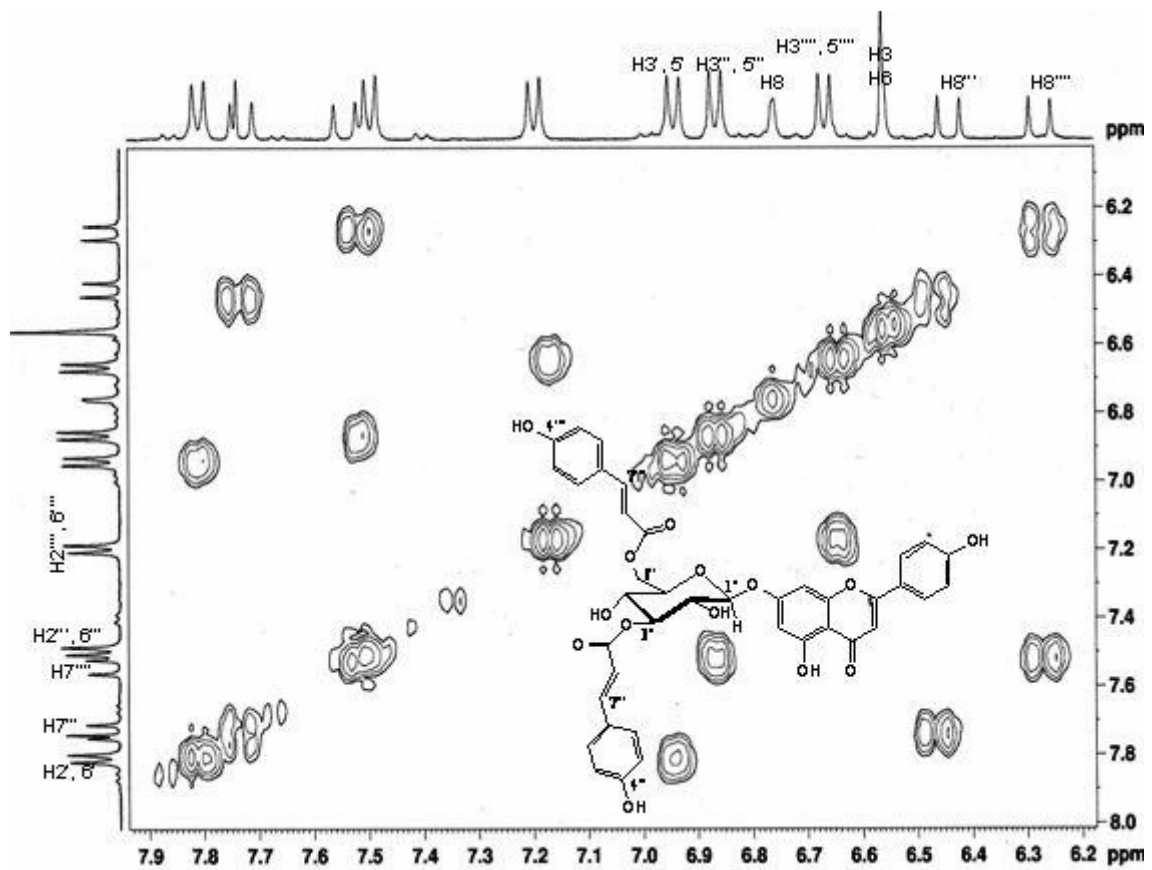




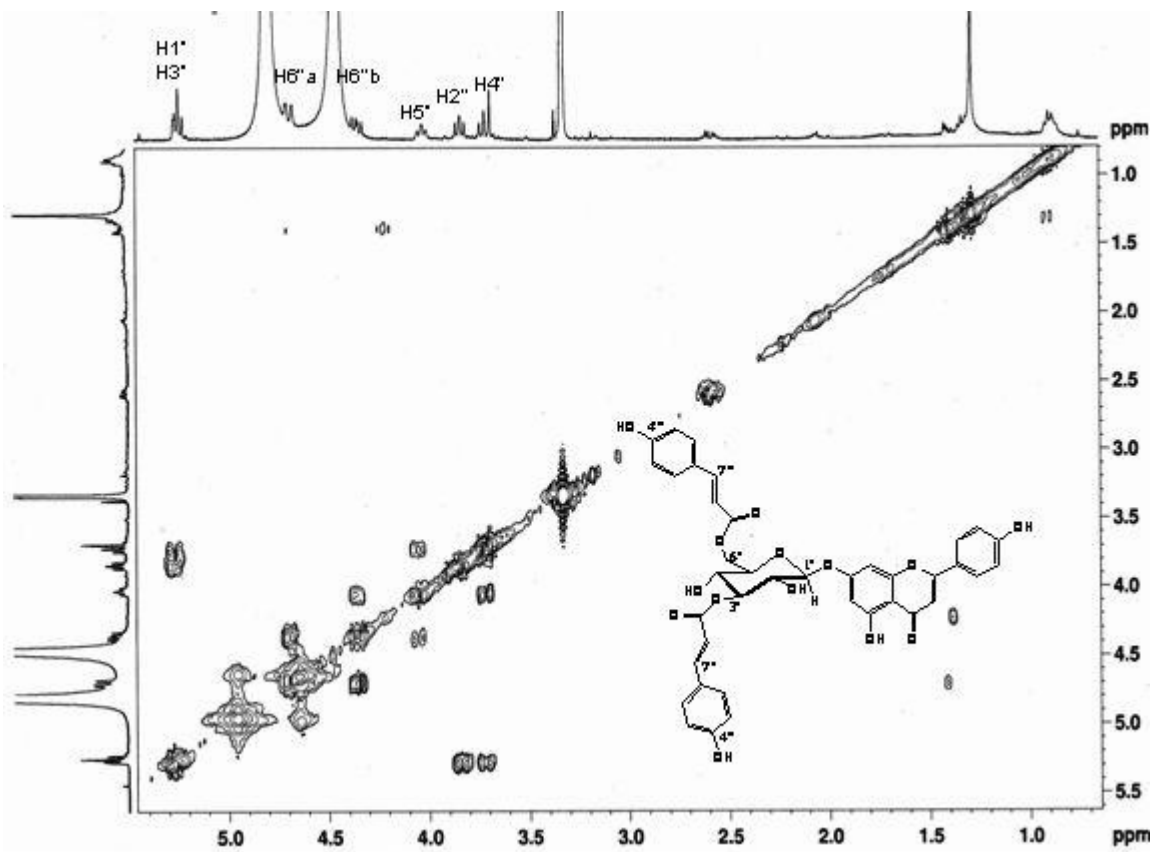
شكل-90- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب M4 (CD_3OD , 400MHz)



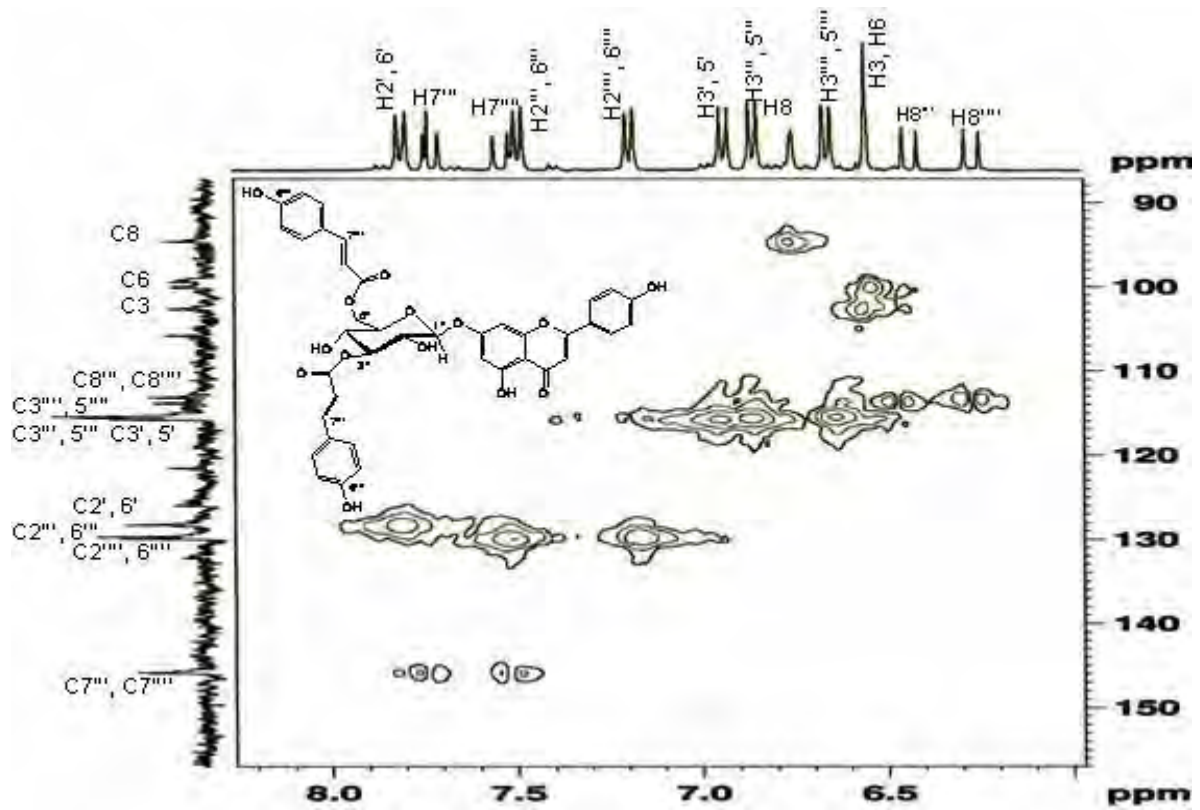
شكل-91- طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب M4 (CD_3OD , 100MHz)



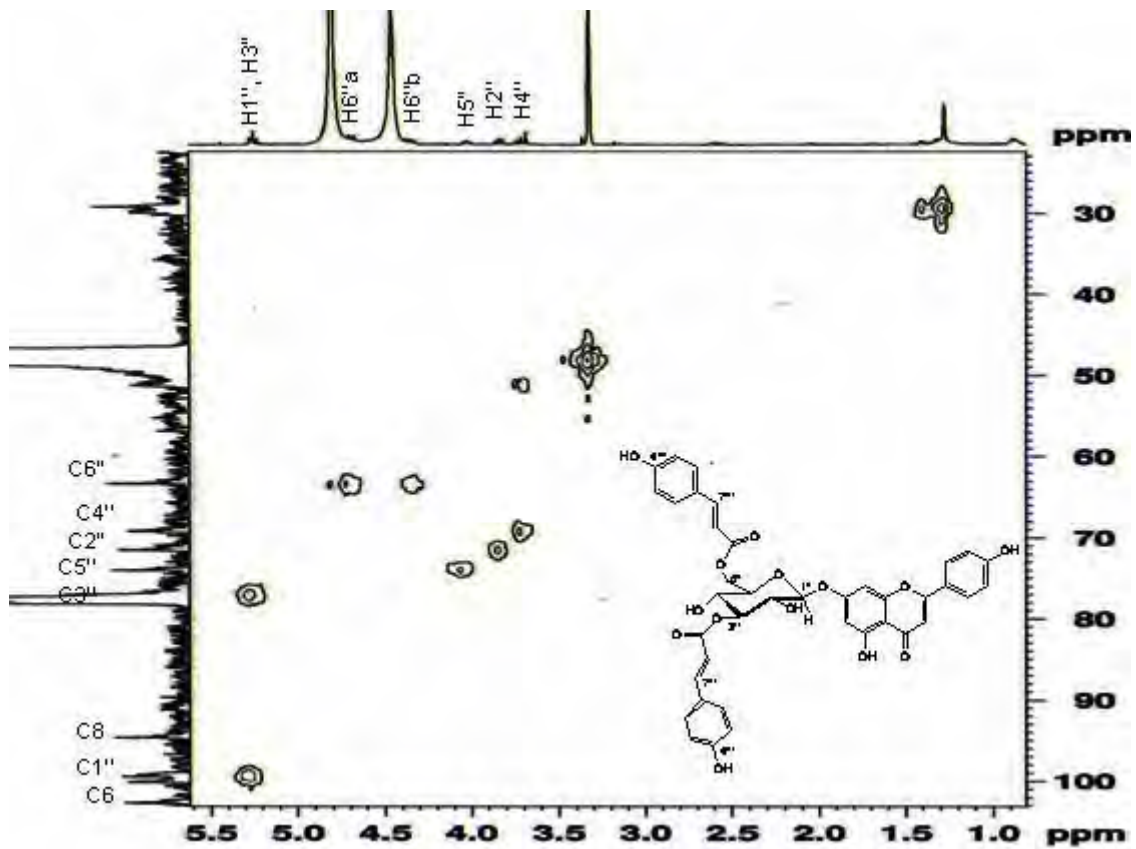
شكل-92- طيف H,H-COSY للمركب M4 (الجزء الأروماتي)



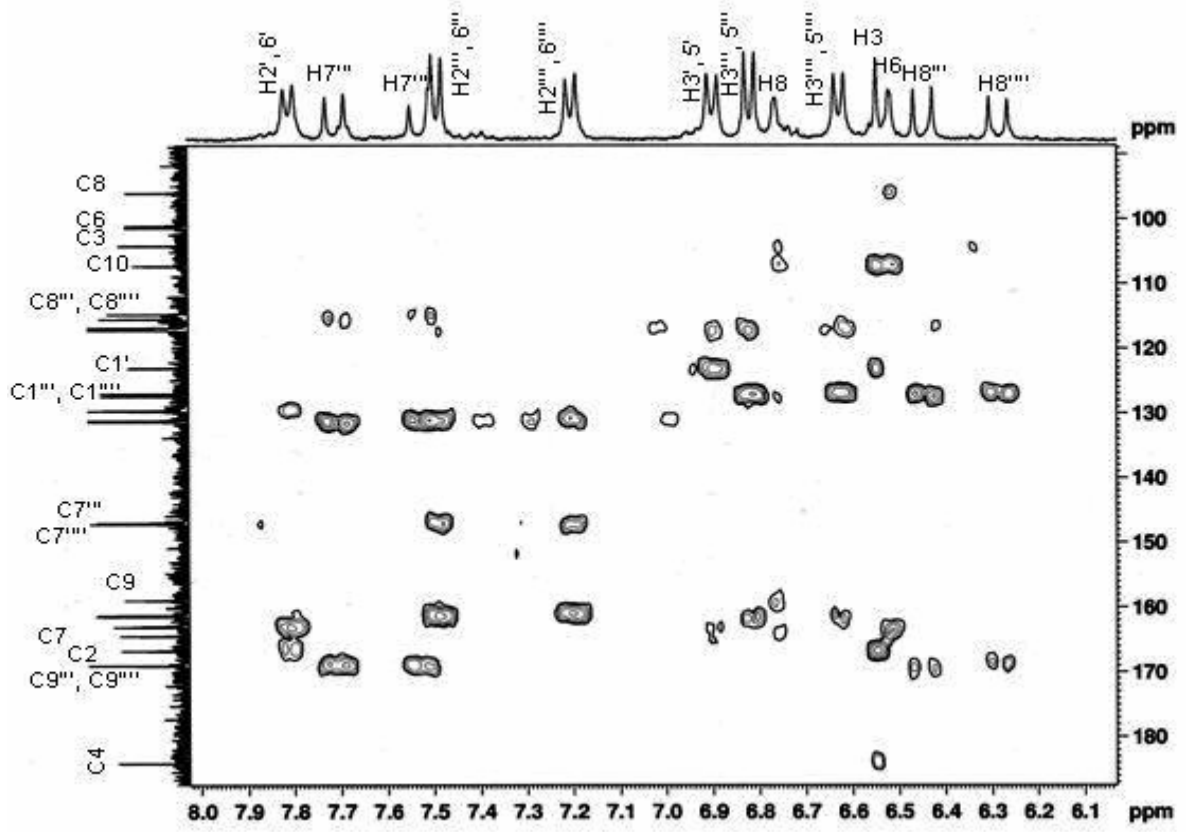
شكل-93- طيف H,H-COSY للمركب M4 (الجزء السكري)



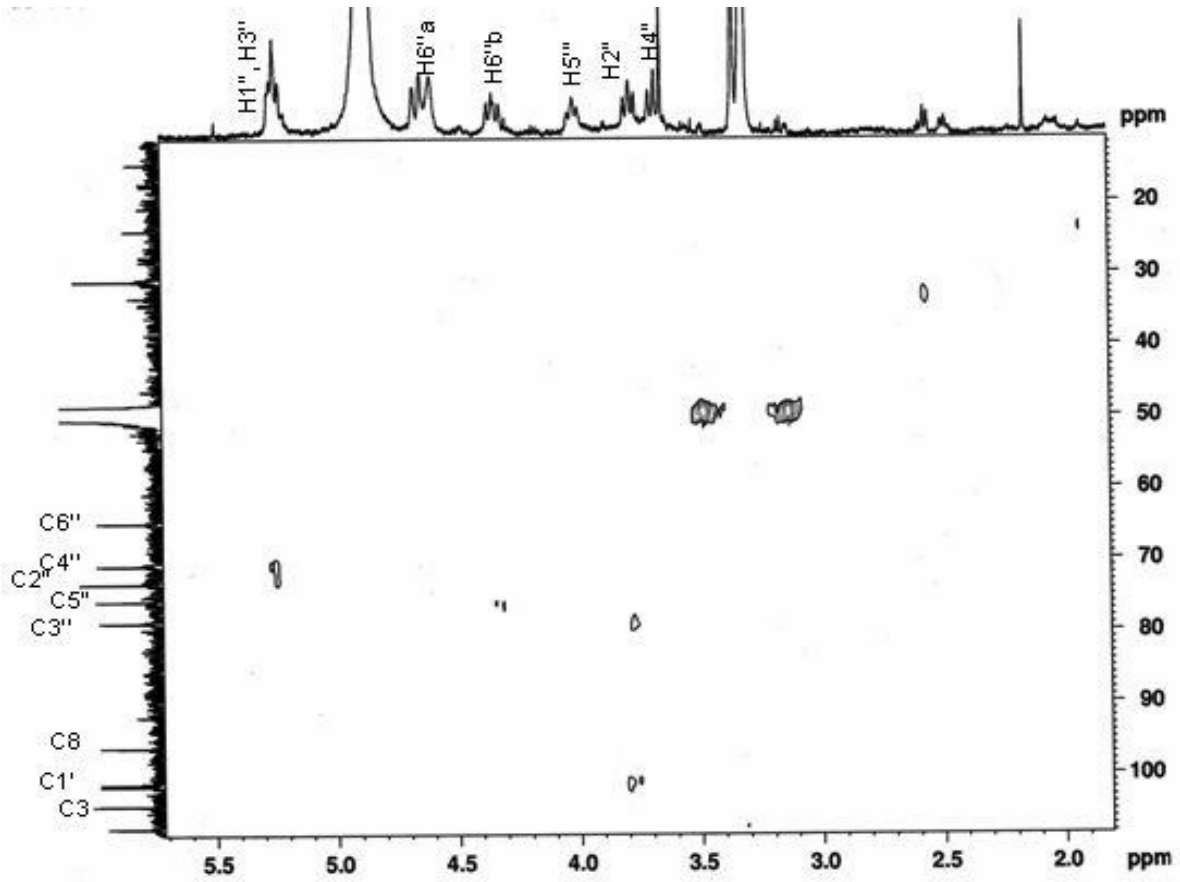
شكل-94- طيف HMQC للمركب M4 (الجزء الأروماتي)



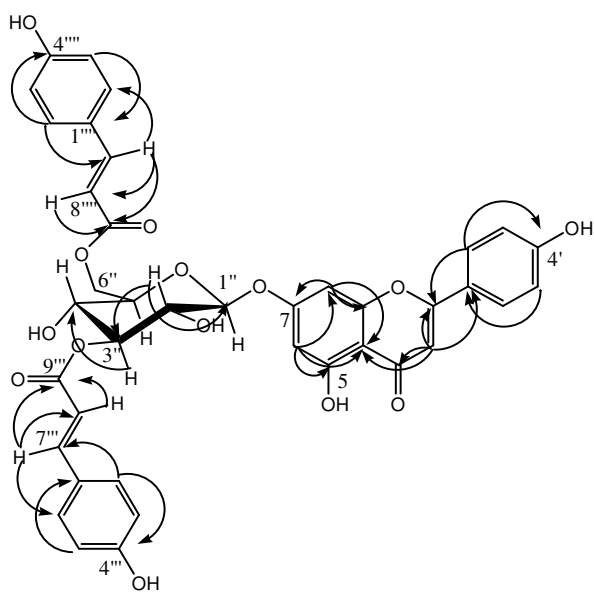
شكل-95- طيف HMQC للمركب M4 (الجزء السكري)



شكل-96- طيف HMBC للمركب M4 (الجزء الأروماتي)



شكل-97- طيف HMBC للمركب M4 (الجزء السكري)



شكل-98- التعانقات $H \rightarrow C$ في طيف HMBC للمركب M4

9-3-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M5:

5, 6-Dihydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone (Ladanein)

- 1) **Colour under UV:** Purple (on cellulose-tlc) بنفسجي
- 2) R_f : 0.80 (4/3/3), 0.24 (13/3/3/1), 0.61 (HOAc50%)
- 3) **UV-Visible:**
MeOH 331 286, +NaOH 408sh 317* 302, +AlCl₃ 363 303, +HCl 355 302, +NaOAc 423sh
330 287, +H₃BO₃ 329 291
- 4) **¹H-NMR** (CDCl₃, 250/400MHz, δ , ppm):
12.62 (1H, s, 5-OH), 7.85 (2H, d, J=9Hz, H2', H6'), 7.02 (2H, d, J=9Hz, H3', H5'),
6.6 (2H, s, H3, H8), 4.01 (3H, s, 7-OCH₃), 3.89 (3H, s, 4'-OCH₃)
- 5) **¹³C-NMR** (CDCl₃, 100MHz, δ , ppm):
182.61 (C-4), 164.23 (C-2), 162.61 (C-4'), 152.74 (C-7), 150.66 (C-9), 145.75 (C-5),
129.58 (C-6), 128.02 (C-2', C-6'), 123.80 (C-1'), 114.51 (C-3', C-5'), 105.95 (C-10),
104.06 (C-3), 90.46 (C-8), 56.47 (7-OCH₃), 55.55 (4'-OCH₃)
- 6) **M.S.** (API-ES⁻, m/z):
313 [M-H-CH₃]⁺, 298 [M-H-CH₃]⁺, 283 [M-H-2xOCH₃]⁺

* نقصان في الشدة الضوئية

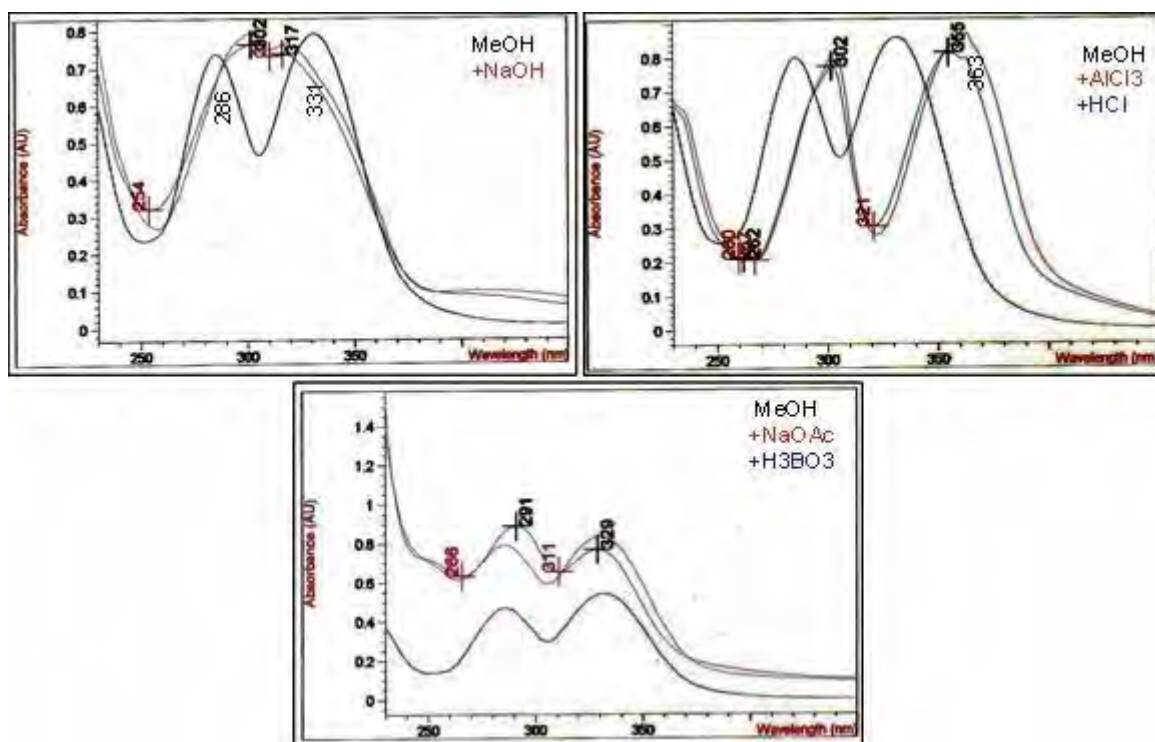
10-3-4- التحليل البنوي للمركب M5:

اللون البنفسجي تحت الأشعة البنفسجية و قيمة العصابة I في الطيف الميتانولي للمركب يدلان على أنه فلافون Flavone، قيمة مرتفعة للعصابة II عند 286nm تدل على حلقة A متعددة الاستبدال. طيف الكتلة بتقنية API-ES⁻ (شكل-105) أعطى قمة شبه جزئية هي القمة الأساسية عند $m/z=313$ موافقة لـ [M-H]⁺ مما يدل أن المركب فلافون ثنائي الهيدروكسيل ثنائي الميثوكسيل و له الصيغة الجزيئية C₁₇H₁₄O₆ كما تظهر في الطيف قمم موافقة لفقدان مجموعة المثلث الأولى ثم الثانية عند $m/z=298$ و $m/z=283$ على التوالي.

تحليل أطيف الأشعة فوق البنفسجية و بداية بالانزياح الهيسوكرومي مع نقصان في الشدة الضوئية (شكل-99) للعصابة I بعد إضافة NaOH تدل على وجود هيدروكسيل مستبدل في 4' ، غياب عصابة جديدة مع هذا المفاعل و كذا عدم وجود انزياح العصابة II مع NaOAc يدلان على غياب هيدروكسيل حر في الموضع 7، غياب لانزياح باثوكرومي للعصابة I عند مقارنة طيف المركب بعد إضافة (NaOAc + H₃BO₃) مع طيفه في الميثانول يدل على غياب مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل في المركب، انزياح هيسوكرومي لطيف للعصابة I

عند مقارنة طيفي المركب بوجود (AlCl₃+ HCl) و (AlCl₃) يدل على غياب مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل بالمركب.

