

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة منتوري قسنطينة

قسم الكيمياء

كلية العلوم

رقم الترتيب

رقم التسلسل

رسالة

مقدمة لنيل شهادة الدكتوراه في العلوم

تخصص كيمياء عضوية

شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان

الدراسة الفيتوكيميائية و الفعالية البيولوجية للنباتات

Ammi visnaga L.,

Eryngium triquetrum Vahl. (Apiaceae)

و *Astragalus armatus* Willd. (Fabaceae)

تحت إشراف الأستاذة:

زهية كعبوش

تقديم

خلف الله آسيا

أعضاء لجنة المناقشة:

رئيسا	أستاذ بجامعة منتوري- قسنطينة	د. كعبوش أحمد
مقررة	أستاذة بجامعة منتوري- قسنطينة	د. كعبوش زهية
ممتحنا	أستاذ بجامعة منتوري- قسنطينة	د. عكال صالح
ممتحنا	أستاذة بجامعة عنابة	د. برجم مليكة
ممتحنا	أستاذ بجامعة عنابة	د. عوف نور الدين
ممتحنا	أستاذ بجامعة بشار	د. شريتي عبد الكريم

إهداء

أهدي هذا العمل المتواضع إلى:

والدي العزيزين حفظهما الله

إلى **جدتي** أطال الله في عمرها

إلى أختاي **أمال** و **راخية**

إلى إخوتي **حسين** و **زوجته** ، **نبيل** ، **شريف** ، **خالد** ، **عمام** و خاصة **زهير**

إلى من أدخل البهجة إلى قلوبنا **أسامة**

إلى من كانت دائما لي عوناً وسنداً **نجوى**.

إلى **سارة** ، **سامية** و إلى جميع الأهل و الأصدقاء

إهداء

أهدي هذا العمل المتواضع إلى:

والدي العزيزين حفظهما الله

إلى **جدتي** أطال الله في عمرها

إلى أختاي **أمال** و **راخية**

إلى إخوتي **حسين** و **زوجته** ، **نبيل** ، **شريف** ، **خالد** ، **عمام** و خاصة **زهير**

إلى من أدخل البهجة إلى قلوبنا **أسامة**

إلى من كانت دائما لي عوناً وسنداً **نجوى**.

إلى **سارة** ، **سامية** و إلى جميع الأهل و الأصدقاء

تشكرات

سبحان الله واهب الحياة بالماء و الهواء، و خالق الأرض بالنباتات الخضراء و الكائنات الأحياء من أجل الغذاء و الكساء و الشفاء. الشكر لله أولا و أخيرا و دائما على توفيقه سبحانه لي لإنجاز هذا العمل.

أتقدم بجزيل الشكر إلى الأستاذة كعبوش زهية على كل ما قدمته لي من دعم مادي و معنوي خلال إنجازنا لهذا العمل، كما أتقدم إليها بالشكر على سعيها دائما لتوفيرها لنا كل الإمكانيات اللازمة.

يشرفني حضور أعضاء لجنة المناقشة و أتوجه إليهم بالشكر بدءا بالأستاذ كعبوش أحمد على قبوله رئاسة لجنة المناقشة. و الأساتذة برجم مليكة، عوف نور الدين، شريتي عبد الكريم و عكال صالح على قبولهم المشاركة في مناقشة هذه الرسالة.

أشكر كل أعضاء المخبر : نعيمة خاصة، فيروز، وسيلة، وسام، صباح، عباس، هشام، إلهام، أميرة، ماريان، صليح، شوقي، آسيا زغيب، حبيبة، الأستاذ أحمد كعبوش، طارق، هشام لكحل.
كما أشكر كل الأصدقاء و الزملاء: منى، سهيلة، سليمة، أحلام، حنان، لامية، مالك، رؤوف و خاصة لطفي.

الفهرس

1 مقممة
3 المراجع
الجزء الأول: مقممة ببليوغرافية حول الفلافونيدات و الدراسة النباتية و الكيميائية	
الفصل الأول: الفلافونويدات	
5 I. الفلافونيدات
8 II. تواجد الفلافونيدات
8 III. الفعالية البيولوجية للفلافونيدات
9 IV. الإصطناع الحيوي للفلافونيدات
11 V. طرق إستخلاص و فصل و تنقية الفلافونيدات
11 I.V. الاستخلاص
11 II.V. الفصل و التنقية
11 VI-التعيين البنوي للفلافونيدات
11 1. الخواص الكروماتوغرافية
12 2. طرق التحليل الطيفي
12 1.2. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:
16 2.2. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-NMR}$
19 3.2. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C
19 4.2. تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد
20 5.2. مطيافية الكتلة
21 VII- الحلمة الحمضية
23 المراجع
الفصل الثاني: دراسة ببليوغرافية حول الجنس <i>Astragalus</i>	
26 توزيع الفلافونيدات عند الجنس <i>Astragalus</i>
53 المراجع
الدراسة النباتية و الكيميائية للنبنة <i>Astragalus armatus</i> Willd.	
.]	
61 1. المادة النباتية

61	2. وصف النوع <i>A. armatus</i>
62	3. التصنيف النظامي للنبتة
62	4. الإستخلاص
64	5. الفصل و التنقية
66	6. معالجة الكسور المتحصل عليها
		التعيين البنوي للمركبات المفصولة
70	- التعيين البنوي للمركب A ₁
82	- التعيين البنوي للمركب A ₂
96	- التعيين البنوي للمركب A ₃
108	- التعيين البنوي للمركب A ₄
123	- التعيين البنوي للمركب A ₅
131	- التعيين البنوي للمركب A ₆
142	- التعيين البنوي للمركبين A ₇ و A ₈
		الفصل الثالث: دراسة ببليوغرافية حول الجنس <i>Eryngium</i>
147	توزيع الفلافونيدات عند الجنس <i>Eryngium</i>
151	المراجع
		الدراسة النباتية و الكيميائية للنبتة <i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.
152	1. المادة النباتية
152	2. وصف النوع <i>E. triquetrum</i>
153	3. التصنيف النظامي للنبتة
153	4. الإستخلاص
155	5. الفصل و التنقية
		التعيين البنوي للمركبات المفصولة
162	- التعيين البنوي للمركب E ₁
170	- التعيين البنوي للمركب E ₂
178	- التعيين البنوي للمركب E ₃
186	- التعيين البنوي للمركب E ₄
195	- التعيين البنوي للمركب E ₅

الفصل الرابع: تحليل GC/MS للزيت الأساسي للنبتة *Ammi visnaga* L

206	I- دراسة ببليوغرافية حول الزيوت الأساسية.....
206	1.مدخل.....
206	2.مكونات الزيوت الأساسية.....
209	3.طرق إستخلاص الزيوت الأساسية.....
210	4.طرق تحديد مكونات الزيوت الأساسية.....
-II دراسة مكونات الزيت الأساسي للنبتة <i>Ammi visnaga</i> L	
211	1.مقدمة.....
211	2.المادة النباتية.....
211	3.الوصف النباتي.....
211	4.التصنيف النظامي للنبتة.....
212	5.الإستخلاص باستعمال التقطير المائي.....
212	6.التحليل باستعمال جهاز كروماتوغرافيا الطور الغازي.....
213	7.النتائج المتحصل عليها.....
215	المراجع.....

الجزء الثاني: دراسة الفعالية البيولوجية

الفصل الأول: دراسة ببليوغرافية حول الفعالية المضادة للأكسدة و الفعالية المضادة

للبيكتيريا

217	I-I-1- الفعالية المضادة للأكسدة.....
217	مقدمة.....
217	I-2- الجذور الحرة.....
218	I-3- النظام المضاد للأكسدة.....
218	I-4- الفلافونيدات و الفعالية المضادة للأكسدة.....
219	I-5- الإختبارات المستعملة لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة.....
220	II- الفعالية المضادة للبيكتيريا.....
220	II-1- مقدمة.....
220	II-2- خصائص و مميزات السلالات البكتيرية المدروسة.....
222	II-3- التركيز الأدنى المثبط (CMI).....

223 المراجع
	الفصل الثاني : طريقة العمل و مناقشة النتائج
225 I- الفعالية المضادة للأكسدة
225 I-1- طريقة العمل
225 I-2- النتائج و المناقشة
228 II- الفعالية المضادة للبكتيريا
228 II-1- طريقة العمل
228 II-1-1- الطريقة العملية لتقدير الفعالية المضادة للبكتيريا
229 II-1-2- الطريقة العملية لتحديد CMI
231 II-2- النتائج و المناقشة
 II-2-1- تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص الكلوروفورمي للنبذة
231 <i>Eryngium triquetrum Vahl.</i>
231 II-2-2- تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي للنبذة <i>Ammi visnaga L.</i>
234 المراجع

قائمة المختصرات

AcAc	Acétylacetone
AcOH	Acide acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
MEC	Méthyléthylcétone
CCM	Chromatographie sur couche mince
CC	Chromatographie sur colonne
CP	Chromatographie sur papier
UV	Spectrophotométrie UV-Visible
¹ H-RMN	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
¹³ C-NMR	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
COSY	Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
EI	impact électronique
FAB	Fast atome bombardement
ES	Eléctrospray
CI	Ionisation chimique
J	Constante de couplage
Hz	Hertz
ppm	parties par million.
s	Singulet
sl	Singulet large
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
t	Triplet
td	Triplet dédoublé
<i>R_f</i>	Rapport frontal
IR	Indice de rétention
SH	Souche hospitalière
ATCC	American Type Culture Colection

مقدمة

مقدمة

منذ آلاف السنين، و منذ أن وجد الإنسان على هذه الأرض، و هو في صراع قاس مع الطبيعة، فبإمكانياته البدائية المحدودة قاوم الكوارث الطبيعية و حفظ وجوده بفضل العقل الذي وهبه الله إياه، واستطاع أن يقف في وجه عتو الطبيعة و يكيفها رويدا رويدا بما يتلاءم مع حاجاته و مصالحه، إلى أن توصل إلى تدليلها و الإمساك بقيادها.

و منذ أن خلق الله الإنسان و أوجده على هذه الأرض، أوجد معه أسباب فنائه كما أوجد أسباب بقاءه، فخلق فيها الآفات و الأمراض و خلق معها أسباب علاجها. و كما جعل النباتات غذاء لا يستغنى عنه للحياة، جعل فيها أيضا الدواء الشافي للأمراض. و وهب الله للحيوان الذي لا يعقل غريزة الاهتداء إلى نوع النبات الذي يلائمه و يحفظ وجوده و ترك للإنسان العاقل أن يهتدي لما يناسبه من النباتات بالبحث و التجربة بفضل العقل الذي خصه به من بين سائر الحيوانات.

لا نستطيع أن نحدد بدقة الزمن الذي بدأ فيه التجريب العملي و الاستخدام المنظم لشتى أنواع الأعشاب و النباتات في العلاج الطبي، فمع زيادة التعداد البشري و التقدم العلمي و الصناعي ظهرت طرق جديدة للحفاظ على النباتات الطبية و العطرية و سهولة تداولها و ذلك بتصنيعها في صورة مركزات و خلاصات لزجة أو على هيئة أقراص و حبوب جافة تحتوي على جميع العناصر الفعالة الموجودة في النبتة. و مع تقدم العلوم الكيميائية استطاع العلماء تحديد المواد الفعالة بدقة في كل نبتة يجري البحث فيها مخبريا، بل استطاعوا فصل هذه المواد من النبتة و إعادة تكوينها صناعيا ليستفاد منها في جميع المجالات الطبية. و لكن هذا التطور العلمي الكيميائي لم يقض نهائيا على أساليب التداوي الشعبي المعروف بالطب البلدي، ففي السنوات الأخيرة اتجه كثير من الأطباء إلى الوصفات النباتية الشعبية لعلاج الكثير من الأمراض و ذلك بسبب خلو أكثر من هذه النباتات من المواد الكيميائية الصناعية التي تسبب في كثير من الأحيان أعراضا جانبية قد تؤثر سلبا على صحة المريض [1].

و كتدعيم لهذه الأبحاث انصب اهتمامنا على النباتات الطبية التي يتسم معظمها بفعالية بيولوجية عالية و اخترنا لهذا الغرض ثلاث نباتات إثنان منها و هما *Ammi visnaga* L.

Eryngium triquetrum Vahl. تنتمي إلى العائلة Apiaceae و كتكملة للدراسة التي أجريت في

رسالة الماجستير إختارنا النبتة الثالثة و هي *Astragalus armatus* Willd. التي تنتمي إلى العائلة Fabaceae.

يتميز جنس *Ammi* باحتوائه على ثلاثة أنواع توجد بالجزائر [2] واحدة من هذه الثلاثة النوع *Ammi visnaga* L. حيث توجد في ثماره مادة الخلين والتي تدخل في صناعة بعض الأدوية ويستخدم مغلى هذه الثمار كمهدئ للمغص الكلوى لأنه يؤدي إلى ارتخاء عضلات الحالب ومن ثم يسهل مرور الحصوات الصغيرة وهو أيضا مدر للبول وله فاعلية لعلاج أمراض القلب والسعال الديكى [3]. أما جنس *Eryngium* يحتوي على حوالي 300 نوع [4] ، تتصف هذه الأخيرة بفعالية بيولوجية معتبرة منها مضادة للملاريا [5]، مضادة لداء السكري [5]، مضادة للالتهاب [6] ، مضادة للبكتيريا، مسكنة للألام [7]...

إلا أن جنس *Astragalus* يحتوي على أكثر من 2000 نوع [8] فإضافة إلى أنها تعتبر ذات أهمية زراعية واسعة، غذائية، علفية، تزيينية فهي ذات فعالية بيولوجية مضادة للالتهاب [9]، مضادة للقرحة المعدية [10]، مضادة للجذور الحرة [11-13]، مضادة للالتهاب الكبد [14]، مثبطات إنزيمية [15-17]، مضادة للبكتيريا [18-21] ...

تعود كل هذه الفعاليات كما ذكرنا سابقا إلى العناصر الفعالة الموجودة في كل نبتة نذكر منها التربينات [9] و الفلافونيدات [22]... و قد كان فصل الفلافونيدات و دراسة بعض من الفعالية البيولوجية محور لإهتمامنا في هذا البحث الذي قمنا بعرضه في جزءين إضافة إلى مقدمة و خاتمة.

الجزء الأول: اشتمل على مقدمة ببليوغرافية حول الفلافونيدات و الدراسة الفيتوكيميائية للنبتين

Astragalus armatus Willd. و *Eryngium triquetrum* Vahl. من دراسة ببليوغرافية حول الجنس، دراسة نباتية و كيميائية للنبته و أخيرا التعيين البنوي للمركبات المفصولة.

في حين خصص الفصل الرابع للتحليل GC/MS للزيت الأساسي للنبته *Ammi visnaga* L.

الجزء الثاني: قسم إلى فصلين:

فالفصل الأول احتوى على دراسة ببليوغرافية حول الفعالية المضادة للأكسدة و الفعالية المضادة للبكتيريا و جاء الفصل الثاني لمناقشة نتائج دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي للنبته *Ammi visnaga* L. و المستخلص الكلوروفورمي للنبته *Eryngium triquetrum* Vahl. و أخيرا دراسة الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص البوتانولي للنبته الأخيرة.

المراجع

- [1] Ahmed, C. D. (2000). La phytothérapie et les plantes. Deuxième édition, Beirut, Liban, 4 pp.
- [2] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Tome II, Ed. C.N.R.S. Paris, France.
- [3] Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M. (2002). Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Ammi visnaga* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J. Herbal. Pharmac., 2, 19.
- [4] Muckensturma, B., Boulanger, A., Farahia, M., Reduron, J. P. (2010). Secondary metabolites from *Eryngium* species. Nat. Prod. Res., 24, 391.
- [5] Ali, E., Nilüfer, A., Idris, A. (2011). Phytochemical constituents and inhibitory activity towards Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains of *Eryngium* Species (Apiaceae). Chem. & biodiv., 8, 454.
- [6] Michael, A., Wandana, A., Michael, K., Martin, K., Matthias, H., (2011). Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from, J. Ethnopharm., 133, 278.
- [7] Hamdan, I.I., Afifi, F.U. (2004). Studies on the *in vitro* and *in vivo* hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. J. Ethnopharm., 95, 27.
- [8] Chaudhary, L.B., Srivastava S.K. (2007). Taxonomic and Distributional Notes on Some *Astragalus* L. (Fabaceae) in India. Taiwania, 52, 25.
- [9] Ilarionov, I., Nikolov, S., Elenga, P., Panova, D. (1985). Pharmacological and phytochemical study of triterpene saponins from *Astragalus glycyphyllos* L. Farmat., 35, 12.
- [10] Barnaulov, O. D., Manicheva, O. A., Yasinov, R. K., Yakovlev, G. P. (1985). Evaluation of the effect of flavonoids from the aerial parts of *Astragalus quisqualis* Bunge and *A. floccosifolius* Sumn. on the development of experimental lesions in the mouse stomach. Rast. Res., 21, 85.
- [11] Wang, D., Shen, W., Tian, Y., Sun, Z., Yuan, S., Jiang, J. (1994). The effects of the three components isolated from *Astragalus mongholicus* Bunge on scavenging free radical. Zhongguo Yaolixue Tongbao, 10, 129.
- [12] Wang, D., Shen, W., Tian, Y., Wang, C., Lian, S., Ding, B., Zhou, N., Sun, Y. (1996). Experimental study on anti-radiation effectiveness of *Astragalus* total flavonoids. Zhonghua Fangshe Yixue Yu Fanghu Zazhi, 16, 399.

- [13] Lu, W., Lei, C., Chen, Y., Jiang, Y. (1994). Protective effects of polysaccharide of membranous milkvetch (*Astragalus membranaceus*) on acute myocardially infarcted heart in dog and its mechanism of action. *Zhongcaoyao*, 25, 586.
- [14] Takashima, J., Furui, M., Ryu, E., Ko, T (1995). Triterpene derivatives from *Astragalus complanatus*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 4 pp.
- [15] Yang, Y., Chen, M. (2001). Inhibitory effect of total extract of *Astragalus membranaceus* on hepatocyte apoptosis. *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi*, 15, 287.
- [16] El Hassane, A., Ouazzani, N., Jossang, A., Benkouka, F., Lamnaouer, D. (2001). Inhibition of glycosidases by *Astragalus lusitanicus* and correlation with toxicity. *Vet. and Hum. Toxicol.*, 43, 266.
- [17] Isogai, A., Murakoshi, S., Suzuki, A., Tamura, S. (1973). Isolation from *Astragalus root* of L- canavanine as an inhibitory substance to metamorphosis of silkworm *Bombyx mori*. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 47, 449.
- [18] Zamanizadehnajari, J, A, R., Tahara, P.A. (2002). Antibacterial diterpenoids from *Astragalus brachystachys*. *Z. Naturforsch.*, 57c, 1016.
- [19] Chen, Y., Guo, R. (1988). Effects of *Astragalus saponin 1* on peritoneal macrophages in mice. *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi*, 2, 305.
- [20] Pistelli, L., Bertoli, A., Lepori, E., Morelli, I., Panizzi, L. (2002). Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*. *Fitoterapia*, 73, 336.
- [21] Bedir, E., Calis, I., Aquino, R., Piacente, S., Pizza, C. (1999). Secondary metabolites from the roots of *Astragalus trojanus*. *J. Nat. Prod.*, 62, 563.
- [22] Judit, H., Zsuzsanna, P., Gábor, G., Imre M. (1997). Flavonolacyl glycosides of the aerial parts of *Eryngium campestre*, *Planta Med.*, 63.

الجزء الأول

مقدمة بييليوغرافية حول

الفلافونيدات و الدراسة النباتية

والكيميائية

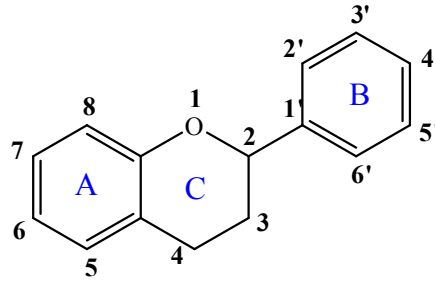
الفصل الأول

الفلافونيدات

المركبات الفينولية واحدة من بين الأسماء الأكثر شيوعا في ميدان المركبات الطبيعية منها ما تحتوي في بنيتها على حلقة عطرية واحدة و تسمى بالمركبات الفينولية البسيطة و منها ما هو أكثر تعقيدا أي تحتوي على أكثر من حلقة عطرية واحدة في بنيتها، وهذه الأخيرة تعتبر أكثر المركبات انتشارا في الطبيعة و هي التي حظيت بالدراسة الوافرة، ومن أهم هذه المركبات منتجات تسمى الفلافونيدات.

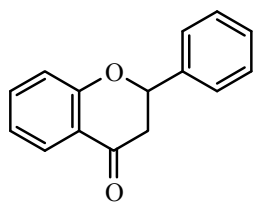
I- الفلافونيدات

هي مركبات طبيعية من نواتج الأيض الثانوي تحتوي في بنيتها على 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات كما في الشكل-1- حيث تمثل نواة 2-Phénylchromane النواة الأم لمختلف صيغ الفلافونيدات.

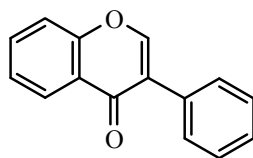


شكل-1- نواة 2-Phénylchromane

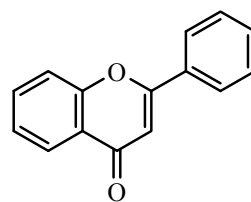
باختلاف المستبدلات و بتغير درجة تأكسد الحلقة C و بتأثير إنزيمات مختلفة [1] نحصل على مختلف أقسام الفلافونيدات و الشكل-2- يوضح الصيغ الأكثر انتشارا منها.



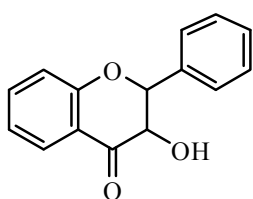
Flavanone



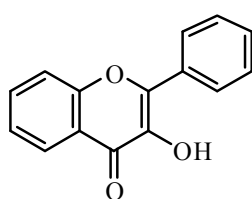
Isoflavone



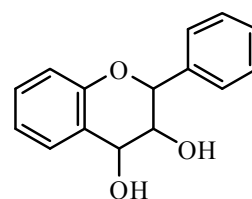
Flavone



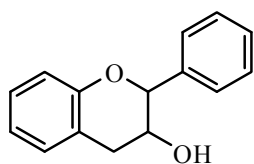
dihydroflavonol



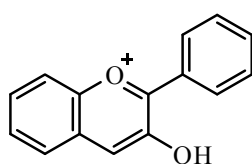
Flavonol



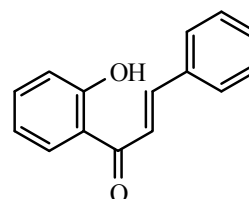
Flavan-3,4-diol



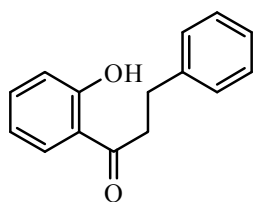
Flavan-3-ol



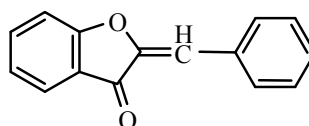
Anthocyanidine



Chalcone



dihydrochalcone



Aurone

شكل-2- مختلف الصيغ الكيميائية للفلافونيدات

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

(أ)- الرابطة من النوع O-glycoside:

حيث يرتبط السكر بالأغليكون برابطة أكسجينية عبر إحدى الهيدروكسيلات الفينولية، ففي حالة الفلافون يكون هيدروكسيل الموضع 7 هو الأكثر استبدالاً يليه و بنسبة قليلة هيدروكسيلات المواضع 5 و 4، أما في حالة الفلافونول فأكثر الهيدروكسيلات استبدالاً هو هيدروكسيل الموضع 3 يليه هيدروكسيل الموضع 7 ، أما بقية المواضع فاستبدالها نادر، كما يمكن الحصول على فلافونيدات ثنائية أو متعددة السكر عبر ارتباط عدة سكريات بعدة مواقع على الفلافونيد أو بارتباط سكر ثان و ثالث و رابع و الجدول-1- يعطي مختلف السكريات التي يمكنها أن ترتبط بالفلافونيد وحيدة أو في تشكيلات سكرية [2].

Pentoses	Hexoses	Uronic acid
<i>D</i> -Apiose	<i>D</i> -Allose	<i>D</i> -Galacturonic
<i>L</i> -Arabinose	<i>D</i> -Galactose	<i>D</i> -Glucuronic
<i>L</i> -Rhamnose	<i>D</i> -Glucose	
<i>D</i> -xylose	<i>D</i> -Mannose	

جدول - 1 - بعض السكريات التي نصادفها مع الفلافونيدات

(ب)- الرابطة من النوع C-glycoside :

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

arabinose أو xylose ، galactose ، rhamnose ، glucose

يكون هذا النوع من الجليكوزيدات مقاوم للتمييه الحمضي على عكس O-glycoside.

II- تواجد الفلافونيدات:

توجد الفلافونيدات في معظم الأصناف النباتية تقريبا، بما فيها الأغذية ذات الأصل النباتي (الليمون، التفاح...) و كذا في المشروبات (شاي، عصير فواكه...) و على مستوى النبات نفسه فإن الدراسات أثبتت تواجدها في جميع الأجزاء من أوراق، أزهار، بذور، جذور و في الفلق... غير أن نسبتها تكون بتراكيز عالية في الأجزاء الهوائية من أزهار و أوراق خاصة. أما على مستوى الخلية فإن الفلافونيدات تتواجد بشكل إيثيروزيدات ذوابة في الماء متركزة في حويصلة الخلية، و الفلافونيدات التي تتحلل في المذيبات غير القطبية كالفلافونيدات عديدة الميثوكسيل فتتواجد في سيتوبلازم الخلية [3] أو تتموضع الفلافونيدات حالة وجودها على شكل أغليكونات على الأنسجة السطحية للأوراق حيث تكون ملازمة لمواد مفرزة هي الأخرى لبيوفيلية و هو حال نباتات المناطق الجافة و شبه الجافة [4]، و عموما توجد أغلب الفلافونيدات بشكل محمي أي إيثيروزيدات، بينما توجد الأغليكونات في الأنسجة النباتية الميتة نتيجة التمييه الحمضي المحفز بواسطة الإنزيمات و كذلك في خشب الأشجار [3].

III- الفعالية البيولوجية للفلافونيدات:

بدأ البحث عن الفعاليات البيولوجية الأساسية في بداية القرن 19 مع فصل المركبات القلوية التالية: المورفين، الستريكنين و الكنين مسجلا بذلك بداية أول تطور للبحث في مجال النباتات الطبية حيث سجل هذا البحث قفزة في منتصف القرن العشرين مع التطور المذهل للكيمياء الصناعية الصيدلانية. فالطرق الجديدة القائمة على التزاوج بين الاختبارات البيولوجية و تقنيات التحليل أدت إلى تقدم ملحوظ في هذا المجال حيث كان و مازال الاهتمام موجهة خاصة نحو التداوي ضد السرطان و ضد HIV، حيث تؤثر المركبات الموجودة في بعض النباتات على السرطان من خلال:

- تقوية الجهاز المناعي و ذلك بمساعدته على مقاومة و تدمير الخلايا السرطانية.
- اقتناص الجذور الحرة (فعالية مضادة للتأكسد).

✓ فالفلافونيدات تعمل على تكسير تسلسل التفاعلات الجذرية نتيجة لبنيتها المستقرة الناتجة عن ظاهرة الرنين الإلكتروني الناشئة عن الحلقات الأروماتية [6,5] ، وقد بينت الدراسات أن فعالية الفلافونيدات المضادة للأكسدة متعلقة بعدد و موقع مجاميع الهيدروكسيل [6] خاصة منها تلك المستبدلة في الموقع 3 للحلقة C [7] و اورثونائي هيدروكسي 4',3' للحلقة B، كما تعود مقاومتها للتأكسد لإحتوائها على الرابطة المضاعفة في الحلقة C بين C₂-C₃ المترافقة مع 4-سيتون [6]،

وجود OH في الموقع 3 وOH في الموقع 5 بالإتحاد مع مجموعة 4-كربونيل و الرابطة المضاعفة بين C₂-C₃ يزيد من فعالية أسر الجذور الحرة [8]، فكلما زادت مجاميع الهيدروكسيل في البنية الفلافونيدية زادت القدرة على أسر الجذور الحرة.

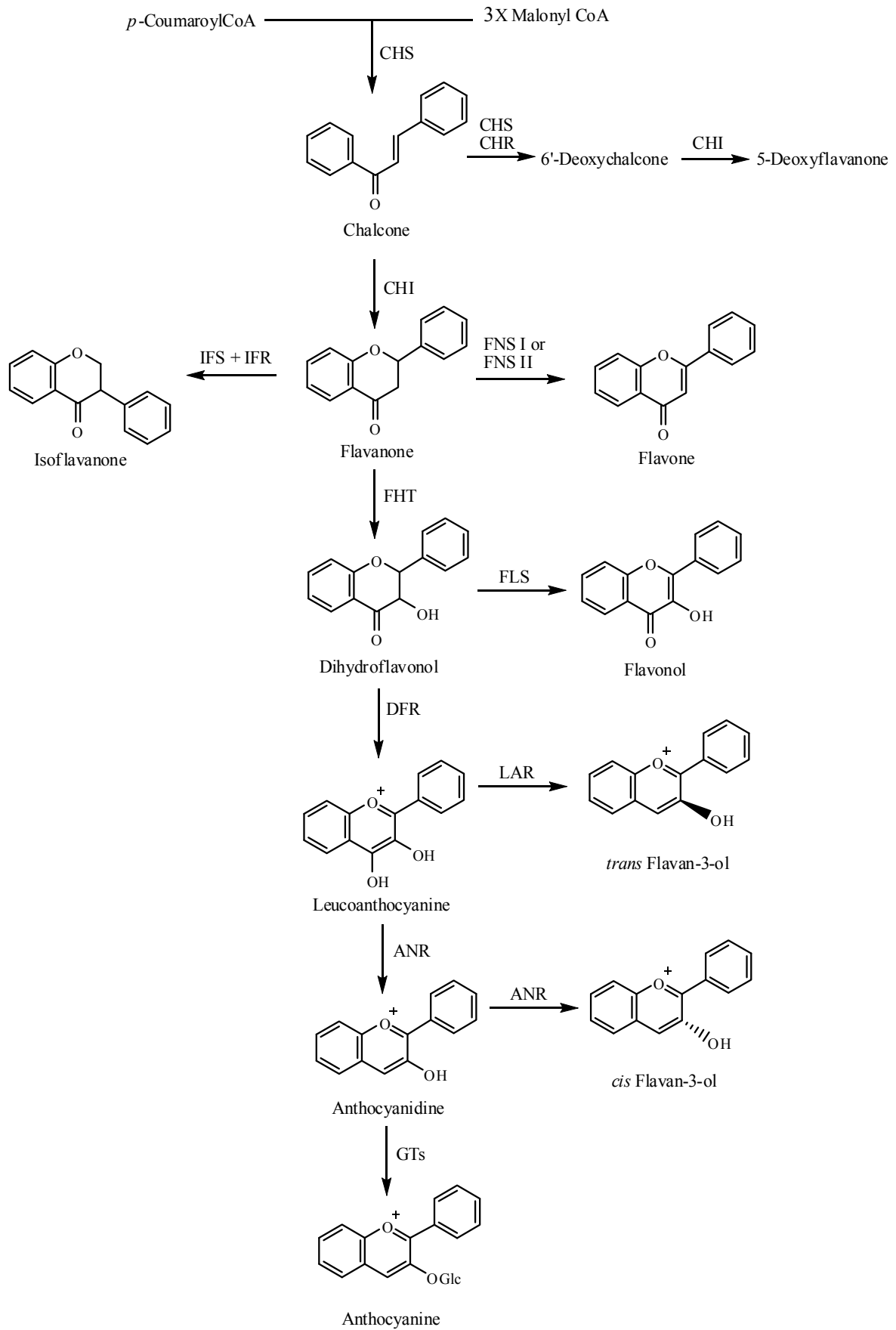
✓ كما أن بعض الفلافونيدات تعمل على تثبيط السيدا HIV.

(human immunodeficiency virus) إذ بينت الدراسة أن الفلافون baicaline يثبط العمل الدفاعي لـHIV-1 وكذا انتقال العدوى [9]، كما تظهر كلا من baicaline [9] ، hinokiflavone ،robustaflavone [10] فعالية تثبيطية على إنزيم النسخ لـHIV-1 ويذكر أن الفلافونيدات acacétine ,chrysin و apigénine تمنع نشاط الـ HIV-1 [11]. إضافة إلى هذا كشفت الدراسات على كون الفلافونيدات مضادة لارتفاع الضغط [12]، مضادة للإلتهاب [13-14]، مضادة للحساسية [15،16]، مضادة للتسمم الكبدي [17]، وذات فعالية ضد الملاريا [18]...

IV- الإصطناع الحيوي للفلافونيدات:

يتم هذا الأخير خلال مراحل:

- فبدءا بالغلوكوز و مرورا بحمض الشكيمييك يتم تكوين حمض Ac.p-coumarique (C₆-C₃) أي تكوين الحلقة B و السلسلة الكربونية الثلاثية C₃.
- يليه تحول الناتج و المتمثل في Ac.p-coumarique إلى p-coumaroyl-CoA.
- الحلقة A تتشكل بتكاتف ثلاث وحدات من Malonyl-CoA.
- إتحاد ثلاث وحدات من Malonyl-CoA مع p-coumaroyl-CoA يشكل الشالكون الذي يعتبر النواة الرئيسية التي تنحدر منها مختلف هياكل الفلافونيدات و المخطط التالي يوضح ذلك [19]:



مخطط -1- : الإصطناع الحيوي للفلافونيدات

و فيما يلي الاختصارات المستعملة لمختلف الإنزيمات الداخلة في عملية الإصطناع الحيوي:

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

V- طرق استخلاص، فصل و تنقية المركبات الفلافونيدية:

I-V- الاستخلاص:

بعد قطف المادة النباتية و تجفيفها بعيدا عن أشعة الشمس يتم تقطيعها أو طحنها لتتقع في محلول كحولي (ماء-كحول) بنسبة (8\2) أو (7\3) ثلاث مرات و في كل مرة ترشح و يركز الراشح بتبخير أكبر كمية من المحلول الهيدروكحولي أين نتحصل على المستخلص الخام الذي يعامل بالماء المقطر المغلى و يترك لمدة ليلة كاملة بعدها يرشح على ورق الترشيح و يحتفظ بالراشح. الراشح تتم تجزئته بواسطة استخلاص من نوع سائل-سائل و ذلك باستعمال مذيبات مختلفة القطبية بدءا بخلات الإيثيل يليه البوتانول العادي، تكرر العملية مع كل مذيب مرتان أو ثلاث مرات.

II-V- الفصل و التنقية:

يتم فصل و تنقية الفلافونيدات باستخدام طرق الفصل الكروماتوغرافي بأنواعها المختلفة:

- كروماتوغرافيا العمود (CC)
- كروماتوغرافيا الورق (CP)
- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)
- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)

VI- التعيين البنوي للفلافونيدات:

يعتمد التعيين البنوي للمركبات الفلافونيدية على:

1. الخواص الكروماتوغرافية:

هذه الأخيرة تعطينا فكرة أولية عن طبيعة الفلافونيد الذي بحوزتنا و تتمثل في:

▪ اللون الإستشعاعي:

يعطينا معلومات أولية عن البنية الكيميائية للمركب

▪ ثابت الإنحباس:

و يعرف بأنه المسافة المقطوعة من طرف المركب انطلاقا من نقطة البداية إلى المسافة المقطوعة من طرف المذيب من نفس النقطة، و هو قيمة مميزة للمركب في شروط كروماتوغرافية معينة (درجة الحرارة، المملص، طبيعة المادة الدامصة...).

يمكن عن طريق قيم ثابت الإنحباس و باستعمال شواهد معروفة التمييز فيما إذا كان المركب أجليكونا أو غليكوزيدا، بل و معرفة ما إذا كان هذا الأخير أحادي، ثنائي أو ثلاثي السكر [20-22].

2. طرق التحليل الطيفي:

2. 1. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية:

تعتبر من أهم التقنيات الطيفية المستعملة للتعرف على البنية الكيميائية للفلافونيدات، و يعتمد أساس هذه التقنية في كون كل مركب فلافونيدي له طيف إمتصاص مميز في الوسط الميثانولي، يتغير هذا الطيف (تحدث له إزاحات معينة) بإضافة كواشف معينة، و هذا التغيير يقودنا إلى معرفة بعض المعلومات على البنية الكيميائية للمركب. و يمكن أن نشير إلى تأثير مختلف هذه الكواشف فيما يلي:

○ طيف الإمتصاص في الوسط الميثانولي:

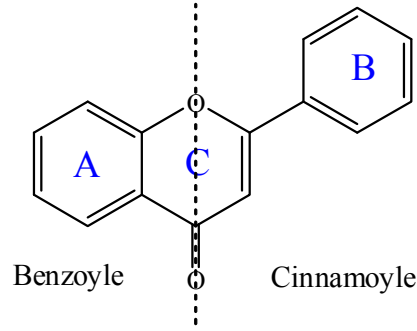
- طيف إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية للفلافونيدات في الوسط الميثانولي يعطي عصابتي إمتصاص:

I : عصابة I : قيمتها تكون محصورة في المجال (300-400 نم) و تنتج عن الشكل الرنيني

Cinnamoyl الناتج عن ترافق مجموعة كربونيل C_4 مع الحلقة البنزينية B.

II : عصابة II : قيمتها تكون محصورة في المجال (250-280 نم) و تنتج عن الشكل الرنيني Benzoyl

الناتج عن ترافق مجموعة كربونيل C_4 مع الحلقة البنزينية A.



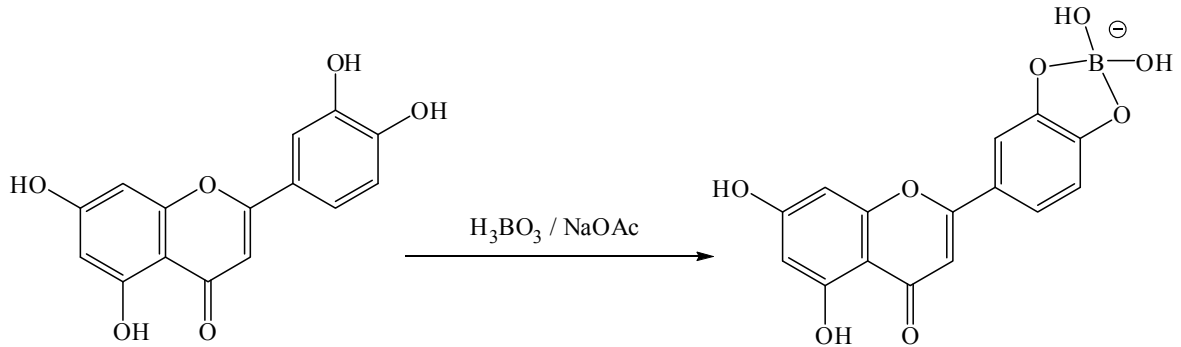
شكل-3- الأشكال الرنينية للفلافونيد

- وضعية العصابة I في الطيف الميثانولي تمكننا من معرفة ما إذا كان المركب فلافون أو فلافونول.

- تغيير عدد المستبدلات على الحلقة A يؤثر في العصابة II.
- تغيير عدد المستبدلات على الحلقة B و الحلقة C يؤثر على العصابة I.

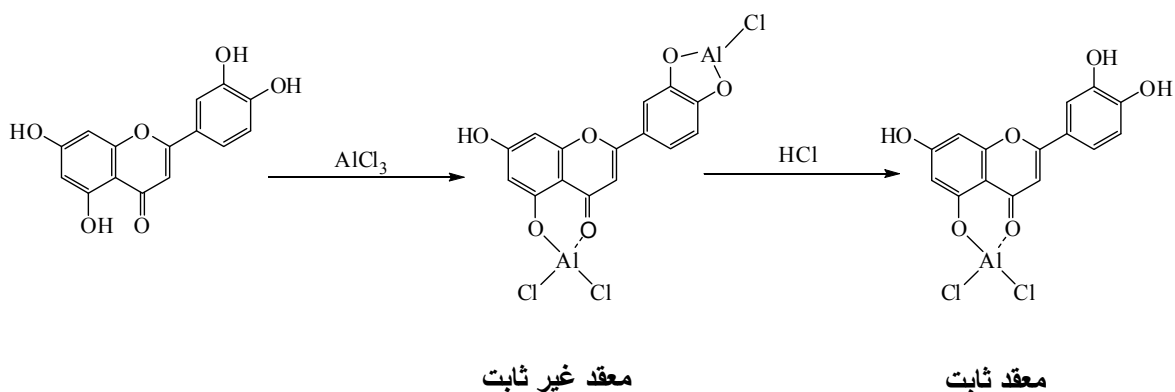
○ تأثير الكواشف على طيف الميثانول:

1. طيف NaOH أو (NaOMe): NaOH هو عبارة عن قاعدة قوية تؤين كل هيدروكسيلات الفلافونيد، يظهر تأثيرها خاصة على العصابة I.
2. طيف NaOAc: NaOAc عن قاعدة ضعيفة تؤين الهيدروكسيلات الأكثر حامضية فقط و هي كاشف نوعي لهيدروكسيل الموقع 7.
3. طيف NaOAc + H₃BO₃: يكون هذا الخليط معقدا مع الهيدروكسيلات في وضع ortho باستثناء الموضع C₅-C₆ [23،20].



شكل-4-: يوضح المعقد المتكوّن بين الفلافونويد و (NaOAc+H₃BO₃)

4. **طيف $AlCl_3$ و $AlCl_3+HCl$** : كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ يشكل معقدات ثابتة مع مجموعة كربونيل C_4 و هيدروكسيل الموضع C_3 أو C_5 ، و يكون معقدات غير ثابتة مع الفلافونيدات التي لها مجموعة أورثو ثنائي الهيدروكسيل هذا بعد إضافة حمض كلور الماء HCl [24].



شكل-5- المعقدات الثابتة و غير الثابتة بين الفلافونيد و $AlCl_3$ قبل و بعد إضافة HCl

و الجدول التالي يوضح مختلف التأثيرات المحتملة على طيف UV و تفسيراتها قبل و بعد إضافة الكواشف [25، 26]

جدول - 2 - تأثير مختلف الكواشف UV للفلافونيدات

الدليل	الإزاحة الكيميائية		الكاشف
	العصاية II (نم)	العصاية I (نم)	
Flavone Flavonol(3-OR) Flavonol(3-OH)	280-250 280-250 280-250	350-310 360-330 385-350	MeOH
OH 3,4'-OH 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 الامتصاص بمرور الزمن (تفكك الطيف) 45+ إلى 60 دون نقصان في شدة الامتصاص 45+ إلى 60 مع نقصان في شدة الامتصاص عصاية جديدة بين 335-320		NaOMe
7-OH 7-OH مع مستبدل أوكسجيني 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	$\Delta\lambda(I) < \Delta\lambda(II)$ NaOMe NaOAc	NaOAc
أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A (7,6) أو (8,7)	12+ إلى 36 إزاحة باتوكرومية 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)	HCl+ AlCl ₃ مقارنة بطيف HCl +AlCl ₃ مقارنة بطيف	30+ إلى 40+ مقارنة بطيف 20+ إلى 25+ مقارنة بطيف	AlCl ₃
5-OH مع وجود مجموعة أوكسجينية في C ₆ 5-OH مع عدم وجود مجموعة أوكسجينية 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 تغير		AlCl ₃ + HCl

كما سبق الذكر فإن مطيافية الأشعة فوق البنفسجية تعطينا معلومات وافية على الصيغة الكيميائية للفلافونيدات إلا أنها تبقى غير كافية لوضع الصيغة المفصلة النهائية لذا نلجأ إلى تقنيات أخرى:

2.2. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $^1\text{H-NMR}$:

هذه الأخيرة تمكننا من معرفة درجة تأكسد كل من الحلقات A، B و C كذلك تحدد لنا موقع و عدد السكريات المرتبطة بالأغليكون و حتى نوع الرابطة بينهما كما أنها تحدد لنا موقع و عدد مجموعات الميثوكسيل و غيرها من المجموعات الكيميائية في المركب [27،28]. طيف هذه التقنية يظهر لنا:

- الإزاحة الكيميائية للبروتونات الموزعة على كل من الحلقات A، B و C و كذا بروتونات السكر أو السكريات المرتبطة بالجزء الأغليكوني إن وجدت.
- التكامل كما في حالة OCH_3 و CH_3 .
- يمكن حساب ثابتات التزاوج التي تمكننا من أخذ فكرة على تموضع البروتونات. تتوزع بروتونات المركب الفلافونيدي من خلال مجموعات:

1- البروتونات الأروماتية:

وتظهر من خلال:

بروتونات الحلقة A:

يتوقف إنزياح بروتوني الحلقة A في حالة الفلافون و الفلافونول على طبيعة المستبدلات الموجودة في الموقعين C_5 و C_7 إن وجدت، ففي حالة وجود ميثوكسيل أو سكر مرتبط بالكربون C_7 تنزاح إشارتي البروتونين السابقين نحو المجال (6.33-6.48 ppm) بالنسبة لـ H_6 و عند (6.71-6.93 ppm) بالنسبة لـ H_8 .

أما وجود ميثوكسيل أو سكر مرتبط بالكربون C_5 يؤثر بشكل كبير في إنزياح إشارتي H_6 و H_8 . أما في حالة وجود ثلاث مستبدلات على الحلقة A فإن إنزياح إشارة البروتون المتبقي على الحلقة A في هذه الحالة تتداخل إشارته مع إشارة بروتون H_3 في حالة الفلافون.

بروتونات الحلقة B:

تكون قيم إنزياح بروتونات الحلقة B على حسب عدد المستبدلات و درجة تأكسد الحلقة C.

- إذا كان هناك مستبدل واحد على الحلقة B OH(OR) -4 تظهر على هذه الحلقة أربع بروتونات (H_3' - H_5') و (H_2' - H_6') و بسبب الدوران الحر للحلقة فإن كل زوج من هذه البروتونات يعطي

إشارة ثنائية ($J = 8-9 \text{ Hz}$) تكون إشارة الزوج ($H_5'-H_3'$) في المجال (6.90-6.96 ppm) أعلى من مجال إشارة الزوج ($H_6'-H_2'$) عند (7.79-8.10 ppm).

- في حالة ما إذا كانت الحلقة B ثنائية الإستبدال ($3',4'$ -di-OH) تظهر البروتونات الثلاث لهذه الحلقة كما يلي:

- H_6' كإشارة ثنائية-ثنائية ($J = 8.5\text{Hz}, 2.5\text{Hz}$) في المجال (7.20-7.65 ppm).
- H_2' كإشارة ثنائية ($J = 2.5 \text{ Hz}$) في المجال (7.20-7.60 ppm) فغالبا ما تتداخل مع إشارة H_6' .
- H_5' تظهر كإشارة ثنائية ($J = 8.5 \text{ Hz}$) في المجال (6.83-6.93 ppm).
- أما إذا كانت الحلقة B تحتوي على ثلاث مستبدلات ($3',4', 5'$ -tri-OH) فإن البروتونين H_2' و H_6' متكافئان و يظهران كإشارة أحادية عند 6.98 ppm.

بروتونات الحلقة C :

يظهر إنزياح إشارة بروتون الموقع 3 في منطقة إشارات بروتوني الحلقة A و هذا الإنزياح يتأثر بالمستبدلات الموجودة على الحلقتين A و B.

2- البروتونات الأليفاتية:

الجدول التالي يوضح قيم إنزياح بروتونات بعض المجموعات الكيميائية في مذيب $DMSO-d_6$:

المستبدل	$\delta(\text{ppm})$
OCH_3	3.75 - 3.95
$C-CH_3$	Flavone : 2.0 - 2.31
	Flavonol: 6-C- $\underline{CH_3}$ (2.0 - 2.1)
	8-C- $\underline{CH_3}$ (2.2 - 2.3)
$O-CH_2O$	5.67 - 6.15

جدول - 3 - قيم انزياح بروتونات بعض المجموعات الكيميائية في مذيب $DMSO-d_6$

3- بروتونات السكر:

أ) الجليكوزيدات أحادية السكر:

إشارة البروتون الأنوميري "H₁" للجزء السكري تظهر في مجال أخفض من بروتونات السكر الأخرى و ثابت التزاوج لهذا الأخير مع "H₂" تمكننا من التعرف على نوع الرابطة α أو β بين السكر و الأجليكون حيث يمتاز الغلوكوز بالرابطة β و يظهر "H₁" الخاص به على شكل إشارة ثنائية بثابت تزاوج ($J = 7 \text{ Hz}$) ناتجة عن تزاوج ثنائي محوري مع "H₂"، أما الرامنوز فيمتاز بالرابطة α و يظهر "H₁" الخاص به على شكل إشارة ثنائية بثابت تزاوج ($J = 2 \text{ Hz}$) ناتجة عن تزاوج استوائي- استوائي مع "H₂".

قيمة إنزياح إشارة "H₁" في طيف المركب تعطينا معلومات عن طبيعة السكر و موقع ارتباطه بالأجليكون حيث يمكن معرفة موقع ارتباط السكر بالموقعين 3 أو 7 من خلال قيمة إنزياح إشارة البروتون الأنوميري "H₁".

ملاحظة:

يمكن التعرف على سكر الرامنوز من خلال ظهور إشارة ثنائية لميثيله بثابت تزاوج ($J = 6 \text{ Hz}$) في المجال (0.8-1.2 ppm) [22]، تتغير قيمة إنزياح هذه الإشارة حسب موقع ارتباط الرامنوز بالأجليكون، ففي حالة ارتباطه بـ C-3 فإن إشارة الميثيل تظهر بين (0.72-0.86 ppm) بينما في حالة ارتباطه بـ C-7 فتظهر بين (1.04-1.21 ppm).

ب) الغليكوزيدات ثنائية السكر:

في هذه الحالة البروتون الأنوميري للسكر المرتبط مباشرة بالأجليكون يرن في مجال أخفض من البروتون الأنوميري للسكر المرتبط بالسكر الأول، و في حالة كون السكر النهائي هو من نوع apiofuranoside فإن بروتونه الأنوميري يرن في مجال أخفض من مجال البروتون الأنوميري للسكر الأول المرتبط بالأجليكون و الجدول التالي يعطي قيم الإنزياح الكيميائي للبروتونات الأنوميرية لبعض من الغليكوزيدات ثنائية السكر [29]:

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

جدول - 4 - قيم انزياح البروتونات الأنوميرية لبعض الغليكوزيدات ثنائية السكر في مذيب DMSO-d₆

3.2. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ¹³C :

تستعمل هذه التقنية للتعرف على:

- عدد ذرات الكربون في المركب.
- عدد مجموعات الميثوكسيل على الهيكل الفلافونيدي [27،28].

4.2. تقنيات الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد:

هناك العديد من المركبات الفلافونيدية التي تحتاج لتحديد بنيتها إلى اللجوء إلى تقنيات الرنين النووي ثنائية البعد نذكر منها:

➤ **تقنية ¹H-¹H COSY**: تظهر نقاط تعالق تسمح بتعيين البروتونات المتزاوجة مع بعضها البعض.

➤ **تقنية ¹H-¹³C HMQC**: تعطي نقاط تعالق بين كل بروتون و الكربون الحامل له.

➤ **تقنية ¹H-¹³C HMBC**: تعطي نقاط تعالق بين بروتون و ذرات الكربون المجاورة لذرة الكربون المتصل بها (قد يصل عدد ذرات الكربون هذه إلى ثلاث ذرات على الأكثر).

2.5 . مطيافية الكتلة:

تستعمل مطيافية الكتلة للتعرف على البنية الكيميائية لمركب ما، فهي تسمح بمعرفة الوزن كما أنها تسمح بتحديد الأيون الجزيئي و الشظايا التي تعطي عموماً عدد و طبيعة المستبدلات الهيدروكسيلية أو الميثوكسيلية [32]، و تكمن أهمية هذه التقنية في كون أنها لا تحتاج إلى كميات كبيرة من العينة و من بين التقنيات المستعملة:

✓ تقنية القذف الإلكتروني (EI):

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

✓ تقنية القذف السريع بالذرات FAB :

تسمح هذه التقنية بمعرفة الأيون الجزيئي و طبيعة السكر [31]، تطبيق هذه التقنية مع الغليكوزيدات يمكننا من الحصول على معلومات فيما يخص الجزء السكري منها، و إضافة إلى أيونات التشخيصية العادية المميزة للفلافونيدات نحصل على قمم موافقة لأيونات شبه الجزيئية من الشكل: $[M+K]^+$ ، $[M+Na]^+$ ، $[M+H]^+$ ، $[M-H]^+$... و هذا في حالة FAB^+ ، و تكوين أيونات سالبة في حالة FAB^- [32].

✓ تقنية التأين بالرذاذ الكهربائي (الإلكتروسبراي ES):

تعتبر هذه التقنية أحدث من FAB و تختلف عنها في الطريقة العملية، حيث تسمح بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة من البروتينات و الجزيئات الصغيرة سهلة التكسير مثل المضادات الحيوية و المبيدات [31].

أما بالنسبة للفلافونيدات فتستعمل تقنية الإلكتروسبراي ES لدراسة المركبات سهلة التكسير مثل O-glycoside.

✓ تقنية التأين الكيميائي (CI) و تقنية التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (API):

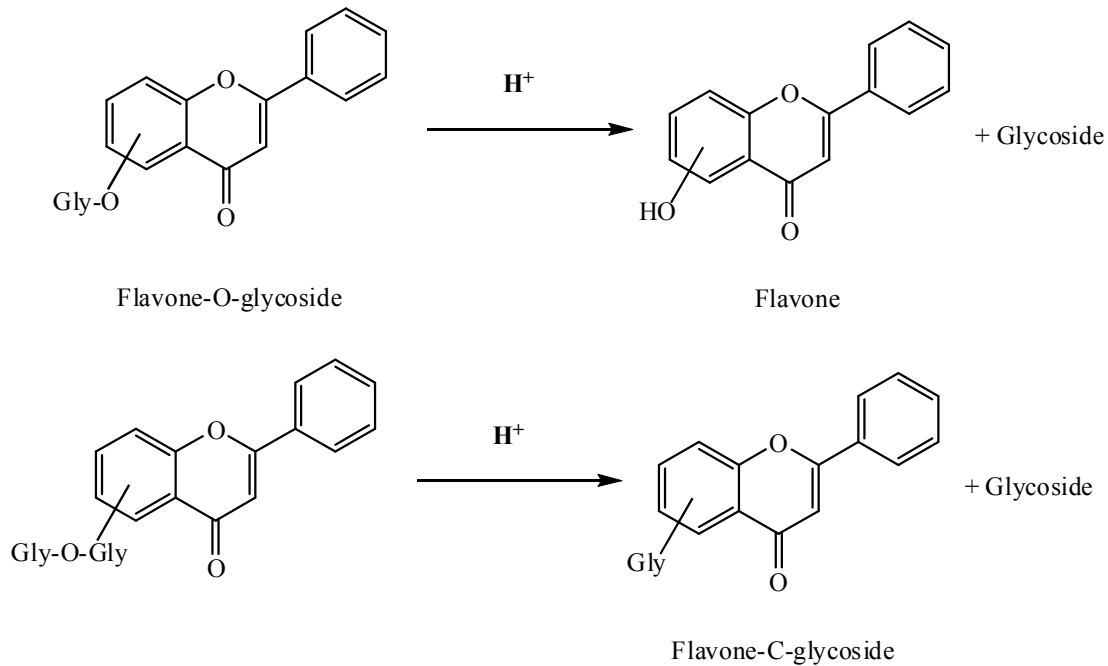
لهما نفس المبدأ حيث تعتمدان على التفاعلات (أيون-جزيء)، يتم اختيار الغاز المتفاعل حسب ألفة المركب المدروس للبروتونات و من الغازات المتفاعلة المستعملة CH_4 ، و يكمن الاختلاف الوحيد بين التقنيتين في أن تقنية API يتم العمل فيها تحت الضغط الجوي و تستعمل بالخصوص في تحليل المركبات المفصولة عند استعمال الكروماتوغرافيا السائلة [32].

2. 6 . تقنية *HPLC-UV-DAD* بالتزاوج مع مطيافية الكتلة:

هي تقنية تتمثل في تزاوج لـ *HPLC* من جهة مع كاشف UV بصمام ثنائي و من جهة أخرى مع مطيافية الكتلة مجهزة بمنبع تأين *APJ-ES+* و *APJ-ES*. حيث يعطي تزاوج *HPLC-UV-DAD* طيف UV موافق لكل قمة في الكروماتوغرام، في حين يعطي تزاوج *HPLC-MS* وفقا لطريقة التأين المستخدمة الكتلة الجزيئية لكل مركب، أما المعلومات المستخلصة من سلوك *HPLC* هي زمن الإحتباس t_R . تقارن النتائج المتحصل عليها لكل من UV، MS، t_R مع بيانات لمركبات أخرى مخزنة سابقا في بنك المعطيات و منه يمكن التعرف على طبيعة المركبات التي تكون بحوزتنا.

VII- الحلمة الحمضية:

تستعمل هذه الأخيرة لمعرفة طبيعة السكر المرتبط بالمركبات الغليكوزيدية المفصولة، كما أنها تعطينا فكرة عن ما إذا كان المركب غليكوزيدا من نوع O-glycosyle أو C-glycosyle لأن الرابطة من النوع الثاني (أي C-glycosyle) مقاومة للتحليل الحمضي، فيستفاد من هذه الخاصية في تمييز هذا النوع من الروابط عن النوع الأول (أي O-glycosyle)، وفيما يلي شكل يبين الإماهة الحمضية للفلافونيدات الغليكوزيدية في حالة O-glycosyle و C-glycosyle [33].



يتم خلال عملية الحلمة الحمضية فصل الجزء السكري عن الجزء الأغليكوني و هذا في حالة الفلافونيدات من النوع O-glycoside حيث يتم تحطيم الرابطة (كربون - أكسجين) الموجودة بين السكر والأغليكون.

و يتحقق ذلك بإضافة حمض HCl (4N) إلى المركب السكري بنفس الكمية ليوضع الخليط في حمام مائي تحت 100° م لمدة ساعة في النهاية يكون لدينا المحلول الذي يحتوي على الجزئين (السكري و الأغليكوني)، فصل هذين الأخيرين يتم بواسطة عملية استخلاص من نوع سائل-سائل و باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية بدءا بإيثير ثنائي الإثيل يليه استخلاص ثاني للطبقة المائية بواسطة خلاص الإيثيل وأخيرا البوتانول النظامي، تركز الطبقة العضوية الحاوية على الأغليكون الذي يمكن التعرف عليه بتسجيل طيف (UV) وكذا بإجراء كروماتوغرافي (CCM) مع شواهد أغليكونية.

أما الجزء السكري فيبقى مذابا في الطبقة المائية التي يتم تجفيفها كي تستعمل لاحقا.

التعرف على نوع السكر المنفصل يعتمد على تحضير ألواح كروماتوغرافية من Gel de silice 60F₂₅₄ ترش بمحلول (0,2M) NaH₂PO₄ (المحضر في الماء المقطر) تترك لتجف في الهواء ثم توضع في فرن تحت درجة حرارة 100° م لمدة ساعة كاملة، يعاد إذابة الطبقة المائية الحاوية على الجزء السكري في قطرات من الماء و بواسطة ماصة توضع نقاط منها على اللوح الكروماتوغرافي المحضر سابقا مع بعض شواهد سكرية معروفة، ليغمس اللوح في مملص يحتوي على (أسيتون: ماء) بنسبة (9:1) وبعد هجرة البقع السكرية يستخرج اللوح الكروماتوغرافي ليجف في الهواء، ثم يعاد وضعه مرة ثانية في نفس المملص السابق يستخرج بعدها ليجف لمدة ساعة ثم يرش بواسطة كاشف مالونات الأنيلين (حمض المالونات 1غ- حمض الفوسفوريك 3ملل- الأنيلين 1ملل- الإيثانول 100 ملل) و يترك لوضع دقائق ليجف في الهواء بعد ذلك يوضع في الفرن تحت درجة حرارة 100° م لمدة 5 دقائق، حيث تبدأ بقع السكريات في الظهور فتكون بنية اللون بالعين المجردة و صفراء عند رؤيتها تحت أشعة UV، عندها يتم التعرف على السكريات المراد معرفتها بمقارنتها مع الشواهد السكرية المستعملة.

المراجع

- [1] Schijlen, E. G. W. M., Ric de Vos, C. H., Tunen, A. J. Van., Bovy, A. G. (2004). «Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants». *Phytochemistry*, 65, 2631.
- [2] Harborne, J. B., Mabry, T. J. (1982). *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London, New York.
- [3] Harborne, J. B. (1973). In «*Phytochemistry*» (Lawrence, P. L. ed). II, 334, Litton Educational Publishing Inc.
- [4] Wollenweber, E., Dietz. V. II. (1980). Flavonoid patterns in the farina of goldback and silver-back ferns. *Biochem. Syst. & Ecol.*, 8, 21.
- [5] Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants, determination of radical scavenging efficiencies methods. *Enzymol*, 343.
- [6] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radi. Biol. Med.*, 20, 933.
- [7] VanAcker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H.V., Bennekom, W.P., Van der vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radi. Biol. Med*, 20, 331.
- [8] Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., Van Acker, F.A.A., Van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers, the role of the hydroxyl groups, *Toxicol. In vitro*, 5, 3.
- [9] Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J.C. Barre-Sinoussi, F. (1989). Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7-Trihydroxyflavone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160, 982.
- [10] Lin, Y.M., Anderson, H., Flavin, M.T. et al. (1997). *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *J. Nat. Prod.*, 60, 884.
- [11] Critchfield, J.W., Butera, S.T. and Folks, T.M. (1996). Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds, *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 1, 39.
- [12] Elber, G. and Wagner, H. (1992). *Planta Med.*, 57, 137.
- [13] Middleton, E.J.R. and Kandasuwami, C. (1992). *Biochem. Pharmacol.*, 43, (6), 1167.
- [14] Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994). Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of *Acitrus* Bioflavonoids, Hesperidin, and the

- isoflavonoids, Duartin and Clausse quinone in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 118.
- [15] Sankawa, U. Chum, Y.T. (1985). *Advances in Chinese*.
- [16] Matsuda, H. Yano, M., Kubo, M., Linuma, M., Oyama, M. Mizuno, M. (1991). Pharmacological study on citrus fruits unshiu markovich (2) on flavonoid components, *Yakugata Zasshi*, 111, 193.
- [17] Wagner, H. Wirer, M., Bauer, R. (1986). *Planta Med.*, 184.
- [18] Murakami, N. Mostaqul, H.M., Tamura, S. Itagak, S. Horü, T.T. (2001). A new anti malarial flavonol glycoside from hydrangeae *dulcis folium (Hydrangea macrophylla)*. *Bivorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 2445.
- [19] Kelly, S., Guilherme, E. N., Meri, E. F., Ânderson, L., Alba. R. M., Clélia, A. H., José, M., Leônia, M.B. (2009). Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules*, 14, 979.
- [20] Berthillier, A. (1972). *La chromatographie et ses applications*. Dunod, 51.
- [21] Mabry, T. J., Markham K. R., Thomas M. B. (1970). *The systhematic identifications of flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin, 13.
- [22] Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Acadmic Press London, 21.
- [23] Bacon, J. D, Mabry, T. J., Mears, J. A. (1976). *Latino. Amer. Quinn.* 7, 83.
- [24] Mabry, T. J., Markham K. R., Thomas M. B. (1970). *The systhematic identifications of flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin, 52.
- [25] Riberau-Gayou, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris.
- [26] Markham, K. R., Mabry T. J. (1975). In *the flavonoids*. Harborne, J. B, Mabry, T. J and Mabry. H, Chapman and Hall, London.
- [27] Wilson, R. G., Bowie, J. H., Williams, D. H. (1968). Solvent effects in NMR Spectroscopy : Solvent shifts of methoxyl resonances in flavones induced by benzene; an aid to structure elucidation. *Tetrahedron*, 24, 1407.
- [28] Rodriguez, E., Carman, N.J., Mabry, T. J. (1972). *Phytochemistry*, 11, 409.
- [29] Markham, K. R., Geiger H. (1994). ¹H Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In *The Flavonoids: Harborne J.B, Chapman & Hall*. London.
- [30] Neilson, J. G., Moller, J. (1970). *Acta. Chem. Scand.*, 24, 2665.

- [31] Becchi, M., Fraisse D. (1989). Fast atom Bombardment and fast atom Bombardment, collision activated-dissociation/mass-analysis ion Kinetic energy analysis of C glycosidic flavonoids. Biomed. & Environmental mass spectromet., 18, 122.
- [32] Constantin, E., Schnell, A. (1986). «Spectroscopie de masse: principes et application», Technique et documentation- Lavoisier, Paris.
- [33] Gonnet, J.F. (1973). A propos de la photographie en couleur de chromatographie sur couches minces en lumière de Wood. J. chromato., 86.

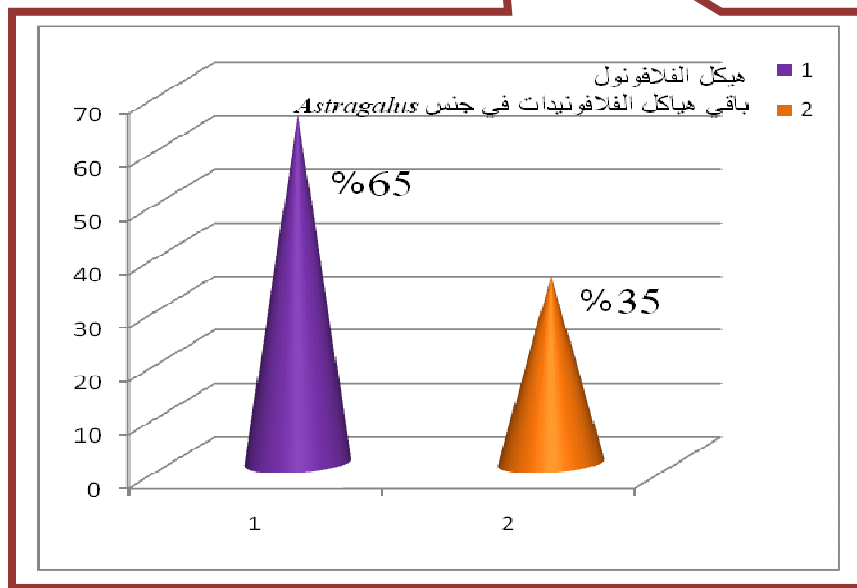
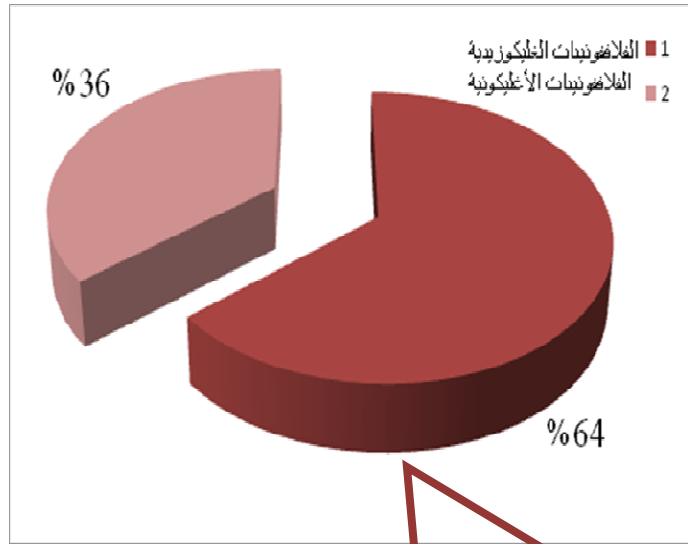
الفصل الثاني

دراسة بيئيوغرافية حول الجنس

Astragalus

توزيع الفلافونيدات عند الجنس النباتي *Astragalus*:

يتميز جنس *Astragalus* بكونه غني بالمركبات الطبيعية خاصة منها التربينات الثلاثية و الفلافونيدات هذا حسب ما بينته الدراسة البيبليوغرافية [1-2]، و قد انصب اهتمامنا على المركبات الفلافونيدية التي ظهرت تقريبا بجميع هياكلها في هذا الجنس من فلافون، فلافونول، إيزوفلافون... موزعة ما بين غليكوزيدية و أغليكونية و تعود النسبة الأكبر إلى الفلافونيدات الغليكوزيدية بحوالي 64%. دائما الدراسة البيبليوغرافية بينت ظهور هيكل الفلافونول في أشكاله معظمها Quercétine، Kaempférol، Isorhamnetine... بحوالي 65% من مجمل الفلافونيدات الغليكوزيدية موزعة ما بين أحادية، ثنائية، ثلاثية و رباعية السكر و الجدول 1- يوضح ذلك:



شكل-1- توزيع الفلافونيدات الغليكوزيدية و الأغليكونية عند جنس *Astragalus*

جدول 1- الفلافونيدات المعزولة من جنس *Astragalus*

الفلافونيد	البنية	النوع	المراجع
Apigénine	1 a	<i>A. lemna</i>	[1]
		<i>A. gypsophila</i>	[1]
		<i>A. ammodendron</i>	[3]
		<i>A. macropterum</i>	[4]
		<i>A. sieberi</i> DC.	[5]
		<i>A. floccosifolius</i>	[6]
		<i>A. tracicus</i>	[7]
		<i>A. peregrinus</i>	[8]
Lutéoline	1 b	<i>A. lemna</i>	[1]
		<i>A. gypsophila</i>	[1]
		<i>A. quisqualis</i>	[9]
		<i>A. coluteocarpus</i>	[10]
		<i>A. kabadianus</i>	[11]
		<i>A. cremophilos</i> Boiss.	[12]
		<i>A. quisqualis</i> Bunge	[13]
		<i>A. floccosifolius</i> Sumn.	[13]
<i>A. peregrinus</i>	[8]		
3',7- dihydroxyflavanone	2	<i>A. centralpinus</i>	[14]
4',5- diméthoxy-7- hydroxyflavane	3 a	<i>A. centralpinus</i>	[15]
4'-5- diméthoxy-7- hydroxyflavan -4-ol	3 b	<i>A. centralpinus</i>	[14]
Kaempférol	4 a	<i>A. melilotoides</i>	[16]
		<i>A. ammodendrom</i>	[3]
		<i>A. brachycarpus</i> M.B.	[17]
		<i>A. cicer</i>	[18]
		<i>A. quisqualis</i>	[9]
		<i>A. babatagi</i>	[19]
		<i>A. eupeplus</i>	[20]
		<i>A. macropterum</i>	[4]
		<i>A. bornmullerianus</i>	[21]
		<i>A. coluteocarpus</i>	[10]
		<i>A. subrobustus</i>	[22]
		<i>A. virgatus</i>	[23]
<i>A. kabadianus</i>	[11]		

		<i>A. membranaceus</i>	[24]
		<i>A. austrosibiricus</i> Schischk	[25]
		<i>A. onobrychis</i>	[26]
		<i>A. chinensis</i>	[27]
		<i>A. sieberi</i> DC.	[5]
		<i>A. torrentum</i>	[28]
		<i>A. floccosifolius</i>	[6]
		<i>A. cremophilos</i> Boiss.	[12]
		<i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao	[29]
Kumatakénine	4 b	<i>A. membranaceus</i>	[30]
Quercétine	4 c	<i>A. mongolicus</i>	[31]
		<i>A. melilotoides</i>	[16]
		<i>A. frigidus</i>	[32]
		<i>A. brachycarpus</i> M.B.	[17]
		<i>A. cicer</i>	[18]
		<i>A. levieri</i>	[33]
		<i>A. sevangensis</i>	[33]
		<i>A. quisqualis</i>	[9]
		<i>A. babatagi</i>	[19]
		<i>A. eupeplus</i>	[20]
		<i>A. macropterum</i>	[4]
		<i>A. bornmullerianus</i>	[21]
		<i>A. captiosus</i>	[34]
		<i>A. saganlugensis</i>	[35]
		<i>A. ciceroides</i>	[35]
		<i>A. coluteocarpus</i>	[10]
		<i>A. subrobustus</i>	[22]
		<i>A. virgatus</i>	[23]
		<i>A. kabadianus</i>	[11]
		<i>A. austrosibiricus</i>	[36]
		<i>A. inopinatus</i>	[36]
		<i>A. marinus</i>	[36]
		<i>A. karakuschensis</i>	[37]
		<i>A. membranaceus</i>	[24]

		<i>A. onobrychis</i> <i>A. sieberi</i> DC. <i>A. ponticus</i> Pall. <i>A. torrentum</i> <i>A. floccosifolius</i> <i>A. cremophilos</i> Boiss. <i>A. quiqualis</i> Bunge <i>A. floccosifolius</i> Sumn. <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao	[26] [5] [38] [28] [6] [12] [13] [13] [29]
Isorhamnetine	4 d	<i>A. novoascanicus</i> <i>A. mongolicus</i> <i>A. dasyanthus</i> <i>A. flexus</i> <i>A. cicer</i> <i>A. kabadianus</i> <i>A. austrosibiricus</i> <i>A. inopinatus</i> <i>A. marinus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. austrosibiricus</i> Schischk <i>A. floccosifolius</i> <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao	[39] [31] [38] [41] [18] [11] [36] [36] [36] [24] [25] [6] [29]
Rhamnetine	4 e	<i>A. floccosifolius</i>	[6]
3- méthoxyisorhamnetine	4 f	<i>A. centralpinus</i> <i>A. centralpinus</i>	[14] [15]
3,5,7,3'- tetraméthoxy -4'- hydroxyflavone	4 g	<i>A. centralpinus</i>	[15]
Kaempferide	4 h	<i>A. complanatus</i> R.Br.	[42]

Rhamnocitrine	4 i	<i>A. mongolicus</i> <i>A. hamosus</i>	[31] [43]
Myricetine	4 j	<i>A. quisqualis</i> Bunge <i>A. floccosifolius</i> Sumn. <i>A. complanatus</i> R.Br. <i>A. sinicus</i>	[13] [13] [42] [44]
Cosmosiine	5 a	<i>A. ammodendron</i> <i>A. macropterum</i> <i>A. cremophilos</i> Boiss. <i>A. kadshorensis</i> <i>A. peregrinus</i>	[3] [4] [12] [45] [43]
Luteolin-7- <i>O</i> - glucoside (cinaroside)	5 b	<i>A. lemna</i> <i>A. gypsophila</i> <i>A. cremophilos</i> Boiss.	[1] [1] [12]
Saponaretine (isovitexine)	5 c	<i>A. lemna</i> <i>A. gypsophila</i>	[1] [1]
Orientine	5 d	<i>A. lemna</i> <i>A. gypsophila</i>	[1] [1]
Vitexine	5 e	<i>A. lemna</i> <i>A. gypsophila</i>	[1] [1]
Apigenin-7- <i>O</i> -rutinoside	6 a	<i>A. onobrychis</i>	[26]
Apigenin-7- <i>O</i> -neohesperidoside	6 b	<i>A. peregrinus</i> <i>A. peregrinus</i>	[8] [43]
Luteolin-7- <i>O</i> - rutinoside (scolymoside)	6 c	<i>A. melilotoides</i>	[16]
Astragaline	7 a	<i>A. lemna</i> <i>A. gupsophila</i> <i>A. galegifolius</i> <i>A. maximus</i> <i>A. testiculatus</i> <i>A. ammodendron</i> <i>A. flexus</i> <i>A. angustifolius</i> Lam. <i>A. brachycarpus</i> <i>A. polygala</i> <i>A. onobrychis</i> <i>A. lasioglottis</i>	[1] [1] [46] [46] [47] [3] [41] [48] [49] [49] [50] [50]

		<i>A. livieri</i>	[33]
		<i>A. sevangensis</i>	[33]
		<i>A. bornmullerianus</i>	[21]
		<i>A. captiosus</i>	[34]
		<i>A. saganlugensis</i>	[35]
		<i>A. lagurus</i>	[51]
		<i>A. arguricus</i>	[52]
		<i>A. interpositus</i>	[52]
		<i>A. goktschaicus</i>	[52]
		<i>A. bungeanus</i>	[52]
		<i>A. circassicus</i>	[52]
		<i>A. sevangensis</i>	[52]
		<i>A. ciceroides</i>	[35]
		<i>A. coluteocarpus</i>	[10]
		<i>A. subrobustus</i>	[22]
		<i>A. dipelta</i>	[53]
		<i>A. virgatus</i>	[23]
		<i>A. complanatus</i> R.Br.	[42]
		<i>A. karakuschensis</i>	[37]
		<i>A. torrentum</i>	[28]
		<i>A. floccosifolius</i>	[6]
		<i>A. glycyphyllos</i> L.	[54]
		<i>A. cremopilos</i> Boiss.	[12]
		<i>A. galgiformis</i>	[55]
		<i>A. sieberi</i> DC.	[5]
		<i>A. tana</i>	[56]
		<i>A. spinosus</i>	[57]
Trifoline	7 b	<i>A. galegifolius</i>	[46]
		<i>A. maximus</i>	[46]
		<i>A. brachycarpus</i> M.B.	[17]
		<i>A. subrobustus</i>	[22]
		<i>A. dipelta</i>	[53]
		<i>A. adsurgens</i>	[58]
		<i>A. torrentum</i>	[28]
		<i>A. lagurus</i>	[51]
		<i>A. sevangensis</i>	[52]
		<i>A. circassicus</i>	[52]
		<i>A. bungeanus</i>	[52]

		<i>A. goktschaicus</i>	[52]
		<i>A. arguricus</i>	[52]
		<i>A. interpositus</i>	[52]
4'-Méthoxykaempférol-3- glucoside	7 c	<i>A. mongholicus</i>	[59]
Quercétin –3- glucoside (isoquercitrine)	7 d	<i>A. captiosus</i>	[34]
		<i>A. membranaceus</i>	[60]
		<i>A. ponticus</i> Pall.	[38]
		<i>A. frigidus</i>	[32]
		<i>A. angustifolus</i> Lam.	[48]
		<i>A. brachycarpus</i> M.B.	[17]
		<i>A. brachycarpus</i>	[49]
		<i>A. onobrychis</i>	[50]
		<i>A. bornmullerianus</i>	[21]
		<i>A. ciceroides</i>	[35]
		<i>A. saganlugensis</i>	[35]
		<i>A. virgatus</i>	[23]
		<i>A. lagurus</i>	[51]
		<i>A. sevangensis</i>	[52]
		<i>A. circassicus</i>	[52]
		<i>A. bungeanus</i>	[52]
		<i>A. goktschaicus</i>	[52]
		<i>A. interpositus</i>	[52]
		<i>A. arguricus</i>	[52]
		<i>A. membranaceus</i>	[29]
		(Fish.) Bge. var.	
		<i>mongholicus</i> (Bge.)	
		Hsiao	
		<i>A. mongholicus</i>	[59]
Quercétin- 3-O- rhamnoside	7 e	<i>A. cremophilos</i> Boiss	[12]
		<i>A. melilotoides</i>	[16]
		<i>A. frigidus</i>	[32]
		<i>A. babatagi</i>	[19]
		<i>A. bornmullerianus</i>	[21]
		<i>A. floccosifoliers</i>	[6]
		<i>A. lagurus</i>	[51]
		<i>A. sevangensis</i>	[52]
		<i>A. circassicus</i>	[52]
		<i>A. bungeanus</i>	[52]

