

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1

قسم : الكيمياء

كلية العلوم الدقيقة

رقم الترتيب :.....

رقم التسلسل :.....

رسالة

مقدمة لنيل شهادة الدكتوراه في العلوم

تخصص كيمياء صيدلانية

شعبة كيمياء النبات

بعنوان

دراسة فيتوكيميائية لنوعين من جنس *Ormenis*  
(*O. mixta* (L.) Dumort, *O. praecox* (Link) Brik.&Cavill) (Asteraceae)  
و تحديد المحتوى الفينولي للمستخلص الهيدروميثانولي  
للنبته *Ammoides atlantica* (Coss.&Durieu) H. Wolff (Apiaceae)  
بواسطة التقنية RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS و نشاطه المضاد للأكسدة

تقديم الطالبة

بن ثلجون منيرة حرم سيفي

أعضاء اللجنة

رئيسا

أستاذ بجامعة الإخوة منتوري- قسنطينة 1

أ.د. كعبوش أحمد

مشرفة

أستاذة بجامعة الإخوة منتوري- قسنطينة 1

أ.د. كعبوش زهية

ممتحنا

أستاذ بجامعة صالح بوبنيدر-قسنطينة 3

أ.د. بلخيري عبد المالك

ممتحنة

أستاذة محاضرة بجامعة عبد الحفيظ بوصوف- ميله

د. خلف الله أسيا

2022/11/24

## الاهداء

استعنت بالله تعالى على عجزى فأعانني ، و توكلت عليه فساعدني

في تقديم هذا العمل الذي أهديه :

إلى روح أبي الطاهرة و إلى أمي العزيزة حفظها الله .

إلى كل أفراد العائلة

إلى زوجي الصبور و بناتي إسراء و رزان.

إلى كل أفراد عائلتي الذين ساعدوني من قريب أو بعيد و شجعوني

في انجاز بحثي، و إلى كل سائر في طريق البحث العلمي .

# كلمة شكر

أحمد الله و أشكره الذي بفضلله و عونته تم انجاز هذا العمل .

يشرفني أن أتقدم بجزيل الشكر و عظيم الامتنان إلى الأستاذة الفاضلة كعبوش زهية أستاذة التعليم العالي بجامعة قسنطينة 1 الذي تشرفت بانجاز هذا العمل تحت إشرافها و بذل جهدا كبيرا في توجيهي و تعليمي أسس البحث ، أفادتني بنصائحها القيمة و لم تبخل علي بأي شيء فشكرا جزيلا .

كما أتقدم بأسمى معاني الشكر و عظيم الامتنان للأستاذ الكريم الأستاذ كعبوش أحمد : أستاذ التعليم العالي بجامعة قسنطينة 1 الذي ساعدني ، وجهني و لم يبخل علي بنصائحه لم يبخل علي بأي شيء فشكرا جزيلا كما أشكره على قبوله رئاسة لجنة المناقشة .

إلى كل أعضاء اللجنة: الأستاذ بلخيري عبد المالك جامعة صالح بوبنيدر-قسنطينة 3، الدكتورة خلف الله أسيا المركز الجامعي عبد الحفيظ بوصوف- ميلة لقبولهما مناقشة بحثي و وقتهم الثمين الذي منحوه من أجل قراءة و مناقشة هذه الأطروحة.

أتقدم بشكري الجزيل إلى الأستاذة Nunziatina de Tommasi التي فتحت لي باب البحث العلمي بجامعة Degli Salerno -إيطاليا - و التي ساعدتني في إجراء التحاليل الكيميائية الخاصة بالمركبات المفصولة بمخبر الصيدلة ، و إجراء الفعالية البيولوجية إلى كل طلبتها الذين ساعدوني و أخص بالذكر Anna Maria Iannuzzi و Massimiliano D'Ambola .

كما أوجه شكري للزميلين بن سويسي شوقي ، بوديار طارق على مساعدتي في إجراء تحليل LC/MS/MS و إجراء الفعالية البيولوجية بمركز الأبحاث قسنطينة.

كما أشكر الأستاذ بلعابد قدور بالمستشفى الجامعي ابن باديس قسنطينة في إجراء الفعالية المضادة للبيكتيريا.

أنوه بدوري جميع الأساتذة الباحثين بمخبرنا، مخبر التحصل على المواد العلاجية L.O.S.T و خاصة خلف الله أسيا ، بشكري سارة، غراب حميدة ، بن مرعاش عباس ، بن سويسي شوقي ، بوديار طارق .

**Solvants et réactifs**

ACN	Acétonitrile
AcOEt	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
AlCl <sub>3</sub>	chlorure d'aluminium
BuOH	butanol
CHCl <sub>3</sub>	chloroform
CD <sub>3</sub> OD	méthanol deutéré
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
Cu	Cuivre
Cu-NC	Cuivre-neocuproéne
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	éthanol
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	acide sulfurique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxide d'hydrogène
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	acide borique
HClO	hypochlorous
HCl	acide chlorhydrique
i-Bu	isobutryl
Mac	methacryloyl
MeOH	méthanol
NaOAc	sodium anhydre en poudre acétate
NaOH	hydroxyde de sodium
SiO <sub>2</sub>	dioxyde de silicium

**Unités**

AGE/mg	acide gallique équivalent par milligramme
Hz	hertz
ppm	parties par million
QE/mg	quercétine équivalent par milligramme
δ	delta déplacement chimique (ppm)
λ	Lambda longueur d'onde
L	Litre
mL	Mililitre
mm	millimètre
min	Minute
nm	nanomètre
Kg	Kilogramme

## قائمة المختصرات

---

g	gramme
µg	Microgramme
uma	Unite de masse atomique

### Techniques phytochimiques

HPLC-DAD-MS/MS	electrospray ionization tandem mass spectrometry
RMN- <sup>13</sup> C	résonance magnétique nucléaire du <sup>13</sup> Carbon
RMN- <sup>1</sup> H	résonance magnétique nucléaire du proton
RP-C18	Silice phase inverse
CC	chromatographie sur colonne
CCM	chromatographie sur couche mince
CG	chromatographie gazeuse
d	doublet
dd	doublet de doublet
DO	densité optique
GC-MS	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
I %	pourcentage d'inhibition
J (Hz)	constante de couplage (Hz)
S	M solution mère
T	triplet
Q	quartet
S	singulet
T <sub>R</sub>	temps de rétention
UV / Vis	Ultraviolet – Visible
UV	ultra-violet

### Biologie et activités biologiques

ATTC	american Type Culture Collection (type de culture de la collection americaine)
ATBS <sup>+</sup>	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) de cation radicalaire
BHA	butyle hydroxyle anisole
BHT	butyle hydroxyle toluene
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Cat	Catalase.
COX-2	cyclooxygenase-2
D	diamètre d'inhibition
DHA	dehydroascorbic
DMAPP	dimethylallyl pyrophosphate
DPPH	1,1-diphenyl -2- radical picrylhydrazyl

## قائمة المختصرات

FPP	Farnesylpyrophosphate
EDTA	Ethylène diamine tetra acetic acid
GAE	Gallic acid
GN	gélose nutritif
Gpx	Glutathion peroxydase
Gram (-)	coloration de Gram négative
Gram (+)	coloration de Gram positive
GSH	Reduced glutathione
GSSH	Disulfid glutathione
GPx	Glutathion peroxidase
GSH	Gluthathion
GSSG	Oxidized glutathione
IC <sub>50</sub>	50% concentration inhibitrice
IPP	isopentenyl pyrophosphate
IVGTT	Injection vasculaire glucose Tolerance Teste
MH	agar Muller – Hinton
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium
NADP	nicotinamide adénine phosphate
NBT	Nitroblue tetrazolium
NO	Oxyde nitrique
OGTT	Oral glucose ToleranceTest
OPP	pyrophosphate
PMS	phenazine methosulfate
ROO°	Radical Pyroxyle
ROS	Reactive oxygen species.
SOD	Superoxide dismutase
TCA	temps de céphaline
TPTZ	2,4,6-Tripyridil-s-triazine ferrique
Vit C	Vitamine C
Vit E	Vitamine E

μQE mg d'extrait : microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

WST 8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)

### Les plantes

AA-E	extract of <i>A. atlantica</i>
AA	<i>Ammoides atlantica</i>
<i>O.Mixta</i>	<i>Ormenis mixta</i>
<i>O.praecox</i>	<i>Ormenis praecox</i>

الصفحة	العنوان
1	المقدمة
4	المراجع
	الجزء الأول: الدراسة البيبلوغرافية
5	الفصل الأول : عائلة Apiaceae
5	مدخل
5	1-I- تعريف العائلة الخيمية (Apiaceae)
5	2-I- التوزيع الجغرافي للعائلة ( Apiaceae )
9	3-I- الخصائص المرفولوجية
10	4-I- التصنيف العلمي للعائلة الخيمية ( Apiaceae )
10	5-I- أهمية العائلة الخيمية ( Apiaceae )
11	6-I- المركبات المفصولة من العائلة الخيمية
12	1-6-I- مركبات الفلافونيدات
13	1-1-6-I- الفلافونيدات الجليكوزيدية
18	2-1-6-I- الفلافونيدات الأجليكونية
20	2-6-I- المركبات الاسيتلينية
21	3-6-I- الكومارينات
22	1-4-6-I- المركبات التربينية
23	2-4-6-I- المركبات السييسكويتربينية اللاكتونية
25	3-4-6-I- التربينات الثنائية
26	4-4-6-I- التربينات الثلاثية
26	5-6-I- الزيوت العطرية الأساسية
29	7-I- الدراسة الكيميائية لنبات <i>Ammoides atlantica</i>
29	1-7-I- وصف النوع
30	2-7-I- التوزيع الجغرافي
30	3-7-I- التصنيف النظامي للنبته
30	4-7-I- الاستخدامات التقليدية
30	5-7-I- المسح الكيميائي للجنس <i>Ammoides</i>
37	6-7-I- المسح البيولوجي للجنس <i>Ammoides</i>
39	المراجع

	الفصل الثاني : عائلة Asteraceae
46	مدخل
47	1-II-التوزيع الجغرافي للعائلة النجمية ( Asteraceae )
48	2-II-الأهمية الاقتصادية للعائلة الخيمية (Asteraceae)
48	3-II-الخصائص المرفولوجية
49	4-II-التصنيف العلمي للعائلة النجمية ( Asteraceae )
50	5-II-الجنس <i>Ormenis</i>
51	6-II-الفعالية البيولوجية للأجناس <i>Ormenis</i> ، <i>Chamaemelum</i> و <i>Cladanthus</i>
52	7-II-نواتج الأيض الثانوي للجنس <i>Ormenis</i>
56	8-II-الدراسة النباتية لـ <i>Ormenis mixta</i>
57	9-II-التصنيف النظامي للنبتة
57	10-II-الدراسة الفيتوكيميائية للنبتة <i>Ormenis mixta</i>
58	11-II-الدراسة النباتية لـ <i>Ormenis praecox</i>
58	1-11-II- وصف النباتة <i>Ormenis praecox</i>
59	12-II- نواتج الأيض الثانوي للنوع <i>Ormenis praecox</i>
60	المراجع
	الفصل الثالث : مطيافية الكتلة الترادفية
64	1-III- نبذة تاريخية
64	2-III- كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC)
67	3-III- مطيافية الكتلة الترادفية Tandem
68	4-III-تحليل عديد الفينولات بتقنيات SM مع مختلف التزاوجات
72	5-III- المركبات الفينولية
72	1-5-III-تعريف المركبات الفينولية
73	2-5-III-مصدرها
73	3-5-III-أقسام عديدات الفينولات
74	1-3-5-III-الاحماض الفينولية
75	1-1-3-5-III- مشتقات حمض البنزويك
75	2-3-5-III- مشتقات حمض السيناميك
76	6-III- الفلافونويدات

77	III-6-1- تقسيم الفلافونويدات
78	III-6-2 - التخليق الحيوي للفلافونويدات
79	III-7- اللجينيئات
81	III-7-1 - أقسام اللجينيئات
82	III-7-2 - الفعالية البيولوجية لمركبات اللجينيئات
83	III-8 - السيسكويتربينات Sesquiterpène
84	III-8-1 - أقسام السيسكويتربينات اللاكتونية
85	III-8-2 - التخليق الحيوي للسيسكويتربينات
87	III-8-3 - الفعالية البيولوجية للسيسكويتربينات اللاكتونية
88	المراجع
<b>الفصل الرابع : الفعالية البيولوجية</b>	
92	IV-الفعالية المضادة للأكسدة
93	IV-2-1- مضادات الأكسدة الأنزيمية
94	IV-2-1-2-الكاتالاز (Catalase)
94	IV-3-1-2- <i>Glytathion peroxydase(Gpx)</i>
94	IV-2-2- مضادات الأكسدة غير الأنزيمية
95	IV-2-2-2- الفيتامين E
96	IV-3-2-2- $\beta$ كاروتين (carotène)
97	IV-4-2-2- أنزيم الجلثاثيون (Glutathion)
97	IV-3-الفعالية المضادة للبكتيريا
97	IV-1-3- مقدمة
98	IV-2-3-الخصائص المرفولوجية و مميزات السلالات البكتيرية المدروسة
98	IV-1-2-3- نوع <i>Escherchia coli</i>
98	IV-2-2-3- نوع <i>Pseudomonas aerouginosa</i>
98	IV-3-2-3- نوع <i>Staphylococcus aureus</i>
99	IV-4-2-3- نوع <i>Klebsiella pneumonia</i>
99	IV-5-2-3- جنس <i>Entérobacter</i>
99	IV-6-2-3- جنس <i>Salmonilla</i>
99	IV-7-2-1-3- نوع <i>Shigella dysenteriae</i>

100	4-IV- التركيز الأدنى المثبط للنمو البكتيري (CMI)
100	5-IV-دراسة التأثير المضاد للبكتيريا
100	6-IV-تحضير السلالات البكتيرية
101	7-IV-تحضير الأقراص
103	8-IV-الفعالية المضادة للتكاثر Activité Antiproliférative
103	1-8-IV- MTT وأملاح التترازوليوم ذات الصلة
104	2-8-IV-أهمية اختبار MTT
106	المراجع
الجزء 02: الدراسة الكيميائية للنباتات <i>Ammoides atlantica</i> ، <i>Ormenis mixta</i> و <i>Ormenis Praecox</i>	
الفصل الأول: تحليل المستخلص الهيدروميثانولي للنباتة <i>Ammoides atlantica</i> بتقنية RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS و تحديد نشاطه المضاد للأكسدة	
111	I-الدراسة الكيميائية للنباتة <i>Ammoides atlantica</i>
111	I-1-المادة النباتية
111	I-2- طريقة استخلاص النباتة
111	I-3-شروط الكروماتوغرافيا و قياس الطيف الكتلي
112	I-4- الطريقة المستخدمة HPLC-DAD-MS/MS
115	I-5-تحديد نشاط مضادات الأكسدة
115	I-6-التقدير الكمي للمركبات الفينولية و الفلافونويدية للمستخلص الهيدروكحولي
115	I-6-1-التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية
115	I-6-2-التقدير الكمي للمركبات الفلافونويدية
116	I-7- تقدير الفعالية المضادة للأكسدة
120	المراجع
الفصل الثاني : الدراسة الفيتوكيميائية للنباتة <i>Ormenis mixta</i> و دراسة الفعالية المضادة للتكاثر	
122	II-الدراسة الكيميائية للنباتة <i>Ormenis mixta</i>
122	II-1- الدراسة النباتية
122	II-2- طريقة الاستخلاص
124	II-3- طريقة الفصل و التنقية
127	II-4-الفعالية المضادة للتكاثر Activité Antiproliférative

	<b>الفصل الثالث: الدراسة الفيتوكيميائية للنبته <i>Ormenis Praecox</i> ودراسة الفعالية البيولوجية</b>
128	III-الدراسة الكيميائية للنبته <i>Ormenis Praecox</i>
128	III-1-المادة النباتية
128	III-2-طريقة الاستخلاص
130	III-3-المسح الفيتوكيميائي للنبته <i>Ormenis Praecox</i>
130	III-3-1-الكشف عن المركبات الفينولية
130	III-3-2-الكشف عن الفلافونويدات
130	III-3-3-الكشف عن القلويدات
130	III-3-4-الكشف عن التانينات Tanins
130	III-4-الفصل و التنقية
130	III-4-1-دراسة المستخلص البيوتانولي
134	III-4-2-دراسة المستخلص الكلوروفورمي
136	III-5-الفعالية البيولوجية
136	III-5-1-تقدير المحتوى الكلي للفينولات لنبات <i>Ormenis praecox</i>
136	III-2-الفعالية المضادة للأكسدة
137	III-2-5-الفعالية المضادة للبكتيريا
140	المراجع
<b>الجزء 03: مناقشة النتائج</b>	
<b>الفصل الأول: المركبات المفصولة من النبتة <i>Ammoides atlantica</i></b>	
142	I-1-التعين البنوي للمركبات المفصولة من النبتة <i>Ammoides atlantica</i>
142	I-1-1- حمض الهيدروكسي سيناميك و مشتقاته
142	I-1-2- أحماض الهيدروكسي بنزويك و مشتقاته
143	I-1-3- مركبات الفلافونويد
143	I-2- مركبات أخرى
152	I-2- تحديد المحتوى الفينولي والنشاط المضاد للاكسدة للمستخلص الهيدروكولي AA-E
152	I-3- النشاط المضاد للأكسدة
154	المراجع
<b>الفصل الثاني: المركبات المفصولة من النبتة <i>Ormenis mixta</i> ودراسة الفعالية المضادة للتكاثر</b>	
159	II-1: التعيين البنوي للمركب 1
170	II-2: التعيين البنوي للمركب 2

181	3-II : التعيين البنيوي للمركب 3
192	4-II : التعيين البنيوي للمركب 4
202	5-II : التعيين البنيوي للمركب 5
212	6-II-المركبات المعروفة معزولة من النبتة <i>O. mixta</i> .
214	6-II-النشاط المضاد للتكاثر
215	7-II:المراجع
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة <i>Ormenis praecox</i> ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا	
216	1-III-نتائج الكشف عن نواتج الأيض الثانوي
217	2-III-التعین البنيوي للمركبات المفصولة من نبتة <i>Ormenis praecox</i>
217	1-2-III-تحديد بنى المركبات المفصولة من المستخلص الكلوروفورمي
217	1-1-2-III-التعین البنيوي للمركب P <sub>1</sub>
234	2-1-2-III-التعین البنيوي للمركب P <sub>2</sub>
235	3-1-2-III-التعین البنيوي للمركب P <sub>3</sub>
235	4-1-2-III-التعین البنيوي للمركب P <sub>4</sub>
236	2-2-III-تحديد بنى المركبات المفصولة من المستخلص البيوتانولي
236	1-2-2-III-التعین البنيوي للمركب P <sub>5</sub>
243	3-2-III-التعین البنيوي للمركب P <sub>6</sub>
251	4-2-III-التعین البنيوي للمركب P <sub>7</sub>
265	3-III-تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا
265	1-3-III-تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص الايثانولي للنبتة <i>Ormenis Praecox</i>
267	2-3-III-التقدير الكمي لمتعدد الفينول
268	4-III- اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH
270	المراجع
	الخاتمة

الصفحة	العنوان
1	المقدمة
3	المراجع
	<b>الجزء 01: الدراسة البيولوجية الجغرافية</b>
5	<b>الفصل الأول : عائلة Apiaceae</b>
6	الشكل I - 1: خارطة انتشار أنواع العائلة الخيمية
10	شكل I-2: الصورة الفوتوغرافية لنبات <i>Apiaceae</i>
12	الشكل I-3: نسبة تواجد أصناف الفلافونيدات في 44 نوع مدروس
29	الشكل I-4: صور فوتوغرافية للنباتة <i>Ammoides Atlantica</i>
	<b>الفصل الثاني : عائلة Asteraceae</b>
47	الشكل II-1: خارطة انتشار أنواع العائلة النجمية <i>Asteraceae</i>
49	الشكل II-2: الصورة الفوتوغرافية لنبات <i>Asteraceae</i>
52	الشكل II-3: مركبات كومانارينية معزولة من الجنس <i>Ormenis</i>
53	الشكل II-4: مركبات سسكويتارينية معزولة من الجنس <i>Ormenis</i>
54	الشكل II-5: مركبات سيسكوتارينية معزولة من النوع <i>Ormenis mixta</i>
55	الشكل II-6: مركبات سيسكوتارينية معزولة من النوع <i>Ormenis fuscatum</i>
55	الشكل II-7: مركبات استيرية معزولة من النوع <i>Ormenis fuscatum</i>
56	الشكل II-8: صورة فوتوغرافية للنباتة <i>Ormenis Mixta</i> .
57	الشكل II-9: بعض الزيوت المعزولة من النباتة <i>Ormenis Mixta</i>
58	الشكل II-10: صورة للنباتة <i>Ormenis praecox</i>
	<b>الفصل الثالث : مطيافية الكتلة الترادفية</b>
67	الشكل III-1: مخطط طيف الكتلة الترادفية tandem
73	الشكل III-2: مخطط التخليق الحيوي للمركبات الفينولية
74	شكل III-3: البنية الكيميائية للأحماض الفينولية
75	الشكل III-4: الهيكل الأساسي لمشتقات حمض البنزويك
76	الشكل III-5: الهيكل الأساسي لمشتقات حمض السيناميك
77	الشكل III-6: الهيكل العام للفلافونويدات
78	الشكل III-7: الهيكل العام لأهم أقسام الفلافونويدات
79	الشكل III-8: مخطط التصنيع الحيوي للفلافونويدات
81	الشكل III-9: ارتباط ثنائي فنيل بروبان (néolignane - lignane)

82	الشكل III-10 : مجموعات هياكل الليجنان
85	الشكل III-11 : المجموعات السبع الأساسية للسيسكويتربينات اللاكتونية وعلاقتها المتبادلة وفعال Fisher
86	الشكل III-12 : مجموعة البنيات الأساسية للسيسكويتربينات اللاكتونية
	<b>الفصل الرابع : الفعالية البيولوجية</b>
93	الشكل IV-1: أنواع مضادات الأكسدة
95	الشكل IV-2 : الصيغة الكيميائية للفيتامين C (ascorbic acid)
96	الشكل IV-3: الصيغة الكيميائية للفيتامين E ( $\alpha$ -tocopherol)
97	الشكل IV-4 : $\beta$ - carotène
105	الشكل IV-5: صيغة MTT
	<b>الجزء 02: الدراسة الكيميائية للنباتات <i>Ammoides atlantica</i> و <i>Ormenis mixta</i> و <i>Ormenis Praecox</i></b>
	<b>الفصل الأول: الدراسة الكيميائية لنباتة <i>Ammoides atlantica</i></b>
116	الشكل I-1: إرجاع الجذر DPPH بواسطة الفينول
118	الشكل I-2 : إرجاع Cu(I) إلى Cu(II)
	<b>الفصل الثاني : الدراسة الفيتوكيميائية للنباتة <i>Ormenis mixta</i> و دراسة الفعالية المضادة للتكاثر</b>
123	الشكل II-1: مخطط استخلاص النبتة <i>Ormenis mixta</i>
125	الشكل II-2 : مخطط فصل المستخلص الكلوروفورمي
127	الشكل II-3 : رسم تخطيطي للوحات 96 جيدا في اختبار MTT
	<b>الفصل الثالث: الدراسة الفيتوكيميائية للنباتة <i>Ormenis Praecox</i> وتحديد الفعالية البيولوجية</b>
129	الشكل III-1: مخطط استخلاص النبتة <i>Ormenis Praecox</i>
131	الشكل III-2 : مخطط التجزئة للمستخلص <i>n</i> -BuOH للنباتة <i>Ormenis Praecox</i>
133	الشكل III-3 : مخطط يوضح مراحل الفصل و التنقية لكسور مستخلص البوتانول
135	الشكل III-4: مخطط فصل المستخلص الكلوروفورمي للنباتة <i>Ormenis Praecox</i>
	<b>الجزء 03: مناقشة النتائج</b>
	<b>الفصل الأول: المركبات المفصولة من النبتة <i>Ammoides atlantica</i></b>
144	الشكل I-1: كروماتوغرام الشظايا الرئيسية للمستخلص الكحولي للنباتة <i>Ammoides atlantica</i> بواسطة RP-HPLC-ESI-QTOF-MS عند التأين السلبي.

