



بسم الله وبعد: تم الرفع بحمد الله من طرف

بن عيسى قرمزي متخرج من جامعة المدية

تخصص: إعلام آلي

التخصص الثاني: حفظ التراث بنفس الجامعة

1983/08/28 بالمدية – الجزائر-

الجنسية الجزائر وليس لي وطن فأنا مسلم

للتواصل **وطلب المذكرات** مجاناً وبدون مقابل

هاتف : +213(0)771.08.79.69

بريدي إلكتروني: benaissa.inf@gmail.com

MSN : benaissa.inf@hotmail.com

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

سكايب: benaissa20082

دعوة صالحة بظهر الغيب فر بما يصلك ملفي وأنا في التراب

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

ملاحظة: أي طالب أو باحث يضح نسخاً لصقاً لكامل المذكرة ثم يزعم أن المذكرة له

فحسبنا الله وسوف يسأل يوم القيامة وما همدنا إلا النفع حيث كان لا أن تنبئ أعمال

الغير والله الموفق وهو نعم المولى ونعم الوكيل....

لا تنسوا الصلاة على النبي صلى الله عليه وسلم

صلى على النبي – سبحانه الله وبحمده سبحانه الله العظيم-

بن عيسى قرمزي 2013

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

قسم: الكيمياء

كلية : العلوم الدقيقة

رقم الترتيب

رقم التسلسل

مذكرة
مقدمة لنيل شهادة الماجستير في العلوم
تخصص كيمياء عضوية
شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان

استخلاص ، فصل وتحديد بنيات منتج الأيض الثانوي عند

نبات جنس *Centaurea*

C. Involucrata

تقديم :كنوش سميرة

لجنة المناقشة:

الدكتورة فضيلة بن عياش أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة رئيسة

الدكتور علي بن تامن أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة مشرف ومقرر

الدكتور سمير بن عياش أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة ممتحنا

الدكتور لحسن زعيتر أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة ممتحنا

الدكتور الشريف بهلول أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة ممتحنا

الإهداء

إلى والديّ الكريمين اللذين كانا سبب وجودي وتعليمي.

إلى إخوتي و أخواتي.

إلى الساهرين على حمل مشعل النور ليضيئوا للأجيال طريق الهدى والتقدم.

إلى كل الأهل و الأحباب.

التشكرات

الحمد لله ولي التوفيق ...

أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذ المشرف علي بن تامن على توجيهاته ونصائحه و مساهمته القيمة من أجل تقديم هذا العمل على أحسن وجه .

كما أتقدم بالشكر الخالص للأستاذة فضيلة بن عياش لقبولها رئاسة اللجنة و على المجهود و المساعدة التي قدمتها لي خلال إنجازي هذا البحث.

أتقدم بالشكر الخالص إلى الأساتذة الكرام سمير بن عياش ، الشريفة بهلول و لحسن زعيتر لقبولهم عضوية اللجنة .

إلى كل أعضاء مخبر التحليل الفيزيوكيميائي والبيولوجي قسم الكيمياء جامعة منتوري قسنطينة .

إلى كل زملائي وزميلاتي في المخبر إلى كل من ساعدني من قريب أو من بعيد.

الفهرس

1.....	المقدمة.....
	الفصل الأول المركبات الفلافونيدية
5.....	1.1.I. ماهية الفلافونيدات
6.....	2.1.I. خصائص الفلافونيدات.....
6.....	3.1.I. أهمية الفلافونيدات.....
8.....	4.1.I. أقسام الفلافونيدات.....
13.....	1.2.I. الإصطناع الحيوي.....
13.....	1.1.2.I. المرحلة الأولى طريق حمض الشيكيميك.....
16.....	2.1.2.I. المرحلة الثانية طريق الخلات.....
17.....	3.1.2.I. المرحلة الثالثة طريق الشالكون.....
	2.2.I. تثبيت المجموعات الإستبدالية
19.....	على الهيكل الفلافونيدي.....
19.....	1.2.2.I. تثبيت مجموعات الهيدروكسيل.....
19.....	2.2.2.I. تثبيت مجموعات الميثيل.....
20.....	3.2.2.I. تثبيت مجموعات السكر.....
22.....	3.I. الإصطناع المخبري.....
23.....	1.3.I. تصنيع الشالكون.....
24.....	2.3.I. تصنيع ثنائي هيدروشالكون.....

24.....	3.3.I. تصنيع الفلافون.....
26.....	4.3.I. تصنيع الفلافانول.....
27.....	5.3.I. تصنيع الفلافونول و الأورون.....
27.....	6.3.I. تصنيع ثنائي هيدروالفلافونول.....
28.....	7.3.I. تصنيع الأورون.....
29.....	3.8.I. تصنيع إيزوفلافون.....
30.....	4.I. الفصل والتنقية.....
30.....	1.4.I. الفصل.....
31.....	1.1.4.I. كروماتوغرافيا العمود CC.....
31.....	2.1.4.I. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.....
33.....	3.1.4.I. كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية.....
34.....	4.1.4.I. كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء.....
34.....	2.4.I. التنقية.....
الفصل الثاني الدراسة البنوية للفلافونيدات	
35.....	1.II. الخواص الكروماتوغرافيا.....
35.....	1.1.II. اللون الإستشعاعي.....
37.....	2.1.II. معامل الإنحباس.....
37.....	2.II. التقنيات الفيزيوكيميائية.....
37.....	1.2.II. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV).....

- 38.....1.1.2.II. طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي.
- 40.....2.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود NaOH أو NaOMe.
- 41.....3.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود NaOAc.
- 41.....4.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود NaOAc+H₃BO₃.
- 42.....5.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود AlCl₃ و HCl و AlCl.
- 45.....2.2.II. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN.
- 45.....1.2.2.II. طيف RMN للبروتون H¹.
- 48.....3.2.II. مطيافية الكتلة.
- 48.....1.3.2.II. طريق القذف الالكتروني EI.
- 49.....2.3.2.II. تقنية القذف السريع بالذرات المسرع FAB.
- 50.....3.3.2.II. تقنية الالكتروسبراي Electrospray.
- 50.....3.II. الإماهة الحمضية.

الفصل الثالث الدراسة الفيتوكيميائية للنبتة

- 52.....1.III. الدراسة النباتية لـ *Centaurea involucreta*.
- 52.....1.1.III. الوصف النباتي لـ *Centaurea involucreta*.
- 52.....2.1.III. المادة النباتية.
- 52.....3.1.III. إختيار النبتة.
- 53.....4.1.III. التصنيف النظامي للنبتة.
- 54.....5.1.III. التوزيع الجغرافي للنبتة *Centaurea involucreta*.

55.....	2.III. التحليل الكيميائي
55.....	1.2.III. الاستخلاص
58.....	2.2.III. الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود
60.....	3.2.III. معالجة الكسور باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
60.....	معالجة الكسر F_2
60.....	معالجة الكسر F_3
61.....	معالجة الكسر F_5
61.....	معالجة الكسر F_{11}
	IV. الفصل الرابع النتائج و المناقشة
62.....	1.IV. التعيين البنوي للمركب ClF_2
67.....	2. IV. التعيين البنوي للمركب ClF_3
74.....	3. IV. التعيين البنوي للمركب ClF_5
81.....	4.IV. التعيين البنوي للمركب ClF_{11}
95.....	الخاتمة
96.....	الملخص
99.....	المراجع

مقدمة

منذ القدم والإنسان مهتم بصحته وهاجس الحياة والبقاء هو الذي يشغل تفكيره، لذا تراه يبحث ويستكشف كل ما هو جديد لأجل الحفاظ على جنسه البشري وقد اهتم هذا المخلوق بأمر الطب والتداوي ولجأ في ذلك إلى الأعشاب والنباتات التي وجد فيها مبتغاه في تخفيف آلامه وتسكين أوجاعه وعلاج أمراضه في العهد القديم الذي لم تتوفر فيه علاجات كيميائية مصنّعة.

المصادر التاريخية اختلفت في رصد ومعرفة أوائل المستخدمين لهذه العلاجات فبعضها ذكر أن حكماء الصين أقدم من استخدم طب الأعشاب وبدأ به. وهم من ألفوا أول كتاب عن التداوي بالأعشاب، والذي أصبح فيما يعد أساساً لجميع المعلومات الطبية. في بابل كان القدماء يدونون فوائد الأعشاب على ألواح من الطين بعد التأكد من نجاحها في العلاج وكذا الحال في مصر القديمة وفراعنتها وما وجد من مدونات ورسوم تشير لاهتمامهم بهذا الطب.

أما العرب والمسلمين فقد أبدعوا في هذا المجال وطوروه وتوسعوا في تجاربهم في مجال التداوي بالأعشاب واكتشفوا العلاجات والمراهم الطبية الخاصة، فكان منهم أساندة الطب وعلماء النفس المتخصصين دونوا تجاربهم وملاحظاتهم في مخطوطات وكتب مهمة مازالت تستخدم كمصادر ومراجع في الدراسة الجامعية لكثير من البلدان.

في بغداد أسست أول صيدلية ومذخر طبي أختص بتجميع الأدوية والمستحضرات العلاجية المنتجة من الأعشاب والنباتات و هم أول من استخدم الكحول لإذابة المواد التي لاتذوب في الماء وقد وردت الكثير من الاحاديث الشريفة عن الأعشاب ومثال على ذلك قول النبي صلى الله عليه وسلم

(عليكم بأربع، فإن فيهن شفاء من كل داء إلا السام (الموت) ، السنا والسنوات والثفاء والحبّة

(السوداء)..لكن مع تقدم الطب تراجع استعمال الأعشابوأصبح استخدامها محدودا فيصورة عادات وتقاليد يمارسها

العجائز الذين توارثوها جيلابعد جيل أو في المناطق الجبلية وقبائل البدو الذين يعيشون في

الصحراء، بعيدا عن المدن التي انتشرت فيها المستشفيات الحديثة وكانت لديهم دراية بقيمة تلك الأعشاب الأمر الذي جعلهم مقصدا للمرضى، الذين يعرفون قدرة تلك القبائل البدوية على معرفة أسرار العلاج بالأعشاب، لكن مع تقدم الطب وظهور عدد من الآثار الجانبية للكثير من الأدوية المخلفة في المعامل، عادت البشرية إلى الأعشاب لكن بطرق أخرى أكثر تقنية بحيث تم استخلاص أدوية كثيرة لعلاج العديد من الأمراض وقامت شركات الأدوية الكبرى بالاعتماد على الأعشاب في استخلاص المواد الحيوية التي تستخدمها في صناعة بعض الأدوية، بطرق تكاد تختلف عن طرق استخدام الطب التقليدي البديل لها .

تزدحم قائمة النباتات الطبية والأعشاب والحشائش الدوائية بعشرات الألوف من أصنافها، بل وتزايد دائما تباعا بما يكتشفه العلماء في الحقول بين النباتات المعروفة أو في الصحارى أوفي كهوف الجبال أو غيرها من الأماكن غير المألوفة.

تتربع الجزائر على مساحة شاسعة ذات مناخ معتدل سمح بنمو غطاء نباتي متنوع ، مما دفع الباحثين الجزائريين إلى دراسة و استثمار هذه الثروة النباتية، خاصة النباتات الطبية لما تحتويه على مواد كيميائية ناتجة عن عمليات الأيض الثانوي ذات الفعالية البيولوجية والفيزيولوجية الهامة، لهذا أجريت في مختبرنا دراسات عديدة لمجموعات مهمة من نباتات جزائرية، من بينها نبات جنس *Centaurea* الذي ينتمي إلى العائلة المركبة *Compositae* فهي من أرقى العائلات النباتية تضم حوالي 1000 جنس وأكثر من 25000 نوع [1]، تحتوي الجزائر على حوالي 109 جنس و أكثر من 408 نوع [2] من هذه العائلة.

غنى هذه النباتات بنواتج الأيض الثانوي مثل الفلافونيدات واللاكتونات السييكويتريينية [3] والسترويدات [4] جعلها هدفا للعديد من الدراسات.

وهذه بعض الأنواع التي درست في مخبرنا حيث تم فصل العديد من المركبات المبينة في الجدول (1).

نوع وعدد المركبات المفصولة	النبتة
ثلاث فلافونيدات [5] لاكتون سيسكوي تربيني [5]	<i>Centaurea lippii</i>
أربعة عشرة لاکتون سيسكوي تربيني [6، 7]	<i>Centaurea musimomum</i>
خمس فلافونيدات [8] لاكتون سيسكوي تربيني [8]	<i>Centaurea napifolia</i>
أربعة عشرة فلافونيد [9]	<i>Centaurea incana</i>
إثنا عشرة فلافونيد [10] إثنين لاکتون سيسكوي تربينين [11]	<i>Centaurea calcitrapa</i>
إثنين لاکتون سيسكوي تربينين [12]	<i>Centaurea pullata</i>
إثنا عشرة فلافونيد [13] أربع لاکتون سيسكوي تربيني [14]	<i>Centaurea nicaensis</i>
إثنا عشرة فلافونيد [15، 16]	<i>Centaurea furfuracea</i>
أربع فلافونيد [17]	<i>Centaurea parviflora</i>
أربع فلافونيد [18]	<i>Centaurea pungens</i>
لاكتون سيسكوي تربيني [19]	<i>Centaurea granata</i>
مركبين فلافونيدين [20] إثنين لاکتون سيسكوي تربيني [20]	<i>Centaurea maroccana</i>

مركب عطري [20]	
خمسة مركبات فلافونيدية [21]	
فلافونويد [22]	<i>Centaurea acaulis</i>
سنة لاكتون سيسكوي ترييني [23]	
مركب عطري [22]	
أربع مركبات فلافونيدية أجليكونية [24]	<i>Centaurea sphaerocephala</i>
مركبين فلافونيين جليكوزيدين [25]	

الجدول (1) الأنواع النباتية و عدد المركبات المفصولة

أما النبتة التي نحن بصدد دراستها فهي نبتة *Centaurea involucreta* نبتة جمعت من نواحي ولاية مسيلة و

حسب معلوماتنا البيولوجرافية لم تدرس هذه النبتة من قبل.

تضمنت هذه المذكرة مقدمة وأربعة فصول و خاتمة حيث شمل الفصل الأول الدراسة النظرية للفلافونيدات من

تعريف و أقسام الفلافونيدات إلى الإصطناع الحيوي و المخبري ثم الفصل والتقية .

الفصل الثاني شمل الطرق الفيزيوكيميائية لتحديد الصيغ الكيميائية للمركبات الفلافونيدية .

الفصل الثالث شمل الحديث عن النبتة المدروسة والطريقة العملية المتبعة في المخبر من الاستخلاص حتى

الوصول إلى المركبات المفصولة .

الفصل الرابع تم الحديث فيه عن النتائج المتحصل عليها مع المناقشة .

أما الخاتمة فهي تلخيص للنتائج المحصل عليها.

الفصل الأول المركبات الفلافونيدية

I. الفلافونيدات

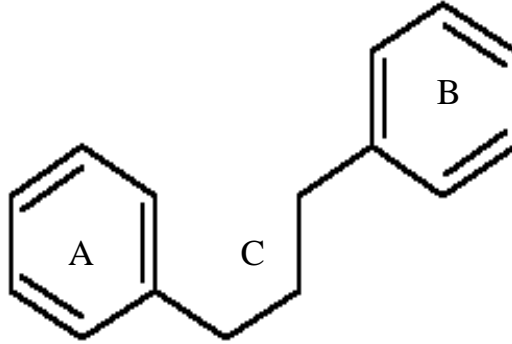
1.1.I. ماهية الفلافونيدات

تعتبر الفلافونيدات الفئة التصنيفية الأكبر للمركبات الفينولية، فهي أحد أفراد مجموعة مركبات بلورية موجودة في النباتات ولقد تم اكتشافها من طرف العالم زينت جيورجي الحاصل على جائزة نوبل عام 1936 في اللب الأبيض للثمار الحمضية، صنفاها على أنها فيتامين P ثم تبين أنها تزيد من شدة امتصاص فيتامين C. [26]

الفلافونيدات صبغات نباتية تتواجد في مختلف أجزاء النبات والتي تعطي الأزهار والفواكه وبعض الأوراق ألوانها الزاهية واللون الأصفر يشكل الغالبية للفلافونيدات. [27-28]

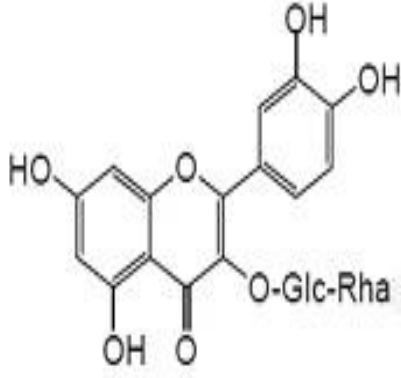
يعود أصل تسمية الفلافونيد إلى الكلمة الاغريقية Flavus والتي تعني اللون الأصفر. تسمى أحياناً باسم "بيوفلافونيدات" وعلى الرغم من أن المصطلح فلافونيدات هو الأكثر دقة من الناحية العلمية، إلا أناسم البيوفلافونيدات يستخدم غالباً لوصف الفلافونيدات النشطة حيوياً. [27-28]

تتميز ببنية أساسية بسيطة نسبياً، تتكون من 15 ذرة كربون موزعة على 3 حلقات من الشكل $C_6-C_3-C_6$ حلقتين عطريتين A و B تجمعهما حلقة غير متجانسة C. [29]

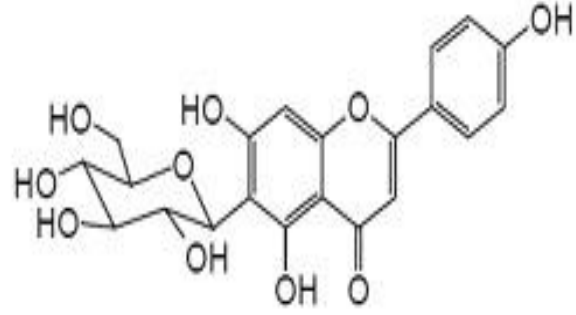


الشكل (1) الهيكل القاعدي للفلافونيدات

توجد الفلافونيدات في كافة النباتات الراقية وتتعدم أو تتواجد بصيغ بنيوية بسيطة في النباتات الدنيا [29] على شكل أجليكونات ذوابة في المذيبات الغير قطبية (الفلافونيدات عديدة الميثوكسيل) أو بشكل جليكوزيدات ذوابة في الماء [30]. حيث تكون وحدة السكر مرتبطة إلى ذرة أكسجين لمجموعة الهيدروكسيل مثل مركب rutine أو مرتبطة مباشرة بإحدى ذرات كربون الحلقة العطرية، مثل مركب isovitexine الشكل (2) وأغلب السكريات الأحادية المتواجدة في بناء الفلافونيدات هي الجلوكوز والجالاكتوز والأرابينوز والزيلوز.



Rutine



Isovitexine

الشكل (2)

2.1.1. خصائص الفلافونيدات

- تتواجد في أغلب الأحيان على شكل جليكوزيدات مرتبطة بوحدة سكر أو أكثر. [31-32]
- أصباغ مسؤولة عن إعطاء الألوان المختلفة للنباتات بالإضافة إلى كونها تجذب انتباه الحشرات المساهمة في تلقيح النباتات. [31-32]
- توفر الحماية للنباتات من الأشعة فوق بنفسجية المؤدية. [31-32]
- لما كانت الفلافونيدات مركبات هيدروكسيلية فإنها لا بد أن تتصف بصفات وخواص الفينولات، فهي مركبات ذات صفة حمضية ضعيفة ذوابة في القواعد القوية مثل هيدروكسيل الصوديوم. تتصف الفلافونيدات التي تحمل عدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة أو مجموعة سكر بالصفة القطبية و عليه فهي تذوب في المذيبات القطبية، مثل الميثانول والإيثانول وثنائي مثيل سلفوكسيد والأسيتون والماء أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل الأيزوفلافونات وكذلك الفلافونات التي تحمل عددا من مجموعات الميثوكسيل فإنها تذوب في الكلوروفورم أو الإيثر. [33]

3.1.1. أهمية الفلافونيدات:

في السنوات الأخيرة كثر الإهتمام بالفلافونويدات بسبب خواصها المضادة للأكسدة، فلقد وجد أن الكثير من هذه المركبات أكثر فاعلية في تأثيرها من مضادات الأكسدة المعروفة، فالخاصية الرئيسية للفلافونويدات هي قدرتها على أكسدة الجذور الحرة للأكسجين و التي هي مصدر لتدهور العديد من الجزيئات الحيوية المؤكسدة مثال الدهون غير مشبعة والبروتينات و الأحماض النووية ...

❖ الوقاية من احتشاء عضلة القلب

أثبتت تجارب أجريت على الفئران من طرف باحثين في مختبرات TIMC تابعة للاتحاد الأوروبي، أن النظام الغذائي الغني بالفلافونيدات خاصة الأنتوسيانين لها آثار وقائية من إحتشاء عضلة القلب L'infarctusdu myocardec في انتظار تعميم هذه النتائج على البشر. [34]

❖ الوقاية من الإصابة بمرض السكري

تمنع بعض الفلافونيدات الإصابة بمرض السكري أو الإنقاص من الإصابة به وهذا عن طريق قدرتها على تثبيط الإنزيم المسبب له Aldose réductase [35].

❖ مضادة للفيروسات

تثبيط Neuraminidase فيروسات الأنفلونزا وفعالية التثبيط مرتبطة ببنية المركب حيث تكون فعالية Aurones>Flavonoles>Iso flavones>Flavanonoles ,Flavanoles فهناك وظائف ضرورية لإحداث النشاطات 4'-OH, 7-OH, C₄O [36].

❖ مضادة للإلتهابات

تثبيط انزيم Cyclooxygénase وLipooxygénase وسطاء لحدوث الأيض الذي ينتج عنه Acide arachidonique المسبب للحساسية وفي المقابل تحرير Leucotriènes الذي يؤدي إلى تقليل التشنجات و الإحمرار... و على عكس غيرها من مثبطات cyclooxygénase لا تؤدي إلى حدوث تقرحات على مخاطية الأمعاء. [37]

❖ وقاية الشعيرات الدموية

الفلافونيدات تقلل من نفاذية الشعيرات الدموية و تزيد من مقاومتها، حيث يتم الجمع بين الفيتامين C و فيتامين P (perméabilité) كعامل مساعد للفيتامين C فيزيد من إمتصاصه وهذه هي فائدة الجمع بينهما. [38]

❖ فعالية على مستوى الهرمونات (الإستروجان)

هناك فلافونيدات تعمل على مزيد من التوازن بين الأستروجان المفيد و الأستروجان الضار حيث أن زيادة الأستروجان المعروف بإسم الإستراديول ، قد يتسبب في حدوث أنواع من السرطانات و الإضطرابات الهرمونية فالفلافونيد يساعد الجسم على تحويل الاستراديول إلى إستيريول وهو صورة آمنة من الاستروجان أي الصورة المفضلة له، يستخدم في الغرب للعلاج الهرموني البديل وتستعمل عادة الفلافونيدات مع فيتامين C حيث إنها تزيد من امتصاصه. [28]

❖ الوقاية من تصلب الشرايين

تصلب الشرايين مرتبط بالجذور الحرة فالفلافونيدات لها فعالية ضد انزيم Cyclooxygenase فتحي استجابة البطانة والحد من تأكسد الكوليسترول المنخفض الكثافة، دراسة هولندية أظهرت انخفاض معدل الوفيات بالشريان التاجي (Coronarienne) لمستهلكي الفلافونيدات ذات الأصل الطبيعي. [38]

❖ مكافحة السرطان

للفلافونيدات أثر ضد نشاط انزيم Topoisomérase II الذي يلعب دور أساسيا في تطور مرض السرطان فقد أظهرت الفلافونيدات أن لها قدرة وقائية ضد العديد من أنواع السرطانات كسرطان البروستات و الكولون و الرئة [39].

4.1.I. أقسام الفلافونيدات:

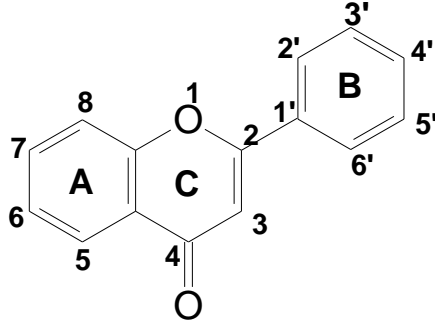
يمكن تقسيم الفلافونيدات حسب:

1. جهة ارتباط الحلقة B بـ C.

2. درجة تأكسد الحلقة C.

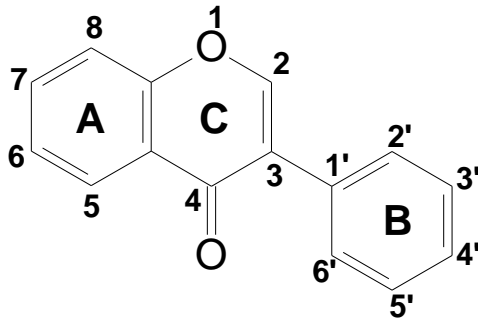
1. حسب جهة ارتباط الحلقة B بـ C

❖ فلافونيدات: إذا كان ارتباط الحلقة B مع الحلقة C في الكربون 2. الشكل (3)



الشكل (3) فلافونيد

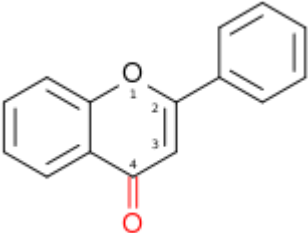
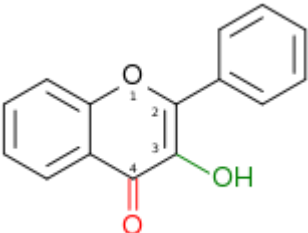
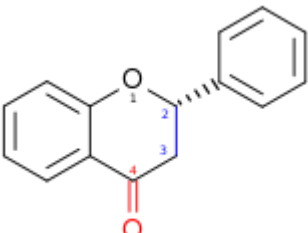
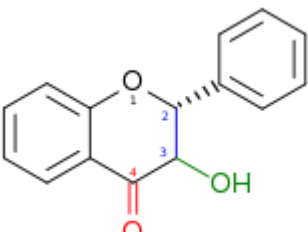
❖ إيزوفلافونيدات: إذا كان ارتباط الحلقة B مع الحلقة C في الكربون 3. الشكل (4)



الشكل (4) إيزوفلافونيد

2. حسب درجة تأكسد الحلقة C

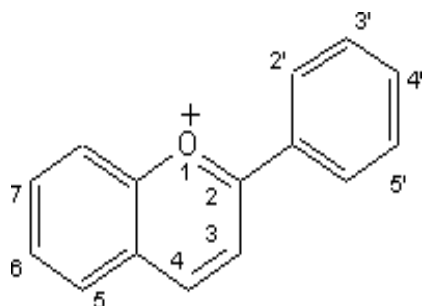
❖ بعض أقسام الفلافونيدات مبينة في الجدول (2)

Groupe	Structure de base	Exemples
Flavone		Luteoline Apigène Tangeritine
Flavonol ou 3-hydroxyflavone		Quercetine Kaempferol Isorhamnetine Pachypodol Rhamnazine
Flavanone		Hesperetine Naringenine Eriodictyol
Flavanonol ou 3-Hydroxyflavanone		Taxifoline Dihydrokaempferol

الجدول (2) بعض أقسام الفلافونيدات

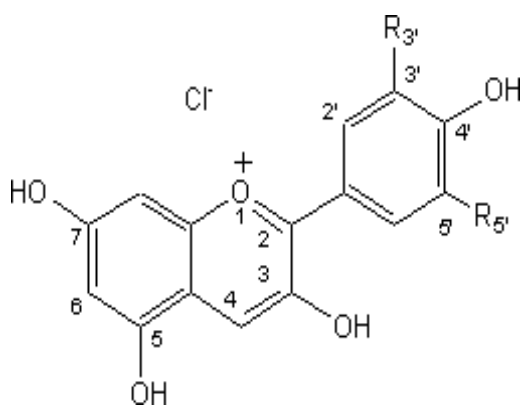
❖ الأنطوسينيدين (Anthocyanidine)

أنطوسينيدين يتميز بغياب الوظيفة السيتونية في الموقع 4، بالإضافة إلى وجود رابطة ثنائية في الموقع O_1-C_2 وكذلك في الموقع C_3-C_4 . الشكل (5)



الشكل (5) نواة Anthocyanidine

الجدول (3) يمثل أهم مركبات Anthocyanidine



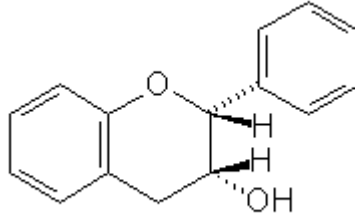
الشكل (6)

R _{3'}	R _{5'}	
H	H	Pélagonidine
OH	H	Cyanidine
OCH ₃	H	Paeonidine
OH	OH	Delphinidine
OCH ₃	OCH ₃	Malvidine
OH	OCH ₃	Pétunidine

الجدول (3)

❖ الفلافانول (Flavan-3-ol)

يتميز هذا النوع بغياب الوظيفة السيتونية في الموقع 4 مع وجود مجموعة هيدروكسيل في الموقع 3 وهو ما يوضحه الشكل (7).

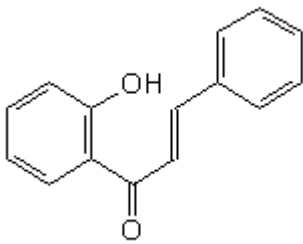


Flavan-3-ol

الشكل (7)

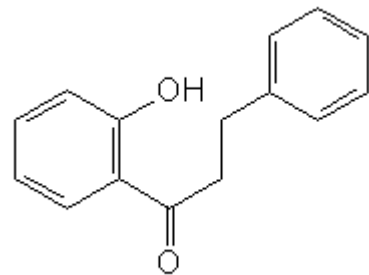
❖ الشالكون (Chalcone)

تتميز هذه المركبات بغياب الحلقة C



Dihydrochalcone

الشكل (9)

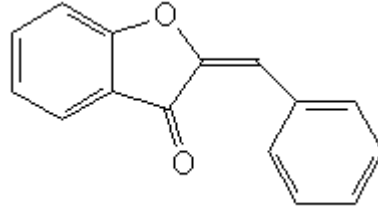


Chalcone

الشكل (8)

الأورون (Aurone)

مركبات تتميز بكون الحلقة C خماسية وهو ما يوضحه الشكل (10).



