

قسم الكيمياء

كلية العلوم الدقيقة
رقم الترتيب:
رقم التسلسل:

منكرة
مقدمة النيل شهادة الماجستير في الكيمياء
تخصص كيمياء عضوية
فرع كيمياء النبات
تحت عنوان:

دراسة نواتج الأيض الثانوي للفلافونيدي و الفعالية
المضادة للأكسدة للنبتة
Convolvulus supinus Coss. & Kral.
(*Convolvulaceae*)

بإشراف:
أ.د. زهية كعبوش

تقديم الطالب:
عباس بن مرعاش

لجنة المناقشة:

رئيسا	أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة	أ.د. أحمد كعبوش
مقررة	أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة	أ.د. زهية كعبوش
ممتحنا	أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة	د. محمد يوهروم
ممتحنة	أستاذة محاضرة بجامعة منتوري قسنطينة	د. سكيثة زريزر

إهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله رب العالمين و الصلاة على رسوله الكريم

أهدي ثمرة جهدي إلى من كانا نورا في ظلامي، و فرحا في أحزاني، و قدوة في كياني،
و منبع الحنان، و الداي الغاليين، فبفضل الله ثم جهودهما وصلت إلى ما أنا فيه الآن. أسأل الله
أن يتمتعهما بالصحة و العافية، و أن يطيل في أعمارهما في الخير.

إلى إخوتي الأعزاء.

إلى أخواتي الغاليات.

إلى كل أفراد عائلتي خاصة عمي، زوجته و أبنائه.

إلى الصغيرة : قطر الندى

إلى كل الزملاء خاصة: تامر، عبد الكريم، سمير، كريم، خير الدين، الشافعي، محمد،
أمال، صليحة، سميرة، أميرة.

إلى كل أفراد دفعتي.

التشكرات

الحمد لله أولا وأخيرا الذي وفقني في إنجاز هذه العمل، أحمذك ربي حتى ترضى و أحمد إذا رضيت وأحمذك ربي بعد الرضي.

أتقدم بكل عبارات الشكر و الإمتنان للأستاذة كعبوش زهية، التي كانت المدرسة التي تعلم، و العون الذي لا ينتهي، على كل ما قدمته من مجهودات لإنجاز هذا العمل.

كما أتقدم بشكري الخالص للدكتورة برحال جمعة، التي زرعت التفاؤل في دربي، و قدمت لي المساعدات و التسهيلات، الأفكار و المعلومات حتى آخر لحظة من إنجاز هذا العمل.

أتوجه بالشكر للأستاذ كعبوش أحمد على قبوله رئاسة لجنة المناقشة.

كما أشكر كل من الدكتور بوهروم محمد و الدكتورة زريزر سكينة على قبولهما المشاركة في لجنة المناقشة.

وأشكر كل من نبيل سالم عبيد و قارة وهيبة على مساعدتهما في إنجاز الفعالية البيولوجية.

وشكر خاص لأفراد مخبرنا مخبر L.O.S.T: صليح، شوقي، عبد الكريم، هشام لكحل، طارق، هشام، سيف، آسيا، وسام، صباح، إلهام، مريا، أميرة، فيروز و نعيمة.

الفهرس

الفهرس

الصفحة	العنوان
01	المقدمة
03	المراجع
الفصل الأول	
دراسة مكتبية للجنس <i>Convolvulus</i>	
04	مدخل
04	I- الوصف النباتي للجنس <i>Convolvulus</i>
04	II - التوزيع فلافونولات و مناطق انتشار أنواع الـ <i>Convolvulus</i>
05	III- المعايير الكيميائية
05	ا- المركبات غير الفلافونيدية
05	ب- المركبات الفلافونيدية
08	IV - المعايير البيولوجية
11	المراجع
الفصل الثاني	
أولا : الفلافونيدات	
16	I – تعريف الفلافونيدات
17	II – تصنيف الفلافونيدات
19	III – الاصطناع الحيوي للفلافونيدات
23	IV – الفعالية البيولوجية للفلافونيدات
25	V - خواص الفلافونيدات
25	VI – الكشف عن الفلافونيدات
26	VII – تثبيت مجموعات الاستبدال على الهيكل الفلافونيدي
26	1- تثبيت مجموعة الهيدروكسيل
26	2- تثبيت مجموعة الميثيل
27	3- تثبيت السكريات
ثانيا: الدراسة الكيميائية	
29	I - طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية
29	1- تحضير النينة
29	2 - الاستخلاص

الفهرس

31	II - طرق التحليل الكروماتوغرافي
31	1 - كروماتوغرافيا العمود (CC)
32	2- كروماتوغرافيا الورقة الرقيقة (CCM)
34	3 - كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (CP)
35	4 - كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC)
35	ثالثا: التعيين البنيوي
36	I- الخواص الكروماتوغرافية
36	1 - اللون الإستشعاعي
36	2 - ثابت الإحتباس
37	II - الطرق الطيفية
37	1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية
44	2 - مطيافية الكتلة
44	3- مطيافية الرنين المغناطيسي النووي: RMN 1H و RMN13C
45	ا - مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN 1H
48	ب - مطيافية الرنين النووي المغناطيس للكربون 13 : DEPT 135 و J mod
49	ج - مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد
49	4 - الإمهاء الحمضية
51	المراجع
الفصل الثالث	
أولا : المادة النباتية – طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية	
55	I – الدراسة النباتية لـ <i>Convolvulus supinus</i>
55	1 - المادة النباتية
55	2- وصف النبتة
56	3- التصنيف النظامي للنبتة
56	II - الدراسة الكيميائية
56	1- طرق استخلاص النبتة
58	2- طريقة الفصل و التنقية
59	3- الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود

الفهرس

64	I - التعيين البنيوي للمركب C1
73	II - التعيين البنيوي للمركب C2
83	III - التعيين البنيوي للمركب C4
90	المراجع
الفصل الرابع	
الفعالية البيولوجية	
91	مدخل
91	1- الجذور الحرة
91	2- مصادر الجذور الحرة
91	3- أسباب زيادة الجذور الحر
91	4- مضادات الأكسدة
92	5- الفلافونيدات و الجذور الحرة و النشاط المضاد للأكسدة
92	6- العلاقة بين بنية الفلافونيد و النشاط المضاد للأكسدة
93	7- آلية الفلافونيدات المضادة للأكسدة
93	8- تقدير النشاط الأسر للجذور الحرة
95	9- النتائج و المناقشة
97	10- تحديد المركبات الفينولية التامة
100	المراجع
102	الخاتمة
الملخص	

فهرس الجداول

الصفحة	العنوان
01	المقدمة
03	الفصل الأول
	<i>Convolvulus</i> دراسة مكتبية للجنس
07	الجدول 1 : الفلافونيدات المعزولة من الجنس <i>Convolvulus</i>
09	الجدول 2 : الفعاليات البيولوجية لبعض أنواع جنس <i>Convolvulus</i>
	الفصل الثاني
	أولا : الفلافونيدات
22	الجدول 1 : قائمة الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوي
29	ثانيا : طرق الفصل الاستخلاص و التنقية
	ثالثا التعيين البنوي
36	الجدول 2 : العلاقة بين بنية الفلافونويد و لونه تحت UV
37	الجدول 3 : العلاقة بين R_f و البنية الفلافونويدية
39	الجدول 4 : أهم الإنزيمات الملاحظة للعصابتين (I) و (II) في الوسط الميثانولي
43	الجدول 5 : أهم الإنزيمات الملاحظة بعد إضافة مجموعة الكواشف على العصابة I و II
45	الجدول 6 : الإنزيم الكيميائي وثابت التزاوج لبروتونات الحلقة A
46	الجدول 7 : الإنزيم الكيميائي وثابت التزاوج لبروتونات الحلقة B في حالة أحادية الاستبدال $C-4'=OR$
46	الجدول 8 : الإنزيم الكيميائي وثابت التزاوج لبروتونات '2, 5, 6' للحلقة B ثنائية الاستبدال
47	الجدول 9 : قيم الإنزيم الكيميائي للبروتون الأنوميري لبعض الفلافونيدات أحادية السكر
48	الجدول 10 : قيم الإنزيم الكيميائي للبروتون الأنوميري لبعض الفلافونيدات ثنائية السكر
48	الجدول 11 : الإزاحة الكيميائية لبعض ذرات الكربون لمختلف الفلافونيدات
	الفصل الثالث
	أولا : المادة النباتية - طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية-

فهرس الجداول

59	الجدول 1: الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي
60	الجدول 2 : النتائج المحصل عليها بعد الجمع
	ثانيا : النتائج و المناقشة
64	الجدول 3 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب C1
64	الجدول 4 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية لمركب C1 تبعا للشكل (2)
64	الجدول 5 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تبعا للشكل (3)
65	الجدول 6 : يبين نتائج الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد موضحا بأهم التعالقات بروتون-كربون (HMQC, HMBC) للمركب C1 تبعا للأشكال (4-5-6)
65	الجدول 7 : نتائج مطيافية UV للأجلكون بعد الإماهة الحمضية للمركب C1
73	الجدول 8 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب C2
73	الجدول 9 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية لمركب C2 تبعا للشكل (7)
73	الجدول 10 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تبعا للشكل (8)
74	الجدول 11 : تعالقات HMQC, HMBC للمركب C2 مع الإزاحة الكيميائية الموافقة لكل كربون تبعا للأشكال (9-10-11-12)
74	الجدول 12 : نتائج مطيافية UV للأجلكون بعد الإماهة الحمضية للمركب C2
83	الجدول 13 : الخصائص الكروماتوغرافية للمركب C4
83	الجدول 14: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية تبعا للشكل (14) للمركب C4
83	الجدول 15 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تبعا للشكل (15)
84	الجدول 16 : نتائج مطيافية UV للأجلكون بعد الإماهة الحمضية للمركب C4
	الفصل الرابع
	الفعالية البيولوجية
95	الجدول 1 : الاختلاف بين قدرتي الأسر الجذري للمستخلص البوتانولي للنبتة <i>C.supinus</i> و كذا مركب الـ Quercétine لجذر DPPH بدلالة مختلف التراكيز حسب الشكل (3)
99	الجدول 2 : نسبة المركبات الفينولية بكتل مختلفة

فهرس الأشكال

الصفحة	العنوان
01	المقدمة
الفصل الأول	
	دراسة مكتبية للجنس <i>Convolvulus</i>
05	الشكل-1- توزيع فلافونيدات الجنس
06	الشكل-2- تصنيف فلافونيدات الجنس
06	الشكل-3- أكثر أنواع الجنس دراسة
الفصل الثاني	
	أولا : الفلافونيدات
16	الشكل -1- الهيكل القاعدي للفلافونيدات
16	الشكل -2- الوحدة الأساسية للفلافونيدات
26	الشكل-3- هيكل الأنثوسيان
	ثانيا : الدراسة البنوية
	ثالثا : التعيين البنوي
38	الشكل -4- ترافق مجموعة الكربونيل مع الحلقتين البنزينيتين A و B
41	الشكل-5- المعقد المتكون بين الفلافونويد ومحلول (NaOAc+H ₃ BO ₃)
42	الشكل-6- المعقدات الثابتة و الغير ثابتة بين الفلافونيد و AlCl ₃ قبل و بعد إضافة HCl
الفصل الثالث	
	أولا : المادة النباتية - طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية-
58	الشكل-1- الخريطة الفلافونويدية للمستخلص البوتانولي لـ <i>C. supinus</i>
	ثانيا : النتائج و المناقشة
66	الشكل-2- سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب C1
67	الشكل-3- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب C1 مع التكبيرات اللازمة
68	الشكل-4- تكبيرات طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMQC للمركب C1
69	الشكل-5- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C1

فهرس الأشكال

70	الشكل-6- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C1
75	الشكل-7- سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب C2
76	الشكل-8- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب C2 مع التكبيرات اللازمة
77	الشكل-9- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMQC للمركب C2
78	الشكل-10- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C2
79	الشكل-11- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C2
80	الشكل-12- تكبيرات طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C2
80	الشكل-13- طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 للمركب C2 بتقنية DEPT 135
85	الشكل-14- سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب C4
86	الشكل-15- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب C4 مع التكبيرات اللازمة
89	الشكل-16- نتائج الاماهة الحمضية
الفصل الرابع	
الفعالية البيولوجية	
92	الشكل-1- المواقع الفعالة في النشاط المضاد للأكسدة للفلافونيدات
93	الشكل-2- تفاعل الـ DDPH مع الفينول
96	الشكل-3- مقارنة الفعل الآسر لجذر DPPH لكل من المستخلص البوتانولي و Quercétine عند تراكيز كتلية مختلفة
96	الشكل-4- منحني يبين النسبة المئوية لإرجاع المستخلص البوتانولي لجذر DPPH بدلالة التركيز

فهرس المخططات

الصفحة	العنوان
01	المقدمة
الفصل الأول	
دراسة مكتبية للجنس <i>Convolvulus</i>	
الفصل الثاني	
أولا : الفلافونيدات	
22	المخطط -1- مخطط استخلاص <i>C. supinus</i>
ثانيا : طرق الفصل الاستخلاص و التنقية	
30	المخطط - 2- طرق الفصل للنبته <i>C. supinus</i>
ثالثا : التعيين البنيوي	
الفصل الثالث	
المادة النباتية- طرق الفصل، الاستخلاص و التنقية	
57	المخطط -1- مخطط استخلاص <i>C. supinus</i>
63	المخطط -2- مخرق الفصل للنبته <i>C. supinus</i>
النتائج و المناقشة	
الفصل الرابع	
الفعالية البيولوجية	

الإختصارات

AcAc	Acétylacetone
AcOEt	Acétate d' éthyle
MEC	Méthyléthylcétone
AcOH	Acide Acétique
CAT	Catalase
CC	Chromatographie sur Colonne.
CCM	Chromatographie sur couche Mince
COSY	Correlation Spectroscopy
CP	Chromatographie sur papier
d	doublet.
dd	doublet de doublet.
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
EI	Impact électronique
ES	ElectroSpray
FAB	Fast Atom Bombardment
GP_x	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione réduit
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
Hz	Hertz.
J	constante de Couplage
L	Leaves
MDA	Malondialdehyde
ppm	partie par million
R_f	Rapport Frontal
Rha	Rhamnose
RMN-H¹	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
SOD	Superoxyde Dismutase
Tol	Toluene
UV	Spectrophotométrie UV-Visible
¹³C-RMN	Resonance Magnétique Nucléaire du carbone 13

المقدمة

تمتد العلاقة بين الإنسان والكائنات الحية الأخرى إلى بداية ظهور الجنس البشري، وإن كانت احتياجات الإنسان البدائي لا تتعدى الغذاء والملبس وضرورات قليلة أخرى. فالحشد الهائل من النباتات المحيطة به والتباين الكبير بينه و بين الحاجة إليها ولد لديه القدرة على تمييز تلك الصالحة للأكل أو تلك التي يستعملها كوقود، و النباتات الطبية من السامة. حيث تشير كل من الحضارات المختلفة كالحضارة الصينية و الهندية و حضارة شمال إفريقيا أن الإنسان استعمل النباتات و الأعشاب في علاج بعض الأمراض التي كانت تصيبه، أو تصيب حيواناته الأليفة، و استخدمها إما في صورتها الطبيعية، أو مستخلصة كالزيوت الأساسية (زيوت عطرية) و هذا لفترة زمنية تقارب الـ 6000 سنة [1].

يعد طب الأعشاب فرع من فروع الطب المكمل أو البديل، وذلك لأن النباتات تؤدي دوراً مهماً في حماية صحة الإنسان وتحسين مسار حياته، وما زالت العديد من الثقافات التقليدية تثمن عالياً قيمة الوصفات الطبية النباتية وأهميتها الوقائية والعلاجية ومنافعها الأخرى، وهذا راجع لكلفتها المنخفضة، وسهولة الحصول عليها والعلاقة التراثية بها، والاعتقاد الشعبي السائد بأن الأدوية النباتية أكثر أماناً و نجاعة من العقاقير المصنعة [2].

و في الواقع يلاحظ ازدياد فائق في استعمال الطب التقليدي في العديد من الدول التي يتوافر فيها الطب الحديث للسكان. وتختلف ممارسات الطب التقليدي بصورة كبيرة بحسب البلد والمنطقة، حيث إنها تتأثر بعوامل عديدة، من بينها الثقافة والتاريخ والتوجهات والفلسفة. يتقدم علم التداوي بالأعشاب بمفهومه الحديث تقدماً كبيراً في مختلف أرجاء العالم، ويزداد الاهتمام بدراسة النباتات الطبية والانتفاع بها في معالجة الأمراض المختلفة، إذ تحتوي النباتات على عدد كبير جداً من المكونات الفعالة طبيياً التي تعكس الإمكانات العلاجية الكبيرة لهذه النباتات، فمن المعلوم أن لبعض العقاقير النباتية قدرة علاجية أكبر من تلك التي تملكها الأدوية المصنعة في معالجة بعض الأمراض، وأن العقاقير النباتية تحتوي على مواد غذائية وفيتامينات فضلاً عن المكونات الفعالة [2].

لهذا الغرض ظهر مؤخراً ميدان الإثنوفارماكولوجيا Ethnopharmacologie [3,4] وهو ميدان جديد يهتم بتقييم النباتات الطبية المستعملة في الطب الشعبي [5-7]، ودراستها بالوسائل المتطورة للصناعة الصيدلانية أخذاً في الاعتبار جميع المعطيات العلمية، منها: البيولوجية، الكيمائية، الاجتماعية والاقتصادية، حتى يمكن الاستفادة منها في الميدان الطبي

مقدمة

بطريقة أنجع وأكثر فائدة، لهذا يمكننا اعتبار النباتات من أهم المصادر الإستراتيجية لصناعة الأدوية هذا بالإضافة إلى استعمالها في ميدان التغذية كالتوابل والزيوت الغذائية أو الزيوت الأساسية المستخدمة في صناعة العطور والمواد التجميلية [8].

نظرا لتعدد مناخاتها تمتلك، الجزائر ثروة هائلة من الأعشاب الطبية والعطرية، تنتشر في مساحات شاسعة ومتفرقة، وفي بيئات مناخية مختلفة في السواحل والوديان والهضاب والمرتفعات الجبلية والصحاري وفي الحقول الزراعية وغيرها، منها ما هي موسمية تظهر بعد هطول الأمطار وتختفي عند الجفاف ومنها المعمرة والشجيرات، و لتقييم هذه الثروة النباتية وقع اختيارنا على عائلة Convolvulaceae التي تعتبر من أرقى العائلات النباتية المتواجدة في الجزائر بهدف دراسة نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي للجنس *Convolvulus*.

قسمنا هذه الرسالة إلى مقدمة و أربعة فصول حيث أدرجنا في الفصل الأول مدخل عام قدمنا فيه دراسة نباتية و كيميائية شاملة عن الجنس *Convolvulus*، من حيث الفلافونيدات المعزولة والأهمية البيولوجية، أما الفصل الثاني فقدمنا فيه دراسة عامة حول الفلافونيدات من حيث التعريف، التصنيف، الإصطناع الحيوي، الأهمية البيولوجية، كذلك طرق الاستخلاص الفصل والتنقية، أما الفصل الثالث فقد خصصناه للطريقة العملية المتبعة خلال هذا البحث من استخلاص و فصل و تحديد بنى المركبات المتحصل عليها، و أخيرا قمنا باستعراض الفعالية المضادة للأكسدة و تحديد المركبات الفينولية التامة و مناقشة نتائجها كفصل رابع.

المراجع

- [1]. John, A., Wilkinson, P. D. (1934). *The Materia Medica*, Ed Oxford.
- [2]. Majed Jamous, R., Ali-Shtayeb, M. S. (2008). *Traditional Arabic Palestinian Herbal Medicine*. Biodiversity and Environmental Reaserch Center (BERC), Til, Nablus.
- [3]. Alcorn, J. B. (1996). Inaugural address. In S.K.Jain: *Ethnobiology in human weffare*, Lucknow, DEEP publ, New Delhi. India.
- [4]. Dasgupta, S. (1998). Share-ware. *Down to earth*, 7 (12).
- [5]. Hoefler, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J. M., Guillrmain, J. (1987). Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. *Ethnopharmacology*. 19, 133-144.
- [6]. Lexa, A., Fleurentin, J., Lehr, P. R., Mortier, F., Pruvost, M., Pelt, J. M. (1989). Choleric and hepatoprotective properties of *Eupatorium cannabinum* in the rat. *Planta Medica*. 55 (2), 117-132.
- [7]. Rolland, A., Lanhers, M. C., Younos, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J. M. (1990). Etude de l'effet sedatif et anxiolytique d'*Eschscholzia californica*. Cham. plante utilisée traditionnellement en Amérique Centrale. *Planta Medica*. 57 (3), 212-217.
- [8]. Lounasmaa M. (1988). Tropane Alkaloids, in *The Alkaloids*, Arnold Brossi ed. New York: Academic Press. *Chemistry & Pharmacology*. 34, 82-97.

الفصل الأول

دراسة مكتوبة للجنس *Convolvulus*

مدخل

تنتشر عائلة Convolvulaceae في مختلف مناطق العالم و خاصة المناطق الإستوائية وشبه الإستوائية و المناطق المعتدلة، إذ تحتوي على حوالي 58 جنس و 1650 نوع، أكثر من 250 نوع منها ينتمي للجنس *Convolvulus* [1].

I. الوصف النباتي للجنس "*Convolvulus*" [2]:

جنس *Convolvulus* عبارة عن نباتات سنوية أو دائمة، قد تكون أعشاب أو شجيرات، زاحفة على الأرض أو منتصبة في الهواء، يطغى عليها اللون الأبيض و الوردي كما نجد الأزرق و البنفسجي و الأرجواني أو الأصفر في بعض من الأنواع.

- الأوراق: بسيطة أو مفصصة قلبية الشكل وقد تكون منفرجة.
- الزهور: إبطية ثنائية الجنس، انفرادية أو ذات أنواع مختلفة.
- التويج: تحمل أسدية في القاعدة، ولها شعيرات خيطية.
- الكأس: سبلات محمولة بشكل غير متناظر، اثنان خارجية مكشوفة و اثنان داخلية منغلقة بعضها متساوية والبعض الآخر غير متساوي.
- التويج: مفصصة أو كاملة
- الطلع: إهليجي يتراوح من 3 إلى 4 كوبات (Cobalt)، غير شائك.
- الكبسولة: متوضعة بشكل غير منتظم تتراوح من 2 إلى 4 صمامات.
- البذور: تتراوح من 1 إلى 4 ذات لون أسود أو بني.

II. التوزيع الجغرافي ومناطق انتشار أنواع الـ (*Convolvulus*)

يتوزع نصف أنواع هذا الجنس تقريبا في منطقة البحر الأبيض المتوسط وغرب آسيا، منها 21 نوع في باكستان، 8 أنواع في الصين [3] و 15 نوع في الجزائر [4]، من أكثرها انتشارا، *C. sabatius*, *C. valentinus*, *C. cavanilles*, *C. supinus*. كما تتوزع في بعض الدول الأوروبية مثل فرنسا و إنجلترا. وفي دول أمريكا الشمالية منها .
C. arvensis, *C. althaeoide*

III. المعايير الكيميائية

من خلال دراسة مكتبية لجنس *Convolvulus* تبين أنه غني بالمركبات الفينولية منها القلويدات و الفلافونيدات فكانت هدفا للعديد من الدراسات الفيتوكيميائية سمحت بفصل العديد من المركبات الطبيعية منها :

أ- المركبات غير الفلافونيدية :

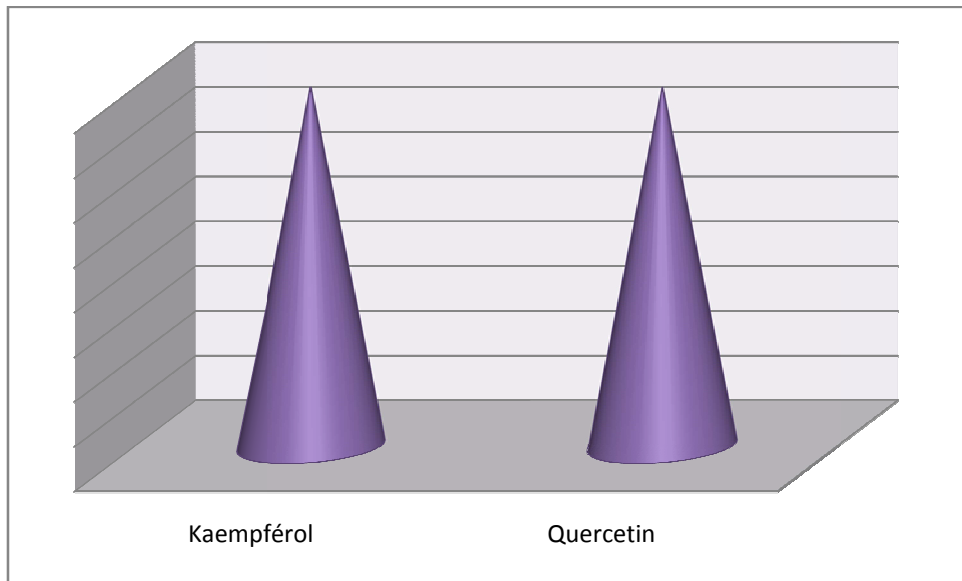
وجد منها العديد من القلويدات [7،5]، و الستيرويدات [9،8]، و بعض الكومارينات و التربينات [10] خاصة في *C. arvanis*, *C. pluricaulis* كما تم عزل بعض الأحماض الأمينية [11]، و بعض السكريات [12]، بالإضافة إلى البروتينات من بعض الأنواع [13].

ب- المركبات الفلافونيدية :

تم فصل وتحديد 8 فلافونيدات كلها من نوع فلافونول وهذا من خلال دراسة 7 أنواع من أصل حوالي 250 نوع.

• توزيع فلافونيدات الجنس :

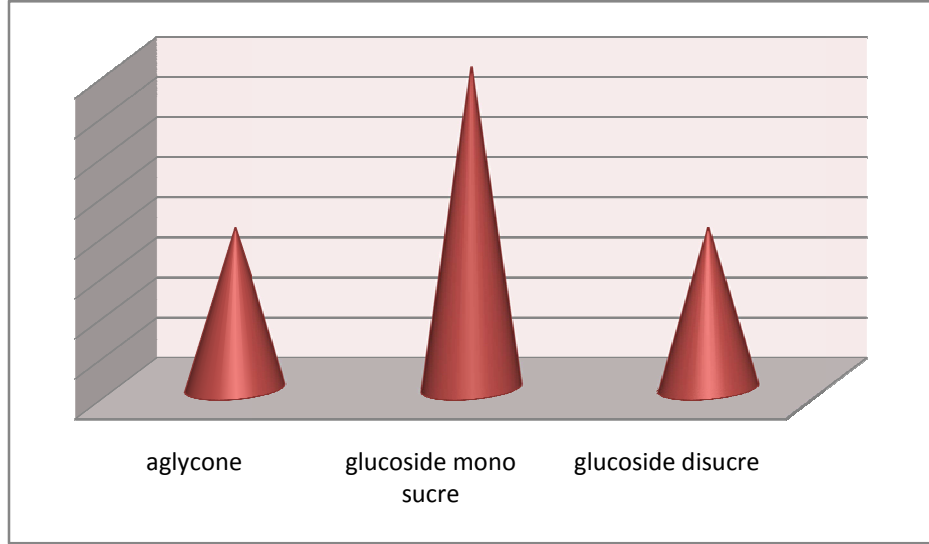
وزعت فلافونيدات هذا الجنس بالتساوي على هيكلين أساسيين هما Kaempférol و Quercetine وذلك بفصل 4 مركبات لكل منهما، حسب الشكل (1).



الشكل (1)

• تصنيف فلافونيدات الجنس :

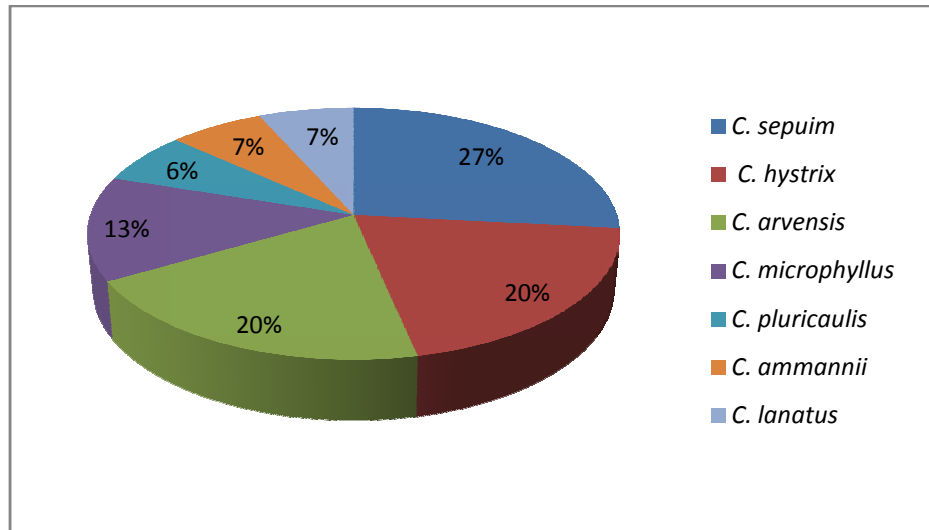
معظم الفلافونيدات المعزولة هي أحادية السكر حيث تم فصل 4 مركبات منها، و مركبين أجليكونيين و مركبين ثنائيي السكر، حسب الشكل (2).



الشكل (2)

• أكثر أنواع الجنس دراسة

أكثر الأنواع دراسة من حيث عدد المركبات الفلافونيدية المعزولة هي *C. sepium* بأربع مركبات، بعدها كل من *C. hystrix* و *C. arvensis* بثلاثة مركبات، و *C. microphyllus* بمركبين، وأخيرا كل من *C. ammannii*, *C. pluricaulis* و *C. lanatus* فلافونيد واحد، حسب الشكل (3).

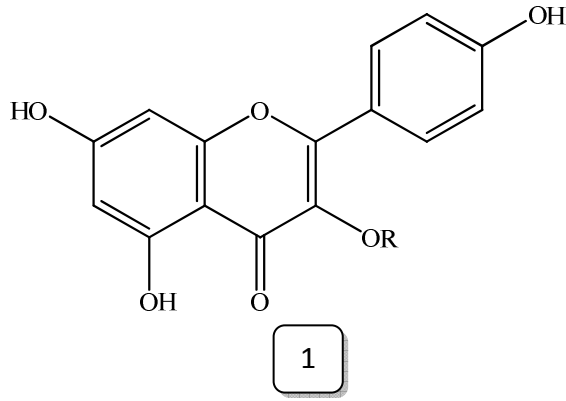


الشكل (3)

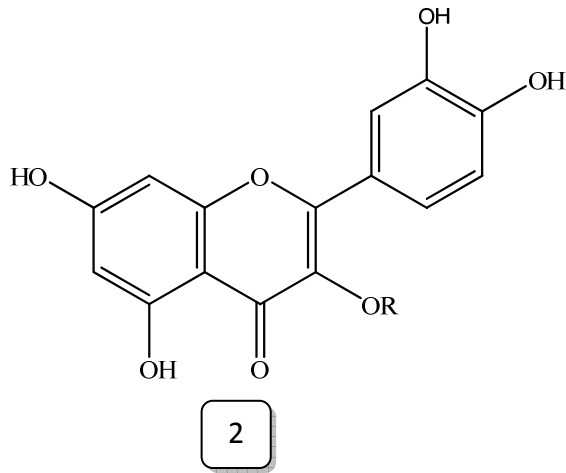
➤ تم جمع وتلخيص كل الفلافونيدات المعزولة من الجنس *Convolvulus* في الجدول-1-

جدول -1- : الفلافونيدات المعزولة من الجنس *Convolvulus*

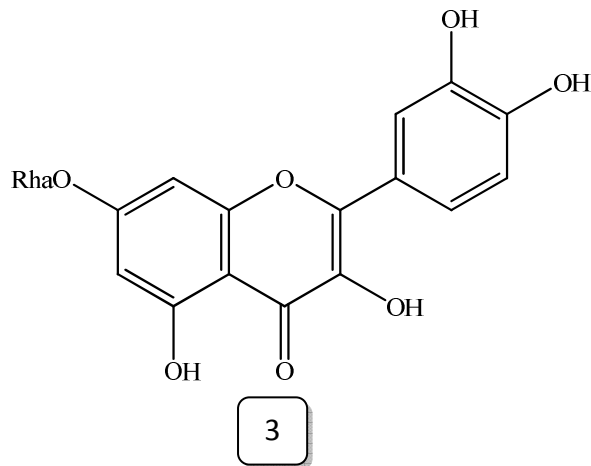
المرجع	البنية	النوع	الفلافونيد
[15]	1a	<i>C. arvensis</i>	kaempférol
[16]		<i>C. pluricaulis</i>	
[17]		<i>C. sepium</i>	
[15]		<i>C. microphyllus</i>	
[18]	1b	<i>C. arvensis</i>	Kaempférol 3-O-glucoside
[17]	1c	<i>C. microphyllus</i>	kaempférol-3-D-galactoside
[19]	1d	<i>C. sepium</i>	kaempférol 3-O-rhamnoglucoside
[16]	2a	<i>C. sepium</i>	Quercétine
[22]		<i>C. haystrix</i>	
[15]		<i>C. arvensis</i>	
[20]	2b	<i>C. lanatus</i>	Quercétine 3- glucoside
[22]	2c	<i>C. haystrix</i>	Quercétine 3-O- rutinoside (rutine)
[19]		<i>C. sepium</i>	
[21]		<i>C. ammannii</i>	
[22]	3	<i>C. haystrix</i>	Quercétine-7-O-rhamnoside



	R
a	H
b	Glu
c	Gal
d	Rha-Glu



	R
a	H
b	Glu
c	Gal
d	Glu-Rha



IV. المعايير البيولوجية:

اشتهرت بعض نباتات جنس *Convolvulus* في الطب الشعبي القديم بعدة منافع، فاستعملت للعلاج من عدة أمراض منها مرض الربو [23] و اليرقان [24] و بعض الأمراض التي تصيب البشرة [25].

