

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الإخوة منتوري قسنطينة-1-

قسم الكيمياء

كلية العلوم الدقيقة

رقم الترتيب: 142/DS/2018

رقم التسلسل: 15/CH/2018

رسالة مقدمة لنيل شهادة الدكتوراه في العلوم

تخصص كيمياء عضوية

شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان

بحث وتحديد نواتج الأيض الثانوي للنببتين

Centaurea solstitialis ssp. schouwii (DC.) Q. et S.

Serratula cichoracea - الفعالية البيولوجية.

تحت إشراف الأستاذة: فضيلة بن عياش

تقديم: عليوش لامية

حرم ربي

نوقشت في 2018/07/10 أمام اللجنة

رئيسة	أستاذة بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1	د. جميلة زعمة
مشرفة	أستاذة بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1	د. فضيلة بن عياش
ممتحنا	أستاذ بجامعة باجي مختار عنابة	د. بلقاسم لقصير
ممتحنة	أستاذة بجامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1	د. رتيبة مكيو
ممتحنا	أستاذ بجامعة محمد الصديق بن يحي جيجل	د. عز الدين بوجردة
ممتحنا	أستاذ محاضر بجامعة فرحات عباس سطيف 1	د. فاروق زايدى



إهداء

إلى من علمتني أن الحياة قلب ينبض وعقل يفكر ، إلى رمز الحب والتضحية والحنان والحكمة، إلى من تقاسمت معي أعباء هذا العمل، إلى أغلى إنسان على قلبي، إلى أمي الغالية أطال الله في عمرها وإلى والدي.

إلى من تقربهم الأعين زوجي ربيعي محمد نور الزمان وأبنائي محمد بدر الدين، إيمان وأسامة عبد الصمد.

إلى من شجعتني ودفعت بي قدما إلى شقيقتي العزيزة كريمة.

إلى من علمتني حب الخير والثقة بالنفس، إلى الغائبة الحاضرة دائما في قلبي، إلى روح جدي الطاهرة خراج أم الخير.

إلى صديقاتي مزهود سامية ، حنان زعتر، صبرينة بيشا و نعيمة خيربي وإلى زملاء دفعتني نجوى، أسيا ، سليمة ، أحلام ، منى ، سهلية ، عبد المالك و عبد الرؤوف..

إلى جميع الأهل والأصدقاء

أهدي هذا العمل المتواضع.

التشكرات

الحمد والشكر لله الذي هدانا سبيل الرشاد وألهمنا من العلم والعمل ما يشد أزرنا في هذه الحياة ، بعد شكر المولى عز و جل أتقدم بخالص شكري وإمتتاني إلى الأستاذة **فضيلة بن عياش** التي فتحت لي باب مخبرها وشجعتني وقدمت لي كل الدعم المادي والمعنوي لإنهاء هذه الرسالة، كما أشكرها على كل ما قدمته لي من توجيهات ومعلومات في كل مراحل البحث.

أتقدم بخالص الشكر والإمتنان للأستاذ الفاضل **سمير بن عياش** ليس فقط لدعمه وتوجيهاته لي بل لجميع جهوده ووقته السخي وحضوره الإيجابي الذي ساهم في خروج هذا العمل إلى النور.

كما أوجه شكري وتقديري للأستاذة الكريمة **جميلة زعمة** لقبولها رئاسة لجنة المناقشة وأشكر الأساتذة الكرام **رتيبة مكيو، بلقاسم لقصير، عزالدين بوجردة ، فاروق زايد** لقبولهم العضوية في لجنة المناقشة.

ولا يفوتني أن أتقدم بجزيل شكري للأستاذة حنان زعتر، سامية مزهود، برحال جمعة، نعيمة خيري و صبرينة بيثا على دعمهم المعنوي ولكل الأصدقاء وكل من مد لي يد العون من قريب أو من بعيد ولكل أساتذة وزملاء المخبر.

الفهرس

الصفحة	الموضوع
01	المقدمة.....
03	مراجع المقدمة.....
الفصل الأول: نواتج الأيض الثانوي	
06	1-I- نواتج الأيض الثانوي.....
06	2-I- التربينات.....
07	1-2-I- التربينات الأحادية.....
08	2-2-I- التربينات الثنائية.....
09	3-2-I- التربينات الثلاثية والستيرويدات.....
11	4-2-I- التربينات الرباعية.....
12	5-2-I- التربينات المتعددة.....
12	6-2-I- السيسكويتربينات.....
13	7-2-I- السيسكويتربينات اللاكتونية.....
14	1-7-2-I- الإصطناع الحيوي للسيسكويتربينات اللاكتونية.....
20	2-7-2-I- الفعالية البيولوجية للسيسكويتربينات اللاكتونية.....
21	3-7-2-I- الدراسة الكيميائية للسيسكويتربينات اللاكتونية.....
23	3-I- المركبات الفينولية.....
23	1-3-I- الفلافونويدات.....
25	2-3-I- تواجد الفلافونويدات.....
26	3-3-I- الإصطناع الحيوي للفلافونويدات.....
29	4-3-I- الفعالية البيولوجية للفلافونويدات.....
31	5-3-I- الدراسة الكيميائية للفلافونويدات.....
44	مراجع الفصل الأول.....

الفصل الثاني: دراسة ببليوغرافية للنبتين

49	1- II نباتات <i>Centaurea solstitialis</i> ssp. <i>schouwii</i> (DC.) Q et S.....
49	1-1- II الوصف النباتي لنبات <i>Centaurea solstitialis</i> L.....
50	2-1- II التصنيف النظامي للنبته.....
51	3-1- II المسح البليوغرافي لنبات <i>C. solstitialis</i>

52 II 4-1- الأثار السلبية لنبات <i>C. solstitialis</i>
53 II 5-1- الطرق المستخدمة للتقليل من آثاره السلبية
54 II 6-1- إستخدامات نبات <i>C. solstitialis</i>
54 II 7-1- المسح البيولوجي لنبات <i>C. solstitialis</i>
57 II 8-1- المسح الكيميائي لنبات <i>C. solstitialis</i>
60 II 2- نبات <i>Serratula cichoracea</i>
60 II 1-2- الوصف النباتي لنبات <i>S. cichoracea</i>
60 II 2-2- التصنيف النظامي للنباتة
61 II 3-2- البحث البليوغرافي لنبات <i>S. cichoracea</i>
61 II 4-2- المسح البيولوجي لنبات <i>S. cichoracea</i>
61 II 5-2- المسح الكيميائي لنبات <i>S. cichoracea</i>
63 مراجع الفصل الثاني

الفصل الثالث: الدراسة الكيميائية للنباتين والتعيين البنيوي للمركبات المفصولة

67 III 1-III الدراسة الكيميائية لنبات <i>Centaurea solstitialis</i> ssp. <i>Schouwii</i> (DC.) Q et S
67 III 1-1-III المادة النباتية
67 III 2-1-III عملية إستخلاص نبات <i>C. solstitialis</i>
69 III 3-1-III فصل و تقوية نبات <i>C. solstitialis</i>
78 III 2-III الدراسة الكيميائية لنبات <i>Serratula cichoracea</i>
78 III 1-2-III المادة النباتية
78 III 1-2-III عملية إستخلاص نبات <i>S. cichoracea</i>
80 III 3-2-III فصل و تقوية <i>S. cichoracea</i>
83 III 3-III التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من <i>Centaurea solstitialis</i> ssp. <i>schouwii</i> (DC.)
83 III 1-3-III التعيين البنيوي للمركب C1
98 III 2-3-III التعيين البنيوي للمركب C2
113 III 3-3-III التعيين البنيوي للمركب C3
120 III 4-3-III التعيين البنيوي للمركب C4
128 III 5-3-III التعيين البنيوي للمركب C5
134 III 6-3-III التعيين البنيوي للمركب C6
140 III 7-3-III التعيين البنيوي للمركب C7

152 III-3-8- التعيين البنيوي للمركب C8
155 III-3-9- التعيين البنيوي للمركب C9
158 III-4-4- التعيين البنيوي للمركبات المفصولة من <i>Serratula cichoracea</i> .
158 III-4-1- التعيين البنيوي للمركب S2
171 III-4-2- التعيين البنيوي للمركب S1
182 مراجع الفصل الثالث

الفصل الرابع: الفعالية المضادة للبكتيريا و الفعالية المضادة للأكسدة

184 IV-1-1- الفعالية المضادة للبكتيريا
184 IV-1-1- مقدمة
186 IV-1-2- خصائص و مميزات السلالات المدروسة
187 IV-2- الفعالية المضادة للأكسدة
187 IV-2-1- مقدمة
188 IV-2-2- مضادات الأكسدة
188 IV-2-3- الفلافونويدات والفعالية المضادة للأكسدة
191 IV-2-4- الإختبارات المستعملة لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة
192 IV-3- دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا لنبات (<i>Centaurea solstitialis</i> ssp. <i>schouwii</i> (DC.)
194 IV-4- تقدير المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات لنبات <i>Centaurea solstitialis</i> ssp. <i>Schouwii</i> (DC.)
196 IV-5- دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لنبات (<i>Centaurea solstitialis</i> ssp. <i>schouwii</i> (DC.)
200 مراجع الفصل الرابع
202 الخاتمة

المقدمة

المقدمة

عرف الإنسان منذ القدم أهمية النباتات الطبية وفوائدها العلاجية المختلفة، ولذلك كانت محط تجاربه وأبحاثه منذ مئات السنين، حيث برع الصينيون والمصريون القدماء في علم التداوي بالأعشاب وإستخدامها في علاج عدة أمراض بالإضافة إلى إستخدامها في التحنيط وكذلك أمور الزينة والتجميل، وكان المصريون أول من إستخدم زيت الحلبة لإزالة تجاعيد الوجه، وزيت الخروع لعلاج الإمساك ودهان الشعر، والنعناع المر لعلاج القروح والالتهابات الجلدية والإضطرابات المعوية وقشور الرمان لطرد الديدان... الخ [1].

وبالرغم من التطور الكبير في علم الأدوية وظهور أعداد هائلة من المستحضرات الدوائية خاصة خلال القرن الماضي، فإن الحقبة الأخيرة شهدت عودة إستخدام الأعشاب الطبية كوحدة من أهم أفرع الطب البديل، وتتنوع طرق إستخدام الأعشاب الطبية من إستخدام منقوع أو مغلي النبات الكامل إلى إستخلاص المواد الفعالة وإستخدامها في صور تراكيب صيدلانية مختلفة، تعد العودة لإستخدام هذه النباتات عودة للطبيعة.

ونظرا لما تتميز به بلادنا من تنوع في غطائها النباتي، نتيجة لإتساع رقعتها وتنوع مناخها، وبغرض تثمين هذه الثروة، فقد قام الباحثون بمخبرنا بدراسة العديد من نباتات العائلة النجمية (Asteraceae) التي تعتبر من أرقى العائلات النباتية إذ تضم حوالي 1000 جنس و أكثر من 25.000 نوع ، وخاصة جنس *Centaurea* الذي ينتشر بكثرة في بلادنا خصوصا في الشرق والجنوب الشرقي [2] ، ومنه فقد جاء هذا العمل كإكمال لما بدأ به الباحثون بمخبرنا في العشرية الأخيرة.

هذه الأعمال والبحوث المنجزة بمخبرنا و بغيره من المخابر أدت إلى فصل العديد من المركبات نذكر منها:

الهيدروكربونات غير المشبهة [3]، القلويدات [4-5] والستيرويدات [6]، ومن أهم المركبات التي فصلت نتيجة الإفرازات الثانوية في هذا الجنس الفلافونويدات [7-17] واللاكتونات السييسكويتريبنية [18-28]. حيث أثبتت الدراسات أن 90% من الفلافونويدات واللاكتونات السييسكويتريبنية التي تم تحديد بنيتها فصلت من العائلة المركبة [29].

لقد تم إختيار النبتة المدروسة على أساس معايير كيميائية وبيولوجية، فمن الناحية الكيميائية يتميز جنس *Centaurea* باحتوائه على المركبات الفلافونويدية، ويمثل تنوع كبير لللاكتونات السييسكويتريبنية، أمّا

من الناحية البيولوجية فهو معروف بخصائصه الطبية والصيدلانية حيث يستعمل في الطب الشعبي لمعالجة عدة أمراض [30] ، فمثلا النوع *C. incana* يستعمل من قبل سكان الأوراس بضواحي باتنة كدواء شعبي تقليدي له تأثير فعال على الخلايا الكبدية، و أستعملت جذوره كدواء لبعض أمراض الكبد [3]، كما تتميز نباتات هذا الجنس بفعالية ضد الجراثيم [31] و ضد الروماتيزم [32] والأنواع [35] *C. melitensis* و *C. aspera* ، [34] *C. corcubionensis* ، [33] *C. seridis* L. var *maritima* تستعمل لمعالجة مرض السكر.

تركز إهتمامنا في هذا البحث على نقطتين مهمتين :

- فصل وتحديد منتوجات الأيض الثانوي لنبات: *Centaurea solstitialis* L. ssp. مع تحديد الفعالية البيولوجية لمختلف أطواره.

- إضافة إلى دراسة الكسور المتبقية من النبتة المدروسة في رسالة الماجستير وهي: *Serratula cichoracea*.

وعليه فقد تم تقسيم الرسالة إلى مقدمة و أربعة فصول:

- الفصل الأول : تطرقنا فيه إلى نواتج الأيض الثانوي ودورها في النبات بصفة عامة، ثم ركزنا بصفة خاصة على ناتجين مهمين وهما التربينات والفلافونويدات فتناولنا تواجدهما كذلك إصطناعهما الحيوي وأهميتهما البيولوجية كما إستعرضنا باختصار طرق إستخلاصهما.

- الفصل الثاني: قمنا بتقديم دراسة ببيوغرافية للنبتين *Serratula cichoracea* و *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q. et S. حيث خصصناه للتعريف بالنبتين والتتويه بمزاياهما البيولوجية.

- الفصل الثالث: بينا فيه الطريقة العملية المتبعة خلال هذا البحث من إستخلاص، فصل و تنقية المركبات، ثم تطرقنا إلى التعيين البنوي للمركبات المفصلة باستعمال مختلف الطرق الفيزيوكيميائية.

- الفصل الرابع: خصص للجانب البيولوجي، تطرقنا فيه إلى دراسة ببيوغرافية حول الفعالية المضادة للبكتيريا والفعالية المضادة للأكسدة ثم بينا فيه الطريقة العملية المتبعة في تحديد الفعاليين ومناقشة نتائج

دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا بالنسبة لمستخلصات *Centaurea solstitialis* L. ssp. *schouwii* (DC.) والمركب المفصول منها β 4,15-dihydro 3-dehydrosolstitialine A وأخيرا بينا نتائج الفعالية المضادة للأكسدة لأطوار المستخلصات الثلاثة دائما لنفس النبات.

و أنهينا الرسالة بخاتمة لخصنا فيها كل النتائج المتحصل عليها.

مراجع المقدمة

1. Aude, N. Médecine en Egypte ancienne-maladies & traitement. Egyptos, **2005**.
2. Quezel, P.; Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome 2. Edition C.N.R.S, Paris, **1963**
3. Aclinou, P.; Boukerb, A.; Bouquant, J.; Massiot, G.; Le Men Olivier, L. Plantes des Aures : constituants des racines de *Centaurea incana*. *Plant. Med. Phytother.*, **1982**, 303-309.
4. Ahmed, Z, F.; Hammouda, F, M.; Rizk, A. M.; Ismail, S. I. Phytochemical studies of certain *Centaurea* species. General analysis and alkaloids. *Planta Med.*, **1970**,18(3), 227-231.
5. Karawya, M. S.; Hilal, S. H.; Hifnawy, M. S.; El-Hawary, S. S. Phytochemical study of *Centaurea calcitrapa* L. growing in Egypt. *Egypt J. Pharm. Sci.*, **1975**,16(4), 429-444.
6. Teresa Picher, M.; Seoane, E.; Tortajada , A. Waxes, triterpenes, steroids, and free and bound acids in leaves and stems of *Centaurea aspera*. *J. Nat. Prod.*, **1984**, 47 (1), 184-185.
7. Kamanzi, K.; Raynaud, J. Contribution à l'étude des glycosides flavoniques de *Centaurea solstitialis* L.(Composées). *Plantes médicinales et phytothérapie*, **1976**, 10, 78-84.
8. Gonzalez Collado, I.; Macias, F. A.; Massanet, G. M.; Rodriguez Luis, F. Flavonoids from *Centaurea clementei*. *J. Nat. Prod.*, **1985**, 48(5), 819-822.
9. Negrete, R. E.; Backhouse, N.; Bravo, B.; Erazo, S.; Garcia, R. Quelques flavonoids de *Centaurea floccosa* Hook. et Arn. *Pl.Medica Phytother.*, **1987**, 21, 168-172.
10. Christensen, L. P.; Jorgen, L. Flavones and other constituents from *Centaurea* species. *Phytochemistry*, **1991**, 30(8), 2663-2665.
11. Rusak, G .; Krajačić, M.; Pleše,N. Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. *Antivir. Res.*, **1997**, 36(2), 125-129.
12. Orallo, F.; Lamela, M .; Camina, M.; Uriarte, E.; Calleja, J.M. Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corcubionensis*. *Planta Med.*, **1998**, 64(2), 116-119.

13. Atmani, G.; Benayache, S.; Benayache, F.; Dendoughi, H.; Jay, H. Métabolisme des Composés flavoniques de *Centaurea nicaensis* All. *J. Soc. Alger. Chem.*, **1998**, 8(1), 29-36.
14. Flamini, G.; Bullerie, C.; Morelli, I.; Manunta, A. A New flavonoid glycoside from *Centaurea horrida*. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63(5), 662-663.
15. Seghiri, R.; Boumaza, O.; Mekkiou, R.; Benayache, S.; Mosset, P.; Quintana, J.; Estévez, F.; León, F.; Bermajo, J.; Benayache, F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea Africana*. *Phytochem. Lett*, **2009**, 2(3), 114-118.
16. Hammoud, L.; Seghiri, R.; Benayache, S.; Mosset, P.; Lobstein, A.; Chaabi, M.; León, F.; Brouard, I.; Bermejo, J.; Benayache, F. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaensis* All. var. *walliana* M. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, 26, 203-208.
17. Zater, H.; Huet, J.; Fontaine, V.; Benayache, S.; Stévigny, C.; Duez, P.; Benayache, F. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis*. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **2016**, 9(6), 554-561.
18. Fernandez, I.; Garcia, B.; Grancha, F.J.; Pedro, J.R. Sesquiterpene lactones, flavonoids and coumarins from *Centaurea collina*. *Phytochemistry*, **1989**, 28(9), 2405-2407.
19. Öksüz, S.; Ayyildiz, H. Sesquiterpene lactones from *Centaurea coronopifolia* *Phytochemistry*, **1986**, 25(2), 535-537.
20. Bruno, M.; Herz, W. Sesquiterpene lactones and flavones from *Centaurea cineraria* subsp. *Umbrosa*. *Phytochemistry*, **1988**, 27(6), 1873-1875.
21. Milkova, T.; Marekov, N.; Welzel, P.; Hobert K. Constituents of *Centaurea diffusa* lam. Proceedings of Bulgarian Academy of sciences, **1993**, 46, 29-31.
22. Fernández, I.; Pedro, J. R.; Polo, E. Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. conifer*. *Phytochemistry*, **1995**, 38(3), 655-657.
23. Maurizio, B.; Paternesto, M. P.; Gedris, T.E.; Herz W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea nicaensis*. *Phytochemistry*, **1996**, 41(1), 335-336.
24. Bruno, M.; Vasallo, N.; Fazio, C.; Gedris, T.E.; Herz, W. Sesquiterpene lactones of two species from Sicily, *Biochem. Syst. Ecol.*, **1998**, 26(7), 801-803.

25. Skalta, H.; Lazari, D.; Panogouleas, C.; Georgiadou, E.; Garcia, B.; Sokovic, M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*, **2000**, 55(8), 903-908.
26. Medjroubi, K.; Benayache, F.; Leon, F.; Bermijo, J. Complete assignment of the ^{13}C of ^1H NMR spectra of two known guaianolides isolated from *Centaurea musimomum*. *Rev. Colomb. Quim.*, **2003**, 32, 17-21.
27. Kolli, E.; León, F.; Benayache, F.; Estévez, S.; Quintana, J.; Estévez, F.; Brouard, I.; Bermejo, J.; Benayache, F. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea omphalotricha*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2012**, 23(5), 977-983.
28. Bicha, S.; Chalard, P.; Hammoud, L.; León, F.; Brouard, I.; Garcia, V.G.; Lobstein, A.; Bentamene, A.; Benayache, S.; Bermejo, J.; Benayache, F. Maroccanin: a new α -lactone and other constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae). *Records of Natural Products*. **2013**, 7(2), 114-118.
29. Fisher, N.H.; Olivier, E. J.; Fischer, H.D. The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. *Fortschritte der chemie organischer naturstoffe / progress in the chemistry of organic natural products*, **1979**, 47-320.
30. Wichtl, M.; Anton, R. *Plantes thérapeutiques, Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. 2^e Editions, Tec & Doc, Paris, **2003**, p 636.
31. Negrette, R.E.; Backhouse, N.; Bravo, B.; Eraso, S.; Garciaet, R.; Avendano S. *Plantes Med. et phytothérapie*, **1987**, 21(2), 168-172.
32. Kamanzi, K.; Raynaud, J.; Voirin, B. *Plantes Med. et Phytothérapie*, **1983**, 17(1), 47-51.
33. Villar, A.; Paya, M. Isolement, identification et évaluation de l'activité antihyperglycémique d'un principe de *Centaurea seridis* L. var *maritima*. *Lge Plant. Med. Phytotherap.*, **1985**, 19, 4-10.
34. Chuclá, M. T.; Lamela, M.; Gato, A.; Cadavid, A. *Centaurea corcubionensis*: A Study of its Hypoglycemic Activity in Rats. *Planta Med.*, **1988**, 54(2), 107-109.
35. Marles, R. J.; Farnsworth, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **1995**, 2(2), 137-189.

الفصل الأول:

نواتج الأيض الثانوي

I-1- نواتج الأيض الثانوي

تنتج النباتات عدد كبير جدًا من المركبات، التي معظمها إلى حدّ الآن لم يتمكن العلماء من تحديد دورها الدقيق وأهميتها بالنسبة للنبات، لكن تمكنوا من تقسيمها إلى نواتج أولية وأخرى ثانوية، حيث عرّفوا النواتج الأولية بجميع المركبات التي يحتاجها النبات للنمو والإستمرار والتغذية وتشمل ثاني أكسيد الكربون، الماء، بعض الأملاح المعدنية، الأحماض الأمينية، السكريات والدهون.

أمّا النواتج الثانوية فهي المركبات التي لا تدخل بصفة مباشرة في تغذية النبات وتكاثره، لكنّها مسؤولة عن عدّة وظائف أخرى كالدفّاع، ألوان النبات..... إلخ وقد تمّ عزل و التعرف على أكثر من 100.000 مركب [1].

نجد نواتج الأيض الثانوي في مختلف أجزاء النبات، جذور، أوراق وزهور ولكن بنسب مختلفة حسب دورها وأهميتها في كلّ جزء، وقد قسمت إلى ثلاث أقسام رئيسية [2]:

• التربينات.

• المركبات الفينولية.

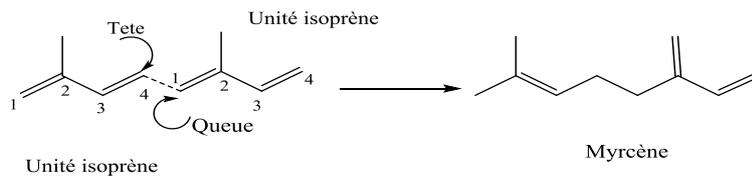
• القلويدات.

جميع هذه الأنواع ذات أهمية كبيرة في مجال الطب والصيدلة ولها تأثير فيزيولوجي على الكائن الحي.

ولأن الهدف من هذا البحث هو دراسة نواتج الأيض الثانوي لنبات *Centaurea solstitialis* ssp. (*DC.*) *schouwii* و *Serratula cichoracea* سنورد لمحة عن بعض هذه المركبات.

I-2- التربينات Les terpènes

هي مركبات هيدروكربونية، مشتقة من مزيج إثنين أو أكثر من وحدات الأيزوبرين [2]، والذي يتكون من خمس ذرات كربون (C_5H_8) و يعرف كيميائيًا باسم 1,3- diène -2- méthyl buta ، وقد تم إكتشافه في أوائل القرن العشرين من طرف Ruzzika [2]، حيث وضح أنّ التربينات تتكون من إتحاد رأس مع ذيل كما هو موضح في الشكل (I-1):



الشكل (I-1): طريقة تشكل التربينات

توجد التربينات في جميع النباتات العليا كما يمكن أن توجد في الطحالب والفطريات، كما تم العثور عليها في الحشرات والجراثيم.

قسمت التربينات حسب ما ذكره Guignard كما هو موضح في الجدول (1-I)

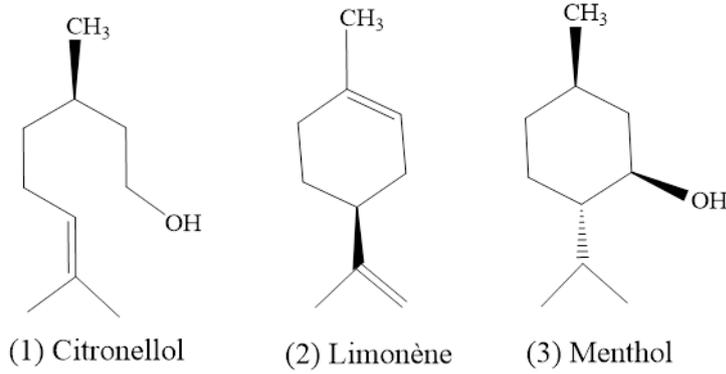
الجدول (1-I) : أقسام التربينات

عدد ذرات الكربون	إسم التربين	وحدات الأيزوبرين	أمثلة
10	التربينات الأحادية Monoterpènes	2	Myrcène
15	سيسكوتربينات Sesquiterpènes	3	Farnésol
20	التربينات الثنائية Diterpènes	4	Terpinol
30	التربينات الثلاثية و الستيرويدات Triterpènes et stéroïdes	6	Squalène
40	التربينات الرباعية Tetraterpènes	8	Carotène
أكثر من 40	متعدد التربين Polyterpènes	أكبر من 8	Caoutchouc

1-2-I- التربينات الأحادية

هي أبسط صيغ التربينات أغلبيتها موجودة في الزيوت العطرية " 90 % من الزيوت العطرية مشكلة من مركبات أحادية التربين [2] ."

هي مركبات تتكون من 10 ذرات كربون ناتجة عن تكاثف وحدتي أيزوبرين " رأس ذيل " [2]، وهي مركبات طيارة تعزي إليها الرائحة الزكية التي تتميز بها الكثير من النباتات، لذلك الكثير منها له أهمية تجارية حيث يستخدم في العطور ومستحضرات التجميل مثل citronellol (1) و limonène (2) ، كما يستخدم البعض منها في الطب مثل menthol (3) الذي يمتلك خصائص مضادة للإلتهاب ومضادة للفيروسات حيث يستخدم لتخفيف آلام الحلق ويعتبر مخدر موضعي ، كما تستخدم في أغراض أخرى الشكل (2-I) .



الشكل (2-1) : أمثلة عن التربينات الأحادية

2-2-1- التربينات الثنائية

تأخذ التربينات الثنائية حيز كبير في المملكة النباتية، وتختلف في تركيبها البنائي تبعاً لإختلاف المصدر الطبيعي وأغلبها مواد صلبة.

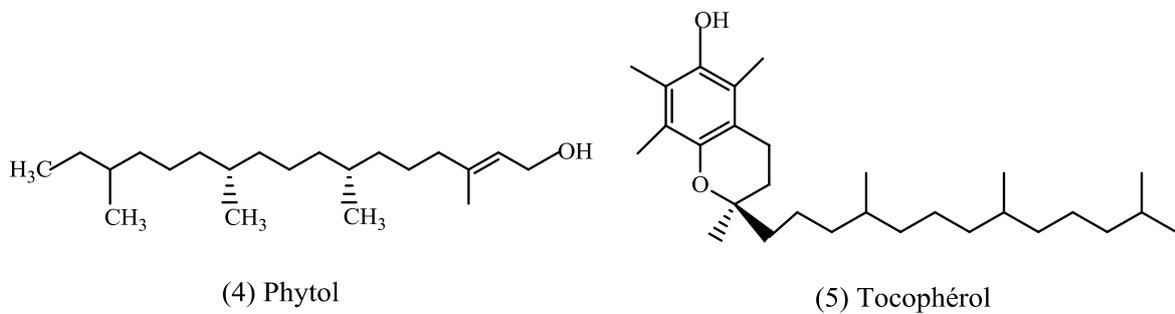
تتكون التربينات الثنائية من أربع وحدات من الأيزوبرين، وأهم المركبات التابعة لهذا القسم مركبان هامان: الفيتول والجبرلين، أما الفيتول فهو تربين رباعي ذو سلسلة مفتوحة يدخل في تكوين جزيء الكلوروفيل، حيث ترتبط حلقة البيروول مع الفيتول (4) يتم الإتحاد بين مجموعة الكربوكسيل بحلقة البيروول مع مجموعة الهيدروكسيل بالفيتول ليتكون الإستر المعروف باسم الكلوروفيل [3].

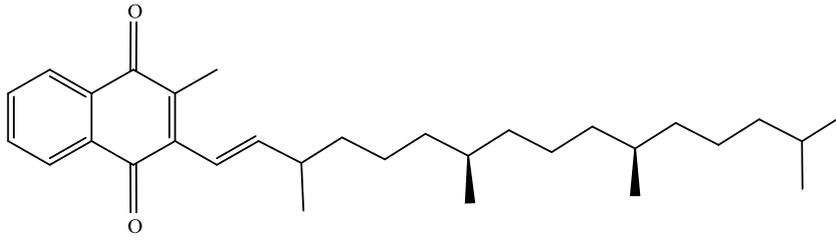
كما يدخل الفيتول في تشكيل كل من الفيتامين E (tocophérol) (5) والفيتامين K₁ (6) [4].

يحتوي الفيتامين A على 20 ذرة كربون وهو من أبرز التربينات الثنائية أحادية الحلقة.

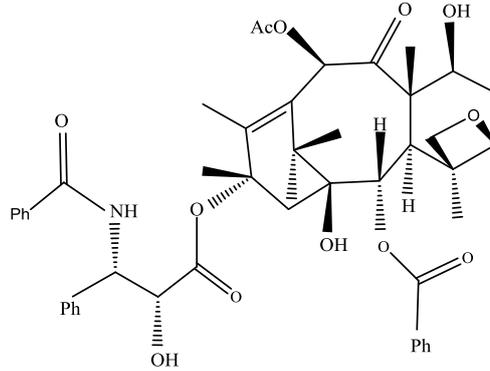
تستعمل التربينات الثنائية في علاج بعض الأمراض ويعتبر المركب paclitaxel (7) الذي تم عزله من نبات *Taxus brevifolia* (Taxaceae) العقار الأول كمضاد للسرطان في الوقت الحالي [5] كما هو

موضح في الشكل (3-1).





(6) Vitamine K1

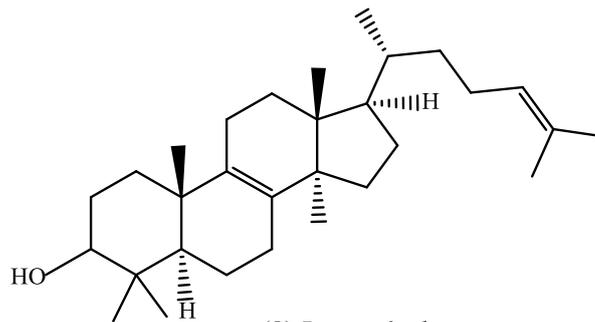


(7) Paclitaxel ou taxol

الشكل (3-I): أمثلة عن التربينات الثلاثية

3-2-I- التربينات الثلاثية والستيرويدات

إنّ أكثر أنواع التربينات إنتشارا في الطبيعة هي التربينات الثلاثية C_{30} وتجدر الإشارة إلى أنّ المركب لانوستيرول (8) هو التربين الثلاثي الشائع من أصل حيواني ويمثل هذا الأخير المصدر الطبيعي للستيرويدات وهو موضح في الشكل (4-I) .

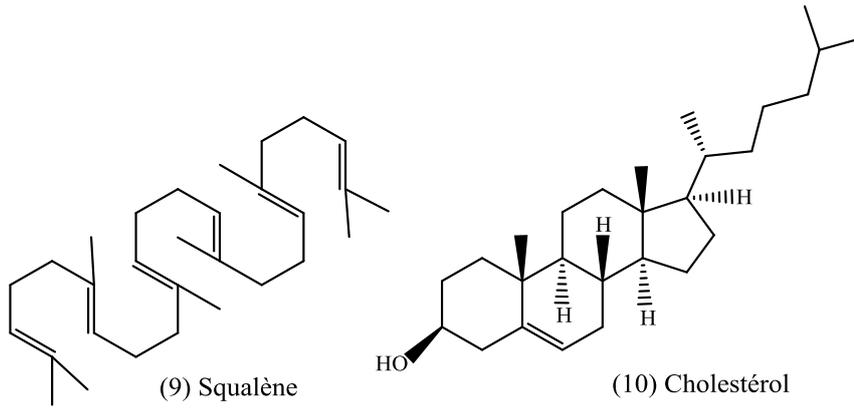


(8) Lanostérol

الشكل (4-I): مثال عن التربينات الثلاثية والستيرويدات

التربينات الثلاثية مركبات صلبة، بيضاء، أغلبها ينصهر عند درجة حرارة عالية، وهي مواد فعالة ضوئياً (متعددة المراكز الكيرالية)، موجودة في الطبيعة في صورة حرة أو إيثيروزيدية، ويدخل في

التركيب البنائي لهذه التربينات أربع أو خمس حلقات في بنائها هي الأكثر وفرة في الطبيعة ويعرف حتى الوقت الحاضر حوالي 40 هيكلًا بنائيًا [5] يتألف منها التركيب البنائي لجميع التربينات الثلاثية، يعتبر السكوالين (9) المصدر الأساسي للتربينات الثلاثية، حيث أنّ غالبية التربينات الثلاثية حلقة ولكن يوجد القليل منها على شكل خطّي تتميز التربينات الثلاثية بهياكل بنائية مختلفة ممّا يؤدي إلى تنوعها وهذه بعض الأمثلة عن التربينات الثلاثية الأكثر انتشارًا في المملكة النباتية مبيّنة أدناه في الشكل (5-I).

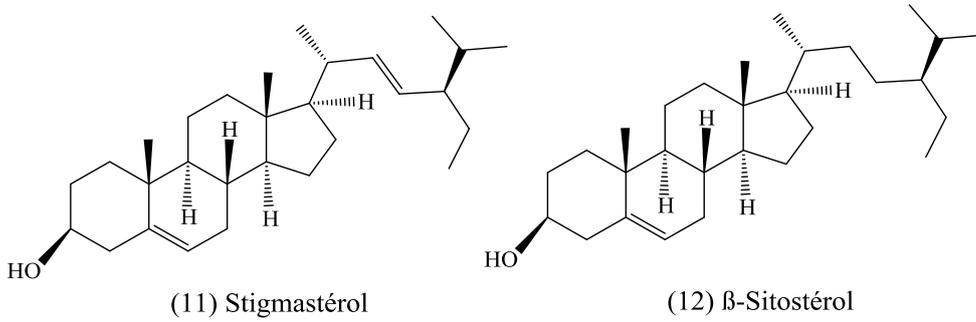


الشكل (5-I): أمثلة عن التربينات الثلاثية

هناك من صنف التربينات الثلاثية إلى عدة مجموعات جزئية [6]، تربينات ثلاثية حقيقية، ستيرويدات، قلويدات ستيرويدية، صابونيات وقلويدات قلبية والمجموعتان الأخيرتان هما أساسا إما تربينات ثلاثية حقيقية أو ستيرويدات موجودة في صورة جليكوزيدية، وبمقارنة أولية يمكن أن نعتبر أن ليس هناك إختلافات أساسية بين التربينات الثلاثية الحقيقية والستيرويدات، حيث يمكن اعتبار هذه الأخيرة تربينات ثلاثية رباعية الحلقة، فقدت على الأقل ثلاث مجموعات ميثيلية، إضافة إلى ذلك يستخدم في الأصل وجود ميثيلات المواقع 4،4،14، لتميز الستيرويدات عن التربينات الثلاثية [5].

يمثل الكولستيرول (10) أبرز مثال على مجموعة الستيرويدات، ويتوفر في جميع أنسجة الجسم، وعلى الأخص الدماغ والحبل الشوكي والحصوات الصفراوية، هذا ويحتوي الجسم على حوالي 125 غ من الكوليستيرول وإذا ترسبت مشتقات الكولستيرول في شرايين الجسم، فإن ذلك يؤدي إلى تصلب الشرايين وارتفاع ضغط الدم.

كما تم العثور على الكولسترول بكميات قليلة في عدد من النباتات الراقية مثل النخيل وفي غيرها كما في الطحالب الحمراء، أما في النباتات الدنيئة كالفطريات والفطريات فقد تم العثور على ergostérol الذي يحول بعد عملية الإستخلاص بطرق ميكروبيولوجية إلى ستيرويدات ذات أهمية صيدلانية [7]. أما الستيرويدات فهي مركبات ستيرويدية أحادية الهيدروكسيل تمتلك 27 أو 28 أو 29 ذرة كربون وجميعها تمتلك مجموعة هيدروكسيل في الموضع 3 ، ومعظمها يحتوي على رابطة ثنائية أو أكثر وتكون في العادة في الموضع 5، 22 أو 7 ، وقد كان الاعتقاد سائدا بأنها إنتاج حيواني من الأمثلة التي يمكن سردها stigmasterol (11) و β -sitosterol (12) وهما عبارة عن ستيرويدات مصدرها نباتي (الشكل 6-I).

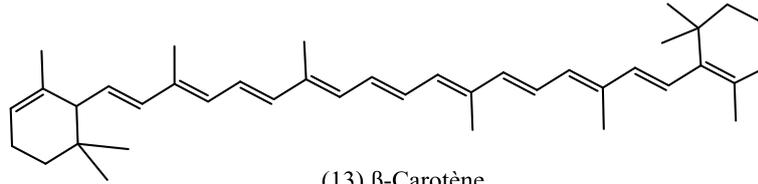


الشكل (6-I): أمثلة عن التربينات الثلاثية

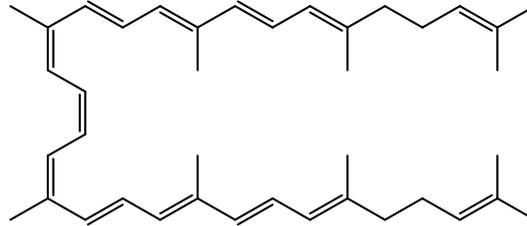
يمكن لهذه الستيرويدات أن تتواجد حرة أو في صورة جليكوزيدية وهناك بعض الستيرويدات أقل انتشارا وتعزى للنباتات الواطئة مثل: الخمائر والفطر.

4-2-I- التربينات الرباعية

هي مركبات تحتوي على 40 ذرة كربون، يطلق عليها أيضا مصطلح الكاروتينويدات، توجد في جميع أنسجة النباتات التي لها القدرة على البناء الضوئي، كما توجد في الجذور والأوراق الزهرية خاصة الأوراق الصفراء، لها أهمية فسيولوجية لدى النباتات التي تقوم بالبناء الضوئي، من صفاتها الكيميائية أنها سهلة الأكسدة وإعادة الترتيب في بنائها من خلال عملية إستخلاصها من الأنسجة النباتية وذلك لكثرة الروابط المضاعفة فيها من أشهرها أو من الأمثلة الشائعة: ألفا وبيتا كاروتين" سائدة في جذور الجزر" يؤدي إنقسام بيتا كاروتين (13) بواسطة البكتيريا في المخاط المعوي إلى جزيئين من فيتامين A، أيضا من مركباته الشهيرة le lycopène (14) الموجود في الطماطم (الشكل 7-I).



(13) B-Carotène

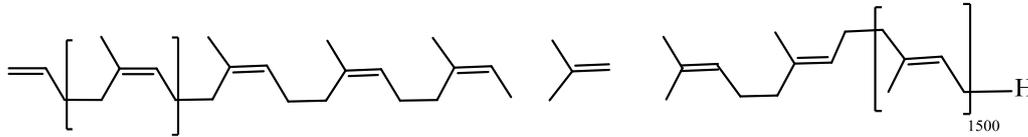


(14) Lycopène

الشكل (7-I): مثال عن التربينات الرباعية

I-2-5- التربينات المتعددة

لها أكثر من 40 ذرة كربون وتوجد في شمع الأوراق وعصارات الأشجار اللبنية، تنشأ من الإضافة المتكررة لوحدات الأيزوبرين إلى بعضها من أمثلتها المطاط (15) والمادة الصمغية العازلة التي تسمى قوتا برشا(16)، تتوفر هاتان المادتان في حوالي 2000 نوع من النباتات (الشكل-I-8) .



(15) Caoutchou

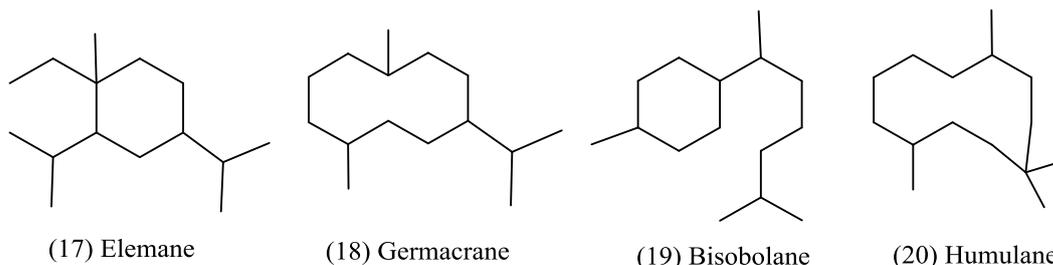
(16) Gutta percha

الشكل (8-I): مثال عن التربينات المتعددة

I-2-6- السيسكويتربينات

مركبات يدخل في تكوينها 15 ذرة كربون "ثلاث وحدات الأيزوبرين"، عبارة عن زيوت طيارة لها درجة غليان عالية. توجد كمركبات مفتوحة أو حلقة (أحادية، ثنائية أو ثلاثية) أو أوكسيجينية أو غير أوكسيجينية.

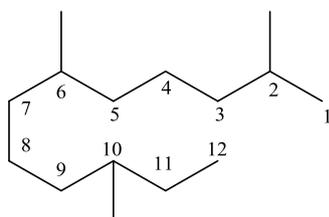
السيسكويتربينات أحادية الحلقة أكثر إنتشارا في الطبيعة من نظيرتها غير الحلقية تتمثل في أربع هياكل بنائية:



الشكل (9-I): الهياكل الأساسية للسيسكويتربينات أحادية الحلقة

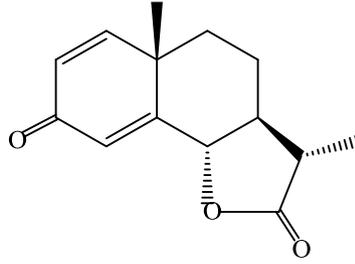
I-2-7- السيسكويتربينات اللاكتونية

بما أننا في صدد إسراد لمحة على بعض نواتج الأيض الثانوي للنبات، سوف نتطرق الآن بتفصيل أكثر لأهم ناتجين ثانويين لنباتات العائلة المركبة وهما الفلافونويدات والسيسكويتربينات اللاكتونية ، حيث بينت الدراسات البليوغرافية أنّ ما يميز هذه العائلة (Asteraceae النجمية) عن غيرها من العائلات غناها بنماذج بنيوية فريدة من نوعها تعرف بالسيسكويتربينات اللاكتونية وهي قسم من التربينات، يتكون هيكلها الرئيسي من 15 ذرة كربون وتحتوي على الأقل على المجموعة γ -لاكتون، تتشكل طبيعيًا داخل النباتات عن طريق تكاثف ثلاث وحدات أيزوبرين مكونة المركب 2,6,10- triméthyl dodécane (الشكل I- 10).



الشكل (10-I): 2,6,10- triméthyl dodécane

هذا الأخير يشكل الجزيء الأساسي لأغلبية العائلات السيسكويتربينية اللاكتونية. تكون السيسكويتربينات اللاكتونية مجموعة هامة من المركبات الطبيعية ذات الفعالية البيولوجية الكبيرة، التي تم الكشف عنها في أكثر من 15 عائلة نباتية أغلبيتها في العائلة المركبة وحددت أكثر من 4000 صيغة بنيوية [7-9] حيث كان تاريخ فصل أولها α -santonine (الشكل I- 11) سنة 1930 [10].

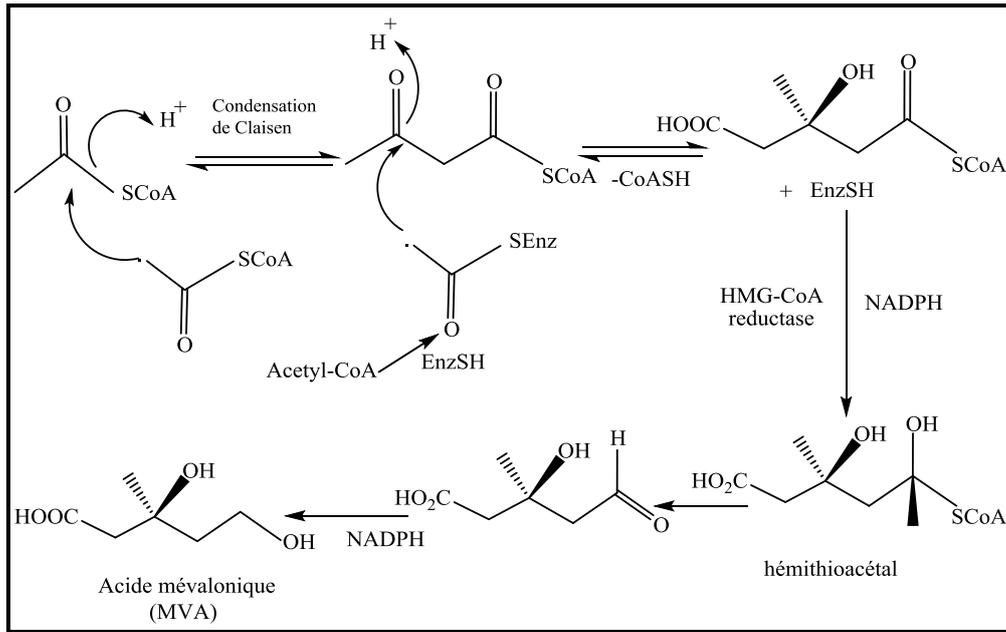
الشكل (11-I) : α -santonine

I-2-7-1- الإصطناع الحيوي للسيكوبترينات اللاكتونية

في 1887 وضع Wallach أول فرضية للإصطناع الحيوي للترينينات إنطلاقاً من ثلاث وحدات أيزوبرين، هذه الفرضية تم تأكيدها مخبرياً من طرف Ruzzika في 1953م [11،12] ، بعد ذلك قام Henedrikson [13] بوضع كل مراحل الإصطناع الحيوي الممكنة إنطلاقاً من ثلاث وحدات أسيتيل مرافق إنزيم A حسب المراحل التالية:

أ - تشكيل حمض الميفالونيك (MVA)

مما يجدر الإشارة إليه أنه أثبتت دراسات الترقيم بالنظائر باستعمال الكربون المشع أن المادة الأساسية الأولية لبناء الترينينات داخل مصادرها الطبيعية ليست الأيزوبرين، ولكنها مادة شبيهة له في البنية وهي isopentenyl pyrophosphate (IPP) ، هذه الأخيرة تنشأ من أسيتيل مرافق إنزيم (A) الغني بالطاقة، إذ يتحول أسيتيل مرافق إنزيم (A) إلى حمض ميفالونيك وذلك بتكاتفه مع أسيتو أسيتيل مرافق إنزيم (A) ثم إختزال الناتج بواسطة NADPH حسب الآتي:

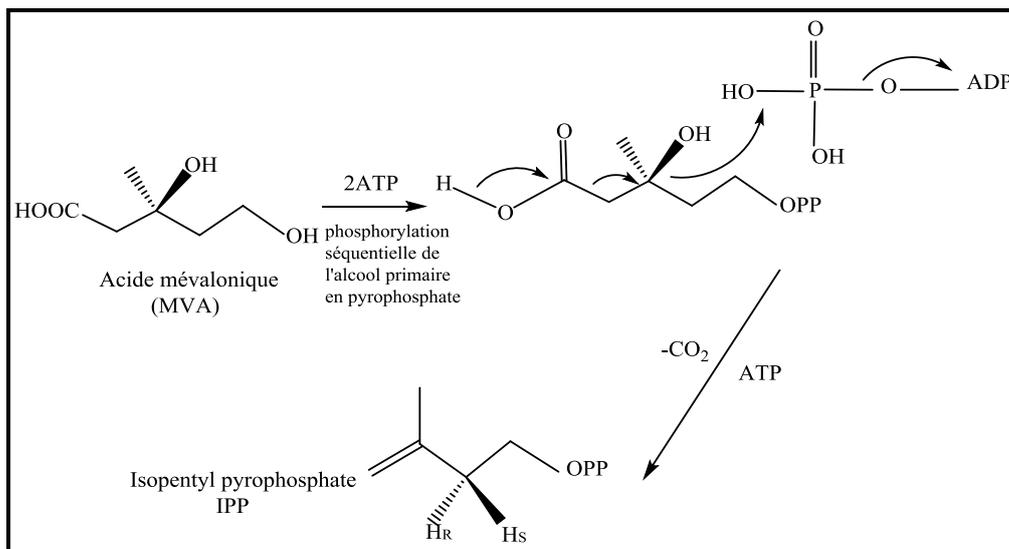


الشكل (12-I): تشكيل حمض الميفالونيك MVA

ب- تشكيل إيزوبنتيل بيروفوسفات (IPP)

يتحول حمض الميفالونيك (6 ذرات كربون)- المركب الأم في الإصطناع الحيوي للترينينات والستيرويدات- إلى بيروفوسفات إيزوبنتيل (5 ذرات كربون) وذلك عن طريق عملية الفسفرة، ثم فقدان ثاني أكسيد الكربون من مجموعة الكربوكسيل الذي يصاحبه تحرير الفوسفات كما هو موضح في

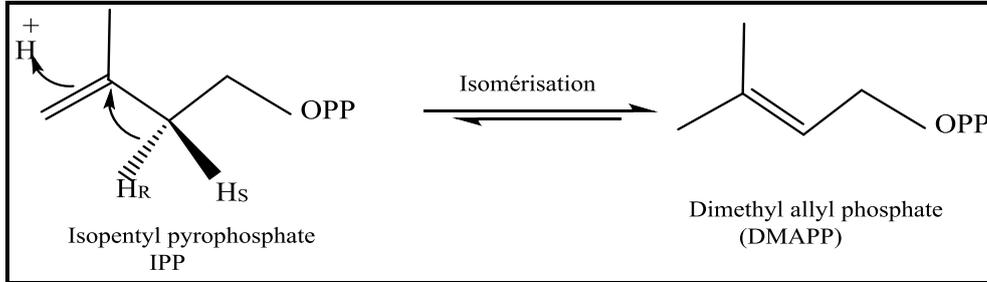
الشكل (13-I):



الشكل (13-I): تحويل حمض الميفالونيك إلى بيروفوسفات إيزوبنتيل

ج- تشكيل dimethyl allyl pyrophosphate (DMAPP)

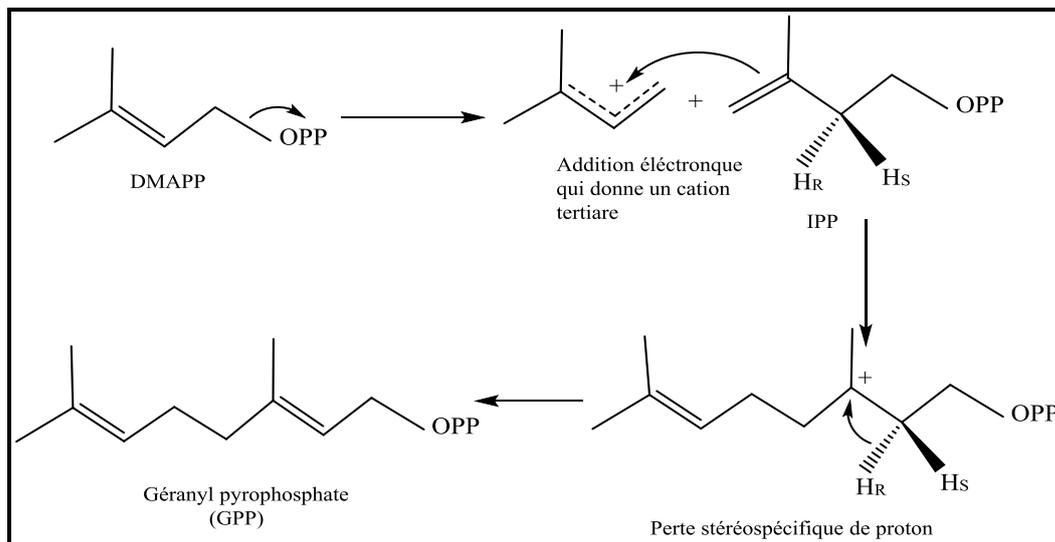
يتماكب isopent-3-ènyl إلى β , β - diméthyl allyl pyrophosphate حيث الرابطة الثنائية أكثر إستقرارا كما هو موضح في الشكل (I-14).



الشكل (I-14): تشكيل DMAPP

د- تشكيل المركب géranyl pyrophosphate (GPP)

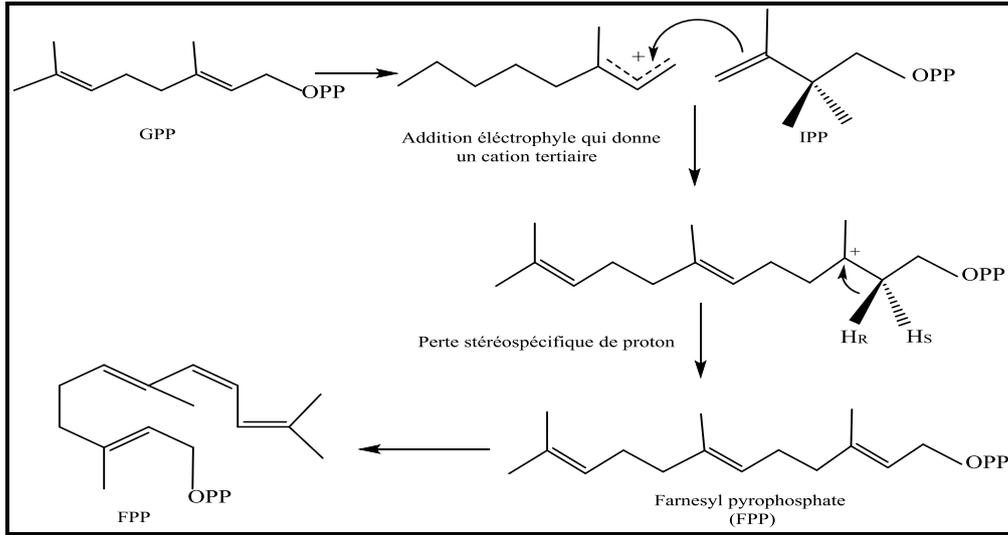
كما هو موضح في الشكل 15 فإن (GPP) ناتج عن تكاثف جزيئة diméthyl allyl pyrophosphate مع جزيئة isopentyl pyrophosphate في وجود إنزيم prenyl transférase يعد المركب GPP المركب الأم لجميع التربينات الأحادية الحلقية أو الخطية مكون من 10 ذرات كربون.



الشكل (I-15): تشكيل المركب géranyl pyrophosphate

ذ- تشكيل السيسكويتربينات اللاكتونية (FPP)

إن تكاثف جزيئة واحدة من (GPP) مع جزيئة واحدة من IPP رأس إلى ذيل كما هو موضح في الشكل 16 يؤدي إلى تكوين faranesyl pyrophosphate جزيئة مكونة من 15 ذرة كربون تعتبر المركب الأم المُفضي لتشييد السيسكويتربينات.

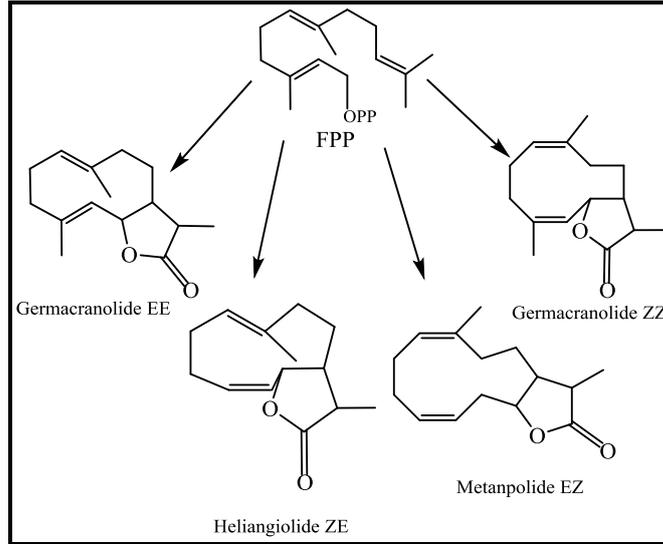


الشكل (I-16): تكوين Farnesyl pyrophosphate

- إن البنيات السيسكويتربينية اللاكتونية متنوعة، ولقد تطرق Fisher إلى مختلف أنواع هياكلها [14-17]، حيث بين أن الكيمياء الفراغية للروابط المضاعفة للفرنسيل بيروفوسفات تعطي أربعة مماكبات هندسية من اللاكتونات السيسكويتربينية وحيدة الحلقة ، هذه المماكبات مكونة أساسا من germacra, 1(10), 4(5)- diène- 6,12-olide الناتج من الفرنسيل بيروفوسفات بعد التحلق، أكسدة مجموعة ميثيل الإيزوبروبيل، أكسدة ذرة الكربون 6 وغلق على الأكسجين للوظيفة الهيدروكسيلية ، المماكبات الناتجة هي :

germacranolide (ZZ) و metanpolide (EZ) ، heliangiolide (ZE)، germacranolide (EE)

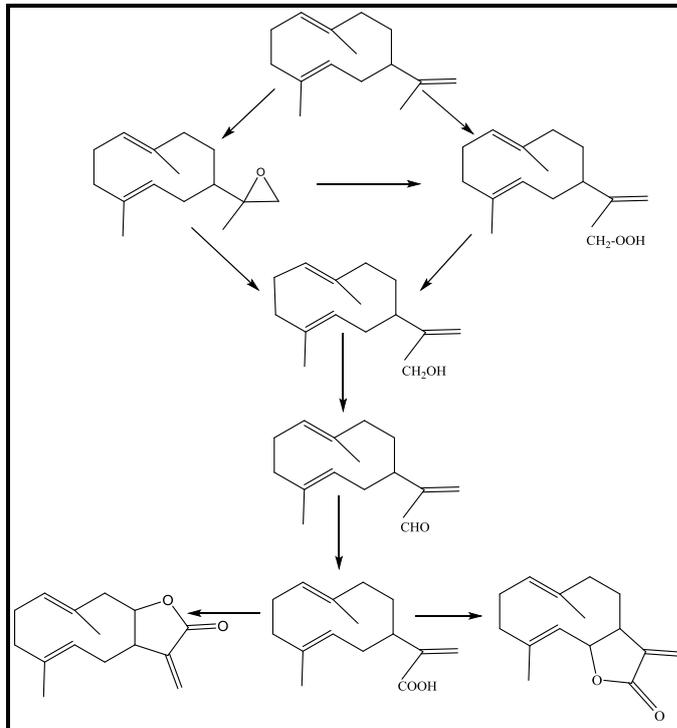
هو موضح في الشكل (I-17).



الشكل (17-I): المماكبات الأربعة الناتجة

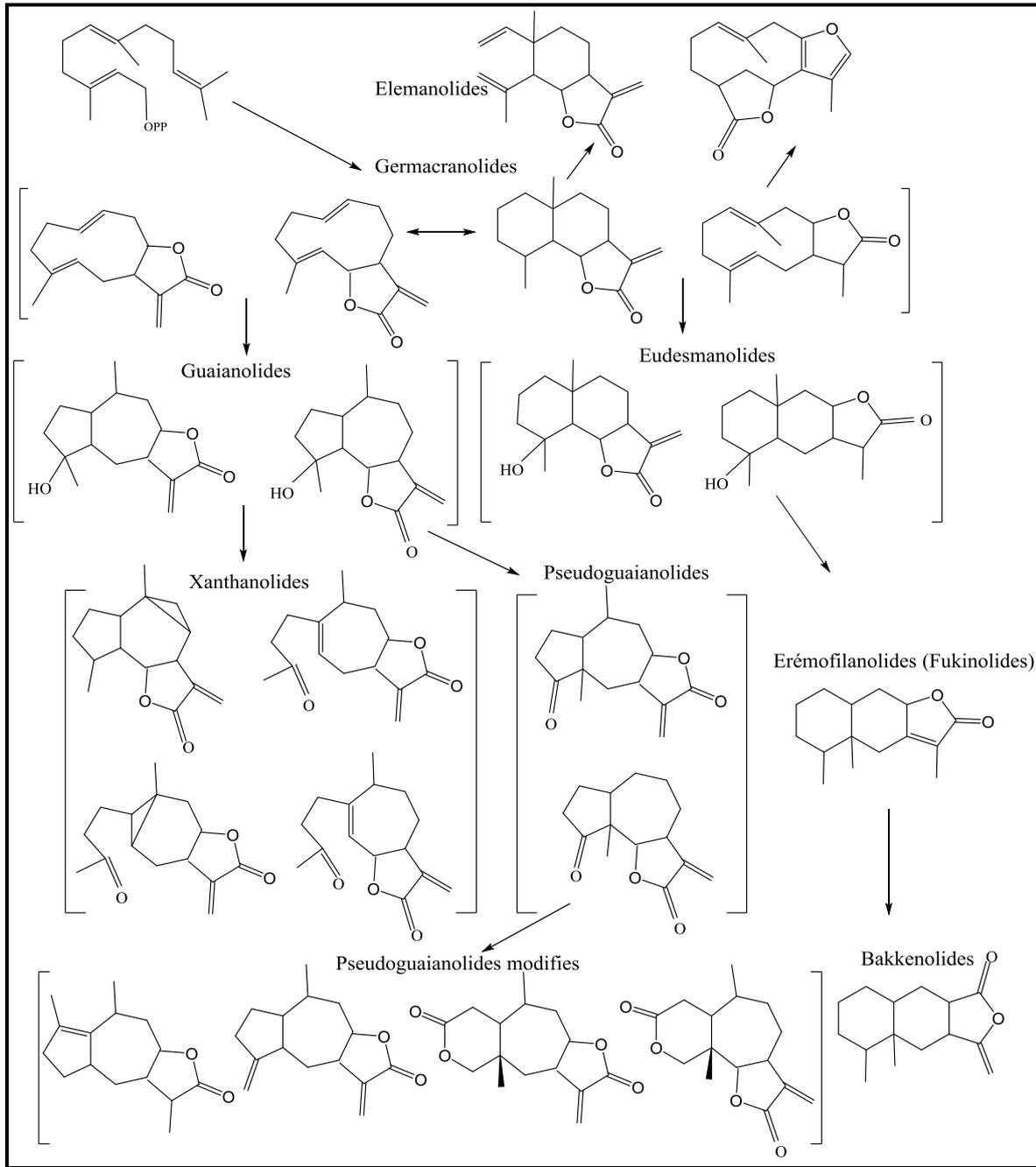
التصنيع الحيوي للحلقة γ -لاكتون يضم عدة إمكانيات [18,7] وذلك حسب الشكل (18-I):

- أولها تبيين الأكسدة على الكربون عن طريق الوظيفة الإيبوكسيدية.
- ثانيها الأكسدة عن طريق الهيدروبيروكسيد، وتظهر على مجموعة الألدريد أو الكربوكسيل التي تتأسر حلقيًا في الموقع 6 أو 8 حيث أن المجموعة الهيدروكسيلية تكون خاصة من الأكسدة الأنزيمية.



الشكل (18-I): مخطط يوضح الإصطناع الحيوي للحلقة اللاكتونية

- أنواع أخرى للهياكل الكربونية للاكتونات السييكويتريينية تتشكل من تفاعلات التحلق، كسر الرابطة وإعادة الترتيب... إلخ.
- التغيرات الثانوية للهياكل الكربونية كثيرة وتتركز حول:
- اللاكتون الذي يمكن أن يكون cis-12,6 ، trans-12,8 ، cis-12,6 ، trans-12,8 حيث أن هذا الأخير هو الأكثر وجودا.
- ويكون بصفة عامة من نوع α -ميثيل- γ - لاكتون والبروتون 7 في الوضعية α دائما [19-20] ما عدا المركبات المفصولة من الفطريات.
- يمكن للمجموعة الميثيلية أن تحمل الوظائف الكحولية، الأحماض الكربوكسيلية، وتشكل بذلك مراكز كيرالية [19].
- كما يمكن للروابط غير المشبعة أن تؤكسد، ترجع أو تستبدل إيبوكسيدات، هيدروكسيلات [21] أو هالوجينات [19-20].
- غالبا ما تكون الوظائف الهيدروكسيلية مؤسترة [22]، وينتج ذلك من الإتحاد مع الأحماض الأليفاتية ذات الوزن الجزيئي الضعيف.
- تتميز الكثير من اللاكتونات السييكويتريينية بالألدهيدات والسيتونات α, β -غير المشبعة، هذه الوظائف لها الخاصية الألكيلية، وبالتالي يمكن أن تتفاعل مع النيكوليفيلات البيولوجية خاصة الثيولات [16].
- إن التنوع الكبير لهذه المركبات يرجع في حقيقة الأمر إلى وجود علاقة بيوراثية (biogénitique) بين مختلف أنواع الهياكل السييكويتريينية اللاكتونية وهذا ما يبينه الشكل (I-19):



الشكل (I - 19): العلاقة البيوراثية بين مختلف أنواع الهياكل السيسكويتربينية اللاكتونية

I-2-7-2-الفعالية البيولوجية للسيسكويتربينات اللاكتونية

تشكل اللاكتونات السيسكويتربينية تنوعا كبيرا في الفعالية البيولوجية، حيث أنها مركبات مضادة للقرحة [23]، مضادة للإلتهاب [23]، مضادة للورم [24]، مضادة للسرطان [23-24]، مضادة للتأكسد [25]، مضادة للبكتيريا [26-27]، مضادة للفطريات [28]، مضادة للشقيقة [23]، منشطة للقلب [23].

I-2-7-3- الدراسة الكيميائية للسيسكويتربينات اللاكتونية

أ- طرق إستخلاص وفصل وتنقية السيسكويتربينات اللاكتونية

البحث عن السيسكويتربينات اللاكتونية وفصلها يتطلب قطف وتجفيف كمية كبيرة ومعتبرة من النبتة المختارة، بعدها يتم نقعها في مزيج هيدروكحولي يتكون عادة من الميثانول أو الإيثانول والماء بنسبة (3/7) أو (2/8) وتترك مدة 24 ساعة وتكرر هذه العملية ثلاث مرات على الأقل ثم ترشح الرشاحة المحصل عليها تبخر وتركز تحت الضغط المنخفض حتى الجفاف ليتحصل على المستخلص الخام للنبتة أين يعالج بالماء المقطر ويترك مدة ليلة كاملة للراحة، ثم يرشح للتخلص من بقايا الشوائب لتبدأ عملية الإستخلاص من نوع سائل- سائل باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية ابتداءً أولاً بإيثير البترول لنزع الكلوروفيل والهيدروكربونات والليبيدات، ثم الكلوروفورم، خلات الإيثيل وأخيراً البوتانول النظامي، تكرر عملية الإستخلاص ثلاث مرات مع كل مذيب بعد ذلك تركز الأطوار الثلاثة لنحصل على:

- السيسكويتربينات اللاكتونية متوسطة القطبية والفلافونويدات متعددة الميتركسيل في المستخلص الكلوروفورمي.

- السيسكويتربينات اللاكتونية التي تحتوي على أكثر من وظيفة و الأجليكونات القطبية وأحادية السكر في مستخلص خلات الإيثيل.

- الفلافونويدات متعددة السكر وكذا الفلافونويدات من نوع C-glycoside في المستخلص البوتانولي.

تعتبر قطبية السيسكويتربينات اللاكتونية متقاربة، لذا فإن فصلها إلى مكونات نقية يكون معقداً، ويتطلب وقتاً ومذيبات كافية، يستعمل لفصلها كروماتوغرافيا العمود من السليكا جال باستعمال إحدى جمل المذيبات الخاصة بعمليات التمليص الموضحة في الجدول (I-2).

الجدول (I-2): جدول المذيبات المستعملة في فصل السيسكويتربينات اللاكتونية في العمود الكروماتوغرافي

النسب	جمل المذيبات
9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:3	CHCl ₃ - Acétone
9:1, 4:1, 2 :1, 1:1, 2:3, 1:3	Hexane-AcOEt
1:1:1, 1:1:2, 2:2:1	Hexane-CHCl ₃ -AcOEt
99,5 :0,5, 99 :1, 98 :2, 95 :5, 50 :1, 10 :1	CHCl ₃ - MeOH

الجدول (2-I): جدول المذيبات المستعملة في فصل السييسكويتربينات اللاكتونية في العمود الكروماتوغرافي (تابع)

1:1	CHCl ₃ - AcOEt
1:3	Hexane- Et ₂ O
1:1	CH ₂ Cl ₂ -Me ₂ CO
99:1, 98:2, 97:3, 19:1, 9:1, 3:1	CH ₂ Cl ₂ -isPrOH
1 : 1 : 1	Et ₂ O-Toluéne- CH ₂ Cl ₂

بعدها يتم مواصلة فصل الكسور المعينة باستعمال عمود جديد أو إجراء سلسلة من فصول باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (من السليكاجال) واستعمال مذيبات ملائمة ينبغي إختبارها مسبقا.

ب- التعيين البنوي للسييسكويتربينات اللاكتونية

تلعب طرق التحليل الطيفي في الوقت الحاضر دورا كبيرا في التعرف على السييسكويتربينات اللاكتونية، من بين الطرق التي يعتمد عليها إلى حد كبير في التعرف على هذه المركبات، طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN^1H وكذا للكربون $RMN^{13}C$ الذي يعطي الدلالة الكاملة على عدد ذرات الكربون (15 ذرة كربون) الأمر الذي يؤكد وجود مركب سييسكويتريني.

