بسم الله وبعد: تم الرفع بحمد الله من طرف

بن عيسى قرمزلي متخرج من جامعة المدية

تخصص: إعلام آلي

التخصص الثاني: حفظ التراث بنفس الجامعة

1983/08/28 بالمدية – الجزائر-

الجنسية الجزائر وليس لي وطن فأنا مسلم

للتواصل **وطلب المذكرات** مجانا وبدون مقابل

هاتف : +213(0)771.08.79.69

بريدي إلكتروني: benaissa.inf@gmail.com

MSN: benaissa.inf@hotmail.com

فيس بوك: http://www.facebook.com/benaissa.inf

سكايب:benaissa20082

دعوة صالحة بظهر الغيب فربما يصلك ملفي وأنا في التراب ....

أن يعفو عنا وأن يدخلنا جنته وأن يرزقنا الإخلاص في القول والعمل..

ملاحظة: أي طالب أو باحث يضع نسخ لصق لكامل المذكرة ثم يزعم أن المذكرة له فحسبنا الله وسوف يسأل يوم القيامة وما هدفنا إلا النفع حيث كان لا أن نتبنى أعمال الغير والله الموفق وهو نعم المولى ونعم الوكيل....

لا تنسوا الصلاة على النبي صلى الله عليه وسلم

صل على النبي – سبحان الله وبحمدك سبحان الله العظيم-

بن عيسى قرمزلي 2013

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة منتوري قسنطينة
مخبر المنتجات الطبيعية ذات الأصل النباتي والاصطناع العضوي

كلية العلوم الدقيقة **قسم الكيمياء**

رقم الترتيب: .....
رقم التسلسل:.....

مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماجستير
في الكيمياء العضوية
شعبة كيمياء النبات
تحت عنوان:

فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي و دراسة الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل لنبتة

Origanum vulgare L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart

من تقديم الطالب : آيت كاكي فريد **تحت إشراف الأستاذ : بن كينيوار رشيد**

لجنة المناقشة:

البروفيسورصالح غواطي	**عميد كلية العلوم الدقيقة بجامعة منتوري قسنطينة**	**رئيس**
الدكتور بن كينيوار رشيد	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**مقرر**
الدكتور زلاقي عمار	**أستاذ محاضر بجامعة العربي بن مهيدي أم البواقي**	**ممتحن**
الدكتور فاروق زايدي	**أستاذ محاضر بجامعة فرحات عباس سطيف**	**ممتحن**

تشكرات

الحمد لله والصلاة والسلام على رسول الله وعلى آله وصحبه أجمعين .
أولا وقبل كل شيء أتقدم بالشكر الخالص والامتنان والتقدير، إلى من يعجز لساني عن إيجاد العبارات المناسبة لشكره ، ومنحني الصبر والتقوى ، وأنار طريقي بنور الإيمان والعلم ، إلى المولى القدير ، رب العزة ، جل جلاله .
وأتقدم بالشكر الجزيل إلى الأستاذ الفاضل بن كينيوار رشيد الذي لم يبخل علي بتوجيهاته ونصائحه القيمة والثمينة و هذا طوال مراحل إنجازنا لهذا البحث
كما أتوجه بجزيل الشكر إلى الأستاذ الفاضل الصالح غواطي ، الذي كان له الفضل في توفير كل الإمكانيات التي نحتاجها في بحثنا هذا ، وكذلك على قبوله للمشاركة في لجنة المناقشة.
وأتوجه بالشكر والامتنان أيضا للأستاذ زلاقي عمار الذي ساعدنا في إجراء هذا البحث ، وأيضا للمشاركة ضمن لجنة المناقشة ، كما أشكر أيضا الأستاذ فاروق زايدي على قبوله للمشاركة في لجنة المناقشة .
كما أتقدم بجزيل الشكر إلى جميع أفراد مخبر (physynor) على ما قدموه لي من نصائح وتوجيهات ، خاصة الأستاذ طويل أحمد ، ناصر عمار، صديقي اليمني علي سعيد لبيب المخلافي ، فيروز، نريمان ، أحلام ، منيرة ، وجميع أفراد دفعتي ،الذين أعتبرهم كإخوتي وأخواتي ،وأتمنى لهم كل النجاح والتوفيق ، كما لا أنسى كل من ساعدني من قريب أومن بعيد .
أخيرا أجدد شكري لله عزّ وجلّ الذي منحني التوفيق والنجاح .

وشكرا

الفهرس

الصفحة

مقدمـــة 1

مـــــــراجع المقدمة 3

الفصل الأول: مدخل لبعض المركبات الطبيعية التي يشتهر بها الأيض الثانوي للجنس *Origanum*

I ـ مدخل إلى العائلة الشفوية 6

I -1 ـ تعريف الجنس "*Origanum*" 6

I- 1 -1 ـ التوزيع الجغرافي ومناطق انتشار أنواع الـ (*Origanum*) 7

I -1- 2 ـ مناطق انتشار النوع "*Origanum vulgare* L." وأصنافه 9

I -2- تعريف الفلافونيدات..... 11

I -2 -1- كيمياء الفلافونيدات..... 11

I -2 -2- الإصطناع الحيوي للفلافونيدات..... 11

I-2 -3- أنواع الفلافونيدات..... 14

I -2-4- توزيعها في المملكة النباتية..... 17

I -2- 5- أهمية و دور الفلافونيدات..... 18

I - 2 ـ 6 ـ المركبات الفلافونيدية المعزولة من الجنس *Origanum*.....20

I-3- التربينـــــــات 24

I-3 -1- تعريف..... 24

I-3- 2 ـ تصنيف التربينات..... 25

I- 4- الزيوت الأساسية..... 25

I- 4 -1- البنيات المختلفة و أسماء و نظام الترقيم لأهم التربينات..... 27

I- 4 -2- الاستعمالات المختلفة للزيوت الأساسية..... 31

I- 4 -3 - الإصطناع الحيوي للتربينات..... 31.

I-4- 4 - طريقة استخلاص الزيوت الأساسية..... 34

I-4-5- طريقة كشف وتحليل مكونات الزيوت الأساسية..... 36

I- 4 -6 - حساب مردود الزيوت الأساسية 36

I-4-7- الزيوت الأساسية المستخلصة من الجنس "*Origanum* " 37
-مراجع الفصل الأول.....42

الفصل الثاني: طرق دراسة المركبات الفلافونيدية

II- طرق استخلاص،فصل، وتنقية المركبات الفلافونيدية.....53
II-1- الاستخلاص 53
II-2- الفصل والتنقية 54
II-3- الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونيدية 58
II-3-1- الخواص الكروماتوغرافية 58
II-3 - 2 - التقنيات الفيزيوكيميائية المختلفة 60
- مراجع الفصل الثاني 76

الفصل الثالث: الدراسة النباتية والكيميائية لنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart

III- الدراسة النباتية والكيميائية للنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart 80
III-1 - الدراسة النباتية.....80
III-1-3- المميزات والخصائص العلاجية.....81
III-1-3- أ- أهمية دراسة الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا للصنف *Origanum vulgar* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart.....82
III-1-4- التصنيف النظامي للنبتة.....83
III-2-الدراسة الكيميائية.....84
III-2-1- الكشف عن عائلة المركبات الكيميائية "نواتج الأيض الثانوي" عند النبات *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart.....84
III-2-2- استخلاص النبتة.....86
- خطوات عملية استخلاص المادة النباتية *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart.....87
III-2-2- أ- الاختبارات الكروماتوغرافية:..... 88

III-2- 2- ب- طريقة الفصل والتنقية..... 90
III-2- 2- ب-1- الفصل بواسطة كروماتوغرافية العمود..... 90
III-2-2-ج - معالجة العينات المختارة..... 92
- مراجع الفصل الثالث 94

الفصل الرابع: مناقشة النتائج العملية ودراسة الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل لنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart

IV- التحليل البنيوي للمركبات المعزولة.....96
IV-1 - التحليل البنيوي للمركب المعزول (FR1) 96
IV-2- التحليل البنيوي للمركب المعزول(FR 2) 108
IV - 3 - التحليل البنيوي للمركب المعزول (FR 3) 123
IV - 4 - دراسة الفعالية البيولوجية 134
IV-4-5- نتائج الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل لنبات
Origanum vulgare L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart 136
- مراجع الفصل الرابع 139
- الخاتمة.....140
- الملخص 141

Nom du document : sommaire
Répertoire : C:\Documents and Settings\poste\Bureau\thèse de Farid
Modèle : C:\Documents and Settings\poste\Application Data\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Titre :
Sujet :
Auteur : farid
Mots clés :
Commentaires :
Date de création : 16/04/2011 19:45:00
N° de révision : 93
Dernier enregistr. le : 22/08/2011 22:43:00
Dernier enregistrement par : lenovog550
Temps total d'édition :195 Minutes
Dernière impression sur : 23/08/2011 00:16:00
Tel qu'à la dernière impression
Nombre de pages : 5
Nombre de mots : 1 359 (approx.)
Nombre de caractères : 7 477 (approx.)

مقدمـــة:

ترجع العلاقة بين الإنسان والنبات إلى عصور ما قبل التاريخ، سواء على مستوى الاستعمال الغذائي وهذا ما يكسبها القيمة الاقتصادية أو على مستوى الاستعمال العلاجي والوقائي وهو ما يكسبها القيمة الإستشفائية والطبية، منذ العصور الأولى للإنسان إلى يومنا هذا.

حيث تشير كل من الحضارات المختلفة، كالحضارة الصينية، الهندية ، و حضارة شمال إفريقيا أن الإنسان استعمل النباتات و الأعشاب في علاج بعض الأمراض التي كانت تصيبه، أو تصيب حيواناته الأليفة، و استخدمها، إما في صورتها الطبيعية ، أو مستخلصة كالزيوت الأساسية (زيوت عطرية) و هذا لفترة زمنية تقارب الـ 6000 سنة[1].

ومن الحقائق التاريخية في هذا المجال نسجل أنه في سنة 2700 ق.م تم وضع المخطوط الأول على يد الإمبراطور الصيني Shennong [2] ذكر فيه ما يقارب من 100 نبتة طبية، متبوعا بالأمبراطور Huoungli بمخطوطه الذي يظم حوالي 200 نبتة طبية وذلك في حدود سنة 2640 ق.م.، أما عن الحضارات أخرى، فنسجل عند الإغريق Grecs أعمال هامة نذكر منها الأعمال التي قام بها كل من Hippocrate [1] الذي تمكن من تصنيف حوالي 300 نبتة طبية مدونة في مخطوطه وكذلك Discorides [1] الذي وضع مخطوطا يضم ما يزيد عن 600 نبتة طبية، و عند العرب فتمكن إبن البيطار من وضع مخطوط يضم ما يفوق من 1400 دواء ونبات طبي [2].

أما في أوروبا لم يحظى هذا المجال الحيوي بالإهتمام إلا بعد القرن الثالث عشر، وهذا مع ظهور و تطور وسائل الطباعة والنسخ، حيث انتقلت المخطوطات إليها مع انتشار الحضارة الإسلامية، إذ أهتم بدراسة هذا المجال الثري بعناية كبيرة، و منذ ذلك الوقت بدأ الأوروبيون في استعمال النباتات في ميدان الطب الشعبي Pharmacopée traditionnelle ، غير أنه ما يعاب على طريقة الاستعمال هذه أنها لم تكن علمية بل كان استعمال النباتات بطريقة عشوائية، لهذا اهتم الأوروبيون خاصة مع تطور الوسائل العلمية والتكنولوجية بتطوير هذا المجال لاسيما في المملكة المتحدة (UK) [3] ، فأصبح يحظى باهتمام كبير سواء في طرق تحضير الدواء الطبيعي من النبات أو البنيوي لتشخيص هذا الدواء واستعماله في التداوي.

مع بداية القرن العشرين ، تمكن الفرنسيان[4] Caventou و Pelletier من فصل المركب Quinine من Cinchona [5] ،وهو يعتبر أول مركب طبيعي فعال مفصول من النباتات الطبية في تلك الفترة [5] ، ومنه إزداد الإهتمام بهذا المجال فأسست لهذا الغرض عبر العالم مخابر متطورة لفصل المواد الفعالة الطبيعية ودراستها ، مثل مخابر الأستاذ Harbone الذي أولى بدوره اهتماما كبيرا

لفصل العديد من المركبات الفلافونيدية بعد الحرب العالمية الثانية ، و تلاه باحثون أخرون. فتم فصل العديد من المركبات الفعالة من النباتات، واستخدمت كعوامل في معالجة الأمراض، بعضها لازال مستخدما إلى غاية الآن، نذكر منها على سبيل المثال الـ Morphine والـ Codéine المفصولين من نبات الـ *Opium* وكذلك الـ Poppy وDigitoxine المفصولين من أوراق *Digitalis* . بعد الحرب العالمية الثانية تراجع إستعمال المضادات الحيوية (antibiotiques) ،وهذا بسبب اكتشاف الفعالية المضادة للبكتيريا (antibactériennes) لسلسلة المركبات المفصولة من أصناف الـ *Penicillium, Cephalosprium* و *Streeptomyces* ، و بعد هذه الفترة لم نسجل اكتشاف مركبات عديدة فعالة بيولوجيا من أصل نباتي باستثناء مركب Réserpine من أصناف نبات *Rauwolfia*.

بالرغم من هذه النتائج العلمية الناجحة وأمام التقدم الصناعي الصيدلاني و المصاحب للثورة التيكنولوجية فلم يخلي إستعمال المنتجات الصيدلانية من ظهور عيوب وآثار جانبية عند الأشخاص،ناتجة بدورها عن إستعمال المخدرات والأدوية المصنعة كيميائيا وبمقارنتها بالنتائج الجد إيجابية المتحصل عليها في إستعمال الأدوية المستحضرة طبيعيا في معالجة بعض الأمراض و التي فاقت بكثير النتائج الصيدلانية نذكر هنا مثال استعمال دواء الـ Taxol ومشتقه Taxotere والمحضر مخبريا [6]. حيث تبين بأن مستخلصه الخام والمستخلص من النبات *Taxus brevifolia* هوأكثر فعالية (ضد السرطان). هذا ما أدى إذن بالعديد من الباحثين الصيدلانيين والكيميائين للرجوع إلى استعمال النباتات في التطبيب الشعبي وفق أسس علمية دقيقة.

لهذا الغرض ظهر مؤخرا ميدان الإثنوفرماكولوجيا Ethnopharmacologie [8،7] و هو ميدان جديد يهتم بتقييم النباتات الطبية المستعملة في الطب الشعبي[9-11]، ودراستها بالوسائل المتطورة للصناعة الصيدلانية آخذا في الاعتبار جميع المعطيات العلمية، منها: البيولوجية، الكيمائية، الإجتماعية والاقتصادية ، حتى يمكن الاستفادة منها في الميدان الطبي بطريقة أنجع وأكثر فائدة ، لهذا يمكننا اعتبار النباتات من أهم المصادر الإستراتيجية لصناعة الأدوية هذا بالإضافة إلى استعمالها في ميدان التغذية كالتوابل والزيوت الغذائية أو الزيوت الأساسية المستخدمة في صناعة العطور والمواد التجميلية [12] .

فتركز إهتمامنا في هذا البحث إذن على الفصيلة الشفوية (Lamiacea) ، والتي تضم الجنس *Origanum* حيث يتميز بأنه غني بالمركبات الطبيعية كالتربينات [13]، الفلافونيدات [14] ، إضافة إلى ذلك تميز الأنواع المنتمية إليه بالخصائص العلاجية [15- 17] ، كما يهدف هذا البحث كذلك إلى:

- دراسة بعض المركبات الطبيعية التي يشتهر بها الأيض الثانوي للجنس " *Origanum* ".
- دراسة المركبات الفلافونيدية المفصولة من النبتة *Origanum vulgare* L.Sbsp. " *glandulosum* (Desf) Ietswaart "
- دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص خلات الإثيل للنبتة *Origanum vulgare* L. " Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart "

مـــــــراجع المقدمة:

[1] John, A., Wilkinson, P. D.,(1934).The Materia Medica,Oxford.

[2] Wong, K.,(1985). The History of Chinese Medicine. Second Ed, Southern Center Fnc., Taipie.

[3] Cox, P. A., Balix, M. J.,(1994). Le Scienze, 312, 62.

[4] Caventou, B., Pelletier, J. B.,(1820). J. Ann. Chim. Phys, 14, 69.

[5] Phillipson, J. D.,(1995). A matter of some sensitivity. Phytochemistry, 38,1319-1343.

[6] Fleurentin, J.,(1993). Ethnopharmacologie et aliments: introduction au sujet et réflexions sur l'éfficacité biologique. Médicaments et aliments: l'approche ethnopharmacologique, II éme Colloque européen d'Ethnopharmacologie et XXIème Conférence international d'Ethnopharmacologie, Heidelberg.

[7] Alcorn, J. B.,(1996). Inaugural address. In S.K.Jain: Ethnobiology in human weffare, lucknow (Inde), DEEP publ , New Delhi.

[8] Dasgupta, S.,(1998). Share-ware. Down to earth, 7 (12).

[9] Hoefler, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J. M., Guillrmain, J.,(1987). Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats, J. Ethnopharmacology, 19, 133-144.

[10] Lexa, A., Fleurentin, J., Lehr, P. R., Mortier, F., Pruvost, M., Pelt, J. M., (1989). Choleric and hepatoprotective properties of *Eupatorium cannabinum* in the rat. Planta Medica, 55 (2), 117-132.

[11] Rolland, A., Lanhers, M. C., Younos, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J. M., (1990). Etude de l'effet sedative et anxiolytique d'*Eschscholzia*

californica. Cham.plante utilisée traditionnellement en Amérique Centrale. Planta Medica, 57 (3), 212-217.

[12] Swaminatham, M. S.,(1996). Inaugural address .In S.K.Jain. Ethnobiology in human welfare, Lucknow (Inde), Deep publ., New Delhi.

[13] Skoula,M., Gotsiou,P.,Naxakis,G., Johnson, C. B.,(1999). A chemosystematics investigation on the mono-and sesquitrepenoids in the genus *origanum* (Labiatae). Phytochemistry ,52, 649-657

[14] Wollenweber, E.,(1984). The systematic implication of flavonoids secreted by plants. Biology and Chemistry of Plant Trichomes. Plenum Press, New York, 53–69.

[15] Baba Aissa, F.,(1999). Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie moderne-Rouiba, 194-231.

[16] Sijelmassi ,A.,(1991). Les plantes médicinales du Maroc. 2^{e} éd., Le Fennec, 199.

[17] Chiej, R., (1984). Macdonald encyclopedia of medicinal plants. Ed Macdonald, London, 212-217.

الفصل الأول

مدخل لبعض المركبات الطبيعية التي يشتهر بها الأيض الثانوي للجنس *Origanum*

I ـ مدخل إلى العائلة الشفوية :

من بين النباتات التي تظهر في حياتنا اليومية، تلك التي تنتمي إلى العائلة الشفوية (Lamiaceae)، وميزتها هي الزيوت الطيارة التي تفرزها الغدد المنتشرة على كافة أجزائها الهوائية، والتي تستعمل في عدة مجالات صناعية من بينها صناعة العطور والصناعات الغذائية.

ومن بين هذه الأنواع المعروفة نجد الخزامى : Lavande ، الجعدة: Germandrée، النعناع:Menthe ، الإكليل: Romarin ، الزعتر:Thym ، الحبق "الريحان": Basilic. حيث تعتبر هذه العائلة غنية بالمركبات الطبيعية كالتربينات ،المركبات الفينولية ، و القلويدات.

ويعود أصل تسميتها إلى الكلمة اللاتينية Labium, والتي تعني الشفتين. معظم هذه النباتات أعشاب حولية أو معمرة أو شجيرات سيقانها قائمة. أما أوراقها فتكون متقابلة متعامدة بسيطة بلا أذنيات، زهراتها غير محدودة، قد تكون لولبية أو بسيطة ذات شعبتين أو عقربية وهي عند كل عقدة تكون ما يشبه السوار. ويكون شكلها إما سنبلي أو عنقودي أو هامي. زهراتها خنثى وحيدة التناظر سفلية، ويتألف الكأس من خمسة سبلات ملتحمة ومستديمة وهو أنبوبي الشكل أو شفوي أو مسنن.يتألف التويج من خمسة بتلات ملتحمة على شكل شفتين،أما الطلع فيتألف من أربعة أسدية ، ويتكون المتاع من كربلتان ملتحمتان وقلم واحد ينتهي بميسمين . أما القرص الغدي فيقع في أسفل المبيض وأحيانا يكون بشكل غدة كبيرة على الجانب الأمامي ، يوجد في المبيض حجرتان لكل واحدة منهما بويضتان . أما الثمرة فتتكون من أربع ثميرات تقع بداخل الكأس، وتحتوي البذرة على السويداء l'endosperme وكثيرا ما يمتصها الجنين (الرشيم) . تشتمل هذه الفصيلة على حوالي 200 جنس و 6000 نوع تنتشر في جميع أنحاء العالم خصوصا حوض البحر الأبيض المتوسط [1،2].

I -1 ـ تعريف الجنس "*Origanum*":

ينتمي الجنس (*Origanum*) للعائلة الشفوية (Lamiaceae)، يحتوي على 43 نوع و 6 أصناف مصنفة في 10 أقسام، إضافة إلى ذلك فقد تم الوصول لمعرفة 18 نوع هجين [3،4]. كثيرا ما تتواجد هذه الأنواع في المناطق (الأوربية ـ السيبيرية، والإيرانية - السيبيرية) الشكل(I -1) [5]، مع ذلك فإن معظمها أي حوالي (75%) منها تتركز في حوض البحر الأبيض المتوسط ، خاصة الجهات الشرقية منه [6،7] ، حيث تمتاز مختلف الأنواع المنتمية إلى هذا الجنس بأنها نباتات عشبية أو ذات الشجيرات القصيرة، وأنها حولية "تنبت طوال السنة " ولها الخاصية العطرية [8،9] . انطلاقا من كلمة (origan)،والمشتقة من الكلمتين اليونانيتين (oros) و(genos) والتي تعني "ضوء الجبال" ، فالـ (origan) يعتبر نوع من أنواع الـ "marjolaine" البرّي والمسمى علميا باسم "*Origanum majorana*" حيث أنه يزين ويعطي الرائحة المنعشة للغابات والطبيعة الجبلية [10]. إن الجنس "*Origanum*" والمسمى باللغة العربية باسم " الزعتر " والمعروف في الأوساط الشعبية في

شمال إفريقيا " الجزائر، تونس ، المغرب " باسم "الزعتر" أو "الصعتر "، وهو يستعمل في بعض الأطعمة التقليدية ، ويعتبر مهم كنبات طبّي في معالجة الأمراض المستعصية ومعالجة السعال والأمراض التنفسية ، حيث يتم استخدام الأوراق الجافة جزئيا وأيضا الأجزاء العليا المزهرة منه، كما تنسب له الفعاليات التالية [11-13]:

- مضاد للتنخّم (البلغم) Expectorant
- دواء للمعدة Stomachique
- منشط ، مقوي، محرض Stimulante
- فعّال Tonique
- مطهّر ومانع العفونة "تعفن الجروح" Antiseptique
- مضاد للتشنج Antispasmodique
- له الفعالية في حفظ الأطعمة من الجراثيم والبكتيريا [14،15]

كما يستعمل أيضا كمادة عطرة و مكمّلة لإنتاج العطور[11-13].

ومن الأنواع المعروفة بكثرة عند هذا الجنس نجد *Origanum vulgare* L. والمعروف باسم (*Oregano*) خاصة في أوربا [16،17] ،إضافة إلى *Origanum majorana* L. والمسمى باسم marjoram [18] أو sweet marjoram [19] أي يمتاز بمذاقه الحلو، حيث يعتبر نبات عشبي معروف ومهم في معالجة مرض عدم تخثر الدم [20،21] "أي التصاق الصفائح الدموية" أثناء حدوث النزيف أو الجرح ،وهو معروف خاصة في الطب التقليدي الإيراني [18].

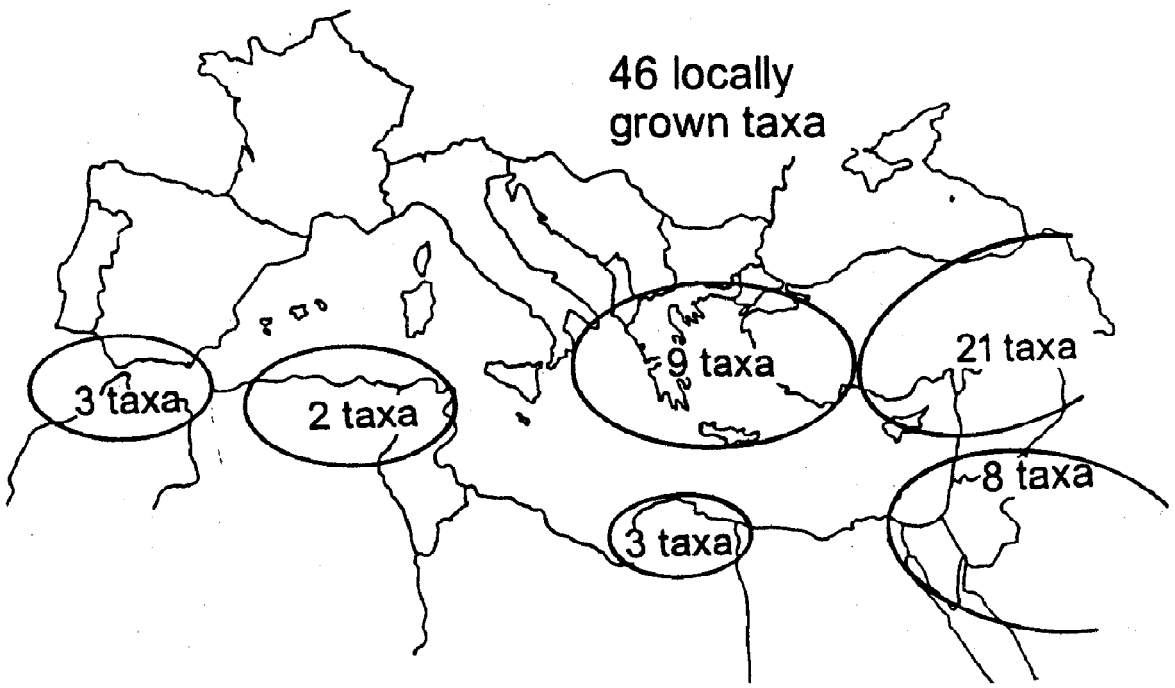
إذن يعتبر الجنس (*Origanum*) غنيا بالمركبات الطبيعية منها الفلافونيدات[22]، الستيرولات ، التنينات، الراتنج (Résine)، إضافة إلى الزيوت الأساسية والمحتوية على التربينات بأنواعها [8]، فكل هذه المركبات تعتبر مسؤولة على العديد من الفعاليات البيولوجية المذكورة آنفا [23،24] .

I- 1 - 1 - التوزيع الجغرافي ومناطق انتشار أنواع الـ (*Origanum*) :

تنتشر معظم أنواع هذا الجنس في الجهات المطلة على حوض البحر الأبيض المتوسط ، فنجد أن هناك ثلاثة معروفة في المغرب الأقصى وجنوب إسبانيا ، اثنتان معروفة في الجزائر وتونس ، ثلاثة مستوطنة في برقة " شمال شرق ليبيا "، تسعة مقتصرة على اليونان وجنوب البلقان وآسيا الصغرى (ستة مستوطنة محليا في اليونان) ، كما تم العثور على واحد وعشرون نوع في تركيا وقبرص وسوريا ولبنان (واحد وعشرون مستوطنة محليا في تركيا) ، وثمانية موزعة محليا في كل من فلسطين والأردن وشبه جزيرة سيناء المصرية [25] ، والشكل (I-2) يوضح ذلك.

نطاق انتشار الجنس *Origanum* في إفريقيا، أوروبا وآسيا

الشكل (I -1): التوزيع الجغرافي للجنس *Origanum*



الشكل (I-2):مناطق تواجد أنواع الجنس" *Origanum* " في مختلف جهات حوض البحر المتوسط

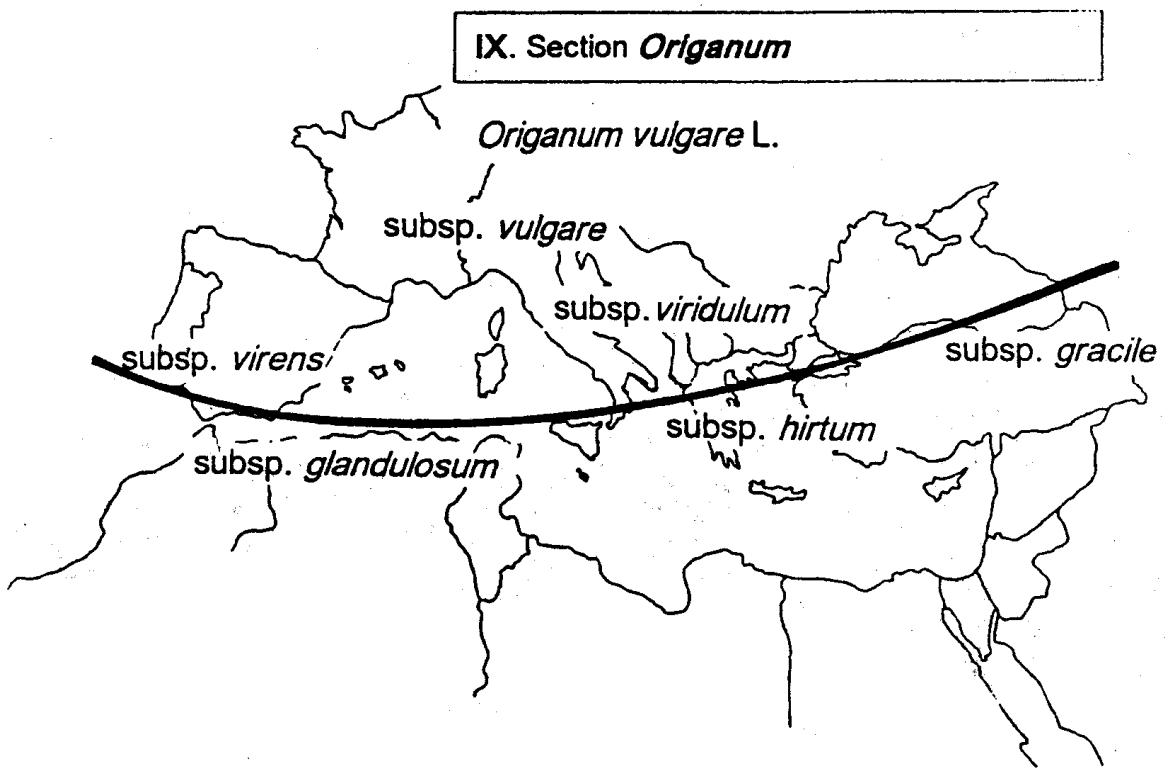
I -1- 2 - مناطق انتشار النوع "*Origanum vulgare* L." و أصنافه:

ينتمي النوع (*Origanum vulgare* L.) إلى القسم المرتب تاسعا(حسب ترتيب Ietswaart لسنة 1980) والذي يحمل بدوره نفس اسم الجنس المدروس، أي القسم *Origanum* ، فهذا القسم يعتبر أحادي النوعية، حيث يحتوي على نوع واحد فقط وهو *Origanum vulgare* L. وأصنافه [3].
ويتوزع هذا النوع على نطاق واسع في أوراسيا (أي في قارتي أوربا وآسيا) وشمال إفريقيا ، وقد انتشر وانتقل مع الإنسان منذ القدم ، بحيث تم العثور عليه أيضا في أمريكا الشمالية [3].
تمتاز نباتات هذا النوع بأنها كثيفة وشائكة، لها كؤوس أنبوبية الشكل تحتوي على خمسة أسنان، بحيث لا تكون لولبية في الثمرة.
ستة أصناف (sous - espèces) من النوع *Origanum vulgare* L. أصبحت معروفة ومتميزة عن بعضها البعض على أساس الاختلاف الموجود فيما بينها من حيث،عدد الغدد الدهنية المتصلة بالأوراق، الاختلاف في عدد الأوراق في قاعدة الزهرة ، عدد الكؤوس ، حجم ولون الأوراق في قاعدة الزهرة ، وكذلك الاختلاف في حجم ولون الأزهار .
و كما هو موضح في الشكل (I -3)، فإن ثلاثة أصناف من النوع (*Origanum vulgare* L.) و الواقعة تحت الخط المبين فهي تعتبر غنية بالزيوت الأساسية، في الحين أن الأصناف الفقيرة من الزيوت الأساسية فهي واقعة ومنتشرة فوق الخط.

والجدول (I-1) التالي يبين مناطق توزيع أصناف النوع (*Origanum vulgare* L.) [25] :

الجدول (I -1) : مناطق توزيع أصناف النوع (*Origanum vulgare* L.)

الأصنـــــــاف	مناطق الانتشـــــــار
O. vulgare* L. subsp. *Vulgare	أوربا ، إيران ، الهند ، الصين
***O. vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart**	الجزائر، تونس
***O. vulgare* L. subsp. *gracile* (Koch) Ietswaart**	أفغانستان ، إيران ، تركيا ، جمهوريات الإتحاد السوفياتي سابقا
***O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart**	ألبانيا ، كرواتيا ، اليونان ، تركيا
***O. vulgare* L. subsp. *viridulum* (Martrin-Donos)Nyman**	أفغانستان ، الصين ، كرواتيا ، فرنسا ، اليونان ، الهند ، إيران ، إيطاليا، باكستان
***O. vulgare* L. subsp. *virens* (Hoffmannsegg & Link) Ietswaart**	المغرب،إسبانيا،البرتغال،جزر الكناري،الباليار(إسبانيا)، جزر الآزور، ماديرا (البرتغال)



الشكل (I -3): عرض مبسط لمناطق انتشار الأصناف المعروفة للنوع *Origanum vulgare* L .

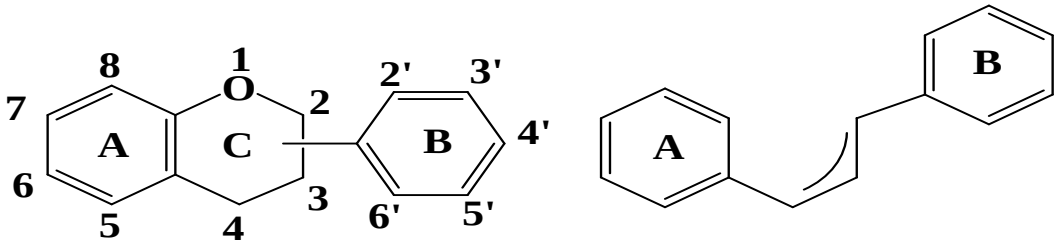
I -2 - تعريف الفلافونيدات:

الفلافونيدات هي مجموعة كبيرة من المركبات الطبيعية الواسعة الانتشار في المملكة النباتية، إذ تحول النباتات نحو 2% مما تنتجه من الكربون العضوي إلى فلافونيدات (ما يعادل 10^9 طن في العام الواحد) [26]. و تشتق كلمة فلافونيدات من Flavus التي تعني أصفر في اللاتينية، وهو المصطلح العام لمجموعة كبيرة من المركبات الفينولية التي عرفت لأول مرة من قبل العالم "Albert Szent-györgyi" و الذي صنفها على أساس أنها فيتامين P [27].

تمتاز الفلافونيدات بصفة التعدد والتنوع ،بالإضافة إلى اختلاف فعالياتها البيولوجية وأثر استهلاكها لدى الإنسان ، هذا ما جلب إليها اهتمام الباحثين و المخبريين في مجالات عدة خاصة في الصيدلة، والتغذية.

I -2 -1- كيمياء الفلافونيدات:

تظهر الفلافونيدات في النباتات ببني كيميائية مختلفة، إذ تم التعرف على أكثر من 9000 فلافونيد [28]، جميعها تشترك في الهيكل القاعدي الذي يتكون من 15 ذرة كربون، تتوزع على حلقتين عطريتين A وB ترتبطان بسلسلة من ثلاث ذرات كربون ، و في غالب الأحيان الجسر الرابط بين الحلقتين A وB يتحلق ليكون الحلقة البيرانية C [29] حسب الشكل (I -4).



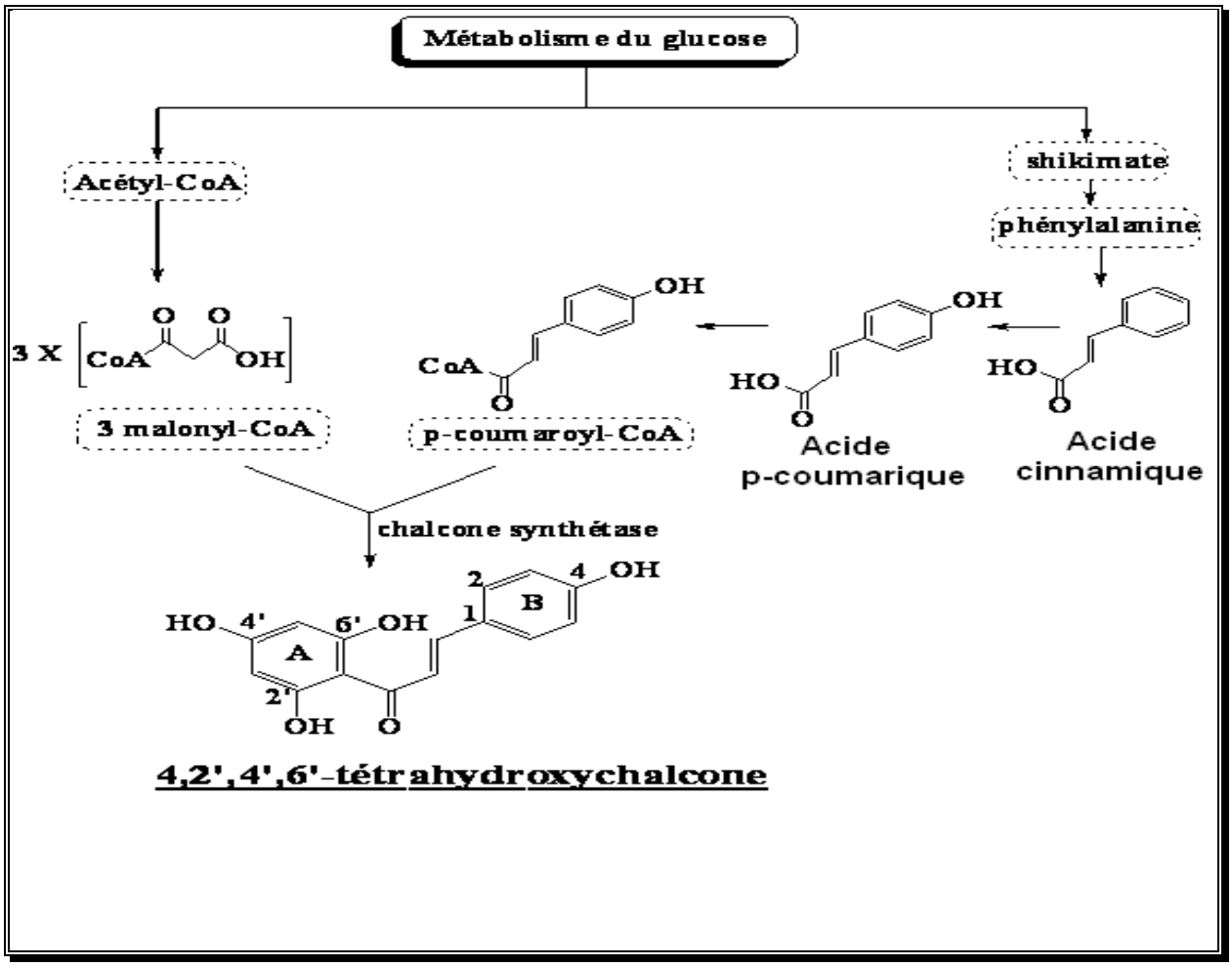
الشكل (I -4): الهيكل القاعدي للفلافونيدات

I -2 -2- الإصطناع الحيوي للفلافونيدات:

تشترك كل الفلافونيدات في هيكلها القاعدي لأنها تشتق من نفس الأصل الحيوي، إذ تتشكل الحلقة A من تكاثف ثلاث جزيئات (malonyl-coenzyme A) الناتجة عن أيض الجلوكوز،و يؤدي أيض الجلوكوز أيضا بطريق (shikimate) إلى phénylalanine، ثم إلى *p*-coumaroyl-CoA إلى تشكيل الحلقة B وسلسلة من ثلاث ذرات كربون.

كخطوة موالية يتكاثف جزيء *p*-coumaroyl-CoA مع ثلاث وحدات للـ malonyls-CoA في نفس المرحلة الإنزيمية لينتج عنها الشالكون (4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone) ذو اللون الأصفر، عن طريق إنزيم (chalcone synthétase) الذي يمثل النواة الأولى لبناء مختلف أنواع

الفلافونيدات[30] كما يتضح ذلك في الشكل (I-5)، و تتشكل الحلقة C من تحلق الشالكون عن طريق الـ chalcone isomérase لينتج الـ (Flavanone).

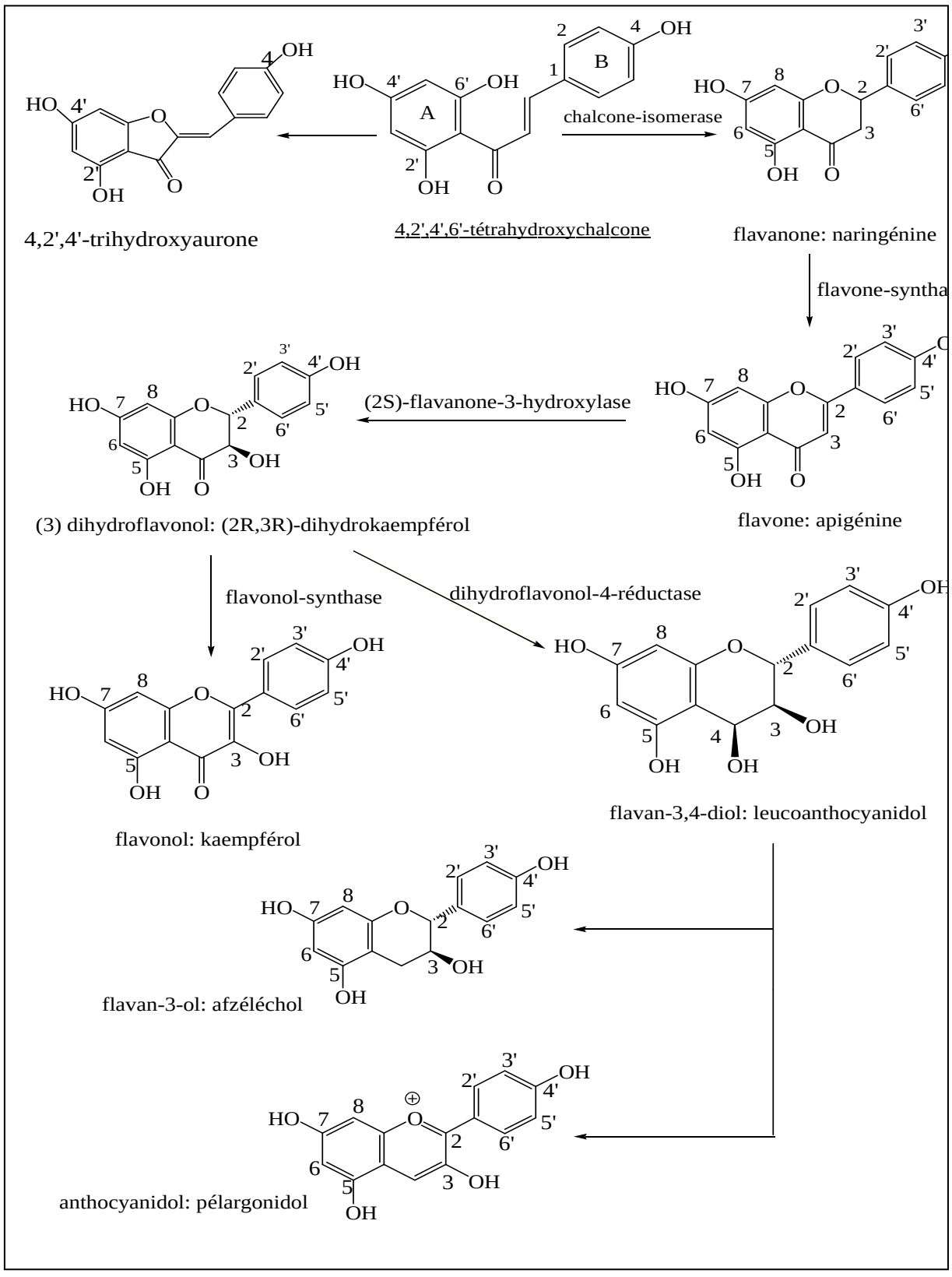


الشكل (I-5): الإصطناع الحيوي لنواة الشالكون.

كما يتحول الـ (Flavanone) إلى (Flavone) عن طريق إنزيم (Flavone synthase) الذي يحفز تشكيل رابطة مزدوجة بين الكربونين (C-2 وC-3)، أو إلى (Dihydroflavonol) بفعل الإنزيم ((*2S*)-Flavanone-3-hydroxylase)، الذي يحفز إدخال مجموعة OH على الكربون C-3.

أما الـ Dihydroflavonol الناتج في وجود الإنزيمين (Flavonol synthase) أو (Dihydroflavonol-4-réductase) يتحول إلى (Flavonol) أو إلى (Flavan-3,4-diol)

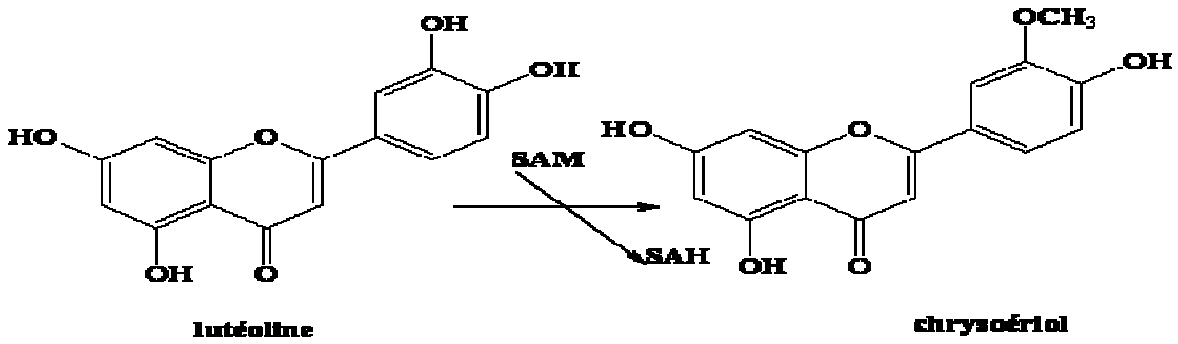
على الترتيب ،هذا الأخير يمكن أن يكون مولدا لـ (Flavan-3-ols) و (Anthocyanidols) حسب الشكل (I-6) الموالي:



الشكل (I-6): الاصطناع الحيوي لمختلف الفلافونيدات انطلاقا من نواة الشالكون.

تتواجد الفلافونيدات أيضا مستبدلة بعدة مجموعات وظيفية (الأستيل، سكر، مثيل ...) حيث يتم إدخال هذه المستبدلات أثناء عملية اصطناعها الحيوي بمحفزات إنزيمية خاصة، نذكر على سبيل المثال إدخال مجموعة الميثوكسيل، فتتم عملية مثيلة مجموعات الهيدروكسيل عن طريق إنزيم O-Méthyl-transférase ومانح للمثيل S-adénosyl-méthionine (SAM) [31].