كما استعملها الهنود كنوع من أنواع المخدرات.

➤ اثبت دراسات بيولوجية على هذا الجنس عدة فعاليات الممثلة في الجدول -2-

الجدول -2- الفعاليات البيولوجية لبعض أنواع جنس *Convolvulus*

الفعالية	النوع	المرجع
مضادة للأكسدة	<i>C. hystrix</i>	[26]
	<i>C. arvensis</i>	[27]
	<i>C. fatmensis</i>	[28]
	<i>C. althaoieds</i>	[29]
	<i>C. pluricaulis</i>	[30]
	<i>C. pleuricauas</i>	[31]
مضادة للبكتيريا	<i>C. lanatus</i>	[32]
مسكنة للألم	<i>C. fatmensis</i>	[11]
	<i>C. pluricaulis</i>	[30]
مضادة للإلتهاب	<i>C. fatmensis</i>	[28]
مضادة للإكتئاب	<i>C. pluricaulis</i>	[33]
مزيلة للقلق	<i>C. pluricaulis</i>	[34,35,36]
مهدئة للأعصاب	<i>C. pluricaulis</i>	[34,35,36]
مضادة للإجهاد	<i>C. pluricaulis</i>	[34,35,36]
مضادة للقرح	<i>C. pluricaulis</i>	[37]
مضادة للسكري	<i>C. pluricaulis</i>	[38,39]
مضادة لفقر الدم	<i>C. pluricaulis</i>	[40]
مضادة للفطريات	<i>C. pluricaulis</i>	[41]
	<i>C. arvensis</i>	[3]
مضادة للقرحة المعدية	<i>C. pluricaulis</i>	[42]
لها تأثير مناعي	<i>C. pluricaulis</i>	[43]

مضادة للسرطان	<i>C. pluricaulis</i>	[19]
مضادة للاختلاج	<i>C. pluricaulis</i>	[44]
	<i>C. arvensis</i>	[45]
منشطة للقلب و الأوعية الدموية	<i>C. pluricaulis</i>	[46]
تخفض نسبة الشحميات في الدم	<i>C. pluricaulis</i>	[46]
مضادة للجامودي	<i>C. pluricaulis</i>	[47]
مضادة للقرح	<i>C. microphyllus</i>	[48]
مضادة لسرطان الثدي	<i>C. betonisifolius</i>	[49]
مضادة للنزيف	<i>C. arvensis</i>	[50]
مضادة للسرطان	<i>C. arvensis</i>	[50]
مضادة لتصلب الأوعية الدموية	<i>C. arvensis</i>	[51]
حافطة للحرارة	<i>C. fatmensis</i>	[43]

المراجع

- [1]. Fang, R. C., Huang, S. H. (1979) in Wu Cheng-yih. Convolvulaceae. Fl. Reipubl. Popularis Sin. 64 (1), 1–153.
- [2]. Choisy, J. D. (1845). Convolvulaceae. In A. De Candolle, Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. 9, 323–465.
- [3]. Moubasher, M. H. (2000). Antifungal activity of 5 Convolvulaceae plant extracts against *Fusarium oxysporum*, *F. sp lycopersici*, and some saprobic, phytopathogenic and dermatophytic fungi. *Microbiology*. 49, 128-137.
- [4]. Quezel, H., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algerie et des régions désertiques, eds du centre national de la recherche scientifique. Paris. 755-759.
- [5]. Hilal, S. H., Haggag, M. Y., Soliman, F. M, Sayeda, A. E. E. (1983). Phytochemical and biological screening of *Convolvulus lanatus*. *Pharm. Sci.* 24, 139-148.
- [6]. Griffen, W. J., Lin, G. D. (2000). Chemataxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*. 53 (6), 623-637.
- [7]. Lounasmaa, M. (1988). Tropane Alkaloids, in The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology. Arnold Brossi ed. New York: Academic Press.
- [8]. Daulatabad, C. D., Desai, V. A., Hosamani, K. M., Hiremath V. B. (1992). Epoxy oleic acid in *Quamoclit seed oils*. *Amer. Oil Chem. Soc.* 69 (2), 190-191.
- [9]. Deshpande, S. M., Srivastava D. N. (1969). Chemical studies of *Convolvulus pluricaulis*. *Indian Chem. Soc.* 46 (8), 759-760.
- [10]. El-Tawil, B. A. H. Fac. S. (1983). Chemical constituents of indigenous plants used in native medicine of Saudi Arabia. II. *Arab Gulf*. 1 (2), 395-419.
- [11]. Panda, S., Kar, A. (2001). Inhibition of T3 production in levothyroxine-treated female mice by the root extract of *Convolvulus pluricaulis*. *Horm. Metab. Res.* 33 (1), 16-18.

- [12]. Son, K. G., Severson, R. F, Snook, M. E., Kays, S. J. (1991). Root carbohydrates, organic acids and phenolic chemistry in relation to sweet potato weevil resistance. *Hort. Sci.* 26 (10), 1305-1308.
- [13]. Basu, N. K., Dandiya, P. C. (1948). Chemical investigation of *Convolvulus pluricaulis*. *Am. Pharm. Assoc.* 37, 27-28.
- [14]. Rizk, A. M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. I. A chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia.* 53, 35-44.
- [15]. Provost, C. (1960). Paper chromatography of flavonoids of *Convolvulus arvensis*. *Bulletin de la Societe d'Histoire Naturelle du Doubs.* 62 (3), 67-69.
- [16]. Melin, D. F. (1974). Study of the flavonols in some species with winding branches. Role in circumnutation?. *Botanique.* 15, 139-143.
- [17]. Bisht, N. P. S., Singh, Ranbir. (1978). Chemical studies of *Convolvulus microphyllus* Sieb Dep. Chem. Jat Vedic Coll. Baraut, India. *Planta Med.* 34 (2). 312-314.
- [18]. Ruben Garcia, M., Silvia Erazo, G., Pena Raul, C. (1995). Flavonoids and alkaloids from *Cuscuta*. *Biochem.* 23 (5), 571-572.
- [19]. Tronchet, J. F. (1966). Flavone constituents of *Convolvulus sepium*. II. Demonstration of a biochemical dorsoventrality in the cortex of creeping stems. *Ann Sci. Univ. Besancon. Bot.* 3 (3), 56-59.
- [20]. El-Fiky, F. K., Abdel-Kader, M. S., Aboul-Ela, M. A. (1996). Constituents of *Convolvulus lanatus Vahl*. with antiviral and cytotoxic activity. *Pharm.Sci.* 10 (1), 25-28.
- [21]. Patrikeeva, A. P., Blinova, K. F. (1968). Phytochemical study of *Convolvulus ammannii* flavonoids. *Biol. Khim.* 26, 174-178.
- [22]. Abd EL Raheim, M. D., Saleh Ibrahim, A., Amani, S. A., Lyle, C. (2011). Antioxidant activity of *Convolvulus hystrix vahl* and its chemical constituents. *Pharm.Sci.* 24 (2), 143-147.

- [23]. Bolus, L. (1983). In "Medicinal plant of North Africa". Reference Publications Inc. 68.
- [24]. Thomas, S. C. (2000). In "*Medicinal Plants*". Culture utilization and phytopharmacology. Technomic Publication Co. Lancaster, Brazil. 635.
- [25]. Suba, V., Murugeran. T., Rao, B. R., Pal, M., Mandal, S. C., Saha, B. P. Neuropharmacological profile of Berleria lupulina lindl. Extarct in animal models. *Ethonopharm.* 2002, 81, 251-255.
- [26]. Sànchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8, 121-137.
- [27]. Jatin, T., Sakshi, B., Roopa, A. N. K. (2010). *Pharm Sci and Drug Res.* 2 (3), 219-223.
- [28]. Atta, A. H., Kenawy, S. A, A. and El-Melegy, R. (2011). Anti-Inflammatory, Antipyretic and Antioxidant Effect of Some Medicinal Plant Extracts, *Compl. Integr. Med.* 8 (1). 122-125.
- [29]. Parihar, M. S., Hemnanit, T. (2003). Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced excitotoxicity. *Biosci.* 28, 121-128.
- [30]. Tawaha. K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2008). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 104, 1372-1378.
- [31]. Dini, I., Tenore, J. C., Dini, A. (2006). New Polyphenol Derivative in *Ipomoea batatas* tubers and its antioxidant activity. *Agric. Food Chem.* 54 (23), 8733-8737.
- [32]. Hilal, S. H., Haggag, M. Y., Soliman, F. M., El-Kashoury, El-Sayeda A. (1985). Phytochemical and biological screening of *Convolvulus lanatus*. *Pharm. Sci.* 24, 139-148

- [33]. Dhingra, D., Valecha, R. (2007). Evaluation of the antidepressantlike activity of *Convolvulus pluricaulis* in the mouse forced swim and tail suspension tests. *Med. Sci Monit.* 13 (7), 155-61.
- [34]. Singh, R. H., Mehta, A. K. (1977). Studies on the psychotropic effect of the *Medhya rasayana* drug 'Shankhpushpi' (*Convolvulus pluricaulis*) part 1 (Clinical Studies). *Res. Ind. Med. Yog. Homeo.* 12 (3), 18.
- [35]. Shukla, S. P. (1981). A comparative study on the barbiturate hypnosis potentiation effect of medhya rasayana drugshankhapushpi, *Convolvulus pluricaulis*. *BMEBR.* 1 (4), 554.
- [36]. Dandiya, P. C. (1990). The pharmacological basis of herbal drugs acting on CNS. *Eastern Pharm.* 33, 39-47.
- [37]. Sairam, K., Rao, C. V., Goel, R. K. (2001). Effect of *Convolvulus pluricaulis* Chois on gastric ulceration and secretion in rats. *Ind. J. Exp. Biol.* 39 (4), 350-354.
- [38]. Alam, M. M., Siddiqui, M. B., Hussain, W. (1990). Treatment of diabetes through herbal drugs in rural India. *Fitoterapia.* 61 (3), 240-242.
- [39]. Penza, M., Montani, C., Jeremic, C., Mazzoleni, G., Hsiao, W. W., Marra, M., Sharma, H., Lorenzo, D. D. (2007). MAK-4 and -5 Supplemented diets inhibit liver carcinogenesis in mice. *BMC. Comp & Alt. Med.* 7, 19.
- [40]. Asthana, S., Greig, N. H., Holloway, H. W., Raffaele, K. C., Berardi, A., Schapiro, M. B. (1996). Clinical pharmacokinetics of arecoline in subjects with Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60 (3), 276-282.
- [41]. Gupta, R. C., Mudgal, V. (1974). Anti-fungal effect of *Convolvulus pluricaulis* (Shankapushpi). *Res. Indian. Med.* 9 (2), 67.
- [42]. Sairam, K., Rao, C. V., Goel R. K. (2001). Effect of *Convolvulus pluricaulis* Chois on gastric ulceration and secretion in rats. *Ind. Exp Biol.* 39 (4), 350-354.

- [43]. Singh, M. P, Panda, H. (2005). *Medicinal herbs with their formulations* 1st edn. Delhi: Daya Publishing.
- [44]. Pawar, S. A., Dhuley, J. N., Naik, S. R. (2001). Neuropharmacology of an extract derived from *Convolvulus microphyllus*. *Pharm. Biol.* 39 (4), 253-258.
- [45]. Atanasova-Shopova, S., Rusinov, K., Markova, M. (1969). *Izv. Inst. Fiziol., Bulg. Akad. Nauk.* 12, 205-16.
- [46]. Sharma, V. N., Barar, F. S. K., Khanna, N. K., Mahawar, M. M. (1965). Some pharmacological actions of *Convolvulus pluricaulis*: an Indian indigenous herb. *Ind. J Med. Res.* 53 (9), 871-6.
- [47]. Bhakuni, R. S., Tripathi, A. K., Shukla, Y. N, Singh, S. C. (1996). Insect antifeedant constituent from *Convolvulus microphyllus* (L) Sieb. *Phytother Res.* 10, 2, 170-1.
- [48]. Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M and El-Elimat, T. (2008). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 104, 1372-1378.
- [49]. Shahina, A. G. (1994). In "Hand book of Arabian medicinal plants". CRC. Press. 89-90.
- [50]. Riordan, N. H., Menh, X., Taylor, P., Riordan, H. D. (2001). Anti-angiogenic, anti-tumor and immunostimulatory effects of a nontoxic plant extract (PMG). *Allergy Research Group Focus Newsletter, Chiropr. Med.* 1(3), 116.

الفصل الثاني

أولاً :

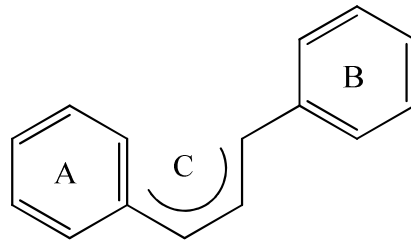
الفلا فونيدات

I. تعريف الفلافونيدات:

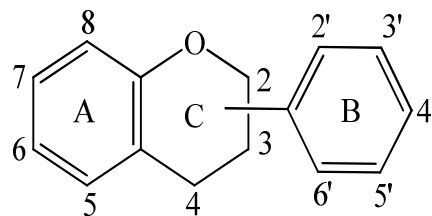
الفلافونيدات عبارة عن مركبات طبيعية تحلل قسما بالغا من نواتج الأيض الثانوي، وهي صبغات نباتية تتواجد في الجزء الهوائي للنبتة خاصة في الأوراق و الأزهار إذ تعطىها خاصية تلوين مميزة [1]. تتواجد منحلة في الفجوات على شكل إيثيروزيدات (Hétérosides)، أو كمكونات للبلاستيدات الخاصة، أما الأجليكولات فتتركز في المناطق الليبوفيلية. عرفت لأول مرة من قبل العالم "Albert Szent-györgyi" و الذي صنفها على أساس أنها فيتامين P [2].

تعدّ الفلافونيدات من المركبات البولي فينولية، تحتوي على مجموعات بديلة هي في الغالب مجموعات هيدروكسي أو ميتوكسي، وقد توجد هذه المركبات على هيئة جليكوزيدات أي يحتوي بنائها على وحدات سكرية، التي قد تكون على هيئة سكر أحادي أو ثنائي، وقد يدخل في بناء السكر أكثر من وحدتين [3].

تظهر الفلافونيدات في النباتات بني كيميائية مختلفة، إذ تم التعرف على أكثر من 9000 فلافونيد [4]، جميعها تشترك في الهيكل القاعدي الذي يتكون من 15 ذرة كربون، تتوزع على حلقتين عطريتين A و B ترتبطان بسلسلة تحتوي ثلاث ذرات كربون، و في غالب الأحيان الجسر الرابط بين الحلقتين A و B يتحلق ليكون الحلقة البيرانية C [1]. (شكل 1-2-)



الشكل 1: الهيكل القاعدي للفلافونيدات



الشكل 2: الوحدة الأساسية للفلافونيدات

II. تصنيف الفلافونيدات:

تصنف الفلافونيدات إلى عدّة مجموعات، كل مجموعة حسب درجة تأكسد الحلقة C، وكذلك حسب نوع التحلق، في حين يحدد نوع الفلافونيد داخل المجموعة الواحدة من خلال المستبدلات على الحلقتين A و B [5].

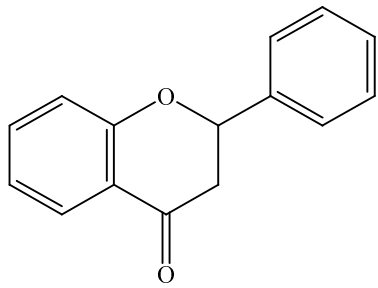
1 - الفلافون: يمكن للحلقة B المشار إليها سابقا أن تتواجد في الموضع 2، و تكون الرابطة C₂-C₃ غير مشبعة، سمّي المركب حينئذ فلافون.

2 - الفلافونول: إذا وجدت في الموضع 3 مجموعة هيدروكسيل (OH) حرة أو مستبدلة (OR) لمركب الفلافون حيث يتم تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في مرحلة الشالكون سمي المركب بالفلافونول، يشكل هذا الأخير نواة أساسية للعديد من المركبات الطبيعية.

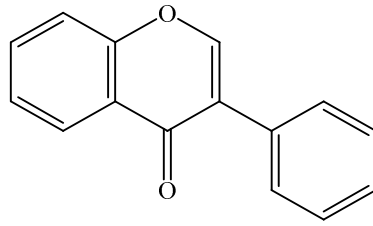
3 - الفلافانول: هي المركبات التي تكون فيها الرابطة C₂-C₃ في هيكل الفلافون مشبعة.

4 - نيوفلافون: إذا وجدت الحلقة B في الموضع 4 و مجموعة الكربوكسيل في الموضع 2 و الرابطة C₂-C₃ كانت غير مشبعة سمي المركب نيوفلافون [6]. فهو قليل الانتشار في الطبيعة خلافا عن الفلافونات و الفلافونولات المنتشرة على نطاق واسع [7].

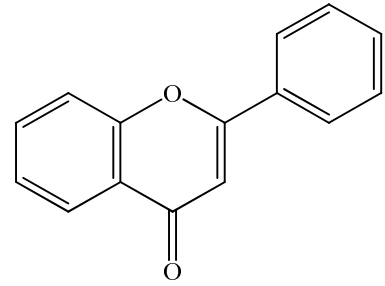
5 - إيزوفلافون: تختلف في بنائها عن الفلافونات في موضع ارتباط الحلقة B إذ ترتبط هذه الأخيرة في الموضع رقم 3 بدلا من الموضع 2.



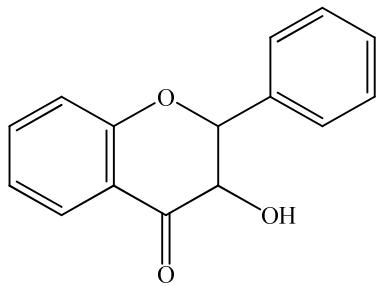
Flavanone



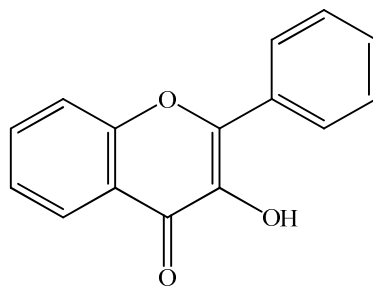
Isoflavone



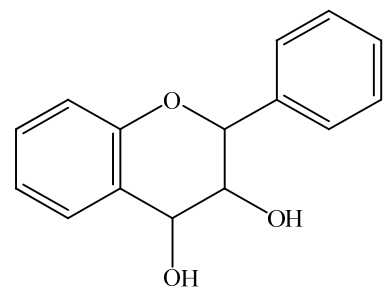
Flavone



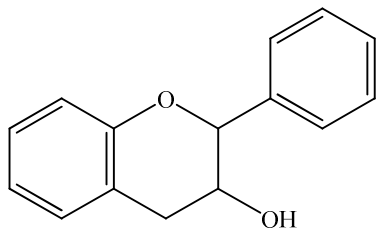
Dihydroflavonol



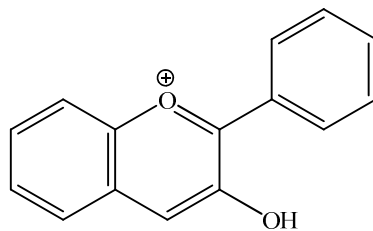
Flavonol



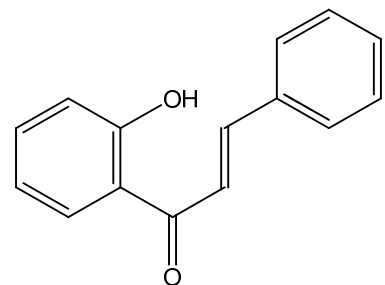
Flavan-3,4-diol



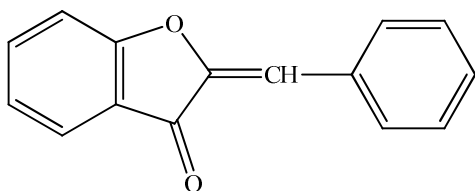
Flavan-3-ol



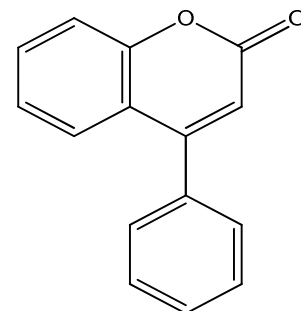
Anthocyanidine



Chalcone



Aurone



Neoflavone (4-phenyl-coumarine)

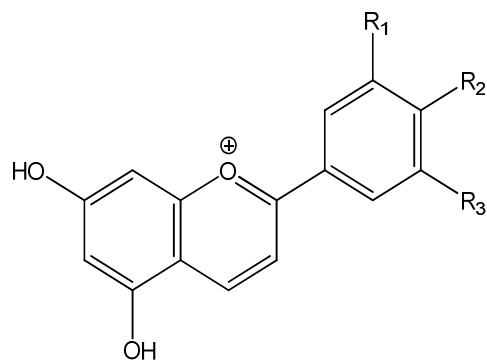
تصنع الفلافونيدات في البلاستيدة إنطلاقاً من Cnamoyl CoA الناتجة من الشبكة الأندوبلازمية المحببة، مركبة في شكل إيتروزيديات، حيث أن البعض منها يغادر البلاستيدة و يتراكم في الفجوة (مثل الأونتوسيانات). فالإنزيم المفتاح لتشكيل الهيكل الفلافونيدي هو Chalcone Synthase (CHS) [8]، الذي يحفز تدريجياً تكاثف ثلاث وحدات الخلات من 4-coumaroyl malonyl-CoA إلى 4,2',4',6-tetrahydroxychalcone هذا الأخير يعتبر نقطة الانطلاق لاصطناع العديد من الفلافونيدات الموضحة في المخطط-1 و هذا بوجود محفزات إنزيمية تخص كل مرحلة من المراحل المختلفة.

يمثل الفلافانولون أهم الفروع الفلافونيدية حيث ينتج من عملية تحويل فراغية نوعية انطلاقاً من نواة الشالكون [9].

كما أن إعادة الترتيب للفلافانولون بفعل الإنزيم Iso flavones synthase الذي يقود إلى الإيزوفلافون يعتبر أول تفاعل نوعي للاصطناع الحيوي للإيزوفلافونيدات [10]، حيث أن 2-hydroxyisoflavone هو المركب الوسيط في هذا التفاعل [11]. ويعتقد أن العملية تتم في خطوتين: الأولى هجرة 2،1 aryl مصحوبة بأكسدة، و الثانية نزع الماء لتشكيل الإيزوفلافون. إما إنزيم Flavonone hydroxylase يحفز تفاعل hydroxylation للفلافانولون إلى Dihydroflavanol وهذا ما أظهرته أبحاث Forkmann [12].

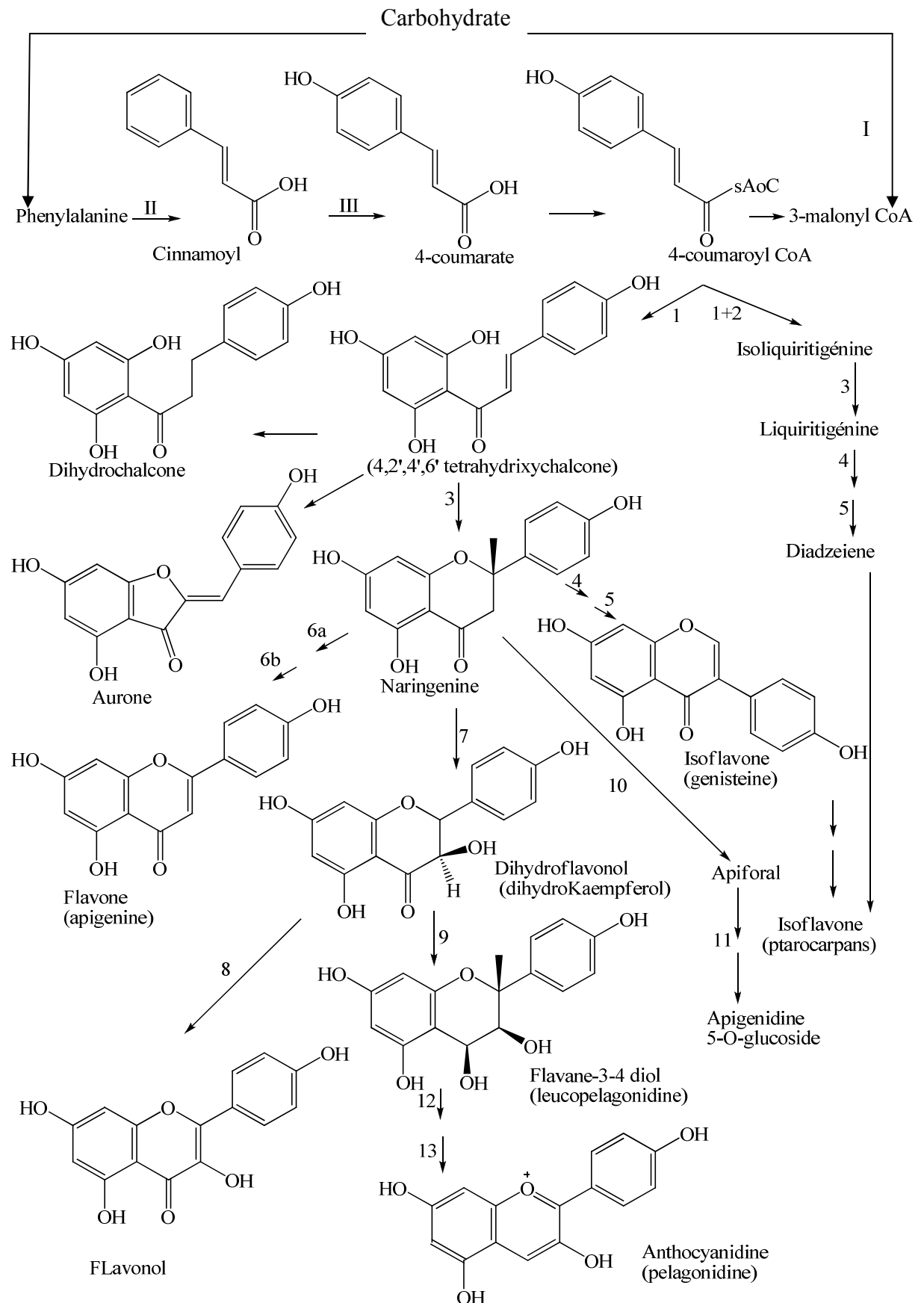
أهم المركبات الفلافونويدية هي:

الأنتوسيانات Anthocyanes: هي مركبات فلافونيدية تعطي بعد تأينها ألوان مختلفة من أجل قيم متنوعة للـ pH: من أحمر- برتقالي في وسط حامضي إلى أزرق - نيلى في وسط قاعدي، وفي حقيقة الأمر يرجع اللون كذلك إلى عدد المجموعات الهيدروكسيلية (OH) غير الميتلية التي يحملها هيكل الـ anthocyanes، فالـ pélagonidine التي تحمل مجموعة (OH) واحدة ذات لون احمر- برتقالي، بينما cyanidine التي تملك مجموعتين (OH) فلونها أحمر أرجواني- قرميزي، أما Delphinidine ذات ثلاث مجموعات (OH) فلونها أزرق- نيلى (الشكل 3)، و الجزئي السكري للإيثيروزيديات فليس له أي علاقة باللون [7].



الشكل-3- : هيكل الأنثوسيان

	R ₁	R ₂	R ₃
Pérlargonidine	H	OH	H
Cyanidine	OH	OH	H
Delphinidine	OH	OH	OH



المخطط -1- الاصطناع الحيوي لمختلف الأقسام الفلافونيدية

الجدول - 1 - قائمة الإنزيمات الداخلة في التصنيع الحيوي

الإنزيم	الرقم
Acétyl-CoA	I
Phénylalanine ammonia-lyase(PAL)	II
Cinnimate 4- hydroxylase (C ₄ H)	III
4-Coumarate:CoA ligase (4CL)	VI
Chalcone synthase (CHS)	1
Polyketide réductase (PKR)	2
Chalcone isomérase	3
2-Hydroxyisoflavone synthase (IFS)	4
2-Hydroxyisoflavanol déshydrathase	5
6-a Flavone synthase I (FNSI)	6a
6-b Flavone synthase II (FNSI)	6b
Flavanone 3-hydroxylase (FHT)	7
Flavonol synthase (FLS)	8
Dihydroflavanol 4- réductase (DFR)	9
Flavanone 4-réductase (FNR)	10
Leucoanthocyanidine 4-réductase	11
Anthocyanine synthase (ANS)	12
Flavonoid 3-O-glucosyltransférase (FGT)	13

IV. الفعالية البيولوجية للفلافونيدات

زاد الإهتمام في السنوات الأخيرة بالمركبات الفلافونيدية بحيث بينت نتائج أبحاث مكثفة في ميدان الطب و البيولوجيا فعاليتها المضادة للسرطان، المضادة للحساسية، المضادة للفيروسات و البكتيريا و المضادة للأكسدة وفعاليات أخرى [13].

1. التأثير المضاد للسرطان :

أثبتت تجارب عديدة و مكثفة الدور الوقائي للفلافونيدات ضد ظهور السرطان، ويعتبر النشاط المضاد للأكسدة لهذه المركبات إحدى الآليات الأولى التي تمت دراستها. تعمل الفلافونيدات على اقتناص الجذور الحرة التي تؤدي إلى إحداث تشوهات بالحمض الريبي النووي ADN المنقوص الأكسجين و بالتالي حدوث طفرات في المورثات الورمية أو الكابحة لظهور الأورام، التي تعتبر بادرة لظهور هذا المرض [14].

يمكن للفلافونيدات أن تثبط الإنزيمات المتدخلة في تنشيط procarcinogènes و تحويلها إلى مواد مسرطنة [15]، حيث تم إثبات دور كل من الـ kaempférol، quercetine و

galangin، وكلها من صنف الفلافونول إضافة إلى apigénine من صنف الفلافون في تثبيط إنزيم Cyt p 450 من عائلة Cyp1 A وهو من إنزيمات المرحلة الأولى للتحويل الحيوي في الكبد و يعمل على زيادة نشاط أغلب المواد الكيميائية المولدة للسرطان كالهيدروكربونات العطرية لجعلها قادرة على الارتباط بـ ADN و إحداث الطفرات [16].

في حين يعمل كل من narigin و quercetine على تثبيط Cyp 3A4 و هو من الإنزيمات الأكثر تواجد في الكبد ويعمل على إستقلاب عدد كبير من مولدات السرطان و الأدوية [16].

2. التأثير المضاد للحساسية:

يعود هذا الفعل إلى تأثير الفلافونيدات على إنتاج الهيستامين المسبب للحساسية، فتعمل الفلافونيدات على تثبيط بعض الإنزيمات المحررة للهيستامين من خلايا الماستوسيت والخلايا القاعدية كـ AMP phosphodiesterase و Ca^{2+} dépendante ATPases فمثلا يعمل هذا الأخير على تحرير الطاقة من إماهة ATP لتسهيل إمتصاص الكالسيوم من قبل الأغشية الخلوية هذا الذي يسمح بتحرير الهيستامين المخزن داخل الحويصلات الخلوية.

كما أثبتت الدراسات أن مركب quercetine أظهر قدرة أكبر من تلك التي لـ Cromoglycate de sodium و المستعمل كدواء مضاد لتحرير الهيستامين [17].