Aurone

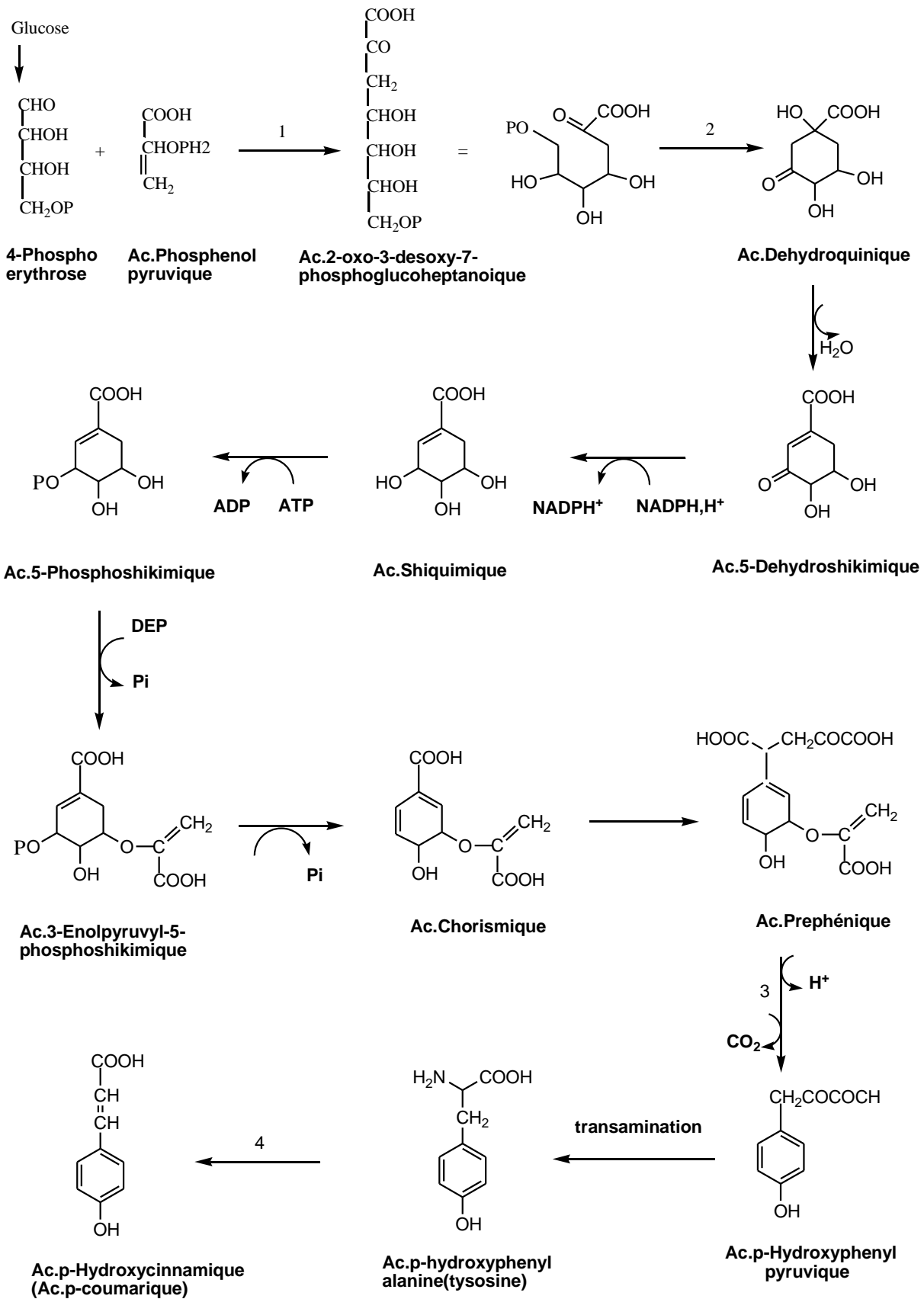
الشكل (10)

1.2.I. الإصطناع الحيوي:

الإصطناع الحيوي للمركبات الطبيعية هي طريقة تكوين هذه الأخيرة داخل مصادرها الطبيعية و ذلك عن طريق تفاعلات الأكسدة والإرجاع بمساعدة إنزيمات خاصة، فلقد أجريت تجارب باستعمال ^{14}C حيث لاحظ العالم Robinson سنة 1936 [40] أن استبدال النواتين البنزينيتين للمركبات الفلافونيدية مختلف جوهريا مما يستلزم أنه ليس لهما نفس الأصل الوراثي الحيوي، و بمواصلة التجارب تم التوصل إلى أن الإصطناع يتم خلال ثلاثة مراحل هي:

1.1.2.I. المرحلة الأولى:

- طريق حمض الشيكيميك: أثبت العالم Davis سنة 1955 دور حمض الشيكيميك في تكوين الحلقة (B) والسلسلة الكربونية (C_3) انطلاقا من الجليكوزوهذا ما يوضحه الشكل (11) حيث تم عزله أول مرة من نبتة يابانية *Illicium anisatum Shikimi- no-ki* ومنه اشتق اسمه [41].



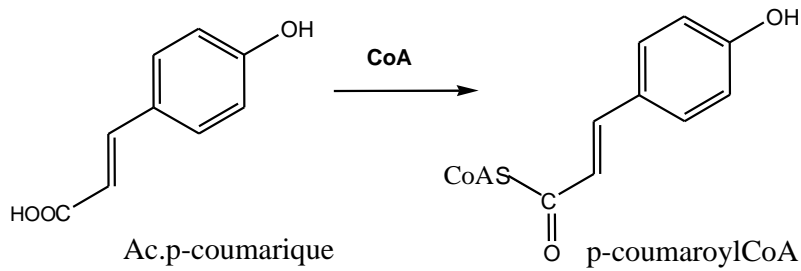
الشكل (11) تكوين حمض Ac.p-coumarique انطلاقا من الجلوكوز مرورا بحمض الشيكيميك

الجدول (5) الأنزيمات المرقمة من 1 إلى 4 على (الشكل 11) هي:

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

الجدول (5)

ثم يتحول الناتج Ac.p-coumaroyl (Ac.coumarique) إلى (p-coumaroyl-CoA) وهو ما يوضحه الشكل (12).

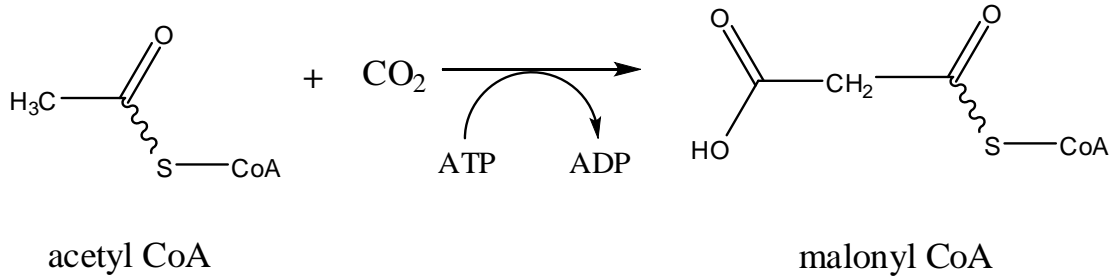


الشكل (12) تحول Ac.p coumarique إلى P-coumaroylCoA

2.1.2.I. المرحلة الثانية :

• طريق الخلات :

يتم تثبيت مجموعة الكاربوكسيل مع أستيل مرافق انزيم (Acetyl-CoA) فينتج عنه وحدة (Malonyl-CoA) و هو ما يوضحه الشكل (13).

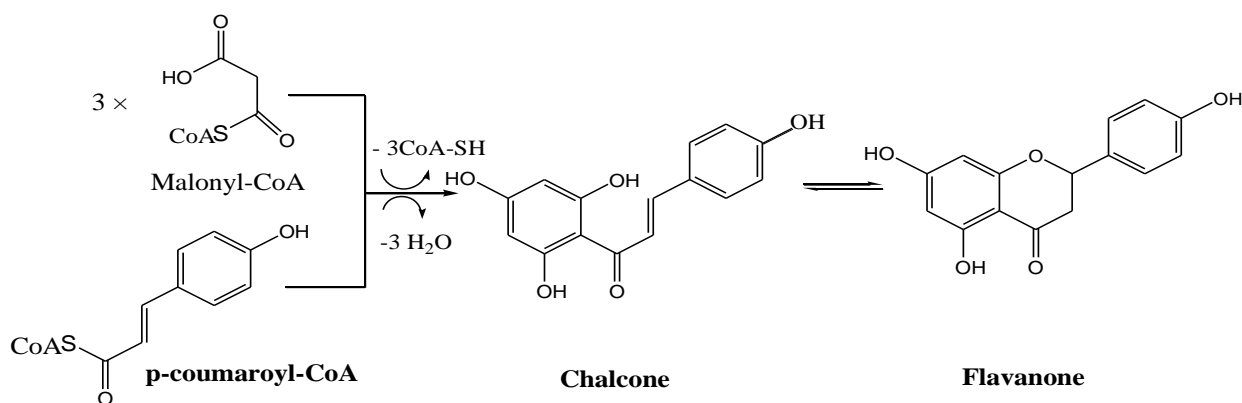


الشكل (13) تشكيل Malonyl-CoA انطلاقا من Acetyl-CoA و CO₂

3.1.2.I المرحلة الثالثة:

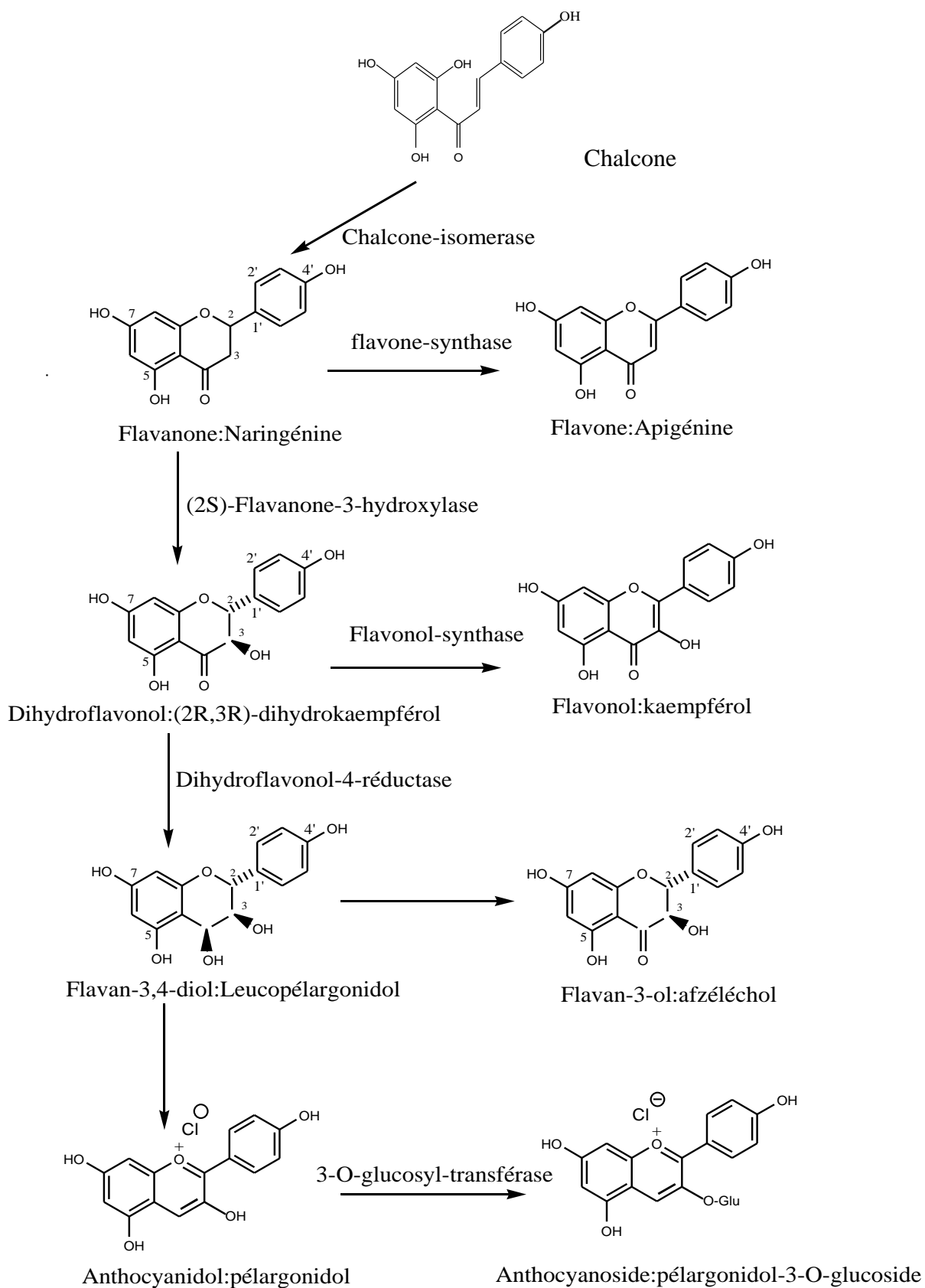
- طريقة الشالكون:

تتكافئ ثلاث وحدات من Malonyl-CoA فتتشكل الحلقة (A) [42] و اتحاد الناتج مع حسييلة المرحلة الأولى (p-coumaroyl-CoA) يعطي الشالكون و هو النواة الأساسية التي تنحدر منه مختلف هياكل الفلافونيدات كما هو موضح في الشكل (14)[43].



الشكل (14)

يتبع



الشكل (15) الإصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونيدية إنطلاقاً من الشالكون. [43] تابع

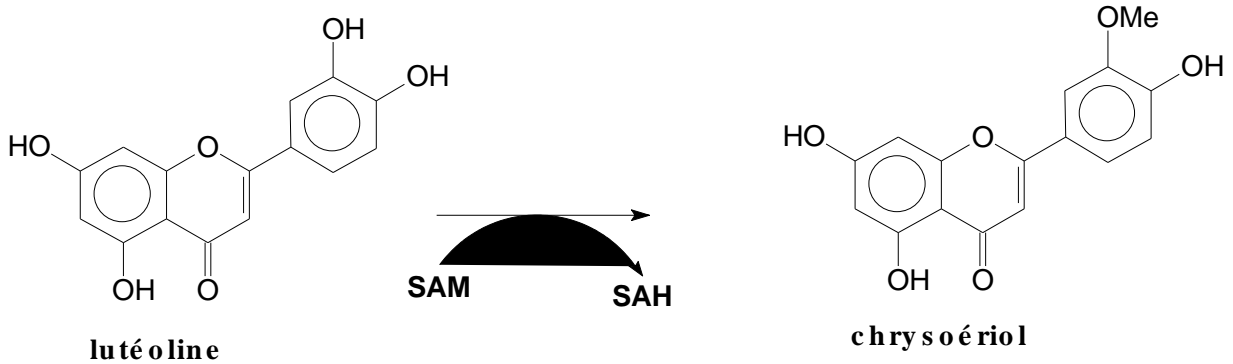
2.2.I تثبيت المجموعات الاستبدالية على الهيكل الفلافونيدي

1.2.2.I تثبيت مجموعات الهيدروكسيل:

إن تثبيت المجموعات الهيدروكسيلية في الموضعين 5 و 7 يتم قبل تشكيل الحلقة A، و لهذا يعتبران من المجموعات الأصلية للحلقة A. [29]
أما بالنسبة للحلقة B فإن هيدروكسيل الموقع 4 يظهر قبل تكوين نواة الشالكون. [29]
أما تثبيت مجموعة هيدروكسيل في الموقع 3 و 5 فيتم بعد غلق الحلقة C. [43-44]
تثبيت مجموعة هيدروكسيل الموقع 3 يتم في مرحلة تشكيل الشالكون.

2.2.2.I تثبيت مجموعات الميثيل:

إن تثبيت الميثيل يأتي بعد تثبيت الهيدروكسيل و يتطلب وجود إنزيم O-méthyl-transférase و مانح للميثيل (SAM) فهذه العملية تتم قبل تكوين الشالكون أو بعد تكوين الفلافونيد في وجود المانح للميثيلومثال عن ذلك تثبيت ميثيل الموضع ميتا (3') على الحلقة B في مركب Lutéoline كما يوضحه الشكل (16). [44]



SAM: S - adénosyl méthionine

SAH: S - adénosyl homocysteine

الشكل (16) تثبيت مجموعات الميثيل

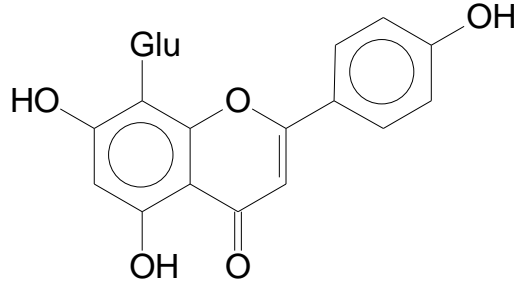
كما يمكن ظهور مجموعات ميثوكسي عن طريق المثيلية المباشرة على الحلقة البنزينية [45].

3.2.2.I. تثبيت جزيئات السكر:

توجد المركبات الفلافونويدية على هيئة جليكوزيدات، أي تدخل وحدات سكرية في بناءها والتي تثبت على الأجليكون بطريقتين:

❖ الطريقة الأولى:

تثبيت جزيئة السكر على الأجليكون بحيث تتشكل الرابطة في هذه الحالة بين ذرة الكربون الأنوميري C₁ لجزيء السكر غالبا يكون Glucose أو Galactose أو أحد البنتوزات و كربون الحلقتين A (و/أو) B-46 [47] تنشأ بهذارتباطة من نوع كربون . كربون بعد تكوين الشالكون مباشرة وهي رابطة مقاومة للأحماض والارتباط عادة ما يكون في الموقعين C₆ و/أو C₈ للأجليكون الذي غالبا يكون فلافونا.



vite xine

الشكل (17)

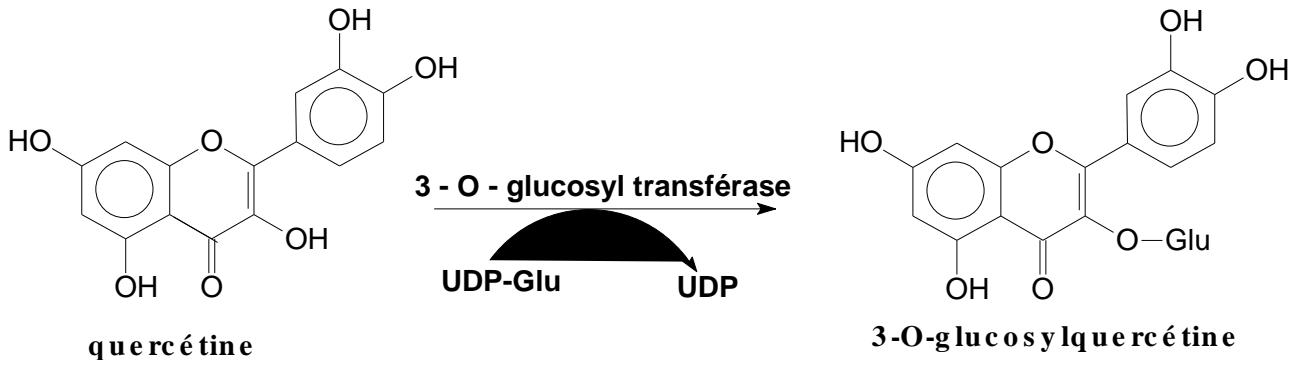
الطريقة الثانية:

و فيه ترتبط جزيئة السكر بذرة أكسجين مجموعة الهيدروكسيل مباشرة أي من نوع (O-heterosidique) وعادة يكون التثبيت عند هيدروكسيل الموقع 7 للفلافونات و هيدروكسيل الموقع 3 في وجود أنزيم "O-glucoside-transférase" و مانح للسكر مثل :

(Uridine diphosphate "UDP-glu" glucose) [48]. الشكل (18)

من أشهر السكريات التي ترتبط بهيدروكسيل الفينول للأجليكول نجد:

Hexoses (D-glucose، D-galactose أو D-allose) و Pentoses (D-apioses، L-arabinose، D-xylose، L-rhamnose).

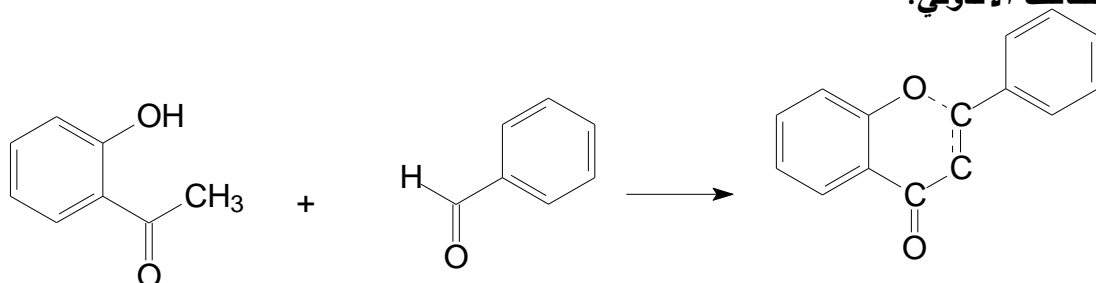


الشكل (18) تثبيت جزيئات السكر في وجود إنزيم ومانح السكر

3.I الاصطناع المخبري: [49]

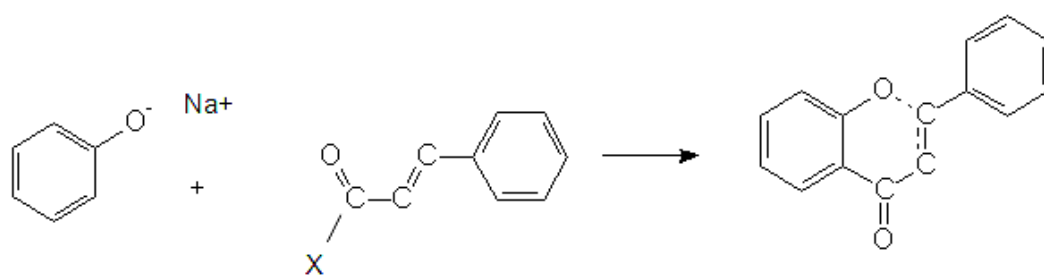
توجد نظريا طريقتين للتصنيع المخبري للفلافونيدات وهي:

❖ التكايف الألدولي:



الشكل (19)

❖ أسالة الفينولات:



الشكل (20)

1.3.1. تصنيع الشالكون:

يمكن الحصول على الشالكونات و ذلك بالتكاتف الألدولي ل :

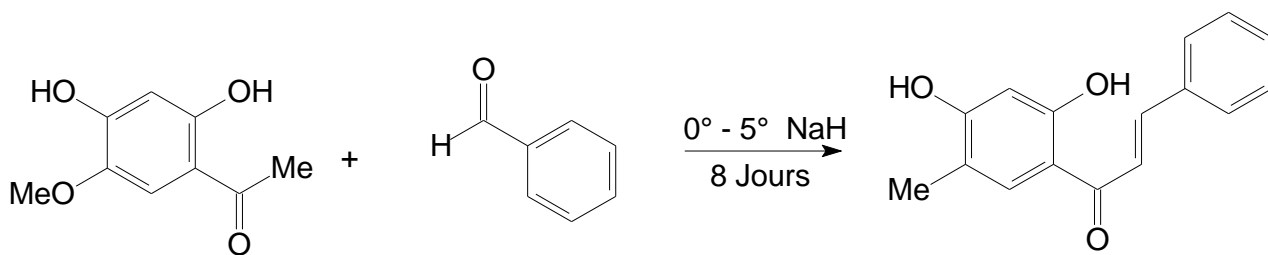
2-hydroxyacetophenone مع المشتقات البنزينية الأدهيدية (benzenaldehydes) في الوسط الحمضي أو القاعدي الشكل (21).

تحدث عملية تحلق للشالكون و ذلك في الوسط الحمضي الذي يؤدي إلى ظهور الفلافانون وفق تفاعل متوازن (شالكون - فلافانون)، إلا أن هذا التوازن ينزاح بشكل شبه كلي إلى جهة الشالكون و هذا في حالة وجود هيدروكسيل حر في الموقع 4 بالنسبة للشالكون.

التفاعل في الوسط القاعدي يجرى تحت الشروط التالية:

- درجة الحرارة 0° م - 20° م
- تركيز القاعدة KOH 50% - 60%
- الزمن اللازم للتفاعل 15 - 48 ساعة

و قد لوحظ أن انعدام مجموعات الميثيل يؤدي إلى مردود جيد.

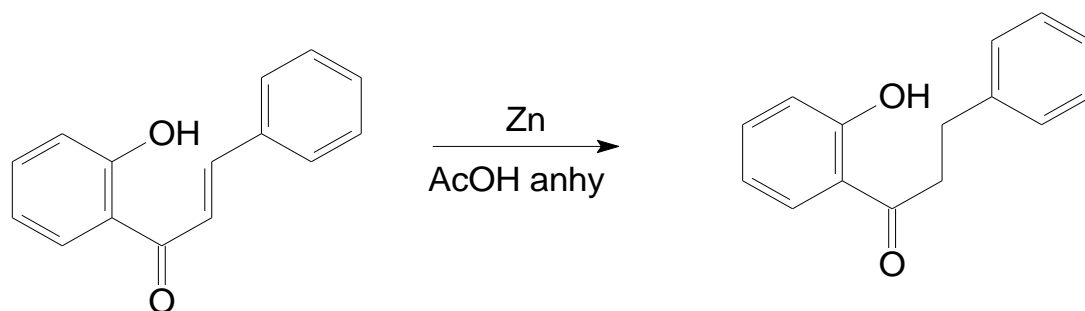


الشكل (21)

من أجل الحصول على الشالكونات ذات مجموعات الميثيل انطلقا من الفلافانون و ذلك بفتح الحلقة في الوسط القاعدي الكحولي ثم الترسيب بالحمض الممدد و تحت حرارة منخفضة و للحصول على مردود جيد ينبغي عدم وجود هيدروكسيل حر في الوضع 5 بالنسبة للفلافانون.

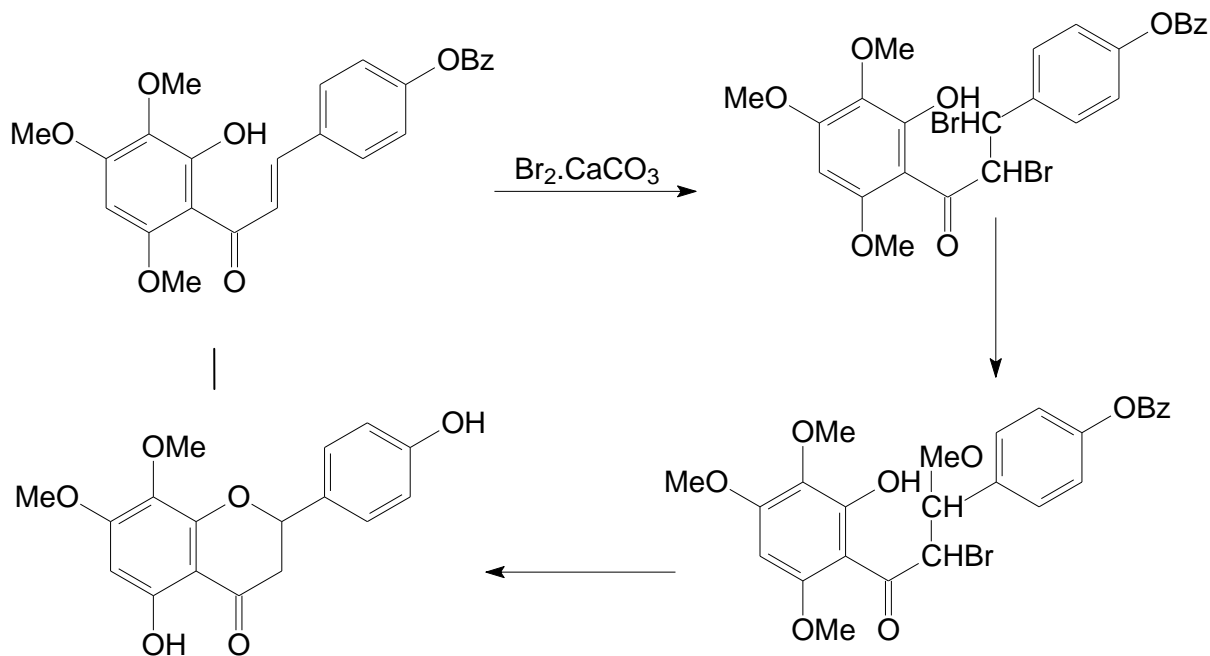
2.3.I. تصنيع ثنائي هيدروشالكون :

نتحصل على ثنائي هيدروشالكون وذلك من تكاثف الفينولات مع مشتقات حمض ثنائي هيدرو سيناميك (acide dihydrocinnamique) أو بهدرجة الشالكون أو الفلافونون الشكل (22).

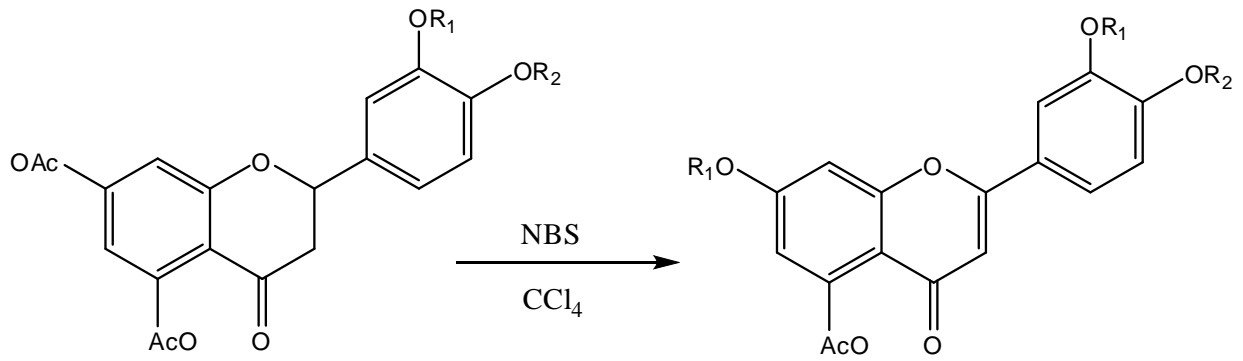


الشكل (22)

3.3.I. تصنيع الفلافونون وهو ما يوضحه الشكل (23) والشكل (24).

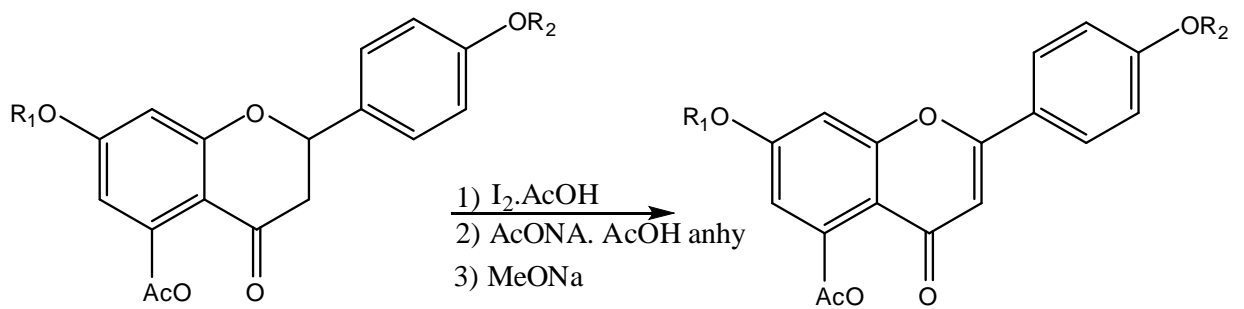


الشكل (23)



	R ₁	R ₂
a	Ac	H
b	Me	Ac
c	Ac	Me

	R ₁	R ₂
A	H	H
B	Me	H
C	H	Me



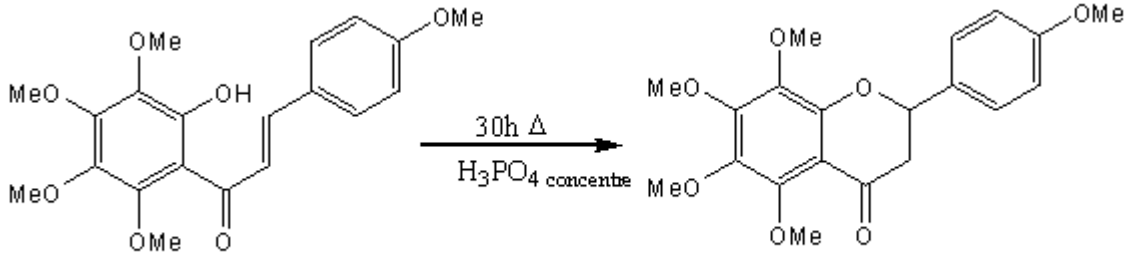
R₁ = Sucre
R₂ = Ac ou Me

R₁ = Sucre
R₂ = H ou Me

الشكل (24)

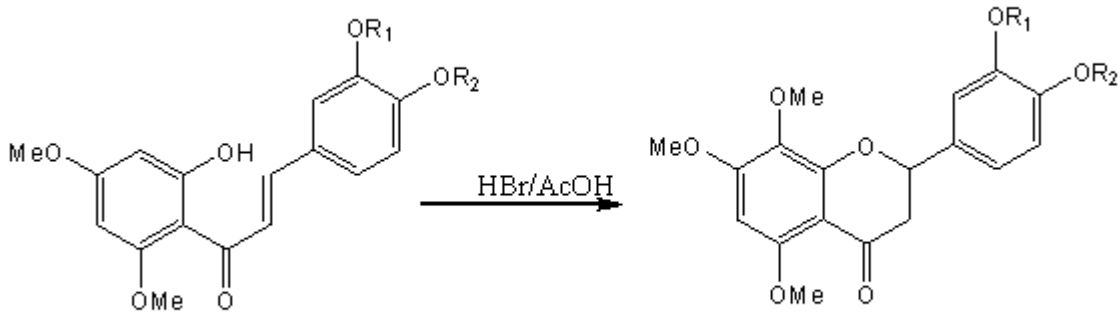
4.3.I. تصنيع الفلافانون:

انطلاقاً من الشالكون يتم الحصول على الفلافانون و هذا بغلق الحلقة و قد لوحظ أن وجود هيدروكسيل حر في الموضع '6' بالنسبة للشالكون يؤدي إلى مردود جيد و يمكن أن نذكر أيضاً أن الفلافانون المستبدل في الموضع 8 لا يمكن الحصول عليه إلا تحت شروط قاسية الشكل (25).



