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

كلية العلوم الدقيقة **قسم الكيمياء**

رقم الترتيب: .....
رقم التسلسل:.....

مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماجستير
في الكيمياء العضوية
شعبة المواد العلاجية

تحت عنوان:

فصل و تحديد فلافونيدات الأجزاء الهوائية للنبتة *Hypericum tomentosum*

من تقديم : مخلوفي الهاني

لجنة المناقشة:

الدكتورة كعبوش زهية	**أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة**	**رئيسة**
الدكتور كعبوش أحمد	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**مشرف و مقرر**
الدكتورة بومعزة وهيبة	**أستاذة محاضرة بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنة**
الدكتور بوهروم محمد	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحن**

2008

إهـــــداء

أهدي ثمرة عملي هذا :

إلى من وصى بهما ربي إلى من هما الغاليين على قلبي وعند ربي رمز الحب و التضحية أمي و أبي حفظهما الله و أدخلهما الجنة.

إلى كل أخوتي الأعزاء من أكبرهم إلى أصغرهم حفظهم الله

إلى عبد القادر و توفيق و زوجتيهما

إلى أعز أخت في الدنيا و زوجها و ولديها فخر الدين و رهام

إليك أنت لمياء مع تمنياتي لك بالصحة و النجاح

إلى جدتاي العزيزتين أطال الله في عمرهما

وكل أفراد عائلة مخلوفي

إلى عبد الرحيم و إسلام و أمين الصغير و أمين الكبير إلى نسيم و سهلم

إلى كل أفراد المخبر:

نجوى. آسيا. طارق. أحمد. هشام.نعيمة.سهيلة.وسيلة.آسيا.

وإلى كل أفراد دفعتي

و إلى كل الأهل و الأصدقاء ..... و شكرا.

تـــشـــكـــرات

الشكر الكبير و الأول و الأخير إلى من يسر لي أمري و وفقني حتى الآن، فلك الشكر و الحمد ربي حتى ترضى و لك الحمد إذا رضيت و لك الحمد بعد الرضى.

أولا أتقدم بجزيل الشكر والإمتنان للأستاذ المشرف أحمد كعبوش و الأستاذة الغالية زهية كعبوش على كل النصائح و المساعدات،و على كل مجهوداتهما في توفير كل الإحتياجات و المتطلبات التي من الصعب أن تجدها في مخبر آخر، و لم يجذبني عنوان البحث، قدر ما اخترته الأستاذة. فالحمد لله ربي العالمين الذي وفقني. فجزيل الشكر لكما أستاذاي أحمد و زهية كعبوش على كل ما قدمتماه لي أثناء مراحل البحث حفظكما الله و جعل الجنة داركما.

أتوجه بالشكر إلى الأستاذة زهية كعبوش على قبولها رئاسة لجنة المناقشة.

كما أشكر كل من الأساتذة : بوهروم محمد و بومعزة وهيبة على قبولهم المشاركة في لجنة المناقشة.

الشكر الخالص للسيد كمال كعبوش الذي أشرف على جمع النبتة فله كل الشكر.

كما أشكر كل أفراد مخبر L.O.S.T ، فالبداية الشكر الخالص لـــ نجوى، آسيا، طارق، هشام، أحمد، نعيمة، سهيلة، وسيلة ..... و كل أفراد دفعتي.

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

الفهـــــــــــــرس

مقدمـــــة	1
الفصل الأول: الفلافونيدات	
أولا: الفلافونيدات	
1. مدخل	3
2. التعريف، التواجد و التقسيم	3
3. خواص الفلافونيدات	7
4. الاصطناع الحيوي	7
5. تثبيت المجموعات الإستبدالية	11
5-1- تثبيت مجموعات الهيدروكسيل	11
5-2- تثبيت مجموعات الميثوكسيل	11
5-3- تثبيت مجموعات السكر	12
6. مميزات و أهمية الفلافونيدات	13
7. الكشف عن الفلافونيدات	14
ثانيا: طرق الإستخلاص، الفصل و التنقية	
الإستخلاص	15
طرق الفصل	18
1. كروماتوغرافيا الإمتزاز	18
2. كروماتوغرافيا التوزيع	18
3. الدعامة الثابتة	19
4. أنواع الكروماتوغرافيا المستعملة	19
4. 1. كروماتوغرافيا العمود	19
4. 2. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة	20
4. 3. كروماتوغرافيا الورق	22
4. 4. كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC)	23
التنقية	24
ثالثا: التعيين البنيوي	
الدراسة البنيوية للفلافونيدات	25
I. الخواص الكروماتوغرافية	25
1. اللون الإستشعاعي	25

2. ثابت الإنحباس	26
II. طرق التحليل الطيفي	27
1. طيف الأشعة فوق البنفسجية	27
2. مطيافية الكتلة	32
3. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي	35
أ- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (H-1)	35
ب- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 (C-13)	37
4. الإماهة الحمضية	37
المراجع	39
الفصل الثاني : دراسة ببليوغرافية للجنس *Hypericum*	
I. لمحة ببليوغرافية عن الجنس ***Hypericum***	43
1. تمهيد	43
2. الوصف النباتي	44
أ. مواقع تمركزها	44
ب. جنس ***Hypericum***	45
II. توزيع الفلافونيدات عند الجنس النباتي ***Hypericum***	46
III. بعض هياكل أخرى عند الجنس النباتي ***Hypericum***	48
المراجع	52
الفصل الثالث: دراسة فيتو كيميائية للنبتة	
× الدراسة الكيميائية النباتية لـ ***Hypericum tomentosum***	55
1- المادة النباتية	55
2- وصف الجنس ***Hypericum L***	55
3- وصف النوع ***H.tomentosum***	55
4- التصنيف النظامي للنبتة	56
5- الاستخلاص	57
6- فحص كروماتوغرافي للمستخلصات	59
7- الفصل و التنقية	60
الفصل الرابع: النتائج و المناقشة	
1. التحليل البنيوي للمركب P_1	64
2. التحليل البنيوي للمركب P_2	70
3. التحليل البنيوي للمركب P_3	76
الخاتمة	85
الملخص	

مقدمـــــــــــة:

إن الله تبارك وتعالى حينما أراد للإنسان أن يكون خليفة له في أرضه ، وللخلافة طبيعتها ومهمتها الثقيلة وأعباؤها الشاقة فهي تحتاج إلى جسم سليم وعقل قوي ونقي، فقد زوده سبحانه وتعالى بما يعين هذه القوى الثلاث بما ينمي فيها الحياة القوية دائما بما يحفظ نشاطها ولا يبعدها عن هدفها أو يضعفها كي تؤدي رسالتها التي خلقت من أجلها على أتم وجه .

ففي مجال الجسم وتغذيته ومطالبه أوجد الله له نعما لا حصر لها فقد قال الله تعالى < هو الذي خلق لكم ما في الأرض جميعا > سورة البقرة / 29 . و < ألم تر أن الله سخر لكم ما في السماوات وما في الأرض وأسبغ عليكم نعمه ظاهرة وباطنة > سورة الحج /65 . وكذلك < وإن تعدوا نعمة الله لا تحصوها > سورة إبراهيم / 34 .

وفي مجال وقايته من الأمراض وعلاجه من العلل التي تنتابه في حياته خلق له من الأعشاب ومختلف أنواع الزرع مما يكون تحت بصره ومصداقا لقول الرسول عليه الصلاة والسلام < ما أنزل الله داء إلا أنزل له شفاء > .

وهذه دعوة إلى استخدام الموارد الطبيعية من ماء وهواء وغذاء ودواء مما خلقه الله سبحانه وتعالى دون إضرار أو آثار جانبية وحثنا الله سبحانه وتعالى إلى كشف ما في الطبيعة من خير للاستفادة منه بقوله تعالى < هو الذي جعل لكم الأرض ذلولا فامشوا في مناكبها وكلوا من رزقه وإليه النشور > . سورة الملك / 15 .

والإنسان منذ القدم بدأ يستعمل " الصيدلة الطبيعية " أو " الأرض التي أعدها الله سبحانه وتعالى ضمن آلاف النعم الإلهية التي أودعها ــ سبحانه وتعالى ــ في هذا المخزن العلاجي وقد ربط الإنسان الأول العلاقة بين النباتات البرية التي تغطي وجه الأرض وبين الأمراض التي يصاب بها فاستعمل هذه الأعشاب أو أجزاء منها في التداوي من هذه الأمراض فاستعمل الإنسان الجذور والأوراق والثمار والبذور والحشائش التي تعرف عليها خلال التجوال والترحال ومراقبته للحيوانات وهي تتناول تلك الحشائش ، بيد أن التطور الصناعي واستخدام الأدوية الحديثة أثر على تناول هذه الأعشاب الطبيعية

كأدوية . ولكن العالم اليوم يتجه أكثر إلى الأعشاب كبديل طبيعي للعقاقير الطبية والتي ما فتئت تتسبب في العديد من المشاكل الطبية المختلفة .

ومع تقدم الكيمياء بصفة عامة تمكن الصيادلة والكيمائيين من التوصل إلى التركيب الكيميائي ومعرفة شكل وتركيب جزيء المادة الفعالة وأمكن في بعض الحالات تخليق تلك المواد الفعالة كيميائيا و هو غايتنا في هذا البحث .

و لقد تم اختيارنا للمادة النباتية *Hypericum tomentosum* على أساس معايير كيميائيـــة و أخـــرى بيولوجية:

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

الفصل الأول: هو مدخل للفلافونويدات تعريفا، تصنيفا، تصنيعا، طرق الفصـــل و التنقيـــة، و أخيـــرا الطرق الفيزيوكميائية للتعيين البنيوي للمركبات الفلافونويدية.

الفصل الثاني: خصص لإحصاء الفلافونويدات بأنواعها عند جنس *Hypericum*.

الفصل الثالث: خصص للطريقة العملية المخبرية المتبعة خلال هذا البحث من اســـتخلاص و فصـــل و تنقية.

الفصل الرابع: خصص لتقديم النتائج المحصل عليها و مناقشتها.

و أخيرا الخاتمة: قيمنا فيها نتائج هذا البحث.

أولا: الفلافونيدات

1. مدخل:

تشكل المركبات الفينولية البنية حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية، نظرا لكثرة عددها، و لتباين الهياكل البنائية لها وتتميز بوجود على الأقل نواة بنزان تكون مرتبطة مباشرة على الأقل بمجموعة هيدروكسيل حر أو مرتبطة بوظيفة أستر،إيثر،أو جزيئة سكر(أي على شكل إيثيروزيد) ، من بين هذه المركبات :

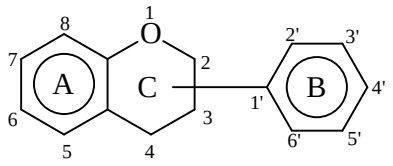
(Les Quinones , Les Phénols , Les dérivés anthracéniques , Les acides cinnamiques)

بالإضافة إلى المركبات الفينولية و المركبات متعددة الفينول **Les polyphénols** ؛ هذه الأخيرة تحتوى على أكثر من حلقة عطرية و تعتبر من الفينولات الأكثر تعقيدا في بنائها والأكثر انتشارا في الطبيعة و قد حظيت هذه المركبات بالدراسة الوافرة[1] و من أهمها الفلافونيدات المتواجدة في معظم الأصناف النباتية تقريبا، لذلك فهي محل دراستنا في هذا البحث.

2. تعريف الفلافونيدات، تواجدها و تقسيمها:

إن الفلافونيدات تعتبـــر من أهم مجموعات المركبات حيث تم عزل و تحديد أكثر من 6400 مركب فلافونيدي[2] في صورة إيثيروزيدية أو أجليكونية وهذا من أنواع مختلفة من النباتات[3]، وهي عبارة عن صبغات متواجدة في النباتات و تنتشر في أجزائها النباتية المختلفة من جذور و خاصة الأوراق و الزهور إذ تنسب لها خاصية تلونها [4]، أما على مستوى الخلية فتتواجد بشكل إثيروزيدات ذوابة في الماء متمركزة في حويصلة الخلية، و بشكل أجليكونات في الأنسجة السطحية للأوراق، أما عديدة الميثوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية[5].

تحتوي جميع الفلافونيدات على" 15 " ذرة كربون في هيكلها الأساسي " شكل 1 " موزعة على شكل " C_6-C_3-C_6 " حيث تمثّل كل (C_6) حلقة بنزينية.



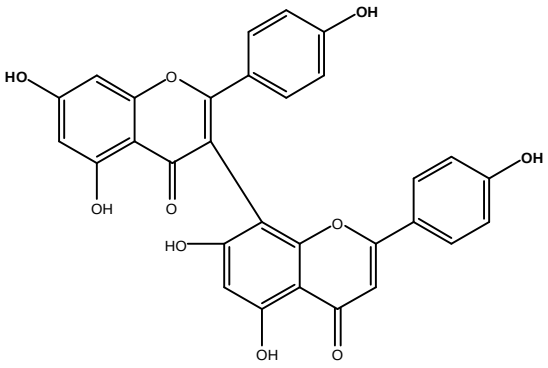
شكل -1- يوضح الهيكل الفلافونيدي

حيث تتفرع الفلافونات، الفلافونولات، الفلافانونات، و ثنائي هيدروفلافونولات من الهيكل الأساسي بحيث يطلق على الفلافونيدات التي تحوي على مجموعة أو أكثر من مجموعات الهيدروكسيل و الميتوكسيل ... على الحلقتين A و B و هيدروجين حر في الموقع 3 بالفلافونات.

وأما إذا وجدت مجموعة بديلة هيدروكسيلية حرة أو مستبدلة في الموضع رقم 3 لمركب فلافوني، فإنه يطلق على المركب اسم فلافونول ؛ و هو يشكل نواة أساسية لعديدٍ من المركبات الطبيعية .

و تتميز الفلافانونات Flavanones و Dihydroflavonols بغياب الرابطة الثنائية " C_2-C_3 " .

يمكن للفلافونيدات أن ترتبط فيما بينها و تشكل مركبات ثنائية (ديمرة)، يكون هذا الإرتباط في الموقع 6 أو 8، أغلبية الفلافونيدات الثنائية عبارة عن ديمرة بين الفلافون و الفلافانون 5، 6، '4 ثلاثي الإستبدال.

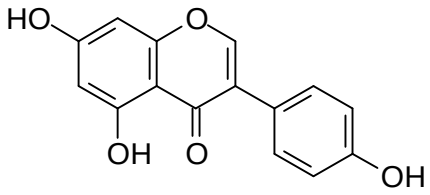


(I-3,II-8)-biapigenine (Fukugetine)

أغلبية الفلافونيدات تتواجد على شكل أجليكونات مرتبطة مع جزء سكري[6] هذا الأخير قد يكون أحادي، ثنائي أو ثلاثي السكر.

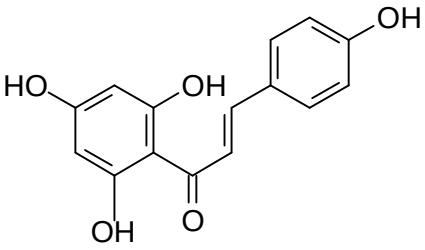
و قد تم التعرف على أكثر من 350 مركب من النوع كربون- إيثيروزيد[7]، حيث تتكون الرابطة بين الكربون الأنوميري للسكر و غالبا ما يكون الجلوكوز كما قد يكون جلاكتوز أو بنتوز وكربون الجزء الأجليكوني في الموقع 6 أو8. وفي هذه الحالة تكون مركبات هذا النوع من الجليكوزيدات مقاومة للتمييه الحمضي[9].

كما أنه هناك مركبات طبيعية أخرى وثيقة الارتباط بالفلافونيدات تدعى إيزوفلافونات و تختلف بنيتها عن الفلافونيدات في موقع ارتباط الحلقة B حيث ترتبط هذه الأخيرة بالموضع 3 بدلا من الموضع 2.



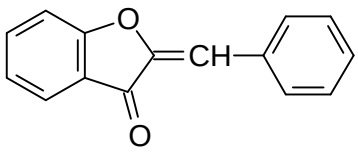
Génisteine (isoflavone)

أما الشالكونات (Chalcones) فهي أشكال مخايلة للفلافونيدات و تكون مفتوحة.



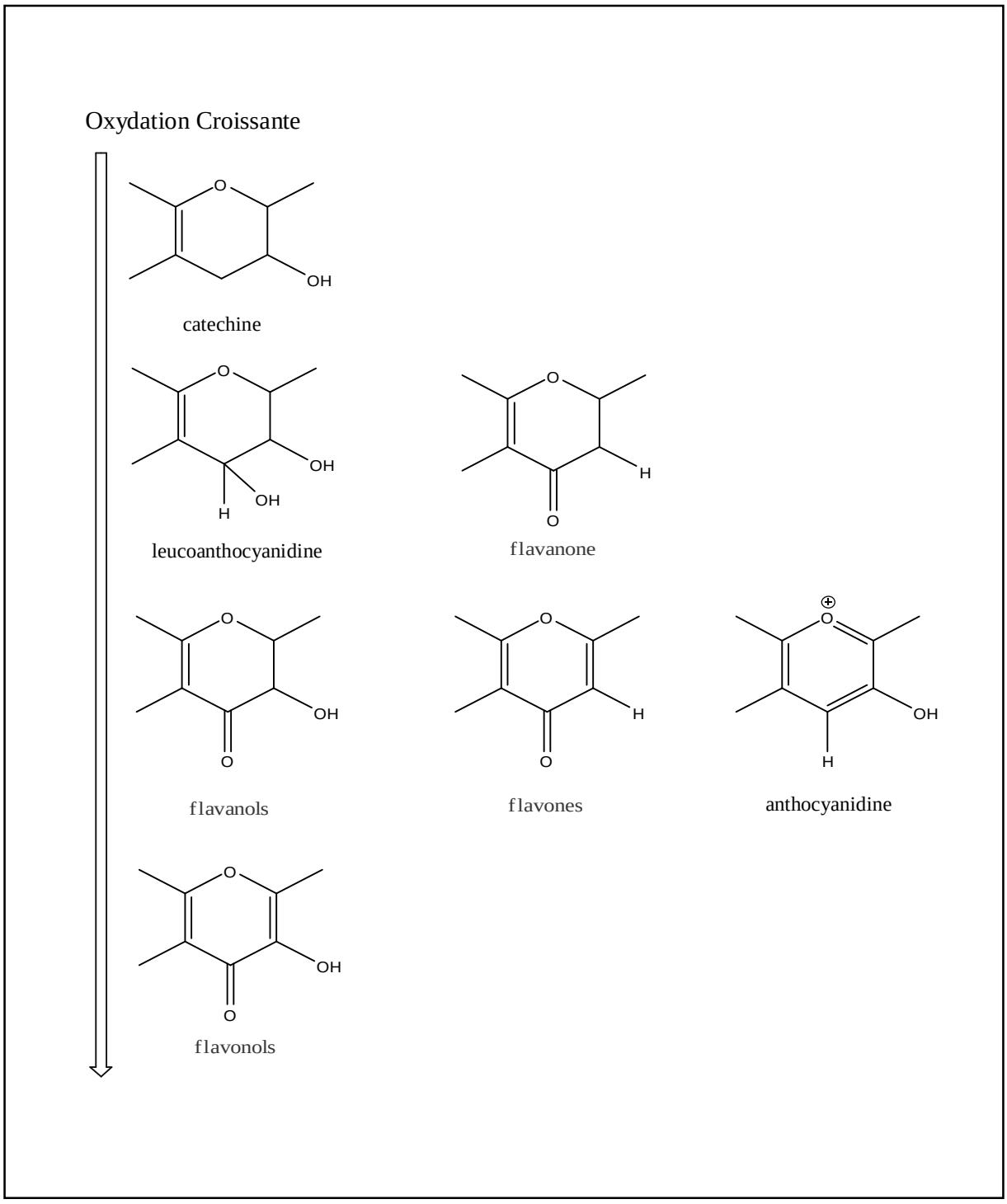
Naringénine chalcone (chalcone)

بالإضافة إلى الأورونات (Aurones) التي تتميز بوجود حلقة خماسية غير متجانسة.



Aurone

و إعتمادا على درجة تأكسد الحلقة المركزية C_3 (نواة البيران Pyrane) نحصل على الأقسام المختلفة للفلافونيدات والمخطط –1- يوضح ذلك[8].



المخطط –1- مختلف أقسام الفلافونيدات حسب درجة تأكسد الحلقة البيرانية

3. ذوبانية الفلافونيدات:

الفلافونيدات ذوابة في القواعد القوية لكونها مركبات فينولية و تمتاز بصفتها الحمضية الضعيفة، و تزيد قطبيتها إذا كانت تحتوى على عدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو جزيئة سكر أو أكثر و هذا ما يجعلها ذوابة في المذيبات القطبية مثل : الميثانول،الإيثانول، ثنائي سيلفوكسيدالأستون، والماء و وجود السكر في الجزيء المركب يجعله أكثر ذوبانا في الماء ، أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل : الايزوفلافونات وكذلك الفلافونات التي تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الإيثر و الكلوروفورم[1].

4. الإصطناع الحيوي للفلافونيدات:

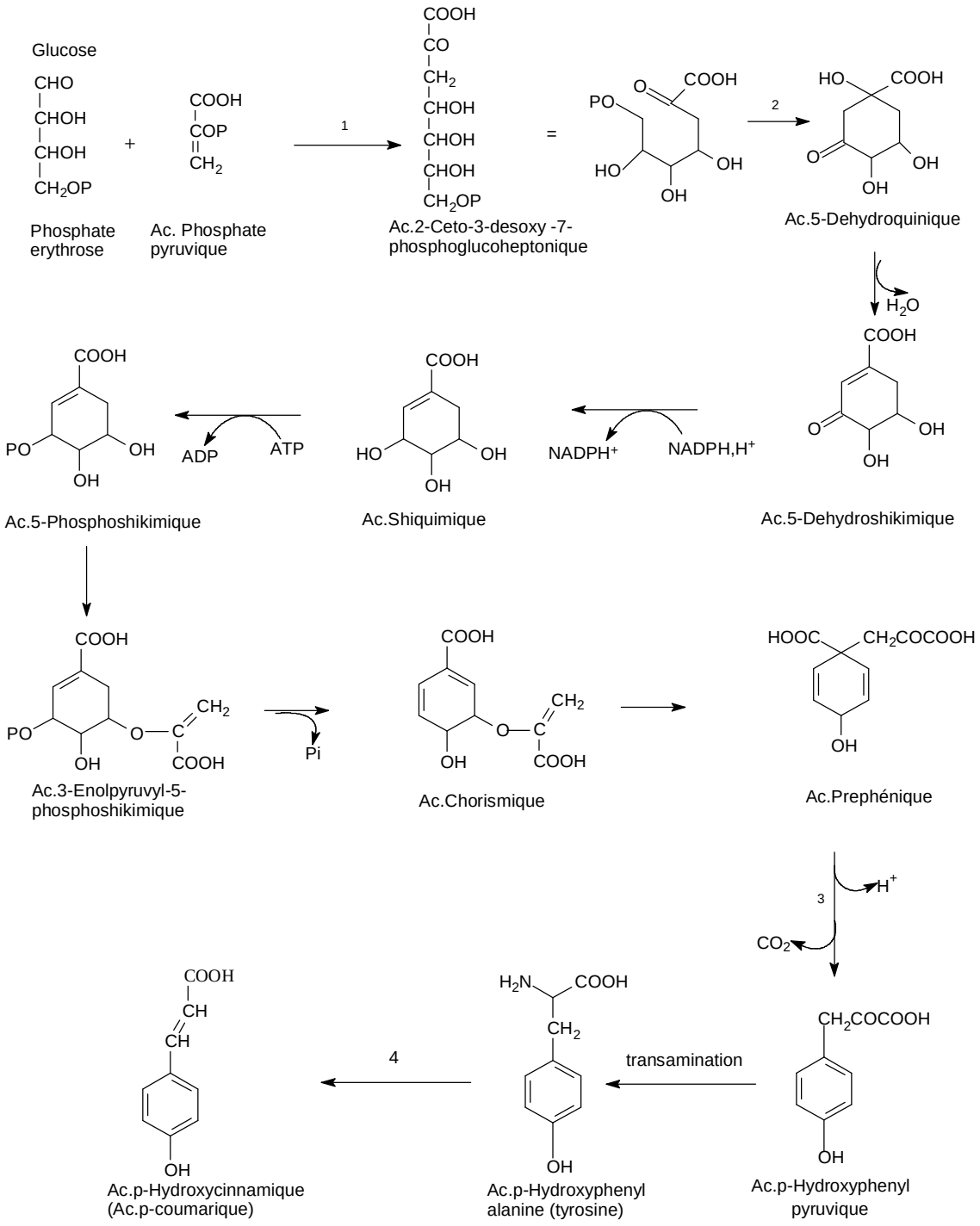
إن الإصطناع الحيوي للمركبات الطبيعية ليس إلا الطريقة التي تتكون بواسطتها هذه المركبات داخل مصادرها الطبيعية و ذلك عن طريق تفاعلات الأكسدة، الإرجاع، الألكلة، الحلمهة...الخ؛ و يكون هذا طبعا بتوافر إنزيمات خاصة تساعد في هذه التفاعلات.

و لمتابعة آلية هذا الأخير تم إجراء تجارب عدة باستعمال النظائر الموسومة بـــ ^{14}C المشع، فمثلا لاحظ الباحث " Robinson "سنة 1936 [66] أن استبدال النواتين البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية مختلف جوهريا فاستنتج أنه ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي و عليه تتم عملية الاصطناع الحيوي خلال ثلاث مراحل:

4-1- المرحلة الأولى:

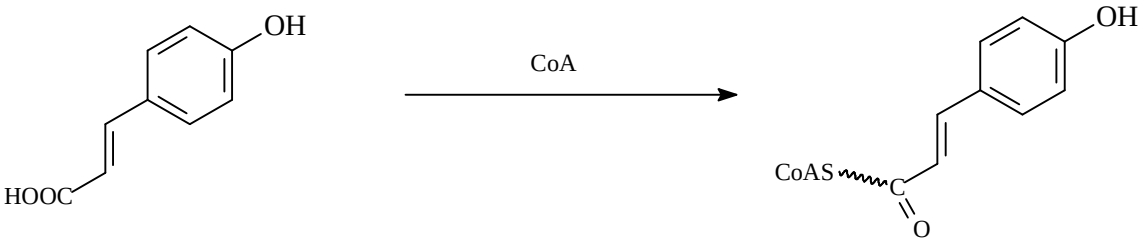
§ طريق حمض الشيكيميك :

أثبت الباحث " Davis " سنة 1955 [67] دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة (B) و السلسلة الكربونية الثلاثية (C_3) و ذلك بدءا بالغلوكوز، كما هو موضح في المخطط -2- :



مخطط –2- تكوين حمض Ac.p-Coumarique (C_6-C_3) إنطلاقا من الغلوكوز و مرورا بحمض الشيكيميك

يليه تحول الناتج و المتمثل فيAc.4-coumaroyl (Ac.p-coumarique) إلى 4-coumaroyl-CoA الذي يكون جاهزا للإتحاد مع Malonyl-CoA في مرحلة قادمة.



