

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
جامعة جيجل

معهد الكيمياء الحيوية  
والميكروبيولوجيا

كلية العلوم

مذكرة تخرج لنيل شهادة الدراسات العليا D.E.S  
فرع الكيمياء الحيوية

الموضوع:

استخلاص الملائفونويدات والزيوت الأساسية  
من النبتة العطرية  
***Thymus numidicus***

لجنة المناقشة:

إعداد الطلبة:

الرئيسة : رولة ساجية  
الممتحن: بن قدار لامية  
المشرفة: بوطغان نعيمة

خلف الله فاطمة الزهراء  
زازوة سامية  
شايب لبنى

السنة الجامعية : 2005 - 2006

# شكرًا

الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي

لو أن هدانا الله

قبل كل شيء نحمد الله عز وجل ونشكره

الذي وفقنا وأعاننا لإتمام هذا العمل

نتقدم بالشكر الجزيل إلى الأستاذة المشرفة "

بوطنان نعيمة"

على توجيهاتها خلال كل مراحل العمل

كما نتوجه بالشكر إلى الأستاذة

"العقون سهيلة"

ولجنة التقويم

ونتقدم بجزيل الشكر لكل فرد من أفراد

مخبر الكيمياء الحيوية

ونخص بالذكر السيدة "هورية"

شكرًا

الصفحة	العنوان	الفهرس:
1	مقدمة .....	
	الجزء النظري	
	أولاً: الدراسة النباتية	
3	1 . التصنيف .....	
3	2 . الوصف النباتي لعائلة الشفويات .....	
3	- الخصوصيات العامة .....	
4	- أهمية نباتات هذه الفصيلة .....	
4	- بعض نباتات هذه الفصيلة .....	
6	3 . التعريف بنبات الجنس <i>Thymus</i> .....	
6	4 . الموطن الأصلي لنبات الجنس <i>Thymus</i> .....	
6	5 . أنواع الجنس <i>Thymus</i> الموجودة في الجزائر .....	
8	6 . الوصف النباتي لنبات الجنس <i>Thymus</i> .....	
8	7 . التركيب الكيميائي .....	
9	8 . الأهمية العلاجية لنبات الجنس <i>Thymus</i> .....	
9	9 . الأهمية الاقتصادية لنبات الجنس <i>Thymus</i> .....	
	ثانياً: الفلافونويدات	
10	1 . مدخل .....	
10	2 . تعريف الفلافونويدات .....	
11	3 . خواص الفلافونويدات .....	
11	4 . تصنيف الفلافونويدات .....	
14	5 . الاصطناع الحيوي للفلافونويدات .....	
16	6 . الفعالية البيولوجية .....	
17	7 . الدور الفيزيولوجي .....	
	ثالثاً: الزيوت الأساسية	
18	1 . تعريف الزيوت الأساسية .....	
18	2 . أماكن تواجد الزيوت الأساسية و توزيعها .....	

18	.....	3 . خصائص الزيوت الأساسية
21	.....	- الخصائص العلاجية
22	.....	4 . استخلاص الزيوت الأساسية
		<b>الجزء التحليلي</b>
23	.....	I. وسائل العمل
24	.....	II. طريقة العمل
24	.....	1 . السحق
24	.....	2 . الاستخلاص (سائل - صلب)
24	.....	3 . التبخير
25	.....	4 . الاستخلاص (سائل - سائل)
26	.....	5 . التبخير
28	.....	6 . التعرف على المحتوى الفلافونويدي لمختلف المستخلصات
28	.....	أ-الكروماتوغرافيا التحليلية على الورق
28	.....	-كروماتوغرافيا الورق أحادية البعد
29	.....	-كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد
29	.....	ب-الكروماتوغرافيا على الطبقة الرقيقة CCM
30	.....	7 . استخلاص الزيت الأساسي لـ <i>Thymus numidicus</i>
30	.....	8 . الدراسة التحليلية لـ <i>Thymus numidicus</i>
30	.....	-تقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي GC
31	.....	-تقنية GC/MS
33	.....	III. النتائج
33	.....	- حساب معامل الاحتباس
36	.....	-الخرائط الكروماتوغرافية
40	.....	IV. مناقشة النتائج
41	.....	<b>الخاتمة</b>
42	.....	<b>المراجع</b>
47	.....	<b>الملخص</b>

الصفحة	الشكل
5	شكل 1: بعض نباتات العائلة الشفوية .....
7	شكل 2: التوزيع الجغرافي لأماكن القطف .....
8	شكل 3: <i>Thymus numidicus</i> .....
24	شكل 4: جهاز التبذ Rotavapor .....
25	شكل 5: عملية استخلاص طور الخلات .....
26	شكل 6: عملية استخلاص طور البوتانول .....
26	شكل 7: مختلف الطبقات العضوية المستخلصة .....
30	شكل 8: جهاز استخلاص الزيوت الأساسية (Clavenger) .....
36	شكل 9: خريطة كروماتوغرافية فلافونويدية أحادية البعد للمستخلصات (إيثير البترول، الكلوروفورم، خلات الإيثيل، البوتانول)
37	شكل 10: خريطة كروماتوغرافية فلافونويدية ثنائية البعد لمستخلص خلات الإيثيل .....
38	شكل 11: خريطة كروماتوغرافية فلافونويدية ثنائية البعد لمستخلص البوتانول .....
39	شكل 12: خريطة كروماتوغرافية (CCM) متعدد الأبعاد للمستخلصات (الكلوروفورم، خلات الإيثيل، البوتانول)

الصفحة	الجدول
20	جدول 1: بعض الخصائص البيولوجية و العلاجية للزيوت الأساسية .....
31	جدول 2: أهم المركبات الداخلة في تركيب الزيت الأساسي للـ <i>Thymus numidicus</i> .....
33	جدول 3: نتائج طور البوتانولي للجملة (S <sub>1</sub> ) .....
33	جدول 4: نتائج طور خلاص الإيثيل للجملة (S <sub>1</sub> ) .....
33	جدول 5: نتائج طور الكلوروفورم للجملة (S <sub>1</sub> ) .....
34	جدول 6: نتائج طور البوتانول للجملة (S <sub>2</sub> ) .....
34	جدول 7: نتائج طور خلاص الإيثيل للجملة (S <sub>2</sub> ) .....
34	جدول 8: نتائج طور البوتانول للجملة (S <sub>3</sub> ) .....
35	جدول 9: نتائج طور الكلوروفورم للجملة (S <sub>3</sub> ) .....

فهرس المخططات:

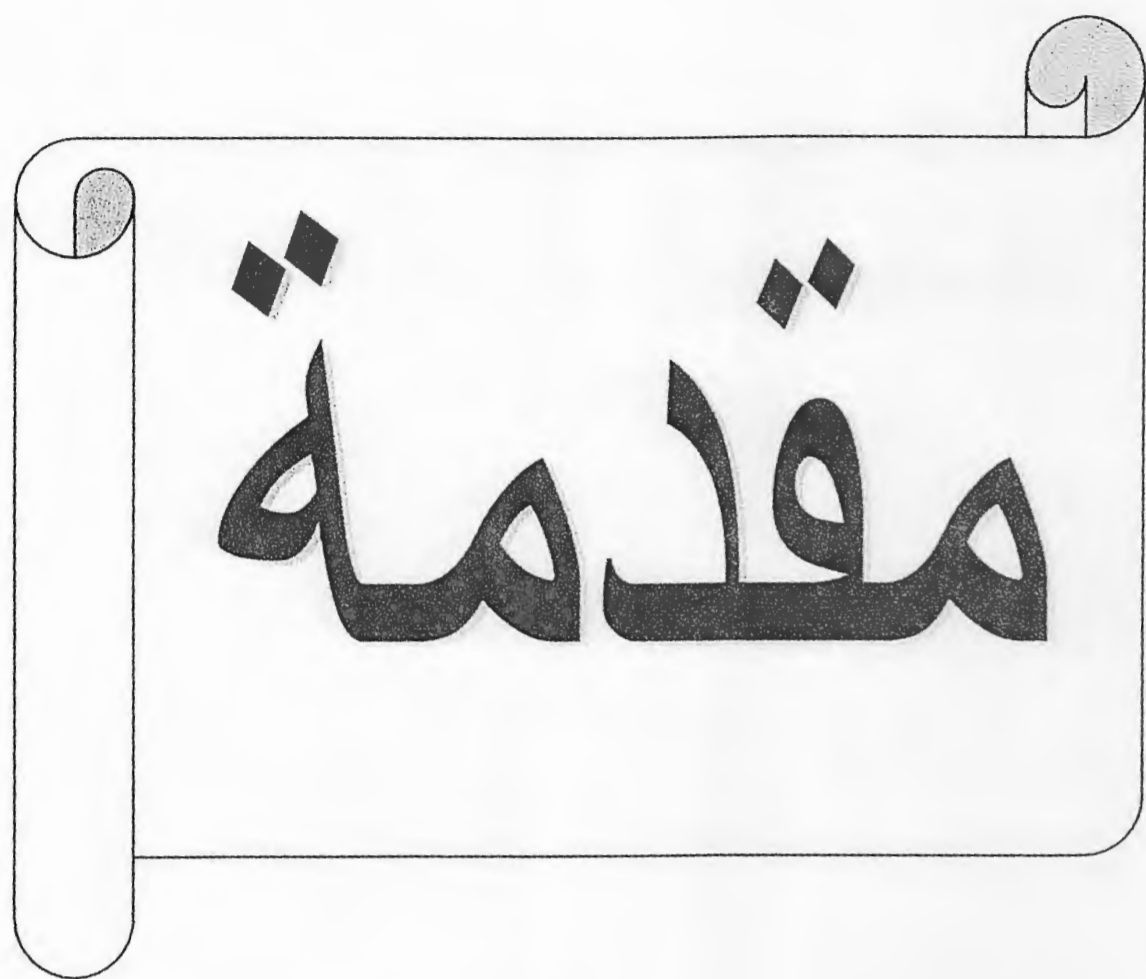
المخطط

الصفحة	المخطط
10	مخطط 1: البنية المشدكة لجميع الفلافونويدات .....
13	مخطط 2: بعض الهياكل الفلافونويدية .....
15	مخطط 3: الاصطناع الحيوي للفلافونويدات .....
27	مخطط 4: مخطط عام لمراحل استخلاص الفلافونويدات .....

الملحق: قائمة الأنزيمات المستخدمة في التصنيع الحيوي للفلافونويدات

الرقم	الإنزيم ( Enzyme )	العامل المرافق Cofacteur
I	Acétyl- CoA	لا يوجد
II	Phényl alanine -lyase ( PAL)	لا يوجد
III	Cinnamate 4- hydroxylase ( C <sub>4</sub> H )	NADPH
IV	4-Coumarate: COA ligase ( 4 CL )	CO-sh ATP
1	Chalcone synthase ( CHS )	لا يوجد
2	Polyketide réductase ( P K R)	NADPH
3	Chalcone isomérase ( C H I )	لا يوجد
4	2- hydroxyisoflavanone synthase ( I F S )	NADPH
5	2- Hydroxyisoflavanone déhydratase	لا يوجد
6	Flavone synthase ( F N S )	NADPH
7	Flavanone 3-hydroxylase ( F H T )	2-Oxoglutarate Fe <sup>+2</sup> Oxoparate
8	Flavonol synthase ( F L S )	2-Oxoglutarate Fe <sup>+2</sup> Oxoparate
9	Dihydroflavonol 4-réductase ( D F R )	NADPH
10	Flavanone 4- réductase ( F N R )	NADPH
11	Anthocyanin synthase ( A N S )	غير معروف







و قد حان الوقت الذي تعلم فيه البلاد العربية قيمة هذه الثروات التي منحها لها الطبيعة و ازدهرت في مناخها المعتدل و تربتها الخصبة. فالدراسة الكيميائية للنباتات الطبية الناجحة لا تكون إلا بتحقيق المعايير التالية :

- ✓ أن يكون النبات ذا فائدة طبية معروفة .
- ✓ أن يكون من النباتات المستغلة عالميا .
- ✓ أن يكون متوفرا بنسبة مقبولة .

و قد كانت هذه المعايير الثلاث من بين أسباب اختيارنا للنوع النباتي *Thymus numidicus* لأن الدراسة المكتبية تؤكد تطابق هذه المعايير مع الجنس *Thymus* و يعود ذلك لاحتوائه على مركبات كيميائية متنوعة ( ذات فائدة طبية) منها التربينات، القلويدات، و أكثرها الفلافونويدات و قد كانت هذه الأخيرة محور بحثنا هذا.

الأجزاء

النظري

أولا - الدراسة النباتية لنبات الجنس *Thymus*: [12،13،14]

### 1. التصنيف :

Rauyaunne	Plantes	المملكة
Embranchement	Angiosperme	الشعبة
Division	Phamérogame	الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
S/classe	Gamopétales	ت/الصف
Ordre	Tubuflorales	الرتبة
Famille	<i>Lamiaceae</i>	العائلة
Genre	<i>Thymus</i>	الجنس
Espèce	<i>T. numidicus</i>	النوع

### 2. الوصف النباتي لعائلة الشفويات ( *Lamiaceae* ): [12]

إن نباتات العائلة الشفوية هي نباتات مزهرة تتمتع بتغيرات عديدة و مختلفة و هي ثلاثية المواسم أزهارها أنثوية .

تعتبر عائلة الشفويات من ضمن النباتات الأولى التي جلبت اهتمام علماء النباتات و هذا لجملتها من الخصوصيات.

