

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

قسم الكيمياء

كلية العلوم الدقيقة

رقم الترتيب:.....

رقم التسلسل:.....

رسالة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء
شعبة الكيمياء العضوية
فرع كيمياء النبات

تحت عنوان

حاجون بيدج و لصف، صل شخص اضي ل ا
يونثوا
سرنج تبلن ن ع *CENTAUREA*
C.Sphaerocephala L.

تحت إشراف
علي بن ثامن

من طرف
رتيبة بوالشحم
حرم مختاري

لجنة المناقشة:

رئيسة
مشرفا
ممتحنا
ممتحنا
ممتحنا

أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة
أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة
أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة
أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة
أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة

د. فضيلة بن عياش
د. علي بن ثامن
د. سمير بن عياش
د. لحسن زعيتير
د. عبد الرحمن ثنيو

ب

سم الله الرحمن الرحيم

إهداء

اهدي ثمرة عملي هذا إلى:

الذين وصى الله بهما إحسانا

روح أمي الغالية رمز العطاء و الإخلاص ينبوع الحنان.

إلى رمز التضحية الذي أعطاني حتى لم يترك للعطاء حدود أبي الغالي.

إلى التي شجعتني ودفعت بي قدما أختي وفاء وأختي صورية.

إلى رمز الوفاء إخوتي الأعزاء.

إلى الذي تقر بهم الأعين زوجي

عبد المالك و ابنتي ملاك.

إلى جميع عائلة زوجي وخاصة الأم فهيمة والأب مبارك.

إلى رفيقتي دربي

زليخة و سهيلة.

إلى زملاء وزميلات دفعتي: سعيدة، سعاد، آمال، وصاف، ليلى، ليندة نصيرة،

لمياء، نسيمة، سامية، عدلان، شعيب، شراف، باز.

إلى زملائي بالمخبر حنان، سعدة، صبرينة، حنان، سناء، شوقي، وهيبه عامر،

رشيد، فيروز، أحلام.

إلى جميع الأهل و الأصدقاء اهدي هذا العمل المتواضع رتيبة



الشكر لله تعالى

الذي أعاننا لما فيه الخير لنا ووفقنا
و جعل العلم ضياء و الذي جعل طالبه كالنور بهاء.

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات و بفضلته تنزل البركات.

الحمد لله الذي وفقنا لإنجاز هذا العمل و الذي أتقدم من خلاله:

- بالشكر الجزيل إلى الأستاذ المشرف بن ثامن علي على قبوله الإشراف على هذا العمل و على كل مساعداته لإنجاز هذا البحث.
- إلى الأستاذة فضيلة بن عياش التي أتقدم إليها بجزيل الشكر و الامتنان لجهودها و صدرها الرحب و أيضا لقبولها رئاسة لجنة المناقشة.
- كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى الأساتذة: بن عياش سمير زعيتز لحسن و ثنيو عبد الرحمن على قبولهم عضوية هذه اللجنة.
- بالشكر أيضا إلى كل أساتذة الاختصاص و جميع أعضاء مخبر الكيمياء النباتية و التحليل الفيزيو كيميائي و البيولوجي.
- و إلى سهيلة و زليخة أوجه خالص شكري و عرفاني لمساعدتهما لي.
- بالشكر أيضا إلى كل من ساعد من قريب أو بعيد في انجاز هذه الرسالة و خاصة جنود الخفاء زوجي عبد المالك، أختاي سورية و وفاء و أخي عبد الرزاق الذي ساعدني في مجال الإعلام الآلي.

1	المقدمة
3	1- التعريف بالفلافونويدات
5	2- خواص الفلافونويدات
5	3- الاصطناع الحيوي للفلافونويدات
5	1-3 المرحلة الاولى (طريق الشيكيميك)
7	2-3 المرحلة الثانية (طريق الخلات)
8	3-3 الاصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونيدية بدءا من الشالكون
10	4- تثبيت المجموعات الاستبدالية للهيكال الفلافونويدي
10	1-4 تثبيت مجموعة الهيدروكسيل
10	2-4 تثبيت مجموعة الميثوكسيل
11	3-4 تثبيت جزيئات السكر
11	5- طرق استخلاص الفلافونويدات
12	1-5 فصل و تنقية المركبات الفلافونيدية
14	5- الفعالية البيولوجية للفلافونويدات
14	6- فلافونويدات جنس <i>centaurea</i>
	الفصل الثاني: الدراسة البنيوية للفلافونويدات
22	1- الخواص الكروماتوغرافية
22	1-1 اللون الاستشعاعي
23	2-1 ثابت الانحباس
	2- الطرق الفيزيائية
24	1-2 طيف الأشعة فوق البنفسجية
24	1-1-2 طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي
25	2-1-2 طيف الامتصاص في وجود NaOH أو NaOMe
25	3-1-2 طيف الامتصاص في وجود NaOAc
25	4-1-2 طيف الامتصاص في وجود NaOAc+H ₃ BO ₃
26	5-1-2 طيف الامتصاص في وجود HCl+ AlCl ₃ و AlCl ₃
28	2-2 مطيافية الكتلة
28	1-2-2 تقنية القذف الإلكتروني EI
28	2-2-2 تقنية القذف السريع بالذرات F. A. B.
29	3-2-2 تقنية الإلتروسبراي
29	3-2 طيف الرنين النووي المغناطيسي
29	1-3-2 طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN- ¹ H
31	2-3-2 طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون RMN- ¹³ C
31	3- الاماهة الحمضية
	الفصل الثالث: المادة النباتية طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية
35	1- المادة النباتية
35	2- وصف النوع
36	3- التصنيف النظامي للنباتة
37	4- اختيار المادة النباتية

40	4- الاستخلاص
42	5- الفصل و التنقية.....
43	6- معالجة الكسور المحصل عليها
	الفصل الرابع: النتائج الكيميائية و المناقشات
46	1- التحليل البنيوي للمركب CS_1
56	2- التحليل البنيوي للمركب CS_2
66	الخاتمة
67	المراجع

الحققة

مقدمة:

تؤكد الإحصائيات في ميدان الصحة أن عدد المرضى في ازدياد في جميع أنحاء العالم، في البلدان النامية والبلدان المتقدمة على السواء، فما السبب يا ترى؟ هل الأدوية الكيميائية المكتشفة أصبحت غير ناجعة؟ هل أصبحت مأكولات اليوم رغم مواصفاتها العلمية المضبوطة و المدققة لا تقوم بدورها الصحي و الغذائي كما هو مطلوب؟ كل هذه الأسئلة و غيرها تجعلنا نفكر في المشكلة الصحيحة التي تردى فيها إنسان اليوم و في عجزه عن مجابهة أمراض و أوبئة لم تكن معروفة في السابق، فما هي أنجع الحلول للتصدي لذلك الخطر الزاحف، خطر العقاقير الكيميائية المستعملة في الصحة و الزراعة. حسب عدة باحثين عصريين فإن الحل الوحيد هو مواكبة الطبيعة و الارتقاء كليا في أحضانها و الثقة في أنها هي التي تداوي.

لقد استعملت الأعشاب منذ قديم الزمان للتداوي و قد اهتمت الإنسان إليها بحكم تجاربه معها و بحكم الملكة الفكرية التي ميزه الله بها على سائر المخلوقات.

فقد اهتمت في البداية بفطرته إلى أن تناول نبات معين قد يزيل التشنج في الجهاز الهضمي و أن آخر قد يشفيه من الصداع أو يخفف عنه وطأة الحمى.

فتناقل الناس ذلك جيلا بعد جيل و زادوا عليه من تجاربهم الخاصة حتى وصلوا إلى مرحلة التدوين بالكتابة و الرموز، فترى ذلك لدى استقراؤنا للخطوط الهيروغليفية الموجودة في مقابر و معابد القدامى لدى البابليين و الآشوريين وفي برديات الفراعنة، من أهم هذه البرديات بردية إبيريس (E bers papyrus) التي شملت 877 وصفة طبية كتبت سنة 1550 قبل الميلاد و هي محفوظة في جامعة ليبتيغ (Leipzig) بألمانيا.

كما لا يخفى علينا أن الطب التقليدي ترك لنا خزان بالغ الأهمية بما يساعدنا على البحث في المستقبل. و بما أن الجزائر أرضية خصبة لنمو العديد من النباتات نظرا لمناخها الذي يخلق بيئات مختلفة، دفعت بالباحثين الجزائريين استثمار هذه الثروة النباتية، و خاصة النباتات الطبية، لما تحويه من مواد كيميائية ناتجة عن عمليات الأيض الثانوي، ذات فعالية بيولوجية و فيزيولوجية على الإنسان و الحيوان.

تكلمة لما بدأه أسلافنا من الباحثين في مخبرنا في إطار مشروع دراسة و تقييم الثروات النباتية الجزائرية و خاصة بعض النباتات المستعملة في الطب الشعبي [1] منها مختلف أنواع جنس *centaurea* قمنا بهذا العمل.

ينتمي هذا النبات إلى العائلة المركبة *Compositae* التي تعد من أرقى العائلات النباتية، تضم حوالي 1000 جنس و أكثر من 25000 نوع [2].

تحوي الجزائر حوالي 109 جنس و أكثر من 408 نوع [3].

جنس *Centaurea* المندرج من هذه العائلة يحوي حوالي 700 نوع و 600 تحت النوع [4].

غنى هذا النبات بنواتج الأيض الثانوي مثل: الفلافونويدات [5، 6] اللاكثونات السيسكيتربينية [7]، المركبات الأسيثيلينية [8] و الستيرويدات [9]، و كذا خصائصها الصيدلانية و الطبية [10] جعلها هدفا للعديد من الدراسات الفيتو كيميائية.

استعمل الطب الشعبي أنواع هذا الجنس لفعاليتها المنشطة و المقوية [11، 12]، ضد مرض السكري [13]، مدر للبول [14]، و ضد الروماتيزم [15].

الدراسات البيولوجية لبعض أنواع هذا الجنس على مستخلص الكلوروفورم مثل: *C. musumomum* ، *C. granata* ، *C. maroccana* و هي أنواع جزائرية أثبتت فعاليتها ضد الطفيليات التي تسبب التسمم الخلوي [16].

كما أن الدراسات الفيتو كيميائية و البيولوجية لـ *C. Floccosa* أثبتت فعاليتها ضد الجراثيم [17] ، كما ان القسم العلوي لـ *C. chilensis* يستعمل ضد الروماتيزم [18].

إن الهدف من هذا العمل يتركز حول

استخلاص، فصل، تنقية و تحديد الصيغة البنوية لمنتجات الايض الثانوي لنبات *Centaurea Sphaerocephala*

يتفرع هذا العمل إلى أربعة فصول

الفصل الأول: تطرقنا فيه إلى التعريف بالفلافونويدات، الاصدطناع الحيوي لها و أخيرا فعاليتها بيولوجيا.

الفصل الثاني: خصصناه لكيفية تحديد بنى الفلافونويدات بواسطة الطرق الفيزيوكيميائية و الكروماتوغرافية المعروفة.

الفصل الثالث: عرضنا الطريقة العملية التي أنجز بها هذا العمل المتمثل في استخلاص، فصل و تنقية الفلافونويدات.

الفصل الرابع: يتضد من النتائج الكيميائية المتمثلة في تحديد الصيغ البنوية للمركبات المفصولة.

فصل الأول

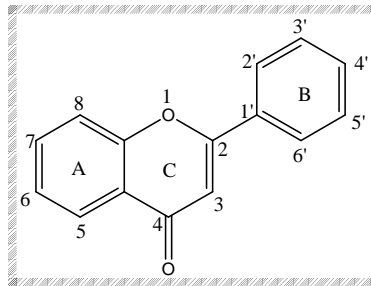
دراسة المكونات الفلافونويدية

1-1 تعريف الفلافونويدات:

الفينولات مركبات معقدة البناء و هي الأكثر انتشارا في الطبيعة حظيت بدراسة وافرة من أهم هذه المركبات منتجات تسمى الفلافونويدات.

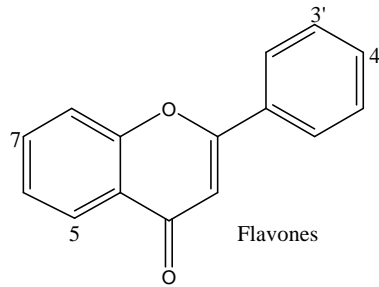
هي عبارة عن صبغات نباتية صفراء تسمى انثوزانثينات anthoxanthins تنتشر في الأجزاء المختلفة للنبات من جذور و بكميات أكبر في الأوراق و الأزهار [19] تعرف هذه المنتجات بمنتجات الأيض الثانوي [20] حيث تم فصل أكثر من 8000 مركب فلافونويدي في صورة اجليكونية و جليكوزيدية [21].

تحتوي الفلافونويدات على 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات (C₆ - C₃-C₆) شكل (1) عبارة عن نواة عطرية، متصلة بنواة غير متجانسة C₃ حيث حسب درجة تأكسد هذه الأخيرة وجدت مختلف أقسام الفلافونويدات حسب الجدول 1- [21].



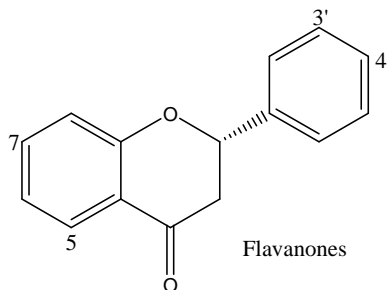
شكل-1- الهيكل الفلافونويدي

جدول-1- مختلف أقسام الفلافونويدات:



Flavones

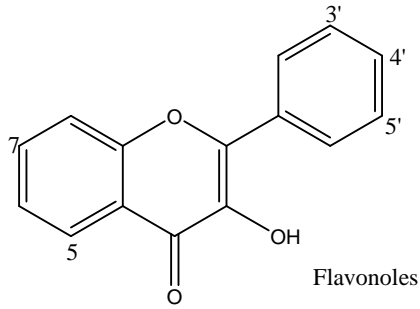
	5	7	3'	4'
luteolin	OH	OH	OH	OH
apigenin	OH	OH		OH
chrisin	OH	OH		



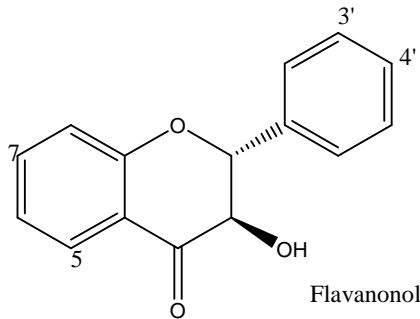
Flavanones

	5	7	3'	4'
hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃
naringenin	OH	OH		OH

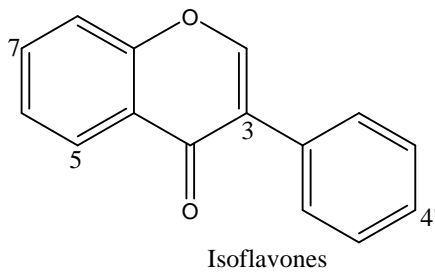
جدول-1- مختلف أقسام الفلافونويدات: (تابع)



	5	7	3'	4'	5'
quercetin	OH	OH	OH	OH	
kaempferol	OH	OH		OH	
galangin	OH	OH			
fisetin		OH	OH	OH	
myricetin	OH	OH	OH	OH	OH



	5	7	3'	4'
taxifolin	OH	OH	OH	OH



	5	7	4'
genistein	OH	OH	OH
genistin	OH	Oglc	OH
daidzein		OH	OH
daidzin		Oglc	OH
biochanin A	OH	OH	OCH ₃
formononetin		OH	OCH ₃

2-I - خواص الفلافونويدات:

الفلافونويدات مركبات هيدروكسيلية ذات حمضية ضعيفة ذوابة في القواعد القوية مثل هيدروكسيد الصوديوم، احتوائها على عدد اكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو جزيئة سكر يكسبها قطبية عالية تجعلها تذوب في المذيبات القطبية أما الفلافونويدات الأقل قطبية مثل:

الأيزوفلافونويدات، الفلافانونات، الفلافونونات تذوب في المذيبات الأقل قطبية [19].

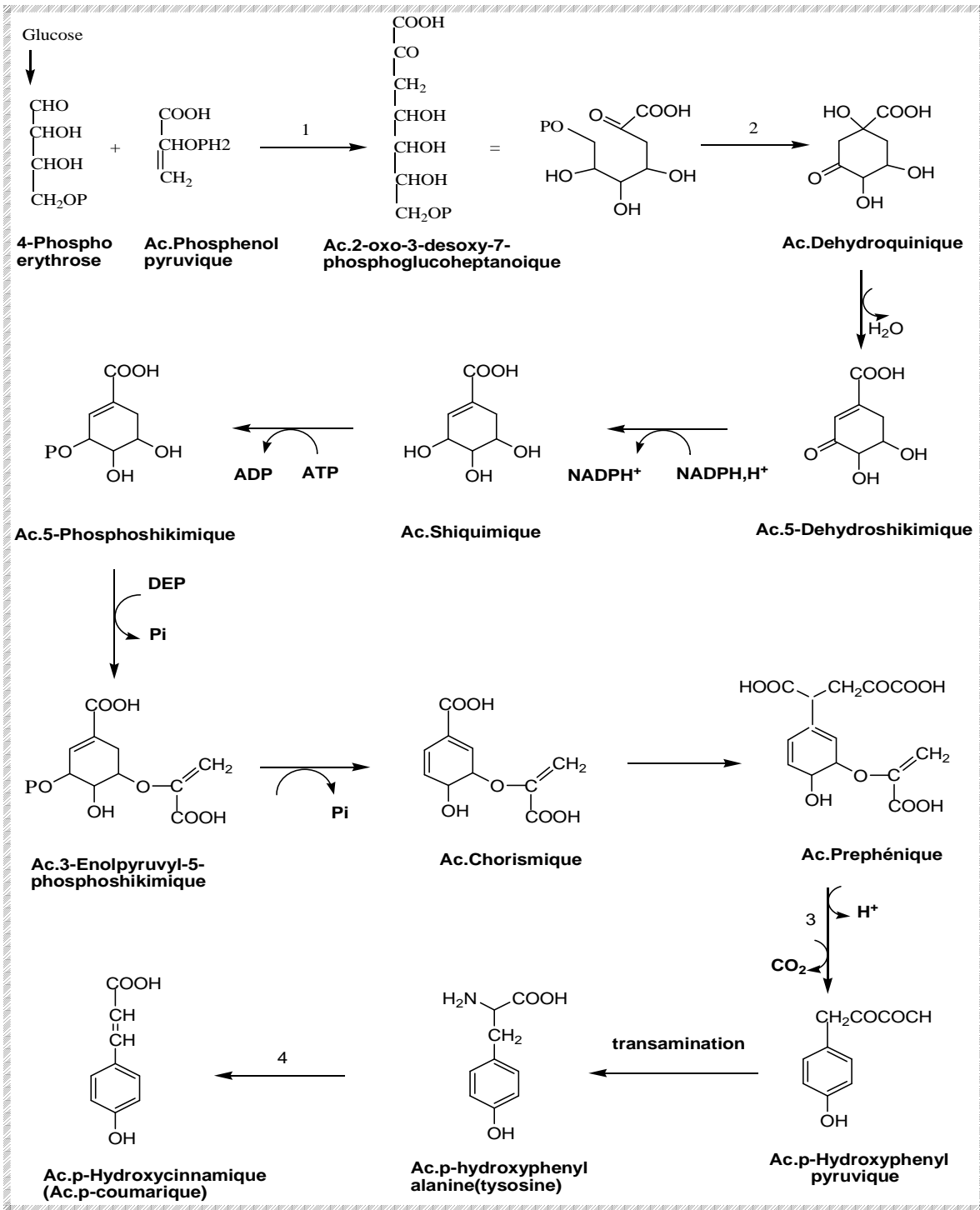
I-3- الاصطناع الحيوي للفلافونويدات:

الاصطناع الحيوي للفلافونويدات طريقة لتكوين هذه الأخيرة داخل مصادرها الطبيعية و ذلك عن طريق الأكسدة، الإرجاع، الالكللة و الحلمة بوجود إنزيمات خاصة.

حيث بينت التجارب التي أجريت باستعمال ^{14}C المشع أن هذا الاصطناع يتم خلال مرحلتين: المرحلة الأولى:

❖ طريق حمض الشيكيميك:

أثبتت التجارب دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة (B) و السلسلة الكربونية (C_3):

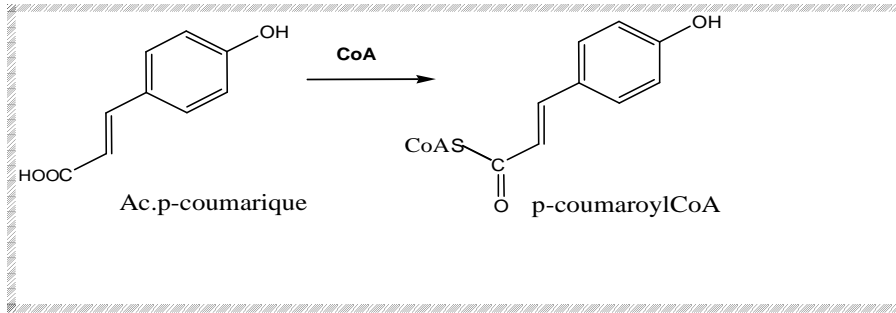


الشكل 2: تكوين حمض Ac.p-coumarique انطلاقاً من الجلوكوز مروراً بحمض الشيكيميك

الانزيمات التي رمزنا لها من 1 إلى 4 هي:

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

ثم يتحول Ac.p-coumarique الى p-coumaroyl-CoA

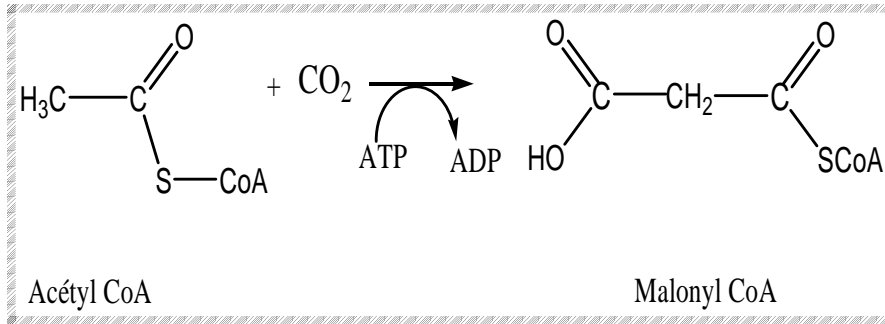


المرحلة الثانية:

❖ طريق الخلات:

يتم تثبيت مجموعة كربو كسيل مع أستيل مرافق-إنزيم (Acétyl-CoA) فينتج عنه وحدة

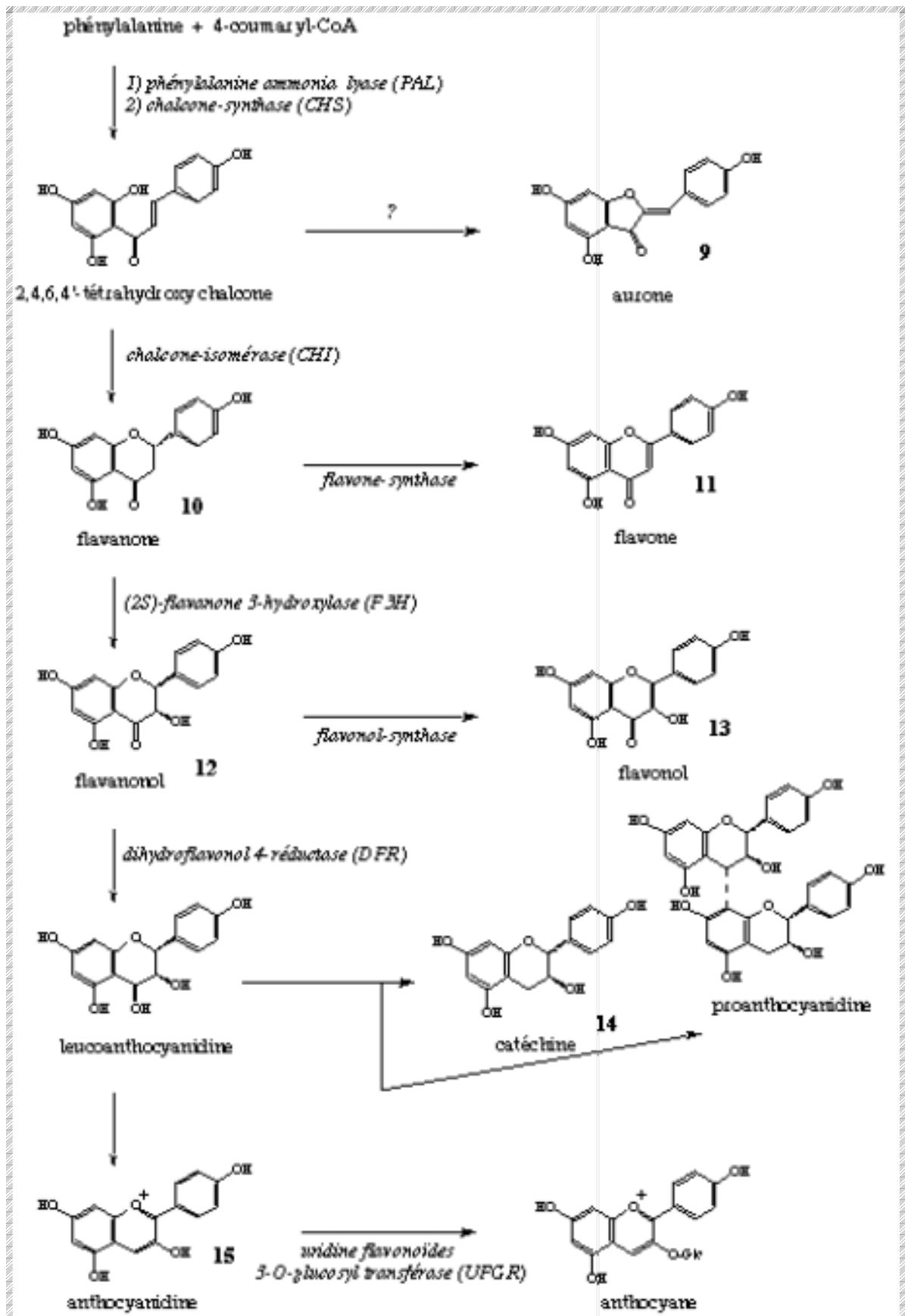
(Malonyl-CoA) .