Ac.p- coumarique

p- Coumaroyl CoA

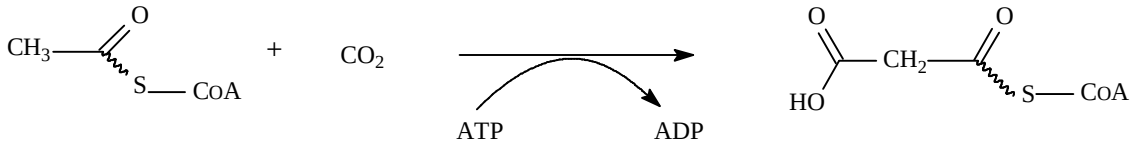
- **<u>الإنزيمات المستخدمة لتكوين حمض Ac.p-Coumarique:</u>**

1. Aldolase,3-désoxy-O-arabinoheptulosonate-7- phosphate synthase ou DHAP synthase.
2. Déshydroquinate synthase.
3. Préphénate déshydrogénase.
4. Tyrosine ammonia-lyase.

4-2- <u>المرحلة الثانية:</u>

§ <u>طريق الخلات</u> :

تتشكل الحلقة (A) من تكاثف ثلاث وحدات من Malonyl - CoA الناتجة من تثبيت مجموعة كربوكسيل مع أستيل مرافق- إنزيم (Acétyl -CoA).



Acétyl CoA

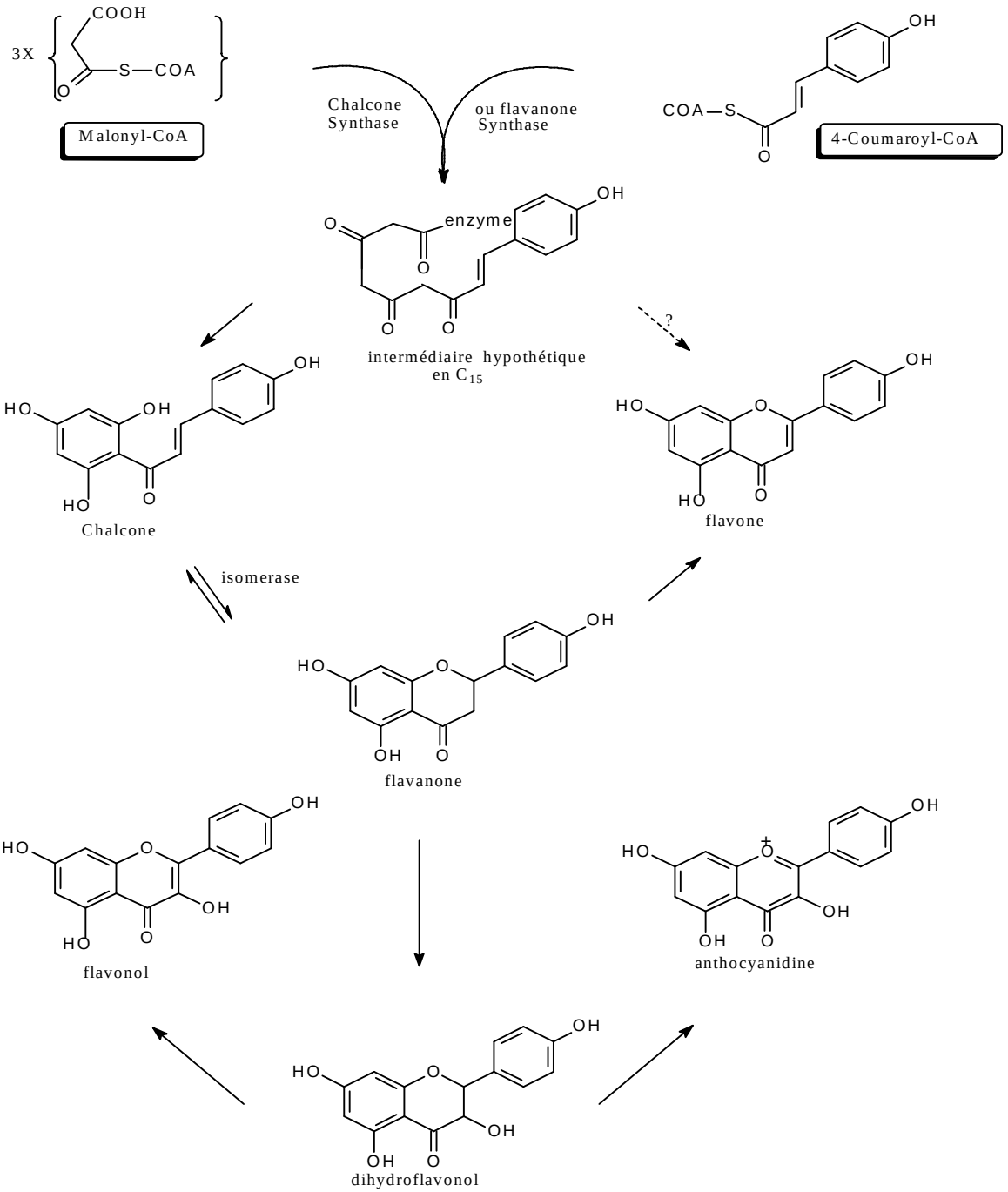
Malonyl CoA

تشكيل Malonyl CoA إنطلاقا من Acétyl CoA و CO_2

4-3- المرحلة الثالثة:

§ طريق الشالكون :

يعتبر الشالكون النواة الرئيسية التي تنحدر منها مختلف هياكل الفلافونيدات و الذي يتكون من تكاثف ثلاث وحدات من malonyl-CoA مع coumaroyl-CoA - 4 و المخطط -3 - يوضح ذلك[8].

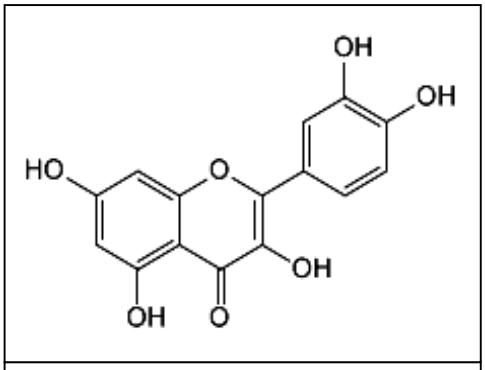


مخطط-3- بعض الهياكل الفلافونيدية التي تنحدر من الشالكون [8]

5. تثبيت المجموعات الإستبدالية على الهيكل الفلافونيدي:

5. 1- تثبيت مجموعات الهيدروكسيل:

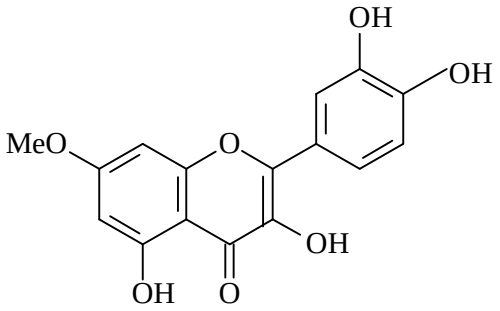
إن مجموعات الهيدروكسيل المثبتة في الموضعين 5 و 7 للهيكل الفلافونيدي، تعد مجموعات أصلية، لأنها تتشكل قبل تشكيل النواة العطرية (A) [4, 11] . كذلك الحال بالنسبة للحلقة B أينما تكون مستبدلة في الموقع 4' في معظم الحالات. بينما يكون الإستبدال في الموقع 3 لمجموعة الهيدروكسيل في مرحلة تشكيل الشالكون، و بعد مرحلة تشكيل الشالكون إذا كان الإستبدال في الموضع 3' و يتم ذلك بعد غلق الحلقة (C) [12].



Quercétine

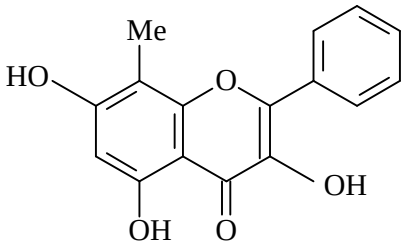
5. 2-تثبيت مجموعات الميثوكسي:

إن تثبيت المثيل يأتي بعد تثبيت الهيدروكسيل و يستوجب هذا وجود إنزيم خاص O-méthyl-transférase كمانح للمثيل[13]، و تتم هذه العملية بعد تكوين جزيئة الفلافونيد أو قبل تكوين نواة الشالكون، أو في آخر مرحلة من تكوينه و هذا حسب نوع الإنزيم المتدخل في هذا التحول (مثال 1).
من الممكن أن تكون الرابطة بين الأجليكون و المثيل من النوع كربون ــ كربون، و يكون هذا النوع من الإستبدال عادة في الموقعين 6 أو/و 8 و أحيانا في المواقع 3 و 7 [14](مثال 2).
كما هناك مركبات تحتوى على نوعي الإرتباط C-Me و C-OMe (مثال 3).



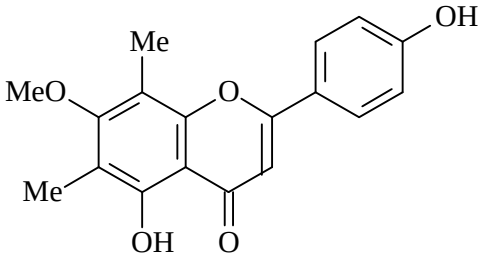
Rhamnétine

(1)



8-C-méthylgalangine

(2)



Sidéroxyline

(3)

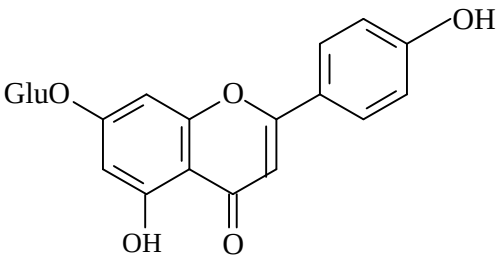
5. 3-تثبيت جزيئة السكر:

إذا كان هذا التثبيت من النوع أكسجين- إيثيروزيد فإنه يتطلب إنزيم O-glycosyl transférase و مانح للسكر[15]، و يتم هذا الإستبدال خاصة في الموقع 7 بالنسبة للفلافونات، و في الموقع 3 بالنسبة للفلافونولات[16].

أما إذا كان الارتباط من النوع كربون- إيثيروزيد ــ وهو قليل الوجود مقارنة بالنوع الأول ــ فإن كربونات الهيكل الفلافونيدي التي تساهم في مثل هذا الإرتباط هي 6 و/أو8. وتتم هذه العملية بعد تكوين الشالكون مباشرة[16].

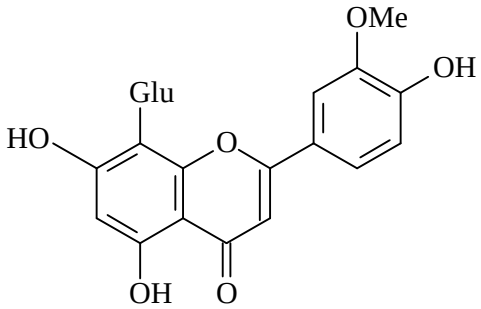
تدخل في هذا الإستبدال سكريات بسيطة أحادية، ثنائية أو ثلاثية[17] (مثال 4 و5).

و يتواجد النوعان في نفس المركب (مثال 6).



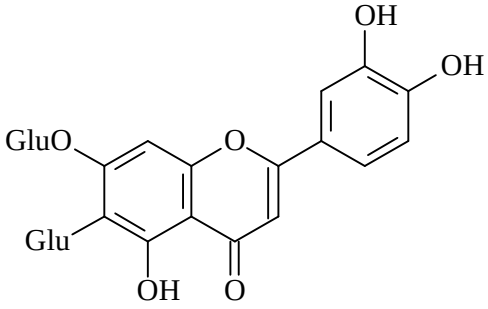
7-O-Glucosylapigénine

(4)



8-C-Glucosylchrysoériol

(5)



7-O-Glucosylisoorientine

(6)

6. <u>مميزات و أهمية الفلافونيدات:</u>

- § تدخلات الفلافونيدات في تفاعلات الأيض الثانوي يكون محدودا وهذا راجع لأنها تختزن في الخلية النباتية.
- § كون الفلافونيدات من نواتج الأيض الثانوي فإنها واسعة الإنتشار في المملكة النباتية، إلا أنها لا تتواجد في جميع النباتات.
- § يسهل الكشف عن الفلافونيدات وهذا لكونها تبقى ثابتة أثناء عمليات الإستخلاص.

إن الفلافونيدات و الكلوروفيل و كذا الكاروتينات عبارة عن أصبغة؛ فهي إذن المسؤولة عن إعطاء اللون للنباتات[17]؛ وهذا ما يجعل لها خاصية جذب الحشرات و الطيور لتساعد في عملية التلقيح و الإخصاب[18،19]، فتعد الأنثوسيانات و الفلافونولات أهم الفلافونيدات المسؤولة على ذلك.

كما تستعمل كمبيدات حشرية و مضادات حيوية خاصة الإيزوفلافونات منها، وللفلافونيدات عدة أدوار بيولوجية، علاجية نذكر منها:

- لها خاصية وقائية حيث تقي النباتات من أخرى متطفلة إذن فلها دور دفاعي[20،21].

- تساعد في تخفيض الضغط الدموي العالي[22]، مضادة لتسمم الكبد، وللحساسية، و للفيروسات وللأورام[23].
- لها خاصية مضادة للأكسدة [24]. كما أثبتت هذه الفعالية المضادة للأكسدة من خلال نماذج مخبرية *In vivo* و *In vitro* [25] .
- مضادة للإلتهاب حيث تعتبر مستخلصات الليمون العلاج الناجع لبعض الأمراض المتميزة بزيادة النفاذية أو بضعف الشعيرات الدموية لكونه غني بالفلافونيدات[26].
- تستعمل لعلاج الإضطربات المرتبطة بالتهاب الشبكية و المشيمة[27].
- تتميز بخصائص مزيلة للتشنج مثل الكرستين و الكامبفيرول، و مضادة للقرحة مثل Apigenine، كما يمكنها أن تقلل من النزيف الناتج عن الشعيرات الدموية مثل Rutine و Hispyridine[28].
- كما لها أيضا الفعالية ضد بعض الخلايا السرطانية وهذا ما يميز الفلافونيدات العديدة الميثوكسيل[20].
- تقوم الفلافونيدات بعدة أدوار منها: مضادة للجراثيم، موانع ضد الحشرات التي تتغذى على النباتات عندما تكون خلائط مع التربينات[29].
- كما تستعمل في مجال التجميل، ومنع الحمل.
- تستعمل الفلافونيدات كذلك في التجارة نذكر على سبيل المثال الستريس و السوفرا (Citrus, Sophora)، اللذان يتواجدان في الأشجار خاصة.

7. **الكشف عن الفلافونيدات** [1]:

تستخدم العديد من الكواشف للكشف عن الفلافونيدات، حيث تعطي ألوانا مميزة لكل مجموعة فلافونيدية، فاستخدام محلول كلوريد الألمنيوم (5%) يعطي بقعا صفراء مع الفلافونيدات التي تحوي مجموعة هيدروكسيل في الموضع رقم5. كما تعطي جميع الفلافونيدات ألوانا صفراء أو برتقالية مع هيدروكسيد الصوديوم .كما يمكن استخدام محلولvanillin-HCl(5%) للتعرف عن الفلافونيدات حيث يؤدي إلى ظهور بقع حمراء بعد رشه (ظهور البقع يكون في الحال،أو بعد التدفئة البسيطة).

ثانيا: طرق الإستخلاص، الفصل و التنقية

I - الإستخلاص:

قبل الشروع في عملية الاستخلاص لا بد من تجهيز النبتة المراد إجراء عليها العملية الإستخلاص و ذلك بـــ :

تجفيفها في الظل و بعيدا عن الرطوبة ثم يلي ذالك تنقيتها وفرز أجزائها ثم طحنها.

وقد نستعمل كل أجزاء النبتة، كما قد نؤخذ الجزء الهوائي لوحده أو الجذور أو الثمار فقط، و عموما تتواجد الفلافونيدات في الجزء الهوائي؛ حيث فيه يتم الاصطناع الحيوي للفلافونيدات و ذلك لارتباطه بالعامل الضوئي.

و يتم استخلاص الفلافونيدات وفق بروتوكول حدده العالم LEBRETON (1967)[30] و المعدُل من قبل BOUTARD (1972)[31]، GONNET (1973)[32] و JAY (1975)[33]، إلى أن أصبح هذا البروتوكول تقليدي يتبع كما هو إلا في بعض الحالات التي يحتاج فيها إلى تغيير بسيط في طريقة الاستخلاص لغرض تحقيق أفضل النتائج في استخلاص مواد معينة[16].

يمكن تحديد خطوات هذه العملية في عدة نقاط :

1. بعد تجهيز المادة النباتية وبعد طحن أجزائها نبدأ بعملية الاستخلاص الأولية باستعمال خليط من محلولين،و في الغالب ما نستعمل خليط مكون من (ماء-ميثانول) و بنسب (8/2) أو (7/3)، و نستعمل الميثانول بنسبة 100% في حالة ما إذا كانت المادة النباتية غضة.

تغمرالمادة النباتية في المحلول الهيدروكحولي على البارد و تترك لمدة لا تقل عن 24 ساعة ، ثم يرشح هذا الأخير و يتم تبخيره تحت الضغط المنخفض حتى الجفاف و تكرر هذه العملية ثلاث مرات متتالية .

2. يعامل المستخلص الخام بواسطة الماء المقطر المغلى و يترك ليلة كاملة بعدها يرشح المحلول، أين يتم التخلص من الشوائب كالأتربة إضافة إلى الكلوروفيل، الدهون، التربينات...[34،35].
3. ثم تعامل الرشاحة المتحصل عليها إيثير البترول ثم ثنائي كلور الميثان و هو إستخلاص من نوع سائل-سائل و هذا قصد التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة المتبقية ونذكر منها (الكلوروفيل، الدهون والتربينات) ، كما أن هذه الرشاحة لا تهمل لأنها قد تحتوي على بعض الفلافونيدات الغير قطبية (أجليكونات ميثوكسيلية)[34،35].
4. في نهاية العملية نتحصل على الطبقة المائية التي تجرى عليها عدة عمليات استخلاص من نوع سائل-سائل.

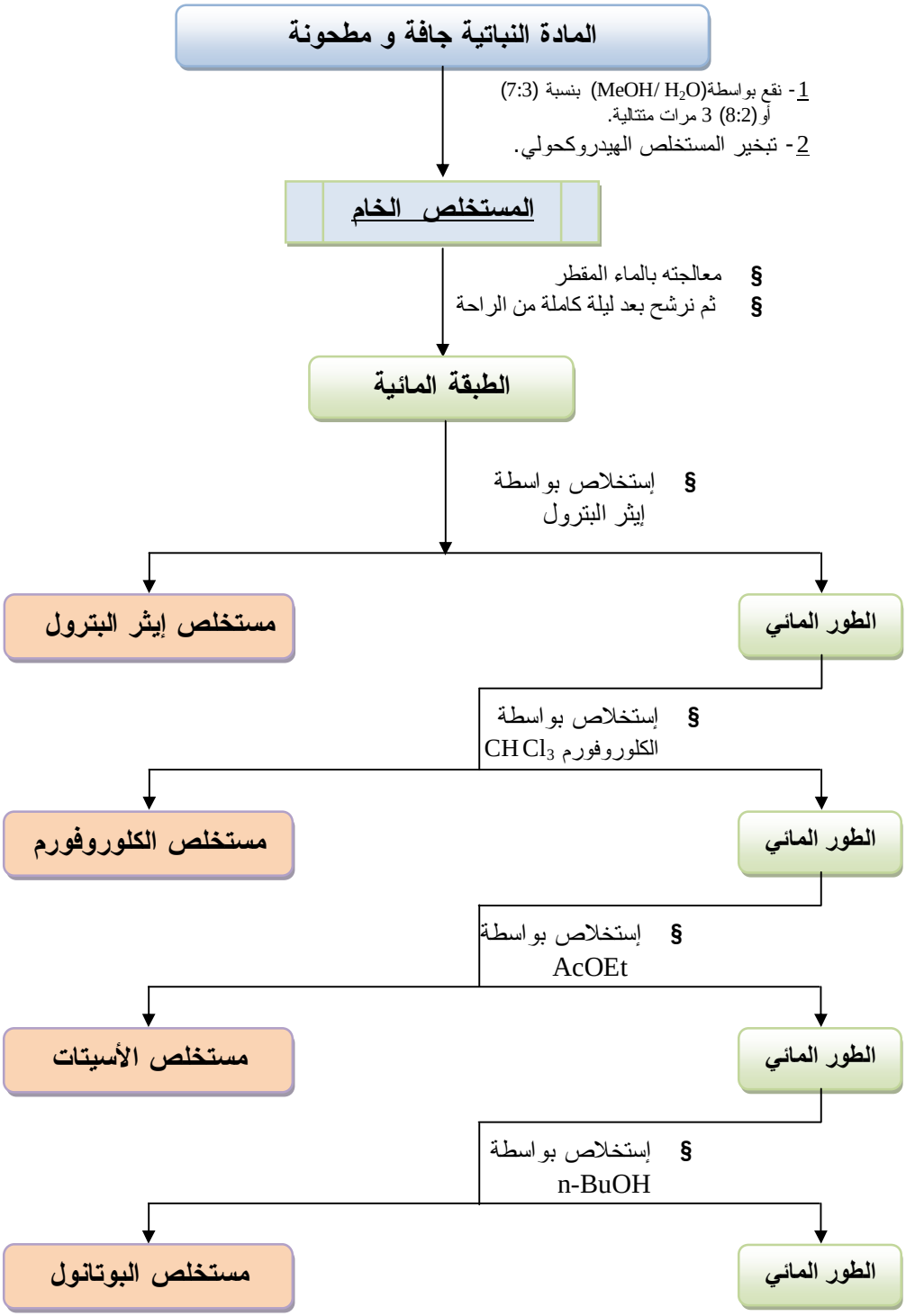
أ - مع خلات الإيثيل

ب- مع البوتانول النظامي.

- حيث أن أسيتات الإيثيل يؤدي إلى استخلاص المركبات الأجليكونية و بعض من المركبات الإيثيروزيدية أحادية السكر و أحيانا ثنائية السكر، وبالخصوص إذا كررت عملية الاستخلاص أكثر من مرة.
- أما عند المعاملة البوتانول فإنه يؤدي إلى استخلاص المركبات ثنائية و ثلاثية السكر و كذا المركبات من النوع " *C-glycoside* "[26].

عند الإنتهاء من عملية الاستخلاص نركز كل الأطوار العضوية حتى الجفاف و يتم هذا تحت ضغط منخفض، و تكون بذلك المستخلصات جاهزة لعمليات الفصل المختلفة.

و المخطط –4- يلخص هذه العملية :



مخطط-4- مخطط عام لاستخلاص الفلافونيدات.

II - طرق الفصل:

في الفصل فإن التقنية الأساسية المستعملة لذلك هي الكروماتوغرافيا بمختلف أقسامها، و كلمة " كروماتوغرافيا " تستخدم الآن للإشارة إلى تقنيات الفصل المختلفة تعتمد جميعها على توزيع المادة تحت الدراسة بين طورين أحدهما ثابت و الآخر متحرك؛ حيث الأول قد يكون جامدا أو سائلا ممتزا على دعامة جامدة، أما الثاني فعادة ما يكون مذيبا عضويا[38].

كما يمكن تعريف الكروماتوغرافيا على أنها طريقة فيزيائية تستعمل أساسا للفصل، أو هي طريقة تحليلية تحضيرية لفصل المركبات أو الخلائط.

و تنقسم تقنيات الفصل الكروماتوغرافي حسب ميكانيكية الفصل إلى قسمين أو نمطين هامين هما كروماتوغرافيا الامتزاز و كروماتوغرافيا التوزيع[37، 38] و بالنسبة لدراستنا الفيتوكيميائية فإن هدفنا هو التحصل على مركبات نقية لأجل ذلك يستعمل طرق فصل متتالية أهمها:

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

1. كروماتوغرافيا الإمتزاز :

يعتمد مبدأ هذه التقنية على ظاهرة الإمتزاز أو الإدمصاص حيث تعد هذه الأخيرة ظاهرة سطحية يتم فيها تثبيت جسم ما سائل، غاز أو صلب على سطح جامد و غالبا ما يكون هذا الإمتزاز إنتقائيا، أما عمليا فيتم الفصل نتيجة لاختلاف قوة إمتزاز المواد المراد فصلها على سطح الطور الثابت (الدعامة الثابتة) المستخدم، و من أمثلة تقنيات كروماتوغرافيا الإمتزاز :

- كروماتوغرافيا العمود CC.
- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM

2. كروماتوغرافيا التوزيع :

يعتمد مبدأ هذه التقنية على فصل المواد نتيجة لإختلاف معاملات التوزيع بين طورين، الأول ثابت و يكون سائلا ممتزا على سطح جامد أما الثاني فيكون متحرك، و من أمثلة هذه التقنية :

- كروماتوغرافيا الورق CP[38] .

3. الدعامة الثابتة :

يرتبط نوع الدعامة الثابتة دائما بالطور المتحرك و كذا بأنواع المركبات المراد فصلها، و أهم أنواع الطور الثابت :

3. 1- السليس (السليكاجال):

يمكن للسيليكاجال أن يكون روابط هيدروجينية مع المركبات القطبية بفضل مجموعات الهيدروكسيل المرتبطة بذرة السليس. يستعمل السليس كدعامة ثابتة لفصل العديد من المركبات الطبيعية.

3. 2- متعدد الأميد :

عبارة عن جسم صلب يستعمل كدعامة ثابتة لفصل المركبات القطبية خاصة المركبات الفينولية كالفلافونيدات.

3. 3 - السليلوز:

يعد الفصل على صفائح السليلوز أو على الورق أفضل الطرق لفصل المركبات القطبية التي تحتوي على السكريات خاصة، حيث أثبتت فعاليته على فصل الفلافونيدات الجليكوزيدية عن الأجليكونية.

4.3 - السيفاداكس :

إن عمود السيفاداكس LH20 يستعمل عادة لغرض تنقية المركبات و خاصة الفلافونيدات منها.

4. أنواع الكروماتوغرافيا المستعملة :

سنتطرق إلى الأنواع الأكثر استعمالا و خاصة تلك المستخدمة في فصل المركبات الفلافونيدية.