أما بالنسبة لطيف IR يعتبر المجال 1700-1800 سم⁻¹ مشخصا لعصابات امتصاص مجموعات لاكتونية، مشبعة عند 1780 سم⁻¹ وغير مشبعة عند 1755 سم⁻¹ [29] غير أنه تظهر أيضا في نفس المجال عصابات مشخصة لمجموعات قريبة: الأسترات 1740 سم⁻¹، أسترات مشبعة 1735 سم⁻¹ وأسترات α ، β غير مشبعة 1720 سم⁻¹، بذلك يتضح عدم الإكتفاء بالكشف المعتمد على طيف IR . حيث أنه إذا ما استقر على وجود مركبات سييسكويتربينات لاكتونية لابد من تأكيدها بدراسة مطيافية الكتلة والرنين النووي المغناطيسي RMN و SM .

هذا ويجدر الإشارة إلى أن استعمال مطيافية الكتلة للتعين البنوي في السييسكويتربينات اللاكتونية يبقى محدودا، لكونها تتمتع ببنى غير ثابتة وتتبلمر بسهولة عند درجات الحرارة العالية، وهو ما يعيق الكشف عن القمة الجزئية، لذا عادة ما نلجأ إلى تقنية مطيافية الكتلة الأكثر هدوءا عن طريق تقنية التأيين الكيميائي هذه الطريقة تسمح بمعاينة القمم الجزئية وعموما فإن إسهام مطيافية الكتلة بالنسبة

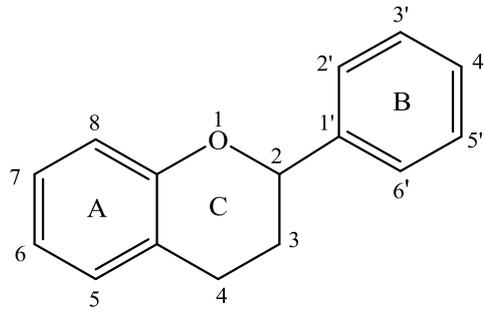
لمعظم المركبات السييسكويترينية يبقى محدودا نسبيا، ويسمح أساسا بمعرفة المجموعات الإستيرية على الهيكل السييسكويتريني [30].

I-3- المركبات الفينولية

المركبات الفينولية واحدة من بين الأسماء الأكثر شيوعا في ميدان المركبات الطبيعية، حيث تشكل حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية، نظرا لكثرة عددها وتباين هياكلها البنائية فمنها ما تحتوي في بنيتها على حلقة عطرية واحدة وتسمى بالمركبات الفينولية البسيطة ومنها ما هو أكثر تعقيدا أي تحتوي على أكثر من حلقة عطرية واحدة في بنيتها، وهذه المركبات تعتبر أكثر المركبات إنتشارا في الطبيعة وهي التي حظيت بالدراسة الوافرة، ومن أهم هذه المركبات منتجات تسمى الفلافونويدات.

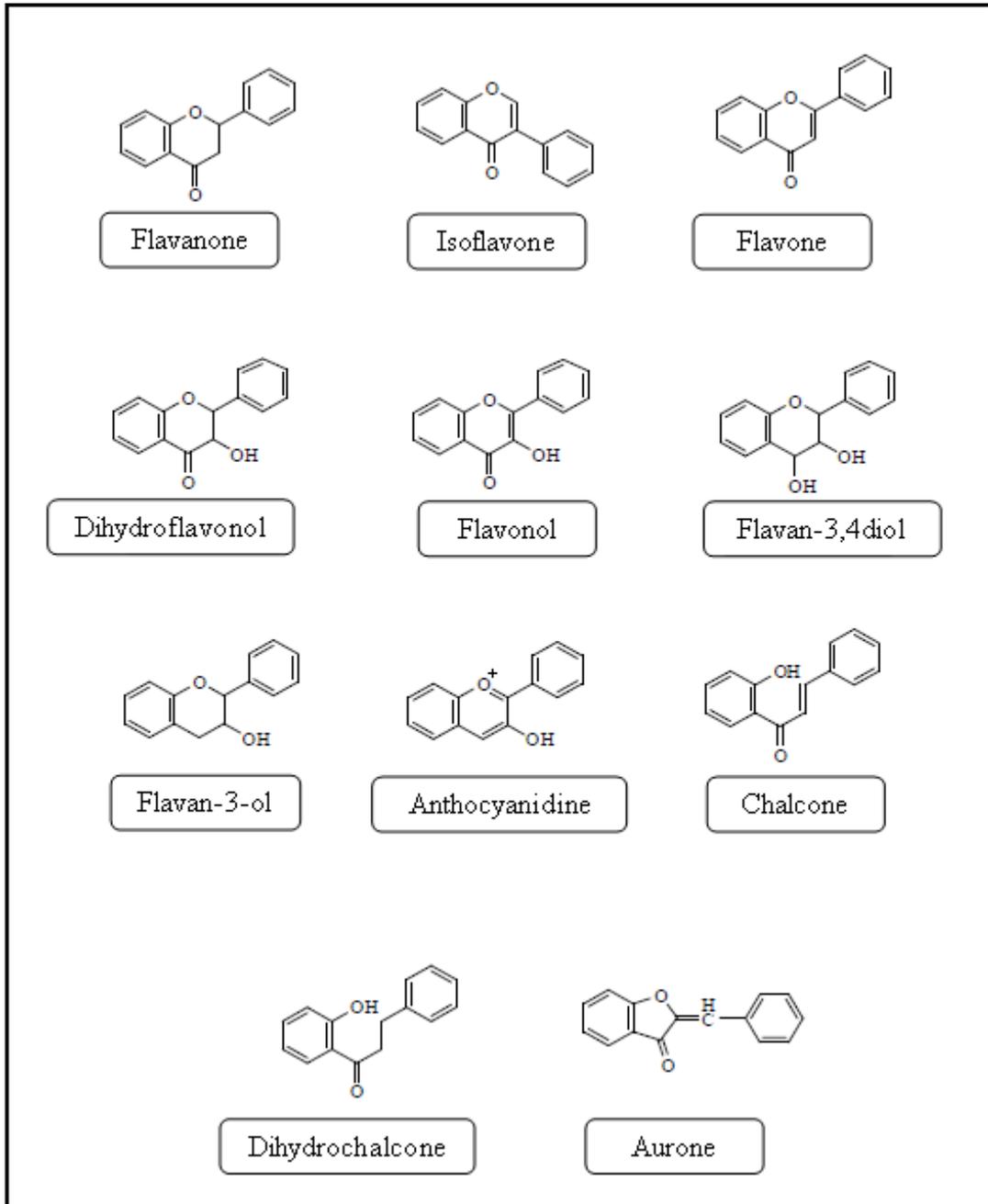
I-3-1- الفلافونويدات

صبغات نباتية صفراء، تنتشر في جميع الأجزاء المختلفة من النباتات (جذور، أوراق والزهور). تحتوي جميع الفلافونويدات في بنيتها على 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات كما هو موضح في الشكل (I-20) حيث تمثل نواة phenylchromane النواة الأم لمختلف صيغ الفلافونويدات



الشكل (I-20): نواة 2-phenylchromane

تصنف الفلافونويدات إلى عدة مجموعات، كل مجموعة حسب درجة تأكسد الحلقة C و كذلك حسب نوع التحلق، في حين يحدد نوع الفلافونويد داخل المجموعة الواحدة من خلال المستبدلات على الحلقتين A و B [31] والشكل (I-21) يوضح الصيغ الأكثر إنتشارا في الطبيعة.



الشكل (21-I) : مختلف الصيغ الكيميائية للفلافونويدات

في الغالب المركبات الفلافونويدية تحتوي على مجموعة هيدروكسيل أو ميتوكسيل كما قد تحتوي إضافة إلى ذلك على وحدات سكرية، هذه الأخيرة ترتبط بالهيكل الفلافونيدي بنوعين من الروابط:

• الرابطة من نوع O-glycoside

حيث يرتبط السكر بالأغليكون برابطة أكسيجينية عبر إحدى الهيدروكسيلات الفينولية، ففي حالة الفلافون يكون هيدروكسيل الموضع 7 هو الأكثر إستبدالاً يليه بنسبة أقل هيدروكسيلات الموضع 4، 5.

أما في حالة الفلافونول فأكثر الهيدروكسيلات إستبدالاً هو هيدروكسيل الموضع 3 يليه هيدروكسيل الموضع 7، أما بقية المواضع فاستبدالها نادر، كما يمكن الحصول على فلافونويدات ثنائية أو متعددة السكر عبر ارتباط عدة سكريات بعدة مواقع على الفلافونويد أو بارتباط سكر ثان وثالث ورابع والجدول (3) يعطي مختلف السكريات التي يمكنها أن ترتبط بالفلافونويد وحيد أو في تشكيلات سكرية [32].

الجدول (3-I): بعض السكريات التي نصادفها مع الفلافونويدات

Pentose	Hexoses	Uronic Acid
D-Apiose	D-Allose	D-Glacturonic
L-Arabinose	D-Galactose	D- Glucuronic
L- Rhamnose	D-Glucose	
D- Xylose	D-Mannose	

• الرابطة من نوع C-glycoside

يرتبط السكر في هذه الحالة مباشرة بالأغليكون برابطة كربون- كربون ويكون الإرتباط في الموضعين 6 و 8 من الحلقة A ويلاحظ هذا النوع من الجليكوزيدات مع الفلافونات بالخصوص، يمكن أن يرتبط سكر واحد بأحد الموضعين 6 أو 8 كما يمكن أن يرتبط سكرين بالموضعين 6 و 8 أما أنواع السكريات التي نصادفها مع هذا النوع من المركبات هي:

glucose ، rhamnose ، galactose ، xylose ، arabinose يكون هذا النوع من الغليكوزيدات مقاوم للتمييه الحمضي على عكس O-glycoside.

I-3-2- تواجد الفلافونويدات

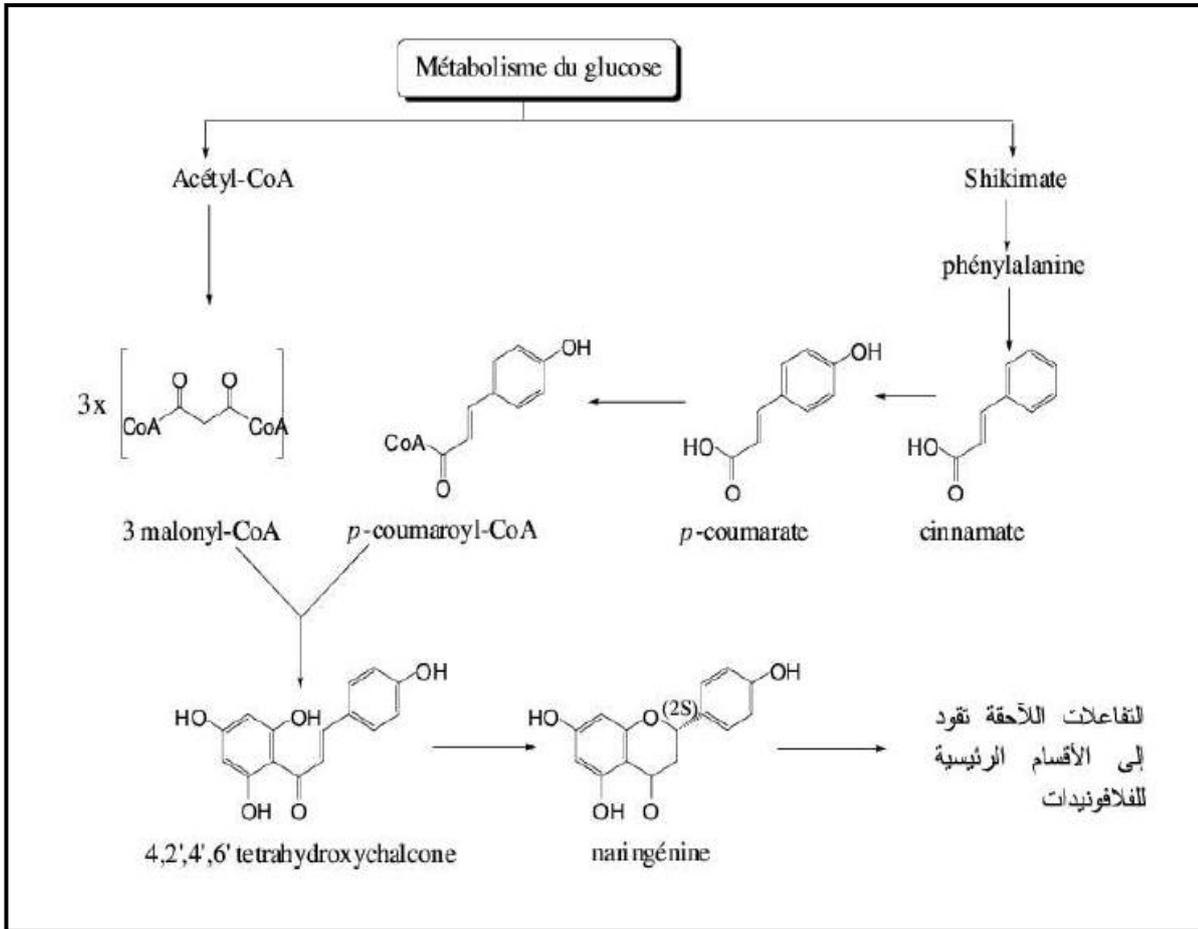
توجد الفلافونويدات في معظم الأصناف النباتية تقريبا، بما فيها الأغذية ذات الأصل النباتي (التفاح، الليمون، البرتقال)، وكذلك الخضروات والبقوليات والخضراء وكذا المشروبات (عصير، شاي، فواكه.....).

وعلى مستوى النبات نفسه فإن الدراسات أثبتت تواجدها في جميع الأجزاء من أوراق، أزهار، بذور، جذور وفي الفلق.... غير أن نسبتها تكون بتركيز عالية في الأجزاء الهوائية من أزهار وأوراق خاصة أما على مستوى الخلية فإن الفلافونويدات تتواجد بشكل إيثيروزيدات ذوابة في الماء متمركزة في حويصة الخلية، والفلافونويدات عديدة الميتوكسيل تتواجد في سيتوبلازم الخلية [33] والتي تكون على شكل أغليكونات نجدها على الأنسجة السطحية للأوراق حيث تكون ملازمة لمواد مفرزة هي الأخرى ليوبفيلية وهو حال نباتات المناطق الجافة وشبه الجافة [34].

وعموما توجد الفلافونويدات بشكل محمي أي إيثيروزيدات، بينما توجد الأغليكونات في الأنسجة النباتية الميتة نتيجة التمييه الحمضي المحفز بواسطة الإنزيمات، وكذلك في خشب الأشجار [34].

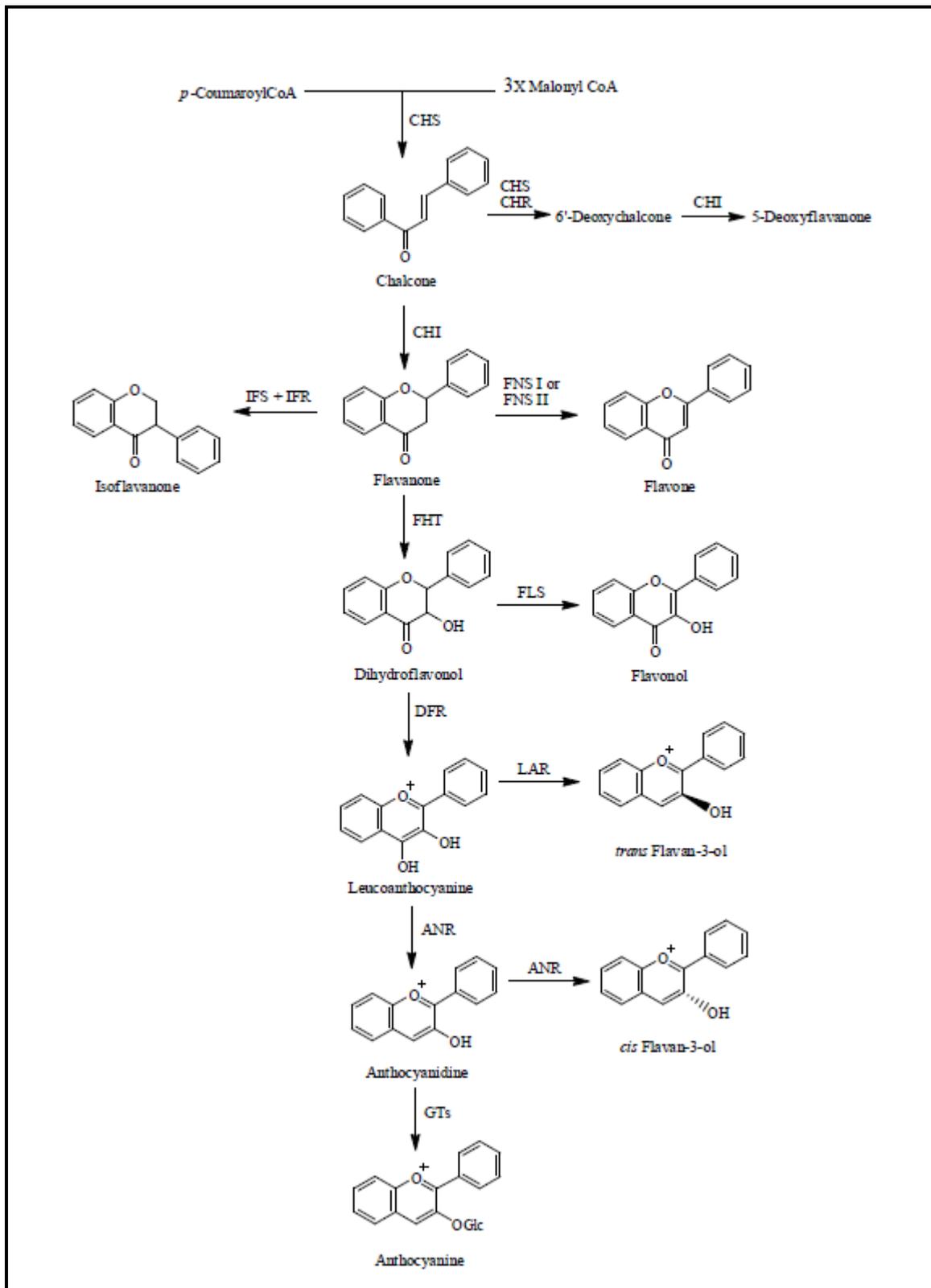
I-3-3- الإصطناع الحيوي للفلافونويدات

كل الفلافونويدات لها نفس الهيكل القاعدي لأنها آتية من أصل إصطناعي حيواني مشترك في الحلقة A (malonyl- CoA)، أما الحلقة B والسلسلة الكربونية فتتشكل عن طريق الشيكيمات الذي يتحول إلى حمض باراكومارويل كونزيم (Acide P- coumaroyl A) تتكاثف ثلاث وحدات من (Acide P- coumaroyl -CoA) فيما بينها وفي مرحلة إنزيمية واحدة نواة الشالكون^{4,2',4',6'} tetrahydroxychalcone الشكل (I-22)[35].



الشكل (22-I): مخطط يوضح تشكل نواة الشالكون

هذا الأخير يعتبر نقطة إنطلاق لإصطناع العديد من الفلافونويدات الموضحة في الشكل (23-I) وهذا بوجود محفزات إنزيمية تخص كل مرحلة من المراحل.



الشكل (I-23): مخطط يوضح الإصطناع الحيوي للفلافونويدات

وفيما يلي قائمة المختصرات المستعملة لمختلف الإنزيمات الداخلة في عملية الإصطناع الحيوي:

ANR, anthocyanidin reductase ;
 ANS, Anthocyanidin synthase (also known as lencoanthocyanidin dioxygenase) ;
 CHI, chalcone isomerase ; CHR , chalcone reductase ;
 CHS, chalcone synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reducthase ;
 FNSI and FNSII , flavone synthase I and II ;
 IFR, isoflavone reductase ; IFS, isoflavone synthase ; LAR, lencoanthocyanidin reductase ;
 GTs, glucosyl transferases.

يمثل الفلافانون أهم الفروع الفلافونويدية، حيث ينتج عن عملية تحويل فراغية نوعية إنطلاقاً من نواة الشالكون [36].

كما أن إعادة الترتيب للفلافانون بفعل الإنزيم isoflavone synthase والذي يقود إلى الإيزوفلافون، يعتبر أول تفاعل نوعي للإصطناع الحيوي للإيزوفلافونويدات [37]، حيث أن 2-hydroxy isoflavone هو المركب الوسيطي لهذا التفاعل [38]، ويعتقد أن العملية تتم في خطوتين الأولى هجرة 1,2-aryl مصحوبة بأكسدة والثانية نزع الماء لتشكيل الإيزوفلافون، أما الإنزيم flavanone hydroxylase يحفز تفاعل hydroxilation للفلافانون إلى dihydroflavanol وهذا ما أظهرته أبحاث Forkmann [39].

I-3-4- الفعالية البيولوجية للفلافونويدات

زاد الإهتمام في السنوات الأخيرة بالمركبات الفلافونويدية بحيث بينت الدراسات ونتائج أبحاث مكثفة في ميدان الطب والبيولوجيا فعاليتها المضادة للسرطان، المضادة للحساسية، المضادة للفيروسات والبكتيريا وفعاليات أخرى [40].

• التأثير المضاد للسرطان:

أثبتت تجارب عديدة ومكثفة الدور الوقائي للفلافونويدات ضد ظهور السرطان، ويعتبر النشاط المضاد للأكسدة لهذه المركبات إحدى الآليات الأولى التي تمت دراستها.

تعمل الفلافونويدات على إقتناص الجذور الحرة التي تؤدي إلى إحداث تشوهات بالحمض الريبي النووي ADN المنقوص الأكسجين وبالتالي حدوث طفرات في المورثات الورمية أو الكابحة لظهور الأورام، التي تعتبر بادرة لظهور هذا المرض [41].

يمكن للفلافونويدات أن تثبط الإنزيمات المتدخلة في تنشيط procarcinogènes وتحويلها إلى مواد مسرطنة [42]، حيث تم إثبات دور كل من الـ quercétine - kaempférol - galangine وكلها من صنف الفلافونول إضافة إلى apigénine من صنف الفلافون في تثبيت إنزيم Cyt p450 من عائلة Cup1A وهو من إنزيمات المرحلة الأولى للتحويل الحيوي في الكبد ويعمل على زيادة نشاط أغلب المواد الكيميائية المولدة للسرطان كالهيدروكربونات العطرية لجعلها قادرة على الارتباط بـ ADN وإحداث الطفرات [43].

في حين يعمل كلا من marigine و quercétine على تثبيط Cup 3A4 وهو من الإنزيمات الأكثر تواجدا في الكبد ويعمل على إسقلاب عدد كبير من الأدوية ومولدات السرطان [44].

• التأثير المضاد للحساسية:

يعود هذا الفعل إلى تأثير الفلافونويدات على إنتاج الهستامين المسبب للحساسية، فتعمل الفلافونويدات على تثبيط بعض الإنزيمات المحررة للهستامين من خلايا الماستوسيت، والخلايا القاعدية كـ AMP phosphodiesterase و ATPase Ca²⁺ dépendante فمثلا يعمل هذا الأخير على تحرير الطاقة من إماهة ATP لتسهيل إمتصاص الكالسيوم من قبل الأغشية الخلوية هذا الذي يسمح بتحرير الهستامين المخزن داخل الحويصلات الخلوية.

كما أثبتت الدراسات أن مركب quercétine أظهر قدرة أكبر من تلك التي لـ Cromoglycate de sodium والمستعمل كدواء مضاد لتحرير الهستامين [45].

• التأثير المضاد للإلتهاب:

إن إسقلاب حمض الأراشيدونيك تحت تأثير كل من إنزيمي cyclo-oxygénase و lipoxygénase يؤدي إلى إنتاج كل من prostaglandines و leucotriènes المسؤولة عن مظاهر الإلتهاب. وقد بين Landofi وفريقه أن بعض الفلافونويدات قادرة على تغيير مسار حمض الأراشيدونيك داخل الصفائح الدموية، حيث ثبت أن كل من myricétine و quercétine بتراكيز عالية يثبطان كل من cyclo-oxygénase و lipoxygénase أما عند التراكيز المنخفضة فيثبطان إنزيم lipoxygénase في حين كل من chrysine و apigénine يوقفان نشاط cyclo-oxygénase [46].

• النشاط المضاد للفيروسات والبكتيريا:

أكثر ما ركزت عليه الأبحاث فيما يخص نشاط الفلافونويدات المضادة للفيروسات هو دراسة تأثير هذه المركبات على فيروس HIV المسؤول عن أعراض العوز المناعي المكتسب (السيدا) [47]. وقد تم

إثبات فعالية الفلافونويدات على كبح تضاعف فيروس السيدا وذلك بتثبيطها لإنزيم الإستتساخ العكسي revers transcriptase [48].

لكن تأثيرها الكابح على كل من إنزيمي ARN و ADN بوليمراز للخلية العائل أكبر من ذلك الملاحظ على revers transcriptase الفيروسي [49،50].

كما بينت دراسات حديثة التأثير الإنتقائي لبعض الفلافونويدات على فيروس HIV وذلك بتداخلها مع بروتين سكري glycoprotéine موجود على سطحه وهو gp 120 مما يعيق ارتباط هذا الفيروس بالخلية العائل [51].

نظريا للفلافونويدات تأثير مضاد للبكتيريا وهذا من خلال إثبات فعاليتها المثبطة لإنزيم ADN gyrase على النماذج المخبرية invitro [52].

أظهرت دراسات حديثة نشاط الفلافونويدات المضادة للبكتيريا *staphylococcus aureus* [52] وتعتبر الآلية التي تؤثر من خلالها الفلافونويدات ضد الميكروبات جد معقدة ونذكر من بين الفرضيات ما يلي:

- تثبيط الإنزيمات الميكروبية خارج الخلية.
- حجز المواد الضرورية للنمو الميكروبي والتقاط بعض المعادن مثل الحديد.
- تثبيط النشاط الاستقلابي للمكروبات [53].

I-1-3-5- الدراسة الكيميائية للفلافونويدات

أ- طرق استخلاص فصل وتنقية المركبات الفلافونويدية

إنّ طريقة استخلاص المركبات الفلافونويدية هي نفسها المشار إليها في استخلاص المركبات السيسكويتربينية اللاكتونية غير أن طريقة فصلها وتنقيتها تكون مختلفة إلى حد ما، حيث يعتمد في فصلها وتنقيتها على مختلف التقنيات الكروماتوغرافية.

وتعتبر كروماتوغرافيا العمود الطريقة الأفضل في فصل كميات كثيرة من المركبات الفلافونويدية، إذ تعتمد هذه الطريقة على الأطوار الثابتة: السليكاجال (gel de silice) والسليولوز (cellulose) ومتعدد الأמיד (polyamide) الذي يعتبر الأفضل لكونه مناسباً للمركبات الفلافونويدية خاصة الجليكوزيدية منها، وذلك لاحتوائه على الوظيفة الأميدية السامحة بتشكيل روابط هيدروجينية قوية مع المجاميع الهيدروكسيلية (OH) [54].

الكسور المحصل عليها عند نهاية العمود تركز وتجمع المتشابهة منها لتفصل مجددا باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية CCM على شرائح من السليكاجال أو متعدد الأמיד أو باستعمال كروماتوغرافيا الورق، كما أن الكسور المعقدة وذات الكميات الكبيرة يمكن أن تفصل مرة ثانية في عمود كروماتوغرافي وأخيرا المركبات المفصولة تنقى عادة في عمود صغير من الـ LH-20 sephadex أو من البولي أميد لنحصل على فلافونويدات نقية جاهزة لدراسة بنيويتها.

ب- التعيين البنيوي للفلافونويدات

يستخدم الكيميائي لاستنتاج بنى المركبات الجديدة الطرق الفيزيائية للتحليل غير أنه في بعض الأحيان يحتاج للجمع بين هذه الطرق والطرق الكيميائية للوصول للصيغ النهائية، من بين الطرق الفيزيائية المستخدمة:

✓ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية.

✓ مطيافية الطنين النووي المغناطيسي.

✓ مطيافية الكتلة.

بالإضافة إلى هذه الأطياف يستعمل ثابت الانحباس R_f واللون الإشعاعي في إعطاء معلومات أولية مهمة توجهنا إلى الصيغ والمستبدلات المختلفة.

- اللون الإشعاعي:

إن لون المركبات الفلافونويدية تحت الأشعة فوق البنفسجية عند 365 نم هو أول المعطيات التي تقودنا إلى تحديد صيغتها البنيوية التقريبية فالجدول رقم(4) يلخص العلاقة بين الفلافونويد ولونه تحت الأشعة فوق البنفسجية [55-56].

الجدول (4-I) : العلاقة بين اللون تحت UV والبنية الفلافونويدية

لون المركب تحت أشعة UV	البنى المختلفة
بنفسجي مسود	- فلافون (5-OH). - فلافون (6-OH, 8-OH). - فلافونول (3-OR, 4'-OH). - فلافونول (3-OR, 5-OH, 4'-OR).

الجدول (4-I): العلاقة بين اللون تحت UV والبنية الفلافونويدية (تابع)

أزرق	- فلافون أو فلافانول بدون OH في الموضع 5. - فلافانول مع OH في الموضع 3 وبدون OH في الموضع 5.
أصفر باهت	- فلافونول مع OH في الموضع 3 و 5.
أصفر لامع	- أوران مع OH في الموضع 4.
أصفر مخضر	- فلافونون بدون OH في الموضع 5.
أخضر	- بعض الشالكونات.

- ثابت الانحباس R_f :

- يمكن تحديد القيمة R_f كما يلي:

$$R_f = \frac{\text{المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقاً من نقطة البداية}}{\text{المسافة المقطوعة من طرف المذيب انطلاقاً من نفس النقطة}}$$

نلجأ في بعض الأحيان إلى المعامل R_f لتحديد البنية الجزيئية المحتملة، وهذا لوجود علاقة بين R_f وطبيعة المركب، حيث أن قيمته تتأثر بالمستبدلات ومواقعها على الجزيء. فانطلاقاً من قيم R_f يمكننا التمييز بين الجليكوزيدات والأجليكونات، ومن جهة أخرى بين الجليكوزيدات أحادية السكر، ثنائية السكر ومتعددة السكر حسب الجدول (5) وهو قيمة مميزة للمركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، المذيب، تركيز العينة وطبيعة المادة...) [57].

الجدول (5-I): العلاقة بين R_f والبنية الفلافونويدية

R_f	البنية الفلافونويدية
نقصان R_f في الأنظمة العضوية.	الزيادة في عدد مجاميع OH-
يزداد R_f في النظام العضوي.	استبدال OH- بمجموعة $-OCH_3$
تنقص قيمة R_f في الأنظمة العضوية وتزداد في الأنظمة المائية.	إدخال المجموعة السكرية

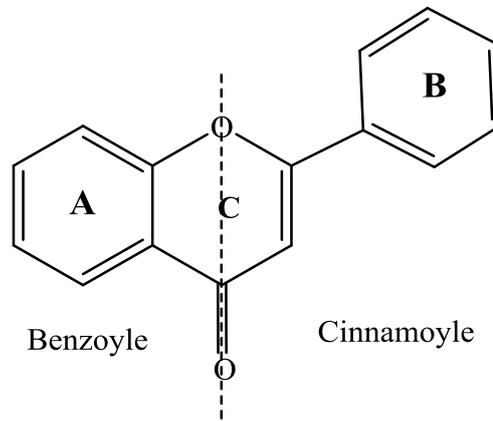
- التحليل الطيفي للفلافونويدات:

➤ طيف الأشعة فوق البنفسجية للمركبات الفلافونويدية:

بالنسبة لطيف الإمتصاص للأشعة فوق البنفسجية UV الخاص بالمركبات الفلافونويدية فإنه يؤخذ عادة في محلول الميثانول أو الإيثانول وهو يتميز بحزمتين:

الحزمة I: ناتجة عن فرع السينامويل المتشكل من الحلقة B مع المجموعة إينون، وتظهر هذه الحزمة ما بين 320 و 380 نانومتر.

الحزمة II: راجعة لفرع البنزويل المتكون من الحلقة A ووظيفة الكيتون، وتظهر هذه الحزمة ما بين 240-280 نانومتر [58] (الشكل I-24).



الشكل (I-24): مركب فلافونويدي

والجدول رقم 6 يعطينا مكان إمتصاص الحزمتين I و II لبعض أنواع الفلافونويدات:

الجدول (I-6) : العلاقة بين المركب الفلافونويدي وموقع الحزمتين I و II

الحزمة II	الحزمة I	نوع المركب الفلافونويدي
280-250	350-320	فلافون
280-250	385-350	فلافونول (3-OH)
280-250	360-330	فلافونول (3-OR)
275-245	330-310	إيزوفلافونون
295-275	330-300	فلافانون وثنائي هيدروفلافانول

الجدول (I- 6) : العلاقة بين المركب الفلافونويدي وموقع الحزمتين I و II (تابع)

شالكون	390-340	270-230 شدة ضعيفة
أورون	440-380	270-230 شدة ضعيفة
أنتوسيانيتين وأنتوسيانين	560-465	280-270

ومما تجدر الإشارة له أن مكان الحزمتين ضمن المدى المذكور في الجدول يعتمد على عدد ومواقع مجموعات الهيدروكسيل، حيث نلاحظ أنه كلما زاد عدد مجموعات الهيدروكسيل فإن حزمة الامتصاص تنزاح إلى طول موجي أعلى. أما في حالة استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات الميتوكسيل أو وحدات سكر فإن حزمتي الامتصاص تنزاح إلى طول موجي أقل.

طيف الأشعة فوق البنفسجية للمركبات الفلافونويدية في وجود الكواشف [59]:

إن إضافة بعض الكواشف إلى المركب الفلافونويدي يساعدنا على معرفة نوع المجموعات البديلة ومكان ارتباطها في المركب الفلافونويدي.

إضافة NaOH: إن إضافة NaOH يعطينا معلومات حول عدد وموضع مجموعات الهيدروكسيل الحرة في المركب الفلافونويدي، خاصة تلك الموجودة في الموضع 7، 4، 3 وذلك عن طريق الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I .

إضافة NaOAc: إستعمال NaOAc يكشف عن وجود مجموعة هيدروكسيل الموضع 7 من خلال حدوث إزاحة باتوكرومية بـ 5 إلى 20 نانومتر.

NaOAc يعمل على تايين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حمضية مثل OH الموضع 3، 7 و 4.

إضافة $H_3BO_3 + NaOAc$: للحصول على هذا الطيف يجب إضافة H_3BO_3 للعينة في وجود

NaOAc، وهو يعطي معلومات حول وجود أو غياب هيدروكسيل Ortho على الحلقة B أو الحلقة A

(7، 6 أو 8، 7) وذلك من خلال تشكيل معقدات تؤدي إلى حدوث إزاحة باتوكرومية للحزمة I بـ 12

إلى 36 نانومتر مقارنة بطيف UV المأخوذ في الميثانول (الشكل I-25).

الجدول (7-I): التأثيرات المحتملة على طيف UV وتفسيراتها قبل وبعد إضافة الكواشف

التحليل	الإزاحة (nm)		المفاعل
	الحزمة I (nm)	الحزمة II (nm)	
فلافون فلافونول (3-OR) فلافونول (3-OH)	-250 -250 -250	350-310 280 360-330 280 385-350 280	MeOH
4 ² - OH 3- OH , 4 ² - OH OH - 4 ² , 3 أو أورثوتنائي الهيدروكسيل على الحلقة A أو ثلاثة هيدروكسيلات متجاورة على الحلقة B. 7-OH	45 + إلى 60 + للحزمة I دون نقصان أو زيادة في شدة الامتصاص. 45 + إلى 60 + للحزمة I مع نقصان في شدة الامتصاص. طيف يتحلل مع مرور الوقت. عصابة جديدة بين 335-320 نم	NaOH	
7-OH 7-OH (مع مستبدل في 6 و (أو) في 8). 5، 6، 7 أو 5، 7، 8 و 3، 3'، 4' ثلاثي هيدروكسيل. 7-OR (في حالة فلافون 4 ² - OH، فلافونول فقط).	5 + إلى 20+ للحزمة II. إزاحة صغيرة للحزمة II. طيف يتحلل مع مرور الوقت.	NaOAc	
أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B	5 + إلى 10 + للحزمة I 12 + إلى 36 + للحزمة I	NaOAc+H ₃ BO ₄	

الجدول (7-I) : التأثيرات المحتملة على طيف UV وتفسيراتها قبل وبعد إضافة الكواشف (تابع)

أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B	30 + إلى 36 للحزمة I مقارنة بطيف $AlCl_3/HCl$	$AlCl_3$
أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A إضافة إلى أورتو الهيدروكسيل على الحلقة B	20 + إلى 40+ للحزمة I مقارنة بطيف $AlCl_3/HCl$	
5-OH	35 + إلى 55 للحزمة I	$AlCl_3/ HCl$
5-OH مع وجود مجموعة أوكسجينية في 6 OH-3 أو 3، 5 ثنائي هيدروكسيل.	17 + إلى 20 للحزمة I 50 + إلى 60+ للحزمة I	

أطياف الرنين النووي المغناطيسي

مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H-RMN :

بالرغم من أن أطياف الطنين النووي المغناطيسي تتطلب كمية كبيرة من العينة المدروسة، إلا أنها استخدمت على نطاق واسع في دراسة المنتجات الفلافونويدية، الأمر الذي أدى إلى جمع معلومات كثيرة بصدد بنيتها، وخاصة أطياف الكربون 13.

أما فيما يخص أطياف الطنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H-RMN فهي لا تختلف عن تلك الخاصة ببروتونات المركبات الأروماتية التي تحمل مجموعات أكسجينية بديلة، حيث تظهر البروتونات المجاورة لمجموعة هيدروكسيلية أو ميتوكسيلية بإزاحة كيميائية تتراوح بين 6,6 إلى 7,1 ppm بينما تظهر البروتونات المجاورة لمجموعتي هيدروكسيل أو ميتوكسيل عند حوالي 6,1 ppm .

وتجدر الإشارة إلى أنه إذا ما وجدت مجموعة أكسجينية على الموضع رقم 6، وكان الموضع رقم 5 غير مستبدل فإن بروتون هذا الموضع يظهر عند قيمة 7,1 تقريبا، وليس ضمن المدى 6,6-7,1 دلتا. وفيما يلي جداول (8-I إلى 10-I) تبين الانزياح الكيميائي لمختلف البروتونات بالنسبة للحلقتين

A و B [60].

الجدول (8-I) : الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A

نوع الفلافونويد	H-5 (δ ,ppm) (J,HHz)	H-6 (δ ,ppm) (J,HHz)	H-7 (δ ,ppm) (J,HHz)	H-8 (δ ,ppm) (J,HHz)
5,7 - OH	-	6,0 - 6,2 <i>d</i> ; 2,5		6,3- 6,5 <i>d</i> ; 2,5
5- و 7-OR(R=Glc) OH	-	5,9 - 6,1 <i>d</i> ; 2,5		6,1 - 6,4 <i>d</i> ; 2,5
5,6,7-OR R=H و Glc 5,7,8-OR	-	- 6,3		6,3
7-OR (R=H و Glc)	<i>d</i> 8,0-9	6,7 - 7,1 <i>dd</i> 2,5 ; 9,0		6,7 - 7,0 <i>d</i> ; 2,5

الجدول (9-I) : الإزاحة الكيميائية لبروتونات الحلقة B

نوع الفلافونويد	(H-5' و H-3') (δ ,ppm) (J,HHz)	(H- 2' و H-6') (δ ,ppm) (J,HHz)
Flavone (4'-OR)	6,7- 7,1 <i>d</i> ; 8,5	7,7- 7,9 <i>d</i> ; 8,5
Flavonol (4'-OR)	6,5- 7,1 <i>d</i> ; 8,5	7,9- 8,1 <i>d</i> ; 8,5

الجدول (10-I) : الإزاحة الكيميائية للبروتونات 6',2'

نوع الفلافونويد	H-2 (δ ,ppm) (J,HHz)	H-6 (δ ,ppm) (J,HHz)
(3',4'-OH ; 3'OMe,4'-OH ;3'-OH, 4'OMe) Flavone	7,2 - 7,3 <i>d</i> ; 2,5	7,3 - 7,9 <i>dd</i> ;8,5 2,5
(3',4'-OH ; 3'OH, 4'OMe) Flavonol	7,5 - 7,7 <i>d</i> ; 2,5	7,6- 7,9 <i>dd</i> ; 8,5 2,5
(3',4'-OH ; 3'OMe, 4'-OH) Flavonol	7,6-7,8 <i>d</i> ; 2,5	7,4- 7,6 <i>dd</i> ; 8,5 2,5

بروتونات الحلقة C:

يعطي بروتون H-3 في الفلافون إشارة أحادية حادة في المنطقة (6,2-6,4 ppm) وتتداخل مع إشارة بروتوني الحلقة A (H-6 أو H-8).

بروتونات الميثوكسيل OCH₃ تظهر مجموعة من الإشارات الأحادية محصورة بين (3,8-4,5ppm) [61].

بروتونات السكر:

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

كما يمكن أن نستدل على مكان ارتباط السكر بالأجليكون من خلال قيمة الإزاحة الكيميائية للبروتون الأنوميري.

الجدول (11-I): قيم الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري لبعض الفلافونويدات أحادية السكر [56].

الفلافونويد	δH-1''ppm
7-O-glucosyl flavonol	5,2 - 4,8
3-O-glucosyl flavonol	6,0 - 5,7
7-O-rhamnosyl flavonol	5,3 - 5,1
3-O-rhamnosyl flavonol	5,1 - 5,0

الجدول (12-I): قيم الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري لبعض الفلافونويدات ثنائية السكر [56].

السكر الابتدائي	δH-1''ppm	السكر النهائي	δH-1''ppm
3-O-β-D-Glucoside	5,72 - 5,75	2-O-β-D-Glucosyl	4,63 - 4,65
3-O-α-L-Rhamnoside	5,28 - 5,46	6-O-β-D-Glucosyl	3,96 - 4,02
	5,40 - 5,66	2-O-α-L-Rhamnosyl	4,90 - 5,10
	5,28	6-O-α-L-Rhamnosyl	4,37 - 4,39
	5,56	2-O-β-D-Glucosyl	4,10 - 4,23
	5,21-5,50	3-O-β-D-Glucosyl	4,32 - 4,48
	5,33-5,40	3-O-β-D-Galactosyl	4,25
	5,31	3-O-α-Rhamnosyl	4,81

✓ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C :

تسمح لنا هذه التقنية بالتعرف على:

- عدد ذرات الكربون في المركب.
- عدد مجموعات الميثوكسيل على الهيكل الفلافونويدي [62،63].

✓ مطيافية الكتلة:

تكن أهمية هذه التقنية في كونها لا تحتاج إلى كميات كبيرة من العينة، فهي تسمح بمعرفة الوزن وتحديد الأيون الجزيئي والشظايا التي تعطي عموماً معلومات حول عدد وطبيعة المستبدلات الهيدروكسيلية أو الميثوكسيلية [64]، من بين التقنيات المستعملة:

تقنية القذف الإلكتروني (EI):

هذه التقنية صالحة مع الأغليكونات فقط لأنها تتطلب طاقة قوية لا تستطيع الغليكوزيدات تحملها لاحتوائها على مستبدلات سكرية.

تقنية القذف السريع (FAB):

تستخدم هذه التقنية لمعرفة الأيون الجزيئي وطبيعة السكر [65]، كما أنها تستعمل مع الغليكوزيدات للحصول على معلومات تخص الجزء السكري منها، إضافة إلى أيونات الشظية العادية المميزة للفلافونويدات حيث نحصل على قمم موافقة للأيونات شبه الجزيئية من الشكل $[M+K]^+$ ، $[M+Na]^+$ ، $[M+H]^+$ ، $[K-H]^+$ في حالة FAB^+ وتكوين أيونات سالبة في حالة FAB^- [64].

تقنية التأيين بالرذاذ الكهربائي (الإليكتروسبراي ES):

هذه التقنية أحدثت من FAB وتختلف عنها في الطريقة العملية تستخدم في الفلافونويدات لدراسة المركبات سهلة التكسير مثل *O*-glycoside [65].

تقنية التأيين الكيميائي (CI) وتقنية التأيين الكيميائي تحت الضغط الجوي (API):

هتان التقنيتان لهما نفس المبدأ حيث تعتمدان على التفاعلات (أيون - جزيء)، ويتم إختيار الغاز المتفاعل حسب المركب المدروس من بين الغازات المستخدمة CH_4 ، ويكمن الاختلاف الوحيد بينهما في كون تقنية (API) يعمل بها تحت الضغط الجوي وهي خاصة بالمركبات المفصولة عند استعمال الكروماتوغرافيا السائلة [64].

✓ تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد: [66,67]

أدى التطور التكنولوجي إلى الجمع بين أطراف البروتون والكربون للحصول في الأخير على طيف ثنائي البعد، نلجأ عادة إلى التقنيات ثنائية البعد عندما لا نتوصل إلى البنية الدقيقة للمركب المفصول من أهم هذه التقنيات:

:(Correlation spectroscopy) (H^1-H^1) COSY

تظهر تعالق بين البروتونات المتزاوجة مع بعضها

:(Total Correlation spectroscopy) (H^1-H^1) TOCSY

تظهر نقاط تعالق بين البروتونات عبر تعانقات بعيدة حيث تسمح لنا هذه التقنية بمعرفة سلسلة البروتونات المتتابعة على الهيكل البنوي.

:(Rotational nuclear overhauser effect spectroscopy) ROESY (H^1-H^1)

تفيد هذه التقنية أكثر في التشكيل الفراغي.

:(Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy) NOESY (H^1-H^1)

تظهر نقاط تعالق بين البروتونات، تسمح هذه التقنية من ملاحظة الجزيء في الفضاء.

:(Heteronuclear Single Quantum Coherence) (J_{H-C}) HSQC

تظهر نقاط تعالق قريبة بين البروتون وذرة الكربون المرتبط بها.

:(Heteronuclear Multiple Bond Coherence) ($^2J_{H-C}, ^3J_{H-C}$) HMBC

تظهر نقاط تعالق بعيدة بين بروتون ما وذرات الكربون المجاورة لذرة الكربون المتصل بها. هذا التعالق لا يتعدى 3 كربونات متسلسلة.

الإمهاء الحمضية [68]:

في كثير من الأحيان يصعب علينا تحديد طبيعة السكر وبالتالي البنية النهائية للمركب، لذلك نلجأ إلى الإمهاء الحمضية التي تتم بإتباع الخطوات التالية:

- تحليل الجليكوزيدات الفلافونويدية من نوع (أكسجين - سكر) تحت ظروف حمضية بواسطة (2N) HCl في حمام مائي تحت 100°م، مدة ساعة لينشطر الجزء السكري عن الأجليكون.

- يتم فصل المحلول الذي يحتوي على الجزئين (السكري والأغليكوني) بواسطة عملية استخلاص من نوع سائل، سائل وباستعمال مذيبات متناوبة القطبية بدءا بإيثير ثنائي الإيثيل يليه استخلاص ثنائي للطبقة المائية بواسطة خلات الإيثيل وأخيرا البوتانول النظامي.
- تركز الطبقة العضوية الحاوية على الأغليكون الذي يمكن التعرف عليه بتسجيل طيف UV.
- تجفف الطبقة المائية التي يبقى مذاها فيها الجزء السكري.
- للتعرف على نوع السكر المنفصل نحضر ألواح كروماتوغرافية من gel de silice 60F₂₅₄ ترش بمحلول (0,2M) NaH₂PO₄ وتترك تجف في الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100°م مدة ساعة.
- تذاب الطبقة المائية الحاوية على الجزء السكري بقليل من الماء (قطرات).
- توضع نقاط من هذه الطبقة فوق اللوح الكروماتوغرافي المحضر سابقا مع بعض شواهد سكرية معروفة.
- يغمس اللوح في مملص يحتوي على أسيتون: ماء بنسبة 1:9 وبعد هجرة البقع السكرية، يستخرج اللوح ويترك ليحجف، يعاد وضعه في نفس المملص السابق، بعدها يستخرج ليحجف مدة ساعة.
- في الأخير يرش اللوح الكروماتوغرافي بكاشف مالونات الأنيلين ويترك ليحجف في الهواء، بعدها يوضع في الفرن (100°م) مدة 5 دقائق، حيث تبدأ بقع السكريات في الظهور فتكون بنية اللون بالعين المجردة وصفراء تحت أشعة UV، وبالمقارنة مع الشواهد المستعملة يتم التعرف على سكر المركب.

مراجع الفصل الأول

1. Pichersky, E.; Gang, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.*, **2000**, 5(3), 439-445.
2. Qureshi, N.; Porter, J. W. In Biosynthesis of isoprenoid compounds. Porter, J. W.; Spurgeon, S.L. Edition, New York, **1981**, 1, 47-94.
3. Hanson, J. R. Natural Products : The secondary metabolites. The royal society of chemistry. E.W. Abel. Edition, **2003**, 35-61.
4. Krueger, R. J.; Dewick, P.M. Medicinal natural products. A biosynthetic approach . 2nd Edition by Dewick, P.M.; Wiley, J. New York. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45 (10), 2120.
5. Bruneton, J. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales In: Technique et documentation. Lavoisier, Paris, **1999** , 418-419.
6. List, P. H.; Horhammer, L. Harger's handbuch der pharmazentischen praxis, Spinger, Berlin, **1979**.
7. Bruneton, J. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. In : Technique et documentation. Lavoisier, Paris, **1993**.
8. Sokovic, M.; Ciric, A.; Glamoclija, J.; Skaltsa, H. Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from the genus *Centaurea* L. *Curr. Pharm. Des.*, **2017**, 23(19), 2767-2786.
9. Seaman, F. C. Sesquiterpene lactones as toconomic characters in the Asteraceae. *Mem. N. Y. Bot. Gard.*, **1986**, 48(2) 121-595.
10. Sangodkar, U.M.X.; Mavinkurve, S. Isolation and characterization; of α -santonin assimilating pseudomonad. *J. Biosci.*, **1982**, 4(1), 79-84.
11. Ruzicka, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compound 1953. *Experientia.*, **1994** , 50(4), 395-405.
12. Ruzicka, L. Faraday lecture (History of the isoprene rule). *Pro. Cem. Soc.*, **1959**, 341, London.
13. Hendrickson, J. B. Stereochemical implications in sesquiterpenes biogenesis, *Tetrahedron*, **1959**, 7, 82-89.
14. Cordell, G. A. Biosynthesis of sesquiterpenes, *Chem. Rev.*, **1976**, 76(4), 425-460.
15. Geissaman, T.A.; Grout, D.H.G. *Organic chemistry on secondary plant metabolism*. San. F.; Calif : Freeman, Cooper .Edition, **1969**.
16. Herz, W. Sesquiterpene lactones in Compositae. *Pharmacogn. Phytochem.*, **1971**, 76, 64-92.

17. Herz, W. Biogenetic aspects of sesquiterpene lactones chemistry. *Natural and Medicinal Products*, **1977**, 16(1), 32-44.
18. Bruneton, M.; Vasallo, N.; Fazio, C.; Gdris, T. E.; Herz, M. Sesquiterpene lactones of two spices from Sicily, *Biochem. Syst et Ecol.*, **1998**, 26, 801-803.
19. Youssef, D.T.A. Sesquiterpene lactone of *Centaurea scopolia*. *Phytochemistry*, **1988**, 49(6), 1733-1737.
20. Tesevic, V.; Vajs, V.; Todorovic, N.; Djokovic, D.; Marin, P.; Milosavljevic, S. Sesquiterpene lactones from plant species *Centaurea solstitialis* L. *Serb. J. Chem. Soc.*, **1998**, 63(2), 131-135.
21. Fisher, N. H.; Olivier, E. J.; Fisher, H. D. The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. Department of Chemistry, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, U. S. A. *Fortschritte der Chemieorganischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, **1979**, 47-320.
22. Macías, F.A.; Galindo, J. C. G.; Massanet, G.M. Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models. *Phytochemistry*, **1992**, 31(6), 1969-1977.
23. Robles, M.; Aregullin, M.; West, J.; Rodriguez E. Review, Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones. *Planta Med.*, **1995**, 61(3), 199-203.
24. Picman, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. et Ecol.*, **1986**, 14(3), 255-281
25. Kubo, I.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Saito, T.; Ishikawa, H.; Haraguchi, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterothe cainuloides*. *Planta Med.*, **1996**, 62(5), 427-430.
26. Gören, N.; Woerdenbag, H. J.; Bozok-Johansson, C. Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum*. *Planta Med.*, **1996**, 62(5), 419- 422.
27. Almogboul, A. Z.; Bashir, A. K.; Khalid; S. A.; Farouk, A. Antimicrobial activity of vernolepin and vernodalin. *Fitoterapia.*, **1997**, LXVIII, 83-84.
28. Skaltsa, H.; Lazari, D.; Panagouleas, C.; Georgiadou, E.; Garcia, B.; Sokovic, M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*, **2000**, 55(8), 903-908.
29. Boumois, F.; Lagrdère, A. Activite 3 : Etude documentaire. Analyse spectrale. Exploitation de spectres infrarouge (IR) . livre Hachette. **2003**, chapitre 4, 90.

30. McLafferty, F.W .Interpretation of mass spectra ,3rd by Benjamin. W. A. University science books, California, **1982**.
31. Harbone, J. B. The flavonoids : advances in Research since1980. Chapman & Hall, London, **1988**.
32. Harbone, J. B.; Mabry, T.J. The advances in Research. Chapman & Hall, London. **1982**.
33. Wollenweber, E.; Dietz, V.H. Flavonoid patterns in the farina of goldenback and silverback ferns. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1980**, 8(1), 21-33.
34. Harbone, J. B. In Phytochemistry. Lowrence, P. L. Edition. **1973**, II, 334.
35. Heller, W.; Forkmann, G. Biosynthesis of flavonoids. In the flavonoids :Advances in research since 1986. Harborne , J.B. Edition, Chapmman & Hall, London, **1993**, 499
36. Boland, M. J.; Wong, E . Purification and kinetic properties of chalcone-flavanone isomerase from Soya Bean. *The FEBS Journal.*, **1975**, 50(2), 383-389.
37. Kochs, G.; Grisebach, H. Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.*, **1986**, 155, 311 -318.
38. Hashim, M.F.; Hakamatsuka, T.; Ebizuka, Y.; Sankawa, U. Reaction mechamism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *FEBS letters.*, **1990**, 271(1-2), 219-222.
39. Stotz, G.; Spribille, R.; Forkmann, G. Flavonoid Biosynthesis in Flowers of *Verbena hybrid*. *J. Plant Physiol.*, **1984**, 116(2), 173-183.
40. Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, **2002**, 96(2-3), 67-202.
41. Nijveldt, R.J.; Nood, E.V.; VanHoorn, D.; Boelens, P.G.; Noren, K.V.; Leeuwen, P.A.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, 74(4), 418-425.
42. Obermeir, M.T.; White, R.E.; Yang, C.R. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica*, **1995**, 25(6), 575-584.
43. Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids- a review, *Biomed Pharmacother.*, **2002**, 56(6), 296-301.
44. Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, **1999**, 65(4), 337-353.
45. Landolfi, R.; Mower, R. L.; Steiner, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem. Pharmacol.*, **1984**, 33(9), 1525-1530.

46. Harborne, J.B.; Williams, C. Advances in favonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 481-504.
47. Spedding, G.; Ratty, A.; E Middleton, Jr. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir. Res.*, **1989**, 12(2), 99-110.
48. Ono, K.; Nakane, H.; Fukushima, M.; Mann, I. C. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *The FEBS Journal*, **1990**, 190 (3), 469-476.
49. Ono, k.; Nakane, H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J. Biochem.*, **1990**, 108(4), 609-613.
50. Mahmoud, N.; Pizza, C.; Aquino, R.; De Tommasi, N.; Piacents, S.; Colman, S.; Burke, A.; Hay, A. J. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.*, **1993**, 22 (2-3), 189-199.
51. Ohemeng, K. A.; Schwender ,C. F.; Fu, K. P.; Barrett, J. F. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3(2) 225-230.
52. Sato, M.; Tsuchiya, H.; Takase, I.; Kureshiro, H.; Tanigaki, S.; Iinuma, M. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophoraexigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother. Res.*, **1995**, 9(7), 509-512.
53. Mila, H.; Scalbert, A. Taunin antimicrobial properties through iron deprivation : a new hypothesis. International symposium on natural phenolsin plant resistance, **1994**, 16(3), 517-544.
54. Lebreton, P.; Jay, M. ; Voirin, B. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides. *Chim. Anal.*, **1967**, 49(7), 375-383.
55. Markham, K. R. Technique of flavonoid identification. Academic press, London. **1982**.
56. Markham, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. Methods in plant biochemistry. Academic press, **1989**, 1(chapiter 6), 197-235.
57. Randerath K. Chromatographie sur couches minces. Edition, Gauthier- Villars, Paris, **1971**, 337-339.

58. Jurd, L.; Horwitz, R. Spectral properties of flavonoid compounds. In: The chemistry of flavonoid compounds. Geissman, T.A. Edition, Pergamon Press, New-York, **1962**, 107-155.
59. Berthillier A. *La chromatographie et ses applications*. Dunod, **1972**.
60. Ulubelen, A.; Topeu, G.; Kolak, U. Labiatae flavonoids and their bioactivity. Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman. Edition. Elsevier, Amesterdam, **2005**, 30.
61. Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. The systematic identifications of flavonoids. Springer- verlag, Berlin, **1970**.
62. Wilson, R.G.; Bowie, J.H.; Williams, D. H. Solvent effects in NMR Spectroscopy : Solvent shifts of methoxyl resonances in flavones induced by benzene ; an aid to structure elucidation. *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 1407.
63. Rodriguez, E.; Carman, N. J.; Mabry, T.J. A general NMR procedure for locating methoxyl groups in all flavone and flavonol aglycones and some glycosides utilizing trimethylsilyl ethers and benzene-induced shifts. *Phytochemistry*, **1972**, *11*(1), 409-410.
64. Constantin, E.; Schnell, A . Spectroscopie de masse : principes et application. Technique et documentation, Lavoisier, Paris, **1986**.
65. Becchi, M.; Fraisse, D. Fast atom bombardement and fast atom bombardement, collision activated-dissociation/mass-analysis ion kinetic energy analysis of C glycosidic flavonoids. *Biomed & Environmental mass spectromet*, **1989**, *18*, 122.
66. Croasmun, W. R.; Carlson, R. M. K . Two-dimentional NMR spectroscopy-applications for chemists and biochemists. VCH, New-York, **1987**.
67. Lambert, J. B.; Mazzola, E. P. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-an introduction to principles, applications and experimental methods. Pearson/ Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, **2003**.
68. Gonnet, J. F. Apropos de la photographie en couleur de chromatographie sur couches minces en lumière de Wood. *J. chromat.*, **1973**, 86.

الفصل الثاني:

دراسة بليوغرافية للنبتين

II-1- نبات *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q. et SII-1-1- الوصف النباتي لنبات *Centaurea solstitialis* L

هو نبات من الفصيلة النجمية إسمه العلمي باللاتينية *Centaurea solstitialis* Linnaeus أسند إليه من قبل العالم لينبوس عام 1753 [1]، يطلق عليه باللغة العربية القنطريون الأصفر وله أسماء أخرى بحسب الأماكن المتواجد فيها منها أسماء محلية وأخرى علمية [2]، من أسمائه العلمية *Calcitrapa solstitialis* Lamarck و *Leucantha solstitialis* A و *Cyanus solstitialis* Baumg ، ومن أسمائه المحلية إسم آفشو وهو إسم بربري عرف به بالمغرب العربي وبلاد الأندلس، كما عرف باسم *starthistle* ومعناه الذهبي في أمريكا الشمالية وكاليفورنيا، ونجوم الشوك في الدول الغربية و *Barnaby's thistle* أي الشوك بارنابي بانجلترا و *Centaurée du solstice* بفرنسا و غيرها من الأسماء الأخرى [2] .

- القنطريون الأصفر نبات عشبي حولي يصل طوله إلى متر ، طفيف في فصل الشتاء مع رؤوس شائكة صفراء ومزهرة سلكية قاسية. تتشكل النباتات في البداية من وريدة قاعدية غير شوكية يتراوح قطرها من 5 إلى 20 سم حتى منتصف الربيع، مع إقتراب فصل الصيف (فترة إزهاره) فإنه ينتج جذعا مركزيا مزهرا ينتج عنه العديد من الشعيرات الشائكة التي تحتوي على العديد من الأزهار الصفراء (10- 50 زهرة) ، هذه الزهيرات الأنبوبية كثيفة مغطاة بجسم مقطن أبيض مع وجود بقع النسيج في الأسس التي قامت عليها الأشواك فترة الإزهار.

يتكاثر *C. solstitialis* فقط عن طريق البذور ويطور نوعين من الأشنة، أشنة الحلقة الخارجية ذات لون بني داكن غالبا ما يتخللها تان والأشنة الداخلية لامعة رمادية يتخللها تان أو فيوس أبيض نحيل ذو شعيرات طولها من 2 إلى 5 ملم، بذوره ذات لون بني فاتح تتخللها نقاط بيضاء يتراوح طولها من 2 إلى 3 مم.

أوراقه المنخفضة منعقدة وأوراقه العلوية كاملة ومتموجة متوزعة على ساق خشبي أخضر مائل للصفرة في نهايته العلوية. الجذر الرئيسي يمكن أن يمتد إلى عمق التربة 6 أقدام مما يسمح لهذا النبات بالاستفادة من رطوبة التربة العميقة [3].

و مما يجدر الإشارة إليه أنه يشبه كثيرا في الوصف نبات *Centaurea melitensis* [4] ، وهو يحتوي على تحت نوعين هما *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* و *C. solstitialis* L. ssp. *schouwii*

(DC.) ، غير أنه في الجزائر لم يثبت إلا تواجد تحت نوع واحد هو *C. solstitialis* L. ssp. *schouwii* (DC.) حسب Quézel et Santa [5] حيث يتميز هذا الأخير عن الأول بطول ساقه المركزي و بطول الأشواك المحيطة بالزهرة وهو الذي تم دراسته في هذا البحث .



صورة فوتوغرافية لنبات *Centaurea solstitialis*.

II-1-2- التصنيف النظامي للنبته Place dans la systématique

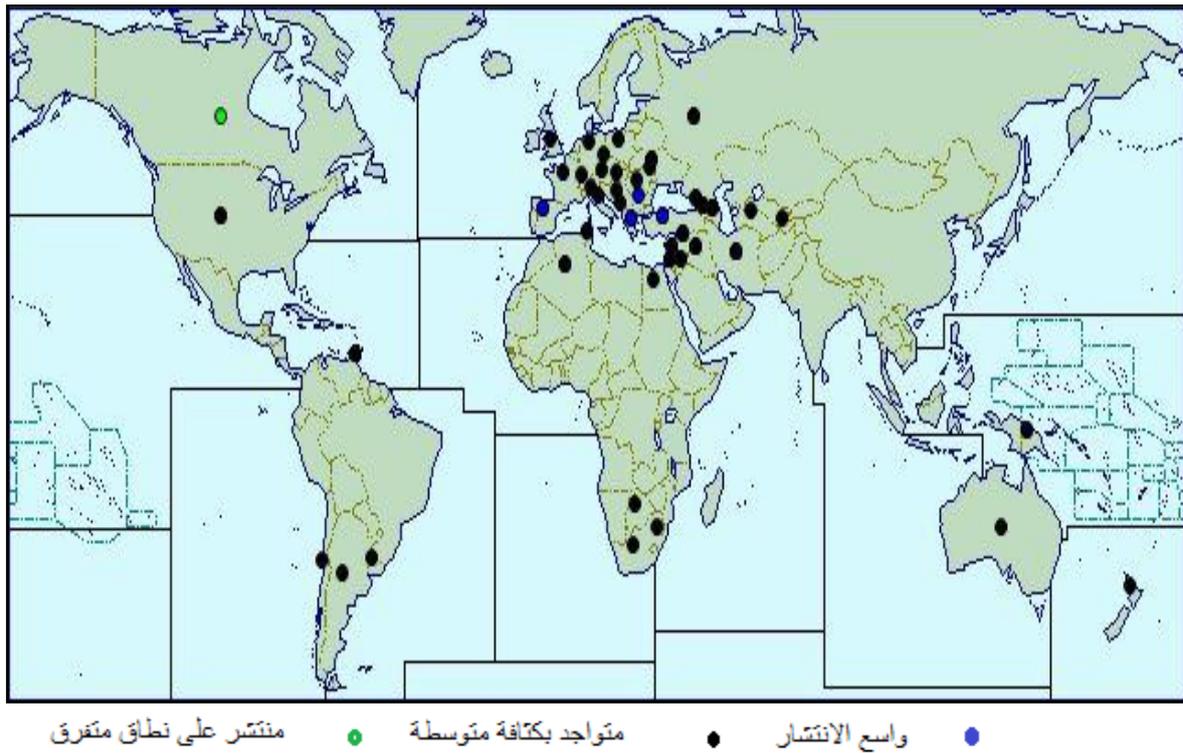
Règne	Plantae	المملكة
Sous règne	Tracheobionata	تحت المملكة
Division	Magnoliophyta	الصنف
Classe	Magnoliopsida	القسم
Sous Classe	Asterida	تحت القسم
Ordre	Asterales	الرتبة
Famille	Asteraceae	العائلة
Genre	<i>Centaurea</i>	الجنس
Espèce	<i>Solstitialis</i>	النوع

II-1-3- المسح البليوغرافي لنبات *Centaurea solstitialis* L.

ينمو *C. solstitialis* في المواقع المفتوحة، سفوح التلال، المروج، الحقول، المراعي، جوانب الطرق وأماكن النفايات، قد تعيش أيضا في الحقول المزروعة إلا أنها لا تتعايش في المناطق القليلة الإضاءة أو المظلمة.

موطنه الأصلي المشرق العربي (لبنان، سوريا...) ووادي النيل والمغرب العربي (الجزائر، تونس، المغرب) وتركيا ومعظم مناطق أوروبا (فرنسا، إيطاليا...) [6].

كما إنتشر بشكل واسع في السهول الآسيوية وإنتقل إلى أمريكا الشمالية وكاليفورنيا في القرن 18 عبر بذور البرسيم الملوثة [7] وأظهرت الدراسات إحتمال قدومه من تركستان، فرنسا وإسبانيا [8]، هو الآن منتشر في 41 ولاية أمريكية وأربع مقاطعات كندية وفي المنطقة الشرقية من ثلثي الولايات المتحدة الأمريكية [9] والخريطة التالية توضح أماكن إنتشار *Centaurea solstitialis*.



خريطة تبين أماكن إنتشار نبات *Centaurea solstitialis*

ينتشر هذا النبات بشكل واسع و ذلك لسهولة تنقله حيث تقطع بذوره مسافات طويلة مع الأبقار، المركبات، المعدات، المواشي، الحبوب و البذور الملوثة بسبب إمتلاكها شعيرات تمكنها من التمسك حتى بالملابس.

II-1-4- الآثار السلبية لنبات *C. solstitialis* L

يعتبر *C. solstitialis* L من أخطر الأعشاب غرب الولايات المتحدة الأمريكية لتأثيره السلبي في الجانب الإقتصادي حيث تسبب بذوره مشكلة حقيقية في حقول الحبوب كونها تعمل على تلوث المحصول والتقليل من جودته وقيمه [10].

كما أنه يحتوي على مركب مجهول يسبب تلين الدماغ nigropallidal عند الخيول أو ما يعرف بمرض عسر المضغ، وأول علاماته هي عدم القدرة على تناول الطعام والشراب بسبب تصلب عضلات الشفاه والوجه واللسان حيث تصبح قاسية ومنقخة مما يؤدي إلى تلف دائم في الدماغ و في نهاية المطاف إلى الموت بسبب الجوع و العطش [11].

أيضا من الدول الغربية التي صنفته ضمن الأعشاب الضارة أريزونا، كاليفورنيا، كولورادو، إيداهو، مونتانا، نيومكسيكو، نيفادا، داكوتا الشمالية، ولاية أوريغون، ولاية ساوت داكوتا، يوتا واشنطن.

والجدول (II-1) يلخص تأثيرات هذا النبات على الإنسان ، الحيوان و البيئة [12].

الجدول (II-1): تأثير *C. solstitialis* في البيئة و المحيط.

الأثر	الفئة
لا شيء	مجموع الحيوان والنبات
سلبي	المنتجات الحيوانية
سلبي	الجانب البيولوجي عموما
له أثر سلبي عليه	إنتاج المحاصيل
سلبي	البيئة عموما
لا شيء	الأسماك وتربية الأحياء المائية
لا شيء	صحة الإنسان
سلبي	الإنتاج الحيواني
لا شيء	النقل
لا شيء	السياحة
لا شيء	العلاقات التجارية
سلبي	الأراضي والمراعي

كما يسبب أيضا غزو هذه النبتة، التقليل من النباتات الأصلية والتنوع فيها، وإستنزاف رطوبة المراعي وخسائر معتبرة في منسوب المياه المخصصة للسقي، إضافة للتقليل من إنتاج وجودة العلف و أحيانا المحاصيل.

II-1-5- الطرق المستخدمة للتقليل من آثاره السلبية

- إن الطبيعة العدوانية لنبات *Centaurea solstitialis* و قدرته التنافسية العالية في غزو الغطاء النباتي في المناطق الطبيعية، جعلت أمريكا ومجموعة من الدول الأوروبية السابقة الذكر يتخذون عدة أساليب للحد من كثافته والسيطرة عليه وذلك بوضع إستراتيجية متكاملة لهذا الغرض شملت الوسائل التالية:

- القلع اليدوي للنبات وهو أكثر الوسائل فعالية في المناطق الصغيرة حيث توجد النباتات بشكل متقطع، أو في التضاريس شديدة الإنحدار أين يستحيل إستخدام الأدوات الميكانيكية ، والوقت الأكثر ملائمة للإزالة اليدوية هو بعد إنتاش النبات ولكن قبل أن ينتج البذور أي في وقت الإزهار المبكر.

- كذلك من بين الوسائل المستخدمة القلع الميكانيكي عن طريق القطع أو القص هذه الوسيلة فعالة جدا في التحكم في تكاثره إذا ما أجريت في مرحلة الإزهار المبكر قبل إنتاج بذور التكاثر.

- كما أستخدمت أيضا الماعز كوسيلة شعبية للسيطرة عليه ، إضافة إلى إستخدام الحرق في بعض المناطق إلا أن هذا الأسلوب أعتبر غير إنتقائي إلى حد ما وتكون فيه السيطرة على نبات *C. solstitialis* غير متناسقة [13].