في حالة الهيدروكسيلات (OH) الأصلية، فالتفاعل يتم قبل تشكيل نواة الشالكون، كما يمكن أن يتم كذلك بعد هذه المرحلة وعلى مجموعات الـ (OH) الأخرى ، مثل مثيلة Lutéoline ليعطي Chrysoériol الشكل (I-7).



الشكل (I-7): تفاعل مثيلة هيدروكسيل أصلي بعد غلق النواة C.

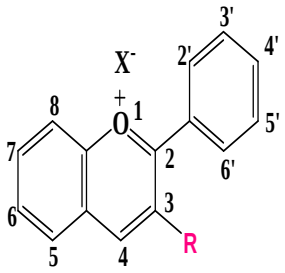
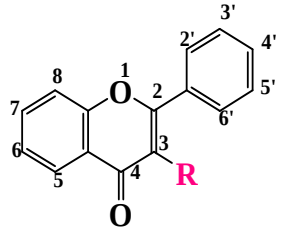
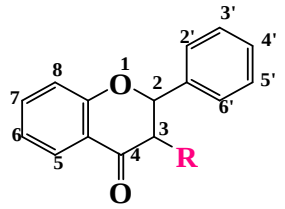
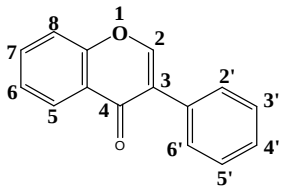
أما تثبيت عدة ميثيلات فإنه يتم من خلال نمط من التفاعلات التسلسلية ويقتضي ذلك أيضا وجود بروتينات إنزيمية مختلفة، و هو الحال بالنسبة لتثبيت عدة ميثيلات على الـ quercétine، فالإنزيم الأول يحفز تحول quercétine إلى 3-méthyl quercétine، والثاني يحفز تحول هذا الأخير إلى 3,7-diméthyl quercétine، و هكذا الحال بالنسبة لتشكيل ثلاثي مثيل الكرستين 3,7,3'-triméthyl quercétine، ونادرا ما تكون المستبدلات الميثيلية في المواقع 6 و 8.

I-2 -3-أنواع الفلافونيدات:

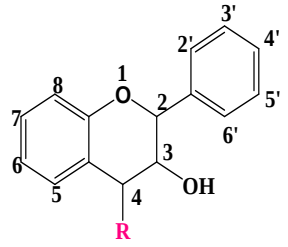
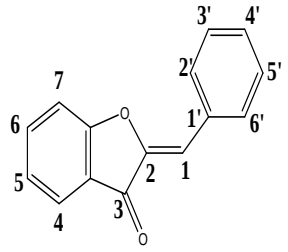
تختلف أقسام الفلافونيدات حسب نوع التحلق، عدم تشبع و درجة أكسدة الحلقة C ،في حين يحدد نوع الفلافونيد داخل المجموعة الواحدة من خلال المستبدلات على الهيكل الفلافونيدي ككل .

أهم أقسام الفلافونيدات حسب نوع تحلق الوحدة C و درجة تأكسدها نلخصها في الجدول(I-2).

الجدول (I-2): أنواع الفلافونيدات

أهم المركبات		مختلف أقسام الفلافونيدات		
التسمية	مواقع OH	اسم العائلة	البنية	المشتقات
Apégénidine Lutéolidine	**5,7,4'** **5,7,3',4'**	**R= H Flavylium (Anthocyane)**		2-phényl-benzopyriliums
Cyanidine	**5,7,3',4'**	**R=OH Anthocyanidine**		
Apéginine Lutéoline	**5,7,4'** **5,7,3',4'**	**R= H Flavone**		2-phényl-chromones
Kaempférol Quercétine	**5,7,4'** **5,7,3',4'**	**R= OH Flavonol**		
Naringénine Butine	**5,7,4'** **7,3',4'**	**R= H Flavanone (dihydroflavone)**		
Fustine Taxifoline	**7,3',4'** **5,7,3',4'**	**R=OH Flavanonol**		
Daidzein Orobo	**7,4'** **5,7,3',4'**	**Isoflavone**		Phényl-3-chromone

الجدول (I-2):أنواع الفلافونيدات (تابع)

مختلف أقسام الفلافونيدات				أهم المركبات	
المشتقات	البنية	إسم العائلة	مواقع OH	التسمية
2-phényl-chromanes		**R= H Catéchine (flavanol-3)**	**5,7,3'4',5'** **5,7,3',4'**	Galocatéchine Catéchine
		R=OH Leucoanthocyanidine (flavandiol-3,4)	**5,7,3',4'**	Leucocyanidine
2-benzylidène-coumaranones (aurone)		**Aurone**	**6,3',4'** **6,7,3',4'**	Sulphurétine Maritimétine

تصنف الفلافونيدات أيضا حسب حجمها الجزيئي. حيث معظمها أحادي الجزيئة، كما وجدت أيضا في الشكل المتعدد الثنائي، الثلاثي، الرباعي ... و معظم الفلافونيدات الثنائية (Biflavonoïdes) ترتكز على الارتباط كربون- كربون لجزيئتين متماثلتين من وحدات الفلافون، كما تعرف أيضا الجزيئات المختلطة للفلافونيدات مثل(Flavonylflavanones).

غالبا ما تحوي الهياكل الفلافونيدية مجموعة OH في المواقع 3 ،5،7، 3'، 4'، و/أو5'، وفي كثير من الأحيان تستبدل واحدة أو أكثر من هذه الهيدروكسيلات بمجموعات أخرى مثل: méthyles، acétyle، prényles وsulfates ....

من المهم الإشارة أن الفلافونيدات تتواجد في الشكل الأجليكوني غير المستبدل بسكريات ، كما أن العديد منها يوجد طبيعيا في الشكل الإيتيروزيدي [32] ،وهي غالبا من النوع Flavone، Flavonol ، Flavanone و Dihydroflavonol ، بحيث تكون مستبدلة بسكر في الموضع 3 ، لكن كذلك في المواضع 5 و/ أو7 ، حيث الشق الجليكوزيدي يكون مرتبط من الشكل (O- سكر) كما يمكن أن يكون الإرتباط من النوع (C- سكر) خاصة إذا كان الإستبدال في الموضعين 6 و/ أو 8.

ويمكـن أن تكـون هـذه السـكريات إمـا أحاديـة منهـا: Glucose، Galactose، Arabinose، Rhamnose، Xylose، Allose، Mannose ، أو متعددة [33].

I -2-4- توزيعها في المملكة النباتية:

النباتات هي الوحيدة القادرة على تصنيع الفلافونيدات عدا استثناءات قليلة جدا، إذ تم استخراجها من مرجان بحري وعدد قليل من الفطريات [34]. فقد تم الكشف عن وجود مركبات فلافونيدية لدى الطحالب، و كاسيات الزهر الوعائية، وعند عاريات و كاسيات البذور [35]. وتنتشر بشكل واسع لدى هذه الأخيرة (Angiospermes) أين يبلغ التنوع النباتي أقصاه [36].

و قد لوحظ تواجد بعض أقسام الفلافونيدات في مجموعات نباتية معينة تكون مميزة لها، كالإيزوفلافونات المميزة للعائلة البقلية [37]، إضافة على ستة عائلات نباتية أخرى مما جعل مؤخراً علماء النبات يربطون بين انتشار هذه المركبات الفلافونيدية والتصنيف النظامي للنّبات (Systèmes taxonomiques) [38،39] و مما ساعد على ذلك توزيعها شبه التام في النباتات، استقرارها النسبي، وسهولة تحديدها وقوة ميل النباتات إلى إنتاج نفس النوع من الفلافونيدات مما جعل منها مؤشرات كيميائية اختيارية في هذا التصنيف [40،41] . يمكن أن تتواجد الفلافونيدات في معظم أجزاء النبات، و خاصة في الشكل الإيتيروزيدي لأن هذا الشكل يجعلها أقل تفاعلا و أكثر انحلالا في الماء مما يسهل تخزينها في فجوات الخلايا، خلايا و حويصلات الأوراق، في البراعم والجذور و في خلايا البشرة للأزهار [36].

أما الفلافونيدات التي تنحلّ في المذيبات غير القطبية، كالفلافونيدات عديدة الميثوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية [42]، حيث تتموضع الفلافونيدات الأجليكونية على الأنسجة السطحية للأوراق، وتكون ملازمة لمواد ذات طبيعة ليبوفيلية (أي مواد لها قابلية إذابة الدهون والزيوت والشحوم) وهو الحال بالنسبة لنباتات المناطق الجافة وشبه الجافة [36،43]، كما تتواجد في الأنسجة النباتية الميتة (نتيجة التمييه الحمضي المحفز بواسطة الإنزيمات) وكذا في خشب الأشجار [42].

لوحظ أن Flavanones و Flavones غالبا ما تتواجد معا في نفس النبتة، و كذا Flavanols وAnthocyanes على عكس Flavones وFlavonols فهي عادة لا تظهر معا في النبات الواحد[44].

عضوية الإنسان غير قادرة على تصنيع الفلافونيدات، لكن غنى النباتات بهذا النوع من المركبات جعلها تتوفر في غذائه اليومي: في الفواكه خاصة القشرة الخارجية لها (البرتقال، العنب،...)، في الخضر وخاصة الورقية منها (الخس، البصل، السبانخ...)، في البذور (الفول، الكاكاو،...)، أوراق الشاي... والجدول (I-3) الموالي يظهر توزيع الفلافونيدات في بعض المصادر الغذائية [45-48].

الجدول(I-3): بعض المصادر الغذائية التي تحوي أنواع الفلافونيدات المعروفة .

الهيكل الفلافونيدي	الفلافونيدات	العناصر الغذائية
Flavanones	Naringénine	الفواكه من نوع الليمون
Flavones	Chrysine	قشر الفواكه
	Apigénine	البقدونس،الزعتر،إكليل الجبل، الكرفس
	Lutéoline	البقدونس ،الكرفس
Flavonols	Kaempférol	الشاي الأسود، القرنبيط، الفجل
	Quercétine	البصل،التفاح، الزيتون، الطماطم
	Myricétine	التوت البري.
Flavan-3-ol	Épicatéchine	الشاي الأسود،الشاي الأخضر.
	Catéchine	الشاي الأسود،الشاي الأخضر.
Anthocyanidols	Cyanidol	عنب الأحراج.
	Malvidol	العنب ،الفراولة
	Apigénidol	توت العليق، الفراولة

I -2 -5- أهمية و دور الفلافونيدات:

I -2- 5 -أ- دورها في النباتات:

I -2-5 -أ- 1- الحماية ضد الأشعة فوق البنفسجية:

تتراكم الفلافونيدات في الطبقات السطحية للنباتات، لتلتقط ما يصل إلى 90 ٪ من الأشعة فوق البنفسجية التي تصل إلى النبات، لمنع الآثار الضارة لهذه الإشعاعات على الأنسجة الداخلية.

I -2 -5 -أ- 2 - طرد وجلب آكلات الأعشاب:

بعض الفلافونيدات و التنينات تحمي النباتات من خلال الطعم المر، الشيء الذي يؤدي بآكلات الأعشاب إلى اختيار نباتات أخرى. في حين بعض الفلافونيدات الأخرى تضفي لونا وعبيرا على النباتات والفواكه خاصة و بذلك تجلب إليها آكلات الأعشاب التي تساهم في عملية تحرير البذور[49].

I-2 -5 -أ- 3- تنظيم نقل هرمون Auxine:

وجد أن النباتات المشوهة لا تحتوي على إنزيم chalcone synthase، الذي يشكل جزءا من مسار

الاصطناع الحيوي للفلافونيدات، كما يعرف أن عدم انتظام النمو في النباتات يرجع إلى وجود ضعف في نقل هرمون Auxine. ولهذا يحتمل أن يكون السبب في عدم انتظام النمو هو عدم وجود الفلافونيدات[50]

I- 2- 5 - أ - 4- إعطاء اللون للنباتات:

الفلافونيدات هي المركبات الملونة للأزهار، على سبيل المثال الأزرق، الأحمر والبرتقالي في الخضار، الفواكه و الأنسجة المتراكمة في النباتات ،بذلك فإن لها دورا مهما في جذب الحشرات التي تساعد في عملية التلقيح و نقل البذور [51]، فوق هذا فالفلافونيدات تدخل أيضا في عمليات التحسس للضوء، نقل الطاقة، و كذلك في عمليات التمثيل الضوئي [52،53].

I - 2 - 5- ب - أهميتها وتطبيقاتها بالنسبة للإنسان:

I - 2- 5- ب -1 - في التغذية:

إسهام الفلافونيدات في النظام الغذائي للإنسان جد مهم ،من 50 إلى 80 مغ/اليوم عن طريق استهلاك الفواكه والخضار، و حتى المشروبات كالشاي[53] ، كما نجدها أيضا في عدة نباتات طبية أو مستحضرات من نباتات تحوي الفلافونيدات و تستعمل في الطب الشعبي [54].

I - 2- 5- ب - 2- في مجال الطب :

تلعب الفلافونيدات دورا مهما في صحة الإنسان و تملك فعاليات مفيدة لوقايته من الأمراض، حيث تتعلق الفعاليات البيولوجية للفلافونيدات بصيغتها الكيميائية و مواقع المستبدلات على هياكلها [23].

تحمي الفلافونيدات التي يستهلكها البشر من ضرر الأكسدة، الناتج عن الأشعة فوق البنفسجية (التي تزداد نسبتها في الصيف)، والتلوث البيئي، المعادن السامة (مثل الرصاص والزئبق)، و بعض المواد الكيميائية في الأغذية (الأصباغ ، والمواد الحافظة ،... إلخ). لأن الجسم البشري ليست لديه القدرة على الحصول على هذه المواد الكيميائية، إلا عن طريق الغذاء.

عن طريق الحد من تفاعلات الجذور الحرة (المسببة للأكسدة)،حيث تقلل الفلافونيدات من خطر الإصابة بالسرطان و تمنع نمو الخلايا السرطانية خاصة Quercétine [55]، كما تخفف أعراض الحساسية و التهاب المفاصل، وتزيد من نشاط الفيتامين C.

ولها فعاليات بيولوجية أخرى ظهرت نتيجة للعديد من الأبحاث منها:

- ✓ تقوي و تحسن أداء عضلة القلب و تقلل من مخاطر أمراض القلب Cardiovasculaire [56،57].
- ✓ تزيد من مقاومة انكسار الشعيرات الدموية وتمنع حدوث النزيف.
- ✓ تحمي من الجلطات الدموية وتخفض نسبة الكولسترول في الدم.

- ✓ تحمي الغشاء المخاطي للجهاز الهضمي.
- ✓ مسكنة و مضادة للالتهابات مثل التهاب المفاصل [49].
- ✓ تقلل من حدوث مرض السكري [58].
- ✓ مضادات للجراثيم و الفيروسات خاصة الإيزوفلافونيدات.
- ✓ مضـــادة للحساســـية بتثبيطهـــا لـــبعض الإنزيمـــات المحفـــزة كـــ:

phosphodiestérase AMP cyclique و ATPase Ca^{2+}-dépendante [52].

I - 2 - 6 ـ المركبات الفلافونيدية المعزولة من الجنس *Origanum*:

لقد تم فصل ، وتحديد (28) نوع فلافونيدي ، (17 من نوع فلافون ، 7 من نوع فلافونول ، 2 فلافانون ، 2 ثنائي هيدرو فلافونول) وهذا من مختلف الأنواع التي تميز الجنس (*Origanum*)، حيث نرتبها ونفصلها حسب تواجد الفلافونيد في كل نوع في الجدول التالي **(I-4)**.

الجدول (I-4) : الفلافونيدات المعزولة من الجنس *Origanum*

المركبات المعزولة	النـــوع	البنيـــّة	المرجـــع
a. Flavones : **Chrysine**	***O. vulgare***	**1a**	**59**
Negletein	***O. vulgare***	**2 a**	**60**
Mosloflavone	***O. vulgare***	**3 a**	**60**
Apigénine	***O. dictamnus*** ***O. vulgare*** ***O.× majoricum***	**4a**	**61** **66-62** **67**
Acacétine	***O. majorana***	**5a**	**68**
Genkwanine	***O.×intercedens***	**6a**	**69**
Apigénin-7,4’-diméthyl ether	***O. pampanini***	**7a**	**70**
Scutellaréine	***O. majorana***	**8a**	**71**
Cirsimaritine	***O.akhadarensis***	**9a**	**70**
Lutéoline	***O. dictamnus*** ***O. vulgare*** ***O.× majoricum***	**10a**	**61** **62،63،66** **67**

Chrysoériol	***O.× majoricum*** ***O. vulgare***	**11a**	**67** **66**
Diosmétine	***O. vulgare***	**12a**	**66**
Thymusine	***O. onites*** ***O.× intercedens***	**13a**	**72** **69**
6-Hydroxylutéolin-7,3'-diméthyl ether	***O. boissieri*** ***O. vetteri*** ***O. acutidens*** ***O.leptocladum*** ***O. scabrum*** ***O. onites*** ***O. syriacum*** ***O.× intercedens***	**14a**	**72** **72** **72** **72** **72** **72** **72** **69**
6-Hydroxylutéolin-7,3',4'-triméthyl ether	***O. onites***	**15a**	**72**
Thymonine	***O. majorana*** ***O. boissieri*** ***O.×intercedens*** ***O. cordifolium*** ***O. saccatum*** ***O. vetteri*** ***O. acutidens*** ***O.leptocladum*** ***O. scabrum*** ***O. onites***	**16a**	**73** **72** **69** **72** **72** **72** **72** **72** **72** **72**
5-Desméthylnobeletin	***O. pampanini***	**17a**	**70**
b. Flavonols : **Galangine**	***O. vulgare***	**1b**	**74**
Kaempférol	***O. vulgare***	**2b**	**75**
Penduletin	***O. majorana***	**3b**	**68**
Quercétine	***O. vulgare***	**4b**	**74**

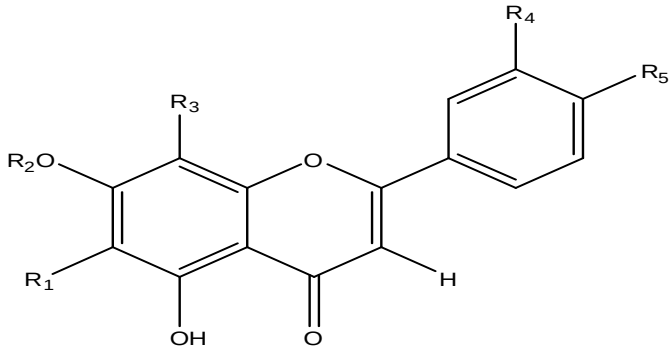
//	*O. dictamnus*	//	61
Axillarin	*O. majorana*	5b	68
Chrysosplenol D	*O. majorana*	6b	68
Retusine	*O. vulgare*	7b	62
c. Flavanones : Naringénine	*O. vulgare* *O.× majoricum*	1c	62،65 67
Eriodictyol	*O. dictamnus* *O. vulgare*	2c	61 66-64
d.Dihydroflavonols : Aromadendrin/ Dihydrokaempférol	*O. compactum* *O. vulgare*	1d	76 64،68،77
Taxifoline / Dihydroquercétine	*O. vulgare*	2d	64،65

تذكير:

العلامة (×) المذكورة في الجدول (I-4) السابق ، دلالة على أن نوع النبات هجين ، كما هو الحال عند النوع الهجين (Rechinger) *O.× intercedens* ، والناتج بدوره من التزاوج بين النوع *O . onites* والصنف *O. vulgare* L . subsp. *hirtum* ، ويعتبر هذا النوع الهجين *O.× intercedens* الأكثر توزيعا وانتشارا من بين الأنواع المعروفة المهجّنة عند الجنس *Origanum*، وهو معروف خاصة عند سكان جزر بحر إيجه والواقعة بين اليونان وتركيا [78،79]

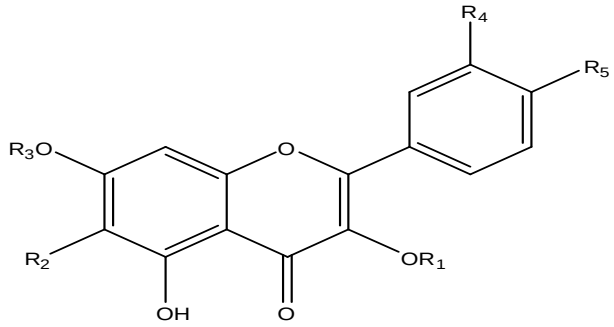
I-2-6-أ- البنية الكيميائية للفلافونيدات المفصولة السابقة:

المركبات الفلافونيدية المفصولة السابقة يمكن تفصيل وهيكلة بنياتها الكيميائية وفق المخططات الأربعة التالية :



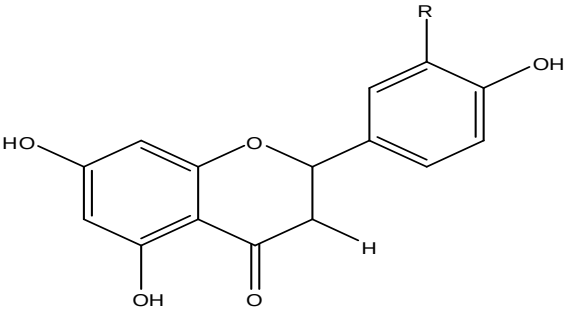
a-

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1 a	H	H	H	H	H
2 a	OH	CH_3	H	H	H
3 a	OCH_3	CH_3	H	H	H
4 a	H	H	H	H	OH
5 a	H	H	H	H	OCH_3
6 a	H	CH_3	H	H	OH
7 a	H	CH_3	H	H	OCH_3
8 a	OH	H	H	H	OH
9 a	OCH_3	CH_3	H	H	OH
10 a	H	H	H	OH	OH
11 a	H	H	H	OCH_3	OH
12 a	H	H	H	OH	OCH_3
13 a	OH	CH_3	OCH_3	H	OH
14 a	OH	CH_3	H	OCH_3	OH
15 a	OH	CH_3	H	OCH_3	OCH_3
16 a	OH	CH_3	OCH_3	OCH_3	OH
17 a	OCH_3	CH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3

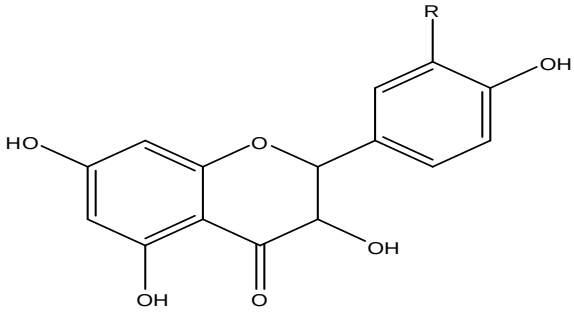


b-

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1 b	H	H	H	H	H
2 b	H	H	H	H	OH
3 b	CH_3	OCH_3	CH_3	H	OH
4 b	H	H	H	OH	OH
5 b	CH_3	OCH_3	H	OH	OH
6 b	CH_3	OCH_3	CH_3	OH	OH
7 b	CH_3	H	CH_3	OCH_3	OCH_3



c-



d-

	R
1 c	H
2 c	OH
1 d	H
2 d	OH

ملاحظة:

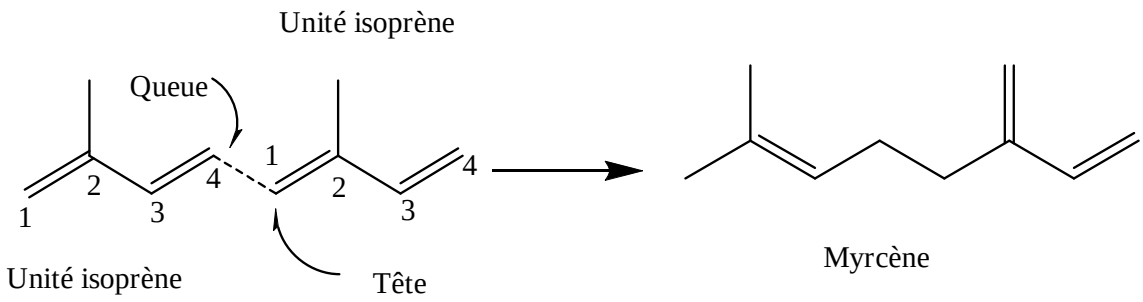
تمتاز العائلة الشفوية (Lamiaceae) [80] ،بأن أنواع الفلافونيدات المفصولة منها هي من النوع فلافون أكثر من النوع فلافونول ، فالعديد منها يكون مستبدل في الموضع (6)، والنادر منها يكون ثنائي الاستبدال في الموضعين (6،8).

I-3- التربينـــــــات :

I-3 -1- تعريف:

تؤلف التربينات المجموعة العظمى من منتجات المملكة النباتية ، فهي مركبات مشتقة من مزيج من اثنين أو أكثر من وحدات الأيزوبرين ، الذي يتكون من خمسة ذرات كربون والذي يعرف كيميائيا باسم 2-ميثيل-1،3- البيوتاديين (2-méthylbuta-1,3-diène).

تتكون التربينات باتحاد رأس مع الذيل كما هو موضح في المثال التالي[81].



توجد التربينات في جميع أجزاء النباتات الراقية، كما يمكن أن توجد في الطحالب والفطريات، وقد تم العثور على بعض التربينات في الحشرات و الجراثيم.

I-3- 2- تصنيف التربينات

تصنف التربينات على حسب عدد وحدات الأيزوبرين الداخلة في تشكيل المركب كما هو موضح في الجدول (I-5)[82].

الجدول (I -5): تصنيف التربينات

نوع التربين	عدد ذرات الكربون	عدد وحدات الأيزوبرين	مثال
Monoterpène	10	2	Limonène
Sesquiterpène	15	3	Artémisinine
Diterpène	20	4	Forskoline
Triterpène	30	6	α-amyrine
Tétraterpène	40	8	β-carotène
Polymérique terpénoïde	N >8	N >8	Caoutchouc

فيما يخص التربينات الأحادية و السيسكويتربينات فهي تعتبر المصدر الأساسي لمحتويات الزيوت الأساسية التي تشتهر بها بعض الفصائل النباتية سواء على مستوى الأجزاء الهوائية كالأوراق و الأزهار ...إلخ، أو الأجزاء الترابية كالجذور النباتية.

I- 4- الزيوت الأساسية:

تمتاز أغلب النباتات باحتوائها على الزيوت الأساسية وقد تكون أوفر في البعض منها دون الأخرى. حيث تشتهر الفصائل النباتية كـ: (Rutaceae, Ombellifreae, Myrtaceae, Lamiaceae) بتوفرها على نسبة كبيرة من الزيوت الأساسية سواء على مستوى الأجزاء الهوائية كالأوراق والأزهار،البذور، الثمار والأجزاء الترابية كالجذور،ومن هذه الأمثلة نذكر:في حبوب جوزة الطيب grain muscade ، جذور نبات الكافور camphrier ، جذور نبات نجيل الهند vétiver .....إلخ [83]

تتموقع الزيوت الأساسية على المساحات السطحية للأجزاء الهوائية للنبات. ففي نباتات عائلة Lauraceae و Zingiberaceae تحتل الزيوت الأساسية خلايا خاصة و في نباتات Lamiaceae فتحتل الزغب النباتية، أما في نباتات الفصيلة المركبة Compositae تحتل الزيوت الأساسية فيها أوعية دقيقة ، و في نباتات الفصائل Rutaceae و Myrtaceae فإن الزيوت الأساسية تتموقع في جيوب أو في حويصلات خاصة[83].

تتميز الزيوت الأساسية بكونها طيارة و ذلك ما يميزها عن الزيوت الأخرى، و عليه تكون لها كثافة أقل من كثافة الماء، و هي قابلة للذوبان في المذيبات العضوية (Liposolubles)، قليلة الذوبان في الماء، و منه تم استخلاصها ببخار الماء (تقطير مكثف (Hydrodistillation)) [83].

تتميز الزيوت الأساسية أيضا، بمجموعتين من المركبات متمايزتين عن بعضهما بالأصل الوراثي الحيوي Biogénétique و هما التربينات و المركبات العطرية، ففيما يخص مجموعة التربينات مثل التربينات الأحادية المفتوحة والأحادية الحلقة Monocyclique أو ثنائية Bicycliques فإن أصلها الوراثي الحيوي هو GPP (Géranyl-pyrophosphate)، أما النصف ثلاثية Sesquiterpènes فإن أصلها الوراثي الحيوي هو FPP (Farnésyl-pyrophosphate).

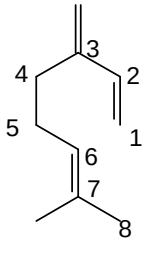
تعتبر التربينات الأحادية، الأحادية الحلقة أكثر انتشارا من مثيلتها غير الحلقية و هي متعددة ،حيث تصنف مجموعة التربينات البسيطة في ثمانية مجموعات و هي[83]:

1) - تربينات أحادية غير حلقية هيدروكربونية
2) - تربينات أحادية ،أحادية الحلقة هيدروكربونية
3) - تربينات أحادية ، ثنائية الحلقة هيدروكربونية
4) - تربينات أحادية غير حلقية كحولية
5) - تربينات أحادية، أحادية الحلقة كحولية
6) - تربينات أحادية، ثنائية الحلقة كحولية
7) - تربينات أحادية ألدهيدية و كيتونية
8) - تربينات نصف ثلاثية

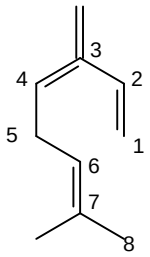
تشكل جملة هذه التربينات قسم الزيت الأساسي المتميز بدرجة غليان أعلى، و أنها المصدر الأساسي لمحتويات مختلف أنواع الزيوت الأساسية نذكر منها : زيت الكافور ، زيت النعناع الياباني ، زيت الصنوبر البحري Huile de pin térébenthine ، الليمونين Limonène [83]، وتعتبر التربينات الأحادية في غاية الأهمية من حيث قيمتها التجارية، حيث يعرف لغاية الآن بضعة آلاف من أنواع هذه المركبات ، لهذا صنفت في مجموعات كما هو مبين فيما يلي:

I- 4 -1- البنيات المختلفة و أسماء و نظام الترقيم لأهم التربينات:

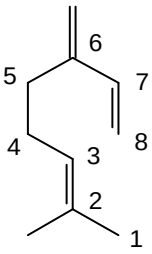
I- 4 -1- أ - تربينات أحادية غير حلقية هيدروكربونية:



Myrcène

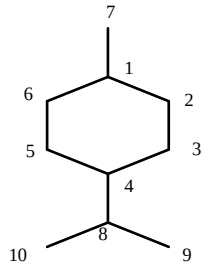


α–Ocimène

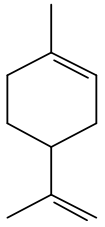


Allocimène

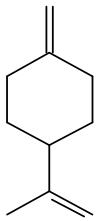
I- 4 -1- ب - تربينات أحادية، أحادية الحلقة هيدروكربونية:



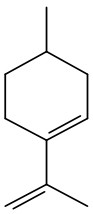
p-menthane (cis and trans)



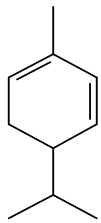
p-mentha-1,8-diène



p-mentha-1(7),8diène

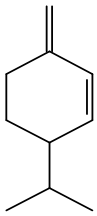


p-mentha-3,8-diène



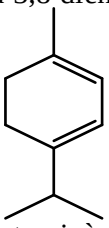
α-phellandrène

p-mentha-1,2-diène



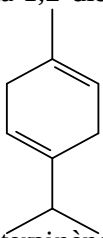
β-phellandrène

p-mentha-1(7),2-diène



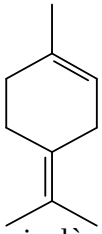
α-terpinène

p-mentha-1,3-diène



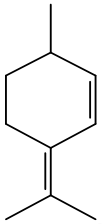
γ-terpinène

p-mentha-1,4-diène



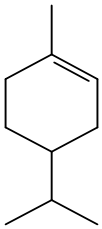
terpinolène

p-mentha-1,4(8)-diène



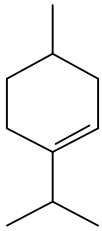
p-menthadiène

p-mentha-2,4(8)-diène

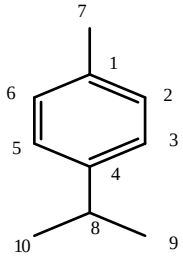


carvomenthène

p-menth-1-ène

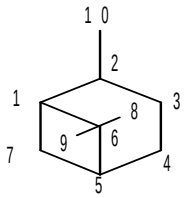


p-menth-3-ène

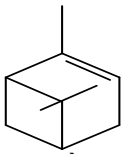


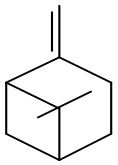
p-cymène

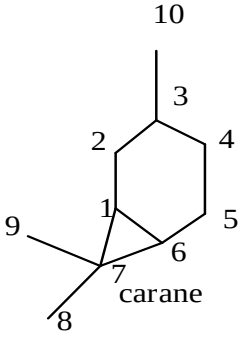
I- 4 -1-ج - تربينات أحادية، ثنائية الحلقة هيدروكربونية:



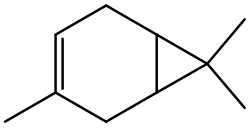
Pinane

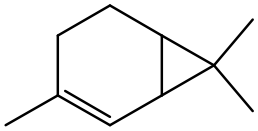

α-pinène
2-pinène

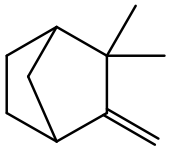

β-pinène
2(10)-pinène

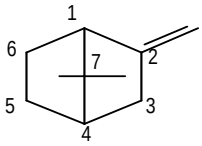


carane


3-carène

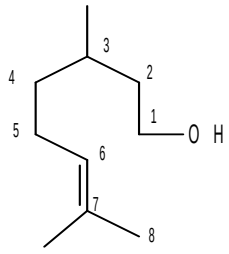

2-carène


camphène

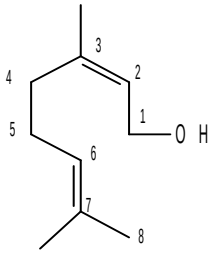


α-fenchène

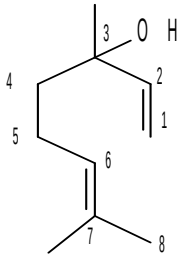
I- 4 -1- د - تربينات أحادية غير حلقية كحولية:



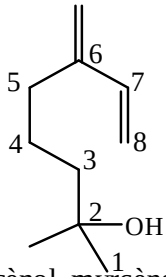
Citronellol
3,7-diméthyloct-6-èn-1-ol



géraniol
3,7-diméthyl-2,6-octadièn-1-ol

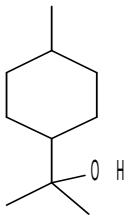


Linalol
3,7-diméthyl-1,6-octadièn-3-ol

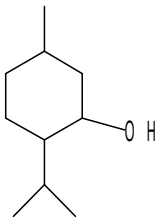


myrcènol, myrcène hydrate
2- méthyl-6-méthylène-7-octèn-2-ol

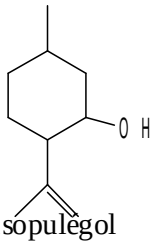
I- 4 -1- م - تربينات أحادية، أحادية الحلقة كحولية:



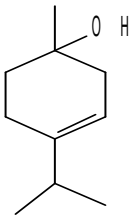
p-menthan-8-ol



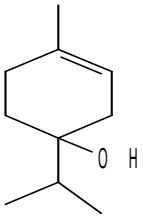
p-menthan-3-ol



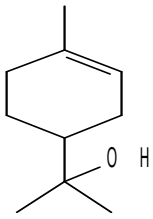
isopulégol
p-menth-8-ène-3-ol



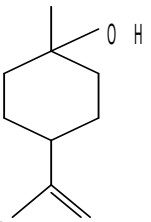
terpinène-l-ol
p-menth-3-ène-1-ol



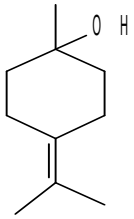
terpinène-4-ol
p-menth-1-ène-4-ol



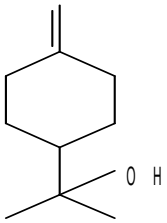
α-terpinéol
p-menth-1-ène-8-ol



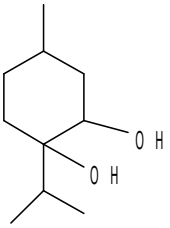
β-terpinéol
p-menth-8-ène-1-ol



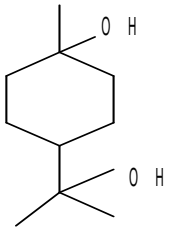
γ-terpinéol
p-menth-4(8)-ène-l-ol



p -menth-1(7)-ène-8-ol

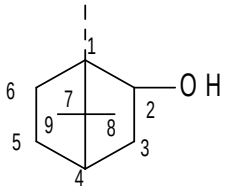


p-menthane-3,4-diol

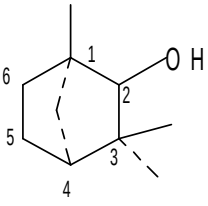


p-menthane-1,8-diol

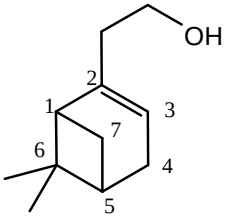
I- 4 -1- ن- تربينــات أحادية ، ثنائيــة الحلقــة كحــوليــة:



Bornéol

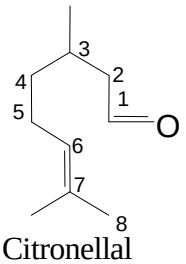


α-fenchol

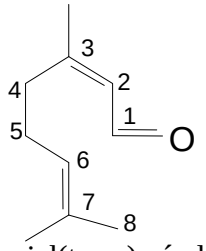


nopol

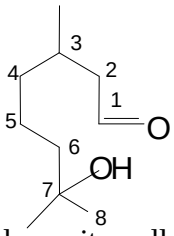
I - 4 -1- ه - تربينات أحادية ألدهيدية و كيتونية:



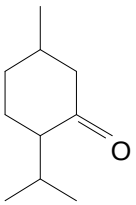
Citronellal
3,7diméthyl-6-octènal



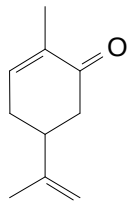
citral,géranial(trans),néral(cis)
3,7-diméthyl-2,6-octadiènal



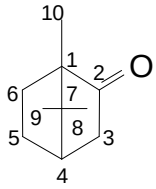
hydroxycitronellal
3,7diméthyl-7-hydroxyoctanal



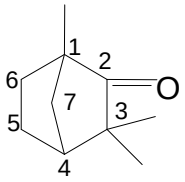
menthone
p-menthan-3-one



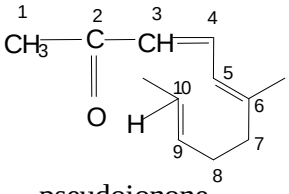
carvone
p-mentha-6,8-diène-2-one



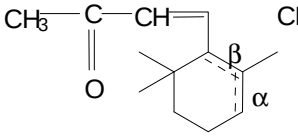
camphre



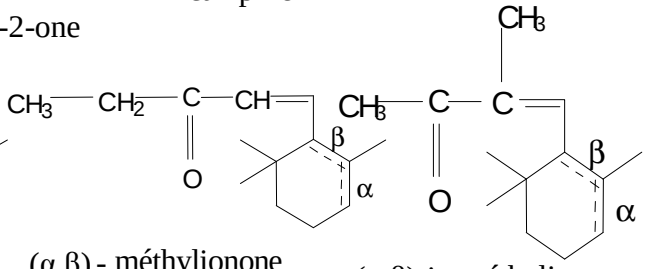
Fenchone



pseudoionone



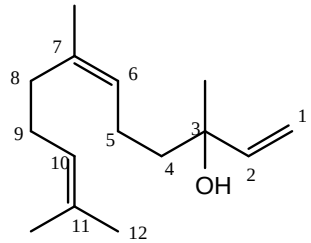
(α,β)-ionone



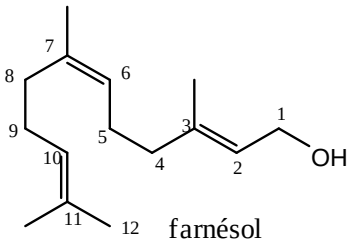
(α,β) - méthylionone

(α,β)-isométhylionone

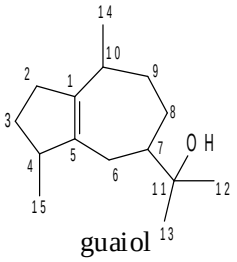
I- 4 -1- و- تربينات نصف ثلاثية (السيسكويتربينات):



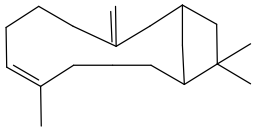
nérolidol
3,7,11-triméthyl-1,6,10-dodécatrièn-3-ol



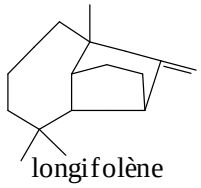
farnésol
3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatrièn-l-ol



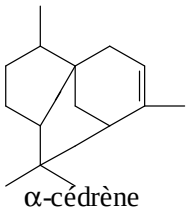
guaiol



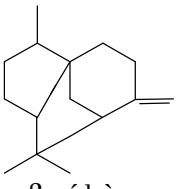
β-caryophyllène



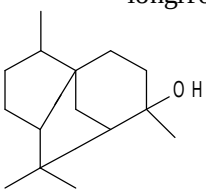
longifolène



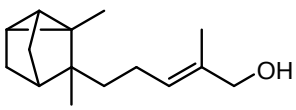
α-cédrène



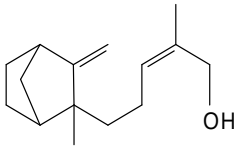
β-cédrène



cédrol

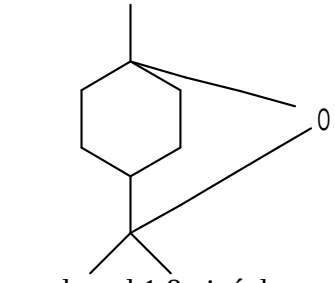


α-santalol

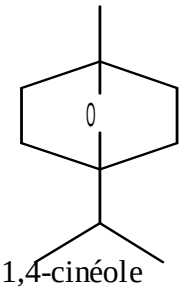


β-santalol

I- 4 -1- ي- السينـــيولات:

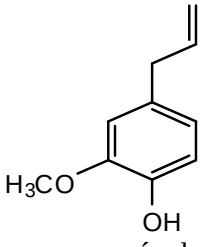


eucalyptol,1,8-cinéole
1,8-époxy-*p*-menthane

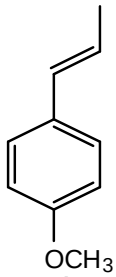


1,4-cinéole
1,4-époxy-*p*-menthane

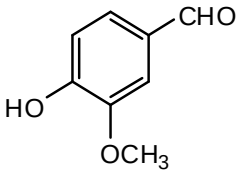
أما أصل مجموعة المركبات العطرية فهو الـ phénylpropane وهي أقل وجودا إذا ما قورنت بالمركبات التربينية، وغالبا ما توجد هذه المركبات العطرية في صورة الـ allyles، propényl، phénols، aldéhydes، Ester نذكر من بينها الصيغ التالية:



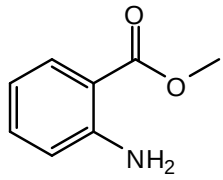
eugénol



E-anéthole



vanilline



anthranilate de méthyle

I- 4 -2- الاستعمالات المختلفة للزيوت الأساسية:

للزيوت الأساسية استخدامات عدة، ذات فوائد كبيرة منها ما يستعمل في التطبيب العطري (Aromathérapie) نذكر من بينها زيت شجر الكاليتوس (*Eucalyptus*) الذي يستخدم في معالجة الأمراض الصدرية ، وكذلك الياسمين (*Jasmin*) المستخدم في تخفيف التعب العصبي ...إلخ. أما في المجال الصناعي فهي ذات أهمية معتبرة خاصة في مجال صناعة العطور ومواد التجميل كاستخدام نبات الخزامى (*Lavande*) في العطور وكمبيد للحشرات[24]. ولقد استخدم التطبيب العطري من طرف الإنسان منذ قديم الزمان عبر مختلف الحضارات والحقبات التاريخية المختلفة التي مر بها ، بمعالجة بعض الأمراض للتخفيف من شدة آلام الدماغ، العين، الأذن وكذلك التشنجات العصبية [24].

I- 4- 3 - الإصطناع الحيوي للتربينات:

تتمثل المراحل الأساسية في تكوين مختلف أنواع التربينات و الستيرويدات (stéroïdes) في مايلي:

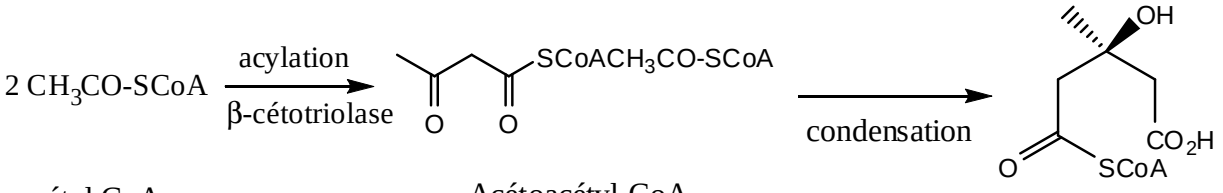
1- تكوين وحدات الإيزوبرين خماسية الكربون إبتداءا من الأسيتات acétate عبر الميفانولات mévanolate.

2- تزاوج الوحدات الإيزوبرينية (رأس- ذيل) الداخلة في تكوين كل من التربينات الأحادية (monoterpènes)، النصف ثلاثية (sesquiterpènes)، الثنائية (diterpènes) و السيسترتربينات (sesterterpènes) .

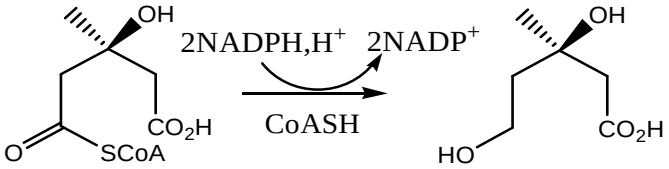
3- تزاوج (ذيل – ذيل) للوحدات C_{15}،C_{20} لتكوين الوحدات المولدة للتربينات الثلاثية و العالية.