انزياح باثو كرومي للعصاة I بمقدار (24nm) فقط عند مقارنة طيف المركب مع (AlCl₃+ HCl) بطيفه في الميثانول يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5 مع وجود مستبدل أو كسيجين بالموضع 6. طيف ¹H-NMR للمركب (شكل-100) المنجز في مذيب CDCl₃ أظهر وجود حلقة B أحادية الاستبدال بظهور إشارتين ثنائيتين (J=9Hz) تكامل كل واحدة بروتونين عند 7.85ppm لـ (H2', H6') و عند 7.02ppm لـ (H3', H5') كما بين وجود حلقة A ثلاثية الاستبدال بظهور إشارة أحادية تكاملها بروتونين عند 6.6ppm موافقة لـ H3 و (H6 أو H8)، أخيرا وجود مجموعتي ميتوكسيل عند 4.01, 3.89ppm ترتبطان بميدروكسيلي C4' و C7 إذا أخذنا معطيات مطيافية الأشعة فوق البنفسجية بعين الاعتبار.



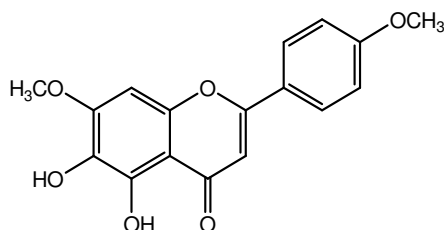
شكل-99- السلسلة الطيفية UV للمركب M5

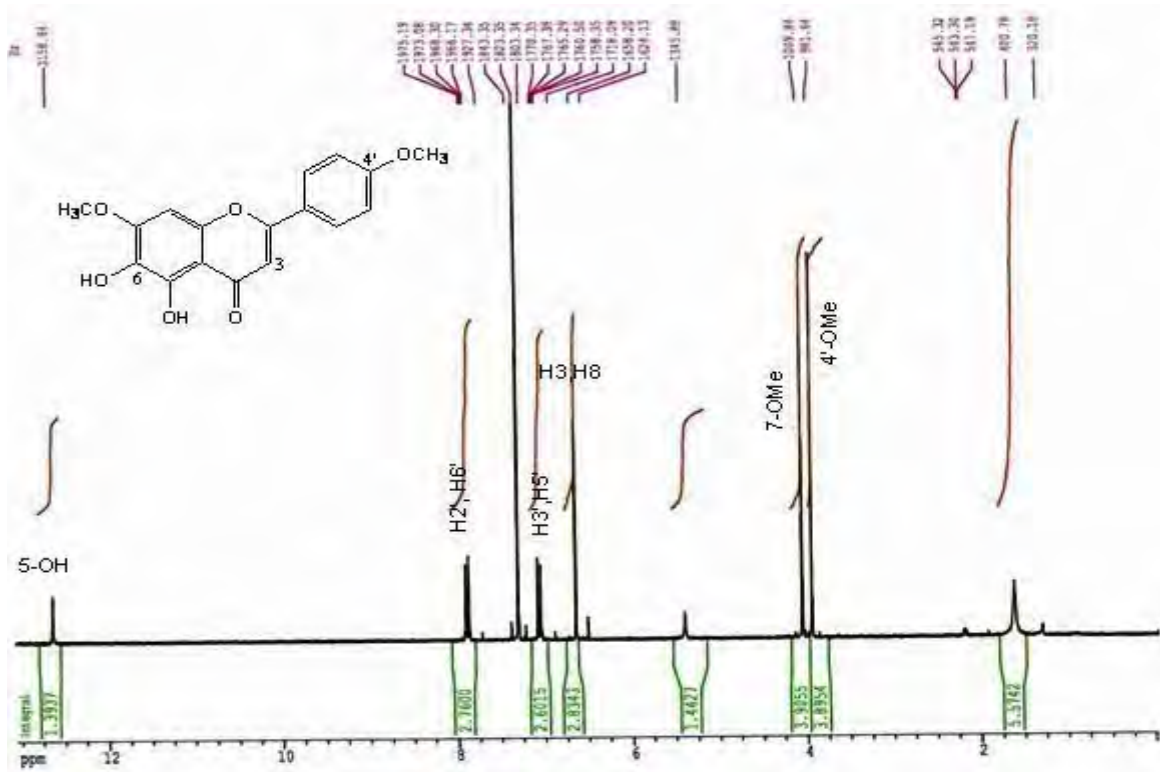
طيف ¹³C-NMR (الشكل-101) أكد ما ذكر آنفا حيث أعطى إضافة إلى القمم الخاصة بالفلافون قمتين لمجموعي ميتوكسيل و نلاحظ في الطيف انزياح إشارة ذرة الكربون C6 إلى مجال أخفض عند 129.58ppm بعيدا عن موقعها عند حوالي 100ppm في حال عدم استبدالها و انزياح كل من C5, C7 (وضع أورثو مع C6)

و C9 (وضع بارا مع C6) إلى مجال أعلى و بالتالي أكدت لنا أن البروتون الوحيد الموجود على الحلقة A هو بروتون الموضع 8.

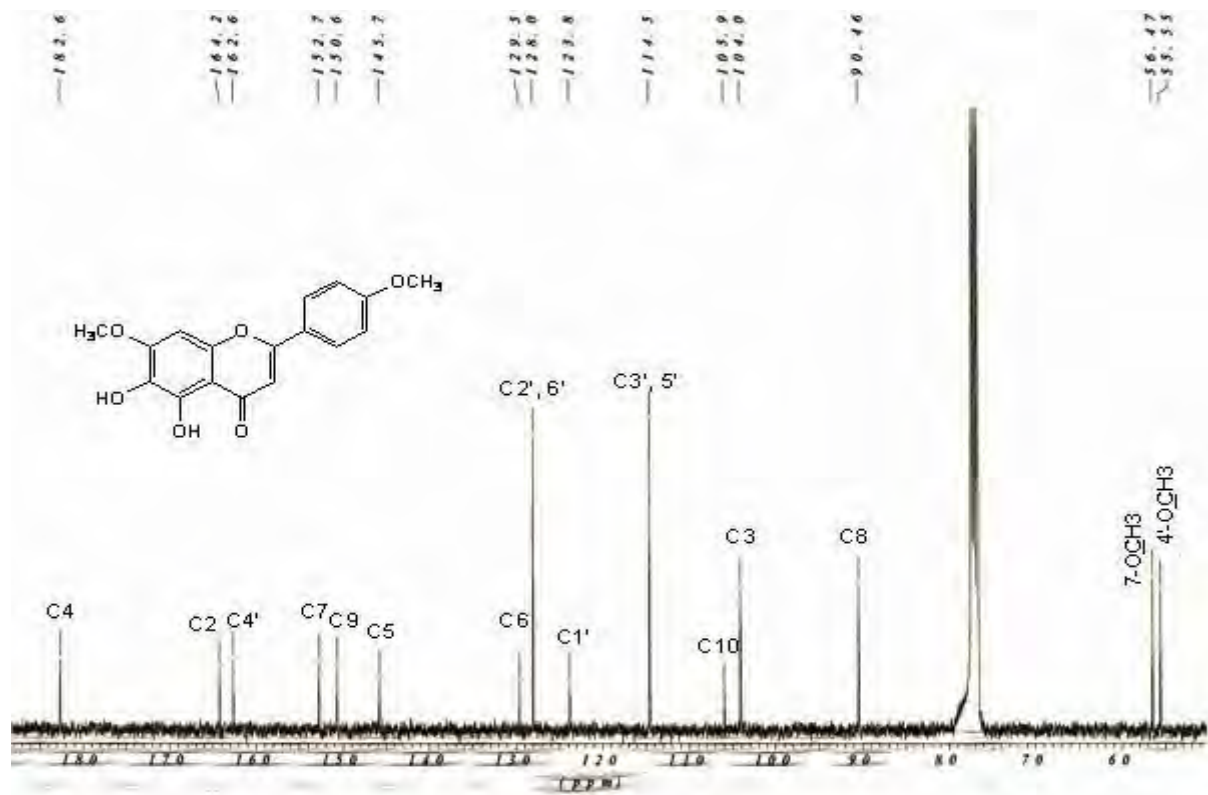
بالاعتماد على أطيف تجارب HMQC في الشكل-102، فقد تم نسب كل البروتونات على قلتها إلى ذرات الكربون المرتبط بها أما طيف تجارب HMBC في الشكل-103، فقد تم بها تعيين الانزياحات الكيميائية لبقية ذرات الكربون و بالخصوص تعيين مواقع مجموعتي الميتوكسيل على الطيف عبر التعانقات البعيدة (J^3) كما هو موضح بالشكل-104، كما أكدت لنا وجود بروتون على ذرة الكربون C8 و بالتالي وجود هيدروكسيل على ذرة الكربون C6 عبر التعانقات الحاصلة بين إشارة H8 مع ذرات الكربون C6، C7، C9 و C10 و تكون بالتالي صيغة المركب M5 النهائية هي:

5, 6-Dihydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone (Ladanein)

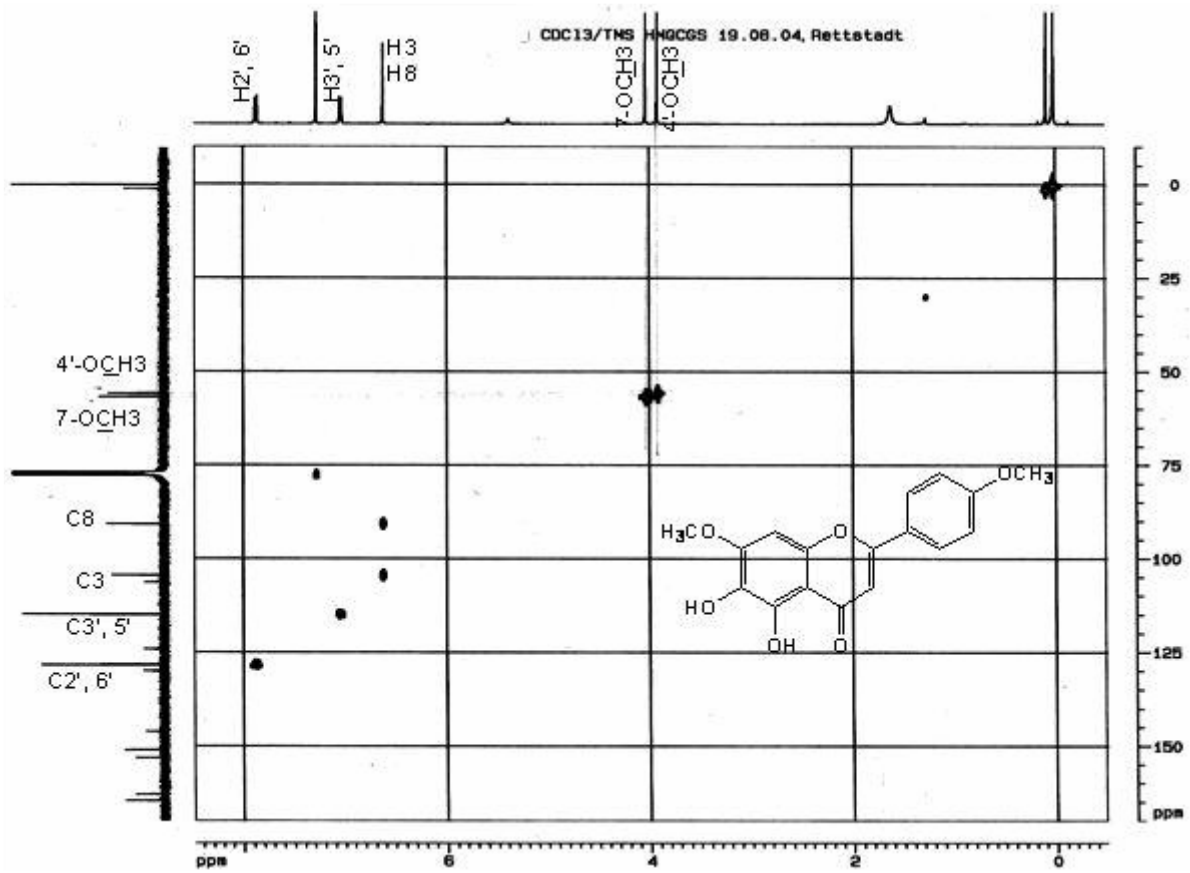




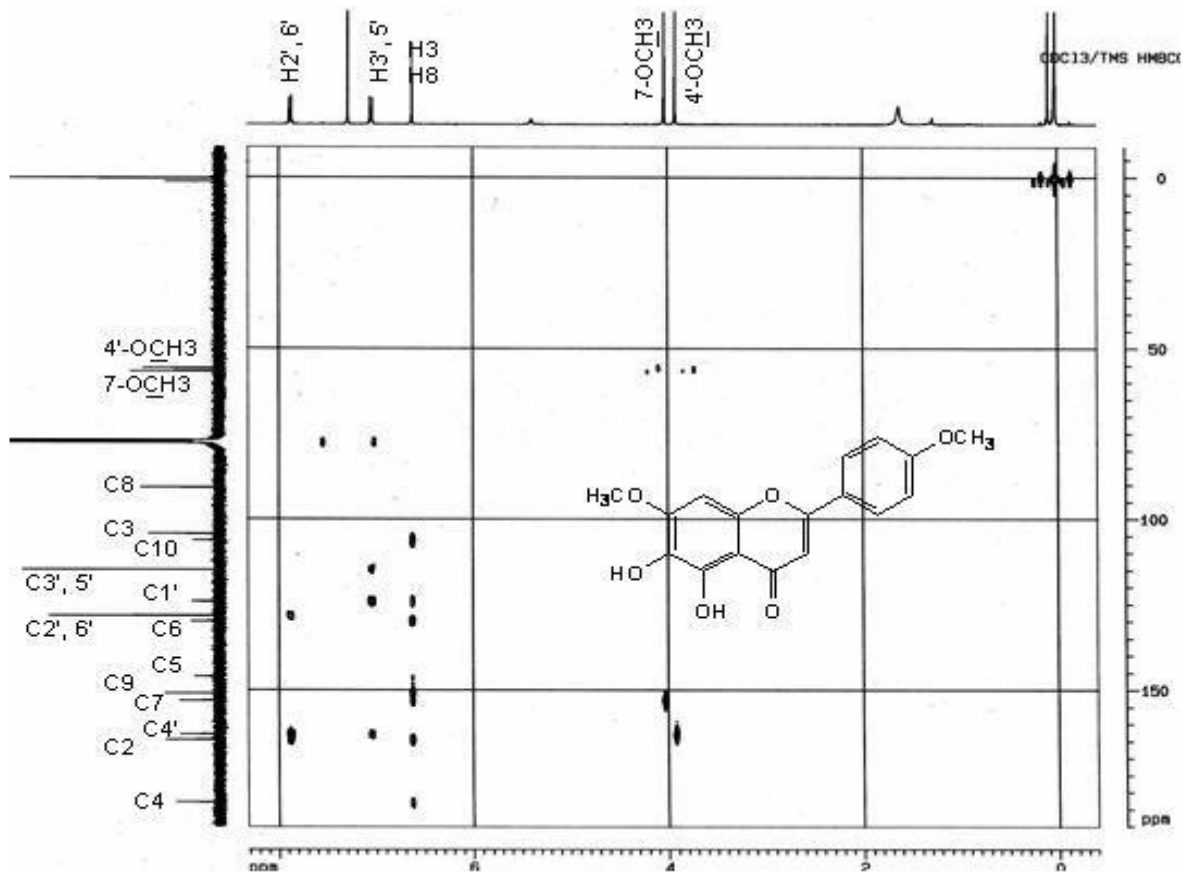
شكل-100- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب M5 (CDCl₃, 250MHz)



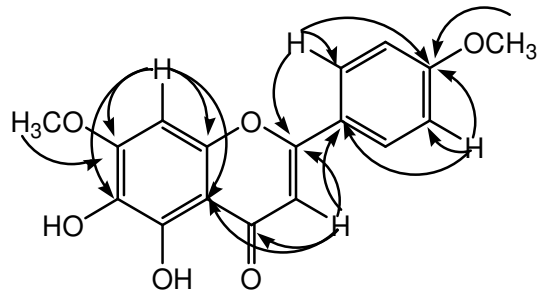
شكل-101- طيف $^{13}\text{C-NMR}$ للمركب M5 (CDCl₃, 100MHz)



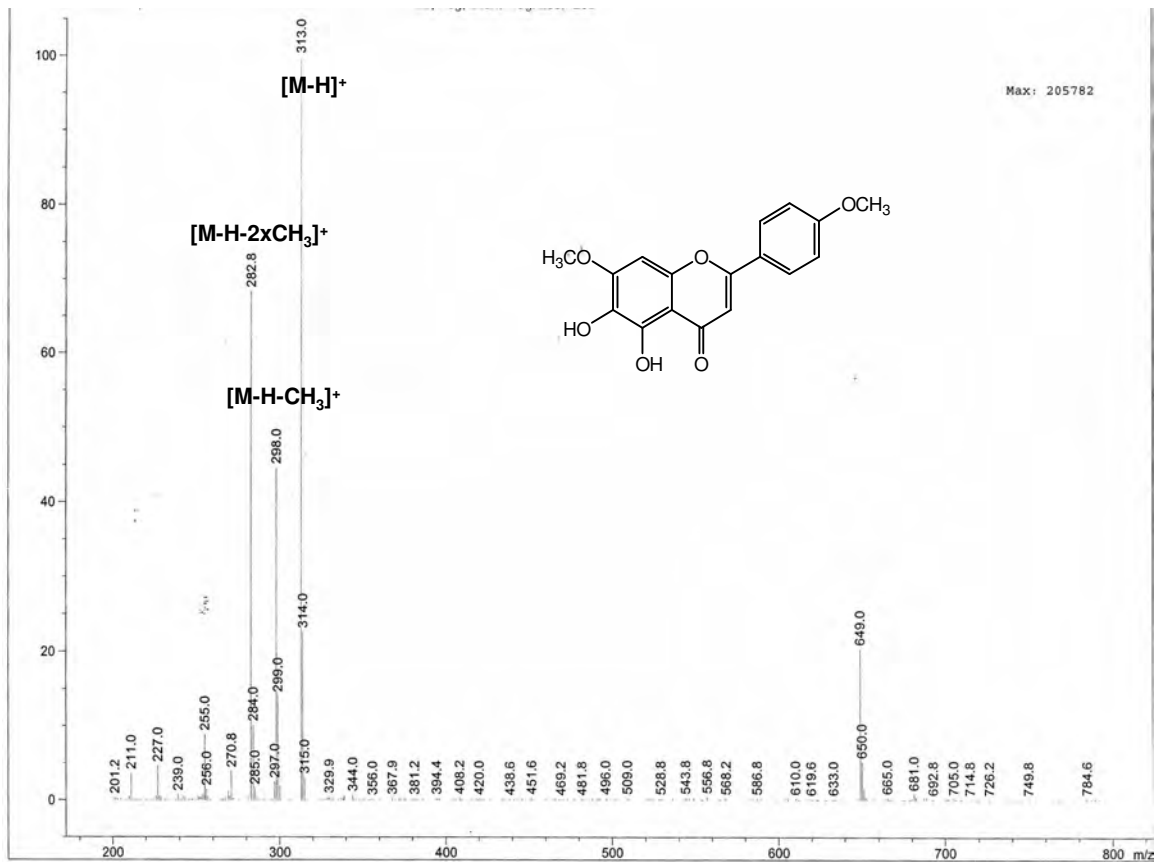
شكل-102- طيف تجارب HMQC للمركب M5



شكل-103- طيف تجارب HMBC للمركب M5



شكل-104- التعانقات H→C في طيف تجارب HMBC للمركب M5



شكل-105- طيف الكتلة MS-APIES⁻ للمركب M5

11-3-4- خصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب M6:

Apigenin 6,8-di-C-β-glucoside

1) **Colour under UV:** Purple (on cellulose-tlc) بنفسجي

2) **UV-Visible:**

MeOH 330 273, +NaOH 398 334 282, +AlCl₃ 380sh 345 304 280, +HCl 380 345 305 280,
+NaOAc 355 305sh 281, +H₃BO₃ 405sh 345sh 322 275

3) **¹H-NMR** (DMSO-d₆, 400MHz, δ, ppm):

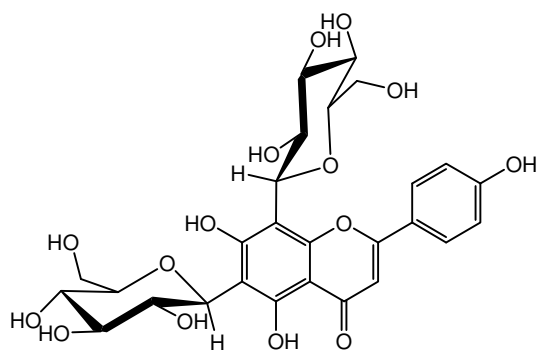
7.85 (2H, br.d, H2', H6'), 6.84 (2H, d, J=8Hz, H3', H5'), 6.36 (1H, s, H3), 5.2-4.54 (2H, H1'', H1'''), [3.0 – 4.80] (12H, glucoses)

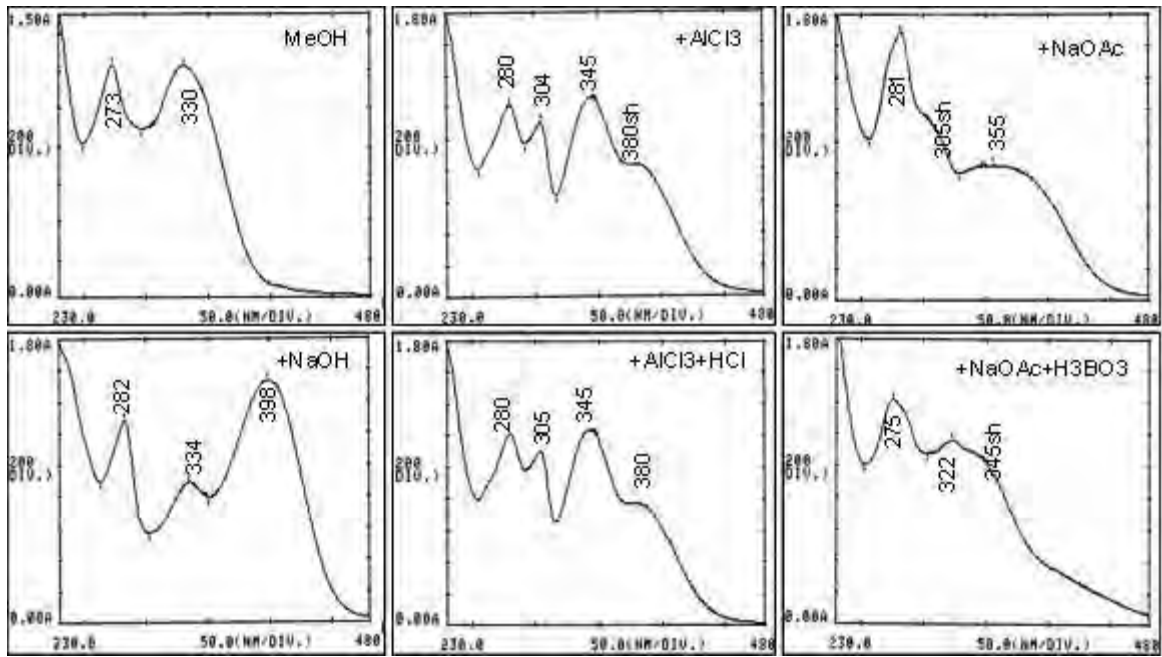
12-3-4- التعيين البنوي للمركب M6:

يتشابه هذا المركب في خصائصه الكروماتوغرافية و الطيفية مع المركب P4 المفصول من نبات *Pituranthos chloranthus* و الذي تم التطرق إليه بالتفصيل إنما أشير هنا إلى الاختلاف البسيط في طيف ¹H-NMR الموضح في الشكل-107 و الذي اعتقد أنه يعود إلى اختلاف الظروف أثناء قياس الطيف و عليه فالمركب M6 هو:

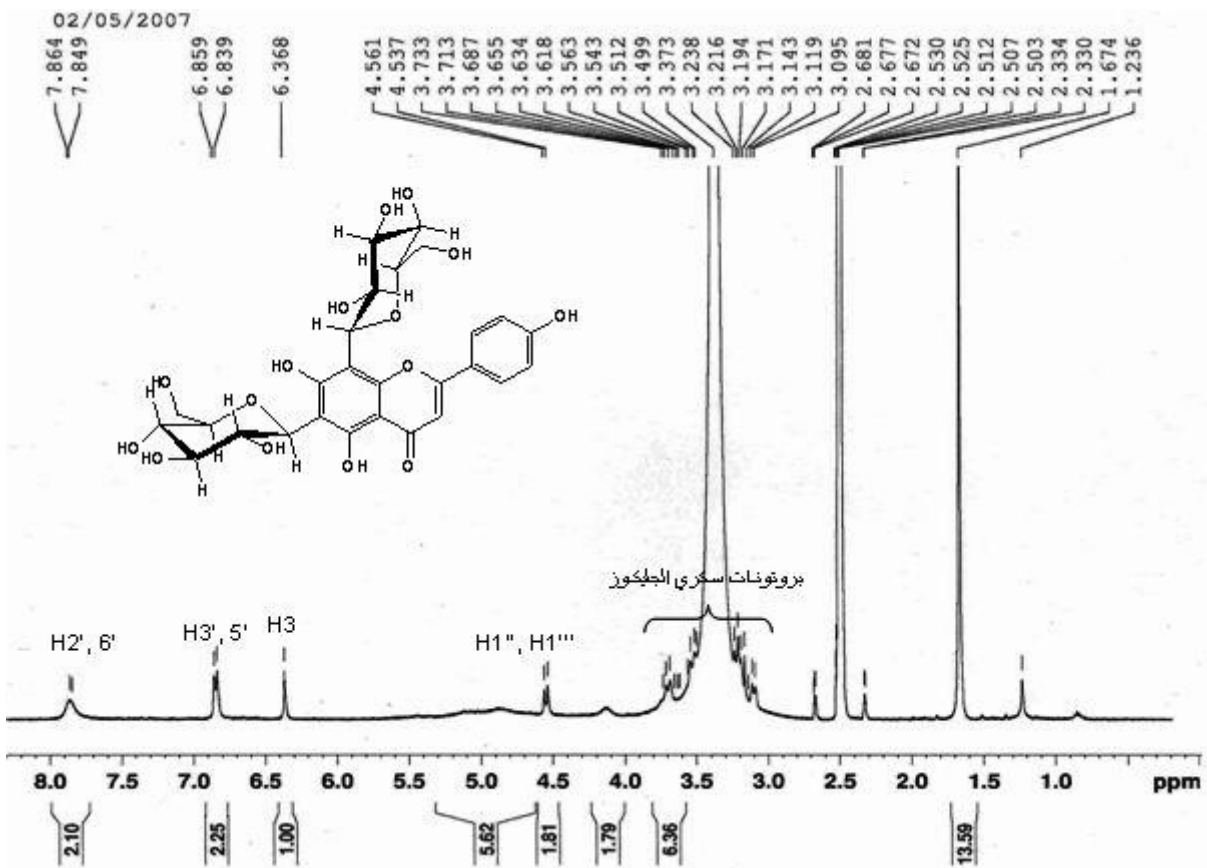
Apigenin 6,8-di-C-β-glucoside

(Vicenin-2)