ومع التطور العلمي فقد لجأت بعض البلدان ومنها الولايات المتحدة إلى إستخدام المكافحة البيولوجية عن طريق إستيراد بعض أنواع الحشرات من اليونان للسيطرة عليه ، هذه الحشرات تقوم بمهاجمة رؤوس زهرة *C. solstitialis* عن طريق إنتاج يرقات تتغذى وتتمو داخل الرؤوس مما يقلل من البذور وبالتالي من تكاثر و إنتشار النبتة .

وقد أثبتت التجارب فيما بعد أن إستخدام هذه الحشرات كاف لتقليل من إنتاج البذور من 76 إلى 43% [14].

بالإضافة إلى كل الوسائل السابقة فقد لجأت بعض البلدان إلى إستخدام المكافحة الكيميائية للتحكم في غزو هذه النبتة عن طريق إستعمال المبيدات مثل إستخدام الكلوبيرياليد (Transline) هذا الأخير الذي أظهر سيطرة ممتازة على نبات *C. solstitialis* ، في حين أنه آمن جدا على الأعشاب الأخرى ويمكنه

أن يقلل كذلك من العديد من النباتات النجمية خصوصا ذات الأعضاء الشوكية ، كما أستخدمت مبيدات أخرى كالغليفوسات وتركلوبير...الخ [13].

II-1-6- استخدامات نبات *C. solstitialis* L

بالرغم من كل آثاره السلبية إلا أن الدراسة البليوغرافية لنبات *C. solstitialis* L أكدت أن له استخدامات علاجية في الطب الشعبي التركي حيث كان يستخدم في علاج الهريس الفموي لدى الأطفال وهو مرض فيروسي يصيب الجلد حول الشفاه وذلك عن طريق هرس النبتة ووضعها على شكل مسحوق في الأماكن الملتهبة [14] ، كما أستخدمت زهوره الشوكية في علاج القرحة الهضمية، الملاريا والصداع [15].

كذلك تم استخدامه لأغراض غذائية على شكل توابل في السلطة و البيض وهو ضمن قائمة النباتات المعترف بامتلاكها خواص علاجية من قبل سكان صقلية في إيطاليا [16]. أما أمريكا فاستخدمته لرعي الأغنام والماعز و الماشية لمدة قصيرة لكن بكثافة عالية قبل أن ينتج النبات رؤوسه الشوكية ، لأنه يتعين على الماشية والأغنام تجنبه في مرحلة الإزهار، عكس الماعز الذي يمكنه رعي هذا النبات في جميع مراحل نموه لذلك فقد أصبح إحدى الوسائل الشعبية المستخدمة في المنطقة للسيطرة عليه كما سبق الذكر، كذلك يعتبر المصدر الأساسي لحبوب لقاح النحل (مادة طبيعية يجمعها النحل من الأزهار لتغذية يرقاته عليها) [17].

II-1-7- المسح البيولوجي لنبات *C. solstitialis*

تعرض نبات *C. solstitialis* للعديد من الدراسات والأبحاث من طرف بلدان متعددة خاصة أمريكا وتركيا ، حيث تطرقت الأولى لضرور نمو هذا النبات ، تأثير الظروف الطبيعية على كثافته وإنتشاره وتأثيره بدوره على التربة ، في حين ركز الباحثون الأتراك على محاولة فصل نواتج الأيض الثانوي ذات الفعالية البيولوجية ، ومنه فقد سلكت الدراسات المجراة عليه مسريين مختلفين بسبب إختلاف دافع البحث منذ البداية .

حيث أثبتت الدراسات قدرة هذا النبات على النمو في ظل التغيرات البيئية ، وبينت تضاعف نموه ستة مرات في إرتفاع ثاني أكسيد الكربون وثلاثة أضعاف إستجابة لهطول الأمطار وترسب النترات عكس باقي الأعشاب البرية المنتشرة في المنطقة وهذا ما يفسر زيادة إنتشاره غرب أمريكا في الآونة الأخيرة [18].

كما بينت الأبحاث ضرورة التقليل من كثافته لإستعادة الأراضي العشبية و المحافظة على رطوبتها بعد أن وضحت قدرة جذره على النمو بسرعة وتغلغله في أعماق التربة إلى 6 أقدام مما يسمح باستنزاف رطوبة الأراضي [19].

كل هذه الآثار السلبية و كذلك خصائصه العدوانية إتجاه الخيول أثارت فضول الباحثين أكثرلمواصلة جهودهم على أمل الوصول إلى عزل وتحديد السموم المسؤولة عن هذا المرض باستخدام نظام زراعة أنسجة النمط العضوي على قشرية الفئران (système de culture tissulaire organotypique sur des explants corticaux des souris) ، وبالفعل تم التوصل إلى عزل مركبين سامين هما الأسبارتيك (les acides aspartiques et glutamique) و حمض الغلوتاميك من المستخلص الكحولي للأجزاء الهوائية لنبات *C. solstitialis* L المقطوف من المنطقة الغربية للولايات المتحدة الأمريكية ، كما أكدت نفس الدراسة وجود مركبات سامة أخرى موجودة في المستخلص غير أن الأسبارتيك يعتبر العنصر السام الرئيسي في النبتة [20].

كذلك تمكنت دراسة أخرى من فصل مركبات سامة بواسطة HPLC موجودة في نفس المستخلص الكحولي، هي عبارة عن سيسكويتربينات لاكتونية تحتوي على كلوروهيدرينات (chlorohydrine sesquiterpène lactone) [21].

كما أظهر مستخلص ثنائي كلورو ميثان للأجزاء الهوائية لنبات دائما *Centaurea solstitialis* ، سمية عالية عند قياس فعاليته على دماغ الفئران الجنيني ، وقد أدى تجزؤه بعد نشاطه داخل مخ الجرذان إلى ظهور سيسكويتربينات المعروفة التالية :

la cynaropicrine ، 13-O- acétyl solstitialine A ، 3-O-acétyl sostitialine A ، solstitialine A

كما أشارت الدراسة إلى أن المركبين الأخيرين تزداد سميتهما بزيادة تركيزهما مما قد يفسر قدرة هذا النبات على إحداث إنتكاسات في دماغ الخيول عند تناولهم لنبات *C. solstitialis* بكميات كبيرة [22]. غير أن دراسة هذه النبتة في تركيا أخذت مسارمختلف كما سبق وأن ذكرنا حيث ركزت الأبحاث على الجمع بين الإختبارات البيولوجية و تقنيات التحليل للتوصل لتحديد صيغة المركبات الفعالة وهذا لدعم ما جاء في موروث الطب الشعبي التركي بحقائق علمية ، فجاءت الدراسات التركيبية موضحة فعالية هذه النبتة من الناحية البيولوجية مبينة أن المستخلص الإيثانولي للأزهار الشوكية الطازجة لنبات *C. solstitialis* ssp. *solstitialis* مضاد للتقرح وتعمقت الدراسة للكشف عن المركبات المسؤولة عن هذه الفعالية، فقام الباحثون باستخلاص من نوع سائل- سائل للمستخلص الإيثانولي بمذيبات متزايدة القطبية

(هكسان، كلوروفورم ، خلات الإيثيل ، البوتانول النظامي) أين أبدى المستخلص الكلوروفورمي فعالية ضد القرع أعلى من باقي المستخلصات ، حيث بلغت نسبة تثبيته للقرحة 99,5% وأرجعت الدراسة إرتفاع نشاط هذا المستخلص إلى إحتوائه على السيسكوتربينين التاليين : 13-acétyl solstitialine A ، chlorojanérine [23].

وتعاقبت الدراسات مينة أن كلا من المركبين 13-acétyl solstitialine A ، chlorojanérine إضافة إلى المركب solstitialine A المفصولين من المستخلص الكلوروفورمي للأجزاء الهوائية لنبات *C. solstitialis ssp. solstitialis* مركبات مضادة للقرحة تأثيرها جد فعال سواء كان تناول عن طريق الفم أو عن طريق الجلد وهذا ما أثبتته التجارب المطبقة على نماذج مختلفة من الجرذان والفئران كما بينت نفس الدراسة أن chlorojanérine أكثر المركبات الثلاثة فعالية ضد القرع [24].

كما بينت الدراسات أن الاكتونات السيسكوتربينية التالية :

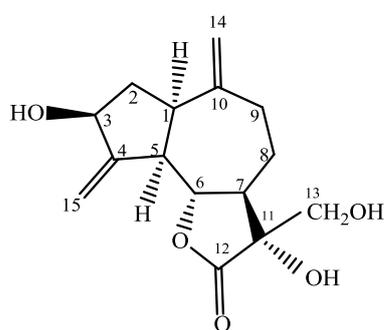
chlorojanérine ، 13-acétyl solstitialine A ، centaurepense المفصولة دائما من المستخلص الكلوروفورمي للأجزاء الهوائية لنبات *C. solstitialis L. ssp. solstitialis* تمتلك نشاط مضاد للفيروسات ومضاد للميكروبات جد معتبر مما يفسر سبب إستعماله في الطب الشعبي التركي لعلاج الهريس وهو مرض فيروسي يسبب تقرحات في الجلد ينقسم إلى نوعين هريس فموي وهريس تناسلي [25].

ومن جهة أخرى بينت دراسة أقيمت على المستخلص الإيثانولي للأجزاء الهوائية لنفس النبات إحتوائه على مضادات حيوية بنسبة معتبرة و نشاط خافض للحرارة ومسكن للألم [26].

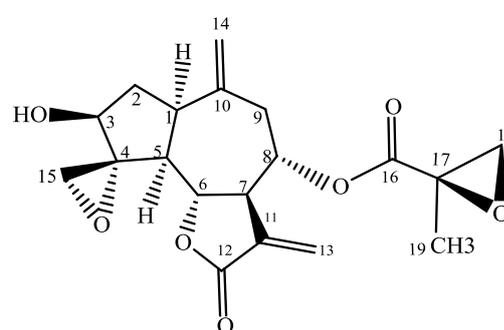
وفي دراسة حديثة قام باحثون أترك بدراسة الأنشطة المضادة للتكاثر على خلايا C6 (خلايا ورم دماغ الفئران) وخلايا هيلا (سرطان الرحم البشري) في المختبر ، باستخدام مستخلص الميثانول لجذور وسيقان وزهور نبات *C. solstitialis L. ssp. solstitialis* بشكل منفصل ، حيث أظهر مستخلص الميثانول للساق نشاط مضاد لتكاثر الخلايا السلطانية معتبر ، لذلك تقرر عزل المركبات الفعالة من جذع النبات، عن طريق غلي المستخلص الميثانولي للجذع عند 97 درجة مئوية لمدة ساعتين في الماء ثم معالجته بالهكسان وأسيئات الإيثيل بالتسلسل. بعدها تم عزل المركبين solstitialine A و 15-dechloro-15-hydroxychlorojanérine من مستخلص أسيئات الإيثيل بواسطة كروماتوغرافيا العمود وتم تحديده بواسطة تقنيات التحليل الطيفي حيث أظهر هذان المركبان نشاطا مضادا للتكاثر عالي جدا على خلايا C6 وخلايا سرطان الرحم البشري [27].

II-1-8- المسح الكيميائي لنبات *C. solstitialis*

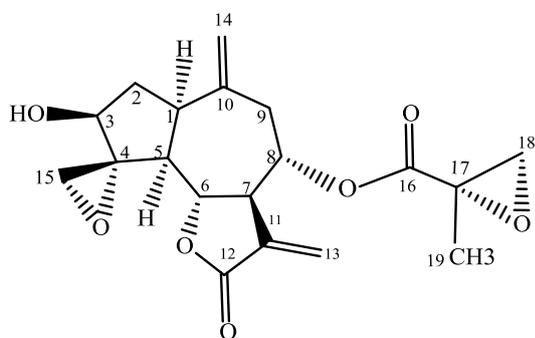
أكد المسح البليوغرافي الكيميائي للنبته إحتوائها على القلويدات ، التربينات الثلاثية ، السييكويتربينات حيث تم فصل المركبات التالية (1) solstitialine A ، (2) répine ، (3) subluteolide ، (4) acroptiline ، (5) cynaropicrine ، (6) janérine ، (7) solstitiolide ، (8) episolstitiolide [28] ، (9) 13-acétyl solstitialine A ، (10) chlorojanérine [23] ، كما بينت الأبحاث إحتواء *C. solstitialis* على (11)centaurépensine [29] ، هذه المركبات موضحة في الشكل (II-1).



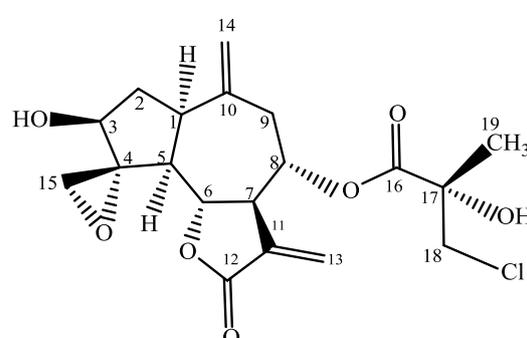
(1) Solstitialine A



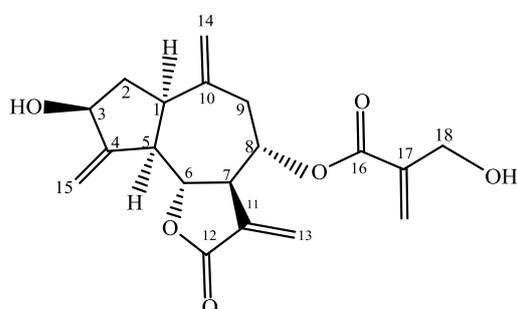
(2) Répine



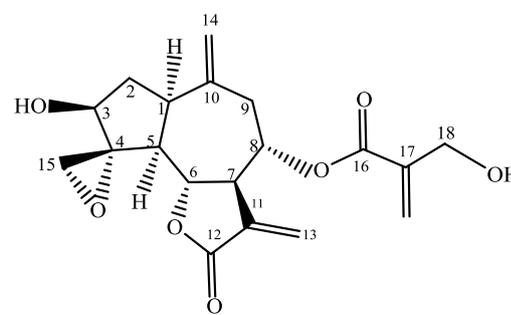
(3) Sublutéolide



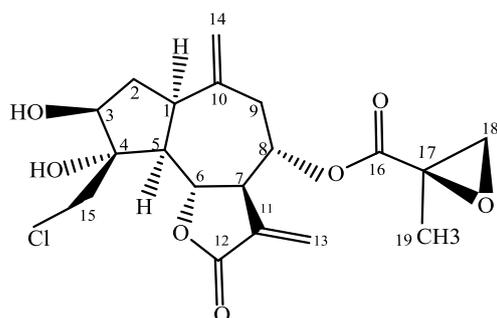
(4) Acroptiline



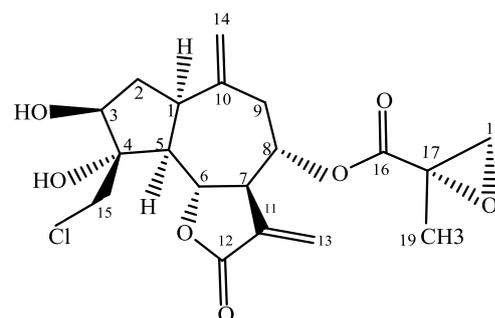
(5) Cynaropicrine



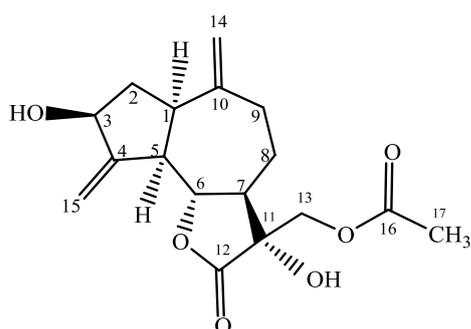
(6) Janérine



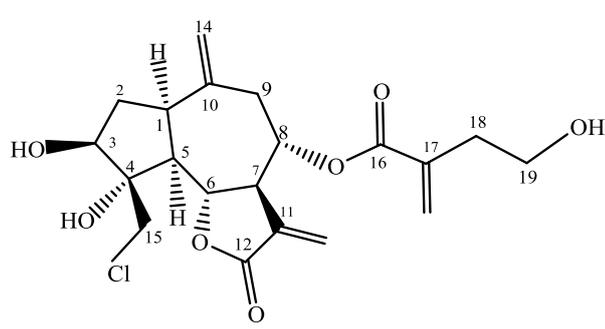
(7) Solstitalide



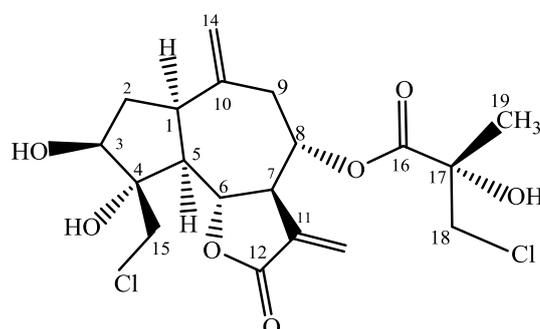
(8) Episolstitalide



(9) 13-O-acetyl solstitialine A



(10) Chlorojanérine



(11) Centaurépensine

الشكل (1-II) : المركبات المفصولة من *C. solstitialis*

كما كشفت دراسة زيت الأجزاء الهوائية لنبات *C. solstitialis* L. subsp. *solstitialis* الذي تم جمعه من شرق الأناضول بتركيا ، إحتوائه على أربعين مركب ، مبينة أن المركبات الأكثر وفرة هي le bicyclogermacrène (14,2%) و β - eudesmol (15,5%) يليها le spathuléol (11,3%) ، le germacrène D (6,3%) ، l'oxyde de caryophyllène (5,2%) ، l'acide hexadécanoïque (4,1%) و (4,2%) l'hexadécanal [30].

في حين بينت الأبحاث أن التركيب الكيميائي للزيت العطري لرؤوس زهرة *C. solstitialis* L. ssp. *schouwii* (DC.) Dostál الذي تم جمعه من صقلية جنوب إيطاليا، إحتواءه على الهيدروكربونات بنسبة 28% وعلى الأحماض الدهنية و إستراتها بنسبة % 46,6 [31] .

من خلال هذه الدراسة البليوغرافية التي خصت نبات *C. solstitialis* L لوحظ إختلاف إستخداماته و فعاليتها البيولوجية باختلاف مناطق نموه وتواجده في العالم ، ويمكن إرجاع ذلك إلى تغير تركيبته الكيميائية بسبب طبيعة التربة والعوامل المناخية والبيئية التي تؤثر في نشأته ، كما لوحظ أيضا إختلاف واضح في التركيب الكيميائي للزيتين، حيث سبق و أن أثبتت الدراسات أن هذا الأخير يتأثر بعدة عوامل خارجية كدرجة الحرارة ، الضوء ، نسبة الرطوبة ونوعية التربة مبينة أن كل هذه العوامل البيئية تغير من بنية الزيت [32].

كما بينت أيضا الدراسات أن فترة قطف النبتة وعمرها وطريقة الإستخلاص كلها عوامل مهمة تؤثر على غنى وتنوع التركيب الكيميائي للزيت وكذا المردود العام [33].

II-2- نبات *Serratula cichoracea*II-2-1- الوصف النباتي لنبات *Serratula cichoracea*

هي عبارة عن نبات عشبي يشبه الشجيرة الصغيرة يمكن أن يتجاوز طولها 1م ، وهي من النباتات المعمرة مع براعم متمركزة على مستوى الأرض ، لها جذع منتصب ممدود، تتوسطه الأوراق ومنقرع في الجزء العلوي، أوراقها مسننة الحافة بأسنان صغيرة ولكنها حادة مرتبطة على الساق بتناوبات الزهور ذات شكل أنبوبي، كل رئيس زهرة يدعمه غلاف بيضوي بمثابة قاعدة للزهرة ويوجد أعلاه شعيرات خيطية [34]، أقتراح الإسم العلمي من قبل كارل لينبوس عالم الأحياء السويدي والذي يعتبر والد التصنيف العلمي الحديث للكائنات الحية في 1753 [35].

صورة فوتوغرافية لنبات *Serratula cichoracea*II-2-2- التصنيف النظامي للنبات *Place dans la systématique*

Embranchement	Angiospermes	الفرع
Classe	Dicotylédones	الصف
Famille	Composées	العائلة
Tribu	Cynarées	الفصيلة

Genre	<i>Serratula</i>	الجنس
Espèce	<i>Cichoracea</i>	النوع

II-2-3- البحث البليوغرافي لنبات *Serratula cichoracea*

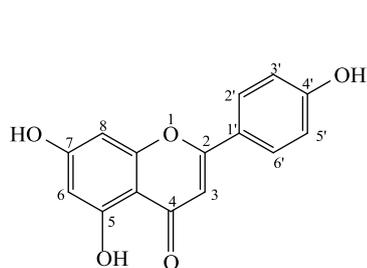
هي نبتة تنتشر بشكل كبير في اليونان وليبيا [36] وبلدان البحر الأبيض المتوسط (الجزائر، المغرب، تونس..) وبعض البلدان الأوروبية كإيطاليا ، إسبانيا [5].
نجدها في المنحدرات الجيرية ، على جوانب الطرقات وبين الصخور وبشكل واسع على طول التلال الصخرية بالقرب من البحر .

II-2-4- المسح البيولوجي لنبات *S. cichoracea*

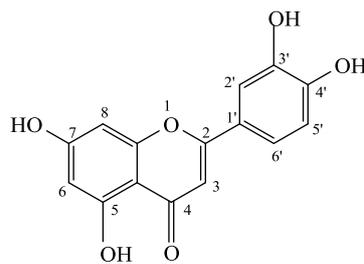
بينت الدراسة البيولوجية لنبات *S. cichoracea* فعالية المركبات المفصولة منه، حيث سبق وأن قمنا بدراسة النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص أسيتات الايثيل لأزهار *S. cichoracea* وذلك بتعيين النشاط الكابح للجذور الحرة باستخدام DPPH الذي من خلاله أظهرت النتائج أن المستخلص يملك فعالية عالية ، قدرت قيمة IC_{50} فيه بـ 3,52 ميكروغرام / مل وهذه القيمة تعادل تلك المسجلة عند استعمال مركب الكرستين الذي تبلغ قيمة IC_{50} فيه بـ 3,49 ميكروغرام / مل [37].

II-2-5- المسح الكيميائي لنبات *S. cichoracea*

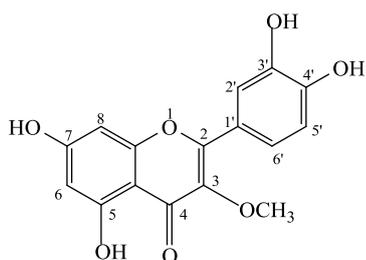
بين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون لمستخلص خلات الإيثيل خلال دراستنا له في رسالة الماجستير إشارات مماثلة لإشارات السترويدات، الفلافونويدات والترينينات الثلاثية.
حيث تم فصل وتنقية 5 مركبات فلافونويدية وتحديد بنيتها الكيميائية (الشكل II-2) وهي للتذكير [37]:
' (14) 3- méthyl quercétine ، (13) la lutéoline ، (12) l'apigénine
' (16) 7- méthyl apigénine ، (15) 4'- méthyl quercétine .



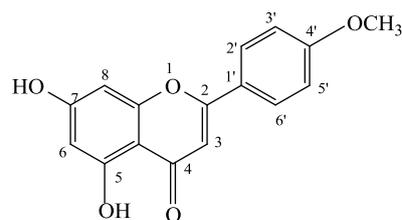
(12) L'apigénine



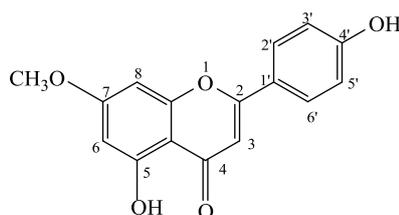
(13) La lutéoline



(14) 3-Méthyl quercétine



(15) 4'-Méthyl apigénine



(16) 7- Méthyl apigénine

الشكل (2-II): الفلافونيدات المفصولة من نبات *Serratula cichoracea*

ونظرا لغنى هذا المستخلص (مستخلص أسيتات الإيثيل لأزهار نبات *S. cichoracea*) كما سبق الذكر فقد تقرر مواصلة فصل وتنقية المزيد من مركباته خصوصا بعد أن أظهر نشاطه الكبير المضاد للأكسدة.

مراجع الفصل الثاني

1. <http://www.cabi.org>> isc >datasheet. USDA-ARS. According to Ochsmann, **2003**.
2. Ditomaso, J. M. Yellow Starthistle: biology and life history. California Exotic Pest Plant Council, **1996**.
3. Bown, D. Encyclopedia herbs and their uses. The definitive guide to the identification cultivation, and uses of 1,000 herbs, **1995**.
4. Tison, J. M.; Foucault, B. Flora Gallica - Flore de France. Edition Biotope, **2014**, 412
5. Quezel, P.; Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du C.N.R.S, Paris, **1963**, 2, 1026.
6. Ditomaso, J. M.; Kyser, G.B.; Pitcairn, M. J. *Yellow Starthistle* Management Guide. Published by california invasive plant council, **2006**, 2.
7. Ditomaso, J. M.; Kyser, G.B.; Oriof, S.B.; Enloe, S.F.; Nader, G.A. New growth regulator herbicide provides excellent control of yellow starthistle. *California Agriculture*, **1999**, 53(2), 12-16.
8. Maddox, D.M.; Mayfield, A.; Poritz, N.H. 1985. Distribution of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) and Russian knapweed (*Centaurea repens*), *Weed Science*, **1985**, 33, 315-327.
9. Callihan, R. H.; Northam, F.E.; Johnson, J. B.; Michalson, E. I.; Prather, T.S. *Yellow Starthistle* Biology and Management in Pasture and Rangeland Moscow, ID: University of Idaho Cooperative. **1989**.
10. Callihan, R.H.; Prather, T.S.; Northan, F.E. Longevity of *Yellow Starthistle* (*Centaurea solstitialis*) achenes in soil. **1993**.
11. Ditomaso, J. M. Invasive weeds in rangelands: species, impacts, and management, *Weed Science*, **2000**, 48(2), 255-265.
12. Thomsen, C.D.; Williams, W.A.; Olkouskiw, Pratt D.W. Grazing, mowing and clover plantings control *Yellow Starthistle* . *IPM Practitioner.*, **1996**, 18 , 1-4.
13. Turner, C.E.; Piper, G.L.; Coombs, E.M. *Chactorellia australis* for biological control of *Yellow Starthistle*. *Centaurea solstitialis* (compositae) in the westem USA: establishment and seed destruction, **1996**, 86,177-182.

14. Fujita, T.; Sezik, E.; Takaishi, Y.; Tabata, M. Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in Middle and West Black Sea Regions. *Economic Botany.*, **1995**, 49(4), 406-422.
15. Yesilada, E.; Gürbüz, I.; Shibata, H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-Helicobacter pylori activity. *J. Ethnopharmacol*, **1999**, 66(3), 289-293.
16. Licata, M.; Tuttolomondo, T.; Leto, C.; Virga, G.; Bonsangue, G.; Cammalleri, I.; Gennaro, M.C.; Salvatore, L. B. A survey of wild plant species for food use in Sicily-(Italy) results of a 3-year study in four Regional Parks. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **2016**, 12:12.
17. Ditomaso, J. M. *Yellow Starthistle* information, Davis, CA: University of California, weed research and Information Center., **2001**.
18. Dukes, J. S.; Chiariello, N. R.; Loarie, S.R.; Field, C. B. Strong response of invasive plant species (*Centaurea solstitialis* L.) to global environmental changes. *Ecological Applications*, **2011**, 21(6), 1887-1894.
19. Ditomaso, J.M.; Kyser, G.B.; Piroosko, C. B. Effect of light and density on yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) root growth and soil moisture use. *Weed Science*, **2003**, 51(3), 334-341.
20. Roy, D.N.; Peyton, D.H.; Spencer, P. S. Isolation and identification of two potent neurotoxins, aspartic acid and glutamic acid, from yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*). *Natural Toxins*, **1995**, 3(3), 174-180.
21. Hamburger, M.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K. Search for chlorinated sesquiterpene lactones in the neurotoxic thistle *Centaurea solstitialis* by liquid chromatography –mass spectrometry , and model studies on their possible artifactual formation. *Natural Toxins*, Wiley Online Library. **1993**, 1(6), 315-327.
22. Wang, Y.; Hamburger, M.; Cheng, C.H.K.; Costall, B.; Naylor, R.G.; Jenner, P.; Hostettmann, K. Neurotoxic Sesquiterpenoids from the Yellow Star Thistle *Centaurea solstitialis* L.(Asteraceae). *Helvetica Chimica Acta.*, **1991**, 74(1), 117-123.
23. Yesilada, E.; Gürbüz, I .; Bedir, E.; Tatli, I.; Khan, I. A. Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *J. Ethnopharmacol*, **2004**, 24(2-3), 213-219.

24. Gürbüz, I.; Yesilada, E. Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *112*(2), 284-291.
25. Özçelik , B.; Gürbüz, I.; Karaoglu,T.; Yeşilada, E. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis*. *Microbiol. Res.*, **2009**, *164*(5), 545-552.
26. Akkol, E. K.; Arif, R.; Ergun, F.; Yesilada, E. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, *122*(2), 210-215.
27. Erenler, R.; Sen, O.; Sahin yaglioglu, A.; Dermirtas, I. Bioactivity-Guided Isolation of Antiproliferative Sesquiterpene Lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis* .*Comb. Chem. High Throughput Screen*, **2016**, *19*(1), 66-72.
28. Merrill, G. B.; Stevens, K. L. Sesquiterpene lactones from *centaurea solstitialis*. *Phytochemistry*, **1985**, *24*No9, 2013-2018.
29. Cassady, J. M.; Abramson, D.; Cowall, P.; Chang, C. J.; McLaughlis, J. L.; Aynehchi.Y. Centaurepensin : a cytotoxic constituent of *Centaurea solstitialis* and *C.repens* (Asteraceae). *J. Nat. Prod.*, **1979**, *42*(4), 427-429.
30. Kilic, O. Essential oil compounds of three *Centaurea* L. taxa from Turkey and their chemotaxonomy . *J. Med. Plants Res.*, **2013**, *7*(19), 1344-1350.
31. Senatore, F.; Formisano, C.; Raio , A.; Bellone, G.; Bruno, M. Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C. parlator is* Helder and *C. solstitialis* L.ssp. *schouwii* (DC.) Dostal growing wild in southern Italy and their biological activity. *Nat. Prod. Res.*, **2008** , *22*No10, 825-832.
32. Bruneton, J. Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales. 2ème Edition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, **1999**, 915.
33. Vasconcelos Silva, M. G.; Craveiro, A. A.; Abreu Matos, F. J.; Machado, M. I. L.; Alencar, J.W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimumgratissimum*. *Fitoterapia.*, **1999**, *70*, 32-34.
34. Tose, L.; Panero et Viki A, Funk . Subfamilial vers une classification phylogénétique pour Compositae (Asteraceae) dans les Actes de la société biologique de Washington. **2002**, *115*, 760-773.

35. Funk, V.A.; Suson, A.; Stuessy, T.F.; Robinson, H. Classification des composées, en systématique, évolution, et biogéographie de composées, Vienne, Association internationale pour la taxonomie végétal (IAPT), **2009**.
36. Greuter, W. Addition à la flore de Crète 1938.1972. Ann Muxi Goulandriss , **1973**, *1*, 15-83.
37. Aliouche, L.; Zater, H.; Zama, D.; Bentamene, A.; Seghiri, R.; Mekkiou, R.; Benayache, S.; Benayache, F. Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidants activity. *Chem. Nat. Compd.*, **2007**, *43*(5), 618.

الفصل الثالث:

الدراسة الكيميائية للنبتين

والتعيين البنيوي للمركبات

المفصولة

III-1-1- الدراسة الكيميائية لنبات *Centaurea solstitialis* L. ssp. *schouwii* (DC.)

Q. et S.

III-1-1- المادة النباتية

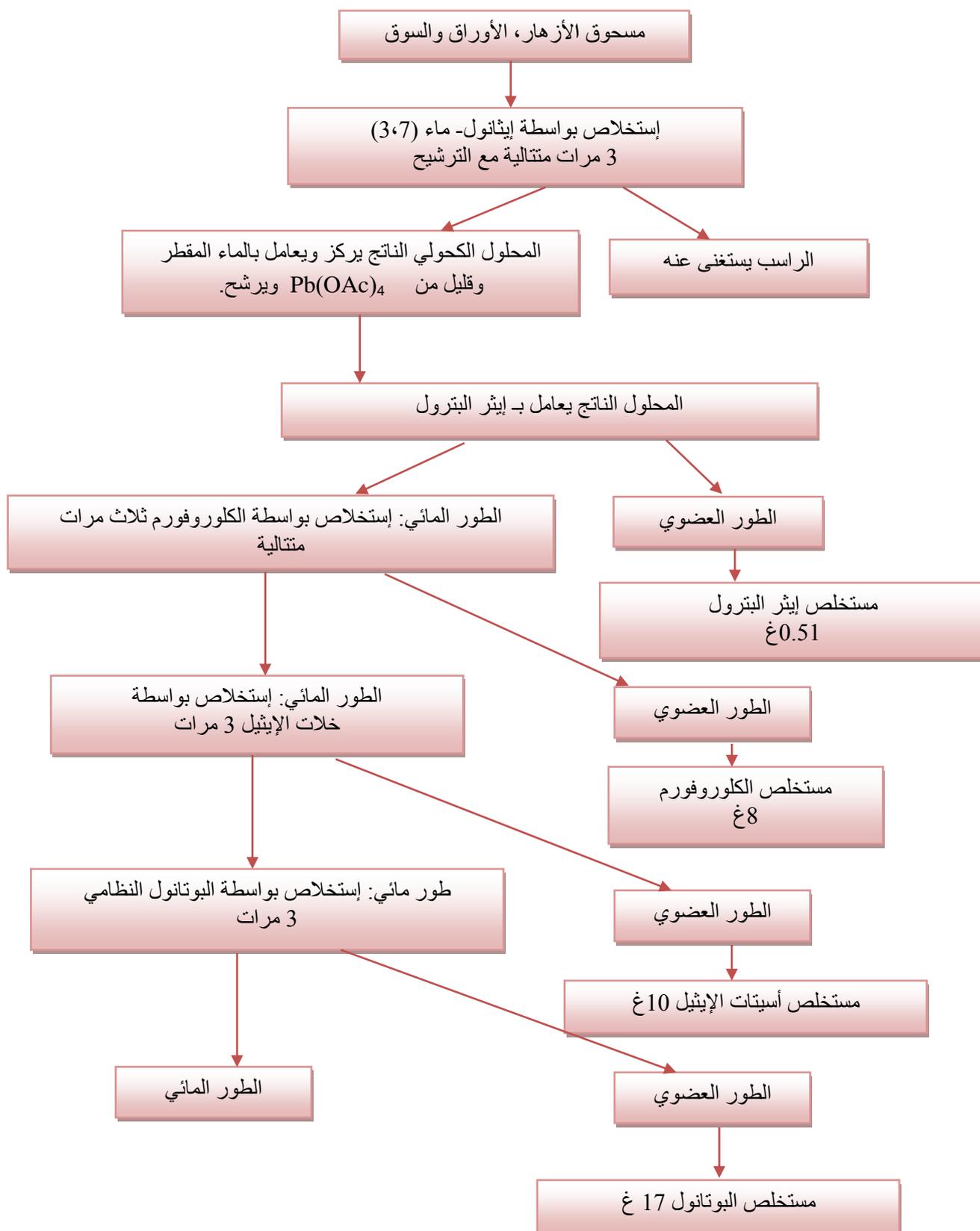
جمعت المادة النباتية في شهر جوان من سنة 2006 من ضواحي القالة، حيث تم قطفها وتجفيفها تحت الظل بعيدا عن الرطوبة، بعدها جمعت الأوراق والأزهار فكان وزنها 1200غ.

III-1-2- عملية إستخلاص نبات *C. solstitialis*

بعد طحن الأجزاء الهوائية الجافة (أوراق، سوق وأزهار) (1200غ) تم نقعها في محلول من الإيثانول والماء بنسبة 30:70 وتركها لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة ، بعد الترشيح كررت هذه العملية مرتين متتاليتين. جمعت الرشاحة الهيدروكحولية وركزت تحت الضغط المنخفض إلى حوالي 450 مل عند درجة حرارة لا تفوق 35°C. تمت معالجة المستخلص بـ480 مل من الماء المقطر في وجود قضيب مغناطيسي لمدة 30 دقيقة فوق محرك مغناطيسي، بعدها تركت لليلة كاملة في الثلاجة وذلك لترسيب أغلبية الكلوروفيل الموجود في المحلول . بعد الترشيح قمنا باستخلاصات متتالية من نوع سائل - سائل باستخدام مذيبات متزايدة القطبية ، إبتداءا بإيثر البترول ثم الكلوروفورم وبعده خلات الإيثيل وأخيرا البوتانول النظامي. جففت الأطوار العضوية المتحصل عليها باستعمال Na_2SO_4 ، رشحت ثم ركزت تحت الضغط المنخفض (35°C) مؤدية إلى المستخلصات الموافقة :

إيثر البترول: 5,10 غ، الكلوروفورم: 8 غ، خلات الإيثيل : 10,98 غ و البوتانول النظامي : 17 غ.

هذه المراحل مبينة في المخطط (III-1).



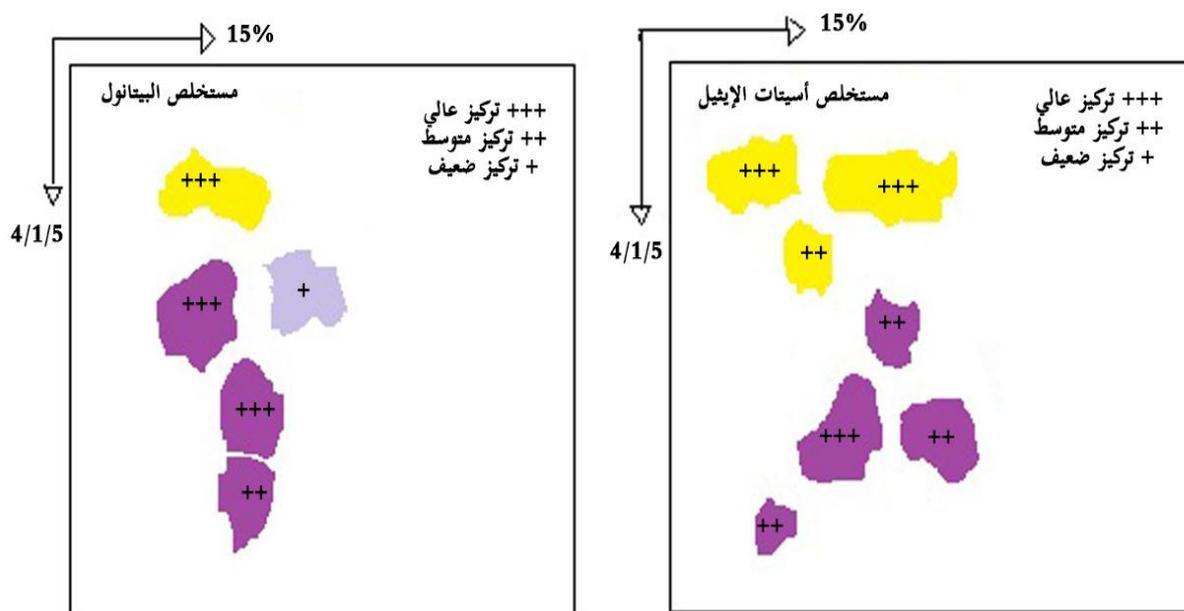
المخطط (1-III) : مراحل إستخلاص نبات *Centaurea solstitialis* L. ssp. *schouwii* (DC.) Q.et S

III-1-3- فصل وتنقية نبات *C. solstitialis*

قبل الشروع في إنجاز أي عمل تقني قمنا بإجراء فحص تحليلي بواسطة كروماتوغرافيا الورق (ك.و) (CP Watman N°3) ثنائية البعد لمستخلص خلات الإيثيل ومستخلص البوتانول في النظامين:

البعد الأول (الطور العضوي): البوتانول النظامي، حمض الخل، الماء (BAW) 5.1.4 ($n\text{-BuOH, AcOH, H}_2\text{O} : 4.1.5$)

البعد الثاني (الطور المائي): حمض الخل CH_3COOH بتركيز 15% (AcOH 15%) و هذا للاطلاع على احتمال وجود مركبات فينولية و فلافونويدية ، ثم إتجها إلى رسم الخرائط بالإستعانة بالأشعة فوق البنفسجية (UV, $\lambda = 365 \text{ nm}$) وهي موضحة في الشكل (1-III).



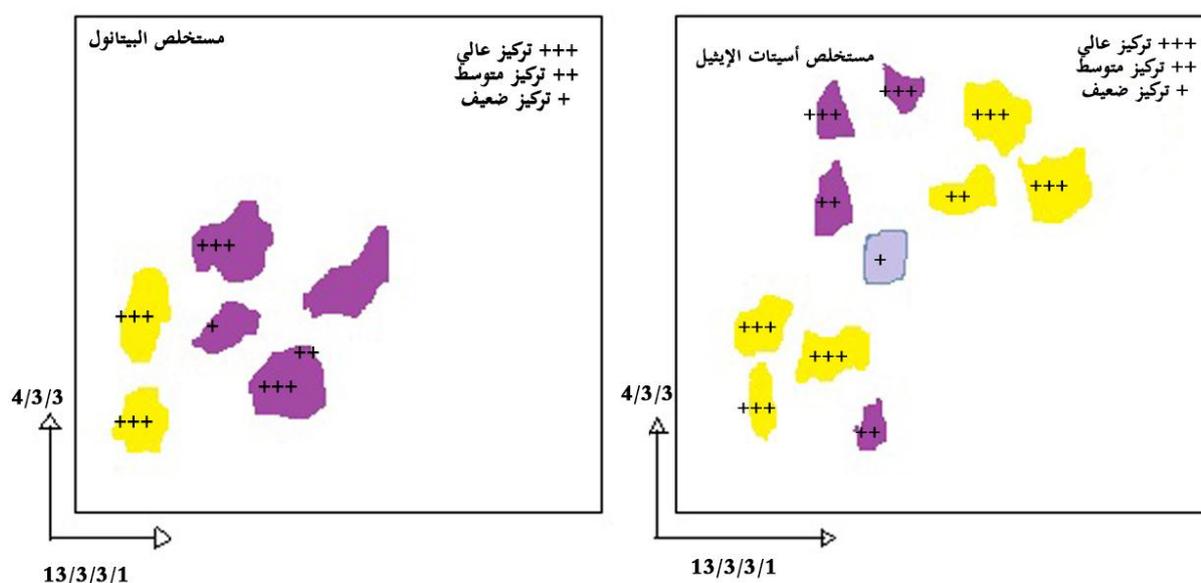
الشكل (1-III) : كروماتوغرام الورق (ك.و)

أما الفحص الثاني تم إجراؤه لنفس المستخلصين بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من متعدد الأמיד DC.6.6 ثنائية البعد في النظامين:

البعد الأول: (4.3.3) Toluène, MeCOEt, MeOH

البعد الثاني: (1.3.3.13) $\text{H}_2\text{O, MeOH, MeCOEt, (CH}_3\text{CO)}_2\text{CH}_2$

الخرائط الفلافونويدية الخاصة بهذه العملية موضحة في الشكل (2-III).



الشكل (2-III): كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (ك.ط.ر) من متعدد الأميد DC.6.6.

إن التحاليل السابقة بينت لنا بأن هناك إختلاف واضح في محتوى المستخلصين ولهذا قررنا دراسة كل مستخلص على حدى، كما بينت غنى مستخلص أسيتات الإيثيل بنواتج الأبيض الثانوي بالنسبة لمستخلص البوتانول.

إن كروماتوغرام مستخلص خلات الإيثيل يبين أن هناك تداخلا كبيرا بين المركبات وهذا يقودنا إلى إستخدام تقنية الفصل بواسطة العمود الكروماتوغرافي، ومما يشجعنا على إتخاذ هذه الخطوة كمية مستخلص خلات الإيثيل 10 غ.

III-1-3-1- فصل مركبات مستخلص خلات الإيثيل

العمود الكروماتوغرافي

قبل الشروع في عملية الفصل بالعمود الكروماتوغرافي قمنا بعدة إختبارات باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لإختيار نظام التمليص المناسب، بعدها تم تحضير عمود الفصل باستخدام الكلوروفورم حيث كان علو الطور الثابت فيه 68 سم. أخذنا ال 10 غ من مستخلص أسيتات الإيثيل وهذا بعد أن أدناها في كمية قليلة من الميثانول، وأضفنا لها قليلا من السيليكاجال ثم ركزنا الخليط حتى أصبح على شكل مسحوق متجانس، وضع هذا الأخير في أعلى العمود الكروماتوغرافي الذي طوله 128 سم وقطره 2,3 سم، حيث كانت دعامة السيليكاجال من نمط 40-63 μm ASTM mesh 230-400 التي

بلغ وزنها 300غ ، تمت عملية التمليص باستخدام الكلوروفورم مع زيادة الميثانول تدريجيا حتى الوصول إلى نسبة 100 % ميثانول ، حيث قمنا بأخذ كل 30 مل في ورق منفصل، بعدها قمنا بتجميع الدوارق المتشابهة من ناحية مكوناتها الكيميائية بإجراء فحوصات تحليلية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، وهكذا تحصلنا على 33 كسر (F₁-F₃₃) . هذه العملية موضحة في الجدول (1-III) .

الجدول(1-III): تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص أسيتات الإيثيل.

الدوارق المسقبة	الكسور	الكلوروفورم %	الميثانول %	الكمية (mg)	ملاحظة
10-01	F ₁	100	0	4	آثار مركبات
21-11	F ₂			1	
27-22	F ₃			2	
37-28	F ₄	98	2	1	آثار مركبات
43-38	F ₅			4	
49-44	F ₆			1	
55-50	F ₇			1	
66-56	F ₈	96	4	4	بلورات صلبة بيضاء
72-67	F ₉			2	
79-73	F ₁₀			105	
87-80	F ₁₁	94	6	7	خليط قابل للفصل
94-88	F ₁₂			13	
95	F ₁₃			17	
101-96	F ₁₄			34	
112-102	F ₁₅	92	8	54	خليط قابل للفصل
123-113	F ₁₆			31	
125-124	F ₁₇	90	10	13	خليط قابل للفصل
138-126	F ₁₈			39	
149-139	F ₁₉	88	12	99	خليط قابل للفصل
160-150	F ₂₀			6	
172-161	F ₂₁	85	15	104	خليط قابل للفصل
194-173	F ₂₂	80	20	33	خليط معقد
215-195	F ₂₃	75	25	16	خليط معقد
237-216	F ₂₄	70	30	12	خليط معقد
258-238	F ₂₅	65	35	16	خليط معقد
279-259	F ₂₆	60	30	5	بقعة لم تعالج
300-280	F ₂₇	55	45	101	خليط قابل للفصل
307-301	F ₂₈	50	50	1	خليط قابل للفصل

الجدول(III-1): تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص أسيتات الإيثيل (تابع)

خليط قابل للفصل	11	55	45	F ₂₉	318-308
خليط معقد	12	60	40	F ₃₀	329-319
خليط معقد	15	70	30	F ₃₁	355-330
خليط معقد	65	80	20	F ₃₂	400-356
خليط معقد	83	100	0	F ₃₃	430-401

تنقية الكسور المختارة

بعد الإنتهاء من العملية السابقة سجلنا الملاحظات التالية:

هناك مجموعة من الكسور حصل عليها بكميات معتبرة كما بينت فحوصاتها التحليلية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة إمكانية فصلها مثل :

F₁₀ الذي حصل عليه في صورته النقية مباشرة من العمود الكروماتوغرافي و بلغت كميته 105 mg كما إحتوى أيضا مستخلص أسيتات الإيثيل على كسور أخرى بكميات معتبرة هي: F₁₅: 54 mg، F₁₉: 99 mg ، F₂₁ : 104 mg ، F₂₇ : 101 mg، ولهذا السبب قررنا التركيز على هذه الكسور ومحاولة تنقيتها باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ومذيبات مختلفة ، فكانت الخطوة التالية كما هو موضح في ما يلي :

• معالجة الكسر F₁₀

كما سبق الذكر، فإن هذا الكسر حصل عليه مباشرة بعد تبخر المذيب على شكل بلورات بيضاء نقية، تم غسلها بالميثانول مرتين ثم ترشيحها فحصلنا على المركب C1 و كانت كميته 105 mg.

• معالجة الكسر F₁₅

فصل منه مركب أساسي F_{15a} وذلك باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام النظام كلوروفورم-ميثانول بنسبة 1:9، أطلقنا عليه إسم المركب C2 كميته 32 mg.

• معالجة الكسر F₁₉

دائما باستخدام نفس التقنية، تم فصل مركبات هذا الكسر باستخدام نظام أسيتات الإيثيل-ميثانول-ماء بنسبة 8: 1: 1 فتحصلنا على مركب نقي F_{19c}، سمي المركب C3 كميته 45 mg.

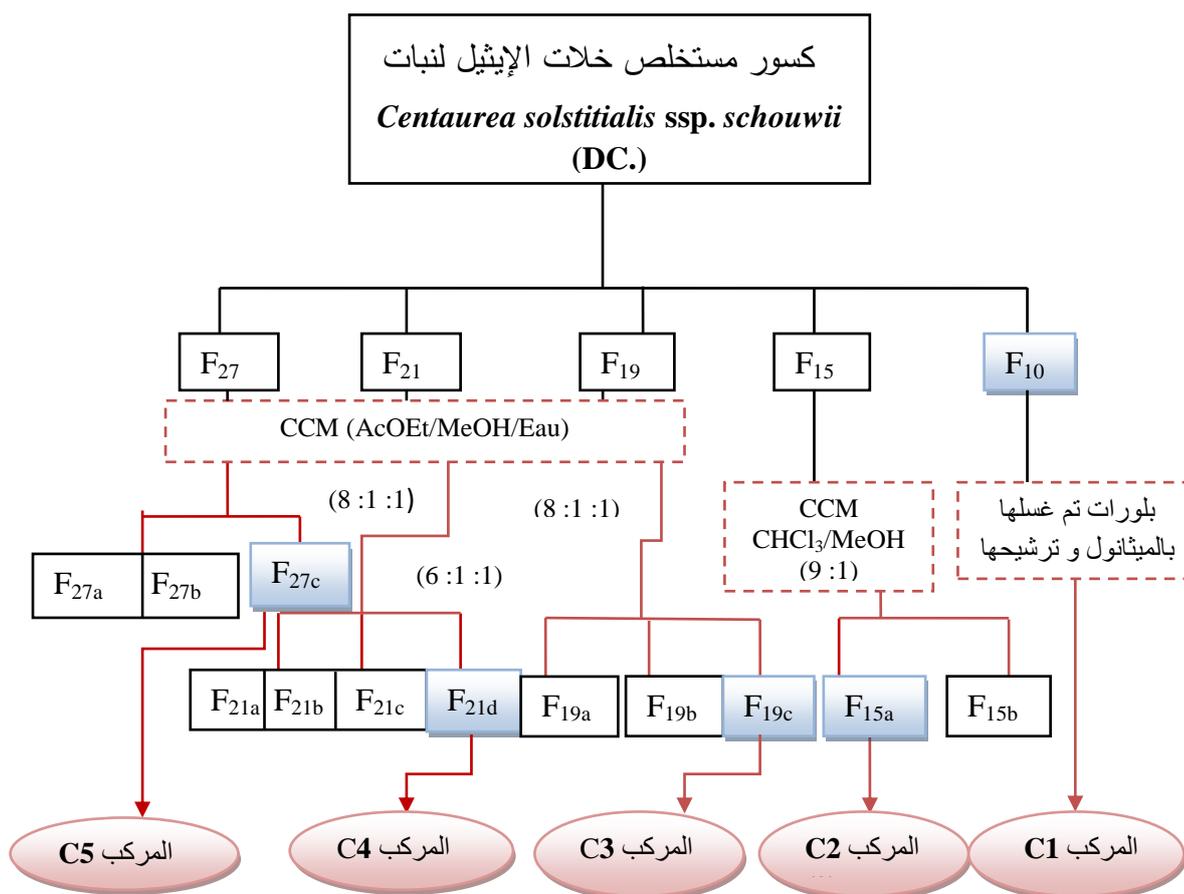
• معالجة الكسر F₂₁

عولج هذا الكسر بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التي أظهرت وجود مركب أساسي F_{21d} كميته 34 mg تم فصله باستعمال النظام أسيتات الإيثيل- الميثانول- الماء بنسبة 1:1:6، فتحصلنا على المركب C4 .

• معالجة الكسر F₂₇

بنفس الطريقة السابقة تم فصل المركب F_{27c} باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في النظام أسيتات الإيثيل- ميثانول- ماء بنسبة 8: 1:1 ، فتحصلنا على المركب C5 كميته 40 mg . حصلنا في نهاية عمليات الفصل التي قمنا بها على 5 مركبات جاهزة لتحديد بنياتها.

والمخطط (2-III) يلخص مراحل الفصل والتنقية للكسور المختارة من مستخلص أسيتات الإيثيل.



المخطط (2-III) : مراحل الفصل والتنقية لكسور مستخلص أسيتات الإيثيل

III-1-3-2- فصل مركبات مستخلص البوتانول

العمود الكروماتوغرافي

تم تحضير عمود الفصل باستخدام الكلوروفورم و 300 غ من السيليكاجال نمط (230-400 mesh ASTM Merck 40-60 µm) في عمود طوله 128 سم وقطره 3,2 سم حيث بلغ طول الطور الثابت 68 سم ، بعدها أخذنا 10 غ من مستخلص البوتانول وهذا بعد أن أذبنها في كمية قليلة من الميثانول، وأضفنا له قليلا من السيليكاجال ثم ركزنا الخليط حتى أصبح على شكل مسحوق متجانس، وضع هذا الأخير في أعلى العمود الكروماتوغرافي وتمت عملية التمليص باستخدام الكلوروفورم مع زيادة الميثانول تدريجيا وختمت التصفية بإدخال الماء. قمنا بأخذ كل 30 مل في ورق منفصل بعدها تم تجميعها بعد الكشف عنها بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بالإستعانة بمصباح الأشعة فوق البنفسجية (254-365 nm) وتعرضها لبعض الكواشف لنتحصل على 55 كسر (F₁-F₅₅). هذه العملية مدونة في الجدول (III-2).

الجدول (III-2): تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص البوتانول

الدوارق المسقبة	الكسور	الكلوروفورم %	الميثانول %	الماء	الكمية (mg)	ملاحظة
10-1	F ₁	100	0	0	1	آثار مركبات
20-11	F ₂				1	
30-21	F ₃				1	
40-31	F ₄	98	2	0	1	آثار مركبات
50-41	F ₅					
51	F ₆					
55-52	F ₇					
65-56	F ₈					
78-66	F ₉	96	4	0	1	خليط قابل للفصل
91-79	F ₁₀					
100-92	F ₁₁					
110-100	F ₁₂	92	8	0	4	خليط قابل للفصل
121-111	F ₁₃					
132-122	F ₁₄					
139-133	F ₁₅					
148-140	F ₁₆	90	10	0	5	خليط قابل للفصل
150-149	F ₁₇					
160-151	F ₁₈					
170-161	F ₁₉					

الجدول (III-2): تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص البوتانول (تابع)

خليط قابل للفصل	11 19	0	12	88	F ₂₀ F ₂₁	182-171 203-183
خليط قابل للفصل	2 5 85 5	0	20	80	F ₂₂ F ₂₃ F₂₄ F ₂₅	258-250 265-259 274-266 280-275
خليط قابل للفصل	51 47 22	0	25	75	F ₂₆ F ₂₇ F ₂₈	291-281 300-292 400-301
خليط قابل للفصل	32 51	0	30	70	F ₂₉ F₃₀	413-401 425-414
خليط معقد	33 28 15	0	35	65	F ₃₁ F ₃₂ F ₃₃	436-426 444-437 450-445
خليط معقد	24 25 13	0	45	60	F ₃₄ F ₃₅ F ₄₀	458-451 464-459 470-465
خليط معقد	1 16 09	0	45	58	F ₄₁ F ₄₂ F ₄₃	477-471 484-478 490-485
خليط معقد	14 8 31	0	50	50	F ₄₄ F ₄₅ F ₄₆	498-491 505-499 512-506
خليط معقد	7 14 9 8	0	60	40	F ₄₇ F ₄₈ F ₄₉ F ₅₀	528-513 535-529 542-536 550-543
خليط معقد	8 14 2	2	60	38	F ₅₁ F ₅₂ F ₅₃	556-551 563-557 570-564
خليط معقد	16 1	4	60	36	F ₅₄ F ₅₅	580-571 590-581

تنقية الكسور المختارة

تم إختيار الكسر F₁₈ لكميته المعتبرة 170 mg والكسر F₂₄ : 85 mg و F₃₀ : 51 mg لإحتوائهما على مركب أعظمي.

• معالجة الكسر F₁₈

تم فصل هذا الكسر باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) من السيليكاجال- 60 فكان النظام المستعمل أسيتات الإيثيل- ميثانول- ماء بالنسب 1:8:1 على الترتيب، تمكنا من خلال هذه العملية من الحصول على المركبين F_{18b} 17,7 mg الذي أعتبر المركب C7 و F_{18c} 12,8 mg الذي أطلقنا عليه إسم المركب C8 في صورتها النقية.

• معالجة الكسر F₂₄

يحتوي هذا الكسر كما سبق الذكر على مركب أعظمي تم فصله بعد إجراء عدت محاولات لإختيار الطريقة المناسبة والمملص المناسب، حيث تم إختيار كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية (Watman N°3) باستعمال حمض الخل (AcOH) كملص بنسبة 15%.

ولتطبيق هذه التقنية تم إتباع الخطوات التالية:

- إذابة الكسر F₂₄ في كمية مناسبة من الميثانول.
- يوضع الكسر بواسطة ماصة على كافة الورق على بعد 4 سم من الحافة مع تجفيفه.
- يغمص الكروماتوغرام في المذيب 15% AcOH حيث تجري عملية التمليص تنازليا لمدة 9 ساعات.
- تخرج الكروماتوغرامات وتترك لتجف في مكان مناسب.
- تعلم الحزم بالإستعانة بمصباح UV (365 nm) ثم تقص وتجمع الحزم المتماثلة وتقطع إلى أجزاء صغيرة تغسل بالإيثانول الساخن في درجة الغليان مع الرج ثم ترشح وتركز.
- تم إذابة العينات المتحصل عليها من العملية السابقة وبعد تركيزها تمت إعادة تنقيتها باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (السيليكاجال60) في النظام أسيتات الإيثيل- ميثانول- ماء بالنسب 1:8:1.

- سمحت لنا هذه العملية بفصل المركبين F_{24c} و F_{24e} اللذين أعتبرا المركب C9 والمركب C10 على الترتيب.

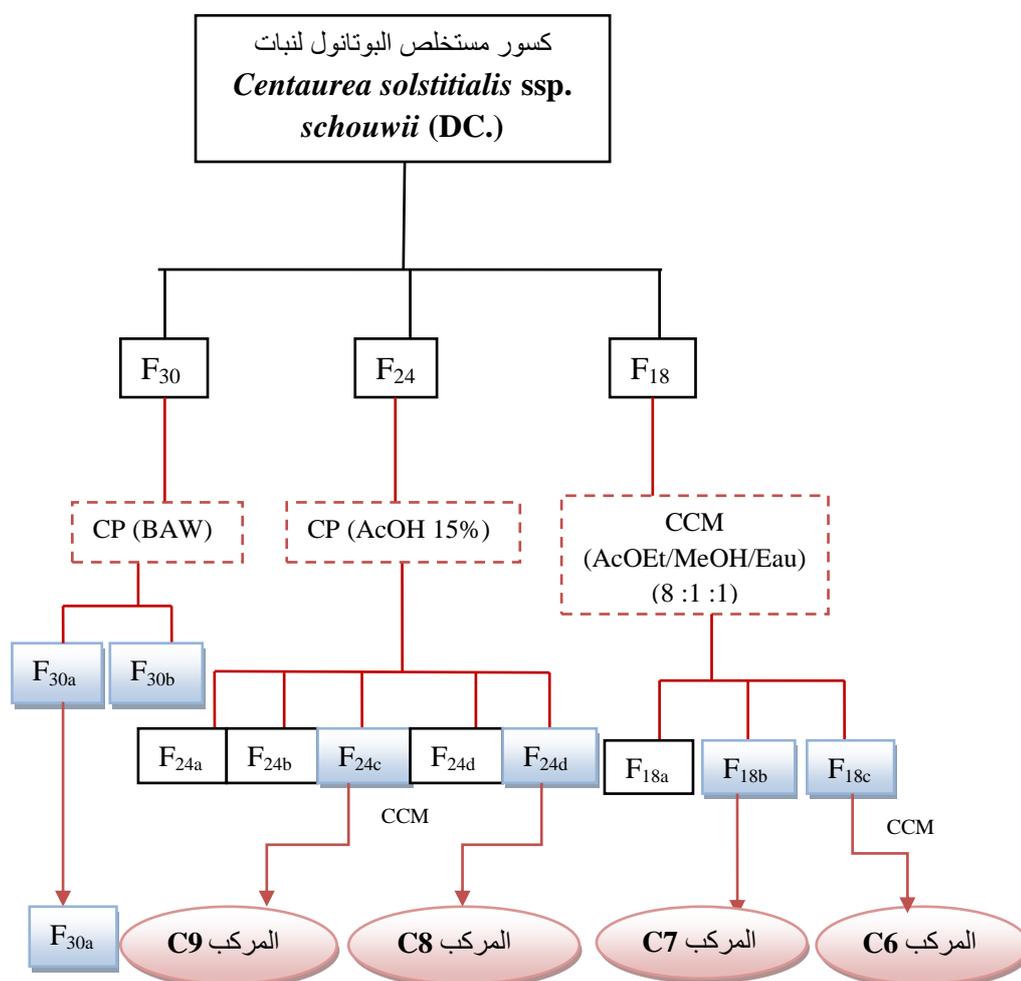
• معالجة الكسر F₃₀

تمت معالجة هذا الكسر باستعمال كروماتوغرافيا الورق التحضيرية باستخدام المملص BAW (40% butanol, 10% acide acétique, 50% eau) ، من خلال إتباع نفس الخطوات السابقة

الذكر. وتمت إعادة التنقية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة من السيليكا جال فتحصلنا على المركب F_{30a} بشكل نقي، لكن لم تمكننا كميته الضئيلة من تحديد بنيته.

في الأخير تحصلنا على 4 مركبات بكميات معتبرة.

والمخطط (3-III) يلخص مختلف مراحل فصل كسور المستخلص البوتانولي لنبات *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q et S.



المخطط (3-III) : مراحل الفصل والتنقية لكسور مستخلص البوتانول.

III-2- الدراسة الكيميائية لنبات *Serratula cichoracea*

III-2-1- المادة النباتية

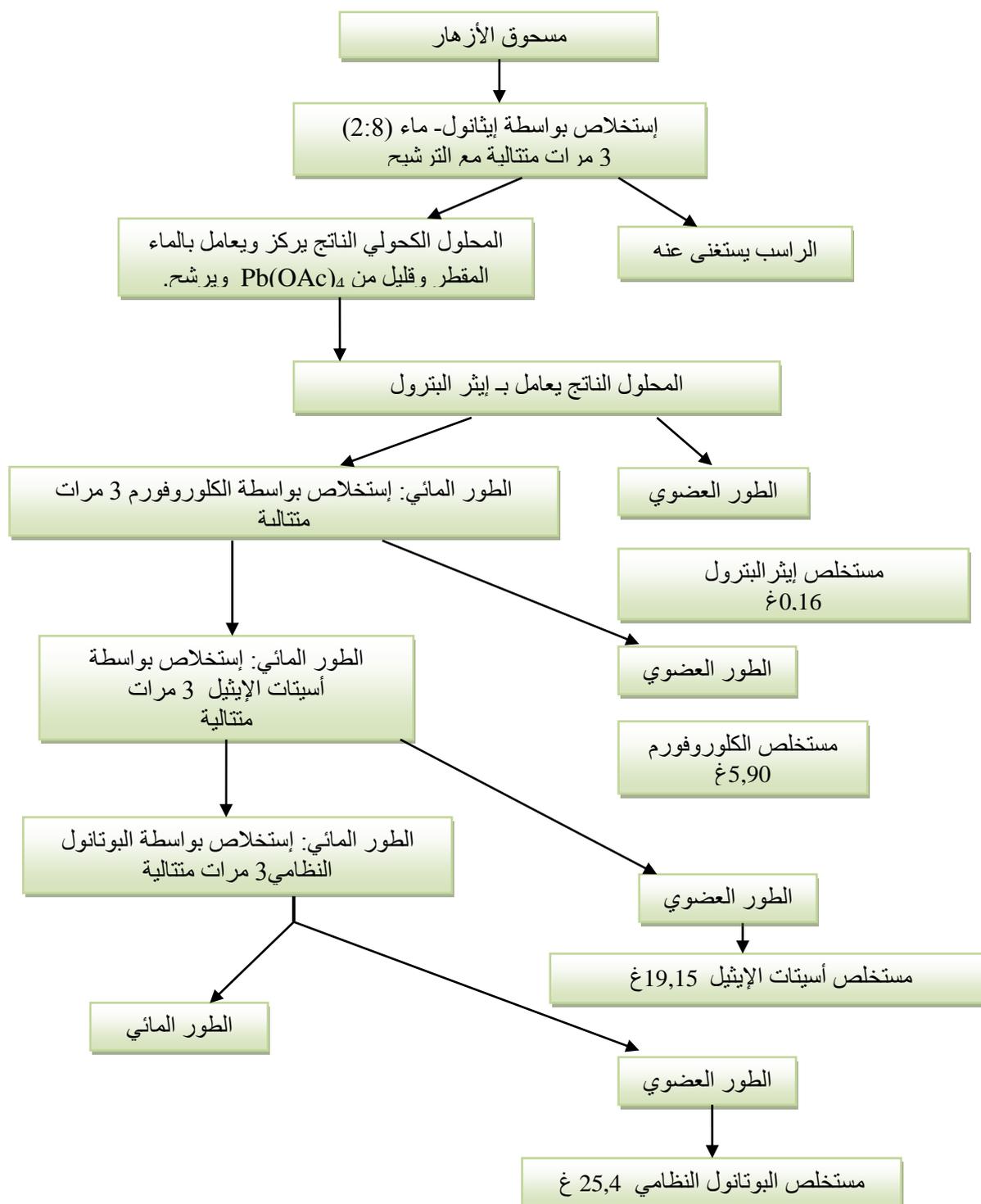
تم قطف نبات *Serratula cichoracea* من نواحي مدينة القالة في جوان 2002 بعدها تم تجفيف الأوراق والزهور كلا منها على حدى في مكان بعيد عن الرطوبة.

III-2-2- عملية إستخلاص نبات *S. cichoracea*

للإشارة فقد قمنا بدراسة هذه النبتة خلال رسالة الماجستير ونظرا لغنى الكسور المستخرجة من مستخلص أسيتات الإيثيل للأزهار بنواتج الأيض الثانوي، فقد تقرر مواصلة فصل وتنقية هذه الكسور. تمت عملية الإستخلاص كالتالي:

بعد طحن 2208,27 غ من أزهار *S. cichoracea* ، تم نقعها في محلول من الإيثانول- الماء بنسبة 30:70 لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة ، بعد الترشيح كررت هذه العملية مرتين متتاليتين. جمعت الرشاحة الهيدروكحولية وركزت تحت الضغط المنخفض إلى حوالي 600 مل عند درجة حرارة لا تفوق 35°C. تمت معالجة المستخلص باضافة 800 مل من الماء المقطر وقليل من $Pb(OAc)_4$ إلى غاية إختفاء اللون الأخضر وبقاء اللون البني وذلك لترسيب الكلوروفيل الموجود في المحلول ، بعد الترشيح قمنا باستخلاصات متتالية من نوع سائل- سائل باستخدام مذيبات متزايدة القطبية ، ابتداءا بإيثر البترول ثم الكلوروفورم وبعده خلات الإيثيل وأخيرا البوتانول النظامي. جففت الأطوار العضوية المتحصل عليها باستعمال Na_2SO_4 ، رشحت ثم ركزت تحت الضغط المنخفض (35°C) مؤدية إلى المستخلصات الموافقة :

إيثر البترول: 0,16 غ، الكلوروفورم: 5,90 غ، خلات الإيثيل: 19,15 غ و البوتانول النظامي : 25,4 غ. هذه المراحل مبينة في المخطط (III-4).



المخطط (4-III): مراحل إستخلاص نبات *Serratula cichoracea*

III-2-3- فصل و تنقية نبات *S. cichoracea*

غنى مستخلص أسيتات الإيثيل بالمركبات كما سبق الذكر دفعنا إلى اللجوء أولاً إلى فصلها عن طريق العمود الكروماتوغرافي باستخدام كلوروفورم- أسيتون كملص، حيث أخذنا 15 غ من مستخلص أسيتات الإيثيل بعد أن أذناه في كمية قليلة من الميثانول وأضفنا له قليلاً من السيليكاجال، ثم ركزنا الخليط حتى أصبح على شكل مسحوق، وضع هذا الأخير في أعلى العمود الذي كان طوله 80 سم وقطره 4 سم، حيث كانت الدعامة السيليكاجال من نمط (40-63µm mesh. 230-400) التي بلغ وزنها 324 غ وطولها في العمود 60 سم، تمت عملية التمليص باستخدام الكلوروفورم مع زيادة الأسيتون تدريجياً وختمت التصفية في النهاية بإدخال الميثانول، قمنا بأخذ كل 50 مل في دورق منفصل، بعدها تم تجميع الدوارق المتشابهة من ناحية مكوناتها الكيميائية بإجراء فحوصات تحليلية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، وهكذا حصلنا على 21 كسر (F'1-F'21)، هذه العملية موضحة في الجدول (III-3).

