

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

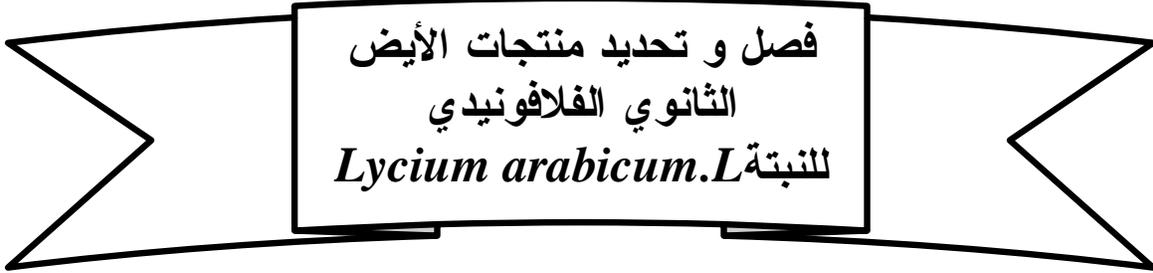
قسم الكيمياء

كلية العلوم الدقيقة
رقم الترتيب
رقم التسلسل

مذكرة

مقدمة لنيل شهادة الماجستير في العلوم
تخصص كيمياء عضوية
شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان



تقديم:

شروانة سهيلة

لجنة المناقشة:

رئيسا	أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة	- د. عبد الرحمن تنيو
مشرقا	أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة	- د. صالح غواطي
ممتحنا	أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة	- د. صالح عكال
ممتحنا	أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة	- د. فاروق زايدي

ديسمبر 2007

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الأهداء

أهدي هذا العمل وثمره جمدي إلى أغلى ما لدي في الكون أبي وأمي حفظهما
الله

إلى جميع أفراد العائلة كبيرا وصغيرا وخاصة إلى أختي الغالية حسينة

إلى صديقاتي: رتيبة، زليخة، سميلة، كوثر، زهرة، زهية، طيبة، حنان، منال، سعدة،
وسيمة، منيرة، منال، أمال، وردة، فوزية، وردة، صبرينة، نوال، سليحة، سعاد،
أسماء، ميادة، سميه، نسيمه، عائشة، ياسمينه

إلى زملائي وزميلاتي في المخبر: حسينة، نريمان، فيروز، فيروز، أحلام، روفيا،
أحلام، مسيكة، سكينه، عمار زلاقي، رشيد بن كينوار، جمال درويش

إلى أستاذي أحمد الطويل

إلى كل من ساعدني من قريب أو بعيد

التشكرات

الشكر الأول والحمد الأكبر لله عز وجل الذي أعطاني القدرة على إنجاز هذا العمل.
أتقدم بالشكر الجزيل إلى الأستاذ محواري صالح على قبوله الإشراف على هذا العمل وعلى كل مساعداته لإنجاز هذا البحث .

أتقدم بجزيل الشكر للأستاذ فنيو محمد الرحمان على قبوله رئاسة اللجنة.
أتقدم بجزيل الشكر إلى الأستاذين زايد زايدي و فاروق و صالح محال على قبولهما مناقشة هذه الرسالة.

كما أتقدم بالامتنان والشكر الجزيل للأستاذ أحمد الطويل على كل مساعدته ونصائحه القيمة طيلة إنجاز لهذا العمل.

أتقدم بالشكر الجزيل إلى أفراد مخبر الدكتور سهيلي الطاهر وخاصة الطالب وليد على المساعدات التي قدمها لي.

أتقدم بجزيل الشكر لكل من ساعدني على إنجاز هذه الرسالة وخاصة رفيقتنا دربي زليخة ورتيبة وصديقتي سميلة، وسيمية ، زهرة كوثر.

كما لا أنسى أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى زملائي وزميلاتي في المخبر.

1
3
	الأول
4ة الفلافونيدات
4ية الفلافونيدات
5سطناع الحيوي
5حلة الأولى (طريق حمض الشيكيميك)
7حلة الثانية (طريق الخلات)
8حلة الثالثة (طريق الشالكون)
9ثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونيدي
9- تثبيت مجموعات الهيدروكسيل
9تثبيت مجموعات الميثيل
10تثبيت جزيئات السكر
10ق الدراسة الكيميائية للفلافونيدات
10كشف عنها
11الاستخلاص
11ة النباتية
11ستخلاص
13صل و تنقية الفلافونيدات
13ل
13روماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية
14روماتوغرافيا الورق
15روماتوغرافيا العمود
15تنقية
16الدراسة البنوية للفلافونيدات
16اص الكروماتوغرافية
16للون الإستشعاعي
16عامل الانحباس

17 ق التحليل
17 مطيافية الأشعة فوق البنفسجية
18 1- طيف الفلافون و الفلافونول في الميثانول
18 2- طيف الفلافون و الفلافونول في وجود كواشف
18 Na
18 NaI
18 NaOAc+H ₃
19 A
19 AlCl ₃ +
22 مطيافية الكتلة
22 مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون R.M.N- ¹ H
22 1- البروتونات الأروماتية
22 ونات الحلقة A
23 ونات الحلقة B
24 ونات الحلقة C
24 البروتونات الأليفاتية
24 ونات مجموعة الميثوكسيل
24 ونات السكر
24 كوزيدات أحادية السكر
25 ليكوزيدات ثنائية السكر
26 ماهة الحمضية
27
 الثاني
30 ف الكومارينات
30 يم الكومارينات
30 رينات مستبدلة على حلقة البيرون
30 مارينات مستبدلة على الحلقة البنزينية
31 انوكومارين
31 وكومارين
32 جد، تراكم وتوزيع الكومارينات
32 نالية البيولوجية للكومارينات
32 سطناع الحيوي للكومارينات
33 رق استخلاص الكومارينات و تنقيتها
33 لدراسة البنيوية للكومارينات
33 - طيف الأشعة فوق البنفسجية UV

33 طيف الأشعة تحت الحمراء
34 طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN
34 ، الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN.^1H$
34 ف الرنين النووي المغناطيسي للكربون $RMN.^{13}C$
35
	الثالث
36 ف النباتي
36 نيف النظامي للنبات
37 اع <i>Lycium</i>
37 مادة النباتية
38 ستعمالات الطبية للنبات
38 حث البيليوغرافي
41 عمليات الاستخلاص
42 الفصل
44 -العمود الكروماتوغرافي
44 فلص الأوراق
46 1- ب- مستخلص الجذور
49
	الرابع
51 تحليل البنيوي للمركب CS_1
58 تحليل البنيوي للمركب CS_2
62 تحليل البنيوي للمركب CS_3
65

المقدمة

الفصل الأول

دراسة المركبات الفلافونيدية

الفصل الثاني

الكومارينات

الفصل الثالث

الدراسة الفيتو كيميائية للنبات

الفصل الرابع

التأنيج والمنافسة

القائمة

المراجع

مقدمة:

منذ القدم و النباتات تلعب دورا هاما في الغذاء و الدواء، وإن غابت المعالجة بالأعشاب الطبية فترة من الزمن بفضل الأدوية المصاغة اصطناعيا، فهي تعود اليوم لتحقيق المكانة اللائقة بها، بعد أن أصبحت المعالجة النباتية قائمة على أسس علمية، والجدير بالذكر أن معظم النباتات تحتوي على أكثر من مادة فعالة و بالتالي يكون لها عدة استطبابات في آن واحد، فمثلا الثوم يحوي زيوت عطرية مضادة للالتهابات، و خمائر تساعد على الهضم، و مواد كبريتية تفيد في علاج ارتفاع التوتر الشرياني و الكولسترول و الشحوم الثلاثية.

ومازال حتى الآن عدد كبير من العقاقير ذات الأصل النباتي ذا قيمة علاجية كبيرة كالديجيتالين و الأسبرين، كما أن هناك دراسات أخرى لمعالجة الآفات التي تسببها الحميات الراشحة بالنباتات الطبية، نذكر منها *Hyssopus* و إكليل الجبل *Rosemarinus* و النعناع *Meniha* و *Inula*.

ولذلك يمكن القول أن للنباتات الطبية دور هام في معالجة الكثير من الأمراض، فما أنزل الله من داء إلا و أنزل له دواء.

تحتوي النباتات على كم هائل من المركبات الكيميائية من فلافونيدات، تربينات، قلويدات، كومارينات... الخ و تعد الفلافونيدات من نواتج الأيض الثانوي الأكثر انتشارا في المملكة النباتية حيث تم حصر أكثر من 4000 مركب فلافونويدي [1].

إن إجراء أبحاث حول المركبات التي يتم عزلها من النباتات أمر في غاية الأهمية لما فيه من اكتشاف لأدوية ذات نفع كبير، وفي هذا الإطار و في مخبر المنتجات الطبيعية ذات الأصل النباتي و الاصطناع العضوي (قسم الكيمياء) قام فريق بحث من مخبرنا بدراسة فيتوكيميائية لأحد نباتات الجزائر وهو نبات العوسج (*Lycium arabicum*.Boiss.) المنتمي إلى العائلة الباذنجانية (Solanaceae) حيث استطاع فصل مركب كوما ريني وهو السكوبوليتين (Scopoletine) و 32 مركب طيار

(Huiles Volatiles) باستعمال الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطيافية الكتلة (C.G.-S.M.) كما تمت دراسة الفعالية ضد البكتيرية لمستخلصات هذا النبات [2] واستكمالا لهذا البحث قمنا بدراسة المحتوى الفلافونويدي له ويستعمل هذا النبات في الطب الشعبي للتداوي من مختلف الأمراض التي تصيب العين كما يستعمل كصبغة للشعر.

أما من الناحية التاريخية فقد ذكر بعض المفسرين للقران الكريم أن عصى موسى من شجرة العوسج لدى يسمى هذا النبات بشجر اليهود، أما ومن وجهة النظر النباتية فإن العائلة الباذنجانية والتي تضم حوالي 96 جنس و 3000 نوع [3] تتوزع في مختلف أنحاء العالم وتتركز بصورة خاصة في أمريكا الجنوبية حيث أصل البطاطا و الباذنجان و الطماطم أغلب نباتاتها (3/4) تنتمي إلى الصنف *Solanum*

وإليه نسبت العائلة [4]، تشمل العائلة الكثير من النباتات ذات الأهمية الاقتصادية مثل: البطاطس (*Solanum tuberosum*) و الطماطم (*Lycopersicon exulentu*) ، البادنجان (*Solanum melorgina*)، كما أن الكثير من نباتاتها له أهمية طبية لاحتوائها على قلويدات هامة وأهم هذه النباتات: البلادونا (*Atropa belladonna*) ، الداتورة (*Datura stramonium*)، السكران (*Hyoscyamus muticus*) والكثير منها سام مثل عنب الذئب (*Solanum nigrum*) وسم الفراخ (*Withania somnifera*) وتتميز نباتات هذه العائلة بـ: الأزهار المنتظمة، الطلع يحتوي على خمسة أسدية، المتاع مائل على محور الزهرة والمشيمة متشحمة مع وجود لحاء داخلي في الحزم الوعائية [5] .

وقد ورد في المنشور [6] أن صحراء الجزائر تحتوي على الأنواع التالية:

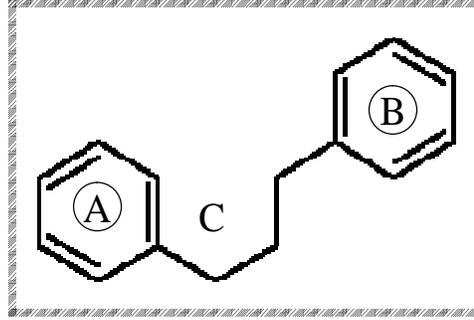
- ü *Lycium arabicum* Boiss.; *Lycium intricatum* L.
- ü *Solanum nigrum* L.
- ü *Withania adpressa* Coss.

ونظرا لقلة الدراسة على هذه النبتة فلقد قمنا بدراسة المحتوى الفلافونيدي لها، وبالرغم من عدم غنى النبتة بهذا النوع من المركبات إلا أننا استطعنا فصل مركبين فلافونيديين. يتناول بحثنا هذا أربعة فصول، وبما أن هدفنا هو معرفة بنية الفلافونيدات المستخرجة من المستخلص البوتانولي للنبات فقد ارتأينا أن يكون الفصل الأول محورا للتعريف بهذه المركبات و ذكر خصائصها و فعاليتها البيولوجية إضافة إلى التقنيات المتبعة لتحديد بنيتها الكيميائية. وفي الفصل الثاني كانت دراسة عامة حول الكومارينات، أما في الفصل الثالث فتطرقنا في الجزء الأول منه إلى الدراسة الكيميائية للنبات وخصصنا الجزء الثاني لشرح الطرق العملية المختلفة المتبعة في دراسة النبات من إستخلاص وتنقية، وفي النهاية قمنا بمناقشة مختلف النتائج المحصل عليها.

- [1]- Medié-Sarié, M., Jasprica, I. Smoleié-Bubalo, A., Mornar, A. (2004) "Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids", *Croatia Chemica Acta*, **77**(1-2), 361-366.
- [2]- Chaabi, M. (2003) "Thèse de magister", Constantine.
- [3]- Wink, M. (2003) "Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective", *Phytochemistry*, **64** (1), 3-19.
- [4]- Guignard, J. L (1994) "Botanique", ed. Masson (9^{ème} eddition), Paris, , Tome II, 187-188.
- [5]- د. شكري إبراهيم سعد (1994) ، "النباتات الزهرية – نشأتها - تطورها - تصنيفها" ، مطابع دار الفكر العربي.
- [6]- Ozanda, P. (1985) " Flore de sahara septentrional et central " ed. C.N.R.S.

I- ماهية الفلافونيدات:

الفلافونيدات صبغات نباتية صفراء تتواجد في مختلف أجزاء النبات من أوراق وزهور وسيقان وجذور [1]. تتميز ببنية أساسية بسيطة نسبياً تتكون من 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات إثنان منها متجانسة (A، B) والثالثة غير متجانسة C (الشكل 1)



الشكل 1: الهيكل القاعدي للفلافونيدات

توجد الفلافونيدات في كافة النباتات الراقية و تنعدم أو تتواجد بصيغ بنيوية بسيطة في النباتات الدنيا [2] حيث تتواجد على مستوى الخلية النباتية بشكل جليكوزيدات ذوابة في الماء و تتمركز بالخصوص في الفجوة أما تواجدها بشكل أجليكونات و التي تكون ذوابة في المذيبات غير القطبية (الفلافونيدات عديدة الميثوكسيل) فإنها تتوضع علي مستوى سطح النبات (خاصة الأوراق) حيث تكون ملازمة لمواد مفرزة هي الأخرى ليوفيلية. وتلاحظ هذه الظاهرة في نباتات المناطق الجافة و شبه الجافة [3].

II- أهمية الفلافونيدات:

للفلافونيدات أدوار بيولوجية وعلاجية نذكر منها:

- أهم فعالية علاجية للفلافونيدات هي خاصية الفيتامين P بسبب نشاطها الواقى اتجاه انخفاض سماحية الشعيرات الدموية لذلك تعتبر الفلافونيدات كأدوية لمعالجة العجز الوريدي [4].
- الفلافونيدات و خاصة الايزوفلافونات تستعمل كمبيدات للحشرات وكمضادات حيوية
- تستطيع بعض الفلافونيدات مثل (الشالكون، ايزوفلافون، الفلافونول، الفلافانول) تقليد الأستروجينات و تنشيطها مثل مركب Génistéine [5].
- بعض الفلافونيدات مثل (الفلافون، الفلافان) لها خاصية تثبيط الفطريات [6].
- بعض الفلافونيدات لها فعالية مضادة للفيروسات بما فيها فيروس HIV [7].
- بعض الفلافونونات مثل tangeretin، nobiletin لها القدرة على منع انتشار الخلايا السرطانية [8].

- تعمل الفلافونيدات على تثبيط العديد من الإنزيمات التي تتدخل في عملية التنفس فمثلا الفلافونيدات التي لها رابطة ثنائية بين C_2 و C_3 أو وظيفة كيتونية عند C_4 أو لها فسي الحلقة B مجموعات الهيدروكسيل في C_3, C_4, C_5 تستطيع تثبيط إنزيم NADH-oxidase [9].
- الفلافونيدات التي تحتوي على مجموعتي هيدروكسيل متجاورتين تكون لها فعالية في تثبيط إنزيم 5-lipoxygenase و إنزيم cyclo-oxygenase [10].
- تلعب الفلافونيدات دورا هاما في حماية النباتات وهذا لكونها مواد ذات فعالية مضادة للمكروبات [11]، [11].

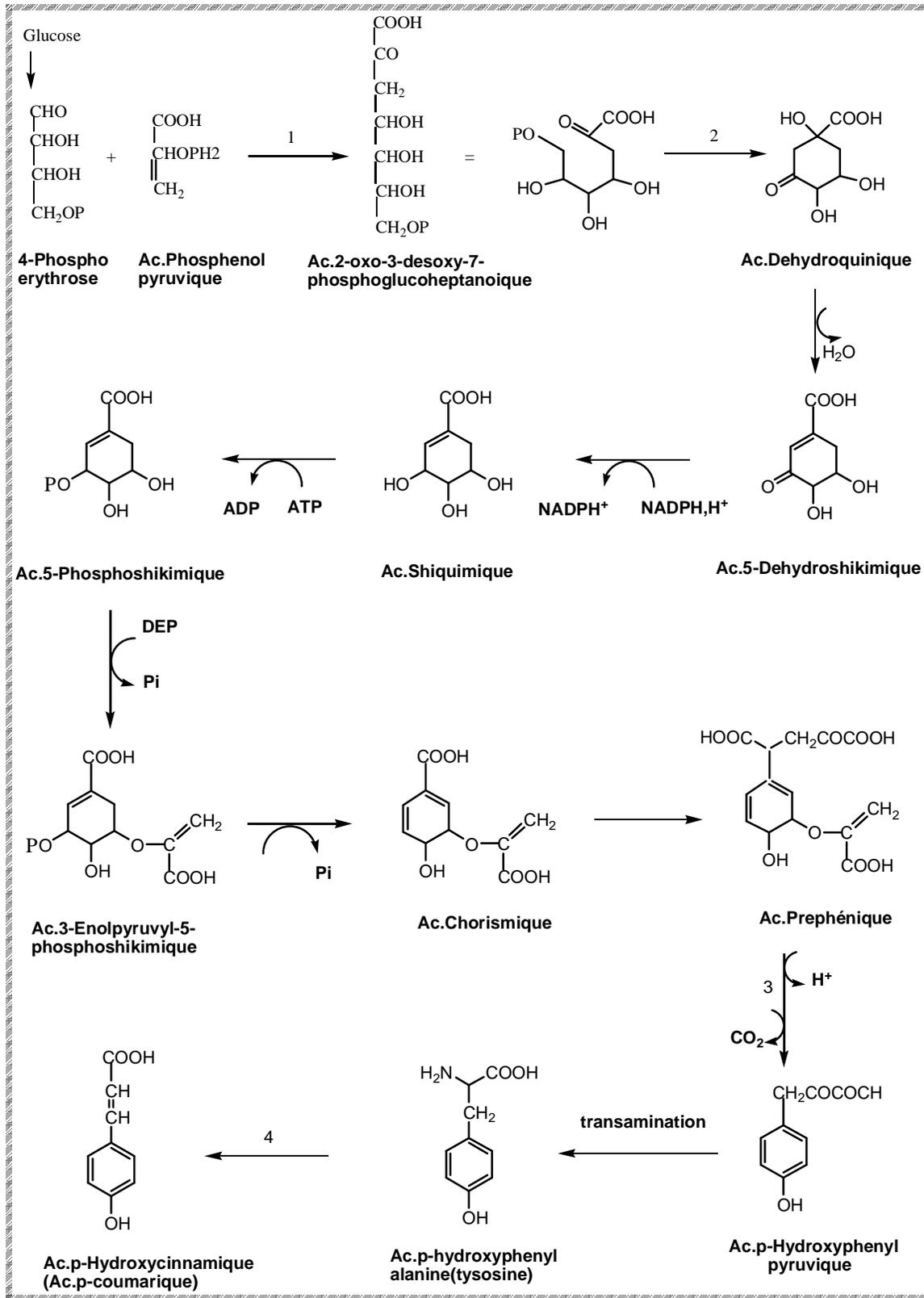
III- الاصطناع الحيوي:

- إن الاصطناع الحيوي للمركبات الطبيعية ليس إلا طريقة لتكوين هذه الأخيرة داخل مصادرها الطبيعية وذلك عن طريق تفاعلات الأكسدة، الإرجاع، الألكلة، الحلمة وهذا بوجود إنزيمات خاصة. ولمتابعة آلية هذا الاصطناع تم إجراء تجارب عدة باستعمال النظائر الموسومة ب C^{14} المشع، حيث - و بالنسبة للفلافونيدات - لاحظ العالم "Robinson" سنة 1936 [12] أن استبدال النواتين البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية مختلف جوهريا مما يستلزم أنه ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي ، و باستمرار هذه التجارب تمّ التوصل إلى أنّ هذا الاصطناع يتم خلال ثلاث مراحل و هي:

المرحلة الأولى:

١) طريق حمض الشيكيميك:

- أثبت العالم " Davis " سنة 1955 [13] دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة (B) و السلسلة الكربونية (C_3) انطلاقا من الجلوكوز (الشكل 2):

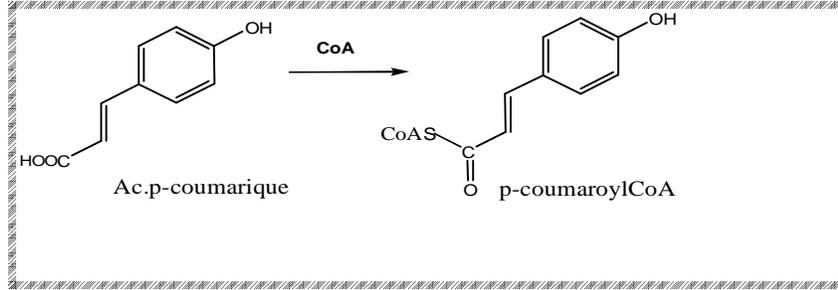


الشكل 2: تكوين حمض Ac.p-coumarique انطلاقاً من الجلوكوز مروراً بحمض الشيكيميك

الأنزيمات التي رمزنا لها بالحروف من 1 إلى 4 هي على التوالي:

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

ثم يتحول Ac.p-coumarique إلى p-coumaroyl-CoA (الشكل 3).