نهتم في فقرتنا هذه بدراسة الاصطناع الحيوي للـ GPP (Géranyl-pyrophosphate) والـ FPP (Farnésyl-pyrophosphate)،وهما المركبان المولدان لمختلف أنواع التربينات وهذا وفق المراحل التالية :

تتكاثف جزيئتين من acétyl CoA بفضل β–cétotriolase لينتج الـ Acétoacétyl-CoA الذي بدوره يتفاعل مع جزيئة ثالثة من (CH_3CO-SCoA)، و في وجود 3-Hydroxy-3-méthylglutalyl-CoA synthase المتبوع بعملية إرجاع لمجموعة CO إلى كحول في وجود أنزيم réductase و NADPA نحصل على حمض الميفالونيك MVA وهذا وفق المخطط التالي :

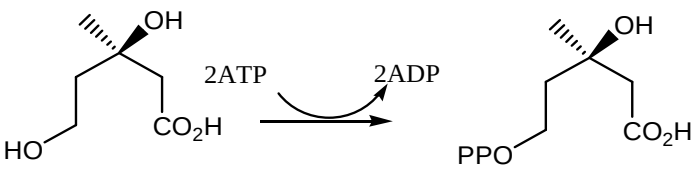


acétyl CoA Acétoacétyl-CoA



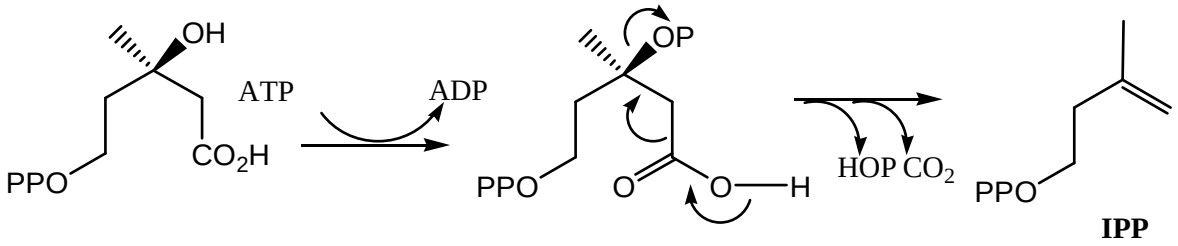
MVA

تسمح الفسفرة المضاعفة لحمض الميفالونيك MVA بواسطة الـ ATP في وجود الإنزيم: Mévalonate kinase و الـ Phosphomévalonate kinase بتكوين الـ d' pyrophosphate isopenténylе IPP كما يلي:



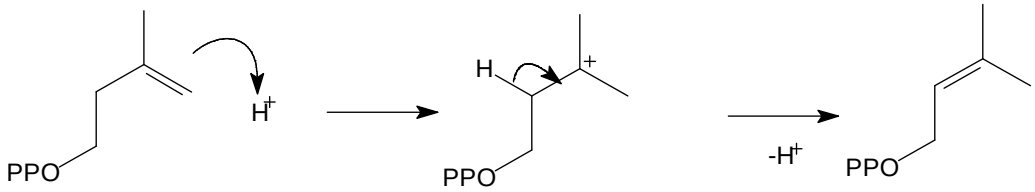
MVA **(MVA-Pyrophosphate)**

الفسفرة الجديدة لحمض الميفالونيك MVA بتثبيط الـ MVAPP تسهل عملية نزع مجموعة $HOPCO_2$ في وجود الإنزيم Mévalonate - diphosphate décarboxylase للحصول على الـ: Pyrophosphate d'isopentényle الذي يعتبر أساس تكوين التربينات كما هو مبين في الشكل التالي:

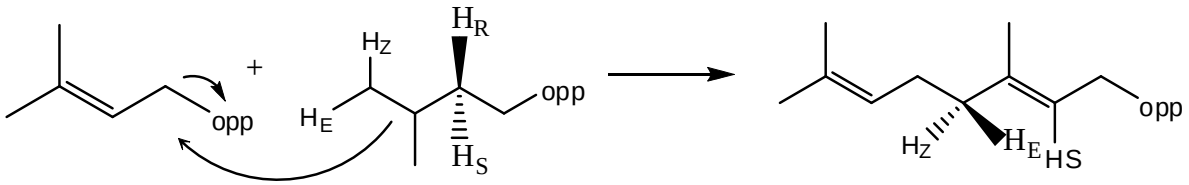


IPP

بعدها يتماكب الـ IPP إلى DMAPP بإضافة بروتون إلى وسط التفاعل متبوعا بنزع الـ H-pro-2R وفقا للشكل الآتي:

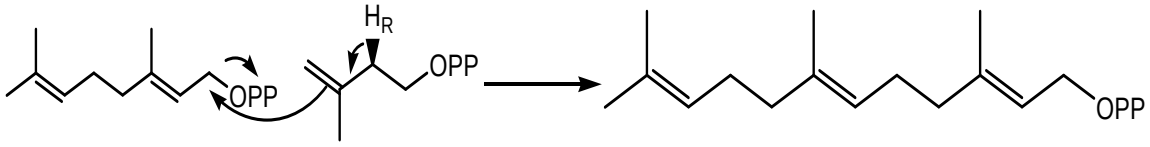


تؤدي الإضافة الانتقائية للـ DMAPP على الرابطة المضاعفة للـ IPP في وجود GPP synthase إلى تكوين الـ (GPP) Géranyl- Pyrophosphate مثل ما هو موضح في الشكل الموالي:



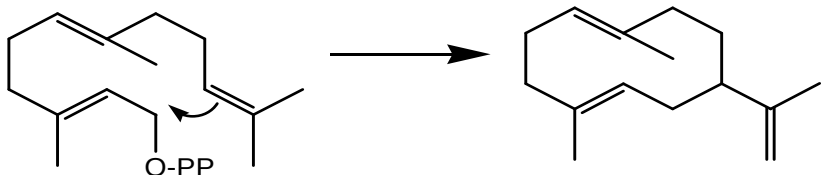
DMAPP IPP GPP

تحدث إضافة الـ GPP إلى IPP بتزاوج (رأس- ذيل) حيث ينتج عنها تكوين الـ: (FPP) Farnésyl-pyrophosphate،وهكذا يتكون الـ GGPP بعد إضافة وحدة من الـ IPP إلى FPP و التي تغير الوحدة الأساسية لجميع التربينات.



GPP **IPP** **FPP**

كما يعتبر الـ FPP المركب المولد للتربينات النصف ثلاثية Sesquiterpènes حيث تتداخل الإنزيمات المناسبة لتكوين البنيات المختلفة للتربينات النصف ثلاثية مثل تكوين الجرماكرانولين:



Germacradiéne

I-4- 4 - طريقة استخلاص الزيوت الأساسية:

هناك عدة طرق معروفة لاستخلاص الزيوت الأساسية نذكر منها [84-86]:

- طريقة الاستخلاص "بالتقطير بالبخار الجاف"
- طريقة الاستخلاص باستعمال " المذيبات الطيارة "
- طريقة الاستخلاص باستعمال " ثاني أكسيد الكربون CO_2 ذو الطور الحرج "
- طريقة الاستخلاص "بالتقطير المكثف Hydrodistillation "

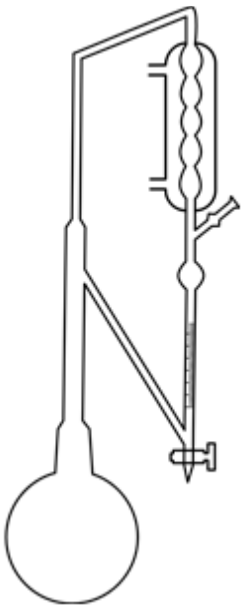
وتعتبر هذه الطريقة الأخيرة أكثر شيوعا واستعمالا، وهذا راجع لسهولة إجرائها كما أنها تعطي لنا مردود نهائي مقبول للزيوت الأساسية المحصل عليها [84-87].

إن كل هذه الطرق المذكورة تؤدي بنا إذن إلى هدف واحد وهو استخلاص الزيوت الأساسية ،غير أنها تختلف عن بعضها البعض من حيث "النوعية والكمية " المحصل عليها[88].

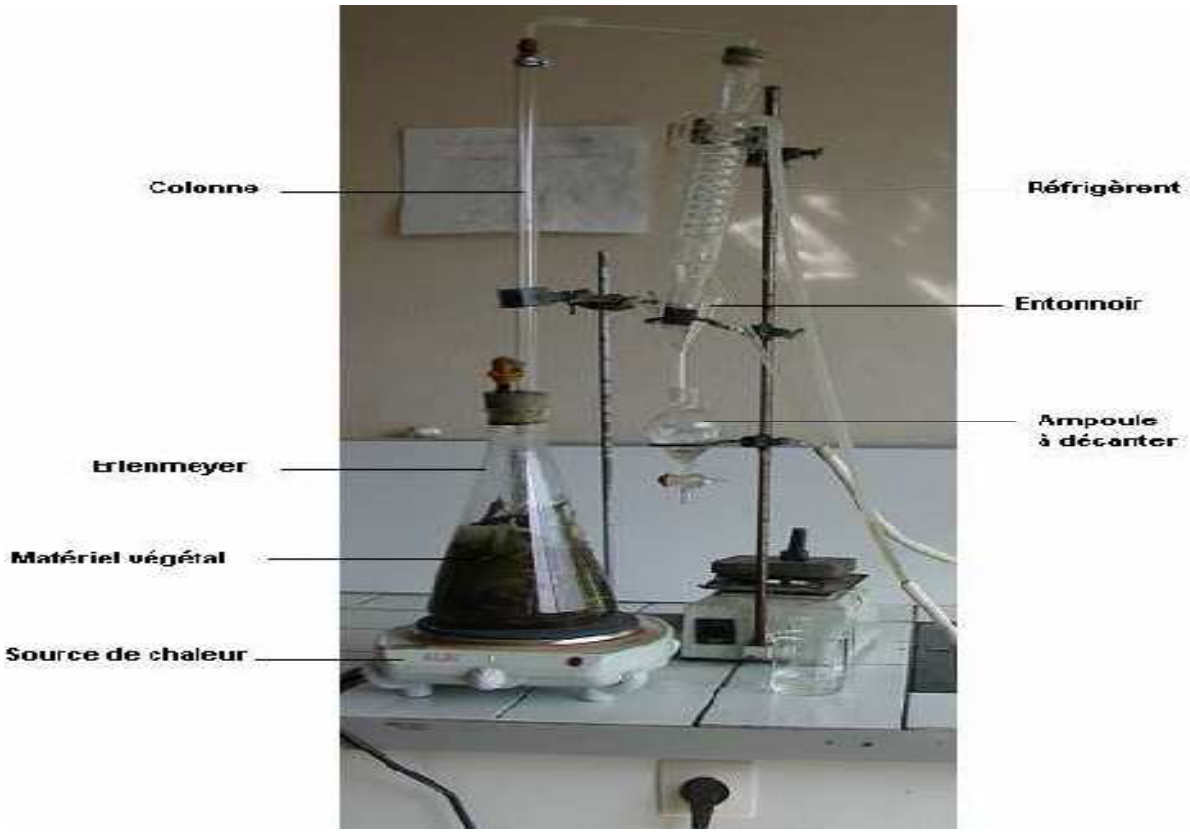
I-4-4- أ- ملخص لطريقة الاستخلاص بالتقطير المكثف (Hydrodistillation):

تأخذ المادة النباتية الجافة المدروسة، سواء الأجزاء الهوائية (ساق ، أوراق ، أزهار)، أو الأجزاء الترابية (الجذور) ، تعالج ببخار الماء بجهاز من نوع (Clevenger) كما هو مبين في الشكل (I-8) ، حيث يتم نقع هذه المادة في الماء المقطر مع التسخين حتى درجة الغليان لمدة (3 ساعات) تقريبا، والزيوت الأساسية إذن تبدأ في التبخر مع البخار المائي المتحرر لتتكاثف وتصبح سائلة بعد أن تبرد ، بعدها تجفف من الماء بواسطة كبريتات الصوديوم (Na_2SO_4) وتحفظ في أنابيب زجاجية بعيدا عن أشعة الشمس وفي درجة حرارة مابين (0°م و4°م) [89].

والصورة الفوتوغرافية رقم (I -1) توضح لنا طريقة تركيب جهاز من نوع (Clevenger) لإجراء التقطير المكثف.



الشكل (I-8):جهاز Clevenger للتقطير المكثف



صورة فوتوغرافية (I -1): تركيبة التقطير المكثف لاستخلاص الزيوت الأساسية

I-4-5- طريقة كشف وتحليل مكونات الزيوت الأساسية :

يتم التحليل وذلك بإخضاع الزيوت المتحصل عليها من عملية الاستخلاص إلى عملية تحليل كروماتوغرافية الطور الغازي (GC) ،أو كروماتوغرافية الطور الغازي المتزاوج بطيف الكتلة (GC/MS) ، فالتحليل الكروماتوغرافي للطور الغازي يمكن أن يتم باستعمال جهاز (Perkin-Elmer clarus 500)،مزود بعمود شعري و بكاشف Détecteur à ionisation de-flamme (FID).

أما التحليل الكروماتوغرافي للطور الغازي المتزاوج بطيف الكتلة ، فيمكن أن يتم باستعمال جهاز (Hewlett Packard 5973-6890 GC-MS) مبرمج بتقنية القذف الإلكتروني (EI)، ومزود بأنبوب شعري [90] ، ومنه يتم تحديد جميع المركبات المفصولة بالمقارنة بين أطياف كتلتها ، وإحداثيات الحجز (I_R) [91] ، وزمن الحجز (t_R) الخاصة بها ، مع تلك التي تم الحصول عليها من عينات مرجعية وانطلاقا من قاعدة البيانات الطيفية المنشورة [92،93].

ملاحظة:

هناك طريقة أخرى لكشف وتحليل مكونات الزيوت الأساسية المستخلصة [89] ، وهذا بإخضاع المزيج الزيتي للتحليل الكروماتوغرافي للطور الغازي (GC) ، بعدها المركبات المفصولة تخضع للتحليل الطيفي بواسطة مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون C^{13} RMN [94] ، ومنه يتم التعرف على المركبات المفصولة النقية بـ[89]:

- المقارنة بين إحداثيات الحجز (I_R) المتحصل عليها والمحسوبة وفق سلسلة من الألكانات (C_8 –C_{28}) مع قيم المركبات المرجعية الخاصة بالزيوت الأساسية والمنشورة في قاعدة البيانات .
- بالمقارنة أيضا بين أطياف الكربون وقيم إزاحتها الكيميائية ، وشدتها ، ومجموعها المتحصل عليها مع أطياف المركبات المرجعية الخاصة بالزيوت الأساسية والمحسوبة وفق ظروف تجريبية محددة [94].

I- 4 -6 - حساب مردود الزيوت الأساسية:

هو العلاقة بين وزن الزيت المستخلص ووزن المادة النباتية المعالجة معبر عليه بالنسبة المئوية وفق العلاقة التالية [95]:

$$R = Pb/Pa \times 100$$

R: مردود الزيت الأساسي بـ (%)

Pb: وزن الزيت المستخلص بـ (غ)

Pa: وزن المادة النباتية المعالجة بـ (غ)

I-4-7- الزيوت الأساسية المستخلصة من الجنس " *Origanum*":

إن الجنس " *Origanum*" معروف بأن العديد من الأنواع المنتمية إليه غنية بالزيوت الطيارة النباتية خاصة التربينات الأحادية والنصف الثلاثية [8]، منها الـ (Thymol) و (Carvacrol) وهي عبارة عن تربينات أحادية فينولية [96،97]، إضافة إلى ذلك تتواجد عناصر ومركبات حمضية [98،99]، وقد خضعت الزيوت الأساسية المستخلصة من أنواع هذا الجنس لدراسة مختلف الفعاليات البيولوجية (كالفعالية المضادة للأكسدة ، الفعالية المضادة للبكتيريا،الفعالية المضادة للفطريات.....إلخ) [99-108].

وللتذكير فإن هناك زيوت أساسية معروفة بفعاليتها المضادة للبكتيريا ويرجع ذلك لاحتوائها على كل من (التربينات الفينولية ، التربينات الكحولية ، التربينات الألسينية)، فعند ترتيب قوة الفعالية المضادة للبكتيريا لهذه التربينات ، تأتي أولا التربينات الفينولية ممثلة في (Carvacrol , Thymol , eugénol) ثم تليها التربينات الكحولية ممثلة في (Cinéole ,Linalol,....) ، وأخيرا التربينات الألسينية ممثلة في (*p*-cymène , pinène, terpinène) [109،110].

وانطلاقا من البحوث والدراسات التطبيقية الكيميائية التي أجريت على العديد من أنواع الجنس (*Origanum*) فقد وجدت أن زيوتها الأساسية غنية بالتربينات الفينولية خاصة (Thymol, Carvacrol) كما ذكرنا سابقا ، ومن ثم فإن العديد من أنواع هذا الجنس قد أثبتت أن لها الفعالية المضادة للبكتيريا [111-116]،كما هو الحال عند النوع الجزائري *Origanum glandulosum* (Desf) من منطقة (ترني Terni ، تلمسان) ، وجد أنه غني بـ Thymol بنسبة (45.4%) ، وبعد الدراسة البيولوجية عليه أثبتت أن له الفعالية المضادة للبكتيريا [89].

كما يمكن أن يعزي وجود النشاط المضاد للأكسدة للزيوت الأساسية، لاحتوائها على نسبة عالية من المركبات الفينولية [7]، فمثلا من خلال الزيوت الأساسية المستخلصة من النوع اللبناني (*Origanum Syriacum*) [117] وجد أنه غني بـ Thymol بنسبة (24.7%) و Carvacrol بنسبة (17.6 %)، إضافة إلى وجود Thymol méthyléther بنسبة (0.6%) و Carvacrol méthyléther بنسبة (0.9%) ، ففي المدة الأخيرة قد أفيد أن هذه المركبات المستخلصة لها القدرة والفعالية المضادة للأكسدة [118].

و الجدول (I-6)، يبين لنا الزيوت الأساسية المستخلصة من بعض الأنواع المعروفة عند الجنس "*Origanum*" ، وخاصة النوع المشابه لمحل الدراسة، حيث تطرقنا للنوع الجزائري *Origanum glandulosum* (Desf) الخاص بمنطقة (سبدو Sebdou ،تلمسان) ، فخضع لاستخلاص زيوته الأساسية بطريقة التقطير المكثف (HD)، والاستخلاص باستعمال المذيبات الطيارة (SFME) ، مع المقارنة بينهما [119].

الجدول (I-6) : الزيوت الأساسية المستخلصة من بعض أنواع الجنس *Origanum*

النـــــوع	الزيوت الأساسية المستخلـــصة	النسبة المئوية %	المـــــرجع
Origanum majorana L.	-Tricyclène - α-Pinène - Camphène - Sabinène -α-Terpinène - *p*-Cimène - Limonène - 1,8-Cinéole - γ-Terpinène - cis-Sabinène hydrate - Terpinène-4-ol - cis-Pipéritol acétate - trans-Pipéritol acétate - Bornéol - trans-Sabinène hydrate - α-Terpinéol - trans-Carvéol - Camphor - β- Caryophyllène - α-Humulène	0.07 0.20 0.22 0.09 0.19 0.05 0.24 0.32 0.52 8.37 55.09 1.29 0.51 1.36 13.20 9.09 0.98 0.72 1.77 3.66	[19]
Origanum glandulosum Desf.	-α-Thujène - α-Pinène - Camphène - 1-Octène-3-ol - 3-Octanone - β-Pinène - Myrcène - α-Phellandrène – δ-3-Carène - α-Terpinène - *p*-Cymène - Limonène - (Z)-β-Ocimène - (E)-β-Ocimène – γ-Terpinène -trans-Sabinène hydrate - Terpinolène - Linalol - Bornéol - Terpinène-4-ol - α-Terpinéol - Thymol - Carvacrol - β-Caryophyllène - α-Humulène - β-Bisabolène -β-Sesquiphellandrène -Caryophyllène oxide	1.0 0.7 0.1 0.2 0.1 0.2 2.0 0.3 0.1 2.8 17.1 0.6 0.1 0.1 27 0.2 0.1 0.7 0.1 0.1 0.2 41.6 2.2 1.0 0.1 0.1 0.6 0.2	[119]

O. vulgare ssp. *hirtum*	- α- Thujène - α- Pinène - Camphène - Sabinène - β – Pinène - 1-Octène-3-ol - 3-Octanone - Myrcène - α- Phellandrène - δ – 3 –Carène - α- Terpinène - *p*-Cymène - Limonène - β- Phellandrène - (Z)- β – Ocimène - (E)- β –Ocimène - γ –Terpinène - cis-Sabinène hydrate - Terpinolène - trans-Sabinène hydrate - Bornéol - Terpinène-4-ol - α-Terpinéol - trans-para-mentha-2-one - trans-Dihydrocarvone - Carvacrolméthyléther - Thymoquinone - Thymol - Carvacrol - Carvacrylacétate - β- Caryophyllène - α-Humulène - β- Bisabolène - γ- Cadinène - δ- Cadinène - Caryophyllène oxide	0.6 0.3 0.1 0.2 0.1 0.1 0.1 1.3 0.2 0.1 1.3 5.3 0.2 0.2 0.1 0.1 8.1 0.8 0.1 2.8 0.2 0.5 0.2 0.1 0.1 0.1 0.1 0.3 77.4 0.3 3.0 0.3 0.5 0.1 0.1 0.1	[120]

O. vulgare var. *creticum*	- α- Thujène - α- Pinène - Camphène - 1-Octène-3-ol - Myrcène - α- Phellandrène - α- Terpinène - *p*-Cymène - Limonène - β- Phellandrène - γ –Terpinène - cis-Sabinène hydrate - trans-Sabinène hydrate - Bornéol - Terpinène-4-ol - α-Terpinéol - Carvacrol méthyléther - Thymoquinone - Thymol - Carvacrol - Carvacrylacétate - β- Caryophyllène -α- Humulène - Allo-Aromadendrène - β- Bisabolène - γ- Cadinène - δ- Cadinène - 3-Méthoxy-2,4,5-triméthylPhénol - epi-α-Muurolol - α-Eudesmol	0.4 0.2 0.1 0.2 0.8 0.1 1.1 4.5 0.1 0.2 8.2 0.6 0.3 0.6 0.4 0.1 0.1 0.6 3.7 74.9 0.2 3.1 0.5 0.2 0.8 0.4 0.7 0.6 0.2 0.3	[120]
O. vulgare var. *Samothrake*	- α- Thujène - α- Pinène - 1-Octène-3-ol - Myrcène - α- Terpinène - *p*-Cymène - γ –Terpinène - cis-Sabinène hydrate - trans-Sabinène hydrate - Bornéol - Terpinène-4-ol - Carvacrol méthyléther - Thymoquinone - Thymol - Carvacrol - Carvacrylacétate - β- Caryophyllène - α- Humulène - Allo-Aromadendrène - α- Muurolol - β- Bisabolène - γ- Cadinène	0.3 0.2 0.2 0.7 0.9 4.8 9.5 0.5 0.3 0.4 0.3 0.7 0.8 0.3 70.0 0.2 2.8 0.4 0.2 0.1 0.7 0.3	[120]

// //	- δ- Cadinène - 3-Méthoxy-2,4,5triméthylPhénol - Spathulénol - Caryophyllène oxide - epi-α-Muurolol	0.6 0.5 0.2 0.1 0.3	

ملاحظة:

النسبة المئوية لمكونات الزيوت الأساسية المستخلصة من أنواع الجنس *Origanum* المذكورة في الجدول السابق، قد تم الحصول عليها بطريقة (GC-FID) ، أي كروماتوغرافية الطور الغازي مزود بـ"كاشف التأين بواسطة اللهب" (Détecteur à ionisation de flamme) (FID) [19،119،120]، حيث تسمح لنا هذه العملية بفصل وبالتحديد الكمي الأقصى للمكونات الفردية المستخلصة كل على حدى [120].

مراجع الفصل الأول :

[1] Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A.,(1968). Flora Europaea, vol. 3. Cambridge University Press, Cambridge, 126-157.

[2] Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F.,(1992). Phytochemistry 31, 3097.

[3] Ietswaart, J.H.,(1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). In: Leiden Botanical Series, vol. 4. Leiden University Press, The Hague.

[4] Skoula, M., Harborne, J.B., (2002). The taxonomy and chemistry of *Origanum*. In: Kintzios (Eed.), S.E. (Ed.), Oregano, the genera *Origanum* and *lippia*-Medicinal and Aromatic Plants Series- Industrial Profiles, vol. 25.Taylor & Francis, London, 67–108.

[5] Spada ,P., Perrino, P.,(1996). Conservation of oregano species in national and international collections: an assessment. Germplasm Institute, National Research Council, Bari, Italy,14

[6] Ietswaart, J.H., (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiateae). In chemical composition and antioxidant activity Essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Leiden Botanical series 4. Leiden University Press, la Haye

[7] Ruberto , C., Barratta , M.T., Sari , M., Kaabache , M.,(2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Flavour and Fragrance Journal,17: 251-254.

[8] Skoula, M.,Gotsiou,P.,Naxakis,G.,Johnson,C.B., (1999). A chemosystematics investigation on the mono - and sesquitrepenoids in the genus *origanum* (Labiatae). Phytochemistry ,52,649-657

[9] sahin,F ., Gulluce,M., Daferera,D.,Sokmen,A., Sokmen,M., Polissiou ,M., Agar, G., Ozer, H.,(2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of turkey. Food control 15,549-557

[10] Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli , E., et al., (1993) .Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. Industrial crops and products 2: 47-50

[11] Baba Aissa, F., (1999). Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie moderne-Rouiba, 194-231

[12] Sijelmassi ,A., (1991). Les plantes médicinales du Maroc. 2e éd., Le Fennec, 199

[13] Chiej, R., (1984). Macdonald encyclopedia of medicinal plants. Ed Macdonald, London, 212-217

[14] Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I. B., (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agriculture Food Chemistry, 49, 4168–4170.

[15] Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., Karadogan, T., (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control, 15, 169–172.

[16] D'Antuono,L.F., Galletti ,G.C ., Bocchini , P., (2000). Variability of essential oil content and composition of *origanum vulgare* L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria region, Northern Italy). Annals of Botany, 86, 471-478.

[17] Bertelli, D., Plessi, M., Miglietta, F.,(2003). Effect of microwaves on volatile compounds in *origanum*. Lebensmittel Wissenschaft und technologic Food science and Technology,36,555-560.

[18] Yazdanparast, R., Shahriyary, L.,(2008) . Comparative effects of *Artemisia dracunculus*, *Satureja hortensis* and *Origanum majorana* on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion. Vascular Pharmacology, 48 ,32–37

[19] Banchio, E., Bogino, P.C., Zygadlo, J., Giordano, W.,(2008). Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochemical Systematics and Ecology, 36,766–771.

[20] Okazaki, K., Nakayama, S., Kawazoe, K., Takaishi, Y.,(1998). Antiaggregant effects on human platelets of culinary herbs. Phytother. Res. 12, 603–605.

[21] Yazdanparast, R., Saee, A., (1999). Effect of aqueous tarragon, *Artemisia dracunculus*, extract on lipid and coagulator parameters in rats. Biomed. Lett.59,137–141.

[22] Wollenweber, E., (1984). The systematic implication of flavonoids secreted by plants. In: Rodriguez, E., Healey, P.L., Mehta, I. (Eds.), Biology and Chemistry of Plant Trichomes Plenum Press, New York, 53–69.

[23] Cody, V.,(1988). Crystal and molecular structure of flavonoids. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine LH Biochemical, Celhdar, and Medicinal Properties, Alan R. Liss, New York, 29-44.

[24] Hostettman, K., Potteray, O., Wolfender, J. L.,(1998b), The potent of higher plants as a source of new drugs. Chimie, 52, 10-17.

[25] Kokkini,S., (1996). Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. Valenzano : S. Padulosi, Editor.

[26] Agrawal, P.K., Markham, K.R., (1989). Introduction. In Carbon-13 NMR of flavonoids. Agrawal P.K . Ed.Elsevier. Amsterdam,1-31.

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

[28] Williams, CA., Grayer, RJ.,(2004). Anthocyanins and other flavonoids. Nat. Prod. Rep, 21, 539-573.

[29] Harborne, J.B.,(1988). The flavonoids, Advances in research since 1980 Chapman & Hall". London.

[30] Heller, W., Forkmann, G., (1993). Biosynthesis of flavonoids. In The flavonoids: Advances in research since 1986. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London, 499.

[31] Geissman, T.A.,(1973). The Biogenesis of sesquiterpene lactones of the compositae, Vkniz recent advences in phytochemestry. academic press, New - York and Landon, 6.

[32] KiJhnau, J.,(1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. Wld. Rev. Nutr. Diet. 24,117-191.

[33] Havsteen, B., (1983).A class of natural products of high pharmacological potency. Biochem. Pharmacol .Flavonoids. 32, 1141-1148.

[34] Iwashina ,T.,(2000). The Structure and distribution of the flavonoids in Plants. Journal of Plant Research. 113(3), 287-299.

[35] Markham, K.R.,(1988). Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In the flavonoids: Advances in research since 1980. Harborne J.B. Ed. Chapmann & Hall. London ,427-468.

[36] Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales, ed. 3, Lavoisier, Paris.

[37] Mann, J., (1987). Secondary metabolism, ed. 2, Clarendon press, Oxford.

[38] Cronquist, A., (1988).An integrated system of classification of flowering plants, 2nd ed. New- York, Botanical Garden.

[39] Thorme, R.F.,(1992). Classification and geography of flowering plants. Bot. Rev 58, 225-348.

[40] Cooper-Driver, G.A., Bhattacharya , M., (1998). Phytochemistry, Role of phenolics in plant evolution. 49(5), 1165-1174.

[41] Grayer, R.J., Chase, M.W., Simmonds, M.S.J., (1999) .Biochemical systematic and ecology .Chemotaxonomie der Pflanzen. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families.27(4), 369-393.

[42] Harbone, J.B.,(1973). Phytochemstry.Lowrence, P.L.ed . vol. 2.

[43] Wollenweber, E., Dietz, V.H.,(1980). Biochem. Shyest. Eco. 8,21.

[44] Merken, H.M., Beecher, G.R.,(2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: Journal of agricultural and food chemistry a review. 48(3), 577-599.

[45] Bronner, W.E., Beecher, G.R. (1995). Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grape fruit juice concentrates. Journal of chromatography A, 705, 247-256.

[46] Crozier, A., Jensen, E., Lean, M.E.J., McDonald, M.S.,(1997). Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography .Journal of Chromatography A, 761, 315-321.

[47] Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B.,(1996). Analysis and health effects of flavonoids. Food Chem, 57, 43-46.

[48] Hollman ,P.C.H., Arts, I.C.W.,(2000). Flavonols, flavones and flavanols nature, occurrence and dietary burden. J sci food agric, 80, 1081-1093.

[49] Palazón, J., Cusidó, R.M., Morales, Y.C.,(1999). Métabolisme et la signification biologique des polyphénols dans le vin, Groupe de biotechnologie des plantes, Faculté de Pharmacie, Université de Barcelone.

[50] Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, B. W., Tague, W. A., Peer, L., Taiz, G. K., (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxine transport in vivo in *Arabidopsis thaliana* . Plant Physiol, 126, 524-535.

[51] MARFAK, A.G .,(2003). Thèse de doctorat ,Université de Limoges.

[52] Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F.,(1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences, 65(4), 337-353.

[53] Pietta ,P., (2000). Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products, 63(7), 1035-1042.

[54] Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W., (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80 (7), 1094-1096.

[55] Zhou, J., Wang, L., Wang, J., Tang, N.,(2001). Antioxidative and antitumour activities of solid quercetin metal(II) complexes. Transition Met. Chem ,26(1-2), 57-63.

[56] Hertog, M. G.,(1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Archives of Internal Medicine, Vol. 155 No. 4.

[57] Yochum, L.,(1999). Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. American Journal of Epidemiology, 149,10.

[58] Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D.,(1983).Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and Indomethacin Biochem Pharmacol, 32,1995.

[59] Mirovich, M.V.,(1987). Studies on the phenolic compounds of common *Origanum*. Nauchnye trudy, vsesoyuznyi nauchno-issledovatel'skii institut farmatsii 25, 105–109.

[60] Zheng, S., Wang, X., Gao, L., Shen, X., Liu, Z., (1997). Studies on the flavonoid compounds of *Origanum vulgare* L. Indian J. Chem ,36, 104–106.

[61] Harvala, C., Skaltsa, H.,(1986). Contribution à l'étude chimique d'*Origanum dictamnus* .1er communication. Planta Méd. Phytothér, 20, 300–304.

[62] Antonescu, V., Sommer, L., Prodescu, I., Barza, P., (1983). Chem. Abstr. 99, 19689x.

[63] Peshkova, V.A., Mirovich, V.M., (1985). Flavonoids of *Origanum vulgare*. Chem. Nat. Compd, 20, 495.

[64] Vekiari, S.A., Oreopoulou, V., Tzia, C., Thomopoulos, C.D., (1993). Oregano flavonoids as lipid antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc, 70, 483–487.

[65] Exarchou, V., Godejohann, M., van Beek, T., Gerothanassis, P., Vervoort, J.,(2003). LC–UV–Solid-phase extraction-NMR–MS combined with a cryogenic flow

probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. Anal. Chem, 75, 6288–6294.

[66] Koukoulitsa, C., Karioti, A., Bergonzi, M.C., Pescitelli, G., di Bari, L., Skaltsa, H., (2006). Polar constituents from aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp.*hirtum* growing wild in Greece. J. Agric. Food Chem, 54, 5388–5392.

[67] Palomino, O.M., Gomez-Serranillos, P., Carretero, E., Cases, A., (1997). Variation in the flavonoid content of *Origanum* × *majoricum* in different plant stages by HPLC. Planta Med, 63, 584.

[68] Souleles, C., (1990). Sur les flavonoides d'*Origanum dubium*. Planta méd. Phytothér, 24, 175–178.

[69] Bosabalidis, A., Gabrieli, C., Niopas, I.,(1998). Flavone aglycones in glandular hairs of *Origanum* × *intercedens*. Phytochemistry , 49, 1549–1553.

[70] Passannanti, S., Paternostro, M., Piozzi, F., Barbagallo, C., (1984). Diterpenes from the genus *Amaracus*. J. Nat. Prod, 47, 885–889.

[71] Kawabata, J., Mizuhata, K., Sato, E., Nishioka, T., Aouama, Y., Kasa, T., (2003). 6-Hydroxyflavonoids as α-glucosidase inhibitors from marjoram (*Origanum majorana*) leaves. Biosci. Biotechnol. Biochem, 67, 445–447.

[72] Tomas-Barberan, F.A., Husain, S.Z., Gil, M.I.,(1988b). The distribution of methylated flavones in the Lamiaceae. Biochem. Syst. Ecol, 16, 43–46.

[73] Voirin, B., Favre-Bonvin, J., Indra, V., Nair, A.G.R., (1984). Structural revision of the flavone majoranin from *Majorana hortensis*. Phytochemistry , 23, 2973–2975.

[74] Kanazawa, K., Kawasaki, H., Samejima, K., Ashida, H., Danno, G., (1995). Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin. J. Agric. Food Chem, 43, 404–409.

[75] Gil-Munoz, M.I.,(1993).Contribution à l'étude phytochimique et chimosystematique de Flavonoïdes dans la famille des labiées, thèse de doctorat, Université de Murcie, 293 .

[76] Bellakhdar, J., Passannanti, S., Paternostro, M.P., Piozzi, F., (1988). Constituents of *Origanum compactum*. Planta Med, 54, 94.

[77] Tsimogiannis, D., Stavrakaki, M., Oreopoulou, V., (2006). Isolation and characterization of antioxidant components from oregano (*Origanum heraclioticum*). Int. J. Food Sci. Technol. 41 (Suppl. 1), 39–48.

[78] Kokkini, S., Vokou , D., Karousou , R.,(1991). Morphological and chemical variation Of *Origanum vulgare* L. in Greece. Bot. Chron, 10,337-346.

[79] Kokkini, S., Vokou, D.,(1993). The hybrid *Origanum* x *intercedens* from the island Of Nisyros (SE Greece) and its parental taxa; Comparative study of essential oils
and distribution. Biochem. Syst. Ecol, 21, 397-403.

[80] Tomas-Barberan, F.A., Grayer-Barkmeijer, R.J., Gil, M.I., Harborne, J.B., (1988a). Distribution of 6-hydroxy, 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and related families. Phytochemistry, 27, 2631–2645.

[81] Ruzicka, L.,(1953), Experimentia, 9, 235.

[82] Satyajit ,D. S., Lutfun, N.,(2007). Chemistry for Pharmacy Students . Northern Ireland, UK.

[83] Bruneton , J. ,(1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Technique et Documentation .Lavoisier, Paris, 487-496 .

[84] Bruneton , J.,(1993). Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, Lavoisier, 278-279.

[85] Sousa ,E.M.B.D., Chiavone-Filho, O., Moreno, M.T., Silva, D.N., Marques, M.O.M., Meireles, M.A.A.,(2002) .Experimental Results for the Extraction of Essential Oil From *Lippia sidoides.* Cham. Using Pressurized Carbon Dioxide. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 19 (02), 229-241.

[86] Adio, A. M.,(2005).Isolation and Structure Elucidation of Sesquiterpenoids from the Essential Oils of Some Liverworts (Hepaticae). Thèse pour le degré du Dr. rer. National à l'institut de la chimie organique, université de Hambourg, 280.

[87] Ferhat, M.A ., Tigrine-Kordjani, N., Chemat, S., Meklati, B.Y., Chemat, F., (2007). Rapid extraction of volatile compounds using a new simultaneous microwave distillation: Solvent extraction device. Chromatographia, 65 (3-4), 217-222.

[88] Bayramoglu ,B., Sahin,S., Sumnu,G .,(2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. Journal of Food Engineering, 88,535 - 540.

[89] Bekhechi,C., Atik-Bekkara, F., Abdelouahid, D.E .,(2008).Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. Phytothérapie, 6,153–159

[90] Liolios, C.C, Gortzi , O., Lalas , S., Tsaknis, J., Chinou, I.,(2009).Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. Food chemistry, 112, 77-83.

[91] Van den Dool, H., Kratz, P. D.,(1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed Gas – liquid partition chromatography. Journal of chromatography, 11, 463 – 471.

[92] Adams , R. P.,(2001). Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectroscopy. Carol Stream, USA, IL: Allured Publishing Corp.

[93] Massada, Y., (1976). Analysis of essential oil by gas chromatography an spectrometry . John Wiley and Sons edition, New York.

[94] Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A., Casanova, J., (1995). Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon – 13 NMR spectroscopy. J of Magnetic Resonance Analysis ,1 ,25 -34.

[95] Careé , P.,(1953). Précis de technologie et de chimie industrielle. Ed, Balliére JB. et fils, T3.

[96] Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B.,(1994). Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food and Chemical Toxicology, 32, 31–36.

[97] Aydin, S., Ozturk, Y., Beis, R., Baser, K. H. C. ,(1996). Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. Phytotherapy Research, 10, 342–344.

[98] Baytop, T .,(1999). Therapy with Medicinal plants in Turkey: Today and in Future. Istanbul University Press , Istanbul , 166-167.

[99] Esen ,G., Azaz , A.D., Kurkcuoglu, M., Baser ,K.H.C., Tinnaz., A., (2007). Essential oil and antimicrobial activity of Wild and cultivated *origanum vulgar* L. subsp.*hirtum* (Link) letswaart, from the Marmara region, Turkey . Flavour Fragr.J,22,371-376.

[100] Daouk ,R.k., Dagher ,S.M., Sattout ,E.J.,(1995). Antifungal activity of the essential oil of *origanum syriacum* L .J. Food Protect ,58, 1147-1149.

[101] Muller – Riebau, F., Berger,B., Yegen,O.,(1995). Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey.J. Agric . Food Chem, 43,2262-2266.

[102] Sokovic, M., Tzakou, O., Pitarakoli ,D., Couladis, M.,(2002). Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. Nahrung /Food ,46 (5), 317- 320.

[103] Bouchra , C., Achouri , M., Hassani , L.M.I ., Hmamouchi , M.,(2003). Chemical Composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers :Fr.J. Ethnopharmacol, 89,165-169.

[104] Yildrim, E., Kesdek, M., Aslan , I., Calmasur , O., Sahin, F.,(2005). The effects of essential oils from eight plant species on two pests of stored product insects. Fresen. Environ. Bull, 14,23-27.

[105] Kizil, S., Uyar , F.,(2006). Antimicrobial activities of some thyme (*thymus, satureja, origanum* and *thymbra*) species against important plant pathogens. Asian J. chem, 18,1455- 1461.

[106] Caglar , O., Calmasur , O., Aslant, I., Kaya , O.,(2007). Insecticidal effect of essential oil of *origanum acutidens* against several stored product pests. Fresen . Environ. Bull, 16 (11A), 1395- 1400.

[107] Lee, S.O., Choi , G.J ., Jang, K.s., Lim , H.K., Cho, K.Y., Kim, J.C.,(2007). Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against post-harvest and sollborne plant pathogenic fungi. Plant Pathol.J, 23,97 -102.

[108] Soylu , S., Yigitbas, H., Soylu , E.M., Kurt , S., (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *scierotinia scierotiorum*. J. Appl. Microbiol ,103, 1021-1030.

[109] Burt, S.A., (2004). Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in foods, a review International. J. Food Microbiol,94, 223-253.

[110] Ultee , A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., (2002).The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol ,68,1561-1568 .

[111] Chorianopoulos , N., Kalpoutzakis, E., Aliqiannis, N., (2004) . Essential oils of *Satureja, Origanum* and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against food borne pathogens. J. Agric Food Chem,52, 8261-8267.

[112] Chun , S.S., Vattem, D.A., Lin, Y.T., Shetty, K., (2005) .Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Process Biochem ,40, 809-816.

[113] Friedman, M., Henika, P.R ., Mandrell, R.E., (2002) .Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter*

jejuni, *Escherichia coli, Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica.* J. Food Prot ,65, 1545-1560.

[114] Hersch-Martinez, P., Leanos-Miranda ,B.E., Solarzano-Santos, F., (2005). Antibacterial effects of commercial essentials oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. Fitoterapia ,76, 453-457.

[115] Nevas , M., Korhonen, A.R. , Lindstrom, M. , Turkki, P., Korkela, H., (2004). Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. J. Food Prot, 67, 199-202.

[116] Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., (2007) .Inhibitory effect of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* Food Control ,18, 414-420 .

[117] Loizzo, M. , Menichini, F. , Conforti, F. , Tundis ,R., Bonesi ,M., Saab ,A.M. , Statti ,G .A., de Cindio,B. , Houghton ,P.G., Giuseppe Frega,N .,(2009). Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils . Food Chemistry, 117,174 -180.

[118] Mastelic, J., Jerkovic, I., Blazevic, I., Poljak-Blazi, M., Borovic, S., Ivancic-Bace, I., (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 3989–3996.

[119] Bendahou , M., Muselli ,A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef ,M., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Costa ,J.,(2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. Food Chemistry,106, 132–139.

[120] Azizi ,A., Yan ,F., Honermeier ,B .,(2009). Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. Industrial crops and products, 29, 554–561.

الفصل الثاني

طرق دراسة المركبات الفلافونيدية

II- طرق استخلاص،فصل، وتنقية المركبات الفلافونيدية:

بما أن المركبات المعزولة أثناء دراستنا لنبتة *Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart كانت من المركبات الفلافونيدية، فإنه يجدر بنا في هذا الفصل لذكر طرق دراستها، من الاستخلاص، الفصل،و التنقية إلى الدراسة البنيوية لها.

II-1- الاستخلاص:

قبل القيام بعملية الاستخلاص لابد من تجهيز النبتة المراد إجراء عليها العملية وذلك بتجفيفها في الظل وبعيدا عن الرطوبة ، بعدها نقوم بتنقيتها من الشوائب ثم طحنها [1].

قد تستعمل النبتة بجميع أجزائها، كما قد يؤخذ الجزء الهوائي لوحده، أو الجذور أو الثمار فقط ، وعموما تتواجد الفلافونيدات في الجزء الهوائي للنبتة، إذ في هذا الأخير بالذات يتم الاصطناع الحيوي للفلافونيدات وذلك لارتباطه بالعامل الضوئي[1].

وتتم عملية الاستخلاص بنقع الأجزاء النباتية المراد استخلاص الفلافونيدات منها في مذيب مناسب، وأكثر المذيبات استعمالا، هي خليط من (كحول/ماء) بنسب معينة (3/7) أو (2/8) في حالة المادة النباتية الجافة ، ويفضل الكحول لوحده في حالة المادة النباتية الغضة (الخضراء)، و الكحولات المستعملة هي الإيثانول أو الميثانول، ويتفادى استعمال الماء المقطر لوحده لأنه قد يؤدي إلى استخلاص مواد غير فلافونيدية كالدهون، هذا من جهة، ومن جهة أخرى الصعوبات التي قد نصادفها أثناء عملية التركيز[1].

ويمكن شرح وتفصيل عملية الاستخلاص بصفة عامة كما يلي[1]:

- تغمر الأجزاء النباتية المسحوقة في وعاء يحتوي على المحلول الهيدروكحولي لمدة (24 سا) على الأقل، ثم نقوم بعملية الترشيح وبعدها نركز الراشح.
- تكرر العملية (3مرات) أو أكثر وفي كل مرة نرشح ونركز الراشح، وذلك بتبخير أكبر كمية ممكنة من الكحول.
- تؤخذ الرشاحة المائية وتعامل بالماء المقطر المغلي على أن تترك لليلة كاملة، بعدها ترشح على ورق الترشيح ويحتفظ بالراشح .
- تعامل الرشاحة المائية المتحصل عليها في قمع الفصل بالكلوروفورم أو الهكسان (أو مذيب ذو قطبية ضعيفة) وذلك من أجل التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون، التربينات والكلوروفيل فنحصل على الطور العضوي الذي تجري له عملية تبخير.
- يعامل الطور المائي في قمع الفصل بخلات الإثيل (أو مذيب ذو قطبية متوسطة) مرة واحدة أو عدة مرات، لنتحصل على الطور العضوي وهو طور الخلات والذي يبخر تحت ضغط منخفظ .
- يعامل كذلك الطور المائي في قمع الفصل بالبوتانول العادي (أو مذيب ذو قطبية عالية) وتكرر هذه

العملية (3مرات)، أو أكثر لنحصل على طور البوتانول و هو الطور العضوي وذلك بعد تبخيره تحت ضغط منخفض . ويكون لدينا في النهاية :

- المستخلص الجاف للهكسان (مذيب ذو قطبية ضعيفة)
- المستخلص الجاف لخلات الإثيل (مذيب ذو قطبية متوسطة)
- المستخلص الجاف للبوتانول العادي (مذيب ذو قطبية عالية)

II-2- الفصل والتنقية:

II-2-1- الفصل:

التقنية الأساسية المستعملة لذلك ، هي الكروماتوغرافية بمختلف أقسامها ، وهي تدل على تقنيات فصل مختلفة، تعتمد جميعها على توزيع المادة المراد دراستها بين طورين أحدهما ثابت و الأخر متحرك ، والطور الثابت قد يكون جامدا أو سائلا محملا على دعامة ثابتة (جامدة) ، أما الطور المتحرك فيكون سائل أو غاز [2]، والهدف منها هو الحصول على مركبات كيميائية نقية ، لأجل ذلك يستعمل طرق فصل مختلفة ومتتالية أهمها :

- كروماتوغرافية العمود (CC)
- كروماتوغرافية الورق (CP)
- كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة (CCM)
- كروماتوغرافية السائل العالي الأداء (HPLC)

II-2-1- أ- كروماتوغرافية العمود:

هي طريقة كلاسيكية ، الهدف منها هو فصل خليط معقد من المركبات ، وخاصة المركبات الفلافونيدية ، ويستعمل لهذا الغرض (السيليكاجال ، السيليلوز، و متعدد الأميد) كدعامة ثابتة .