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

❖ الاصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونيدية بدءاً من الشالكون:

الإصطناع الحيوي شكل (5) يحدث بالإعتماد على بشائر مشتركة، 4, 2, 4', 6'- tétrahydroxy chalcone ، أوران (9) [22،23] بفعل إنزيم، هذا الشالكون ذو لون أصفر، يتأبيض إلى مختلف أقسام الفلافونويدات، فلافانول (10) ، أوران (9) أصفر، 2، 3 ثنائي هيدروكسي فلافونول أو فلافانول (12) ، فلافون (11) ، أنثوسياندين (15) أحمر مزرق، فلافونول (13) أصفر، كثيتشين (14) و هي خطوات داخلية، مثل الأكسدة، الاختزال، الكلة ذرة نتروجين أو أكسجين و خصوصاً الاسيلة ، تعطي فلافونويدات على شكلها النهائي الموجودة in vivo.

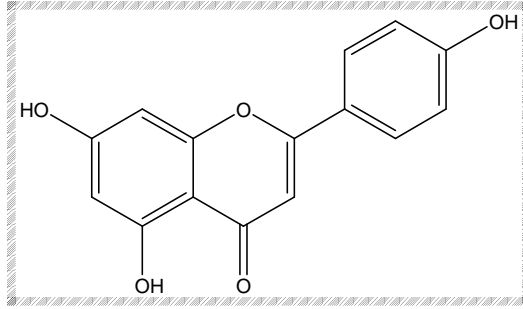


شكل 5: الاصطناع الحيوي لمختلف الفلافونويدات انطلاقا من الشالكون.

4-1- تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونويدي:

1 - 4 - 1 :

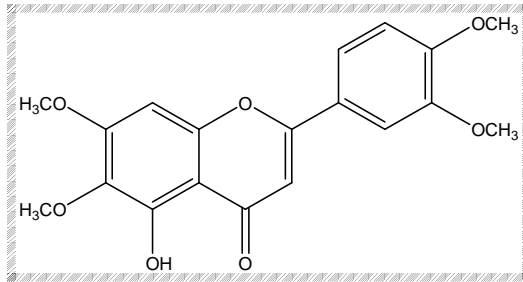
مجموعتي الهيدروكسيل في الموقعين 5 و7 تعتبر أصلية لأنها ناتجة قبل تشكل المجموعة A نفس الشيء بالنسبة لهيدروكسيل الحلقة B في الموقع 4' ناتج عن P- coumaroyl أما بقية الاستبدالات و يقال عنها Extra خاصة بالمواقع 6، 8، بالنسبة للحلقة (A) و 3'، 5' بالنسبة للحلقة B [24] في حالة 2' apigénine على سبيل المثال.



2 Apigénine

2 - 4 - 1 :

تتم المثيلة على جميع مجموعات الهيدروكسيل و خاصة الأصلية منها [25] كمثال 3 5-hydroxy 4,5,6,7-tetramethoxy flavone فصل من نباتات *centaurea senegalensis* [26] كما يمكن لظهور مجموعات (– OMe) على الحلقة البنزينية عن طريق المثيلة المباشرة [27] تتطلب عملية المثيلة إنزيم Omethyl-transferase الذي يعمل على نقل الميثيل الموجود بSAM تثبيته على الركيزة أجليكون .



3 Centaflavone B

I - 3-4- تثبيت جزيئة سكر:

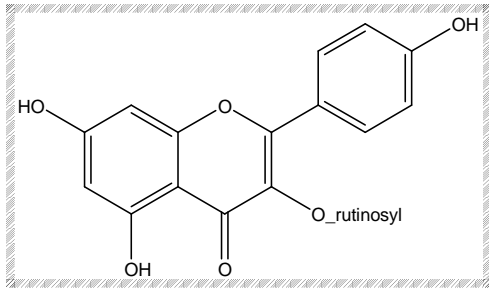
الرابطة اجليكون- سكر تحدث بين هيدروكسيل الحلقة البنزينية و هيدروكسيل السكر بعد نزع جزيئة ماء إذا كان التثبيت من نوع أكسجين- اجليكون.

يمكن تثبيت جزيئة سكر أخرى بمجموعة هيدروكسيل الفلافونويد أو مجموعة هيدروكسيل السكر المثبت سابقا مثل حالة 4 3,O-rutinosylkaempferol ناتج من *Centaurea lippii* [28].

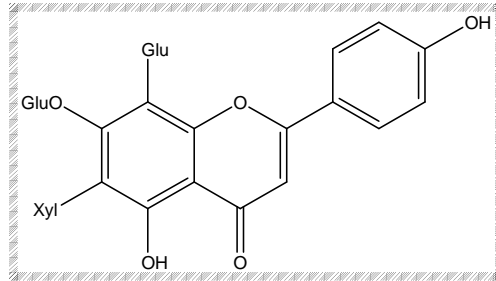
حيث يتم هذا الاستبدال في الموقع 7 بالنسبة للفلافونات و الموقع 3 بالنسبة للفلافونونات [29].

أما إذا كان الارتباط من نوع كربون- ايثيروزيد فان السكر يرتبط مباشرة مع كربون الحلقة البنزينية في المواقع 6 (و/أو)

8 و تتم هذه العملية بعد تكوين الشالكون مباشرة [29]. توجد بعض المركبات تحدث فيها المثيلة بنوعيتها و المركب 5 يوضح هذه الحالة.



4 3-O-rutinosyl kaempférol



5 7-O-glycosyl vicénine

I-5 طرق الدراسة الفيتو كيميائية للفلافونيدات:

I-5-1 طرق استخلاص الفلافونويدات:

بعد اختيار النبتة المراد دراستها و تجفيفها و طحنها ثم معاملتها بمذيب مناسب للاستخلاص، تعتبر المحاليل الكحولية(ميثانول أو ايثانول) أكثر المذيبات استعمالا في حالة النبات الرطب أو محاليلهما (بنسبة 70% أو 80%) في حالة النبات الجاف.

يتم تحليل الفلافونيدات التي تحتويها النبتة عموما على الأجزاء الهوائية لارتباطها بالتمثيل الضوئي (سيقان، أوراق و زهور)

هناك طرق ثابتة متبعة لاستخلاص كل نوع من المركبات الكيميائية حيث تعتمد على البنى الكيميائية و خواصها، و من

ضمن هذه الطرق المختلفة لعمليات الاستخلاص المشار إليها في بعض

المراجع و المخطط التالي يبين الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص [27، 30].

-2

تبخير المستخلص الهيدروكولي

1- معالجته بالماء المقطر
يب الكلوروفيل ل

2- ترشد يحه بع د ترسد

بواسطة $Pb(CH_3COO)_4 \cdot 3H_2O$

الطبقة المائية

استخلاص بواسطة ثلاثي كلور الميثان

استخلاص بواسطة خلات الإيثيل

تبخير

استخلاص بواسطة البوتانول

تبخير



تبخير

1

: الخطوات المتبعة في عملية الاستخلاص المخطط

I-2-5- فصل و تنقية المركبات الفلافونيدية:

لفصل و تنقية المركبات الفلافونيدية نستخدم طرق الفصل الكروماتوغرافي بمختلف أنواعها مثل كروماتوغرافيا الورق، كروماتوغرافية العمود و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، من أحسن الطرق المستعملة كروماتوغرافيا الورق لأنها تعطي

دلالة جيدة عن نوع المركب الفلافونيدي، كما أنها تستخدم لفصل كميات صغيرة عن طريق استعمال ورق وطمأن باستخدام جملة من المذيبات نذكر منها:

BAW n-BuOH: AcOH: H₂O 4/1/1

TBA t-BuOH: AcOH: H₂O 3/1/1

Forestal AcOH: H₂O: Hcl 30/10/3

AcOH: H₂O 15%, 30%

أما كروماتوغرافيا العمود فيتم استعمالها عن طريق تعبئة هذا الأخير بأحد الأطوار الثابتة الثلاث منها السيليكاجال أو السيليلوز أو متعدد الاميد، و تستخدم هذه الطريقة لفصل كميات كبيرة من المواد الفلافونيدية بعد اختيار جملة من المذيبات المناسبة لعملية التمليص.

يعتبر البولي أميد من أهم الأصناف المستعملة في كروماتوغرافيا العمود و خاصة في فصل المركبات الفلافونيدية الجليكوزيدية غير انه يتطلب تنظيف جيد نظرا لاحتوائه على شوائب عضوية، كما يستخدم السيليلوز لفصل المركبات الفلافونيدية اللاسكرية، في حين يستخدم السيليكاجال لفصل المركبات الأقل قطبية.

نتابع عملية التمليص باستعمال الطبقة الرقيقة التحليلية التي تسمح بتجميع الكسور المتشابهة بعدها يتم فصل مركبات الكسور المحصل عليها باستعمال كروماتوغرافية الورق أو كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية. وفي النهاية نقوم بتنقية نهائية بواسطة الترشيح على عمود بولي أميد أو عمود السيفادكس sephadex باستعمال الميثانول كمذيب [31]، [32].

I-6- الفعالية البيولوجية للفلافونويدات:

الفلافونويدات مركبات ناتجة عن الميثابوليزم الثانوي للنباتات وهي أكثر المواد الفينولية انتشارا في النبات لها فوائد كثيرة يمكن تلخيصها في النقاط التالية:





- ✓ ألوانها الجذابة تجذب إليها الحشرات مما يساعد على عملية التلقيح و الإخصاب [33، 34].
- ✓ تمنع انفجار الأوعية الشعرية و هي معرقة و مدرة للبول.
- ✓ تستعمل في صباغة الألياف.
- ✓ الكثير من الفلافونويدات سامة للنباتات المتطفلة. إذن فهي تقي النبات منها [35، 36].
- ✓ منفرة للحشرات المضرة للنبات [37].

- ✓ معظم هذه الفلافونويدات يزيل الالتهابات الجلدية السطحية، حيث أنها توجد ذائبة في العصير الخلوي عكس الكاروتينات التي توجد على شكل مواد صلبة في البلاستيدات.
- ✓ لها فعالية ضد بعض الخلايا السرطانية و خاصة الفلافونويدات عديدة الميثوكسيل [33].
- ✓ بعض الفلافونويدات لها خصائص مزيلة للتشنج مثل الكيرستين و الكامفيرول و أخرى مضادة للإلتهابات مثل الأكاسدين، و مضادة للقرحة مثل الأبجدين و كذلك لتقليل النزيف الناتج من الشعيرات الدموية مثل الروتين، الهيسبريدين [35].
- ✓ الفلافونويدات تحوي وظائف ضد الحساسية [38]، ضد الالتهاب [39]، مضادة للأكسدة [40].

I-7- فلافونويدات جنس *Centaurea* المفصولة من مخبرنا:

من المعروف أن مختلف أنواع جنس *Centaurea* غنية بالفلافونويدات حيث تم فصل أكثر من 160 فلافونويد من حوالي 74 نوع لهذا الجنس منها حوالي 11 نوع تمت دراستها في مخبرنا حيث فصلت منها حوالي 50 فلافونويد من صنف الفلافونون و الفلافونول تم تلخيصها في الجدول رقم 2.

جدول-2- فلافونويدات جنس *centaurea* المفصولة في مخبرنا

			
---	---	--	---

[41]	<u>01</u>	7-O-metyl glucuronosylapigénine	<i>C. incana</i>
	<u>02</u>	Hispiduline	
	<u>10</u>	6-méthoxy Kaempférol	
	<u>11</u>	Népétine	
	<u>27</u>	3',5-diméthoxy-7-glucosyl Myricétine	
	<u>28</u>	Corymbosine	
	<u>05</u>	7-glucosyl Hispiduline	
	<u>41</u>	Vicénine-2	
	<u>12</u>	Patulétine	
	<u>13</u>	7-O-glucosyl patulétine	
	<u>29</u>	7,3',5-trimethoxy Tricétine	
	<u>30</u>	7-O-glucosyl-3-methoxy Myricétine	
[42]	<u>40</u>	4'-méthoxy kaempférol	<i>C. acaulis</i>
[43]	<u>19</u>	3'-methoxy Saligénine	<i>C. granata L.</i>
	<u>20</u>	3'-hydroxy Saligénine	
[44]	<u>03</u>	Apigénine	<i>C. calcitrapa L.</i>
	<u>02</u>	Hispiduline	
	<u>14</u>	Pectolinargénine	
	<u>15</u>	Jacéosidine	
	<u>35</u>	Kaempférol	
	<u>10</u>	6-méthoxy kaempférol	
	<u>16</u>	7-Oglucosyl-6-méthoxy Kaempférol	
	<u>04</u>	7-O-glucosyl Apigénine	
	<u>36</u>	3-O-rutinosyl Kaempférol	
	<u>17</u>	3-O-glucosyl-6-méthoxy Kaempférol	
	<u>33</u>	3-O-glucosyl Quercétine	
	<u>34</u>	3-O-glucosyl Kaempférol	

جدول-2- فلافونويدات جنس *centaurea* المفصولة في مخبرنا (تابع)

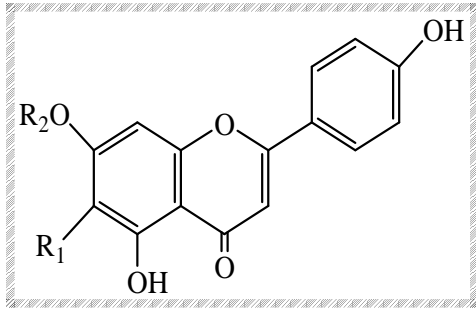
[45]	<u>05</u>	7-O-glucosyl Hispiduline	<i>C.nicaensis</i>
	<u>39</u>	6-O-glucosyl Isoorienine	

	<u>12</u>	patulétine	
	<u>13</u>	7-O-glucosyl patulétine	
	<u>41</u>	Vicénine-2	
	<u>18</u>	Cirsilinéol	
	<u>38</u>	7-O-glucosyl Isoorientine	
	<u>11</u>	Népétine	
	<u>24</u>	4',5,7-trimethoxy-3',6-dimethoxyflavone	
	<u>25</u>	Cirsiliol	
	<u>19</u>	3',4',7-trimethoxy Népétine	
	<u>26</u>	3',6-dimethoxy-7-O-glucosyl Quercétine	
[46]	<u>03</u>	Apigénine	<i>C. furfuracea</i>
	<u>02</u>	Hispiduline	
	<u>07</u>	Cirsimaritine	
	<u>37</u>	3-méthoxy Kaempférol	
	<u>23</u>	7-O-glucosyl Isoorientine	
	<u>05</u>	7-O-glucosyl Hipiduline	
	<u>08</u>	7-O-methyl glucuronosyl Hipiduline	
	<u>04</u>	7-O-glucosyl Apigénine	
	<u>09</u>	7-O-glucuronosyl Apigénine	
	<u>31</u>	Quercétine	
[46]	<u>18</u>	Cirsilinéol	<i>C. napifolia L.</i>
	<u>02</u>	Hispiduline	
	<u>07</u>	Cirsimaritine	
	<u>05</u>	7-O-glucosyl Hipiduline	
	<u>42</u>	7-O-glucosyl Quercétine	
	<u>32</u>	3-O-rhamnoglucosyl Quercétine	
	<u>19</u>	3'-methoxy Saligénine	

جدول-2- فلافونويدات جنس *centaurea* المفصولة في مخبرنا (تابع)

[47]	<u>35</u>	Kaempférol	<i>C. pullata</i>
------	-----------	------------	-------------------

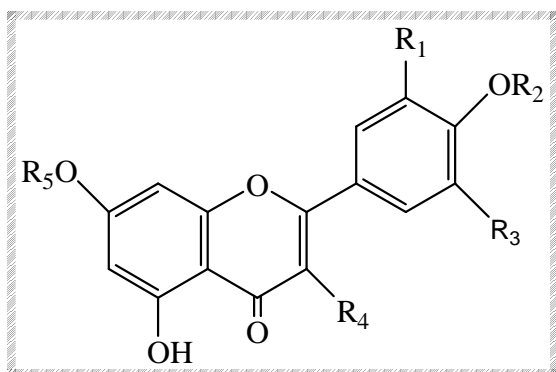
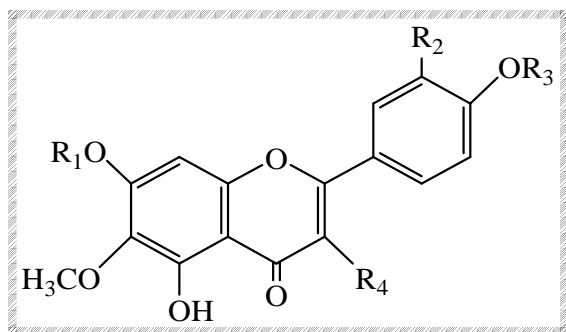
	<u>02</u>	Hispiduline	
	<u>07</u>	Cirsimaritine	
	<u>21</u>	7-O-glucosyl patulétine	
	<u>17</u>	3-O-glucosyl-6-methoxy Kaempférol	
	<u>05</u>	7-O-glucosyl Hipiduline	
[48]	<u>06</u>	Isovitexine	<i>C. lippi</i>
	<u>33</u>	3-O-glucosyl Quercétine	
	<u>36</u>	3-O-rutinosyl Kaempférol	
[49]	<u>43</u>	5,7-dihydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone (Eupatiline)	<i>C. parviflora</i>
	<u>44</u>	5,3'-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone (Eupatorine)	
	<u>45</u>	5,4'-dihydroxy-6,7,3'-trimethoxyflavone (Cirsilineol)	
[50]	<u>46</u>	5,7,3'-trihydroxy-6,3,4'-trimethoxy flavone Centaureidine	<i>C. africana</i>
	<u>47</u>	5,6,8,3'-tetrahydroxy-3,7,4'-trimethoxy flavone	
	<u>48</u>	5,3'-dihydroxy-3,7,8,4'-tetramethoxy flavone	
	<u>49</u>	5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy flavone Chrysoeriol	
	<u>2</u>	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxy flavone	
	<u>50</u>	5,7,4'-trihydroxy flavone Jaceidine	
	<u>51</u>	4'-methylgossypetine	
	<u>52</u>	8-methylgossepetine	
	<u>11</u>	3',4',5,7-tetrahydroxy-6-methoxy flavone Népétine	
	<u>53</u>	5, 7,8-trihydroxy-3'-O-rhamnosyl flavone	
	<u>54</u>	7-O- β -D-glucopyranosyl centaureidine	



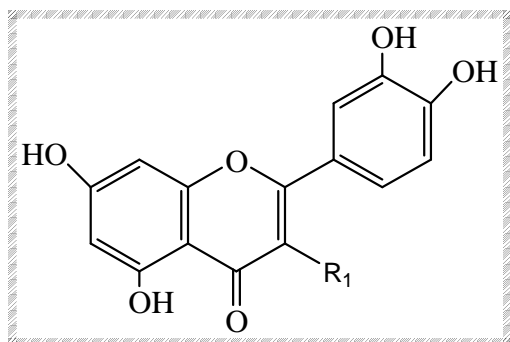
<u>1</u>	H	Meglur
<u>2</u>	OCH ₃	H
<u>3</u>	H	H
<u>4</u>	H	Glc
<u>5</u>	OCH ₃	Glc
<u>6</u>	C- glc	H
<u>7</u>	OCH ₃	OCH ₃
<u>8</u>	OCH ₃	Meglur
<u>9</u>	H	Meglur

R ₄	R ₃	R ₂	R ₁	N ⁰
OH	H	H	H	<u>10</u>
H	H	OH	H	<u>11</u>
OH	H	OH	H	<u>12</u>
OH	H	OH	Glc	<u>13</u>
H	CH ₃	H	H	<u>14</u>
H	H	OCH ₃	H	<u>15</u>
OH	H	H	Glc	<u>16</u>
O- Glc	H	H	H	<u>17</u>
H	H	OCH ₃	CH ₃	<u>18</u>
H	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	<u>19</u>
H	CH ₃	OH	CH ₃	<u>20</u>
OH	H	OH	Glc	<u>21</u>
H	CH ₃	OH	CH ₃	<u>22</u>
OH	H	OH	Glc	<u>23</u>