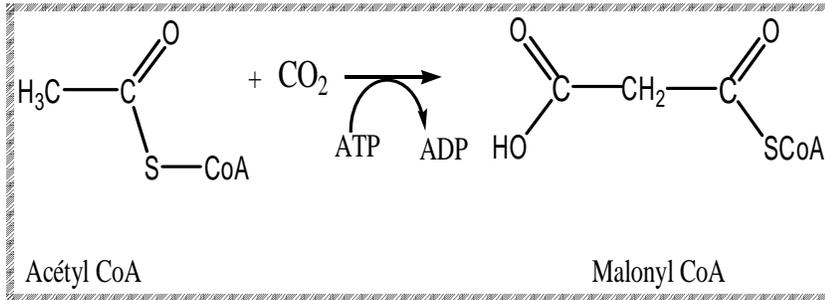


الشكل 3: تحول Ac.p-coumarique إلى p-coumaroylCoA

المرحلة الثانية:

ن طريق الخلات:

يتم تثبيت مجموعة كربوكسيل مع أستيل مرافق-انزيم (Acétyl-CoA) فينتج عنه وحدة (Malonyl-CoA) (الشكل 4) .

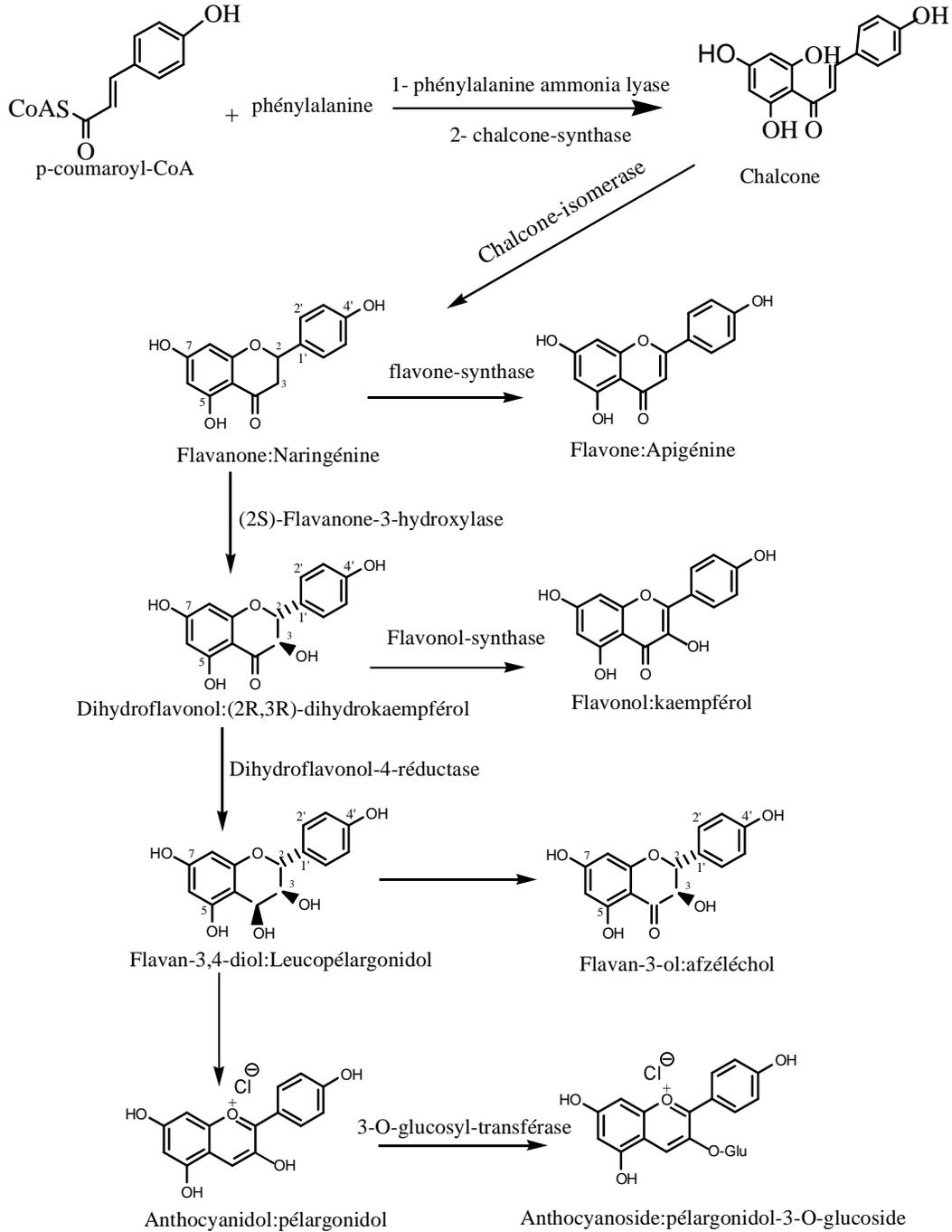


الشكل 4: تشكيل Malonyl-CoA انطلاقاً من Acétyl-CoA و CO₂

المرحلة الثالثة:

طريق الشالكون:

تتشكل الحلقة (A) من تكاتف phenylalanine مع حصيلة المرحلة الأولى (p-coumaroyl-CoA) يعطي الشالكون و هو النواة الأساسية التي تتحدر منها هياكل الفلافونيدات (الشكل 5) [14].



الشكل 5: التحولات الداخلية بين مختلف أقسام الفلافونيدات [2]

IV- تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونيدي :

إن التنوع الفلافونيدي يعود أساسا إلى عمليات الإستبدال أو التثبيت التي تتم خلال أنماط من التفاعلات التسلسلية في وجود إنزيمات خاصة بكل نمط، كتفاعلات التماكب، الأكسدة، تثبيت الميثيل، تثبيت السكريات.

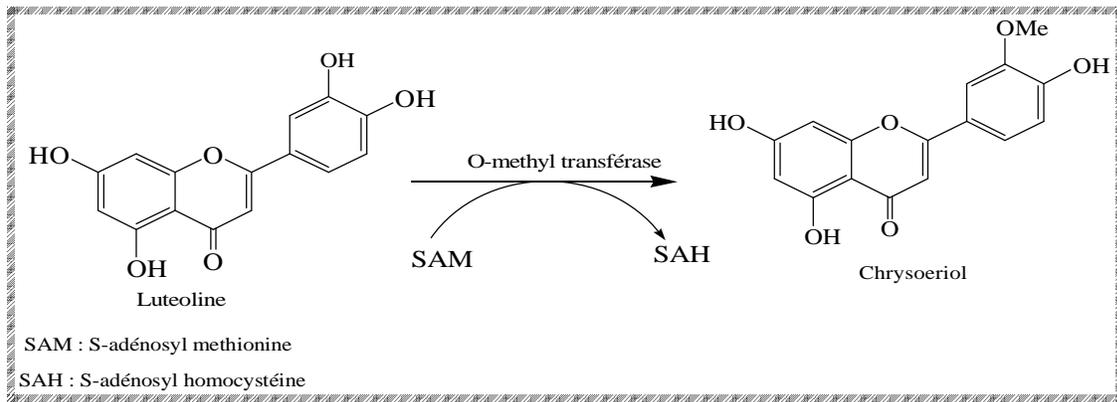
IV-1- تثبيت مجموعات الهيدروكسيل :

إن نمط تكوين الهيكل الفلافونيدي هو المسؤول عن تثبيت مجموعات هيدروكسيل الحلقة A، وتعد كمجموعات هيدروكسيلية أصلية لكونها تكون ثنائية الاستبدال في الموضعين 7، 5 وهذا بنسبة 90%. وقد تحتوي الحلقة A على ثلاث هيدروكسيولات أو هيدروكسيل واحد في بعض الفلافونيدات ويفسر ذلك بكون هذه الأخيرة تتبع اصطناعا حيويا مغايرا للأول.

أما في الحلقة B فان هيدروكسيل الموضع 4' هو الوحيد الذي يتم تثبيته قبل تكوين الفلافونيد [15].

IV-2- تثبيت مجموعات الميثيل:

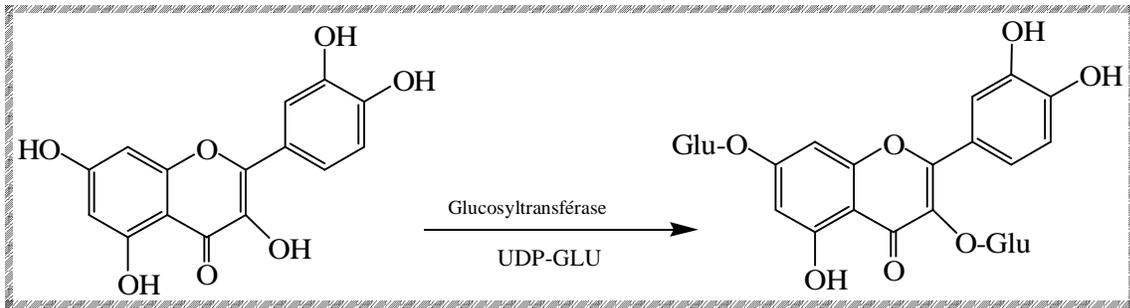
يثبت الهيدروكسيل أولا وبعدها الميثيل ويتطلب ذلك وجود عدة أنواع من إنزيمات O-methyl-transferase منها من يعمل على تثبيت مجموعة الميثيل قبل تكوين نواة الشالكون كما هو الحال في حالة 4-OH [16] ومنها من يقوم بعملية التثبيت بعد تكوين الشالكون [17] وأخرى قادرة على تثبيت العديد من مجموعات الميثيل على الأجليكون الواحد (الشكل 6).



الشكل 6: التحويل الأنزيمي لمركب Luteoline إلى Chrysoeriol

3-IV- تثبيث جزيئات السكر:

إن عملية تثبيث السكريات بأنواعها البسيطة، الثنائية والثلاثية تزيد إلى حد بعيد من تنوع البنى الفلافونيدية ومن أشهر السكريات نجد الجليكوز، الجلاكتوز، الرامنوز و الأرابينوز... الخ و التي ترتبط بالهيدروكسيلات الفينولية مشكلة رابطة O- heteroside. وأكثر المواقع استبدالاً الموقع 7 بالنسبة للفلافونات المعروفة بأكثر من 650 ايتيروزيد والموقع 3 بالنسبة للفلافونولات المعروفة بأكثر من 330 ايتيروزيد [18] وتثبيث السكر يتم في وجود أنظمة إنزيمية خاصة Glycosyltransferase مع وجود مانح للسكر (الشكل 7).



الشكل 7: تثبيث الجليكوز في C₇ في وجود إنزيم وماتح للجليكوز

V- طرق الدراسة الفيتو كيميائية للفلافونيدات:

V-1- الكشف عن الفلافونيدات:

تعتبر كروماتوغرافيا الورق و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من أهم طرق التحليل المستخدمة للتحليل الأولي للمستخلصات الخام و هذا للكشف عن الأجليكونات و الجليكوزيدات الموجودة بها.

فبالنسبة لبعض الفلافونيدات مثل: anthocyanines، chalcones، aurones يمكن تمييزها مرئياً على الورق أما غيرها فنلجأ إلى بعض الكواشف لتمييزها و هذا بالفحص المباشر باستخدام الأشعة فوق البنفسجية عند 365 نم قبل و بعد الرش بكلوريد الألمنيوم AlCl₃ ، و كذلك الأمر بالنسبة لأبخرة محلول النشادر NH₃ المركز ، حيث تحدث تغيرات في نوع الإستشعاع كما يبين (الجدول 1) [19،20]:

الجدول 1: تأثير NH_3 على لون بعض الفلافونيدات تحت UV

الصيغ الكيميائية المحتملة	لون البقعة تحت أشعة UV	
	دون NH_3	بوجود NH_3
5-OH Flavones; 5-OH Flavonols (3-OR,4'-OH)	أصفر أو أصفر مخضر.	بنفسجي -أسود
Flavones ; Flavonols (3-OR, 5-OH, 4'-OH) Flavones (6-OH ou 8-OH)	تغير طفيف أو عدم التغير في اللون	بنفسجي -أسود
Flavones(5-OR) ; Flavonols (3-OR, 5-OR)	أصفر مخضر أو أزرق مخضر	أزرق
Flavonols(5-OH) ; Flavones (3-OH,5-OR)	تغير طفيف أو عدم التغير في اللون	أصفر فاقع أو أصفر باهت

2-V- الإستخلاص:

أ- المادة النباتية:

تم قطف المادة النباتية، نظفت من الشوائب، جففت في الظل وحفظت في أماكن بعيدة عن المؤثرات الخارجية (الغبار، الرطوبة، أشعة الشمس..الخ) للحفاظ على المركبات التي تحتويها وهذا لتفادي تأثير

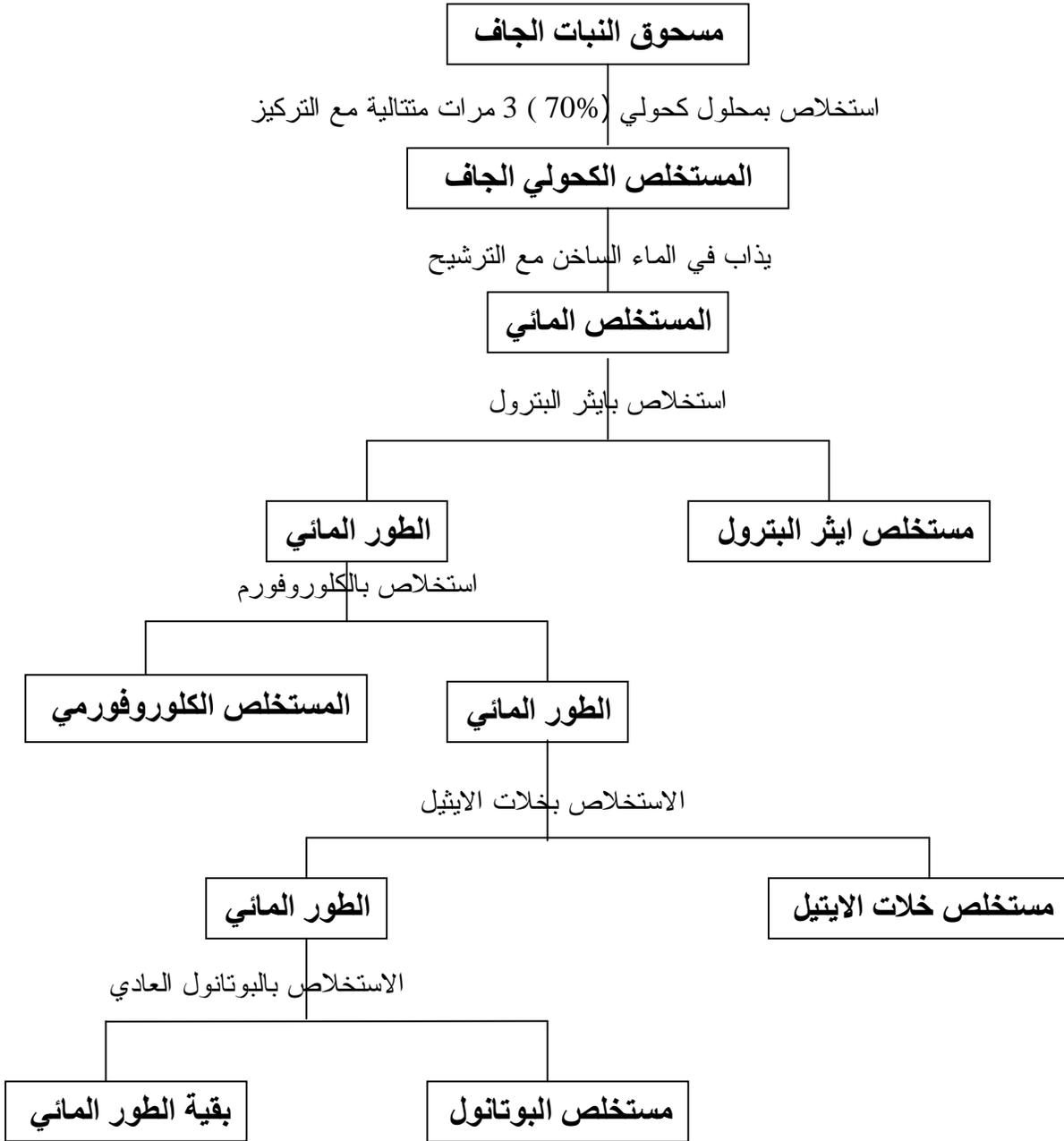
مختلف الإنزيمات الموجودة في النبات مثل إنزيمات Polyphenol-oxydase،Glycosidase التي تحول الإيتيروزيدات المعقدة إلى إيتيروزيدات بسيطة أو أجليكونات [15،21].

ب- الإستخلاص:

تم استخلاص الفلافونيدات حسب الخطوات التالية والموضحة في المخطط (4):

بعد تجفيف وطحن الأجزاء النباتية المراد استخلاص الفلافونيدات منها، تعامل بمذيب مناسب للاستخلاص وتعتبر المحاليل الكحولية هي أكثر المذيبات استخداما وهذا تبعا لحالة النبات رطب أم جاف، فنستعمل الكحول (ميثانول أو إيثانول) في حالة النبات الرطب أو محاليلهما (بنسبة 70% أو 80%) في حالة النبات الجاف.

تتقع الأجزاء النباتية في المحلول المناسب لمدة لاتقل عن يوم واحد مع التحريك من حين إلى آخر بعدها يرشح ويتم تركيز المستخلص (الرشاحة) تحت ضغط منخفض حتى الجفاف وتعاد العملية عدة مرات إلى غاية التأكد من استخلاص أغلب المركبات الطبيعية



المخطط 1: الخطوات المتبعة في عملية الإستخلاص

V-3- فصل و تنقية الفلافونيدات :

أ- الفصل:

في سنة 1903 تم اكتشاف الكروماتوغرافيا من طرف العالم الروسي TWEST وهي طريقة تحليلية وتحضيرية لفصل مكونات خليط ما.

وتقسم تقنيات الفصل الكروماتوغرافي إلى ثلاثة أنواع رئيسية:

- كروماتوغرافيا العمود (CC)

- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

- كروماتوغرافيا الورق (CP)

أ-1- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية:

نستعمل في هذه التقنية شرائح ذات أبعاد (20×20 سم) حيث تحضر طبقة رقيقة من الدعامة الصلبة تكون عبارة عن متعدد الأميد أو السيليكاجل أو السيليلوز على هذه الشرائح.