		<i>A. goktschaicus</i>	[52]
		<i>A. interpositus</i>	[52]
		<i>A. arguricus</i>	[52]
Quercétin- 3- <i>O</i> - galactoside	7 f	<i>A. sevangensis</i>	[33]
		<i>A. levieri</i>	[33]
		<i>A. quisqualis</i>	[9]
		<i>A. batatagi</i>	[19]
		<i>A. eupeplus</i>	[20]
		<i>A. macropterum</i>	[4]
		<i>A. coluteocarpus</i>	[10]
		<i>A. subrobustus</i>	[22]
		<i>A. karakuschensis</i>	[37]
		<i>A. pontius</i> Pall.	[38]
		<i>A. lagurus</i>	[51]
		<i>A. circassicus</i>	[52]
		<i>A. bungeanus</i>	[52]
		<i>A. goktschaicus</i>	[52]
		<i>A. interpositus</i>	[52]
		<i>A. arguricus</i>	[52]
		<i>A. sevangensis</i>	[52]
		<i>A. brachycarpus</i> M.B.	[17]
Isorhamnetin -3- <i>O</i> - β -D- galactoside	7 g	<i>A. kabadianus</i>	[11]
		<i>A. floccosifolus</i>	[6]
Isorhamnetin -3- <i>O</i> - β -D- glucoside	7 h	<i>A. mongholicus</i>	[59]
		<i>A. flexus</i>	[41]
		<i>A. cicer</i>	[18]
		<i>A. captiosus</i>	[34]
		<i>A. saganlugensis</i>	[35]
		<i>A. adsurgens</i>	[58]
		<i>A. virgatus</i>	[23]
		<i>A. angustifolius</i> Lam.	[61]
		<i>A. centralpinus</i>	[15]
		<i>A. mongholicus</i>	[15]
		<i>A. kabadianus</i>	[11]
		<i>A. floccosifolius</i>	[6]
		<i>A. karakuschensis</i>	[37]
		<i>A. glycyphyllos</i> L.	[54]
		<i>A. pubiflorus</i>	[62]

		<i>A. propinguus</i>	[63]
		<i>A. lusitanicus</i> Lam.	[64]
		<i>A. austrosibiricus</i>	[65]
Isorhamnetin-7- <i>O</i> -rhamnoside	7 i	<i>A. centralpinus</i> <i>A. austrosibiricus</i>	[15] [65]
Rhamnetin- 3- <i>O</i> - β -D-galactoside	7 j	<i>A. floccosifolus</i>	[6]
Rhamnocitrin- 3- glucoside	7 k	<i>A. complanatus</i> R.Br. <i>A. membranaceus</i> <i>A. complanatus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. hamosus</i>	[42] [60] [66] [67] [68]
Populnine	7 l	<i>A. dipelta</i> <i>A. virgatus</i> <i>A. lagurus</i> <i>A. polygala</i>	[53] [23] [51] [49]
Quercimeritrine	7 m	<i>A. flexus</i> <i>A. lagurus</i>	[69] [51]
4'- <i>O</i> - méthoxyquercetin 3- <i>O</i> - β -D-glucoside	7 n	<i>A. miser</i> Var. <i>Oblongifolius</i>	[70]
Kaempférol- 3-L- arabinoside	7 o	<i>A. angustifolius</i> Lam.	[61]
Isorhamnetin- 3-L- arabinoside	7 p	<i>A. angustifolius</i> Lam.	[61]
Kaempferide- 3- <i>O</i> - α -L- arabioside	7 q	<i>A. complanatus</i> R.Br.	[42]
Myricomplanoside	7 r	<i>A. complanatus</i> R.Br.	[42]
Myricetin-3'- <i>O</i> - β -D-glucoside	7 s	<i>A. sinicus</i>	[44]
Myricetin-3'- <i>O</i> - β -D-xyloside	7 t	<i>A. sinicus</i>	[44]
Isorhamnetin- 3- glucoside-7- rhamnoside	8 a	<i>A. adsurgens</i> <i>A. austrosibiricus</i>	[58] [65]
Isorhamnetin 3,7- diglucoside	8 b	<i>A. galegiformis</i>	[71]
Rhamnocitrin- 3,4'-di- <i>O</i> - β -D- glucoside (complanatuside)	8 c	<i>A. complanatus</i>	[72]
Dactiline	8 d	<i>A. galegiformis</i> <i>A. lasioglottis</i>	[71] [50]
kaempférol-3,7-diglucoside	8 e	<i>A. spinosus</i> Forsk.	[57]
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (rutine)	9 a	<i>A. frigidus</i> <i>A. Ponticus</i> pall. <i>A. melilotoides</i> <i>A. flexus</i>	[32] [73] [16] [69]

		<i>A. angustifolius</i> Lam. [48] <i>A. levieri</i> [33] <i>A. sevangensis</i> [33] <i>A. quisqualis</i> [9] <i>A. babatagi</i> [19] <i>A. eupeplus</i> [20] <i>A. macropterum</i> [4] <i>A. bornmullerianus</i> [21] <i>A. captiosus</i> [34] <i>A. ciceroides</i> [35] <i>A. saganlugensis</i> [35] <i>A. coluteocarpus</i> [10] <i>A. Kabadianus</i> [11] <i>A. kabakuschensis</i> [37] <i>A. torrentum</i> [28] <i>A. floccosifolius</i> [6] <i>A. cremophilos</i> Boiss. [12] <i>A. sevangensis</i> [52] <i>A. circassicus</i> [52] <i>A. bungeanus</i> [52] <i>A. goktschaicus</i> [52] <i>A. interpositus</i> [52] <i>A. arguricus</i> [52] <i>A. ponticus</i> Pal. [38] <i>A. membranaceus</i> [29] (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao.	
Isohamnetin -3-O-[β -D- glucosyl-(1→6)- β -D-glucoside] (Astragaloside)	9 b	<i>A. lemna</i> [1] <i>A. Gypsophila</i> [1] <i>A. pubiflorus</i> [39] <i>A. pubiflorus</i> [74] <i>A. dasyanthus</i> [40] <i>A. brachycarpus</i> [49] <i>A. onobrychis</i> [50] <i>A. centralpinus</i> [14] <i>A. membranaceus</i> [73] <i>A. torrentum</i> [28]	

		<i>A. membranaceus</i>	[75]
		<i>A. membranaceus</i>	[76]
Narcissine	9 c	<i>A. dasyanthus</i> <i>A. lusitanicus</i> Lam. <i>A. centralpinus</i> <i>A. livieri</i> <i>A. sevangensis</i> <i>A. virgatus</i> <i>A. torrentum</i> <i>A. galgiformis</i> <i>A. propinguns</i>	[77] [64] [14] [33] [33] [23] [28] [55] [63]
Kaempférol- 3- <i>O</i> - rutinose (nicotifoline)	9 d	<i>A. anagustifolius</i> Lam. <i>A. falcatus</i> <i>A. ammodendron</i> <i>A. sieberi</i> DC. <i>A. Ponticus</i> Pall. <i>A. tana</i>	[61] [78] [3] [5] [38] [56]
Quercétin –3- <i>O</i> -[β -D-xylosyl (1→2)- β -D-glucoside]	9 e	<i>A. sinicus</i>	[44]
Rhamnositrin- 3- <i>O</i> -gentiobioside	9 f	<i>A. hamosus</i>	[43]
Kaempférol- 3- <i>O</i> -gentiobioside	9 g	<i>A. spinosus</i> Forsk	[57]
Kaempférol- 3- <i>O</i> - β -robinoside-7- <i>O</i> - α -rhamnoside (robinine)	10	<i>A. falcatus</i> <i>A. polygala</i> <i>A. livieri</i>	[78] [49] [33]
		<i>A. sevangensis</i> <i>A. eupeplus</i> <i>A. adsurgens</i> <i>A. karakuchensis</i> <i>A. austrosibiricus</i> <i>A. falcatus</i> Lam. <i>A. torrentum</i> <i>A. johannis</i>	[33] [20] [58] [37] [65] [79] [28] [80]
Kaempférol-3- <i>O</i> -[β -D-Xylosyl (1 → 3)- α -L- rhamnosyl (1 → 6)]- β -D-galactoside	11 a	<i>A. caprinus</i>	[81]
Kaempférol –3- <i>O</i> -{[β -D-xylosyl (1→3)- α -L- rhamnosyl (1→6)]-[β -D-apiosyl (1→2)]}- β -D-galactoside	11 b	<i>A. caprinus</i>	[82]

Quercétin -3-O-{{[β -D-xylosyl (1→3)- α -L-rhamnosyl (1→6)] -[β -D-apiosyl (1→2)]}- β -D-galactoside	11 c	<i>A. caprinus</i>	[81]
Rhamnetin -3-O-{{[3-hydroxy-3-méthylglutaroyl (1→6)]- β -D-apiosyl (1→2)]}- β -D-galactoside	11 d	<i>A. caprinus</i>	[81]
Rhamnocitrin -3-O-{{[3-hydroxy-3-méthylglutaroyl-(1→6)]- β -D-apiosyl-(1→2)]}- β -D-galactoside	11 e	<i>A. caprinus</i>	[81]
Isorhamnetin-3-O-[α -L-rhamnosyl-(1→6)- β -D-galactoside]	11 f	<i>A. Vulneraria</i>	[83]
Kaempférol-3-O-[α -L-rhamnosyl-(1→6)- β -D-galactoside]	11 g	<i>A. Tana</i>	[56]
Isorhamnetin-3-O-[β -D-apiosyl-(1→2)-[α -L-rhamnosyl-(1→6)]- β -D-galactoside]	11 h	<i>A. Vulneraria</i>	[83]
Kaempférol -3-O-[[β -D-xylosyl (1→3)- α -L-rhamnosyl (1→6)] [α -L-rhamnosyl (1→2)]]- β -D-galactoside	11 i	<i>A. caprinus</i>	[84]
Quercétin -3-O- β -D-galactosyl-(6→1)- β -L-rhamnoside	11 j	<i>A. captiosus</i>	[34]
Kaempférol -3-O- β -D-galactosyl-(3",4")-di-O- α -L-Rhamnoside (ascaside)	11k	<i>A. caucasicus</i> <i>A. tana</i>	[85] [56]
Kaempférol -3- α -L-rhamnosyl-(1→2)-[α -L-rhamnosyl-(1→6)]- β -D-galactoside	11 l	<i>A. sieberi</i> DC.	[5]
Kaempférol -3-O- β -D-apiosyl-(1→2)-[α -L-rhamnosyl-(1→6)]- β -D-glucoside.	12a	<i>A. sinicus</i>	[44]
Kaempférol- 3-O- β -rutinoside -7-O- α -L-rhamnoside	12 b	<i>A. cicer</i>	[18]
(3R)-7-2'-3', trihydroxy-4'-méthoxy isoflavane	13 a	<i>A. membranaceus</i> Fish Bunge	[86]
(3R)-8,2'-dihydroxy-7,4'-diméthoxyisoflavane	13 b	<i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao <i>A. membranaceus</i>	[86] [73] [29] [87]

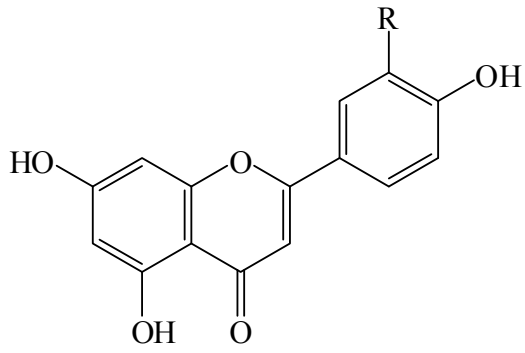
7-hydroxy -2',3',4'- trimethoxyisoflavane	13 c	<i>A. alexandrinus</i> <i>A. trigonus</i>	[88] [88]
(+)- mucronulatol ((+) (3R)-7,3'- dihydroxy -2',4'- diméthoxyisoflavane	13 d	<i>A. lusitanicus</i> Lam. <i>A. cicer</i>	[64] [89]
Isomucronulatol	13 e	<i>A. membranaceus</i>	[90]
7- <i>O</i> -méthylisomucronulatol	13 f	<i>A. mongholicus</i>	[91]
Isomucronulatol-7- <i>O</i> -glucoside	13g	<i>A. membranaceus</i>	[90]
(3R)-7,2'-dihydroxy-3',4'- diméthoxyisoflavan	13h	<i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i>	[92] [92]
Formononetine	14 a	<i>A. clusii</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i>	[93] [73] [94] [95] [96] [29] [90] [97] [92] [92] [98] [87]
8,3'- dihydroxy -7,4'-diméthoxyisoflavone	14 b	<i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i>	[73] [98] [87]
7,3'-dihydroxy -4'-méthoxyisoflavone (Calycosine)	14 c	<i>A. membranaceus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> Bge. Var. <i>mongholicus</i> Bge. <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> root <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao	[73] [94] [99] [95] [96] [29]

		<i>A. membranaceus</i>	[90]
		<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	[97]
		<i>A. mongholicus</i>	[92]
		<i>A. membranaceus</i>	[92]
		<i>A. membranaceus</i>	[98]
		<i>A. membranaceus</i>	[87]
		<i>A. membranaceus</i>	
Afromosine	14 d	<i>A. clusii</i>	[93]
7-hydroxy-3',5'-diméthoxyisoflavone	14 e	<i>A. peregrines</i>	[8]
Daidzeine	14 f	<i>A. peregrinus</i>	[8]
		<i>A. membranaceus</i>	[90]
		<i>A. peregrinus</i>	[43]
		<i>A. peregrines</i>	[101]
Genisteine	14 g	<i>A. peregrinus</i>	[8]
		<i>A. peregrinus</i>	[43]
		<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	[97]
		<i>A. peregrines</i>	[101]
Cajanine	14 h	<i>A. cicer</i>	[89]
-(3R)-8,2'-dihydroxy-7,4'- diméthoxyisoflavone	14 i	<i>A. membranaceus</i> var. <i>Mongholicus</i>	[97]
7-hydroxy-3',5'-diméthoxyisoflavone	14 j	<i>A. peregrines</i>	[101]
odoratin-7-O- β -D-glucoside	14 k	<i>A. membranaceus</i>	[98]
7,3'-dihydroxy-8,4'-diméthoxyisoflavone	14 l	<i>A. membranaceus</i>	[98]
(3S)-7,1'-dihydroxy-8,3'- diméthoxyisoflavane (8-méthoxyvestitol)	15	<i>A. alexandrinus</i>	[88]
		<i>A. trigonus</i>	[88]
3'-méthoxy-5'-hydroxyisoflavone 7-O- β - D-glucoside	16 a	<i>A. membranaceus</i>	[76]
		<i>A. membranaceus</i>	[102]
7,3'- dihydroxy-4' - méthoxyisoflavone 7- O- β -D- glucoside (Calycosin 7-O- glucoside)	16b	<i>A. mongholicus</i>	[94]
		<i>A. complanatus</i>	[66]
		<i>A. membranaceus</i>	[103]
		<i>A. membranaceus</i>	[104]
		<i>A. membranaceus</i> Bge.	[105]
		Var. <i>mongholicus</i> Bge.	
		<i>A. mongholicus</i>	[95]

		<i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao <i>A. membranaceus</i>	[95] [90] [97] [92] [92] [100] [106] [98]
Formononetin-7- <i>O</i> - β -D-glucoside (ononine)	16 c	<i>A. complanatus</i> <i>A. membranaceus</i> Bge. Var. <i>mongholicus</i> Bge. <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao <i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao	[66] [105] [95] [96] [29] [97] [92] [92] [106]
Astrozide (5-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone 7- β -D- glucoside)	16 d	<i>A. austriacus</i> <i>A. lemna</i> <i>A. gypsophila</i>	[107] [1] [1]
7-glucosyl-3'-hydroxy-4' - méthoxyisoflavone	16 e		[104]
2'-hydroxy-3',4'- diméthoxyisoflavone-7- <i>O</i> - β -D-glucoside	16 f	<i>A. membranaceus</i> var. <i>Mongholicus</i>	[96]
pratensein-7- <i>O</i> - β -D-glucoside	16 g	<i>A. membranaceus</i> var. <i>Mongholicus</i>	[96]
calycosin 7- <i>O</i> - β -D-glucoside-6"- <i>O</i> -	16 h	<i>A. membranaceus</i>	[92]

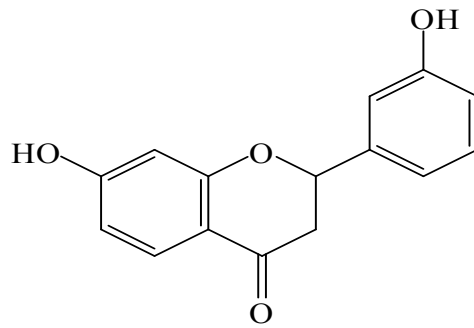
malonate			
formononetin 7- <i>O</i> - β -D-glucoside-6''- <i>O</i> -malonate	16 i	<i>A. membranaceus</i>	[92]
(3R)-(-)-7,2'-dihydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavan -7- <i>O</i> - β -D-glucoside	17a	<i>A. mongholicus</i> <i>A. chrysopterus</i> Bunge <i>A. membranaceus</i> var <i>mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> Bge. Var. <i>mongholicus</i> Bge <i>A. membranaceus</i> root <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i>	[94] [108] [109] [73] [110] [96] [92] [92]
Isomucronulatol 7,2'-di- <i>O</i> -glucoside	17 b	<i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i>	[91] [90]
5'-hydroxyisomucromulatol 2',5'-di- <i>O</i> -glucoside	17c	<i>A. mongholicus</i>	[91]
2'-hydroxy -3',4'- diméthoxyisoflavan-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	17 d	<i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i>	[73] [87]
2',4'-dimethoxy-3'-hydroxy-isoflavan-6- <i>O</i> - β -D-glucoside	17e	<i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao	[29]
7-hydroxy -2'- méthoxy-4',5'-méthylénedioxyisoflavane (Astracicerane)	18	<i>A. cicer</i> <i>A. cicer</i>	[111] [89]
6-hydroxy -7- méthoxy-3',4'-méthylénedioxyisoflavone (Acicerone)	19	<i>A. circassicus</i> <i>A. cicer</i> <i>A. cicer</i>	[52] [112] [89]
3,9-diméthoxynissoline	20 a	<i>A. mongholicus</i>	[91]
10-hydroxy-3, 9-diméthoxypterocarpane	20 b	<i>A. membranaceus</i> <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao <i>A. membranaceus</i>	[73] [29] [86]
(6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan	20 c	<i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i>	[92] [92]

(6aR, 11aR) 9,10-diméthoxypterocarpan-3- <i>O</i> -β-D-glucoside	20 d	<i>A. membranaceus</i> Bge. Var. <i>mongholicus</i> Bge. <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i> (Fish.) Bge. var. <i>mongholicus</i> (Bge.) Hsiao <i>A. membranaceus</i> var. <i>Mongholicus</i> <i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i>	[110] [95] [96] [94] [29] [97] [92] [92]
astrapterocarpanglucoside 6"- <i>O</i> -malonate	20 e	<i>A. mongholicus</i> <i>A. membranaceus</i>	[92] [92]
Maackiaine	21	<i>A. cicer</i>	[89]

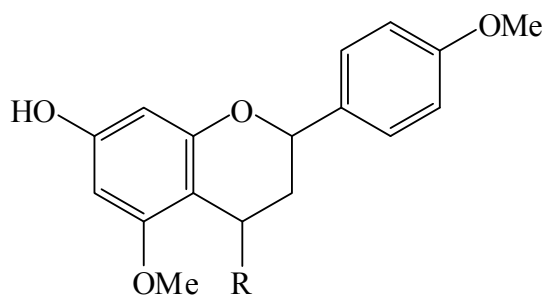


	R
a	H
b	OH

1

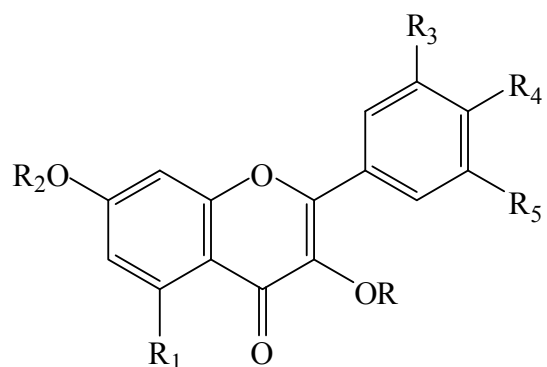


2



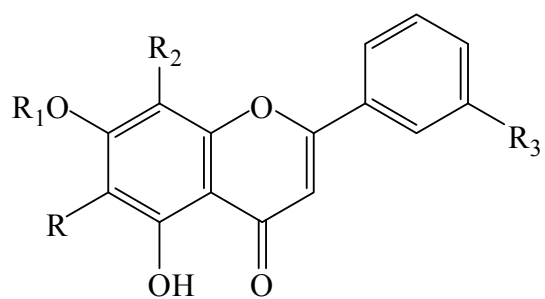
	R
a	H
b	OH

3



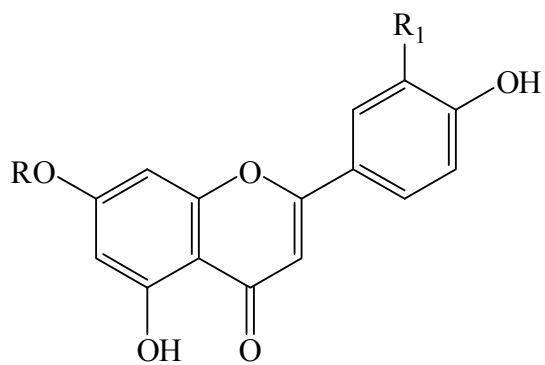
4

	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	H	OH	H	H	OH	H
b	CH ₃	OH	CH ₃	H	OH	H
c	H	OH	H	OH	OH	H
d	H	OH	H	OCH ₃	OH	H
e	H	OH	CH ₃	OH	OH	H
f	CH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	H
g	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃	OH	H
h	H	OH	H	H	OCH ₃	H
i	H	OH	CH ₃	H	OH	H
j	H	OH	H	OH	OH	OH



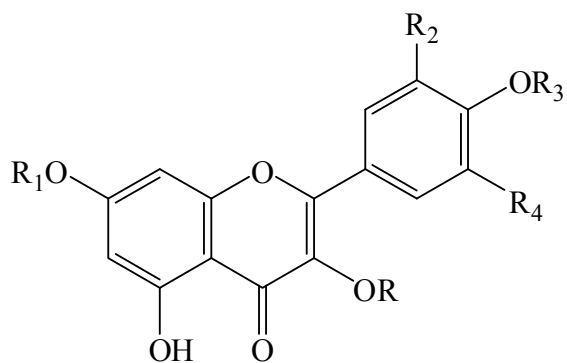
5

	R	R ₁	R ₂	R ₃
a	H	Glu	H	H
b	H	Glu	H	OH
c	Glu	H	H	H
d	H	H	Glu	OH
e	H	H	Glu	H



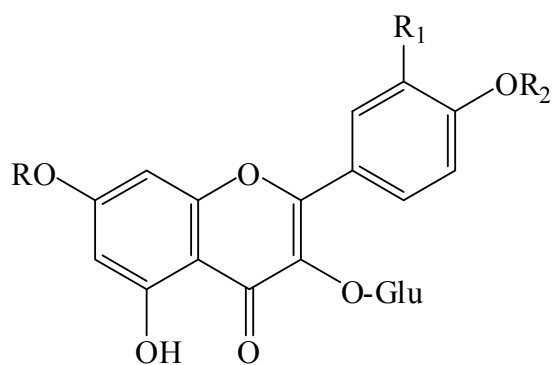
6

	R	R ₁
a	Rutinose	H
b	Neohesperidose	H
c	Rutinose	OH



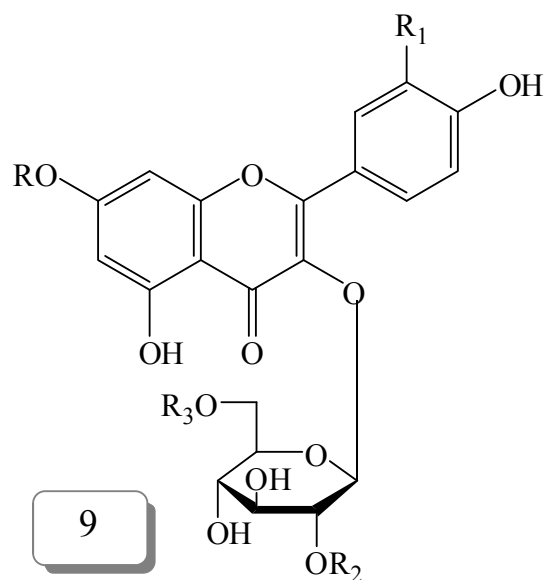
7

	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	Glu	H	H	H	H
b	Gal	H	H	H	H
c	Glu	H	H	Me	H
d	Glu	H	OH	H	H
e	Rha	H	OH	H	H
f	Gal	H	OH	H	H
g	Gal	H	OMe	H	H
h	Glu	H	OMe	H	H
i	H	Rha	OMe	H	H
j	Gal	Me	OH	H	H
k	Glu	Me	H	H	H
l	H	Glu	H	H	H
m	H	Glu	OH	H	H
n	Glu	H	OH	Me	H
o	Arab	H	H	H	H
p	Arab	H	OMe	H	H
q	Arab	H	H	Me	H
r	H	H	OMe	H	OGlu
s	H	H	OGlu	H	OH
t	H	H	OXyl	H	OH



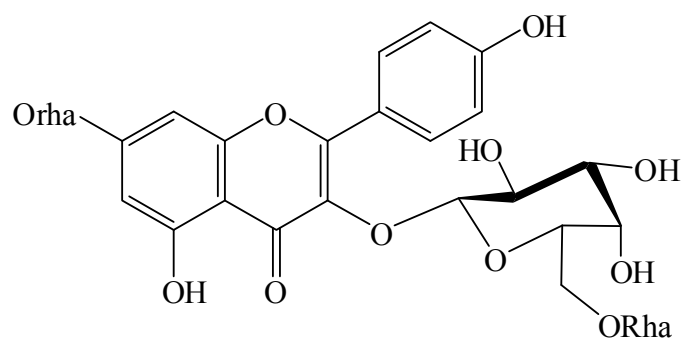
8

	R	R ₁	R ₂
a	Rha	OMe	H
b	Glu	OMe	H
c	Me	H	Glu
d	H	OMe	Glu
e	Glu	H	H

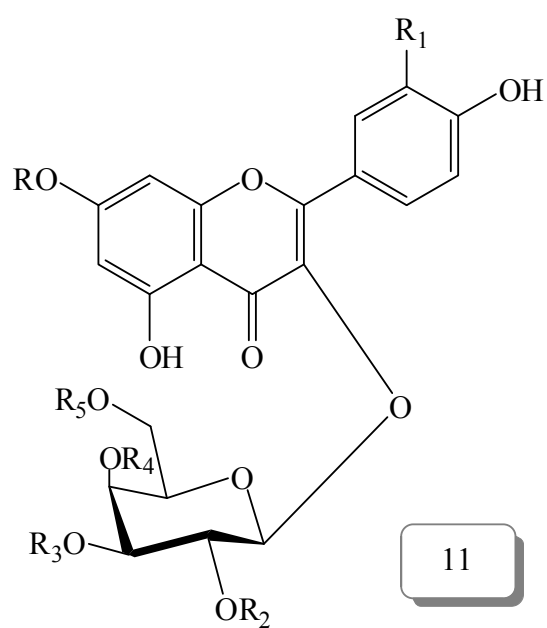


9

	R	R ₁	R ₂	R ₃
a	H	OH	H	Rha
b	H	OMe	H	Glu
c	H	OMe	H	Rha
d	H	H	H	Rha
e	H	OH	Xyl	H
f	Me	H	H	Glu
g	H	H	H	Glu

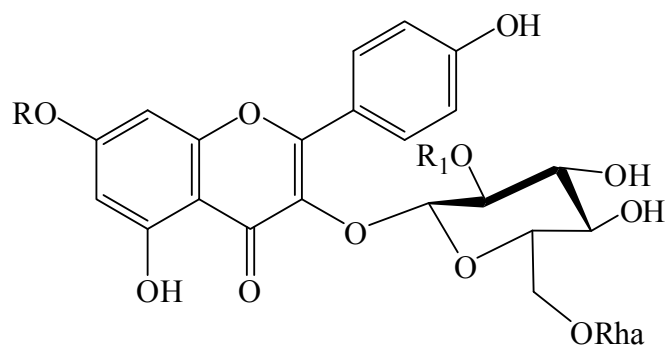


10



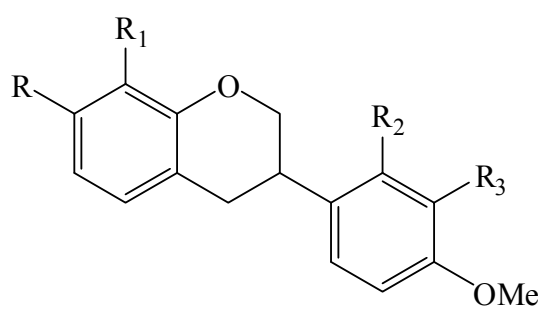
11

	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	H	H	H	H	H	-Rha-3-Xyl
b	H	H	Api	H	H	-Rha-3-Xyl
c	H	OH	Api	H	H	-Rha-3-Xyl
d	CH ₃	OH	Api	H	H	3-OH-3-CH ₃ -glut
e	CH ₃	H	Api	H	H	3-OH-3-CH ₃ -glut
f	H	OMe	H	H	H	Rha
g	H	H	H	H	H	Rha
h	H	OMe	Api	H	H	Rha
i	H	H	Rha	H	H	-Rha-3-Xyl
j	H	OH	H	H	H	Rha
k	H	H	H	Rha	Rha	H
l	H	H	Rha	H	H	Rha



	R	R ₁
a	H	Apio
b	Rha	H

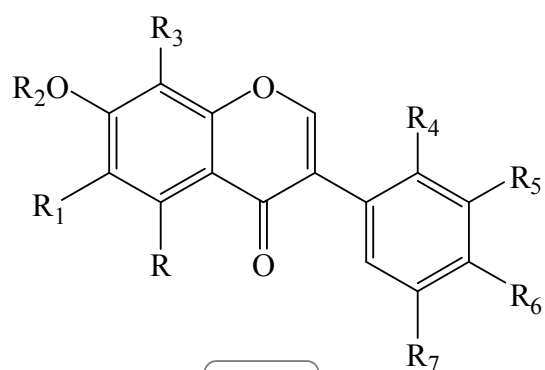
12



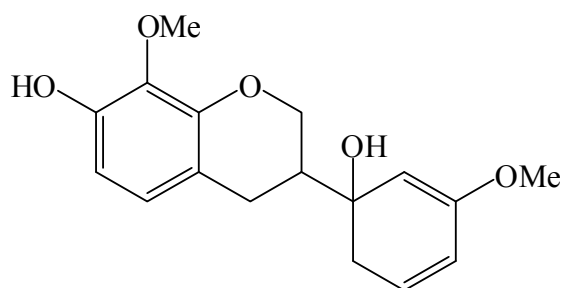
13

	R	R ₁	R ₂	R ₃
a	OH	H	OH	OH
b	OMe	OH	OH	H
c	OH	H	OMe	OMe
d	OH	H	OMe	OH
e	OH	H	OH	OMe
f	OMe	H	OH	OMe
g	OGlu	H	OH	OMe
h	OH	H	OH	OMe

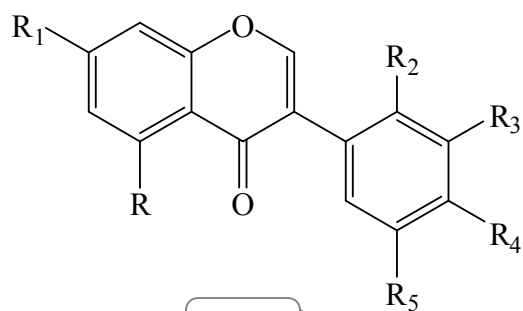
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
a	H	H	H	H	H	H	OMe	H
b	H	H	Me	OH	H	OH	OMe	H
c	H	H	H	H	H	OH	OMe	H
d	H	OH	H	H	H	H	OMe	H
e	H	H	H	H	H	OMe	H	OMe
f	H	H	H	H	H	H	OH	H
g	OH	H	H	H	H	H	OH	H
h	OH	H	Me	H	OH	H	OH	H
i	H	H	Me	OH	OH	H	OMe	H
j	H	H	H	H	H	OMe	H	OMe
k	H	OMe	H	H	H	OH	OMe	H
l	H	H	H	OMe	H	OH	OMe	H



14

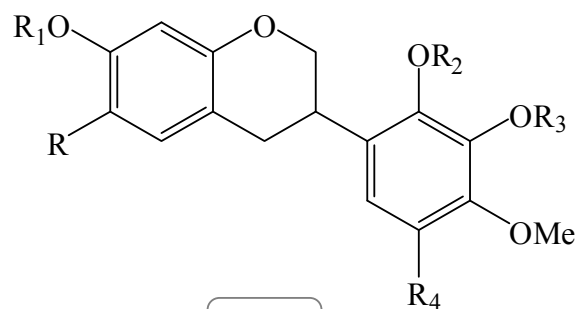


15



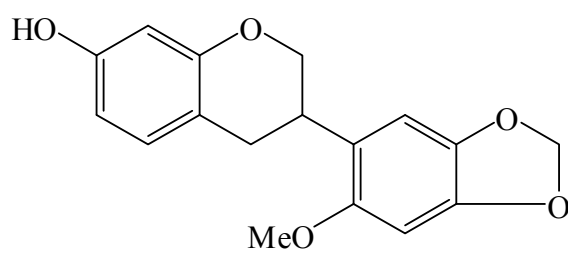
16

	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
a	H	OGlu	H	OMe	H	OH
b	H	OGlu	H	OH	OMe	H
c	H	OGlu	H	H	OMe	H
d	OH	OGlu	H	H	OMe	H
e	H	OGlu	H	OH	OMe	H
f	H	OGlu	OH	OMe	OMe	H
g	OH	OGlu	H	OH	OMe	H
h	H	O-6''-O-malonylglucosyl	H	OH	OMe	H
i	H	O-6''-O-malonylglucosyl	H	H	OMe	H

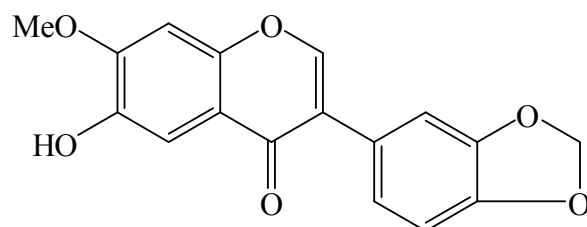


17

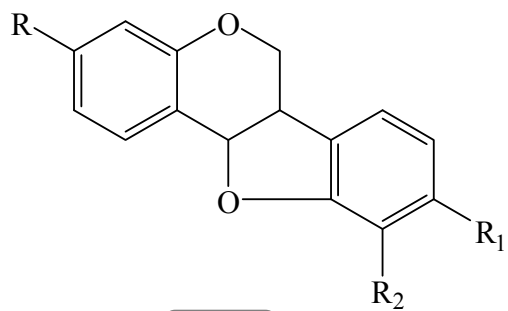
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
a	H	OGlu	H	Me	H
b	H	OGlu	Glu	Me	H
c	H	OH	Glu	Me	OGlu
d	H	OGlu	H	Me	H
e	OGlu	H	Me	H	H



18

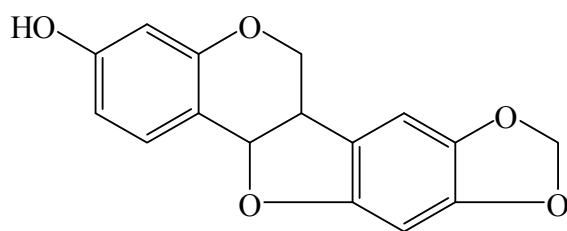


19



20

	R	R ₁	R ₂
a	OMe	OMe	OMe
b	OMe	OMe	OH
c	OH	OMe	OMe
d	OGLu	OMe	OMe
e	O-6''-O-malonyl glucosy	OMe	OMe



21

المراجع

- [1] Krivenchuk, P. E., Litvinenko, V. I., Maksyutina, N. P., Deryugina, L. I., Tikhonov, A. I., Darmograi V. N. (1968). Polyphenol compounds in some *Astragalus*, *Lemna*, and *Gypsophila* species. po Fenol'nym Soedineniyam, 104.
- [15] Takashima, J., Furui, M., Ryu, E., Ko, T (1995). Triterpene derivatives from *Astragalus complanatus*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 4 pp.
- [3] Khozhambergenova, P., Blinova, K. F. (1980). Flavonoids of *Astragalus ammodendron*. Khim. Prir. Soedin., 4, 566.
- [4] Yasinov, R. K. (1986). Flavonoids of *Astragalus macropterum*. Khim. Prir. Soedin., 4, 513.
- [5] El-Mawla, A. M. A. Abd., Attia, A. A. (2002). Production of flavonoids in cell cultures of *Astragalus sieberi* DC. Bull. Pharm. Sci., 1, 79.
- [6] Yasinov, R. K., Syrovezhko, N. V., Yakovlev, G. P., Ovcharenko, S. N. (1984). *Astragalus floccosifolius* flavonoids. Khim. Prir. Soedin., 4, 523.
- [7] Ionkova, I., Nikolov, S., Panova, D. (1984). Representatives of the genus *Astragalus* L: saponin and flavonoid aglycone content. Probl. Farm, 12, 43.
- [8] Abd El-latif, R. R., Shabana, M. H., El-Gandour, A. H., Mansour, R. M., Sharaf, M. (2003). A new isoflavone from *Astragalus peregrinus*. Nat. Comp., 6, 39.
- [9] Yasinov, R. K., Syrovezhko, N. V., Yakovlev, G. P. (1983). Flavonoids of *Astragalus quisqualis*. Khim. Prir. Soedin., 3, 387.
- [10] Yasinov, R. K., Aripova, Z. T. (1987). Flavonoids of *Astragalus coluteocarpus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 454.
- [11] Yasinov, R. K., Khaitov, I. Kh. (1988). Flavonoids of *Astragalus kabadianus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 450.
- [12] Makboul, M. A., El-Shanawany, M. A., Abdel-Baky, A. M. (1984). Study of the lipid and flavonoid contents of *Astragalus cremophilus* Boiss. growing in Egypt Bull. Pharm. Sci., 2, 380.
- [13] Barnaulov, O. D., Manicheva, O. A., Yasinov, R. K., Yakovlev, G. P. (1985). Evaluation of the effect of flavonoids from the aerial parts of *Astragalus quisqualis* Bunge and *A. floccosifolius* Sumn. on the development of experimental lesions in the mouse stomach. Rastit. Resur., 1, 85.

- [14] Marechkova, L., Kumanova, B. (1981). Isolation of flavonoids and some accompanying substances from the aboveground part of some *Astragalus centralpinus*, family: Leguminosae. Problemi na Farmatsiyata, 9, 63.
- [15] Paskhov, D., Marichkova, L. (1983). Flavonoids of *Astragalus centralpinus* and their effect on the smooth muscle of the gastrointestinal tract. Problemi na Farmatsiyata, 11, 36.
- [16] Makbul, M. A., Blinova, K. G. (1979). Flavonoids of *Astragalus melilotoides*. Khim. Prir. Soedin., 5, 725.
- [17] Alaniya, M. D., Kemertelidze, E. P. (1981). Chemical study of *Astragalus brachycarpus* M. B. Izv. Akad. Nauk Gruz. SSR, Ser. Khim., 2, 125.
- [18] Alaniya, M. D., Aneli, D. N., Patudin, A. V., Komelin, R. V. (1983). *Astragalus cicer* flavonoid glycosides. Khim. Prir. Soedin., 4, 528.
- [19] Yasinov, R. K., Yakovlev, G. P. (1986). Flavonoids of *Astragalus babatagi*. Khim. Prir. Soedin., 3, 373.
- [20] Yasinov, R. K. (1986). Flavonoids of *Astragalus eupeplus*. Khim. Prir. Soedin, 3, 376.
- [21] Yasinov, R. K., Syrovezhko, N. V., Yakovlev, G. P. (1986). Flavonoids of *Astragalus bornmullerianus*. Khim. Prir. Soedin., 6, 781.
- [22] Guzhva, N. N., Luk'yanchikov, M. S., Dranik, L. I. (1987). Phenolic compounds of *Astragalus subrobustus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 455.
- [23] Guzhva, N. N., Luk'yanchikov, M. S., Kazakov, A. L. (1987). Flavonoids of *Astragalus virgatus*. Khim. Prir. Soedin., 6, 911.
- [24] Cheshuina, I. A. (1990). Flavonol aglycons of *Astragalus membranaceus*. Khim. Prir. Soedin., 6, 832.
- [25] Polyakova, L. V., Ershova, E. A. (1996). Flavonoid complex of *Astragalus austrosibiricus* Schischk in natural populations of Altai. Rastitel'nye Resursy, 3, 74.
- [26] Benbassat, N., Nikolov, S. (1995). Flavonoids from *Astragalus onobrychis*. Planta Med., 1, 100.
- [27] Xu, Y., Wei, L. (1995). Studies of chemical constituents of *Astragalus chinensis*. Zhongguo Zhongyao Zazhi, 5, 296.
- [28] Guzhva, N. N., Dzhumyrko, S. F., Kazakov, A. L. (1984). *Astragalus torrentum* flavonoids. Khim. Prir. Soedin., 4, 522.
- [29] Bian, Y., Li, P. (2008). Scavenging activities for superoxide anion radicals and structure-activity relationship of flavonoids from *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. Zhongguo Yaoxue Zazhi, 4, 256.

- [30] Dungereorzh, D., Petrenko, V.V. (1972). Kumatakenin from *Astragalus membranaceus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 389.
- [31] Dungereorzh, D., Petrenko, V. V., Dergyugina, L. I. (1974). Aglyconic composition flavonol glycosides of *Astragalus mongolicus*. Khim. Prir. Soedin., 2, 250.
- [32] Makbul, M. A., Blinova, K.F. (1980). Quercetin glycosides from *Astragalus frigidus*. Khim. Prir. Soedin., 2, 252.
- [33] Guzhva, N. N., Luk'yanchikov, M. S., Kazakov, A. L. (1983). Flavonoids from *Astragalus levieri* and *A. sevangensis*. Khim. Prir. Soedin., 4, 529.
- [34] Guzhva, N. N., Ushakov, V. B., Luk'yanchikov, M. S., Sarkisov, L. S. (1986). Flavonoids of *Astragalus captiosus*. Khim. Prir. Soedin., 6, 783.
- [35] Kazakov, A. L., Luk'yanchikov, M. S., Turubarov, V. D., Guzhva, N. N. (1987). Phenols of *Astragalus ciceroides* and *A. saganlugensis*. Khim. Prir. Soedin., 1, 142.
- [36] Kadyrova, R. B. (1989). Flavonoid composition of some Siberian species of *Astragalus* L. Rastitel'nye Resursy, 4, 552.
- [37] Guzhva, N. N., Sarkisov, L. S., Dzhumyrko, S. F., Prudnik, Yu. V. (1990). Polyphenols of *Astragalus karakuschensis*. Khim. Prir. Soedin., 3, 406.
- [38] Kr'steva, I., Nikolov, S., Pavlova, D. (1999). Flavonoids from *Astragalus ponticus* Pall. (Fabaceae). Farmatsiya, 2, 6.
- [39] Deryugina, L. I., Maksyutina, N. P., Krivenchuk, P. E. (1968). Isorhamnetin glycoside from *Astragalus novoascanicus* flowers. Khim. Prir. Soedin., 4, 254.
- [40] Khoron'ko, A. T., Glyzin, V. I. (1973). Flavonoids of *Astragalus dasyanthus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 430.
- [41] Khozhambergenova, P., Blinova, K. F. (1979). Flavonoids from *Astragalus flexus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 408.
- [42] Cui, B. L., Lu, Y. R., Wei, L. X. (1989). Chemical constituents of *Astragalus complanatus* R. Br. Yaoxue Xuebao, 3, 189.
- [43] Shabana, M. H., Mansour, R. M., Sharaf, M., Abd-El-Latif, R. R., El Ghandour., A.H. (2006). comparative morphological, phytochemical and biological study of *Astragalus hamosus* L. and *Astragalus peregrinus* Vahl subsp. *peregrinus*. Bulletin of the Faculty of Pharmacy, 1, 175.
- [44] Yeom, S-H., Kim, M-K., Kim, H-J., Shim, J-G., Lee, J-H., Lee, M-W. (2003). Phenolic compounds from seeds of *Astragalus sinicus* and their antioxidative activities. Saengyak Hakhoechi, 4, 344.
- [45] Alaniya, M. D., Komissarenko, N. F., Kemertelidze, E. P. (1971). Apigenin

- glycoside from *Astragalus kadshorensis*. Khim. Prir. Soedin., 4, 527.
- [46] Alaniya, M. D., Komissarenko, N. F., Kemertelidze, E. P. (1972). Flavonoids from *Astragalus galegifolius* and *A. maximus*. Khim. Prir. Soedin., 6, 802.
- [47] Sidel'nikova, V. I. (1978). Flavonol glycoside of *Astragalus testiculatus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 397.
- [48] Panova, D., Nikolov, S., Elmasova, L., Ionkova, I. (1981). Flavonoids from *Astragalus angustifolius* Lam. Int. Conf. Chem. Biotechnol. Bio. Act. Nat. Prod., 1, 98.
- [49] Kazakov, A. L., Dzhumyrko, S. F., Sergeeva, T. A., Kompantsev, V. A. (1981). Flavonoids of some *Astragalus* species. Part II. Khim. Prir. Soedin., 3, 391.
- [50] Kazakov, A. L., Luk'yanchikov, M. S., Dzhumyrko, S. F., Kompantsev, V. A. (1981). Flavonoids of some *Astragalus* species. Part 1. Khim. Prir. Soedin., 3, 388.
- [51] Guzhva, N. N., Kazakov, A. L., Dzhumyrko, S. F., Sarkisov, L. S. (1984). *Astragalus lagurus* flavonoids. Khim. Prir. Soedin., 5, 660.
- [52] Guzhva, N. N., Luk'yanchikova, M. S., Kazakov, A. L. (1985). Flavonoids from the *Onobrychium* section of genus *Astragalus*. Khim. Prir. Soedin., 3, 411.
- [53] Luk'yanchikov, M. S., Guzhva, N. N., Elisevich, D. M. (1987). Kaempferol glycosides of *Astragalus dipelta*. Khim. Prir. Soedin., 3, 453.
- [54] Nikolov, S., Elenga, P., Panova, D. (1984). Flavonoids of *Astragalus glycyphyllos* L. Farmatsiya, 6, 26.
- [55] Tsepkova, N. A., Svechnikova, A. N., Bandyukova, V. A., Khalmatov, Kh. Kh. (1972). Polyphenol compounds of *Astragalus* in flora of the northern Caucasus and Uzbekistan. Khim. Prir. Soedin., 5, 661.
- [56] Alaniya, M.D., Chkadua, N. F. (2001). Flavonoids of *A. Tana*. Khim. Prir. Soedin., 5, 537.
- [57] Shabana, M. H. (2003). New flavonol glycoside from *Astragalus spinosus* Forsk. Pharm. Sci., 1, 19.
- [58] Komissarenko, N. F., Polyakova, L. V. (1987). Flavonoids of *Astragalus adsurgens*. Khim. Prir. Soedin., 2, 302.
- [59] Lu, Shuhua., Zhu, Yongzhi., Wu, Shoujin. (1990). Flavonoid constituents of stems and leaves of Mongolian milkvetch (*Astragalus mongholicus*). Zhongcaoyao, 6, 249.
- [60] Ma, Y., Tian, Z., Fan, C., Meng, R. (1991). Constituents of stems and leaves of *Astragalus membranaceus* B. Shenyang Yaoxueyuan Xuebao. 2, 121.
- [61] Panova, D., Nikolov, S., Ionkova, I. (1983). *Astragalus angustifolius* Lam. flavonoids. Problemi na Farmatsiyata, 11, 21.

- [62] Deryugina, L. I., Krivenchuk, P. E., Maksyutina, N. P. (1966). Chemical study of the flavonoids from *Astragalus pubiflorus*. Farm. Zh., 6, 41.
- [63] Dungerdorzh, D., Petrenko, V. V. (1973). Flavonol glycosides of *Astragalus propinguus*. Khim. Prir. Soedin., 2, 272.
- [64] De Pascual Teresa, J., Hernandez Aubanell, J. C., Grande, M. (1979). Components of *Astragalus lusitanicus* Lam. II. Flavonoids. An. Quim., Ser. C. (1968-1979), 12, 1005.
- [65] Polyalkova, L. V., Yershova, E. A. (1996). Flavonoids of *Astragalus austrosibiricus* Schischk. In natural populations of the Altai. 1. Intrapopulational variability in steppe communities. Rastitel'nye Resursy, 1-2, 81.
- [66] Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S. (1991). Flavone glucosides from seeds of *Astragalus complanatus* (Sha Yuan Zi). Shoyakugaku Zasshi, 3, 261.
- [67] Tian, Z., Ma, Y., Meng, R., Li, B. (1993). Quantitative determination of flavonoids in the stalk and leaves of *Astragalus membranaceus* by TLC. Shenyang Yaoxueyuan Xuebao, 1, 24.
- [68] Toaima, S.M. (2002). Flavonoidal glycosides of some *Astragalus* species. Pharm. Sci., 2, 135.
- [69] Khozhambergenova, P., Blinova, K. F. (1980). Quercetin glycosides from *Astragalus flexus*. Khim. Prir. Soedin., 2, 251.
- [70] Norris, Frank A., Stermitz, Frank R. (1970). 4'-O-methylquercetin 3-glucoside from *Astragalus miser var oblongifolius*. Phytochemistry, 1, 229.
- [71] Alaniya, M. D., Komissarenko, N. F., Kemertelidze, E. P. Kovalev, I. P., Gordienko, V. G. (1975). Chemical structure of flavonol glycosides of *Astragalus galegiformis*. Soobshch. Akad. Nauk Gruz. SSR, 3, 625.
- [72] Chen, M. H., Liu, F. S. (1988). Studies on chemical constituents of *Astragalus complanatus* R. Brown II. Yaoxue Xuebao, 3, 218.
- [73] Zhiren, Z., Di, L., Chunqing, S., Changxin, C., Zhibi, H. (1998). Studies on chemical constituents and immunological function activity of hairy roots of *Astragalus membranaceus*. Shengwu Gongcheng Xuebao, 2, 153.
- [74] Deryugina, L. I., Maksyutina, N. P., Krivenchuk, P. E. (1966). Flavonoids of *Astragalus astrogaloside*. Khim. Prir. Soedin., 6, 394.
- [75] Hirotani, Masao., Zhou, Yu., Lui, Hekai., Furuya, Tsutomu. (1994). *Astragalus membranaceus*. Phytochemistry, 3, 665.
- [76] C, Zhengzhong., C, Yuan., Y, Yijun., W, Yongping., L, Zongkang., L, Du., Owen,

- Noel L. (1999). Identification of isoflavone glucosides from *Astragalus membranaceus*. *Yaoxue Xuebao*, 5, 392.
- [77] Khoron'ko, A. T. (1974). Narcissin from *Astragalus dasyanthus*. *Khim. Prir. Soedin*, 1, 88.
- [78] Alaniya, M. D., Komissarenko, N. F., Kemertelidze, E. P. (1972). Flavonoids from *Astragalus falcatus*. *Soobshch. Akad. Nauk Gruz. SSR*, 2, 357.
- [79] Alanya, M.D., Grigolava, B.L. (1980). Robinin levels in the cultivated plant *Astragalus falcatus* Lam. *Izv. Akad. Nauk Gruz. SSR, Ser. Biol.*, 2, 138.
- [80] Suleymanov, T.A. (2003). Allocation, identification and quantitative determination of robinin in *Astragalus johannis* R. *Azerb. Ecz. J.*, 2, 22.
- [81] Semmar, N., Fenet, B., Gluchoff-Fiasson K., Hasan A., Jay M. (2002). Four new flavonol glycosides from the leaves of *Astragalus caprinus*. *J. Nat. Prod.*, 4, 576.
- [82] Semmar, N., Fenet, B., Lacaille-Dubois. M., Gluchoff-Fiasson K., Chenli. R., Jay, M. (2001). Two New glycosides from *Astragalus caprinus*. *J. Nat. Prod.*, 64, 656.
- [83] Bedir, E., Calis, I., Piacente, S., Pizza, C., Khan, I A. (2000). A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulneraria*. *Chem. Pharm. Bull.*, 12, 1994.
- [84] Semmar, N., Fenet, B., Gluchoff-Fiasson K., Comte G., Jay M. (2002). New flavonol tetraglycosides from *Astragalus caprinus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 7, 981.
- [85] Alaniya, M. D., Komissarenko, N. F., Kemertelidze, E. P. (1975). Ascaside, a new flavonol glycoside of *Astragalus caucasicus*. *Khim. Prir. Soedin.*, 3, 351.
- [86] Song, C., Zheng, Z., Liu, D., Hu, Z. (1997). Antimicrobial isoflavans from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge. *Zhiwu Xuebao*, 5, 486.
- [87] Zheng, Z., Song, C., Liu, T., Hu, Z. (1998). Determination of 6 isoflavonoids in the root cultures of *Astragalus membranaceus* by HPLC. *Yaoxue Xuebao*, 2, 148.
- [88] El-Sebakhy N A., Asaad A M., Abdallah R M., Toaima S M., Abdel-Kader M S., Stermitz F. R. (1994). Antimicrobial isoflavans from *Astragalus* species *Phytochemistry*, 6, 1387.
- [89] Martin, S.S., Townsend, C.E., Lensen, A.W. (1994). Induced isoflavonoids in diverse populations of *Astragalus cicer*. *Biochem. Syst. & Ecol.*, 7, 657.
- [90] Lee, E.J., Yean, M.H., Jung, H.S., Kim, J.S., Kang, S.S. (2008). Phytochemical studies on *Astragalus* root (2) - flavonoids and a lignan. *Nat. Prod. Sc.*, 2, 131.
- [91] Subarnas, A., Oshima, Y., Hikino, H. (1991). Isoflavans and a pterocarpan from *Astragalus mongholicus*. *Phytochemistry*, 8, 2777.

- [92] Lin, L.-Z., He, X.-G., Lindenmaier, M., Nolan, G.; Yang, J., Cleary, M., Qiu, S.-X., Cordell, G. A. (2000). Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *J. Chromato. A*, 1+2, 87.
- [93] Marco, J. L., Sanz, J. Rodriguez, B. (1983). Phenol compounds from *Astragalus clusii*. *An. Quim., Ser. C.*, 1, 94.
- [94] Lu, G., Lu, S., Zhang, G., Xu, S., Li, D., Huang, Q. (1984). Isolation and identification of flavone-like constituents from Mongolian milkvetch (*Astragalus mongholicus*). *Zhongcaoyao*, 10, 452.
- [95] Dehong, Y., Yanlong, D., Yongming, B., Chaoliang, W., Lijia, A. (2005). Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protected PC 12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Ethnopharm.*, 98, 89.
- [96] Taowu, S.W., Annie, B., Li-hua, G., Zheng-tao, W., He-ping, L., Xue-mei, C., Chris, J., Branford-white., Zhi-bi, H. (2005). Simultaneous determination of six isoflavonoids in commercial *Radix Astragali* by HPLC-UV. *Fitoterapia*, 76, 157.
- [97] Ma, X., Tian, X., Chen, Y., Tu, P. (2005). Flavonoid constituents of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. *Zhongcaoyao*, 9, 1293.
- [98] Song, C., Zheng, Z., Liu, D., Hu, Z., Sheng, W. (1997). Isoflavones from *Astragalus membranaceus*. *Zhiwu Xuebao*, 8, 764.
- [99] Yiaofeng, M., Tianyou, Z., Yun, W., Pengfei, T., Yingjie, C., Yoichiro, I. (2002). Preparative isolation and purification of calycosin from *Astragalus membranaceus* Bge. Var. *mongholicus* Bge Hsiao by high speed counter-current chromatography. *J. Chromato. A*, 243.
- [100] Wu, D., Hu, Z., Zhou, J., Fan, Y. (2003). Calycosin and calycosin-7-O-beta-glucoside of *Astragalus membranaceus*, which have the inhibitory effect on myocardial ischemia. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 12 pp.
- [101] Abd El-Latif, R. R., Shabana, M. H., El-Gandour, A. H., Mansour, R. M., Sharaf, M. (2003). A new isoflavone from *Astragalus peregrinus*. *Chem. Nat. Comp.*, 6, 536.
- [102] Cao, Z. Z., Cao, Y., Yi, Y. J., Wu, Y. P., Len, Z. K., Li, D., Owen, N.L. (1998). A new isoflavone glucoside from *Astragalus membranaceus*. *Chin. Chem. Lett*, 6, 537.
- [103] Baek, N.-I., Kim, Y. S., Kyung, J. S., Park, K. H. (1996). Isolation of anti-hepatotoxic agents from the roots of *Astragalus membranaceus*. *Saengyak Hakhoechi*, 2, 111.
- [104] Kosuge, T., Ishida, K., Nagasawa, M. (1985). Preparation of an isoflavone derivative from *Astragalus roots*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 5 pp.

- [105] Xiaofeng, M., Pengfei, T., Yingjie, C., Tianyou, Z., Yun, W., Yoichiro, I. (2003). Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *Mongholicus* Bge Hsiao by high speed counter-current chromatography. *J. Chromato. A*, 193.
- [106] Ma, X., Tu, P., Chen, Y., Zhang, T., Wei, Y., Ito, Y. (2003). Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromato. A*, 1-2, 193.
- [107] Deryugina, L. I. (1966). Astrozide--a new isoflavone glycoside of *Astragalus austriacus*. *Khim. Prir. Soedin.*, 5, 315.
- [108] Wang H K., He K., Xu H X., Zhang Z L., Wang, Y. F., Kikuchi, T., Tezuka, Y. (1990). The structure of *A. astrachryosid* and the study of 2D-NMR on astrasieversianin XV and 7,2'-dihydroxy-3',4'-diméthoxy-isoflavane-7-O- β -D-glycoside. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 6, 445.
- [109] He, Z. Q; Findlay, J. A. (1991). Constituents of *Astragalus membranaceus*. *J. Nat. Prod.*, 3, 810.
- [110] Xiaofeng, M., Pengfei, T., Yingjie, C., Tianyou, Z., Yun, W., Yoichiro, I. (2004). Preparative isolation and purification of isoflavan and pterocarpan glycosides from *Astragals membranaceus* Bge. Var. *mongholicus*. Bge. *J. Chromato, A*, 311.
- [111] Ingham, john L., Dewick, Paul M. (1980). Astraciceran: a new isoflavan phytoalexin from *Astragalus cicer*. *Phytochemistry*, 8, 1767.
- [112] Lenssen, A. W., Martin, S.S., Townsend, C. E., Hawkins, B. (1994). Acicerone: an isoflavone from *Astragalus cicer*. *Phytochemistry.*, 5, 1185.

الدراسة النباتية و الكيمائية للنبته

Astragalus armatus Wild.

الدراسة الكيميائية النباتية 1. *Astragalus armatus* Willd.

1- المادة النباتية:

تم جمع النبتة في أواخر شهر ماي من سنة 2007 من منطقة كبيرة بقسنطينة، حيث تم اقتلاعها من جذورها، الجزء الهوائي أجري له عملية تجفيف بوضعه في أماكن خاصة تحت الظل وبعيدا عن الرطوبة، بعد ذلك طحن فكانت الكتلة المستعملة 1500 غ. و لقد تم التعرف على هذه النبتة من طرف الأستاذ Gérard de Bélair (كلية العلوم، جامعة باجي مختار، عنابة).

2- وصف النوع. *A. armatus* Willd.:

القتاد نبتة معمرة كثيرة الأشواك لذلك يطلق عليها اسم *armatus* أي *armée* (مسلحة)، ذات ساق متخشب لا يتعدى 60 سم طولاً، لها أوراق تلتصق بالساق بواسطة معلاق ورقي و هذه الأوراق تتكون من عدد فردي من وريقات لاطية، لونها أخضر قاتم، و عند فقدان النبتة لهذه الأوراق يصبح المعلاق الورقي حاد و صلب و هو الذي يشكل الأشواك الملاحظة، و الزهرة صفراء اللون ذات تويج أبيض وردي يحمل 9 بتلات و 10 أسدية، 9 منها مشتركة في منبر واحد و الأخرى لها منبرها الخاص، أما الكأس فتكون منتفخة و تضم الثمرة التي تكون فولية ذات غلاف ورقي و منتفخة غير مقسمة طولياً بحاجز، و تحمل هذه النبتة فروع تكون عبارة عن حراشف بدون شعيرات.



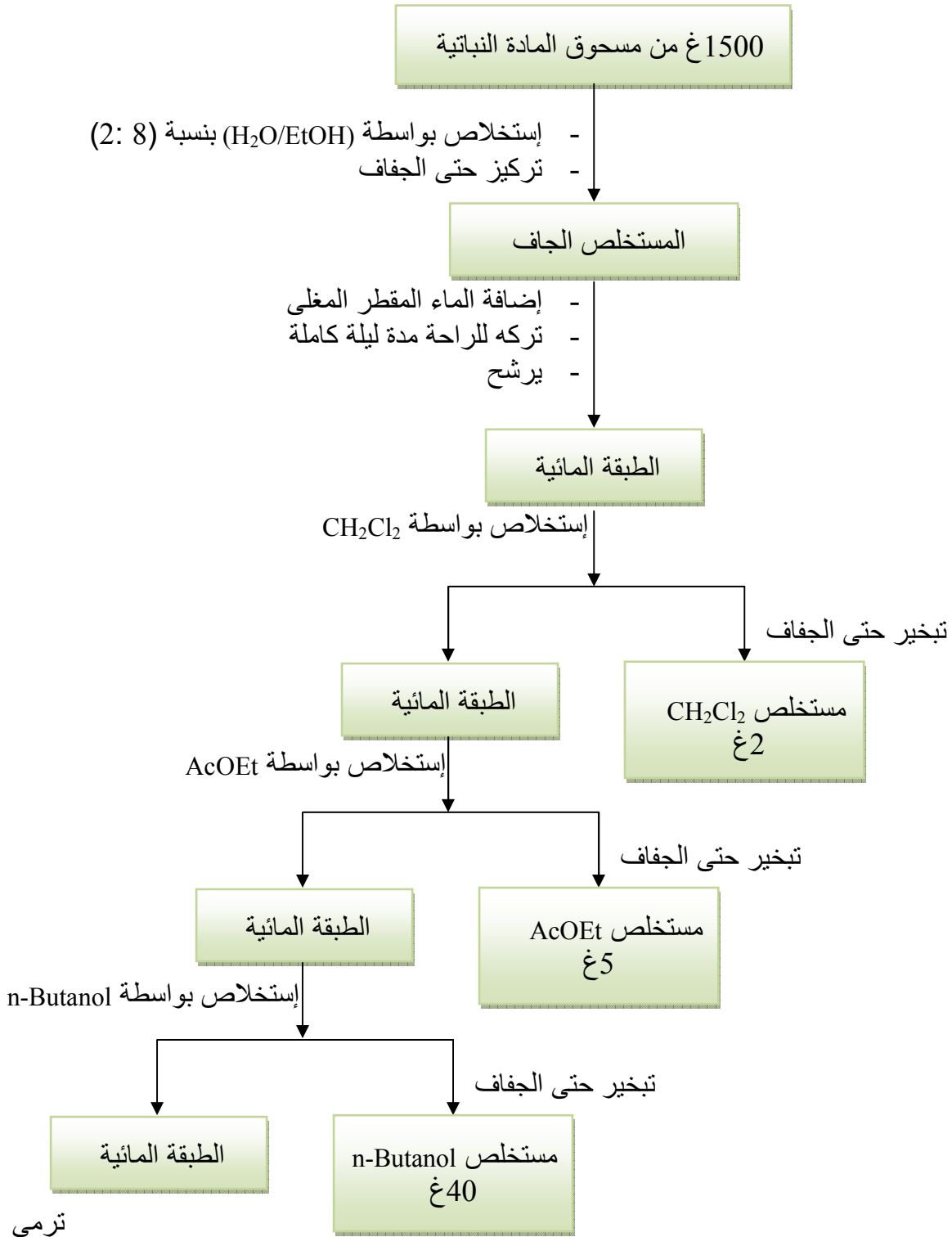
شكل- 1- صور فوتوغرافية للنبتة *Astragalus armatus* Willd.

3- التصنيف النظامي للنبتة:

Embranchement	Spermaphytes	الفرع
Sous embranchement	Angiospermes	تحت الفرع
Famille	Fabaceae	العائلة
Sous famille	Papilionaceae	تحت العائلة
Genre	<i>Astragalus</i>	الجنس
Espèce	<i>Astragalus armatus</i> Willd.	النوع

4- الاستخلاص:

للإشارة فقد قمنا بدراسة هذه النبتة خلال رسالة الماجستير ونظرا لغنى المستخلص البوتانولي بالمركبات الفلافونيدية التي لم نتمكن من فصلها جميعها و ذلك بسبب الكمية القليلة للكسور المحصل عليها تقرر إعادة دراسة هذه النبتة بزيادة كميتها (1500 غ)، و قد تمت عملية الاستخلاص بنفس الطريقة المتبعة في رسالة الماجستير حيث قمنا بنقع المادة النباتية في محلول هيدروكحولي (إيثانول/ماء) بنسبة (80 : 20) ثم تركناها لمدة 24 ساعة كررنا العملية 3 مرات أخرى مع تجديد المذيب في كل مرة و ذلك بإضافته إلى النبتة بعد ترشيحها، قمنا بجمع الرشاحات المحصل عليها و تبخيرها تحت ضغط منخفض أين تحصلنا في الأخير على المستخلص الجاف الذي عاملناه بالماء المقطر المغلي ثم تركناه للراحة مدة ليلة كاملة بعدها قمنا بترشيحه و أجرينا على الراشح استخلاصا من نوع سائل- سائل باستعمال مذيبات متفاوتة القطبية بدءا بثنائي كلور الميثان بعدها أسيتات الإيثيل و أخيرا البوتانول النظامي و المخطط التالي يلخص هذه الخطوات:



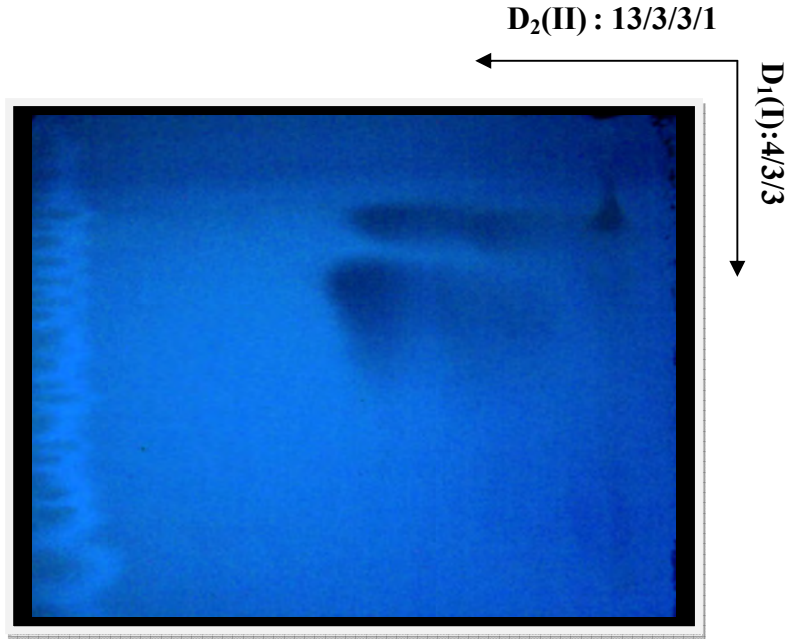
مخطط-1- مخطط الاستخلاص للنبذة *Astragalus armatus* Willd.

5- الفصل و التنقية:

قمنا باختيار المستخلص البوتانولي للدراسة كإتمام للعمل الذي قمنا به خلال إنجازنا لمذكرة الماجستير، إضافة إلى هذا إذا ما نظرنا إلى كمية مستخلص أسيتات الإيثيل (5غ) نجد بأنها كمية قليلة مقارنة مع عدد المركبات الذي يحتوي عليها هذا المستخلص و قد تقرر هذا بعد إجراء اختبارات كروماتوغرافية ذات بعد واحد على ورق whatman و ذات بعدين على متعدد الأמיד، و قد تم تصوير الخريطة الكروماتوغرافية ثنائية البعد للمستخلص البوتانولي و هي موضحة في الشكل التالي:

البعد (I) :D₁ (4/3/3) (Toluène/ MeOH/ méthyléthylcétone)

البعد (II) :D₂ (13/3/3/1) (H₂O/ MeOH/ méthyléthylcétone/ Acétylacétone)



شكل- 2- كروماتوغرام ثنائي البعد للمستخلص البوتانولي لنبته *Astragalus armatus Willd.*

- وبما أن الخريطة الفلافونيدية تظهر تداخل عدد لا بأس به من المركبات الفلافونيدية فحسب:
- لونها تحت الأشعة UV هي عبارة إما عن فلافونات أو فلافونولات مستبدلة في الموقع 3
 - أما هجرتها في النظام المائي فتوحي بأنها مركبات متعددة السكر

هذه المعلومات الأولية تقودنا إلى اختيار تقنية كروماتوغرافيا العمود أول خطوة للقيام بعمليات الفصل لمكونات 25 غ من المستخلص البوتانولي و اخترنا لذلك متعدد الأמיד (SC₆) كدعامة ثابتة و ذلك لكونه الدعامة الملائمة لفصل المركبات الفلافونيدية خاصة السكرية، عملية التمليص تمت باستعمال التولوين مع تشبيعه تدريجيا بالميثانول.

متابعة الحزم النازلة خلال العمود تمت باستعمال مصباح (UV) لتستقبل أسفل العمود حيث ركزت تحت ضغط منخفض، في النهاية تحصلنا على الكسور المدونة في الجدول التالي:

الكسور المحصل عليها	نسبة Toluène	نسبة MeOH
—	100	0
1-25	98	2
26-33	96	4
34-63	92	8
64-95	88	12
96-125	85	15
126-185	80	20
186-215	75	25
216-230	70	30
231-264	65	35
265-280	60	40
281-286	50	50
287-290	0	100

و قد تم تجميع هذه الكسور باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (CCM) على السيليكاجال و ذلك بالاستعانة بالأنظمة التالية كمملصات:

(CH₂Cl₂/ MeOH): (9.5/0.5), (8/2), (7/3) -

(AcOEt/ MeOH/ H₂O): (10/2/1) -

تحصلنا في الأخير على الكسور التالية:

الملاحظة	الكسور قبل و بعد الجمع		الملاحظة	الكسور قبل و بعد الجمع	
خليط معقد	F ₇	199-232	خليط لعدد كبير من مركبات غير فلافونيدية	F ₁	1-136
يحتوي على خليط قابل للفصل	F ₈	233-239	مزيج من آثار لمركبات فلافونيدية	F ₂	136-144
خليط معقد	F ₉	242-251	يحتوي على راسب أصفر	F ₃	145-168
يحتوي على خليط معقد	F ₁₀	252-268	يحتوي على خليط قابل للفصل	F ₄	169-178
خليط معقد	F ₁₁	269-281	يحتوي على خليط معقد	F ₅	179-189
خليط معقد	F ₁₂	282-290	يحتوي على خليط قابل للفصل	F ₆	190-198

6- معالجة الكسور المحصل عليها:

ملاحظة: عملية تنقية كل المركبات المفصولة تمت بواسطة عمود صغير من السيليكاجال و

باستعمال (AcOEt/ MeOH/ H₂O): (10/2/1)

• معالجة الكسر F₂:

تمت معالجته بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (AcOEt/ MeOH/ H₂O): (10/2/1) كملص، فكانت النتيجة الحصول على مركبين متداخلين لم نستطع تحديد بنيتهما كما لم نتمكن من فصلهما لقلّة كميتهما.

• معالجة الكسر F₃:

لاحظنا بأنه يحتوي على راسب أصفر اللون قمنا بغسله بواسطة دفعات متتالية من MeOH أين تحصلنا عليه في صورته النقية (المركب **A₇** = 147).

• معالجة الكسر F_4 :

الاختبار التحليلي لهذا الكسر بين احتوائه إضافة إلى المركب A_7 على مركب آخر تم فصله بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (10/2/1): (AcOEt/ MeOH/ H₂O) كملص بعد عملية التنقية تحصلنا على المركب

$$A_2 = 169_2$$

• معالجة الكسر F_6 :

نظرا إلى أنه يحتوي على آثار لعدة مركبات غير فلافونيدية إضافة إلى مركبين فلافونيديين تقرر استعمال كروماتوغرافيا العمود بدلا عن كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لفصل مكونات هذا الكسر وذلك باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (10/2/1): (AcOEt/ MeOH/ H₂O) كملص من بداية العمود إلى آخره، تحصلنا على أربع كسور مدونة في الجدول التالي:

الملاحظة	الكسور قبل و بعد التجميع	
آثار لمركبات غير فلافونيدية	f_1	8 -1
آثار لمركبات غير فلافونيدية تختلف عن سابقتها	f_2	12 -9
مركب فلافونيدي مع آثار لمركبات غير فلافونيدية	f_3	15-13
مركبين فلافونيديين	f_4	20-16

❖ معالجة كسر f_4 :

بينت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بأن هذا الأخير يحتوي نفس المركب الفلافونيدي الذي يتواجد في تحت الكسر F_3 إضافة إلى مركب آخر لذلك قمنا بدراسة تحت الكسر F_4 بدلا عن F_3 حيث تم فصل مركبين بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال متعدد الأמיד كدعامة ثابتة و النظام (13/3/3/1): (H₂O / MeOH/MEC/Ac.Ac) كملص، تحصلنا في الأخير على المركب $A_3 = 191_4$ الذي تم تنقيته إضافة إلى المركب 191_5 الذي تبين بأنه يتكون من مركبين هما A_7 و A_8 لم نتمكن من فصلهما لقلّة كميتيهما و لكن تم التعرف على بنية كل منهما.

• معالجة الكسر F_8 :

لاحتوائه على ثلاث بقع فلافونيدية إضافة إلى أخرى غير فلافونيدية تقرر استعمال كروماتوغرافيا العمود للفصل واختير لأجل ذلك السيليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (10/2/1): (AcOEt/ MeOH/ H₂O) كملص من بداية العمود إلى آخره، في الأخير تحصلنا على تحت الكسور التالية:

الملاحظة	الكسور قبل و بعد التجميع	
آثار لمركبات غير فلافونيدية	f ₁	3-1
مركبين فلافونيديين	f ₂	11-4
مركب فلافونيدي واحد	f ₃	18-12
مركبين فلافونيديين	f ₄	28-19

❖ معالجة تحت الكسر f₂

الاختبار التحليلي له بين بأنه يتكون من مركبين فلافونيديين تم فصلهما عن طريق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال متعدد الأמיד كدعامة ثابتة و النظام (MeOH/ H₂O) (18/1/1):/AcOH) كملص تحصلنا في الأخير على المركبين $A_4 = 233_{11}$ و $A_5 = 233_{12}$ هذا بعد تنقيتهما.

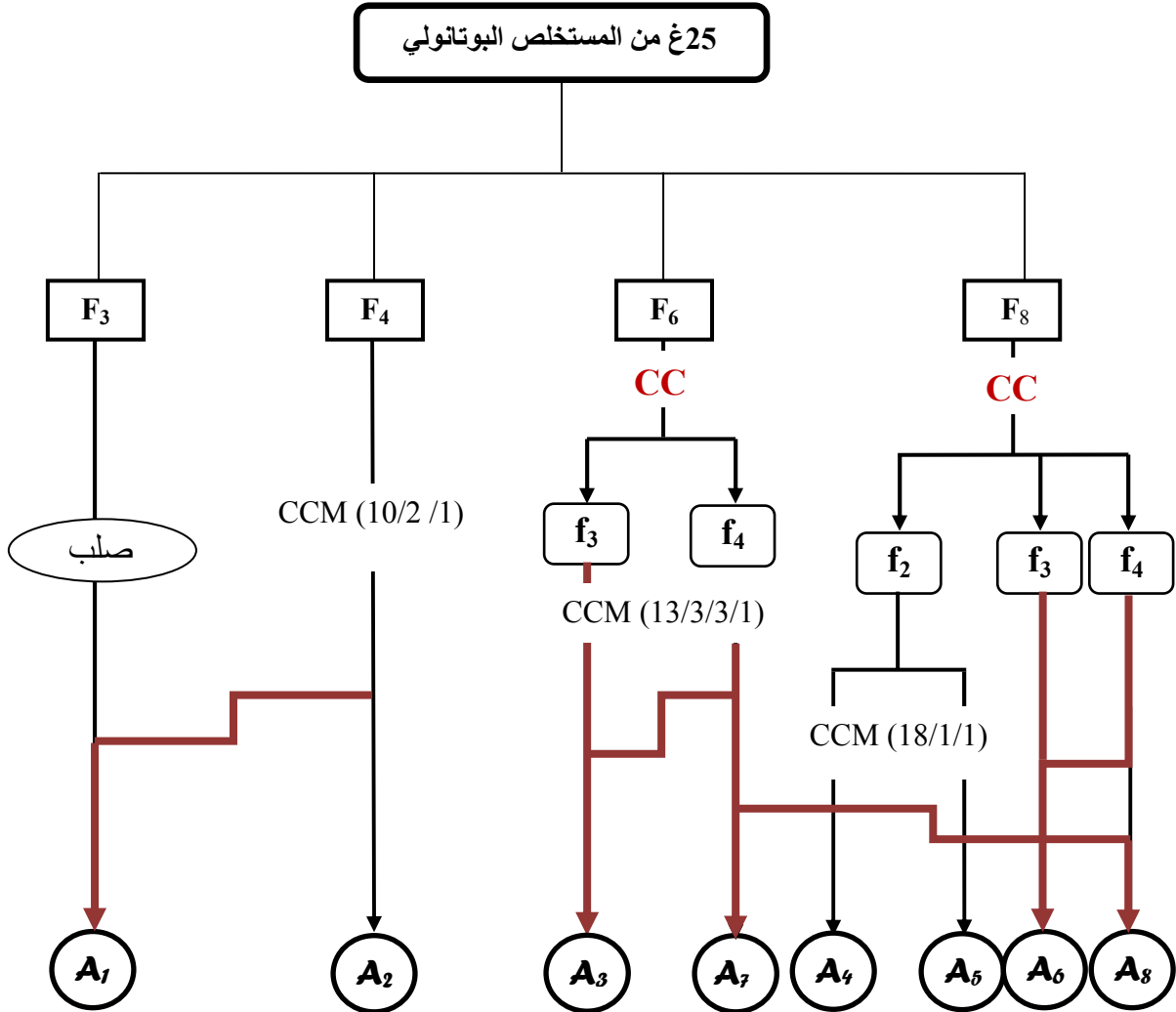
❖ معالجة تحت الكسر f₃

تبين بأنه يحتوي على مركب فلافونيدي واحد مع آثار لمركبات غير فلافونيدية، تمت عملية الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (10/2/1): (AcOEt/ MeOH/ H₂O) كملص و بعد عملية التنقية تحصلنا على المركب $A_6 = 233_3$.