الشكل (25)

بعض التفاعلات الخاصة التي تمكننا من الحصول على فلافانون خاص وهو ما يوضحه الشكل (26).

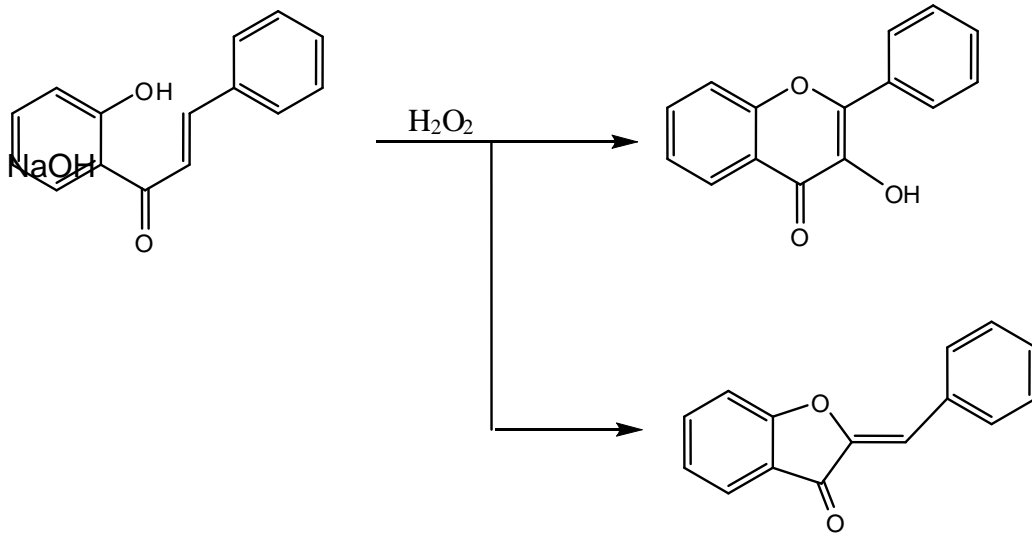


	R ₁	R ₂
a	Bz	Me
b	Me	Bz

	R ₁	R ₂
A	H	Me
B	Me	H

الشكل (26)

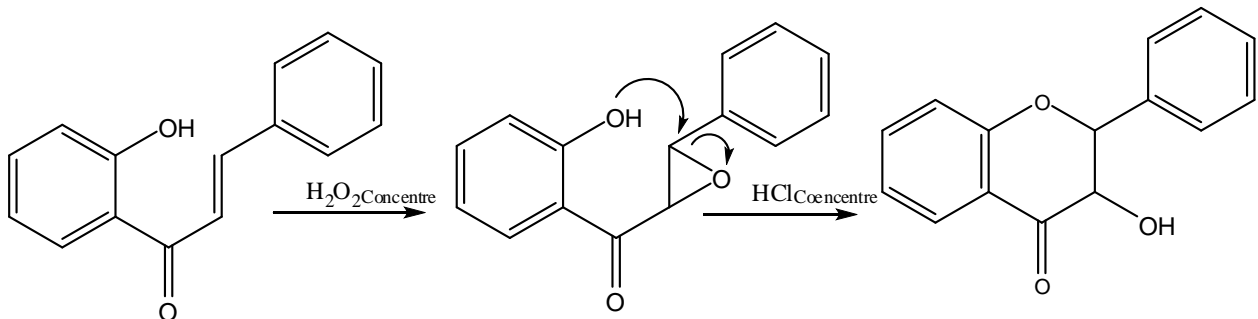
5.3.I. تصنيع الفلافونول و الأورون:



الشكل (27)

لوحظ أن شروط التفاعل و وجود المستبدلات لها تأثير كبير على مردودية التفاعل، فبالنسبة للمستبدلات لوحظ أن وجود هيدروكسيل في الموقع 2 و الموقع 4 بالإضافة إلى مجموعة ميثوكسيل في الموضع 6 فإن مردود التفاعل يزيد باتجاه الحصول على الفلافونول المطلوب. أما الشروط المثالية: 5% - 30% H₂O₂ ، 20% NaOH

6.3.I. تصنيع ثنائي هيدرو الفلافونول:

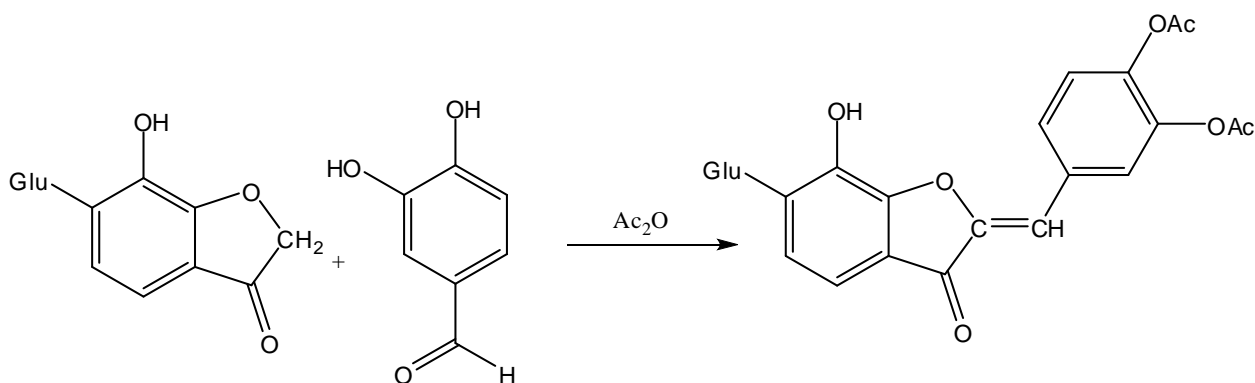


الشكل (28)

يمكن إجراء الخطوة الثانية من هذا التفاعل في وجود حمض HCl المركز أو يمكن استعمال HCl النقي و حمض الخل البلوري و هذا بوجود BF_3 و الإثير كمذيب.

7.3.I. تصنيع الأورون:

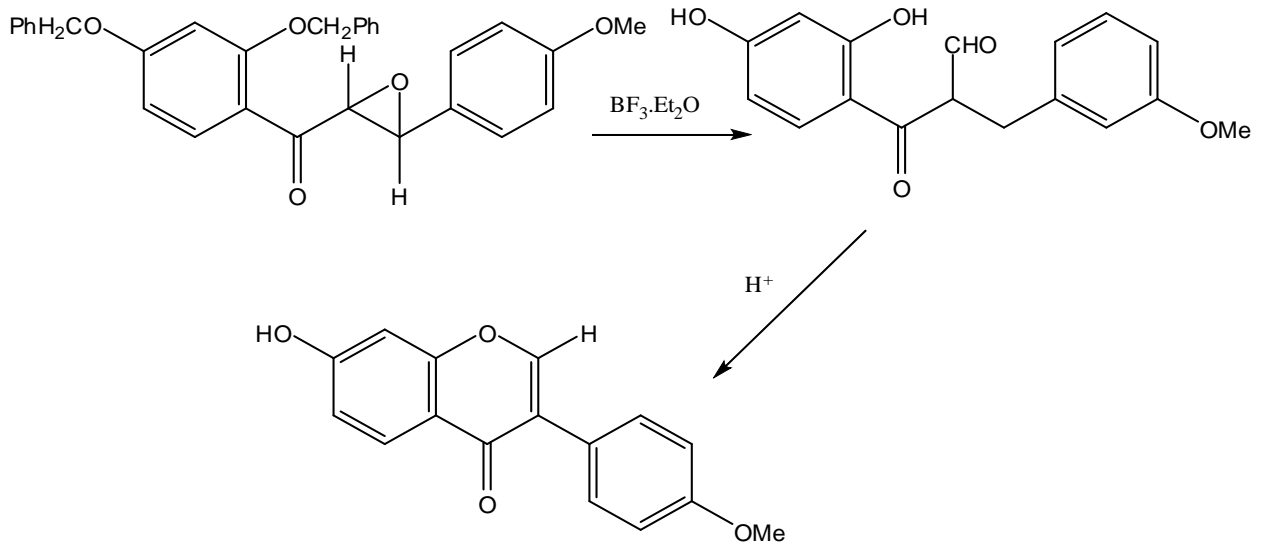
الطرق العملية المستعملة تقريبا كلها تعتمد أساسا على تكاثف الكومارين مع الألدهيدات العطرية في وسط حمضي إلا أنه في حالة وجود سكريات كمستبدلات لا يمكن استعمال هذه الطريقة التي تتطلب وجود حمض HCl لذا فإننا نلجأ إلى تفاعلات أخرى.



الشكل (29)

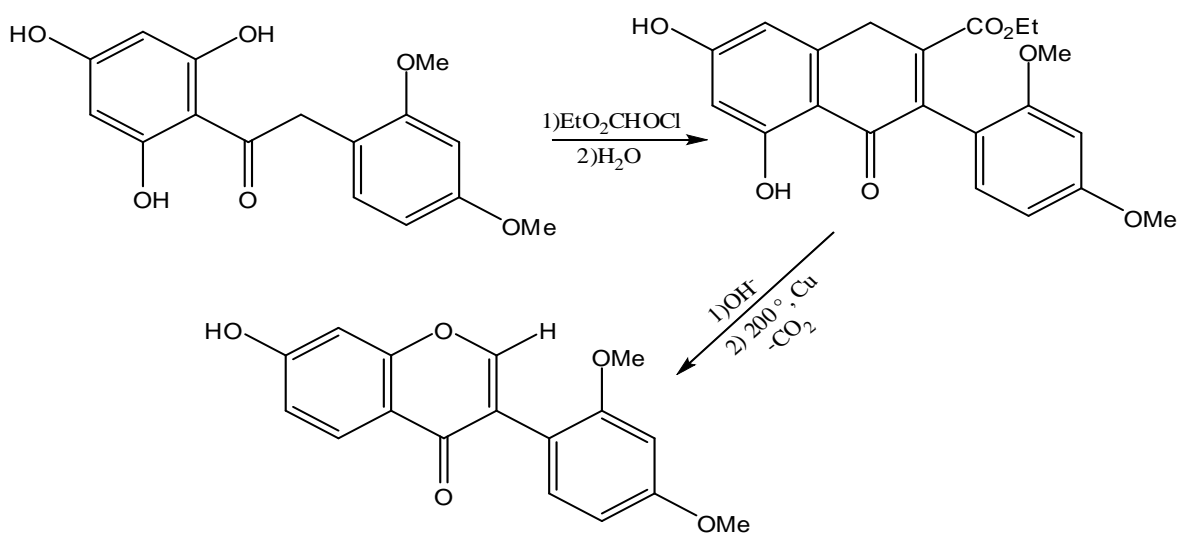
8.3.1. تصنيع إيزوفلافون:

❖ الطريقة الأولى:

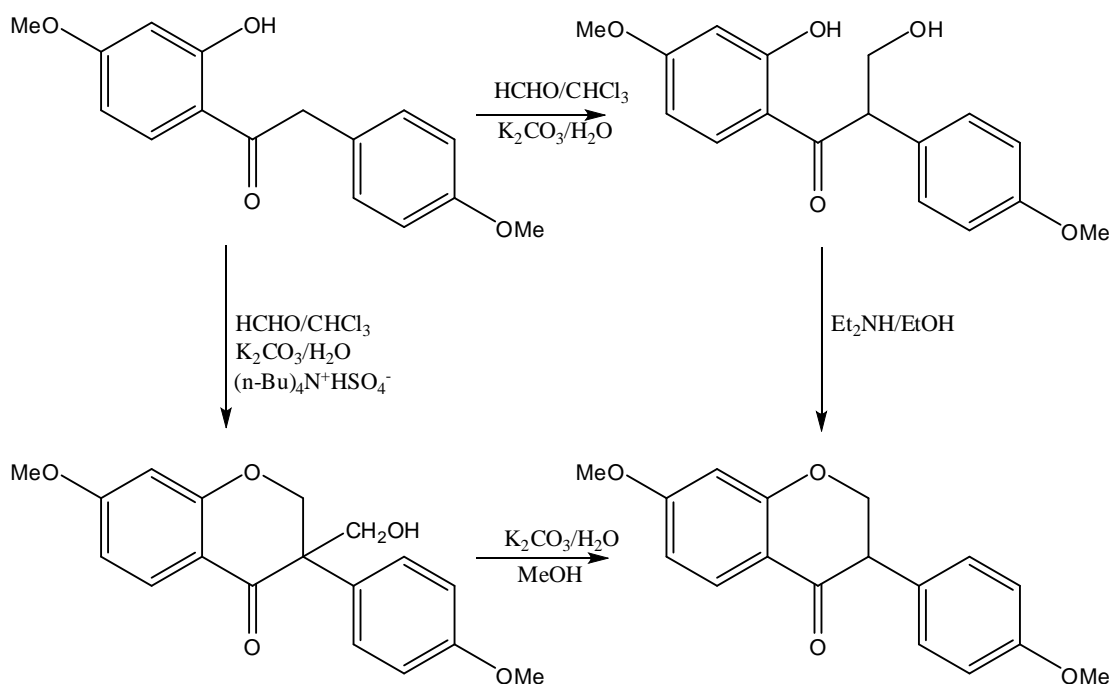


الشكل (30)

❖ الطريقة الثانية:



الشكل (31)



الشكل (32)

4.I. الفصل والتنقية:

I.1.4. الفصل

في سنة 1903 تم اكتشاف الكروماتوغرافيا من طرف العالم الروسي west وهي من أهم الطرق التي يتم بواسطتها فصل وتنقية المركبات الفلافونيدية أهمها:

. كروماتوغرافيا العمود (CC)

. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

. كروماتوغرافيا الورق (CP)

. كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC)

1.1.4.I. كروماتوغرافيا العمود CC:

تستخدم كروماتوغرافيا العمود لفصل الكميات الكبيرة من الفلافونيدات يعبأ العمود بالصنف الثابت الذي يكون سليكاجل أو سليلوز أو بولي أميد. يستخدم السليكاجل لفصل الفلافونيدات الأقل قطبية حيث يؤخذ 32 غ منه لكل 1 غ من المستخلص الخام على الأقل. في حين أثبت السليلوز فعاليته في فصل الفلافونيدات الجليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر ولقد لقي البولي أميد SC_6 تطبيقاً واسع النطاق في حقل الفلافونيدات، نظراً لكون هذه المادة مناسبة لفصل جميع المركبات الفلافونيدية و على الأخص لفصل الفلافونيدات الجليكوزيدية وهذا لإمتلاك بولي أميد الوظيفة الأميدية التي تكون روابط هيدروجينية مع مجاميع هيدروكسيل المركبات الفينولية [51]. حيث يؤخذ 10 غ من بولي أميد لكل 1 غ من المستخلص الخام على الأقل ونقطة الإختلاف في استعمال هذه المادة مقارنة بالسليلوز والسليكاجل هي أنها تغسل في العمود بالماء و الميثانول قبل تطبيق خليط الفلافونيدات المراد فصله وذلك لتجنب الشوائب التي تذوب في المذيبات المستعملة للتملص. بعد تعبأ العمود يذاب خليط الفلافونيدات في أقل كمية ممكنة من المذيب المناسب و يطبق في العمود ثم تبدأ عملية التملص بالمذيب الأقل قطبية ثم يضاف المذيب القطبي تدريجياً حتى الوصول إلى أقصى قطبية، خلال هذه العملية تتم مراقبة الحزم المنفصلة باستعمال الأشعة فوق البنفسجية، عند استعمال البولي أميد تستقبل أسفل العمود أما عند استعمال سليكاجل يتم فحص و جمع الكسور المشابهة باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة .

2.1.4.I. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

تستعمل في هذه التقنية شرائح من الزجاج ذات أبعاد (20×20 سم) حيث تحضر طبقة رقيقة من الدعامة الصلبة تكون من متعدد الأميد أو السليكاجل أو السليلوز . يوضع الخليط على طول الشريحة على بعد (1.5-2 سم) نتركها تجف، ثم توضع في حوض به المذيب المناسب وأثناء هجرته يجر معه مختلف المركبات على شكل حزم ، تحدد بعد ملاحظتها بالأشعة فوق البنفسجية (UV). تكشف الحزم كلا على حدى. توضع في قمع زجاجي تغسل أولاً بالمذيب المستعمل و الثانية بالمثانول، يركز الراشح وتفحص نقاوة الحزم بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية .

الأنظمة المستعملة كمذيبات : [52]

الجدول (6) بالنسبة لمتعدد الأמיד:

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

الجدول (7) بالنسبة للسيلكاجال :

نوع الفلافونويد	جملة المملصات
الجليكوزيدية	الميثانول: الماء المقطر: البيريدين: خلاص الإيثيل 5 10 20 80
الأجليكونية قليلة الهيدروكسي	الميثانول: الكلوروفورم 1 15
الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل	الطولين: أسيتون: الكلوروفورم 8 5 7 الماء المقطر : الميثانول : خلاص الإيثيل 9 12 63

3.1.4.I. كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية CP

هذه الطريقة تعتبر من أهم طرق فصل المركبات الفلافونيدية، نظرا لقدرة الإدمصاص الكبيرة يأخذ ورق WATMAN رقم I أو II يوضع المستخلص بواسطة ماصة على كامل عرض الورقة على شكل شريط، حيث يكون على بعد 02 سم من الحافة العلوية 03 سم على الحواف الجانبية وبعد أن تجف تغمس في المملص المناسب للفصل، حيث تفصل المركبات على شكل حزم متتالية مع الإشارة هنا أنه يمكن استعمال نوعين من الكروماتوغرافيا.

كروماتوغرافيا الورق الصاعدة و كروماتوغرافيا الورق النازلة هذه الأخيرة الأكثر استعمالا. بعد وصول المذيب إلى مسافة قصيرة من الحافة السفلية) تدوم هذه العملية من 05 إلى 20 ساعة) تسحب الورقة من المذيب وتترك لتجف .

بعدها تحدد الحزم باستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV).

ثم تقص و تغمس في الميثانول، بعدها ترشح و تركز ثم يجرى لها فحص باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للتأكد من مدى نقاوة المركبات المحصل عليها.

الأنظمة المستعملة في هذه التقنية هي: [53]

الماء المقطر: حمض الخل:البوتانول العادي.

4 1 5

الماء المقطر:حمض الخل:البوتانول الثالثي.

1 3 1

حمض كلور الماء:الماء المقطر:حمض الخل.

3 10 30

الماء المقطر:حمض الخل. حمض الخل

تراكيز مختلفة. 10 25

75 90

هذه التقنية يمكن إستعمالها ببعدين يكون أحدهما عموديا على الآخر وهذا عندما يكون استخدام بعد واحد غير كافي لفصل الخليط فبعد إجراء البعد الأول تسحب الورقة ، تترك لتجف ثم تدار بمقدار 90° ثم تعمس في المذيب آخروعادة يكون الأول عضوياوالثاني مائيا.

4.1.4.I كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء :

تسمح هذه التقنية بتعيين عدد المركبات التي تحتوي عليها العينة المراد تحليلها في وقت قصير حيث تستخدم ضغوط عالية لدفع المذيب خلال العمود فيجر معه المركبات بصفة انتقائية فتفصل المركبات الأكثر قطبية ، تليها الأقل لذا فهي نوع من أنواع التحليل الكروماتوغرافي التجزيئي. و المملص المستعمل يتكون من مذيبين A و B حيث :

(A) الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : 4 / 10 / 90.

(B) الماء / الأسيتونتريل / حمض الخل : 4 / 80 / 20.

و ذلك وفق برنامج يحدد نسب تدفق هذين المذيبين.

2.4.I. التنقية:

الهدف من التنقية هو التخلص من الشوائب العالقة بالمركبات المعزولة إذن فهي عملية مكملة لعملية الفصل و هذا باستعمال.

عمود صغير من متعدد الأميد SC₆ نذيب المركب المفصول في قليل من الميثانول يغسل بالطولوين ثم نغير الملمص بإضافة الميثانول تدريجيا، نتتبع نزول المركب بمصباح UV.

كما يمكن استعمال عمود من السفاداكس LH20 يتم نقع جال السيفاداكس في الميثانول ثم يصب في العمود و بعد تموضعه، نذيب المركب المفصول في أقل كمية من الميثانول يوضع في العمود يملص بدفعات متتالية من الميثانول .

الفصل الثاني الدراسة البنيوية للمركبات الفلافونيدية

الدراسة البنيوية للفلافونيدات تتم اعتمادا على التقنيات التالية :

1. الخواص الكروماتوغرافية :

- اللون الاستشعاعي
- ثابت الاحتباس

2. التقنيات الفيزيوكيميائية :

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية
- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي
- مطيافية الكتلة

3. الإماهة الحمضية

1.II. الخواص الكروماتوغرافية:

1.II.1. اللون الإستشعاعي: تتميز الفلافونيدات بأنها تعطي ألوانا معينة تحت الأشعة فوق البنفسجية و

التي تساعدنا على التعرف على نوع الفلافونويد [51] ونلخصها بصفة عامة في الجدول (8).

لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV)	البنى الكيميائية المختلفة
بنفسجي-أسود.	. فلافون. . 5،6،7 أو 5،7،8 ثلاثي هيدروكسيل فلافون. . فلافونول مستبدل في الموضع 3. . بعض الشالكونات.
بنفسجي-نيلي.	. فلافانول يملك هيدروكسيل في 3 أو فلافانول. . فلافون أو فلافانول دون OH في 5. . فلافونول مستبدل في 3 أو دون OH في 5.
أصفر أو أصفر باهت.	. فلافونول مع OH حر في 3 أو دون OH في 5.
برتقالي لامع.	. إيزوفلافون.
أصفر مخضر.	. أوران.
أخضر.	. بعض الشالكونات.
أزرق مخضر.	. فلافانول دون OH في 5.

الجدول (8) لون المركب تحت الأشعة فوق بنفسجية (UV) وعلاقته بالبنية الفلافونيدية

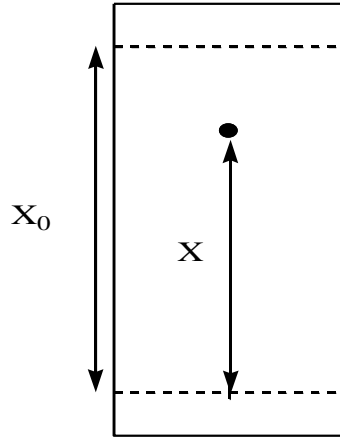
2.1.II. معامل الانحباس:

R_f هو قيمة مميزة لكل مركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، طبيعة المادة الدامصة، والمملص). وتتأثر هذه القيمة بالمستبدلات ومواقعها على الجزيئي فمن خلال R_f يمكن التمييز بين الجليكوزيدات أحادية، ثنائية و متعددة السكر [51] و بين الأجليكونات البسيطة ومتعددة الهيدروكسيل أو متعددة الميتوكسيل.

$$R_f = x / x_0 \quad \text{يعرف } R_f \text{ بأنه:}$$

حيث: x هي المسافة المقطوعة من طرف المركب.

x_0 هي المسافة المقطوعة من طرف المذيب ابتداء من نفس النقطة.



الشكل (33)

2.II. التقنيات الفيزيوكيميائية

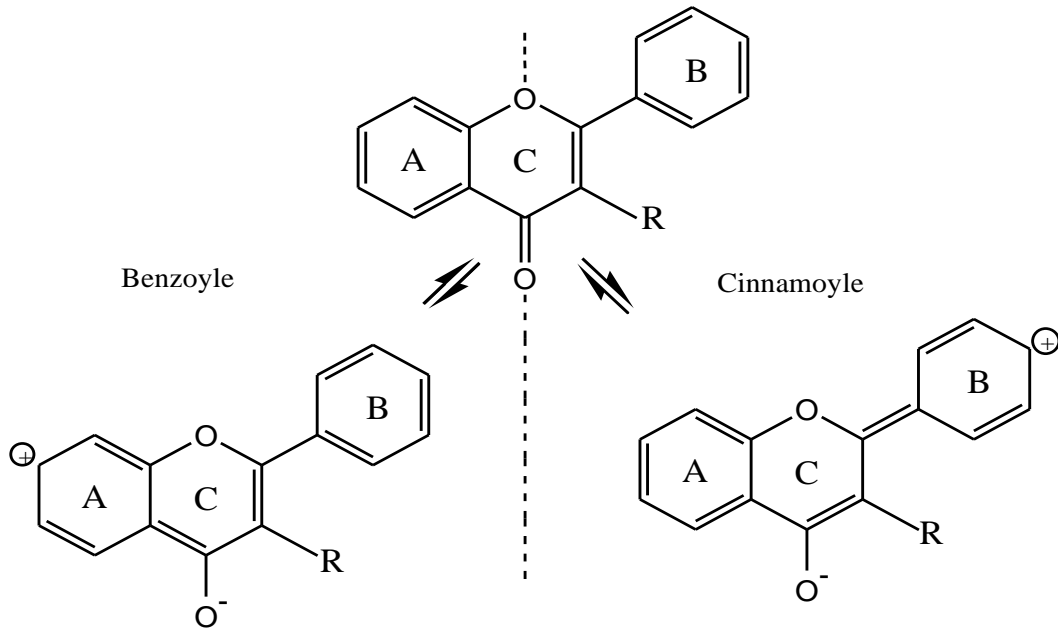
1.2.II. مطيافية الأشعة فوق بنفسجية (UV)

يتم تحقيق السلسلة الطيفية للأشعة فوق البنفسجية عمليا على المراحل التالية :

- نقوم أولاً بقياس وتسجيل الطيف الميثانولي الخالص للمركب .
- نضيف لخلية المركب قطرة من NaOH بتركيز 0.5 عياري.
- نسجل طيف الامتصاص ثم نعيد تسجيله بعد 5 د .
- نحضر خلية جديدة تحتوي على المركب و نضيف إليها بعض القطرات من $AlCl_3$ ذو التركيز 2% في الميثانول و نسجل طيف الامتصاص ثم نضيف قطرة من HCl (2N) و نسجل طيف الامتصاص.
- نحضر خلية جديدة تحتوي على المركب المدروس نضيف لها NaOAc الصلب حتى التشبع و نسجل طيف الامتصاص ثم نضيف الخلية H_3BO_3 (1% H_2O) ونسجل الطيف الامتصاص.

1.1.2.II. طيف الامتصاص في الوسط الميثانولي:

يظهر في هذا الطيف و في حالة فلافون أو فلافونول عصبائين أساسيتين فوق الشكالاتالي:



الشكل (34) الشكلين السينامويلي والبنزيلي

I العصابة

تظهر بين (300-400 نم) وتعود إلى امتصاص الشكل Cinnamoyl الموضح في الشكل السابق و الذي ينتج عن ترافق مجموعة كربونيل C₄ مع الحلقة البنزينية B والرابطة الثنائية للحلقة غير المتجانسة المركزية.

II: العصابة

في حدود (250 -280 نم) و يكون مسؤول عنها الشكل الرنيني Benzoyl و الذي ينتج عن ترافق مجموعة كربونيل C₄ مع الحلقة البنزينية. [48]A.

- من خلال العصابة (I) في طيف الميثانول [43] يمكن التمييز بين بنية الفلافون والفلافونول إذ أن حزمة (I) تظهر بين [305-350نم] بالنسبة للفلافون وعند [350-380نم] بالنسبة للفلافونول.
- يرتبط مكان الحزمتين على عدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل البديلة، فكلما زادت مجاميع الهيدروكسيل، فإن حزمة الامتصاص تزداد، إلى طول موجي أعلى أي (انزياح باتوكرومي) وعند استبدال مجموعات الهيدروكسيل بمجموعات ميتوكسيل أو وحدات سكر تتزاح حزمتا الامتصاص إلى طول موجي أقل (انزياح هيبسوكرومي) [33].

الجدول (9) يبين أهم الإنزيمات للعصابتين في الوسط الميثانولي [51].

نوع الفلافونويد	العصابة II (نم)	العصابة I (نم)
فلافون.	280-250	350-310
فلافونوليهيدروكسيلي الموضع 3 مستبدل.	280-250	360-330
فلافونوليهيدروكسيلي الموضع 3 حر.	280-250	385-350
إيزوفلافون.	275-245	330-310 نتوء
شالكون.	270-230 شدة منخفضة	390-340
أورون.	270-230 شدة منخفضة	430-380
أنتوسيانين و أنتوسيانين.	280-270	560-465

الجدول (9) أهم الانزيمات للعصابتين في الوسط الميثانولي [51].