## فهرس الأشكال

151	الشكل 2-I : تحديد الهياكل الكيميائية للفلافونويدات، أحماض الهيدروكسي سيناميك و مشتقاتها و أحماض الهيدروكسي بنزويك و مشتقاته لنبته <i>Ammoides atlantica</i>
	<b>الفصل الثاني : المركبات المفصولة من النبتة <i>Ormenis mixta</i></b>
164	الشكل 1-II: طيف ال <sup>13</sup> C-RMN للمركب 1 في ال(150 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
165	الشكل 2-II : طيف HSQC للمركب 1 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
166	شكل 3-II : طيف ال <sup>1</sup> H-RMN للمركب 1 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
167	الشكل 4-II: طيف الCOSY للمركب 1 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
160	الشكل 5-II: مختلف تعالقات COSY لهيكل المركب 1
168	الشكل 6-II : طيف الHMBC للمركب 1 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
161	الشكل 7-II : بنية الحلقة الخماسية
161	الشكل 8-II : بعض تعالقات HMBC للمركب 1
169	شكل 9-II : طيف ال1D-TOCSY للمركب 1 في ال(600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
162	الشكل 10-II : بنية المركب 1
173	الشكل 11-II: طيف ال <sup>13</sup> C-RMN للمركب 2 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
174	الشكل 12-II: طيف ال <sup>13</sup> C-RMN للمركب 69 OMA في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
175	الشكل 13-II : طيف ال <sup>1</sup> H-RMN للمركب 2 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
176	الشكل 14-II: طيف الHMBC للمركب 2 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
177	الشكل 15-II: طيف الHMBC للمركب 2 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
178	الشكل 16-II: طيف ال HSQC للمركب 2 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
172	الشكل 17-II : بنية الحلقة الخماسية للمركب 2
179	الشكل 18-II: طيف الCOSY للمركب 2 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
180	الشكل 19-II: طيف ال1D TOCSY للمركب 2 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
172	الشكل 20-II : بنية المركب 2
184	الشكل 21-II: طيف ال <sup>13</sup> C-RMN للمركب 3 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)
185	الشكل 22-II : طيف ال <sup>1</sup> H-RMN للمركب 3 في ال (600 MHz,CD <sub>3</sub> OD)

فهرس الأشكال

186	الشكل 23 : طيف ال COSY للمركب 3 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
187	الشكل 24-II : طيف ال HSQC الممدد للمركب 3 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
188	الشكل 25-II : طيف ال HMBC للمركب 3 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
189	الشكل 26-II : طيف ال 1D TOCSY للمركب 3 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
190	الشكل 27-II : طيف ال 1D-ROESY للمركب 3 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
191	الشكل 28-II : طيف ال 1D-ROESY للمركب 3 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
182	الشكل 29-II : بعض التعالقات الخاصة بالمركب 3
182	الشكل 30-II : بعض التعالقات الخاصة بالمركب 3
183	الشكل 31-II : بنية المركب 3
196	الشكل 32-II : طيف ال RMN- <sup>13</sup> C للمركب 4 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
197	الشكل 33-II : طيف ال RMN- <sup>1</sup> H للمركب 4 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
198	الشكل 34-II : طيف ال HSQC للمركب 4 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
199	الشكل 35-II : طيف ال COSY للمركب 4 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
200	الشكل 36 : طيف ال 1D-ROESY للمركب 4 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
201	الشكل 37-II : طيف ال HMBC للمركب 4 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
197	الشكل 38-II : بعض تعالقات المركب 4
194	الشكل 39-II : بعض تعالقات المركب 4
194	الشكل 40-II : بنية المركب 4
206	الشكل 41-II : طيف ال RMN- <sup>13</sup> C للمركب 5 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
207	الشكل 42-II : طيف ال RMN- <sup>1</sup> H للمركب 5 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
208	الشكل 43-II : طيف ال HSQC للمركب 5 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
209	الشكل 44-II : طيف ال HMBC للمركب 5 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
210	الشكل 45-II : طيف ال 1D TOCSY للمركب 5 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
211	الشكل 46-II : طيف ال 1D ROESY للمركب 5 في ال (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD)
203	الشكل 47-II : بنية المركب 5
205	الشكل 48-II : بعض تعالقات HMBC للمركب 5
213	الشكل 49-II : بنية المركبات السيسكويتربينية (9-1) المعزولة من طرف نبتة <i>O.mixta</i>

	الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة <i>Ormenis praecox</i> ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا
223	الشكل III-1: طيف $^{13}\text{C}$ -RMN للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
223	الشكل III-2 : طيف $^{13}\text{C}$ -RMN الممدد للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
224	الشكل III-3: طيف ال $^1\text{H}$ -RMN للمركب $\text{P}_1$ في ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )
224	الشكل III-3-1: تمديد طيف $^1\text{H}$ -RMN للمركب $\text{P}_1$ في المجال [6.70-7.00 ppm]
225	الشكل III-3-2: تمديد طيف $^1\text{H}$ -RMN للمركب $\text{P}_1$ في المجال [3.00-6.00 ppm]
225	الشكل III-3-3: تمديد طيف $^1\text{H}$ -RMN للمركب $\text{P}_1$ في المجال [6.70-7.00 ppm]
226	الشكل III-3-4: تمديد طيف $^1\text{H}$ -RMN للمركب $\text{P}_1$ في المجال [1.0-2.7 ppm]
226	الشكل III-4: تمديد طيف HSQC للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
227	الشكل III-4-1: تمديد طيف HSQC للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
228	الشكل III-4-2: تمديد طيف HSQC للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
219	الشكل III-5: تمثيل جزئي أول للمركب $\text{P}_1$
229	الشكل III-6 : طيف COSY( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
230	الشكل III-6-1 : تمديد طيف COSY( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
231	الشكل III-6-2: تمديد طيف COSY( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
220	الشكل III-7: تمثيل جزئي أول للمركب $\text{P}_1$
232	الشكل III-8: تمديد طيف الHMBC للمركب $\text{P}_1$ في $\text{CD}_3\text{OD}$
233	الشكل III-8-1: تمديد طيف HMBC في المجال [1.0-7.0 ppm] للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
220	الشكل III-9 : مختلف تعالقات HMBC لهيكل المركب $\text{P}_1$
221	الشكل III-10 : مختلف تعالقات HMBC لهيكل المركب $\text{P}_1$
221	الشكل III-11 : مختلف تعالقات HMBC لهيكل المركب $\text{P}_1$
222	الشكل III-12: بنية المركب $\text{P}_1$
234	الشكل III-13: طيف 1D TOCSY للمركب $\text{P}_1$ المسجل في $\text{CD}_3\text{OD}$
234	الشكل III-14 : بنية المركب $\text{P}_2$
235	الشكل III-15: بنية المركب $\text{P}_3$

فهرس الأشكال

235	الشكل III-16 : بنية المركب P <sub>4</sub>
238	الشكل III-17 : البنية الأولية للمركب P <sub>5</sub>
239	الشكل III-18 : بنية المركب P <sub>5</sub>
240	الشكل III-19 : أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P <sub>5</sub>
241	الشكل III-20 : أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P <sub>5</sub> بعد الحلمهة الحمضية
241	الشكل III-21 : طيف ال RMN- <sup>1</sup> H للمركب P <sub>5</sub> المسجل في (CD <sub>3</sub> OD)
242	الشكل III-22 : تكبير المجال [6.4ppm-4.9ppm] للمركب P <sub>5</sub>
242	الشكل III-23 : مطيافية الكتلة (ES <sup>+</sup> ) للمركب P <sub>5</sub>
246	الشكل III-24 : الصيغة الأولية للمركب P <sub>6</sub>
248	الشكل III-25 : أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P <sub>6</sub>
248	الشكل III-26 : أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P <sub>6</sub> بعد الحلمهة الحمضية
249	الشكل III-27 : طيف ال RMN- <sup>1</sup> H للمركب P <sub>6</sub> المسجل في (CD <sub>3</sub> OD)
249	الشكل III-28 : طيف الكتلة للمركب P <sub>6</sub>
250	الشكل III-29 : مطيافية RMN- <sup>13</sup> C للمركب P <sub>6</sub> المسجل في (CD <sub>3</sub> OD)
255	الشكل III-30 : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون RMN- <sup>1</sup> H المسجل في CD <sub>3</sub> OD للمركب P <sub>7</sub>
256	الشكل III-31 : طيف RMN- <sup>13</sup> C للمركب P <sub>7</sub>
257	الشكل III-32 : طيف تجارب COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H المسجل في CD <sub>3</sub> OD للمركب P <sub>7</sub>
258	الشكل III-32-1 : طيف تجارب COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H المسجل في CD <sub>3</sub> OD للمركب P <sub>7</sub>
259	الشكل III-32-2 : طيف تجارب COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H المسجل في CD <sub>3</sub> OD للمركب P <sub>7</sub>
260	الشكل III-33 : مطيافية HSQC المسجل في CD <sub>3</sub> OD للمركب P <sub>7</sub>
261	الشكل III-33-1 : مطيافية HSQC المسجل في للمركب P <sub>7</sub>
262	الشكل III-34 : طيف تجارب HMBC المسجل في CD <sub>3</sub> OD للمركب P <sub>7</sub>
263	الشكل III-34-1 : طيف تجارب HMBC المسجل في CD <sub>3</sub> OD للمركب P <sub>7</sub>
264	الشكل III-35 : المركبات المفصولة من النبتة <i>Ormenis praecox</i>
267	الشكل III-36 : المنحنى القياسي لحمض الغاليك
268	الشكل III-37 : منحنى النسبة المئوية لتنشيط DPPH بواسطة مستخلص <i>n</i> -BuOH
269	الشكل III-38 : منحنى النسبة المئوية لتنشيط DPPH بواسطة مستخلص AcOEt



الصفحة	العنوان
	الجزء 01: الدراسة البيبلوغرافية
	الفصل الأول : عائلة Apiaceae
06	الجدول I-1 : توزيع أجناس العائلة الخيمية في العالم
07	الجدول I-2 : الأجناس المتواجدة في الجزائر للعائلة الخيمية
10	جدول I-3 : التصنيف العلمي للعائلة Apiaceae
13	الجدول I-4- الفلافونيدات الغليكوزيدية المعزولة من عدة أنواع من العائلة الخيمية
18	الجدول I-5:أنواع الفلافونيدات الأجليكونية المعزولة في عدة أنواع من العائلة الخيمية ( Apiaceae).
27	الجدول I-6 : بنى بعض الزيوت الأساسية المعزولة من هذه الأنواع
30	الجدول I-7: التصنيف النظامي للنباتة
31	الجدول I-8: بنية المركبات المعزولة من الجنس <i>Ammoides</i>
37	الجدول I-9 : الزيوت الأعظمية ل <i>Ammoides</i>
	الفصل الثاني : عائلة Asteraceae
49	الجدول II-1 : التصنيف العلمي للعائلة Asteraceae
51	الجدول II-2 : الفعاليات البيولوجية لبعض أنواع لاجناس <i>Ormenis</i> ، <i>Chamaemelum</i> و <i>Cladanthus</i> .
52	الجدول II-3: الكومارينات المعزولة من الجنس <i>Ormenis</i>
53	الجدول II-4 : السيسكوتاربيينات المعزولة من الجنس <i>Ormenis</i>
53	الجدول II-5 : السيسكوتاربيينات المعزولة من النوع <i>Ormenis fuscatum</i> ذات هيكل eudesmanolides
54	الجدول II-6 : السيسكوتاربيينات المعزولة من النوع <i>Ormenis fuscatum</i> ذات هيكل bisabolene
57	الجدول II-7 : التصنيف النظامي للنباتة
59	الجدول II-8 : الاسيتيلات المعزولة من النوع <i>Ormenis fuscatum</i>
	الفصل الثالث : مطيافية الكتلة الترادفية
69	الجدول III-1:البنيات المختلفة للفلافونويدات الأجليكونية المدروسة
70	الجدول III-2: التسميات المعتمدة لإعادة التدوير و الانشقاقات المختلفة التي لوحظت من خلال هذه الدراسة
71	الجدول III-3 : تنشيطية الفلافونولات (7-10) بواسطة بتقنية ESI-MS/MS
72	الجدول III-4: تنشيطية الفلافونونات (15-12) بواسطة بتقنية ESI-MS/MS

74	الجدول III-5: بعض أصناف المركبات الفينولية
75	الجدول III-6: بعض الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك
76	الجدول III-7: بعض الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك
83	الجدول III-8: هياكل السييسكويتربينات
	<b>الفصل الرابع : الفعالية البيولوجية</b>
132	الجدول III-1: الكسور المحصل عليها من ا لطور العكسي Rp-C <sub>18</sub> للكسر F <sub>a</sub>
133	الجدول III-2: تحت الكسور المحصل عليها من الكسر F <sub>10</sub>
134	الجدول III-3: الكسور المحصل عليها من ا لطور الكلوروفورمي
136	الجدول III-4: التراكيز النهائية المخففة (لكل مستخلص).
138	الجدول III-5: تحضير مجموعة التراكيز
	<b>الجزء 02: الدراسة الكيميائية للنباتات <i>Ormenis mixta</i> و <i>Ormenis Praecox</i> و <i>Ammoides atlantica</i></b>
	<b>الفصل الأول: الدراسة الكيميائية لنبته <i>Ammoides atlantica</i></b>
113	الجدول I-1: المعايرة LC/MS/MS في وجود المركبات المرجعية
	<b>الفصل الثاني : الدراسة الكيميائية <i>Ormenis mixta</i></b>
122	الجدول رقم I-II: كمية مستخلصات الجزء الهوائي لنبته <i>O. Mixta</i> .
124	الجدول II-2: تمليص العمود الكروماتوغرافي للمستخلص الكلوروفورمي.
	<b>الفصل الثالث: الدراسة الفيتوكيميائية لنبته <i>Ormenis Praecox</i> وتحديد الفعالية البيولوجية</b>
132	الجدول III-1: الكسور المحصل عليها من ا لطور العكسي Rp-C <sub>18</sub> للكسر F <sub>a</sub>
133	الجدول III-2: تحت الكسور المحصل عليها من الكسر F <sub>10</sub>
134	الجدول III-3: الكسور المحصل عليها من ا لطور الكلوروفورمي
136	الجدول III-4: كميات البوليفينول المقاسة لكل مستخلص
137	الجدول III-4-1: التراكيز النهائية المخففة (لكل مستخلص).
138	الجدول III-5: تحضير مجموعة التراكيز
	<b>الجزء 03: مناقشة النتائج</b>
	<b>الفصل الأول: المركبات المفصولة من النبته <i>Ammoides atlantica</i></b>
145	الجدول I-1: المركبات الفلافونويدية والفينولية الحمضية المحددة للجزء الهوائي لنبته <i>Ammoides atlantica</i> بواسطة طريقة RP- HPLC--ESI-QTOF-MS <sup>n</sup>
153	الجدول رقم I-2: النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الكحولي ل <i>Ammoides atlantica</i>

	(AA-E)، قيم المحتوى الفينولي للفلافونويدات
	<b>الفصل الثاني: المركبات المفصولة من النبتة <i>Ormenis mixta</i></b>
163	الجدول II-1: المعطيات الطيفية لل $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) وال- $^{13}\text{C}$ للمركب 1 في ال- $\text{CD}_3\text{OD}$
172	الجدول II-2: المعطيات الطيفية لل $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) وال $^{13}\text{C}$ -RMN (150 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) للمركب 2 في ال- $\text{CD}_3\text{OD}$
183	الجدول II-3: المعطيات الطيفية لل $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) وال- $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) للمركب 3 في ال- $\text{CD}_3\text{OD}$
195	الجدول II-4: المعطيات الطيفية لل $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) وال- $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) للمركب 4 في ال- $\text{CD}_3\text{OD}$
205	الجدول II-5: المعطيات الطيفية لل $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) وال- $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\delta$ ; ppm, $J$ ; Hz) للمركب 5 في ال- $\text{CD}_3\text{OD}$
214	الجدول II-6: قيم <i>Ec50</i> للمركبات المعزولة لنبتة <i>O. mixta</i>
	<b>الفصل الثالث: المركبات المفصولة من النبتة <i>Ormenis praecox</i> ودراسة الفعالية المضادة للاكسدة و المضادة للبكتيريا</b>
216	الجدول III-1: نتائج الكشف عن نواتج الأيض الثانوي
217	الجدول III-2: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $\text{P}_1$
218	الجدول III-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $\text{P}_1$
236	الجدول III-4: قيم $R_f$ للمركب $\text{P}_5$
236	الجدول III-5: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب $\text{P}_5$
237	الجدول III-6: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب $\text{P}_5$
237	الجدول III-7: نتائج مطيافية (UV) بعد الحلمة الحمضية
243	الجدول III-8: قيم $R_f$ للمركب $\text{P}_6$
244	الجدول III-9: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب $\text{P}_6$
244	الجدول III-10: نتائج طيف البروتون $^1\text{H}$ -RMN للمركب $\text{P}_6$
245	الجدول III-11: نتائج طيف الكربون $^{13}\text{C}$ -RMN للمركب $\text{P}_6$
245	الجدول III-12: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية بعد الحلمة الحمضية للمركب $\text{P}_6$
251	الجدول III-13: نتائج طيف البروتون $^1\text{H}$ -RMN للمركب $\text{P}_7$
251	الجدول III-14: نتائج طيف الكربون $^{13}\text{C}$ -RMN للمركب $\text{P}_7$

265	الجدول III-15 : النشاطية ضد البكتيرية للمستخلص الايثانولي معبرا عنها بقطر التثبيط بالملمتر
265	الجدول III-16 : النشاطية ضد البكتيرية للمستخلص البوتانولي معبرا عنها بقطر التثبيط بالملمتر
266	الجدول III-17 : النشاطية ضد البكتيرية لمستخلص خلات الايثيل معبرا عنها بقطر التثبيط بالملمتر
267	الجدول III-18 : نتائج المحتوى الفينولي للمستخلصين ( <i>n</i> -BuOH و AcOEt ) للنبذة <i>O.praecox</i>
268	الجدول III-19 : قيم IC <sub>50</sub> للمستخلص <i>n</i> -BuOH
268	الجدول III-20 : قيم IC <sub>50</sub> للمستخلص AcOEt

# مقدمة

# مقدمة

## مقدمة

بدأت علاقة الإنسان بالنباتات منذ لحظة الخلق الأولى حيث كان سيدنا آدم في الجنة ينعم بما فيها من خيرات عدا نباتا واحدا أمره الله سبحانه و تعالى بعدم الاقتراب منه حيث

قال الله تعالى لأدم في سورة البقرة الآية رقم 3: (و قلنا يا آدم أسكن أنت و زوجك الجنة و كلا منها رغدا حيث شئتما و لا تقربا هذه الشجرة فتكونا من الظالمين) صدق الله العظيم.

نظرا لأهمية النباتات الطبية لاحتوائها على مواد كيميائية ذات فائدة عظيمة و أهمية كبرى لتأثيرها الفيزيولوجي و نشاطها الدوائي على أعضاء الجسم البشري و الحيواني، فإن النبات يمكن أن يعالج العديد من الأمراض و ذلك لاحتوائه على أكثر من مادة فعالة و كما أن الانسجام المتوفر طبيعيا في النباتات له الأثر البالغ في أحداث الشفاء دون أعراض جانبية ، مما دفع الباحثين الجزائريين إلى دراسة و استثمار هذه الثروة النباتية خاصة النباتات الطبية لما تحتويه من مواد كيميائية عن عمليات الأيض الثانوي ذات الفعالية البيولوجية الهامة مثل الفلافونويدات و غيرها.

كمثال على النباتات الطبية الموجودة في بلدنا ، قمنا بدراسة 3 أنواع من النباتات *Ammoides atlantica* ,

### *Ormenis praecox* و *Ormenis mixta*

يعرف النبات الطبي بأنه شيء من أصل نباتي و يستعمل طبيا، كما يعرف أيضا بأنه النبات الذي يحتوي على مادة أو مجموعة مواد طبية قادرة على علاج مرض معين أو تقليل الإصابة [1,2] . أو حتى الذي يحتوي على المواد الأولية المستخدمة في تحضير المواد الطبية ، كما تعرف النباتات العطرية أنها النباتات التي تحتوي في أي جزء من أجزائها على زيوت عطرية طيارة [3] .

ان احتواء النباتات الطبية عدد كبير من المكونات الفعالة طبيا تعكس الإمكانيات العلاجية الكبيرة لها ، من المعلوم أن بعض العقاقير النباتية تملك قدرة علاجية تفوق التي تمتلكها الأدوية المصنعة كما يخلو استعمال العقاقير من الآثار الجانبية الضارة التي تصاحب استعمال الأدوية المصنعة أحيانا.

أدت هذه العوامل و غيرها إلى تنامي استخدام النباتات الطبية و الاهتمام بدراستها ، قصد معرفة ما تحويه من مواد فعالية و تأثير فيسيولوجي تعرف بالمواد الفعالة .

نظرا لتربع الجزائر على مساحات شاسعة فقد أكسبها ذلك وجود تضاريس و ظروف مناخية متعددة و قد انعكس ذلك على النمط النباتي ، مما جعلها من البيئات النادرة حيث تنوع الغطاء النباتي و التدرج من الغابات الرطبة الكثيفة إلى النباتات الجافة الصحراوية المبعثرة و المحدودة الانتشار ، و انعكس ذلك

# مقدمة

بدوره على وجود العديد من الفصائل والأجناس و الأنواع النباتية البرية المختلفة و التي بدورها تضم العديد من النباتات الطبية .

و عليه انصب التفكير العلمي الحالي في العلاج باستعمال التداوي بالنباتات الطبية بشعار جديد هو العودة الى الطبيعة ، مما دفع الباحثين الجزائريين إلى دراسة و استثمار هذه الثروة النباتية ، و خاصة النباتات الطبية لما تحتويه على مواد كيميائية عن عمليات الأيض الثانوي ذات الفعالية البيولوجية الهامة ، عن هذه النباتات بنواتج الأيض مثل الفلافونويدات و غيرها .

و قد دلت الإحصائيات التي قدمتها وزارة الفلاحة و الصيد البحري بفرعها A.N.N و I.U.C.N لعام 1997 على ذكر 118 نبتة طبية تنتمي إلى 49 عائلة من بينها العائلة Apiaceae والنجمية ، و لمعرفة الخصائص العلاجية و غيرها بدراسة الفعالية البيولوجية لمستخلص نبتة *Ormenis* ، و لتحقيق ذلك قمنا بتقسيم العمل الى ثلاثة أجزاء ،أدرجنا الجزء الأول مدخل عام قدمنا فيه دراسة نباتية و كيميائية شاملة عن الجنسين *Ammoides* و *Ormenis* من حيث استخدامها في الطب التقليدي ، الأهمية البيولوجية ، و بنية مركباتها المعزولة ، أما الفصل الثاني فقد خصصناه للطريقة العملية المتبعة خلال هذا البحث من استخلاص و فصل و تنقية بنى المركبات المتحصل عليها ، و أخيرا قمنا باستعراض و تحديد البنى الكيميائية للمركبات المتحصل عليها.

**الجزء الأول :** اشتمل على مقدمة و قسم إلى أربع فصول :

فالفصل الأول احتوى على دراسة ببيولوجرافية لعائلة Apiaceae و جنس *Ammoides* ، استخداماته التقليدية ، والأيض الثانوي له.

تم تخصيص الفصل الثاني لمراجعة ببيولوجرافية لعائلة Asteraceae و جنس *Ormenis* ، واستخداماته التقليدية ، أنشطته البيولوجية ، ومستقلباته الثانوية.

\* في الفصل الثالث ، يقدم معلومات عامة عن تقنية تحليل LC / MS / MS .

● في الفصل الرابع ، وصفنا بإيجاز تقنيات دراسة نشاط مضادات الأكسدة بست طرق ، وهي اختبارات DPPH ، ABTS ، CUPRAC و O<sub>2</sub>-DMSO القلوية والأيونات المخلبة وتقليل الطاقة والنشاط المضاد للبكتيريا.

الجزء الثاني الذي يصف المعدات والطرق ، ويتضمن 3 فصول تتناول الجزء التجريبي من العمل.

## مقدمة

• في الفصل الأول ، تصف المادة النباتية (*Ammoides atlantica*) ، واستخلاصها وتحليل

LC/MS / MS وكذلك تقييم إمكاناتها المضادة للأكسدة.