#### ◀ الخصوصيات العامة :

- ❖ عادة ما تكون في شكل شجيرات تنمو بالبساتين تحت ظل الأشجار الكبيرة و تعتبر من النباتات العشبية التي تتبع منها روائح عطرة لها سيقان رباعية .
- ❖ ذات أوراق مركبة فوق بعضها البعض منفصلة متجهة عادة نحو الأعلى و هي تتكاثف في قمة الساق على شكل سنابل .
- ❖ أزهارها مجتمعة على شكل إكليل مكون من أجزاء منفصلة متجهة عادة نحو الأعلى و هي تتكاثف في قمة الساق على شكل سنابل .
- ❖ تتكون الأزهار النهائية بعد نضجها من خمسة أجزاء في شكل شفاه مندفعة في شكل أسطواناني طولي مكونة عادة أربعة إلى خمسة أكاليل متجانسة و لها من الجهة السفلية شفاه واحدة تكون منتفخة قليلا أما الشفاه العلوية فهي أقل انتفاخا .
- ❖ تتركز أزهارها على وسادة مكونة من أربع قواعد مرنة و تكون الخامسة صغيرة جدا و في بعض الأحيان منعدمة تماما .
- ❖ تتكاثر بغلافين بهما بويضات مقسمين بفاصل يميز حجرتين لوضع البويضات بصورة متجانسة.

- ❖ تتكاثر بنفس طريقة تكاثر النبات المحتوي على البويضات و حبات الطلع ليكون التخصيب ذاتي.
- ❖ تتكون ثمارها من أربع أكتان ملتحمة عن طريق الجهة الداخلية .

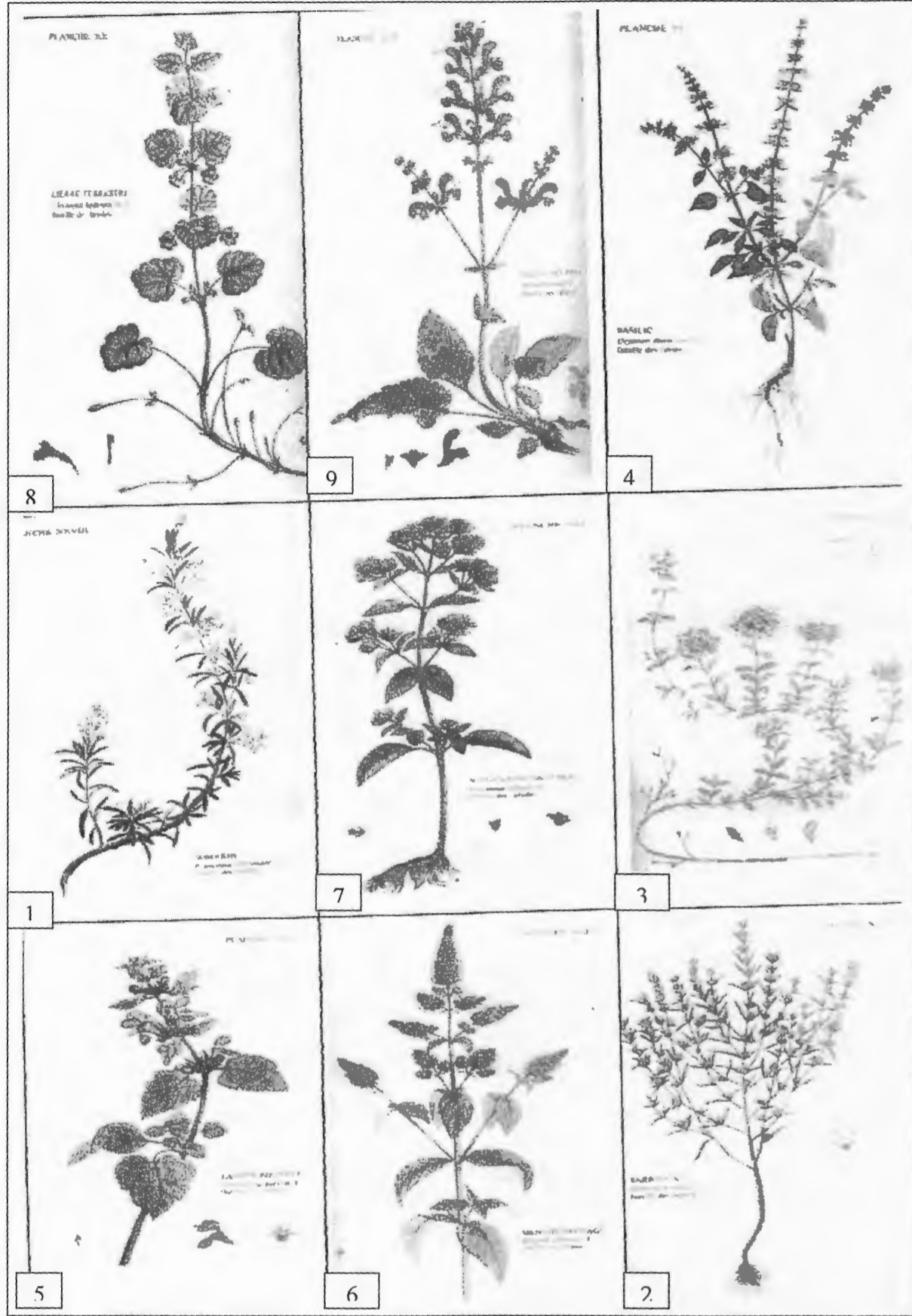
◀ أهمية نباتات هذه الفصيلة :

و من ضمن عائلة هذه الفصيلة من النباتات نجد معظم النباتات العطرية المستعملة في التقطير و الصيدلة و في تحضير الأطعمة و التوابل .

هذه الفصيلة تستلهم خصائصها من التسع المتواجد في الأوبار النسيجية و المستعمل في التقطير من أجل صناعة العطور و الأدوية .

◀ بعض نباتات هذه الفصيلة : [15]

1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	ROMARIN..
2. <i>Satureia hortensis</i>	SARRIETTE.
3. <i>Thymus serpyllum</i>	SERPOLET.
4. <i>Ocymium basilium</i>	BASILIC.
5. <i>Lamium purpurem</i>	LAMIER POURPRE.
6. <i>Mentha sylvestris</i>	MENTHE SAUVAGE.
7. <i>Origanum vulgare</i>	MARJOLAINE SAUVAGE.
8. <i>Glechoma hederaceum</i>	LIERRE TERRESTRE.
9. <i>Salvia pratensis</i>	SAUGE DES PRÉS.



شكل 1: بعض نباتات العائلة الشفوية [15].

3. التعريف بنبات الجنس *Thymus* :

الزعر نبتة صغيرة، معمرة، شبه شجيرية تنمو في الأراضي الكلسية الجافة و الصخرية المعرضة للشمس، في المناطق المتوسطة حتى ارتفاع 1500م، ذات خصائص طبية و عطرية [12].

4. الموطن الأصلي لنبات الجنس *Thymus* :

تمثل منطقة البحر المتوسط و لا سيما السواحل الجنوبية لقارة أوروبا و الشمالية لقارة أفريقيا، المنشأ الرئيسي لأنواع هذا الجنس بالرغم من وجودها بريا في آسيا الصغرى و جنوب شرق آسيا و انتشرت زراعته في معظم بقاع العالم و خاصة البيئات المعتدلة الحرارة و من أهم البلدان المنتجة هي: إسبانيا و فرنسا و المغرب و البرتغال و اليونان و أمريكا الشمالية و روسيا [4].

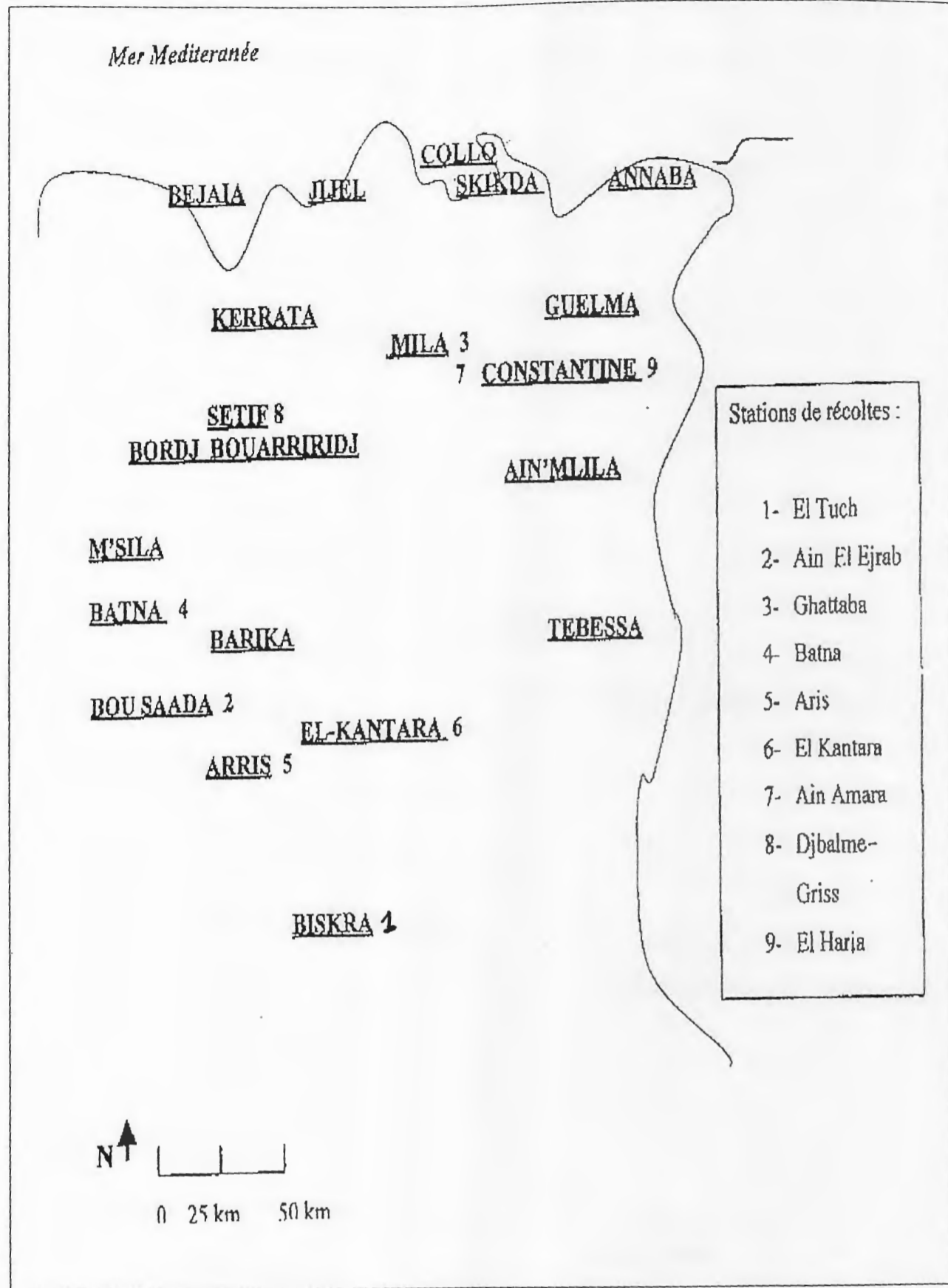
5. أنواع الجنس *Thymus* الموجودة في الجزائر:

حسب Quezel [16] تعتبر الجزائر مهدا خصبا لأكثر من حوالي 26 نوع من الزعر، تختلف سواءا من الناحية المورفولوجية أو من الناحية الكيميائية. أهم هذه الأنواع :

1. *Thymus capitatus* .
2. *Thymus fontanesü* .
3. *Thymus commutatus* .
4. *Thymus numidicus* .
5. *Thymus lanceolatis* .
6. *Thymus pallidus* .
7. *Thymus hirtus* .
8. *Thymus glandulosus* .
9. *Thymus algeriensis* .
10. *Thymus ciliatus* .
11. *Thymus gyosuidenoé* .
12. *Thymus numidices* .
13. *Thymus vulgaris* .

تتوزع هذه الأنواع في شرق و جنوب الجزائر [13] و الخريطة التالية توضح الموقع الجغرافي لهذه الأنواع :

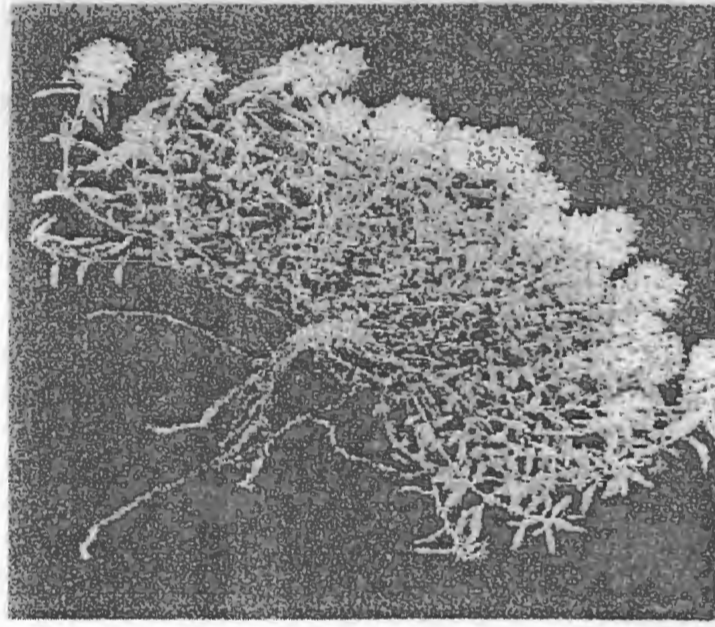




شكل 2: التوزيع الجغرافي لمراكز القطف .