❖ معالجة تحت الكسر f₄

هذا الأخير يحتوي على المركب A_6 إضافة إلى آخر تم التعرف على بنيته فقط و لم نتمكن من فصله و السبب دائما يعود إلى قلة الكمية سمي A_8 .

و المخطط التالي يلخص كل خطوات الفصل السابقة:



مخطط-2- يلخص خطوات الفصل للمستخلص البوتانولي للنبته

Astragalus armatus Willd.

التعيين البنيوي

للمركبات المفصولة

التعيين البنوي للمركب A₇:

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

جدول 1: قيم R_f للمركب A₇

الجملة	R _f
4/3/3 (toluène : MeOH : MEC)	0.34
13/3/3/1 (H ₂ O : MeOH : MEC : Ac.Ac)	0.38
10/2/1 (ACOEt :MeOH : H ₂ O)	0.36

ملاحظة: تم استعمال متعدد الأמיד كدعامة ثابتة مع النظامين I، II و السيليكاجال مع النظام III.

2. الخصائص الطيفية

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب A₇

الكواشف	العصابة I (نم) (λ _{max})	العصابة II (نم) (λ _{max})	عصابات أخرى (نم) (λ _{max})
MeOH	358	254	
NaOH	415	272	328
AlCl ₃	405	267	
AlCl ₃ + HCl	405	268	
NaOAc	376	274	
NaOAc + H ₃ BO ₃	362	267	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 400 MHz) :

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **A**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ _H (ppm)
H-2'	d (<i>J</i> = 1.8 Hz)	1H	8.03
H-6'	dd (<i>J</i> = 8.4 Hz, <i>J</i> = 1.8 Hz)	1H	7.60
H-5'	d (<i>J</i> = 8.4 Hz)	1H	6.91
H-8	d (<i>J</i> = 1.9 Hz)	1H	6.41
H-6	d (<i>J</i> = 1.9 Hz)	1H	6.21
H-1''glu	d (<i>J</i> = 7.8 Hz)	1H	5.23
H-1'''rha	d (<i>J</i> = 1.7 Hz)	1H	4.53
3'-OCH ₃	S	3 H	3.97
CH ₃ rha	d (<i>J</i> = 6.2 Hz)	3 H	1.17
بروتونات glu+ rha	-	10 H	3.20- 3.90

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (RMN ¹³C, CD₃OD, 100.6 MHz) :

جدول 4: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب **A**

الكربون الموافق	δ _C (ppm)	الكربون الموافق	δ _C (ppm)
C-6'	123.9	C-2	159.0
C-1''	105.8	C-3	135.6
C-2''	74.0	C-4	179.6
C-3''	75.2	C-5	163.2
C-4''	72.2	C-6	100.1
C-5''	75.7	C-7	166.3
C-6''	67.6	C-8	95.0
C-1'''	102.1	C-9	158.6
C-2'''	70.2	C-10	105.1
C-3'''	72.4	C-1'	123.1
C-4'''	73.2	C-2'	114.8
C-5'''	69.9	C-3'	148.6
OCH ₃	57.1	C-4'	151.0
CH ₃	18.1	C-5'	116.1

○ مطيافية الكتلة:

جدول 5: نتائج طيف الكتلة للمركب **A_r**

ES ⁺	
الشاردة	(m/z)
[M+K] ⁺	663.2
[M+Na] ⁺	647.2
[M+Na+H-CH ₃] ⁺	633.2
[M+H] ⁺	625.2
[M+Na+H-OCH ₃] ⁺	617.2
[M+2H-Orha] ⁺	463.1
[M +H-rha-glu] ⁺	317.2

■ الحملة الحمضية:

○ الثنى الأجليكوني:

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 6: نتائج مطيافية UV بعد الحملة الحمضية للمركب **A_r**

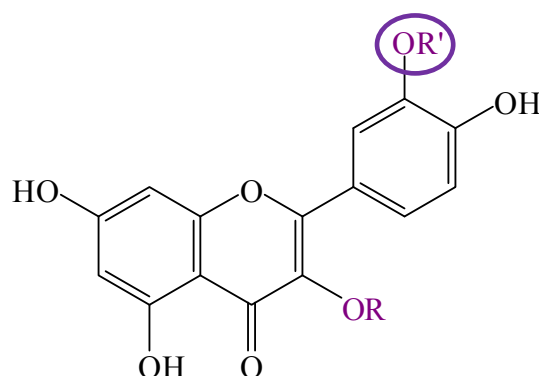
الكاشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)
MeOH	365.8	254.2

○ الثنى السكري: glucose + rhamnose

■ قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:

قيمة R_f للمركب في الجمل الثلاث تدل على أن المركب غليكوزيدا، اللون البنفسجي تحت الأشعة (UV) و قيمة العصابة I في الميثانول $\lambda_1 = 358 \text{ nm}$ يدلان على عدم وجود OH حر في الموضع 3. إزاحة باثوكرومية للعصابة I تقدر بـ 57 nm عند مقارنة طيف NaOH بطيف MeOH تدل على وجود OH حر في الموقع 4، عدم وجود إزاحة باثوكرومية لنفس العصابة عند مقارنة طيف $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ مع طيفه في AlCl_3 تدل على عدم وجود أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B، و الإزاحة الباثوكرومية دائما للعصابة I المقدره بـ 45 nm عند مقارنة طيف $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ بطيفه في MeOH دليل على وجود OH حر في الموقع 5. أما الإزاحة الباثوكرومية للعصابة II و المقدره بـ 20 nm عند مقارنة طيف NaOAc بطيفه في MeOH تشير إلى وجود OH-7. (شكل 1)

و عليه يمكن وضع الصيغة الأولية للمركب حيث تتميز بوجود مجموعة مستبدلة في الموقع 3 مع وجود أو عدم وجود أخرى في الموقع 3 :



مطيافية الكتلة (شكل 4) أعطت قمة جزيئية عند 625.2 $[M+H]^+$ موافقة للصيغة المجملة $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ وهذه الأخيرة تشير إلى أن المركب غليكوزيد ثنائي السكر. مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (شكل 2) أظهرت ثلاث إشارات خاصة بالحلقة B مما يدل على وجود مستبدل في الموقع 3 هذه الإشارات تتمثل في:

➤ إشارة ثنائية بثابت تزاوج $J = 8.4 \text{ Hz}$ عند 6.91 ppm خاصة بالبروتون H_5' .
➤ إشارة ثنائية بثابت تزاوج $J = 8.4 \text{ Hz}$ و $J = 1.8 \text{ Hz}$ عند 7.60 ppm خاصة بالبروتون H_6' .

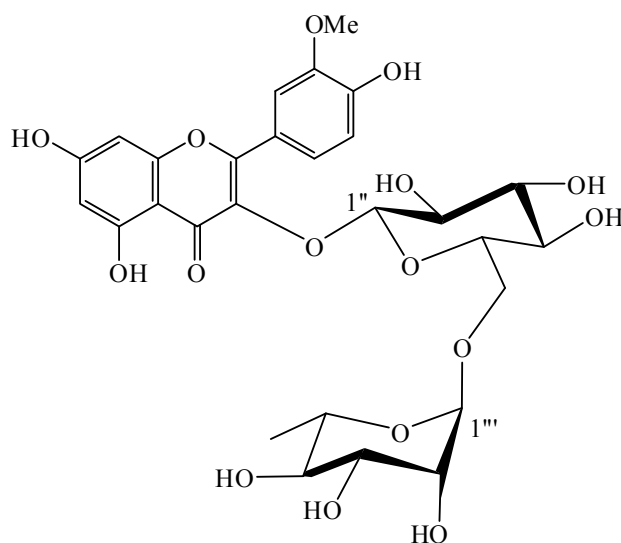
➤ إشارة ثنائية بثابت تزاوج $J = 1.8 \text{ Hz}$ عند 8.03 ppm خاصة بالبروتون H_2' .
أما إشارتا الحلقة A فظهرتا بشكل ثنائية لكل واحدة بنفس ثابت التزاوج $J = 1.9 \text{ Hz}$ عند 6.21 ppm خاصة بالبروتون H_6 ، و عند 6.41 ppm خاصة بالبروتون H_8 .
كذلك أظهرت مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (شكل 2) إضافة إلى بروتونات الحلقتين A و B إشارة أحادية عند 3.97 ppm بتكامل 3H دليل على وجود مجموعة OMe، هذا بالإضافة إلى إشارتين ثنائيتين عند 4.53 ppm و 5.23 ppm بثابتي تزاوج $J = 1.7 \text{ Hz}$ و $J = 7.8 \text{ Hz}$ على التوالي و بتكامل 1H تشيران إلى بروتونين أنوميريين لسكرين، و عليه فإن المستبدلين R و R' عبارة عن مجموعة OMe و سكرين.

للتعرف على طبيعة هذين السكرين نبدأ بمطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون حيث:
○ تدل كل من الإشارة الثنائية بثابت التزاوج $J = 1.7 \text{ Hz}$ عند 4.53 ppm والإشارة الثنائية عند 1.17 ppm بثابت تزاوج $J = 6.2 \text{ Hz}$ بتكامل 3H (ميثيل الرامنوز) على سكر الرامنوز.
○ أما الإشارة الثنائية بثابت التزاوج $J = 7.8 \text{ Hz}$ عند 5.23 ppm تشير لسكر glucose وذلك حسب الحلمهة الحمضية التي حررت هذا النوع من السكر.

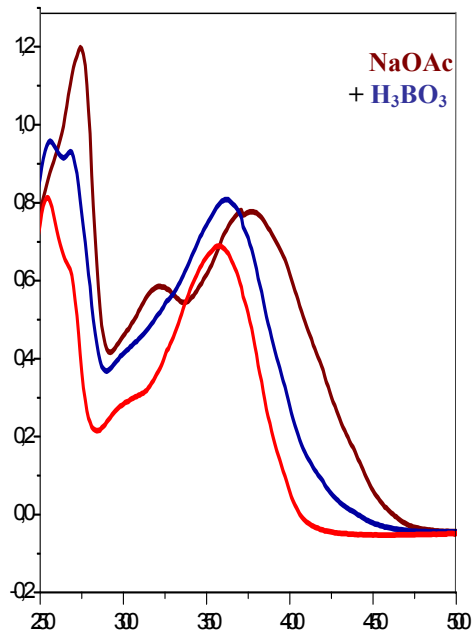
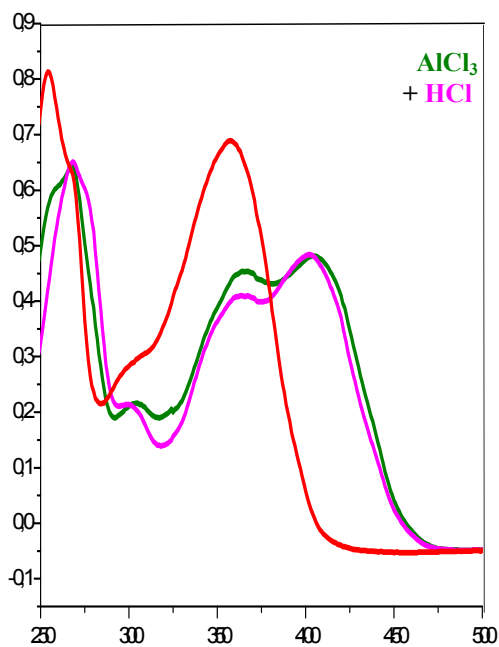
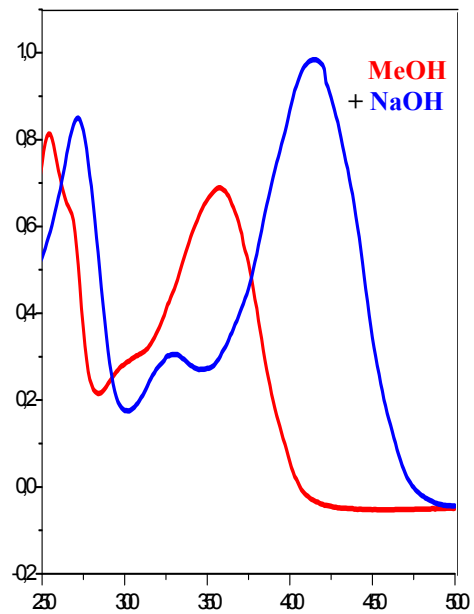
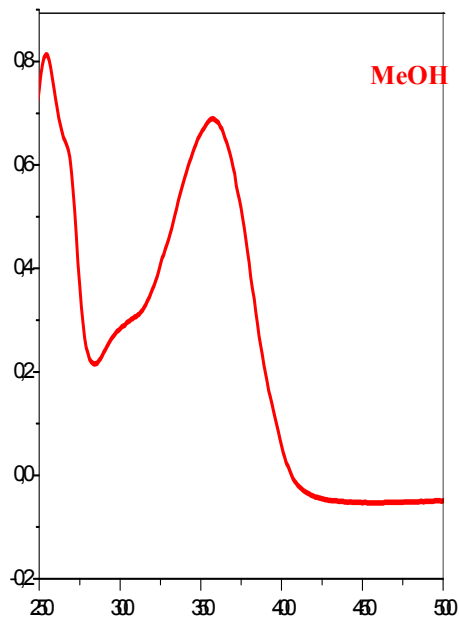
و لمعرفة مكان ارتباط هذه المستبدلات نلجأ إلى تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد **HMBC** (شكل 6) حيث أعطت هذه الأخيرة بقعة تعالق لإشارة OMe ذات الإزاحة 3.97 ppm مع كربون الموقع 3' ذو الإزاحة 148.6 ppm (شكل 3) مما يدل على أنّ مجموعة OMe مرتبطة بالموقع رقم 3' و عليه فإنّ الهيكل الفلافونيدي عبارة عن isorhamnetine.

بقي لدينا سكرين و موقع واحد شاغر و هو الموقع رقم 3 إذن فالاحتمال الوحيد هو أن يكون هذين السكرين مرتبطين ببعض، و لمعرفة من السكر الذي يرتبط مباشرة بهيكل الـ isorhamnetine أي السكر الأول و السكر الثاني نلجأ إلى مطيافية **HMBC** حيث أعطت بقعة تعالق للبروتون الأنوميري "H-1" لسكر glucose ذو الإزاحة 5.23 ppm مع الكربون رقم 3 ذو الإزاحة 135.6 ppm و عليه فإن سكر glucose هو من يرتبط بالموقع رقم 3، و يليه سكر rhamnose و لمعرفة بالتحديد مكان ارتباط هذا الأخير بسابقه نستعين دائماً بمطيافية **HMBC**

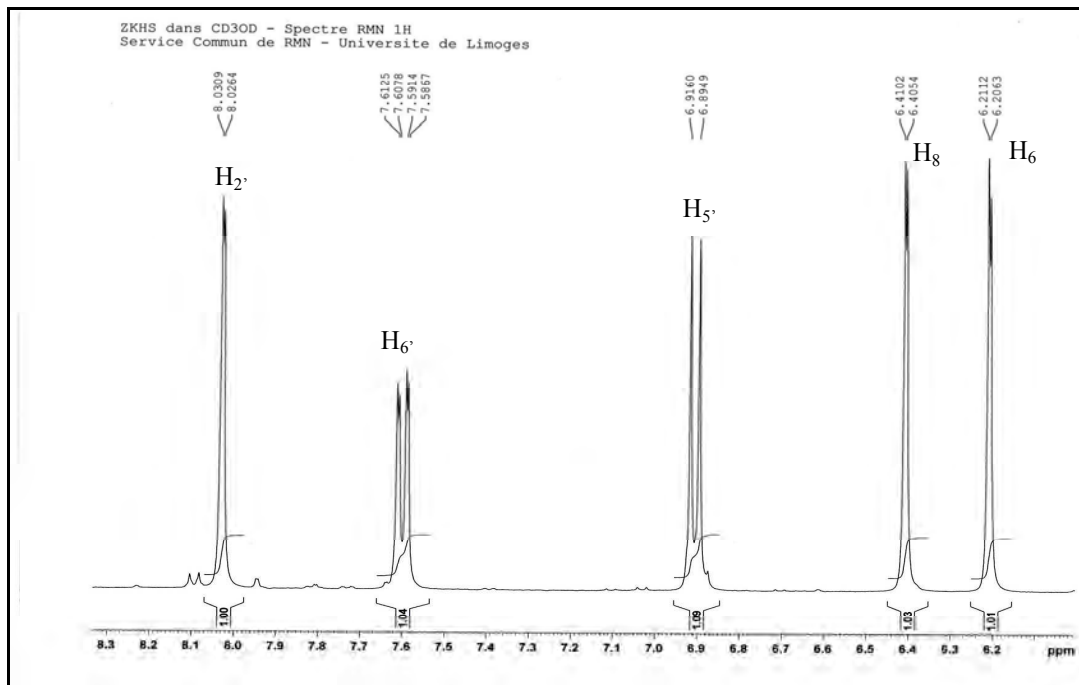
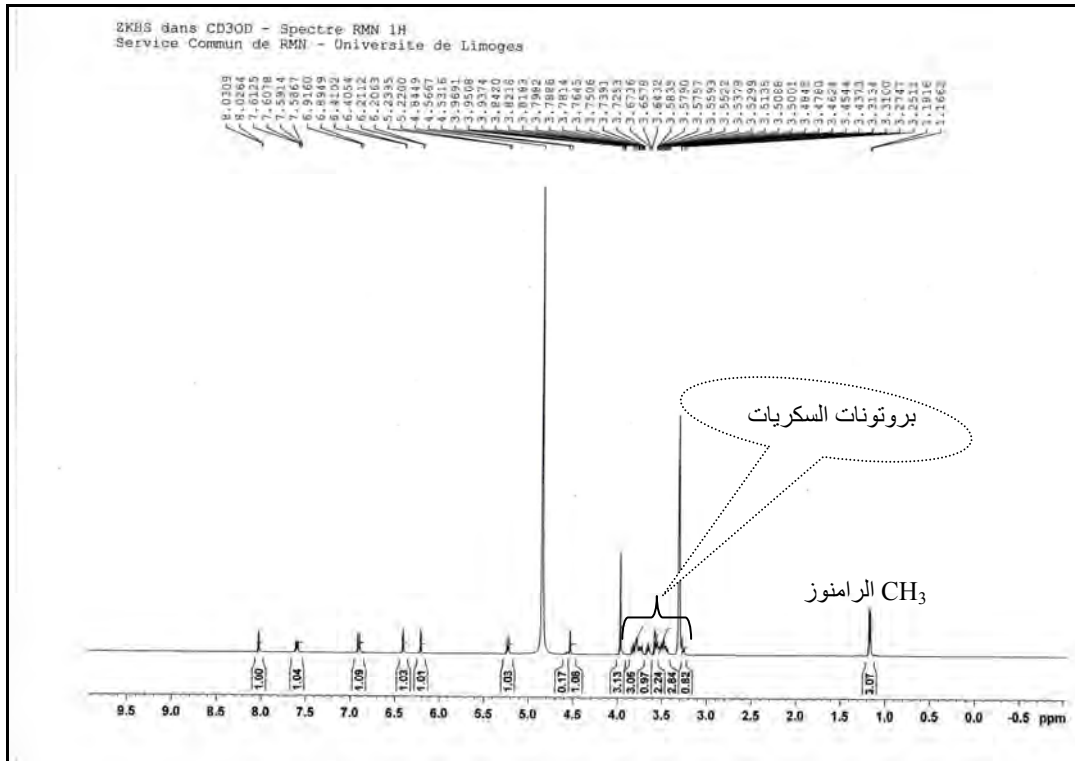
(شكل 6) والتي أعطت بقعة تعالق للبروتون الأنوميري الخاص بسكر rhamnose ذو الإزاحة 4.53 ppm مع الكربون رقم C6" ذو الإزاحة 67.6 ppm (شكل 3) ممّا يدل على أنّ هذا السكر (سكر rhamnose) يرتبط بالموقع 6 لسكر glucose .
و للإشارة فقد تمّ إرفاق إشارة كل بروتون بكاربونه تبعا لتقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد (شكل 5) **HMQC** إذا فالصيغة المفصلة للمركب **A7** هي:



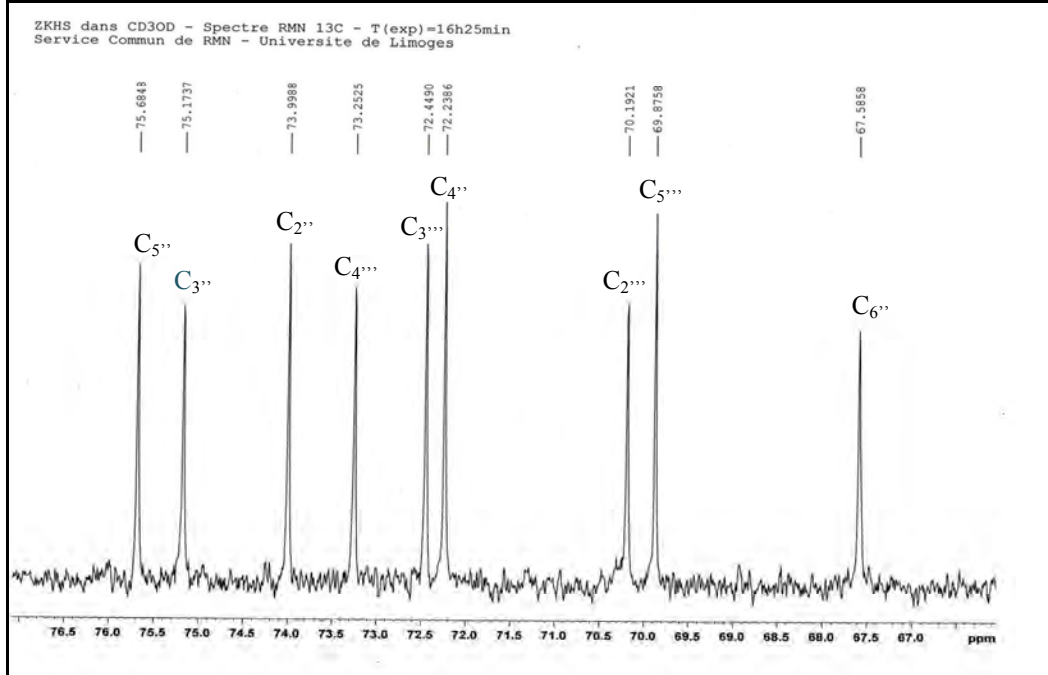
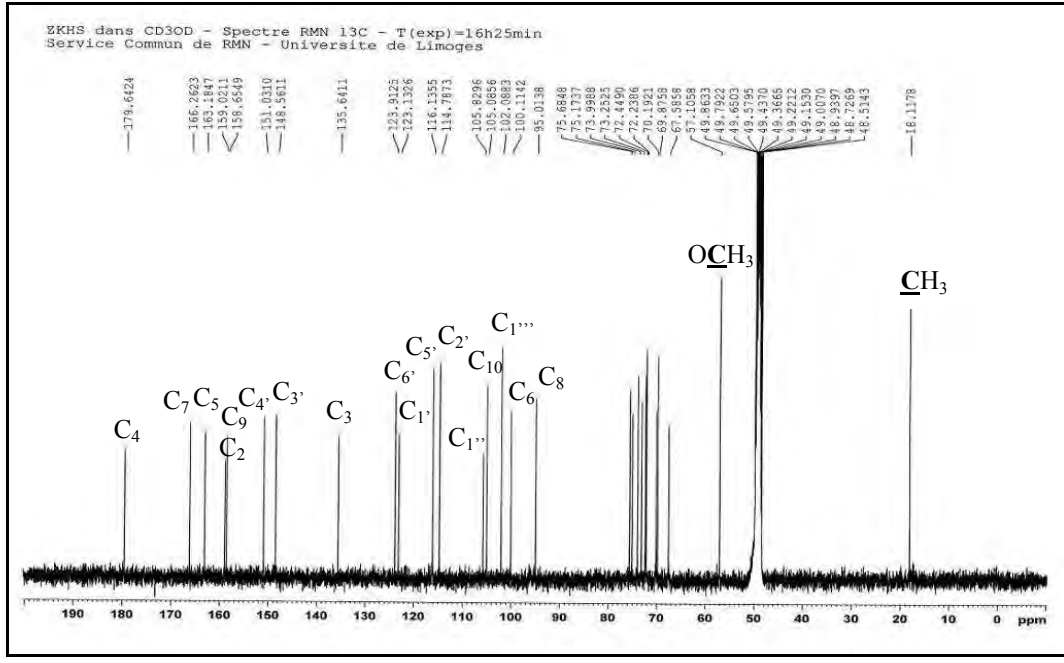
isorhamnetin-3-O-[[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside]



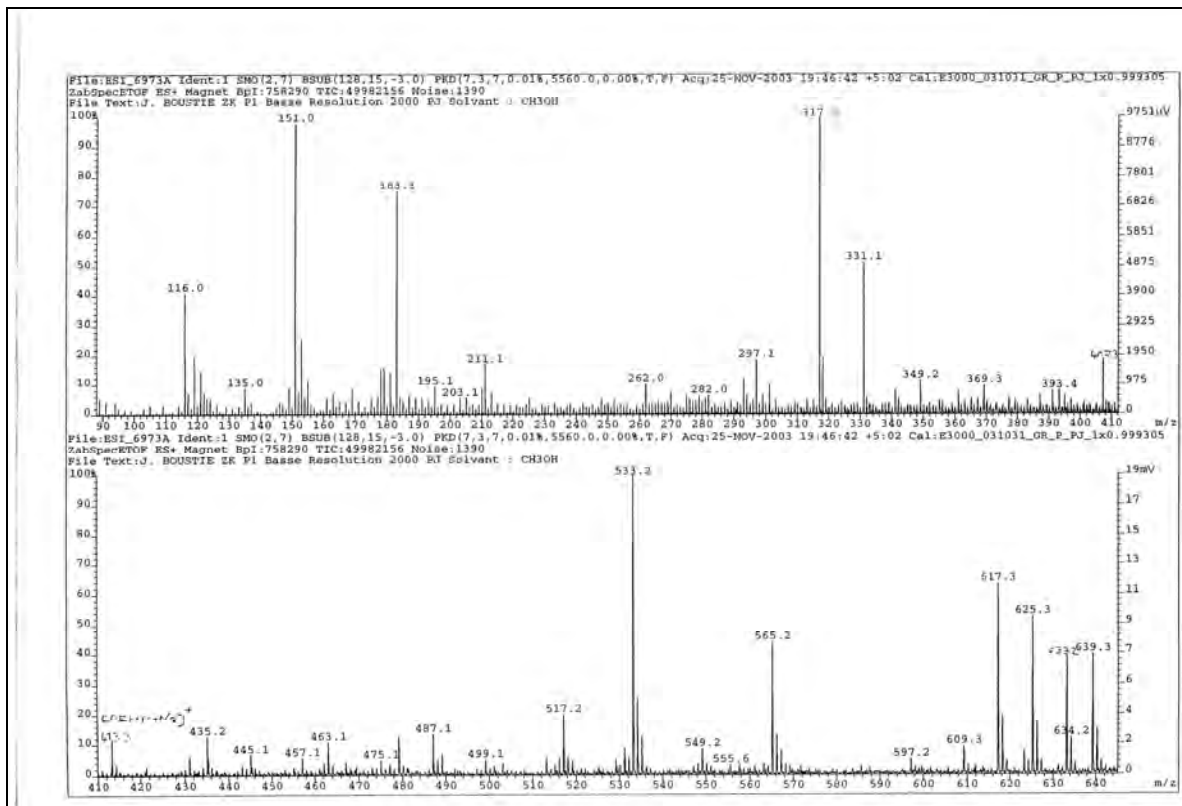
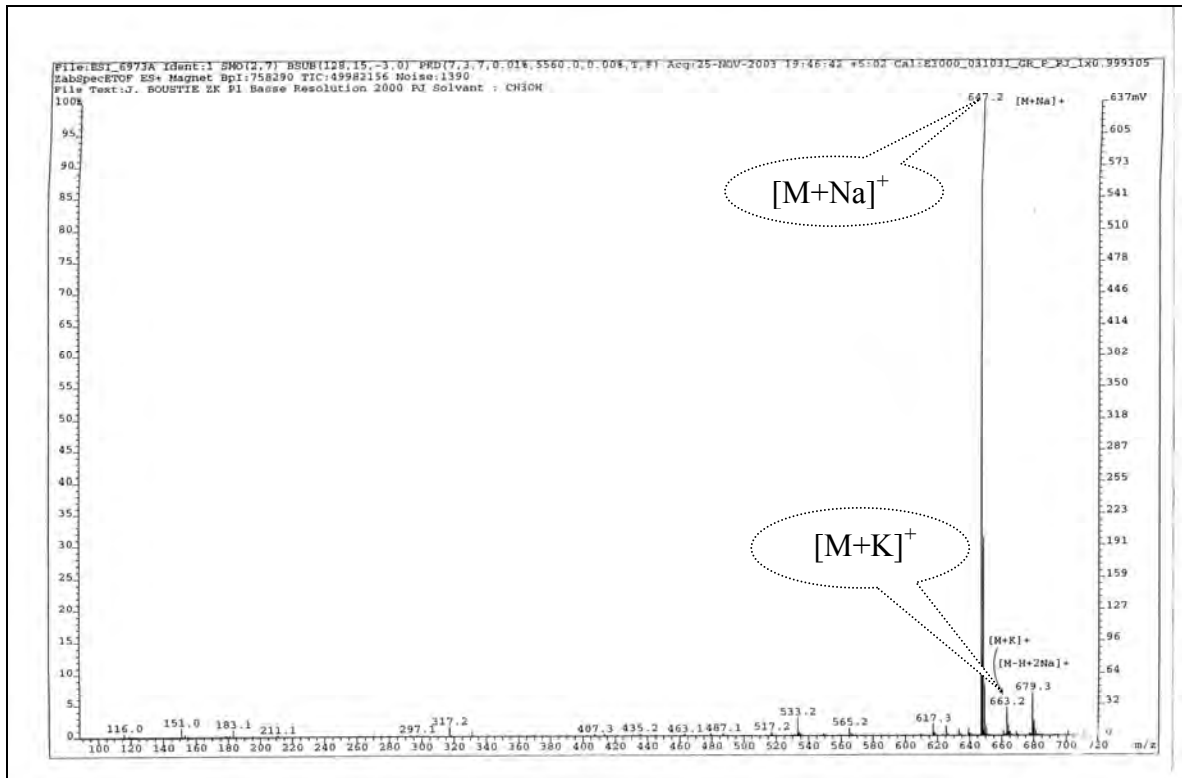
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب A₁



شكل 2: طيف ^1H RMN للمركب **2r** مع التكبيرات اللازمة

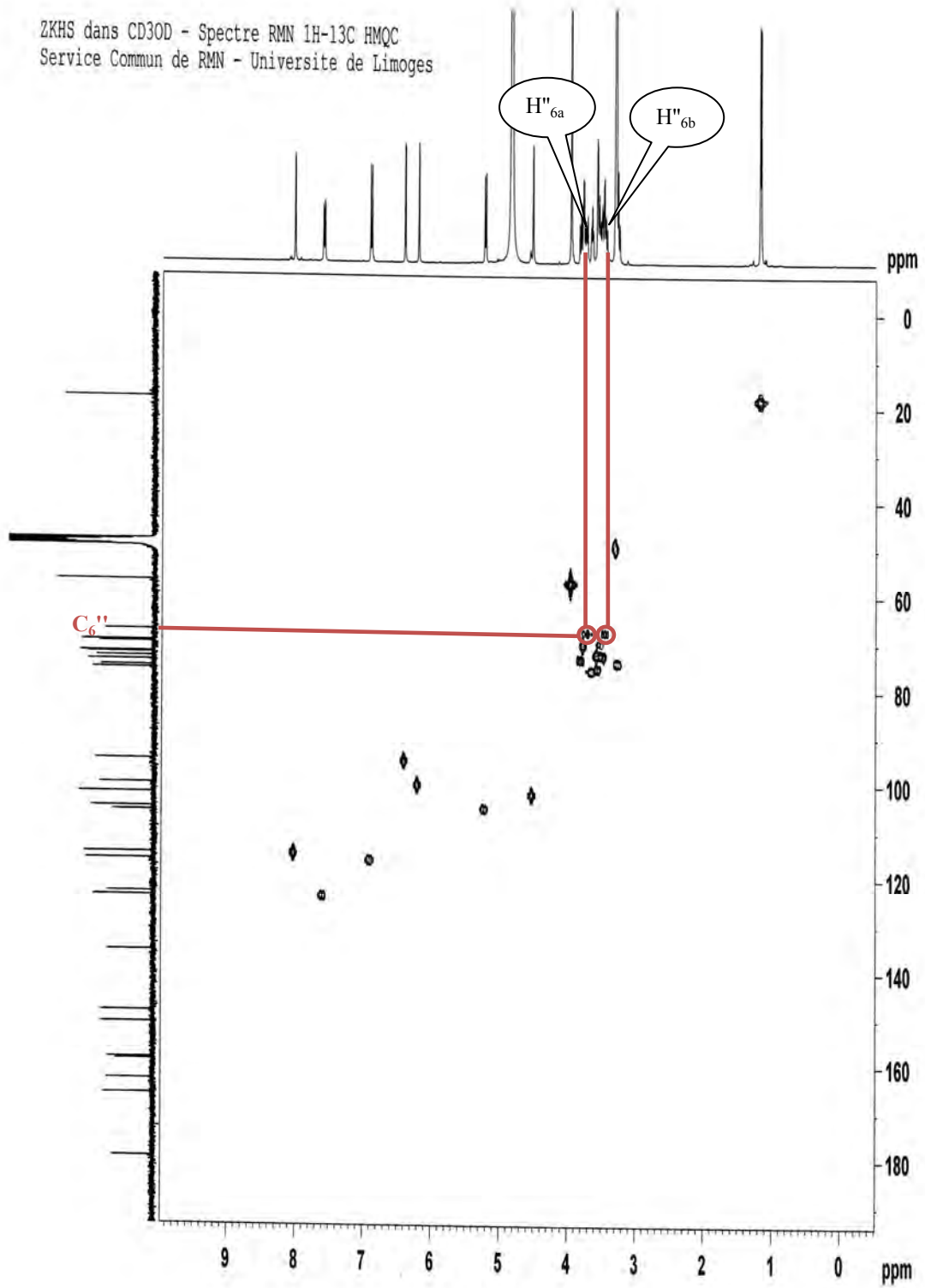


شكل 3: طيف ^{13}C RMN للمركب **1** مع التكبيرات اللازمة

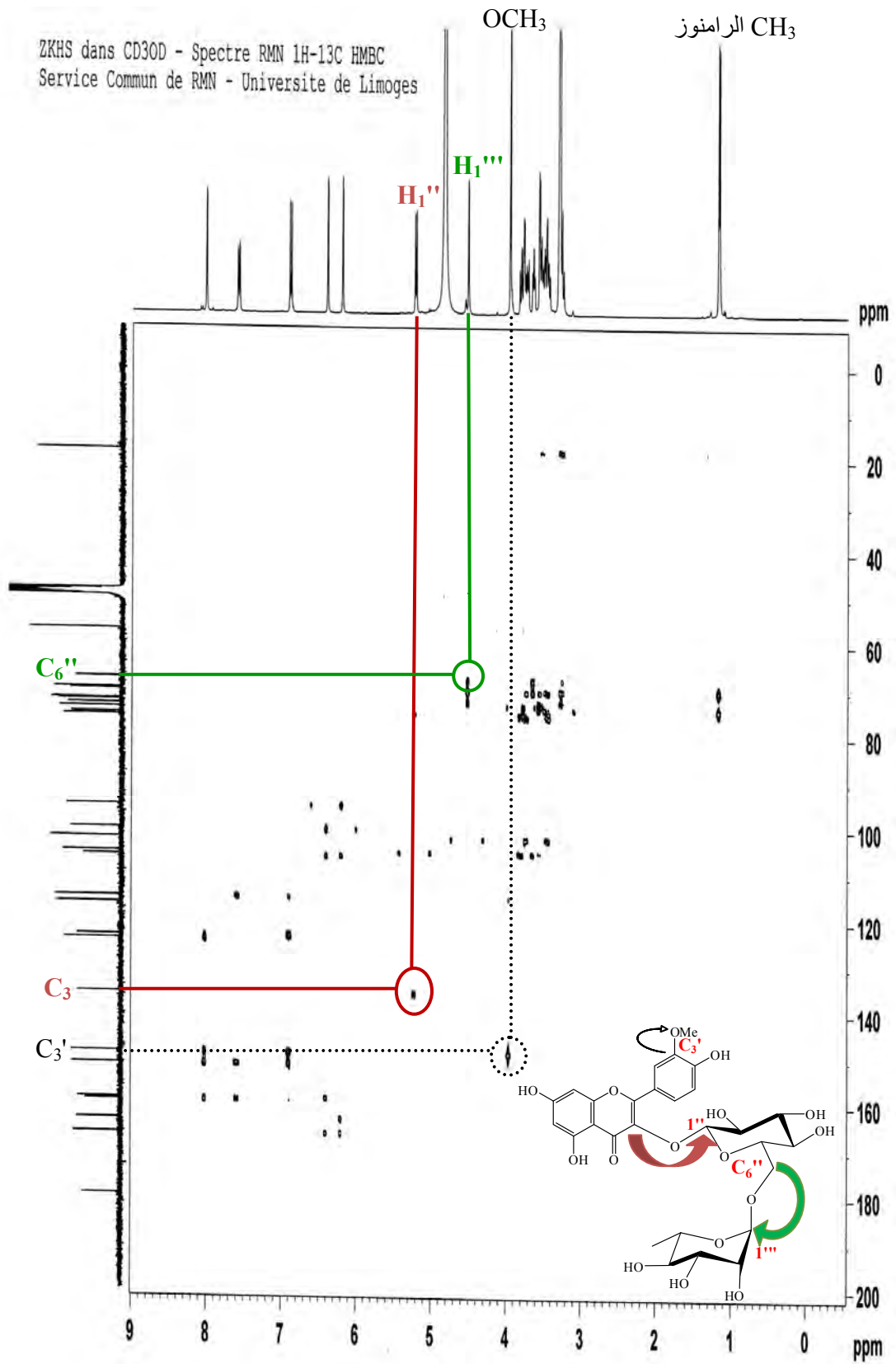


شكل 4: طيف الكتلة ES^+ للمركب **A**,

ZKHS dans CD3OD - Spectre RMN 1H-13C HMQC
Service Commun de RMN - Université de Limoges



شكل 5: طيف تجارب HMQC للمركب A₁



التعيين البنوي للمركب A_2 :

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

جدول 1: قيم R_f للمركب A_2

الجملة	R_f
4/3/3	0.33
13/3/3/1	0.64
10/2/1	0.19

2. الخصائص الطيفية:

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب A_2

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})
MeOH	351	254
NaOH	379	272
AlCl ₃	413	257
AlCl ₃ + HCl	410	270
NaOAc	363	274
NaOAc + H ₃ BO ₃	354	268

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 400MHz) :

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **A₂**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ _H (ppm)
H-6'	dd (<i>J</i> = 8.7 Hz, <i>J</i> = 2.1 Hz)	1H	7.77
H-2'	d (<i>J</i> = 2.1 Hz)	1H	7.67
H-5'	d (<i>J</i> = 8.7 Hz)	1H	7.05
H-8	sl	1H	6.38
H-6	sl	1H	6.19
H-1" (Glu)	d (<i>J</i> = 7.7 Hz)	1H	5.36
H-1'''(apio)	d (<i>J</i> = 1.5 Hz)	1H	5.46
H-1''''(rha)	d (<i>J</i> = 1.5 Hz)	1H	4.52
OCH ₃	s	3 H	3.93
CH ₃ (rha)	d (<i>J</i> = 6.2 Hz)	3 H	1.17
بروتونات السكريات	—		3.25 - 4.10

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (RMN ¹³C, CD₃OD, 100.6 MHz) :

جدول 4: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب **A₂**

الكربون الموافق	δ _C (ppm)	الكربون الموافق	δ _C (ppm)
C-3 "	75.7	C-2	158.9
C-4 "	71.1	C-3	135.7
C-5"	75.7	C-4	180.0
C-6 "	67.6	C-5	163.5
C-1'''	111.3	C-6	100.5
C-2'''	78.6	C-7	166.8
C-3'''	81.3	C-8	95.3
C-4'''	75.9	C-9	158.8
C-5 '''	66.6	C-10	106.2
C-1''''	102.3	C-1'	125.0
C-2''''	72.5	C-2'	112.7
C-3 ''''	72.8	C-3'	147.5
C-4''''	74.4	C-4'	152.0
C-5''''	70.2	C-5'	117.4
C-6''''	18.4	C-6'	123.8
OCH ₃	56.9	C-1"	102.1
—	—	C-2"	77.4

■ **الحلمهة الحمضية:**

○ **الشفق الأليكوني:**

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 5: نتائج مطيافية UV بعد الحلمهة الحمضية للمركب

الكاشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)
MeOH	367.8	255.2

○ **الشفق السكري:** سكر ثالث + glucose + rhamnose

■ **قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب A₂:**

الخصائص الكروماتوغرافية من لون استشعاعي و قيمة R_f للمركب A₂ في الجمل الثلاث تدل على أنه غليكوزيدا، أما قيمة العصابة I في الميثانول والمقدرة بـ 351 nm تدل على عدم وجود OH حر في الموضع 3.

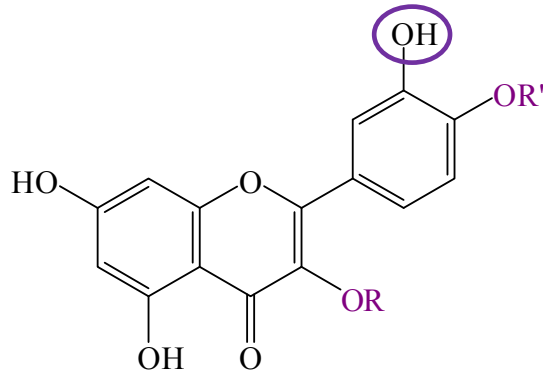
الإزاحة الباثوكرومية المتوسطة للعصابة I و المقدرة بـ 28 nm عند مقارنة طيف NaOH بطيف MeOH تدل على عدم وجود OH حر في الموقع 4.

غياب أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B نستدل عليه بالإزاحة الباثوكرومية الضعيفة عند مقارنة طيف NaOAc+H₃BO₃ مع طيف MeOH للعصابة I، وجود OH حر في الموقع 5 تؤكد الإزاحة الباثوكرومية المقدرة بـ 59 nm عند مقارنة طيف AlCl₃+HCl بطيف MeOH.

أما الإزاحة الباثوكرومية و المقدرة بـ 20 nm عند مقارنة طيف NaOAc بطيف MeOH للعصابة II تشير إلى وجود OH حرفي الموضع 7. (شكل 1)

من خلال هذه المعطيات يمكن وضع صيغة مبدئية للمركب A₂ وهي فلافونول مستبدل في

الموقعين 3 و 4 مع احتمال وجود أو عدم وجود مجموعة OH في الموقع 3 :



طيف $^1\text{H-NMR}$ (شكل 2) أكد صيغة الجزء الأليكوني من المركب وذلك بظهور إشارتين عند 6.38 ppm و 6.19 ppm تدلان على البروتونين H_6 و H_8 على الترتيب، إضافة إلى هذا ظهور ثلاث إشارات خاصة بالحلقة B مما يدل على أن هذه الأخيرة ثنائية الاستبدال أي وجود 3-OH ، اثنان من هذه الإشارات عبارة عن ثنائيتين بثابتي تزاوج $J = 8.7 \text{ Hz}$ و $J = 2.1 \text{ Hz}$ عند الإزاحتين 7.05 ppm و 7.67 ppm خاصتين بالبروتونين H_5' و H_2' على التوالي و الثالثة عبارة عن ثنائية ثنائية بثابتي تزاوج ($J = 8.7 \text{ Hz}$ ، $J = 2.1 \text{ Hz}$) عند الإزاحة 7.77 ppm خاصة بالبروتون H_6' .

- إضافة إلى هذا بين الطيف:

- وجود إشارة أحادية عند 3.93 ppm بتكامل 3 بروتونات تشير إلى مجموعة OCH_3 .
- و ثلاث إشارات ثنائية أخرى عند 5.36 ppm ($J = 7.7 \text{ Hz}$) و عند 5.46 ppm ($J = 1.5 \text{ Hz}$) وكذا عند 4.52 ppm ($J = 1.5 \text{ Hz}$) هي عبارة عن بروتونات أنوميرية لثلاث سكريات.
- إشارة ثنائية عند 1.17 ppm بتكامل 3 بروتونات و ثابت تزاوج ($J = 6.2 \text{ Hz}$) تشير إلى مجموعة ميثيل سكر rhamnose.

■ إلى حد الآن بينت المعطيات الطيفية السابقة بأن المركب \mathbf{A}_2 عبارة عن فلافونول مستبدل في الموقعين 3 و 4 أما طبيعة المستبدلات فهي عبارة عن مجموعة OCH_3 و ثلاث سكريات. إذن و لتحديد الصيغة المفصلة لهذا المركب لا بد لنا من تحديد طبيعة هذه السكريات إضافة إلى تحديد موقع كل منها مع مجموعة OCH_3 على الهيكل الفلافونيدي، تحديد طبيعة السكريات يقودنا إلى تقنيات أخرى منها:

✓ مطيافية الكتلة (شكل 3) والتي أعطت قمة جزيئية عند 755.6 ($[\text{M-H}]^-$) موافقة للصيغة المجملة $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{20}$ من خلال هذه الأخيرة يتم تحديد عدد كربونات السكريات فإذا استثنينا 16 ذرة كربون (الهيكل الفلافونيدي + مجموعة OCH_3) من مجموع 33 ذرة يبقى لدينا 17 ذرة خاصة بالسكريات الثلاث.

أحد هذه السكريات هو عبارة عن سكر rhamnose و ذلك حسب طيف ^1H RMN (ظهور مجموعة CH_3 الخاصة به عند 1.17 ppm)، سكر rhamnose يحتوي على 6 ذرات كربون يبقى لدينا 11 ذرة خاصة بالسكريين الآخرين إذن فأحدها يتكون من 6 ذرات و الآخر من 5 ذرات كربون.

○ من خلال ثابت التزاوج ($J = 1.5 \text{ Hz}$) والمميز للبروتونين الأنوميريين ذوا الإزاحتين 5.46 ppm و 4.52 ppm يدل على أن هذين السكريين يرتبطان برابطتين من نوع α فحسب طيف ^1H RMN لدينا إشارة واحدة فقط لميثيل سكر rhamnose كما أشرنا إليه سابقا ليبقى السكر الآخر و الذي بمطابقته بالمرجع [1] تبين بأنه عبارة عن سكر apiofuranose وهذا ما أكده طيف ^{13}C RMN بتقنية **J-mode** (شكل 4) حيث أعطى إشارتين عند 66.6 ppm و 75.9 ppm خاصتين بكربوني المجموعتين OCH_2 المميزتين للموقعين $5''$ و $4''$ على التوالي لهذا السكر. للإشارة فإن سكر apiofuranose يحتوي على 5 ذرات كربون وعليه فإن السكر الأخير يحتوي على 6 ذرات كربون فمن خلال عدد ذرات الكربون و ثابتة التزاوج ($J = 7.7 \text{ Hz}$) والتي تظهر عند 5.36 ppm و الحلمة الحمضية إتضح بأن هذا السكر glucose.

([1] Bedir, E., Calis, I., Piacente, S., Pizza, C., Khan, I A. (2000). A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulneraria*. Chem. Pharm. Bull., 12, 1994.)

و بهذا نكون قد تمكنا من تحديد طبيعة المستبدلات بقي لنا أن نعرف مواقع ارتباطها على الهيكل الفلافونيدي فإذا ما نظرنا إلى طيف تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد **HMBC** (شكل 7) نلاحظ عدة بقع تعالق منها:

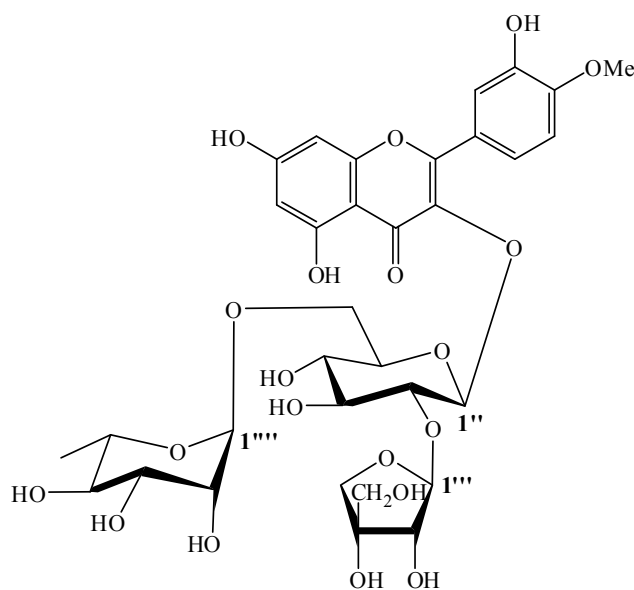
- بقعة تعالق لمجموعة OCH_3 مع C_4 مما يدل على أن OCH_3 ترتبط بالموقع 4' ومنه نستنتج بأن الهيكل الفلافونيدي الأغليكوني عبارة عن tamarixetine.
- إذن فالاحتمال الوحيد لتواجد السكريات الثلاث هو أن تكون هذه الأخيرة مرتبطة ببعض و ترتبط بالموقع رقم 3.
- البروتون الأنوميري لسكر glucose (H_1'') أعطى بقعة تعالق مع C_3 للأغليكون هذا يدل على أن سكر glucose يرتبط بالموقع 3 لهذا الأخير. (شكل 7)
- البروتونين الأنوميريين الآخرين لديهما نفس ثابتة التزاوج و كما بينا سابقا فإن أحدهما يعود إلى سكر rhamnose و الآخر لسكر apiofuranose، تقنية **HMBC** أظهرت بقعة تعالق للبروتون الأنوميري (H_1'') ذو الإزاحة 4.52 ppm مع الكربون C_6'' لسكر glucose ، كما أعطى بقعة تعالق أخرى مع الكربون C_5'' لسكر rhamnose في نفس الوقت أعطى CH_3 rhamnose بقعة تعالق مع نفس

الكربون مما يدل على أن هذا البروتون الأنوميري خاص بسكر rhamnose ومنه فهذا يعني أن هذا السكر يرتبط بالموقع 6 لسكر glucose.

■ إذن فالبروتون الأنوميري ذو الإزاحة 5.46 ppm يعود إلى سكر apiofuranose و لقد أعطى هذا الأخير بقعة تعالق مع الكربون C₂ لسكر glucose و بقعة أخرى مع C₃ لسكر apiofuranose مما يدل على أن هذا البروتون الأنوميري خاص فعلا بسكر apiofuranose. (شكل 7)

■ **ملاحظة:** لقد تم رفع بروتونات المركب **A₂** بالكربونات الموافقة لها من خلال طيف تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد **HMQC** (شكل 5).

■ و منه و **كنتيجة نهائية:** المركب **A₂** هو عبارة عن tamarixetine مستبدل في الموقع 3 بثلاث سكريات و هي سكر glucose ، سكر rhamnose و سكر apiofuranose مرتبطة مع بعض كالاتي:
سكر glucose يرتبط بالموقع 3 لهيكل tamarixetine ، سكر apiofuranose يرتبط بالموقع 2 لسكر glucose أما بالنسبة لسكر rhamnose فهو يرتبط بالموقع 6 لسكر glucose ومنه فإن الصيغة المفصلة لهذا المركب هي:

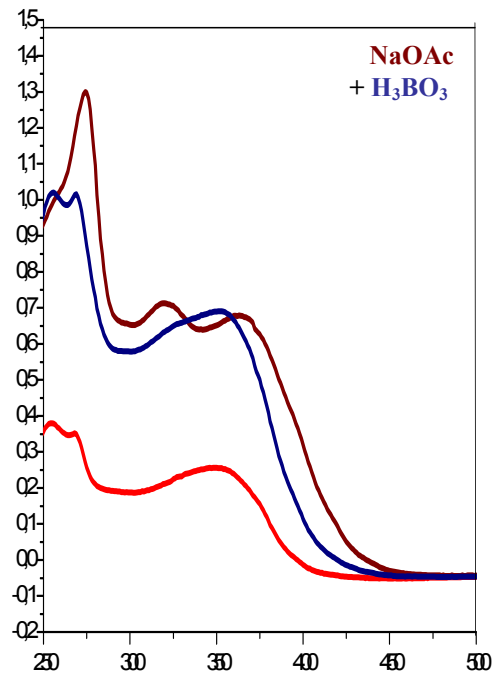
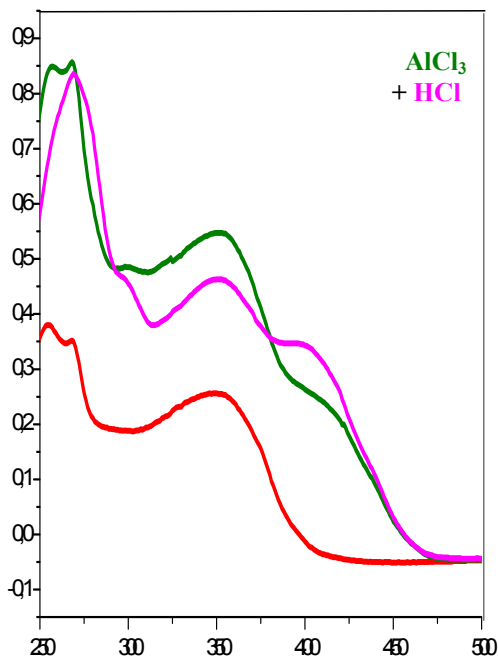
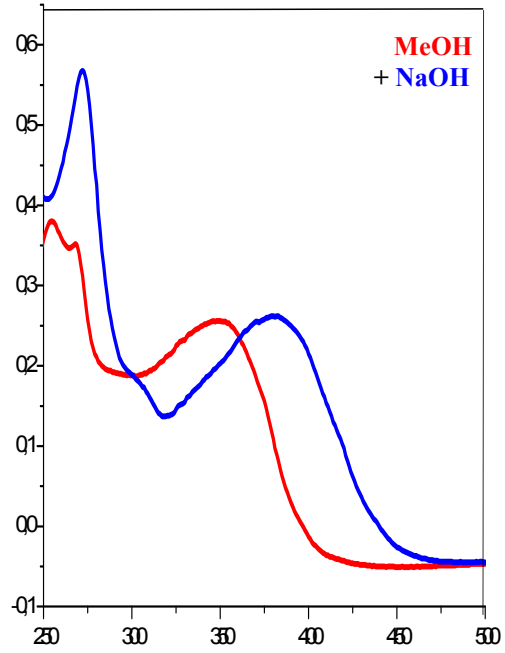
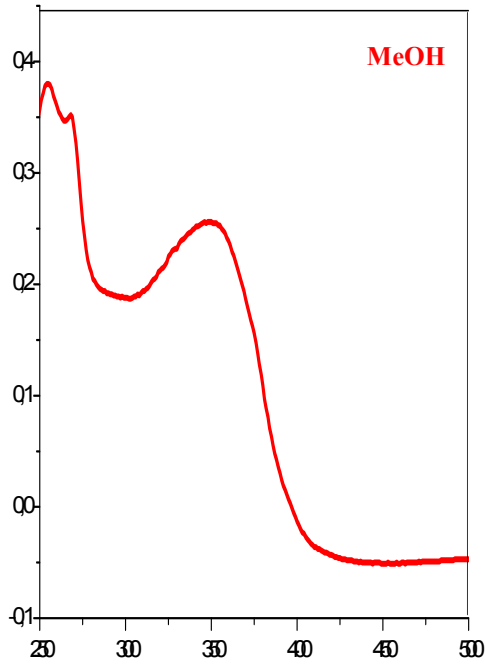


tamarixetin-3-O-[α-L-apiofuranosyl-(1→2)-{α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)}-β-D-glucopyranoside]

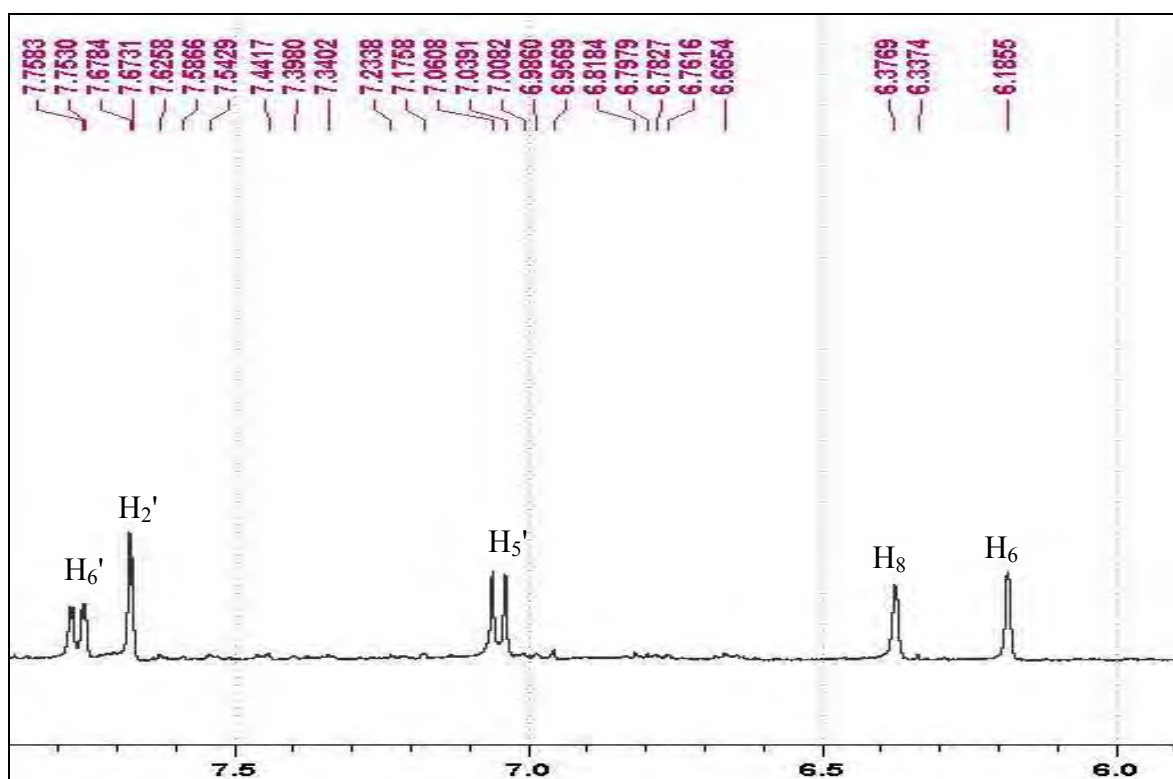
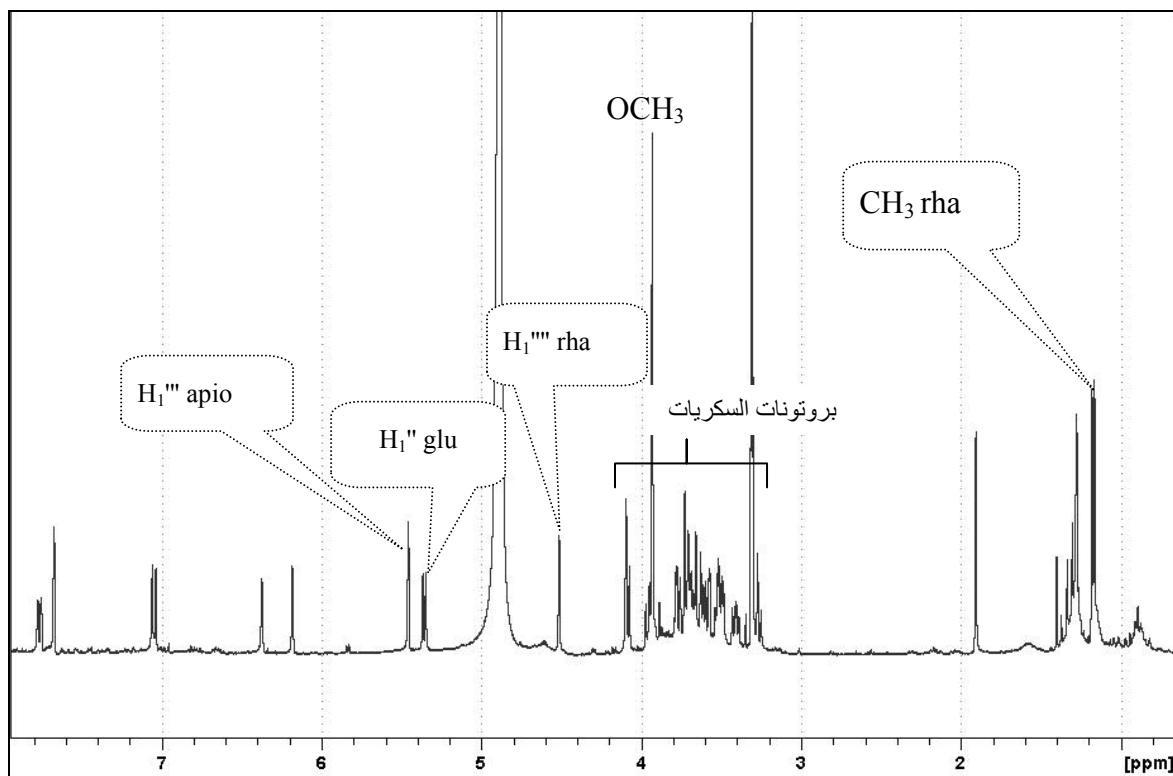
و هو مركب جديد في المملكة النباتية

جدول 6 :أهم نتائج الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بروتون-كربون لتجارب ***HMBC***

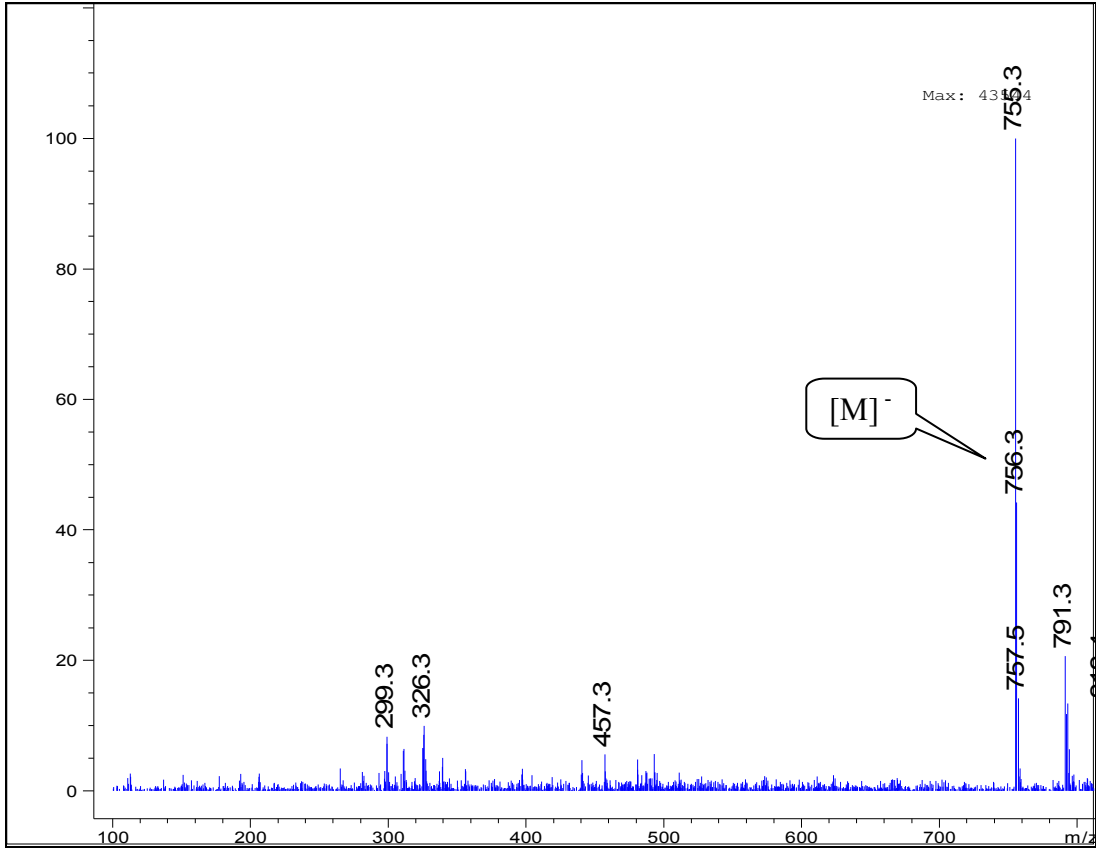
البروتون	δ_H (ppm)	قيم δ_{13C} (ppm) اعتمادا على طيف <i>HMQC</i>	مختلف تعالقات البروتونات و الكربونات المجاورة لها حسب طيف <i>HMBC</i>
H-2'	7.67	112.7	C-2, C-3', C-4'
H-6'	7.77	123.8	C-2, C-4'
H-5'	7.05	117.4	C-1', C-3', C-4'
H-8	6.38	95.3	C-7, C-9, C-10
H-6	6.19	100.5	C-5, C-7 , C-10
H-1'' (Glu)	5.36	102.1	C-3
H-2'' (Glu)	3.95	77.4	C-1'''
H-1''' (apio)	5.46	111.3	C-2''
H-1'''' (Rha)	4.52	102.3	C-6''



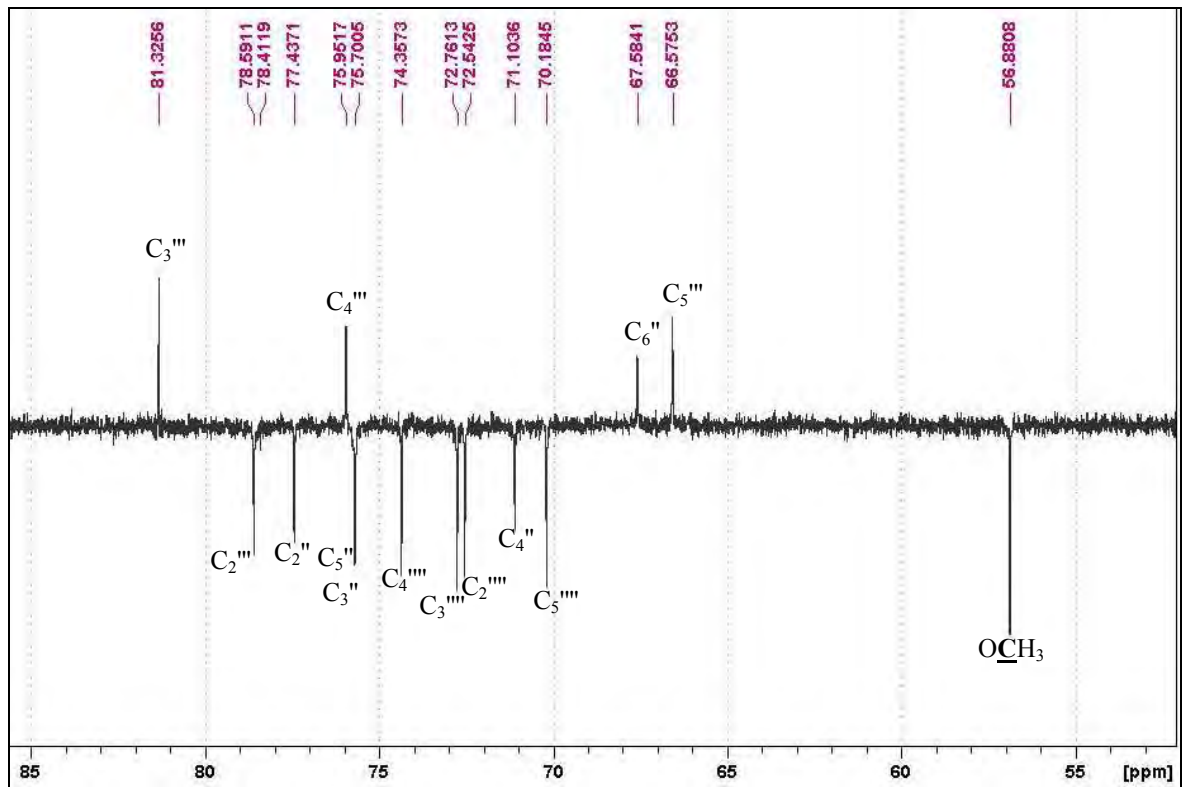
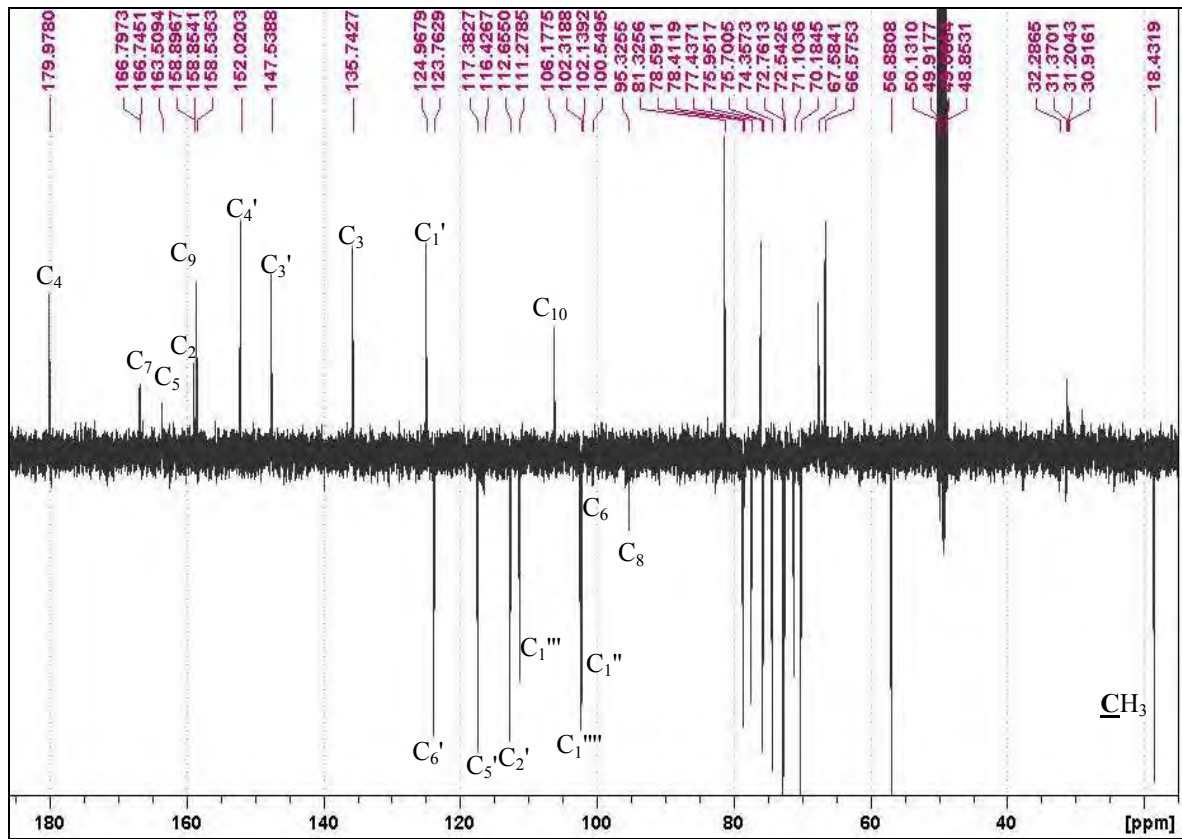
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب A₂



شكل 2: طيف ¹H RMN للمركب **A₂** مع التكبيرات اللازمة

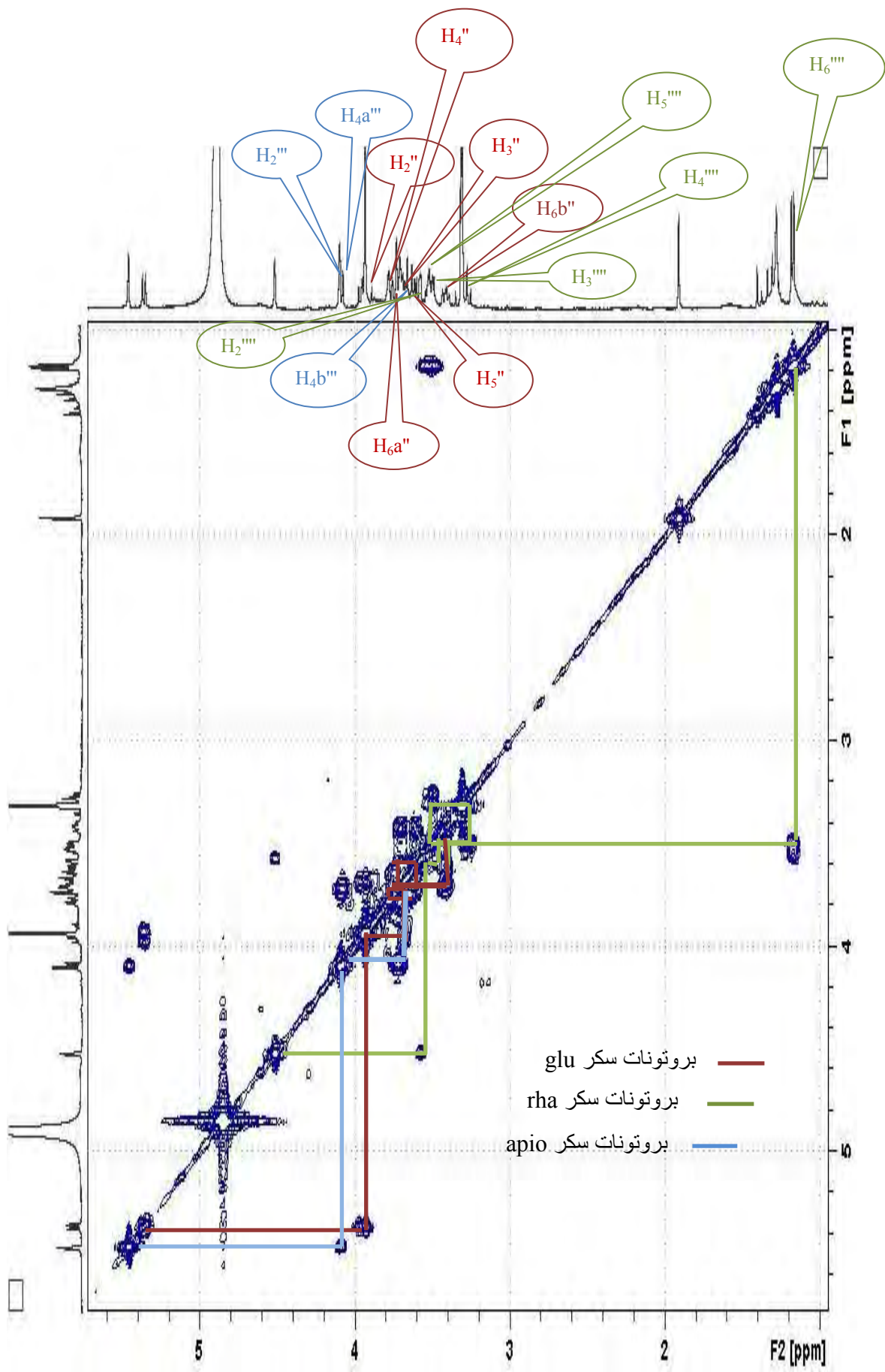


شكل 3 : طيف الكتلة للمركب A_2 بتقنية $AP1-ES^-$

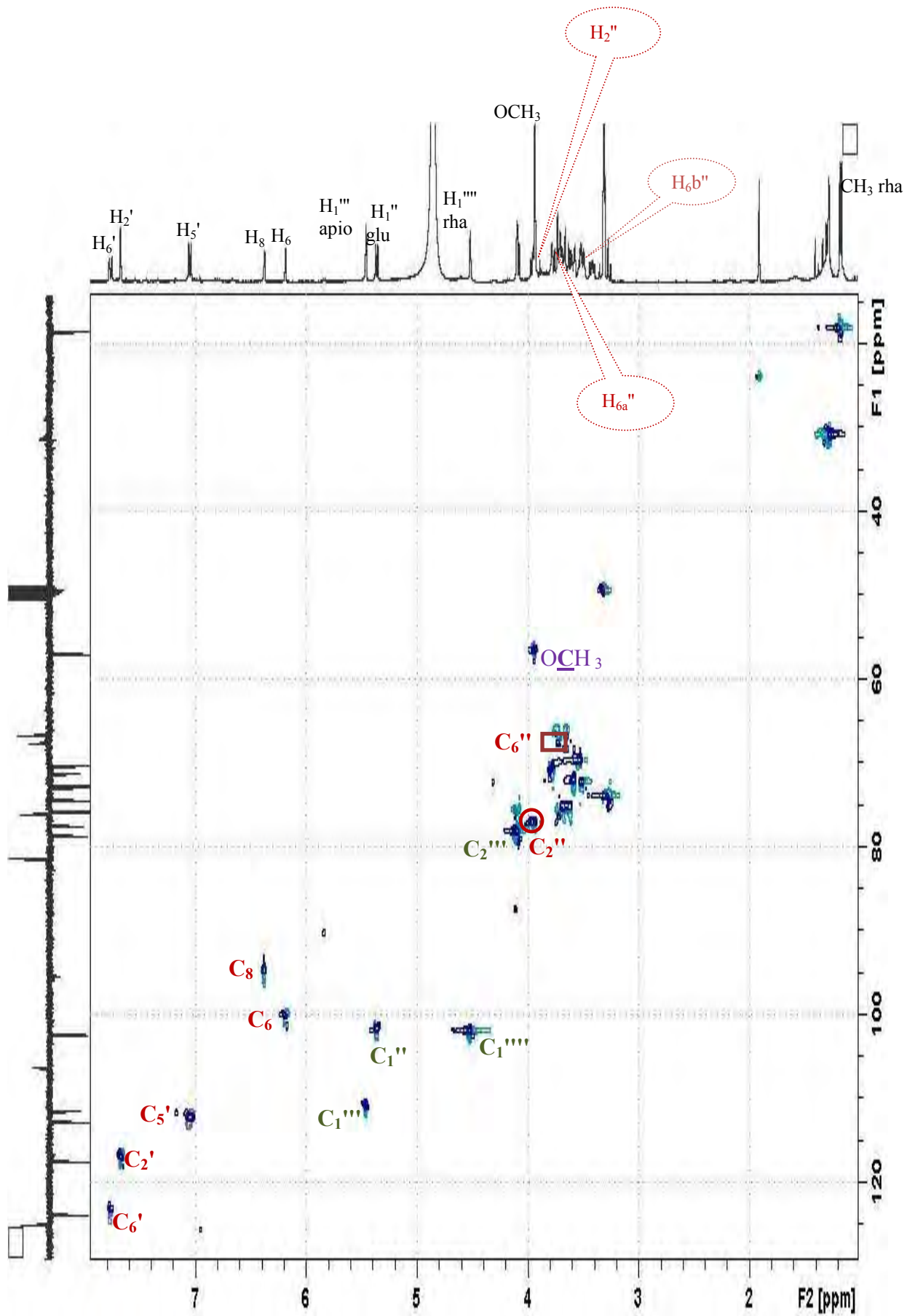


شكل 4: طيف ^{13}C RMN للمركب A_2 بتقنية $J\text{-Mode}$

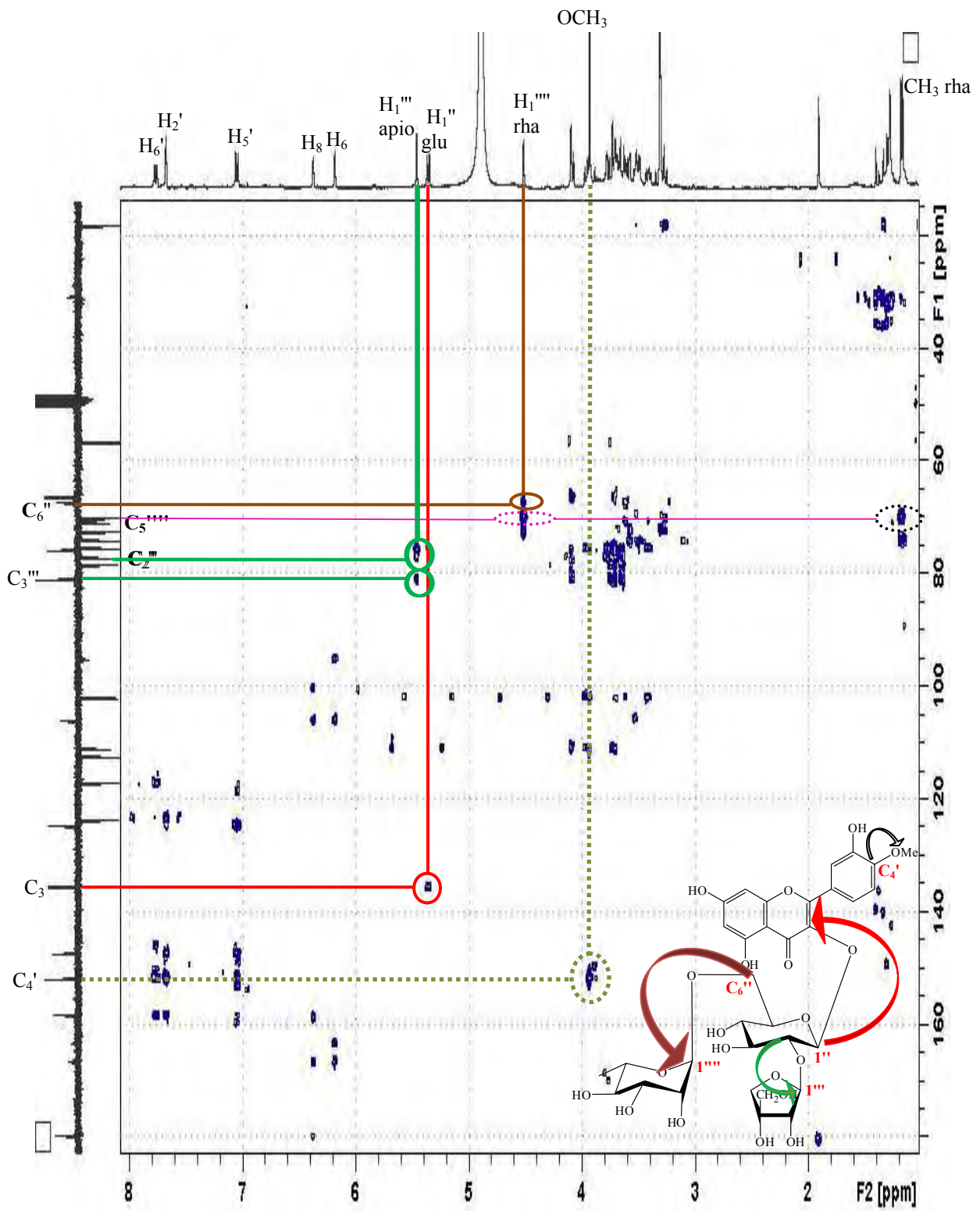
مع التكبيرات اللازمة



شكل 5: طيف تجارب *Cosy* للمركب A_2



شكل 6: طيف تجارب ${}^1\text{H}$ و ${}^{13}\text{C}$ HMQC للمركب A_2



شكل 7: طيف تجارب *HMBC* للمركب *A₂*

التعيين البنوي للمركب A_3 :

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

جدول 1: قيم R_f للمركب A_3

الجملة	R_f
4/3/3	0.29
13/3/3/1	0.60
10/2/1	0.29

2. الخصائص الطيفية:

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب A_3

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})	عصابات أخرى (نم) (λ_{max})
MeOH	356	253	
NaOH	410	271	327
AlCl ₃	415	267	
AlCl ₃ + HCl	403	267	
NaOAc	356	267	
NaOAc + H ₃ BO ₃	357	269	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 400 MHz) :

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **A₃**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ_H (ppm)
H-2'	d ($J = 1.9$ Hz)	1H	8.05
H-6'	dd ($J = 8.5$ Hz, $J = 1.9$ Hz)	1H	7.59
H-5'	d ($J = 8.5$ Hz)	1H	6.92
H-8	d ($J = 1.6$ Hz)	1H	6.40
H-6	d ($J = 1.6$ Hz)	1H	6.19
H-1'' (Gala)	d ($J = 7.8$ Hz)	1H	5.58
H-1''' (apio)	d ($J = 2.0$ Hz)	1H	5.44
H-1'''' (rha)	d ($J = 1.5$ Hz)		4.54
OCH ₃	s	3 H	4.03
CH ₃ (rha)	d ($J = 6.1$ Hz)	3 H	1.20
بروتونات السكريات	—		3.28 - 4.06

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (RMN ¹³C, CD₃OD, 100.6 MHz) :

جدول 4: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب **A₃**

الكربون الموافق	δ_C (ppm)	الكربون الموافق	δ_C (ppm)
C-3 ''	75.8	C-2	159.0
C-4 ''	70.9	C-3	135.2
C-5''	75.8	C-4	179.8
C-6 ''	67.8	C-5	163.6
C-1'''	111.1	C-6	100.3
C-2'''	78.5	C-7	166.3
C-3'''	81.4	C-8	95.2
C-4'''	76.1	C-9	158.9
C-5'''	66.9	C-10	106.4
C-1''''	102.4	C-1'	123.9
C-2''''	72.6	C-2'	115.2
C-3''''	72.8	C-3'	148.9
C-4''''	74.4	C-4'	151.1
C-5''''	70.2	C-5'	116.4
C-6''''	18.4	C-6'	124.0
OCH ₃	57.6	C-1''	101.8
—	—	C-2''	77.1

○ مطيافية الكتلة:

جدول 5: نتائج طيف الكتلة للمركب **A₃**

ES ⁺		ES ⁻	
الشاردة	(m/z)	الشاردة	(m/z)
[M+Na] ⁺	779.5	[M] ⁻	756.7
[M+H+Na] ⁺	780.6		
[M +H -Orha – H ₂ O] ⁺	576.7	[M-H] ⁻	755.6
[M +3H-Oapio-rha] ⁺	463.6		
[M +5H-Ogal-rha-apio] ⁺	304.5		

■ الحلمهة الحمضية:

○ الشفق الأجليكوني:

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 6: نتائج مطيافية UV بعد الحلمهة الحمضية للمركب **A₁**

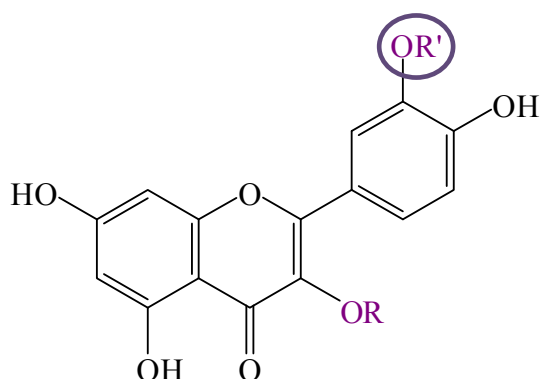
الكاشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)
MeOH	365.2	256.1

○ الشفق السكري: سكر ثالث + glucose + rhamnose

■ قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:

قيمة R_f للمركب في الجمل الثلاث تدل على أن المركب غليكوزيد متعدد السكر، فإذا ما قمنا بمقارنة نتائج أطيف الأشعة فوق البنفسجية لهذا المركب مع سابقه **A₁** نجدتها تقريبا متطابقة أي أن هذا المركب عبارة عن فلافونول مستبدل في الموقع 3 مع احتمال وجود مستبدل آخر في الموقع 3' أو عدم وجوده. (شكل 1)

إذن فهذه المعطيات تقودنا إلى وضع نفس الصيغة الأولية للمركب **A**:



و كتأكيد لهذه الصيغة الأولية ولمعرفة طبيعة المستبدلات لجأنا إلى:

أولاً: طيف ^1H RMN (شكل 2) الذي بين وجود حلقة B ثنائية الاستبدال و يتجلى ذلك من خلال ظهور ثلاث إشارات عند 6.92 ppm (ثنائية)، 7.59 ppm (ثنائية ثنائية) و 8.05 ppm (ثنائية) موافقة لـ H_5' ، H_6' و H_2' على التوالي و هذا يدل على وجود مجموعة مستبدلة في الموقع 3، حلقة A كذلك ثنائية الاستبدال و يتضح ذلك من خلال ظهور إشارتين ثنائيتين عند 6.19 ppm و 6.40 ppm موافقتين لـ H_6 و H_8 على الترتيب بنفس ثابت التزاوج. إضافة إلى هذا بين الطيف:

- وجود إشارة أحادية عند 4.03 ppm بتكامل 3 بروتونات تشير إلى مجموعة OCH_3 .
- و ثلاث إشارات ثنائية أخرى عند 5.58 ppm ($J = 7.8 \text{ Hz}$)، 5.44 ppm ($J = 2.0 \text{ Hz}$) و 4.54 ppm ($J = 1.5 \text{ Hz}$) هي عبارة عن بروتونات أنوميرية لثلاث سكريات.
- إشارة ثنائية عند 1.20 ppm بتكامل 3 بروتونات تشير إلى مجموعة ميثيل سكر rhamnose.
- إذن فهذه المستبدلات هي عبارة عن مجموعة OCH_3 و ثلاث سكريات أحدها عبارة عن سكر rhamnose ولمعرفة طبيعة السكرين المتبقين نذهب إلى :

ثانياً: طيف الكتلة (شكل 3) و كفكرة أولية يمكن على الأقل معرفة عدد كربونات هذه السكريات حيث أعطى هذا الطيف قمة جزيئية عند 756.7 (M⁻) موافقة للصيغة المجملة $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{20}$ ، فإذا اعتبرنا بأن الهيكل الفلافونيدي يحتوي على 15 ذرة كربون مع مجموعة OCH_3 يصبح لدينا 16 ذرة كربون إذن يبقى 17 منها عبارة عن مجموع كربونات السكريات الثلاث و باعتبار أن أحد هذه السكريات عبارة عن سكر rhamnose، أي نستثنى 6 ذرات كربون أخرى من

مجموع 17 يبقى بحوزتنا 11 ذرة خاصة بالسكرين المتبقين، فأحدهما يحتوي على 6 كربونات و الآخر 5 فقط.