• يتضمن الفصلان الثاني والثالث وصف المادة النباتية *Ormenis praecox* و *Ormenis mixta* واستخلاصهما والتقنيات الكروماتوجرافية المختلفة المستخدمة CC ، TLC ، HPLC لفصل وتنقية المستقلبات والتقنيات المستخدمة في الاختبارات البيولوجية (مضاد للأكسدة ، مضاد للبكتيريا و المضاد للتكاثر .

يتكون الجزء الثالث من المخطوطة الذي يشمل النتائج التي تم الحصول عليها من 3 فصول :

خصص الفصل الأول لمناقشة نتائج تحليل LC / MS / MS لمستخلص الهيدرووميثانول لنبتة

*Ammoides atlantica* ونتائج تقييم النشاط المضاد للأكسدة .

\* الفصلان الثاني والثالث يصفان التفسير الهيكلي للمنتجات المعزولة على التوالي من النوعين *Ormenis praecox* و *Ormenis mixta* بفضل التحليلات الطيفية للرنين المغناطيسي النووي أحادي وثنائي الأبعاد ( $NMR-^1H$  ،  $NMR-^{13}C$  ، COSY ، HSQC ، HMBC ، ROESY ، مطياف الكتلة المرئي للأشعة فوق البنفسجية وعالي الدقة (HR-ESI-MS) ، و دراسة الفعالية المضادة للتكاثر لنبتة

*Ormenis mixta* و الفعالية البيولوجية لنبتة *Ormenis praecox* .

# مقدمة

---

## المراجع:

- [1] Hoefler, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J.M., and Guillemain, J. (1987). Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats, *Journal of Ethno pharmacology*. 19(2):133-43. doi: 10.1016/0378-8741(87)90037-7.
- [2] Lexa, A., Fleurentin, J., Lehr, P. R., Mortier, F., Pruvost, M., and Pelt, J. M. (1989). Choleric and hepatoprotective properties of *Eupatorium cannabinum* in the rat, *Planta medica* 55, 127-132.
- [3] Benzahi, K.D. (2001). Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante cynodon Dactylon –L'Chiendenr. mémoire de magister Université de Ouargla.15-17.

الجزء الأول

الدراسة البيبلوغرافية

# الفصل الأول

## عائلة **Apiaceae**

## مدخل

الخيميات نباتات قديمة المنشأ ، نسب اسمها إلى شكل نورتها ، قد تتواجد بشكل عشبي عطري ، حولي أو ثنائي الحول أو معمر ، و قد تكون أشجارا في المناطق المدارية ، تحوي نسجها قنوات مفرزة لزيوت عطرية ايثيرية.

نورتها خيمية بسيطة و هي نورة تتميز بخروج الحوامل الزهرية من نقطة واحدة تعطىها شكل الخيمية ، و تكون زهرتها خنثوية صغيرة، شعاعية ، تتوضع أجزاءها في أربع دورات .

تعتبر العائلة الخيمية (*Apiaceae*) من أهم العائلات النباتية تضم حوالي 446 جنس و 3540 نوع، موزعة على معظم أنحاء العالم، خاصة في المناطق المعتدلة في نصف الكرة الشمالي. هي عائلة متجانسة نسبيا، تنتمي إلى صنف ثنائية الفلقة، أنواعها عبارة عن نباتات عشبية أو شجيرات، دائمة أو سنوية تظهر مرة كل سنتين، تستعمل كنباتات طبية و منها ما يستعمل كغذاء أو كتوابل، *Apiaceae* من أهم العائلات النباتية في الجزائر ممثلة بأكثر من 56 جنس [1-3].

تسمى العائلة الخيمية في الانجليزية *Family persley* (عائلة البقدونس)، و تعرف علميا باسم *Umbelliferae*، و هي عائلة كبيرة نسبيا. معظم نباتاتها عشبية ، و تتميز غالبيتها بوجود رائحة عطرية، خاصة في جميع أجزاء النبات بما في ذلك البذور، تحمل الأزهار في نورات خيمية، تكون مركبة غالبا. تكون السيقان عادة مجوفة، الأوراق مركبة و متبادلة غالبا. عميقة التفصيص، أو مجزأة أحيانا. تحمل الأزهار في نورات خيمية ، أزهارها صغيرة ، يتكون الكأس فيها من خمس سبلات منفصلة، و يتكون التويجان من خمس بتلات غير ظاهرة. و يتكون المتاع من مبيض سفلي به حجرتان ، و قلمان ، و ميسمان. و التلقيح خلطي بالحشرات.

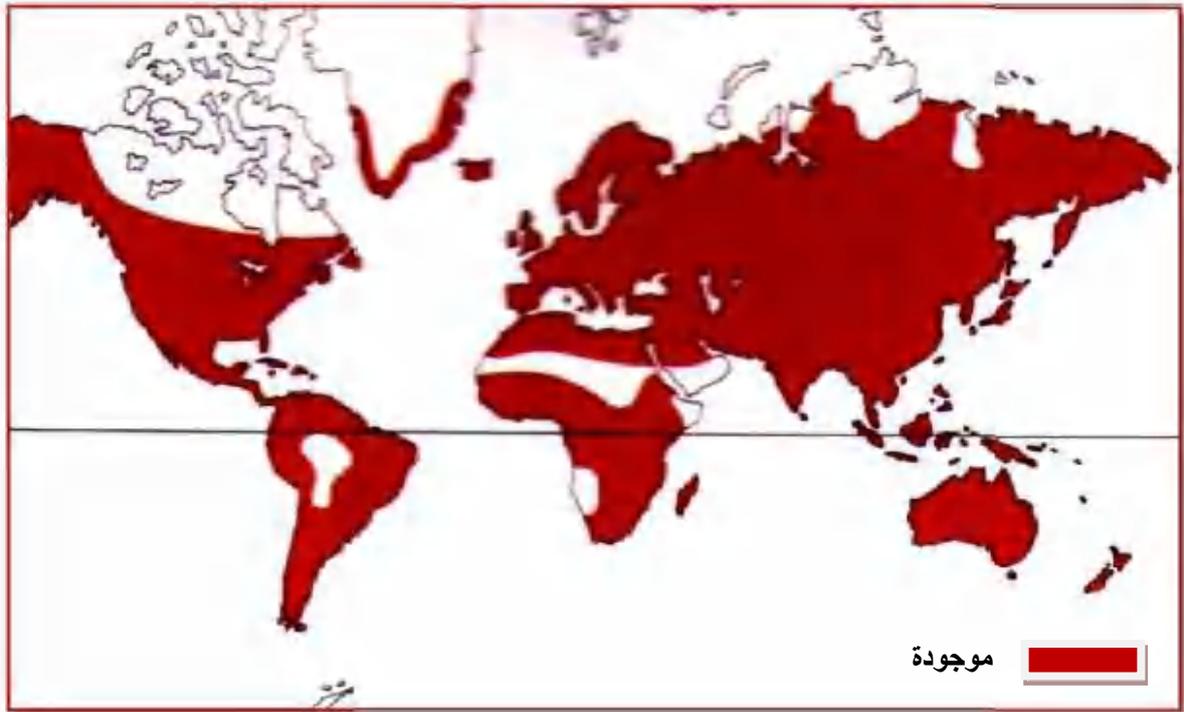
1-I- تعريف العائلة الخيمية (*Apiaceae*) :

هي نباتات عشبية نوراتها عادة خيمية مضاعفة أو مركبة يسهل التعرف علي أفراد الفصيلة، يضم الساق سلاميات جوفاء و يحمل أوراق متعاقبة مقسمة عادة و غالبا مركبة مجهزة بقاعدة غمدية [4].

العائلة الخيمية (*Apiaceae*) هي عائلة كبيرة تضم حوالي 450 جنس و أكثر من 3540 نوعا، مما يجعل هذه العائلة واحدة من أكبر الأصناف بين النباتات الراقية [4، 5].

2-I- التوزيع الجغرافي للعائلة (*Apiaceae*) :

تعد العائلة الخيمية (*Apiaceae*) من العائلات الراقية فهي تضم حوالي 1222 صنف ، 3000 إلى 3700 نوع [6]، تنتشر على نطاق واسع خاصة المناطق المعتدلة في نصف الكرة الشمالي [7]، و نادرا في المناطق الاستوائية [4، 6].



الشكل 1-I-: خارطة انتشار أنواع العائلة الخيمية [9,8,1]

تتوزع أجناس هذه العائلة الخيمية عبر مختلف القارات الخمس للكرة الأرضية مع وجود تمثيل أكبر لها في قارة آسيا كما هو موضح في الجدول 1-I : القارة الآسيوية (265)، أمريكا (197)، أوروبا (139) ، أستراليا (36) و إفريقيا (126) [10,9].

الجدول 1-I- : توزيع أجناس العائلة الخيمية في العالم [10] :

الأنواع النادرة	عدد الأجناس	مكان التواجد
159	265	القارة الآسيوية
52	197	القارة الأمريكية
29	139	القارة الأوروبية
50	126	القارة الإفريقية
11	36	القارة الأسترالية

تمثل في الفلورا الفرنسية ب 70 جنس [11]، و في الفلورا المصرية ب 25 جنسا [12]. كما تتخذ هذه العائلة مكانة هامة في الفلورا الجزائرية 56 جنس مكون من 130 نوع ( 24 منها نادر) كما تحتوي 26 تحت النوع [13] كما هو موضح في الجدول 2-I ، أما في الصحراء تمثل العائلة الخيمية ب 8 أجناس و 12 نوع [14] .

الجدول I-2 : الأجناس المتواجدة في الجزائر للعائلة الخيمية [13].

الأنواع النادرة	عدد تحت النوع	عدد الأنواع	الجنس
		2	<i>Ammi</i>
		1	<i>Ammiopsis</i>
		1	<i>Ammodaucus</i>
<b>1</b> ( <i>A. atlantica</i> )		2	<i>Ammoides</i>
		1	<i>Anethum</i>
		2	<i>Anthriscus</i>
		1	<i>Apium</i>
<b>1</b> ( <i>B. glaberrima</i> )		1	<i>Balansaea</i>
		1	<i>Bifora</i>
		2	<i>Brachyapium</i>
<b>4</b> ( <i>B. fontanesii, B. chaberti, B. elatum, B. crassifolium</i> )		7	<i>Bunium</i>
<b>5</b> ( <i>B. plantagineum, B. atlanticum, B. montanum, B. balansae, B. oligactis</i> )		14	<i>Bupleurum</i>
		1	<i>Capnophyllum</i>
<b>2</b> ( <i>C. montanum, C. foetidum</i> )		2	<i>Carum</i>
<b>1</b> ( <i>C. bifrons</i> )		4	<i>Caucalis</i>
		1	<i>Chaerophyllum</i>
			<i>Conium</i>
			<i>Conopodium</i>
			<i>Coriandrum</i>
			<i>Crithmum</i>
			<i>Cuminum</i>
			<i>Danaa</i>
<b>1</b> ( <i>D. reboudii</i> )	8	11	<i>Daucus</i>
		1	<i>Echinophora</i>
		2	<i>Elaeoselinum</i>

		7	<i>Eryngium</i>
<b>2</b> ( <i>F. Cossoniana</i> , <i>F. vesceritensis</i> )		5	<i>Ferula</i>
	3	1	<i>Foeniculum</i>
		3	<i>Helosciadium</i>
	2	1	<i>Heracleum</i>
	2	1	<i>Hippomarathrum</i>
		2	<i>Hohenackeria</i>
		1	<i>Hydrocotyle</i>
		1	<i>Kundmannia</i>
		2	<i>Magydaris</i>
	1	1	<i>Malabaila</i>
		1	<i>Margotia</i>
<b>1</b> ( <i>Oe. Virgata</i> )		6	<i>Oenanthe</i>
		3	<i>Orlaya</i>
		1	<i>Petroselinum</i>
<b>1</b> ( <i>P. munbyi</i> )		3	<i>Peucedanum</i>
		1	<i>Physocaulos</i>
<b>1</b> ( <i>P. battandieri</i> )		2	<i>Pimpinella</i>
<b>4</b> ( <i>P. reboudii</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>P. battandieri</i> , <i>P. chloranthus</i> )	5	4	<i>Pituranthos</i>
		1	<i>Reutera</i>
		1	<i>Ridolfla</i>
		1	<i>Sanicula</i>
	2	3	<i>Scandix</i>
		4	<i>Seseli</i>
		1	<i>Sison</i>
		2	<i>Smyrnum</i>
		3	<i>Thapsia</i>
		1	<i>Tinguarra</i>

		1	<i>Tordylium</i>
	3	2	<i>Torilis</i>
		1	<i>Turgenia</i>

ما يلاحظ من خلال هذا التلخيص التنوع الوراثي لهذه العائلة في الجزائر كما أن الجنسين *Bupleurum* و *Daucus* هما الأكثر غنا بالأنواع (11,14) كما تحتوي الأجناس *Bunium*، *Eryngium* و *Oenanthe* على عدد معتبر أيضا من الأنواع لكن اغلب الأجناس ممثلة بنوع واحد أو اثنين [13].  
تضم بعض الأجناس عددا من الأنواع الأصلية Endémiques نلخصها كما يلي :  
*Bupleurum* (5), *Bunium* (4), *Pituranthos* (4), *Ferula* (2), *Daucus* (2), *Ammoides*(1),  
*Brachyapium* (1) , *Caucalis* (1), *Peucedanum* (1), *Pimpinella* (1), *Oenanthe* (1).  
و هناك أجناس لا تحتوي على أنواع أصلية مثل *Ammi* و *Scandix* يقابلها أجناس أخرى ممثلة بأنواع أصلية فقط مثل *Ammiopsis*، *Balansaea* و *Carum*.

### I-3- الخصائص المرفولوجية:

نباتات هذه العائلة عشبية حولية أو ثنائية الحول و نادرا ما تكون شجرة [15] ، تحتوي نباتاتها على سيقان مجوفة من الداخل تلتف بها سويقات صغيرة ، أوراقها متعاقبة مقسمة غالبا و تكون مركبة مجهزة بقاعدة غمدية، متبادلة وقد تكون متقابلة، معقدة نادرا ما تكون بسيطة ، أزهارها صغيرة و مرتبة و مجمعة في نورات خيمية (*Ombelle*)، بيضاء و أحيانا تكون صفراء اللون ، و تحتوي على 5 بتلات، كما تحتوي على عدد قليل من الكويسات و في بعض الأحيان لا توجد [16,13] ، ثمارها مميزة ثنائية مؤلفة من أقسومتين (*Mericarpes*) محمولتين بواسطة حامل ينشطر طوليا عند النضج مباعدا بين الأقسومتين.

شكل رقم I-2: الصورة الفوتوغرافية لنبات *Apiaceae* [11].

#### I-4- التصنيف العلمي للعائلة الخيمية (*Apiaceae*)

تنتمي العائلة الخيمية إلى شعبة كاسيات البذور (Angiospermes) ، صنف ثنائي الفلقة Dicotylédonae ، تحت صف سائبة البتلات Dialypétalae ، رتبة الخيمييات Apiales و هي تضم ثلاث تحت عائلات : تحت عائلة Apiioideae وهي الأكثر تنوعا و التي تحتوي على 8 قبائل، أما تحت عائلة Saniculoideae و تحت عائلة Hdrocotyloideae فكل واحدة ممثلة بقبيلتين فقط [17,18] .

تصنف العائلة *Apiaceae* حسب الجدول I-3.

جدول I-3: التصنيف العلمي للعائلة *Apiaceae*

Magnoliophyta (Angiospermes)	المملكة
Campanulidées أو Euastéridées	القسم
Apiaceae	الصنف
Magnoliophyta (Angiospermes)	الرتبة
Apiaceae	العائلة

#### I-5- أهمية العائلة الخيمية (*Apiaceae*)

الأهمية الاقتصادية : بعض نباتات العائلة الخيمية تعتبر ذات أهمية اقتصادية بحيث تستغل منتجاتها كأطعمة ، توابل ، دواء ، نباتات للزينة. و البعض منها يعتبر سام و هذا لاحتوائها على قلويدات (خاصة القلويدات البيريدينية) و هي سامة إذا أكلت و من بين النباتات ذات الأهمية الاقتصادية نذكر : كأطعمة [15]، مثل الجزر (*Daucus carota*)،الجزر الأبيض (*pastina casativa*)،البقدونس (*petroselinum crispum*) و الكرفس (*Apium graveolens*).كبهارات و توابل مثال على ذلك الكراوية

(*carum carvi*) و الكمون (*cuminum cyminum*)، الشمر (*Foeniculum vulgare*) و اليانسون (*pinpinellaanisum*) أو غيرها .

كما يستغل العديد من النباتات ذات الرائحة المميزة في كثير من الصناعات كالعطور و الصابون و مواد التجميل و في صناعة الحلويات و المشروبات الكحولية و الفواكه المجففة أو تضاف في الأدوية لتخفي بعض المذاقات غير المقبولة كنبات *Foeniculum vulgare* الذي يستغل صناعيا لاستخراج مركب Anethole الذي يستعمل في تعطير المأكّل كالمسك و الزيتون و غيرها و مثل *Ferula galbaniflua* التي تعتبر مصدرا طبيعيا للرتنجات [17] بينما تستخدم أنواع قليلة منها في الزينة مثل جنس *Hedera* و Scheffera [20,19].

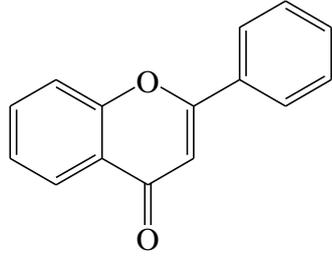
كما أن نباتات هذه الفصيلة لها قيمة علاجية كبيرة لاحتوائها على العديد من النباتات الطبية نذكر من أهمها نبتة *Ammi majus L.* الذي يستخرج من ثمارها مركب Xanthotoxine الذي يستعمل لمعالجة مرض الصدفية الجلدية و البهاق [21]، و منها *Anethum graveolens L.* فالى جانب استعماله كتابل فتأثيره الطبي مهضم و مدر للبول و يساعد في حالات الشد العضلي، و نبتة *Ammi visinaga Lamk* التي يستخرج من ثمارها مركب Visnadine الموسع للأوعية التاجية القلبية و الشعب الهوائية ، مضاد للمغص الكلوي و كذلك يستعمل لإخراج حصوة الكلية [22]، و كذلك مركب Kheline المعروف ضد مرض الربو و الذبحة الصدرية كمضاد للتقلص و مهدئ [23]، و مثل *Apium graveolens L.* و بذوره منشطة تستعمل في حالات الاضطرابات المعدية و طارد للغازات و مخفض لدرجة الحرارة ، جذوره و أوراقه خاصة المطلوبة في مجال الطهي لخصائصها العطرية ، و مثل *Carum carvi L.* بذورها مهضمة ، مهدئة فاتحة للشهية و مدرة للبول و *Coriandrum sativum L.* تستعمل بذوره كتابل كما تستعمل في الطب الشعبي لالتئام الجروح و مداواة القروح و طرد الديدان المعوية ، *Petroselinum crispum (Mill.) Fuss* أوراقه الطازجة الغنية بالفيتامين A، B، C فاتحة للشهية و لذلك يضاف إلى المقبلات و هو منشط أيضا [15].

#### I-6- المركبات المفصولة من العائلة الخيمية

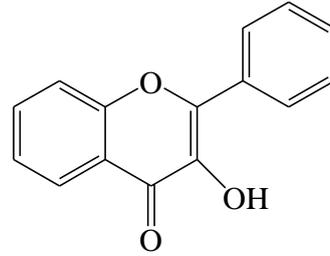
تعتبر العائلة الخيمية غنية بالمركبات الناتجة عن عملية الأيض الثانوي و من أهم هذه المركبات الفلافونويدات [14]، السيسكويتربينات اللاكتونية [15]، الكوماريات [16]، الأسيثيلينات، الزيوت الأساسية [17]، التربينات [18] و السيسكويتربينات [19].

1-6-I-مركبات الفلافونيدات

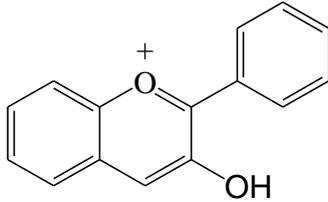
عند إجراء دراسة ببليوغرافية حول الفلافونويدات المعزولة من العائلة الخيمية ( Apiaceae ) تبين أنها تحتوي على 47 نوع من مركبات فلافونويدية منها 36 فلافونويد غليكوزيدي و 11 فلافونويد أجليكوني، تتواجد هذه المركبات بأربع هياكل مختلفة 24 فلافون ، 20 فلافونول وفلافانولين و أنتوسيانيدين واحد .[24]



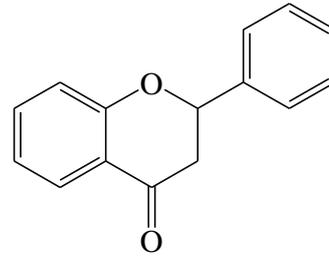
24 Flavones



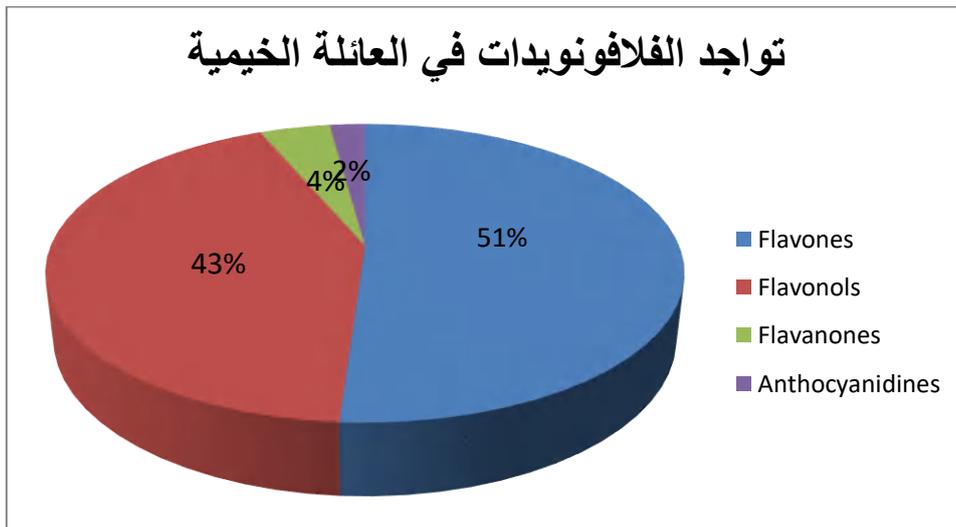
20 Flavonols



1 Anthocyanidine



2 Flavanones



الشكل 3-I: نسبة تواجد أصناف الفلافونويدات في 44 نوع مدروس [43] .