3. التأثير المضاد للإلتهاب :

إن إستقلاب حمض الأراشيدونيك arachidonic acide تحت تأثير كل من إنزيمي cyclooxygénase و lipooxygénas يؤدي إلى إنتاج كل من Leucotriènes و prostaglandines المسؤولة على مظاهر الإلتهاب. وقد بين Landofى وفريقه أن بعض الفلافونيدات قادرة على تغيير مسار حمض الأراشيدونيك داخل الصفائح الدموية، حيث ثبت أن كل من myricétine و quercetine بتركيز عالية يثبطان كل من cyclooxygénase و lipooxygénase أما عند التراكيز المنخفضة فيثبطان إنزيم lipooxygénase في حين كل من chrysin و apigénin يوقفان نشاط cyclooxygénase [18].

4. النشاط المضاد للفيروسات و البكتيريا :

أكثر ما ركزت عليه الأبحاث فيما يخص نشاط الفلافونيدات المضادة للفيروسات هو دراسة تأثير هذه المركبات على فيروس HIV المسؤول عن أعراض العوز المناعي المكتسب (السيدا) [19]. وقد تم إثبات فعالية الفلافونيدات على كبح تضاعف فيروس السيدا و ذلك بتثبيطها لإنزيم الإستتساخ العكسي revers transcriptase [14،20]. لكن تأثيرها الكابح على كل من إنزيمي ARN و ADN بوليمراز للخلية العائل أكبر من ذلك الملاحظ على revers transcriptase الفيروسي [21،22]. بينت تجارب حديثة التأثير الإنتقائي لبعض الفلافونيدات على فيروس HIV وذلك بتداخلها مع بروتين سكري glycoprotéine موجود على سطحه وهو gp120 مما يعيق ارتباط هذا الفيروس بالخلية العائل [23].

نظريا للفلافونيدات تأثير مضاد للبكتيريا وهذا من خلال إثبات فعاليتها المثبطة لإنزيم ADN gyrase على النماذج المخبرية in vitro [24].

أظهرت دراسات حديثة نشاط الفلافونيدات المضادة للبكتيريا *Staphylococcus aureus* [25]، و تعتبر الآلية التي تؤثر من خلالها الفلافونيدات ضد الميكروبات جد معقدة و نذكر من بين الفرضيات ما يلي :

- تثبيط الإنزيمات الميكروبية الخارج الخلوية.

- حجز المواد الضرورية للنمو الميكروبي و التقاط بعض المعادن مثل الحديد.
- تنشيط النشاط الإستقلابي للمكروبات [26].

V. خواص الفلافونيدات [7] :

بما أن الفلافونيدات مركبات هيدروكسيلية فإنها لا بد أن تتصف بخواص و صفات الفينولات، فهي مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة ذوابة في القواعد القوية مثل هيدروكسيد الصوديوم. تتصف الفلافونويدات التي تحمل عددا أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة، أو التي تحوي بقية سكر بالصفة القطبية، و عليه فهي ذوابة في المذيبات القطبية مثل الميثانول والإيثانول و ثنائي ميثيل سلفوكسيد و الأسيتون و الماء. و وجود بقية السكر في جزيء المركب يجعله أكثر ذوبانا في الماء، أما الفلافونونات و الفلافونات التي تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الكلورفورم و الإثير.

VI. الكشف عن الفلافونيدات [7] :

يمكن الكشف عن المركبات الفلافونيدية بالألوان المميزة التي تعطيها مع الكثير من الكواشف التي تستخدم في الدلالة على المركبات الطبيعية من بينها:

- كلوريد الألومنيوم (5%) : يعطي بقع صفراء في وجود المادة الفلافونيدية التي تحمل مجموعة هيدروكسيل في الموضع 5 .
- هيدروكسيد الصوديوم: يعطي بقع صفراء أو برتقالية مع جميع الفلافونيدات.
- حمض الكبريت المركز: يعطي في وجود كل الفلافونيدات ألوان صفراء أو برتقالية .
- محلول الفانيلين HCl (5%) : يحضر بإضافة HCl المركز إلى محلول فانيلين (Vanilline) في الإيثانول بنسبة 1 : 4 على التوالي. ويستدل على وجود جميع الفلافونيدات في الحال أو بعد التدفئة البسيطة، إلا أن الفلافونونات تعطي إيجابية تجاه هذا الكاشف ولكن بصورة أبطأ من الفلافونيدات الأخرى.

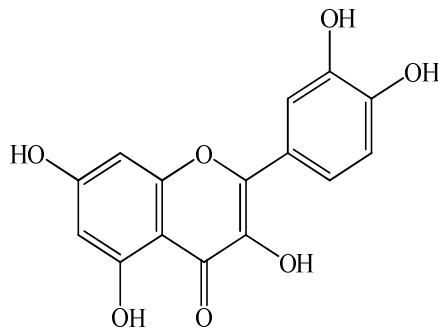
VII. تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونيدي :

1- تثبيت مجموعة الهيدروكسيل :

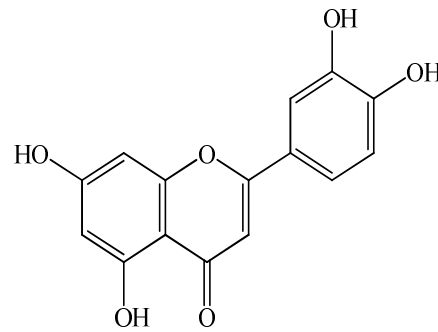
إن تثبيت المجموعات الهيدروكسيلية في الموضعين 5 و 7 يتم قبل تشكيل الحلقة A، و لهذا فهي تعتبر مجموعات أصلية، كذلك الحال بالنسبة الموضع 4' للحلقة B الذي يكون مستبدلا في معظم الحالات [27].

أما تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في الموضع 3 يتم في مرحلة تكوين الشالكون على خلاف الموضع 3' الذي يتم فيه تثبيت مجموعة الهيدروكسيل بعد غلق الحلقة C، وبالنسبة للموضعين 2' و 6' فننادرا ما يكونان حاملين لهذه المجموعة [28،29].

مثال



Quercétine



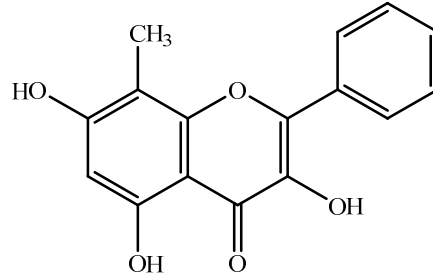
Lutéoline

2- تثبيت مجموعة المثل :

يتم تثبيت المثل على هيكل الأجليكون بعد تثبيت الهيدروكسيل في حالتين :

• الحالة الأولى:

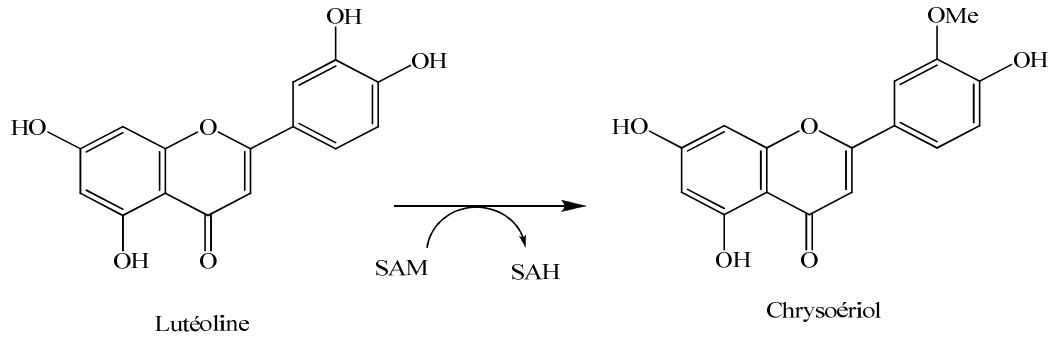
يتم تثبيت مجموعة الميثيل على الأجليكون بواسطة رابطة تكون بين كربون الميثيل و كربون النواتين A و(أو) B و مثال على ذلك المركب



8-C-methylcalangine

• الحالة الثانية :

هي مثيلية المجموعات الهيدروكسيلية التي يتم تثبيتها من قبل (O-methylation) و هذا في وجود أنزيم O-methyltransférase كمانح للمثيل [31,30]. و الشكل التالي يبين ذلك.



SAM : S – adénosyl méthionine

SAH : S – adénosyl homocysteine

3- تثبيت السكريات :

تسمى المركبات الفلافونيدية التي تحمل وحدات من السكر بالفلافونيدات الإيثيروزيدية، وقد تكون أحادية أو ثنائية أو ثلاثية وحتى رباعية وهي حالة نادرة. وهناك حالتين لتثبيت جزيئات السكر على ركيضة الأجليكون.

• الحالة الأولى:

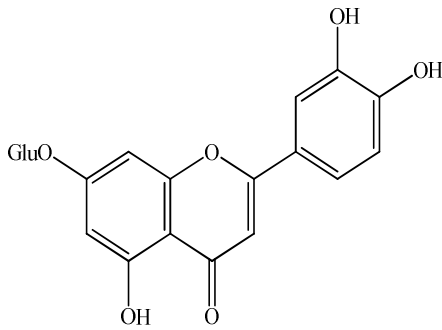
تكون فيها الرابطة بين جزيئة السكر و كربون الأجليكون أي من النوع (C-glycoside)، وهي رابطة جد مقاومة للأحماض، نجدها غالبا في الموقع C-6 (و، أو) الموقع C-8 [32].

• الحالة الثانية:

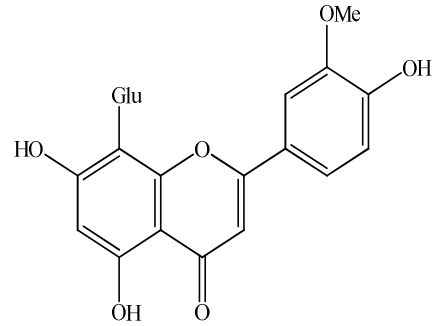
بعد تثبيت مجموعة الهيدروكسيل تتدخل فيها مجموعة السكر لتكون الرابطة من النوع (O-glycoside) عادة ما يكون هيدروكسيل الموقع 7 للفلافونات، و هيدروكسيل الموقع 3 للفلافونولات، ولحدوث هذا الاستبدال يتطلب إنزيم « O-glucosyl tarnsférase » . كما يمكن أن ترتبط جزيئه سكر ثانية بالبنية الفلافونيدية إما مع مجموعة (OH) للأجليكون، أو مع مجموعة (OH) الكحولية للسكر المثبت من قبل [33].

- يمكن في بنى أخرى ملاحظة الحالتين معا (C-glycoside) و (O-glycoside) كما هو

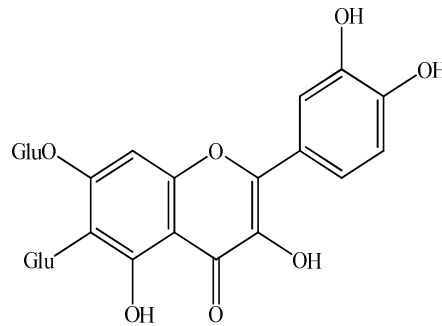
موضح في المثال التالي:



7-O-Glucosylapigénine



8-C-Glucosylchrysoériol



7-O-Glucosylisoorietine

ثانياً:

طرق الإستخلاص، الفصل و التنقية

I. طرق الاستخلاص الفصل و التنقية:

يتم استخلاص الفلافونيدات في عدة مراحل :

1. تحضير النبتة :

قبل القيام بعملية الاستخلاص، يشترط أن تنقى النبتة من الشوائب، ثم تجفف جيدا في أماكن خاصة تسمح بالتهوية وبعيدة عن أشعة الشمس والرطوبة، بعدها تطحن لتكون جاهزة للاستخلاص.

2. الاستخلاص [34] :

تعامل النبتة بمذيب مناسب، وأكثر المذيبات استخداما هو الميثانول المائي الذي يكون بإحدى النسب التالية :

ميثانول / ماء 8 : 2

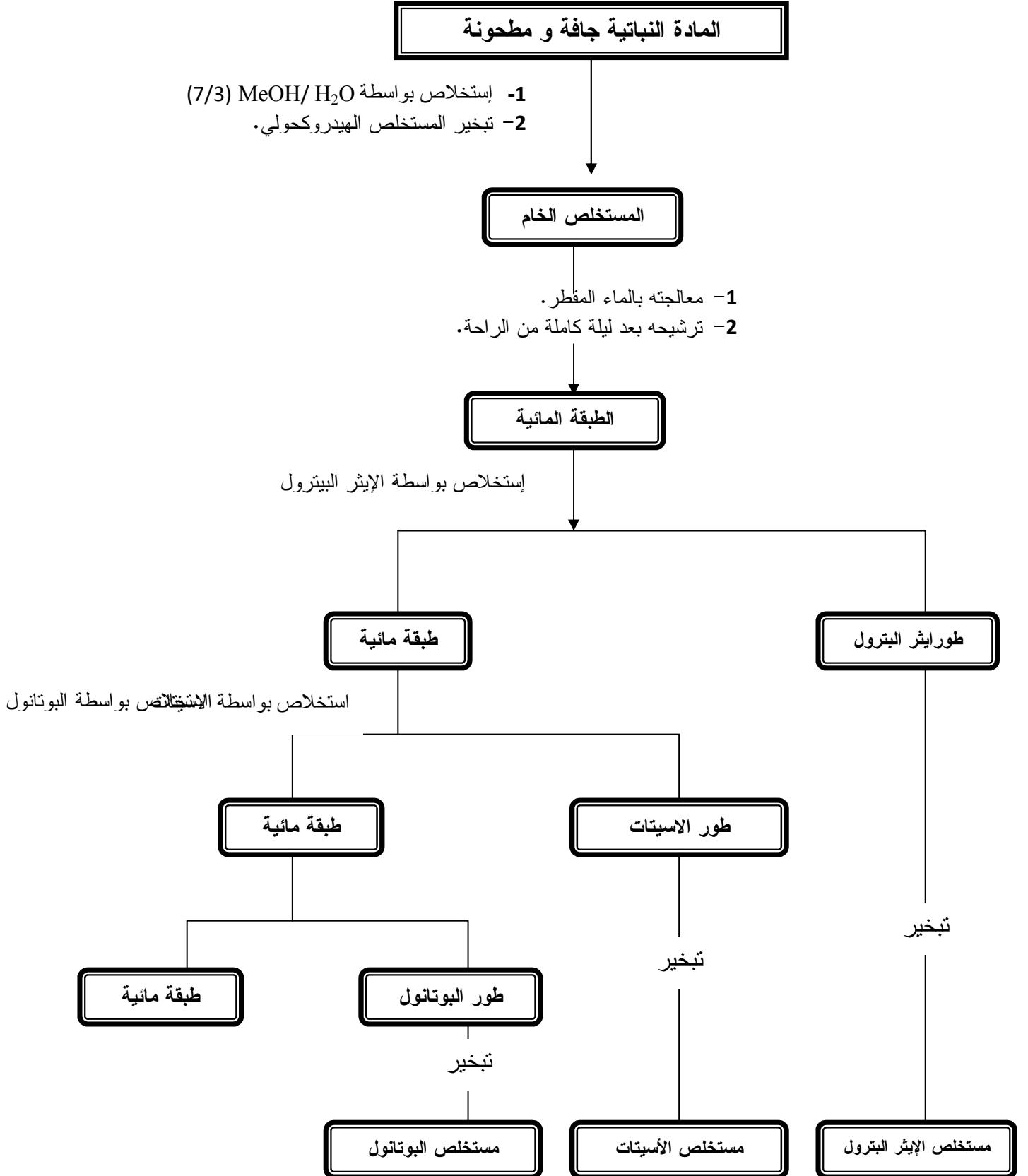
ميثانول / ماء 7 : 3

ميثانول 100 %

تنتقع الأجزاء النباتية في المحلول المائي للميثانول لمدة لا تقل عن يوم واحد مع التحريك من أن لآخر، و من ثم يرشح ويغسل المتبقي من الأجزاء النباتية بالمذيب المستخدم للاستخلاص. يختزل حجم الرشاحة وذلك بتبخير أكبر كمية ممكنة من الميثانول، تعالج الرشاحة المائية بالماء المقطر المغلي ثم تترك ليلة كاملة للراحة، ليرشح بعدها.

يتم استخلاص الطبقة المائية المحصل عليها أولا بواسطة الهكسان وهذا للتخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون والتربينات و الكلوروفيل (قد تحوي رشاحة الهكسان على الفلافونيدات و بالأخص تلك التي تتصف بقطبية ضعيفة، وعليه فإن هذه الرشاحة لا تهمل، و يكشف عن وجود الفلافونيدات فيها). الرشاحة المائية تعامل بخلات الإيثيل في خطوة ثانية عدة مرات، تجمع المستخلصات و تتركز تحت ضغط منخفض أما الطور المائي تجرى له عملية استخلاص أخيرة بواسطة البوتانول العادي، تعاد العملية ثلاث مرات، تجمع كذلك مستخلصات البوتانول وتتركز حتى الجفاف، ويتم تدويبها في الميثانول.

في النهاية تكون لدينا مستخلصات جاهزة لفصل مركباتها عمليات الاستخلاص المتبعة ملخصة في المخطط -2-



II. طريقة التحليل الكروماتوغرافي :

تعتبر الكروماتوغرافيا طريقة وتنقية لفصل مكونات خليط ما، وكلمة Chroma معناها بالغة اللاتينية لون، نشأت هذه الفكرة على يد العالم Twett سنة 1903 وذلك لفصل المواد الملونة في الزهور و الأوراق، ليتسع مجال استعمالها، يمتد حتى إلى المواد غير الملونة سواء الصلبة أو السائلة أو الغازية [35].

كما يمكن اعتبارها طريقة فيزيائية تستعمل أساسا للفصل، أو هي طريقة تحليلية تحضيرية لفصل المركبات أو الخلائط. وتعتمد جميعها على توزيع المادة تحت الدراسة على طورين، أحدهما ثابت و الآخر متحرك. فالطور الثابت جامدا أو سائلا محملا على الدعامة الثابتة، أما الطور المتحرك يمكن أن يكون سائلا عضويا [36].

و لغرض الفصل نستعمل عدة طرق كروماتوغرافية منها :

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

1. كروماتوغرافيا العمود:

الهدف من هذه التقنية هو فصل خليط معقد يحتوي على عدد من المركبات المراد فصلها مثل الفلافونيدات، أو جعلها في شكل كسور أقل تعقيدا لتعالج بطرق أخرى، وتعد هذه الطريقة من أساسيات الفصل نظرا لقدرتها العالية على تمييز المركبات تبعا لارتباطها بالدعامة الثابتة، حيث تبدأ المركبات الأقل إمتزازا في التحرك، ثم تليها المركبات الأكثر إمتزازا وهذا بزيادة قطبية المذيب. و يستعمل لهذا الغرض كدعامة ثابتة :

السيليكا، السيليلوز أو متعدد الأميد.

حيث يستخدم السيليكاجال لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية، أما السيليلوز فيستخدم لفصل الفلافونيدات الغليكوزيدية، غير أن متعدد الأמיד لقي تطبيقاً واسع النطاق في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية عن بعضها البعض على اختلاف أنواعها. وتتحقق هذه التقنية بـ:

- اختيار العمود المناسب الذي تختلف أبعاده باختلاف كمية المستخلص، و يثبت بواسطة حامل ثم يزود بقليل من الرمل الخاص يدعى Sable de fontainebleau بسمك 0.5 سم، و يعبأ بالطور الثابت متعدد الأמיד المشبع بالمذيب الأقل قطبية (عادة يعبأ العمود إلى ثلثيه) وهذا بأخذ كمية كافية مقارنة بكمية المستخلص حيث يلزم حوالي 10 غ من متعدد الأמיד لكل 1 غ من المستخلص.

يرص العمود جيداً ليكون جاهزاً للاستعمال، بعدها يوضع المستخلص سواء كان :

• على شكل مسحوق :

يتم تذويب المستخلص في كمية قليلة من الميثانول ثم يضاف إليه كمية قليلة من متعدد الأמיד حتى يصبح في حالة تجانس، أين يتم تجفيفه تحت الضغط المنخفض ليضاف المسحوق بعناية مباشرة أعلى العمود ثم يغسل بدفعات متتالية بمذيب التولين، بعدها ترفع نسبة الميثانول تدريجياً.

• على شكل سائل :

يتم تذويب المستخلص في أقل كمية من الميثانول بواسطة ماصة باستور يوضع بعناية و بصورة متساوية على السطح ثم يغسل بالتولين للتخلص من الميثانول، بعدها ترفع قطبية المذيب تدريجياً إلى غاية 100 % ميثانول.

تتابع الحزم النازلة بمصباح الأشعة فوق البنفسجية، تستقبل أسفل العمود على شكل كسور، ليتم اختبارها بكماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

2. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM:

هي تقنية سهلة وسريعة، تستخدم بهدف الفصل والتنقية لمختلف الخلائط التي تحتوي على عدد قليل من المركبات، تعتمد على مبدأ الإمتزاز على سطح الدعامة الثابتة (سيلسكاجال، متعدد الأמיד أو السيليلوز)، وهي عبارة عن صفائح مصنوعة من الألمنيوم أو البلاستيك أو

الزجاج، مربعة الشكل ذات أبعاد 20 x 20 سم، منها ما يباع جاهز للاستعمال مباشرة ومنها ما يحضر في المخابر.

عمليا بواسطة ماصة شعرية توضع نقطة أو خط من الخليط المراد فصل مكوناته على بعد 1.5 سم من حافة الصفيحة، تغمص هذه الأخيرة في وعاء يحتوي على الملمص المناسب، أثناء هجرته إلى الأعلى و مرورا بالنقطة أو الخط يلاحظ تحرر مكونات الخليط في شكل حزم التي تحدد بواسطة مصباح UV، تكشف هذه الحزم كلا على حدا، يتم إذابتها في الميثانول ثم ترشح في قمع زجاجي للتخلص من الدعامة الثابتة، بعدها يركز الراشح و تجرى له عمليات فحص متعددة للتأكد من نقاوته.

أهم الأنظمة المستعملة حسب نوع الدعامة الثابتة لفصل الفلافونيدات [36] :

• على السيليكاجال

نوع الفلافونويد	جمل المملصات
الجليكوزيدية	- EtOAc -Pyr -H ₂ O - MeOH (80 : 20 : 10 : 5) (flavone C-glycosides)
الأجليكونات القطبية متعددة الهيدروكسيل	- CHCl ₃ - Acétone - Tol (5 : 7 : 8) - EtOAc - H ₂ O - MeOH (63 : 12 : 9) - EtOAc - MEC-HCO ₂ H -H ₂ O (5 : 3 :1 : 1) - HOAc - H ₂ O - MeOH (3 : 3 : 4)
الأجليكونات غير القطبية متعددة الميثيل	- CHCl ₃ - MeOH (15 : 3) , (3 : 1)

• على لمتعدد الأמיד

جملة المملصات	نوع الفلافونويد
- H ₂ O- MeOH -MEC- AcAc (13 : 3 :3 :1)	الجليكوزيدات
- MeOH- AcOH – H ₂ O (18 :1 :1) - H ₂ O- EtOH-n BuOH- AcOH (50 :25 :20 :2)	الأجليكونية القطبية متعددة الهيدروكسيل
- Tol- Hex – MeC – MeOH (30 :90 :2 :1.5) - Tol- Hex – MeOH (4 :3 :3) - Tol- Ether de petrole - MeC – MeOH (60 :26 :10 :10)	الأجليكونية غير القطبية متعددة الميثيل

• على طبقات السيليلوز :

صالحة لكل الفلافونيدات :

n BuOH- AcOH- MeOH 4 : 3 : 5 طور عضوي

t BuOH- AcOH- MeOH 3 : 1 : 1 طور عضوي

40 % AcOH بالنسبة للأجليكونات

15 % AcOH بالنسبة للأجليكونات

3. كروماتوغرافيا الورق CP :

تعتبر كروماتوغرافيا التحضيرية على الورقة تقنية متداولة في المخابر خاصة في تحليل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي وتعد من أفضل التقنيات الكروماتوغرافية لفصل المركبات الفلافونيدية .

و من أنواع الورق الموجودة هي: Arches, Durieux, Schull, schleider, Whatman، و الأكثر انتشارا هو Whatman، توجد ثمانية أنواع من هذا الورق مرتبة حسب سمكها، وحسب نسيج مساحتها وكذا سرعة انتشار الماء بها.

عملياً بواسطة ماصة يوضع الخليط على كامل عرض الورق من نوع Watman (يعتبر واطمان رقم III الأحسن لفصل المركبات الفلافونيدية) على مسافة قصيرة من الحافة العلوية مع ترك هامش صغير (2 سم). بعد أن تجف الورقة تغمص في المملص حيث تبدأ الحزمة في الهبوط تسلسلياً، فعند انقضاء الوقت المناسب تستخرج الورقة وتترك لتجف ثم تحدد الحزم بالإستعانة بمصباح U V، تقص إلى قطع صغيرة و تغمص في الميثانول المغلي. بعد الترشيح تركز الرشاحة ثم تفحص الحزم بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، فإذا كانت الحزمة تمثل مركبا وحيدا نتوقف عن عملية الفصل. أما في الحالة العكسية (الحزمة تتكون من عدة مركبات) فنستمر في تكرار عمليات الفصل إلى غاية فصل جميع مكونات الخليط.

تستعمل في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية عدة أنظمة [37] نذكر منها:

	بنسب مختلفة 15 – 50 %	AcOH
الطبقة العضوية	n BuOH / AcOH / H ₂ O [4 : 1 : 5]	BAW
الطبقة العضوية	t BuOH / AcOH / H ₂ O [3 : 1 : 1]	TBA
	MeOH / AcOH / H ₂ O [3 : 1 : 1]	MAW
	AcOH / H ₂ O / Hcl [3 : 1 : 1]	Forestal

4. - كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC)

و هي نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي ألتجزئي الذي يتطلب إستخدام ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمود، و هي التقنية الأفضل لفصل و تحليل الخلائط المعقدة في وقت قصي [24]، و أهم المذيبات المستعملة هي :

المذيب 1 : الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : (40 / 100 / 900). أو (40 / 800 / 200).

ثالثًا :

التّعين البنّيوي

I. الخواص الكروماتوغرافية

1. اللون الإستشعاعي :

إن لون المركبات الفلافونيدية تحت الأشعة فوق البنفسجية هو أول المعطيات التي تعطي فكرة أولية على بنية الفلافونيد التقريبية، فالجدول -2- يلخص العلاقة بين بنية الفلافونويد ولونه تحت الأشعة فوق البنفسجية UV [34].

الجدول-2- : العلاقة بين بنية الفلافونويد و لونه تحت UV

التراكيب البنوية المحتملة	الإستشعاع
<ul style="list-style-type: none"> - فلافون - فلافون مع (5-OH). - فلافون مستبدل في الموضع 3. - 7، 5، 6 أو 5، 7، 8 ثلاثي هيدروكسيل فلافون. - بعض الشالكونات 	بنفسجي - أسود
<ul style="list-style-type: none"> - فلافون أو فلافانول بدون OH في الموضع 5. - فلافون او فلافونول في يملك OH في الموضع 3. - فلافونول مستبدل في 3 و بدون OH في الموضع 5. 	بنفسجي - نيلي
<ul style="list-style-type: none"> - فلافونول مع OH حر في الموضع 3 و مع أو بدون OH في الموضع 5. 	أصفر أو أصفر باهت
<ul style="list-style-type: none"> - ايزوفلافون. 	برتقالي لامع
<ul style="list-style-type: none"> - أوران. 	أصفر مخضر
<ul style="list-style-type: none"> - بعض الشالكونات. 	أخضر
<ul style="list-style-type: none"> - فلافانول بدون OH في الموضع 5. 	أزرق مخضر

2. ثابت الإنحباس R_f [25,21]

ثابت الإنحباس R_f هو قيمة مميزة للمركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، المملص، تركيز العينة وطبيعة المادة الدامصة....).

تلجأ في بعض الأحيان إلى المعامل R_f لأخذ معلومات عن البنية الجزيئية المحتملة، وهذا نظرا لوجود علاقة بين R_f وطبيعة المركب و تشكيله الفراغي، حيث أن قيمته تتأثر بالمستبدات و مواقعها على الجزيء. فانطلاقا من قيمة R_f في عدة أنظمة مختلفة يمكننا التمييز بين الجليكوزيدات و الأجليكونات، ومن جهة أخرى بين الجليكوزيدات أحادية السكر، ثنائية و متعددة السكر تبعا للجدول -3-

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

$$R_f = \frac{\text{المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية}}{\text{المسافة المقطوعة من طرف المملص (المذيب) من نفس النقطة}}$$

الجدول -3- : العلاقة بين R_f و البنية الفلافونويدية

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

I. الطرق الطيفية

1. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية

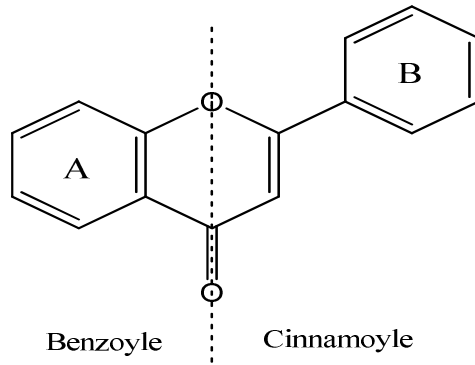
تعتبر مطيافية الأشعة فوق البنفسجية تقنية سهلة الاستعمال و لا تتطلب كمية كبيرة من المركب المراد تحليله. تلعب الأطياف المحصل عليها دورا هاما في التعرف على مختلف بنى

المركبات الفلافونيدية [8]، وهذا راجع إلى المعلومات الوافرة التي تقدمها، حيث تسمح بمعرفة الهيدروكسيولات الحرة و مواقعها على الهيكل الفلافونيدي وذلك بتشكيل أيونات أو معقدات مع مختلف الكواشف التي تترجم على طيف UV بإزاحة باتوكرومية أو هبسوكرومية للحزم الممتصة بالنسبة إلى طيف مرجعي ممتص في الوسط الميثانولي، ويتميز هذا الأخير بحزمتي إمتصاص أساسيتين، الحزمة I و الحزمة II [38].

1. 1- طيف الإمتصاص في الوسط الميثانولي:

يظهر طيف الأشعة فوق البنفسجية في الوسط الميثانولي حزمتين أساسيتين في جميع المركبات الفلافونيدية، إلا أنه يختلف إمتصاص هاتين الحزمتين باختلاف نوع المركب الفلافونيدي.

- الحزمة I : التي تمتص عند طول موجي أعظمي في حدود (300-400 nm)، تتسب إلى الشكل Cinnamoyle الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل C-4 مع الرابطة الثنائية و الحلقة B. إذ تسمح بتمييز الفلافونول عن الفلافون وتعطي معلومات عن التغيرات البنوية للحقتين B و C [34].
- الحزمة II : تعطي طيف موجي أعظمي في حدود (250 - 280 nm)، و ناتجة عن الشكل Benzoyle و ذلك نتيجة للرنين الناتج عن ترافق مجموعة كربونيل C-4 مع الحلقة البنزينية A كما هو موضح الشكل 4-



الشكل 4- ترافق مجموعة الكربونيل مع الحقتين البنزينيتين A و B

- يرتبط مكان ظهور الحزمتين على عدد ومواقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فمن الملاحظ أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل، فإن حزمة الامتصاص تزداد إلى طول

موجي أعلى "انزياح باتوكرومي". وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميتوكسيل، أو وحدات سكر تزاح حزمنا الامتصاص إلى طول موجي أقل "انزياح هيبسوكرومي" [7]، والجدول 5- يوضح مكان إمتصاص الحزمتين (I) و (II) حسب نوع الفلافونيد في الوسط الميثانولي .

الجدول - 4 - أهم الإنزياحات الملاحظة للعصابتين (I) و (II) في الوسط الميثانولي

العصابة I	العصابة II	توع الفلافونويد
250 – 280	350 – 310	فلافون
250 – 280	360 – 330	فلافونول ' 3-OH مستبدل'
250 – 280	385 - 350	فلافونول ' 3-OH حر'
275 - 245	330 – 310	فلافانول و <i>Dihydroflavonol</i>
270 – 230 الشدة منخفضة	390 – 340	شالكون
270 – 230 الشدة منخفضة	430 - 380	أورون
280 – 270	560 - 456	إنتوسيانيدين أو إنتوسيانين

1. ب- طيف الإمتصاص في وجود الكواشف :

• في وجود NaOH (NaOMe)

- باعتبار NaOH قاعدة قوية فهي تؤين كل هيدروكسيلات الفلافونويد، مما يؤدي إلى إنزياح Bathochrome للطيف الذي يكون واضحاً على الحزمة I، حيث تكون الفلافونيدات الأكثر هيدروكسيلية غير مستقرة بوجود هذا الكاشف و بالأخص الفلافونيدات التي تملك هيدروكسيل حر في الموقع 4.
- ظهور قمة جديدة في المجال 320 - 335 nm مقارنة بالطيف الميثانولي، دلالة على وجود OH حر في الموقع 7.
- و في هذه الحالة أيضاً يمكن بفعل القاعدة على الفلافون و الفلافونول أن نستدل على وجود مجموعة من الهيدروكسيل في المواقع 3 (و، أو) 4 و 7.
- في حالة الأيزوفلافون الهيدروكسيلي على الحلقة A، يعطي الطيف بعد إضافة NaOH إزاحة باتوكرومية تكون واضحة على الحزمتين I و II، إذا كان نظام ارثوا ثنائي هيدروكسيل في الموضعين 3' و 4' يلاحظ تناقص في الشدة مع مرور الوقت [2].