- بالنسبة للبروتون الأنوميري ذو ثابت التزاوج ($J = 7.8 \text{ Hz}$) و الذي يظهر عند 5.58 ppm يدل إما على سكر glucose أو galactose وكلاهما يحتوي على 6 ذرات كربون.
- الحلمة الحمضية حررت سكر galactose والذي أكد طبيعته كذلك مقارنة الجزء السكري لهذا المركب مع نفس المركب بالمرجع [1].
- أما بالنسبة للبروتون الأنوميري الثالث الخاص بالسكر ذو الخمس كربونات فهو بروتون أنوميري لسكر apiofuranose و ذلك حسب الدراسة البيليوغرافية [1] و ما أكد ذلك:

([1] Bedir, E., Calis, I., Piacente, S., Pizza, C., Khan, I A. (2000). A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulneraria*. Chem. Pharm. Bull., 12, 1994.)

ثالثاً: طيف ^{13}C RMN بتقنية **J-mode** (شكل 5) حيث بالإضافة إلى ظهور إشارة عند 67.8ppm خاصة بـ CH_2O لسكر galactose أعطى إشارتين أخريتين عند 66.9 ppm و 76.1 ppm تدلان على CH_2O للموقعين $5''$ و $4''$ لسكر apiofuranose على التوالي بالإضافة إلى كربون رباعي للموقع $3''$ عند 81.4 ppm لنفس السكر.

و كخلاصة: حسب كل المعطيات الطيفية السابقة لدينا إذن موقعي استبدال $3'$ و 3 على الهيكل الفلافونيدي و أربع مستبدلات متمثلة في:

- مجموعة OCH_3

- سكر galactose

- سكر rhamnose

- سكر apiofuranose

بقي الآن التعرف على كيفية ارتباط هذه المستبدلات بالهيكل الفلافونيدي، وهذا يقودنا إلى:

رابعاً: تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد **HMBC** (شكل 6) حيث بينت هذه الأخيرة:

➤ بقعة تعالق لمجموعة OCH_3 مع C_3' مما يدل على أن OCH_3 ترتبط بالموقع $3'$ ومنه نستنتج بأن

الهيكل الفلافونيدي الأغليكوني عبارة عن isorhamnetine

- إذن فالاحتمال الوحيد لتواجد السكريات الثلاث هو أن تكون هذه الأخيرة مرتبطة ببعض و ترتبط بالموقع رقم 3.

➤ بقعة تعالق للبروتون الأنوميري الخاص بسكر galactose مع الكربون رقم 3 هذا يشير إلى أن هذا السكر يرتبط مباشرة بهيكل isorhamnetine. (شكل 6)

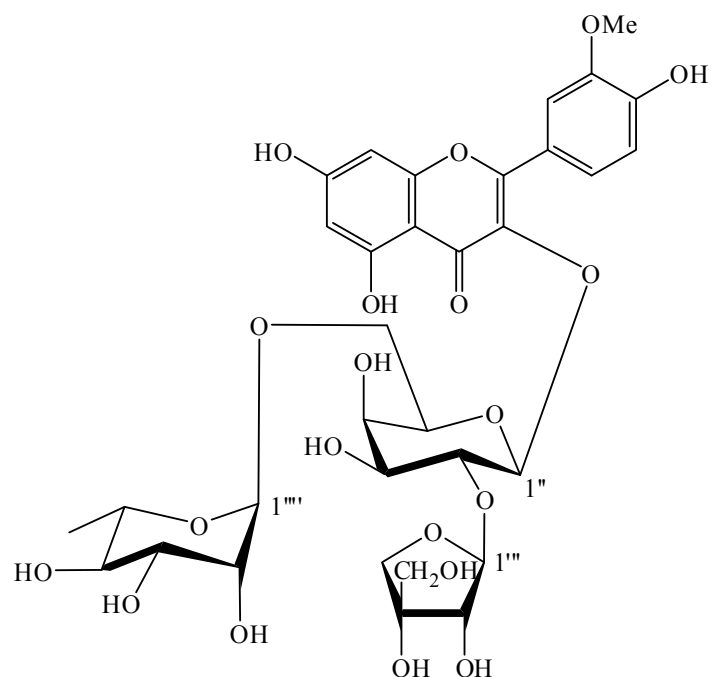
❖ حسب ما ذكرنا سابقا طيف $^1\text{H RMN}$ بين وجود بروتونين أنوميرين آخرين إضافة إلى البروتون الأنوميري الخاص بسكر galactose ذات الإزاحتين 5.44 ppm و 4.54 ppm وهما خاصتين بسكري apiofuranose و rhamnose و كما نلاحظ فإن ثابت التزاوج لكلا البروتونين متقاربة و لمعرفة أي البرتونين خاص بسكر rhamnose و أيهما خاص بسكر apiofuranose دائما نلجأ إلى تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد **HMBC** (شكل 6) حيث بينت:

➤ بقعة تعالق للبروتون الأنوميري ذو الإزاحة 4.54 ppm مع الكربون رقم 6 أي (C_6) ، إضافة إلى هذا نفس البروتون أعطى بقعة تعالق مع الكربون رقم 5 أي (C_5) لسكر rhamnose وبالموازاة أعطى ممثل سكر rhamnose بقعة تعالق مع نفس الكربون أي (C_5) مما يدل على أن البروتون الأنوميري ذو الإزاحة 4.54 ppm خاص بسكر rhamnose و عليه فإن هذا السكر يرتبط بالموقع رقم 6 لسكر galactose .

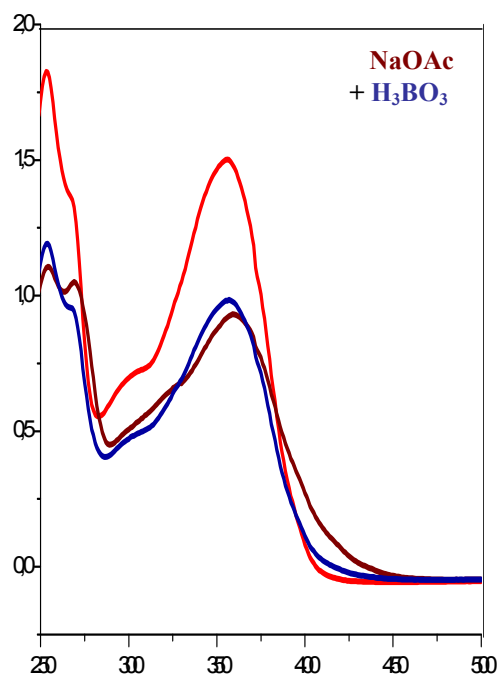
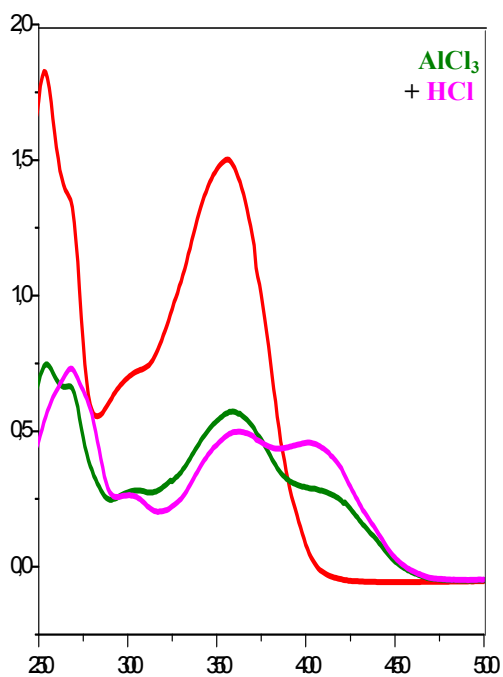
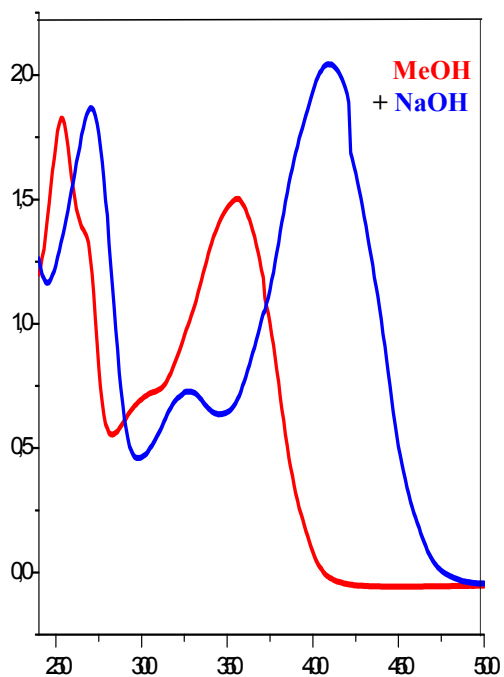
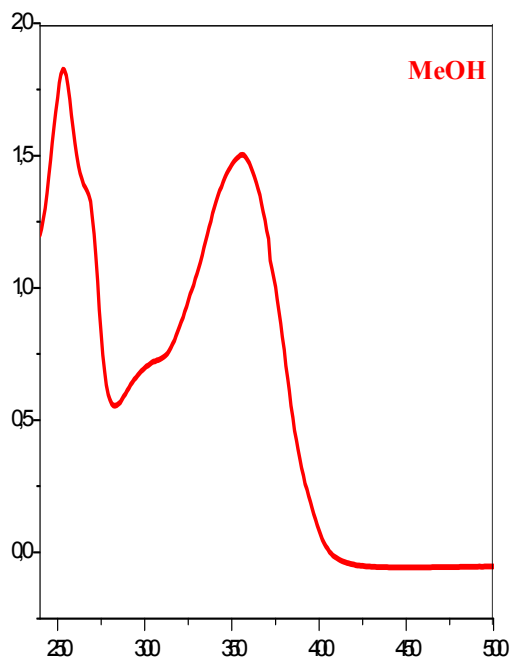
➤ بقعة تعالق أخرى للبروتون الأنوميري ذو الإزاحة 5.44 ppm مع الكربون رقم 2 (C_2) لسكر galactose وبقعة تعالق أخرى لنفس البروتون مع الكربون رقم 3 لسكر apiofuranose أي (C_3) (شكل 6) هذا ما يؤكد بأن هذا البروتون الأنوميري هو لسكر apiofuranose و عليه فإن هذا السكر يرتبط بالموقع 2 لسكر galactose .

❖ و منه و **كحوصلة نهائية** المركب **A** هو عبارة عن isorhamnetine مستبدل في الموقع 3 بثلاث سكريات و هي سكر galactose ، سكر rhamnose و سكر apiofuranose مرتبطة مع بعض كالاتي:

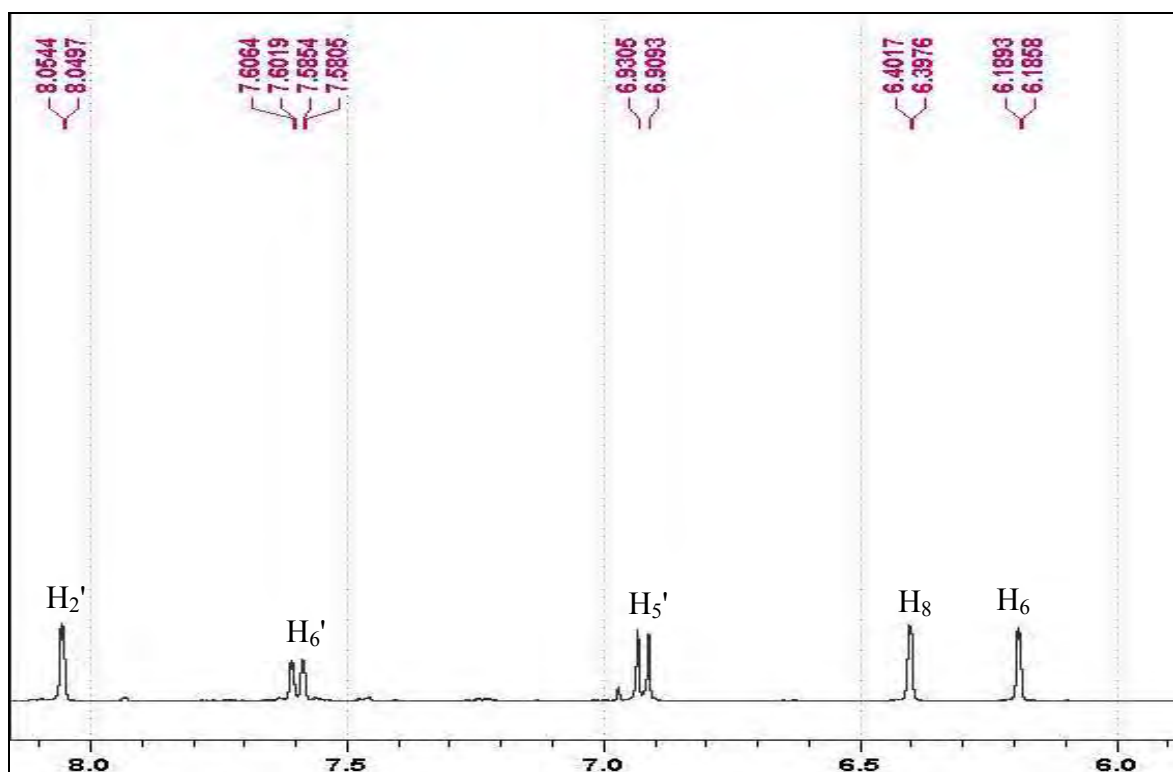
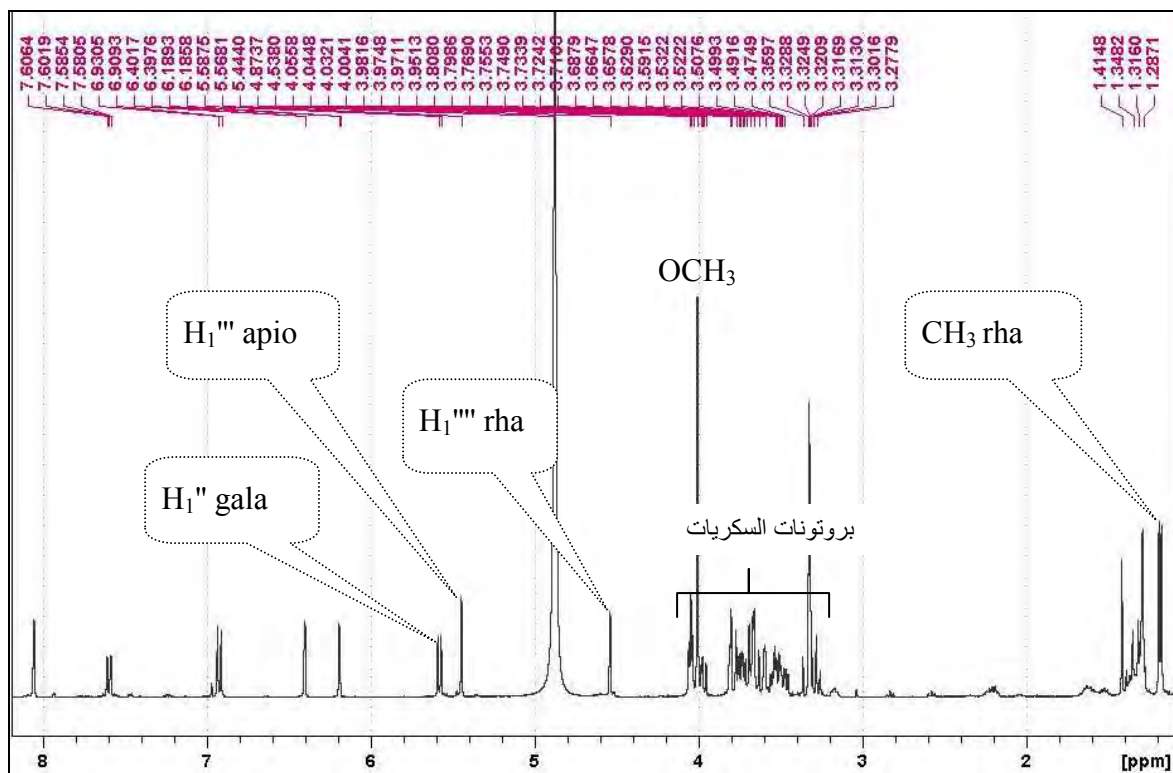
سكر galactose يرتبط بالموقع 3 لهيكل isorhamnetine ، سكر apiofuranose يرتبط بالموقع 2 لسكر galactose أما بالنسبة لسكر rhamnose فهو يرتبط بالموقع 6 لسكر galactose ومنه فإن الصيغة المفصلة لهذا المركب هي:



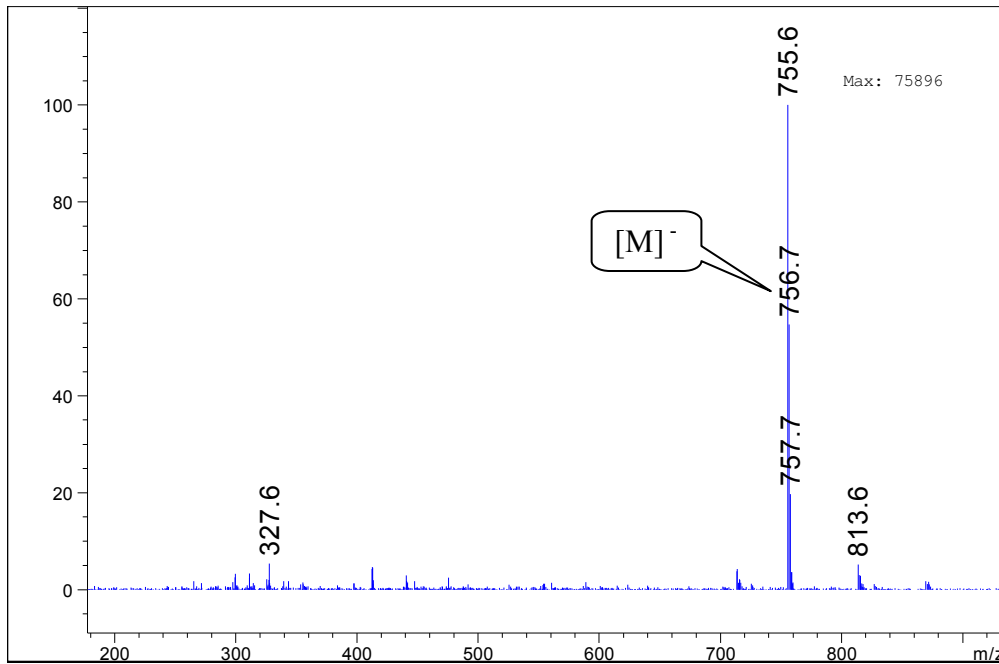
Isorhamnetin-3-O-[α-L-apiofuranosyl-(1→2)-{α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)}-β-D-galactopyranoside]



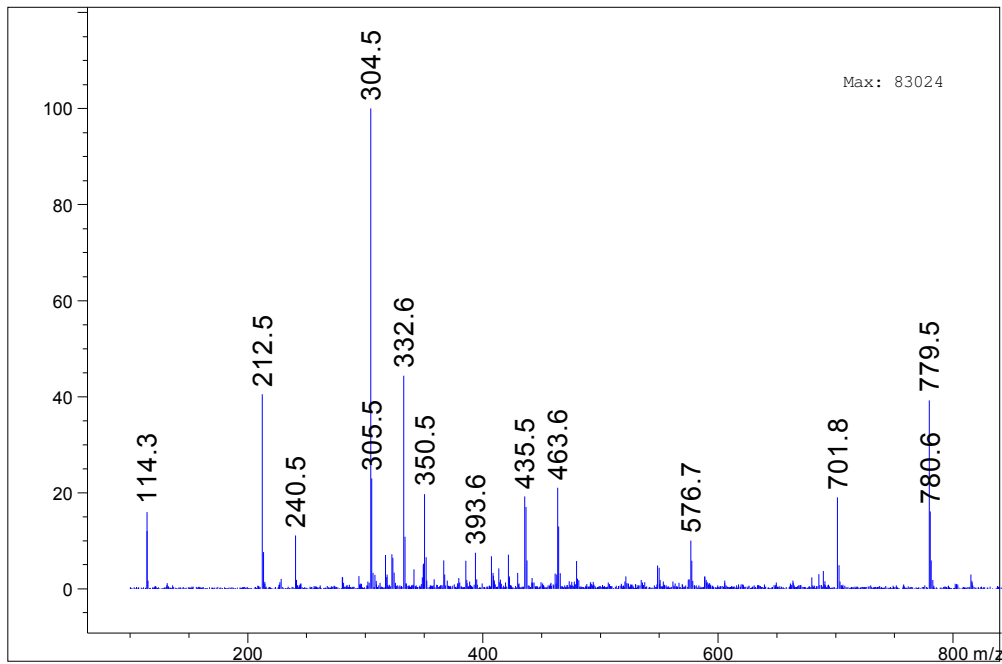
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب A_3



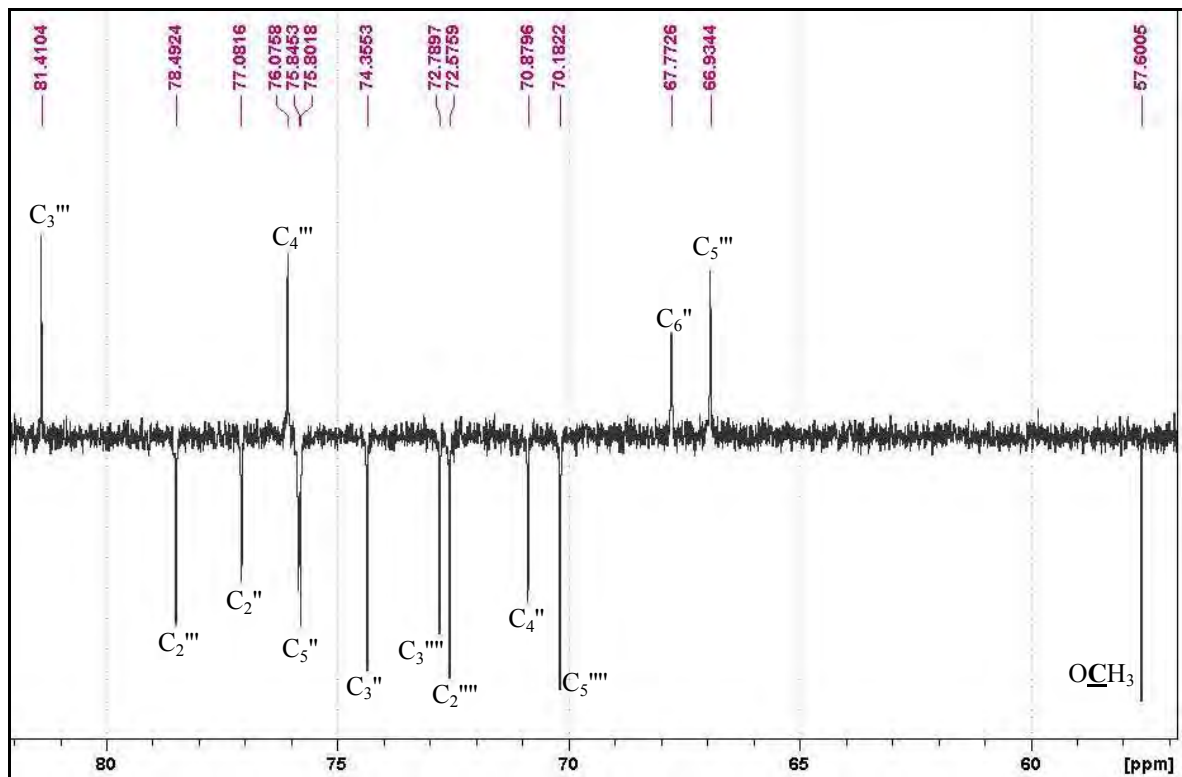
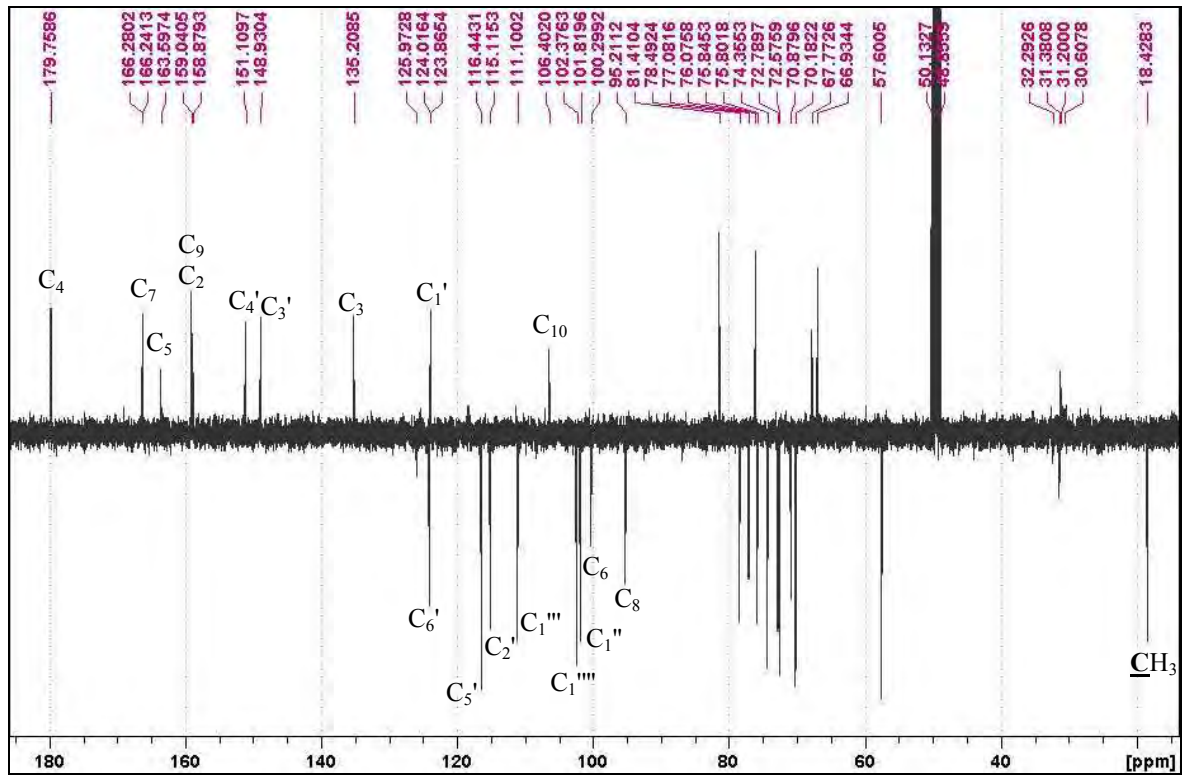
شكل 2: طيف 1H RMN للمركب A_3



شكل 3: طيف الكتلة للمركب A_3 بتقنية APJ-ES-

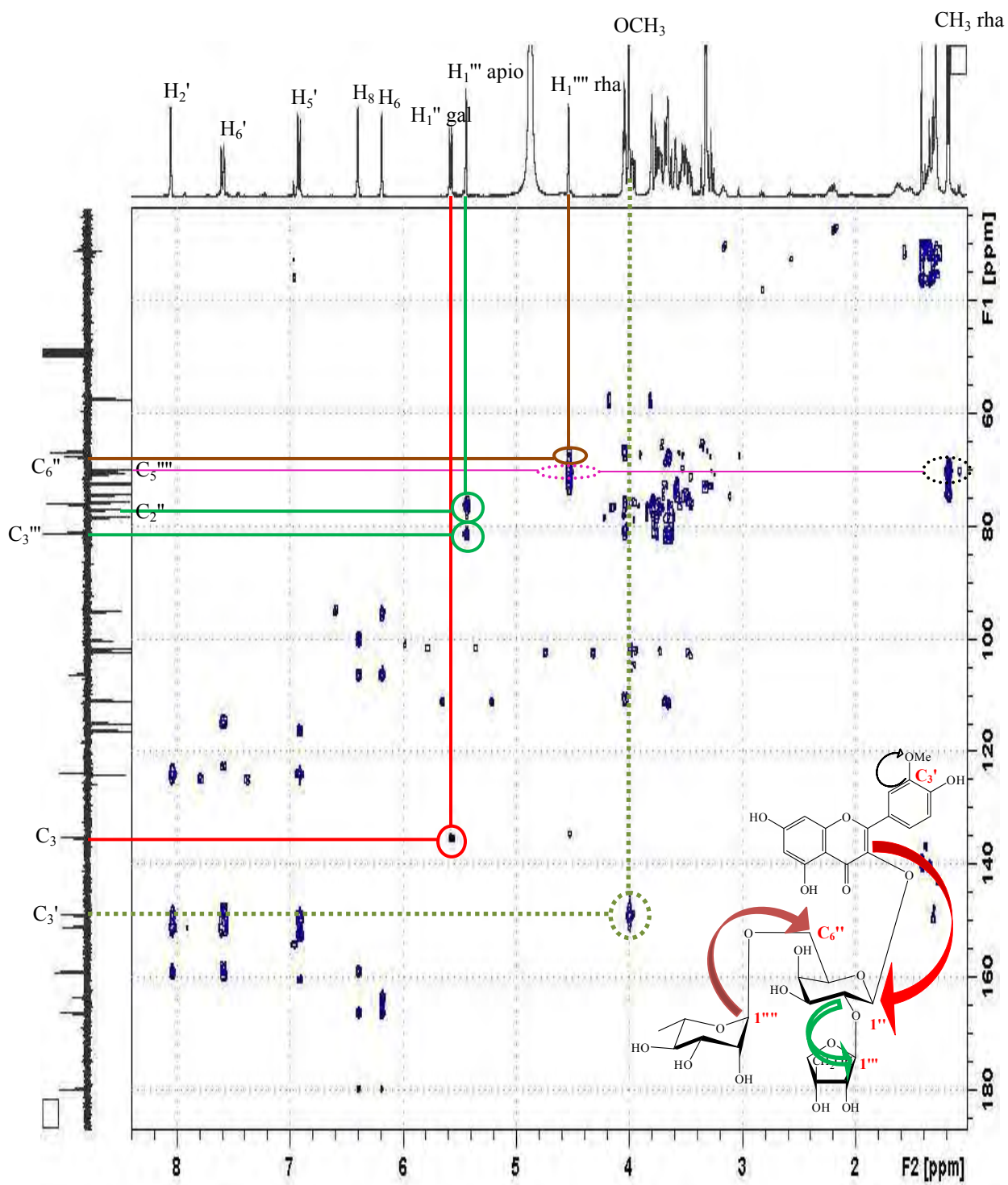


شكل 4: طيف الكتلة للمركب A_3 بتقنية APJ-ES+



شكل 5: طيف ^{13}C RMN بتقنية *J-mode* للمركب **A₃**

مع التكبيرات اللازمة



شكل 6 : طيف تجارب *HMBC* للمركب **A₃**

التعيين البنوي للمركب A_4 :

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

جدول 1: قيم R_f للمركب A_4

الجملة	R_f
10/2/1	0.48

2. الخصائص الطيفية:

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب A_4

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})
MeOH	330	255
NaOH	405	273
AlCl ₃	401	260
AlCl ₃ + HCl	400	263
NaOAc	317	274
NaOAc + H ₃ BO ₃	324	256

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 400 MHz):

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **A4**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ_H (ppm)
H-2'	d ($J = 2.0\text{Hz}$)	1H	8.04
H-2''''', H-6'''''	d ($J = 8.7\text{ Hz}$)	2H	7.53
H-6'	dd ($J = 8.4\text{ Hz}, J = 2.0\text{ Hz}$)	1H	7.36
H-5'	d ($J = 8.4\text{ Hz}$)	1H	6.90
H-3''''', H-5'''''	d ($J = 8.7\text{ Hz}$)	2H	6.61
H-8	d ($J = 2.1\text{ Hz}$)	1H	6.17
H-6	d ($J = 2.1\text{ Hz}$)	1H	6.08
H-1'' (gal)	d ($J = 7.9\text{ Hz}$)	1H	5.76
H-1''' (apio)	sl	1H	5.48
H-1'''' (rha)	sl	1H	4.59
H-5a'''	sl	1H	4.56
H-5b'''	d ($J = 12.0\text{ Hz}$)	1H	4.45
OCH ₃	s	3 H	4.01
CH ₃ (rha)	d ($J = 6.2\text{ Hz}$)	3 H	1.18
بروتونات السكاكر	-		3.20 - 4.50

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (RMN ¹³C, CD₃OD, 100.6 MHz):

جدول 4: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون للمركب **A4**

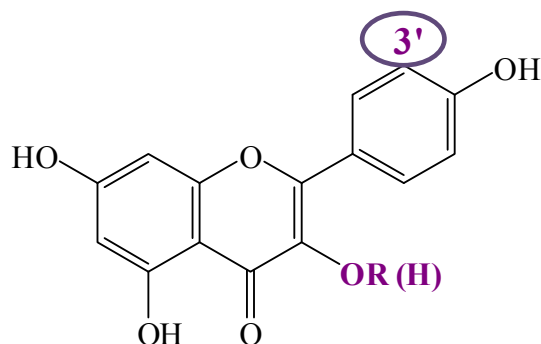
الكربون الموافق	δ_C (ppm)	الكربون الموافق	δ_C (ppm)
C-1'''	109.9	C-3	134.9
C-2'''	78.6	C-6	101.4
C-3'''	80.2	C-8	95.0
C-4'''	75.8	C-9	158.8
C-5'''	70.9	C-10	106.4
C-1''''	102.4	C-1'	123.6
C-2''''	72.6	C-2'	115.0
C-3''''	72.8	C-3'	148.9
C-4''''	74.3	C-4'	150.9
C-5''''	70.2	C-5'	116.3
C-6''''	18.4	C-6'	123.6
C-1'''''	123.8	C-1''	101.4
C-2''''', C-6'''''	132.9	C-2''	75.2
C-3''''', C-5'''''	116.3	C-3''	76.0
C-4'''''	164.4	C-4''	71.0
C-7'''''	168.3	C-5''	76.0
OCH ₃	57.6	C-6''	67.7

جدول 5: نتائج طيف الكتلة للمركب **A**

ES ⁺		ES ⁻	
الشاردة	(m/z)	الشاردة	(m/z)
[M+Na] ⁺	899.7	[M] ⁻	876.9
[M+H+Na] ⁺	900.6		
[M -3H-Hydroxybenzoylapio] ⁺	620.6	[M-H] ⁻	875.9
[M -3H-Ogal-rha-Hydroxybenzoylapio] ⁺	296.6		

■ قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:

اللون البنفسجي للمركب تحت الأشعة UV و قيمة العصابة I في الميثانول عند 330nm يدلان إما على أن المركب فلافونول مستبدل في الموقع 3 أو فلافون. الإنزياح الباثوكرومي للعصابة I بمقدار 75 nm بعد إضافة NaOH إلى MeOH يدل على وجود مجموعة هيدروكسيل حرة في الموقع 4'. غياب إنزياح باثوكرومي للعصابة I عند مقارنة طيف AlCl₃+HCl مع طيفه في AlCl₃ دليل على عدم وجود مجموعة أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B. الإزاحة الباثوكرومية للعصابة II ذات القيمة 19 nm عند مقارنة طيف NaOAc بطيف MeOH تشير إلى وجود OH حرفي في الموقع 7. أما دليل وجود OH حرفي في الموقع 5 هو الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I المقدره بـ 70 nm عند مقارنة طيف AlCl₃+HCl بطيفه في MeOH. (شكل 1) هذه المعطيات تقودنا إلى وضع صيغة أولية للجزء الأجليكوني لهذا المركب وهي فلافونول مستبدل في الموقع 3 أو فلافون مع احتمال وجود أو عدم وجود مستبدل آخر في الموقع 3':



طيف $^1\text{H-NMR}$ (شكل 2) لم يظهر الإشارة الأحادية التي تدل على أن هذا المركب فلافون ومنه فإن المركب **A** عبارة عن فلافونول مستبدل في الموقع 3 كما جاء هذا الطيف ليعطي ثلاث إشارات خاصة بالحلقة B متمثلة في:

- إشارة ثنائية عند 8.04 ppm بثابتة تزاوج $J = 2.0 \text{ Hz}$ تنسب إلى البروتون H_2'
- إشارة ثنائية عند 6.90 ppm بثابتة تزاوج $J = 8.4 \text{ Hz}$ تنسب إلى البروتون H_5'
- إشارة ثنائية ثنائية بثابتي تزاوج ($J = 2.0 \text{ Hz}$ ، $J = 8.4 \text{ Hz}$) عند الإزاحة 7.36 ppm خاصة بالبروتون H_6'

هذه الإشارات الثلاث تشير إلى أن الحلقة B ثنائية الاستبدال هذا يعني وجود مستبدل في الموقع 3'. كما أظهر هذا الطيف إشارتين ثنائيتين عند 6.17 ppm و 6.08 ppm بثابت تزاوج $J = 2.1 \text{ Hz}$ لكل منهما تدلان على البروتونين H_6 و H_8 على الترتيب مما يؤكد بأن الحلقة A ثنائية الاستبدال.

■ ما لفت انتباهنا أيضا هو ظهور بالإضافة إلى بروتونات الحلقتين A و B إشارتين أخريتين عند 7.53 ppm و 6.61 ppm بثابت تزاوج $J = 8.7 \text{ Hz}$ مشتركة تدل على أنها بروتونات لحلقة عطرية مستبدلة، كما يبدو فإن هاتين الإشارتين مميزتين لمجموعة hydroxybenzoyl.

كما يتجلى أيضا من خلال طيف $^1\text{H-NMR}$ بأن هذا المركب يحتوي على ثلاث سكريات وذلك من خلال الثلاث إشارات للبروتونات الأنوميرية التي تظهر عند 5.76 ppm ($J = 7.9 \text{ Hz}$) و عند 5.48 ppm و 4.59 ppm كذا إضافة إلى هذا بين الطيف وجود:

- إشارة أحادية عند 4.01 ppm بتكامل 3 بروتونات تشير إلى مجموعة OCH_3
- إشارة ثنائية عند 1.18 ppm بتكامل 3 بروتونات و ثابت تزاوج ($J = 6.2 \text{ Hz}$) تشير إلى مجموعة ميثيل سكر rhamnose.

من خلال المعطيات الطيفية السابقة استطعنا أن نستنتج بأن المركب **A** عبارة عن فلافونول مستبدل في الموقعين 3 و 3' كما أخذنا فكرة عن طبيعة هذه المستبدلات و التي تتمثل في:

❖ ثلاث سكريات أحدها عبارة عن سكر rhamnose

❖ مجموعة hydroxybenzoyl

❖ مجموعة OCH₃

تحديد الصيغة المفصلة لهذا المركب تحتم علينا اللجوء إلى معطيات طيفية أخرى فمطيافية الكتلة (شكل 3) أعطت قمة جزيئية عند 876.9 ([M]⁻) موافقة للصيغة المجملة C₄₀H₄₄O₂₂ و هذه الأخيرة موافقة لما سبق من معطيات، إذا استثنينا مجموع ذرات كربون كل من مجموعة hydroxybenzoyl ، OCH₃ و كذا الهيكل الفلافونيدي يبقى لدينا مجموع كربونات ثلاث سكريات يمكن أخذ فكرة عن طبيعتها من خلال:

1. ظهور مثيل rhamnose يدل على وجود هذا النوع من السكر.
2. ثابت التزاوج للبروتون الأنوميري الذي يأخذ نفس قيمة ثابت تزاوج البروتون الأنوميري لسكر rhamnose فحسب مطيافية الكتلة، مطيافية ¹³C RMN (شكل 5) و مطيافية ¹H RMN (شكل 2) التي قمنا بمقارنتها بالمرجع [1] فإن هذا السكر هو apiofuranose.
3. ثابت التزاوج ذو القيمة $J = 7.9 \text{ Hz}$ مع عدد الكربونات المتبقية حسب الكتلة وهي 6 و الحلمهة الحمضية تدل على أنه لدينا سكر galactose والذي أكد طبيعته كذلك مقارنة الجزء السكري لهذا المركب مع الجزء السكري لنفس المركب بالمرجع [1].

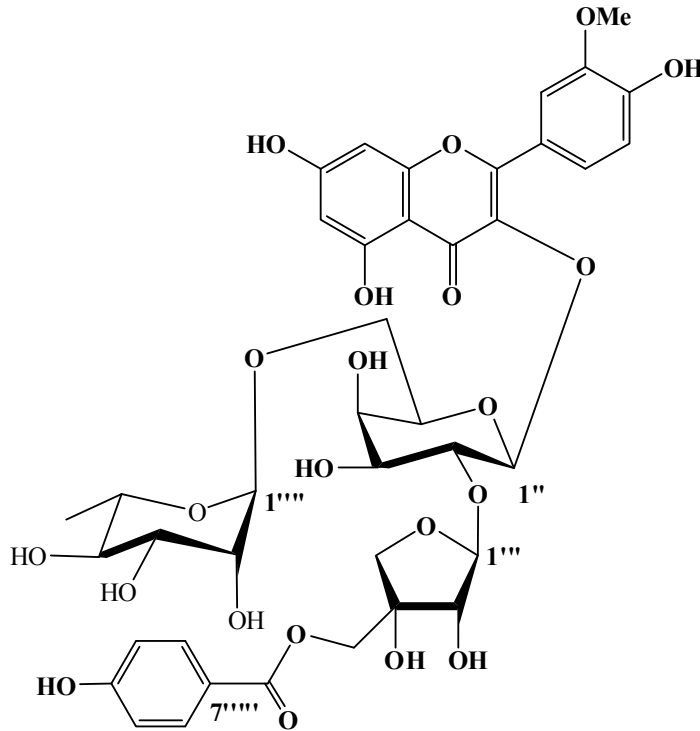
([1] Bedir, E., Calis, I., Piacente, S., Pizza, C., Khan, I A. (2000). A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulneraria*. Chem. Pharm. Bull., 12, 1994.)

4. عموماً قيم ثوابت تزاوج البروتونات الأنوميرية الثلاث شبيهة إلى حد كبير بقيم ثوابت تزاوج البروتونات الأنوميرية لسكريات المركب **A**، كذلك إذا ما قارنا مجال ظهور بروتونات السكريات من 3 إلى 4ppm نجد تشابه كبير مقارنة بنفس المجال للمركب سابق الذكر و المرجع [1] مع بعض الاختلافات و هي تباعد بقية إشارات apiofuranose فيما بينها إضافة إلى إنزياحها عموماً إلى مجال أخفض و بالخصوص إشارتي ^{5a} H (4.56 ppm) و ^{5b} H (4.45 ppm) و التي كان إنزياحها حسب المرجع [1] ^{5a} H (3.73 ppm) و ^{5b} H (3.56 ppm) مما يدل على أسيلة هيدروكسيل هذا الموضع و عليه فإن مجموعة hydroxybenzoyl ترتبط بالموقع 5 لسكر apiofuranose و لمعرفة مواقع ارتباط السكريات على الهيكل الفلافونيدي نقوم بقراءة لطيف تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد **HMBC** (شكل 9) حيث بين هذا الأخير:

▪ بقعة تعالق لمجموعة OCH₃ مع C₃ مما يدل على أن OCH₃ ترتبط بالموقع 3' ومنه نستنتج

بأن الهيكل الفلافونويدي الأجليكوني عبارة عن isorhamnetine.

- البروتون الأنوميري لسكر galactose (H_1'') أعطى بقعة تعالق مع C_3 للأجليكون هذا يدل على أن هذا الأخير يرتبط بالموقع 3 للأجليكون.
- بقعة تعالق للبروتون الأنوميري (H_1''') ذو الإزاحة 4.59 ppm مع الكربون C_6'' لسكر galactose (شكل 8)، كما أعطى بقعة تعالق أخرى مع الكربون C_5''' لسكر rhamnose في نفس الوقت أعطى rhamnose CH_3 بقعة تعالق مع نفس الكربون مما يدل على أن هذا البروتون خاص بسكر rhamnose و منه فهذا يعني أن هذا السكر يرتبط بالموقع 6 لسكر galactose.
- إذن فالبروتون الأنوميري ذو الإزاحة 5.48 ppm يعود إلى سكر apiofuranose و لقد أعطى هذا الأخير بقعة تعالق مع الكربون C_2'' لسكر galactose (شكل 8) و بقعة أخرى مع C_3''' لسكر apiofuranose مما يدل على أن هذا البروتون الأنوميري خاص فعلا بسكر apiofuranose.
- و كما أشرنا سابقا فإن مجموعة hydroxybenzoyl ترتبط بالموقع 5 لسكر apiofuranose وهذا ما أكدته ظهور بقعتا تعالق للبروتونين H_5a''' و H_5b''' الخاصين بسكر apiofuranose بالكربون رقم 7 لمجموعة hydroxybenzoyl (شكل 9). إذن فكل هذه المعطيات تقودنا إلى وضع الصيغة المفصلة للمركب **A₄**:

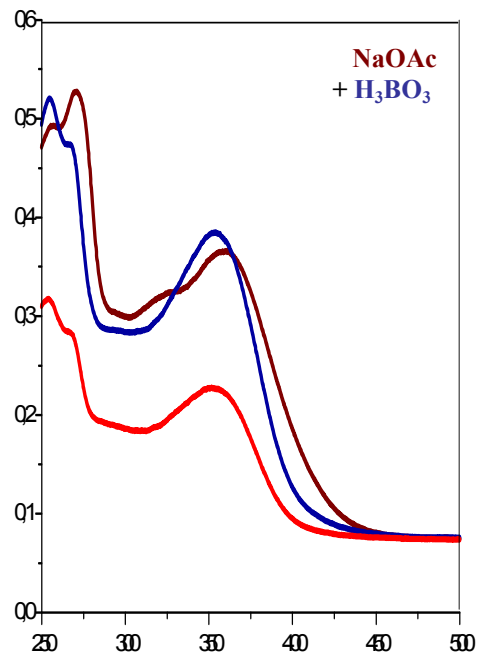
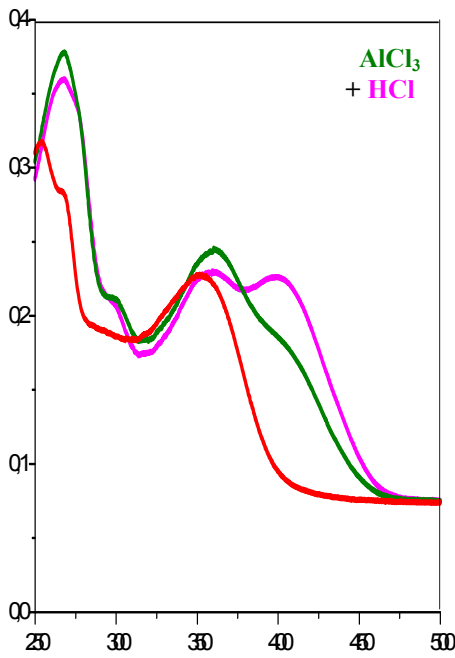
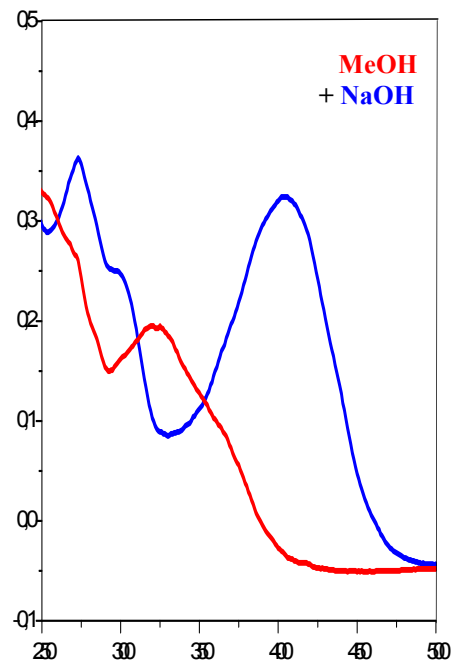
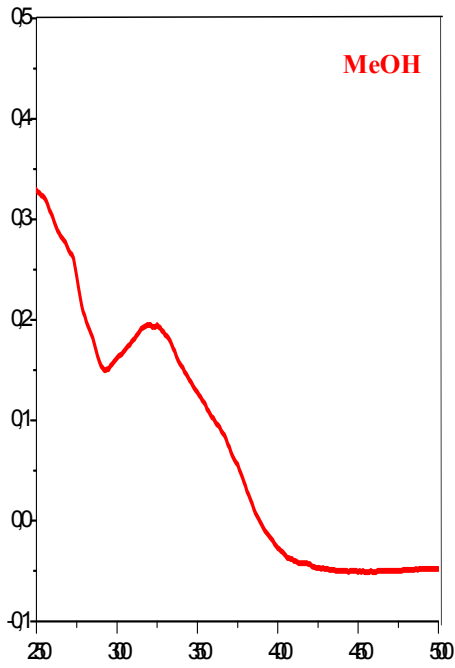


Isorhamnetin-3-O- [(5'''-p-hydroxybenzoyl)- α -L-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galacopyranoside

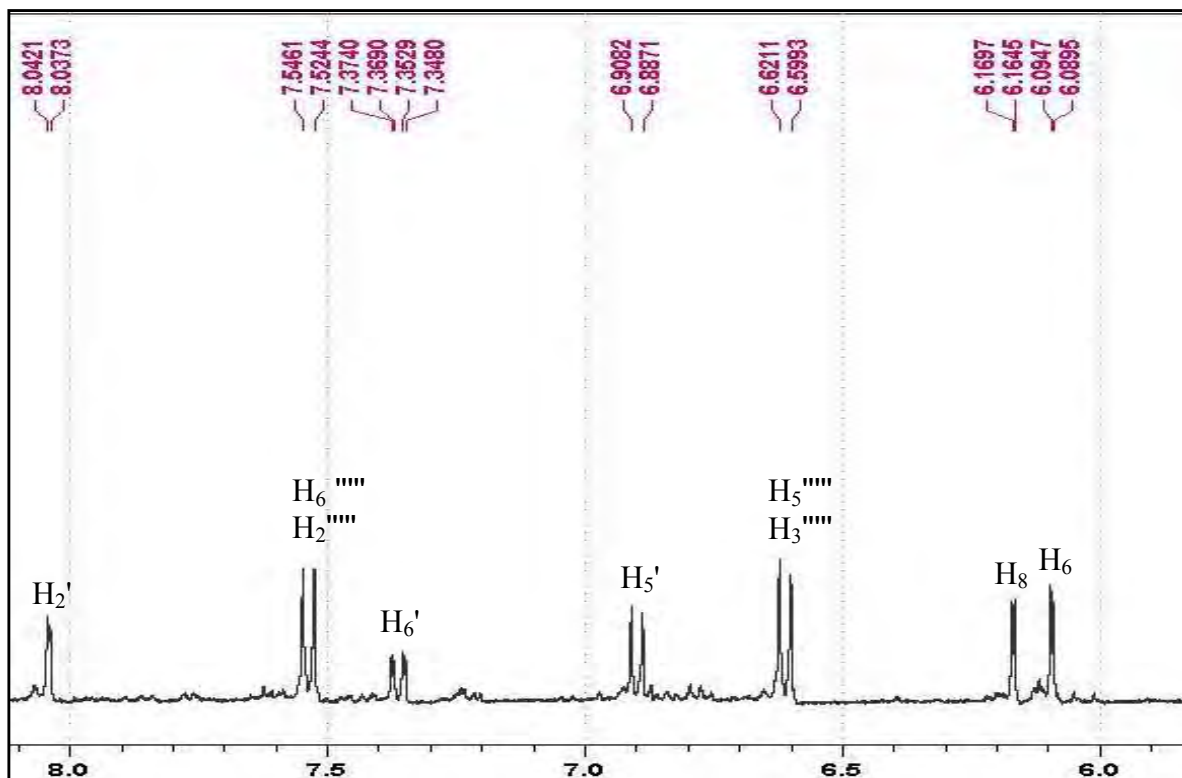
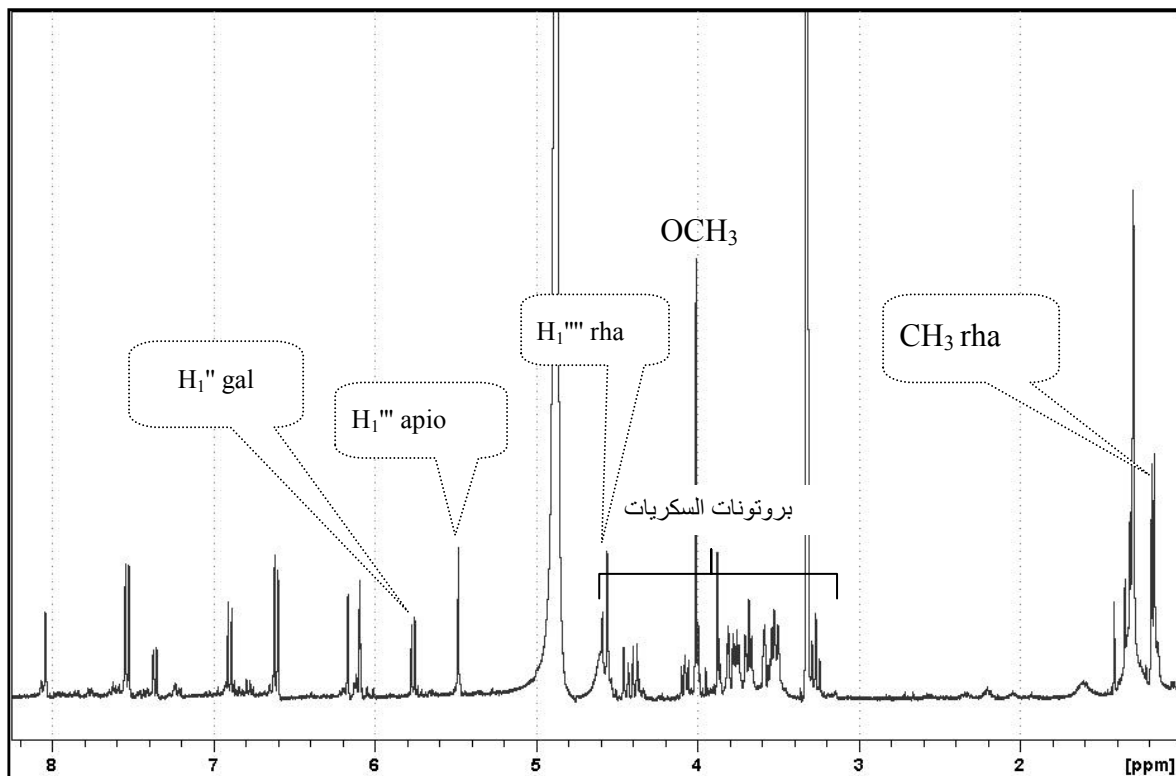
و هو مركب جديد في المملكة النباتية

البروتون	δ_H (ppm)	قيم δ_{13C} (ppm) اعتمادا على طيف <i>HMQC</i>	مختلف تعالقات البروتونات و الكربونات المجاورة لها حسب طيف <i>HMBC</i>
H-2'	8.04	115.0	C-2, C-1', C-3', C-4'
H-6'	7.36	123.6	C-2, C-4'
H-5'	6.90	116.3	C-1', C-3', C-4'
H-8	6.17	95.0	C-7, C-9, C-10
H-6	6.08	101.4	C-5, C-7, C-10
H-1'' (Gala)	5.76	101.4	C-3
H-2'' (Gala)	4.08	75.2	C-1'''
H-1'''' (Rha)	4.59	102.4	C-6''
H-1''' (apio)	5.48	109.9	C-2''
H-5a''' (apio)	4.57	70.9	C-7''''(C=O Benzoyl)
H-5b''' (apio)	4.44	70.9	C-3''', C-7''''
H-2''''', H-6'''''	7.53	132.9	C-3''''', C-5''''', C-4''''', C-7'''''
H-3''''', H-5'''''	6.61	116.3	C-2''''', C-6''''', C-1'''''

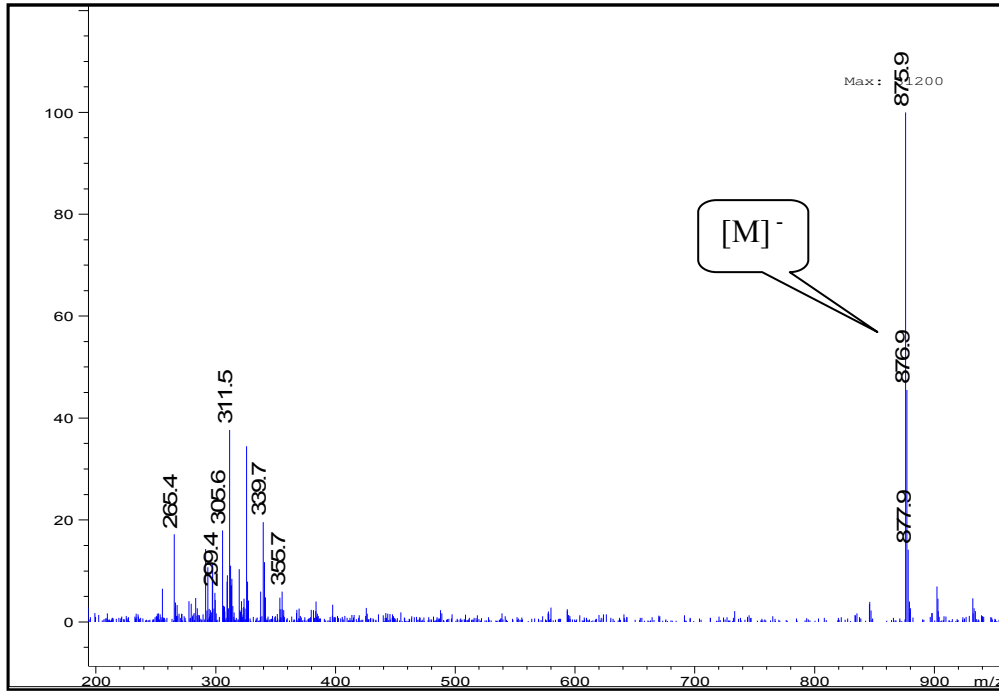
جدول 1: يبين أهم نتائج الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد بروتون-كربون لتجارب



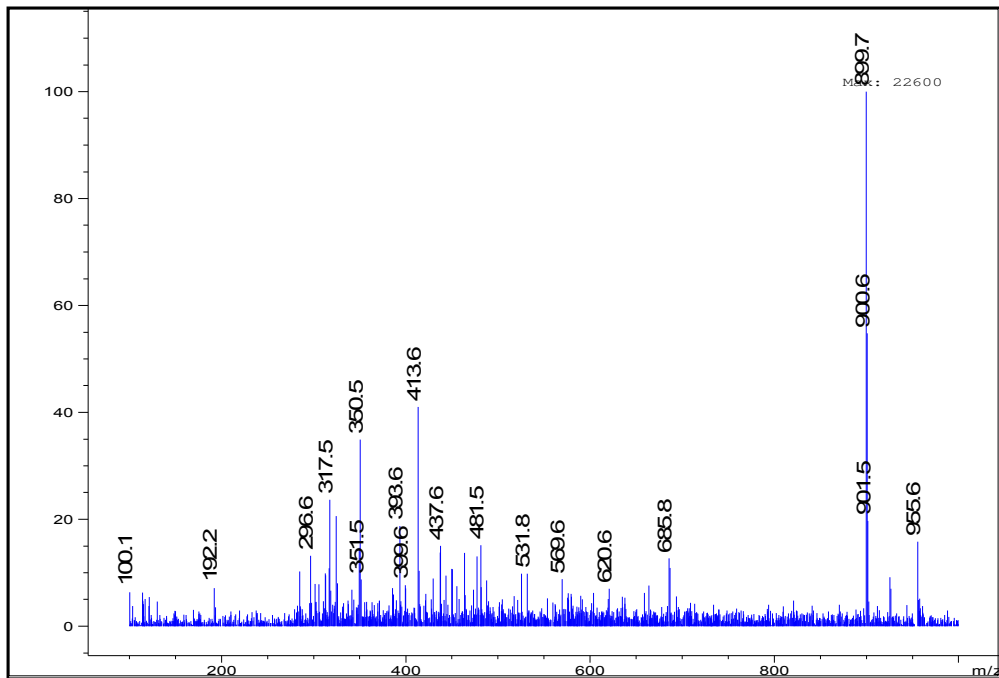
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب 4



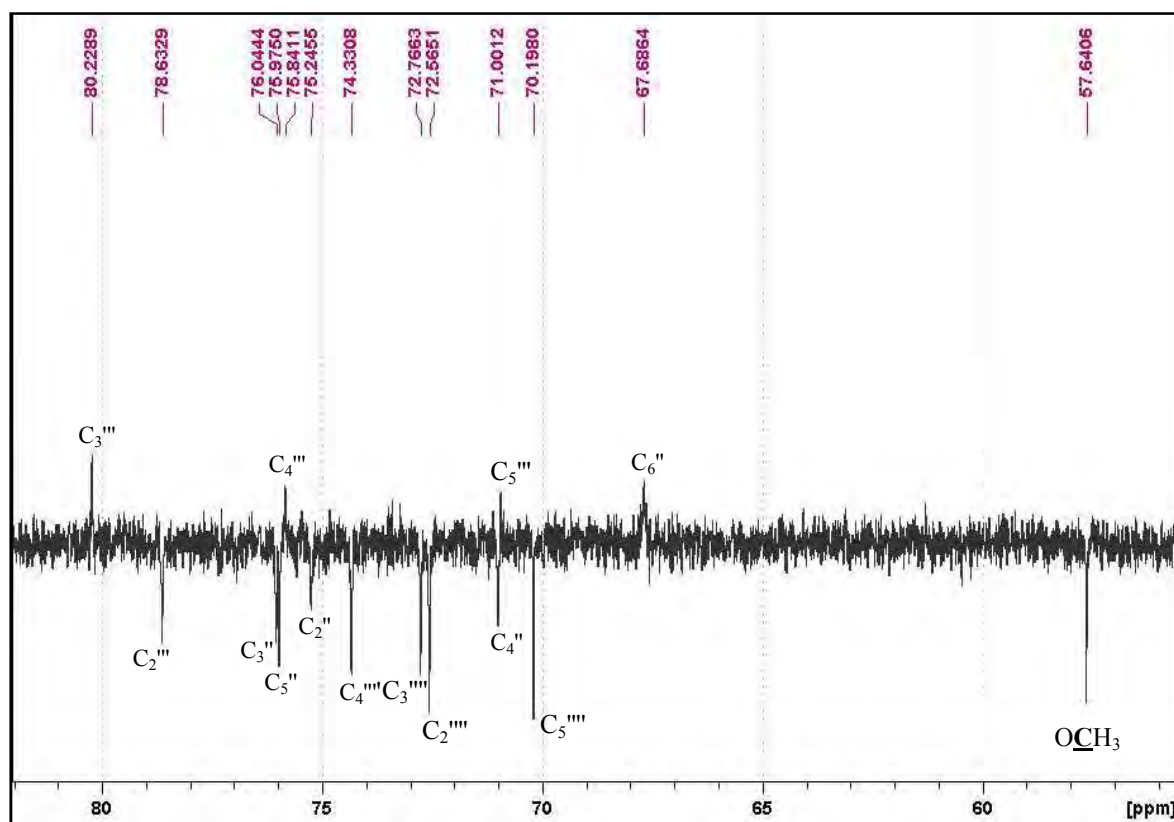
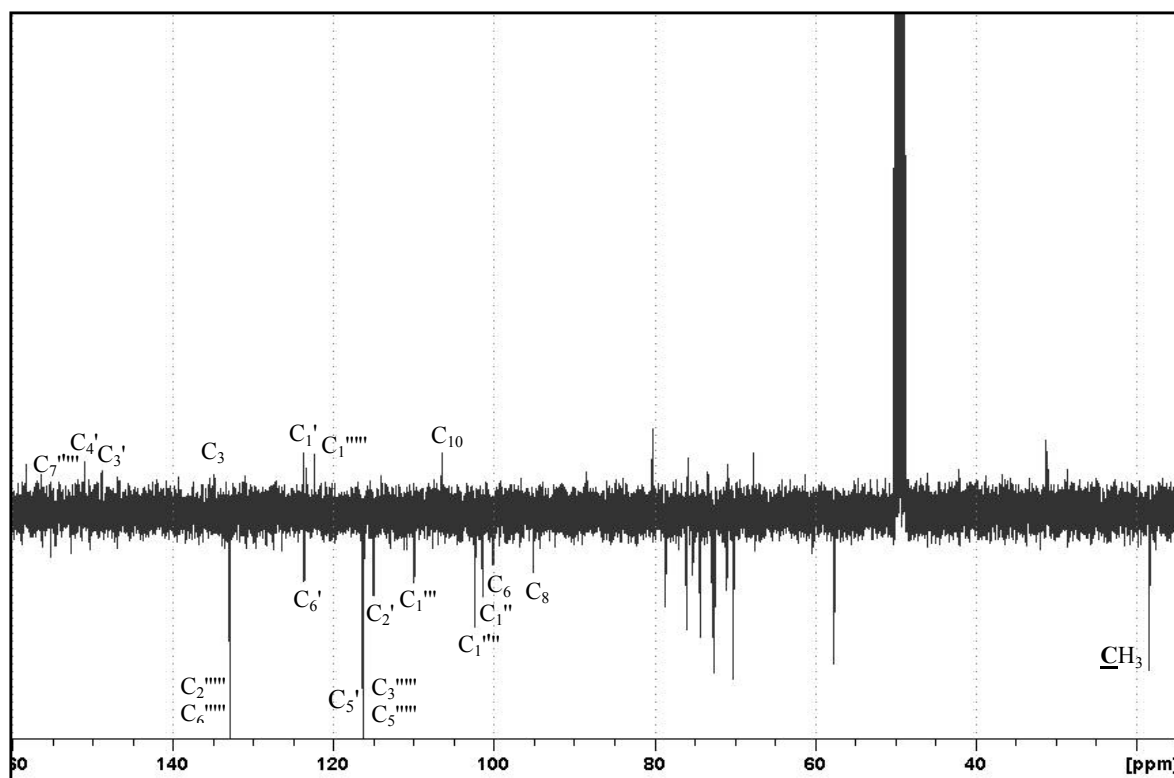
شكل 2: طيف ¹H RMN للمركب 4a



