جامعة قاصدي مرباح ورقلة
كليــة الرياضيــات وعلــوم المــادة
قــسم الكــيمياء

رقم الترتيب: ـــ-

رقم التسلسل:

مذكــــرة تخــــرج لنـيل شهـــادة

مـــاســـتر أكـــاديمـــي

مجـــال: عـــلوم الـمادة

فـــــرع: كيـــمياء

تخصـص: كيـــميـاء مـــطبقـــة

من إعداد: حلـــــوة أمـــال

الموضوع

المساهمة في دراسة واستخلاص الفلافونيدات لنبتة طبية من العائلة الرمرامية (Chénopodiacées)

نوقشت يوم: 2014/06/09

أمام اللجـــنـة المكـــونة مـــن

رئيسا	الوناس علي	أستاذ محاضر (أ)	جامعة قاصدي مرباح ورقلة
مناقشا	دحاك كريمة	أستاذة محاضرة (أ)	جامعة قاصدي مرباح ورقلة
مؤطر	دندوقي حسين	أستاذ التعليم العالي	جامعة قاصدي مرباح ورقلة
مساعد مؤطر	سماره ونيسة	أستاذ مساعد(أ)	جامعة قاصدي مرباح ورقلة

الموســـم الجامـــعي: 2013- 2014

إهداء

بسم الله الرحمن الرحم

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،

والداي الغاليين، فبفضل الله ثم جهودهما وصلت إلى ما أنا فيه الآن .أسال الله

أن يمتعهما بالصحة والعافية، و أن يطيل في أعمارهما في الخير

إلى رفيق دربي الذي كان عوننا وسندا لي حفظه الله

إلى كل أخوتي الأعزاء من أكبرهم إلى أصغرهم حفظهم الله

إلى أختي الغالية رجـــــــاء

إلى كل أفراد دفعتي دون استثناء،

إلى جميع الأصدقاء

إلى كل هؤلاء اهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع

شكر و عرفان

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

أولا أتقدم بجزيل الشكر والإمتنان إلى الأستاذ المشرف، الأستاذة الفاضلة :
سمارة ونيسة صاحبة البصمة الأولى في هذا البحث على كل النصائح و المساعدات،و
على كل مجهوداتها في توفير كل الإحتياجات و المتطلبات، ودعمها الكبير لي
للوصول للمنهج العلمي الصحيح والهادف. كما أشكرها على المعاملة الطيبة التي
حضيت بها من قبلها .

كما أتقدم كذلك بأتم وأصدق عبارات الشكر و العرفان و الاحترام إلى لأستاذ
الفاضل دندوقي حسين.

أتقدم بجزيل الشكر للأستاذ الوناس علي على قبوله رئاسة اللجنة.

أتقدم بجزيل الشكر إلى الأستاذة دحاك كريمة على قبولها مناقشة هذه الرسالة

أتقدم بالشكر الجزيل إلى جميع أفراد العائلة.

كما لانسى جميع افراد المخبر خاصة أسماء، أنيسة .

كما لا أنسى أن أتقدم بالشكر الجزيل والإمتنان والمحبة إلى الذين حملوا أقدس رسالة
في الحياة والى الذين مهدوا لي طريق العلم والمعرفة إلى جميع أساتذتي وأستاذاتي
الأفاضل كل باسمه .

وفي الأخير لا يفوتني أن أتقدم بأصدق عبارات الشكر و العرفان إلى زملائي و
زميلاتي في دفعة ماستر كيمياء مطبقة كل باسمه على روحهم المرحة والطيبة وكل
المساعدات التي قدموها لي، كما لا أنسى أن أشكركل الأصدقاء والزملاء وكل من
ساهم في إتمام هذا العمل والبحث من قريب أو من بعيد.

الفهـــــــــــــرس

	المقدمة.....	1
	المراجع.....	
الجانـــب النظـــري		
الفصل الأول:الدراسة الببليوغرافية		
I	مدخل.....	3
II	العائلة الرمرامية (*Chénopodiacées*).....	3
III	الجنس *Atriplex*.....	4
1- III	النوع *Atriplex halimus* L.....	4
2- III	التصنيف النظامي لنبات القطف (*Atriplex halimus* L.).....	6
IV	التوزيع الجغرافي لنبات القطف (*Atriplex halimus* L.).....	7
V	الاستعمالات التقليدية لنبات القطف (*Atriplex halimus L.*)	8
1-V	من الناحية الزراعية.....	8
2-V	من الناحية الرعوية.....	8
3-V	من الناحية الصيدلانية.....	8
VI	دراسات سابقة حول النبتة.....	9
1-VI	تقدير نسبة الفينولات.....	9
2-VI	تقدير نسبة الفلافونيدات.....	9
3-VI	تقدير نسبة التانات	9
	المـــراجـع	
الفصل الثاني :عموميات حول الفلافونيدات		
	أولا: الفلافونيدات	
1-I	مدخل.....	10
2-I	تعريف الفلافونيدات.....	10
3-I	توزيعها وتواجدها في النباتات.....	11
4-I	أهمية الفلافونيدات.....	11
1-4-I	أهميتها في التغذية.....	11

2-4-I	أهميتها الفسيولوجية	11
3-4-I	أهميتها البيولوجية والعلاجية	12
5-I	أنواع الفلافونيدات	12
6-I	الاصطناع الحيوي للفلافونيدات	17
7-I	الاصطناع الحيوي لمختلف هياكل الفلافونيدات بدءا من الشالكون.....	19
	ثانيا:الدراسة الكيميائية للفلافونيدات	
1-II	ذوبانية الفلافونيدات	23
2-II	استخلاص الفلافونيدات	23
3-II	الكشف عن الفلافونيدات	23
4-II	الفصل والتنقية	24
1-4-II	كروماتوغرافيا العمود (CC)	24
2-4-II	كروماتوغرافيا الورق(CP).....	25
3-4-II	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(CCM).....	25
	ثالثا:الدراسة البنيوية للفلافونيدات	
1-III	الخواص الكروماتوغرافيا	27
2-III	اللون الاستشعاعي.....	**27**
3-III	ثابت الانحباس R_f.....	**27**
4-III	الطرق الطيفية	**28**
	المـــراجـع	
	الجانــب التطبيـقي	
	الفصل الثالث:الدراسة الفيتو الكيميائية	
I	مدخل	31
II	المادة النباتية	31
III	الدراسة الكيميائية	32
1-III	تمهيد	32
2-III	عملية الاستخلاص	32
IV	الدراسة الكروماتوغرافيا	37

1-IV	الدراسة الكروماتوغرافيا بواسطة الطبقة الرقيقة (CCM)	37
2-IV	الدراسة الكروماتوغرافيا بواسطة الورق(CP)	45
V	التحليل الكمي للمركبات الفينولية	49
1-V	تقدير الفينولات الكلية	49
2-V	تقدير الفلافونيدات	51
	المـــراجـع	
	الـخـاتمـة	
	المـــلحـق	

فهـــــرس الجـــــداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
الجانب النظري		
الفصل الثاني: عموميات حول الفلافونيدات		
الجدول (I–1)	مختلف أنواع الفلافونيدات	13
الجدول (I–2)	الإنزيمات المستخدمة لتكوين حمض Ac.p–coumarique	18
الجدول (I–3)	الأقسام الرئيسية للفلافونيدات	22
الجدول (III –4)	العلاقة بين اللون الاستشعاعي والهيكل الفلافونيدي	27
الجدول (III –5)	العلاقة بين R_f والبنية الفلافونيدية	28
الجدول (III –6)	أهم الانزياحات الملائمة للعصابتين I و II في الوسط الميثانولي	29
الجدول (III –7)	تأثير الكواشف علي الطيف UV	30
الجانب العملي		
الفصل الثالث: الدراسة الفيتو كيمائية		
الجدول (III –1)	قيم مردود الاستخلاص الأولي	33
الجدول (III –2)	قيم مردود الاستخلاص	37
الجدول (IV–3)	نتائج الفصل الكروماتوغرافي لمستخلص البيوتانول	41
الجدول (IV–4)	نتائج الفصل الكروماتوغرافي لمستخلص خلات الايثيل	41
الجدول (IV–5)	نتائج الفصل الكروماتوغرافي لمستخلص الكلوروفورم	44
الجدول (IV–6)	نتائج الفصل الكروماتوغرافي الورق لمستخلص البيوتانول	47
الجدول (IV–7)	نتائج الفصل الكروماتوغرافي الورق لمستخلص خلات الايثيل	48
الجدول (V–8)	كمية الفينولات في المستخلصات	50
الجدول (V–9)	كمية الفلافونيدات في المستخلصات	53

فهـــــرس الأشكـــــــال

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
الجانب النظري		
الفصل الأول: الدراسة الببليوغرافية		
الشكل (1)	صورة فوتوغرافية لنبات القطف Atriplex halimus	5
الشكل (2)	صورة فوتوغرافية لأوراق نبات القطف Atriplex halimus	5
الشكل (3)	التوزيع المكاني لنبات القطفAtriplex halimus في الجزائر	7
	الفصل الثاني:عموميات حول الفلافونيدات	
الشكل (I-1)	الهيكل الأساسي للفلافونيدات	10
الشكل (I-2)	تحول Ac.p-coumarique إلى p- coumaroyl - CoA	17
الشكل (I-3)	تشكيل Malonyl coA انطلاقا من Acètyl و CO_2	18
الشكل (I-4)	تشكيل الشالكون	19
الشكل (I-5)	ترافق مجموعة الكربونيل مع كل من الحلقتين A و B	29
الجانب العملي		
الفصل الثالث:الدراسة الفيتو كيمائية		
الشكل (III-5)	طريقة الاستخلاص	36
الشكل (IV-2)	كروماتوغرام الطبقة الرقيقة للمستخلصي البيوتانول وخلات الايثيل	40
الشكل (IV-3)	كروماتوغرام الطبقة الرقيقة للمستخلص الكلوروفورم	43
الشكل (IV-4)	كروماتوغرام الورق للمستخلص البيوتانول (الاوراق)	45
الشكل (IV-5)	كروماتوغرام الورق للمستخلص البيوتانول (السبفان)	46
الشكل (IV-6)	كروماتوغرام الورق للمستخلص خلات الايثيل (الاوراق)	46
الشكل (IV-7)	كروماتوغرام الورق للمستخلص خلات الايثيل (السيقان)	47

الشكل (V-8)	منحنى معايرة d'acide gallique	49
الشكل (IV-9)	كمية الفينولات الكلية في المستخلصات	51
الشكل (IV-10)	منحنى معايرة الكرستين (*Quercetine)*	52
الشكل (IV-11)	كمية الفلافونيدات الكلية في المستخلصات	53

الملـــحـــق

الشكل رقم (1)	ميزان تحليلي لقياس الأوزان
الشكل رقم (2)	مطحنة Broyeur
الشكل رقم (3)	جهاز ر التبخير والتقطير الدوراني (Rota vapeur)
الشكل رقم (4)	جهاز الرج
الشكل رقم (5)	جهاز مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV
الشكل رقم (6)	جهاز التحليل الطيفي

فهـــــرس المخـــــططات

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
الجانب النظري		
الفصل الثاني: عموميات حول الفلافونيدات		
المخطط (I–1)	مختلف أنواع الفلافونيدات حسب تأكسد الحلقة البيرانية	16
المخطط (I–2)	الاصطناع الحيوي للمختلف الأقسام الفلافونيدية	20
الجانب العملي		
الفصل الثالث: : الدراسة الفيتو كيمائية		
المخطط (II –1)	مراحل استخلاص الأوراق	34
المخطط (II –2)	مراحل استخلاص السيقان	35

مقدمة عامة

مقدمة عامة:

خلق الله النباتات على الكرة الأرضية قبل أن تطأها قدم إنسان أو حيوان، لان النباتات هي الغداء الأساسي لكل مخلوق حي؛ وبدونه لا وجود للحياة، ومنذ أن خلق الله الإنسان والحيوان وجدت الأمراض التي تنتابهما.

وكما أن الله، جل جلاله، قد جعل النباتات غداء فقد اوجد فيه أيضا الدواء للأمراض.و أعطى الحيوان الذي لا عقل له ولا فكر غريزة الاهتداء إلى نوع النبات الذي يشفيه من مرضه، وترك الإنسان العاقل آن يهتدي إلى النباتات الشافية من الأمراض بالدراسة والتجارب والاستنتاج. [1-2]

إن النباتات والأعشاب الطبية باختلافها على النباتات الأخرى تحوى مواد لها تأثير طبي فعال، وان لم يعبر الشكل الظاهري للنباتات عن وجودها فيه أو غيابها منه ؛ فقد اثبت الدراسات الكيميائية لغالبية هذه النباتات أنها غنية بهده المواد الفعالة على سبيل المثال المركبات الفينولية (les composés phénoliques) فهي تشكل حيزا كبير في حقل المنتجات الطبيعية رغم كثرة عددها وتباين هياكلها، ومن أهم المركبات الفينولية التي تحتويها النباتات الطبية هي الفلافونيدات (les flavonoïdes) التي تختلف نسبة تواجدها من نبات لآخر، تم استخلاصها والكشف عنها بالطرق الكروماتوغرفية المختلفة التي تطبق لفصل المواد الكيمائية وتحليلها كميا ونوعيا مهما كانت هذه المركبات الفعالة [3-7].

نظرا لتعدد المناخ بالجزائر أدى الى إمتلاك ثروة هائلة من نباتيات الطبية والعطرية. هذه الاخيرة تنتشر في مساحات شاسعة ومتفرقة، وفي بيئات مناخية مختلفة. كالسواحل و المناطق الصحراوية. هذا الغطاء النباتي منها ما هو موسمي يظهر بعد هطول الأمطار ويختفي عند الجفاف ومنها ما هو معمر. من اجل تثمين هذه الثروة النباتية وقع اختيارنا على عائلة Chénopodiacées التي تعتبر من أرقي العائلات النباتية المتواجدة في الجزائر و بهدف دراسة نواتج الأيض الثانوي (الفلافونيدات) تم اختيارنا لنوع *Atriplex* halimus L.

قسم عملنا إلى ثلاث فصول:

- الفصل الأول: يضم دراسة البيليوغرافية عن العائلة المدروسة (Chénopodiacées)، وكذا الجنس *Atriplex* و النوع (*Atriplex halimus*)، وتطرقنا إلى دراسة سابقة حول الموضوع .

- الفصل الثاني :يضم دراسة شاملة حول الفلافونيدات، توزيعها، تواجدها، واصطناعها الحيوي وأهميتها، بعدها تطرقنا بإيجاز إلى طرق الاستخلاص والفصل.

– الفصل الثالث: خصص للطريقة العملية المتبعة خلال هذا البحث من الاستخلاص إلى الفصل، ثم إلى معايرة (تقدير) نسبة الفينولات و الفلافونيدات في المستخلصات المتحصل عليها إضافة إلى نتائج البحث و مناقشتها

المراجع العربية :

[1] رويحة ايمن .، "التداوي بالاعشاب بطريقة علمية تشمل الطب الحديث والقديم ". الطبعة السابعة . 1973.ص10

[4] م، سلالمة .،م .الهاشمية.، " الأعشاب والنباتات الطبية والعطرية كإضافات غذائية للمجترات ".عدد1285. 2005

[5] م، السيد هيكل.،ع . عبد الرزاق عمر.،"النباتات الطبية والعطرية (كيمياؤها، انتاجها، فوائدها) ".الطبعة الثانية . 1993 ،ص7- 13

المراجع الفرنسية :

[2] http://www.m3loma.com/nabat/.(ed en arabe 2. Mills, S.Y. (2002) « ESCOP Research Committee and European. Phytotherapy Research Group ».

[3] Medié-Sarié, M., Jasprica, I., Smoleié-Bubalo., A. Mornar, A., "Optimization Of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids". *Croatica Chemica Acta* . 2004.77(1-2). P: 361-366

[6] Richter, G.," métabolisme des végétaux physiologie et biochimie ". Polyte chimique et universitaires ronandes . 1993. P: 317

[7] Mahyzier, G., Hamon, M., " Abrège de chimie Analytique".1990. Tome 2. Ed .Masson, paris, P:8-235.

الجانب النظري

الفصل الأول

الدراسة البيلوغرافية

I- مدخل :

في السنوات الأخيرة الجنس *Atriplex* وعلى وجه الخصوص النوع *halimus (A. halimus L)* كان محل دراسة من حيث قدرته على التكيف مع المحيط ، وطاقته الإنتاجية، والإستنساخية (تغير في جيناتها) لتقيم مستويات وأنماط الجينات لهذه الأنواع ثم العثور على 99عينة منها 11عينة موجودة في المغرب و 9عينات في الولايات المتحدة الأمريكية وبالرغم من عمليات الاستنساخ الكبيرة لهذا النوع إلا أن الفروق بينها ليست كبيرة (5.87 ٪) من مجموع الاختلافات الجينية [1،2].بينما في الجزائر إلى حد الساعة لم نستطع معرفة عدد العينات الموجودة. ولقد حضت بأهمية كبيرة في مجال الزراعة، وفي مجال الرعي وخاصة من الناحية الصيدلانية لاحتوائها علي المركبات الفينولية ومن أهمها الفلافونيدات، ، ينتمي هذا النوع للعائلة الرمرامية من أصل حوض البحر الأبيض المتوسط [2].

II- العائلة الرمرامية (Chénopodiacées):

هي عائلة كبيرة نسبيا من الأعشاب المعمرة و تضم حوالي 100 جنس و150 نوع، معظم ما تضمه هذه العائلة من النباتات هي أعشاب و شجيرات لكن تضم أيضا بعض الشجيرات الطويلة و أشباه أشجار .و قد يكون (الجذع ، الساق) عشبيا أو خشبيا و غالبا عصيري في العديد من الحالات الأوراق تكون متبادلة، أو متقابلة، مسطحة أو اسطوانية، أو بيضاوية عصيرية، أو مختزلة إلى حراشف صغيرة و أحيانا تكون شوكية إلى شوكية من الطرف الأعلى. الأزهار صغيرة ثنائية الجنس، أو أحيانا أحادية الجنس. المبيض ضخم ذو حجرة واحدة و يكون ثمرة وحيدة البذرة ، ربما تبدو الثمرة محمية في بعض الأجناس بسبب فصوص الغلاف الزهري المستديم التي تكون أجنحة [3].