• في وجود NaOAc

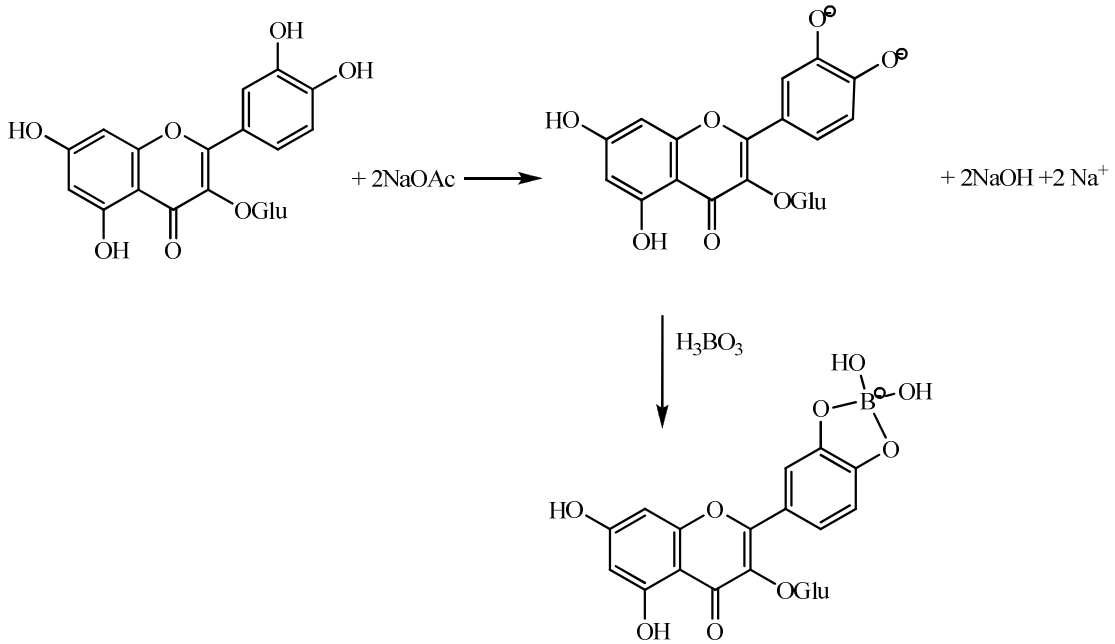
- باعتبار NaOAc قاعدة ضعيفة مقارنة بـ NaOH فهي تؤين فقط الهيدروكسيلات الأكثر حامضية C-7، C-3، C-4.
- إزاحة باتوكرومية ضعيفة على الحزمة II في وجود NaOAc تدل على وجود هيدروكسيل في الموقع 7، وتكون هذه الإزاحة غير مستقرة بوجود مستبدلات أخرى في الموقع 6 أو 8 [2].
- أما بالنسبة إلى الأيزوفلافون، فهذه القاعدة تؤين بالخصوص المجموعة الهيدروكسيلية الموجودة في الموقع 7. وهذا بظهور إزاحة باتوكرومية على الحزمة II (20-6 nm)، فإن لم تظهر يمكن القول أن C-6 يحمل مجموعة أوكسجينية [2].

• في وجود خلات الصوديوم مع حامض البوريك NaOAc+H₃BO₃

- يستعمل هذا الكاشف للدلالة على وجود مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل، في حالة وجود 3'، 4' أورثو ثنائي OH يؤدي إلى إنزياح باتوكرومي للحزمة I [26]، إذ يشكل حمض

البوريك في وجود خلات الصوديوم مع هيدروكسيلاات الفينولية في الموضع أورثو

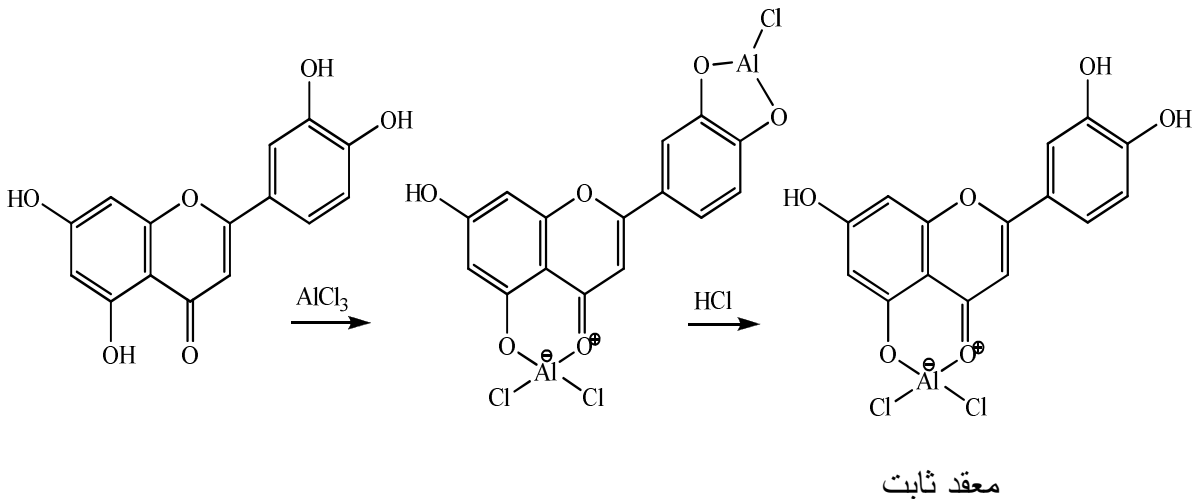
حسب الشكل (6).



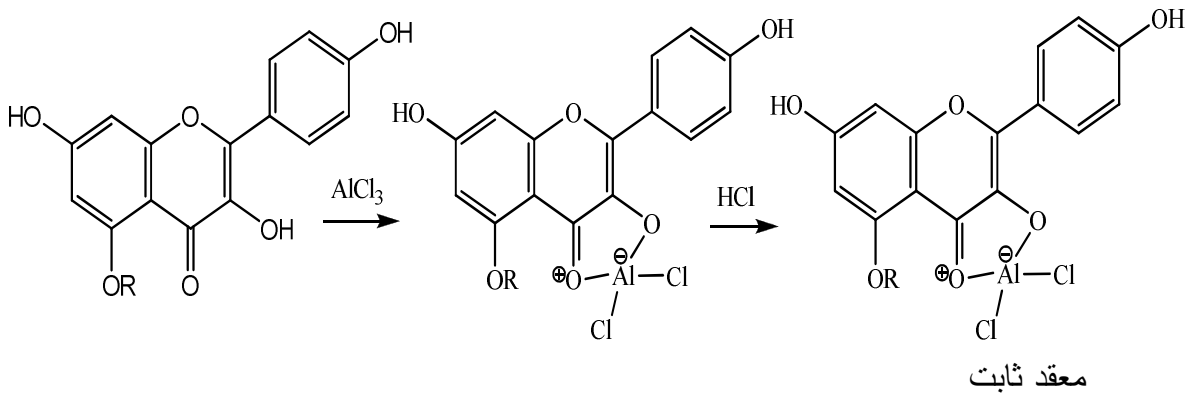
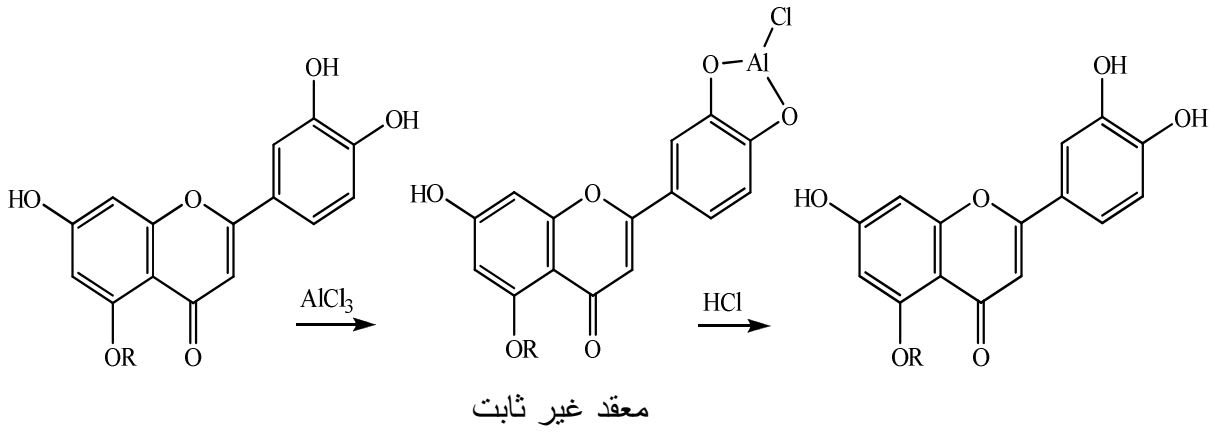
الشكل (6) : يوضح المعقد المتكوّن بين الفلافونويد ومحلول (NaOAc+H₃BO₃)

• في وجود AlCl₃، HCl، AlCl₃

يؤدي إضافة كلوريد الألومنيوم إلى العينة (مركب + ميثانول) في الوسط الحمضي إلى تشكيل معقدات ثابتة مع مجموعة الكربونيل، وهيدروكسيلاات المواقع 3 أو 5، ومعقدات غير ثابتة مع جملة أورثو ثنائي الهيدروكسيل مثل 3'، 4' كما هو موضح في الشكل (5).



معقد ثابت



شكل-5- المعقدات الثابتة و الغير ثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد إضافة HCl

الجدول (5) يبيّن أهمّ الإنزيمات الملاحظة بعد إضافة مجموعة الكواشف على العصابة I و II

الدليل	الإزاحة الكيميائية		الكاشف
	العصابة II	العصابة I	
Flavone	250-280	350-310	MeOH
Flavonol(3-OR)	250-280	360-330	
Flavonol(3-OH)	250-280	380-350	
3,4'-OH أو أرثو ثنائي OH على الحلقة A أو ثلاثة OH متجاورة على الحلقة B 4'-OH 3-OH, 4'-OR 7-OH	إستمرار تناقص شدة الإمتصاص بمرور الزمن (تفكك الطيف) 45+ إلى 60 دون نقصان في شدة الإمتصاص 45+ إلى 60 مع نقصان في شدة الامتصاص عصابة جديدة بين 335-320		NaOMe /NaOH
7-OH 7-OH مع مستبدل أكسجيني في C-6 و / أو في C-8 5, 6, 7 ; 5, 7, 8 ; 3, 3',4' tri-OH 7-OR (حالة 4'-OH flavones و flavonols فقط)	5+ إلى 20+ إزاحة صغيرة طيف يتفكك بمرور الوقت	$\Delta\delta(I) < \Delta\delta(I)$ NaOMe NaOAc	NaOAc
أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (6, 7 أو 7, 8)	12+ إلى 36+ إزاحة باتوكرومية ضعيفة		NaOAc+H ₃ BO ₃
أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (إضافة إلى أرثو di-OH على الحلقة B)	30+ إلى 40+ مقارنة بطيف AlCl ₃ + HCl 20+ إلى 25+ مقارنة بطيف AlCl ₃ + HCl		AlCl ₃
5-OH مع وجود مجموعة أكسجينية في C-6 5-OH مع عدم وجود مجموعة أكسجينية في C-6 3-OH أو 3-OH و 5-OH إمكانية 5-OH ومجموعة prenyl في C-6	17+ إلى 20+ 35+ إلى 55+ 50+ إلى 60+ دون تغيير		AlCl ₃ + HCl

2. مطيافية الكتلة

مطيافية الكتلة طريقة تستعمل لتحديد الوزن الجزيئي للمركبات الأجليكونية ، وتحديد عدد وطبيعة المستبدلات الهيدروكسيلية أو الميتوكسيلية [39]. كما تمكن الشضايا الناتجة عن تكسيرات الروابط الكيميائية من معرفة توزيع هذه المستبدلات على الحلقة A و B، ولها دور هام في تحديد وتعيين مواقع إرتباط السكر بالأجليكون أي C-sucre أو O-sucre [40].

وتعتمد هذه التقنية على عدة طرق هي :

2. أ- تقنية الفذف الإلكتروني (EI):

تتميز هذه التقنية بكونها متخصصة في حالة المركبات الأجليكونية [41،42]، ولا تكون صالحة في حالة المركبات الجليكوزيدية نظرا لوجود المستبدلات السكرية التي لا تتحمل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية.

2. ب- تقنية الفذف السريع بالذرات (F.A.B):

تستعمل هذه التقنية مع المركبات الجليكوزيدية لكونها مركبات سهلة الإنكسار حيث تتأين دون تسخين، وهي تقنية تسمح بمعرفة الأيون الجزيئي وطبيعة السكر.

2. ج- تقنية الإلكروسبراي electrospray :

من بين التقنيات الجديدة التي ظهرت تقنية الإلكروسبراي، تختلف عن غيرها في الطريقة العملية. تسمح هذه التقنية بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الصغيرة سهلة التكسير مثل المضادات الحيوية و المبيدات، والجزيئات ذات الأوزان الكبيرة مثل البروتينات.

أما بالنسبة للمركبات الفلافونيدية فتستعمل لدراسة المركبات سهلة التكسير مثل O-sucre [43].

3. مطيافية الرنين المغناطيسي النووي: $RMN^{13}C$ و $RMN^{1}H$

مطيافية الرنين النووي المغناطيسي (RMN) تقنية تسمح بالتعرف على مختلف المركبات ومن بينها المركب الفلافونيدي، كما يمكن من خلالها معرفة نوع المستبدلات التي تحملها [44].

و لمطيافية الرنين النووي المغناطيسي عدة تقنيات أحادية و ثنائية البعد أهمها :

3. ا. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H RMN

يسمح هذا الطيف بتحديد عدد و موضع البروتونات التي يحملها الجزيء، وعدد مجموعات المتوكسيل، و كذلك عدد وموضع وطبيعة مستبدلات السكريات الموجودة، وهذا من خلال التكامل و الإزاحة الكيميائية وكذلك ثابتة التزاوج.

وللحصول على طيف الرنين النووي المغناطيسي نستعمل عدة مذيبات وهذا حسب طبيعة المركب، نذكر منها:

CDCl_3 يستعمل خاصة مع الفلافونيدات غير القطبية، ومذيب CD_3OD DMSO-d_6 يستعمل مع و الجليكوزيدات [2].

➤ تظهر بروتونات الفلافونيدات كما يلي :

• بروتونات الحلقة A :

حسب المستبدلات المحتملة يمكن تحديد نوع وثابتة التزاوج، وكذلك مقدار الإزاحة الكيميائية

للحقة A وهذا ملخص في الجدول -6- يلخص مختلف الحالات الممكنة [43].

الجدول-6-: الإنزياح الكيميائي وثابت التزاوج لبروتونات الحلقة A

(H-8)		(H-6)		(H-5)		بروتونات الحلقة A طبيعة الفلافونيد
δ, ppm	J, Hz	δ, ppm	J, Hz	δ, ppm	J, Hz	
6.3-6.5	(d) 2.5	6.0-6.2	(d) 2,5	-	-	5, 7 di-OH
6.5-6.9	(d) 2.5	6.2-6.4	(d) 2.5	-	-	5-OH, 7-OR (R: sucre)
6.7-7.0	(d) 2.5	6.7-7.1	(dd) 2.5-9	8,0	(d) 9,0	7-OR (R = H, sucre)
6.3	(s)	-	-	-	-	5, 6, 7-OR (R = H, sucre)
-	-	6.3	(s)	-	-	5, 7, 8-OR

بروتونات الحلقة B :

تظهر بروتونات الحلقة B في المجال [6.7-8.1 ppm]، و تتغير قيمة إزاحتها الكيميائية حسب نوع مستبدلاتها، وكذلك درجة تأكسد الحلقة C. كما هو موضح في الجدولين 7-8.

الجدول 7- : الإنزياح الكيميائي وثابت التزاوج لبروتونات الحلقة B في حالة أحادية الاستبدال C-4'=OR

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

الجدول 8- : الإنزياح الكيميائي وثابتة التزاوج لبروتونات 2', 5', 6' للحلقة B ثنائية الاستبدال

H-6'		H-5'		H-2'		نوع الفلافونيد
δ ,ppm	J,Hz	δ ,ppm	J,Hz	δ ,ppm	J,Hz	
7.5 – 7.3	dd(8.5-2.5)	6.7 – 7.1	d (8.5)	7,3 - 7,2	d (2.5)	فلافون (3'-OH، 4'-OMe : 3',4'OH) (3'-OMe، 4'-OH)
7.9 – 7.6	dd(8.5-2.5)	6.7 – 7.1	d (8.5)	7,7 - 7,5	d (2.5)	فلافونول (3'-OH، 4'-OMe : 3',4'OH)
7.6 – 7.4	dd(8.5-2.5)	6.7 – 7.1	d (8.5)	7,8 - 7,6	d (2.5)	فلافون (3'-OMe، 4'-OH : 3',4'OH)

• بروتونات الحلقة C :

يظهر البروتون (H-3) في حالة الفلافون إشارة أحادية في المجال (6.2-6.4 ppm) أين تتداخل مع إشارة بروتونات الحلقة A [36]. أما في حالة الفلافونول فلا تظهر هذه الإشارة.

• بروتونات الميتوكسي :

تتميز بروتونات الميتوكسي بإشارة، أو عدة إشارات أحادية بتكامل 3H حسب عدد مجموعات الميتوكسي المتواجدة في الجزيء، إذ تظهر في المجال (3.8-4.5 ppm) [45].

• بروتونات السكر :

ترن بروتونات السكريات في المجال [3-4 ppm]، باستثناء البروتون الأنوميري الذي يرن في مجال أدنى على شكل إشارة ثنائية بتكامل 1H، يمكن أن نميز من خلالها نوع السكر ونوع الرابطة بينه وبين الأجليكون (α أو β) وهذا من خلال ثابتة التزاوج.

كما يمكن أن نستدل على مكان ارتباط السكر بالأجليكون من خلال قيمة الإزاحة الكيميائية للبروتون الأنوميري، وممكن أن تقودنا هذه القيمة إلى حد معرفة ما إذا كان السكر مرتبط مباشرة بالأجليكون أو مرتبط بسكر ثاني.

الجدول -9- يعطي قيم الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري لبعض الفلافونيدات أحادية السكر

الفلافونيزيد	δ H-1'' ppm
7-O-glucosyl flavonol	5.2 – 4.8
3-O-glucosyl flavonol	6.0 – 5.7
7-O-rhamnosyl flavonol	5.3 – 5.1
3-O- rhamnosyl flavonol	5.1 – 5.0

الجدول -10- قيم الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري لبعض الفلافونيدات ثنائية السكر

السكر الابتدائي	δ H-1'' ppm	السكر النهائي	δ H-1''' ppm
3-O- β -D-Glucoside	5.72-5.75	2-O- β -D-Glucosyl	4.63-4.65
	5.28-5.46	6-O- β -D-Glucosyl	3.96-4.02
	5.40-5.66	2-O- α -L-Rhamnosyl	4.90-5.10
	5.28	6-O- α -L-Rhamnosyl	4.37-4.39
3-O- α -L-Rhamnoside	5.56	2-O- β -D-Glucosyl	4.10-4.23
	5.21-5.50	3-O- β -D-Glucosyl	4.32-4.48
	5.33-5.44	3-O- β -D-Galactosyl	4.25
	5.31	3-O- α -L-Rhamnosyl	4.81

3. ب. مطيافية الرنين النووي المغناطيس للكربون 13 : DEPT 135 و J mod

استخدمت هذه الطريقة على نطاق واسع في تحديد الهيكل الكربوني العام للفلافونيد، فهي تعتمد على أطيف ذرات الكربون التي تظهر في صورة إمتصاصات فردية من خلالها يمكن تحديد عدد هذه الذرات وكذلك إزاحتها الكيميائية، و التمييز بين الكربون الأحادي (CH₃)، و الكربون الثنائي (CH₂)، وكذلك الكربون الثلاثي (CH) و الكربون رباعي الاستبدال (C) كما يمكن تحديد موقع الرابطة بين السكر و الأجليكون. الجدول -11- يوضح الإزاحة الكيميائية لبعض ذرات الكربون للفلافونيدات المختلفة.

الجدول -11- الإزاحة الكيميائية لبعض ذرات الكربون لمختلف الفلافونيدات.

المركب الفلافونيدي	C-2 ppm	C-3 ppm	C-4 ppm
فلافونات	165.0 - 160.5	111.8 - 103.5	184.0 - 176.3
فلافونولات	150.0 - 145.0	139.0 - 136.0	177.0 - 172.0

3. جـ. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد

➤ الأنوية المتجانسة :

COSY (1H -1H) : هذه التقنية تعطي معلومات على التزاوج بروتون - بروتون 2J و 3J

➤ الأنوية الغير متجانسة :

- HSQC : تعطي معلومات على التزاوج الكيميائي للبروتون و الكربون الحامل له .
- HMBC : تعطي معلومات على التزاوج بين بروتون - كربون بعيدة المدى.

4. الإماهة الحمضية :

إضافة إلى المعلومات التي تقدمها كل من RMN البروتون والكربون 13 و UV يمكن كذلك الاعتماد على الإماهة الحمضية للتعرف على عدد و نوع السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية .تتم هذه العملية وفق الخطوات التالية :

في أنبوب إختبار يتم تدويب كمية قليلة من المركب الجليكوزيدي، ثم يزود بـ 2 ملل من (4N, HCl) يوضع الخليط في حمام مائي تحت درجة حرارة 100 م° في مدة أقصاها 120 دقيقة.

بعد تبريد الأنبوب نقوم بعملية الاستخلاص من النوع (سائل - سائل)، نستعمل الإيثيل كأول مذيب عضوي و ذلك بإضافة 2 ملل للخليط، يرج الأنبوب جيدا ثم يترك للراحة بعدها تتم عملية فصل الطبقة العضوية عن المائية، تكرر العملية ثلاث مرات، حيث الجزء الأجليكوني يتواد في الطبقة العضوية و السكر يكون في الطور المائي، ولتأكد من عدم بقاء الجزأين الأجليكوني و السكري نقوم بعملية استخلاص ثانية مع أسيتات الإيثيل و مرة واحدة مع البوتانول العادي

تركز الطبقات العضوية تحت الضغط المنخفض، بعدما يتم جمعها كل واحدة على حدى، بعدها يتم الكشف عن المركب الأجليكوني الموجود في احد الطبقات العضوية وذلك بإجراء إختبار كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة مع شواهد أجليكونية أو بتسجيل طيف UV أما بالنسبة للسكر فهو متواجد أصلا فهي الطبقة المائية وللتعرف على نوع السكر المنفصل يعمد إلى تحضير ألواح كروماتوغرافية التي تكون من Gel de silice ثم ترش بمحلول (0,2M) NaH_2PO_4 ، بعد جفافها تترك في الفرن لمدة ساعة تحت درجة حرارة 100 م°.

توضع نقاط من الطبقة العضوية على اللوح وبجانبيها بعض السكريات المعروفة التي تستعمل كشواهد، ليغمس اللوح في مملص يحتوي على (أسيتون : ماء) بنسبة (9 : 1)، يترك ليجف ثم يرش بواسطة كاشف مالونات الأنيلين (حمض المالونات 1 غ - حمض الفوسفوريك 3 ملل - الأنيلين 1 ملل - الإيثانول 100 ملل) ويترك لبضع دقائق بعد ذلك يوضع في الفرن تحت درجة حرارة 100°م لمدة 5 دقائق، بعدها تبدأ بقع السكريات بالظهور فيلاحظ اللون البني بالعين المجردة ، و اللون الأصفر تحت مصباح UV.

يتم التعرف على أنواع السكر بمقارنة R_f لكل سكر.

المراجع

- [1]. Harborne, J. B. (1988). The flavonoids, Advances in research since (1980). Chapman & Hall. London.
- [2]. Mabry, T. J., Thomas, M. B., Markham, K. R. (1970). The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag. Berlin, 13.
- [3]. Harborne, J. B. (1973). Flavonoids in phytochemistry, eds, J. B. Litton educational publishing inc. London.
- [4]. Williams, C. A., Grayer, R. J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 539-573.
- [5]. Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, ed. Lavoisier, Paris.
- [6]. Eyton, W. B., Ollis, W. D., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R., Tavira Magalhaes, M. (1965). *Proc. Tetrahedron*, 21, 2683.
- [7]. El Hazimi, H. (1995). Les produits Naturelles. Université du Roi Saoud, Djada.
- [8]. Heller. W., Forkmann. G. (1980). in Flavonoids. Advances in Research since, editor Harborne, J. B. Chapman and HALL , London 1988, 400.
- [9]. Boland, M. J., Wong, E. (1975). Purification and kinetic properties of chalcone-flavanone isomerase from soya. *Biochem.* 50, 383-389.
- [10]. Koch, G., Grisebach, H. (1986). Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *Biochem.* 155, 311.
- [11]. Hashim, M. F., Hakamastuka, T., Ebizuka, Y., Sankawa, (1990). U. FEBS Lett. 271, 219.
- [12]. Stotz, G., Spribille, R., Forkmann, G. (1984). Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*. *Plant Physiol.* 116, 173-183.
- [13]. Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol & Therapeutics.* 96, 67-202.

- [14]. Nijveldt, R. J., Nood, E. V., EC van Hoorn, D., Booelens, P. G., Norren, K. V. (2001). Leeuwen PAV. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potentiel applicatins. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418-425.
- [15]. Obermeir, M., White, R. E., Yang, C. (1995). Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Pharm. Res.* 25 (6), 575-584.
- [16]. Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Bio. Med. Pharmacother.* 56, 296-301.
- [17]. Di Caarlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F. (1999). Flavonoids : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci.* 65, 337-53.
- [18]. Landolfi, R., Mower, R. L., Steiner, M. (1984). Modiication of platelet functin and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1525-1530.
- [19]. Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since (1992). *Phytochemistry.* 55, 481-504.
- [20]. Spedding, G., Rtty, A., Middieton, E. J. (1989). Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antivir. Res.* 12 (2), 99-110.
- [21]. Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Mann, J. C., Barre-Sinoussi, F. (1990). Differential inhibitory effect of various flavonoids on the activities of reverrse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J.Biochem.* 190 (3), 469-76.
- [22]. Ono, K., Nakane, H. (1990). Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *Biochem.* 108 (4), 609-613.
- [23]. Mahmoud, N., Pizza, C., Aquino, R., De Tommasi, N., Piacente, S., Colman, S., Burke, A., Hay, A. J. (1993). Inhibition of HIV infection by flavonoids. *Antivir. Res.* 49 (7), 1257-71.

- [24]. Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., Barrett, J. F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 3 (2), 225-230.
- [25]. Sato, M., Tsuchiya, H., Takase, I., Kureshiro, H., Tanigaki, S., Linuma, M. (1995). Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother. Res.* 9 (7), 509-512.
- [26]. Mila, H., Scalbert, A. (1994). Tannin antimicrobial properties through iron deprivation : a new hypothesis. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance.* 16 (3), 517-544.
- [27]. Ahmed, Z. F., Rizk, A. M., Hamouda, F. M. (1970). Prostep dziedzinie Lzkurosl. Pr. Ref. Dosw. Wygloszone symp. 20-23.
- [28]. Iinuma, M., Mizuno, M. (1989). Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry.* 28, 68.
- [29]. De Luca V, Ibrahim RK (1985). "Enzymatic synthesis of polymethylated flavonols in *Chrysosplenium americanum*. II. Substrate interaction and product inhibition studies of flavonol 3-, 6-, and 4'-O-methyltransferases". *Arch. Biochem. Biophys.* 238 (2), 606-18.
- [30]. Jay, M. (1983). The phylogenetic relationship of *Solanum* flavonols. *Z. Naturforsch.* 38, 413.
- [31]. Sutfeld et al. (1981). Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glucosides in *chrysosplenium americanum*. *Z. Naturforsch.* 36, 30.
- [32]. Chopin. J. (1966). Actualites de phytochimie fondamentale, 2 éme Série, Mentaza. C, Editeur Masson, Paris, 119.
- [33]. Jurd, L. (1962). The chemistry of flavonoids compounds. Pergamon press, New-York.

- [34]. Markham, K. R. (1982). The techniques of flavonoids identification, eds. Academic press. London.
- [35]. Yahiaoui, S., Hraoubia, R. (1993). Structure de la matière. 4^{ème} édition.
- [36]. Abd Elchakour, A. S. (1987). Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abd Elaziz, Djedda.
- [37]. Randerah, (1971). Chromatographie sur couche mince, eds Gautier Villard.
- [38]. Jurd, L., Horowitz, R. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-205.
- [39]. Audier, H. (1966). Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 9, 2892-2899.
- [40]. Nielsen, J. G., Moller, J. (1970). *Acta Chem. Scand.* 24, 2665.
- [41]. Markham, K. R. (1989). Flavones, flavonols and their glucosides in "methode in plant biochemistry". *Academic Press.* 1 (6), 197-232.
- [42]. Gonnet, J. F. (1989). Apport de la biologie micromoléculaire (flavonoïdes) à la compréhension de la structure et du fonctionnement de l'espèce allogame *Centaurea montana* (composés). Thèse de doctorat d'état, université, Claude-Bernad, Lyon I.
- [43]. Voirin, B. (1970). Thèse de doctorat, université de Lyon.
- [44]. Silverstein, R. M., Webster, F. X. and Kiemle, D. J. (2007). Identification spectrométrique de composés organiques, ed.2, De Boeck Université.
- [45]. Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H. (1992). 20^{ème} Anniversaire du groupe polyphénols (book of abstracts) 1 (16), 217, 13-16.
- [46]. Markham, K. R., Geiger, H. (1994). ¹HNMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuteurodimethyl-sulfoxide, In the flavonoids, edited by Harborne, J.B. (1993). Chapman and Hall, London.

الفصل الثالث

المادة النباتية :

طرق الإستخلاص، الفصل و التنقية

I. الدراسة النباتية لـ *Convolvulus supinus*:**1- المادة النباتية:**

تم جمع النبتة في أواخر شهر مارس من سنة 2010 من ضواحي مدينة غرداية، حيث تم قطفها وهي بعد نبتة فتية، جففت النبتة تحت الظل و بعيدا عن الرطوبة، بعد ذلك طحنت فكانت الكتلة المتحصل عليها 1500 غ.

2- وصف النبتة: [1,2]

Convolvulus supinus نبتة أصلية (Endémique)، تتوطن في صحراء الجزائر و بالخصوص شمالي الطاسيلي و منطقة فزان، معروفة باسم تجيجيت «tegit» أو بومشقون «Bou Machgoun».

تكسوها شعيرات تعطيها مظهر الحرير. تحتوي على ساق خشبية نوعا ما في القاعدة. و تويج ذو شكل خطي أبيض اللون يبدو من الخارج أبيض مصفر. و على أوراق بدون ذيل، خطية أو ببيضاوية الشكل، غير مسننة و غير ملتفة حول القاعدة، محمول على الساق بواسطة حامل يلتف حول القاعدة، تضيق تدريجيا كلما اقتربت منه، طولها لا يتعدى ثلاث أضعاف عرضها. كما تحتوي على أزهار بيضاء اللون كما تظهر عليها بقع صفراء، يتراوح عددها من 1 إلى 3 زهرات، طولها ما بين 2 إلى 3 سم. و على بذور سوداء اللون تحمل حبيبات بيضاء.