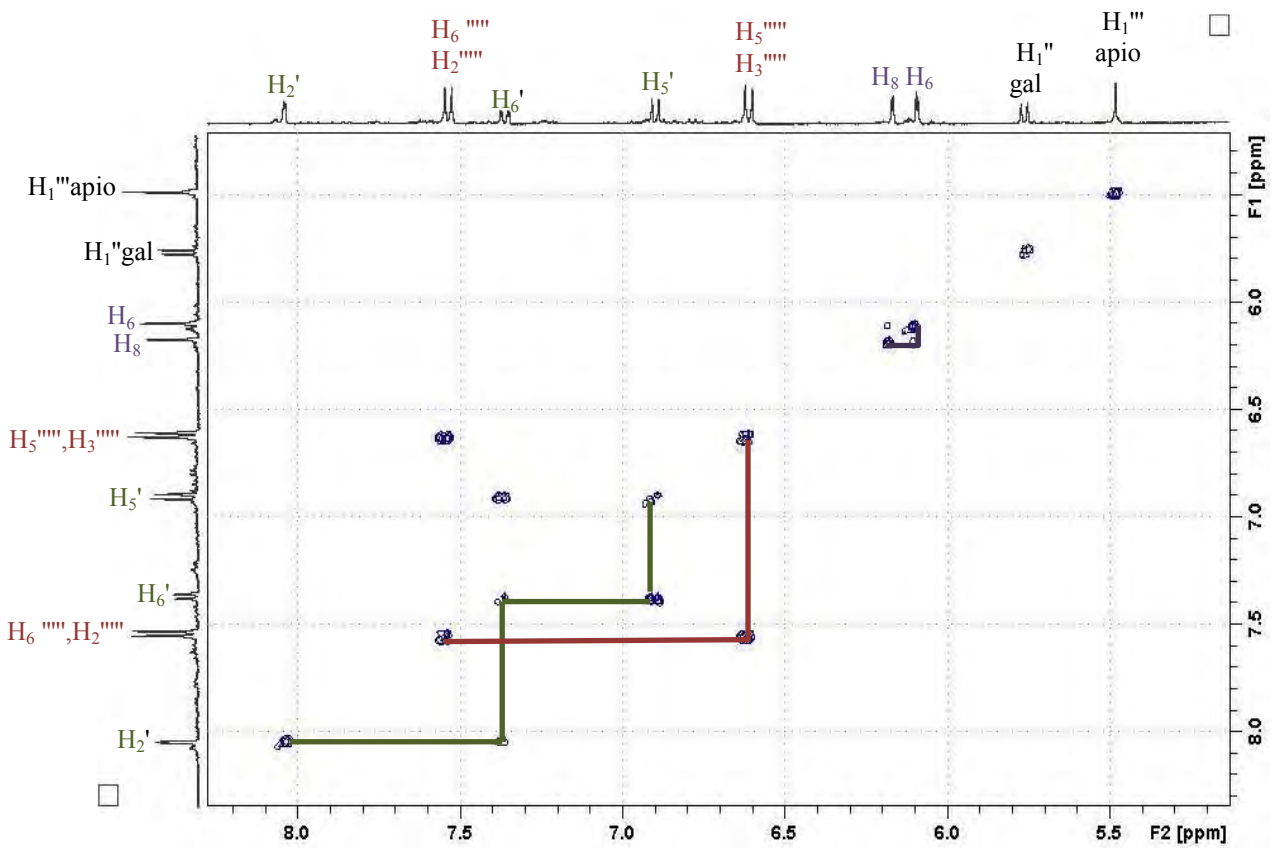
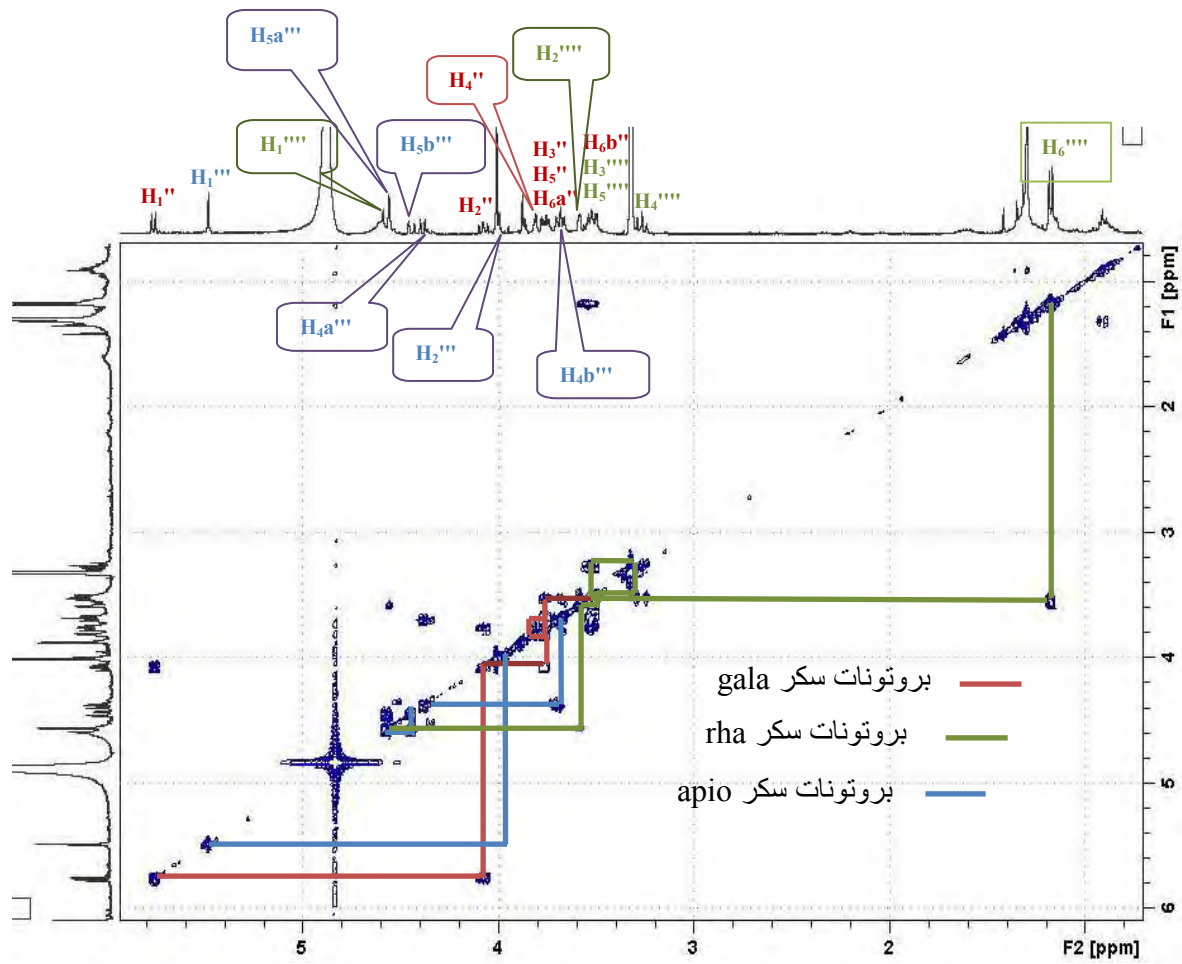
شكل 3: طيف الكتلة للمركب A_4 بتقنية $API-ES^-$

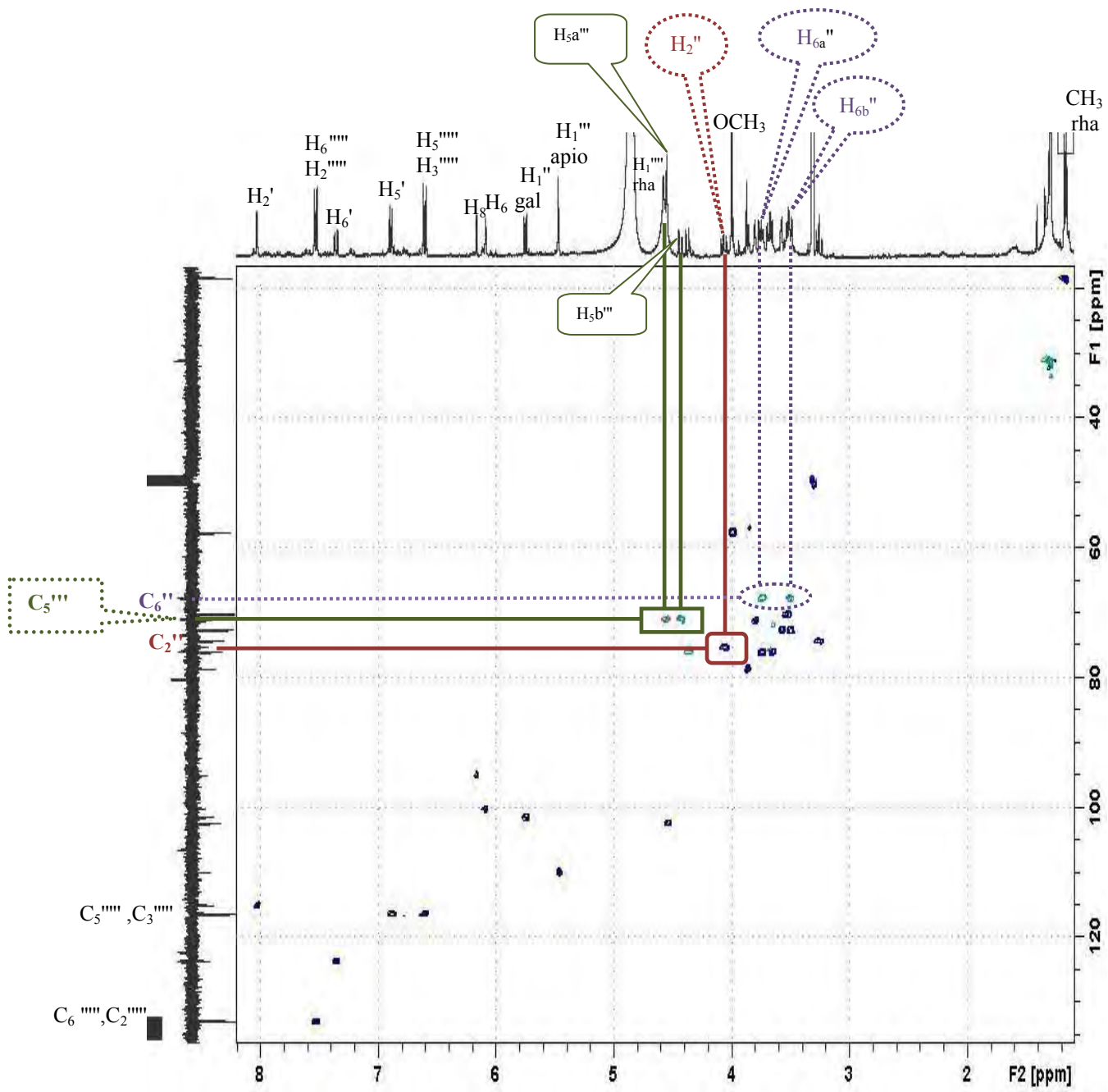


شكل 4: طيف الكتلة للمركب A_4 بتقنية $API-ES^+$

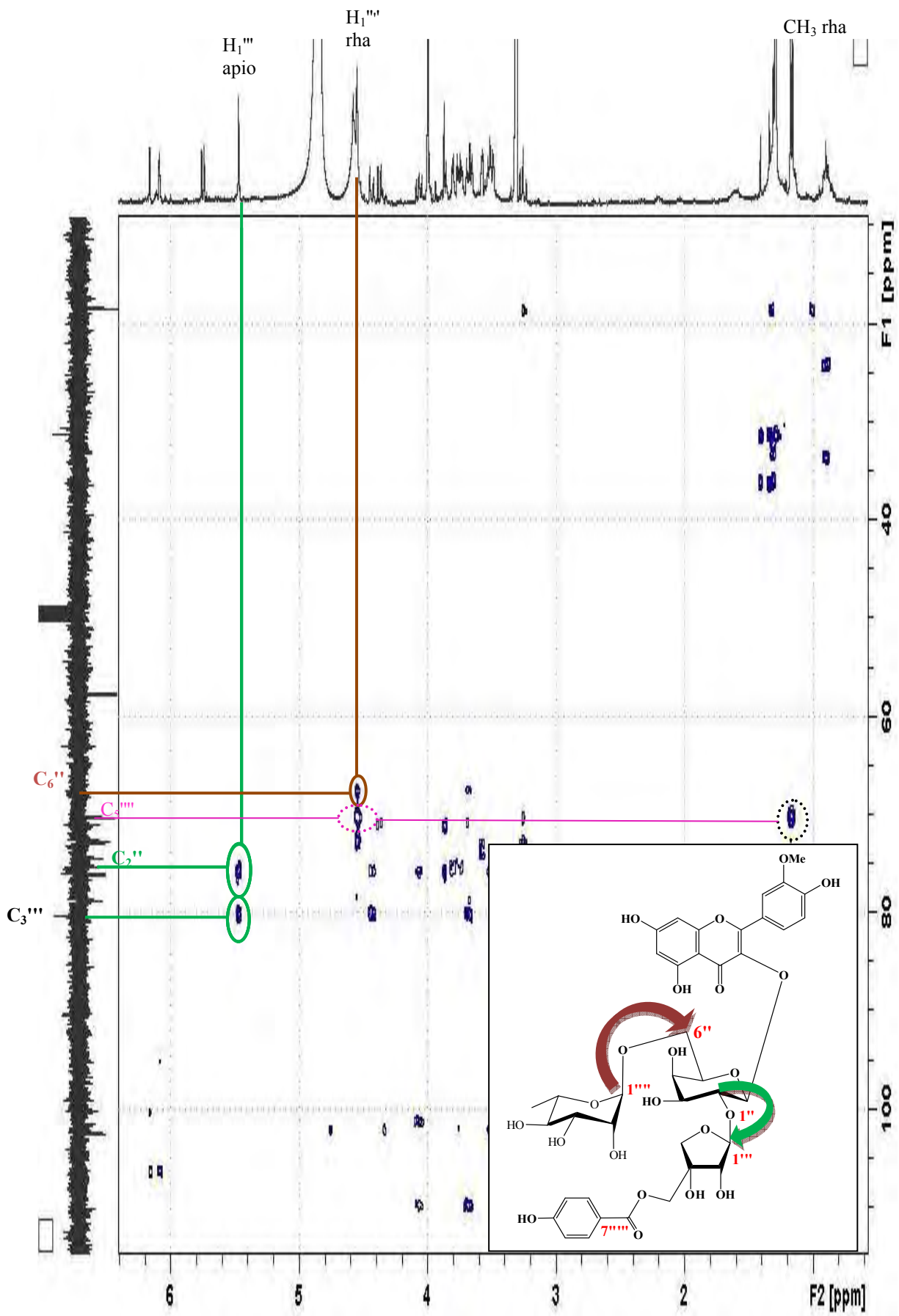


شكل 5: طيف ^{13}C RMN بتقنية *J-mode* للمركب A_4 مع التكميرات اللازمة

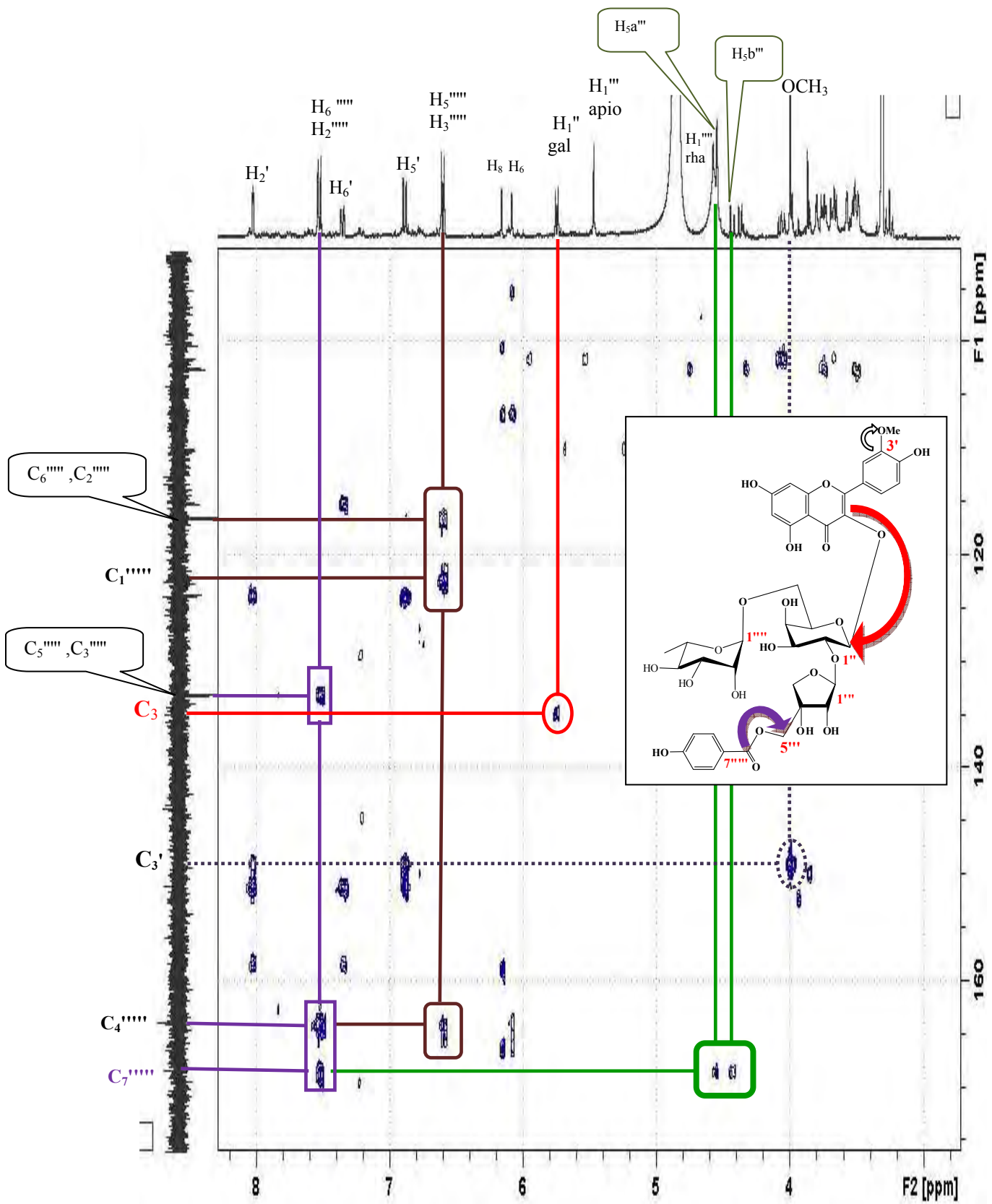




شكل 7: طيف تجارب *HMQC* للمركب **A₄**



شكل 8: طيف تجارب *HMBC* للمركب **A₄**
 (10 -115 ppm)



شكل 9: طيف تجارب *HMBC* للمركب **4**
 (90 -175 ppm)

التعيين البنوي للمركب A_5

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

جدول 1: قيم R_f للمركب A_5

الجملة	R_f
4/3/3	0.25
13/3/3/1	0.26
10/2/1	0.47

2. الخصائص الطيفية:

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب A_5

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})	عصابات أخرى (نم) (λ_{max})
MeOH	341	268	
NaOH	403	276	328
AlCl ₃	396	274	
AlCl ₃ + HCl	395	268	
NaOAc	376	274	
NaOAc + H ₃ BO ₃	377	268	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 400MHz) :

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **A₅**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابتة التزاوج	التكامل	δ_H (ppm)
H-2', H-6'	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	8.07
H-3', H-5'	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	6.90
H-8	Sl	1H	6.40
H-6	Sl	1H	6.21
H-1"glu	d ($J = 6.8$ Hz)	1H	5.14
H-1"rha	Sl	1H	4.53
CH ₃ rha	d ($J = 6.7$ Hz)	3 H	1.17
بروتونات glu+ rha	—	10 H	3.20- 3.98

○ مطيافية الكتلة:

جدول 4: نتائج طيف الكتلة للمركب **A₅**

ES ⁺		ES ⁻	
الشاردة	(m/z)	الشاردة	(m/z)
[M+Na] ⁺	617.6	[M] ⁻	594.5
[M+2Na+3H] ⁺	643.2		
[M +2H-rha-glu] ⁺	287.4		

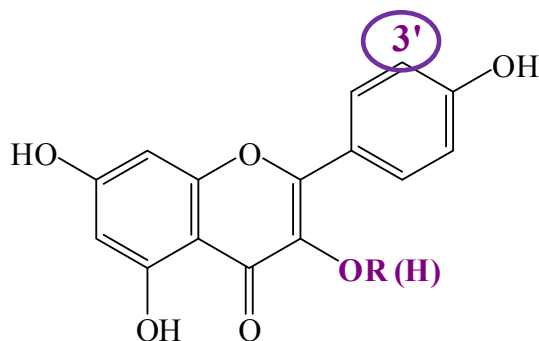
■ **قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب **A₅** :**

السلوك الكروماتوغرافي للمركب في الجمل الثلاث يشير إلى أنه عبارة عن غليكوزيد، و غياب مجموعة OH حر في الموقع 3 نستدل عليه باللون البنفسجي تحت الأشعة (UV) للمركب أما قيمة العصابة I في الميثانول $\lambda_1 = 341$ nm تدل على أن المركب **A₅** إما عبارة عن فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3.

وجود OH حر في الموقع 4' يتجلى من خلال ظهور الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I والمقدرة بـ 62 nm عند مقارنة طيف NaOH بطيف MeOH، أما غياب أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B فيظهر من خلال عدم وجود إزاحة باثوكرومية عند مقارنة طيف $AlCl_3+HCl$ مع طيفه في $AlCl_3$ للعصابة I، ظهور إزاحة باثوكرومية مقدرة بـ 54nm عند مقارنة طيف $AlCl_3+HCl$ بطيفه في MeOH دليل على وجود 5-OH.

الإزاحة الباثوكرومية للعصابة II و المقدرة بـ 6 nm عند مقارنة طيف NaOAc بطيفه في MeOH تشير إلى وجود 7-OH حر وهذا ما يؤكد ظهور العصابة الجديدة و المقدرة بـ 328 nm عند مقارنة طيف NaOH بطيف MeOH. (شكل 1)

هذه النتائج تقودنا إلى وضع الصيغة الأولية للمركب **A₆** وهي فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3 مع وجود أو عدم وجود مجموعة مستبدلة في الموقع 3'.



مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (شكل 2) جاءت لتعطي إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H لكل منهما الأولى ظهرت عند 8.07 ppm بثابت تزواج $J = 8.6$ Hz خاصة بالبروتونين H_2' و H_6' و الثانية عند 6.90 ppm بنفس ثابت التزاوج خاصة بالبروتونين H_3' و H_5' مما يدل على أن الحلقة B أحادية الاستبدال أي عدم وجود مستبدل في الموقع 3'.

إشارتي الحلقة A ظهرت عند 6.21 ppm خاصة بالبروتون H_6 ، و عند 6.40 ppm خاصة بالبروتون H_8 . كما بينت مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون بأن هذا المركب عبارة عن فلافونول مستبدل في الموقع 3 لأنها لم تعط إشارة بروتونه.

كذلك أظهرت إضافة إلى بروتونات الحلقتين A و B إشارتين ثنائيتين عند 4.53 ppm و 5.14 ppm بتكامل 1H لكل منهما تشيران إلى وجود بروتونين أنوميريين لسكرين، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية بينت احتمال وجود مستبدلين أحدهما في الموقع 3 و الآخر في الموقع 3' لكن مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون بينت عدم وجود مستبدل في الموقع 3' ليبقى احتمال وجود

مستبدل وحيد في الموقع 3، وجود بروتونين أنوميريين لسكرين وموقع واحد للاستبدال يحتم ارتباط السكرين ببعضهما وارتباطهما بالموقع 3.

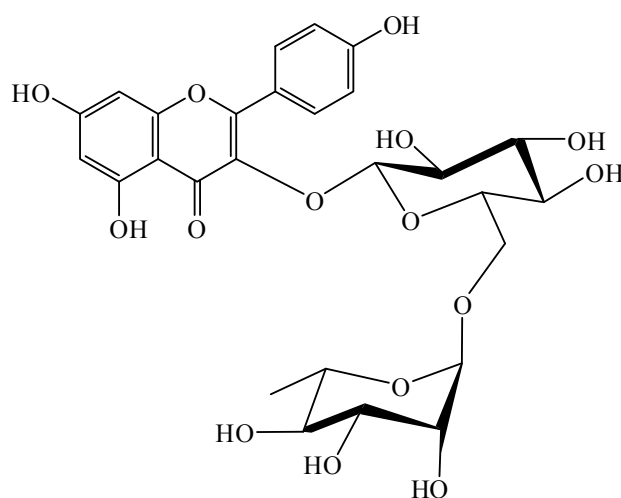
بقي لنا أن نعرف طبيعة هذين السكرين و كيفية ارتباطهما، فمطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون أعطت إضافة إلى الإشارة عند 4.53 ppm إشارة ثنائية أخرى عند 1.17 ppm بثابت تزواج $J = 6.7 \text{ Hz}$ و بتكامل 3H (ميثيل الرامنوز) دليل على وجود سكر الرامنوز، أما الإشارة التي ظهرت عند 5.14 ppm و بثابت تزواج $J = 6.8 \text{ Hz}$ تدل على بروتون أنوميري لسكر يرتبط برابطة من نوع β ولمعرفة عدد كربونات هذا السكر نلجأ إلى مطيافية الكتلة (شكل 4) التي أعطت قمة جزيئية عند 594.5 ($[M]^-$) موافقة للصيغة المجملة $C_{27}H_{30}O_{15}$ فإذا ما نظرنا إلى عدد ذرات الكربون (27 ذرة) 15 ذرة منها خاصة بالهيكل الفلافونيدي (Kaempférol) ليبقى 12 ذرة أخرى مما يشير إلى أن السكرين المستبدلين بالموقع 3 عبارة عن سكرين سداسيين أحدهما هو عبارة عن سكر الرامنوز كما أشرنا إليه سابقا ليبقى السكر الآخر و الذي هو كذلك يحتوي على ست كربونات ، و نظرا لقلّة كمية المركب **A₆** لم نتمكن من إجراء تقنيات أخرى لتحديد طبيعة السكر بدقة و كيفية ارتباطه بسابقه لذلك كان من الضروري مطابقته بغيره من الأطياف لنجد بأنه مطابق تطابقا كليا لطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب nikotiflorine [2] أي:



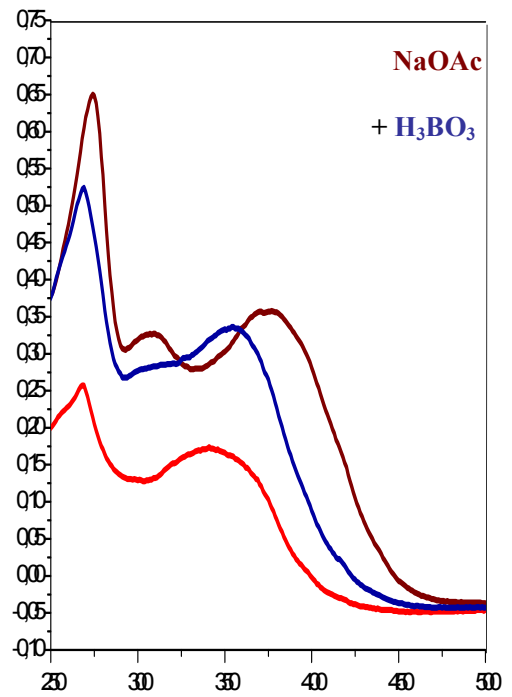
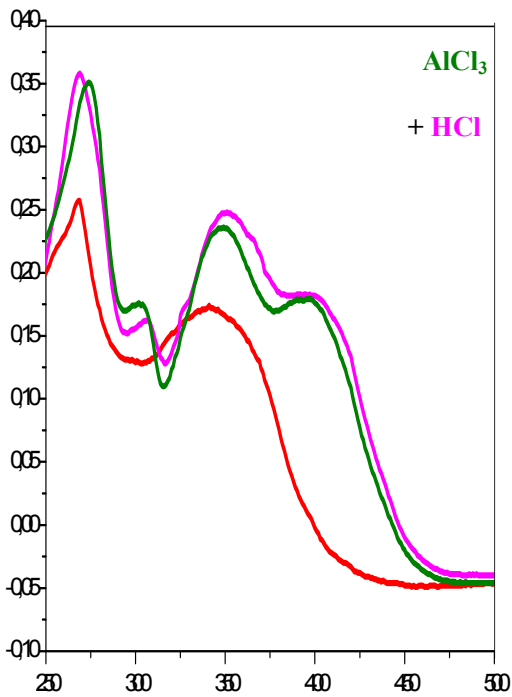
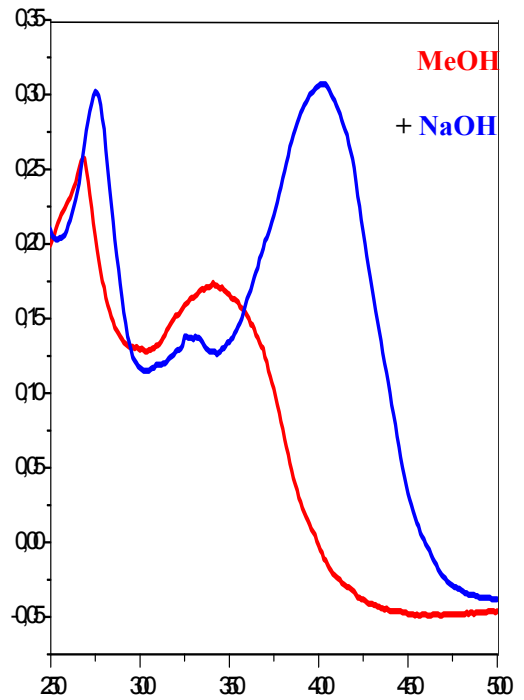
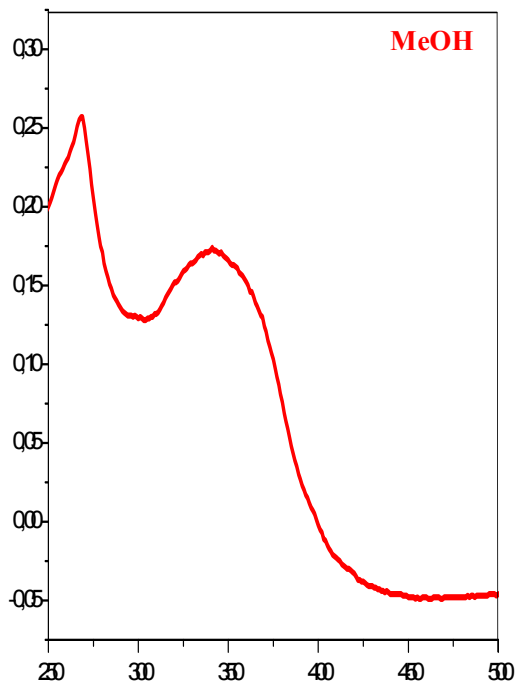
([2] Vermes, B., Farkas, L., Nógrádi, M., Wagner, H., Dirscherl, R. (1976).

Phytochemistry, 15, 1320.)

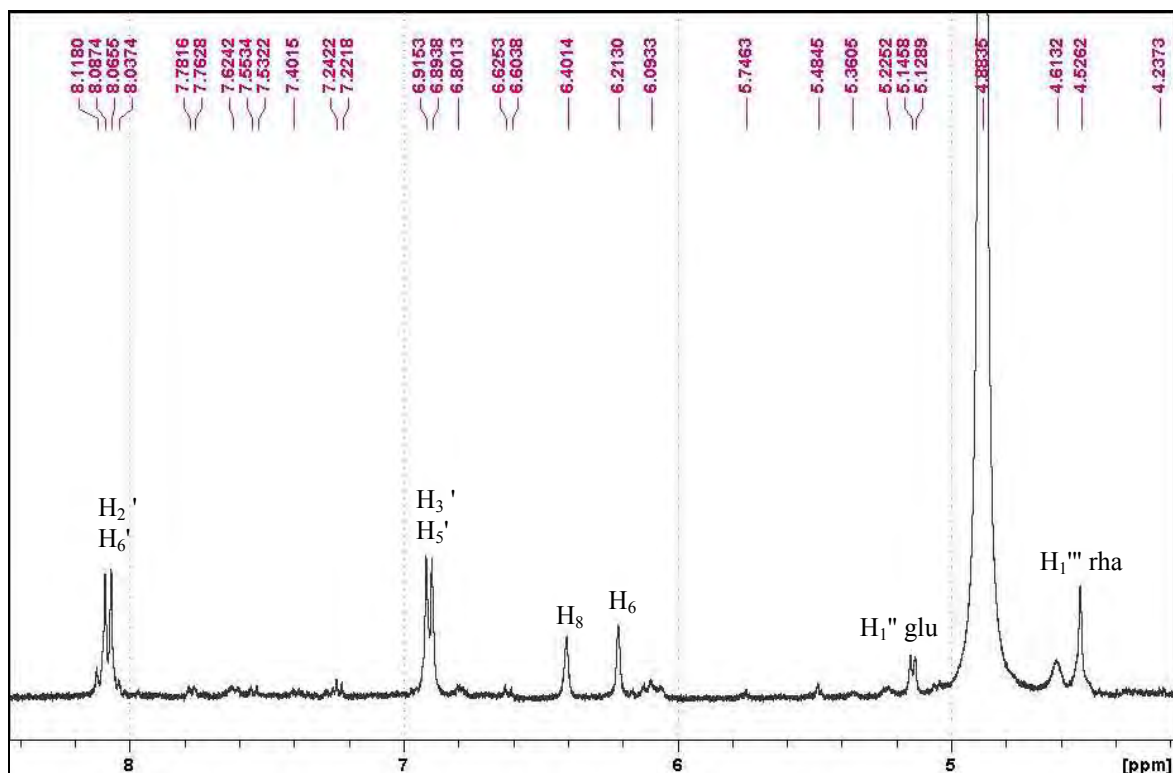
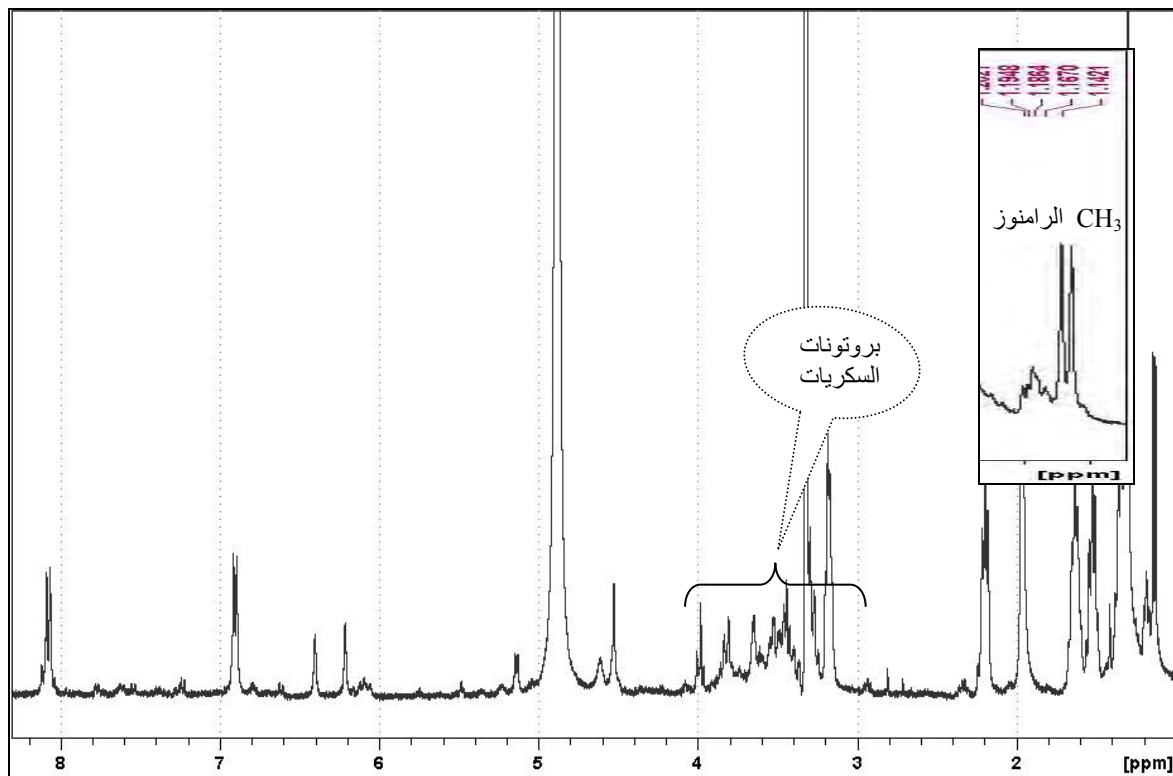
وعليه فالصيغة المفصلة للمركب **A₆** هي:



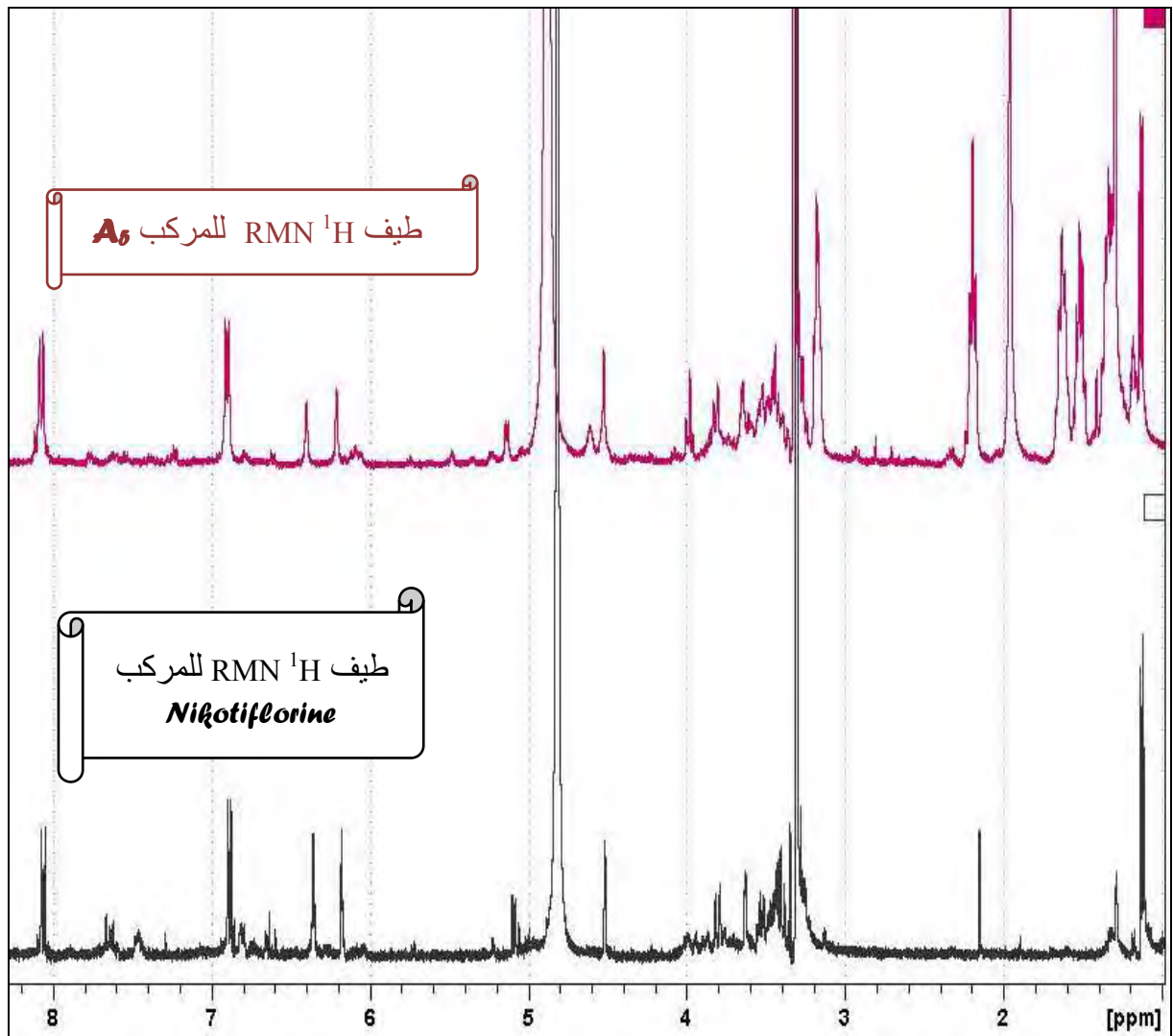
Kaempférol-3-O-[\alpha-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-\beta-D-glucopyranoside]



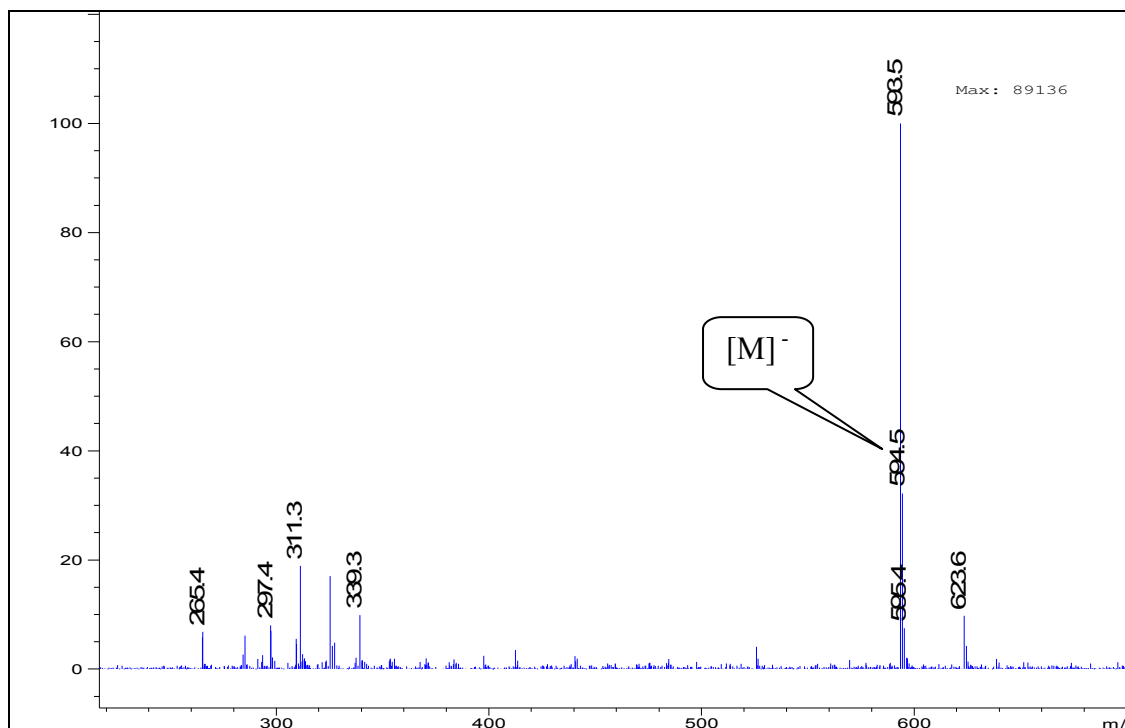
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب **A₅**



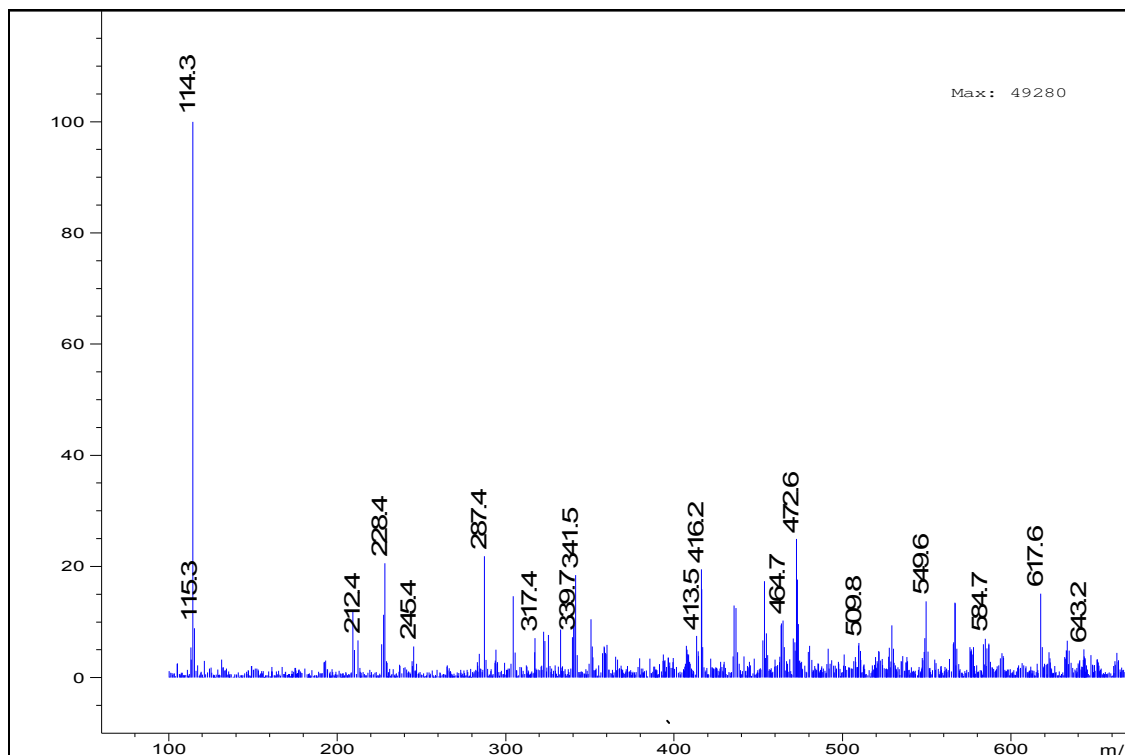
شكل 2: طيف ^1H RMN للمركب **6a** مع التكبيرات اللازمة



شكل 3 : مقارنة طيفي ¹H RMN للمركبين A₅ و Nikotiflorine [2]



شكل 4 : طيف الكتلة للمركب **A₅** بتقنية **API-ES⁻**



شكل **A₅** : طيف الكتلة للمركب **A₅** بتقنية **API-ES⁺**

التعيين البنوي للمركب A_6

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

جدول 1: قيم R_f للمركب A_6

الجملة	R_f
4/3/3	0.17
13/3/3/1	0.68
10/2/1	0.30

2. الخصائص الطيفية:

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب A_6

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})	عصابات أخرى (نم) (λ_{max})
MeOH	342	272	
NaOH	390	276	332
AlCl ₃	349	273	
AlCl ₃ + HCl	352	274	
NaOAc	350	276	
NaOAc + H ₃ BO ₃	346	275	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, , CD₃OD, 400MHz) :

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **A6**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ _H (ppm)
H-2', H-6'	d (J = 8.9 Hz)	2H	7.98
H-3', H-5'	d (J = 8.9 Hz)	2H	6.86
H-8	d (J = 2.0 Hz)	1H	6.14
H-6	d (J = 2.0 Hz)	1H	6.01
H-1''(Glu)	d (J = 7.6 Hz)	1H	5.54
H-1'''(rha)	Sl	1H	5.20
H-1''''(rha)	Sl		4.50
CH ₃ (rha)	d (J = 6.2 Hz)	3 H	1.10
CH ₃ (rha)	d (J = 6.2 Hz)	3 H	1.01
بروتونات السكاكر	—		3.24 - 4.15

○ مطيافية الكتلة:

جدول 4: نتائج طيف الكتلة للمركب **A6**

ES ⁺		ES ⁻	
الشاردة	(m/z)	الشاردة	(m/z)
[M+Na] ⁺	763.3	[M-H] ⁻	739.8
		[M-H-rha-rha] ⁻	445.7
		[M-4H-Oglu-rha-rha] ⁻	265.4

▪ الحمهة الحمضية:

○ الشفق الألبكتوني:

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 5: نتائج نتائج مطيافية UV بعد الحلمهة الحمضية للمركب

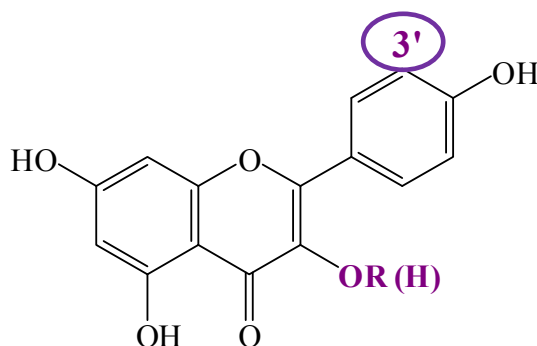
الكاشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)
MeOH	362.0	253.2

○ الشق السكري: glucose + rhamnose

■ قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب **A₆**:

السلوك الكروماتوغرافي للمركب **A₆** يدل على أنه غليكوزيد متعدد السكر، اللون الإستشعاعي البنفسجي و قيمة العصابة I في الميثانول 342 nm يدلان على أن هذا المركب إما فلافونول مستبدل في الموقع 3 أو فلافون، إنزياح قيمة العصابة I بقيمة 48 nm بعد إضافة NaOH دليل على وجود - 4'OH، ظهور عصابة جديدة مع نفس المفاعل عند 332 nm تشير إلى وجود 7-OH، عدم تغير طيف AlCl₃ عند إضافة HCl تقريبا تدل على عدم وجود أرثو ثنائي الهيدروكسيل على مستوى الحلقة B، و نستدل على وجود 5-OH من الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف MeOH بطيفه في AlCl₃+ HCl. (شكل 1)

و عليه يمكن وضع الصيغة الأولية للمركب **A₆** فهي إما فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3 مع وجود أو عدم وجود مستبدل آخر في الموقع 3:



عدم ظهور إشارة أحادية على طيف ^1H RMN (شكل 2) دليل على أن المركب **A₆** فلافونول مستبدل في الموقع 3 أما ظهور الإشارتين الثنائيتين بثابتة تزاوج $J = 8.9 \text{ Hz}$ و بتكامل 2H لكليهما الموافقتين لـ ($\text{H}_3'-\text{H}_5'$) و ($\text{H}_2' - \text{H}_6'$) عند الإزاحتين 6.86 ppm وعند 7.98 ppm على الترتيب تدل على أن الحلقة B أحادية الاستبدال أي عدم وجود مستبدل في الموقع 3' ومنه فإن الأغلكون عبارة عن هيكل Kaempférol ، إشارتي الحلقة A ظهرت على شكل إشارتين ثنائيتين بثابت تزاوج $J = 2.0 \text{ Hz}$ لكل منهما عند 6.01 ppm و 6.14 ppm موافقتين لـ H_6 و H_8 على التوالي. كما أكد هذا الطيف وجود ثلاث سكريات اثنان منها من نوع rhamnose و يتجلى ذلك من خلال ظهور ميثيليهما عند 1.01 ppm و 1.10 ppm بثابت تزاوج $J = 6.2 \text{ Hz}$ لكليهما أما إشارتا البروتونين الأنوميريين لهما فظهرتا:

• الأولى عند 5.20 ppm

• و الثانية عند 4.50 ppm

السكر الثالث ظهر بروتونه الأنوميري بشكل إشارة ثنائية عند 5.54 ppm بثابت تزاوج $J = 7.6 \text{ Hz}$ نستطيع معرفة عدد كربونات هذا السكر من خلال مطيافية الكتلة (شكل 3) حيث أعطت قمة جزيئية عند 739 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) موافقة للصيغة المجملة $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{19}$ تدل على أن السكر الثالث يتكون من 6 ذرات كربون ، بينت طبيعته الحلمهة الحمضية حيث حررت سكر glucose.

❖ إلى حد الآن تمكنا من تحديد الهيكل الفلافونيدي وهو عبارة عن Kaempférol مستبدل في الموقع 3 بثلاث سكريات اثنان منها عبارة عن سكر rhamnose و الثالث سكر glucose، ترى كيف ترتبط هذه السكريات؟

الإجابة عن هذا السؤال تلزمننا اللجوء إلى تقنيات أخرى:

تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد **HMBC** (شكل 5) أعطت:

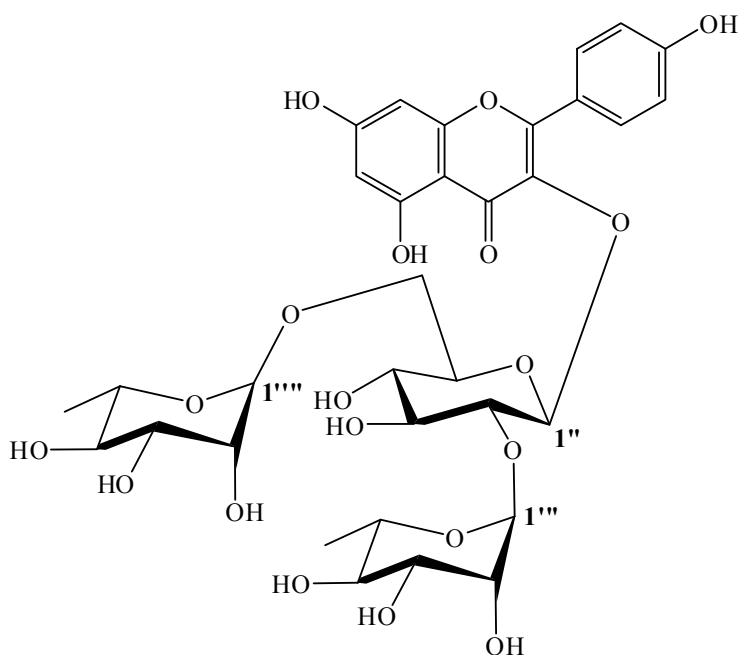
■ بقعة تعالق للبروتون الأنوميري لسكر rhamnose ذو الإزاحة 4.50 ppm مع الكربون رقم 6 لسكر glucose.

■ بقعة تعالق أخرى للبروتون الأنوميري لسكر rhamnose ذو الإزاحة 5.20 ppm مع الكربون رقم 2 لسكر glucose.

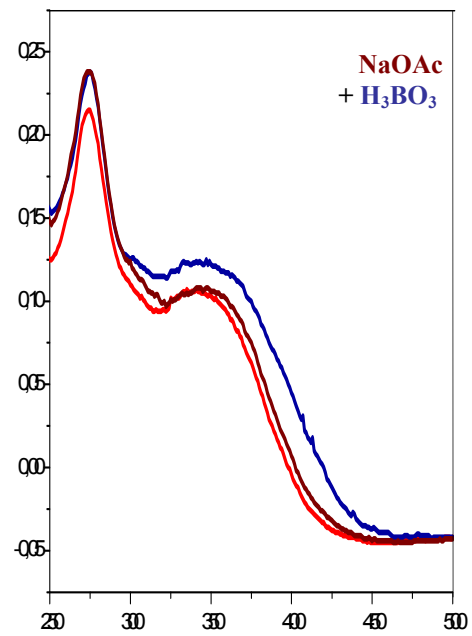
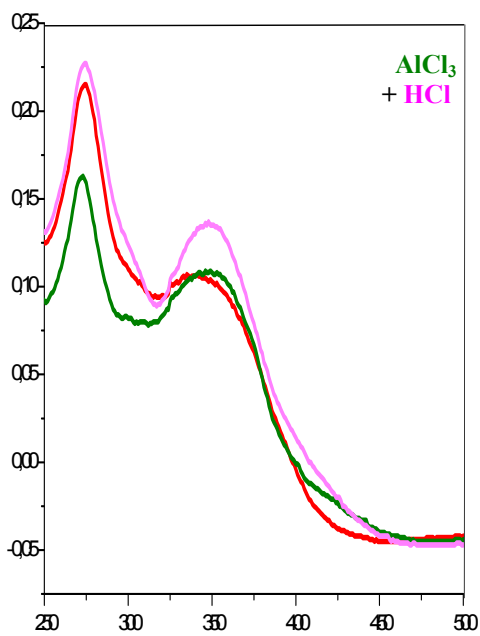
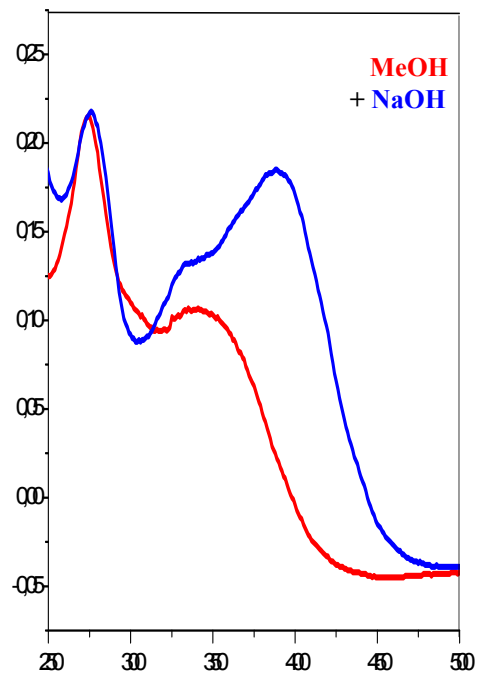
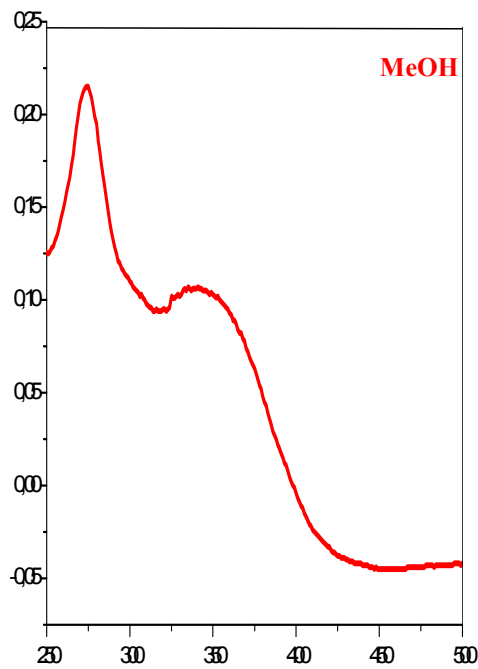
إذن فإن سكريي rhamnose يرتبطان بالموقعين 2 و 6 لسكر glucose و كما ذكرنا سابقا فإن

المركب **A₆** عبارة عن Kaempférol مستبدل في الموقع 3 بثلاث سكريات و حسب تقنية

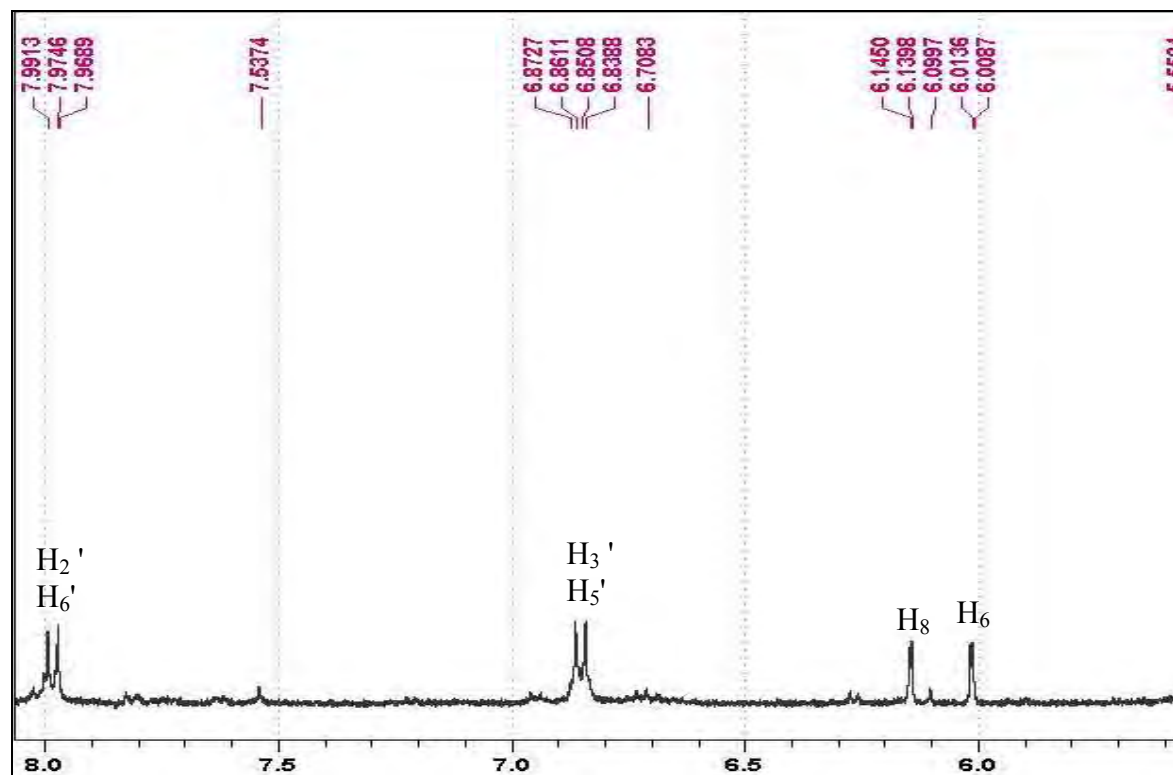
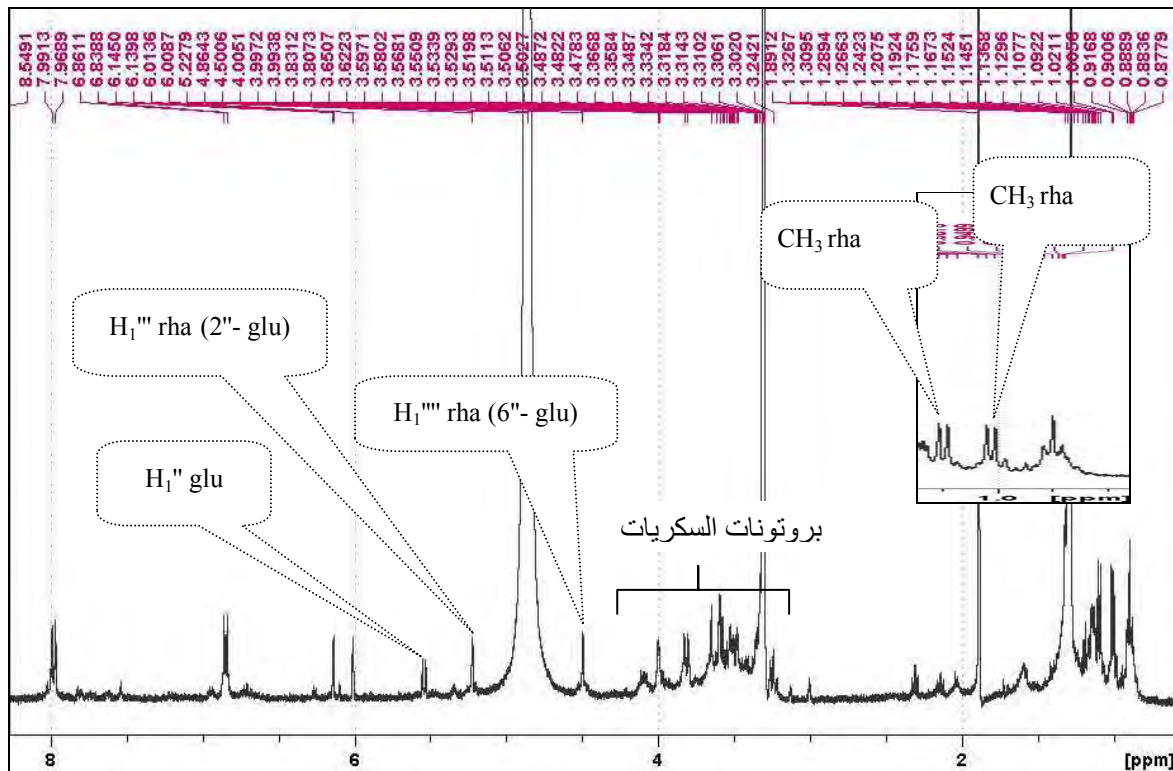
الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد ***HMBC*** فإن سكري rhamnose يرتبطان بسكر glucose فالاحتمال الوحيد لارتباط سكر glucose هو الموقع 3 لهيكل Kaempferol و هذا فعلا ما أكدته الحلمة الحمضية حيث حررت أغليكونا أصفر اللون الذي يدل على وجود OH في هذا الموقع. و عليه فإن الصيغة المفصلة للمركب ***A₆*** هي كالآتي:



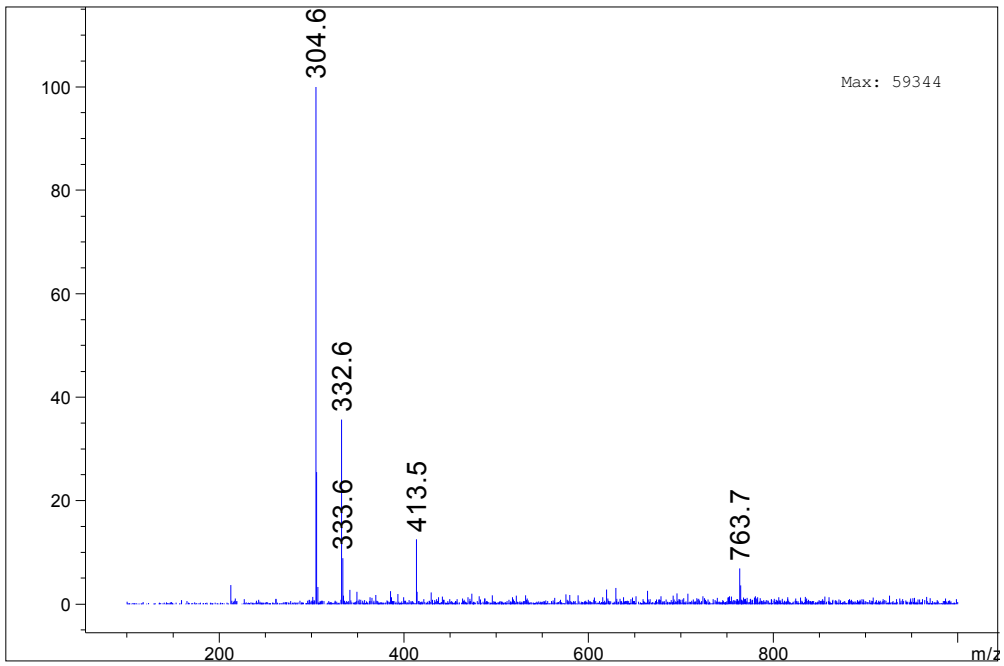
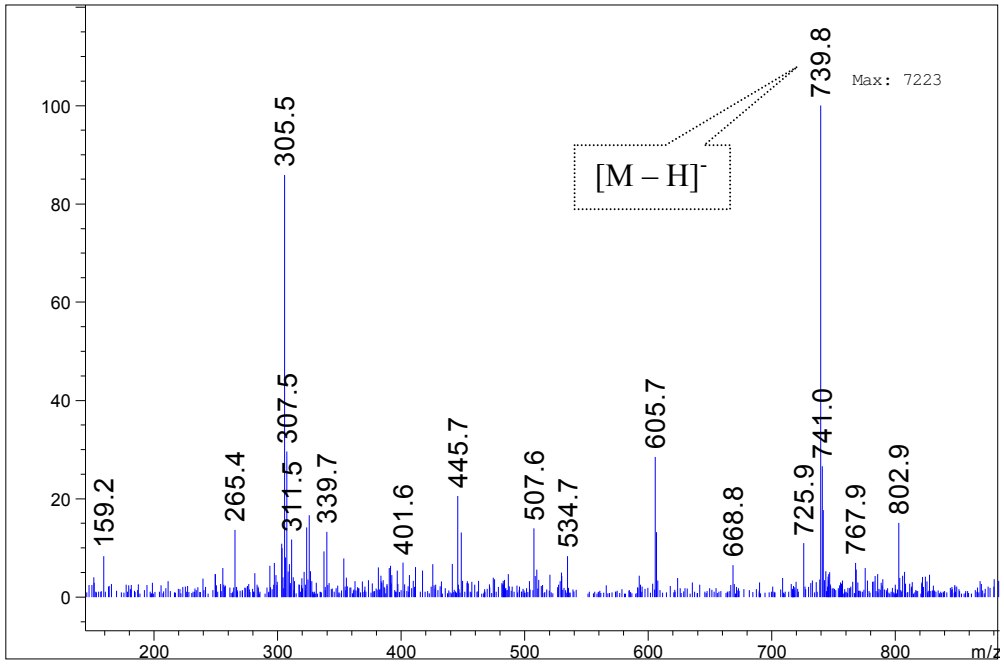
Kaempférol-3-O-[2,6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside]



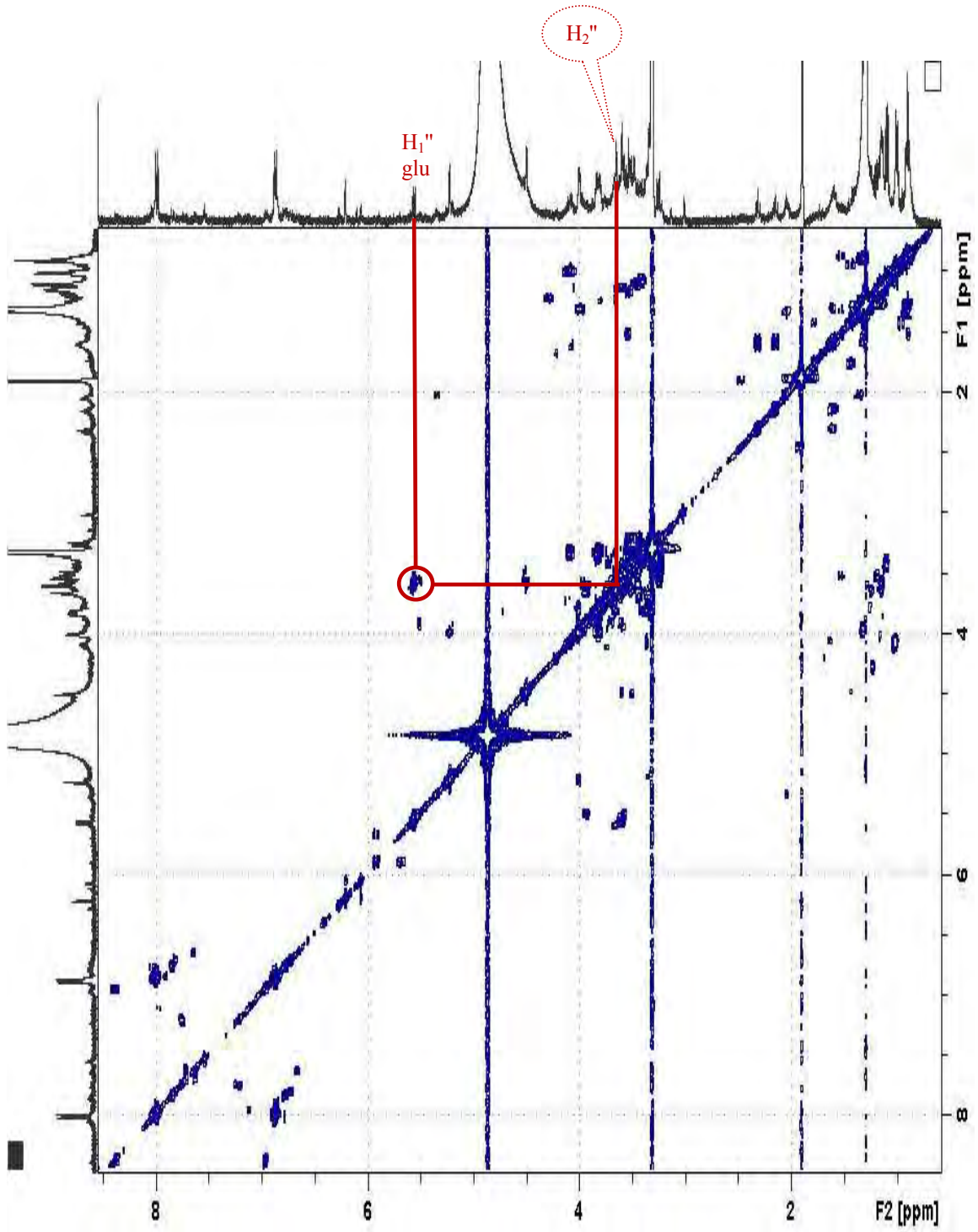
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب **6**



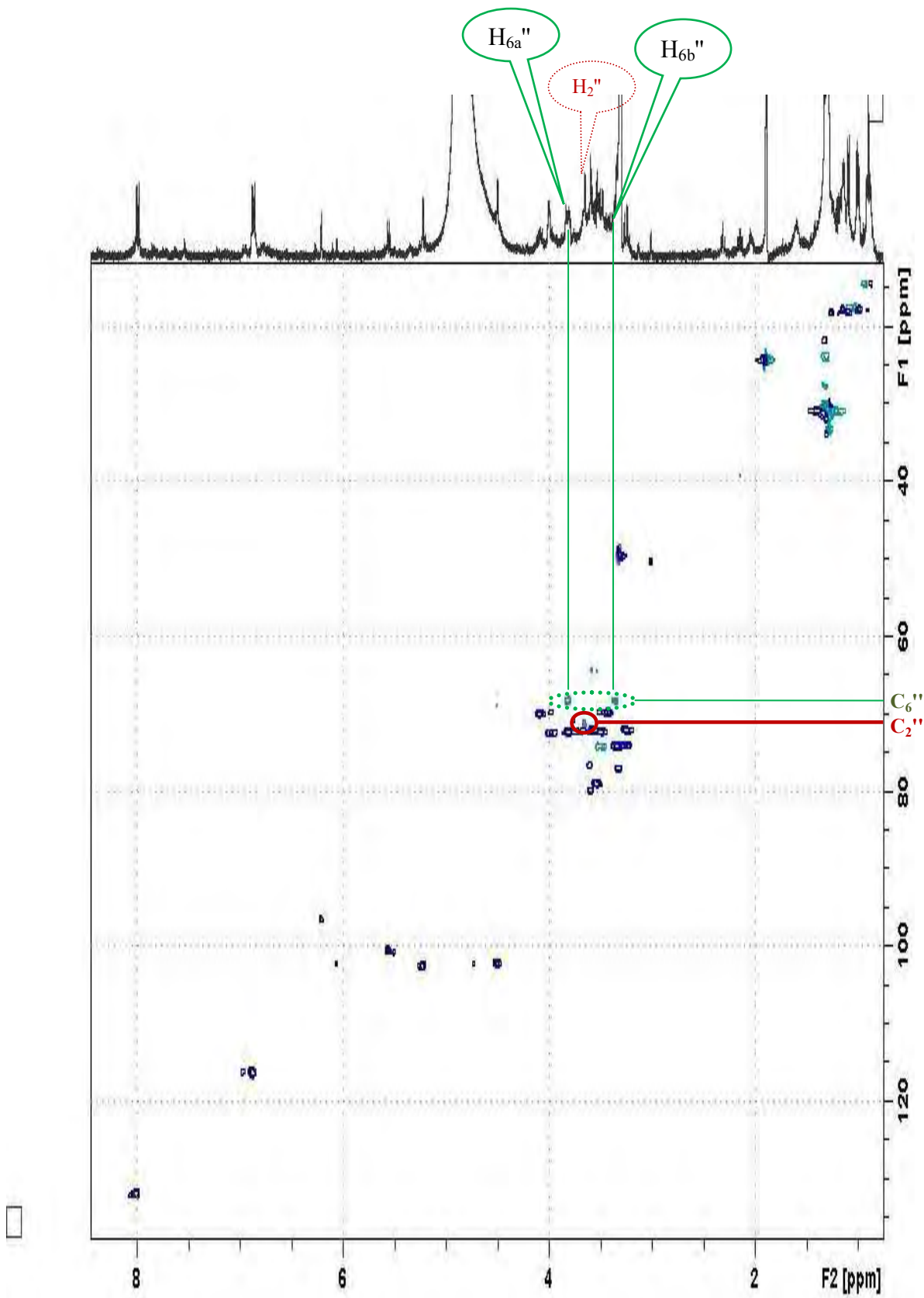
شكل 2: طيف ^1H RMN للمركب **6a** مع التكبيرات اللازمة



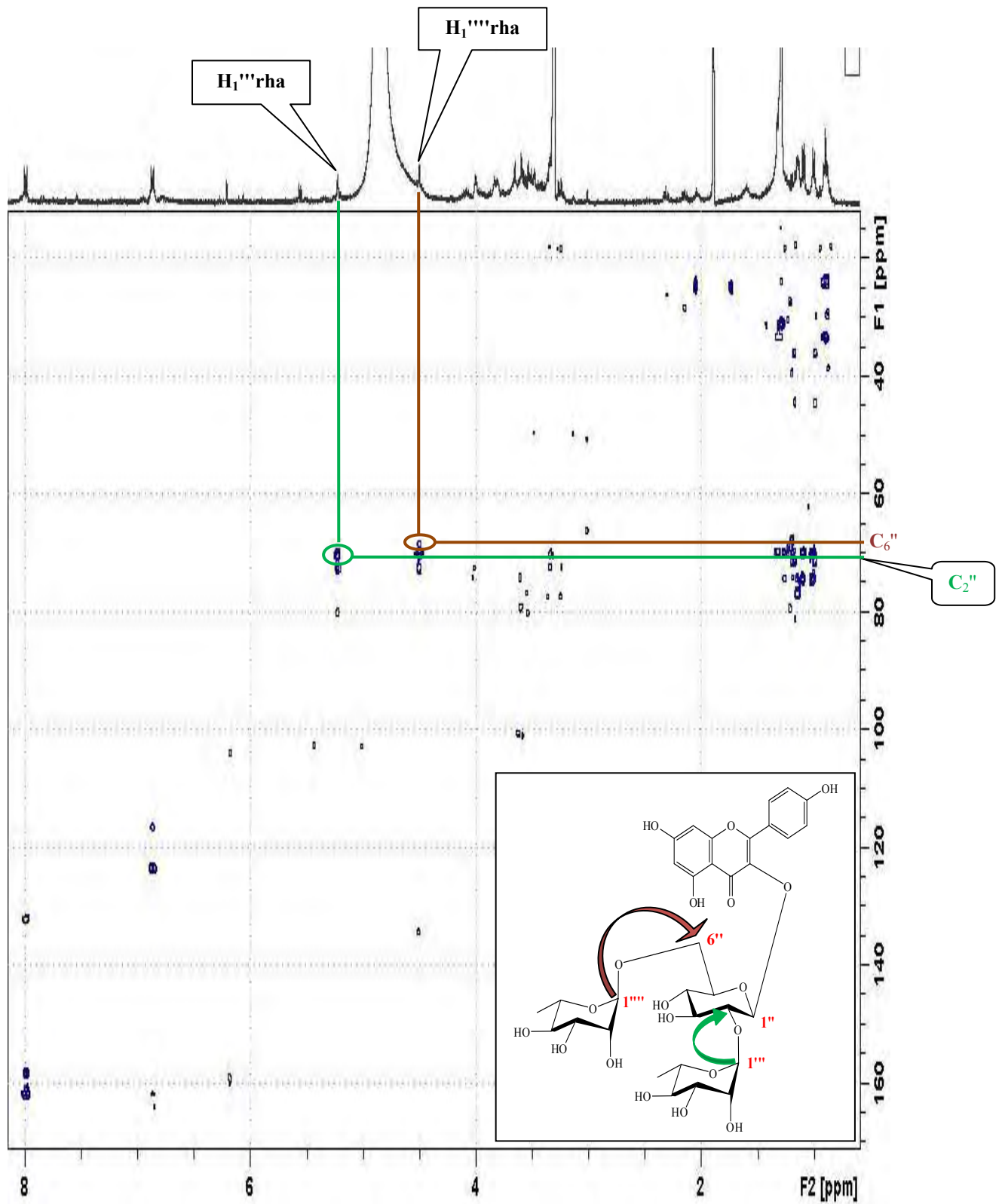
شكل 3: طيف الكتلة للمركب **A₆** بتقنية **API-ES**



شكل 4: طيف تجارب *cosy* للمركب **A₆**



شكل 5: طيف تجارب *HMQC* للمركب **A₆**



شكل 6: طيف تجارب *HMBC* للمركب **A₆**

التعيين البنوي للمركبين **A₇** و **A₈**

لقد تم التعرف على بنية كل من المركبين **A₇** و **A₈** عن طريق تقنية **HPLC-UV-DAD** بالتزاوج مع مطيافية الكتلة.

و فيما يلي معلومات حول الشروط التجريبية المستخدمة في هذه التقنية:

العمود الكروماتوغرافي ذو أبعاد (150 mm x 3 mm)، مجهز من السليكاجال (RP-C18) كدعامة ثابتة (أبعاد جزيئات السليكاجال 5 µm)، أما المملص فيتمثل في:

[acetonitrile (A)-H₂O(pH 3.2)-acide formique (0.03%) (B)] مع معدل تدفق 0.4 ml/min، عملية التمليص تمت باستعمال النسب التالية :

0-7 min, 10%-15% (A), 7-14 min, 22% (A), 14-22 min 22% (A), 22-27 min, 22%-30% (A)

سجل طيف UV-vis بين 220 و 500 nm، كما سجل طيف الكتلة من m/z= 100 إلى m/z=800.