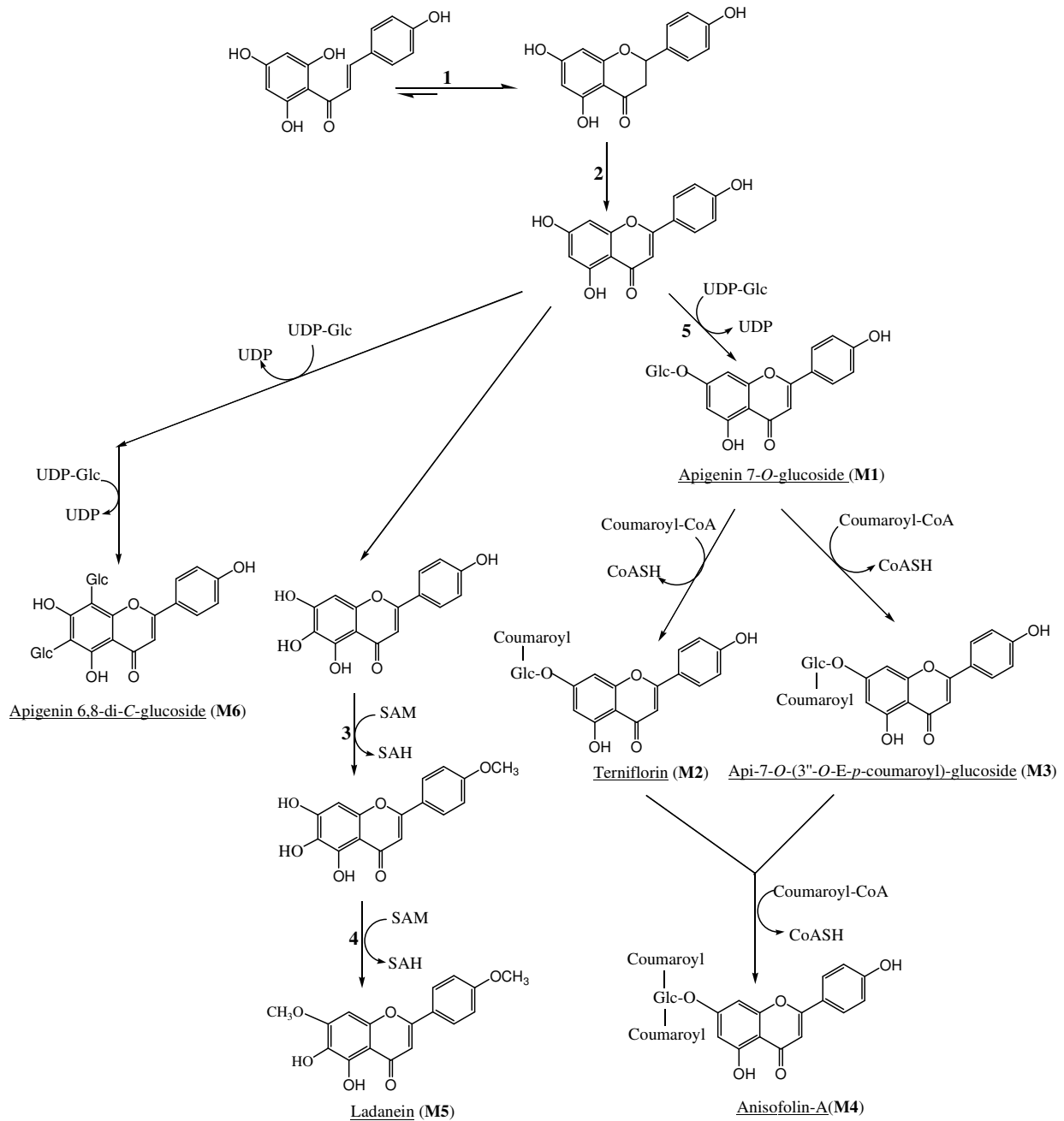


شكل-106- السلسلة الطيفية UV للمركب M6



شكل-107- طيف ¹H-NMR للمركب M6 (DMSO-d₆, 400MHz)

أخيرا و بالنظر إلى المركبات المحصل عليها تم اقتراح مخططا للاصطناع الحيوي لفلافونيدات هذا النبات كما هو موضح في الشكل-108، مع العلم أنني استعنت بالمراجع [5] و [8] من الجزء النظري من هذه الرسالة في تحديد نوعية بعض الأنزيمات المصاحبة للتفاعلات كما أن ترتيب بعض التفاعلات الأنزيمية يمكن أن يتغير.



شكل-108- مخطط الاصطناع الحيوي المقترح لفلافونيدات نبات *Marrubium deserti*

4-4- المركبات المفصولة من نبات *Ballota hirsuta*:

تم فصل و التعرف على سبعة فلافونيدات جليكوزيدية ثلاثة منها **B7, B6, B1** تم فصلها من هذا النبات سابقا [97] بينما بقية المركبات **B5, B4, B3, B2** جديدة بالنسبة للنوع و المركب **B4** هذه أول إشارة له في الصنف كله أما المركبان **B3, B2** فهذه المرة الثانية التي يتم فصلهما من هذا الصنف كما أنها المرة الثالثة التي يفصل فيها المركبان **B5** و **B6** من الصنف أما المركبان **B1** و **B7** فهما من المركبات المميزة لنباتات الصنف مع العلم أنه تم الإشارة [97] إلى وجود مركب ترتبط به مجموعة coumaroyl لكن دون تحديد لموقع هذه المجموعة على سكر الجليكوز.

نشير إلى أن المركبات **B1, B2, B3, B4** و **B6** هي المركبات **M1, M2, M3, M4** و **M6** نفسها التي فصلت من نبات *Marrubium deserti* و بالتالي فإننا لن نتعرض لها بالتفصيل إلا لضرورة.

4-4-1- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب **B1**:

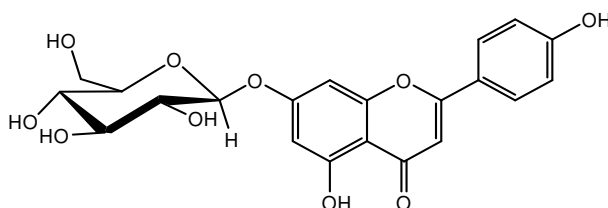
Apigenin 7-O-β-glucoside

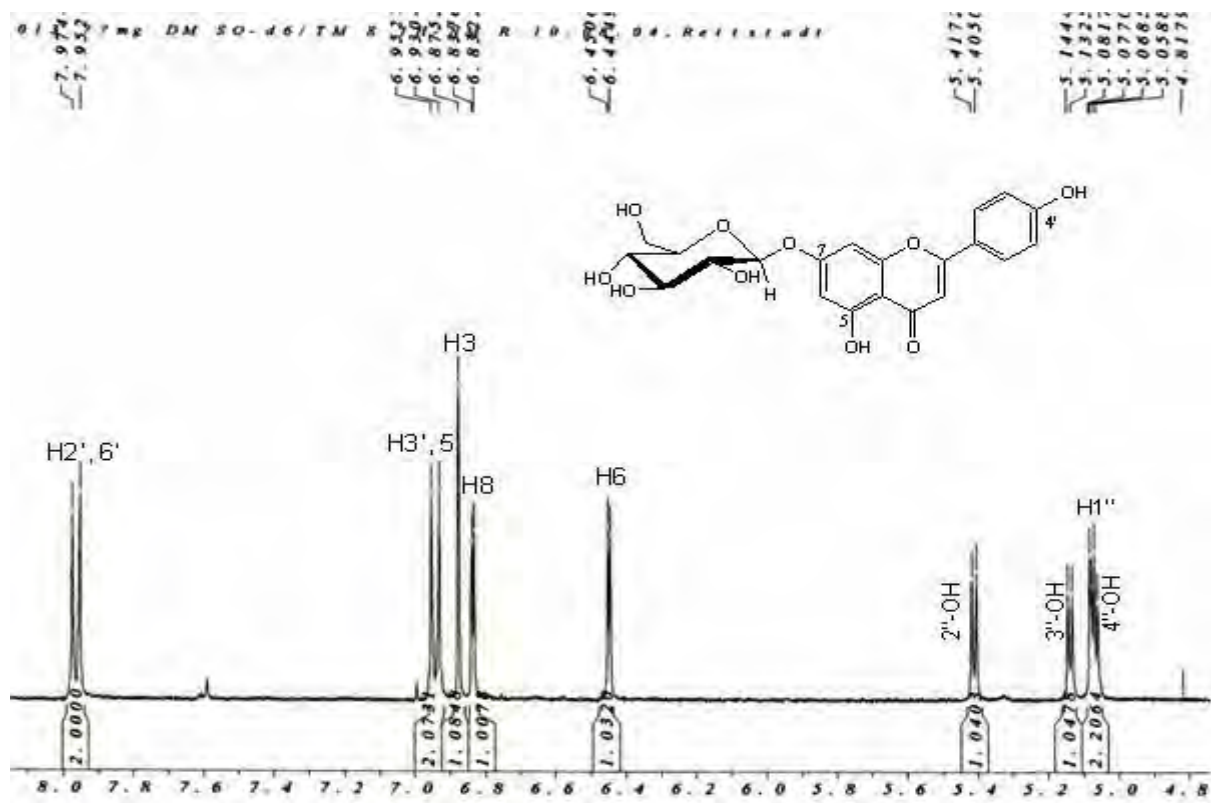
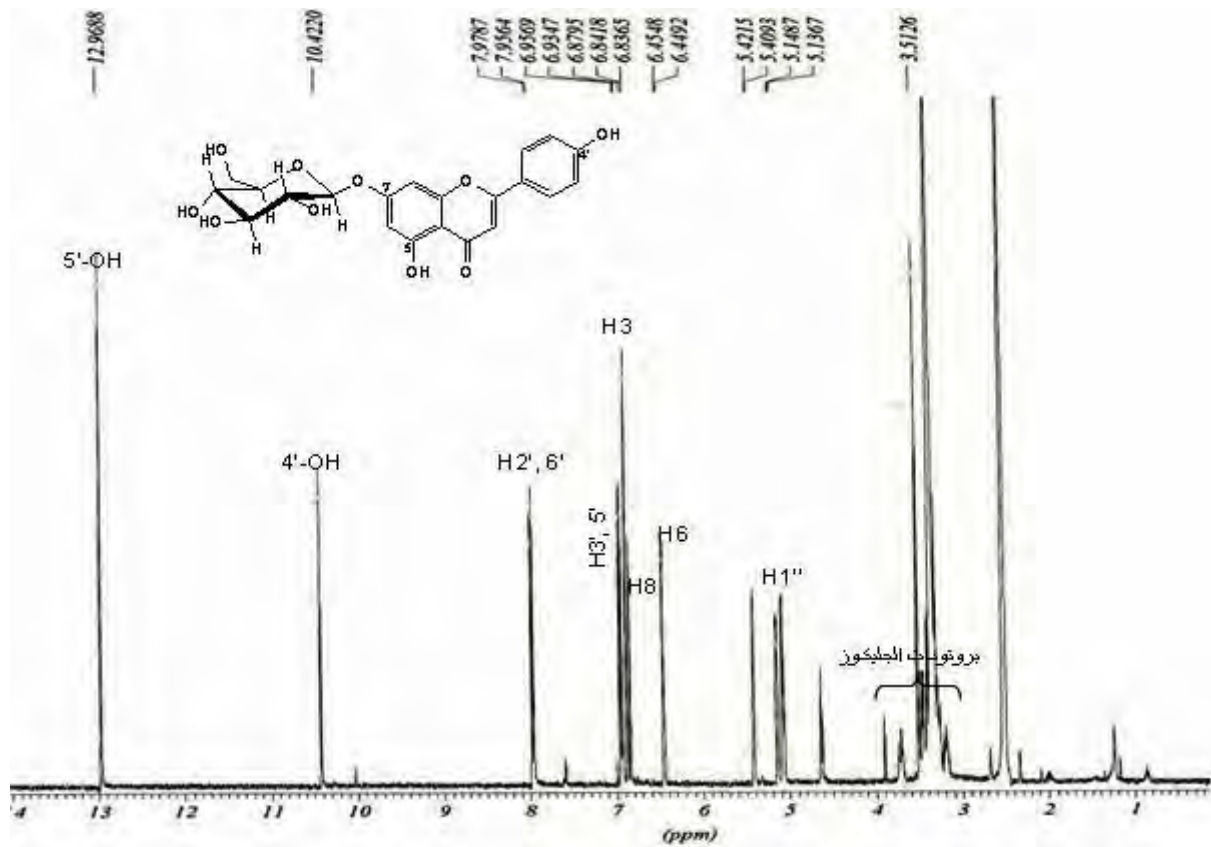
- 1) **Colour under UV:** Purple (on silica gel-tlc) بنفسجي
- 2) **R_f:** 0.28 (HOAc15%), 0.32 (D6M1)
- 3) **UV-Visible:**
MeOH 333 268, + NaOH 390 300sh 268, + AlCl₃ 385 347 298 275, +HCl 383 342 298 276, + NaOAc 386sh 341 267, +H₃BO₃ 339 268
- 4) **¹H-NMR** (DMSO-d₆, 400MHz, δ, ppm):
12.96 (1H, s, 5-OH), 10.42 (1H, s, 4'-OH), 7.96 (2H, d, J=8.9Hz, H2', 6'), 6.94 (2H, d, J=8.9Hz, H3', 5'), 6.87 (1H, s, H3), 6.83 (1H, d, J=2.1Hz, H8), 6.44 (1H, d, J=2.2Hz, H6), 5.07 (1H, d, J=7.3Hz, H1''), 3.52 (H4''), 3.47 (H5''), 3.45 (H6''a), 3.40 (H6''b), 3.3 (H2''), 3.28 (H3'')
- 5) **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 100MHz, δ, ppm):
182.5 (C4), 165.1 (C2), 163.7 (C7), 162.2 (C4'), 161.9 (C5), 157.7 (C9), 129.5 (C2', C6'), 122.0 (C1'), 117.0 (C3', C5'), 106.5 (C10), 104 (C3), 101 (C1''), 100.5 (C6), 96.0 (C8), 78.0 (C5''), 77.2 (C3''), 74.0 (C2''), 71.0 (C4''), 61.5 (C6'')
- 6) **MS-ESI⁺ (m/z):**
433 [MH]⁺; 271 [MH-glucose]⁺

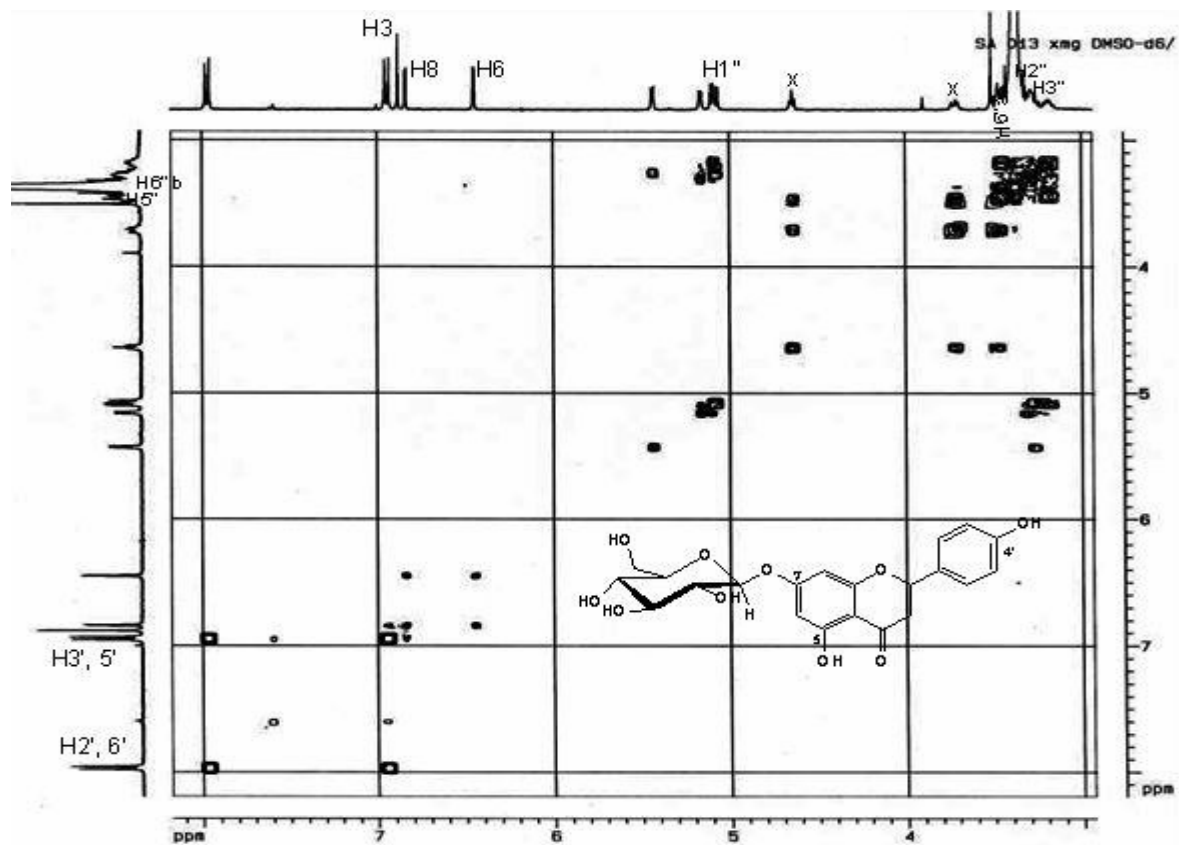
2-4-4- التعيين البنوي للمركب B1:

هذا المركب هو نفسه المركب M1 المفصول من نبات *Marrubium deserti* و قد تم التطرق إليه بالتفصيل و لكن نعيد وضع النتائج و الأطياف بسبب أن تسجيل طيف $^1\text{H-NMR}$ تم في مذيب مختلف هو DMSO-d_6 كما تم الحصول على أطياف تجارب $^1\text{H-NMR}$ ، $^1\text{H-COSY}$ ، $^1\text{H-MQC}$ ، $^1\text{H-HMBC}$ و طيف الكتلة (MS-ESI^+) له. فنتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية تدل على أن المركب هو *apigenin-7-O-glycoside* و يؤكد ذلك طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب (شكل-109 و 110) المنجز هذه المرة في مذيب DMSO-d_6 حيث يظهر وجود حلقة B أحادية الاستبدال من خلال ظهور إشارتي الزوجين ($6', 2'$) و ($5', 3'$) و كذلك وجود حلقة A ثنائية الاستبدال بظهور إشارتي بروتوني H8 و H6 و ظهر الجزء السكري من المركب من خلال إشارة ^1H بشكل ثنائية ($J=7.3\text{Hz}$) من يدل على وجود سكر الجليكوز برابطة β مع الأجليكون و ظهور بقية البروتونات السكرية و التي تم تحديد انزياحاتها الكيميائية بالاعتماد على أطياف تجارب $^1\text{H-NMR}$ ، $^1\text{H-COSY}$ في الشكل-111، $^1\text{H-MQC}$ في الشكل-112 و $^1\text{H-HMBC}$ في الشكل-113، نشير هنا إلى ظهور إشارات أخرى موافقة لبروتونات مجموعات الهيدروكسيل العطرية $4'-\text{OH}$ ، $5-\text{OH}$ و السكرية $2''-\text{OH}$ ، $3''-\text{OH}$ ، $4''-\text{OH}$ هذه الإشارات الأخيرة تتداخل إشاراتها مع إشارة البروتون الأنوميري و قد استعنا بأطياف تجارب الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد في تحديد انزياحاتها الكيميائية في طيف $^1\text{H-NMR}$ و طيف $^{13}\text{C-NMR}$. طيف الكتلة MS-ES^+ في الشكل-114- أعطى قمة شبه جزيئية موافقة $[\text{MH}]^+$ عند $m/z=433$ موافقة لصيغة $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ و قمة موافقة لفقد المركب لسكر الجليكوز عند $m/z=271$ و بالتالي يكون المركب B1 هو:

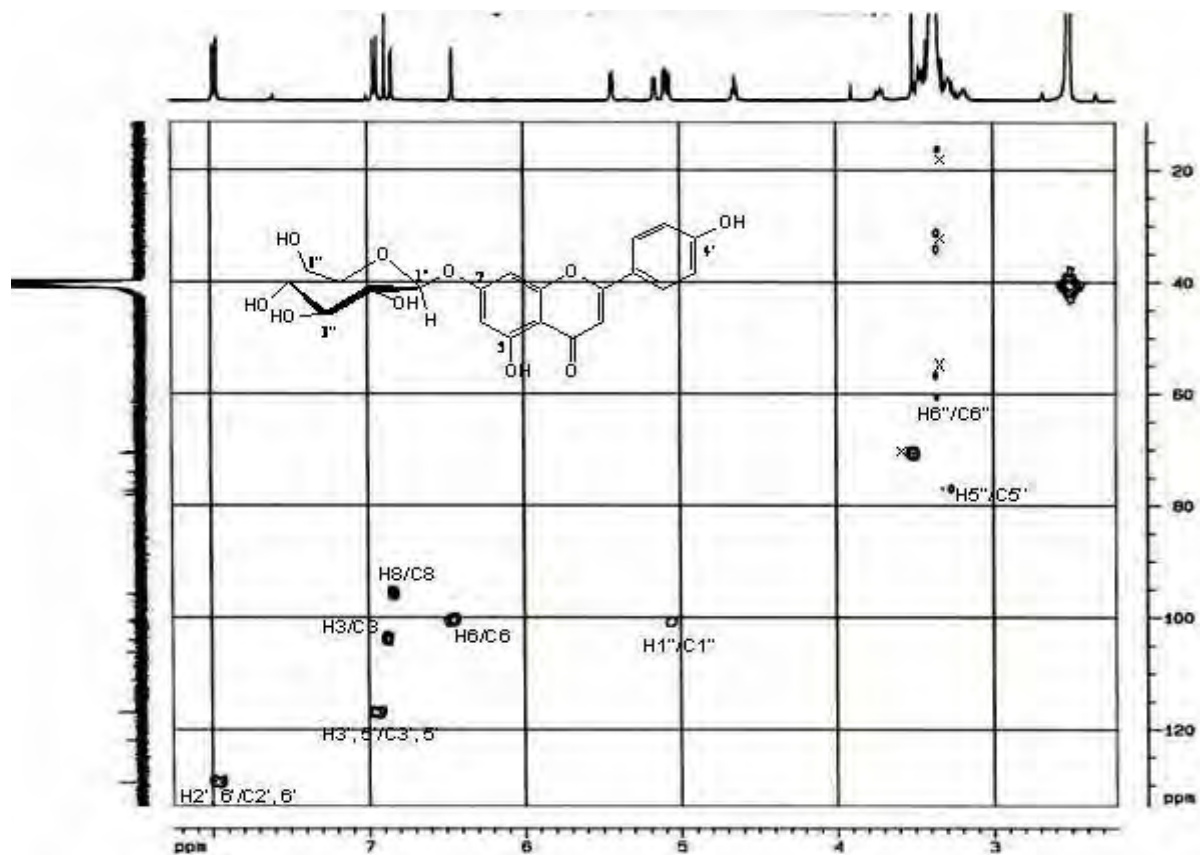
Apigenin 7-O- β -glucoside



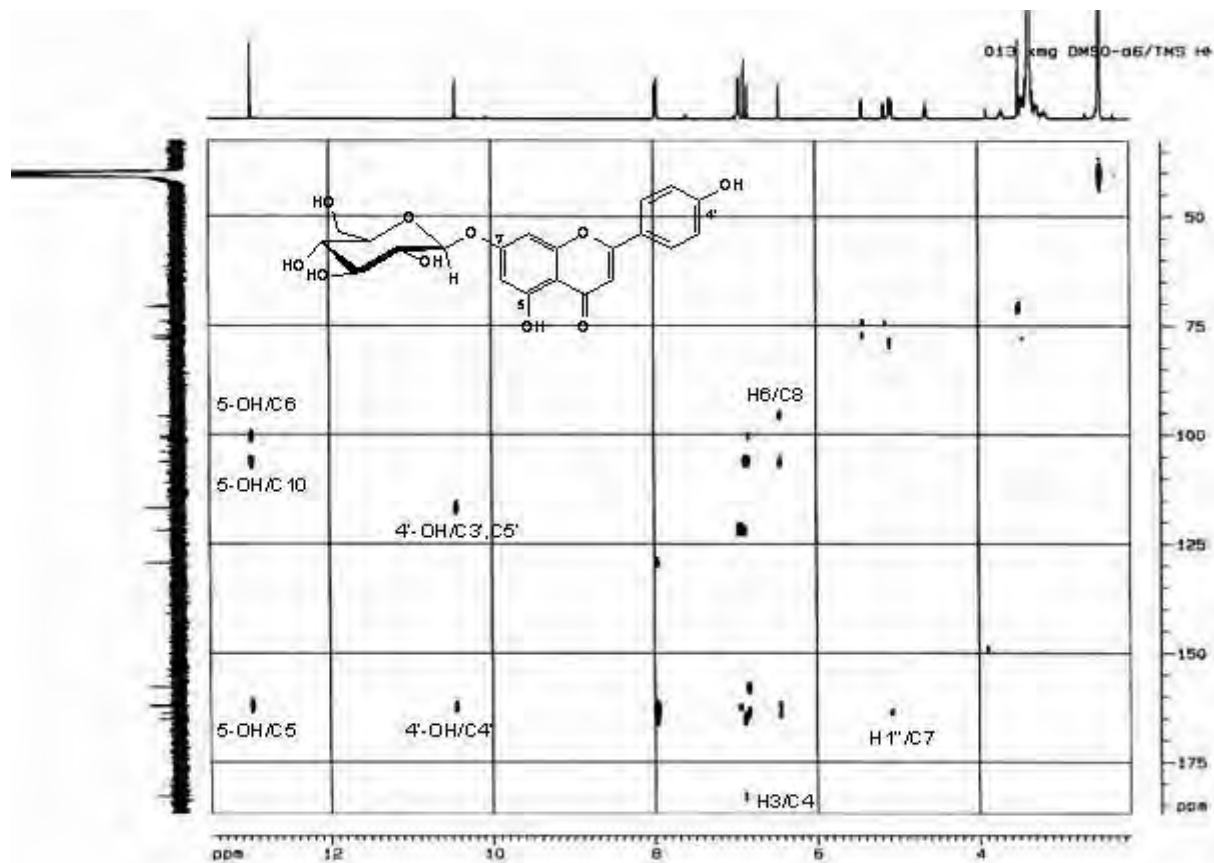




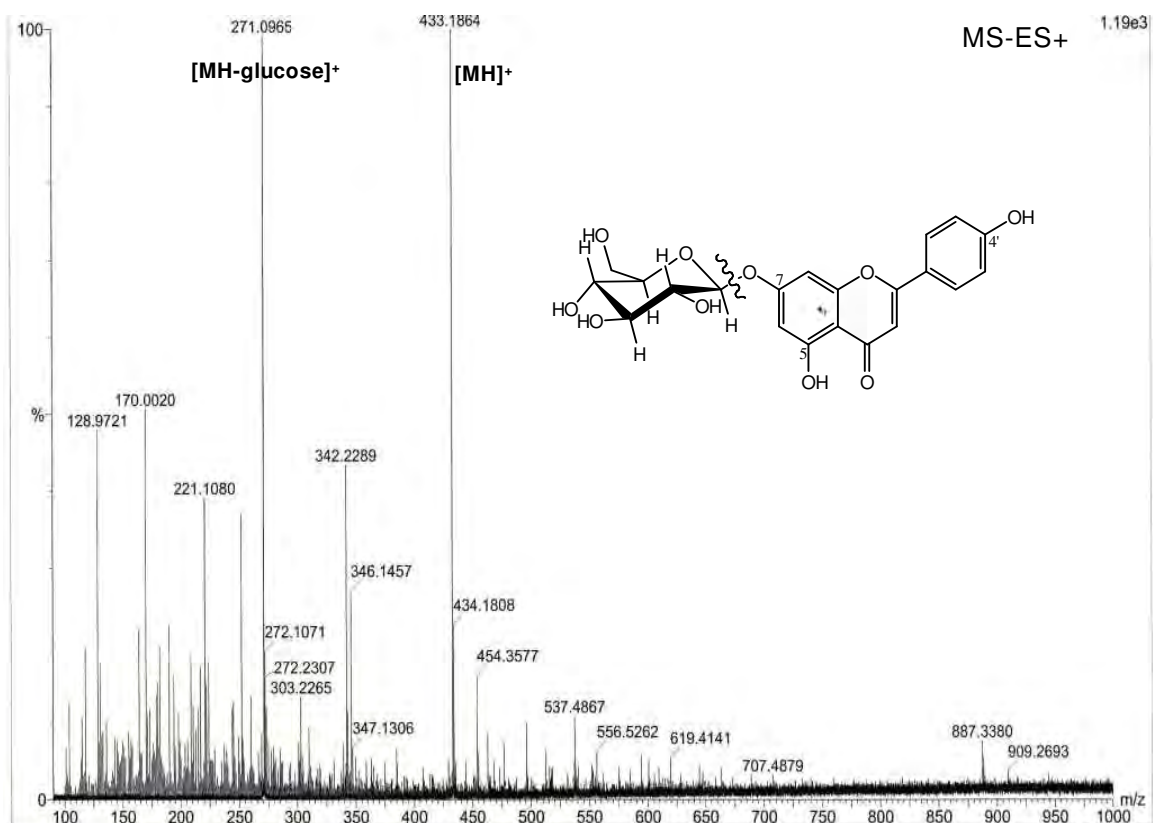
شكل-111- طيف تجارب H,H-COSY للمركب B1



شكل-112- طيف تجارب HMQC للمركب B1



شكل-113- طيف تجارب HMBC للمركب B1

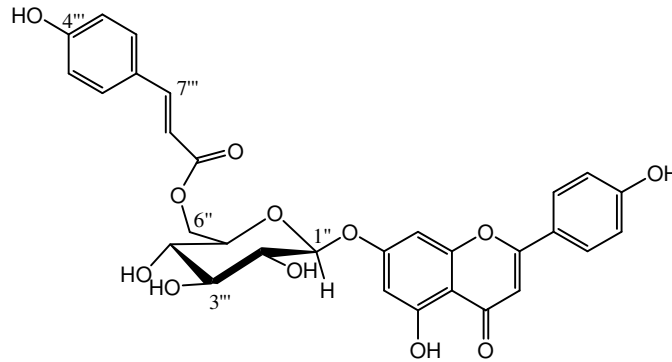


شكل-114- طيف الكتلة MS-ESI+ للمركب B1

3-4-4- التعيين البنوي للمركب B2:

Apigenin 7-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside

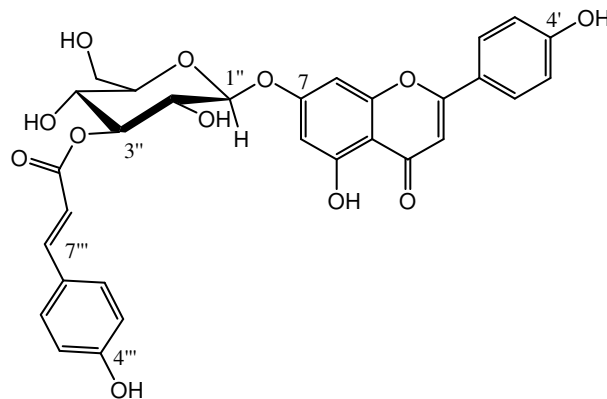
هذا المركب يفصل للمرة الثانية من الصنف *Ballota* خصائصه الكروماتوغرافية و الطيفية هي نفسها الخاصة بالمركب M2 الذي تم فصله من نبات *Marrubium deserti* و بالتالي فصيغته الكيميائية هي:

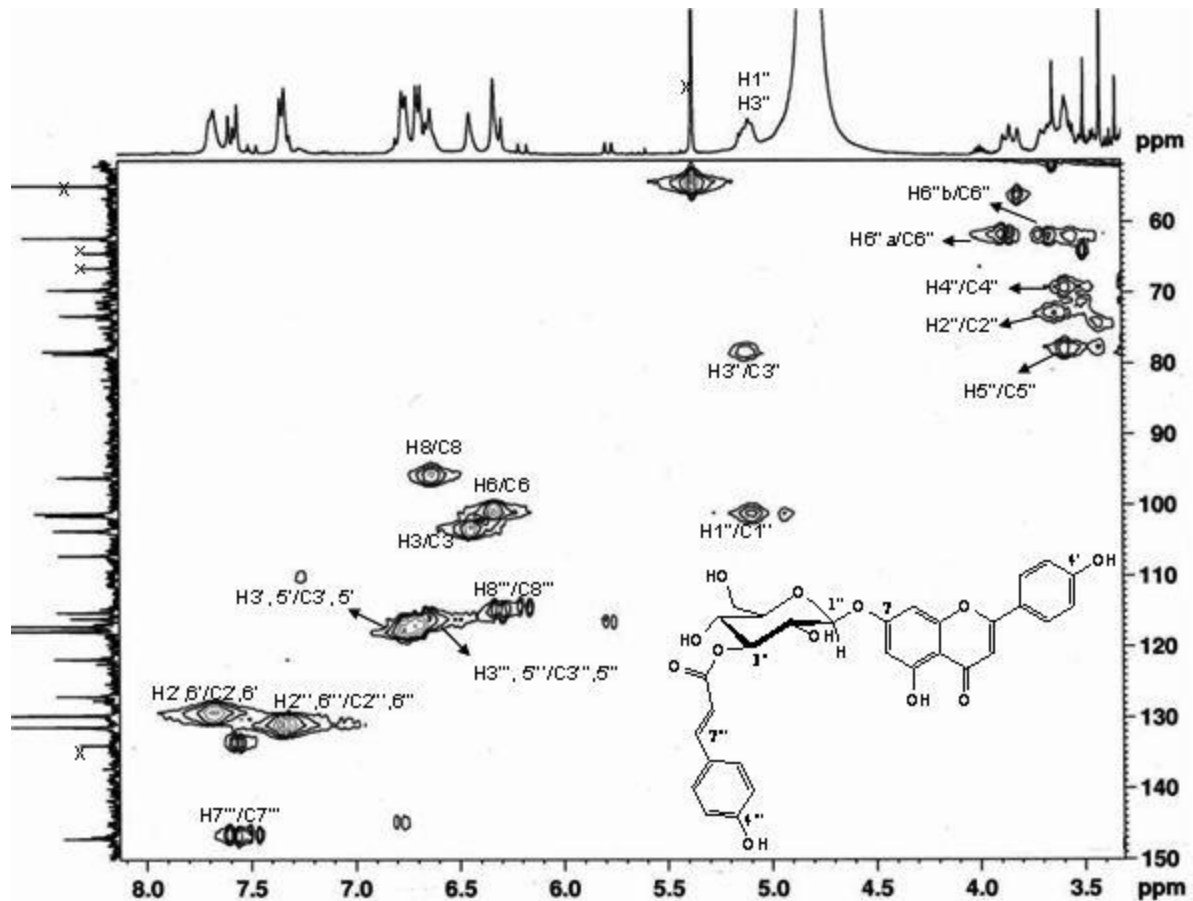


4-4-4- التعيين البنوي للمركب B3:

Apigenin 7-O-(3''-O-E-p-coumaroyl)-glucoside

هذا المركب أيضا يفصل للمرة الثانية من صنفه و خصائصه الكروماتوغرافية و الطيفية هي نفسها للمركب M3 المفصول من نبات *Marrubium deserti* و كما ذكرنا في تحليلنا له فقد تم الحصول على أطياف تجارب H,H-COSY و تجارب HMQC (شكل-115) لهذا المركب حيث تجلت مختلف التعانقات بين مختلف البروتونات و ذرات الكربون الحاملة لها و نلاحظ بالخصوص تعانق الإشارة عند 5.1ppm و التي نسبت إلى بروتوني (H3'', H1'') مع ذرتي كربون عند 101.54ppm موافقة لـ C1'' و أخرى عند 78.72ppm موافقة لـ C3'', و بالتالي فالمركب B3 هو:



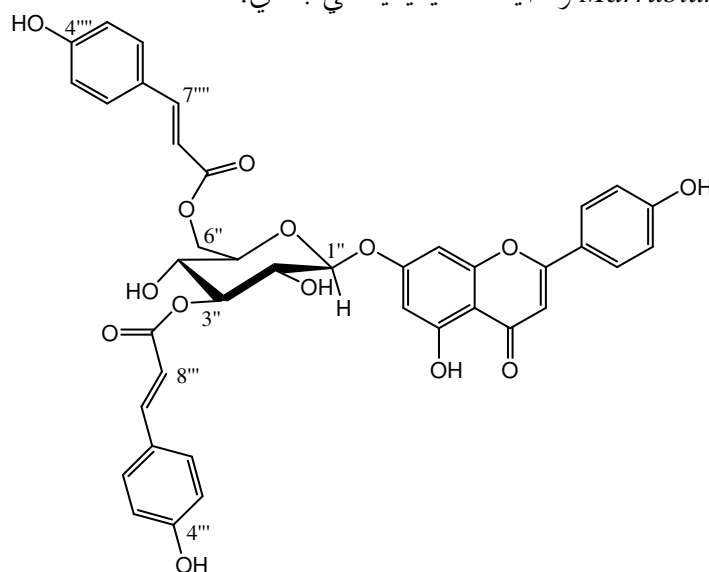


شكل-115- طيف تجارب HMQC للمركب B3

5-4-4- التعيين البنوي للمركب B4:

Apigenin 7-O-(3'', 6''-di-O-E-p-coumaroyl)-glucoside

هذا المركب يفصل لأول مرة من الصنف *Ballota*، خصائصه الكروماتوغرافية و الطيفية هي نفسها للمركب M4 من نبات *Marrubium deserti* و صيغته الكيميائية هي بالتالي:



6-4-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب B5:

Chrysoeriol 7-O-β-glucoside

- 1) **Couleur under UV:** Purple (on silica gel-tlc) بنفسجي
- 2) **R_f:** 0.22 (13/3/31), 0.47 (4/3/3), 0.12 (HOAc15%), 0.57 (D6M1)
- 3) **UV-Visible:**
MeOH 343 268 251, + NaOH 410 295sh 260, + AlCl₃ 390 363 295sh 274, + HCl
386 355 295sh 275, + NaOAc 407 349 268 253, + H₃BO₃ 347 268 253
- 4) **¹H-NMR** (Pyridine-d₅, 400MHz, δ, ppm):
7.25 (1H, d, J=8.5Hz, H5'), 7.2 (2H, H2', H6')*, 7.14 (1H, d, J=2Hz, H8), 6.96 (1H, s, H3), 6.86 (1H, d, J=2Hz, H6), 5.82(1H, d, J=7.3Hz, H1''), 3.83(3H, s, 3'-OCH₃),
3.60-3.66 (6H, glucose)

* إشارة مغطاة بإشارة المذيب Pyridine-d₅

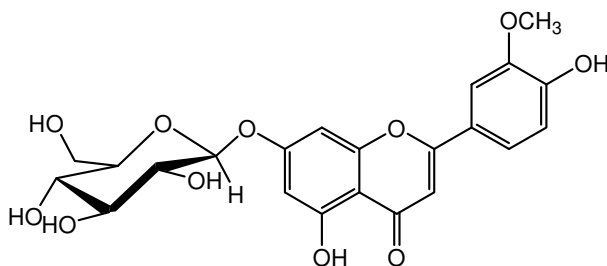
7-4-4- التحين البنيوي للمركب B5:

قيمة مرتفعة لثابت الانحباس للمركب في الجمل العضوية (4/3/3) و (D6M1) يدل على وجود مجموعات ميتوكسيل بالمركب و قيم ثابت الانحباس للمركب في الجمل المائية (13/3/3/1) و (HOAc15%) تدل من جهتها على أن المركب جليكوزيد و التمييه الحمضي حرر سكر الجليكوز. لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية و قيمة العصابة I في الميتانول يدلان على أن المركب فلافون (Flavone)، وجود قمتين عند 269, 251nm للعصابة II يدل على أن الحلقة B على الأقل ثنائية الاستبدال (شكل-116).

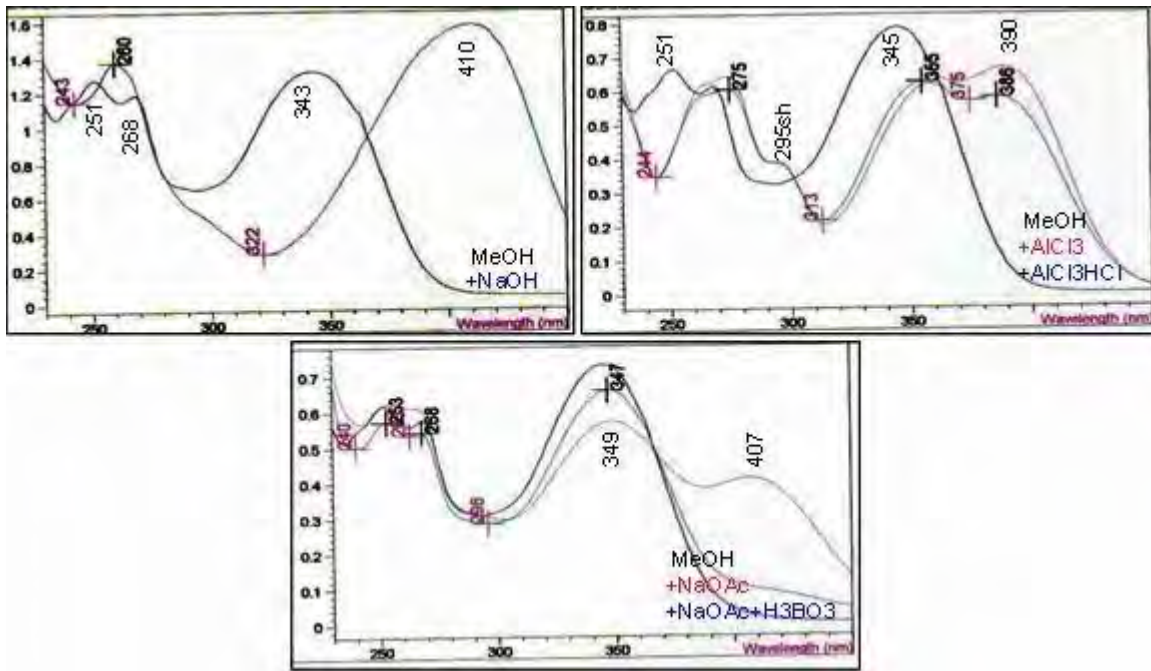
انزياح باثو كرومي لطيف المركب مع زيادة في الشدة الضوئية و بالتحديد للعصابة I بعد إضافة NaOH يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4'، عدم ظهور عصابة جديدة بين (320-335nm) مع المفاعل السابق و كذا عدم انزياح العصابة II بعد إضافة NaOAc مقارنة بطيف الميتانول يؤكدان وجود مستبدل على هيدروكسيل الموضع 7، انزياح باثو كرومي للعصابة I بعد إضافة المفاعل (AlCl₃+ HCl) مقارنة بطيف المركب في الميتانول يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5. غياب انزياح هيسوكرومي للعصابة I عند مقارنة طيف المركب مع (AlCl₃ + HCl) و طيفه مع (AlCl₃) من جهة، كذلك غياب انزياح باثو كرومي للعصابة I عند مقارنة طيف المركب مع (NaOAc+H₃BO₃) بطيفه في الميتانول يؤكدان غياب نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل في المركب.

طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب المنجز في مذيب Pyridine- d_5 (الشكل-117) أعطى إشارة ثنائية ($J=8.5\text{Hz}$) عند 7.25ppm موافقة لبروتون $\text{H}5'$ ، بينما إشارتي البروتونين $\text{H}2'$, $\text{H}6'$ فقد تداخلتا مع إشارة المذيب، إشارتا بروتوني $\text{H}6$ و $\text{H}8$ ظهرتتا كل منهما كإشارة ثنائية ($J=2\text{Hz}$) عند 7.14ppm و 6.86 على الترتيب. بروتون $\text{H}3$ ظهر كإشارة أحادية عند 6.96ppm و بين الطيف وجود مجموعة ميتوكسيل عند 3.83ppm و اعتمادا على نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية فموقعها يكون في $\text{C}3'$ أو $\text{C}7$ و يكون الموضع الأول هو الأكثر احتمالا و بالتالي يرتبط سكر الجليكوز بهيدروكسيل $\text{C}7$.
الجزء السكري للمركب ظهر في طيف $^1\text{H-NMR}$ من خلال إشارة البروتون الأنوميري الذي ظهر عند 5.82ppm بشكل ثنائية ($J=7.3\text{Hz}$) مما يؤكد وجود رابطة β بين سكر الجليكوز و الأجليكون بينما بقية بروتونات الجليكوز تركزت في منطقة ضيقة (3.60-3.66ppm) و عليه فالمركب **B5** هو:

Chrysoeriol 7-O- β -glucoside



تم فصل هذا المركب من بعض نباتات الصنف *Ballota* لكن هذه أول مرة يتم فصله و التعرف عليه في هذا النبات.



شكل-116- السلسلة الطيفية UV للمركب B5

8-4-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب B6:

Apigenin 6,8-di-C-glucoside (Vicenin-2)

1) **Colour under UV:** Purple (on silica gel-tlc) بنفسجي

2) **R_f:** 0.03 (D6M1), 0.5 (HOAc15%)

3) **UV-Visible :**

MeOH 328 304sh 274, + NaOH 399 334 283, + AlCl₃ 395sh 346 305 277, +HCl 395sh
343 304 279, + NaOAc 382 309sh 282, +H₃BO₃ 352 310sh 281

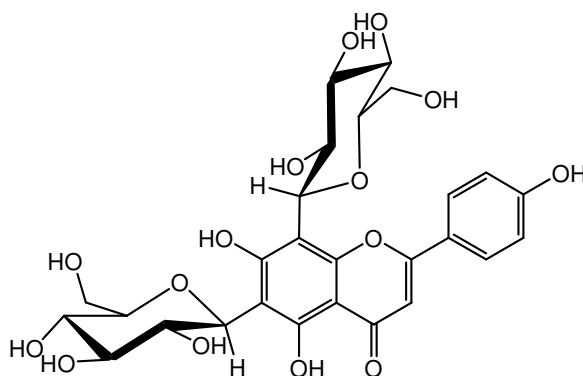
4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 500MHz, δ, ppm):

7.98 (2H, d, J=8.5Hz, H2', H6'), 6.94 (2H, d, J=8.5Hz, H3', H5'), 6.62 (1H, s, H3),
4.9-5.2 (H1'', H1'''), 3.1-4.2 (12H, glucoses)

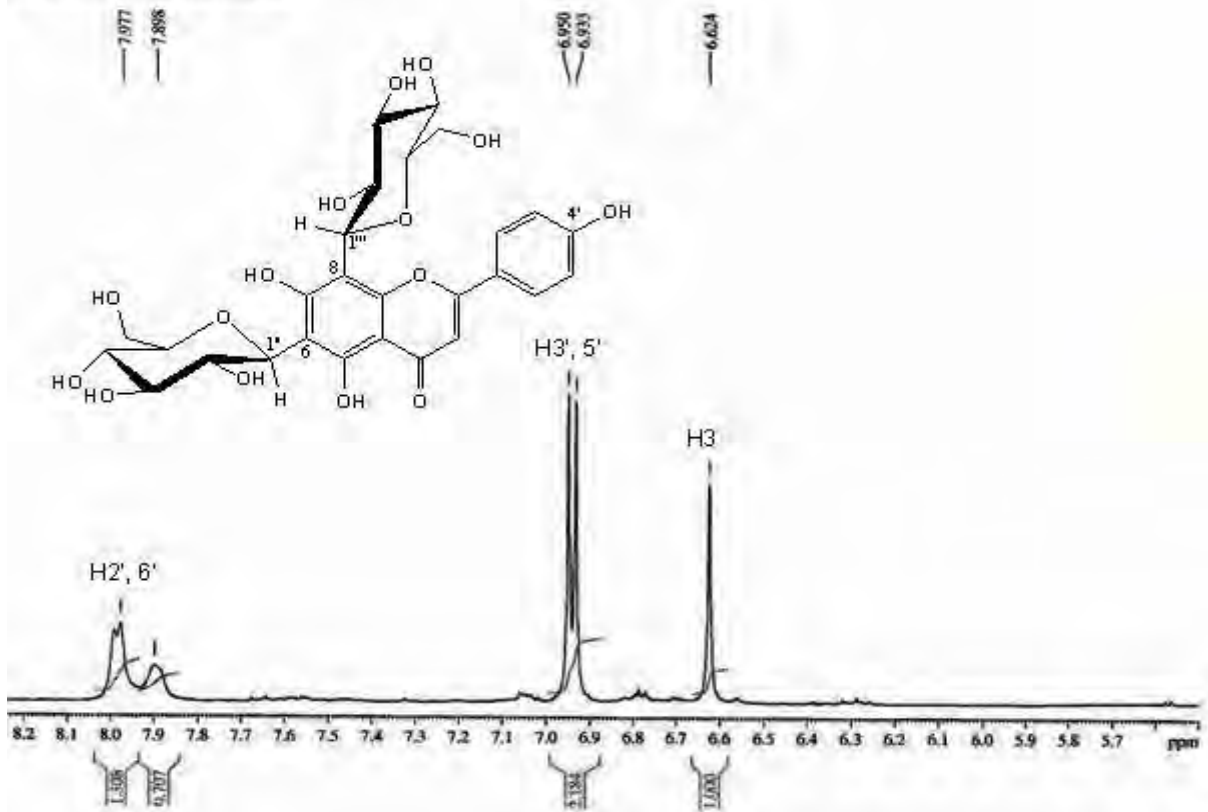
9-4-4- التعيين البنوي للمركب B6:

الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية لهذا المركب هي نفسها للمركب P4 من نبات *Pituranthos chloranthus* و المركب M6 من نبات *Marrubium deserti* و بالتالي التحليل نفسه ينطبق عليه و نعيد هنا وضع طيف ¹H-NMR للمركب في الشكلين-118، 119 لأنه تم تسجيله في مذيب مختلف هو CD₃OD و الصيغة الكيميائية للمركب B6 هي:

Apigenin 6,8-di-C-glucoside (Vicenin-2)

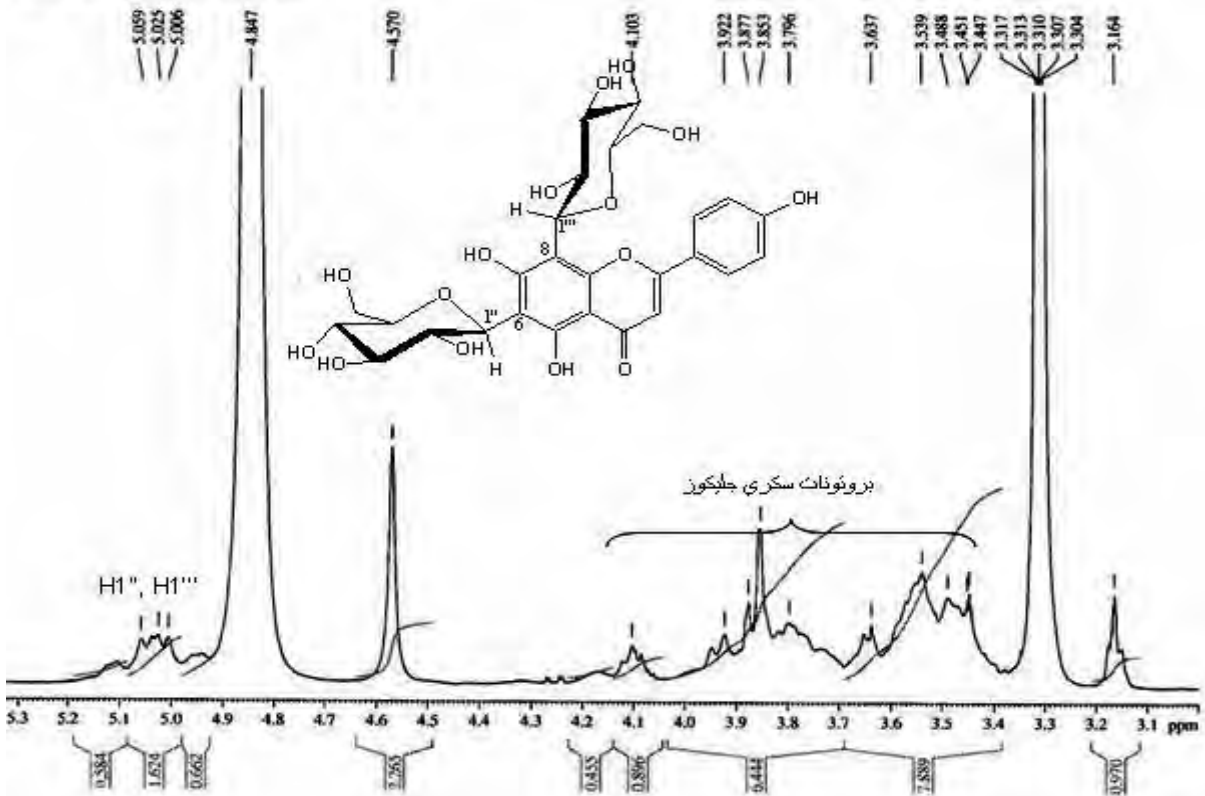


1H metanol-d4 256 scan Shigem



شكل-117- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب B6 (الجزء الأروماتي) (CD_3OD , 500MHz)

1H metanol-d4 256 scan Shigem



شكل-118- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب B6 (الجزء السكري) (CD_3OD , 125MHz)

10-4-4- الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب B7:

Luteolin 7-O-β-glucoside

1) **Colour under UV:** Purple بنفسجي

2) **R_f** : 0.09 (D6M1)

3) **UV-Visible:**

MeOH 348 267sh 255, +NaOH 402 290sh 263, +AlCl₃ 402 350sh 295sh 272, +HCl

387 363 295sh 270, +NaOAc 410sh 352 266sh 257, +H₃BO₃ 373 259

4) **¹H-NMR** (CD₃OD, 400MHz, δ, ppm):

7.35 (1H, dd, J=8.4, 2Hz, H6'), 7.30(1H, d, J=2Hz, H2'), 6.76 (1H, d, J=2Hz, H8), 6.71 (1H, d, J=8.4Hz, H5'), 6.49 (1H, s, H3), 6.45 (1H, d, J=2Hz, H6), 5.06 (1H, d, J=6.8Hz, H1''), 3.93 (1H, dd, J=10.4, 1.5Hz, H6''a), 3.72 (1H, dd, J=12.0, 5.6Hz, H6''b), 3.41-3.59 (H2'', H3'', H4'', H5'')

11-4-4- التعيين النيوي للمركب B7:

اللون البنفسجي للمركب تحت الأشعة فوق البنفسجية و قيمة العصابة I في الميتانول (شكل-120) تدل على أن المركب فلافون (أو فلافونول مستبدل في C3)، ظهور انثناء عند 267sh دليل على وجود أكثر من مستبدل على الحلقة B و التمييه الحمضي حرر سكر الجليكوز.