4 . 1. كروماتوغرافيا العمود :

وهي طريقة الهدف منها هو فصل خليط معقد من المركبات الفلافونيدية تستعمل هذه التقنية من أجل فصل خليط معقد يحتوي على عدد كبير من المركبات و ليس الغرض من هذه التقنية هو الحصول على مركبات نقية، و لكن الهدف الأساسي منها هو الحصول على كسور أقل تعقيدا يمكن فصلها بالطرق الكروماتوغرافية الأخرى و يستعمل لهذا الغرض كدعامة ثابتة كل من (السيليكاجال، السيليلوز، و متعدد الأميد).

حيث يعتبر السيليكاجال دعامة جيدة لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية، أما السيليلوز فيستخدم لفصل الفلافونيدات الجليكوزيدية خاصة، على عكس متعدد الأميد الذي يعد أفضل دعامة لفصل المركبات الفلافونيدية على اختلاف أنواعها الجليكوزيدية و غير ذلك.

و يمكن تلخيص هذه التقنية فيما يلي :

يؤخذ العمود الذي تختلف أبعاده باختلاف كمية المستخلص و يثبت بواسطة حامل و يوضع القطن في الأسفل و يعبأ بالطور الثابت المشبع بالمذيب الأقل قطبية ويوضع القليل من الرمل الخاص sable de Fontaine bleau حوالي 1 سم و هذا لأجل تسوية السطح جيدا.

ثم نقوم بوضع المستخلص و هناك طريقتان أساسيتان لوضع المستخلص في العمود.

1- **على شكل مسحوق** أين يتم إذابة المستخلص في أقل كمية ممكنة من الميثانول ، نضيف لمحلول المستخلص كمية من مسحوق البولي أميد SC_6 و نركز هذا الخليط حتى نحصل على مسحوق جاف الذي يضاف إلى العمود الكروماتوغرافي، مع الحرص دائما على أن تكون طبقة المستخلص قليلة السمك.

2- **على شكل سائل** يذاب المستخلص المراد فصله في أقل كمية ممكنة من الميثانول، و بواسطة ماصة باستور يتم وضعه على سطح الرمل مع الحرص على عدم إتلافه للتخلص من كمية الميثانول التي ذوبنا فيها المستخلص يتم غسل العمود بكميات من التولين كافية لإزالة كل الميثانول المستعمل.

بعد ذلك يضاف المملص الذي يكون في البداية مذيب أقل قطبية ثم ترفع قطبيته بإضافة مذيب قطبي تدريجيا إلى غاية الوصول إلى قطبية عالية، و يتم مراقبة الحزم باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV حيث تستقبل أسفل العمود و تركز حتى الجفاف.

4. 2. **كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM :**

تستعمل هذه التقنية لفصل عدد قليل من المركبات، ثلاثة حتى أربعة مركبات على الأكثر، و إلا فمن الأفضل الرجوع إلى كروماتوغرافيا العمود.

و نستعمل في هذه التقنية شرائح من الزجاج أو البلاستيك ذات الأبعاد (20x20 سم) لتثبت عليها دعامة صلبة و لتحضير خمسة صفائح ذات سمك 0.25 ملم نستعمل :

* في حالة سيليكاجال 30 غ من الدعامة الثابتة في 60 ملل من الماء المقطر.
* في حالة متعددالأميد 10 غ من الدعامة الثابتة في 55 ملل من الإيثانول.
* في حالة السيليلوز 15 غ من الدعامة الثابتة في 40 ملل من الماء المقطر.

تجفف بعد ذلك الصفائح جيدا أين تصبح جاهزة الاستعمال .

ثم يوضع الخليط المراد فصله عرضيا على بعد 1.5 سم من حافة الصفيحة، بعدها توضع الصفائح في حوض به مملص، و أثناء هجرته يمر بالعينة الموضوعة أين يجر معه مختلف المركبات في شكل حزم التي يتم تحديدها بواسطة مصباح UV، و الأنظمة المستعملة كمملصات هي[38] :

- بالنسبة لمتعدد الأميد (كدعامة صلبة) :

H_2O / MeOH / MEC / Acétylacétone : (13 /3 / 3 / 1)
Toluène / MEC / MeOH : (4 / 3 / 3)
MeOH / H_2O / AcOH : (18 / 1 / 1)

- بالنسبة لـــ : السيليكاجال (كدعامة صلبة) :

AcOEt/H_2O/AcOH : (8/1/1)

MeOH/CH_2Cl_2 : (1/9), (2/8), (5/5)

و يمكن تحديد المسافة التي قطعتها كل بقعة أو حزمة و تعرف النسبة بين هذه المسافة و تلك التي قطعها المذيب باسم معامل الإعاقة أو ثابت الانحباس R_f حيث :

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعتها الحزمة من خط الإنطلاق}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب من خط الإنطلاق}}$$

بعد تحديدها بواسطة مصباح UV، و بعد أن تجف الصفائح تكشط الحزم المفصولة و توضع في أرلان أين يتم صب الميثانول و مزج الخليط جيدا لكي يسمح لنا ذلك بإذابة المركب ، ثم يتم ترشيحه في قمع زجاجي به قطن لكي نتخلص من الدعامة الثابتة، بعدها نبخر الرشاحة تحت الضغط المنخفض و نقوم

بعدة تحاليل كروماتوغرافية للتأكد من نقاوة المركب، و إن كان غير ذلك فيجب أن نبحث عن نظام فصل آخر.

4. 3. كروماتوغرافيا الورق CP :

وهي تقنية تشبه نوعا ما كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، وقد تستعمل هذه التقنية مباشرة على المستخلص في حالة عدم غنائه بالمركبات الفلافونيدية . كما تستعمل لجمع و فصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي ، وفيها يعتمد الفصل على اختلاف معاملات التوزيع للمواد المراد فصلها بين طور ثابت، و هو عبارة عن طبقة رقيقة من الماء ممتزة على ورقة ترشيح لذلك فكل أنظمة الفصل تحتوي على الماء، و الطور المتحرك الذي يكون عادة مذيبا عضويا[38]. تستعمل هذه التقنية أساسا من أجل فصل المركبات الأكثر قطبية مثل الأحماض الأمينية، السكريات، و المركبات المتعددة الوظائف مثل الفينولات و البولي فينول على رأسهم الفلافونيدات.

- يستعمل في هذا النوع من الفصل ورق من نوع Whatman رقم II أو III، حيث يوضع الخليط بواسطة ماصة على كامل عرض الورقة قريب من الحافة العلوية مع ترك هامش صغير يقدر بـــ (2 سم)، و بعد أن يجف تغمس الورقة في المملص أين تبدأ الحزم في الهبوط تسلسليا، بعد جفاف الكروماتوغرام و بالاستعانة بمصباح UV يتم تحديد الحزم التي تقص إلى قطع صغيرة و تغمس في الميثانول؛ أين ترشح و يجفف الراشح لتجرى له عملية فحص متعددة بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للتأكد من نقاوة المركب الذي تم فصله.
- بعد تحديد الحزم يتم قصها إلى قطع صغيرة و وضعها في أرلان ثم نضيف لها المذيب الذي يكون عادة الميثانول، بعدها نرشحه و نبخر الرشاحة و نعيد العملية عدة مرات لتجميع اكبر كمية من المركب.

- و نستعمل في تقنية الفصل بتقنية CP مجموعة من الأنظمة :

نستعمل غالبا :

AcOH بنسب مختلفة 30,20,15 %

BAW $BuOH / AcOH / H_2O$ [4 : 1 :5] الطبقة العضوية

TBA	Tertiobutanol / AcOH / H_2O [3 : 1 :1]	الطبقة العضوية
MAW	MeOH / AcOH / H_2O [4 : 1:5]	
Forestal	AcOH / H_2O / HCl [30 : 10 : 3]	

4. 4. **كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء** (HPLC):

تقنية الــ HPLC تتركز على نفس مبدأ CC ، إلا أنها تتطلب استخدام ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمود ، و تعتبر كأحسن طريقة لفصل الخلائط المعقدة في وقت قصير، و هي لا تحتاج إلى كميات كبيرة من المستخلص وتعطي فصل جيد فيكفي أخذ حجم صغير من المستخلص حوالي (10 – 20 ميكرولتر) المذاب في الميثانول و يوضع داخل العمود ليعطينا فصلا جيدا لهذا فهي تستعمل في فصل المركبات الطبيعية.

و أهم الأنظمة المستعملة في هذه التقنية :

Acétonitrile / H_2O / ACOH (100 / 900 / 40)
Acétonitrile / H_2O / ACOH (800 / 200 / 40)

يجر المملص معه المركبات في العمود بصفة انتقائية فتنزل المركبات ثنائية السكر ثم تليها المركبات أحادية السكر و هذه الأخيرة تسبق عديمة السكر.إذن فكروماتوغرافيا السائل عالي الأداء تعطي معلومات بنيوية [41]، ففي حالة الفلافونيدات الأجليكونية التي تحتوي على مجموعات أكسجينية في الحلقة B فمثلا مركب الذي يحتوي على ثلاث مجموعات OH في الحلقة B يملص قبل الذي يحتوي على مجموعتي OH ، ثم يأتي الذي يحتوي على مجموعة OH واحدة في الحلقة B دائما [42]. لنحصل في في نهاية الفصل على كروماتوغرام يوضح عدد المركبات الموجودة في المستخلص، و لكل مركب زمن انحباس خاص به.

ملاحظة هامة :

من أجل تحقيق فصل جيد للمركبات يجب قبل البدء في أي عملية فصل القيام بعدة اختبارات كروماتوغرافية تحليلية أولية[43].

III- **التنقية** :

و هي عملية تلي الفصل باستعمال الورق أو الفصل باستعمال الطبقة الرقيقة و تأتي مكملة لعملية الفصل حيث يتم من خلالها التخلص من الشوائب العالقة في المركب كالسيليلوز و متعدد الأميد و غيرهما و هناك طريقتان :

1-على عمود من متعدد الأميدSC_6 : و يتم ذلك باستعمال Toluène كمذيب و إغنائه قليلا بالميثانول..

2-على عمود من السيفاداكس LH20: يستعمل في الغالب مملص واحد من بداية إلى نهاية التنقية؛ و هذا راجع إلى طبيعة (Sephadex LH20) حيث طريقة انتفاخه تختلف من مذيب لآخر[44].

ونستعمل MeOH كمذيب في غالب الأحيان.

و باتباع كل هذه الخطوات يكون قد تم فصل مركبات نقية جاهزة لدراستها بنيويا.

ثالثا: التعيين البنيوي:

الدراسة البنيوية للفلافونيدات:

نعتمد في الدراسة البنيوية الفلافونيدات على الخواص الكروماتوغرافية وهي معطيات أولية و تتمثل هذه الخواص في اللون الإستشعاعي و ثابت الانحباس أو معامل الإعاقة R_f.

كما نعتمد و بشكل كبير على طرق التحليل الطيفي والتي لها دور مهم في التعرف على بني المركبات عموما، و نخص منها مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، أطياف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و الكربون 13 و كذا مطيافية الكتلة.

I. الخواص الكروماتوغرافية :

1. اللون الاستشعاعي :

يعتبر لون المركبات الفلافونيدية تحت الأشعة فوق البنفسجية UV بمثابة المؤشر الدال على المعطيات التي تساعد على تحديد الصيغة البنيوية التقريبية للمركب الفلافونيدي ، إذ أن كل المركبات الفلافونيدية ترى تحت UV .بحيث توجد هناك علاقة بين اللون الاستشعاعي للمركبات و طبيعتها و كذا طبيعة مستبدلاتها، و الجدول -1- يبين ذلك.

الجدول – 1 العلاقة بين لون المركب و بنيته الكميائية وهذا تحت أشعة الـ UV[40، 45، 46، 43].

لون المركب الفلافونيدي تحت الأشعة	البنـــى المختلفـــة
بنفسجي - أسود	فلافون 7،6،5 أو 8،7،5 ثلاثي هيدروكسيل فلافون فلافونول مستبدل في الموضع 3 بعض الشالكونات
بنفسجي – نيلي	فلافونول أو فلافانول يملك هيدروكسيل في الوضع 3 فلافون أو فلافانون بدون OH في الوضع 5
أصفر أو أصفر باهت	فلافونول معOH حر في الموضع 3 و مع أو بدون OH في الموضع 5
برتقالي لامع	إيزو فلافون
أصفر مخضر	أورون
أخضر	بعض الشالكونات
أزرق مخضر	فلافانون بدون OH في الموضع 5

2. ثابت الانحباس R_f :

إن ثابت الانحباس يعبر عن النسبة بين المسافة المقطوعة، من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية، و المسافة المقطوعة من طرف المملص أو المذيب من نفس النقطة و هو يعطى بالعلاقة :

$$R_f = \frac{\text{المسافة المقطوعة من طرف المركب}}{\text{المسافة المقطوعة من طرف المملص}}$$

وترتبط قيمة R_f بطبيعة المجموعات الاستبدالية على المركب و تشكيله الفراغي[43، 47]، و باستعمال شواهد معروفة يمكننا التمييز ما إذا كان المركب أجليكونا أو جليكوزيديا، بل نصل إلى معرفة ما إذا كان أحادي، ثنائي أو ثلاثي السكر[43، 48].

إن السلوك الكروماتوغرافي للفلافونيدات كل حسب بنيته يتأثر و يتغير حسب طبيعة المذيب ما إذا كان عضوي أو مائي حيث يسمح لنا هذا التغيير بتعيين أو تحديد أولي لمستبدلات الهيكل الفلافونيدي حيث أن :

الجدول-2- البنى الفلافونيدية و R_f الموافق لها:

البنية الفلافونيدية	R_f
الزيادة في عدد المجموعات هيدروكسيلية OH	نقصان قيمة R_f في الأنظمة العضوية .
الجليكوزيدات	R_f يزداد في الأنظمة المائية[46، 48] . R_f ينقص في الأنظمة العضوية[46، 48] .
وجود مجموعات ميثوكسي استبدال مجموعة OH- بمجموعة CH_3O-	زيادة في قيمة R_f في الأنظمة العضوية[49].

وتتأثر قيمة R_f بالشروط التجريبية الكروماتوغرافية نذكر منها : درجة الحرارة، الرطوبة، طبيعة المادة الدامصة، طبيعة المذيب، تركيز العينة، سمك الطبقة...[7، 50، 45، 51]، لذلك فهي تعد قيمة مميزة، و إنه لمن الضروري عند مقارنة مركب ما بواسطة مركبات أخرى معروفة أن نستعمل نفس الكروماتوغرام في نفس الشروط.

من خلال قيم R_f يمكننا أخذ فكرة أولية عن المركب الفلافونيدي المفصول لنلجأ بعدها إلى طرق التحليل الطيفي.

II. **طرق التحليل الطيفي:**

1- طيف الأشعة فوق البنفسجية UV :

وهي تقنية تعطينا معلومات قيمة عن بنية المركب، ومواقع المستبدلات على الهيكل الفلافونيدي، وهي تقنية سهلة ، ولا تحتاج الى كميات كبيرة من المركب المراد تحليله.

مبدأ هذه التقنية يتركز على أنه لكل مركب فلافونيدي طيف امتصاص خاص به في وسط كحولي و يتغير هذا الأخير بإضافة كواشف معروفة سواءا كانت قواعد قوية أو أحماض[52]. فإضافة كواشف مختلفة مثل ($NaOAc + H_3BO_3$)، أوكلوريد الألمنيوم ($AlCl_3$) إلى الوسط الميثانولي للمركب الفلافونيدي يعطي ألوانا مميزة مع هذه الكواشف، و هذه الألوان تكون نتيجة تكوين معقدات مع هذه الكواشف، و يمكن ملاحظة إزاحة حزم الامتصاص التي تعطي دلالات جيدة عن نوع المجموعات و مكان ارتباطها.

وتتلخص مراحل و أطوار الفحص في[43 46 48 53 54] :

1- نضع ميثانول + قطرات من المركب في الخلية ثم نسجل الطيف.

2- نفس الخلية السابقة + قطرة أو 2 من NaOH و نسجل الطيف.

3- نسجل نفس الطيف السابق بعد 5 دقائق.

4- ميثانول + قطرات من المركب ونضيف للخلية قطرات من $AlCl_3$ و نسجل الطيف.

5-نضيف للخلية السابقة قطرات من HCl و نسجل الطيف.

6- ميثانول + قطرات من المركب ونضيف للخلية NaOAc (على شكل صلب) نسجل الطيف.

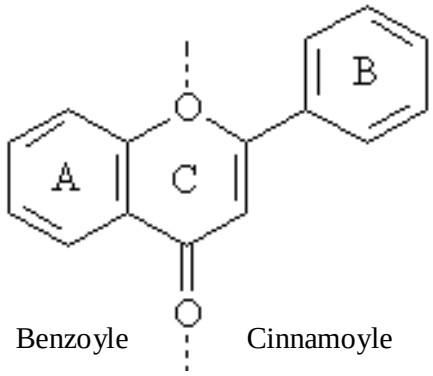
7- نضيف H_3BO_3 لنفس الخلية السابقة و نسجل الطيف.

أ- طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي :

تعطي المركبات الفلافونيدية المحتوية على كربونيل في الموقع 4 عصابتي امتصاص في وجود الميثانول،

العصابة I: ناتجة عن فرع Cinnamoyle المتشكل من الحلقة B مع المجموعة اينون، تكون هذه الحزمة متواجدة ضمن المجال 320-380نم.

العصابة II: ناتجة عن فرع Benzoyle الناتج عن ترافق وظيفة الكربونيل و الحلقة العطرية A ، و تظهر هذه الحزمة في المجال 240-280نم [53]. كما هو مبين في الشكل –4-.



الشكل –4- ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقتين البنزينيتين A و B .

إن التمييز بين بنية (الفلافون) و (الفلافونول) يكون من خلال وضعية العصابة I في الطيف الميثانولي[55]، فالحزمة I تظهر بين (305 –350 نم) بالنسبة للفلافون و بين (350 –385 نم) بالنسبة للفلافونول، كما أن المقارنات التي تمت بين أطياف مختلف الفلافونات و الفلافونولات أعطت ما يلي[56] :

استبدال مجموعة الهيدروكسيل بمجموعة ميثوكسيل أو **O-sucre** في المواقع 3 ،7،'4 ؛حيث يحدث انزياح هبسوكرومي للعصابة I يتراوح بين (3- 10 نم) في حالة استبدال في الموقع'4، و من (5 – 15 نم) لكلا العصابتين في حالة استبدال في الموقع 7، و انزياح من (12 – 17 نم) في حالة الموقع 3 مستبدل، و يكون التأثير ضعيفا في حالة وجود مستبدلات في المواقع الأخرى.
يتأثر الطيف بطبيعة السكر المرتبط بالأجليكون في حالة سكر الرامنوز فقط[7، 46].

الجدول –3- يوضح مكان امتصاص الحزمتين I وII لبعض انواع الفلافونيدات في الوسط الميثانولي .

الجدول –3-

نوع الفلافونيد	العصابة II(نم) λ_{max}	العصابة I(نم) λ_{max}
فلافون	280 – 250	350 – 310
3- مستبدل"OHفلافونول "	280 – 250	360 – 330
3- حر "OHفلافونول "	280 – 250	385 – 350
إيزوفلافون	275 – 245	330 – 310
Dihydroflavonolفلافانون و	295 – 275	330 – 300
شالكـون	270 – 230 شدة ضعيفة	390 – 340
أورون	270 – 230 شدة ضعيفة	430 – 380
أنثوسيانيدين أو أنثوسيانين	280 – 270	560 – 456

تساعدنا إضافة الكواشف المختلفة على تحديد انواع المجموعات البديلة، وكذا مكان ارتباطها في الهيكل الفلافونيدي.

ب. <u>في وجـــود NaOH</u> :

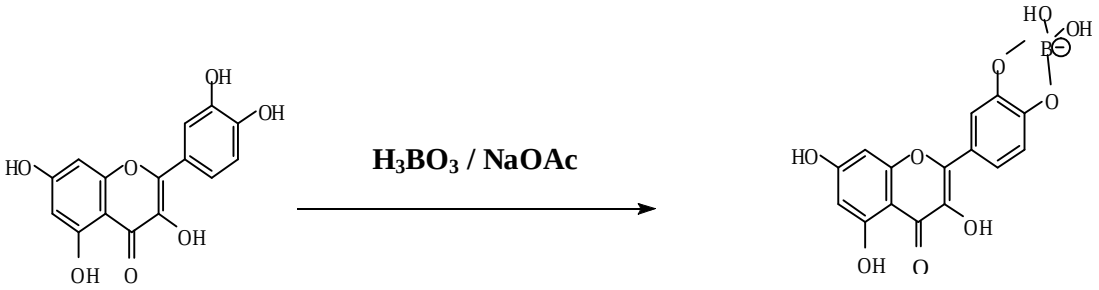
يعتبر NaOH أو (NaOMe) أساس قوي يؤين كل هيدروكسيلات الفلافونيد، و إضافتها لـــ (مركب + ميثانول) تحدث إزاحة باثوكرومية لكل الطيف نتيجة تأثيرها على المجموعات الهيدروكسيل خاصة تلك المجودة في الموضع 7، 3، '4 ، و تأثيرها يظهر خاصة على العصابة I.

ت. <u>في وجـــود NaOAc</u> :

و لأنها قاعدة ضعيفة فإنها تؤين الهيدروكسيلات الأكثر حامضية فقط و التي توجد في المواقع 7، 3، '4. و تعتبر NaOAc كاشفا نوعيا للهيدروكسيل الموجود في الوضع 7.

ث. <u>في وجود $NaOAc+H_3BO_3$</u>:

حالة وجود مجموعة أرثو ثنائي الهيدروكسيل فإن H_3BO_3 + AcONa يشكل معقدا على بنية الفلافونيد، و يؤدي هذا إلى انزياح باثوكرومي للعصابة I حالة وجود '3، '4 أورثو ثنائي OH [43] (مخطط- 5- تشكيل معقد بعد اضافة $NaOAc+H_3BO_3$).



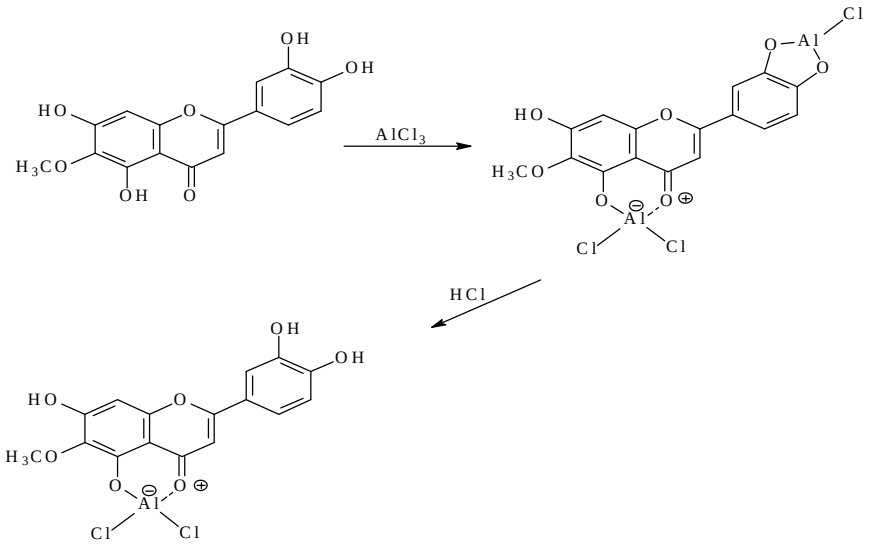
مخطط-5- تأثير خلات الصوديوم مع حامض البوريك على بنية الفلافونيد

ج. <u>في وجود $AlCl_3$ و $AlCl_3 + HCl$:</u>

يكون كلوريد الألمنيوم ($AlCl_3$) معقدات مع المركبات التي تحتوي على كربونيل في 4 و هيدروكسيل الموقع 3 أو 5، أو جملة أرثو ثنائي الهيدروكسيل.

حيث يشكل مع الأولى معقدات ثابتة، و غير ثابتة مع الثانية و ذلك بعد إضافة HCl [48]، و عليه فإن طيف الامتصاص في وجود $AlCl_3$ يمثّل تأثير كل المعقدات الثابتة و غير ذلك. بينما طيف الامتصاص في وجود $AlCl_3 + HCl$ فهو يمثّل طيف امتصاص المعقدات الثابتة فقط.

و المخطط-6- يوضح ذلك.



المخطط-6- تأثير $AlCl_3$ و HCl على بنية الفلافونيد

يمكن تلخيص كل هذه المعلومات في الجدول-4- :

جدول- 4 - تأثير الكواشف على طيف UV :

الكاشف	الإزاحة الكيميائية		الدليل
	العصابة I	العصابة II	
MeOH	350-310 360-330 385-350	280-250 280-250 280-250	Flavone Flavonol(3-OR) Flavonol(3-OH)
NaOMe / NaOH	استمرار تناقص شدة الإمتصاص بمرور الزمن (تفكك الطيف)		3,4'-OH أو أرثو ثنائي OH على الحلقة A أو ثلاثةOH متجاورة على الحلقة B
	+45 إلى 60 دون نقصان في شدة الإمتصاص		4'-OH
	+45 إلى 60 مع نقصان في شدة الإمتصاص		3-OH, 4'-OR
	عصابة جديدة بين 320-335		7-OH
NaOAc		+ 5 إلى + 20	7-OH
		إزاحة صغيرة	7-OH مع مستبدل أكسجيني في C_6 و/أو في C_8
		طيف يتفكك بمرور الوقت	5,6,7 ; 5,7,8 ; 3,3',4' tri-OH
	Δλ(I) < Δλ(I) NaOMe NaOAc		7-OR (حالة 4'-OH flavones و flavonols فقط)
$NaOAc + H_3BO_3$	+12 إلى + 36 إزاحة باتوكرومية ضعيفة		أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (6, 7 أو 7, 8)
$AlCl_3$	+30 إلى +40 مقارنة بطيف $HCl+ AlCl_3$ +20 إلى +25 مقارنة بطيف $HCl + AlCl_3$		**<u>أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة *B*</u>** **<u>أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة *A*</u>** **<u>(إضافة إلى أرثو *di-OH* على الحلقة *B*)</u>**
$AlCl_3 + HCl$	+17 إلى +20 +35 إلى +55 +50 إلى +60 دون تغير		5-OH مع وجود مجموعة أكسجينية في C_6 5-OH مع عدم وجود مجموعة أكسجينية في C_6 3-OH أو 3-OH و 5-OH إمكانية 5-OH و مجموعة prenyl في C_6

2- مطيافية الكتلة :

تعتبر مطيافية الكتلة من التقنيات التي تستعمل للتعرف على البنية الكميائية للفلافونيدات، وذلك من خلال التعرف على الوزن الجزيئي و مختلف الروابط في المركب الفلافونيدي وذلك بدراسة مختلف الايونات الناتجة عن انشطاره، كما تمكننا من تحديد و تعيين مواقع ارتباط السكر بالأجليكون أي C-sucre أو O-sucre [40] وهي لا تتطلب كميات كبيرة من المركب الفلافونيدي ، و من بين التقنيات المستعملة في هذا المجال :

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

أ- تقنية القذف الإلكتروني IE :

تستعمل هذه التقنية خاصة في حالة المركبات الأجليكونية[59، 60]، حيث أن الجليكوزيدات لا تتحمل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية نتيجة للمستبدلات السكرية الموجودة بها، و نتيجة لهذه الطاقة التي يكتسبها الأيون الجزيئي ($M^{+\cdot}$) تحدث له تشظيات لنحصل بموجبها على الأيونات المميزة للمركب المدروس.