الجدول (III-3) : تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص أسيتات الإيثيل

الملاحظة	الميثانول%	الأسيتون%	الكلوروفورم	الكسور	الدوارق المستقبلية
آثار مركبات	0	0	100	F'1	14-1
بقعتين	0	5	95	F'2	53-15
بقعتين	0	7.5	92.5	F'3	64-54
ثلاث بقع	0	10	90	F'4	148-65
بقعتين	0	12.5	87.5	F'5	296-149
بقعتين	0	15	85	F'6	349-297
بقعتين	0	20	80	F'7	373-350
ثلاث بقع	0	22.5	77.5	F'8	421-374
4 بقع	0	25	75	F'9	477-422
بقعتين متداخلتين	0	30	70	F'10	503-478
5 بقع	0	35	65	F'11	556-504
بقعتين متداخلتين	0	40	60	F'12	613-557
بقعتين متداخلتين	0	50	50	F'13	620-614

الجدول (III-3) : تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص أسينات الإيثيل (تابع)

بقعتين متداخلتين	0	60	40	F'14	633-621
خليط معقد	0	70	30	F'15	657-634
خليط قابل للفصل	1	70	30	F'16	669-658
خليط معقد	5	70	30	F'17	717-670
خليط معقد	10	70	30	F'18	763-718
خليط معقد	15	70	30	F'19	905-764
خليط قابل للفصل	30	70	30	F'20	990-906
خليط معقد	60	70	30	F'21	1008-991

تنقية الكسور المختارة

• معالجة الكسر F'16

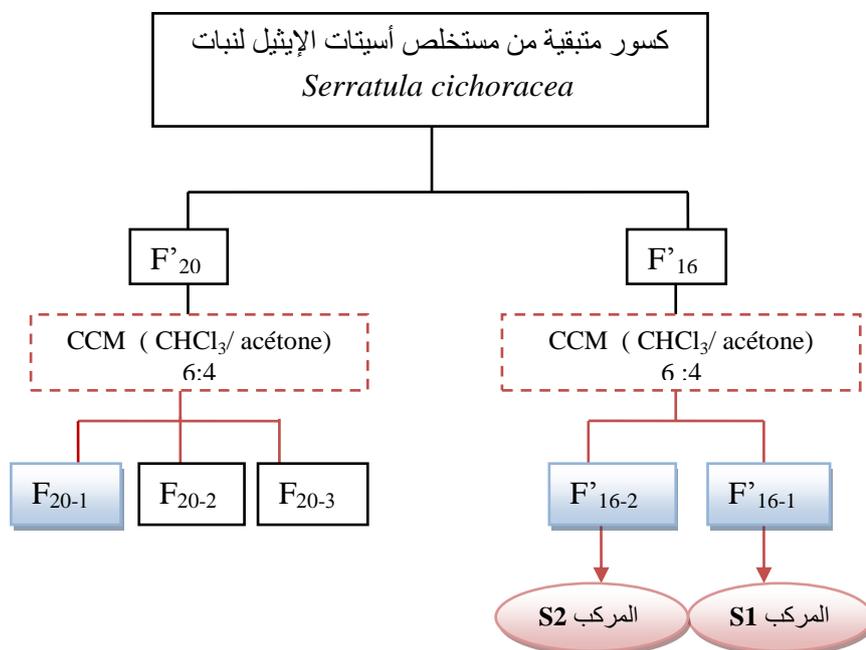
تمت معالجته بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة والنظام كلوروفورم- أسيتون(4:6) كملص فكانت النتيجة الحصول على مركبين F'16-1 و F'16-2 الذين سميا المركب S1 و المركب S2 على الترتيب .

• معالجة الكسر F'20

الإختبار التحليلي له بين بأنه يتكون من عدة مركبات تم فصل مركب منها (F'20-1) بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة والنظام كلوروفورم- أسيتون(4:6) كملص ، لكن كميته الضئيلة لم تسمح إلا بتسجيل طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون هذا الأخير لم يتمكن من خلاله في غياب الأطياف الثنائية البعد من تحديد الصيغة النهائية له .

في الأخير تم الحصول على مركبين جاهزين لتحديد بنيتهما النهائية هما المركب S1 و المركب S2.

والمخطط (5-III) يلخص طريقة تنقية الكسور .

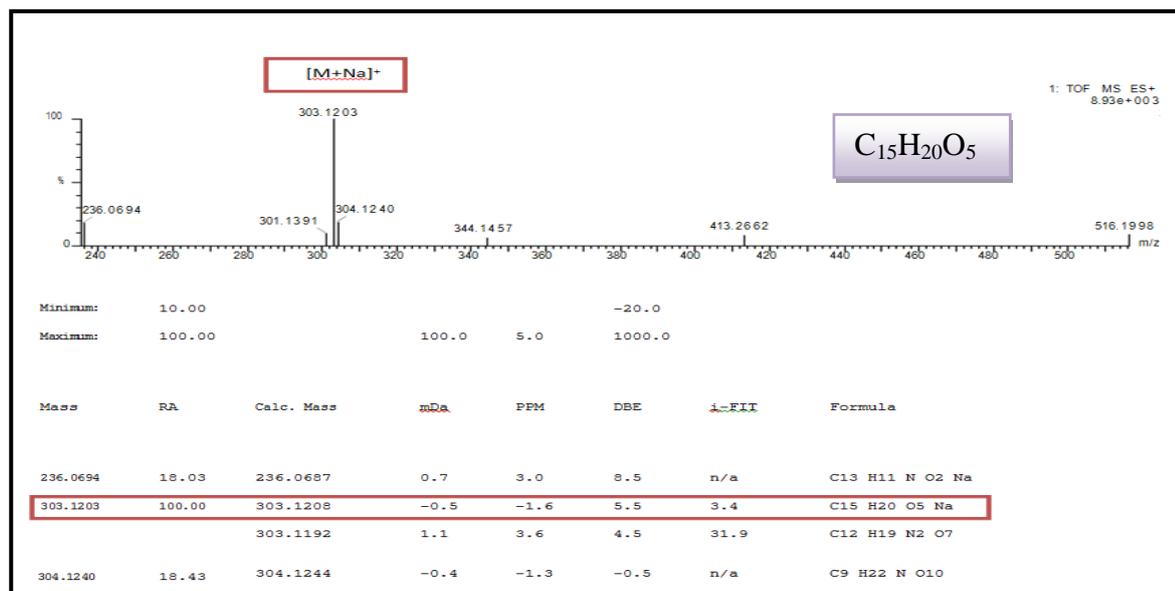


المخطط (5-III) : طريقة تنقية الكسور F'20 و F'16.

III-3-التعيين البنوي للمركبات المفصولة من نبات *Centaurea solstitialis* L. *ssp. schouwii* (DC.)

III-3-1-التعيين البنوي للمركب C1

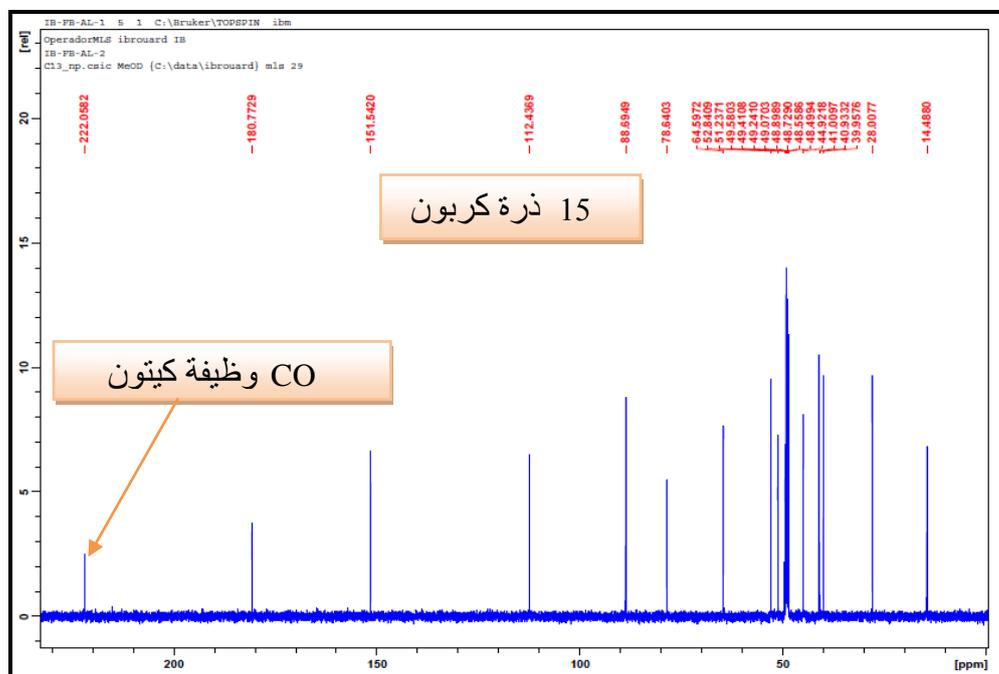
-أعطى طيف الكتلة للمركب C1 المذاب في CH₃CN المسجل بتقنية TOF-HRESI-MS موجبة (الطيف I-III) أيون شبه جزئي عند $m/z = 303,1203$ موافق لـ $[C_{15}H_{20}O_5Na]^+$ أي $[M+Na]^+$ (الكتلة المحسوبة لـ $C_{15}H_{20}O_5Na$ $m/z = 303,1208$) والتي تؤدي إلى الصيغة المجملة $C_{15}H_{20}O_5$ ذات الكتلة الجزيئية 280 Da ، هذه النتيجة مؤكدة بظهور الأيون المضاف (ion adduit) عند $m/z = 344,1457$ المناسب لـ $[C_{15}H_{20}O_5Na+CH_3CN]^+$ ، هذه الصيغة تقود إلى وجود 6 روابط غير مشبعة و حلقات.



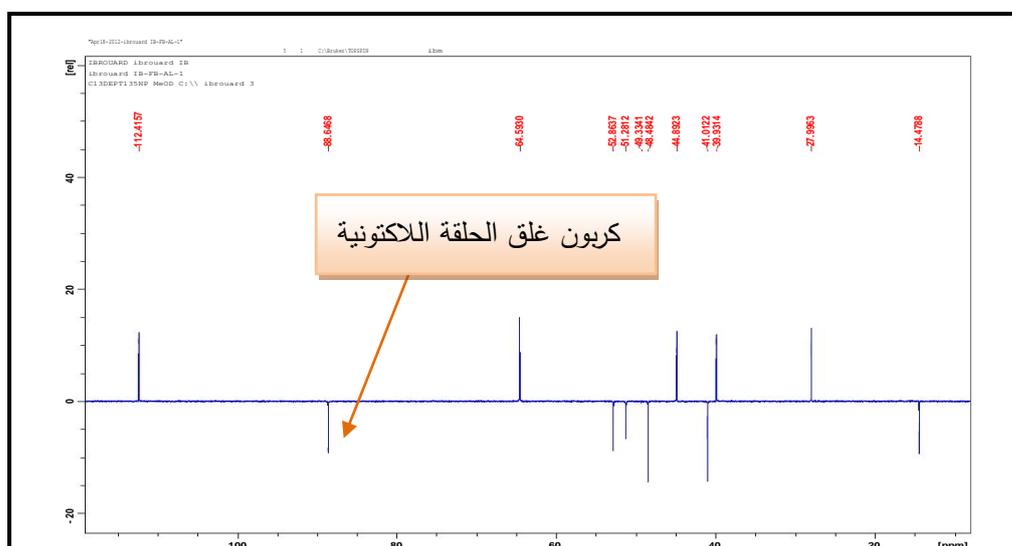
الطيف (I-III) : طيف الكتلة للمركب C1 (CD₃OD, 400 MHz)

- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ¹³C RMN لهذا المركب (الطيف II-2) المدونة نتائجه في الجدول (III-3) تؤكد وجود 15 ذرة كربون غير متكافئة مغناطيسيا، كما تبين بصفة خاصة إشارة عند 222,06 ppm موافقة لوظيفة كيتونية وإشارة عند 180,77 ppm ممكن أن توافق وظيفة لاكتونية γ- لاكتون α ، β- المشبعة، وجود هذه الوظيفة مدعم من خلال تجربة DEPT-135 (الطيف III-3) المدونة

نتائجها في الجدول (3-III) التي تظهر إشارة خاصة بمجموعة CH عند $\delta_c = 88,65$ ppm ، الإزاحة الكيميائية لهذه الأخيرة مميزة لمجموعة CH خاصة بموضع غلق الحلقة γ -لاكتونية [2،1] .



الطيف (2-III) : طيف ^{13}C RMN للمركب C1 (CD_3OD , 100 MHz)



الطيف (3-III) : DEPT-135 للمركب C1 (CD_3OD , 100 MHz)

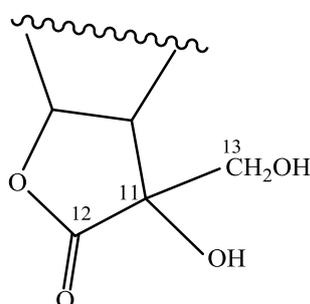
- طيف الرنين النووي للبروتون (الطيف 4-III) يبين وجود نظام AB عند $\delta = 3,68$ و $\delta = 3,71$ ppm موافق لمجموعة CH_2 مؤكسجة، بما أن المركب C1 لاكتون سيسكوپترييني ($J = 10,4$ Hz)

فلا بد أن ال 15 ذرة كربون التي يحتوي عليها تخص الهيكل السييسكويتريني، وعليه فهذه المجموعة CH_2 المؤكسجة لا يمكن أن تكون إلا على شكل CH_2OH ونظرا لتعددتها فإنها محمولة من طرف كربون رباعي غير متمائل.

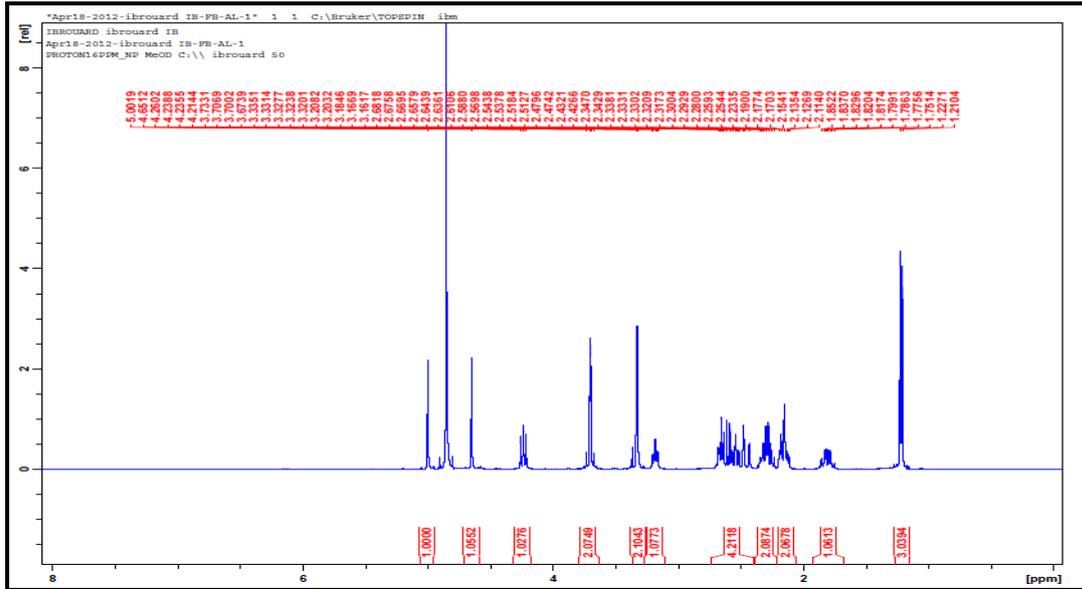
- في طيف HMBC (الطيف 5-III)، تظهر بروتوني هذه المجموعة (CH_2) بقع تعالقات واضحة مع كربونيل - γ -لاكتون، مما يسمح لنا بوضعها على الكربون المجاور للوظيفة الكربونيلية، بالأخذ في عين الاعتبار الترقيم المعتمد للسييسكويترينات اللاكتونية، نستنتج أن كربون CH_2-OH هو الكربون C-13 المحمول من طرف الكربون C-11 الرباعي.

من خلال دائما طيف HMBC نلاحظ تعالق بروتوني H_2-13 مع الكربون الرباعي المؤكسج، نظرا لإزاحته الكيميائية $\delta_c = 78,64$ ppm يمكن أن نرفق هذه الإشارة بالكربون C-11، نظرا لعدد ذرات الكربون الموجودة في هذا الجزيء وكذا إزاحته الكيميائية فالمجموعة الأوكسجينية المتصلة بهذا الكربون لا يمكن أن تكون إلا مجموعة هيدروكسيل.

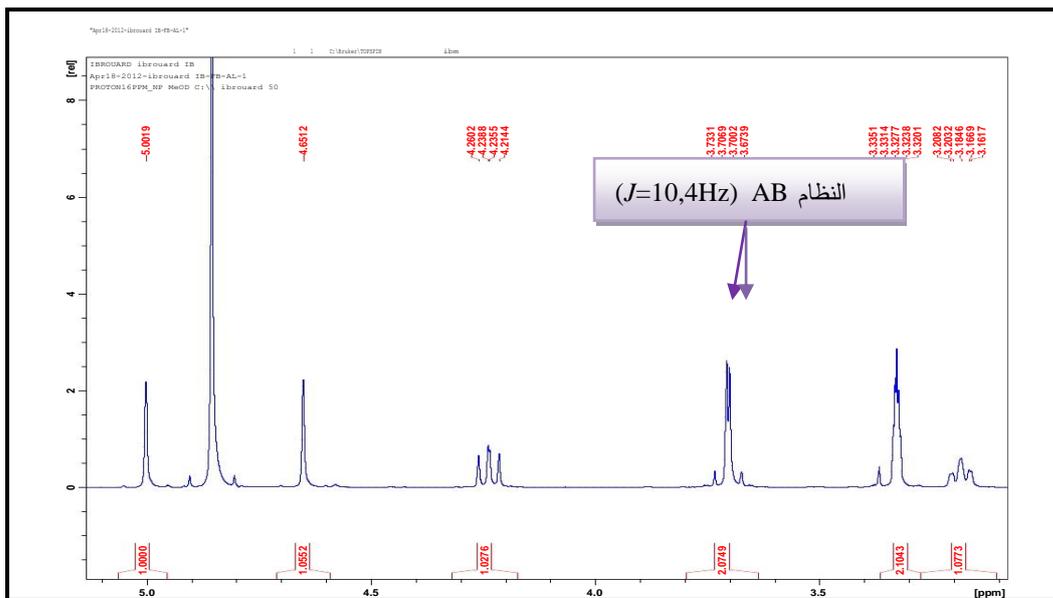
مجموع هذه المعطيات يؤدي إلى الجزء المبين في الشكل (3-III)



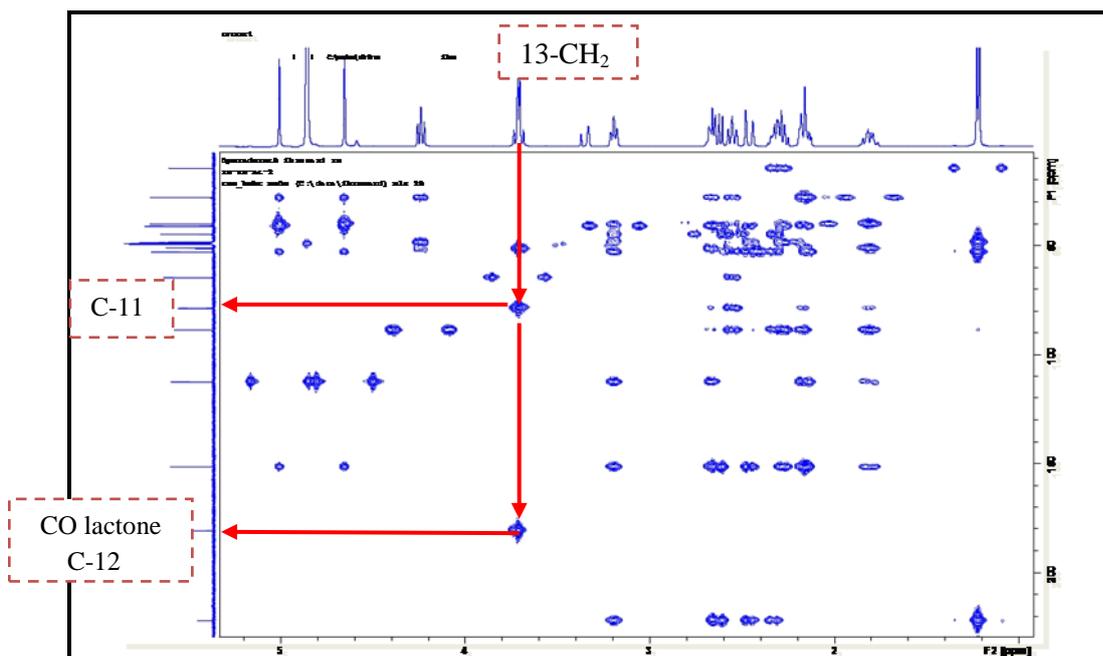
الشكل (3-III): تمثيل جزئي أول للمركب C1



الطيف (4-III) : طيف ^1H -RMN للمركب C1 (CD₃OD, 400 MHz)



تكبير للطيف (4-III) في المجال [3 - 5,1 ppm]

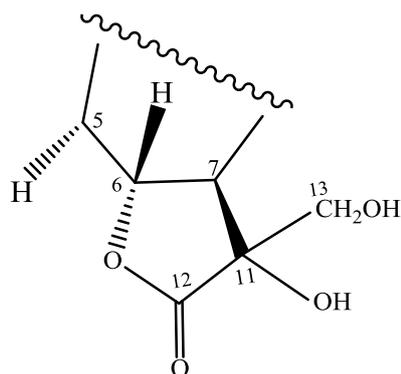


الطيف (5-III) : طيف HMBC للمركب C1 (CD₃OD, 400 MHz)

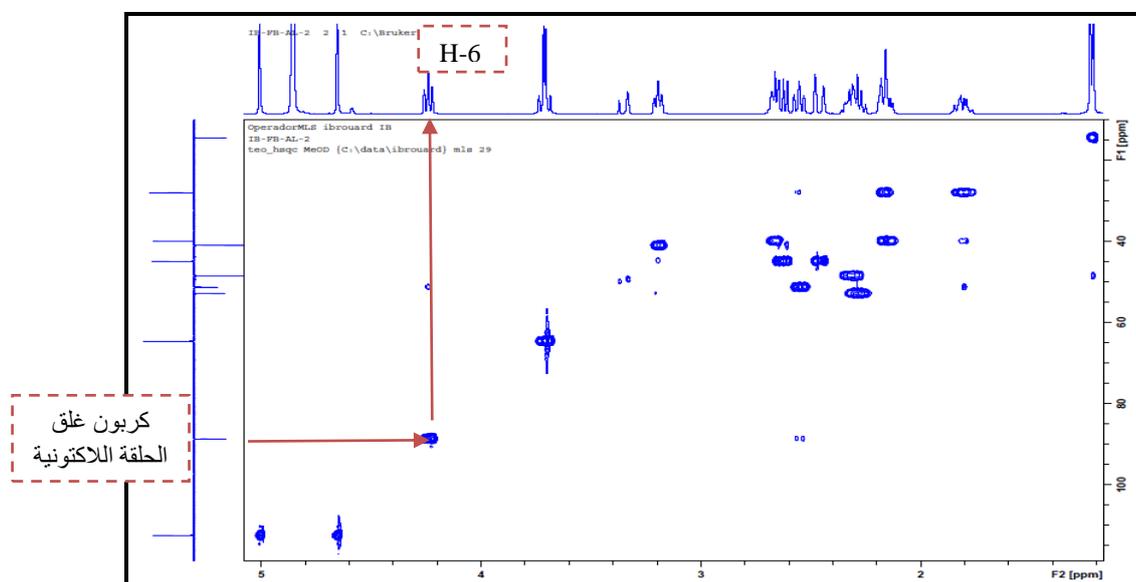
- يبين طيف HSQC (الطيف 6-III) نقطة تعالق بين كربون غلق الحلقة اللاكتونية و إشارة على شكل ثنائي- ثنائي بتكامل 1H عند 4,23 ppm ($J = 9,9 ; 8,5$ Hz) ، حسب قوانين غلق الحلقة اللاكتونية فإن هذه الإشارة يمكن نسبها ل H-6 أو H-8 .

بالرجوع إلى الصيغة المجملة وخاصة عدد ذرات الأكسجين (5O) فيتضح أننا قد أشرنا إليها كلها، وعليه فيروتون غلق الحلقة اللاكتونية لا يمكن أن يكون H-8 لأن هذه الحالة تتطلب مستبدل في C-9 أي مجموعة أكسجينية باتجاه إستوائي حتى نحقق تعددية ثنائي- ثنائي بقيمتي ثابت تزاوج 9,9 و 8,5 هرتز لهذا البروتون الذي لا يمكن أن ينسب إلا إلى H-6، كما يمكن أن نستنتج إتجاه H-6 β محوري و H-5 α محوري و H-7 α محوري .

ومنه يمكن إقتراح الجزء الممثل في الشكل (4-III).



الشكل (4-III): تمثيل جزئي ثاني للمركب C1



الطيف (6-III) : طيف HSQC للمركب C1 (CD₃OD, 400 MHz)

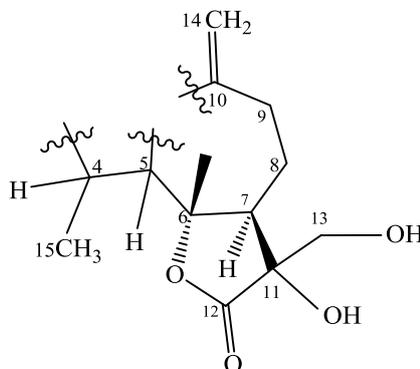
- من خلال طيف تجربة COSY (¹H-¹H) (الطيف 7-III) يمكن التعرف على هذين البروتونين (H-5 و H-7) المجاورين للبروتون H-6 عن طريق تعالقهما مع هذا الأخير، الأول (H-5) ظهر على شكل إشارة ثلاثية عريضة ($J = 8,5 \text{ Hz}$) عند $\delta = 2,25 \text{ ppm}$ و الثاني (H-7) ظهر على شكل متعدد (m) عند $\delta = 2,54 \text{ ppm}$.

كما يسمح هذا الطيف بالإستعانة بأطياف HSQC و DEPT-135 بتموضع H₂-8 عن طريق الملاحظات التالية :

- يبين بوضوح طيف COSY نقطة تعالق بين H-7 و البروتون عند 1,81 ppm
(H-8 β) (qd, $J= 12,5 ; 5,0\text{Hz}$) قيمة ثابت التزاوج الرباعي لهذه الإشارة تسمح باسناد هذا البروتون إلى H-8 محوري .

بالرجوع إلى طيفي HSQC و DEPT-135 نلاحظ أن هذا البروتون محمول من طرف مجموعة CH₂ سمح إذن طيف HSQC تحديد H-8 الإستوائي (H-8 α) عند 2,17 ppm (متعدد).
- هذه المعلومة مؤكدة من طرف طيف COSY حيث يظهر بقعة تعالق واضحة بين هذين البروتونين ، كما يبين هذا البروتون (H-8 β) تعالق واضح مع البروتونين ذات الإشارتين المتعدتين عند $\delta = 2,13 \text{ ppm}$ و $\delta = 2,67 \text{ ppm}$ التي يمكن نسبها للبروتونين H-9 α و H-9 β على الترتيب، هذا التوزيع مؤكد من طرف طيفي DEPT-135 و HSQC التي تبين إشارة خاصة بمجموعة CH₂ عند $\delta_c = 39,95 \text{ ppm}$.

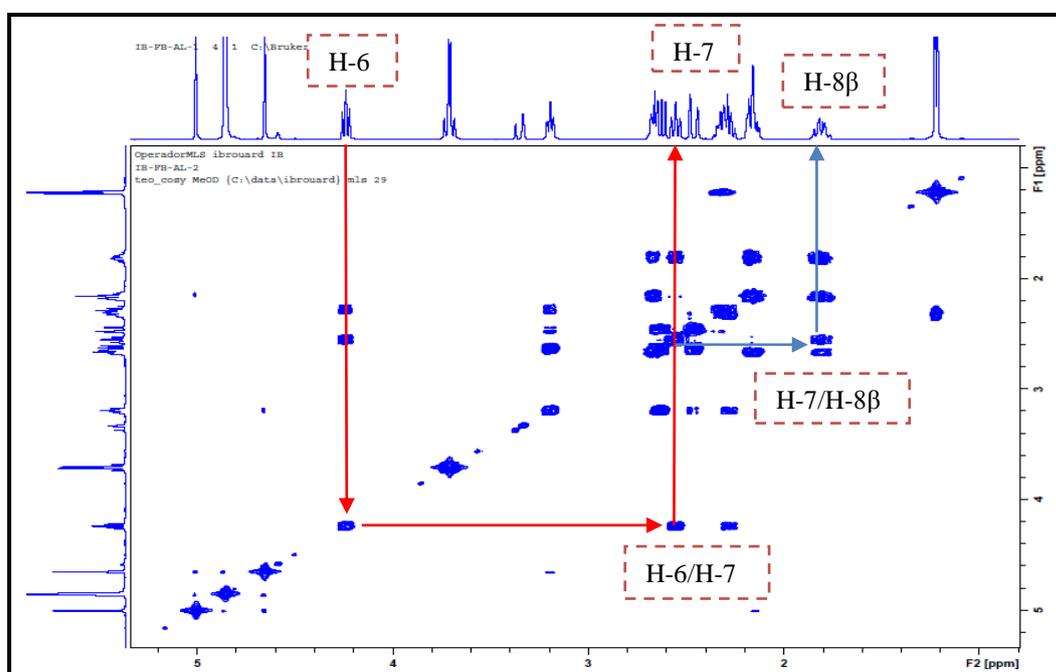
- دائما من خلال طيف COSY ، يبين البروتون H-5 تعالق مع بروتون يظهر على شكل إشارة متعددة (m) عند الإنزياح الكيميائي 2,33 ppm والذي بدوره يتزاوج مظهرا تعالقا مع مجموعة ميثيل CH₃ التي ظهرت على شكل إشارة ثنائية بتزاوج 6,7 Hz عند 1,20 ppm، بالعودة إلى هيكل المركب C1 الذي هو لاكتون سيسكوبيريني نستنتج أن مجموعة CH₃ هي CH₃-15 المحمولة طبعا من طرف الكربون 4 (C-4) وعليه نستنتج أن الإشارة المتعددة عند 2,33 ppm تنسب للبروتون H-4.
بالرجوع إلى طيف HMBC يلاحظ تعالق واضح بين H-9 α و H-9 β مع ذرتين كربون إيثيلينية، الأولى خاصة بمجموعة CH₂ عند $\delta_c = 112,43 \text{ ppm}$ و الثانية رباعية تظهر على شكل إشارة عند $\delta_c = 151,54 \text{ ppm}$ هذه الحالة تسمح بنسب هذين الذرتين إلى C-14 و C-10 على التوالي للهيكل سيسكوبيريني اللاكتوني هذه المعلومات تؤدي إلى الشكل (5-III) .



الشكل (5-III) : تمثيل جزئي ثالث للمركب C1

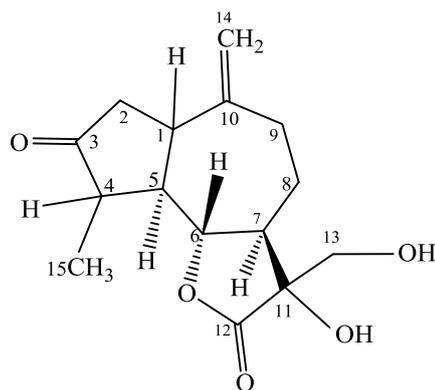
- وبالرجوع إلى طيف COSY يلاحظ وجود بقع تعالق بين H-5 و بروتون آخر يرن عند 3,18 ppm على شكل ثنائي ثنائي ثنائي (ddd) ($J = 8,5 ; 7,8 ; 3,6 \text{ Hz}$) ، هذا التزاوج لا يمكن أن يكون إلا في هيكل غوايانوليد ومنه تنسب هذه الإشارة إلى البروتون H-1 ، إسناد هذا البروتون مؤكد أيضا من خلال طيف HMBC والذي يبين بقع تعالق بين هذا البروتون و C-10 و C-14 ، الذين سبقا تحديدهما.

- دائما من خلال طيف COSY تموضع H-1 يؤدي إلى البروتونين H-2 α و H-2 β عند $\delta_H = 2,61 \text{ ppm}$ ($J = 19,0 ; 7,8 \text{ Hz}$) و $\delta_H = 2,45 \text{ ppm}$ ($J = 19,0 ; 3,6 \text{ Hz}$) على التوالي [3]. نظرا لتعددية إشارتهما فهذين البروتونين لا يقوموا إلا بتزاوج بين بعضهما والبروتون H-1 وهذا واضح في طيف COSY ونستنتج من هذه الملاحظة أن C-3 هو كربون رباعي Cq [4، 5].



الطيف (7-III): طيف COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) للمركب C1 (CD₃OD, 400 MHz)

- من خلال طيف HMBC نلاحظ أن البروتونات H-1 ، H-2 α ، H-2 β ، H-4 ، H-5 و H-15 جميعها تظهر نقاط تعالق مع مجموعة الكربونيل عند $\delta_c = 222,06 \text{ ppm}$ هذه الملاحظات تسمح لنا بوضع المجموعة الكيتونية في الموضع C-3 ، من خلال المعلومات السابقة نتمكن من اقتراح الصيغة الموضحة في الشكل (6-III).



الشكل (6-III) : الصيغة الأولية للمركب C1

- أما بالنسبة للكيمياء الفراغية للمراكز الكيرالية C-6، C-5، C-7، C-4، C-1، و C-11 يمكن تحديدها كما يلي:

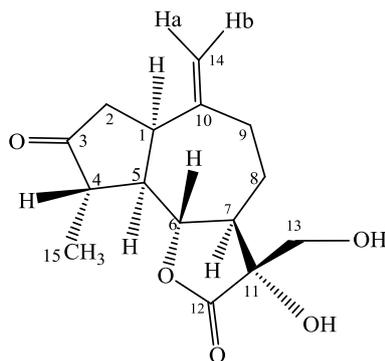
بالنسبة لذرات C-6، C-5، C-7 سبق تحديد الكيمياء الفراغية لهذه المراكز من خلال قيم ثوابت التزاوج للبروتون H-6.

بالنسبة للذرة C-4 نستنتج أن H-4 ذو توجيه β من خلال دائما ثابت التزاوج الخاص بهذا البروتون الذي أظهر تزاوج W مع H-2 β ، هذا التزاوج مؤكد بنقطة تعالق واضحة من خلال طيف COSY (الطيف III-7)، ومنه من البديهي CH₃-15 ذو توجيه α .

فراغية ذرة الكربون C-1 أستنتجت من خلال القيمة العالية لثابت تزاوج البروتون H-1 مع البروتون H-5 ($J = 8,5 \text{ Hz}$) ومنه H-1 ذو توجيه α [5].

الكيمياء الفراغية للكربون C-11 حددت من خلال الدراسات الببليوغرافية الخاصة بالسيكويترينات اللاكتونية [5] وكذلك بالرجوع لنفس المركب الذي فصل من الجنس *Centaurea* فيما سبق [3، 6].

تجميع هذه النتائج المتحصل عليها من التجارب المختلفة للرنين النووي المغناطيسي الأحادي البعد (RMN-¹H، RMN-¹³C، DEPT-135) والثنائي البعد (HSQC، COSY¹H-¹H، HMBC) يؤكد أن الصيغة النهائية للمركب C1 موضحة في الشكل (7-III).



الشكل (7-III) : 4β, 15-dihydro-3-dehydrosolstitialine A

كل النتائج السابقة مدونة في الجداول (3-III) و(4-III).

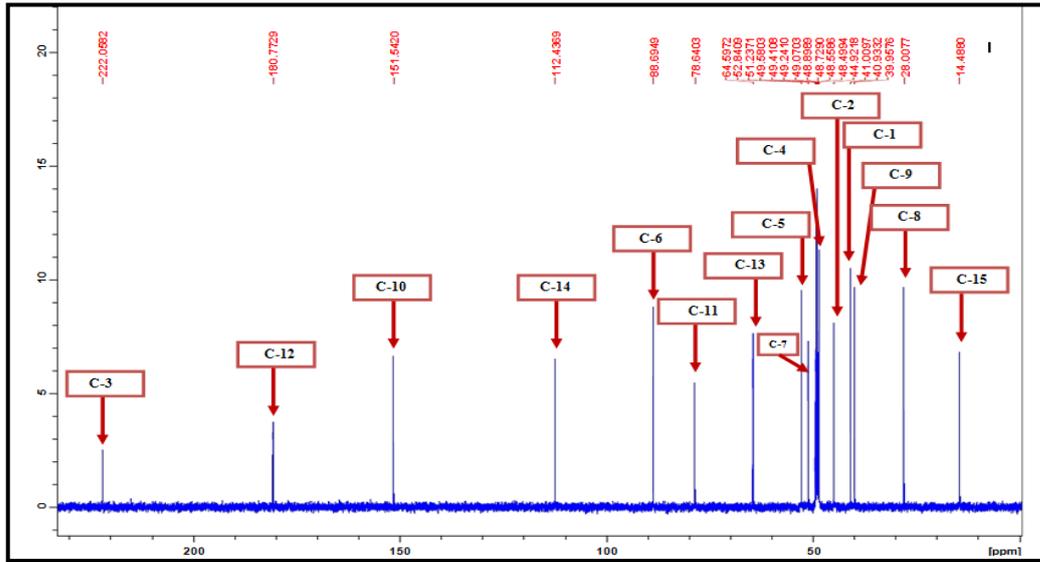
الجدول (3-III) : قيم الإزاحة الكيميائية لنواة ذرة الكربون ^{13}C -RMN ونتائج الـ 135°DEPT الخاصة بالمركب C1.

^{13}C	δ (ppm)	DEPT-135°
1	41,00	CH
2	44,92	CH ₂
3	222,05	C=O
4	48,49	CH
5	52,84	CH
6	88,69	CH
7	51,23	CH
8	28,00	CH ₂
9	39,95	CH ₂
10	151,51	C
11	78,64	C
12	180,77	C=O
13	64,59	CH ₂
14	112,43	CH ₂
15	14,48	CH ₃

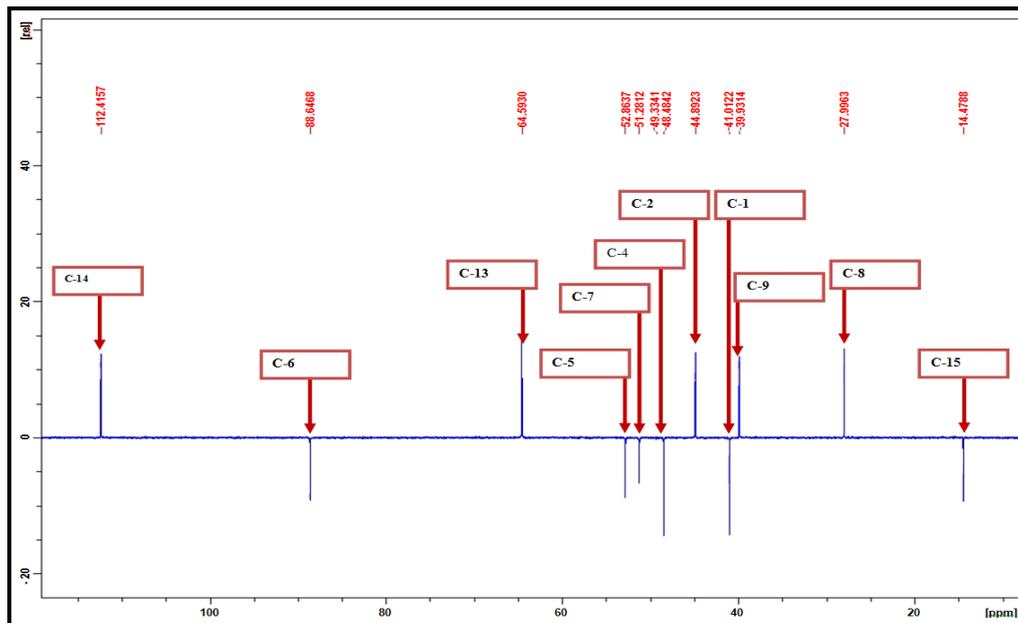
الجدول (4-III) : قيم الإزاحات الكيميائية (δ) لطيف الرنين النووي المغناطيسي لنواة الهيدروجين

RMN-¹H للمركب C1

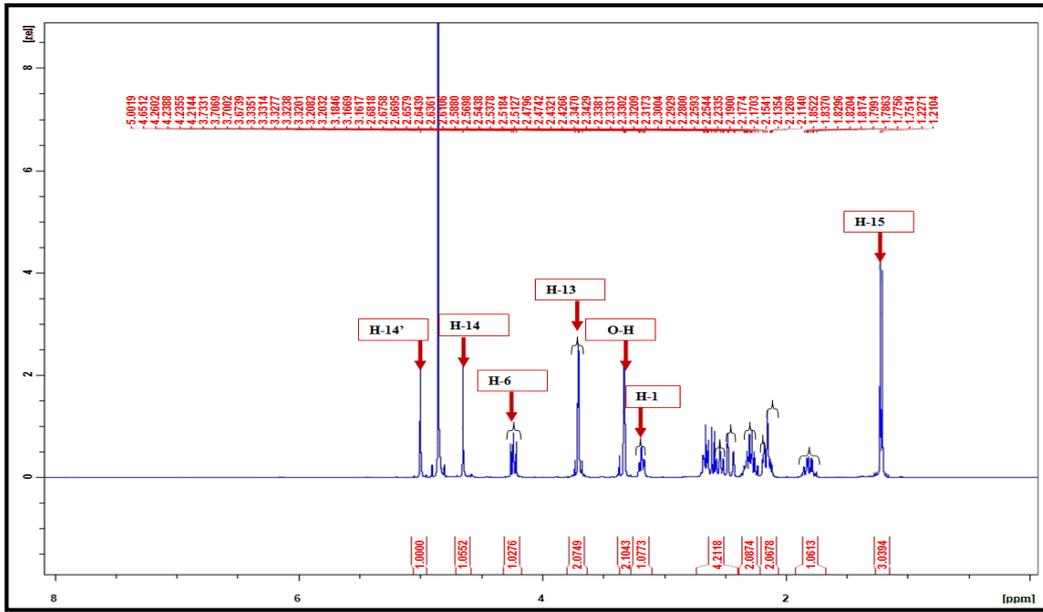
¹ H	δ (ppm)	التكامل	J(Hz) التعددية
1 α	3,18	1H	ddd ($J = 8,5 ; 7,8 ; 3,6$ Hz)
2 α	2,61	1H	dd ($J = 19,0 ; 7, 8$ Hz)
2 β	2,45	1H	dd ($J = 19,0 ; 3,6$ Hz)
4 β	2,33	1H	m
5 α	2,25	1H	brt ($J = 8,5$ Hz)
6 β	4,23	1H	dd ($J = 9,9 ; 8,5$ Hz)
7 α	2,54	1H	m
8 α	2,17	1H	m
8 β	1,81	1H	qd ($J = 12,5; 5,0$ Hz)
9 α	2,13	1H	m
9 β	2,67	1H	m
11	2,34	(OH)2H	brs
13a	3,72	1H	d ($J = 10,5$ Hz)
13b	3,69	1H	d ($J = 10,5$ Hz)
14a	5,00	1H	s
14b	4,65	1H	s
15	1,2	3H	d ($J = 6,7$ Hz)



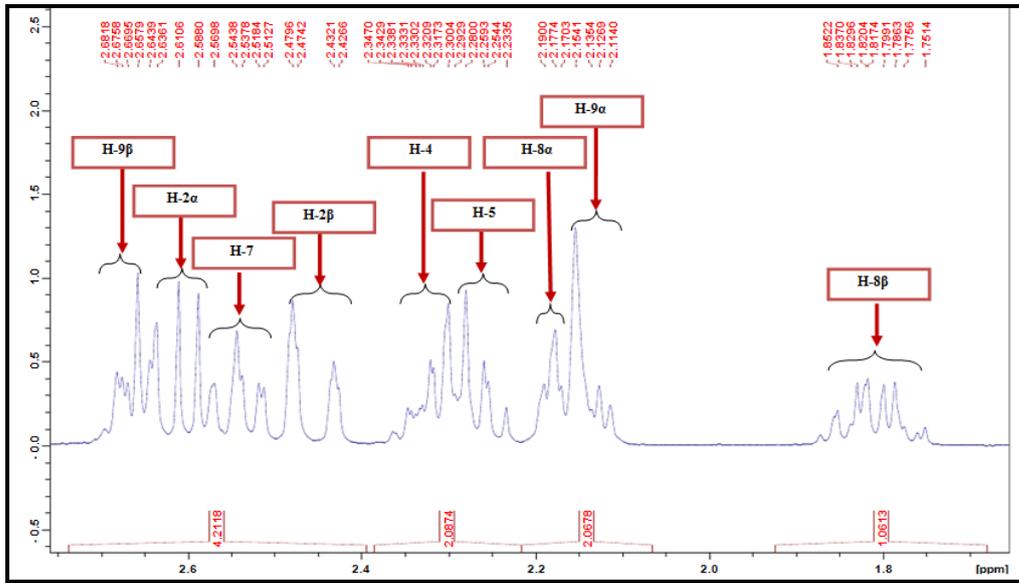
الطيف (2-III) : طيف ^{13}C RMN للمركب C1 (CD₃OD, 100 MHz)



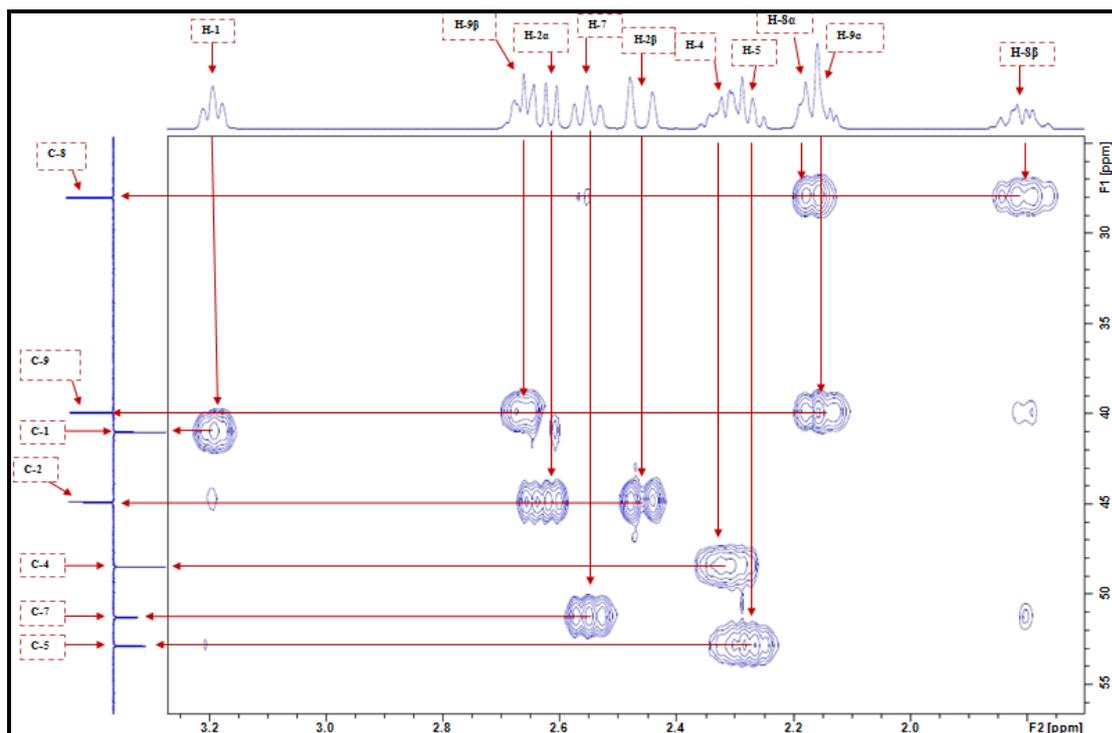
الطيف (3-III) : طيف DEPT-135 للمركب C1 (CD₃OD, 100 MHz)



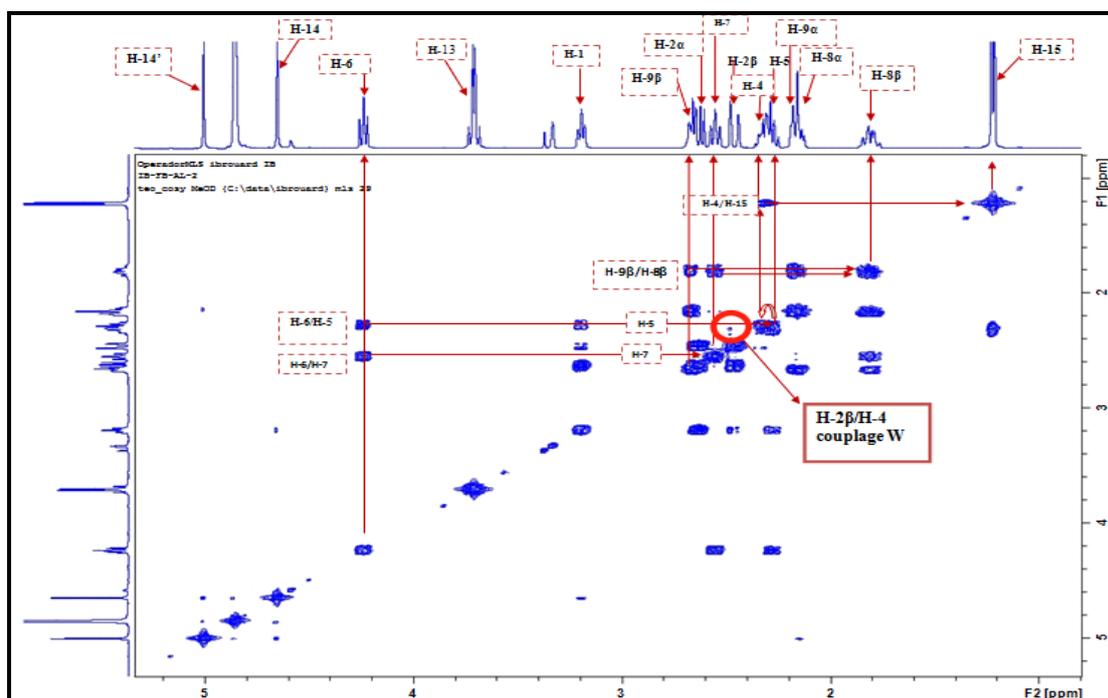
الطيف (4-III) : طيف ^1H RMN للمركب C1 (CD_3OD , 400 MHz)



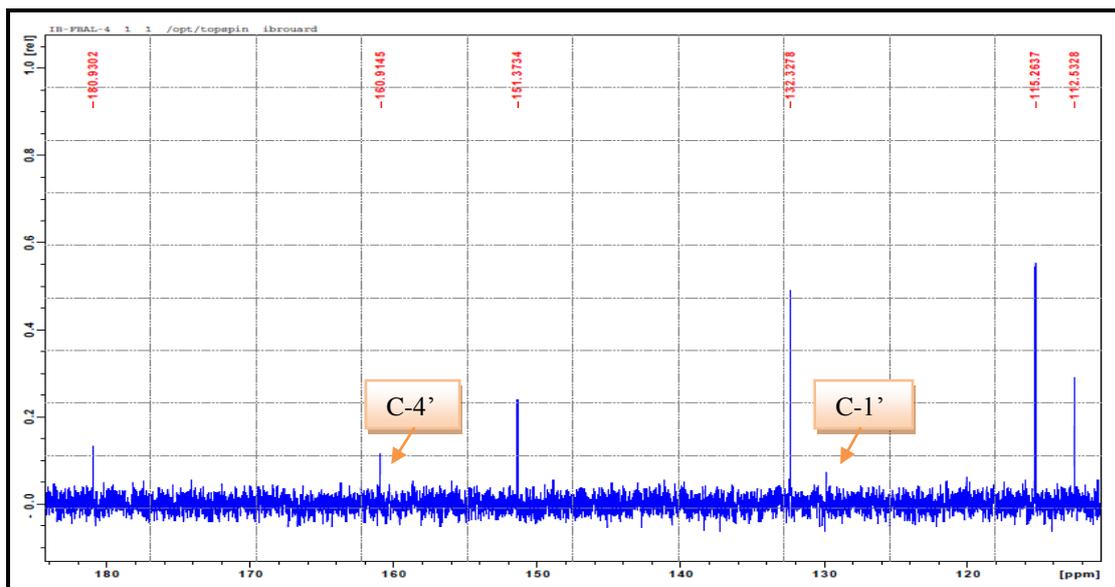
تكبير للطيف (4-III) في المجال [1,85-2,65 ppm]



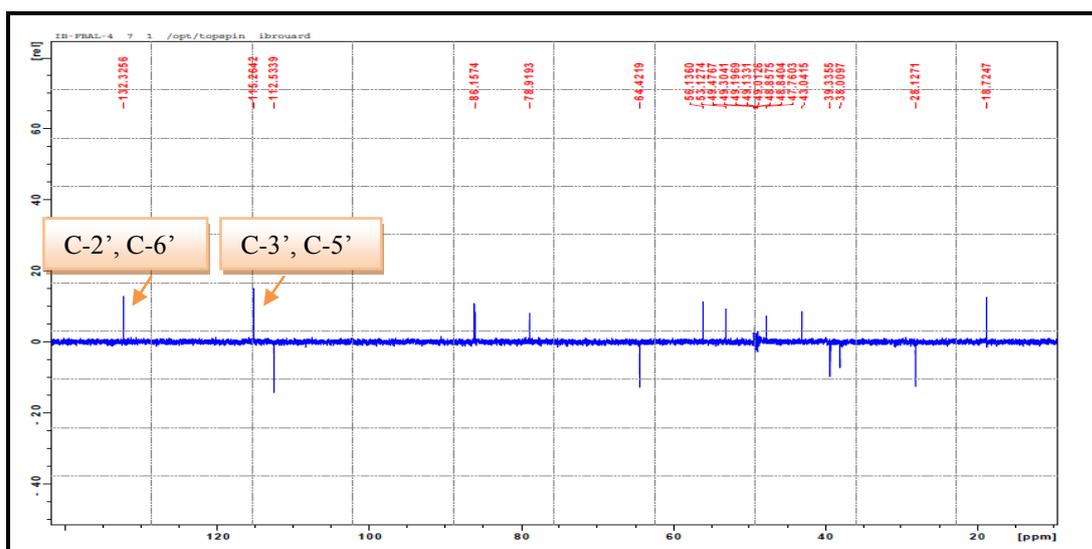
تكبير للطيف (6-III) في المجال [1-3,2 ppm]



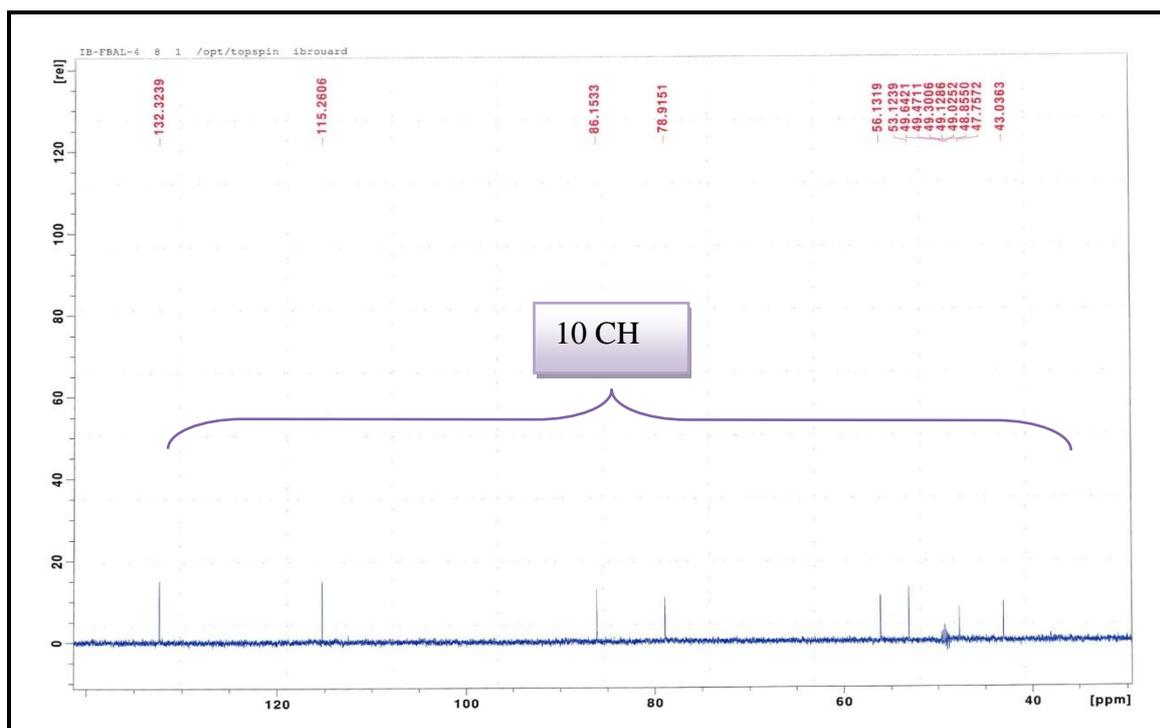
الطيف (7-III): طيف $(^1\text{H}-^1\text{H})$ COSY للمركب C1 (CD₃OD, 400 MHz)



تكبير للطيف (9-III) في المجال [112-182 ppm]

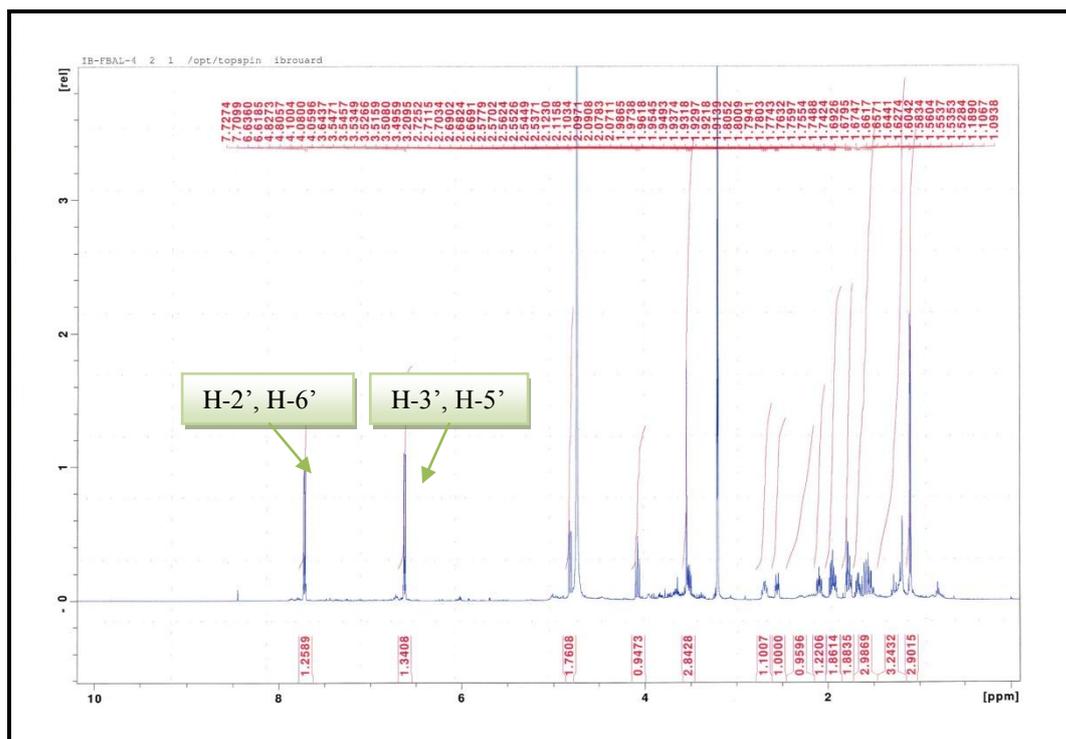


الطيف (10-III) : DEPT-135 للمركب C2 (CD₃OD, 125 MHz)



الطيف (III- 11) : DEPT-90 للمركب C2 (CD₃OD, 125 MHz)

نتحقق من ذلك بالعودة إلى طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ¹H-RMN (الطيف III- 12) الذي يبين وجود جميع إشارات مركب C1 و يؤكد ظهور إشارتين ثنائيتين بثابتة تزاوج تقدر ب 8,7 هرتز لكليهما ويتكامل 2H لكل واحدة منهما ، حيث تظهر الإشارة الأولى عند 7,72 ppm والثانية عند 6,63 ppm ، هذه الإشارات مميزة للحلقة العطرية ثنائية الإستبدال في المواضع 4،1 (para).



الطيف (12-III) : طيف ^1H -RMN للمركب C2 (CD₃OD, 400 MHz)

- طيف تجربة COSY (13-III) يبين التعلق الموجود بين بروتوني مجموعتي CH كما يظهر طيف تجربة HMBC (14-III) عدة تعلقات أهمها:

✓ التعلق الموجود بين البروتونين الظاهرين عند 6,63 ppm وبين الكربون الرباعي عند 128,90 ppm .

✓ تعلق بين البروتونين الظاهرين عند 7,72 ppm وبين الكربون الرباعي عند 160,91ppm .

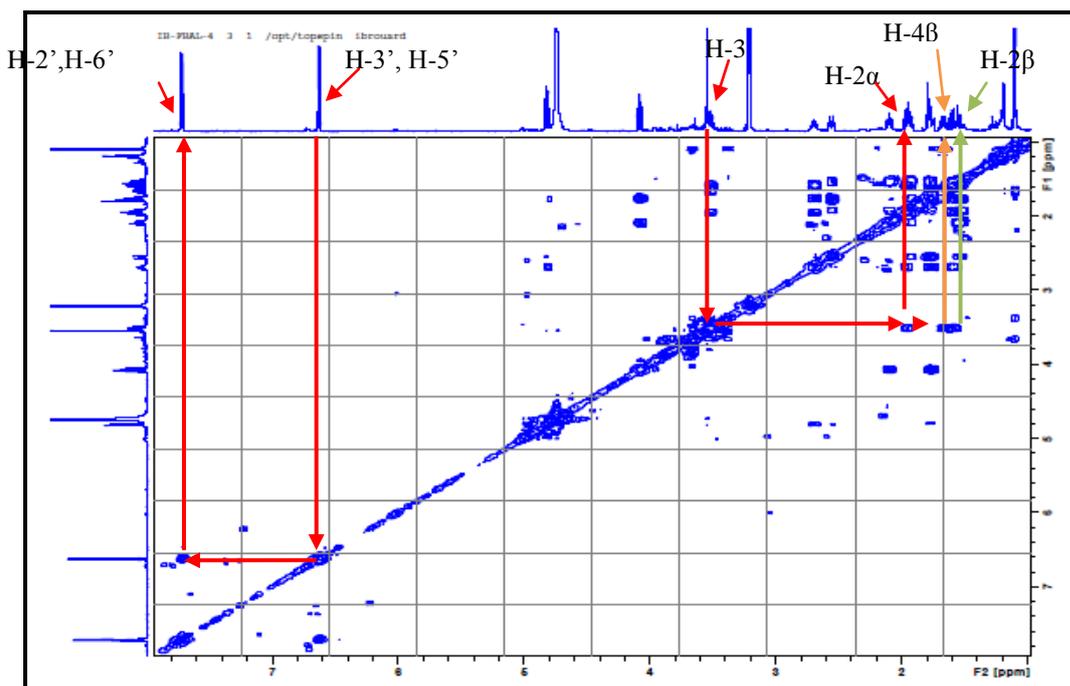
✓ تعلق بين الكربون الرباعي السابق وبين الإشارة الثنائية الظاهرة عند 7,72 ppm .

- هذه التعلقات تسمح لنا برفاق الكربونين إلى C-1' و C-4' و الإشارتين الثنائيتين إلى كل من (H-5', H-3') و (H-6', H-2') على الترتيب .

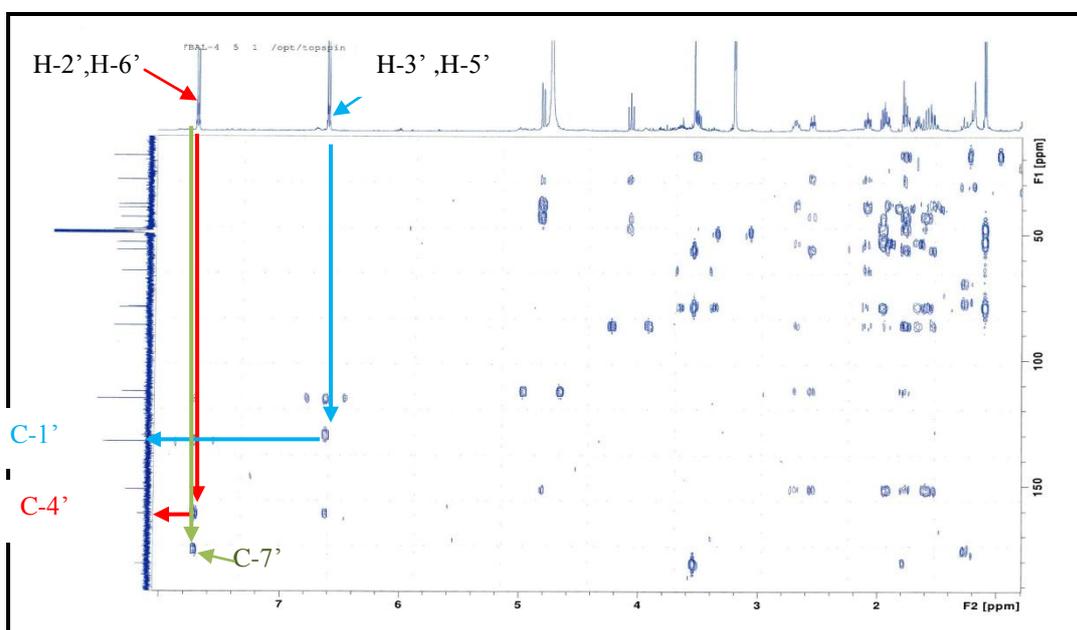
- الجمع بين معطيات طيف الكتلة (الصيغة الجزيئية للمركب) و أطيف RMN يبين وجود مجموعة بارا هيدروكسيل بنزويل في الجزيئة .

كما يمكن إستنتاج وجود إشارة خاصة بكربونيل وظيفة إسترية عند 171,54 ppm من خلال التعلق الملحوظ مع البروتونين H-2' و H-6' في طيف HMBC .

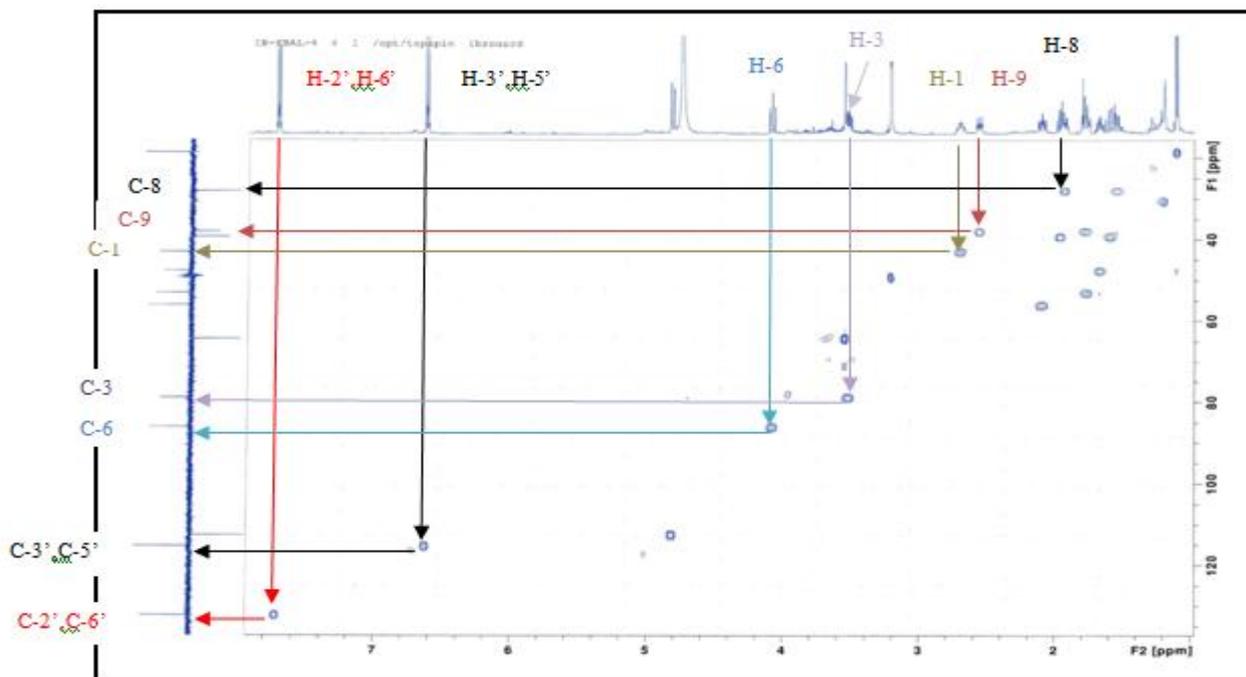
وعليه يمكن إقتراح الجزء المبين في الشكل (8-III) في المركب C2 :



الطيف (13-III) : طيف $\text{COSY}^1\text{H}-^1\text{H}$ للمركب C2 (CD₃OD, 500 MHz)



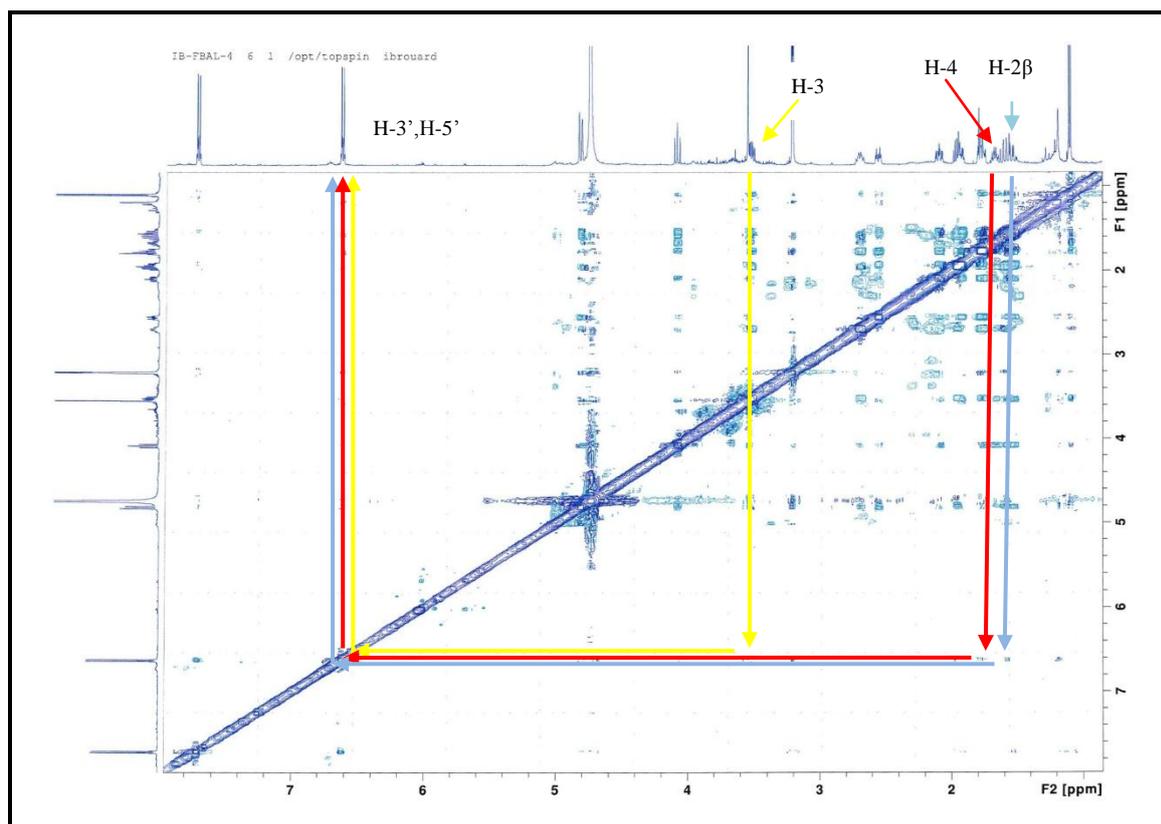
الطيف (14-III) : طيف HMBC للمركب C2 (CD₃OD, 500 MHz)



الطيف (15-III): طيف HSQC للمركب C2 (CD₃OD, 500 MHz)

- في المركب C2 لم يتبقى سوى ربط الهيكل الغوايانوليدي بمجموعة بارا هيدروكسيل بنزويل ، من أجل هذا لجأنا إلى تجربة NOESY (الطيف 16-III) التي بينت تعالقات واضحة بين H-3 مع H-3' و H-5' مع H-2 α ، تعالق H-2 α مع H-3' و H-5' ، كذلك تعالق H-14a ، H-14b مع H-5' ، H-2' ، H-3' ، H-5' . من هذه التعالقات نستنتج أن جزيئة بارا هيدروكسيل بنزويل مرتبطة في الهيكل الغوايانوليدي في الموقع C-3.