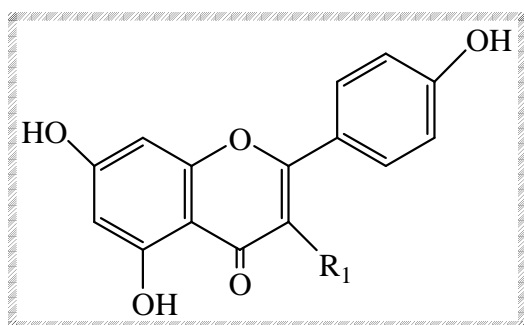
H	H	OCH ₃	H	<u>24</u>
H	H	OH	CH ₃	<u>25</u>
OH	H	OCH ₃	Glc	<u>26</u>



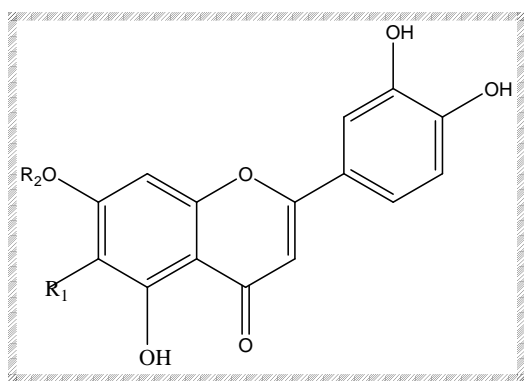
R ₅	R ₄	R ₃	R ₂	R ₁	N°
Glc	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	<u>27</u>
CH ₃	H	OCH ₃	CH₃	OCH ₃	<u>28</u>
CH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	<u>29</u>
Glc	OCH ₃	OH	H	OH	<u>30</u>



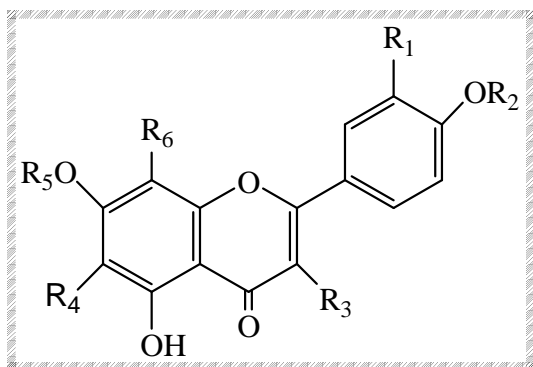
R ₁	N°
OH	<u>31</u>
O-glc O-rha	<u>32</u>
C-rha	<u>33</u>



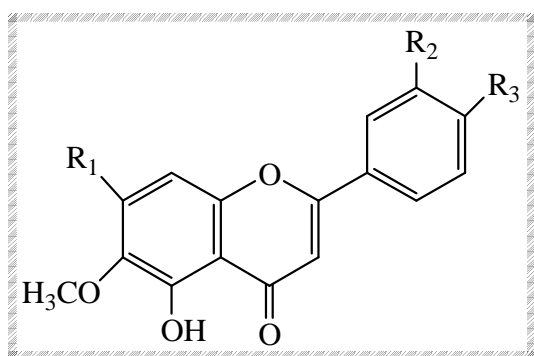
R ₁	N°
O-glc	<u>34</u>
OH	<u>35</u>
O-rut	<u>36</u>
OCH ₃	<u>37</u>



R ₂	R ₁	N°
Glc	Glc	<u>38</u>
	C-glc O-glc	<u>39</u>
H		



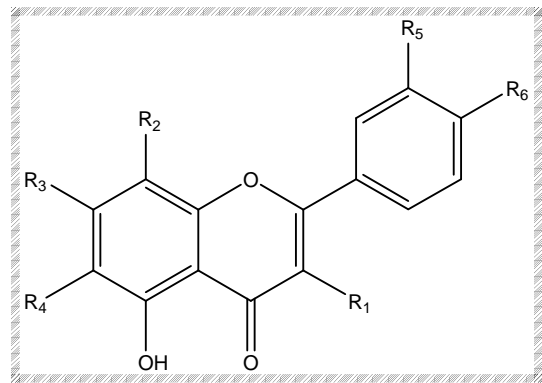
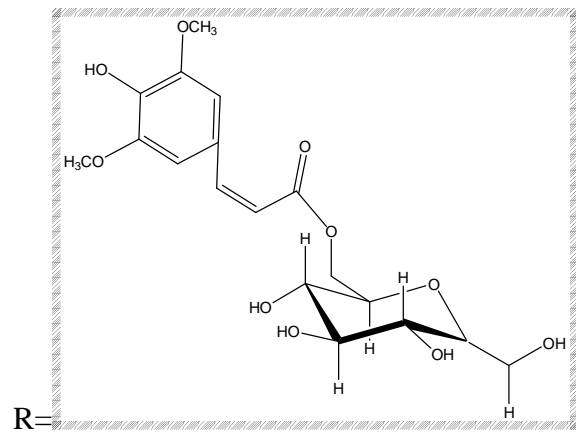
R ₆	R ₅	R ₄	R ₃	R ₂	R ₁	N°
H	H	H	OH	CH ₃	H	<u>40</u>
Glu	H	Glu	H	<i>H</i>	H	<u>41</u>
H	Glu	H	OH	H	OH	<u>42</u>

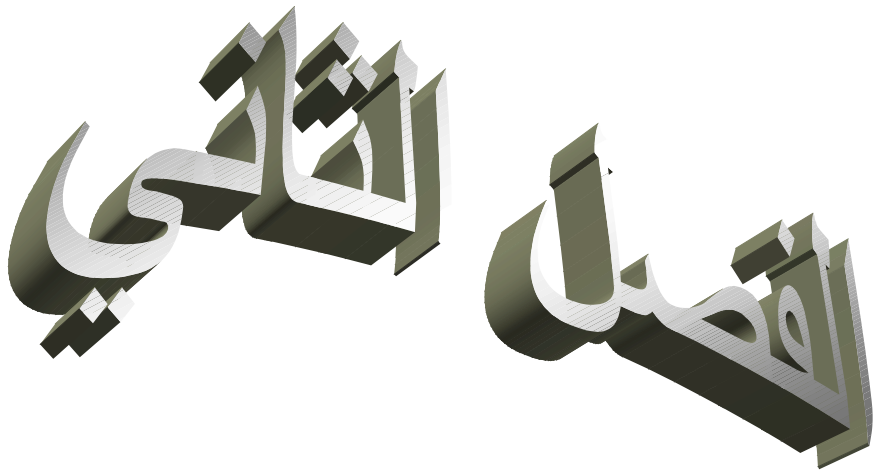


R ₃	R ₂	R ₁	N°
OCH ₃	OCH ₃	OH	<u>43</u>
OCH ₃	<i>OH</i>	OCH ₃	<u>44</u>
OH	OCH ₃	OCH ₃	<u>45</u>
OH	OH	OCH ₃	<u>46</u>

R ₆	R ₅	R ₄	R ₃	R ₂	R ₁	N°
OH	H	OCH ₃	OH	H	H	<u>2</u>
OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	<u>46</u>
OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	<u>47</u>
OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	<u>48</u>
H	H	H	OH	H	H	<u>49</u>
OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	<u>50</u>
OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	<u>51</u>
OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	<u>52</u>

OH	OH	OCH3	OH	H	H	<u>11</u>
OCH3	Orha	OCH3	OH	OH	OCH3	<u>53</u>
OCH3	OH	OCH3	R	H	OCH3	<u>54</u>



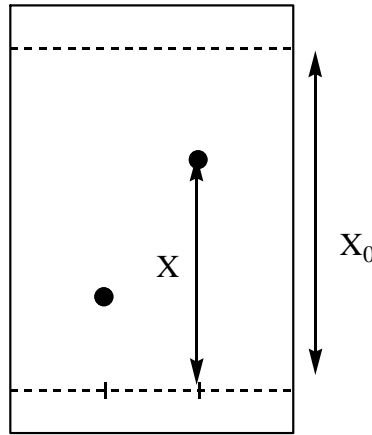


الدراسة السنوية للفلافونويدات
التي هي بيروية للفلافونويدات

II-1-2- ثابت الانحباس:

تعرف قيمة R_f كما يلي:

$$R_f = \frac{\text{المسافة المقطوعة من طرف المركب (X)}}{\text{المسافة المقطوعة من طرف المملص (X_0)}}$$



R_f لمركب فلافونويدي في نظام كروماتوغرافي (عضوي أو مائي) يعطي معلومات مهمة على صديغته و مواقع المستبدلات على الهيكل الفلافونويدي [52] و يمكننا من التمييز بين الجليكوزيدات و الاجليكونات و من جهة أخرى بين الجليكوزيدات أحادية السكر، ثنائية السكر و متعددة السكر... [53].

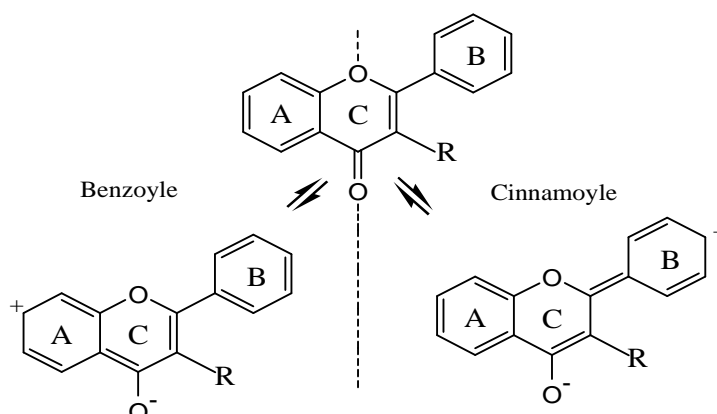
الجدول 4: يبين العلاقة بين قيمة R_f و صيغة الفلافونويد.

قيم R_f	البنية الفلافونويدية
-----------	----------------------

زيادة مجموعات الهيدروكسيل	R_f ينقص في الأنظمة العضوية و يتزايد في الأنظمة المائية.
استبدال الهيدروكسيل بميثوكسيل	R_f يتزايد في الأنظمة العضوية و يتناقص في الأنظمة المائية.
مثيلة الموقع 5	R_f ينقص في الأنظمة العضوية.
إدخال مجموعة سكر	R_f ينقص في الأنظمة العضوية و يتزايد في الأنظمة المائية.

II-2-1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:

لكل مركب فلافونويدي طيف امتصاص مميز في وسط كحولي (ميثانولي) مشكلا بذلك عصابتي امتصاص اساسيتين I و II شكل-6- يتغير بإضافة كواشف تترجم على طيف الأشعة فوق البنفسجية بإزاحات باتوكرومية أو هيبسوكرومية لحزم الامتصاص بالمقارنة مع طيف مسجل في وسط ميثانولي يأخذ كمرجع [52] تعطينا معلومات وافية على بنية المركب (جدول-5-) كما أن هذه التقنية لا تحتاج إلى كميات كبيرة من العينة لهذا كانت من أهم الوسائل المستعملة للتعرف على البنى الكيميائية للفلافونويدات.



الشكل-6-

إضافة الكواشف:

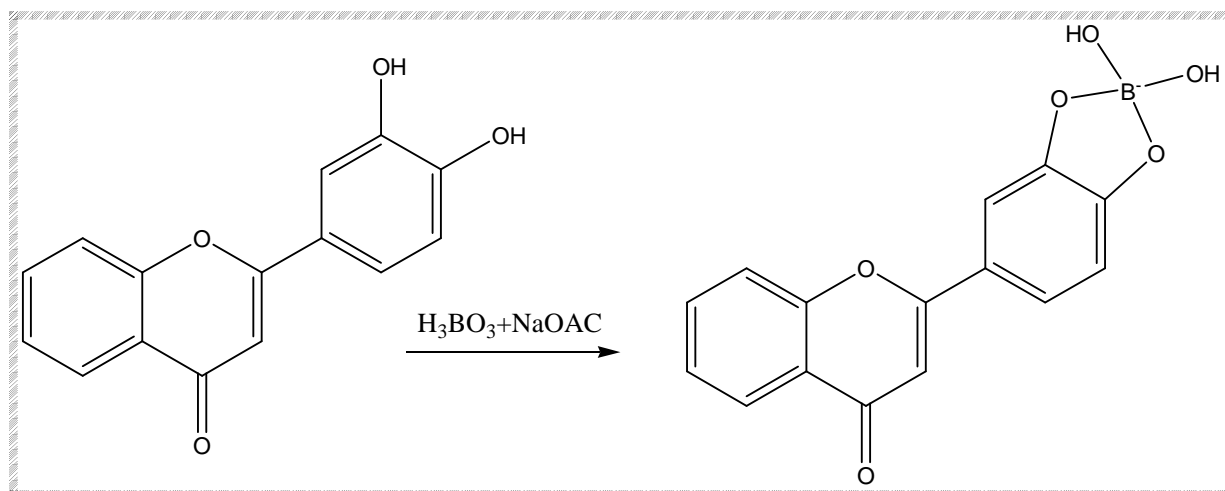
NaOH (أو NaOMe):

قاعدة قوية تستطيع تايين كل مجموعات الهيدروكسيل للهيكل الفلافونويدي، الإزاحة الباتوكرومية و تغير شدة الحزمة I بعد إضافة NaOH تعطينا معلومات على عدد و مواقع OH الحرة [54]. ظهور حزمة جديدة بين 320-335 ن م مقارنة مع طيف الميثانول، يؤكد وجود OH حر في الموقع 7 بالنسبة للفلافونويدات [55].

NaOAc و H_3BO_3 + NaOAc

أسيئات الصوديوم قاعدة ضعيفة، لا تأين إلا مجموعات الهيدروكسيل ذات الحمضية القوية في المواقع 3, 7, '4 [56]، تخلق فعل باتوكرومي من 5 إلى 20 ن م على الحزمة II يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الموقع 7.

إضافة حمض البوريك في وجود أسيئات الصوديوم يشكل معقد مع مجموعات أرثو ثنائي هيدروكسيل، ينتج فعل باتوكرومي للحزمة I من 12 إلى 30 ن م [57].



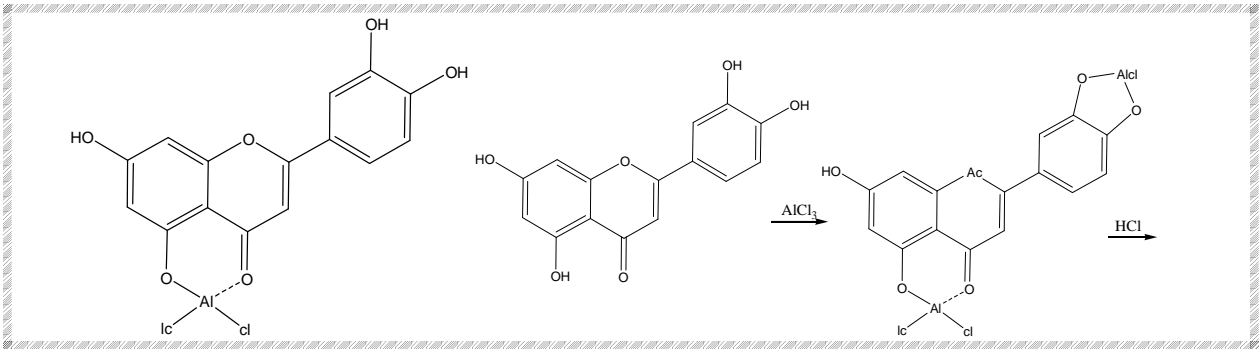
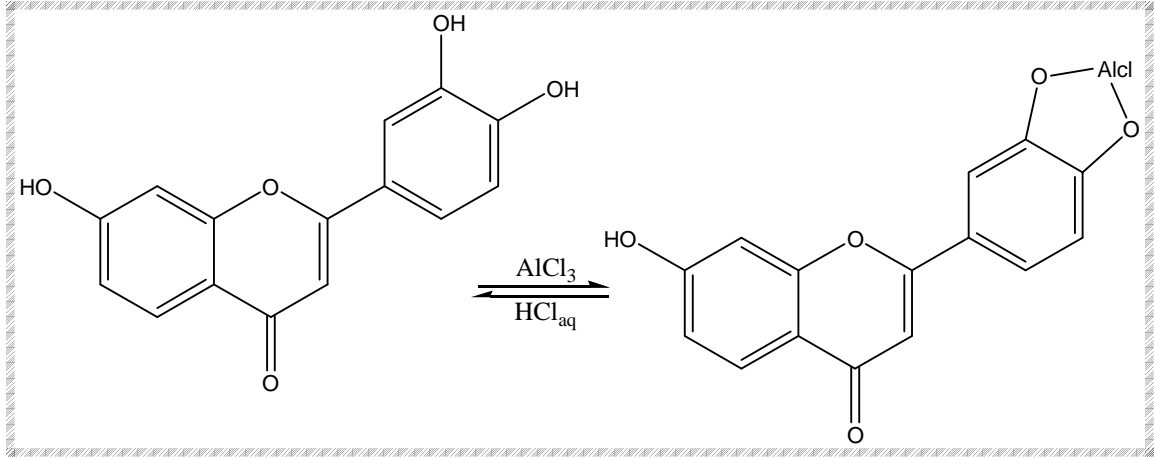
الشكل 7 : المعقد المتكون في وجود $H_3BO_3 + NaOAc$

 $AlCl_3$ و $HCl + AlCl_3$

إضافة $AlCl_3$ يشكل معقد مستقر مع كربونيل الموقع 4 و هيدروكسيل الموقع 5 و/ أو 3، و معقد غير مستقر في حالة وجود أرثو ثنائي هيدروكسي [58] هذا الأخير ينتج فعل باتوكرومي للحزمة I بالمقارنة مع الطيف الميثانولي، و إزاحة هيبسوكرومية لنفس الحزمة عدد 30 إلى 40 ن م عدد إضافة HCl بالمقارنة مع طيف $AlCl_3$.

وجود إزاحة هيبسوكرومية للحزمة I تقدر ب 20 ن م تعني وجود ثلاثي هيدروكسي على الحلقة B.

من جهة أخرى، إذا نتج عن إضافة HCl إزاحة باتوكرومية للحزمة I عند 60 ن م تؤكد وجود OH حر في الموقع 3 و/ أو في الموقع 5.



الشكل 8: المعقدات الثابتة و غير الثابتة بين $AlCl_3$ و بعض الفلافونيدات في وجود و غياب HCl

جدول-5- مختلف تأثيرات الكواشف على طيف UV و تعيلاتها

الدليل	الإزاحة الكيميائية(ن م)		الكاشف
	العصابة II (nm)	العصابة I (nm)	
Flavone	280-250	350-310	MeOH
Flavonol(3-OR)	280-250	360-330	
Flavonol(3-OH)	280-250	385-350	

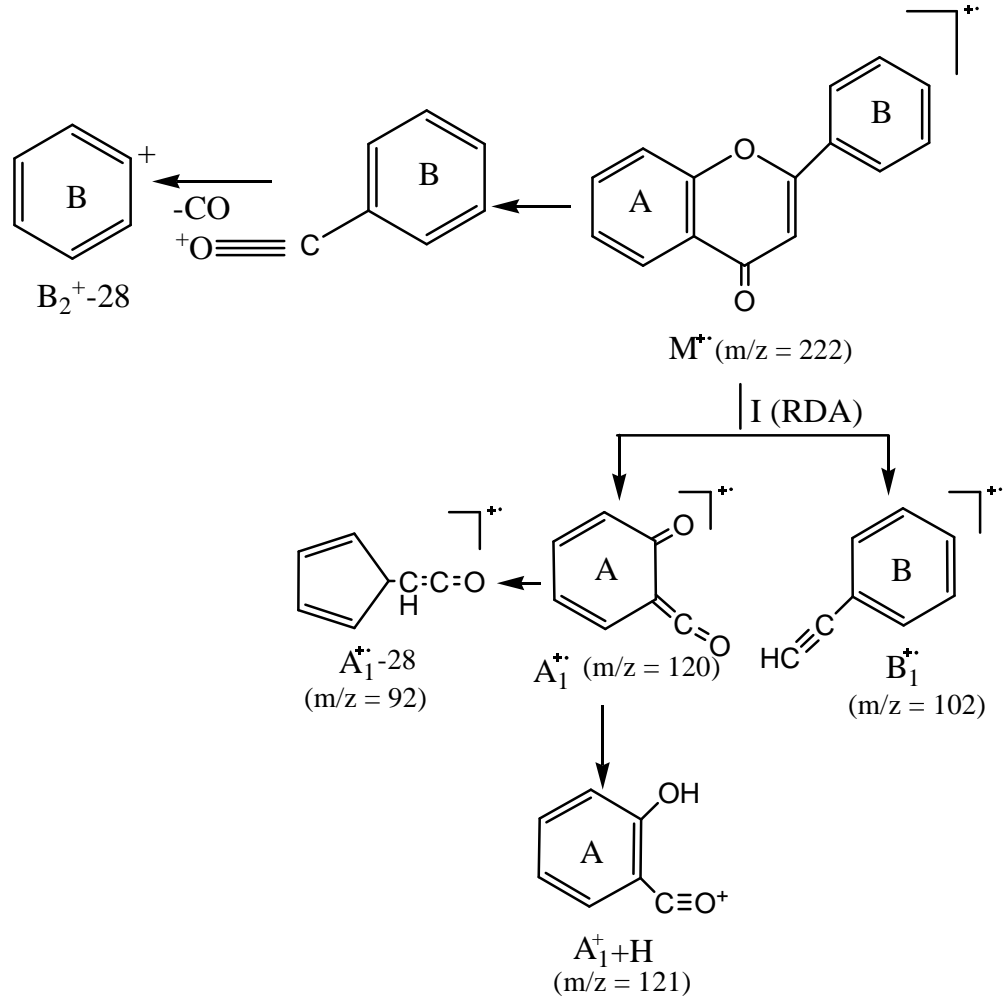
OH-3,4' أو أرثو ثنائي OH على الحلقة A أو ثلاثة OH متجاورة على الحلقة B 4'-OH 3-OH,4'-OR 7-OH	استمرار تناقص شدة الإمتصاص بمرور الزمن (تفكك الطيف) 45+ 60 دون نقصان في شدة الإمتصاص 45+ 60 مع نقصان في شدة الإمتصاص عصابة جديدة بين 320-335	NaOMe
7-OH 7-OH مع مستبدل أكسجيني في C ₆ و/ أو في C ₈ 5,6,7 ; 5,7,8 ; 3,3,4' tri-OH 7-OR (حالة flavones 4'-OH و flavonols فقط)	5+ إلى 20+ إزاحة صغيرة طيف يتفكك بمرور الوقت $\Delta\lambda(I) < \Delta\lambda(I)$ NaOMe NaOAC	NaOAC
أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (6.7 أو 7.8)	12+ إلى 36+ إزاحة ياتوكرومية ضعيفة	NaOAC+H ₃ BO ₃
أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (إضافة إلى أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B)	30+ إلى 40+ مقارنة بطيف HCl+ AlCl ₃ 20+ إلى 25+ مقارنة بطيف HCl+ AlCl ₃	AlCl ₃
5-OH مع وجود مجموعة أكسجينية في C ₆ 5-OH مع وجود مجموعة أكسجينية في C ₆ 3-OH أو 3-OH و 5-OH إمكانية 5-OH و مجموعة prenyl في C ₆	17+ إلى 20+ 35+ إلى 55+ 50+ إلى 60+ دون تغيير	HCl+ AlCl ₃

II-2-2- مطيافية الكتلة:

مطيافية الكتلة تقنية تستعمل لتحديد البنية الكيميائية للمركبات العضوية تعطي لنا الوزن الجزيئي بدقة للمركب كما أنها لا تحتاج الى كميات كبيرة من العينة المدروسة كما تمكننا من معرفة مختلف الروابط الكيميائية في المركب بدراسة الشذايا الناتجة عن انقسام المركب حيث تستعمل تقنية القذف الالكتروني IE [59] في حالة الاجليكونات على الحلقة الغير

متجانسة حسب الشكلين II•I [60] حيث

الأيون A_1^+ للحلقة A و الأيون B_1^+ و B_2^+ للحلقة B
في حالة الفلافونات كثافة الأيون A_1^+ اكبر من كثافة الايون B_1^+ [57].