2.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود NaOH أو NaOMe

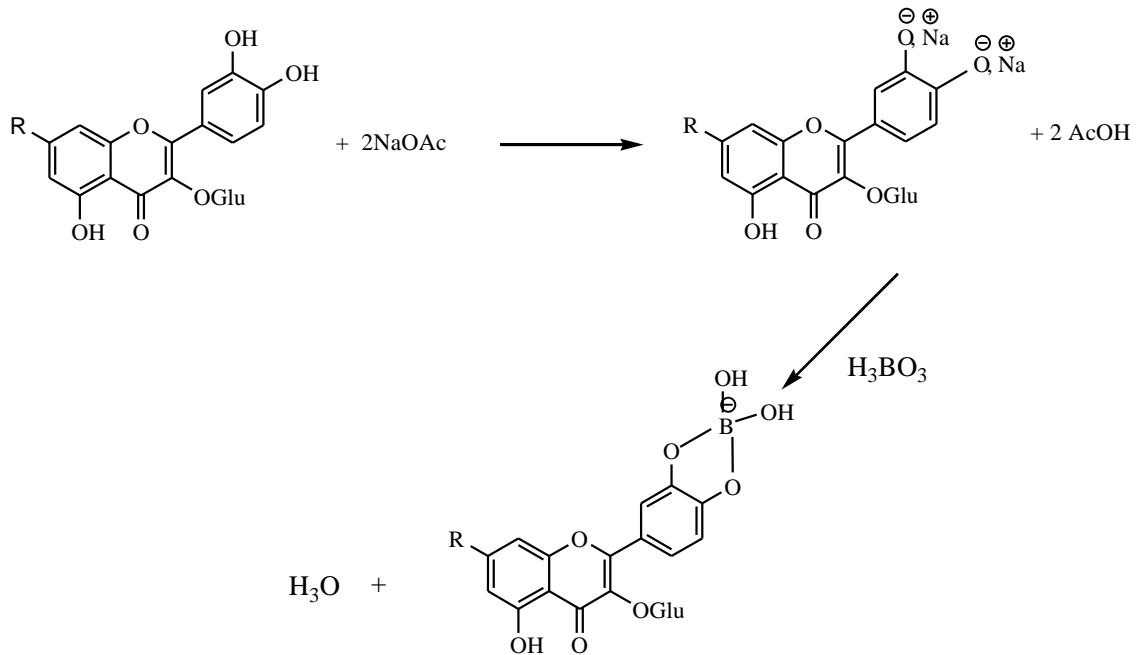
تعتبر NaOH أو NaOMe () قاعدة قوية تؤين جميع هيدروكسيدات المركب الفلافونويدي يكون تأثيرها على العصابة I أكبر منه على العصابة II تؤدي إلى انزياح باتوكرومي لكامل الطيف. [54]

3.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود NaOAc

خلات الصوديوم أساس ضعيف مقارنة مع NaOH وبالتالي فهي تؤين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حامضية في المواضع C₃, C₄, C₇ وتعتبر كاشف نوعي لهيدروكسيل الموقع C₇ ويظهر واضحا على العصابة II للطيف المسجل، إذ أنه يحدث فعل باثوكرومي [+5 إلى +20 نم] للعصابة (II) و يشير هذا إلى وجود OH حر في الموقع C₇. [55]

4.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود (NaOAc + H₃BO₃)

تستعمل للكشف عن أورثو ثنائيالهيدروكسيل حيث يشكل حمض البوريك معقدات مع الهيدروكسيلات الفينولية في الموضع أورثو وفي وجود الخلات، يؤدي إلى إنزياح باثو كرومي [51] كما مبين في الشكل(35):

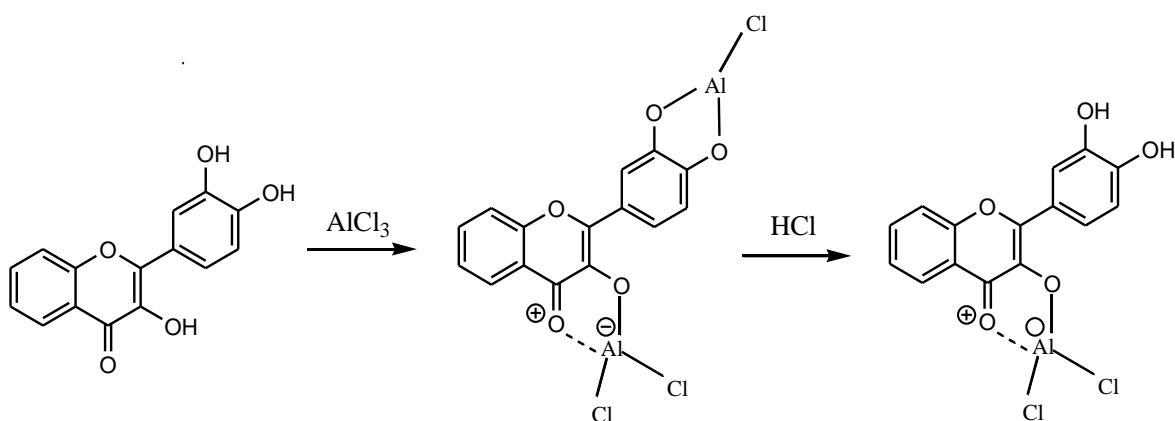


الشكل(35)المعقدات المتشكلة بين الفلافونويد وNaOAc +H₃BO₃

5.1.2.II. طيف الامتصاص في وجود $AlCl_3$ و $(AlCl_3+HCl)$

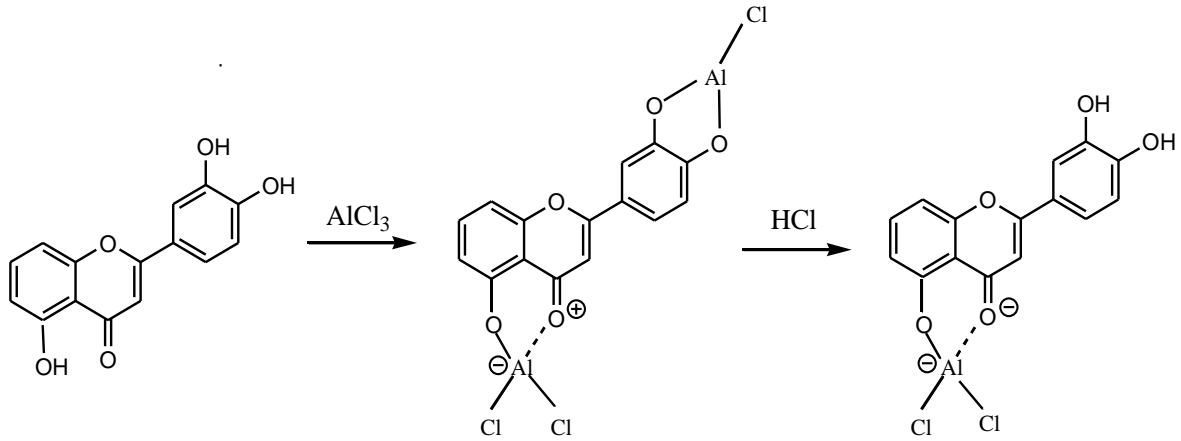
في وجود $AlCl_3$: يشكل $AlCl_3$ معقدات ثابتة بين كربونيل الموضع 4 و هيدروكسيل الموضع 3 أو (و) الموضع 5 في الوسط الحمضي أي بعد إضافة HCl ، و معقدات غير ثابتة في الوسط الحمضي مع المركبات المحتوية على هيدروكسيل حر في (3'، 4')، (7، 8)، (6، 7).

في وجود $(AlCl_3+HCl)$: نقارن الطيف المسجل في وجود $AlCl_3$ مع المسجل بعد إضافة HCl فيكون انزياح هيبوسكرومي للعصابة (I) في حالة وجود معقد غير مستقر و هذا معناه وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A و B [26] و بذلك يكون طيف $AlCl_3$ الممثل لتأثير كل المعقدات الثابتة و غير الثابتة أما طيف $(AlCl_3+HCl)$ فطيف المعقدات الثابتة فقط. كما مبين في الشكل (36).



الشكل (36) المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين $AlCl_3$ بعض الفلافونيدات في وجود وغياب HCl

يتبع



تابع الشكل (36) المعقدات الثابتة وغير الثابتة بين $AlCl_3$ بعض الفلافونيدات في وجود وغياب HCl

الجدول (10) يمثل أهم التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية .

التعليق	الإزاحة الملاحظة بـ (nm)		المفاعلات
	الحزمة II	الحزمة I	
فلافون	280 - 250	350 - 304	MeOH
فلافونول	280 - 250	385 - 352	
OR في الموضع 3	280 - 250	357 - 328	
OH في 4' OR في 4'		45+ إلى 65+ 1- عدم نقصان الشدة الضوئية/MeOH 2- نقصان الشدة الضوئية/MeOH	NaOMe (NaOH)
OH في 3، 4' أو Orthodi-OH على الحلقة A مثلاً 7، 6 أو 8، 7 أو Orthodi-OH على الحلقة B		استمرار التناقص في الشدة الضوئية، طيف يتحلل مع الوقت	
Tri OH في 3، 3'، 4' أو Tetra OH في 3، 3'، 4'، 5'		استمرار التناقص في شدة الامتصاص مع تفكك سريع للطيف	
OH في 7		عصابة جديدة بين 320 - 335	

OH في 7 مع ملاحظة أن هذا الانزياح يتراجع في وجود مستبدلات 6 أو 8	5+ إلى 20+		NaOAc
OR في 7	عدم وجود أي انزياح أو ظهور انزياح ضعيف		
Di OH في 7، 6 أو 8، 7 أو 4'، 3' Tri OH في 7، 6، 5 أو 8، 7، 5 أو 4'، 3'، 3	طيف يتفكك بمرور الزمن		
Orthodi OH على الحلقة B		12+ إلى 36+	NaOAc + H ₃ BO ₃
Orthodi OH على الحلقة A (7-6 أو 8-7) إيزوفلافون	+10 - 15		MeOH/ NaOAc + H ₃ BO ₃
5-OH مع مجموعة أوكسجينية في 6		17+ إلى 20+	MeOH/ AlCl ₃ +HCl
OH في 5 فلافون و OCH ₃ في 3 فلافونول		35+ إلى 55+	
OH في 3 مع أو عدم وجود OH في 5		50+ إلى 60+	
Orthodi OH على الحلقة B		20- إلى 40- مع نتوء أو قمة من [350 - 360]	AlCl ₃ / (AlCl ₃ +HCl)
إمكانية وجود Orthodi OH على الحلقة A أكثر من Orthodi OH على الحلقة B أو Tri OH على الحلقة B		20- إلى 25-	

الجدول(10)التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV)[26-51-56]

ملاحظة - : إزاحة هيبسوكرومية + : إزاحة باتوكرومية

2.2.II. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي RMN

استخدمت هذه التقنية على نطاق واسع في دراسة المنتجات الطبيعية فهي تمكننا من معرفة درجة تأكسد الحلقات A, B, C وكذا عدد ومواقع المجموعات الميثوكسيلية وعدد وطبيعة السكريات الموجودة في المركب. تستخدم في هذه التقنية العديد من المذيبات أهمها: $CDCl_3$ ديوتروكلوروفورم الذي يعطي نتائج جيدة مع الفلافونيدات غير القطبية، و $DMSO-d_6$ (Hexadeuterodimethyl sulfoxide) الذي يستخدم خاصة في حالة الفلافونيدات الجليكوزيدية وكذا الأجليكونات [33-57]

1.2.2.II. طيف RMN للبروتون 1H

فيما يلي الجداول (11)، (12)، (13) تبين الانزياح الكيميائي لمختلف بروتونات الحلقتين A و B [26-58].

الجدول (11) الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة A

H-8	H-6	H-5	نوع الفلافونيد
$d(J=2,5 \text{ Hz})$ 6,3– 6,5 ppm	$d(J=2,5 \text{ Hz})$ 6,2 –6,0 ppm	-	5,7-OH
$d(J=2,5 \text{ Hz})$ 6,1–6,4 ppm	$d(J=2,5 \text{ Hz})$ 6,1 –5,9 ppm	-	5-OH,7-O Glc
6,3 ppm (s)	-	-	5,6,7-OR (R=H, Glc)
-	6,3 ppm (s)	-	5,7,8-OR (R=Glc,H)
$d(J=2,5 \text{ Hz})$ 6,7–7 ppm	$d,d(9 \text{ Hz}, 2,5 \text{ Hz})$ 7,1 –6,7 ppm	$d(J=9 \text{ Hz})$ 8,0 ppm	7-OR (R=H, Glc)

الجدول (12) الانزياح الكيميائي لبروتونات الحلقة B أحادية الاستبدال

H-6' , H2' $d(J = 8,5 \text{ Hz})$	H-5' , H3' $d(J = 8,5 \text{ Hz})$	الفلافونويد
7,9 - 7,7 ppm	7,1 - 6,5 ppm	فلافون
8,1 - 7,9 ppm	7,1 - 6,5 ppm	فلافونول

الجدول (13) الإزاحة الكيميائية لبروتونات الحلقة B ثنائية الاستبدال

H-6' $dd(J = 8,5; 2,5 \text{ Hz})$	H2' $d(J = 2,5 \text{ Hz})$	نوع الفلافونويد
7,5 - 7,3 ppm	7,3 - 7,2 ppm	Flavone - 3',4'- OH. - 3'- OMe, 4'- OH. - 3'-OH, 4'- OMe.
7,9 - 7,6 ppm	7,7 - 7,5 ppm	Flavonol - 3',4' OH. - 3'-OH, 4' OMe.

• بروتون الحلقة C: يتأثر بروتون H₃ في الفلافون بمستبدلات الحلقتين العطريتين، يعطي إشارة

أحادية حادة في المجال (6.2-6.4ppm) فنكون هناك تداخل مع إشارة بروتوني الحلقة

A(H₆,H₈)وبالأخص مع البروتون H₈. [58]

❖ البروتونات الأليفاتية:

• بروتونات مجموعة الميثوكسيل:

تتمركز إشارات بروتونات الميثوكسيل في المجال [3,8-4,5 ppm]. [58].

• بروتونات السكر

يعتمد الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري H_1'' على طبيعة الفلافونيد و موقع ونوع الرابطة بين السكر والأجليكون.

والجدول (14) يعطي قيم الانزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري H_1'' لبعض الفلافونيدات أحادية السكر. الجدول (14) قيم الانزياح الكيميائي لـ H_1'' لبعض الفلافونيدات أحادية السكر

$\delta H_1''$ ppm	الفلافونيد
5.2 – 4.8	7-O-glucosyl flavonol
6.0 – 5.7	3-O-glucosyl flavonol
5.3 – 5.1	7-O-rhamnosyl flavonol
5.1 – 5.0	3-O-rhamnosyl flavonol

تستغل قيمة ثابت الاقتران بين H_1'' و H_2'' للتعرف على نوع الرابطة (α أو β) بين السكر والأجليكون.

حيث يمتاز الجليكوز بالرابطة β ويظهر H_1'' بإشارة ثنائية وثابت تزواج ($J=7$ Hz) ناتج عن تزواج ثنائي

محوري (diaxial) مع H_2'' . أما في حالة سكر الرامنوز حيث يمكن أن تكون الرابطة من النوع α بإشارة

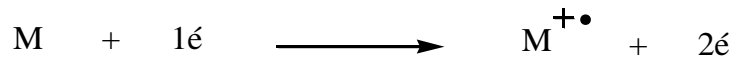
ثنائية لـ H_1'' بثابت تزواج ($J=2$ Hz) نتيجة الاقتران استوائي. استوائي بين H_1'' و H_2'' . [26].

3.2.II. مطيافية الكتلة:

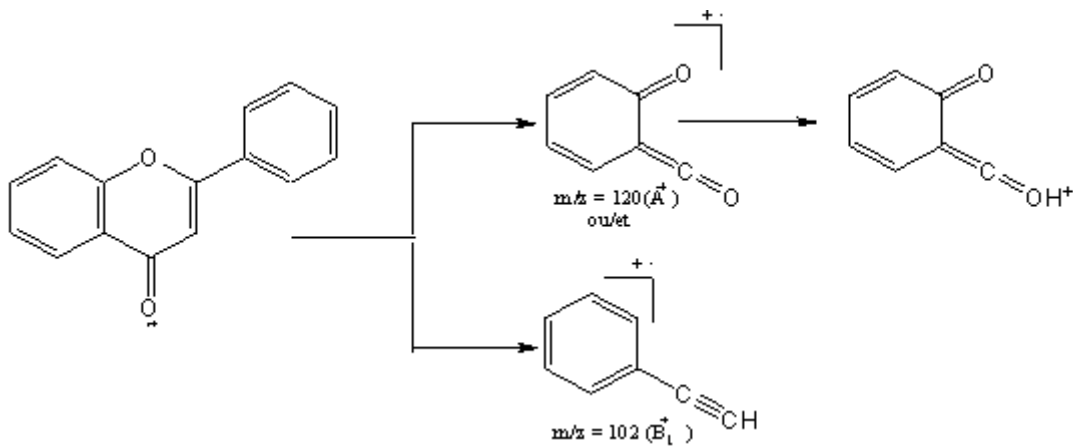
من التقنيات الفيزيائية المهمة تمكننا من التعرف على البنية الكيميائية للمركب بالإضافة إلى أنها لا تتطلب إلا كمية قليلة من العينة المدروسة (جزء من الملعق) في حين تعطي معلومات كثيرة يمكن معرفة الوزن الجزيئي وبالتالي معرفة الصيغة المجملة للمركب الذي يبين نوعية المستبدلات ميتوكسيلية كانت أو هيدروكسيلية، كما تمكن قيم الشظايا من معرفة توزع هذه المستبدلات على الحلقتين A و B. وتعتمد هذه التقنية على عدة طرق أهمها:

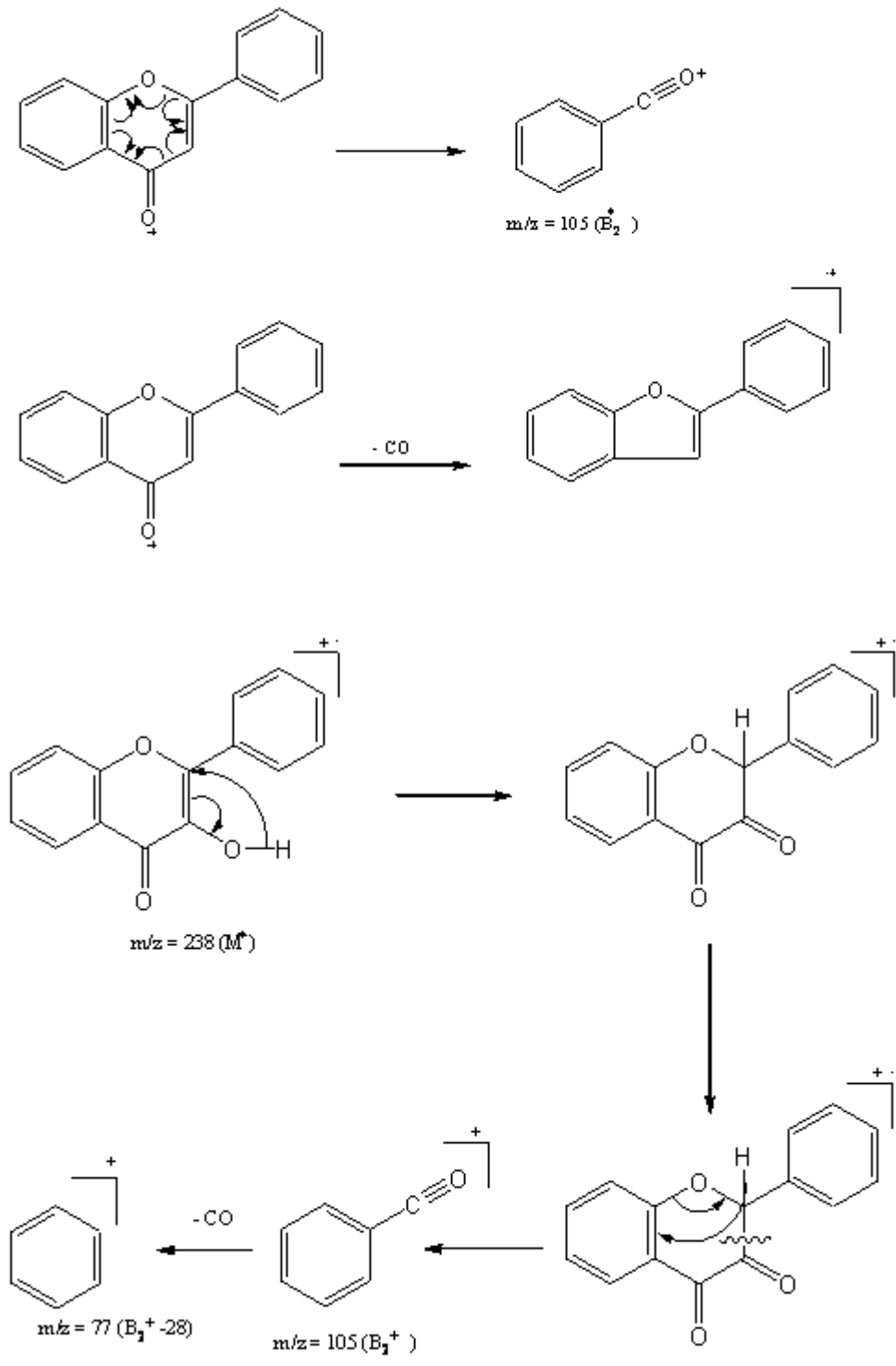
1.3.2.II. طريقة القذف الإلكتروني EI

هذه التقنية تستعمل في حالة الجليكونات ولا تكون صالحة مع الجليكوزيدات لوجود المستبدلات السكرية التي لا تحتل الطاقة القوية التي تتطلبها هذه التقنية. تتم بقذف المركب بسيل من الإلكترونات داخل غرفة التأين عند درجة حرارة مناسبة.



فيما يلي آليات الانشطار لأهم الشظايا على بعض الفلافونويدات :





أهم الإنشطارات الملاحظة على الفلافون (تابع)

تطورت مطيافية الكتلة بفضل ظهور تقنيات أخرى.

2.3.2.II. تقنية القذف السريع بالذرات المسرع [59]F.A.B

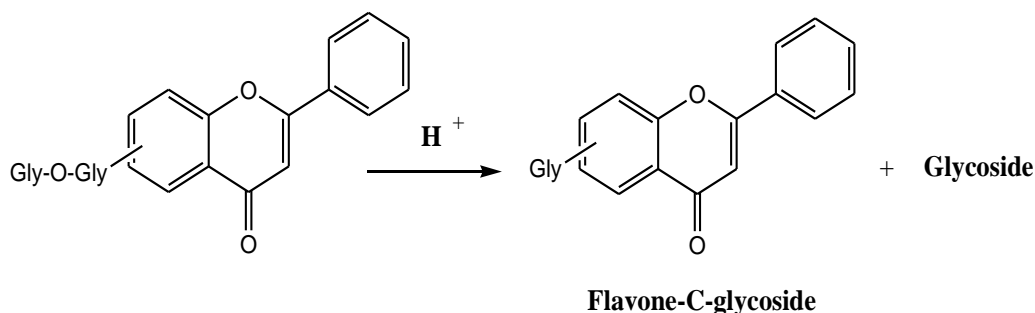
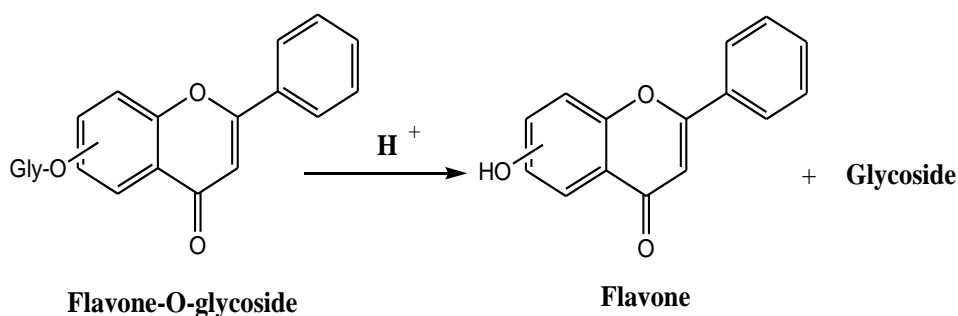
تستعمل في حالة المركبات الجليكوزيدية حيث تأين المركبات دون تسخين .

3.3.2.II. تقنية الإلتروسبراي Electro-spray

تسمح هذه التقنية بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة كالبروتينات تستعمل أيضاً مع الجليكوزيدات .

3.II.الإماهة الحمضية:

تستعمل هذه التقنية للتعرف على طبيعة السكريات الموجودة في المركبات الجليكوزيدية بالإضافة إلى أنها تعطينا فكرة عن نوع الرابطة بين السكر والأجليكون رابطة من نوع (O-glycosyl) أو من نوع (C-glycosyl) لأن الرابطة من النوع الثاني أي (C-glycosyl) مقاومة للتحليل الحمضي .حيث يتم تمييزه المركب الجليكوزيدي في وسط حمضي لتحطيم الرابطة (كربون - أكسجين) .
الشكل(38)يبين الإماهة الحمضية للفلافونيدات الجليكوزيدية في حالة O- جليكوزيل و C- جليكوزيل [60].



الشكل(38)يبين الإماهة الحمضية المركبات الجليكوزيدية

عمليا نقوم بمايلي :

في أنبوب إختبار نذيب المركب الجليكوزيدي في 1 مل من الميثانول، يضاف إليه 1 مل من حمض كلور الماء (4N) HCl ثم يسخن في حمام مائي عند 100م° لمدة 15 إلى 120 دقيقة . بعد تبريد الأنبوب نقوم بإستخلاص من نوع سائل /سائلحيث نضيف 2مل من الإيثراالإيثيلي(EtOET)يرج جيدا ثم يترك الأنبوب للراحة ، حتى ظهور طورين طور عضوي وطور مائيتفصل الطبقة العضوية. تكرر العملية مرتين ثم نقوم بنفس العملية مع خلات الإيثيل (AcOET) ثم البيوتانول العادي (n-butanol). تركز الطبقة العضوية المحتوية على الأجليكون إذ يمكن التعرف على هذا الأخير بتسجيل طيف(UV)وكذلك إجراء اختبارات كروماتوغرافية مع شواهد أجليكونية أما الجزء السكري فلتعرف عليه نستعمل ألواح كروماتوغرافية (gel de silice 60 GF₂₅₄) حيث ترش (NaH₂PO₄0.2M) تترك لتجف في الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100 م° لمدة ساعة . بعدها توضع بقعة من الطبقة المائية مع بعض الشواهد السكرية المعروفة، يغمس اللوح الكروماتوغرافي في المملص (أستون / ماء : 1/9) بعد هجرة البقع السكرية يستخرج اللوح الكروماتوغرافي ليجف في الهواء لمدة ساعة بعدها يرش بكاشف مالونات الأنيلين و يسخن عند 100° لمدة 5 دقائق حيث تبدأ بقع السكريات بالظهور .

الفصل الثالث الدراسة الفيتوكيميائية لنبته *Centaurea involucrata*

III. الدراسة الفيتوكيميائية للنبته

III.1. الدراسة النباتية لـ *Centaurea involucrata*

III.1.1. الوصف النباتي للنوع *C. involucrata*

نبته زهرية ذو سيقان قائمة طولها حوالي 40 سم، تتفرع منها أوراق صغيرة مدببة في نهاية الساق نجد زهرة صفراء متوسطة الحجم تحيط بها حراشف لها أشواك حادة.



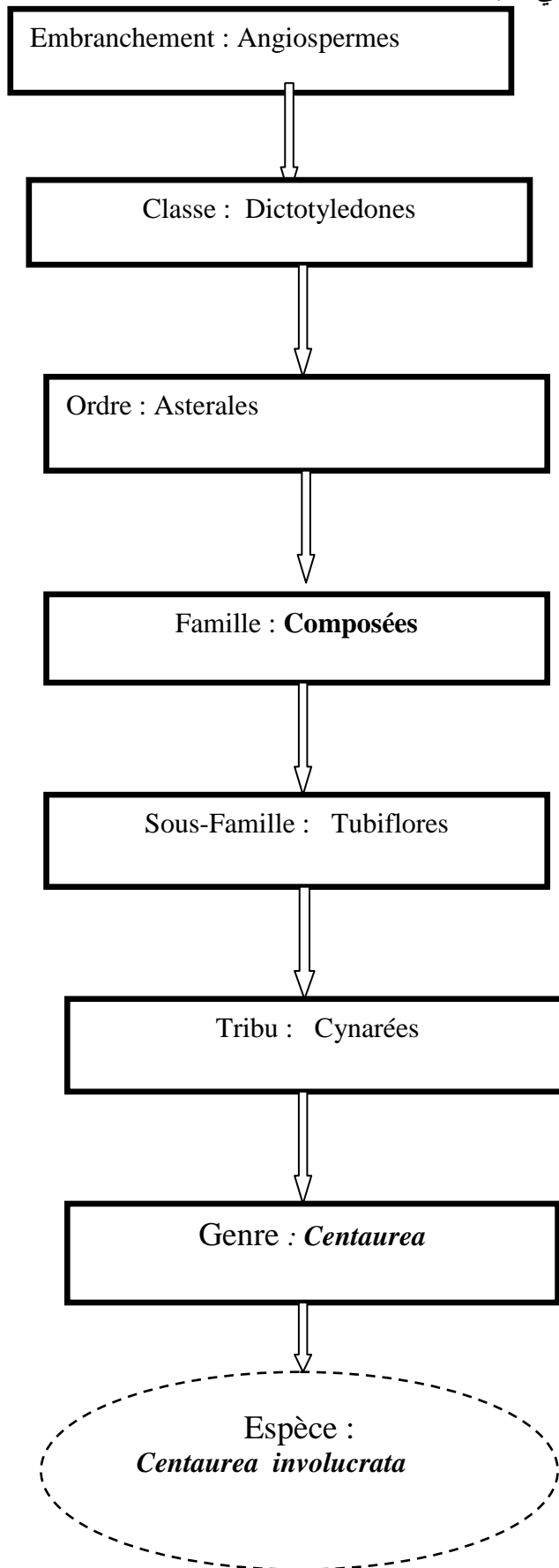
صورة (1) صورة فوتوغرافية للنبته

III.2.1. المادة النباتية :

جمعت هذه النبتة من ضواحي ولاية مسيلة من الشرق الجنوبي للجزائر تم تنقيتها من الجذور وتقطيعها، جففت بعيدا عن الشمس والرطوبة والغبار فكان وزن المادة النباتية المستعملة من الأوراق و الأزهار 1626 غ حيث تم استخلاصها معاللتشابه الكبير بين مستخلص الأوراق والزهور و ذلك بعد إجراء إختبارات أولية.

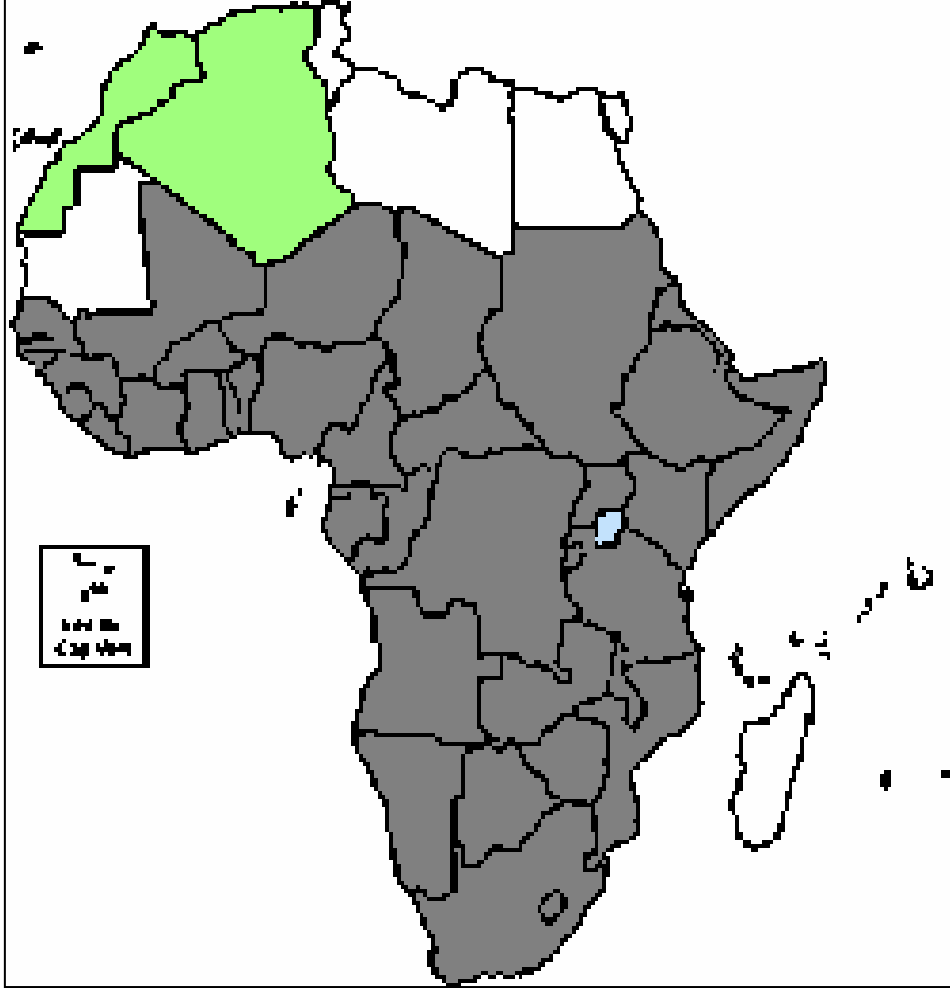
III.3.1. إختيارالمادة النباتية :

تم اختيار هذه النبتة على أسس كيميائية و بيولوجية فجنس *Centaurea* يحتوي على الكثير من المركبات الفلافونيدية [61-62] و اللاكتونات السيسكوي تربينية أما بيولوجيا فقد أثبتت الأبحاث قدرة هذا الجنس على علاج الكثير من الأمراض و النوع الذي نحن بصدد دراسته هو *Centaurea involucrata*.



5.1.III.التوزيع الجغرافي للنبتة *Centaurea involucrata* [63]

تنمو نبتة *Centaurea involucrata* بالنسبة للقارة الإفريقية في الجزائر، المغرب و الصحراء الغربية الشكل (39).



مكان تواجد نبتة *Centaurea involucrata*



الشكل (39) التوزيع الجغرافي لنبتة *Centaurea involucrata*

2.III. التحليل الكيميائي

1.2.III. الاستخلاص:

نعتمد في عملية الإستخلاص لإنتقائي (سائل - سائل) على مذيبات كإيثر البترول لنزع

الكلوروفيل والليبيدات و الكلوروفورم ($CHCl_3$) لاستخلاص الأجليكونات الحرة [28].

وأكثر المذيبات استعمالا خلاص الإيثيل (AcOEt) لاستخلاص الأجليكونات عديدة الهيدروكسيل

والجليكوزيدات أحادية السكر كما يستعمل البيوتانول العادي (n-BuOH) في استخلاص الجليكوزيدات عديدة السكر.

عمليا:

تمت عملية الاستخلاص كما يلي جففت النبتة في مكان بعيد عن الغبار والشمس ثم قمنا بتفتيتها من الجذور وتقطيعها.

تتقع المادة النباتية في خليط من الميثانول و الماء (2:8) وتترك لمدة 24 سا .
ترشح ويركز المحلول تحت درجة حرارة 35° وضغط مناسب تكرر العملية 3 مرات .

تتقع المادة النباتية المستعملة في مذيب جديد ميثانول وماء (3:7) و في نفس الشروط تكرر العملية 3 مرات . يخفف الخليط بالماء المقطر ثم تبدأ عملية استخلاص سائل . سائل كمايلي :

في قمع الفصل نضيف إيثربترول للمستخلص، على أن يكون حجم المذيب (إيثر البترول) يساوي ثلث حجم المستخلص، يرح جيدا ثم يترك للراحة حتى يتشكل لنا طبقتين عضوية ومائية ، تفصل الطبقة العضوية و تركز تعاد العملية مرتين.