يوضع المركب على طول الشريحة على بعد (1.5-2 سم) بواسطة ماصة شعرية نتركها تجف ثم توضع في المملص، ومن المملصات المستعملة لفصل الفلافونيدات في حالة شرائح متعدد الأميد مايلي:

S₁: (4 / 3 / 3): Toluene / Méthyléthylcetone / Méthanol

S₂: (60 / 26 / 7 / 7): Toluene / Ether de petrol / Méthyléthylcetone / Acetylacetone

S₃: (13 / 3 / 3 / 1): Eau / Méthyléthylcetone / Méthanol / Acetylacetone

S₄: (30 / 15 / 10 / 5): Eau / Méthyléthylcetone / Méthanol / Acetylacetone

و (الجدول 2) يشمل بعض الأنظمة الشائعة في فصل الفلافونيدات على شرائح متعدد الأميد

الجدول 2: بعض أنظمة الفصل

نوع الفلافونيدات	النظام الملائم
الجليكوزيدات	H ₂ O-MeOH-MEC-Acetylacetone (13/3/3/1) / (30/15/10/5) H ₂ O-n-BuOH-Acetone-Dioxane(70/15/10/5)
الجليكوزيدات والجليكونات القطبية (polyhydroxylées)	MeOH-AcOH-H ₂ O (18/1/1) H ₂ O-EtOH-n-BuOH-AcOH (50/25/20/2) / (75/15/10/2)
الأجليكونات غير القطبية (متعددة الميثوكسيل)	Toluène.-Héxane-MEC-MeOH (30/90/2/1.5) / (60/30/10/5) Toluène-MEC-MeOH(4/3/3) Toluène-Ether de petrol-MEC-MeOH(60/26/10/10)

أما في حالة شرائح السليلوز فنستعمل الأنظمة: محلول حمض الخل 15% :S₅

وأخيرا مع شرائح السيليكا جل فنستعمل الأنظمة: CH₂Cl₂ / MeOH (5:1) :S₆

فأثناء انتشار المملص على الشريحة يسحب معه المركبات حسب قطبيتها في شكل حزم التي تحدد بالاستعانة بمصباح الأشعة فوق البنفسجية تكشف هذه الحزم كلا على حدى، تملص بالميثانول ثم يركز الراشح وللتأكد من نقاوة هذه الحزم تجرى عليها اختبارات كروماتوغرافية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ومملصات مختلفة ومن محاسن هذه التقنية [19،24] أنها

- سريعة حيث تستغرق من 30 دقيقة إلى 3 ساعات

- فعالة في حالة بعض الخلائط الأيزوميرية

أ- 2- كروماتوغرافيا الورق:

تعتبر من أحسن الطرق لفصل المركبات الفلافونيدية وذلك بسبب قدرة الامصاص الكبيرة كما في حالة ورق واتمان رقم 3 (Papier Whatman) و تستخدم جمل من المملصات تحتوي على حمض الخل وهذا من أجل تحسين عملية الفصل و المذيبات المستعملة في هذه التقنية:

SI : B.A.W (4/1/5) : بوتانول نظامي / حمض الخل / ماء

M.A.W (4/1/5) : ميثانول / حمض الخل / ماء

tB.A.W (3/1/3) : البوتانول الثالثي / حمض الخل / ماء

- حمض الخل بتركيز مختلفة من 5% إلى 70% : SII

وتتم حسب الخطوات التالية:

يوضع المستخلص بواسطة ماصة على كامل عرض الورق إما على شكل نقاط تفصل بينها مسافة 2-3 سم أو على شكل شريط على كل عرض الورقة و يكون على بعد 5 سم من الحافة العلوية و 3 سم على الحواف الجانبية، بعد جفاف المستخلص على الورقة تغمس في المملص الذي يقوم بفصل المركبات على شكل حزم متتالية مع الإشارة إلى أنه يمكن استعمال كروماتوغرافيا الورق النازلة و هي الأكثر شيوعا أو كروماتوغرافيا الورق الصاعدة.

بعد انقضاء الوقت المناسب و الذي يكون من 5-20 ساعة تستخرج الورقة وتترك لتجف ثم تحدد الحزم أو العصابات بالاستعانة بأشعة (UV) [25].

نقص مختلف الحزم الورقية تم تملص في الميثانول بعدها ترشح وتركز ثم تفحص باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وهذا للتأكد من مدى نقاوتها.

هذه التقنية يمكن استخدامها ببعدين يكون احدهما عموديا على الآخر وهذا عندما يكون استخدام بعد واحد غير كافي لفصل الخليط فبعد إجراء التمليص في المملص الأول (SI) تخرج الورقة وتترك لتجف تم تدار بمقدار 90° ثم تغمس في المملص الثاني (SII) وتعتمد عملية الفصل على ثلاث عوامل:

- تركيز المستخلص على الورق.

- اختيار المملص المناسب.

- الوقت الكافي لعملية التمليص.

وتتحدد هذه العوامل بإجراء اختبارات كروماتوغرافية أولية [15] ومن مميزات هذه التقنية [19].

- فصل كمية كبيرة من المركب

- تصلح لفصل مختلف الفلافونيدات

أ-3- كروماتوغرافيا العمود:

لفصل الكميات الكبيرة والأكثر تعقيدا فإننا نستعمل كروماتوغرافيا العمود حيث يكون الطور الثابت في أغلب الأحيان هو متعدد الأميد SC6 الذي يستعمل مع مختلف أنواع الفلافونيدات وتستعمل عدة أنظمة مملصة تتكون في أغلب الأحيان من مذيبين و تبدأ عملية التمليص بالمذيب الأقل قطبية ثم يضاف له المذيب القطبي تدريجيا حتى الوصول إلى أقصى قطبية ويجب أن يكون الطور الثابت (l'adsorbant) متجانسا ومشبع بالمذيب الأقل قطبية وقد يكون الطور الثابت السيليكاجل والذي يستعمل بصورة خاصة مع الفلافونيدات الغير قطبية (عديدة الميتوكسيل) أما العمود الزجاجي فيتم اختياره على حسب كمية المستخلص الجاف حيث يعبأ هذا الأخير بالطور الثابت (10غ من متعدد الأميد لكل 1غ من المستخلص يحفظ سطح الطور الثابت (الذي يجب أن يكون أفقي) من التشوهات المحتملة نتيجة إضافة المملص و ذلك بتغطيته بطبقة من رمل خاص أو قطعة قطن أو ورق ترشيح بعدها يوضع المستخلص الخام المذاب في أقل كمية من المذيب القطبي فوق سطح الطبقة الواقية للطور الثابت، بعد ذلك نبدأ في عملية تمليص المركبات الفلافونيدية ويكون التمليص في البداية بالمذيب الأقل قطبية ثم نزيد من قطبيته تدريجيا وهذا بإضافة كميات محددة من المذيب القطبي حتى الوصول في النهاية إلى المذيب القطبي وخلال عملية التمليص تتم مراقبة الحزم المنفصلة باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية وكذا مراقبة الكسور المحصل عليها باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة حيث يتم تجميع الكسور المتشابهة مع بعضها لتفصل لاحقا ومن الأنظمة المستعملة في فصل الفلافونيدات على العمود الكروماتوغرافي يمكن ذكر:

Toluene → MeOH

H₂O → MeOH

ب- التنقية:

وهي عملية مكملة لعملية الفصل وبها يتم التخلص من الشوائب العالقة بالمركبات المعزولة ونستخدم فيها إمامود كروماتوغرافي صغير من البولي أميد SC6 حيث يوضع في أعلى العمود المركب المذاب في الميثانول بعد توضع يغسل بالماء المقطر وغير المملص تدريجيا بإضافة الميثانول حتى يتم تمليص أو نستخدم عمود آخر من السيفادكس (Colonne de Sephadex LH-20) بواسطة مذيب واحد بنفس الطريقة السابقة فنحصل على المركب النقي المطلوب .

4-V- الدراسة البنيوية الفلافونيدات:

ترتكز هذه الدراسة أساسا على الخواص الكروماتوغرافية وكذا تحليل أطيف الأشعة فوق البنفسجية كما ترتكز أيضا على نتائج مطيافية الكتلة ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون وللكربون.

أ- الخواص الكروماتوغرافية:

تتلخص في عنصرين مهمين هما

أ-1- اللون الأستشعاعي:

لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية UV له دور في إعطائنا معلومات أولية على البنية الكيميائية و (الجدول 3) يعطي بعض الأمثلة:

الجدول 3: العلاقة بين لون المركب تحت أشعة UV وبنيته الكيميائية [26]

الفلافونيد المستعمل	لون المركب تحت أشعة UV
<ul style="list-style-type: none"> • فلافون • فلافونول مستبدل في الموضع 3. • فلافون مع (5-OH). 	بنفسجي مسود
<ul style="list-style-type: none"> • فلافون أو فلافانول بدون OH في الموضع 5. • فلافونول مستبدل في 3 وبدون 5-OH. 	أزرق
<ul style="list-style-type: none"> • فلافونول مع أو بدون 5-OH. 	أصفر أو أصفر باهت

CCM على ألواح متعدد الأמיד	}	Toluène / MEC / MeOH : 4/3/3 Ø
		H ₂ O / MEC / EtOH / Acétylacétone : 13/3/3/1 Ø
		Acide acétique Ø : CCM: 10 – 30 % على ألواح السيليلوز.

و ترتبط هذه القيمة بطبيعة المستبدلات و مواقعها على الجزئ و هذا في مذيبات معينة [27، 28، 29، 30]. فمثلا:

- كلما زاد عدد OH \swarrow $R_f \leftarrow$ \swarrow في: 4/3/3 : T/MEC/MeOH (نظام عضوي).
- كلما زاد عدد OCH₃ \swarrow $R_f \leftarrow$ \swarrow في : 4/3/3 : T/MEC/MeOH (نظام عضوي).
- كلما زاد عدد السكر \swarrow $R_f \leftarrow$ \swarrow في: 13/3/3/1 : H₂O/MeOH/MEC/Acétylacétone.

ب- طرق التحليل الطيفي:

ب-1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:

تعتبر هذه التقنية أهم وسيلة مستعملة للتعرف على البنية الكيميائية للفلافونيدات وقد نشرت أبحاث كثيرة في هذا الميدان [31]، [32]، [20]، [33]، [34] وتكمن أهميتها في:

- لا تتطلب كمية كبيرة من المركب.
- سهولة تحقيقها وتعطي بالمقابل معلومات وافية على البنية الكيميائية للمركب.
- مبدأ هذه التقنية أنه لكل مركب فلافونيدي طيف امتصاص مميز في وسط كحولي (ميثانول) هذا الطيف يتغير بإضافة كواشف معينة بحيث تعطي طبيعة الكاشف وتأثيره على طيف الامتصاص معلومات على بنية المركب. يتم تحقيق السلسلة الطيفية للأشعة فوق البنفسجية لمركب فلافونيدي عمليا على ثلاث مراحل حيث نقوم في بداية كل مرحلة بقياس وتسجيل الطيف الميثانولي للمركب.
- المرحلة الأولى:** نسجل طيف الإمتصاص في الميثانول الخالص للمركب بعدها نضيف لخلية المركب قطرة من NaOH بتركيز 0.5 عياري ونسجل مباشرة طيف الامتصاص ثم نعيد تسجيله بعد خمس دقائق.

المرحلة الثانية: نحضر من جديد خلية تحتوي على المركب ونضيف إليها بعض القطرات من AlCl₃ ذو التركيز 2 % في الميثانول ونسجل طيف الامتصاص ثم نضيف قطرة من HCl (2N) ونسجل طيف الامتصاص

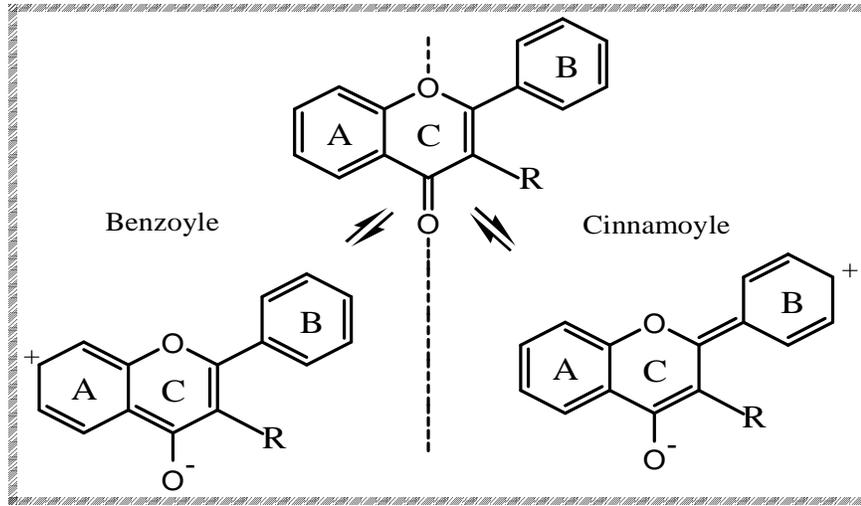
المرحلة الثالثة: نحضر خلية جديدة تحتوي على المركب المدروس نضيف لها NaOAc (الصلب) حتى التشبع ونسجل طيف الامتصاص ثم نضيف لمحلول الخلية H₃BO₃ (1% في H₂O) ونسجل طيف الامتصاص.

ب-1-1- طيف الفلافون والفلافونول في الميثانول:

يتكون طيف الامتصاص للفلافون والفلافونول في الميثانول من عصابتين:

العصبة I: تكون لها قمة امتصاص عظمى في حدود (300-400 نم) وتنتج عن الشكل الرنيني Cinnamoyl الناتج عن ترافق مجموعة كربونيل C₄ مع الحلقة البنزينية B.

العصبة II: تكون لها قمة امتصاص عظمى في حدود (250-280 نم) ويكون المسؤول عنها الشكل الرنيني Benzoyl الناتج عن ترافق مجموعة كربونيل مع الحلقة البنزينية A.



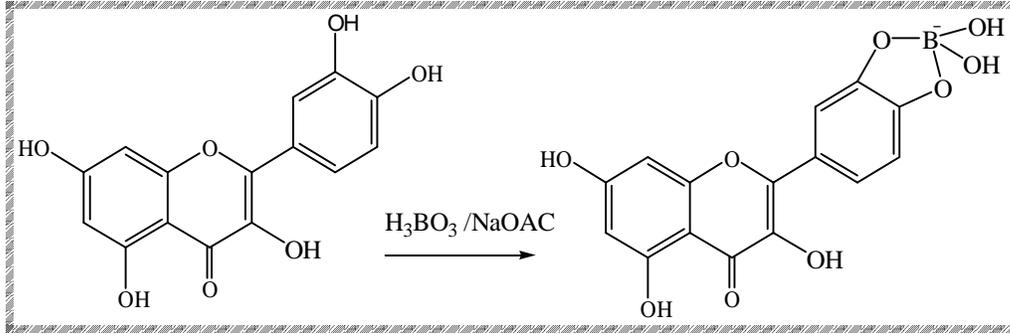
الشكل 8: الشكلين السينامويلي و البنزيلي

ب-1-2- طيف الفلافون والفلافونول في وجود كواشف:

NaOH*: يعتبر NaOH أو (NaOMe) محلولاً قاعدياً يؤين جميع هيدروكسيلات الفلافونيد.

NaOAc*: تعتبر خلات الصوديوم أساساً ضعيفاً مقارنة مع NaOH وعلى هذا فهي تأين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حمضية فقط في المواضع C₄, C₃, C₇ وبصورة خاصة يعتبر NaOAc كاشفاً نوعياً لهيدروكسيل C₇.

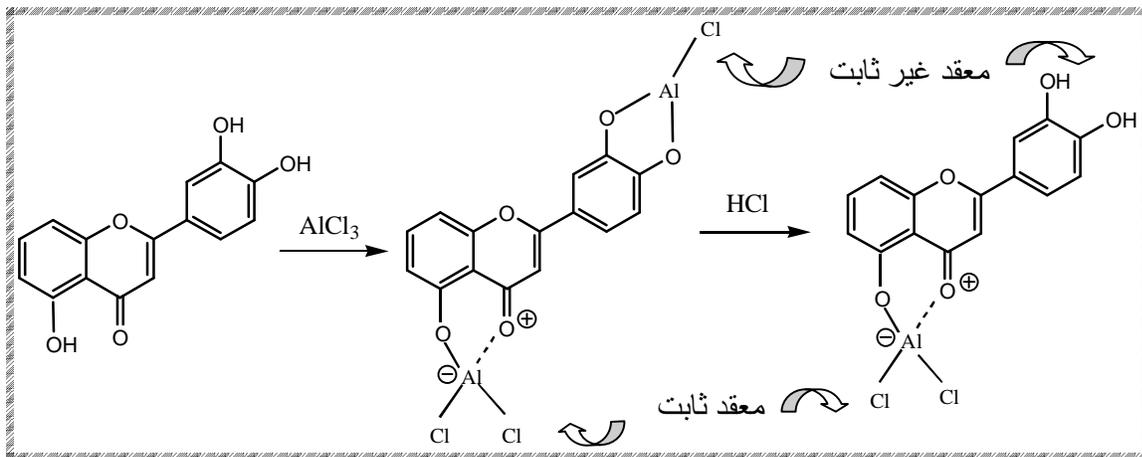
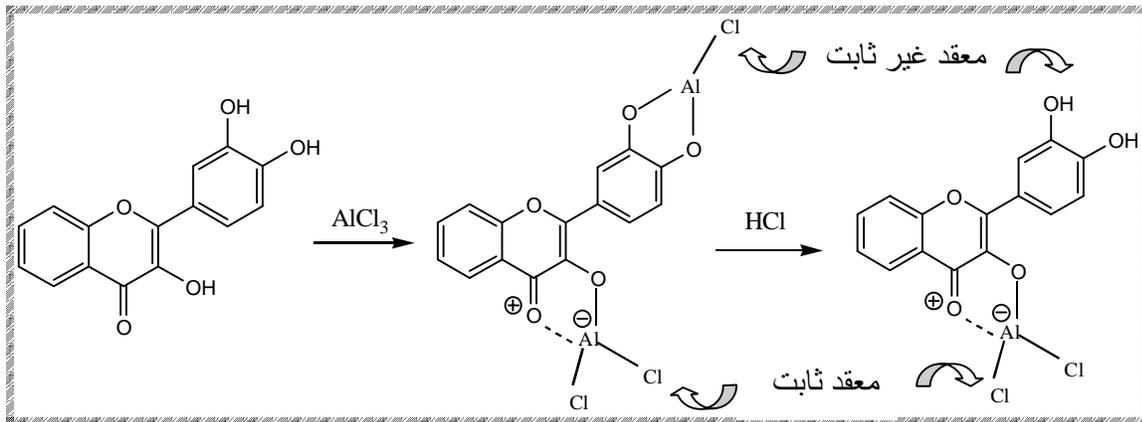
NaOAc+H₃BO₃*: يكون حمض البوريك في وجود خلات الصوديوم معقدات مع الهيدروكسيلات الفينولية في الموضع أورثو، حيث تستغل في التعرف على وجود أورثوثنائي الهيدروكسيل.



الشكل 9: المعقد المتكون في وجود $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$

* AlCl_3 : يشكل AlCl_3 معقدات ثابتة مع كربونيل الموضع 4 و هيدروكسيل الموضع C_3 أو C_5 في الوسط الحمضي أي بعد إضافة HCl ، ومعقدات غير مستقرة مع المركبات المحتوية على أورثو ثنائي الهيدروكسيل الحر في المواضع (C_7, C_6) ; (C_8, C_7) ; (C_4, C_3) .

* $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$: في غياب HCl يسجل إنزياح باتوكرومي للعصابة I مقارنة بطيف الميثانول، وإضافة HCl يبين إذا كان الطيف مستقرا أم لا. حيث نبدأ أولاً بمقارنة الأطياف المسجلة في وجود $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ مع أطياف الميثانول فانزياح باتوكرومي من 40-50 ن.م للعصابة I يدل على وجود 3-OH أو 5-OH، بعدها نقوم بمقارنة أطياف AlCl_3 مع $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ فنسجل إزاحة هيبسوكرومية من 30-40 ن.م للعصابة I وهذا يدل على وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A أو B كما هو موضح في (الجدول 4) وعليه فإن طيف الإمتصاص في وجود AlCl_3 يمثل تأثير كل المعقدات الثابتة والغير ثابتة بينما طيف الإمتصاص في وجود $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ فيمثل طيف المعقدات الثابتة فقط و(الشكل 10) يوضح هذه المعقدات.



الشكل 10: المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين AlCl_3 وبعض الفلافونيدات في وجود وغياب HCl

الجدول 4: يمثل مختلف التأثيرات المحتملة على طيف UV مع الكواشف

النتيجة و التعليل	الإزاحة(نم)		الكاشف
	العصابة II	العصابة I	
فلافون فلافونول (3-OR) فلافونول(3-OH)	280-250 280-250 280-250	350-310 360-330 385-350	Me OH
4'-OH 3-OH, 4'-OR 3, 4'-OH أو أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A أو ثلاثة هيدروكسيلات متجاورة على الحلقة B 7-OH	45+ إلى 60+ للعصابة I دون نقصان في شدة الامتصاص 45+ إلى 60+ للعصابة I مع نقصان في شدة الامتصاص طيف يتحلل مع مرور الوقت عصابة جديدة بين 335-320 (نم)		NaOH
7-OH 7-OH (مع مستبدل في 6 أو (و) في 8)	5+ إلى 20+ للعصابة II إزاحة صغيرة للعصابة II		NaOAc
أورثوثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A	12+ إلى 36+ للعصابة I إزاحة باتوكرومية ضعيفة للعصابة II		NaOAc+H ₃ BO ₃
أورثوثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B أورثوثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A	30+ إلى 40+ للعصابة I مقارنة بطيف AlCl ₃ +HCl 20+ إلى 25+ للعصابة I مقارنة بطيف AlCl ₃ +HCl		AlCl ₃
5-OH 5-OH مع وجود مجموعة أوكسجينية في 6 3-OH أو 3-OH و 5-OH	35+ إلى 55+ للعصابة I 17+ إلى 55+ للعصابة I 50+ إلى 60+ للعصابة I		AlCl ₃ +HCl

ب-2- مطيافية الكتلة:

تستعمل مطيافية الكتلة للتعرف على البنية الكيميائية لمركب ما وذلك بالتعرف على الوزن الجزيئي ومختلف الروابط الكيميائية في المركب بدراسة الأيونات الناتجة عن انقسام المركب. وتكمن أهميتها في أنها لا تتطلب إلا كمية قليلة من العينة المدروسة (جزء من الملع) وبالمقابل تعطي معلومات على بنيته الكيميائية، تطبيقها على الفلافونيدات يمكننا من التعرف على:

الأيون الجزيئي (M^+) أو الصيغة المجملة للمركب.

توزيع المستبدلات على الحلقتين A و B .

طبيعة المستبدلات ومواقع ارتباطها على الهيكل الفلافونيدي.

من تقنيات التأين المستعملة مع الفلافونيدات، تقنية القذف الإلكتروني (IE) و التي تستعمل بالخصوص مع الأجليكونات أما مع الجليكوزيدات فتستعمل طرق ألطف مثل تقنية القذف السريع بالذرات (Fast atomic Bombardment) و تقنية التأين الكيميائي (Ionisation chimique) وتقنية (electrospray)

ب-3- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $R.M.N.^1H$:

تستعمل هذه التقنية في التحليل الكيفي الفلافونيدات لمعرفة:

- درجة تأكسد الحلقات A، B، C.