المركب **A₇**:

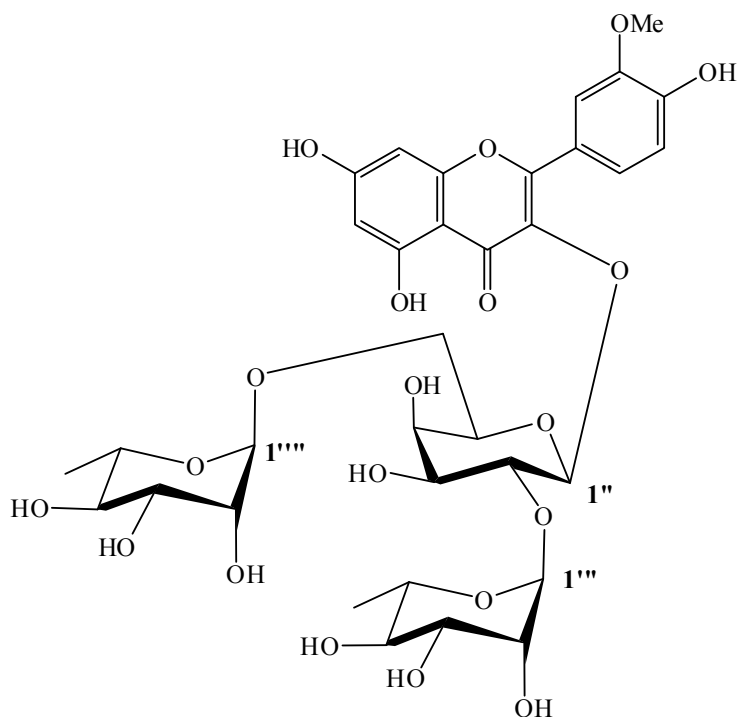
تم تحديد بنية هذا الأخير إنطلاقاً من مطيافية الكتلة (شكل 8) التي أعطت قمة جزيئية عند

770.7 ([M-H]⁻) موافقة للصيغة المجملة C₃₄H₄₃O₂₀ و زمن إحتباس t_R = 15.8 min (شكل 7)

المطابق لزمن إحتباس المركب:

Isorhamnetin-3-O-[2,6-di-O-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-galactopyranoside]

و منه فالصيغة المفصلة للمركب **A₇** هي:

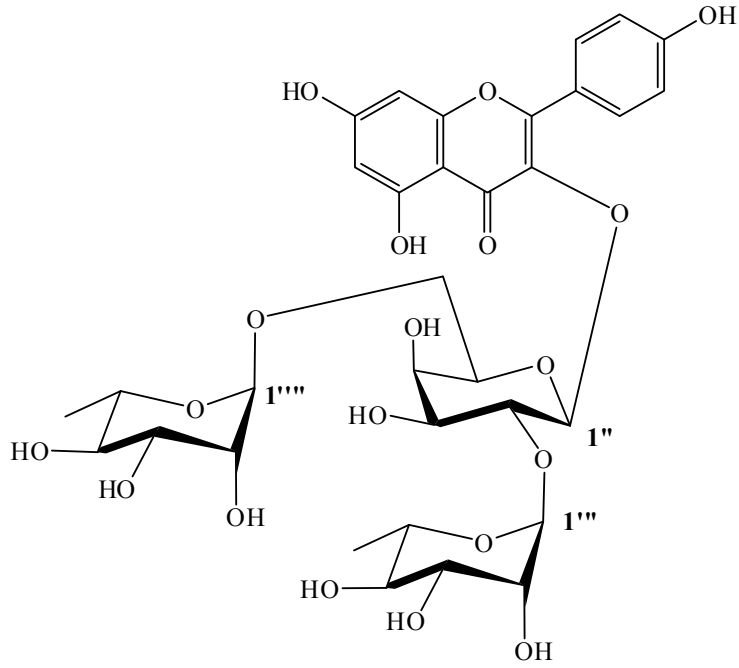


***Isorhamnetin-3-O-[2,6-di-O-α-L-
rhamnopyranosyl-β-D-galactopyranoside]***

أما بالنسبة للمركب **A₈** فكان عبارة عن:

Kaempférol-3-O-α-[2,6-di-O-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-galactopyranoside]

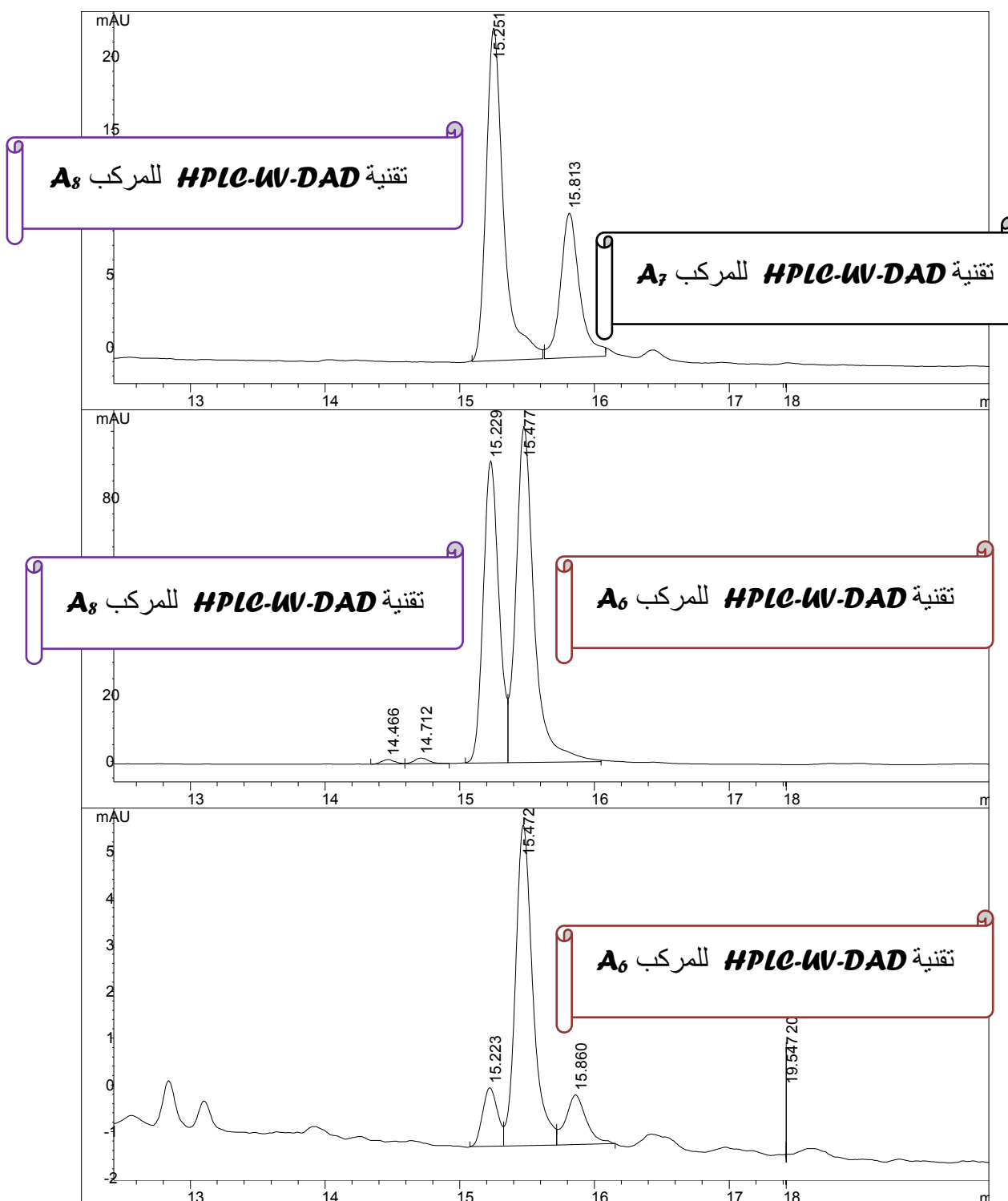
و ذلك حسب قيمة زمن الإحتباس $t_R = 15.2 \text{ min}$ (شكل 7) والصيغة المجملة $C_{33}H_{41}O_{19}$ الموافقة للقيمة الجزيئية 740.7 ($[M]^-$) (شكل 8) و منه فالصيغة المفصلة لهذا المركب هي:



Kaempférol-3-O-[2,6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranoside]

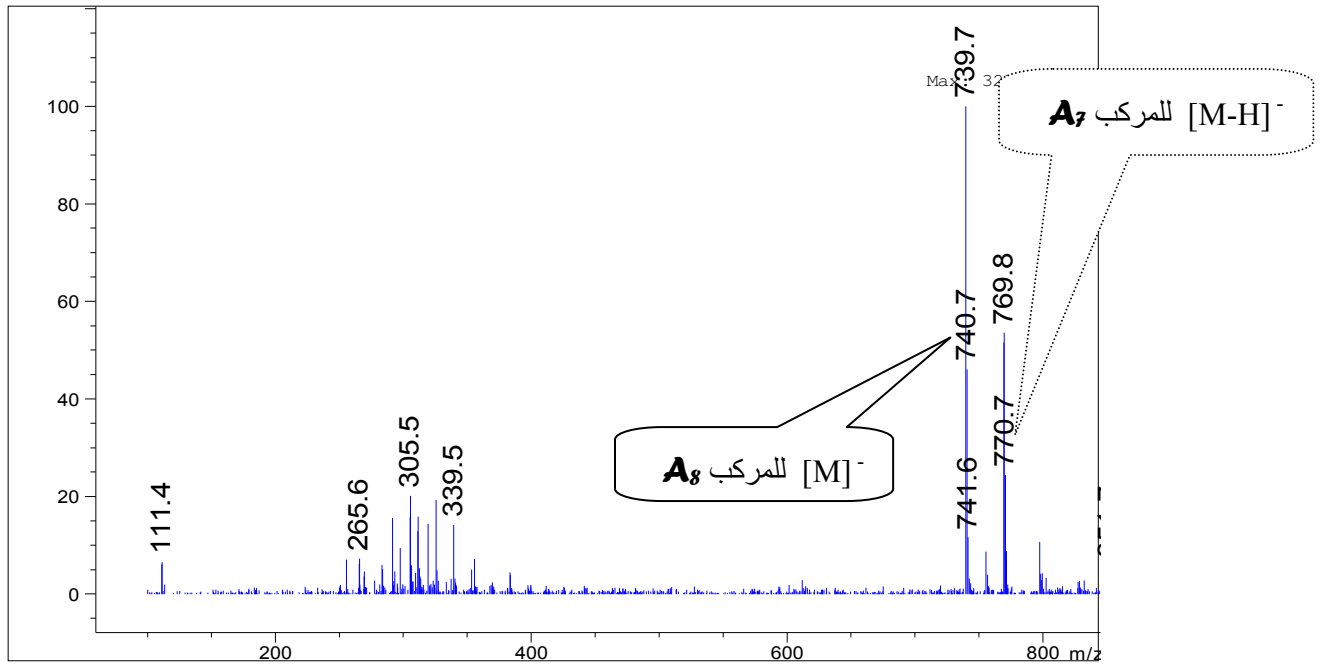
و فيما يلي كوماتوغرام يوضح:

- المزيج المتحصل عليه من المركبين A_7 و A_8
- كذلك المزيج المتحصل عليه من المركبين A_6 و A_8

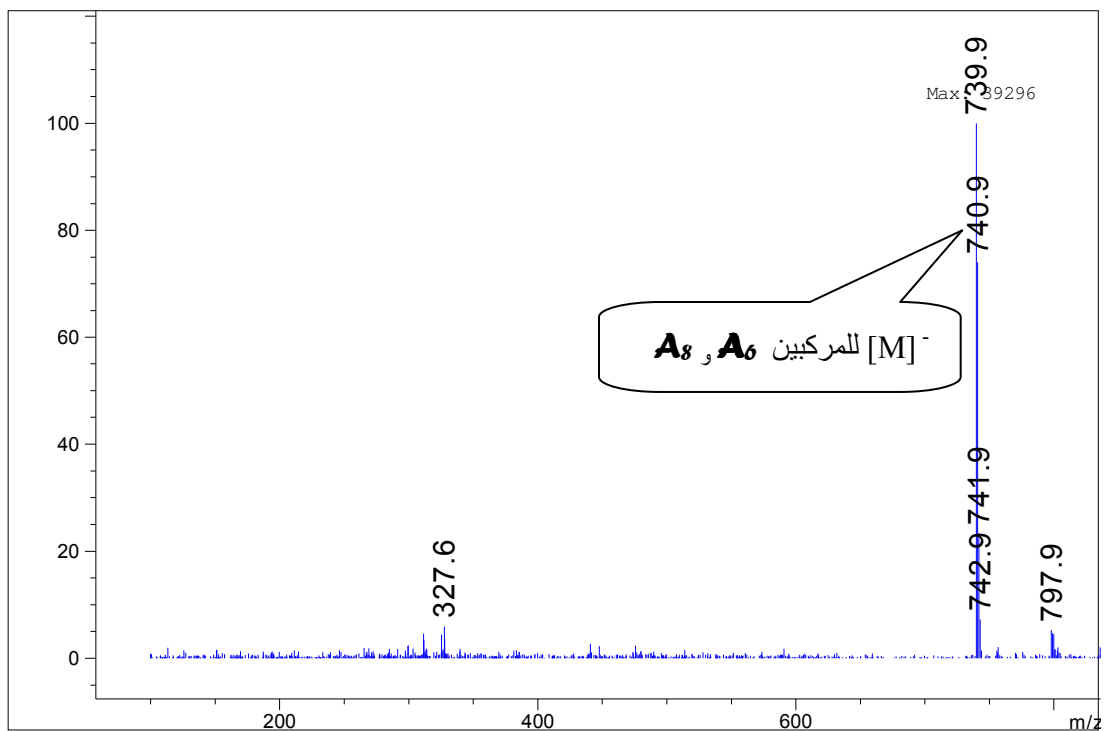


شكل 7: تقنية **HPLC-UV-DAD** توضح كروماتوغرام المركبات **A₆**،

A₇ و **A₈**



شكل 8: طيف الكتلة للمركبين **A₇** و **A₈** بتقنية **API-ES**



شكل 8: طيف الكتلة للمركبين **A₈** و **A₆** بتقنية **API-ES**

الفصل الثالث

دراسة بيئيو جرافية حول الجنس

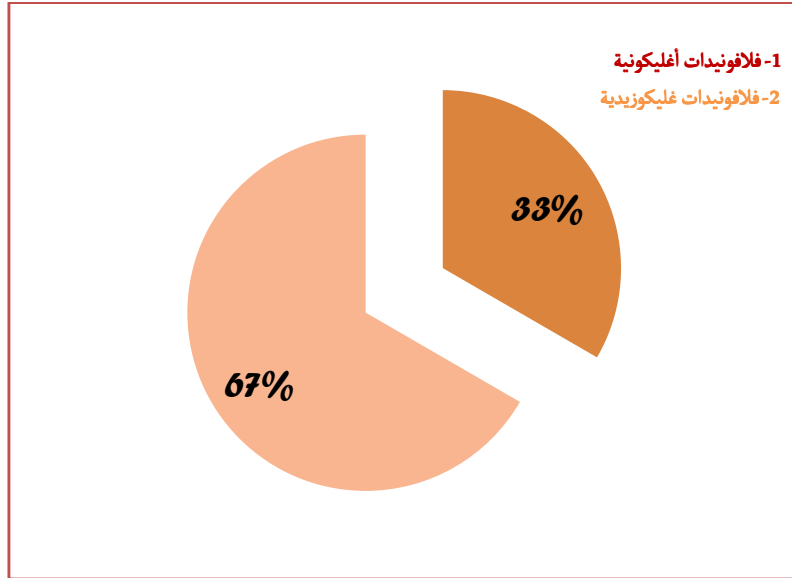
Eryngium

توزيع الفلافونيدات عند الجنس النباتي *Eryngium*:

الدراسة البيبليوغرافية بينت عدم غنى جنس *Eryngium* بالمركبات الفلافونيدية، إذ أنه تم فصل حوالي 14 فلافونيد من بين ثلاثة أنواع والجدول 1- يوضح ذلك:

و هذه الإحصائيات سمحت لنا بالاستنتاجات التالية:

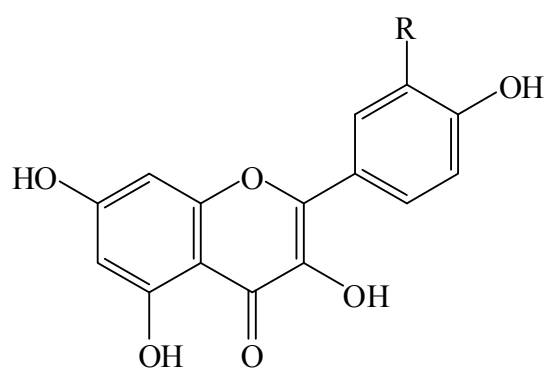
من بين 13 فلافونيد المفصولة يوجد فلافون واحد غليكوزيدي، ثلاث فلافونولات أغليكونية، 6 فلافونولات غليكوزيدية أحادية السكر، 3 فلافونولات غليكوزيدية ثنائية السكر.



توزيع الفلافونيدات الغليكوزيدية و الأغليكونية عند جنس *Eryngium*

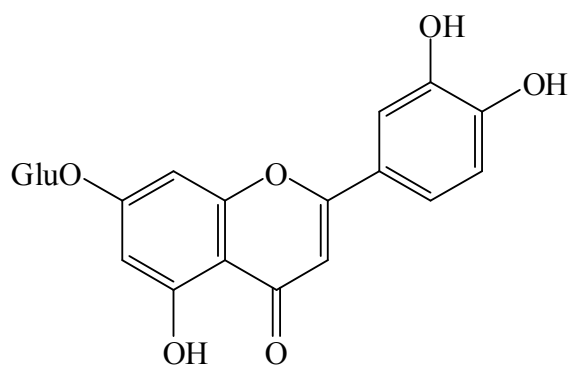
جدول - 1- الفلافونيدات المعزولة من جنس *Eryngium*

الفلافونيد	البنية	النوع	المراجع
Kaempférol	1a	<i>E. campestre</i>	[1]
Quercetine	1b	<i>E. campestre</i>	[1]
Isorhamnetine	1c	<i>E. campestre</i>	[1]
Luteolin-7- <i>O</i> - β -D-glucoside	2	<i>E. campestre</i>	[2]
Kaempférol-3- <i>O</i> - β -D-glucoside	3a	<i>E. campestre</i>	[2]
Kaempférol-7- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	3b	<i>E. campestre</i>	[2]
Kaempférol-3,7- di- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	3c	<i>E. campestre</i>	[2]
Kaempférol-3- <i>O</i> - β -D-glucoside-7- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	3d	<i>E. campestre</i>	[1]
Kaempférol-3- <i>O</i> -[2,6-di- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl- β -D-glucoside]	3e	<i>E. campestre</i> <i>E. yuccifolium</i>	[2] [3]
Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-glucoside	4a	<i>E. campestre</i>	[2]
Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	4b	<i>E. campestre</i>	[2]
Quercetin-3- <i>O</i> - [2,6-di- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl- β -D-glucoside]	4c	<i>E. campestre</i>	[2]
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	4d	<i>E. campestre</i>	[1] [2]

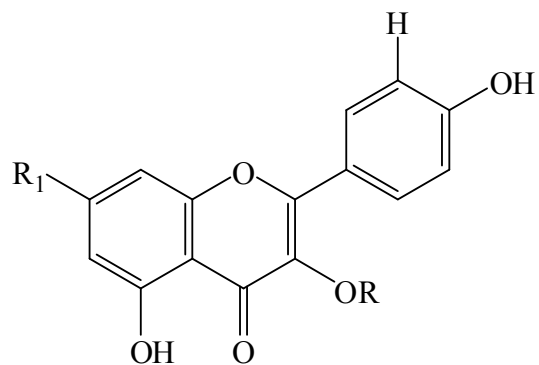


	R
a	H
b	OH
c	OMe

1

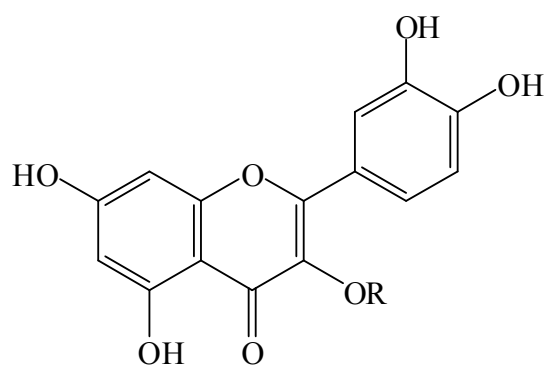


2



3

	R	R ₁
a	Glu	H
b	H	Rha
c	Rha	Rha
d	Glu	Rha
e	2,6-di- <i>O</i> -trans- <i>p</i> -coumaroyl- β -D-glucoside	H



4

	R
a	Glu
b	Rha
c	2,6-di- <i>O</i> -trans- <i>p</i> -coumaroyl- β -D-glucoside
d	Rutinoside

المراجع

- [1] Judit, H., Zsuzsanna, P., Gábor, G., Imre M. (1997). Flavonolacyl glycosides of the aerial parts of *Eryngium campestre*, *Planta Med.*, 63.
- [2] Karting, T., Wolf, J. (1993). Flavonoids from the Aboveground parts of *Eryngium campestre*, *Planta Med.*, 59.
- [3] Zhizhen, Z., Shiyou, L., Stacy, O., Ping, W., Wei, Y., Wanli, Z., Scott, B . (2008). Phenolic compounds and rare polyhydroxylated triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium*, *Phytochemistry*, 69, 2070.

الدراسة النباتية و الكيميائية للنبته

Eryngium triquetrum Vahl.

الدراسة الكيميائية النباتية 1. *Eryngium triquetrum* Vahl.

1- المادة النباتية:

قطفت المادة النباتية في شهر مارس من سنة 2010 من منطقة قسنطينة، اختير الجزء الهوائي للدراسة حيث تم تجفيفه بوضعه في أماكن خاصة تحت الظل وبعيدا عن الرطوبة، بعد ذلك تم طحنه فكان الوزن المستعمل 1500 غ.
و لقد تم التعرف على هذه النبتة من طرف الأستاذ Gérard de Bélair (كلية العلوم، جامعة باجي مختار، عنابة).

2- وصف النوع. *E.triquetrum* Vahl. :

عبارة عن نبتة شوكية سنوية، أو معمرة تتشكل من محور أصلي يحمل زهرات محاطة بأوراق شوكية، الأزهار لا تحتوي على عنق وتتصل في قاعدتها بالأوراق الشوكية. يحتوي الكأس على خمسة أسنان ورقية الشكل و شوكية، خمس بتلات صغيرة متقاربة، الثمار تكون بيضوية مغطاة بقشرة سميكة أو درنات جانبية.



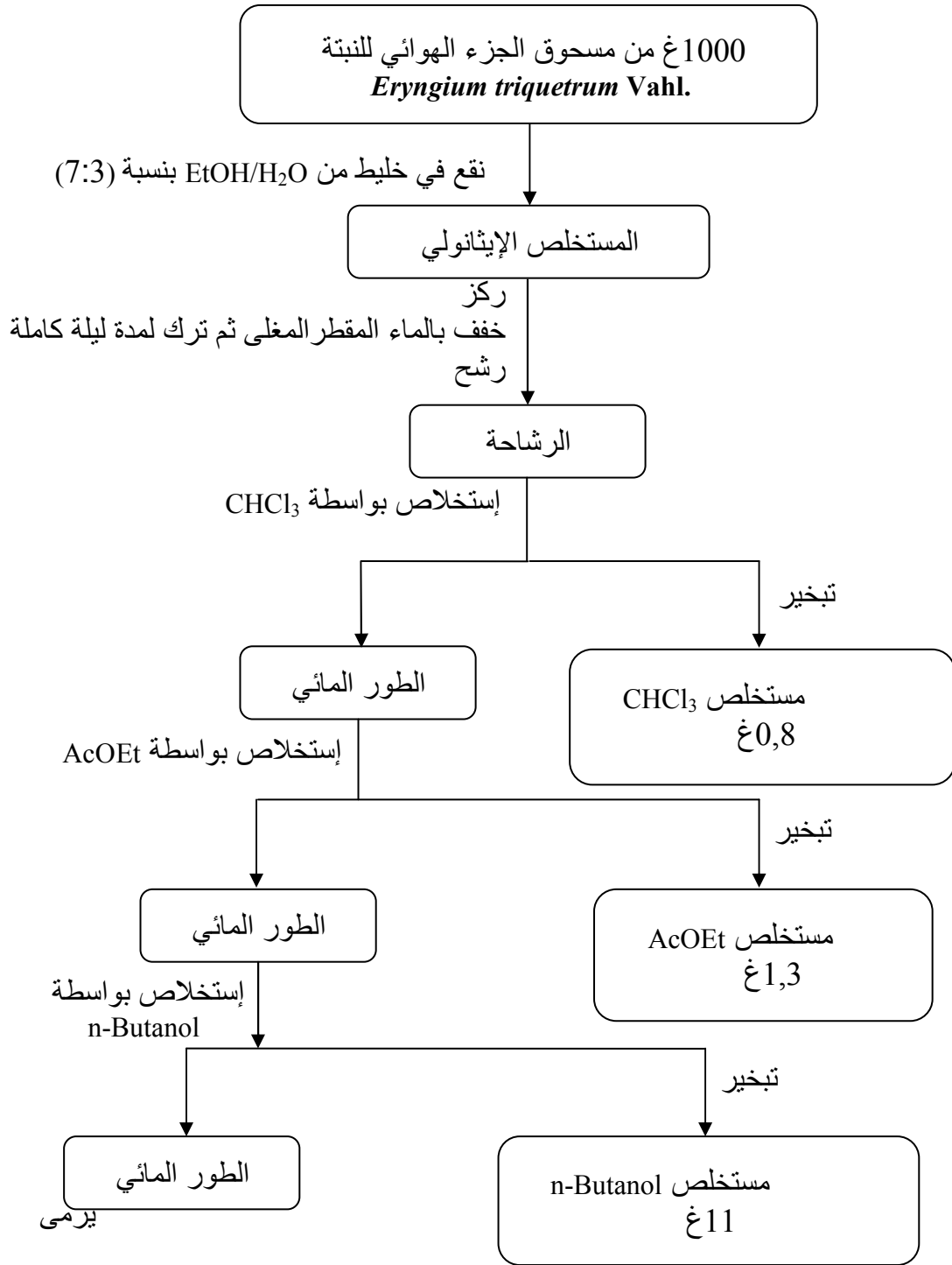
شكل-1- صور فوتوغرافية للنبتة *Eryngium triquetrum* Vahl.

3- التصنيف النظامي للنبته:

Embranchement	Angiospermes	الفرع
Classe	Dicotylédones	تحت الفرع
Ordre	Araliales	الرتبة
Famille	Apiaceae (ombellifères)	العائلة
Genre	<i>Eryngium</i>	الجنس
Espèce	<i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.	النوع

4- الاستخلاص:

بعد تنقية الجزء الهوائي من أوراق و أزهار للمادة النباتية و تجفيفها نقعت في محلول هيدروكحولي مكون من إيثانول و ماء بنسبة 70 % من الإيثانول لمدة ليلة كاملة بعدها رشحت مع تجديد المذيب للنبته، كررت هذه العملية 3 مرات و في الأخير جمعت الرشاحة التي ركزت إلى غاية الجفاف فكانت في شكل مستخلص الذي عومل بالماء المقطر المغلى وترك لمدة ليلة كاملة بعدها رشح، الرشاحة أجريت لها عملية إستخلاص من نوع سائل-سائل بواسطة مذيبات متفاوتة القطبية بدءاً بأحادي كلور الميثان يليه أسيتات الإيثيل و أخيراً البوتانول النظامي، جمعت هذه المستخلصات كلا على حدى و ركزت حتى الجفاف و المخطط التالي يلخص هذه الخطوات:



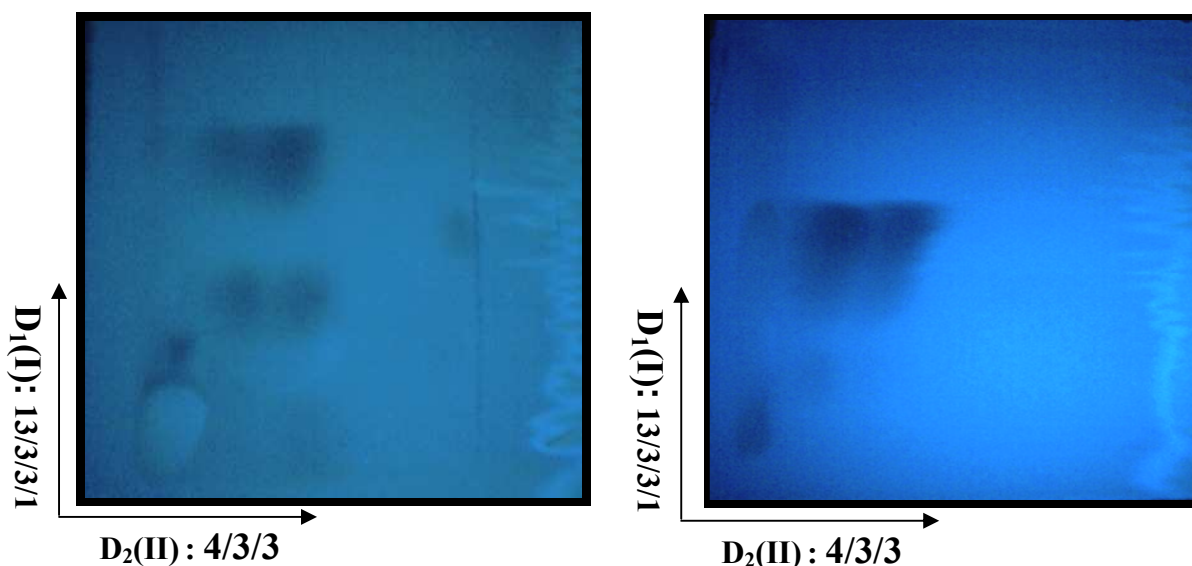
مخطط-1- مخطط الاستخلاص للنبتة *Eryngium triquetrum* Vahl.

5- الفصل و التنقية:

قبل البدء بعملية الفصل قمنا بإجراء اختبار كروماتوغرافي تحليلي لكل من المستخلص البوتانولي و مستخلص أسيتات الإيثيل على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ثنائية البعد باستعمال متعدد الأמיד كدعامة ثابتة و الكروماتوغرامين التاليين يوضحان صورتان فوتوغرافيتان مأخوذتان تحت الأشعة UV لهذا الاختبار:

البعد $D_1(II)$: (13/3/3/1) (H₂O/ MeOH/ méthyléthylcétone/ Acétylacétone)

البعد $D_2(I)$: (4/3/3) (Toluène/ MeOH/ méthyléthylcétone)



شكل-3- كروماتوغرام ثنائي البعد لمستخلص أسيتات

الإيثيل للنبته *Eryngium triquetrum* Vahl.

شكل-2- كروماتوغرام ثنائي البعد للمستخلص

البوتانولي للنبته *Eryngium triquetrum* Vahl.

فإذا ما نظرنا إلى الكروماتوغرام الموضح للمستخلص البوتانولي و قمنا بمقارنته مع الكروماتوغرام الموضح لمستخلص أسيتات الإيثيل نجد ظهور بقع فلافونيدية زيادة في المستخلص الأخير مقارنة بالمستخلص الأول وللتأكد من ذلك، أخذنا مستخلص أسيتات الإيثيل و أجرينا عليه عدة اختبارات و دائما كنا نقارنه بالمستخلص البوتانولي أين تأكدنا من وجود بقعتين فلافونيديتين في مستخلص أسيتات الإيثيل زيادة على التي ظهرت في المستخلص البوتانولي و نظرا

إلى كون الجزء المتشابه في مستخلص أسيتات الإيثيل مع المستخلص البوتانولي لم يكن نقيا لذلك تقرر فصل مكونات كل مستخلص على حدى أي دون مزجهما.

➤ دراسة المستخلص البوتانولي:

حسب الكروماتوغرام الموضح لهذا المستخلص نلاحظ ظهور بقع بنفسجية اللون و هذا اللون مميز للمركبات الفلافونيدية من نوع فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3، أما هجرة هذه البقع في النظامين فتدل على أن هذه الفلافونيدات غليكوزيدية لذلك قمنا بفصل مكونات هذا المستخلص بواسطة عمود كروماتوغرافي من متعدد الأميد (SC_6) و الجملة المملصة عبارة عن تولوين-ميثانول حيث بدأنا عمليات التلميص بإضافة التولوين أولا و الذي تم تشبيعه تدريجيا بالميثانول، في النهاية حصلنا على الكسور المدونة في الجدول أسفله.

الكسور المحصل عليها	نسبة Toluène(%)	نسبة MeOH(%)
5-1	100	0
13-6	98	2
16-14	96	4
19 -17	92	8
33 -20	88	12
86 -34	85	15
124 -87	80	20
140 -125	75	25
162 -141	70	30
170-163	40	60
190- 171	0	100

و قد تم تجميع الكسور المتشابهة عن طريق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (CCM) على السيليكاجال باستعمال النظامين ($CH_2Cl_2/ MeOH$) و ($AcOEt/ MeOH/ H_2O$) بنسب متفاوتة في عملية التلميص:

الملاحظة	الكسور قبل و بعد الجمع		الملاحظة	الكسور قبل و بعد الجمع	
يحتوي على خليط قابل للفصل	F ₅	101-91	آثار لمركبات غير فلافونيدية	F ₁	9-1
يحتوي على خليط قابل للفصل	F ₆	106-102	مزيج من مركبات غير فلافونيدية تختلف عن سابقتها	F ₂	48-10
يحتوي على خليط معقد	F ₇	141-107	يحتوي على آثار من مركب فلافونيدي غير نقي	F ₃	52-49
خليط معقد	F ₈	190-142	يحتوي على خليط قابل للفصل	F ₄	90-53

- معالجة الكسور المحصل عليها:

• معالجة الكسر F₄:

تم فصل مركبات هذا الأخير باستعمال كروماتوغرافيا العمود، الدعامة الثابتة فيها كانت عبارة عن السيليكاجال و المملص عبارة عن النظام (AcOEt/ MeOH/ H₂O): (10/1/0.5) من بداية العمود إلى آخره، في نهاية عملية الفصل حصلنا على الكسور التالية:

الملاحظة	الكسور قبل و بعد التجميع	
آثار لمركبات غير فلافونيدية	f ₁	9-1
مركب فلافونيدي مع آثار لآخر غير فلافونيدي	f ₂	16-9
مركبين فلافونيين	f ₃	19-17
مركب فلافونيدي	f ₄	23-20
مركبين فلافونيين	f ₅	46-24

❖ معالجة تجزء الكسر f₂

باستعمال عمود صغير من السيليكاجال والنظام (8/2) : (CH₂Cl₂/ MeOH) تم تنقية المركب **e₁** = 73₁.

❖ معالجة تجزء الكسر f₄

لاحظنا بأنه يحتوي على راسب أصفر اللون قمنا بغسله بواسطة دفعات متتالية من MeOH أين تحصلنا عليه في صورته النقية فكان المركب **e₂** = 73.

❖ معالجة تجزء الكسر f₅

كما ذكرنا سابقا فإن هذا الأخير يحتوي على المركبين 73 و 73₂ و قد اختيرت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية لفصل المركب 73₂ و ذلك باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (10/1/0.5) : (AcOEt/ MeOH/ H₂O) كملص بعد عملية التنقية التي تمت باستعمال عمود صغير من السيليكاجال و نفس المملص السابق تحصلنا على المركب 73₂ الذي اتضح فيما بعد بأنه عبارة عن مزيج لمركبين لم نتمكن من تحديد طبيعتهما.

• معالجة الكسر F₆:

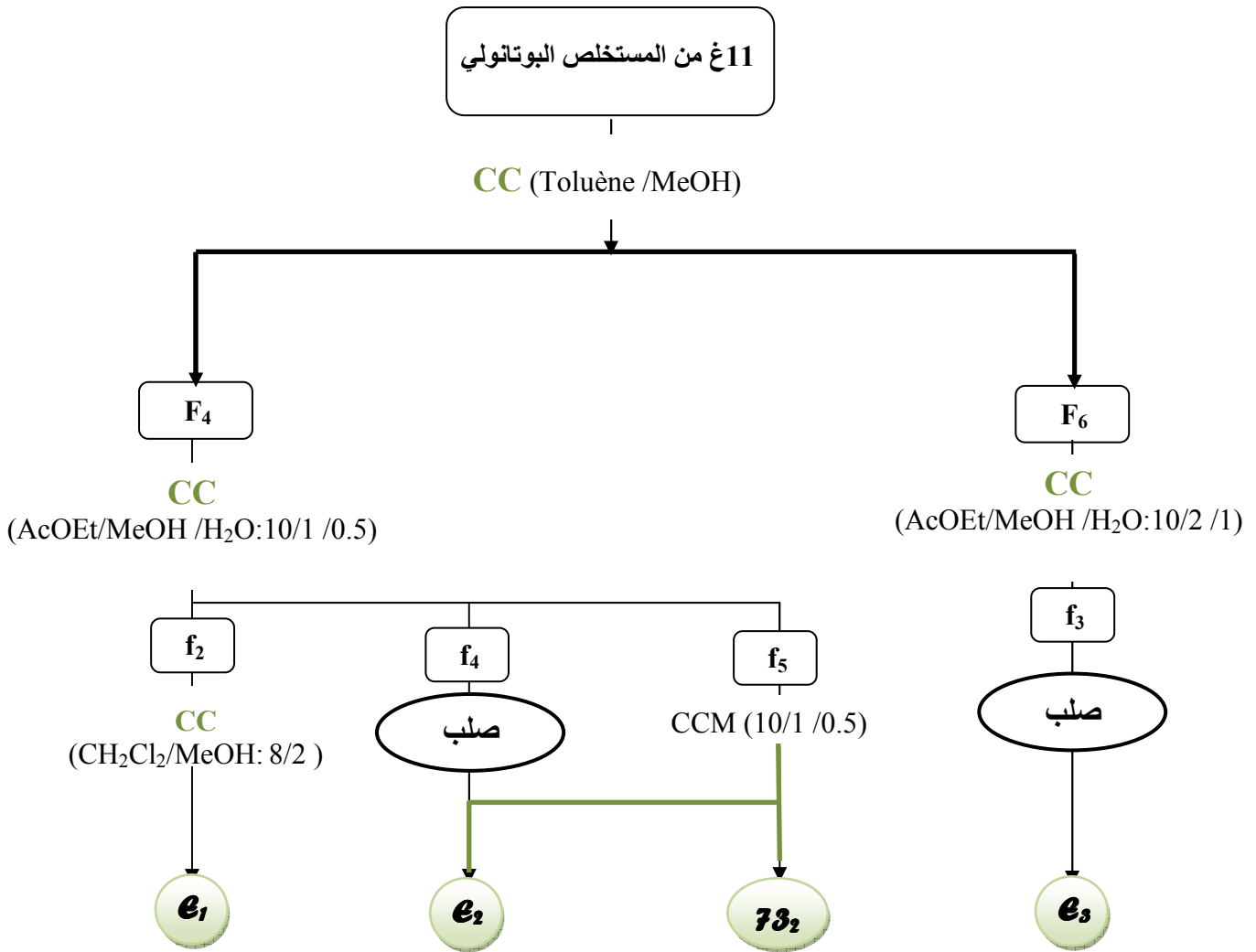
تم معالجة هذا الكسر بواسطة كروماتوغرافيا العمود باستعمال السيليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (10/2/1) : (AcOEt/ MeOH/ H₂O) كملص بعد نهاية هذه العملية تحصلنا على ثلاث تحت كسور:

الملاحظة	الكسور قبل و بعد التجميع	
آثار لمركبات غير فلافونيدية	f ₁	9 - 1
آثار لمركبين فلافونيديين	f ₂	15 - 9
مركب فلافونيدي	f ₃	23 - 16

❖ معالجة تجذبه الحمر f_3

لاحظنا احتوائه على راسب أصفر اللون قمنا بغسله بواسطة دفعات متتالية من MeOH فتحصلنا عليه في صورته النقية سمي $e_3=16$.

و المخطط التالي يلخص كل خطوات الفصل السابقة:



مخطط 1- مخطط يلخص خطوات الفصل للمستخلص البوتانولي للنبتة

Eryngium triquetrum Vahl.

➤ دراسة مستخلص أسيتات الإيثيل:

أخذنا 1,3 غ من مستخلص أسيتات الإيثيل و حاولنا فصل مكوناته مستعملين في ذلك كروماتوغرافيا العمود فكانت الدعامة الثابتة عبارة عن السيليكاجال (220-440 mesh) و المملص عبارة عن الكلوروفورم مع تشبيعه تدريجيا بالميثانول، متابعة الكسور المحصل عليها تم بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية على السيليكاجال و المملص هو نفسه المستعمل في العمود لكن بقطبيات متفاوتة، في الأخير تحصلنا على الكسور المدونة في الجدول التالي:

الكسور المحصل عليها	نسبة CHCl ₃ (%)	نسبة MeOH(%)
10 -1	100	0
22-11	95	5
35 -23	90	10
50 -36	80	20
70 -51	0	100

بعد تجميع هذه الكسور باستعمال نفس النظام السابق والمستعمل في العمود تحصلنا على ما يلي:

الملاحظة	الكسور قبل و بعد التجميع	
آثار لمركبات غير فلافونيدية	F ₁	20 -1
مركب فلافونيدي	F ₂	22 -21
مركب فلافونيدي آخر	F ₃	27 -23
ظهور نفس مركبات المستخلص البوتانولي و التي تم فصلها سابقا	F ₄	70 -28

- معالجة الكسور المحصل عليها:

• معالجة الكسر F₂:

عولج هذا الأخير باستعمال عمود صغير من السيليكاكاجال و باستعمال النظام

(AcOEt/ MeOH/ H₂O):(10/1/0.5) كملص تحصلنا في الأخير على المركب 21 في صورته

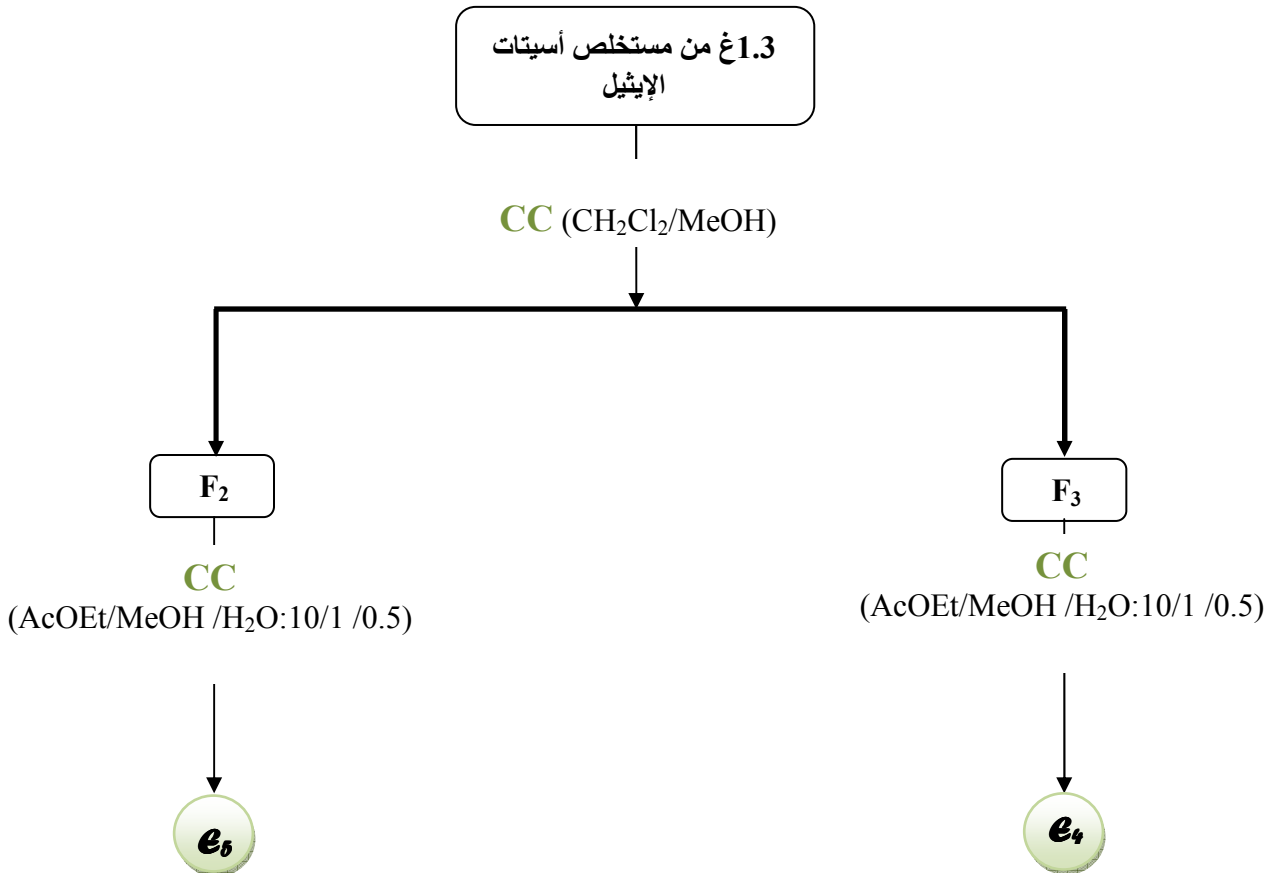
النقية تم تسميته 21 = e₆.

• معالجة الكسر F₃:

لوحظ بأن هذا الكسر يحتوي على مركب فلافونويدي آخر يختلف عن سابقه فقمنا بتنقيته بنفس الطريقة

السابقة فكان المركب 23 = e₄.

و المخطط التالي يوضح الخطوات السابقة:



مخطط-2- مخطط يلخص خطوات الفصل لمستخلص أسيتات الإيثيل للنبذة

Eryngium triquetrum Vahl.

التعيين البنيوي

للمركبات المفصولة

التعيين البنوي للمركب E_1

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

الأنظمة المستعملة لقياس قيم R_f :

جدول 1: قيم R_f للمركب E_1

الجملة	R_f
I) 4/3/3 (toluène : MeOH : MEC)	0.37
II) 13/3/3/1 (H ₂ O : MeOH : MEC : Ac.Ac)	0.23
III) 10/1/1 (ACOEt : MeOH : H ₂ O)	0.55

ملاحظة: تم استعمال متعدد الأميد كدعامة ثابتة مع النظامين I، II و السيليكاجال مع النظام III.

2. الخصائص الطيفية:

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب E_1

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})	عصابات أخرى (نم) (λ_{max})
MeOH	347	267	
NaOH	401	275	325
AlCl ₃	398	273	
AlCl ₃ + HCl	397	274	
NaOAc	377	274	
NaOAc + H ₃ BO ₃	355	268	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 250MHz):

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **1**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ_H (ppm)
H-2', H-6'	d ($J = 8.9$ Hz)	2H	8.09
H-3', H-5'	d ($J = 8.9$ Hz)	2H	6.91
H-8	d ($J = 1.9$ Hz)	1H	6.42
H-6	d ($J = 1.9$ Hz)	1H	6.22
H-1"glu	d ($J = 7.3$ Hz)	1H	5.28
بروتونات glu	—	5H	3.26-4.14

○ مطيافية الكتلة:

جدول 4: نتائج طيف الكتلة للمركب **1**

ES ⁻	
الشاردة	(m/z)
[M] ⁻	448.2
[M-H] ⁻	447.2
[M+H-H ₂ O] ⁻	431.2
[M-H-glu] ⁻	284.1

■ **قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:**

○ اللون البنفسجي للمركب تحت الأشعة (UV) و قيمة العصابة I في الميثانول عند 347 nm

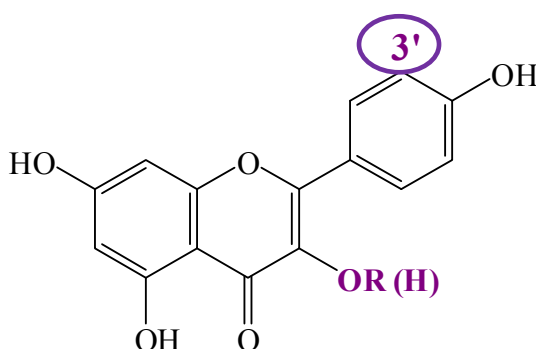
يدلان على أن المركب إما فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3.

○ الإنزياح الباثوكرومي للعصابة I عند مقارنة طيف NaOH بطيف MeOH و المقدر بـ

54 nm يدل على وجود OH حر في الموقع 4، إنزياح باثوكرومي مقدر بـ 7 nm للعصابة II بعد إضافة NaOAc إلى MeOH يشير إلى وجود OH حر في الموقع 7، عدم وجود أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B يعززه عدم وجود إزاحة باثوكرومية عند مقارنة طيف $AlCl_3+HCl$ مع طيفه في $AlCl_3$.

○ أما الإزاحة الباثوكرومية عند مقارنة طيف $AlCl_3+HCl$ للمركب بطيفه في MeOH و المقدره بـ 50 nm فتدل على وجود OH حر في الموضع 5. (شكل 1)

و على أساس هذه المعطيات يمكن وضع الصيغة الأولية للمركب **6**:



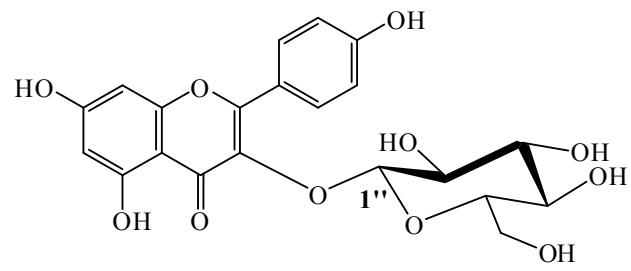
طيف RMN^1H (شكل 2) لم يظهر الإشارة الأحادية التي تدل على أن هذا المركب عبارة عن فلافون ومنه فهو عبارة عن فلافونول مستبدل في الموقع 3 مما يدل على أن الهيكل الفلافونيدي عبارة عن Kaempférol وهذا ما أظهره نفس الطيف حيث بين إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H و بثابت تزاوج $J = 8.9 \text{ Hz}$ لكل منهما عند 6.91 ppm موافقة للبروتونين H_3' و H_5' و عند 8.09ppm موافقة للبروتونين H_2' و H_6' ، أما الإشارتين الخاصتين بالبروتونين H_6 و H_8 ظهرتا على شكل ثنائيتين بثابت تزاوج $J = 1.9 \text{ Hz}$ لكل منهما عند 6.42 ppm و 6.22 ppm على التوالي.

المستبدل الموجود في الموقع 3 كما يبدو من خلال طيف RMN^1H عبارة عن سكر لأن هذا الطيف بين إشارة بروتونه الأنوميري على شكل إشارة ثنائية بثابت تزاوج $J = 7.3 \text{ Hz}$. مطيافية الكتلة (شكل 3) أعطت قمة جزيئية عند 448.2 ($[M]^-$) موافقة للصيغة المجملة $C_{21}H_{20}O_{11}$ تدل على أن

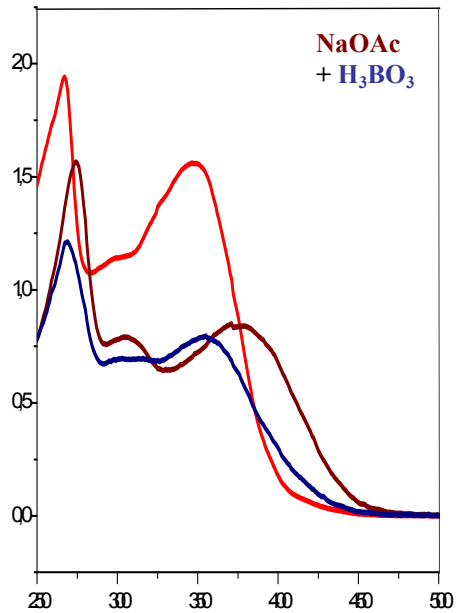
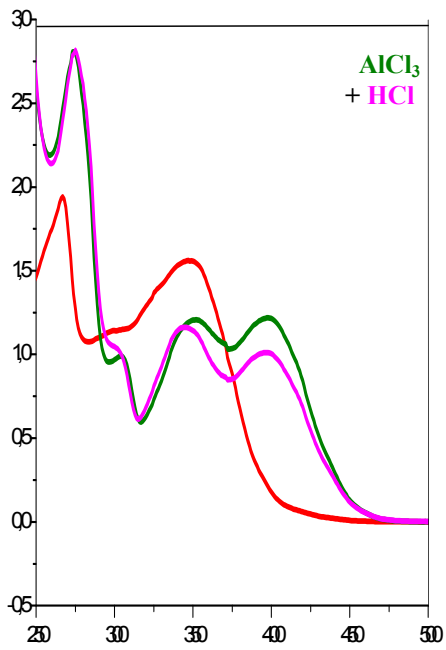
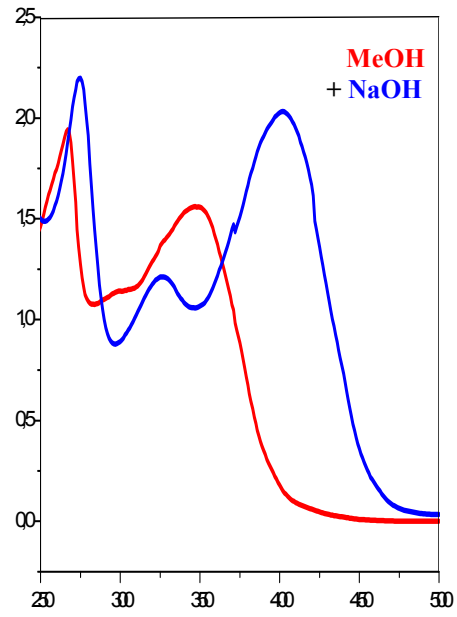
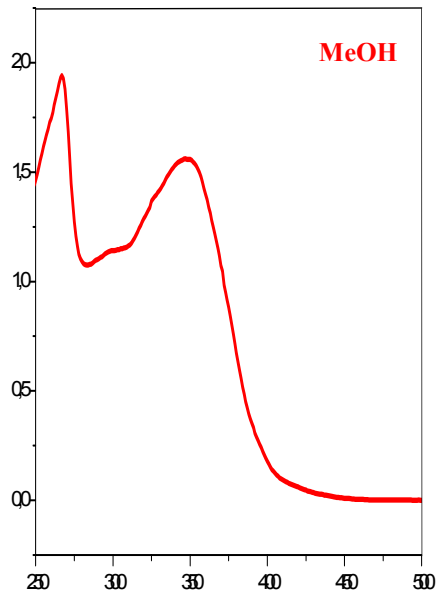
هذا السكر يتكون من ست كربونات، تقنية **HPIC-UV-DAD** أعطت زمن إحتباس

$t_R = 21.4 \text{ min}$ مطابق لزمن إحتباس المركب Kaempférol-3-O- β -D-glucopyranoside و هذا ما يوضحه كروماتوغرام الشكل 4 و بهذا تكون لدينا كل المعطيات لوضع الصيغة المفصلة للمركب

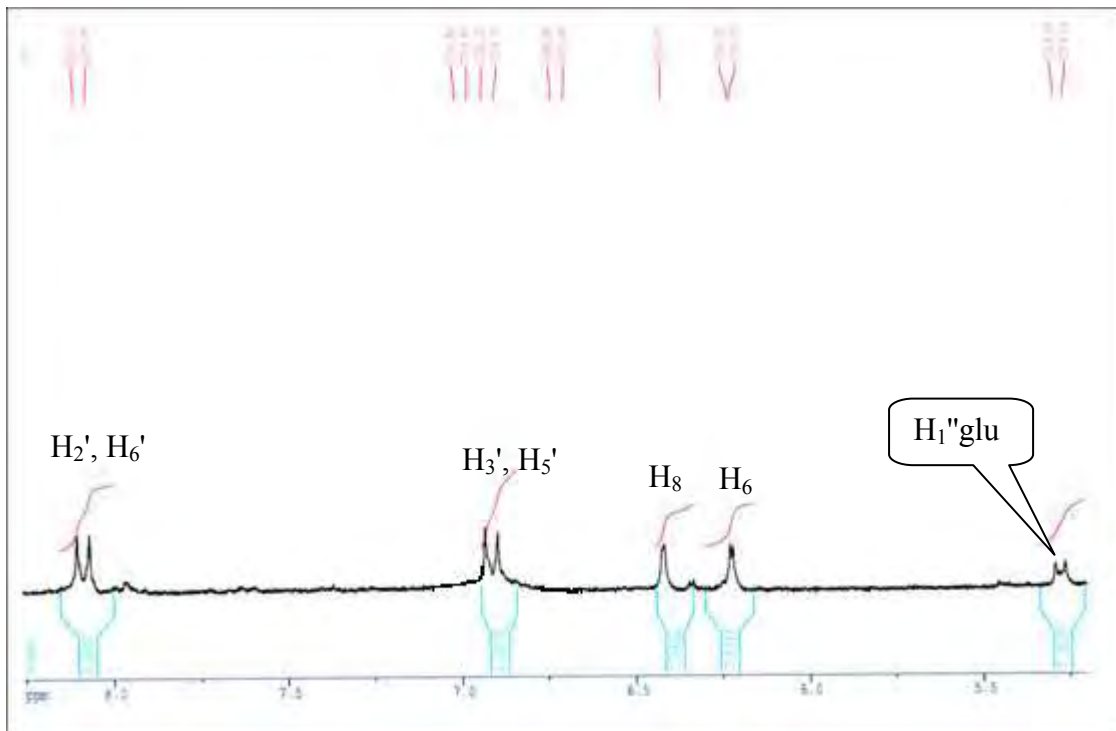
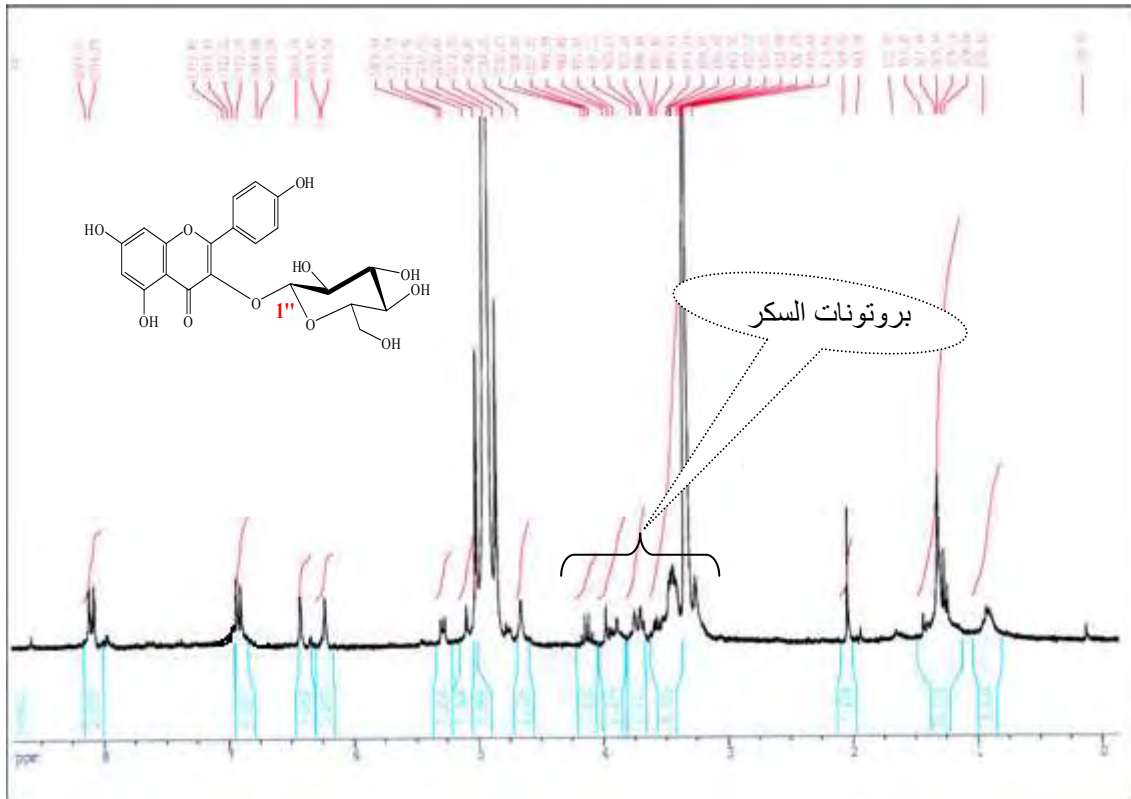
6 و هي كالاتي:



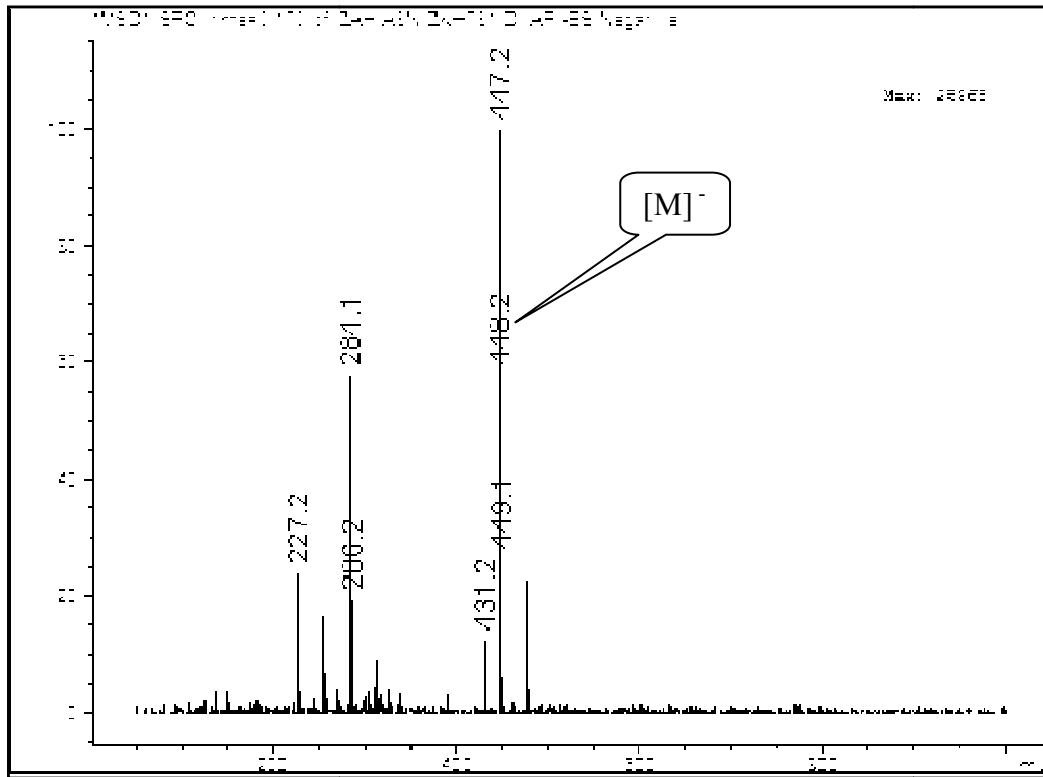
Kaempférol-3-O-β-D-glucopyranoside



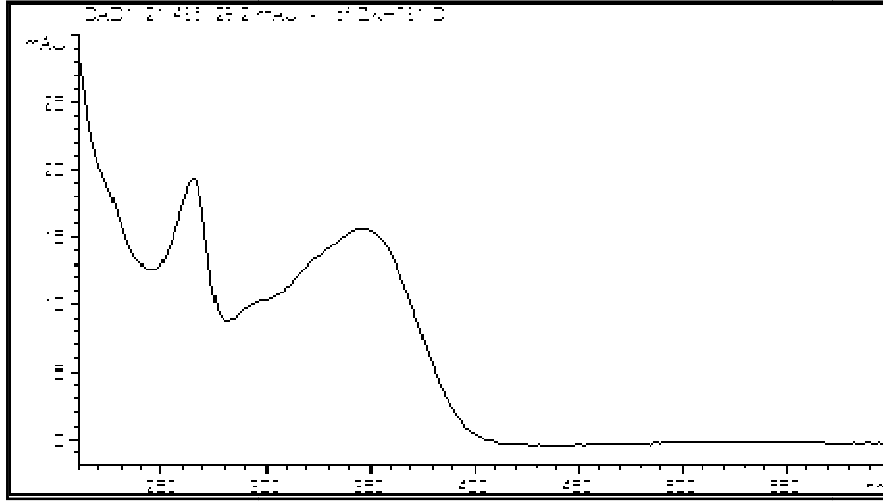
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب 1



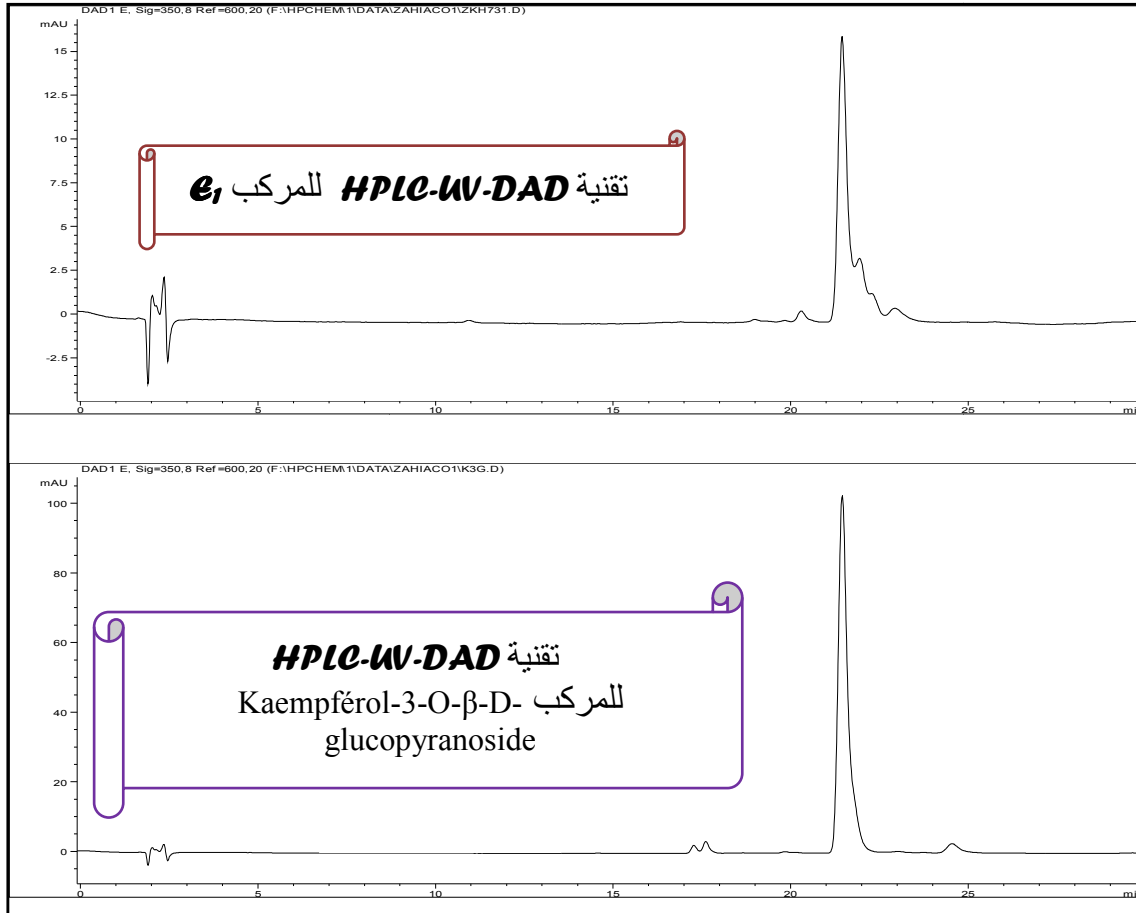
شكل 2 : طيف ^1H RMN للمركب **1** مع التكبيرات اللازمة



شكل 3: طيف الكتلة للمركب *e*, بتقنية *AP1-es*



- المملص: [acetonitrile (A)-H₂O (pH 3.2)-acide formique (0.03%) (B)]
- معدل التدفق: 0.4 ml/mn ، t_R = 21.4 mn
- عملية التمليص تمت باستعمال النسب التالية :
- 0-7 mn, 10%-15% (A), 7-14 mn, 22% (A), 14-22 mn 22% (A), 22-27 mn, 22%-30% (A)
- طيف UV-vis سجل بين 220 و 500 nm
- طيف الكتلة سجل من m/z= 100 إلى m/z=800



شكل 4: تقنية **HPLC-UV-DAD** توضح تطابق كروماتوغرام المركب **1** مع كروماتوغرام المركب

التعيين البنوي للمركب E_2

▪ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

- اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي
- معامل الإحتباس (R_f):

الأنظمة المستعملة لقياس قيم R_f :

جدول 1: قيم R_f للمركب E_2

الجملة	R_f
4/3/3	0.32
13/3/3/1	0.39
10/1/1	0.26

2. الخصائص الطيفية:

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب E_2

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})	عصابات أخرى (نم) (λ_{max})
MeOH	352	267	
NaOH	403	275	325
AlCl ₃	398	274	
AlCl ₃ + HCl	396	275	
NaOAc	376	274	
NaOAc + H ₃ BO ₃	357	269	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 250MHz):

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **E₂**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ _H (ppm)
H-2', H-6'	d (J = 9.0 Hz)	2H	8.09
H-3', H-5'	d (J = 9.0Hz)	2H	6.92
H-8	d (J = 2.1 Hz)	1H	6.44
H-6	d (J = 2.1 Hz)	1H	6.24
H-1"glu	d (J = 7.7 Hz)	1H	5.16
H-1"rha	sl	1H	4.52
CH ₃ rha	d (J = 6.2 Hz)	3H	1.07
بروتونات glu+ rha	—	10H	3.26- 4.00

○ مطيافية الكتلة:

جدول 4: نتائج طيف الكتلة للمركب **E₂**

ES ⁺		ES ⁻	
الشاردة	(m/z)	الشاردة	(m/z)
[M+Na] ⁺	617.6	[M] ⁻	594.5
[M +2H - rha] ⁺	449.2	[M-H] ⁻	593.5
[M +2H - rha - glu] ⁺	287.2	[M - rha - glu] ⁻	285.1

■ الحملة الحمضية:

○ الشفق الأليغوني:

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 5: نتائج مطيافية UV بعد الحملة الحمضية للمركب **E₂**

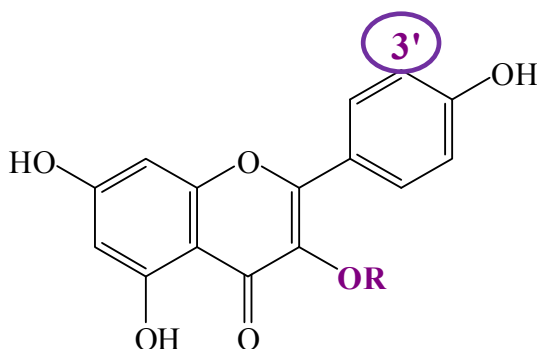
الكاشف	العصابة I (nm)	العصابة II (nm)
MeOH	369	265

○ الشق السكري: glucose + rhamnose

■ قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:

اللون البنفسجي للمركب تحت الأشعة (UV) و نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (شكل 1) تقريبا مطابقان للمركب السابق مما يدل على أن الشق الأغليكوني لهذا المركب هو عبارة عن Kaempferol مستبدل في الموقع 3، أما قيمة R_f في النظام (10/1/1): (AcOEt/ MeOH/ H₂O) تشير إلى أن هذا المركب أكبر قطبية من سابقه.

و على أساس هذه المعطيات يمكن وضع الصيغة الأولية للمركب **2** و التي تتميز بوجود مجموعة مستبدلة في الموقع 3 مع احتمال وجود أو عدم وجود مجموعة مستبدلة أخرى في الموقع 3:



للتأكد مما إذا كانت الحلقة B أحادية أو ثنائية الاستبدال نلجأ إلى طيف RMN^1H (شكل 2) للمركب فهذا الأخير أعطى إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H و بثابتة تزاوج $J = 9.0 \text{ Hz}$ لكل منهما عند 6.92 ppm موافقة للبروتونين H_3' و H_5' و عند 8.09 ppm موافقة للبروتونين H_2' و H_6' مما يدل على أن الحلقة B أحادية الاستبدال أي عدم وجود مجموعة مستبدلة في الموضع 3 أي أن الشق الأغليكوني هذا هو عبارة عن Kaempferol، إشارتا بروتوني الحلقة A وهما H_6 و H_8 ظهرتا على شكل إشارتين ثنائيتين بنفس ثابت التزاوج $J = 2.1 \text{ Hz}$ عند 6.44 ppm و 6.24 ppm على التوالي.

وكما ذكرنا سابقا فإن هذا المركب أكبر قطبية من المركب **1** فعلا هذا ما بينه طيف RMN^1H بإظهاره لإشارتين ثنائيتين عند 5.16 ppm بثابت تزاوج $J = 7.7 \text{ Hz}$ والأخرى عند 4.52 ppm مميزتين لبروتونين أنوميريين لسكرين إحداهما هو عبارة عن سكر rhamnose و يتجلى ذلك من

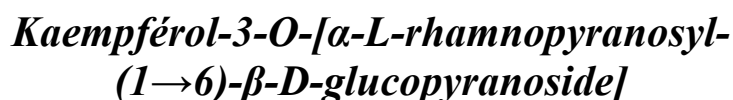
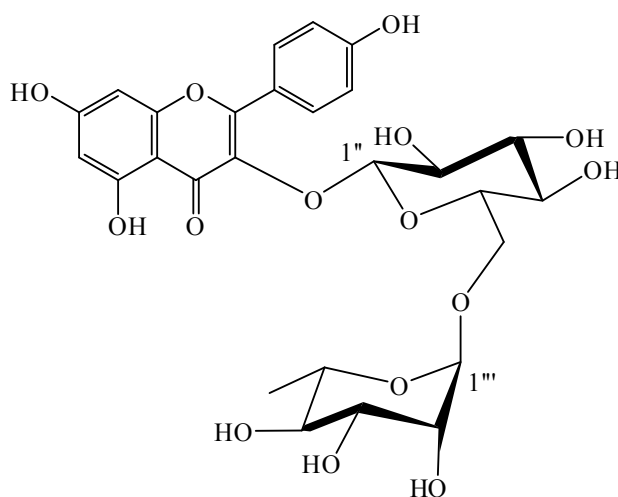
خلال ظهور ميثيله عند 1.07 ppm بثابت تزاوج $J = 6.2 \text{ Hz}$ أما السكر الآخر هو سكر ذو ست كربونات و ذلك حسب نتائج مطيافية الكتلة (شكل 3) التي أعطت قمة جزيئية عند 594.5 ($[M]^-$) موافقة للصيغة المجملة $C_{27}H_{30}O_{15}$ ، طبيعة السكر المجهول حددته الحلمة الحمضية التي حررت إضافة إلى سكر rhamnose سكر آخر و هو سكر glucose.