في الأخير فإن طيف الكتلة IE للأجليكونات، خاصة الفلافون و الفلافونول يحوي على الأيون الجزيئي $M^{+\cdot}$ و تكون غالبا القمة الأساسية، كما يحتوي على شظايا أخرى تختلف باختلاف نوع الفلافونيد.

أما بالنسبة للجليكوزيدات من النوع C-Sucre فإن طيف IE لا يحتوي على الأيون الجزيئي.

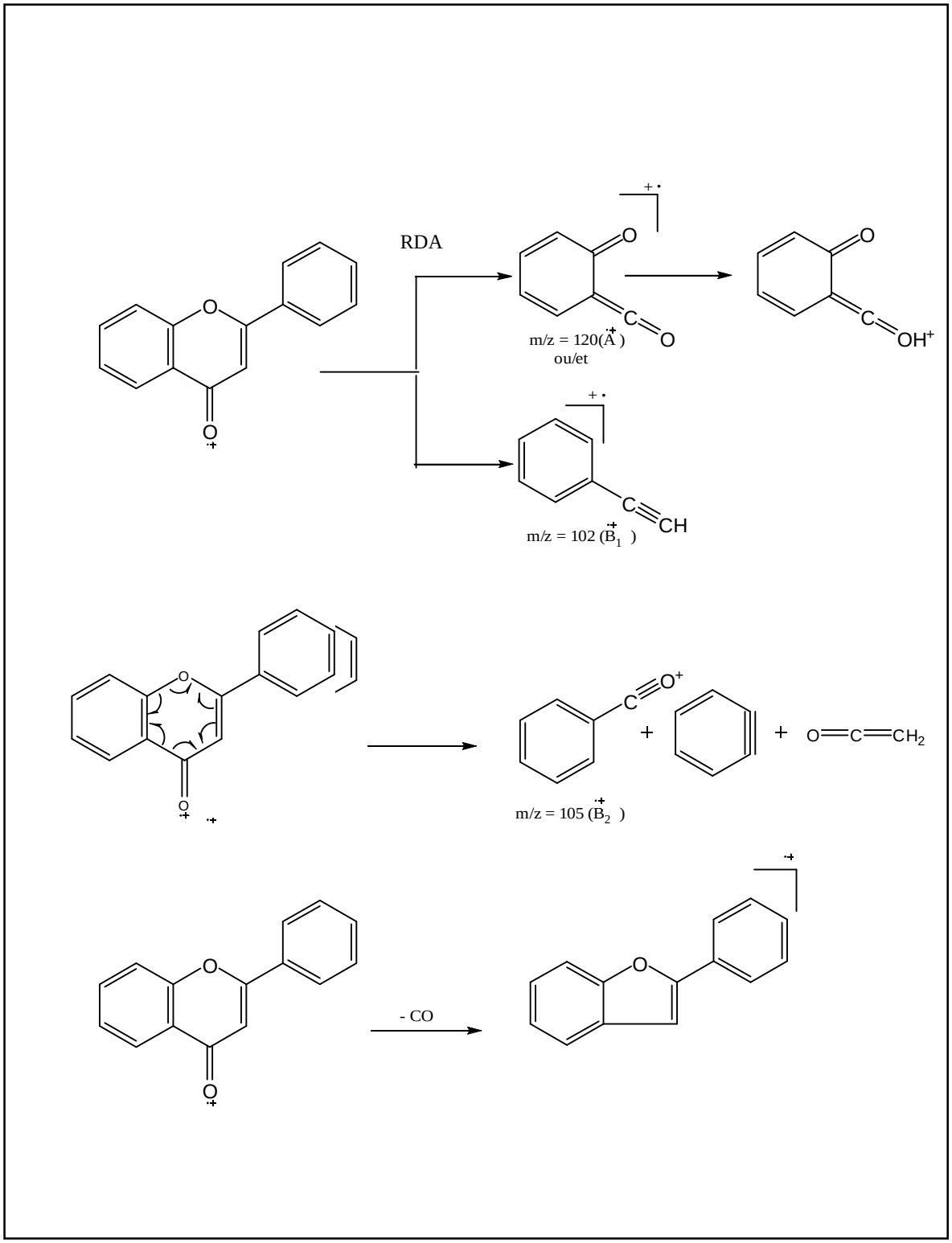
ب- تقنية القذف السريع بالذرات FAB :

تعتبر هذه التقنية من أفضل التقنيات المستعملة في حالة المركبات الجليكوزيدية، فمن خلالها يتم تأيين المركبات دون تسخين، مما يسمح بثباتها و دراستها و عليه فإن تطبيقها يمكننا من الحصول على معلومات فيما يخص طبيعة الجزء السكري، كما تسمح لنا بمعرفة الأيون الجزيئي[61].

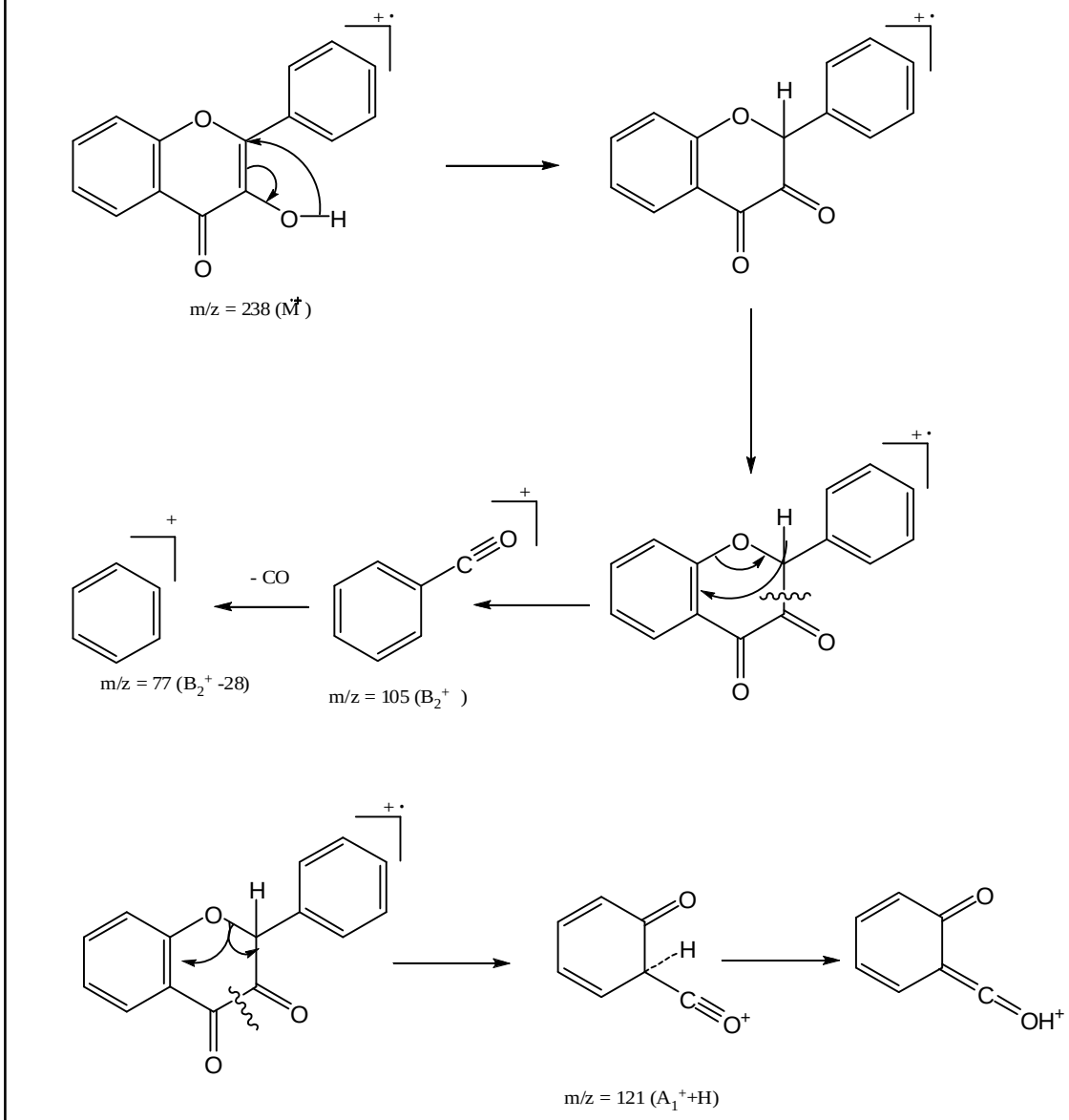
ج- تقنية الإلكتروسبراي electrospray :

تختلف عن سابقتها في الطريقة العملية و تستعمل هذه التقنية للمركبات الطيارة و المركبات التي تنكسر بسهولة مثل O-Sucre. و يتميز طيف الكتلة لهذه التقنية بوجود قمة الأيون الجزيئي $[M+H]^+$ أو $[M-H]^-$.

ومن أهم الإنشطارات التي تحدث على الفلافون و الفلافونول موضحة في الشكلين 1 و 2.



الشكل - 1 : اهم الانشطرات التي تحدث على الفلافون.



m/z = 238 (M+·)
- CO
m/z = 77 (B2+ -28)
m/z = 105 (B2+)
m/z = 121 (A1++H)

الشكل -2: اهم الانشطارات التي تحدث على الفلافونول .

3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي :

وتعد من التقنيات الهامة لتحديد البنى و تستخدم مطيافية الرنين المغناطيسي النووي في نطاق واسع لدراسة المنتجات الطبيعية كالفلافونيدات فمن خلالها يمكن معرفة صيغة المركبات.

أ- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^{1}H:

تسمح مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون بإعطاء عدة معلومات منها :

- تموضع البروتونات على الجزيئ.
- تحديد عدد البروتونات من خلال التكامل.
- تحديد عدد مجموعات الميثوكسيل.
- تعيين عدد، طبيعة، و وضعية السكريات الموجودة .

و فيما يلي جداول 6، 7، 8 تبين بعض الانزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة A و B [48].

البروتونات الحلقة A :

جدول - 5 - قيم الإنزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A:

الفلافونيد	H-5	H-6	*H-7*	H-8
5,7 – OH	-	d (J = 2.5 Hz) δ (6.2 – 6.0 ppm)	-	d (J = 2.5 Hz) δ (6.5 – 6.3 ppm)
5-OH, 7-OR (R = sucre)	-	d (J = 2.5 Hz) δ (6.4 – 6.2 ppm)	-	d (J = 2.5 Hz) δ (6.9 – 6.5 ppm)
5,6,7 -OR (R = H, sucre)	-	-	-	δ = 6.3 ppm (s)
5,7,8 –OR (R = H, sucre)	-	δ = 6.3 ppm (s)	-	-
7- OR (R = H, sucre)	d (J = 9 Hz) δ = 8 ppm	dd (9 Hz, 2.5 Hz) δ = 6.7 –7.1 ppm	-	d (J = 2.5 Hz) δ (6.7 – 7.0 ppm)

بروتونات الحلقة B :

تتموضع بروتونات هذه الحلقة في المنطقة ذات الإزاحة (6.7 – 7.9 ppm)، و تتغير قيم الإزاحة حسب المستبدلات الموجودة على الحلقة و كذا درجة تأكسد الحلقة C و حسب طبيعة الفلافونيد .

- **حالة الحلقة مستبدلة في '4** : الجدول - 6 - يوضح ذلك[48] :

جدول - 6 - الإزاحة الكيميائية لبروتونات الحلقة B حالة الحلقة مستبدلة في '4 :

نوع الفلافونيد	H-2' , H-6'	'3' , H-5H-
فلافون (4'-OR)	δ (7.7 - 7.9 ppm) d (J = 8.5 Hz)	δ (6.5 - 7.1 ppm) d (J = 8.5 Hz)
فلافونول (4'-OR)	δ (7.9 - 8.1 ppm) d (J = 8.5 Hz)	δ (6.5 - 7.1 ppm) d (J = 8.5 Hz)

- **حالة الحلقة مستبدلة في '3 و'4**: البروتون الموجود في '5 يظهر على شكل ثنائي نتيجة تزاوجه تزاوج أورثو مع بروتون '6، بثابتة تزاوج تقدر بـــ 8.5 هرتز.

أما البروتونات 'H-2 و 'H-6 فإنها تظهر كما هو موضح في الجدول - 7- [48، 63] :

جدول - 7 - الإزاحة الكيميائية للبروتونات '2 و'6 للحلقة:

نوع الفلافونيد	H-2'	H-6'
فلافون (3'-OH, 4'-OMe ; 3',4' OH ; 3'-OMe, 4'- OH)	δ (7.2 - 7.3 ppm) d (J = 2.5 Hz)	δ (7.3 - 7.5 ppm) dd (J = 8.5, 2.5 Hz)
فلافونول (3'-OH, 4'-OMe ; 3',4' OH)	δ (7.5 - 7.7 ppm) d (J = 2.5 Hz)	δ (7.6 - 7.9 ppm) dd (J = 8.5, 2.5 Hz)
فلافونول (3',4' OH 3'- OMe, 4'- OH ;)	δ (7.6 - 7.8 ppm) d (J = 2.5 Hz)	δ (7.4 - 7.6 ppm) dd (J = 8.5 , 2.5 Hz)

- **حالة الحلقة مستبدلة في '5 ،'4 ، '3** : إذا كان " OR " الموجود في الموقع'3 نفسه في '5 فإن البروتونين : 'H-2 و 'H-6 يكونا متكافئين و يظهران كإشارة أحادية بين (6.5 – 7.5 ppm)، و نحصل على إشارة ثنائية ذات ثابتة تزاوج تقدر بـــ J = 2.5 Hz ، في حالة ارتباط مجموعة ميثوكسي أو سكر بـــ 'C-3 أو'C-5 و المستبدلات الأخرى OH مثلا [64].

<u>بروتونات الحلقة C</u> :

في حالة الفلافون يظهر البروتون H-3 كإشارة أحادية في حدود 6.3 ppm أين تتداخل هذه الإشارة مع البروتونين H-6 أو H-8 للحلقة A [65].

ب- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C :

يمكن لهذه التقنية أن تزودنا بالعديد من المعلومات الخاصة بالهيكل الكربونيلي للجزيء[43] من عدد الكربونات و الوسط المحيط بها كما تساعدنا في تحديد طبيعة الرابطة بين السكر و الفلافونيد، خاصة التوصل إلى التعرف على جليكوزيدات الفلافونات و الفلافونولات، حيث أنها تقدم الكثير من المعلومات فيما يتعلق بطبيعة و مكان ارتباط الوحدة الجليكوزيدية.

كما يمكننا التمييز بين هياكل المركبات الفلافونيدية اعتمادا على اطياف الكربون للذرات 2 و3 و 4 ويتضح مكان الانزياح الكميائي للذرات 2، 3، 4 للفلافونات والفلافونولات في الجدول 8.

الجدول- 8 : الازاحة الكميائية لذرات الكربون للفلافونات و الفلافونولات[43] .

المركب الفلافونيدي	C-2	C-3	C-4	
فلافون	165 - 160.5	130.0 - 111.8	184.0 - 176.3	δ ppm
فلافونول	150.0 - 145.0	139 - 136.0	177.0 - 172.0	δ ppm

4- الإماهة الحمضية :

تستعمل هذه الأخيرة لمعرفة طبيعة السكر المرتبط بالمركبات الغليكوزيدية المعزولة.

$$Aglycone + (sucre) \xrightarrow[100°C]{H^+} glycoside \quad Flavonoide$$

وتتلخص خطوات هذه العملية في :

1- نأخذ كمية قليلة من الفلافونيد الجليكوزيدي المذاب في الميثانول، أو أي مذيب آخر ثم يضاف له 2 ملل من حمض الكلور بتركيز 2 أو 4 نظامي في أنبوبة اختبار: و يسخن المزيج في حمام مائي لمدة ساعة كاملة تحت درجة حرارة 100°م.

2- يستخرج الأنبوب و يترك ليبرد ثم نقوم بعملية استخلاص من نوع سائل-سائل، نستعمل أولا الإيثر ثنائي الإيثيل حيث نضع 2 ملل من المذيب العضوي في الأنبوب و نخلط جيدا ثم نفصل

الطبقة العضوية عن المائية، و تكرر العملية ثلاث مرات، حيث يتواجد الجزء الأجليكوني في الطبقة العضوية و السكر يكون في الطور المائي، و للتأكد من عدم بقاء أي جزء أجليكوني أو جليكوزيدي لم يتميه نقوم بعملية استخلاص ثانية بأستات الإيثيل ثلاث مرات و بواسطة البوتانول مرة أو أكثر.

3- تجمع الطبقات العضوية كلا على حدى و تركز تحت ضغط منخفض ثم يتم تحليل الجزء الأجليكوني المنفصل عن الجليكوزيد بتسجيل طيف UV في الميثانول و أحيانا نلجأ إلى اجراء السلسلة الطيفية مع كل الكواشف و هذا حسب موضع السكر في المركب، كما نقوم بإجراء اختبار كروماتوغرافي (CCM) مع شواهد أجليكونية، نشير إلى أنه يكفي أن نحلل الطور إيثر ثنائي الإيثيل.

4- من أجل التعرف على الجزء السكري المنفصل عن الجليكوزيد يتم أولا تحضير الصفيحة الكروماتوغرافية، التي تكون من السيليكاجال، ترش هذه الأخيرة بمحلول (NaH_2PO_4) بتركيز 0.1 نظامي و تترك لتجف في الهواء ثم توضع في الفرن لمدة ساعة تحت درجة 100°م، فتصبح الطبقة جاهزة للاستعمال.

5- بواسطة ماصة شعرية توضع نقاط من الطبقة المائية المحتوية على السكر حتى تركز مع شواهد سكرية معروفة، و نحضر النظام أستون - ماء (9 : 1) لتمليص الكروماتوغرام، بعد ذلك يجفف و يرش بكاشف مالونات الأنيلين و يترك ليجف ثم يوضع في الفرن لمدة 5 دقائق دائما تحت درجة حرارة 100°م أين تبدأ بقع السكريات بالظهور فتكون بنية في الضوء المرئي و صفراء تحت مصباح UV. كل سكر يكون له R_f خاص به.

6- تتأثر الإماهة الحمضية بـــ :

- **§** قوة الحمض المستخدم.
- **§** نوع الجزء السكري الموجود.
- **§** موضع ارتباط السكر.
- **§** النواة الفلافونيدية.

.

المـــراجع:

[1]. El Hazimi, H. (1995). Natural Products. Université du Roi Saoud, Djedda .

[2] Rauha, J.P., Vuorela, H., Kostiainen, R.(2001). J. Mass Spectrom. 36, 1269.

[3]. Harborne, J. B. (1988). The flavonoids. Chapman and Hall, London. 539.

[4]. Harborne, J. B. (1988). The flavonoids. Chapman and Hall. London. 620.

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

[6]. Richtre, G. (1993). Métabolismes des végétaux (physiologie et biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne CH-1015.

[7]. Riberau-gayou, J.B. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.

[8] Trevor Robinson.(1957). The organic constituents of higher plants, Sixth Edition. 188.

[9]. Harborne, J. B. (1975). The flavonids. Ed. J.B. Harborne et al. Academic Press. part. 2.

[10]. Bruneton, J .(1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 5 ème Edition. TEC & DOC.

[11]. Ahmed, Z. F., Rizk, A. M., Hamouda, F. M. (1970). Postep dziedzinie Lzkurosl. pr. Ref. Dosw. Wygloszone symp. 20-23.

[12]. Gorkmann, G.B. (1980). Dangelmayr-Biochem Genet. 18, 519.

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

[14]. Wollenweber, E., Jay, M. (1988). Flavones and flavanols in «The flavonoids».Ed. Harborne, J. B. Chapman and Hall, London 233-295.

[15]. Sutter, A. (1975). Arch. Biochem. Biophys. 170, 847.

[16]. Dendougui, H. (2002). Etude du métabolisme flavonique et terpénique de quelques plantes des Dayas du Sahara Algérien. Thèse de doctorat d'état en chimie organique, université Mentouri- Constantine.

[17]. Harborne, J.B. (1964). In biochemistry of phenolic compounds. Academic Press, New-York.

[18]. Harborne, J. B., Smith, D. M. (1978). Anthochlor and other flavonoids as honey guides in the Compositae. Biochem. Syst. & Ecol. 6(4), 287-291.

[19]. Harborne, J. B., Smith, D. M. (1978). Correlations between anthocyanin chemistry and pollination ecology in the Polemoniaceae. Biochem. Syst. & Ecol. 6(2), 127-130.

[20]. Mc Lure, J. W., Physiology and function of flavonoids Ed. Harborne , J. B., Mabry, T. J. M. (1975). the flavonoids. Chapman and Hall, London. 970-1055.

[21]. Brehm, B. G., Krell, D. (1975). Flavonoid localization in epidermal Papillae of flower petals, a specialized adaptaion for ultra-violet absorbtion. Science, New York, 190, 1221-1223.

[22]. Wagner, H., Witer, M., Buer, R. (1986). Plant Med. 184-187.

[23]. Barberan, F., Tomas-Lorente, F., Garcia-Grau, M. (1988). The Wastes of the industrial treatment of *Salvia lavandulaefolia* as a source of biologocally active flavonoids. Fitoterapia, 59, 62-64.

[24]. Grisebach, H. (1957). Z. Naturforsch. C, 12 b, 277 .

[25]. Pitta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042.

[26]. Szent-Gyorgyi, A., Rasznyak, S. (1936). Nature.138. 27.

[27]. Manthey, A., John, N., Guthrie, K. (2001). Curr. Med. Chem. 8,2, 135-153.

[28]. Zaat, S. A. J., Wijffelman, C. A.,Spaink, H. P, Van Brussel, A. A. N., Okker, R. J. H. and Lugtenberg, B. J. J. (1987). Induction of the nod A promoter of *Rhizobium leguminosarum* sym Plasmid PRL 1JI by plant flavanones and flavones. J. Bacter. 169(1), 198-204.

[29]. Jerry W. Mclure. (1975). The flavonids. Ed. Harborne, J,B., et al. Academic Press. part 2.

[30]. Lebreton, P et al. (1967). Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides. Chim. Anal. France, 49, 375-383.

[31]. Boutard ,B. (1972). Contribution à l'étude des flavonoides de *Potamogeton natans* L. et autres fluvales. Thèse de doctorat de spécialité (3 ème cycle) Lyon.

[32]. Gonnet, J. F., Jay, M., Voirin, B., Lebreton P. (1973). Récent développement dans l'analyse des aglycones flavoniques. Assemblée générale du « groupe polyphénols». Le pont de la Morge, suisse.

[33]. Jay, M. (1975). Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimio-taxonomique. Phytochemistry .14, 1605-1612.

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

[35]. Gonnet, J. F. (1973). A propos de la photographie en couleur de la chromatographie sur couches minces en lumière de Wood. J. Chromato. 68, 192.

[36]. Hassan, A. (1976). Contribution à l'étude biochimique de trois représentants de la tribu des lotées: *Dorycnium* Vill, *Bonjeania* teichenb., *Lotus* L. (Légumineuses). Thèse de doctorat de spécialité (3ème cycle), Lyon.

[37]. Yahiaoui, S., Hraoubia, R. (1993). Structure de la matière. 4 ème edition.

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

[39]. Dey, P. M., Harborne, J. B. (1989). Methods in plant Biochemistry. Academic Press. Vol I.

[40]. Markham, K. R. (1989). Flavones, Flavonols and their glycosides in « methods in plant biochemistry». Academic Press. Vol I (Chapitre 6), 197-232.

[41]. Combier, H., Jay, M., Voirin, B., Lebreton, P. (1974). Influence des -6 (et/ ou) des –8 substitution sur la comportement spectrométrique et chromatographique des flavonoides Assemblée du (Groupe polyphénols). Lyon, France.

[42]. Browning, D.R. (1971). Chromatographie, Ed . Masson et Cie.

[43]. Markham, K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Acadmic Press London.

[44]. Hostettmann, K., Hostettmann, M. (1982). Isolation techniques of flavonoids in "The flavonoids". Harborne, J. B ., Maby, T. J. Ed. Chapman and Hall London, 1-18.

[45]. Randerath, K. (1971). Chromatographie sur couches minces. Ed . Gauthier-Villars. Paris-6ème.

[46]. Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H. (1975). The flavonoids. Ed. Chapman and Hall, London Tome (I, II).

[47]. Berthillier, A. (1972). La chromatographie et ses applications. Dunod.

[48]. Mabry, T.J., Markham, K. R., Thomas, M.B. (1970). The systhematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin. 13.

[49]. Combier, H. (1968). Thèse, université Claude Bernard, Lyon I.

[50]. Loiseleur, J. (1963). Techniques de laboratoire. Ed. Masson et Cie. Paris. Tome I, 634.

[51]. Bouillant, M. L. (1976). Structure et synthèse de C-glycosyldihydroxy-5,7- flavones. Thèse de doctorat d'état en Sciences, Lyon.

[52]. Jurd, L. (1962). Spectral Properties of flavonoid compounds in T.A Geissman, Biochem. Biopys. Acta, 151-154, 427-440.

[53]. Jurd, L., Horwitz, R. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds. In « the chemistry of flavonoid compounds», (Geissman T. A). Pergamon Press, New-York. 107-155.

[54]. Voirin B. (1983). UV. Spectral differenciation of 5-hydroxy-and 5- hydroxy-3-methoxyflavones with mono -(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B-rings. Phytochemistry. 22 (10), 2107-2145.

[55]. Mabry, T. J. (1969). In Perspectives in Phytochemistry. Ed. Harborne, J. B., Swain, T. Academic Press, London. 13.

[56]. Mabry , T. J. (1963). Perspectives in Phytochemistry. Ed. Harborne, J. B. Academic

Press.

[57]. Markham, K.R., Mabry, T.J. (1975). in (the flavonoids). Ed : Harborne, J.B., Mabry, T, J., Mabry .H. Chapman and Hall, London. 45.

[58]. Wollenweber, E., Jay. M. In (the flavonoids). Ed : Harborne, J.B. Chapman and Hall, London. 232.