- عدد السكريات الموجودة في المركب ونوع الرابطة α, β بين السكر والأجليكون.

- عدد ومواقع مجموعات الميثوكسيل في المركب.

يمكن الحصول على طيف $R.M.N.^1H$ للفلافونيدات باستعمال مذيبات مختلفة أفضلها $CDCl_3$ (الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونيدات غير القطبية) ومذيب $DMSO-d_6$ الذي يعطي نتائج جيدة مع الجليكوزيدات والأجليكونات [20] و مذيب CD_3OD .

تتوزع بروتونات الفلافونيدات بشكل مجموعات محددة هي: بروتونات الحلقة A، بروتونات الحلقة B، بروتونات الحلقة C في حالة الفلافون، بروتونات أليفاتية (سكريات، مجموعات الميثوكسيل ... الخ).

ب-3-1- البروتونات الأروماتية:

* بروتونات الحلقة A :

بروتونات H_6 و H_8 تعطي زوج من الإشارات الثنائية في المنطقة (6.0-6.5ppm) بثابت تزواج

$J=2.5Hz$ وفي حالة ارتباط سكر بأكسجين C_7 فإن إشارتي H_6 و H_8 تنزحان إلى مجال أدنى [20].

بعض الفلافونيات تحتوي على بروتون وحيد على الحلقة A وبالتالي فإن الإشارة الناتجة عن بروتون

H_6 أو H_8 تكون أحادية وتتمركز في منطقة امتصاص البروتون H_3 للفلافون بجوار 6.3ppm، بينما

الفلافونيدات المحتوية على مستبدل وحيد في C_7 أي (7-OR) فإن H_5 يعرى من طرف الوظيفة السيتونية وبالتالي تكون إشارته ثنائية ($J=9\text{Hz}$) عند 8.0ppm نظرا لوضع أورثو مع H_6 ، أما إشارة H_6 فتكون (ثنائية-ثنائية) ($J=9 ; 2.5 \text{ Hz}$) بينما إشارة H_8 فتكون ثنائية ($J=2.5 \text{ Hz}$) مع إمكانية تغيير موقعيهما الواحدة بالنسبة للأخرى [20] الجدول-5-

جدول 5: قيم الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A

H_8	H_7	H_6	H_5	الفلافونيد
$d (J=2.5 \text{ Hz})$ 6.5-6.3 ppm	-	$d (J=2.5 \text{ Hz})$ 6.2-6.0 ppm	-	5,7-OH
$d (J=2.5 \text{ Hz})$ 6.9-6.5 ppm	-	$d (J=2.5 \text{ Hz})$ 6.4-6.2 ppm	-	5-OH, 7-OR (R=Sucre)
6.3 ppm (S)	-	-	-	5,6,7-OR R=H, Sucre
-	-	6.3 ppm (S)	-	5,7,8-OR
$d (J=2.5 \text{ Hz})$ 6.7-7.0 ppm	-	$dd (9 ; 2.5 \text{ Hz})$ 6.7-7.1ppm	$d (J=9 \text{ Hz})$ 8.5-0 ppm	7-OR (R=H, Sucre)

*بروتونات الحلقة B :

بروتونات هذه الأخيرة تتموضع في المنطقة ذات الإزاحة الكيميائية (6.5-8.0ppm) وقيمتها تعتمد على المستبدلات الموجودة على الحلقة B وكذا درجة تأكسد الحلقة C، كما هو مبين فيما يلي

مستبدل وحيد على الحلقة B: في هذه الحالة الحلقة B لديها أربع بروتونات H_2 ، H_3 ، H_5 ، H_6 وتظهر هذه البروتونات على شكل ثنائي وثابت تزواج ($J=9\text{Hz}$) وفي المجال (6.7-8.0ppm) حيث تقع إشارة (H_5 ، H_3) في مجال أعلى من مجال إشارة (H_6 ، H_2) بسبب فعل حجب مستبدل C_4 على (H_5 ، H_3) والتعربة الناشئة على H_6 ، H_2 من طرف الحلقة C.

جدول 6: قيم الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B في حالة C_4 -OR

(H_6 ، H_2)	(H_5 ، H_3)	الفلافونيد
7.7-7.9ppm	6.5-7.1ppm	Flavone
7.9-8.1ppm	6.5-7.1ppm	Flavonol

مستبدلان على الحلقة B: في هذه الحالة الحلقة B بها ثلاث بروتونات H_2' ، H_5' ، H_6' حيث H_5' يظهر كإشارة ثنائية بثابت تزاوج ($J=9$ Hz) وفي المجال (6.7-8.0ppm) في حين يظهر H_2' بإشارة ثنائية ($J=2.5$ Hz) غالبا ما تكون متداخلة مع إشارة H_6' الذي يظهر كإشارة ثنائية- ثنائية وبثابت تزاوج ($J=9$; 2.5Hz) وهاتان الإشارتان تتمركزان في المجال (7.2-8.0ppm). ثلاث مستبدلات على الحلقة B: يكون البروتونات H_2' ، H_6' متكافئان ويظهران بإشارة أحادية بين (6.5-7.5ppm) في حالة 3'، 4'، 5'-OH أما في حالة ارتباط مجموعة OMe أو O-Sucre ب C_3' أو C_5' نحصل على إشارة ثنائية غير متناظرة ($J=2.5$ Hz) [35].

*بروتون الحلقة C:

يعطي بروتون H_3 في الفلافون إشارة أحادية حادة في المجال (6.2-6.4ppm) وبالتالي يكون هناك تداخل مع إشارة بروتون الحلقة A ثلاثية الاستبدال.

ب-3-2- البروتونات الأليفاتية:

*بروتونات مجموعة الميثوكسيل:

تتركز إشارات الميثوكسيل بصورة عامة في المجال (3.0-4.1ppm) ويستغل الانزياح النسبي (Δ) الناتج عن قياس الطيف في مذيبين مختلفين في تحديد مواقع مجموعات الميثوكسيل، هذا الانزياح النسبي (Δ) يكبر في حالة ترافق مجموعة الميثوكسيل مع مجموعة كربونيل C_4 ويقل في حالة مجاورتها لمجموعة ميثوكسيل أخرى أو هيدروكسيل [35].

*بروتونات السكر:

يعتمد الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري H_1 على: طبيعة الفلافونيد و موقع ونوع الرابطة بين السكر والأجليكون.

أ- الجليكوزيدات أحادية السكر:

تظهر إشارة البروتون الأنوميري H_1 عموما في مجال أدنى من مجال بقية بروتونات السكر والجدول التالي يعطي بعض قيم الانزياح الكيميائي لبعض البروتونات الأنوميرية لبعض الجليكوزيدات.

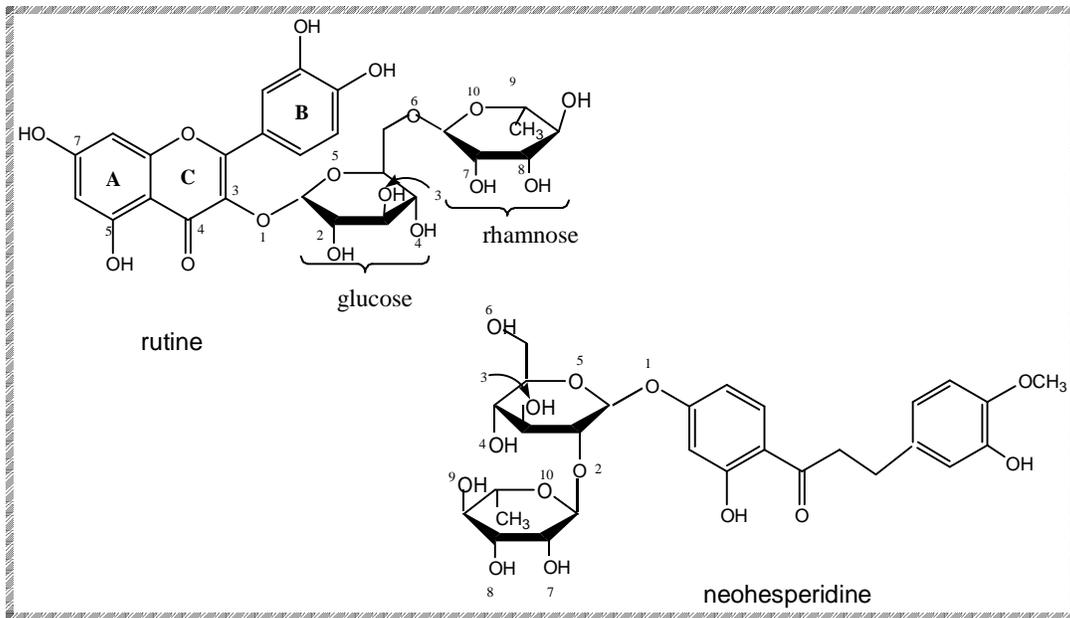
الجدول 7: قيم الانزياح الكيميائي للبروتون الأثوميري

$\delta (H_{1''})$ ppm	الفلافونيد
5,2-4,8	7-O-glycosylflavonol
6,0-5,7	3-O-glycosylflavonol
5,3-5,1	7-O-rhamnosylflavonol
5,1-5,0	3-O- rhamnosylflavonol

تستغل قيمة ثابت الاقتران بين $H_{1''}$ و $H_{2''}$ للتعرف على نوع الرابطة (α أو β) بين السكر والأجليكون. ففي حالة سكر الجلوكوز (glycose) الذي يعطي دائما رابطة β فإن $H_{1''}$ يظهر كإشارة ثنائية بثابت اقتران $J=7$ Hz ناتجة عن تزاوج محوري-محوري (Diaxial) مع $H_{2''}$ أما في حالة سكر الرانوز (rhamnose) فإشارة $H_{1''}$ تكون ذات ثابت اقتران $J=2$ Hz وهذا نتيجة اقتران «استوائي- استوائي» بين $H_{1''}$ و $H_{2''}$ فتكون الرابطة من النوع α .

كما أن إشارة مجموعة مثيل الرانوز والتي تتموضع في المجال (0.8-1.2 ppm) تظهر كإشارة ثنائية ($J=6.2$ Hz) أو كإشارة متعددة تساعد على التعرف على سكر الرانوز [20]

ب- الجليكوزيدات ثنائية السكر من أمثلة ذلك rutine ; neohesperidine :



الشكل 11 : جزيأتي neohesperidine و rutine [36]

إشارة H_1 في (7, 3-O-rutinosides) تتمركز في المنطقة (4.2-4.4ppm) بثابت اقتران $J=2$ Hz بينما إشارة مجموعة مثيل الراموز فتمركز في المنطقة (0.7-1ppm).

أما إشارة H_1 في (7, 3-O - neohesperidosid) فتموضع في المنطقة (4.9-5.0ppm) بثابت تزواج $J=2$ Hz أما إشارة مجموعة مثيل الراموز فتظهر كثنائية $J=6$ Hz في المنطقة (1.1-1.3ppm) [35].

ج- الإماهة الحمضية:

للتعرف على عدد ونوع السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية المعزولة يتم تمييزه هذه الأخيرة في وسط حمضي حيث يتم تحطيم الرابطة (كربون / أكسجين) بين السكر والأجليكون. في أنبوب إختبار نضيف إلى 1مل من المركب المذاب في الميثانول 1مل من حمض كلور الماء بتركيز أنظامي، نسخن في حمام مائي درجة حرارته (100م°) لمدة ساعة بعدها نضيف 1 مل من خلات الإيثيل يرج الخليط جيدا ويترك للراحة حتى ظهور طورين: طور عضوي وطور مائي حيث تفصل الطبقة العضوية، تكرر العملية مرتان وتركز الطبقة العضوية المحتوية على الأجليكون ثم نضيف 1مل من 1- بوتانول إلى الطور المائي، تفصل الطبقة العضوية ثم تركز، أما الجزء السكري من الجليكوزيد فيبقى ذائب في الطبقة المائية.

للتعرف على الأجليكون المنفصل عن الجليكوزيد والمتواجد في طور خلات الإيثيل أو 1- بوتانول نقوم بتسجيل طيف UV في الميثانول للأجليكون وكذلك إجراء اختبارات كروماتوغرافية (CCM) مع شواهد أجليكونية.

أما السكر فيتم التعرف عليه باستعمال ألواح كروماتوغرافية (gel de silice 60 GF₂₅₄) حيث ترش هذه الأخيرة ب(0.2M) NaH₂PO₄ ثم تترك لتجف بعدها توضع في فرن لمدة ساعة وعند درجة حرارة 100 م° بعدها توضع الشواهد السكرية على اللوح الكروماتوغرافي وتغمس في المملص

(أستون - ماء مقطر) (1:9) ثم تعاد إلى الفرن مرة أخرى وتترك لمدة 150-180 دقيقة وبعد أن تجف ترش بمالونات الأيتيلين وتوضع في الفرن لمدة 5 دقائق وعند درجة حرارة 100م° حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور.

الجدول 8: قيم R_f لبعض السكريات المعروفة:

السكر	R_f
α (L) Rhamnose	0.88
D(+) Xylose	0.79
L(+)Arabinose	0.66
β (+)Glucose	0.53
D(+)Galactose	0.33

- [1]- El Hazimi, M. H. (1990) "Natural product", efficedes publications universitaires. Université Du Roi Saoud, 152.
- [2]- Harborne, J. B. (1973) "Flavonoids in phytochemistry", ed. Lawrence, P. Miller, Litton Education Publishing Inc, **2**, 344.
- [3]- Wollenwebre, E., Dietz, V. H. (1980), *Biochem. Syst. Eco.*, **8**, 21.
- [4]- Meclure, J. W. (1975) "physiology and function of flavonoids in the flavonoids", ed. Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H. Chapman and Hall, London, 970-1055.
- [5]- Kitaoka, M., Kadokawa, H., Sugano, M., Ichikawa, K., Taki, M., Takaishi, S., Iijima, Y., Tsutsumi, S., Boriboon, M., Akiyama, T. (1998) "Prenylflavonoids, A new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8- isopentenylnaringenin and an initial study on its structure- activity relationship". *Planta Medica.*, **64**, 511-515.
- [6]- Jensen, P. R., Jenkins, K. M., Porter, D., Fenical, W. (1998) "A new antibiotic flavone glycoside chemically defends the sea grass *Thalassia testudinum* against zoosporic fungi. *Aolied Environmental Microbiology*", **64**, 1490-1496.
- [7]- Li, B. Q., Fu, T., Yan, Y. D., Baylor, N. W., Ruscetti, F. W., Kung, H. F. (1997) "Inhibition of HIV by biacalin", *Cellular Molecular Biological Research*, **39**, 119-124.
- [8]- Kandaswami, C., Perkins, E., Drezewiecki, D. S., Middleton, E. (1992) "Anti-Cancer Drugs", *Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma and embryonic fibroblastlike lung cells in culture by plant flavonoids*, **3**, 525-530.
- [9]- Hodnick, W. F., Duval, D. L. R. S. (1994) "Pardini, Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide- stimulated generation of reactive oxygen species by selective flavonoids", *Biochemical Pharmacology*, **47**, 573-580.
- [10]- Williams, C. A., Hout, J. R. S., Harborne, J. B., Greenham, J., . Eagles, J. (1995) "A biologically active lipophilic flavonoid from *Tanacetum parthenium*", *Phytochemistry*, **38**, 267-270.
- [11]- Grayer, R. J., Harborne, J. B., Kimmins, E. M., Stevenson, F. C., Wijayagunasekera, H. N. P. (1994) "Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown plant hopper *Nilaparvata lugens*", *Acta Horticulturae*, **381**, 691-694.
- [11]- Harborne, J. B. (1999b) "The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plant", *Biochemical Systematic and Ecology*, **27**, 335-368.
- [12]- Robinson, R. (1936), *Nature*, **137**, 1172.
- [13]- Davis, B. D. (1955), *Advances in enzymology*, **247**, 206.
- [14]- Bruneton, J. (1999) "Pharmacognosie et Phytochimie des Plantes médicinales", ed. (3^{ème} édition) Tec & Doc Lavoisier .Paris, 1120.

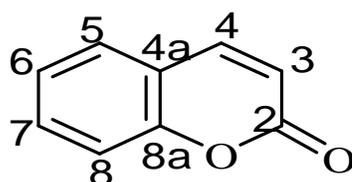
- [15]- Ribereau-Gayon, P. (1968) "Les composés phénoliques des végétaux", Dundo, Paris,
- [16]- Sutfeld, Naturforsch, Z. (1981), **36c**, 30
- [17]. Jay, M., Naturforsch, Z. (1983), **38c**, 413
- [18]- Delluca, V., Ibrahimi, R. K. (1968), *biochem. Biophys.*, Paris, **606**, 238-595.
- [19]- Harborne, J. B. (1973) "Phytochemical methods", ed. Chapman and Hall.
- [20]- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. P.(1970) "The systematic identification of flavonoids", Springer- Verlag, Berlin, 13.
- [21]- Zaidi, F. (1989) "Thèse de magister", Université de Constontine.
- [22]- Lebreton, P., Jay, M., Voirin, B., Bouchez, M. B. (1967) "Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides", **49** (7), 376.
- [23]- Gonnet, J. F. (1973) "Apropos de la photographie encouleur de chromatographie sur couchesminces de Wood", *chromato.* , **68**, 192.
- [24]- Vernin, G. (1970) "La chromatographie en couches minces, techniques et applications en chimie organique", ed. Dundo, Paris.
- [25]- Bruneton, J. (1999) "Pharmacognosie phytochimie plants médicinales", ed. Lavoisier, Paris.
- [26]- Markham, K. R. (1982) "The techniques of flavonoids identification" ed. Academic Press, London.
- [27]- . Combiér, H (1968) "Thèse de doctorat", Université Claude Bernard, Lyon I.
- [28]- Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H. (1975) "The flavonoids" Tome I, Tome II, Chapman and Hall, London,.
- [29]- Voirin, B
. (1983), *Phytochemistry*, **22** (10), 2107-2145.
- [30]- Randerah, H. (1971) "Chromatography sur couche minces", Gautier Villard,.
- [31]- Jurd, L. (1962) "The chemistry of flavonoids compounds", ed. Geissman, T. A. Pergamon press, New york, 107.
- [32]- Harborne, J. B. (1966) "The evaluation of flavonoid pigments compounds in plants" in *Comparative photochemistry*, ed. . Goodwin, T. W. Academic press, London, 230.
- [33]- Jay, M., Gonnet, J. F., Wollenwelier, E., Voisine, B. (1975) "Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxonomique", *phytochemistry*, **14**, 1605-1612.
- [34]- Voirin, B. (1983), *Phytochemistry*, **22** (10), 2107-2145.

[35]- Markham, K. R., Mabry, T. J. (1975) “*Ultraviolet Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids, in the flavonoids*”, ed. Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H. Chapman and hall, London, 45.

[36]- Satterfield, M., Brodbelt, J.S. (2001) “ Structural Characterization of Flavonoid Glycosides by Collisionally Activated Dissociation of Metal Complexes ”, Am. Soc. Mass Spectrum, **12**, 537–549.

I- تعريف الكومارينات:

اشتق اسم الكومارين من كلمة «coumarou» وهو اسم نبات (*Dipteryx odorata* Willd.) من عائلة Fabaceae الذي فصل منه الكومارين (1) سنة 1820، تعتبر الكومارينات مركبات طبيعية مهمة جدا حيث تستعمل كمواد حافظة للأغذية وكذا مواد التجميل [1]، تنتمي الكومارينات إلى مجموعة من مركبات تسمى α -benzopyrone تتكون من حلقة عطرية مرتبطة مع حلقة بيران [2]. تتواجد الكومارينات في الطبيعة بشكل أجليكونات أو مرتبطة بجزئيات سكرية مشكلة جليكوزيدات (glycosides).



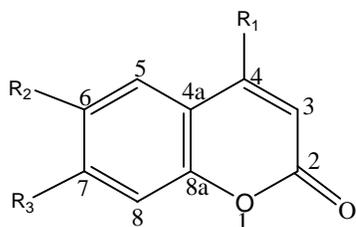
(1) Coumarine

II- تقسيم الكومارينات: يمكن تقسيم الكومارينات إلى عدة أقسام [3]:

(أ) كومارينات مستبدلة على حلقة البيرون: وتشمل هذه المجموعة كومارينات مستبدلة في الموقعين 3 و/أو 4 على حلقة البيرون بمجموعات مثل: هيدروكسيل (ألكوكسيل)، ألكيل، فينيل ، (hydroxyl(alkoxy), alkyl, phenyl). الشكل (12) يوضح ذلك.

العائلات التي تحتوي على هذا النوع من الكومارينات هي: Rutaceae، Papillonaceae، Guttiferae، umbelliferae، Ranunculaceae، Meliaceae

(ب) كومارينات مستبدلة على الحلقة البنزينية: يكون المستبدل على الحلقة البنزينية هو مجموعة هيدروكسيل (ألكوكسيل) أو ألكيل أو أسيتيل. (الشكل 12) يوضح ذلك.