- وعليه بالنسبة للشكل السابق R1 = R2 = H و R3 = C₇H₅O₂ ، أما بالنسبة للكيمياء الفراغية للمركز C-3 أستنتجت من خلال التعالق NOE بين بروتونات الحلقة العطرية والبروتون H-4 ذي إتجاه β وعليه فمجموعة بارا هيدروكسيل بنزويل لها إتجاه β وطبعا H-3 ذو إتجاه α ، هذا الإتجاه ل H-3 مؤكد من طرف تعالقه مع H-1 الذي سبق تحديد إتجاهه α .

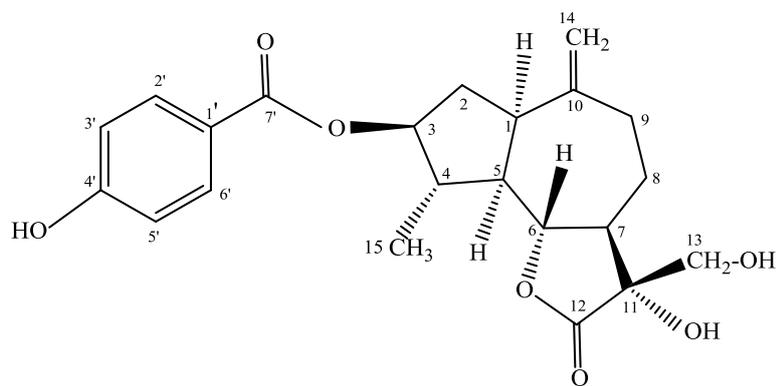


الطيف (16-III) : طيف NOESY للمركب C2 (CD₃OD, 500 MHz)

-تجميع هذه النتائج تقودنا إلى تحديد البنية النهائية للمركب C2 الذي هو عبارة عن مشتق جديد ل-cynaratriol يفصل لأول مرة في المملكة النباتية ، للعلم فإن cynaratriol هو عبارة عن سيسكويترين لاكتوني هيكل الغوايانوليد، سبق عزله من *Cynara cardunculus* L [7] و *Centaurea musimomum* . [8]

يمكن تسمية المركب C2 حسب أسماء المركبات المتشابهة له المنشورة في الببليوغرافيا 3-(4-hydroxybenzoyl)-cynaratriol . هذا النوع من الغوايانوليدات الحامل لمستبدل 4- هيدروكسيل بنزويل تم فصله من نبات *Acroptilon repens* [9] و *Centaurea glastifolia* [10] .

وعليه الصيغة الكيميائية المفصلة للمركب C2 موضحة في الشكل (10-III).



الشكل (10-III) : 3-(4-hydroxybenzoyl)-cynaratriol

كل المعلومات السابقة مدونة في الجداول (III-5) و (III-6)

الجدول (III-5) : قيم الإزاحة الكيميائية لنواة ذرة الكربون ^{13}C -RMN ونتائج الـ DEPT-135

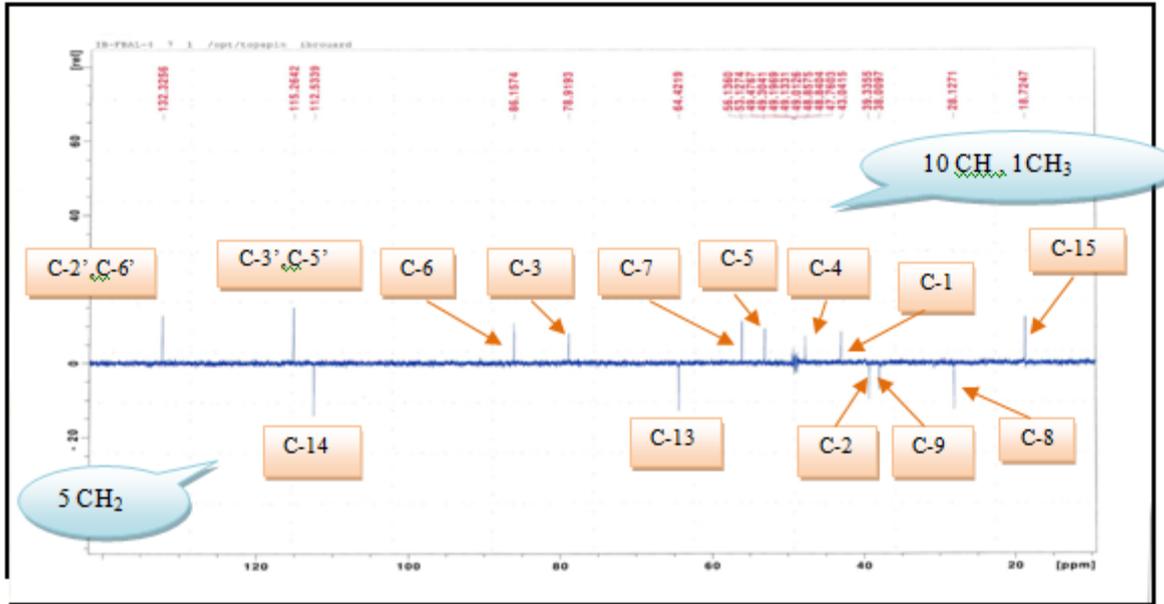
الخاصة بالمركب C2

^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135
1	43,04	CH
2	39,33	CH ₂
3	78,92	CH
4	47,76	CH
5	53,12	CH
6	86,15	CH
7	56,13	CH
8	28,13	CH ₂
9	38,01	CH ₂
10	151,37	Cq
11	78,64	Cq
12	180,93	Cq
13	64,43	CH ₂
14	112,53	CH ₂
15	18,72	CH ₃
2',6'	132,33	CH
3',5'	115,26	CH
1'	128,90	Cq
4'	160,91	Cq
7'	171,54	C=O

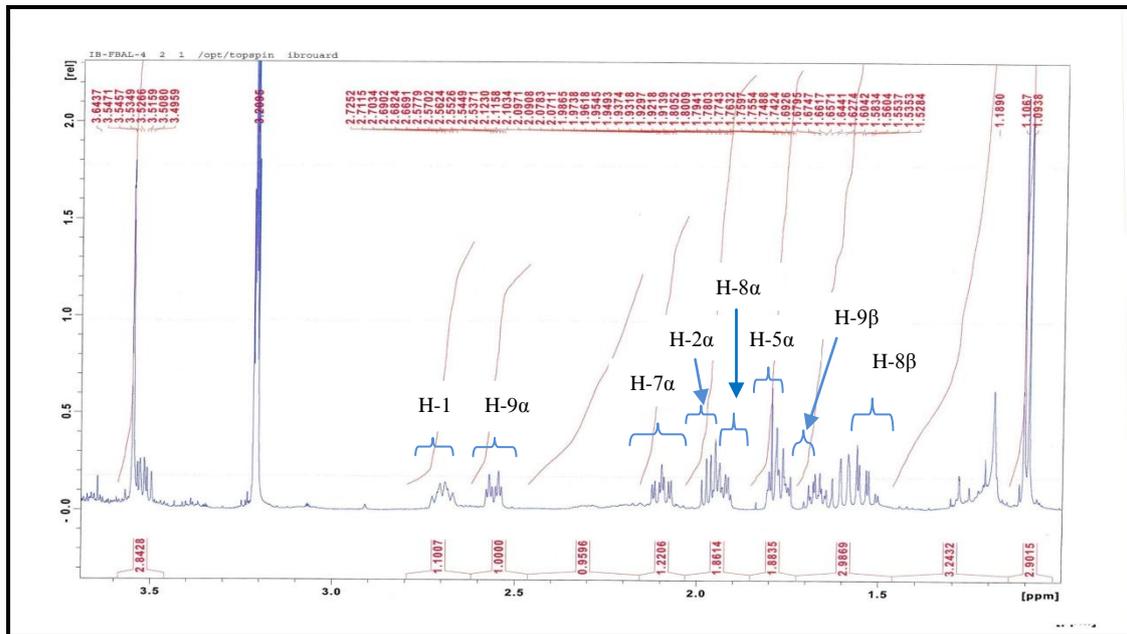
الجدول (III - 6) : قيم الإزاحات الكيميائية (δ) لطيف الرنين النووي المغناطيسي لنواة الهيدروجين

RMN-¹H للمركب C2

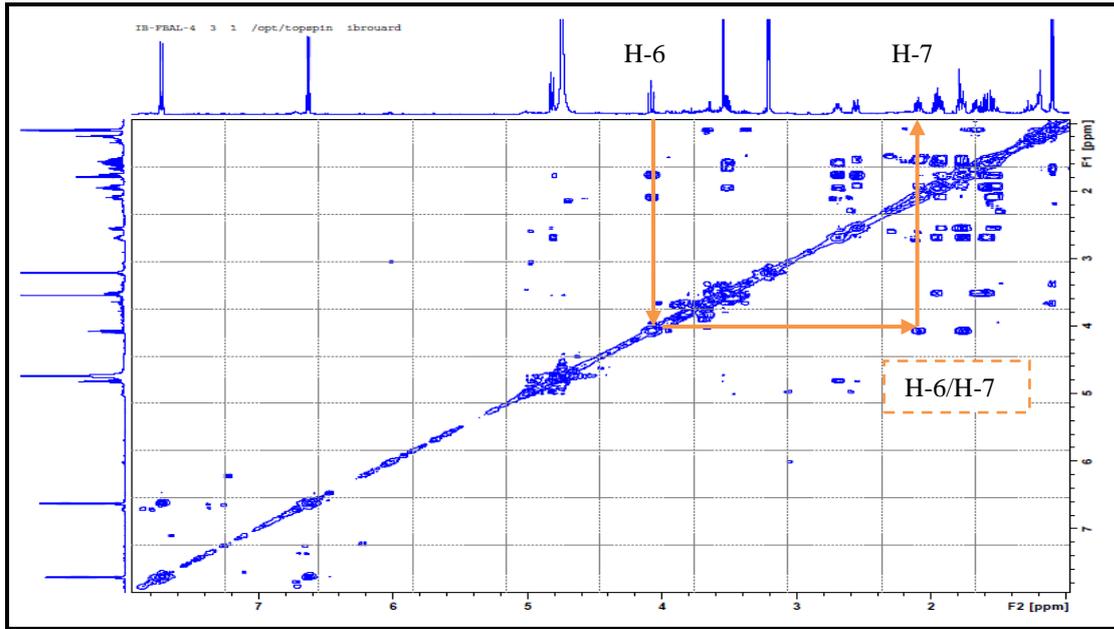
1H	δ (ppm)	التكامل	J(Hz) التعددية
1α	2,70	1H	m
2α	1,97	1H	m
2β	1,60	1H	m
3α	3,53	1H	m
4β	1,65	1H	m
5α	1,78	1H	m
6β	4,08	1H	t (J = 10, 2 Hz)
7α	2,10	1H	ddd (J = 12,5 ; 9,8 ; 3,6)
8α	1,94	1H	m
8β	1,57	1H	m
9α	1,75	1H	m
9β	2,55	1H	dt (J = 12,6 ; 3,9)
13	3,55	2H	brs
14a	4,83	1H	brs
14b	4,80	1H	brs
15	1,10	3H	d (J = 6,3Hz)
2', 6'	7,72	2H	dd (J = 8,7Hz)
3', 5'	6,63	2H	dd (J = 8,7Hz)



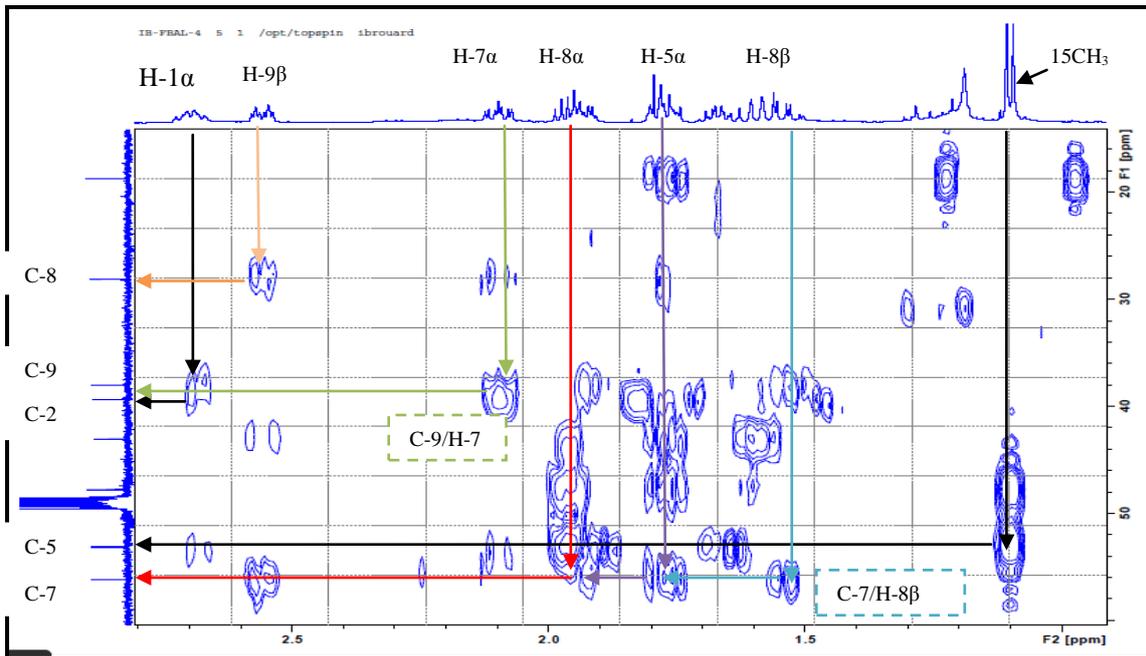
الطيف (10-III) : DEPT-135 للمركب C2 (CD₃OD, 125 MHz)



تكبير للطيف (12-III) في المجال [1,0-3,6 ppm]



الطيف (13-III) : طيف $\text{COSY}^1\text{H}-^1\text{H}$ للمركب C2 (CD_3OD , 500 MHz)



ت ك ب ير لل طيف (14-III) في المجال [1-2,7ppm]

III-3-3- التعيين البنوي للمركب C3

السلوك الكروماتوغرافي

اللون الإستشعاعي للمركب C3 تحت أشعة Wood: بنفسجي

المعطيات الطيفية

الجدول (7-III) : نتائج المجموعة الطيفية في المجال فوق البنفسجي للمركب C3 .

المفاعلات	الحزمة I ب (نم)	الحزمة II ب (نم)	الحزمة الجديدة ب (نم)
MeOH	350	266	
NaOH	401	275	324
NaOH+5min	401	275	324
NaOAc	374	273	306
NaOAc+H ₃ BO ₃	356	267	
AlCl ₃	352-398	272	305
AlCl ₃ +HCl	344-397	274	302

الجدول (8-III) : نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون.

الإزاحة δ (ppm)	التكامل	التعددية	ثابتة التزاوج J (Hz)	الهيدروجين الموافق
7,79	2H	d	7,9	H-2' H-6'
6,96	2H	d	7,9	H-5' H-3'
6,39	1H	d	2,0	H-8
6,22	1H	d	2,0	H-6
5,39	1H	d	1,5	H-1''
0,94	3H	d	5,5	CH ₃

نتائج الإماهة الحمضية :

نوع السكر : Rhamnose

نوع الأجليكون : kaempférol و هذا حسب المعطيات .

قراءة النتائج و تحديد البنية النهائية للمركب:

- اللون البنفسجي تحت أشعة Wood وقيمة λ_{max} للعصبة I المقدرة بـ 350 نم في الطيف UV-Vis المسجل في الميثانول دليل على أن هذا المركب C3 فلافونول مستبدل في الموقع 3 أو فلافون .

- إنزياح قيمة الحزمة I بقيمة 51 نم مع زيادة في الشدة الضوئية بعد إضافة NaOH دليل على وجود OH حر في الموضع '4.

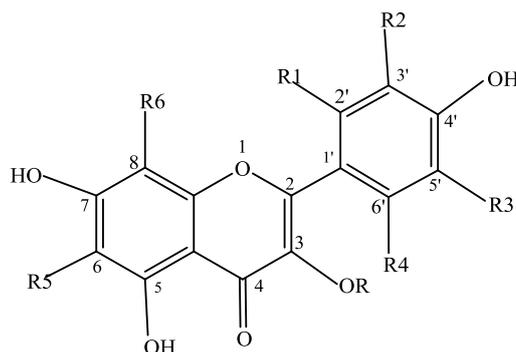
ظهور عصبة جديدة مع نفس المفاعل عند 324 نم تشير إلى وجود مجموعة هيدروكسيل حر في الموضع 7 (الطيف III-17) .

إستقرار الطيف بعد 5 دقائق من إضافة NaOH يدل على أن المركب لا يحتوي على هيدروكسيل حر في الموضع 3.

- الإزاحة الباتوكرومية للحزمة II بـ 7 نم عند مقارنة الطيف المسجل بعد إضافة NaOAc بالطيف المسجل في MeOH تؤكد وجود OH حر في الموقع 7.

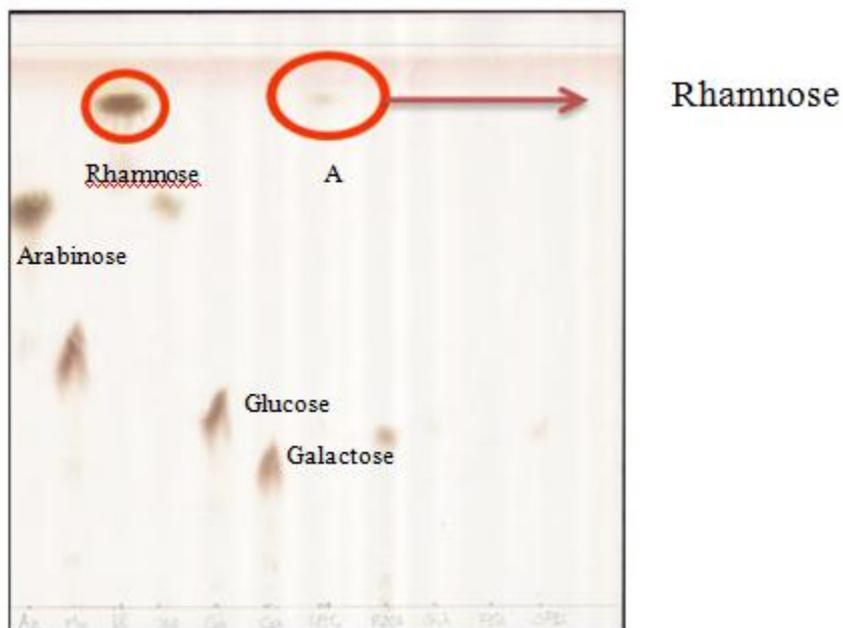
- عدم تغير الطيف المسجل في HCl بعد إضافة $AlCl_3$ تدل على عدم وجود أروثو ثنائي الهيدروكسيل على مستوى الحلقة B.

ونستدل على وجود OH حر في الموضع 5 من الإزاحة الباتوكرومية للعصبة I بـ 47 نم عند مقارنة الطيف المسجل في MeOH مع الطيف المسجل بعد إضافة $AlCl_3+HCl$ وعليه يمكن وضع الصيغة الأولية للمركب C3 المبينة في الشكل (III-11) .



الشكل (III-11) : الصيغة الإبتدائية للمركب C3

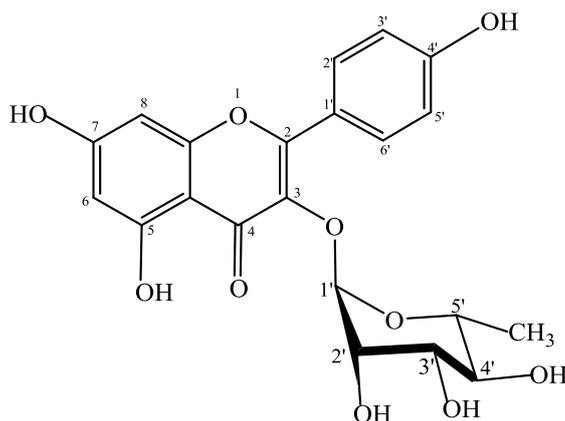
- طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H-NMR}$ (الطيف III-18) يبين مايلي:
- ✓ عدم ظهور أي إشارة أحادية في المجال الأروماتي دليل على أن المركب C3 فلافونول مستبدل في الموضع 3.
- ✓ ظهور إشارات الحلقة B على شكل إشارتين ثنائيتين بثابتة تزاوج $J = 7,9 \text{ Hz}$ ويتكامل 2H لكليهما موافقتين لـ ($\text{H-3}'$ ، $\text{H-5}'$) و ($\text{H-2}'$ ، $\text{H-6}'$) عند الإزاحتين 6,96 ppm و 7,79 ppm على الترتيب دليل على أن الحلقة B ثنائية الإستبدال في الموضعين بارا .
- ✓ ظهور إشارتي الحلقة A على شكل إشارتين ثنائيتين بثابت تزاوج $J = 2,0 \text{ Hz}$ لكل منهما عند 6,22 ppm و 6,39 ppm موافقتين لـ H-6 و H-8 على التوالي. نستنتج من المعطيات السابقة أن هيكل الأجليكون من نوع kaempférol.
- كما بين الطيف وجود سكر من نوع رامنوز ويتجلى ذلك من خلال ظهور ميثيله عند 0,94 ppm على شكل ثنائي بثابت تزاوج $J = 5,5 \text{ Hz}$ وإشارة بروتونه الأنوميري الذي ظهر عند 5,39 ppm على شكل إشارة ثنائية بثابتة تزاوج $J = 1,5 \text{ Hz}$.
- أكدت الحلمة الحمضية طبيعة السكر حيث حررت سكر الرامنوز كما هو موضح في الشكل (III -



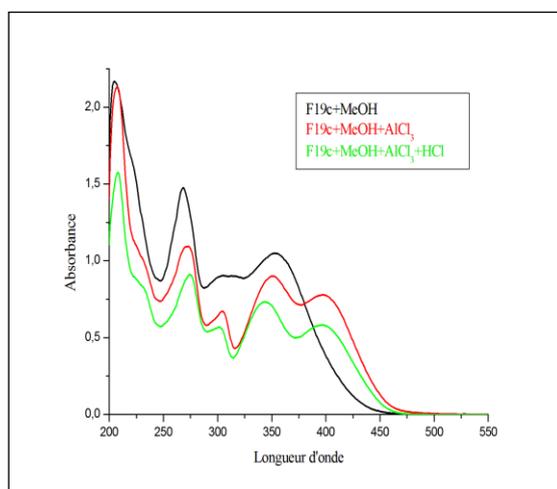
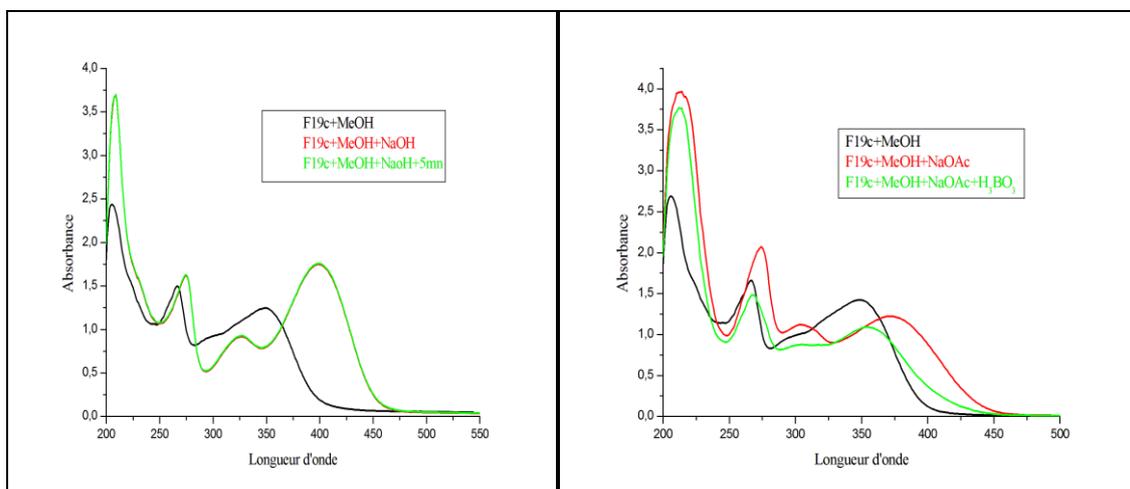
A : الطور المائي المركز بعد الحلمة الحمضية للمركب C3

الشكل (12-III): كروماتوغرام يبين السكر الناتج عن الإماهة الحمضية مع بعض الشواهد السكرية

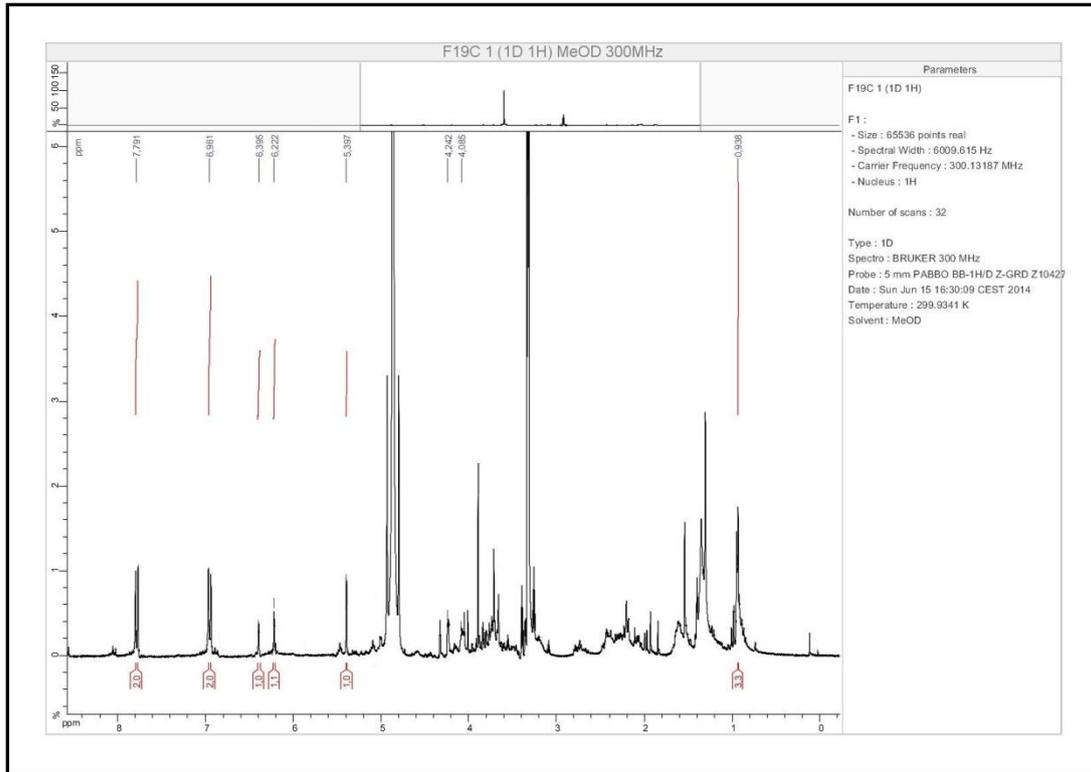
مجموع هذه المعطيات يؤدي إلى الصيغة المفصلة النهائية الموضحة في الشكل (13-III) [11] :



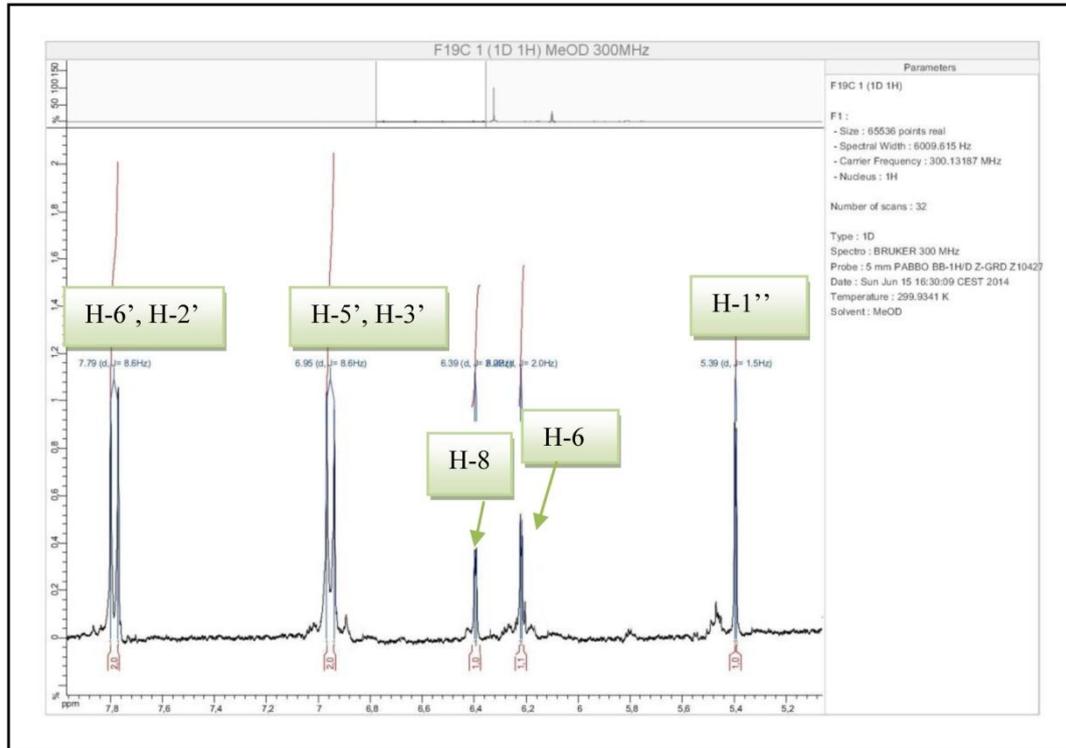
الشكل (13- III) : Kaempferol -3-O- α - rhamnoside



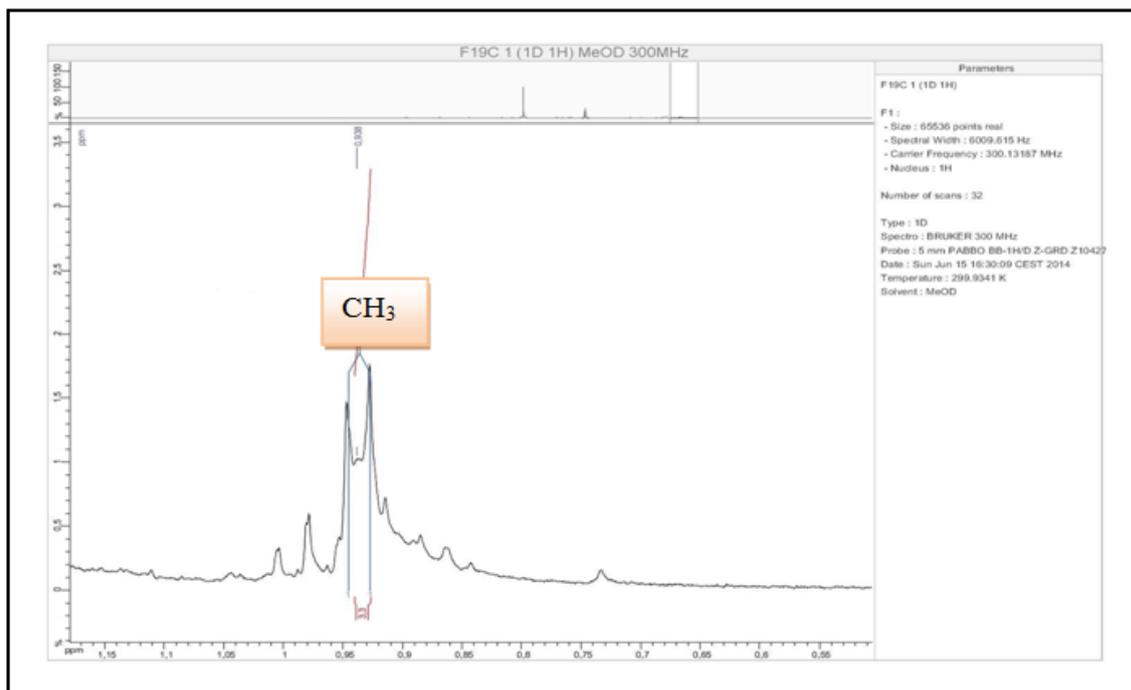
الطيف (17-III): سلاسل أطياف UV للمركب C3



الطيف (18-III): طيف ^1H -RMN للمركب C3 (CD_3OD , 300 MHz)



تكبير للطيف (18-III) في المجال [5,2-7,8 ppm]



تكبير للطيف (18-III) في المجال [0,56-1,15 ppm]

III-4-3- التعيين البنوي للمركب C4

السلوك الكروماتوغرافي

اللون الإستشعاعي للمركب C4 تحت أشعة Wood: بنفسجي.

المعطيات الطيفية

نتائج مطيافية إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Vis ومعطيات طيف البروتون مسجلة في الجداول التالية.

الجدول (9-III) : نتائج المجموعة الطيفية في المجال فوق البنفسجي للمركب C4

المفاعلات	الحزمة I ب (نم)	الحزمة II ب (نم)	الحزمة الجديدة ب (نم)
MeOH	350	270	
NaOH	395	275	325
NaOH+5min	395	275	325
NaOAc	350	280	
NaOAc+H ₃ BO ₃	350	270	
AlCl ₃	400	275	
AlCl ₃ +HCl	400	275	

الجدول (10-III) : معطيات الرنين النووي المغناطيسي للبروتون

الإزاحة δ (ppm)	التكامل	التعددية	ثابتة التزاوج J(Hz)	الهيدروجين الموافق
7,99	2H	d	8,6	H-2', H-6'
6,82	2H	d	8,6	H-3', H-5'
6,42	1H	s large	-	H-8
6,18	1H	s large	-	H-6
6,50	1H	s	-	H-3
5,13	1H	d	6,6	H-1''

قراءة النتائج وتحديد البنية النهائية للمركب:

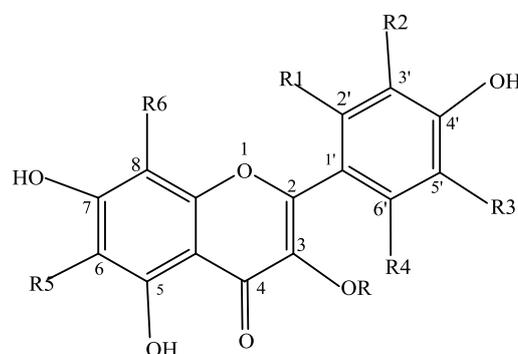
- اللون البنفسجي تحت أشعة Wood وقيمة λ_{max} للعصبة I المقدرة بـ 350 nm في الطيف UV-Vis المسجل في الميثانول دليل على أن المركب C4 فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3.

- عند إضافة NaOH نلاحظ إزاحة باتوكرومية للعصبة I قيمتها 45 nm مع زيادة في الشدة الضوئية مقارنة بالطيف المسجل في الميثانول دليل على وجود OH حر في الموضع 4' الطيف (III-19).
كما أن ظهور حزمة جديدة عند 325 nm مع نفس المفاعل يدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7.

إستقرار الطيف بعد 5 دقائق من إضافة NaOH يدل على أن المركب مستبدل في الموضع 3.
- إضافة خلات الصوديوم NaOAc يؤدي إلى تغيير الحزمة II مقارنة بطيف MeOH بحوالي 5 nm يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7.

- الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I بمقدار 50 nm بعد إضافة $AlCl_3+HCl$ مقارنة بالطيف المأخوذ في الميثانول دليل على وجود OH حرفي الموضع 5.

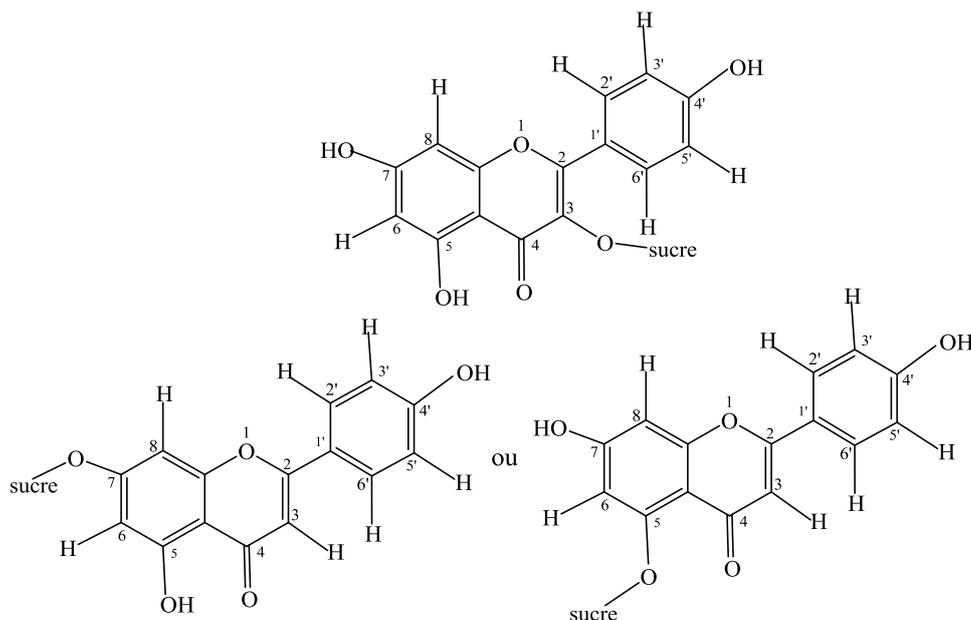
مجموع هذه المعطيات تؤدي إلى الصيغة في الشكل (III-14):



الشكل (III-14): الصيغة الإبتدائية للمركب C4

- طيف $RMN-^1H$ الطيف (III-20) يبين بروتونات الحلقة B على شكل إشارتين ثنائيتين بثابتة تزاوج تقدر بـ 8,6 هرتز لكليهما ويتكامل 2H لكل واحدة منهما، ترن الأولى عند 7,99 ppm والثانية عند 6,82 ppm موافقتين لـ (H-2' ، H-6') و (H-3' ، H-5') على الترتيب.

- كما ظهرت بروتونات الحلقة A على شكل إشارتين أحاديتين عريضتين عند 6,42 ppm و 6,18 ppm موافقتين للبروتونين H-6 و H-8 على الترتيب.
- كما أظهر الطيف إشارة أحادية أقل شدة مقارنة بتكامل إشارتي H-6 و H-8 عند 6,50 ppm تنسبت للبروتون H-3 مؤدية إذا إلى وجود فلافون مع الفلافونول 3-OR المنتظر، بما أن تكامل إشارات الحلقة ظهرت بنسبة موافقة لتكامل إشارات H-6 و H-8 ، نستنتج أننا أمام مزيج من الفلافونويدين، الأول من نوع 3-OR kaempférol والثاني من نوع apigénine.
- من جهة أخرى أعطى طيف $^1\text{H-NMR}$ إشارة ثنائية بثابتة تزواج $J = 6,6 \text{ Hz}$ عند 5,13 ppm نسبت للبروتون الأنوميري، من خلال قيمة الإزاحة الكيميائية لهذا البروتون نستنتج أن الشق الأجليكوني مرتبط بالجزء السكري برابطة من نوع O-glycoside.
- ثابت التزواج للبروتون الأنوميري هو $J = 6,6 \text{ Hz}$ مما يدل على أن الكربون الأنوميري للسكر ذو إتجاه β ، تكامل البروتون الأنوميري هو 1H كما هو الحال بالنسبة ل H-6 و H-8 ومنه نستنتج أن الجزء السكري يخص كلا من مشتق الـ apigénine و مشتق الـ kaempférol ، بينما ترن بقية بروتونات السكر في المجال 3-5,5 ppm ، من خلال كل المعطيات السابقة نستنتج أن المركبين عبارة عن إيثيروزيد أحادي السكر.
- بالنسبة لمشتق الـ kaempférol فإن موضع السكر هو C-3 وهذا كما سبق الذكر نتيجة للونه البنفسجي تحت الأشعة UV.
- أما بالنسبة لمشتق الـ apigénine فإن موضع السكر هو C-7 أو C-5 نتيجة لوجود إزاحة باتوكرومية للحزمة I مع زيادة معتبرة في الشدة الضوئية عند إضافة NaOH لأنه في حالة وجود 4'-OR في إحدى المركبين فإن هذه الشدة تكون أقل، ومنه الصيغ الأولية المقترحة للمركبين موضحة في الشكل (III-15) .

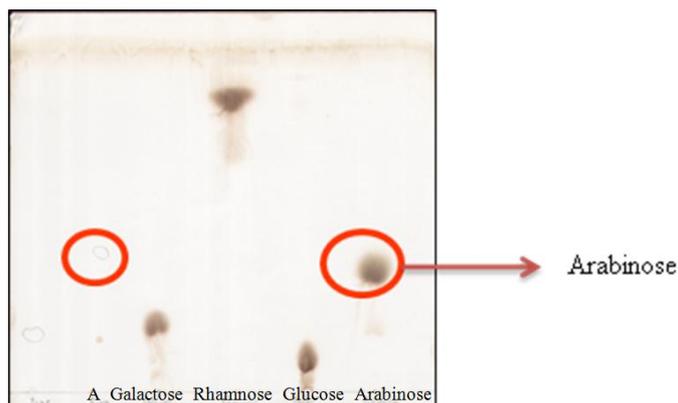


الشكل (III-15) : الصيغة الإبتدائية للمزيج

- فيما يخص نسبة كل مركب في المزيج قمنا بأخذ إشارة H-3 الخاص بمشتق الـ apigénine الذي تكامله 1,000 وحساب مجموع تكامل H-8 الخاص بالمركبين apigénine و kaempférol فوجدناه 1,4870.

وهذا معناه عند نزع تكامل 1,000 الخاص بـ H-3 للـ apigénine نجد تكامل H-8 الخاص بـ الـ kaempférol يساوي 0,4870 ومنه نستنتج أن نسبة apigénine- O-glycoside هي حوالي 67% ونسبة kaempférol- O-glycoside 33%.

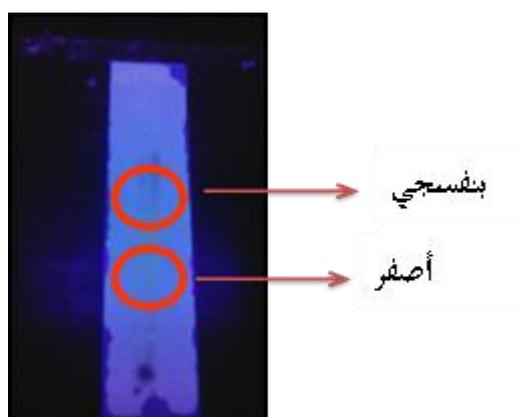
- لتحديد طبيعة السكر الموجود في المركبين لجأنا للإمهاة الحمضية الشكل (III-16) التي بينت أن السكر المحرر عبارة عن arabinose.



A : الطور المائي المركز بعد الحلمهة الحمضية للمركب C4

الشكل (16-III) : كروماتوغرام يبين السكر المحرر الناتج عن الإماهة الحمضية مع بعض الشواهد المعروفة

في الأخير قمنا بوضع نقطة من الشق الأجليكوني فوق طبقة رقيقة من متعدد الأميد وباستخدام المملص 3 : 3 : 4 Toluène /MeOH/méthyléthylcétone تحصلنا على الشكل (17-III) .

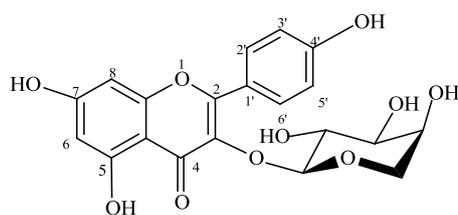


الشكل (17-III) : كروماتوغرام للمركب C4

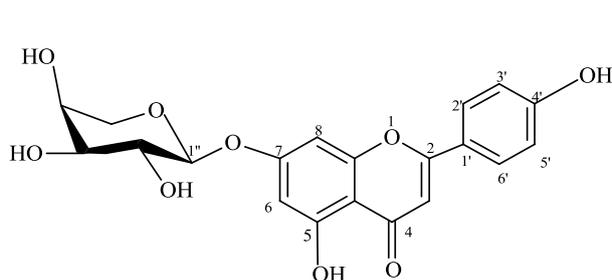
الذي يبين تحت الأشعة فوق البنفسجية وجود مركبين الأول لونه بنفسجي وهو apigénine

والثاني لونه أصفر مما يؤكد أن kaempférol فعلا مستبدل في الموضع 3 كما سبق الذكر، ومنه المركب C4 عبارة عن خليط متكون من مركبين الأول هو Kaempférol 3-O-β-arabinopyranoside والثاني هو إما Apigénine 7-O-β-arabinopyranoside أو Apigénine 5-O-β-arabinopyranoside

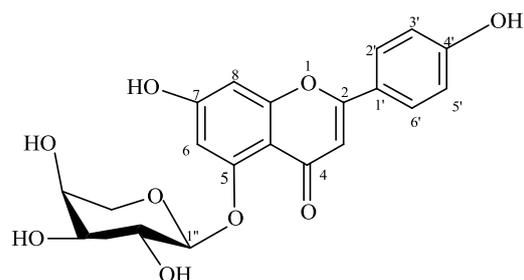
وعليه الصيغة النهائية للمركبين موضحة في الشكل (III-18) :



Kaempférol 3-O-β-arabinopyranoside

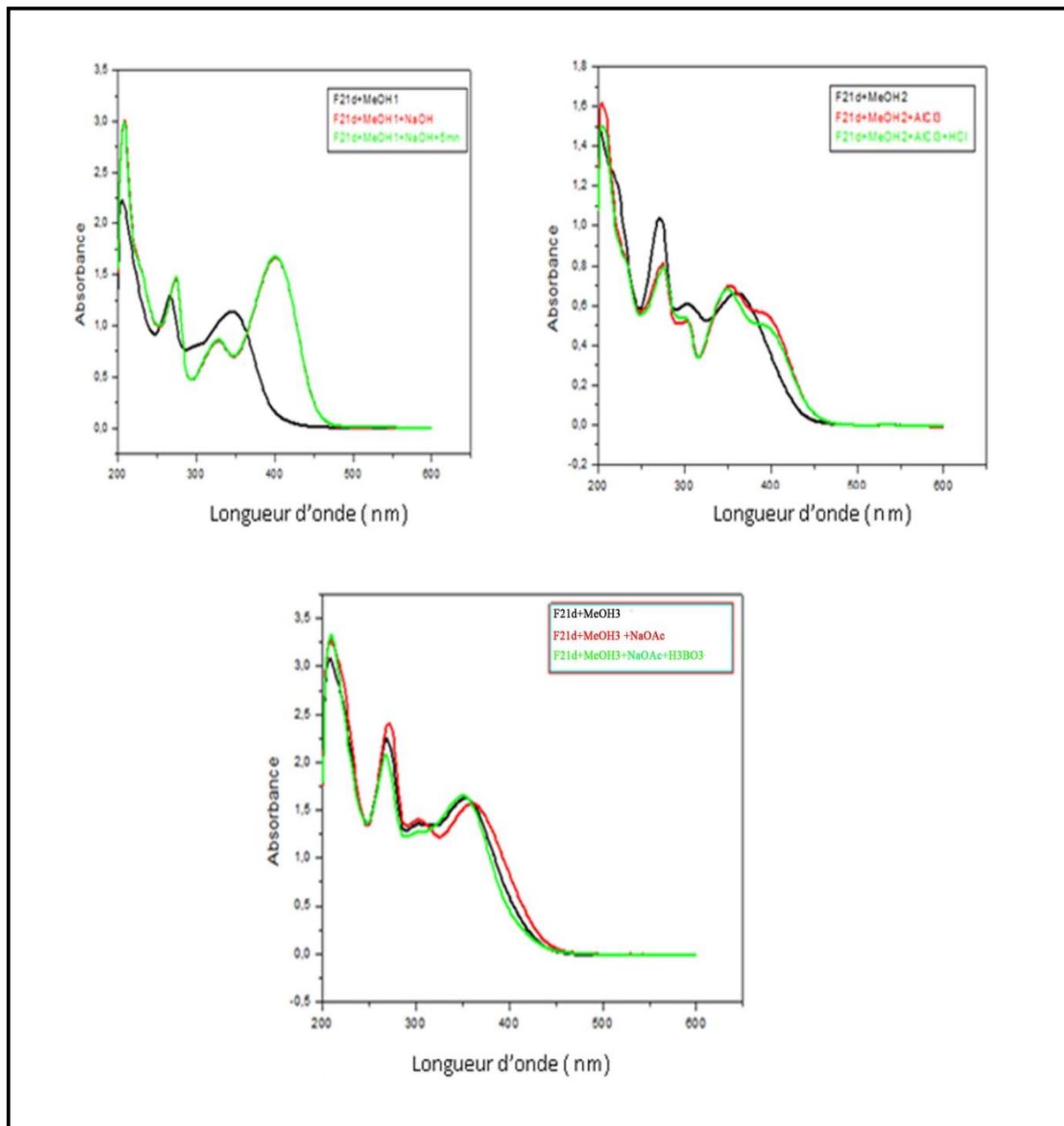


Apigénine 7-O-β-arabinopyranoside

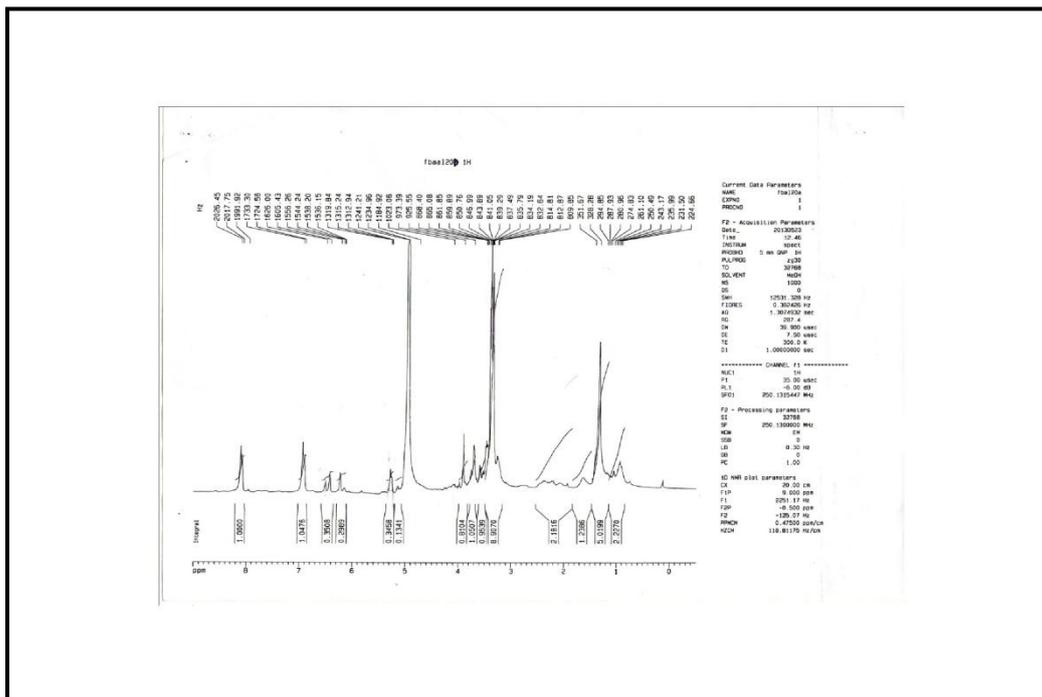


Apigénine 5-O-β-arabinopyranoside

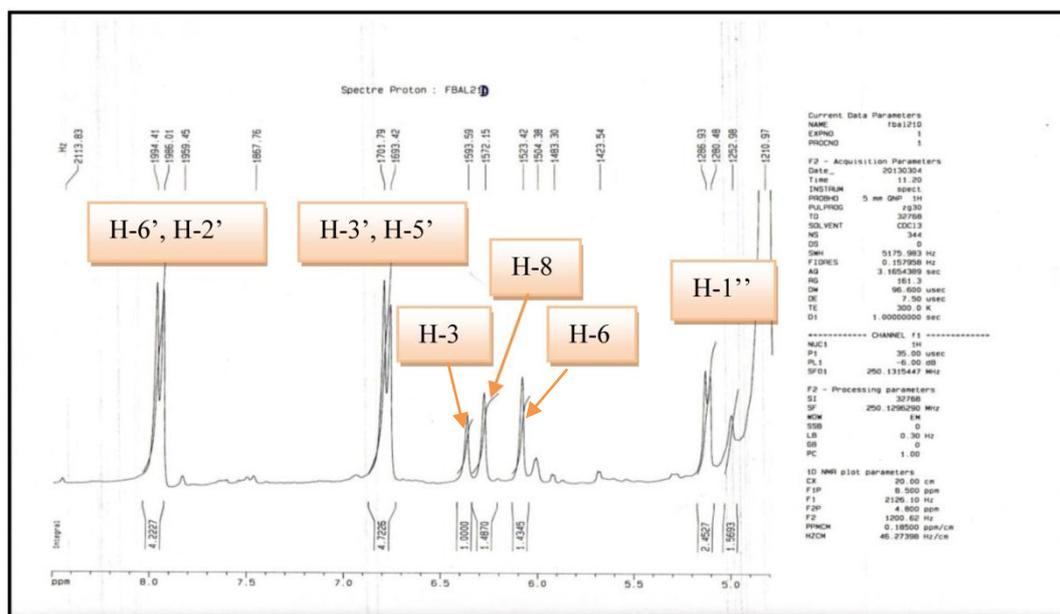
الشكل (III-18) : الصيغة النهائية للخليط



الطيف (19-III): سلاسل أطياف UV للمركب C4



الطيف (20-III): طيف ^1H RMN للمركب C4 (CD_3OD , 250 MHz)



تكبير للطيف (20-III) في المجال [5-8 ppm]

III-3-5- التعيين البنوي للمركب C5

السلوك الكروماتوغرافي:

اللون الإستشعاعي للمركب C5 تحت أشعة Wood: بنفسجي.

المعطيات الطيفية:

الجدول (III-11): نتائج المجموعة الطيفية في المجال فوق البنفسجي للمركب C5

المفاعلات	الحزمة I ب (نم)	الحزمة II ب (نم)	الحزمة الجديدة ب (نم)
MeOH	350	270	
NaOH	400	275	325
NaOH+5min	400	275	325
NaOAc	352	277	
NaOAc+H ₃ BO ₃	351	270	
AlCl ₃	400	273	
AlCl ₃ +HCl	400	273	

الجدول (III-12): معطيات مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون

الإزاحة (ppm) δ	التكامل	التعددية	ثابتة التزاوج J(Hz)	الهيدروجين الموافق
8,08	1H	d	2,7	H-2'
8,06	1H	dd	8,5 2,7	H-6'
6,92	1H	d	8,5	H-5'
6,32	1H	s	/	H-3
6,28	1H	d	2,1	H-8
6,12	1H	d	2,1	H-6
5,10	1H	d	*	H-1''

نتائج الإماهة الحمضية

نوع السكر : Glucose

نوع الأجليكون : kaempférol

قراءة النتائج وتحديد البنية النهائية للمركب:

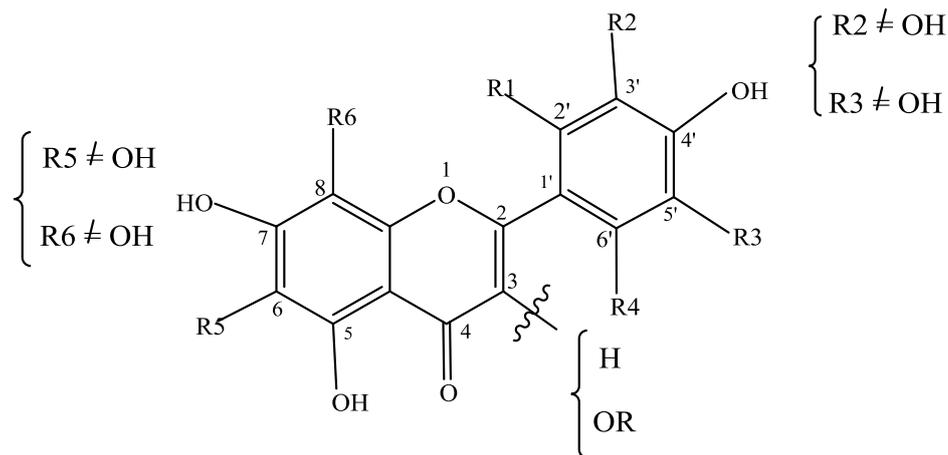
- اللون البنفسجي تحت أشعة Wood وقيمة λ_{max} للعصابة I المقدره بـ 350 نم في الطيف UV-Vis المسجل في الميثانول تدل على أن المركب C5 فلافون أو فلافونول مستبدل في الموضع 3.
- عند إضافة NaOH للمحلول السابق نلاحظ إزاحة باتوكرومية للحزمة I تقدر بـ 50 نم مع زيادة في الشدة الضوئية مقارنة بالطيف المسجل في الميثانول دليل على وجود OH حر في الموضع 4' الطيف (21-III) .

كما أن ظهور حزمة جديدة عند 325 نم مع نفس المفاعل دليل على وجود مجموعة هيدروكسيل حر في الموضع 7.

- إضافة خلات الصوديوم NaOAc للمحلول الميثانولي يؤدي إلى إزاحة باتوكرومية مقدره بـ 7 نم على مستوى الحزمة II مقارنة بطيف الميثانول يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7.
- الإزاحة الباتوكرومية للحزمة I بمقدار 50 نم بعد إضافة $AlCl_3+HCl$ مقارنة بالطيف المأخوذ في الميثانول دليل على وجود OH حر في الموضع 5.

غياب إزاحة باتوكرومية للحزمة I في طيف $NaOAc+H_3BO_3$ يدل على غياب أورثو ثنائي الهيدروكسيل (di-OH) على مستوى الحلقتين A و B.

- إستقرار الطيف $AlCl_3$ بعد إضافة HCl يؤكد غياب أورثو ثنائي الهيدروكسيل في هذا المركب .
مجموع هذه المعطيات يؤدي إلى الصيغة الموضحة في الشكل (19-III) :



الشكل (19-III) : الصيغة الابتدائية للمركب C5

- بالرجوع إلى طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H-RMN}$ (الطيف 22-III) نسجل:

✓ إشارة ثنائية-ثنائية تخص 2H الأول نسب للبروتون $\text{H-2}'$ ويظهر على شكل ثنائي ($J = 2,7 \text{ Hz}$) عند 8,08 ppm ، و أما إشارة البروتون الثاني فتظهر على شكل ثنائي-ثنائي ($J = 8,5 ; 2,7 \text{ Hz}$) عند 8,06 ppm حيث الجزء الأول متطابق مع إشارة $\text{H-2}'$ ، تتسب هذه الإشارة إلى $\text{H-6}'$.

✓ إشارة ثنائية ($J = 8,5 \text{ Hz}$) عند 6,92 ppm متراكمة جزئيا مع إشارة الكلوروفورم تتسب إلى $\text{H-5}'$.

✓ إشارة أحادية عند 6,32 ppm بتكامل 1H نسبت للبروتون H-3 .

✓ إشارتين ثنائيتين بثابت تزاوج 2,1 Hz و بتكامل 1H لكل واحدة منهما عند 6,28 ppm و 6,12 ppm نسبت إلى H-8 و H-6 على الترتيب .

كذلك أظهرت مطيافية الرنين المغناطيسي للبروتون إضافة لبروتونات الحلقة A ، B و C إشارات خاصة بمستبدل سكري في المجال [3-5,5 ppm]، وللتعرف على طبيعة هذا المستبدل السكري لجأنا للحمهة الحمضية (الشكل 20-III) التي حررت الجليكوز (glucose).



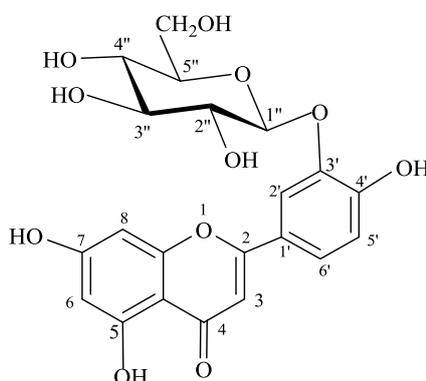
B : الطور المائي المركز بعد الحلمة الحمضية للمركب C5

الشكل (20-III): كروماتوغرام يبين السكر المحرر الناتج عن الإماهة الحمضية مع بعض الشواهد المعروفة

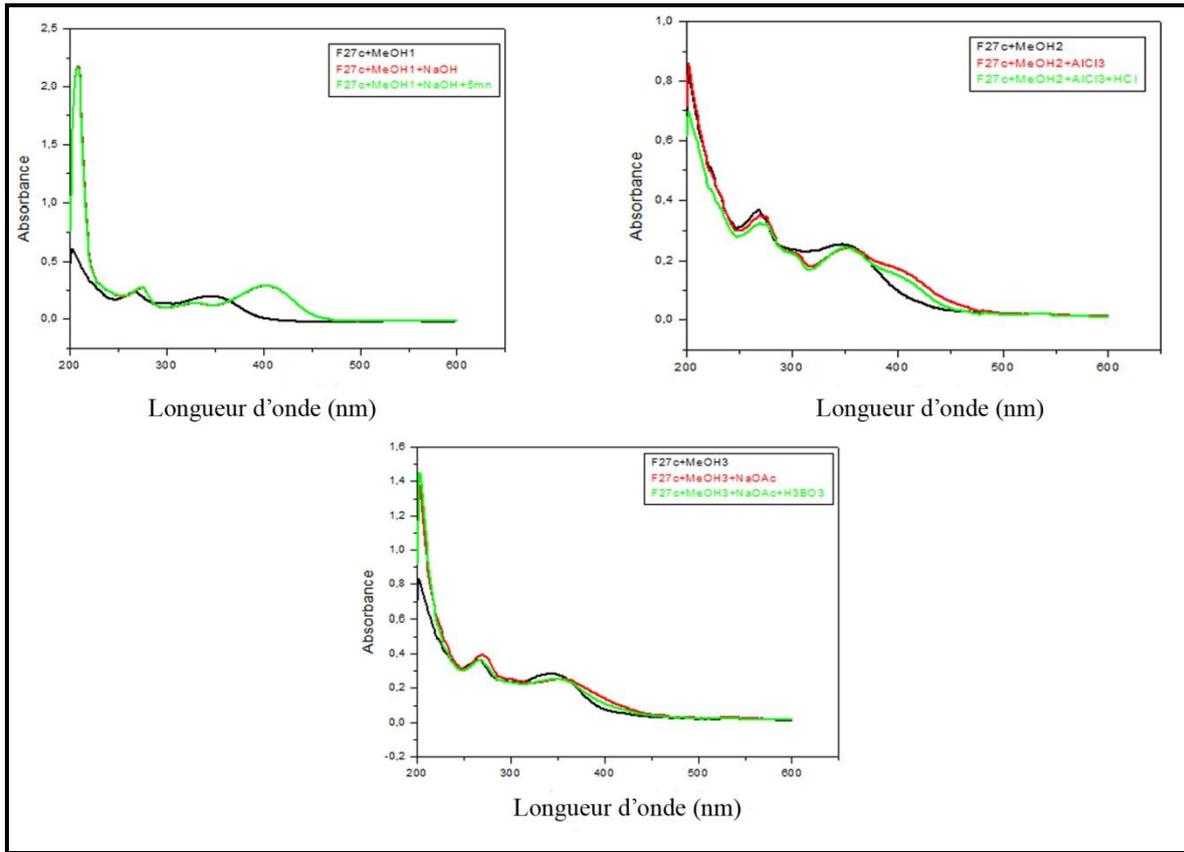
وعليه يتضح أن هذا المركب يحتوي على مستبدل واحد زيادة على المجموعات الهيدروكسيلية السابق ذكرها أي الموجودة في المواضع '4، 5، 7 .

بالرجوع إلى الصيغة المقترحة في الشكل السابق و معطيات مطيافية الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H-NMR}$ يتضح أن موضع السكر في المركب C5 لا يمكن أن يكون إلا '3-C.