**I-6-1-1- الفلافونيدات الجليكوزيدية :** من بين 44 نوع التي وجدت فيها الفلافونويدات تم إحصاء 36

مركب فلافونويدي جليكوزيدي ، و نلخصها في الجدول التالي:

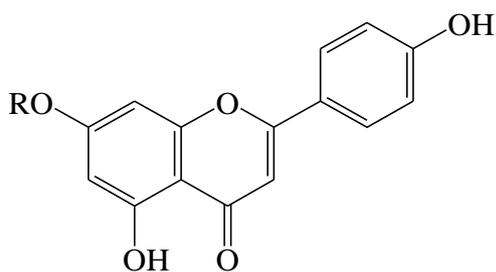
الجدول-I-4. الفلافونيدات الجليكوزيدية المعزولة من عدة أنواع من العائلة الخيمية

المرجع	التوزيع	البنية	الفلافونويد
			<b>Apigénine</b>
[25]	<i>Pencedanum villosum</i>	1 a	Apigenin 7-O-β-D-glucoside
[26]	<i>Apium graveolens</i>	1 b	Apigenin 7-O-β-D -apiosylglucoside
[27]	<i>Torilis ssp.</i>	1 c	Apigenin 7-O-α-L- rhamnosyl-β-D -glucoside
[27]	<i>Pseudorlaya pumila</i>	1 d	Apigenin 7-O-β-D-diglucoside
[27]	<i>Pseudorlaya pumila</i>	1 e	Apigenin 7-O-arabinosyl-α-L-rhamnosyl-β-D -glucoside
[27]	<i>Orlaya daucorlaya</i>	1 f	Apigenin 7-O-β-D -glucosylglucuronide
			<b>Lutéoline</b>
[25]	<i>Daucus carota</i>	2 a	Luteolin 7-O-β-D -glucoside
[29]	<i>Torilis nodosa</i>	2 b	Luteolin 7-O-β-D -diglucoside
[29]	<i>Torilis leptophylla</i>	2 c	Luteolin 7-O-β-D -triglucoside
[28]	<i>Petroselinum crispum</i>	2 d	Luteolin 7-O-β-D -apiosylglucoside
[29]	<i>Torilis ssp.</i>	2 e	Luteolin 7-O- α -L-rhamnosyl-β-D -glucoside
[29]	<i>Turgenia latifolia</i>	2 f	Luteolin 4'-O-β-D -glucoside
[29]	<i>Turgenia latifolia</i>	2 g	Luteolin 4'-O-β-D -diglucoside
[30]	<i>Daucus carota</i>	2 h	Luteolin 4'-O-sulphate
[31]	<i>Torilis, daucus</i>	2 i	Luteolin 5-O-β-D -glucoside
			<b>Kaempférol</b>
[32]	<i>Daucus carota</i>	3 a	Kaempferol 3-O-β-D -glucoside
[25]	<i>Biforatesticulata</i>	3 b	Kaempferol 3-O-rutinoside
[33]	<i>Foeniculum vulgare</i>	3 c	Kaempferol 3-O-β-D -glucuronide
[33]	<i>Foeniculum vulgare</i>	3 d	Kaempferol 3-O-arabinoside
[32]	<i>Daucus carota</i>	3 e	Kaempferol 3-O-β-D -diglucoside
			<b>Quercétine</b>
[34]	<i>Foeniculum vulgare</i>	4 a	Quercetin 3-O-arabinoside
[26]	<i>Orlaya kochii</i>	4 b	Quercetin 3-O-galactoside
[32]	<i>Hydrocotyle ssp</i>	4 c	Quercetin 3-O-β-D -glucoside
[25]	<i>Buplenrum falcatum</i>	4 d	Quercetin 3-O-rutinoside
[33]	<i>Foeniculum vulgare</i>	4 e	Quercetin 3-O-β-D -glucuronide
[25]	<i>Pimpinella procumbens</i>	4 f	Quercetin 3-O- α -L-rhamnoside
[30]	<i>Oenanthe crocata</i>	4 g	Quercetin 3-O-sulfate

الجدول-4-I- الفلافونيدات الغليكوزيدية المعزولة من عدة أنواع من العائلة الخيمية

			<b>Chrysoeriol</b>
[27]	<i>Pseudorlaya pumila</i>	5 a	Chrysoeriol 7-O-β-D -glucoside
[27]	<i>Apium graveolens</i>	5b	Chrysoeriol 7-O-β-D -diglucoside
[35]	<i>Apium graveolens</i>	5c	Chrysoeriol 7-O-β-D -apiosylglucoside
			<b>Isorhamnetine</b>
[36]	<i>Buplenrum multinerve</i>	6 a	Isorhamnetin 3-O-rutinoside
[37]	<i>Pastinaca sativa</i>	6 b	Isorhamnetin 3-O-rutinoside-4'-rhamnoside
[38]	<i>Oenanthe stolonifera</i>	6 c	Isorhamnetin 3-O-potassium hydrogen sulphate
			<b>Diosmetine</b>
[39]		7	Diosmetin 7-O-rutinoside
			<b>Rhamnetine</b>
[30]	<i>Ammi visnaga</i>	8	Rhamnetin 3-O-sulphate
			<b>Rhamnocitrine</b>
[30]	<i>Ammi visnaga</i>	9	Rhamnocitrin 3-O-sulphate

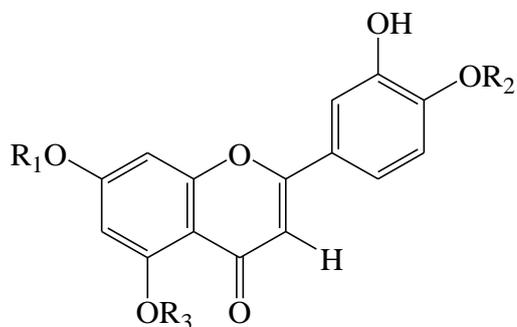
- فلافونويدات غليكوزيدية من النوع Apigénine



1

	<b>R</b>
<b>1 a</b>	Glucoside
<b>1 b</b>	ApiosylGlucoside
<b>1 c</b>	Rhamnosylglucoside
<b>1 d</b>	DiGlucoside
<b>1 e</b>	ArabinosylRhamnosylGlucoside
<b>1 f</b>	GlucosylGlucuronide

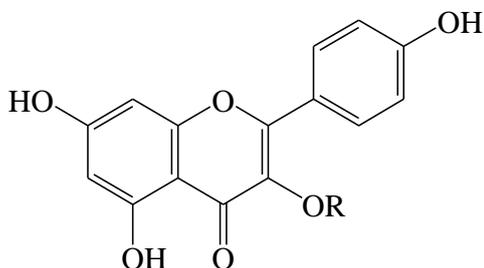
- فلافونويدات غليكوزيدية من النوع Lutéoline



2

	R1	R2	R3
2 a	Glucoside	H	H
2 b	DiGlucoside	H	H
2 c	TriGlucoside	H	H
2 d	ApiosylGlucoside	H	H
2 e	RhamnosylGlucoside	H	H
2 f	H	Glucoside	H
2 g	H	DiGlucoside	H
2 h	H	Sulphate	H
2 i	H	H	Glucoside

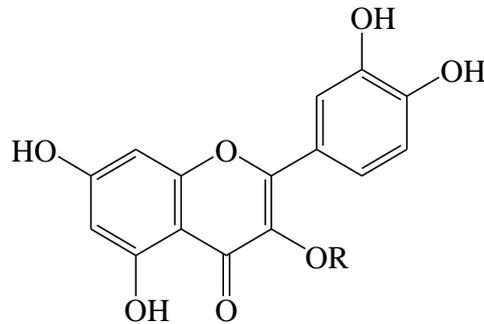
- فلافونويدات غليكوزيدية من النوع Kaempferol



3

R	
3 a	Glucoside
3 b	Rutinoside
3 c	Glucuronide
3d	Arabinoside
3 e	DiGlucoside

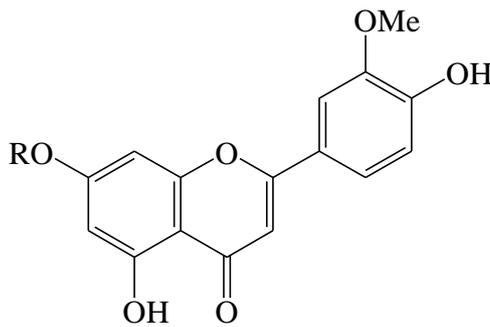
- فلافونويدات غليكوزيدية من النوع Quercétine



4

R	
4 a	Arabinoside
4 b	Galactoside
4 c	Glucoside
4 d	Rutinoside
4 e	Glucuronide
4 f	Rhamnoside
4 g	Sulfate

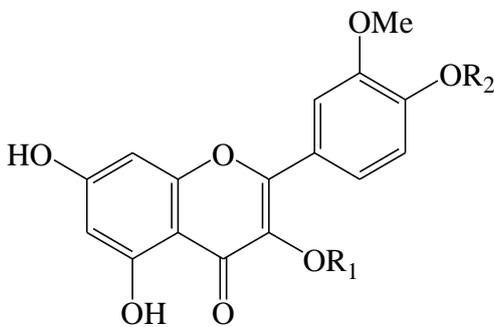
- فلافونويدات غليكوزيدية من النوع Chrysoeriol



5

R	
5 a	Glucoside
5 b	DiGlucoside
5 c	ApiosylGlucoside

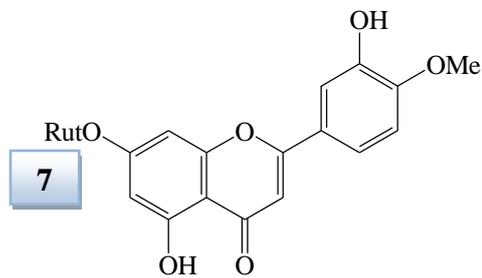
- فلافونويدات غليكوزيدية من النوع Isorhamnetine



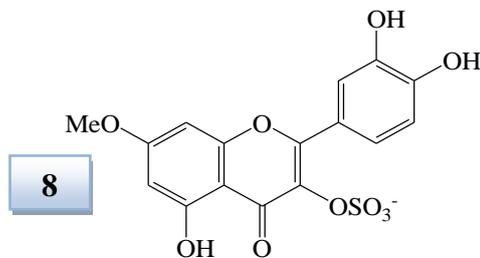
6

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
6 a	Rutinoside	H
6 b	Rutinoside	Rhamnoside
6 c	potassium hydrogen sulphate	H

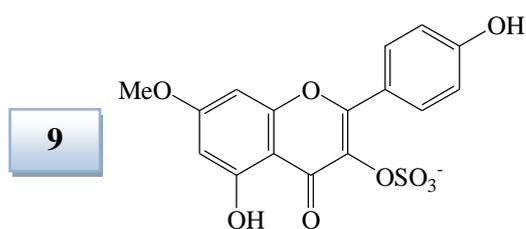
## - فلافونويد غليكوزيد من النوع Diosmetine



## - فلافونويد غليكوزيد من النوع Rhamnetine



## - فلافونويد غليكوزيد من النوع Rhamnocitrine



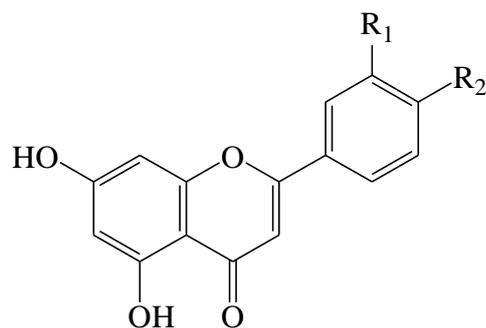
I-6-1-2- الفلافونيدات الأجليكونية :

تم احصاء 11 مركب حيث تم توضيحها في الجدول التالي :

الجدول-I-5: أنواع الفلافونيدات الأجليكونية المعزولة من عدة أنواع من العائلة الخيمية (Apiaceae).

المرجع	التوزيع	البنية	الفلافونويد
			<b>Flavones</b>
[25]	<i>Apium, Daucus, Laserpitium</i>	10 a	Apigenine
[40]	<i>Ammoides atlantica</i>	10 b	Luteoline
[33]	<i>Apium, Daucus, Torilis, turgenia</i>	10 c	Chrysoeriol
[34]	<i>Angelica, Cnidium, Conopodium</i>	10 d	Diosmetine
[34]	<i>Ammi visnaga</i>	10 e	Acacetine
			<b>Flavonols</b>
[41]	<i>Foeniculum vulgare</i>	11 a	Kaempférol
[42]	<i>Buplenrum, Ammi</i>	11 b	Quercetine
[42]	<i>Buplenrum, Oenanthe, Pastinaca</i>	11 c	Isorhamnetine
			<b>Flavanones</b>
[25]	<i>Cnidium silaifolium</i>	12 a	Hesperitine
[26]	<i>Selinum vaginatum</i>	12 b	Selinone
			<b>Anthocyanidine</b>
[36]	<i>Torilis, Daucus, Heracelum</i>	13	Cyanidine

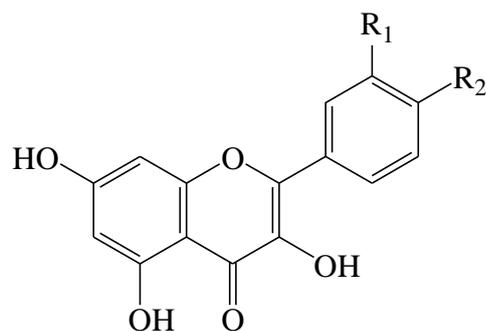
- فلافونويد أغليكوني من النوع Flavone



	R1	R2
10 a	H	OH
10 b	OH	OH
10 c	OMe	OH
10 d	OH	OMe
10 e	H	OMe

10

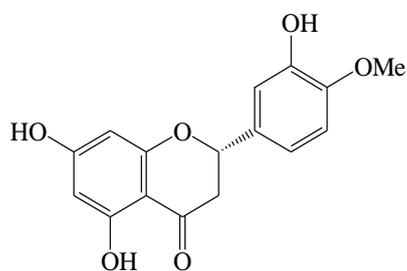
- فلافونويد أغليكوني من النوع Flavonol



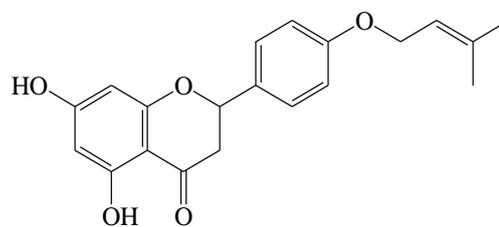
	R1	R2
11 a	H	OH
11 b	OH	OH
11 c	OMe	OH

11

- فلافونويد أغليكوني من النوع Flavanone

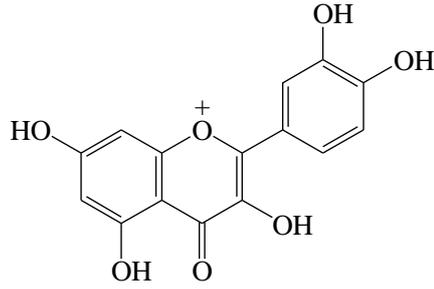


12 a



12 b

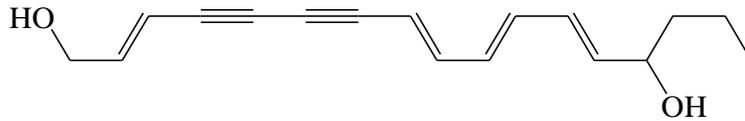
- فلافونويد أغليكوني من النوع Anthocyanidine



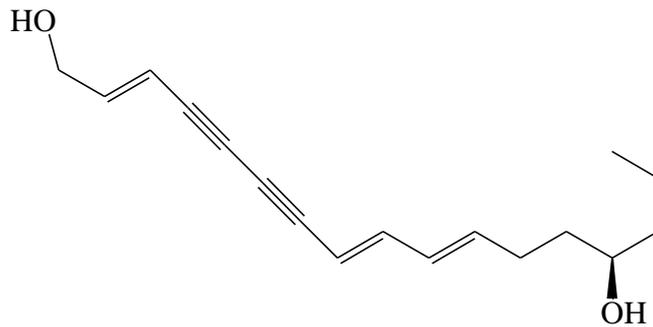
13

I-2-6-2- المركبات الاسيتلينية

تعتبر العائلة الخيمية غنية بالمركبات الأسيتلينية التي هي عبارة عن هيدروكربونات ، تتميز بوجود رابطة ثلاثية بين ذرتي كربون. تحتوي عموما من 13 الي 17 ذرة كربون معظمها سمية،علي سبيل المثال مركب Cicutoxine المتواجد في النوع *Cicuta virosa* و أيضا مركب Oenanthotoxine المتواجد في النوع *Oenanthe crocata* [43] .



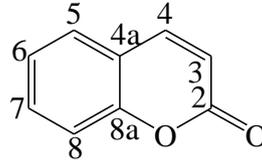
Cicutoxine



Oenanthotoxine

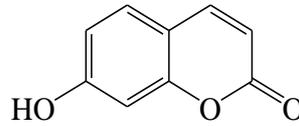
3-6-I الكومارينات

الكومارينات هي عبارة عن مجموعة من مركبات تسمى  $\alpha$ -benzopyrone تتكون من حلقة عطرية مرتبطة مع حلقة بيران [44]. تتواجد الكومارينات في الطبيعة بشكل أجليكونات أو مرتبطة بجزيئات سكرية مشكلة جليكوزيدات (glycosides).



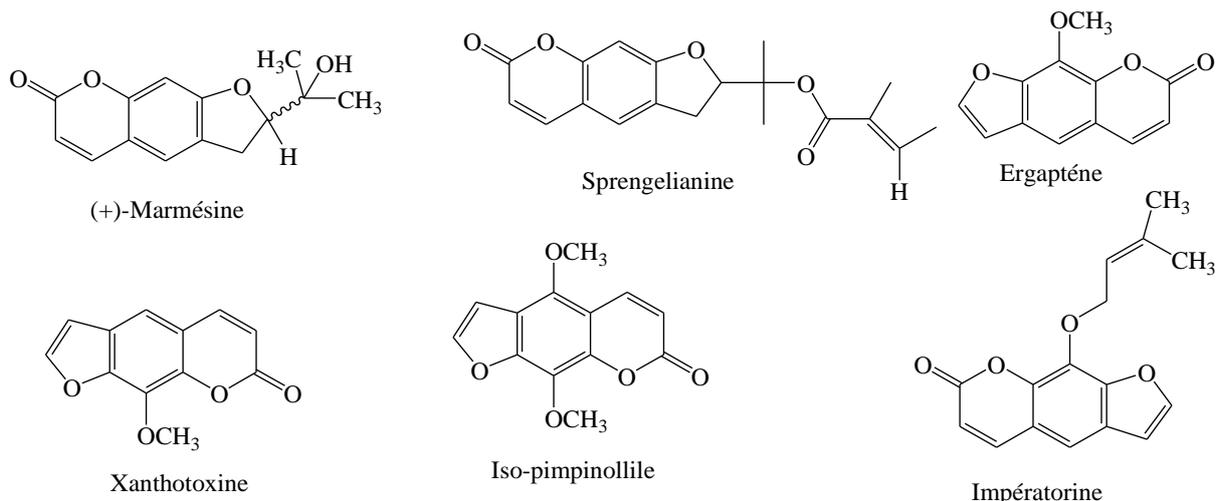
Coumarine

فالعائلة الخيمية (Apiaceae) تعتبر من أهم العائلات الغنية بالكومارينات و على وجه الخصوص الأجناس *Smyrneae, Peucedaneae* و *Amineae* التي تعتبر أكثر تنوعا و توفرا من حيث احتوائها على الكومارينات [45] على عكس الجنس *Elaeoselium* الذي يحتوي علي نسبة منخفضة من الكومارينات . *Ombelliférone* يعتبر من المركبات الأكثر شيوعا في هاته العائلة حيث تم عزله من عدة أجناس تنتمي للعائلة الخيمية (Apiaceae) [46,45].

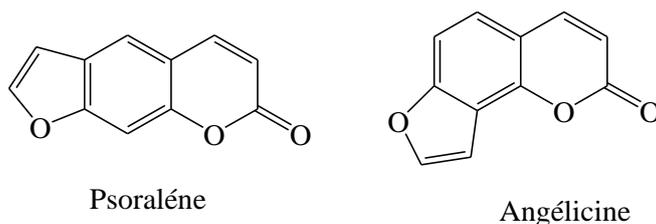


Ombelliférone

يعد *Cachrys sicula* L أكثر الأنواع غنا بالمركبات الكومارينية للعائلة الخيمية ،فهو يعرف ب *Hippomarathrum pterochlaenum* (DC) Boiss [47]،حيث تم عزل سلسلة من المركبات الكومارينية: *Bergapténe* ، *Impératorine* ، *Iso-impératorine* ، *Isopimpinelline* ، *Marmésine*-(+) ، *Saxaline* ، *Ulopterol* و *Xanthotoxine* ، *Prantschimigine*-(-) ، *Sprengelianine*-(-) .



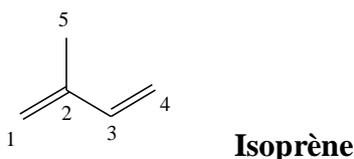
تحتوي العديد من الأنواع على furocoumarines، وهذا الأخير له تأثير على تحفيز تصبغ الجلد، ولهذا الغرض تم بالفعل استخدام بذور *Ammi visnaga* في مصر القديمة. الكومارين المسؤول عن هذا النوع من العمل مشتق من السورالين Psoraléne و Angélicine [48].



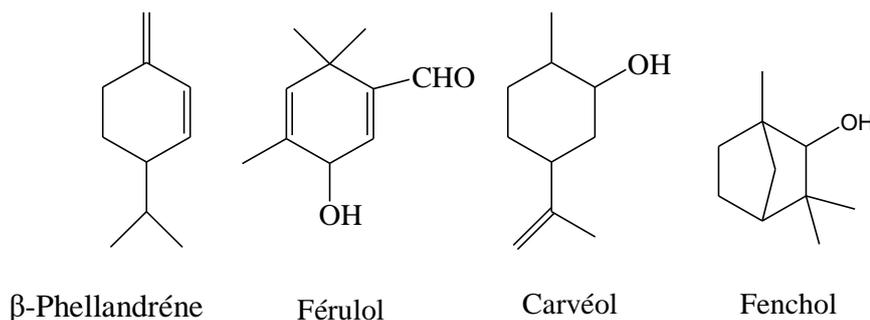
تم عزل furocoumarines مثل Bergapténe و Xanthotoxine ومشتقاتها الأيزوبرينويد من جذور أو ثمار حوالي ثلاثين نبتة من العائلة الخيمية [49]. عادة ما توجد furocoumarines كمزيج معقد (تم عزل أكثر من خمسة عشر من هذه المركبات من نوع واحد من Apiaceae).

#### 1-4-6-I- المركبات التربينية :

تؤلف التربينات المجموعة العظمى من منتجات المملكة النباتية، فالكثير من الزيوت الطيارة في النباتات العطرية تحوي مركبات هيدروكربونية، ذات صيغ كيميائية يدخل في هيكلها مضاعفات من 5 ذرات كربون أي مضاعفات وحدة الايزوبرين ( $C_5H_8$ ). الشكل الذي يعرف كيميائياً باسم 2-ميثيل، 1،3-البيوتادين.



فهي المكونات السائدة للعائلة الخيمية Apiaceae [50] بشكل رئيسي التربينات الأحادية و السيسكويتربينات، تم عزل العديد من هذه المركبات لأول مرة و تم اشتقاق أسمائها من النبات الأصلي ، على سبيل المثال ،  $\beta$ -Phellandrene، من النوع *Phellandrium aquaticum* ، و المركبين carvone و carveol من النوع *Carum carvi* ، fenchol و fenchone من النوع *Foeniculum vulgare* و المركب Ferulol من النوع *Ferula Hispanica* .

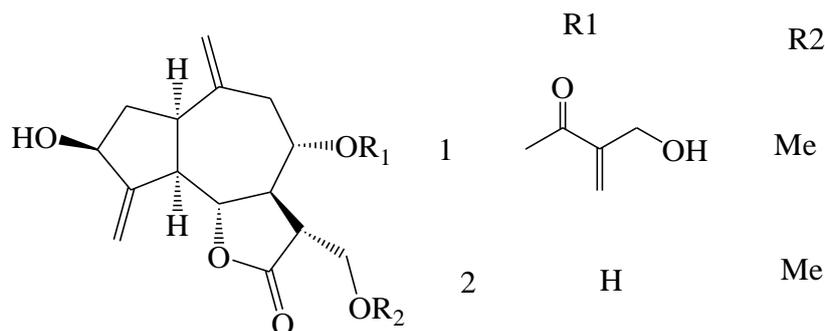


### I-4-2-المركبات السيسكويتربينية اللاكتونية

تعد العائلة الخيمية (Apiaceae) من العائلات الغنية بالمركبات اللاكتونية، و التي تنقسم إلى عدة أنواع منها Ermophilanolide و Eudesmanolide , Elémanolide , Germacranolide , Guaianolide . من بين المركبات السيسكويتربينية اللاكتونية المعزولة من بعض الأنواع للعائلة الخيمية (Apiaceae) .

### \* النوع Guaianolide

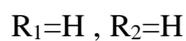
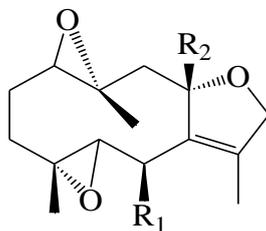
تم فصل هذا المركب لأول مرة من النوع النباتي *Ferula olga* [51] .



- 1) 8 $\alpha$ -O-2-hydroxymethyl-2-propenoyl-3 $\beta$ -hydroxy-13-methoxy-4(15),10(14)-guaiadien-12,6-olide
- 2) 3 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-13-methoxy-4(15),10(14)-guaiadien-12,6-olide

## \* النوع Germacranolide

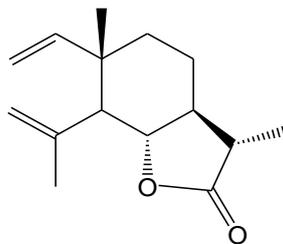
تم فصل هذا المركب من النوع النباتي *Smyrniium olusartrum* [52].