الشكل 12: بنية بعض المركبات

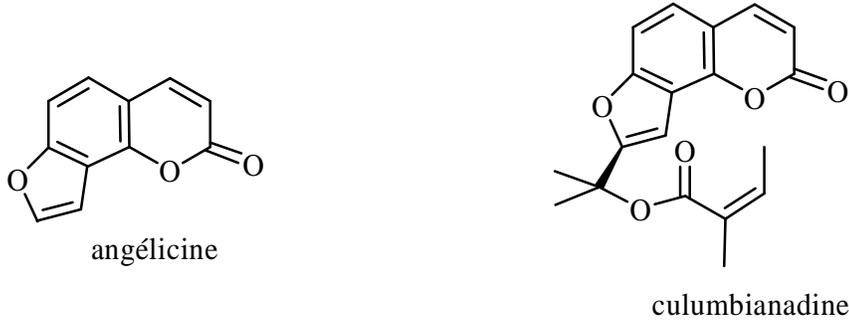
الكومارينية البسيطة

(ج) فيرانوكومارين: تتألف هذه المجموعة

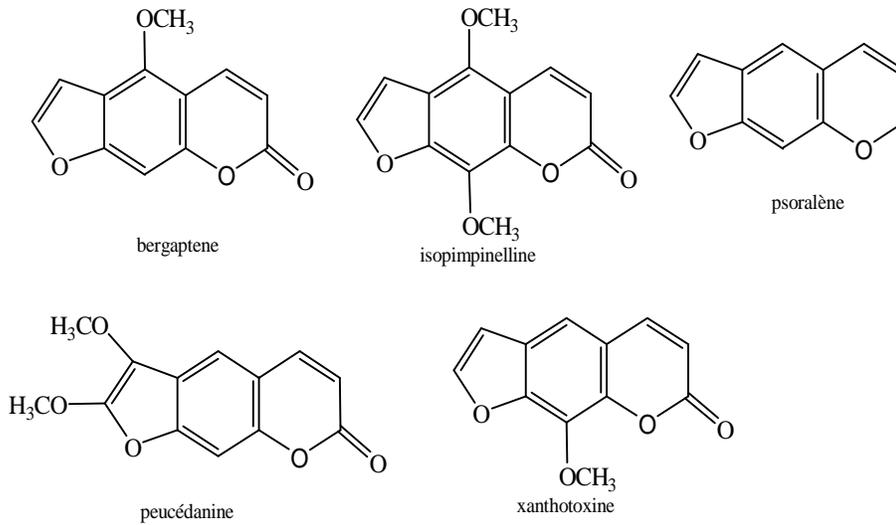
	R1	R2	R3
coumarine	H	H	H
herniarine	H	H	OCH ₃
Méthylombelliférone	CH ₃	H	OH
scopolétine	H	OCH ₃	OH
ombelliférone	H	H	OH

من اندماج حلقة الفيران مع الكومارين في الموقع 7 وتضم نموذجين أساسيين الأول خطي (psoralene)

والثاني زاوي (angelicine) و قد ثبت أن عائلة (Rutaceae) يتركز بها هذا النوع من الكومارينات مقارنة بنباتات عائلات أخرى Apiace، Fabaceae، Moraceae و (الشكلين 13، 14) يوضحان بعض الأمثلة على هذا النوع من الكومارينات.

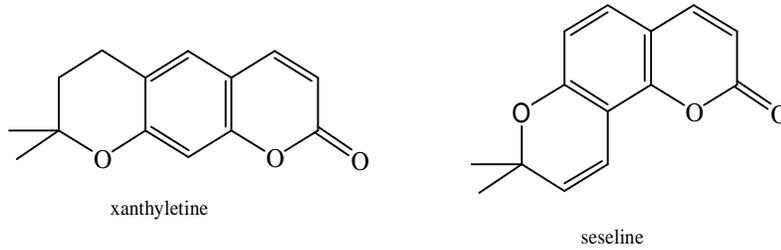


الشكل 13: بنية بعض مركبات فيرانوكومارين الزاوية



الشكل 14 : بنية بعض مركبات الفيرانوكومارين الخطية

(د) بيرانوكومارين: تتكون هذه المجموعة من مساهمة ذرة أكسجين في الموقع 7 للكومارين في تشكيل حلقة سداسية لتعطي نوعين: خطي (xanthyletine) التي تتواجد فقط في نباتات عائلة (Umbellifereae) أو زاوي (seseline) . (الشكل 15).



الشكل 15: بنية بعض مركبات بيرانو كومارين

III- تواجد، تراكم وتوزيع الكومارينات:

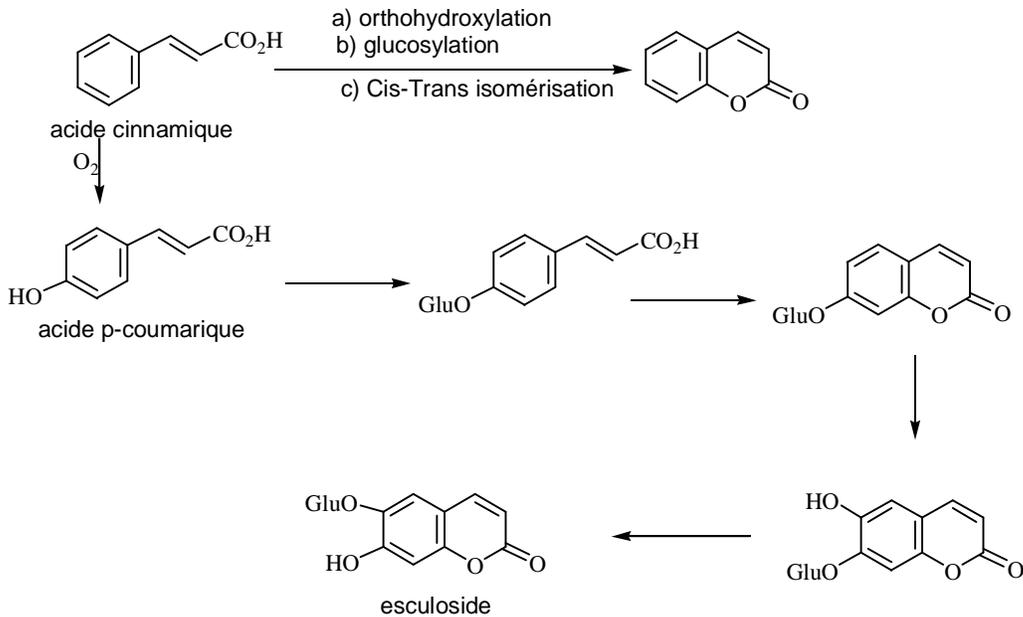
تتواجد الكومارينات في عدة فصائل نباتية Compositae, Leguminosae, Magnoliaceae, Rutaceae. Oleaceae, Convolvulaceae, Ranunculaceae [4]. يتم الاصطناع الحيوي للكومارينات في الأوراق لكنها تتراكم بنسب كبيرة جدا في الثمار و الجذور و السيقان كما أن التغيرات الفصلية والعوامل المحيطة يمكن أن تؤثر على تواجد و تراكم الكومارينات في مختلف أجزاء النبات.

IV- الفعالية البيولوجية للكومارينات:

يستعمل Hydroxy-4-coumarine ضد تخثر الدم [3] ، يستعمل المركب coumerymycin_{A1} والمركب novobiocine كمضادات للبكتيريا [3].

V- الاصطناع الحيوي للكومارينات:

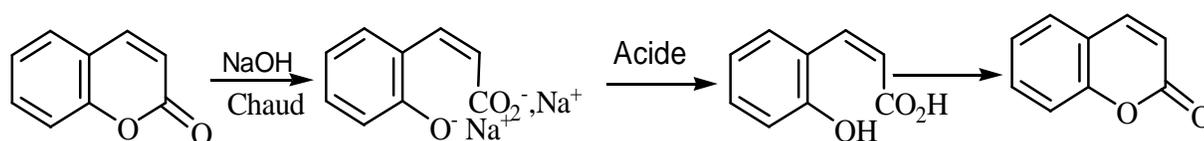
المخطط التالي يوضح الاصطناع الحيوي للكومارينات



الشكل 16: يمثل مبدأ الاصطناع الحيوي للكومارينات البسيطة.

VI- طرق استخلاص الكومارينات وتنقيتها:

يمكننا استخلاص الكومارينات من مصادرها الطبيعية بمعاملة الأجزاء النباتية بالمحاليل القلوية حيث أن هذه الأخيرة لها القدرة على تحطيم الرابطة اللاكتونية في الكومارين فتتسأ أملاح يمكن أن تتحلل مرة أخرى في وسط حمضي لتعطي المركب الأصلي [3].



أما الشائع في الوقت الحاضر فهو استخلاص الكومارينات بالمذيبات (خصوصا المحاليل الكحولية) دون المعالجة القلوية أو الحمضية التي تؤثر على المركب الأصلي في غالب الأحيان ثم تليها عمليات الفصل باستخدام الطرق الكروماتوغرافية المختلفة [1].

VII- الدراسة البنوية للكومارينات:**1-VII- طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV):**

أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للكومارينات تتميز عموما بعصابتها إمتصاص في المجال 241-311 نانومتر و هي تتأثر بشكل كبير بموقع و طبيعة المستبدلات على الكومارين خاصة في وسط قاعدي أو في وجود معقدات.

تأخذ الكومارينات ألوان مختلفة من الأزرق إلى الأصفر تحت الأشعة فوق البنفسجية يزيد بريقها بوجود أبخرة الأمونياك و يمكن تمييز بعض أقسام الكومارينات اعتمادا على ألوانها تحت الأشعة فوق البنفسجية فمثلا تظهر 7-hydroxycoumarine; 5,7-dihydroxycoumarine بلون أزرق [5].

2-VII- طيف الأشعة تحت الحمراء:

يمكننا طيف الأشعة تحت الحمراء من الكشف عن المجموعات الوظيفية و بالتحديد المجموعة اللاكتونية [1]، حيث يظهر اهتزاز مجموعة الكربونيل في الكومارينات (α -بيرون) في المنطقة 1700-1750 سم⁻¹ بعيدة نوعا ما عن المركبات (γ -بيرون) التي تظهر عند حوالي 1650 سم⁻¹ [6].

3-VII - طيف الرنين النووي المغناطيسي (RMN) :

3-أ - طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ($RMN-^1H$) :

يعتبر طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ($RMN-^1H$) من أحسن الوسائل المستخدمة للتعرف على البنية الكيميائية للكومارينات الطبيعية، فمن الممكن التعرف على مستبدلات الحلقة البنزينية في الكومارينات غير المستبدلة في الموضعين 3،4 وهذا بالنظر إلى مكان امتصاص بروتوني هذين الموضعين. (الجدول 9).

الجدول 9: قيم الانزياح الكيميائي ($RMN-^1H$) للكومارين

نوع الاستبدال في الكومارين	δ (ppm)	ثابت التزاوج J (Hz)
غير مستبدل في الموضع 5	H3 (6.4-6.1) H4 (7.9-7.5)	d (9.5)
5-OH	C ₃ :6.4-6.1 C ₄ : 8.2-7.9	d (9.5)
8-OH	C ₃ : 6.9-6.6 C ₄ :7.5-7.1	d (9.5)

3-ب - طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون ($RMN-^{13}C$) :

الجدول 10 يبين قيم الانزياح الكيميائي لدارت الكربون في الكومارين.

الجدول 10: قيم الانزياح الكيميائي ($RMN-^{13}C$) للكومارين

C-8a	C-8	C-7	C-6	C-5	C-4a	C-4	C-3	C-2	درة الكربون
153.9	116.4	131.8	124.4	128.1	118.8	143.6	116.4	160.4	δ (ppm)

- [1] Bruneton, J. (1999) "Pharmacognosie, Phytochimie, Plants médicinales", 3^{ème} ed. Tec et Doc, Paris, 263-265.
- [2]- Keating, G. J., O'kennedy, R. (1997) "The chemistry and occurrence of coumarins", 23-66.
- [3] Murry, R. D. H., Méndez, J., Brown, S. A. (1982) "The Natural Coumarine: Occurrence, Chemistry and Biochemistry", John Wiley and Sons Ltd; Chichester, U
- [4]- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004) " Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer ", *Life Sciences*, **74**(17), 2157-2184.
- [5]- Harborne, J. B. (1987) "Phytochemical methods", 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, 179.
- [6] Angles, L. R. (1984) "A Coumarin from *Perizia Coerubescens*", *Phytochemistry*, **23** (9), 2094-2095.

I- الوصف النباتي:

نبات العوسج (*lycium arabicum* Boiss.) عبارة عن شجيرة شوكية معمرة تتواجد بكثرة في شمال إفريقيا [1] يصل ارتفاعها إلى حوالي مترين، تنمو في عدة أنواع من التربة ذات حمضية مختلفة ، نموها يكون جيد تحت أشعة الشمس .
أوراقه محببة وأزهاره مختلفة الألوان مابين البنفسجي والبرتقالي، أما الثمار فتكون خضراء ويحمر لونها عند النضج.
الإزهار يكون في فصل الخريف أما الثمار فتكون في فصل الربيع، تتحمل هذه النبتة التعرض لجو بحري (تنمو بالقرب من المياه) [2] وهي تنتمي إلى عائلة غنية بالنباتات السامة لكن لا توجد معلومات حول سميتها، ولها عدة أسماء شائعة هي: العوسج (Aoucedj)، الغردق (Ghardeq) ، كساد (qasad) [3،4-5].



الشكل 17: يمثل شجرة العوسج



الشكل 18: يمثل أزهار وثمار نبات العوسج

II-التصنيف النظامي للنبتة:

Classe: Dicotylédone



Sous Classe: Asterideas



Ordre: Polomoniale



Famille: Solanaceae



Sous Famille: Solanoides



Tribus: Lycieas



Genre: Lycium



Espèce: *L. arabicum*

III- أنواع *Lycium*:

1. *Lycium afrum* L.
2. *Lycium andersonii* A. Gray
3. *Lycium arabicum* Schweinf. ex Boiss. (*Lycium shawii* Roem. & Schult.)
4. *Lycium austrinum* Miers (*Lycium oxycarpum* Dunal)
5. *Lycium barbarum* L. (*Lycium halimifolium* Mill., *Lycium vulgare* Dunal)
6. *Lycium berlandieri* Dunal
7. *Lycium carolinianum* Walter
8. *Lycium cestroides* Schlttdl.
9. *Lycium chilense* Bertero
10. *Lycium chinense* Mill.
11. *Lycium chinense* var. *chinense* (*Lycium chinense* var. *ovatum* (Poir.) C. K. Schneid., *Lycium ovatum* Loisel.)
12. *Lycium chinense* var. *ovatum* (Poir.) C. K. Schneid. (*Lycium chinense* var. *chinense*)
13. *Lycium chinense* var. *potaninii* (Pojark.) A. M. Lu (*Lycium potaninii* Pojark.)
14. *Lycium cooperi*
15. *Lycium depressum* Stocks (*Lycium turcomanicum* Turcz. ex Miers)
16. *Lycium europaeum* L.
17. *Lycium ferocissimum* Miers
18. *Lycium flexicaule* Pojark.
19. *Lycium foetidum* L. f. (*Serissa japonica* (Thunb.) Thunb.)
20. *Lycium halimifolium* Mill. (*Lycium barbarum* L.)
21. *Lycium horridum* Thunb.
22. *Lycium japonicum* Thunb. (*Serissa japonica* (Thunb.) Thunb.)
23. *Lycium ovatum* Loisel. (*Lycium chinense* var. *chinense*)
24. *Lycium oxycarpum* Dunal (*Lycium austrinum* Miers)
25. *Lycium pallidum* Miers
26. *Lycium potaninii* Pojark. (*Lycium chinense* var. *potaninii* (Pojark.) A. M. Lu)
27. *Lycium ruthenicum* Murray
28. *Lycium shawii* Roem. & Schult. (*Lycium arabicum* Schweinf. ex Boiss.)
29. *Lycium* spp.
30. *Lycium turcomanicum* Turcz. ex Miers (*Lycium depressum* Stocks)

IV- المادة النباتية:

تم جمع نبات العوسج (*lycium arabicum* Boiss.) من منطقة ديدوش مراد ولاية قسنطينة بين شهري أكتوبر ونوفمبر 2004 ثم فصل كل عضو على حدة (أوراق وجذور) ووضعت للتجفيف بمخبر المنتجات الطبيعية والإصطناع الحيوي بجامعة قسنطينة، كلية العلوم الدقيقة، قسم الكيمياء فحصنا على الأوزان التالية:

* الأوراق: 645 غ

* الجذور: 762 غ

V- الإستعمالات الطبية للنبات: تستعمل بعض أجزاء النبات في الطب الشعبي و(الجدول 11) يلخص أهمها.

الجدول 11: الاستعمالات الطبية لبعض أجزاء النبات

المرجع	الاستعمالات الطبية	الجزء النباتي
[6]	عصير الأوراق يقطر في العينين لعلاجها من مختلف الأمراض علاج مرض السل علاج مرض الكلب مستخلص الأوراق يستعمل كصبغة للشعر.	الأوراق
[6]	الثمار الحمراء تفيد في علاج الإسهال.	الثمار

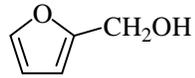
VI- البحث البيبليوغرافي:

حظيت بعض نباتات جنس *Lycium* بعدة دراسات (الجدول-12-) والشكل (20) يمثل بعض المركبات المفصولة من جنس *Lycium* أما فيما يخص النبات الذي نحن بصدد دراسته فيوجد بحث وحيد [7] تم فيه فصل مركب كوماريني (Scopoletine) من مستخلص (الأوراق والسيقان) و32 مركبا طيارا أهمها: Benzyl alcohol (29.27%), 2,3- Dihydrobenzofuran (6.97%), 2-Methanolfuran (5.43%), Hexadecanoicacid (5.20%) والتي تم الحصول عليها عند استخلاص الأجزاء الهوائية للنبات ببخار الماء في جهاز Soxlet وبعض هذه المركبات موضحة في (الشكل19).

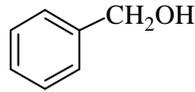
نفس الدراسة السابقة أظهرت أن المستخلص الفينولي (1-بوتانول) أعطى فعالية ضد بكتيرية جد معتبرة مع مستنبتات بكتيرية من النوع (*Proteus mirabilis*) ولم تسجل لمستخلصات النبات أي فعالية ضد الفطريات من النوع *Aspergillus niger* ; *Gladosporium cladosporioides* ; *Aspergillus terreus*.

كما خلصت الدراسة السابقة إلى أن النبات لا يحتوي على فلافونيدات جليكوزيدية بل توجد اجليكونات (فلافونيدات متعددة الميثوكسيل) و هذا ما نفته دراستنا هذه و التي تهدف إلى التعرف على المحتوى

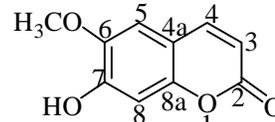
الفلافونيدي لهذا النبات *Lycium arabicum* Boiss.



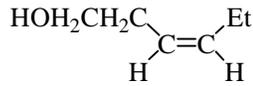
2-Méthanolfuran



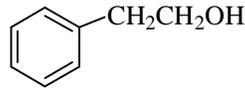
benzylalcohol



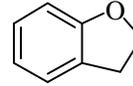
Scopoléline



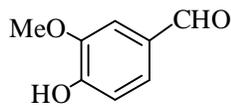
Z)-3-Héxèn-1-ol



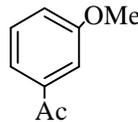
2-Phenylethanol



2,3-Dihydrobenzofuran

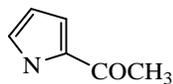


Vaniline

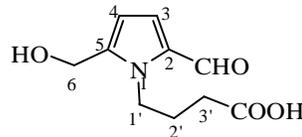


3-Methoxyacetophenone

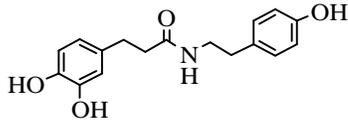
[7] *Lycium arabicum* Boiss. الشكل 19: بنية بعض المركبات المعزولة من



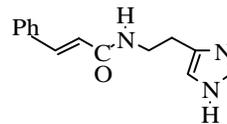
2-Acetylpyrrole



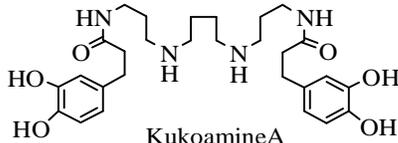
4-[formyl-5-(hydroxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl]butanoic acid



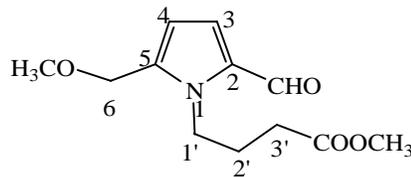
Dihydro-N-Caffeoyltyramine



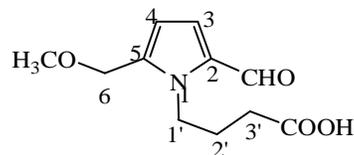
N-cinnamoyl-histamine (form E)



Kukoamine A



4-[formyl-5-(methoxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl] butanoate



4-[formyl-5-(methoxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl]butanoic acid

الشكل 19: بنية بعض مركبات جنس *Lycium*

الجدول 12: الدراسة الفيتوكيميائية السابقة على جنس *Lycium*

Espèces	Types de produits naturels	Références
<i>Lycium chinense</i>	Dihydro-N-caffeoyltyramine (amidephenolique)	[8]
	KukoamineB	[9]
	Composes aromatiques	[10]
	Huile essentielle	[11]
	β -carotène, B-sitosterol- β -D –Glucoside, 6,7-époxy-5,20-dihydroxy-1- oxowitha-2,24-diénoïde, Polysaccharides (LBP, LbGp2)	[12]
	Sesquiterpenoides (Cyperone, Solavetivone), β -sitostérol Acide linoéique	[12-13]
	Tétrazterpènoïdes, (Zéaxanthine, Physaline)	[13]
	KukoamineA	[16]
	Lyciumoside IV-LX	[17]
	Octapeptide cyclique (LyciuminA)	[18]
	Lycium amide; dipeptide)	[19]
	Diterpènes glycosides acyclique	[20]
	Scopolétine, acide vanillique	[21]
	Zéaxanthines	[22]
	Zéaxanthin dipalmitate	[24]
	α -tocophérol	[25]
(+)-Lyoniresinol-3 α -O- β -D-glucopyranoside	[26]	
<i>Lycium barbarum</i>	Polysaccharides (LBP, LbGp2)	[12]
	Flavonoides	[13], [14], [15]
	Biosgénine	[23]
<i>Lycium halimifolium</i>	Flavonoides	[13], [14], [15]

VII-عمليات الاستخلاص:

تمت عمليات الإستخلاص على كل من الأوراق والجذور أما الأزهار فلم يتمكن من قطف الكمية الكافية منها.