بعدها يجفف محلول إيثر البترول بكبريتات الصوديوم Na_2SO_4 يرشح المحلول و يركز الراشح.
الطبقة المائية أعيد استخلاصها بمذيب الكلوروفورم تتبع نفس الطريقة السابقة (طريقة إيثر البترول)

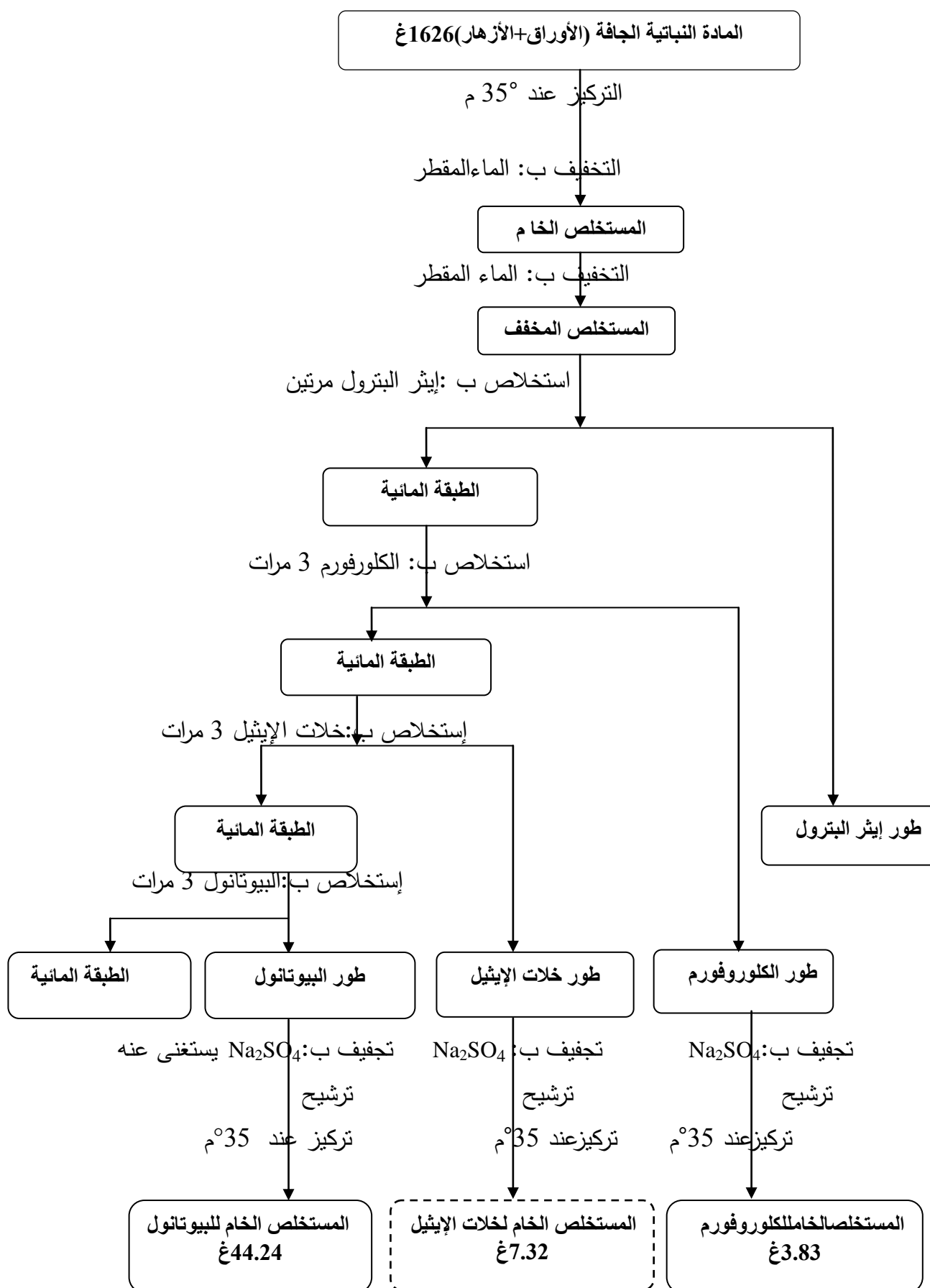
على أن تعاد العملية 3 مرات بعدها يجفف محلول الكلوروفورم ،بكبريتات الصوديوم Na_2SO_4 يرشح المحلول و يركز الراشح.

الطبقة المائية أعيد استخلاصها بمذيب خلات الإيثيل ثم بالبيوتانول العاديحيث تتبع نفس الطريقة السابقة .

تمت عملية الفصل للمستخلص المخفف (7: 3) والمستخلص المخفف (8: 2) في قمع فصل مختلفين و بعد الحصول على مستخلصات الإيثيل من كل قمع أجريت إختبار على المستخلصين باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية و الأشعة فوق بنفسجية (UV)حيث بينت تشابه في مكونات المستخلصين عندئذ جمعت في مستخلص واحد ثم وزن المستخلص فحصلنا على 7.32غ وزن المستخلص الخام لخلات الإيثيل.

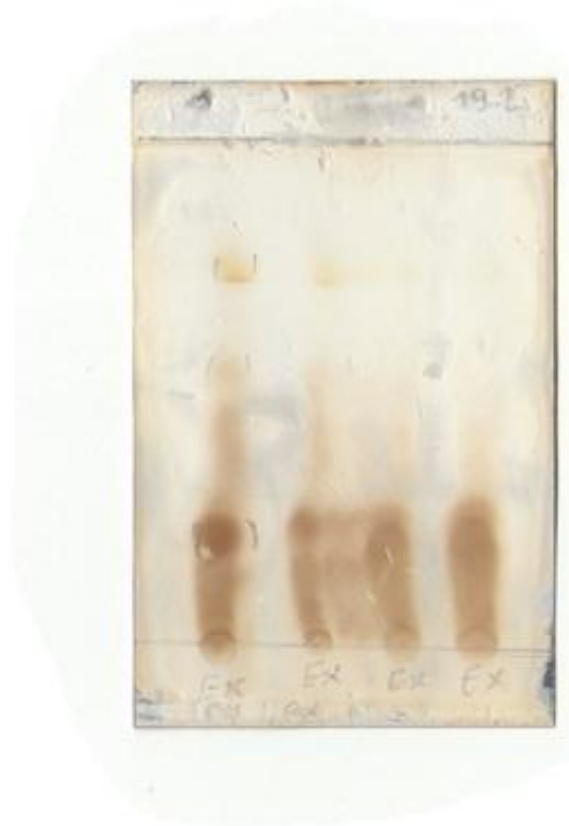
يمكن تلخيص أهم الخطوات المتبعة في عمليات الاستخلاص في الشكل (40) مع الوزن المحصل عليه في كل طور حيث حصلنا في الطور الكلوروفورم على 3.83غ أما طور البيوتانول تحصلنا على 44.24غ .

الشكل (40) الخطوات المتبعة في عملية استخلاص *Centaurea involucreta*



III.2.2. الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود

قبل بداية عملية الاستخلاص أخذنا عينة من مستخلص خلات الإيثيل و أجرينا عليه اختبارات للأجل اختيار الملمص و الدعامة المناسبة، باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية توصلنا إلى النظام الذي سمح بفصل جيد لمكونات المستخلص والتي ظهرت تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) على شكل بقع صفراء، زرقاء وسوداء بنفسجية الصورة (2).



الصورة (2)

تمثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية لمستخلص خلات الإيثيل للأوراق و الأزهار في النظام (1:19 Acètone : CHCl₃) بعد إستعمال الكاشف محلول حمض السيلفريك Solution acide sulfurique (1 : 1 : 8 / H₂SO₄ : ACO₂H : H₂O) وتسخين عند 100م لمدة 3 د.

- **تحضير المستخلص:** إذابة المستخلص الخام في قليل من الميثانول ثم إضافة كمية كافية من gel de silice ليحفظ ثم يسحق .
- **كمية الدعامة:** غالبا يؤخذ 30 غ من gel de silice لكل 1 غ من المستخلص الخام .

- تحضير العمود: إختارنا عمود مناسب طوله 95 سم و قطره 3.5 سم أما الدعامة المستعملة فهي gel de silice 60, (230-400 mesh) ASTM merk

طول الدعامة 71 سم والملص المستعمل الكلوروفورم ثم الزيادة في القطبية باستعمال الأسيتون تدريجيا .



الصورة(3)العمود الكروماتوغرافي المستعمل في عملية الفصل

حصلنا على كسور جمعت المتشابهة تباكال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية بعد فحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) فحصنا على الجدول (16).

الملاحظة	الوزن (مغ)	الملص	الكسور
شحوم	20	CHCl ₃ 100%	F ₀ 1000مل
شحوم+كلوروفيل	75	CHCl ₃ /Acètone 98-2	F ₁ 1-26
مركب على شكل بلورات	140	CHCl ₃ /Acètone 98-2	F ₂ 27-40
خليط قابل للفصل	1895	CHCl ₃ /Acètone 98-2	F ₃ 41-95
خليط	90	CHCl ₃ /Acètone 19-1	F ₄ 96-120
خليط قابل للفصل	151	CHCl ₃ /Acètone 19-1	F ₅ 121-197

خليط	99	CHCl ₃ /Acètone 7-1	F ₆	198-211
خليط	103	CHCl ₃ /Acètone 5-1	F ₇	212-242
خليط قابل للفصل	130	CHCl ₃ /Acètone 3-1	F ₈	243-250
خليط	140	CHCl ₃ /Acètone 2-1	F ₉	251-270
خليط قابل للفصل	53	CHCl ₃ /Acètone 2-1	F ₁₀	271-304
مركب على شكل بلورات	1401	CHCl ₃ /Acètone 1-1	F ₁₁	305-313
خليط	504	CHCl ₃ /Acètone 1-1	F ₁₂	314-340
خليط معقد	501	CHCl ₃ /Acètone 1-2	F ₁₃	341-375
خليط معقد	1140	CHCl ₃ /Acètone 1-4	F ₁₄	376-399
خليط معقد	307	Acètone 100%	F ₁₅	1000مل
خليط معقد	410	Methanol 100%	F ₁₆	1000مل

الجدول (16) كروماتوغرافيا العمود لمستخلص خلايا الإيثيل لـ *Centaurea involucreta*.

III.3.2.3. معالجة الكسور باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

• معالجة الكسر F2 (140مغ)

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافي عند النظام 2:98 / CHCl₃: Acétoe تم الحصول على المركب CIF₂ (140مغ) من العمود الكروماتوغرافي على شكل بلورات ، أختبرت نفاوة المركب بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية وباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV) 254نم، 365نم.

• معالجة الكسر F3 (1895 مغ)

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافي عند النظام 2:98 / CHCl₃: Acétoe

استعملنا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية المكررة مرتين باستعمال شرائح من السيليكاجل حيث تم فصل المركب CIF_3 (37.6مغ) باستعمال المذيب CHCl_3 :3ml :2 gouttesMeOH/ وباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV) 254نم، 365نم.

• معالجة الكسر F5 (151مغ)

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافي عند النظام Acétone: CHCl_3 /19:1 استعملنا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية المكررة مرتين و باستعمال شرائح من السيليكاجل حيث تم فصل المركب CIF_5 (88.4مغ) باستعمال المذيب CHCl_3 : MeOH / 15 : 1 وباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV) 254نم، 365نم.

• معالجة الكسر F11 (1401مغ)

المتحصل عليه من العمود الكروماتوغرافي عند النظام CHCl_3 :Acétone 1:1 / تم الحصول على المركب CIF_{11} (1401مغ) من العمود الكروماتوغرافي على شكل بلورات أختبرت نقاوة المركب بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية وباستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV) 254نم، 365نم.

الفصل الرابع النتائج و المناقشة

IV. 1. التعيين البنوي للمركب CIF₂

تم التعرف على صيغة المركب CIF₂ باستعمال طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN-¹³C و RMN-¹H باستعمال المذيب (CD₃COCD₃).

• معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN-¹³C , RMN-¹H

من طيف RMN-¹H طيف (2) نجد إشارات يمكن نسبها إلى حلقة عطرية و هي

- إشارة (ثنائي -ثنائي, $J=7.66 ; 1.39\text{Hz}$) عند $\delta_{\text{H}}=8.07\text{ppm}$ ذات التكامل 2H .
 - إشارة (ثلاثية, $J=7.66\text{Hz}$) عند $\delta_{\text{H}}=7.67\text{ppm}$ ذات التكامل 1H .
 - إشارة (ثلاثية, $J=7.66\text{Hz}$) عند $\delta_{\text{H}}=7.55\text{ppm}$ ذات التكامل 2H .
- هذه المعلومات تقودنا إلى أن الحلقة أحادية الاستبدال.

من طيف RMN-¹³C الطيف (3)

- إشارة عند $\delta_{\text{C}}=166.80\text{ppm}$ يمكن نسبها إلى كربون حمض كربو كسيلبي (ترافق).
- إشارات عند ($\delta_{\text{C}}=128.41 ; 129.51 ; 130.28 ; 132.84\text{ppm}$) تنسب إلى الحلقة العطرية .

نلخص هذه المعطيات الطيفية في الجدولين (17) و (18)

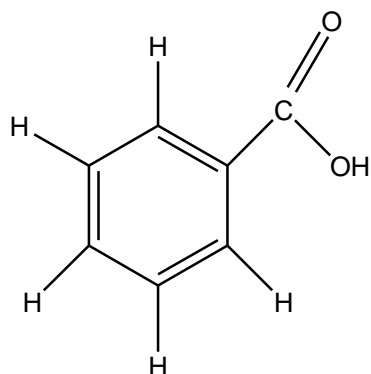
الجدول (17) معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN-¹H (CD₃COCD₃, 250MHz)

الإزاحة الكيميائية $\delta(\text{ppm})$	التعددية	التكامل	ثابت الإقتران J(Hz)	التعيينات الكيميائية
8.07	dd	2H	7.66 ; 1.39	H-2+H-6
7.67	t	1H	7.66	H-4
7.55	t	2H	7.66	H-3+H-5

الجدول (18) معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي (RMN-¹³C (CD₃COCD₃, 250MHz)

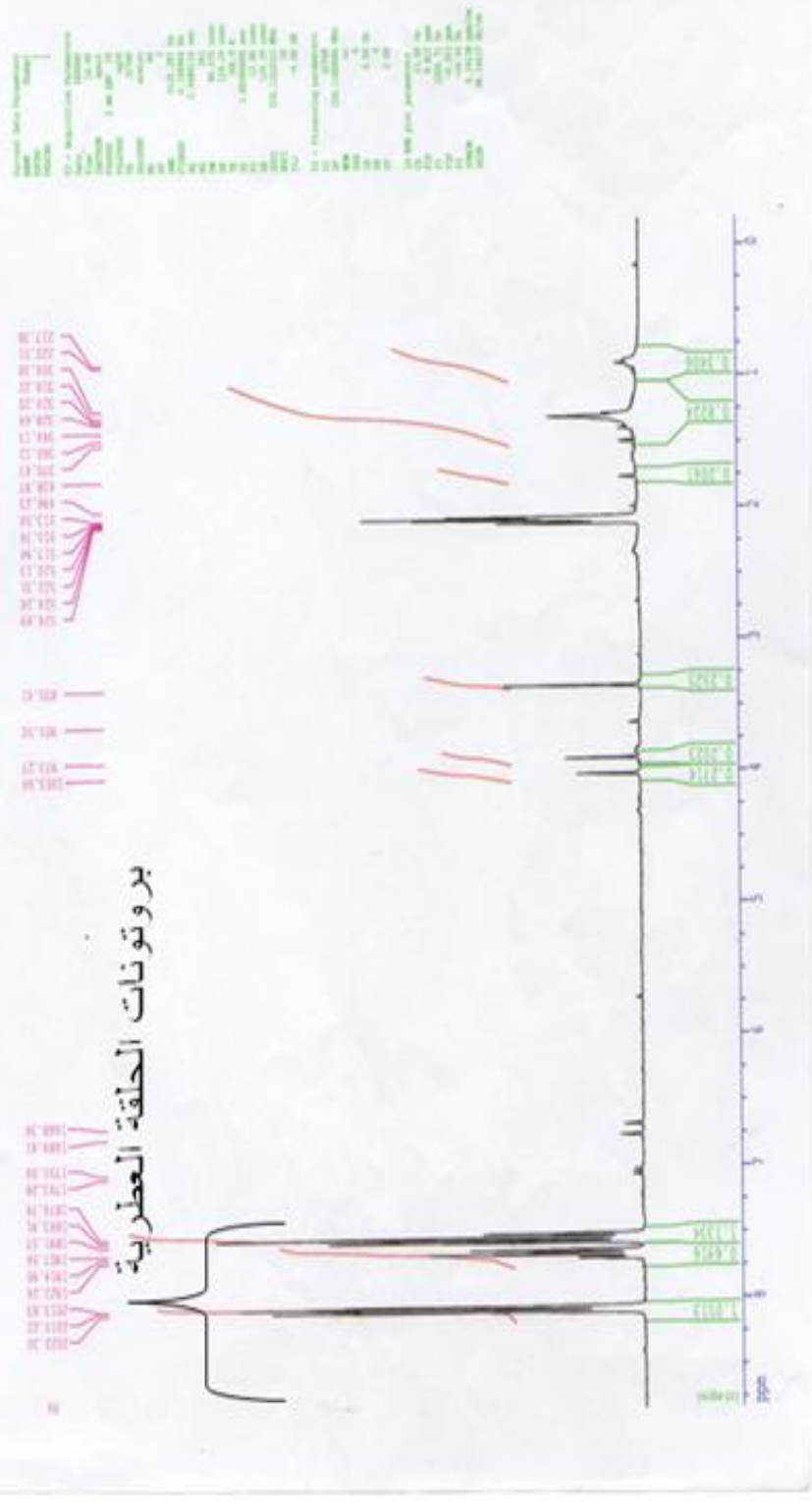
الإزاحة الكيميائية δ(ppm)	التعيينات الكيميائية
128.41	C-2+C-6
129.51	C-3+C-5
130.28	C-4
132.84	C-1
166.80	C

كل هذه النتائج تقودنا إلى الصيغة التالية للمركب CIF₂

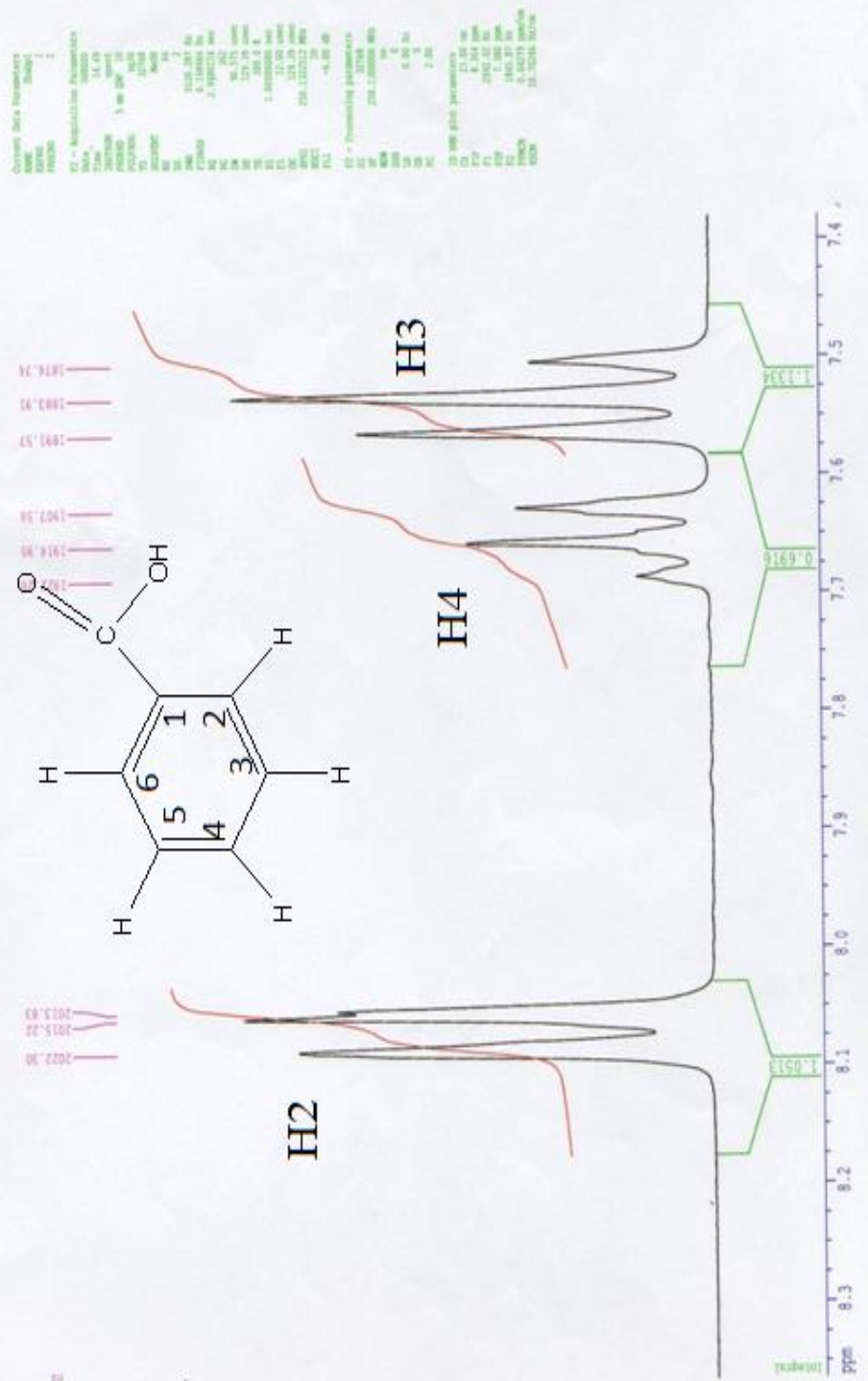


Acide benzoïque

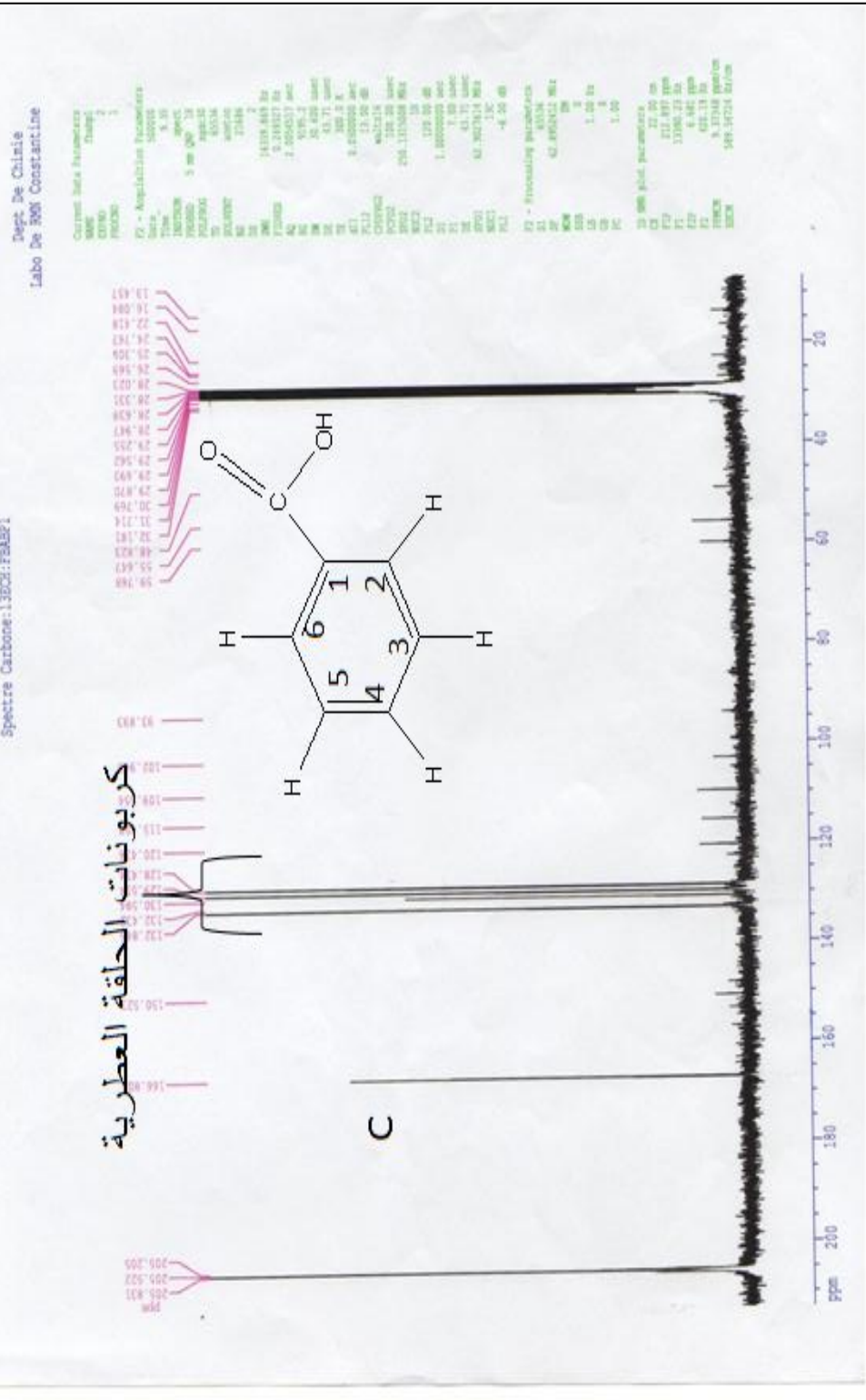
الطيف رقم 1: طيف ^1H -RMN (CD_3COCD_3) للمركب C_{11}F_7



الطيّف رقم 2؛ طيف (CD₃COCD₃, 250MHz) لRMN-¹H للمركب ClF₂ تمديد المجال 7.5 - 8.2



الطيف رقم: 3 طيف (CD₃COCD₃، 250MHz) ¹³C RMN للمركب



2.IV.التعيين البنوي للمركب CIF₃

- الأنظمة المستعملة للتعرف على ثابت الإحتباس R_f

النظام I - 4 : 3 : 3 Toluène/MeCOEt/MeOH

النظام II - 13 : 3 : 3 : 1 H₂O/MeCOEt/EtOH/(Ac)₂CH₂

• الخواص الكروماتوغرافية :

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.86	0.06
اللون الإستشعاعي	أسود بنفسجي	

الجدول (19) الخواص الكروماتوغرافية للمركب CIF₃

• السبل الطيفية

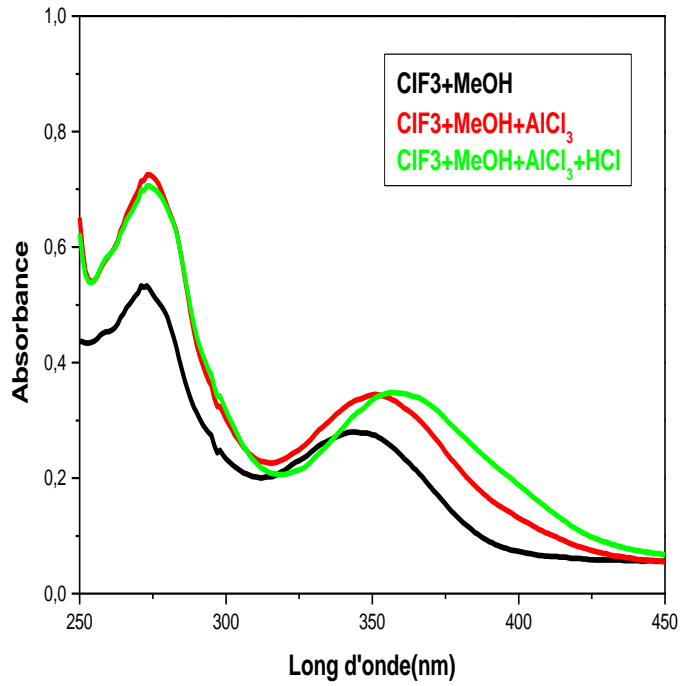
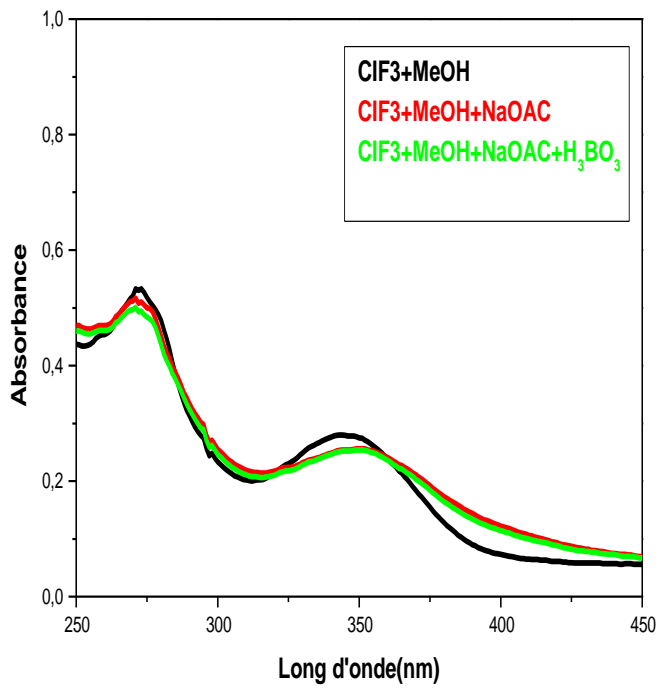
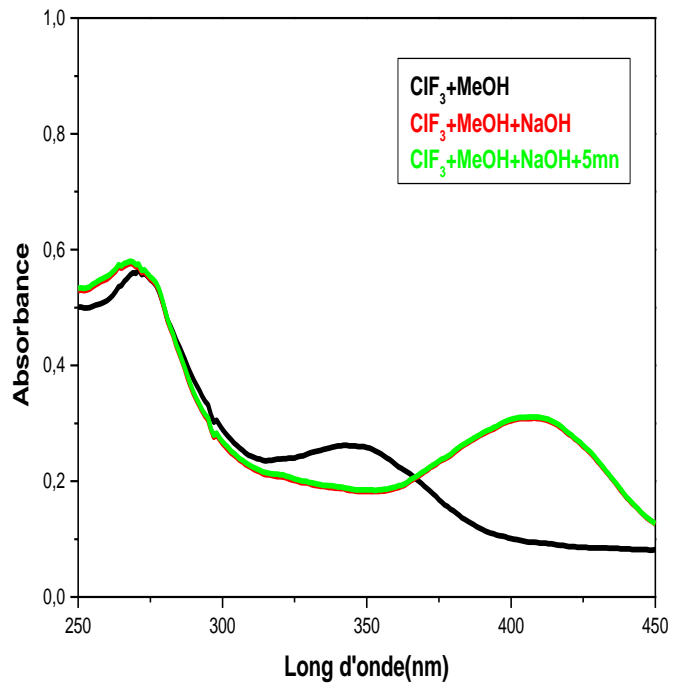
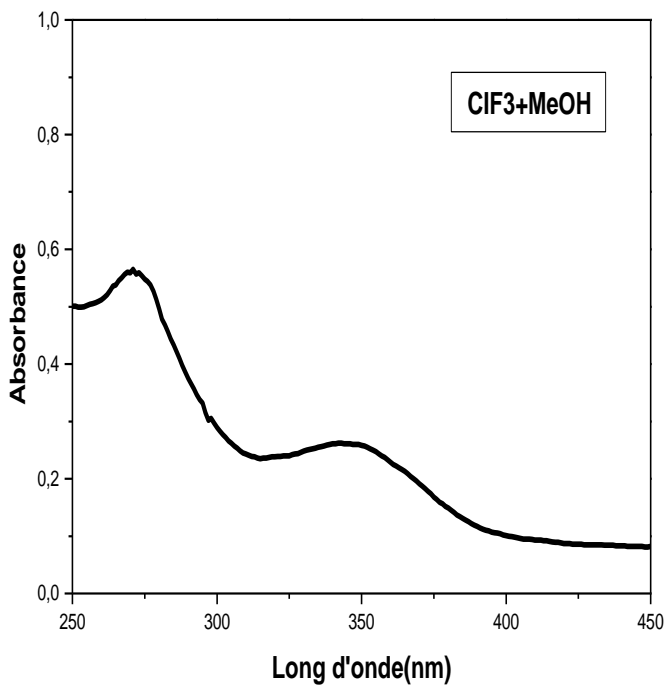
1- معطيات مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV) للمركب CIF₃ مبينة في الجدول (20)

الملاحظة	العصابة I (ن.م)	العصابة II (ن.م)	الكواشف
فلافون	343	273	MeOH
4 ² -OH	407	268	NaOH
لم يتغير الطيف	407	268	NaOH+5min
عدم وجود di Ortho على الحلقة B	351	274	AlCl ₃
5-OH	358	274	AlCl ₃ +HCl
7-OR	351	273	NaOAc
وجود di Ortho على الحلقة A	351	271	NaOAc+H ₃ BO ₃

الجدول (20) معطيات الأشعة فوق البنفسجية(UV) للمركب CIF₃.