1 $\beta$ ,10 $\alpha$ , 4 $\alpha$ ,5 $\beta$  -diepoxyglechoman-8 $\alpha$ ,12-olide

## \* النوع Elémanolide

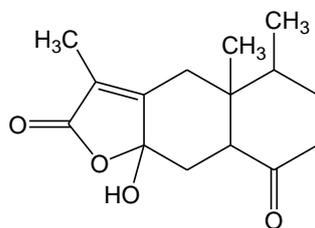
تم فصل هذا المركب من النوع النباتي *Thapsia gymnesica* [53].



Saussurea lactone

## \* النوع Ermophilanolide

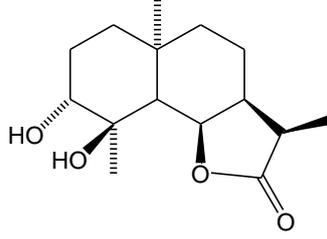
تم فصل هذا المركب من النوع النباتي *Smyrniium olusatrum* [54].



Istanbuline A

## \* النوع Eudesmanolide

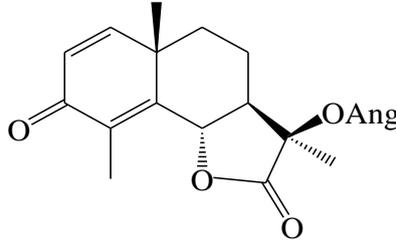
تم فصل هذا المركب من النوع النباتي *Ferula sinaica* [ 55] .



3 $\alpha$ , 4 $\beta$  -dihydroxy-5 $\beta$ H, 11 $\alpha$ H,12-olide

## \* النوع Pseudoguaianolide

تم فصل هذا المركب من النوع النباتي *Melanoselinum decipiens* [56].



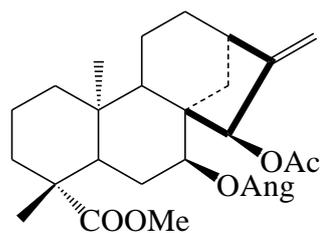
Decipienine A

## I-3-4-6- التربينات الثنائية:

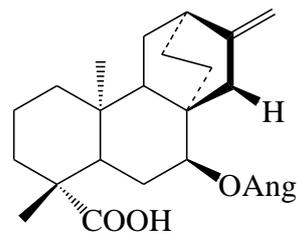
في العائلة الخيمية عدد قليل من الدراسات التي تصف وجود تربينات ثنائية، الأبحاث التي أجريت على نوع جذور *Hermas villosa* [57] ، أدى إلى عزل و تحديد أربعة مركبات متخالفة (isomères) حمضية للتربينات الثنائية [57]، للهيكال labdane على شكل (trans,cis):

أما دراسة النوع *Elaeoselinum gummiferum* فقد أعطت أربع مركبات Acide gummiférolique، Acide isomargotianoïque، ent-Kaur-16-en-19-oïque و margotianine .

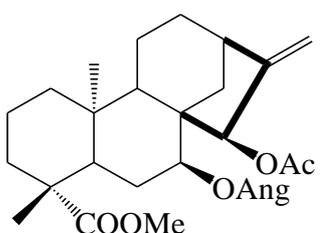
أظهرت الدراسة البيبليوغرافية للنوع *Elaeoselinum gummiferum* بعزل أربع مركبات acide gummiférolique، Acide isomargotianoïque، ent-Kaur-16-en-19-oïque و margotianine [59,58].



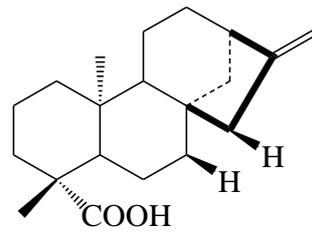
Acide isomargotianoïque



Acide gummiférolique



Margotianine

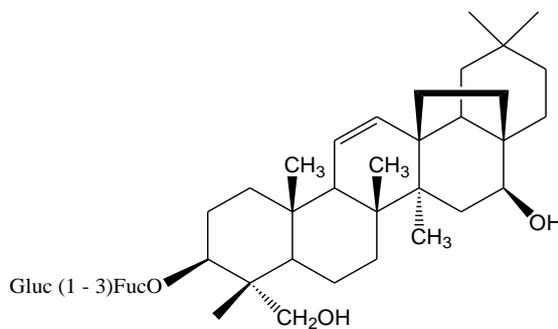


ent-Kaur-16-en-19-oïque

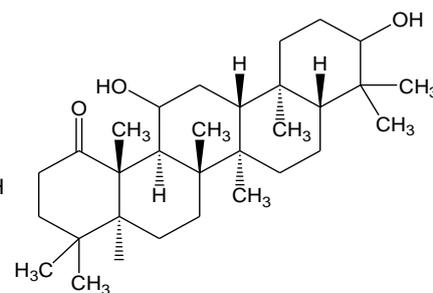
#### 4-4-6-I- التربينات الثلاثية

و هي التي تتكون من ست وحدات من الايزوبرين ، و تعتبر العائلة الخيمية غنية بهذا النوع من المركبات و خاصة الجليكوزيدية منها والتي تكون فعالة بيولوجيا . نذكر منها Coriandrindiol الذي فصل من ثمار النبتة *Coriandrum sativum L* ، Saikosaponine و الذي فصل من جذور النبتة

*Bupleurum falcatum* [61,60].



Coriandrindiol



Saikosaponine A

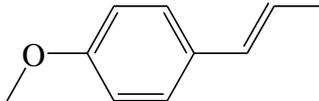
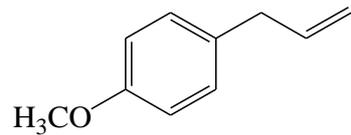
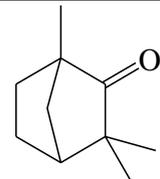
#### 5-6-I- الزيوت العطرية الأساسية:

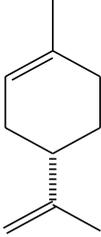
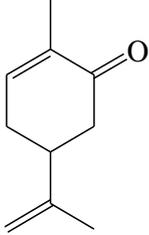
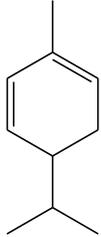
الزيوت العطرية هي مستخلصات زيتية تستخرج من النبات أو بعض أجزائه .تمتاز بقوة تركيزها و رائحتها النفاذة و كونها سهلة التطاير حيث تتبخر بالكامل دون أن تترك أثرا دهنيا خلفها .

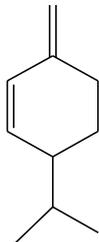
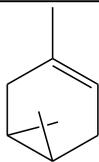
تعرف العائلة الخيمية بإحتوائها على الزيوت العطرية، التي تتميز بروائح مميزة، و تتواجد في الأزهار و الفواكه و الأوراق كذلك السيقان و حتى القشور. و تستعمل الزيوت العطرية الأساسية في مواد التجميل كما تستعمل كمواد لتحنيط وغيرها من الإستعمالات ومنها زيت الليمون، و زيت خشب الأرز وغيرها. و في دراسة قام بها WILLIAMS, C.A. [62]، شملت 24 نوع من العائلة الخيمية، لمعرفة تركيبة الزيوت الأساسية وهذا عن طريق كروماتوغرافيا الغازية.

والنتائج المتحصل عليها كانت مفيدة بشكل خاص في الفصل بين أجناس العائلة الخيمية. و أظهرت الدراسة البيليوغرافية لستة أنواع من العائلة الخيمية ، الاختلاف الكمي و النوعي في محتوياتها من الزيوت الأساسية و الجدول التالي يوضح بعض بنى الزيوت الأساسية المعزولة من هذه الأنواع :

الجدول 6-I : بنى بعض الزيوت الأساسية المعزولة من هذه الأنواع :

النوع النباتي	بنية و إسم المركبات المعزولة	المراجع
<i>Pimpinella anisum</i> L. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill var. <i>dulce</i>	Anéthol	[64,63]
		
<i>Pimpinella anisum</i> L. <i>Foeniculum vulgare</i> Miller. var. <i>vulgare</i>	Estragol	[64,63]
		
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill var. <i>dulce</i>	fenchone	[64,63]
		

[64,63]	limonène	<i>Anethum graveolens</i> L. (الثمار) <i>Carum carvi</i> L.
		
[64,63]	Carvone	<i>Anethum graveolens</i> L. (الثمار) <i>Carum carvi</i> L.
		
[64,63]	Alpha Pinéne	<i>Angelica archangelica</i> L.
		
[64,63]	$\alpha$ - phellandréne	<i>Angelica archangelica</i> L.
		

[64,63]	$\beta$ - phellandrène	<i>Angelica archangelica</i> L.
		
[64,63]	$\Delta^3$ -Carène	<i>Angelica archangelica</i> L.
		

7-I- الدراسة الكيميائية لنبات *Ammoides atlantica*

## 1-7-I- وصف النوع:

*Ammoides atlantica* نبات حولي أو معمر ذات حزم كثيفة فقيرة إلى الوريدات في الأوراق القاعدية. سيقانها أقل تشبعا مقارنة بالنوع الآخر *Ammoides pusilla* ، تتميز بخيميات ذات 3 إلى 6 أشعة. أما الثمار فذات شعاع بيضوي بطول 2-2.5 mm ، تنمو بالجبال في المرتفعات الأكثر من 1000 m وهي نبتة أصلية بالجزائر [65].

الشكل I-4: صور فوتوغرافية للنبات *Ammoides atlantica*

2-7-I-التوزيع الجغرافي:

نبات *Ammoides atlantica* مستوطن في الجزائر [2].

3-7-I-التصنيف النظامي للنباتة: يكون هذا التصنيف حسب الجدول (7-I) .

الجدول 7-I : التصنيف النظامي للنباتة

Spermaphytes	الفرع
Angiospermes	تحت الفرع
Dicotylédones	الصف
Rosida	تحت الصف
Apiales	الرتبة
Apiaceae	العائلة
Apioidae	تحت العائلة
<i>Ammoides</i>	الجنس
<i>Ammoides atlantica</i>	النوع

4-7-I- الاستخدامات التقليدية :

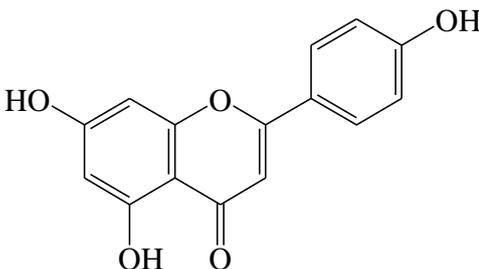
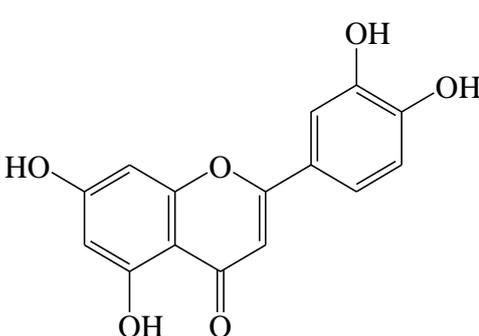
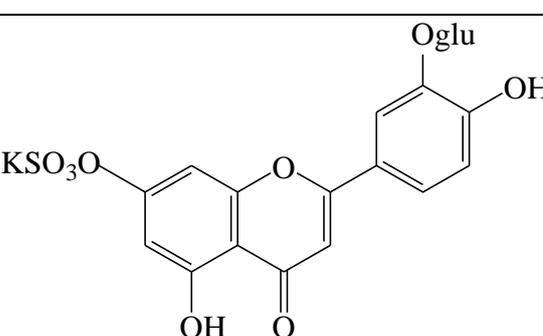
في الطب الشعبي الجزائري، يستخدم *A. atlantica* على نطاق واسع في الحقن لعلاج الصداع و الإسهال. له أيضا خصائص هضمية مهمة و يستخدم في بعض الوصفات. في بعض الأحيان يتم استخدامه أيضا في الكمادات منفردة أو منقوعة في الكحول أو الخل و مخلوطة بالحناء، لعلاج الأطفال المصابين بالوهن العقلي [66,40] .

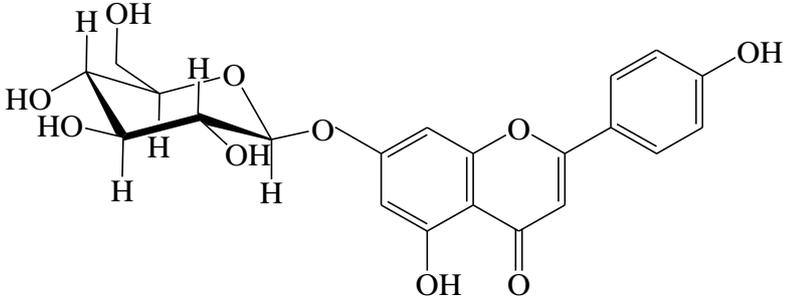
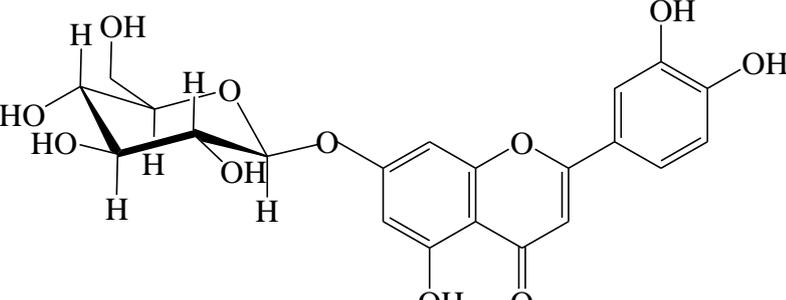
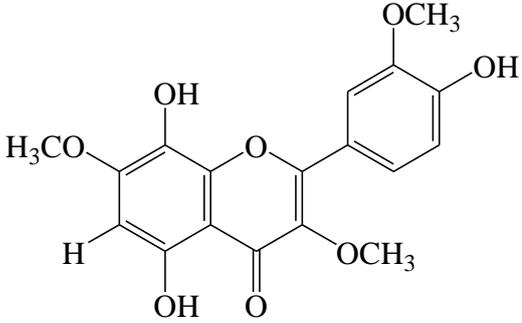
5-7-I- المسح الكيميائي للجنس *Ammoides*:

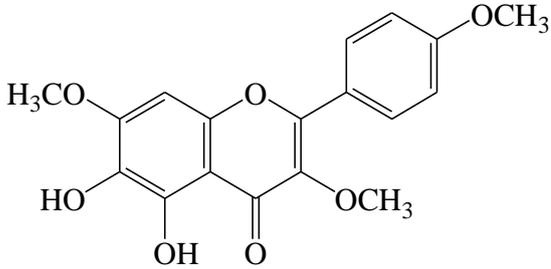
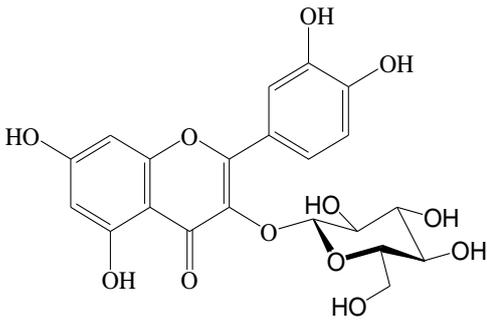
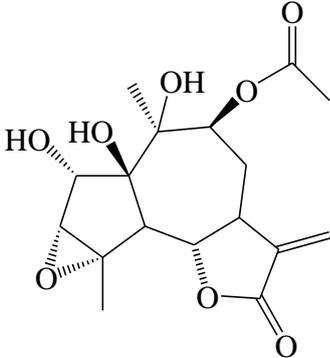
يعتبر الجنس *Ammoides* مهم و هذا لاحتوائه على عدد معتبر من المركبات المعزولة و في ما يلي جدول (8-I) لمختلف المركبات المعزولة من الجنس *Ammoides* :

الجدول I-8: بنية المركبات المعزولة من الجنس *Ammoides* :

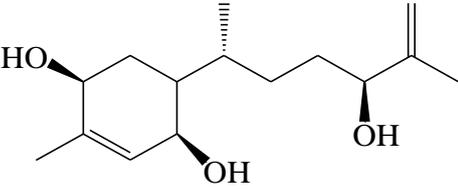
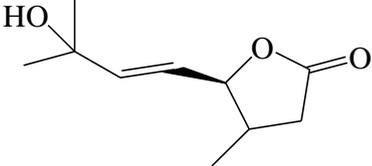
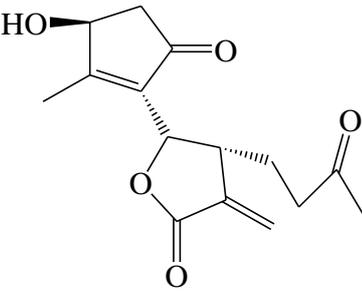
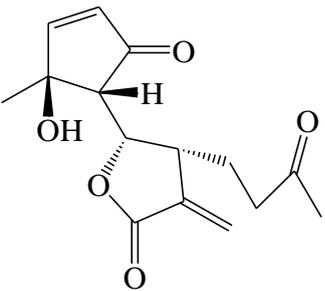
يمثل بنية المركبات المعزولة من الجنس *Ammoides* .

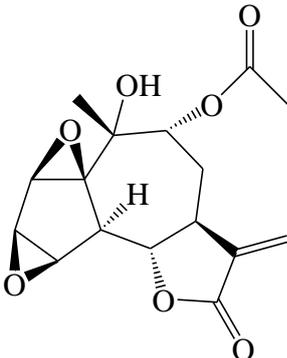
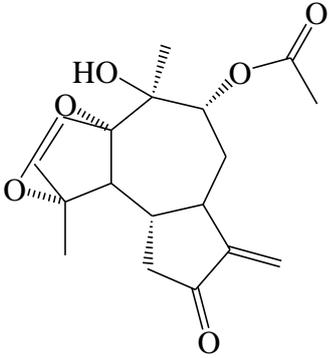
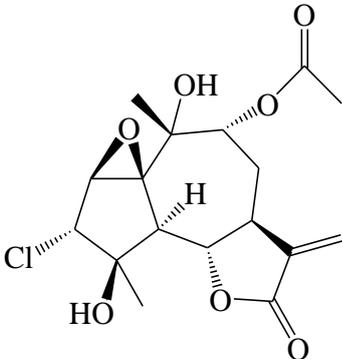
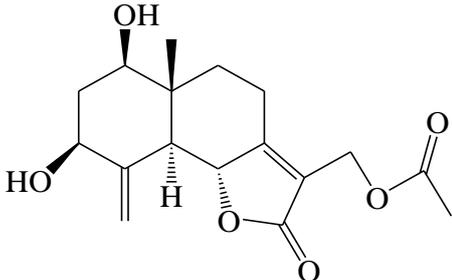
المراجع	بنية و اسم المركبات المعزولة	النوع النباتي
[40]	Apigénine	<i>Ammoides atlantica</i>
		
[67,40]	Lutéoline	<i>Ammoides atlantica</i>
		
[68]	Luteolin 7-Sulfate-3'-O-β-D -glucoside	<i>Ammoides pusilla</i>
		

<p>[67,40]</p>	<p>Apigenin 7-O-β-D -glucoside</p> 	<p><i>Ammoides atlantica</i> <i>Ammoides pusilla</i></p>
<p>[67,40]</p>	<p>Luteolin 7-O-β-D -glucoside</p> 	<p><i>Ammoides atlantica</i> <i>Ammoides pusilla</i></p>
<p>[69]</p>	<p>Gossypetin 3,7,3'-trimethyl ether</p> 	<p><i>Ammoides atlantica</i></p>

[69]	<p style="text-align: center;">Tanetine</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>
	<p style="text-align: center;">Quercetin 3-O-β-D-glucoside</p> 	<i>Ammoides pusilla</i>
[69]	<p>1S*,2S*,10S*-trihydroxy-3R*,4S*-epoxy-9S*-acetoxy-5α,7αH-guaia-11(13)-en-12,6α-olide</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>

[69]	1S*,4R*,9R*,10R*-tetrahydroxy-5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ H-guaia-2(3),11(13)-dien-12,6 $\alpha$ -olide	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	Acide 2-oxo-6 $\alpha$ -hydroxy-8R*-acetoxyguaia-1(10),3(4)-dien-12-oique	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	1R*,5R*-epoxy-guaian-10R*,11-diol	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	Acide 1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,13-trihydroxy-6 $\alpha$ -acetoxy-eudesma-4(15),7(11)-dien-12-oique.	<i>Ammoides atlantica</i>

[69]	<p>2S*,5R*,10S*-trihydroxybisabol-3,12-diene</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	<p>dihydro-3S*-hydroxy-3S*-methyl-4R*-(3-hydroxy-3-methyl-1-buten-1-yl)-2(3H)-furanone.</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	<p>epi-Tanaphiline</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	<p>seco-Tanapartholide B</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>

[69]	<p style="text-align: center;">9<math>\alpha</math>-acetoxyartecanin</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	<p style="text-align: center;">Apressine</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	<p style="text-align: center;">3<math>\alpha</math>-chloro-9<math>\alpha</math>-acetoxy-4<math>\beta</math>,10<math>\alpha</math>-dihydroxy-1<math>\beta</math>,2<math>\beta</math>-epoxy-5<math>\alpha</math>,7<math>\alpha</math>H-guai-11(13)-en-12,6<math>\alpha</math>-olide</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>
[69]	<p style="text-align: center;">1<math>\beta</math>,3<math>\beta</math>-dihydroxy-13-acetoxy-eudesma-4(15),7(11)-dien-12,6<math>\alpha</math>-olide</p> 	<i>Ammoides atlantica</i>

باستعمال طريقة التحليل GC/MS للزيت الطيار لكل من *A. pusilla* [70] و *A. atlantica* [71] أثبت احتوائها على نفس المركبات الأعظمية و بنسب متقاربة كما هو موضح في الجدول التالي:

الجدول 9-I: الزيوت الأعظمية ل *Ammoides*

المركبات الأعظمية	Thymol	γ-Terpinéne	p-Cymene
<i>A. atlantica</i>	53.25%	19.40%	10.60%
<i>A. pusilla</i>	44.50%	3.29%	13.50%

بالنسبة للدراسات المسبقة للمركبات الفلافونويدية التي تحض النبتة *A. atlantica* و *A. pusilla* فكل ما تم فصله مدون في الجدول 8-I.

#### 6-7-I- المسح البيولوجي للجنس *Ammoides* :

تستعمل كل من نوعي *A. atlantica* و *A. pusilla* في الطب الشعبي كمضاد للبكتيريا و الإسهال، كما تستعمل *A. pusilla* لمعالجة الحمى، الأنفلونزا و تداوي أوجاع الرأس كما تنفع في الكحول أو حمض الخل و تمزج مع الحناء لمعالجة التخلف العقلي لدى الأطفال، بالإضافة إلى استعمالها كتوابل في الأطعمة [70]، و قد ذكرها ابن البيطار في كتابه الجامع لمفردات الأدوية و الأغذية باسم أطريلال و هي كلمة بربرية تعني رجل طائر، يعرف بالديار المصرية برجل الغراب و بعضهم يسمونه بجزر الشيطان، و قد نوه بعضهم فائدتها في علاج البرص. و أول ما ظهر استعمال هذه النبتة كان عند قبيلة بربرية تعرف ببني أبي شعيب من بني وجهان من بجاية [72].

كما يستعمل المستخلص المائي لهذه النبتة في الطب الشعبي شرق المغرب كعلاج لداء السكري، و هذا ما أثبتته التحاليل البيولوجية التي أجريت بطريقتي (OGTT (Oral glucose Tolerance Test) و (IVGTT (Injection vasculaire glucose Tolerance Test) التي أثبتت التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لنبتة *A. pusilla* على امتصاص سكر بنسبة 28.5% بجرعة 250 mg/Kg و قد طمأنت التحاليل السمية من عدم وجود مضاعفات أو مخاطر من استعمال هذه النبتة [73].

كما أثبت حسين لعور و فرقته التأثير التثبيطي للزيت الطيارل *A. pusilla* على كل من نوعي البكتيريا الممرضة *Pseudomonas syringae pv. Syringae* و *Pseudomonas syringae pv. morsprunorum* [74]. كما أظهر هذا الزيت فعالية ضد ميكروبية معتبرة مع كل من السلالات :

*Serratia marcescens*, *Salmonilla enteritidis*, *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas syringae pv. morsprunorum*, *Pseudomonas syringae pv. syringae*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* [70].