6 . الوصف النباتي لنبات الجنس *Thymus*:

نباتات عشبية أو شجيرية، مستديمة الاخضرار و معمرة طويلا و يبلغ ارتفاعها أكثر من 50 سم، متميزة بالتفرع الغزير القائم أو الزاحف، و النمو إما يكون قويا أو محدودا [4].  
عروقها صلبة، خشبية و من هذه العروق تخرج سيقان عديدة مستقيمة، أسطوانية، رمادية أو سمراء مائلة للحمرة، مزغبة قليلا [5].  
و الأوراق صغيرة الحجم و بسيطة، لونها رمادي مخضر أو فضي لوجود الأوبار على سطحها و حافظها كاملة [4].  
الأزهار وردية أو بيضاء تظهر ابتداء من شهر ماي إلى غاية شهر أكتوبر، صغيرة سنبلية، تخرج من تحت إبط الأوراق. الأكبر حجما لها كأسا محدب ذو شعيرات قاسية، لها 3 أسنان علوية عريضة مبيضان منخفضان، مستدقان، تويج لها شفتان و 4 أسدية [6].  
الثمار رباعية الفقيرات ملساء، صغيرة الحجم، لونها داكن، موجودة داخل الكأس الذي أصبح قاس أو جلديا، مطبقة بها العديد من البذور المجعدة [7].

شكل 3: *Thymus numidicus*.

## 7 . التركيب الكيميائي :

يحتوي نبات الجنس *Thymus* على زيت عطري طيار، رائحته قوية و طعمه حار [8]. يحتوي على مواد فينولية بنسبة 52% أثناء النمو الخضري و 59.5% في موسم التزهير.

تتكون من الثيمول (نسبتها في العشب غير المزهر حوالي 70% بينما في المزهر 98.6%) وأخرى غير فينولية تتكون من *P-cymène, Terpinène, Bornéol*. بجانب ذلك أعلن Granger و آخرون أن نسبة المركبات و نوعيتها تختلف باختلاف مراحل التطور خلال موسم التزهير و النضج [4].

#### 8. الأهمية العلاجية لنبات الجنس *Thymus* :

لقد تم استعمال هذا الجنس *Thymus* في المجال الطبي منذ القدم حيث كانت له أهمية كبيرة و ذلك بفضل ما يملكه من خصائص علاجية جد مفيدة و مهمة دون إحداث أي مضاعفات ثانوية فقد استعمل في الطب الشعبي لعلاج الكثير من الأمراض و خاصة منقوعه المائي الذي يفيد تناوله في حالة السعال الديكي و الكحة و الالتهابات التنفسية كما ثبتت فعاليته في شفاء مرض التهاب الكبد [4].

بالإضافة إلى ذلك له دور في معالجة فقر الدم الغذائي و انتفاخ و تقلصات المعدة و الأمعاء و التقليل من ألم داء المفاصل و في وقاية انتشار الوباء، كما يستعمل لفتح الشهية [6].

و الخصائص المميزة للمادة العطرية الموجودة في النبات كالثيمول و الكرفاكرول تملك نشاط مضاد للجراثيم [17،18]. (البكتريا، الفيروسات، الفطريات و الديدان) فهو له تأثير قاتل للفطريات خاصة من النوع *Coccidiose* [19].

و تأكد أن زيت الزعتر بقوة 5% لديه القدرة على قتل و إبادة جرثومة مرض التيفوس و الدوسنتاريا خلال دقيقتين فقط، و كذلك بعض جراثيم القولون خلال 8 دقائق بينما يقضي جرثومة السل خلال 30 - 60 د [9].

و تستخدم حمامات مغلى الزعتر لحالات الرمد و إجهاد العينين، لتسكين آلام الأسنان، و التهاب اللوزتين، لحالات الإرهاق العصبي و الأكرزما المزمنة [6].

و لا تقتصر الأهمية العلاجية لنبات الزعتر على الأمراض العضوية فحسب بل تتعدى فاعليته بعض الأمراض و الاضطرابات النفسية [20].

#### 9. الأهمية الاقتصادية لنبات الجنس *Thymus* :

لقد أصبح لنبات الجنس *Thymus* أهمية كبيرة في المجال الاقتصادي نظرا لما يحتويه من خصائص غذائية متعددة كدخوله في معظم منتجات الصناعات الغذائية سواء على شكل توابل بالإضافة إلى منتجات اللحوم و الخضرة و منتجات الأسماك المختلفة ذلك لإكسابها الطعم و الرائحة .

يدخل الزيت الأساسي لنبات الزعتر في صناعة المشروبات الروحية و غير الروحية، كما يدخل في صناعة مستحضرات التجميل و إنتاج بعض أنواع العطور و الصابون [4].

كما يدخل في تركيب معاجين الأسنان و يعمل منه محلول مطهر لغسل الأنف و الفم و يدخل في صناعة بعض أدوية الزكام و السعال و التهابات الحلق [9].

ثانيا - الفلافونويدات :

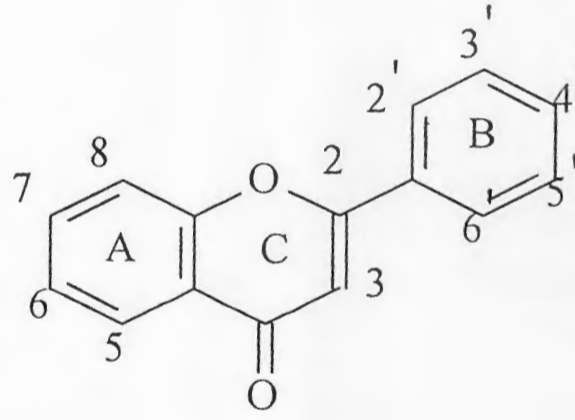
1. مدخل :

تشكل المركبات الفينولية بنى العديد من المنتجات الطبيعية و تتميز بوجود على الأقل نواة بنزان تكون مرتبطة مباشرة على الأقل بمجموعة هيدروكسيل حرا أو مرتبطة بوظيفة أستر، إيثير أو جزيئة سكر ( أي على شكل إيثيروزيد )، من بين المركبات:

بالإضافة إلى les acides cinnamiques ,les derives anthracéniques ,les phenols ,les quinines الأحماض الفينولية و المركبات متعددة الفينول les polyphénols. هذه الأخيرة تحتوي على أكثر من حلقة عطرية و تعتبر من الفينولات الأكثر تعقيدا في بناءها و الأكثر انتشارا في الطبيعة و قد حظيت هذه المركبات بالدراسة الوافرة [3] و من أهمها الفلافونويدات المتواجدة في معظم الأصناف النباتية تقريبا.

تعريف الفلافونويدات :

الفلافونويدات عبارة عن صبغات متواجدة في النباتات و تنتشر في أجزائها النباتية المختلفة من جذور و خاصة الأوراق و الزهور إذ تنسب إليها خاصية تلونها. أما على مستوى الخلية فتتواجد بشكل إيثيروزيدات hétérosides ذوابة في الماء متمركزة في حويصلة الخلية، و بشكل أجليكونات Aglycones في الأنسجة السطحية للأوراق، أما عديدة الميثوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية [22،21]. تم عزل وتحديد أكثر من 4300 فلافونويد في صورة إيثيروزيدية و أجليكونية [24،23]. أما من الناحية البنائية فتحتوي الفلافونويدات على 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>، نواتين عطريتين A و B تجمعهما حلقة C غير متجانسة، تحتوي على عنصر الأكسجين.



المخطط 1 : البنية المشتركة لجميع الفلافونويدات .

و تبعا لدرجة تأكسد الحلقة غير المتجانسة نستطيع تقسيم الفلافونويدات إلى مايلي :

- 2-Phenyl chromones .
- Flavones , Flavonols .

- Flavanones3 et Dihydroflavonols .
- Isoflavones , Isoflavanones .
- 2-Phenyl chromanes .
- Flavanes .
- Flavan -3- ol ,Flavan -3-4- diols .
- Chalcones et Dihydrochalcones .
- 2- benzylidène coumaranones.
- 2- phenyl benzopyriluims . [10]

### 3 . خواص الفلافونويدات :

تذوب الفلافونويدات في القواعد القوية لأنها مركبات فينولية تمتاز بصفة حمضية ضعيفة، و تزيد قطبيتها إذا كانت تحتوي على عدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو جزيئة سكر أو أكثر و بالتالي تكون ذوابة في المذيبات القطبية، و تذوب في المذيبات الأقل قطبية كالكلوروفورم إذا كانت تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل [3].

### 4 . تصنيف الفلافونويدات :

#### • الفلافون و الفلافونول :

تمثل أغلبية الفلافونويدات حيث تتواجد بنسبة 80% من مجموعها. تكون الحلقة A مستبدلة بنسبة 90% في الموقعين 5 و 7 بواسطة مجموعات هيدروكسيل حرة، أو ممثلة أو على شكل إيتيروزيد أي مرتبطة بسكر.

يمكن أن تكون هناك مستبدلات أخرى بدرجات متفاوتة، فمثلا قد يوجد استبدال في الموقع 6 أو 8 بواسطة هيدروكسيلات حرة أو إيزوبروبينيل أو جزيئة سكر.

أما بالنسبة للحلقة B فتكون مستبدلة بنسبة 80% في الموقع '4 مع احتمال أن تكون ثنائية الإستبدال في '4 و '3، أو ثلاثية الإستبدال في المواقع '3، '4 و '5 و هذا بنسبة أقل، أما المواقع '2، '6 فنادرا ما تكون مستبدلة، هذه المستبدلات غالبا ما تكون مجموعة هيدروكسيل حرة أو مجموعة ميثوكسيل [25].

نستطيع تطبيقيا إيجاد جليكوزيدات الفلافونولات في جميع أنسجة النباتات الراقية حيث يتواجد البعض منها على شكل Anthoxanthines الذي يعطي اللون الأصفر الفاتح للأزهار [26].

تتواجد الفلافونولات في مختلف الخضر و الفواكه خاصة البصل، التفاح و الشاي [54] .

#### • الفلافانول و ثنائي هيدروفلافونول :

يتميز هذا الصنف بغياب الرابطة الثنائية في الموقع C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> [25].

تتواجد الفلافانولات في الحمضيات [54].

• الفلافونويدات الثنائية :

يمكن للفلافونويدات أن ترتبط فيما بينها و تشكل مركبات ثنائية ( ديمرة) يكون هذا الارتباط في الموقع 6 أو 8، أغلبية الفلافونويدات الثنائية عبارة عن ديمرة بين الفلافون و الفلافانول 5، 6، 4 ثلاثي الإستبدال [26].

• الشالكونات و الأورونات :

تتميز الشالكونات بغياب الحلقة غير المتجانسة، وجود سلسلة ثلاثية الكربون سيتونية  $\beta, \alpha$  غير مشبعة، و تكون الحلقة B فيها غير مستبدلة بينما الحلقة A فمستبدلاتها تماثل ذلك في الفلافونويدات الأخرى أما الأورونات فتتميز بالصيغة 2 benzylidene coumaranone [26].

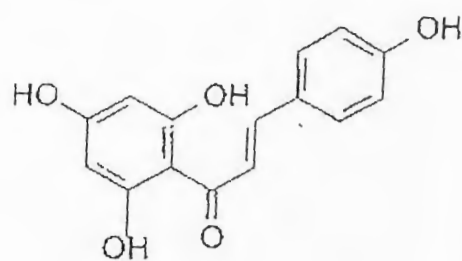
• الأنثوسيانيدين (Anthocyanidines) :

عبارة عن أجليكونات Anthocyan ( جليكونات ) هذه الأخيرة عبارة عن صبغات فجوية حمراء أو زرقاء في كل النباتات [26].

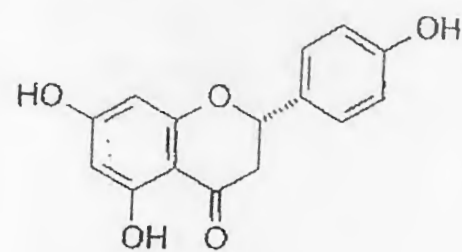
تتواجد في الفواكه و الخضر [54].

• الإيزوفلافونات ( Isoflavones ) :

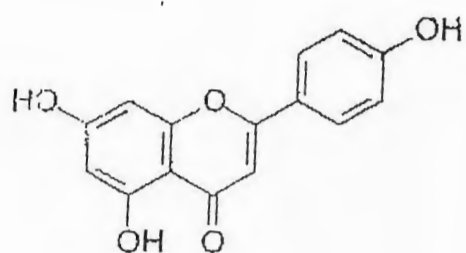
متميزة بخصائصها الإستروجينية و متواجدة في الصوجا [54].



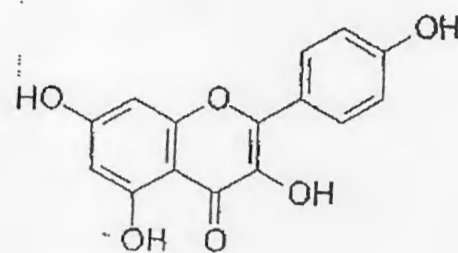
Naringénine chalcone (chalcone)



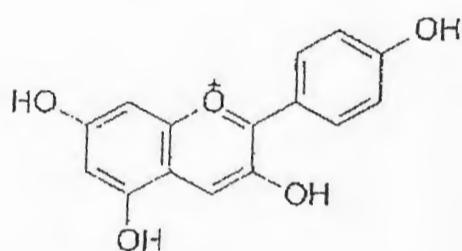
Naringénine (flavanone)



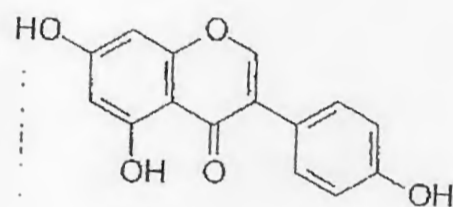
Apigénine (flavone)



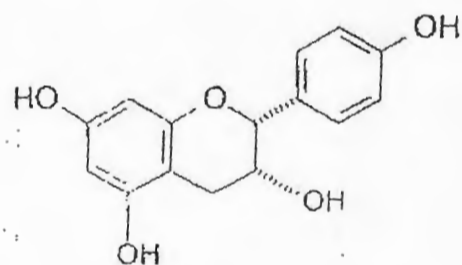
Kaempférol (flavonole)



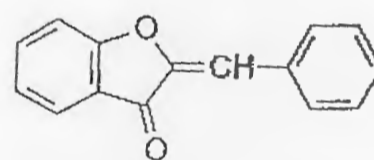
Pélargonidine (anthocyanidine)



Génisteine (isoflavone)



Epiafzelechine (flavan-3-ol)



Aurone

المخطط 2: بعض الهياكل الفلافونويدية.