أما تقنية القذف السريع [FAB] تطبق على الجليكوزيدات، لان هذه الأخيرة لا تتحمل الطاقة القوية التي تتطلبها تقنية IE [61] لوجود المستبدلات السكرية. تمكنا هذه التقنية من معرفة الأيون الجزيئي وطبيعة السكر [62] إضافة إلى تكوين

أيونات شبه جزيئية مثل: $(M+H)^+$, $(M+K)^+$, $(M+Na)^+$,

... $(M-H)^+$

من التقنيات الحديثة تقنية الالكتروسبراي، مثل تقنية FAB و تختلف عنه فقط في الطريقة العملية و تستعمل للمركبات الطيارة إضافة إلى الجزيئات التي تنكسر بسهولة مثل الجليكوزيدات O-glycosides .

II 3-2 طيف الرنين النووي المغناطيسي:

من بين التقنيات الفيزيوكيميائية المعروفة، RMN هي الوحيدة التي تتطلب كميات نوعا ما كبيرة من العينة. لهذا كان استعمالها محدود مقارنة مع طرق التحليل الأخرى، لكن هذا لا ينفي فعاليتها في تحديد البنية الكيميائية للفلافونويدات خاصة

أطياف البروتون $RMN-^1H$ والكربون $RMN-^{13}C$

II 1-3-2 طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN-^1H$:

يعطينا معلومات حول بنية بعض البروتونات الفلافونويدية التي تتغير في المجال 6-8 ppm كما يمكننا من معرفة [63].

- 1- عدد وموقع مختلف البروتونات الفلافونويدية.
- 2- البروتونات الميثوكسيلية المحمولة على الهيكل الفلافونويدي.
- 3- عدد وطبيعة السكريات المرتبطة بالأجليكون.
- 4- تحديد وتعيين عدد السكريات الموجودة على الهيكل الفلافونويدي ونوع الرابطة α ، β بين السكر والأجليكون.

يمكن الحصول على طيف ^1H R.M.N. للفلافونيدات باستعمال مذيبات مختلفة أفضلها CDCl_3 (الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونيدات غير القطبية) ومذيب DMSO-d_6 الذي يعطي نتائج جيدة مع الجليكوزيدات والأجليكونات [64] و مذيب CD_3OD .

تتوزع بروتونات الفلافونيدات بشكل مجموعات محددة هي: بروتونات الحلقة A، بروتونات الحلقة B و بروتونات الحلقة C في حالة الفلافون، بروتونات أليفاتية (سكريات، مجموعات الميثوكسيل... الخ). أ- البروتونات الأروماتية:
* بروتونات الحلقة A :

يعطي البروتونين H_6 و H_8 زوج من الاشارات الثنائية في المنطقة (6.5-6.0 ppm) بثابت تزاوج $J=2.5$ Hz، وفي حالة ارتباط سكر بأكسجين C_7 فإن إشارتي H_6 و H_8 تنزاحان إلى مجال أدنى [64]. بعض الفلافونات تحتوي على بروتون وحيد على الحلقة A و بالتالي فإن الإشارة الناتجة عن بروتون H_6 أو H_8 و تتمركز في منطقة امتصاص البروتون H_3 للفلافون بجوار 6.3 ppm.

جدول 6: قيم الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A

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

				الفلافونيد
	(H ₆ 'H ₂ ')	(H ₅ 'H ₃ ')		Flavone
	7.7-7.9ppm	6.5-7.1ppm		Flavonol
	7.9-8.1ppm	6.5-7.1ppm		
<i>d</i> (J=2.5 Hz)	-	<i>dd</i> (9 ; 2.5 Hz)	<i>d</i> (J=9 Hz)	7-OR (R=H, Sucre)
6.7-7.0 ppm	-	6.7-7.1ppm	8.5-0 ppm	

*بروتونات الحلقة B :

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

مستبدل وحيد على الحلقة B: في هذه الحالة الحلقة B لديها أربع بروتونات H₅'، H₃'، H₆'، H₂' و تظهر البروتونات على شكل ثنائي و بثابت تزواج (J=9 Hz) و في المجال (6.7-8.0 ppm) حيث تقع إشارة (H₅'، H₃') في مجال أعلى من مجال إشارة (H₆'، H₂') بسبب فعل حجب مستبدل C₄ على (H₅'، H₃') و التعرية الناشئة على H₆'، H₂' من طرف الحلقة C.

جدول 7: قيم الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B في حالة C4'-RO

مستبدلان على الحلقة B: في هذه الحالة الحلقة B بها ثلاث بروتونات H₆'، H₅'، H₂' حيث H₅' يظهر كإشارة ثنائية بثابت تزواج (J=9 Hz) وفي المجال (6.7-8.0ppm) في حين يظهر H₂' بإشارة ثنائية (J=2.5Hz) غالبا ما تكون متداخلة

مع إشارة H_6' الذي يظهر كإشارة ثنائية-ثنائية و بثابت تزاوج ($J=9;2.5\text{Hz}$) و هاتان الإشارتان تتمركزان في المجال (7.2-8.0ppm)

ثلاث مستبدلات على الحلقة B: يكون البروتونان H_2' ، H_6' متكافئان و يظهران بإشارة أحادية بين (6.5-7.5ppm) في حالة $3',4',5'\text{-OH}$ أما في حالة ارتباط مجموعة OMe أو O-Sucre ب C_3' أو C_5' نحصل على إشارة ثنائية غير متناظرة ($J=2.5\text{Hz}$) [65].

بروتون الحلقة C:

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

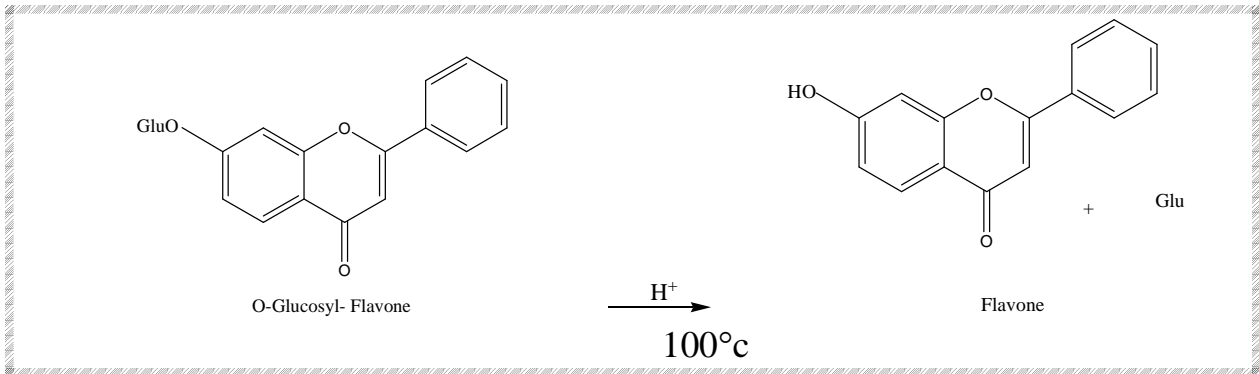
طيف الرنين النووي المغناطيسي الكربون ^{13}C -RMN :

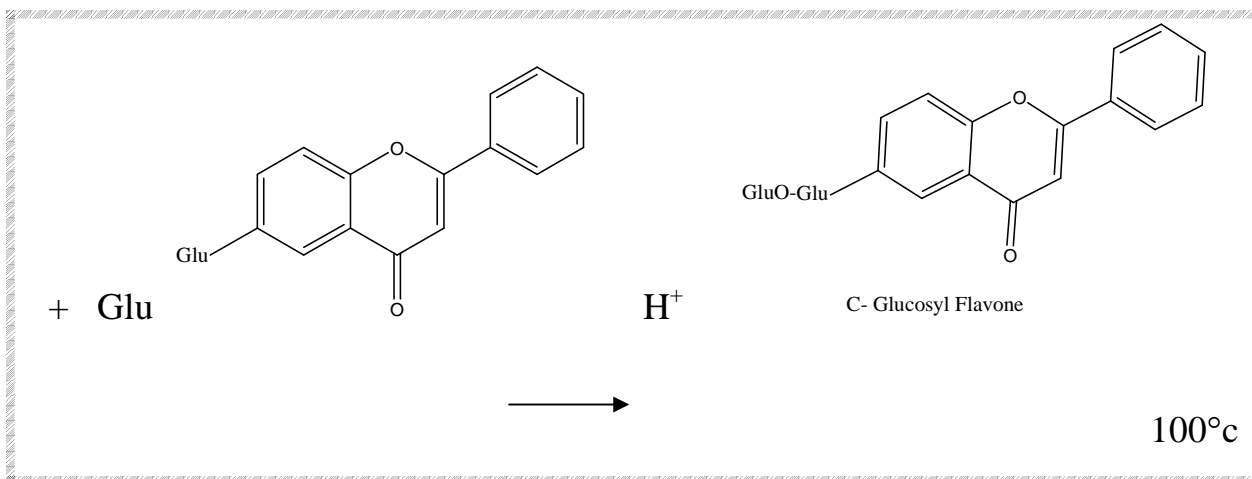
يعطي معلومات مهمة لإيجاد الصيغة الكيميائية للمركب مثل [8-66]:

- 1- عدد ذرات كربون المركب الفلافونويدي ومجالات تغيراتها.
- 2- معرفة نوع الرابطة ما إذا كانت كربون-سكر أو أكسجين-سكر.

الإماهة الحمضية:

إذا تحصلنا بعد عمليات الفصل على فلافونويد يحتوي على جزيئة سكر أو أكثر فإنه يصعب علينا تحديد مواقع هذه الأخيرة على الهيكل الفلافونويدي باستعمال التقنيات السابقة الذكر خاصة في غياب مطيافية الكتلة لهذا نلجأ إلى الإماهة الحمضية التي تساعدنا على معرفة نوع الجزء الأجليكوني و نوع السكر. شكل-9-



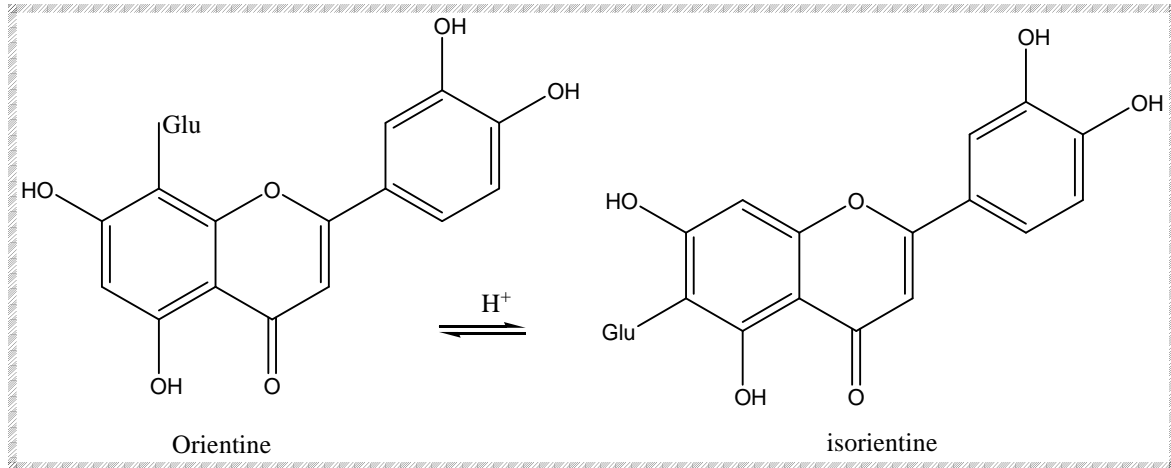


الشكل 9 : التمييه الحمضي للمركبات الجليكوزيدية.

حيث يتم تحلل الجليكوزيدات من ذوع أكسجين - سكر تحت تأثير عدة عوامل عدى قوة الحمض، ذوع وموقع الجزء السكري حسب الجدول: 8 [67].

طبيعة السكر	الموقع	اتجاه زيادة مدة التمييه
L-rhamnose	3-O-Glucosides	↓
L-arabinose	4'-O-Glucosides	
D-glucose, D-galactose	7-O-Glucosides	

أما الجليكوزيدات من ذوع كربون- سكر فإنها تقاوم التحلل الحمضي [68]، لكن تنفتح الحلقة الغير متجانسة بسهولة خاصة مشتقات 5-hydroxy c-glucosil flavones، الذي يفسر حدوث تبادل في المواقع بين السكر المرتبط في الموقع 6 و الأخر في الموقع 8 فيتشكل لدينا متماكبين، و هذا ما يعرف بـ isomérisation wessey mosev شكل 10. تعطي هذه العملية معلومات عن الصيغة البنوية لهذه المركبات. حيث تم إثبات أن جزيء السكر مرتبط بذرة كربون الحلقة [67] (A).



الشكل 10 : تماكب Wessely-Moser

عملية التمييه الحمضي:

نذيب كمية من الجليكوزيد في الميثانول، نضيف له 2ملل من حمض كلور الماء بتركيز 2-4 نضامي في أنبوبة اختبار ثم نسخن المزيج في حمام مائي لمدة ساعة تحت 100 درجة مئوية.

بعد أن يبرد المزيج نقوم بعملية استخلاص سائل- سائل، حيث نضيف 2ملل من الإيثر ثنائي الإيثيل للمزيج، نحرك جيدا ثم نفصل الطبقة العضوية التي تحوي الأجليكون عن المائية التي تحوي الجزء السكري، تكرر العملية ثلاث مرات.

نعيد عملية الاستخلاص بواسطة أسيتات الإيثيل ثلاث مرات و بواسطة البيوتانول مرة أو أكثر و ذلك للتأكد من تمييه كل الأجزاء الجليكوزيدية، تجمع الطبقات العضوية و تركز تحت ضغط منخفض.

ثم نقوم بتحليل الأجليكون بتسجيل طيف UV أو بمقارنته مع شواهد أجليكونية باستعمال كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة. أما الجزء السكري فيتم تحليله بواسطة صفيحة كروماتوغرافية تحضر من السلكالجال ترش بمحلول (NaH₂PO₄H₂O) و عندما تجف توضع لمدة ساعة في فرن عند 100 درجة مئوية.

بواسطة ماصة شعرية توضع نقاط من الطبقة المائية التي تحوي الجزء السكري مع شواهد سكرية معروفة حتى تركز، تملص في نظام أستون- ماء (1:9) بعد أن تجف توضع في فرن لمدة 5 دقائق عند نفس الدرجة أين تبدأ بقع السكريات بالظهور فتكون بنية في الضوء المرئي و صفراء تحت مصباح UV . الجدول-9- يعطي قيم R_f لسكريات معروفة [69].

الجدول 9: قيم R_f لبعض السكريات المعروفة:

	R _f
α (L) Rhamnose D(+)-Xylose	0.88

L(+) Arabinose	0.79
β (+) Glucose	0.66
D(+) Galactose	0.53
	0.33

فصل الثالث

الدراسة الكيميائية النباتية

-الدراسة الفيتوكيميائية للنبتة :

طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية

الدراسة الكيميائية النباتية ل *Centaurea Sphaerocephala*



تم جمع هذه النبتة في شهر جوان سنة 2003 من منطقة القالة ولاية الطارف بالشرق الجزائري حيث تم تقسيمها إلى أجزائها المختلفة من (أوراق، أزهار) التي أجريت لها عملية التجفيف بوضعها بعيدا عن الشمس و الرطوبة حيث تم استخلاص هذه الأجزاء كل على حدى ثم جمعت مستخلصاتها لاحتوائها على نفس المركبات و كانت الكتلة المستعملة 2170غ.

2- وصف النوع

كما هو الحال لمعظم النباتات الزهرية فان نبات *Centaurea*

Sphaerocephala يزهر في أواخر فصل الربيع، معمر، أزهاره

بنفسجية متوسطة الحجم.

له أوراق متوسطة غير مرتبطة بالساق، طولها (30-60 سم).سيقان أكثر

أو اقل نائمة بدون جذور عرضية، هذه السيقان في نهايتها تتجه نحو

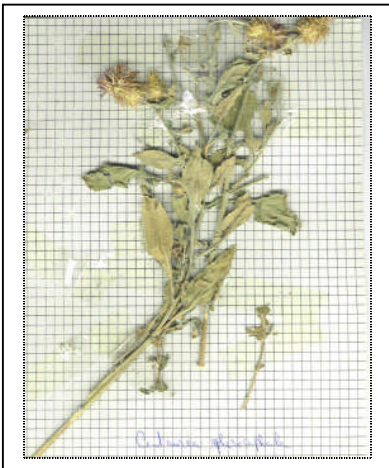
الأعلى، متفرعة. أوراق سفلية مفصصة ذات شكل دائري،الفص الأخير

دائري بشكل أكبر، العلوية منها بدون معلق،

على شكل ادينات مسننة، حامل الأزهار وحيد، عريض من 2-3 سم

متجمعة على 1-3 أوراق، زوائد القنبات ملتصقة من 5-7 زوائد

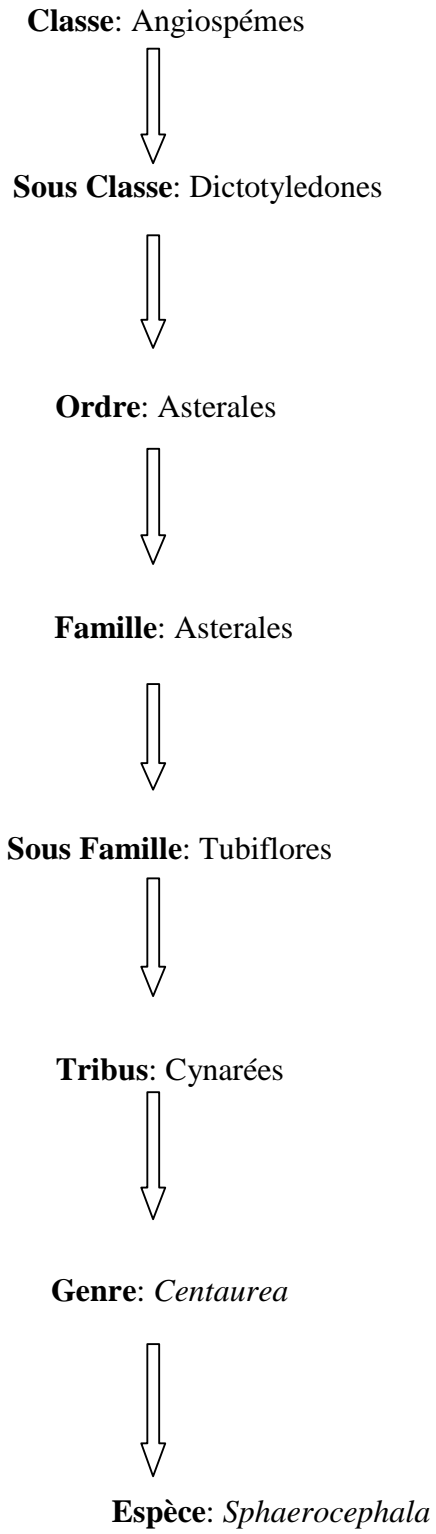
جارحة. الوسطى أكثر طولاً، Akènes بيضاء بالرمادي [3].



صورة فوتوغرافية ل

Centaurea sphaerocephala

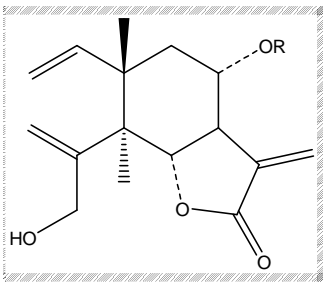
3- التصنيف النظامي للنباتة



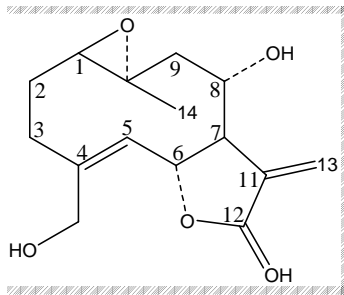
اختيار المادة النباتية:

على الصعيد الكيميائي جنس *centaurea* نبات غني بالعديد من المركبات خاصة اللاكتونات السيسكيتربينية [70] و الفلافونويدية [41]. أكدت دراسة بيبلوغرافية حول احد الأنواع لهذا الجنس و الذي نحن بصدد دراسته و هو *Centaurea sphaerocephala* انه غير محلي، لم تتم عليه إلا دراستين فيتو كيميائيتين [71-72]، حيث تم في إحداها دراسة الطور الكلوروفورمي الذي نتج عنه فصل و تحديد الصيغة الكيميائية لخمس مركبات من نوع

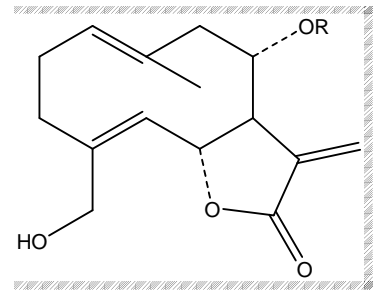
اللاكتونات السيسكيتربينية [72]



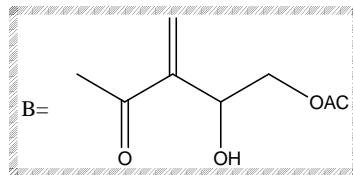
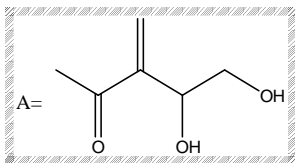
3a R=H
3c R=B



2



1a R=A
1b R=B

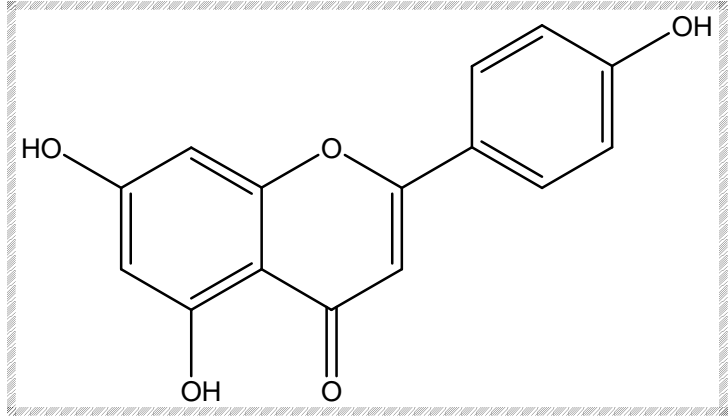


كما تمت دراسة أخرى في مخبرنا حول نواتج الايض الثانوي لهذا النوع

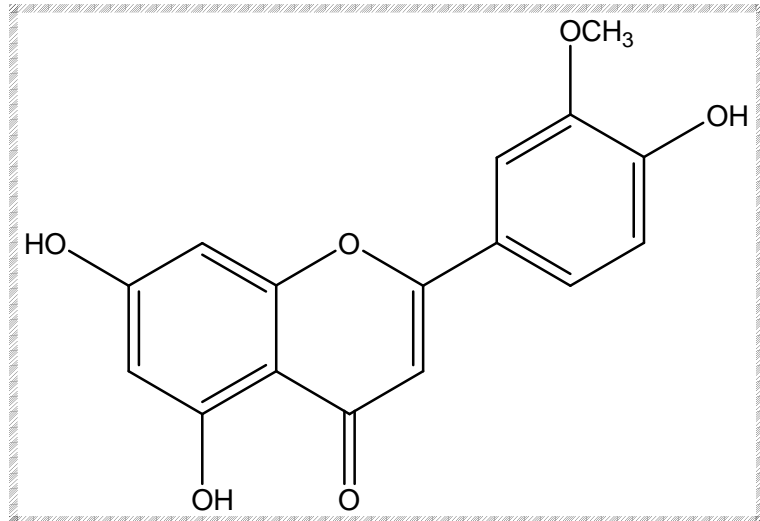
(*sphaerocephala*)

و التي لم تدرس سابقا للطور خلات الايثيل حيث فصلت منه أربع فلافونويدات مرقمة

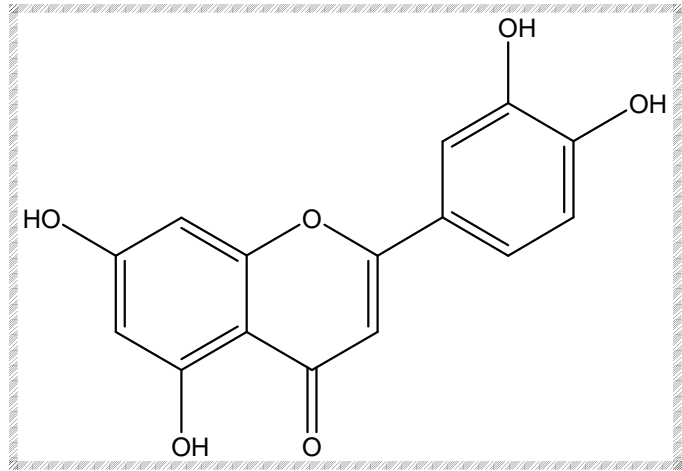
من 1 إلى 4 [73].