✓ التوزيع الجغرافي:

تنتشر العائلة الرمرامية حول العالم بكثرة في المناطق الجافة، والشبه الجافة و المالحة والمناطق الاستوائية، خاصة في المناطق الساحلية للبحر الأبيض المتوسط، البحر الميت، البحر الأحمر، الصحاري الجافة، في وسط وشرق أسيا، وفي الولايات المتحدة الأمريكية، في استراليا ، وفي سهول الأرجنتين. وتنتشر كذلك هذه العائلة من النباتات على الأراضي الخصبة المالحة بالأخص اتجاه سيلان المياه [3]

III- الجنس *Atriplex* :

الجنس *Atriplex* الاسم الشائع له هو القطف، الأكثر شيوعا لعائلة الرمرامية (Chénopodiacées)، وتضم حوالي 400 نوعا موزعة على المناطق المعتدلة وشبه الاستوائية و مختلف المناطق القاحلة وشبه القاحلة في العالم وخاصة في إفريقيا، يشمل هذا الجنس أنواع كثيرة حيث تضم مناطق حوض البحر الأبيض المتوسط 48 نوعا ومن بين هذه الأنواع *Atriplex halimus L* [5].

III-1 النوع *Atriplex halimus L.*:

Atriplex halimus L هو نبات ملحي، يمكن أن يصل طوله إلى مترين، أوراقه مثلثة الشكل عصارية خضراء باهتة ، والسيقان بنفسجية اللون ، ذو طعم مالح له أزهار صغيرة صفراء من شهر افريل إلى ماي تخلف ثمارا جامدة بيضوية الشكل [5،6].

الشكل(1) صورة فوتوغرافية لنبات القطف (*Atriplex halimus*)

الشكل(2) صورة فوتوغرافية لأوراق نبات القطف(*Atriplex halimus*)

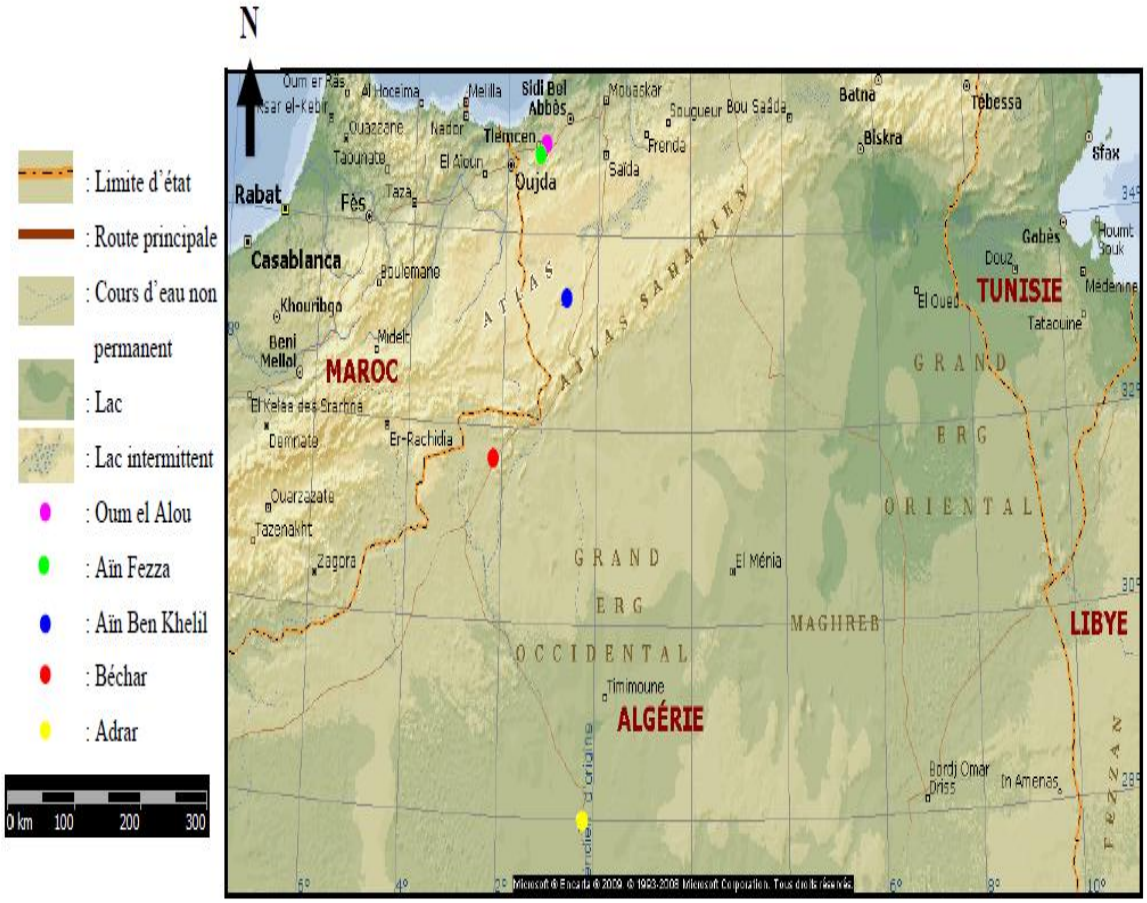
III-2 التصنيف النظامي لنبات القطف (*Atriplex halimus L.*) :[5،7،8]

الاسم العلمي : ***Atriplex***			
الاسم الشائع : **القطف**			
الأسماء بالفرنسية : **pourpier de mer , Aramass**			
الأسماء العربية : **يطلق على نبتة القطف عدة أسماء عربية منها السرمق، الملوخ، الحليم. وبالأمازيغية الهرمس**			
الفرع	نباتات بذرية	Spermaphytes	**Embranchement**
تحت الفرع	كاسيات البدور	Angiospermes	**Sous-embranchement**
الصنف	ثنائية الفلقة	Dicotylédone	**Classe**
تحت الصنف	–	Caryophyllida	**Sous- classe**
الرتبة	قرنفليات	Caryophyllales	**Sous- classe**
العائلة	الرمرامية	Chénopodiacées	**Famille**
الجنس	–	*Atriplex*	**Genre**
النوع	–	*Atriplex halimus L*	**Espèce**

IV - التوزيع الجغرافي لنبات القطف (L ***Atriplex halimus***):

نبتة تتواجد في الفيافي، يمكن أن نجدها في المناطق الصحراء الشمالية في الأماكن ذات التربة المالحة، وفي الأماكن المعزولة داخل الفيافي، وفي جبال الصحراء الوسطى [6]. تم العثور على هذا النبات في جميع أنحاء الجزائر، سواء في الصخور أو منحدرات الطين [9].

ويبين الشكل التالي أماكن تواجد نبات القطف بالجزائر: [6]



الشكل (3): التوزيع المكاني لنبات القطف (*Atriplex halimus*) في الجزائر

- الاستعمالات التقليدية لنبات القطف (*Atriplex halimus* L)

V-1 من الناحية الزراعية :

يختار علماء الزراعة القطف من بين النباتات المقاومة للجفاف الناجم عن نقص المياه سواء المطرية أو الري الصناعي، وارتفاع نسبة الأملاح سواء في التربة أو مياه الري، ومقاوم لدرجة الحرارة العالية. وبالتالي يمكن زراعتها في الأراضي المستديمة بعد سقوط الأمطار لتترك بدون ري انتظارا لأمطار العام التالي، كما تستخدم الشجيرات في تثبيت الكثبان الرملية، كما انه يتحمل الملوحة بدرجة كبيرة حيث يمكنها التخلص من الأملاح بإفرازها عن طريق تكوين حويصلات صغيرة مملوءة بالملح على أسطح الأوراق ما

تلبث أن تنفجر تاركة الأملاح خارج النبات، فهو يزرع للتخلص من ملوحة التربة، ومفيد أيضا في إعادة تأهيل المراعي المتدهورة ،كما تستخدم أيضا في عملية الاستنساخ (تغير في جيناتها) تستعمل للزينة في الحدائق والشوارع.[11]

V-2 من الناحية الرعوية :

يعتبر نبات القطف من أهم شجيرات البرية الهامة في استغلاله كغذاء للحيوانات فهو محبب من طرف الحيوانات أكلات العشب خاصة الإبل والغنم، فتكتسب هذه الحيوانات أملاح معدنية مثل Ca , K ,Na [2،11].

V- 3 من الناحية الصيدلانية :

كان في فترات ما قبل السبعينيات نبات القطف يمثل جانبا من الأطعمة التي يتناولها الناس لأنه يحتوى على مادة البروتين بنسبة عالية، يصل معدل هضمه إلى 72%، وتتميز بروتينات نبات القطف بسهولة هضمها كما أن أوراقه تؤكل طازجة، فهو غني بفيتامين(أ)وما لبث إن أصبح مادة تستخدم كعلاج للاستشفاء، فمستخلص النبات يستخدم كمسكن ومهدئ لآلام، و الالتهابات وقد نفعت للأكياس بأنواعها، للكوليسترول، للمرض السرطان ولكن في حالته الأولية، لأمراض الرحم، وللغدة الدرقية، للمرض السكر. يستعمل في الحمية المعتمدة على الحليب واللحوم، ولكن تأثير هذه الحميات على أداء الحيوانات غير معروف،كما يستعمل كذلك لمعالجة السمنة [1،6] .

VI- دراسات سابقة حول النبتة :

المركبات المضادة للأكسدة هي موضوع دراسات عديدة لأنه بالإضافة إلى استخدامها كمواد حافظة في المواد الغذائية عن طريق استبدال المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية بالمواد المؤكسدة الطبيعية، هذه المواد تستعمل في علاج الكثير من الأمراض. في إطار اكتشاف مواد جديدة مضادة للأكسدة من المصادر الطبيعية وجدنا دراسة سابقة حول هذا الموضوع والذي يهتم بدراسة المركبات الفينولية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة لعشرة (10) مستخلصات نباتات طبية ومن بينها النبتة المختارة للدراسة *Atriplex halimus L.*[5]

VI-1 تقدير نسبة الفينولات:

تم تحديد المحتوى الفينولي لمستخلص نبات *Atriplex halimus* باستخدام كاشف Folin–Ciocalteu [11،15]

وبعده يتم قياس الامتصاصية عند 765 nm بالاستخدام (acide gallique) كمرجع، وبالاستعانة بجهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجيّ وجد أن محتوى الفينولات في المستخلص يساوي (3.776 ± 0.067) mg EAG/g MS

VI- 2 تقدير نسبة الفلافونيدات:

أما بالنسبة للفلافونيدات فإن تحديد كميتها يكون بإستعمال الطرق اللونية [12،15] وذلك بإضافة نثراث الصوديوم ($NaNO_2$)، وكلور الالمنيوم ($AlCl_3$) وتقاس الامتصاصية عند 510 nm في الميثانول. وجد أن محتوى الفينولات في المستخلص يساوي (0.035 ± 0.564) mg EAG/g MS

VI-3 تقدير نسبة التانات:

تحدد كمية التانات بإستعمال طريقة الفانيلين (vanilline) في وسط حمضي وفي درجة حرارة الغرفة [13،15] وتقاس الامتصاصية عند 250 nm. وجد أن محتوى التانات في المستخلص يساوي (0.169 ± 1.421) mg EAG/g MS

[1] luig, S.,dario, G.,gaetano., A,giussppe., D.M. "productivity of Atriple hilimus Shrubbery and effects of grazing on lambs".J.anim.Scl.2009.8 p:549-551

[2] Bouda, S. L.E., Herinandez,M., Baaziz. "Variability of Natural populations of Atriplex halimus L.in marocco as investigated by rapd marakes". Romanian Biotechnological lettres. 2013 18 (3).p: 8361-8364

[3] Rosas, M.R., " El genero Atriplex (Chenopodiaceae) en Chile" .Gayana Bot. 1989. 46(1-2). p. 3-82.

[4] Houérou, H.N., "The role of saltbushes (Atriplex spp) in arid lands rehabilitation in the méditerranéen Basin areview". Agr Syst. (1992). 18p: 107-148

[5] Benhammou, N.,Belyagoubi., " Activité antioxydante des extraits des Composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud- Ouest Algérien.thèse de doctorat.Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 2012. p:23-55

[6] Chehma ,A .,"Catlougue des plantes spontanèes du Sahara Septentrional algèrien".2006. tome1.p:61.

[7] Chambari ,M.,"Atriplex halimus & Atriplex canescens " . 2009.

[8] Quezel, P. Santa, S." Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales". Ed. CNRS .1963. Tome2. Paris.

[9] Dupont,F., Guignard., J.L ., "Abrèges botanique systématique moléculaire". 14 ème éd. 2007. Masson.

[10] http://f.zira3a.net/t4834

[11] Souayah, N., Khouja, M.L., Rejeb, M.N., Bouzid, **S**.,"Micropropagation D'un arbustesylvo-pastoral, Atriplex halimus L (Chénopodiacées)".chairs Soptions méditerranéennes. 2004. (62). P: 131-135

[12] Singleton, V., L , Rossi. J. R.,"Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphothungstic acid". *Am. J. Enol. Vitic,*16. 1965. P:144–158.

flavonoid contents inmulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". Food Chem. 1999. 64 (4). p: 555–559.

[14] Julkunen-Titto., R., "Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methodsfor the analysis of certain phenolics". *J. Agric. Food Chem,* 1985 (33). p: 213-217.

[15] Mahamoudi, S .Khali., M .Mahmoudi., N."etude de l èxtraction des composès phénoliques des différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara Scolymus L)".* nature et technologie. *2013.* (9). *p:35-40*

الفصل الثاني

عموميات حول الفلافونيدات

أولا:

الفلافونيدات

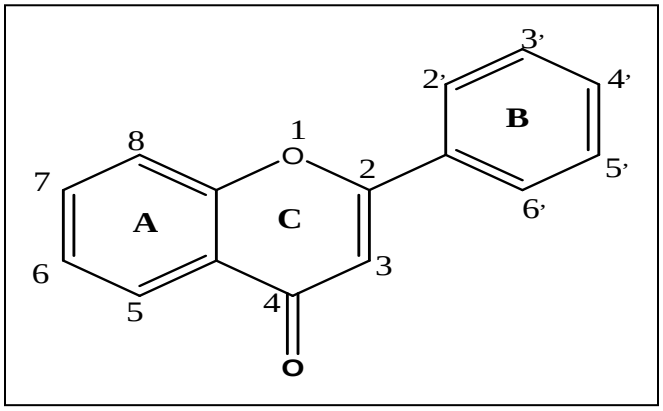
I-1 مدخل :

نظرا لإتساع دائرة البحث في مجال المنتجات الطبيعية ، فقد أخذت الفلافونيدات حيزا كبيرا من اهتمام الباحثين باعتبارها من أهم المجموعات الفينولية، و القسم البالغ الأهمية من نواتج الأيض الثانوي التي تحدث في جميع خلايا و أنسجة النباتات و الدليل على ذلك أن8000 نوع من الفلافونيدات في صورتها الإيتروزيدية و الأجليكونية تم استخراجها طبيعيا من النبات. وبصورة واسعة عند كاسيات البذور حيث يبلغ تنوع البنيات التركيبية أقصاه، غير أن تنوع بنياتها يكون محدودا عند عاريات البذور و الطحالب [2 ،1]

I-2 تعريف الفلافونيدات:

الفلافونيدات احد أهم أقسام المركبات الفينولية و مصطلح Flavonoide في اللغة الأجنبية مشتق من الكلمة اليونانية Flavus و تعني أصفر (favus) [3]، و هي عبارة عن صبغات نباتية صفراء موزعة على جميع أجزاء النبات، و بشكل أكبر في الجزء الهوائي منه، مسؤولة عن ألوان الأزهار، الفواكه، و أحيانا الأوراق.[2، 3]

أما كلمة فلافونيد أدخلت عام 1952 م من طرف "Geissman" إشارة إلى جميع الصفات التي تملك الهيكل القاعدي، C6- C3 -C6 و هي عبارة عن وحدتين عطريتين C6 (A et B) ترتبطان بسلسلة تحتوى على ثلاث كربونات (C)، تحلق هذه الأخيرة على شكل البيران يعطي الهيكل القاعدي للفلافونيدات ، التي تنحدر أساسا من الوحدة الأساسية المسماة 2- phènylchromane . كما في الشكل (I -1) [4،5،6]



الشكل(I -1) الهيكل الأساسي الفلافونيدات

I-3 توزيعها وتواجدها في النباتات:

تعد الفلافونيدات من نواتج الايض الثانوي ، تنتشر بشكل مفرط على مستوى النباتات الراقية، خاصة على مستوى بعض العائلات مثل المركبة، والقرعية، والخيمية، موزعة على جميع أجزاء النباتات وبشكل اكبر في الأجزاء الهوائية (الأزهار –الأوراق) [4،7]، وذلك بشكل اتيروزيدات تذوب في الماء متمركزة في حوصلة الخلية أما الفلافونيدات متعددة الميتوكسيل فتتواجد في سيتووبلازم الخلية وتنحل في المذيبات الغير قطبية أما تواجدها في الصورة اجليكونات (aglycones) فإنها تتوضع على الأنسجة السطحية للأوراق وتتواجد في أوراق بعض النباتات على شكل بلورات في الخلية ، ونباتات المناطق الجافة[2،6]. كما تتواجد الفلافونيدات في قشور الفواكه الحمضية مثل البرتقال، والليمون، وكذلك الخضروات، والبدور بشتى أنواعها .

I-4 أهمية الفلافونيدات:

I-4-1 أهميتها في التغذية :

الفلافونيدات دور هام في النظام الغذائي للإنسان إذ بينت الدراسات أننا نحصل على كمية من الفلافونيدات تقدر من 50 إلى 800 ملي غرام في اليوم راجعة إلى تناول كميات من الفواكه ، والخضروات، والبقوليات الخضراء، و المشروبات مثل الشاي [6]. كما يمكننا الحصول على الفلافونيدات كذلك من خلال النباتات و الأعشاب المتداولة عند عامة الناس، إذ تعد اغلب النباتات المستعملة في الطب الشعبي عبر العالم غنية بالمركبات الفلافونيدية [6،8]

I- 4-2 أهميتها الفسيولوجية:

بفضل تركيبها المتعدد الفينولي تستطيع الفلافونيدات أن تلعب دورا هاما في سلاسل الأكسدة الإرجاعية، فبعضها ضد مؤكسدات، إذ يظهر سلوكها في الترابط المعقد للمعادن الداخلة في تفاعل الأكسدة ويتوقف هدا الترابط على وجود كربونيل في الموضع 4 ووجود مجموعة هيدروكسيل في الموضع 5 أو3 ، ولكذا وجود في الموضع 3، 4 أرثو ثنائي هيدروكسي [8]. وبحكم غنى المركبات الفلافونيدية بمجاميع فينولية فهي قادرة على أن تتثبت على بعض البروتينات و الإنزيمات ومن ثم تغير التوازنات الإنزيمية، وتتدخل في المراحل المختلفة للتطور و بخاصة عند التلقيح، هذا عند النبات أما تأثيرها عند خلايا الثدييات فاستعمالاتها عديدة و متنوعة [2،9].