## 5 . الإصطناع الحيوي للفلافونويدات :

الإصطناع الحيوي للمركبات الطبيعية هو الطريقة التي تتكون بواسطتها هذه المركبات داخل مصادرها الطبيعية، حيث أن التفاعلات لا تتعدى أن تكون تفاعلات أكسدة، إختزال، ألكة ذرة نيتروجين أو أكسجين، حذف ثنائي أكسيد الكربون من مجموعة كربوكسيل ..... إلخ .  
و من المعتقد أن الوحدات الأساسية التي تستخدمها الخلية في صنع المركبات الطبيعية هي الماء، ثاني أكسيد الكربون، حمض النمل، حمض الخل و يكون هذا الأخير داخل الجسم على هيئة مشتق لأستيل مرافق الإنزيم A حيث يعتبر هذا المركب وحدة أساسية تبدأ منها عملية بناء معظم المركبات الطبيعية و يتم ذلك وفق مسارات مختلفة [27،25].

بالنسبة للفلافونويدات تتم عملية التصنيع الحيوي داخل البلاستيدات الملونة انطلاقا من CinnamoylCOA الآتي من الشبكة الأندوبلازمية المحيية و المالونات ( Malonate ) مركبة في شكل إيثيروزيدات، حيث أن البعض منها يغادر البلاستيدة و يتراكم في الفجوة مثل الأنثوسيانينات [28].  
و قد أعطت تجارب الوسم بالنظائر المشعة نتائج هامة فيما يخص الإصطناع الحيوي للفلافونويدات، حيث أثبتت بأن الهيكل الفلافونويدي ينحدر من طريقتين مختلفتين [30،29].

## • طريق الشيكيميك :

بتدخل إنزيمين مفتاحين Phenylalanine ammonialyase و Tyrosine ammonialyase .

## • طريق الخلات :

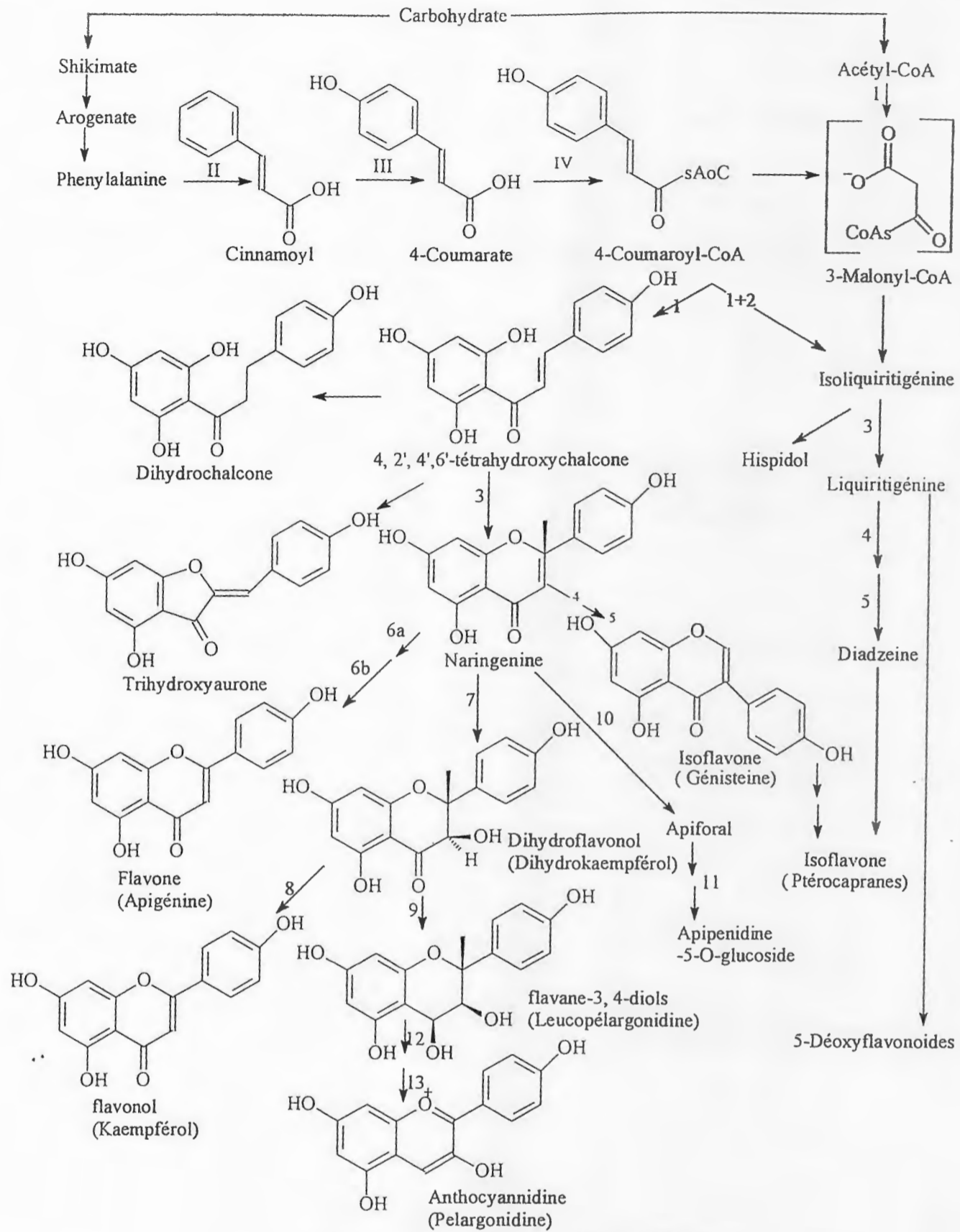
بتدخل إنزيم Chalcone synthase الذي يعتبر الإنزيم المفتاحي لتشكيل الهيكل الفلافونويدي، حيث أنه يخفز تدريجيا تكاثف ثلاث وحدات الخلات من Malonyl COA و 4-Coumaroyl إلى 4,2,4',6'-Tetrahydroxychalcone الذي يعتبر نقطة انطلاق لإصطناع العديد من الفلافونويدات الأخرى و هذا بوجود محفزات إنزيمية تخص كل مرحلة من المراحل المختلفة .  
نحصل على الأورونات Aurones مباشرة من الشالكون كوسيط بدون محفز .  
و للحصول على الفلافانون فإنه تجري عملية تحويل فراغية نوعية للشالكون بفعل إنزيم Chalcone isomerase .

أكسدة الفلافانون ثم إعادة ترتيب متمثلة في إزاحة مجموعة الأريل من C<sub>2</sub> إلى C<sub>3</sub> تؤدي إلى إيزوفلافون.

تشكيل رابطة ثنائية بين C<sub>2</sub> و C<sub>3</sub> للفلافانون يقود إلى فائض من مجموعات الفلافون مثل Apiginine يتم هذا التفاعل بتحفيز أنزيمات مختلفة منها Flavone synthase , Flavanone 3- hydroxylase فيحفز تفاعل إضافة الهيدروكسيل للفلافانون في الوضع C<sub>3</sub> إلى Dihydroxyflavanol، و يعتبر هذا الأخير



كمرحلة وسطية لتشكيل الفلافونولات و من أمثلتها Kaempferol الذي يتم تكوينه بإدخال رابطة بين C<sub>2</sub> و C<sub>3</sub> في وجود إنزيم Flavonol synthase [10].



## 6 . الفعالية البيولوجية :

بدأ البحث عن الفعاليات الأساسية في بداية القرن 19 مع فصل المركبات القلوية التالية : المورفين، الستريكينين و الكنين مسجلا بذلك بداية أول تطور للبحث في مجال النباتات الطبية [31] حيث سجل هذا البحث قفزة في منتصف القرن العشرين مع التطور المذهل للكيمياء الصناعية الصيدلانية .  
فالطرق الجديدة القائمة على التزاوج بين الاختبارات البيولوجية و تقنيات التحليل أدت إلى تقدم ملحوظ في هذا المجال حيث كان الاهتمام موجها خاصة نحو التداوي ضد السرطان و ضد الـ HIV [32،33].

و تؤثر المركبات في بعض النباتات على السرطان من خلال :

— تقوية الجهاز المناعي و ذلك بمساعدته على مقاومة و تدمير الخلايا السرطانية .

— إقتناص الجذور الحرة المؤكسجة ( فعالية مضادة للتأكسد ) [34،35].

فالفلافونويدات مثلا أظهرت قدرة على تحفيز عدد كبير من الأنزيمات منها :

AMP<sub>c</sub> phosphodiesterase , Phosphatases, Cyclooxygenases , Hydrolases , العديد من

Kinases و Hydroxylases, Transférases , Oxidoréductases, Lyases, ATPases [36].

فالدراسة المكثفة للفلافونويدات كشفت بأنها عبارة عن مركبات ، مضادة للسرطان [37] ، مضادة

لارتفاع الضغط ، مضادة للالتهاب ، مضادة للحساسية ، مضادة للتسمم الكبدي [38].

فالعديد من الدراسات *In vivo* و *In vitro* حول نشاط الفلافونويدات المضاد للفيروسات قد تم نشرها

كالدراسة التي أجراها ( Che, 1991 ) و التي ساهمت في إعطاء فهم جديد و توضيح للآلية الفيزيو-

باثولوجية ( الفيزيو-مرضية للتضامن الفيروسي ) و تبين أن مجموعة 3-ميثوكسي، وظيفية الكربونيل و

الرابطية المزدوجة C<sub>2</sub> - C<sub>3</sub> ضرورية لإحداث التأثيرات المضادة للفيروسات .

و توصلت الأبحاث كذلك إلى أن الزيادة في عدد مجاميع الهيدروكسيل ( -OH ) على الحلقة A و

B ينتج عنها زيادة في النشاط المضاد للورم، كما تعتبر الرابطة المضاعفة C<sub>2</sub> - C<sub>3</sub> ضرورية لإحداث

النشاط ( Geahlen et . 1989 ) [39].

كما اتضح بعد دراسة فارماكولوجية أن الفلافونويدات هي أساس أدوية العجز الوريدي، إذ تعتبر

منشطات للأوردة و في نفس الوقت تقلل نفاذية الأوعية الشعرية، كتأثيرها على جدار الأوعية و كذا

خواصها المضادة للالتهاب و هي أصل استعمالها في التطبيب كحاميات أوعية ( Vasculo-protecteurs )

أو مقويات وريدية ( Veinotonique ) . و ترتبط الآليات الواقية للفلافونويدات ضد الأمراض القلبية

الوعائية cardiovasculaire بتأثيراتها المضادة للتأكسد أو فعلها المباشر على المركبات الداخلة في

عمليات توليد الإصابات الشريانية مثل تثبيط التجلط و تثبيط الظواهر الإلتهابية.

ثالثا - الزيوت الأساسية :

### 1 . تعريف الزيوت الأساسية :

تعتبر الزيوت الأساسية إحدى منتجات الأيض الثانوي، و هي أهم المنتجات الثانوية و ذلك بسبب الإفرازات الأولية التي تفرزها أو تنتجها طبيعيا بعض النباتات الخاصة و المعروفة باسم النباتات العطرية (les plantes aromatiques)، حيث تفرز هذه الزيوت في غدد داخلية و في تركيبات تشبه الشعيرات. من خواصها التبخر و التطاير عند تعرضها للهواء، لها طعم مميز و رائحة عطرية قوية. و هي تتميز بسهولة فصلها بواسطة طرق التقطير و الإستخلاص المختلفة [4]، حيث يتم الحصول عليها في شكل سوائل تسمى الزيوت الطيارة أو الزيوت العطرية [42].

### 2 . أماكن تواجد الزيوت الأساسية و توزيعها :

غالبا ما تكون الزيوت الأساسية ذات مصدر نباتي، تتواجد في أنواع عديدة من النباتات الراقية، لذلك فإن هناك ما يقارب 60 عائلة نباتية تضم تحتها نحو 3000 نوع نباتي يحتوي على الزيوت الأساسية، و من أهم العائلات المنتجة لها :

العائلة المركبة (Compositae)، العائلة الشفوية (Lamiaceae) ..... إلخ .

تخزن هذه الزيوت في مختلف الأجزاء النباتية :

- الأوراق العطرية كما في الحبق Basilic .
- الفواكه كما في الليمون Citron .
- الأزهار كما في الورد Rose .
- الحبوب كما في الكزبرة Coriandre .
- القشرة كما في القرفة Cannelle .
- الجذور عند بعض النباتات .

- و تتركز أساسا في غدد تسمى < خلايا الزيوت الأساسية > [43].

### 3. خصائص الزيوت الأساسية :

تملك الزيوت الأساسية أهمية كبيرة جدا بفضل ما تتميز به من خصائص. و الجدول التالي يوضح بعض الخصائص البيولوجية و العلاجية للعائلة البيوكيميائية المكونة للزيوت الأساسية [44].