بالنسبة للنوع الثاني *A. atlantica* فقد أظهر التشخيص البيولوجي لزيتته الطيار، فعالية ضد ميكروبية على كل من الانواع : *Escherichia coli* (ATCC 25922) ، *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) .

كما سجل هذا الزيت تأثيرا تثبيطا جد فعال على النوع البكتيري *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) [75]. كما أثبتت الدراسات البيبلوغرافية عدة نشاطات بيولوجية منها مضادات الأكسدة ،مضادات الأستيل-كولينستراز ،مضادات التيروسيناز و مضادات ألفا-غليكوز لمستخلصات *A. atlantica* المائية - الميثانولية و أجزاءها الفرعية ،الهكسان، الكلوروفورم ، أسيتات الايثيل ، البوتانول و المستخلص المائي .و كذلك تقييم النشاط المضاد للقرحة المعدية و التأثير على الحركية المعدية المعوية ( إفراغ المعدة و العبور المعوي ) .

كما أظهر تحليل GC-MS أن الكارفاكروول، حمض اللينوليك، حمض الأوليك، (9- حمض أوكتاديسينويك (Z)) و حمض البالمتيك على أنها المركبات الرئيسية للمستخلص الهكسانولي. كذلك بينت تقييم كمية البوليفينولات و الفلافونويدات .حيث أعطت جميع مستخلصاتها أنشطة مضادة للأكسدة و مضادات الأنزيمات.كما بينت أن مستخلص أسيتات الايثيل أعطى أعلى نشاطا مع معظم الاختبارات البيولوجية ،حيث تسبب في تأخير إفراغ المعدة [76].

## المراجع باللغة العربية

- [7] الصباغ، ع. ع. ( 1988 ). موسوعة النبات العام . ديوان المطبوعات الجامعية ،الجزائر .ص 649-651.
- [24] مخلوفي ،ا.دراسة فيتوكيميائية لنوعين من النباتات الطبية ذات الأصل الجزائري من العائلة الخيمية مع دراسة فعاليتها البولوجية (*Reutera lutea* (Apiaceae) ،*Daucus aureus* (Apiaceae). (2014). مذكرة لنيل شهادة الدكتوراه في الكيمياء العضوية .جامعة قسنطينة 1.
- [68] عزوزي، س.دراسة منتوجات الأيض الثانوي للنبتين *Oenanthe globulosa L.* و *Ammoides Pusilla* (Apiaceae). (2004).مذكرة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية .جامعة قسنطينة 1.

## المراجع باللغة الأجنبية

- [1] Heywood, V. H. (1996). Les plantes à fleurs: 306 familles de la flore mondiale, Nathan.
- [2] Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1, Edition CNRS, Paris.
- [3] Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K.H.C., Bedir, E., Khan, I.A., Wedge, D.E. (2006). Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. Journal of Chromatography. 1117, 194-205.
- [4] Seraga, S., Gedarab, R., Abo El- Nagaa, Z., Amara, G. (2013). "Habitat Effect on The Essential oils, Phenolics and Flavonoids of The Medicinal Weed *Apium graveolens L.*," Scientific Journal for Damietta Faculty of Science. 2, 33-42.
- [5] Pimenov, M.G., Kljuykov, E.V. (1987). Neoconopodium a new genus of the Umbelliferae from the Himalaya. Feddes Repetorium. 98, 373-378.
- [6] Stephen, R.D., Deborah, S.K., Krzysztof, S. (2000). A Phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. American Journal of Botany. 87, 76-95.
- [8] Laouer, H., Zerroug, M.M., Sahli, F., Chaker, A.N., Valentini, G., Ferretti, G., Grande, M., Anaya, J. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Ammoides pusilla Brot.* Breistr. Essential oil. Journal of Essential Oil Research. 15, 135-138.
- [9] Jabrane, A., Ben Jannet, H., Harzallah-Skhiri, F., Mastouri, M., Casanova, J., Mighri, Z. (2009). Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota L. ssp. maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy, and in vitro Antibacterial.
- [10] Pimenov, M.G., Leonov, M.V. (1993). The genera of the Umbelliferae Nomenclature. Royal Botanic Gardens Kew, U.K. & Botanical Garden of Moscow University, Russia. 90.
- [11] Reduron, J. P., Charpin, A., Pimenov, M. (1997). Contribution à la nomenclature générique des Apiaceae (Ombellifères). Le Journal de Botanique. 03, 91-104.
- [12] Chokra, I.S. (1994). Flowering plants. Printing House of the Arab Thought.
- [13] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome 2. Édition Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- [14] Ozenda, P. (1991). Flore et végétation du Sahara, 3<sup>ème</sup> édition, Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S), Paris, p355-362.
- [15] Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmonod, D. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs, 3<sup>ème</sup> éd. Presses polytechnique et universitaires romandes,

Lausanne.

- [16] Struwe, L. (2009). Field identification of the 50 most common plant families in temperate regions.
- [17] Downie, S.R., Ramanath, S, D S. Katz-Downie, E Lianas . (1998). Molecular Systematics of Apiaceae Subfamily Apioideae : Phylogenetic Analyses of Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer, American Journal of Botany, 85(4), 563–591.
- [18] Drude, O. (1898). Umbelliferae. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien, Engler A & Prantl K, editor, 63-150.
- [19] Judd, W.S., camphell, C.S., Kellogg, E.K., Stevens, P.F. (1999). Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, 3ème éd, Sinauer Associates, p387.
- [20] Torck, M., Troitiw, F. (1980). Plantes médicinales des régions tempérées, Maloine, Paris, p 225.
- [21] Krolicka, A., Kartanowicz, R., Wosinski, S.A. (2006). Induction of secondary metabolite production in transformed callus of *Ammi majus* L. grown after electromagnetic treatment of the culture medium, Enzyme and Microbial Technology, 39, 1386-1391.
- [22] Zgorka, G., Dragan, T., Głowniak, K. (1998). Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and *Ammi visnaga* fruits, Journal of Chromatography A, 797, 305-309.
- [23] Gunaydina, K., Erimb, F.B. (2002). Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A. 954, 291-294.
- [25] Crowden, R.K., Harborne, J.B., Heywood, V.H. (1969). Chemosystematics of the Umbelliferae A general survey. Phytochemistry. 08, 1963-1984.
- [26] Dewick, P.M. (2001). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2ed Edition. New York: John Wiley & Sons.
- [27] Nordstrom, N., Swain, A., Hamblin, A.J. (1953). The flavone glycosides of parsley. Chemical Industry, London. 85-86.
- [28] Harborne, J.B. (1967). Comparative biochemistry of flavonoids. V. Luteolin 5-glucoside and its occurrence in the Umbelliferae. Phytochemistry. 6, 1569-1573.
- [29] Glennie, W., Harborne, J.B. (1971). Flavone and flavonol 5-glucosides. Phytochemistry. 10, 1325-1329.
- [30] Minaeva, V.G., Volkhonskaya, T.A. (1964). Flavonoid of *Bupleurum multinerve*. Doklady Akademii nauk SSSR Journal. 154, 956-959.

- [31] Farooq, M.O., Gupta, S.R., Kiamuddin, M., Rahman, W., Seshadri, T.R. (1953). Chemical examination of celery seeds. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 12, 400.
- [32] Rahman, W., Ilyas, M., Khan, A.W. (1963). Flower pigments: Flavonoids from *Daucus Carota*, Linn. D. *Vulgaris*. *Naturwissenschaften*. 50, 477.
- [33] Harborne, J.B., Saleh, N.A.M. (1971). Flavonol glycoside variation in fennel, *Foeniculum vulgare*. *Phytochemistry*. 10, 399-400.
- [34] Ohta, T., Miyazaki, T. (1959). Foenicularin, a Quercetin-3-*O*-Arabinoside from the Leaves of *F. vulgare*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 76, 323-324.
- [35] Plouvier, V. (1969). Glycosides and Polyalcohols of Some Umbelliferae. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 268, 86-88.
- [36] Maksyutina, N.P., Litvinenko, V.I. (1966). Chemical investigation of pasternoside. *Chemical Abstracts Journal*. 65, 788.
- [37] Matsushita, A., Iseda, S. (1965). Flavonoid Constituents of the Flowers of *Oenanthe stolonifera*. *Journal of the agricultural chemical society of Japan*. 39, 317-318.
- [38] Gerichten, E.V. (1876). About Apiole. *Breach Der Deutsch chemichen Gesellschaft*. 9, 1477-1479.
- [39] Harborne, J.B., King, L. (1976). Flavonoid sulphates in the Umbelliferae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 4, 111-115.
- [40] Louaar, S., Akkal, S., Bayet, C., Laouer, H., Guilet, D. (2008). Flavonoids of Aerial Parts of an Endemic Species of the Apiaceae of Algeria, *Ammoides atlantica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 44, 516-517.
- [41] Fathy, M.S., Afaf, H.S., Amal, E.K., Shahera, M.E. (2002). An Acylated Kaempferol Glycoside from Flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. Dulce*. *Molecules*. 7, 245-251.
- [42] Bencheraiet, R., Kherrab, H., Kabouche, A., Kabouche, Z., Jay, M. (2011). Flavonols and Antioxidant Activity of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae). *Natural Products*. 5, 52-55.
- [43] Anet, E.F.L.J., Lythgoe, B., Silk, M.H., Trippett, S. (1953). Oenanthe toxin and cicutoxin. Isolation and structures. *Journal of the Chemical Society*. 62, 309-322.
- [44] Keating, G. J., Kennedy, R.O. (1997). The chemistry and occurrence of coumarins, 23-66.
- [45] Murray, R.D. (1978). Naturally Occurring Plant Coumarins. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*. 35, 199.
- [46] El Hazimi, H. (2002). *Natural Products 3rd Ed.* Alkheraiji Library, Riyadh, Saudi Arabia. 166-165.
- [47] Rodriguez, B., Pinar, M. (1979). Aus Wurzeln und Kraut Atisan- und Kaurande-rivate.

*Anales de Quimica.* 75, 936.

[48] Evans, F.J., Schmidt, R.J. (1980). Plants and plant products that induce contact dermatitis. *Planta Medica.* 38, 289-316.

[49] Dean, F.M. (1963). Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds. Butterworth's, London. p 54.

[50] Mariaca, R.G., Berger, T.H.F., Gauch, R., Imhof, M.I. (1997). Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavour compounds in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4423-4434.

[51] Ha, T.J., Park, K.H., Jang, D.S., Lee, J.R., Park, K.M., Yang, M.S. (2003). New Sesquiterpene Lactones from *Hemisteptia lyrata* Bunge. *International Journal for Reviews and Communications in Heterocyclic Chemistry.* 60, 623-629.

[52] El-Gamal, A.A. (2001). Sesquiterpene lactones from *Smyrniololus*. *Phytochemistry.* 57, 1197-1200.

[53] Drew, D.P., Krichau, N., Reichwald, K., Simonsen, H.T. (2009). Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Rev.* 8, 581-599.

[54] Buděšinská, M., Holuba, M., Šamana, D., Smolová, Z., Ulubelenb, A., Kšuzb, S. (1984). Structure of istanbulin A and istanbulin B - two sesquiterpenic lactones from *Smyrniololus* L. *Collection of Czechoslovak chemical communications.* 49, 1311-1317.

[55] Ahmed, A. A., Abdel-Razek, M.H., Nassar, M.I., Izumi, S., Ohta, S., Hirata, T. (2001). An eudesmanolide and a carotene from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry.* 57, 513-515.

[56] Macas, F.A., Aguilar, J.M., Molinillo, J.M.G., Rodriguez-Lus, F., Collado, I.G., Massanet, G.M., Fronczek, F.R. (2000). Studies on the Stereostructure of Eudesmanolides from Umbelliferae: Total Synthesis of (+)-Decipienin A. *Tetrahedron.* 56, 3409-3414.

[57] Bohlmann, F., Zdero, C. (1974). Ozidsäure war bereits aus der Leguminose *Daniellaea* bekannt. *Chemische Berichte.* 107, 1416.

[58] Pascual, T.J., Grande, C., Moran, J.R., Grande, M. (1984). A revised structure for diterpenoid magydaradienol. *Chemistry Letters.* 13, 247-250.

[59] Rodriguez, B., Pinar, M. (1974). Margotianin, a new diterpenoid from *Margotia gummifera*. *Phytochemistry.* 18, 891-893.

[60] Paloma Filliat. Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. *Sciences pharmaceutiques.* 2012. dumas-00740660. p 55 .

- [61] Hsu, M.J., Cheng J.S., Huang H.C. (2000). Effect of saikosaponin, a triterpene saponin, on apoptosis in lymphocytes. *British Journal of Pharmacology*. 131, 1285-1293.
- [62] Williams, C.A., Harborne, J.B. (1972). Essential oils in the spiny-fruited umbelliferae. *Phytochemistry*. 11, 1981-1987.
- [63] Daloma ,F. (2012). Les plantes de la famille des apiacées dans les troubles digestifs. Thèse d'doctorat .Université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie .Grenoble.P 44-64.
- [64] Teuscher, E., Anton R., Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec & Doc, Paris. p 522.
- [65] Ababsa, Z.E. (2013). Etude d'activités biologiques des deux espèces : *Ammoides atlantica* et *Ranunculus bulbosus* .Thèse de Magistère .Université Hadj Lakhder- Batna.p 38.
- [66]Bellakhdar, J.L. (1997). A pharmacopee marocaine traditionnelle. Medecine arabe ancienne et savoirs populaires. Paris: Ibis Press.
- [67] Bousetla ,A ., Akkal S ., Medjroubi K., Louaar S ., Azouzi S ., Djarri L., Zaabat N., Laouer H., Chosson E., Seguin E. ( 2005).Flavonoid Glycosides From *Ammoides pusilla*.Chemistry of Natural Compounds, Vol. 41, No. 1, UDC 547.972
- [69] Boudermine, S., Parisi V,Lemoui R., Boudiar B.,Giovanna Chini M., Franceschelli S, Pecoraro M.,Pascale M., Bifulco G, Braca A.,De Tommasi N.,De Leo M.(2022).Cytotoxic Sesquiterpenoids from *Ammoides atlantica* Aerial Parts . Journal of Natural Products. 85, 647–656.
- [70] Laouer, H., Zerroug, M.M., Sahli, F., Chaker, A.N., Valentini, G., Ferretti, G.,Grande,M. and Anaya, J. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. essential oil. *Journal of Essential Oil Research*,15(2),135-138..
- [71] Laouer, H., Boulaacheb, N., Akkal, S., Singh, G., Marimuthu, P.,de Heluani, C., Catalan, C. and Baldovini, N. (2008). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ammoides atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf. *Journal of Essential Oil Research*, 20(3), 266-269.
- [72] IbnAlbitar, Dam. (1874). Aljame Li-Mofradat al adwiyah wal aghthiyah(The collection of medical and food items), Dar Sader Publishing,Beirut, Lebanon(in Arabic), Vol.1.
- [73] Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maallem, S. and Ziyyat,A.(2007). Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsute* *Pharmazie* , 62(8), 630-632.
- [74] Laouer, H., Zerroug, M. M., Chaker, A. N. and Bouzerzour, H. (2004) .Study of the effect of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breist, essential oil against *Pseudomonas sp.*,*Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69(4), 619-624.

[75] Laouer, H., Boulaacheb, N., Akkal, S., Singh, G., Marimuthu, P., de Heluani, C., Catalan, C. and Baldovini, N. (2008). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ammoides atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf., Journal of Essential Oil Research, 20(3), 266-269.

[76] Loucif, K. (2022). Pharmacological activities of two plants from the Apiaceae family: *Ammoides atlantica* (Coss. & Durieu.) H. Wolff. and *Athamanta sicula* L. Thèse de Magistère .Université Ferhat Abbas University, Setif 1. 73.

## الفصل الثاني

### **Asteraceae** عائلة

## مدخل

كلمة استر هي كلمة يونانية تعني نجمة لشكل الزهرة [2,1]. Asteraceae المعروفة سابقا باسم Compositae هي عائلة تنتمي إلى صف ثنائيات الفلقة، و هي أكبر فصيلة من حيث عدد نباتاتها، الفصيلة المركبة Compositae تسمية قديمة لفصيلة نباتية حَوَّلَتْها قواعد التسمية الحديثة إلى الفصيلة الكوكبية أو النجمية أو Asteraceae التي تولف رتبة الكوكبيات Asterales المنسوبة إلى صيف الكوكبيات Asterideae الموضوع في قمة ملتحات البتلات [2].

تضم الفصيلة النجمية نباتات عشبية معمرة درنية أو حولية [3] ، بعضها شجرية. نادرة النباتات المائية ، المتسلقة أو السطحية التي تعيش على سطوح الأشجار. تحتوي بعض أنواعها نسجاً مفرزة لبنية. أوراقها عادة متعاقبة، وقد تكون أحياناً متقابلة أو دوارية، غالباً ما تكون مفصصة أو مقسمة ونادراً بسيطة، عديمة الأذنان. النورة الأصلية رؤيسية capitulum تمثل زهرة زائفة pseudanthium محاطة بقناب involucre وحيد الدوارة أو عديد الدورات المكونة من براقع bracts أو رفاق phyllaries. الرؤيسات منفردة. الكرسي أجرد أو حرشفي paleae أو هلبى (قاسي الشعر) داعم للأزهار. الزهيرات عادة صغيرة تراوح بين 1 - 500، لاطئة على كرسي مشترك، خنثوية أو مذكرة أو مؤنثة أو عقيمة، عديمة الطلائع الورقية. الكأس منعدم أو ضامر، أو ممثل بإكليل من أشعار مسماة هفة أو بابوسة pappus. التويج ملتحم البتلات، المكونة من ثلاثة أو خمسة فصوص منتظمة متساوية أو جانبية التناظر ثنائية الشفة، ذات شفة داخلية ثنائية الفصوص وشفة خارجية ثلاثية الفصوص. الأسدية فوق بتلية، الخيوط حرة والمآبر متلاصقة خارجية الالتفاف مشكلة أنبوباً مدغم المآبر محيطاً بالقلم. المبيض ثنائي الكرابل، وحيد الحجيرة، وحيد البويضة المقلوقة، قاعدية التثبيت. القلم ثنائي الشعبة مزود بوبر جامع لحبوب الطلع. الثمرة جافة غير متفتحة تسمى سبسيلة cypselum. البذور عديمة السويداء والجنين مستقيم زيتي غالباً.

تضم الفصيلة النجمية قرابة 1620 جنس موزعة على 25000 نوع، و 17 قبيلة 750 منها مستوطنة [5,4,1]، وفصيلتين: الخسية Lactuoideae المميّزة بأوعيتها اللبنية، وتويجها اللسيني خماسي الأسنان. والكوكبية Asteroideae المميّزة بغياب أوعيتها اللبنية، وتويجها الأنوبي خماسي الأسنان أو اللسيني ثلاثي الأسنان ، يعتبر Senecio أكثر أجناسها من حيث عدد النباتات إذ يحتوي على 1500 نوع ثم يليه Vernonia بـ 1000 نوع و كل من Cousinia و Centaurea بـ 600 نوع [7,6].

أما في الجزائر هناك 109 جنس ، 408 نوع ، أما في فرنسا 111 جنس و 638 نوع [6] . لديها توزيع جغرافي في جميع أجزاء العالم ، هامة اقتصادياً توفر بعض نباتاتها زيوت للطبخ و أغلب نباتاتها تستخدم في طب الأعشاب.

## 1-II-التوزيع الجغرافي للعائلة النجمية (Asteraceae)

تعد الفصيلة النجمية من أرقى فصائل النباتات الزهرية وأكثرها تخصصا ، و هي فصيلة واسعة الانتشار على مستوى العالم ، متواجدة في كل مكان باستثناء القارة القطبية الجنوبية. و لاشك أنها متعددة وخاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية بما في ذلك أمريكا الوسطى، و شرق البرازيل، و البحر الأبيض المتوسط أفريقيا، و آسيا الوسطى و جنوب غرب الصين (الشكل 1-II)(1) [1] ، تعد الفصيلة المركبة من أكبر الفصائل حجما ، و الأرقى في ملتحات البتلات .

تتوزع الفصيلة النجمية في كل البيئات ، و غالبيتها العظمى نباتات عشبية ، و القليل منها نحو 2 في المئة أشجار أو شجيرات . بعضها ذات أهمية اقتصادية ، فبعض أجناسها تعد نباتات زينة مثل

*Calendula – Chrysanthemum* ، و كثير منها ذات أهمية طبية مثل *Artemisia – Inula-Aster* و بعضها الأخر ذو أهمية غذائية مثل (*Helianthus*) [2].

تتوزع جغرافيا و تتمركز في أوروبا، آسيا، إفريقيا، أمريكا الشمالية ( كندا و الولايات المتحدة الأمريكية) و استراليا [8].

نباتات العائلة النجمية تستعمل بكثرة في المجال الطبي لأنها تشفي العديد من الأمراض Bellakher1997, و تستعمل نباتات هذه العائلة في التداوي ، من خصائصها أنها مضادة للالتهاب و الحساسية و تعتبر أيضا مضادة للبكتيريا [9].



الشكل 1-II-1- خارطة انتشار أنواع العائلة الخيمية Asteraceae [10]

## II-2-الأهمية الاقتصادية للعائلة النجمية (Asteraceae)

تشمل هذه الفصيلة الكثير من النباتات الاقتصادية مثل الخرشوف *Cynara scolymus*، يؤكل الجزء اللحمي من نوراته قبل تفتح الأزهار ، القرطم *Cartamus*، حيث يستخرج من بذوره زيت يسمى الزيت الحلو ، يستعمل في صناعة الصابون و مواد الطلاء و الطعام ، و يستخرج من بتلات أزهاره الحمراء مادة تسمى العصفر Carthamine تستعمل في صناعة الصباغة ، أما الزعفران فيستخدم في الطعام كتوابل و ملون غذائي و كذا في مستحضرات التجميل .لهذه الفصيلة دور في البحث عن طاقات متجددة جديدة حيث تم تحديد زيت عباد الشمس و زيت الزعفران كزيوت نباتية واعدة في إنتاج الوقود الحيوي ، تتحول هذه الزيوت إلى وقود حيوي بفضل تطبيق تفاعلات مختلفة (trans-esterification) على ثلاثي الغليسريد [14-11].

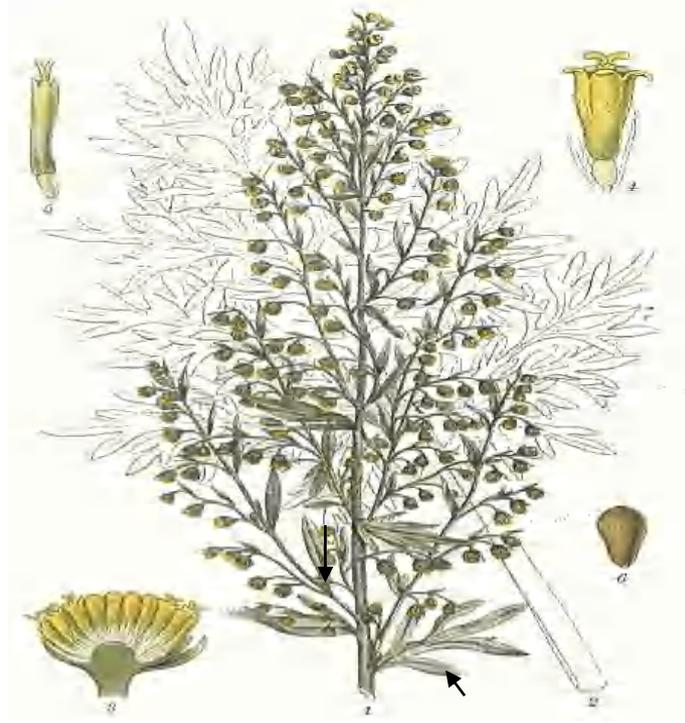
تعتبر هذه الفصيلة من الناحية الاقتصادية على جانب عظيم من الأهمية فقد تكون مصدر لطعام الإنسان من بذور زيتية و خضر و توابل ، كما أن له جانب لا يقل عن الجانب الأول في استعمالاته الكثيرة ، فالبعض منها يستعمل على نطاق محدود في التحضيرات الدوائية المسجلة ، كما تستعمل أحيانا كمحليات دوائية edulcolorant ، كما تتميز بمركباتها متعددة الاستيلينات التي لها خصائص مثبطة لنمو البكتيريا (bactériostatique) و كذا لنمو الفطر (fongistatique) ، كما تشارك في الفعالية الصيدلانية لبعض الأدوية [16, 15].