انزياح باثو كرومي للعصابة I مع زيادة في الشدة الضوئية يؤكد وجود هيدروكسيل حر بالموضع C4، عدم ظهور قمة جديدة في المجال بين (320-335nm) و عدم انزياح العصابة II بعد إضافة NaOAc مقارنة بقيمتها في طيف الميتانول يدلان على استبدال هيدروكسيل الموضع C7.

انزياح باثو كرومي للعصابة I بعد إضافة (AlCl₃+HCl). بمقدار (39nm) مقارنة بقيمتها في طيف الميتانول يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع C5.

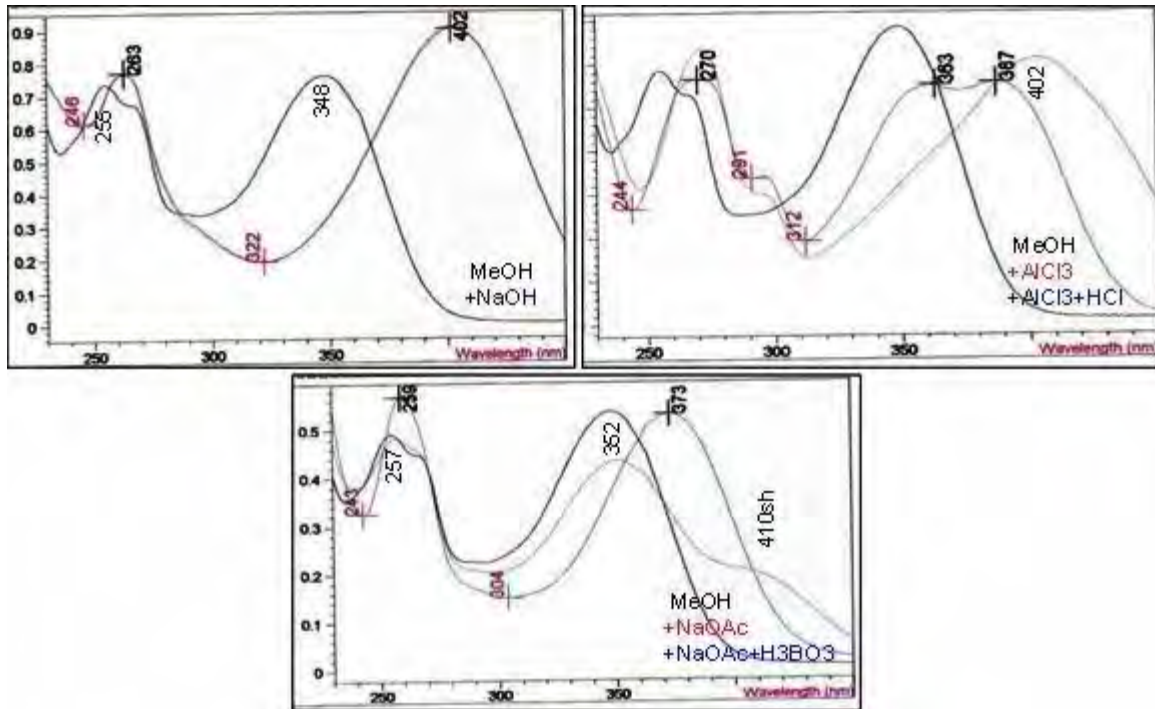
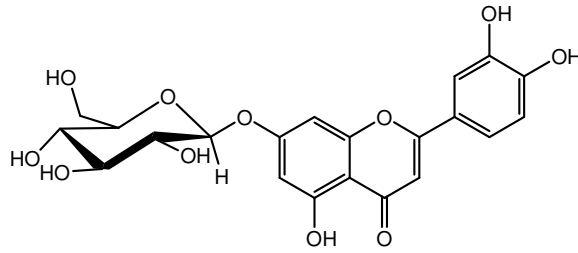
انزياح هيسوكرومي للعصابة I بعد إضافة (AlCl₃+HCl) بالنسبة لقيمتها مع (AlCl₃) و كذلك انزياح باثو كرومي لنفس العصابة بعد إضافة (NaOAc+H₃BO₃) مقارنة بقيمتها في وجود الميتانول الخالص يؤكدان على وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B.

طيف ¹H-NMR (الشكل-121) أكد وجود حلقة B ثنائية الاستبدال بظهور إشارة ثنائية-ثنائية (J=8.4, 2Hz) موافقة لـ H6'، إشارة ثنائية (J=2Hz) موافقة لـ H2' و أخرى ثنائية (J=8.4Hz) لـ H5'.

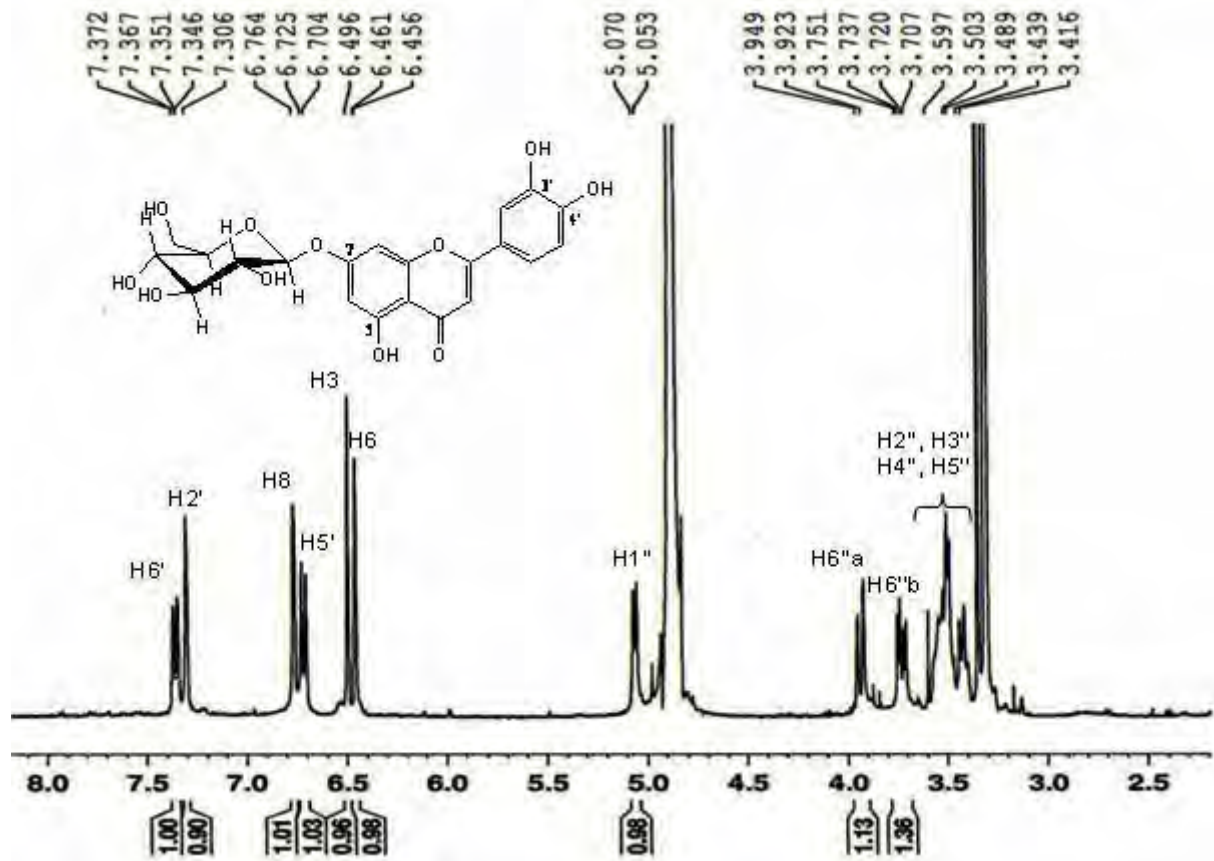
ظهور أيضا في الطيف بروتوني H8, H6 كل واحد بشكل إشارة ثنائية (J=2Hz) ثم ظهور إشارة أحادية موافقة لـ H3 عند 6.49ppm، مما يؤكد أن الجزء الأجليكوني من المركب هو luteolin.

الجزء السكري تجلى من خلال إشارة ثنائية ($J=6.8\text{Hz}$) لـ $H1''$ عند 5.06ppm لسكر الجليكوز المرتبط بالأجليكون برابطة β ثم إشارة $H6''a$ الذي ظهر في مجال أخفض بشكل إشارة ثنائية-ثنائية ($J=10.4, 1.5\text{Hz}$) ثم إشارة $H6''b$ الذي ظهر هو الآخر بشكل إشارة ثنائية-ثنائية ($J=12, 5.6\text{Hz}$) بينما بقية إشارات بروتونات الجليكوز تواجدت في المجال ($3.41-3.59\text{ppm}$) و عليه فالمركب **B7** هو:

Luteolin 7-O- β -glucoside

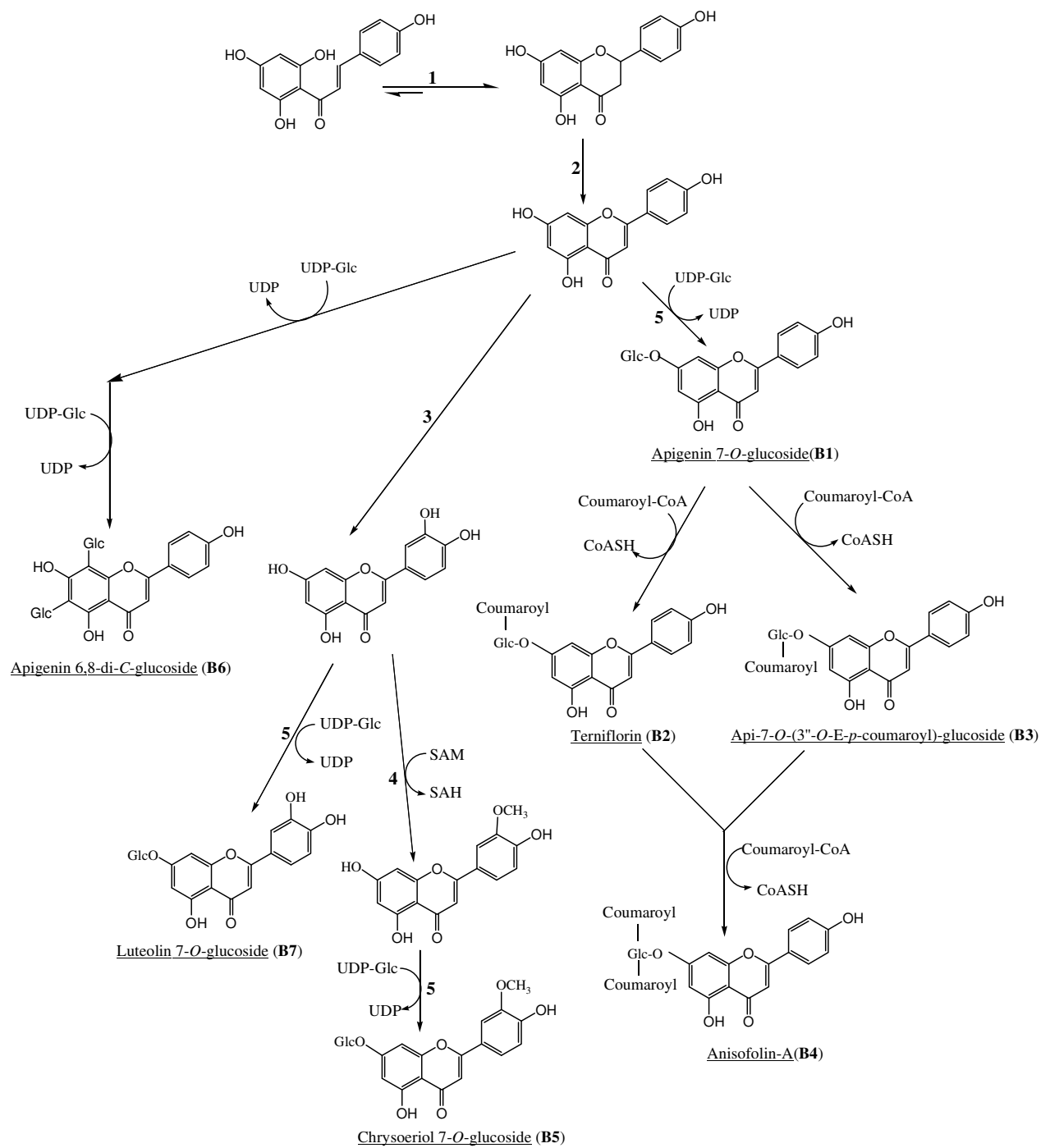


شكل-119- السلسلة الطيفية UV للمركب **B7**

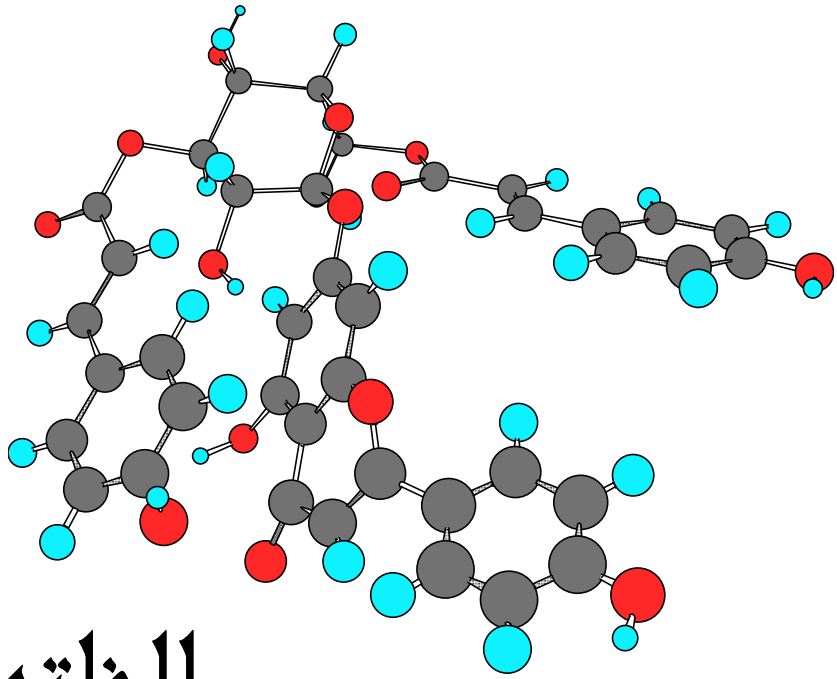


شكل-120- طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب B7 (CD₃OD, 400MHz)

بالاعتماد على النتائج المحصل عليها بالنسبة لنبات *Ballota hirsuta* تم اقتراح مخطط للاصطناع الحيوي لفلافونيداته (شكل-122) و كما ذكرنا سابقا فقد استعنا في تحديد الأنزيمات المحفزة لبعض التفاعلات بالمراجع [5] و [8] المذكورة في الجزء النظري من هذه الرسالة.



شكل-121- مخطط الاصطناع الحيوي المقترح لفلافونيدات نبات *Ballota hirsuta*



الخاصة

الختام

كان الهدف من هذه الرسالة دراسة نواتج الميتابوليزم الثانوي و بالتحديد نواتج الميتابوليزم الفلافونيدي لبعض نباتات منطقة الهقار المتميزة حيث قمنا بعمليات استخلاص و فصل لمركبات من أربعة أنواع نباتية اعتمدنا فيها على التقنيات الكروماتوغرافية المختلفة و قد سمحت لنا هذه الدراسة بالتعرف على العديد من المركبات الفلافونيدية إضافة إلى مركب كومارين، أسترفينولي و مركب متعدد الهيدروكسيل و ذلك بالاعتماد على مختلف التقنيات الطيفية الحديثة و قمنا في نهاية دراسة كل نبات باقتراح مخطط للاصطناع الحيوي لفلافونيداته. كان أول نبات محل الدراسة نبات *Pituranthos chloranthus* حيث تم فصل و التعرف لأول مرة من النبات على ستة مركبات هي أربعة فلافونيدات كانوا موضوع نشر في مجلة متخصصة [142] و مركب كومارين و آخر متعدد الهيدروكسيل، البعض من هذه المركبات يفصل لأول مرة من الصنف *Pituranthos* و المركبات التي تم التعرف عليها هي:

Isorhamnetin 3-*O*-glucoside (P1)

Isorhamnetin 3-*O*-(6''-*O*-rhamnosyl)-glucoside (P2)

Tamarixetin 3-*O*-glucoside (P3)

Apigenin 6, 8-di-*C*-glucoside (P4)

Scopoletin (P5)

L-Iditol (P6)

بينما من دراسة نبات "العرجل" *Solenostemma argel* تم فصل أربعة مركبات منها ثلاثة فلافونيدات تم الإشارة إليها في نشرات سابقة و أسترفينولي يفصل لأول مرة من هذا الصنف *Solenostemma* و المركبات التي تم التعرف عليها هي:

Kaempferol (S1)

Kaempferol 3-*O*-glucoside (S2)

Kaempferol 3-*O*-(2''-*O*-rhamnosyl)-glucoside (S3)

Methyl-(*E*)-ferulate (S4)

أما من نبات *Marrubium deserti* فتم التعرف على ستة مركبات فلافونيدية كلها جديدة بالنسبة للنبات مع العلم أن المركبات M2, M3, M4 تفصل لأول مرة مجتمعة من نفس النبات كما أنها المرة الأولى التي يتم فيها نشر طيف ¹³C-NMR للمركب M3 و المركبات التي تم التعرف عليها هي:

Apigenin 7-*O*-glucoside (M1)

Apigenin 7-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)-glucoside (M2)

Apigenin 7-*O*-(3''-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)-glucoside (M3)

Apigenin 7-*O*-(3'', 6''-di-*O*-*E-p*-coumaroyl)-glucoside (**M4**)

Ladanein (**M5**)

Apigenin 6, 8-di-*C*-glucoside (**M6**)

و أخيرا من نبات *Ballota hirsuta* تم التعرف على سبعة فلافونيدات، أربعة منها جديدة بالنسبة للنبات و من هذه الأخيرة مركب **B4** جديد بالنسبة للصنف *Ballota* كله و المركبات التي تم التعرف عليها هي:

Apigenin 7-*O*-glucoside (**B1**)

Apigenin 7-*O*-(6''-*O*-*E-p*-coumaroyl)-glucoside (**B2**)

Apigenin 7-*O*-(3''-*O*-*E-p*-coumaroyl)-glucoside (**B3**)

Apigenin 7-*O*-(3'', 6''-di-*O*-*E-p*-coumaroyl)-glucoside (**B4**)

Chrysoeriol 7-*O*-glucoside (**B5**)

Apigenin 6, 8-di-*C*-glucoside (**B6**)

Luteolin 7-*O*-glucoside (**B7**)

الملاحظ بالنسبة للنوعين الأخيرين هو التشابه في أغلب المركبات المفصولة منهما مما يؤكد انتمائهما إلى نفس تحت العائلة Limioidea.

من جهة أخرى تم دراسة الفعالية ضد المؤكسدة [143] للمركب **P4** من نبات *Pituranthos chloranthus* و المركب **S2** من نبات *Solenostemma argel*.

أتمنى أن تكون هذه النتائج مقدمة و أرضية لأبحاث أخرى مستقبلية تتناول بعمق أكثر دراسة و تثمين الغطاء النباتي لمنطقة الهقار ليس من الجانب الكيميائي فقط و إنما من جوانب أخرى تتناول إمكانية تقييم و استغلال هذه الثروة الطبيعية و الاستفادة منها و أظن أنه لا بد من تضافر الجهود مجموعة من الهيئات المتخصصة لأن طبيعة المنطقة من حيث شساعتها و صعوبتها و بعدها تتطلب إمكانيات كبيرة هي بالتأكيد ليست في متناول هيئة واحدة.

مراجع الجزء العملي

- [1] Quezel P., Santa S., (1963), “*Nouvelle flore de l’Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*”, Tome II, C.N.R.S., Paris, France
- [2] Ozenda P., (1958), “*Flore du Sahara septentrional et central*”, CNRS, Paris, France
- [3] Trabut L., (1935), “*Flore du Nord de l’Afrique- Répertoire des plantes indigènes des Plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l’Afrique*”, Collection du Centenaire de l’Algérie, Alger
- [4] Singab A-N., Khalifa T., Mahran G. H., Okada Y. Matsumaru Y., Nishino H., Okuyama T., (1998), “A new flavonoid glycoside from *Pituranthos tortuosus*”, *Natural Medicines* (Tokyo), 52(2), 191-4
- [5] Shalaby N. M. M., (1998), “Chemical investigation of *Pituranthos triradiatus* growing in Egypt”, *Modelling, Measurement & Control, C: Energetics, Chemistry & Chemical Engineering, Earth, Resources, Environment, Biomedical Problems*, 57(1), 17-35
- [6] Abdelwahed A., Hayder N., Kilani S., Mahmoud A., Chibani J., Hammami M., Chekir-Ghedira L., Ghedira K., (2006), “Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos Tortuosus*”, *Flavour and Fragrance Journal*, 21(1), 129-33
- [7] Boutaghane, N., Nacer, A., Kabouche, Z., Ait-Kaki, B., (2004), “Comparative antibacterial activities of the essential oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* from Algerian septentrional Sahara”, *Chemistry of Natural Compounds*, 40(6), 606-7
- [8] Abdel Ghani A., Hafez, S. S., (1995), “GC-MS analysis and antimicrobial activity of volatile oil of *Pituranthos tortuosus*”, *Qatar University Science Journal*, 15(1), 23-6
- [9] Haba H., Benkhaled M., Georges M., Christophe L., Lavaud C., (2004), “Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*”, *Natural Product Research*, 18(5), 409-13
- [10] Mahran G. H., Ahmed M. S., Seida A. A., Amarquaye A. A., (1989), “A phytochemical investigation of *Pituranthos tortuosus*”, *Bulletin of the Faculty of Pharmacy* (Cairo University), 27(1), 87-9
- [11] Abdel-Kader Maged S., (2003), “New ester and furocoumarins from the roots of *Pituranthos tortuosus*”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(1), 48-51
- [12] Halim A. F., Saad H.-E. A., Lahloub M. F., Ahmed A. F., (1995), “Pituranthoside

- from *Pituranthos triradiatus*”, *Phytochemistry*, 40(3), 927-9
- [13] Nassar M. I., Abdel-Fattah M. E., Gaara A. H., El-Khrisy E. A. M., (1993), “Constituents of *Coriandrum sativum* and *Pituranthos triradiatus*”, *Bulletin of the Faculty of Pharmacy* (CairoUniversity), 31(3), 399-401
- [14] Halim A. F., Lahloub M. F., Saad H.-E. A., Ahmed A. F., (1991), “Coumarins of roots of *Pituranthos triradiatus* growing in Egypt”, *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 402-13
- [15] Ashkenazy D., Friedman J., Kashman Y., (1983), “The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*”, *Planta Medica*, 47(4), 218-20
- [16] Vernin G., Lageot C., Ghiglione C., Dahia M., Parkanyi C., (1999), “GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* from Algeria”, *Journal of Essential Oil Research*, 11(6), 673-6
- [17] Verite P.; Nacer A.; Kabouche Z.; Seguin E., (2004), “Composition of seed and stem essential oils of *Pituranthos scoparius*”, *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 562-4
- [18] Abdel-Mogib M.; Ayyad S. N.; Metwally M. A.; Dawidar A. M., (1992), “Lactones from *Pituranthos tortuosus*”, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 35(3), 93
- [19] Schulte K. E., Potter B., (1977), “Polyacetylenes from *Pituranthus tortuosus*”, *Archiv der Pharmazie* (Weinheim, Germany), 310(12), 945-63
- [20] Singab A. N. B., (2003), “Essential oils and lipids content of *Pituranthos* species growing in Egypt”, *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*, 41(3), 213-7
- [21] Ashkenazy D.; Friedman J.; Kashman Y.; Egyed M. N.; Shlosberg A.; Nyska A. (1984), “Photosensitization in ducklings induced by *Pituranthos triradiatus*”, *Veterinary and Human Toxicology*, 26(2), 118-20
- [22] Escarpa A., Gonzalez M. C., (2000), “Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources”, *Journal of chromatography A*, 897, 161-70
- [23] Boulos L., (1983), “*Medicinal Plants of North Africa*”, Reference Publications Inc., Michigan, USA.
- [24] Heneidak S., Grayer Renee J., Kite Geoffrey C., Simmonds Monique S. J., (2006), “Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae)”, *Biochemical Systematic and Ecology*, 34(7), 575-84
- [25] Khaled S. A., Szendrei K. Novak I., (1974), “Sudanese plants, *Solenostemma argheI*”,