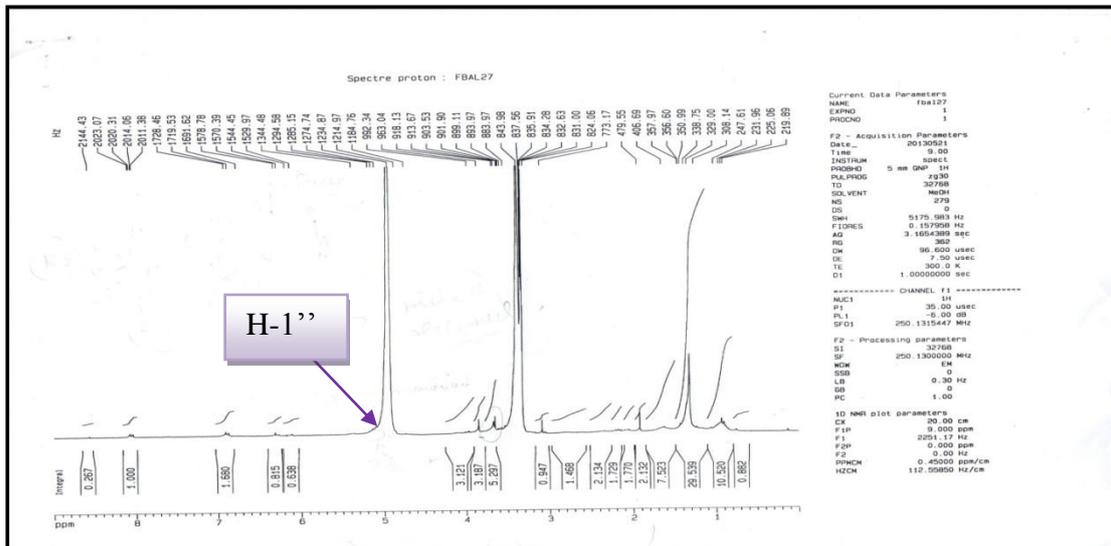
و منه الصيغة المفصلة النهائية لهذا المركب هي الموضحة في الشكل (21-III) [12] :



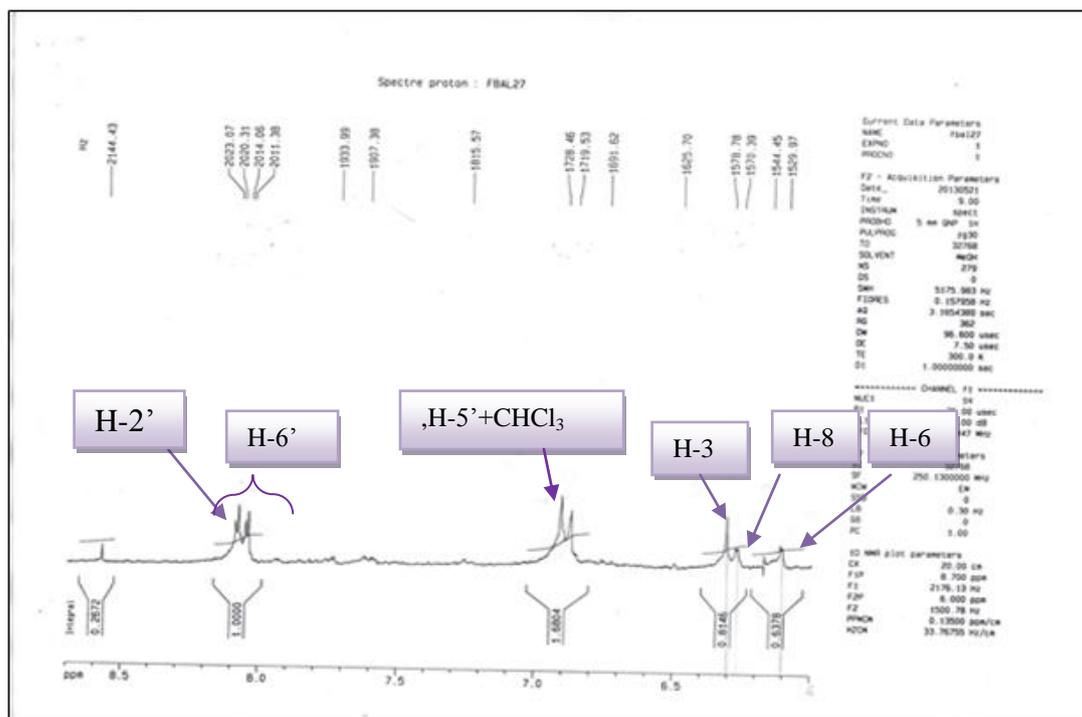
الشكل (21-III) : luteoline 3'-O-β-glucopyranoside



الطيف (21-III) : سلاسل أطياف UV للمركب C5



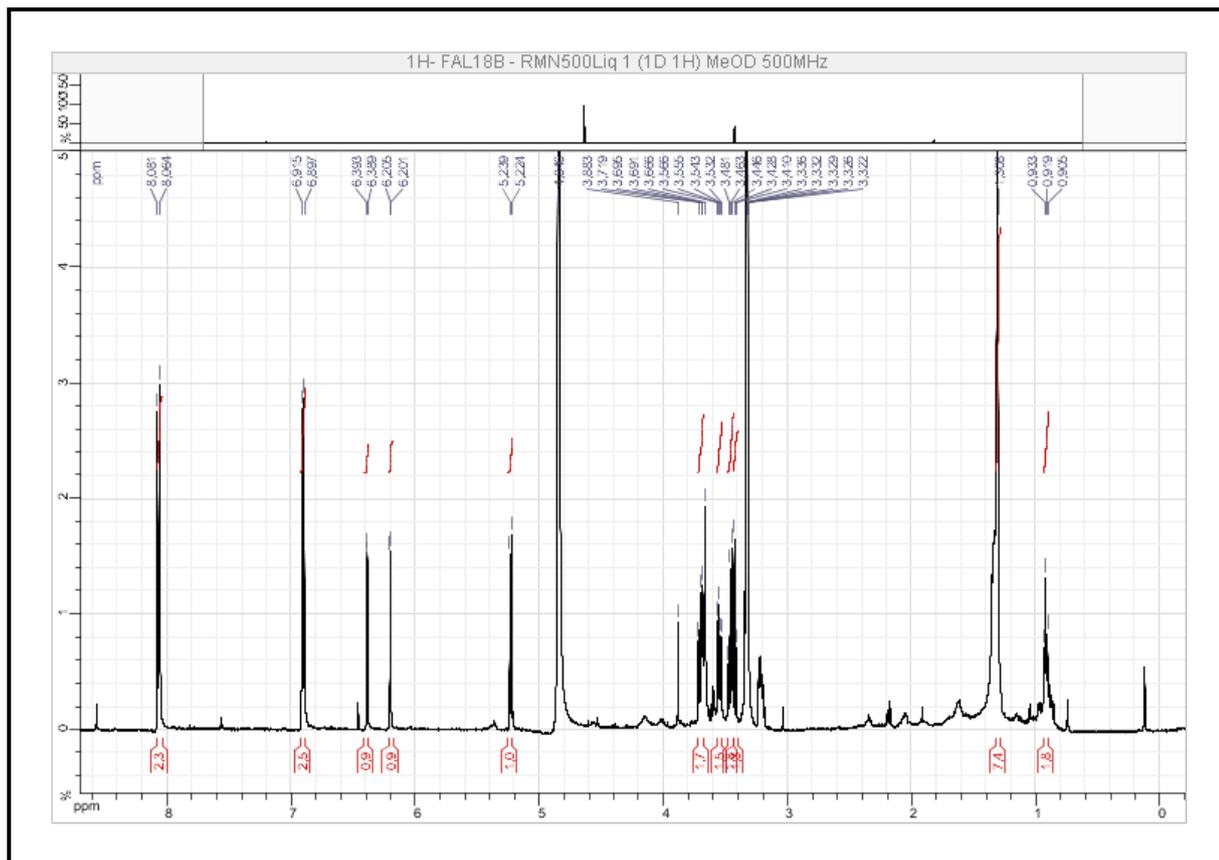
الطيف (22- III) : طيف ^1H -RMN للمركب C5 (CD_3OD , 250 MHz)



تكبير للطيف (III- 22) في المجال [6-8,5 ppm]

III-6-3-التعيين النيوي للمركب C6

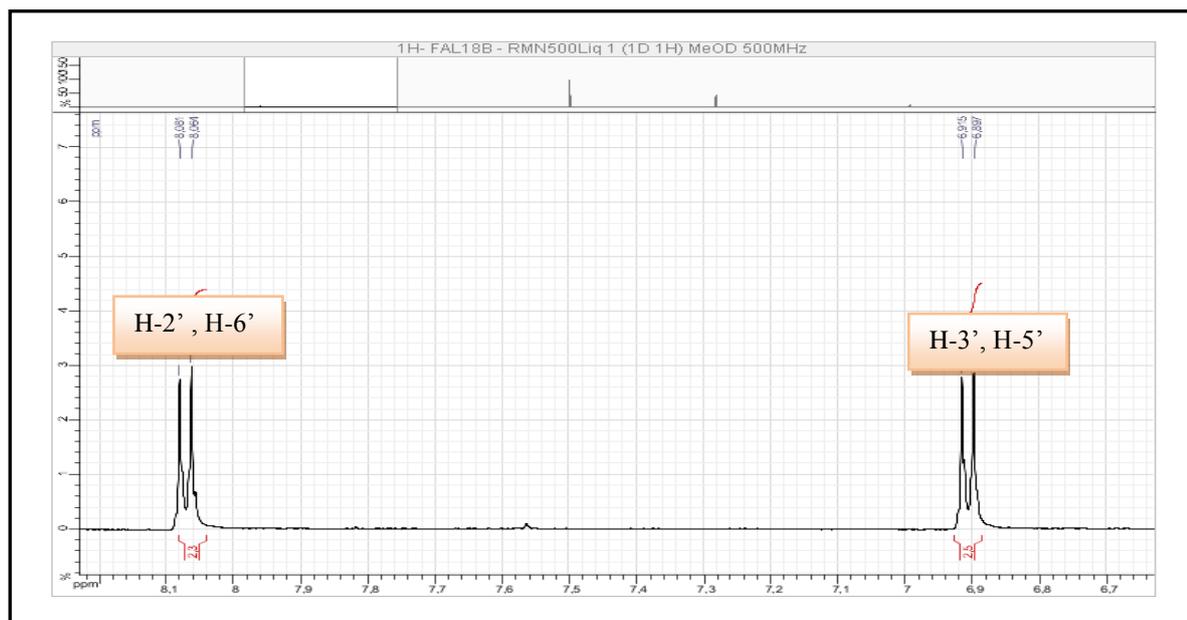
- اللون البنفسجي تحت أشعة Wood للمركب C6 دليل على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3 .



الطيف (III-23) : طيف $^1\text{H-NMR}$ للمركب C6 (CD_3OD , 500 MHz)

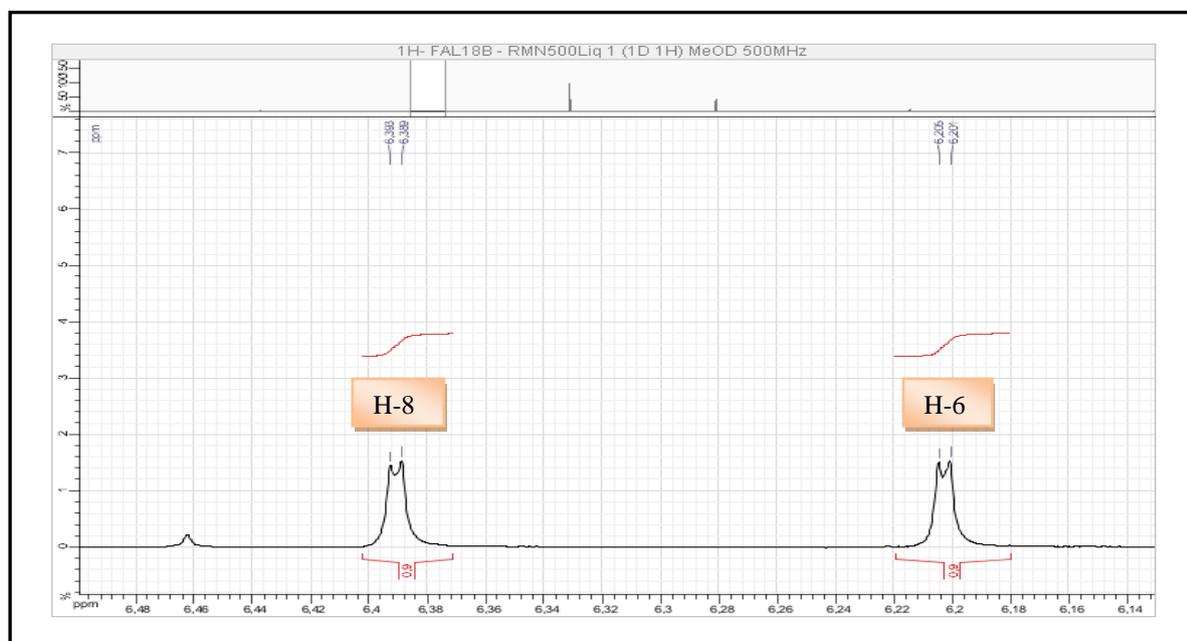
طيف $^1\text{H-NMR}$ الطيف (III-23) المدونة نتائجه في الجدول (III-13) أعطى النتائج التالية :

- بروتونات الحلقة B على شكل إشارتين ثنائيتين بثابتة تزاوج تقدر ب 8,8 هرتز ويتكامل 2H لكل واحدة منهما، ترن الأولى عند $\delta = 8,07$ ppm عند والثانية عند $\delta = 6,90$ ppm موافقتين ل ($\text{H}-2'$, $\text{H}-6'$) و ($\text{H}-3'$, $\text{H}-5'$) على الترتيب (تكبير الطيف III-23).



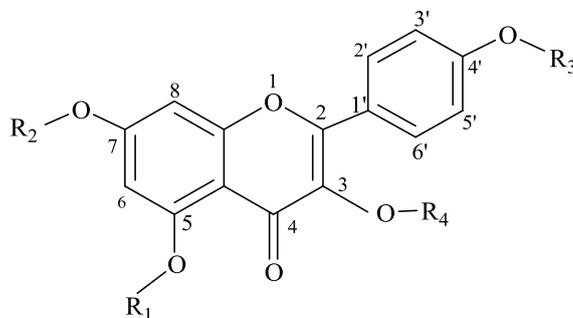
تكبير للطيف (23-III) في المجال [6,7-8,2 ppm]

- بروتونات الحلقة A جاءت على شكل إشارتين ثنائيتين بتكامل 1H موافقتين للبروتون H-8 الذي يرن عند $\delta = 6,37$ ppm و الأخرى للبروتون H-6 الذي يرن عند $\delta = 6,20$ ppm بثابتة تزاوج $J = 2,0$ Hz لكليهما.



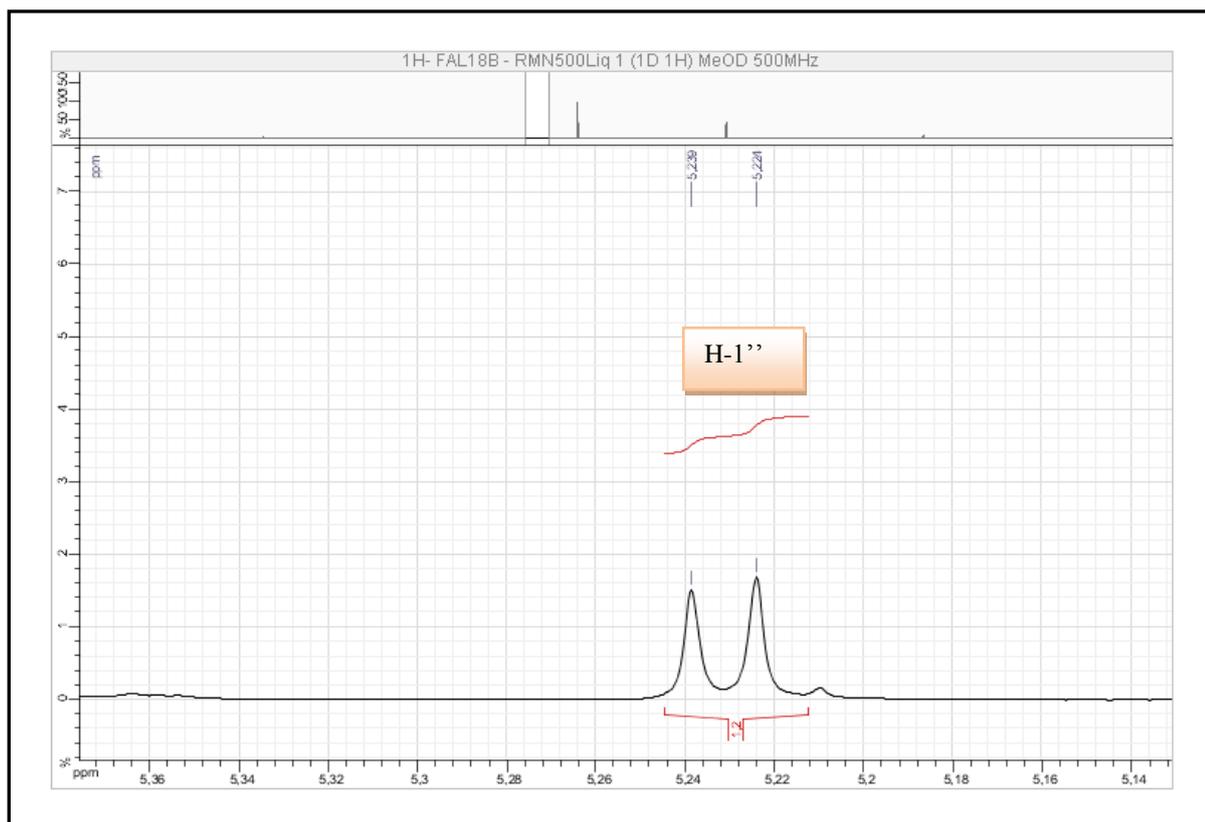
تكبير للطيف (23-III) في المجال [6,14-6,48 ppm]

هذه المعطيات تقودنا إلى هيكل kaempférol (الشكل-III-22) مع R_4 مختلف عن H نظرا للون البنفسجي للمركب C6 و غياب إشارة H-3 في طيف البروتون.



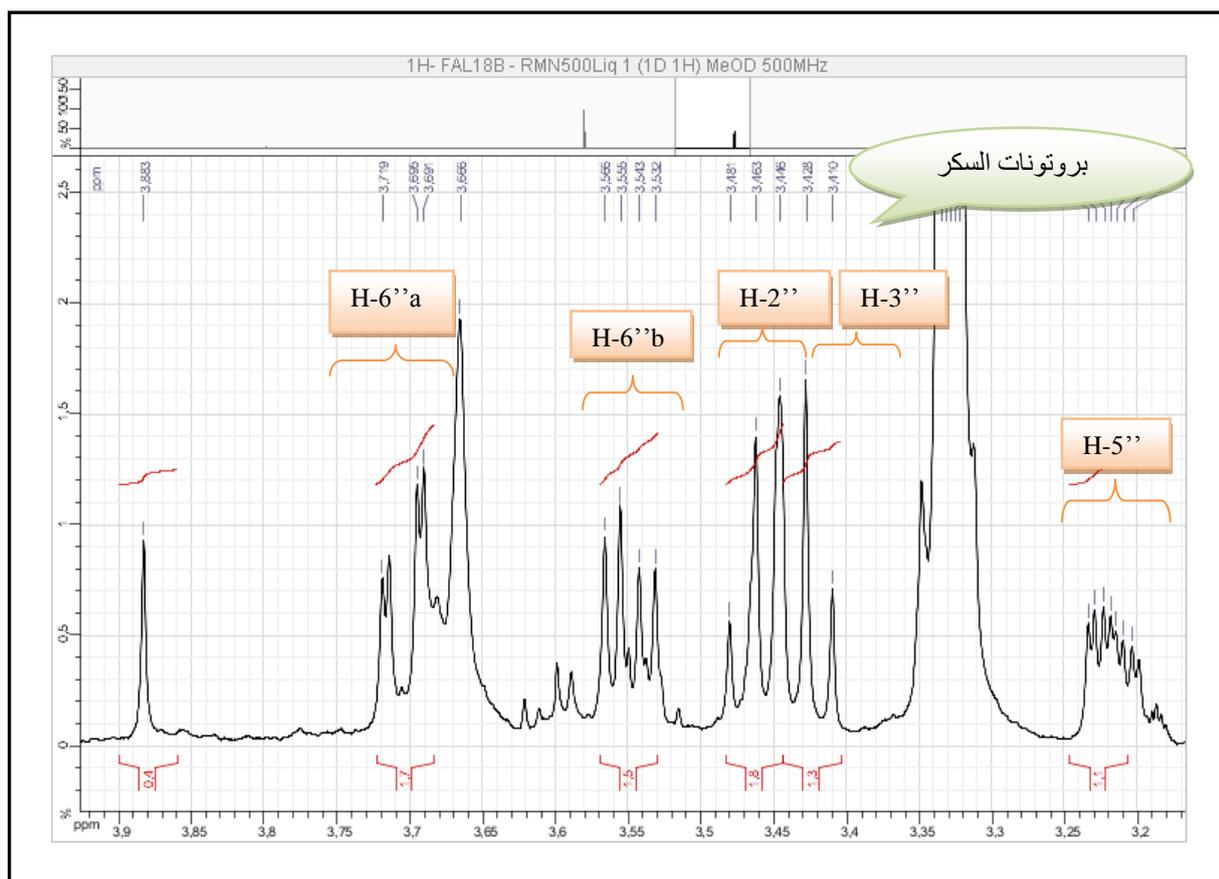
الشكل (22-III) : الصيغة الأولية للمركب C6

- كما أظهر طيف RMN-1H إشارة ثنائية عند $\delta = 5,23$ ppm بثابتة تزاوج 8,7 هرتز نسبت للبروتون الأنوميري ، من خلال إزاحة هذا الأخير نستنتج بأن السكر مرتبط بالشق الأجليكوني برابطة من نوع (O-sucre) ، أما من خلال قيمة ثابتة تزاوجه نستنتج وجود تأثير محوري- محوري بين البروتون الأنوميري و بروتون الكربون C-2 للسكر مما يسمح بتشكيلة β للكربون الأنوميري ، هذه النتائج تستبعد تماما أن يكون السكر mannose أو rhamnose.



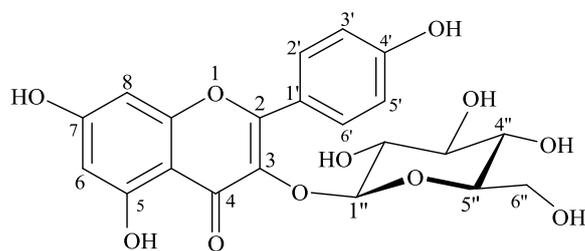
تكبير للطيف (23-III) في المجال [5,14-5,35 ppm]

- كما ظهرت أهم إشارات بروتونات السكر على الشكل التالي :
- إشارتان على شكل ثنائي-ثنائي ، الإشارة الأولى عند $\delta = 3,70$ ppm ($J = 12,0 ; 2,0$ Hz) والإشارة الثانية عند $\delta = 3,55$ ppm ($J = 12,0 ; 5,5$ Hz) نسبتا إلى H-6''a و H-6''b على الترتيب ، وبذلك تلغى إحصائية أن يكون السكر عبارة عن رامنوز أو أحد مشتقاته .
 - إشارتان ثلاثيتان بتكامل 1H وثابتة تزواج $J = 9,0$ Hz لكل إشارة يظهران عند $\delta = 3,43$ ppm و $\delta = 3,46$ ppm موافقتين للبروتونين H-3'' و H-2'' على الترتيب.
 - من خلال المعطيات السابقة ، إضافة إلى قيمة ثوابت التزواج المرتفعة لـ H-1'' ، H-2'' و H-3'' نستنتج أن السكر عبارة عن جليكوز.
 - إشارة البروتون H-4'' مغطاة بإشارة الميثانول وإشارة H-5'' تظهر بجواره عند $\delta = 3,22$ ppm.



تكبير للطيف (23-III) في المجال [3,2-3,9 ppm]

مجموع المعطيات السابقة تفودنا إلى البنية المفصلة الموضحة في الشكل (23 - III) [13]

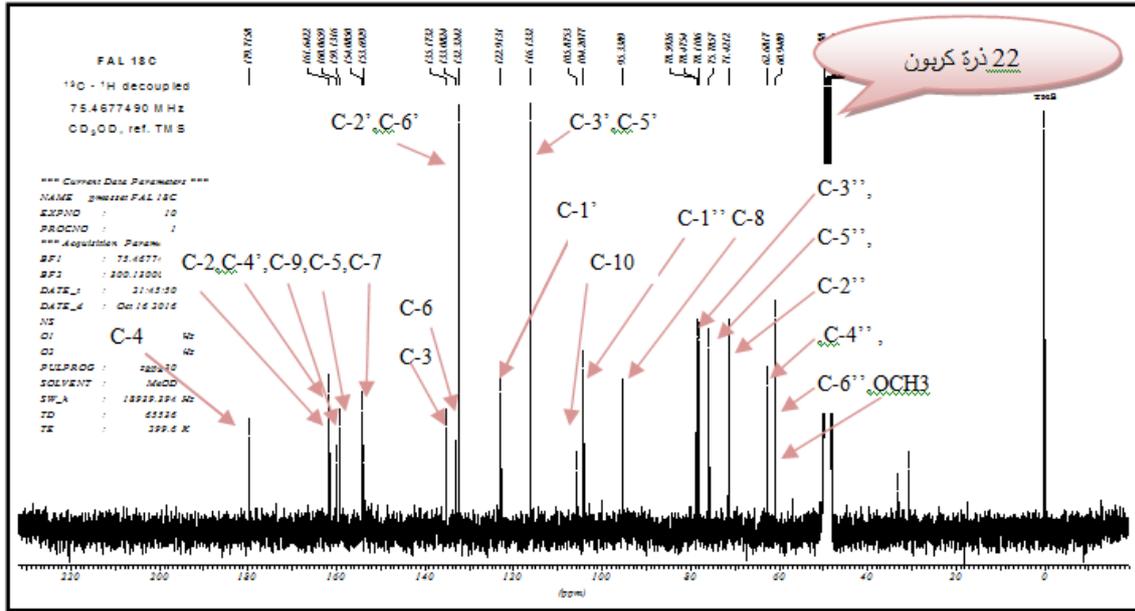


الشكل (23 - III) : Kaempferol-3-O-β-glucopyranoside (astragaline)

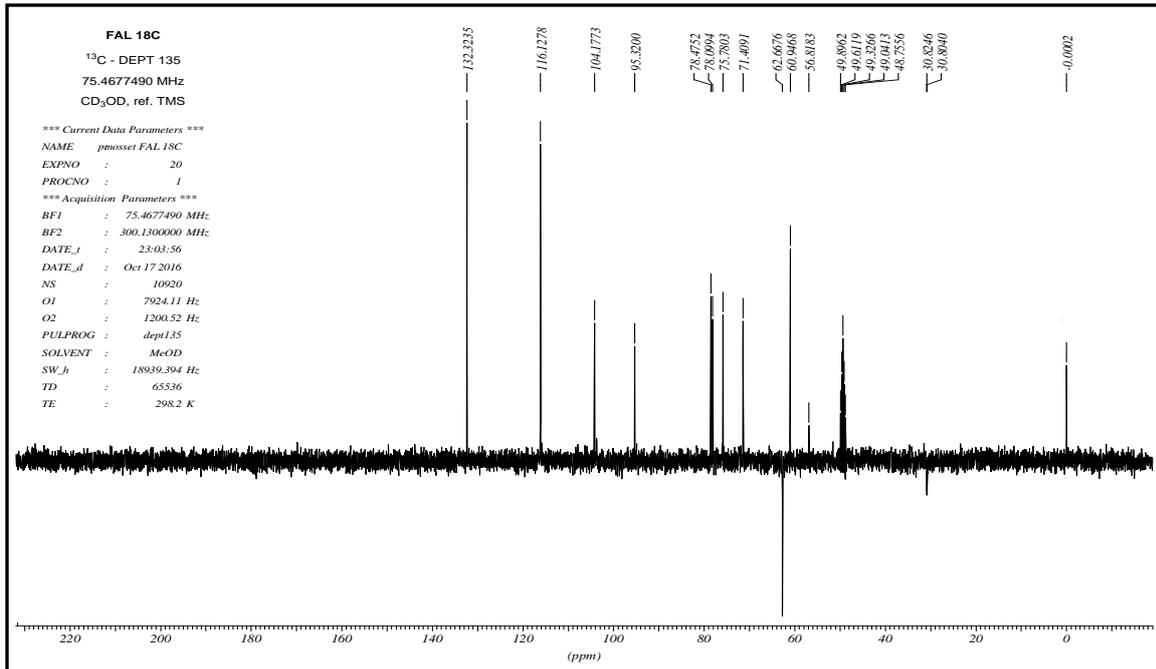
الجدول (13-III) : قيم الإزاحات الكيميائية (δ) لطيف الرنين النووي المغناطيسي لنواة الهيدروجين

RMN-¹H للمركب C6

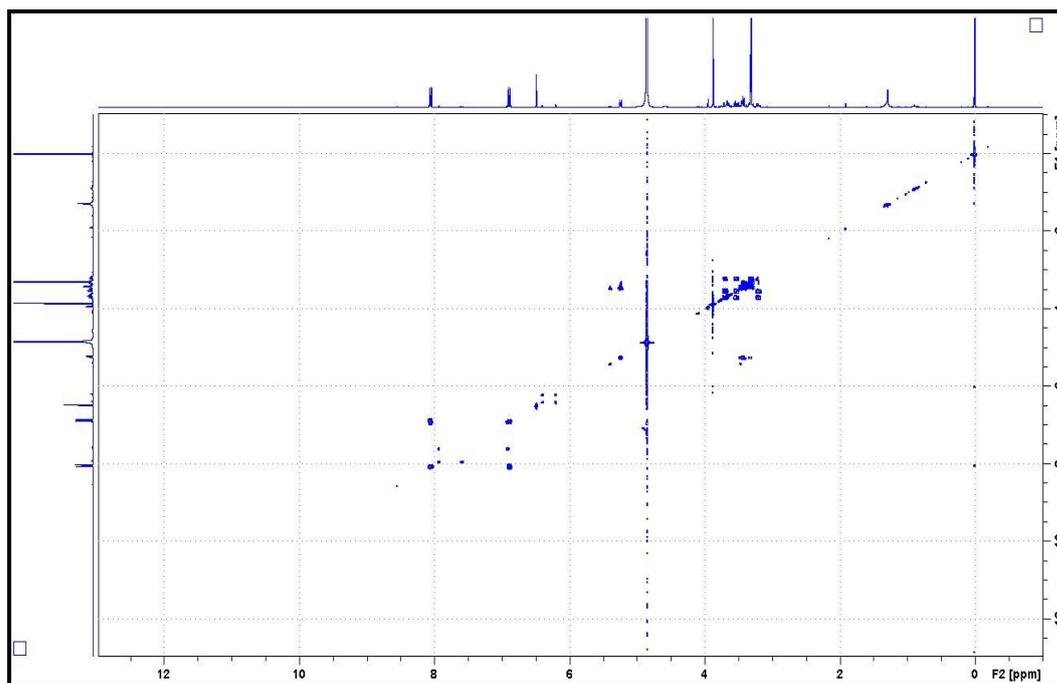
1H	δ (ppm)	التكامل	J(Hz) التعددية
H-2'H-6'	8,07	2H	d (J = 8,8 Hz)
H-3'H-5'	6,90	2H	d (J = 8,8 Hz)
H-8	6,37	1H	d (J = 2,0 Hz)
H-6	6,20	1H	d (J = 2,0 Hz)
H-1''	5,23	1H	d (J = 8,7 Hz)
H-2''	3,46	1H	t (J = 9,0 Hz)
H-3''	3,43	1H	t (J = 9,0 Hz)
H-4''	3,34*	*	/
H-5''	3,22	1H	m
H-6''a	3,70	1H	dd (J = 12,0 ; 2,0 Hz)
H-6'' b	3,55	1H	dd (J = 12,0 ; 5,5 Hz)



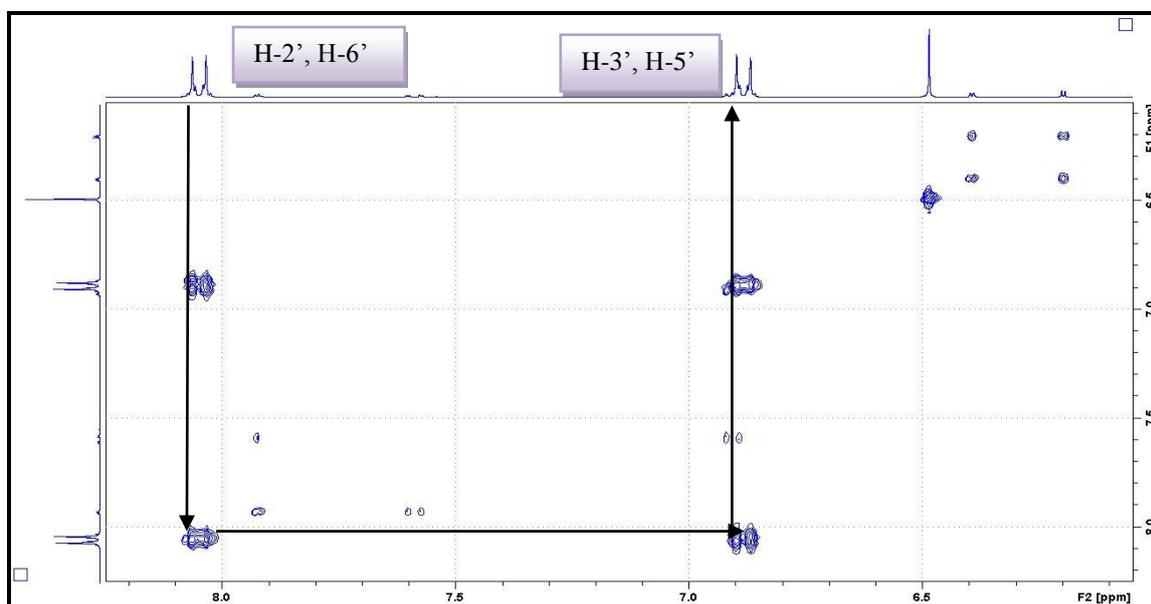
الطيف (25-III): طيف ¹³C للمركب C7 (CD₃OD, 100 MHz)



الطيف (26-III): طيف DEPT135 للمركب C7 (CD₃OD, 100 MHz)



الطيف (27-III): طيف COSY(H¹-H¹) للمركب C7 (CD₃OD, 400 MHz)



تكبير للطيف (27-III) في المجال [6-8,2 ppm]

- في طيف HMBC (الطيف 28-III) تبين H-3' و H-5' تعالق واضح مع الكربون الرباعي الذي يرن عند $\delta_c = 122,91$ ppm والذي ينسب إذن إلى C-1' ، أما H-2' و H-6' فتبين تعالق مع الكربون

الرباعي ذي الإشارة عند $\delta_c = 161,64$ ppm الذي ينسب إلى 'C-4، نظرا للإزاحة الكيميائية لهذا الكربون فمن البديهي أنه مؤكسج.

- كما يبين طيف البروتون إشارة أحادية عند $\delta = 6,48$ ppm يمكن إسنادها إلى H-6 ، H-8 أو H-3 ، بالرجوع إلى طيف HMQC (الطيف III-29) نجد أن هذا البروتون يبين تعالق مع الكربون ذي الإشارة عند $\delta_c = 95,53$ ppm ، قيمة الإزاحة الكيميائية لهذا الكربون تسمح بإسناده إلى C-8 لأن الإزاحة الكيميائية ل C-6 و C-3 عادة تفوق 100 ppm .

- نستنتج من هذه المعطيات أن هذا الفلافونويد مستبدل في الموضعين C-6 و C-3 و طبعا في C-7 و C-5 يمكن تحديد هذه الذرات الرباعية بدراسة معمقة لطيف HMBC.

كما سبق الذكر فتظهر 'C-1 و 'C-4 عند $\delta_c = 122,91$ ppm و $\delta_c = 161,64$ ppm على الترتيب.

- إنطلاقا من H-8 يمكن تحديد C-7 عند $\delta_c = 160,07$ ppm من خلال تعالقه مع هذا البروتون و هذا التوزيع مؤكد من طرف قيمة إزاحته الكيميائية المعتبرة ، كما يسمح H-8 بتحديد C-9 دائما من خلال تعالقه مع هذا البروتون عند $\delta_c = 153,69$ ppm ، كما يبين H-8 تعالق مع الكربون عند $\delta_c = 133,08$ ppm و الذي ينسب ل C-6 ، هذا الإسناد مؤكد من طرف قيمة الإزاحة الكيميائية التي تسمح بانتظار مجموعة أوكسجينية في هذا الموضع.

هذه الفرضية يمكن التأكد منها بالرجوع إلى طيف البروتون الذي يبين إشارة خاصة بمجموعة ميتوكسيلية عند $\delta = 3,87$ ppm.

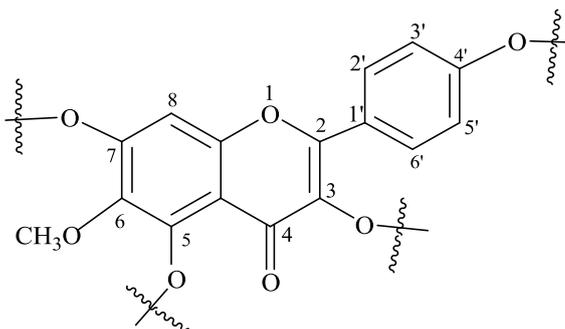
- في طيف HMBC بروتونات هذه المجموعة الميتوكسيلية تبين بوضوح تعالق مع الكربون الذي يرن عند $\delta_c = 133,08$ ppm أي الكربون الذي نسبناه إلى C-6. دائما في طيف HMBC و دائما من خلال H-8 يمكن إسناد الكربون الرباعي ذي الإشارة عند $\delta_c = 105,88$ ppm إلى C-10 وهذا الإسناد على توافق مع قيمة الإزاحة الكيميائية لهذا الكربون .

- كما يسمح طيف HMBC بتحديد C-2 عند $\delta_c = 159,13$ ppm من خلال التعالق الواضح لهذا الكربون مع 'H-2 و 'H-6 ، تمكنا من تفريق هذا الكربون (C-2) و الكربون 'C-4 من خلال تعالق هذا الأخير مع 'H-3 و 'H-5 . و بالرجوع إلى طيف الكربون لم يتبقى لنا إلا إرفاق C-3 ، C-5 و

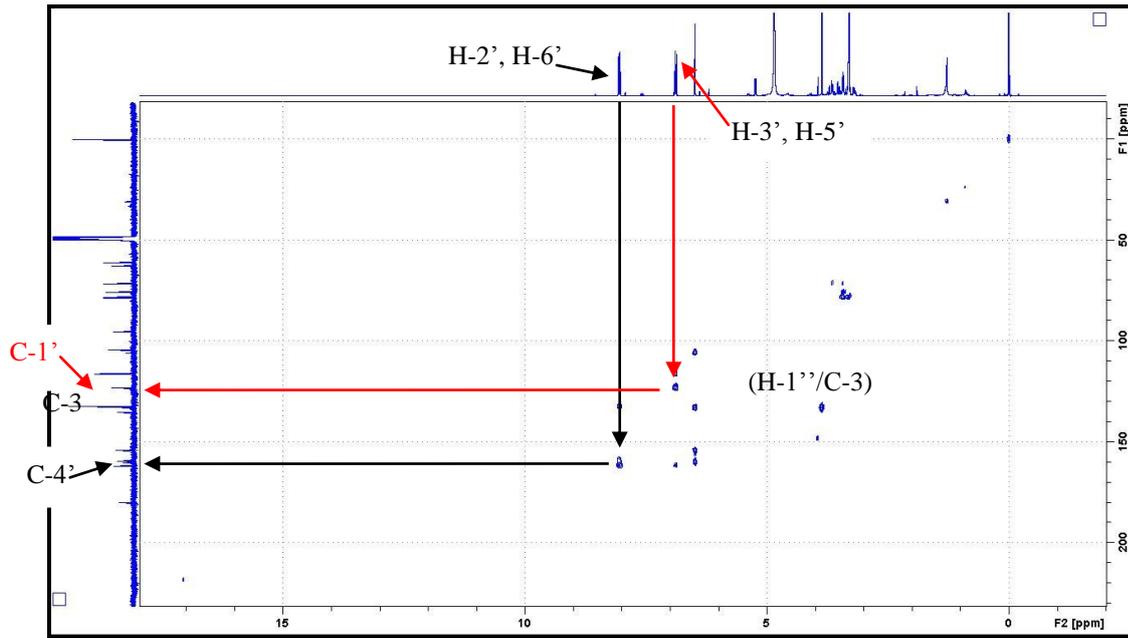
C-4 للإشارات عند $\delta_c = 135,17$ ppm $\delta_c = 154,09$ ppm $\delta_c = 179,72$ ppm، نظرا لقيمة

الإزاحات الكيميائية فمن البديهي أن ترفق هذه الإشارات ل C-3، C-5، و C-4 على الترتيب .

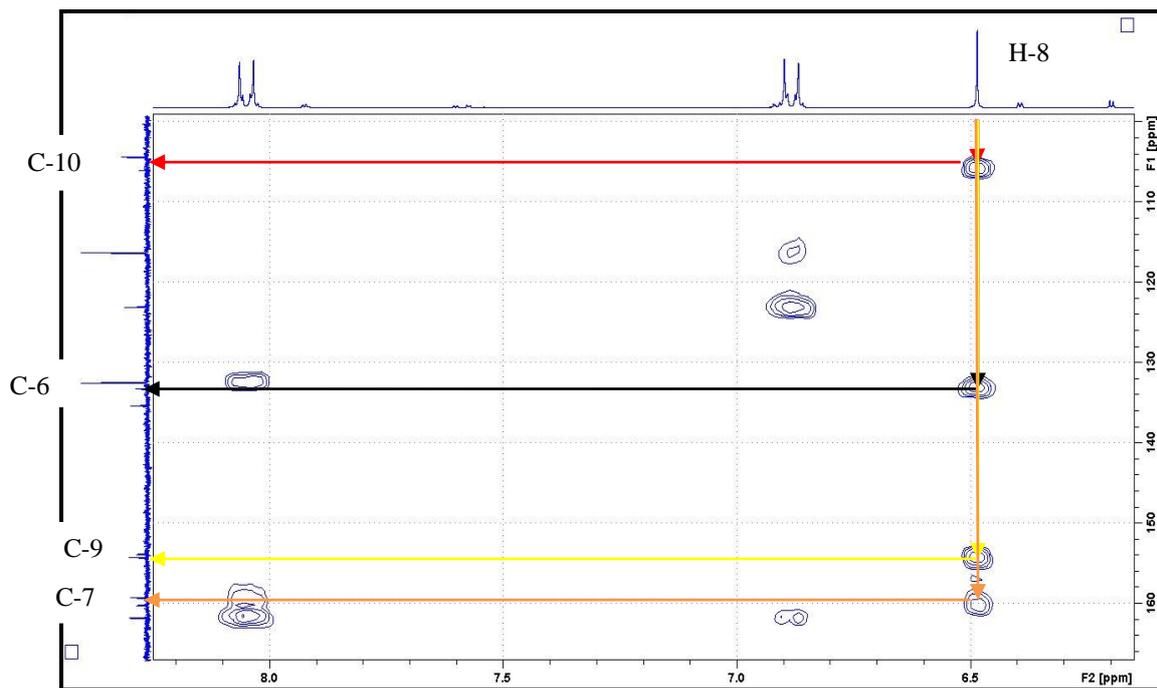
من هذه المعطيات يمكن اقتراح الصيغة الابتدائية الموضحة في الشكل (24-III) :



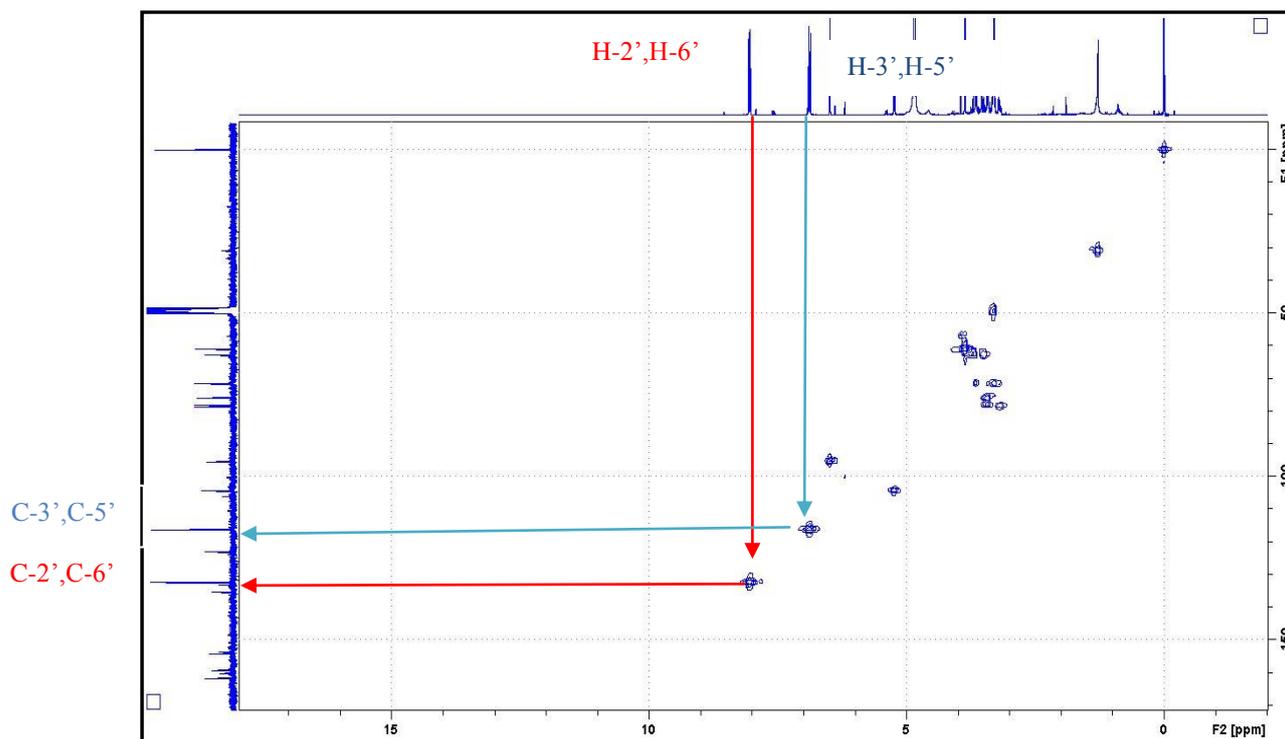
الشكل (24-III): الصيغة الابتدائية للمركب C7



الطيف (28-III): طيف HMBC للمركب C7 (CD₃OD, 400 MHz)



تكبير للطيف (28-III) في المجال [6,2-8,2 ppm]



الطيف (29-III): طيف HMQC للمركب C7 (CD₃OD, 400 MHz)

- إلى هذا الحد من التحليل واضح أننا ننتظر مستبدل مؤكسج في الموضع C-3 ، بالرجوع إلى الأطياف و خاصة طيفي الكربون و DEPT يلاحظ وجود إشارات خاصة بمجموعة سكرية من نوع سكر سداسي (hexose) ، حيث يبين طيف RMN-1H إشارة البروتون الأنوميري على شكل إشارة ثنائية عند $\delta = 5,23$ ppm الذي من خلال إزاحته نستنتج أنه مرتبط بالشق الأجليكوني برابطة من نوع O-sucrose مؤكدا نتائج تحليلنا السابق.

و بنظرة سريعة لطيف HMBC يلاحظ تعالق هذا البروتون الأنوميري مع الكربون ذي الإشارة عند $\delta = 135,17$ ppm أي C-3 و عليه نستنتج من الآن أن المستبدل السكري في الموضع C-3 أما الإشارات الأخرى للمستبدل السكري فتحدد كما يلي :

إشارتان على شكل ثنائي-ثنائي ، الإشارة الأولى عند $\delta = 3,68$ ppm ($J = 11,9 ; 2,2$ Hz) والإشارة الثانية عند $\delta = 3,53$ ppm ($J = 11,9 ; 5,4$ Hz) نسبتا إلى H-6''a و H-6''b على الترتيب.

ويؤكد هذا الإسناد طيف DEPT-135 و HMQC الذي يبين تعالق هذين البروتونين مع المجموعة
 عند $\delta_c = 62,63$ ppm CH_2 .

و من خلال دراسة طيف COSY إنطلاقاً من إشارة $H-1''$ يمكن التعرف على $H-2''$ الذين يظهر
 على شكل ثنائي-ثنائي ($J = 9, 1 ; 7,4$ Hz) عند $\delta = 3,45$ ppm.

قيم ثوابت التزاوج تؤكد أن $H-2''$ محوري وتدل أيضا على أن $H-3''$ محوري.

تحديد $H-2''$ يقود إلى $H-3''$ دائما من خلال طيف COSY حيث يظهر تعالق بينهما ويسند إذن
 الثلاثي ($J = 9, 1$ Hz) عند $\delta = 3,43$ ppm إلى $H-3''$ ، تعددية هذه الإشارة و قيمة ثابت التزاوج

المستخرج من هذه الإشارة يؤكد الإتجاه المحوري ل $H-3''$ وتقود إلى إتجاه محوري ل $H-4''$ ، هذا

البروتون ($H-4''$) يظهر مغطى بإشارة المذيب عند $\delta = 3,30$ ppm من خلال طيفي COSY و

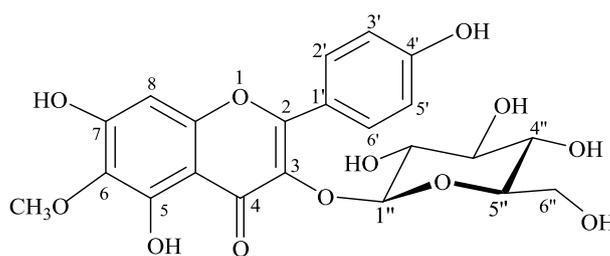
HMQC ، و تتسب الإشارة المتبقية (متعدد) عند $\delta = 3,20$ ppm إلى $H-5''$. يسمح طيف

HMQC بتحديد $C-2''$ ، $C-3''$ ، $C-4''$ عند $\delta_c = 75,78$ ppm ، $\delta_c = 78,10$ ppm و

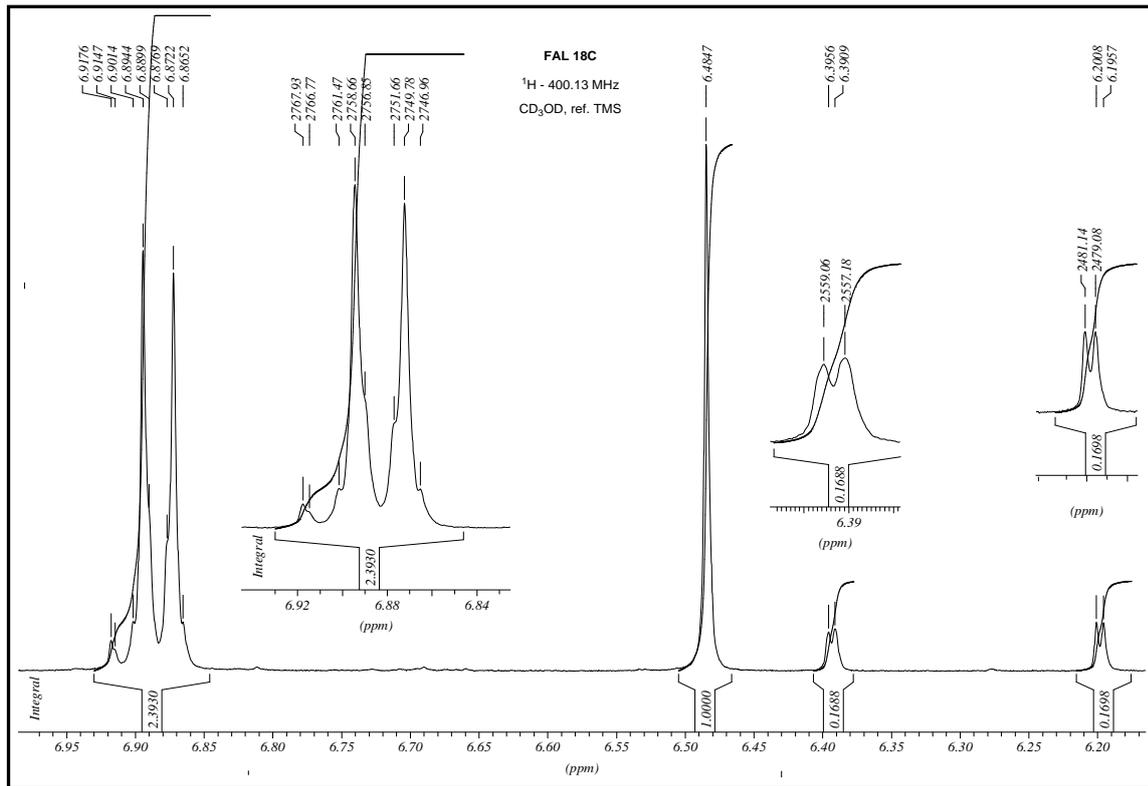
$\delta_c = 71,41$ ppm على الترتيب.

هذه المعطيات تتاسب سكر الجليكوز الذي سبق تحديد موضعه في الموضع C-3 .

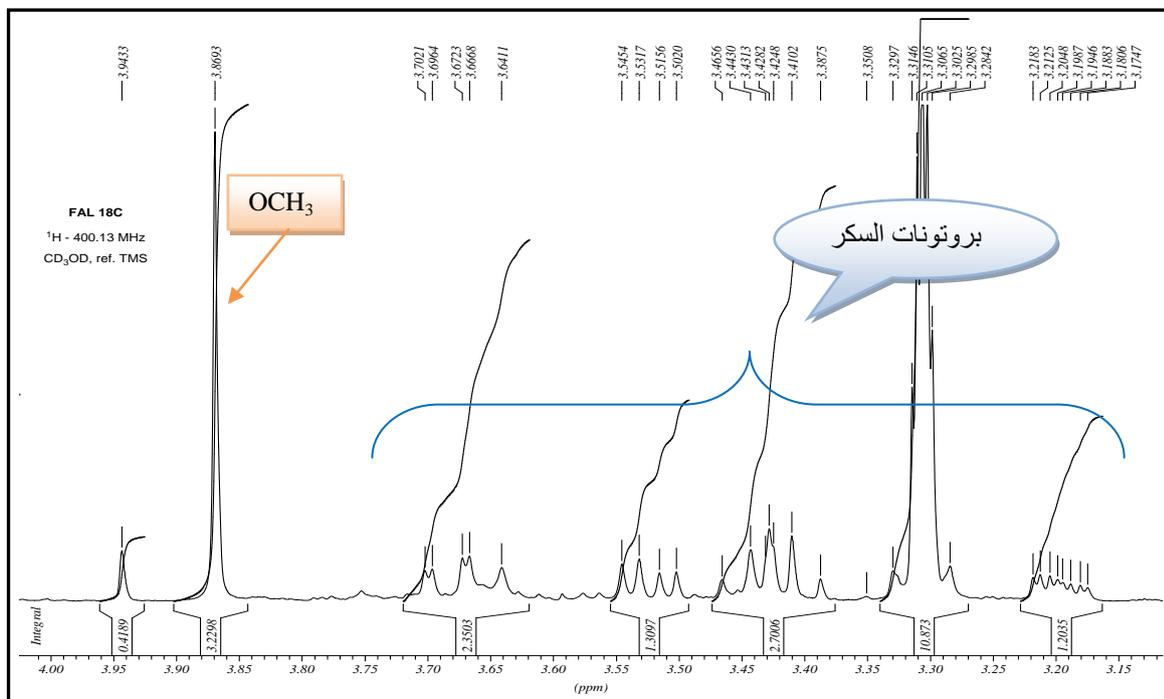
مجموع هذه المعطيات يؤدي إلى الصيغة النهائية المبينة في الشكل (25-III) [14] :



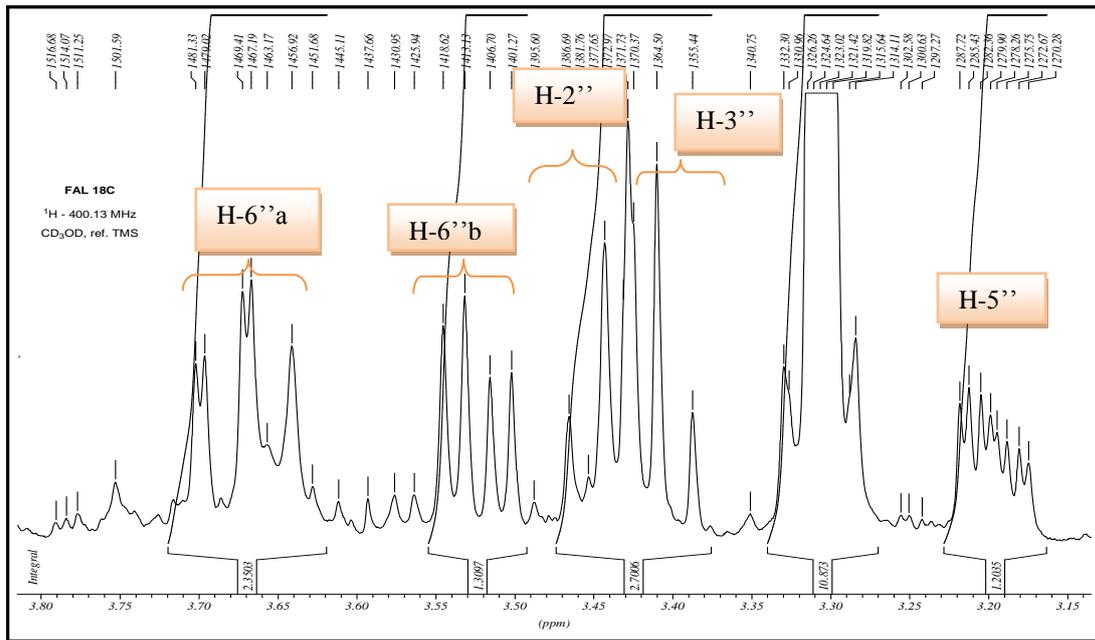
الشكل (25-III) : 6-methoxy kaempferol -3- β -O-glucoside



تكبير للطيف (24-III) في المجال [6,20-6,95 ppm]



تكبير للطيف (24- III) في المجال [3,15-4,00 ppm]



تكبير للطيف (24-III) في المجال [3,15-3,80 ppm]

المعطيات السابقة مدونة في الجداول (14-III) و(15-III).

الجدول (14-III) : قيم الإزاحة الكيميائية لنواة ذرة الكربون ^{13}C -RMN ونتائج الـ DEPT-135 الخاصة

بالمركب C7

^{13}C	δ (ppm)	DEPT-135
2	159,13	Cq
3	135,17	Cq
4	179,72	C=O
5	154,09	Cq
6	133,08	Cq
7	160,07	Cq
8	95,34	CH
9	153,69	Cq
10	105,88	Cq
1'	122,91	Cq
2'	132,32	CH
3'	116,13	CH
4'	161,64	Cq
5'	116,13	CH
6'	132,32	CH
1''	104,21	CH
2''	75,78	CH
3''	78,10	CH
4''	71,41	CH
5''	78,48	CH
6''	62,63	CH ₂
OCH ₃	60,94	CH ₃

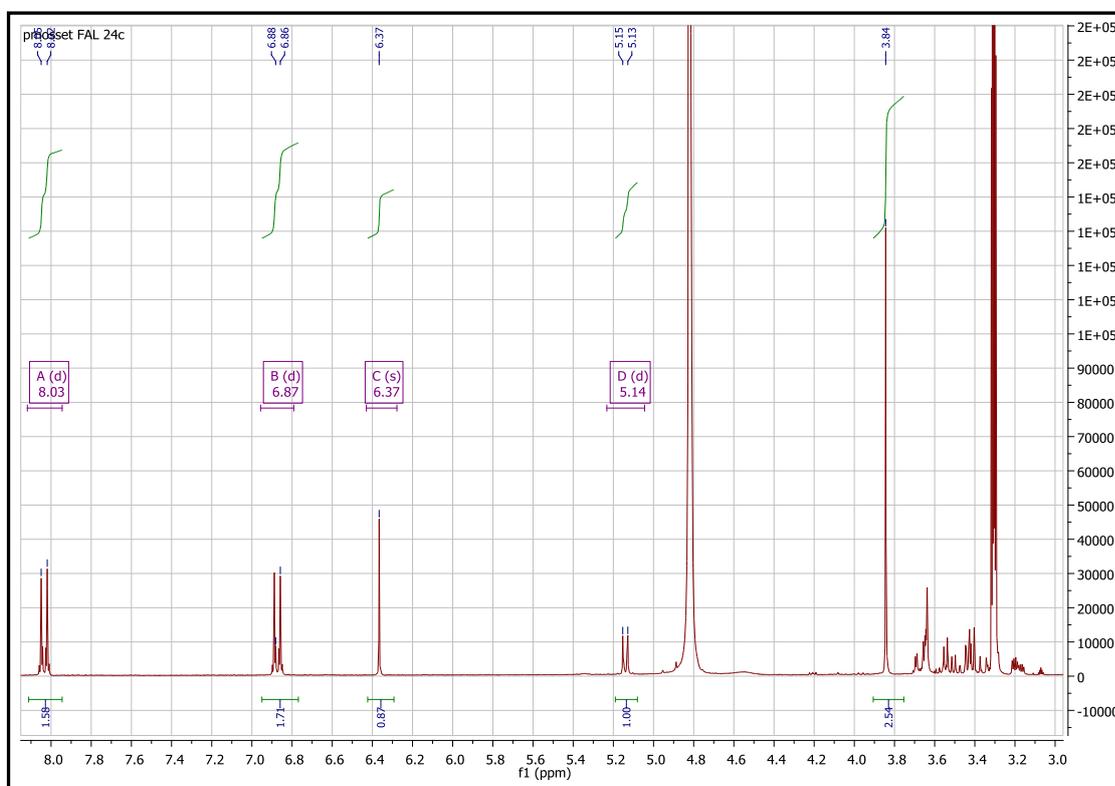
الجدول (15-III) : قيم الإزاحات الكيميائية (δ) لطيف الرنين النووي المغناطيسي لنواة الهيدروجين

RMN-¹H للمركب C7

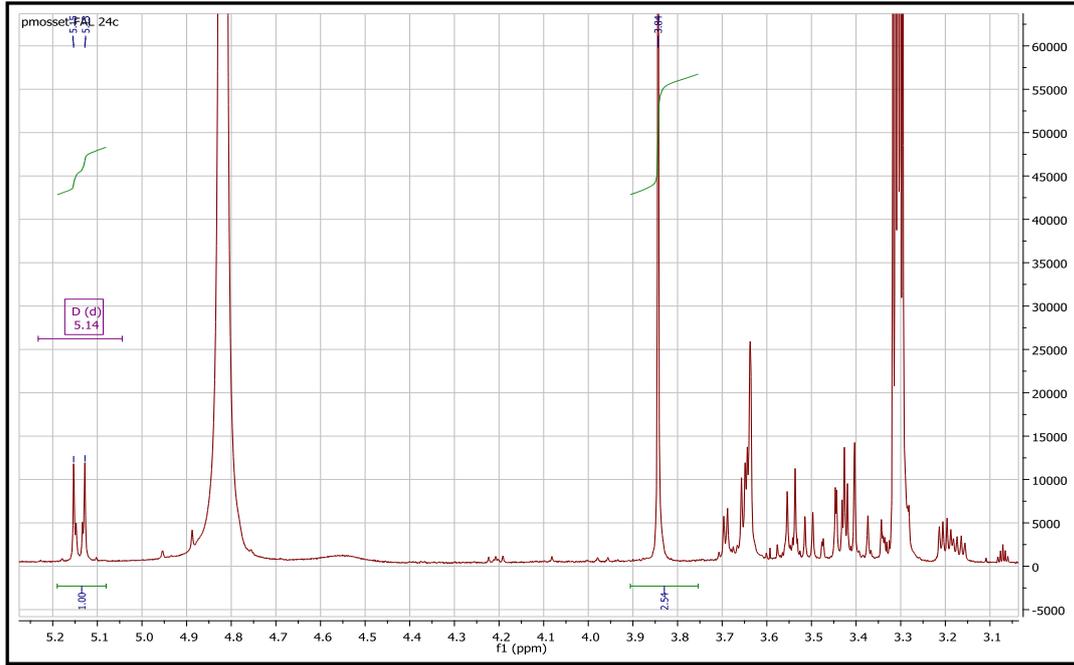
1H	δ (ppm)	التكامل	J(Hz) التعددية
2' 6'	8,04	2H	d ($J = 8,8$ Hz)
3' 5'	6,88	2H	d ($J = 8,8$ Hz)
8	6,48	1H	s
1''	5,23	1H	d ($J = 7,4$ Hz)
2''	3,45	1H	dd ($J = 9, 1 ; 7,4$ Hz)
3''	3,43	1H	t ($J = 9, 1$ Hz)
4''	3,30*	*	/
5''	3,20	1H	m
6a''	3,68	1H	dd ($J = 11,9 ; 2,2$ Hz)
6b''	3,53	1H	dd ($J = 11,9 ; 5,4$ Hz)
OCH ₃	3,87	3H	s

III-3-8- التعيين النيوي للمركب C8

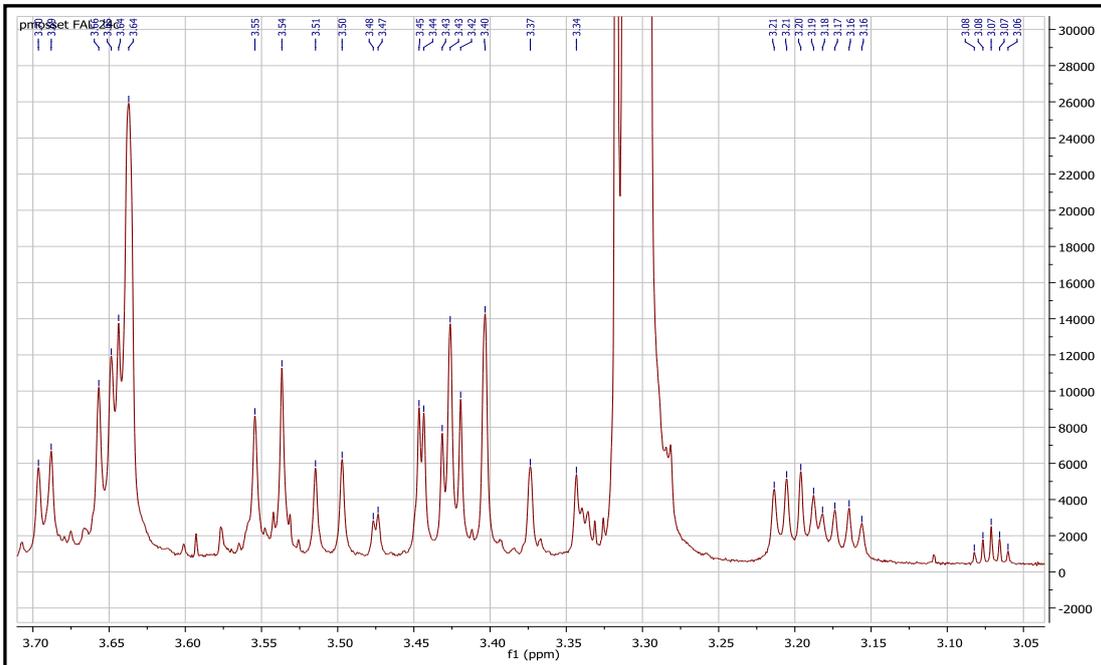
اللون البنفسجي تحت أشعة Wood دليل على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3. أظهر طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-1H (الطيف III-30) المسجل في MeOH-d₄ للمركب C8 تطابقه مع طيف البروتون النووي للمركب C7، كما أن الفحص الدقيق لطيف DEPT-135 (الطيف III-31) للمركب C8 أعطى نفس الإشارات الموجودة في طيف DEPT-135 للمركب C7، ومنه نستنتج أن المركب C8 هو 6-methoxy kaempferol-3-β-O-glucoside.



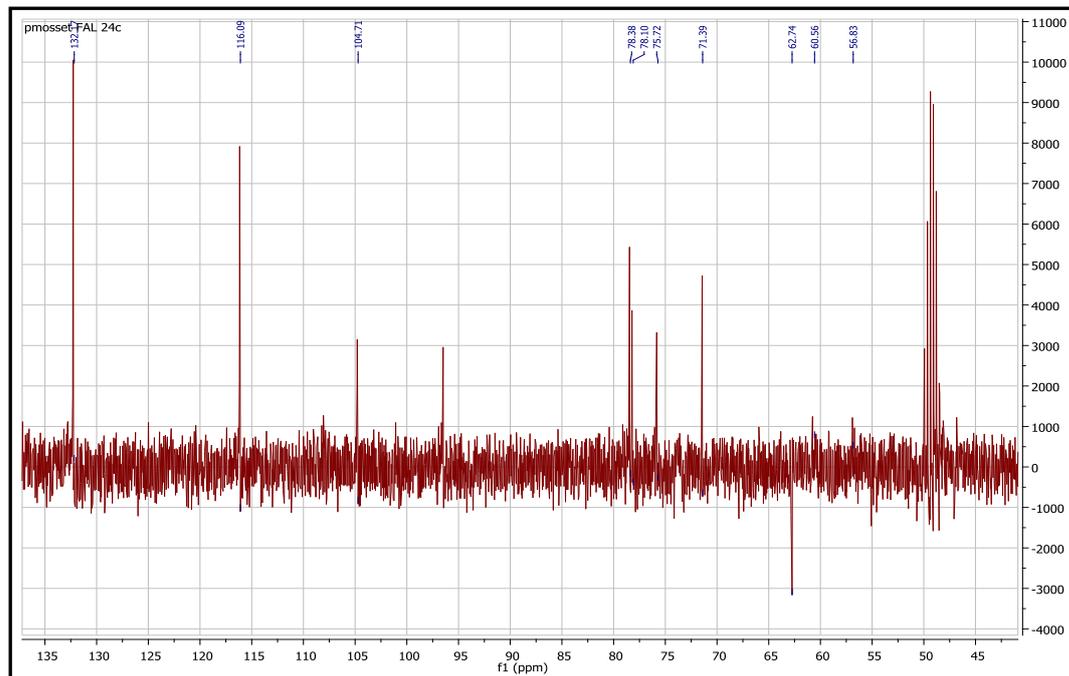
الطيف (30-III) : طيف RMN-¹H للمركب C8 (CD₃OD, 400 MHz)



تكبير للطيف (30-III) في المجال [3,10-5,20 ppm]



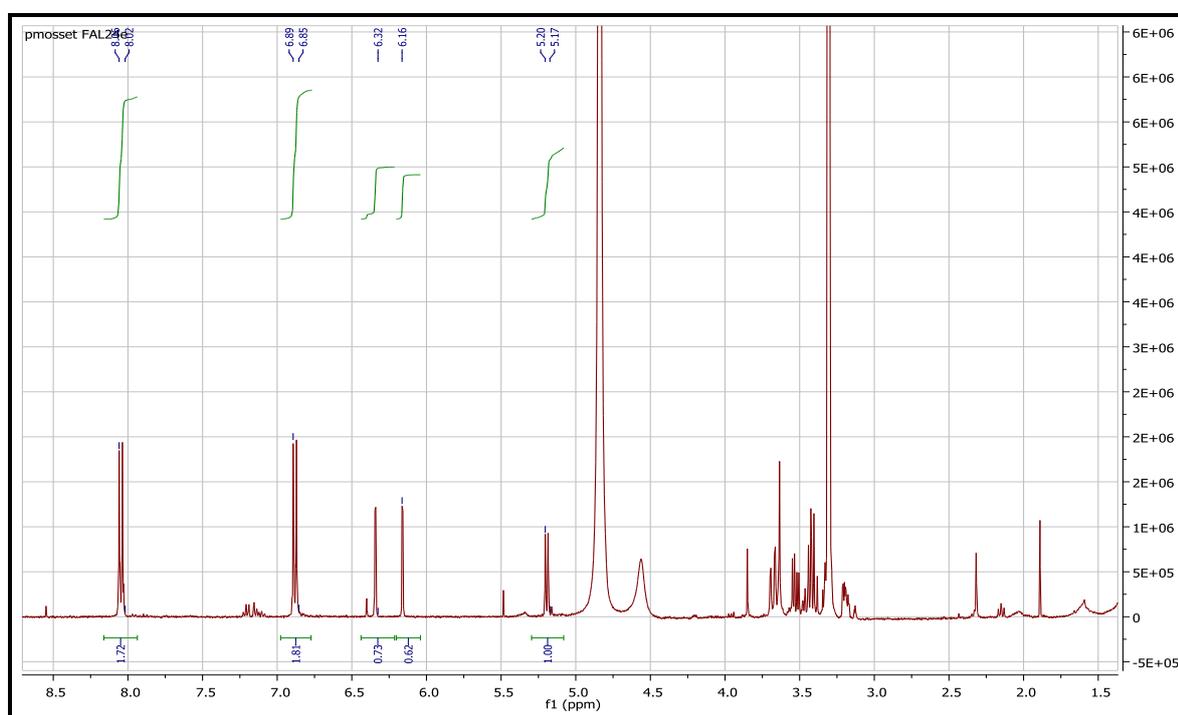
تكبير للطيف (30-III) في المجال [3,05-3,70 ppm]



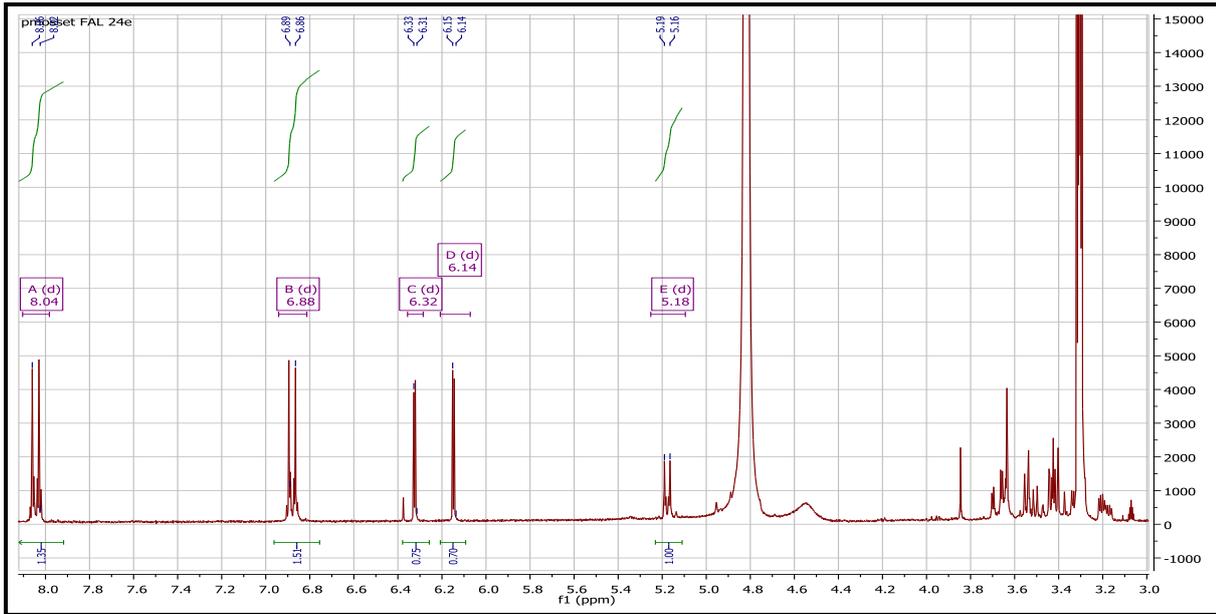
الطيف (31-III): طيف DEPT-135 للمركب C8 (CD₃OD, 100 MHz)

III-3-9- التعيين النيوي للمركب C9

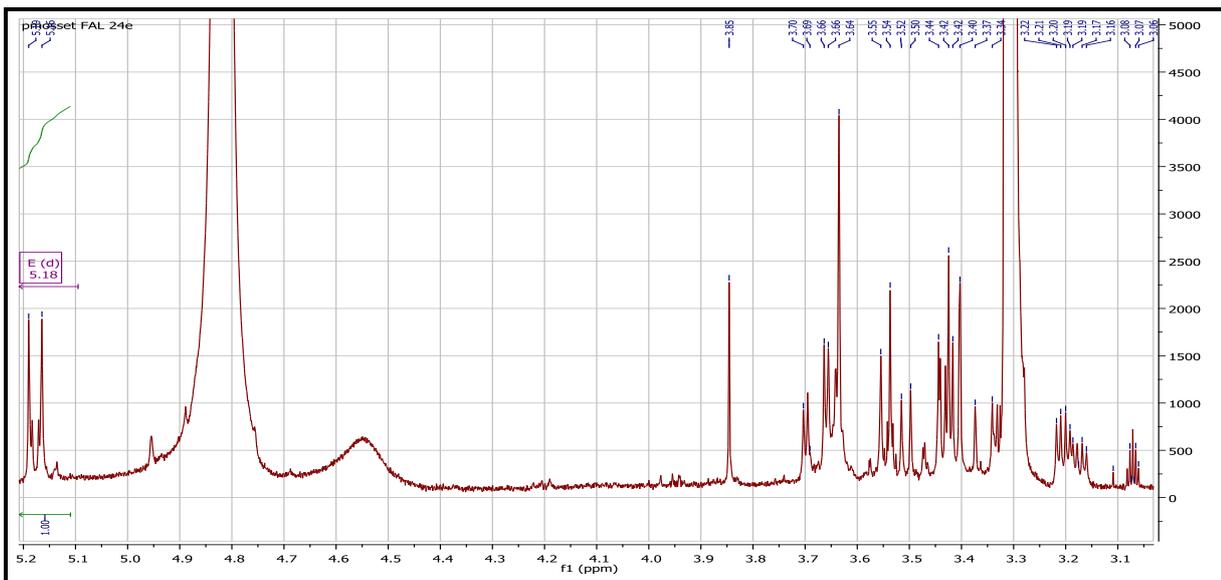
اللون البنفسجي تحت أشعة Wood دليل على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3. أظهر طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-1H (الطيف III-32) المسجل في MeOH-d₄ للمركب C9 تطابقه مع طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب C6. ومنه المركب C9 هو kaempferol-3-β-O-glucoside.