صورة فوتوغرافية للنبتة *Convolvulus Supinus*

3- التصنيف النظامي للنباتة:

Royaume	Plantes	المملكة
Sous royaume	Tracheobiontes	تحت المملكة
Embranchement	Spermatophytes	الفرع
Division	Magnoliophytes	القسم
Classe	Magnoliopsides	الصف
Sous classe	Asteridae	تحت الصف
Ordre	Solonales	الرتبة
Famille	Convolvulaceae	العائلة
Genre	<i>Convolvulus</i>	الجنس
Espèce	<i>Convolvulus supinus</i>	النوع

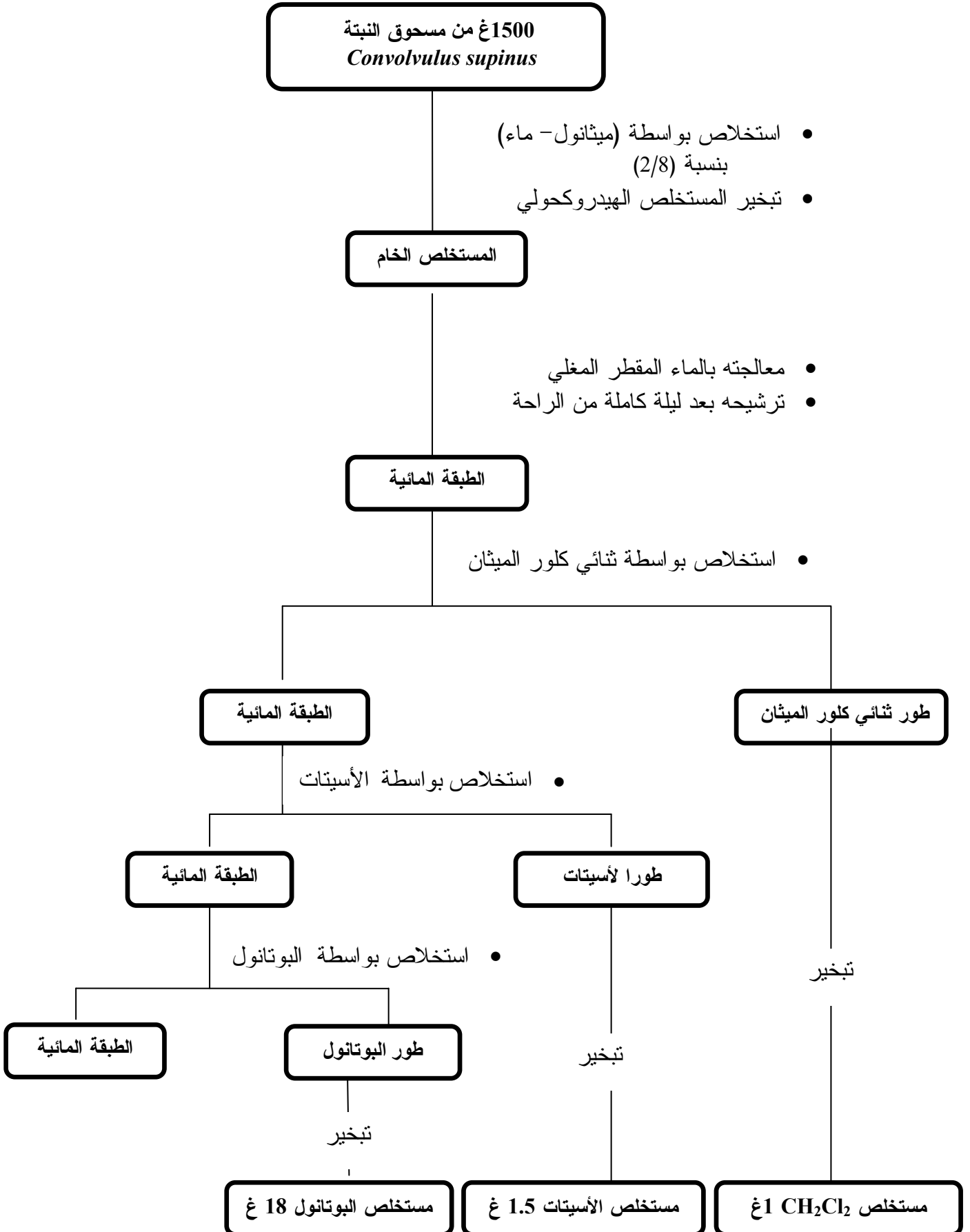
II- الدراسة الكيميائية :

1- طريقة استخلاص النباتة:

بعد طحن للأجزاء النباتية الجافة (1500 غ)، نقعت في خليط من الميثانول و الماء بنسبة (2/8)، ثم تركت لمدة 24 ساعة، رشح و ركز المحلول الهيدروكولي تحت ضغط منخفض، أعيدت هذه العملية 3 مرات متتالية مع تجديد المذيب في كل مرة، إلى أن تحصلنا على المستخلص الخام في حالة الجفاف، عاملنا هذا الأخير بـ 800 ملل من الماء المقطر المغلى و ترك ليلة كاملة للراحة، بعدها رشح لنحصل على الطبقة المائية. أجريت عليها عمليات الاستخلاص (سائل - سائل) وذلك باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية: بداية بثنائي كلور الميثان (300 ملل x 3)، خلات الإيثيل (300 ملل x 3)، و أخيرا البوتانول النظامي (300 ملل x 3). في النهاية تحصلنا على ثلاث مستخلصات و هذا بعد عملية التبخير و هم على التوالي:

- مستخلص CH_2Cl_2 بوزن 1 غ.
- مستخلص AcOEt بوزن 1.5 غ.
- مستخلص البوتانول بوزن 18 غ.

المخطط -1- يلخص كل الخطوات السابقة



2- طريقة الفصل والتنقية :

قبل الشروع في عمليات الفصل قمنا بإجراء بعض الاختبارات التحليلية أحادية البعد على ورق واطمان و السليكاجال، و ثنائية البعد على البولي أميد لمستخلصي البوتانول و الأسيتات في الأنظمة التالية:

• على ورق واطمان :

(1) n- BuOH : HOAc : H₂O (BAW) 4 : 1 : 5

(2) AcOH 15 %

• على السليكاجال :

(1) AcOEt : MeOH : H₂O 10 : 1.0 : 0.5

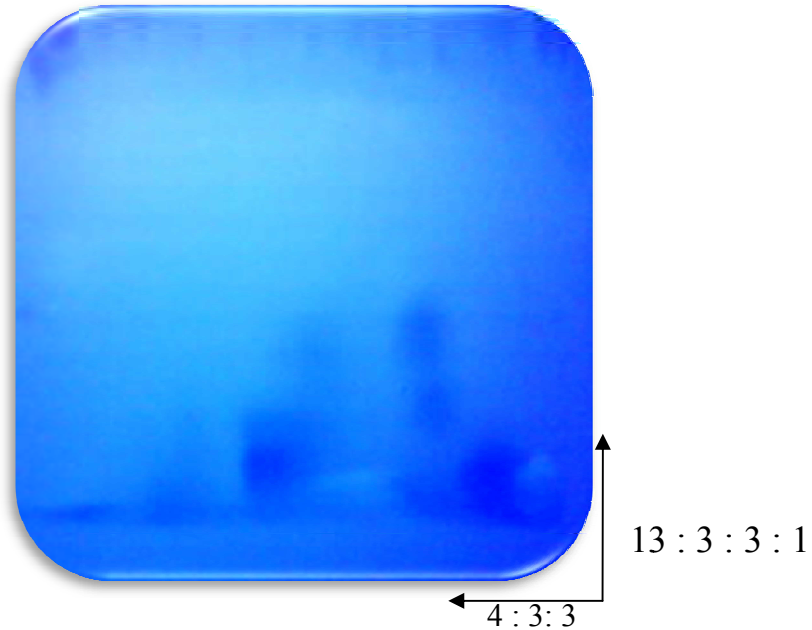
(2) AcOEt : MeOH : H₂O 10 : 1.5 : 1.0

• على البولي أميد :

(1) Toluéne : MeOH : MEC 4 : 3 : 3

(2) H₂O : MeOH : MEC : Ac Ac 13 : 3 : 3 : 1

بينت هذه التحاليل تقارب كبير بين فلافونيدات مستخلص الأسيتات و مستخلص البوتانول، كما أن هذا الأخير يحتوي على كمية كافية منه لذلك تم اختياره لدراسة وفصل مكوناته. على إثر التحاليل الكروماتوغرافية ثنائية البعد على متعدد الأميد تم تصوير الخريطة الفلافونيدية التي تبين توزيع المركبات الفلافونيدية في هذا المستخلص (الشكل -1-)



الشكل -1- الخريطة الفلافونيدية للمستخلص البوتانولي لـ *C. supinus*

3- الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود:

تبين الخريطة الفلافونيدية غنى المستخلص البوتانولي بالمركبات الفلافونيدية، و لذلك تم اختيار تقنية كروماتوغرافيا العمود لغرض فصل 12 غ من مستخلص البوتانول للنبتة *C. supinus* و ذلك باستعمال البولي أميد كدعامة ثابتة، التولين كملص مع إشباعه تدريجيا بالميثانول.

تم تتبع عمليات الفصل باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية، و نتيجة لهجرة الحزم المفصولة بغير قطبية المملص في كل مرة، تستقبل الكسور أسفل العمود في أرنان بكميات تقدر بين 100 و 150 ملل، يتم تركيزها تحت الضغط المنخفض حتى الجفاف وإعادة تدويرها في أقل كمية ممكنة من الميثانول. والجدول-1- يبين الكسور المتحصل عليها:

الجدول -1- الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي

الكسور المحصل عليها	Toluènes %	MeOH %
4.....1	100	0
16.....5	98	2
30.....17	96	4
42.....31	92	8
64.....43	88	12
80.....65	85	15
95.....80	80	20
120.....96	75	25
140.....121	70	30
163.....141	60	40
179.....164	50	50
191180	25	75
203. 192	0	100

تم جمع الكسور المتشابهة نتيجة لاختبارها بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) على السيليكاجال باستعمال عدة أنظمة من بينها :

S₁: CH₂Cl₂ : MeOH 7 : 3

S₂: AcOEt : MeOH : H₂O 10 : 1.0 : 0.5

S₁: AcOEt : MeOH : H₂O 10 : 1.5 : 1.0

في الأخير تحصلنا على 19 كسر تم تدويرها في الجدول -2-

الجدول -2- النتائج المحصل عليها بعد الجمع

الملاحظات	الكسور المحصل عليها بعد الجمع	
مركبات غير فلافونويدية	F1	4 - 1
	F2	16 - 5
	F3	30 - 17
	F4	36 - 31
خليط لم يعالج	F5	41 - 37
	F6	42 - 67
	F7	80 - 68
	F8	69-54
وجود مركبين رئيسيين	F9	79-70
خليط يشبه F9	F10	88 - 80
	F11	92 -89
كمية قليلة	F12	109 - 93
	F13	125 -110
مركبات يمكن فصلها	F14	127-126
خليط لم يعالج	F15	145-128
	F16	154 -146
مركبات يمكن فصلها	F17	177-155
مركبات يمكن فصلها	F18	195- 178
خليط لم يعالج	F19	203 - 196

4- فحص الكسور المحصل عليها :

أظهرت التحاليل الكروماتوغرافية وجود عدة مركبات فلافونويدية موزعة على عدة كسور تم معالجتها بطرق مختلفة.

1- معالجة الكسر F₉:

عولج هذا الكسر بواسطة كروماتوغرافيا العمود، باستعمال السليكاجال كدعامة ثابتة والنظام S₂ كملص ثابت (Colonne Isocratique) أين تحصلنا على 11 تحت الكسور، تم اختيار تحت الكسور التالية للدراسة:

- أ. **تحت الكسر f₉₋₄:** وجود مركب أساسي تم تنقيته باستعمال عمود صغير من السليكاجال في النظام S₂ تم الحصول على مركب C1 في صورته النقية.
- ب. **تحت الكسر f₉₋₉:** بنفس الطريقة عولج هذا الكسر فتحصلنا على المركب C2 في حالته النقية.

2- معالجة الكسر F₁₄:

عولج هذا الكسر بتقنية كروماتوغرافيا العمود باستعمال النظام S₂ كملص ثابت و السليكاجال كدعامة ثابتة في النهاية تحصلنا على 9 تحت الكسور تم اختيار تحت الكسور التالية للدراسة:

- أ. **تحت الكسر f₁₄₋₃:** باستعمال عمود صغير من السليكاجال في النظام S₂ تم الحصول على المركب C3 في صورته النقية.
- ب. **تحت الكسر f₁₄₋₆:** بواسطة عمود صغير من البولي أميد تحصلنا على المركب C4 في حالته النقية.

3- معالجة الكسر F₁₇:

يحتوي هذا الكسر على مركبين أساسيين باستعمال السليكاجال كدعامة ثابتة و النظام S₃ كملص ثابت فتحصلنا على 10 تحت الكسر عولجت تحت الكسور التالية:

- أ. **تحت الكسر f₁₇₋₅:** تمت معالجته بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على السليكاجال في النظام S₃، فتحصلنا على المركب C5 في الصورة النقية.
- ب. **تحت الكسر f₁₇₋₈:** تمت معالجته بعمود صغير من البولي أميد فتحصلنا على المركب C6 في حالته النقية.

4 - معالجة الكسر F₁₈:

عولج هذا الكسر بتقنية كروماتوغرافيا العمود باستعمال النظام S₃ كملص ثابت و السليكاجال كدعامة ثابتة في النهاية تحصلنا على 15 تحت الكسور تم اختيار تحت الكسور التالية للدراسة:

- أ. **تحت الكسر f₁₈₋₂**: باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على السليكاجال و في النظام S₃ تحصلنا على المركب C7 في صورته النقية.
- ب. **تحت الكسر f₁₈₋₇**: باستعمال عمود صغير من السلسكاجال في النظام S₂ تحصلنا على المركب C8 في صورته النقية.
- ت. **تحت الكسر f₁₈₋₁₂**: بنفس الطريقة السابقة تحصلنا على المركب C9 في صورته النقية.

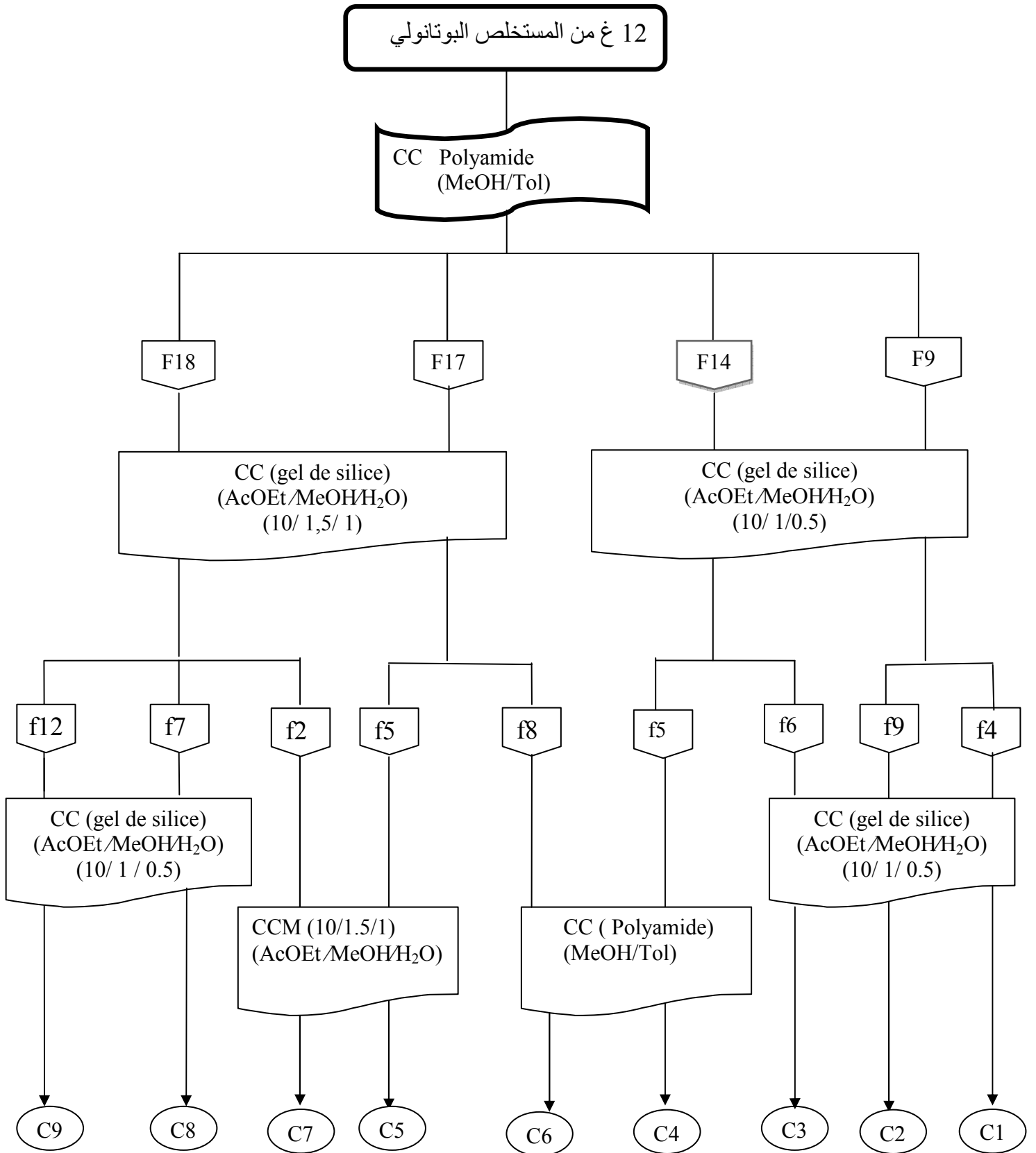
بقية تحت الكسور لم تعالج لأن مركباتها موجودة في الكسور السابقة أو اللاحقة لها أو بكميات قليلة.

➤ حصلنا في عمليات الفصل السابقة على ثلاثة مركبات فلافونيدية مختلفة في صورته النقية، وبكميات كافية جاهزة لتحديد بنياتها الكيميائية و المخطط -1- يلخص كل مراحل الفصل التي قمنا بها.

بقية المركبات المفصولة لم نتمكن من تحديد بنياتها الكيميائية بدقة وهذا إما لوجود كميات قليلة منها منعنا من إجراء اختبارات طيفية أخرى مثل ¹³C، أو لعدم توفر الإمكانيات لإجراء اختبارات طيفية ثنائية البعد تساعدنا على التحديد الدقيق للبنى الكيميائية لهذه المركبات.

اعتمدنا لأجل التعرف على البنى الكيميائية للفلافونيدات الثلاثة المفصولة على عدة طرق طيفية منها مطيافية UV، RMN أحادية و ثنائية البعد.

كما استعنا بالخواص الكروماتوغرافية من اللون الإستشعاعي وقيمة ثابتة الإنحباس، و أتممنا العمل بالطريقة الكيميائية التي تساعدنا على معرفة السكر وكذا مكان ارتباطه بالأجليكون وهي الإماهة الحمضية.



المخطط - 2 - طرق الفصل للنبتة *C. supinus*

التّأجيل و المناقشة

I التعيين البنوي للمركب C1:**1- الخصائص الكروماتوغرافية:**

جدول -3- الخصائص الكروماتوغرافية للمركب C1

الجملة	S ₁	S ₂
ثابت الإحتباس	0.2	0.42
اللون الإستشعاعي	بنفسجي	

S₁ =H₂O / MeOH / MEC / AcAc 13 / 3 / 3 /1S₂ =Tol / MEC / MeOH 4 / 3 / 3**2- المعطيات الطيفية :**

أ. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV:

جدول -4- نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (2) لمركب C1

الكواشف	العصابة I (نم)	عصابات أخرى (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	350	-	266
NaOH	400	325	274
AlCl ₃	398	304-350	275
AlCl ₃ +HCl	398	277-341	275
NaOAc	375	-	275
NaOAc+H ₃ BO ₃	357	-	266

في NaOH وبعد خمس دقائق : الطيف مستقر

ب. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي:

جدول -5- نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تبعا للشكل (3)

الإزاحة الكيميائية δ(ppm)	التكامل	ثابت التزاوج J (Hz)	التعددية	البروتون الموافق
8.10	2H	9.0	d	H-6' , H-2'
6.90	2H	9.0	d	H-5' , H-3'
6.43	1H	2.5	d	H8
6.22	1H	2.5	d	H6
5.25	1H	7.5	d	H-1"(3-O-Glu)

جدول -6- يبين نتائج الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد موضحا بأهم التعالقات بروتون-كربون (HMQC, HMBC) للمركب C1 تبعا للأشكال (4-5-6)

البروتون الموافق	الإزاحة الكيميائية δ (ppm)	قيم ^{13}C اعتمادا على طيف HMQC	مختلف تعالقات البروتونات والكربونات المجاورة لها حسب طيف HMBC
H-2' H-6'	8.10	130.5	C-6', C-2 (157.5) C-4' (160) C-2', C-2, C-4'
H-3' H-5'	6.90	115	C-5', C-4' (160), C-1' (121.5) C-3', C-4', C-1'
H-8	6.43	93.50	C-6, C-7(165) C-10(104), C-9(157)
H-6	6.22	98.50	C-8, C-7 (165), C-10 (104), C-5 (161.5)
H-1" (3-O-Glu)	5.25	102.50	C-3 (134)

3- الحلمة الحمضية:

• الشق الأجليكوني: Kaempférol

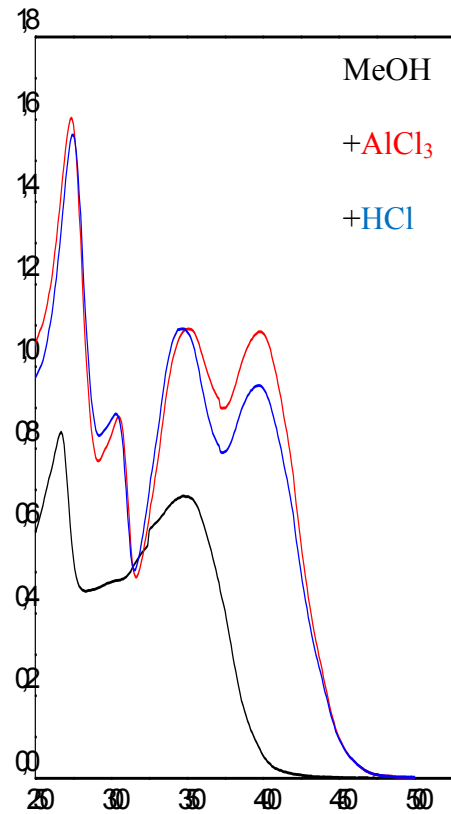
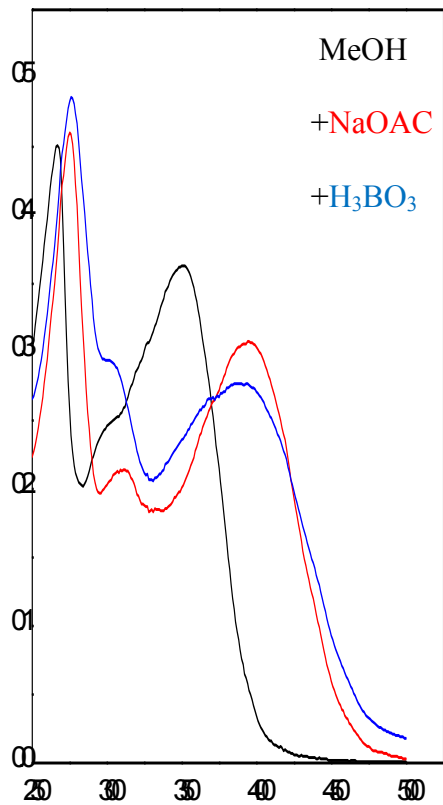
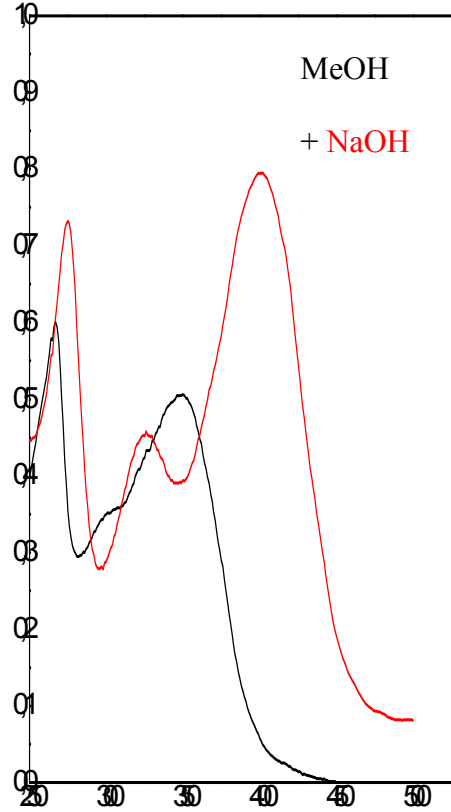
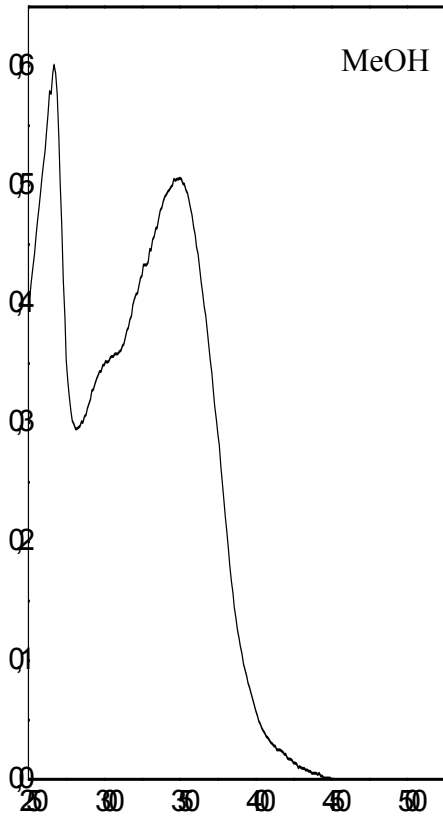
أ. اللون الإستشعاعي: أصفر

ب. نتائج مطيافية UV :

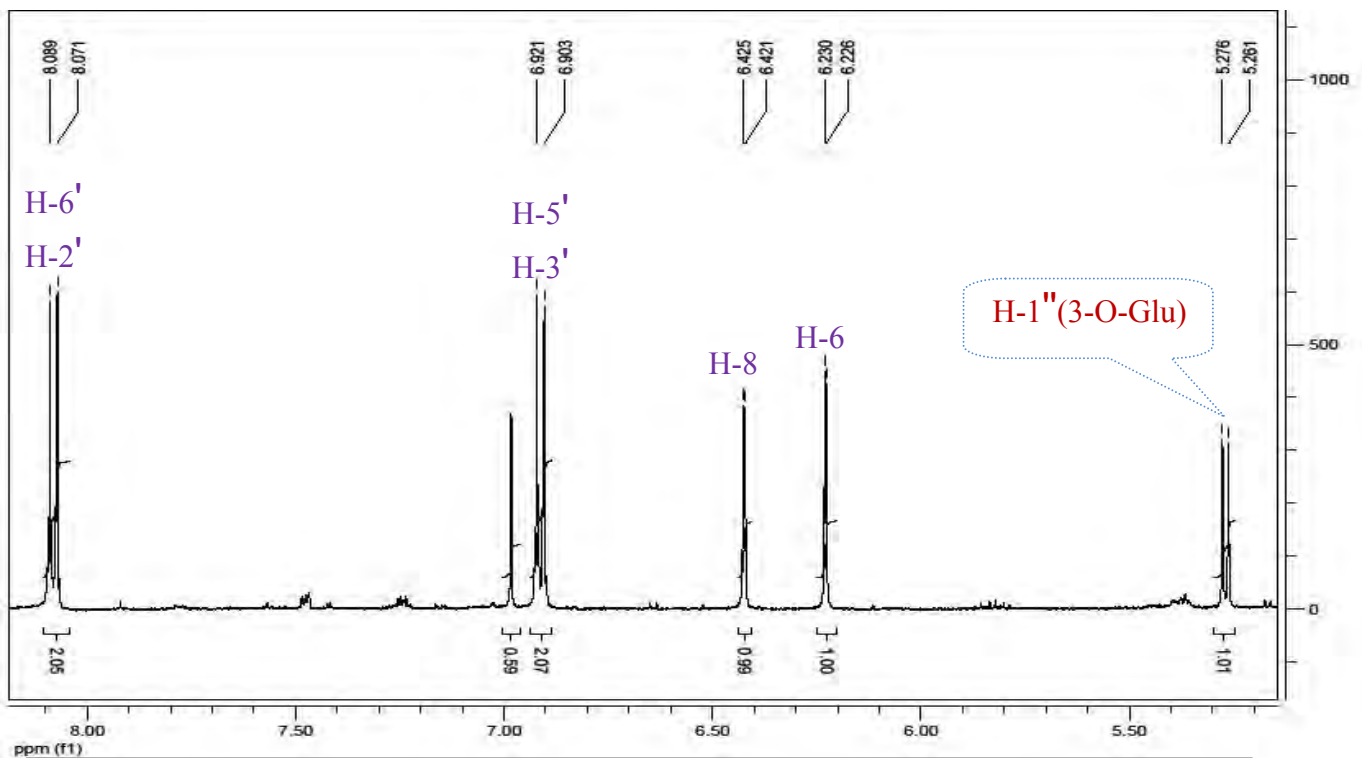
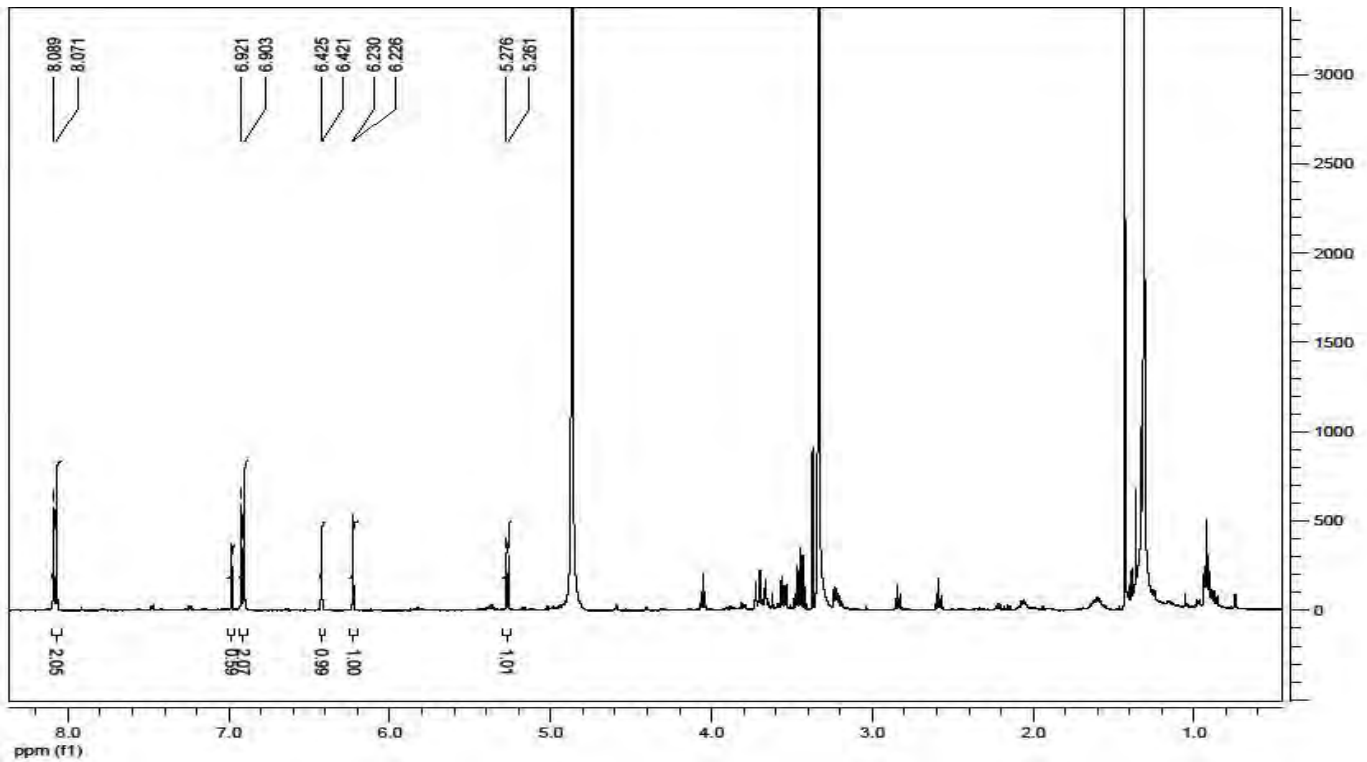
جدول -7- : نتائج مطيافية UV للأجليكون بعد الإماهة الحمضية للمركب C1