[59]. Gonnet, J.F. (1989). Apport de la biologie micromoléculaire (flavonoides) à la compréhension de la structure et du fonctionnement de l'espèce allogame *Centaurea montana* (composées) . Thèse de doctorat d'état, université Claude- Bernard, Lyon I.

[60]. Audier, H. (1966). Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse, Bull. Soc. Chim. Fr. 9, 2892-2899.

[61]. Becchi, M., Fraisse, D. (1989). Fast atom bombardment and fast Atom Bombardment, Alision Activated- dissociation /mass-analysis ion Kinetic energy analysis of C- Glycosidic flavonoids. Biomed. Environm. mass electrom. 18, 122-130.

[62]. Pawank. A. (1992). NMR spectroscopy in structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry. 10, 3307-3330.

[63]. Markham, K.R., Geiger, H. (1994). ^{1}H NMR Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In (the flavonoides) Ed. Harborne, J. B (1993) Chapman and Hall, London.

[64]. Markham, K. R., Mabry, T. J. (1975). The flavonids. Ed. Harborne, J.B et al. Chapman and Hall, London.

[65]. Mabry, T. J. (1969). The Ultra-Violet and nuclear magnetic resonance analysis of flavonoids perspectives in Phytochemistry, Ed. Harborne, J. B. 1-45.

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

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

الفصل الثاني

لمحة ببليوغرافية عن الجنس Hypericum

I- لمحة ببليوغرافية عن الجنس ***Hypericum***:

1- تمهيد:

يتألف جنس *Hypericum -(L Clusiaccae)* من 400 نوع و كلمة *Hypericum* مشتقة من كلمتين الإغريقيتين :

Hyper: معناها: أكثر من – ما فوق

Eikom: معناها الصورة

لكن المعنى الأكثر إحتمالا ينسب إلى ظاهرة تغيير اللون: حيث أن الأزهار الصفراء تصبح حمراء بفعل الدلك، و السبب يعود إلى وجود صباغ أحمر مشع يدعى: *Hypericine*[1].

لعبت نبتة *Hypericum* دورا هاما في ميدان الطب التقليدي فكان إستعمالها في القضاء على العدوى الفيروسية و البكتيرية و استعملت في علاج مختلف الإلتهابات و الندبات الناجمة عن الجروح كما أنها تحد من القلق[2].

منذ زمن طويل، تم إستخدام الأطراف المزهرة للنوع الياباني *H-japonium* في علاج الأمراض العقلية، كما أنها مضادة للإلتهابات البكتيرية و مختلف الأورام السراطانية[3].

أما نوع *H.erectum* فله فعالية ضد الإلتهابات البكتيرية و الورمية [4] .

لقد بينت دراسات حديثة أن الأجزاء الهوائية للنبتة المتعلقة بالنوع: *H-Hircinum* تكون جد نشطة في القضاء على الإلتهابات البكتيرية إذ تظهر هذه الفعالية خصوصا ضد البكتيريا G^+

(*Staphylacoccus aureus , listeria monocytogenes , bacillus subtilis*)

و البكتيريا G^- *(Pseudomonas aeroginosa – salmonella entreridis)*

في حين هذه المستخلصات النباتية لا تملك أي فعالية مضادة للفطريات [5].

و قد استعملت النبتة من نوع *H.Perforatum* في فرنسا لكونها مضادة للتعفن كما أنها تساعد على لم الجروح بظهور الذمل، ويحتوي هذا النوع على كينونات حلقية متعددة ذات فعالية ضوئية و بالتالي فهي فعالية في القضاء على الإلتهابات الفيروسية [6].

و قد تم التأكد من خاصيتها المضادة للبكتيريا على الخلايا التجريبية (*In vitro*).

أما بالنسبة للصباغ: *Hyperfornie* فإن بنيته الكيميائية قريبة من مركبات *Cetoenols* المضادة للبكتيريا إذ تتمركز هذه المركبات في مخاريط الكوة. والمادة الفعالة في النبتة تمر إلى الإنسان و تجعله يقاوم مختلف الإنهيارات العصبية [7] .

وقد قام *Daudt* و رفقاؤه [8] باختبار ثلاث أنواع من *Hypericum* و هي:

H.myrianthum – H.caprifoliatum – H.brasilien و التي يعود أصلها إلى جنوب البرازيل.
و قد تم تقييم فعاليتها المضادة للإنهيارات من خلال إختبار خاص *(lanage focée)*، إذ تبين أن *H.caprifoliatum* هو النوع الوحيد الذي أبدى فعالية مضادة للإنهيارات العصبية.
و قد أخذت مكونات هذه النبتة و قسمت إلى عينات تم دراستها عن طريق مذيبات ذات قطبية متصاعدة: إيثر بترول+ كلوروفورم بكميتين متساويتين الكلوروفورم + ميثانول، فكانت النتيجة أن مستخلص الإيثربترول هو المزيج الوحيد الذي أظهر فعالية ضذ الإنهيارات العصبية .
بينت الكيمياء التحليلية أن هذا المستخلص غني بالمركبات الفنيولية خاصة مشتقات خاصة مشتقات فلور غليسينول [8] .

درس [13]« *De Clercq* » مختلف الأجزاء الخاصة بالأنواع – *H.glandulosum H.reflexum – H.grandifolum* إذ تم إستعمالها كمسكنات في حالة الإصابة بالإلتهابات التي تسببها الديدان الكروية كما تساعد على إلتئام الجروح.
أما الأجزاء الهوائية للنوع: *H.Perforatum* أبدت فعاليتها ضد الإنهيارات بشكل واضح.
إن المركبات المستخلصة من المذيب (ماء-ميثانول) للأجزاء الهوائية لكل نوع من الأنواع السابقة تم إختبارها على مجموعة من الفئران بعدما تبين تأثيرها على الجهاز العصبي المركزي و ما يظهر من أعراض في السلوك الفردي.

النتائج أظهرت أنه إنطلاقا من كمية تقدر بـــ 2غ/كغ يكون مفعول المستخلص مميتا بدون إحداث ضرر على النظام الحدسي الحركي- ولا تتغير درجة حرارة الجسم العادية، غير أنها تطيل من مدة الجمود الحركي مما يوحي تأثيرها المباشر على الجهاز العصبي المركزي[13] .

أظهرت التجارب التي أجريت على فئران مصابة بالإحباط نتيجة تعريضها للسباحة ضد التيار حيث تم حقنها بالمركب *heperfoliatine* [15] المعزول من النبتة *H.Perfoliatum* في مخبر *LOST* فأظهر هذا المركب أنه مضاد للإكتأب *Antidépressif* [14].

2- الوصف النباتي:

أ- <u>مواقع تمركزها:</u>

يمكن إحصاء 400 نوع من جنس *Hypericum* في العالم كله، تتوزع خصوصا في المناطق المعتدلة و في الجبال المدارية [11].
اصل النبتة من جنس *Hypericum* هو أوروبا، لتنتشر في العالم: في أستراليا، المناطق الشمالية من أمريكا، إفريقيا و آسيا [10].

و بالرغم من سيادة الغطاء النباتي الضار في هذه المناطق إلا أن النبتة إستطاعت أن تتأقلم فيها من جهة، و من جهة أخرى النبتة الموجودة في كل من أستراليا و زيلندا الجديدة تميزت بسميتها و هذا يظهر من خلال هلاك العديد من الحيوانات المجترة خاصة ذات الفرو الأبيض مثل المواشي [12].

تنمو نبتة *Millepertuis* في المناطق المعتدلة و المناطق الجافة من العالم، حيث تظهر على حواف الطرقات، على جوانب الغابات، في المروج، كما تنمو في السهول و الهضاب، فهي تشكل مساحات كثيفة ذات لون أصفر ذهبي[9].

ب- <u>جنس *Hypericum*</u>:

تعد من النباتات العشبية المعمرة، طولها يتراوح ما بين 0.3 إلى 1.2 م [12] قد تشبه في حجمها شجيرة صغيرة.

لها ساق منتصبة و متطاولة تمتد من 30 سم إلى 1 م طولا.

تتفرغ في العديد من النقاط عند القمة أين تعمل أوراقها [10].

لها شكل أسطواني، يمكن في مستوى الساق جانبين متطاولتين و بارزين و هي خاصية مميزة لها.

إن النوع *H. maculatum* يملك 4 إمتدادت متطاولة و بارزة.

أما نوع *H.hissutum* تتميز سيقانها بأنها مغطاة بأوبار صفراء [10].

تخرج الأوراق من السيقان و هي ذات شكل بيضوي، صغيرة الحجم (حوالي 2 سم طولا و 1 سم عرضا)، منظمة مثنى مثنى، حيث كل واحدة تقابل الأخرى في نفس الثنائية، بالتالي فهما متعاكسين في الإتجاه و يمتدان من الساق مباشرة دون حامل.

لها مساحة متوسطة، لكن في بعض الأحيان قد تكون الأوراق عريضة نوعا ما.

تنطلق من النبتة *Millepertuis* رائحة طيبة، تمتاز بذوقها المر و العطري [16].

تتلون الأوراق باللون الأصفر الذهبي الفاقع، و قد تتلون باللون الأصفر المستمر. في حين يظهر باقي النبتة باللون الرمادي المخضر [10].

تتخذ الثمرة شكل محفظة بيضوية الشكل واقية تتكون من 3 حجرات [16] . و تتلون عادة باللون البني، طولها حوالي 1 مم فهي صغيرة جدا [10].

و يتركز بحثنا نحن على دراسة الفلافونيدات حيث تم إحصائها و المحور التالي يوضح ذلك.

II. توزيع الفلافونيدات عند الجنس النباتي ***Hypericum*** :

Flavonoides	Espèces	Stru	Réf
Quercetine	*H. ericoides*	A1	21
	H. ascyron		22
	H. perforatum		23,31,39,21
	H. scabrum		24
	H. elongatum		23
	H. helianthenoides		23
	H. canariensis		23
	H. adenotrichum		24
	H. nagasawai		26
	H. brasiliense		29
	H. ascyron		34
	H. pseudomaculatum		36
	H. pseudopetiolatum		37
	H. hirsutum		37
	H. maculatum		39
	H. tetrapterum		39
	H. montanum		39
	H. humifusum		39
	H. henryi		39
	H. hyssopifolium		41
			45
3-sulfate Quercetine	*H. androsaemum*	A2	25
Hyperine (3-O-b-D-galactoside Quercetine)	*H. adenotrichum*	A3	26
	H. triquetrifolium		43
	H. hyssopifolium		45
	H. ericoides		21
	H. ascyron		22
	H. perforatum		23,38,39,44
	H. scabrum		23
	H. elongatum		23
	H. helianthenoides		23
	H. canariensis		24
	H. caprifolium		28
	H. nagasawai		29
	H. brasiliense		34
	H. pseudomaculatum		37
	H. pseudopetiolatum		37
	H. hirsutum		39
	H. maculatum		39
	H. tetrapterum		39
	H. montanum		39
	H. humifusum		39
3-glucuronide-3'-sulfate Quercetine	*H. elodes*	A4	27
3-méthoxy Quercetine	*H. caprifolium*	A5	28
Quercitrine (3-O-a-L-rhamnoside Quercetine)	*H. nagasawai*	A6	29
	H. caprifolium		28
	H. japonicum		30,20
	H. brasiliense		34
	H. pseudomaculatum		37
	H. pseudopetiolatum		37
	H. perforatum		38,39,44
	H. hirsutum		39
	H. maculatum		39
	H. tetrapterum		39
	H. montanum		39
	H. humifusum		39
	H. henryi		41
7-O-a-L-rhamnoside Quercetine	*H. henryi*	A7	41

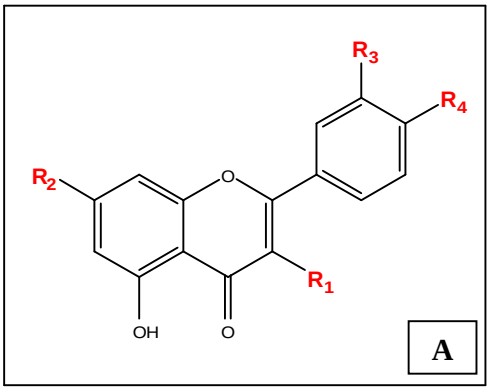
3-O-a-L-arabinofuranoside Quercetine	***H. hyssopifolium***	**A8**	**45**
3-O-b-D-galactoside-7-O-b-D-glucoside Quercetine	***H. hyssopifolium***	**A9**	**45**
Isoquercitrine	***H. ascyron***	**A10**	**22**
	H. brasiliense		**34**
	H. ascyron		**36**
	H. perforatum		**38,39,44**
	H. hirsutum		**39**
	H. maculatum		**39**
	H. tetrapterum		**39**
	H. montanum		**39**
	H. humifusu		**39**
Rutine (3-Rutinoside Quercetine)	***H. ascyron***	**A11**	**22**
	H. perforatum		**23,31,39,44**
	H. scabrum		**23**
	H. elongatum		**23**
	H. helianthenoides		**23**
	H. pseudomaculatum		**37**
	H. pseudopetiolatum		**37**
	H. hirsutum		**39**
	H. maculatum		**39**
	H. tetrapterum		**39**
	H. montanum		**39**
	H. humifusum		**39**
Kaempferol	***H. ascyron***	**A12**	**22**
	H. nagasawai		**29**
	H. brasiliense		**37**
	H. ascyron		**36**
3-O-glycoside Kaempferol	***H. triquetrifolium***	**A13**	**43**
Luteoline	***H. adenotrichum***	**A14**	**26**
	H. brasiliense		**34**
Dihydroquercetine	***H. henryi***	**B1**	**41**
7-O-a-L-rhamnoside-dihydroquercetine	***H. henryi***	**B2**	**41**
3,7-O-a-L-dirhamnoside (2R,3R)-dihydroquercetine	***H. japonicum***	**B3**	**42**
3-O-a-L-rhamnoside-dihydroquercetine	***H. henryi***	**B4**	**41**
(I-3,II-8)-biapigenine (Fukugetine)	***H. canariensis***	**C**	**24**
	H. perforatum		**32,39**
	H. aucheri		**33**
	H. hirsutum		**39**
	H. maculatum		**39**
	H. tetrapterum		**39**
	H. montanum		**39**
	H. humifusum		**39**
	H. triquetrifolium		**43**
	H. hyssopifolium		**45**
gemichalcone	***H. geminiflorum***	**D**	**40**
(-) epicatechine	***H. triquetrifolium***	**E**	**42**
7,8-(2'',2''-dimethylpyrano)-5,3',4'-trihydroxy-3-methoxyflavone	***H. japonicum***	**F**	**42**

III. بعض هياكل أخرى متواجدة عند الجنس النباتي ***Hypericum*** :

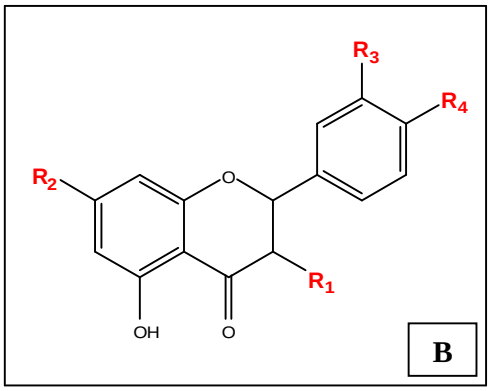
Composés	Espèces	Stru	Réf
Hypéricine	*H. adenotrichum* *H. perforatum* *H. hirsutum* *H. maculatum* *H. tetrapterum* *H. montanum* *H. humifusum*	1	26 31,39,17 39 39 39 39 39
Pseudohypéricine	*H. perforatum* *H. hirsutum* *H. maculatum* *H. tetrapterum* *H. montanum* *H. humifusum*	2	39,18 39 39 39 39 39
Protohypéricine	*H. perforatum*	3	18
Protopseudohypéricine	*H. perforatum*	4	18
Cyclopseudohypéricine	*H. perforatum*	5	18
Hyperforine	*H. perforatum* *H. hirsutum* *H. maculatum* *H. tetrapterum* *H. montanum* *H. humifusum*	6	18,2,39 39 39 39 39 39
Adhyperforine	*H. perforatum*	7	18
Hyperfoliatine	*H. perfoliatum*	8	19

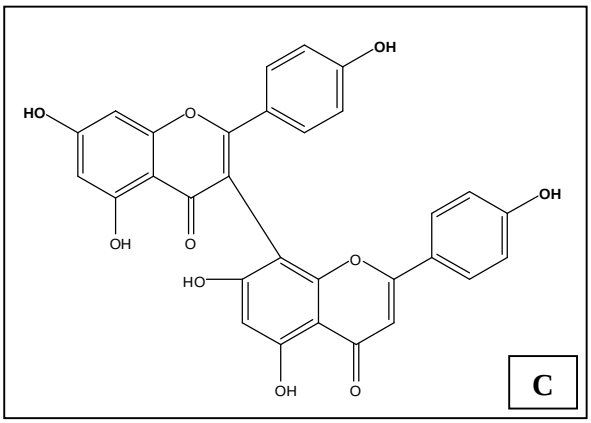
IV. بنية المركبات التي تم إحصاءها:

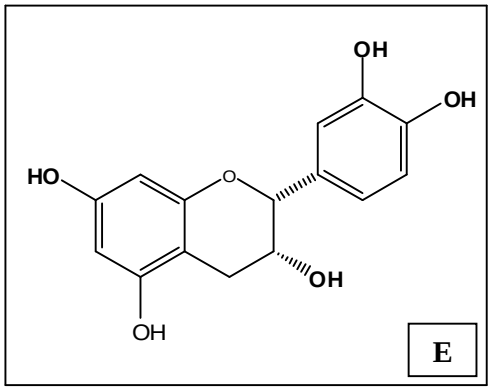
Code	R1	R2	R3	R4
A1	OH	OH	OH	OH
A2	sulfate	OH	OH	OH
A3	O-β-D-gal	OH	OH	OH
A4	O-glur	OH	sulfate	OH
A5	O-Me	OH	OH	OH
A6	O-a-L-rham	OH	OH	OH
A7	OH	O-a-L-rham	OH	OH
A8	O-a-L-ara	OH	OH	OH
A9	O-β-D-gal	O-β-D-glu	OH	OH
A10	O-glu	OH	OH	OH
A11	O-rham-glu	OH	OH	OH
A12	OH	OH	H	OH
A13	O-glu	OH	H	OH
A14	H	OH	OH	OH

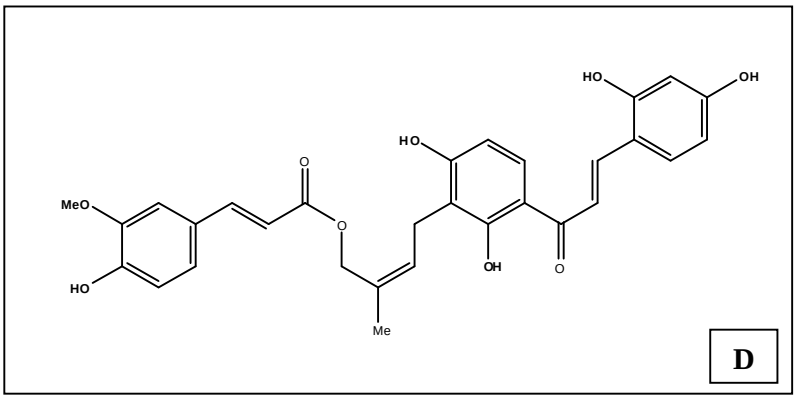


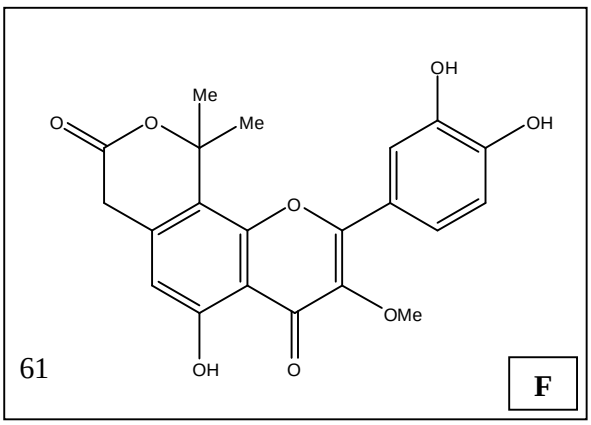
Code	R1	R2	R3	R4
B1	OH	OH	OH	OH
B2	OH	O-a-L-rham	OH	OH
B3	O-a-L-rham	O-a-L-rham	OH	OH
B4	O-a-L-rham	OH	OH	OH

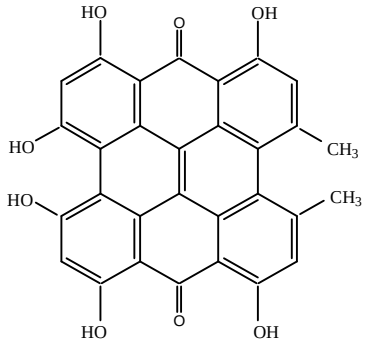




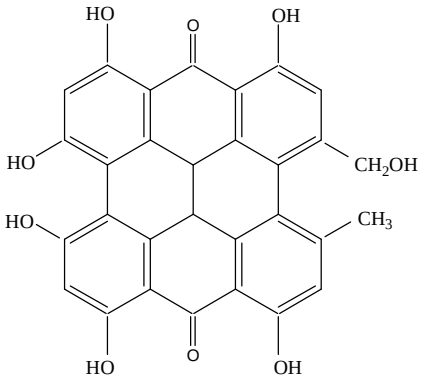




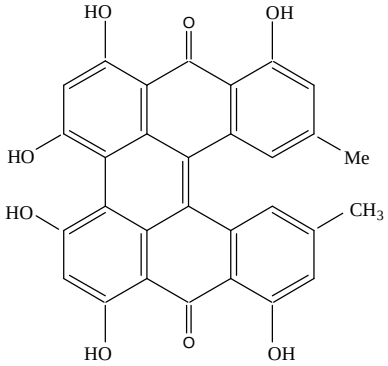




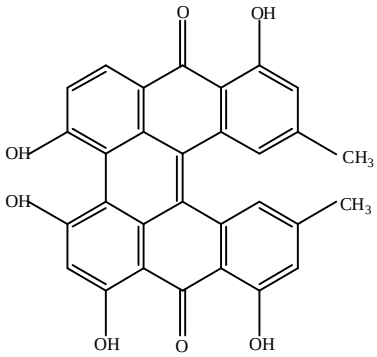
1 Hypéricine



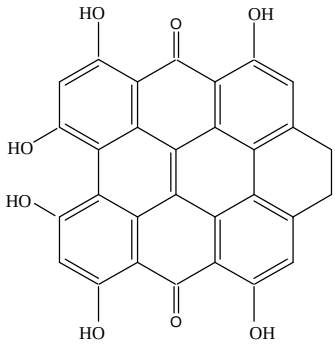
2 Pseudohypéricine



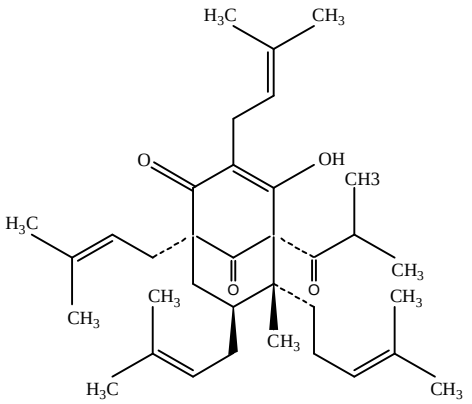
3 Protohypéricine



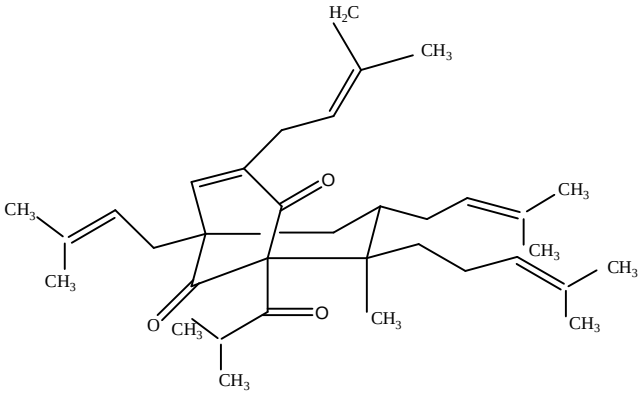
4 Protopseudohypéricine



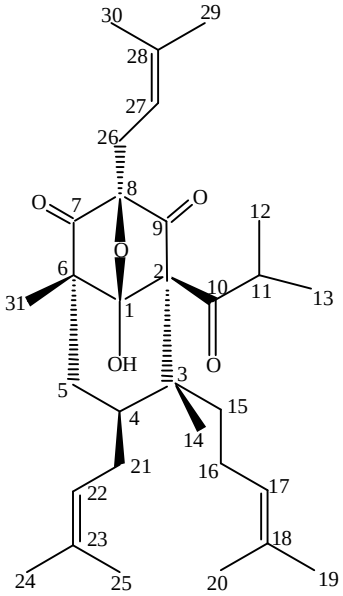
5 Cyclopseudohypéricine



6 Hyperforine



7 Adhyperforine



8 Hyperfoliatine

المـــراجع:

[1] Lebret, J. (1981). *Les pratiques de jardinage : les jardins de Rocaille et plantes alpines*, Ed. Larousse, Paris.

[2] Athanasas, K., Magiatis, P., Fokialakis, N., Skaltsounis, A. L., Pratsinis, H., Klitsas, D. (2004). *J Nat. Prod*, 977.

[3] Li-Hang, H., Ching-Wan, K., Jagadese, J. V., Keng yeow, S. (2000). *Phytochemistry*. 709.

[4] Masahiro, T., Kazuhiro, C., Hirokazu, Y., Hirokazu, M. (1991). *Phytochemistry*. 2562.

[5] Pistelli, L., Bertoli, A., Zucconelli, S., Morelli, I., Panizzil, L., Menisheni, F. (2000). *Fitoterapia*. 71 (suppl.1) 140.

[6] Girzu-Amblard, M., Carnat, A., Fraisse, O., Carnat, A. P., Lamaison, J. L. (2000). *Ann. Pharm. Fr*. 58, 345.

[7] Hölzl, J., Demish, L., Gollnik, B., (1989). *Phytochemistry*. 29, 3558.

[8] Daudt, R., Von Poser, G. L., Neves, G., Rates, S. M. K. (2000). *Phytother. Res.* 14, 346.

[9] Bruneton. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*, 3éme édition, TEC et DOC.

[10] Bombardelli, E., Morazzoni, P. (1995). *Hypericum Perforatum, Fitoterapia*. 66, 583.

[11] Yves-Marie, A. (1988). *Les arbustes, les pratiques du jardinage*, Ed. Larousse, Paris. 72.