العائلة البوكيميائية	الخصائص البيولوجية و العلاجية
التريبينات الأحادية Monoterpènes	- تعتبر محفزات للجهاز المناعي . - تستعمل في حالات الآلام الموضوعية فهي إذن عبارة عن مسكنات للألم (Antalgique) . - يجب أن يكون استعمالها محدودا لأنه مع الوقت قد تصبح مهيجة للبشرة و مخاطية الجسم .
Monoterpéoles	- تعتبر مركبات مضادة للتعفنات فهي قاتلة لكل من البكتيريا (Bactericides) والفيروسات (Virucides) كما يمكن اعتبارها محفزات جيدة للجهاز المناعي و مهدئة للأعصاب و خافضة لضغط الدم.
Phénols	- يمتلك هذا النوع من المركبات فعالية مضادة للتعفنات Anti-infectieuse جد كبيرة و أخرى محفزة للجهاز المناعي. - يمكن اعتبارها كمنشطات عند تناولها بجرعات صغيرة. - يجب استعمالها بحذر شديد لأنها تعتبر كمهيجات للمخاطية كما تمتلك القدرة على إحداث تسمم للكبد Hépatotoxique عند أخذها بجرعات متتالية. - أما فيما يخص استعمالها على البشرة فيجب تجفيفها دائما بواسطة زيت نباتي.
Diterpénols	- نظرا للتشابه الكبير بين بنيتها و بنية الستيرويدات و الهرمونات الجنسية لدى الإنسان تعتبر Diterpénols منظمات هرمونية جيدة حتى عند أخذها بجرعات صغيرة.
الألدهيدات Aldéhydes	- تعتبر هذه الألدهيدات مضادات إلتهاب جيدة ، مهدئات للجهاز العصبي، خافضة لضغط الدم، منشطات و مضادات للتعفنات Anti-infectieuse. لكن يمكنها أن تهيج كل من البشرة و المخاطية.
Sesquiterpènes	- تعطي مركباتAzulènesاللون الأزرق الداكن للزيوت الأساسية مما يكسبها فعالية مضادة للإلتهاب جيدة Excellentes anti-inflammatoire

<p>- تعتبر أكثر مركبات المملكة النباتية مقاومة للالتهاب و خافضة لضغط الدم ، توجد عموماً على شكل إسترات.</p>	<p>الأحماض Acides</p>
<p>- مركبات جد نشطة على المستوى الفيزيولوجي لكن يجب تسوخي الحذر عند استعمالها، فتعتبر مهدئات جيدة و مسكنات ألم عند أخذها بجرعات صغيرة، أما عند رفع الجرعة و تكرارها فتبدي تأثيرها السمي على مستوى الجهاز العصبي (Neurotoxicité).</p> <p>- كما يمكن أن يصاب الشخص بنوبات من الصرع.</p> <p>- يمكن اعتبارها مواد مانعة للتجلط Anti - Coagulante و منشطة للدورة الدموية .</p> <p>- تملك قدرة محدودة في القضاء على البكتيريا و تعتبر محفزات جيدة للجهاز المناعي.</p> <p>- تحذيرات الاستعمال - يجب عدم :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ استعمال هذا النوع من المركبات وحده.</li> <li>▪ استعمال جرعات كبيرة.</li> <li>▪ استعمالها لوقت طويل.</li> </ul>	<p>السيونات Cétones</p>
<p>- تجمع الإسترات بين الخاصية المهدئة للسيونات و الخاصية المنشطة للكحوليات، و من ثمة كانت خاصيتها المهدئة للأعصاب و المضادة للتشنجات Anti - spasmodique.</p> <p>- مضادة للانقيار العصبي Anti - dépresseurs.</p> <p>- لا تهيج البشرة.</p> <p>- كثيرة الاستعمال نظرا لتأثيراتها الجانبية النادرة</p>	<p>الإسترات Esters</p>



## 4 . استخلاص الزيوت الأساسية :

يتم استخلاص الزيوت الأساسية من المصادر النباتية بعدة طرق تتوقف أساساً على الصفات الطبيعية للزيت و مكوناته التريبنية، و على النوع النباتي و أعضائه المختلفة [11].

و من بين هذه الطرق نذكر مايلي :

## ● الاستخلاص بالمذيبات العضوية :

تستخدم هذه الطريقة في استخلاص الزيوت الأساسية الحساسة و التي تتأثر بالحرارة أو تلك التي توجد في أجزاء النباتات بكميات ضئيلة جداً [11].

## ● الاستخلاص بالتحلل المائي :

توجد الزيوت الأساسية إما في شكل حر أو في صورة جليكوزيدية، و عند وجودها على هذه الأخيرة فإنه لا يمكن تقطير زيتها الأساسي بإحدى طرق التقطير إلا بعد تحرر الزيت من المواد العضوية بفعل النشاط الإنزيمي الناتج عن التحلل المائي، الذي يؤدي إلى انفصالها عن الجزء الجليكوزيدي محررة بذلك رائحتها المميزة [11].

## ● الاستخلاص بطريقة التقطير بالماء :

تعتبر هذه الطريقة من أشهر طرق استخلاص الزيوت الأساسية، حيث يتم فيها تحويل السائل إلى بخار بالتسخين، ثم تكثيف هذا البخار و تحويله إلى سائل بالتبريد [11].

الأخضر

العطري



I. وسائل العمل:

1. المادة النباتية :

تم جمع النبات المستعمل *Thymus numidicus* من منطقة « جبل الوحش » بقسنطينة بالشرق الجزائري، و تم حفظها في أماكن بعيدة عن الرطوبة ، فكانت كتلة المادة النباتية المستعملة 100 غ.

2. الأجهزة المستعملة :

- جهاز التبخير Rotavapor .
- جهاز التقطير بالماء Clavenger.
- مصباح الأشعة فوق البنفسجية La lampe U.V .
- حوض الكروماتوغرافيا .

3. وسائل أخرى :

- قمع الفصل Ampoule à décantation
- ورق الترشيح Papier filtre
- بيشر Becher
- قمع Entonnoir
- ماصة باستور Pipette Pasteur
- المخبار المدرج Epruvette

4. المحاليل :

- ماء مقطر .
- ميثانول .
- إيثير البترول .
- كلوروفورم .
- خلاص الإيثيل .
- حمض الخل .
- بيوتانول .
- التولوين Toluène .
- Methyl - ethyl -cétone .

II. طريقة العمل:

أ- يتم استخلاص الفلافونويدات وفق بروتوكول تقليدي يتبع كما هو إلا في بعض الحالات التي تحتاج فيها إلى تغيير بسيط في طريقة الإستخلاص لغرض تحقيق أفضل النتائج في استخلاص مواد معينة.

1 . السحق :

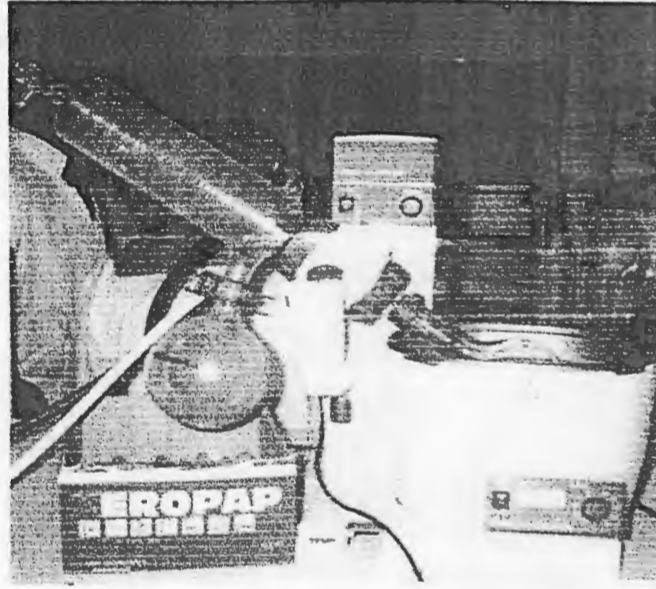
قمنا بطحن المادة النباتية الجافة ( الأوراق ) يدويا بواسطة الهاون إلى غاية الحصول على مسحوق متجانس.

2 . الإستخلاص (سائل- صلب) :

بدأت عملية الإستخلاص الأولية باستعمال 100 غ من المسحوق النباتي *Thymus numidicus* مع خليط من محلولين (ماء + ميثانول) بنسبة (8/2)، ترك الخليط لمدة 3 أيام ليتم ترشيحه بعد ذلك. كررت نفس العملية السابقة (نقع و ترشيح) مرتين للرشاحة الناتجة لمدة 24 سا لتتحصل في الأخير على المستخلص الهيدروكولي للنبتة.

3 . التبخير :

تم إخضاع الرشاحة بعد كل عملية ترشيح إلى عملية التبخير بواسطة جهاز التبخير Rotavapor تحت ضغط منخفض للتخلص من أكبر كمية المحلول الهيدروكولي إلى حد قريب من الجفاف. و الرسم التالي يوضح جهاز التبخير:



شكل 4: جهاز التبخير Rotavapor



4. الاستخلاص (سائل- سائل) :

تمت إذابة المستخلص المركز في 300مل من الماء المقطر و يعتبر استعمال الماء هاما جدا لتجزئة المحلول بغية إجراء استخلاص جديد من نوع سائل- سائل في قمع الفصل و استخدمنا لهذا الغرض مذيبات عديمة الإمتزاج مع الماء و هي على التوالي:

- إيثير البترول و الكلوروفورم: استعمالا للتخلص من البقايا و الشوائب كما أن هذه الرشاحة لا تهمل لأنها قد تحتوي على بعض الفلافونويدات غير القطبية (أجليكونات، مركبات ميثوكسيلية) .
- خلاات الإيثيل: استعمال لغرض استخلاص المركبات الأجليكونية و بعض المركبات الإيثيروزيدية أحادية السكر و أحيانا ثنائية السكر و خاصة إذا كررت عملية الاستخلاص أكثر من مرة.
- البوتانول: أما الهدف المتوخى من استعمالنا للبوتانول فهو استخلاص المركبات ثنائية و ثلاثية السكر و كذا المركبات من النوع «Glycoside» .

◀ المعاملة بواسطة إيثير البترول:

قمنا بمعاملة المستخلص النباتي الناتج بـ 150مل إيثير البترول، وقد ترك لمدة ليلة كاملة بعدها وضع الخليط في قمع الفصل Ampoule à decantation أين تم تشكل طبقتين:

• طبقة عضوية في الأعلى.

• طبقة مائية في الأسفل.

كررت نفس العملية السابقة مرتين للطبقة المائية.

◀ المعاملة بالكلوروفورم:

تمت معاملة الطبقة المائية الناتجة من التجربة السابقة 3مرات بواسطة الكلوروفورم (150مل) الذي يعمل في كل مرة على فصل الطور المائي إلى طبقتين: إحداهما عضوية متوضعة في الأسفل و الأخرى مائية متوضعة في الأعلى.

◀ المعاملة بخلاات الإيثيل:

تجرى عملية الاستخلاص على مستوى الطور المائي للكلوروفورم بخلاات الإيثيل مرة واحدة لتتصل على طور الخلاات المتوضع في الأعلى.



شكل 5: عملية استخلاص طور الخلاات

المعاملة بالبوتانول:

تعالج الطبقة المائية لخلات الإيثيل بالبوتانول 3مرات لنتحصل في نهاية العملية على طور البوتانول.



شكل 6: عملية استخلاص طور البوتانول.

5. التبخير:

خضعت مختلف الطبقات العضوية المحصل عليها (3طبقات إيثير، 3طبقات كلوروفورم، طبقة خلات الإيثيل، 3طبقات بوتانول) لعملية التبخير بواسطة Rotavapor على درجات حرارة مختلفة:

-إيثير البترول و الكلوروفورم و خلات الإيثيل على 35°م.

-البوتانول على درجة حرارة 70°م.

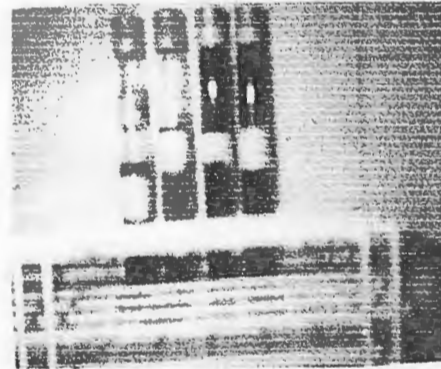
في نهاية العملية تحصلنا على أربعة مستخلصات عضوية أخضعت للتحليل الكروماتوغرافي:

● طبقة إيثير البترول.