I-4- 3 أهميتها البيولوجية و العلاجية :

زاد الاهتمام 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 و يمكن حصر بعض الفعاليات البيولوجية الهامة منها :[11،10]

- الفلافونيدات لها تأثير مضاد للإلتهاب، و ذلك أن بعض الأمراض المتميزة بزيادة النفادية أو بضعف الشعيرات يمكن أن تعالج بمستخلصات اللعون الغنية بالفلافونيدات. [2،12].

- كما تعتبر أدوية للعجز الوريدي، كونها منشطات للأوردة و في نفس الوقت تقلل نفادية الأوعية الدموية، فتأثيرها على جدار الأوعية و خواصها المضادة للالتهاب هي أصل استعمالها كحاميات أوعية أو مقومات وريدية، كما لها تأثيرات مضادة للسرطان. [9،13]

- يمكن لبعض الفلافونيدات أن تمنع حدوث مرض السكري أو على الأقل إنقاصه [13].

- بالإضافة إلى ذلك كشفت الدراسات على كون الفلافونيدات مضادة لارتفاع الضغط، ومضادة للتسمم الكبدي وذات فعالية ضد الملاريا [14]

I-5 أنواع الفلافونيدات:

جميع الفلافونيدات –أكثر من 4000 نوع – من أصل تخليق حيوي، تملك نفس مجموعة الهياكل الأساسية وهو تسلسل 2 – phènylchromme، تصنف إلى 12 قسما حسب درجة تأكسد الوحدة [C] حيث يمكن تجميعها إلى 5 أقسام رئيسية وهي : [15]

- ✓ phènylbenzoprilium
- ✓ 2-Phènylchromones مثل :
  - flavones, flavonol et leurs dimères
  - dihydroflavonol et flavanones ومشتقات 2,3-dihydrogènès
- ✓ 2 -phènylchromanes مثل :

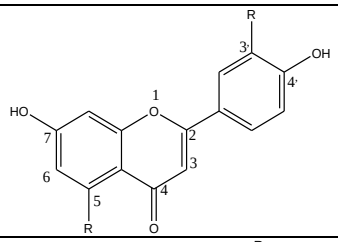
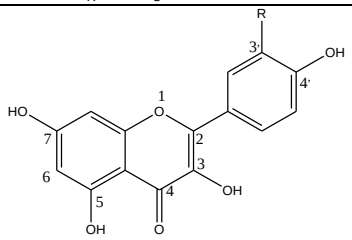
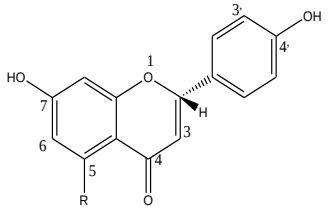
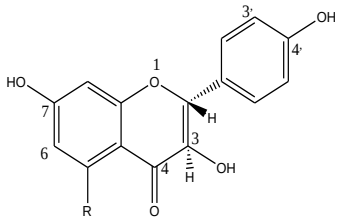
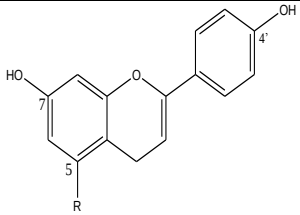
- flavanes

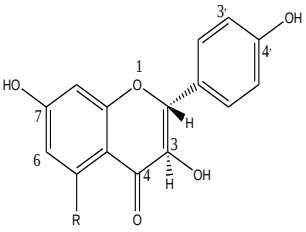
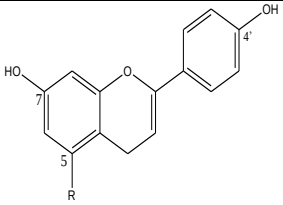
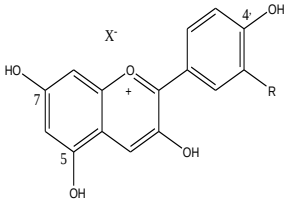
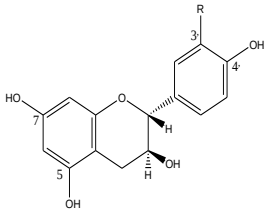
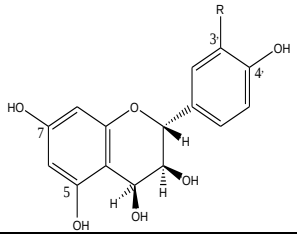
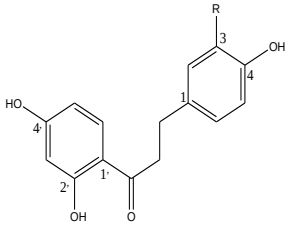
- flavan 3,4-diols ,flavan-3-ols

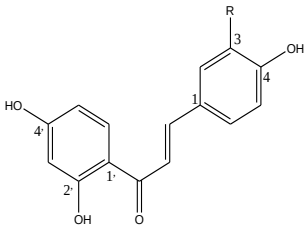
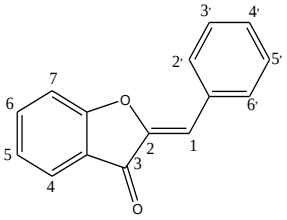
✓ Dihydrochalcones et Chalcones (الحلقة البيرانية مفتوحة)

✓ 2-benzylidène-coumaranones (= aurones)

و الجدول (I-1) يوضح مختلف أقسام الفلافونيدات : [15، 16]

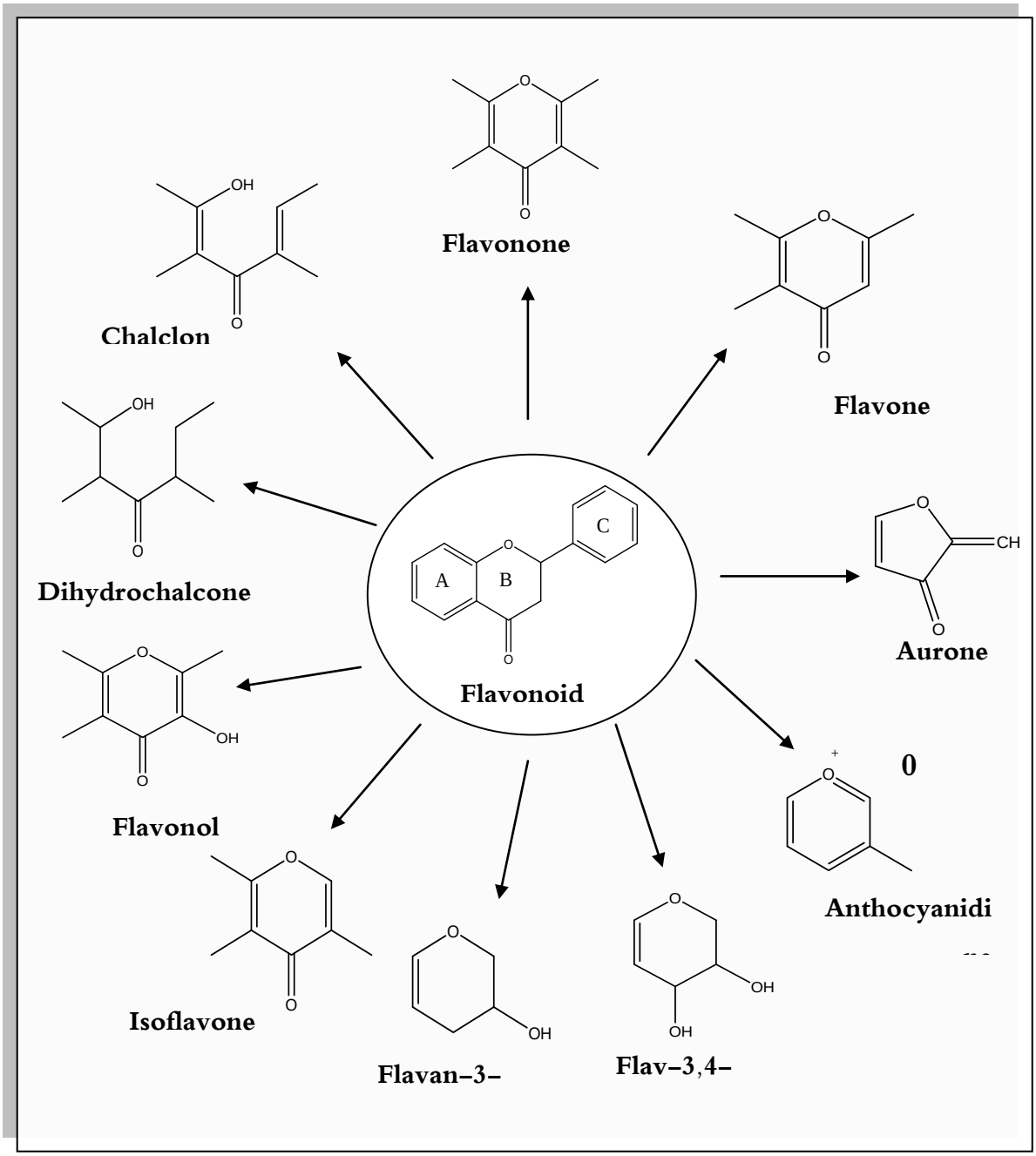
Classe	Sous classe	Structure	Exemple
2-Phèny-Chromones	Flavones		Apigénine (R = H) Lutéoline (R=OH)
	Flavonols		Kaempférol (R = H) Quercétine (R = OH)
	Flavanones		Naringénine (R = H) Eriodictyol (R=OH)
	Flavanoles (Dihdroflavonolos)		Dihydrokaempférol (R = H) Dihydroquercétine (R = OH)
	Isoflavones		Diadzeine (R = H) Genisteine (R = OH)

	Flavanoles (Dihdroflavonolos)		Dihydrokaempférol (R = H) Dihydroquercétine (R = OH)
	Isoflavones		Diadzeine (R = H) (Genisteine) (R = OH)
2-phenyl-rilliums benzopy-	Anthocyanes		Cyanidine (R = H) Delphinidine (R = OH)
2-phènyl- chroman	Flavanes Flavan-3-ol		Afzéléchol (R = H) Catéchol (R = OH)
	Flavan -3,4- Diols		Leucocyanidol (R =OH) Leucopélargonidol (R = H)
Chalcones	Chalcones		Isoliquiritigénine (R = H) Buteine (R = OH)

chalcones –Dihydro	Chalcones		Dihydro-isoliquiritigénine (R = H) Dihydrobuteine (R=OH)
2-benzylidène-Coumaranones	Aurones		Hispidol

الجدول(I-1) مختلف أنواع الفلافونيدات

❖ تتدخل الفلافونيدات كمضادات أكسدة على مستوى كيمياء النبتة ، وتبعا لدرجة أكسدة الحلقة الغير متجانسة (الحلقة البيرانية) نحصل علي الأقسام المختلفة الفلافونيدات وكما هو موضح في المخطط (I-1) [6،17]



المخطط (I–1) مختلف أقسام الفلافونيدات حسب تأكسد الحلقة البيرانية (الحلقة C)

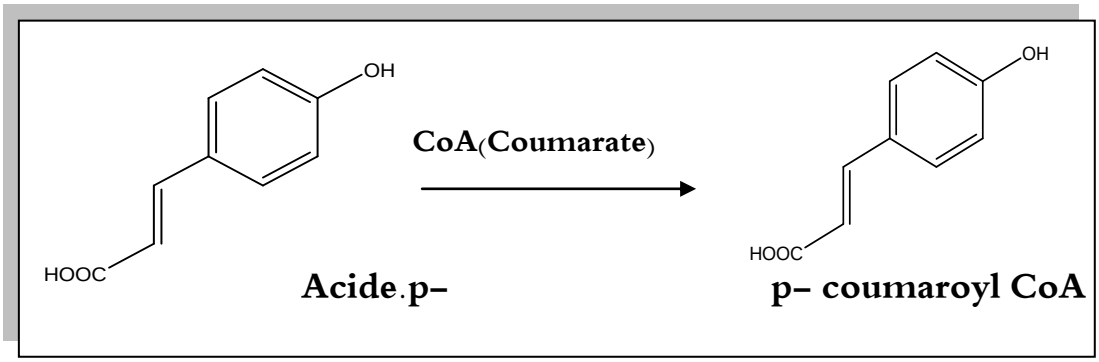
I-6 الاصطناع الحيوي للفلافونيدات:

إن الاصطناع الحيوي للمركبات الطبيعية ليس إلا الطريقة التي تتكون بواسطتها هذه المركبات مصادرها الطبيعية، و ذلك عن طريق تفاعلات الأكسدة، الإرجاع، الأكلة، الحلمهة...الخ؛ ويكون هذا طبعا بتوافر إنزيمات خاصة تساعد في هذه التفاعلات، ويعتبر استعمال النظائر المشعة مثل C^{14} من أهم الطرق التي ساعدت على تتبع الطريقة (الاصطناع الحيوي) . و بالنسبة للفلافونيدات، لاحظ العالم "Robinson" سنة 1936 أن استبدال النواتين البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية مختلف جوهريا مما يستلزم أنه ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي و باستمرار هذه التجارب تم التوصل إلى أن هذا الاصطناع يتم خلال ثلاث مراحل وهي: [18,7]

I-6-1 المرحلة الأولى:

- **طريق حمض الشيكيميك:**

تمكن عدد من الباحثين بعدة تجارب عديدة لمركبات مختلفة دور حمض الشيكميك في تكوين الحلقة البنزينية B، والسلسلة الكربونية الثلاثية $C6 - C_3$ بدءا من الجلوكوز وذلك بوجود محفزات إنزيمية فيتكون حمض باراكوماريك (coumarique Acide.p) و أن طريق حمض الشيكميك تمثل النمط الأساسي لتراكم الفينولات في النبات و تدخلاته في تفاعلات الميتابوليزم يليه تحول الناتج Acide.p-coumaroyl إلى (Coumarate) p- coumaroyl- CoA. يكون جاهزا للإتحاد مع (Coumarate) Malonyl-CoA في مرحلة قادمة.



الشكل(I -2) تحول Ac.p-coumarique إلى p- coumaroyl - CoA

الإنزيمات المستخدمة لتكوين حمض: Ac.P-coumarique

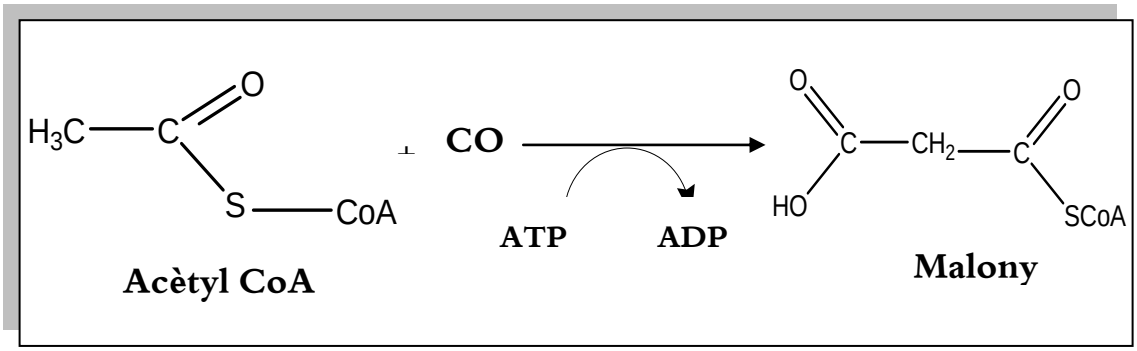
التفاعل	نوع الانزيم
1	Aldolase,3-désoxy-O-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase ou DHAP synthase.
2	Déshydroquinate synthase.
3	Préphénate déshydrogénase.
4	Tyrosine ammonia-lyase.