حيث يستخدم السيليكاجال لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية، أما السيليلوز فقد أثبتت فعاليته في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر، غير أن متعدد الأميد لقي تطبيق واسع النطاق في فصل الفلافونيدات الغليكوزيدية بعضها عن بعض ، ويتلخص طريقة إجراء هذه التقنية فيما يلي:

ـ اختيار العمود والذي تختلف أبعاده باختلاف كمية المستخلص الذي تجري عليه هذه التقنية، ويثبت بواسطة حامل ويعبأ بالطور الثابت مشبع بالمذيب الأقل قطبية

ـ بعد ترصيص الطور الثابت جيدا داخل العمود توضع فوقه طبقة رقيقة من رمل خاص يدعى (SABLE DE FONTAINE BLEAU) بسمك (0.5 سم) ، بعدها تحضر العينة حيث يذاب المستخلص في أقل كمية ممكنة من الميثانول ، وبواسطة (ماصة باستور) يتم وضعه على سطح الرمل

مع الحرص على عدم إتلافه ، أو إتباع طريقة أخرى والتي تستعمل في حالة ما إذا تطلب الأمر إذابة المستخلص الجاف في كمية زائدة من الميثانول ، حيث في هذه الحالة نضيف لمحلول المستخلص كمية من مسحوق متعدد الأميد (SC_6) ونركز هذا الخليط حتى نحصل على مسحوق جاف والذي يضاف إلى العمود الكروماتوغرافي ، بعد ذلك يضاف المملص الذي يكون في البداية مذيب أقل قطبية ، ثم ترفع قطبيته بإضافة مذيب قطبي تدريجيا إلى غاية الوصول إلى القطبية العالية . ويتم مراقبة الحزم النازلة باستعمال مصباح الأشعة فوق بنفسجية (UV)، حيث تستقبل أسفل العمود وتركز حتى الجفاف وهذا بعد تبخيرها تحت ضغط منخفض .

II-2-1- ب- كروماتوغرافية الورقة التحضيرية:

II-2-1- ب-1- كروماتوغرافية الورقة التحضيرية ذات البعد الواحد :

تستعمل هذه التقنية مباشرة على المستخلص ، في حالة عدم غناه بالمركبات الفلافونيدية، كما تستعمل لجمع وفصل الكسور المحصل عليها من العمود الكروماتوغرافي ، وورق (whatmans®) المستعمل هنا يكون من النوع رقم (N°1)أو (N°3)، حيث يوضع المستخلص بواسطة ماصة على كامل عرض الورقة وعلى مسافة قصيرة من الحافة العلوية مع ترك هامش صغير حوالي (2 سم) ، بعد أن يجف المستخلص تغمس الورقة في المملص، أين تبدأ الحزم في الهبوط تسلسليا حتى وصول المملص إلى مسافة قصيرة من الحافة السفلية للورقة، بعدها تترك لتجف، وبالاستعانة بمصباح الأشعة (UV) يتم تحديد الحزم التي تقص إلى قطع صغيرة وتغمس في الميثانول أين ترشح ويجفف الراشح لتجري له عملية فحص متعددة بواسطة كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة للتأكد من نقاوة المركبات المفصولة ، والأنظمة المستعملة في هذه التقنية عادة هي [1]، [3]:

- الماء المقطر : حمض الخل :البوتانول العادي (BAW):(4/1/5)
- الماء المقطر:حمض الخل: البوتانول الثالثي (TBA):(3/1/1)
- حمض كلور الماء : الماء المقطر : حمض الخل (30/10/3)
- حمض الخل بتراكيز مختلفة (5%←50 %)

II-2-1- ب -2- كروماتوغرافية الورقة التحضيرية الثنائية البعد:

تستعمل هذه التقنية مباشرة لاختبار مدى غنى المستخلص المراد فصله بالمركبات ، كما نستعملها في حالة ما إذا كان البعد الواحد غير كافي لتجزئة أو فصل الخليط فصلا كاملا ، حيث يكون البعد الأول عمودي على البعد الثاني، فبعد إجراء الفصل على البعد الأول،تخرج الورقة وتترك لتجف ثم تدار بمقدار (90°) وتغمس في مذيب أخر، حيث يكون البعد الأول عادة عضوي ، مثل الطبقة العضوية للنظام (BAW) ، والبعد الثاني يكون مائي مثل الطبقة المائية للنظام ($AcOH/H_2O$).

BAW:الماء المقطر : حمض الخل: البيوتانول العادي (4/1/5).

($AcOH/H_2O$) :الماء المقطر: حمض الخل (25/75).

II-2-1- ج- كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة :

تستعمل في هذه التقنية شرائح من الزجاج أو البلاستيك أو الألمونيوم ذات الأبعاد (20 سم × 20 سم) لتثبت عليها دعامة صلبة (من السيليكاجال أو متعدد الأميد)، ثم يوضع عليها الخليط (المستخلص) المراد فصله عرضيا وعلى بعد (1.5 سم) من خط الانطلاق، بعدها توضع هذه الصفائح في حوض به مملص ، وأثناء هجرته يمر بالعينة الموضوعة ، أين يجر معه مختلف المركبات في شكل حزم والتي يتم تحديدها بواسطة مصباح الأشعة (UV).

بعد أن تجف الصفائح تكشط الحزم كلا على حدى وتوضع في قمع زجاجي به قطن لتغسل مرتين، المرة الأولى بالمملص المستعمل أثناء الفصل والثانية بالميثانول وفي الأخير يركز الراشح وتجري له عمليات فحص متعددة للتأكد من نقاوته ، والأنظمة المستعملة كمملصات في تقنية الـ CCM [1،4،5]، يمكن تفصيلها في الجدولين (II-1 و II-2) وهذا حسب طبيعة الدعامة الثابتة المستعملة وطبيعة الفلافونيد المفصول في كل حالة.

الجدول II-1 : بالنسبة للسيليكاجال (كدعامة صلبة)

نوع الفلافونيد	جملة المملصات
الغليكوزيدية	الميثانول: الماء المقطر: البيريدين: خلات الإيثيل 5 10 20 80
الأجليكونية قليلة الهيدروكسيل	الميثانول : الكلوروفورم 1 15 أو (1 :3)
الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل	التولوين: أسيتون:الكلوروفورم 8 5 7 الماء المقطر : الميثانول : خلات الإيثيل 9 12 63

الجدولII-2 : بالنسبة لمتعدد الأميد (كدعامة صلبة)

نوع الفلافونيد	جملة المملصات
الغليكوزيدية	أسيتيل أسيتون: ميثيل إيثيل سيتون:الميثانول :ماءمقطر 1 3 3 13
الأجليكونية قليلة الهيدروكسيل	الميثانول : ميثيل إيثيل سيتون : الإيثر: التولوين 10 10 2 60 الميثانول : ميثيل إيثيل سيتون : الهكسان : التولوين 1.5 2 90 30 الميثانول : ميثيل إيثيل سيتون : التولوين 3 3 4
الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل	الماء المقطر: حمض الخل : الميثانول 1 1 18 حمض الخل: البوتانول العادي : الإيثانول : الماء المقطر 2 20 25 50

II-2-1- د - كروماتوغرافية النظام سائل العالي الأداء :

تسمح هذه التقنية بتحديد المحتوى الفينولي للعينة المراد تحليلها ، وهي أيضا نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي ألتجزيئي الذي يتطلب استخدام ضغوط عالية وهذا لدفع المذيب خلال العمود، وتعتبر هذه التقنية الأفضل لفصل وتحليل الخلائط المعقدة في وقت قصير [6] وأهم المذيبات المستعملة هي:

الماء المقطر : الأسيتونتريل : حمض الخل

4 : 10 : 90

4 : 80 : 20

يجر المملص معه المركبات في العمود بصفة انتقائية، فتنزل المركبات الثنائية السكر قبل أحادية السكر وهذه الأخيرة قبل الأجليكونات [7]، فبالنسبة للأجليكونات التي تحتوي على الأكسيجين في الحلقة (B)،فيملص المركب الذي يحتوي على ثلاث مجموعات هيدروكسيل في الحلقة (B) قبل الذي يحتوي على مجموعتي (OH) وهذا الأخير قبل الذي يحتوي على (OH) واحدة دائما على الحلقة(B) [8].

II-2-2- التنقية:

من أجل تنقية المركبات المفصولة بالتقنيات الكروماتوغرافية السابقة تنقية جيدة ، والهدف من ذلك هو التخلص من الشوائب العالقة بالمركبات المفصولة (كمتعدد الأميد، والسيليلوز.....الخ) ، وللحصول على نتائج جيدة نستعمل عمود بطول (20 سم) وقطر (1 سم) ثم نتبع الخطوات التالية :

II-2- 2- أ- التنقية على عمود من متعدد الأميد SC_6:

يتم مزج متعدد الأميد (SC_6) بالتولوين ، ثم يسكب في العمود الكروماتوغرافي وبعد استقرار المزيج فيه يوضع المركب المفصول والمذاب في أقل كمية ممكنة من الميثانول على سطح الدعامة الثابتة ، بعد

تموضعه يغسل بالتولوين ثم يغير في قطبية المملص تدريجيا بإضافة الميثانول حتى يتم نزول المركب كليا .

II-2-2- ب- التنقية على عمود من السيفاداكس:

لتحقيق عمود من (Sephadex LH20) ، يتم نقع جال السيفاداكس في الميثانول ثم يسكب المزيج بلطف في العمود، وبعد استقراره يتم وضع المركب المفصول والمذاب في أقل كمية ممكنة من الميثانول على سطح الدعامة الثابتة بعناية ، يملص بعدها بدفعات متتالية من الميثانول ، حيث يخرج المركب أسفل العمود نقيا وجاهزا لمختلف الدراسات البنيوية .

II-3- الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونيدية:

تعتمد الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونيدية على :

- الخواص الكروماتوغرافية : من

ـ اللون الإستشعاعي : وهو لون المركب عند تعرضه للأشعة فوق بنفسجية

ـ ثابت الاحتباس (R_f)

- كذلك على التقنيات الفيزيوكيميائية المختلفة : من

ـ مطيافية الأشعة فوق بنفسجية (UV)

ـ مطيافية الكتلة (SM)

ـ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي (RMN-^{1}H, RMN-^{13}C)

- و الإماهة الحمضية

II-3-1- الخواص الكروماتوغرافية :

II-3-1- أ- اللون الإستشعاعي :

إن لون المركب تحت مصباح الأشعة فوق بنفسجية يعطينا معلومات أولية تخص صيغته البنيوية المحتملة، والجدول التالي يوضح ذلك [1]،[9] :

الجدولII - 3 : لون المركب تحت الأشعة فوق بنفسجية وتركيبته البنيوية المحتملة

لون المركب تحت الأشعة (UV)	التراكيب البنيوية المحتملة
بنفسجي مسود	فلافون, فلافون مع (5-OH). فلافون مستبدل في الموضع 3. 7,6,5 أو 8,7,5 ثلاثي هيدروكسي فلافون.
أزرق(بنفسجي نيلي)	فلافون أو فلافانون بدون (5-OH). فلافونول مستبدل في 3 وبدون (5-OH).

أصفر أو أصفر باهت	فلافونول غير مستبدل مع أو بدون (5-OH)
برتقالي لامع	إيزوفلافون.
أصفر مخضر	أورون.
أخضر	بعض الشالكونات

الجدولII - 3 : لون المركب تحت الأشعة فوق بنفسجية وتركيبته البنيوية المحتملة (تابع)

II-3-1- ب- ثابت الاحتباس :

من خلال قيم معامل الاحتباس (R_f) في نظام مذيب معين، يمكن معرفة طبيعة الفلافونيد الذي بحوزتنا ويعرف هذا الأخير أي (R_f)، بأنه النسبة بين المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية ، والمسافة المقطوعة من طرف المذيب (المملص) من نفس النقطة ، وهو قيمة مميزة لكل مركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة ، المذيب المستعمل.....الخ)، وترتبط قيمة (R_f) أيضا بطبيعة المجموعات الاستبدالية على المركب وتشكيله الفراغي [1]،[10].

ويتم قياس قيم (R_f) للمركبات النقية عادة في ثلاث أنظمة لمذيبات مختلفة:

النظام الأول:(4/3/3) Toluène/Méthanol/méthyléthylcétone

النظام الثاني: (13/3/3/1) Eau/ Méthanol/Méthyléthylcétone/Acétylacétone

النظام الثالث: (15%) Acide acétique

وباستعمال كواشف معروفة ، يمكن معرفة ما إذا كان المركب أجليكونيا أو إيتيروزيد، كذلك معرفة ما إذا كان أحادي أو متعدد السكر [11] ،والجدول التالي يبين ذلك [12- 14].

الجدول II-4 : العلاقة بين R_f و البنية الفلافونيدية:

البنية الفلافونيدية	قيـــــــــــم R_f
الزيادة في مجاميع OH	♦ نقصان قيم R_f في الأنظمة العضوية ♦ زيـــادة قيم R_f في الأنظمة المائيـــة
استبدال OH بـ OMe	♦ زيـــادة قيم R_f في الأنظمة العضوية ♦ نقصان قيم R_f في الأنظمة المائيـــة
إدخال مجموعة السكر	♦ نقصان قيم R_f في الأنظمة العضوية ♦ زيـــادة قيم R_f في الأنظمة المائيـــة

II-3 - 2 - التقنيات الفيزيوكيميائية المختلفة :

من طرق التحليل الطيفي وهي :

II-3-2- أ- مطيافية الأشعة فوق بنفسجية :

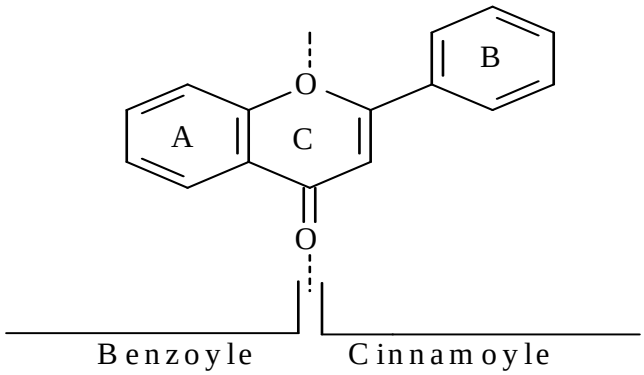
الفلافونيدات هي واحدة من المركبات القادرة على امتصاص الأشعة فوق بنفسجية ، وذلك لاحتوائها على مجموعات مسؤولة عن ذلك تدعى بـ (Chromophore)، وهذه الأخيرة هي عبارة عن مواقع غنية بالإلكترونات ، كما قد تكون عبارة عن مجموعات كيميائية ،مثل مجموعة الهيدروكسيل "OH-" ومجموعة الميتوكسيل "OCH_3 – ". وتعتبر مطيافية الأشعة فوق بنفسجية من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على البنية الكيميائية للمركبات الفلافونيدية ، وقد نشرت أبحاث كثيرة بهذا الصدد [15-19] وتكمن أهميتها في

- سهولة وسرعة تحقيقها
- لا تحتاج إلى كمية كبيرة من المركب لإنجازها (0.1 مغ)
- كما أنها تعطي معلومات معتبرة ووافية عن البنية الكيميائية المحتملة للمركب .

ويعتمد أساس هذه التقنية في كون كل مركب فلافونيدي له طيف امتصاص مميز و خاص في الوسط الميثانولي ، ويتغير هذا الطيف بإزاحات معينة بعد إضافة كواشف معروفة ،إما قواعد (مثل هيدروكسيد الصوديوم NaOH ،خلات الصوديوم NaOAc)، أو أحماض لويس (مثل كلوريد الألمونيوم $AlCl_3$، حمض البوريك H_3BO_3)، حيث أن طبيعة الكاشف وتأثيره على طيف الامتصاص يوفران معلومات حول بنية المركب ، فمثلا إذا أضيف ($HCl+AlCl_3$) إلى محلول المركب يسبب إزاحة للعصابة (I) بمقدار 20 إلى 25 من النانومترات مقارنة بطيف المركب المسجل في الميثانول ، و يدل ذلك على وجود مجموعة هيدروكسيل في الموقع 5 [20] .

II-3-2- أ-1- طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي :

إن طيف الامتصاص في الميثانول للصيغة الفلافونيدية (فلافون ،فلافونول) يعطي عصابتين أساسيتين: العصابة (I): تقع بين (300 - 400 نم) وتعود إلى امتصاص الشكل (Cinnamoyle) للمركب وذلك نتيجة للرنين الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل (C4) مع الحلقة البنزينية (B). العصابة (II): تقع بين (250 - 280نم) وتعود إلى امتصاص الشكل (Benzoyle) للمركب وذلك نتيجة للرنين الناتج عن ترافق مجموعة الكربونيل (C4) مع الحلقة البنزينية (A) كما هو موضح في الشكل(II-1) التالي :



الشكل (II-1) : ترافق مجموعة الكربونيل مع كل من الحلقتين (A)و(B)

إن التمييز بين بنية (Flavones) و(Flavonols) يكون من خلال وضعية العصابة (I) في الطيف الميثانولي [15]، فالحزمة (I) تظهر بين (305 - 350 نم) بالنسبة للفلافون وبين (350 - 385 نم) بالنسبة للفلافونول ، وقد سمحت المقارنات التي أجريت بين أطياف مختلف الفلافونيدات بالاستنتاجات التالية :

الزيادة في عدد مجموعات الهيدروكسيل الحرة يصاحبه عموما انزياح في اتجاه طول الموجات الأكبر انزياح باتوكرومي " Bathochrome " فعلى سبيل المثال :

- Galangine (3,5,7-tri OH flavone) تكون طول موجته الأولى 359 nm
- Quercétine (3,5,7,3',4'- penta OH flavone) تكون طول موجته الأولى 370 nm
- kaempférol (3,5,7, 4'-tétra OH flavone) تكون طول موجته الأولى 367 nm

إن وجود مجموعة ميثيل أو سكر في المواضع التالية 4',3,5,7 يصاحبه انزياح هيبسوكرومي "Hypsochrome" أي في اتجاه طول موجات أقل [1]

الجدول II -5: أهم الإنزياحات الملاحظة للعصابتين (I) و (II) في الوسط الميثانولي

نوع الفلافونيد	العصابة II (nm)	العصابة I (nm)
فلافون	280-250	350-310
فلافونول3-OH مستبدل	280-250	360-330
فلافونول 3-OH حر	280-250	385-350
ايزوفلافون	275-245	330-310
فلافانون وDihydroflavonol	295-275	330-300
شالكون	270-230	390-340
اورون	270-230	430-380
انثوسيانيدين و انثوسيانين	270-230	560-465

إذن فتحديد شدة العصابتين الأولى و الثانية للطيف المنجز في الميثانول يكشف لنا عن طبيعة الهيكل الفلافونيدي وكيفية استبداله ، وبإضافة كواشف معينة إلى محلول الميثانول مثل NaOH, NaOAc أو ($AlCl_3$+HCl) يمكننا من التعمق أكثر في الدراسة البنيوية ، حيث تتضح لنا مستبدلات الهيكل الفلافونيدي، فالمعلومات المستخلصة إذن من طيف امتصاص الميثانول تكون مكملة للتي تعطيها لنا الأطياف المأخوذة بوجود هذه الكواشف .

II-3-2 - أ-2- طيف الامتصاص في وجود (NaOHأوNaOMe):

إن NaOH وNaOMe تعتبر كقاعدة قوية تأين كل هيدروكسيلات الفلافونيد ، وإضافتها (للمركب +ميثانول) تحدث إزاحة باتوكرومية لكل الطيف أي الانزياح في الاتجاه (λ) الطويلة ، ويظهر تأثيرها خاصة على العصابة (I) أشد منه على العصابة (II) ، ومثال ذلك وجود (OH) حر في الموقع ('4) لفلافون أو فلافونول يؤدي إلى انزياح بمقدار [+40 إلى +65 نم] بدون نقصان في الشدة الضوئية .

II-3-2 - أ- 3- طيف الامتصاص في وجود (NaOAc):

إن خلات الصوديوم NaOAc تعتبر كقاعدة ضعيفة ، لذا فهي تأين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حامضية فقط C_7, $C_{4'}$, C_3 ويعتبر كاشف نوعيا لهيدروكسيل الموقع (C_7) ، ويظهر ذلك جليا على العصابة (II) للطيف المسجل، إذ أنه يحدث فعل باتوكرومي بمقدار[+5 إلى +20 نم] للعصابة (II) ، ويشير ذلك إلى وجود (OH) حر في الموضع (C_7) [21] .

II-3-2- أ- 4- طيف الامتصاص في وجود (H_3BO_3+NaOAc) :

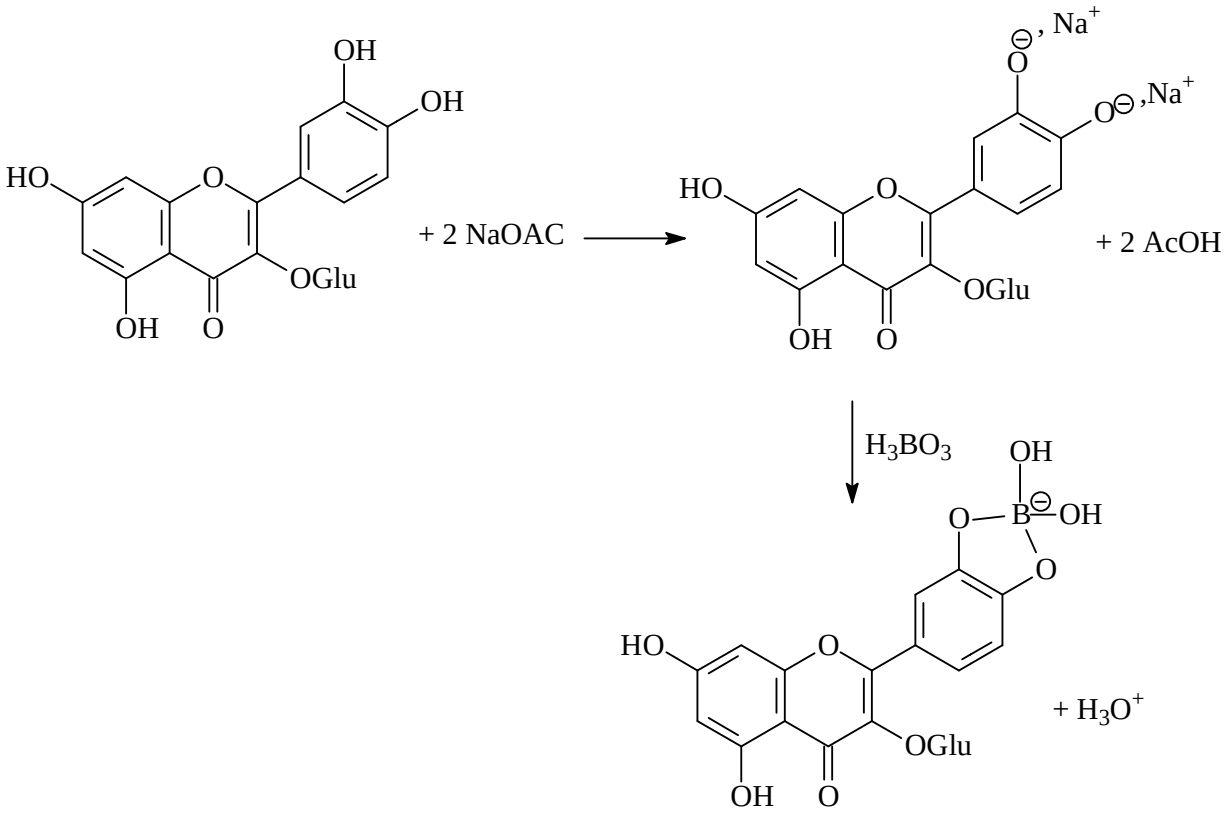
يستعمل هذا المحلول للكشف عن أرثو ثنائي الهيدروكسيل ، إذ أنه في وجود مجموعة أرثو ثنائي الهيدروكسيل باستثناء الموضعين C_5 و C_6[22],[23] ، تتشكل معقدات مخلبية،والشكل(II-2)يوضح ذلك.

II-3 -2- أ- 5- طيف الإمتصاص في وجود $AlCl_3$ و($AlCl_3$+HCl):

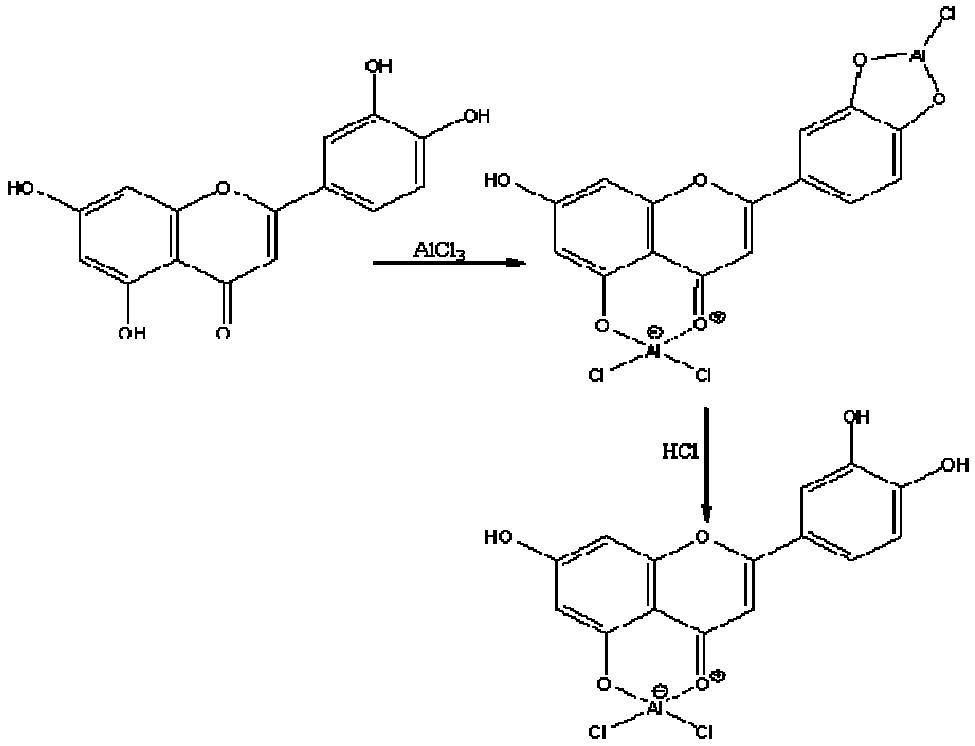
يشكل كلوريد الألمونيوم ($AlCl_3$) مع الكربونيل (C_4) وهيدروكسيل الموقع (C_3) أو الموقع (C_5) معقدات، وكذلك مع أرثو ثنائي الهيدروكسيل ، إلا أن الأول معقد ثابت والثاني غير مستقر في الوسط الحمضي ،فالتحليل يبدأ أولا بمقارنة الطيف المسجل في الميثانول (MeOH) مع الطيف المسجل في ($AlCl_3$+HCl) وفي حالة وجود انزياح" باتوكرومي" للعصابة (I) يدل ذلك إذن على وجود هيدروكسيل في الموقع (C_3) أو (C_5).

في المرحلة الثانية تتم مقارنة الطيف المسجل في وجود ($AlCl_3$+ HCl) مع الطيف المسجل في وجود ($AlCl_3$) ، ففي حالة وجود انزياح "هيبسوكرومي " للعصابة (I) بعد إضافة (HCl) إلى طيف

($AlCl_3$) دل على وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة (A)أو(B)وهذا ما سيوضحه الشكل (II-3) [13].



الشكل(II -2): المعقد المتشكل بين الفلافونيد و (H_3BO_3 + NaOAc)



شكل (II-3) :المعقدات الثابة و الغير ثابة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد اضافة HCl

II-3-2 - أ- 6- الطريقة العملية لتحقيق السلسلة الطيفية :

يتم تسجيل السلسلة الطيفية على ثلاث مراحل وهي:

المرحلة الأولى : نسجل طيف الامتصاص في الميثانول الخالص للمركب ، بعدها نضيف لخلية المركب قطرة من (NaOH) أو (NaOMe) بتركيز (0.5N) ونسجل مباشرة طيف الامتصاص ، ثم نعيد تسجيل طيف الامتصاص بعد (5 دقائق).

المرحلة الثانية : نحضر خلية جديدة تحتوي على المركب ، ونضيف إليها بعض القطرات (2 أو 3) من كلوريد الألمونيوم $AlCl_3$ بتركيز (1%) ونسجل طيف الامتصاص ، ثم نضيف لمحلول الخلية قطرات من حمض (HCl) بتركيز (1%) ونسجل طيف الامتصاص .

المرحلة الثالثة : نحضر خلية جديدة تحتوي على المركب المدروس ، نضيف إليها (NaOAc الصلب) حتى التشبع ونسجل طيف الامتصاص ، ثم نضيف لمحلول الخلية قطرات من حمض البوريك (H_3BO_3) والمذاب في الماء المقطر بتركيز (1%) ونسجل طيف الامتصاص . والجدول (II-6) يوضح مختلف التأثيرات المحتملة على طيف المركب وتفسيراتها قبل وبعد إضافة الكواشف [1]،[23-25] .

الجدول II- 6 : التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف المركب

المفاعل	الازاحة بـ (nm)		التعليل
	العصابة (I)	العصابة(II)	
MeOH	350 - 310	280 - 250	فلافون
	360 -330	280 - 250	فلافونول(3-OR)
	375 - 350	280 - 250	فلافونول(3-OH)
	330 - 300	295 - 275	فلافانول

NaOMe	+45 إلى +65 1- استقرار الشدة الضوئية/ MeOH 2- نقصان في الشدة الضوئية/ MeOH 3- طيف يتحلل مع الوقت عصابة جديدة مقارنة بطيف MeOH بين 320 - 330		4'-OH 3-OH, 4'-OR 3'-OH, 4'OH أو أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A أو B 7-OH
NaOAc		+5 إلى +20 عدم وجود انزياح انزياح ضعيف طيف يتحلل مع الوقت	7-OH 7-OR 7-OH مع مستبدل في 6 أو 8 7،6،5 - 8،7،5 - 4’،3’،3 ثلاثي هيدروكسيل
H_3BO_3 + NaOAc	+12 إلى +36 إزاحة باتوكرومية ضعيفة		أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B. أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A.

$AlCl_3$	+30 إلى +36 مقارنة بطيف $AlCl_3$+HCl. +20 إلى +25 مقارنة بطيف $AlCl_3$+HCl.		أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B. أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A و الحلقة B كذلك
$AlCl_3$+HCl /MeOH	+17 إلى +20 +35 إلى +55 +50 إلى +60		5-OH مع مجموعة أوكسجينية في الموقع6 5-OH 3-OH أو 3-OH و5-OH

الجدول II- 6 : التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف المركب (تابع)

ملاحظات:

/ : مقارنة بـــ

- : إزاحة هيبسوكرومية

+ : إزاحة باتوكروميـــة

II-3-2- ب- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN:

يعتبر طيف الرنين النووي المغناطيسي (RMN) من أهم الطرق المتاحة للحصول على التركيبة الكيميائية للمركبات ، وقد استخدمت هذه الطريقة في نطاق واسع لدراسة المنتجات الطبيعية كالفلافونيدات ، وتوجد عدة تقنيات هي :

- طيف RMN للبروتون ^1H
- طيف RMN للكربون ^{13}C

كما ظهرت للوجود تقنيات جديدة، أمكن بها الجمع بين أطياف البروتون ^1H والكربون ^{13}C وهذا للحصول على طيف ثنائي البعد، ويمكن بهذه التقنيات معرفة:

- درجة تأكسد الحلقات A , B , C

- عدد السكريات الموجودة في المركب ، ونوع الرابطة (α أوβ) بين السكر والأغليكون

- عدد ومواقع مجموعات الميتوكسيل على الهيكل الفلافونيدي [26،27] .

فمثلا البروتونات المجاورة لمجموعة هيدروكسيلية أو ميتوكسيلية تظهر بإزاحة كيميائية تتراوح بين

(6.6-7.1ppm) ، بينمـا يظهـر البروتـون المحـاط بمجمـوعتي هيدروكسـيل أوميتوكسـيل عنـد حـوالي (6.1ppm) ، أما إذا وجدت مجموعة أكسيجينية على الموضع رقم (6) وكـان الموضـع رقـم (5) غيـر مستبدل فإن بروتون هذا الموضع يظهر عند قيمة (7.4ppm) وليس ضمن المجال(6.6-7.1ppm).

II-3-2- ب-1- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN-^{1}H :

يتم الحصول على طيف RMN-^{1}H باستعمال مذيبات مختلفة مثل ($CDCl_3$) والذي يعطـي نتـائج جيـدة مع الفلافونيدات الغير قطبية ، ومذيب (CD_3OD) و(DMSO –d_6) الذي يعطي نتائج جيدة مع معظم الغليكوزيـدات و الأجليكونـات [15]، حيـث تقـاس قـيم الانزيـاح الكيميـائي (δ) بالنسـبة لقيمـة الانزيـاح الكيميائي لـ (TMS) الذي يؤخذ اصطلاحا مساويا للصفر δ(TMS)=0.

وفيمـا يلـي الجـدولين (II-7 وII-8)، يبينـان بعـض الإنزياحـات الكيميائيـة لبروتونـات الحلقتـين (A) و(B)[28].

الجدول II - 7 : الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة A

طبيعة الفلافونيد \ بروتونات الحلقة A	(H-5) δ,ppm	(H-5) J,Hz	(H-6) δ,ppm	(H-6) J,Hz	(H-8) δ,ppm	(H-8) J,Hz
5,7-OH	-		6,0-6,2(d)	2,5	6,3-6,5(d)	2,5
5-OH, 7-OR (R : Glu)	-		6,2-6,4(d)	2,5	6,5-6,9(d)	2,5
7-OR (R = H, sucre)	8,0(d)	9,0	6,7-7,1(dd)	2,5-9	6,7-7,0(d)	2,5
5,6,7-OR (R = H,sucre)	-		-		6,3(s)	
5,7,8-OR	-		6,3(s)		-	

الجدول II - 8 : الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة B

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

II-3-2- ب-1-1- بروتونات الحلقة (C):

يعطي البروتون (H-3) في الفلافون إشارة أحادية حادة في المجال [6.4ppm -6.2] ، وبالتالي تتداخل مع إشارة بروتوني الحلقة A (H-6) أو (H-8) في حالة 5,7,8-OH أو 5,6,7-OH [29].

II-3-2- ب-1-2- بروتونات الميتوكسيل :

وجود ميتوكسيل أو عدة ميتوكسيلات على الجزيء يظهر مجموعة من الإشارات الأحادية بين [4.5ppm -3.8] [30].

II-3-2- ب-1- 3- بروتونات السكر :

بروتونات السكر تتميز بالبروتون الأنوميري ، إذ يختلف انزياح هذا البروتون حسب طبيعة الفلافونيد ، وكذا موقع ونوع الرابطة بين السكر والأجليكون ، وتتواجد إشارته عموما في مجالات أدنى وأقل من مجال إشارات بقية بروتونات الأجليكون [13].

والجدول التالي يعطي قيم الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري ("1- H) لبعض الفلافونيدات أحادية السكر.

الجدول II - 9 : قيم الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري "1-H لبعض الفلافونيدات أحادية السكر

الفلافونيد	H-1" (δ .ppm)
7-O-glucosylflavonoide	5.2 - 4.8
3-O- glucosylflavonoide	6.0 - 5.7
7-O-rhamnosylflavonoide	5.3 - 5.1
3-O- rhamnosylflavonoide	5.1 - 5.0

كما يمكن التعرف على نوع الرابطة (α أو β) بين السكر و الأغليكون من خلال ثابت الاقتران (التزاوج) لـ "1- H ، "2- H ، حيث يمتاز الغلوكوز بالرابطة (β) ويظهر ("1- H) بإشارة ثنائية بثابت تزاوج (*J*=7Hz) ناتج عن تزاوج ثنائي محوري مع ("2- H) ، كما يمتاز الرامنوز برابطة قد

تكون (α) بإشارة ثنائية لـ ("1- H) بثابت تزاوج (J=2Hz) نتيجة الاقتران (استوائي - استوائي).
كما يمكن التعرف على سكر الرامنوز بظهور إشارة ثنائية لميثيل السكر بثابت تزاوج (J=6Hz) في المجال (0.8-1.2ppm) [15].

بالإضافة إلى الغليكوزيدات الأحادية ، فهناك غليكوزيدات ثنائية السكر ، أغلب هذه المركبات يكون الجزيء السكري فيها إما *Rutine* أو *Neohesperidine* ويمكن التفريق بينهما بظهور إشارة H-1 rhamnosyl عند (4.4 ppm) وإشارة H-1glucosylعند (5ppm) مع إشارة ميثيل الرامنوز في حدود (0.7-1 ppm) وهذا في حالة الجزيء السكري هو (O-rutinoside) ، في حين تظهر إشارة H-1 rhamnosyl عند (4.9ppm) وإشارة H-1glucosyl عند (5.1 ppm) مع إشارة ميثيل الرامنوز في حدود (1.1-1.3ppm) ،هذا في حالة الجزيء السكري هو (O-neohesperidoside) .

والجدول التالي يعطي قيم الانزياح الكيميائي للبروتونات الأنوميرية ("1- H) و ("'1- H) لبعض الغليكوزيدات الثنائية السكر [27].

الجدول II- 10 : قيم الانزياح الكيميائي للبروتونات الأنوميرية "H-1 ، "'H-1 لبعض الغليكوزيدات ثنائية السكر في $DMSO-d_6$

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

II-3-2- ب-2- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN-^{13}C:

تعتبر مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C تقنية مكملة لمطيافية البروتون ^{1}H وتستعمل مع مختلف أنواع الفلافونيدات ، والجدول التالي يبين أهم الإنزياحات المختلفة لذرات الكربون للفلافونات و الفلافونولات .

الجدول II- 11 : يبين أهم الإنزياحات المختلفة لذرات الكربون للفلافونات و الفلافونولات في أطياف RMN-^{13}C

طبيعة الكربون	الإزاحة الكيميائية ppm بالنسبة لـ TMS
Aromatique C-CH_3	7 - 22
Aromatique O-CH_3	59 - 63
3-Methoxyflavone (3-OCH_3)	58 - 59
Sucre CH_2OH, CH-OH, C-glycoside	56 -78
5,7-Dihydroxyflavonoide (C_6-C_8)	90 -110
Flavone (C-3)	90 -135
Flavanol (C-3) 3-Methoxyflavone (C-3)	135 -144
Flavanol (C-2) 3-Methoxyflavone (C-2)	136 -158
Flavone (C-2)	155 -168
Flavone (C-4) Flavanol (C-4) 3-Methoxyflavone (C-4)	172 -186

II-3-2-ج- مطيافية الكتلة:

تستعمل مطيافية الكتلة للتعرف على البنية الكيميائية لمركب ما، فهي تسمح بمعرفة الوزن الجزيئي له، كما أنها تسمح بتحديد الأيون الجزيئي و الشظايا التي تعطي عموما عدد وطبيعة المستبدلات الهيدروكسيلية أو الميتوكسيلية [31]، ومن بين التقنيات المستعملة في هذا المجال :

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

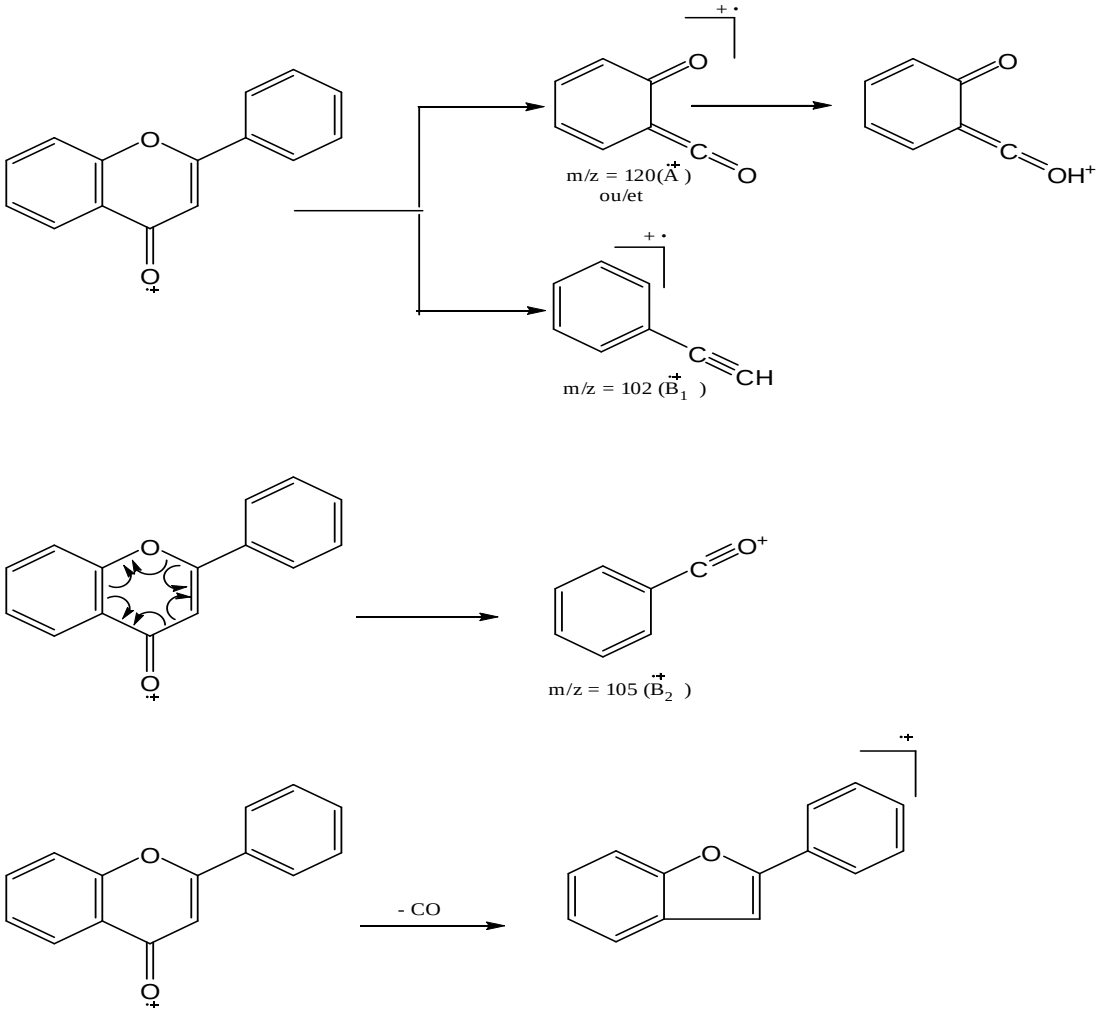
II-3-2-ج- 1- تقنية القذف الإلكتروني (EI) :

تعتمد هذه التقنية على تطيير المركب في غرفة التأين، وسط درجة حرارة (100 - 300 °م)، ليقذف بعدها بسيل من الإلكترونات لتأينه وبالتالي نحصل على أيونات موجبة حسب المعادلة التالية:

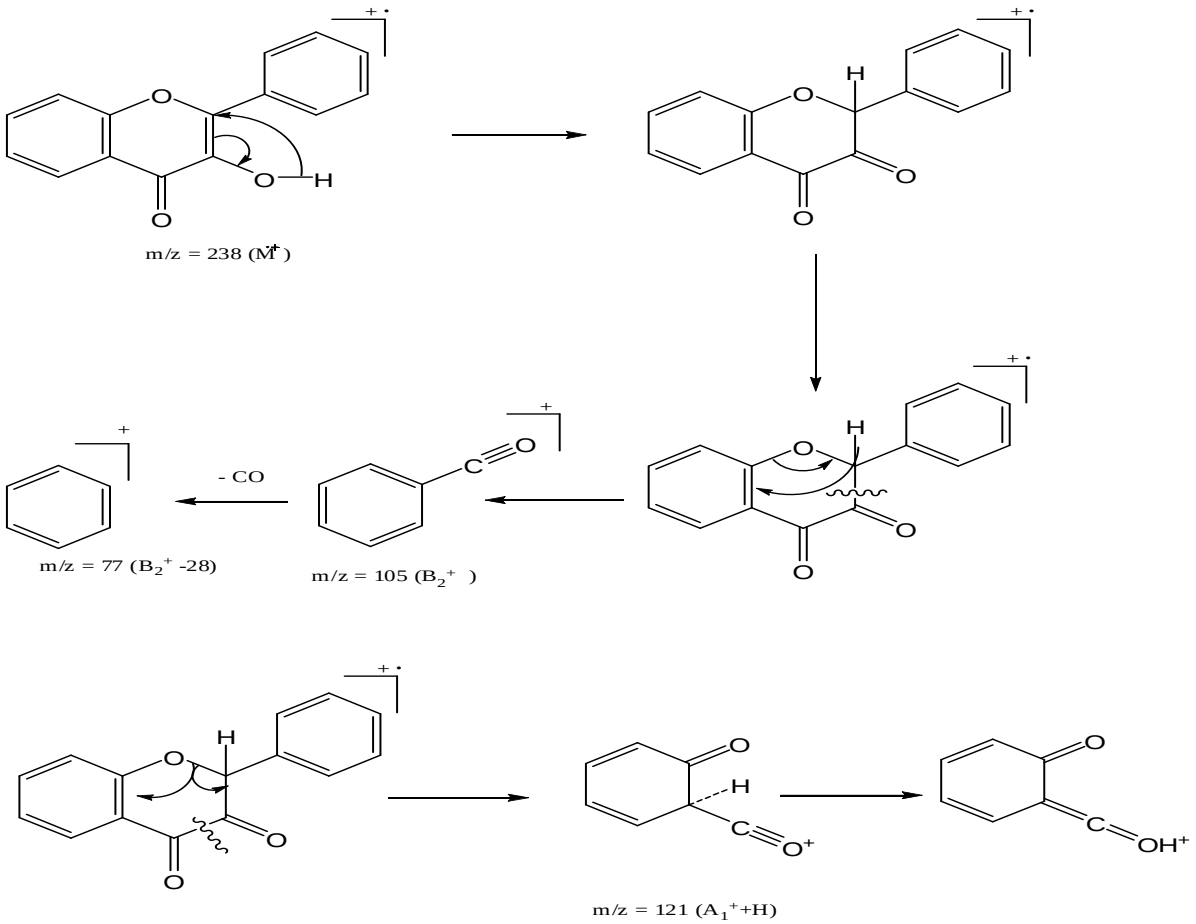
$$M + 1e^- \longrightarrow M^+ + 2e^-$$

و كنتيجة للطاقة التي يكسبها الأيون الجزيئي (M^+) برتبة (70 éV) تحدث له تشظية ، من خلالها نحصل على الأيونات المميزة للمركب تحت الدراسة ، وتعتبر هذه التقنية صالحة إلى مع الأغليكونات ، لأن الإيتيروزيدات تفتقر إلى خاصية التطيير وكذلك لاحتوائها على المستبدلات السكرية التي لا تتحمل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية [32]،[33].

و فيما يلي شرح لأهم الشظايا على بعض الأقسام الفلافونيدية بشكل عام .



شكل II- 4 : أهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافون



شكل II- 5 : أهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافونول

II-3-2-ج- 2- تقنية القذف السريع بالذرّات (F.A.B):

تسمح تقنية القذف السريع بالذرّات (F.A.B) بمعرفة الأيون الجزيئي وطبيعة السكر [34]، فهذه التقنية صالحة بالنسبة للمركبات الإيتيروزيدية القطبية ، ذات الأوزان الجزيئية المرتفعة والتي لا نستطيع دراستها بواسطة التقنية السابقة (تقنية EI) [32، 35]،فباستعمال تفريغ (كاتود) يتم تأين ذرّات غاز الأرغون لنحصل على أيونات (Ar^+)

$$Ar \longrightarrow Ar^+ + 1e^-$$

بعدها تدخل هذه الأيونات غرفة الصدم والمحتوية هي الأخرى على غاز الأرغون و هذا تحت ضغط معين ، فيحدث انتقال الشحنة بين (Ar) و (Ar^+) حسب التفاعل التالي :

$$Ar + \overrightarrow{Ar}^+ \longrightarrow Ar^+ + \overrightarrow{Ar}$$

حيث تبقى الذرّات الناتجة ($\overrightarrow{Ar}$) محافظة على طاقتها ، وعند الخروج من غرفة الصدم نحصل على خليط من ($\overrightarrow{Ar}, Ar^+$)، يتم بعدها عزل أيونات (Ar^+) باستعمال لوحي مكثفة لنحصل في النهاية على سيل من ذرّات الأرغون ($\overrightarrow{Ar}$) والتي تدخل غرفة التأين لتصطدم بذرات العينة (المركب المدرس) و الموضوعة على لوح معدني ، فنحصل على أيونات المركب التي يتم قلعها وتسريعها وتحليلها بعد ذلك.