Herba Hungarica, 13(3), 33-5

- [26] Kamel, M. S.; Ohtani, K.; Hasanain, H. A.; Mohamed, M. H.; Kasai, R.; Yamasaki, K., (2000), "Monoterpene and pregnane glucosides from *Solenostemma argel*", *Phytochemistry*, 53(8), 937-40
- [27] Michael Helana N., (1998), "A new flavonol diglycoside from *Solenostemma argel* leaves", *Asian Journal of Chemistry*, 10(4), 1038-40
- [28] Abd El-Hady, F. K.; Ouf, S. A., (1993), "Fungitoxic effect of different substances from *Solenostemma argel* on some shoot surface fungi", *Zentralblatt fuer Mikrobiologie*, 148(8), 598-607
- [29] Ahmad Mamdouh, M., (2005), "Antioxidant constituents from *Solenostemma argel*", *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 30-41
- [30] El-Askary H., (2003), "Pregnene glycoside and monoterpene derivative from *Solenostemma argel*", *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)*, 41(3), 131-7
- [31] Innocenti G; Dall'acqua S; Sosa S; Altinier G; Della Loggia R., (2005), "Topical anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel* leaves", *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 307-10
- [32] Hamed A. I., (2001), "New steroids from *Solenostemma argel* leave", *Fitoterapia*, 72(7), 747-55
- [33] Hassan H. A., Hamed A. I., El- Emary N. A., Springuel I. V., Mitome H., Miyaoka H., (2001), "Pregnene derivatives from *Solenostemma argel* leave", *Phytochemistry*, 57(4), 507-11
- [34] Kamel, M. S., (2003), "Acylated phenolic glycosides from *Solenostemma argel*", *Phytochemistry*, 62(8), 1247-50
- [35] Plaza A., Piacente S., Perrone A., Hamed A. I., Pizza C., Bifulco G., (2004), "Stemmosides C and D, two novel unusual pregnane glycosides from *Solenostemma argel*: Structural elucidation and configurational study by a combined NMR-quantum mechanical strategy", *Tetrahedron*, 60(52), 12201-9
- [36] Plaza A., Bifulco G., Hamed A. I., Pizza C., Piacente S., (2003), "Argeloside A and B, two novel 14,15-secopregnane glycosides from *Solenostemma argel*", *Tetrahedron letters*, 44(47), 8553-8
- [37] Perrone A., Plaza A., Ercolino S. F., Hamed A. I., Parente L., Pizza C., Piacente S., (2006), "14,15-Secopregnane Derivatives from the Leaves of *Solenostemma argel*",

- [38] Plaza A., Perrone A., Balestrieri M. L., Felice F., Balestrieri C., Hamed A. I., Pizza C., Piacente S., (2005), "New unusual pregnane glycosides with antiproliferative activity from *Solenostemma argel*", *Steroids*, 70(9), 594-603
- [39] Plaza A., Perrone A., Balestrieri C., Balestrieri M. L., Bifulco G., Carbone V., Hamed A.I. Pizza C. Piacente S., (2005), "New antiproliferative 14,15-secopregnane glycosides from *Solenostemma argel*", *Tetrahedron*, 61(31), 7470-80
- [40] Braca A., Bader A., Morelli I., Scarpato R., Turchi G., Pizza C., De Tommasi N., (2002), "New pregnane glycosides from *Caralluma negevensis*", *Tetrahedron*, 58(29), 5837-48
- [41] Deepak D., Srivastav S., Khare A., (1997), "Pregnane glycosides from *Hemidesmus indicus*", *Phytochemistry*, 44 (1), 145-51
- [42] Pan W.B., Chang F.R., Wei L.M., Wu Y.C., (2003), "New flavans, Spirotanol sapogenins and a pregnane genin from *Tupistra chinesis* and their cytotoxicity", *Journal of Natural Products*, 66(3), 161-8
- [43] El Hady Faten K. A., Hegazi A.G., Ata N., Enbaawy M. L., (1994), "Studies for determining antimicrobial activity of *Solenostemma argel*, 2-Extraction with chloroform/methanol in different proportions", *Qatar University Science Journal*, 14(Spec. Issue), 143-6
- [44] El Hady Faten K. A., Hegazi A.G., Ata N., Enbaawy M. L., (1994), "Studies for determining antimicrobial activity of *Solenostemma argel*, 1-Extraction with methanol/water in different proportions", *Qatar University Science Journal*, 14(Spec. Issue), 138-42
- [45] Jabeen F., Tharib S. M., Veitch G.B.A., (1984), "An investigation of the anti-inflammatory activity of *Solenostemma oleifolium*", *Fitoterapia*, 55(3), 186-9
- [46] Berrougui H., Isabelle M., Cherki M., Khalil A., (2006), "*Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage", *Life Sciences*, 80(2), 105-12
- [47] El Bardai S., Lyoussi B., Wibo M., Morel N., (2004), "Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat.", *Clinical and Experimental Hypertension*, 26(6), 465-74
- [48] Deepak M., Umashankar D.C., Handa S.S., (1999), "Verbascoside a promising

- phenylpropanoid”, *Indian Drugs*, **36**, 336-45
- [49] Martin-Nizard F., Sahpaz S., Furman C., Fruchart J-C., Duriez P., Bailleul F., (2003), “Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity”, *Planta Medica*, **69(3)**, 207-11
- [50] أنطوان بشار خليفة (1998)، ”النباتات صيدلانية الطبيعة“ الجزء 1، المركز الثقافي العربي، الدار البيضاء المغرب
- [51] Karioti A., Protopappa A., Megoulas N., Skaltsa H., (2007), “Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15(7)**, 2708-14
- [52] De Jesus R.A.P., Cechinel-Filho V., Oliveira A.E., Schlemper V., (1999), “Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*”, *Phytomedicine*, **7**, 111-5
- [53] El Bardai S., Morel N., Wibo M., Fabre N., Llabres G., Lyoussi B., Quetin-Leclercq J., (2003), “The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *marrubium vulgare*”, *Planta Medica*, **69(1)**, 75-7
- [54] Stulzer H. K., Tagliari M. P., Zampirolo J. A., Cechinel-Filho V. Schlemper V., (2006), “Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*”, *Journal of Ethnopharmacology*, **108(3)**, 379-84
- [55] El Bardai S., Wibo M., Hamaide M-C., Lyoussi B., Quetin- Leclercq J., Morel N., (2003), “Characterisation of marrubenol, a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker”, *British Journal of Pharmacology*, **140(7)**, 1211-16
- [56] Belhattab R., Larous L., Figueiredo A. C., Santos Pedro A. G., Costa M. M., Barroso Jose G., Pedro Luis G., (2006), “Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* growing wild in Algeria”, *Journal of Essential Oil Research*, **18(4)**, 369-73
- [57] Asadipour A., Mehrabani M., Nazeri V., Tabarraii M., (2004), “Composition of the essential oil of *Marrubium vulgare*”, *Ulum-i Daroei*, **(2)**, 77-82
- [58] Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F., (2002), “Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*”, *Journal of Ethnopharmacology*, **79(3)**, 389-92
- [59] Saleh M. R. I., Sarg T. M., Metwally A. M., Rakha A. A., (1981), “Chemical constituents from *Marrubium alysson*”, *Planta Medica*, **41(2)**, 202-3

- [60] Karioti A., Heilmann J., Skaltsa H., (2005), "Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*", *Phytochemistry*, 66(9), 1060-6
- [61] Michelis F., Tiligada E., Skaltsa H., Lazari D., Skaltsounis A- L., Delitheos A., (2002), "Effects of the flavonoid pilloin isolated from *Marrubium cylleneum* on mitogen-induced lymphocyte transformation", *Pharmaceutical Biology* (Lisse, Netherlands), 40(4), 245-8
- [62] Savona G., Bruno M., Rodriguez B., (1984), "Preperegrinine, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium friwaldskyanum*", *Phytochemistry*, 23(1), 191-2
- [63] Rigano D., Apostolides Arnold N., Bruno M., Formisano C., Grassia A., Piacente S., Piozzi F., Senatore F., (2006), "Phenolic compounds of *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum* from Lebanon", *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(3), 256-8
- [64] Bal Y., (1989), "Terpenoids and a flavone from *Marrubium parviflorum*", *Marmara Universitesi Eczacilik Dergisi*, 5(1), 89-91
- [65] Wollenweber E., Dietz V. H., (1981), "Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants", *Phytochemistry*, 20(5), 869-932
- [66] Salei L. A., Poda D. P., Lazurevskii G. V., (1969), "4', 5, 6, 7-Tetramethoxyflavone from *Marrubium peregrinum*", *Chemistry of Natural Compounds*, 5(3), 182-3
- [67] Nagy M., Gergel D., Grancai D., Novomesky P., Ubik K., (1996), "Antilipoperoxidative activity of some phenolic constituents from *Marrubium peregrinum*", *Farmaceuticky Obzor.*, 65(12), 283-5
- [68] Hatam Natiq A. R., Porzel A., Seifert K., (1995), "Polyodonine, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium polydon*", *Phytochemistry*, 40(5), 1575-6
- [69] Citoglu G. S., Aksit F., (2002), "Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum*", *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(9), 885-6
- [70] Karioti A., Skaltsa H., Heilmann J., Sticher O., (2003), "Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*", *Phytochemistry*, 64(2), 655-60
- [71] Kowalewski Z., Matlawska I., (1978), "Flavonoid compounds in the herb *Marrubium vulgare*", *Herba Polonica*, 24(4), 183-6
- [72] Amer Mohamed M. A., (1993), "Constituents of the aerial parts of *Marrubium vulgare*", *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 92-8
- [73] Nawwar M. A. M., El-Mousallamy Amany M. D., Barakat Heba H., Buddrus J., Linscheid M., (1989), "Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*",

- Phytochemistry*, 28(11), 3201-6
- [74] Calis I., Hosny M., Khalifa T., Ruedi P., (1992), "Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*", *Phytochemistry*, 31(10), 3624-6
- [75] Karioti A., Heilmann J., Skaltsa H., (2005), "Secondary metabolites from *Marrubium velutinum*, growing wild in Greece", *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences*, 60(3), 328-32
- [76] Sahpaz S., Hennebelle T., Bailleul F., (2002), "Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare*", *Natural Product Letters*, 16(3), 195-9
- [77] Sagitdinova G. V., Makhmudov M. K., Tashkhozhaev B., Mal'tsev I. I., (1996), "Labdanoids of *Marrubium anisodon*", *Chemistry of natural compounds*, 32(1), 43-6
- [78] Savona G., Piozzi F., Aranguiz Luisa M., Rodriguez B., (1979), "Diterpenes from *Marrubium sericeum*, *Marrubium supinum* and *Marrubium alysson*", *Phytochemistry*, 18(5), 859-60
- [79] Lida A., Tanaka Y., Mihara T., Tabata M., Honda G., Shingu T., Takeda Y., Takaishi Y., Yesilada E., (1995), "Marrubinones A and B, labdane diterpenoids from *Marrubium astracanicum*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 43(9), 1454-7
- [80] Takeda Y., Yanagihara K., Masuda T., Otsuka H., Honda G., Takaishi Y., Sezik E., Yesilada E., (2000), "Labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *globosum*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48(8), 1234-5
- [81] Rigano D., Grassia A., Borrelli F., Aviello G., Piozzi F., Bruno M., Arnold N. A., Capasso R., Senatore F., (2006), "Phytochemical and pharmacological studies on the acetonic extract of *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum*", *Planta Medica*, 72(6), 575-8
- [82] Rigano D., Grassia A., Bruno M., Rosselli S., Piozzi F., Formisano C., Arnold N. A., Senatore F., (2006), "Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*", *Journal of Natural Products*, 69(5), 836-8
- [83] Bal Y., Kaban S., Nizami S. S., (1995), "Anatolione: A new diterpene from *Marrubium parviflorum*", *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 38(3/4), 144-5
- [84] Nik Z. B., Mirza M., (2003), "Composition of the essential oil of *Marrubium astracanicum*", *Journal of Essential Oil Research*, 15(5), 342-3
- [85] Morteza-Semnani K., Saeedi M., (2004), "The essential oil composition of *Marrubium astracanicum* from Iran", *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 7(3),

- [86] Demirci B., Baser K. H. C., Kirimer Nes'e, (2004), "Composition of the essential oil of *Marrubium bourgaei* ssp. *Caricum*", *Journal of Essential Oil Research*, 16(2), 133-4
- [87] Kurkcuoglu M., Baser K. H. C., Tosun A., Dogan E., Duman H., (2007), "Essential oil composition of an endemic species of Turkey: *Marrubium bourgaei* ssp. *Bourgaei*", *Journal of Essential Oil Research*, 19(1), 34-6
- [88] Nik Z.B., Mirza M., Shahmir F., (2004), "Essential oil of *Marrubium cuneatum* and its secretory elements", *Flavour and Fragrance Journal*, 19(3), 233-5
- [89] Grassia A., Senatore F., Arnold N. A., Bruno M., Piozzi F., Rigano D., Formisano C., (2006), "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from aerial parts of two *Marrubium* species growing wild in Lebanon", *Polish Journal of Chemistry*, 80(4), 623-8
- [90] Skaltsa H., Lazari D., Loukis A., Aslanis D., Tiligada E., (1997), "Chemical and Biological studies on the essential oil of *Marrubium cylleneum*", *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 7(4), 184-6
- [91] Bal Y., Kaban S., Kirimer N., Baser K. H. C., (1999), "Composition of the essential oil of *Marrubium parviflorum*", *Journal of Essential Oil Research*, 11(3), 300-2
- [92] Khanavi M., Ghasemian L., Motlagh E. H., Hadjiakhoondi A., Shafiee A., (2005), "Chemical composition of the essential oils of *Marrubium parviflorum* and *Marrubium vulgare* from Iran", *Flavour and Fragrance Journal*, 20(3), 324-6
- [93] Lazari D. M., Skaltsa H., Constantinidis, T., (1999), "Essential oils of *Marrubium velutinum* and *Marrubium peregrinum* growing wild in Greece", *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 290-2
- [94] Nagy M., Svajdlenka E., (1998), "Comparison of essential oils from *Marrubium vulgare* and *M. peregrinum*", *Journal of Essential Oil Research*, 10(5), 585-7
- [95] Weel Koen G. C., Venskutonis P. R., Pukalskas A., Gruzdiene D., Linssen J. P. H., (1999), "Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania", *Fett/Lipid*, 101(10), 395-400
- [96] Rao L. Jagan M., Kumari G. N. K., Rao N. S. P., (1982), "Anisofolin-A, a new acylated flavone glucoside from *Anisomeles ovata*", *Heterocycles*, 19(9), 1655-61
- [97] Ferreres F., Tomas-Barberan F.A., Tomas-Lorente F., (1986), "Flavonoid compounds from *Ballota hirsuta*", *Journal of Natural Products*, 49 (3), 654-5
- [98] Siciliano T., Bader A., Vassallo A., Braca A., Morrelli I., Pizza C., De Tommasi N.,

- (2005), "Secondary metabolites from *Ballota undulata*", *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(4), 341-51
- [99] Vrchovska V., Spilkova J., Valentao P., Sousa C., Andrade P.B., Seabra R. M., (2007), "Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion", *Food Chemistry*, 105(4), 1396-1403
- [100] Citoglu G.S., Sever B., Antus S., Baitz-Gacs E., Altanlar N., (2003), "Antifungal flavonoids from *Ballota glandulosissima*", *Pharmaceutical Biology* (Lisse, Netherlands), 41(7), 483-6
- [101] Citoglu G.S., Sever B., Antus S., Baitz-Gacs E., Altanlar N., (2004), "Antifungal diterpenoids and flavonoids from *Ballota inaequidens*", *Pharmaceutical Biology* (Lisse, Netherlands), 42(8), 659-63
- [102] Citoglu G., Tanker M., Sever B., Englert J., Anton R., Altanlar N., (1998), "Antibacterial activities of diterpenoids isolated from *Ballota saxatilis* subsp. *Saxatilis*", *Planta Medica*, 64(5), 484-5
- [103] Ahmad V-U., Farooq U., Abbaskhan A., Hussain J., Abbasi M.A., Nawaz S.A., Choudhary M.I., (2004), "Four new diterpenoids from *Ballota limbata*", *Helvetica Chimica Acta*, 87(3), 682-9
- [104] Ahmad V-U., Farooq U., Hussain J., Ullah F., Nawaz S. A., Choudhary M.I., (2004), "Two new diterpenoids from *Ballota limbata*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52(4), 441-3
- [105] Sahpaz S., Skaltsounis A. L., Bailleul F., (2002), "Polyphenols from *Ballota acetabulosa*", *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(6), 601-4
- [106] Mericli A.H., Mericli F., Tuzlaci E., (1988), "Flavonoids of *Ballota acetabulosa*", *Acta Pharmaceutica Turcica*, 30(3), 143-4
- [107] Darbour N., Baltassat F., Raynaud J., (1986), "The presence of apigenin *O*-heteroside and *C*-heteroside in the leaves of *Ballota foetida*", *Pharmazie*, 41 (8), 605-6
- [108] Hussein A.A., Jimeno M.L., Rodriguez B., (2007), "Spectral assignments and reference data structural and spectral assignment of a new diterpenoid isolated from *Ballota undulata* and a complete ¹H and ¹³C NMR data assignment for three other structurally related compounds", *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45(10), 899-901
- [109] Hennebelle T., Sahpaz S., Ezer N., Bailleul F., (2007), "Polyphenols from *Ballota larendana* and *Ballota pseudodictamnus*", *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(5, 6), 441-3

- [110] Parvez M., Riaz M., Malik A., (2001), "Eupatorin", *Acta Crystallographica*, Section E, E57 (1), 289-91
- [111] Toth E., Toth G., Mathe I., Blunden G., (2007), "Martynoside, forsythoside B, ladanein and 7 α -acetoxyroyleanone from *Ballota nigra*", *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(12), 894-7
- [112] Kisiel W., Piozzi F., (1995), "Tangeretin from *Ballota nigra*", *Polish J. Chem.*, 69 (3), 476- 7
- [113] Bertrand M.C., Tillequin F., Bailleul F., (2000), "Two major flavonoids from *Ballota nigra*", *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(10), 1031-3
- [114] Bruno M., Bondi M.L., Piozzi F., Arnold N.A., Simmonds M.S.J., (2001), "Occurrence of 18-hydroxyballonigrin in *Ballota saxatilis* ssp. *saxatilis* from Lebanon", *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(4), 429-31
- [115] Savona G., Bruno M., Piozzi F., Barbagallo C., (1982), "Diterpenes from *Ballota* Species", *Phytochemistry*, 21(8), 2132-3
- [116] Citoglu G., Tanker M., Sever B., (1999), "Flavonoid aglycons from *Ballota saxatilis* subsp. *saxatilis*", *Pharmaceutical Biology* (Lisse, Netherlands), 37(2), 158-60
- [117] Radwan H.M., El-Missiry M.M., El-Nasr M.M., (1997), "Phytochemical investigation of *Ballota undulate*", *Bulletin of the Faculty of Pharmacy* (Cairo Univ.), 35(1), 83-6
- [118] Seidel V., Bailleul F., Tillequin F., (1996), "Phenylpropanoid glycosides from *Ballota nigra*", *Planta Medica*, 62(2), 186-7
- [119] Seidel V., Bailleul F., Libot F., Tillequin F., (1997), "A phenylpropanoid glycoside from *Ballota nigra*", *Phytochemistry*, 44(4), 691-3
- [120] Didry N., Seidel V., Dubreuil L., Tillequin F., Bailleul F., (1999), "Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*", *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2), 197-202
- [121] Savona G., Piozzi F., Hanson J.R., Siverns M, (1978), "18-Hydroxyballonigrin, a new diterpenoid from *Ballota acetabulosa*", *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, organic and bio-organic chemistry*, (10), 1271-2
- [122] Rustaiyan A., Mosslemin-Kupaii M.H., Papastergiou, F., Jakupovic, J., (1995), "Persianone, a dimeric diterpene from *Ballota aucheri*", *Phytochemistry*, 40(3), 875-9
- [123] Rustaiyan A., Mosslemin-Kupaii M.H., Zdero, C., (1991), "Furanolabdanes and related compounds from *Ballota aucheri*", *Phytochemistry*, 31(1), 344-6
- [124] Savona G., Piozzi F., Rodriguez B., (1978), "Hispanolone, a new furanoditerpene",

- [125] Rodriguez B., Savona G., Piozzi F., (1979), “Two new unusual diterpenoids from *Ballota hispanica*”, *Journal of Organic Chemistry*, 44(13), 2219-21
- [126] Lopez de Lerma J., Garcia-Blanco S., Rodriguez J.G, (1980), “New compounds from *Ballota hispanica*, X-ray crystal and molecular structure of hispanonic acid methyl ester”, *Tetrahedron Letters*, 21(13), 1273-4
- [127] Savona G., Piozzi F., Hanson J.R., (1978), “13-Hydroxyballonigrinolide, a new diterpenoid from *Ballota lanata*”, *Phytochemistry*, 17(12), 2132-3
- [128] Citoglu G. S., Yilmaz B. S., Tankahya B., Tipirdamaz R., (2005), “Chemotaxonomy of *ballota* species”, *Chemistry of Natural Compounds*, 41(3), 299-302
- [129] Riaz M., Krohn K., Malik A., Floerke U., (2004), “Limbetazulone: a new "decahydro-8-oxanaphtho [2,1-f]azulen-7-one" diterpenoid from *Ballota limbeta*, and occurrence of two conformational isomers in the crystal”, *Chemistry & Biodiversity*, 1(3), 458-62
- [130] Savona G., Piozzi F., Hanson J.R., Siverns M., (1976), “Structure of ballotinone, a diterpenoid from *Ballota nigra*”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, organic and bio-organic chemistry*, (15), 1607-9
- [131] Savona G., Piozzi F., Hanson J.R., Siverns M., (1977), “Structure of three new diterpenoids from *Ballota* species”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, organic and bio-organic chemistry*, (3), 322-4
- [132] Savona G., Piozzi F., Hanson J.R., Siverns M., (1977), “The structure of ballotenol a new diterpenoid from *Ballota nigra*”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, organic and bio-organic chemistry*, (5), 497-9
- [133] Bruno M., Savona G., Pascual C., Rodriguez B., (1986), “Preleosibirin, a new prefuranic labdane diterpene from *Ballota nigra* subsp. *foetida*”, *Phytochemistry*, 25(2), 538-9
- [134] Seidel V., Bailleul F., Tillequin F, (1996), “Isolation from *Ballota nigra* of 13-hydroxyballonigrinolide, a diterpene useful for the standardization of the drug”, *Journale de Pharmacie de Belgique*, 51(2), 72-3
- [135] Savona G., Piozzi F., Marino M.L., (1977), “Rupestralic acid, a new diterpene lactone”, *Heterocycles*, 7(1), 161-4
- [136] Couladis M., Chinou I.B., Tzakou O., Loukis A., (2002), “Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ballota pseudodictamnus*”, *Phytotherapy Research*, 16(8), 723-6

- [137] Rustaiyan A., Masoudi S., Ameri N., Samiee K., Monfared A., (2006), "Volatile constituents of *Ballota aucheri*, *Stachys benthamiana* and *Perovskia abrotanoides* growing wild in Iran", *Journal of Essential Oil Research*, 18(2), 218-21
- [138] Harborne J. B., Mabry T.J., (1982), "*The Flavonoids: Advances in Research*", Chapman and Hall, London.
- [139] Harborne J. B., (1993), "*The flavonoids Advances in research since 1986*", Chapman and Hall, London
- [140] Al-Ansari M.A., Newwar M.A., Saleh Nabil A.M., (1995), "Stachysetin, a diapienin - 7 - glucoside - *p, p'*-dihydroxy - truxinate from *stachys aegyptiaca*", *Phytochemistry*, 40(5), 1543-8
- [141] Citoglu G.S., Coban T., Sever B., Iscan M., (2004), "Antioxidant properties of *ballota* species in Turkey", *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2-3), 275-80
- [142] Touil A., Rhouati S., Creche J., (2006), "Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*", *Chemistry of natural compounds*, 41(1), 104-5
- [143] Lahoual M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., Bousseboua H., (2006), "The interaction of new plant flavonoids with rat livermitochondria: Relation between the anti- and pro-oxydant effect and flavonoids concentration", *Phytotherapy*, 61(4), 347-55

ملخص

كان الهدف من هذا البحث دراسة نواتج الميتابوليزم الثانوي و على وجه الخصوص الفلافونيدات لبعض نباتات منطقة الهقار في محاولة لثمين الثروة النباتية غير المدروسة لهذه المنطقة و من جملة النباتات المستعملة في الطب الشعبي لهذه المنطقة قمنا باختيار أربعة نباتات لم يحظى أغلبها بدراسات كيميائية سابقة. إنجاز هذا البحث تطلب استعمال طرق و تقنيات الاستخلاص و الفصل و التنقية و تركزت بالخصوص على التقنيات الكروماتوغرافية المختلفة مما سمح بفصل ثلاثة و عشرين مركبا جليها فلافونيدات من الأجزاء الهوائية لهذه الأنواع النباتية.

المركبات المفصولة تم التعرف على صيغها الكيميائية بالاعتماد على خصائصها الكروماتوغرافية

و التقنيات الطيفية في التحليل ، بالخصوص مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية و ثنائية البعد

($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT135, COSY, HMQC, HMBC)، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية

الكتلة (MS) و التحليل الكيميائي (تفاعلات التمييه الحمضي و الأستلة) للبعض منها و بالتالي تم التعرف على

عشرين مركبا فلافونيدا و مركب كوما ريني و أسترفينولي و أخيرا مركب متعدد الهيدروكسيل.

- من نبات *Pituranthos chloranthus* تم التعرف على ستة مركبات كلها جديدة بالنسبة للنوع، أربع منها

تفصل لأول مرة من نباتات الصنف.

- من نبات *Solenostemma argel* تم التعرف على أربعة مركبات منها مركب يفصل لأول مرة من الصنف.

- من نبات *Marrubium deserti* تم التعرف على ستة مركبات كلها جديدة بالنسبة للنوع منها ثلاثة

فلافونيدات نادرة تفصل لأول مرة مجتمعة من نفس النبات.

- أخيرا من نبات *Ballota hirsuta* تم التعرف على سبعة مركبات، أربعة منها جديدة بالنسبة للنوع منها

مركب واحد يفصل لأول مرة من نباتات هذا الصنف.

Abstract

The aim of this work was the study of secondary metabolites, especially the flavonoids of some species of the Hoggar flora which had never been studied before.

Among the species used in the folk medicine in this region, we have selected four species previously haven't been reported.