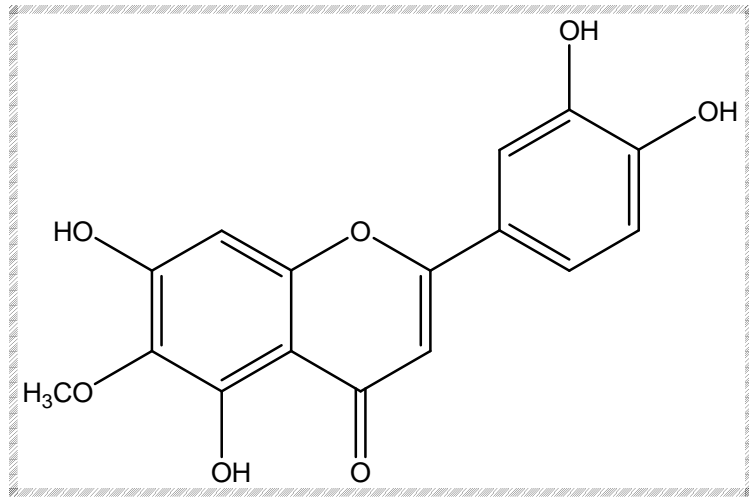
1 Apigénine



2 3'-methoxy Apigénine



3 Lutéoline



4 6-methoxy Lutéoline

4- الاستخلاص:

بعد تنقية النبتة و طحنها أخذنا كمية (2170غ) أجريت لها عملية الاستخلاص بواسطة

الميثانول-الماء (20-80) وتركت لمدة 24 ساعة لرشح المحلول وكررت العملية ثلاث مرات متتالية مع تجديد المذيب في كل مرة للحصول على كمية معتبرة من المستخلص حيث تجمع الرشاحة في دورق في كل مرة بعدها تركز هذه الأخيرة حتى التخلص من أكبر كمية من الميثانول تحت ضغط منخفض حتى الحصول على مستخلص خام في الحالة الجافة تقريبا

و أجرينا عليها استخلاصا من نوع سائل-سائل باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية

➤ فبدأنا بإضافة ثلاثي كلور الميثان للمستخلص حيث فصلنا الطبقة العضوية وركزت فصلنا على

(2.1 غ) من مستخلص ثلاثي كلور الميثان

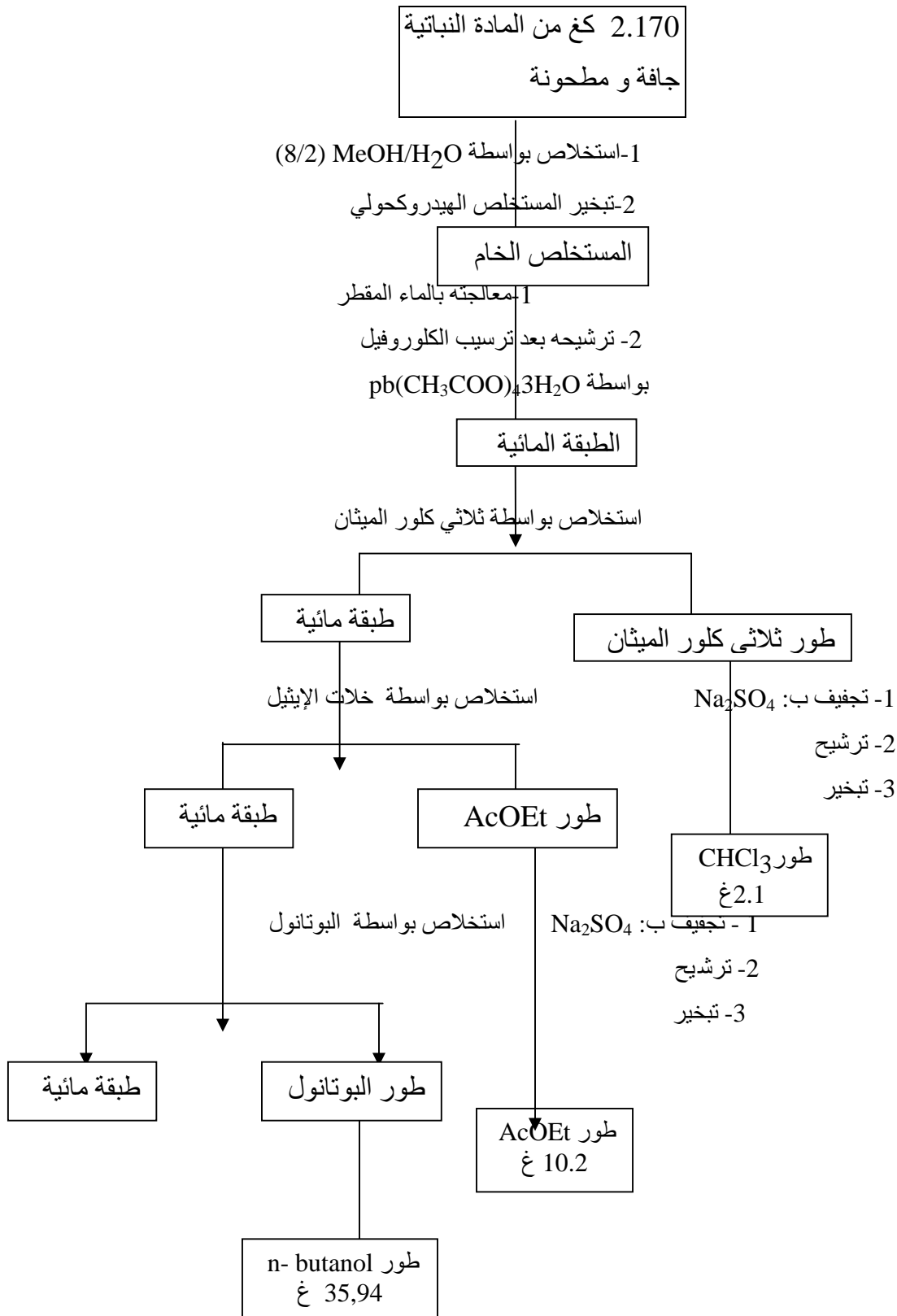
➤ ثم خلات الايثيل حيث أضيفت للطور المائي وكررت العملية ثلاث مرات وجمعت

المستخلصات وركزت تحت ضغط منخفض فكان وزن مستخلص خلات الايثيل (10.2 غ)

➤ وأخيرا البوتانول (n-butanol) الذي أضيف دائما للطور المائي وجمعت المستخلصات و

ركزت تحت ضغط منخفض فكان وزن مستخلص البوتانول (35,94 غ)

والمخطط التالي يلخص كل هذه المراحل:



مخطط عملية استخلاص *C. Sphaerocephala*

هدفنا الأساسي في هذا البحث هو فصل المركبات الفلافونيدية و لاجل ذلك قمنا بإجراء فحص تحليلي بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) على متعدد الاميد و السيليكا جال ، باستخدام جملة من المذيبات فكان النظام المناسب هو (1:9:39) (CHCl₃:MeOH:H₂O) فاخترنا لهذا الغرض كروماتوغرافية العمود باستخدام السيليكا جال محضرة بثلاثي كلور الميثان و بحوالي 20 غ من المستخلص البوتانولي و عملية التلميص تمت باستعمال ثلاثي كلور الميثان مع تشبيعه بالميثانول و بمراقبة مستمرة بإجراء اختبارات كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة (CCM) على السيليكا جال تم تحديد الكسور المتشابهة حيث ركزت تحت ضغط منخفض أين حصلنا في نهاية العملية على الكسور المدونة في الجدول التالي:

جدول-10- تلميص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص البوتانول

الميثانول %	الكلوروفورم %	الكسور	الدوارق المستقبلية
5	95	F ₁	1-2
5	95	F ₂	3-13
5	95	F ₃	14-22
5	95	F ₄	23-26
10	90	F ₅	27-37
10	90	F ₆	38-41
10	90	F ₇	42-45
10	90	F ₈	46
10	90	F ₉	47-49
10	90	F ₁₀	50-52

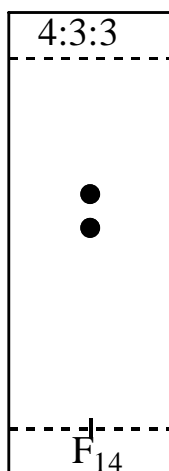
10	90	F11	53-55
10	90	F12	56-59
10	90	F13	60-76

جدول-10- تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص البوتانول (تابع)

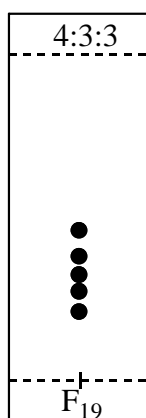
فصلت بكمية معتبرة من العمود الكروماتوغرافي مقارنة مع بقية الكسور لذا ركزنا F_{13} ، F_{14} و F_{19} دراستنا عليها

حيث و بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية المكررة مرتين باستعمال شرائح من متعدد الأמיד في نظام يتكون من الطولين: الميثانول: ميثيل ايثيل سيتون : 3:3:4

أعطى الكسر F_{14} حزمتين F_{141} و F_{142} حيث تم تفتيتهما بواسطة شرائح من السيليكاجال بنظام $CHCl_3:CH_3OH$ 3:1

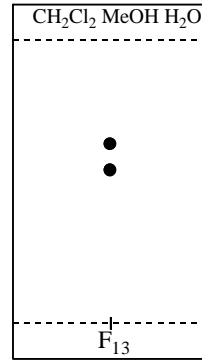


أعطى الكسر F_{19} 5 حزم F_{191} و F_{192} و F_{193} و F_{194} و F_{195} فصلت بكميات قليلة جدا لا تكفي لإجراء الاختبارات الكروماتوغرافية.



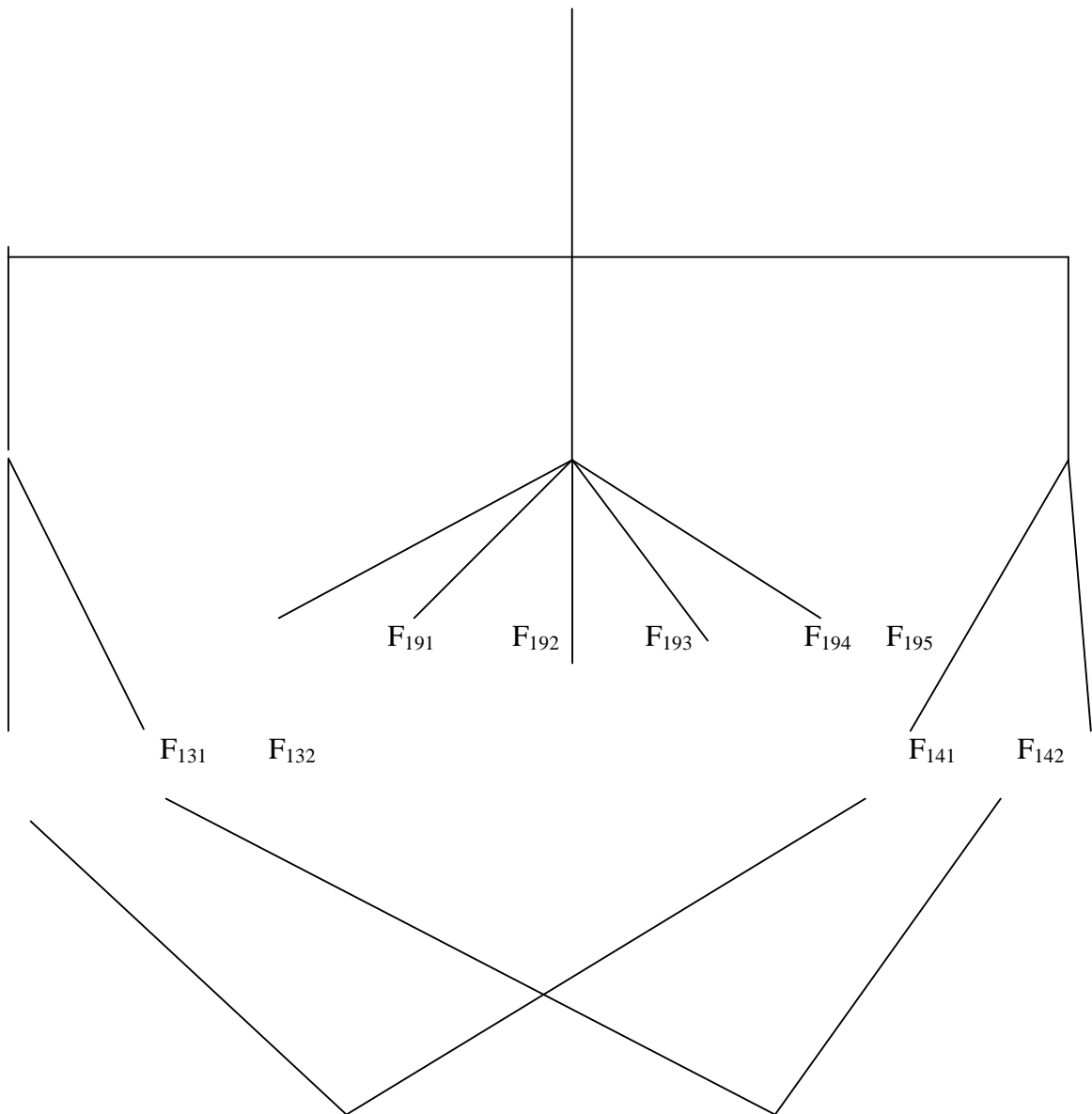
و بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال شرائح من السيليكاجال اعطى الكسر F_{13}

حزمتين تم فصلهما باستعمال المذيب $CH_2Cl_2: MeOH: H_2O$ 4: 2: 0.1



والمخطط التالي يبين مختلف مراد ل فصل ل فلافونويدات نبات القنطريون (*Centaurea sphaerocephala*).

المستخلص البوتانولي للنبات (20 غ)



CS₁CS₂

المخطط 2: مختلف مراحل فصل فلافونويدات نبات *Centaurea sphaerocephala*.

باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية و باستعمال جملة من الانظمة تبين لدينا ان :

$$F_{142} = F_{132} \text{ و } F_{141} = F_{131}$$

أما الكسر F₁₉ أعطى خمس حزم تم فصلها من العمود بكميات صغيرة جدا لا تكفي لاجراء الاختبارات الفيزيو كيميائية.

و بالتالي المركبات المحصل عليها في نهاية هذا العمل هما: CS₁ و CS₂.

فصل الرابع

المناقشة والنتائج

IV-التعيين البنوي للمركبات المعزولة:

بالاعتماد على السلوك الكروماتوغرافي، طيف الأشعة فوق البنفسجية UV، طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون تم التعرف على الصيغ الكيميائية المفصلة للمركبين المفصولين.

النظام I: الطولين: ميثيل ايثيل سيتون : الميثانول (3:3:4)

النظام II: ماء : ميثانول : ميثيل ايثيل سيتون : اسيتيل اسيتون (1:3:3:13)

IV-1- التحليل البنوي للمركب CS₁

IV-1-1- خواصه الكروماتوغرافية:

النظام	I	II
ثابت الانحباس $100 * R_f$	47.6	23.2
اللون الاستشعاعي	بنفسجي مسود	

IV-1-2 المعطيات الطيفية:

IV-1-2-أ. طيف الأشعة فوق البنفسجية UV :

الجدول 10: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CS₁

الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	340	268
NaOH	390	267
AlCl ₃	356	268
AlCl ₃ +HCl	385-355	275
NaOAc	346	250
NaOAc+H ₃ BO ₃	348	251

التحليل:

اللون الاستشعاعي بنفسجي مسود و العصابة I في حدود 340nm بالنسبة للطيف المسجل في MeOH تدل أن المركب عبارة عن فلافون.

بمقارنة الطيف المسجل في NaOH بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للحزمة I (+50nm) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4، عدم ظهور حزمة جديدة بعد 5 دقائق دلالة على وجود OR في الموضع 7.

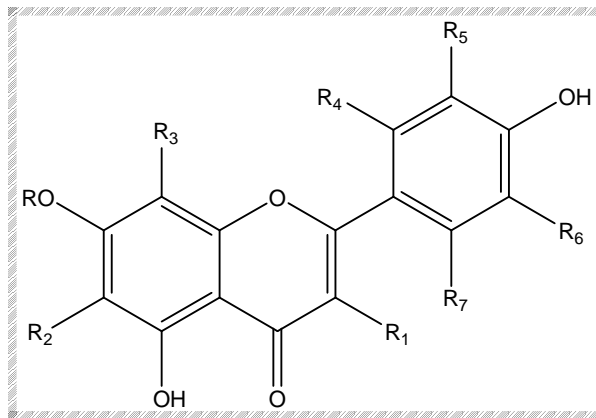
بمقارنة الطيف المسجل في $AlCl_3$ بالطيف المسجل في $(AlCl_3 + HCl)$ لا نجد أي إزاحة دلالة على عدم وجود أي أورثو ثنائي هيدروكسيل.

بمقارنة الطيف المسجل في $(AlCl_3 + HCl)$ مع الطيف المسجل في الميثانول نجد إزاحة باتوكرومية (+45nm) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5.

الطيف المسجل في NaOAc يؤكد عدم وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7، و التي تشير أيضا إلى عدم وجود مستبدل في الموضع 6 و الموضع 8، و بما أن الطيف لا يتحلل مع مرور الوقت فإنه لا وجود لثلاثي هيدروكسيل و لا وجود أيضا لأورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A.

الطيف المسجل في $(NaOAc + H_3BO_3)$ يشير إلى عدم وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A و الحلقة B و هي نفس الملاحظات المأخوذة من الطيف المسجل في $(AlCl_3 + HCl)$.

من خلال هذه النتائج يمكن كتابة الصيغة التالية:



IV-1-2-ب- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون 1H :

الجدول 11: نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب CS₁

الإزاحة الكيميائية (ppm)	التعددية	التكامل	ثابت التزاوج J (Hz)	التعيينات الكيميائية
5.1	d	1H	Br.s	H _{1''}
6.90	d	1H	2	H ₈
6.5	d	1H	2	H ₆
6.75	s	1H	–	H ₃
6.85	d	1H	8.5	H _{5'}
7.6	d	1H	2	H _{2'}
7.65	dd	1H	8.5-2	H _{6'}
4.00	s	3H	–	-OCH ₃

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و التي دونت نتائجه في الجدول رقم 11 ظهور الحلقة B ثنائية الاستبدال عبر إشارات H_{2'}، H_{5'}، H_{6'}.

البروتون H_{6'} ظهر بإشارة (ثنائية- ثنائية) و بثابت تزاوج (J=8.5, 2.0Hz) عند $\delta=7.65$ ppm كما ظهر البروتون H_{5'} كإشارة ثنائية بثابت بتزاوج (J=8.5Hz) عند $\delta=6.85$ ppm، نلاحظ أيضا إشارة ثنائية بثابت تزاوج (J=2.0Hz) عند $\delta=7.6$ ppm توافق البروتون H_{2'}. نشير أيضا إلى وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند $\delta=6.75$ ppm يمكن نسبتها إلى البروتون H₃ و هذا ما يؤكد أن المركب هو فلافون و ليس فلافونول مستبدل في الموضع 3.

ظهرت الحلقة A أيضا ثنائية الاستبدال عبر إشارات H₆ و H₈ حيث ظهرت إشارة ثنائية (J=2.0Hz) موافقة للبروتون H₈ عند $\delta=6.9$ ppm و إشارة ثنائية (J=2.0Hz) موافقة للبروتون H₆ عند $\delta=6.5$ ppm اما الإشارة الاحادية ذات التكامل 3H عند $\delta=4$ ppm فهي خاصة بمجموعة ميثوكسيل في الموضع 3' حسب النتائج السابقة و بالتالي الشق الاجليكوني عبارة عن مركب 3'-methoxy apigénine. الجزء السكري من المركب ظهرت إشارة البروتون الأنوميري للجليكوز (H_{1''}) كثنائية عند $\delta=4.75$ ppm بثابت تزاوج (J=7.2Hz).