من مميزات هذه التقنية [35]:

- تكوين أيونات المركب من دون تسخين العينة.
- تكوين أيونات شبه جزيئية (quasi moléculaires).
- تكوين أيونات موجبة و سالبة .
- مدة حياة طويلة للعينة .

إن تطبيق هذه التقنية (F.A.B) مع الغليكوزيدات يمكننا من الحصول على معلومات فيما يخص الجزء السكري منها ، وإضافة إلى أيونات التشظية العادية المميزة للفلافونيدات ، فإننا نحصل على قيم موافقة للأيونات شبه جزيئية من الشكل، $[M+H]^+, [M+Na]^+, [M+K]^+, [M-H]^-$.

II-3-2-ج- 3- تقنية الإلكتروسبراي (électrospray):

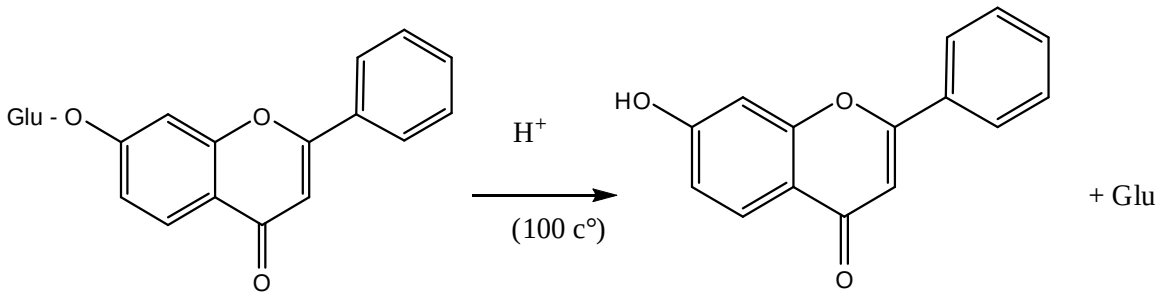
تعتبر هذه التقنية أحدث من التقنية السابقة، تقنية (F.A.B) وتختلف عنها في الطريقة العملية ، حيث تسمح بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة مثل البروتينات ،والجزيئات الصغيرة السهلة التكسير مثل المضادات الحيوية والمبيدات [36].

أما بالنسبة للفلافونيدات فنستعمل تقنية الإلكتروسبراي (ES^+) وهذا لدراسة المركبات السهلة التكسير مثل O- glycosides [37] .

ويتميز طيف الكتلة المحصل عليه بوجود قمة الأيون الجزيئي $[MH]^+$ وقمم موافقة للأيونات شبه جزيئية من الشكل $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$ [38].

II-3-2-د- الإماهة الحمضية :

تستعمل هذه الأخيرة لمعرفة طبيعة السكر المرتبط بالمركبات الغليكوزيدية المعزولة [1] ، حيث يتم تمييه هذه الأخيرة في وسط حمضي حسب الشكل (II- 6) التالي :



O- Glucose flavone FLAVONE

الشكل II-6 : التمييه الحمضي للمركبات الجليكوزيدية

كما أنها تعطينا فكرة عن ما إذا كان المركب غليكوزيدا من النوع (O – glycosyl) أو من النوع (C – glycosyl) لأن الرابطة من النوع الثاني مقاومة للتحليل الحمضي، فيستفاد من هذه الخاصية في تمييز هذا النوع من الروابط عن النوع الأول [1].

II-3-2- د- 1- الطريقة العملية :

تؤخذ كمية قليلة من الغليكوزيد المذابة في مذيب معين ، ويضاف إليها (2ملل) من حمض كلور الماء (HCl , 4N) في أنبوب اختبار ، يسخن هذا الخليط في حمام مائي (100 °م) لمدة ساعة من الزمن، بعد التبريد يستخرج الأنبوب ويضاف له حوالي (2ملل) من ثنائي إيثيل الإيثر (EtOEt) ويرج جيدا، ثم يترك ليهدأ حتى ظهور خط الفصل بين الطورين المائي والعضوي، وتفصل الطبقة العضوية (المحتوية على ثنائي إيثيل الإيثر) ، تكرر العملية مرة أخرى مع ثنائي إيثيل الإيثر ومرتين مع خلات الإثيل (AcOEt)، حيث دائما تفصل الطبقة العضوية عن المائية ، ليضاف إلى هذه الأخيرة (2ملل) من البوتانول العادي (n – Butanol) مرة أولى ثم مرة ثانية [1] .

بعد تجميع الطبقات العضوية كلا على حدى يتم تجفيفها ليصبح لدينا :

- الطبقة العضوية الخاصة بثنائي إيثيل الإيثر
- الطبقة العضوية الخاصة بخلات الإيثيل
- الطبقة العضوية الخاصة بالبوتانول العادي

عموما الطبقة العضوية لثنائي إيثيل الإيثر هي التي تحتوي على الأغليكون، أما الجزء السكري من الغليكوزيد فيبقى مذابا في الطبقة المائية التي يتم تجفيفها .

التعرف على الأغليكون يكون بواسطة تسجيل طيف الـ (UV) له في الميثانول ، كما يمكن التعرف عليه بواسطة كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة باستعمال أنظمة مناسبة ، أما الجزء السكري فيتم التعرف عليه بإتباع الخطوات التالية :

II-3-2- د- 1-1- تحضير العينة :

نقوم بتبخير الطور المائي المتحصل عليه والذي يحتوي على الجزء السكري حتى الجفاف وذلك باستعمال مضخة خاصة تدعى (pompe à palettes) لنعيد تذويبه في كمية قليلة جدا من الماء المقطر، وبذلك يكون جاهزا للاستعمال فيما بعد.

II-3-2- د-1-2- تحضيراللوح الكروماتوغرافي من النوع (gel de silice 60 F 254):

يرش اللوح الكروماتوغرافي بمحلول من (NaH_2PO_4 (0.2 M ، ثم يترك ليجف في الهواء بضع دقائق قبل وضعه في الفرن تحت درجة حرارة (100 °م) لمدة ساعة ، بعدها وباستعمال ماصة توضع نقاط من الطور المائي المحتوي على السكر (المحضر سابقا) مع بعض الشواهد السكرية المعروفة ليغمس اللوح في مملص يحتوي على (أسيتون / ماء) بنسبة (9 / 1)، وبعد (150 – 180 دقيقة) يستخرج الكروماتوغرام ويترك ليجف لمدة ساعة ، ليعاد وضعه مرة ثانية في نفس المملص السابق ولنفس المدة السابقة، يستخرج بعدها ليجف مدة ساعة، عندها يرش بواسطة كاشف" مالونات الأنيلين " (حمض المالونات 1 غ – حمض الفوسفوريك 3 ملل – الأنيلين 1 ملل – الإيثانول 100 ملل)، ويترك ليجف في الهواء بضع دقائق ،بعد ذلك يوضع في الفرن تحت درجة حرارة (100 °م) لمدة 5 دقائق، حيث تبدأ بقع السكريات في الظهور، فتكون بنيّة اللون بالعين المجردة ، وصفراء عند رؤيتها تحت مصباح الأشعة (UV)، عندها يتم التعرف على السكريات التي بحوزتنا وذلك بمقارنتها مع الشواهد السكرية المستعملة، والجدول التالي يعطي لنا قيم ثابت الاحتباس (R_f) لبعض السكريات المعروفة [1] .

الجدول II- 12 : قيم ثابت الاحتباس R_f لبعض السكريات المعروفة

السكر	R_f
α(L)rhamonose	0,88
D(+)xylose	0,79
L(+) arabinose	0,66
β(+)glucose	0,53

مراجع الفصل الثاني :

[1] Markham, K. R.,(1982). The techniques of flavonoids identification, eds. Academic press. London.

[2] Abd Elchakour, A. S.,(1987). Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abd Elaziz, Djedda, 173.(ed en arabe)

[3] Randerah, (1971). Chromatographie sur couche mince, eds Gautier Villard.

[4] Wang, H. K., Lin, S. Y., Hwang, K. M., Tylor, G., Lee, K. M.,(1994). Bioorg, MED chem, 2, 1397.

[5] Andersen, M., Markham, K.R.,(2006). Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. CRC Press Taylor & Francis Group.

[6] Francisco, A., Tomas-Barberan, F.,(1990). High performance liquid chromatography, thin layer chromatography and ultra violet behavior of flavone aglycone with unsubstituted rings . Phytochemistry. Anal, 1, 44.

[7] Combier, H., Jay, M., Voirin, B., Lebreton, P.,(1974). Influence des 6 et /ou des 8-substitutions sur le comportement spectrométrique et chromatographique des flavonoides. Assemblée annuelle du Groupe poly- phénols . Lyon, France.

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

[9] Harborne, J.B, Mabry, T.J, Mabry, H.,(1975). The flavonoids. Academic press .London ,Tome I.

[10] Alain, B.,(1972). La chromatographie et ses applications. Dunod, Paris.

[11] Simoes, C. M. O., Amoros, M., Gire, L.,(1990). J. Nat. Prod, 53, 989.

[12] Harborne, J. B.,(1975). The flavonoids, eds Chapman and Hall, London. V.1

[13] Mabry, T.J., Thomas, M. B.,(1970). The systematic identification of flavonoids, eds, Springer-Verlag, Berlin.

[14] Randerah, H.,(1970). Chromatographie sur couche mince, eds Gautier Villard. Paris.

[15] Harborne, J.B.,(1988). The flavonoids, advances in research since 1980, Chapman and Hall, London.

[16] Jurd, L.,(1962). The chemistry of flavonoids compounds. Geissman, Pergamon press, New-york

[17] Harborne, J. B.,(1967). Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic press. London.

[18] Jay, M., Gonnet, J. F., Wollenweber, E., Voirin, B.,(1975). Phytochemistry, 14, 1605.

[19] Voirin, B.,(1983). Phytochemistry, 22, 2107.

[20] Elhazemi, H.,(1995). Natural products, eds University of King Saoud.

[21] Harborne, J.B., Swain, T.,(1969). Perspectives in phytochemistry. Academic press. London.

[22] Bacon , J.D., Mabry, T.J., Mears, J .A .,(1976) . Latino .Amer .Quinn, 7,83.

[23] Riberau-Gayon, P.,(1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.

[24] Markham, K.R., Mabry, T.J.,(1975). In the flavonoids. Harborne, J. B. Mabry, T. J. and Mabry. H, Chapman and Hall, London.

[25] Wollenweber, E., Jay, M.,(1971). In the flavonoids. Harborne, J. B. Chapman and Hall, London.

[26] Wilson, R.G., Bowie, J .H., Williams, D.H.,(1968). Tetrahedron, 24,1407.

[27] Rodriguez, E., Carman, N.J., Mabry, T.J.,(1972). Phytochemistry, 11 ,409 .

[28] Mabry, T.J.,(1969). Perspectives in phytochemistry, eds Chapman and Hall. London,45

[29] Mabry, T.J.,(1963). Perspectives in phytochemistry, eds, Harborne, J. B. Academic press. London.

[30] Mabry,T.J.,(1969).The Ultra-violet and nuclear magnetic resonance analysis of flavonoids in respective in phytochemistry, in Harborne, J.B. Academic press. London,1-45.

[31] Nielson, J.G., Moller ,J.,(1970). Acta.chem.scand, 24,2665.

[32] Audier, H.,(1966). Etude des composes flavoniques par spectrométrie de masse. Bull. soc. Chim, 9, 2892.

[33] Goudard, M.,Bouvin, J.F., chopin, J.,(1978) Phytochemistry,17,145 .

[34] Becchi, M., Fraisse, D.,(1989). Fast atom bombardment and collision activated-dissociation, mass-analysis ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. Biomedical and environmental mass spectrometry, 18,113-122.

[35] Constantin, E., Schenell, A.,(1986).Spectrométrie de masse, principes et applications, Lavoisier, Paris.

[36] Markham, R.,(1995). Les facteurs anti –nutritionnels (F.A.N) phénoliques de *Pisum sativum* et de *Vicia faba* (Leguminosae) : Aspects structuraux. Thèse de doctorat, Université de Claude Bernard, Lyon I.

[37] Pawank, A.,(1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligo-saccharids glycosides. Phytochemistry, 10, 3307-3330.

[38] Voirin, B.,(1970). Thèse de doctorat, Université de Lyon.

الفصل الثالث

الدراسة النباتية والكيميائية للنبتة
Origanum vulgare L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart

III- الدراسة النباتية والكيميائية للنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart :

III-1 - الدراسة النباتية:

III-1-1- المادة النباتية :

تم قطف وجمع النبتة في أواخر شهر أفريل من سنة 2005 ،من طرف الأستاذ بن كينيوار رشيد ، من بلدية تاكسنة ولاية جيجل ، وأجريت عليها عملية التجفيف بوضعها في أماكن خاصة تحت الظل ،وبعيدا عن الرطوبة، بعد ذلك قمنا بفصل الأجزاء الهوائية (الأوراق و الأزهار) فقط ، فكانت الكتلة المتحصل عليها هي 1200 غ .

و قد صنفت هذه النبتة لأول مرة، من قبل عالم النبات الفرنسي René Louiche Desfontaines بين عامي (1798- 1799م) تحت إسم *Origanum glandulosum* (Desf)[1].

في عام (1980) أعاد تصميمها وتصنيفها بالكامل الدكتور J.H. Ietswaart حيث اعتبر أن النوع المذكور *Origanum glandulosum* (Desf) هو واحد من بين ستة أصناف للنوع *Origanum vulgare* L. وبالتالي فقد أعطى لها الاسم التالي :

Origanum vulgare L .Sbsp.*glandulosum* (Desf) Ietswaart

هذه الدراسة قد تم نشرها من طرف دار النشر (Leiden University Press) لاهاي ، هولندا عام (1980) ، تحت اسم : المراجعة التصنيفية للجنس (*Origanum*) (A taxonomic révision of the genus *Origanum*) [2].

III-1- 2 - وصف النبتة :

هي نبتة بسيقان قائمة ، لها أوراق خطية ، سطحها إما عاري أو بشعيرات ناعمة (رخوية). الإزهار، يكون بسبلات كثيفة ، وأزهار تبقى متشابكة بعد وقت الإزهار ،و التويج ، وهو أبيض أو ورديّ اللون ، بشفتين ، شفة سفلية وهي تبدو أطول من الشفة العلوية ،كما يتألف الكأس من خمسة أسنان متماثلة وهولا يحتوي على شفتين [3].

إن هذا الصنف "*Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart" ينبت تلقائيا في كل الشمال الإفريقي، خاصة في المناطق الجبلية التي يتراوح ارتفاعها مابين (300م إلى 1600م) وخاصة بجانب الأماكن الصخرية[4].

صور فوتوغرافية (III-1 و III - 2):
النبتة (*Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart)

III-1- 3 - المميزات والخصائص العلاجية :

أظهرت الدراسات والأبحاث أهمية العائلة الشفوية والجنس *Origanum* بامتلاكهما خواص مضادة للبكتيريا وخواص و مميزات أخرى شجعتنا على دراسة الفعالية البيولوجية للصنف *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart، من أهم هذه الخصائص [5]:

- **للاستعمال الداخلي :**
  - قاتل للبكتيريا Bactéricide
  - مضاد لتشنج المجاري الهضمية Antispasmodique
  - مسكن للألم، مهدئ، مزيل للقلق وآلام الدماغ Sédatif
  - دواء للمعدة stomachique
  - مشروب منعش، فاتح الشهية Apéritif
  - مضاد للتنخّم (البلغّم)،"إفرازات والتهابات الشعب الهوائية " Expectorant
  - مطهر، ومانع العفونة (تعفن القصبات الهوائية) Antiseptique
  - مدّر للطمث، في حالة تأخر نزول العادة الشهرية للأنثى Emménagogue
- **للاستعمال الخارجي :**
  - مبيد للطفيليات Parasiticide
  - مسكن للألم (يمكن استعماله كزيت عطري لمداواة الآلام) Antalgique

III-1-3- أ- أهمية دراسة الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا للصنف *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart:

إن دراسة النباتات الطبية وتحديد فعاليتها في تثبيط البكتريا و غيرها من الجراثيم هي طريقة علمية فتحت المجال للاستفادة من هذه النباتات الطبيعية، وهناك الكثير من النباتات المعتمدة علمياً بفعاليتها في تثبيط الجراثيم وفي معالجة بعض الالتهابات، كما أن مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية المعروفة حاليا زاد من أهمية البحث عن مضادات حيوية جديدة أو معالجات جديدة .

III- 1- 3- ب- السلالات البكتيرية المستهدفة:

شملت دراستنا للفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا السلالات التالية [6-9]

- ***Escherichia coli:***
  - عبارة عن بكتيريا سالبة الجرام.
  - تعيش في الأنبوب الهضمي للإنسان والحيوان.
  - يمكن أن تسبب عدة أمراض كالتهاب المعدة والأمعاء، التهابات المسالك البولية ، والتهاب الأغشية الدماغية (التهاب السحايا).
- ***Klebsiella pneumoniae:***
  - تتواجد في الأنبوب الهضمي و الأنبوب التنفسي للإنسان و الحيوان.
  - عبارة عن بكتيريا سالبة الجرام.
  - تتميز خلاياها بوجود المحفظة.
  - بإمكانها أن تسبب عدة التهابات، كالالتهاب الرئوي ،التهاب الأمعاء و المسالك البولية.
- ***Staphylococcus blanc:***
  - تعيش في المجاري التنفسية العليا و على مخاطيات و بشرة الإنسان و الحيوان.
  - عبارة عن بكتيريا موجبة الجرام.
  - هي في معظم الحالات غير ممرضة و لكن في ظروف معينة كنقص المناعة لدى الإنسان قد تسبب التهابات خطيرة كتعفن الدم و التهاب السحايا.
- ***Pseudomonas aeruginosa:***
  - عبارة عن بكتيريا سالبة الجرام
  - تنتشر في كل مكان ،التربة، الماء، الهواء وتوجد في الأنبوب المعوي بصورة طبيعية للإنسان والحيوان.

- تعرف بمصاحبتها للعديد من الآفات التقيحية (الجروح-الحروق) بالإضافة إلى الالتهاب الرئوي، التهاب السحايا وقد تسبب عدة مضاعفات لدى المصابين بنقص المناعة.

III-1- 4- التصنيف النظامي للنبتة:

نقوم بتفصيل التصنيف النظامي للنبتة تحت الدراسة في الجدول (III-1) التالي [10].

الجدول (III-1): التصنيف النظامي للنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) letswaart

Règne	Végétal (النباتية)	المملكـــــــــــة
Embranchement	Phanérogames (الزهرية)	الفـــــــرع
Sous-embranchement	Angiospermes (مغطاة البذور)	تحت الفرع
Classe	Dicotylédones (ذوات الفلقتين)	الصـــف
Sous-classe	Gamopétales (الأزهار ملتحمة البتلات)	تحت الصف
Subdivision	Superovariées tétracycliques	تحت القســـــم
Ordre	Lamiales	الرتبـــــــــة
Famille	Labiées (الشفوية)	العائلـــــــــة
Genre	*Origanum*	الجنـــــــس
Espèce	*Origanum glandulosum* (Desf)	النـــــــــوع

III-2- الدراسة الكيميائية :

III-2-1- الكشف عن عائلة المركبات الكيميائية " نواتج الأيض الثانوي" عند النبات *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart:

لأجل ذلك نأخذ (30غ) من المادة النباتية السابقة (أي الجزء الهوائي "الأوراق و الأزهار" فقط)، نقوم بتنقيتها من الشوائب ثم نقصها إلى قطع صغيرة لتسهيل عملية الطحن .

بعدها نعالج هذه المادة النباتية المطحونة بواسطة (إيثانول/ماء) بنسبة (2/8) ونتركها لمدة (24سا) على الأقل ،بعد عملية التصفية نأخذ المستخلص الهيدروكحولي ونجري عليه التجارب المخبرية .

ملاحظة: إن هذا المستخلص الهيدروكحولي الناتج له رائحة عطرة وطيبة ، وهذا مؤشر مهم على وجود الزيوت الأساسية في هذه النبتة .

III- 2-1- أ- الكشف عن التربينات الثلاثية والستيرولات:

نأخذ (10 مل) من المستخلص الهيدروكحولي السابق، نقوم بتبخيره حتى يجف تماما، نضيف له 0.5مل من حمض الخل لامائي (acide acétique anhydre) و(0.5مل) من الكلوروفورم($CHCl_3$) ،ثم نضع الكل في أنبوب اختبار ونضيف له (1إلى 2مل) قطرة ، قطرة من حمض الكبريت المركز(H_2SO_4).

عند اتصال الطبقتين العضوية والمائية و ظهور حلقة بينهما ذات لون أحمر بني أو ذات لون بنفسجي دليل على وجود التربينات الثلاثية و/أو الستيرولات.

ملاحظة: نلاحظ ظهور حلقة بنفسجية دليل على وجود الستيرولات و/أو التربينات الثلاثية.

III-2-1 - ب- الكشف عن الفلافونيدات :

نأخذ (10مل) من المستخلص الهيدروكحولي السابق، نقوم بتبخيره حتى يجف تماما، الناتج نضيف له (1إلى2 مل) من الميثانول الساخن ، ثم نضيف بعض الحبيبات من (المغنيزيوم المعدني) و(4 إلى 5قطرات) من حمض كلور الماء المركز(HCl conc) .

عند ظهور اللون الأحمر أو البرتقالي ذلك دليل على وجود الفلافونيدات .

ملاحظة: نلاحظ ظهور اللون البرتقالي دليل إذن على وجود الفلافونيدات .

III-2- 1-ج-الكشف عن الكومارينات :

نأخذ (10 مل) من المستخلص الهيدروكحولي السابق ، نقوم بتبخيره حتى يجف تماما ، الناتج نضيف له (1 إلى 2 مل) من الماء المقطر الساخن ، بعد التبريد نقسم المحلول الناتج إلى قسمين في أنبوبي اختبار

اثنين.

- في الأنبوب الأول نضيف له (0.5 مل) من محلول الأمونيا (NH_4OH 10%).

- في الأنبوب الثاني لا نضيف له أي شيء .

نعرض الأنبوبين للمصباح الأشعة فوق البنفسجية (UV) ، فعند ملاحظة شدة إشعاع أقوى في إحدى الأنبوبين والناتج بدوره من المحلول وهذا بعد تأثره بالإشعاعات الفوق بنفسجية دليل على وجود الكومارينات .

ملاحظة: بالمقارنة بين شدة إشعاع الأنبوبين ، نلاحظ أن الأنبوب الذي يحتوي على الأمونيا أكثر إشعاع من الأنبوب الخالي من الأمونيا . هذا دليل إذن على وجود الكومارينات .

III-2 - 1 - د- الكشف عن العفصيات (TANNINS):

نأخذ (2 مل) من المحلول الهيدروكحولي السابق ، نضيف له (2 مل) من الماء المقطر الساخن و(2 إلى 3 قطرات) من كلوريد الحديد ($FeCl_3$) .

- عند ظهور لون أزرق مسود دليل على وجود (tannins galliques)

- عند ظهور لون أسود مخضر دليل على وجود (tannins catéchiques)

ملاحظة: نلاحظ ظهور لون أسود مخضر دليل إذن على وجود (tannins catéchiques).

III-2- 1- ه- الكشف عن القلويدات:

نأخذ (50 مل) من المستخلص الهيدروكحولي السابق ،نقوم بتبخيره حتى يصل حجمه إلى (5 مل) ،ثم نضيف له (8 مل) من محلول حمض كلور الماء (HCl 10%) ،نتركه يبرد ثم نضيف له (0.5 غ) من (Na_2CO_3) ، بعدها نقوم بترشيحه وتنقيته بواسطة (2 مل) من محلول حمض كلور الماء (HCl10%) ، بعدها نأخذ (3 مل) من المحلول المرشح الناتج ونضيف له بعض القطرات من مفاعل (Dragendorf) .

- عند ظهور راسب ، ذلك دليل على وجود القلويدات .

ملاحظة : نلاحظ عدم ظهور راسب ، دليل على عدم وجود القلويدات.

III-2-1 -و- الكشف عن الصابونيات (Saponines):

نأخذ (2 مل) من المحلول الهيدروكحولي السابق، نضعه في أنبوب اختبار ، نسده ، ثم نقوم برجه لبضع دقائق حوالي (15د).

- في حالة ظهور فقاعات في المحلول ، ذلك دليل على وجود الصابونيات

ملاحظة: نلاحظ وجود الفقاعات بعد مدة 5 دقائق ، دليل إذن على وجود الصابونيات .

نقوم إذن بتلخيص النتائج السابقة في الجدول (III-2):

الجدول(III-2): نتائج الكشف عن نواتج الأيض الثانوي لنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart

الكشف عن	التربينات الثلاثية والستيرولات	الفلافونيدات	الكومارينات	العفصيات	القلويدات	الصابونيات
نتيجة الكشف	+++	+++	++	+++	--	+

الاستنتاج: نستنتج إذن أن هذه النبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart تحتوي على العديد من نواتج الأيض الثانوي ، والمركبات الكيميائية المهمة كالفلافونيدات، والتي يجري الكشف عنها في بحثنا هذا ودراستها دراسة كيميائية .

III-2-2- استخلاص النبتة:

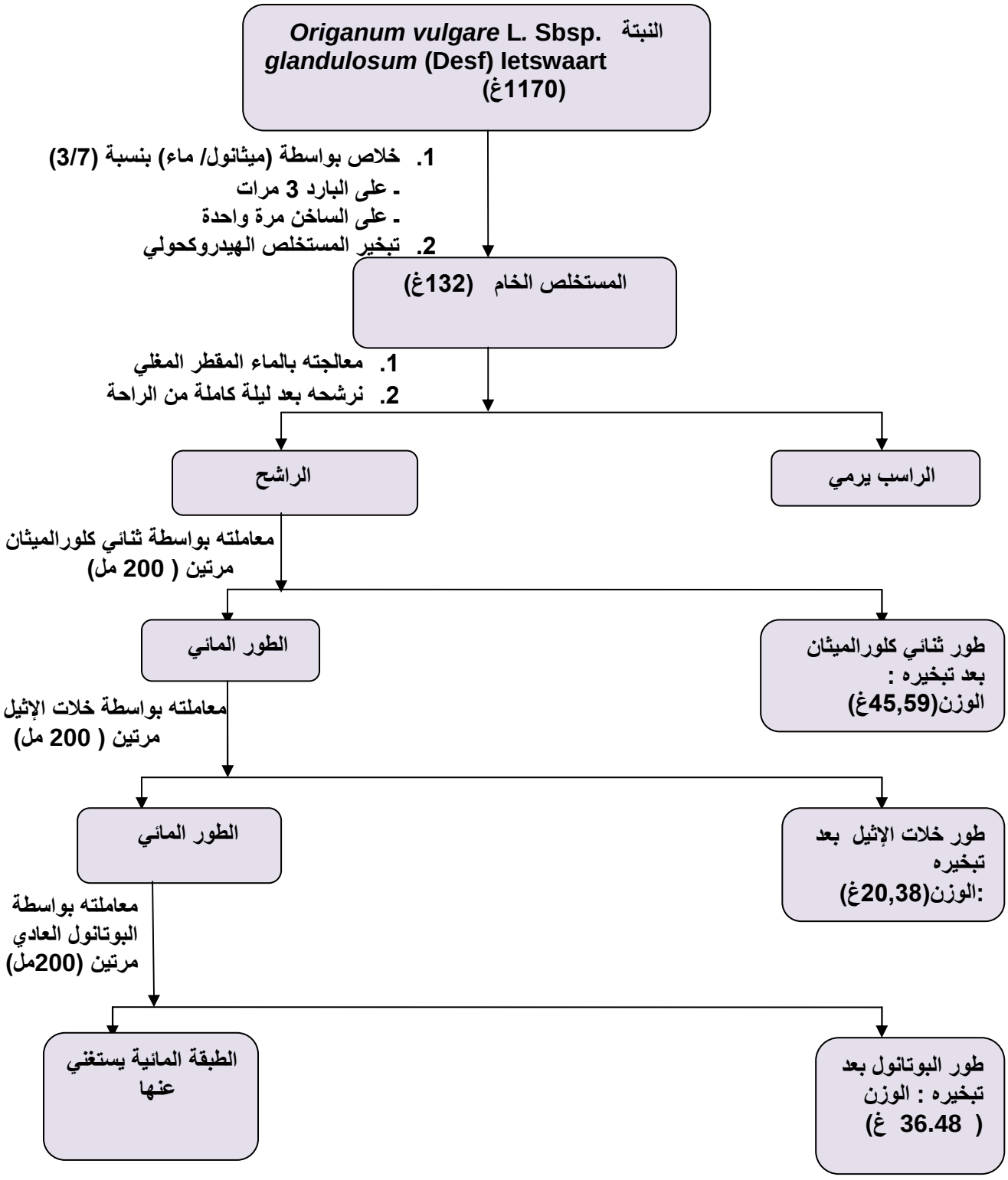
بعد قطع وطحن الأجزاء النباتية الجافة "الأوراق والأزهار فقط " (1170غ)، نقعت في خليط من (ميثانول/ماء) بنسبة (3/7) في حالتين :

على البارد: حيث تركت في المزيج (ميثانول /ماء) في درجة الحرارة العادية وهذا لمدة (24سا)، ثم رشحناها ونحتفظ بالرشاحة. نعيد هذه العملية (3مرات) مع تجديد المذيب المستعمل كل (24سا).

على الساخن : حيث تركت لمدة (24سا) في المزيج (ميثانول/ ماء) المغلي ثم نرشحها ونحتفظ بالرشاحة

ـ نجمع الرشاحتين المتحصل عليهما في الحالتين ونركز المحلول الهيدروكحولي وهذا بتبخيره تحت ضغط منخفض ودرجة حرارة لا تتجاوز (40°م) ، لنحصل في الأخير على الخلاصة الجافة.

ـ الخلاصة الجافة المتحصل عليها تمت إذابتها بالماء المقطر المغلي حوالي (500 مل) وتركت لمدة ليلة كاملة، ثم نقوم بالترشيح للتخلص من الشوائب والأتربة ، في الأخير نقوم بعملية الاستخلاص من النوع (سائل / سائل) في قمع الفصل، باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية وهي ثنائي كلورالميثان ـ خلات الإثيل ـ البوتانول العادي . والمخطط (III-1) يمثل خطوات عملية استخلاص النبتة المدروسة :



مخطط (III -1): خطوات عملية استخلاص المادة النباتية

***Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) letswaart**

III-2- 2 - أ- الاختبارات الكروماتوغرافية:

بما أن الهدف الأساسي من بحثنا هذا، هو فصل المركبات الفلافونيدية، قمنا باختيار مستخلص (خلآت الإثيل) ، وهذا بعدما تأكدنا من مختلف الاختبارات الكروماتوغرافية التي أجريناها عليه وعلى المستخلصات الأخرى التي تحصلنا عليها ، وهي مستخلص ثنائي كلور الميثان ، والمستخلص البوتانولي، أنه يساعدنا في فصل والحصول على المركبات الفلافونيدية .

III-2-2- أ-1- الاختبار الكروماتوغرافي في ورق whatmans® N°1 ذو بعد واحد:

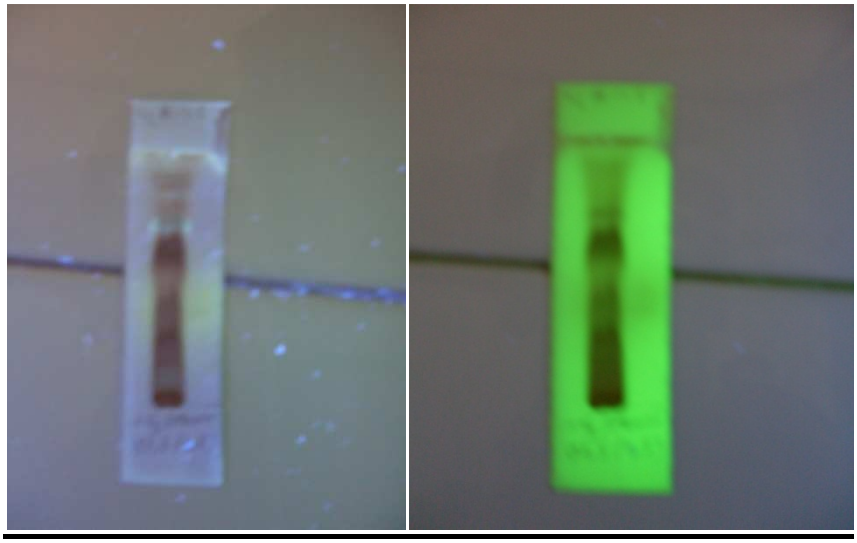
حيث استعملنا المملصات مرة مع محلول من حمض الخل (15%) ،ومرة مع (BAW 4/1/5) فعند تعريض أوراق (whatmans®) لمصباح الأشعة فوق البنفسجية، أي عند الإشعاعات (254nmو365nm)، نلاحظ أن هناك تقارب بين الطورين البوتانولي و خلآت الإثيل و هذا بظهور ألوان متشابهة للحزم الصاعدة ، خاصة المهمة منها والدالة على وجود الفلافونيدات (خاصة اللون الأصفر، البنفسجي نيلي)، في الحين أن الطور ثنائي كلور الميثان ، يبين لنا ألوان قليلة وغير مهمة (غير مؤكدة على وجود الفلافونيدات).

III-2-2- أ-2- الاختبار الكروماتوغرافي باستعمال الطبقة الرقيقة التحليلية (CCM) من السيليكاجال (60):

حيث اختبرنا مختلف المملصات من ($CHCl_3$ 100%) و($CHCl_3$/MeOH) بنسب مختلفة (18.5/1.5) ، (19/1) ،(29/1)، (9/1)، فوجدنا أن مستخلص خلآت الإثيل عند اختباره يعطي ألوان متداخلة ومتلاصقة غير أنها مهمة ودالة على وجود الفلافونيدات أحسن من الطور ثنائي كلور الميثان. نستنتج إذن أن مستخلص خلات الإثيل يسمح بالحصول على مركبات كيميائية الضعيفة والمتوسطة القطبية بالخصوص ، كما يسمح لنا بالحصول على أكبر قدر ممكن من المركبات الفلافونيدية والتي يجري الكشف عنها في بحثنا هذا ، في الحين أن المستخلص ثنائي كلور الميثان يعطي مركبات كيميائية الضعيفة القطبية ولا يسمح لنا بالحصول على المركبات الفلافونيدية بالقدر المطلوب.

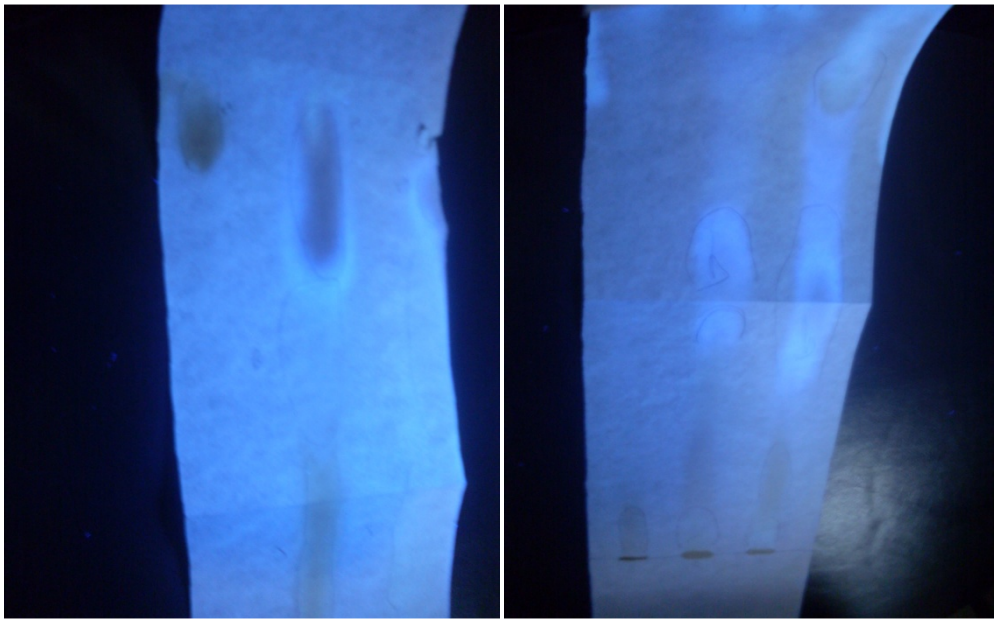
III-2-2- أ- 3- صور فوتوغرافية لمختلف الاختبارات السابقة التي أجريناها:

- إختبار الطور خلات الإثيل في النظام (18.5/1.5) $CHCl_3$/MeOH باستعمال طبقات (CCM)من السيليكاجال تحت مصباح الأشعة (365nm -254nm) (UV).



صورة رقم (III -3) **صورة رقم (III-4)**

- اختبار الطور خلات الإيثيل باستعمال ورق whatmans® N°1 ذو بعد واحد حيث يظهر في وسط الورقة بين الطورين ثنائي كلورالميثان والبوتانولي، تحت مصباح الأشعة (365nm)(UV)



صورة رقم (III-5)
في نظام :حمض الخل 15%

صورة رقم (III-6)
في نظام : (BAW)(4/1/5)

III-2- 2 - ب- طريقة الفصل والتنقية:

III-2- 2- ب-1- الفصل بواسطة كروماتوغرافية العمود :

اخترنا هذه التقنية والتي أثبتت فعاليتها في فصل خلائط معقدة من المركبات الفلافونيدية [11] ، حيث أخذنا (10.57غ) من مستخلص خلات الإثيل لنبتة *Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart واخترنا لهذا الغرض متعدد الأميد (SC_6) كدعامة ثابتة (طور ثابت) وهذا لقدرته على فصل المركبات الفلافونيدية.

ـ اخترنا عمود كروماتوغرافي بأبعاد متناسبة مع وزن المستخلص بطول حوالي (55سم) وقطر (3سم) حيث يحوي في أسفله على حلقة رشاحة (verre fritté) وهي تلعب دور مهم كمصفاة، لتفادي تسرب حبيبات متعدد الأميد أسفل العمود ، وتسمح لنا بالتالي بالحصول على الكسور المفصولة صافية .

- حضرنا متعدد الأميد مع مذيب أقل قطبية (التولوين) مع الرج ، بعدها نملئ العمود بهذا المزيج بصفة جيدة ليكون الطور الثابت كله متجانس، مع مراقبة عدم تشكل أي فقاعات هوائية.

ـ حولنا مستخلص خلات الإثيل إلى مسحوق ناعم ، وهذا بعد إدمصاصه على متعدد الأميد .

ـ وضعنا المسحوق الناعم السابق في العمود فوق متعدد الأميد بصفة مستوية ومتجانسة .

ـ تمت عملية الفصل باستعمال المملص (التولوين النقي 100%) ، ثم تم إشباعه بالميثانول تدريجيا إلى غاية الوصول لنسبة (100%) من هذا الأخير.

ـ وقد كانت نهاية عملية الفصل باستعمال (ميثانول/ماء)(50/ 50)، (ماء 100%)، (محلول من حمض الخل 15%،30%) .

ـ اعتمدنا في تغيير قطبية المذيب أثناء عملية الفصل على فحوص كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة التحليلية (CCM) لمختلف الكسور المتحصل عليها وهذا بعد معاينتها بمصباح الأشعة فوق بنفسجية .

ـ جمعت الكسور المتماثلة اعتمادا على فحوص كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة التحليلية ، بحيث تحصلنا على الجدول(III-3) ، وكان حجم الكسور المأخوذة كل مرة يتراوح مابين 20 و 25 مل .

الجدول (III-3): يبين لنا الكسور المجمعة حسب النسبة المئوية للمملص

الكسور المحصل عليها	تولوين %	ميثانول %
F1→F4	100	0
F5→F27	95	5
F28→F159	90	10
F160→F241	85	15
F242→F338	80	20
F339→F408	70	30
F409→F574	50	50
F575→F643	30	70
F644→F701	0	100
الكسور المحصل عليها	**ميثانول %**	**ماء %**
F702→F706	50	50
F707→F711	0	100
F712	**محلول من حمض الخل 15%**	
F713	**محلول من حمض الخل 30%**	

ـ قمنا بإجراء الاختبار الكروماتوغرافي للكسور المحصل عليها باستعمال الطبقة الرقيقة من السيليكاجال (CCM) و مملصات وفق الأنظمة التالية :

(100%) $CHCl_3$, $CHCl_3$/MeOH بنسب (9/1),(8/2),(7/3),(5/5) فتم بذلك جمع الكسور السابقة في الجدول (III -4) على النحو التالي:

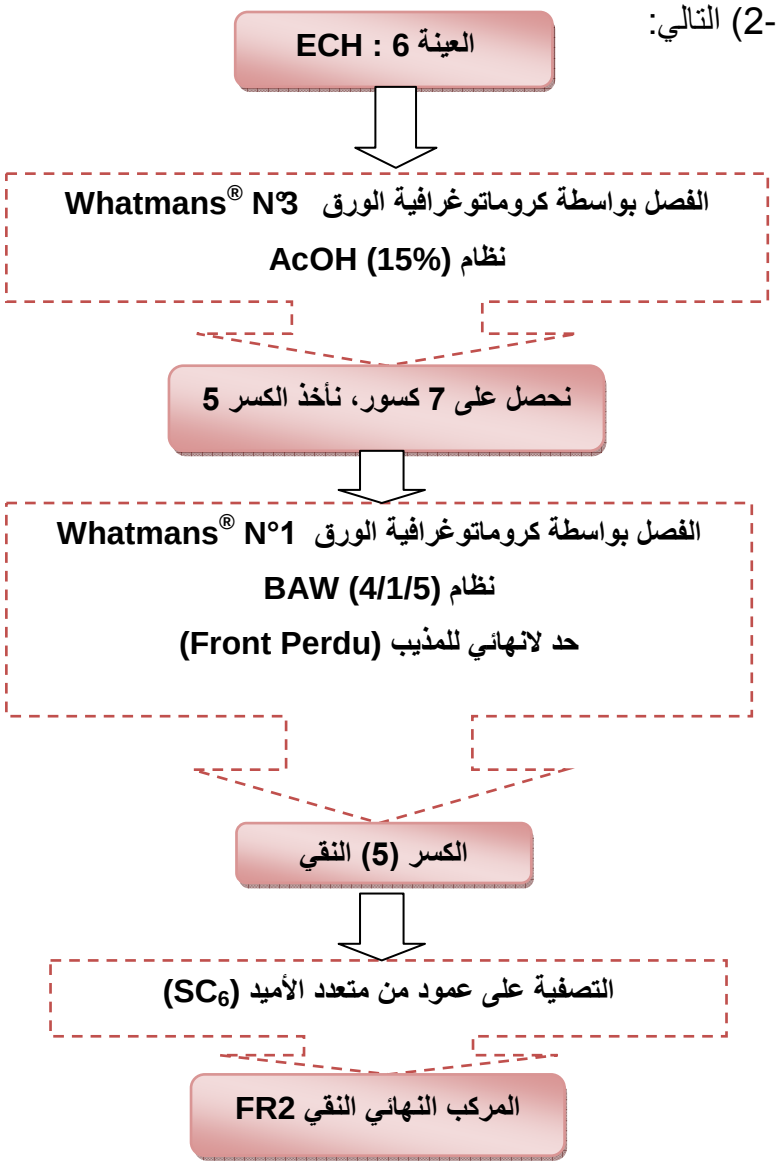
الجدول (III-4): يبن لنا مجموع الكسور المتشابهة فيما بينها كروماتوغرافيا

الكسور بعد الجمع	التصنيف الجديد	ملاحظة
F1→F20	ECH : 1	**خليط بتراكيز ضعيفة وعناصر غير مهمة**
F21→F40	ECH : 2	**خليط بتراكيز مقبولة وعناصر غير مهمة**
F41→F60	ECH : 3	**خليط بتراكيز مقبولة مع وجود عناصر مهمة**
F61→F159	ECH : 4	// // // //
F160→F241	ECH : 5	// // // //
F242→F260	ECH : 6	// // // //
F261→F350	ECH : 7	// // //
F351→F356	ECH : 8	// // // //
F357→F420	ECH : 9	// // // //
F421→F589	ECH : 10	// // // //
F590→F701	ECH : 11	**خليط بتراكيز ضعيفة وعناصر غير مهمة**
F702→F713	ECH : 12	// // // //

بعدما توصلنا إلى التصنيف الجديد للكسور السابقة ، تحصلنا على (12) عينة أجرينا لها الاختبار الكروماتوغرافي في ورق (whatmans®N°1) نظام (BAW 4/1/5) و (AcOH 15%)، وفي الطبقة الرقيقة التحليلية من السيليكاجال (CCM) نظام ($CHCl_3$/MeOH) (9/1)، (8/2)،(7/3)، فوقع اختيارنا على ثلاث عينات مناسبة لفصل المركبات الفلافونيدية منها ، ولكونها أيضا عينات سهلة الفصل (غير مختلطة كثيرا) .

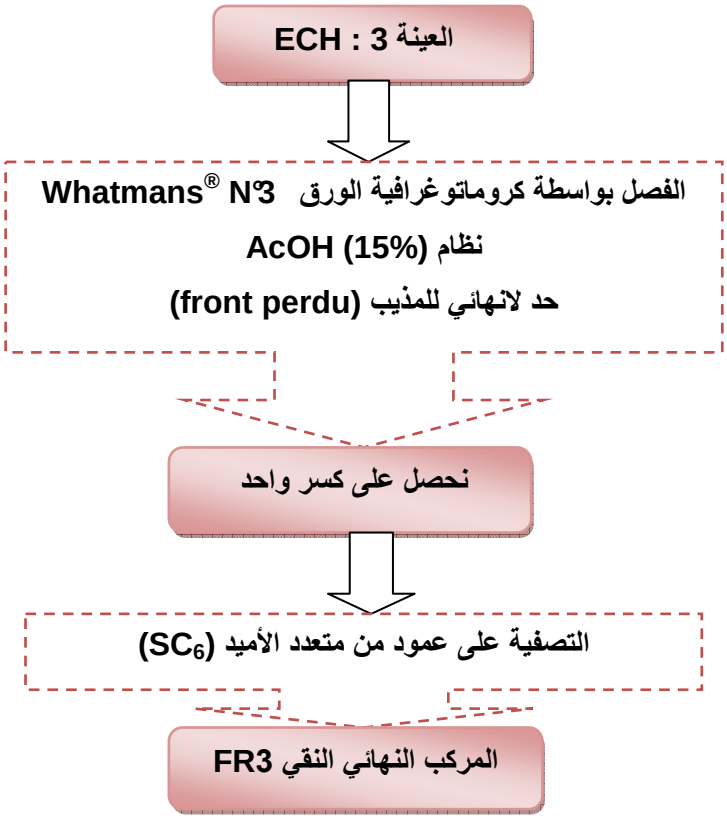
III-2-2-ج - معالجة العينات المختارة :

- ✓ تم عزل الراسب (FR 1) ذو اللون الأصفر من العينة (ECH :8) أي الكسر (F351-F356)، حيث تمت تنقيته بغسله بدفعات متتالية من الميثانول .
- ✓ تم عزل المركب النقي (FR2) من العينة (ECH :6) أي الكسر (F242-F260) وفق المخطط (III-2) التالي:



مخطط (III-2): خطوات عملية فصل المركب النقي FR2

✓ تم عزل المركب النقي (FR3) من العينة (ECH : 3)، أي الكسر (F41-F60) وهذا حسب المخطط (III -3) التالي:



مخطط (III -3): خطوات عملية فصل المركب النقي FR3

مراجع الفصل الثالث:

[1] Desfontaines , R .L .,(1798). Flore de l'Atlantique. éditeur L.G. desgranges , Haute-Feuille, N°14, paris , 2, 27.