الجدول(I –2) الإنزيمات المستخدمة لتكوين حمض:Ac.p –coumarique

I-6-2-المرحلة الثانية:

- **طريق الخلات**:

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

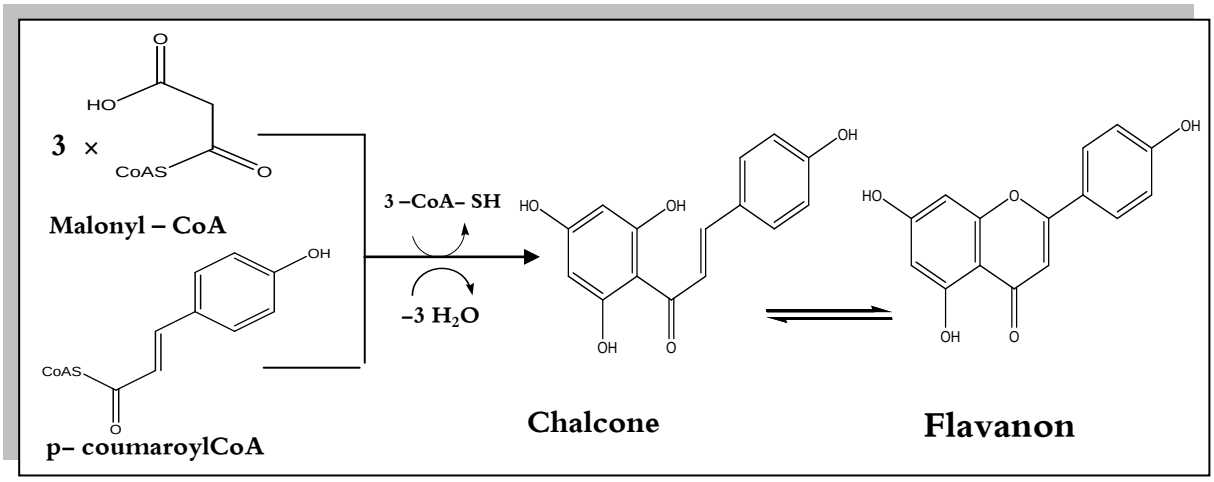


الشكل (I –3) تشكيل Malonyl CoA إنطلاقا من Acétyl CoA وCO_2

I-6-3 المرحلة الثالثة:

- **طريق الشالكون**

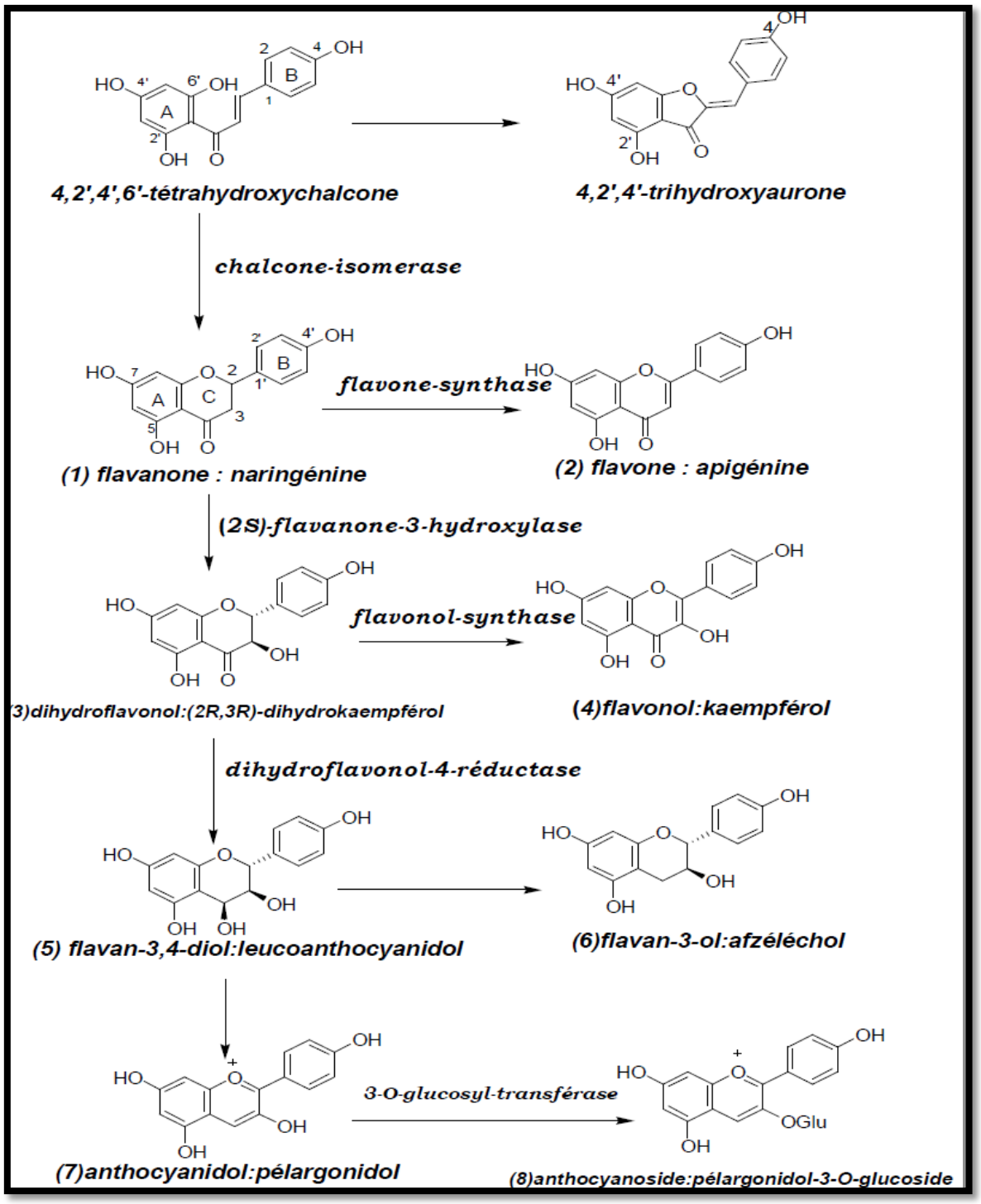
تتشكل الحلقة A إما من تكثيف لثلاث وحدات من Malonyl – CoA الناتجة من تثبيت مجموعة كربوكسيل على أستيل مرافق – أنزيم Acetyl – CoA، أو من تكثيف لثلاث وحدات من حمض الأستيك المشعة ب: ^{14}Cعلى مجموعة المثيل، أو الكربونيل مع حمض باراكوماريك، لتشكيل الشالكون . [17]



الشكل(I–4) تشكل الشالكون

I–7 الاصطناع الحيوي لمختلف هياكل الفلافونيدات بدءا من الشالكون:

يعد هيكل الشالكون نقطة انطلاق تشكل باقي الفلافونيدات، إذ أن تنوع هذه المنتجات داخل مصادرها الطبيعية لا تعدو إلا أن تكون تفاعلات ناتجة من التسلسل الوراثي الحيوي (Flavanone – Chalcone) و هي عبارة عن مواد متراكمة ذات تعقيد بنيوي تتغير بدلالة محفزات إنزيمية لتفاعلات الأكسدة، الإرجاع، ألكلة ذرة النيتروجين أو الأكسجين، أسيلة، تثبيت السكر ....إلخ. ومن المعتقد أن الوحدات الأساسية التي تستخدمها الخلية في صنع أو بناء المركبات الطبيعية هي الماء، ثاني أكسيد الكربون، حمض النمل، حمض الخل إلى أن هذا الأخير (حمض الخل)يتشكل داخل الجسم على هيئة مشتق Acetyl – CoA الغني بالطاقة و الذي يدخل في بناء معظم المنتجات الطبيعية و يتم ذلك وفق مسارات مختلفة في تشكيل مختلف أنماط الفلافونيدات انطلاقا من هيكل الشالكون كما هو موضح في الشكل (I–5) [7،15،18]



المخطط (I–2) لاصطناع الحيوي لمختلف الأقسام الفلافونيدية

في وجود محفزات أنزيمية تخص كل مرحلة من المراحل المختلفة في التصنيع الحيوي للفلافونيدات يمكن تلخيص المراحل السابقة الشكل (I-5) فيما يلى: [2]

- الحصول على الأورونات (aurones) مباشرة من الشالكون كوسيط بدون محفز

- أما الانتقال من الشالكون إلى الفلافونون(naringénine) فإنه يتطلب عملية تحوير فراغية نوعية بفعل أنزيم chalcone isomérase.

- أكسدة الفلافانون ثم إعادة ترتيب متمثلة في إزاحة مجموعة لأريل من الموقع C_2 إلى الموقع C_3 تؤدي إلى ايزوفلافون isoflavone (génisteine) وتتم هذه العملية عن طريق أنزيم isoflavone synthase

- تشكيل رابطة ثنائية بين C_2 و C_3 للفلافانون يؤدي إلى الفلافون مثل apigénine و يتم تحضير هذا التفاعل بأنزيمات مختلفة منها أنزيم flavone synthase.

- يتكون dihydroflavonol مباشرة بفعل hydroxylation للفلافانون في الموقع C_3 يتم تحفيز هذه العملية بواسطة flavanone – 3 – hydroxylase.

- يعتبر تحضير dihydroflavonol كمرحلة وسيطية لتشكيل الفلافونولات و من أمثلها ال Kaempférol الذي يتم تكوينه بإدخال رابطة ثنائية بين C_2 وC_3 حيث يتم تحفيزه بواسطة أنزيم Flavonol Synthase

وتوجد خمسة أقسام رئيسية للفلافونيدات متميزة بتنوع كبير سواء من حيث البنية أو من حيث الخواص البيوكيميائية والصيدلانية كما هو موضح في الجدول (I-3) وهي :[2]

الفلافونيدات	أمثلة
Flavanones	naringenin, citromistin, hesperidin, eriodictyole
Flavones	luteolin, hispidulin, acacetin, apigenin
Flavonols	rhamnetin, morine, myricetin, kaempferol, quercetin rutin,
Flavyliums	pelargonidine, cyanidin, anthocyanidines
Flavanolأو Catechins	afzelecol, theoflavin

الجدول (I-3) الأقسام الرئيسية الفلافونيدات

ثانيا:
الدراسة الكيميائية للفلافونيدات

II-1 ذوبانية الفلافونيدات:

الفلافونيدات ذوابة في القواعد القوية مثل NaOH، لكونها مركبات فينولية و تمتاز بصفتها الحمضية، جزيئة سكر أو أكثر و هذا ما يجعلها ذوابة في المذيبات القطبية مثل : الميثانول، الإيثانول، ثنائي سيلفوكسيد الأستون، والماء، ووجود السكر في الجزيء المركب يجعله أكثر ذوبانا في الماء، أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل: لايزوفلافونات، الفلافونات التي تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الإيثر و الكلوروفورم [19].

II-2 استخلاص الفلافونيدات:

يقع تحليل الفلافونيدات غالبا على الأجزاء الهوائيةلارتباطها بالتمثيل الضوئي، ويقتضي التجفيف السريع للمادة النباتية عقب القطف مباشرة للتغلب على إمكانية عطب أنزيمات glucosidase ، polyphenoloxidase.وهناك العديد من طرق الاستخلاص أكثرها استعمالا،الاستخلاص بواسطة المذيبات القطبية ، ثم استخلاص سائل – سائل ابتداء من اقل قطبية إلى أعلى قطبية [20]

II-3 الكشف عن الفلافونيدات:

هناك مجموعة من الوسائل التي يتم الاستعانة بها للكشف على طبيعة الهيكل الفلافونيدي في مستخلاصاتها الخامة منها كروماتوغرافيا الورق، و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، إضافة إلى اللون الإستشعاعي تحت الأشعة فوق البنفسجية، التي تعتبر أهم وسيلة للكشف عن ما تحويه هذه المستخلصات من هياكل فلافونيدية محتملة . كما تستخدم العديد من الكواشف للدلالة على وجود الفلافونيدات في المركبات الطبيعية، حيث تقوم بإعطاء ألوانا مميزة على حساب نوع المجموعات المختلفة المتصلة بالهيكل الفلافونيدي،ومن بين هذه الكواشف نذكرمها :[21،22]

-كلوريد الألومنيوم $AlCl_3$ 5٪ : تعطي ألوانا صفراء أو برتقالية مع جميع الفلافونيدات.

- حمض الكبرتيك المركز تعطي جميع الفلافونيدات ألوانا صفراء أو برتقالية في وجوده .

- محلول الفانيلين – HCL 5٪ يحضر بإضافة HCL المركز إلى محلول الفانيلين في الايثانول بنسبة 1: 4 على التوالي ، ويكشف عن جميع الفلافونيدات إذا تظهر بقع حمراء في الحال أو بعد التسخين .

-كاشفNeu: يعطى هو الأخر ألوانا صفراء أو برتقالية مع المركبات الفلافونيدية خاصة الفلافونولات، الفلافونات، كما تستعمل أبخرة محلول النشادر NH_3.

II-4 الفصل و التنقية:

أهم طرق الفصل و التنقية هي الكروماتوغرافيا التي اكتشفت عام 1903 م من قبل عالم النبات الروسي، Twest و هي طريقة تحليلية تحضيرية ذات نطاق واسع الاستعمال في فصل الخلائط و تنقية المركبات. إن هدف الفيتو كيميائي هو الحصول على مركبات نقية لأجل ذلك يستعمل طرق فصل متتالية وهي: [23]

- كروماتوغرافيا العمود (CC).
- كروماتوغرافيا الورق (CP).
- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).

II-4-1 كروماتوغرافيا العمود(CC):

تعد هذه التقنية الأكثر استعمالا لفصل الكميات الكبيرة و الأكثر تعقيدا من الفلافونيدات يتم استعمالها عن طريق طور ثابت من الأطوار الثلاثة يعبأ بها العمود، منها السيليكاجل أو السيليلوز أو متعدد الأميد، و تستخدم هذه الطريقة لفصل كميات كبيرة من المواد الفلافونيدية بعد اختيار جملة من المذيبات المناسبة لعملية التملص، حيث يستخدم السيليكاجال لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية، أما السيليلوز فقد أثبت فعاليته في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر؛ غير أن متعدد لأميد لقي تطبيقا واسع النطاق في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية بعضها عن بعض. و يتلخص طريق إجراء هذه التقنية فيما يلي :

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

- بعد ترصيص الطور الثابت جيدا داخل العمود توضع طبقة من رمل خاص يدعى Sable defontaine bleau بسمك 0.5سم، بعدها تحضر العينة حيث يذاب المستخلص المراد فصله في أقل كمية ممكنة من الميثانول، و بواسطة ماصة باستور يتم توزيعه على سطح الرمل مع الحرص على عدم إتلافه، أو بإتباع طريقة أخرى، و التي تستعمل في حالة ما إذا تطلبت إذابة

المستخلص الجاف كمية كبيرة من الميثانول، ففي هذه الحالة نضيف لمحلول المستخلص كمية من مسحوق البولي أميد SC6 و نركز هذا الخليط حتى نحصل على مسحوق جاف الذي يضاف إلى العمود الكروماتوغرافي، بعد ذلك يضاف المملص الذي يكون في البداية مذيب أقل قطبية ثم نغير قطبيته بإضافة مذيب قطبي تدريجيا إلى غاية الوصول إلى قطبية عالية، و يتم مراقبة الحزم باستعمال الأشعة فوق البنفسجية(UV) حيث تستقبل أسفل العمود و تركز حتى الجفاف أو عن طريق الطبقة الرقيقة CCM .[23،3]

II-4-2 كروماتوغرافيا الورق (CP):

تعتبر كروماتوغرافيا الورق من أحسن الطرق استعمالا و ذلك لأنها تعطي دلالة جيدة عن نوع المركب الفلافونيدي، خاصة القطبية كالفلافونيدات السكرية، كما تستعمل لجمع و فصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي .

يكون الورق المستعمل من نوع Whatman رقم I أو III ؛ حيث يوضع الخليط بواسطة ماصة على كامل عرض الورقة على مسافة 2 سم من الحافة العلوية للورقة، و بعد أن تجف تغمس الورقة في المملص أين تبدأ الحزم في الهبوط تسلسليا، حتى وصول المملص إلى مسافة قصيرة من الحافة السفلية للورقة. بعد جفافها و بالاستعانة بمصباح(UV) يتم تحديد الحزم التي تقص على شكل قطع صغيرة و تغمس في الميثانول، أين ترشح ليجف الراشح، ثم تجرى له عملية فحص متعددة بواسطة كروماتواغرافيا الطبقة الرقيقة للتأكد من نقاوة المركبات الذي تم فصلها، و الأنظمة المستعملة في هذه التقنية عادة هي : [3]

- AcOH حمض الأستيك بتراكيزمختلفة.

- B.A.W : الطبقة العضوية n-butanol/aceti c acid/water (5 /1 /4)

- M.A.W: methanol/acetic acid/water (5 /1 /4)

- T.B.A : tertiobutanol/acetic acid/water (1 / 1 / 3)

II-4-3 كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

تعتبر كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من أسهل وأسرع الطرق الكروماتوغرافية فهي تستعمل لفصل المركبات على السلمين التحضيري، و التحليلي ،وفي تحليل ودراسة النسب المحصل عليها من الفصل بالعمود الكروماتوغرافي، وتعتمد طريقة الطبقة الرقيقة على استخدام لوح زجاجي أو صفائح بلاستيكية مغطاة بطبقة رقيقة من متعدد الاميد، أو السيليكاجال، أو السليلوز، والتي تمثل

الطور الثابث أما الطور المتحرك فيكون عبارة عن مذيب كحولي مع مذيب عضوي متوسط أو عديم القطبية مثل:الكلوروفورم، الأسيتون، بيثانول أو ميثانول، وفي جميع الحالات تضاف قطرات من حمض عضوي لاستقرار المستخلص النباتي وتجنب جرف البقع، ويتم فصل مركبات المستخلص وفق ظاهرة الادمصاص و الذوبانية ويحدد موضع المركبات المفصولة بالاستعانة بمصباح UV ورش كواشف خاصة لتوضيح المركبات الغير الملونة [24].

ثالثا:
الدراسة البنيوية للفلافونيدات

III-1 الخواص الكروماتوغرافية:

III-1-1 اللون الإستشعاعي:

إن لون المركبات الفلافونيدية تحت الأشعة فوق البنفسجية هو أول المعطيات التي تعطي فكرة أولية على بنية الفلافونيد التقريبية ، جدول (III -4) يلخص العلاقة بين بنية الفلافونويد ولونه تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) [2]

لون المركب الفلافونيدي تحت nm (365 UV)	البني المختلفة للفلافونيدات
بنفسجي – أسود	فلافون (Flavone) 7، 6 ،5 أو 8 ، 7 ،5 ثلاثي هيدروكسيل فلافون. فلافونول مستبدل في الموقع3(3-OR)
بنفسجي – نيلي	فلافانول يملك هيدروكسيل في الموقع 3 فلافون لا يحتوي على في الموقعOH 5 فلافونول مستبدل في الموقع 3 بدون في الموقعOH 5
أصفر – أصفر باهت	فلافونول(OH حر في الموقع3) مع أو بدونOH في الموقع5
برتقالي لامع	ايزوفلافون (isoflavone)
أصفر مخضر	أورون (aurone)
أخضر	بعض الشالكونات (chalcones)
أزرق مخضر	فلافانون بدون OH في الموقع(flavanone) 5

الجدول (III –4) العلاقة بين اللون الإستشعاعي و الهيكل الفلافونيدي

III-1-2 ثابت الإنحباس R_f :

ثابت الانحباس R_f هو قيمة مميزة للمركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجةالحرارة، المملص، تركيز العينة وطبيعة المادة الدامصة....) يمكن عن طريق قيم معامل الإعاقة (الإنحباس) R_f و باستعمال أنظمة معروفة، التمييز فيما إذا كان المركب إيتروزديا أو اجليكونيا بل و معرفة ما إذا كان هذا الأخير أحادي أو ثنائي أو ثلاثي السكر و يمكن تعيين قيمته بالعلاقة :

$$Rf = x / x_0$$

حيث : x هي المسافة المقطوعة من طرف المركب، و x_0 هي المسافة المقطوعة من طرف المذيب ابتداء من نفس النقطة [6، 25].

كما يمكن حسب الجدول (III –5) توضيح العلاقة بين معامل الإعاقة و البنية الفلافونيدية المرافقة له.