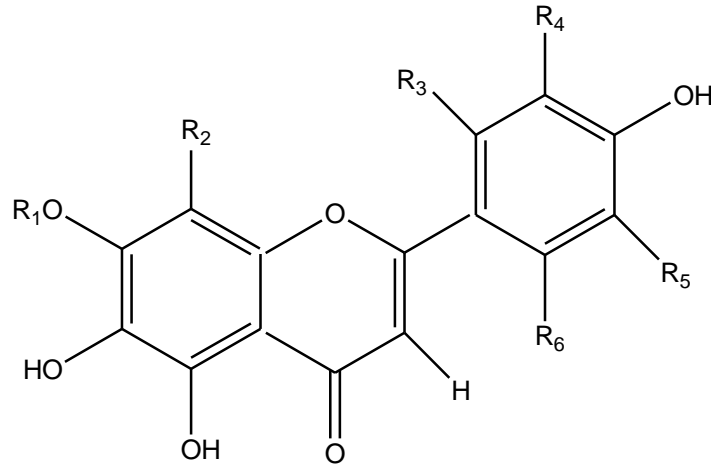
التحليل :

- قيمة ثابت الإنحباس R_f يدل على أن المركب هو أجليكون .
- اللون الأسود البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) وقيمة العصابة (I) في الميثانول عند 343nm تدل على أن المركب فلافون .
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOH بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للحزمة (I) بـ (+64nm) مع الزيادة في شدة الإمتصاص الضوئية ، تدل على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4'.
- غياب عصابة جديدة ما بين 320-335nm تدل على إستبدال الموضع 7 أي 7-OR.
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOAc مع الطيف المسجل في MeOH لانجداً أي إزاحة للعصابة (II) وهذا يدل على وجود 7-OR .
- بمقارنة الطيف المسجل في ($\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$) مع الطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية ضعيفة للحزمة (I) تدل على وجود أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A.
- بمقارنة الطيف المسجل في ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للحزمة (I) بـ (+15nm) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5.
- بمقارنة الطيف المسجل في AlCl_3 بالطيف المسجل في ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) لا نجد أي إزاحة هيبسوكرومية دلالة على غياب أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B .



الطيف رقم(4) السلسلة الطيفية للأشعة فوق بنفسجية (UV) للمركب ClF₃

مجموعة هذه النتائج تقودنا إلى الصيغة الموضحة في الشكل (35)



الشكل (35)

2- معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي $^1\text{H-NMR}$ للمركب ClF_3

- وجود إشارتين أحاديتين الأولى ذات التكامل 1H عند $\delta=6.6\text{ppm}_\text{H}$ والثانية ذات التكامل 1H عند $\delta_\text{H}=6.75\text{ppm}$ يمكن نسبها إلى البروتونين H3 و H8.

من نفس الطيف نجد إشارة ثنائية ($J=8.17\text{Hz}$) بتكامل 1H عند $\delta=7.1\text{ppm}_\text{H}$ يمكن نسبها إلى البروتون H5`.

- وجود إشارات متداخلة (ثنائي-ثنائي $J=8.17; 2.03$ ، ثنائي $J=2.03\text{Hz}$) بتكامل 2H عند ($\delta_\text{H}=7.6\text{ppm}$, $\delta_\text{H}=7.63\text{ppm}$) وهي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقة B يمكن نسبها إلى H2`، H6` على الترتيب .

- وجود إشارة أحادية عند $\delta=3.76\text{ppm}_\text{H}$ بتكامل 3H خاصة بمجموعة ميثوكسيل .

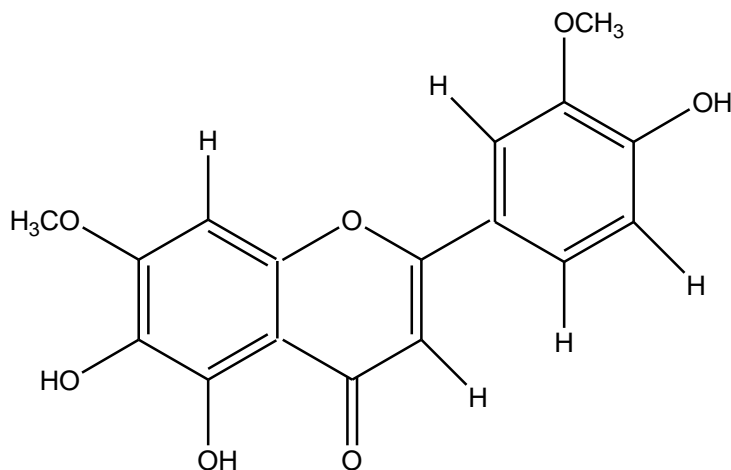
- وجود إشارة أحادية عند $\delta_\text{H}=4\text{ppm}$ بتكامل 3H خاصة بمجموعة ميثوكسيل .

- كل هذه النتائج يمكن تلخيصها في الجدول (21)

التعيينات الكيميائية	ثابت الإقتران J(Hz)	التكامل	التعددية	الإزاحة الكيميائية δ(ppm)
H3	---	1	s	6.6 ; 6.75
H8	---	1	s	
H5`	8.17	1	d	7.1
H6`	8.17 ; 2.03	1	dd	7.6
H2`	2.03	1	d	7.63
O-CH3	---	3	---	3.76
O-CH3	---	3	---	4

الجدول (21) معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H RMN للمركب CIF_3

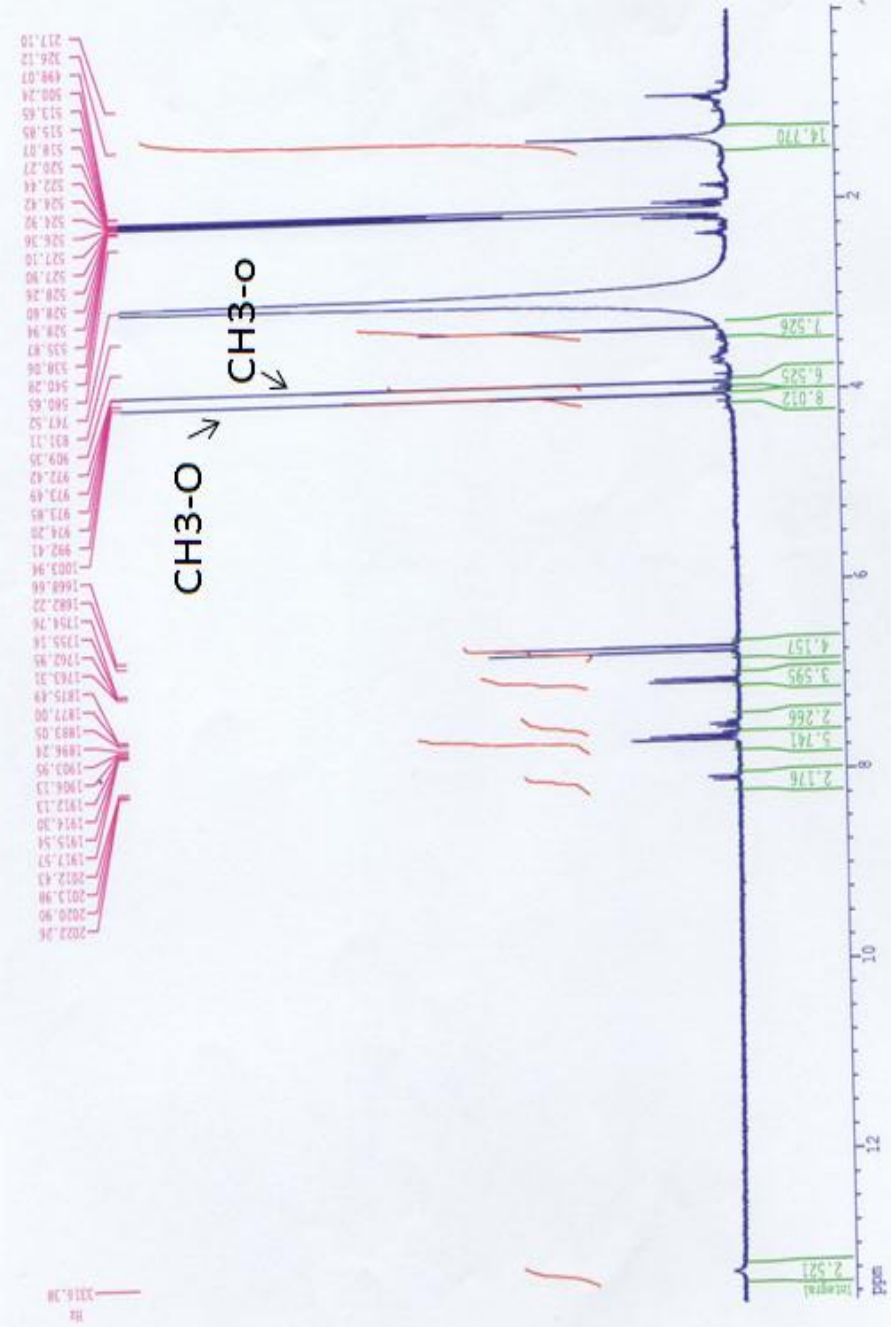
كل هذه المعطيات تقودنا إلى الصيغة التالية للمركب CIF_3



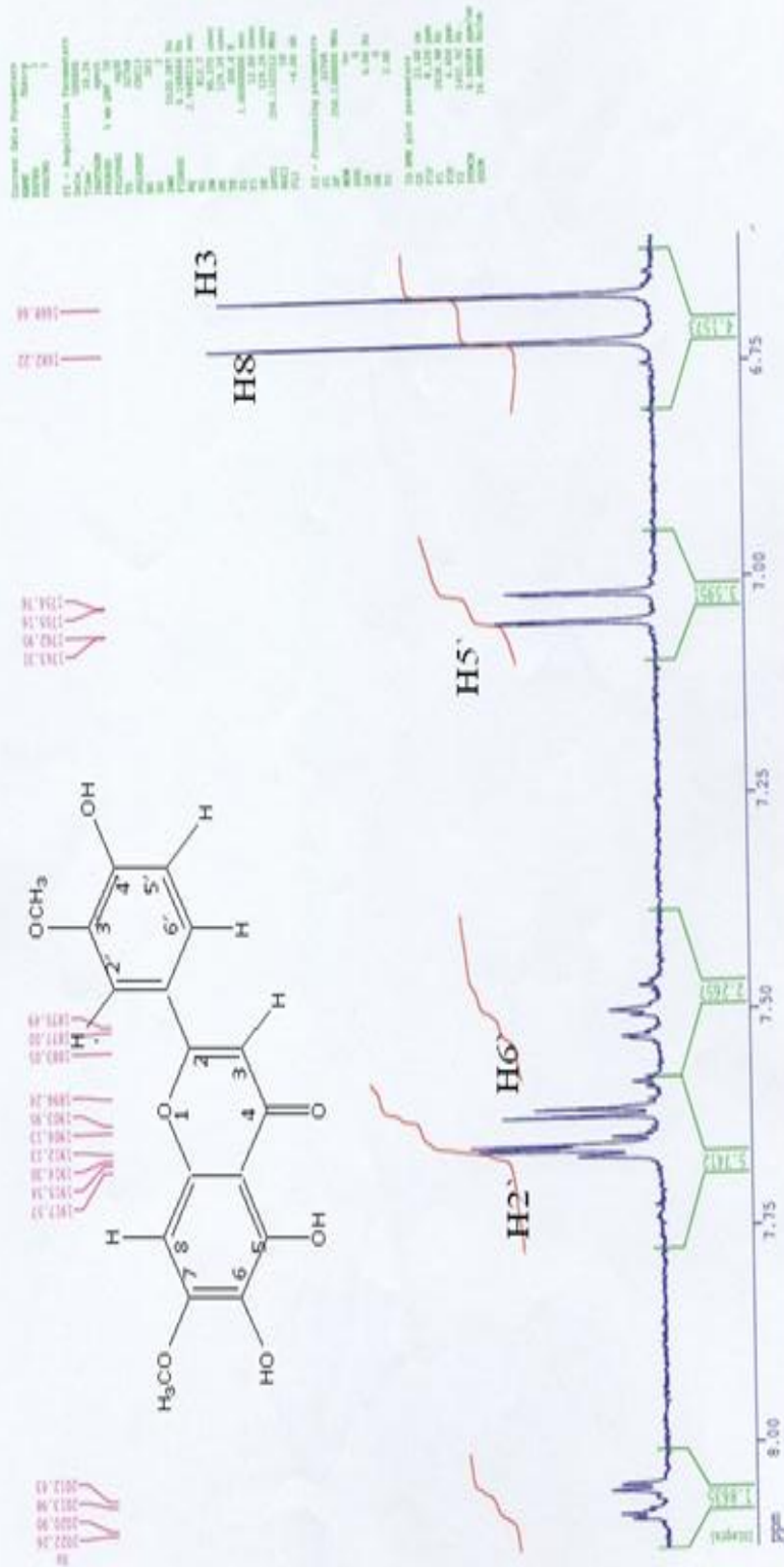
5,6,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone

الطيف رقم 5 : طيف (250MHz) ${}^1\text{H}$ RMN لـ CD_3COCD_3 للمركب CIF3

Current Date Parameters
 Name: CIF3
 Date: 11/11/2023
 Time: 10:10
 File: CIF3
 P1 - Acquisition Parameters
 Date: 11/11/2023
 Time: 10:10
 File: CIF3
 P2 - Processing parameters
 Name: CIF3
 Date: 11/11/2023
 Time: 10:10
 File: CIF3



الطيف رقم 6 : طيف(RMN-1H(CD₃COCD₃, 250MHz) للمركب CIF3 تمدد المجال 8.1-6.5 ppm



IV.3.التعيين البنوي للمركب CIF₅

- الخواص الكروماتوغرافية :

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.75	0.03
اللون الإستشعاعي	أسود بنفسجي	

الجدول (22)

- السبل الطيفية

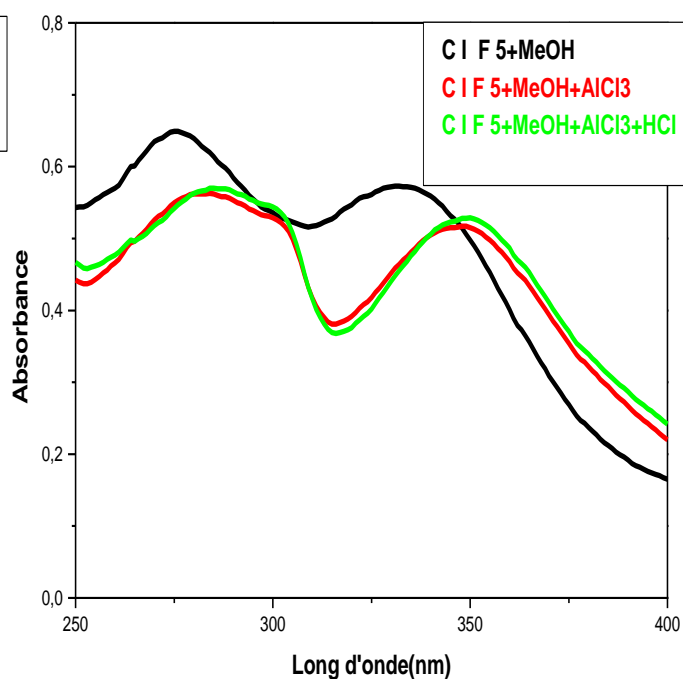
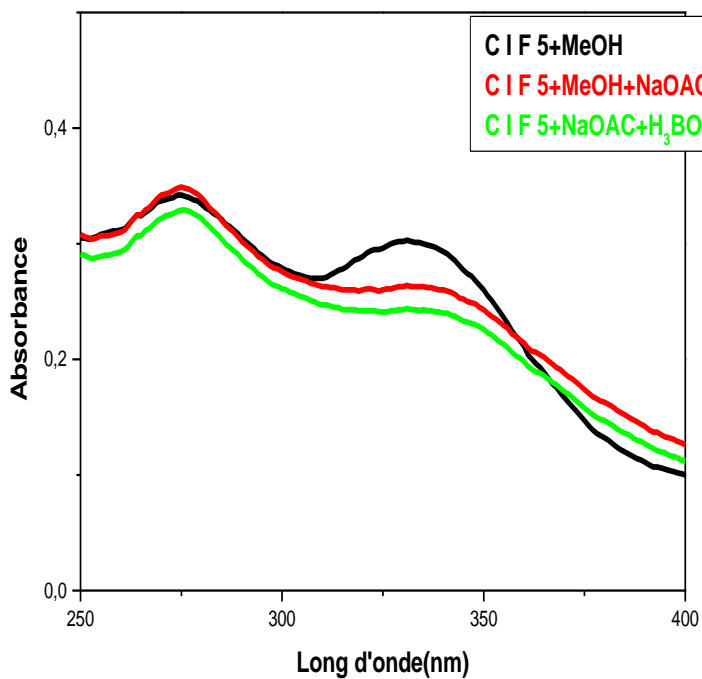
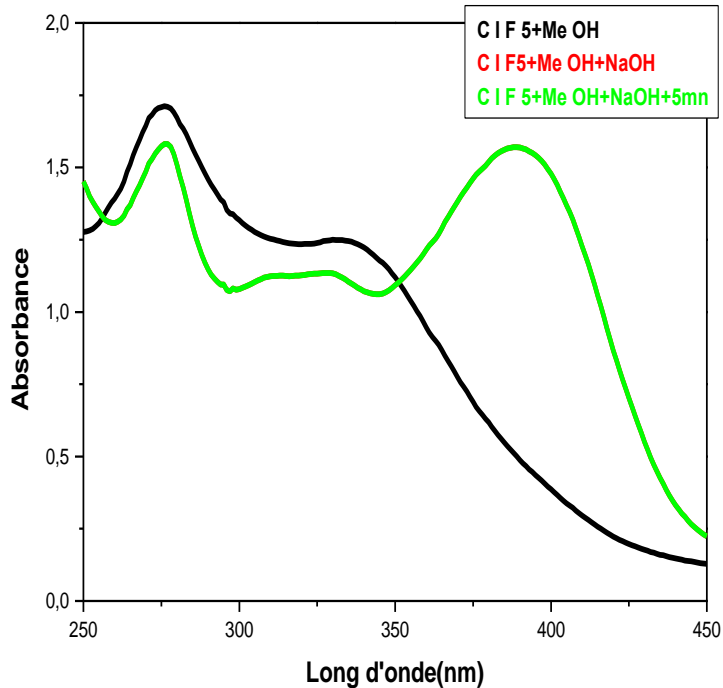
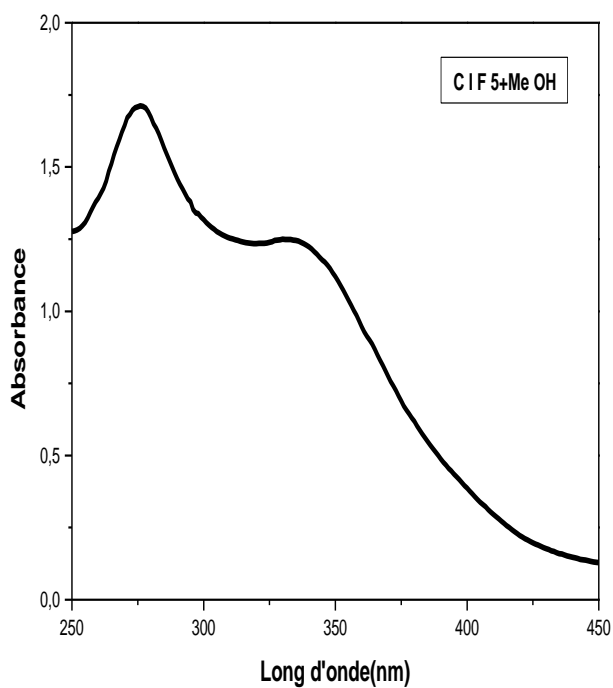
1 - مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CIF₅ مبينة في الجدول (23)

الملاحظة	العصابة I (ن.م)	العصابة II (ن.م)	الكواشف
فلافون	332	278	MeOH
4'-OH عصابة جديدة عند 328nm يعني 7-OH	389	276	NaOH
لم يتغير الطيف	389	276	NaOH+5min
لا يوجد di Ortho	349	284	AlCl ₃
6-OR مع 5-OH	350	284	AlCl ₃ +HCl
7-OH مع 6-OR أو 8-OR	331	275	NaOAc
لا يوجد di Ortho	331	276	NaOAc+H ₃ BO ₃

الجدول (23):مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CIF₅.

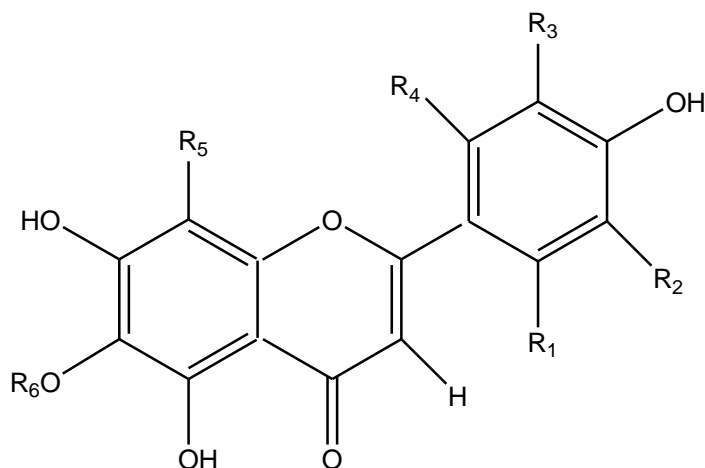
التحليل

- قيم ثابت الإنحباس تدل على أن المركب هو أجليكون .
- اللون الأسود البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) وقيمة العصابة (I) في الميثانول عند 332 نم دلالة على أن المركب فلافون .
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOH مع الطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية (+57نم) للعصابة (I) مع ارتفاع في شدة الامتصاص ، دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 4.
- ظهور عصابة جديدة عند 328نم دلالة على وجود هيدروكسيل حر 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 $(AlCl_3+HCl)$ بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للعصابة (I) ب(+18نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 5 مع مجموعة أكسيجينية في 6 .
- بمقارنة الطيف المسجل في NaOAc مع الطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باتوكرومية للعصابة (II) ب(+3نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الموضع 7 و هذا تأكيد للنتيجة المستخلصة سابقا (ظهور حزمة جديدة عند 328نم) مع مستبدل في 6 أو 8 .
- من نتيجة مقارنة طيف $(MeOH/AlCl_3+HCl)$ يمكن إستنتاج أن الإستبدال يكون في الموضع 6.
- بمقارنة الطيف المسجل في $(NaOAc+H_3BO_3)$ مع الطيف المسجل في MeOH لا نجد أي إزاحة تأكيدا على عدم وجود ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A و الحلقة B.
- و هي نفس الملاحظة المأخوذة من طيف المقارنة المسجل في $(AlCl_3/AlCl_3+HCl)$.



الطيف رقم (7) السلسلة الطيفية للأشعة فوق بنفسجية (UV) للمركب C I F_5

مجموعة هذه المعلومات تقودنا إلى الصيغة التالية:



الشكل (36)

2-معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H -RMN للمركب $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$

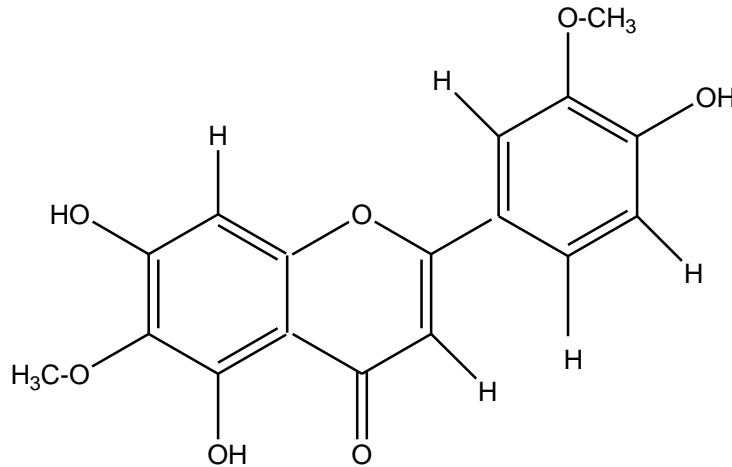
- وجود إشارة ثنائية $J=8.94\text{Hz}$ () بتكامل 1H عند $\delta=7.76\text{ppm}$ يمكن نسبها إلى H_6 .
- وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند $\delta=7.52\text{ppm}$ يمكن نسبها إلى H_2 .
- وجود إشارة ثنائية $J=8.89\text{ppm}$ بتكامل 1H عند $\delta=6.9\text{ppm}$ يمكن نسبها إلى H_5 .
- وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند $\delta=6.49\text{ppm}$ يمكن نسبها إلى H_8 .
- وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند $\delta=6.26\text{ppm}$ يمكن نسبها إلى H_3 بمأن المركب فلافون .
- إشارة أحادية عند $\delta=3.77\text{ppm}$ بتكامل 3H خاصة بمجموعة ميثوكسيل .
- وجود إشارة أحادية عند $\delta=3.65\text{ppm}$ بتكامل 3H خاصة بمجموعة ميثوكسيل .

كل هذه النتائج يمكن تلخيصها في الجدول (24)

الإزاحة الكيميائية δ (ppm)	التعددية	التكامل	ثابت الإقتران J(Hz)	التعيينات الكيميائية
6.26	s	1	---	H3
6.49	s	1	---	H8
6.9	d	1	8.9	H5`
7.52	sl	1	---	H2`
7.76	dl	1	8.9	H6`
3.65	s	3	---	O-CH3
3.77	s	3	---	O-CH3

الجدول (24) معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^1H RMN للمركب $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$

مجموعة هذه المعطيات تقودنا إلى الصيغة التالية للمركب $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$:



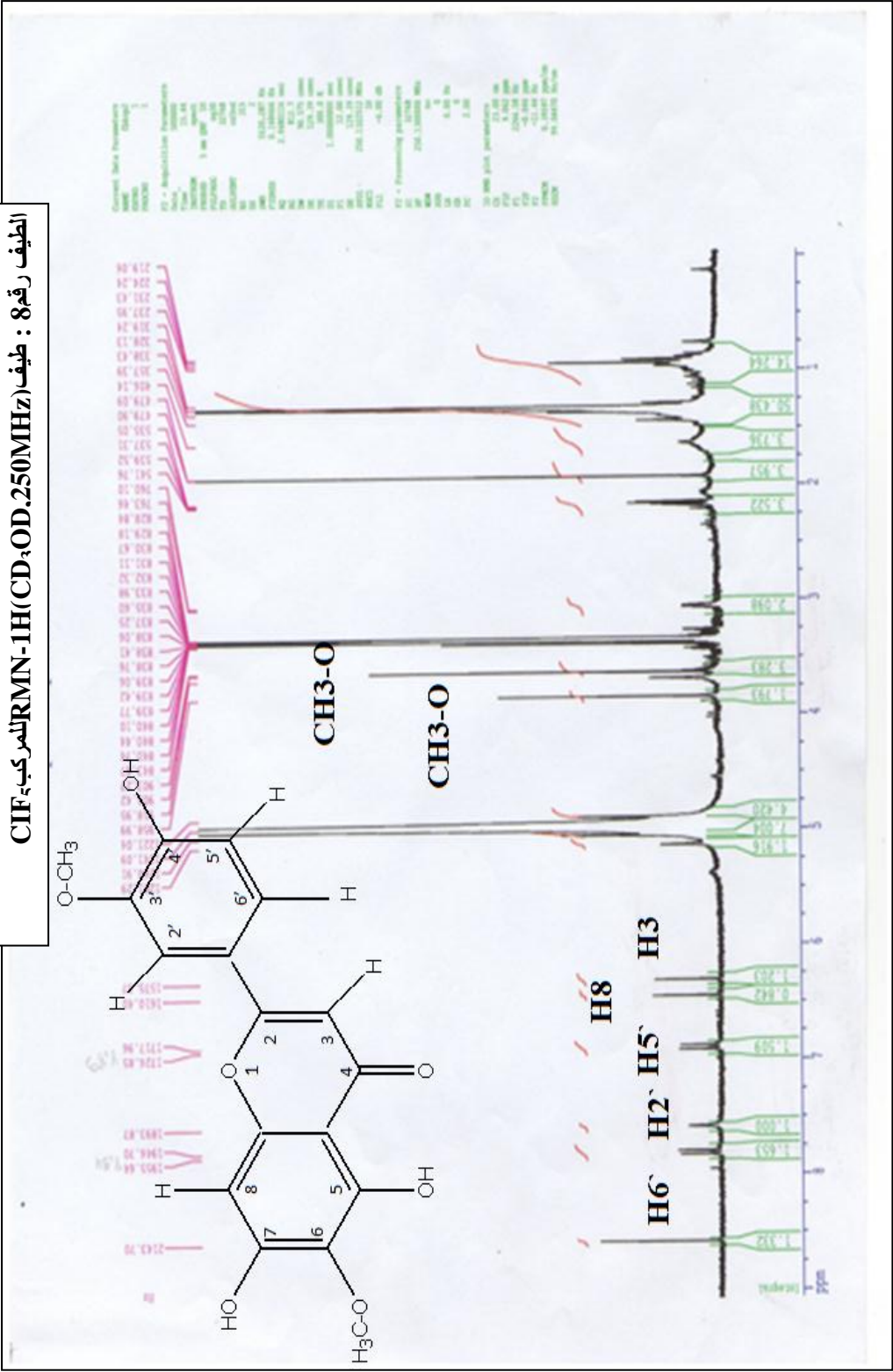
5,7,4'-trihydroxy 6,3'-dimethoxyflavone

❖ حسب معلوماتنا البيبليوغرافية هذا المركب جديد بالنسبة للنوع *C. involucrata* أما بالنسبة

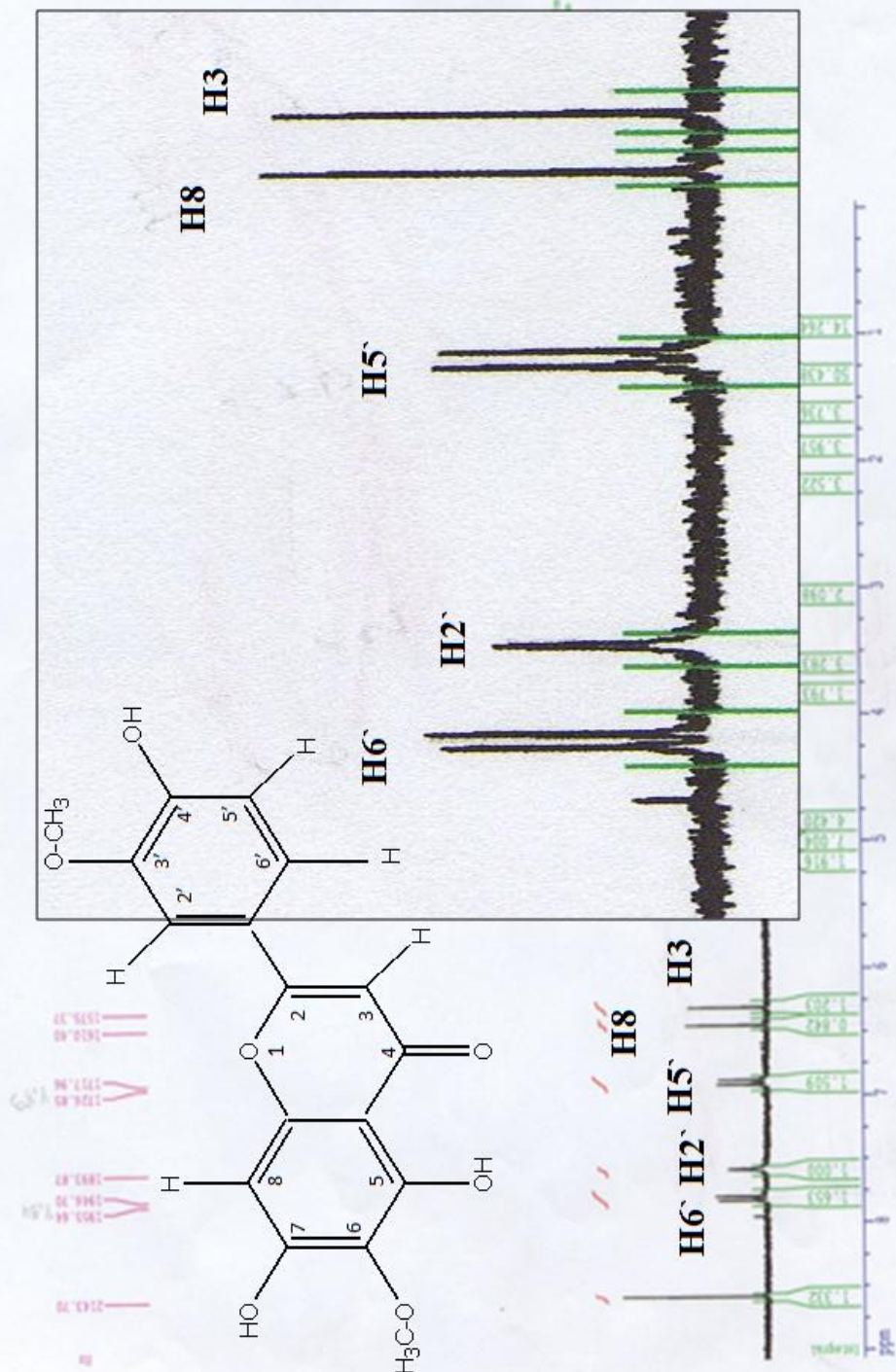
للجنس *Centaurea* فقد سبق فصله من

All. Centaurea nicaensis, [64] *Centaurea maroccana*, [21].