3-1-IV- الحلمة الحمضية:

قمنا بحلمة المركب CS₁ في وسط حمضي حسب الطريقة المذكورة سابقا (ص 26) فحصلنا على:

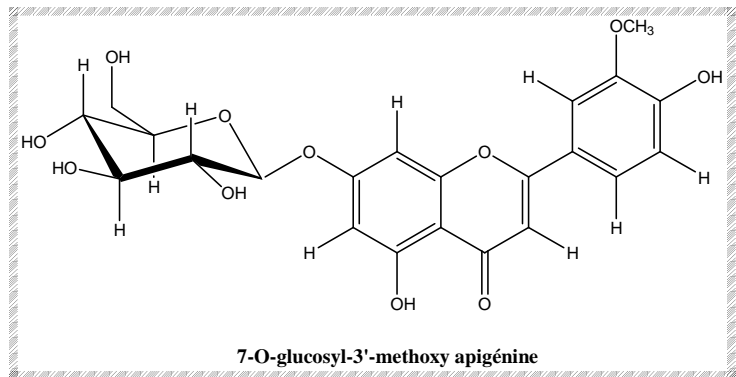
- الشق الاجليكوني: تم قياس طيف UV في الميثانول و R_f للجزء الاجليكوني (مع المركب الأم للتأكد من حدوث تفاعل الحلمهة).
 ✓ ثابت الانحباس للشق الاجليكوني:

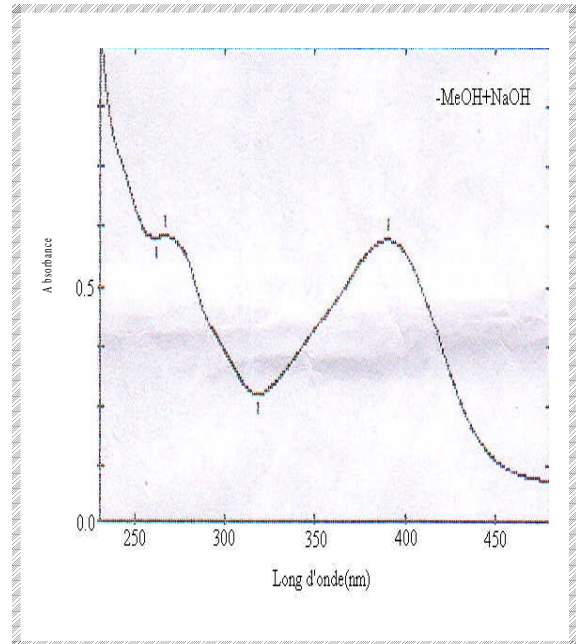
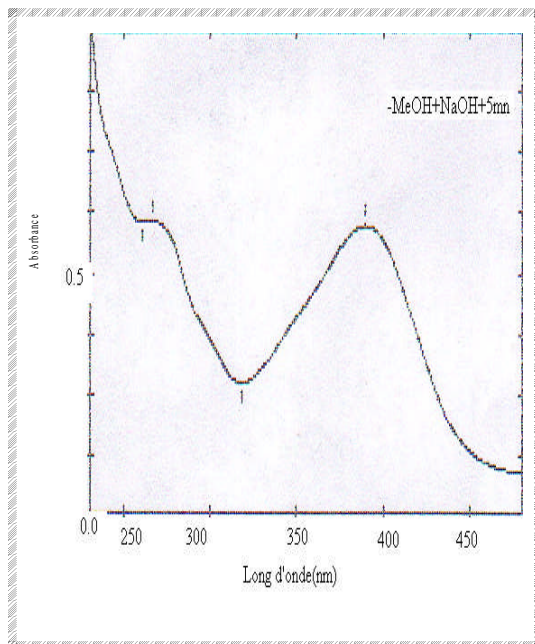
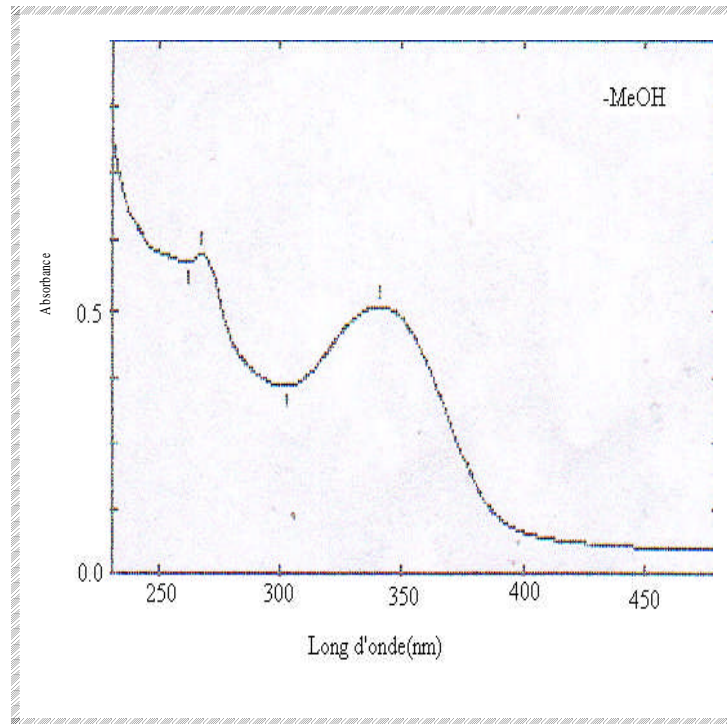
I	النظام
54.3	ثابت الانحباس $R_f * 100$

✓ الأشعة فوق البنفسجية للشق الاجليكوني في الميثانول و NaOH:

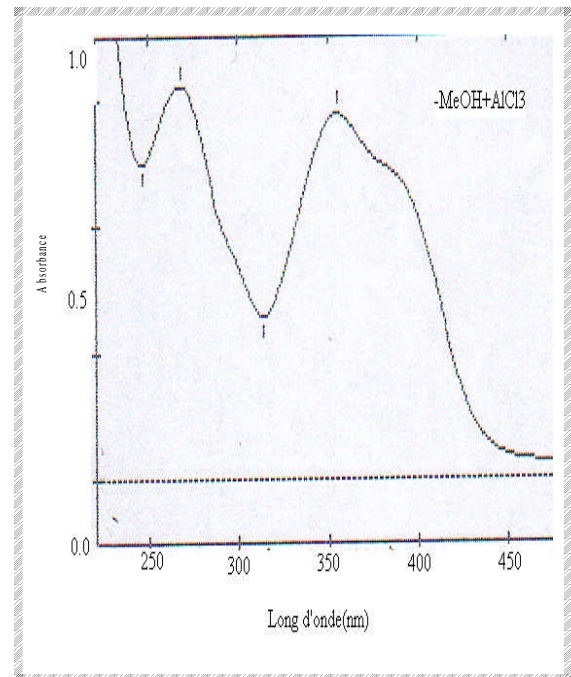
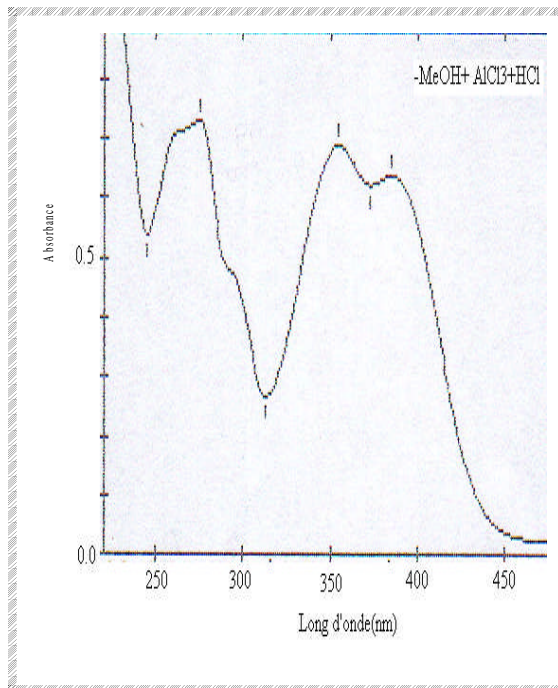
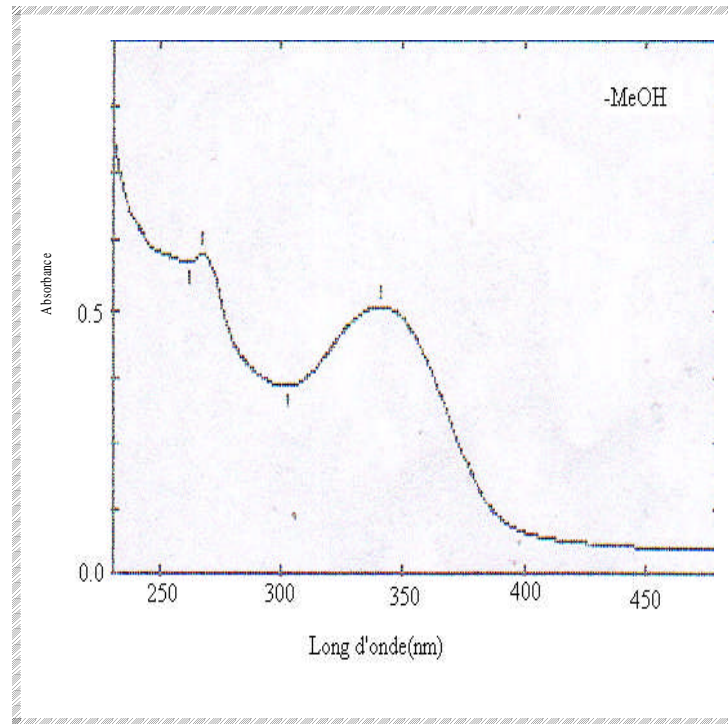
الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)	حزمة جديدة
MeOH	340	272	-
NaOH	338	268	323

- الشق السكري: تم التعرف على طبيعة السكر المفصول بمقارنة R_f هذا الأخير بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهد الجليكوز كما هو موضح في الشكل 11.
 وبتسجيل طيف الأشعة فوق البنفسجية للشق الأجليكوني باستعمال كاشف NaOH نلاحظ ظهور حزمة جديدة عند حوالي 323 (نم) دلالة على ظهور هيدروكسيل حر في الموضع 7 مما يؤكد أن الجليكوز مرتبط بالاجليكون في الموضع 7 وعليه و من المعطيات السابقة فإن الصيغة المقترحة لهذا المركب هي:

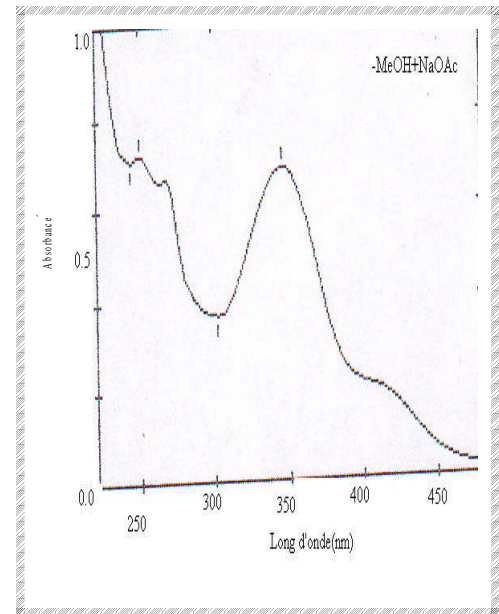
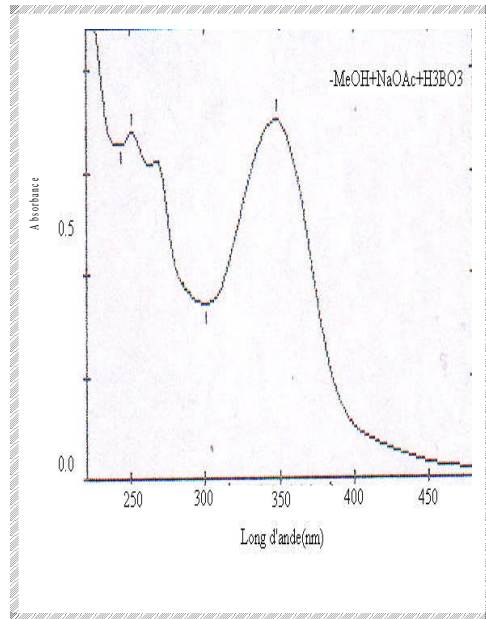
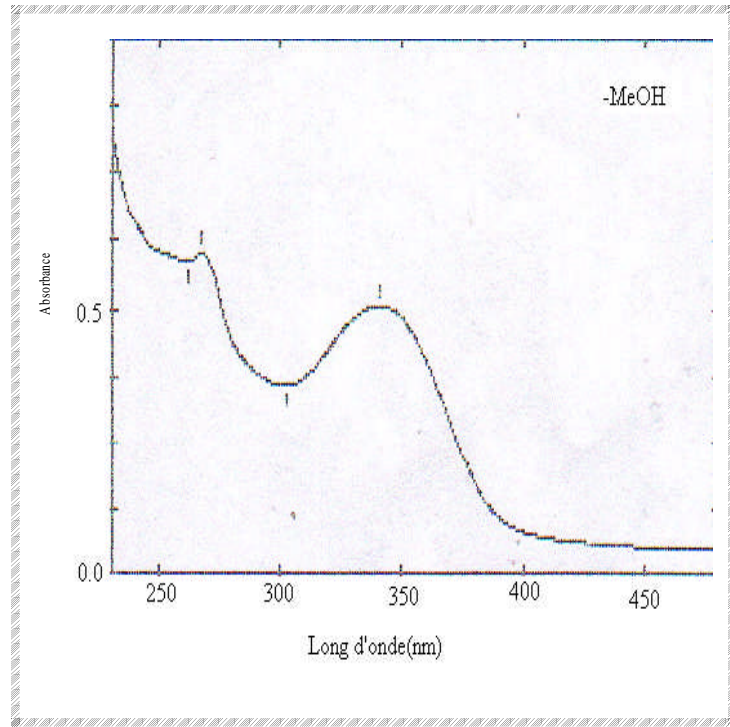




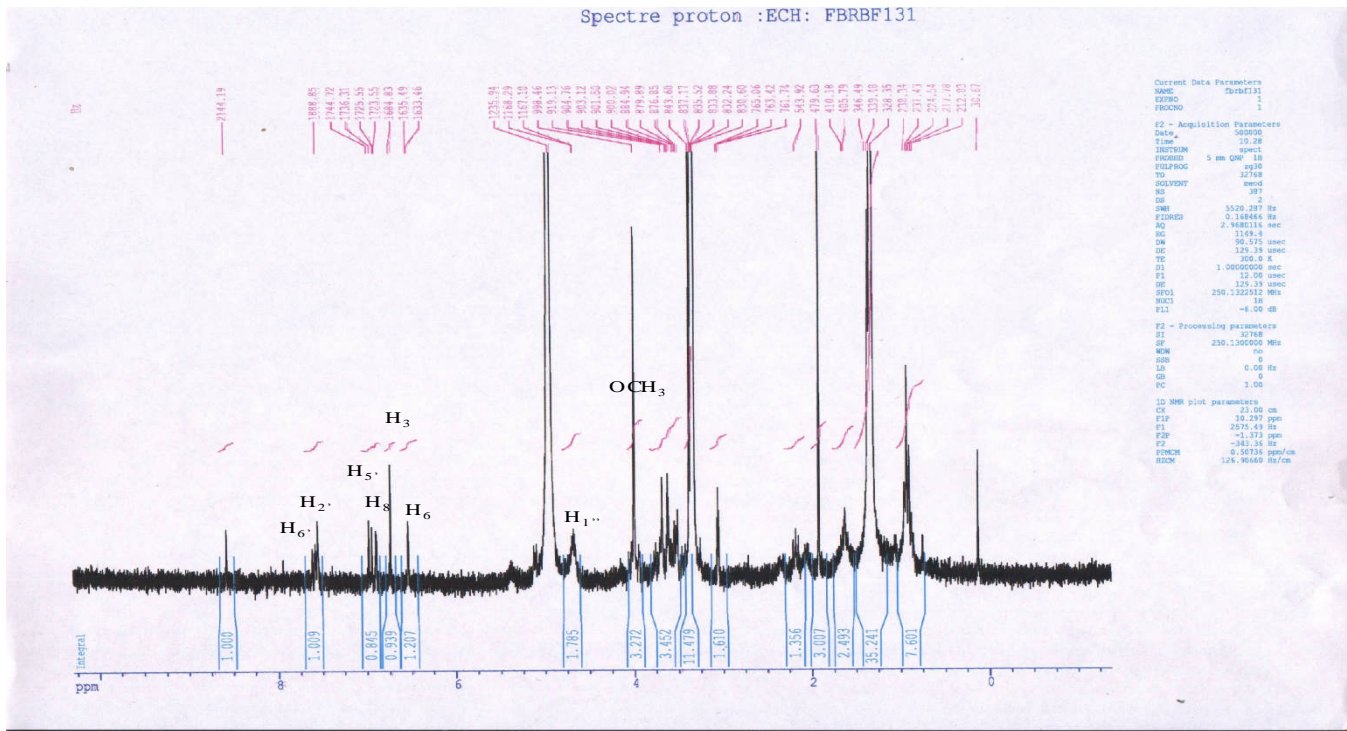
الطيف 1: سلسلة أطياف الاشعة فوق البنفسجية للمركب CS_1 و مختلف المفاعلات.



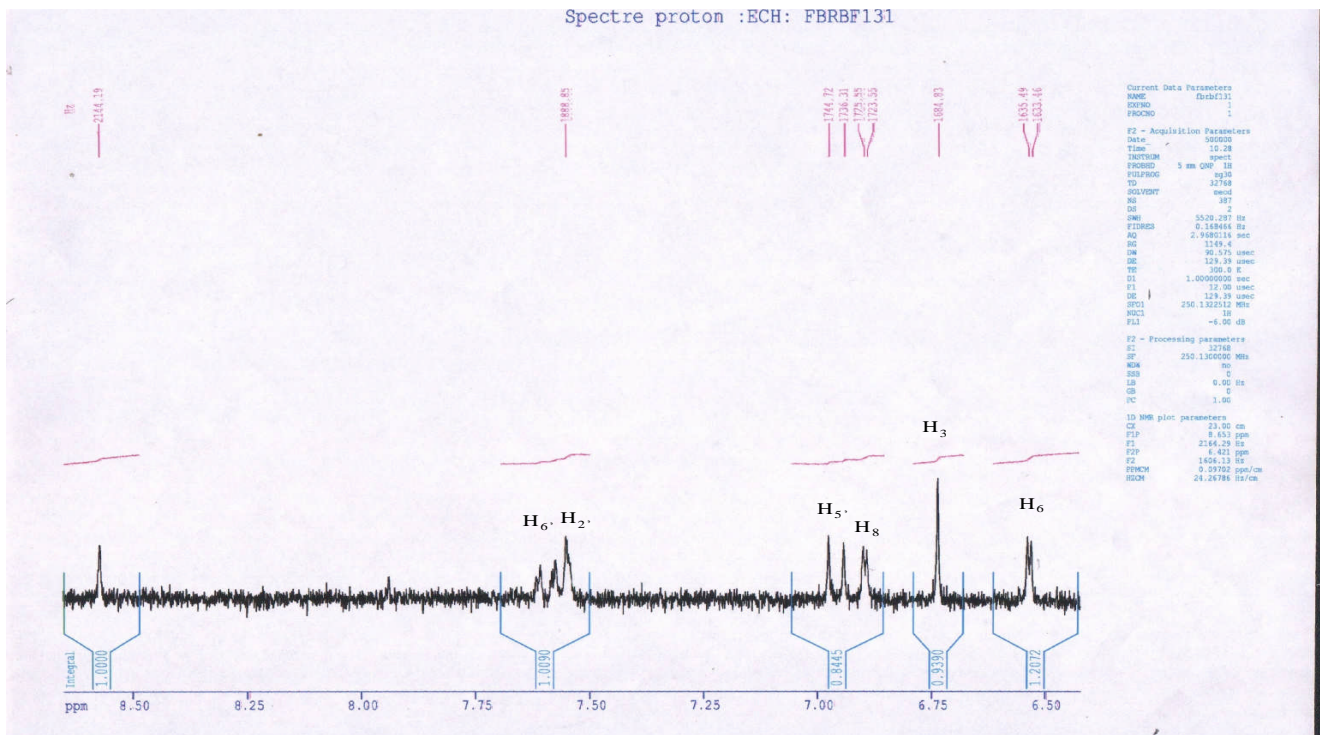
الطيف 1: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب CS_1 و مختلف المفاعلات (تابع).



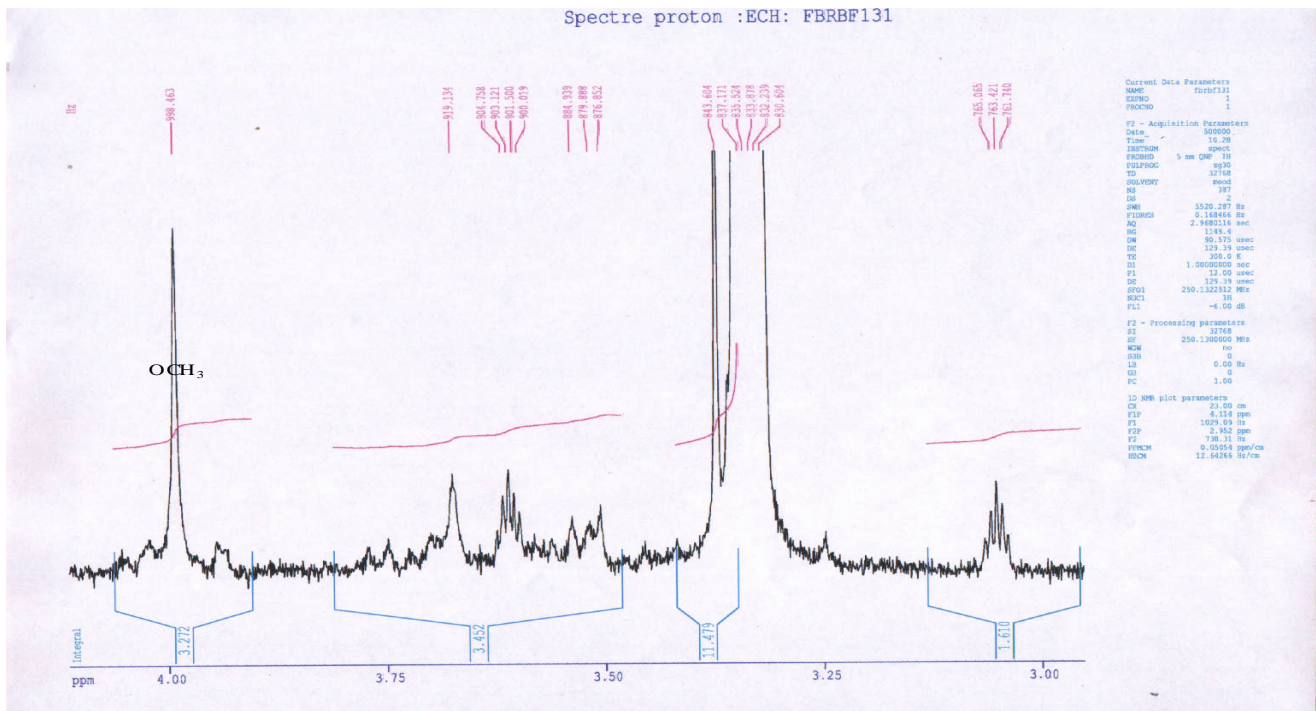
الطيف 1: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب CS₁ و مختلف المفاعلات (تابع).



الطيف-2- طيف البروتون $^1\text{H-NMR}$ للمركب CS_1 في الميثانول



الطيف-3- تكبير المجال (6.25-8.5 ppm) لطيف المركب CS_1



الطيف-4- تكبير المجال (3.25-4.5 ppm) لطيف المركب CS₁

IV-2- التحليل البنوي للمركب CS₂ :

IV-2-1- خواصه الكروماتوغرافية:

النظام	I	II
ثابت الانحباس 100*R _f	45.5	25.01
اللون الاستشعاعي	بنفسجي مسود	

IV-2-2 المعطيات الطيفية:

IV-2-2-أ- طيف الأشعة فوق البنفسجية UV :

الجدول 10: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CS₂

الكواشف	العصابة I (نم)	العصابة II (نم)
MeOH	333	267
NaOH	368	268
NaOAc	337	268
NaOAc+H ₃ BO ₃	337	268
AlCl ₃	344	271
AlCl ₃ +HCl	382-342	275

التحليل:

اللون الاستشعاعي بنفسجي مسود و العصابة I في حدود 333 نم تدل على ان المركب عبارة عن فلافون. بمقارنة الطيف المسجل في NaOH بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للحزمة I (+35 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4، عدم ظهور حزمة جديدة بعد 5 دقائق دلالة على وجود OR في الموضع 7.