البنية الفلافونيد	Rf
الزيادة في عدد مجاميع OH	زيادة Rf في المذيبات المائية ونقصان في المذيبات العضوية
استبدال OH بمجموعة CH_3 او OCH_3	زيادة قيمة R_f في المذيبات العضوية ونقصان في المذيبات المائية.
إدخال مجموعة سكرية	نقصان R_f في المذيبات العضوية و زيادة Rf في المذيبات المائية
الأستلة	زيادة R_f في المحلول العضوي ونقصان في المحلول المائي

الجدول (III –5) العلاقة بين Rf و البنية الفلافونويدية

III–2 الطرق الطيفية:

هناك عدة طرق طيفية لمعرفة بنية المركبات الفلافونيدية ونذكرمنها :

- **مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:**

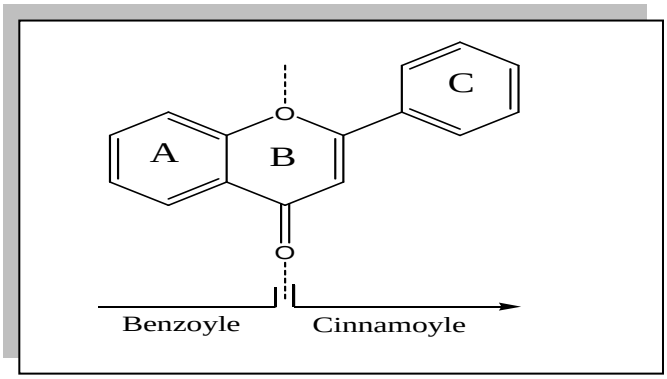
تعتبر هذه المطيافية تقنية و وسيلة مهمة في التعرف على بنية الفلافونيدات، و هذا لسهولة تحقيقها إذ لا تتطلب كمية كبيرة من المركب و بالمقابل تعطي معلومات وافية في أغلب الأحيان عن البنية الكيميائية للمركب، إذ تقوم على أساس أن لكل مركب فلافونيدي طيف امتصاص مميز في وسط كحولي(ميتانولي) و بإضافة كواشف معينة يتغير هذا الطيف. [25]

✓ طيف الامتصاص في الوسط الميتانولي:

يعطي طيف الفلافونيدات المحتوية على مجموعة كربونيل في C_4 فلافونات و فلافونولات (عصابتين مميزتين)

العصابة I: محصورة بين nm(385 –340) راجعة إلى امتصاص صورة شكل السيناميل (Cinnamoyle) الناتجة من ترافق الحلقة B مع مجموعة الكربونيل.

العصابة II: محصورة بين nm(280 –250) راجعة إلى امتصاص صورة شكل البنزويل (Benzoyle) الناتجة من ترافق الحلقة A مع مجموعة الكربونيل كما في الشكل (III –6) [26].



الشكل (III –5) ترافق مجموعة الكربونيل مع كل من الحلقتين A و B

إن الموقع الحقيقي للعصابيتين I و II للطيف المنجز في الميتانول يكشف عن طبيعة هيكل المركب الفلافونيدي، إذ تسمح قمة العصابة I بصفة عامة بتمييز الفلافونات عن الفلافونولات[2].

الجدول (III –6) يوضح أهم الإنزياحات الملاحظة للعصابيتين I و II في الوسط الميتانولي. [26]

نوع الفلافونيد	العصابة I λ max (nm)	العصابة II λ max (nm)
فلافون	350 - 310	280 – 250
فلافونول (3 - OH) مستبدل	360 – 330	280 – 250
فلافونول (3 -OH) حر	385 – 350	280 – 250
أيزوفلافون	330 – 310	275 – 245
فلافانون و ثنائي هيدروفلافونول	330 – 300	295 – 275
شالكون	390 – 340	270 – 230 الشدة ضعيفة
أورون	430 – 380	270 – 230 الشدة ضعيفة
أنتوسياندين أو أنتوسيانين	560– 456	280 - 270

الجدول (III –6) أهم الأنزياحات الملاحظة للعصابيتين I وII في الوسط الميتانولي

✓ طيف الامتصاص في وجود الكواشف :

يمكن تلخيصها في الجدول (III -7) : [28،27]

الكاشف	الإزاحة المشاهدة العصابة I (λ_{max} (nm)) العصابة II (λ_{max} (nm))	التعليل
MeOH	350 -310 / 280 – 250	Flavones
	360-330 / 280 – 250	flavonol (3 – OR)
	385 -350 / 280 – 250	flavonol (3 – OH)
NaOH (NaOMe)	1- نقصان في شدة الامتصاص بمرور الزمن (تفكك الطيف) 2) + 45 إلى 60 دون نقصان في الشدة 3) + 45 إلى 60 مع نقصان في الشدة 4) ظهور عصابة جديدة بين320 -335	3,4' OH او أرثو ثنائي OH على الحلقة A أوثلاثة OH متجاورة على الحلقة B 4' – OH 3 – OH, 4' – OR 7 – OH
NaOAc	+5إلى 20 للعصابة II إزاحة قليلة نقصان في الشدة بمرور الزمن) (تفكك الطيف) $\Delta\lambda(I) < \Delta\lambda(I)$ NaOAc 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– OH (فلافون OR – 4 ' و فلافونول)
NaOAc + H3BO3	+ 12إلى +36 للعصابة I إزاحة باثكرومية ضعيفة	الحلقة على هدروكسيل ثنائي أرثو B الحلقة على هدروكسيل ثنائي أرثو A في (6,7) أو (7,8)
AlCl3	+30 AlCl3 / HCl إلى 40 + مقارنة بطيف +20 AlCl3 + HCl إلى 25 + مقارنة بطيف	أرثو ثنائية هدروكسيل على الحلقة B هدروكسيل ثنائي أرثو على الحلقة A إضافة على الهدروكسيل ثنائي أرثو إلى الحلقة B
AlCl3 + HCl	+17إلى 20 + للعصابة I +35إلى 55 +للعصابة I I + 50إلى 60 + للعصابة دون تغير	5– OH مع وجود مجموعة أكسيجينية الموقع في C-6 5 – OH في بدون مجموعة أكسيجينية الموقع C- 6 3 – OH مع أو عدم وجود OH في C- 5 5– OH و مجموعة مستبدلة في C-6

جدول (III -7) تأثير الكواشف على طيف UV

المراجع العربية:

[2] زعيتر لحسن .،"تحديد المكونات الكميائية لأطوار الكلوروفورم والزيوت الأساسية لأنواع من العائلتين المركبة Compositae) و السيستية(Cistaceae) ". رسالة دكتوراء دولة في العلوم. جامعة منتوري قسنطينة. 2001. ص4-32

[6] برحال جمعة .، " فصل وتحديد الايض الثانوي الفلافونيدي لبعض نباتات العائلة الريزيدية(Rsedaceae)". رسالة دكتوراء

دولة في العلوم .جامعة منتوري قسنطينة،2001 ، ص 5 - 14

المراجع الأجنبية:

[1]Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., "Flavonoids-potent versatile biologically compounds interacting with cytochromes chem". boil, interact; 2002.139. P: 121.

[3] Harborne, J. B, Mabry, T.J., Mabry., " The flavonoids ".Chapman and Hall, londres. 1975. p: 46-61

[4] Souâd, A.," Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels". Thèse Dé doctorat. Université Mentouri de Constantine. 2011:p14

[5] Emerenciano, V. P., Barbosa K. O., Scotti .M. T.,Ferriro M. J. P "Self organisating maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoids data". *Journal of brazilian chemical society* . 2007. 18 (5).p: 891-899

[7] Jurd, L., Horowitz, L., "Spectral properties of flavonoid compounds". In Gerssman, T. T., the chemistry of the flavonoids. Editeur Pergaman Press Oxford. 1962. P:107

[8] Latifa , C" Acylation des flavonoïdes par les lipases de Candida antarctica et de Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle". Thèse Dé doctorat. Université Mentouri de Constantine 2006. p14

[9] Mclur , J.W .," Physiology and function of flavonoïdes". Ed. Harborne , J.B, Mabry T.J.M. the flavonoïdes .chapman and hall. London. 1975. P: 105-970

[10] Mabry, T.J., Thomas, M.B., Markham, K.R., « The systhematic Identification of flavonoids ». Springer-Verlag, Berlin. 1970. P: 13

[11] Havsteen, B. H., "The biochemistry and medical sinificance of the flavonoids". *Pharmacol &Therapeutics*. 2002. 96 .p:67-202.

[12] Szent-Gyorgyi, A., Rasznyak, S., Nature. 1936. 27.p: 138

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

[14] Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D., "Inhibition of human lensaldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin "Biochem Pharmacol. 1983. p: 32

[15] Bruneton, J., " Pharmacognosie et Phytochimie des Plantes médicinales". (3ème édition) Tec & Doc Lavoisier., Paris .1999.p:310-311

[16] Attaway, J. A., "Citrus juice flavonoids with anticarcinogenic and antitumor properties in food phytochemical for cancer prevention".I. Fruits and vegetales (M. T Huang, T. Society, Washington , JC. Osawa, C .T . Ho, and R.T. Rosen, ed s), A CS Symposium Series. American Chemical. 1994. 546.p: 240-248.

[17] Trevor, R., "The organic constituents of higher plants" Sixth Edition., 188.p: 1957.

[18] Robinson, R. Nature., 137.1936. p: 1172.

[19] El Hazemi, H. *Natural Product.* 1995. p: 149 – 190.

[20] Fadila B," Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis* ", Thèse de Doctorat, Université Constantine, 2000, p92-102

[21]Harborne, J.B .,"Phytochemical Methodes ".Chapman and Hall London.1973**.** P:54

[22] Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., "The systematic Identification of flavonoids". Springer- Verlag, Berlin. 1970. P: 13

[23] Jay, M., Gonnet, J.F., Wollenweber., Voirin, B., "Sur l'analyseQualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxonomique "Phytochem. 1975.14. p:1605-1612.

[24] P. Waridel., " Investigation phytochimique des plantes aquatiques Potamogeton pectinatus L". Thèse de Doctorat, Université de Lausanne. P161-167

[25] Jurd, L., "Spectral Propreities of Flavonoids Compounds in T. A, Geissmann, *Bioch, Bioch. Acta".* 1962. P: 151 – 154, 427 – 440.

[26] Jurd, L., In " The Chemistry of Flavonoid Compounds". (Geiss man, T. A. ed), Pergamon, Press, New York. 1962. P:107 – 155

[27] Markham, K. R., "Techniques of Flavonoid Identification". *Academic Press* London. 1982. P: 36

[28] Wollen Weber, E., Jay, M., In"The Flavonoids". (Harborne, T. B. ed) Chapman and Hall. London. 1993. P: 233

الجانب العملي

الفصل الثالث

الدراسة الفيتو كيميائية

I-مدخل:

• كيفية جمع وقطف النبات:

عملية قطف النبات من أهم الخطوات، ويجب اختيار الفصل المناسب من فصول السنة لجمع النبات لكون هذه النباتات تحمل المادة الفعالة طول السنة إلا أن تركيز المادة الفعالة قد يتغير من فصل لأخر[1].

1- **لأزهار**:

عندما تكون حبوب اللقاح أو عند تفتح الأزهار تقطف، ومن الأحسن أن يكون القطف صباحا، ثم توضع في تهوية مناسبة بدون ضغط وقد تجمع الأزهار وهي في طور البراعم الزهرية أو حالة تفتح جزء منها[3،2].

2- **الجذور**:

عند تمركز المادة الفعالة بها ويبدأ نموها في الجفاف .

3- **الأوراق**:

الوقت المناسب لقطف الأوراق في حالة تمركز المادة الفعالة بها ومن الأحسن أن يكون فترة بداية تفتح الأزهار إلى غاية اكتمالها [3]

• كيفية تجفيف النبات:

بعد عملية القطف تكون عملية التجفيف مباشرة، و التي تسبق بالتجزئة مختلف أعضاء النبتة كل على حدى (الأوراق – الأزهار –الجذور – السيقان) وتنقى من الشوائب و الأتربة وتوضع في مكان مع ترك مسافات فيما بينها للتهوية. عملية التجفيف تكون في الظل مع التقليب من حين لأخر حتى يجف النبات[4-6].

II- المادة النباتية:

قطفت النبتة من ضواحي منطقة الحجيرة، ولاية ورقلة التي تبعد عن الولاية حوالي (100كم) في شهر فيفري 2014. جففت النبتة في الظل وبعيدا عن الرطوبة، بعد ذلك طحنت في مطحنة (Broyeur) في غربال متوسط المسامات. (الشكل رقم 2 في الملحق)، فتحصلنا على الأوزان التالية :الأوراق 763 غ ، السيقان 2220 غ ، الجذور 539 غ.

III- الدراسة الكيمائية:

III-1 تمهيد:

تم دراسة المسح الكيميائي لنبتة القطف (*A.halimus L.*) للجزء الهوائي في العام الماضي 2012 من قبل الطالبة صندالي عفاف، فوجد فيها العديد من المركبات الفعالة من بينها الفلافونيدات، لذا وقع اختيارنا على دراسة واستخلاص الفلافونيدات. الجزء الذي قمنا بدراسته من الجزء الهوائي للنبتة (الأوراق – الساق) و لكن كل على حدى، و ذلك حتى نستطيع معرفة اختلاف تواجد المادة الفعالة في أجزاء النبتة.

III-2 عملية الاستخلاص:

في عملية الاستخلاص استعمالنا أوزان متساوية من الاجزاء الهوائية للنبتة وهي كالتالي:

- الأوراق: 76 g
- السيقان: 76 g

III-2-1 الاستخلاص:

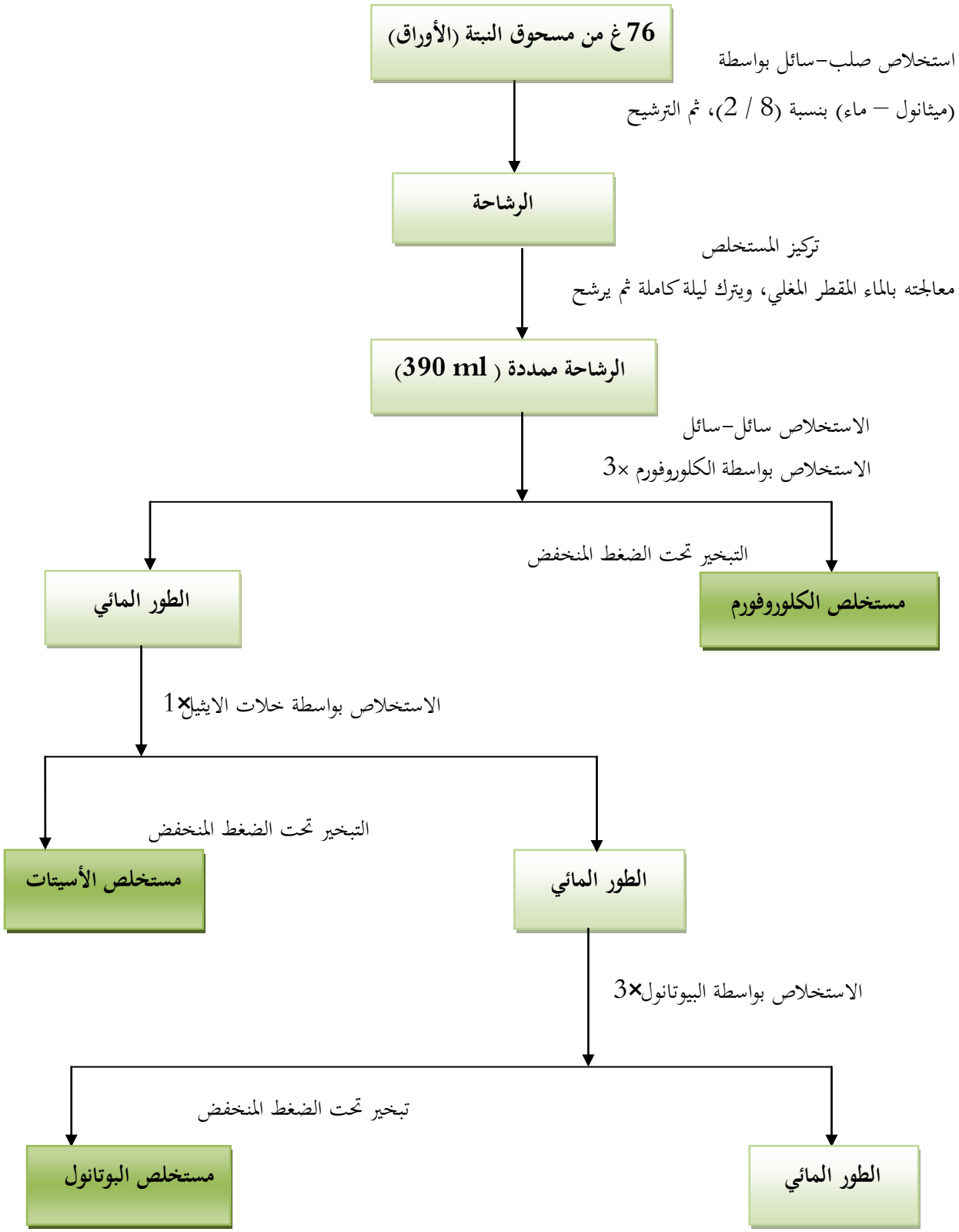
كون أن النبتة غنية بالكلوروفيل (مادة اليخضور) تطرقنا إلى إجراء استخلاص أولي لتخلص مادة الكلوروفيل، حيث نقعت النبتة في ايثر البترول (éther de pétrole) ، ثلاث مرات و في كل مرة ترشح ثم تجمع الرشاحة. الرشاحة السابقة تبخر في جهاز التبخير (Rota vapeur) (الشكل رقم 3 في الملحق) وذلك للتخلص من المذيب (ايثر بترول)، ثم وزن مستخلص الكلوروفيل وحسب المردود كالتالي:

- سجلت النتائج لمستخلص ايثر بترول للأوراق و السيقان في الجدول (III-1):