The selected species were subjected to extraction, separation and purification methods, based on chromatographic techniques; thus twenty three compounds were isolated from the aerial parts of these species.

These compounds were identified by chromatographic behaviours and spectroscopic analysis, especially NMR spectroscopy with the aid of one and two-dimensional NMR experiments ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT135, COSY, HMQC, HMBC), UV, MS and for some compounds acid hydrolysis and acetylation were used.

Thus, the structures of twenty flavonoids, one coumarin, one phenolic ester and one polyol compounds were determined.

From *Pituranthos chloranthus*, six compounds were identified for the first time, in which four are new for the genus.

From *Solenostemma argel*, four compounds were identified; one of them is identified for the first time in the genus.

Also, for the first time six flavonoids were identified in *Marrubium deserti*, in which three of them have never been identified from the same specie.

Finally, from *Ballota hirsuta*, seven flavonoids were identified, four of them are new for the specie and one is new for the genus.

Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude des produits du métabolisme secondaire, et plus spécialement les flavonoïdes de certaines espèces de la flore du plateau du Hoggar, laquelle n'a pas vu d'études du point de vue composition chimique.

Parmi les plantes utilisées en médecine traditionnelle dans cette région, on a fait l'étude de quatre espèces dont la recherche bibliographique n'a montré aucune référence.

Pour aboutir à notre but, on a utilisé les différentes méthodes d'extraction, de séparation et de purification basées surtout sur les techniques chromatographiques, ce qui nous a permis de séparer vingt trois produits des parties aériennes de ces espèces.

Les produits séparés ont été identifiés par les méthodes spectrales d'analyse, spécialement la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et ses séquences (RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT135, COSY, HMQC et HMBC), UV-Visible et la spectroscopie de masse et aussi les analyses chimiques (l'hydrolyse acide et l'acétylation) pour certains produits.

Ainsi vingt composés flavoniques, une coumarine, un ester phénolique et un polyols ont été identifiés.

De l'espèce *Pituranthos chloranthus* six produits ont été identifiés dont quatre sont cités pour la première fois dans le genre.

De l'espèce *Solenostemma argel* quatre produits ont été isolés et identifiés, dont un produit est cité pour la première fois dans le genre.

Six flavonoïdes ont été isolés et identifiés pour la première fois chez l'espèce *Marrubium deserti*, dont trois flavonoïdes très peu cités en littérature ont été séparés pour la première fois de la même espèce.

Enfin, de l'espèce *Ballota hirsuta* on a isolé et identifié sept flavonoïdes dont quatre sont séparés pour la première fois de l'espèce et l'un d'eux pour la première fois du genre.

FLAVONOID GLYCOSIDES FROM *Pituranthos chloranthus*

A. Touil,¹ S. Rhouati,¹ and J. Creche²

UDC 547.972

As part of our current work on the chemistry of some plants growing in the Hoggar region (southern of Algeria), *Pituranthos chloranthus* (Bent. et Hook.), which is an endemic species of the Sahara septentrional and central [1], was examined for its flavonoids. To our knowledge, this plant has not been investigated before.

Aerial parts of *P. chloranthus* were collected from Hoggar (Algeria) in 1999 and identified by Dr. Mohamed Kaabache (Department of Biology, University of Setif, Algeria). A voucher specimen has been deposited in the herbarium of the Laboratory of Natural Substances and Organic Synthesis, University of Constantine, under No. 10/ 1999/ OPC2.

Dried powder of aerial parts (350g) of flowering *P. chloranthus* was extracted with 70% MeOH solution. The MeOH extract was concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in dist. H₂O (300 ml) and filtered after 24 hrs. The filtrate was extracted successively with CHCl₃ (2.1g), EtOAc (1g), and *n*-BuOH (14g).

The *n*-BuOH extract (14g) was subjected to CC on polyamide MN-SC6 and eluted with a gradient of H₂O-MeOH with increasing polarity. Fifteen fractions of 150 ml were collected and analyzed by TLC on cellulose in 15% AcOH (system I) and BAW (*n*-BuOH-AcOH-H₂O, 4:1:5 top layer (system II)) as solvent systems and silica gel 60GF₂₅₄ using CH₂Cl₂-MeOH (3:1) (system III) in which some fractions were combined to get ten fractions.

Four flavonoids (1–4) were isolated from fractions 3, 4, 5, and 6 by preparative PC on Whatman 3MM and preparative TLC on silica gel 60GF₂₅₄ using the above solvent systems. Purification of each compound for spectral analysis was carried out using a small column of polyamide MN-SC6 and solvent mixtures (toluene-MeOH) with increasing polarity and finally MeOH over a Sephadex LH-20 column [2]. The structures of these compounds were confirmed by UV, ¹H NMR, ¹³C NMR, and MS, and all these data were in good agreement with the respective literature data [3, 4].

Acid Hydrolysis. The pure compounds were treated with 2M HCl at 100°C for 1 h. The hydrolysates were extracted with EtOAc and the aglycones were identified by their UV spectra in methanol and by comparison of *R_f* with authentic samples. Sugars were identified in the aqueous residue by comparison with authentic samples on silica gel TLC impregnated with 0.2 M NaH₂PO₄, solvent Me₂CO-H₂O (9:1); detection: aniline malonate. So 1, 4 gave glucose, 2 gave glucose and rhamnose, while 3 was acid resistant.

Compound 1, C₂₂H₂₂O₁₂; mp 154–157°C; *R_f* 0.36 (system I), 0.40 (system II), 0.74 (system III).

UV (λ_{\max} , nm), MeOH: 357, 300sh, 267sh, 255; +NaOH: 415, 329, 271; +AlCl₃: 397sh, 361, 300, 267; +HCl: 398, 359, 300sh, 267; +NaOAc: 384, 320, 274; +H₃BO₃: 358, 305sh, 267sh, 255. FAB⁺-MS(*m/z*): 479 [M+H]⁺, 316 [M+H-glucosyl].

¹H NMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 7.92 (1H, d, J = 2, H-2'), 7.61 (1H, dd, J = 8.5, J = 2, H-6'), 6.92 (1H, d, J = 8.5, H-5'), 6.35 (1H, d, J = 2, H-8), 6.17 (1H, d, J = 2, H-6), 5.34 (1H, d, J = 7.5, H-1''glucose), 3.96 (3H, s, OMe-3'), 3.15–3.80 (protons of glucose).

¹³C NMR (62.89 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 177.59 (C-4), 167.46 (C-7), 161.33 (C-5), 157.16 (C-2), 156.91 (C-9), 149.45 (C-4'), 147.00 (C-3'), 133.76 (C-3), 122.40 (C-1'), 121.60 (C-6'), 114.61 (C-2'), 112.78 (C-5'), 103.48 (C-10), 102.45 (C-1''), 98.21 (C-6), 94.04 (C-8), 77.00 (C-5''), 76.57 (C-3''), 74.42 (C-2''), 69.94 (C-4''), 61.02 (C-6''), 55.33 (OMe-3'). Identified as isorhamnetin-3-O-glucoside.

Compound 2, C₂₈H₃₂O₁₆; mp 172–174°C; *R_f* 0.55 (system I), 0.35 (system II), 0.30 (system III).

1) Departement de chimie, Faculte des sciences, Universite Mentouri de Constantine, route de Ain el-Bey, 25000, Constantine, Algerie, tel/fax: 213 31 61 46 22, e-mail: ahmedtouil@yahoo.fr. 2) EA 2106 Biomolecules et Biotechnologie vegetales, Faculte des Sciences Pharmaceutiques, Universite de Tours, France. Published in Khimiya Prirodnykh Soedinenii, No. 1, pp. 85-86, January-February, 2006. Original article submitted May 6, 2005.

UV (λ_{\max} , nm), MeOH: 357, 300sh, 267sh, 254; +NaOH: 415, 329, 271; +AlCl₃: 397sh, 361, 300, 278sh, 267; +HCl: 398, 359, 302sh, 277sh, 267; +NaOAc: 384, 320, 274; +H₃BO₃: 359, 305sh, 270sh, 255. FAB⁺-MS(m/z): 624 [M+H]⁺, 316 [M+H-rutinosyl].

¹H NMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 7.97 (1H, d, J = 1.8, H-2'), 7.62 (1H, dd, J = 8.5, J = 1.8, H-6'), 6.91 (1H, d, J = 8.5, H-5'), 6.34 (1H, d, J = 1.8, H-8), 6.16 (1H, d, J = 1.8, H-6), 5.19 (1H, d, J = 7.3, H-1'' glucose), 4.54 (1H, d, J = 1.2, H-1'''), 3.95 (3H, s, OMe-3'), 1.12 (3H, d, J = 6.2, H-6''' rhamnose), 3.25–3.80 (protons of rutinose). Identified as isorhamnetin-3-O-rutinoside.

Compound 3, C₂₇H₃₀O₁₅; mp 149–150°C; *R_f* 0.45 (system I), 0.04 (system II), 0.06 (system III).

UV (λ_{\max} , nm) MeOH: 332, 273; +NaOH: 401, 328, 271; +AlCl₃: 392sh, 348, 305, 280; +HCl: 392sh, 345, 304, 280; +NaOAc: 363, 339, 276; +H₃BO₃: 363, 347, 280.

¹H NMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 8.01 (2H, d, J = 8.7, H-2', H-6'), 6.91 (2H, d, J = 8.7, H-3', H-5'), 6.78 (1H, s, H-3), 5.2 (1H, m, H-1''), 4.8 (1H, m, H-1'''), 2.50–3.90 (protons of two glucoses).

So **3** is identified as apigenin-6,8-di-C-glucoside (vicenin-2).

Compound 4, C₂₂H₂₂O₁₂; mp 315–317°C; *R_f* 0.32 (system I), 0.25 (system II), 0.76 (system III).

UV (λ_{\max} , nm), MeOH: 349, 267sh, 255; +NaOH: 391, 321, 272; +AlCl₃: 395sh, 356, 300sh, 267; +HCl: 396sh, 355, 300sh, 268; +NaOAc: 369, 322, 274; +H₃BO₃: 355, 267sh, 256.

¹H NMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm, J/Hz): 7.71 (2H, m, H-2', H-6'), 7.06 (1H, d, J = 9.1, H-5'), 6.25 (1H, d, J = 1.9, H-8), 6.10 (1H, d, J = 1.9, H-6), 5.16 (1H, d, J = 7.2, H-1''), 3.95 (3H, s, OMe-4'), 3.25–3.80 (protons of glucose; **4** is identified as tamarixetin-3-O-glucoside).

Thus, all these compounds are isolated from *P. chloranthus* for the first time, compounds **1**, **2** are isolated from other species *P. triradiatus* and *P. tortuosus* [5, 6], but to our knowledge compounds **3**, **4** are identified for the first time in the genus *Pituranthos*.

ACKNOWLEDGMENT

Partial financial support by ANDRS (Agence Nationale pour le Developpement en Sante) and MESRES (Ministere de l'Enseignement Superieur et de la Recherche Scientifique) are gratefully acknowledged; thanks are due Dr. H. Duddeck (Germany) for providing spectroscopic facilities.

REFERENCES

1. P. Ozenda, *Flore du Sahara Septentrional et Central*, C.N.R.S., Paris, 1958.
2. K. R. Markham, *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, 1982.
3. T. J. Mabry, K. R. Markham, and M. B. Tomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York, 1970.
4. J. B. Harborne and T. J. Mabry, *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall, London, 1982.
5. A. N. Singab, T. Khalifa, G. H. Mahran, Y. Okada, Y. Matsumaru, H. Nishino, and T. Okuyama, *Natural Medicines* (Tokyo), **52**(2), 191 (1998).
6. N. Shalaby, *Modelling, Measurement and Control, C: Energetics, Chemistry and Chemical Engineering, Earth, Resources, Environment, Biomedical Problems*, **57** (1), 17–35 (1998).

The Interaction of New Plant Flavonoids with Rat Liver Mitochondria: Relation between the Anti- and Pro-oxidant Effect and Flavonoids Concentration

Mesbah Lahouel,¹ Souad Amedah,² Amar Zelligui,³ Ahmed Touil,³ Salah Rhouati,³ Fadila Benyache,² Essaïd Leghouchi¹ and Haçène Bousseboua⁴

1 Laboratoire de Pharmacologie, Département de Biologie, Université de Jijel, Algérie

2 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Département de Chimie, Université de Constantine, Algérie

3 Laboratoire de Recherche de Substances d'Origine Végétale et de Synthèse, Département de Chimie, Université de Constantine, Algérie

4 Laboratoire de Génie Microbiologique, Département de Biologie, Université de Constantine, Algérie

Texte reçu le 19 novembre 2004 ; accepté le 29 mars 2005

Keywords:

flavonoids;
mitochondria;
oxidative stress;
respiratory chain;
rat

Abstract – Flavonoids are polyphenols derivatives of plant origin that possesses a broad range of pharmacological properties, including protection of cells and tissues against the deleterious effects of reactive oxygen species. Their antioxidant activity results from scavenging of free radicals and other oxidizing intermediates, from the chelation of iron or copper ions and from inhibition of oxidases. But a number of studies have found both anti and prooxidant effects for many of these compounds. These reasons prompted us to investigate whether flavonoids compounds alone or combined flavonoids had antioxidant, free radical scavenger and antiapoptotic properties. The investigation was carried *in vitro* using rat hepatic mitochondria. Respiratory control ratio (RCR), oxygen consumption, adenosine tri phosphate (ATP) synthesis, scavenging action, enzymatic activities of involved complexes, superoxide anion and the release of cytochrome C were measured to assess the mechanisms of action of these drugs. Our data showed that the decrease of RCR induced by high concentrations (0.1 mM and 0.01 mM) of all flavonoids tested was due to a common inhibition of oxidative phosphorylation (State 4) and activation of state 3. At the opposite mitochondrial swelling was slightly induced only by low concentrations (10^{-8} and 10^{-9} M) of the flavonoids. They had no effects on the mitochondrial complexes (I to V) activity. Furthermore the mitochondrial membrane potential was not affected by any flavonoids. The effect of flavonoids on superoxide anion generation was variable. All the flavonoids studied acted between 10^{-4} M and 10^{-6} M with no effects at lower concentrations. These effects were similar on lipid peroxidation (malondialdehyde [MDA] levels). We remarked a concentration-dependent in the effect of flavonoids since they acted as antioxidant and also as uncoupler at high concentrations, which is a risk for the cells. We conclude that flavonoids extracted from algerian plants have some protecting effects against oxidative stress by protecting the mitochondria.

Mots clés :

flavonoïdes ;
mitochondrie ;
stress oxydatif ;
respiration
mitochondriale ;
rat

Résumé – Interaction de nouveaux flavonoïdes d'origine végétale avec la mitochondrie de foie de rat : relation entre les effets anti- et pro-oxidant et la concentration en flavonoïdes. Les flavonoïdes, des polyphénols extraits à partir de plantes, possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques protégeant les cellules contre les effets délétères des radicaux libres oxygénés. Leur activité antioxydante résulte de leur capacité à piéger les radicaux libres en complexant les ions fer et cuivre ainsi que par l'inhibition des oxydases. Mais de nombreuses études ont montré que ces substances ont des effets à la fois antioxydants et pro-oxidants. Ces raisons nous ont incité à rechercher et à évaluer les effets antioxydant, le pouvoir piégeur des radicaux libres ainsi que les propriétés antiapoptotiques de ces flavonoïdes ou de leur association. L'étude a été réalisée *in vitro* sur des mitochondries isolées de foie de rat. Le contrôle respiratoire (CR), la consommation d'oxygène, la synthèse d'ATP, le pouvoir piégeur des radicaux libres, l'activité enzymatique des complexes mitochondriaux, la production d'anion superoxyde ainsi que le relargage du cytochrome C ont été déterminés pour évaluer le mécanisme d'action de ces substances.

D'après nos résultats, la diminution du CR observé aux fortes concentrations (0.1 mM et 0.01 mM) de tous les flavonoïdes testés est due à l'inhibition des phosphorylations oxydatives (stade 4) et à l'accélération du stade 3. Cependant le gonflement mitochondrial est modérément induit par des concentrations basses (10^{-8} M et 10^{-9} M). Les flavonoïdes n'ont pas d'effets sur les activités enzymatiques des complexes I à V ni sur le potentiel de membrane mitochondrial. Tous les flavonoïdes étudiés n'ont d'effets sur la lipopéroxydation et sur la production d'anion superoxide qu'aux concentrations comprises entre 10^{-4} M et 10^{-6} M. Nous remarquons une opposition d'effets des flavonoïdes qui agissent à la fois comme antioxydants et comme découpleurs à fortes concentrations ce qui est un risque pour les cellules. Nous concluons que les flavonoïdes extraits de plantes algériennes, agissent contre le stress oxydatif par un mécanisme de protection de la mitochondrie.

1. Introduction

Polyphenols are compounds present in plants, which include flavonoids, phenolic acids and tannins. They possess a wide range of pharmacological properties. Considerable interest in these compounds extracted from medicinal plants has arisen with the recognition of their anti-inflammatory, anticancer, antibacterial and antioxidant effects. Over the last 30 years, original research in this field has increased considerably.^[1-3] However, despite epidemiological and antibacterial data on the beneficial effects of flavonoids, the molecular mechanisms underlying interactions with isolated mitochondria have not yet published.

Indeed, oxidative stress and mitochondrial dysfunction are associated with disease and aging. Reactive oxygen species contribute decisively to a great variety of diseases. It is clearly established that mitochondria are the main site of reactive oxygen species (ROS) production, which is a normal cellular process. Mitochondria are involved in the molecular events leading to tissue damage occurring in different physiopathological situations such as ischaemia, neurodegenerative diseases and in the ageing process.^[3-7]

Of the polyphenols, flavonoids are the most studied and possess a broad range of pharmacological properties, including protection against oxidation.^[8-11] Plants of the Algerian desert are an important source of flavonoids.^[12] It has been established that flavonoids play an important role in the pre-treatment of oxidative stress and exert many effects on liver cells. However, the effects on liver mitochondrial function are not known and little is known about the mechanism by which they rescue cells from oxidative damage. It is unknown if the antioxidant effect of flavonoids may explain their protective effect and few data are available about the concentration-effect relationships of various flavonoids on liver mitochondrial function. Indeed, flavonoids can be pro- or antioxidant. The determination of the concentrations effects on mitochondrial respiratory chain and the production of ROS are therefore of key relevance.

Mitochondria control intracellular calcium and upon stress generate a high quantity of ROS which play an important role in the evolution of cell injuries. ROS are produced by complexes I

and III of the respiratory chain as a superoxide radical (O_2^-). A mitochondrial – protective antioxidant strategy can prevent the oxidant cascade either by prevention of ROS production or neutralisation of free radicals by a scavenger effect. A close relationship between the mitochondrial membrane potential and ROS production has been demonstrated.^[13-15]

The mechanism of action of flavonoids is not well defined but it is evident that some of their protective effect can be attributed to direct scavenging properties. A mitochondrial target has been suggested to explain the protecting effect of flavonoids.^[16-18] Some flavonoids with antioxidant and free radical scavenging properties were shown to inhibit also lipid peroxidation (resveratrol, quercetin and propolis extract).^[19-21]

We hypothesized that these protective effect could be due to a direct action on mitochondrial functions. So we have studied the effect of flavonoids on mitochondrial function and further elucidate the mechanism of interaction of these flavonoids with liver mitochondria. We investigated *in vitro* the mitochondrial effects of different flavonoids extracted from Algerian plants containing some flavonoids like myricetin, luteolin, kampferol in using rat liver mitochondria, by analysing their scavenging ability and their effects on each respiratory complex, membrane potential, swelling, superoxide radical production, lipid peroxidation and also on oxidative phosphorylation at different concentrations. We studied the effect of terpenoid and alkaloid compounds extracted from Algerian plants.

2. Material and methods

Materials used were: sucrose, EGTA (ethylene glycol bis(-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid), rotenone, malonate, antimycin A, oligomycin, succinate, malate, glutamate, NADH (nicotinamide adenine dinucleotide), ADP (adenosine diphosphate), CCCP (carbonyl m-chlorophenylhydrazine), sodium ascorbate, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine, KCl, MgCl₂ and KCN were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). TRIS base (tris-hydroxymethyl-aminomethane) and KH₂PO₄ were purchased from Sigma Co. All drugs were solubilized in distilled

water in order to obtain a stock solution 10^{-3} M. N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) and oligomycin were solubilized in DMF (dimethylformamide). All the controls were carried out using the same mixture. The plant extracts solubilised in DMF are added at different final concentrations, between 10^{-4} M to 10^{-9} M.

2.1. Extraction of plant extracts

Chrysanthemum fusatum grows abundantly in the desert and was obtained from the dayas of Touggourt region in the East South of Algeria (Dr Amedah S). *Solenostemma argel* and *Pituranthos chloranthus* were obtained from Mila region in the East of Algeria (Dr Amedah S). The dried aerial parts of *C. fusatum* (4430 g) and of *S. argel* and *P. chloranthus* were sliced and macerated with methanol-water (8:2 v/v). The crude extract was concentrated under reduced pressure and extracted successively with CHCl_3 and n-butanol giving after removal of solvent 126.4 g of butanol soluble fraction. The presence of flavonoids in this extract was confirmed by bidimensional TLC (thin layer chromatography), Toluene/ MeOH/Ethyl methyl cetone (4:3:3) and H_2O /MeOH/Ethyl methyl cetone/Acetyl cetone (13:3:3:1). The spots were detected under UV irradiation (365 nm). Molecular weight of pure flavonoids extracted from plants, components were determinate by mass spectrometry using an Hitachi S 3200 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) and by HPLC (high performance liquid chromatography) using a HPLC chain (Jasco France, Nantes, France).

2.2. Isolation of liver mitochondria

Mitochondria were extracted from an homogenate of rat liver by differential centrifugations. Briefly, rats (male Wistar, weighing 280–300 g) were killed by decapitation and the liver removed and placed quickly in an ice-bath. The liver was then homogenized (6 ml/g of tissue) in ice-cold isolation medium (Tris 20 mM, Sucrose 250 mM, EGTA 2 mM and MgCl_2 5 mM, pH = 7.2 at 4 °C) using a Potter-Elvehjem homogenizer (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Mitochondria isolation was performed at 4 °C without delay using differential centrifugations. The homogenate was centrifuged at 2000 g for 10 min. to remove cell debris and nuclei, then mitochondria were separated from the supernatant by centrifugation at 12 000 g for 5 min. The pellet (mitochondria) was washed and re-suspended in a respiratory buffer (KH_2PO_4 10 mM, sucrose 200 mM, pH = 7.2 at 25 °C) for measuring mitochondrial enzymatic and respiratory activities. Protein concentration of the mitochondrial suspension was determined by the method of Lowry.

2.3. Assay of mitochondrial oxygen consumption

Oxygen uptake was determined with a Clark-type microelectrode (Hansatech instruments Eurosep, Cergy, France). Each experiment was carried out as follows: an aliquot of mitochondria suspension equivalent to 1 mg/ml was incubated with (or without) the tested drug, incubated 1 min. at 25 °C in 1000 μl of the respiratory buffer with or without the inhibitors, then the substrate was added and oxygen consumption has been checked (State 2). To initiate state 3 respiratory activities, 200 μM adenosine diphosphate (ADP) was added to the "cuvette". When all ADP was converted to ATP, the state 4 was measured. The following parameters were determined: the respiratory rates calculated as nanomoles of O_2 per min. and per mg of mitochondrial protein, RCR (respiratory control ratio) expressed as the ratio of state 3/state 4 oxygen consumption and P/O ratio as ADP used divided by O_2 consumed in state 3 respirations. The rates of oxygen consumption by the different complexes were determined according to Rustin *et al.*^[3] Briefly, rotenone (2 μM), malonate (10 mM), antimycin A (1 μM) and oligomycin (10 μM) were used to inhibit complexes I, II, III and V, respectively. Glutamate (10 mM) plus pyruvate (10 mM), succinate (10 mM), ascorbate (5 mM) plus N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (1 mM) were used as substrates for complexes I, II, III and IV, respectively. Cholycholestanol, progesterone, testosterone, alpha tocopherol are used as recouplers of membrane potential.

2.4. Mitochondrial activities assays

All assays were performed at 25 °C. Experiments were assessed by measuring absorbance variations using a Jasco V-530 double beam spectrophotometer (Jasco France, Nantes, France) where reference "cuvette" contained a specific inhibitor for each mitochondrial complex assay studied in order to eliminate the background.

2.4.1. Mitochondrial Complex I assay

Mitochondrial Complex I catalyses the oxidation of NADH + H^+ to NAD^+ (nicotinamide adenine dinucleotide) with the ultimate reduction of ubiquinone to ubiquinol. Complex I activity was measured as the rate of NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) oxidation in presence or absence of the plant extracts (flavonoids) at 25 °C. The reaction mixture contained: 10 μl test molecule at given concentration, 200 μg of mitochondria (45 μl) in a final volume of 1 ml of respiratory buffer. Rotenone (2 μM) was added to the reference "cuvette" to inhibit Complex I activity and serve as control assay. The reaction was initiated by

the addition of malate/pyruvate 10 μ l. Oxygen consumption was checked (State 2). To initiate state 3 respiratory activity, 200 μ M ADP was added to the "cuvette". When the complex I was inhibited G3P (glycero-3-phosphate) 20 mM was added to activate the biochemical pathway. Percentage inhibition of state 2 (activity of Complex I) is determined for each concentration compared to the control.

2.4.2. Mitochondrial Complexes II-III, IV and V assay

An aliquot of mitochondria suspension equivalent to 1 mg/ml was incubated without the tested extract, at 25 μ C in 1000 μ l of the respiratory buffer with rotenone 10 mM (the inhibitor of complex I). Then, 10 mM succinate were added and oxygen consumption was checked (State 2). To initiate state 3 respiratory activities, 200 μ M ADP were added to the "cuvette". Before all ADP was converted to ATP (adenosine triphosphate), 10 mM malonate and antimycin A 1 μ M (control essay) or the plant extract (8C1, 4K and ChIII) was added and the state 4 was measured. Antimycin A was added to the reference "cuvette" to inhibit Complex III activity. When complex III was inhibited ascorbate 5 mM and TMPD (N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) 1 mM were added to activated the biochemical pathway. The respiration parameters were determined as previously described for Complex I.

2.5. Superoxide anion (O_2^-) assay

Generation of O_2^- was achieved using rat liver mitochondria. Reaction mixture contained mitochondria (0.2 mg/ml), 1 μ M CsA (cyclosporin A) and nitroblue tetrazolium (NBT) 100 μ M in 1.2 ml of respiration buffer at 25 $^{\circ}$ C. The reaction was started by adding succinate (6 mM) in the assay "cuvette" and the rate of NBT reduction was measured at 560 nm. In absence of mitochondrial substrate (succinate), there was no O_2^- production.