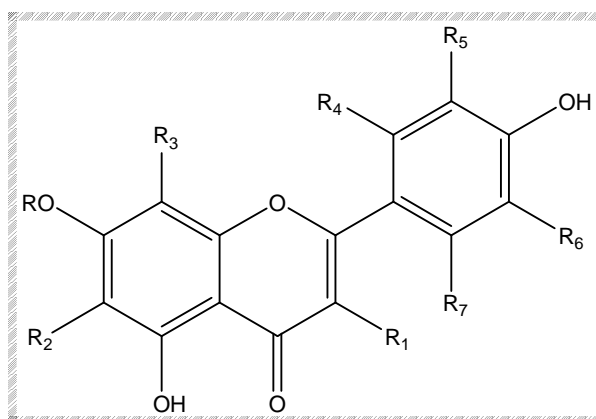
بمقارنة الطيف المسجل في AlCl₃ بالطيف المسجل في (AlCl₃ +HCl) لا نجد أي إزاحة دلالة على عدم وجود أي أورثو ثنائي هيدروكسيل.

بمقارنة الطيف المسجل في (AlCl₃ +HCl) مع الطيف المسجل في الميثانول نجد إزاحة باتوكرومية (+49نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5.

الطيف المسجل في NaOAc يؤكد عدم وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7، و التي تشير أيضا إلى عدم وجود مستبدل في الموضع 6 و الموضع 8، و بما أن الطيف لا يتحلل مع مرور الوقت فإنه لا وجود لثلاثي هيدروكسيل و لا وجود أيضا لأورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A.

الطيف المسجل في (NaOAc+H₃BO₃) يشير إلى عدم وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A و الحلقة B و هي نفس الملاحظات المأخوذة من الطيف المسجل في (AlCl₃ +HCl).

من خلال هذه النتائج يمكن كتابة الصيغة التالية:



IV-2-2-ب- طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ¹H:

الجدول 11: نتائج مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب CS₂

الإزاحة الكيميائية (δ) (ppm)	التعددية	التكامل	ثابت التزاوج J (Hz)	التعيينات الكيميائية
------------------------------	----------	---------	---------------------	----------------------

H _{1''}	br.s	1H	d	5.12
H ₈	2.1	1H	d	6.5
H ₆	2.1	1H	d	6.85
H ₃	-	1H	S	6.65
H _{5'} , H _{3'}	8.5- 2.1	2H	dd	6.85
H ₂ , H _{6'}	8.5- 2.1	2H	dd	7.85

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و التي دونت نتائجه في الجدول رقم 11 ظهور إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H عند $\delta=6.85$ ppm ، $\delta=7.85$ ppm و هي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقة B المستبدلة في الموضع 4' لذا يمكن نسبتها إلى كل من (H_{5'}, H_{3'}) و (H_{2'}, H_{6'}) على الترتيب. نشير أيضا إلى وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند $\delta=6.65$ ppm يمكن نسبتها إلى البروتون H₃ و هذا ما يؤكد أن المركب هو فلافون و ليس فلافونول مستبدل في الموضع 3. أما الحلقة A ظهرت ثنائية الاستبدال عبر إشارات H₆ و H₈ حيث ظهرت إشارة ثنائية (J=2.1Hz) موافقة للبروتون H₈ عند $\delta=6.5$ ppm و إشارة ثنائية (J=2.1Hz) موافقة للبروتون H₆ عند $\delta=6.85$ ppm و هي مطابقة لإشارتي (H_{5'}, H_{3'}) و بالتالي الشق الاجليكوني عبارة عن مركب Apigénine.

الجزء السكري من المركب ظهرت إشارة البروتون الأنوميري للجليكوز (H_{1''}) كثنائية غير مكتملة (br.s) عند $\delta=5.12$ ppm

3-2-IV- الحلمهة الحمضية:

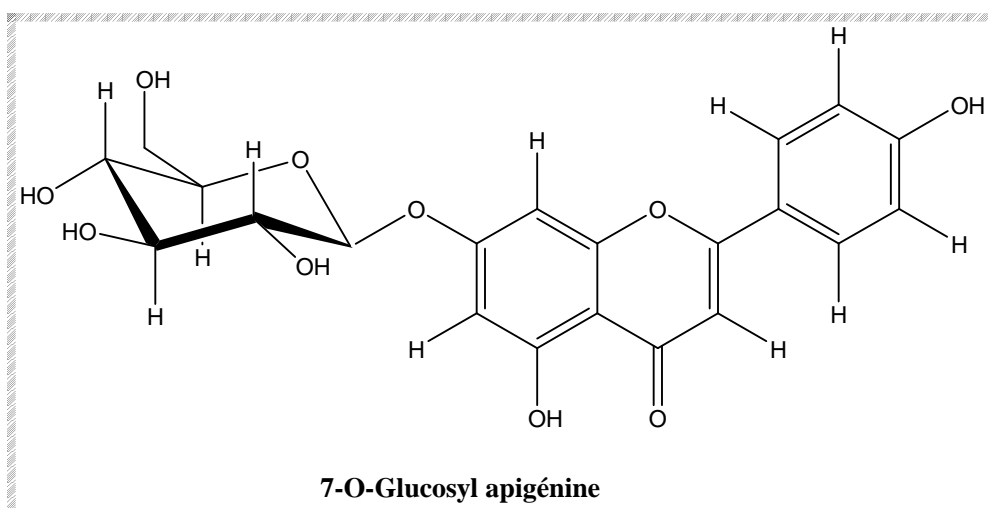
قمنا بحلمهة المركب CS₂ في وسط حمضي حسب الطريقة المذكورة سابقا (ص 26) فحصلنا على:
 - الشق الاجليكوني: تم قياس طيف UV في الميثانول و R_f للجزء الاجليكوني (مع المركب الأم للتأكد من حدوث تفاعل الحلمهة).
 ✓ ثابت الانحباس للشق الاجليكوني:

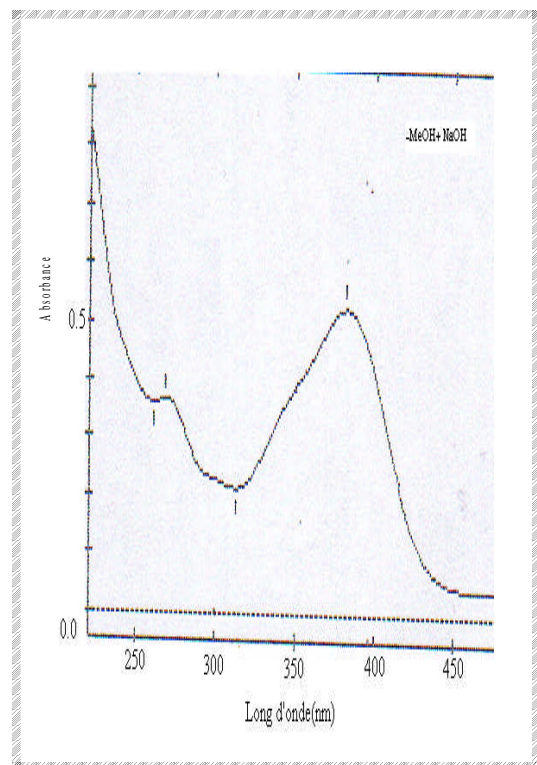
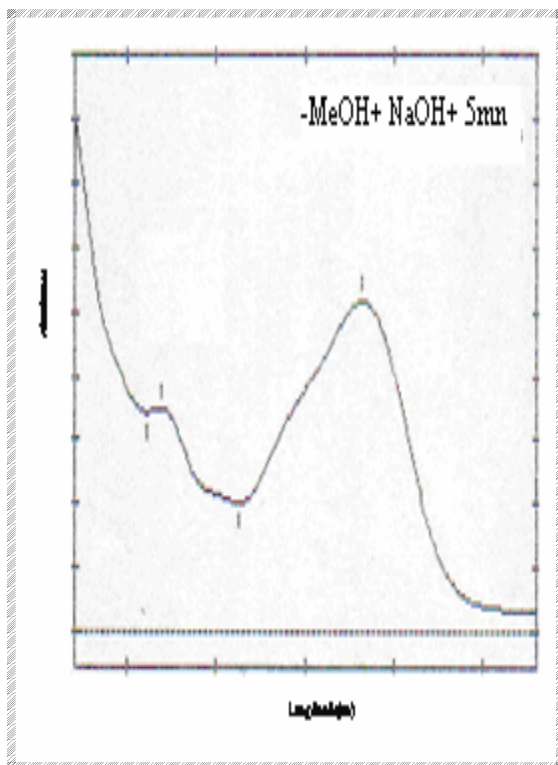
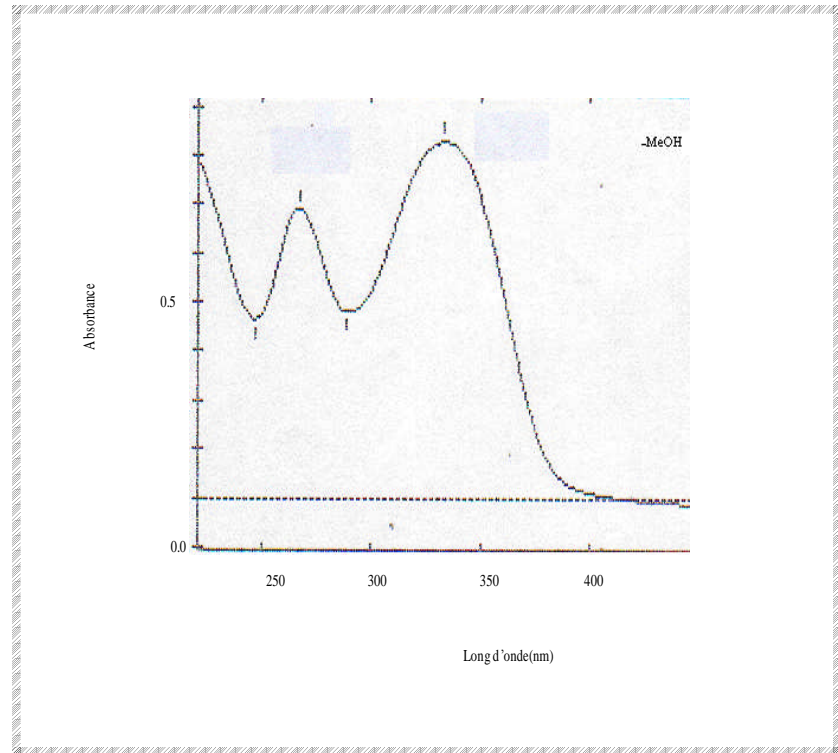
I	النظام
56.1	ثابت الانحباس R _f *100

✓ الأشعة فوق البنفسجية للشق الاجليكوني في الميثانول و NaOH:

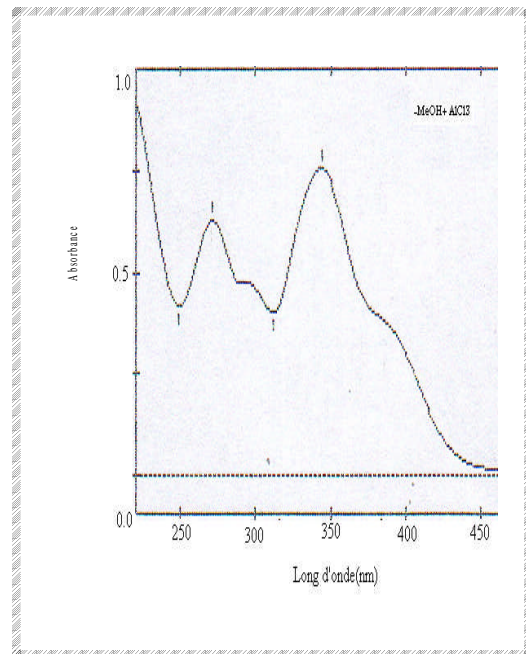
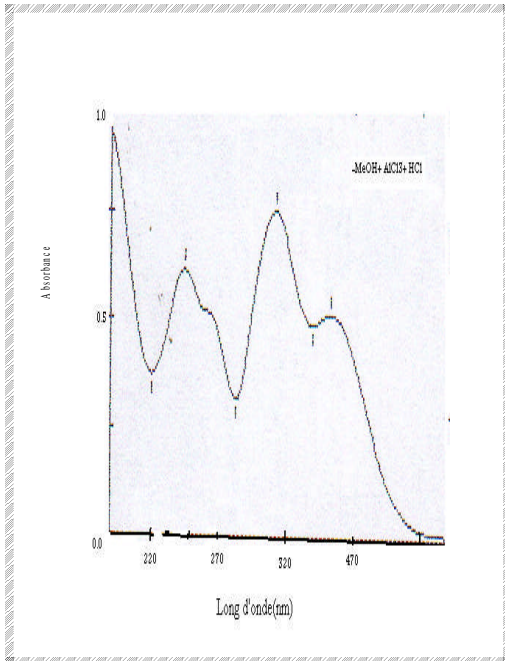
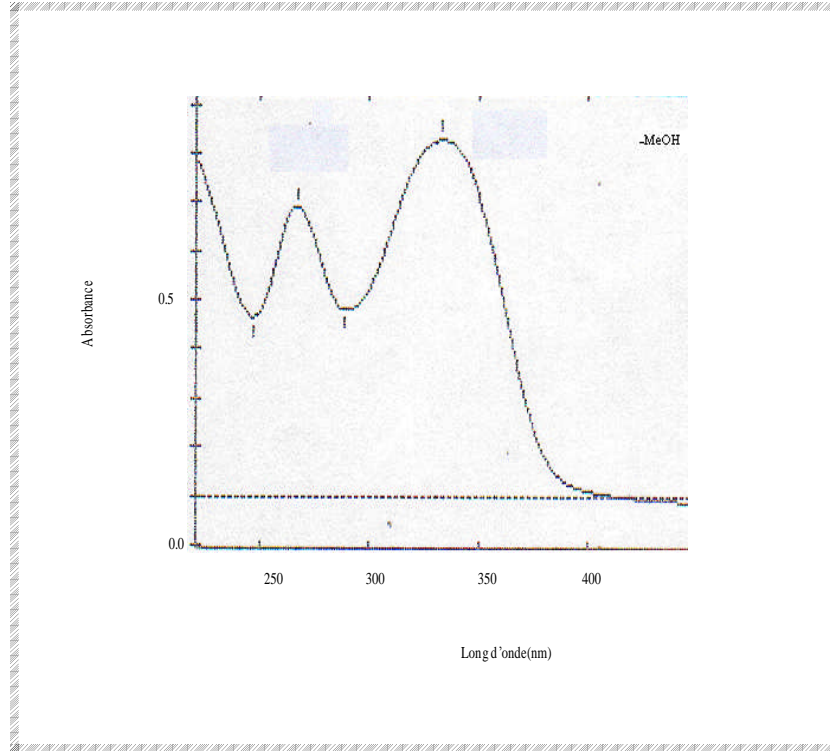
الكواشف	العصبة I (نم)	العصبة II (نم)	حزمة جديدة
MeOH	405	273	-
NaOH	392	275	323

- الشق السكري: تم التعرف على طبيعة السكر المفصول بمقارنة R_f هذا الأخير بعدة شواهد سكرية فوجدنا أنه يماثل شاهد الجليكوز كما هو موضح في الشكل 11. وبتسجيل طيف الأشعة فوق البنفسجية للشق الأجليكوني باستعمال كاشف NaOH نلاحظ ظهور حزمة جديدة عند 323 (نم) دلالة على ظهور هيدروكسيل حر في الموضع 7 مما يؤكد أن الجليكوز مرتبط بالاجليكون في الموضع 7 وعليه و من المعطيات السابقة فإن الصيغة المقترحة لهذا المركب هي:

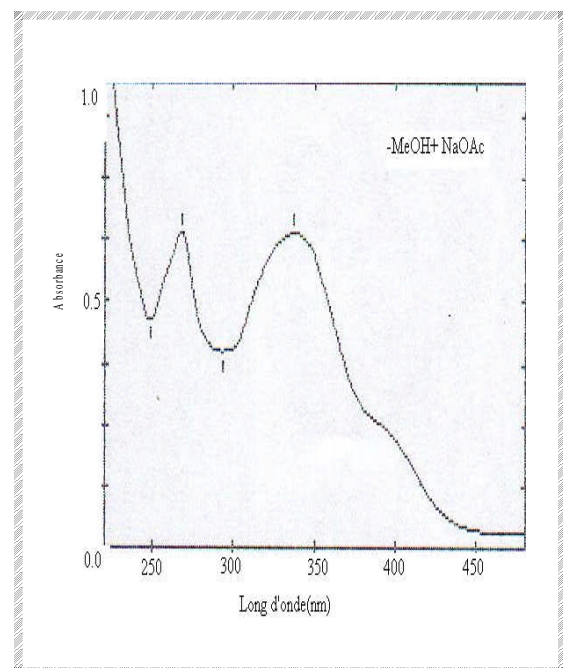
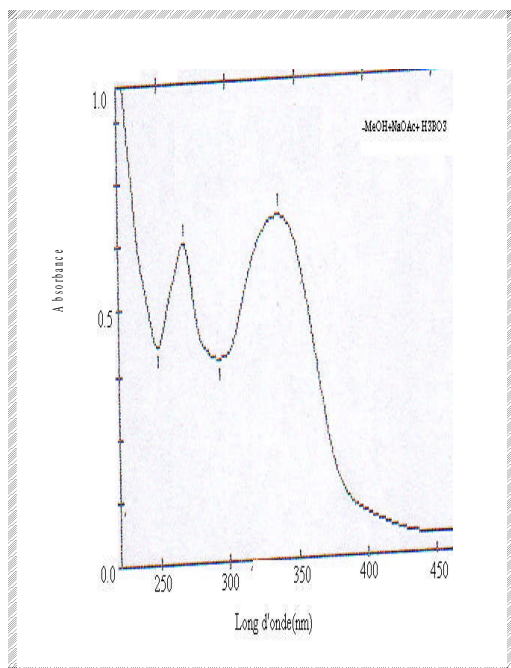
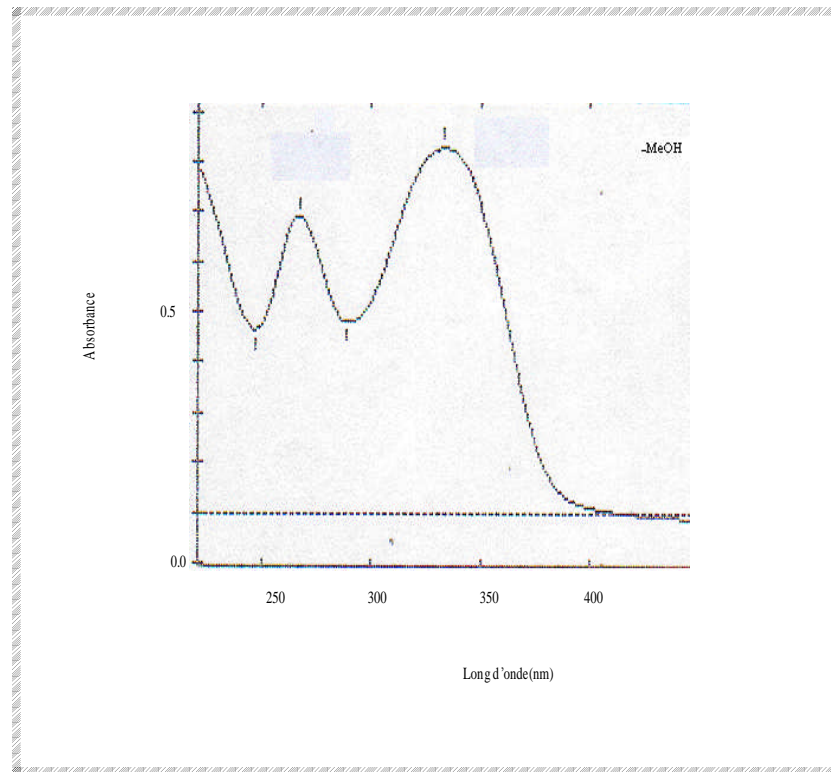




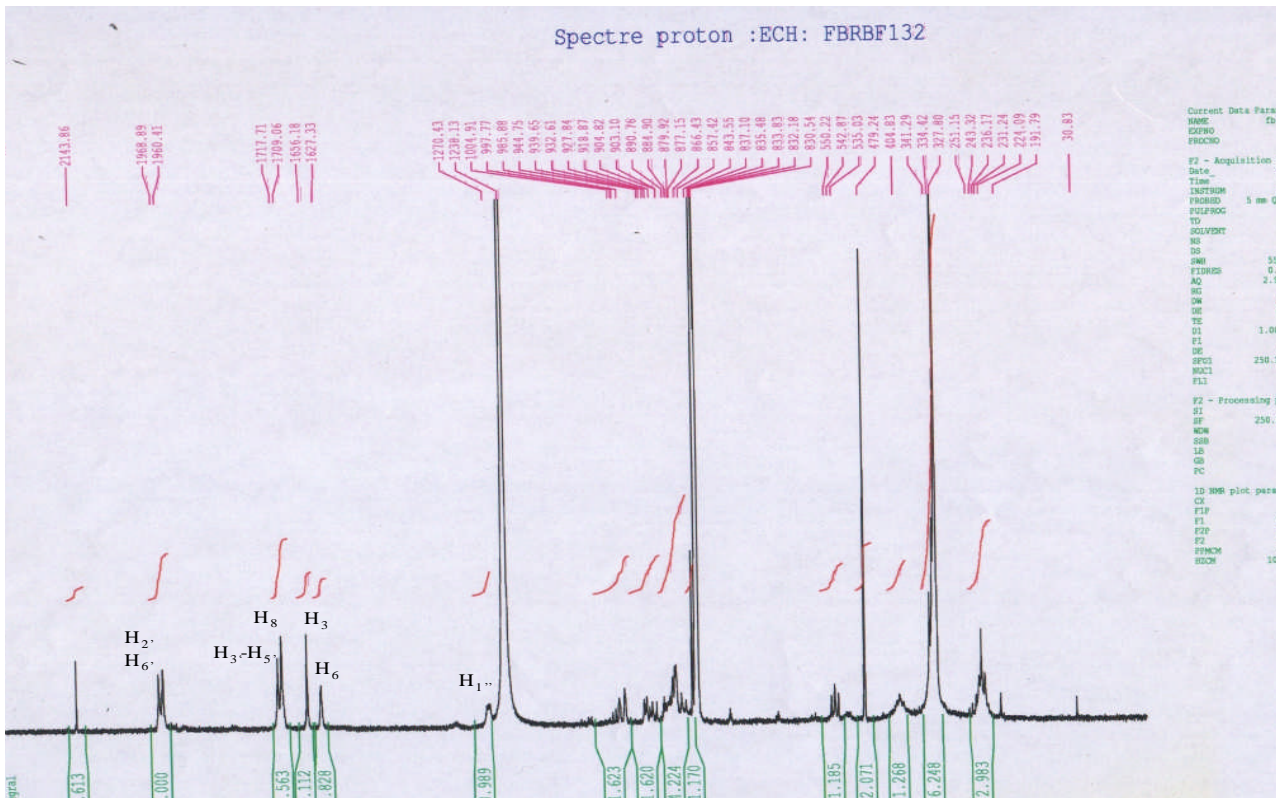
الطيف 5: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب CS_2 و مختلف المفاعلات.