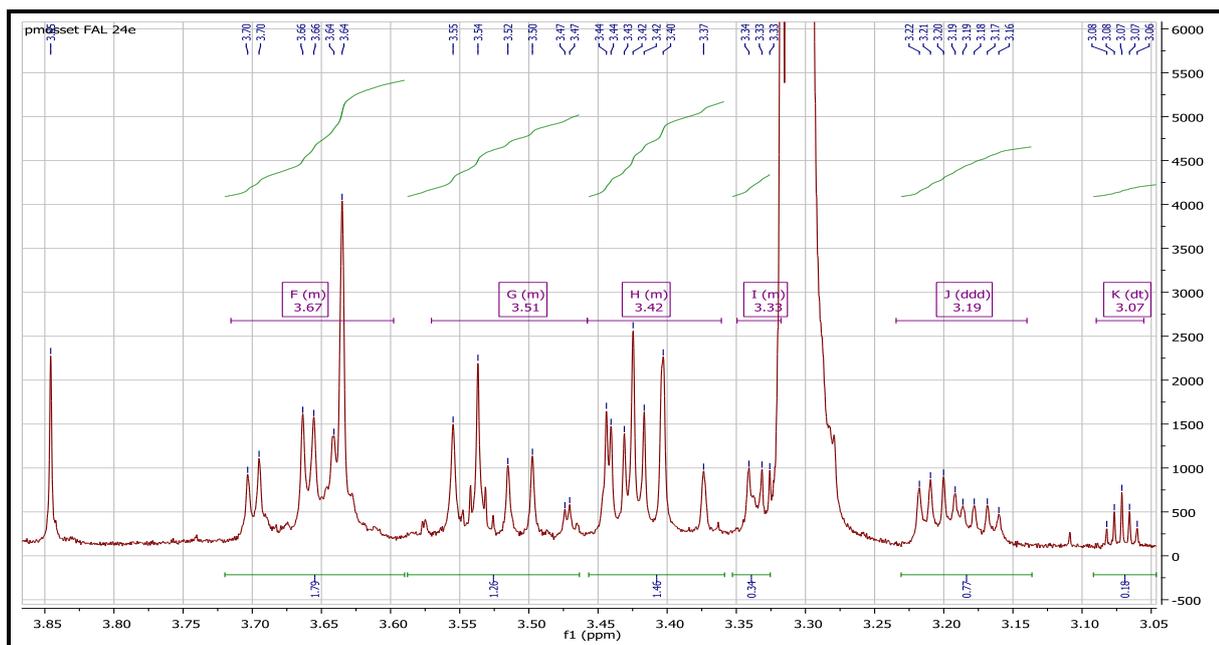
الطيف (III-32): طيف RMN-¹H للمركب C9 (CD₃OD, 400 MHz)



تكبير للطيف (32-III) في المجال [3,0-8,0 ppm]



تكبير للطيف (32-III) في المجال [3,0-5,2 ppm]

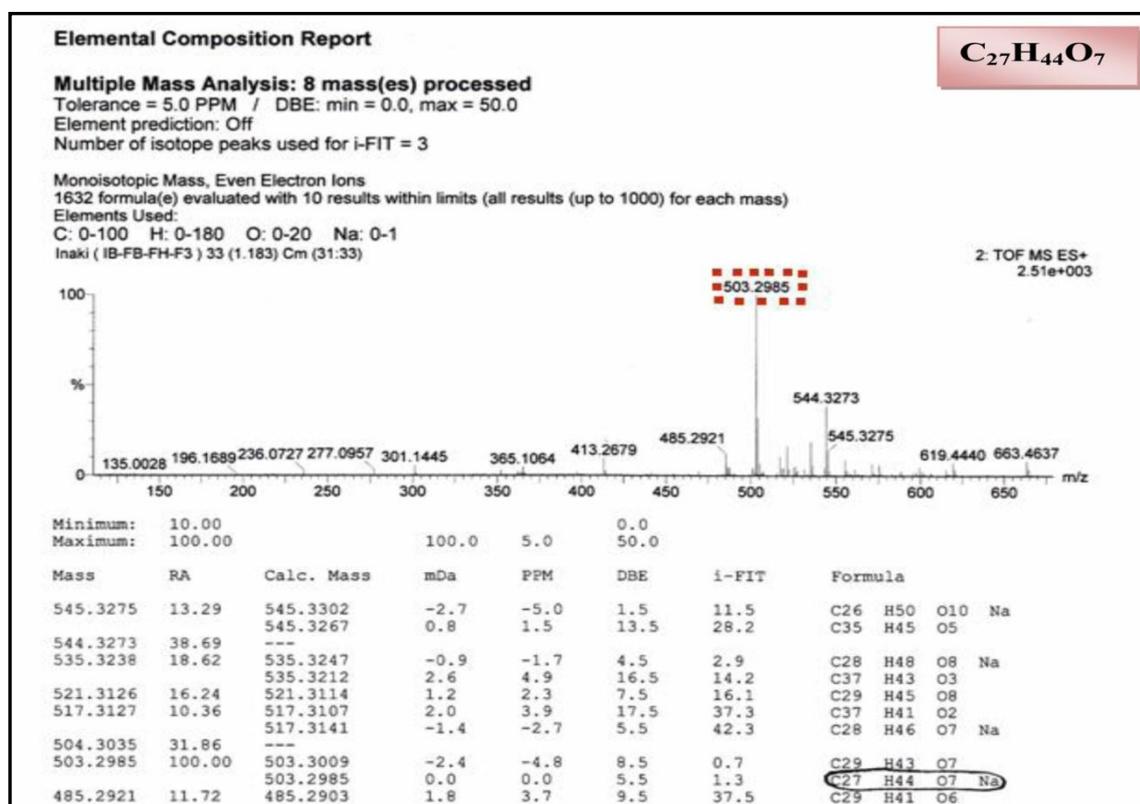


تكبير للطيف (32-III) في المجال [3,85-3,0 ppm]

III-4- التعيين البنوي للمركبات المفصولة من نبات *Serratula cichoracea*

III-4-1- التعيين البنوي للمركب S2

أعطى طيف الكتلة للمركب S2 المسجل بتقنية TOF-HRESI-MS الموجبة (الطيف III-33) قمة الأيون شبه الجزيئي عند $m/z = 503,2985$ الموافقة لـ $[C_{27}H_{44}O_7Na]^+$ أي $[M+Na]^+$ (الكتلة المحسوبة لـ $C_{27}H_{44}O_7Na$ $m/z = 503,3009$) و التي تؤدي إلى الصيغة المجملة $C_{27}H_{44}O_7$ ذات الكتلة الجزيئة 480 Da، هذه الصيغة تشير إلى وجود 6 روابط غير مشبعة وحلقات في الجزيء.



الطيف (III-33): طيف الكتلة للمركب S2 (CD_3OD , 500 MHz)

معطيات طيف ^{13}C RMN (الطيف III-34) و أطياف تجارب DEPT (الطيف III-35) و (الطيف III-36)

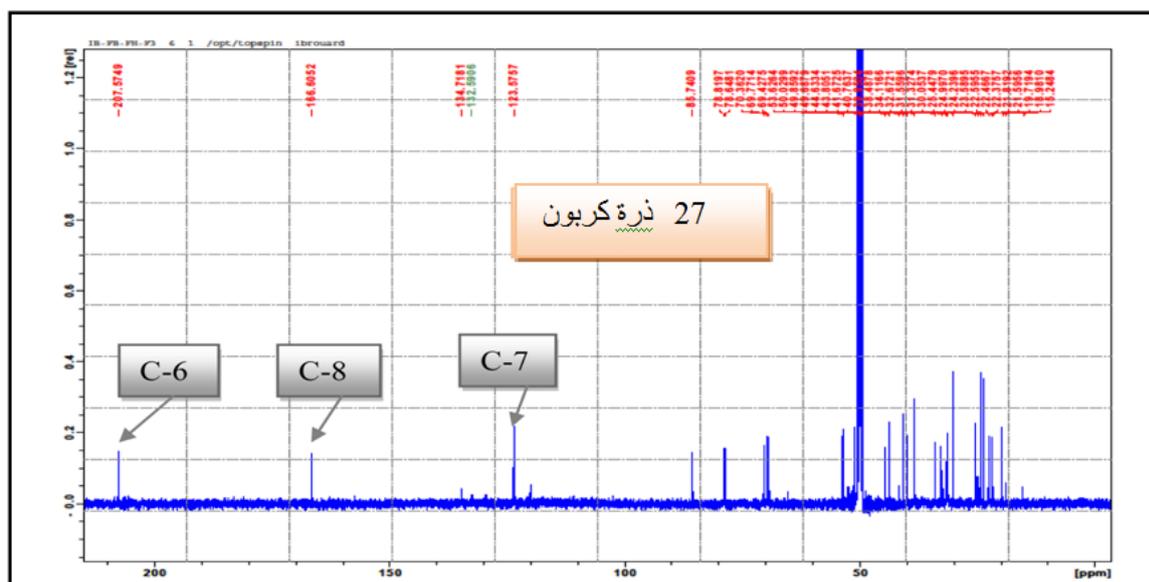
تؤكد وجود 27 ذرة كربون في المركب من بينها :

✓ مجموعة كربونيل كيتونية عند $\delta = 207,57$ ppm

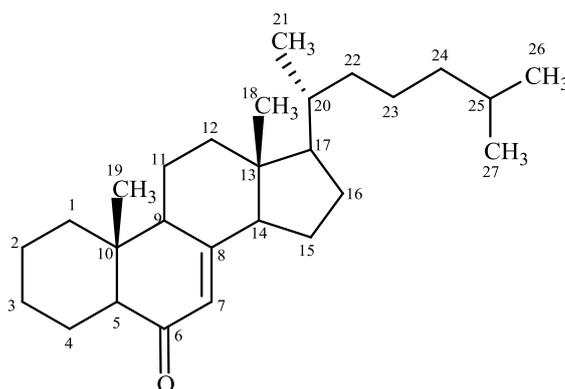
✓ كربون رباعي إيثيليني عند $\delta = 166,61$ ppm

✓ مجموعة CH إيثيلينية عند $\delta = 123,58$ ppm

هذه المعطيات مطابقة حسب الدراسة الببليوغرافية للهيكـل cholest-7-ène-6-one (الشكل III-26) وهو إحدى مشتقات الكوليسترول ومنه فإن الكربون الذي يرن عند $\delta = 207,57$ ppm خاص بالكربون رقم 6 "وظيفة السيتون" ، أما الكربونات الإيثيلية التي ترن عند $\delta = 166,61$ ppm و $\delta = 123,58$ ppm تتسب لـ C-7 و C-8 على الترتيب.



الطيف (III-34): طيف ^{13}C -RMN للمركب S2 (CD₃OD, 125 MHz)



الشكل (III-26): Cholest-7-ène-6-one

بما أن هذه الجزيئة تحتوي على 27 ذرة كربون وعلى 6 روابط غير مشبعة، بعد طرح وظيفة الكيتون والرابطة الايثيلينية لم يتبقى إلا أربعة درجات من عدم التشبع والتي تخص الهيكل المقترح ، و هذا يؤدي إلى إستنتاج بأنها لا تحتوي على أي مستبدل هيدروكربوني، وبالتالي فإن ذرات الأوكسجين الستة المتبقية موجودين على شكل مجموعات هيدروكسيل، يبقى لنا أن نستدل على مواقع هذه المجموعات الهيدروكسيلية.

- من جهة أخرى يبين طيف البروتون $^1\text{H-RMN}$ (الطيف III-37) إشارة ثنائية- ثنائية ($J = 2,7$; 0,8 Hz) تظهر عند $\delta = 5,7$ ppm تتسب للبروتون H-7.

- من أجل تحديد البنية النهائية للمركب S2 لجأنا إلى أطيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بمختلف تقنياتها.

- تقنية $(^1\text{H}-^1\text{H})$ COSY (الطيف III-38) تمكنا من خلالها من توزيع بروتونات المركب كما يلي:

سمحت بقعة تعالق عن بعد ل H-7 مع إشارة على شكل ثنائي- ثنائي بثابتي تزواج

($J = 8,7$; 2,9 Hz) عند $\delta = 3,05$ ppm بنسب هذه الإشارة للبروتون H-9 هذا الأخير بدوره أعطى

بقعة تعالق مع إشارة على شكل ثنائي- ثنائي- ثنائي ($J = 10,6$; 8,8 ; 6,8 Hz) عند $\delta = 4,01$

ppm نسبت للبروتون H-11. الإزاحة الكيميائية لهذه الذرة تدل على وجود مجموعة هيدروكسيل عند

C-11، من جهة أخرى قيمة ثابت التزواج ($J = 8,7$ Hz) للبروتون H-9 تدل على وجود تأثير محوري-

محوري بين هذا البروتون والبروتون H-11 مما يسمح بتوجيه α ل H-9 وتوجيه β للبروتون H-11 ومنه

مجموعة الهيدروكسيل المتصلة بالكربون 11 ذو توجيه α .

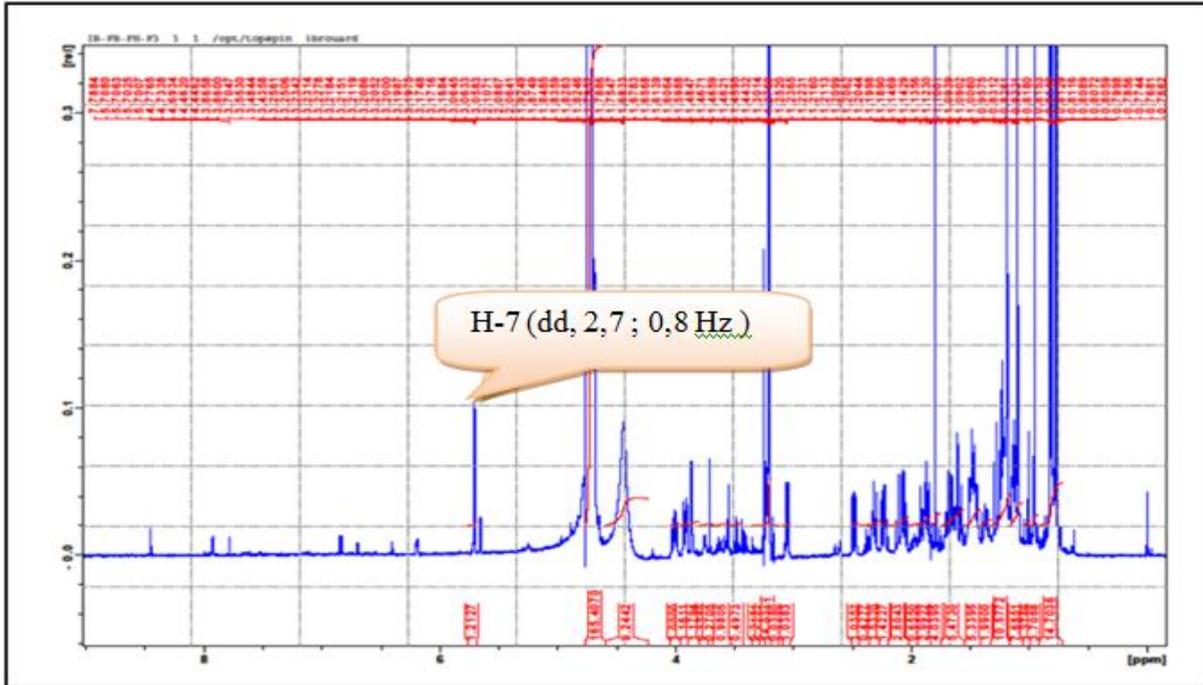
- دائما من خلال طيف COSY نتمكن من إرفاق الإشارتان الظاهرتان على شكل ثنائي- ثنائي

عند $\delta = 2,11$ ppm ($J = 12,3$; 10,6 Hz) و $\delta = 2,04$ ppm ($J = 12,3$; 6,1 Hz) إلى البروتونين

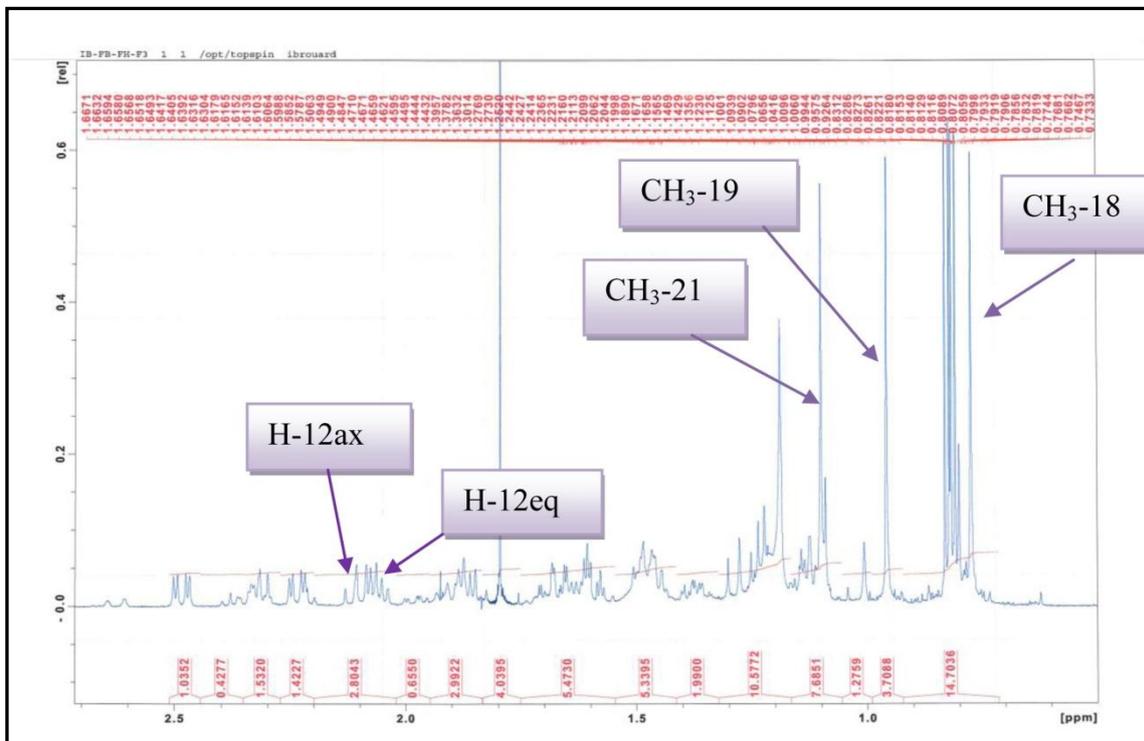
H-12 من خلال بقع تعالقهما مع البروتون H-11 ، قيم ثوابت التزواج ل H-12 سمحت بتوجيه

محوري ل H-12 الظاهر عند $\delta = 2,11$ ppm و توجيه إستوائي ل H-12 الظاهر عند

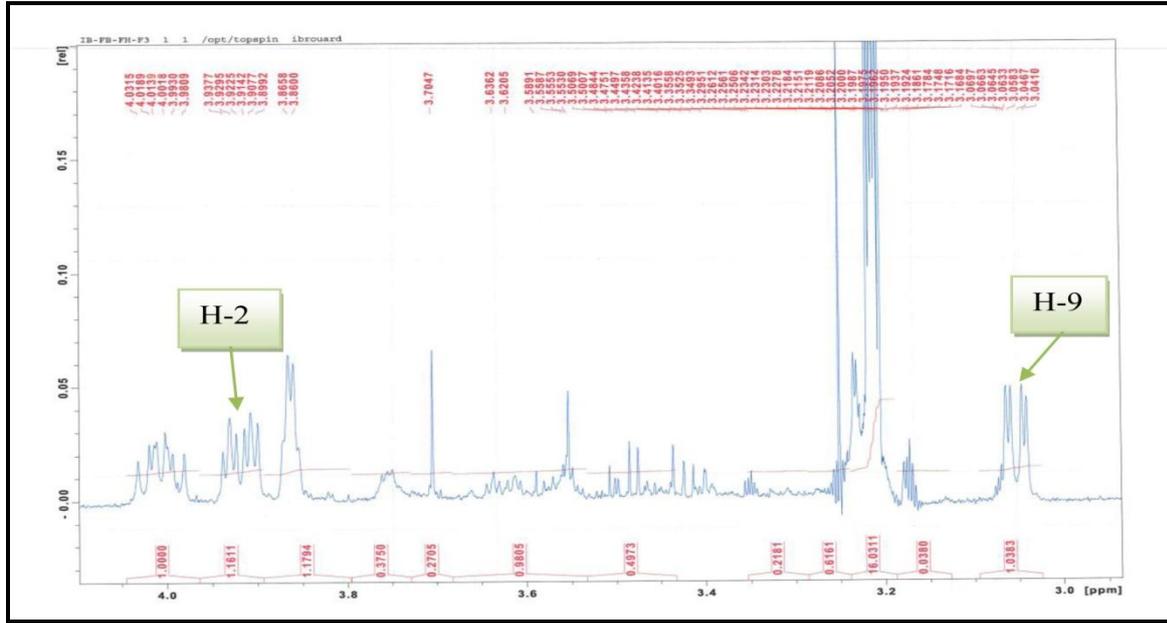
. $\delta = 2,04$ ppm



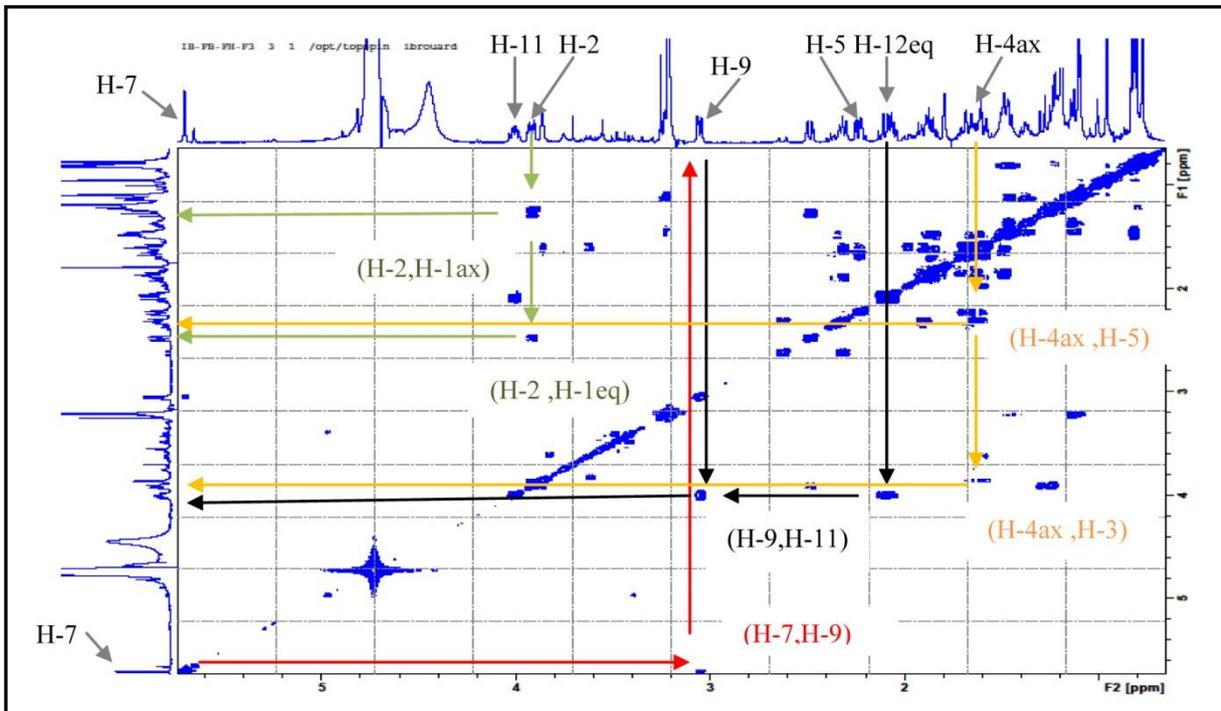
الطيف (37-III): طيف RMN-1H للمركب S2 (CD₃OD, 500 MHz)



تكبير للطيف (37-III) في المجال [0,20-2,60 ppm]



تكبير لطيف (37-III) في المجال [2,0- 4,0 ppm]



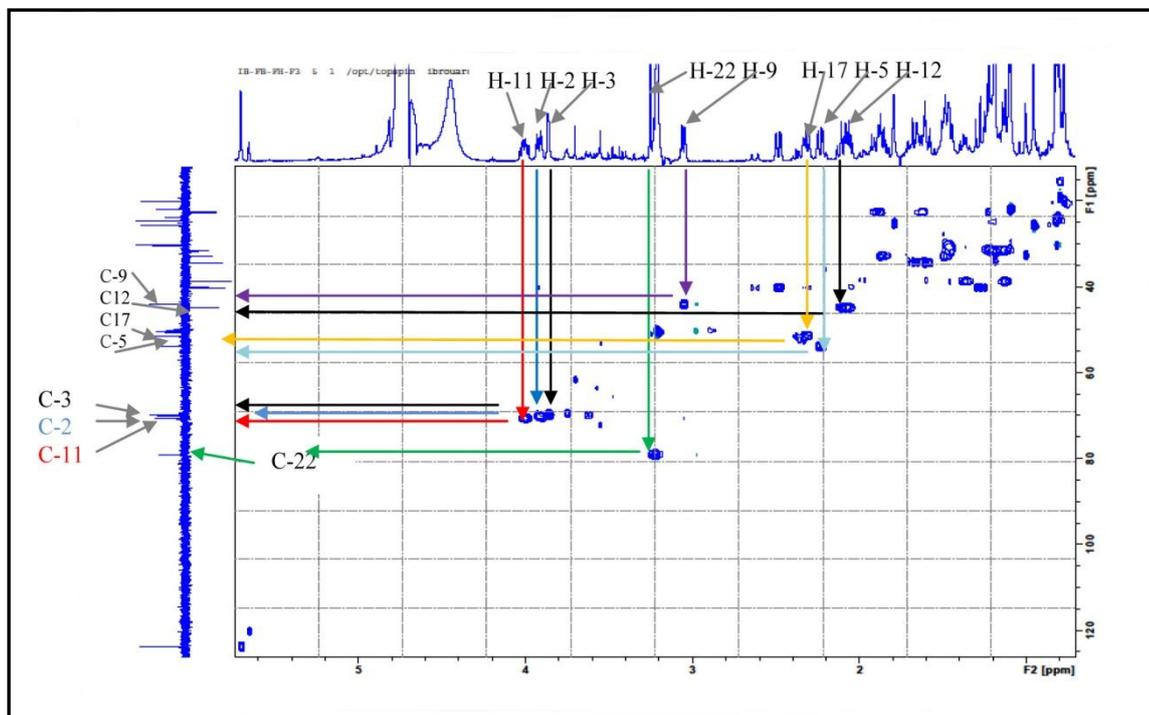
الطيف (38-III): طيف COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) للمركب S2 (CD₃OD, 500 MHz)

- طيف HSQC (الطيف III-39) يسمح بتحديد الكربون C-9 عند $\delta_c = 43,81$ ppm من خلال بقعة تعالقه مع H-9.

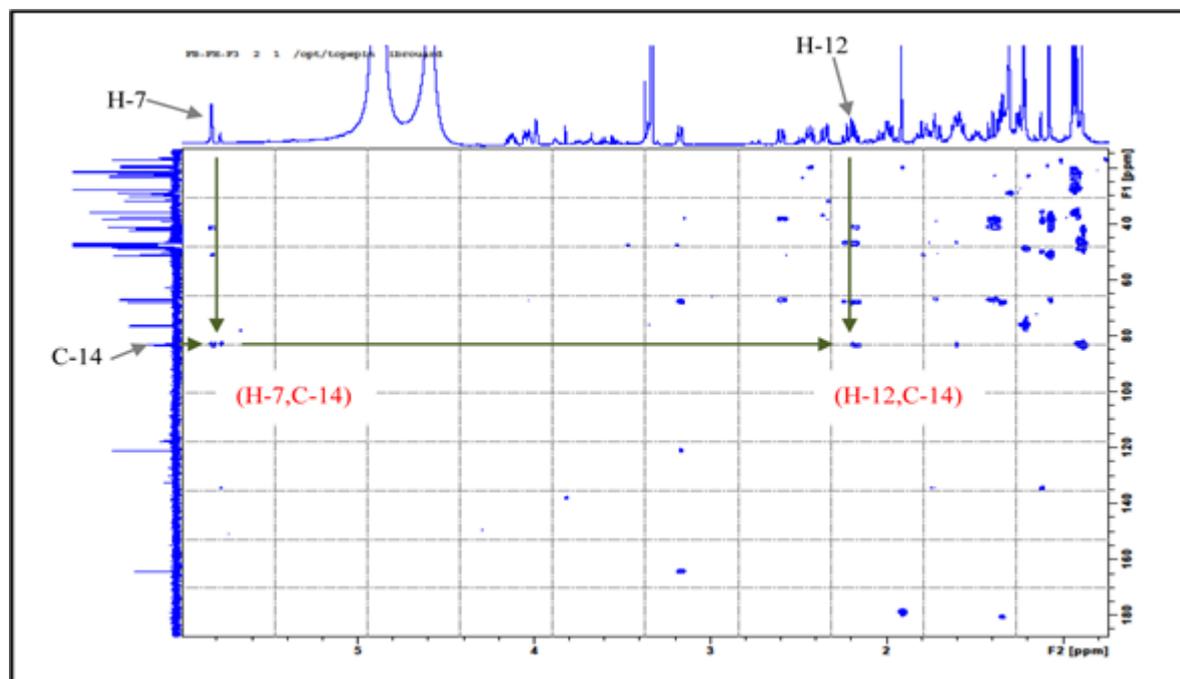
ومن خلال طيف HMBC (الطيف III-40) الكربون C-9 يسمح بتحديد موضع CH₃-19 عند $\delta_c = 25,45$ ppm و $\delta_H = 0,95$ ppm ، دائما من خلال نفس الطيف بروتونات المثل 19 أعطت نقاط تعالق واضحة مع CH₂ عند $\delta_c = 39,95$ ppm التي لا يمكن أن تكون إلا بروتونات الكربون 1 ($\delta_{H-1\beta} = 1,28$ ppm, dd, $J = 12,8 ; 11,0$ Hz ، $\delta_{H-1\alpha} = 2,49$ ppm , dd , $J = 12,8 ; 4,2$ Hz) ، كما أظهرت أيضا بروتونات المثل 19 نقاط تعالق مع كربون مجموعة CH عند $\delta_c = 53,63$ ppm ($\delta_H = 2,22$ ppm , dd , $J = 12,1 ; 4,0$ Hz) هذا الكربون لا يمكن أن يكون إلا الكربون 5. بما أن تعددية H-5 ثنائي-ثنائي فالكربون C-4 هو عبارة عن CH₂ و بما أن قيمة ثابت تزاوج H-5 مع إحدى H-4 هي 12,1 هرتز نستنتج أن هناك تأثير محوري-محوري بين هاذين البروتونين مما يؤدي إلى توجيه β للبروتون H-5.

هذه النتائج مؤكدة من خلال طيف COSY الذي يبين نقاط تعالق واضحة بين H-5 و بروتوني C-4.

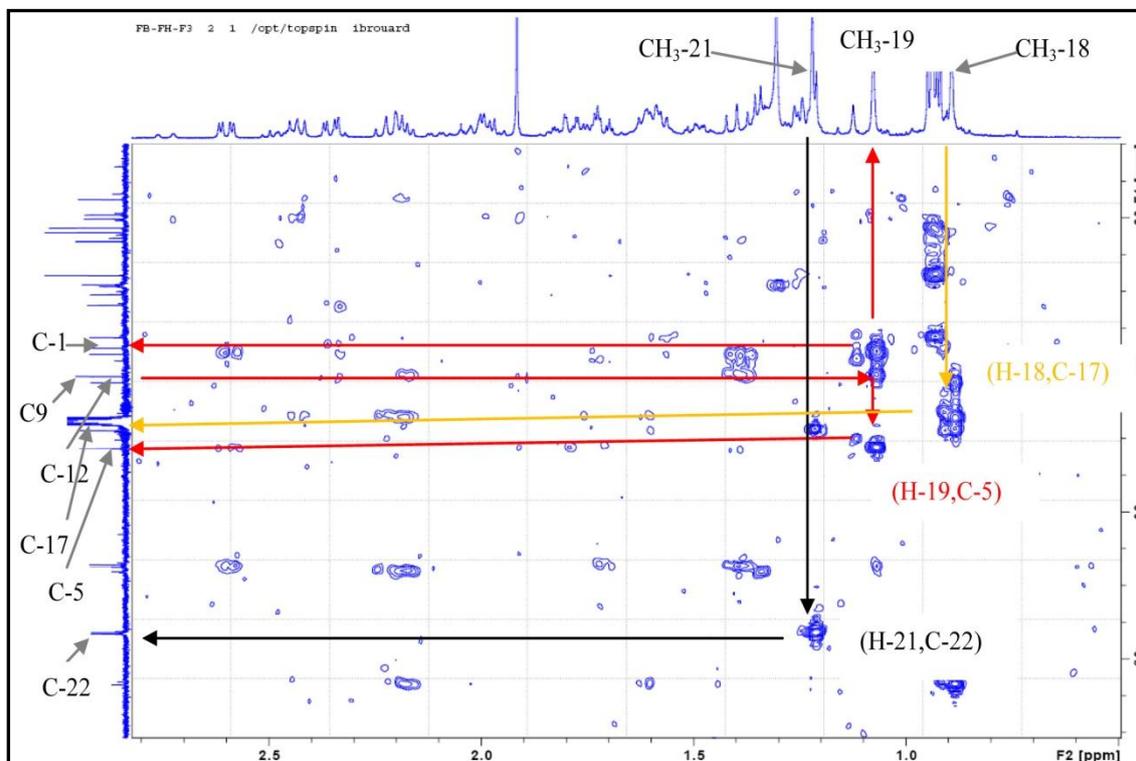
الأولى عند $\delta = 1,65$ ppm على شكل ثلاثي ثنائي (td) ($J = 13,2 ; 2,5$ Hz) نسبت إلى H-4 α (المحوري) و الثانية عند $\delta = 1,60$ ppm على شكل ثنائي ثلاثي (dt) ($J = 13,2 ; 2,9$ Hz) نسبت إلى H-4 β (الاستوائي).



الطيف (39-III): طيف HSQC للمركب S2 (CD₃OD, 500 MHz)



الطيف (40-III): طيف HMBC للمركب S2 (CD₃OD, 500 MHz)



تكبير للطيف (40-III) في المجال [0,5-2,8 ppm]

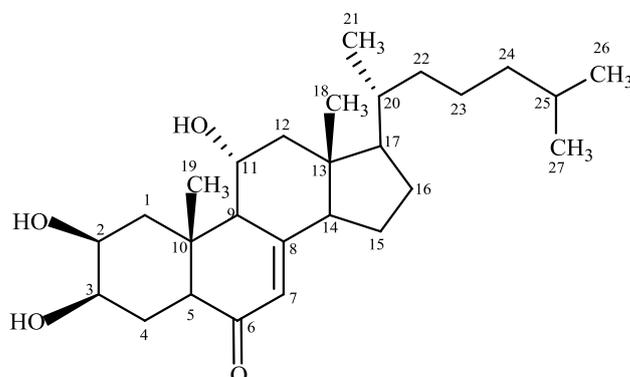
- دائما من خلال طيف COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) البروتون H-4 يظهر نقاط تعالق مع إشارة رباعية عند $\delta_{\text{H}} = 3,86$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 69,43$ ppm) تنسب للبروتون H-3.

قيمتي الإزاحة الكيميائية للبروتون H-3 و الكربون C-3 تبين وجود مجموعة هيدروكسيل عند C-3 ، كما تسمح قيمة ثابت التزاوج الخاصة بـ H-4 α (المحوري) بتوجيه α (استوائي) للبروتون H-3 وبالتالي بتوجيه β (محوري) لمجموعة الهيدروكسيل.

- من جهة أخرى يظهر البروتون H-3 نقطة تعالق مع إشارة على شكل ثنائي ثلاثي (dt) هذا مؤكد من خلال نقطة تعالق واضحة بين هذا البروتون و H-1.

- قيمة الإزاحة الكيميائية للكربون C-2 والبروتون H-2 توحي بوجود مجموعة هيدروكسيلية عند C-2 ، أما قيمة ثابت التزاوج للبروتون H-2 و H-1 β تسمح بتوجيه α (محوري) للبروتون H-2 ومنه بتوجيه β (استوائي) لمجموعة هيدروكسيل C-2.

إلى حد الآن تم تحديد موقع ثلاث مجموعات هيدروكسيلية ومنه الصيغة الأولية المقترحة موضحة في الشكل (27-III) وهي:



الشكل (27-III) : الصيغة الأولية المقترحة

- للوصول إلى البنية النهائية للمركب يبقى لنا تحديد موقع الثلاث مجموعات الهيدروكسيلية المتبقية وهذا دائما من خلال الأطياف الثنائية البعد RMN-2D.

طيف HMBC يبين نقاط تعالق البروتونين H-7 و H-12 مع كربون رباعي عند 85,74 ppm لا يمكن أن يكون إلا الكربون C-14، من خلال إزاحتها الكيميائية نستنتج بأنه يحمل مجموعة هيدروكسيل، هذه الأخيرة ذو توجيه α (محوري) لأسباب خاصة بتشكيل الجزيئة (considérations conformationnelles).

- من جهة أخرى الكربون C-12 يظهر نقاط تعالق مع بروتونات الميثيل عند $\delta = 0,77$ ppm التي تظهر على شكل إشارة أحادية، نسبت إلى الموضع 18 ($\delta_C = 19,72$ ppm) الذي حدد ذو توجيه β لأسباب التصنيع الحيوي للجزيئة (considérations biosynthétiques)، بروتونات الميثيل 18 تسمح لنا بسهولة تحديد C-17 عند $\delta_C = 51,41$ ppm ($\delta_H = 2,11$ ppm, t, $J = 10,9$ Hz) من خلال نقطة تعالق بين هذه الذرات.

- دائما بالفحص الدقيق لطيف HMBC نلاحظ أن C-17 يظهر نقاط تعالق مع إشارة أحادية عند $\delta = 1,10$ ppm ($\delta_C = 21,82$ ppm) هي عبارة عن بروتونات مجموعة ميثيل نسبت إلى الموضع 21، تعددية هذه الإشارة وكذلك قيمة إزاحتها الكيميائية تشير إلى أنها محمولة من طرف كربون رباعي

مؤكسج ومنه هذا الكربون يحمل مجموعة هيدروكسيل موضعها C-20 ذو توجيه β مفروض لخلفية إصطناع حيوي لهذه الجزئية (*considérations biosynthétiques*).

- في الأخير لم يبقى لنا سوى الإستدلال على مجموعة الهيدروكسيل الأخيرة وبنفس الطريقة ومن

خلال نقطة تعالق بروتونات الميثيل 21 مع كربون مجموعة CH عند $\delta_c = 78,65$ ppm

($\delta = 3,22$ ppm) هذه الأخيرة التي نسبت إلى الموضع C-22 قيمة الإزاحة الكيميائية لهذا الكربون

توحي بأنه مؤكسج وبالتالي يحمل مجموعة هيدروكسيل.

نستنتج من مجموع هذه المعطيات أن المركب S2 هو عبارة عن:

2 β , 3 β , 11 α , 14 α , 20, 22 hexahydroxy-5 β -cholest-7-ène-6-one

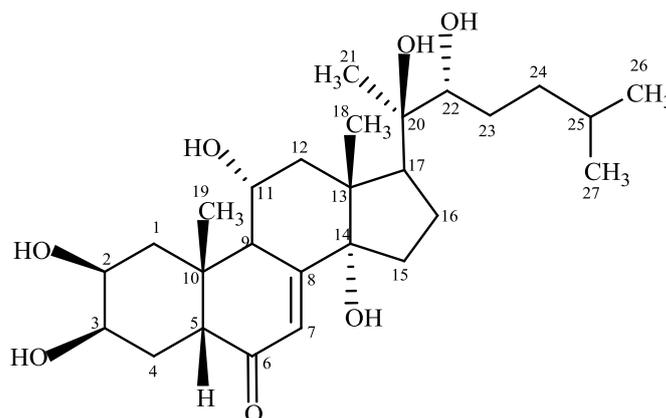
- كما سبق الذكر فإن المركز الكيرالي C-20 ذو تشكيل R وذلك إعتقادا على مرتكزات التصنيع الحيوي.

أما لتحديد التشكيل الفراغي للكربون C-22 فقد لجأنا إلى الدراسات الببليوغرافية، حيث قمنا بمقارنة أطياف هذا المركب فوجدناها مطابقة لأطياف *Ajugasterone C* (الشكل III-28) ، هذه الجزئية سبق

فصلها من *serratula coronata*. L [15] و *leuzea carthamoides* [16] .

- في هذه الجزئية الكربون C-22 ذو تشكيل فراغي R ومنه الصيغة النهائية للمركب موضحة في

الشكل (III-28):



الشكل (III-28): *Ajugasterone C*

مجموع المعطيات السابقة مدونة في الجداول (III-16) و (III-17).

الجدول (16-III) : قيم الإزاحة الكيميائية لنواة ذرة الكربون ^{13}C -RMN ونتائج الـ DEPT-135 الخاصة بالمركب S2.

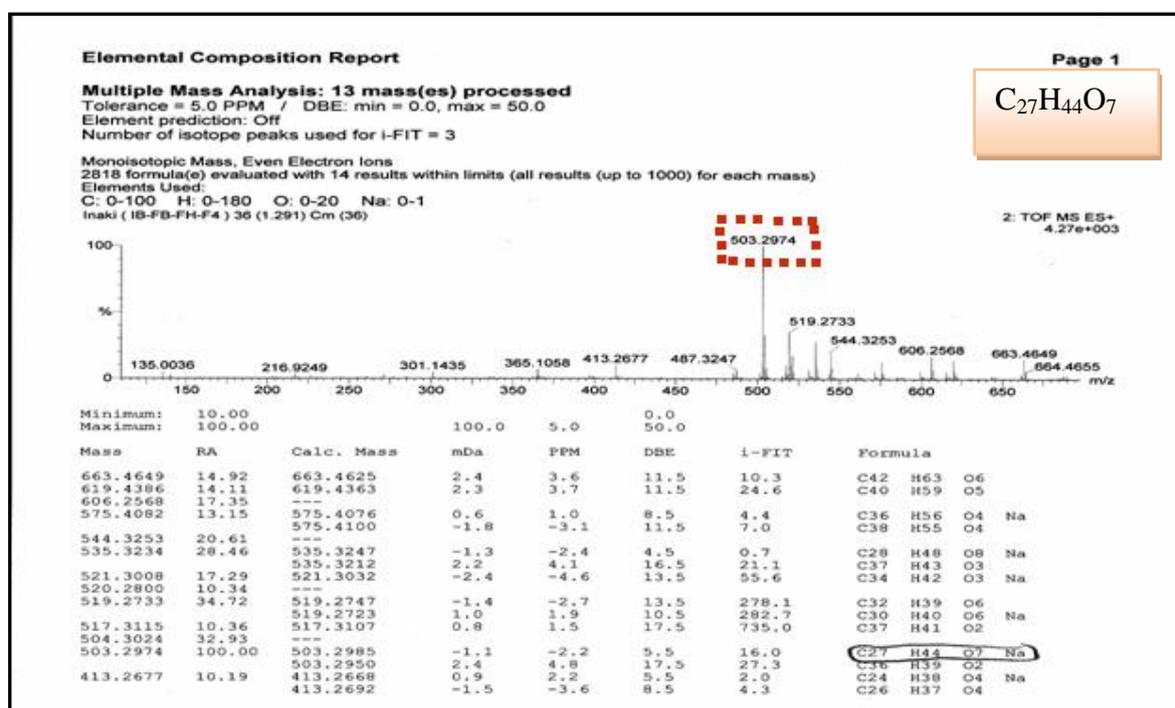
^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135
1	39,95	CH ₂
2	69,77	CH
3	69,43	CH
4	34,12	CH ₂
5	53,63	CH
6	207,57	C=O
7	123,58	CH
8	166,61	Cq
9	43,81	CH
10	40,76	Cq
11	70,36	H-OH
12	44,63	CH ₂
13	52,65	Cq
14	85,74	Cq
15	32,67	CH ₂
16	22,38	CH ₂
17	51,41	CH
18	19,72	CH ₃
19	25,45	CH ₃
20	78,82	Cq
21	21,82	CH ₃
22	78,65	CH
23	31,33	CH ₂
24	38,48	CH ₂
25	30,05	CH
26	24,24	CH ₃
27	23,59	CH ₃

الجدول(III-17) : قيم الازاحات الكيميائية δ لطيف الرنين النووي المغناطيسي لنواة الهيدروجين $RMN-^1H$ الخاصة بالمركب S2.

1H	δ (ppm)	التكامل	J(Hz) التعددية
1-eq	2,49	1H	dd ($J = 12,8 ; 4,2$ Hz)
1-ax	1,28	1H	dd ($J = 12,8 ; 11,0$ Hz)
2	3,92	OH β	dt ($J = 11,2 ; 4,2$ Hz)
3	3,86	OH β	q ($J = 3$ Hz)
4-ax	1,65	H	td ($J = 13,2 ; 2,5$ Hz)
4-eq	1,60	H	dt ($J = 13,2 ; 2,9$ Hz)
5	2,22	H	dd ($J = 12,1 ; 4,0$ Hz)
7	5,70	H	dd ($J = 2,7 ; 0,8$ Hz)
9	3,05	H	dd ($J = 8,7 ; 2,9$ Hz)
11	4,01	H-OH α	ddd ($J = 10,6 ; 8,8 ; 6,8$ Hz)
12-ax	2,11	H	dd ($J = 12,3 ; 10,6$ Hz)
12-eq	2,04	H	dd ($J = 12,3 ; 6,1$ Hz)
15-a	1,88	H	m
15-b	1,48	H	m
16-a	1,85	H	m
16-b	1,61	H	m
17	2,31	H	t ($J = 10,9$ Hz)
CH ₃ -18	0,77	3H	s
CH ₃ -19	0,95	3H	s
CH ₃ -21	1,10	3H	s
22	3,22 ^a	H,OH	/
23	1,15	H	m
23'	1,47	H	m
24	1,37	H	/
24'	1,15	H	/
25	1,47	H	/
CH ₃ -26	0,80	3H	d ($J = 6,5$ Hz)
CH ₃ -27	0,81	3H	d ($J = 6,5$ Hz)

III-4-2- التعيين البنوي للمركب S1

أعطى طيف الكتلة للمركب S1 المسجل بتقنية TOF-HRESI-MS الموجبة (الطيف III-41) قمة الأيون شبه الجزيئي عند $m/z = 503,2974$ الموافقة لـ $[C_{27}H_{44}O_7Na]^+$ أي $[M+Na]^+$ (الكتلة المحسوبة لـ $C_{27}H_{44}O_7Na$ $m/z = 503,2985$) و التي تؤدي إلى الصيغة المجملة $C_{27}H_{44}O_7$ ذات الكتلة الجزيئية 480 Da، هذه الصيغة تشير إلى وجود 6 روابط غير مشبعة وحلقات في الجزيء، ههذ المعطيات تذكرنا بـ C ajugasterone (المركب S2).



الطيف (41-III): طيف ^{13}C RMN للمركب S1 (CD₃OD, 500 MHz)

- فحص طيف الكربون للمركب S1 (الطيف III-42) وطيف تجربة DEPT90 و DEPT135 (الطيف III-43، III-44) وطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (الطيف III-45) وكذلك الأطياف التثائية البعد (COSY III-46، HSQC III-47، HMBC III-48) يبين أنها جميعها مطابقة لأطياف C ajugasterone كما بينت انه لا يوجد اختلاف على مستوى الحلقات الأربعة

للمركب ، من خلال قيم الازاحات الكيميائية وقيم ثوابت التزاوج (المدونة في الجداول 18-III و 19-III) المساوية لقيم الازاحات الكيميائية وقيم ثوابت التزاوج للـ *ajugasterone C* ، من جهة أخرى بينت هذه الأخيرة اتجاه β لكل من هيدروكسيلي الموضعين 2 و 3 (2-OH , 3-OH) و اتجاه α لهيدروكسيلي الموضعين 11 و 14 (11-OH , 14-OH) أي عدم تغير التشكيل الفراغي للكربونات الاربعة الحاملة للمجموعات الهيدروكسيلية الموجودة في الحلقات الأربعة.

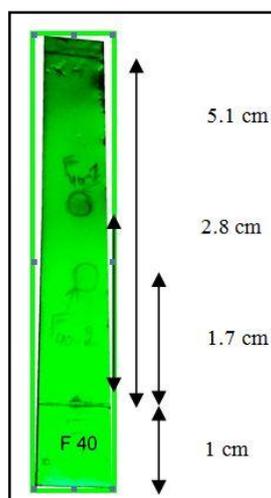
- هذه الملاحظات تشير إلى أن الاختلاف بين هاذين المركبين يمكن أن يكون في السلسلة الكربونية الخارجية المتصلة بالهيكل وبالضبط في التشكيل الفراغي (configuration absolue) للكربونين C-20 و C-22 .

- هذا الاختلاف تم التعرف عليه من خلال قيمة ثابت الإنحباس R_f المحسوب بواسطة CCM في النظام كلوروفورم-أسيتون بنسبة 4-6 (الشكل-III-29) ، حيث تبين أن قيمة R_f للمركب S1 مساوية لـ 0,55 ، وقيمة R_f للـ *ajugasterone C* هي 0,33 ومنه نستنتج أن S1 أقل قطبية من المركب *ajugasterone C*.

-تم التأكد من وجود هذا الاختلاف بين المركبين من خلال قياس زاوية التدوير النوعي

التي اعطت القيم التالية : $+18^\circ(c=0,0026, \text{MeOH})$ للمركب S1 و $+23^\circ(c=0,0026, \text{MeOH})$

للمركب *ajugasterone C* .

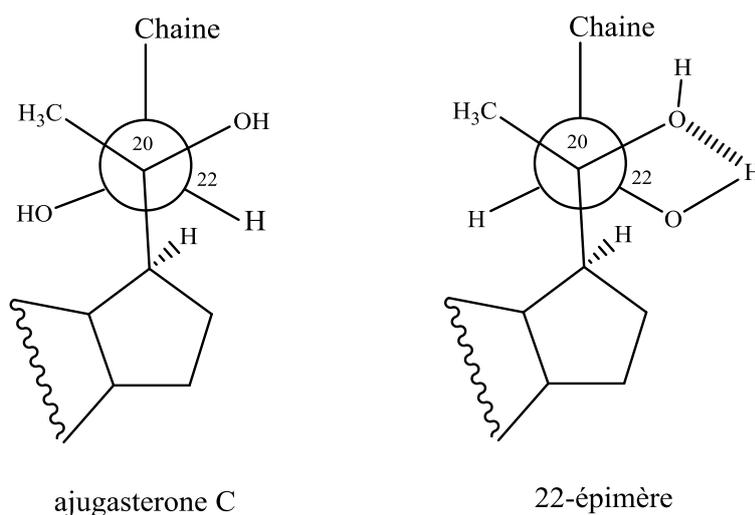


الشكل (III-29): كروماتوغرام المركب S1 والمركب S2

- بينت المقارنة الدقيقة بين أطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والكربون للمركبين تغير جد بسيط في قيم الازاحات الكيميائية ل H-17، C-17 و C-13 مقارنة بنفس الذرات في ajugasterone C هذه الملاحظات على توافق مع انعكاس التشكيل الفراغي للكربون C-22 من R في ajugasterone C إلى S في المركب S1، ومنه نستنتج أن المركب S1 هو عبارة عن épimère لل ajugasterone C. هذه النتيجة تتوافق مع نتائج دراسة *Serratula tinctoria* التي أدت إلى عزل hydroxyecdysone و 22-epi-20-hydroxyecdysone [17].

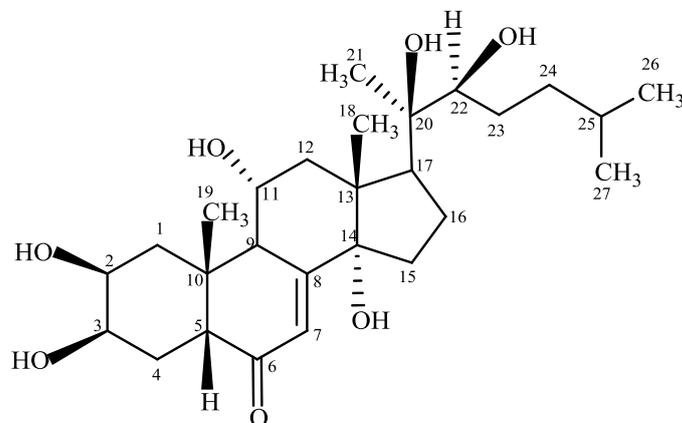
- يبين تمثيل نيومان لل ajugasterone C و 22-épimère الموضح في الشكل (30-III) أن مجموعة الهيدروكسيل الموجودة في الموضع 20 معاكسة تماما (en position anti) لمجموعة الهيدروكسيل الموجودة في الموضع 22 بالنسبة ل ajugasterone C (22-R)، مما يمنع تشكيل أية روابط هيدروجينية بين هاذين المجموعتين وهذا يجعل ajugasterone C أكثر قطبية من 22-épimère.

كما بين من جهة أخرى تمثيل نيومان ل 22-épimère أن هيدروكسيلي الموضعين 20 و 22 حسب التشكيل الفراغي للكربون 22 (S) أنهما يقعان في نفس الجهة اليسرى، مما يسمح بتشكيل روابط هيدروجينية وهذا ما جعله اقل قطبية ومنه المركب S1 هو 22-epi-ajugasterone C. 22-epi-ajugasterone C هو مركب جديد يفصل لأول مرة في المملكة النباتية.



ال شكل(30-III) : تمثيل نيومان لل ajugasterone C و المركب S1

البنية النهائية للمركب S1 موضحة في الشكل (31-III) :



الشكل (31 -III) : 22-epi- ajugasterone C

مجموع المعطيات السابقة مدونة في الجداول (18-III) و (19-III)

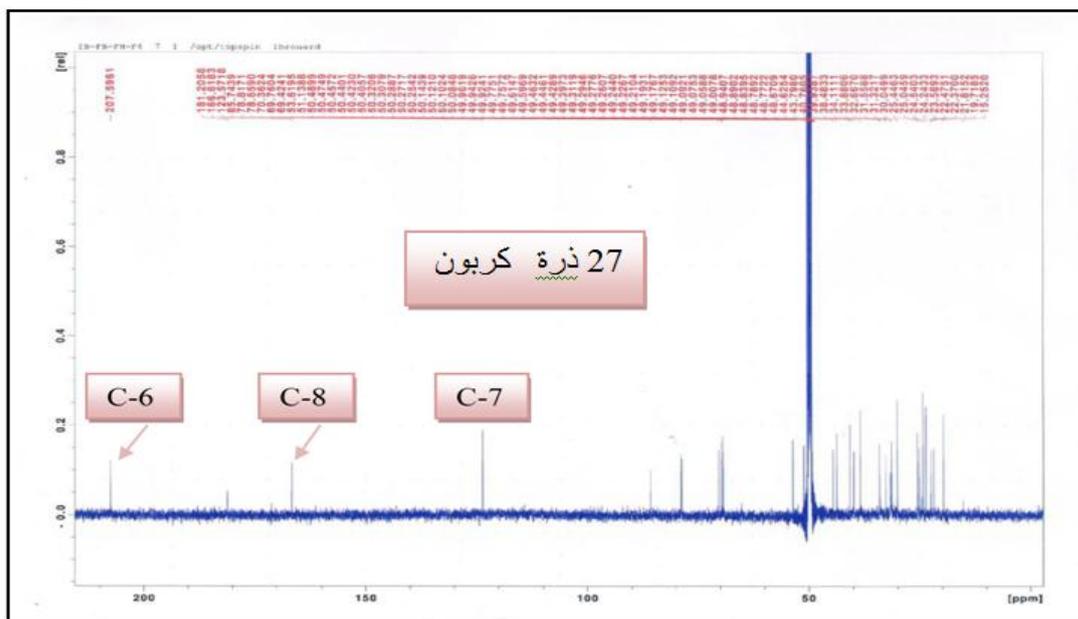
الجدول (18-III) : قيم الإزاحة الكيميائية لنواة ذرة الكربون ^{13}C -RMN ونتائج الـ DEPT-135 الخاصة

بالمركب S1

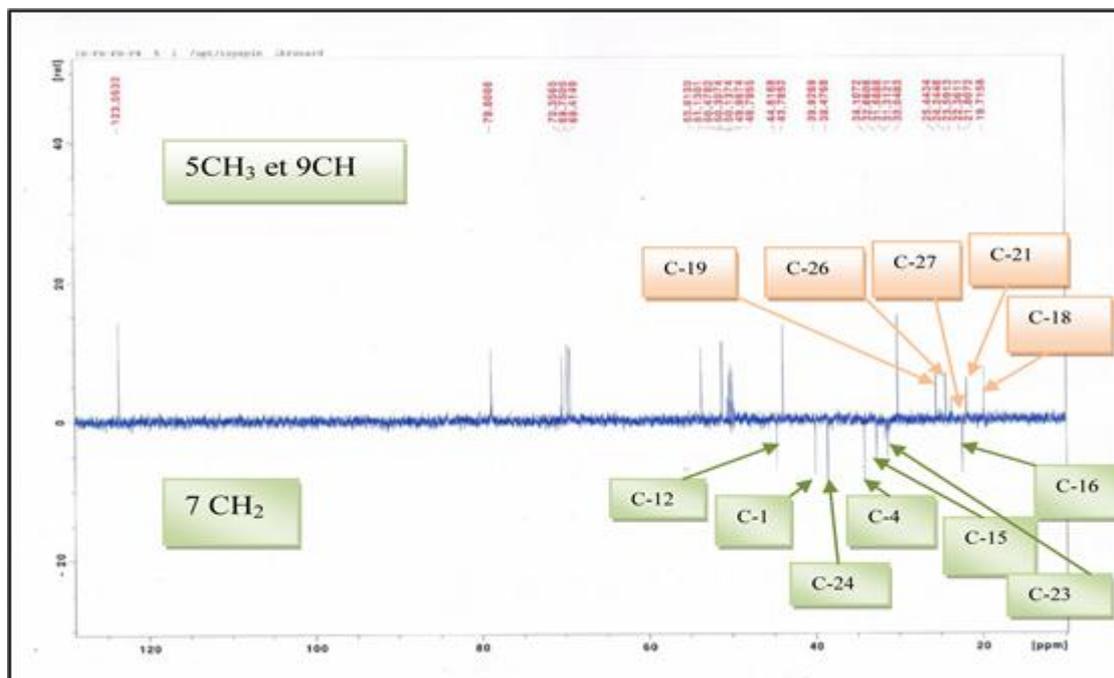
^{13}C	δ (ppm)	DEPT 135
1	69,76	CH ₂
2	69,42	CH
3	34,11	CH
4	53,62	CH ₂
5	207,60	CH
6	123,57	C=O
7	166,62	CH
8	43,80	Cq
9	40,76	CH
10	70,36	Cq
11	44,63	H-OH
12	52,30	CH ₂
13	85,74	Cq
14	32,67	Cq
15	22,37	CH ₂
16	51,13	CH ₂
17	19,72	CH
18	25,45	CH ₃
19	78,82	CH ₃
20	21,82	Cq
21	39,94	CH ₃
22	38,48	CH
23	30,05	CH ₂
24	24,24	CH ₂
25	23,59	CH
26	31,32	CH ₃
27	78,66	CH ₃

الجدول (19-III): قيم الإزاحة الكيميائية لنواة ذرة الهيدروجين ^{13}C -RMN الخاصة بالمركب S1

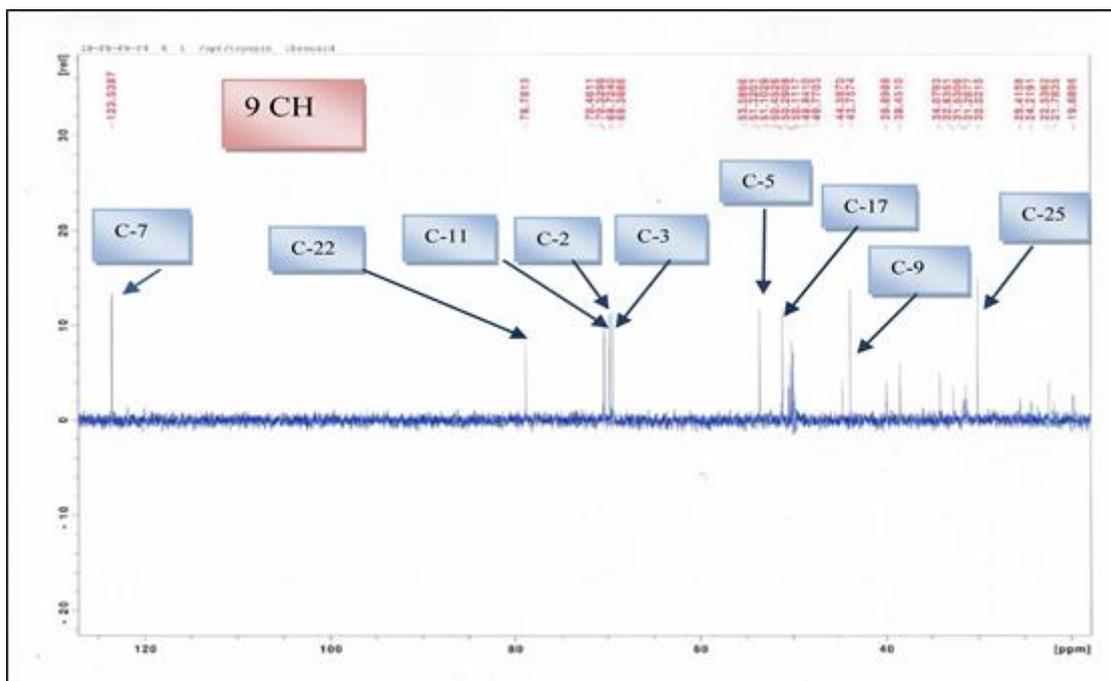
1H	δ (ppm)	التكامل	J (Hz) التعددية
1-eq	2,48	1H	dd ($J = 12,9 ; 4,3$ Hz)
1-ax	1,23	1H	dd ($J = 12,9 ; 11,2$ Hz)
2	3,92	OH β	dt ($J = 11,2 ; 4,3$ Hz)
3	3,86	OH β	q ($J = 3,0$ Hz)
4-ax	1,67	H	td ($J = 13,5 ; 2,5$ Hz)
4-eq	1,60	H	dt ($J = 13,5 ; 3,5$ Hz)
5	2,24	H	dd ($J = 12,9 ; 3,8$ Hz)
7	5,70	H	dd ($J = 2,8 ; 0,8$ Hz)
9	3,05	H	dd ($J = 9,0 ; 2,9$ Hz)
11	4,01	H-OH α	ddd ($J = 10,6 ; 8,8 ; 6,8$ Hz)
12-ax	2,09	H	dd ($J = 12,3 ; 10,6$ Hz)
12-eq	2,03	H	dd ($J = 12,3 ; 6,1$ Hz)
15-a	1,86	H	m
15-b	1,48	H	m
16-a	1,88	H	m
16-b	1,61	H	m
17	2,34	H	t ($J = 11,2$ Hz)
CH ₃ -18	0,77	3H	s
CH ₃ -19	0,97	3H	s
CH ₃ -21	1,10	3H	s
22	3,23 ^a	H	/
23	1,17	H	m
23'	1,65	H	m
24	1,37	H	m
24'	1,15	H	m
25	1.48	H	/
CH ₃ -26	0,81	3H	d ($J = 6,6$ Hz)
CH ₃ -27	0,83	3H	d ($J = 6,6$ Hz)



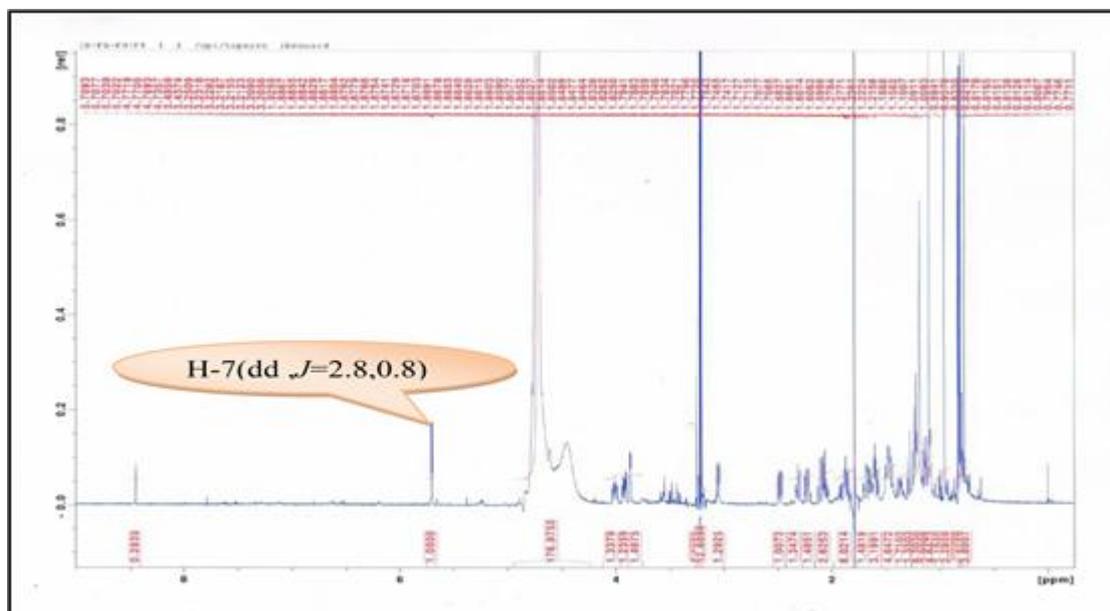
الطيف (42-III) : طيف ^{13}C RMN للمركب S1 (CD₃OD, 125 MHz)