تتقع المادة النباتية الجافة في مذيبات ذات قطبية ضعيفة للتخلص من المواد الليبوفيلية (كلوروفيل، دهون نباتية،... الخ) والتي قد تعيق عمليات الفصل مع إمكانية دراسة هذه المستخلصات الليبوفيلية وفصل مركبات الميتابوليزم الثانوي منها (كومارينات مثلا)، وبالتالي تتقع المادة النباتية لمدة 24 ساعة في مذيب إيثر البترول، ترشح ثم يركز الراشح حتى الجفاف، تكرر العملية مرة أخرى، ثم تتقع المادة النباتية الجافة في مذيب أكثر قطبية من الأول وهو ثنائي كلور الميثان لمدة 24 ساعة بعد الترشح يركز الراشح. وأخيرا تتقع المادة النباتية الجافة في محلول ميثانولي (70%) لمدة 72 ساعة يرشح ويركز الراشح، تكرر العمليات ثلاث مرات لمدة 24 ساعة حيث يستعمل في المرة الأخيرة محلولاً ساخناً يرشح ويركز الراشح حتى الجفاف.

يعالج المستخلص الجاف للمحلول الميثانولي بإذابته في 500 مل من الماء المقطر الساخن، يترك في مكان بارد ليلة كاملة بعدها يرشح للتخلص من الشوائب (دهون نباتية، تراب، كلوروفيل... الخ). أما المستخلص المائي يضاف له 200 مل من مذيب ثنائي كلور الميثان في قمع الفصل يرج جيدا ثم يترك للراحة ثم تفصل الطبقة العضوية، تكرر العملية مرتين ويضاف إلى مستخلص طور ثنائي كلور الميثان المحصل عليه سابقا.

يضاف مذيب خلات الإيتيل (200 مل) بنفس الطريقة السابقة إلى المستخلص المائي ثم تفصل الطبقة العضوية، تكرر العملية مرتين.

في الأخير يضاف مذيب 1-بوتانول (200 مل) إلى المستخلص المائي ثم تفصل الطبقة العضوية، تكرر العملية ثلاث مرات.

يتم تركيز كل مستخلص حتى الجفاف، و(المخطط6) يبين أهم الخطوات المتبعة في عمليات الإستخلاص، لنحصل في نهاية الإستخلاص على الكميات المدونة في (الجدول13) التالي:

الجدول 13:

الكمية بالغرام		المادة
الجزور	الأوراق	
726	645	المادة النباتية الجافة
10.70	8.90	مستخلص 1- بوتانول الجاف
4.70	8.10	مستخلص ثنائي كلور الميثان الجاف
2.75	1.26	مستخلص خلات الإيثيل الجاف
-	9.49	مستخلص لإيثر البترول الجاف

نلاحظ أن الأجليكونات والجليكوزيدات أحادية السكر تستخلص بمذيب خلات الإيثيل عموماً بينما مذيب 1-بوتانول يستخلص الجليكوزيدات عديدة السكر.

VIII- الفصل:

تم إجراء تحاليل كروماتوغرافية على كل من المستخلص البوتانولي ومستخلص خلات الإيثيل قبل الشروع في عملية الفصل باستعمال الكروماتوغرافيا الورقية (C.P.) مع الأنظمة:

SI- حمض الخل بتركيز 5% و 15%

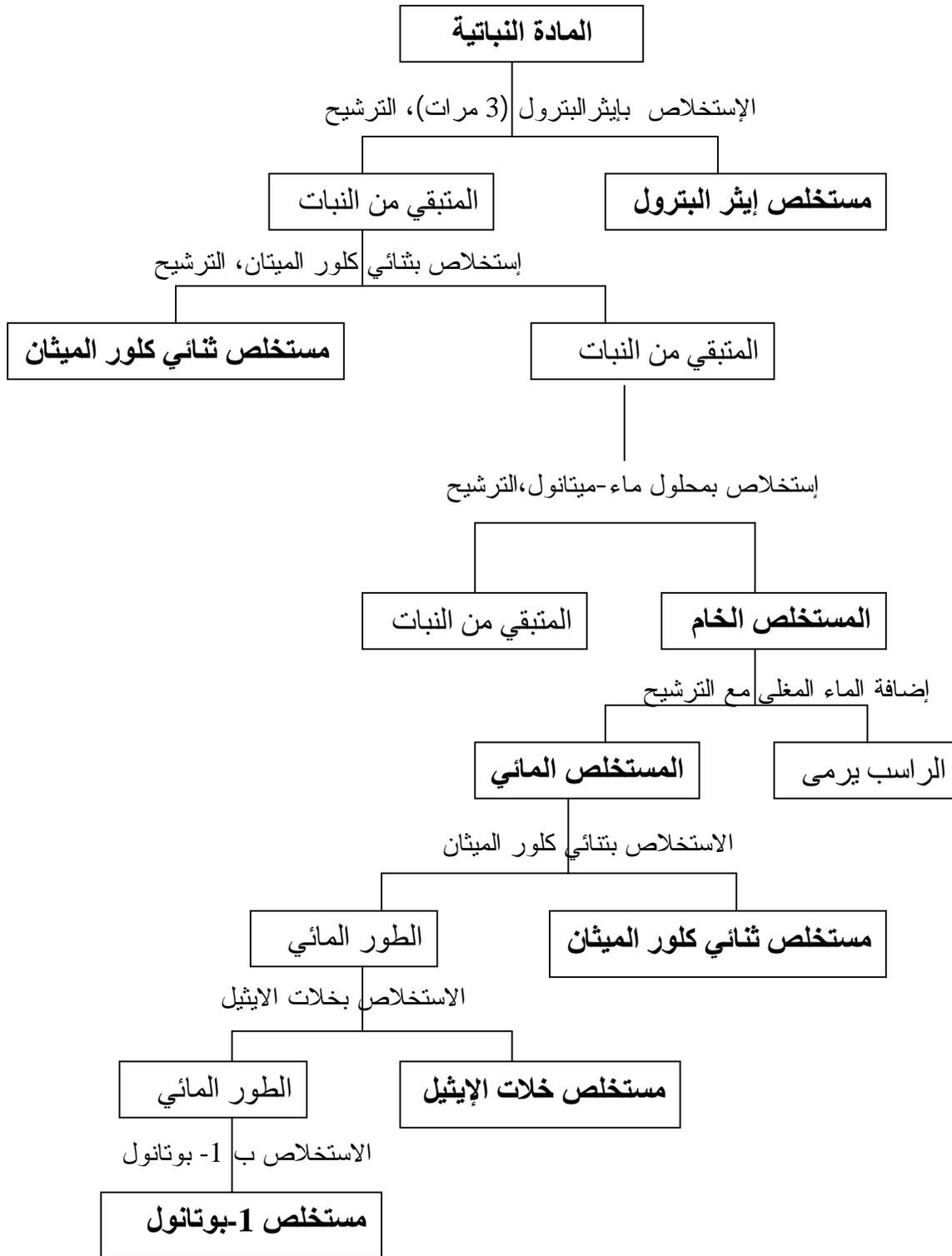
SII- (ماء (4) / حمض الخل (1) / بوتانول (5))

كذلك باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على ألواح من السيليكاجل مع الأنظمة:

SIII- ميثانول (1) / خلات الإيثيل (3)

SIV- ميثانول (1) / ثنائي كلور الميثان (5)

من خلال مقارنة هذه النتائج التحليلية اتضح أن هناك فروق بين المستخلصين حيث لاحظنا احتواء المستخلص البوتانولي على بعض الفلافونيدات الجليكوزيدية وعدم احتواء مستخلص خلات الإيثيل على الأجليكونات الفلافونيدية.



المخطط 2: الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص

1-VIII-العمود الكروماتوغرافي:

1- أ- مستخلص الأوراق:

المستخلص البوتانولي الجاف للأوراق (8.9 غرام) تم فصله باستعمال عمود كروماتوغرافي (يقطر 2.7 سم و طول 95.5 سم) من البولي أميد (100 غرام) باستعمال المملص: ماء مقطر - ميثانول.

طريقة العمل: حضر العمود الكروماتوغرافي بوضع قطعة قطن أسفل العمود ثم ملاً بمحلول مسحوق متعدد الأميد المذاب في الماء وبعد توضع الطور الثابت جيدا أضيف المستخلص البوتانولي الجاف (الذي تمت إذابته في الميثانول مع كمية من غيرة متعدد الأميد ثم تركيزه حتى الحصول على مستخلص جاف). تم بعد ذلك إضافة طبقة من رمل خاص بسمك 0.5 سم وهذا للحفاظ على ثبات سطح الطور الثابت أثناء إضافة المملص.

أضيف المملص الذي يكون في البداية الماء المقطر ثم نغير في قطبيته تدريجيا بإضافة الميثانول، ويتم مراقبة الحزم النازلة باستعمال مصباح الأشعة فوق البنفسجية واستقبالها أسفل العمود حيث تركزت تحت ضغط منخفض لنحصل على الكسور التالية:

الجدول 14: الكسور المحصل عليها من مستخلص الأوراق للطور البوتانولي

رقم الكسر	الميثانول (%)	الماء المقطر (%)
1-31	0	100
32-39	20	80
40-46	30	70
47-48	40	60
49-53	50	50
54-75	100	0

تم جمع الكسور المتشابهة في محتواها الفلافونيدي وهذا باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (ك.ط.ر) من السيليكاجل (Gel de silice GF254) المحضرة في المخبر وكجمل مملصة:

SIII- ميثانول(1)/ خلات الإيثيل(3)

SIV- ميثانول(1)/ ثنائي كلور الميثان(5)

فحصلنا على الكسور الجديدة المدونة في (الجدول 15) التالي:

الجدول 15: الكسور المحصل عليها بعد الجمع

الكسور المحصل عليها من العمود	الكسور بعد الجمع
f ₁	10-1
f ₂	16-11
f ₃	19-17
f ₄	29-20
f ₅	30
f ₆	31
f ₇	32
f ₈	33
f ₉	34
f ₁₀	35
f ₁₁	36
f ₁₂	41-37
f ₁₃	44-42
f ₁₄	46-45
f ₁₅	51-47
f ₁₆	56-52
f ₁₇	63-57
f ₁₈	70-46
f ₁₉	75-71

وباستعمال الكروماتوغرافيا الورقية (ورق واتمان رقم 3) وكجمل مملصة:

SI- حمض الخل بتركيز 5% و 15%

SII- (ماء (4) / حمض الخل (1) / بوتانول (5)) تحصلنا على الكسور النهائية :

$$F1 = f_1 ; F2 = f_2 ; F3 = f_3 + f_4 ; F4 = f_{12} + f_{13} + f_{14} ; F5 = f_{15} ; F6 = f_{16} ; F7 = f_{17} + f_{18} + f_{19}$$

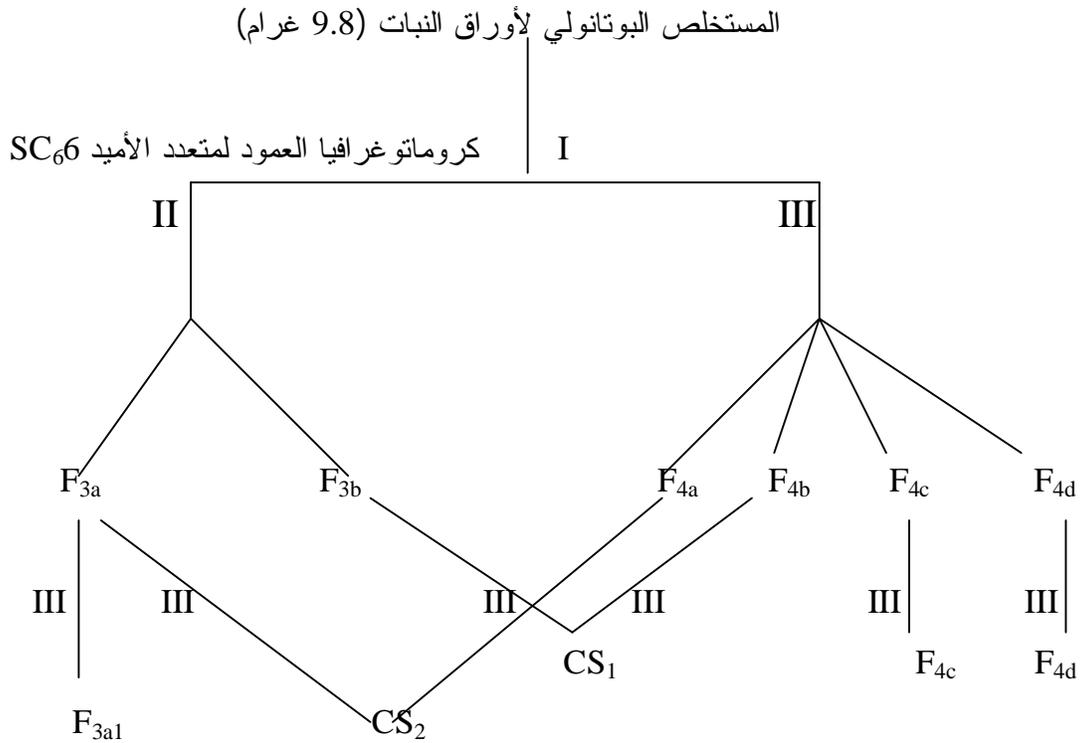
وقد ركزنا في هذه الدراسة على الكسرين F3 و F4 فقط وهذا لوجودهما بكمية معتبرة مقارنة مع بقية الكسور

وباستعمال ألواح من السيليكاجل والجملة المملصة SII :

أعطى الكسر F3 حزمتين: F3_a و F3_b

أعطى الكسر F4 4 حزم: F4_a و F4_b و F4_c و F4_d

والمخطط -3- يبين مختلف مراحل فصل فلافونيدات نبات العوسج (*Lycium arabicum* Boiss.)



I: H₂O → MeOH

II: MeOH / CH₂Cl₂ / H₂O: 2 / 8 / 0.1

III: n-BuOH / Acétic acid / Water: B / A / W

المخطط 3: مختلف مراحل فصل فلافونيدات نبات العوسج (*Lycium arabicum* Boiss.)

VI-1-ب - مستخلص الجذور:

مستخلص ثنائي كلور الميثان (4.7 غرام) تم فصله باستعمال عمود كروماتوغرافي (بقطر 3 سم وطول 61 سم) من السيليكا جل (gele de silice) (112 غرام) باستعمال المملص كلوروفورم - ميثانول، وباتباع طريقة العمل المذكورة سابقا تحصلنا على الكسور التالية:

الجدول 16: الكسور المحصل عليها من مستخلص الجذور لطور ثنائي كلور الميثان

رقم الكسر	الميثانول %	الكلوروفورم %
10-1	0	100
16-11	5	95
20-17	10	90
28-21	20	80
34-29	30	70
40-35	40	60
48-41	50	50
52-49	100	0

تمكنا من تحديد الكسور المتشابهة في محتواها الفلافونيدي وبالتالي جمعها مع بعض وهذا باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من السيليكاجل (Gel de silice GF254) المحضرة في المخبر والمملص CH_2Cl_2 فتحصلنا على الكسور الجديدة التالية

الجدول 17: الكسور المحصل عليها بعد الجمع

الكسور المحصل عليها من العمود	الكسور المحصل عليها بعد الجمع
4-1	F ₁
7-5	F ₂
11-8	F ₃
14-12	F ₄
18-15	F ₅
22-19	F ₆
28-24	F ₇
52-29	F ₈

وباستعمالنا لكروماتوغرافيا الطبقة التحضيرية والنظام (1/1/1) (AcOH(10%)/Et₂O/Tol) لاحظنا تشابه كبير بين الكسرين F₂ و F₃ فقمنا بجمعهما في كسر واحد الذي فصل منه المركبين CS₃ و CS₄ هذا الأخير كانت كميته قليلة جدا لا تكفي لإجراء الإختبارات الكروماتوغرافية وبالتالي عدم التعرف على صيغته الكيميائية.

وفي نهاية عملية الفصل تحصلنا على المركبات التالية: CS₁، CS₂، CS₃ ، CS₄

- [1]-Bean, W. (1981) "Tree and Shrubs Hardy in Great Britain", ed. Marry **1-4**.
- [2] Huxley, A. (1992) "The news RHS Dictionary of Gardining", ed. Mac Millan, Press,.
- [3]- Quèzel, P., Santa, S. (1963) "Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales". TomeII, ed. CNRS, Paris, 819-822, 852.
- [4]- The Global Compendium of weeds. *Lycium shawii* Roemer etSchultes. www.hear.org/gcw/htm/index.html.
- [5]- Ghazanfar, S. A.(1994) "CRC Handbook of Arabian Medicinal Plants", CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, p. 265.
- [6]- Boulos, L. (1983) "Medicinal plants of North Africa", Inc, Michigan. U.S.A.
- [7]- Chaabi, M. (2003) "Thèse de magister", Constantine.
- [8]- Han, S. H., Lee, H. H., Lee, I. S., Moon, Y. H., Woo, E. R.(2002) "A new phenolic amide from *Lycium chinense* Miller", *Archives of Pharmacal Research*, , **25**(4), 433-437.
- [9]- Funayama, S., Zhang, G. R. (1995) "Kukoamine B, a spermine alkaloid from *lycium chinense*" *Phytochemistry*, **38**(6), 1529-1531.
- [10]- Kim, S. y., Lee, k. H.(1997) "Taste and flavor compounds in boxthorn *Lycium chinense* M. leaves", *Food Chemistry*, **58**(4), 297-303.
- [11]- Ryu, S.N., Kim, S.M.(1998) "Volatile oil of doxthorn *Lycium chinense* M. Leaves", Korean, *J. Crop Science*, **43**(3), 189-193.
- [12]- Duke, J.(2002) "Chemicals in: *Lycium chinense* M. (Solanaceae). Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. USDA-ARS-NGRL. Beltsville Agricultural Research Center", Beltsville, Maryland.
- [13]- Dharmananda, S.(1997) "*Lycium fruit*. Institute for Traditional Medicine", Portland, Oregon.
- [14]- Huang, Y., Lu, J., Shen, Y., Lu, J. (1999) "The protective effects of total flavonoids from *lycium barbarum* L. on lipid peroxidation of liver mitochondria and red blood cell in rats", *Wei Sheng Yan Jiu*, **28**(2), 115-116.
- [15]- Christen, P., Kapetanidis, I. (1987) "flavonoids from *lycium halimifolium*", *Planta Med.*, **53** (6), 571-572.
- [16]- "Dictionary of natural products", Chemical database,eds: Chapman et hall, London, (1994), **3**, 3532.
- [17]- Terauch, M., Kanamori, H. (1998) "New acyclic diterpene glycosides, lyciumosides IV- IX from *Lycium chinense* Mill. ", *Natural Medicines*, **52** (2), 167-171.
- [18]- Morita, H., Yoshida, N. (1996) "Configerational and conformational analyses of a cyclic octapeptid lyciumin A, from *Lycium chinense* Mill. ", *Tetrahedron*, **52** (8), 2795-2802.

- [19]- Noguchi, M., Mochida, K. (1984) "The components of the Chinese drug "Tiku'-pi":1. Isolation and composition of *Lycium amid*, a new dipeptide", *Chem. Pharm. Bull*, **32** (9), 3584-3587.
- [20]- Yahara, S., Shigeyama, C. (1993) "Cyclic peptides, acecelic diterpene glycosides and other compounds from *Lycium chinense* Mill. ", *Chem. pharm. Bull.*, **41**(4), 703-709.
- [21]- Hansel, R., Huang, J.T. (1997) "*lycium chinense* III: Isolierung von scopoletin und fanillinsäure", *Pharmazie*, **310** (1), 38-40.
- [22]- Kim, S. Y., Kim, H. P. (1997) "Antihepatotoxic zeaxanthins from the fruits of *Lycium chinense*", *Archives of Pharmacal Research Seoul*, **20** (6), 529-532.
- [23]- Basterechea, M., preiss, A., Coll, F., Voigt, D., Mola, J.L., Adam, G. (1984) "Havanine-a steroidal alkaloid glycoside from *Solanum havanense*", *Phytochemistry*, **23** (9), 2057-2058.
- [24]- Kim, H.P., Lee, E.J., Kim, Y.C., Kim, J., Kim, H.K., Pak, J.H., Kim,S.Y., Kim,Y.C. (2002) "Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats", *Boil. Pharm. Bull.*, **25** (3), 390-392.
- [25]- Ching, L. Mohamed, S. (2001) "Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants" *J. Agric. Food. Chem.*, **49** (6), 3101-3105.
- [26]- Chaabi, M., Zellagui, A., Rhouati, S.(2004) "Scopoletin and essential oil from *Lycium arabicum* Schwein. Ex Boiss", *J. Soc. Alger. Chim.* , 14 (2), 189-196.