2.6. Free radical scavenging assay

The scavenging ability of each plant extract (flavonoids) was determined using diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) stable free radical. Test compounds were added to an ethanol solution of DPPH 100 μ M and the decrease in absorbance was recorded against time at 515 nm in a Jasco V-530 spectrophotometer. The curves allowed an estimation of the effective concentration of the compound tested producing a 50% decrease in DPPH concentration at steady state (EC_{50}).

2.7. Membrane potential measurement

Membrane potential was monitored by means of the fluorescent dye rhodamine 123 at the excitation and emission wavelengths of 503 and 527 nm respectively using a fluorescence photometer (Perkin Elmer Life Science, Wilbad, Germany). Mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in 1.8 ml buffer C (250 mM sucrose, 5 mM KH_2PO_4 , pH = 7.2) in the presence of 2 μ M rotenone and 0.3 μ M rhodamine 123. After 30 s, 6 mM succinate were added. When potential was established, plant extract were added to the medium at different concentrations (between 10^{-4} M and 10^{-9} M).

2.8. Mitochondrial swelling measurement

Mitochondrial swelling was assessed by measuring the change in absorbance of the suspension at 540 nm using a Jasco V-530 spectrophotometer. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated in a total volume of 1.8 ml of buffer C in the presence of succinate 6 mM at 25 $^{\circ}$ C. Rotenone 2 μ M is added to the buffer just before the experiment. Swelling is induced by addition of increasing concentrations of the plant extracts.

Mitochondrial swelling is also studied under deenergized conditions. Mitochondria (1 mg/ml) were preincubated for 1 min in a Tris buffer consisting of 150 mM sucrose, 5 mM Tris, 0.5 μ g/ml of rotenone and 0.5 μ g/ml of antimycin, pH = 7.4 at 25 $^{\circ}$ C in a total volume of 1.8 ml prior to the addition of 100 μ M $CaCl_2$. Swelling was initiated 4 min later by introducing the plant extracts at the concentrations indicated above.

2.9. Lipid peroxidation assessment

Liver mitochondria were suspended in NaCl 0.9% (0.2 mg/ml) and then incubated in a total volume of 1 ml in the presence of Fe^{2+}/Fe^{3+} (50 μ M / 50 μ M) for 30 min. The reaction was stopped with 1 ml of 3% trichloroacetic acid and 1.5 ml of 1% thiobarbituric acid was added. The mixture was then heated to 100 $^{\circ}$ C for 30 min and re-cooled on ice for 5 min. The supernatant was then read at 530 nm. Results are expressed as μ M MDA or nMole/mg of mitochondrial membrane proteins.

2.10. Statistical analysis

For each compound, mean values (m) and standard deviations (sd) of three experiments (n = 3) are given in figures and tables.

For each experiment, mean values of RCR or percentages were compared with a one-way analysis of variance and a Dunnett test. EC_{50} was calculated by non-linear regression fit of effect-concentration (C) curve to the equation:

$$E = (E_{max} \times C) / (C + EC_{50}),$$

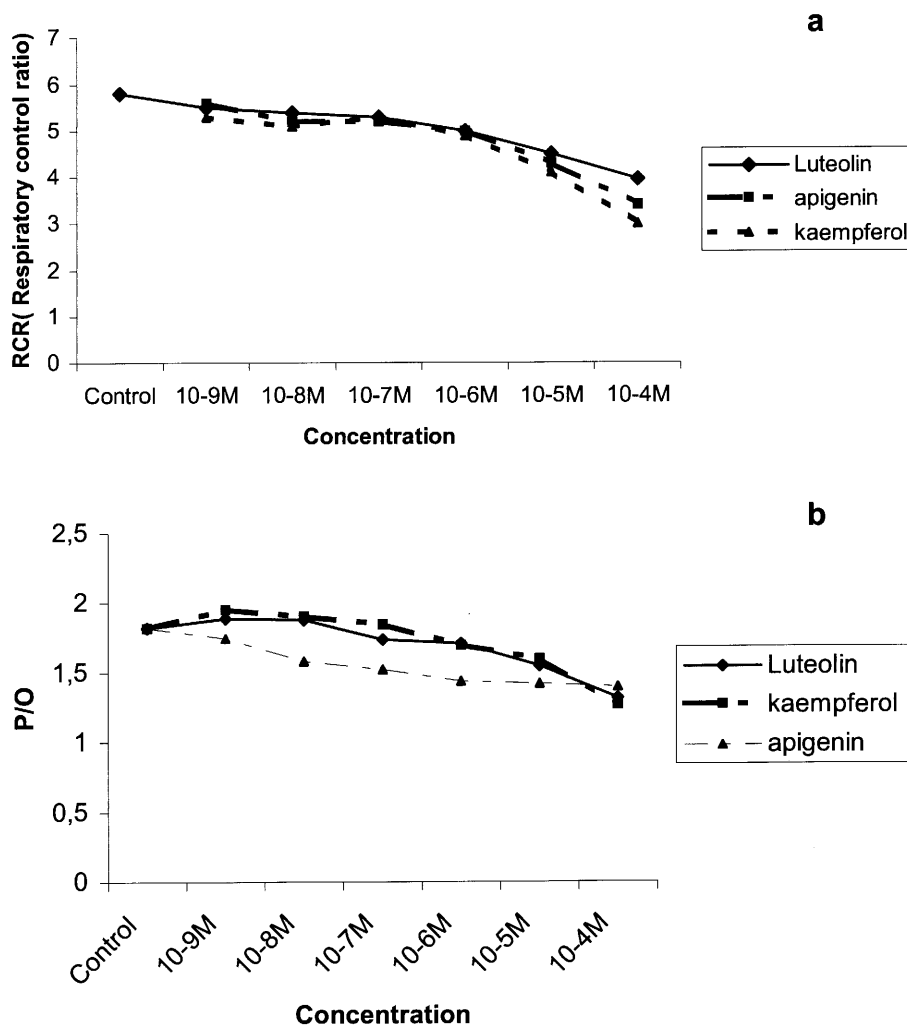


Fig. 1. Dose-dependent effect of flavonoids (luteolin, apigenin and kaempferol) extracted from algerian medicinal plants on liver mitochondrial respiratory chain ratio (RCR). **fig 1a:** $RCR = V_3/V_4$; **fig 1b:** P/O (P/O = Adenosin diphosphate [ADP] used divided by O_2 consumed in state 3 respiration). Incubation mixture consisted of 0.4 mg liver mitochondria, 1 mM succinate, 0.1 M ADP in a buffer total volume of 1 ml.

where E_{max} and EC_{50} are the maximal effect and the concentration producing 50% effect respectively, using a commercially available software (Micropharm-K).^[22]

3. Results

3.1. Chemical nature of plant extracts

The flavonoidal prints of our plant extracts and the determination of their chemical compositions shows that 8C1 is a flavone (luteolin 3'-O-glucoside), 4K (Kaempferol-3-O-neohesperidoside) [C27H30O15] and ChIII is 3 (apigenin-6,8-di-6-glucoside) [C27H30O15] flavonols extracted from *C. fuscatum*, *Solenostemma argel* and *Pituranthos chloranthus* plants respectively.

3.2. The effect of flavonoids on mitochondrial functions

3.2.1. Effect of flavonoids on mitochondrial respiration

We studied pure compounds 8C1 (luteolin), ChIII (apigenin), 4K (kaempferol). These flavonoids increased the oxygen consumption (state 3) and inhibit state 4 at higher concentrations (0.1 mM), causing a decrease of respiratory chain ratio ($RCR = V_3/V_4$) and P/O (Figures 1a and 1b). Flavonoids had no effect on RCR and P/O at concentrations between 10^{-6} M and 10^{-9} M. The effect of flavonoids on respiratory chain was concentration-dependant leading to a biphasic curve with a slight increase of P/O at lower concentrations 10^{-7} M to 10^{-9} M but not significantly and a decrease of P/O at higher concentrations (10^{-4} M); $p < 0.001$. Flavonoids act on states 3 and 4 as shown in Table I.

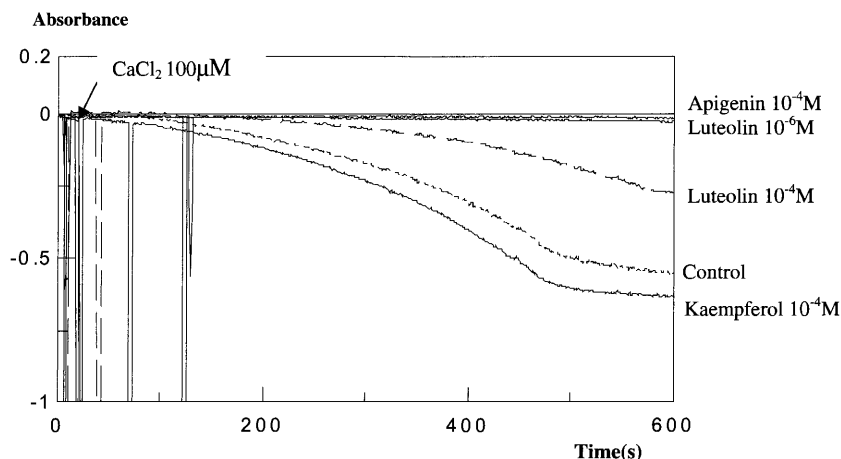


Fig. 2. Effect of flavonoids (luteolin, apigenin and kaempferol) on mitochondrial swelling. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated in a total volume of 1.8 ml of buffer C (250mM sucrose, 5 mM KH₂PO₄, pH 7.2) in the presence of succinate 6 mM at 25 °C. Rotenone 2 µM was added to the buffer just before the experiment. Prior to the addition of 100 µM CaCl₂ swelling was induced by addition of increasing concentrations of flavonoids.

Table I. Effect of flavonoids (8C1, ChIII, 4K) on oxygen consumption (nmol/mg/min) by rat liver mitochondria (states 3: oxygen uptake in presence of 0.2 mM ADP and 4: oxygen uptake in presence of 10 mM succinate and 2 µM rotenone) at 10⁻⁹ and 10⁻⁴ M (lower and higher concentrations respectively). Mean of three experiments (m ± sd). Treated versus Control: ns: no significant; *: *p* < 0.5; **: *p* < 0.01; ***: *p* < 0.001.

Compound	10 ⁻⁹ M		10 ⁻⁴ M	
	State 3	State 4	State 3	State 4
Control	117 ± 12	21 ± 6	117 ± 12	21 ± 6
Apigenin (ChIII)	110 ± 19	29 ± 9	63 ± 15	19 ± 5
	ns	ns	***	ns
Luteolin (8C1)	119 ± 20	28 ± 8	123 ± 22	28 ± 9
	ns	ns	ns	ns
Kaempferol (4K)	124 ± 22	29 ± 8	74 ± 12	30 ± 8
	ns	ns	***	*

3.2.2. Effect of flavonoids on mitochondrial swelling

Addition of flavonoids to a mixture of rat liver mitochondria with 25 µM calcium, under energized (in the presence of succinate) [figure 2] or de-energized conditions (without succinate) inhibited slightly the rate and the amplitude of mitochondrial swelling at 10⁻⁸ M and 10⁻⁹ M concentrations. However, at higher concentrations (10⁻⁴ M and 10⁻⁵ M) flavonoids seems to increase the swelling. The effect is observed with pure flavonoids (8C1, 4K, ChIII) and mixtures.

3.2.3. Effect of flavonoids on mitochondrial (Complexes I to V)

The flavonoids tested pure or as a mixture had no effect on the mitochondrial complexes I, II, III, IV or V compared to the activity of compounds tested in the experiments for their inhibitory effects on the different complexes I (rotenone), II (an-

Table II. Effects (% inhibition) of flavonoids (apigenin, luteolin and kaempferol) on complexes I to V enzymatic activities of isolated rat liver mitochondria. Rotenone, malonate and KCN were used as inhibitors of complexes I, II and IV, respectively.

	Complex I to V	Complex II to V	Complex III to V	Complex IV to V
Control	No Effect	No Effect	No Effect	No Effect
Rotenone 10 mM	100%	No Effect	No Effect	No Effect
Flavonoids	No Effect	No Effect	No Effect	No Effect
Malonate 10 mM	No Effect	100%	No Effect	No Effect
KCN 5 mM	No Effect	No Effect	No Effect	100%

timycine), III (RU1 a novel terpene compound), V (cyanhydric acid) [Table II].

3.2.4. Effect of flavonoids on mitochondrial membrane potential

Modification of the mitochondrial membrane potential is a signal of apoptotic process. Luteolin, apigenin and kaempferol have no effects on this parameter at concentrations ranged between 10⁻⁴ M and 10⁻⁹ M (Table III).

3.3. Antioxidant effects of flavonoids

3.3.1. Scavenging activity of flavonoids

Compared to the raw extract (Figure 3), all the flavonoids showed a high scavenging effect except methobenzoic acid and a moderate effect with quercetin and myricetin. The effects of quercetin are similar to those observed with other flavonoids like 4K, ChIII and 8 C1 who are active at 10⁻⁴ M.

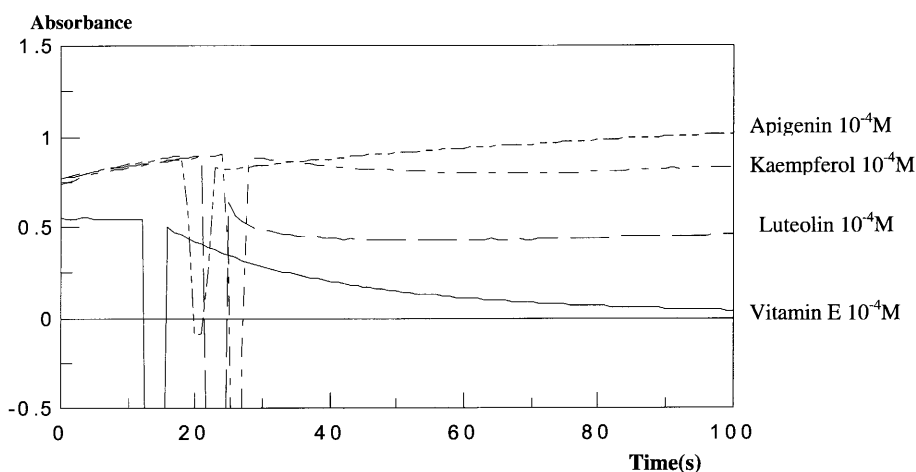


Fig. 3. Scavenging activity of the flavonoids. Flavonoids (apigenin, kaempferol, luteolin and vitamin E) at different concentrations were added to an ethanol solution of DPPH 100 μ M and the decrease in absorbance was recorded against time at 515 nm in a Jasco V-530 spectrophotometer. **DPPH:** diphenyl-2-picryl-hydrazyl.

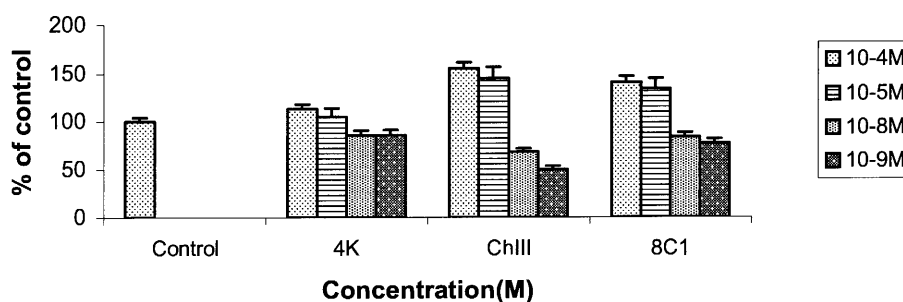


Fig. 4. Effect of flavonoids (4K, 8C1, ChIII, kaempferol, luteolin and apigenin respectively) compounds on super-oxide anion production. Liver mitochondria (0.25 mg protein/ml) were incubated at 25 °C with 6 mM succinate, 1 μ M cyclosporin (CsA) and 100 μ M nitroblue tetrazolium in a final volume of 1 ml of buffer. The reaction was started by adding succinate and the rate of nitroblue tetrazolium reduction was measured at 560 nm. **ns** : no significant; *: $p < 0.5$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Table III. Effects (% of inhibition) of flavonoids (apigenin, luteolin and kaempferol) on membrane potential of isolated rat liver mitochondria. Values are mean of three experiments, **ns**: no significant.

	Membrane potential (% inhibition)
Apigenin	4 \pm 0.7
10 ⁻⁴ M	ns
Luteolin	1.5 \pm 0.03
10 ⁻⁴ M	ns
Kaempferol	1.9 \pm 0.2
10 ⁻⁴ M	ns

3.3.2. Effect of flavonoids on superoxide anion production

In order to evaluate the role of the antioxidant or pro-oxidant of the flavonoids in liver mitochondria, superoxide anion production was measured. Figure 4 shows that flavonoids reduced the production of anion at concentrations of 10⁻⁸ M and 10⁻⁹ M and increased it at higher concentrations 10⁻⁴ M and 10⁻⁵ M.

3.3.3. Effect of flavonoids on lipid peroxidation

Flavonoids inhibited the lipid peroxidation of liver mitochondrial membrane. The inhibition of lipid peroxidation reached 90% at 10⁻⁴ M concentration with the pure flavonoids (8C1, ChIII, 4K) [Figure 5]. Flavonoids shows a good protection against lipid peroxidation of mitochondrial membranes.

4. Discussion

Our results have permitted to clarify the effect of flavonoids on liver mitochondrial respiratory and we concluded that an excessive consumption of flavonoids may be a risk for the cells and tissues and induce diseases.

The biological activities of flavonoids extracted from endemic plants of South Algeria are related to their antioxidative effects. Our study presents the interaction of flavonoids with liver mitochondria and discusses their antioxidant activity, their pro-oxidant risk. The aim of the present work was the chemical survey and the assessment of the biologic effects of different flavonoids

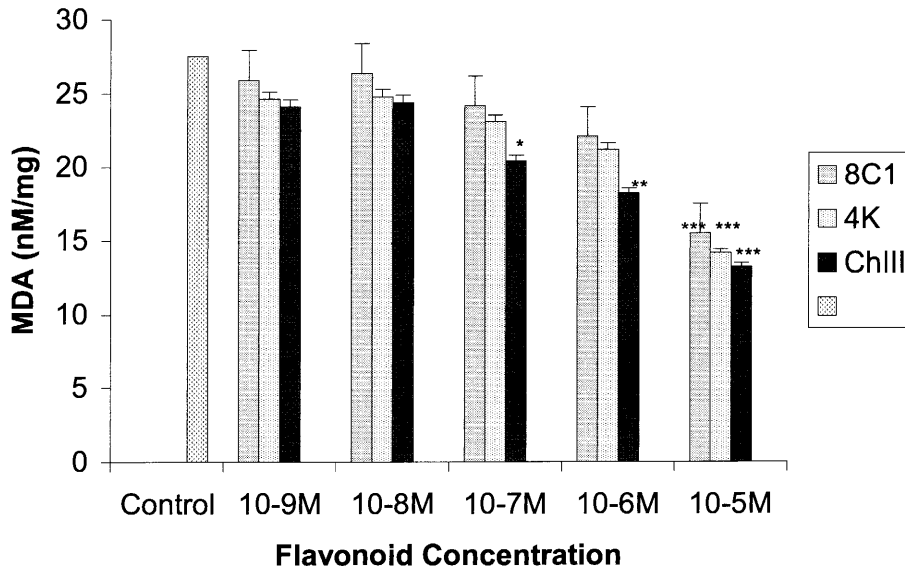


Fig. 5. Variations of liver mitochondria malondialdehyde (MDA) levels (nMol/mg) in the presence of different flavonoid concentrations, from 10^{-5} M to 10^{-9} M (8C1, 4K, ChIII are luteolin, kaempferol and apigenin respectively). ns : no significant; *: $p < 0.5$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

extracted from medicinal plants coming from the south of Algeria (Touggourt).

In the first place, we were interested in their chemical profiles. The chromatographic analysis (HPLC) permitted to clarify the nature of the compounds in the extracts, flavonoids such as luteolin, kampferol and myrecitin.

Our results confirm the anti-oxidant role of the flavonoids.^[3,14,21,23] These have the capacity to capture and to deactivate free radicals.^[8,15,24] Some of the flavonoids, such as quercetin, artepillin C, a major component of Brazilian propolis^[9] and catechins^[25,26] can effectively protect cells and tissues against the damage effects of reactive oxygen species. Their antioxidant activity results from scavenging of free radicals and other oxidizing intermediates, from the chelation of iron or copper ions and from inhibition of oxidases. For their free radical scavenging properties, scavenging of lipid- and protein-derived radicals is presumably of special importance. A non-radical reactive oxygen species effectively trapped by flavonoids is hypochlorous acid. Generally, the antioxidative properties of flavonoids are in relation with a high degree of OH substitution.^[27,28]

Induction of the mitochondrial permeability transition has been implicated in several cellular events. It results in a rapid loss of membrane potential, uncoupling of respiration and inhibition of ATP synthesis.^[27] Our study shows that the flavonoids alone are unable to restore the loss of membrane potential induced by potent inducer of mitochondrial permeability transition such as ferulenol (Results not shown). Many compounds tested (testosterone 500 μ M, progesterone 5000 μ M, ketocholestanol 500 μ M,

atractylate and carboxyatractylate 250 μ M) were unable to inhibit the collapse of membrane potential induced by ferulenol (Results not shown).

The flavonoids act by opposing the binding of free radicals.^[3,28-30] Plant flavonoids are efficient trappers of hydroxyle and peroxyde radicals particularly implied in lipid peroxydation. This is how it seems likely to us that the flavonoids opposes the toxic action of the reactive metabolites.

Our study shows that flavonoids play two opposite roles: an antioxidant effect at lower concentrations ranging between 10^{-9} M and 10^{-6} M and a pro-oxidant effect for concentrations higher than 10^{-5} M. These results are in agreement with published data. Effectively, it is clearly demonstrated that the same flavonoids could behave as both antioxidants and pro-oxidants, depending on concentration and free radical source.^[31-33] Flavonoids acted as antioxidants against free radicals but demonstrated pro-oxidant activity when a transition metal was available. The antioxidant activities and the copper-initiated pro-oxidant activities of these flavonoids depended on their structures. Flavone and flavanone, which have no OH substitutions and which provide the basic chemical structures for the flavonoids, showed neither antioxidant activities nor copper-initiated pro-oxidant activities. However, it is known that OH substitution is necessary for the antioxidant activity of a flavonoid.

It has been observed that flavonoids in the presence of Cu^{2+} without hydrogen peroxide (H_2O_2) acted as pro-oxidants rather than antioxidants, and this copper-initiated pro-oxidant activity always increased with the concentration of the flavonoids. This finding does not support the concept of chelation by some flavonoids,

including flavonols like quercetin.^[8] The flavonoids that contain multiple OH substitutions have very strong antioxidant activities against peroxy radicals. In this regard, some of the flavonoids which induce a concentration-dependent antioxidant effect display interesting properties in the protection of cells and tissues. By contrast, the flavonoids that show pro-oxidant effects could serve as anticancer drugs.

The cell survives the toxicity of the free radicals that are formed in the course of normal metabolism by their confinement to organelles; by the catalytic action of super-oxide dismutase (SOD); and by the sacrifice of endogenous reductants, such as cysteine, glutathione (GSH), ascorbate, tocopherol (vitamin E), and ubiquinol.^[34,35] However, when free radical production in pathological situations becomes excessive,^[36] then additional antioxidants and radical scavengers should be given to minimise the damage to the membranes, enzymes, and genes. Flavonoids are excellent agents for this purpose.

References

- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1(6): 569-90
- Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 837-41
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, *et al.* Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228: 35-51
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *Febs Lett* 1997; 416: 15-8
- Di Lisa F, Menabo C, Petronilli V. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 69-78
- Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, *et al.* Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000; 32: 189-98
- Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1363: 100-24
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55(6): 481-504
- Greenway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The composition and plant origins of propolis, report of work at Oxford Bee World 1990; 71: 107-118
- Hertog MGI, Hollman PCH, Van De Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 1242-1246
- Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, *et al.* Chemopreventive effect of flavonoides against the toxicity of cyclophosphamide, vinblastine and paracetamol by inhibition of lipid peroxidation and increasing glutathione levels in hepatic rats. *Heama* 2004; issue7(1): 59-67
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 845-850
- Horakova K, Sovcikova A, Seemannova, *et al.* Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(6): 650-64
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341: 233-49
- Ligeret H, Barthelemy S, Zini R, *et al.* Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 919-929
- Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 139-76
- Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, *et al.* Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptotic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* 1998; 273: 33942-8
- de Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 1998; 12(3): 249-55
- Sohn YT, Oh JH. Characterization of physicochemical properties of ferulic acid. *Arch Pharm Res* 2003; 26(12): 1002-8
- Santos AC, Uyemura SA, Lopes JL, *et al.* Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1455-61
- Zini R, Morin C, Bertelli A, *et al.* Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25: 87-97
- Urien S. Micropharm-K, a microcomputer interactive program for the analysis and simulation of pharmacokinetic processes. *Pharm Res* 1995; 12: 1225-30
- Roy S, Kobushi H, Sen CK, *et al.* Ginkgo biloba extract (EGB 761): antioxidant properties and regulation of gene expression. In: Packer L, Christen Y (Eds.), *Advances in Ginkgo biloba extract research, Ginkgo biloba extract (EGB 761): Lessons from Cell Biology* 1998; Vol. 7, Elsevier, Paris, pp 1-17
- Kawabe M, Lin C, Kimoto N, *et al.* Modifying effects of propolis on MeQx promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two-stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. *Nutr Cancer* 2000; 37(2): 179-86
- Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994; 41(1-2): 9-13
- Kondo K, Kurihara M, Miyata N, *et al.* Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(7-8): 855-63
- Nakanishi I, Uto Y, Ohkubo K, *et al.* Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Org Biomol Chem* 2003; 71(9): 1452-4
- Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994; 41(1-2): 9-13
- Daneyemez M, Kurt E, Cosar A, *et al.* Methylprednisolone and vitamin E therapy in perinatal hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Neuroscience* 1999; 92, 693-7
- Torel J. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem* 1986; 25: 383-5
- Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Les flavonoides protègent les cellules neuronales contre le stress par trois mécanismes distincts. *Free Radic Biol Med* 2001; 4: 433-6
- Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, *et al.* Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors* 2000; 12 (1-4): 193-7
- Sang S, Cheng X, Stark RE, *et al.* Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Inorg Med Chem* 2002; 10 (7): 2233-7
- Lopez-Lazaro M, Martin-Cordero C, Ayuso M.J. Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poisons. *Z Naturforsch* 2000; 55 (11-12): 898-902
- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, *et al.* Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab* 1999; 68 (4): 468-72
- Bellizzi MC, Franklin MF, Duthie GG, *et al.* Vitamin E and coronary heart disease: The European paradox. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: 822-31

Correspondence and offprints: *Mesbah Lahouel*, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté des Sciences, Université de Jijel, 18000, Jijel, Algérie.
E-mail: lahouelmesbah@yahoo.fr