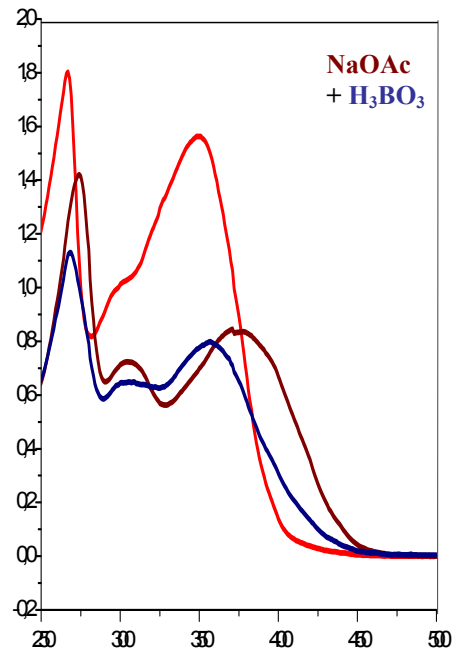
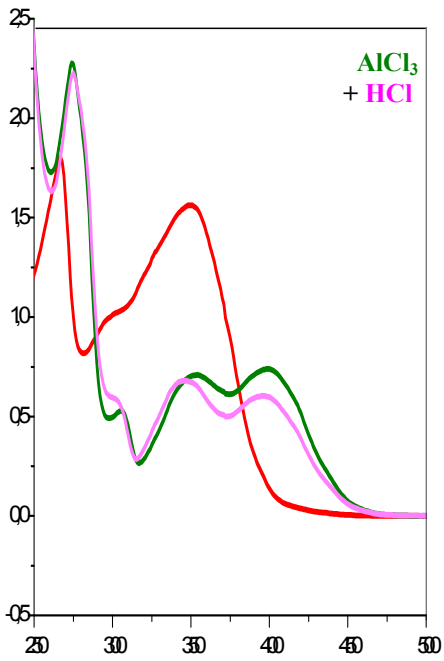
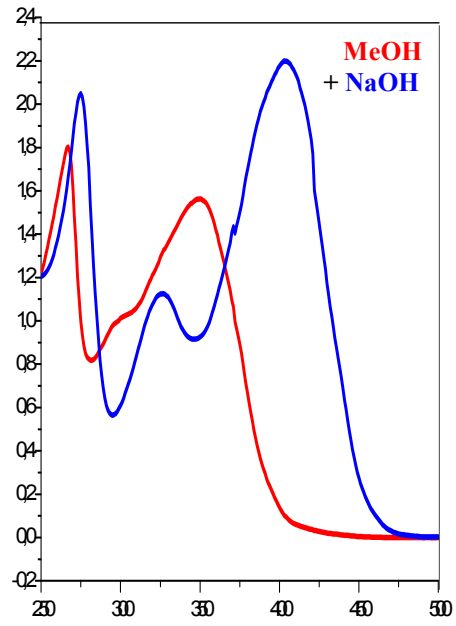
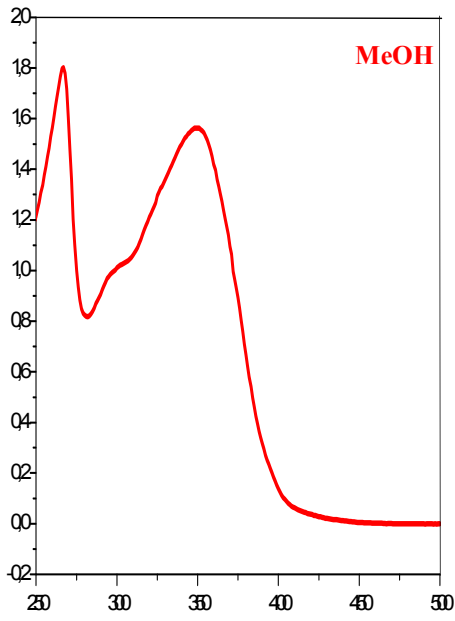
المعطيات الطيفية السابقة بينت موقع مستبدل واحد على هيكل Kaempférol و هو الموقع 3 و وجود سكرين مما يدل على إرتباط هذين الأخيرين ببعضهما و ارتباطهما بالموقع 3 لـ Kaempférol ، ترى ما هو السكر الذي يرتبط مباشرة بالهيكل الفلافونيدي أي السكر الأول و من هو السكر النهائي أي الثاني؟ مطيافية الكتلة التي أعطت إضافة إلى القمة عند 594.5 ($[M]^-$)

قمة أخرى عند 449.2 موافقة لـ $[M + 2H - rha]^+$ مما يدل على أن سكر rhamnose يأتي في الترتيب الثاني بعد سكر glucose حيث أكد هذا تقنية **HPLC-UV-DAD** التي أعطت زمن إحتباس $t_R = 19.8 \text{ min}$ مطابق لزمن إحتباس المركب

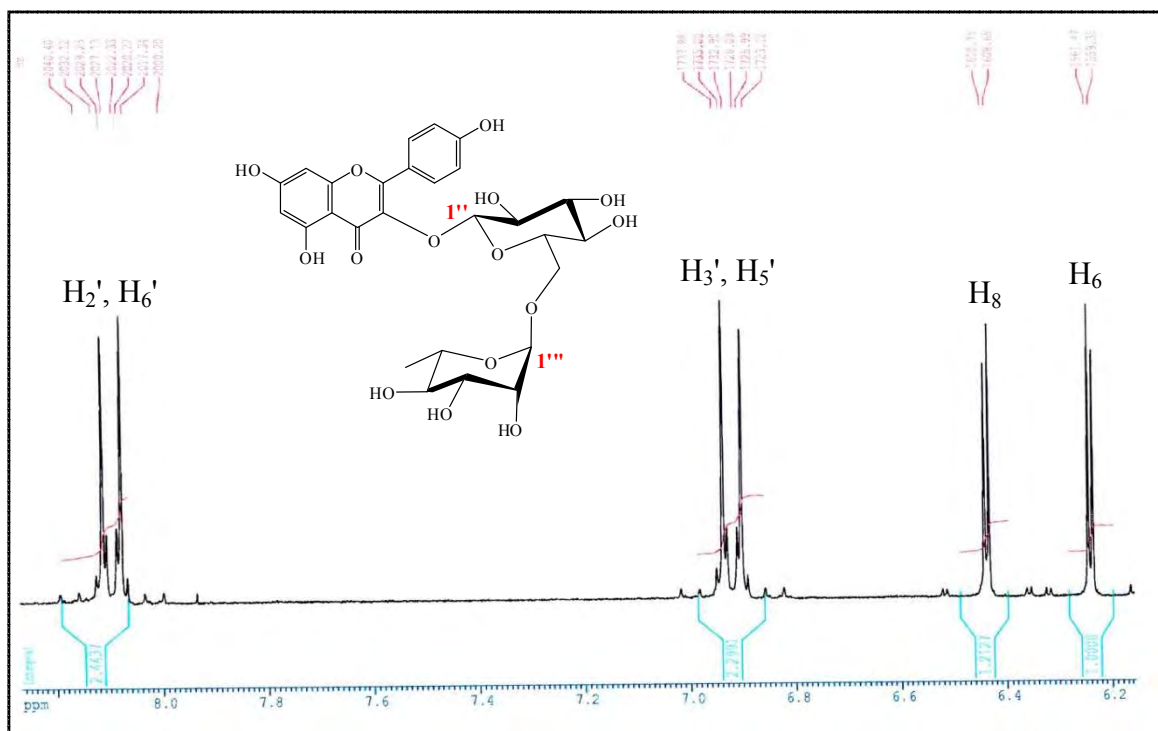
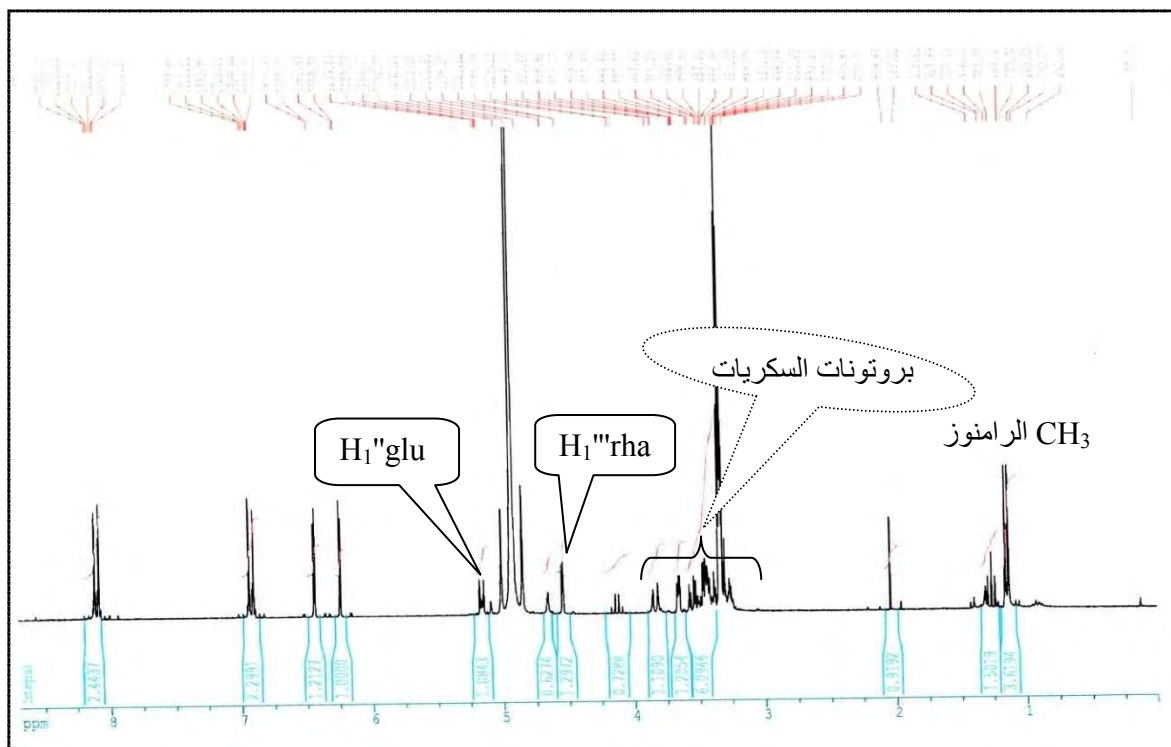


و منه فالصيغة المفصلة للمركب **2** هي كالآتي:

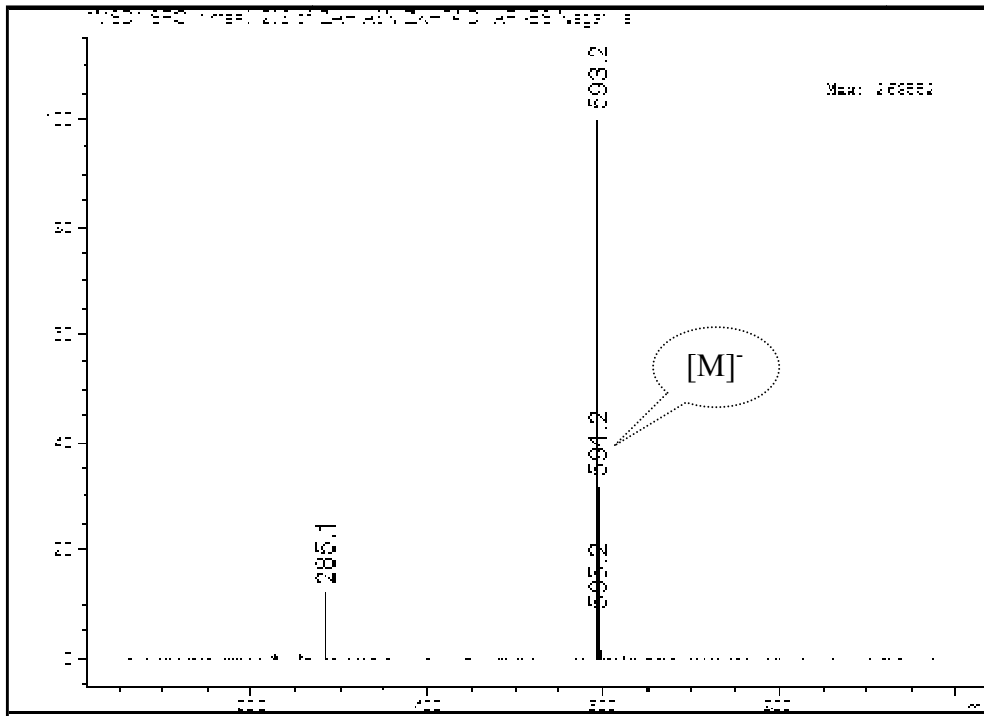




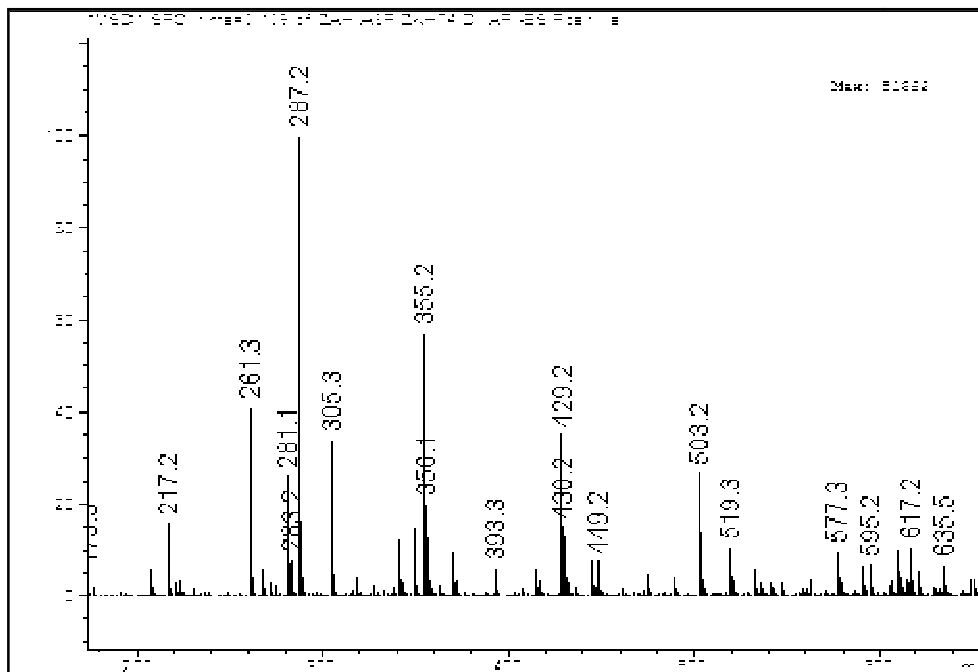
شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب e_2



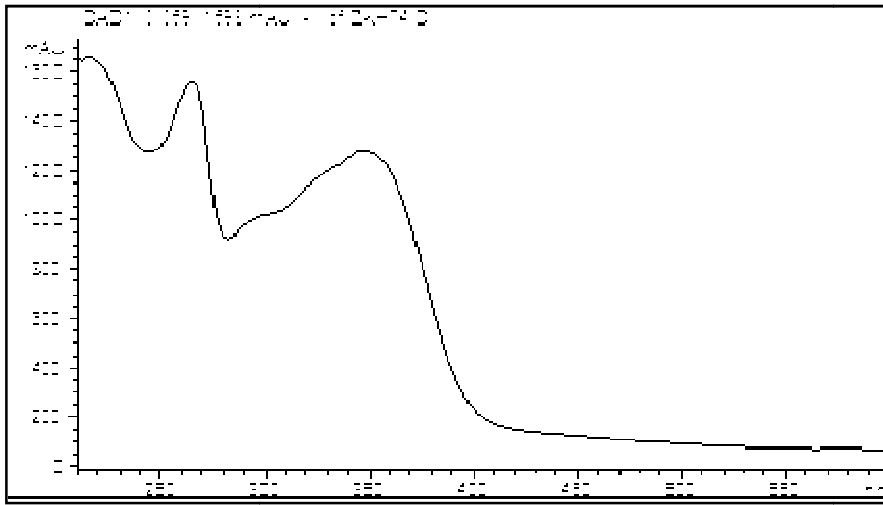
شكل 2: طيف ^1H RMN للمركب \mathbf{e}_2 مع التكبيرات اللازمة



شكل 3: طيف الكتلة للمركب e_2 بتقنية APJ-ES



شكل 4: طيف الكتلة للمركب e_2 بتقنية APJ-ES+



- المملص: [acetonitrile (A)-H₂O (pH 3.2)-acide formique (0.03%) (B)]
- معدل التدفق: 0.4 ml/mn ، t_R = 19.8 mn
- عملية التمليص تمت باستعمال النسب التالية :
- (A) 0-7 mn, 10%-15% (A), 7-14 mn, 22% (A), 14-22 mn 22% (A), 22-27 mn, 22%-30% (A)
- طيف UV-vis سجل بين 220 و 500 nm
- طيف الكتلة سجل من m/z= 100 إلى m/z=800

شكل 5: طيف UV المسجل من خلال تقنية HPLC-UV-DAD

للمركب **e₂**

التعيين البنوي للمركب E_3

▪ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

- اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي
- معامل الإحتباس (R_f):
- الأنظمة المستعملة لقياس قيم R_f :
- جدول 1: قيم R_f للمركب E_3

الجملة	R_f
4/3/3	0.09
13/3/3/1	0.36
10/1/1	0.11

2. الخصائص الطيفية:

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب E_3

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})	عصابات أخرى (نم) (λ_{max})
MeOH	358	257	
NaOH	409	274	325
AlCl ₃	432	274	
AlCl ₃ + HCl	425	275	
NaOAc	388	273	
NaOAc + H ₃ BO ₃	381	264	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 250MHz):

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **E₃**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ _H (ppm)
H-6'	dd ($J = 8.2 \text{ Hz}, J = 2.1 \text{ Hz}$)	1H	7.55
H-2'	d ($J = 2.1 \text{ Hz}$)	1H	7.53
H-5'	d ($J = 8.2 \text{ Hz}$)	1H	6.83
H-8	d ($J = 2.0 \text{ Hz}$)	1H	6.36
H-6	d ($J = 2.0 \text{ Hz}$)	1H	6.17
H-1"glu	d ($J = 7.3 \text{ Hz}$)	1H	5.33
H-1"rha	sl	1H	4.38
CH ₃ rha	d ($J = 6.2 \text{ Hz}$)	3 H	0.99
بروتونات glu+ rha	-	10 H	3.00- 3.90

■ الحلمهة الحمضية:

○ الشق الأليكوني:

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 4: نتائج مطيافية UV بعد الحلمهة الحمضية للمركب **E₃**

العصابة II (nm)	العصابة I (nm)	الكاشف
256	370	MeOH

○ الشق السكري: glucose + rhamnose

▪ قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:

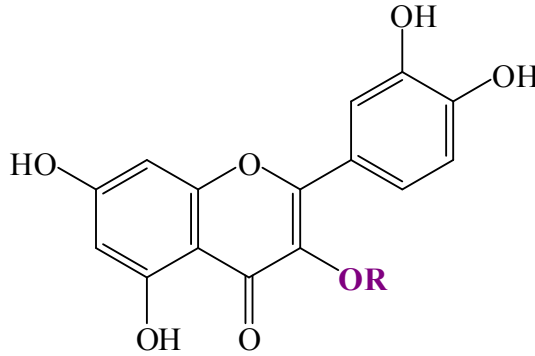
اللون البنفسجي تحت الأشعة UV يقودنا إلى الاعتقاد بأن المركب **3** عبارة إما عن فلافون أو فلافونول مستبدل في الموقع 3 لكن قيمة العصابة I في الميثانول و المقدره بـ 358 nm ترجح كفة أن يكون هذا المركب فلافونول مستبدل في الموقع 3، أما قيم R_f لهذا المركب في الجمل الثلاث فتشير إلى أنه غليكوزيدي.

الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I والمقدرة بـ 51 nm عند إضافة NaOH إلى MeOH تؤكد وجود OH حر في الموقع 4، إنزياح العصابة II بقيمة 16 nm بعد إضافة NaOAc إلى MeOH تشير إلى وجود OH حرفي في الموقع 7.

وجود أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B نتأكد منه بالإزاحة الباثوكرومية للعصابة I المقدره بـ 23 nm عند مقارنة طيف $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ مع طيفه في MeOH ، أما وجود OH حر في الموضع 5 فنستدل عليه بالإزاحة الباثوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ بطيفه في MeOH. (شكل 1)

من خلال هذه المعطيات يمكن لنا وضع الصيغة الأولية للمركب **3** و هي عبارة عن

Quercétine مستبدل في الموقع 3:



طيف RMN^1H (شكل 2) جاء مؤكدا للمعطيات السابقة حيث بين إشارات الحلقة B على شكل:

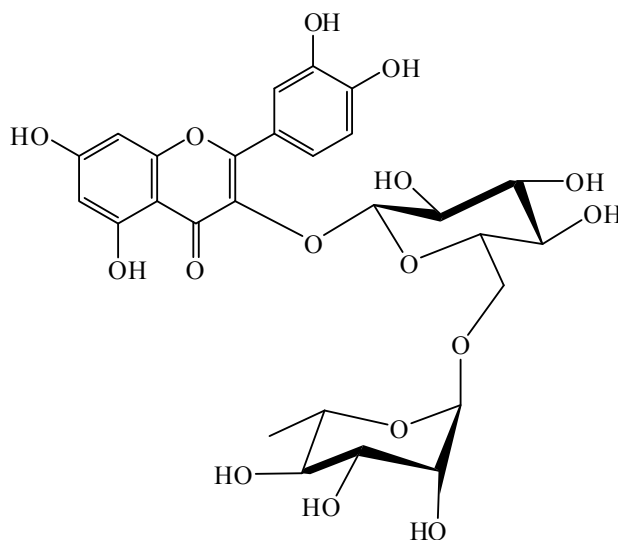
- إشارة ثنائية ثنائية بثابتي تزاوج $J = 8.2 \text{ Hz}$ و $J = 2.1 \text{ Hz}$ عند الإزاحة 7.55 ppm موافقة للبروتون H_6' .

- إشارة البروتون H_2' تداخلت عند 7.53 ppm مع إشارة H_6' .

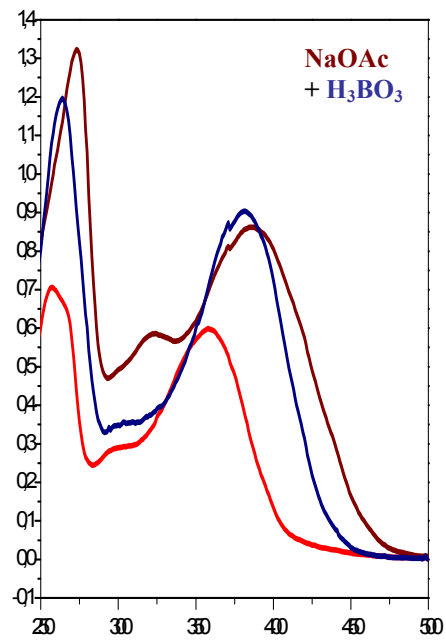
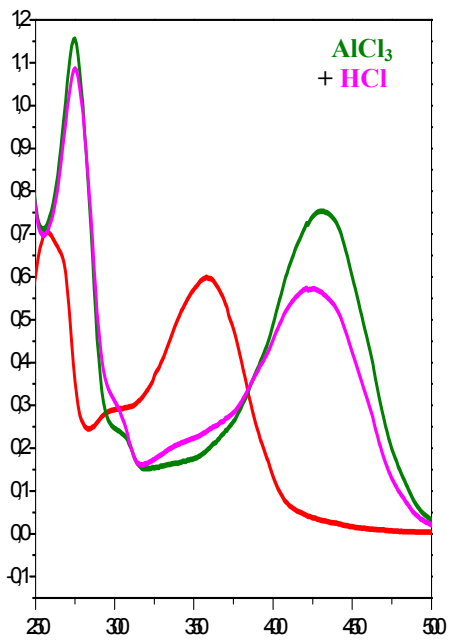
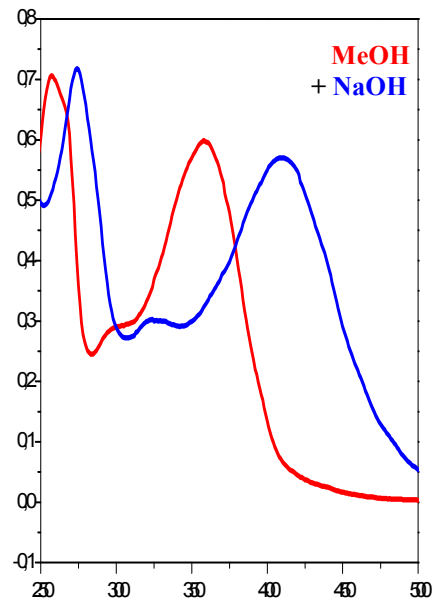
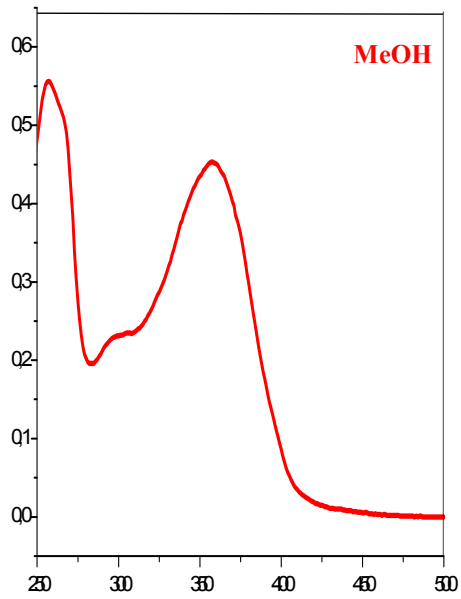
- إشارة البروتون H_5' ظهرت عند 6.83 ppm بثابت تزاوج $J = 8.2 \text{ Hz}$.

بينما إشارتا بروتوني الحلقة A و هما H₆ و H₈ ظهرتا على شكل إشارة ثنائية لكل منهما بثابت تزاوج مماثل $J = 2.0 \text{ Hz}$ عند 6.36 ppm و 6.17 ppm على التوالي. كما بين الطيف إضافة إلى ذلك وجود إشارتين ثنائيتين الأولى بثابت تزاوج $J = 7.3 \text{ Hz}$ عند 5.33 ppm والثانية عند 4.38 ppm مميزات لبروتونين أنوميريين لسكرين، أحد هذين السكرين هو عبارة عن سكر rhamnose و ذلك لظهور ميثيله عند 0.99 ppm بثابت تزاوج $J = 6.2 \text{ Hz}$ ، مطيافية الكتلة (شكل 3) أعطت قمة جزيئية عند 610.2 موافقة للصيغة المجملة C₂₇H₃₀O₁₆ و هي تشير إلى أن السكر الثاني يحتوي على 6 كربونات و فعلا الحلمهة الحمضية حررت كل من سكري glucose و rhamnose و كما أشرنا سابقا فإن المركب **3** عبارة عن Quercétine مستبدل في الموقع 3 مما يدل على أن سكري glucose و rhamnose يرتبطان بهذا الموقع و بالضبط كيفية ارتباط السكرين ببعضهما بينته تقنية **HPLC-UV-DAD** التي أعطت حسب الكروماتوغرام الموضح في (الشكل 4) زمن إحتباس $t_R = 17.5 \text{ min}$ مطابق تمام التطابق لقيمة زمن الإحتباس للمركب Quercétin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside]

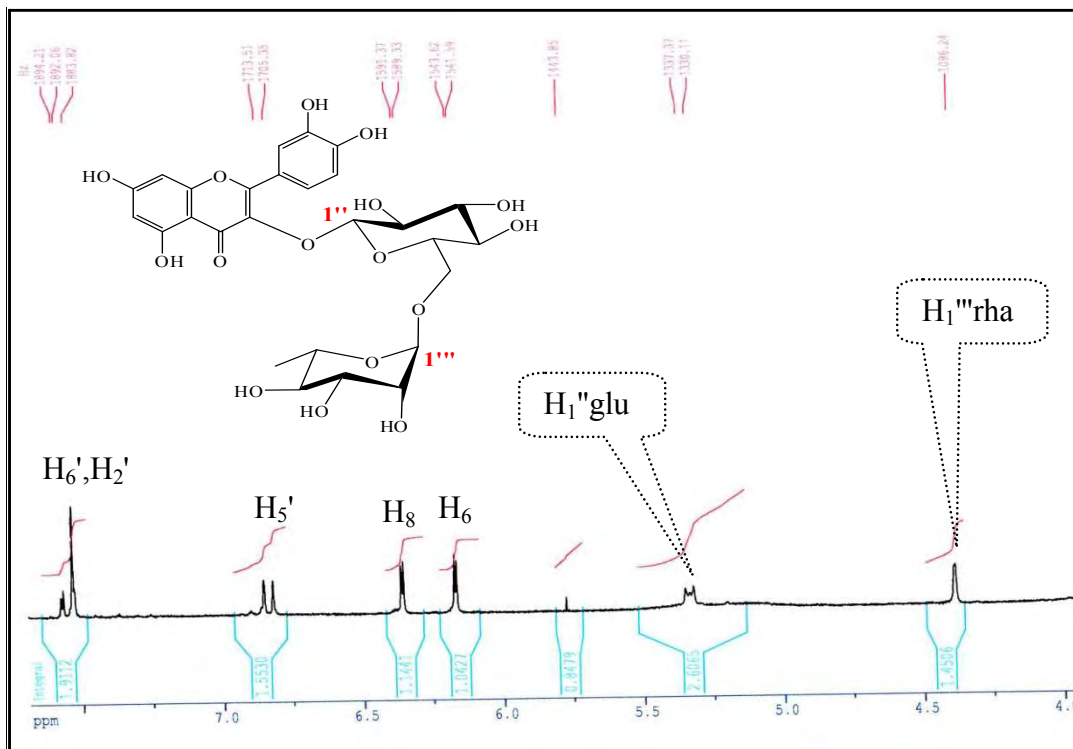
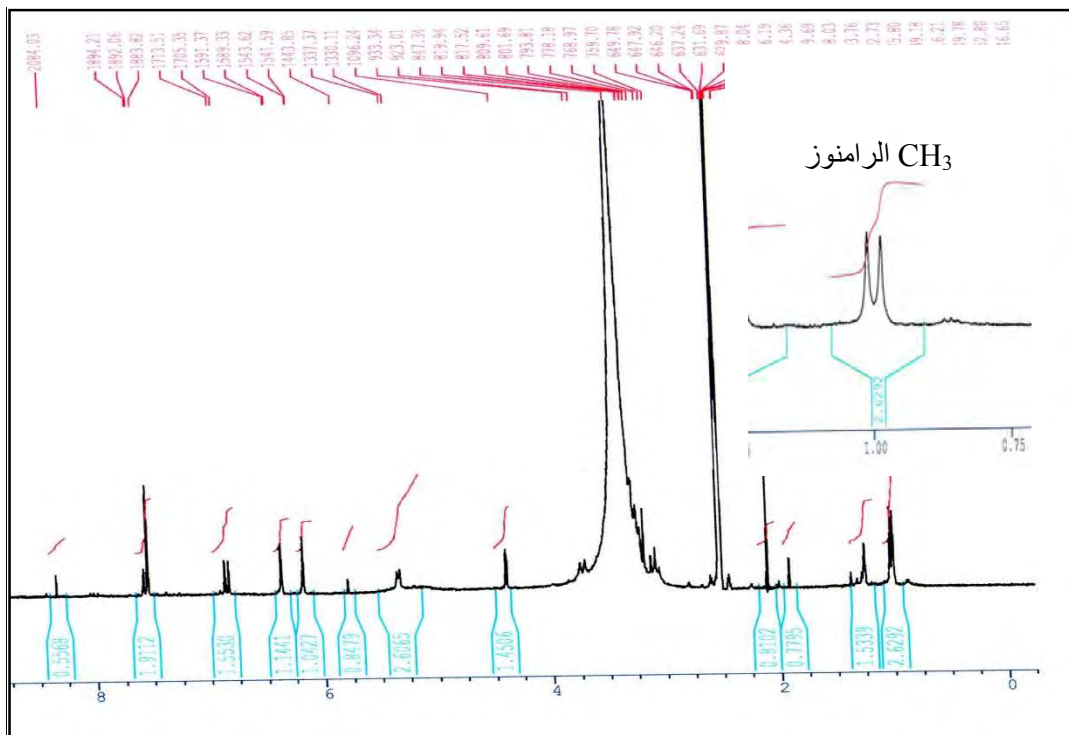
و عليه فإن الصيغة المفصلة للمركب **3** هي:



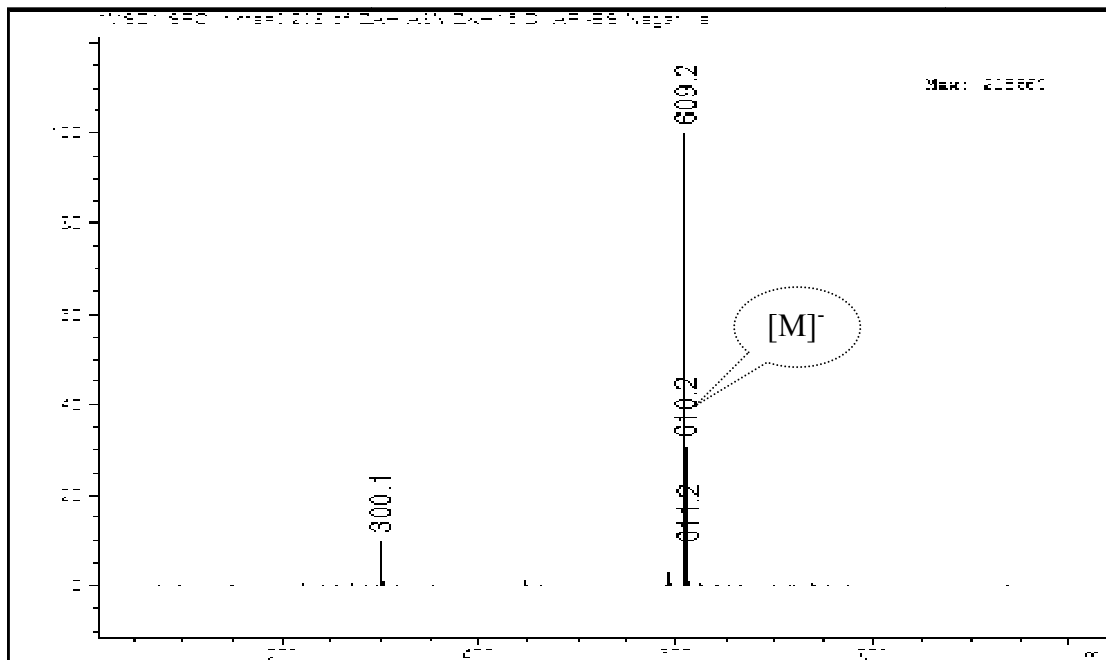
Quercétin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside]



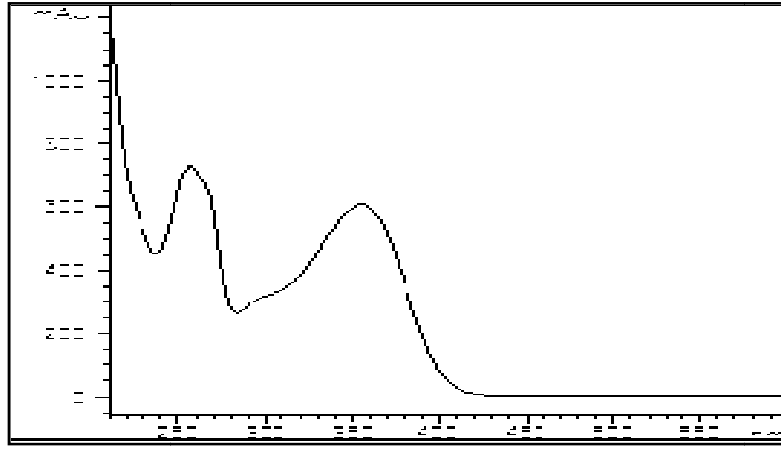
شكل 1 : سلسلة أطياف أشعة UV للمركب e_3



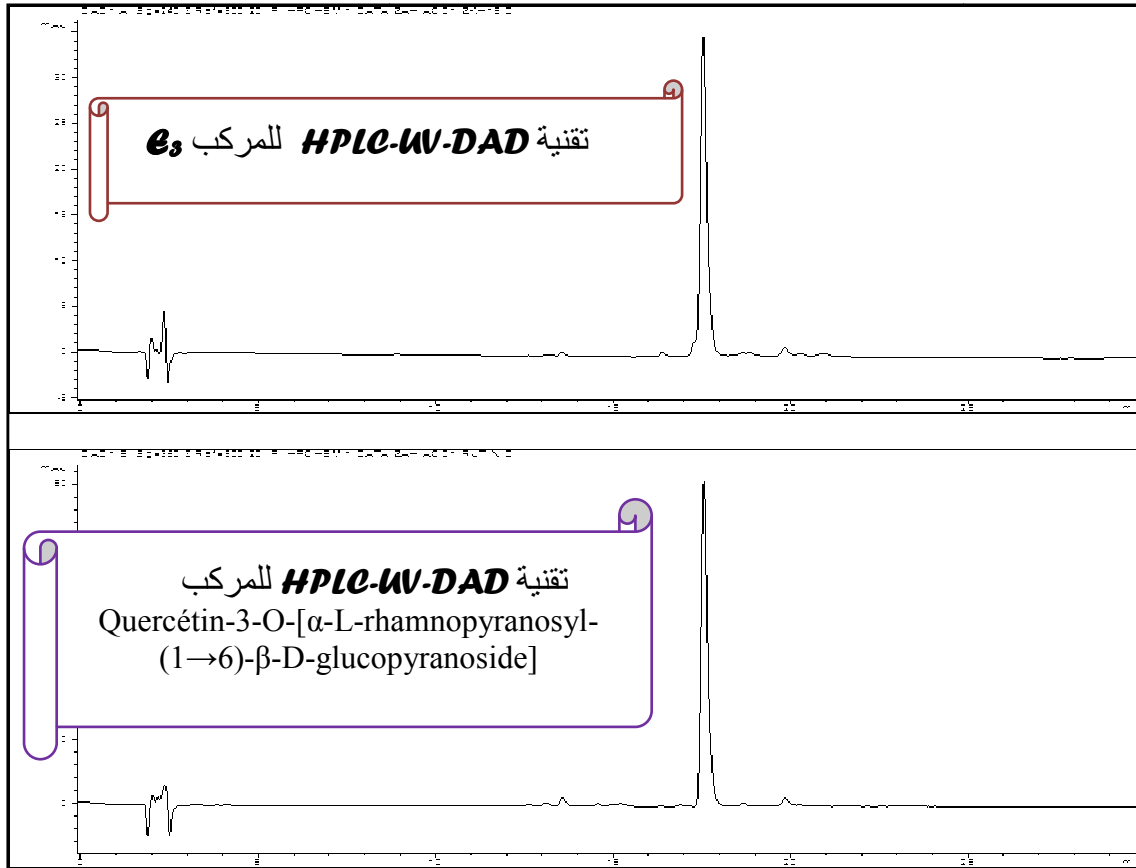
شكل 2 : طيف ^1H RMN للمركب **3** مع التكبيرات اللازمة



شكل 3: طيف الكتلة للمركب e_3 بتقنية *APJ-es*



- المملص: [acetonitrile (A)-H₂O (pH 3.2)-acide formique (0.03%) (B)]
- معدل التدفق: 0.4 ml/mn ، t_R=17.5 mn
- عملية التمليص تمت باستعمال النسب التالية :
0-7 mn, 10%-15% (A), 7-14 mn, 22% (A), 14-22 mn 22% (A), 22-27 mn, 22%-30% (A)
- طيف UV-vis سجل بين 220 و 500 nm
- طيف الكتلة سجل من m/z= 100 إلى m/z=800



شكل 4: تقنية **HPLC-UV-DAD** توضح تطابق كروماتوغرام

المركب **e₃** مع كروماتوغرام المركب

Quercétin-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside]

التعيين البنوي للمركب E_4

■ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

- اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي
- معامل الإحتباس (R_f):
- الأنظمة المستعملة لقياس قيم R_f :

جدول 1: قيم R_f للمركب E_4

الجملة	R_f
4/3/3	0.30
13/3/3/1	0.04
10/1/1	0.73

2. الخصائص الطيفية:

- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب E_4

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})
MeOH	315	267
NaOH	368	274
AlCl ₃	403	274
AlCl ₃ + HCl	403	273
NaOAc	372	274
NaOAc + H ₃ BO ₃	371	272
في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر		

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 400MHz):

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب **4**

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ_H (ppm)
H-2', H-6'	d ($J = 8.9$ Hz)	2H	7.97
H-7'''	d ($J = 15.9$ Hz)	1H	7.39
H-2''', H-6'''	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	7.28
H-3', H-5'	d ($J = 8.9$ Hz)	2H	6.79
H-3''', H-5'''	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	6.77
H-8	d ($J = 1.7$ Hz)	1H	6.27
H-6	d ($J = 1.7$ Hz)	1H	6.11
H-8'''	d ($J = 15.9$ Hz)	1H	6.06
H-1'' glu	d ($J = 7.2$ Hz)	1H	5.24
H-6 _a '' glu	d ($J = 11.5$)	1H	4.32
H-6 _b '' glu	dd ($J = 12.5, 5.6$ Hz)	1H	4.19
بروتونات glu	—	5H	3.20- 4.40

○ مطيافية الكتلة:

جدول 4: نتائج طيف الكتلة للمركب **4**

ES ⁻	
الشاردة	(m/z)
[M] ⁻	594.1
[M-H] ⁻	593.2
[M - coumaroyl-glu] ⁻	285.1

■ قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب **6**:

اللون البنفسجي تحت الأشعة (UV) و قيمة العصابة I في الميثانول 315 nm يدلان على أن المركب **6** عبارة عن فلافون.

عدم وجود إزاحة باثوكرومية عند مقارنة طيف AlCl_3+HCl مع طيفه في AlCl_3 تدل على عدم وجود أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B، الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف AlCl_3+HCl بطيفه في MeOH دليل على وجود 5-OH، أما الإزاحة الباثوكرومية للعصابة II و المقدره بـ 7 nm عند مقارنة طيف NaOAc بطيفه في MeOH تشير إلى وجود OH حر في الموقع 7. (شكل 1)

مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (شكل 2) أعطت إشارتا بروتوني الحلقة A و هما H_8 و H_6 على شكل إشارتين ثنائيتين بنفس ثابتة التزاوج $J = 1.7 \text{ Hz}$ عند 6.27 ppm و 6.11 ppm على التوالي.

أما غياب أرثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B فيتجلى من خلال ظهور إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H لكل منهما و بنفس ثابت التزاوج $J = 8.9 \text{ Hz}$ الأولى عند 6.79 ppm موافقة للبروتونين H_3' و H_5' و الثانية عند 7.97 ppm موافقة للبروتونين H_2' و H_6' ، هاتين الإشارتين الأخيرتين تدلان على أن الحلقة B أحادية الاستبدال بمجموعة OH في الموقع 4' كما أشارت إليه مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) سابقا، أما بالنسبة للموضع 3 فمن خلال نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية التي أعطت قيمة للعصابة I في MeOH عند 315 nm تدل على أن المركب **6** عبارة عن فلافون أي وجود H في هذا الموقع فمن المفروض نلاحظ ظهور إشارة أحادية في مطيافية ^1H RMN لكن هذه الأخيرة لم تظهر أي إشارة من هذا النوع ربما يعود هذا إلى ظهور مستبدلات غير اعتيادية أثرت على مجال امتصاص العصابة I، فاللون البنفسجي تحت الأشعة UV ينفي احتمال أن تكون مجموعة OH في الموضع 3 ليبقى الاحتمال الوحيد وهو وجود مستبدل في هذا الأخير أي أن الجزء الأغليكوني عبارة عن Kaempférol، فمطيافية ^1H RMN أعطت عدة إشارات أخرى زيادة على التي ذكرت سابقا:

- فبدءا بالإشارة التي ظهرت عند 5.24 ppm بثابت تزاوج $J = 7.2 \text{ Hz}$ فهي مميزة لبروتون أنوميري لسكر نجهل لحد الآن طبيعته.
- ما لفت انتباهنا أيضا ظهور إشارتين ثنائيتين بثابت تزاوج $J = 15.9 \text{ Hz}$ و بتكامل 1H لكل

منهما عند 7.39 ppm و عند 6.06 ppm تشيران إلى موضع (*trans*) لهذه الرابطة، أيضا ظهور إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H لكل منهما و بنفس ثابت التزاوج $J = 8.6 \text{ Hz}$ الأولى عند 7.28 ppm و الثانية عند 6.77 ppm فحسب الدراسة البيبليوغرافية فهذه الإشارات الأربع مميزة لمجموعة coumaroyl.

مطيافية الكتلة (شكل 6) أعطت قمة جزيئية عند 594.1 ($[M]^-$) موافقة للصيغة المجملة $C_{30}H_{26}O_{13}$ و كما ذكرنا سابقا فإن هذا المركب عبارة عن Kaempférol مستبدل في الموقع 3، مطيافية 1H RMN أعطتنا فكرة عن طبيعة هذا المستبدل فهو عبارة عن سكر إضافة إلى وجود مجموعة coumaroyl، و لمعرفة عدد كربونات هذا السكر نلجأ إلى مطيافية الكتلة التي بينت وجود 30 كربون فإذا أنقصنا عدد ذرات هيكل Kaempférol و coumaroyl يبقى لدينا 6 ذرات كربون و هي خاصة بالسكر مع ثابت التزاوج $J = 7.2 \text{ Hz}$ لبروتونه الأنوميري فهاتين المعلوماتين مميزتين إما لسكر glucose أو galactose فالمعلومات التي بحوزتنا إلى حد الآن لا تميز طبيعة السكر بدقة.

كما أن مطيافية الكتلة أعطت قمة أخرى عند 285.1 موافقة لـ $[M - \text{coumaroyl-glu}]^-$ أو $[M - \text{coumaroyl-gala}]^-$ فهذه القمة تؤكد وجود مجموعة coumaroyl.

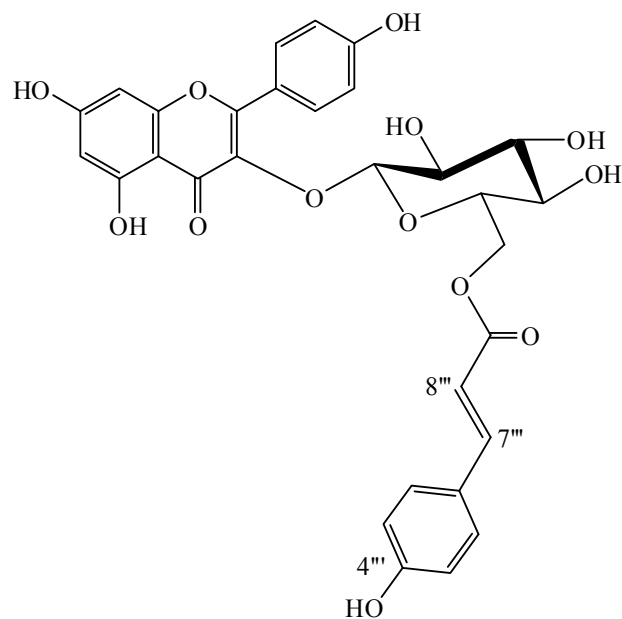
نلجأ إلى مطيافية 1H RMN (شكل 2) لمعرفة كيفية ارتباط كل من مجموعة coumaroyl والسكر بهيكل Kaempférol فإذا ما نظرنا إلى مجال ظهور بروتونات السكر و قارناها بمجال ظهور بروتونات سكر المركب Kaempférol-3-O- β -D-glucopyranoside [1]

([1] : "Om"ur, D., Filiz, G., Z"uhal, G"., Karster, S., A, Z. (2006). Iridoids, Flavonoids and Monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *Verum*, Turk J Chem., 30, 525.

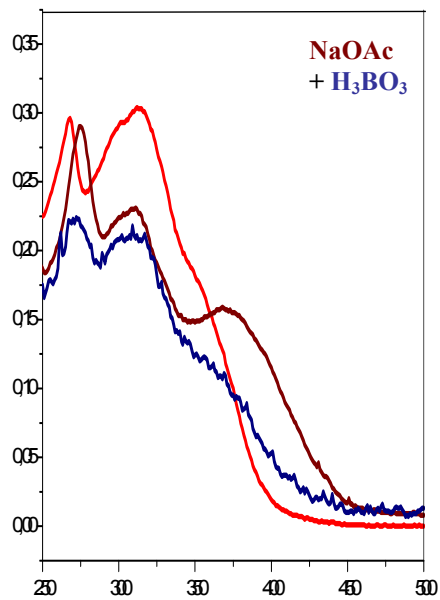
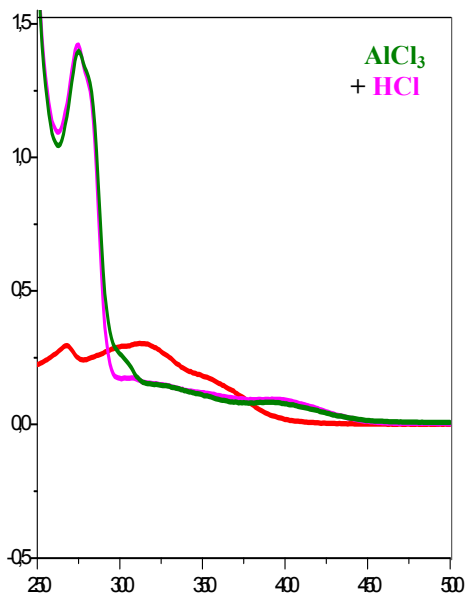
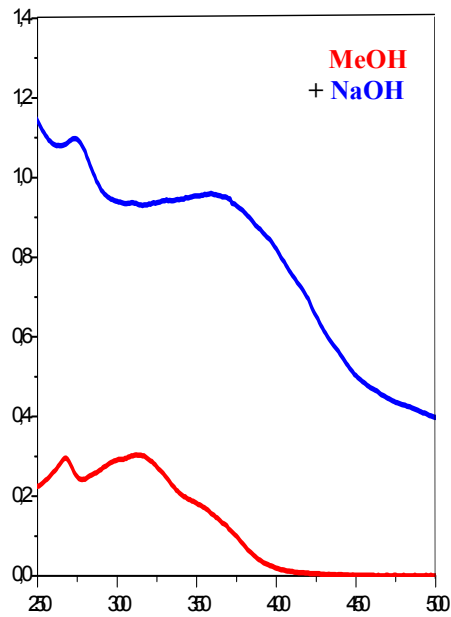
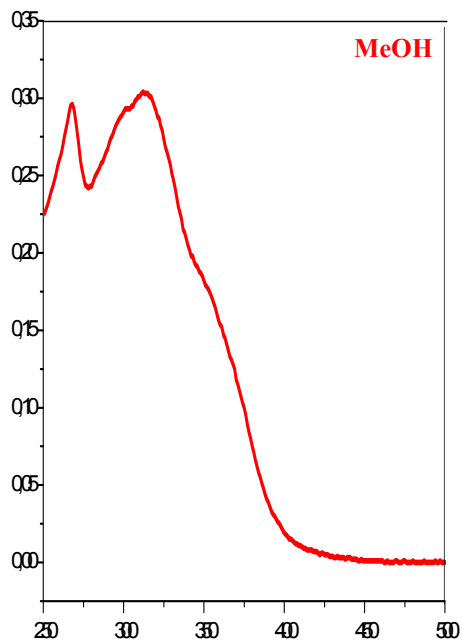
نجد إنزياح إشارتي البروتونين H-6"a (4.32 ppm) و H-6"b (4.19 ppm) في طيف المركب **3** إلى مجال أخفض مقارنة بطيف المركب سابقه [1] و التي ظهرت عند H-6"a (3.68 ppm) و H-6"b (3.52 ppm) مما يدل على أن مجموعة coumaroyl ترتبط بالموقع 6 للسكر و منه فإن السكر هو الذي يرتبط مباشرة بالموقع 3 لهيكل Kaempférol، ما أكد لنا طبيعة السكر هو تقنية

HPLC-UV-DAD التي أعطت زمن إحتباس $t_R = 34.0 \text{ min}$ مطابق لزمن إحتباس المركب Kaempférol-3-O-[6"-O-E-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside]

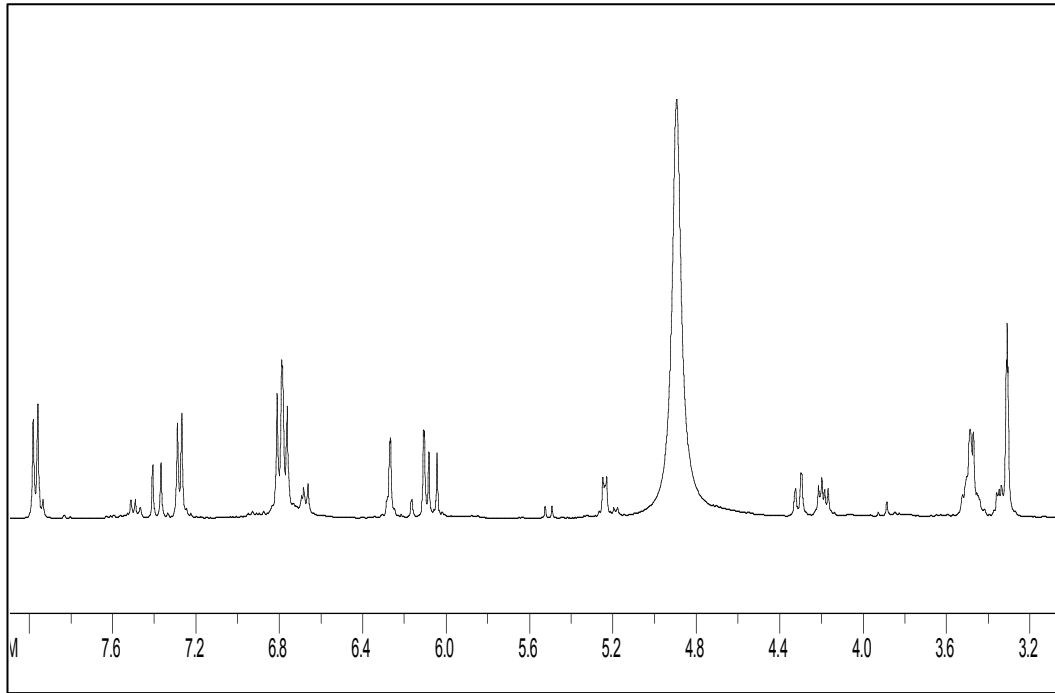
إذا فالصيغة المفصلة للمركب **3** هي:



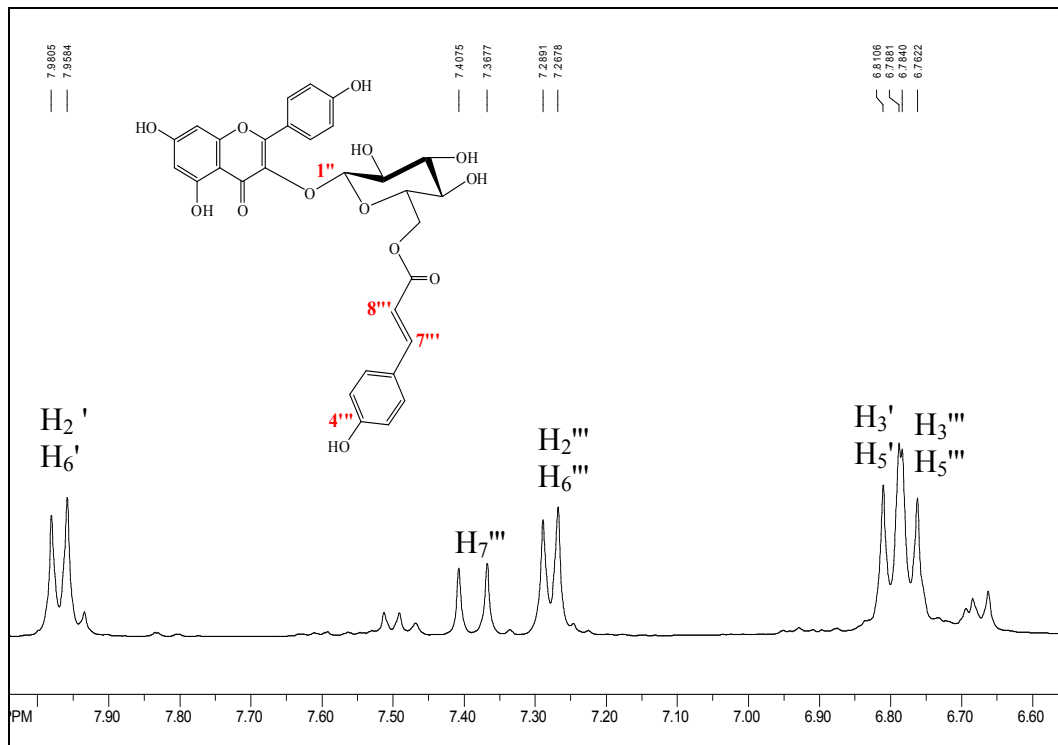
Kaempférol-3-O- [(6''-O-E-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]



شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب e_4



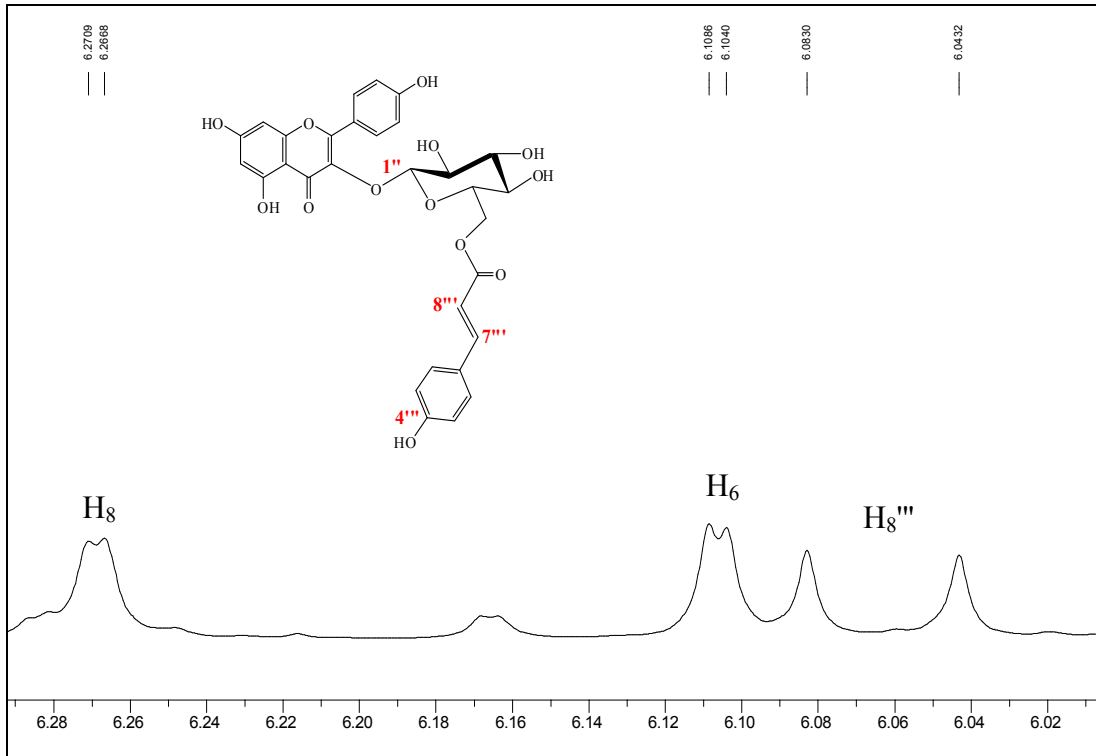
شكل 2: طيف ^1H RMN للمركب $4e$



شكل 3 : طيف ^1H RMN للمركب $4e$

تكبير للمجال

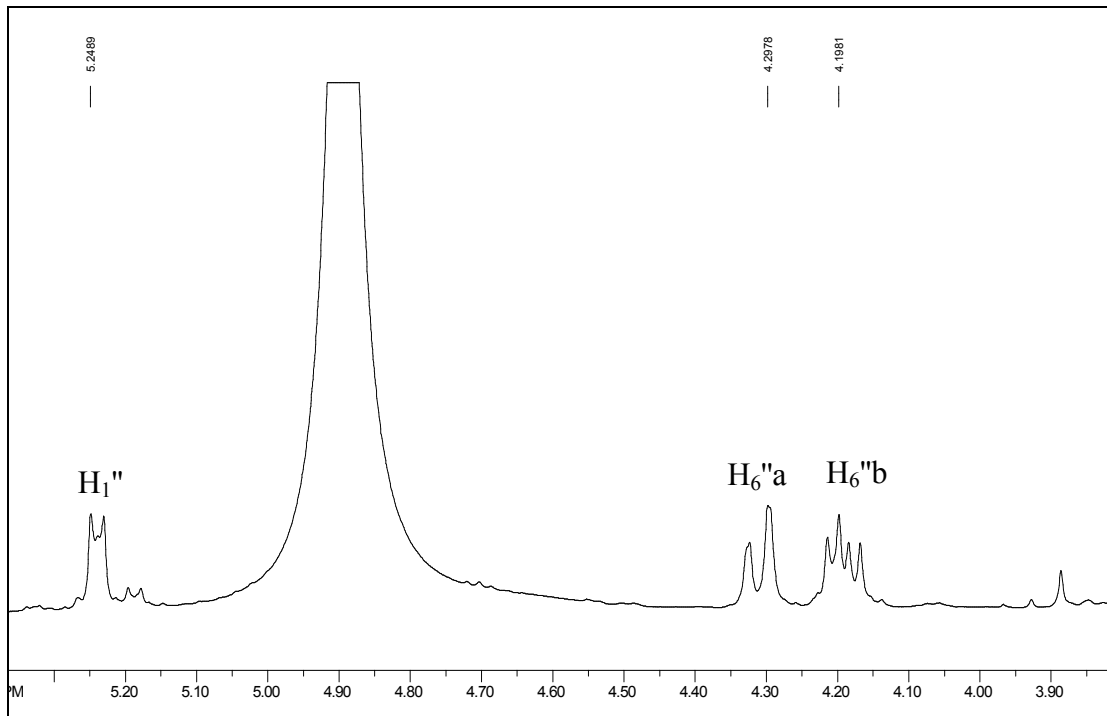
من 6.60 ppm إلى 8.00 ppm



شكل 4 : طيف ^1H RMN للمركب **4**

تكبير للمجال

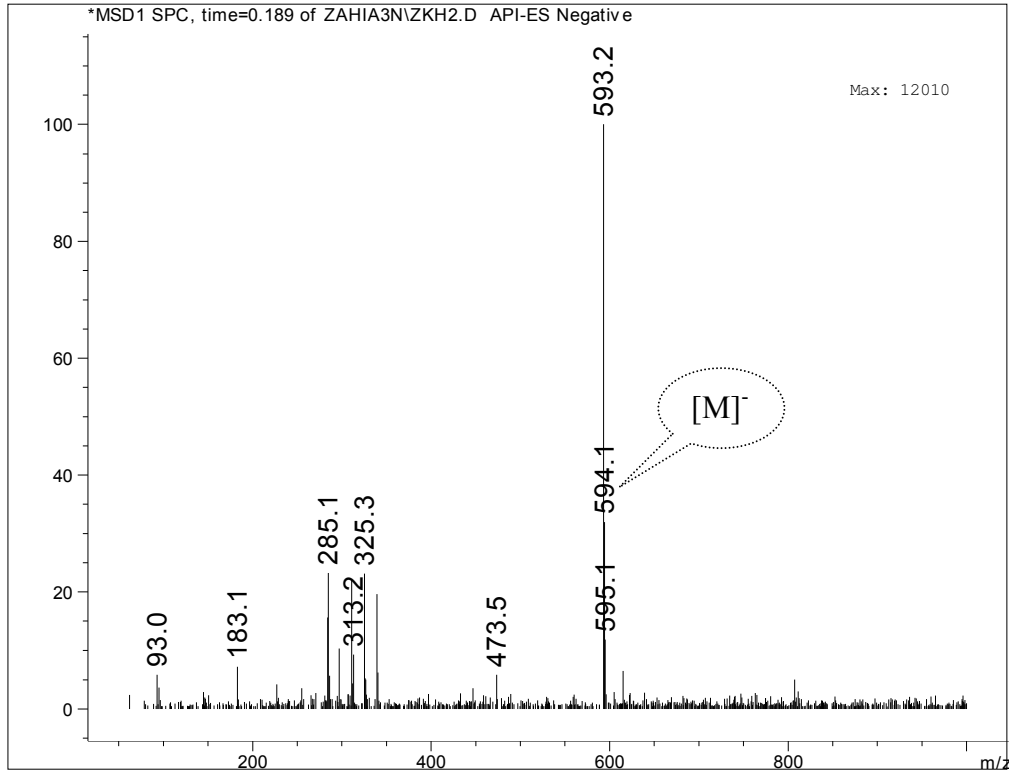
من 6.02 ppm إلى 6.29 ppm



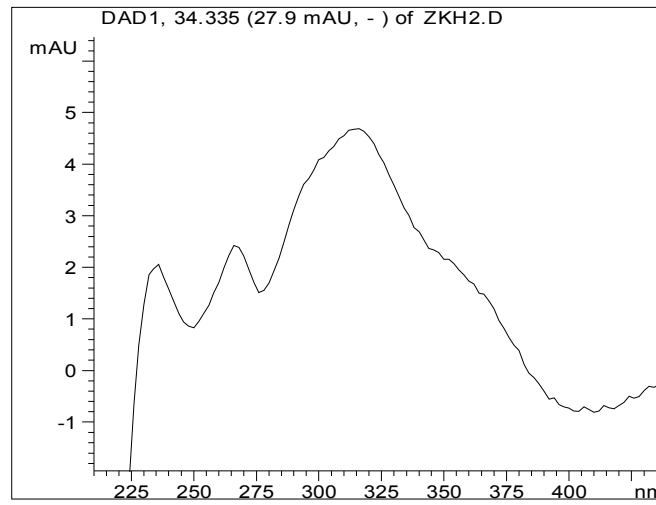
شكل 5 : طيف ^1H RMN للمركب **4**

تكبير للمجال

من 3.90 ppm إلى 5.30 ppm



شكل 6: طيف الكتلة للمركب e_4 بتقنية **API-ES**



- المملص: [acetonitrile (A)-H₂O (pH 3.2)-acide formique (0.03%) (B)]
- معدل التدفق: 0.4 ml/mn ، $t_R = 34.0$ mn
- عملية التمليص تمت باستعمال النسب التالية :
- 0-7 mn, 10%-15% (A), 7-14 mn, 22% (A), 14-22 mn 22% (A), 22-27 mn, 22%-30% (A)
- طيف UV-vis سجل بين 220 و 500 nm
- طيف الكتلة سجل من $m/z=100$ إلى $m/z=800$

شكل 7: طيف UV المسجل من خلال تقنية **HPLC-UV-DAD**

للمركب e_4

التعيين البنوي للمركب E_5

▪ الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:

○ اللون الاستشعاعي للمركب: بنفسجي

○ معامل الإحتباس (R_f):

الأنظمة المستعملة لقياس قيم R_f :

جدول 1: قيم R_f للمركب E_5

الجملة	R_f
4/3/3	0.35
13/3/3/1	0.02
10/1/1	0.89

2. الخصائص الطيفية:

○ مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول 2: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب E_5

الكواشف	العصابة I (نم) (λ_{max})	العصابة II (نم) (λ_{max})	عصابات أخرى (نم) (λ_{max})
MeOH	314	269	
NaOH	365	276	321
AlCl ₃	399	276	
AlCl ₃ + HCl	399	277	
NaOAc	374	275	
NaOAc + H ₃ BO ₃	372	275	

في NaOH و بعد 5 دقائق : الطيف مستقر

○ مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN ¹H, CD₃OD, 400MHz) :

جدول 3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب 5e

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج	التكامل	δ _H (ppm)
H-2', H-6'	d ($J = 8.9$ Hz)	2H	7.95
H-7''''	d ($J = 15.9$ Hz)	1H	7.72
H-2''''', H-6'''''	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	7.48
H-7'''	d ($J = 15.9$ Hz)	2H	7.40
H-2''', H-6'''	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	7.30
H-3', H-5'	d ($J = 8.9$ Hz)	2H	6.86
H-3''', H-5'''	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	6.81
H-3''''', H-5'''''	d ($J = 8.6$ Hz)	2H	6.80
H-8''''	d ($J = 15.9$ Hz)	1H	6.80
H-8'''	d ($J = 15.9$ Hz)	1H	6.45
H-8	d ($J = 2.0$ Hz)	1H	6.25
H-6	d ($J = 2.0$ Hz)	1H	6.05
H-1" glu	d ($J = 8.2$ Hz)	1H	5.65
H-2" glu	t ($J = 8.2$ Hz)	1H	5.09
H-6a" glu	dd ($J = 11.9$ Hz, $J = 1.9$ Hz)	1H	4.37
H-6b" glu	dd ($J = 11.9$ Hz, $J = 6.6$ Hz)	1H	4.22
H-3" glu	td ($J = 10.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz)	1H	3.71
H-4" glu	t ($J = 9.5$ Hz)	1H	3.44
H-5" glu	dd ($J = 14.1$ Hz, $J = 7.0$ Hz)	1H	3.61

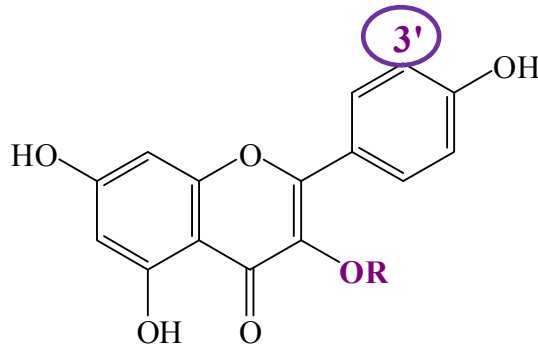
○ مطيافية الكتلة:

جدول 4: نتائج طيف الكتلة للمركب **e₅**

ES ⁻	
الشاردة	(m/z)
[M] ⁻	740.2
[M-H] ⁻	739.2
[M - coumaroyl] ⁻	593.2
[M - coumaroyl-coumaroyl-glu] ⁻	285.1

■ **قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:**

يتشابه هذا المركب مع المركب **e₄** في لونه تحت الأشعة UV و سلسلته الطيفية للأشعة فوق البنفسجية إلى حد كبير. (شكل 1)
 هذه النتائج تمكننا من وضع الصيغة الأولية التالية وهي وجود مستبدل في الموقع 3 مع احتمال وجود أو عدم وجود مجموعة أخرى في الموقع 3':



هذا من جهة و لكن من جهة أخرى نلاحظ أن هذا المركب يختلف عن المركب **e₄** في قيم R_f فإذا ما نظرنا إلى قيمة R_f في النظام (13/3/3/1) بالنسبة للمركبين **e₄** و **e₅** نلاحظ انخفاض قطبية

e₅ مقارنة بـ **e₄** و هذا يشير إلى احتوائه ربما على مجموعة coumaroyl أخرى، و هذا ما توضحه فعلا مطيافية ¹H RMN (شكل 2) حيث أعطت إضافة إلى إشارات الجزء الأغليكوني Kaempférol أربع إشارات أخرى ثنائية بثابت تزواج $J = 15.9 \text{ Hz}$ و بتكامل 1H لكل واحدة خاصة ببروتونات رابطتين ثنائيتين ذات وضع (*trans*)، و أربع إشارات أخرى بتكامل 2H لكل واحدة و بنفس ثابت التزاوج $J = 8.6 \text{ Hz}$ تؤكد فعلا وجود مجموعتي coumaroyl، و زيادة على هذا لاحظنا وجود إشارة بروتون أنوميري لسكر ذو ثابت تزواج $J = 7.2 \text{ Hz}$ عند 5.65 ppm فحسب نتائج مطيافية الكتلة (شكل 9) التي أعطت قمة جزيئية عند 740.2 ([M]⁻) موافقة للصيغة المجملة C₃₉H₃₂O₁₅ فإن هذا السكر يحتوي على 6 كربونات و من خلال ثابت التزاوج يمكن أن يكون عبارة عن glucose أو galactose و لكن حسب إشارة البروتون H₄" و التي تظهر على شكل ثلاثية بثابت تزواج $J = 9.5 \text{ Hz}$ فهو عبارة عن سكر glucose، إذا ما نظرنا إلى إنزياح إشارات كل من بروتونات السكر التالية (H_{6a}" (4.37 ppm)، H_{6b}" (4.22 ppm) و H₂" (5.09 ppm) نجد و أنها انزاحت إلى مجالات أخفض إذا ما قارناها بنفس البروتونات للمركب Kaempférol-3-O-β-D-glucopyranoside [1] و التي تظهر عند (H_{6a}" (3.68 ppm، H_{6b}" (3.52 ppm) و H₂" (3.19 ppm).

([1] : "Om"ur, D., Filiz, G., Z"uhal, G"., Karster,S., A,Z. (2006). Iridoids, Flavonoids and Monoterpene glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*, Turk J Chem., 30,525.

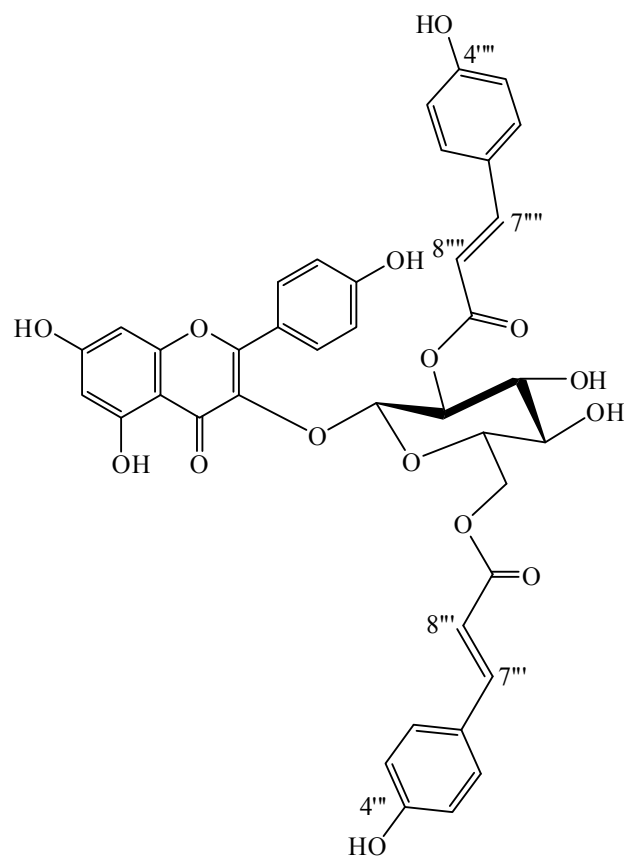
مما يدل على أن مجموعتي coumaroyl إحداهما ترتبط بالموقع 6 لسكر glucose والأخرى ترتبط بالموقع 2 لنفس السكر و ذلك ما أكدته تقنية **HPLC-UV-DAD** حيث أعطت زمن إحتباس

$t_R = 36.8 \text{ min}$ مطابق لنفس زمن إحتباس المركب

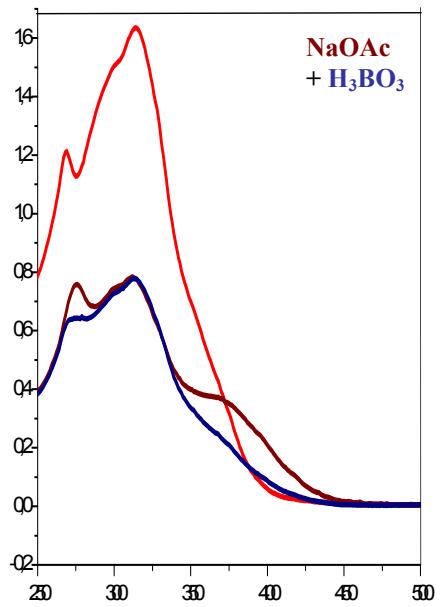
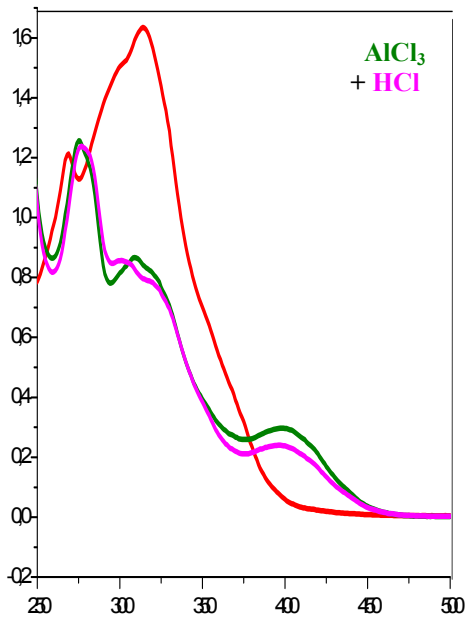
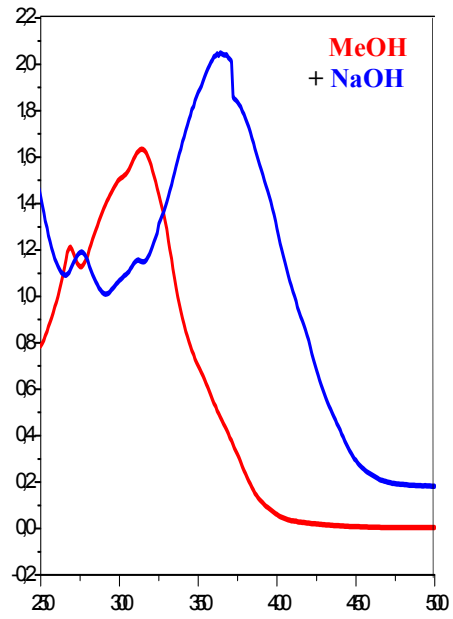
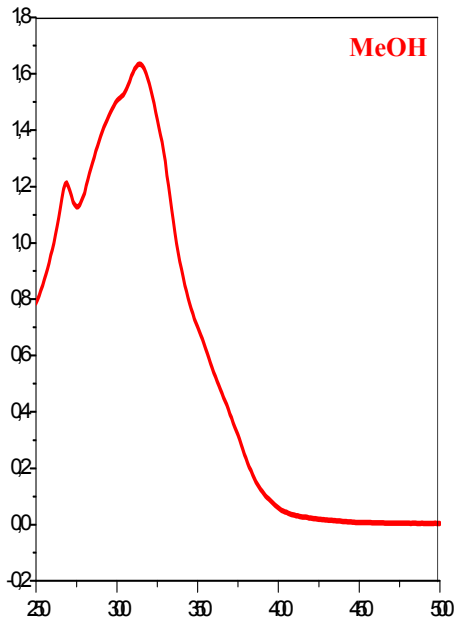
Kaempférol-3-O-[(2",6"-di-O-E-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]

ومنه فالصيغة المفصلة للمركب **e₅** هي كالآتي:

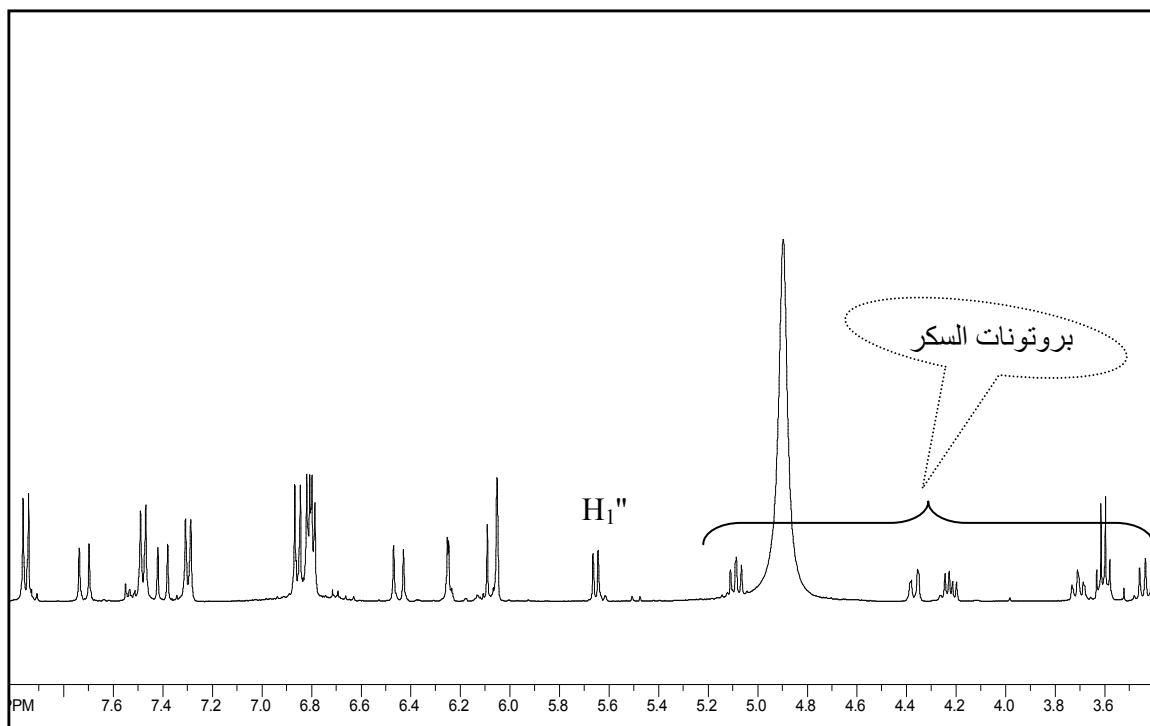
ملاحظة: لقد تم إرفاق كل إشارة ببروتونها من خلال طيف تجارب **cosy** (شكل 8) للمركب.