I- التعيين البنوي للمركبات المعزولة:

تحصلنا على ثلاثة مركبات و اعتمدنا في التعرف على البنى الكيميائية لهذه المركبات على:

السلوك الكروماتوغرافي، طيف الأشعة فوق البنفسجية UV، طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون.

تم تعيين قيم ثابت الإنحباس R_f للمركبات المفصولة في عدة أنظمة مملصة هي، (الجدول 18):

- I : حمض الخل (15%) على ألواح السيليلوز
- II: تولوين / ميثانول / ميثيل إيثيل سيتون: (3/3/4)
- III : ماء / ميثانول / ميثيل إيثيل سيتون / أسيتيل أسيتون: (1/3/3/13) على شرائح متعدد الأמיד
- IV: ثنائي كلور الميثان
- V: ثنائي إيثير الإيثيل - تولوين - حمض الخل (10%) : (1/1/1) على شرائح السيليكاجل GF254

الجدول 18: قيم R_f في الأنظمة

قيمة $R_f \times 100$ في النظام					المركبات
النظام (V)	النظام (IV)	النظام (III)	النظام (II)	النظام (I)	
-	-	44	16	65	CS ₁
-	-	29	11	53	CS ₂
31	10	-	-	-	CS ₃

1- التحليل البنوي للمركب CS₁:

1-1- اللون الإستشعاعي تحت الأشعة فوق البنفسجية: بنفسجي

2-1- المعطيات الطيفية:

2-1- أ- طيف الأشعة فوق البنفسجية UV:

الجدول 19: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CS₁

الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)	نثوءات أخرى (نم)
MeOH	359	258	270 300
NaOH	408	271	329
AlCl ₃	407	270	300
AlCl ₃ +HCl	399	268	299 369
NaOAc	364	266	
NaOAc+H ₃ BO ₃	379	262	295

2-1- ب- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون H¹:

الجدول 20 : نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب CS₁

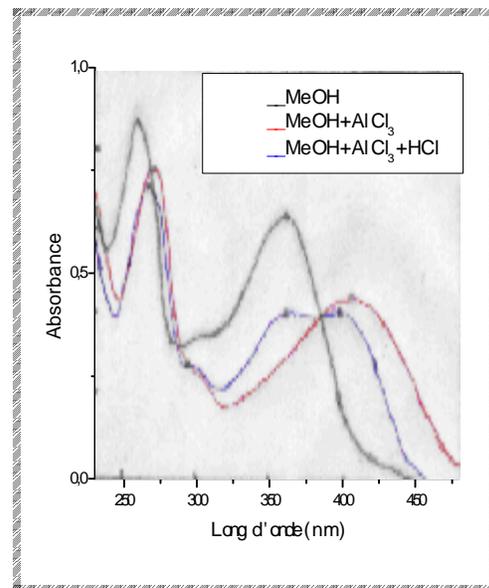
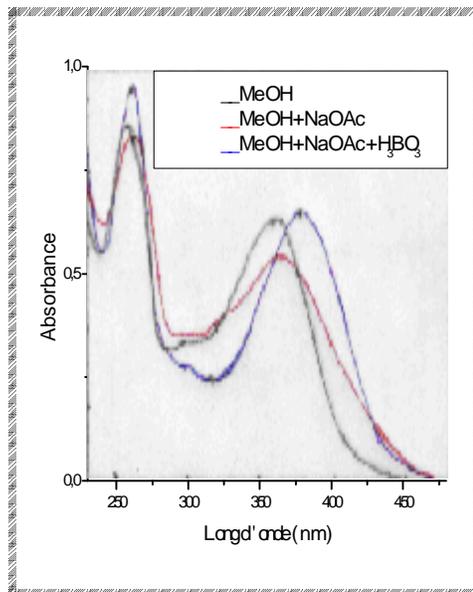
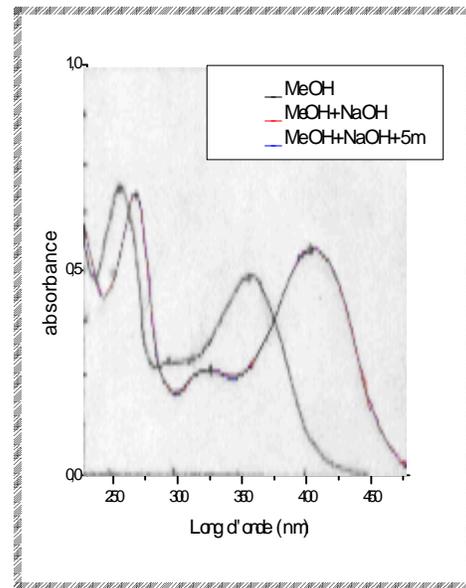
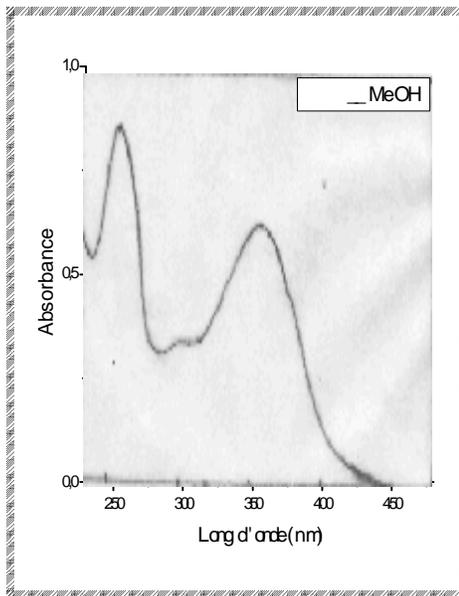
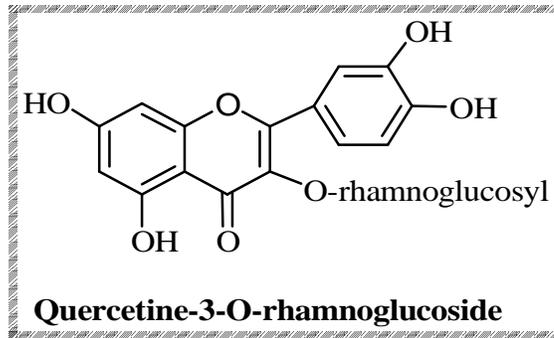
الإزاحة الكيميائية δ (ppm)	التكامل	ثابت التزاوج J (Hz)	الهيدروجين الموافق
7.60	1H	dd (8.7, 2)	H _{6'}
7.56	1H	d (2)	H _{2'}
6.79	1H	d (8.7)	H _{5'}
6.20	1H	d (2)	H ₈
6.03	1H	d (2)	H ₆
5.25	1H	d (7.2)	H _{1''} جليكوز
4.42	1H	br.s	H _{1'''} رامنوز
1.03	3H	d (5.9)	H _{6'''} (CH ₃ رامنوز)
3.80-3.20	10H		بقية بروتونات الجليكوز و الرامنوز

- Ø **الحلمة الحمضية**: تمت حلمة المركب في وسط حمضي (الصفحة 26) فحصلنا على:
- الشق الأجليكوني: تم قياس طيف UV في الميثانول و R_f للجزء الأجليكوني (مع المركب الأم للتأكد من حدوث تفاعل الحلمة).
 - الشق السكري: تم التعرف على السكريات المفصولة من المركب باستعمال شواهد سكرية وفق الطريقة المذكورة في (الصفحة 26).

التعليل:

يشير السلوك الكروماتوغرافي للمركب في الجمل المملصة (I, III) إلى كونه جليكوزيد ثنائي السكر. اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) وقيمة العصابة (I) في الميثانول λ_I (MeOH) = 359nm يدلان على وجود 3-OR (فلانول). إزاحة باتوكرومية $\Delta\lambda_I$ (NaOH/MeOH) = (49nm) تدل على وجود OH حر في الموضع 4 واستقرار الطيف في NaOH بعد 5 دقائق يؤكد غياب OH في C_3 . ظهور قمة جديدة عند 329nm بعد إضافة NaOH دليل على وجود 7-OH، ويؤكد ذلك الإزاحة الباتوكرومية (5nm) للعصابة II بعد إضافة NaOAc. عند مقارنة الطيف المسجل في MeOH مع الطيف المسجل في $HCl+AlCl_3$ نسجل إزاحة باتوكرومية (40 nm) للعصابة I دليل على وجود 5-OH. وجود مجموعتي OH بوضع أورثو على الحلقة B نستدل عليه من الإزاحة الهيسوكرومية عند مقارنة $AlCl_3+HCl$ مع $AlCl_3$ وكذلك الإزاحة الباتوكرومية (+20nm) عند مقارنة $NaOAc+H_3BO_3$ مع MeOH بالنسبة للعصابة I. (الشكل 21).

و للتأكد من طبيعة السكر قمنا بعملية الحلمة الحمضية للمركب CS_1 و قارنا R_f للشق السكري من المركب بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهدا الجلوكوز والرامنوز كما هو موضح في (الشكل 25) و حيث أن هيدروكسيل C_3 هو الوحيد المستبدل (مطيافية UV) فإن الجلوكوز و الرامنوز مرتبطين ببعضهما من جهة و من جهة أخرى بالأجليكون و عليه ومن المعطيات السابقة يمكن اقتراح الصيغة التالية للمركب:



الشكل 21: سلسلة أطياف UV للمركب CS₁ في MeOH ومختلف المفاعلات

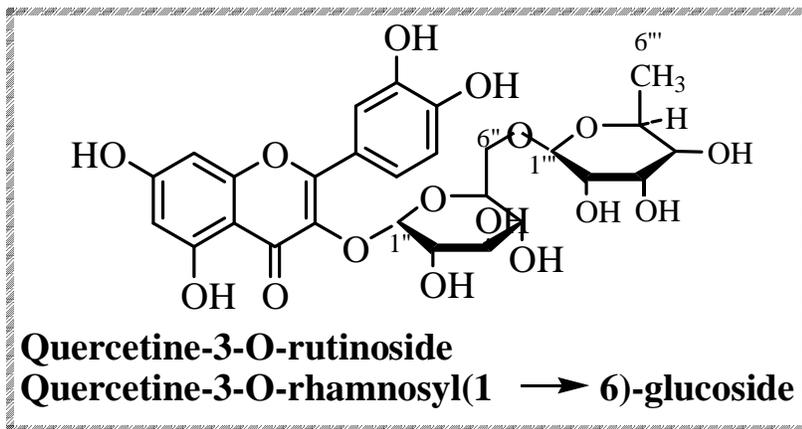
مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون فصلت في هذه الصيغة (الشكلين 22، 23) حيث ظهرت الحلقة B ثنائية الاستبدال عبر إشارات H_6' ، H_5' ، H_2' .

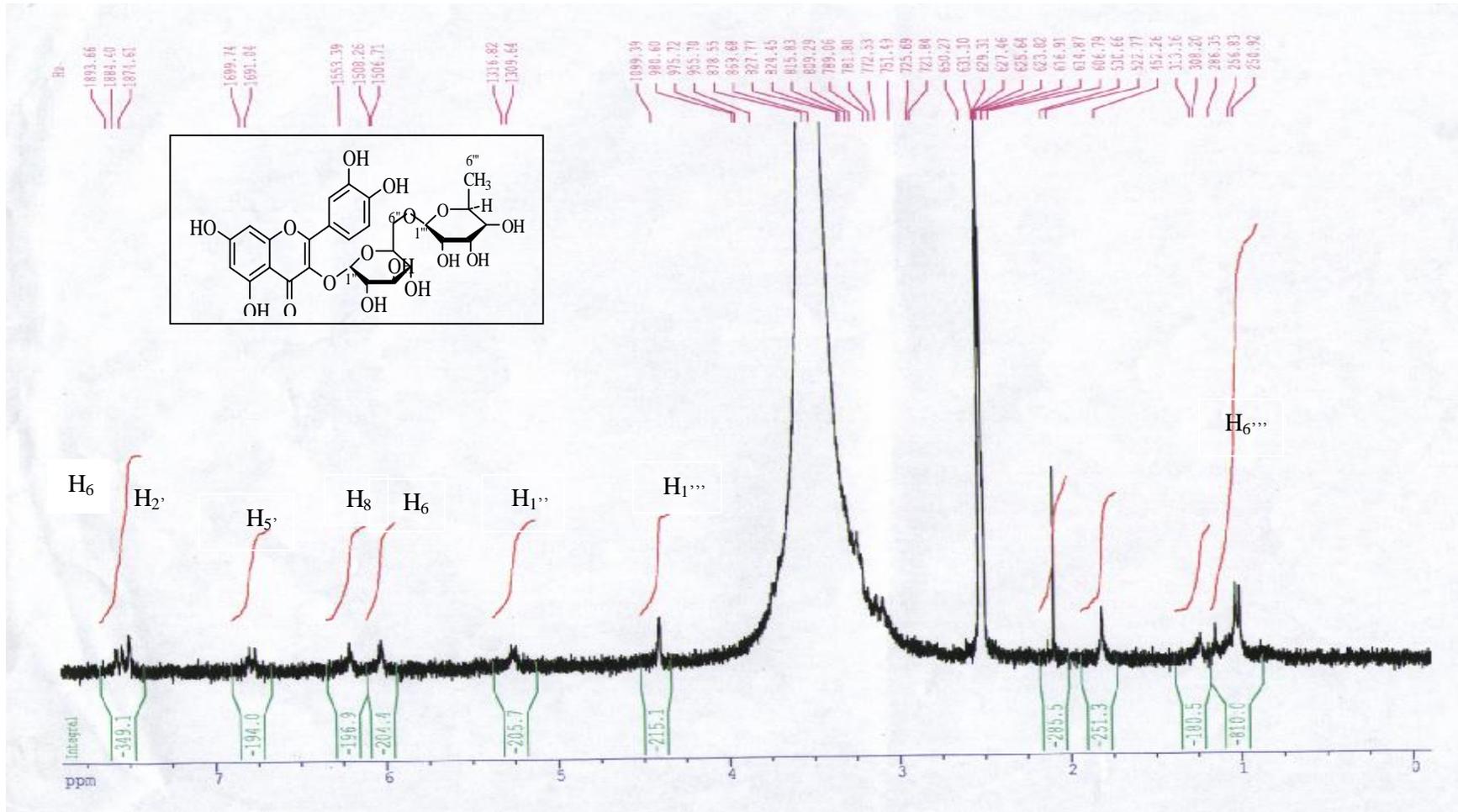
البروتون H_6' ظهر بإشارة (ثنائية- ثنائية) وبثابت تزواج ($J= 8.7, 2.0 \text{ Hz}$) عند $\delta = 7.60 \text{ ppm}$ كما ظهر بروتون H_5' كإشارة ثنائية ($J= 8.7\text{Hz}$) عند $\delta= 6.79 \text{ ppm}$ ، إشارة ثنائية ($J=2.0 \text{ Hz}$) موافقة للبروتون H_2' $\delta=7.56\text{ppm}$.

ظهرت الحلقة A كذلك ثنائية الاستبدال عبر إشارات H_6 و H_8 حيث ظهرت إشارة ثنائية ($J=2.0 \text{ Hz}$) موافقة للبروتون H_8 عند $\delta=6.20 \text{ ppm}$ وإشارة ثنائية ($J=2.0 \text{ Hz}$) موافقة للبروتون H_6 عند $\delta=6.03 \text{ ppm}$ و بالتالي ثبت أن الشق الأجليكوني هو مركب Quercetine .

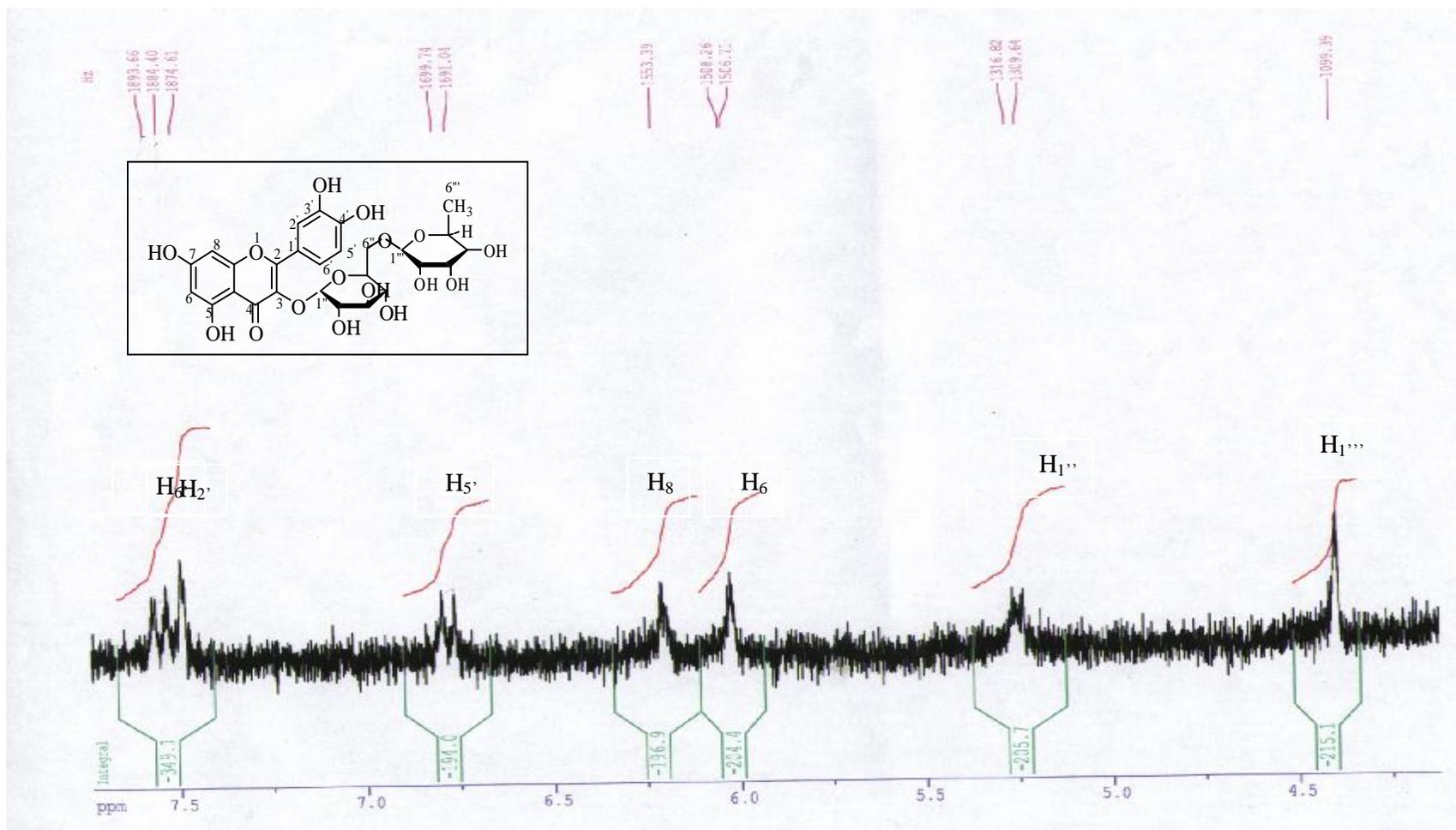
الجزء السكري من المركب ظهرت إشارة البروتون الأنوميري للجلكوز ($H_{1''}$) كثنائية ($J=7.2 \text{ Hz}$) عند $\delta = 5.25 \text{ ppm}$ بينما إشارة البروتون الأنوميري للرامنوز ($H_{1''}$) فظهرت كثنائية غير مكتملة (br.s) عند $\delta = 4.24 \text{ ppm}$ بينما

ظهر بروتون مثيل الرامنوز ($H_{6''}$) بشكل ثنائية ($J=5.9 \text{ Hz}$) عند $\delta=1.0\text{ppm}$. إن وجود إشارة ($H_{1''}$) في المجال $4.4-4.2 \text{ ppm}$ وكذا وجود إشارة بروتون مثيل الرامنوز ($H_{6''}$) في المجال $1.0-0.7 \text{ ppm}$ يدل على أن ارتباط الرامنوز بالجلكوز هو من الشكل 1 ← 6 وليس من النوع 1 ← 2 (أنظر الصفحة 26) . وعليه فالصيغة النهائية للمركب هي:





الشكل - 22 - طيف RMN^1H للمركب CS_1 في DMSO



الشكل -23- تكبير المجال (4.25-7.75 ppm) لطيف المركب CS₁

II- التعيين البنوي للمركب CS₂

1-2- اللون الإستشعاعي تحت الأشعة فوق البنفسجية: بنفسي

2-2- المعطيات الطيفية:

2-2- أ- طيف الأشعة فوق البنفسجية UV:

الجدول 21: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CS₁

الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)	قمم ونثوءات (نم)
MeOH	348	267	
NaOH	404	274	326
AlCl ₃	395	275	350 303
AlCl ₃ +HCl	395	275	350 303
NaOAc	367	274	305
NaOAc+H ₃ BO ₃	348	267	

Ø الحلمهة الحمضية: تمت حلمهة المركب في وسط حمضي فحصلنا على:

- الشق الأجليكوني: تم قياس طيف UV في الميثانول و R_f للجزء الأجليكوني (مع المركب الأم للتأكد من حدوث تفاعل الحلمهة).
- الشق السكري: تم التعرف على السكريات المفصولة من المركب وهما (جلوكوز+ رامنوز) وهذا باستعمال شواهد سكرية وفق الطريقة المذكورة سابقا.