[2] www.Senteursduquercy.com

[3] Quezel, P., Santa, S ., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 2, 819.

[4] Ietswaart, J.H., (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiateae) In chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Leiden Botanical series 4. Leiden University Press, la Haye .

[5] Valnet, J., (1984). Aromathérapie traitement des maladies par les essences des plantes. 10e ed., Maloine S.A., Paris,544.

[6] Kaper, J.B., Nataro, J. P., Mobley, H. L.,(2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol.2(2),123-140.

[7] Lawlor, M. S., Hsu, J., Rick, P. D., Miller, V.L.,(2005). Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. Mol Microbiol. 58(4),1054-1073.

[8] Perry, J. J., Staley, J. T., Lory, S.,(2004).Microbiologie. ed Dunod Paris,650.

[9] Cavallo, J. D.,(2010). *Pseudomonas aeruginosa* et antibiotiques. HIA Bégin – Saint-Mandé.

[10] Guignard, J.L.,(1977). Abrégé de botanique à l'usage des étudiants en pharmacie. Masson, Paris, 257.

[11] AbdElchakour, A. S.,(1987). Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abd Elaziz, Djedda, 173.(ed en arabe)

الفصل الرابع

مناقشة النتائج العملية ، ودراسة الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل لنبتة

***Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart**

IV- التحليل البنيوي للمركبات المعزولة:

IV-1 - التحليل البنيوي للمركب المعزول (FR 1) :

نقيم السلوك الكروماتوغرافي ،ونقوم بشرح المعطيات الطيفية للمركب في الجداول المرفقة.

الجدول (IV-1): السلوك الكروماتوغرافي

النظام	SI	SII
R_f	0.1	0.22
اللون الإستشعاعي	دون استعمال NH_3	باستعمال NH_3
	بنفسجي داكن	أصفر

SI : $(CH_2Cl_2/MeOH)(5/1)$ استعملنا الطبقة الرقيقة من السيليكاجال

SII : AcOH (15%) استعملنا الطبقة الرقيقة من السيليلوز

التعليل:

ـ يدل السلوك الكروماتوغرافي حسب قيم (R_f) في الجدول (IV-1) أعلاه ،على أن المركب قطبي (إيتيروزيدي)، يكون أحادي السكر.

ـ اللون البنفسجي الداكن للمركب تحت مصباح الأشعة (UV) يدل على أن المركب إما يكون فلافون (3-H)، أو فلافونول (3-OR) مستبدل ، غير أن طول العصابة (I) للمركب في الميثانول (λ=335nm) (مطيافية الأشعة فوق بنفسجية) تأكد على أنه فلافون أي وجود (3-H).

ـ طيف الأشعة فوق بنفسجية للمركب الذائب في الميثانول بإضافة (NaOH) يعطي إزاحة الباثوكرومية للعصابة (I) المقدرة ب $\Delta\lambda$=+45nm مع زيادة في الشدة الضوئية بالنسبة للطيف الميثانولي دليل على وجود 4'-OH ،وغياب عصابة جديدة له في المجال 320-330nm يدل على أن المركب مستبدل في الموضع 7(7-OR).

ـ طيف الأشعة فوق بنفسجية للمركب الذائب في الميثانول عند إضافة (NaOAc) نلاحظ أن العصابة (II) لا يحدث لها فعل باثوكرومي ، هذا يؤكد أن المركب مستبدل في الموقع 7 (7-OR).

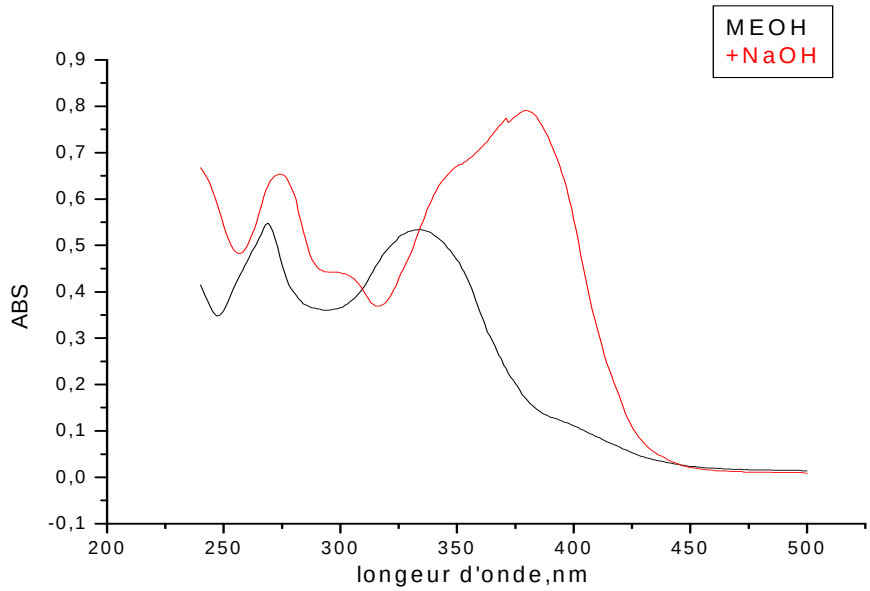
ـ بإضافة الكاشف (H_3BO_3) لنفس الخلية السابقة المحتوية على المركب الذائب في الميثانول + (NaOAc) نلاحظ أن العصابة (I) لا يحدث لها أي فعل باثوكرومي يذكر، هذا دليل على عدم وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل لا على الحلقة (A) ولا على الحلقة (B) .

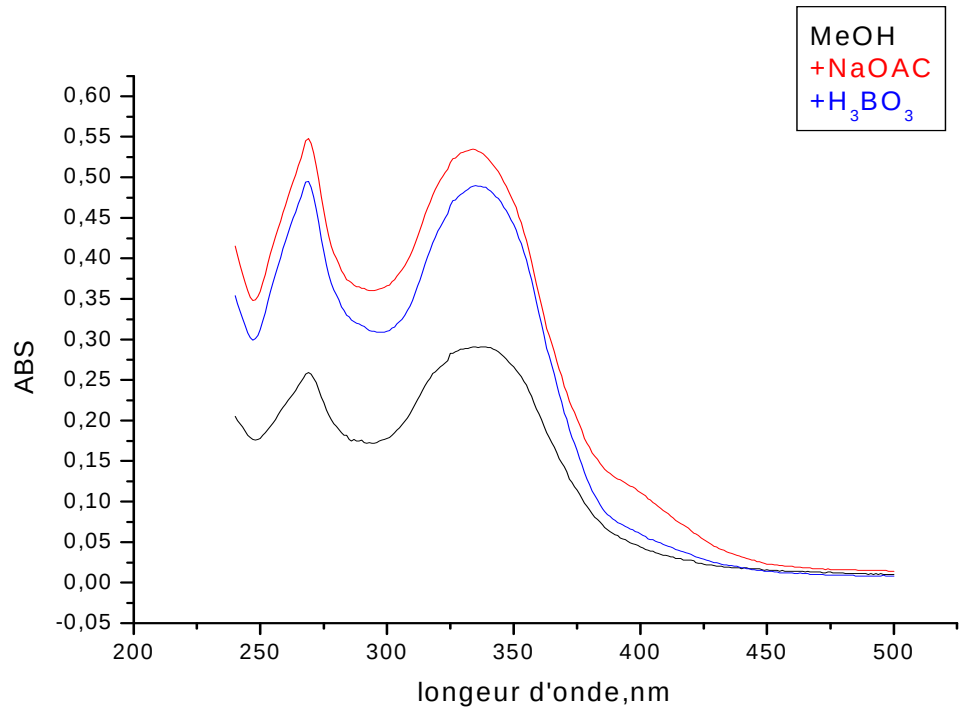
ـ طيف الأشعة فوق بنفسجية للمركب الذائب في الميثانول بإضافة($AlCl_3$) يشير على وجود عصابة(I) لها انزياح كيميائي مقدر ب $\Delta\lambda=+3nm$ مقارنة بالعصابة (I) للطيف المسجل للمركب الذائب في الميثانول و بوجود ($AlCl_3+HCl$) فهي إزاحة ضعيفة ، تؤكد على عدم وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل لا على الحلقة (A) و لا على الحلقة (B).

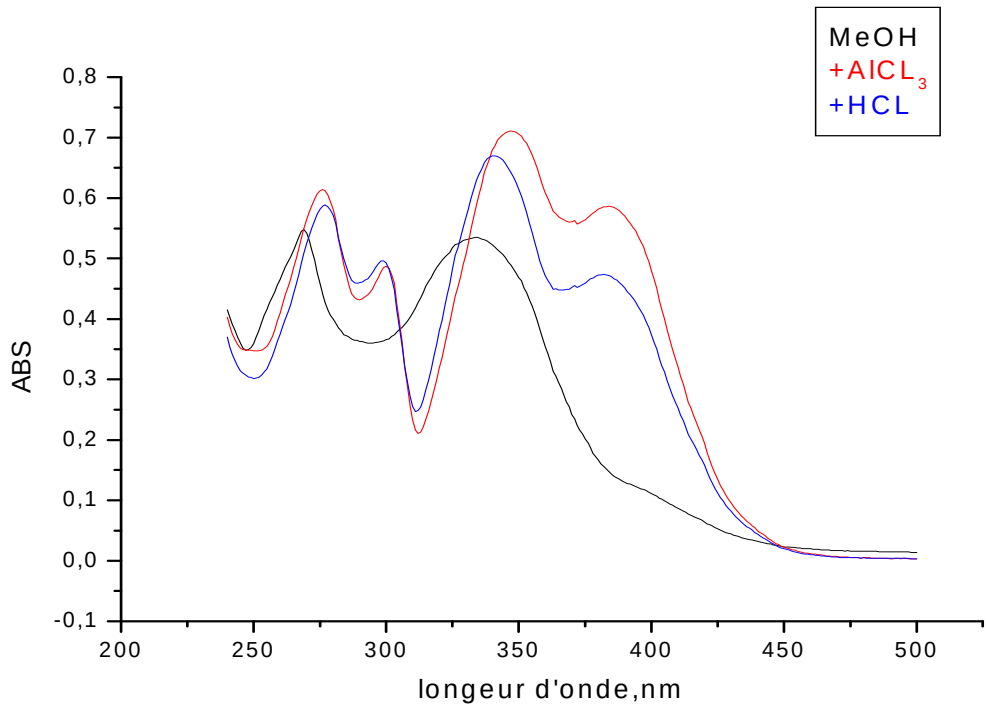
ـ أما الإزاحة الباثوكرومية للعصابة(I) للطيف المسجل للمركب الذائب في الميثانول و بوجود ($AlCl_3+HCl$) المقدرة ب $\Delta\lambda=+46nm$ مقارنة بالطيف المسجل للمركب في الميثانول دليل على وجود 5-OH . والجدول التالي يبين لنا قيم العصابات للمركب FR1 لطيف الأشعة فوق بنفسجية بوجود مختلف الكواشف.

الجدول (IV-2): مطيافية الأشعة فوق بنفسجية ـ المرئية

الكواشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	قمم(nm)
MeOH	335	269	-
NaOH	380	272	303
$AlCl_3$	384	275	299-347
$AlCl_3+HCl$	381	276	298-340
NaOAc	333	269	-
$NaOAc+H_3BO_3$	336	269	-
NaOH بعد 5 دقائق : مستقر			

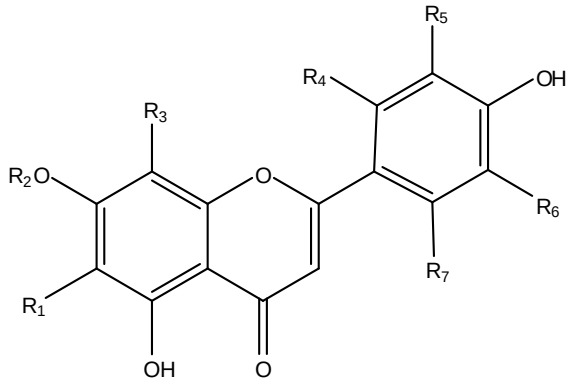






سلسلة أطياف UV للمركب FR1 في مختلف الكواشف

من هذه المعطيات يمكننا أن نعطي البنية الأولية للمركب (FR1) وهي كالتالي :



طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون H^{-1} الأطياف (IV-1 و IV-2) تبين:

ـ إشارة أحادية بتكامل 1H عند δ=13ppm وهي تنسب لـ 5-OH .

ـ إشارتين ثنائيتين عند δ=6.95ppm و δ=7.15ppm بتكامل 2H لكل من الإشارتين ، ويدل قيمة ثابت التزاوج J=8.84Hz لكل منهما على أن التزاوج بين البروتونين هو من النوع أورثو ، وبالتالي تنسب الإشارة الثنائية الأولى للبروتونين H3',H5' والإشارة الثنائية الثانية للبروتونين H2',H6'.

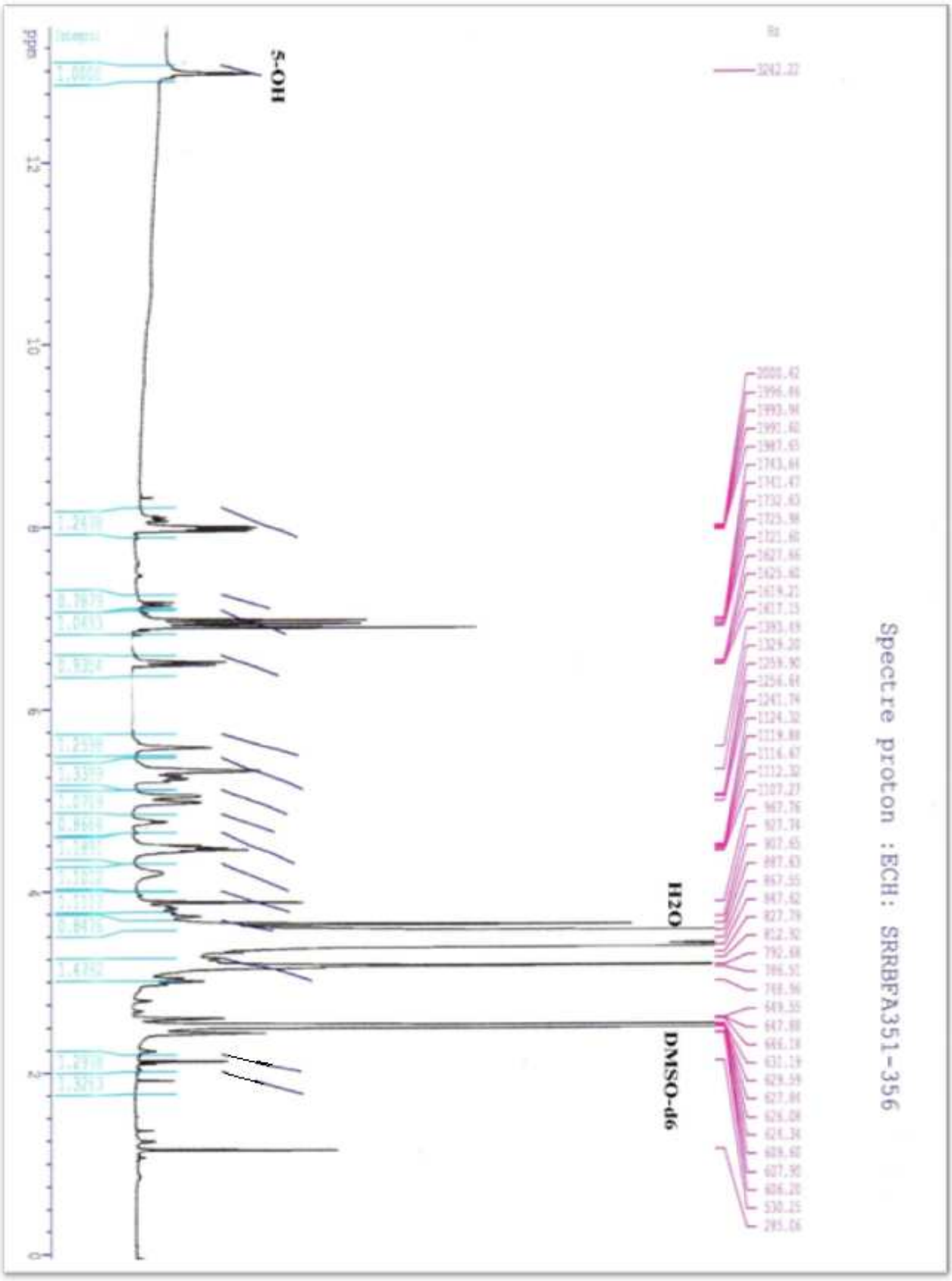
ـ وجود إشارة أحادية حادة بالتكامل 1H عند δ=6.9ppm وهي تنسب للبروتون H3 .

ـ إشارتين ثنائيتين بالتكامل 1H لكل منهما حيث تظهر الأولى عند δ=6.48ppm والثانية عند δ=6.52ppm بثابت التزاوج لكل منهما يساوي J=2.06 Hz يشير إلى تزاوج من النوع ميتا ، ومنه تنسب الإشارتين على التوالي للبروتونين H6 و H8 . والجدول التالي يبين لنا معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب FR1.

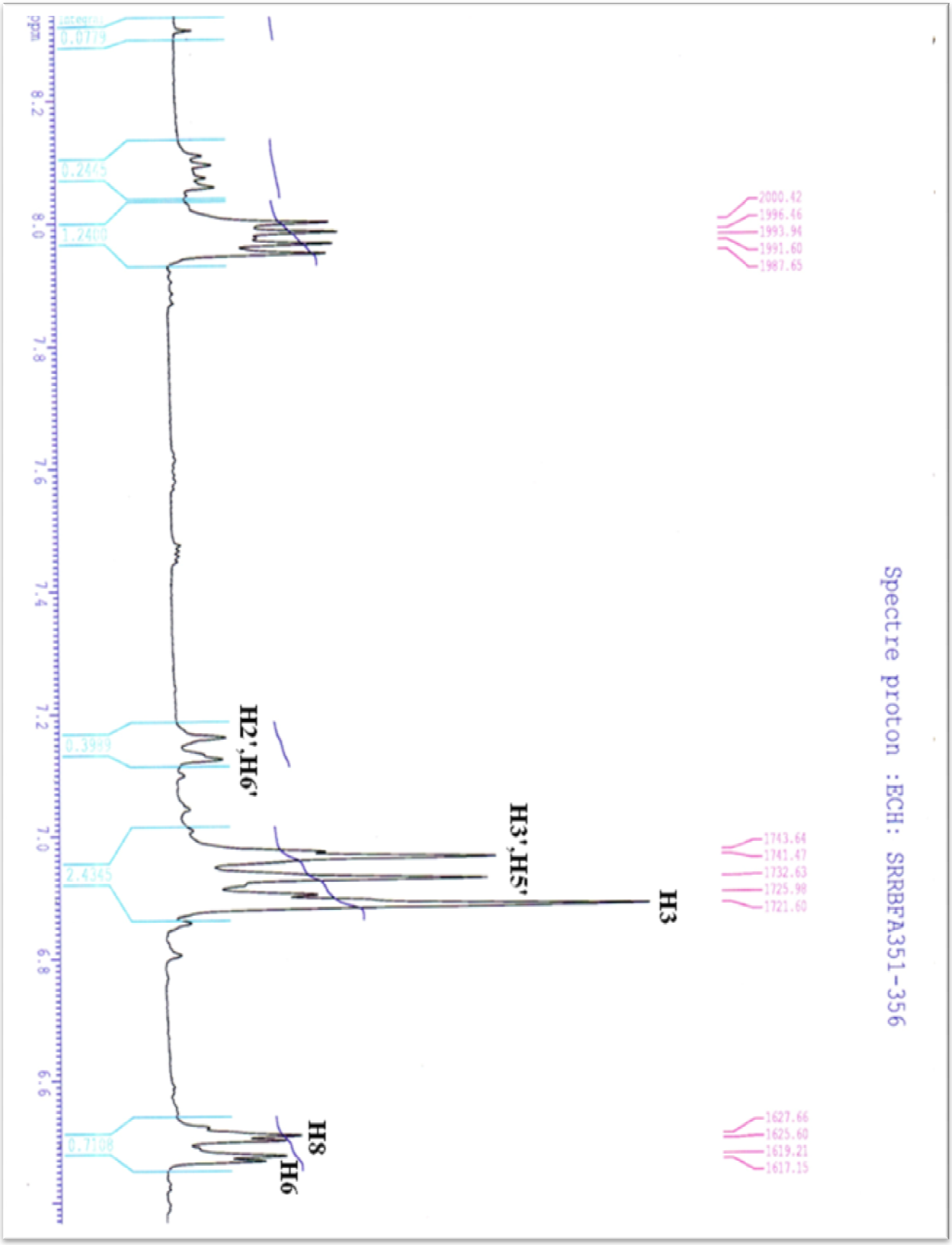
الجدول (IV-3): مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ($RMN-^1H$)

البروتون الموافق	J(Hz)	التعددية	التكامل	الإزاحةδ (ppm)
H6	2.06	d	1H	6.48
H8	2.06	d	1H	6.52
H3	-	s	1H	6.9
H3', H5'	8.84	d	2H	6.95
H6', H2'	8.84	d	2H	7. 15
5-OH	-	s	1H	13

طيف رقم(IV -1): $RMN\text{-}H^1$ للمركب FR1
DMSO-d_6 ; 250 MHz



طيف رقم(IV -2): $RMN\text{-}H^1$ للمركب FR1 (تكبير المجال ppm8.00-6.5)

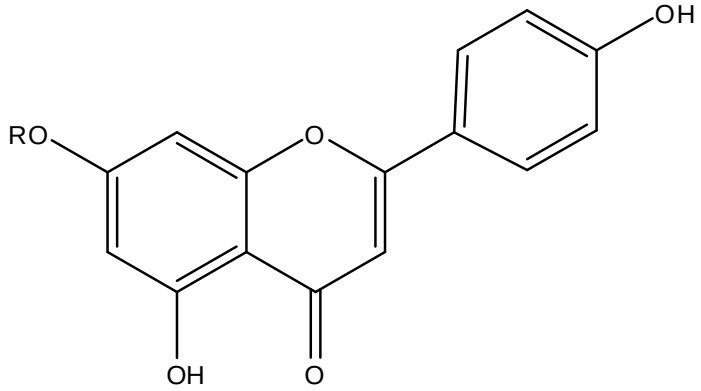


طيف الرنين النووي المغناطيسي لـ C^{-13} طيف رقم (4-IV) للمركب FR1 أعطى لنا إشارتين مهمتين فيما يخص الأغليكون وقيم هذه الإشارتين مدونتين في الجدول (4-IV):

الجدول(4-IV): مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ($RMN-C^{-13}$)

رقم الكربون	الإزاحة δ (ppm)
C3',C5'	116.47
C2',C6'	129.13

يمكن إذن الوصول إلى البنية النصف نهائية للمركب (FR1) وهي كما يلي:



IV -1- 1- دراسة الجذر R (التأكد من أن المركب (FR1) جليكوزيدي) :

لأجل التأكد من أن المركب المعزول (FR1) جليكوزيدي ، تجرى له عملية الإماهة الحمضية. فقبل ذلك نقوم بتجفيفه التام من المذيب المدوتر الـ (DMSO) ، فنستعمل لهذا الغرض مضخة خاصة تدعى (Pompe à palettes) ، بعدها نقوم بإذابته في أقل كمية ممكنة من الماء المقطر الساخن ، ونضعه في أنبوب اختبار، عندها نضيف له 4 مل من حمض كلور الماء (HCl 4N) + 2 مل من الميثانول ونقوم بالتسخين في حمام مائي(100°م) لمدة ساعة من الزمن ، بعد التبريد نقوم بعملية الفصل من النوع سائل ـ سائل (كل عملية تعاد ثلاث مرات) وهذا بإضافة المذيبات التالية :

ـ ثنائي إيثيل الإثر d=0.713

ـ خلات الإيثيل d=0.901

ـ البوتانول العادي d=0.801

حيث كل مرة تفصل الطبقة العضوية عن المائية فنحصل في الأخير على :

ـ الطور العضوي لثنائي إيثيل الإثر.

ـ // // // // لخلات الإثيل .

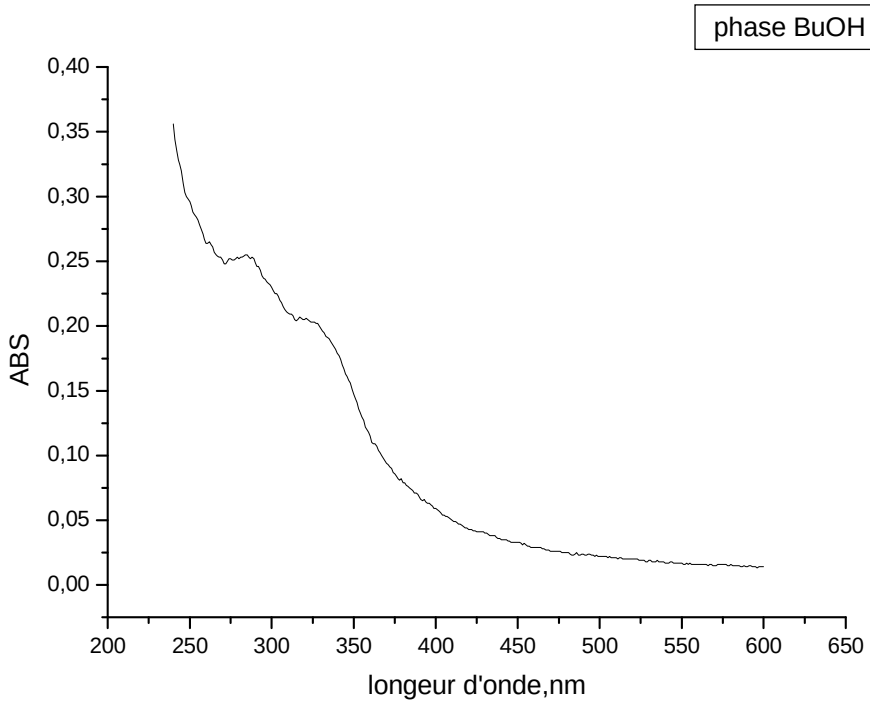
ـ // // // // للبوتانول العادي.

ـ الطور المائي المحتوي على الجزء السكري.

بعد تجفيف الأطوار العضوية السابقة نقوم باختبارها بإجراء مطيافية الأشعة فوق بنفسجية المرئية في الوسط الميثانولي ، فنلاحظ أن الطور العضوي للبوتانول العادي يبين لنا عصابتين كما هو موضح في الشكل الموالي :

ـ طول العصابة (I) λ_1=324 nm

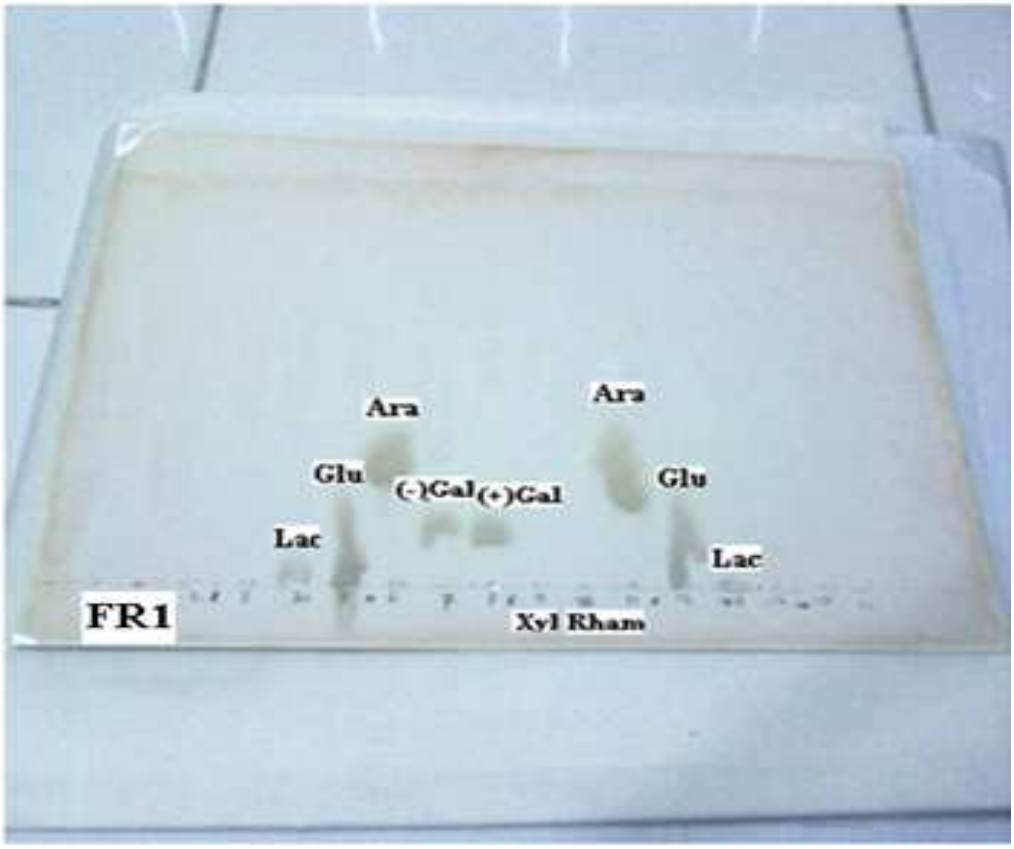
ـ طول العصابة (II) λ_2=281 nm



طيف UV للطور البوتانولي للمركب (FR1) بعد الإماهة

فنلاحظ أن الطور العضوي للبوتانول العادي هو الذي يحتوي على الجزء الغير سكري(الأغليكون) وهو من النوع فلافون هذا حسب قيم انزياح العصابتين .(كان من الممكن إكمال إجراء طيف MeOH+NaOH لطور البوتانول للتأكد من أن هناك 7-OH أم لا)

أما الطور المائي المتحصل عليه نقوم باختباره في اللوح الكروماتوغرافي من النوع gel de silice 60F254 المحضر مسبقا (بنفس الخطوات المذكورة في الصفحة 76 (الفصل الثاني)) ، وبالاستعانة ببعض شواهد سكرية معروفة هي : D-(-)-galactose ، D-(+)-galactose ، D-(+)-xylose α-L-(+)-rhamnose ، α-L-(+)arabinose ، β-D-(+)-glucose ، α-lactose نضع بالتالي اللوح السابق في المملص (أسيتون / ماء) بنسبة (1/9) ،عندها لم نستطع تحديد طبيعة السكر المبحوث عنه لكون الطور المائي المختبر ذو تركيز ضعيف كما هو مبين في الصورة المرفقة



صورة فوتوغرافية (IV-1): الطور المائي للمركب FR1 على يسار الورقة المختبر مع الشواهد السكرية

بالرجوع إلى طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (H^{-1}) طيف رقم (IV-3) ، وبالرغم من أن بروتونات السكر تظهر عموما عند المجال [3-4ppm] لكن في هذا المثال تبدو محتجبة نظرا لاستعمال المذيب المدوتر الـ DMSO، غير أنه تظهر لنا إشارة ثنائية عند δ=5.03ppm بثابت تزاوج J=3.26 Hz وبتكامل 1H فهي خاصة بالبروتون الآنوميري ''H1 لسكر الجلوكوز،و تكون الرابطة بينه و الأغليكون من النوع α [1].

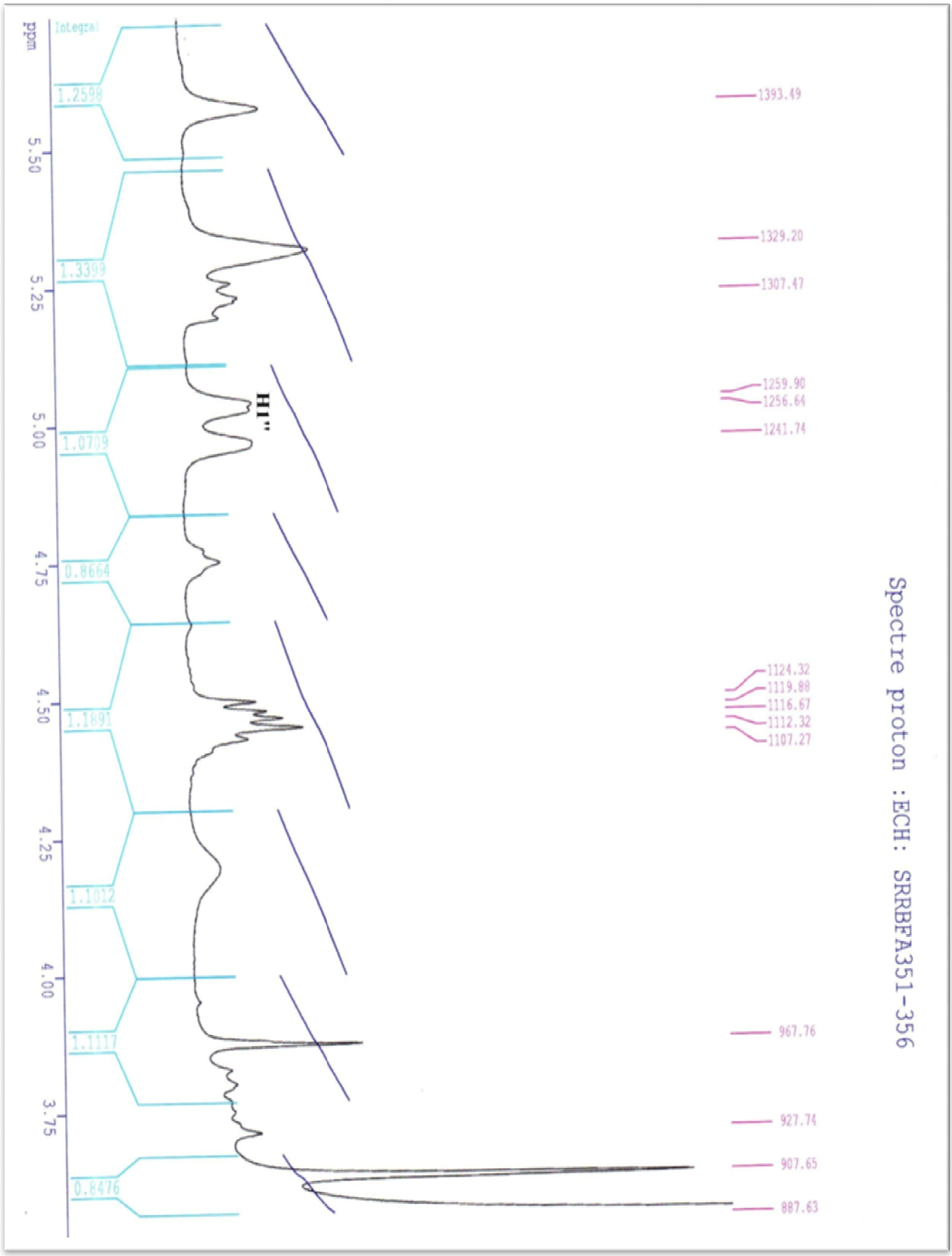
من طيف الرنين النووي المغناطيسي للـ C^{-13} طيف رقم (IV-4) تظهر كربونات السكر كما يلي:

- إشارة عند δ=77.38ppm خاصة بـ ''C5

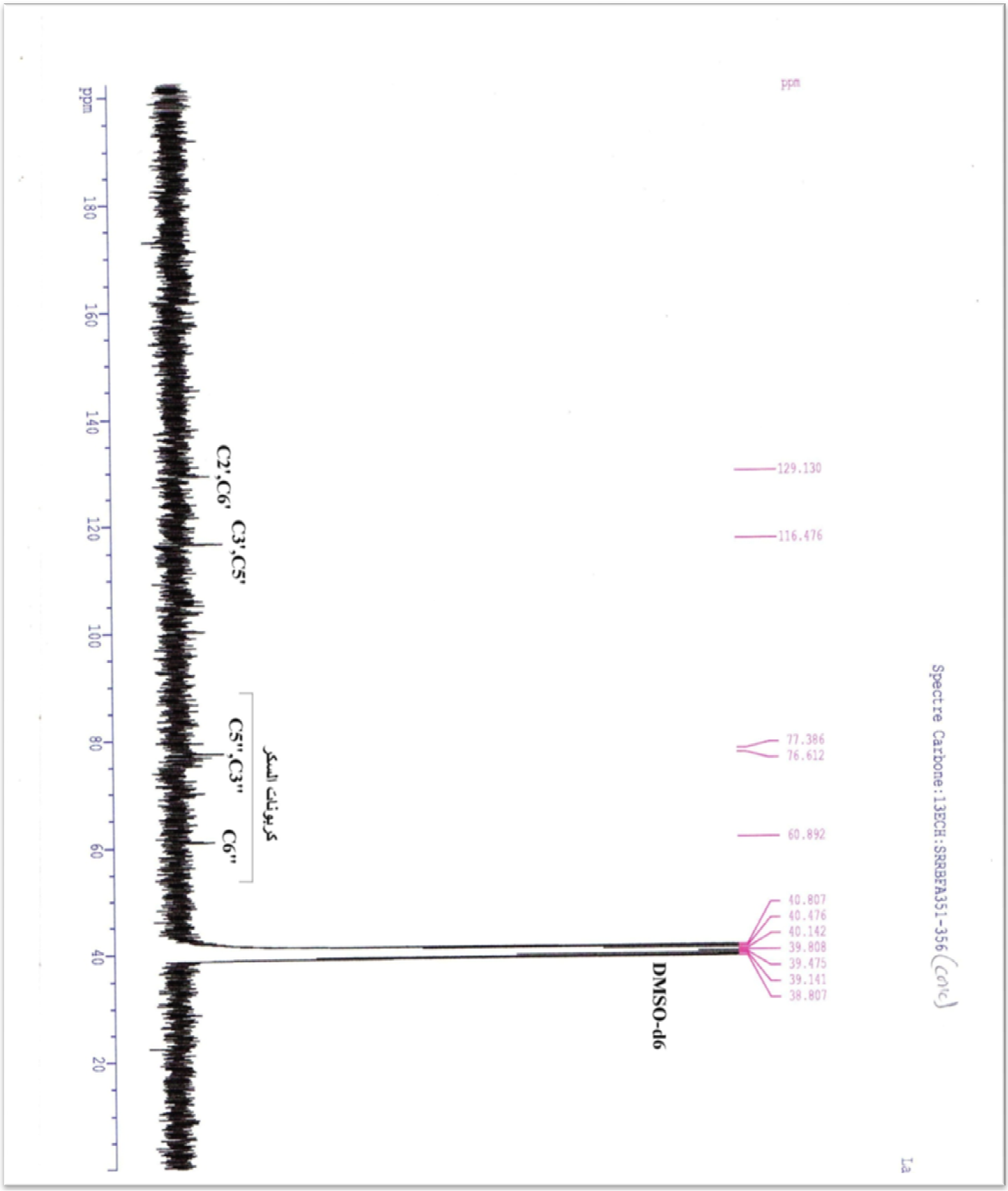
- إشارة عند δ=76.61ppm خاصة بـ ''C3

ـ إشارة عند δ=60.89ppm خاصة بـ ''C6 وهو دليل على وجود CH_2-OH الخاص بالجلوكوز.

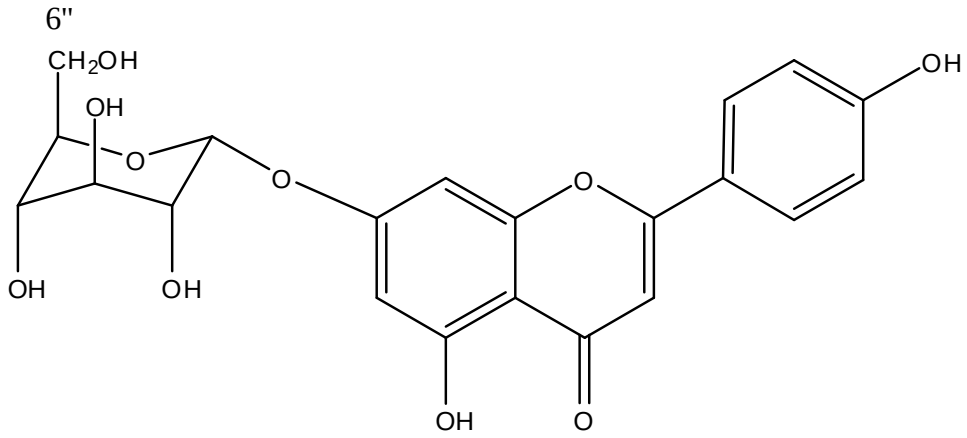
طيف رقم(IV -3): RMN-H^1 للمركب FR1 (تكبير المجال ppm5.50-3.75)



طيف رقم (4-IV): RMN-C^{13} للمركب FR1
DMSO-d_6 ; 250 MHz



✓ من كل هذه المعطيات يمكن التوصل لإعطاء الصيغة النهائية المحتملة للمركب (FR1) بالشكل التالي:



5,4’-dihydroxy-7-O-α-D-glucosylflavone

(Apigénine 7-O-α-D-glucosyl)

IV -2- التحليل البنيوي للمركب المعزول (FR 2) :

نقيم السلوك الكروماتوغرافي ، ونقوم بشرح المعطيات الطيفية المرفقة للمركب FR2 كما يلي :

الجدول (IV -5) : السلوك الكروماتغرافي للمركب FR2

النظام	SI	SII
R_f	0	0.2
اللون الإستشعاعي	بنفسجي داكن	

لأجل اختبار هذين النظامين استعملنا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6

SI : Toluène/MEC/MeOH (4 / 3 / 3)

SII : H_2O/MeOH/MEC/Acétyl acétone (13 / 3 / 3 / 1)

ـ يدل السلوك الكروماتوغرافي حسب قيم R_f المدونة في الجدول أعلاه على كون المركب قطبي (إيتيروزيدي) أحادي السكر

ـ اللون البنفسجي الداكن للمركب تحت مصباح الأشعة (UV) يدل على أن المركب إما يكون فلافون (3-H)، أو فلافونول (3-OR) مستبدل.

ـ زمن الاحتباس للمركب t_R=17.1 min " بتقنية كروماتوغرافية HPLC طور عكسي C18 " حيث نقوم بجر المركب FR2 أوتوماتيكيا في العمود الكروماتوغرافي باستعمال المملصين التاليين :

(H_2O/Acide formique 1000/5) : A

(Acétonitrile/ Acide formique 1000/5) : B

ـ في المرحلة الأولى يكون التمليص باستعمال المملص A 100 % لمدة دقيقتين.

ـ في المرحلة الثانية يكون التمليص بواسطة خليط من (A/B) ابتداء من النسبة (80/20) إلى غاية الوصول إلى النسبة (20/80) بعد 30 دقيقة.

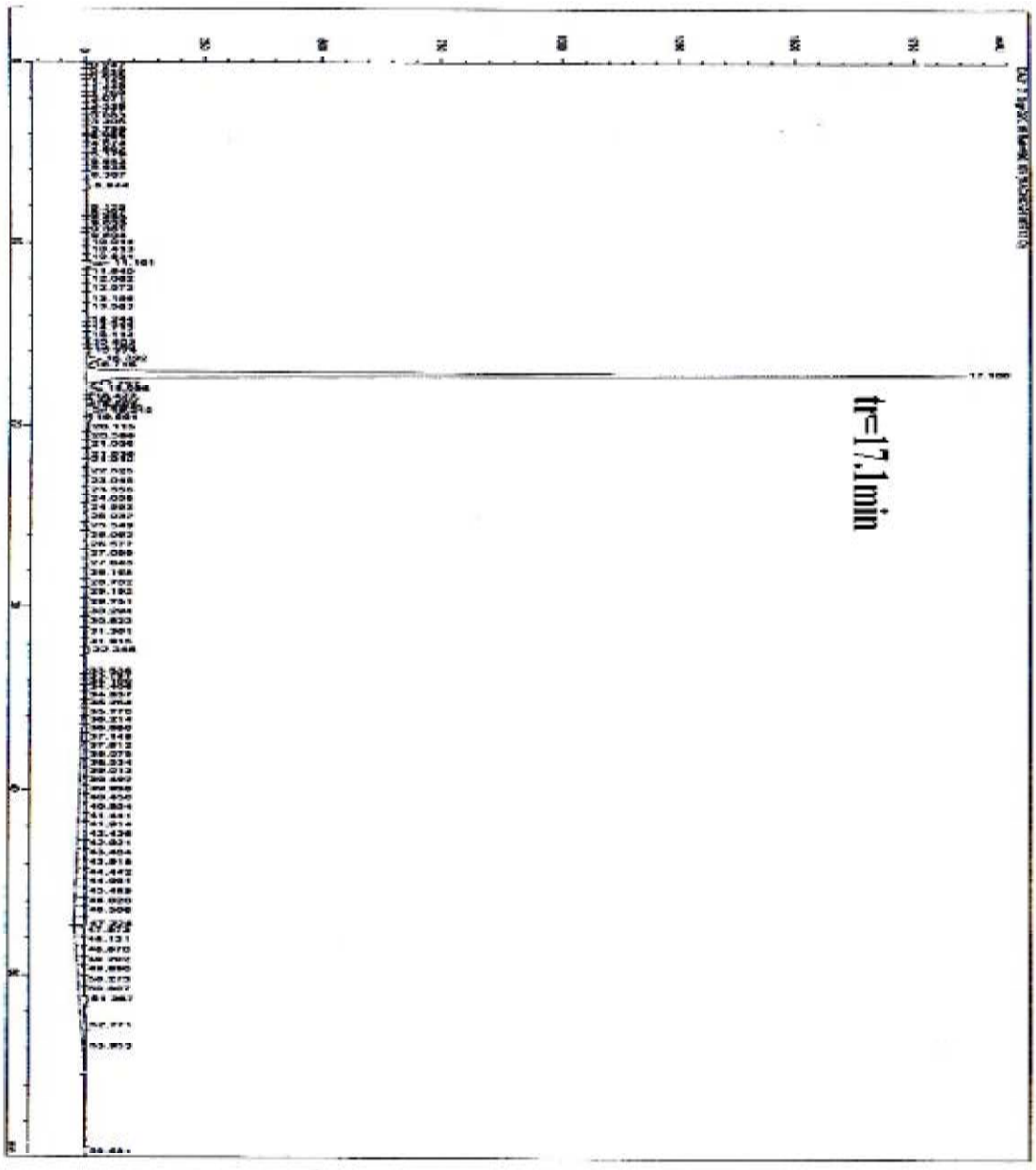
ـ في المرحلة الثالثة يكون التمليص بواسطة خليط من (A/B) بنسبة (20/80) إلى غاية الوصول إلى النسبة 100% من المملص B بعد مدة 10دقائق.

ـ في المرحلة الرابعة يكون المملص هو 100 % من B لمدة دقيقتين.