العصابة II (نم)	العصابة I (نم)	الكاشف
295	375	MeOH

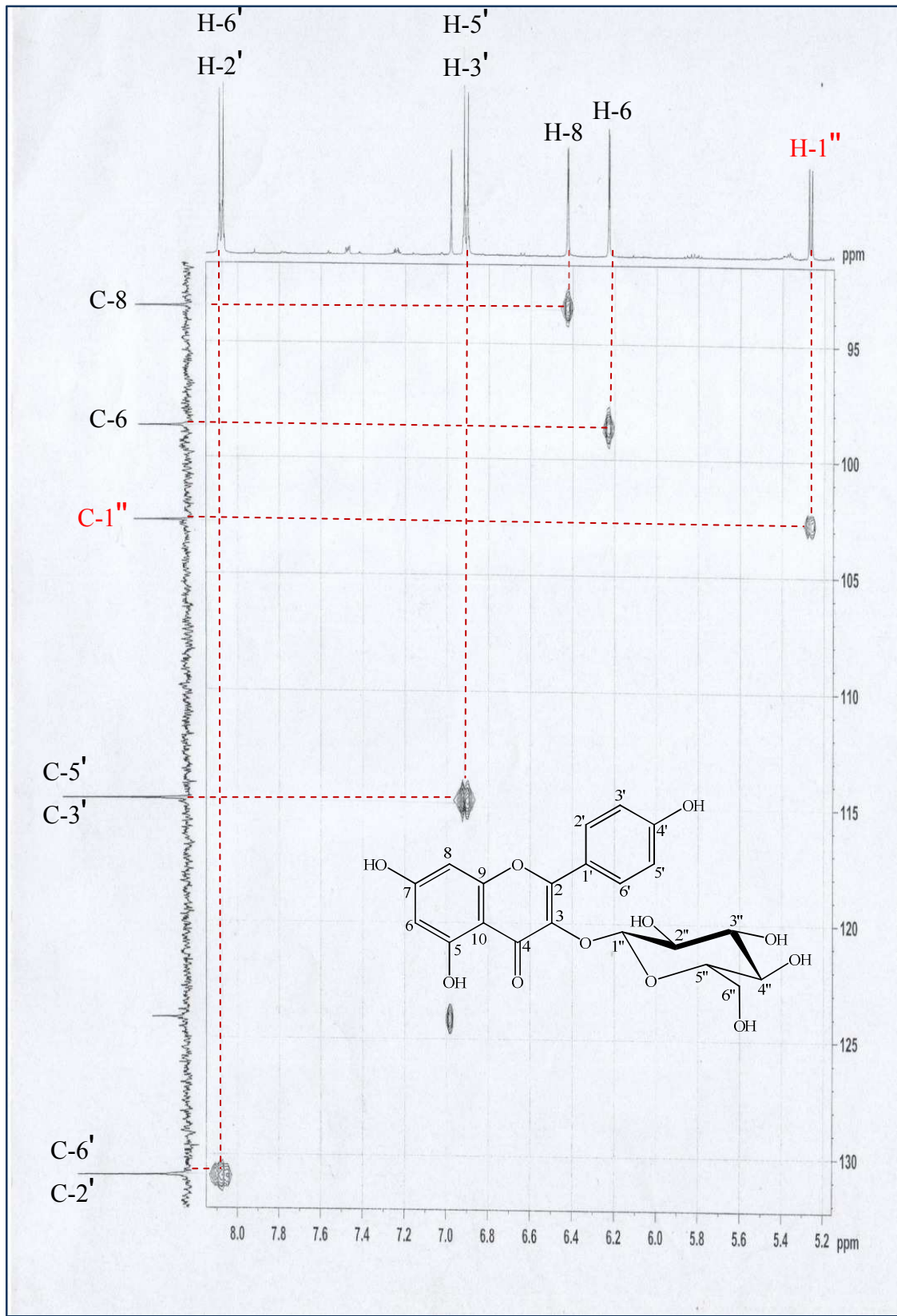
• الشق السكري: Glucose



الشكل-2- سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب C1



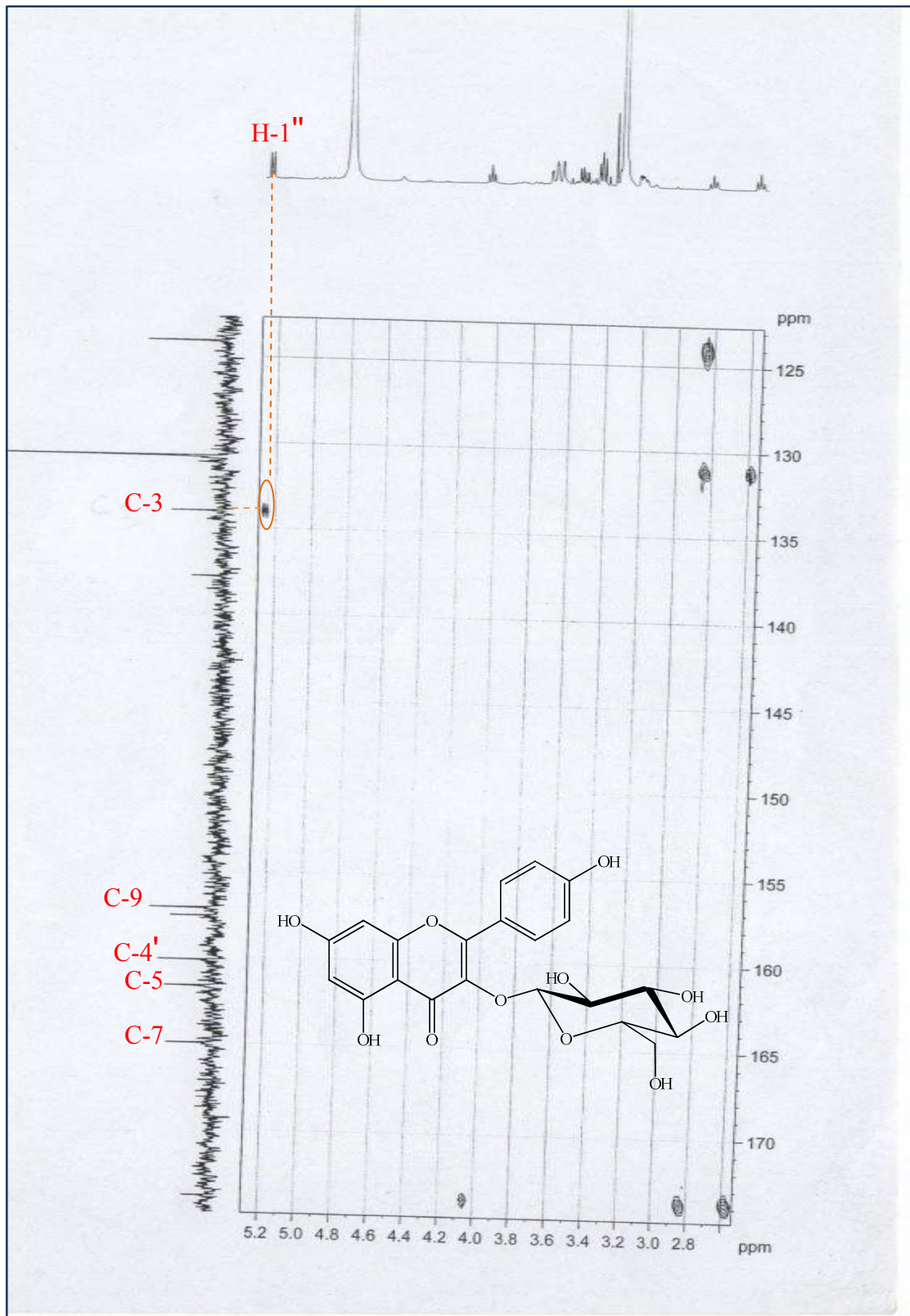
الشكل 3- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون في (CD₃DO, 400MHz) للمركب C1 مع التكبيرات اللازمة



الشكل -4- تكبيرات طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMQC للمركب C1



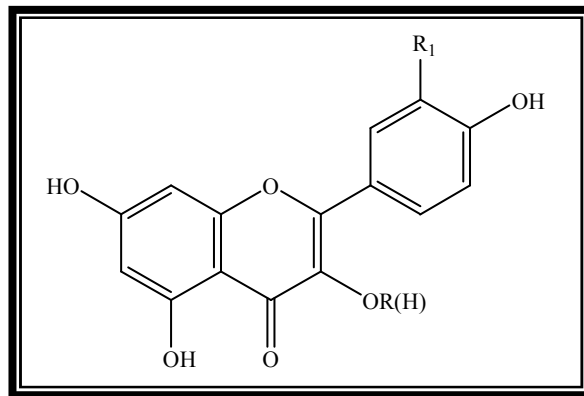
الشكل-5- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C1



الشكل 6- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C1

4-قراءة النتائج وتحديد البنية النهائية للمركب C1

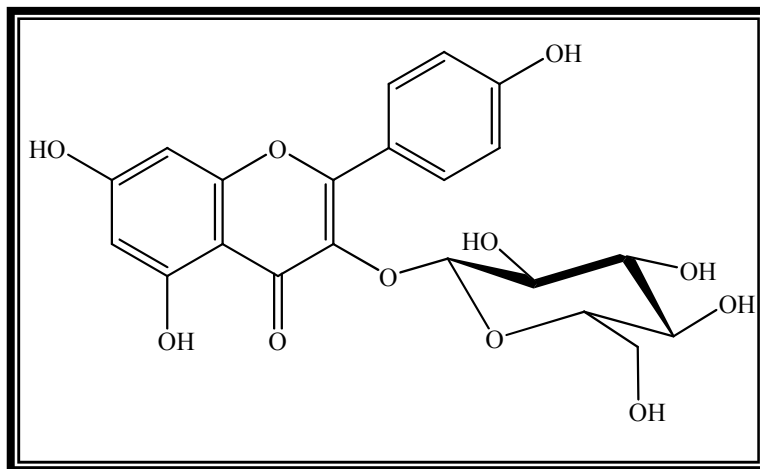
- السلوك الكروماتوغرافي للمركب C1 يدل على أنه جليكوزيد أحادي السكر.
 - لونه البنفسجي وقيمة العصابة I في الميثانول و المقدره بـ 350 نم دليل على أنه فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3 (الشكل-3-).
 - الإزاحة الباثوكرومية عند إضافة NaOH قدرة بـ 50 نم مع زيادة في شدة إمتصاصها تدل على وجود OH-4'.
 - ظهور عصابة جديدة عند 325 نم مع نفس المفاعل دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7. ويتأكد هذا بالإزاحة الباثوكرومية للعصابة II بمقدار 3 نم عند مقارنة طيف الميثانول بطيف NaOAc.
 - الإزاحة الباثوكرومية المقدره بـ 48 على مستوى العصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيفي $AlCl_3+HCl$ تشير إلى وجود OH-5.
 - عدم تغير طيف $AlCl_3$ بعد إضافة HCl يدل على عدم وجود نظام أرثو ثنائي هيدروكسيل على مستوى الحلقة B. زيادة على ذلك الإزاحة الباثوكرومية الضعيفة عند مقارنة طيف الميثانول بطيف $NaOAc + H_3BO_3$ دائما على مستوى للعصابة I
- مجموعة هذه المعلومات تقود إلى اقتراح البنية الأولية للمركب C1



جاءت نتائج RMN للبروتون (الشكل-4-) لتأكد كل المعلومات السابقة إذ بينت:

➤ وجود بروتونات الحلقة B على شكل إشارتين:

- إشارة ثنائية ($J = 9.0 \text{ Hz}$) بتكامل 2H عند $\delta = 8.10 \text{ ppm}$ يمكن إسنادها إلى كل من H-6', H-2'.
- إشارة ثنائية ($J = 9.0 \text{ Hz}$) بتكامل 2H عند $\delta = 6.90 \text{ ppm}$ يمكن إسنادها إلى كل من H-5', H-3'
- وجود بروتونات الحلقة A على شكل إشارتين:
- إشارة ثنائية ($J = 2.5 \text{ Hz}$) بتكامل 1H عند $\delta = 6.43 \text{ ppm}$ يمكن إسنادها إلى البروتون H-8.
- إشارة ثنائية ($J = 2.5 \text{ Hz}$) بتكامل 1H عند $\delta = 6.22 \text{ ppm}$ يمكن إسنادها إلى البروتون H-6.
- بين كذلك طيف RMN^1H نوع المستبدل المتمثل في سكر الـ Glucose تميز بظهور بروتونه الأنوميري على شكل إشارة ثنائية ($J = 7.5\text{Hz}$) عند $\delta = 5.25 \text{ ppm}$.
- الإماهة الحمضية حررت سكر الـ Glucose من الموضع 3، إذ أعطيت أجليكون أصفر اللون يوافق Keampférol، العصابة I في الميثانول المقرة بـ 375 نم تؤكد على أن الأجليكون عبارة عن فلافونول (3-OH).
- بينت مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ذو بعدين بتقنية HMBC نقطة تعالق بين H-1 الذي يرن عند $\delta = 5.25 \text{ ppm}$ و C-3 الذي يرن عند $\delta = 134 \text{ ppm}$ لتؤكد ارتباط السكر بالكربون C-3 للأجليكون الشكل (6).
- إذا فالبنية النهائية للمركب C1 هي:



Kaempférol 3-O-β-D-glucoside

II التعين البنوي للمركب C2:

1- الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول -8- الخصائص الكروماتوغرافية للمركب C2:

الجملة	S ₁	S ₂
ثابت الإحتباس	0.31	0.35
اللون الإستشعاعي	بنفسجي	

2- المعطيات الطيفية:

أ. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV :

جدول -9- نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية تبعا للشكل (7) لمركب C2

الكواشف	العصابة I (نم)	عصابات أخرى (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	351	-	267
NaOH	401	325	275
AlCl ₃	398		273
AlCl ₃ +HCl	398		274
NaOAc	371	307	273
NaOAc+H ₃ BO ₃	351	-	267
في NaOH وبعد خمس دقائق : الطيف مستقر			

ب. -مطيافية الرنين النووي المغناطيسي

جدول -10- نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تبعا للشكل (8)

البروتون الموافق	التعددية	ثابت التزاوج J (Hz)	التكامل	الإزاحة الكيميائية δ(ppm)
H-6' , H-2'	d	8.9	2H	8.10
H-5' , H-3'	d	8.9	2H	6.90
H8	d	2.0	1H	6.43
H6	d	2.0	1H	6.22
H-1''(3-O-Glu)	d	7.5	1H	5.20
H-1''' (3-O-Rh)	d	1.5	1H	4.50
CH ₃ (3-O-Rha)	d	6.2	3H	1.15

جدول -11- تعالقات HMQC, HMBC للمركب C2 مع الإزاحة الكيميائية الموافقة لكل

كربون δ (ppm) تبعا للأشكال (9-10-11-12)

البروتون الموافق	الإزاحة الكيميائية δ (ppm)	قيم ^{13}C اعتمادا على طيف HMQC	مختلف تعالقات البروتونات والكربونات المجاورة لها حسب طيف HMBC
H-2' H-6'	8.10	131.50	C-6', C-4' (160), C-2 (158) C-2', C-4', C-2
H-3' H-5'	6.90	114	C-5', C-4'(160), C-1' (121.5) C-3', C-1', C-4'
H-8	6.43	93.50	C-6, C-7 (165) C-10 (104), C-9 (157)
H-6	6.22	99	C-8, C-7 (165), C-5 (161.5), C-10 (104)
H-1''(3-O-Glu)	5.20	104	C-3 (134)
H-1''' (3-O-Rh)	4.50	101	C-6''(67.25)
CH ₃ (3-O-Rha)	1.15	16	C-4'''(72.5), C-5'''(68.25)
H-6''(3-O-Glu)	3.35	67.25	C-1'''(101.0)

3- الحلمة الحمضية :

• الشق الأجليكوني : Kaempférol وهذا حسب المعطيات التالية:

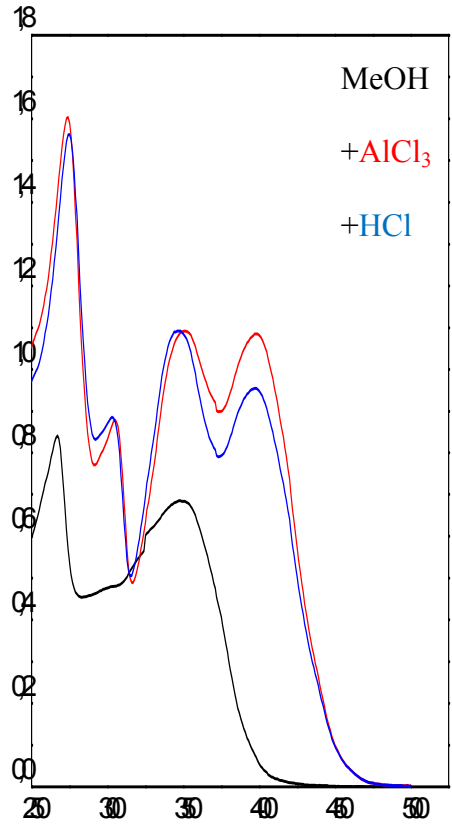
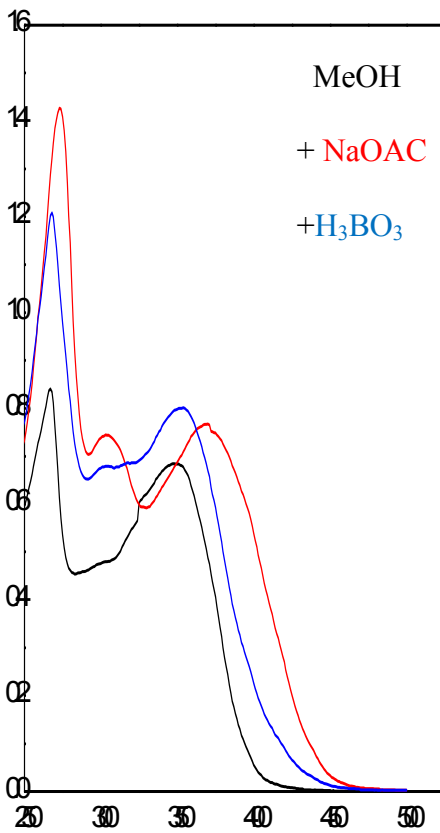
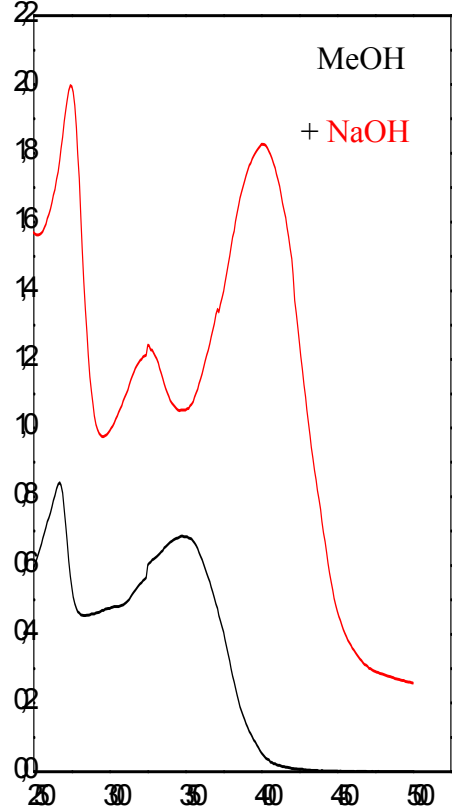
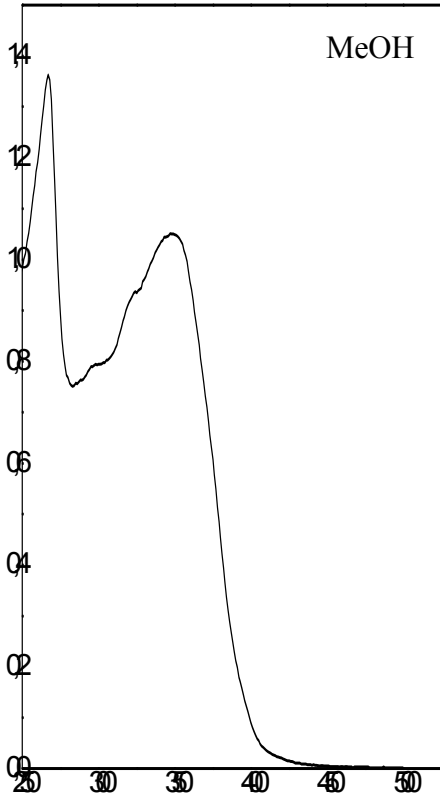
أ. اللون الإستشعاعي: أصفر

ب. نتائج مطيافية UV:

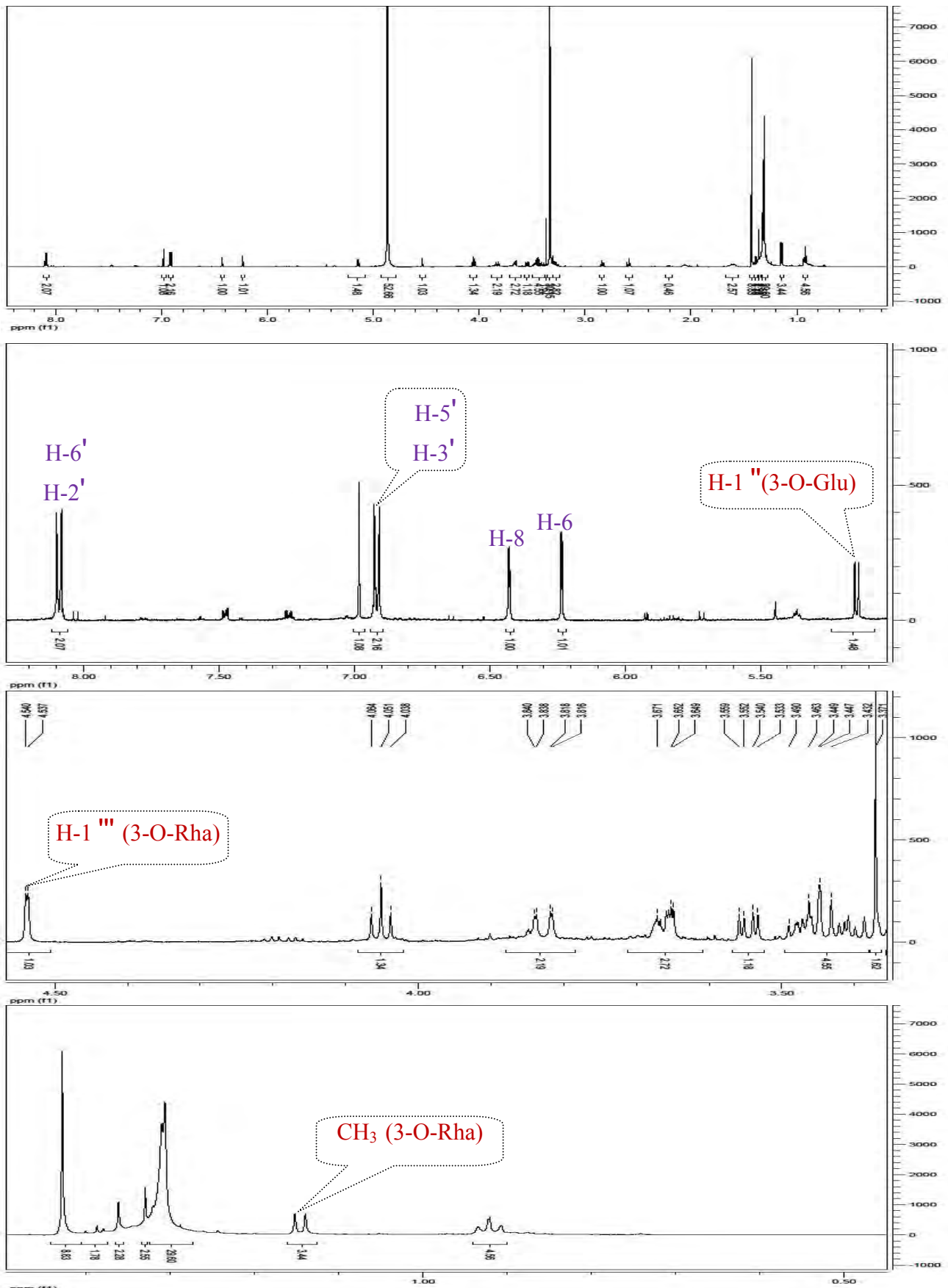
جدول -12- نتائج مطيافية UV للأجليكون بعد الإمهاء الحمضية للمركب C2

العصابة II (نم)	العصابة I (نم)	الكاشف
290	372	MeOH

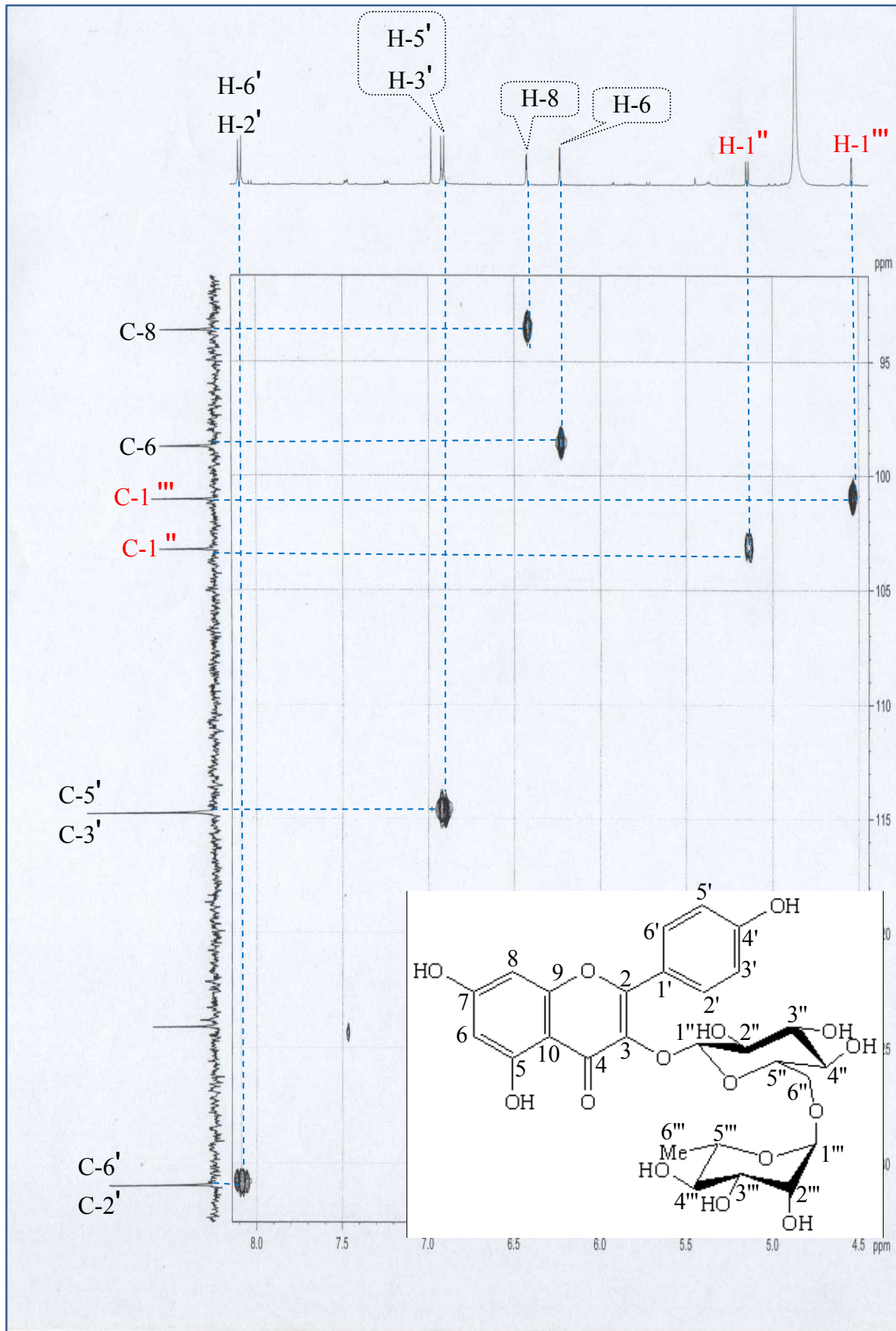
• الشق السكري: Glucose +Rhamnose



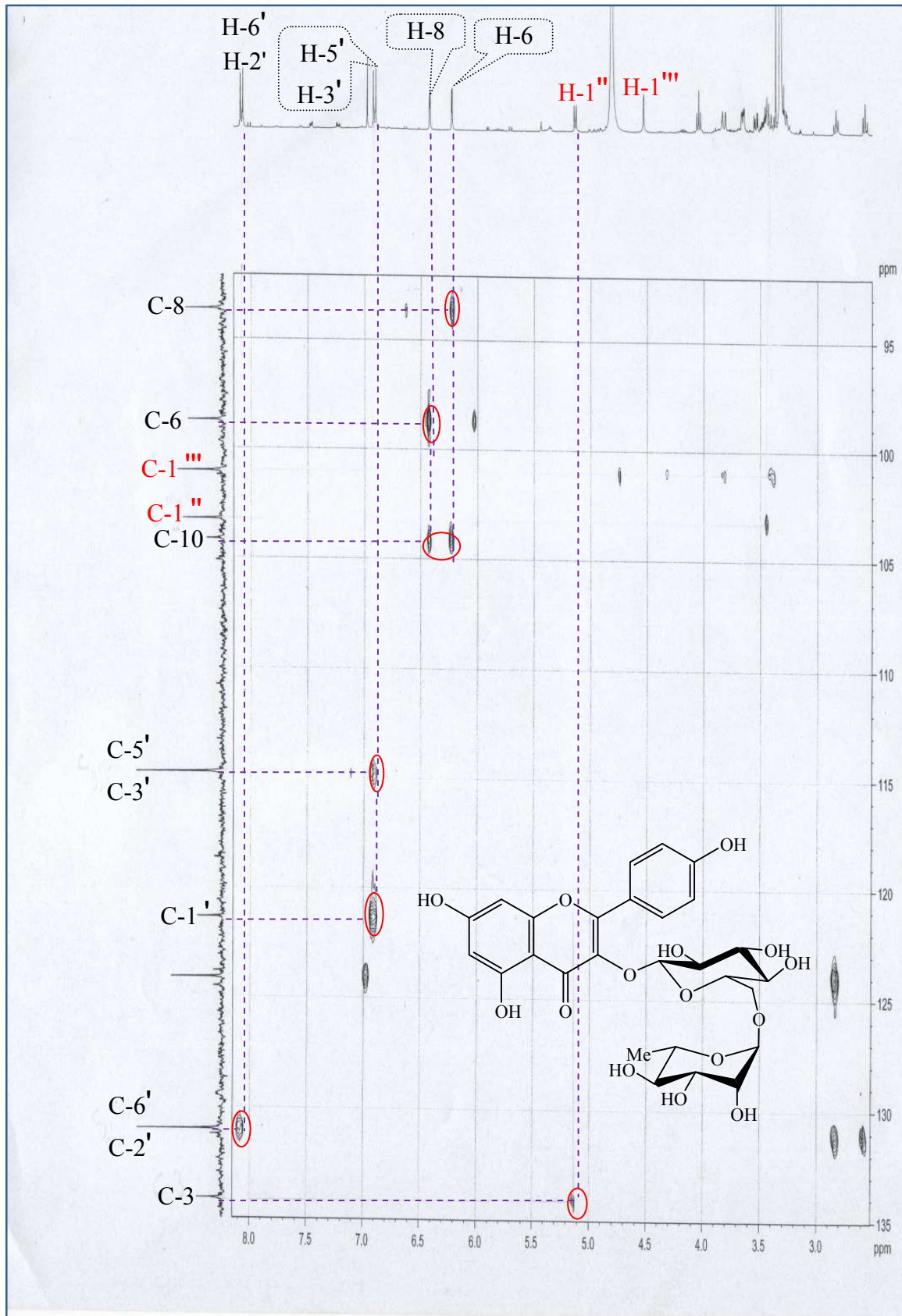
الشكل -7- سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب C2