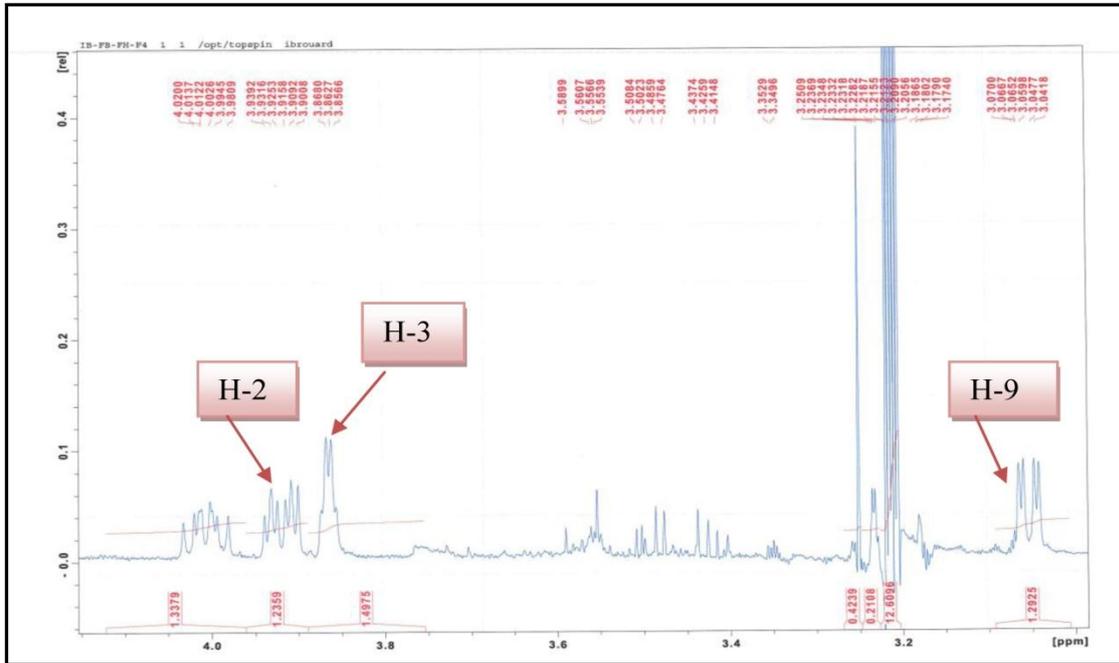
الطيف (43-III) : طيف DEPT 135 للمركب S1 (CD₃OD, 125 MHz)

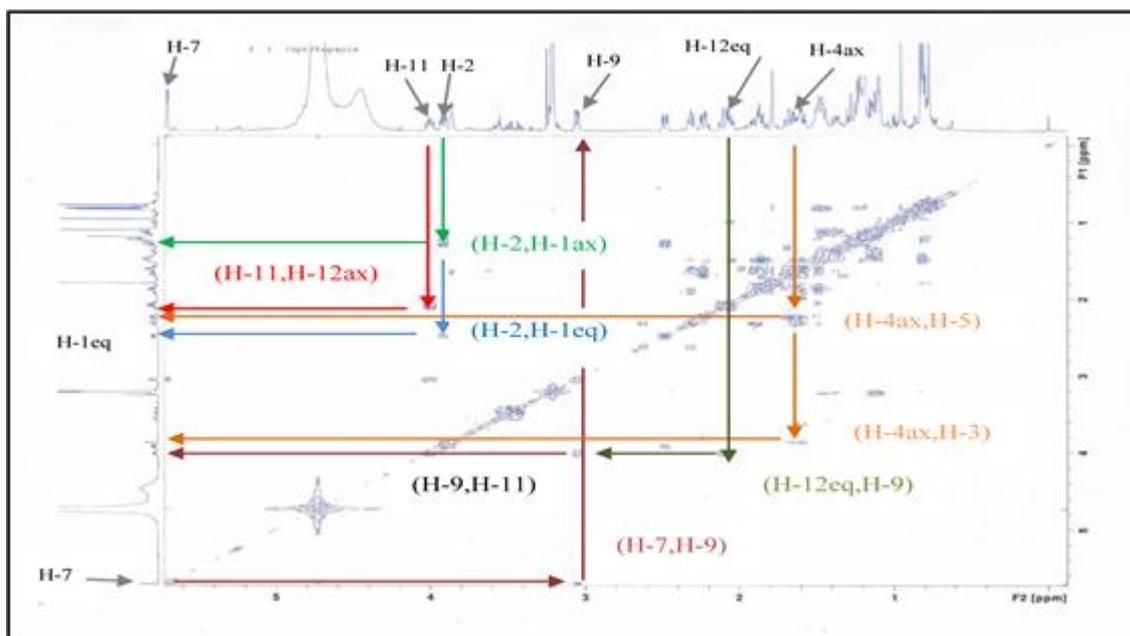


الطيف (44-III) : طيف DEPT- 90 للمركب S1 (CD₃OD, 125 MHz)

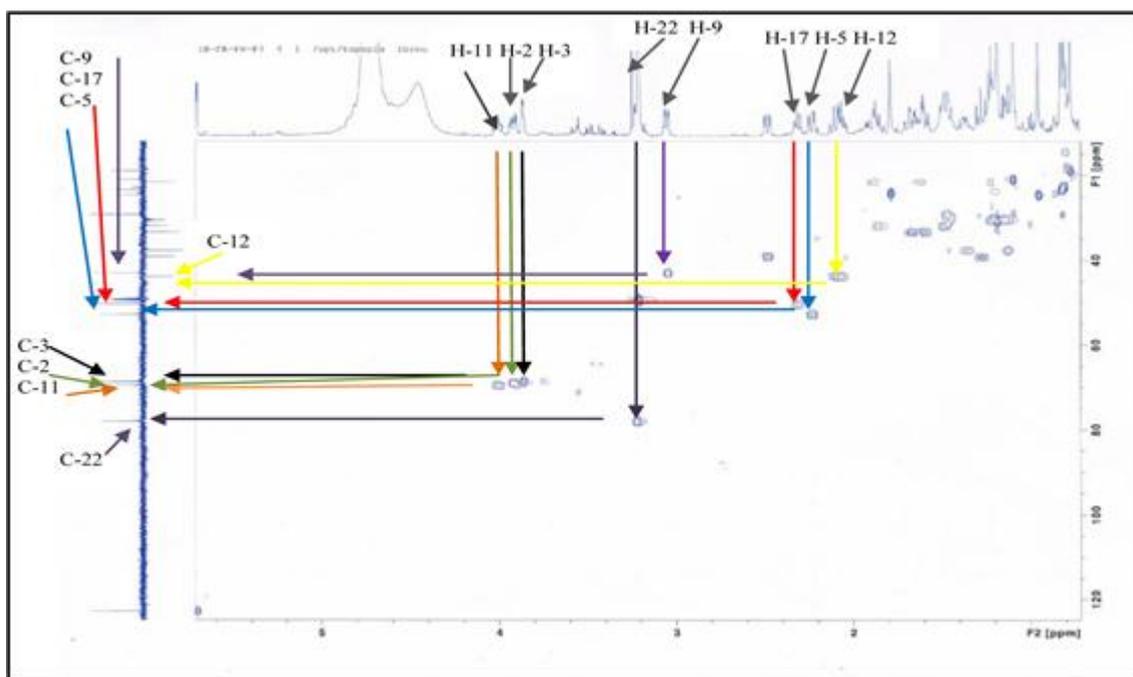


الطيف (45 -III) : طيف RMN-¹H للمركب S1 (CD₃OD, 500 MHz)

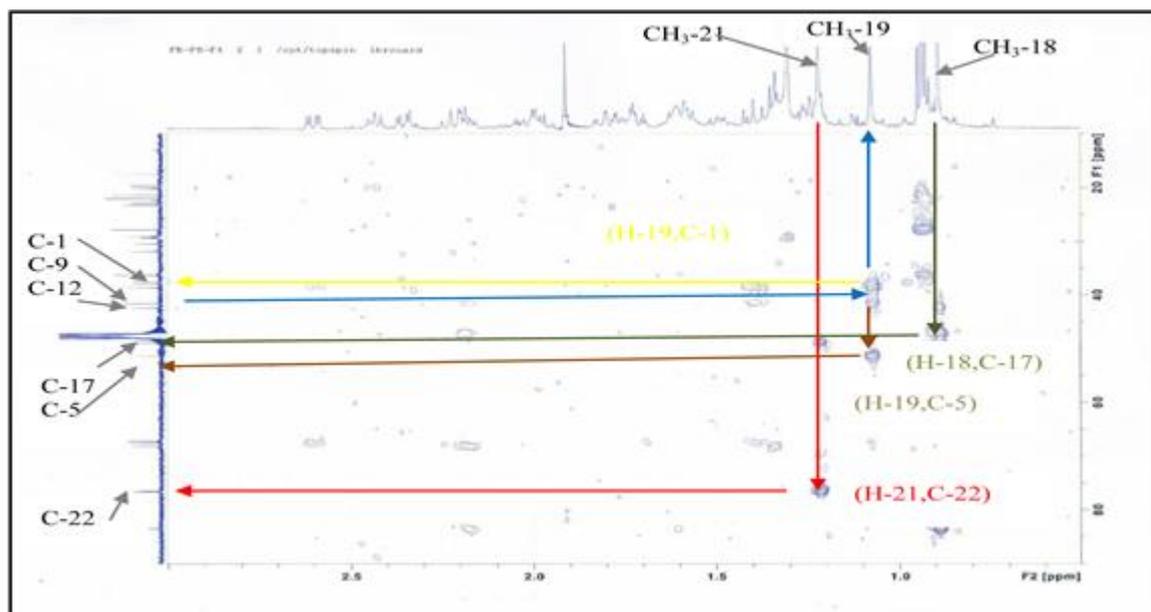




الطيف (III-46) : طيف $\text{COSY}^1\text{H}-^1\text{H}$ للمركب S1 (CD₃OD, 500 MHz)



الطيف (III-47) : طيف HSQC للمركب S1 (CD₃OD, 500 MHz)



الطيف (48-III) : طيف HMBC للمركب S1 (CD₃OD, 500 MHz)

مراجع الفصل الثالث

38. Fernandez, I.; Garcia, B .; Grancha , F. J.; Perdo, J. R. Two guaianolides from *Centaurea collina*. *Phytochemistry*, **1987**, 26(8), 2403-2405.
39. Appendino, G.; Gariboldi, P.; Belliardo, F. Sesquiterpene lactones from *Centaurea uniflora* subsp. *Nervosa*. *Phytochemistry*, **1986**, 25(9), 2163-2165.
40. Medjroubi, K.; Benayache, F.; Leon, F.; Bermejo, J. Complete assignment of the ^{13}C and ^1H NMR spectra of two known guaianolides isolated from *Centaurea musimomum*. *Rev. Colomb. Quim.*, **2003**, 32, 17.
41. Picman, A.K.; Ranieri, R. L.; Towers, G.H.N .; Lam J. Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylenes on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr. A.*, **1980**, 189(2) ,187-198.
42. Rustaiyan, A. Annual reports on NMR spectroscopy , Published by Academic press in San Diego, London, **1995**, 30, 232-242.
43. Zater H. Magister Thesis, November **2004**, University Mentouri, Constantine, Algeria.
44. Bernhard, H. O.; Thiele, K. Cynaratriol, ein neues Guajanolid aus der Kardone *Cynara cardunculus* L.und der Artischocke *C. scolymus* L.(Compositae). *Helv Chim. Acta.*, **1979**, 62(4), 1288-1297.
45. López-Rodríguez, M.; García, V.P.; Zater, H.; Benayache, S.; Benayache, F. ; Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. *Acta. Cryst.*, **2009**, E65, o1867-o1868.
46. Stevens, K.L.; Witt, S.C.; Kunt, S.; Haddon, W.F.; Benson, M. Picrolide A , an unusual sesquiterpene lactone from *Acroptilon repens*. *J. Nat. Prod.*, **1991**, 54(1), 276-280.
47. Öksüz, S.; Topcu, G. Guaianolides from *Centaurea Glastifolia*. *Phytochemistry*, 1994; 37(2), 487-490.
48. Diantini, A.; Subarnas, A.; Lestari, K.; Halimah, E.; Susilawati, Y.; Supriyatna, S.; Julaha, E.; Achmad, T.H.; Suradji, E.W.; Yamazaki, C.; Kobayashi, K.; Koyama, H.; Abdulah, R. Kaempferol 3-O -rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth. inhibitsMCF-7breast cancer cell through activation of the caspase cascade pathway. *Oncol. Lett.*, **2012**, 3, 1069-1072.

49. Jiang, X.; Shi, S.; Zhang, Y.; Chen, X. Excellent combination of HPLC-RSD-DAD-ESI/MS and HSCCC experiments to screen and identify radical scavengers from *Neo-Taraxacum siphonanthum*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, *21*, 1524-1529.
50. Chemam, Y.; Benayache, S.; Marchioni, E.; Zhao, M.; Mosset, P.; Benayache, F. On-Line Screening, Isolation and Identification of Antioxidant Compounds of *Helianthemum ruficomum*. *Molecules* .**2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22020239
51. Wei, X.; Huang, H.; Wu, P.; Cao, H.; Ye, W. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 1091-1096.
52. Odinkov, V. N.; Galyautdinov, I. V.; Nedopekin, D. V.; Khalilov, L. M.; Shashkov, A. S.; Kachala, V. V.; Dinan, L.; Lafont, R. Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32*, 161-165.
53. Buděšínský, M.; Vokáč, K.; Harmatha, J.; Cvačka, J. Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides*. *Steroids*, **2008**, *73*, 502-514.
54. Bathori, M.; Mathe, I.; Girault, J. P.; Kalasz, H.; Lafont, R. Isolation and structural elucidation of two plant ecdysteroids, gerardiasterone and 22-epi-20-hydroxyecdysone. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 415-417.

الفصل الرابع:

الفعالية المضادة للبكتيريا والفعالية

المضادة للأكسدة

IV-1- الفعالية المضادة للبكتيريا

IV-1-1- مقدمة

البكتيريا عبارة عن كائنات حية دقيقة وحيدة النوى، تم التعرف أو الكشف عنها مجهريا لأول مرة من قبل العالم الكيميائي الفرنسي باستير من خلال تجارب التخمر، كما إكتشف أيضا طعومها، وجاء بعدها العالم الألماني روبرت كوخ الذي ساهم في إكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض وهو أول من عمل مزارع نقية للبكتيريا [1-2].

توجد البكتيريا في كل مكان، فهي من أكثر الكائنات الحية وجودا بحيث تنتشر في أوساط بيئية متباينة لا تستطيع الكائنات الحية الأخرى العيش فيها، كما أنها تستطيع الإعتكاف إذا ساءت الظروف وتعود من جديد بعد حين [3] ، بسبب إحتواء الخلية البكتيرية على غلاف قاس، متماسك مسؤول عن حمايتها حيث عند تحسن الظروف تتخلص منه وترجع إلى حيوتها ونشاطها. صنف العلماء البكتيريا على عدة إعتبرات، فهمنهم من صنفها من حيث الشكل، ومنهم من صنفها حسب الوسط، التغذية، التلوين....الخ.

من حيث توزيع أسواطها [3] فيمكن تقسيمها إلى:

- بكتيريا وحيدة السوط وهي تحتوي على حالتين إما أن يكون السوط متصل بالخلية من جهة واحدة فقط وإما أن يكون السوط متصل بالخلية على إتجاهين مختلفين.
- بكتيريا ذات أسواط عديدة متجمعة عند طرف واحد.
- بكتيريا ذات أسواط عديدة موزعة على كل خلية.

من حيث الشكل [3] فيمكن تقسيمها إلى:

- بكتيريا عصوية bacilli : التي تأخذ خلاياها شكل عصويات تحت المجهر.
- بكتيريا حلزونية spiral : التي تأخذ خلاياها الشكل الحلزوني.
- بكتيريا واوية vibro : والتي تأخذ شكل حرف الواو في اللغة العربية.
- بكتيريا كروية cocci : التي خلاياها على شكل كرويات صغيرة .

من حيث الوسط الذي تعيش فيه [3] قد قسمت إلى ثلاث أنواع:

- بكتيريا هوائية aérobie: وهي التي تعيش فقط في وجود الهواء الجوي وتعتبر المصدر الأساسي لتسمم المواد الغذائية.
- بكتيريا لا هوائية anaérobie: وهي تعيش فقط في غياب الهواء الجوي.
- بكتيريا لا هوائية إختيارية anaérobie facultatives: وهي البكتيريا التي بإمكانها العيش والنمو في وجود الهواء أو عدمه.

من حيث التغذية [3] قسمت إلى نوعين:

- بكتيريا ذاتية التغذية: وهي التي تستهلك الكربون للنمو.
- بكتيريا عضوية (غير ذاتية التغذية): وهي التي تحصل على الكربون من تحليل المواد النيئة كالسكر.

من حيث طريقة التلوين (غرام) [3]:

يمكن الإختلاف في تركيب جدار الخلية بالتلوين، حسب تقنية غرام نسبة للعالم J. Gram المكتشفة سنة 1884 فقد أستتبط هذين النوعين:

- بكتيريا غرام موجب gram positif: عند تلوينها باستعمال صبغة الكريستال البنفسجي وغسلها بالماء ثم اليود وبعدها بالكحول الإيثيلي فإنها لا تفقد اللون الممتص تظهر أرجوانية.
- بكتيريا غرام سالب gram negatif: تحرر صبغة الكريستال البنفسجي وتكون عديمة اللون، يتم الكشف عنها بإضافة صبغة ثانياً وهي الصفرايين حيث تظهر باللون الأحمر.

جدار خلية بكتيريا غرام موجب أسمك من جدار بكتيريا غرام سالب.

من حيث الأثر على الإنسان [3] يمكن تقسيمها إلى نوعين:

- بكتيريا نافعة: هذه البكتيريا تتعايش مع الإنسان ولا تضره بل تحميه وتدافع عنه ضد البكتيريا الضارة فهناك نوع من البكتيريا يعيش في أمعاء الإنسان يساعد على هضم الطعام، وهناك نوع يعيش في التربة يعمل على تحليل أجسام الكائنات الميتة، وتحويل المواد العضوية المعقدة إلى مواد بسيطة لتستفيد منها التربة والنبات والحيوان.
- بكتيريا ضارة وهي نوعين:

بكتيريا إنتهازية: تعيش في جسم الإنسان دون أن تسبب أضرار صحية واضحة، إلا أنها تؤدي إلى انخفاض مناعة الجسم مما يجعله عرضة للعديد من الإلتهابات كالتهاب اللوزتين والحلق.

بكتيريا ممرضة أو الضارة: هي كائنات تهاجم الإنسان وتنتقل بين الناس محدثة لهم مشاكل. صحية مثل: السعال الديكي، التيفوئيد، الكوليرا....الخ

تتشترك جميع أنواع البكتيريا في الخصائص التالية:

- بساطة التركيب.
- قدرتها على مقاومة الظروف والتكيف معها.
- تتكاثر خلال مدة وجيزة إلى أعداد كبيرة في درجة حرارة تتراوح ما بين 37-45[3].

IV-1-2- خصائص ومميزات السلالات البكتيرية المدروسة

Pseudomonas aeruginosa: هي بكتيريا سالبة الغرام متحركة هوائية تتواجد في التربة، المياه النباتات، الجلد ومعظم البيئات سواء الطبيعية أو الإصطناعية ، تعمل على الإلتلاف السطحي للأغذية المبردة وتعد من بين المكروبات المحللة للدهون باللبن مما يؤدي إلى تغير لونه وطعمه وهي مقاومة للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات مما يجعلها من أصعب البيكتيريات معالجة ، تتكاثر وتتمو بشكل كبير في الأوساط الإستشفائية 'الألبسة، الأفرشة، الأجهزة' وهي ممرضة حيث تضعف الجهاز المناعي للجسم [3] ، تم عزلها لأول مرة سنة 1882 من طرف Gessard [1]

Escherichia coli : هي بكتيريا سالبة الغرام، تعيش في جسم الإنسان (الأمعاء) والحيوان والنبات وفي التربة تكون متحركة على شكل عصيات، تسبب العديد من الأمراض، أشهرها أمراض الجهاز البولي، الإسهال الطفيلي، إلتهاب السحايا وتسمم الدم [4-5]، تم إكتشافها من طرف Theodor Escherich سنة 1885 [1].

Klebsiella oxytoca : هي بكتيريا سالبة الغرام، هي بكتيريا عصوية الشكل، غير متحركة، ذات كبسولة بارزة مكونة من عديد السكر، تعيش في الأمعاء الغليظة للإنسان وبالتحديد في منطقة القولون، ولا يحدث التأثير المرضي لهذه البكتيريا إلا عند خروجها من منطقة القولون، فتسبب التهابات

خطيرة على مستوى الرئة، الجهاز البولي وإنتانات في الدم [5] وتأثيرها المرضي سببه إفرازها لمادة سمية لا تتأثر بالحرارة، سميت نسبة للعالم أودين كلييس [1].

Staphylococcus aureus: هي بكتيريا موجبة الغرام، كروية الشكل تسمى كوكسي ذات لون أصفر براق عديمة الحركة، تكون عناقيد على شكل أكوام تتواجد في الجلد، الأمعاء، الجهاز التناسلي وعلى الوجه [5].

هذه البكتيريا مسؤولة على تشكل الصديد وتسبب تسمم الغذاء وتسبب في التهابات جلدية خطيرة ويسبب هذا النوع العديد من الوفيات نتيجة لالتهابات الرئة، أمراض السحايا، تسمم الدم... [5]، تم إكتشاف هذا النوع من البكتيريا من طرف Pasteur سنة 1880 [1].

IV-2- الفعالية المضادة للأكسدة

IV-2-1- مقدمة

الجزور الحرة عبارة عن ذرة أو مجموعة ذرية تحتوي على إلكترونات منفردة [6] ، وقد سجلت الدراسات أكثر من 120 سببا يؤدي إلى تكوينها يأتي في مقدمتها المسببات البيئية مثل: الأشعة المؤينة الصادرة من الصناعة ، التعرض لأشعة الشمس لفترات طويلة، أشعة X والتلوث إضافة إلى مسببات فرضتها الحياة العصرية كالوجبات العالية الدهون، المواد الملونة والحافظة الموجودة في الأغذية، إضافة إلى المواد المنظفة كذلك العمليات الحيوية الطبيعية التي تحدث داخل جسم الإنسان والذي يحاول أن ينظم تركيزها لذلك فإن تواجدها في الدم بتركيز منخفض يعتبر أمرا طبيعيا ولكن المشكلة عندما يزيد تركيزها داخل الجسم.

إن الخطر الرئيسي الناتج عن الجزور الحرة يكمن في التلف الناتج عن تفاعلها مع أهم مكونات الخلية الحرة وهو الحامض النووي DNA أو مع جدار الخلية ما يؤدي إلى تدميرها وعدم قدرتها على القيام بوظائفها بالشكل المطلوب، وتؤدي الجزور الحرة دورا هاما في حالات الإصابة بالأمراض مثل: مسببات السرطانات والشيخوخة المبكرة والأمراض النفسية والعصبية وأمراض الأوعية القلبية.... الخ.

والجزور الحرة هي إما مشتقات أكسجينية (ROS (espèce d'oxygène radical) [7] ،
(radical anion superoxyde) O_2^- ، (radical hydroxyle) OH \cdot أو مشتقات لذرات أخرى كالآزوت أكسجينية (espèces d'azote radical) RNS ، كما أن هناك أنواع أخرى مشتقة من

الأكسجين تسمى أنواع أكسجينية نشطة مثل الأكسجين المنفرد O_2^1 وثنائي أكسيد الهيدروجين $[8]H_2O_2$ ، وثنائي أكسيد الآزوت ONOOH هذه الأنواع الأخيرة ليست جذور حرة لكنها تعتبر بواذر للجذور الحرة [9 - 11] .

لذلك ونتيجة لأضرار هذه الجذور وتأثيرها على الصحة ومن أجل حياة خالية من الآلام تركزت الأبحاث حول هذا الموضوع بشكل جاد خصوصا حول مضادات الأكسدة.

IV-2-2- مضادات الأكسدة

الأكسدة تفاعل كيميائي يؤدي إلى فقدان المادة إلكترون أو أكثر، إذ تعتبر من التفاعلات الأساسية و المهمة في جسم الإنسان ، فمن خلالها يقوم الجسم بتوفير الطاقة التي يحتاجها عن طريق أكسدة الغذاء في وجود الأكسجين ، ولكن كما سبق الذكر ما لا تحمد عقباه هو نواتج تلك الأكسدة (الجذور الحرة) حيث تأتي مضادات الأكسدة وهي مركبات ترتبط بالجذور الحرة فتعمل على تدميرها، إذ تتمتع هذه المركبات بميزة أنها قابلة للأكسدة من قبل الجذور الحرة و بهذا فهي تحمي المركبات العضوية في الجسم من الأكسدة ونجدها بشكل طبيعي في الأغذية التي تحتوي على فيتامينات Beta carotène، C، E و الفيتامين A (كبد، بيض، الفواكه الحمضية، اللوز، الأسماك...) ومركبات طبيعية مثل متعددات الفينول كالفلافونويدات و بعض المعادن خاصة الزنك Zn السيلينيوم Se والنحاس Cu إذ تعتبر كل هذه المضادات السابقة الذكر مضادات ذات مصدر خارجي، كما توجد مضادات ذات مصدر داخلي وهي المضادات الإنزيمية، (الجلوتاثيون glutathione، السوبر أكسيد ديسموتيز superoxide peroxidase و dismutase) [12-15] ورغم تنوع مضادات الأكسدة فإنها تؤثر على مستويين:

- الوقاية من الإنتاج المفرط للجذور الحرة.

- الأسر الجذري من خلال إنتقاط الإلكترونات العازية للجذور الحرة وتحويلها إلى جزيئات ثابتة.

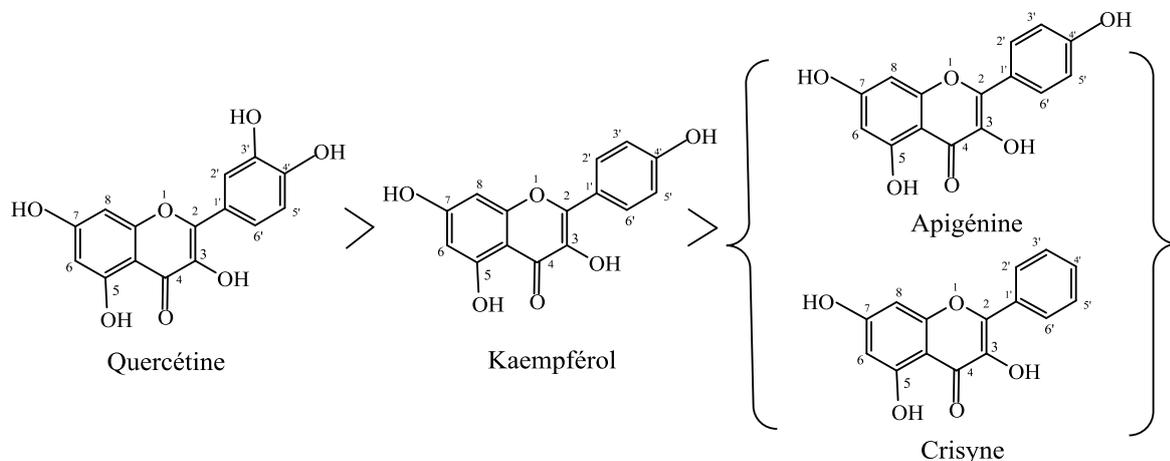
IV-2-3- الفلافونويدات و الفعالية المضادة للأكسدة [16-17]

من أهم مميزات الفلافونويدات هو نشاطها المضاد للأكسدة و الناتج عن خاصيتها القابلة للأكسدة والإرجاع، حيث توصلت الأبحاث التي إهتمت بالعلاقة بين البنية الكيميائية للفلافونويد ونشاطه

المضاد للأكسدة للتوصل إلى التعرف على المجاميع والمواقع النشطة في الآلية المضادة للأكسدة والتمثلة في:

- مجموعة الهيدروكسيل في الموضعين 5,7 للحلقة A : أكدت الدراسات أن الفعالية المضادة للأكسدة للفلافونويدات ترجع إلى وجود مجموعات هيدروكسيلية في الموقع 5,7 وكذلك 3',5' حيث كلما زادت هذه المجاميع تؤدي إلى إستقرار الفلافونويد بعد فقد بروتونه خلال عملية الأكسدة وكلما نقصت تراجعت فعاليته.

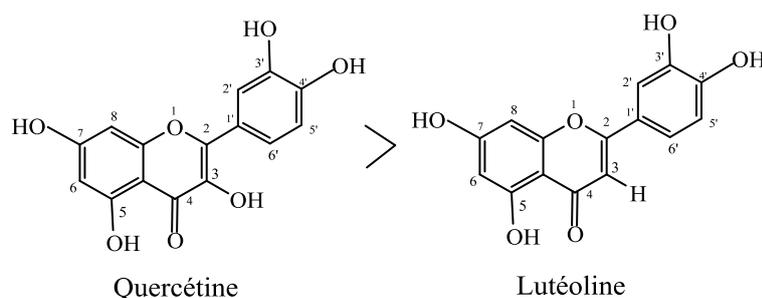
- مجموعة أروثو ثنائي الهيدروكسيل 3',4' : غياب أحد الهيدروكسيلات المتواجدة على الحلقة B يخفض كثيرا من الفعالية المضادة للأكسدة للجزيئة ونلاحظ هذا واضحا عند مقارنة فعالية quercétine بـ kaempférol (3,5,7,4'- tetra-OH) وكذلك عند مقارنة قيمة فعالية kaempférol بـ chrysin و (5,7- di-OH) apigénine (الشكل IV-1)



الشكل (I-IV) : تأثير مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3', 4' على الفعالية

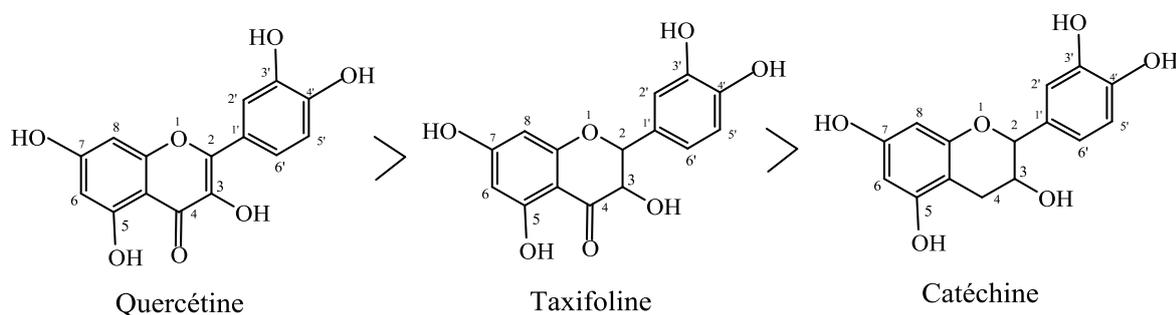
المضادة للأكسدة

- مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للحلقة C: حيث بينت الدراسات أن غياب الهيدروكسيل الحر في الموضع 3 ينقص من الفعالية المضادة للأكسدة بشكل واضح فعند مقارنة مثلا فعالية (3,5,7, 3',4'- pent-OH) quercétine مع (5,7,3',4'- tetra-OH) lutéoline نلاحظ انخفاض واضح جدا في الفعالية (الشكل IV-2) .



الشكل (2-IV) : تأثير مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 على الفعالية المضادة للأكسدة

- الرابطة غير المشبعة بين الموقعين (C₂,C₃) والمترافقة مع مجموعة الكربونيل C₄ للحلقة C: بينت الأبحاث أن غياب الرابطة الثنائية أو مجموعة الكربونيل يرافقه تراجع في الفعالية المضادة للأكسدة وهذا ما لوحظ عند مقارنة فعالية quercétine مع taxifoline هذا الأخير الذي لا يحتوي على الرابطة الثنائية بين C₂ و C₃ أو مع catéchine الذي لا يحتوي على الرابطة الثنائية ولا على الوظيفة الكربونيلية (الشكل IV-3) .



الشكل (3-IV) : تأثير الرابطة غير المشبعة للحلقة C على الفعالية المضادة للأكسدة

IV-2-4- الإختبارات المستعملة لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة

مع التطور العلمي في السنوات الأخيرة تم إكتشاف عدة تقنيات لتحديد ومعرفة ما إذا كان المركب له فعالية مضادة للأكسدة أم لا ومن أكثر الإختبارات إستعمالا [18] : 2.2-diphényl-1-picryl hydrazyl :

• إختبار DPPH

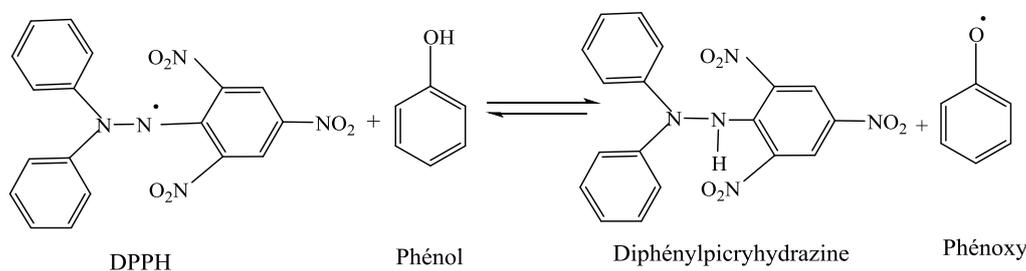
• إختبار CUPRAC

• إختبار acid sulfonique 2.2- azio-bis-3-ethylbenzothiazoline ABTS

خلال هذا البحث قمنا باختيار إختبارين وهما إختبار DPPH وإختبار CUPRAC لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الثلاث (مستخلص الكلوروفورم- مستخلص أسيتات الإيثيل- مستخلص البوتانول) لنبات *Centaurea solstitialis*.

مبدأ إختبار DPPH

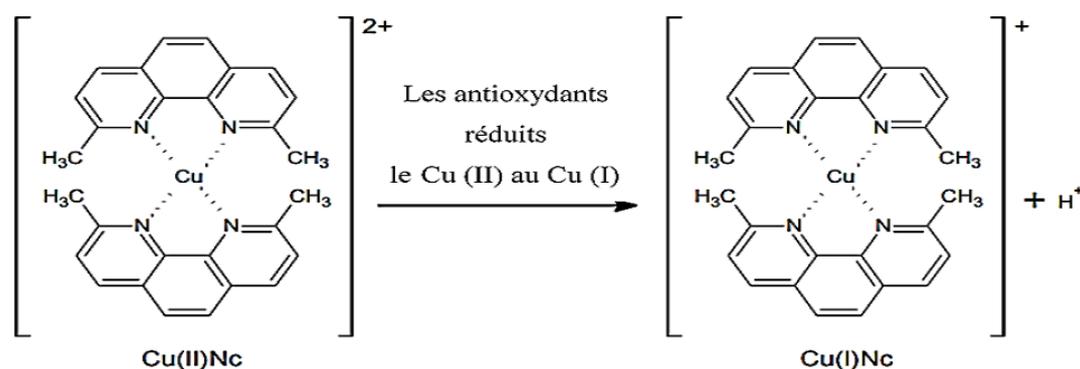
يسمح هذا الإختبار بتقييم قدرة المستخلص على أسر والتقاط الجذور بالطريقة اللونية [19] وذلك باستعمال الجذر الحر الثابت DPPH ، حيث يرجع هذا الأخير (جذر DPPH) بالجزئيات المانحة للمستخلص المختبر (الجزئيات المضادة للأكسدة الموجودة في المستخلص) حيث يتم إرجاع جذر DPPH باقتناصه لذرة هيدروجين إلى مركب DPPH-H هذا الإرجاع يصاحبه تغير في اللون من البنفسجي إلى الأصفر ونقص في الإمتصاص بدلالة الزمن عند طول موجة 517 nm، كما هو موضح في الشكل IV-4.



الشكل (4-IV): الصيغة الجذرية ل DPPH وتفاعله مع الفينول

مبدأ إختبار CUPRAC

يعتبر هذا الإختبار من الاختبارات الأكثر دقة في تقييم الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات ويعتمد أساسا على إرجاع (Cu (II) إلى Cu(I) من خلال ارجاع معقد (Cu-NC) cuivre-neocuproéne حسب التفاعل الموضح في الشكل (5-IV) و ذلك من خلال الجزئيات المضادة للأكسدة الموجودة في المستخلص أو المركب، هذا الإرجاع يصاحبه نقصان في الإمتصاص بدلالة الزمن عند طول موجة 450 نم.



الشكل (5-IV) : ارجاع معقد cuivre-neocuproéne

3-IV- دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا لنبات *Centaurea solstitialis ssp. schouwii* (DC.)

1- طريقة العمل

- سلالات الاختبار : تم الحصول على السلالات البكتيرية *Pseudomonas aeruginosa* ، *Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella oxytoca* ، *Escherichia coli* من مخبر علم البكتيريا والطفيليات بالمستشفى الجامعي ابن باديس - قسنطينة.
- الاختبار البيولوجي : تمت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا باستعمال تقنية الأقراص كما هو معمول به في إدارة الغذاء والدواء بالولايات المتحدة الأمريكية [20] ، زراعة البكتيريا تمت باستعمال محلول ملحي معقم للحصول على اضطراب أو غباشة مساوية للكثافة الضوئية 0,08-0,1 عند طول موجة 625 nm .

تحضر الأقراص من ورق واتمان رقم (03) ذو قطر 6 mm مشبعة ب 10 µl من كل تخفيف من

المستخلصات المحضرة والمركب C1 بتركيز 1/1,25g، بعد التجفيف توضع هذه الأقراص على سطح أطباق بتري الحاوية على الاجار المغذي بسمك 4 mm المزروع بمختلف أنواع البكتيريا المحضرة من مزرعة فتية (18 ساعة) ، وذلك باستعمال طريقة المسح ويستعمل الايثانول و gentamicine كشاهد ، تحضن الأطباق في درجة حرارة 37°C .

بعد مرور 18 ساعة من التحضين تسجل النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط بواسطة مسطرة لمعرفة مدى تأثير المستخلصات والمركب A 4β,15-dihydro-3-dehydrosolstitialine على البكتيريا.

ب- النتائج والمناقشة

النتائج المحصل عليها عند قياس منطقة التثبيط مدونة في الجدول (I-IV) .

الجدول (I-IV) : الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلصات الثلاثة (كلوروفورم- أسيتات الإيثيل-

البوتانول) ومركب A 4β, 15-dihydro-3-dehydrosolstitialine : للنبته *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.)

القطر (mm)								الشواهد		السلالة البكتيرية
1/5 v/v				1/10 v/v						
A	B	C	C1	A	B	C	C1	EtOH	Gentamicine	
32	07	-	10	30	06	-	07	-	16	<i>P.aeruginosa</i>
22	07	-	12	20	06	-	10	-	30	<i>E. coli</i>
18	08	05	28	19	12	-	20	-	20	<i>K. oxytoca</i>
11	21	05	16	9	16	-	12	-	35	<i>S. aureus</i>

A : مستخلص الكلوروفورم

B : مستخلص اسيتات الايثيل

C : مستخلص البوتانول

C1 : A 4β, 15 -dihydro -3-dehydrosolstitialine

- أظهر المركب السيسكويتريني اللاكتوني A 4β, 15 -dihydro -3-dehydrosolstitialine فعالية مضادة للبكتيريا معتبرة مع كل السلالات المدروسة السالبة الغرام والموجبة الغرام، حيث وصل قطر

التثبيط مع *K. oxytoca* 28 مم و 16 مم مع *S. aureus* غير أن هذه الفعالية تراجعت قيمتها قليلا كما هو ملاحظ من خلال أقطار التثبيط عند تخفيف تركيز اللاكتون السييسكويتريني. أما فيما يخص مستخلص خلات الإيثيل فقد أعطى فعالية مضادة للبكتيريا مع السلالة البكتيرية الموجبة الغرام فقط (*S. aureus*)، وفعالية منخفضة مع السلالات البكتيرية الأخرى. بينما لم يظهر مستخلص البوتانول أية فعالية مضادة للبكتيريا مع جميع السلالات البكتيرية. أما فيما يخص مستخلص الكلوروفورم فهو الذي أبدى فعالية أكبر مع جميع السلالات المرجعية مقارنة بالمستخلصين السابقين حيث وصل قطر التثبيط إلى 32 مم مع *P. aeruginosa* وحافظ على هذه القدرة مع التخفيف وهذا ما لاحضناه من القيم المتحصل عليها.

IV-4- تقدير المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات لنبات *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.)

أ- تقدير المحتوى الكلي للفينولات

تم تقدير المحتوى الكلي للفينولات من خلال كاشف Folin-ciocalteu كما يبينه Singleton [21] حيث تخط 100 µl من المستخلص مع 250 µl من الكاشف السابق (1N) ثم تترك لمدة دقيقتين . تضاف 1250 µl من كربونات الصوديوم (20%) و تخط جيدا و تترك في درجة حرارة الغرفة في الظلام لمدة ساعتين . تقرأ الامتصاصية عند 765 nm وتقدر الفينولات الكلية من خلال منحنى قياسي باستخدام حمض الغاليك (25-200 mg/l) . يعبر عن النتائج على صورة مكافئ mg حمض الغاليك (GAE) / غ من المستخلص .

ب- تقدير الفلافونويدات :

تم تقدير المحتوى الكلي للفلافونويدات باستخدام طريقة Türkoğlu [22] . يضاف حجم 0,5 مل من 2% $AlCl_3$ محضر في الإيثانول إلى 0,5 مل من محلول العينة . يترك لمدة ساعة في حرارة الغرفة ثم تقرأ الامتصاصية عند 415 nm يدل اللون الاصفر على وجود الفلافونويدات ، تقدر عينات المستخلص بتركيز نهائي قدره 0,1µg/ml . ثم تقدر الفلافونويدات من خلال منحنى قياسي باستخدام

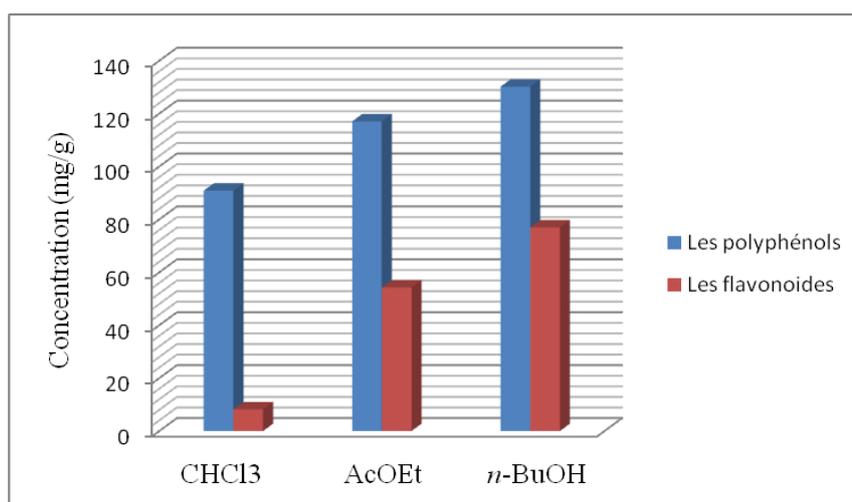
الكيرستين (25-200 mg/l) ، يتم التعبير عن النتائج على صورة مكافئ mg كيرستين/(QE) غ من المستخلص.

النتائج المحصل عليها مدونة في الجدول (2-IV) وتم تمثيلها في الشكل (6-IV).

ج- النتائج والمناقشة

الجدول (2-IV) : المحتوى الكلي للفينولات والفلافونيدات لنبات *Centaurea solstitialis*

المستخلصات	تقدير المحتوى الكلي للفينولات (mg GAE/g extract)	تقدير المحتوى الكلي للفلافونيدات (mg QE/g extract)
مستخلص الكلوروفورم	90,90 ± 4,37	8,2 ± 0,57
مستخلص أسيتات الإيثيل	117,08 ± 8,54	54,31 ± 2,87
مستخلص البوتانول	130 ± 4,71	76,97 ± 6,19



الشكل (6-IV): كمية متعددات الفينول والفلافونويدات في المستخلصات الثلاثة للنبات

C. solstitialis

- نلاحظ من النتائج المحصل عليها أن المركبات متعددة الفينول قد بلغت قيمتها في المستخلص

البوتانولي 130 ± 4,71 ، وهي أعلى من الكمية المتحصل عليها في المستخلصين الإيثياتي

(117,08 ± 8,54) والكلوروفورمي (90,90 ± 4,37) ، كما بينت هذه الدراسة كمية أحد أهم أقسام

المركبات متعددة الفينول المتمثلة في الفلافونويدات والتي حددت ب 76,97 ± 6,19 في المستخلص

البوتانولي و $54,31 \pm 2,87$ في المستخلص الاسيتاتي، نستنتج من هذه النتائج غنى مستخلصي البوتانول وأسيئات الايثيل لنبات *C. solstitialis* بنواتج الايض الثانوي الفلافونويدي.

5-IV- دراسة الفعالية المضادة للأوكسدة لنبات (*Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.)

1-اختبار DPPH

- من أجل تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة DPPH تم إتباع طريقة Blois (1985) [23] ، حيث تم استخدام butylhydroxydroyanisole (BHA), butylhydroxytoluene (BHT), α -tocopherol كمضادات أكسدة وكشواهد.
- تم قياس الكثافة الضوئية عند طول الموجة 517 nm، مقابل الشواهد السابقة في نفس الشروط.
- حددت قدرة المستخلص على أسر والنقاط الجذور الحرة بالنسبة المئوية لإرجاع الجذر الحر الثابت DPPH من خلال العلاقة التالية:

$$\% \text{inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

مع العلم أن:

A control: يمثل الكثافة الضوئية لـ DPPH في الميثانول.

A sample: الكثافة الضوئية لـ DPPH في المستخلص المراد تقدير فعاليته.

- تعريف IC_{50} :** هي تركيز المستخلص اللازم لأسر 50% من الجذور الحرة، يمكن حسابه من خلال المنحنى البياني من خلال قيمة التركيز الموافق لـ 50%.
- النتائج المحصل عليها مدونة في الجدول (3-IV) وممثلة في الشكل (7-IV).

ب-اختبار CUPRAC

- تم تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة باتباع طريقة Apak [24] ، حيث تم استخدام Butylhydroxydroyanisole (BHA) , butylhydroxytoluene (BHT) كمضادات أكسدة وكشواهد.
- حيث تم إعادة التجارب ثلاث مرات و اعتبرت الفروق معنوية عند $P < 0.05$ والنتائج المحصل عليها مدونة في الجدول (4-IV) وممثلة في الشكل (8-IV).

ج- النتائج والمناقشة

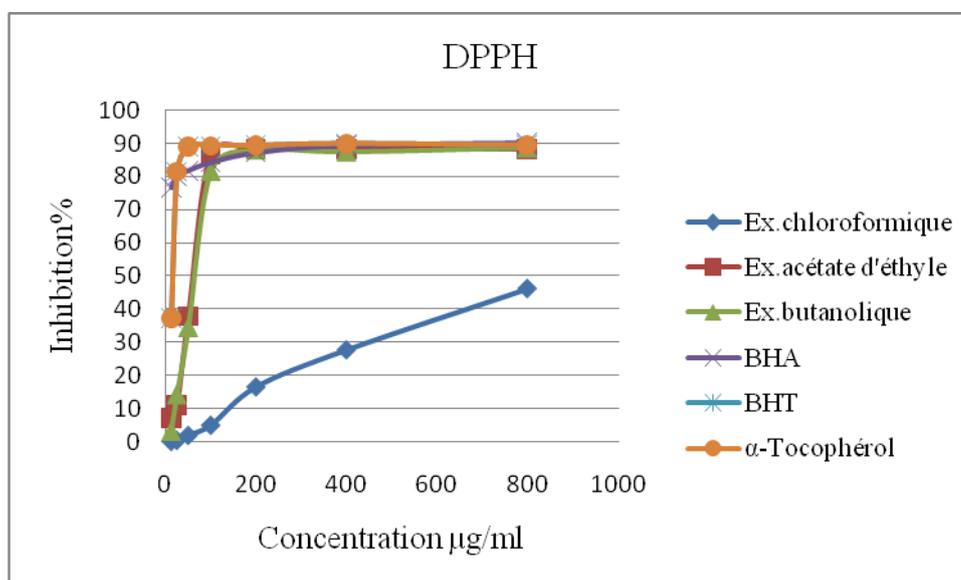
الجدول (3-IV) : تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة باستعمال إختبار DPPH

IC ₅₀ µg/ml	% Inhibition إختبار DPPH							المستخلصات
	800 µg	400 µg	200 µg	100 µg	50 µg	25 µg	12.5 µg	
≥ 800	46,29± 0,74	27,80± 0,59	16,63± 2,93	5,08± 1,71	NA	NA	NA	مستخلص الكلوروفورم
44.01±1.06	88,19± 0,00	88,27± 0,71	88,10± 0,53	86,39± 0,56	37,99± 4,04	11,07± 0,22	7,22± 0,22	مستخلص اسيتات الايثيل
65.46±3.07	88,70± 0,00	87,50± 3,08	88,06± 0,64	81,60± 1,97	34,61± 3,92	14,36± 3,24	3,32± 0,77	مستخلص البوتانول
6.14±0.41	90,14±0,00	89,36±0,19	87,13±0,17	84,18±0,10	81,73±0,10	79,89± 0,26	76,55± 0,48	BHA ^b
12.99±0.41	95.02±0,23	95.38±0,41	94.97±0,08	94.00±0,31	88.73±0,89	72.63± 2,06	49,09± 0,76	BHT ^b
13.02±5,17	89,52±0,33	89,99±0,23	89,45±0,22	89,38±0,19	89,23±0,12	81,53±1,51	37,21±1,82	α-Tocopherol ^b

^a القيم المعبر عنها ±S.D هي قيم متوسطة لثلاث تجارب متتالية.

^b المركبات المرجعية.

NA : لم تمتص



الشكل (7-IV) : مقارنة الفعالية المضادة للأوكسدة (DPPH) للمستخلصات الثلاثة للنبتة

مع *C. solstitialis* α-tocopherol ، BHA و BHT كشواهد.

- أبدى الطور الأسيثاتي كفاءة معتبرة في أسر جذر الـ DPPH إنطلاقاً من تراكيز منخفضة حيث قدرت قيمة IC_{50} $\mu\text{g/ml}$ ب 44.01 ± 1.06 ، كذلك هو الحال بالنسبة لطور البوتانول الذي قدرت فيه قيمة IC_{50} $\mu\text{g/ml}$ ب 65.46 ± 3.07 ، بينما أبدى طور الكلوروفورم تراجع في أسر جذر DPPH يمكن تفسير هذه النتائج من خلال الدراسات السابقة والتي بينت بأن القدرة المانعة للتأكسد مع الجذر DPPH تتوقف على عدد جزيئات DPPH التي يمكنها أن ترتبط بمجاميع الـ OH [16-17] ، وهذا ما سبق ذكره حيث إقتناص الهيدروجين الفينولي للجزيئية المانحة للإلكترون يجعل من الجذر بنية مستقرة. ومنه يمكن تفسير هذه النتائج بالرجوع إلى المحتوى الكلي للفلافونويدات الذي بين غنى هاذين المستخلصين (الاسيثاتي والبوتانولي) بالمركبات الفلافونويدية مقارنة بمستخلص الكلوروفورم مما جعل قابلية المستخلصين الأولين لإلتقاط الجذور الحرة أكبر وبالتالي كانت كفاءة المستخلصين أفضل مقارنة بمستخلص الكلوروفورم عند جميع التراكيز .

كما يمكن استنتاج بأن الطور الأسيثاتي لنبات *C. solstitialis* يملك كفاءة نوعاً ما معتبرة إذا ما قورن بالشواهد المستعملة BHA ($IC_{50} = 6.14 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$) و BHT ($IC_{50} = 12.99 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$) و α -tocopherol ($IC_{50} = 13.02 \pm 5.17 \mu\text{g/ml}$) .

للتأكد من هذه النتائج أخضعت هذه المستخلصات إلى اختبار CUPRAC فاعطت النتائج التالية

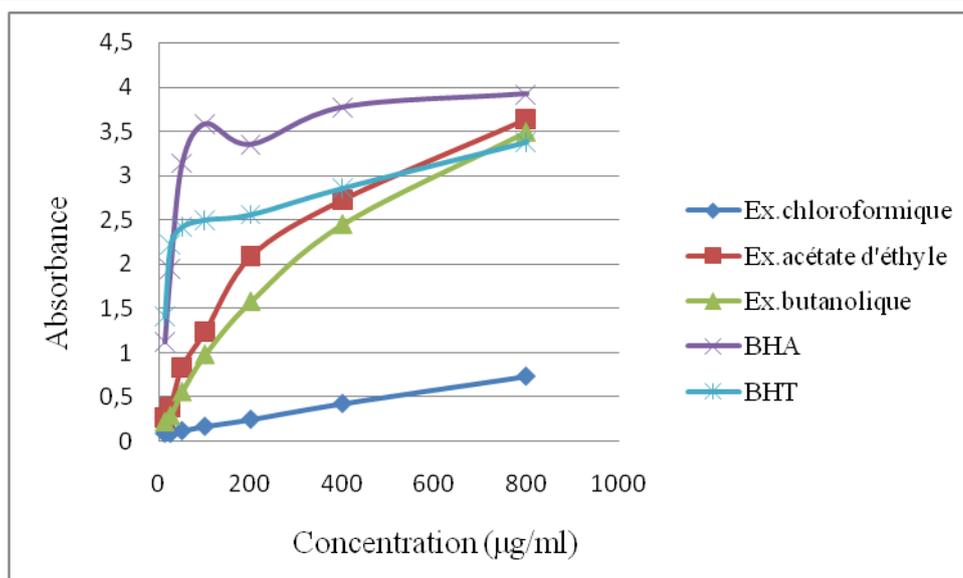
الجدول (4-IV) : تقدير الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال إختبار CUPRAC

A _{0.50} $\mu\text{g/ml}$	% Inhibition CUPRAC إختبار							المستخلصات
	800 μg	400 μg	200 μg	100 μg	50 μg	25 μg	12.5 μg	
515.33±39.56	0,74±0,04	0,43±0,04	0,25±0,01	0,17±0,02	0,12±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01	مستخلص الكلوروفورم
30.93±2.50	3,64±0,39	2,73±0,72	2,09±0,44	1,24±0,28	0,84±0,12	0,39±0,09	0,27±0,04	مستخلص اسيتات الايثيل
44.80±3.74	3,49±0,32	2,45±0,33	1,58±0,12	0,98±0,20	0,56±0,04	0,29±0,01	0,22±0,02	مستخلص البوتانول
5,35±0,71	3,92±0,13	3,77±0,19	3,35±0,20	3,58±0,42	3,14±0,46	1,95±0,31	1,12±0,05	BHA ^b
8,97±3,94	3,38±0,13	2,86±0,07	2,56±0,05	2,50±0,01	2,42±0,02	2,22±0,05	1,41±0,03	BHT ^b

^a القيم المعبر عنها \pm S.D هي قيم متوسطة لثلاث تجارب متتالية .

^b المركبات المرجعية.

NA : لم تمتص



الشكل (8-IV): مقارنة الفعالية المضادة للأوكسدة (CUPRAC) للمستخلصات الثلاثة للنبات

مع *C. solstitialis* وBHA وBHT كشواهد.

- أعطى المستخلص الأسياتي فعالية جد معتبرة حيث قدرت قيمة $A_{0.50}$ ب $30.93 \pm 2.50 \mu\text{g/ml}$ كما أبدى المستخلص البوتانولي فعالية مضادة للأوكسدة نوعا ما معتبرة ، قدرت قيمة $A_{0.50}$ ب $44.80 \pm 3.74 \mu\text{g/ml}$ مقارنة بالشواهد المستعملة BHA ($A_{0.50} = 5,35 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$) و BHT ($A_{0.50} = 8.97 \pm 3.94 \mu\text{g/ml}$) هذه النتائج على توافق مع نتائج اختبار DPPH لكن يعتبر اختبار CUPRAC أكثر دقة ، نستنتج أن مستخلص أسيتات الايثيل لنبات *C. solstitialis* يملك فاعلية مضادة للأوكسدة أكبر مقارنة بباقي المستخلصات.

مراجع الفصل الرابع

1. Ferron, A. Bactériologie médicale, à l'usage des étudiants en médecine. 8^{ème} édition. Edité par Groun & Roques, **1976**.
2. Ullmann, A. Pasteur -Koch: Distinctive Way of Thinking about Infectious Diseases. *J. Virol.*, **2007**, 2(8), 383-387.
3. Guespin-Michel, J. Les bactéries, leur monde et nous. Vers une biologie intégrative et dynamimique. Edité par Dunod, **2015**.
4. Avril, J. L.; Dabernat, H.; Denis, F.; Monteil, H. Bactériologie Clinique. 1^{ère} édition. Edité par Ellipses, Paris, **1992**, 298-312.
5. Berche, P.; Gaillard, J.L.; Simont, M. Bactériologie: les bactéries des infections humaines. Flammarion, Paris, **1991**.
6. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence . *The Lancet.*, **1994**, 344-721
7. Buak Cimen, M.Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta.*, **2008**, 390 (1-2),1-11.
8. Gutman, J. Glutathione aide essentielle à une bonne santé. Gutman & Schettini Inc., Montréal, Canada. **2001**.
9. Favier, A. Mécanismes biochimiques. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. **2003**, 108.
10. Fontaine, E. Production et élimination des radicaux libres oxygénés parentérale, département de médecine aiguë spécialisée. Hôpital Albert Michallon, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, **2009**.
11. Pryor, W. A.; Houk, K. N.; Foote, Ch.S.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J.; Squadrito, G.L.; Davies, K.J.A. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2006**, 291, R491.
12. Scandalios, J. G. Oxidative stress : molecular perception and transduction of signals triggering antioxidants gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2005**, 38(7), 995-1014.
13. Wu, D.; Cederbaum, A. L. Alcohol, oxidative stress, and Free radical damage. *Alcohol Res. Health.*, **2003**, 27(4), 277-284 .
14. Comhair, S.A.; Erzurum, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **2002**, 283(2), 246-255.

15. Zasaki, Y. Does Oxidative stress participate in development of hepatocellular carcinoma ?. *Journal of Gastroenterology*. **2007**, 41(12), 1135-1148.
16. Rice-Evans, C.A.; Miller, N. J. Antioxidants activities of flavonoids as bioactive components of food . *Biochem. Soc. Trans.*, **1996** , 24(3), 790-795.
17. Rice-Evans, C.A.; Miller, N. J.; Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, 20(7), 933-956.
18. Rolland, Y. Antioxydants naturels des végétaux. *OCL. Journal org.*, **2004**, 11No 6, 1.
19. Koleva, I. I.; Van Beek T. A.; Linssen, J. P. H. Extracts for antioxidant activity : a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Analysis.*, **2002**, 13(1), 8-17.
20. Lennette , H. E. ; Balows, A. ; Hausler J. W. ; Shadomy H. J. Manual of clinical microbiology. 4th ed. American Society for microbiology, Washington DC. **1985**.
21. Slinkard, K.; Singleton. V. L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.*, **1977**, 28, 49-55.
22. Türkoğlu, A.; Duru, M. E.; Mercan, N.; Kıvrak, Đ.; Gezer, K. Antioxidant and antimicrobial activity of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chem.*, **2007**, 101, 267-273.
23. Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.
24. Apak, R.; Guclu, K.; Ozyurek, M.; Karademir, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 7970-7981.

الخاتمة

الخاتمة

يعد هذا العمل كامتداد لأبحاث بدأها مخبرنا في إطار الكشف عن المواد الفعالة لنباتات العائلة المركبة الجزائرية ، المعروفة بغناها بنواتج الأيض الثانوي وبفعاليتها البيولوجية ومنه فقد تم إختيار نبتتين منها هما *Serratula cichoracea* و *Centaurea solstitialis ssp. schouwii* (DC.) .

تركز إهتمامنا خلال دراسة هاتين النبتتين على التعرف على نواتج الأيض الثانوي لكل نبتة وتثمين الفعالية البيولوجية لنبات *Centaurea solstitialis ssp. schouwii* (DC.) وذلك باستخدام مختلف طرق الإستخلاص وتقنيات الفصل الكروماتوغرافية المتعددة بداية بكروماتوغرافيا العمود ثم كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وأحيانا كروماتوغرافيا الورق، تلت هذه الخطوات عمليات تنقية متعددة لتتحصل في الأخير على مركبات نقية جاهزة لدراستها بنيويا ولأجل هذا لجأنا إلى مختلف الطرق التحليلية منها الفيزيائية والكيميائية حيث تتمثل الأولى في مطيافية الأشعة فوق البنفسجية ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والكربون وكذلك إلى مختلف تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد ومطيافية الكتلة أحيانا (HMBC, HSQC, RMN¹³C RMN¹H, ESI-HRMS, UV-Vis) ، أما الكيميائية فتتمثل في الإماهة الحمضية دون إهمال الخواص الكروماتوغرافية التي تساعدنا كثيرا في إعطاء فكرة عن البنية الأولية للمركب.

حيث أدت الدراسة الكيميائية لنبات *Centaurea solstitialis ssp. schouwii* (DC.) إلى فصل 10 مركبات تم التعرف على البنية الكيميائية لـ 7 من بينها مركب جديد يفصل و يحدد لأول مرة ، هذه المركبات هي :

1- 4 β -15 dihydro 3- dehydrosolstitialine A

2- 3-(4-hydroxybenzoyl)-cynaratriol

3- kaempferol 3-O-α- rhamnoside

4- luteoline 3'-O- β -glucopyranoside

5- astragaline

6- 6-methoxy kaempferol-3-O-glucopyranoside

7- مزيج من apigénine5- O-β--arabinopyranoside أو apigénine7- O-β-arabinopyranoside

و Kaempférol 3-O- β-arabinopyranoside

الدراسة الكيميائية لمستخلص أسيتات الإيثيل لنبات *Serratula cichoracea* سمحت لنا بفصل 3

مركبات تم تحديد البنية الكيميائية النهائية ل 2 منها وهما :

1- C-ajugasterone

2- C-epi-ajugasterone هذا الأخير مركب جديد يفصل ويحدد لأول مرة.

وبغية الكشف عن مدى الفعالية البيولوجية للنبته *Centaurea solstitialis ssp. schouwii* (DC.) أجريت بعض التحاليل ضد البكتيرية على مستخلصات الأطوار الثلاثة (الكلوروفورم- خلات الإيثيل - البوتانول) و على المركب 4 β -15 dihydro-3- dehydrosolstitialine التي أظهرت فعالية مضادة للبكتيريا جيدة لهذا الأخير وكذلك للمستخلص الكلوروفورمي على السلالات البكتيرية المرجعية *P.aeruginosa* (32 mm), *E.Coli* (22 mm) ، كما أعطى مستخلص خلات الإيثيل فعالية معتبرة مع السلالات البكتيرية الموجبة الغرام، وهذا يفتح المجال لدراسات أخرى لأنواع بكتيرية سواء كان على المستخلص أو على المركبات المفصولة.

كما وصلنا الدراسة البيولوجية على مستخلصات الأطوار الثلاثة للنبته وذلك بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات بالإعتماد على طريقتين طريقة تقدير نشاط الإلتقاط الجذري ل DPPH و طريقة CUPRAC ، حيث أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل يليه مستخلص البوتانول فعالية جيدة مع الطريقتين ، كما تم تحديد المحتوى الكلي للفينولات والمحتوى الكلي للفلافونويدات للمستخلصات السابقة .

جزء من هذا العمل تم نشره في جريدة محكمة دوليا والجزء الآخر في طريقه للنشر .

Résumé

Ce travail est le bilan de deux études que nous avons menées sur deux plantes appartenant à la famille Asteraceae, *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q. et S. et *Serratula cichoracea*.

Les travaux effectués sur *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q. et S. ont débuté par la macération dans l'éthanol à 70% des parties aériennes récoltées en période de floraison de la région de El Kala. Après filtration, concentration et dilution dans de l'eau distillée, la solution obtenue a subi des affrontements à l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et l'*n*-butanol donnant les extraits correspondants. Les extraits CHCl₃, EtOAcet *n*-BuOH ont été évalués pour leur capacité antioxydante par les méthodes du piégeage de radical DPPH et la réduction du cuivre, en utilisant le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT) et le α -tocopherol comme contrôles positifs. Les dosages des phénols et des flavonoïdes totaux des trois extraits ont été également effectués. En matière d'activité antioxydante, les résultats obtenus ont montré que l'extrait acétate d'éthyle était le plus actif suivi avec un degré moindre par l'extrait *n*-BuOH dans les deux méthodes. Ce pendant aucun des extraits n'a montré une activité aussi importante que celle donnée par les antioxydants standards utilisés. Le dosage des phénols et des flavonoïdes totaux a montré que l'extrait *n*-BuOH était le plus riche en ce type de composants, suivi par l'extrait acétate d'éthyle. Ces résultats ont justifié le fractionnement des extraits AcOEt et *n*-BuOH qui a été réalisé par chromatographie sur colonne de gel de silice 60. Les fractions obtenues, purifiées par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice normale ont mené à l'isolement et à la détermination structurale de 2 lactones sesquiterpéniques de type guaianolide dont une nouvelle et que nous reportons pour la première fois dans la littérature, ainsi que 5 flavonoïdes glycosylés. Les élucidations structurales des composés isolés ont été réalisées grâce à l'analyse : des spectres de masse haute résolution en mode ESI positif [HRESI-MS(+)], des résultats des séries spectrales UV-Vis, des spectres de RMN 1D (¹H, ¹³C et DEPT) et RMN 2D (COSY, NOESY, HSQC and HMBC), des résultats de l'hydrolyse acide des composés hétérosides et enfin par la comparaison avec les données de la littérature.

Concernant l'espèce *Serratula cichoracea*, les travaux effectués représentent la continuité d'une étude que nous avons réalisée auparavant sur l'extrait acétate d'éthyle obtenu par un protocole similaire à celui indiqué plus haut pour *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q. et S. Après fractionnement sur colonne de gel de silice de cet extrait, l'étude d'une des fractions obtenues a permis l'isolement et la détermination structurale de deux ecdystéroïdes diastéréoisomères dont un nouveau et que nous reportons pour la première fois dans la littérature.

Ces travaux ont fait l'objet de deux publications internationales.

Mots clés: Lactones sesquiterpéniques, Flavonoïdes, Ecdystéroïdes, *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q. et S., *Serratula cichoracea*, Activité antioxydante.

Abstract

This work is the assessment of two studies which we conducted on two plants belonging to Asteraceae family, *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (CD.) Q. et S. and *Serratula cichoracea*. The works carried out on *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (CD.) Q. et S. began with the maceration in 70% ethanol of the aerial parts collected in the flowering stage from the area of El Kala. After filtration, concentration and dilution in distilled water, the remaining solution was successively extracted with petroleum ether, CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH to give the corresponding extracts. The antioxidant abilities of CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH extracts were assessed using DPPH radical scavenging, and cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC). Butylhydroxyanisole (BHA), Butylhydroxytoluene (BHT) and α -Tocopherol were used as controls. The total phenolic and total flavonoid contents of the extracts were also determined. Concerning the antioxidant activity, the EtOAc extract was the most active followed by the *n*-BuOH extract in the two methods. However, none of the extracts exhibited higher activity than those of the antioxidant standards. The *n*-BuOH extract had the highest phenolic and flavonoid contents followed by EtOAc extract. These data allowed guiding the fractionation of EtOAc and *n*-BuOH extracts which was carried out by chromatography on silica gel 60 column. The obtained fractions, purified by chromatography on preparative normal silica gel plates led to the isolation of two sesquiterpene lactones with guaianolide skeleton-type one of which was new, we describe it for the first time in the literature. We also isolated 5 flavonoid glycosides. The structures of all the isolated compounds were established by the analyses of: the high resolution mass spectra recorded in ESI positive mode [HRESI-MS(+)], the results of UV-Vis spectral series, the 1D NMR (¹H, ¹³C and DEPT) and 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC and HMBC) spectra, the results of the acidic hydrolysis of the glycosylated compounds and finally with comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature.

Concerning the species *Serratula cichoracea*, the carried out work represents continuity of a study that we previously realized on the ethyl acetate extract obtained by a protocol similar to that indicated higher for *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (CD.) Q. et S., after fractionation of this extract on silica gel column, the study of one of the obtained fractions allowed the isolation and the structural determination of two ecdysteroid diastereoisomers. One of these two compounds was new, we reported it for the first time in the literature.

These works were the object of two international publications.

Key words: Sesquiterpene lactones, Flavonoids, Ecdysteroids, *Centaurea solstitialis* ssp. *Schouwii* (DC.) Q. et S., *Serratula cichoracea*, Antioxidant activity.

الملخص

هذا العمل هو حصيلة لدراستين قمنا بهما على نبتتين من العائلة المركبة هما: *Serratula cichoracea* و *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) Q. et S.

شملت الدراسة الأولى إستخلاص الأجزاء الهوائية لنبات *Centaurea solstitialis* ssp. *schouwii* (DC.) المتحصل عليها خلال فترة الإزهار من منطقة القالة ، حيث أجري لها دراسة كيميائية نباتية كاملة من نفع المادة النباتية ، إستخلاص الطور الكحولي الميثانولي المميح، إستخلاص مختلف الأطوار باستعمال مذيبات عضوية ذات قطبيات متزايدة متحصلين في الأخير على المستخلصات الثلاثة: مستخلص الكلوروفورم ، مستخلص خلات الإيثيل و مستخلص البوتانول النظامي .

خضعت هذه المستخلصات إلى تقييم الفعالية المضادة للأكسدة بالإعتماد على طريقتين طريقة تقدير نشاط الإنقراط الجذري DPPH و طريقة CUPRAC، حيث أظهر مستخلص خلات الإيثيل و مستخلص البوتانول فعالية معتبرة مع الطريقتين .

كما تم تحديد المحتوى الكلي للفينولات والمحتوى الكلي للفلافونويدات للمستخلصات الثلاثة الذي بين غنى و ثراء مستخلص البوتانول بهذا النوع من المركبات يليه مستخلص خلات الإيثيل .

هذه النتائج قادتنا إلى فصل هذين المستخلصين باستعمال مختلف طرق الفصل من عمود و طبقة رقيقة. بعد تنقية الكسور المتحصل عليها تم فصل سيسكويترپينين لآكتونيين من نمط الغوايانوليد أحدهما يفصل و يحدد لأول مرة و خمس فلافونويدات جليكوزيدية ، تم تحديد البنية الكيميائية للمركبات المفصولة باستخدام التقنيات الطيفية و المتمثلة في مطيافية الكتلة، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية البعد للبروتون و الكربون 13 و ثنائية البعد بمختلف تقنياتها (COSY ، HMBC ، HSQC ، NOESY) إلى جانب الحلمة الحمضية.

أما فيما يخص الدراسة المنجزة على *Serratula cichoracea* فهي تكملة للدراسة التي أجريناها مسبقا على مستخلص خلات الإيثيل المتحصل عليه وفق نفس الخطوات المذكورة سابقا، حيث أدت تنقية إحدى كسوره إلى فصل مركبين ستيرويدين (2 ecdystéroïdes diastéréoisomères) أحدهما يفصل و يحدد لأول مرة. جزء من هذا العمل تم نشره في جريدة محكمة دوليا والجزء الآخر في طريقه للنشر.

الكلمات الدالة (المفتاحية):

Lactones sesquiterpéniques, Flavonoïdes, Ecdystéroïdes, *Centaurea solstitialis* ssp. *Schouwii* (DC.) Q. et S., *Serratula cichoracea*, Activité antioxydante