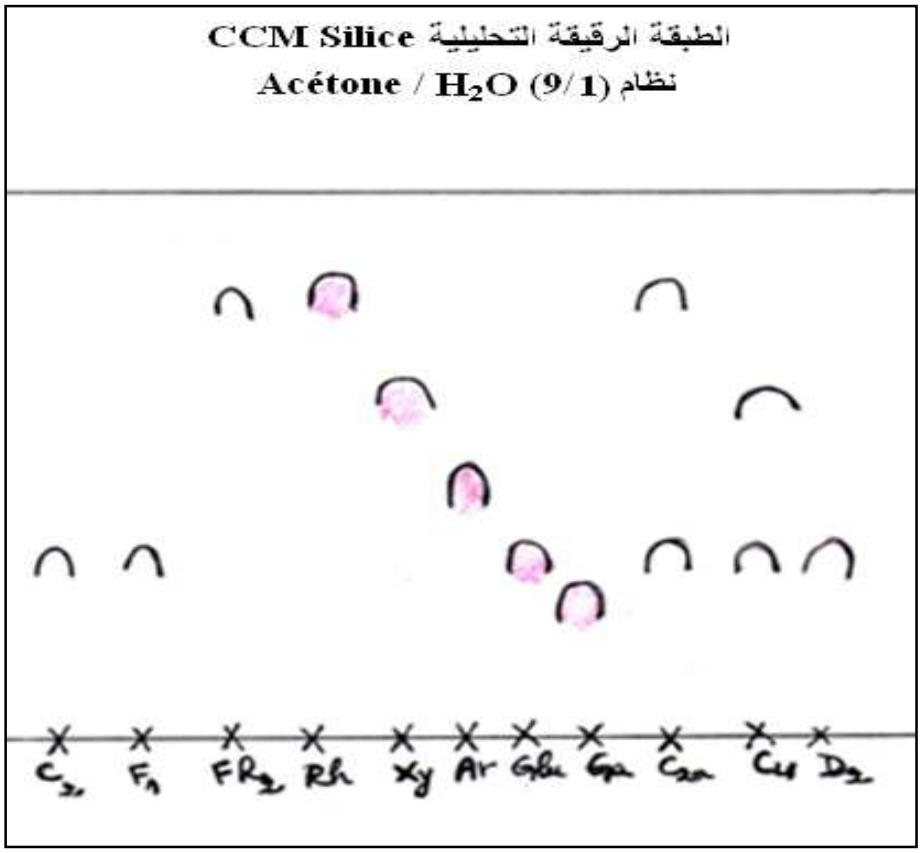
ـ في المرحلة الأخيرة يكون المملص هو 100 % من A لمدة 3 دقائق

فزمن الاحتباس الناتج للمركب يدل على أنه قطبي (الطيف رقم:IV-5).

طيف رقم (IV-5): طيف HPLC للمركب FR2



ـ بعد إجراء عملية الإماهة الحمضية للمركب FR2 وجدنا أن السكر المرتبط بالأغليكون هو من النوع rhamnose (صورة:IV -2) ، واللون الإستشعاعي للأغليكون الناتج تحت مصباح الأشعة UV هو أصفر هذا دليل على أن هناك 3-OH حر وبالتالي كان السكر مرتبط في الموضع 3.

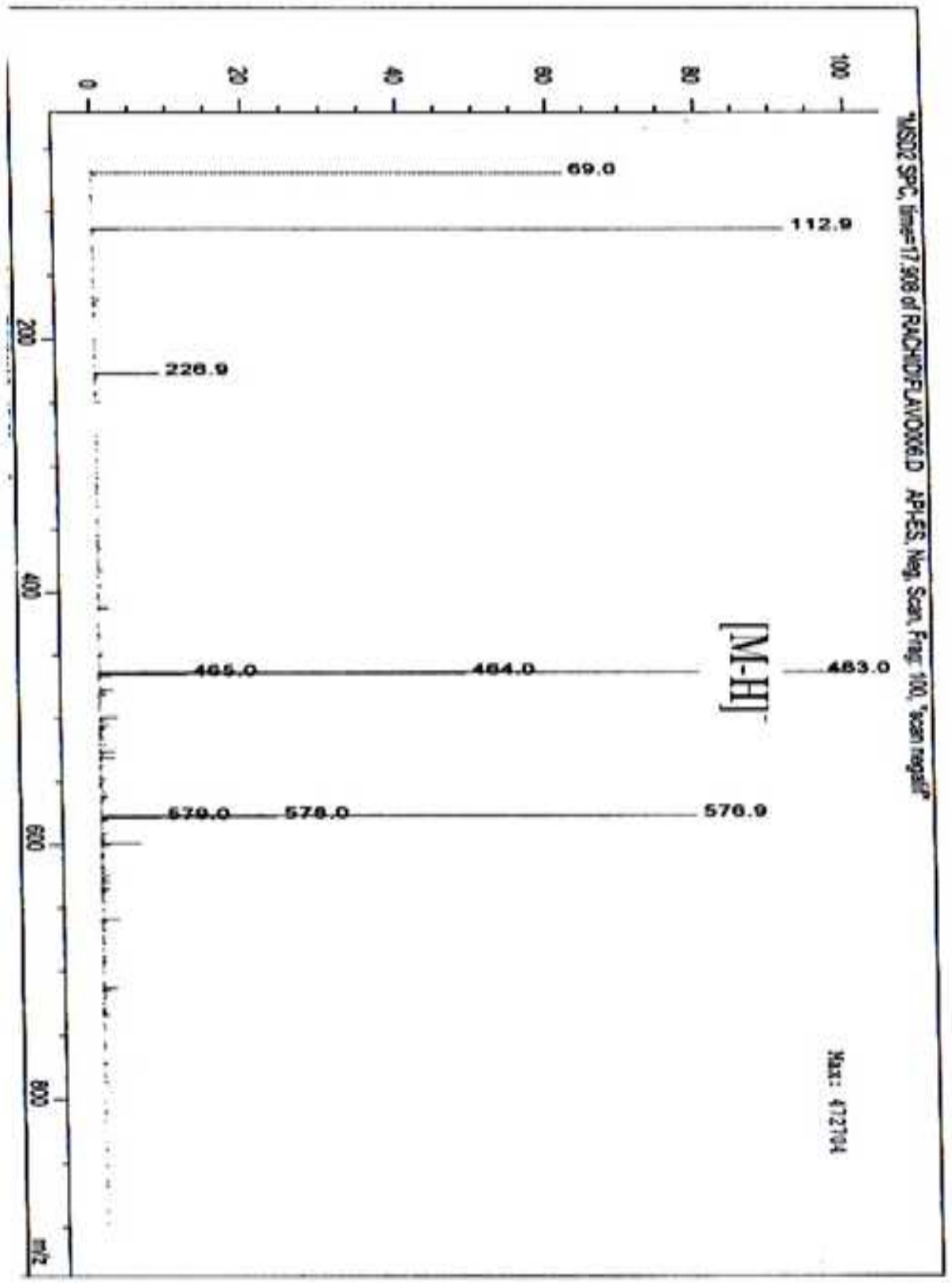


صورة (IV-2): الطور المائي للمركب FR2 على يسار الورقة المختبر مع الشواهد السكرية

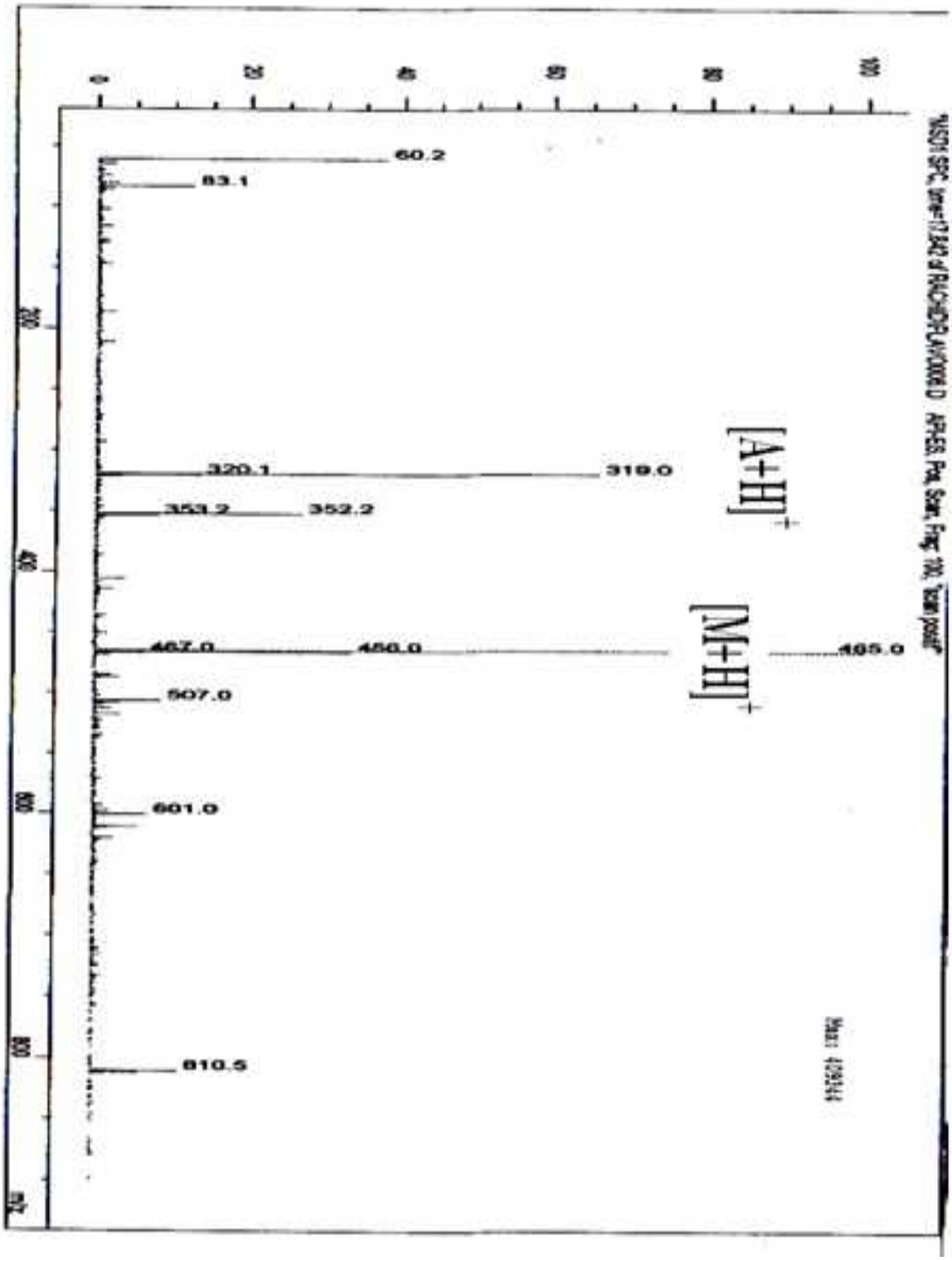
ـ طيف الكتلة بتقنية الإلكتروسبراي السالبة بينت لنا قمة للأيون شبه جزيئي سالب عند m/z=463 وهي موافقة لـ $[M-H]^-$ ،وبتقنية الإلكتروسبراي الموجبة تظهر قمة للأيون شبه جزيئي موجب عند m/z=465 وهي موافقة لـ $[M+H]^+$ ،هذا يدل على أن الكتلة الجزيئية للمركب هي M=464، وفي نفس الوقت يدل على أن المركب أحادي السكر،أما الشظية عند m/z=319 فهي موافقة لـ $[A+H]^+$ وهي تكسيرة بفقدان السكر، إذن نقول أن كتلة جدر السكر هي (464-317=147) والموافق لجدر سكر الرامنوز (الطيف رقم:IV-1-6، IV -6 -2).

ـ بما أننا استنتجنا أن السكر هو من النوع rhamnose ، وانطلاقا من الكتلة الجزيئية السابقة للمركب ككل ، نجد أن الكتلة الجزيئية للأغليكون فقط تكون M=318 هذا دليل على أن الأغليكون هو عبارة عن فلافونول يكون مستبدل بـ 5 مجموعات هيدروكسيلية -HO.

طيف رقم (IV -6 -1): طيف الكتلة بتقنية الإلكتروسبراي السالبة للمركب FR2



طيف رقم (IV- 6-2): طيف الكتلة بتقنية الإلكتروسبراي الموجبة للمركب FR2



طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون H^{-1} طيف رقم (IV-7) يبين:

- إشارتين ثنائيتين بالتكامل 1H لكل منهما حيث تظهر الأولى عند δ=6.2ppm والثانية عند δ=6.4ppm بثابت التزاوج لكل منهما يساوي J=2.0 Hz يشير إلى تزاوج من النوع ميتا ، ومنه تنسب الإشارتين على التوالي للبروتونين H6 و H8 ، و أن المركب مستبدل في الموضعين 5 و7 عل التوالي .

- إشارة أحادية بتكامل 2H عند δ=6.9ppm وهي خاصة بالبروتونين المتكافئين مغناطيسيا H2' و H6' ومنه نقول إذن أن الحلقة B تكون مستبدلة في المواضع 3',4',5' .

- إشارة ثنائية بتكامل 1H عند δ=5.2ppm بثابت تزاوج يساوي J=1.2 Hz خاصة بالبروتون الأنوميري H1'' لسكر الرامنوز ، وثابت تزاوجه يدل على أنه يرتبط مع الأغليكون برابطة α.

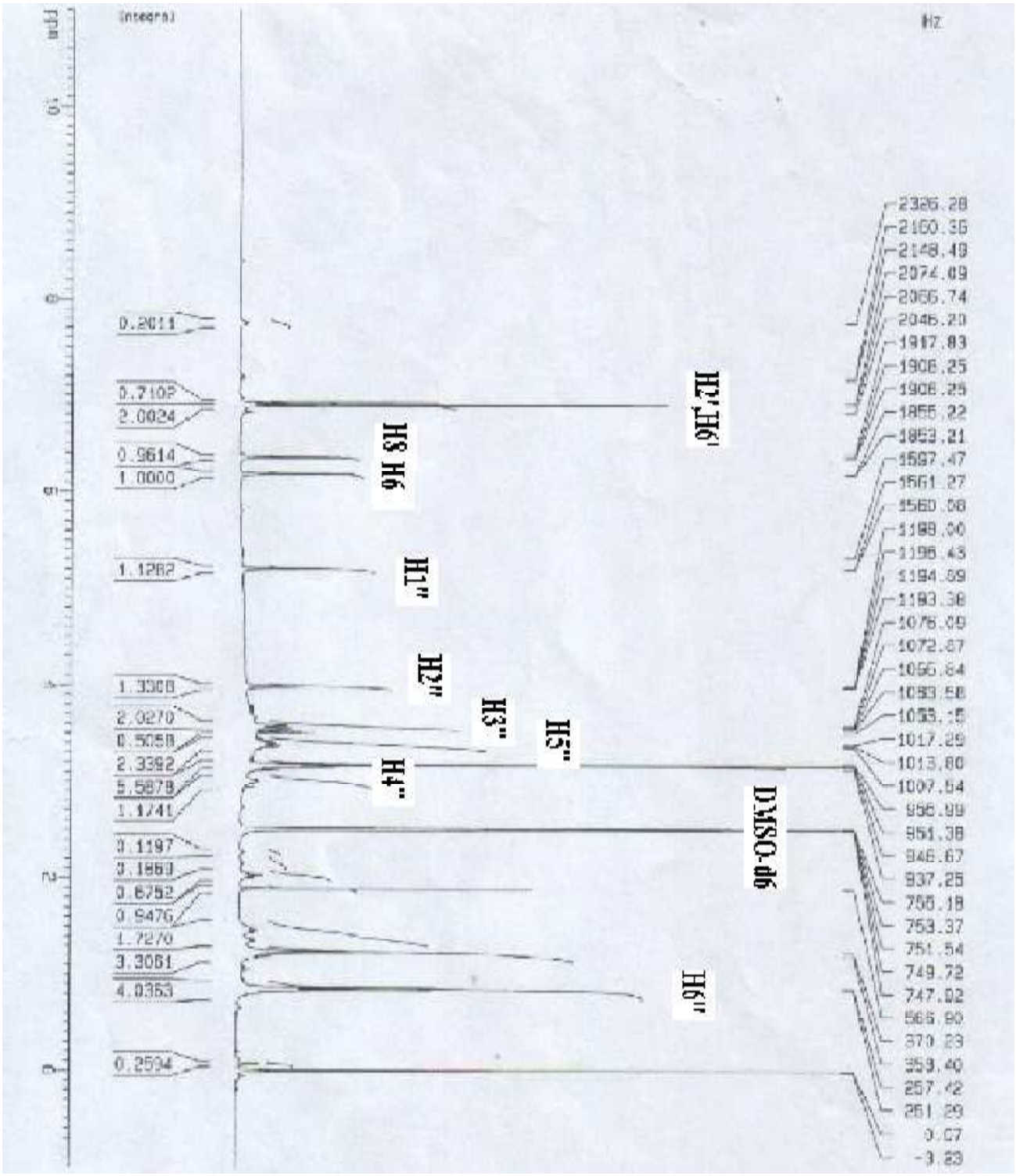
- إشارة ثنائية بتكامل 3H عند δ=0.8ppm بثابت تزاوج J=6.1 Hz وهي خاصة بالبروتون H6'' لسكر الرامنوز .

- ظهور أربع إشارات عند δ=3.1، δ=3.4، δ=3.6، δ=4ppm.، وهي خاصة ببروتونات السكر H4''، H5'' ، H3'' ، H2'' على الترتيب حيث يمكن التأكد من ذلك انطلاقا من الارتباطات الموضحة في الطيف COSY H^{-1}-H^{-1} رقم (IV -8) حيث تظهر بقع التعالق الدالة على ذلك ، إضافة إلى ذلك فطيف COSY سمح لنا بالتأكيد أن الحلقة A تكون مستبدلة في موضعين ، وأن الحلقة B تكون مستبدلة في ثلاث مواضع .

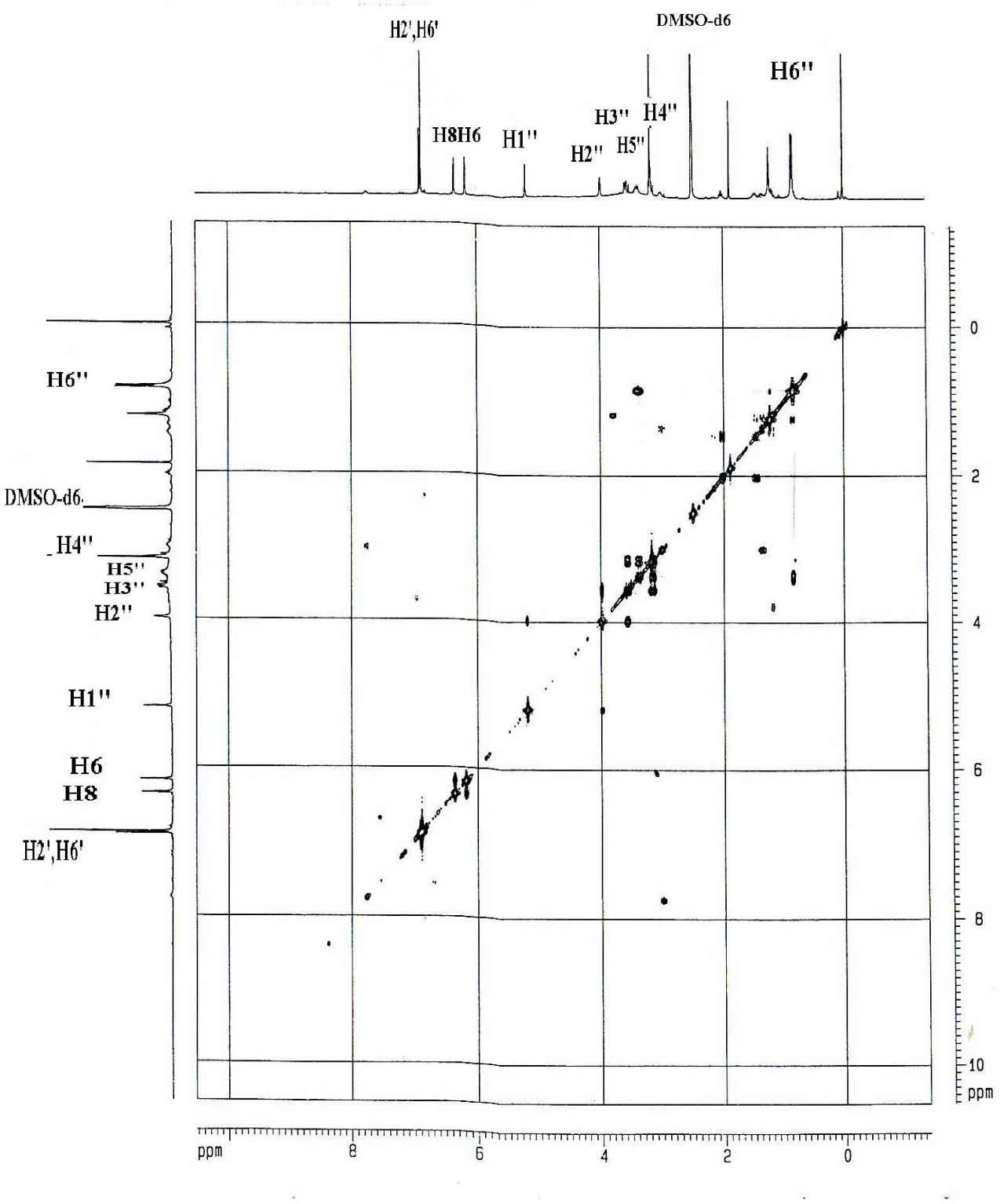
الجدول (IV-6): مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ($RMN-^1H$)

البروتون الموافق	J(Hz)	التعددية	التكامل	الإزاحة δ (ppm).
H6	2	d	1H	6.2
H8	2	d	1H	6.4
H2',H6'	-	s	2H	6.9
H1''(Rhamnose)	1.2	d	1H	5.2
H2''(Rhamnose)	1.57	d-d	1H	4
H3''(Rhamnose)	3.26	d-d	1H	3.6
H4''(Rhamnose)	4.61	t	1H	3.1
H5''(Rhamnose)	-	q^n	1H	3.4
H6''(Rhamnose)	6.1	d	3H	0.8

طيف رقم (IV -7): طيف $RMN\text{-}H^{-1}$ للمركب FR2
DMSO-d_6 ;300MHz



طيف رقم (8-IV): طيف H^{-1}- H^{-1} COSY للمركب FR2
DMSO-d_6 ; 300MHz



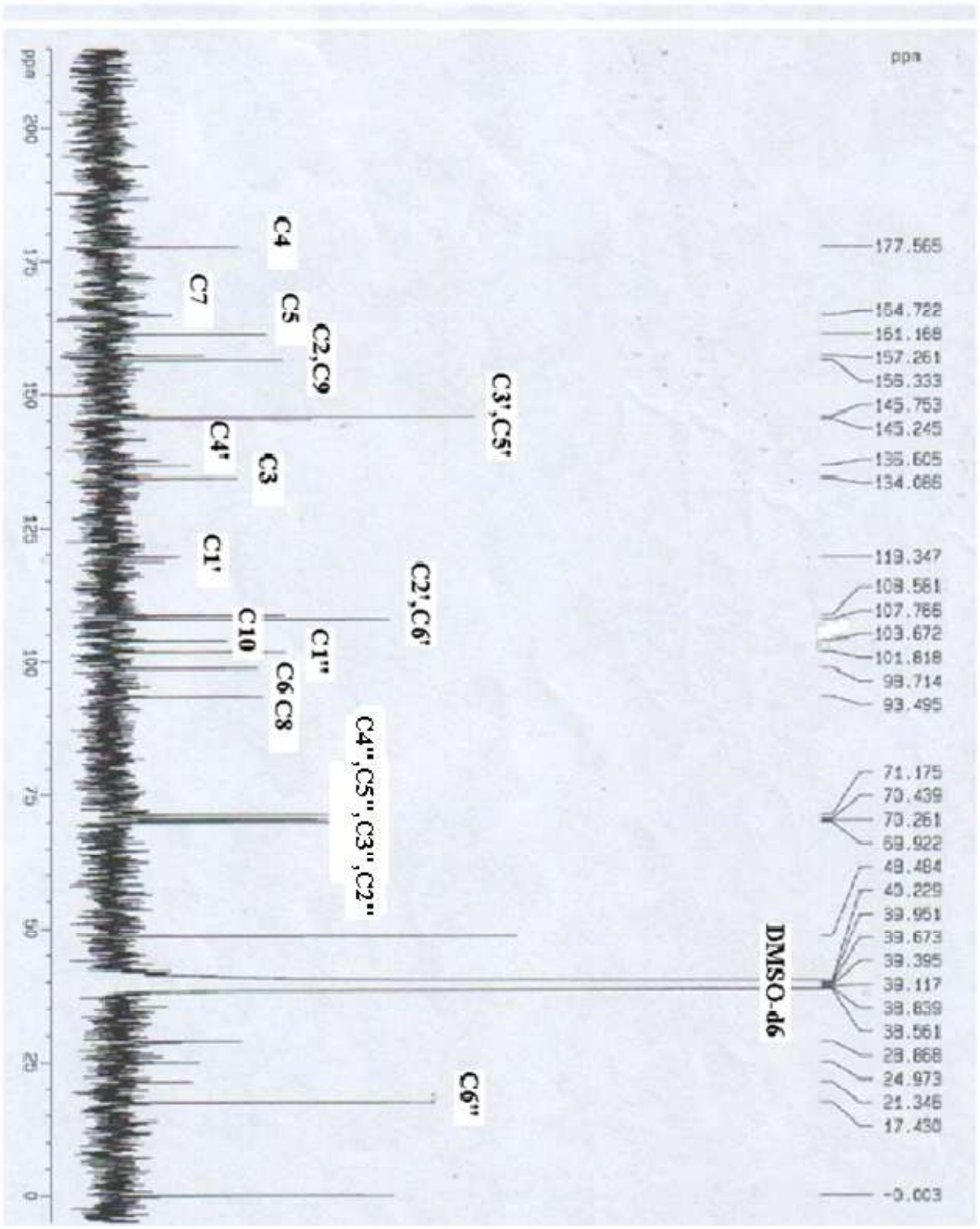
طيف الرنين النووي المغناطيسي لـ C^{-13} (رقم :IV -9) لهذا المركب أعطى لنا الإشارات التالية:

- إشارة عند δ=17.4ppm دليل على وجود $-CH_3$ فهو إذن خاص بالكربون ''C6 لسكر الرامنوز.
- ظهور أربع إشارات عند δ=69.92، δ=70.26، δ=70.43، δ=71.17ppm فهي خاصة بكربونات سكر الرامنوز ''C2، ''C3، ''C5، ''C4 على الترتيب (الجدول:IV- 7).
- ظهور إشارة عند δ=101.82ppm وهي تنسب للكربون الأنوميري ''C1 لسكر الرامنوز حيث أنه يرتبط بالأغليكون برابطة (α) .
- تظهر إشارة الكربون C3 عند δ=134.08 ppm دليل على أنه مستبدل بـ O-rhamnosyle.
- بقية كربونات الهيكل الفلافونيدي نقوم بتعينها وتحديد قيم إزاحتها الكيميائية δ في الجدول (IV-7):

الجدول(IV-7): مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ($RMN-C^{-13}$)

الإزاحة الكيميائية (δ,ppm)	الكربون المرافق
156.33	C2,C9
134.08	C3
177.56	C4
161.16	C5
98.71	C6
164.72	C7
93.49	C8
103.67	C10
119.34	C1’
108.56	C2’,C6’
145.24	C3’,C5’
136.60	C4’
كربونات السكر	
101.82	C1’’
69.92	C2’’
70.26	C3’’
71.17	C4’’
70.44	C5’’
17.43	C6’’

طيف رقم (9-IV):طيف $RMN-C^{13}$ للمركب FR2
DMSO-d_6 ;300MHz

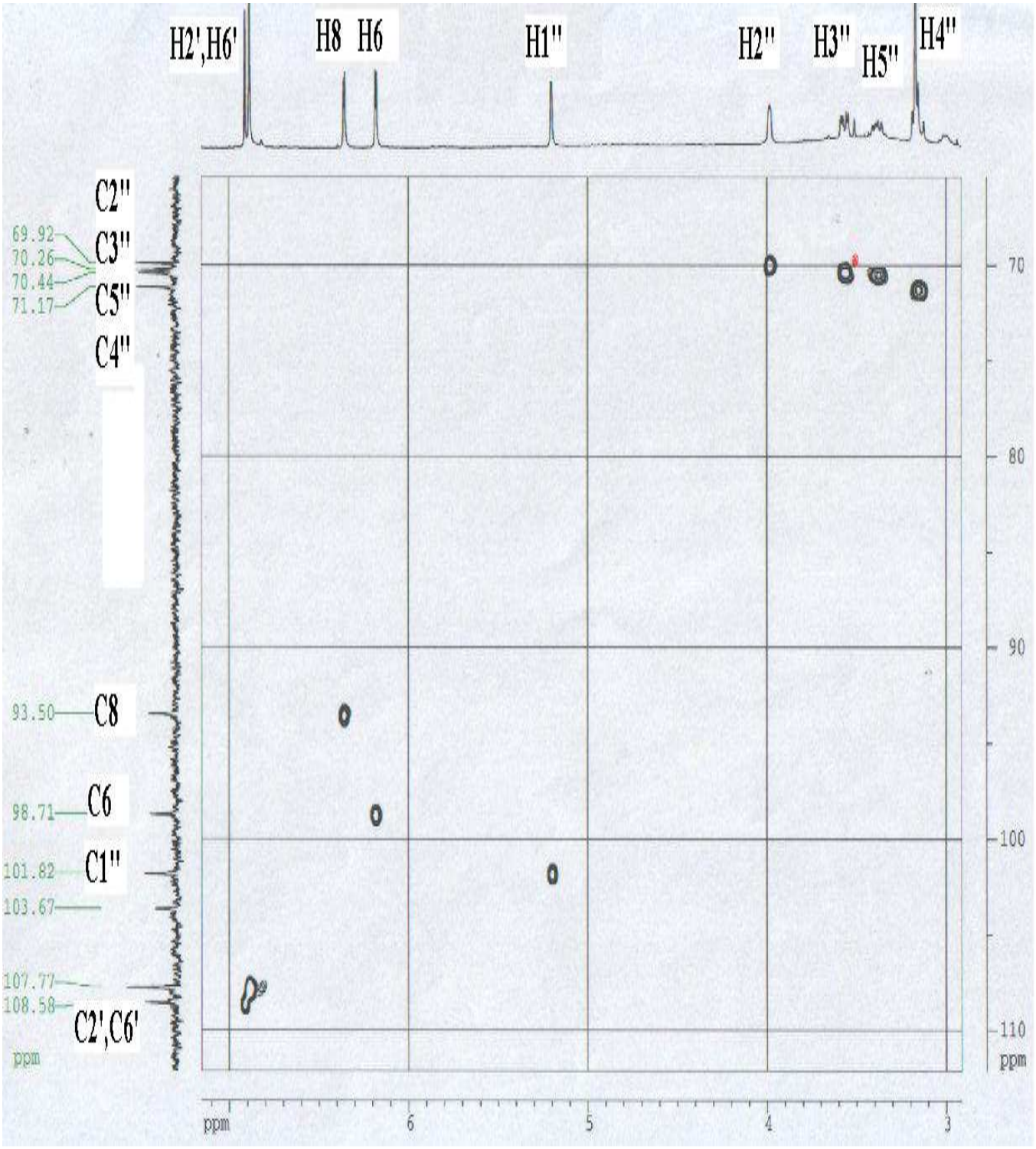


ويمكن التأكد من معطيات أطياف الكربون السابقة انطلاقا من مطيافية التزاوج بين RMN-^{1}H و(RMN-C^{13}) الثنائي البعد HSQC وHMBC حيث تظهر بقع التعالق الدالة على ذلك حسب الأطياف رقم (IV -10-1، IV-10- 2 ،IV-11) ، و نقوم بتفصيلها في الجدول (IV-8):

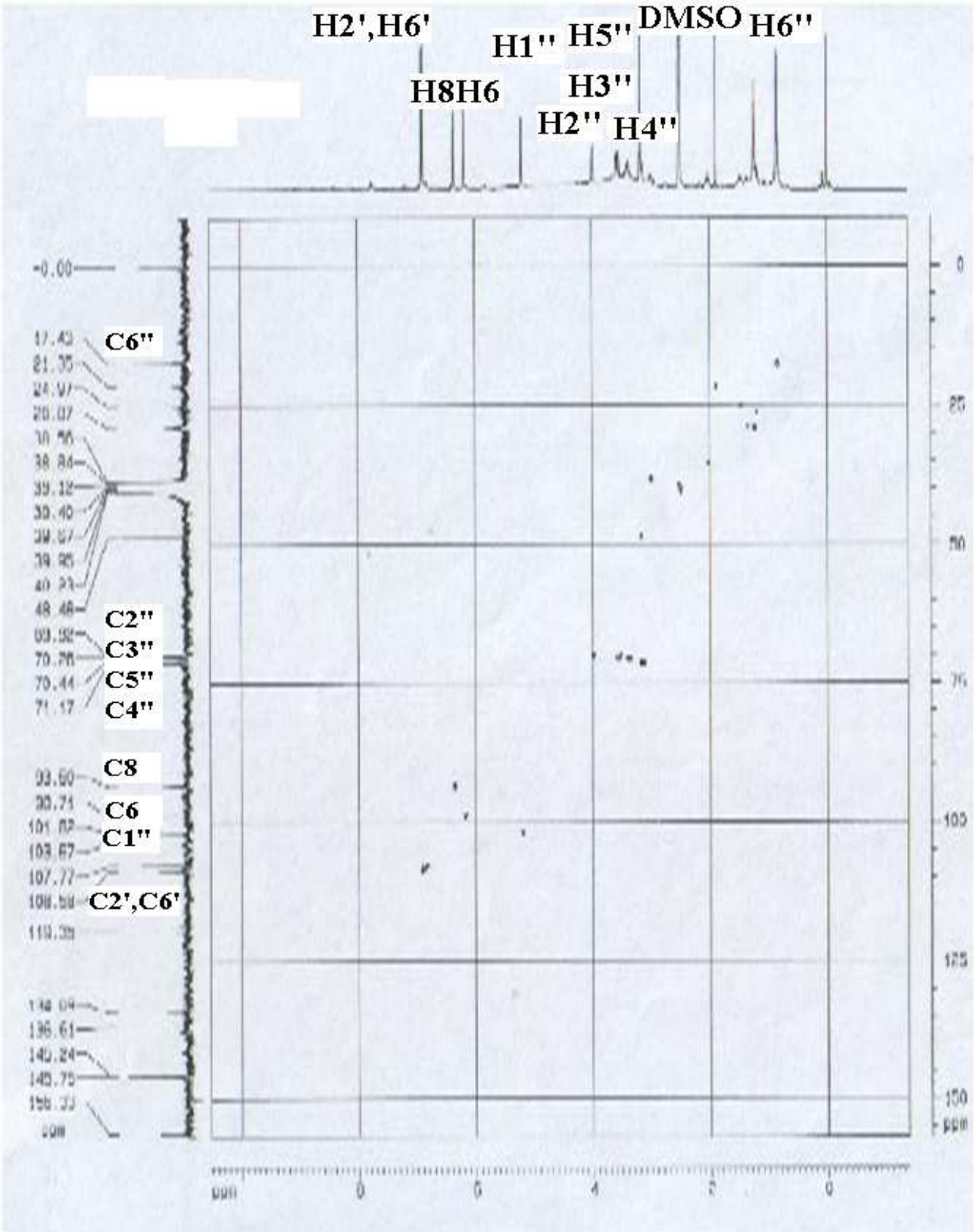
الجدول (IV-8) : معطيات أطياف ^{1}H -RMN , HMBC, HSQC للمركب FR2

البروتون	δ (ppm).	الكربون الذي يرتبط به البرتون δ (ppm) HSQC	ذرات الكربون المجاورة HMBC
H2',H6'(s)	6.9	C2',C6'(108.56)	C2(156.33), C3',C5'(145.24), C4'(136.60), C1'(119.34), C2',C6'(108.56)
H8(d)	6.4	C8(93.49)	C7(164.72), C9(156.33), C10(103.67), C6(98.71)
H6(d)	6.2	C6(98.71)	C7(164.72), C5(161.16), C10(103.67), C8(93.49)
H1''(d)	5.2	C1''(101.82)	C3(134.08), C2''(69.92), C5''(70.44), C3''(70.26), C4''(71.17)
H2''(d-d)	4	C2''(69.92)	—
H3''(d-d)	3.6	C3''(70.26)	C2''(69.92), C5''(70.44), C3''(70.26), C4''(71.17)
H5''(q^{n})	3.4	C5''(70.44)	—
H4''(t)	3.1	C4''(71.17)	C2''(69.92), C5''(70.44), C3''(70.26), C4''(71.17), C6''(17.43)
H6''(d)	0.8	C6''(17.43)	C2''(69.92), C5''(70.44), C3''(70.26), C4''(71.17)

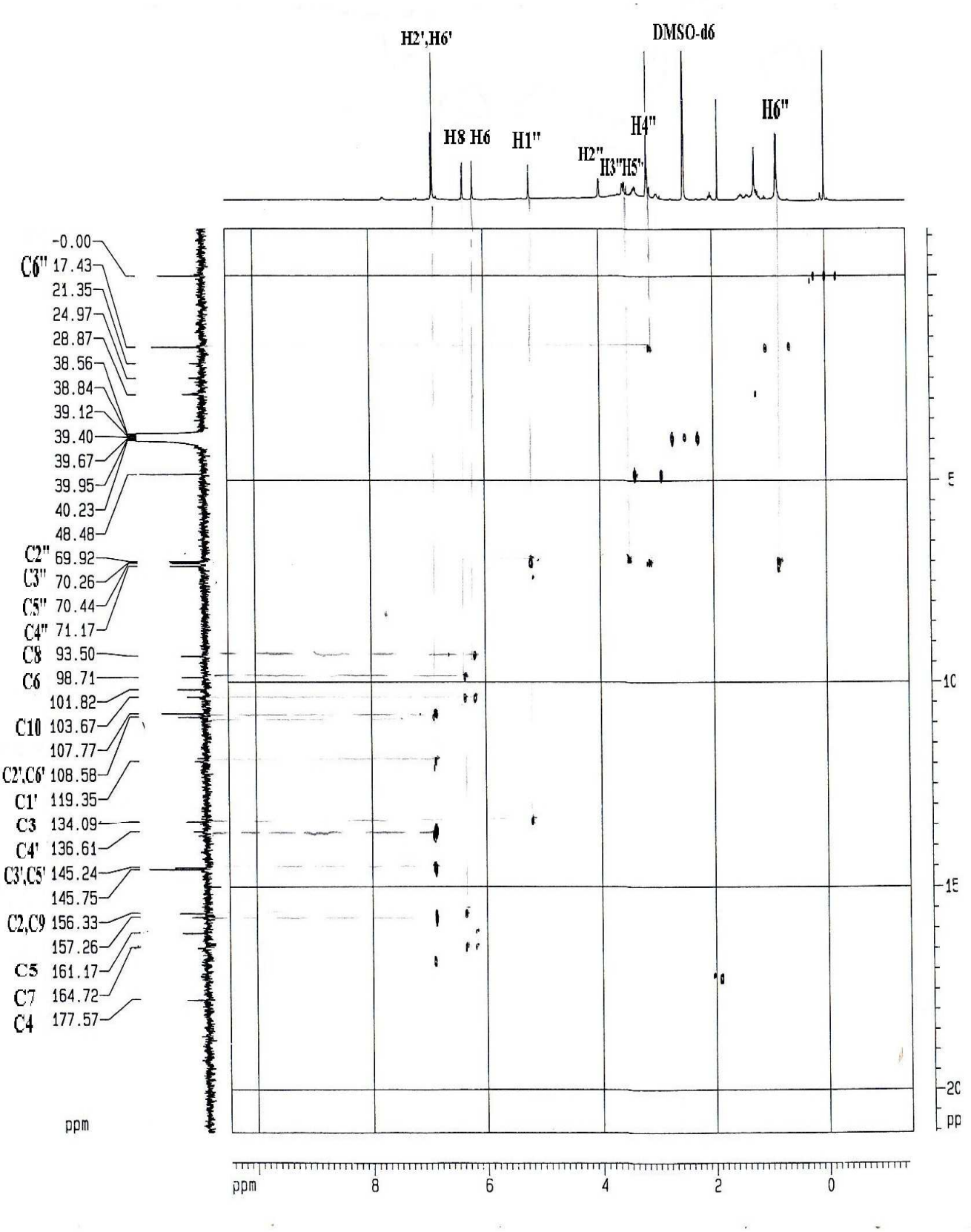
طيف رقم (IV-10-1): طيف HSQC للمركب FR2
DMSO-d_6 ; 300MHz



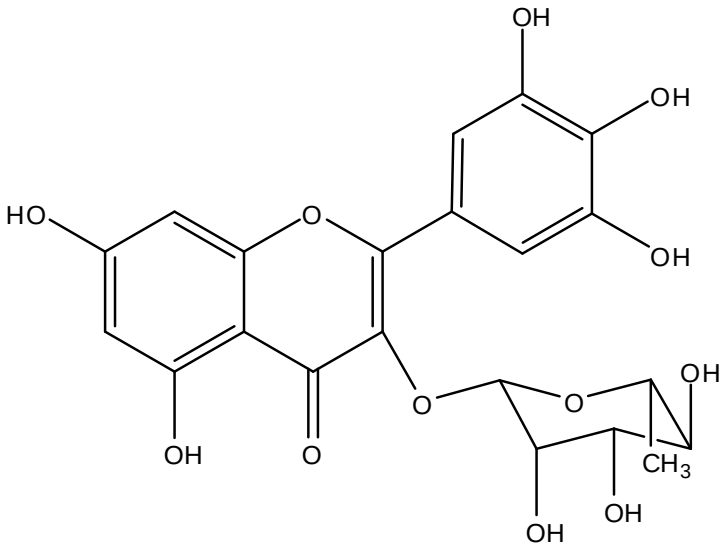
طيف رقم (IV-10-2): طيف HSQC للمركب FR2
DMSO-d_6 ; 300MHz



طيف رقم (IV-11): طيف HMBC للمركب FR2
DMSO-d_6 ; 300MHz



✓ من كل ما سبق توصلنا لإعطاء الصيغة النهائية المحتملة للمركب (FR2) كما يلي :



5,7,3’,4’,5’-pentahydroxy-3-O-α-L-Rhamnosylflavonol
(Myricétin-3-O-α-L-Rhamnosyl)

IV - 3 - التحليل البنيوي للمركب المعزول (FR 3):

نقيم السلوك الكروماتوغرافي ، ونقوم بشرح المعطيات الطيفية المرفقة للمركب FR3 كما يلي:

الجدول (IV-9) : السلوك الكروماتوغرافي للمركب FR3

النظام	SI	SII
R_f	0.8	0.05
اللون الإستشعاعي	بنفسجي	

لأجل اختبار هذين النظامين استعملنا الطبقة الرقيقة من متعدد الأميد DC_6

SI : Toluène/MEC/MeOH (4 / 3 / 3)

SII : H_2O/MeOH/MEC/Acétyl acétone (13 / 3 / 3 / 1)

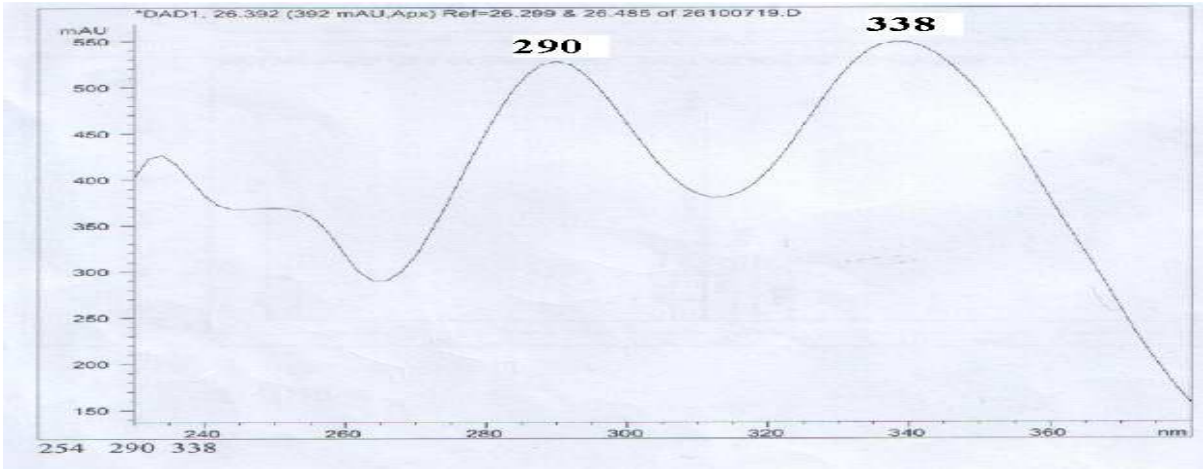
ـ يدل السلوك الكروماتوغرافي حسب قيم R_f المدونة في الجدول أعلاه على كون المركب أغليكوني.

ـ اللون البنفسجي للمركب تحت مصباح الأشعة (UV) ،وطول العصابة I لطيف الأشعة فوق بنفسجية للمركب FR3 في الوسط الميثانولي هو λ_1=338nm يدلان على أن هذا المركب هو فلافون.

ـ طول العصابة II لطيف الأشعة فوق البنفسجية للمركب FR3 في الوسط الميثانولي هو λ_2=290nm تدل على أن المركب مستبدل بعدة مجموعات ميتوكسيلية في الحلقة A [2،3] (الجدول رقم : IV -10 ،الطيف رقم :IV -12).

الجدول (IV-10): مطيافية الأشعة فوق بنفسجية – المرئية

الكاشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)	قمم(nm)
MeOH	338	290	254



طيف رقم (IV-12):طيف الأشعة فوق بنفسجية للمركب FR3 في الوسط الميثانولي

- زمن الاحتباس للمركب t_R=26.38 min " بتقنية كروماتوغرافية HPLC طور عكسي C18 " حيث نقوم بجر المركب FR3 أوتوماتيكيا في العمود الكروماتوغرافي باستعمال المملصين التاليين :

(H2O/Acide formique 1000/5) : A

(Acétonitrile/ Acide formique 1000/5) : B

- في المرحلة الأولى يكون التمليص باستعمال المملص A 100 % لمدة دقيقتين.

- في المرحلة الثانية يكون التمليص بواسطة خليط من (A/B) ابتداء من النسبة (80/20) إلى غاية الوصول إلى النسبة (20/80) بعد 30 دقيقة.

- في المرحلة الثالثة يكون التمليص بواسطة خليط من (A/B) بنسبة (20/80) إلى غاية الوصول إلى النسبة 100% من المملص B بعد مدة 10دقائق.