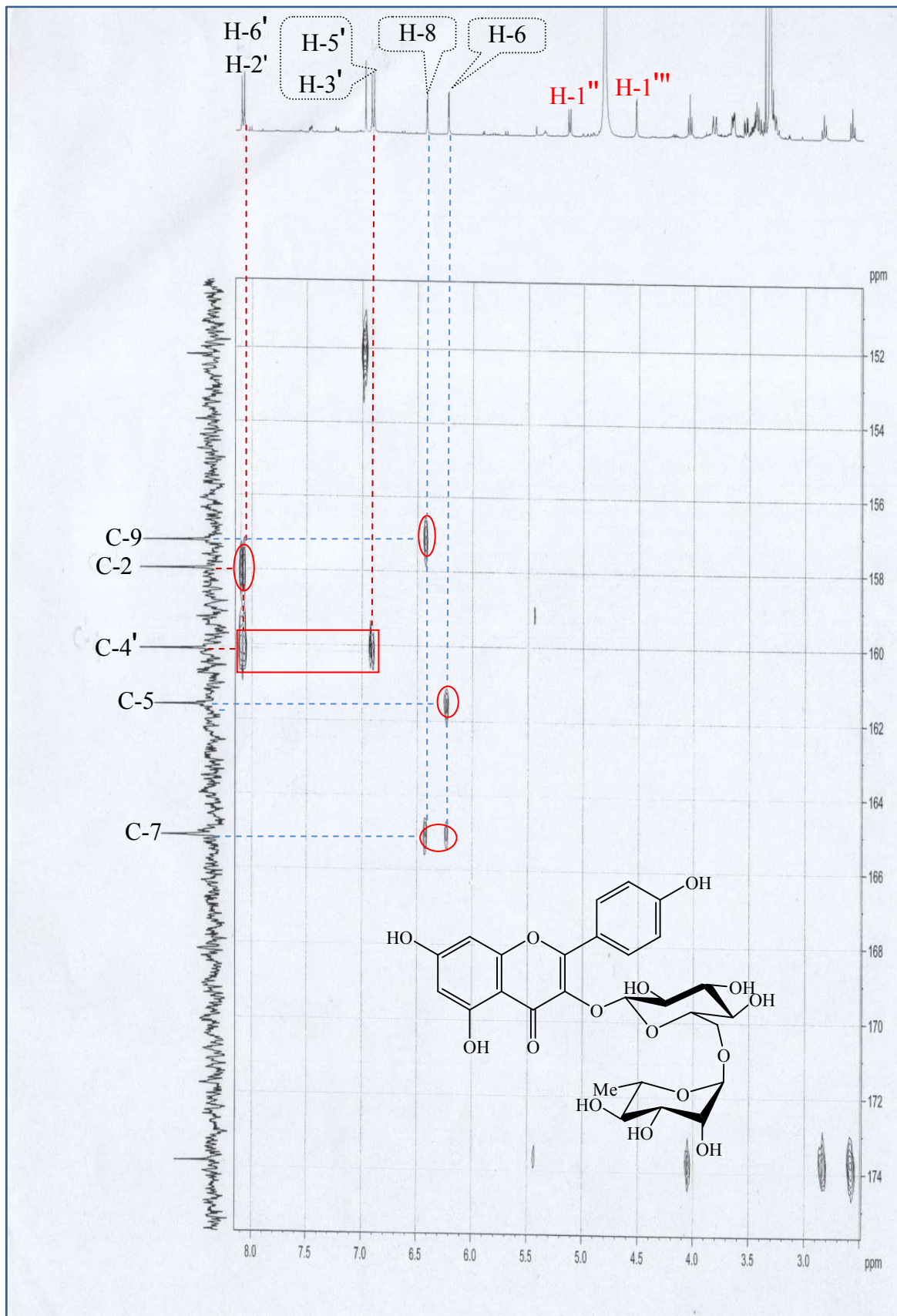
الشكل-8- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون في (CD₃DO, 400MHz) للمركب C2 مع التكبيرات اللازمة



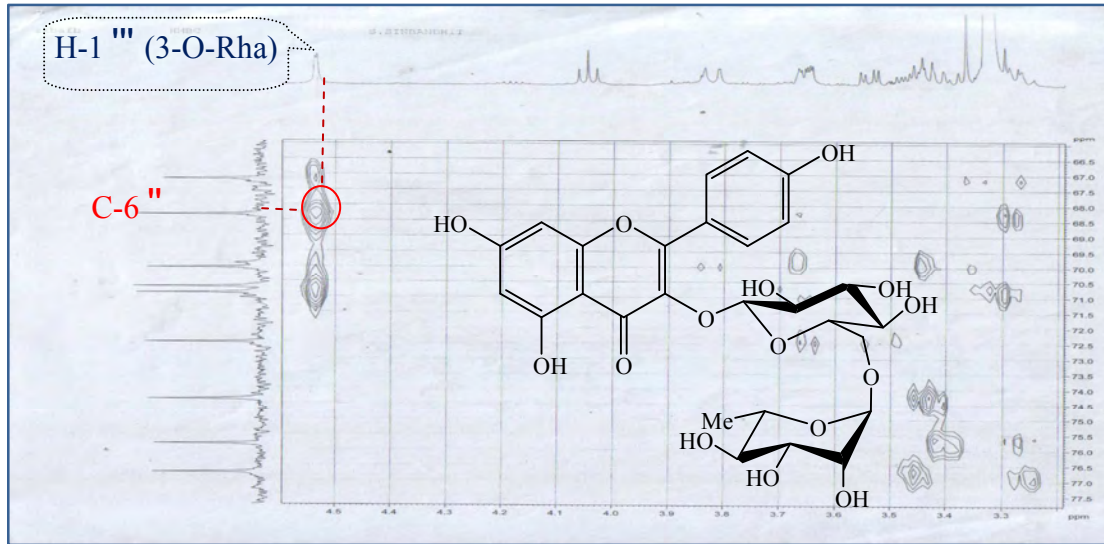
الشكل-9- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMQC للمركب C2



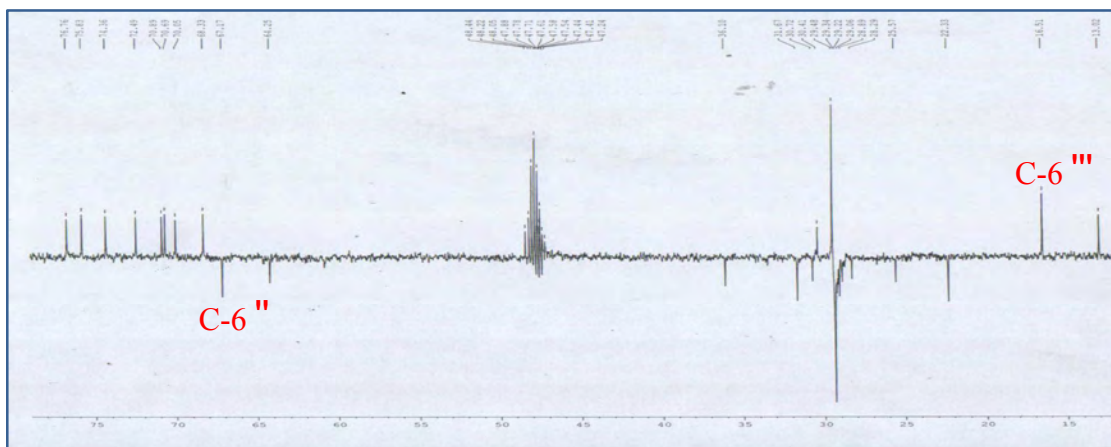
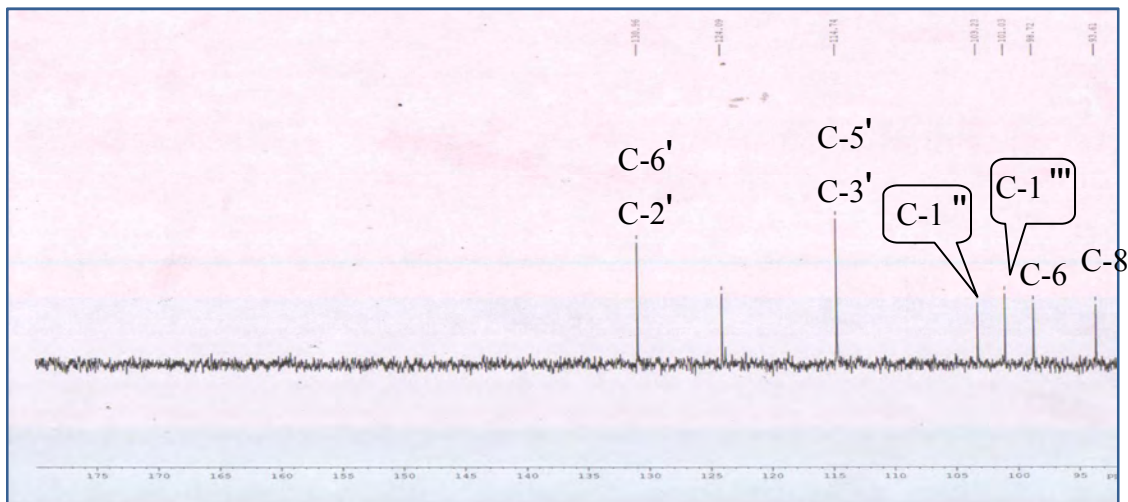
الشكل-10- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C2



الشكل-11- تكبيرات لطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C2



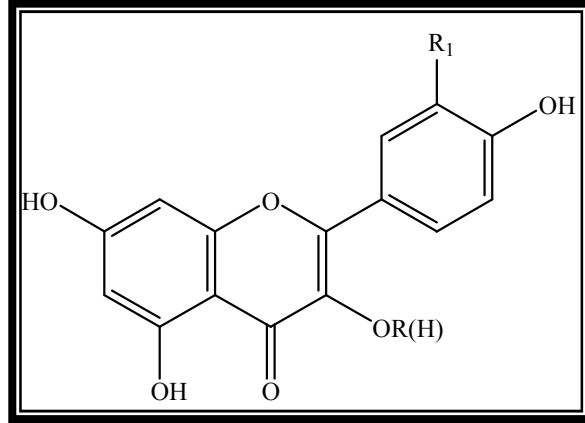
الشكل-12- تكبيرات طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي البعد بتقنية HMBC للمركب C2



الشكل-13- طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 في (CD₃DO,400MHz) للمركب C2 بتقنية DEPT 135

6-قراءة النتائج وتحديد البنية النهائية للمركب C2

- من خلال قيم R_f يدل السلوك الكروماتوغرافي على أن المركب C2 جليكوزيد متعدد السكر.
 - اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية و قيمة العصابة I في الميثانول 351 نم دليل على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3 (الشكل-7).
 - الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I 50 نم الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع استقرار الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموضع 4، و ظهور عصابة جديدة عند 325 نم يدل على وجود OH حر في الموضع 7 والذي يتأكد بالإزاحة الباتوكرومية للعصابة II بمقدار 6 نم وهذا بمقارنة طيف NaOAc بطيف الميثانول.
 - غياب الإزاحة الهيسوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف $AlCl_3$ بـ $AlCl_3+HCl$ دليل على غياب نظام أرثو ثنائي هيدروكسيل على مستوى الحلقة B. يؤكد ذلك عدم تغير طيف $NaOAc + H_3BO_3$ مقارنة بطيف الميثانول على مستوى العصابة I
 - أما الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I المقدره بـ 47 نم الناتجة عن المقارنة الطيفية لـ $AlCl_3+HCl$ بـ MeOH دليل على وجود OH في الموضع 5.
- مجموعة هذه المعلومات تقود إلى اقتراح البنية التالية:



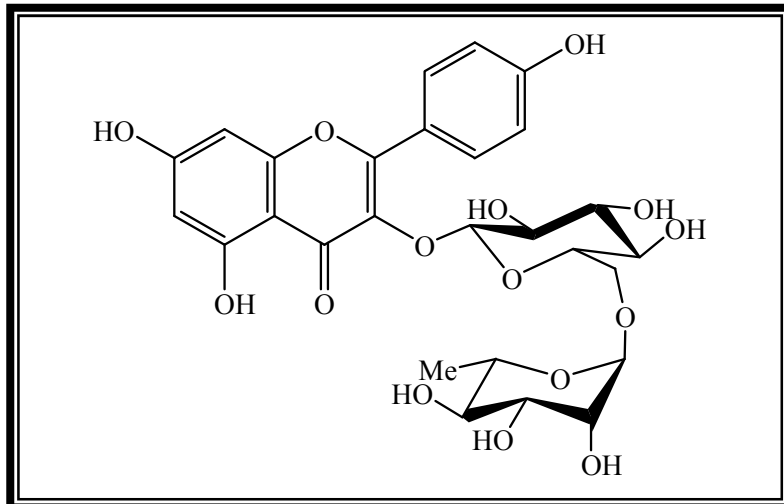
بينت نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (الشكل-8) $RMN-^1H$ وجود:

- إشارتان ثنائيتان بتكامل 1H و بثابتة تزاوج ($J=2.0$ Hz) لكل منهما عند $\delta = 6.43$ ppm
- و $\delta = 6.22$ ppm موافقتين لـ H-8 و H-6 على الترتيب.
- إشارة ثنائية و بثابتة تزاوج ($J= 8.9$ Hz) بتكامل 2H عند $\delta = 8.10$ ppm موافقة إلى كل من H-2' و H-6'.

- إشارة ثنائية و بثابتة تزاوج ($J = 8.9 \text{ Hz}$) و بتكامل 2H عند $\delta = 6.90 \text{ ppm}$ يمكن إسنادها إلى كل من H-3' و H-5'.
- أكد طيف RMN^{-1}H على أن المركب C2 يحتوي على سكرين و هذا من خلال وجود إشارة الجلوكوز المميزة بالبروتون الأنوميري الخاص به، إذ جاءت على شكل إشارة ثنائية بثابتة تزاوج قدرة بـ ($J = 7.5\text{Hz}$) و التي ترن عند $\delta = 5.20 \text{ ppm}$ أما السكر الثاني فهو رامنوز إذ تميز بوجود إشارة ثنائية بثابتة تزاوج قدرة بـ ($J = 1.5\text{Hz}$) ترن عند $\delta = 4.50 \text{ ppm}$ و الخاصة بالبروتون الأنوميري الموافق له، مرفقا بإشارة ثنائية بتكامل 3H بثابتة تزاوج قدرة بـ ($J = 6.2\text{Hz}$) ترن عند $\delta = 1.15 \text{ ppm}$ مميزة للمثيل الخاص بسكر الرامنوز.
- الإماهة الحمضية حررت سكري الرامنوز و الجلوكوز، و أعطت أجليكونا أصفر اللون، موافق لبنية Keampférol، مما يدل على أن سكري الرامنوز و الجلوكوز مرتبطين ببعضهما
- لأجل تحديد مكان ارتباط سكري الرامنوز و الجلوكوز لجأنا إلى أطيف RMN ثنائية البعد بمختلف تقنياتها.

طيف الرنين النووي المغناطيسي ذو بعدين بتقنية HMBC (الأشكال 10-11-12) بين:

- نقطة تعالق بين H-1" الذي يرن عند $\delta = 5.2 \text{ ppm}$ و C-3 الذي يرن عند $\delta = 134 \text{ ppm}$ يؤكد ارتباط الجلوكوز بالأجليكون في الموضع 3.
- نقطة تعالق بين H-1 "' الذي يرن عند $\delta = 4.5 \text{ ppm}$ و C-6 " الذي يرن عند $\delta = 67.25 \text{ ppm}$ يبين أن البروتون الأنوميري للرامنوز يرتبط بالكربون 6 للجلوكوز وعليه فالبنية النهائية للمركب C2 هي:



Kaempférol 3-O-[α -L-rhamnosyl (1→6)-O- β -D-glucoside]

III التعين البنوي للمركب C4:

1- الخصائص الكروماتوغرافية:

جدول 13- الخصائص الكروماتوغرافية للمركب C4

الجملة	S ₁	S ₂
ثابت الاحتباس	0.25	0.38
اللون الاستشعاعي	بنفسجي	

2- المعطيات الطيفية:

أ. الأشعة فوق البنفسجية UV

جدول 14- نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية تبعا للشكل (14) للمركب C4

الكواشف	العصابة I (نم)	عصابات أخرى (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	352	-	266
NaOH	400	325	275
AlCl ₃	398		273
AlCl ₃ +HCl	398		274
NaOAc	377	304	274
NaOAc+H ₃ BO ₃	357	306	269

في NaOH وبعد خمس دقائق : الطيف مستقر

ب. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي البروتون :

جدول 15- نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تبعا للشكل -15-

الإزاحة الكيميائية δ(ppm)	التكامل	ثابتة التزاوج J (Hz)	التعددية	البروتون الموافق
8.10	2H	8.4	d	H-6' , H-2'
6.75	2H	8.4	d	H-5' , H-3'
6.35	1H	1.1	d	H8
6.15	1H	1.1	d	H6
5.35	1H	6.1	d	H-1''(3-O-Glu)
4.10	1H	7.6	d	H-1''' (3-O-Glu)

3- الحمهة الحمضية :

- الشق الأجليكوني: Kaempférol وهذا حسب المعطيات التالية:

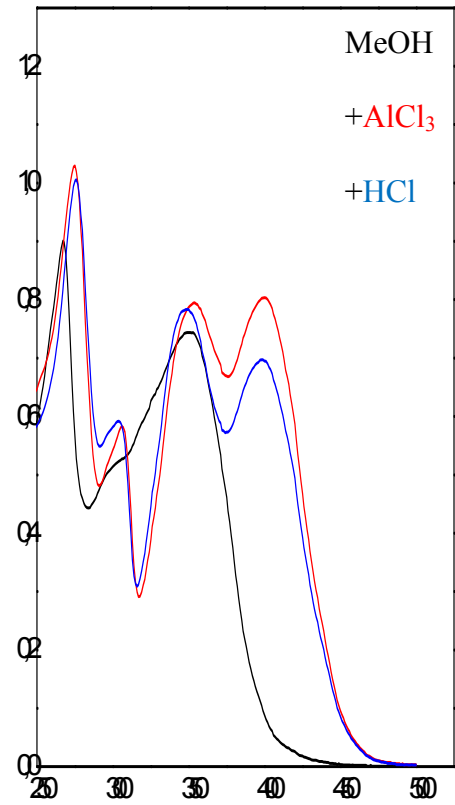
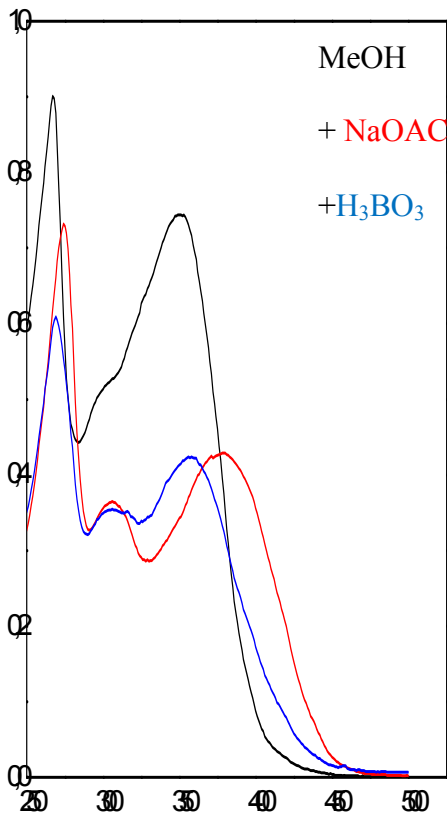
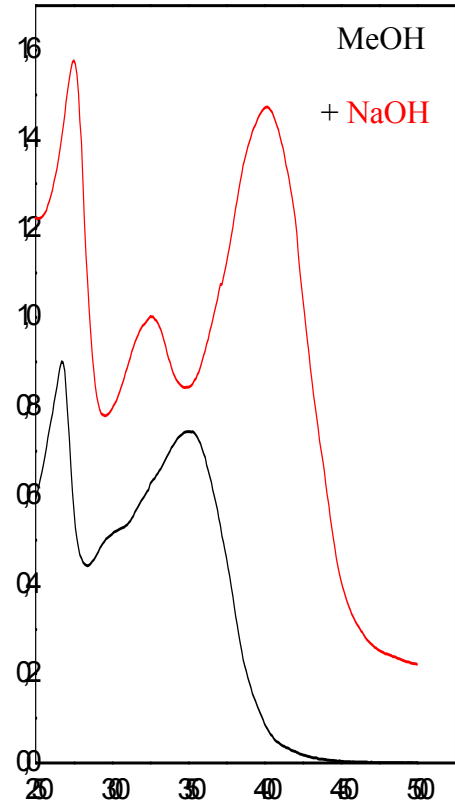
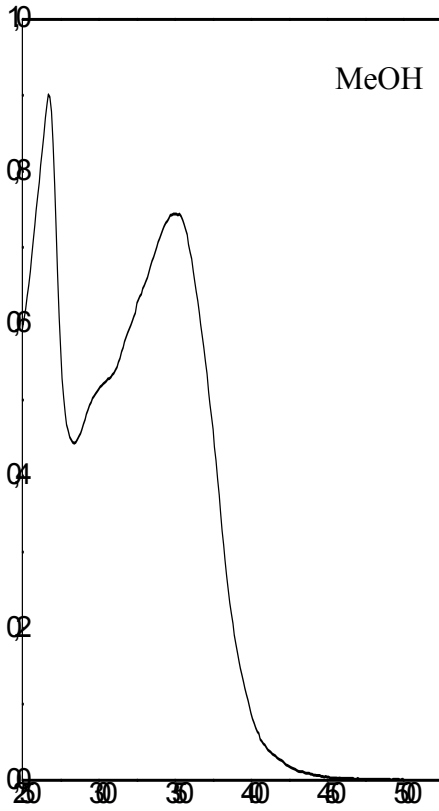
أ . اللون الإستشعاعي: أصفر

ب . نتائج مطيافية UV:

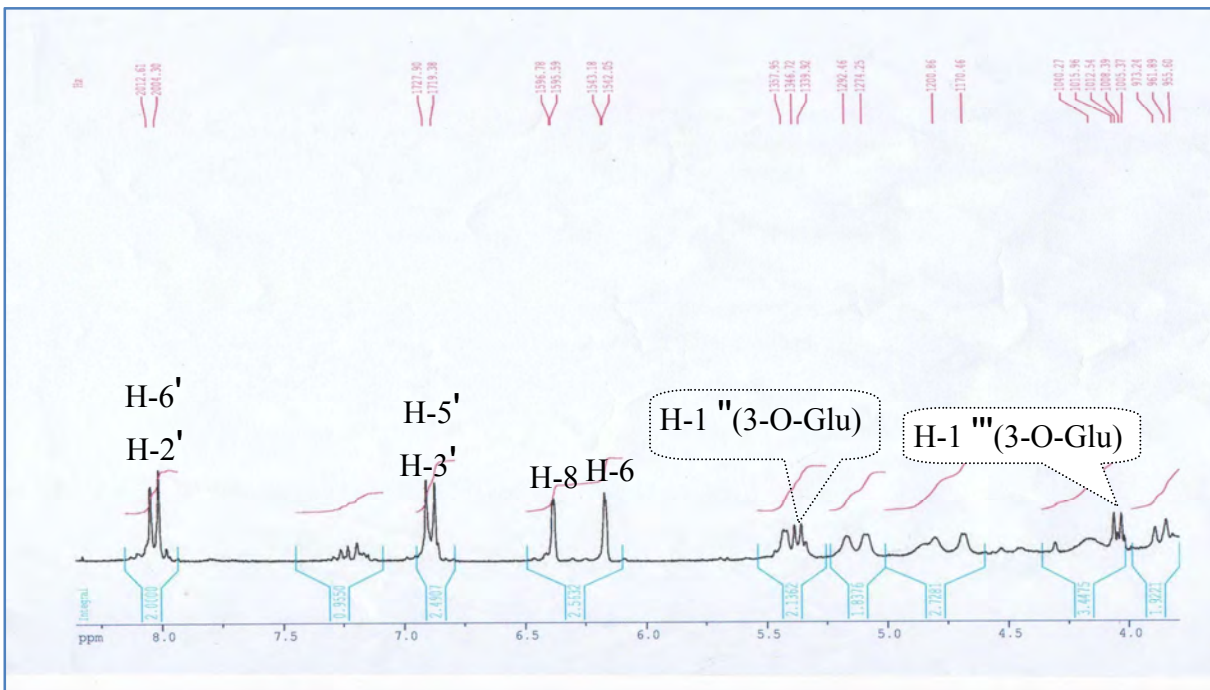
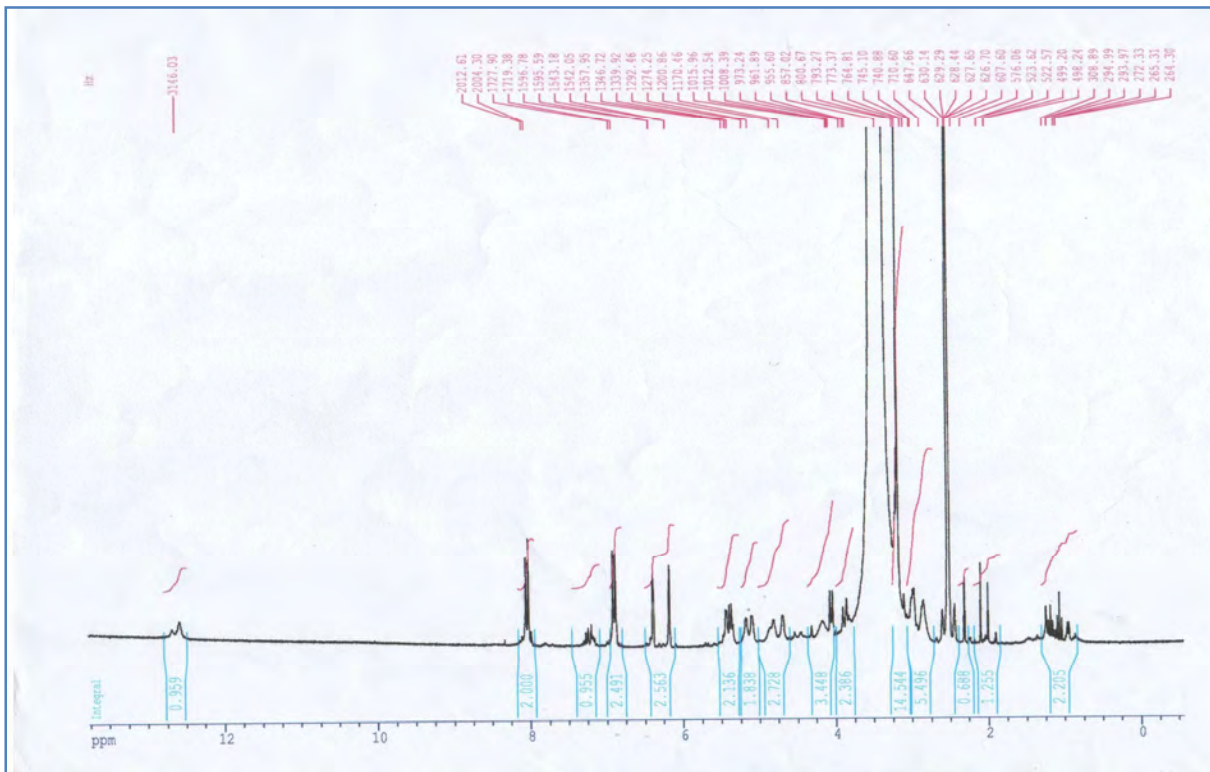
جدول -16- نتائج مطيافية UV للاجليكون بعد الاماهة الحمضية للمركب C4

العصابة II (نم)	العصابة I (نم)	الكاشف
295	375	MeOH

- الشق السكري: Glucose



الشكل-14- سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب C4

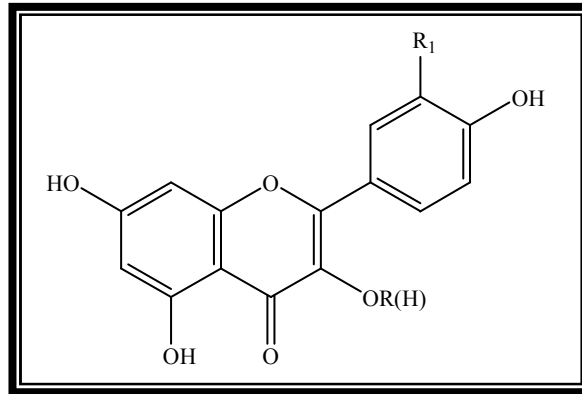


الشكل 15- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون في (DMSO-d₆, 250MHz) للمركب C4 مع التكبيرات اللازمة

4- قراءة النتائج وتحديد البنية النهائية للمركب C4

- اللون البنفسجي للمركب C4 و قيمة العصابة I في الميثانول المقدره بـ 352 نم يدلان على أنه فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3 الشكل (14).
- أما سلوكه الكروماتوغرافي فيؤكد على أنه جلوكوزيد متعدد السكر.
- إزاحة طيف الميثانول عند إضافة NaOH على مستوى العصابة I بقيمة +48 نم تدل على وجود 4'-OH.
- ظهور عصابة جديدة عند 325 نم مع نفس المفاعل دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7. يتأكد هذا بالإزاحة الباثوكرومية للعصابة II بمقدار 8 نم عند مقارنة طيفي NaOAc و الميثانولي.
- الإزاحة الباثوكرومية المقدره بـ 9 نم على مستوى العصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيف $AlCl_3+HCl$ تشير إلى وجود 5-OH.
- نستدل على غياب نظام أرثو ثنائي هيدروكسيل بعدم تغير طيف $AlCl_3$ تقريبا بعد إضافة HCl و يؤكد من الإزاحة الباثوكرومية الضعيفة للعصابة I عند مقارنة طيف الميثانول بطيف $NaOAc + H_3BO_3$.

مجموعة هذه المعلومات تقود إلى اقتراح الصيغة التالية:



نتائج طيف RMN الشكل (15) بين:

غياب H-3 الخاصة بالفلافون ما يؤكد أن المركب C4 عبارة عن فلافونول مستبدل في الموضع 3، يندرج تحت هيكل الـ Kaempférol، وهذا من خلال إشارات الحلقتين A و B حيث تميزت الأولى بظهور إشارتين ثنائيتي بتكامل 1H و بثابتة تزواج قدرها ($J = 1.1\text{Hz}$)

لكل منهما، حيث رنت الإشارة الأولى عند $\delta = 6.35\text{ppm}$ الخاصة بالبروتون H-8 و الثانية عند $\delta = 6.15\text{ppm}$ الخاصة بالبروتون H-6.

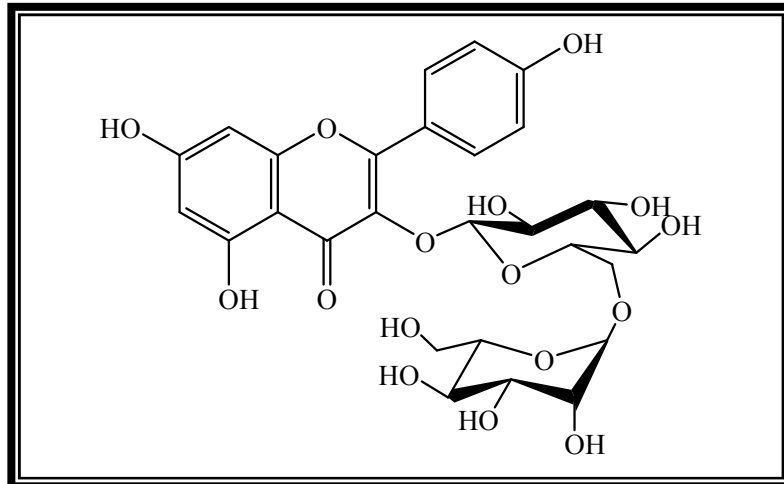
أما الحلقة B فتميزت بظهور إشارتين على شكل ثنائي بتكامل 2H وثابتة تزاوج $J = 8.4\text{Hz}$ لكل منهما، الأولى ترن عند $\delta = 8.10\text{ ppm}$ يمكن إسناده إلى كل من H-2' و H-6' و الثانية عند $\delta = 6.75\text{ ppm}$ يمكن إسنادها إلى كل من H-3' و H-5'.

بين كذلك طيف RMN^1H وجود سكرين من نوع الـ Glucose حيث تميز كل واحد منهما بوجود بروتونه الأنوميري على شكل إشارة ثنائية بثابتة تزاوج قدرت بـ $J = 7.6\text{Hz}$ ، رن الأول عند $\delta = 4.10\text{ ppm}$ ، و الثاني عند $\delta = 5.35\text{ ppm}$ بثابتة تزاوج قدرت بـ $J = 7.6\text{Hz}$. حررت الإماهة الحمضية سكري الـ Glucose، وأجليكون ذو لون أصفر يدل على تحرر السكرين من الموقع 3.