## II-3-الخصائص المرفولوجية [17] :

عبارة عن أعشاب ، أزهارها منتظمة أو وحيدة التناظر خماسية الأوراق الزهرية إلا المتاع فيتكون من عدد قليل من الكرابل ، و أهم ميزة لهذه العائلة هي التحام متوك الأسدية في أنبوبة متكية . نباتات العائلة *Asteraceae* تتكون من أوراق متبادلة وقد تكون متقابلة وهي بسيطة عديمة الأذينات، تحتوي على هوامش كلية أو مسننة وقد تتحول إلى أشواك في النباتات الجافة ، والتعرق ريشي وقد يكون متوازيا ، غالبا ما تحتوي على قنوات إفرازية .

الأزهار مغلقة بعدة قنابات تعرف بالقلافة ، وقد يوجد نوعان من الأزهار، أزهار شعاعية خارجية مؤنثة وأزهار قرصية داخلية مذكرة، وتخرج كل زهرة من إبط قنابة شفافة ، وقد لا توجد قنابات في بعض النورات، وفي بعض الأنواع تتركب النورة من نوع واحد من الأزهار إما أزهار شعاعية كما يختلف عدد الأزهار في النورة فيصل إلى المئات ، وقد توجد زهرة واحدة محاطة بعدة قنابات ، وقد يكون الحامل الزهري مسطحا أو محدبا أو مستطيلا أو مقعرا . وتمتاز هذه الفصيلة بتجمع أزهارها في نورات مهمة ، حيث تكون ظاهرة مهما صغرت .

:



الشكل II-2: الصورة الفوتوغرافية لنبات *Asteraceae* [17].

#### II-4-التصنيف العلمي للعائلة النجمية (*Asteraceae*)

تصنف العائلة *Asteraceae* حسب الجدول II-1

جدول II-1-التصنيف العلمي للعائلة *Asteraceae*

Plantae :	المملكة:
Magnoliophyta	القسم:
Magnoliopsida	الصف:
Rosidae :	الفئة الفرعية:
Asterales :	الرتبة
Asteraceae	العائلة

## II-5-Ormenis الجنس

*Ormenis* هي واحدة من أصغر أجناس عائلة Asteraceae ، في الواقع تضم أكثر من 20 نوع فقط موزع عبر القارة و غالبا على نطاق واسع في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

أشهر أنواعها *Ormenis nobilis*، و المعروفة أيضا باسم *Chamaemelum nobile* أو *Anthemis nobilis* أو الأكثر شيوعا باسم البابونج الروماني . هي نباتات عشبية، سنوية أو معمرة، نادرا ما يزيد ارتفاعها عن نصف متر، و عادة ما يكون لها أزهار بيضاء منفردة ذات مركز أصفر تتواجد أنواعه عادة في الغابات، والحقول والمراعي الرملية والحجرية والجبال المنخفضة. كما ينمو في التربة الرملية في شمال المغرب على طول ساحل المحيط الأطلسي. و تستخدم أساسا لاستخراج الزيت العطري الذي يتميز برائحة الكافور. يستعمل في مستحضرات التجميل والطب وخاصة في صناعة العطور [18].

تصنف الأنواع من هذا الجنس إلى أجناس أخرى تمثل مرادفات مثل :

*Ormenis multicaulis Braun-Blanq.& Marie* ، *Chamaemelum mixtum (L.) Alloni* ، *Cladanthus mixtus (L.)* ، *Anthemis mixta (L.)*.

و موطنهم في أوروبا ، و لكن يمكن أيضا العثور على معظم الأنواع في قارات أخرى حيث أدخلها الإنسان. توجد بشكل رئيسي في اسبانيا، فرنسا، إيطاليا ، البرتغال ،مالطا، تونس ، المغرب ، ايرلاندا ، كازاخستان و الجزائر [18,19]. يتم تمثيل جنس *Ormenis* بخمسة أنواع في الجزائر: *O. Mixta*

، *O. africana* ، *O. lonadioides* ، *O. nobilis* و *O. praecox* .

II-5-1-استعمالات نباتات الجنس *Ormenis* في الطب التقليدي

تستخدم بعض الأنواع من الجنس *Ormenis* على نطاق واسع في الطب الشعبي و في تحضير بعض الأدوية. مضاد للتشنج ، و مضاد للسعال ، خاصة النوع *Ormenis mixtus* الذي يستعمل في المغرب باعتباره مزيل للقلق وإعادة التوازن للجهاز العصبي المركزي ، كما تستعمل في معالجة التهابات القصور الكبدي و التهابات المعدة و القولون ، مطهرة ، طاردة للديدان و استخدامات أخرى كمبيدات للحشرات [18, 20, 21].

تستخدم الأنواع التي تنتمي إلى جنس *Ormenis* في الطب التقليدي لأغراض علاجية مختلفة [22]. على وجه الخصوص ، في المغرب ، يستخدم *Ormenis mixtus (L.)* في مغلي لعلاج الحمى و أمراض المعدة المختلفة. يزرع أيضا لاستخراج زيت أساسي من أجزائه الهوائية ، و الذي يباع و يستخدم في العلاج بالروائح كمنشط جنسي و مزيل للقلق و مضاد للبكتيريا ، في العديد من المستحضرات [23].

لقد ثبت في الواقع أن الزيت العطري للنباتة *Ormenis mixtus (L.)* للمغرب فعال ضد بكتيريا *Escherichia Coli* ، *Bacillus subtilis* ، *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* و ضد البكتيريا الفطرية مثل *Aspergillus niger* ، *Penicillium parasiticus* و *Trametes pini* [24].

أظهرت الدراسة البيولوجية الجغرافية العديد من الاستخدامات التقليدية لـ *O. mixtus*، في بعض مناطق المغرب ، مثل الرباط و المعمورة ، يتم فرك رؤوس الزهور على الجروح الصغيرة للشفاء [25]. بينما يتم الحصول على المستحضرات من الأجزاء الهوائية من *Ormenis* ، تستخدم *Ormenis nobilis* لعلاج عسر الهضم و الغثيان و الروماتيزم و الأكزيما و البواسير و الألم العصبي [26].

أظهر مستخلص *O. nobilis* أيضا نشاطا مضادا في المخبر، لاسيما ضد اثنين من الكائنات الحية الدقيقة مثل المتفوية البروسية ليشمانيا دونوفاني [27].

يتم الحصول على مستحضرات ذات نشاط معدي ، فاشل ، مطمئ و طارد للديدان من الأجزاء الهوائية من *O. africana* و قد أظهرت هذه المركبات النباتية أيضا فعاليتها في علاج مرض السكري [25].

كما أظهر المستخلص الايثانولي لنورات *O. Africana* نشاطا مضادا للأكسدة و في الخلايا المستنبتة ، ارتبط هذا النشاط بكمية عالية من المادة الكيميائية لمتعدد الفينولات. يستخدم *O. Africana* أيضا في الطب الشعبي لخصائصه الخافضة لسكر الدم ، حيث أن متعدد الفينولات. نفسه الموجود يمنع ألفا وبيتا glucosidase [28].

*O. Praecox* يستخدم كعامل مضاد للالتهابات في جب العيون و طب الأسنان. و بدلا من ذلك

*O. Scarriosa* كمنشط و معدي و مسكن و مضاد للتشنج [29].

## II-5-2-الاستخدامات غير الطبية:

تستخدم الانواع التي تنتمي إلى جنس *Ormenis* لإعداد العطور و البلمس لتدليك و العلاج العطري .

## II-6-الفعالية البيولوجية للأجناس *Ormenis* ، *Chamaemelum* و *Cladanthus*:

اثبت دراسات بيولوجية على هذا الأجناس وجود بعض الفعاليات بيولوجية الممثلة في الجدول II-3

الجدول II-2: الفعاليات البيولوجية لبعض أنواع للأجناس *Ormenis* ، *Chamaemelum* و *Cladanthus* .

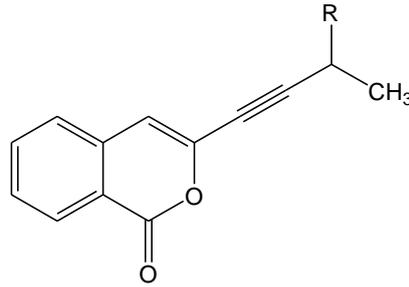
المرجع	النوع	الفعالية البيولوجية
<i>Ormenis</i>		
[30]	<i>Ormenis multicaulis</i>	سمية التبخير (Fumigant toxicity)
[28]	<i>Ormenis Africana</i>	مضادة للأكسدة
<i>Chamaemelum</i>		
[28]	<i>Chamaemelum mixtum</i>	مضاد للفطريات
[28]	<i>Chamaemelum mixtum</i>	مضاد للجراثيم
[31]	<i>Chamaemelum mixtum</i>	ضد التآكل

سمية التبخير	<i>Chamaemelum nobile</i>	[30]
<i>Cladanthus</i>		
مضادة للأكسدة	<i>Cladanthus mixtum</i>	[28]
مضاد للجراثيم	<i>Cladanthus mixtum</i>	[28]

### 7-II-نواتج الايض الثانوي للجنس *Ormenis*

بينت دراسات المسح الفيتوكيميائي لجنس *Ormenis* بتمييزه بالتنوع لمواده الأيضية الثانوية و غناه بالمنتجات الطبيعية التربينية وعلى وجه الخصوص عديدات الفينول ،كما بينت غناها بالمركبات السييسكويتربينية اللاكتونية التي تنتمي بشكل رئيسي إلى فئة eudesmane . حيث كشفت الدراسات عن فصل مركبين من عائلة الكومارينات من النبتة *Ormenis mixta* (2-1) و أربع مركبات جديدة تم عزلها من نوعين من هذا الجنس، تربين أحادي غلوكوزيدي ، فينول غلوكوزيدي ، 5 أحماض فينولية، 15 فلافونويد ، 5 مشتقات لحمض الكينيك من النبتة *Ormenis mixta*.

### 1-الكومارينات:



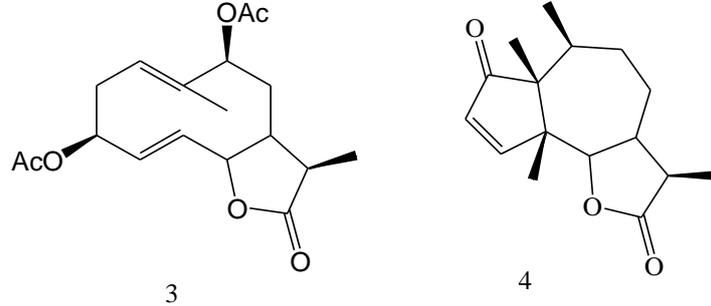
الشكل 3-II:مركبات كومارينية معزولة من الجنس *Ormenis*

جدول 3-II: الكومارينات المعزولة من الجنس *Ormenis*

المرجع	النوع	R	اسم المركب	الرقم
[28]	<i>O. mixtum</i>	H	Corfine	1
[28]	<i>O. mixtum</i>	OH	3'-hydroxycorfine	2

2-السيكوتاربيينات الاكتونية:

تم فصل مركبين من عائلة السيكوتاربيينات اللاكتونية يندرجان تحت هيكلية cladantholide (3) و elucidated (4) من النبتة *Cladanthus arabicus*.



الشكل 4-II: مركبات سسكويتريينية معزولة من الجنس *Ormenis*

جدول 4-II: السيكوتاربيينات المعزولة من الجنس *Ormenis*

الرقم	المركبات	النوع	المراجع
3	2-oxy-laH,5αH,6αH,7β-H,11α-H-guai-3,4-en-6,12-olide.	<i>O. arabicus</i>	[32]
4	3-β-9-β-diacetoxy-6βH,7αH-germacra-l(10),4(5)-dienes,6-12-olide.	<i>O. arabicus</i>	[32]

1-7-II- نواتج الايض الثانوي للنوع *Ormenis mixta*

عند إجراء دراسة ببليوغرافية على الجنس *Ormenis mixta* والتي كان أكثر تركيزها على النبتة *Ormenis mixta* حيث تبين أن معظم المركبات المعزولة منها تنتمي إلى عائلة السيكوتاربيينات، تم التعرف على 9 مركبات (5-17) بهيكل eudesmanolides و مركبين (18-19) بهيكل bisaboléne (جدول 5-II).

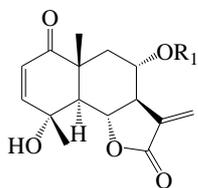
1-1-7-II-السيكوتاربيينات

1-1-7-II-هيكل eudesmanolides

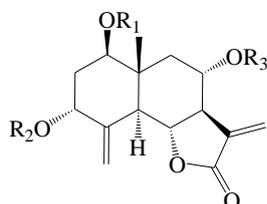
جدول 5-II: السيكوتاربيينات المعزولة من النوع *Ormenis fuscatum* ذات هيكل eudesmanolides

المرجع	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	المركبات	الرقم
[33]	/	/	Mac	8 α -methacryloyloxyarglanin	5
[33]	/	/	<i>i</i> -Bu	8 α- isobutyryloxyarglanin	5a
[18,33]	<i>i</i> -Bu	Ac	Ac	3 α -acetoxy-8 α- isobutyryloxyreynosin	6
[18,33]	Mac	H	H	3 α -hydroxy -8 α -methacryloyloxyreynosin	7
[18,33]	<i>i</i> -Bu	Ac	H	3α-hydroxy-isobutyryloxyreynosin	8

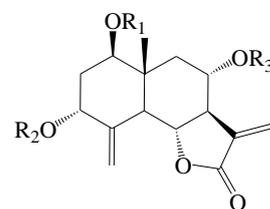
[18,33]	/	/	/	Santamarine	9
[28,33]	/	/	/	Armexilofine	10
[28,33]	/	/	/	Armefolin	11
[28,33]	/	Mac	H	8 $\alpha$ -methacryloyloxybalchanine	12
[28,33]	/	iBu	H	8 $\alpha$ -isobutryloxybalchanine	13
[28,33]	/	Mac	H	8 $\alpha$ -methacryloyloxyarmexilofine	14
[28,33]	/	OiBu	H	8 $\alpha$ -isobutryloxyarmexilofine	15
[28,33]	/	Mac	H	8 $\alpha$ -methacryloyloxyarmelofine	16
[28,33]	/	OiBu	H	8 $\alpha$ -isobutryloxyarmelofine	17



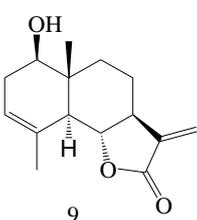
5 (R<sub>1</sub> = Mac)  
5a (R<sub>1</sub> = i-Bu)



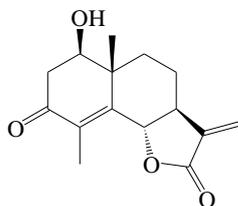
6 (R<sub>1</sub>=Ac , R<sub>2</sub>= Ac , R<sub>3</sub> = i-Bu)



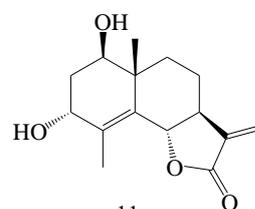
7 (R<sub>1</sub> = H , R<sub>2</sub> = H , R<sub>3</sub> = Mac )  
8 (R<sub>1</sub> = H , R<sub>2</sub> = H , R<sub>3</sub> = i-Bu )



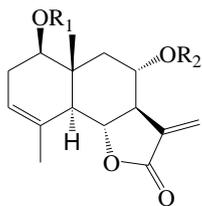
9



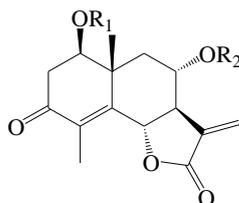
10



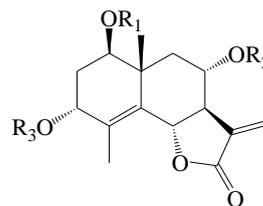
11



12 ( R<sub>1</sub> = H , R<sub>2</sub>= Mac)  
13 ( R<sub>1</sub> = H , R<sub>2</sub>= iBu)



14 ( R<sub>1</sub>=H , R<sub>2</sub> = Mac)  
15 ( R<sub>1</sub> = H , R<sub>2</sub> = i-Bu )



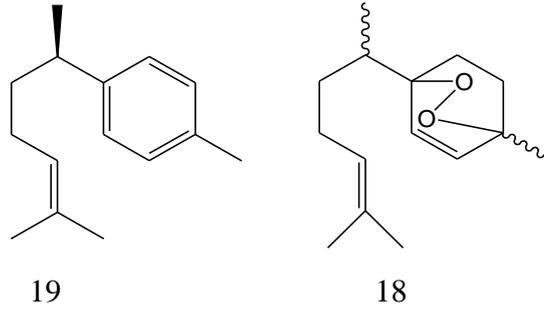
16 (R<sub>1</sub> = H , R<sub>2</sub>= Mac , R<sub>3</sub> = H )  
17 (R<sub>1</sub> = H , R<sub>2</sub>= i-Bu , R<sub>3</sub> = H )

شكل II-5: مركبات سيسكوتاربينية معزولة من النوع *Ormenis mixta* [33].

II-7-1-1-2-هيكل bisaboléne:

جدول II-6: السيسكوتاربينات المعزولة من النوع *Ormenis fuscatum* ذات هيكل bisaboléne

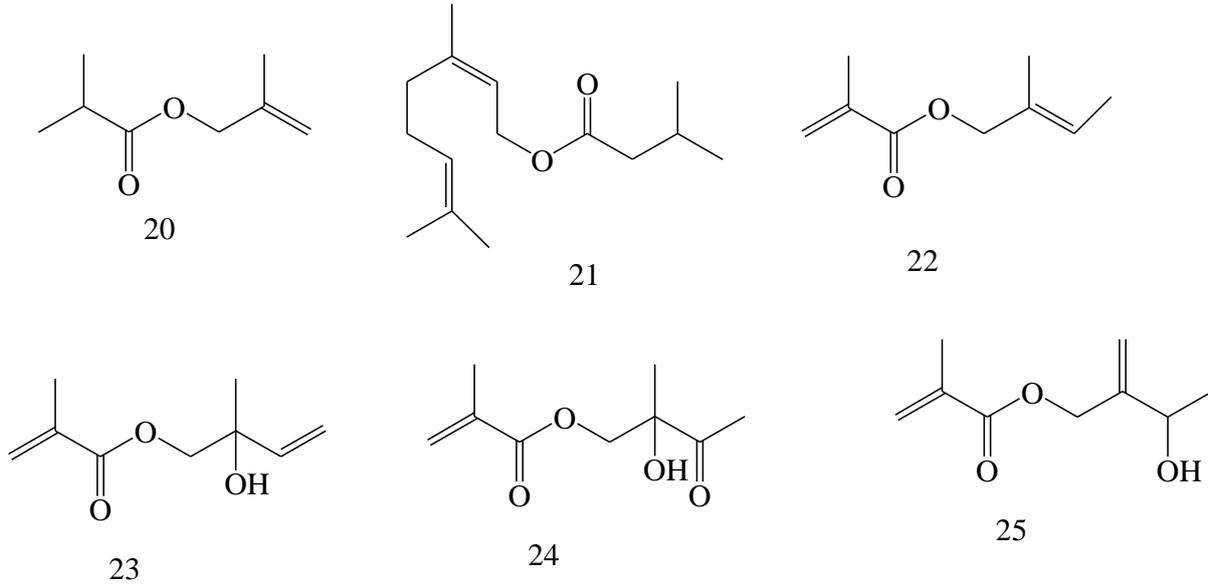
المرجع	النوع	المركبات	N°
[30,33]	<i>O. fuscatum</i>	(-)-ar-curcumene	18
[30,33]	<i>O. fuscatum</i>	Bisabolen-1,4-endoperoxide	19



شكل II-6: مركبات سيسكوتاربيينية معزولة من النوع *Ormenis fuscata*

**II-7-1-1-3-المركبات الاستيرية:**

تم عزل ستة مركبات استيرية من نفس النبتة *Ormenis fuscata* أربع مركبات منها عزلت لأول مرة من المملكة النباتية [31].



الشكل II-7: مركبات استيرية معزولة من النوع *Ormenis fuscata*

8-II-الدراسة النباتية لـ *Ormenis mixta*

## 1-8-II-وصف النبتة:

*Ormenis mixta* هي نبتة عطرية سنوية أو معمرة، نجدها خاصة في شمال إفريقيا (المغرب، الجزائر، ليبيا وتونس) وكذلك الجانب الشمالي للبحر الأبيض المتوسط (اسبانيا، ايطاليا، اليونان، وألبانيا) فهي معروفة باسم البابونج المغربي و كذلك تعرف بالاسم الشعبي "الحلالة" Hellâla [25,18]، في البحر الأبيض المتوسط ، تملك عدة أسماء منها (*Chamaemelum mixtum* (L.)، *Ormeni smixta* (L.)، *Anthemis mixta* L [2]، يتراوح طول ساقها ما بين 10 - 40 cm ، أوراقها مسننة و سميكة نوعا ما، وعادة ما تنقسم مرة أخرى و نادرا مرتين، حادة في الشكل النهائية، بتلاتها تتواجد بين الزهور، بيضاء اللون و تكون صفراء في القاعدة تتطور ما بين شهر جوان حتى شهر سبتمبر، أزهارها صفراء اللون في المنتصف بيضاوية أو مستطيلة الشكل، حادة و مطوية [25,32].

تنمو بشكل رئيسي في الكثبان الرملية و في الأراضي الأخرى الواقعة على بعد أقل من كيلومتر واحد من السهل الشرقي في منطقة باستيا . توجد أيضا على بعض شواطئ الساحل الغربي .

تشمل الأزهار رؤوس أزهار صفراء و بتلات بيضاء ، و الساق المتفرعة منتصبية ، ناعمة و تنمو حتى ارتفاع 15-60cm . الأوراق طويلة ، ضيقة و شعرية هي ثنائية أو ثلاثية [19].

يزرع النبات في المغرب لأنه يتم الحصول على زيت أساسي، أصفر اللون و ذو رائحة قوية و رائحة، يستخدم في الطب و صناعة العطور [34].



الشكل 8-II-صورة فوتوغرافية للنبتة *Ormenis mixta* [18]

II-8-2-استعمالاتها الطبية

يستخدم نبات *Ormenis mixta* في جمع الزيوت التي تفيد في تهدئة الناس و تهدئة البشرة كما يتم استخدام بعض زيوتها في العطور المراهم الجلدية و منتجات أخرى. يتم سحق الزهرة بأكملها لمحاولة استخراج زيوت هذه النبتة حيث أكدت بعض الدراسات وجود عدة تركيبات مختلفة لهذه النبتة حسب المنطقة التي تزرع فيها. في بعض المناطق تكون تركيزات أعلى من تركيزات نفس النوع في مناطق مختلفة في بعض الحالات .

II-9- التصنيف النظامي للنبتة:

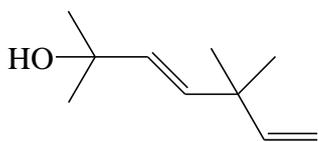
جدول II-7: التصنيف النظامي للنبتة

Plantae	المملكة
Magnoliophyta	القسم
Magnoliopsida	الصف
Rosidae	الفئة الفرعية
Asterales	الرتبة
Asteraceae	العائلة
<i>Ormenis</i>	الجنس
<i>Ormenis mixta</i>	النوع

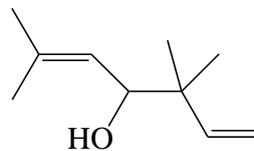
II-10- الدراسة الفيتوكيميائية للنبتة *Ormenis mixta*

ذكرت بعض الدراسات الواردة في البيبليوغرافيا بأن الزيوت الأساسية متشابهة في النوع مع بعضها البعض و تتميز بنسبة مئوية مهمة من الكحول أحادي التربين غير المنتظم ، و المعروف جيدا لعائلة *Asteraceae* [33]. الممثل الرئيسي لهذه الفئة هي كحول *Santolina* ( 27.9 % - 32.0 % ) ،  $\alpha$ -Pinène ، ( 3.6 % - 15.0 ) إضافة إلى كحول *Yomogi* ( 2.8 % - 4.5 % ) و كحول *Artemisia* (3.6%) ، مع الأسيتات المقابلة بكميات أقل . إضافة إلى ذلك ، يحتوي الزيت العطري أيضا على سيسكويترابين ، و يتم تمثيله بشكل أساسي بكميات منخفضة جدا من أسترات الدهون [35].