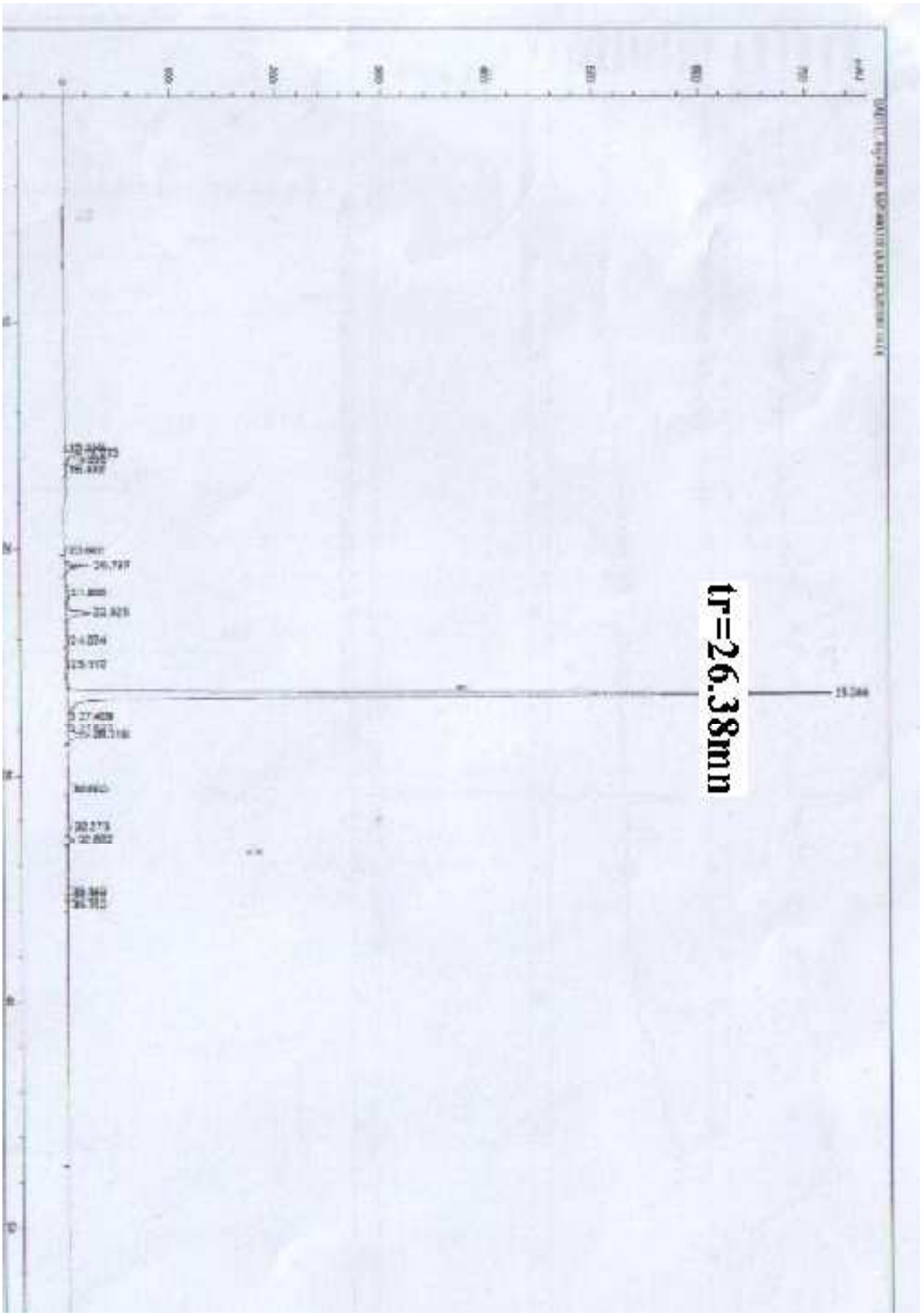
- في المرحلة الرابعة يكون المملص هو 100 % من B لمدة دقيقتين.

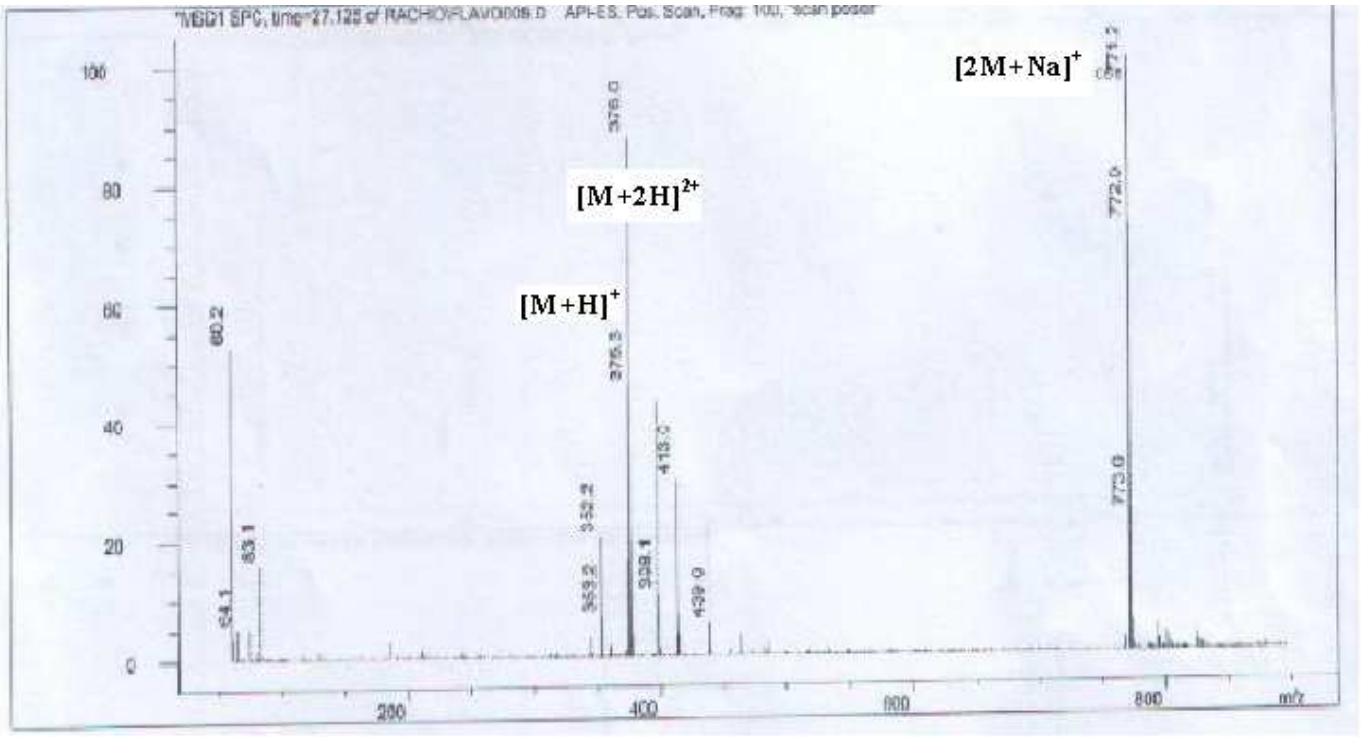
- في المرحلة الأخيرة يكون المملص هو 100 % من A لمدة 3دقائق

فزمن الاحتباس الناتج للمركب يدل على أنه أغليكوني (الطيف رقم: IV-13).

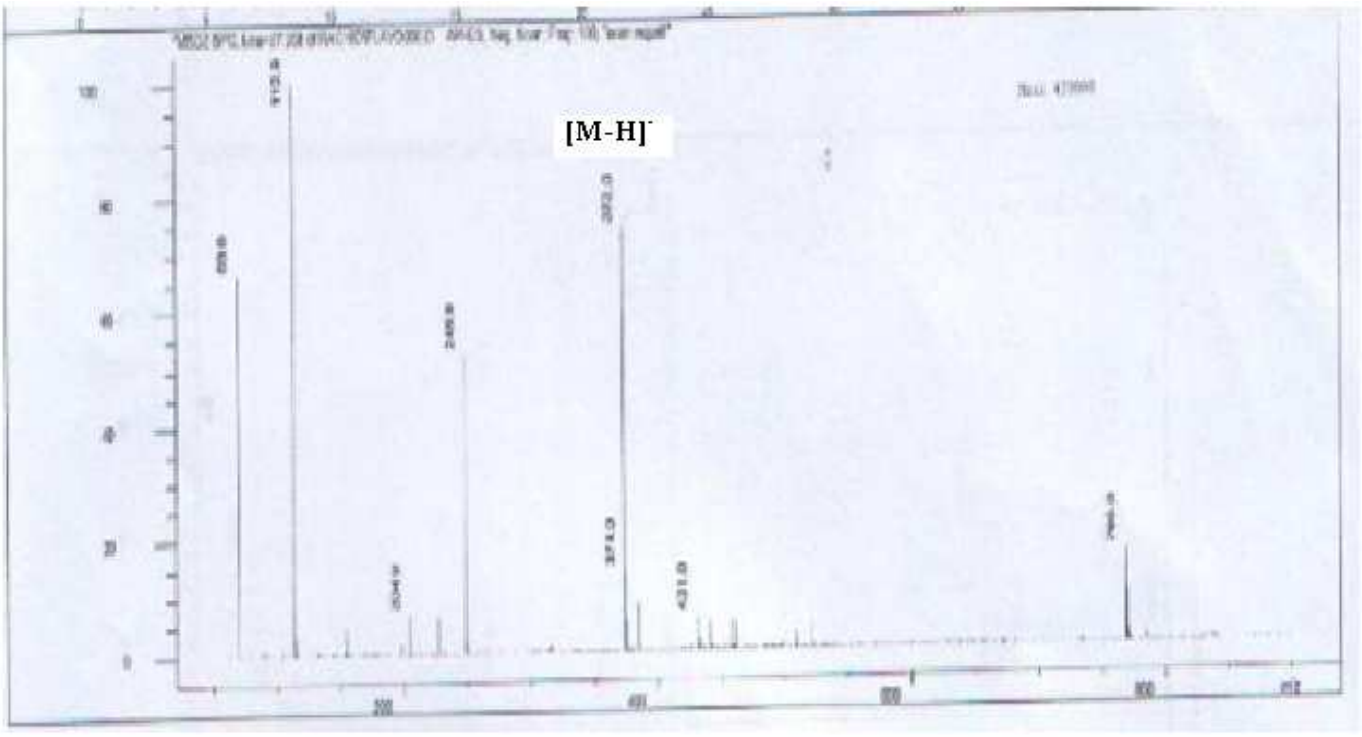
- طيف الكتلة بتقنية الإلكتروسبراي السالبة بينت لنا قمة للأيون شبه جزيئي سالب عند m/z=373 وهي موافقة لـ $[M-H]^-$ ،وبتقنية الإلكتروسبراي الموجبة تظهر قمم للأيونات شبه جزيئية موجبة عند m/z=375 وهي موافقة لـ $[M+H]^+$ ، والأخرى عند m/z=376 موافقة لـ $[M+2H]^{2+}$ ،كما تظهر قمة للأيون شبه جزيئي موجب عند m/z=771 وهي موافقة لـ $[2M+Na]^+$ ،هذا يقودنا للقول أن الكتلة الجزيئية للمركب هي M=374 ، إذن يكون مستبدل بمجموعتي هيدروكسي وأربع مجموعات ميتوكسي (الأطياف رقم:IV - 14-1، IV - 14- 2)

طيف رقم (IV-13):طيف HPLC للمركب FR3





طيف رقم (IV -14-1): طيف الكتلة بتقنية الإلكتروسبراي الموجبة للمركب FR3



طيف رقم (IV -14 - 2): طيف الكتلة بتقنية الإلكتروسبراي السالبة للمركب FR3

طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون H^{-1} للمركب FR3(طيف رقمIV- 15) يبين لنا :

ـ أربع إشارات أحادية بتكامل 3H لكل واحدة منها في المجال 3.8- 4ppm تؤكد على وجود أربع مجموعات ميتوكسي CH_3-O.

ـ إشارة ثنائية بتكامل 1H عند δ=7.1ppm بثابت تزاوج *J*=8 Hz وهي تنسب للبروتون H5'، حيث يتزاوج مع البروتون H6' بتزاوج من نوع أورثو.

ـ الإشارة الثنائية المضاعفة بتكامل 1H عند δ=7.7ppm تدل على أن هذا البروتون له تزاوج أورثو (*J*=8 Hz) مع البروتون H5' ، وتزاوج ميتا مع البروتون H2' بثابت تزاوج ضعيف ، إذن تنسب هذه الإشارة لـ H6' .

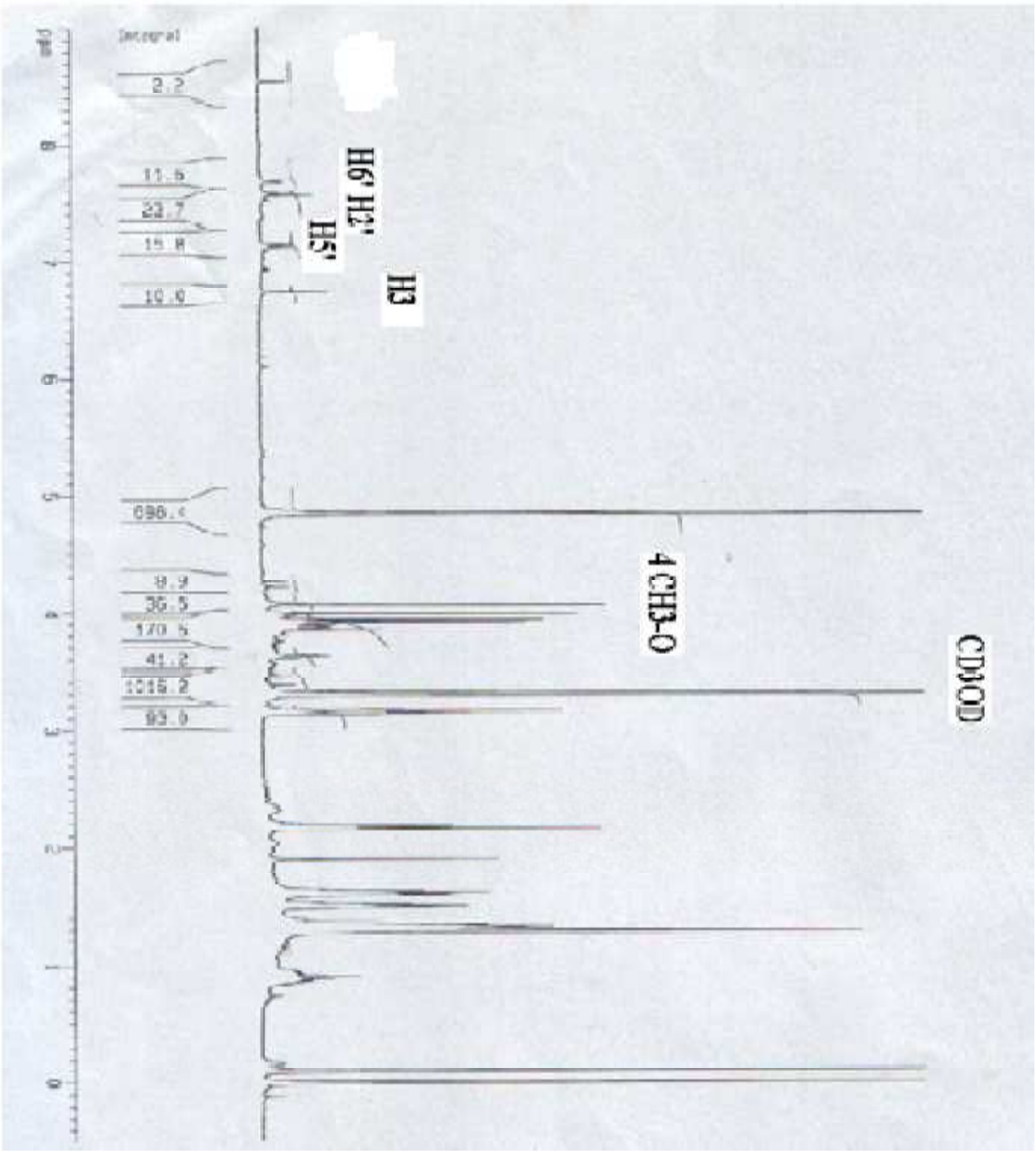
ـ الإشارة الثنائية عند δ=7.6ppm بتكامل 1Hبثابت تزاوج ضعيف تنسب للبروتون H2' الذي يتزاوج مع H6' بتزاوج من النوع ميتا ، ومنه نقول أن الحلقة B تكون مستبدلة في الموضعين 3' و 4' ،و يمكن التأكد من ذلك من طيف $^{1-}$H-$^{1-}$H grad module COSY رقم (16-IV) حيث تظهر بقع التعالق الدالة على ذلك .

ـ الإشارة الأحادية عند δ=6.7ppm بتكامل 1H تنسب للبروتون H3 ، يمكن التأكد من ذلك انطلاقا من طيف HSQC رقم (17-IV) حيث يبين لنا الكربون المرتبط به هو (C3(104.2ppm دلالة على أن هذا الموضع غير مستبدل ، ومنه يمكن القول أن الحلقة العطرية A تكون مستبدلة كليا، و الجدول التالي رقم (IV -11) يبين لنا معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب تحت الدراسة.

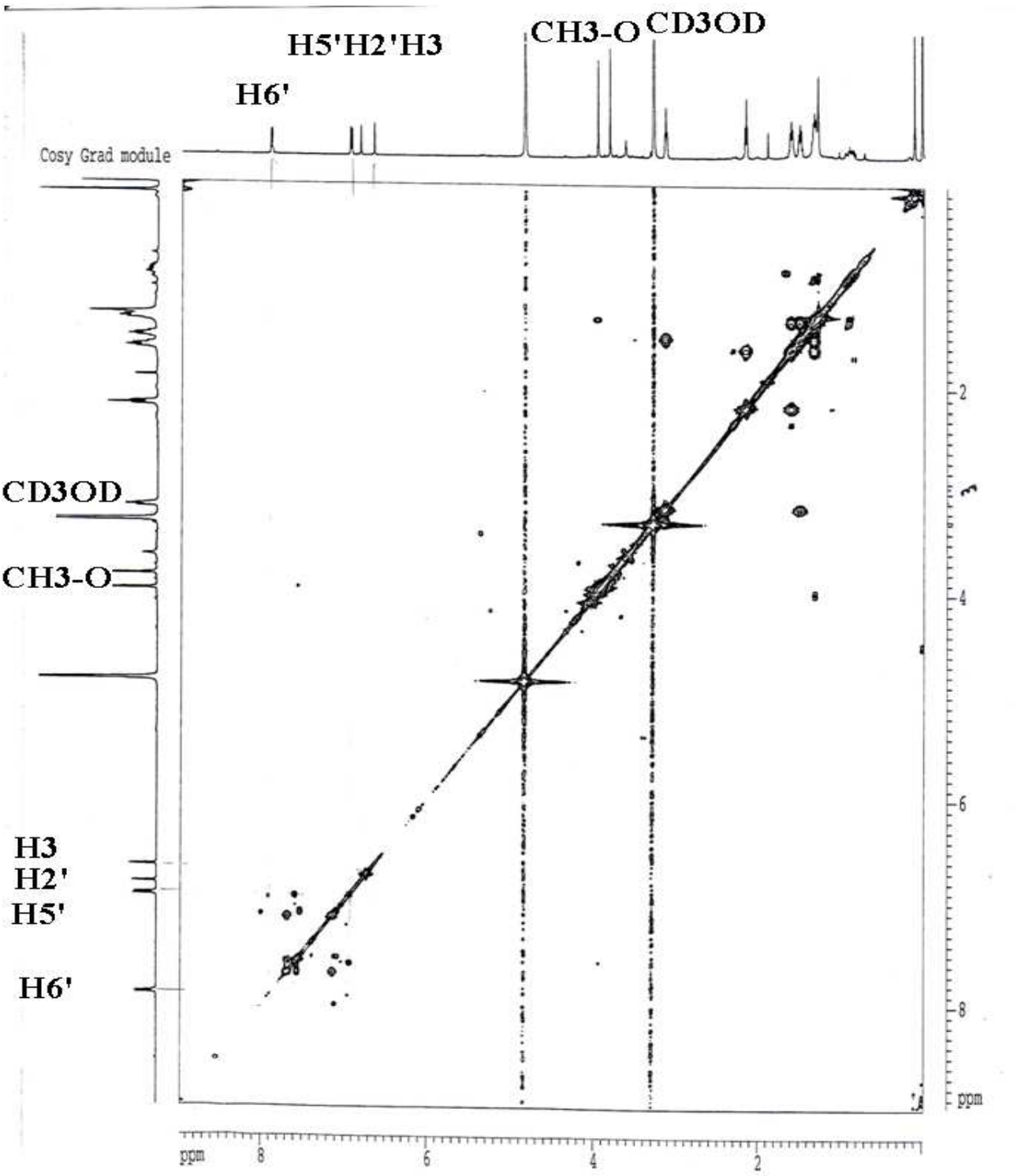
الجدول (11-IV): مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN-^{1}H)

الإزاحة δ (ppm).	التكامل	التعددية	*J*(Hz)	البروتون الموافق
7.1	1H	d	8	H5'
7.7	1H	d-d	8	H6'
7.6	1H	d	-	H2'
6.7	1H	s	-	H3
3.8- 4	3H	s	-	CH_3-O

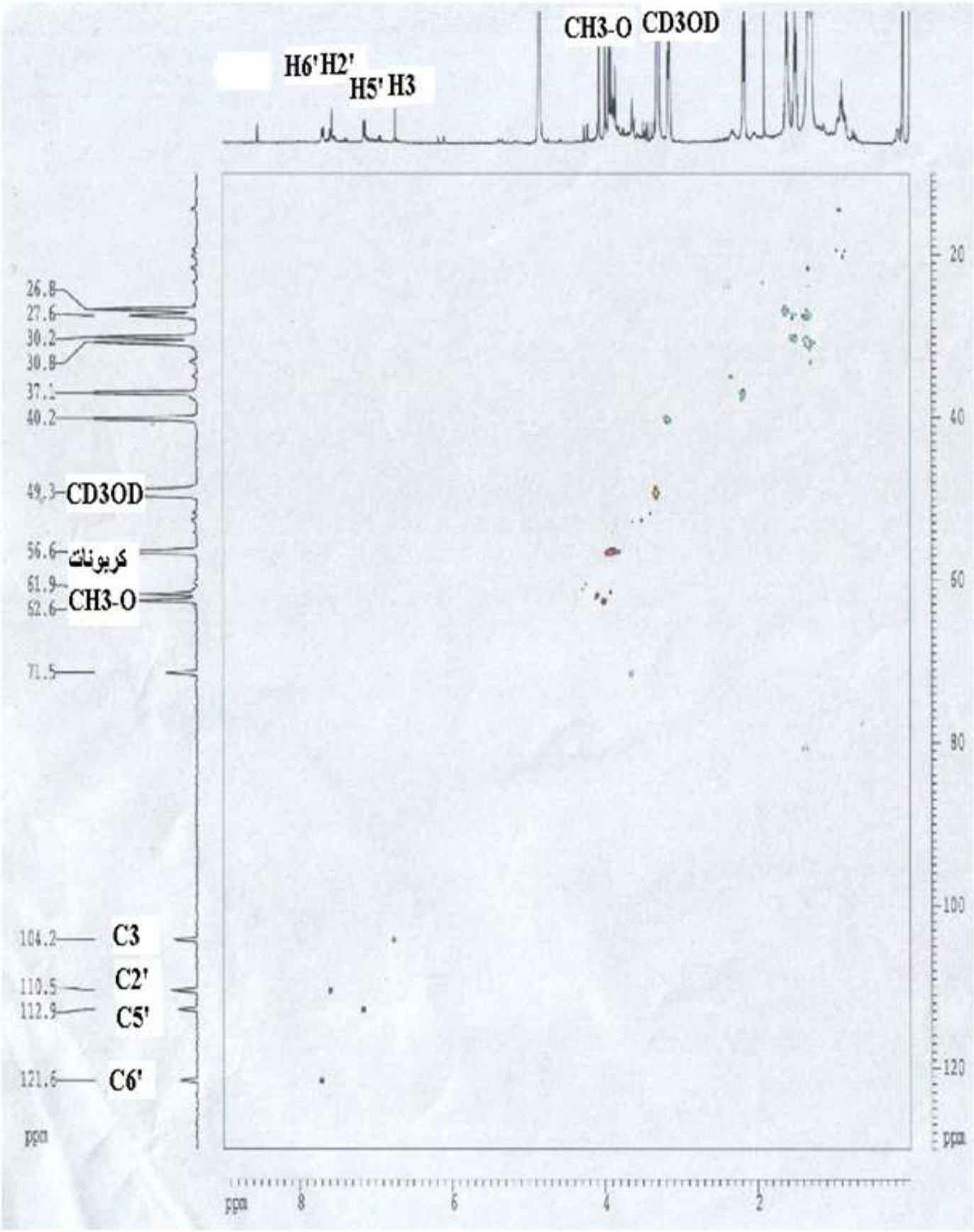
طيف رقم (15-IV): طيف RMN-^{1}H للمركب FR3
CD_3OD ;300MHz



طيف رقم (IV-16):طيف ^{1}H-^{1}H grad module COSY ثنائي البعد للمركب FR3
CD_3OD ;300 MHz



طيف رقم (IV- 17):طيف HSQC ثنائي البعد للمركب FR3
CD_3OD ;300MHz



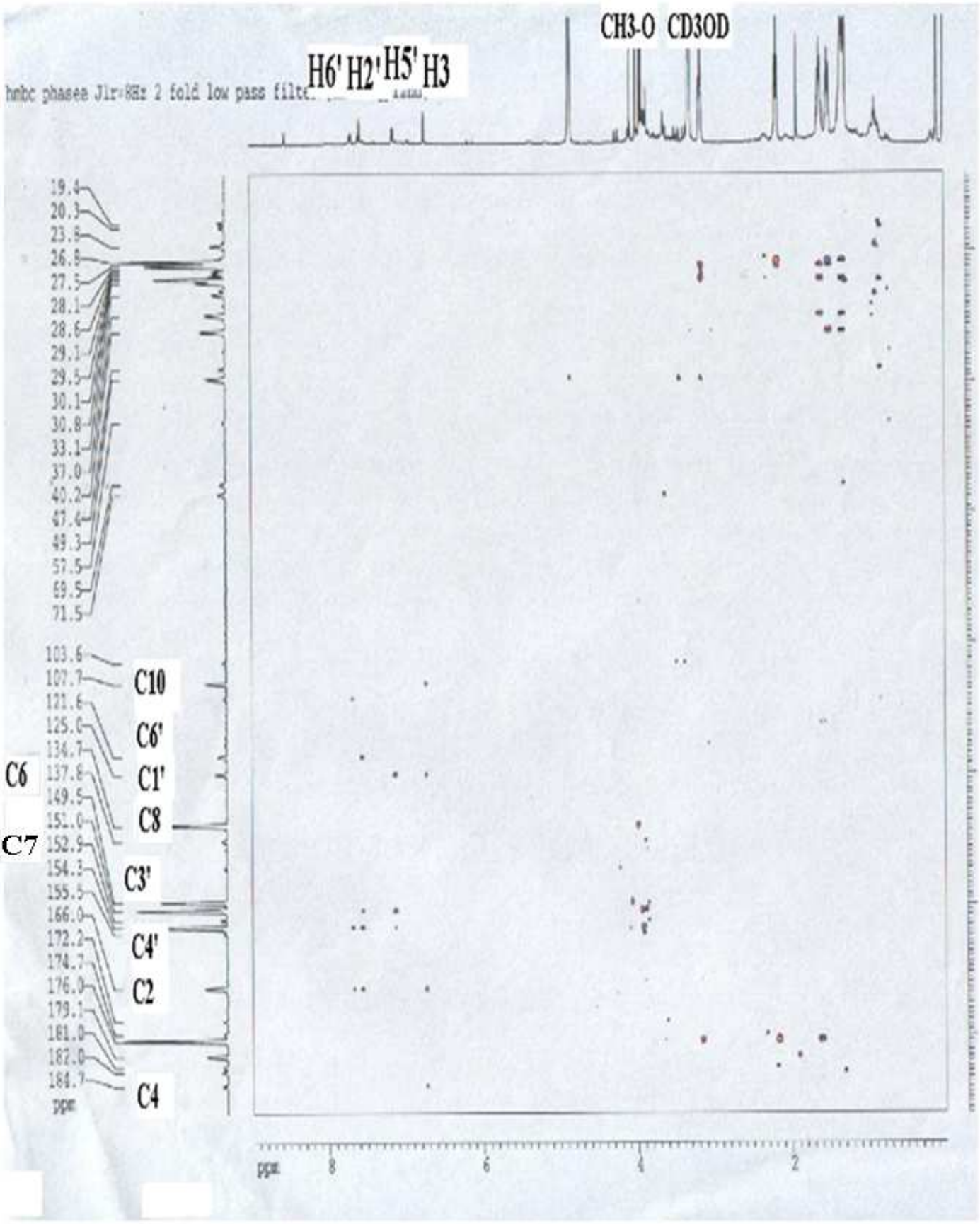
ـ طيف HMBC رقم (IV-18) سمح لنا بالإضافة إلى تحديد الكربونات المجاورة للبروتونات المحددة مسبقا، بتحديد مواقع ارتباط مجموعات الميتوكسي على الكاربونات هي C3',C4',C6,C8 [4،5] حيث تظهر بقع التعالق الدالة على ذالك .

بقية معطيات الطيف HMBC ، HSQC نلخصها في الجدول (IV-12).

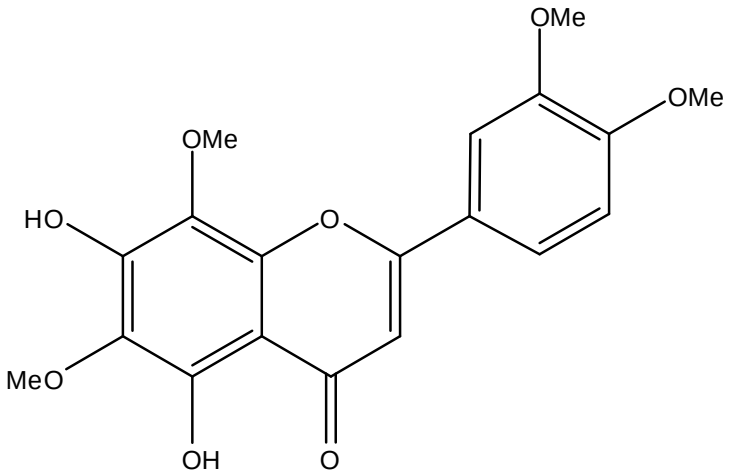
الجدول (IV -12) : معطيات أطياف ^{1}H -RMN , HMBC, HSQC للمركب FR3

البروتون	δ (ppm)	الكربون الذي يرتبط به البرتون (ppm) δ HSQC	ذرات الكربون المجاورة HMBC
H2' (d)	7.6	C2' (110.5)	C2(166), C4' (154.3), C6'(121. 6)
H6'(d-d)	7.7	C6'(121.6)	C4' (154.3), C2(166)
H5'(d)	7.1	C5'(112.9)	C1'(125), C4' (154.3)
H3(s)	6.7	C3(104. 2)	C10(107.7), C1'(125), C2(166),C4(184.7)
بروتونات CH_3-O (s)	3.8-4	2C (56.6) C (61.9) C (62.6)	C6(137.8), C5,C7 (152.9) C3'(149.5), C4' (154.3) C8(134.7)

طيف رقم (IV -18): طيف HMBC ثنائي البعد للمركب FR3
CD_3OD ;300MHz



✓ يمكن إذن إعطاء الصيغة النهائية المحتملة للمركب FR3 بالشكل التالي:



5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tetraméthoxyflavone (Hymenoxine)

IV- 4 - دراسة الفعالية البيولوجية :

IV -4-1- مكان التجربة :

تم إجراء التجربة العملية بمختبر الميكروبيولوجيا بقسم علوم الطبيعة والحياة التابع لجامعة العربي بن مهيدي (أم البواقي).

IV-4- 2- الأدوات والوسائل المستعملة:

- أوساط مغذية.
- أنابيب اختبار معقمة.
- أطباق بتري معقمة.
- ماء مقطر معقم.
- ورق ® whatmans رقم 3.
- إبرة تلقيح.
- ماصات معقمة.
- السلالات البكتيرية .
- المستخلص النباتي لنبات *Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart .
- ملقط معقم.
- موقد بنزن .
- ماء جافيل.
- حوجلات .
- سحاحات مدرجة.
- ميزان حساس .
- حمام مائي.
- حاضنة وفور باستور.
- ماء فيزيولوجي .

IV-4-3- العينات البيولوجية:

المستخلص النباتي: طور خلات الإثيل لنبات *Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart

تحضير التراكيز : لتحضير المحلول الأصلي ذو التركيز8000 مكغ/مل قمنا بوزن 0.08 غرام من المستخلص النباتي وإذابته في 10مل من الماء المقطر المعقم ، وانطلاقاً منه قمنا بتحضير التراكيز 2000 مكغ/مل و 500 مكغ/مل.

- لتحضير 10مل من المحلول ذو التركيز 2000 مكغ/مل نأخذ 2.5مل من المحلول الأصلي ذو التركيز8000 مكغ/مل و نضيف له 7.5مل من الماء المقطر المعقم .
- لتحضير 10مل من المحلول ذو التركيز 500 مكغ/مل نأخذ 2.5مل من المحلول ذو التركيز 2000 مكغ/مل و نضيف له 7.5مل من الماء المقطر المعقم.

تحضير الأقراص: تم تحضير أقراص من ورق (whatmans® N°3) ذات قطر 6 ملم بوضعها في طبق بتري ونضيف لها 10 ملل ماء مقطر ثم تعقم في جهاز Autoclave لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 120°م ونشبعها بوضعها في التراكيز المحضرة للمستخلص بمقدار 40 مكرولتر.

تحضير الماء الفزيولوجي : تم تحضيره بإذابة 9غ من NaCl في 1 ل من الماء المقطر ثم نقوم بتوزيعه في أنابيب اختبار بأحجام متساوية (2 ملل في كل أنبوب) بعد ذلك قمنا بتعقيمها في جهاز Auto clave لمدة 30 دقيقية عند 120م°.

IV-4-4- دراسة الأثر التثبيطي للمستخلص الخام باستعمال طريقة الانتشار على الأقراص:

IV- 4 -4- أ- استعمال الأوساط الغذائية:

نستعمل وسط Muller Hinton وهو عبارة عن وسط خاص بعملية دراسة الفعالية البيولوجية بالنسبة للبكتيريا، حيث نقوم بإذابة هذا الوسط في حمام مائي ثم نقوم بتوزيعه على أطباق بترية ويترك ليبرد ويتجمد.

IV- 4-4 - ب- تحضير اللقاح البادئ Inoculum:

نأخذ مسحة من مستعمرات بكتيرية المراد اختبارها ،نقوم بزرعها في وسط جيلوز المغذي و هذا بحقنها بواسطة إبرة تلقيح و تحفظ لمدة 24 سا عند درجة حرارة 37°م ، بعدها تأخذ مسحة منها ويتم تحليلها في 2 مل من الماء الفيزيولوجي المعقم للحصول على المعلق البكتيري ثم تترك لمدة 15 دقيقة.

IV-4- 4 - ج - طريقة الزرع :

نضع المعلق البكتيري المحضر في الطبق البتري المقسم إلى جزئيين والمحتوي على وسط Muller Hinton ثم يوزع المعلق البكتيري على كامل مساحة الطبق ونتخلص من الفائض بتفريغه في إناء يحتوي على ماء جافيل.

IV-4 - 4 - د - استعمال الأقراص:

وزعنا الأقراص بواسطة ملقط معقم حيث نضع كل قرص مشبع بتركيز المستخلص المخفف المعين في أحد الأجزاء للطبق المقسم بحيث نكون قد استخدمنا التراكيز المختبرة لكل سلالة في طبق واحد.

IV-4- 4- م- عملية الحضن:

بعد الانتهاء من عملية وضع الأقراص وضعنا الأطباق البترية المحتوية على السلالات البكتيرية في الحاضنة لمدة 18-24 ساعة عند درجة حرارة 37 م° [6] .

IV- 4 - 4- ن - قراءة النتائج:

بواسطة قياس طول منطقة التثبيط حول القرص الذي لم تنمو فيه السلالات البكتيرية لثلاث اختبارات متتالية.

IV-4-5- نتائج الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل لنبات

: *Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) letswaart

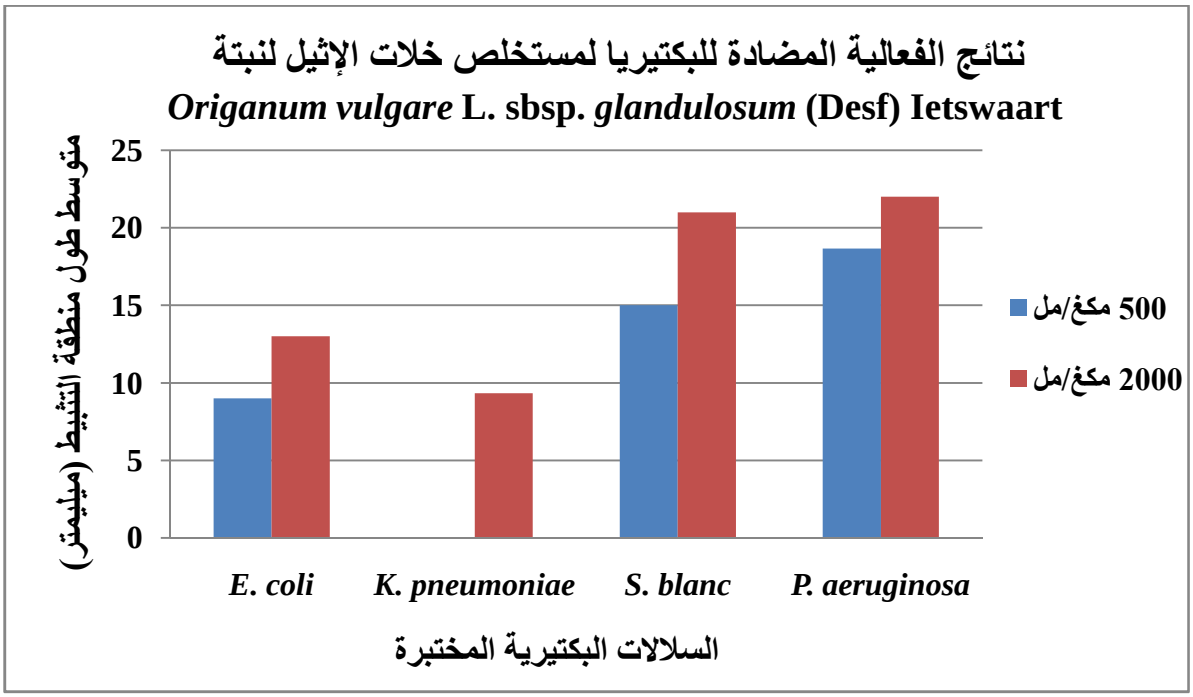
قمنا باختبار الفعالية المضادة للبكتيريا بالانتشار أجري على أربعة سلالات بكتيرية هي : *E.coli, Klebsiella pneumoniae ,Staphylococcus blanc ,Pseudomonas aeruginosa* بقياس طول منطقة التثبيط حول القرص بالميليمتر لثلاث اختبارات متتالية ،ثم حساب معدل هذه القياسات نحصل على النتائج في الجدول التالي:

الجدول IV- 13 : نتائج الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل للنبتة

***Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart**

السلالات البكتيرية	500 مكغ/مل	2000 مكغ/مل
E. coli ATCC 25922	9±1	13±1.73
Klebsiella pneumoniae	-	9.33±1.52
Staphylococcus blanc ATCC 27853	15±1	21±1
Pseudomonas aeruginosa	18.66±3.21	22±2.64

نقوم بتمثيل النتائج المحصل عليها في الرسم البياني (IV-1):



رسم بياني (IV- 1): نتائج الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل لنبتة

***Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart**

أظهرت نتائج الاختبار البيولوجي للمستخلص النباتي خلات الإثيل للنبتة *Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart أنه قد أثر على نمو البكتيريا في التركيزين 500 مكغ/مل و 2000 مكغ/مل ، وأن متوسط طول منطقة التثبيط يزداد بزيادة تركيز المستخلص ، حيث بلغ أقصى حد له عند 2000 مكغ/مل خاصة مع البكتيريا *Staphylococcus blanc* و *Klebsiella pneumoniae* بينما ينعدم تأثيره على البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

عند التركيز 500 مكغ/مل ، أما عند مضاعفة هذا التركيز إلى حوالي أربع مرات أي 2000 مكغ/مل فنلاحظ أنه يعطي نتيجة متوسطة مع هذه البكتيرية.

وبالنسبة للبكتيرية *E.coli* نلاحظ أن هذا المستخلص قد أعطى نتيجة متوسطة في التأثير على نمو هذه البكتيرية عند التركيزين المختبرين.

النتيجة:

نقول إذن عن هذه النبتة *Origanum vulgare* L. sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart (الزعتر) أن له فعالية مهمة في التأثير على نمو البكتيريا المختبرة في هذا البحث ، وبالتالي فإن له فائدة وأهمية كبيرة في الوقاية من العديد من الأمراض المعروفة كالتهاب الرئوي ، التهاب الأغشية الدماغية (التهاب السحايا)، التهاب المعدة والأمعاء .....إلخ

مراجع الفصل الرابع :

[1] Harborne, J.B.,(1988). The flavonoids, advances in research since 1980, Chapman and Hall, London.

[2] Mabry, T.J., Thomas, M.B., Markham, K.R.,(1970). The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag. Berlin, 41.

[3] Voirin, B., (1983).Phytochemistry, 22, 2107.

[4] Markham, K. R.,(1982). The techniques of flavonoids identification, eds. Academic press. London.

[5] Agrawal, P.K., (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids, Ed. Agrawal P.K , Elsevier,39.

[6] Carbonnelle, B. F., Denis, A., Marmonier, G., Rivargues, P.,(1987). Bactériologie Médicale-techniques usuelles, 224-243 .

الخـاتمـة

إن الغاية الرئيسية من هذا البحث هي التعرف على نواتج الأيض الثانوي والفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل للنبات :
Origanum vulgare L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart.

خلال قيامنا بهذا العمل قمنا بدراسة سردية عن الفلافونويدات، و عن الطرق المستخدمة في فصلها و تنقيتها ، وكذلك الطرق الفيزيو كميائية لتحديد بنيتها.

كما قمنا كذلك بدراسة سردية عن الجنس *Origanum* ، ودراسة إحصائية عن الفلافونيدات المفصولة منه ابتداء من سنة 1983 إلى غاية 2006 .

كذلك تطرقنا إلى التربينات واصطناعها الحيوي، إضافة إلى الزيوت الأساسية وطرق استخلاصها، مع ذكر وتحديد المفصولة منها عند بعض أنواع وأصناف الجنس *Origanum*.

اتبعنا في عملية الفصل جملة من الخطوات ابتداء من الاستخلاص، يليه فصل أولي بواسطة كروماتوعرافية العمود بعدها القيام بعملية الفصل باستخدام كروماتوغرافية الورق. و أخيرا عملية التنقية عن طريق استخدام عمود صغير من متعدد الأميد SC_6 .

من أجل التحديد البنيوي للمركبات المفصولة استخدمنا مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ، إضافة إلى تقنية HPLC/MS و قد تم فصل و تحديد ثلاث مركبات فلافونيدية:

- 5,4'-dihydroxy-7-O-α-D-glucosylflavone (Apigénin 7-O-α-D-glucosyl).
- 5,7,3',4',5'-pentahydroxy-3-O-α-L-Rhamnosyl flavonol (Myricétin-3-O-α-L- Rhamnosyl)
- 5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tetraméthoxyflavone (Hymenoxine)

و هي مركبات جديدة تم فصلها لأول مرة بالنسبة للصنف والجنس ككل.

في الأخير قمنا بدراسة الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل للنبات *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart، وقد كانت نتائجه إيجابية خاصة مع البكتيريا سالبة الجرام *Pseudomonas aeruginosa* و البكتيريا موجبة الجرام *Staphylococcus blanc* .

Résumé

L'objectif principal de ce travail est la séparation et l'identification des métabolismes secondaires de sous-espèce *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart, plante appartenant à la famille des Lamiaceae.

On a pu isoler trois produits flavoniques par les différentes techniques chromatographiques (colonne, papier, couche mince)

- 5,4'-dihydroxy-7-O-α-D-glucosylflavone (Apigénin 7-O-α-D-glucosyl).
- 5,7,3',4',5'-pentahydroxy-3-O-α-L-Rhamnosylflavonol (Myricétin-3-O-α-L- Rhamnosyl)
- 5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tetraméthoxyflavone (Hymenoxine)

Ces composés sont isolés pour la première fois de sous-espèce *Origanum vulgare* L. Sbsp *glandulosum* (Desf) Ietswaart ,et aussi du genre *Origanum.*

Les structures de ces flavonoïdes ont été bien établies grâce à l'utilisation des méthodes spectroscopiques usuelles (UV, RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, COSY $^{1}H^{1}H$, HMBC, HSQC et HPLC/MS).

Nous avons testé aussi l'activité biologique anti –bactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de sous-espèce *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart , et les résultats ont été positifs , surtout avec les bactéries Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* , et bactéries à Gram positif *Staphylococcus blanc.*

Mots clés:Lamiaceae, *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart, Flavonoïdes, Terpènes, Acétate d'éthyle.

abstract

The main objective of this work is the separation and identification of secondary metabolism of the subspecies *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart, belonging to the Lamiaceae family.

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

- 5,4'-dihydroxy-7-O-α-D-glucoside flavone (Apigenin7-O-α-D-glucoside).
- 5,7,3',4',5'-pentahydroxy-3-O-α-L-Rhamnoside flavonol (Myricetin-3-O-α-L-Rhamnoside).
- 5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tetramethoxyflavone (Hymenoxin)

These compounds are isolated for the first time from *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart subspecies and also in *Origanum* kind.

The structures of these compounds were well established using the usual spectroscopic methods (UV, HPLC/MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY ^{1}H-^{1}H, HMBC, HSQC).

In the end of this project we have tested the antibacterial activity of ethyl acetate extract of the subspecies *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart, and the results were positive, especially with Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa ,* and Gram-positive bacteria *Staphylococcus blanc.*

Key words: Lamiaceae, *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart , Flavonoids, Terpenes, Ethyl acetate.

الإسم: فريد اللقب: آيت كاكي	تاريخ المناقشة :03 جويلية 2011

مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية
شعبة: كيمياء النبات

تحت عنوان:

فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي و دراسة الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل لنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart

الملخص:

إن هدفنا الرئيسي من هذا البحث هو فصل والتعرف على نواتج الأيض الثانوي للنبتة *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart والتي تنتمي إلى العائلة الشفوية، وقد تمكنا من فصل ثلاث مركبات فلافونيدية باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (كروماتوغرافية العمود CC، كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة CCM، كروماتوغرافية الورق CP). واستخدمنا مختلف الطرق الفيزيائية من مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV، و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي (RMN ^{1}H, RMN ^{13}C , COSY ^{1}H-^{1}H , HMBC, HSQC)،إضافة إلى تقنية HPLC/MS في تحديد بنية المركبات المفصولة :

- 5,4'-dihydroxy-7-O-α-D-glucosylflavone (Apigénin 7-O-α-D-glucosyl).
- 5,7,3',4',5'-pentahydroxy-3-O-α-L-Rhamnosylflavonol (Myricétin-3-O-α-L- Rhamnosyl).
- 5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tetraméthoxyflavone (Hymenoxine).

و هي مركبات جديدة تم فصلها لأول مرة بالنسبة للصنف والجنس ككل.

إضافة إلى ذلك قمنا بدراسة الفعالية البيولوجية المضادة للبكتيريا لمستخلص خلات الإثيل للنبات *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart وقد كانت نتائجه إيجابية خاصة مع البكتيريا سالبة الجرام *Pseudomonas aeruginosa* و البكتيريا موجبة الجرام *Staphylococcus blanc*

الكلمات المفتاحية : فلافونيدات ،التربينات ، الشفوية ، نبات *Origanum vulgare* L. Sbsp. *glandulosum* (Desf) Ietswaart ، خلات الإثيل