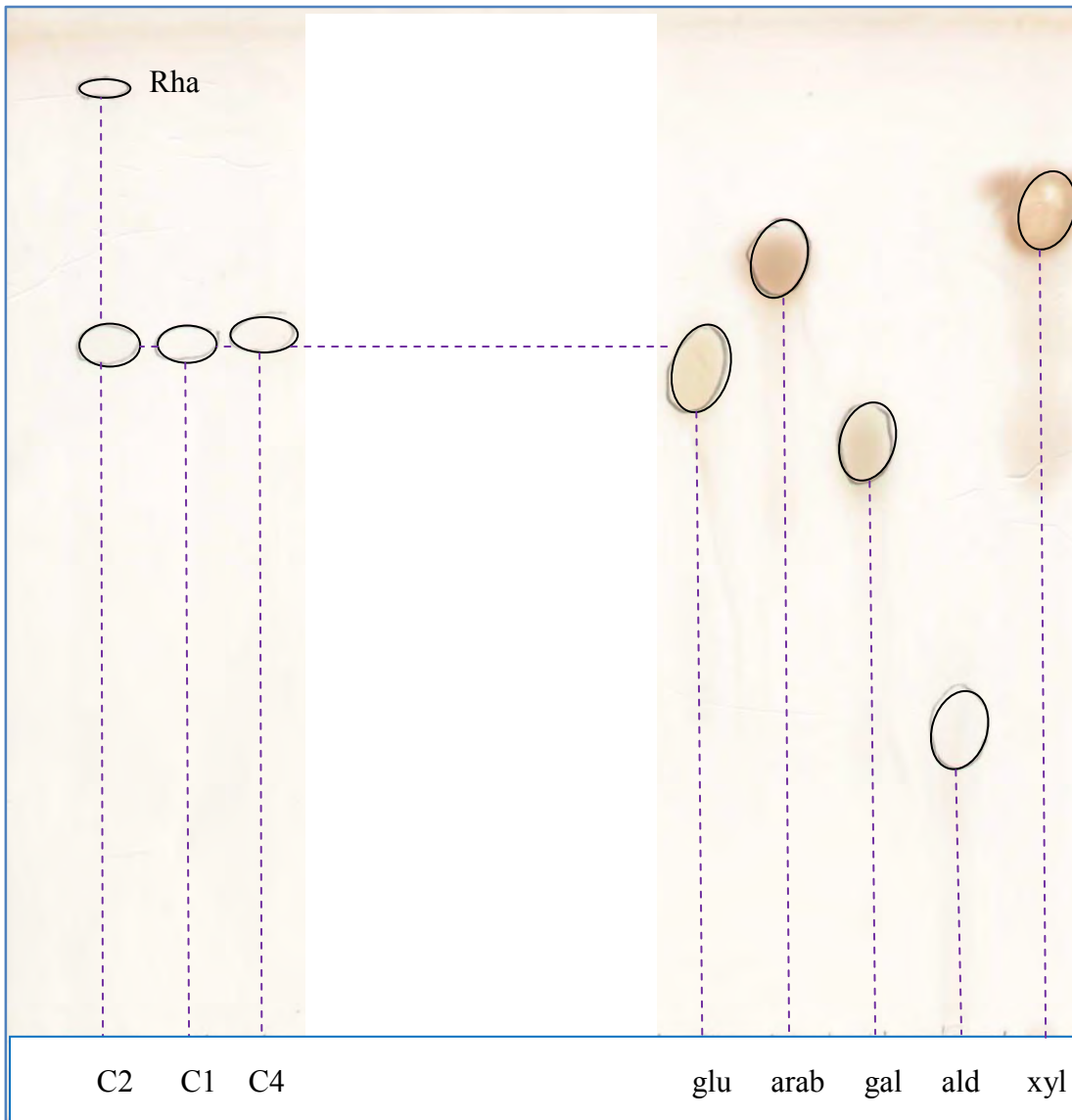
قيمة العصابة I في الميثانول المقطرة بـ 374 نم تؤكد أن الأجليكون عبارة عن فلافونول 3-OH

كل هذه النتائج تؤكد على أن كل من السكرين متواجدان في الموضع 3، يبقى معرفة ارتباط مكان السكرين و نظرا لغياب تقنيات RMN المختلفة اعتمدنا على المراجع المكتبية (صفحة 48) التي تؤكد على أن:

- بروتون الجلوكوز الأنوميري ذو الإزاحة $\delta = 5.35\text{ ppm}$ يكون ارتباطه مباشرة بالأجليكون و في الموضع 3.
 - البروتون الأنوميري للجلوكوز النهائي ذو الإزاحة $\delta = 4.1\text{ ppm}$ يكون مرتبط مباشرة بالكربون 6 للجلوكوز الأولي.
- الصيغة النهائية للمركب C4 هي:



Kaempférol-3-O-[β -D-glucosyl (1→6)-O-β-D-glucoside]



الشكل -16- نتائج الإمهاء الحمضية

المراجع

[1]. Quezel, H., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques, eds du centre national de la recherche scientifique. Paris. 756-757.

[2]. Ozenda, P (1958) Faune du Sahara, septentrional et Central, preface du professeur Ed : C.N.R.S. Paris. 376-377

الفصل الرابع

الفعالية البيولوجية

مدخل

للجذور الحرة دور كبير في الآليات الجزيئية للعديد من الأمراض، كونها تتولد بشكل طبيعي في جسم الإنسان ويزداد تشكلها بفعل عدة عوامل داخلية وخارجية، وبموازاة ذلك يتركز الإهتمام على دراسة مضادات المؤكسدات antioxidants داخلية وخارجية المنشأ لأنها النظام الذي يحمي العضوية من أضرار الجذور الحرة [1-4].

1- الجذور الحرة :

الجذور الحرة عبارة عن ذرة أو مجموعة من الذرات تحتوي على إلكترون غير مزدوج على الأقل، وعندما يتحول الإلكترون من مزدوج إلى غير مزدوج فإن خطره يزيد ويصبح غير مستقل، وعموما فإن الجذور الحرة تنتج طبيعيا من خلال التفاعلات الحيوية داخل الجسم والذي يحاول أن ينظم تركيزها، ولذلك فإن تواجدها في الدم بتركيز منخفض يعتبر أمرا طبيعيا ولكن المشكلة تكمن عندما يزيد تركيز داخل الجسم البشري.

2- مصادر الجذور الحرة :

للجذور الحرة عدة مصادر كالمركبات البترولية و المواد الملونة و الحافظة، إضافة إلى المواد المنظفة و الكحول وكذلك شوارذ المعادن الثقيلة و القطران في التبغ.

3- أسباب زيادة الجذور الحرة :

- ✓ يزيد تشكل الجذور الحرة بازدياد سرعة الإستقلاب كما يحدث في حالة التوتر والشدة
- ✓ يزيد بزيادة عوامل التلوث البيئي المختلفة التي يتم تحطيمها في الجسم لتتحول إلى جذور حرة.
- ✓ استهلاك كميات كبيرة من الأوكسجين.
- ✓ يزيد بالتدخين و لأسباب عديدة...

4- مضادات الأوكسدة:

للحفاظ على التوازن الإرجاعي الداخلي يسخر الجسم على مجموعة معقدة من أنظمة الدفاع المضادة للأوكسدة تعمل على الحد من التأثيرات السلبية للجذور الحرة و التي تكون في غالبيتها غير عكسية [1].

مضادات الأوكسدة هي مجموعة من الجزيئات تتواجد بتركيز قليلة مقارنة ببيادئات التأكسد ولكن لها القدرة على خفض أو تثبيط أكسدتها [1-4]، وتشمل المركبات داخلية المصدر ذات طبيعة إنزيمية مثل GPx، SOD، CAT، وبعض الجزيئات غير الإنزيمية Thioedoxin، GSH réduit وأخرى ذات مصدر خارجي من بينها الفيتامينات المضادة للجذور الحرة

كالفيتامين E و C، مركبات طبيعية مثل متعددات الفينول كالفلافونيدات وبعض المعادن خاصة الزنك (Zn)، السيلينيوم (Se) والنحاس (Cu) [5-8]، و رغم تنوع مضادات الأكسدة فإنها تؤثر على مستويين:

- الوقاية من الإنتاج المفرط للجذور الحرة.
- الأسر الجذري من خلال التقاط الإلكترونات العازبة للجذور الحرة و تحويلها إلى جزيئات ثابتة [9].

5- الفلافونيدات و الجذور الحرة و النشاط المضاد للأكسدة :

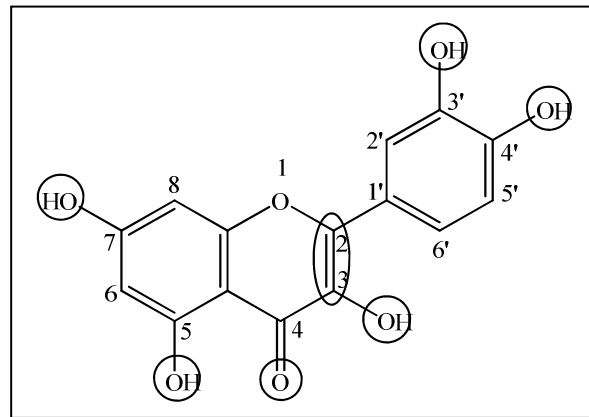
إن من أهم مميزات الفلافونيدات هو نشاطها المضاد للأكسدة و الناتج أساسا عن خاصيتها القابلة للأكسدة و الإرجاع، و بذلك فهي تعمل على الوقاية من الإجهاد التأكسدي الناتج عن الجذور الحرة .

6- العلاقة بين بنية الفلافونيد و النشاط المضاد للأكسدة :

أدت الأبحاث التي أجريت على النماذج المخبرية و التي اهتمت بالعلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونيد (شكل-1) و نشاطه المضاد للأكسدة للتوصل إلى التعرف على المجاميع و المواقع النشطة في الآلية المضادة للأكسدة و المتمثلة في :

- مجموعة أرثو ثنائي هيدروكسيل 3', 4' على الحلقة B - Ortho dihydroxy -
- الرابطة غير المشبعة بين الموقعين (C₂-C₃) و المترافقة مع مجموعة الكربونيل C₄ للحلقة C.
- مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للحلقة C.
- مجموعة الهيدروكسيل في الموقعين 5، 7 للحلقة A.

و يعد Quercétine بامتلاكه لكل هذه المجاميع من أحسن الفلافونيدات فعالية [10-12].



الشكل-1- .المواقع الفعالة في النشاط المضاد للأكسدة للفلافونيدات

7- آلية الفلافونيدات المضادة للأكسدة : [14-12,10]

إن النشاط المضاد للأكسدة يرجع للفاعليات التالية :

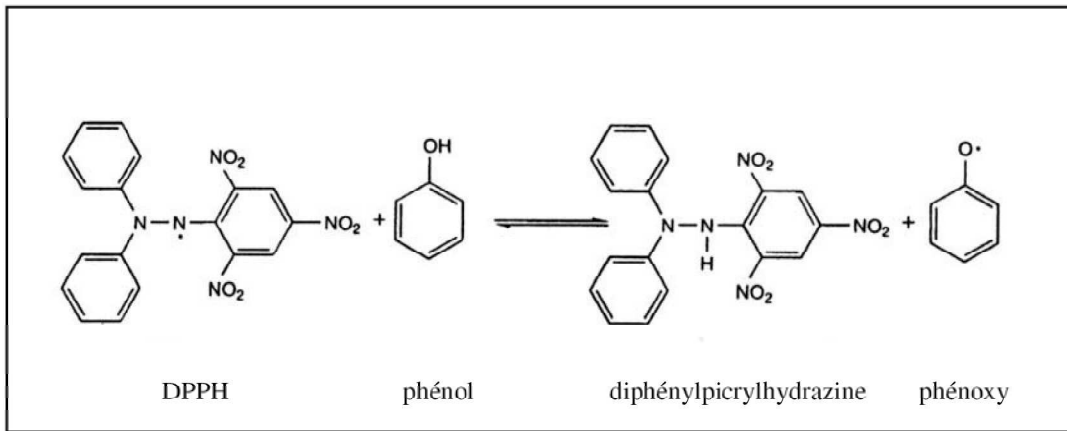
- الاقتصاص المباشر للجذور الحرة.
- حجز و التقاط الايونات المعدنية المتدخلة في تخليق الجذور الحرة.
- تثبيت الإنزيمات المولدة للجذور الحرة.
- حماية أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة.

8- تقدير النشاط الأسر للجذور الحرة (اختبار DPPH)

يسمح هذا الاختبار بتقييم قدرة المستخلص البوتانولي على أسر والتقاط الجذور الحرة بالطريقة اللونية [15]، وذلك باستعمال الجذر الحر الثابت DPPH (شكل-2).
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl الذي يعتبر من أهم الاختبارات المعتمدة في تقييم الدور المانع للأكسدة.

أ. مبدأ التفاعل :

يعتمد هذا التفاعل على أساس إرجاع جذر الـ DPPH للجزيئات المانحة لذرات الهيدروجين للمستخلص البوتانولي (الجزيئات المضادة للأكسدة)، حيث يتم إرجاع جذر DPPH باقتناصه لذرة هيدروجين إلى مركب DPPH-H ويصاحب ذلك تغير في اللون من البنفسجي إلى الأصفر، يترجم هذا التغير بنقص في الامتصاص بدلالة الزمن عند طول موجة 517 نم. وهذا حسب التفاعل التالي :



الشكل(2):تفاعل الـ DPPH مع الفينول

ب. طريقة العمل :

تم تحضير محلول ميثانولي ذو تركيز $C_1 = 5$ مغ/مل للمستخلص البوتانولي، وانطلاقاً من هذا الأخير حضرت التخفيفات التالية $C_2 = 3$ مغ/مل، $C_3 = 2$ مغ/مل، $C_4 = 1$ مغ/مل، $C_5 = 0.5$ مغ/مل، $C_6 = 0.25$ مغ/مل، $C_7 = 0.125$ مغ/مل.

- في أنابيب اختبار أخذ حجم قدره $30 \mu l$ لكل تركيز من تراكيز المحلول الميثانولي للمستخلص البوتانولي (كل تركيز على حدى) وأضيف له 3 مل من المحلول الميثانولي لجذر الـ DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M=394.33$) بتركيز 100 ميكرومول/لتر ($100 \mu M$)، بعد الخلط الجيد يوضع الخليط التفاعلي في الظلام لمدة 15 دقيقة وفي درجة حرارة المخبر، ثم تقرا الكثافة الضوئية عند 517 نم، مقابل الشاهد المحضر في نفس الشروط التجريبية لكن باستعمال الميثانول بدلا من محلول المستخلص.

- إن التراكيز التي تأخذ بعين الاعتبار لتقييم النشاط الأيسر الأيوني للجذر DPPH هي تلك الموجودة في الخليط التفاعلي أي بعد التخفيف، فالتركيز $C_1 = 5$ مغ/مل يوافق التركيز التالي:

التركيز قبل التخفيف \times الحجم قبل التخفيف = التركيز بعد التخفيف \times الحجم بعد التخفيف

$$5 \text{ مغ/مل} \times 0.030 \text{ مل} (30 \mu l) = \text{التركيز بعد التخفيف} \times 3.030 \text{ مل}$$

التركيز بعد التخفيف أو في الخليط التفاعلي هو: 0.0495 مغ/مل

- تتم مقارنة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص البوتانولي بتلك الخاصة بالفلافونيد التجاري Quercétine حيث حدد النشاط المضاد للأكسدة لهذا الأخير بنفس البروتوكول التجريبي الخاص بالمستخلص.

ت- تقييم النشاط الأيسر للجذور الحرة

لتقييم النشاط المضاد للأكسدة، حددت قدرة المستخلص البوتانولي على اسر و التقاط الجذور الحرة بالنسبة المئوية لإرجاع الجذر الجر الثابت DPPH ومقارنة هذه النسبة بتلك الخاصة

Quercétine بـ

- تحدد النسبة المئوية لإرجاع الجذر الجر الثابت DPPH بالعلاقة التالية :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{blank} - \text{sample}}{\text{blank}} \times 100$$

حيث :

blank : الكثافة الضوئية لـ DPPH في المحلول الميثانولي

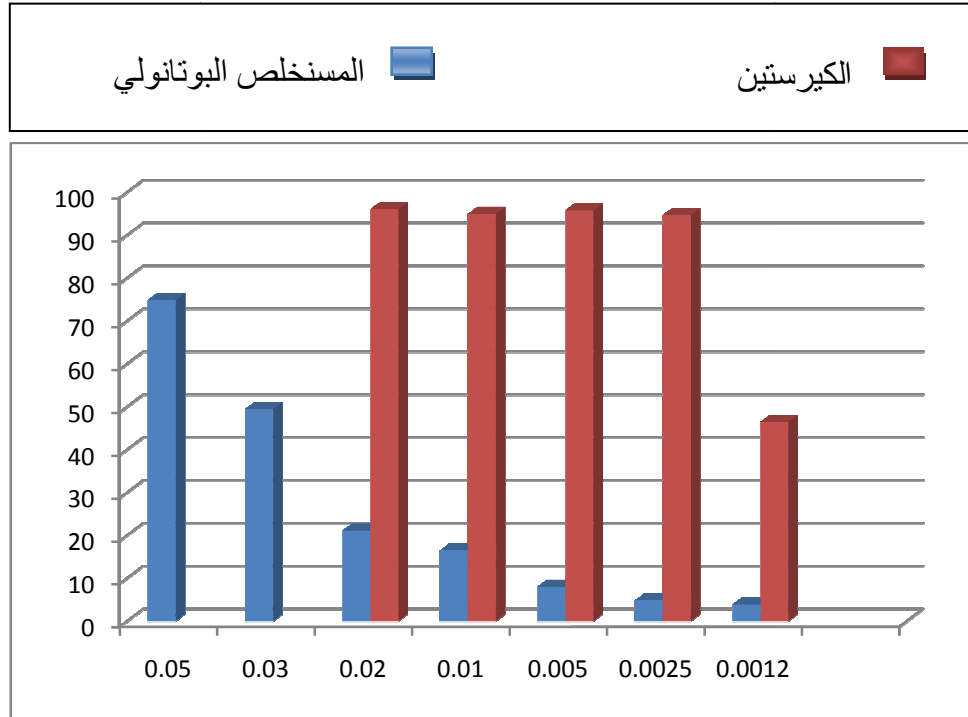
sampl : الكثافة الضوئية لـ DPPH بوجود المستخلص البوتانولي

9- النتائج والمناقشة :

النتائج المحصل عليها مدونة في الجدول -1-

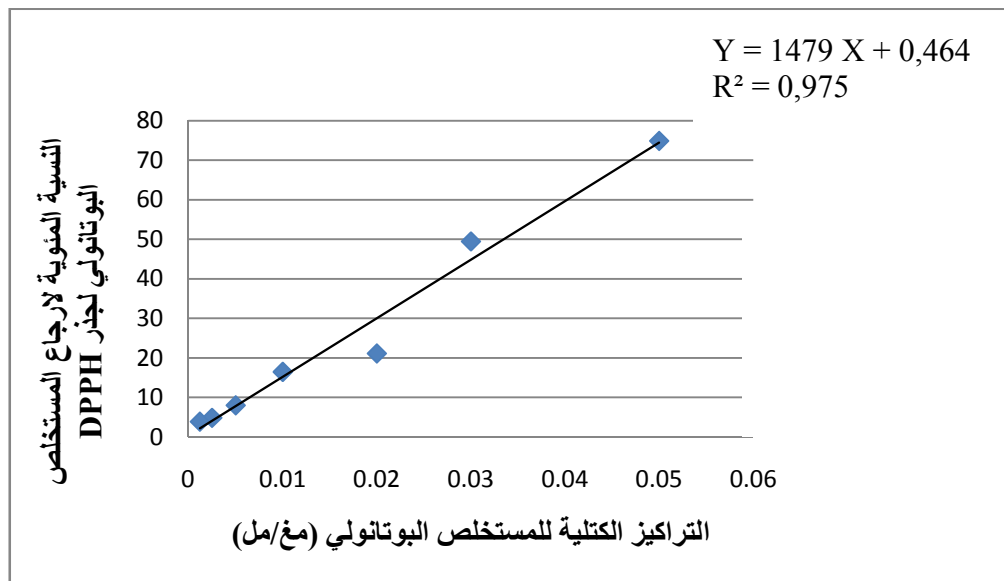
جدول -1- : يبين الاختلاف بين قدرتي الأسر الجذري للمستخلص البوتانولي للنبته *C. supinus* وكذا مركب الـ Quercétine [16] لجذر DPPH بدلالة مختلف التراكيز حسب الشكل -3-

% لارجاع DPPH		تراكيز المستخلص البيتانولي و الكيرستين (مغ/مل)	
Quercetin	المستخلص البوتانولي	التركيز في الخليط التفاعلي	التركيز الابتدائي
/	74.88	0.05	5.0
/	49.48	0.03	3.0
0.04 ± 96.06	21.14	0.02	2.0
0.01 ± 95.91	16.49	0.01	1.0
0.13 ± 95.81	8.060	0.005	0.5
0.3 ± 94.72	4.87	0.0025	0.25
1.78 ± 46.45	3.93	0.0012	0.125
	1.97	0.001	0.1



الشكل -3- مقارنة الفعل الأسر لجذر DPPH لكل من المستخلص البوتانولي و Quercétine عند تراكيز كتلية مختلفة

1 - المنحنى البياني لإرجاع المستخلص البوتانولي للنبتة *C. supinus* لجذر الـ DPPH



الشكل -4- منحنى يبين النسبة المئوية لإرجاع المستخلص البوتانولي لجذر DPPH بدلالة التركيز

ب- تحديد قيمة IC_{50}

تحدد قيمة IC_{50} من خلال المنحنى البياني، حيث يتم حساب قيمة التركيز الموافق لـ 50% اعتماداً على معادلة المنحنى التالية :

$$Y=1479 X + 0.464$$

➤ إذا كانت Y نسبة الإرجاع المقدر بـ 50% تكون قيمة IC_{50} كما يلي :

$$X = (50 - 0.464) / 1479 = 0.033$$

➤ عند النسبة 50% قدر تركيز المستخلص البوتانولي لنبته *C. supinus* بـ

$$IC_{50} = 0.033\text{mg/ml}$$

➤ أثبتت النتائج المحصل عليها فعالية المستخلص البوتانولي لنبته *C. supinus* في أسر والتقاط الجذور الحرة، حيث قدر التأثير الأسر لجذر DPPH بـ 74.88 % وهذا عند التركيز 0.05 مغ/مل وبقي تأثير هذا المستخلص ذو فعالية حتى التراكيز الجذ منخفضة المستعملة، حيث قدر التركيز الأسر لـ 50 % بـ 0.033 مغ/مل.

➤ وعند مقارنة الفعالية المانعة للأكسدة للمستخلص البوتانولي بتلك الخاصة بالفلافونيد التجاري الـ Quercétine و الذي يعرف بأنه من اكفاء الفلافونويدات المضادة للأكسدة نجد انه عند التركيز 0.02 مغ/مل قدرت نسبة إرجاع جذر DPPH للمستخلص بـ 21.14 % في حين سجلت عند نفس التركيز بـ 96.06 % للكيرسيتين، أي أن تأثير المستخلص كان حوالي ربع ذلك الملاحظ للفلافونويد Quercétine.

10- تحديد المركبات الفينولية التامة (Folin Ciocalteu):

تتنمي المركبات الفينولية الى نواتج الأيض الثانوي تتميز بوجود حلقة عطرية التي تحمل مجموعات الهيدروكسيل حرة او غير حرة، و هي مشتقات غير آزوتية حيث تتركب الحلقات العطرية بشكل أساسي من تفاعلات لحمض الشكميك.

1 . مبدأ التفاعل تعتمد هذه المعايير على تحديد المركبات الفينولية المتواجدة في النبات، و يعبر عن النتيجة بالنسبة المئوية للمركبات الفينولية (غ / 100 غ من pyrogallol)، تقارن هذه النتيجة عنها بمركب مرجعي هو Pyrogallol. استعملت في هذه التجربة طريقة Folin-Ciocalteu [18,17].

2 . طريقة العمل :

- نأخذ كمية m من مستخلص البوتانولي، نضيف إليه 2 مل من الميثانول و 13 مل من الماء المقطر و بالتالي نحصل على محلول A.
- نأخذ كمية m₁ من Pyrogallol، نضيف إليها 100 مل من الماء المقطر ثم نقوم بالتخفيف بقيمة 1/20 و بالتالي نحصل على محلول B.
- في أنبوبين مختلفين نضع في واحد منهما 2 مل من المحلول A و في الأنبوب الآخر 2 مل من المحلول B، نضيف لكل منهما على التوالي:
- 1 مل من Réactif Folin-Ciocalteu
- 10 مل من الماء المقطر.
- 12 مل (290 غ / لتر) من Carbonate de sodium
- بعد الخلط جيدا يوضع هذين الأنبوبين في الظلام مدة 30 دقيقة.
- نقرأ DO (الكثافة الضوئية) عكس الماء المقطر و ذلك على طول موجة 760 nm.
- تحسب نسبة المركبات الفينولية الممتلة في الجدول -2- كما يلي :
- 1 - حساب m₂:

$$m_2 = (m \times 25 \times 50) / 15$$

2 - حساب Polyphénols totaux (%) حسب المعادلة التالية :

$$\text{Polyphénols totaux (\%)} = \frac{(62.5 \times DO_1 \times m_1)}{DO_2 \times m_2}$$

حيث

m : كتلة المستخلص البوتانولي

DO₁ : الكثافة الضوئية للمستخلص البوتانولي

m₁ : كتلة الـ Pyrogallol

DO₂ : الكثافة الضوئية للـ Pyrogallol

جدول -2- نسبة المركبات الفينولية بكتل مختلفة

m(mg)	m ₁ (mg)	DO ₁ (nm)	Polyphénols totaux (%)
3.6	300	0.824	9.54
3.9	325	0.80	8.54

النتائج المحصل عليها بالنسبة للمعايرة الفينولية للمستخلص البوتانولي للنبتة *C. supinus* هي :

$$\text{Polyphénols totaux (\%)} = 9.035 \pm 0.70 \text{ (g/100g pyrogallol)}$$

➤ من خلال هذه النتيجة تبين أن مستخلص البوتانولي يحوي كمية معتبرة من المركبات الفينولية مقارنة بـ Picnogerol = 30.7 ± 0.3 (g/100g pyrogallol)، و هذا يوافق النتيجة المحصل عليها في الدراسة السابقة المتعلقة بالفعالية المضادة للأكسدة.

المراجع

- [1]. Re db, N. I., Le Goff, L .K., Had-Aisouni. L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implication sur la survie neuronale. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* 24, 502-509.
- [2]. Fonatine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., Leverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation.* 620-650.
- [3]. Clark, S. F. (2002). The Biochemistry of Antioxidants Revisited. *Nutr. Clin. Pract.* 17, 5-17.
- [4]. Suntres, Z. E., Omri, A. (2006). The role of liposomal antioxidants in oxidative stress. *Frontiers Nanother.* 191-205.
- [5]. Scandalis, J. G. (2005). Oxidative stress : molecular perception and transduction of singals triggering antioxidant gene defence. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (7), 995-1014.
- [6]. Wu, D., Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, Oxidative stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Res. & Health.* 27, 277-284.
- [7]. Comhair, S. A. A., Erzurum, S. C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Physiol. Lung. Cell .Mol. Physiol.* 283, 246-255.
- [8]. Zasaki, S. Y. (2006). Does Oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol.* 41, 1135-1148.
- [9]. Mafak. A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depside. Thèse de doctorat de l' université de Limoges. 30-35.
- [10]. Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres; étude et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur, Strasbourg I. 22-36.
- [11]. Harborne, J. B. (2000). Flavonoids in phytochemistry. Lawrence, Litton Educatinal Phytochemistry. (55), 481-504.

- [12]. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine some problems and concept. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 501-514.
- [13]. Fioruccis, S. (2006). Activité biologique de composés de la famille des flavonoides: Approche par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat de l'université de Nice-Sophia Antipolis. 14-29
- [14]. Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol Med.* 30, 433-446.
- [15]. Koleva, Van Beek T. A., Linssen, J. P. H. (2002). Extracts for antioxidant activity : a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Analysis.* 15, 8-17.
- [16]. Kara, w. (2008). Thèse de magister, Université de Constantine.
- [17]. Kujala, T. S., Lojonen, J. M., Klika, K. D., Pihlaja, K. (2000). Phenolic and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Food Chem.* 48, 5338-5342.
- [18]. Sanchez-Moreno, C., Satué-Garcia, M. T., Frankel, E. N. (2000). Antioxidant activity of selected spanish wines in corn oil emulsions. *Agric. Food. Chem.* 48, 5581-5587.

الأخاتمة

الخاتمة

من خلال هذا البحث الذي كان هدفه الرئيسي فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي للمستخلص البوتانولي للنبته *Convolvulus supinus*. قدمنا دراسة حول التنوع البنيوي لفلافونيدات الجنس *Convolvulus* الذي تتميز أنواعه بفعاليات بيولوجية مختلفة خاصة المضادة للأكسدة.

إضافة إلى ذلك عرضنا دراسة بيبلوغرافية شاملة عن المركبات الفلافونيدية، وعن الطرق المستخدمة في فصل وتنقية هذه المركبات و الطرق الفيزيوكيميائية لتحديد بنيتها. بعد عملية الإستخلاص اعتمدنا في فصل هذه المركبات على تقنيات كروماتوغرافية مختلفة منها كروماتوغرافيا العمود و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، و لأجل تحديد بنيتها الكيميائية لجأنا إلى طرق فيزيائية وكيميائية مختلفة، بداية بمطيافية الأشعة فوق البنفسجية و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والكربون، يليها الرنين النووي المغناطيس ثنائي البعد بتقنياته المختلفة، و أخيرا الإماهة الحمضية.

تمكنا خلال هذا العمل من فصل تسعة مركبات تم تحديد منها ثلاث بنى كيميائية هي:

- 1- Kaempférol 3-O- β -D-glucoside
- 2- Kaempférol 3-O-[α -L-rhamnosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]
- 3- Keampférol 3-O-[β -D-glucosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]

عزلت المركبات الثلاثة لأول مرة من النوع *C. supinus* و المركبين الأخيرين لأول مرة من الجنس *Convolvulus*.

كما تمكنا من الكشف على مدى الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص البوتانولي لهذه النبتة بطريقة DPPH و بطريقة Folin Ciocalteu مدى إحتوائه على المركبات الفينولية.

المخلص

الهدف الرئيسي من هذا البحث هو فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي للمستخلص البوتانولي لنبته *Convolvulus supinus* التي تنتمي إلى العائلة Convolvulaceae.

تمكنا من فصل تسعة مركبات و هذا باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (كروماتوغرافيا العمود CC كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM، كروماتوغرافيا الورق CP)، و تحديد بنية ثلاثة منها بواسطة مختلف طرق التحليل الطيفي من مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV، و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون أحادي و ثنائي البعد، و الكربون 13، (^1H RMN ^{13}C RMN، HSQC، HMBC) و كذلك الإماهة الحمضية، تتميز بهيكل : Kaempférol

- 1- Kaempférol 3-O- β -D-glucoside
- 2- Kaempférol 3-O-[α -L-rhamnosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]
- 3- Keampférol 3-O-[β -D-glucosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]

لأول مرة وجدت :

- المركبات (3-1) في النوع *C. Supinus* .
- المركبان 2 و 3 في الجنس *Convolvulus* .

أعطى المستخلص البوتانولي فعالية مضادة للأكسدة و هذا باستعمال طريقة الـ DPPH. أثبتت معايرة متعددة الفينول، تبعا لطريقة Folin Ciocalteu، أن المستخلص البوتانولي غني بالمركبات الفينولية.

الكلمات المفتاحية: *Convolvulus supinus*، Convolvulaceae، فلافونيد، المستخلص البوتانولي.

RESUME

L'objectif principal de ce travail est la séparation et l'identification des flavonoïdes de l'extrait butanolique de la plante *Convolvulus supinus* appartenant à la famille des *Convolvulaceae*.

Nous avons séparé neuf produits, par différentes techniques chromatographiques (colonne, papier, couche mince), dont 3 flavonoïdes éte identifiés, en utilisant des différentes méthodes spectroscopiques tell que : l'ultra-violet, la RMN du proton unidimensionnelle, la RMN du Carbone 13, la RMN bidimensionnelle (UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC, HSQC), et l'hydrolyse acide. Ces 3 flavonoïdes possèdent un squelette kaempférol :

- 1- Kaempférol 3-O- β -D-glucoside
- 2- Kaempférol 3-O-[α -L-rhamnosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]
- 3- Keampférol 3-O-[β -D-glucosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]

Ces 3 flavonols glycosylés sont rapportés Pour la première fois de l'espèce *C. Supinus* alors que les flavonols 2 et 3 sont nouveaux pour le genre *Convolvulus*.

L'extrait butanolique a révélé une bone activité anti-oxidante, en utilisant la méthode du DPPH.

Le Dosage des polyphénols totaux, par la méthode de Folin Coicalteu, a montré une bonne richesse de L'extrait boutanolique en polyphénols.

Mots- clés: *Convolvulus supinus*, *Convolvulucaeae*, flavonoïdes
extrait Butanolique

ABSTRACT

The aim of this work is the separation and identification of the flavonoids from *Convolvulus supinus*, belonging to the Convolvulaceae family.

The use of different chromatographic methods (column, paper, thin layer), permitted the isolation of nine compounds from the butanolic extract, from which three flavonoids identified by the use of spectral methods: UV, one dimensional ^1H NMR, ^{13}C NMR, two dimensional NMR (HSQC, HMBC) and acid hydrolysis. These flavonoids were bearing a Kaempferol skeleton :

- 1- Kaempferol 3-O- β -D-glucoside
- 2- Kaempferol 3-O-[α -L-rhamnosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]
- 3- Kaempferol 3-O-[β -D-glucosyl (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucoside]

The three flavonol glycosides are reported from the first time from the species *C. supinus* while flavonols 2 and 3 are New for the genus *convolvulus*.

The Butanolic extract exhibited a good antioxidant activity by the use of DPPH Scavenging radical method. This extract has been shown to be rich with polyphenols, by the use of Folin Ciocalteu method.

Key words: Convolvulus Supinus, Convolvulaceae, flavonoids, butanolic extract.