التعليق:

يشير السلوك الكروماتوغرافي للمركب في مختلف الجمل المملصة إلى كونه جليكوزيد.

اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية وكذا قيمة العصابة (I) في الميثانول

λ_1 (MeOH) = 349 nm يدلان على أن المركب هو فلافونول مستبدل في الموقع 3.

الإزاحة الباتوكرومية المقدرة ب $\Delta\lambda_1$ (NaOH/MeOH) = + 55 nm تدل على وجود OH حر في الموضع 4 .

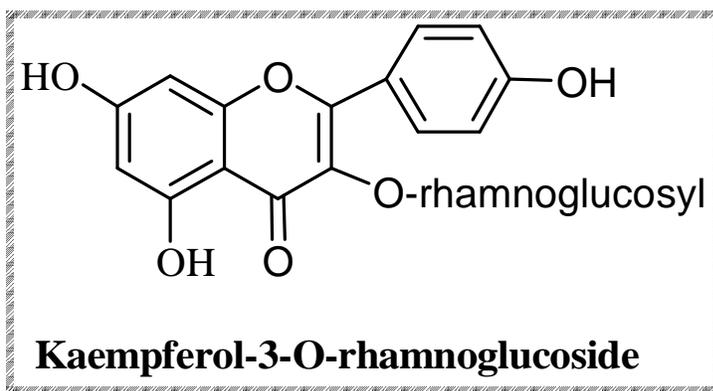
ظهور قمة جديدة عند طول الموجة $\lambda = 326$ nm يدل على وجود 7-OH، وتؤكد الإزاحة

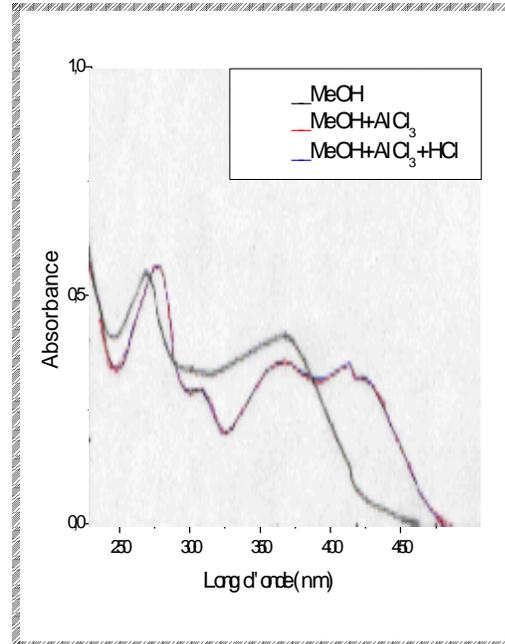
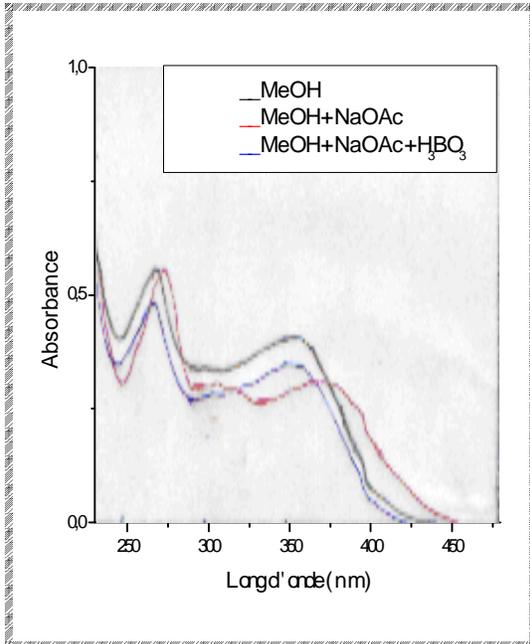
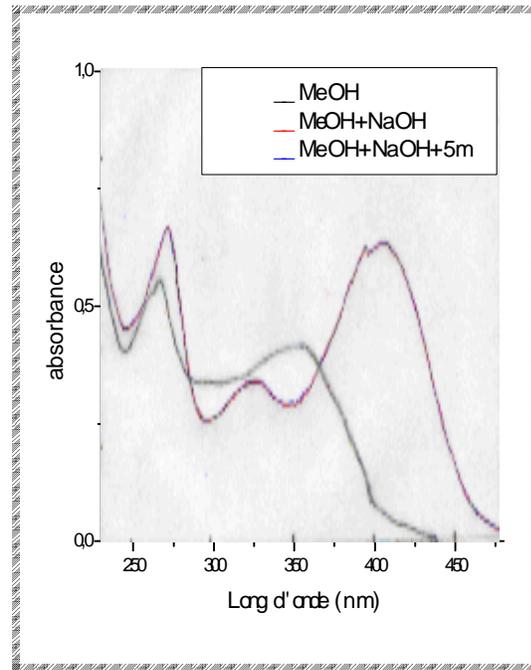
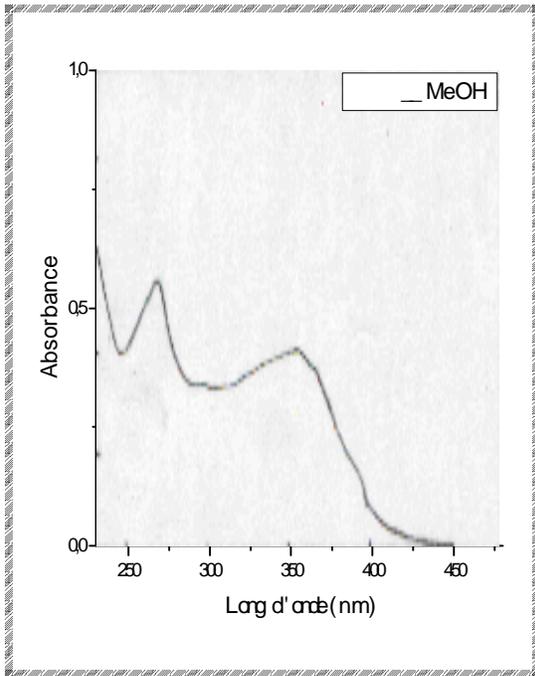
الباتوكرومية للعصابة II عند إضافة NaOAc $\Delta\lambda_{II}$ (NaOAc/MeOH) = +7nm.

عدم تغير طيف AlCl₃ بعد إضافة HCl دليل على غياب أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B.

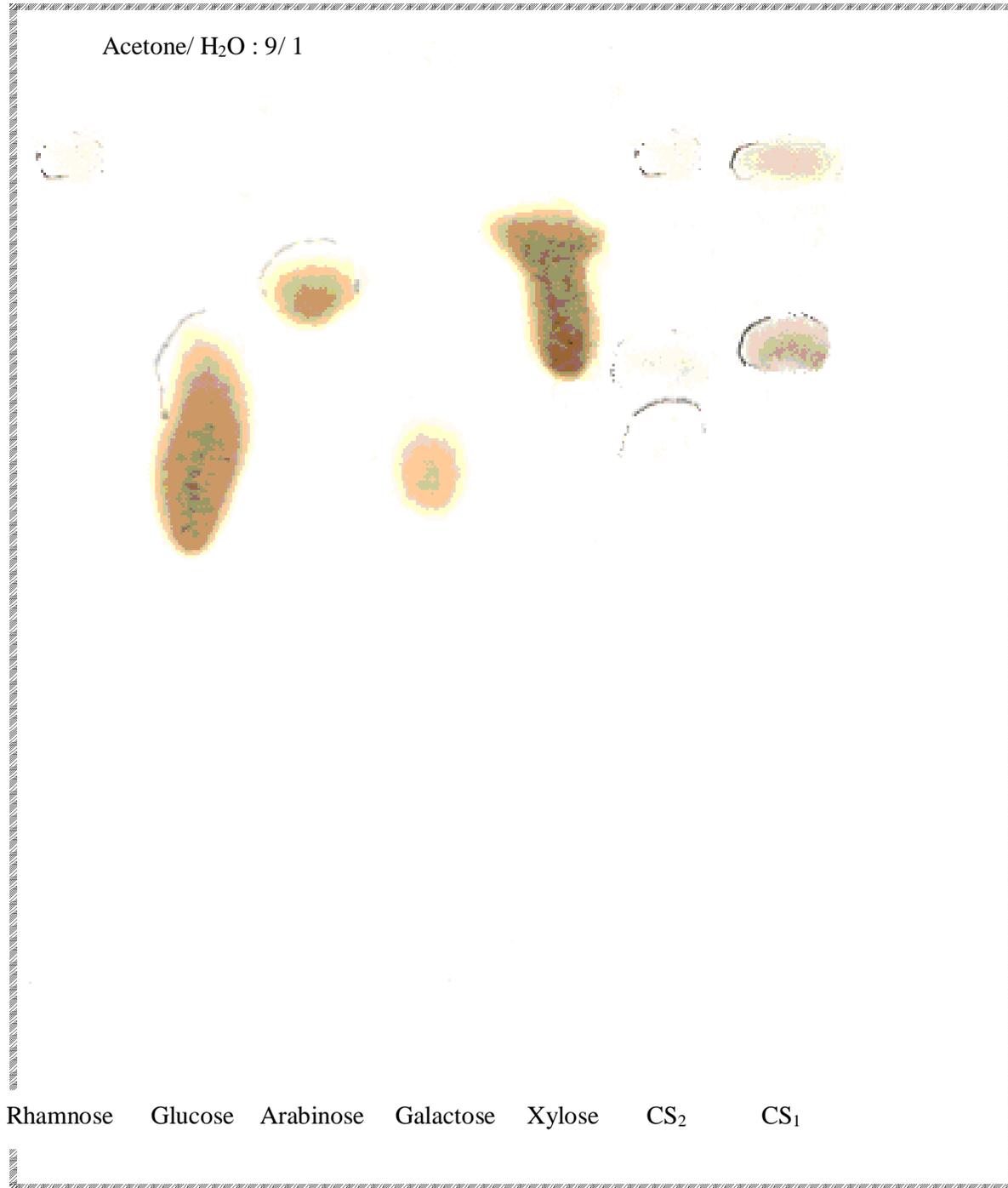
الإزاحة الباتوكرومية $\Delta\lambda_1$ (AlCl₃+HCl / MeOH) = +46 nm تدل على وجود 5-OH، الشكل (24).

و للتأكد من طبيعة السكر قمنا بعملية الحلمة الحمضية و قارنا الشق السكري لـ CS₂ بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهد الجلوكوز والرامنوز كما هو موضح في الشكل (24) أما موقع إرتباطه فمن خلال المعلومات الطيفية لدينا فقط الموقع 3 إذا صيغة هذا المركب هي :





الشكل 24: سلسلة أطياف UV للمركب في CS₂ في MeOH ومختلف المفاعلات



الشكل 25: كروماتوغرام السكريات المفصولة من المركبات مقارنة مع شواهد سكرية معروفة

3-I- التعيين البنوي للمركب CS₃:

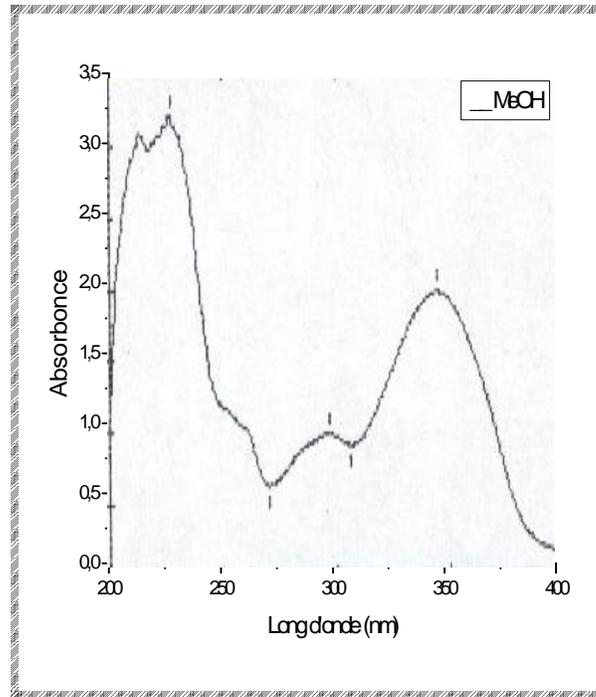
3-1- اللون الإستشعاعي تحت الأشعة فوق البنفسجية: أزرق

3-2- المعطيات الطيفية

3-2-أ- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:

طيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب أعطى ثلاث عصابات ذات القيم:

(الشكل 26) $\lambda_{\text{MeOH}} = 345, 297, 227 \text{ nm}$ على الترتيب



الشكل 26: طيف UV للمركب CS₃ في MeOH

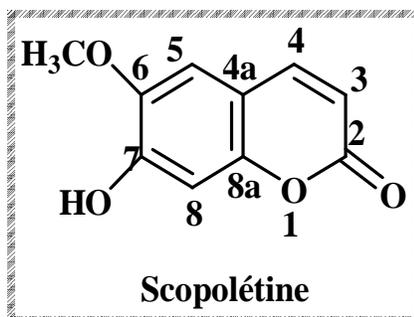
3-2-ب- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H :

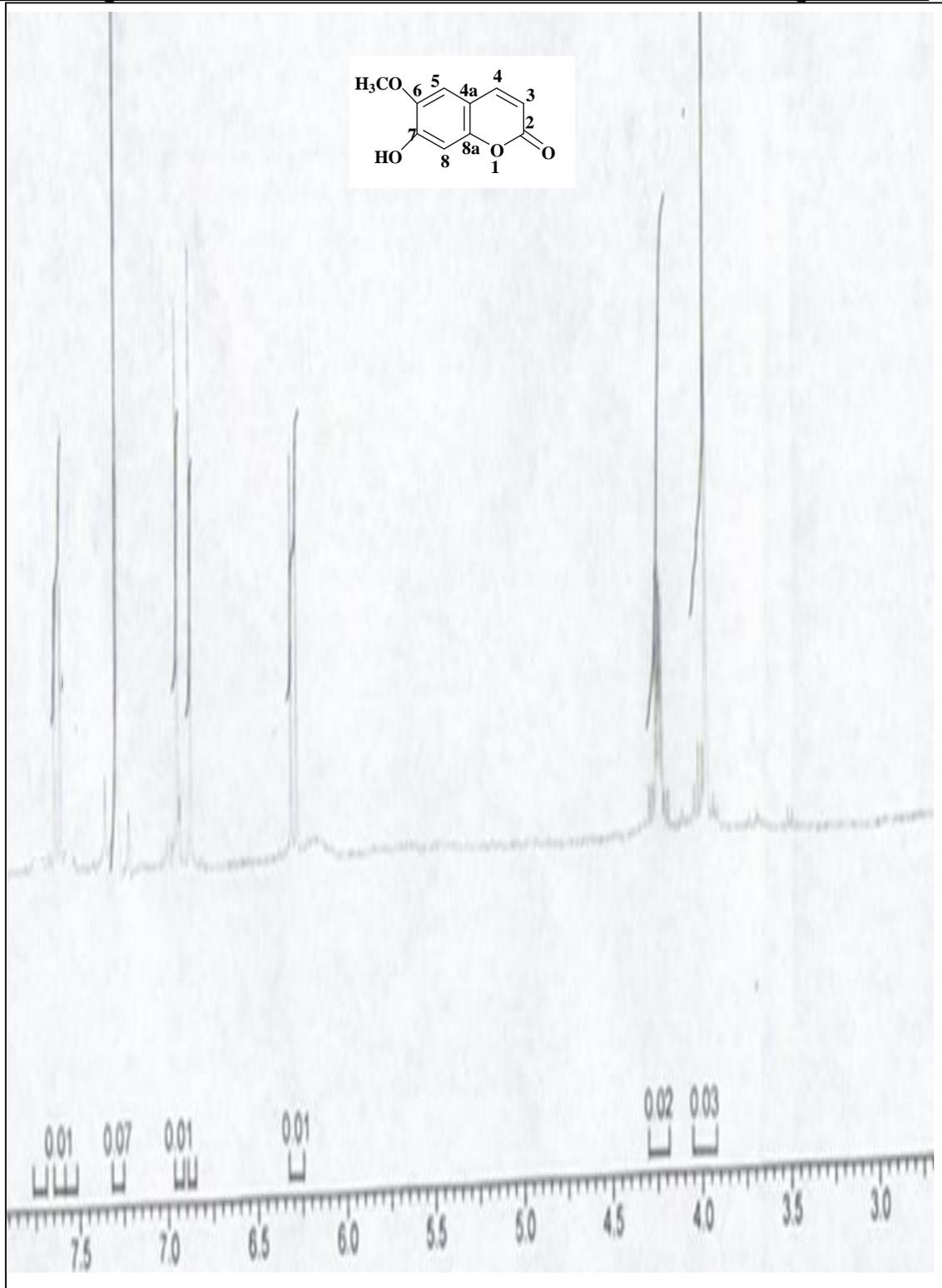
الجدول 22: نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب CS_3

الإزاحة الكيميائية (ppm) (δ)	التكامل	ثابت التزاوج (J) Hz	الهيدروجين الموافق
6.27	1H	d (9.5)	H_3
7.33	1H	d (9.5)	H_4
6.80	1H	s	H_5
6.95	1H	s	H_8
3.95	3H	s	OCH_3

التعليل:

لون المركب تحت UV وإستشعاع لونه عند تعرضه إلى أبخرة الأمونياك يوجهنا نحو مركب كوماريني، مطيافية $^1\text{H-RMN}$ أكدت صيغته (الشكل 27) حيث ظهر بروتوني حلقة البيرون H_3 و H_4 كل واحد بشكل ثنائية ($J=9.5 \text{ Hz}$) عند 6.27 ppm و 7.33 ppm على الترتيب، بينما ظهر بروتوني الحلقة البنزينية H_5 و H_8 بشكل إشارة أحادية لكل منهما. حيث يكون H_8 في مجال أدنى 6.95 ppm نتيجة التعرية الناتجة عن المجموعات الأوكسجينية ويظهر H_5 في مجال عال عند 6.80 ppm ، وأخيرا مجموعة ميثوكسيل تظهر بشكل إشارة أحادية عند 3.95 ppm. وبالتالي فالصيغة المقترحة للمركب CS_3 هي:





الغائمة

تمكنا من خلال هذه الدراسة التجريبية على نبات العوسج (*Lycium arabicum* Boiss.) المنتمي إلى العائلة البادنجانية باستعمال طرق كروماتوغرافية مختلفة وهي: كروماتوغرافيا العمود، كروماتوغرافيا الورق، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وبالإعتماد على الطرق الفيزيوكيميائية: التمييه الحمضي، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و المرئية (UV- Visible)، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ($^1\text{H-RMN}$). من فصل و تحديد البنى الكيميائية لمركبين فلافونيديين من المستخلص البوتانولي للأوراق و هما:

1- Quercetine-3-O-rhamnosyl (1 → 6)-glucoside (rutine)

2- Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside

ومركب كومارينيني من مستخلص ثنائي كلور الميثان للجذور وهو:

3- Scopoletine

ورغم قلة عدد المركبات المفصلة نشير إلى أن النبات يحتوي حسب الدراسات السابقة على قلويدات. و نطمح في المستقبل لدراسة الفعالية البيولوجية للمركبات المفصلة.

المنص

تركز اهتمامنا في هذا العمل على فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي لنبات *Lycium arabicum* L. وقد تمكنا من فصل 3 مركبات [مركبين فلافونيديين (1، 2) ومركب كوماريني (3)] معتمدين في ذلك على مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (كروماتوغرافيا العمود CC، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM، كروماتوغرافيا الورق CP).

باستعمال الإماهة الحمضية ومختلف الطرق الفيزيائية من مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV-Visible ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-NMR}$. تم التعرف على البنى الكيميائية للمركبات المفصولة:

- 1- Quercetine-3-O-rhamnosyl (1→ 6)-glucoside (Rutine)
- 2- Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside
- 3- Scopoletine

Abstract

In this work we are interested for the separation and identification of the secondary metabolites especially the flavonoids of the species: *lycium arabicum* L.

The use of the different methods of extraction and separation by different chromatographic techniques (column, paper and thin layer) permitted the separation of three compounds: Two flavonoid glycosides (1, 2) and one coumarin (3).

These compounds have been identified using physico - chemical techniques: acid hydrolysis, UV-Visible spectroscopy; nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$).

So the identified compounds are:

- 1- Quercetin-3-O-rhamnosyl (1 \longrightarrow 6)-glucoside (rutin).
- 2- Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside.
- 3- Scopoletin.

Résumé

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la séparation et l'identification des métabolites secondaires et particulièrement les flavonoïdes de l'espèce: *lycium arabicum* L.

L'utilisation des différentes méthodes d'extraction et de séparation par des techniques chromatographiques (colonne, papier et couche mince) a permis la séparation de trois composés: Deux flavonoïdes glycosides (1, 2) et une coumarine (3).

Ces produits ont été élucidés par les techniques physico-chimiques usuelles: L'hydrolyse acide, la spectroscopie UV-Visible, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN-¹H).

Les produits identifiés sont :

- 1-Quercétine-3-O-rhamnosyl (1 → 6)-glucoside (rutine).
- 2- Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside.
- 3- Scopoletine.