الطيف رقم 8 : طيف (RMN-1H(CD₃OD, 250MHz) للمركب CIF



الطيف رقم 9 : طيف ^1H (CD_3OD , 250MHz) للمركب CIF تكبير للمجال 8-6



4.IV.التعيين البنوي المركب CIF₁₁

1.4. IV. السلوك الكروماتوغرافي

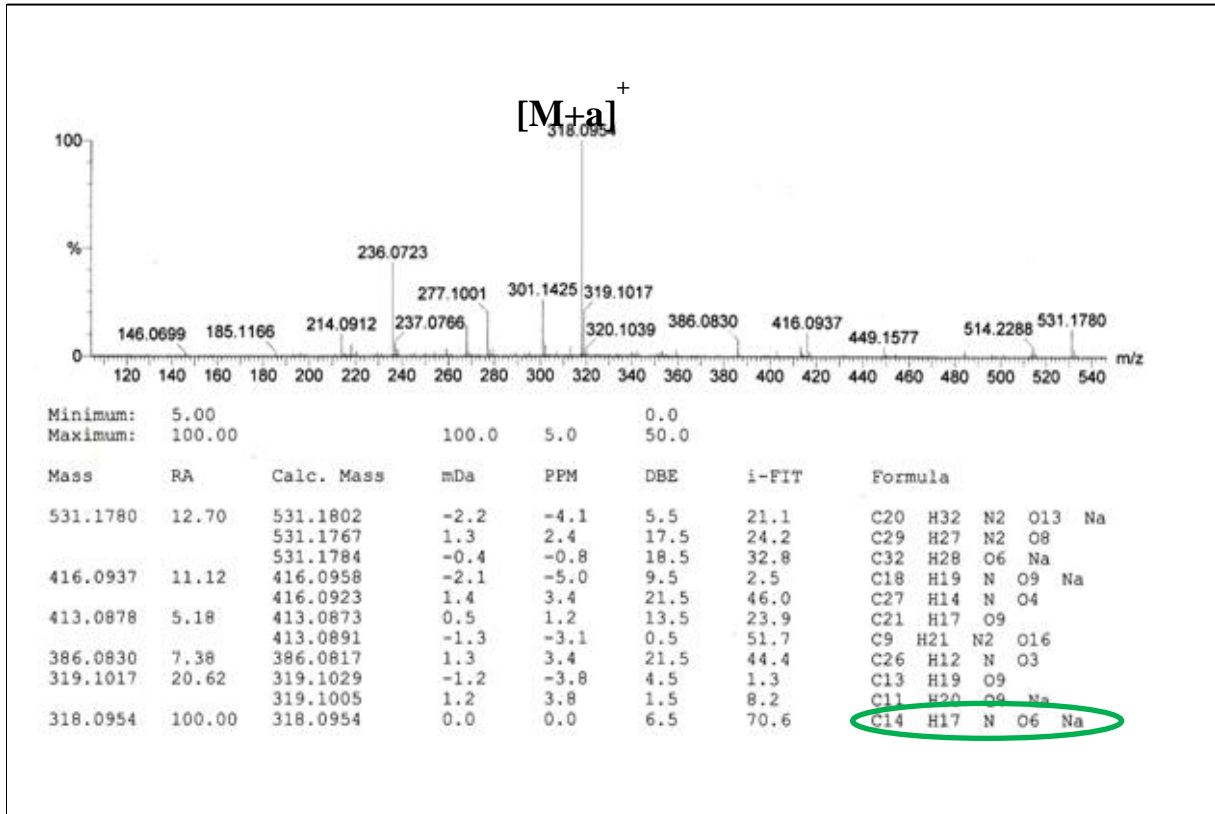
لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV)أسود.

2.4. IV. المعطيات الطيفية

لتشخيص المركب CIF₁₁ إعتدنا على طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN-¹³C, RMN-¹HDEPT135, DEPT90, COSY (H1,H1), HSQC, باستعمال المذيب (CD₃COCD₃) مع طيف الكتلة ESI.

1.2.4.IV. معطيات طيف الكتلة ESI

في طيف الكتلة ESI (الطيف 10) نجد أيون شبه جزئي [M+Na]⁺ عند $m/z = 318.0954$ يعني أن الكتلة المولية الجزئية للمركب هي $M=295$ Da وصيغته الجزئية المجملة هي $C_{14}H_{17}NO_6$ عدد الوحدات الغير مشبعة سبعة (7).



الطيف رقم 10 : طيف ESI للمركب CIF₁₁

IV.2.2.4. معطيات طيف الرنين النووي المغناطيسي RMN

- من طيف ^{13}C -RMN (الطيف 12) نجد 12 ذرة كاربون فقط مما يعني وجود كربونات عطرية متكافئة .
يمكن التعرف على نوع الذرات من خلال طيف DEPT90 (الطيف 12) و طيف DEPT135 (الطيف 11)
فنصل إلى النتيجة التالية : (2) Cq ; (6) CH-O ; (3) CH= ; (1) CH₂-O .
- في طيف ^1H -RMN (الطيف 16) نجد إشارتين مميزتين لحلقة عطرية الأولى ذات التكامل $J_{\text{H}}=6.53$;
2H ($\delta_{\text{H}}=7.63\text{ppm}$. 1.95Hz) .
والثانية ذات التكامل (2 ppm ; 4.99 ; $J_{\text{H}}=7.5$. $\delta_{\text{H}}=7.5$) هذا يعني أن الحلقة أحادية الإستبدال .
- من طيف ^{13}C RMN (الطيف 13) المسجل في (CD₃COCD₃) نجد مجموعة إشارات CH= عند
(131.01 ; 130.30 ; 128.92) δ_{C} ، Cq عند $\delta_{\text{C}}=135.23\text{ppm}$ وهي إزاحات خاصة بالحلقة العطرية.
- من طيف HSQC (الطيف 18) يمكن نسب كل بروتون الحلقة العطرية إلى الكربون الموافق له فيكون
لدينا :
($\delta_{\text{C}}=128.92\text{ppm}$ - $\delta_{\text{H}}=7.63\text{ppm}$)
($\delta_{\text{C}}=131.01\text{ppm}$ - $\delta_{\text{H}}=7.5\text{ppm}$), ($\delta_{\text{C}}=130.30\text{ppm}$ - $\delta_{\text{H}}=7.5\text{ppm}$)
- من طيف ^{13}C -RMN (الطيف 14) نجد مجموعة إزاحات يمكن نسبها إلى وحدة سكر خاصة بوجود
إزاحة عند $\delta_{\text{C}}=63.43\text{ppm}$ لمجموعة CH₂-O .
- من طيف HSQC (الطيف 18) يمكننا التعرف على إشارات بروتونات المجموعة CH₂-O
ف نجد ($\delta_{\text{H}}=3.93\text{ppm}$) H-6`b ($\delta_{\text{H}}=3.93\text{ppm}$) ; H-6`a ($\delta_{\text{H}}=3.72\text{ppm}$) .
- في طيف ^1H -RMN (الطيف 17) نجد الإشارتين من النوع (ثنائي - ثنائي) الأولى الخاصة بـ
H-6`a ($\delta_{\text{H}}=3.93\text{ppm}$. $J_{\text{H}}=11.70$; 1.82Hz)
- والثانية الخاصة بـ H-6`b ($\delta_{\text{H}}=3.72\text{ppm}$. $J_{\text{H}}=11.70$; 5.4 Hz)
- في طيف ^1H -RMN (الطيف 17) وجود إشارة ثنائية عند ($\delta_{\text{H}}=4.45\text{ppm}$. $J_{\text{H}}=7.02\text{Hz}$) تلتحق
بالبروتون الأنوميري .

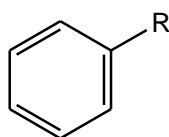
- بالنظر إلى قيمة الإنزياح الكيميائي للبروتون الأنوميري ($\delta_{H-1}=4.45\text{ppm}$) تدل على أن وحدة السكرتتصل مع أجليكون برابطة من النوع (C-O) كربون-أكسجين . وهذا يؤكد الإزاحة الكيميائية للكربون الأنوميري من طيف HSQC (الطيف 18) نجد إزاحته عند $\delta_{C-1}=102.69\text{ppm}$.

ثابت التزاوج للبروتون الأنوميري ($J_{H-1}=7.02\text{Hz}$) يدل على أن التوجيه $H-2^{\wedge}$ محوري مما يقودنا إلى إفتراض أن المستبدل السكري عبارة عن جليكوز أو جلاكتوز من النوع (β -glucose أو β -galactose)

- تظهر فيطيف ^1H RMN الطيف (15) باقي بروتونات السكر في

المجال ($\delta_{H}=3.51\text{ppm}$) ($\delta_{H}=3.26\text{ppm}$) يمكن نسبها إلى $H-2^{\wedge}$; $H-3^{\wedge}$; $H-4^{\wedge}$; $H-5^{\wedge}$.

- من المعطيات السابقة وصلنا إلى النتيجة التالية:



(C_6H_5) عدد ذرات الحلقة العطرية أحادية الإستبدال

R-O-glu

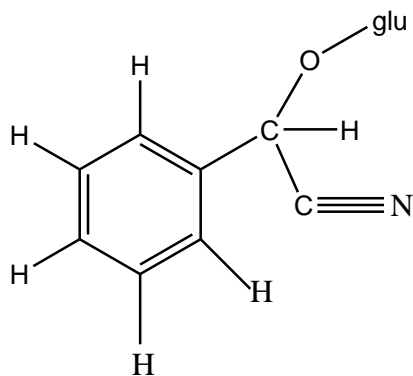
($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6$) عدد ذرات المستبدل السكري (جليكوز أو جلاكتوز)

(عدد الذرات الباقية من الصيغة الإجمالية للمركب هي (C_2HON) وعدد الوحدات الغير مشبعة 2)

- من طيف HSQC (الطيف 18) نجد إزاحة كربون لمجموعة CH-O عند $\delta_{C}=68,60\text{ppm}$ تقابلها إشارة أحادية للبروتون عند $\delta_{H}=6\text{ppm}$

- نعود إلى طيف ^{13}C RMN نجد إشارة لكربون رباعي Cq عند ($\delta_{C}=119,80\text{ppm}$) تتنسب إلى الكربون المجموعة (Nitrile) CN.

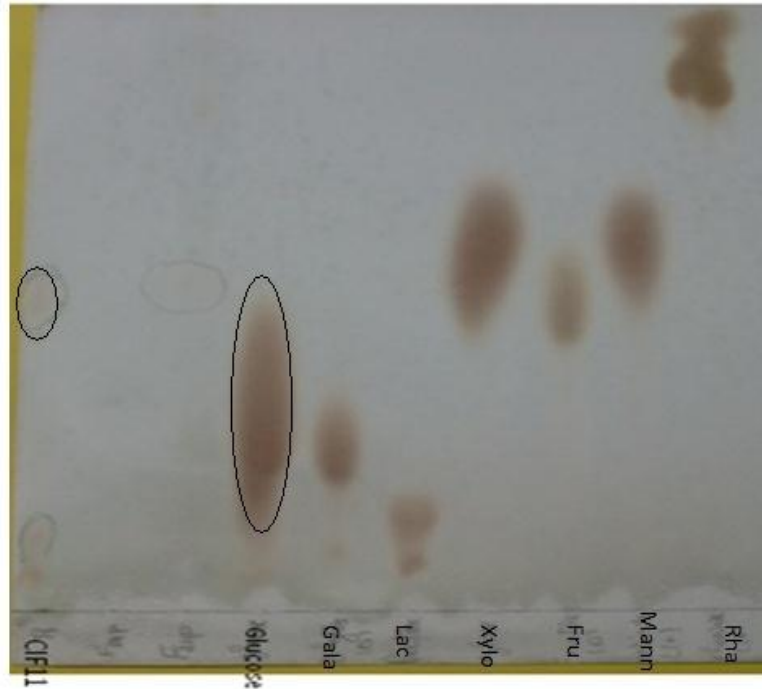
- من المعطيات السابقة وصلنا إلى الصيغة الموضحة في الشكل (37)



الشكل (37)

3.4.IV. الإماهة الحمضية للمركب CIF₁₁

للتعرف على نوع السكر بالضبط قمنا بالإماهة الحمضية للمركب حيث أخذنا قليل من المركب مذاب في 1مل من الميثانول أضفنا إليه 2مل من HCl(4N) وضع في حمام مائي درجة حرارته 100م° لمدة ساعة ونصف ، ترك ليبرد ثم تم إستخلاصه بخلات الإيثيل ثلاث مراتتؤخذ الطبقة المائية تضع على شكل بقع مع الشواهد السكرية على شريحة كروماتوغرافية، تغمس في المذيب أسيتون /ماء (1/9).بعد جفافها ترش بمحلول مالونات الأنيلين تم سخنت فأعطت النتيجة الموضحة في الصورة(5) نوع سكر المركب CIF₁₁ هو الجليكوز.



الصورة (5) كروماتوغرافيا السكر المفصول من المركب CIF₁₁ مقارنة مع شواهد سكرية معروفة.

- من طيف HSQC(الطيف18) نجد إزاحات كربونات الجليكوز الباقية عند ($\delta_C=71,92 ; 75,99 ; 78,26 ; 78,31\text{ppm}$) بالإعتماد على المرجع البيبليوغرافي [65] يمكن معرفة تموضع هذه الإزاحات.

يمكن تلخيص كل هذه المعطيات في الجدولين (25) و(26).

الجدول (25) معطيات طيف ^{13}C RMN- CD_3COCD_3 , 500MHz للمركب CIF_{11}

كربون الحلقة العطرية	الإزاحة الكيميائية δ_c (ppm)
C-1	135.23
C-2 ;C-6	128.92
C-3 ;C-5	130.30
C-4	131.01
كربون السكر	الإزاحة الكيميائية δ_c (ppm)
C-1'	102.69
C-2'	75.99
C-3'	78.26
C-4'	71.92
C-5'	78.31
C-6'	63.43
كربون السلسلة	الإزاحة الكيميائية δ_c (ppm)
CH-O	68.60
CN	119.80

الجدول (26) معطيات طيف ^1H RMN- CD_3COCD_3 , 250MHz للمركب CIF_{11}

بروتونات الحلقة العطرية	التكامل	التعددية	ثابت التزاوج J(Hz)	الإزاحة الكيميائية (ppm)
H-3 ; H-5 ; H-4	3H	dd	4.99 ;2	7.5
H-2 ; H-6	2H	dd	6.53 ;1.95	7.63
بروتونات السكر	التكامل	التعددية	ثابت التزاوج (Hz)	الإزاحة الكيميائية (ppm)
H-1'	1H	d	7.02	4.45
H-6'a	1H	dd	11.70 ;1.82	3.93
H-6'b	1H	dd	11.70 ;5.49	3.72
H-2' ;H-3' ;H-4' ;H-5'	3	m	-----	3.26 - 3.51
بروتونات السلسلة	التكامل	التعددية	ثابت التزاوج (Hz)	الإزاحة الكيميائية (ppm)
H	1H	s	-----	6

- نستعمل طيف COSY(H1, H1) (الطيف 19) للتأكد من الصيغة النهائية للمركب.

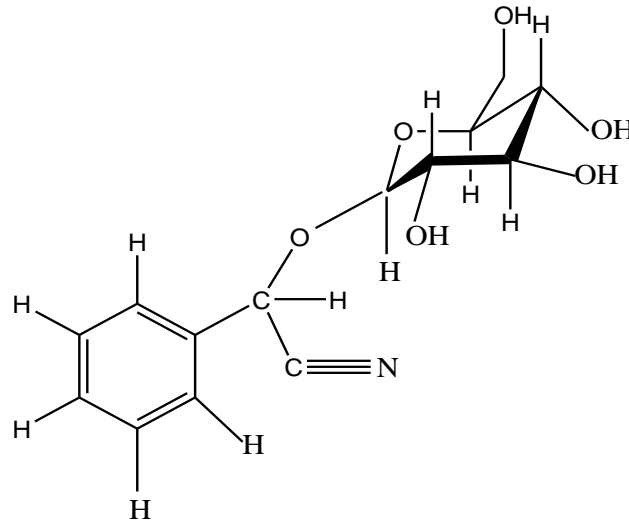
بالنسبة لبروتونات الحلقة العطرية نجد بقعة التعالقين بروتون (H-2 ; H-6) و بروتونات المجموعة (H-3;H-5 ; H-4).

بالنسبة لبروتونات وحدة السكر (Glucose) نجد في طيف COSY(H1,H1) بقعة التعالق بين البروتون H-1 و البروتون H-2 الموجودة إشارته في الطيف مع مجموعة إشارات بروتونات (H-3` ,H-4` ,H-5`).

نجد أيضا بقعة التعالق بين البروتون H-6`a والبروتون H-6`b.

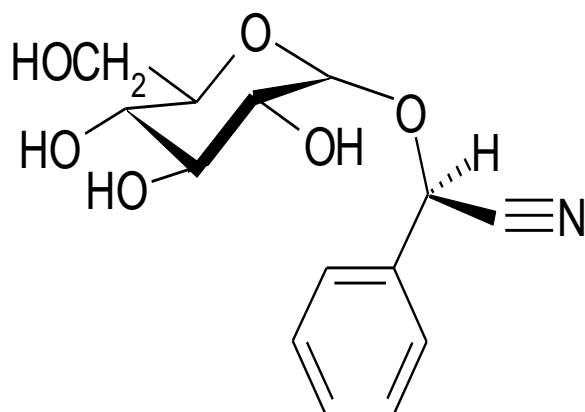
وجود بقعة التعالقين البروتون H-6`b والبروتون H-5` الموجودة إشارته في الطيف مع مجموعة إشارات بروتونات (H-2` ,H-3` ,H-4`) .كل هذه المعطيات الواردة في طيف COSY(H1, H1) هي تأكيد لصيغة المركب التي وصلنا إليها من خلال الأطياف السابقة.

من كل المعطيات السابقة نصل إلى الصيغة النهائية للمركب CIF₁₁ الشكل (38)



الشكل (38) La prunasine

بالإعتماد على المراجع البيبليوغرافية شكل المركب في الفراغ موضح في الشكل (39)

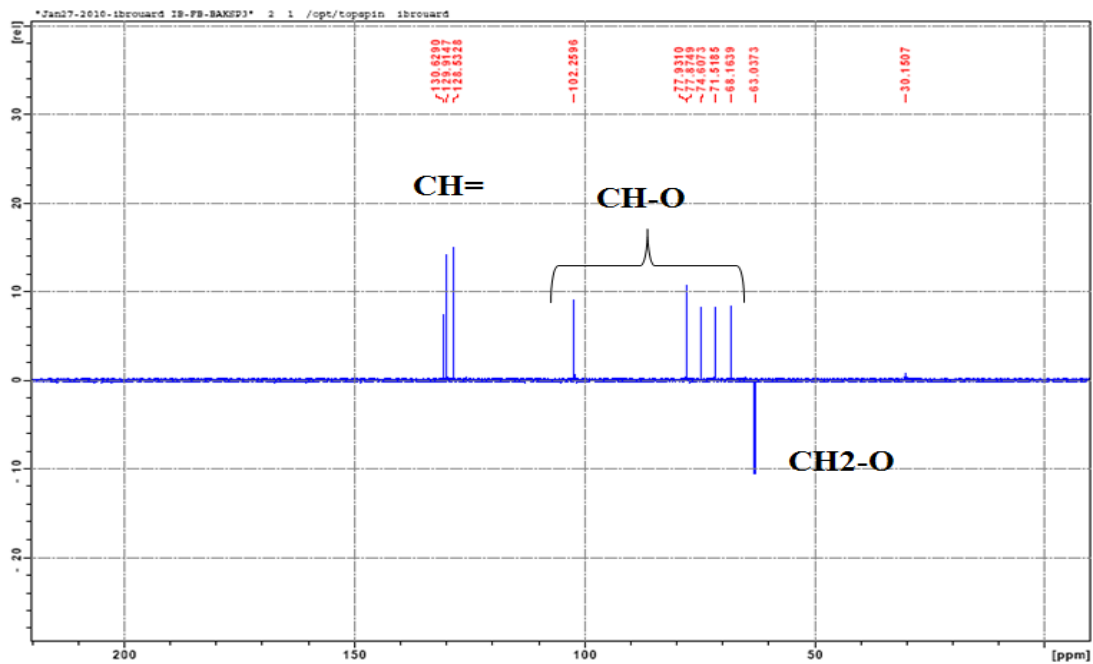


الشكل (39) La prunasine

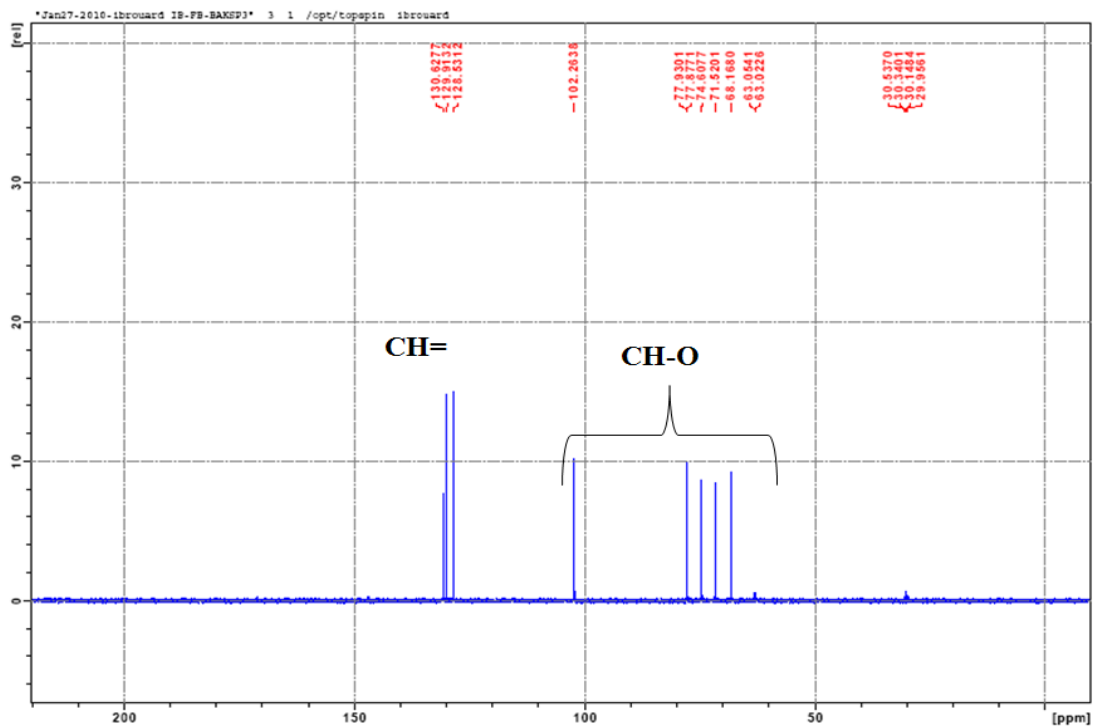
❖ حسب معلوماتنا البيبليوغرافية هذا المركب جديد بالنسبة للنوع *C. involucrata* أما بالنسبة للجنس

Centaurea سبق وأن فصل في مخبرنا [66] كما تم فصله من

Centaurea aspera Var. *Subinermis* [67], *Eucalyptus* L'herit [68],
Prilla frutescens Var. *Acuta* [69].

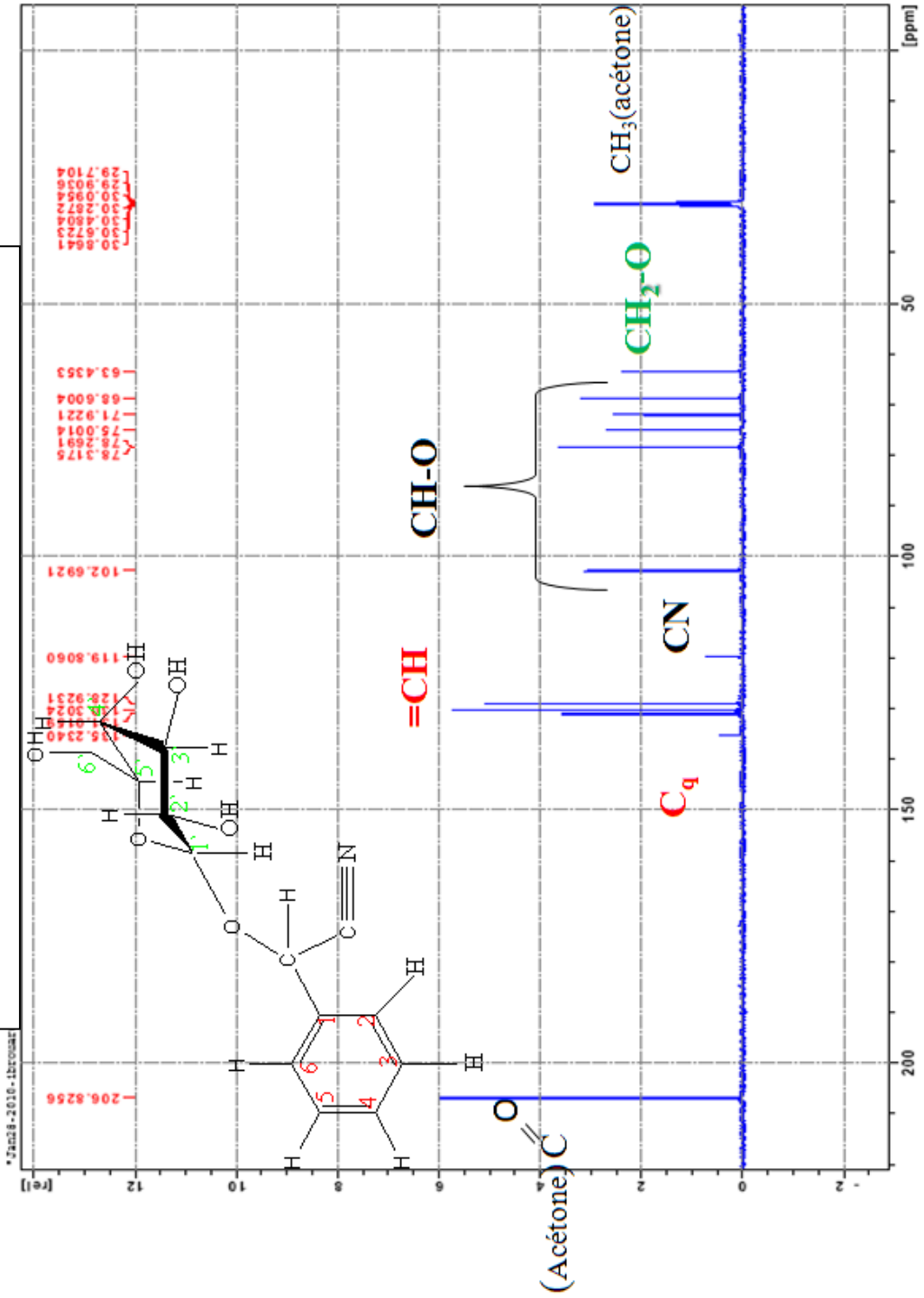


الطيف رقم (11) طيف DEPT 135 (CD_3COCD_3 , 500 MHz) للمركب CIF₁₁

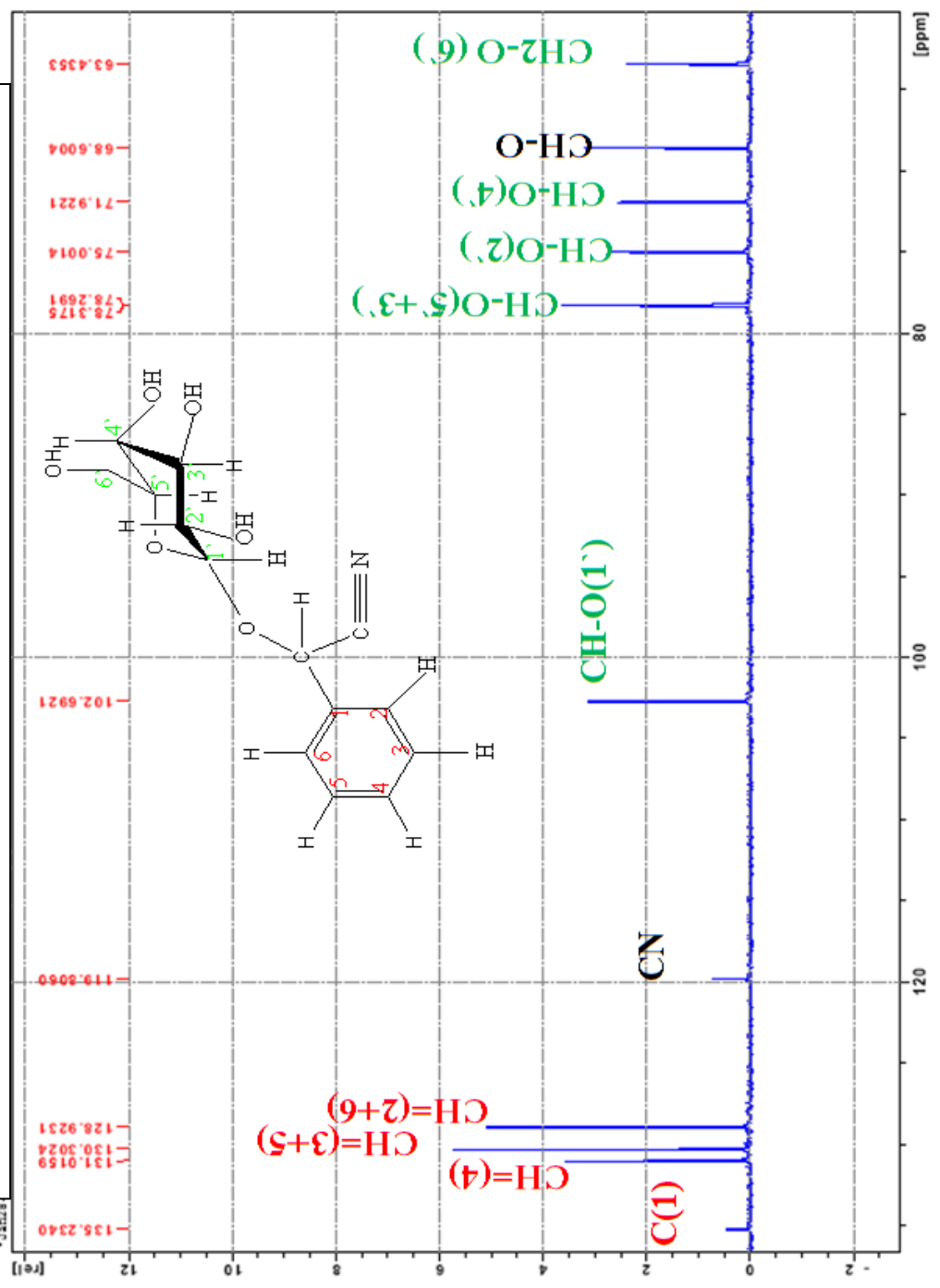


الطيف رقم (12) طيف DEPT 90 (CD_3COCD_3 , 500MHz) للمركب CIF₁₁

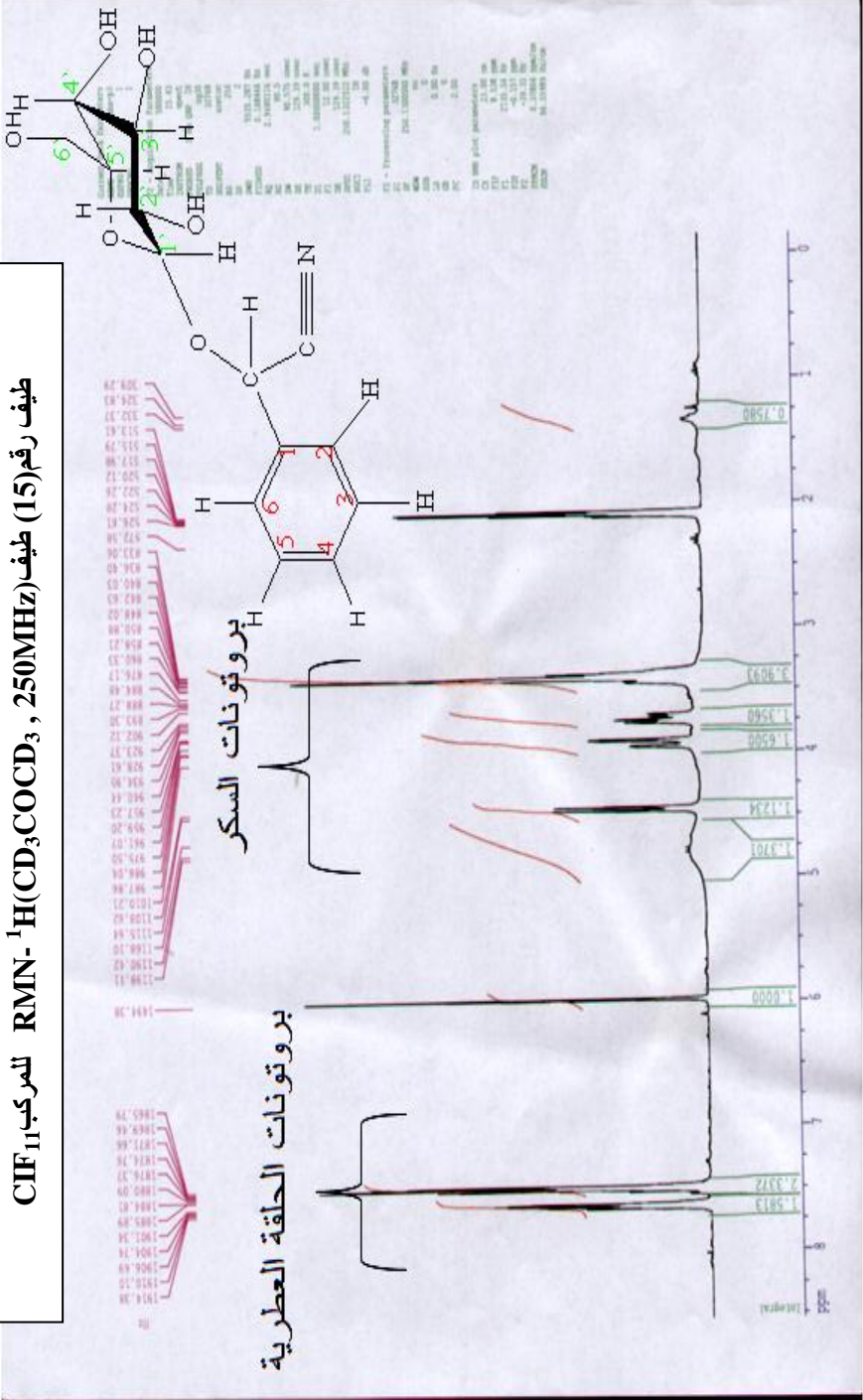
الطيف رقم (13) طيف (RMN-¹³C) (CD₃COOD₃, 500MHz)