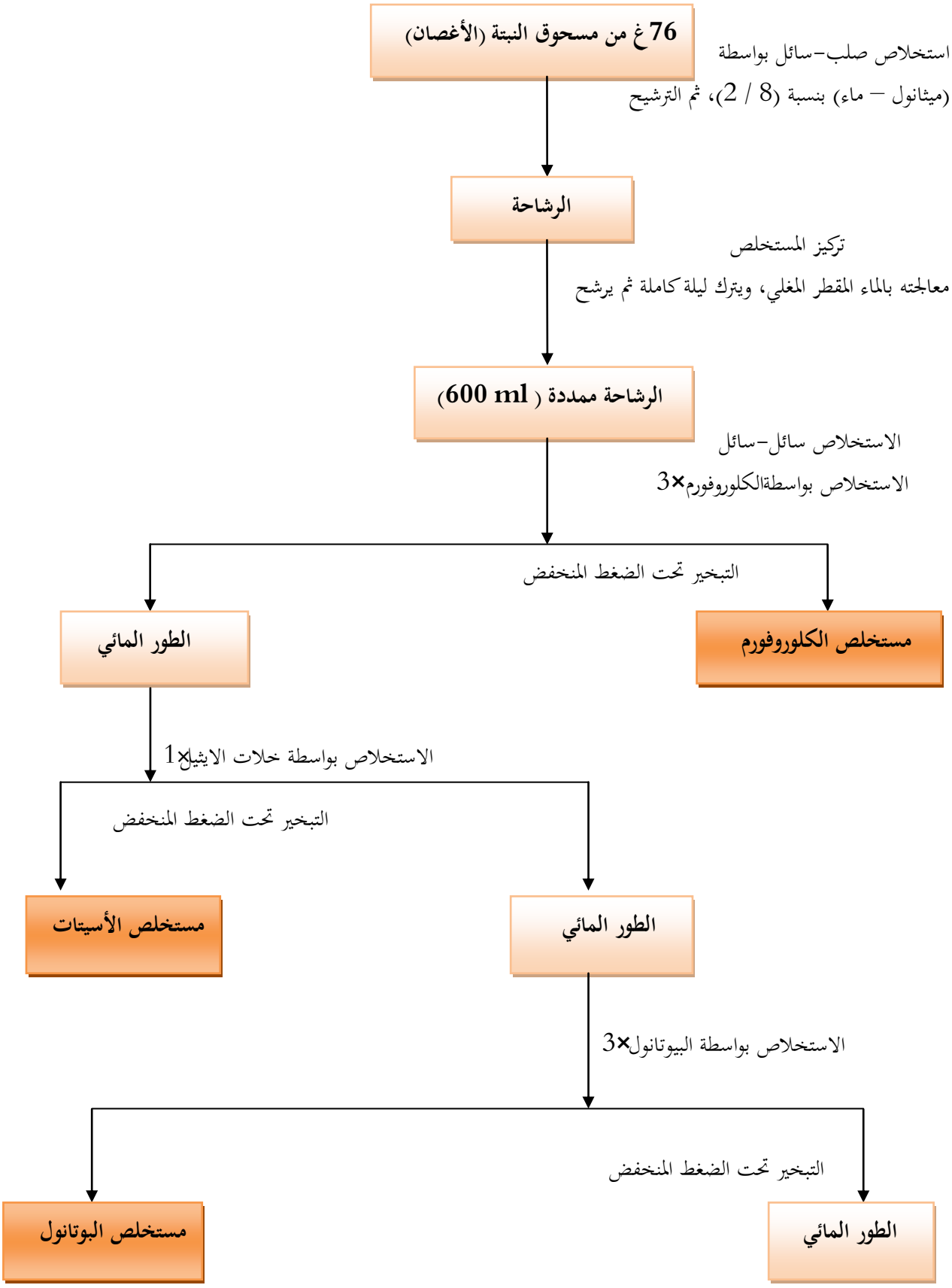
المستخلص النباتي	كتلة العينة ب:g		المردود٪	
	الأوراق	السيقان	الأوراق	السيقان
مستخلص ايثر بترول	28	2.5835	36.842	3.4

الجدول(III-1) قيم مردود الاستخلاص الأولي

مسحوق النبات المنزوع الكلوروفيل بواسطة ايثر البترول تجفف لمدة 5 ساعات تقريبا ثم نجري بعدها عملية الاستخلاص التالية: حيث نقع مسحوق النبتة (الأوراق – السيقان) كل على حدى، في خليط من الميثانول والماء بنسبة (2/8)، ثم تركت لمدة 24 ساعة، و أعيدت العملية 3 مرات متتالية مع تجديد المذيب في كل مرة، وذلك باستعمال جهاز الرج (الشكل رقم 4 في الملحق) بعدها رشح وركز المحلول الهيدرو-كحولي بواسطة جهاز التبخير للتخلص من الكحول، عاملنا هذا الأخير بالماء المقطر المغلي وترك ليلة كاملة للراحة في الثلاجة، بعدها رشح فتحصلنا على الطور المائي. أجريت على هذا الاخير عمليات الاستخلاص (سائل -سائل) و ذلك باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية مبتدئ بالكلوروفورم (chloroforme)، ثم خلات الإيثيل (acétate d' éthyle)، و أخيرا البيتانول (butan-1-ol)، و في الاخير تحصلنا على ستة (6) مستخلصات (خاصة بالأوراق و السيقان) وتلخص عملية الاستخلاص في المخطط التالي :



المخطط (III-1) مراحل استخلاص الاوراق

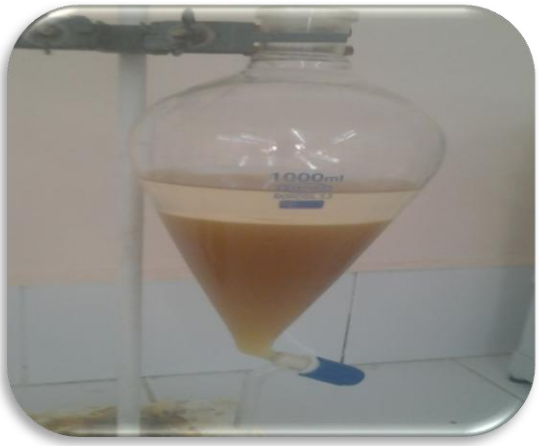


المخطط (III-1) مراحل استخلاص السيقان

السيقان **الاستخلاص بواسطة الكلوروفورم** الأوراق

السيقان **الاستخلاص بواسطة خلات الايثيل** الأوراق

السيقان **الاستخلاص بواسطة البيوتانول** الأوراق



الشكل(III–1) طريقة الاستخلاص سائل– سائل

حساب مردود الإستخلاص:

المستخلص النباتي	كتلة العينة ب: غ		المردود ٪	
	الأوراق	السيقان	الأوراق	السيقان
مستخلص الكلوروفورم	1.120	1.800	1.47	2.37
مستخلص خلات الايثيل	1.250	2.240	1.64	2.94
مستخلص البيوتانول	4.021	4.067	5.29	5.35

الجدول (III-2) قيم مردود الاستخلاص

نلاحظ من خلال الجدول (III-3) أن قيم مردود السيقان اكبر من قيم مردود الأوراق، و بالنسبة للمستخلصات مستخلص البيوتانول أعطى اكبر مردود مقارنة مع المستخلصي الكلوروفورم و خلات الايثيل

IV- الدراسة الكروماتوغرافيا:

IV-1 الدراسة الكروماتوغرافيا بواسطة الطبقة الرقيقة CCM:

IV-1-1 دراسة مستخلصات الأوراق والسيقان:

بعد الاستخلاص أجرينا CCM بعدة أنظمة:

- ✓ **مستخلص الكلوروفرم للأوراق والسيقان :**

1- Hexane/$CHCl_3$ (2/1), (4/1), (6/1), (8/1)

2- Acètat d'éthyle/ether de pètrole (1/1), (2/1), (1/6), (1/4), (1/2),

3- $CHCl_3$/Acèton (1/1), (1/2), (1/4), (1/6), (2/1)

4- Hexane/$CHCl_3$/ Acètat d'éthyle (2/2/1)

5- $CHCl_3$/MeOH (1/ 40), (20/1), (10/1), (1/1)

- ✓ **مستخلص خلات الايثيل للأوراق والسيقان:**

1- Hexane/$CHCl_3$ (2/1), (4/1), (6/1), (8/1)

2- Acètat d'éthyle/ether de pètrole (1/1), (2/1), (1/6), (1/4), (1/2)

3- $CHCl_3$ /Acèton (1/1), (1/2), (1/4), (1/6), (2/1)

4- $CHCl_3$ /MeOH (1/ 40), (20/1), (10/1), (1/1)

5- Acètat d'éthyle /Ac. formiique /Ac.acètique /eau (10/1,1/0,5/1)

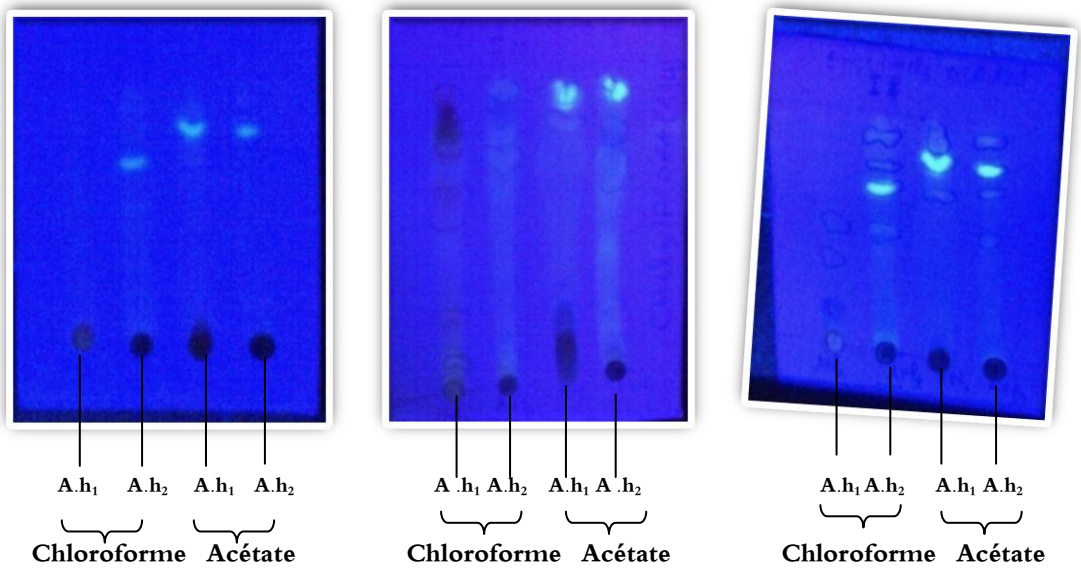
✓ **مستخلص البيوتانول للأوراق والسيقان:**

1- Acètat d'éthyle /Ac. formiique /Ac.acètique /eau (10/1,1/0,5/1)

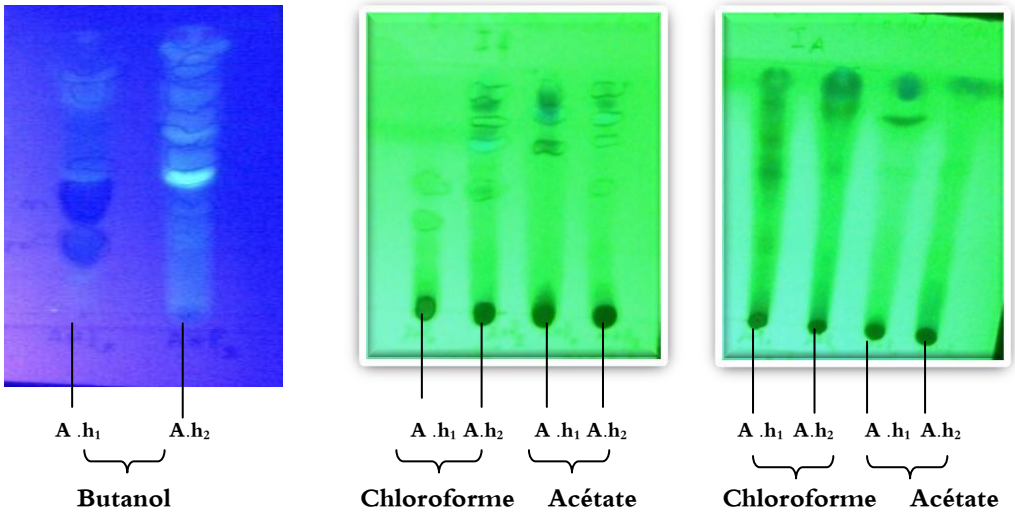
2- Acètat d'éthyle /ETOH/Butanol/ H_2O (13/3/3/1), (6/2/2,5/0,5)

اخدت صور فوتوغرافية تحت الاشعة الفوق بنفسجية (UV) بأطوالها الموجية (λ_1 (254nm) λ_2 (365nm) لبعض الأنظمة التجريبية:

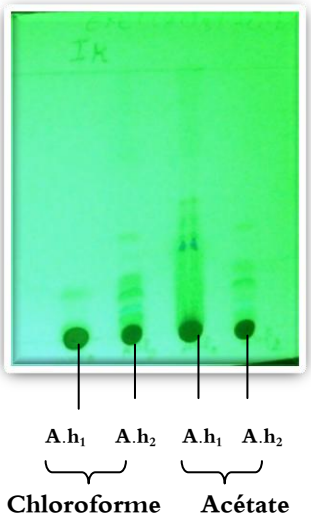
النظام(1), 1/4 **النظام (3), 1/4** **النظام (2),1/4**



النظام (1) النظام(1),2/1 النظام(1) ,6/1



النظام,(2)1/1



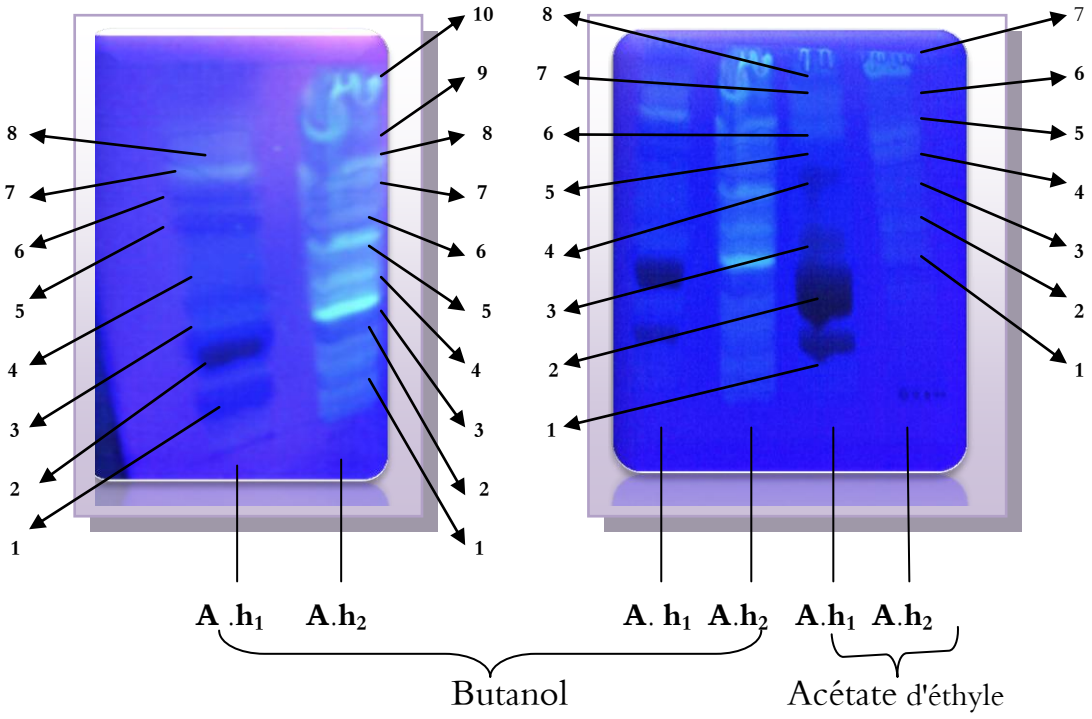
A .h 1: أوراق النبات

A .h2: سيقان النبات

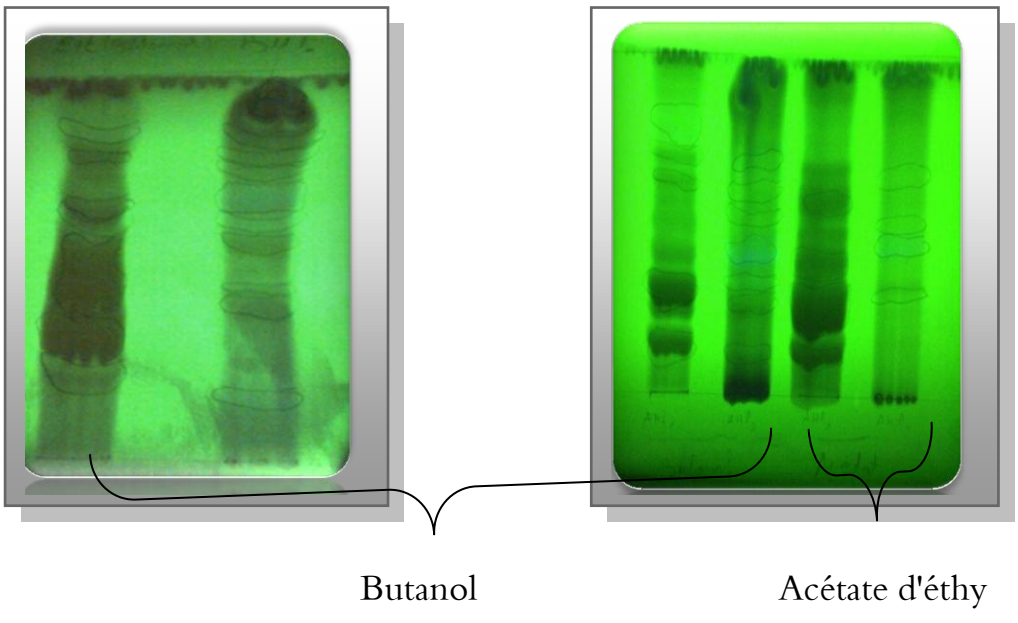
بعد إجراء العديد من الانظمة على المستخلصات السابقة، باستخدام السليكاجال على ورق الالومنيوم (الأنظمة السابقة) ،وبما أن هدفنا هو الكشف عن المركبات الفلافونيدية فإننا توصلنا إلى النظام المناسب لعملية الفصل .