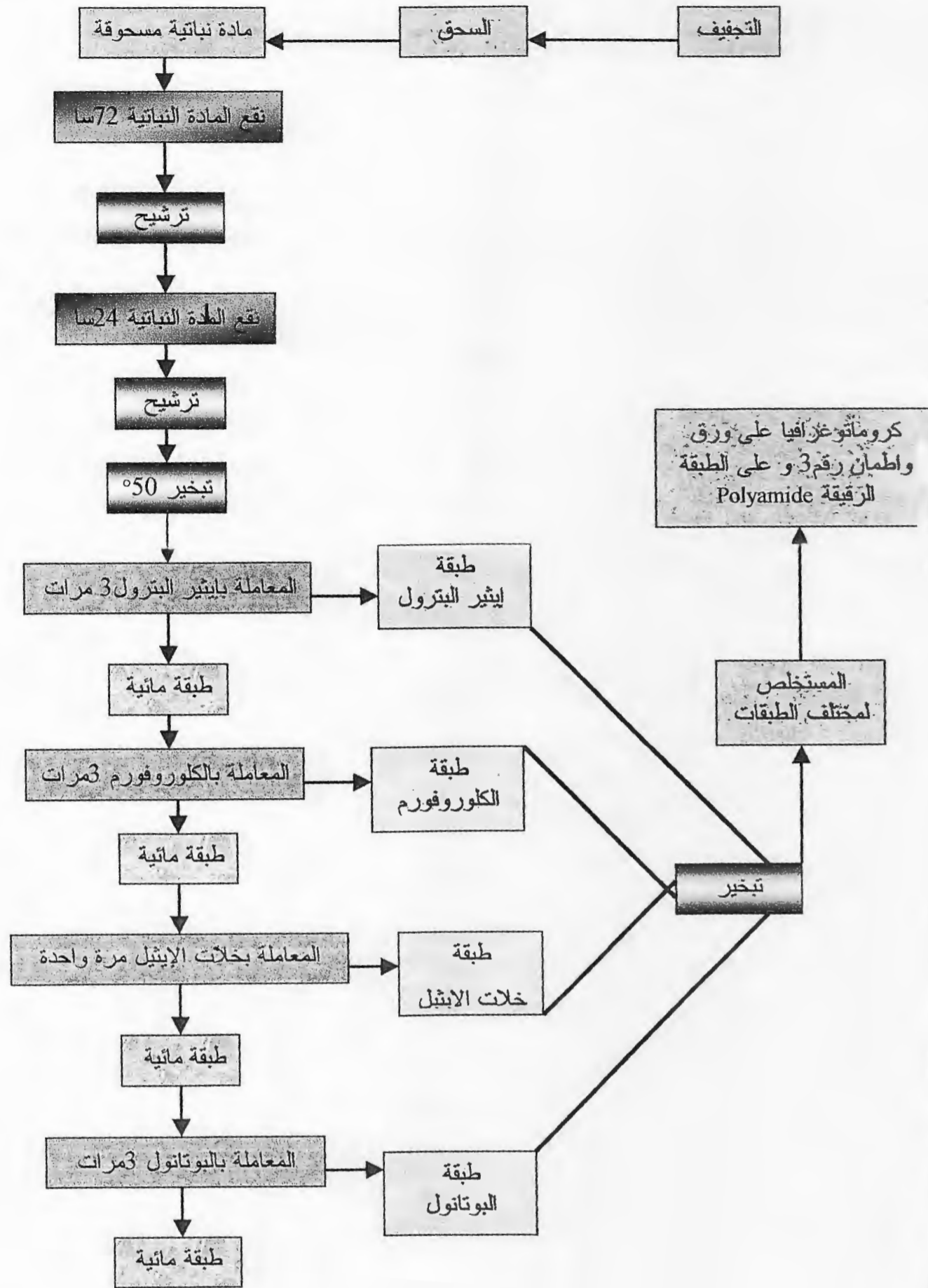
● طبقة الكلوروفورم.

● طبقة خلات الإيثيل.

● طبقة البوتانول.



شكل 7: مختلف الطبقات العضوية المستخلصة.



## 6 . التقوية على المحتوى الفلافونويدي لمختلف المستخلصات:

تم إجراء فحوصات أولية تحليلية لمستخلصات الإبيثر، الكلوروفورم، الخلائط و البوتانول وذلك باستعمال الكروماتوغرافيا التحليلية أحادية و ثنائية البعد حيث كانت الجمل المستعملة هي: (S<sub>1</sub>)، (S<sub>2</sub>)، (S<sub>3</sub>) وهذا بهدف معرفة المحتوى الفلافونويدي للنبته:

أ- الكروماتوغرافيا التحليلية على الورق:  
إن كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية تقنية من أفضل التقنيات الكروماتوغرافية و أكثرها شيوعا في فصل المركبات الفلافونويدية بسبب قدرة الامتصاص العالية التي يتمتع بها الورق و سهولة الكشف باستخدام مصباح U.V[45].

حيث يعتمد الفصل على اختلاف معاملات التوزيع للمواد فصلها بين طور ثابت، هو عبارة عن طبقة رقيقة من الماء ممتزة على ورقة ترشيح لذلك فكل أنظمة الفصل تحتوي على الماء، و الطور المتحرك الذي يكون عادة مذيبا عضويا [46].

تستعمل هذه التقنية أساسا من أجل فصل المركبات الأكثر قطبية مثل: الأحماض الأمينية، السكريات، المركبات المتعددة الوظائف مثل: الفينولات، البوليفينول على رأسهم الفلافونويدات[46].

☒ كروماتوغرافيا الورق أحادية البعد:

لفصل كل خليط من عدة مركبات يستعمل ورق واطمان رقم 3 و عادة ما يحتوي نظام المذيب على حمض الخل لتحسن عملية الفصل [45].

تقوم بتخصير أربعة أوراق واطمان و نعين عليهم أربعة وضعيات للمستخلصات (اسم في الإرفاق):

☒ ورق 1: مستخلص إيثير البترول.

☒ ورق 2: مستخلص الكلوروفورم.

☒ ورق 3: مستخلص خلائ الإيثيل.

☒ ورق 4: مستخلص البوتانول.

توضع المستخلصات الأربعة على الأوراق بواسطة ماصة باستور الشعرية ثم تترك لتجف، و بعدها تغمس هذه الأوراق في حوض الكروماتوغرافيا الذي يحتوي على نظام المذيب BAW (4:1:5) (ماء، حمض الخل، بوتانول) و بعد قليل يبدأ المذيب في الصعود إلى الأعلى حاملا معه الحزم تسلسليا.

بعد انقضاء الوقت المناسب و الذي عادة ما يكون لساعات تستخرج الأوراق و تترك لتجف، ثم تحدد الحزم بالإستعانة بمصباح U.V .

☒ كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد:

طورت هذه التقنية إلى استخدام بعدين من أبعاد الورقة أحدهما عمودي على الآخر. وذلك بهدف إعطاء فكرة أولية على عدد أو نوع المركبات الموجودة، حيث يلجأ إلى هذا الأسلوب عندما يكون استخدام بعد واحد غير كاف لتجزئة الخليط كلية.

و بعد تحديد الحزم بواسطة كروماتوغرافيا أحادية البعد. قمنا بتحضير ورقتي واطمان (20x20)، ثم قمنا بتعيين وضعية كل ورقة (اسم في الارتفاع):

تم اختيار كل من مستخلص خلاص الإيثيل و البوتانول لدراسة احتوائهما على تراكيز معتبرة من الفلافونويدات.

☒ ورقة 1: مستخلص خلاص الإيثيل.

☒ ورقة 2: مستخلص البوتانول.

فبعد إجراء التجربة على البعد الأول مع المذيب الأول المتمثل في BAW (ماء، حمض الخل، بوتانول): (4:1:5) تخرج الورقة و تترك لتجف ثم تدار بمقدار 90° ثم تغمس في المذيب الثاني المتمثل في (حمض الخل و الماء).

بعد انقضاء الوقت المناسب تستخرج الأوراق لتجف ثم تحدد الحزم بالإستعانة بمصباح U.V .

ب- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM):

تجرى هذه المرحلة بهدف إعطاء فكرة عن المحتوى الفلافونويدي للعينة و اختيار نظام المذيب للفصل الجيد و لتحقيق هذا النوع من الكروماتوغرافيا استعملنا: متعدد الأميد، إذ يستعمل هذا الأخير لفصل المركبات الفلافونويدية حيث تتكون جسور هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل للمركبات الفينولية [47].

نقوم بتحضير ثلاث طبقات رقيقة متعددة الأميد، أين يتم وضع نقطة من المستخلصات المراد فصلها بواسطة أنبوبة شعيرية على بعد اسم من أحد أضلاع كل صفيحة:

☒ صفيحة 1: مستخلص الكلوروفورم.

☒ صفيحة 2: مستخلص خلاص الإيثيل.

☒ صفيحة 3: مستخلص البوتانول.

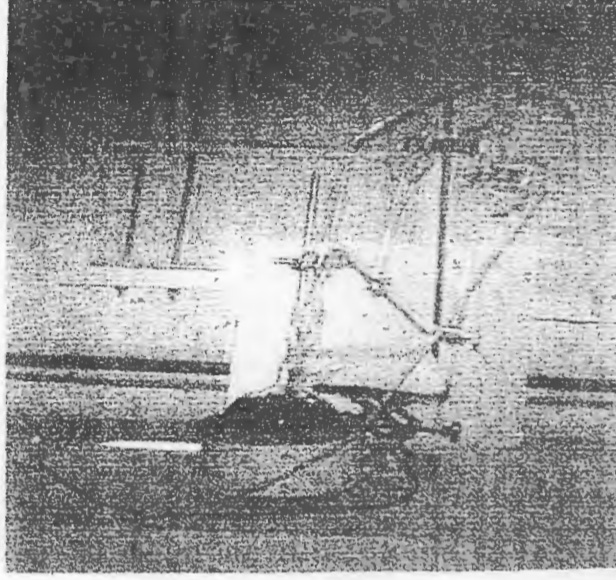
توضع الصفائح في حوض الكروماتوغرافيا الذي يحتوي على المذيب ( Toluène -Mec- MeoH ) (4:3:3) بحيث نراعي أن لا تتغمس نقطة المستخلص داخله و بعد قليل يبدأ هذا الأخير في السير إلى أعلى الصفيحة مارا بالنقطة التي تحتوي على الخليط الذي يبدأ في تحرير مكوناته، نتيجة لذلك يفصل الخليط إلى عدة بقع أو حزم.

يتم تحديد الحزم بالإستعانة بمصباح U.V و من ثم يمكن تحديد المسافة التي قطعتها كل بقعة أو حزمة و تعرف النسبة بين هذه المسافة و تلك التي قطعها المذيب بثابت الإنحباس  $R_f$ .

7. استخلاص الزيت الأساسي لـ *Thymus numidicus* :

أجريت عملية الإستخلاص لـ 100 غ من *Thymus numidicus* بواسطة تقنية التقطير بالماء في جهاز لمدة 3 ساعات لتتصل في الأخير على مستخلص الزيت الأساسي بوزن 2.1 غ ذو لون أصفر برتقالي و رائحة عطرية.

و الرسم التالي يوضح جهاز التقطير بالماء.



شكل 8: جهاز استخلاص الزيوت الأساسية (Clavenger).

8- الدراسة التحليلية لـ *Thymus numidicus* :

❖ تقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي GC:

تم تحقيق هذا النوع من الكروماتوغرافيا على جهاز كروماتوغرام من النوع Perkin Elemer تحت

الشروط التجريبية التالية:

- العمود: DB بطول 30 متر و قطر 0.25 ملم.
- DB-WAX بطول 30 متر و قطر 0.25 ملم.
- درجة الحرارة الابتدائية 45-175 م بسرعة 3 دورة/ دقيقة لترتفع بعدها السرعة حتى 15 دورة/ دقيقة.



تم تحييقها على جهاز كروماتوغرام من النوع Perkin Elemer، بحيث يكون العمود: DB-1 بطول 30متر و قطر 0.25ملم. أما بالنسبة لمطيافية الكتلة فقد تم إجراؤها في درجة حرارة تقدر بـ 220°م و بطاقة تأين قدرها 70 ev.

وقد تم تحديد المركبات الداخلة في تركيب الزيت الأساسي *Thymus numidicus* اعتمادا على:

- ثابت الإنحباس (RI) indice de rétention .

- مطيافية الكتلة المعززة بمكتبة Niste.

- المقارنة مع الدراسات المكتبية.

الجدول (2) يوضح أهم المركبات الداخلة في تركيب الزيت الأساسي للـ *Thymus numidicus*.

المركبات	النسبة المئوية	ثابت الإنحباس
$\alpha$ -Pinéne	Trace	930
1-Octen-3-ol	0.1	961
B-pinéne	Trace	963
B-myrcéne	Trace	975
P-cyméne	0.1	1003
Limonéne	Trace	1009
$\gamma$ -Terpinéne	0.3	1035
Trans-sabinéne hydrate	0.3	1037
Cis-sabinéne hydrate	Trace	1066
Linalool	11.05	1074
Bornéol	0.1	1134
(+)- $\alpha$ -Terpineol	0.3	1159
Thymol	68.20	1275
Carvacrol	16.92	1086
Eugénol	Trace	1327
$\alpha$ -Caryophylléne	0.3	1414
Germacréne D	0.1	1474
$\alpha$ -Muroléne	0.1	1494

1561	0.3	B-caryophyllène oxyde
1620	0.1	$\alpha$ -Cadinol
1656	0.1	Bisabolol
1675	Trace	Myrcenylacetate

## III. النتائج:

حساب معامل الاحتباس:

أ- الجملة (S<sub>1</sub>):□ الطور البوتانولي: جدول (3): نتائج الطور البوتانولي في الجملة (S<sub>1</sub>).

طور البوتانول		الجملة
Rf	اللون الإشعاعي	(S <sub>1</sub> )
0.94	بنفسجي (V <sub>3</sub> )	(8/2) أحادية البعد
0,058	أصفر (J)	نظام مائي حمض الخل/ماء

□ طور خلاص الإيثيل: جدول (4): نتائج طور خلاص الإيثيل في الجملة (S<sub>1</sub>).

طور خلاص الإيثيل		الجملة
Rf	اللون الإشعاعي	(S <sub>1</sub> )
0,057	أصفر (J)	(8/2) أحادية البعد
		نظام مائي حمض الخل/ماء

□ طور الكلوروفورم: جدول (5): نتائج طور الكلوروفورم في الجملة (S<sub>1</sub>).