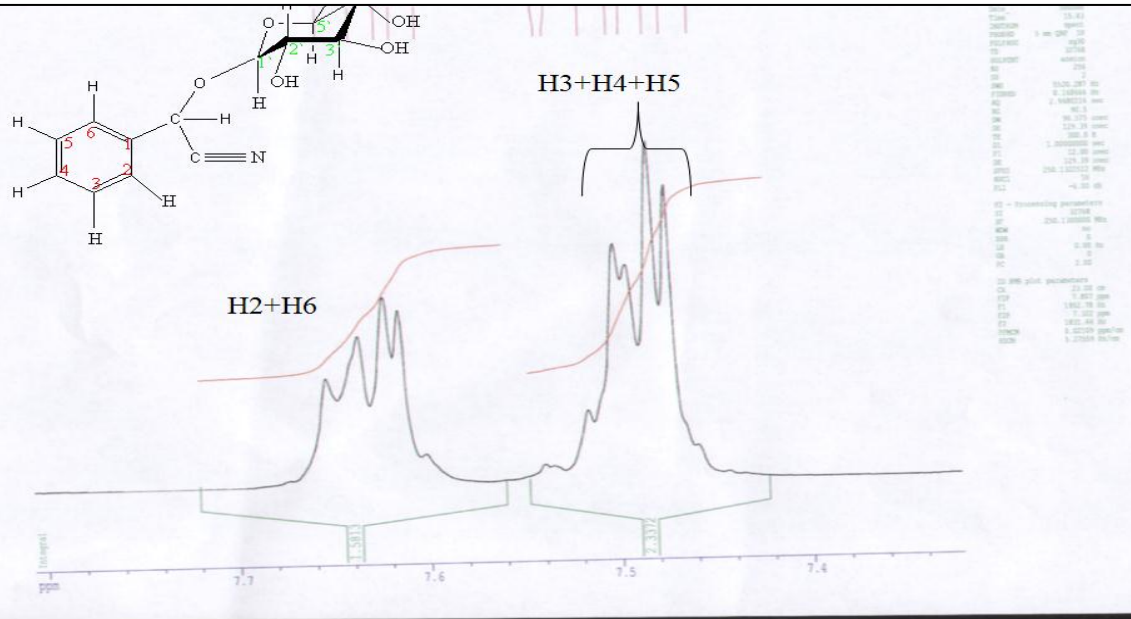
الطيف رقم (14) طيف (CIF11 للمركب 137-60 RMN-13C(CD₃COCD₃, 500MHz) تكبير المجال



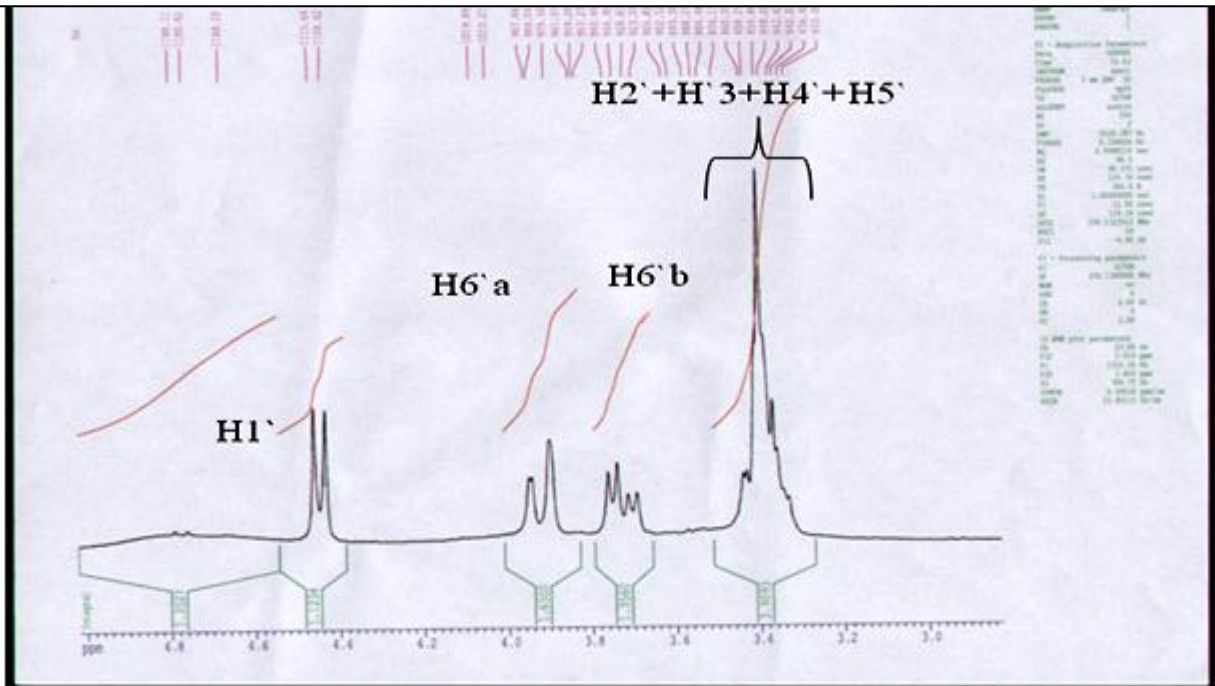
طيف رقم(15) طيف ${}^1\text{H}(\text{CD}_3\text{COCD}_3, 250\text{MHz})$ للمركب CIF_{11}



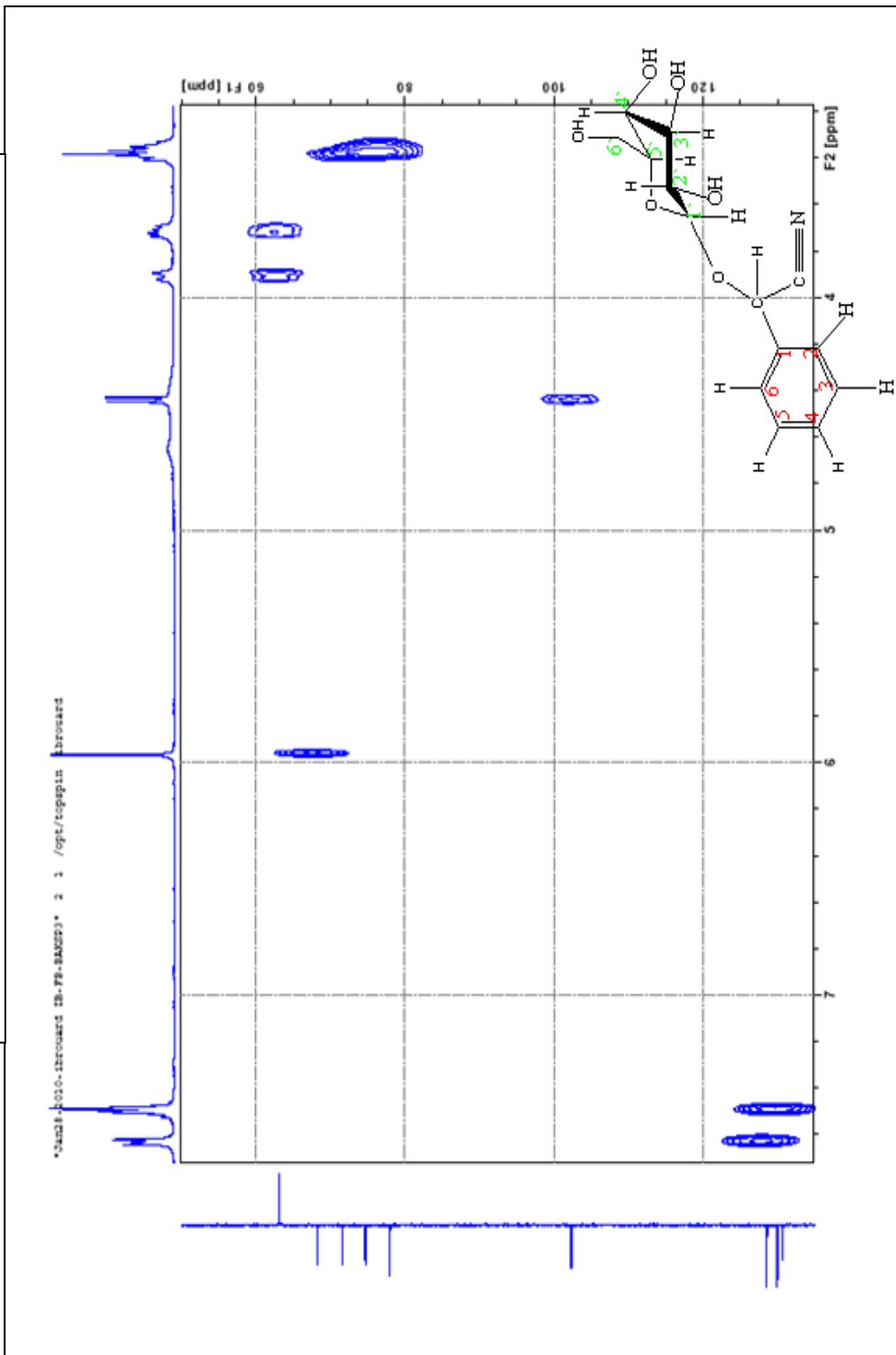
الطيف رقم (16) : طيف $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{COCD}_3, 250\text{MHz})$ للمركب CIF11 تكبير المجال -7.4ppm



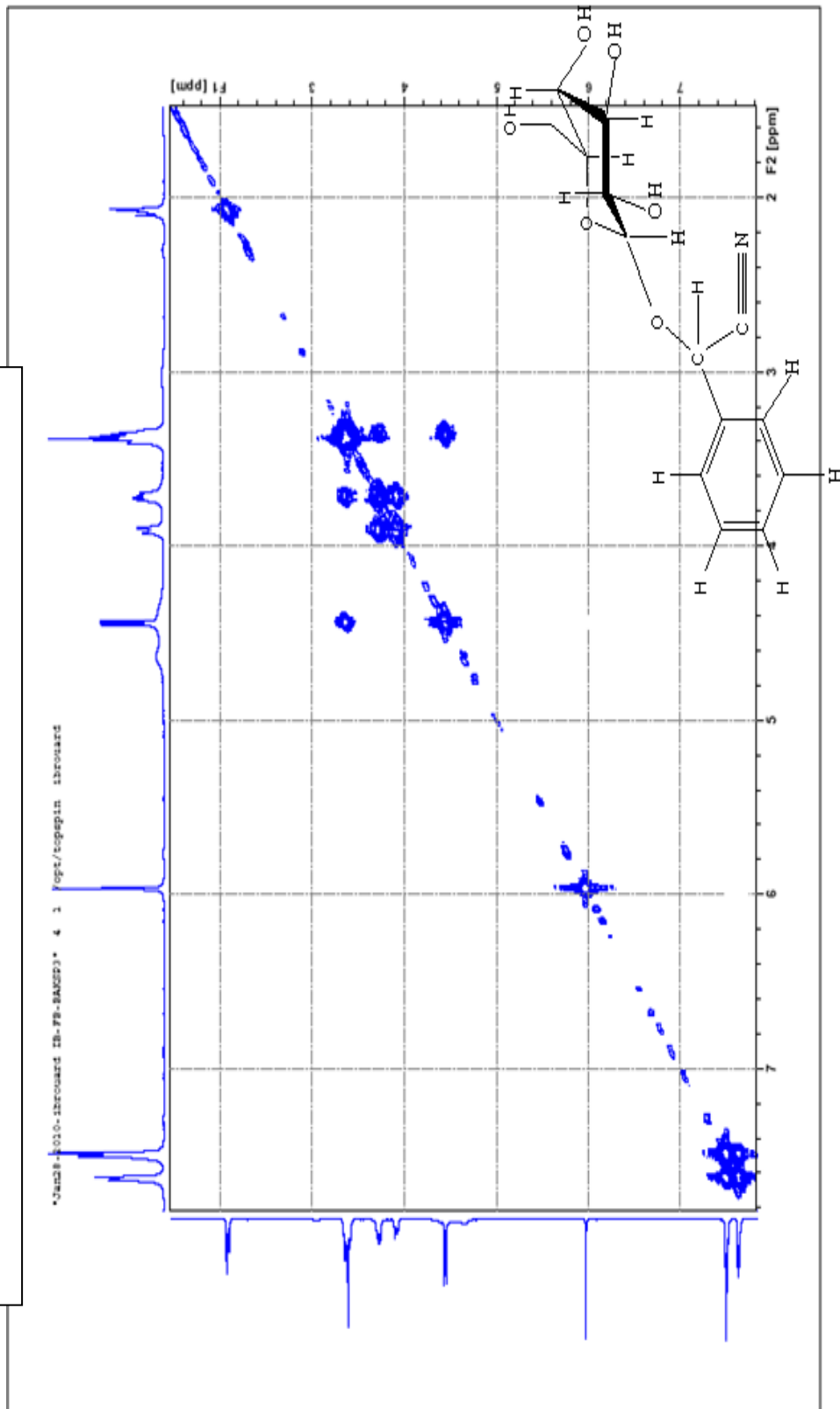
الطيف رقم (17) : طيف $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{COCD}_3, 250\text{MHz})$ للمركب CIF11 تكبير المجال $[3.2-4.6\text{ppm}]$



الطيف رقم (18) طيف (HSQC) CD_3COCD_3 للمركب CIF₁₁



الطيف رقم (19) طيف, CD_3COCD_3 للمركب CIF_{11} 500MHZ



الختامة

قمنا بهذا البحث لغاية التعرف على نواتج الأيض الثانوي لنبات *Centaurea involucrata* لطورخلات الإيثيل .

في البداية تعرفنا على الفلافونيدات من الجانب النظري أقسام الفلافونيدات طرق الاصطناع الحيوي و المخبري ، طرق الفصل والتنقية وأخيرا الطرق الفيزيوكيميائية المتبعة للتعرف على البنى الكيميائية للمركبات المعزولة .

تمكنا مخبريا من فصل وتحديد الصيغ البنوية لأربع مركبات هي :

- Acide benzoïque.
- 5,6,4`-trihydroxy 6,3`-dimethoxy flavone
- 5,7,4`-trihydroxy 6,3`dimethoxyflavone (Jaceosidine).
- La prunasine .

اعتمدنا في فصل هذه المركبات على الكروماتوغرافيا بأنواعها (كروماتوغرافيا العمود،كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة).

أما تحديد الصيغة البنوية للمركبات المفصولة تم بالاعتماد على التحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي ^{13}C -RMN , ^1H -RMN , COSY(^1H , ^1H), HSQC, DEPT و طيف الكتلة ESI بالإضافة إلى مطيافية الأشعة فوق بنفسجية – المرئية (UV-VIS).

الملخص

الهدف الرئيسي من هذا البحث هو فصل وتحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لطورأسيتات الإيثيل لنبته *Centaurea involucrata* التي تنتمي إلى العائلة المركبة. باستعمال طرق الفصل الكروماتوغرافي المختلفة (كروماتوغرافيا العمود CC، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM) سمحت بفصل أربع مركبات.

المركبات المفصولة هي :

- Acide benzoïque.
- 5,6,4`-trihydroxy 6,3`-dimethoxy flavone .
- 5,7,4`-trihydroxy 6,3`-dimethoxyflavone (Jaceosidine).
- La prunasine

التعرف على البنناالكيميائية للمركبات المفصولة تحققت باستعمال الإلماهة الحمضية، الطرق الطيفية

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) ، طيف الرنين النووي المغناطيسي (^1H , ^{13}C RMN, DEPT, HSQC, COSY (^1H , ^1H)) بالإضافة إلى طيف تحليل الكتلة ESI.

هذه المركبات جديدة بالنسبة للنوع *C.inolucrata* أما بالنسبة للجنس *Centaurea*

فصل المركب (Jaceosidine) من *All.Centaurea nicaensis*[66],[21], *Centaurea maroccana*.

أما المركب (prunasine) سبق وأن فصل في مخبرنا [67] كما تم فصله من

Centaurea aspera var. *subinermis*[68], *Eucalyptus L'hérit*[69], *Prilla frutescens* var. *acuta*[70].

résumé

L'objectif principal de ce travail est d'identifier des métabolites secondaires (flavonoïdes) contenus dans la phase acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique de la plante *Centaurea involucrata* qui appartient à la famille des composées.

L'utilisation de différentes méthodes de séparations chromatographiques (colonne, couche mince) a permis d'isoler quatre composés.

Les composés séparés sont :

- Acide benzoïque.
- 5,6,4'-trihydroxy 6,3'-dimethoxy flavone .
- 5,7,4'-trihydroxy 6,3'-dimethoxyflavone (Jaceosidine).
- La prunasine (un composé cyanogénique).

L'établissement des structures de ces composés a été réalisé grâce à l'hydrolyse acide, les méthodes spectroscopiques (UV, RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, HSQC, COSY) et de l'analyse des spectres de masse en mode ESI.

Ces composés sont isolés pour la première fois de l'espèce *involucrata* et pour le genre

Centaurea le composé Jaceosidine a été isolé de *Centaurea nicaensis* All [66] *Centaurea maroccana* [21].

Le composé prunasine a été isolé dans notre laboratoire [67] et de *Centaurea aspera* var. *subinermis* [68], d'*eucalyptus* L'hérit [69] et de *Prilla frutescens* var. *acuta* [70].

Abstract

The principal aim of the present work consisted to identify the secondary metabolites (flavonoids) present in the acetate ethyl soluble part of the aqueous-methanol extract *Centaurea involucreta* belonged to the compositae family.

The use of the different chromatographic methods (column, thin layer) permitted the isolation of four compounds .

The isolated compounds are:

- Benzoic acid
- 5,6,4'-trihydroxy 6,3'-dimethoxy flavone.
- 5,7,4'-trihydroxy 6,3'-dimethoxyflavone .(Jaceosidin)
- prunasin (cyanogenic compound)

The structures of these compounds were established the use acid hydrolysis, the spectroscopic data(UV, RMN-1H, RMN-13C, DEPT, HSQC, COSY) and the ESIMS spectrum.

These compounds are isolated for the first time from the species *involucreta*. For the genus *Centaurea*, Jaceosidin compound was isolated from *Centaurea nicaensis*. All. [66] *Centaurea maroccana* [21].

Prunasin compound was isolated in our laboratory [67]. It was also isolated from *Centaurea aspera* var. *Subinermis* [68] , *Eucalyptus L'herit* [69] and *Prilla frutescens* Var. *acuta* [70] .

BIBLIOGRAPHIE

المراجع

- [1] J. Menz, R. K. winkejmann, Contact Dermatites, 16, 169 (1987).
- [2] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol II, p.949, CNRS. Paris (1963).
- [3] G. flamini, C. Bullerie, I. Morelli and A. Manunta, J. Nat. prod, 63, 662-663 (2000).
- [4] Z. F. Ahmed, H. rimpler, F. M. Hamouda, A. M. Rick and S. I. Ismail, planta Med, 19, 3, 264-269 (1971).
- [5] N. Mezache, thèse de magister, Constantine (2002).
- [6] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, N. Khalfallah and P. Aclinou, Guaianolides from *Centaurea musimomum*, Phytochemistry, 45 (7), 1449 (1997).
- [7] J. G. platas, C. Ruiz-perez, A. G. Gonzalez, J. Bermejo and K. Medjroubi, 4 β , 15-dihydro-3dehydrosolstitialin A, Acta Cryst, 55, 1837 (1999).
- [8] S. Akkal, F. Benayache, A. Bentamene, K. Medjroubi, E. Seguin and F. Tellequin, Flavonoid Aglycone from *Centaurea napifolia*, Chemistry of natural compound, 39 (2), 219-220 (2003).
- [9] S. Akkal, F. Benayache, S. Benayache and M. Jay, Flavonoids from *Centaurea incana*, Biochemical systematic and Ecology, 4, 361 (1997).
- [10] R. Bencherait, Thèse de magister, Constantine (1989).
- [11] K. Medjroubi, thèse de magister, Constantine (1991).
- [12] F. Benayache, S. Benayache, K. Medjroubi, G. Massiot, P. Aclinou, B. drodz and G. Nowak, phytochemistry, 31 (12), 4359-4360 (1992).
- [13] G. Athmani, S. Benayache, F. Benayache, H. Dendoughi, M. Jay, J. Alg. Chem, 8 (1), 29-36 (1998).

- [14] K.Medjroubi,N.Boudardara, F. Benayache, S.Akkal, E. seguinand F.Tellequin, sesquiterpene lactone of *centaurea nicaensis*,Chemistry of natural compound, 39 (5), 506 (2003).
- [15] S. Akkal, F. Benayache, S.Benayache, K. Medjroubi, M. jay, F.Tellequin and E. Sguin, New flavone glycoside from*Centaureafurfuracea*, Fitoterapia, 70,368-370 (1999).
- [16] S. Delouche, thèse de magister, Constantine (2003).
- [17] C. Boubekri, thèse de magister, Constantine (2003).
- [18] R. Benakcha,thèse de magister, Constantine (2001).
- [19] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, M.Kaabeche, E. Seguin and F. Tellequin, Eudesmanolide from*Centaurea granata*, phytochemistry, 49 (8),2425 (1998).
- [20] A. Bentamene, S. Benayache, J. Creche, J. Bermejo, F. Benayache, sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*, chemistry of natural compounds, 43(6) 749 March-April(2007).
- [21]S. Bicha, A. Bentamene, O. Benaissa, S. Benayache, J. Bermejo, V. P. Garcia, F. Benayache, chemistry of natural compounds acceptée.
- [22] A. Bentamen, thèse de magister, Constantine (1997).
- [23]A. Bentamene, S. Benayache, J. crèche, G. petit, J. Bermejo-Barrera, F. Leon, F. Benayache, a new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis*L. (*Asteraceae*).
- [24]A. Bentamene, M. Baz, R. Boucheham, S. Benayache, J. Crèche, F. Benayache, flavonoid aglyconesfrom *centaurea sphaerocephala* L. chemistry of natural compounds 44(3) 234 March-April(2008).
- [25] A. Bentamene, R. Bouchham, M. Baz, S. Benayache, j. Crèche, F. Benayache, Chemistry of natural coumpounds 46(3) (2010).
- [26] T. J. Mabry, M. B. Thomas, K. R. Markham, The systhematic identification of flavonoids,Springer-Verlag, Berlin (1970).

- [27] S. Lieberman, N. Bruning, *The real Vitamin and Mineral*, Aver(1997).
- [28] J. Bruneton, *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, p.1120, 3^{ème} édition Tec&Doc Lavoisier, Paris(1999).
- [29] J. B. Harborne, *Flavonoids in phytochemistry*, eds, J. B. Litton educational publishing inc, London (1979).
- [30] E. Wollenweber, V. H. Dietz, *Biochem, syst, ecol*, 8, 21 (1980).
- [31] J. Bruneton, *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, Ed Tec et Doc (1997).
- [32] Y. Dacosta, *Les phytonutriments bioactifs*, Ed Y. Dacosta, 669 références bibliographiques, Paris (2003).
- [33] Docencia.udea.edu.co/~farmacogfit/Flavonoides/D_main.html - 3k.
- [34] M. G. Hertog, E. J. Feskens, P. C. Chollman, M. B. Katan, D. Kromhout, *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen Elderly Study*, *Lancet* 342, 1007-1011 (1993).
- [35] P. S. Chaudhry, J. Cabrera, H. R. Juliani, S. D. Varma, (1983). *Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin*, *Biochem Pharmacol.* 32 (1995).
- [36] J. F. Christopher, G. H. Neil-Thowers, *Phytochemistry*, 31(9), 3017-3020 (1992).
- [37] B. Havsteen, *Flavonoids class of natural product of high pharmacological potency*, *Biochemical Pharmacology*, 32, 7, 1141, 8 (1983).
- [38] M. Paris, M. Hurabielle, *Abregé de matière médicale, Pharmacognosie. Vol I. Paris - New York – Barcelone*, Masson (1981).
- [39] C. Kandaswami, E. Perkins, D. S. Drezewiecki, E. Middleton, *Anti –cancer drug, Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma and embryonic fibroblast like lung cells in culture by plant flavonoids*, 3, 525-530 (1992).
- [40] R. Robinson, *Nature* 137, 1172 (1936).
- [41] G. Richter, *Metabolism des Végétaux, physiologie et biologie*, eds, press polytechnique et universitaire romandes, Lausanne (1993).
- [42] H. Dendougui, *Thèse de magister*, Constantine (1989).
- [43] M. J. Turner, B. W. Smith, E. J. Haslam, *Chem, Soc, perkin*, 52, 5 (1975).
- [44] V. Deluca, R. K. Ibrahim, *Arch, Biochem, Biophys*, 606 (1985).
- [45] P. R. Gayon, *Les composés phénoliques des végétaux*, eds Dunod, Paris (1968).

- [46] J. B. Harborne, Biochemistry of phenolics compounds ,Academic press, New - York (1964).
- [47] J. Chopin, Actualités de phytochimie fondamentale, 2^{ème} Série,édsMasson, Paris, 119 (1966).
- [48] L. Jurd, The chemistry of flavonoids compounds, Pergamon press,New – York (1962).
- [49] J. B. Harborne, The flavonoids advances in research since 1980,edsChapman and Hall, New -York (1989).
- [50]J. B. Harborne, The flavonoids, Academic press,London(1980).
- [51] K. R. Markham, Technique of flavonoid identification, Academicpress, London (1982).
- [52] H. K. Wang , S. Y. Lin, K. M. H. Wang ,G. Tylor and M. Lee, Bioorg, Med,chem, 2, 1397(1994).
- [53] Randerathk,Chromatographie sur couches mince ,edsGautierVillard(1971).
- [54] J. B. Harbone,The flavonoids,V.1,eds Champan andHall,London(1975).
- [55]J.B. Harborne, T. Swain, Prespectives in phytochemistry.Academic press, London (1969).
- [56] E. Wollenweber, In the flavonoids-Advances in Research (J.B.Harborne and J. J. Mabry, eds, Chapman and Hall, London, New -York) (1982).
- [57] M. A. Lacaille-Dubois, H. Wagner, 20^{ème} Aniversaire du groupe polyphenols(book of abstracts) vol I(16), 217, 13-16 (1992).
- [58] K. R. Markham, H. Geiger, In The Flavonoids, edited by J.B. Harborne (1993). Chapman and Hall, London (1994).
- [59] M. Becchi, D. Fraisse, Fast atom bombardment and Collision Activated-dissociation mass-analysis ion Kin tics analysis of C-Glycosidic flavonoids.Biomedical and enveronmental masselectrometry, 18,122-130(1989).
- [60] J. F. Gonnet, A propos de la photographie en couleur dechromatographie sur couches minces en lumière de Wood, J, of chromato, 86, 192 (1973).
- [61] M. J. Boland, E.Wong, J. Aur, Biochem, 50,383,(1975).Biorg,Chem,8,1 (1979).
- [62] G.Kochs, H. Grisebach, J. Aur, Biochem, 155-311(1986).
- [63] <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDAFN/1.00/nn/136725>(2005).
- [64] G. Atmani, thèse de magister, Constantine .
- [65] P. K. Agrawal, Phytochemistry, 31(10), 3307-3330 India (1992).

[66] L. Hammoud, thèse de magister, Constantine (2009).

[67] L. Cardona, I. Fernandez, J. R. Pedro and R. Vidal, polyoxygenated terpenes and cyanogenic glucosides from *Centaurea aspera* Var. *Subinermis*, phytochemistry, 31(10), 3507-3509 (1992).

[68] R. M. Gleadow, I. E. Dun habwyak, M. E. Conn, H. Conn eric, frequency and distribution of cyanogenic glycosides in *Ecalyptus L'hérit*, phytochemistry, 69, 1870-1874 (2008).

[69] M. Aritomi, T. Kumori and T. Kawasaki, cyanogenic glucosides in leaves of *Perilla frutescens* Var. *Acuta*, phytochemistry, 24(10), 2438-2439 (1985).