IV-1-2 فصل مستخلصي البيوتانول وخلات الايثيل للأوراق والسيقان :

تمت عملية فصل المستخلصي البيوتانولي وخلات الايثيل بإستخدام الطبقة الرقيقة CCM اعتمادا على السليكاجال كطور ثابت، والنظام (1) كطور متحرك : Acètatd'éthyle/Ac. formiqiue /Ac.acètique /eau (10/1,1/0,5/1) اخدت صور فوتوغرافية للطبقة الرقيقة تحت الأشعة (UV)بأطوالها الموجية λ_1 λ_2 كما هو موضح:



الشكل(IV -2 كروماتوغرام الطبقة الرقيقة للمستخلصي البيوتانول وخلات الايثيل



لخصت نتائج الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص البيوتانول في الجدول التالي :

مستخلص البيوتانول للأوراق			مستخلص البيوتانول للسيقان		
رقم المركب	ثابت الاحتجاز R_f	الوان المركبات تحت الاشعة UV (365nm)	رقم المركب	ثابت الاحتجاز Rf	الوان المركبات تحت الاشعة UV (365nm)
1	0,08	بنفسجي مصفر	**1**	0,15	ازرق فاتح
2	0,20	اصفر فاتح	**2**	0,39	اصفر داكن
3	0,31	اصفر	**3**	0,44	اصفر
4	0,48	بني داكن	**4**	0.54	بني داكن
5	0,60	اصفر فاتح	**5**	0,67	اصفر لامع
6	0,64	بني فاتح	**6**	0,65	بنفسجي
7	0,79	اصفر	**7**	0,76	بني بنفسجي
8	0,85	اصفر لامع	**8**	0,77	اصفر
			9	0,81	برتقالي
			10	0,92	برتقالي مصفر

الجدول(IV-3) نتائج الفصل الكروماتوغرافي لمستخلص البيوتانول

لخصت نتائج الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص خلات الايثيل في الجدول التالي :

مستخلص خلات الايثيل للأوراق			مستخلص خلات الايثيل للسيقان		
رقم المركب	ثابت الاحتجاز Rf	الوان المركبات تحت الاشعة UV (365nm)	رقم المركب	ثابت الاحتجاز Rf	الوان المركبات تحت الاشعة UV (365 nm)
1	0,10	بني فاتح	**1**	0,30	اصفر بنفسجي
2	0,25	بني داكن	**2**	0,38	ازرق مصفر
3	0,38	بني بنفسجي داكن	**3**	0,45	ازرق فاتح
4	0,57	بني	**4**	0,51	بنفسجي مصفر
5	0,64	ازرق مصفر	**5**	0,57	اصفر فاتح
6	0,72	بنفسجي مصفر	**6**	0,72	اصفر بنفسجي
7	0,80	بنفسجي مصفر	**7**	0,72	اصفر داكن
8	0,90	برتقالي مضفر			

الجدول(IV-4) نتائج الفصل الكروماتوغرافي لمستخلص خلات الايثيل

❖ مناقشة النتائج:

• نتائج الفصل الكروماتوغرافي لمستخلص البيوتانول وخلات الايثيل:

من خلال النتائج المحصل عليها والممثلة في الجدول (IV-3) نلاحظ أن طريقة الفصل المتبعة أعطيت العديد من المركبات الفلافونيدية المفصولة ،عموما المستخلص النباتي البيوتانولي المدروس وحسب النتائج يحتوي على حوالي8 مركبات فلافونيدية في الأوراق، وعلى حوالي 10 مركبات فلافونيدية في السيقان، و بالنسبة للمستخلص النباتي لخلات الايثيليحتوي على حوالي 8 مركبات فلافونيدية في الأوراق، وعلى حوالي 7 مركبات فلافونيدية في السيقان . ومن خلال الألوان الملاحظة بواسطة UV وقيم R_f و مقارنتها حسب نظام الهجرة المستعمل (wagner,1999) [7]. نستنتج احتمال تواجد أنواع الفلافونيدات التالية:

✓ **أزرق لامع**:

- شالكون يحوي OHفي الموضع C_2أو/OH في الموضع C_4
- فلافون و فلافانون لا يحويOH حرة في الموضع C_5
- فلافونول لا يحويOH في الموضع C_5 مع استبدال OHفي الموضع C_3
- ايزو فلافون لا يحويOH في الموضع C_5 حرة.

✓ **بنفسجي داكن– بنفسجي**:

- دوما فلافون يحوي OHفي الموضعين C_5،$C_{4'}$وOH مستبدلة في الموضع C_3
- فلافونول يحوي OH في الموضعين C_5، و $C_{4'}$.
- بعض الفلافونات تحوي OH في الموضع C_5 او شالكونات تحوي OHفي الموضع$C_{4'}$، وعدم وجود OH على الحلقة العطرية.
- فلافونول مستبدل في الموقع 3 بدون OH في الموقع 5

✓ **أصفر – أصفر فاتح**:

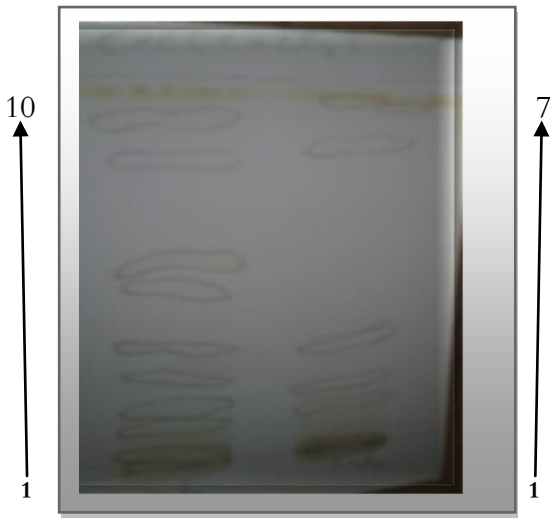
- فلافونولOH) حر في الموقع(3 مع أو بدون OH في الموقع 5

✓ **برتقالي**:

- ايزوفلافون (isoflavone)

IV-1-3 فصل مستخلص الكلوروفورم للأوراق والسيقان :

تمت عملية الاستكشاف لمستخلص الكلوروفورم بإستخدام الطبقة الرقيقة CCM اعتمادا على السليكاجال كطور ثابت، والنظام (5) كطور متحرك : $CHCL_3$ /MeOH (40 /1) اخدت صور فوتوغرافية للطبقة الرقيقة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) كما هو موضح في الشكل التالي:



الشكل(IV-3)اكروماتوغرام الطبقة الرقيقة للمستخلص الكلوروفورم

لخصت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلص الكلوروفورم في الجدول التالي :

مستخلص الكلوروفورم للأوراق			مستخلص الكلوروفورم للسيقان		
رقم المركب	ثابت الاحتجاز R_f	الوان المركبات تحت الاشعة UV (365nm)	رقم المركب	ثابت الاحتجاز Rf	الوان المركبات تحت الاشعة UV (365 nm)
1	0,047	اصفر	**1**	0,129	ازرق فاتح
2	0,117	برتقالي فاتح	**2**	0,164	اصفر فاتح
3	0,164	برتقالي فاتح	**3**	0,2	اصفر لامع
4	0,059	ازرق	**4**	0,317	اصفر فاتح
5	0,270	برتقالي داكن	**5**	0,847	ازرق فاتح
6	0,482	برتقالي فاتح	**6**	0,941	بني
7	0,564	احمر	**7**	0,976	ازرق لامع
8	0,8	ازرق فاتح			
9	0,894	احمر فاتح			
10	0,659	برتقالي			

الجدول(IV-5) نتائج الفصل الكروماتوغرافي لمستخلص الكلوروفورم

❖ مناقشة النتائج:

• نتائج الفصل الكروماتوغرافي للمستخلص الكلوروفورم:

من خلال النتائج المحصل عليها والممثلة في الجدول (IV-5) ، عموما المستخلص النباتي الكلورفورم المدروس وحسب النتائج يحتوي على حوالي10 مركبات فلافونيدية في الأوراق، وعلى حوالي7 مركبات فلافونيدية في السيقان، ومن خلال الألوان الملاحظة بواسطة UV وقيم Rf ومقارنتها حسب نظام الهجرة المستعمل (wagner,1999) [7] نستنتج احتمال تواجد أنواع الفلافونيدات التالية:

✓ **أصفر – أصفر فاتح:**

- فلافونول(OH حر في الموقع 3 مع أو بدون OH في الموقع 5

✓ برتقالي:

- ايزوفلافون (isoflavone)

IV-2 الدراسة الكروماتوغرافيا بواسطة الورق(CP) :

تطرقنا الى إجراء عملية الفصل باستعمال كروماتوغرافيا الورق (CP)ثنائية البعد على المستخلصي البيوتانولي وخلات الايثيل لأوراق والسيقان، الورق المستعمل من نوع(I) whatman وبتطبيق النظام BAWكطور متحرك.

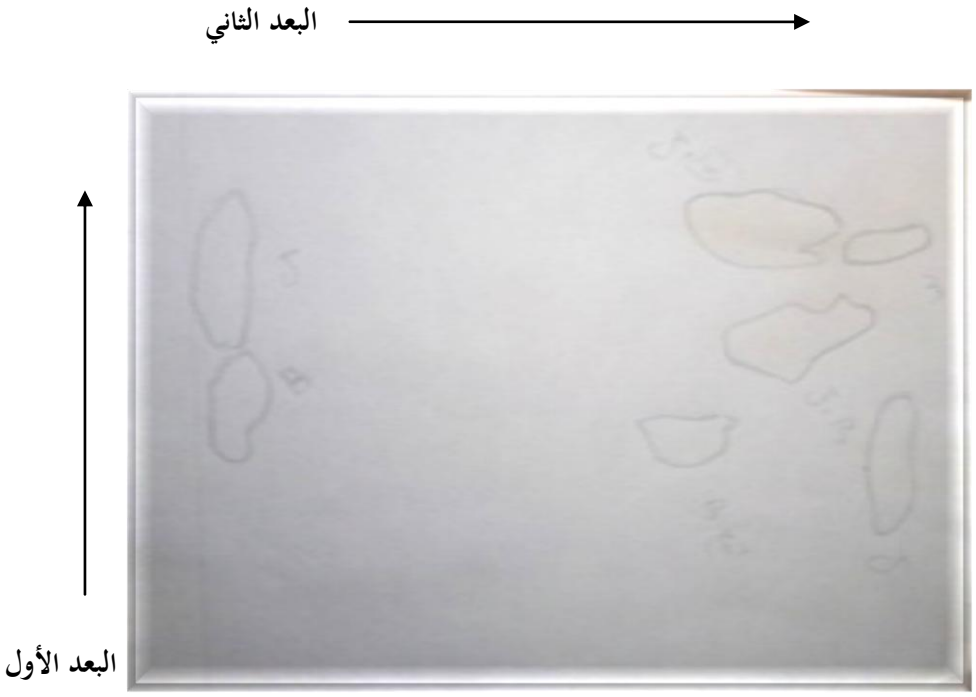
BAW: (60/ 40) acide acetique/eau

أخذت صور فوتوغرافية للورق تحت الأشعة الفوق بنفسجية (UV)كما هو موضح في الشكل التالية :

الشكل(IV-4) كروماتوغرام الورق للمستخلص البيوتانول (الأوراق)

الشكل(IV-5) كروماتوغرام الورق للمستخلص البيوتانول (السيقان)

الشكل (IV-6) كروماتوغرام الورق للمستخلص خلات الايثيل (الأوراق)



الشكل (IV-7) كروماتوغرام الورق للمستخلص خلات الايثيل (السيقان)

لخصت نتائج كروماتوغرافيا الورق في الجدول التالي :

- مستخلص البيوتانول

	مستخلص الاوراق			مستخلص السيقان		
البعد	**رقم المركب**	R_f	**الوان المركبات تحت الاشعة UV (365nm)**	**رقم المركب**	R_f	**الوان المركبات تحت الاشعة UV (365nm)**
البعد الأول	1	0,81	اصفر	1	0,72	برتقالي
	2	0,65	بني	2	0,11	اصفر
البعد الثاني	1	0,94	ازرق بني	1	0,90	برتقالي
	2	0,83	ازرق	2	0,81	ازرق برتقالي
	3	0,85	بني	3	0,83	بني
				4	0,66	ازرق لامع

الجدول(IV-6) نتائج كروماتوغرافي الورق لمستخلص البيوتانول

– مستخلص خلات الايثيل:

	مستخلص الاوراق			مستخلص السيقان		
البعد	**رقم المركب**	**R_f**	**الوان المركبات تحت الاشعة (365UVnm)**	**رقم المركب**	**R_f**	**الوان المركبات تحت الاشعة (365UVnm)**
البعد الأول	**1**	0 ,78	اصفر	**1**	0,76	اصفر
	2	0,7	بني	**2**	0,57	ازرق
البعد الثاني	**1**	0,81	ازرق	**1**	0,90	اصفر
	2	0,7 3	بنفسجي بني	**2**	0,86	بني
	3	0,73	بني	**3**	0,77	ازرق مصفر
	4	0,62	اصفر	**4**	0,71	ازرق مصفر
	5	0,39	ازرق	**5**	0,65	ازرق لامع

الجدول(IV–7) نتائج كروماتوغرافي الورق للمستخلص خلات الايثيل

❖ مناقشة النتائج:

نلاحظ من خلال نتائج كروماتوغرافيا الورق أن مستخلص البيوتانول للأوراق والسيقان أعطى نفس عدد المركبات تقريبا في البعدين ذو ألوان وقيم R_f مختلفة، وكذلك بالنسبة لمستخلص خلات الايثيل للأوراق والسيقان .

من خلال الألوان الملاحظة تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) نلاحظ أنها أعطيت نفس الألوان بالنسبة للكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، وعليه نستنتج احتمال تواجد المركبات الفلافونيدية في المستخلاصات .

❖ خلاصة عامة :

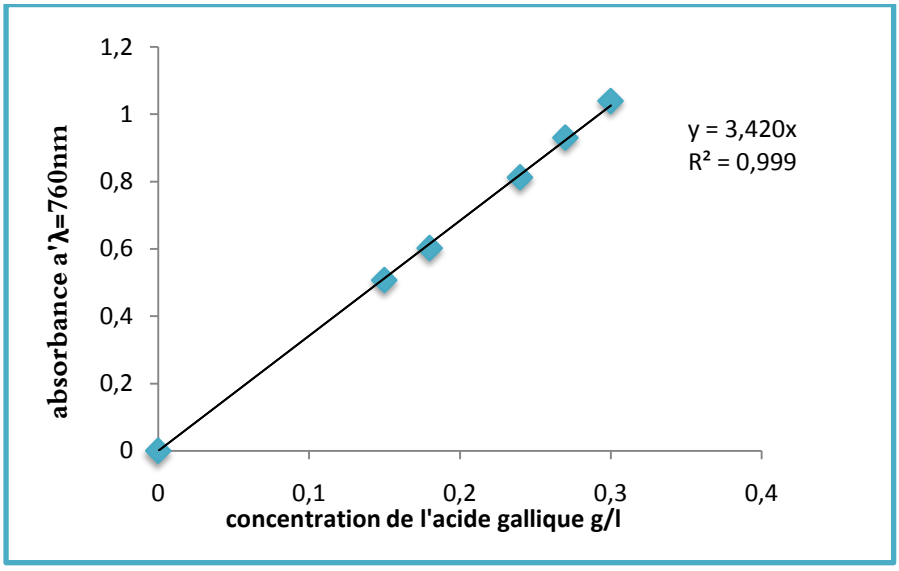
من خلال النتائج المحصل نلاحظ أن كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة تظهر لنا المركبات أكثر منها في كروماتوغرافيا الورق ، وفي الأفاق المستقبلية يمكن تطبيق وسائل أكثر تطورا ودقة .

V-التحليل الكمي للمركبات الفينولية:

V-1 تقدير الفينولات الكلية:

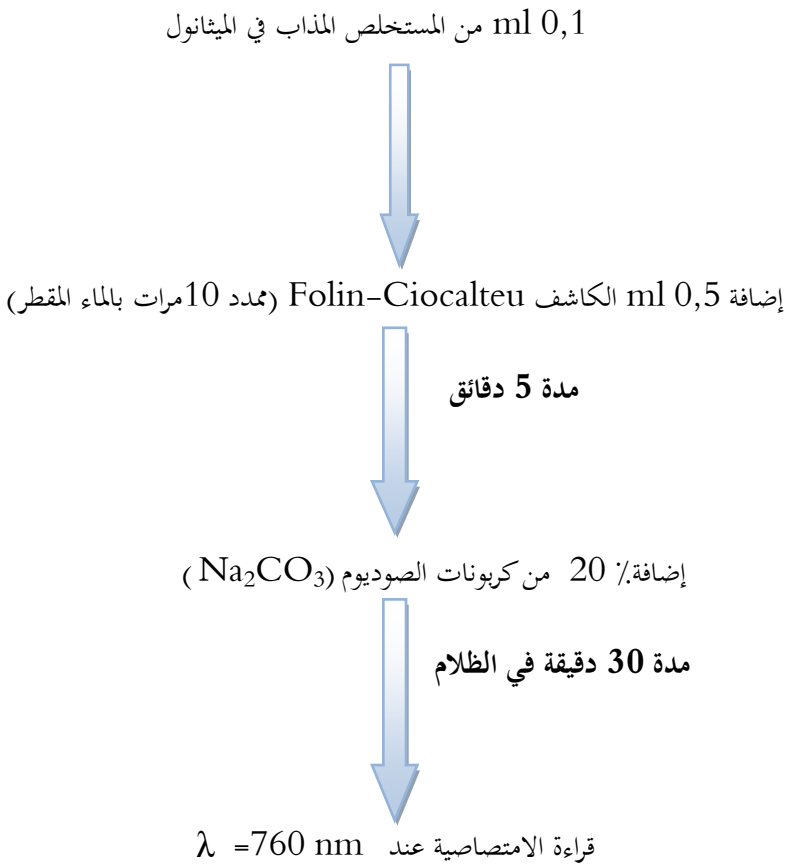
تقدير نسبة الفينولات الكلية بالإعتماد على طريقة متفاعل Folin-Ciocalteu ، و استعمل d'acide gallique كمرجع ، و بستخدام تراكيز مختلفة من0,03 إلى 0,3 وقياس الامتصاصية بجهاز التحليل الطيفي λ =760 nm (الشكل رقم -6-في الملحق)، رسم منحنى المعايرة الامتصاصية بدلالة التراكيز، الشكل(V - 8).