[12] Southwell, I. A., Browke, C. A. (2001), *Phytochemistry*. 56, 437.

[13] De clercq, E.(2000), *Med. Res. R*. 20, 349.

[14] Benkiki, N., Kabouche, Z., Tillequin, F., Vérité, P., Chosson, E., Seguin, E. (2003). A New Polyisoprenylated Phloroglucinol derivative from *Hypericum perfoliatum* (Glusiaceae), Z. Naturforsch. 655, 658.

[15] do Rego, J. C, Benkiki, N., Chosson, E., Kabouche, Z., Seguin, E., Costentin, J. (2007). Antidepressant-like effect of heperfoliatin, a polyisoprenylated Phloroglucinol derivative from *Hypericum perfoliatum* (Glusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake, European Journal of Pharmacology. 569, 197- 203.

[16] Wichtl, M., Anton, R. (1999), *Plantes thérapeutiques : tradition pratique officinale science et thérapeutique*, Ed. TEC et DOC, Paris 3émé édition.

[17] Chi, J. D., Franklin, M. (1999). *J. Chromatog B Biomed Sci Appl*, 735, 288.

[18] Kleber E., Obry T., Hipelli S., Schneider W., Elstner E. F. (1999), Arzniem-Forsch/ Drug Res.m 49, 109.

[19] Bladt S., Wagner H. (1994), *Geriatric Psychiatry and Neurology*, 7, 559.

[20] Gu, G., Feng, S., Wang, X. (1983). Isolation and identification of a flavone from Di Er Cao
(*Hypericum japonicum*). Zhongcaoyao. 14, 347-8.

[21] Cardona, M. L., Seoan, E. (1982). Flavonoids and xanthonolignoids of *Hypericum ericoides*. Phytochemistry. 21, 2759-60.

[22] Wang, Z., Wang, X. (1980). Studies on the active principles of Hong Han Lian (*Hypericum ascyron L.*). Yao Hsueh Hsueh Pao. 6, 365-7.

[23] Karryev, M. O., Komissarenko, N. F. (1980). Phytochemical study of *Hypericum L.* plants of the Turkmenian flora. Biol. Nauk . 3, 52-7.

[24] Cardona, M. L., Fernandez, I., Pedro, J., Serrano, A. (1989). A new pyranoxanthone and flavonoids from *Hypericum canariensis*. Heterocycles. 29, 2297-300.

[25] Seabra, R., Alves , A. C. (1989). Identification of quercetin 3-sulfate in *Hypericum androsaemum*. Revista Portuguesa de Farmacia. 39, 16-18.

[26] Doganca, S., Oksuz, S. (1989). Constituents of Hypericum adenotrichum. Fitoterapia. 60, 93.

[27] Seabra, R., Alves, A. C. (1988). Quercetin 3-glucuronide-3'-sulfate from *Hypericum elodes*. Phytochemistry. 27, 3019-20.

[28] Ayuga, C., Carretero, E. (1987). Flavonoids from *Hypericum caprifolium Boiss*. Plant. Med. Phytother. 21, 334-7.

[29] Chen, M. T., Wan, C. H., Chen, C. M., Kuoh, C. S. (1988), Flavonoids from *Hypericum nagasawai Hayata*. Soc. (Taipei) 35, 167-71.

[30] Xu, L., Liu, A. (1987). Coulometric titration for the determination of quercitrin in *Hypericum japonicum thunb*. Yaowu Fenxi Zazhi. 7, 280-2.

[31] Stoyanova, A., Popova, M., Georgiev, E. (1987). Thin-layer chromatography of extracts of Hypericum perforatum. Farmatsiya (Sofia). 1, 8-13.

[32] Berghoefer, R., Hoelzl, J. (1987). Biflavonoids in *Hypericum perforatum*. Part 1. Isolation of I3,II8-biapigenin. Planta Med. 53, 216-17.

[33] Kitanov, G. (1985), 3,8"-Bisapigenin, biflavone from *Hypericum aucheri*. Farmatsiya (Sofia) 35, 13-16.

[34] Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M A., Stoeckli-Evans, H.,Hostettmann, K. (1995). Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense.* Switzerland PHYTOCHEMISTRY . 40, 1447-52.

[35] Wu, Q. L., Wang, S. P., Liao, Y. H., Wang, L. W., Feng, Y. Xiu., Yang, J. S., Xiao, P. G. (1996). New constituents from *Hypericum japonicum*. Chinese Chemical Letters 7, 1011-1012.

[36] Park, H. J., Kwon, S. H., Yun, S. Y., Lee, K. T. (2000). Isolation of steroids and flavonoids from the herbs of *Hypericum ascyron L.* Saengyak Hakhoechi . 31, 39-44.

[37] Makovetskaya, E. Yu. (2000). Flavonoids of certain species of *Hypericum L*. Chemistry of Natural Compounds . 35, 582-583.

[38] Butterweck, V., Jurgenliemk, G., Nahrstedt, A., Winterhoff, H. (2000). Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. Planta Medica 66, 3-6.

[39] Umek, A., Kreft, S., Kartnig, T., Heydel, B. (1999). Quantitative phytochemical analyses of six Hypericum species growing in Slovenia. Planta Medica 65, 388-390.

[40] Chung, M.I., Weng, J.R., Lai, M.H., Yen, M.H., Lin, C.N. (1999). A New Chalcone, Xanthones, and a Xanthonolignoid from *Hypericum geminiflorum.* Journal of Natural Products. 62, 1033-1035.

[41] Wu, Q., Wang, S., Wang, L., Yang, J., Xiao, P. (1998). Flavonoids from *Hypericum henryi Levl*. et Wan. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa. 10, 15-18.

[42] Wu, Q.L., Wang, S.P., Du, L.J., Zhang, S.M., Yang, J.S., Xiao, P.G. (1998). Chromone glycosides and flavonoids from *Hypericum japonicum*. Phytochemistry 49, 1417-1420.

[43] Conforti, F., Statti, G.A., Tundis, R., Menichini, F., Houghton, P. (2002). Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. Fitoterapia. 73, 479-483.

[44] Urbanek, M., Blechtova, L., Pospisilova, M., Polasek, M. (2002), On-line coupling of capillary isotachophoresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extracts of *Hypericum perforatum* leaves or flowers. Journal of Chromatography. 958, 261-271.

[45] Cakir, A., Mavi, A., Yildirim, A., Duru, M. E., Harmandar, M., Kazaz, C. (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* . JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY. 87, 73-83.

الفصل الثالث

دراسة
فيتوكيميائية للنبتة

× الدراسة الكيميائية النباتية لـــ *Hypericum tomentosum*

8- المادة النباتية :

تم جمع النبتة في أواخر شهر جوان من سنة 2001 من منطقة جيجل في الشرق الجزائري، حيث تم اقتلاعها من جذورها، أجريت لها عملية التجفيف بوضعها في أماكن خاصة تحت الظل وبعيدا عن الرطوبة وهذا في المخبر (LOST)، بعد ذلك طحنت فكانت الكتلة المستعملة 1000 غ.

9- وصف الجنس *Hypericum L*:

تعتبر نباتات الجنس *Hypericum L* نباتات عشبية ذات اوراق متقابلة و أزهار عنقودية الشكل، تحتوي على العديد من الأسدية ملتحمة مع بعضها في 5 مجموعات أما المبيض فيحتوي على حجيرة واحدة، و تتميز فواكه هذا الجنس بأنها كبسولية[1].

10- وصف النوع *H. tomentosum*:

النوع *H.tomentosum* عبارة عن نبتة عشبية داكنة شائكة كثيرة الزغب، تنمو في المناطق الرطبة ذات أورق بيضوية الشكل طولها ضعف عرضها.

تتميز نباتات هذا النوع بوجود بتلات يزيد طولها بمرتين عن وريقة كأس الزهرة[2].

---

[1] Quezel P., Santa S. (1963). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Tome II, Ed. CNRS, Paris 681.

[2] Quezel P., Santa S. (1963). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Tome II, Ed. CNRS, Paris 682.

صورة فوتوغرافية للنبتة ***Hypericum tomentosum***

4- التصنيف النظامي للنبتة:

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones	القسم
Sous classe	Dialypétales	تحت القسم
Ordre	Guttiférales	الرتبة
Famille	Clusiaceae	العائلة
Sous famille	Papilionacées	تحت العائلة
Genre	*Hypericum*	الجنس
Espéce	*tomentosum*	النوع

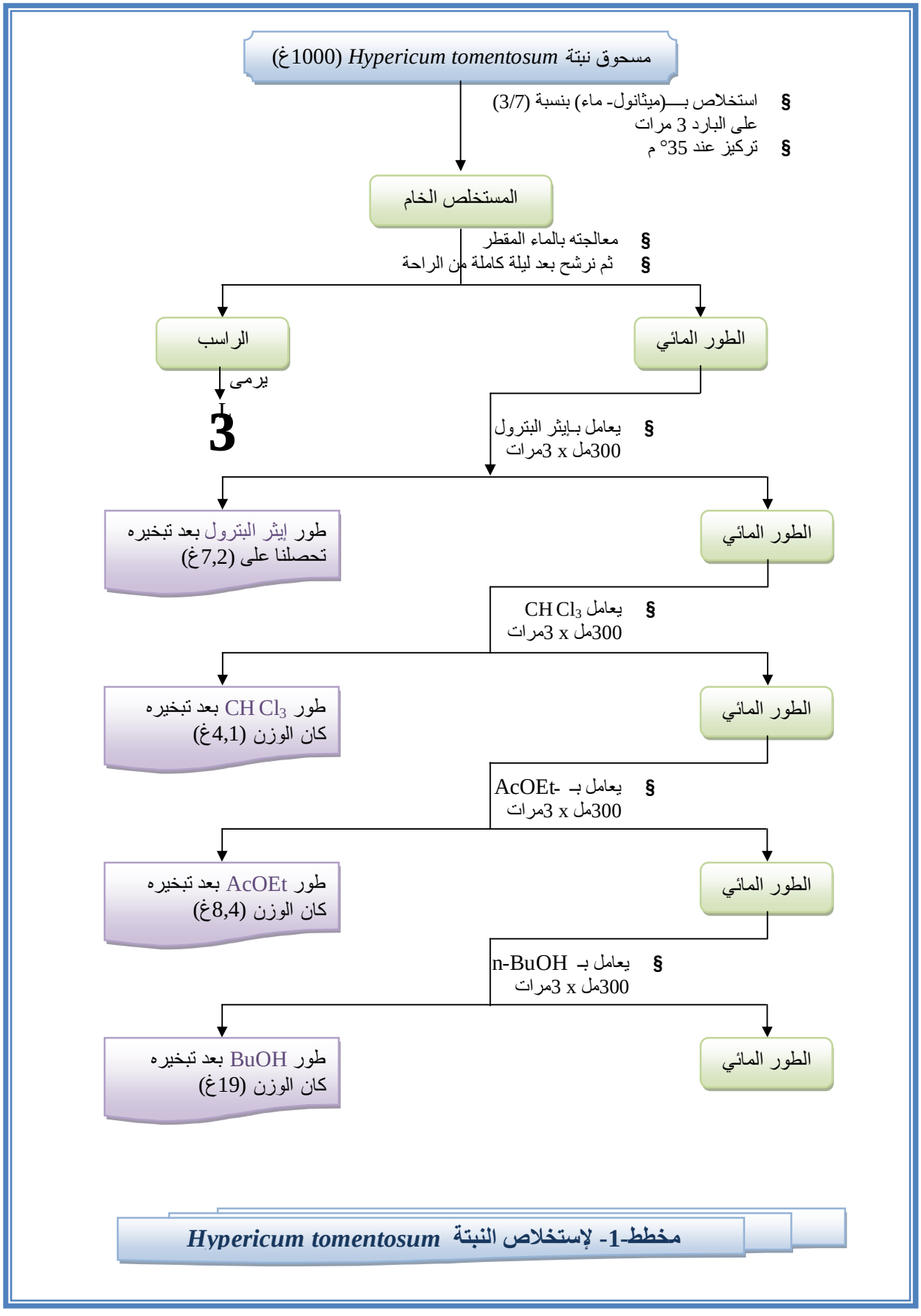
5- **الإستخلاص**:

قمنا في هذه العملية بإتباع الخطوات التالية:

بعد القيام بعملية سحق للأجزاء النباتية الجافة (1000 غ)، تم نقعها في خليط هيدروكحولي من (ميثانول-ماء) بنسبة (3/7)، ثم تركت لمدة 24 ساعة و للحصول على كمية المستخلص بصفة كلية كررت العملية 3 مرات متتالية مع تجديد المذيب كل 24 ساعة (بإضافته إلى النبتة بعد ترشيحها)، ليستقبل المرشح الهيدروكحولي في دورق أثناء كل عملية ترشيح، عندها ركز هذا الأخير حتى الجفاف تحت ضغط منخفض ودرجة حرارة (35° م) أين تحصلنا على المستخلص الخام، وعاملنا هذا الأخير بـــالماء المقطر و تركناه للراحة مدة ليلة كاملة، بعدها رشح المحلول اين تحصلنا على الطبقة المائية حيث أجرينا عليها عملية إستخلاصا من نوع سائل- سائل باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية وهي:

- إيثر البترول 3 مرات متتابعة بعد التبخير تحصلنا على 7,2 غ من مستخلص الإيثر.
- الكلوروفورم 3 مرات متتابعة بعد التبخير تحصلنا على 4,1 غ من مستخلص الكلوروفورم.
- أسيتات الإثيل 3 مرات متتابعة بعد التبخير تحصلنا على 8,4 غ من مستخلص الأسيتات.
- البوتانول 3 مرات متتابعة بعد التبخير تحصلنا على 19 غ من مستخلص البوتانول.

ونلخص خطوات هذه العملية في المخطط التالي:



مخطط-1- لإستخلاص النبتة *Hypericum tomentosum*

6- فحص كروماتوغرافي للمستخلصات:

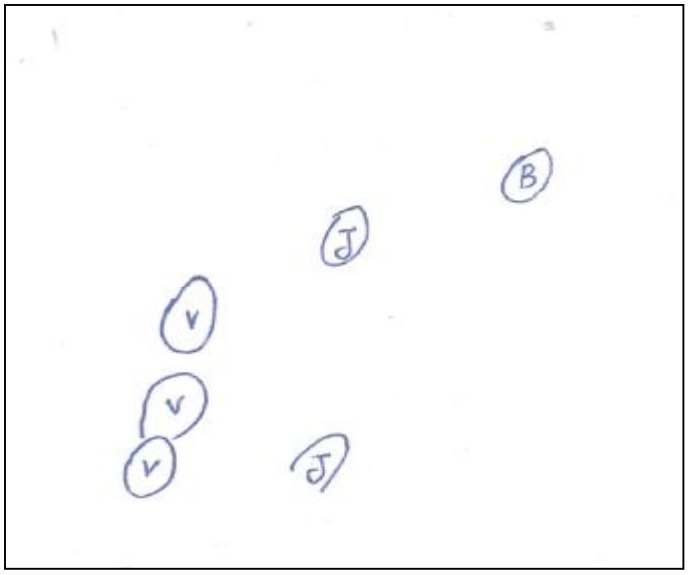
بما أن الهدف الأساسي من بحثنا هذا هو فصل المركبات الفلافونيدية و لأنها تتميز بقطبية عالية قمنا باختيار المستخلص البوتانولي و أسيتات الإيثيل ، أما بقية المستخلصات المتحصل عليها (إيثر البترول، الكلوروفورم) حفظت لدراسة مستقبلية.

و قبل الشروع في عملية الفصل قمنا بإجراء فحص تحليلي بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) ثنائية البعد و باستخدام جملة المذيبات التالية:

البعد D_1(I): (4/3/3) (Toluéne/ MeOH/ méthyléthylcétone)

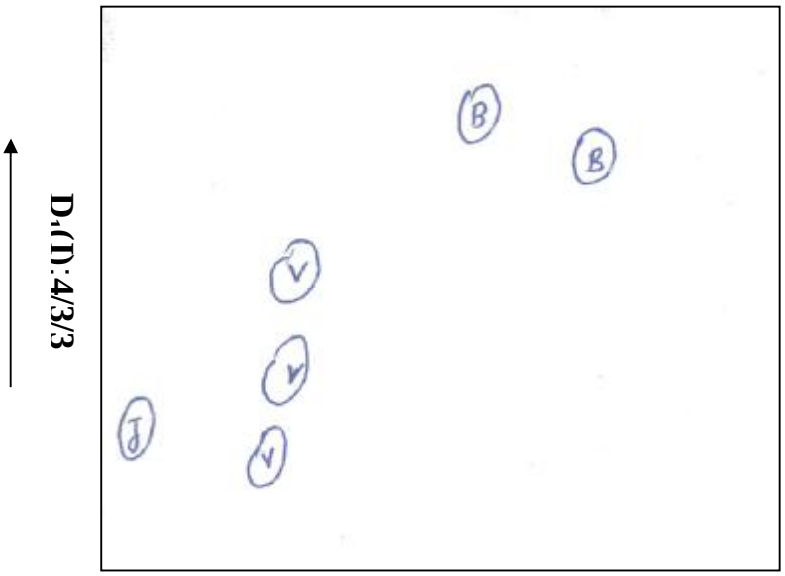
البعد D_2(II): (13/3/3/1) (H_2O/ MeOH/ méthyléthylcétone/ Acétylacétone)

وبعد عملية التجفيف تحت ساحبة الهواء، أتجهنا إلى رسم الخريطة الفلافونيدية و ذلك بالإستعانة بالأشعة فوق البنفسجية (UV) شكل-1- و شكل-2-



V : بنفسجي
J : أصفر
B : أزرق

شكل- 1- كروماتوغرام ثنائي البعد للمستخلص البوتانولي لنبتة *H. tomentosum*



D_1(I):4/3/3

D_2(II) : 13/3/3/1

V : بنفسجي
J : أصفر
B : أزرق

شكل- 2- كروماتوغرام ثنائي البعد للمستخلص الأسيتات الإثيل لنبتة *H. tomentosum*

- ومن خلال دراسة مقارنة تبين أن المستخلصين يحتويان على نسبة لاباس بها من المركبات الفلافونيدية، إضافة إلى هذا تبين انه لا توجد فوارق بين المستخلصين تستدعي دراسة مقارنة لكل مستخلص على حدا . كما تبين أن المركبات الفلافونيدية الملاحظة متداخلة فيما بينها، مما يقودنا إلى استخدام العمود الكروماتوغرافي لعملية الفصل.

7- الفصل و التنقية:

وبما أن الخريطة الفلافونيدية تظهر تداخل عدد كبير من هذه المركبات لجأنا إلى كروماتوغرافيا العمود كفصل أولي لـــ15 غ من مزيج من المستخلص البوتانولي و الأسيتات لنبتة ***H. tomentosum***.

حيث إخترنا لهدا الغرض متعدد الأميد (SC_6) كطور ثابت لقدرته على فصل المركبات الفلافونيدية، أما عملية التمليص فتمت باستعمال التولوين مع تشبيعه بالميثانول تدرجيا.

و قد تمت متابعة الحزم النازلة خلال العمود باستعمال مصباح (UV) لتستقبل أسفل العمود حيث ركزت تحت ضغط منخفض، أين تحصلنا في نهاية العملية على الكسور المدونة في الجدول التالي:

الجدول - 1 - يوضح الكسور المتحصل عليها:

رقم الكسور المحصل عليها	% التولين	% الميثانول
1 - 8	100	0
9 - 18	98	2
19 - 25	96	4
26 - 48	92	8
49 - 83	88	12
84 - 97	85	15
98 - 122	80	20
123 - 134	75	25
135 - 144	70	30
145 - 153	60	40
154 - 160	50	50
161 - 166	0	100

للإشارة فإن حجم الكسور يتراوح ما بين 150 إلى 200 مل في كل كسر.

تلت هذه العملية تجميع الكسور المتشابهة و هذا بالإستعانة بعدة أنظمة منها:

- على السليكاجال:

(AcOEt –H_2O- AcOH) (8 :1 :1)

- على البولي أميد:

(H_2O – MeOH – MEC – AcAc) (13 :3 :3 :1)

(Tol – MEC – MeOH) (4:3:3)

- على ورق واطمان:

(BAW) (n- BuOH : HOAc : H_2O) (4 : 1 : 5)

AcOH 15 %

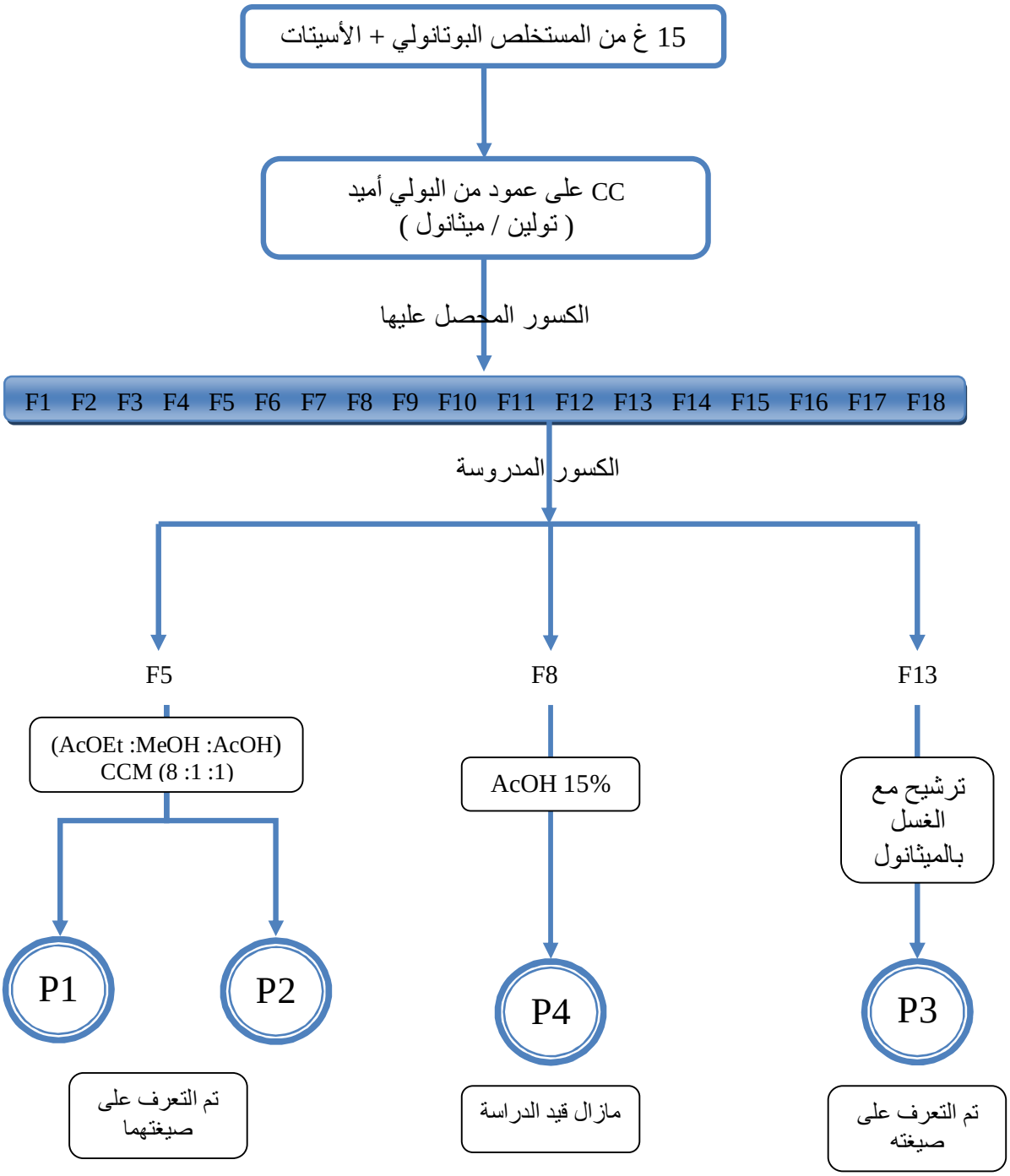
في آخر العملية تم الحصول على الكسور المدونة في الجدول 2.

جدول –2- يوضح الكسور بعد الجمع:

الكسور بعد الجمع		ملاحظة
1 - 14	F1	مركبات غير فلافونيدية
15 - 20	F2	
21 - 25	F3	خلائط ذات تراكيز قليلة لم تعالج
26 - 31	F4	
32 - 42	F5	وجود مركبين أساسيين
43 - 49	F6	
50 - 57	F7	كمية قليلة
58 - 70	F8	وجود مركب رئيسي
71 - 77	F9	كمية قليلة تشبه F8
78 - 85	F10	خليط
86 - 94	F11	
95 - 101	F12	كميات قليلة
102 - 118	F13	تكون راسب أصفر
119 - 125	F14	
126 - 135	F15	خليط معقد لم يدرس
136 - 147	F16	غير واضحة تلغى
148 - 160	F17	
161 - 166	F18	

فحص الكسور المحصل عليها:

- الكسر F5 يحتوى على مركبين رئيسيين تم فصلهما بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) على السليكاجال في النظام (AcOEt :MeOH :AcOH) (8 :1 :1) بعدها تمت تنقيتهما بإستعمال عمود صغير من السيفادكس لنحصل عليهما في صورتهما النقية P1 و P2.
- الكسر F13 يتميز بوجود مركب رئيسي على شكل راسب أصفر اللون ، تم ترشيحه و غسله بدفعات متتالية من الميثانول لنحصل عليه في صورته النقية P3.
- الكسر F8 يتميز بوجود مركب رئيسي فيه تم فصله بتقنية الورق في النظام AcOH 15% ، تلت هذه العملية التنقية حيث تمت على عمود صغير من البولي أميد، لنحصل عليه في صورته النقية P4.


15 غ من المستخلص البوتانولي + الأسيتات
CC على عمود من البولي أميد
(تولين / ميثانول)
الكسور المحصل عليها
F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16 F17 F18
الكسور المدروسة
F5
F8
F13
(AcOEt :MeOH :AcOH)
CCM (8 :1 :1)
AcOH 15%
ترشيح مع الغسل بالميثانول
P1
P2
P4
P3
تم التعرف على صيغتهما
مازال قيد الدراسة
تم التعرف على صيغته

الفصل الرابع

النتائج و المناقشة

التحليل البنيوي للمركب P1:

الإستشعاع تحت الأشعة (UV) : أصفر.