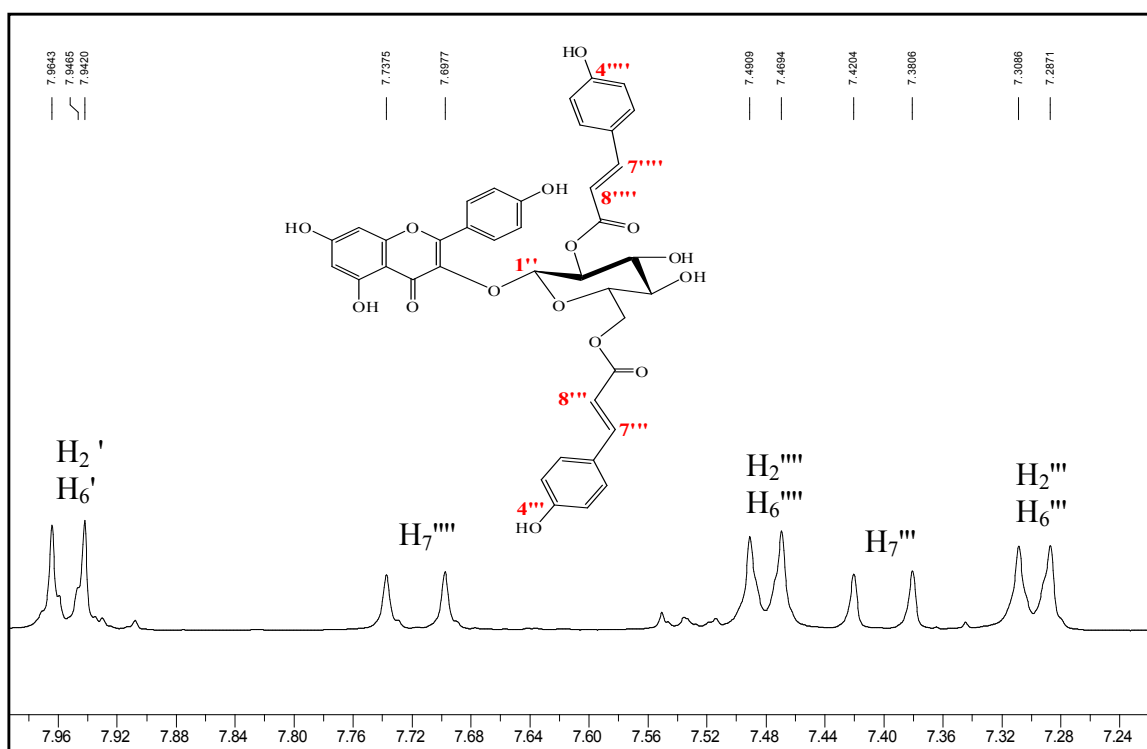
Kaempférol-3-O-[(2'',6''-di-O-E-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside]



شكل 1: سلسلة أطياف أشعة UV للمركب e_8



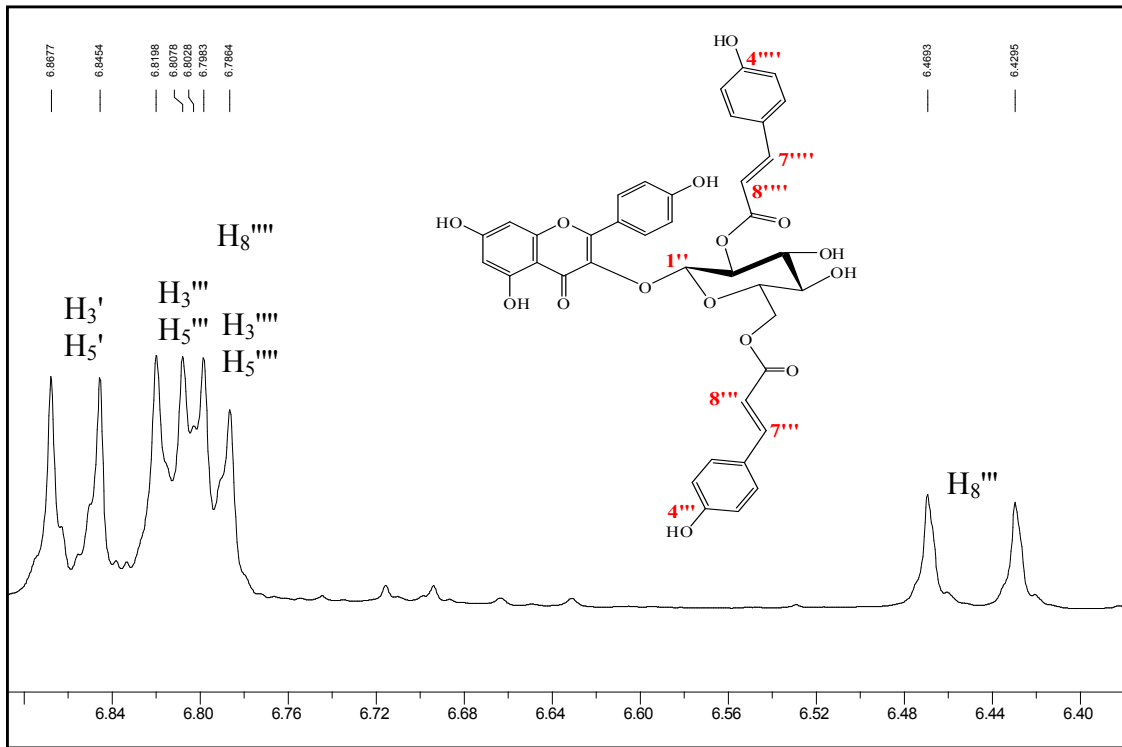
شكل 2: طيف ^1H RMN للمركب $5e$



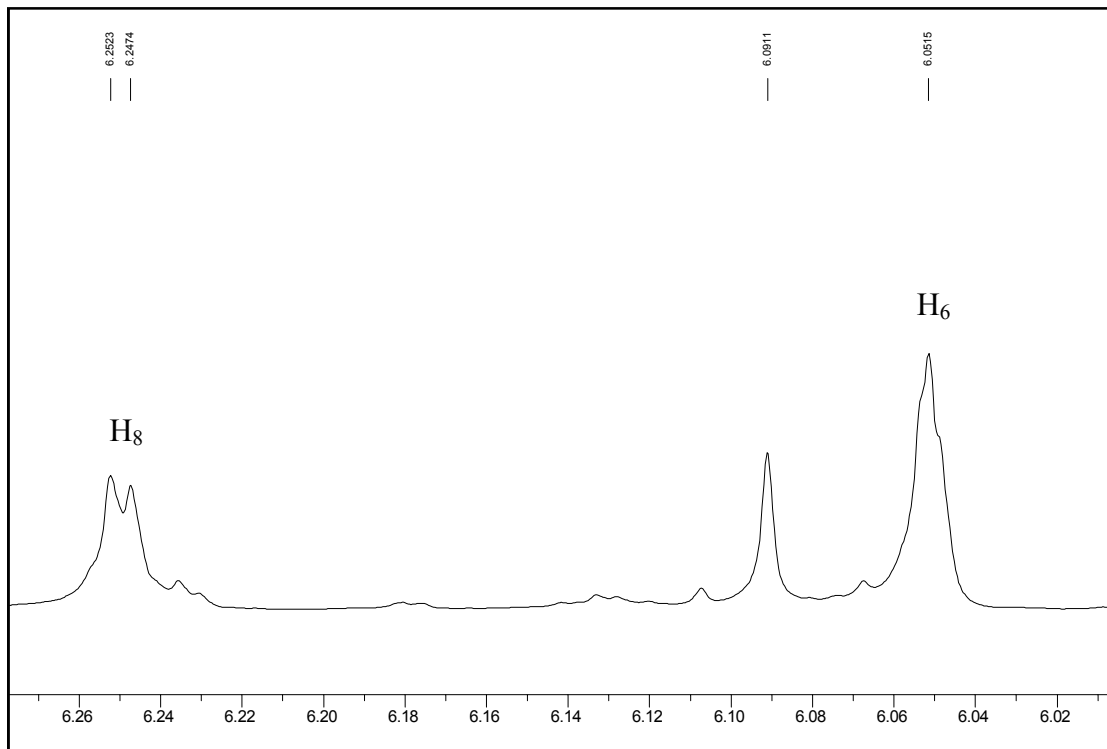
شكل 3: طيف ^1H RMN للمركب $5e$

تكبير للمجال

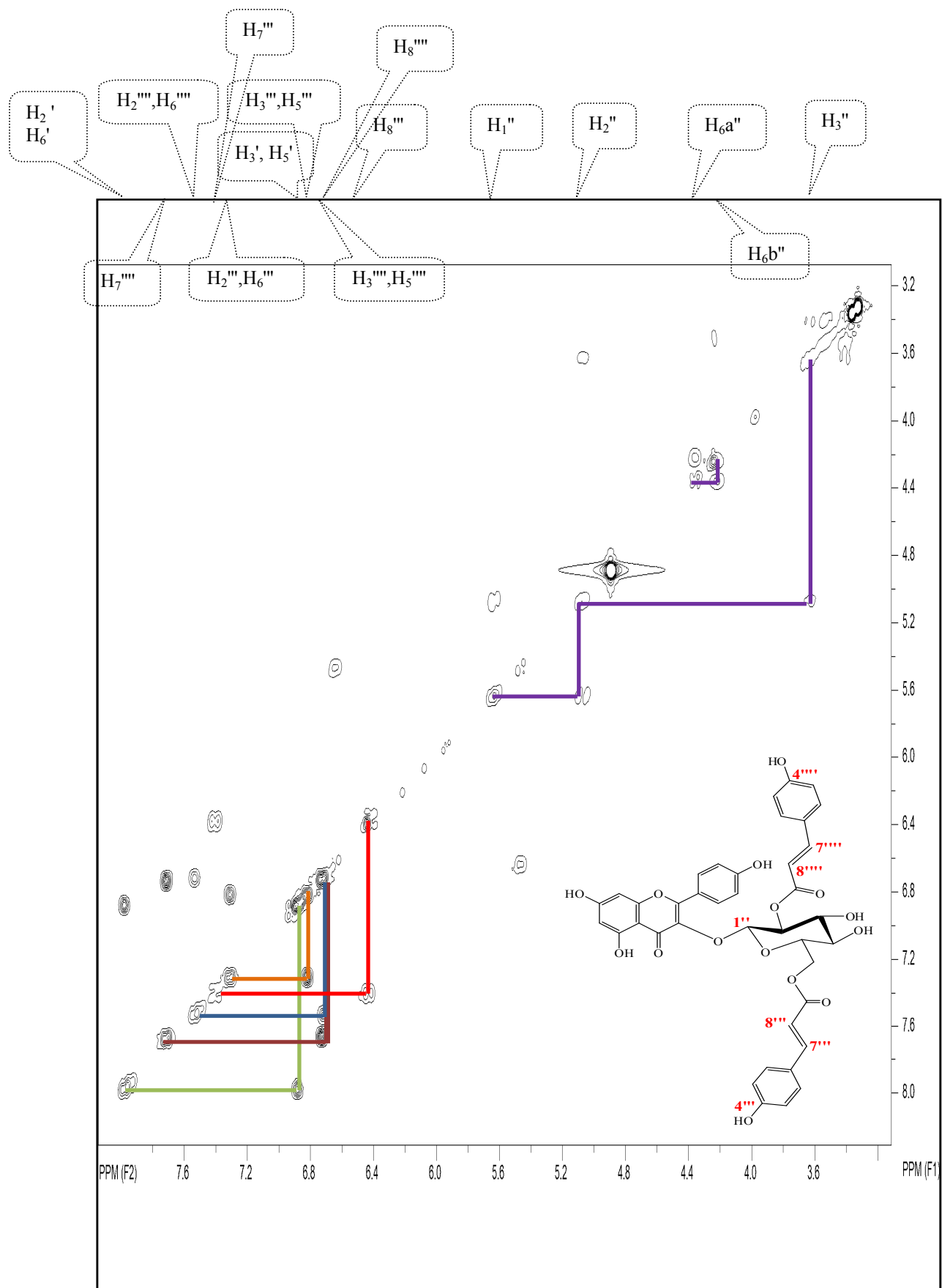
من 7.28 ppm إلى 7.98 ppm



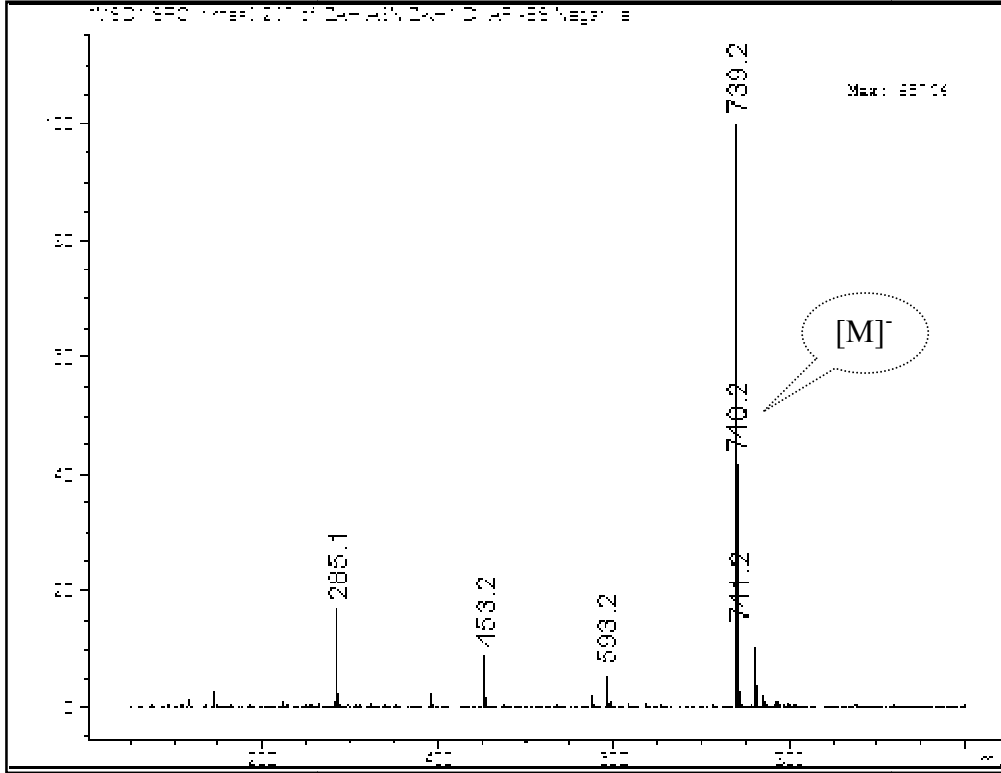
شكل 4 : طيف ^1H RMN للمركب **6b**
 تكبير للمجال
 من 6.40 ppm إلى 6.88 ppm



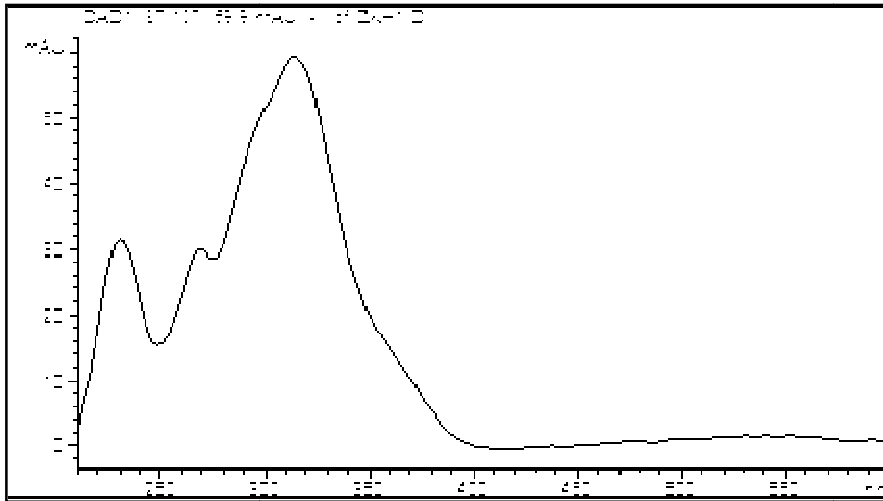
شكل 5 : طيف ^1H RMN للمركب **6b**
 تكبير للمجال
 من 6.04 ppm إلى 6.26 ppm



شكل 8 : طيف تجارب *cosy* للمركب **6b**



شكل 9 : طيف الكتلة للمركب e_5 بتقنية APJ-ES



- المملص: [acetonitrile (A)-H₂O (pH 3.2)-acide formique (0.03%) (B)]
- معدل التدفق: 0.4 ml/mn ، $t_R = 36.8$ mn
- عملية التمليص تمت باستعمال النسب التالية :
- 0-7 mn, 10%-15% (A), 7-14 mn, 22% (A), 14-22 mn 22% (A), 22-27 mn, 22%-30% (A)
- طيف UV-vis سجل بين 220 و 500 nm
- طيف الكتلة سجل من $m/z=100$ إلى $m/z=800$

شكل 10 : طيف UV المسجل من خلال تقنية HPLC-UV-DAD

للمركب e_5

الفصل الرابع

تحليل *gc/ms* للزيت الأساسي

للنبته *Ammi visnaga* L.

I- دراسة بيبليوغرافية حول الزيوت الأساسية:

1. مدخل:

الزيوت الأساسية هي عبارة عن مزيج معقد من المواد المتطايرة [1-2] لها رائحة عطرية، تنتجها بعض النباتات و تستخرج منها على شكل سائل لا تحتوي على الدهون مثل الزيوت النباتية تتواجد بتركيز منخفضة في النباتات العطرية، تستخدم في العديد من المجالات منها: الطب، الصيدلة، العطور، مستحضرات التجميل، الغذاء [3] حيث تعتبر صناعات كل من مستحضرات التجميل، العطور، النكهات هي المستهلك الرئيسي للزيوت الأساسية. فهي تستخدم كمعززات للنكهة في مختلف المنتجات (البن، الشاي، الوجبات الجاهزة...إلخ)، كذلك تستعمل في تعطير مستحضرات التجميل (الصابون، الشامبو...) كما تستخدم في مجال المنتجات المنزلية (منظفات و مساحيق للغسيل...) إضافة إلى استعمالها في إخفاء الروائح الكريهة من بعض المنتجات النقية. تستعمل الزيوت الأساسية على نطاق واسع في ميدان طب الأعشاب حيث تستعمل في معالجة عدة أمراض، فمن المعروف منذ القدم و الزيوت الأساسية تمثل فعالية مطهرة غير مهمة ففي الطب التقليدي تستخدم عادة في المساعدة على شفاء و تطهير الجروح أو العلاج من الصدمات، في ميدان طب الأسنان أعطت الزيوت الأساسية نتائج جد مرضية في العلاج و الوقاية من التسوس [4,5]، كما أظهرت الدراسات الحديثة أن مركب géraniol و الذي يعتبر واحدا من بين مكونات هذه الزيوت له تأثير على خلايا سرطان القولون [6] بالإضافة إلى النشاط المضاد للإلتهاب [7].

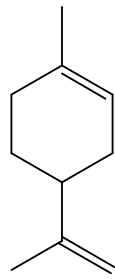
2. مكونات الزيوت الأساسية:

أكثر المركبات التي نصادفها في هذه الزيوت هي التربينات و التي تتكون من إتحاد لعدة وحدات من مركب Isoprène ، فإذا اتحدت وحدتي Isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) يتكون ما نسميه بالتربينات الأحادية (C₁₀H₁₆) أما إذا اتحدت ثلاث وحدات من نفس المركب فيتكون نوع آخر من التربينات و هو السيسكويتربينات (C₁₅H₂₄) وناذرا ما نجد التربينات الثنائية (C₂₀H₃₂) [8-10] و التي تتكون من إتحاد لأربع وحدات من Isoprène. التربينات التي نصادفها في الزيوت هي التي لها درجة تبخر صغيرة يعني كتلتها الجزيئية صغيرة مثل التربينات الأحادية والسيسكويتربينات. وإذا ما نظرنا إلى مكونات الزيوت الأساسية نجد تواجد مركبات أخرى إضافة إلى التي ذكرناها سابقا، ما يفسر تواجد هذه المركبات هو أنه أثناء الاصطناع الحيوي للتربينات (التربينات الأحادية والسيسكويتربينات) نلاحظ تكون مركبات وسطية منها الكحولات (α-bisabolol, géraniol)، السيتونات (β-vétivone, menthone)، الألدهيدات (citronellal, sinensal)، الإسترات

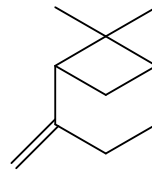
الخب. ... (thymol) و الفينولات (acétate d' α -terpinyl, acétate de cédryle)
بعض الصيغ الكيميائية لهذه المركبات ممثلة في الشكل 1:

التربينات الأحادية

الهيدروكربونات

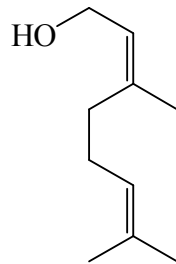


Limonène

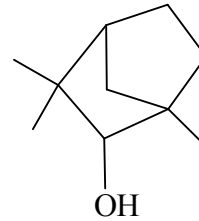


α -pinène

الكحولات

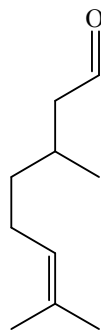


Nérol

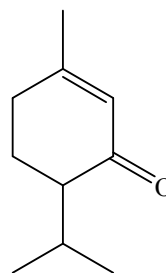


Endo-fenchol

الألدهيدات و السيتونات

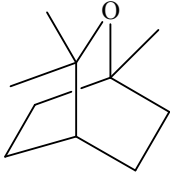


Citronellal

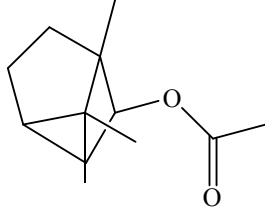


Pipéritone

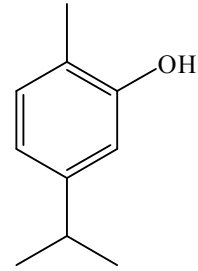
الإسترات، الإيثرات و المركبات الفينولية



1,8-cinéole



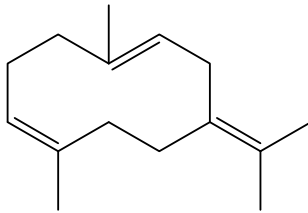
Acétate de Bornyle



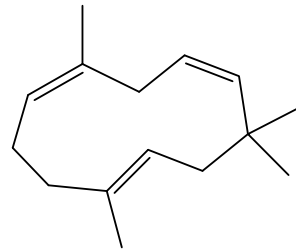
Carvacrol

السيكويتربينات

الهيدروكاربونات

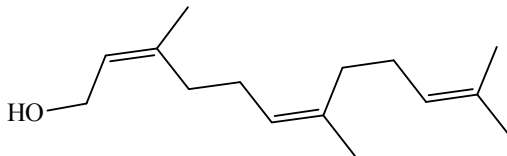


Germacrène B

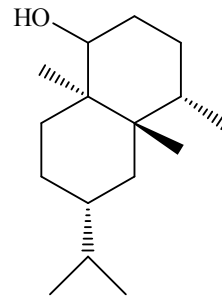


α -Humulène

الكحولات



Cis-Cis-Farnésol



Eudesmol

شكل -1- بعض الصيغ الكيميائية للتربينات الأحادية و السيكويتربينات

تتميز هذه المركبات بفعالية بيولوجية متنوعة منها مضادة للبكتيريا [11]، مضادة للأكسدة [12]...

3. طرق استخلاص الزيوت الأساسية:

هناك عدة طرق تستعمل لهذا الغرض نذكر منها:

- استخلاص بواسطة مذيب عضوي متطاير (Extraction par solvant organique volatil) [13].
- استخلاص بواسطة ماء جد ساخن (Extraction à l'eau surchauffée) [13].
- استخلاص بواسطة CO₂ فوق الحرج (Extraction par CO₂ super critique) [13].
- استخلاص باستعمال الميكروويف (Extraction par micro-ondes) [14].
- استخلاص باستعمال الموجات فوق الصوتية (Extraction par ultrasons) [13].
- استخلاص باستعمال التقطير المائي (hydrodistillation) [13].
- استخلاص باستعمال بخار التقطير (distillation par entraînement à la vapeur d'eau) [13].

من بين هذه الطرق تعتبر الطريقتين الأخيرتين الأكثر استعمالا في المجال الصناعي لإنتاج الزيوت الأساسية [15]:

➤ استخلاص باستعمال التقطير المائي:

تعتبر الطريقة الأسهل كما أنها لا تتطلب إمكانيات كبيرة حيث تتم بوضع المادة النباتية في دورق مملوء بالماء مع التسخين لدرجة الغليان، الأبخرة غير المتجانسة تتكاثف لينفصل الزيت عن الماء بسبب اختلاف كثافة كل منهما، الزيت الأساسي أخف من الماء إلا في بعض الحالات الخاصة حيث يسبح الزيت فوق الماء [13].

➤ استخلاص باستعمال بخار التقطير:

في هذا النوع من الاستخلاص لا تعرض النبتة إلى النقع المباشر في الماء حيث توضع على شبكة مثقوبة تسمح لبخار الماء بالمرور عبر النبتة، بخار الماء يقوم بتخريب الخلايا النباتية ليسمح بتحرير المركبات المتطايرة التي تتكاثف بمرورها عبر المكثف، هذه الطريقة تؤدي إلى التحسين في نوعية الزيت الأساسي حيث أن المادة النباتية لا تنقع مباشرة في الماء المغلي [16]. تعتبر هذه الطريقة الأكثر استعمالا في المجال الصناعي لاستخلاص الزيت الأساسي لنبتة إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) للحصول على مردود جيد إضافة إلى التقليل من وقت الاستخلاص [17].

4. طرق تحديد مكونات الزيوت الأساسية:

تشخيص مكونات الزيوت الأساسية عملية دقيقة تحتاج إلى عدة تقنيات [18]، الطريقة التي غالبا ما تستعمل هي تزاوج لكروماتوغرافيا الطور الغازي (CPG) و مطيافية الكتلة (SM) حيث تسمح بتحديد طبيعة هذه المكونات بالمقارنة مع المعطيات الطيفية للمركبات التي تكون مخزنة في مكتبات خاصة بها.

II- دراسة مكونات الزيت الأساسي للنبتة . *Ammi visnaga* L.

1. مقدمة:

تعرف النبتة *Ammi visnaga* L. تحت إسم الخلة البلدي و هي واحدة من بين النباتات التي تحتوي على المركبات الفلافونيدية [19] التي لها فعالية بيولوجية معتبرة، إضافة إلى كون النبتة *Ammi visnaga* L. ذات فعالية مضادة للأكسدة [19] فهي تعمل على تخفيف عدد وافر من الأمراض بما في ذلك الآلام الناجمة عن انخفاض في تدفق الدم الى القلب [20] و يعود ذلك إلى مادة الخلين المتواجدة في الثمار التي تنجز هذا العمل ومع ذلك، الخلين لا تخلو من آثار جانبية. فقد وجد الباحثون أن لديها سمية التراكمي [20].

2. المادة النباتية:

قطفت النبتة في شهر أبريل سنة 2009 من منطقة ديدوش مراد بقسنطينة، حيث تم التعرف عليها من قبل الأستاذ Gérard De Bélair من جامعة باجي مختار بعنابة. عينة من هذه النبتة أودعت بمخبر LOST، كلية العلوم، جامعة منتوري قسنطينة تحت رمز (LOST Av/04/09)، بعد تنقية الجزء الهوائي للنبتة ترك جانبا للدراسة لاحقا.

3. الوصف النباتي:

الساق قائمة خضراء ملساء الملمس الأوراق القاعدية ذات وريقات مسننة أما الأوراق العلوية كاملة الحواف كما أن الأوراق مفصصة ذات نوريات خيمية مركبة لها شمراخ طويل الجذر وتدى أما لون الأزهار فهو ابيض واصفر والثمرة لها كربلتين تنشق إلى ثمرتين.

4. التصنيف النظامي للنبتة:

Embranchement	Angiospermes	الفرع
Sous embranchement	Dicotylédones	تحت الفرع
Famille	Apiaceae	العائلة
Genre	<i>Ammi</i>	الجنس
Espèce	<i>Ammi visnaga</i> L.	النوع

5. الاستخلاص باستعمال التقطير المائي (hydrodistillation):

باستعمال طريقة التقطير المائي تم استخلاص الزيوت الأساسية من النبتة و ذلك بأخذ 200 غ من الجزء الهوائي لها ووضعه في جهاز خاص يدعى Clevenger لمدة 3 ساعات. الزيت المتحصل عليه كان بنسبة 1.3% (w/w) ذو لون أصفر و للتخلص من قطرات الماء العالقة به تم إضافة كمية من مركب كبريتات الصوديوم اللامائي لامتصاصها، بعدها ترك تحت درجة +4 °م بعيدا عن الرطوبة لحين دراسته.

6. التحليل باستعمال جهاز كروماتوغرافيا الطور الغازي (تقنية GC و GC/MS):

أ- تقنية GC:

تمت عملية التحليل باستعمال Shimadzu GC17A، مجهزة بعمود من نوع DB5-MS (40 م × 0.88 ملم، سمك الفيلم هو 0.18 ميكومتر). حيث في البداية تبرمج درجة حرارة الفرن عند 60 °م لمدة 5 دقائق ثم ترفع إلى 275 °م وترفع بعدها 5 °م كل دقيقة و ذلك لمدة 5 دقائق. و يستعمل الهيليوم كناقل للغاز بمعدل 1 ملل/ دقيقة.

ب- تقنية GC/MS:

تم إجراء GC/MS باستخدام الكاشف الانتقائي للكتلة Shimadzu QP5050. ظروف التشغيل كانت مماثلة لعملية التحليل بتقنية GC. أما معايير تشغيل مطيافية الكتلة فكانت على النحو التالي:

- كمون التأين 70 eV.
- تيار التأين 2 A.
- درجة حرارة منبع الأيونات 200 °م.

7. النتائج المتحصل عليها:

21 مركب تم التعرف عليها حيث تمثل نسبة 97.3 % من مجمل المركبات المحتواة في هذا الزيت، و تتمثل المركبات التي ظهرت بنسب أكبر أي الغالبة في isobutyl isobutyrate (14.0%)، linalool (12.1%)، 2,2-dimethylbutanoic acid (30.1%)، thymol (6.0%)، bornyl acetate (7.3%)، و croweacin (12.2%) و النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول 1:

جدول 1- يوضح مكونات الزيت الأساسي للنبتة *Ammi visnaga L.*

النسبة (%)	IR (معامل الاحتباس)	المركب
1.5	930	α -Thujene
2.5	935	3-Methylpentenol
0.1	992	β -Myrcene
14.0	1004	Isobutyl isobutyrate
12.1	1029	Linalool
1.2	110	Methylbutyl 2-methylbutanoate
30.1	1108	2,2-Dimethylbutanoic acid
3.8	1121	α -Isophorone
1.2	1143	2-Nonyne
1.6	1152	Hexenyl isobutanoate
0.2	1220	<i>endo</i> -Fenchyl acetate
7.3	1289	Bornyl acetate
6.0	1290	Thymol
1.2	1381	Geranyl acetate

1.2	1439	Lavandulyl acetate
0.6	1446	Citronellyl propionate
12.2	1460	Croweacin
0.1	1491	Neryl isobutanoate
0.1	1512	Lavandulyl 2-methylbutanoate
0.1	1689	α -Damascone
—	1701	(Z,E)-farnesal

IR : Indice de rétention

النتيجة:

يتكون الزيت الأساسي للنبته *Ammi visnaga* L. المقطوفة من منطقة ديدوش مراد من 21 مركب من بينها ست مركبات تتواجد بنسبة أكبر وهي:

- isobutyl isobutyrate
- linalool
- 2,2-dimethylbutanoic acid
- Thymol
- bornyl acetate
- croweacin

إذا ما قورنت هذه النسب مع بعض من الزيوت الأساسية لبذور تعود إلى أنواع متواجدة بالمغرب [21] نجد بأن المركبين الأساسيين فيها هما linalool بنسبة (70.1%) و pentylmethylbutanoate بنسبة (4.3%).

المراجع

- [1] Association française de Normalisation, Huiles essentielles. (2000). Tome1- Echantillonnage et méthode d'analyse, Tome 2-Vol.1 et 2, Monographies relatives aux huiles essentielles, 6^{ème} édition.
- [2] Garnero, J. (1996). Les huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, K 345, Paris.
- [3] Schwob, I. Bessière, J. M. Dherbomez, M. Viano, J. (2002). C. R. Biologies, 325, 781.
- [4] Kato, T., Lijima, H., Ishihara, K., Kanek, T., Hirai, K., Naito, Y., Okuda, K. (1990). Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. Bull. Tokyo. Dent. Coll, 31, 301.
- [5] Sourai, P.G. (1989). Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry: a review Odontostomatol. Prodos. 43, 399.
- [6] Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Duranton, B., Gosse, F., Seiler, N.Raul, F. (2001). Geraniol, a Component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. J. Phamacol. Exp. Ther., 298, 197.
- [7] Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de-Lima, Jr., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernandez Ferreira, E., Soares, R.O.A., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimaraes, A.C., Zoghbi, M.G.B., Henriques, M.G.M.O. (1999). Evaluation of anti-inflammatory- related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. J. Ethnopharmacol., 66 ,57.
- [8] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. (2008). Review MI-Biological effects of essential oils-A Review Food. Chemical. Toxicol., 46, 446.
- [9] Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. Phytother. Res., 18, 435.
- [10] Vila, R., Mundina, M., Tomif, Fursan, R., Zacchino, S., Casanova, J., Canigural S. (2008). Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. Planta Med., 68, 164.
- [11] Dorman, H. J. D., et Deans, S. G. (2000). Antimicrobiol agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. J. App. Microbio., 88, 308.
- [12] Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Polission, M., Sokmen, A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Tymus sipyleus* subsp. *sipyleus* Var. *rosulans*. J. Food Engineer., 66, 447.
- [13] Bruneton, J. (1999). pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes, TEC-DOC, 3 , 484.

- [14] Lucchesi, M. E., Smadja, J., Baradshaw, S., Louw, W., Chemat, F. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food. Engineer.*, 79, 1079.
- [15] Way, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.*, 106, 408.
- [16] Franchomme, P., Pénéol, D. (1990). Matière médicale aromatique fondamentale- L'aromathérapie exactement, Roger Jallois éditeur, Lilmoges, 4, 317.
- [17] Marzoug, Z., Neffai, A., Marzoug, B., Chraif, I., Khemiss, F., Chekirghedira, L., Boukef, K. (2006). Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine. *J. Food Agric. Envir.*, 4, 61.
- [18] Cavalli, J.F. (2002). Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat en chimie organique et analytique université de Corse Pascal Paoli.
- [19] Bencheraiet, R., Kherrab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z., Jay, M. (2011). Flavonols and Antioxidant Activity of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae). *Rec. Nat. Prod.*, 5, 52.
- [20] Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M. (2002). Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Ammi visnaga* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Herb. Pharmacother.*, 2, 19.
- [21] Lamiri, A., Lhaloui, S., Benjilali, B., Berrada, M. (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly *Mayetiola destructor*. *Field Crops Res.*, 71, 9.

الجزء الثاني

دراسة الفعالية البيولوجية

الفصل الأول

دراسة بييليوغرافية حول:

- الفعالية المضادة للأكسدة
- الفعالية المضادة للبكتيريا

I- الفعالية المضادة للأكسدة:

I-1- مقدمة:

يعتبر الأكسجين (O_2) غاز ضروري لاستمرارية الحياة إذ يتحول عادة عبر السلسلة التنفسية إلى ماء وذلك من أجل إنتاج الطاقة على شكل (ATP) الضرورية لكافة أنشطة الخلية. غير أن عمل الميتوكوندريا ليس على الدوام مثالياً لأنه من 2 إلى 5% من الأكسجين المتنفس يتحول إلى ما يسمى بالأنواع الأكسجينية النشطة (ROS (reactive oxygene species). ففي الحالات العادية يكون إنتاج ROS تحت رقابة خلوية بأنظمتها المضادة للأكسدة و عندما تعجز هذه الأنظمة عن تعديل نشاط هذه الأنواع الجذرية يحدث ما يسمى بالإجهاد التأكسدي الذي يكون السبب في تفاقم العديد من الحالات المرضية. فالإجهاد التأكسدي عبارة عن خلل في التوازن بين النظام الدفاعي المضاد للأكسدة و إنتاج الجذور الحرة الأكسجينية [1].

I-2- الجذور الحرة:

هي عبارة عن ذرات أو جزيئات تبدي إلكترون أو عدة إلكترونات في مدارها الخارجي [1,2]، هذه الجذور الحرة تكون مشتقات أكسجينية (ROS (reactive oxygene species)،
الأكسجينية (RNS (radical netrogene species)، كما أنه هناك أنواع أخرى مشتقة من الأكسجين تسمى بأنواع أكسجينية نشطة مثل الأكسجين المنفرد O_2^{\cdot} (superoxide anion radical) ، OH^{\cdot} (hydroxyl radical) [3] أو مشتقات لذرات أخرى كالآزوت ثاني أكسيد الآزوت ONOOH، هذه الأنواع الأخيرة ليست بجذور حرة لكنها يمكن أن تكون بواحد للجذور الحرة [4-6].

للجذور الحرة مصدرين أما الأول فهو مصدر خارجي حيث يمكن لها أن تتكون نتيجة عوامل بيئية، كتلوث الهواء الذي يكون سببه التدخين و العديد من المنتجات الكيميائية، الأشعة فوق البنفسجية أو نتيجة التلوث بالمعادن الثقيلة أو عوز غذائي [7,8] و الثاني عبارة عن مصدر خلوي فيمكن للجذور الحرة أن تنتج تحت تأثير عامل فيزيائي مثل الأشعة أو تفاعلات كيميائية خاصة إنزيمية حيث أن كل تفاعل يدخل فيه الأكسجين و يكون هناك نظام مرجع قادر على نقل الإلكترونات يمكن أن يحرق جذور حرة [9].

تؤدي الزيادة في الجذور الحرة إلى تلف الجزيئات الكبرى البيولوجية مثل البروتينات، الليبيدات و ADN.

I-3- النظام المضاد للأكسدة:

يتميز الجسم بنظام دفاعي ضد الإنتاج المفرط للجذور الحرة الأوكسجينية و الأنواع النيتروجينية النشطة، يمكن تمييز نظامين إحداهما إنزيمي و الآخر لا إنزيمي:

النظام الإنزيمي: يتكون من عدة إنزيمات مثل (SOD (superoxide dismutase، catalase و

peroxidase لها قدرة القضاء على الجذور الحرة و عدة أنواع أوكسجينية أخرى.

النظام غير الإنزيمي: حيث يعتبر العديد من الأغذية مصادر طبيعية لمضادات الأكسدة و هي إما

معنوية مثل السيلينيوم و الزنك أو فيتامينية مثل الفيتامين C... أو متعددة الفينولات [10] مثل الفلافونيدات.

I-4- الفلافونيدات و الفعالية المضادة للأكسدة:

ترجع الخاصية المضادة للأكسدة للفلافونيدات إلى قدرتها على حماية الليبوبروتينات من الجذور الحرة و قدرتها على إقتناص أيونات المعادن الناقلة للإلكترونات [11]، فمركب الـ Quercetine واحد من المركبات الفلافونيدية له خاصية مضادة للأكسدة ترجع إلى تواجد مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 5 و 7 من الحلقة A والموقع 3 و 4 من الحلقة B [12،13].

الفلافونيدات يمكن لها اقتناص الجذور الأوكسجينية النشطة لكل من $\cdot\text{OH}$ و $\cdot\text{O}_2$ بإعطائها ذرة هيدروجين أو إلكترون، فالنشاط المضاد للأكسدة يعتمد على درجة الحموضة [14] لأن مجاميع الهيدروكسيل تنفصل عن مركباتها عند إرتفاع قيمة الـ pH و يزداد مع انفصالها القدرة على إعطاء الإلكترون للجذر الحر. بهذه الطريقة تقوم الفلافونيدات بتثبيط عملية فوق الأكسدة الليبيدية باقتناص جذر lipid peroxy (LOO \cdot) [13،14].

تعتمد الخاصية المضادة للأكسدة على عدد ذرات الهيدروجين في الحلقة الفينولية و مدى استقرار الفلافونيد بعد فقد البروتون و تحوله إلى جذر حر لذلك تم اقتراح ارتباط الخاصية المضادة للأكسدة للفلافونيدات بوجود كل من:

- مجموعة أرثو ثنائي هيدروكسيل 3'، 4' على الحلقة B إذ تشكل مواقع مستهدفة من قبل الجذور الحرة.
- الرابطة غير المشبعة بين الموقعين (C₂-C₃) على الحلقة C.
- الوظيفة السيتونية في الموقع 4.

- مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للحلقة C.
- مجموعة الهيدروكسيل في الموضعين 7، 5 للحلقة A من أجل قدرة اقتناص عالية للجذور الحرة [16,15].

I-5- الإختبارات المستعملة لتحديد الفعالية المضادة للأكسدة:

هناك عدة إختبارات تستعمل لهذا الغرض نذكر منها الأكثر إستعمالاً: [17]

✓ إختبار **ABTS** (acide 2,2-azido-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)

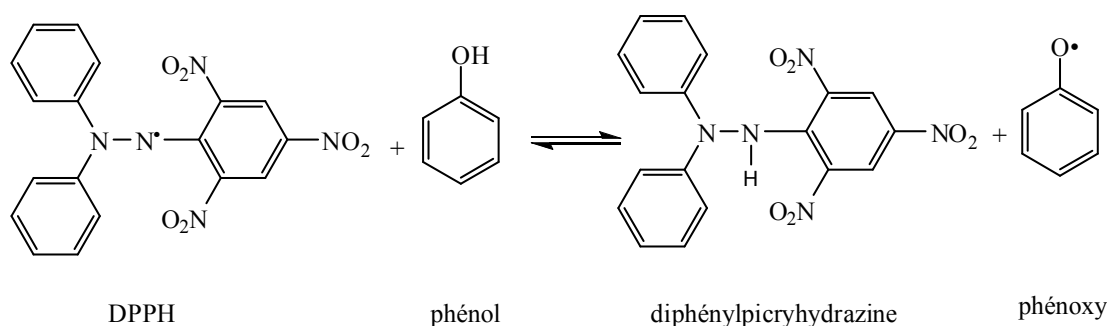
✓ إختبار **FRAP** (ferric reducing antioxidant power)

✓ إختبار **DPPH** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

قمنا باختيار الإختبار الأخير حيث يسمح بتقييم قدرة المستخلص البوتانولي على أسر والتقاط الجذور الحرة بالطريقة اللونية [18] ، وذلك باستعمال الجذر الثابت **DPPH** (شكل-1-).

مبدأ التفاعل :

يعتمد هذا التفاعل على أساس إرجاع جذر الـ DPPH بالجزيئات المانحة لذرات الهيدروجين للمستخلص البوتانولي (الجزيئات المضادة للأكسدة)، حيث يتم إرجاع جذر DPPH باقتناصه لذرة هيدروجين إلى مركب H-DPPH ويصاحب ذلك تغير في اللون من البنفسجي إلى الأصفر، يترجم هذا التغير بنقص في الامتصاص بدلالة الزمن عند طول موجة 517 نم. وهذا حسب التفاعل التالي:



شكل-1- الصيغة الجذرية لـ DPPH وتفاعله مع الفينول

II - الفعالية المضادة للبكتيريا:

II - 1- مقدمة:

علم البكتيريا يحوى عدد كبير من الأجناس البكتيرية، و تعتبر البكتيريا كائنات دقيقة (Micro- organismes) وحيدة الخلية تنتمي إلى بدائيات النواة (Procarvates)، بعضها ممرض (Pathogènes) و البعض الآخر يعيش متعايشا مع كائنات أخرى ويمكن أن تسبب أمراض لدى الإنسان.

الهدف من دراستنا هذه هو تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص نبتة طبية *Eryngium triquetrum* Vahl. على سلالات بكتيرية متنوعة (موجبة الغرام (+) gram و سالبة الغرام (-) gram) وقد تم اختيار هذه السلالات باعتبارها مسؤولة عن عدد كبير من الأمراض التي تصيب الإنسان خلال فترة تواجده بالمستشفى (Les infections nosocomiales)

II - 2- خصائص ومميزات السلالات البكتيرية المدروسة:

II - 2- 1- *Escherichia coli*:

تنتمي بكتيريا هذا النوع إلى عائلة *Enterobacteriaceae* و تمثل أكبر قسم من الكائنات الدقيقة التي تعيش في الأنبوب الهضمي لكنها ممرضة للجهاز البولي [19،20] تتميز بأنها عصوية متحركة بأسواط جسمية (Ciliature péritriche) ، سالبة الغرام، كذلك تعتبر واحد من أهم أسباب الإسهال الحاد في العالم و هي تحدث عدد كبير من القتلى في الدول النامية وهذا راجع لإنتاجها سموم داخلية (entérotoxine)[19،20].

طولها 6 ميكرومتر و عرضها من 0.3 إلى 1 ميكرومتر، تنمو بسرعة في أوساط مثالية بعد 24 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م.

II - 2- 2- جنس *Streptococcus*:

إسم *Streptococcus* مشتق من *Streptus* بمعنى مرن و *Coccus* بمعنى حبيبات و هي تعرف على أنها كرويات تتوضع في ثنائيات كما تكون على الشكل السبحي [20].

يضم هذا الجنس مجموعة من الأنواع البكتيرية تشترك في مجموعة من الخصائص المرفولوجية والميتابولزمية، هي بكتيريا كروية موجبة الغرام، تنمو في وسط خاص يحوى 5% من دم الحصان أي أنها بكتيريا مطلوبة، لوحظت لأول مرة من قبل Ehrlich و Bilroth سنة 1874 على جروح متعفنة [20] ، ثم لوحظت مرة أخرى هذه الكائنات من قبل Louis Pasteur في عينات من إفرازات مهبلية وفي دم نساء يعانون من حمى النفاس [20،21].

II -2-3- جنس *Pseudomonas aeruginosa*

ينتمي هذا الجنس إلى عائلة *Pseudomonadaceae*، و يعتبر النوع *P.aeruginosa* المشتق من الاسم اللاتيني *Aeruginosa=couvert de rouille* الأكثر انتشارا [22،20] ، يسمى بالعصويات بيوسيانيك (Pyocyanique) و هو عبارة عن عصويات سالبة الغرام يتراوح طولها من 1.5 إلى 3 ميكرومتر وعرضها من 0.5 إلى 0.8 ميكرومتر كثيرة الحركة و هذا راجع لامتلاكها لسوط واحد قطبي (monotriche) [20،19]، وهي مسؤولة عن التعفنات الخطيرة الملاحظة بعد العمليات الجراحية، تنمو بسهولة على كل الأوساط الهوائية في درجة حرارة 37° م أو 30° م [19،20]، تطرح رائحة عطرية مميزة راجعة إلى إنتاج المركب أرتو أمينو أسيتو فينون [19] ، تنتشر بالتربة و المياه وفي السوائل المخاطية للأنف و المجاري التناسلية والبولية وكذلك في الفيج، وهي المسؤولة على إحداث الإصابات التعفنبة الخطيرة.

II -2-4- جنس *Staphylococcus*

جنس *Staphylococcus* ينتمي إلى عائلة *Micrococcaceae* ، أطلق Ogston اسم *staphylocoque* المنقسم إلى شطرين [20]:

Kokkos: حبوب متجمعة على شكل كومة غير منتظمة .

Staphylos: عنقود عنب.

تظهر بكتيريا الستافيلوكوك تحت المجهر على شكل مكورات موجبة الغرام غير متحركة يتراوح قطرها من 0.8 إلى 1 ميكرومتر تجتمع في ثنائيات (diplocoque) أو على شكل عنقود عنب صغير (grappes de raisin) عادة ما تكون بدون محفظة (sans capsule) [22-20] تتواجد بشكل شبه دائم في سداة الأنف الداخلية، على الجلد، في الغدد الجلدية وعلى كثير من المواد الغذائية، كذلك وجدت في العجان (المسافة بين عضو التناسل و الشرج) [22]، النوع المثالي *S.aureus* [19،23]. لها القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء، يمكنها إفراز سموم بجسم العائل أو في بيئة النمو، فهي سلالات ممرضة، كما قد تحدث تسمما غذائيا، كذلك تفرز هذه البكتيريا مجموعة من السموم الداخلية [23].

II -2-5- جنس *Klebsiella*

خاصة *Klebsiella pneumonia* ينتمي إلى عائلة *Enterobactériaceae* تعتبر من بين البكتيريا البيئية (تتواجد في الماء، تربة، هواء،...)، كذلك تتواجد في براز الإنسان بشكل طبيعي و غالبا ما تعتبر من بين بكتيريا الجلد و المخاطية، و لكن تتواجد بكمية قليلة في الجهاز الهضمي و الجهاز

التنفسي و التربة [19-22], [24] ، و هي عبارة عن عصويات سالبة الغرام غير متحركة تتميز بشكلها الدائري محدبة، قطرها من 3 إلى 4 مم.

II -2-6- جنس *Entérobacter*: [19]

ينتمي إلى عائلة *Enterobacteriaceae* و هي عصويات سالبة الغرام تتواجد طبيعيا علي الجلد و في السوائل المخاطية لكن تتواجد بكمية قليلة بالخصوص في الجهاز الهضمي، الجهاز التنفسي و الشرج، وهي تعتبر جد خطيرة وهذا راجع لإفرازها لإنزيمات خارجية. من الخصائص المميزة لهذا الجنس هو كثرة الحركة و هذا راجع لامتلاكها لأسواط جسمية و عدم احتواءها علي كبسولة باستثناء بعض الأنواع مثل: *E. aerogenes* ، كذلك إنتاجها لصبغات صفراء مثل النوع: *E. cloacae*.

II -3- التركيز الأدنى المثبط (CMI):

CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

تعريفه:

تعرف CMI [25] على أنها أدنى تركيز ممكن من المضاد الحيوي الذي يؤدي إلى تثبيط كل نمو بكتيري مرئي بعد 18 إلى 24 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م.

المراجع

- [1] Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *The Lancet*, 344, 721.
- [2] Gutman, J. (2001). Glutathione aide essentielle à une bonne santé. Gutman & Schettini Inc., Montréal, Canada, 1.
- [3] Buak Çimen, M., Y. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta.*, 390, 1.
- [4] Favier, A. (2003). Mécanismes biochimiques Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108.
- [5] Fontaine, E. (2009). Production et élimination des radicaux libres oxygénés parentérale, département de médecine aiguë spécialisée, Hôpital Albert Michallon, Grenoble.
- [6] Pryor, W. A., Houk, K.N., Foote, Ch.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J.A. (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291, R491.
- [7] Allergan, Inc., Irvine, (2005). Antioxidant backgrounder. CA 92612. TM Marks owned by Allergan, Inc.
- [8] Anne, N. S., Robert, S. (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL*, 12, 433.
- [9] Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine /sciences*, 22, 266.
- [10] Best, B. (2002). General antioxidant actions. *The chemistry and biochemistry of free radicals-and antioxidant enzymes*, 11.
- [11] Surai, P. F., Spinnler Benadé, A.J., Speake, B.K. (2007). Natural Antioxidants in Land- and Marine-Based Wild-Type Food Risk Reduction. From: *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention* Edited by: F. De Meester and R. R. Watson. Humana Press Inc., Totowa, 357.
- [12] Terao j. (1990). Dietary flavonoids as plasma antioxidants on lipid peroxidation significance of metabolic conversion; *antioxidant Food Supplements in Human Health Japan* 770.
- [13] Piergiorgio P., Paolo S., ITBA C.N.R (1999). Dietary flavonoids and interaction with Physiologic Antioxidants University of Milan.

- [14] Rice-Evans, C. (1999). Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity
guy's, King's St. Thomas'International Antioxidant Research Centre and School of
Biomedical Sciences London SE1 9RT, United Kingdom.
- [15] Mathiesen, L. (1996). C-Methylated dihydrochalcones and chalcones from the fruit
Myrica gale L. : antioxidant, radical scavenging and uncoupling activities .school of
pharmacy, department of pharmacology , university of Oslo .these, 1.
- [16] Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants:
chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional
Biochemistry* 13, 572.
- [17] Rolland,Y. (2004). Antioxydants naturels des végétaux. *Review*.11,1.
- [18] Koleva, V. T. A., Linssen, J. P. H. (2002). Extracts for antioxidant activity : a
comparative study on three testing methods. *Phytochem. Analysis*, 15, 8.
- [19] Berche, P., Gaillard, J.L., Simont, M. (1989). *Bactériologie: les bactérie des infections
humaines*, Flammarion (1^{ère} édition), Paris.
- [20] Avril, J.L., Dabermat, H., Denis, F., Monteil, H. (1992). *Bactériologie clinique*.
Edition Marketing (1^{ère}édition) Paris.
- [21] Leclerc, H. (1975). *Microbiologie générale* . Edition Dund.
- [22] Ferron, A. (1976). *Bactériologie (à l'usage des étudiants en médecine)* Edition Gouan
et Roque (8^{ème} édition).
- [23] Renato, D., Bernard, D., Herman, N. E., Horold, S. G. (1990). *Microbiologie*, Fourth
edition J. B lippincott company (New York), 231.
- [24] Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargas, R. (1987).*Bactériologie
médicale*, Techniques usuelles. SIMEP. Paris.
- [25] Le Minor, L., Véron, V. (1989). *Bactériologie médicale*. Edition Flammarion. Paris.

الفصل الثاني

طريقة العمل و

مناقشة النتائج

طريقة العمل و مناقشة النتائج

I. الفعالية المضادة للأكسدة

1.I. طريقة العمل:

من أجل تقدير الفعالية المضادة للأكسدة يتم أولاً تحضير المحلول الميثانولي لجذر الـ (C₁₈H₁₂N₅O₆, DPPH (M=394.33 g/mol) بتركيز 0.2 mM ليتم بعدها تحضير المحلول الميثانولي ذو تركيز 1 mg/ml للمستخلص البوتانولي المراد تقدير فعاليته ، وانطلاقاً من هذا الأخير (المحلول الأم) تحضر سلسلة من التخفيفات ذات التراكيز من 1 µg/ml إلى 500µg/ml.

يمزج حجم معين من كل تركيز من محلول المستخلص البوتانولي مع نفس الحجم من محلول جذر DPPH المحضر سابقاً، ليوضع بعدها في الظلام لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة المخبر. بعد إنتهاء 30 دقيقة يتم قياس الكثافة الضوئية عند طول الموجة 517 nm، مقابل الشاهد المحضر في نفس الشروط التجريبية لكن باستعمال الميثانول بدلاً من محلول المستخلص.

لتقييم النشاط المضاد للأكسدة ، تحدد قدرة المستخلص البوتانولي على أسر و التقاط الجذور الحرة بالنسبة المئوية لإرجاع الجذر الحر الثابت DPPH حيث تحدد هذه النسبة بالعلاقة التالية:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{blanc} - \text{sample}}{\text{blanc}} \times 100$$

حيث :

blanc : الكثافة الضوئية لـ DPPH في الميثانول

sample : الكثافة الضوئية لـ DPPH في المستخلص البوتانولي

2.I. النتائج والمناقشة

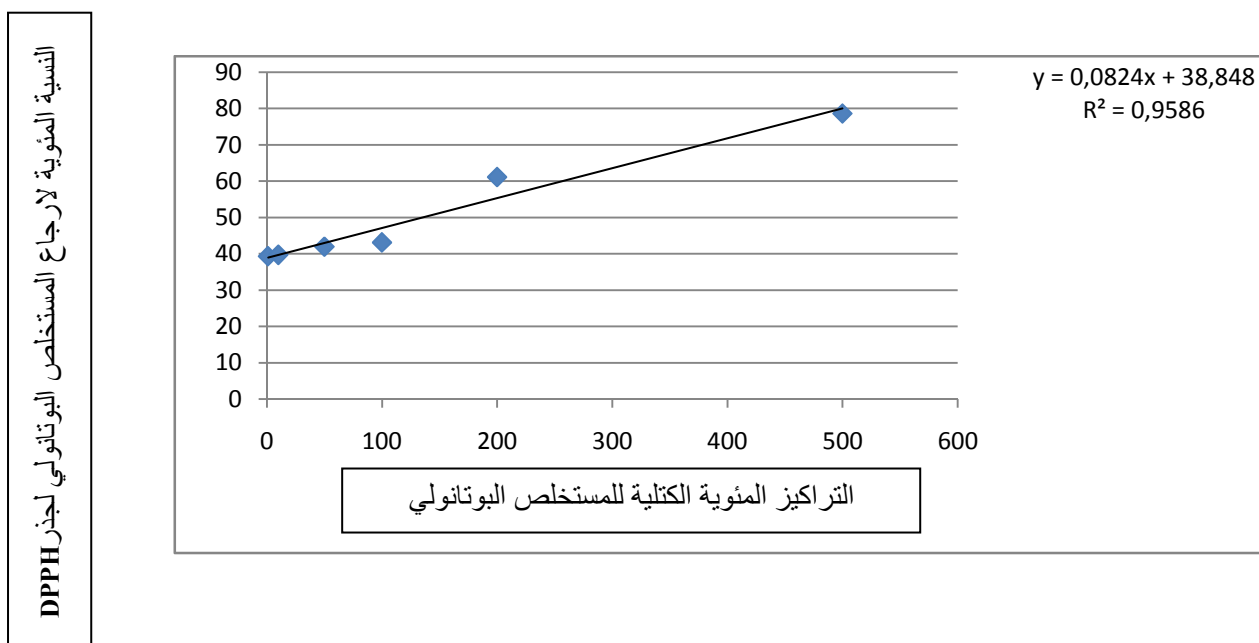
تبين النتائج المحصل عليها و المدونة في الجدول 1 النسبة المئوية لإرجاع المستخلص البوتانولي للنبتة *E. triquetrum* Vahl. لجذر DPPH بدلالة التركيز:

جدول 1. يبين قدرة الأسر الجذري للمستخلص البوتانولي للنبته *E. triquetrum* Vahl.

لجدر DPPH بدلالة مختلف التراكيز

500	200	100	50	10	1	المستخلص البوتانولي للنبته <i>E. triquetrum</i> Vahl. (µg/ml)
78.61	67.15	43.17	41.99	39.76	39.37	% لارجاع DPPH

هذه القيم يمكن تمثيلها على المنحنى البياني التالي:



شكل 1. منحنى يبين النسبة المئوية لارجاع المستخلص البوتانولي لجدر

DPPH بدلالة التركيز

❖ تحديد قيمة IC₅₀

تعريفه: IC₅₀ هي تركيز المستخلص اللازم لأسر 50% من الجذور الحرة.

من خلال المنحنى البياني تم حساب قيمة التركيز الموافق لـ 50% من نسبة الإرجاع اعتمادا على معادلة المنحنى التالية:

$$Y=0.0824 X + 38.848$$

➤ إذا كانت Y نسبة الإرجاع المقدر بـ 50% تكون قيمة IC₅₀ كما يلي:

$$X = (50 - 38.848) / 0.0824 = 136$$

و بهذا يكون تركيز المستخلص البوتانولي المؤدي إلى 50% من الإرجاع هو:

$$IC_{50} = 136 \mu\text{g/ml}$$

بينت النتائج المحصل عليها فعالية عالية للمستخلص البوتانولي للنبتة *E. triquetrum* Vahl. في أسر والتقاط الجذور الحرة، حيث قدر التأثير الأسر لجذر DPPH بـ 80% وهذا عند التركيز 0.5mg/ml، أما التركيز الأسر لـ 50% فقدر بـ 136 µg/ml وهو نوعا ما مرتفع مقارنة بالقيم المرجعية لكل من مركبي الفيتامين E و Quercétine و مع أبحاث أجريت على نباتات من نفس المخبر و التي كانت لها فعالية مضادة للأكسدة جيدة و الجدول 2 يوضح ذلك:

جدول-2- مقارنة IC₅₀ للمستخلص البوتانولي للنبتة *E. triquetrum* Vahl. و كل من قيم Quercétine و الفيتامين E و نباتات أخرى درست بالمخبر

IC ₅₀ (µg/ml)	
136	المستخلص البوتانولي للنبتة <i>Eryngium triquetrum</i> Vahl.
12	Quercétine
25	Vitamine E
47.9	المستخلص البوتانولي للنبتة <i>Stachys mialhesi de Noé</i>
71	المستخلص البوتانولي للنبتة <i>Stachys circinnata</i> l'Her

II. الفعالية المضادة للبكتيريا

II.1. طريقة العمل

II.1.1. الطريقة العملية لتقدير الفعالية المضادة للبكتيريا

▪ تحضير السلالات البكتيرية حيث يتم تجديد عملية الزرع بداية كل أسبوع إذ يتم زرع كل نوع بكتيري على الوسط الملائم له، فتزرع *S. aureus* على وسط خاص (Chapman) ، Streptocoque تزرع على الوسط chocolat (Mueller-Hinton +5% دم خروف)، أما باقي الأنواع الأخرى فتزرع فوق الوسط (Héktoen).

▪ تحضر الأقراص المصنوعة من ورق واتمان رقم (3) والتي تكون بقطر 6 مم بوضعها في أنبوب اختبار زجاجي يحوي 10 مل من الماء المقطر في جهاز (Autoclave) لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 120م° بعدها يتم التخلص من الماء ثم توضع الأقراص في الحاضنة حتى تجف.

▪ من أجل تقدير الفعالية أو النشاط المضاد للبكتيريا أنجز الأنتيبيوغرام بواسطة طريقة الإنتشار على وسط جيلوزي [1، 2، 3] إذ تعتبر هذه الطريقة غير مكلفة مقارنة بالطرق الأخرى إضافة إلى أنها تسمح بتحديد حساسية البكتيريا للمركبات المضادة لها، وتحديدًا قمنا بتطبيق تقنية (NCCLS) :

National Committee for Clinical Laboratory Standards

ويختلف تطبيق هذه التقنية حسب نوع البكتيريا إذا كانت متطلبة لشروط خاصة (exigeante) أو غير متطلبة لهذه الشروط.

وأهم الخطوات المتبعة لتحقيق الأنتيبيوغرام حسب تقنية (NCCLS) مع البكتيريا التي لا تتطلب لشروط خاصة هي:

✓ الوسط

يسكب الجيلوز Mueller-Hinton في علب بيتري بحيث يكون ارتفاعه 4 مم ثم يترك ليحف قبل الاستعمال.

✓ اللقاح البكتيري Inoculum

1- يتم كشط خمس مستعمرات متباعدة عن بعضها البعض ومتشابهة من مزرعة بكتيرية عمرها 18 ساعة بواسطة إبرة تلقح بلاتينية (anse de platine).

2- تغمر إبرة التلقح في أنبوب به 10 مل من الماء المقطر ويرج الأنبوب جيدا للحصول على معلق بكتيري.

✓ L'ensemencement الزرع

- 1- بعد مرور 15 دقيقة على تحضير اللقاح البكتيري تغمر ممسحة (écouvillon) في الأنبوب الحاوي على المعلق البكتيري.
- 2- يمسح كامل سطح علبة بيتري المحضرة سابقا في اتجاه واحد من الأعلى للأسفل تكرر العملية مرتين بحيث تدار العلبة بزاوية 60 في كل مرة .
- 3- توضع الأقراص الحاوية على المستخلص مباشرة (تركيز المستخلص).
- 4- بعد غلق العلب تترك لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة عادية ثم توضع بعدها في الحاضنة لمدة 18 ساعة على درجة حرارة 35 م°.

✓ القراءة

بعد مرور 18 ساعة تتم القراءة بقياس مناطق التثبيط (Zone d'inhibition) بدقة بواسطة مسطرة .

ملاحظة:

بالنسبة للبكتيريا المتطلبة لشروط خاصة (exigeantes) تتبع نفس الخطوات السابقة باستثناء وسط النمو إذ يتم استعمال الوسط Mueller-Hinton +5% دم خروف. أما عن اللقاح البكتيري فيحضر انطلاقا من مزرعة عمرها من 20 إلى 24 ساعة.

II.1.2. الطريقة العملية لتحديد CMI

- تحضر مجموعة من تراكيز مختلفة للمستخلص [4] و ذلك بإذابة 20 ملغ من المستخلص البوتانولي للنبذة في 10 مل من الإيثانول، يسمى المحلول المحصل عليه بالمحلول الأم وانطلاقا من هذا الأخير يتم تحضير سلسلة من التراكيز المتناقصة.
- يتم تحضير مزارع بكتيرية في الطور الثابت للنمو لكل سلالة من السلالات تحت الدراسة.
- يؤخذ حجم قدره (0.1 مل من العصويات السالبة الغرام، 0.3 مل من *S. aureus*، *P. aeruginosa*، 0.6 مل من *Streptocoque*) من هذه المزرعة وتوضع في أنبوب اختبار يحوي 10 مل من الوسط Mueller-Hinton.

- يتم وضع الأنابيب في حمام مائي درجة حرارته 37 م° لمدة تتراوح ما بين 3 إلى 5 ساعات مع الرج لحين بداية ظهور تعكر طفيف، هذا التعكر يدل على أن كل أنبوب يحوي حوالي $10^7 \times 5$ بكتيريا/مل.
- يؤخذ 1 مل من كل أنبوب ويوضع في أنبوب آخر يحوي 10 مل من الوسط Mueller-Hinton درجة حرارته 37 م°.
- تؤخذ علب بيترى فارغة ليوضع في كل علبه 2 مل من تركيز معين من التراكيز المحضرة سابقا ثم يضاف إلى كل علبه 18 مل من الوسط Mueller-Hinton ذائب درجة حرارته 45 م°.
- تحرك العلب جيدا لأجل ضمان الانتشار الجيد للمستخلص في كامل العلبه، ثم تترك لتجمد وتجف لمدة 30 دقيقة في الحاضنة درجة حرارتها 37 م°.
- تؤخذ علب كشاهد تحوي 18 مل من الوسط Mueller-Hinton و 2 مل من الماء المقطر عوضا عن 2 مل من المستخلص .
- بعد أن تصبح العلب جاهزة تتم عملية الزرع على كل علبه بشكل (Strie) بواسطة إبرة التلقيح البلاتينية.
- في اليوم الثاني تتم قراءة نتائج العلب ومن ثم تحديد أصغر تركيز مثبت للبيكتيريا CMI [5].

ملاحظة:

- 1- إضافة إلى تعويض الوسط (M.H) بالوسط (Chocolat) بالنسبة للبيكتيريا المتطلبة لشروط، تمت عملية الحضان في حاضنة خاصة تحتوي على CO_2 .
- 2- من أجل ضمان الحصول على نتائج متناهية الدقة فقد كنا نحرص على إعادة كل تجربة من 3 إلى 4 مرات.

II. 2. النتائج والمناقشة

II.2.1. تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص الكلوروفورمي للنبتة

: *Eryngium triquetrum Vahl.*

فكما ذكرنا سابقا تمت القراءة بعد مرور 18 ساعة بقياس مناطق التثبيط (Zone d'inhibition) بواسطة مسطرة، النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول 3:

جدول 3. الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص الكلوروفورمي للنبتة

(*E. triquetrum Vahl.*) (أقطار مناطق التثبيط)

القطر (mm)		السلالة
المستخلص الكلوروفورمي (128 µg/ml)	Fosfomycine (10 µg/ml)	
22	30	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
12	19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
18	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
19	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH
24	32	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300
30	—	<i>Streptococcus</i> SH

أظهر المستخلص الكلوروفورمي فعالية مضادة للبكتيريا معتبرة مع كل السلالات المدروسة و قد كانت هذه الفعالية جيدة خاصة مع السلالات البكتيرية الموجبة الغرام حيث وصل قطر التثبيط 30 mm مع *Streptococcus* SH و 24 mm مع *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

II.2.2. تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي للنبتة *Ammi visnaga* L.

النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول 4:

جدول 4. الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي للنبته *Ammi visnaga* L. (أقطار مناطق التثييط)

القطر (mm)		السلالة
الزيت الأساسي (128 µg/ml)	Ampicilline (10 µg/ml)	
29	18	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
25	—	<i>Escherichia coli</i>
25	30	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300
16	—	<i>Staphylococcus aureus</i>
25	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
20	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20	—	<i>Enterobacter aerogenes</i>
23	14	<i>Klebsiella pneumonia</i>

أعطى الزيت الأساسي للنبته *Ammi visnaga* L. فعالية جيدة مضادة للبكتيريا خاصة مع السلالات المرجعية *Escherichia coli* ATCC 25922 ، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ، *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 حيث قدرت أقطار التثييط بـ 29 mm ، 25 mm ، و 25 mm على الترتيب.

أما بالنسبة لقيم CMI فهي مدونة في الجدول 5:

جدول 5. الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي للنبته *Ammi visnaga* L.

(قيم CMI)

CMI		السلالة
الزيت الأساسي (128 µg/ml)	قيم Ampicilline (10 µg/ml)	
16	10	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
16	—	<i>Escherichia coli</i>
32	5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300
32	—	<i>Staphylococcus aureus</i>
16	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
16	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16	—	<i>Enterobacter aerogenes</i>
16	32	<i>Klebsiella pneumonia</i>
16	—	<i>Morganella morganii</i>

جاءت نتائج هذا الاختبار لتؤكد نتائج الأنتيبوغرام فلم تتعدى CMI 16 µg/ml مع كل السلالات المدروسة.

المراجع

- [1] Barry, A. (1986). Procedure for testing anti microbial agents in agar media, 2nd edition.
- [2] Bauer, A.W., Kirby, W., Sherris, I., Turk, M. (1986). Antibiotic susceptibility a standardized single disc methods. Am. J. clin. Pathol. (45), 493.
- [3] Ericsson, H. M., Sherris, J.C. (1971). Acta Pathol, microbiolscan, Sect. B, suppl, (217), 1.
- [4] Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A.(1987). Bactériologie médicale, Techniques usuelles. SIMEP. Paris.
- [5] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 6th ed. Approved standard. M2-A6, Wayne, PA.

الخاتمة

الخاتمة

لقد انصب اهتمام مخبرنا منذ سنوات على دراسة النباتات الطبية الجزائرية، و كامتداد لهذه الأبحاث قمنا باختيار ثلاث أنواع نباتية أصلية تنتمي إلى عائلتين تتميزان بفعالية بيولوجية عالية، هذه النباتات هي:

Ammi visnaga L. و *Eryngium triquetrum* Vahl. (Apiaceae)

Astragalus armatus Willd. (Fabaceae)

حيث كان الهدف الأساسي هو فصل و تحديد منتجات الأيض الثانوي الفلافونيدي لكل من النباتين *Astragalus armatus* Willd. ، *Eryngium triquetrum* Vahl. و فصل الزيت الأساسي للنباتة *Ammi visnaga* L. و أخيرا دراسة الفعالية البيولوجية للزيت الأساسي المفصول و لبعض من مستخلصات النباتة *Eryngium triquetrum* Vahl.

أدت الدراسة الفيتوكيميائية للنباتين الأولتين إلى فصل 11 مركب فلافونيدي و التعرف على بنية مركبين آخرين، حيث تم فصل هذه المركبات باستعمال تقنيات الفصل المعتادة بدءا بالإستخلاص الذي تليه تقنيات الفصل الكروماتوغرافية من كروماتوغرافيا العمود و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، أنهينا عمليات الفصل بتنقية للمركبات المفصولة أين تحصلنا عليها في صورتها النقية حيث أصبحت جاهزة لدراستها بنيويا، و قد اعتمدنا في تحديد بنى المركبات المفصولة على الطرق التحليلية منها الفيزيائية و الكيميائية، حيث تتمثل الفيزيائية في مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد من *Cosy* ، *HMBC* ، *HMQC* في حالات و في حالات أخرى تقنية *HPIC* و *UV-DAD-MS* و أخيرا مطيافية الكتلة، أما الكيميائية فتتمثل في الإمهاء الحمضية و الخواص الكروماتوغرافية.

كل هذه التقنيات أدت إلى وضع الصيغ المفصلة التالية:

➤ بالنسبة للنباتة *Astragalus armatus* Willd. تم فصل 8 مركبات فلافونيدية منها إثنان ثنائية السكر فصلت لأول مرة في النوع و هي:

- 1- isorhamnetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside]
- 2- Kaempférol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside]

و أربعة ثلاثية السكر واحد منها فصل لأول مرة من النوع و هو:

- 3- Isorhamnetin-3-O-[α -L-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}]- β -D-galacopyranoside]

و آخر فصل لأول مرة من الجنس

- 4- Kaempférol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl -(1 \rightarrow 2)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}]- β -D- glucopyranoside]

و إثنان فصلت و لأول مرة في المملكة النباتية و هي:

- 5- *tamarixetin-3-O- [α -L-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- { α - L - rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}]- β -D-glucopyranoside]*

- 6- *Isorhamnetin-3-O-[(5''-p-hydroxybenzoyl)- α -L-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6) }]- β -D-galacopyranoside]*

و إثنان تم تحديد بنيتها الكيميائية و هي:

- 7- Isorhamnetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}]- β -D-galactopyranoside]

حيث يعتبر جديد في الجنس و

- 8- Kaempférol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- { α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}]- β -D-galactopyranoside]

الذي يعتبر جديد في النوع.

➤ أما بالنسبة للنبته *Eryngium triquetrum* Vahl. فقد تم فصل 5 مركبات فلافونيدية منها ثلاثة أحادية السكر و هي:

- 1- Kaempférol-3-O- β -D-glucopyranoside
2- Kaempférol-3-O-[(2'',6''- di-O-E-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside]

جديدة في النوع أما

- 3- Kaempférol-3-O-[(6''-O-E-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside]

فهو جديد في الجنس.

و إثنان ثنائية السكر و هي:

4- Kaempférol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside]

جديد في الجنس أما

5- Quercetin-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside]

فيعتبر جديد في النوع.

مكننا تحليل **gc** و **gc/ms** للزيت الأساسي للنبذة *Ammi visnaga* L. من التعرف على 21 مركب، حيث تمثل هذه المركبات نسبة 97.3% من مجمل المركبات المحتواة في هذا الزيت، المركبات التي ظهرت بنسبة أكبر تتمثل في isobutyl isobutyrate (14.0%)، linalool (12.1%)، 2,2-croweacin (7.3%)، bornyl acetate (6.0%)، thymol (30.1%)، dimethylbutanoic acid (12.2%).

أظهر المستخلص الكلوروفورمي للنبذة (*Apiaceae*) *Eryngium triquetrum* Vahl فعالية مضادة للبكتيريا جيدة مع *Streptococcus* SH (30 mm) و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (24 mm) *Staphylococcus*.

كما أظهر الزيت الأساسي للنبذة (*Apiaceae*) *Ammi visnaga* L. فعالية مضادة للبكتيريا خاصة مع السلالات المرجعية *Escherichia coli* ATCC 25922، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 حيث أعطى أقطار مناطق تثبيط مقدر بـ 29 mm، 25 mm و 25 mm.

أما المستخلص البوتانولي للنبذة (*Apiaceae*) *Eryngium triquetrum* Vahl فقد أظهر فعالية مضادة للأكسدة جيدة باستعمال طريقة DPPH.

الملخص

خلال هذا البحث قمنا بدراسة فيتوكيميائية و بيولوجية للنباتات: *Astragalus armatus* Willd. (Fabaceae)،
Ammi visnaga L. (Apiaceae) و *Eryngium triquetrum* Vahl . (Apiaceae)

الدراسة الفيتوكيميائية للنباتة *Astragalus armatus* Willd. (Fabaceae) أدت إلى فصل ثمان فلافونولات
جليكوزيدية إثنان من بين هذه الأخيرة تعتبر **جديدة في المملكة النباتية** حيث فصلت لأول مرة،
أربعة فصلت لأول مرة في النوع و إثنان منها فصلت لأول مرة في الجنس.

الدراسة الفيتوكيميائية للنباتة *Eryngium triquetrum* Vahl . (Apiaceae) أدت إلى فصل خمس
فلافونولات جليكوزيدية، ثلاثة منها تعتبر جديدة في النوع و إثنان جديدة في الجنس.

تم التعرف على البنى الكيميائية لهذه الفلافونولات باستخدام التقنيات الطيفية والمتمثلة في **UV** و
 ^{13}C RMN و ثنائية البعد بمختلف تقنياتها (**COsy, HMQC, HMBC**) إلى جانب مطيافية الكتلة
وفي بعض الحالات تقنية **HPLC-UV-DAD-MS**، إضافة إلى الحلمهة الحمضية.

إضافة إلى هذا قمنا بإجراء التحليل باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي **GC** و كروماتوغرافيا
الطور الغازي بالتزواج مع مطيافية الكتلة **GC/MS** للزيت الأساسي للنباتة
Ammi visnaga L. (Apiaceae) حيث مكننا من التعرف على 21 مركب، ثلاثة منها تعتبر أعضوية وهي:
acide 2,2-Dimethylbutanoïque (30.1 %) ، isobutyl isobutyrate (14.0 %) و croweacin (12.2 %)

أظهر المستخلص الكلوروفورمي للنباتة *Eryngium triquetrum* Vahl . (Apiaceae) فعالية مضادة
للبكتيريا جيدة مع *Streptococcus* SH (30 mm) و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (24 mm).

كما أظهر الزيت الأساسي للنباتة *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) فعالية مضادة للبكتيريا جيدة خاصة
مع السلالات المرجعية *Escherichia coli* ATCC 25922 ، *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 حيث أعطى أقطار تثبيط مقدرة بـ 29 mm ، 25 mm
و 25 mm على الترتيب.

أما المستخلص البوتانولي للنباتة *Eryngium triquetrum* Vahl . (Apiaceae) فقد أظهر فعالية مضادة
للأكسدة جيدة باستعمال طريقة DPPH.

الكلمات المفتاحية: فلافونولات جليكوزيدية، الزيت الأساسي، الفعالية المضادة للبكتيريا، الفعالية المضادة للأكسدة،
Ammi visnaga L. ، *Eryngium triquetrum* Vahl. ، *Astragalus armatus* Willd. ، Fabaceae ، Apiaceae

Résumé

Nous avons réalisé une étude phytochimique et établi les activités biologiques des espèces *Astragalus armatus* Willd. (Fabaceae), *Eryngium triquetrum* Vahl. (Apiaceae) et *Ammi visnaga* L. (Apiaceae).

L'étude de l'espèce *Astragalus armatus* Willd. a conduit à huit flavonols glycosylés parmi lesquels deux sont isolés pour la première fois du règne végétal, deux sont nouveaux dans le genre et quatre sont nouveaux pour l'espèce.

L'étude de l'espèce *Eryngium triquetrum* Vahl. a conduit à cinq flavonols glycosylés parmi lesquels trois sont nouveaux dans l'espèce et deux sont nouveaux dans le genre.

Ces produits ont été identifiés grâce à l'utilisation des méthodes spectrales d'analyse telles que l'ultra-violet, la RMN du proton unidimensionnelle, la RMN du C-13, la RMN bidimensionnelle (COSY, HSQC, HMBC), la spectrométrie de masse en plus la technique de HPLC-UV-DAD-MS.

L'analyse GC et GC / MS de l'huile essentielle de l'espèce endémique *Ammi visnaga* L. a permis d'identifier 21 composés dont l'acide 2,2-diméthylbutanoïque (30.1 %), isobutyl isobutyrate (14.0 %) et croweacin (12.2 %) sont majoritaires.

L'extrait chloroformique de l'espèce *Eryngium triquetrum* Vahl. a montré une meilleure activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (24 mm) et *Streptococcus* SH (30 mm).

l'huile essentielle de l'espèce *Ammi visnaga* L. a considérablement inhibé la croissance de *Escherichia coli* ATCC 25922 (29 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (25 mm) et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (25 mm).

L'extrait butanolique de l'espèce *Eryngium triquetrum* Vahl. a montré une bonne activité antioxydante en utilisant la méthode du DPPH.

Mots clés: flavonols glycosylés, huile essentielle, activité antioxydante, activité antibactérienne, Apiaceae, Fabaceae, *Astragalus armatus* Willd., *Eryngium triquetrum* Vahl., *Ammi visnaga* L.

Abstract

We've realized a phytochemical study and established biological activities of the species *Astragalus armatus* Willd. (Fabaceae), *Eryngium triquetrum* Vahl. (Apiaceae) and *Ammi visnaga* L. (Apiaceae).

Eight flavonol glycosides, from which two are isolated for the first time from a natural source, two are new for the genus and four are new for the species, have been isolated from *Astragalus armatus* Willd.

Five flavonol glycosides, from which two are isolated for the first time from the genus and three for the first time from the species, have been isolated from *Eryngium triquetrum* Vahl.

These products have been identified by the use various spectral methods like one-dimensional proton NMR, 13-C NMR, two-dimensional NMR (COSY, HMQC, HMBC), Mass spectrometry and HPLC-UV-DAD-MS.

21 compounds have been identified in the hydrodistilled essential oil of *Ammi visnaga* L., by the use of GC and GC/MS analyses, with 2,2-dimethylbutanoic acid (30.1 %), isobutyl isobutyrate (14.0 %) and croweacin (12.2 %) as main compounds.

The chloroform extract showed the best antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (24 mm) and *Streptococcus* SH (30 mm) .

The essential oil of *Ammi visnaga* L. inhibited strongly the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 (29 mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (25 mm) and *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (25 mm).

The butanolic extrac exhibited a good antioxidant activity, by the use of the DPPH method.

Key words: flavonol glycosides, essential oil, antioxidant, antibacterial activity, Apiaceae, Fabaceae, *Astragalus armatus* Willd., *Eryngium triquetrum* Vahl., *Ammi visnaga* L.