التركيز (g/l)	0.03	0.06	0.09	0.012	0.15	0.18	0.21	0.24	0.27	0.3
الامتصاصية (nm)	0.065	0.181	0.263	0.357	0.507	0.602	0.755	0.812	0.930	1.039



الشكل (V – 8) منحنى معايرة d'acide gallique

لخصت طريقة تقدير الفينولات للمستخلص كيما يلي :



V-1 -1 نتائج الدراسة:

قدرت الفينولات الكلية بإعتماد طريقة Folin-Ciocalteu واستعمال حمض الكافين كمرجع, ثم قياس الكثافة الضوئية في طول موجة765nm . نظمت النتائج المحصل عليها في منحى العيارية (الشكل V-8)

من خلال هذا المنحنى نقدر كمية عديد الفينولات الكلية في المستخلص و سجلت النتائج في الجدول(V-8)

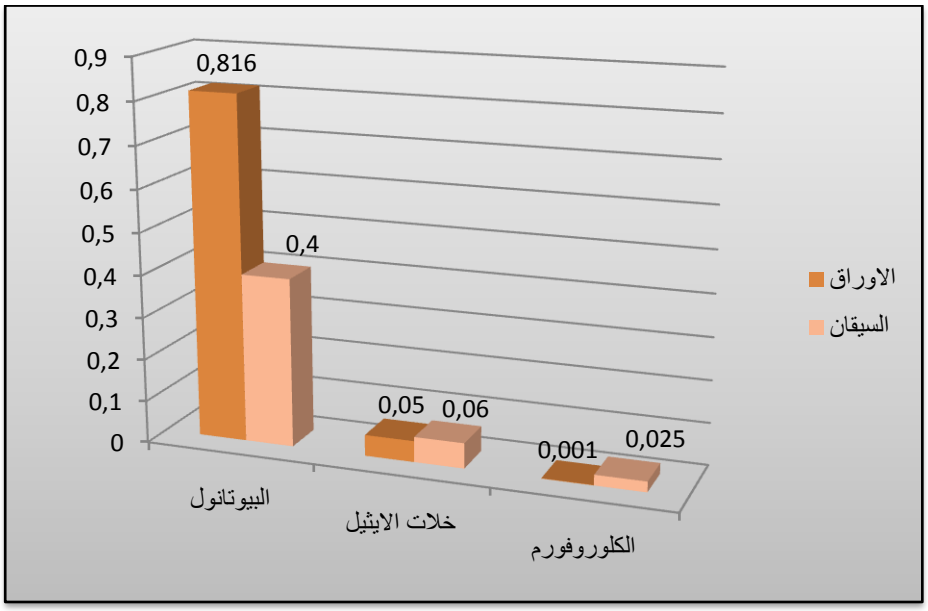
$$m=A\times n\times v/k\times m'$$

A: الإمتصاصية، n: عدد التمديدات المستخلص، v:حجم المستخلص ، k: الميل، m: الكتلة الكلية لنبات.

التعبير عن كمية الفينولات	مستخلص البيوتانول		مستخلص خلات الايثيل		مستخلص الكلوروفورم	
	الأوراق	السيقان	الأوراق	السيقان	الأوراق	السيقان
الكمية (mg/g)	0,816	0,4	0,05	0,06	0,001	0,025
الكمية الكلية في النبات	1,2		0,1		0,03	

الجدول (V-8) كمية الفينولات في المستخلصات

نلاحظ من خلال الجدول(V-8) أن مستخلص البيوتانول يحتوي على اكبر كمية من المركبات الفينولية مقارنة بمستخلصي خلات الايثيل و الكلوروفورم ، وبمقارنة النتائج المتحصل عليها بنتائج التي درست من قبل التي تطرقنا إليها في الفصل الأول (الدراسة الببلوغرافية) تقريبا متساوية[8]، و الشكل (V -9) يعبر عن كمية الفينولات الكلية في المستخلصات .

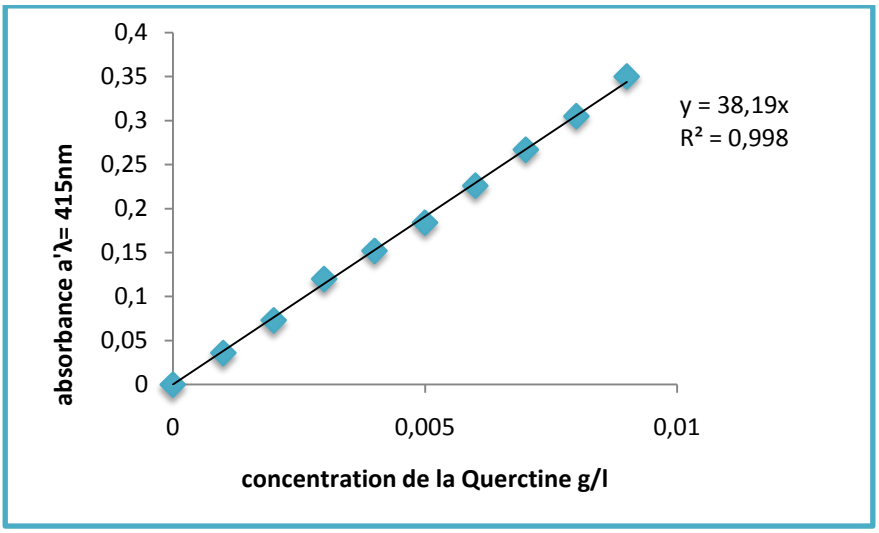


الشكل (V -9) كمية الفينولات الكلية في المستخلصات

V-2 تقدير الفلافونيدات:

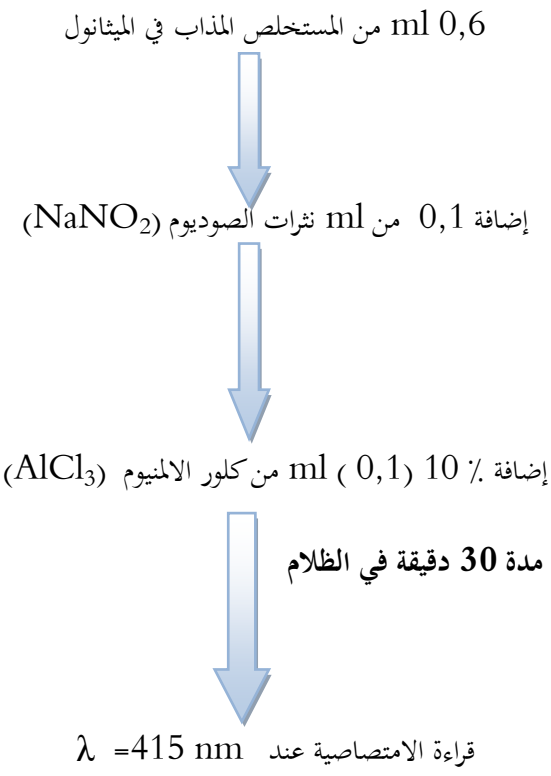
تقدير نسبة الفلافونيدات بالإعتماد على طريقة اللونية ، بإستعمال نترات الصوديوم ($NaNO_2$) وكلور الالمنيوم ($AlCl_3$)، واعتمادا على الكرستين (Quercétine) كمرجع ، و بستخدام تراكيز مختلفة من0,01 إلى 0,09 وقياس في جهاز التحليل الطيفي λ = 415 nm ، رسم منحنى المعايرة الامتصاصية بدلالة التركيز الشكل(V -10).

التركيز (g/l)	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0 .007	0.008	0.009
الامتصاصية (nm)	0.036	0.073	0.120	0.152	0.184	0.226	0.267	0.305	0.350



الشكل (V – 9) منحنى معايرة الكرستين (*Quercetine*)

لخصت طريقة تقدير الفلافونيدات في المستخلص كيما يلي:



V -2 -1 نتائج الدراسة:

قدرت الفلافونيدات الكلية بإعتماد طريقة اللونية وبإستعمال الكرستين كمرجع, ثم قياس الكثافة الضوئية في طول موجة 415nm. وضعت النتائج المحصل عليها في المنحنى(الشكل V-9)

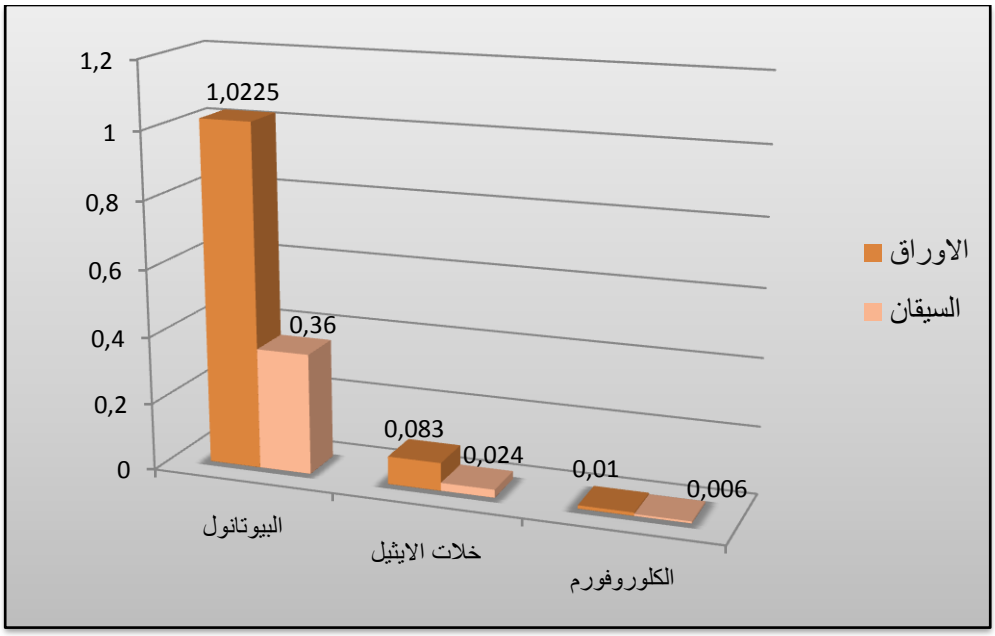
من خلال هذا المنحنى نقدر كمية الفلافونيدات الكلية في المستخلص و سجلت النتائج في الجدول(V-9)

$$m=A\times n\times v/k\times m'$$

التعبير عن كمية الفلافونيدات	مستخلص البيوتانول		مستخلص خلات الايثيل		مستخلص الكلوروفورم	
	الأوراق	السيقان	الأوراق	السيقان	الأوراق	السيقان
الكمية(mg/g)	1,0225	0,360	0,083	0,024	0,006	0,01
الكمية الكلية في النبات	1,385		0,107		0,016	

الجدول (V-9) كمية الفلافونيدات في المستخلصات

نلاحظ من خلال الجدول(V-9) أن مستخلص البيوتانول يحتوي على اكبر كمية من الفلافونيدات مقارنة بمستخلصي خلات الايثيل و الكلوروفورم ، وبمقارنة النتائج المتحصل عليها بنتائج التي درست من قبل التي تطرقنا إليها في الفصل الأول (الدراسة الببلوغرافية) تقريبا متساوية [8]، و الشكل (V -10) يعبر عن كمية الفلافونيدات في المستخلصات .



الشكل (V -10) كمية الفلافونيدات الكلية في المستخلصات

المراجع العربية:

[1] ف، محمود سلامة .،" مقدمة في تصنيف النباتات الزهرية " .كلية العلوم . جامعة التحدي.1994. ص 79

[2] د، إسراء عميرة.، " علم العقاقير الطبية النظرية و العملية ". الطبعة الأولى. دار البداية.2005

[4] م،السيد هيكل.، ع، عبد الرزاق عمر.، "النباتات الطبية والعطرية (كيمياؤها، إنتاجها، فوائدها) ".الطبعة الثانية . 1993. ص 3

[5] ر، محمود جبر.، "الوجيز في علم العقاقير والنباتات الطبية ". الطبعة الأولى.2006 .ص 21- 23

المراجع الأجنبية:

A ,Beloued .," plantes médicinales d' Algérie " .p :7[3]

[6] Rhaffari L, El., Zaid, A.," Pratique de la phytothérapie dans le sud-est Du Maroc (Tafilalet) .un savoir empirique pour une pharmacopée Rénovée. p :14

[7] Wagner, H. and Bladt.S., *Plant drug analysis A Thin Layer Chromatography Atlas.* 2eme Edition, 2001

lèxtraction des composès Mahamoudi, S .Khali., M .Mahmoudi., N."etude de[8] phénoliques des différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara Scolymus L)".* nature et technologie. *2013.* (9). *p:35-40*

الخاتمة

الخـــــاتمـــة :

كانت النباتات الطبية ولازالت محط اهتمام العلماء بغية اكتشاف مواد طبيعية فعالة تستعمل في الطب والصيدلة والتجميل، حيث أكثر من نصف سكان الكرة الأرضية يستعملون هذه الأدوية وأكثر مواد التجميل رواجا مصنوعة من االمواد الطبيعية.

إن الغاية الرئيسية من هذا البحث فصل المركبات الفلافونيدية والتي تعتبر من أهم نواتج الايض الثانوي من المستخلصات العضوية (البيوتانول، خلات الايثيل، الكلوروفورم) لأوراق وسيقان النبتة Atriplex halimus .L كل على حدى .وخلال قيمنا بهذا البحث أجرينا دراسة ببلوغرافية على النبتة المدروسة، وتطرقنا إلى دراسة شاملة حول الفلافونيدات .

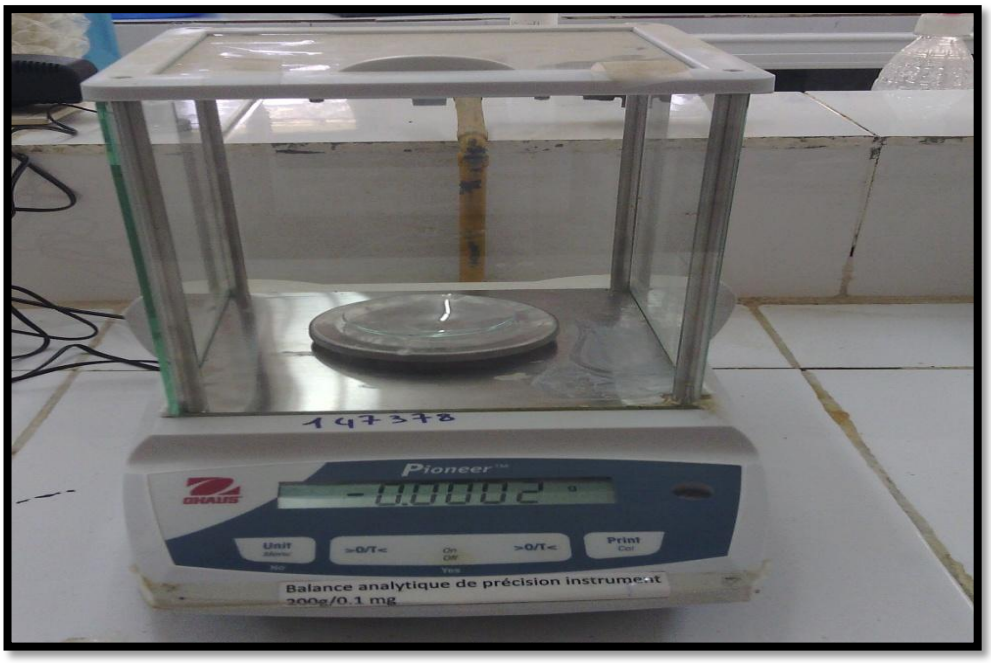
قمنا بعملية الاستخلاص النبتة بتطبيق أشهر طرق الاستخلاص ماء/ ميثانول (20/ 80)، حيث تحصلنا على اعلى مردود في مستخلص البيوتانول ، والمستخلصات العضوية المحصل عليها خضعت لتحليل الكروماتوغي بواسطة CPوCCM .

ومن خلال الألوان الملاحظة اقترحنا تواجد الأنواع الفلافونبيدية التالية : شالكون، فلافون، فلافانون، فلافونول، ايزو فلافون.....

ومن اجل معرفة المحتوى الفينولي، و الفلافونويدي للمستخلصات تطرقنا إلى إجراء طريقة متفاعل Folin-Ciocalteu و استعمل حمض الكافين (d'acide gallique) كمرجع بالنسبة للفينولات ، والطريقة اللونية واعتمادا على الكرستين (Quercetine) كمرجع بالنسبة للفلافونيدات، بالاستعانة بمنحنيات المعايرة للمركبات المرجعية وجد أن المستخلص البيوتانولي يحتوي على الفينولات والفلافونيدات بنسبة اكبر من المستخلصي خلات الايثيل والكلوروفورم

ولتثمين هذه الدراسة نقترح مواصلة الدراسة الفيتو كميائية بصورة ادق وبأجهزة أكثر تطور مستقبلا إن شاء الله.

الملحق



الشكل رقم (1): ميزان تحليلي لقياس الأوزان

الشكل رقم (2): مطحنة Broyeur

الشكل رقم (3): جهاز التبخير والتقطير الدوراني (Rota vapeur)

الشكل رقم (4): جهاز الرج

الشكل رقم (5) : جهاز مصباح الأشعة فوق البنفسجية UV

الشكل رقم (6) جهاز التحليل الطيفي

الملخص:

يخص هذا العمل دراسةٌ كيميائية نباتية لواحد من أصناف النباتات المتواجدة بشمال الصحراء الجزائرية. هذا النبات ينتمي إلى عائلة Chenopodiaceae. الاستخدامات العديدة لهذا النبات في الطب التقليدي و كذا عدم وجود دراسات كافية عليه، كلُّها أسباب دفعتنا إلى اقتحام البحث فيه.

تم التحقيق النباتي لغالبية المستخرجات الأجزاء الهوائية من القطف. *Atriplex halimus* L بواسطة الطرق الكروماتوغرافية الورقية و الطبقة الرقيقة. و باستخدام أنظمة متعددة، والكشوف الكيميائية. هذه الدراسة يعقبها تقييم الفينولات مقاسة بطريقة Folin Ciocalteu

الكلمات الدالة: *Atriplex halimus* .L ، الفيتو كيميائية، الكروماتوغرافيا الورق و الطبقة الرقيقة ، الفلافونيدات.

Résumé:

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique d'une espèce du Sahara septentrional d'Algérie. Elle appartient à la famille des Chénopodiaceae. L'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle et le fait qu'il n'y ait que peu de travaux qui l'ont ciblé nous ont encouragés d'entamer cette étude.

L'investigation phytochimique est appliquée sur la majorité des extraits des parties aériennes d'*Atriplex halimus L.* Différentes méthodes chromatographiques sont utilisées, Il s'agit de la chromatographie sur couche mince (CCM) et sur papier en utilisant plusieurs systèmes et révélations chimiques. Cette étude suivie d'une évaluation phénolique par le dosage par la méthode de folin-ciocalteu.

Mots-clés: Atriplex halimus L., chromatographie sur papier et sur CCM, les flavonoïdes.

Summary:

This work is devoted to the phytochemical study of a species of the northern Sahara of Algeria. It belongs to the family Chenopodiaceae. We use this plant in traditional medicin and and the fact that he did little work that targeted it have encouraged us to begin this study.

Phytochemical investigation is applied to the majority of extracts of the aerial parts of Atriplex halimus L. Different chromatographic methods are used; it is the thin layer chromatography (TLC) and paper using multiple systems and chemical revelations. This study followed by an evaluation by the phenol assay the Folin-Ciocalteu method.

Keywords: L. Atriplex halimus, paper chromatography and thin layer, flavonoids.