السلوك الكروماتوغرافي:

- معامل الإحتباس (R_f):

الجملة	R_f
I	0,2
II	**0,09**

(I) (4 :3 :3) (Toluène : MEC :MeOH)
(II) (13 :3 : 3 :1) (H_2O :MEC :MeOH :AcAc)

- **المعطيات الطيفية:**

1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

الجدول 1

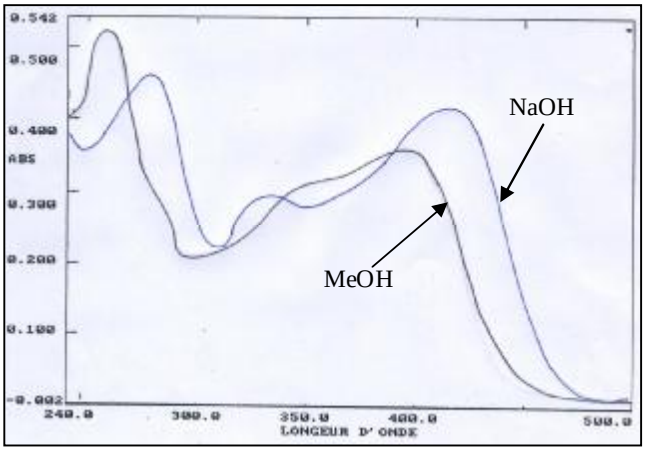
الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)	عصابات أخرى (نم)
MeOH	**370**	**255**	
NaOH	**420**	**278**	325
$AlCl_3$	**456**	**269**	
$AlCl_3$ + HCl	**424**	**265**	
NaOAc	**418**	**273**	
NaOAc + H_3BO_3	**392**	**266**	
في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر			

2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون:

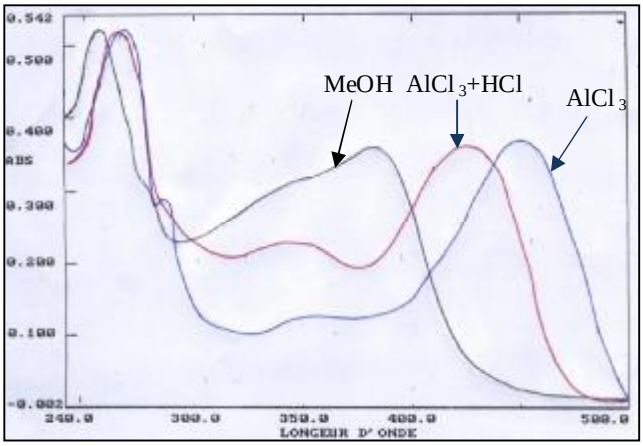
الجدول 2

الهيدروجين الموافق	الإشارة	التكامل	δ (ppm)
H-6'	dd (J = 8.6 Hz, J = 2.1 Hz)	H	7.54
H-2'	d (J = 2,1 Hz)	H	7.68
H-5'	d (J = 8.6 Hz)	H	6,88
H-8	d (J = 2 Hz)	H	6.41
H-6	d (J = 2 Hz)	H	6.19

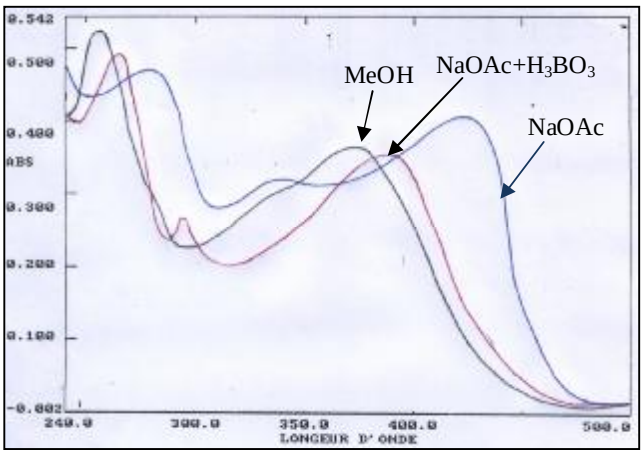
و في ما يلي أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P1:



طيف MeOH و طيف NaOH



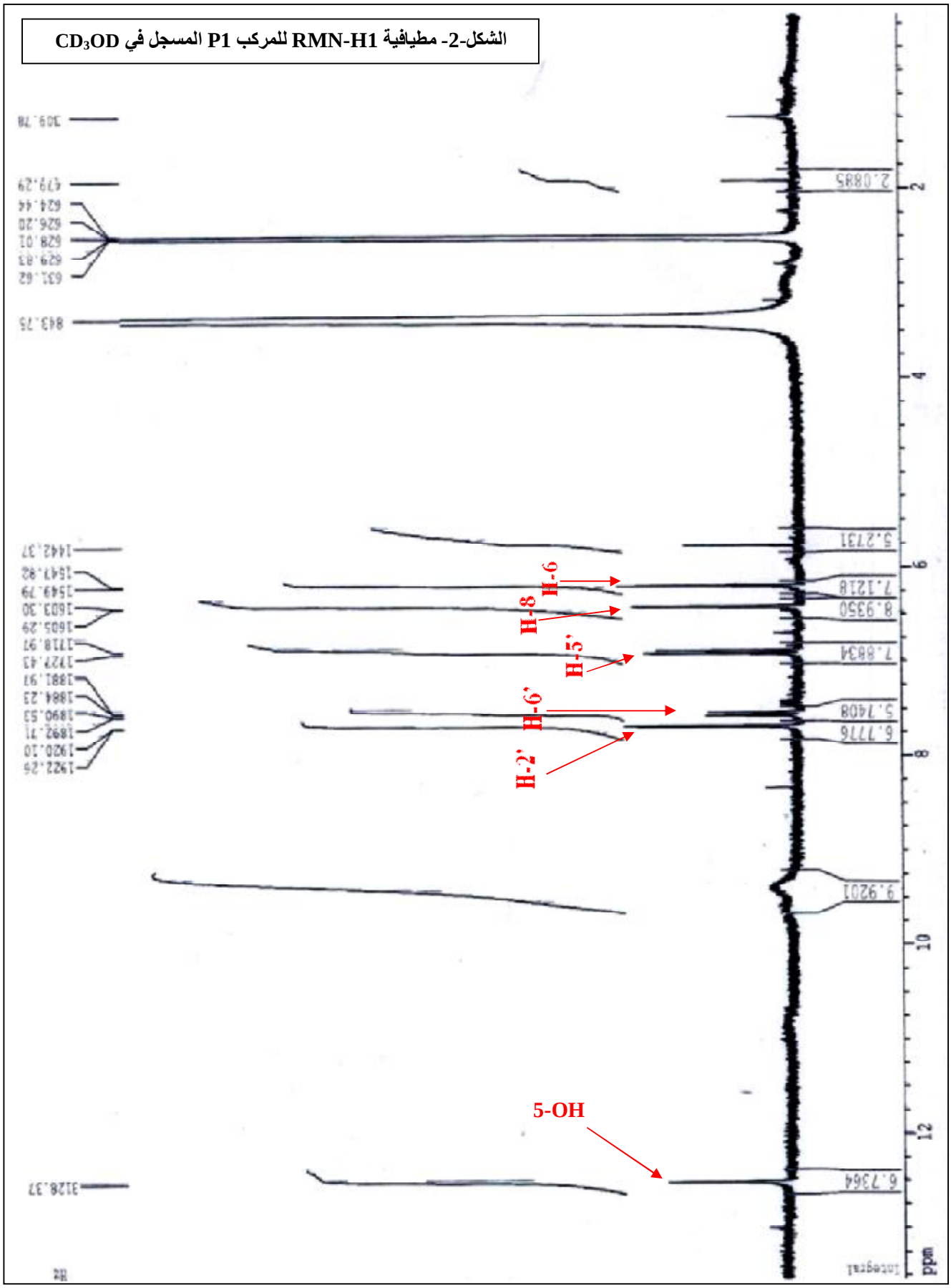
طيف $AlCl_3$ و طيف $AlCl_3$+HCl



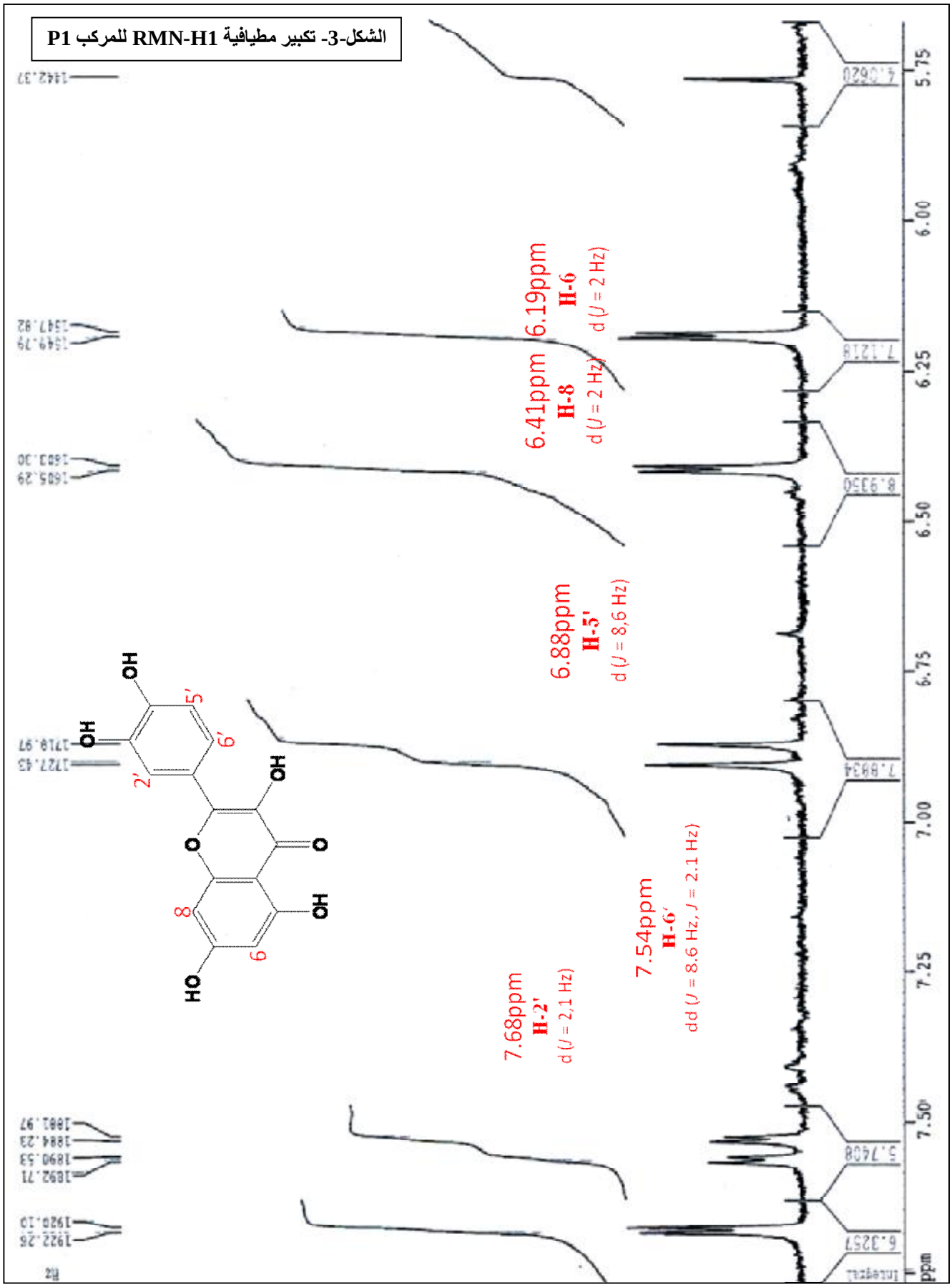
طيف NaOAc و طيف $NaOAc+H_3BO_3$

الشكل -1- أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P1

الشكل-2- مطيافية RMN-H1 للمركب P1 المسجل في CD_3OD



الشكل-3- تكبير مطيافية RMN-H1 للمركب P1



× <u>التعليل:</u>

§ اللون الإستشعاعي للمركب (أصفر) و قيمة العصابة I في طيف MeOH المقدرة بـــ 370 نـــم يدل على أن المركب فلافونول أي وجود OH في الموضع 3.

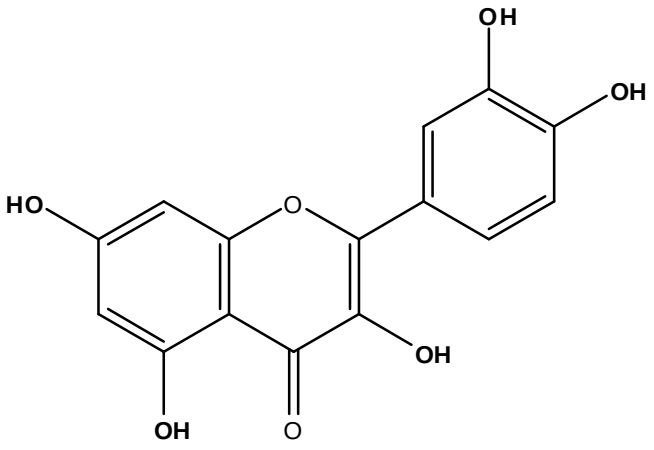
§ **إزاحة باثوكرومية للعصابة I مقدرة بـــ 50 نـــم عند مقارنة طيف NaOH بطيف الميثانول ، تدل على وجود 4'-OH .**

§ ظهور قمة جديدة مقدرة بـــ 325 نـــم مع نفس الكاشف (NaOH) تدل على وجود 7-OH ، و يتأكد ذلك بالإزاحة االمقدرة بـــ 18 نـــم للعصابة II عند مقارنة طيف NaOAc مع الميثانول.

§ الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I و المقدرة بـــ 22 نـــم و هذا عند مقارنة طيف H_3BO_3 + NaOAc مع الميثانول تدل على وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B (3'-OH,4'-OH) .

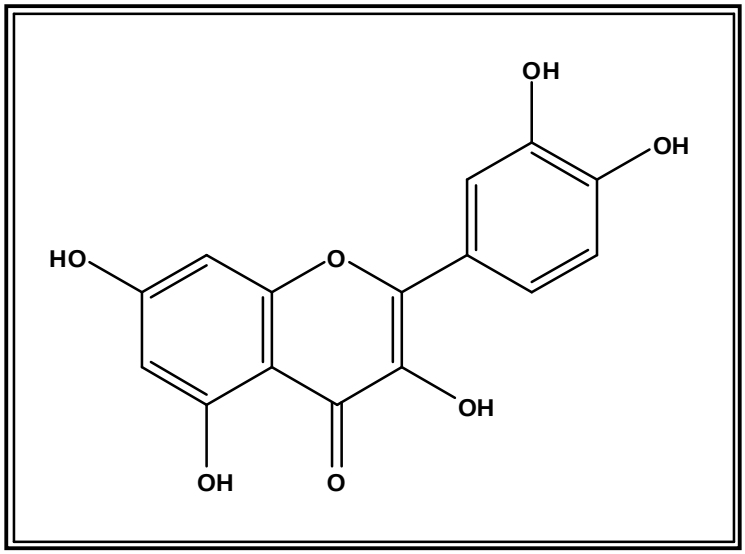
§ الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I دائما و المقدرة بـــ 32 نـــم عند مقارنة طيف $AlCl_3$ مع طيف $AlCl_3$ + HCl تؤكد وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B .

§ و نستدل على وجود 5-OH من مقارنة طيف $AlCl_3$ + HCl بطيف الميثانول حيث نلاحظ إزاحة باثوكرومية قدرها 54 نـــم.



§ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون جاءت مؤكدة لكل النتائج السابقة كما هو موضح في جدول 2 للمعطيات و الشكل 2 و 3.

§ كل المعطيات السابقة تؤكد بأن المركب P1 هو 3’, 4’,3, 5, 7-pentahydroxyflavone أو ما يسمى (Quercétine)



3’, 4’, 3, 5, 7-pentahydroxyflavone

Quercétine

التحليل البنيوي للمركب P2:

الإستشعاع تحت الأشعة (UV) : بنفسجي.

السلوك الكروماتوغرافي:

- معامل الإحتباس (R_f):

الجملة	R_f
I	0,36
II	**0,03**

(I) (4 :3 :3) (Toluène : MEC :MeOH)

(II) (13 :3 : 3 :1) (H_2O :MEC :MeOH :AcAc)

- **المعطيات الطيفية**:

3- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

الجدول 3

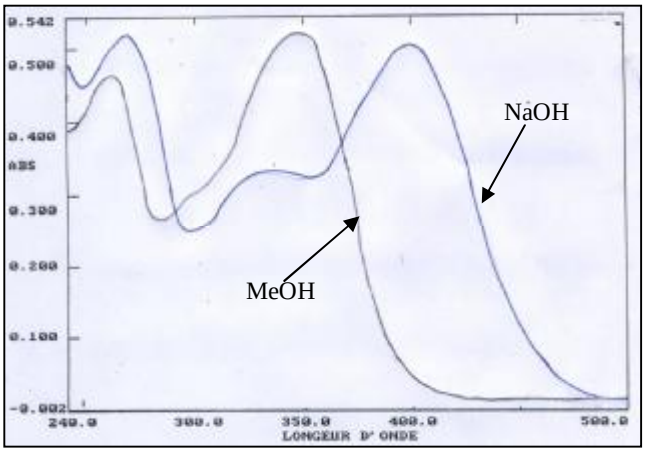
الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)	عصابات أخرى (نم)
MeOH	348	256	
NaOH	398	266	326
$AlCl_3$	425	273	
$AlCl_3$ + HCl	386	275	
NaOAc	388	271	
NaOAc + H_3BO_3	371	261	
في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر			

4- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون:

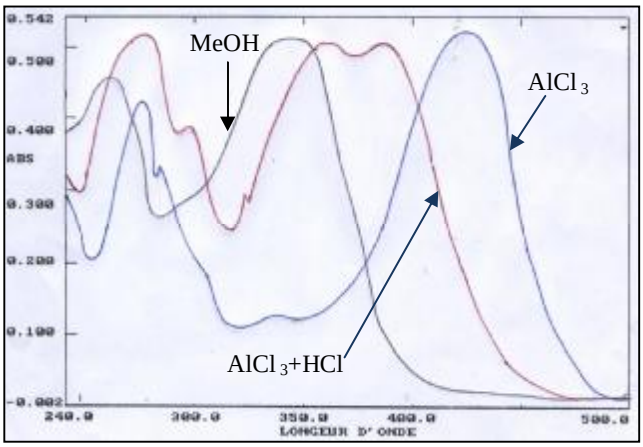
الجدول 4

الهيدروجين الموافق	الإشارة	التكامل	δ (ppm)
H-2'	d (*J* = 2,3 Hz)	1H	7.43
H-6'	dd (*J* = 8.2 Hz, *J* = 2.3 Hz)	1H	7.39
H-5'	d (*J* = 8.2 Hz)	1H	6,87
H-3	s	1H	6,67
H-8	d (*J* = 2 Hz)	1H	6.43
H-6	d (*J* = 2 Hz)	1H	6.17

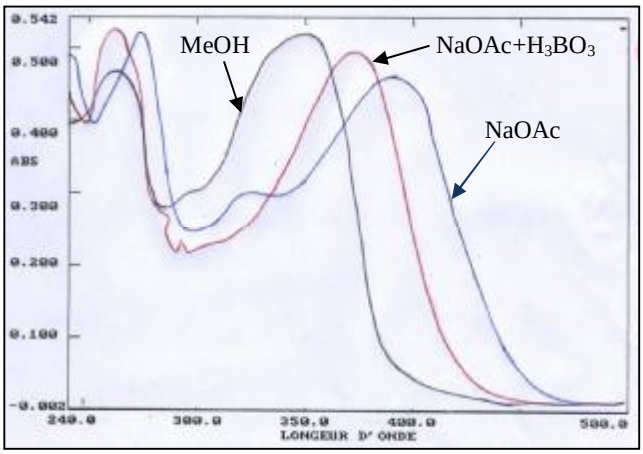
و في ما يلي أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P2:



طيف MeOH و طيف NaOH



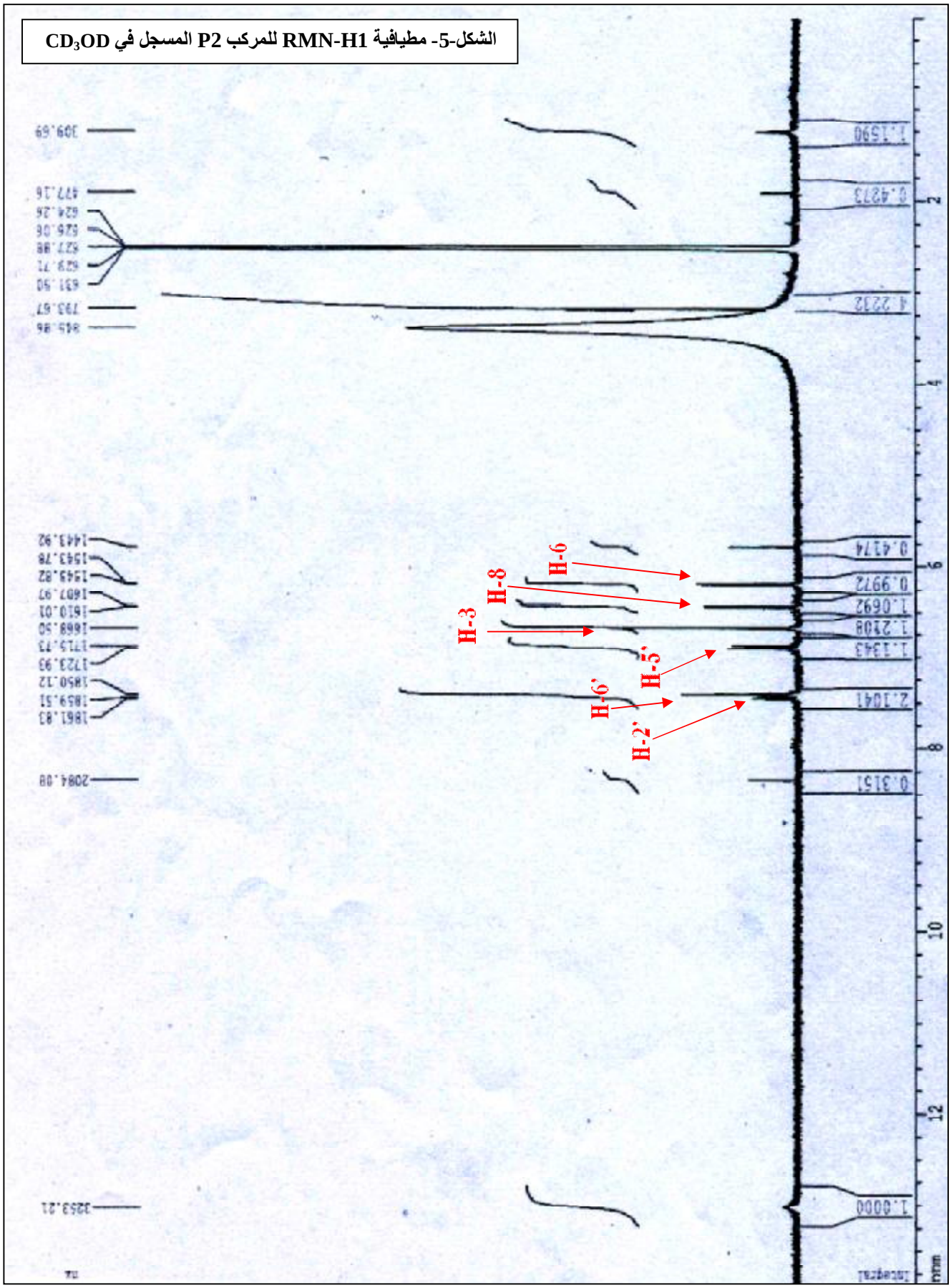
طيف $AlCl_3$ و طيف $AlCl_3$+HCl



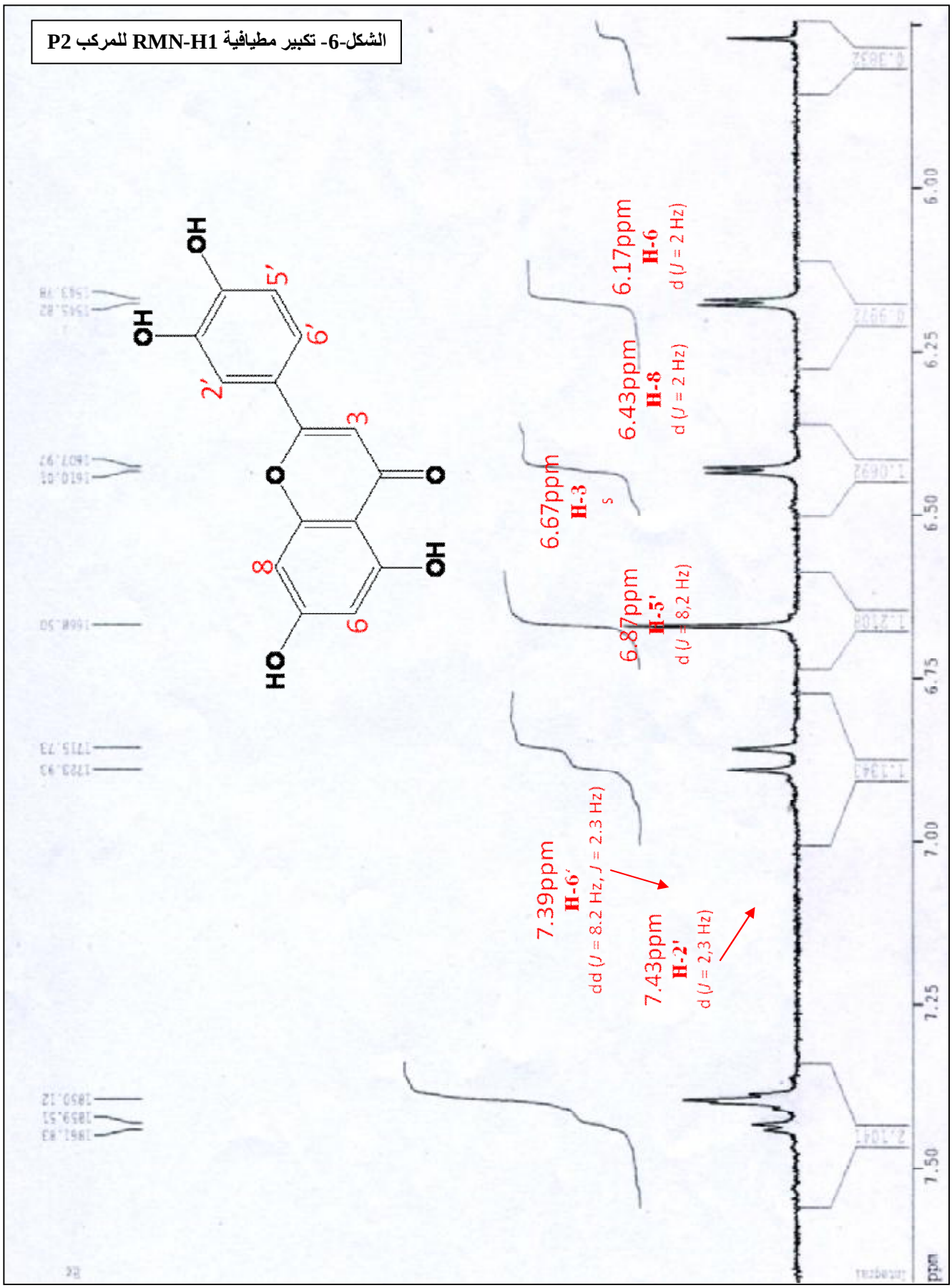
طيف NaOAc و طيف $NaOAc+H_3BO_3$

الشكل -4- أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P2

الشكل-5- مطيافية RMN-H1 للمركب P2 المسجل في CD_3OD



الشكل-6- تكبير مطيافية RMN-H1 للمركب P2



× التعليل:

§ اللون الإستشعاعي للمركب (بنفسجي) و قيمة العصابة I في طيف MeOH المقدرة بـــ 348 نـــم يدل على أن المركب فلافون أي وجود H في الموضع 3.