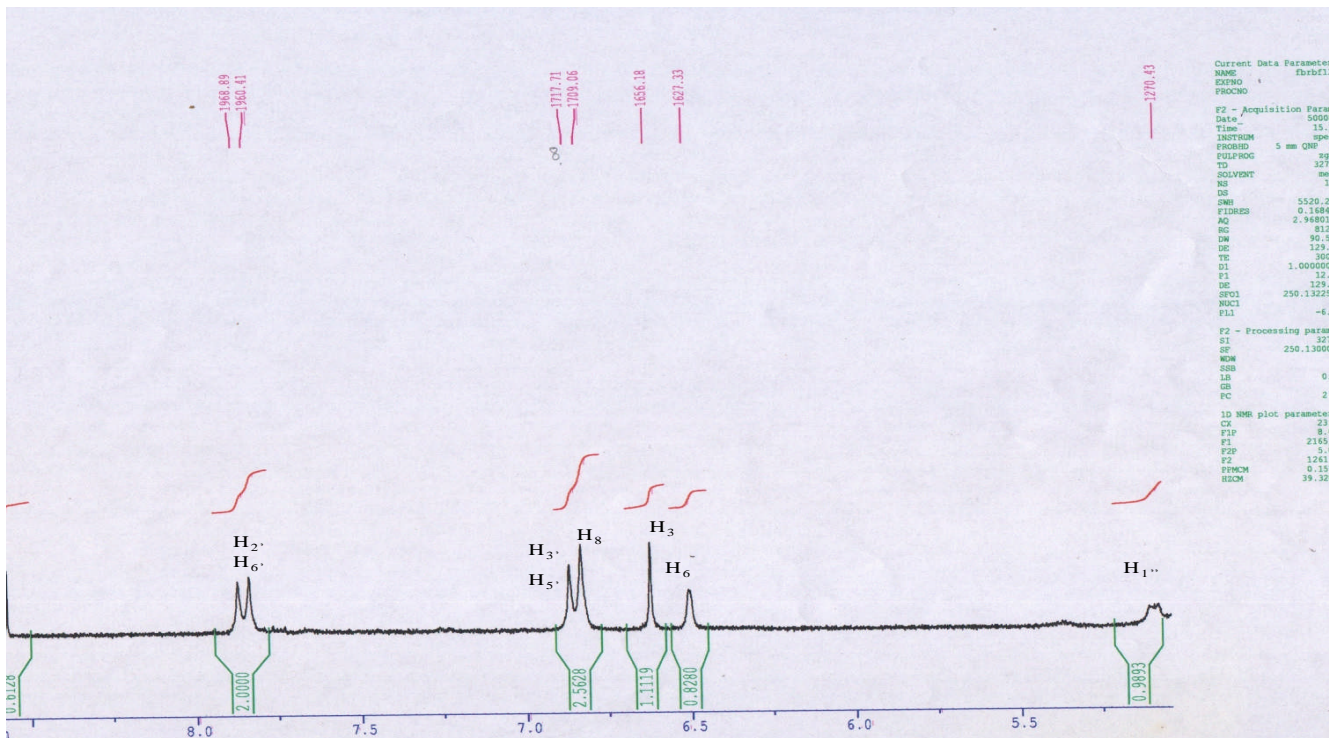
الطيف 5: سلسلة أطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب CS_2 و مختلف المفاعلات (تابع).



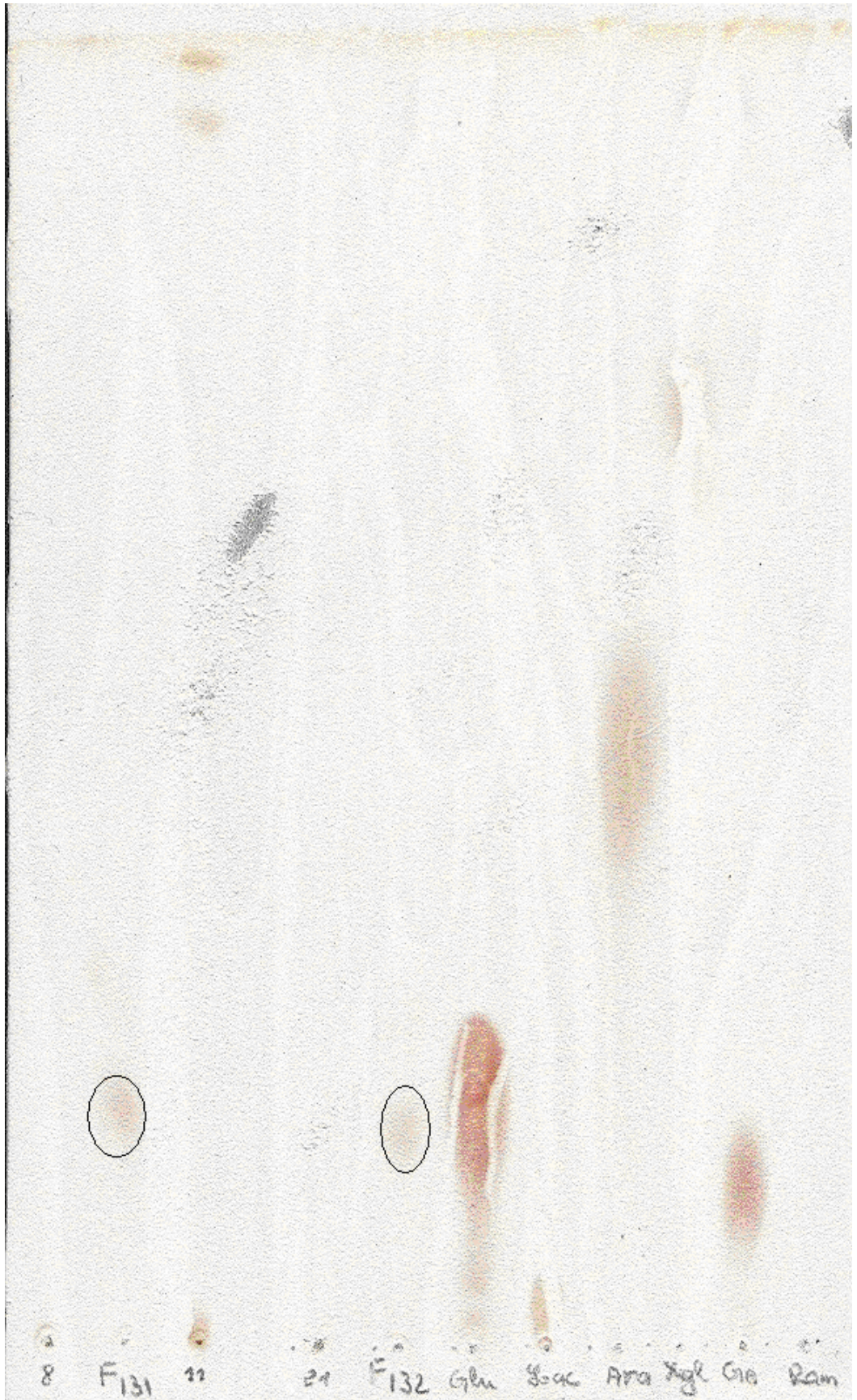
الطيف 5: سلسلة أطياف الاشعة فوق البنفسجية للمركب CS₂ و مختلف المفاعلات (تابع).



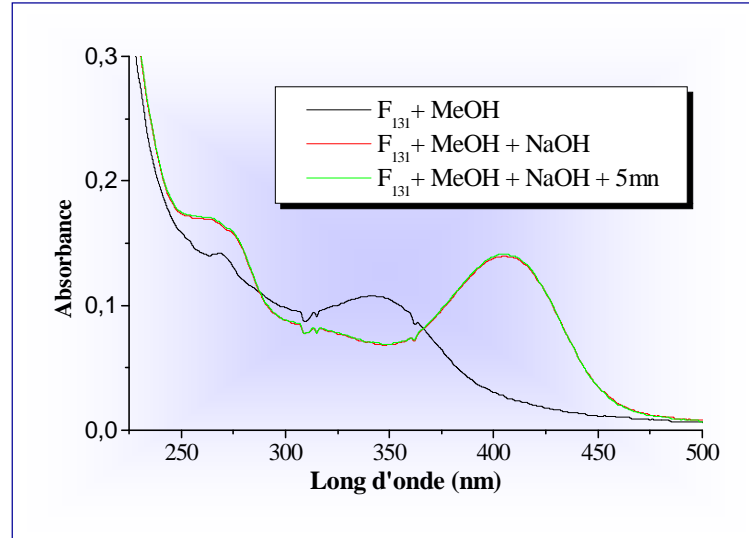
الطيف-6- طيف البروتون ¹H-RMN للمركب CS₂ في الميثانول



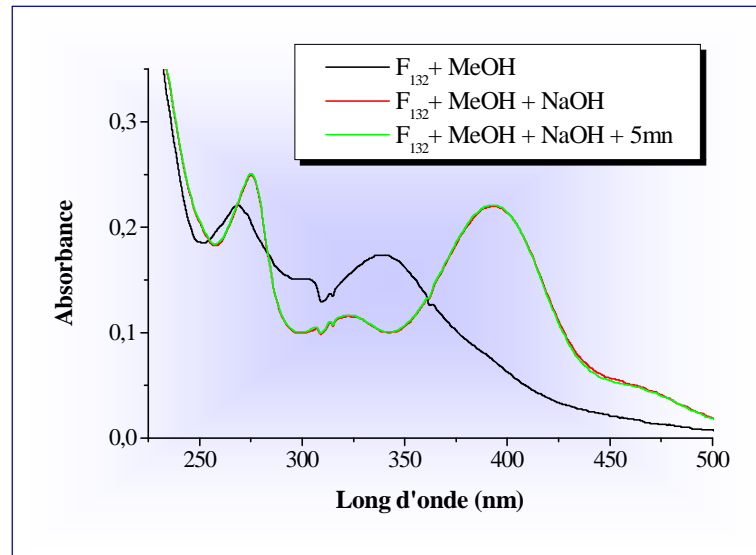
الطيف-7- تكبير المجال (5.0-8.25 ppm) لطيف المركب CS₂



الشكل 11 : كروماتوغرام السكريات المفصولة من المركبات مقارنة مع شواهد سكرية معروفة.



طيف الأشعة فوق البنفسجية للشق الأجليكوني للمركب CS₁ باستعمال كاشف NaOH



طيف الأشعة فوق البنفسجية للشق الأجليكوني للمركب CS₂ باستعمال كاشف NaOH

الخلاصة

من خلال الدراسة التجريبية للمستخلص البوتانولي (للأوراق والازهار)
 لنبات القنطريون (*Centaurea sphaerocephala*)
 المنتمي إلى العائلة المركبة، باستخدام طرق كروماتوغرافية مختلفة : كروماتوغرافيا العمود و
 كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
 وبالاعتماد على الطرق الفيزيوكيميائية: مطيافية الأشعة فوق البنفسجية
 والمرئية (UV- Visible)، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي
 للبروتون ($^1\text{H-NMR}$) والتميه الحمضي،
 تمكنا من فصل و تحديد البنى الكيميائية للمركبين الفلافونويديين :

7-O- glucosyl apigénine

7-O- glucosyl-3'- methoxy apigénine.

هذه المركبات فصلت لأول مرة عند النوع *Sphaerocephala* لكنها فصلت من قبل من جنس
 القنطريون

REFERENCES:

- [1] A. Bentamene, *thèse de doctorat d'états*, Université Mentouri de Constantine, (2005).
- [2] J. Menz, R. K. Winkejmann, *Contact Dermatitis*, **16**, 169, (1987).
- [3] P. Quenzel, S. Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales*, Tome VI, CNRS, Paris, (1963).
- [4] G. E. Trease, W. Ewans, *C pharmacognosy*, **225**, 514, 12^{em} Edition, (1983).
- [5] S. Akkal, *thèse de magister*, Université Mentouri de Constantine, (1992).
- [6] F. Ferres, A. Guirado, F. Tomas, *Afinidad*, **37(368)**, 337-338, (1980).
- [7] G. flamini, C. Bullerie, I. Morelli, A. Manunta, *Nat. prod*, **63**, 662-663, (2000).
- [8] R. Jente, F. Bohlmann, S. Schone Weiss, *phytochem*, **18**, 829, (1979).
- [9] Z.F. Ahmed, H. rimpler, F.M. Hamouda, A.M. Rick, S. I. Ismail, *Planta Med* , **19(3)**, 264-269, (1971).
- [10] J. L. Massot, M. N, Bertran et T. Adzet, *planta Med, et phytothérapie*, **8(1)**, 41-45, (1979).
- [11] IBN EL BITAR, *Mofradat Al –Adwiah wa Al- Arzia, Al- Zharia*, press Cairo, 148, (1980).
- [12] J. M. WAI, M. G. BREYER-BRANDWIJK, *the medicinal and poisonous plants of souiherm and Ester Africa*, Livingtone, Edinburghs **210**, (1962).
- [13] M. KAIJ-A-KAMB, M. AMORS, L. GIREL, *pharma. Acta. Helvena*, **67**, 178, (1992).
- [14] A. G. GONZALEZ., J. BERMEJO, J. CABERAR, A. GAHIDO, G. N. MASSANET, *Ann. Quin*, **73**, 86,(1977).
- [15] J. P. TEREZA, E. CABALLERO, J. ANAYA, M. C. CABALLERO and M. S. GOZALEZ, *phytochemistry*, **25**, 1365,(1986).
- [16] K. MEDJROUBI, *thèse de doctorat d'état*, Université Mentouri de Constantine,(1999).
- [17] R. E. Negrette, N. Backhouse, B. Bravo, S. Eraso, R. Garciaet S. Avendano, *planta Med. Et phytotherapiem*, **21(2)** 168-172, (1987).
- [18] K. Kamanzi, J. Raynaud, B. Voirin, *planta Med. Et phytothérapie*, **17(1)**, 47-51, (1983).
- [19] EL Hazemi, H., *natural product*, eds University of King Soud, (1995).

- [20] J. B. Harborne, H. Baxter, *the Hand book of natural Flavonoids*, 2, Wiley, Chichester, (1999).
- [21] Pier-Giorgio Pietta, *Flavonoid as Antioxidants*, *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042, (2000).
- [22] W. Heller, G. Forkmann, *the Flavonoids Advances in research since 1986*, éd. 499-535, (1993).
- [23] H. Grisebach, *Anthocyanins as Food Color*, éd. P. Markakis, Academic Press, New York, 69-92, 1982.
- [24] G. Forkmann, B. Dangelmayr, *Biochem Genet.*, 18, 559, (1980).
- [25] M. Jay, et Z. A. I., *Naturforsch*, 38, 413, (1983).
- [26] M. Apil, I.Z. Khan, and Goni A. Dimari., *Flavonoids from Centaurea senegalensis de (Compositae)* *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 12 (2), 177-180, (1998).
- [27] P. R. S. G. Ayon, *Les Composés phénoliques des végétaux*, eds Punod; Paris (1968).
- [28] N. Mazaache, *thèse de Magister*, Université Mentouri de Constantine, (2002).
- [29] H. Dendougui, *thèse de doctorat en chimie organique*, Mentouri Constantine.
- [30] E. F. Graciela *Acta Farm Bonaerense*, 2(2), 97 (1983).
- [31] R. A. Anderson, J. Sowers, *Phytochemistry*, 7, 293, (1968).
- [32] L. Jurd, in *the chemistry of Flavonoid compounds*, Pergamon Press, New York, 107-155, (1962).
- [33] J. B. Harborne, D. M. Smith, *Anthochlor and other flavonoids as honey guides in the Compositae* *Biochemical Systematic and Ecology*, 6(4), 287-291, (1978).
- [34] D. H. Janzen, *New horizons in the biology of plant defense*, In Rosenthal, A. G. and Janzen, D. H. Editeur, *Herbivores-their interactions with secondary plant metabolites*, Academic Press, London. 331-350, (1979).
- [35] J. W. Mc Lure, *Physiology and function of flavonoids in Harborne*, J. B. and Mabry, T. J. M. *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London. 970-1055, (1975).
- [36] B. G. Brehm, D. Krell, *Flavonoid Localisation in epidermal papillae of flower petals a specialized adaptation for ultra-violet absorption* *Science*, New York, 190, 1221-1223, (1975).
- [37] S. A. J. Zaat, C. A. Wijffelman, H. P. Spaink, A. A. N. Van Brussel, R. J. H. Okker, and B. J. J. Lugtenberg, *Induction of the Flavonoids*, *Biology and Medicine*, 537-540, (1985).
- [38] H. Matsuda, M. Yano, M. Kubo, M. Linuma, M. Oyama, M. Mizuno, *Pharmacological study on Citrus fruits unshui*, (1991).

- [39] J. A. Emin, A. B. Oliveira A. J. Lapa, *pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidins, and the isoflavonoids, Duartin and Claussequinone in rats and mice*, *J pharm. Pharmacol.*, **46**, 118-122, (1994).
- [40] F. Natella, M. Nardini, M. difelice, C. Scaccini, *Benzoic and cinnamic acid derivates as antioxidants: structure- activityrelation*.*J .Agric. Food chem.*, **47**, 1453- 1459, (1999).
- [41] S. Akkal, F. Benayache, S. Benayache M. Jay, *Biochemical Systematic and Ecology*, **361- 362**, (1997).
- [42] A. Bentamene, *Thèse de Magister*, Université Mentouri de Constantine, (1997).
- [43] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, M. Kaabeche, *Tillequin, E. and Seguin, phytochemistry*, **49(8)**, 2425, (1997).
- [44] R. Bencherait, *Thèse de Magister*, Université Mentouri de Constantine, (1989).
- [45] G. Atmani, F. Benayache, S. Benayache, H. Dendoughi and M. Jay, *Métabolisme des Composés flavoniques de Centaurea nicaensis All*, *J. Soc.Alg. Chim.*, **8(1)**, 29, (1998).
- [46] S. Akkal, *Thèse de Doctorat d'état*, Université Mentouri de Constantine, (2001).
- [47] S. Oksuz, A. Yylidiz ,C. Johansson, *J. Nat prod.*, **47**, 902- 903, (1984).
- [48] N. Mezzache, *Thèse de Magister*, Université Mentouri de Constantine, (2002).
- [49] C. Boubekri, *Thèse de Magister*, Université Mentouri de Constantine, (2003).
- [50] R. Serhiri, R. Mekkiou, O. Boumaza, S. Benayache, J. Bernijo, F. Benayache, *Chemistry of natural compounds*, **42, 5**, (2006).
- [51] J. B. Harborne, T. J. Mabry and Mabry, *the Flavonoids*, Tome I, Academic press, **71**, (1975).
- [52] A. Dellouche, *thèse de magister*, Université Mentouri de Constantine, (2003).
- [53] A. Touile, *Thèse de Magister*, Université Mentouri de Constantine, (1997).
- [54] K.R. Markham, *Technique of the Flavonoïdes identification*, Tome, I Academic press, (1982).
- [55] J. D. Bacon, T. J. Mabry and Mears, *UV spectral procedure for distinguishing free and substituted 7- hydroxy groups in flavones and flavonols* *Rev Latioam Quim*, **7**, 83-86, (1976).
- [56] K. R. Markham, T. J. Mabry, *ultra violet visible and proton magnétique resonance spectroscopy of flavonoids in the flavonoids*, Chapman and Hall, **45-77**, (1976).
- [57] K. R. Markham, *Technique of Flavonoids identification*, (1982).
- [58] K. R. Markham, T. J. Mabry, (1968): *phytochemistry*, **7**, (1997).
- [59] H. Audier, *Etude des composés flavoniques par la spectroscopie de mass*, *Bull Soc, Chim. Fr*, **9**, 2892-2899, (1966).

- [60] M. Goudard, J. F. Bouvin, J. Chopin, *Phytochem*, **17**, 145, (1978).
- [61] E. Constantin, A. Schenell, *Spectométrie de masse, principes et applications*, Lavoisier, Paris, (1986).
- [62] M. Beechi, D. Fraisse, *Fast atom Bombardment and Fast atom Bombardment, collision actived- dissociation/ mass- Analysis ion kinetic energy analysis of C-glycosidic Flavonoids. Biomed. & Environmental mass spectromet*, **18**, 122, (1989).
- [63] K. R. Markham, H. Geiger, (1993).
- [64] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. P. Thomas, *the systematic identification of flavonoids*, Springer- Verlag, Berlin, **13**, (1970).
- [65] K. R. Markham, T. J. Mabry, *Ultraviolet Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids*, in the flavonoids, ed. , J. B. Harborne T. J., Mabry, H. Mabry, Chapman and hall, London, **45** (1975).
- [66] K. R. Markham, *¹³C NMR of flavonoides- II, Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones. Tetrahedron*, **32**, 2607- 2612, 1976.
- [67] J. B. Harborne, *the flavonoids*, V.1, eds chapman and Hall, 1975.
- [68] P. R. Gayon, *Les composés phénoliques des végétaux*, eds Dunod, paris, 1968.
- [69] K. R. Markham, *the technique of flavonoids identification*, eds academic press, London, New York, 1982.
- [70] K. Medjroubi, *thèse de doctorat d'état*, université Mentouri de Constantine, 1999.
- [71] M. M. S. M. Bastos, A. Kijjoa, J. M. Cardoso, A. B. Gutierrez and W. Herz, *planta Med*, **56**, 403-405, 1990.
- [72] M. Bruno, C. Fazio, S. Passananti, M. P. Paternostro, J. G. Diaz , W. Herz, *phytochemistry*, **35**(5), 1371-1372, 1994.
- [73] A. Bentamene, M. Baz, R. Boucheham, S. Benayache, J. Creche, and F. Benayache, *Chemistry of Natural Compounds*, **44**(2) , 234-235, (2008) .

المخلص

إن الهدف الرئيسي من هذا البحث هو فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي للطور البوتانولي للنبتة *C. Sphaerocephala* التي تنتمي إلى العائلة المركبة و مما لا يخفى علينا غنى هذا الجنس بالمركبات الفلافونيدية ذات الفعالية البيولوجية الهامة و خاصة ضد الأكسدة. حيث تمكنا من فصل مركبات فلافونيدية و ذلك باستعمال جل طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية (كروماتوغرافيا العمود CC، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM) و بالاستعانة بالإمهاء الحمضية و طرق التحليل الطيفي و خاصة مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ($^1\text{H-NMR}$) و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية- المرئية (UV-VIS) تم تحديد بنى المركبات المفصولة:

7-O- glucosyl apigénine

7-O- glucosyl-3'- methoxy apigénine.

Résumé

L'objectif principal de ce travail est d'identifier les métabolites secondaires (flavonoïdes) de la plante *C. Sphaerocephala* qui appartenant à la famille des composées, ce genre est réputé pour accumuler des substances de type flavonique, molécules connus pour leurs activités biologiques importante notamment anti- oxydante.

L'utilisation des différentes méthodes de séparation chromatographiques (colonne, couche mince) a permis d'isoler deux composés flavoniques, et grâce à l'hydrolyse acide et aux méthodes spectroscopiques usuelle (UV et RMN-¹H), les structures de ces flavonoïdes ont été établies comme suivant:

7-O- glucosyl apigénine

7-O- glucosyl-3'- methoxy apigénine

Abstract

The principal aim of the present work consisted to identify the secondary metabolites (flavonoids) of *Centaurea sphaerocephala* belonged to the compositae family, this genus is known to accumulate of biological activities notably antioxidant. The use of the different chromatographic methods, permitted the isolation of two flavonoids, and with using the acid hydrolysis and usual spectroscopic methods (UV, ¹HNMR), the structures of this compounds were established as:

7-O- glucosyl apigénine

7-O- glucosyl-3'- methoxy apigénine