طور الكلوروفورم		الجملة
Rf	اللون الإشعاعي	(S <sub>1</sub> )
0.073	بنفسجي (V <sub>1</sub> )	(8/2) أحادية البعد
0.16	بنفسجي (V <sub>2</sub> )	نظام مائي حمض الخل/ماء

ب-الجملة (S<sub>2</sub>):□ الطور البوتانولي: جدول (6) : نتائج طور البوتانول في الجملة (S<sub>2</sub>)

طور البوتانول		الجملة
Rf	اللون الإشعاعي	(S <sub>2</sub> )
0.33	بنفسجي (V)	(BAW) ثنائية البعد نظام عضوي
0,61	أصفر (A)	

□ طور خلاص الإيثيل: جدول (7) : نتائج طور خلاص الإيثيل في الجملة (S<sub>2</sub>)

طور خلاص الإيثيل		الجملة
Rf	اللون الإشعاعي	(S <sub>2</sub> )
0,50	أصفر (A)	(BAW) ثنائية البعد نظام عضوي

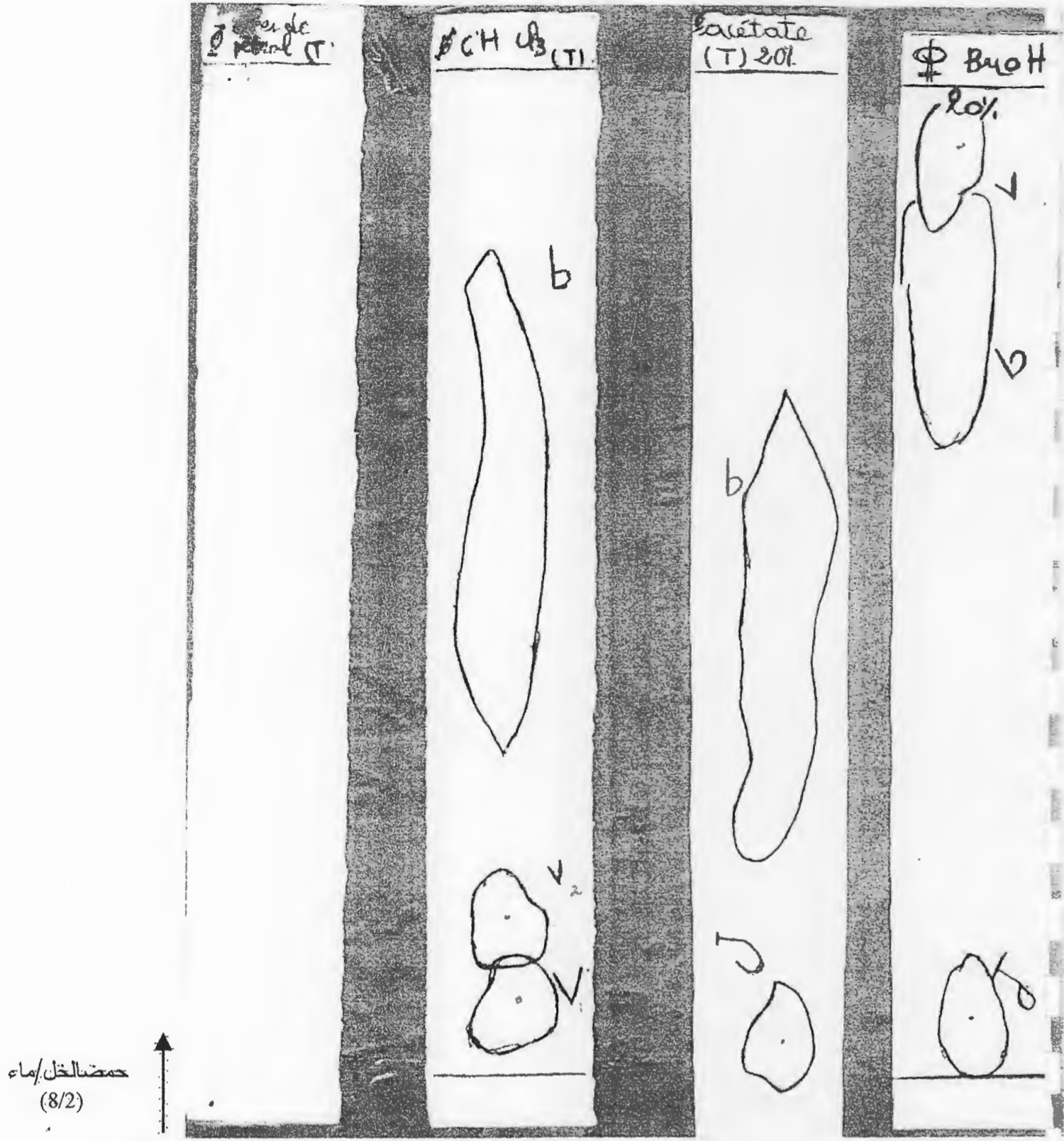
ب-الجملة (S<sub>3</sub>):□ الطور البوتانولي: جدول (8) : نتائج طور البوتانول في الجملة (S<sub>3</sub>)

طور البوتانول		الجملة
Rf	اللون الإشعاعي	(S <sub>3</sub> )
0.32	بنفسجي (V)	(Toluène -Mec -MeoH)
0,91	أصفر (A)	نظام عضوي

□ طور الكلوروفورم : جدول (9) : نتائج طور الكلوروفورم في البلمة (S<sub>3</sub>).

طور الكلوروفورم		البلمة
Rf	اللون الإشعاعي	(S <sub>3</sub> )
0.65	بنفسجي (V)	(Toluène-Mec-MeoH)
0.52	أصفر (J)	نظام عضوي

التشائم



شكل 9: خريطة كروماتوغرافية فلافونويدية أحادية البعد للمستخلصات (إيثير البترول، الكلوروفورم، خلات الإيثيل، البوتانول).

Acétate d'éthyl (T) (BAW)

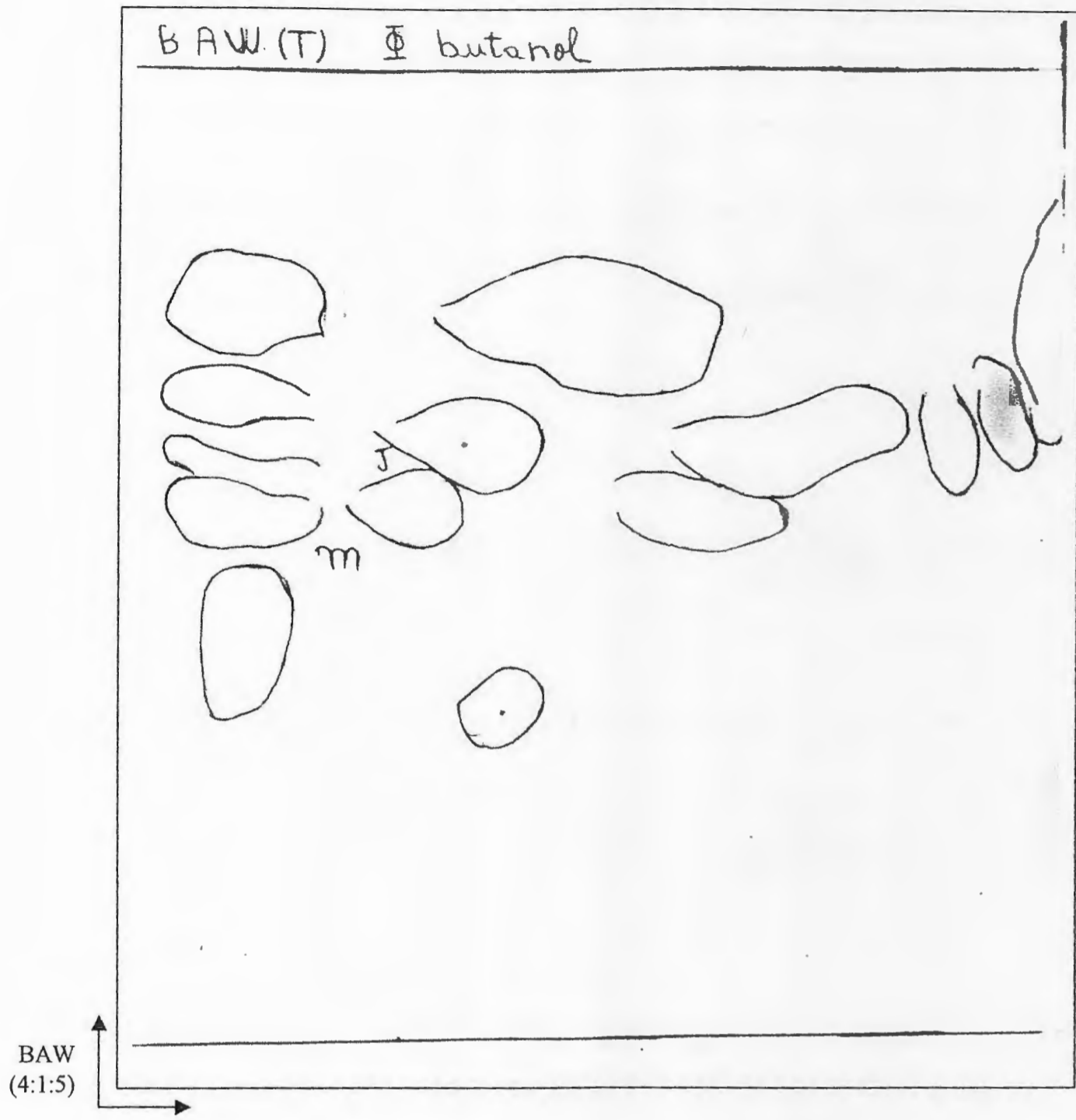


BAW  
(4:1:5)

حمض الخل/ماء  
(8/2)

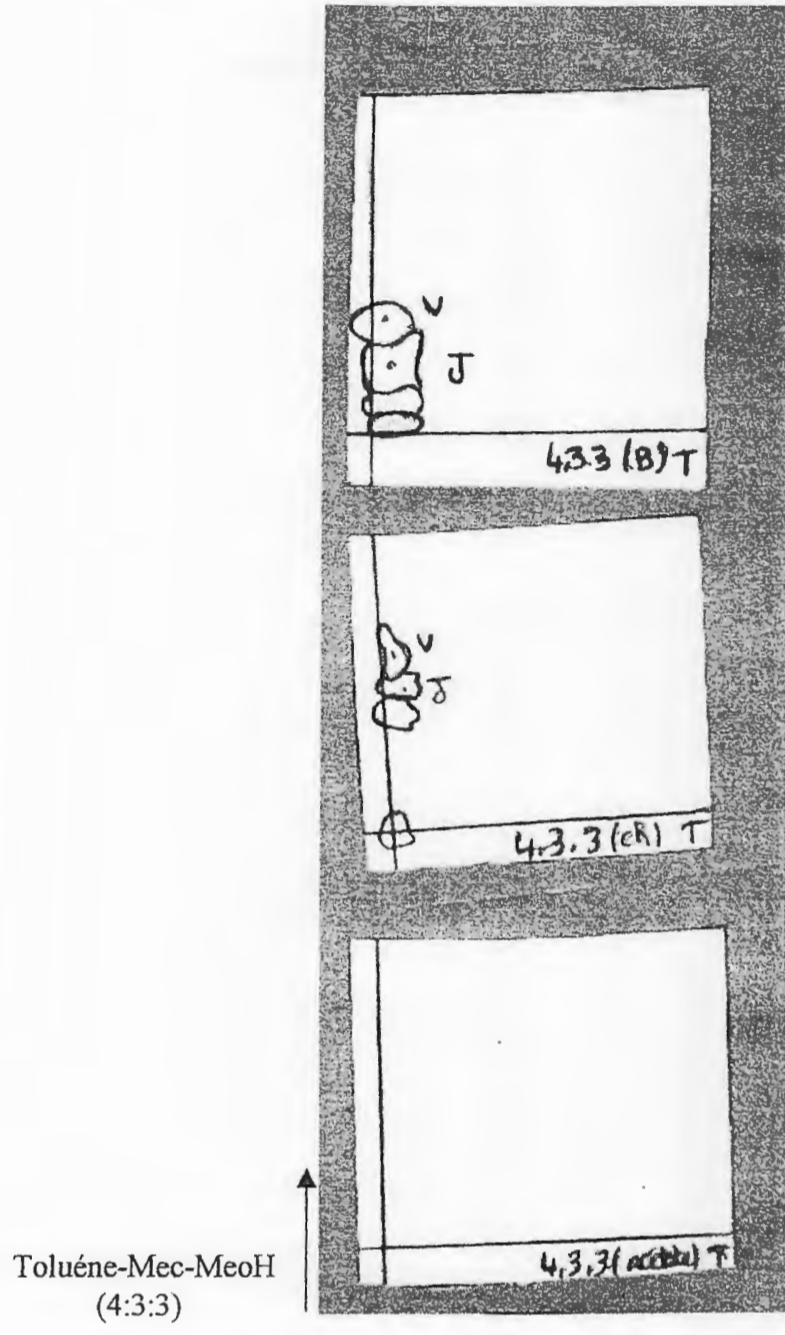
شكل 10: خريطة كروماتوغرافية فلافونويدية ثنائية البعد لمستخلص  
خلات الإيثيل





حمض الخل/ماء  
(8/2)

شكل 11: خريطة كروماتوغرافية فلافونويدية ثنائية البعد لمستخلص  
البوتانول



شكل 12: خريطة كروماتوغرافية فلافونويدية (CCM) متعدد الأמיד للمستخلصات (بوتنول، كلوروفورم، خلات الإيثيل)

مناقشة

النتائج

## IV. مناقشة النتائج:

إن لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (U.V) يعطينا معلومات أولية تخص صيغتها البنوية التقريبية فباستثناء إيزوفلافونويد فإن كل المركبات الفلافونويدية الأخرى ترى تحت الأشعة فوق البنفسجية على شكل بقع ملونة [49،48]. كما يمكن كذلك تدعيم هذه الصيغة التركيبية من خلال حساب ثابت الانحباس، حيث يعتبر هذا الأخير قيمة مميزة لكل مركب إذ أثبتت الدراسات وجود علاقة بين البنية الجزيئية المحتملة و قيمة Rf [49،48].

فمن خلال معاينة مختلف الكروماتوغرامات التي أجريت على مختلف مستخلصات النبتة يتبين غناها و تنوعها بالمركبات الفلافونويدية، فمثلا و عند استغلالنا للمعطيات المدونة في الجداول رقم: 3،4،5،6،7،8،9 فلاحظ أن الطور البوتانولي يتكون من بقعتين أساسيتين (P.majoritaire):  
(المركب)  $V_3$  و المركب J، كما أن السلوك الكروماتوغرافي للمركب  $V_3$  في النظامان العضويان  $S_2$  و  $S_3$  و النظام المائي  $S_1$  توحي بأن المركب هو عبارة عن فلافونويد جليكوزيدي كما أن لونه الإستشعاعي البنفسجي يقوم إلى الاحتمال أن المركب هو عبارة عن فلافون: إذن فحسب هذه المعطيات من لون إستشعاعي و سلوك كروماتوغرافي فالمركب  $V_3$  هو عبارة عن فلافون جليكوزيدي (ثنائي أو ثلاثي السكر) [49،50،51].