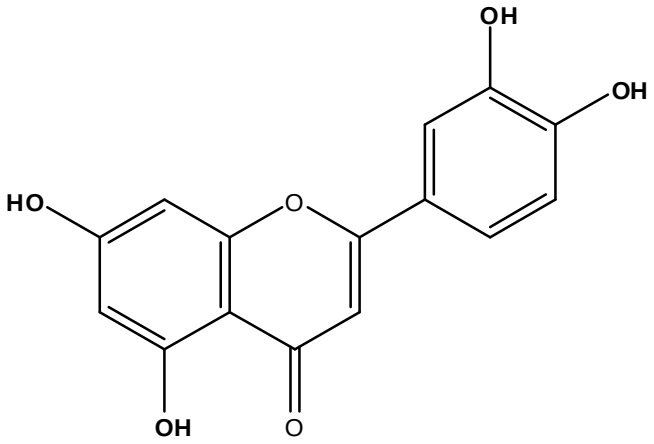
§ **إزاحة باثوكرومية للعصابة I مقدرة بـــ 50 نـــم عند مقارنة طيف NaOH بطيف الميثانول ، تدل على وجود 4'-OH .**

§ ظهور قمة جديدة مقدرة بـــ 326 نـــم مع نفس الكاشف (NaOH) تدل على وجود 7-OH ، و يتأكد ذلك بالإزاحة االمقدرة بـــ 15 نـــم للعصابة II عند مقارنة طيف NaOAc مع الميثانول.

§ الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I و المقدرة بـــ 23 نم و هذا عند مقارنة طيف H_3BO_3 + NaOAc مع الميثانول تدل على وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B (3'-OH,4'-OH).

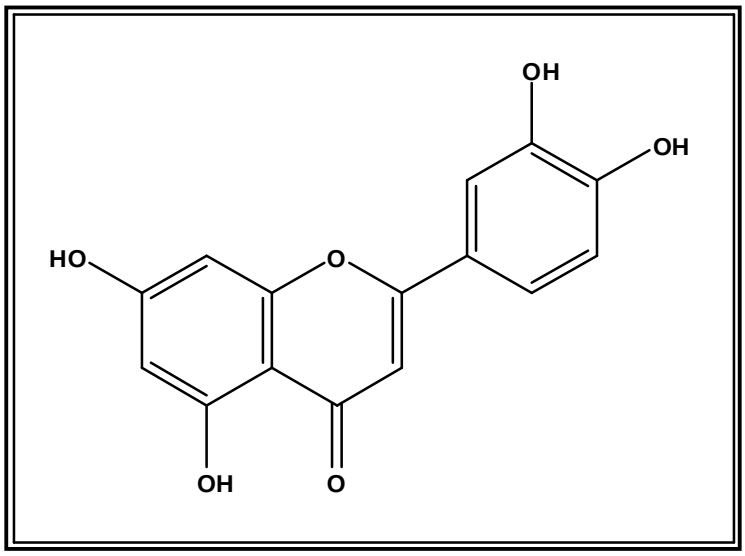
§ الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I دائما و المقدرة بـــ 39 نم عند مقارنة طيف $AlCl_3$ مع طيف $AlCl_3$ + HCl تؤكد وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B .

§ و نستدل على وجود 5-OH من مقارنة طيف $AlCl_3$ + HCl بطيف الميثانول حيث نلاحظ إزاحة باثوكرومية قدرها 38 نم.



§ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون جاءت مؤكدة لكل النتائج السابقة كما هو موضح في جدول المعطيات و الشكلين 5 و 6 .

§ كل المعطيات السابقة تؤكد بأن المركب P2 هو 3’, 4’, 5, 7-tetrahydroxyflavone أو ما يسمى (Lutéoline)



3’, 4’, 5, 7-tetrahydroxyflavone

Lutéoline

التحليل البنيوي للمركب P3:

الإستشعاع تحت الأشعة (UV) : بنفسجي.

السلوك الكروماتوغرافي:

- معامل الإحتباس (R_f):

الجملة	R_f
I	0.050
II	0.401
III	0.353

(I) (4 :3 :3) (Toluène : MEC :MeOH)
(II) (13 :3 : 3 :1) (H_2O :MEC :MeOH :AcAc)
(III) (18 :1 :1) (MeOH :H_2O :AcOH)

- **المعطيات الطيفية:**

5- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

الجدول 5

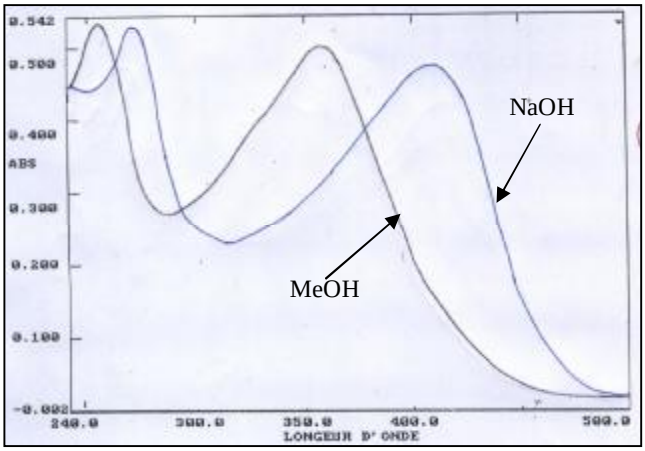
الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	356	257
NaOH	409	271
$AlCl_3$	421	273
$AlCl_3$ + HCl	400	272
NaOAc	361	261
NaOAc + H_3BO_3	375	262
في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر		

6- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون:

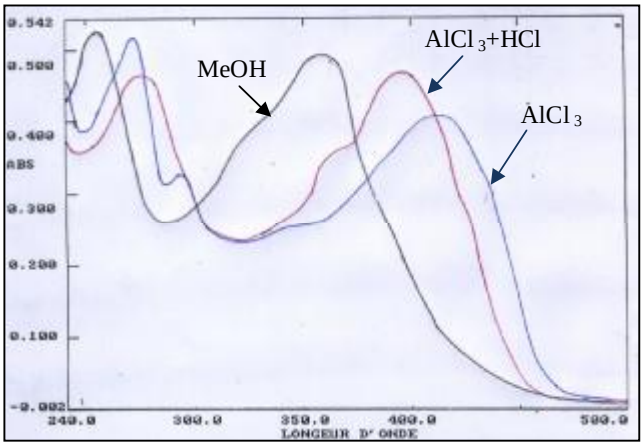
الجدول 6

الهيدروجين الموافق	الإشارة	التكامل	**δ (ppm)**
H-2'	d (*J* = 2,2 Hz)	1H	7.62
H-6'	dd (*J* = 8,9 Hz, *J* = 2,2 Hz)	1H	7.62
H-5'	d (*J* = 8,9 Hz)	1H	6,85
H-8	d (*J* = 2,1 Hz)	1H	6.80
H-6	d (*J* = 2,1 Hz)	1H	6.44
H-1" رامنوز	d (*J* =1,7 Hz)	1H	5.56
H-1'" غلوكوز	d (*J* = 7.4 Hz)	1H	5.50
CH_3 رامنوز	d (*J* = 6.0 Hz)	3 H	1.12
بروتونات الرامنوز والغلوكوز	ـــــ	10 H	3.96-3.18

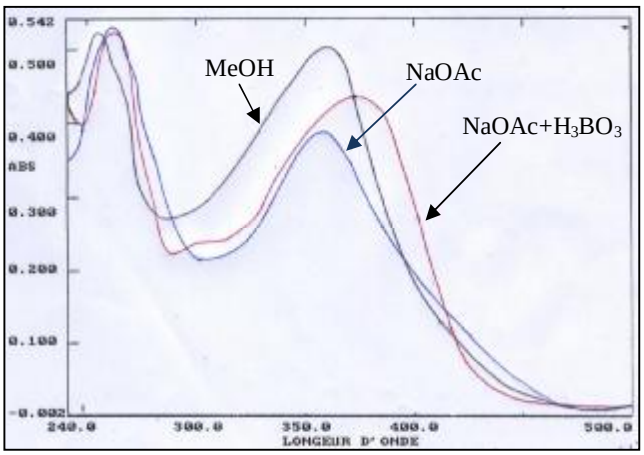
و في ما يلي أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P3:



طيف MeOH و طيف NaOH



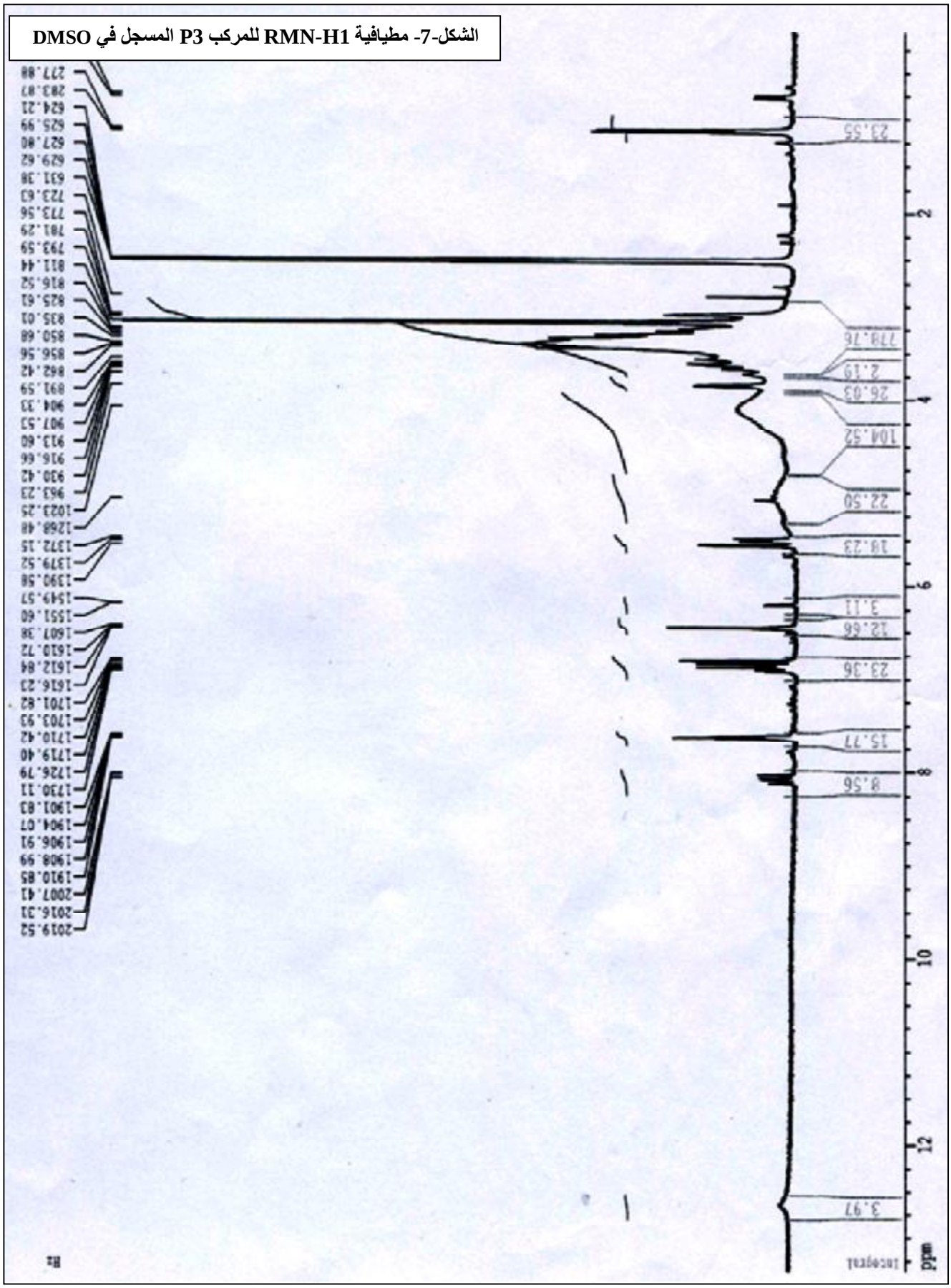
طيف $AlCl_3$ و طيف $AlCl_3$+HCl

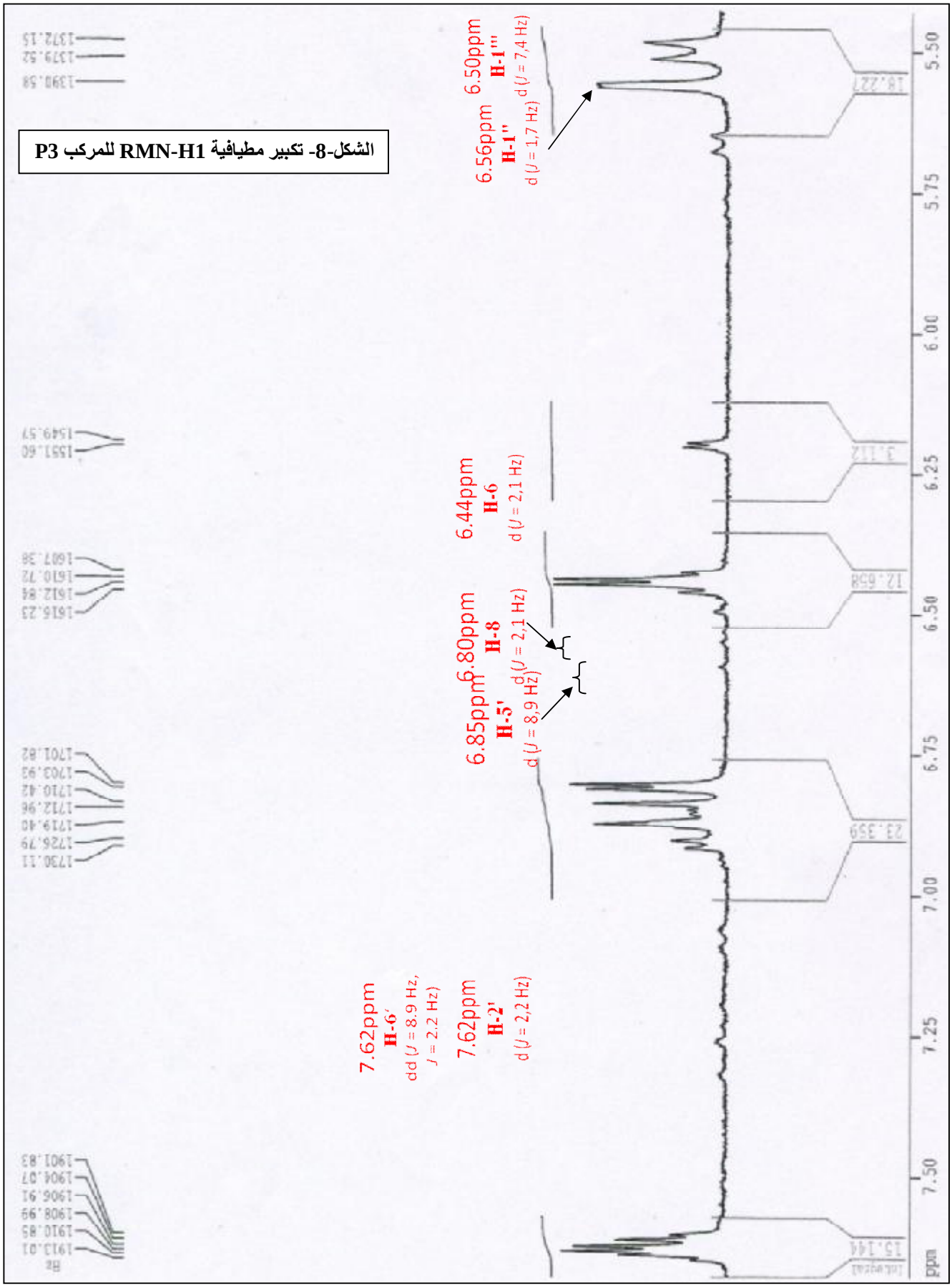


طيف NaOAc و طيف $NaOAc+H_3BO_3$

الشكل -4- أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P3

الشكل-7- مطيافية RMN-H1 للمركب P3 المسجل في DMSO





الشكل-8- تكبير مطيافية RMN-H1 للمركب P3

الشكل-9- تكبير مطيافية RMN-H1 للمركب P3

الإماهة الحمضية للمركب P3 بينت و جود سكرين (رامنوز و جلوكوز) كما هو موضح الشكل الموالي

الشكل -10- يوضح الإماهة الحمضية للمركب P3

× <u>التعليل:</u>

§ السلوك الكروماتوغرافي للمركب في الجمل الثلاث يدل على أن المركب جليكوزيد ثنائي السكر.

§ اللون الإستشعاعي للمركب (بنفسجي) و قيمة العصابة I في طيف MeOH المقدرة بـــ 356 نم دل على وجود 3-OR.

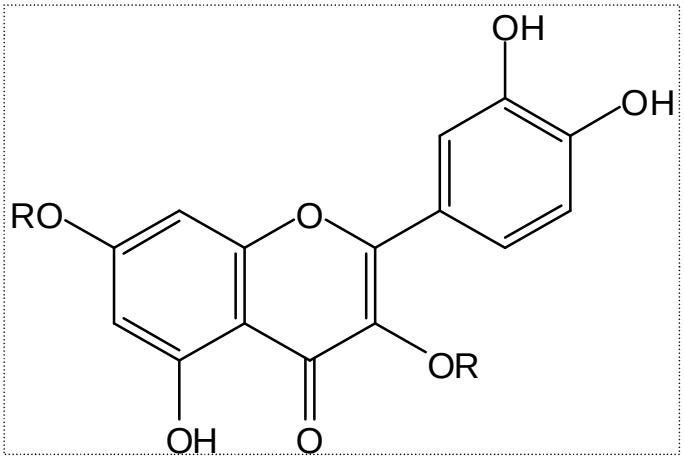
§ **إزاحة باثوكرومية للعصابة I مقدرة بـــ 54 نم عند مقارنة طيف NaOH بطيف الميثانول ، تدل على وجود 4'-OH .**

§ غياب قمة جديدة مع نفس الكاشف (NaOH) تدل على وجود 7-OR ، و يتأكد ذلك بالإزاحة الضعيفة للعصابة II عند مقارنة طيف NaOAc مع الميثانول.

§ الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I و المقدرة بـــ 19 نم و هذا عند مقارنة طيف H_3BO_3 + NaOAc مع الميثانول دل على وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B .

§ الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I دائما و المقدرة بـــ 21 نم عند مقارنة طيف $AlCl_3$ مع طيف $AlCl_3$ + HCl تؤكد وجود نظام أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B .

§ و نستدل على وجود 5-OH من مقارنة طيف $AlCl_3$ + HCl بطيف الميثانول حيث نلاحظ إزاحة باثوكرومية قدرها 44 نم.



§ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون جاءت مؤكدة لكل النتائج السابقة كما هو موضح في جدول 6 للمعطيات و الشكل 7 و 8 و 9.

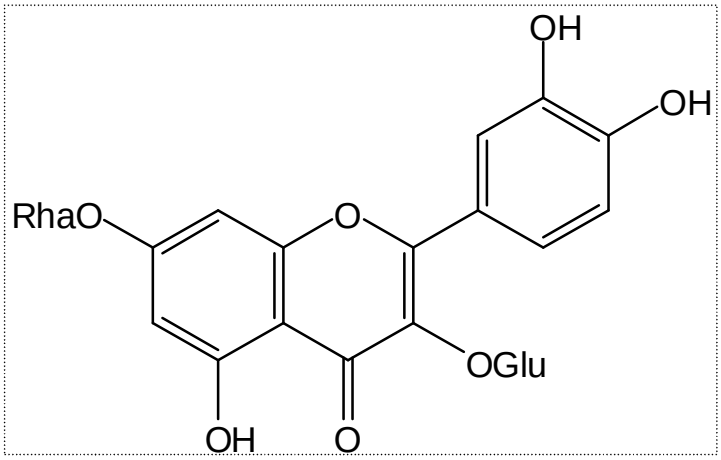
§ و قد أعطت الإماهة الحمضية أجليكونا أصفر اللون تحت مصباح UV حينما كان لون المركب بنفسجي قبل الحلمهة و هذا دليل على أن الموقع 3 كان يحتوى على جزء سكري تحرر بعد الحلمهة كما بينت الحلمهة الحمضية سكرين (رامنوز و جلوكوز).

§ بما أن الجزء السكري رامنوز و جلوكوز كما أوضحته الحلمهة الحمضية و كذا مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و ذلك بظهور البروتونين الأنوميريين لهما، و عليه وحسب كل المعطيات السابقة فالبنية المقترحة تحتوى إما على رامنوز في الموقع 3 و جلوكوز في الموقع 7 أو العكس.

و في غياب مطيافية الكتلة، يمكن الفصل في هذا الخلاف اعتمادا على مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون، و حسب المرجع 1 إذ ينص على ما يلي:

الفلافونيدات من النوع 3-O-Glu يمكن تمييزها عن تلك من النوع 3-O-Rha، حيث أن البروتون الأنوميري للجلوكوز في هذه الوضعية يكون ذا إزاحة كيميائية ما بين 5.35 و 5.56 ppm . و يكون هذا المجال ما بين 4.96 و 5.36 ppm حالة بروتون الرامنوز في الموقع 3 [1].

ومنه فإن وجود إشارة ثنائية تقدر بـــ 2 هرتز ذات إزاحة كيميائية 5.56ppm ، موافقة للبروتون الأنوميري لسكر الرامنوز المتواجد في الموقع 7 و إشارة ثنائية تقدر بـــ 7,4 هرتز ذات إزاحة كيميائية 5.50 ppm وتقودنا هذه التفسيرات إلى البنية النهائية الآتية:



3-O-β-D- glucosyl-7-O- α-L -rhamnosyl Quercétine

[1] Markham, K. R., Geiger H., (1993). ^{1}H Nuclear magnétic résonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadenterodimethyl sulfoxide In (the flavonoids advances in research since 1986), (Harborne J. B.) Ed. chapman and Hall (Chapitre 10) p. 144- 471.

الخـاتمــة

إن الغاية الرئيسية من هذا البحث هي التعرف على نــواتج الأيــض الثــانوي لنبــات *Hypericum tomentosum*.

خلال دراستنا قمنا ببحث ببليوغرافي عن الفلافونويدات، و عن الطرق المســتخدمة فــي فصل و تنقية هذه المركبات و الطرق الفيزيو كميائية لتحديد بنيتها.

كما قمنا كذلك بدراسة إحصائية عن الفلافونويدات المعزولة من هذا الجنس .

اتبعنا في عملية الفصل جملة من الخطوات ابتدءا من الاستخلاص يليــه فصــل أولــي بواسطة كروماتوعرافيا العمود بعدها القيام بعملية الفصل باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة و الورق. و أخيرا عملية التنقية عن طريق استخدام عمود صغير من السيفادكس.

من أجل التحديد البنيوي للمركبات استخدمنا مطيافية الأشعة فوق البنفســجية، مطيافيــة الرنين النووي المغناطيسي. و قد تم فصل و تحديد ثلاثة (03) مركبات (فلافونويدات) هي :

- Quercetine
- Lutéoline
- 7-O- α -D-rhamnosyl-3-O-β-L- glucosyl Quercétine

الملخــص

إن البحـث الـذي قمنـا بـه يهـتم بفصـل ودراسـة بنـى المركبـات الفلافونيديـة المتواجـدة فـي النبتـة (*Hypericum tomentosum*) التـي تنتمـي إلـى العائلـة (Clusiaceae)) قمنـا . وبعد الإسـتخلاص بدراسـة مـزيج المسـتخلص البوتـانولي و أسـيتات الإيثيـل و قـد تمكنـا مـن فصـل ثلاثـة (03) مركبـات فلافونويدية وهذا باستعمال مختلف التقنيـات الكروماتوغرافيـة (العمـود CC، الطبقة الرقيقة CCM ، الورقCP.)

الفلافونيدات المتحصل عليها هي :

- Quercétine
- Lutéoline
- 3-O-β-D- glucosyl-7-O- α-L -rhamnosyl Quercétine

و هي مركبات جديدة في النوع وقد تم تحديد البنى الجزئية للمركبات المفصولة باستخدام الطرق الفيزيوكميائية:

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN.

الكلمات المفتاحية : ***Hypericum tomentosum, Clusiaceae*** ***،الفلافونيدات ، مستخلص البوتانولي، مستخلص الأسيتات .***

Résumé

***Notre travail, s'intéresse à la séparation et l'étude structurale des flavonoïdes contenus dans la plante Hypericum tomentosum* (Clusiaceae).**

L'utilisation des différentes méthodes d'extraction, de séparation par des techniques chromatographiques sur colonne, sur papier et sur couche mince et des méthodes de purification a permis la séparation de trois composés flavonoidiques à partir de l'extrait Butanolique et acétate d'éthyle.

Les flavonoïdes isolés qui sont :

- Quercètine
- Lutéoline
- 3-O-β-D- glucosyl-7-O- α-L -rhamnosyl Quercétine

ont été identifiés par les technique physico-chimiques usuelles : R_f , fluorescence, l'hydrolyse acide et les méthode les plus performantes notamment la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et la spectroscopie d'absorption ultraviolette.

Mots cles: Hypericum tomentosum, Clusiaceae, flavonoide , extrait Butanolique, extrait acétate d'éthyle.

Abstract

***In our work, we are interested with the separation and structural identification of the flavonoids contained in the Hypericum tomentosum* (Clusiaceae).**

The use of different chromatographic methods (column, paper, thin layer) permitted the isolation of three (03) flavonoids :

- Quercetin
- Luteolin
- Quercetin-7-O- α-L -rhamnosyl-3-O-β-D- glucoside

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

Key words: Hypericum tomentosum, Clusiaceae,* flavonoids, *l'extrait Butanolic, l'extrait acétate d'éthyle.