أما المركب J الموجود في الطور البوتانولي دائما فهو عبارة عن فلافونول.  
عند إجراء مقارنة بين كروماتوغرام الطور البوتانولي و طور خلات الإيثيل نلاحظ أن المركب J يمتلك نفس ثابت الانحباس للمركب J مع جميع الأنظمة.  
كما نلاحظ أن طور الكلوروفورم يتكون من عدة بقع  $V_1, V_2, V_3, b$ ، و أن السلوك الكروماتوغرافي للمركبين  $V_1, V_2$  في نظام مائي  $S_1$  يوحي بأن المركبين عبارة عن فلافونويدين أجليكونيين، كما أن لونهما الإستشعاعي البنفسجي يدل على أنهما عبارة عن فلافونات أجليكونية، أما بالنسبة لطور إيثير البترول فقد أظهرت التحاليل الكروماتوغرافية أنه خال من المركبات الفلافونويدية.

كما بينت تقنية (GC) و (GC/MS) غنى النبتة بمختلف منتجات الأيض الثانوي (زيوت أساسية) ك:  
التربينات الأحادية (Monoterpènes)، Limonene،  $\alpha$ -pinène، B-pinène، الفينولات، Eugenol، Carvacrol، Thymol و غيرها من المركبات. و من خلال معاينة الجدول رقم (2) نلاحظ أن الزيت الأساسي للـ *T.numidicus* يحتوي على مركبين أساسيين هما Thymol بنسبة 68.20% و مركب Carvacrol بنسبة 16.92% و حسب الدراسات البيبلوغرافية [52،53] يمتلك هذا الزوج ( Carvacrol Thymol) العديد من الفعاليات البيولوجية خاصة المضادة للبكتيريا و المضادة للميكروبات و المضادة للالتهاب Anti- inflammatoire.

الخطبة

## الختامة:

سمحت لنا الدراسة الفيتوكيميائية للنبتة *Thymus numidicus* المنتمية للعائلة الشفوية باستخلاص المركبات الفلافونويدية و التي تعتبر من نواتج الأيض الثانوي الفلافونويدي كخطوة أولى، ثم قمنا بالتعرف على المحتوى الفلافونويدي لكل مستخلص من خلال استعمالنا لمختلف الطرق الكروماتوغرافية: كروماتوغرافيا الورق (CP) على (Papier Watmane N°3) أحادية و ثنائية البعد، و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) على متعدد الأמיד.

و قمنا كخطوة ثانية باستخلاص الزيت الأساسي بواسطة التقطير بالماء لنقوم بعدها بتحديد مكونات هذا الزيت بواسطة تقنية (GC) و (GC / MS) كالتريبيينات الأحادية، الفينولات و غيرها من المركبات.

المراج

- 1 . د. عبد العزيز الصباغ، (1989)، موسوعة النبات العام(خلية- أنسجة- أعضاء نباتية- تصنيف نباتي- تعضي جهاز التناسل في مغلفات البذور)، المطبوعات الجامعية- الجزائر.
- 2 . د. حسان قبيسي، (1995)، معجم الأعشاب و النباتات الطبية، دار الكتب العلمية- بيروت، لبنان. الطبعة الثانية.
- 3 . د. شكري ابراهيم سعد، (1994)، النباتات الزهرية، نشأتها- تطورها- تصنيفها، دار الفكر العربي.
- 4 . د. الشحات نصر أبو زيد، (1992)، النباتات العطرية و منتجاتها الزراعية و الدوائية، الدار العربية للنشر و التوزيع، الطبعة الثانية ص: 297،305،306.
- 5 . د. حلومي عبد القادر علي، (1996)، الفصائل المروية في الأعشاب الطبية ص: 371.
- 6 . د. حسان القبيسي، (2002)، معجم الأعشاب و النباتات الطبية، دار الكتب العلمية- بيروت، لبنان، الطبعة الخامسة ص: 214-219.
- 7 . الطيب يحيى حمودي، البشائر في النباتات الطبية الأكثر استعمالا في الجزائر ص: 57.
- 8 . عبد العزيز زلماطي، (1993)، التداوي بالأعشاب و النباتات الطبية، دار الهدى للطباعة و النشر و التوزيع- عين مليلة، الجزائر ص: 98 .
- 9 . مختار سالم، (1987)، أعشاب لكنها دواء، دار المريح للنشر- الرياض ص: 242،243 .
- 10 . بوطغان نعيمة، (2003)، فصل و تحديد نواتج الأيض لنبتتين منتميتين للعائلة الشفوية (Lamiaceae) و دراسة التأثير المضاد للبكتيريا، رسالة مقدمة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء الصيدلانية، جامعة منتوري- قسنطينة.



11. د. محمد السيد هيكل، د. عبد الله عبد الرزاق عمر، (1993)، النباتات الطبية و العطرية كيمياؤها- إنتاجها- فوائدها، منشأة المعارف- الإسكندرية ص: 181، 180  
المراجع باللغة الأجنبية:
- 12 . Boumlik. M, (1995), systématique des spermaphytes, office des publications universitaires. 1, place centrale- Ben Aknoun, Alger.
- 13 . MERGHEM. R, (1985), étude du polymorphisme génétique à l'aide de marqueurs biochimique chez une plante d'intérêt économique *Thymus*, thèse de majistère Université de Mentouri- Canstantine P: 20-23.
- 14 . RICHARD. H, (1974), quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles, Edition Taline (U.A.S) P:105.
- 15 . MAURICE. M, (1975), Mon herbier de santé. Editions Robert Laffont, S.A, Paris, ISBN 2-221-07564, P: 64, 192, 256, 286.
- 16 . QUEZEL. P, SANTA.S, (1962), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions Désertiques méridionales Paris: C.N.R.S.
- 17 . AZAD, AD, ALPER.H, KURKCUOGLU. M, BASER. K, (2004), Composition and the in vitro anti microbial activities of the essential oils from Algéria, the intrnational jornal of Aromathérapie.
- 18 . Kabouche. Z, Boutaghane. N, Laggonne. S, Kabouche. S, Ait-Kaki. Z, Benlabeled. K, (2005), comparative antibactériel activity of five Lamiaceae essential oils from Algéria. the international journal of Aromathérapie 15 P: 129-133.
- 19 . PARIS. M, HURABIELLE. M, (1986), Abrégé de matière médicales, Edition Masson P:339.
- 20 . GAYON. R, (1986), Les composés phénoliques des végétaux, Edition Dunod P: 165.
- 21 . Wollenweber. E., Dietz. V, h, (1980), Biochim. Syst of Ecol. P:8- 21.

- 22 . Harbone. J.B, (1973), In phytochemistry Ed, Lawrence, P.L. Litton Educational.
- 23 . Harbone. J.B, (1988), the flavonoides Chapman and Hall, London P: 539.
- 24 . Harbone. J.B, Willain, C.A (1995), Vat. Rod. Rep. P: 639.
- 25 . Forkmann. G, (1992), structure and biosynthesis of flavonoids 16<sup>ème</sup> Assemble du groupe polyphénols, brisbonne P: 16,19,27.
- 26 . GERHARD. R, (1993), Métabolisme des végétaux physiologie et biochimie P:318 , 332, 338.
- 27 . Heller. W, Forkmann. G, Rilsh, Griesbach. N, (1985), Planta Med, P: 163, 191.
- 28 . Heller.W, Forkmann. G, (1980), In flavonoids. Advances in reserch (Harborn, J.B, Chapmann and Hall, London).
- 29 . Davis. B.D, (1995), Advances in Enzymology, 16, 274 P: 206.
- 30 . Underhill. E.W , Watlein. J.B , Neish. A.C , (1957), c and J.biochim physio, 35, 219 P:251.
- 31 . Hamburger.M, Hoshetman.k, (1991), Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and Medicrine, phytochemistry P: 30, 38, 64.
- 32 . corley. D.G et Durley. R.C, NAT. J. Prod, (1994), 57, 1484.
- 33 . Beutler. J.A, Mclece. T.C, Fuller. R.W, Tishler. M, cardellinall. J.H, MCCLOND. T.G. . Snader. K.M et Boyd. M.R, (1993), ANTIVIRAL CHEM. Chemother, 4, 167.
- 34 . Boik. J, (1995), Cancer and Natural Medecine, Oregon Medical Press.
- 35 . Gilbert. S, Omenn, (1998), Chemoprevention of Lung cancer: The rise and Demise of Beta-carotene, Annu. Rev. Public.Hearth, 19, 73 .

- 36 . Havyteen. B, (1993), Biochem, Pharmacol 32, 41.
- 37 . Man. A they John, Guthrie. N et Ghrmann, (2001), current Medicinal chemistry P; 8, 2, 135, 153.
- 38 . Elber. G, Wangner. H, (1992), Planta Med P: 57, 137, 141.
- 39 . Sankawa. U et Tchun. Y, (1985), Advances in chinese.
- 40 . Ozenda. P,(1958), "Flore du Sahara spetentrional et central" P: 438 CNRS Paris.
- 41 . Rehn. S, (1960) Ergebni, Biol, 22.
- 42 . Bernard. M,(1983), Phyto-aromathérapie pratique, Edition Dougles France, P: 78,79,80,81.
- 43 . Paris. Met Hurbaille. M, (1981), abrégé de Matière Médical (Phamaconosie), Tomel, Edition Masson, Paris, Newyork, P:32.
- 44 . Honchit. J, (1992), Pharmacie Naturelle, Edition Aubanel.
- 45 . Markham. K.R, (1982), Techniques of flavonoid identification, Academic Press, London.
- 46 . Abd Elchakour. A.S, (1987), Chimie organique moderne et pratique. Université du Roi Abdel Ebaziz. Djada. Ed en arabe.
- 47 . Gonnet. J.F, (1974), Thèse de doctorat Université de Lyon.
- 48 . Markham. K.R, (1989), Flavones, Flavonols and their Glycosides in "Methods in plant Biochemistry" . Academic press, Vol I (chapitre6) P: 197-232.
- 49 . Randerah. H, (1971), Chromatography sur couche minces, Ed Gautier Villard.
- 50 . Harbonne. J.B and Malbry. T.J and Malbry. H, (1975), The flavonoids Tomel, Tome II Ed Chapman and Hall, London.

51 . Voirin.B, (1983), Phytochemistry, 22, (10), 2105, 2107.

52 . Ismaili. Aet Coll, (2002), Topical anti- inflamatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettü*, journal of pharmacy and pharmacology p: 54.

53 . Vardar-üntü. G, Candan. F, Sökmen. A, Daffrera. D, Pollission. M, Sökmen. M, Etal, (2003), Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus pectinatus* , fish J. Agric food chem.(51) P:63, 7.

**Sites d'internet:**

54 . [http:// www.Membres. Lycos. Fr /Mourad / flavonoids des htm.](http://www.Membres.Lycos.Fr/Mourad/flavonoids.htm)

55 . [http:// www. Noturotheque. Org: huile- info- html.](http://www.Noturotheque.Org/huile-info.html)

### المخلص:

إن هدفنا الرئيسي لهذا البحث هو التعرف على نواتج الأيض الثانوي لنبتة *Thymus numidicus* التي تنتمي للعائلة الشفوية، و قد تمكنا من التعرف على المحتوى الفلافونويدي باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية ( كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM و كروماتوغرافيا الورق CP ) بالإضافة إلى تحديد المركبات الرئيسية للزيت الأساسي لهذه النبتة وهذا بواسطة تقنية (GC/MS) و (GC).

### الكلمات المفتاحية:

*Thymus numidicus* ، العائلة الشفوية، الفلافونويدات، الزيت الأساسي. (GC/MS) , (GC)

تاريخ المناقشة

2006/ 7/12

من إعداد :

- خلف الله فاطمة الزهراء

- زازوة سامية

- شايب لبنى

### الموضوع:

استخلاص الفلافونويدات والزيوت الأساسية من النبتة العطرية *Thymus numidicus*

### الملخص:

إن هدفنا الرئيسي لهذا البحث هو التعرف على نواتج الأيض الثانوي لنبتة طبية *Thymus numidicus* التي تنتمي للعائلة الشفوية *lamiaceae*, وقد تمكنا من التعرف على المحتوى الفلافونويدي باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) وكروماتوغرافيا الورق (CP) بالإضافة إلى تحديد المركبات الرئيسية للزيت الأساسي لهذه النبتة وهذا بواسطة تقنية (GCIMS) و (GC).  
الكلمات المفتاحية:

*Thymus numidicus*, العائلة الشفوية, الفلافونويدات, الزيت الأساسي, (GC), (GC / MS)

### Résumé

Notre but principal dans cette recherche, c'est de connaître les métabolites secondaires de la plante médicinale *Thymus numidicus* qui appartient à la famille des *lamiaceae*, nous avons pu identifier le contenu flavonoïdiques en utilisant les méthodes chromatographiques (Chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie sur papier (CP)), ainsi que la détermination des composants majoritaires de l'huile essentielle de cette plante grâce aux techniques (GC), (GC / MS).

#### **Mots clés :**

*Thymus numidicus*, *lamiaceae*, flavonoïdes, huile essentielle, (GC), (GC / MS).

### Summary

Our main goal purpose in this research, is to know the secondary metabolites of the plant medicinal *Thymus numidicus* that belongs to the family of *lamiaceae*, we could have identify the flavonoid components we used chromatographic methods (Chromatographic of thin layer (TLC), chromatographic of the paper (PC)), as well as the determination of the major components of the essential oil, uses (GC), (GC / MS) Techniques

#### **Key words:**

*Thymus numidicus*, *lamiaceae*, flavonoids, essential oil, (GC), (GC / MS).