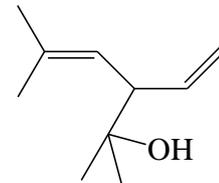
علاوة على ذلك، يحتوي الزيت العطري الذي تم الحصول عليه من الأجزاء الهوائية ل *Ormenis mixta*(L.) في كورسيكا و سردينيا ، على نفس أحادية التربينات الثلاثة غير منتظمة المذكورة سابقا ، كحول *Santolina* ، كحول *Yomogi* و كحول *Artemisia* وكحول *ferneséne* ، تم أيضا عزل بعض الهيدروكربونات المشتقة من الأحماض الدهنية .



*Yomogi alcohol*



*Artemisia alcohol*



*Santolina alcohol*

الشكل II-9: بعض الزيوت المعزولة من النبتة *Ormenis mixta*

## II-الدراسة النباتية لـ *Ormenis praecox*

### II-1-وصف النبتة *Ormenis praecox*:

نوع *Ormenis praecox* المعروف باسم \*البابونج المبكر\* هو نبات سنوي له رائحة مميزة. تكون سيقانه مفردة أو متنوعة ، طولها ما بين 10 إلى 40cm . الأوراق ثنائية أو ثلاثية مع قطع قمي رفيعة ، الأجزاء العلوية ذات ذراع عريض و دائما ما تكون صغيرة الحجم أو أحيانا ثنائية البيئاتوزيت ، السفلية مع مقسمة إلى خطي قصير . في المرحلة الخضرية الأولى ، تأخذ الأوراق مظهرا أكثر أو أقل نضارة ، ثم تميل الي الجفاف و تأخذ مظهرا ذابلا و أرق في الأجزاء القمية. يبلغ قطر رؤوس الزهور من 1.5 إلى 2.5cm ، و مجهزة بسيقان من 1-7 و موسعة في الجزء العلوي . تتميز الأزهار الصفراء بوجود فلوسكولي أنبوبي و متسع الأجنحة في الجزء السفلي من 1 إلى 1.2mm . يحدث التزهير في الفترة ما بين يناير و يونيو.

نتوءات الطرف 2-3mm ، مائلة ، مجردة و أحيانا زجاجية مع حافة دائما تقريبا حديدي بشكل ملحوظ و تتعكس على الإثمار .

الثمرة عبارة عن cypselae مضغوطة قليلا، مخططة بدقة طوليا ، مجردة و بنية أو مخضرة قليلا في اللون . ينتشر في المناطق الغربية من البحر الأبيض المتوسط [36].



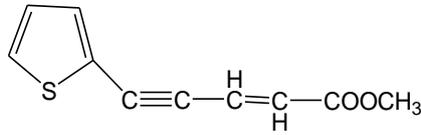
الشكل II-10: صورة للنبتة *Ormenis praecox* [36] .

12-II - نواتج الأيض الثانوي للنوع *Ormenis praecox*

أظهرت الدراسات البيبليوغرافية أنه تم عزل بعض المركبات من الأجزاء الهوائية لـ *Ormenis praecox* و هي نفس المركبات المعزولة من النوع *Ormenis fuscatum* بما في ذلك: \*2 سيسكويتربينين ذو هيكل bisaboléne (19,18) [38-37] (الشكل 6-II) .

\*4 أسترات أليفاتية مشتقة من مسار التخليق الحيوي للتربينات، أحدهما 2-Methylallyl isobutyrate (20) [39] ، ثلاث منها أسترات مثل أكرليت (25,24,23) (الجدول 8-II) [40].

\* مشتق ثيوفين أسيتيل ، 5-(thiophen-2yl) pent-2-en-4-ynoate de methyle (الجدول 8-II) [41].



26

• عزل مركب Neryl isovalerate (22) (الجدول 8-II) [40].

بالإضافة إلى ذلك ، تم عزل مركبين سيسكويتربينين لاكتونين من الأجزاء الهوائية لـ *O.praecox* (9,10) (الجدول 5-II) [40]، و عزل 6 مركبات ذو هيكل bisaboléne (17-12) (الجدول 5-II) [33].

جدول 8-II: الاستيالات المعزولة من النوع *Ormenis fuscatum*

المرجع	النوع	المركبات	N°
[28]	<i>O. fuscatum</i>	2-Methylallyl isobutyrate	20
[28]	<i>O. fuscatum</i>	Neryl isovalerate	21
[28]	<i>O. fuscatum</i>	2-Methyl-2E-butenyl methacrylate	22
[28]	<i>O. fuscatum</i>	2-Hydroxy-2-methyl-3-butenyl methacrylate	23
[28]	<i>O. fuscatum</i>	2-Hydroxy-2-methyl-3-oxobutyl methacrylate	24
[28]	<i>O. fuscatum</i>	Nerol	25
38	<i>O. fuscatum</i>	5-(thiophen-2yl) pent-2-en-4-ynoate de methyl	26

## المراجع بالعربية :

- [15]-مخلوف م,ا,و لايقه , س .(2011). دراسة التنوع الحيوي للفصيلة النجمية في محافظة الاذقيةسورية . مجلة جامعة دمشق للعلوم الاساسية.2 (27).
- [16]-زعيتر, ل .(2006) . تحديد المكونات الكيميائية لأطوار الكلوروفورم و الزيوت الأساسية لأنواع من العائلتين المركبة (compositae) و السيسيتية (Cistaceae) .دكتوراه في الكيمياء العضوية .جامعة الإخوة منتوري قسنطينة .
- [19]-درويش ,ك .(2022) . استخلاص وتنقية المركبات الفعالة بيولوجيا من بعض الأنواع النباتية *Chrysanthemum fuscatum , Chrysanthemum macrocarpum et Chrysanthemum. R eboudianum* مع دراسة مقارنة لنشاطيتها ضد ميكروبية.مذكرة لنيل شهادة دكتوراه في العلوم . جامعة الإخوة منتوري قسنطينة .

## المراجع باللغة الأجنبية

- [1] Harkati B. (2011). Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille Asteraceae: *Scorzonera undulata*. Thèse doctorat : Chimie organique : Constantine : Université de Mentouri Constantine, 4-5.
- [2] Mezache N. (2010). Détermination structurale et évaluation biologique de substances naturelles de quelques espèces de la famille Asteraceae: *Senecio giganteus* Desf. Et *Chrysanthemum myconis*L. Thèse Doctorat: Phytochimie: Constantine : Université Mentouri Constantine, 4-5.
- [3] Bremer K., Gordon P., Dewolf JR. (1994). Asteraceae cladistics and classification, Portland.97 (890), 176-178.
- [4] Crete , P. (1965) : Précis de botanique. Masson, Paris, édition 2, P 429.
- [5] Bonnier. (1934). Flore complète de France, Suisse et Belgique. édition 10, P 118.
- [6] Larguet Habiba.2011.Les molécules terpéniques (ecdystéroïdes)de fleurs de *Serratula cichoracea* recherche d'activités antimicrobienne et antioxydante (2).Thèse magistère .université de constantine.
- [7] Quezel, P., Santa, S. (1963).Nouvelle flore de l'Algérie, et des régions désertique méridionales». Tome II, Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris. 976-978.
- [8] Mishio,T., Houma ,T., Iwashina,T.(2006).Yellow flavonoids in *Centorea ruthencia* as flower pigments.Biochemical Systematics and ecology.34,180-184.
- [9] Vaisakh, M.N., Pandey, A.(2012).The invasive weed with healing properties : areview on *chromolaena odorata* .International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 3(1), 80-83.
- [10] Oberprieler, C. (2002). A phylogenetic analysis of *Chamaemelum* Mill.(Compositae: Anthemideae) and related genera based upon nr DNA ITS and cp DNA trnL/trnF IGS sequence variation. Botanical Journal of the Linnean Society.138, 255-273.
- [11] Heywood, V. H. et al., (eds.). (1977).Biology and Chemistry of the Compositae.2, 141–65. London. Strasburger, E. (1983). Lehrbuch der Botanik. 32, Aufl.Verlag Jena.
- [12] Pavelaa, R., Sajfrtovà, M., Sovova, H., Bàrnet, M. &Karban, J. (2010).The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Extracts obtained by supercritical fluid extraction and Hydrodistillation. Industial Crops and Products.31 (3),449-454.
- [13] Casida, J. E. (1973). Pyrethrum: the natural insecticide. Academic Press, New York. p. 329.

- [14] Girardi, C. (2015). Recherche d'accepteurs de Michael à visées antiparasitaire à partir d'une Asteraceae: *Pseudelephantopus spiralis*(Less). Cronquist.Thèse Doctorat. Université Toulouse 3 Paul Sabatier.
- [17] Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., Bousta, D., Talbi, M. (2007).Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*.Bulletin de la Societe de pharmacie de Bordeaux.146, 85-96.
- [18] Harras, N., and Lamarti, A. (2014). In Vitro Germination and Plantlet Establishment of Wild Chamomile of Morocco *Cladanthus mixtus*(L.) Oberpr.and Vogt, American Journal of Plant Sciences.5, 2623-2632.
- [20] Fattorusso, E., Santelia, F.U., Appendino, G., Ballero, M. Taglialatela-Scafati, O.(2004). Polyoxygenated eudesmanes and *trans*-chrysanthemanes from the aerial parts of *Santolina insularis*.Journal of Natural Products.67, 37-41.
- [21]Appendino, G., Aviello, G., Ballero, M., Borrelli, F., Fattorusso, E., Petrucci, F., SanteliaF.U.,Taglialatela-Scafati, O. (2005). Cytotoxic germacrane sesquiterpenes from the aerial parts of *Santolina insularis*.Journal of Natural Products.68(6), 853-857.
- [22] Ferrari, B., Tomi,F.,Casanova, J. ( 2005). Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology.33(4), 445-44.
- [23] Lahsissene, H., Kahouadji, A., Tijane, M., Hseini, S. (2009), Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental), *Rev. Bot., Lejeunia*, 186.
- [24 ] Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D., Talbi M. (2007).Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*, Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux.146, 85-89.
- [25] Bellakhdar, J. (1997), La pharmacopée marocaine traditionnelle.éd. Ibis Press, Paris.
- [26] Zhao, J., Khan, S.I., Wang, M. (2001). Octulosonic acid derivatives from roman chamomile (*chamaemelum nobile*) with activities against inflammation and metabolic disorder, Journal of Natural Products, 77509-515.
- [27] De Mieri, M., Monteleone, G., Ismajili, I., Kaiser, M., Hamburger, M. (2017).Antiprotozoal Activity-Based Profiling of a Dichloromethane Extract from *Anthemis nobilis* Flowers .Journal of Natural Products.80, 459-470.
- [28] Ben Mansour, R., Gargouri, B., Bouaziz, M., Elloumi, N., Jilani, B. I., Ghrabi, Z., Lassoued, S. (2011). Antioxidant activity of ethanolic extract of inflorescence of *Ormenis Africana* in vitro and in cell cultures. Lipids in Health and Disease.10, 78.
- [29] Bouayoun, T., Ilidrissi, A., FkihTetouani, S., Bellakhdar, J. (1991).Flavonoïde de l'*Ormenis Africana* Jord. et Four.Plante Endémique du Maghreb. (Al) Biruniya.7 (2), 79 -85.

- [30] Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Raimondo, F. M., Maggio, A., and Bruno, M.(2012). Essential oil composition and antibacterial activity of *Anthemis mixta* and *A. Tomentosa* (Asteraceae). *Natural product communications*.7, 1379-1382.
- [31] Zrira S., Menut C., Bessiere J.M., Benjilalii B. (2007). Chemical Composition of the Essential Oils of Moroccan *Ormenis mixta* (L.) Dumort.ssp. *Multicaulis*. *Journal of essential oil bearing plants*.10, 378-285.
- [32] Abdel-Gaber, A., Abd-El-Nabey, B., Sidahmed, I., El-Zayady, A., Saadawy, M.(2006). Inhibitive action of some plant extracts on the corrosion of steel in acidicMedia. *Corrosion Science*.48, 2765-2779.
- [33] De Pascual, J., Teresa, J., Anaya, J., Caballero, E., Caballero, M. C. (1988). Sesquiterpenes lactones and aliphatic ester from *Chamaemelum fuscatum*.*Phytochemistry*. 27, 855–860.
- [34] Coste, H. (1980); *Flor Descriptive et Illustré de la France, de la Corse et des Contreé s Limitrophes II*; Librairie Scientifique et Technique Albert Blanchart: Paris, France, 627.
- [35] Elouaddari, A. El Amrani, A. JamalEddine,J. José ,G. Barroso, L. G. Pedro and Figueiredo,A.C.(2014). Intraspecific Variability of the Essential Oil of *Cladanthus mixtus* from Morocco .*Natural product communications*.9(1),133-136.
- [36] Pignatti, S. (1982). *Anthemis praecox Link*. *Flora d'Italia*, Edagricole, Bologna,3, pg. 73.
- [37] Bohlmann, F., Jakupovic, J., Zdero, C. (1978), Neue norsesquiterpene aus *Rudbeckia laciniata* und *Senecio paludaffinis*, *Phytochemistry*, **17**(11), 2034-2036.
- [38]Damodaran, N. P., Dev, S., (1968), Studies in sesquiterpenes—XXXVII: Sesquiterpenoids from the essential oil of zingiber zerumbet smith, *Tetrahedron*,**24**(11), 4113-4122.
- [39] Bohlmann, F., Zero, C. (1971). Polyacetylene verbindungen, 184.Überzweineue Phenyl polyine aus *Anthemis fuscata* Brot. *Chemische Berichte*. 104(5), 1375-1378.
- De Pascual Teresa, J., Caballero, E., Caballero, C., Anaya, J., Gonzalez, M. S. (1983).Four aliphatic esters of *Chamaemelum fuscatum* essential oil.*Phytochemistry*.22, 1757–1759.
- [40] Bohlmann, F., Zero, C. (1970). Polyacetylen verbindungen, 184. Die Inhaltsstoffe aus *Anthemis fuscata*Brot. *Chemische Berichte*.103(9), 2856-2859.
- [41] Romo de Vivar, A. and Jimencx, M. (1965), *Z & Shedron* **21**, 1741.
- [42] Rome de Vivar, A., Vaxquex, F. and Zctina, C. (1977), *Rev. Luhoam. Chim.* **8**,127.

## الفصل الثالث

مطيافية الكتلة الترادفية

## III-1-نبذة تاريخية

تُعد تقنية اقتران الفصل الكروماتوغرافي مع مطيافية الكتلة إستراتيجية تحليل كيميائي متطورة تعود إلى الخمسينيات من القرن الماضي. حيث تم الدمج بين كروماتوغرافيا الغاز (GC) ومطيافية الكتلة MS في عام 1952، عندما كان AT James و AJP Martin يحاولان تطوير تقنيات تحليل الفصل الكتلي بالترادف. خرج مكونات العينة المطلوب تحليلها من خلال عمود الفصل في أجهزة الفصل الكروماتوغرافي الغازي في صورة غازية وبالتالي يكون الاتصال مع مصدر الأيونات المعتمد على التأين بالترذيد الألكتروني (EI) أو التأين الكيميائي (CI) أمراً سهلاً من الناحية الفنية ولهذا السبب، كان تطوير أنظمة GC-MS أسرع من LC-MS حيث تم تسويق هذه الأنظمة لأول مرة في السبعينيات من القرن الماضي. استغرق تطوير أنظمة LC-MS وقتاً أطول من GC-MS وارتبط هذا الأمر بشكل مباشر بتطوير واجهات (وصلات بِنِيَّة) مناسبة. بدأ VL Tal'roze والمعاونون تطوير LC-MS في أوائل السبعينيات، عندما استخدموا الأوعية الشعرية لتوصيل أعمدة الفصل الكروماتوغرافي السائل ومصدر الأيونات في مقياس طيف الكتلة [2,1].

قام مكلافيرتي ومعاونوه بالتحقيق في إستراتيجية مماثلة عام 1973. كانت هذه هي الطريقة الأولى والأكثر وضوحاً للربط بين LC و MS ، وكانت تعرف "واجهة المدخل الشعري". حققت هذه الواجهة الرائدة لجهاز LC-MS نفس الكفاءة التحليلية تقريبا التي يحققها جهاز GC-MS و كان يقتصر على تحليل المواد المتطايرة إلى حد ما والمركبات غير القطبية ذات الكتلة الجزيئية المنخفضة (أقل من 400 دالتون).

(High-performance liquid chromatography) هو تقنية لفصل مكونات مزيج ما كل على حدى و عادة فضل طرق الاستشراب السائل فائق الأداء HPLC على الطرق المتبعة الأخرى في التحليل الكمي. و ذلك لنوعيتها المثالية التحليلية. حيث نحصل على فصل نوعي دقيق لمكونات المزيج المراد التعرف عليه.

كروماتوغرافيا سائلة عالية الضغط HPLC هو شكل من أشكال الكروماتوغرافيا العمودية و غالبا ما تستخدم في الكيمياء الحيوية و الكيمياء التحليلية لفصل ، تحديد و قياس المركبات في مخلوط واحد تستخدم عمود يحتوي على الطور الثابت (stationary phase).

## III-2-كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC):

تعتبر الكروماتوغرافيا أهم تقنية لتقنيات الفصل الكيميائي بين المواد و أكثرها شيوعا في مختلف الصناعات و مجالات البحث المختلفة. تميز أنواعها فمنها الوسط المحرك (mobile phase) و الوسط الثابت (stationary phase) كما تشمل (HPLC) و كروماتوغرافيا الغاز (GC) .

## III-1-2-ما هو (HPLC) :

تتعدد أنواع الكروماتوغرافيا حسب تعدد أنواع الوسط المتحرك و الوسط الثابت.

High-performance liquid chromatography يعتمد على وسط متحرك في عمله , لذا سمي بهذا الاسم طور هذا الجهاز في أواخر الستينات و السبعينات و لاقى روجا كتقنية فصل. لكل من تحليل و فصل المواد في العديد من المجالات .

تتزايد تطبيقات هذا الجهاز بنجاح يوما بعد يوم ، فتمت إضافة تحليل الأحماض النووية و الكربوهيدرات ، و تحليل عدمية التناظر (chiral analysis) التي سميت بهذا الاسم للتمييز بينها و بين كروماتوغرافيا العمود البسيطة (column chromatography).

### III-2-2-2-2-2: مكونات جهاز (HPLC):

يتكون الجهاز من 8 مكونات رئيسية

#### III-2-2-2-1-2-2: وعاء الوسط المتحرك mobile phase reservoir:

هو دورق (flask) أو مجرد وعاء تجاري بشرط أن يكون نظيفا مفرغا من الهواء و الغازات حتى لا يسبب في خطأ عند التحليل. كما يجب تنقيته من الشوائب عند إعداد الوسط المتحرك ، لمنع تعطل الجهاز و الخطأ في التحليل.

#### III-2-2-2-2-2-2: نظام توصيل المذيب (solvent delivery):

هو مضخة لضمان السريان الحر للوسط المتحرك بشكل مستمر و دقيق و بنبض ثابت هناك نوعان يستخدمان في (HPLC) مضخة حقيقية ذات مسمار (crew-driven syringe type) و هي بالرغم من امتيازها بسهولة التحكم في معدل السريان إلا أنها غير مناسبة لتغير المذيب .

تتكون المضخة المزدوجة الترددية ذات المكابس (Reciprocating piston) من غرفة أسطوانة تملأ و تفرغ بواسطة الحركة الأمامية و الخلفية للمكابس ، و تشمل مزايا هذه التقنية حجمها الداخلي الصغير الذي يتراوح بين 35 إلى 40  $\mu\text{L}$ ، مع ضغط خارجي كبير يصل إلى 10000 رطل لكل بوصة مربعة (psi). من استخدامات الجهاز المهمة الفصل المتدرج (gradient elution) بمعدلات سريان ثابتة حيث لا تتأثر بشكل ملحوظ بأي من الضغط العكسي للعمود (Column back pressure) و لا لزوجة المذيب .

#### III-2-2-2-3-2-2: نظام إدخال العينة :

يمكن أن يكون ألي أو يدوي و يستخدم صمامات عند فتحها يمكن ملاً تجويف العينة (loop sample) بحجم من 10 إلى 50  $\mu\text{L}$ . و عند غلق الصمامات تذهب العينة إلى مجرى الوسط المتحرك ذي الضغط العالي حيث يتم تحليلها. يجب أن تكون العينة في حالة سائلة و تذاب في محلول إذا كانت في حالة صلبة , حيث يكون المذيب منسجما مع الوسط المتحرك و الثابت ، تحقن العينة بكمية تتراوح من 1 إلى 100  $\mu\text{L}$ . و هي بالرغم من امتيازها بسهولة التحكم

## III-2-2-4- العمود:

هو قلب الجهاز حيث تحدث عملية الفصل عادة ما يكون مصنوعا من الفولاذ غير قابل للصدأ و مضاد لتآكل و ينقسم إلى نوعين:

أ- **الأعمدة التحليلية:** هي النوع الأساسي و توجد في جميع الأجهزة و يتراوح طولها من 3 إلى 5 مم محشو بمادة الوسط الثابت و هي جزيئات بحجم 5ميكرومتر.و في الثمانينات ، تطورت سرعة الفصل بسبب تقليل القطر و زيادة الطول .

ب- **الأعمدة الأولية(Precolumns):** و تنقسم إلى نوعين الأول العمود النابش لفضلات (scaven gercolumn) و يقع بين منطقة حقن العينة و وعاء الوسط المتحرك و الثاني العمود الحارس(Guardcolumn) و يقع بين العمود التحليلي و منطقة حقن العينة و يقوم بإزالة الشوائب من المذيب .

كما ينقسم حشو العمود المستخدم في هذا الجهاز إلى نوعين:

حزم مغلف (pellicular) و هي بوليميراتعلي هيئة خرزات كروية و غير مسامية يتراوح قطرها من 30 إلى 40mm.مغلفة بطبقة رقيقة مسامية من السيليكا أو الالومينا أو الراتنج القادر عن التبادل الأيوني (lon-exchange resin). و الذي يستخدم الآن لفصل البروتينات و الجزيئات الحيوية كبيرة الحجم , و النوع الآخر من الحشو هو الحشو المسامي .وعادة يحتوي على جزيئات صغيرة يتراوح قطرها بين 3إلى10mm و تتكون من السيليكا أو الالومينا أو الراتنج القادر عن التبادل الأيوني و السيليسكا تعتبر من أكثر المواد المستخدمة شيوعا في حشو العمود و أحيانا تحاط بطبقة عضوية رقيقة ترتبط بالسطح الداخلي للعمود كيميائيا أو فيزيائيا.

III-2-2-5- **الكاشف (detector):** وظيفته مراقبة المواد المذابة المراد استخلاصها عند خروجها من العمود،فهو يبعث إشارات كهربائية تتناسب مع مستوى خاصية معينة لدى مادة الوسط المتحرك أو للمادة المستخرجة.

III-2-2-6- **الأنابيب الرابطة:** هي مصنوعة من مادة خاملة لا تتفاعل مع مادة الوسط المتحرك و المذيبات, و تكون في العادة مصنوعة من الحديد غير قابل للصدأ و من البلاستيك الخامل.

III-2-2-7- **جهاز حاسوب أو مسجل:** يستخدم كجهاز مجمع للبيانات ، حيث يكون متصلا بالكاشف فيلتقط الإشارات الالكترونية الآتية منه ثم يقوم بتحليلها و إخراجها في شكل رسوم بيانية تسمى كروماتوغرام (chromatogram).

## III-2-2-8- وعاء الفضلات

## III-3- مطيافية الكتلة الترادفية Tandem

تعد مطيافية الكتلة الترادفية، والمعروف أيضا باسم MS/MS أو MS<sup>2</sup>، بتقنية التحليل الآلي حيث يقترن محللان أو أكثر معا باستخدام خطوة تفاعل إضافية لزيادة قدراتهم على تحليل العينات الكيميائية [1]. الاستخدام الشائع MS/Tandem هو تحليل الجزيئات الحيوية مثل البروتينات و الببتيدات.

تتأين جزيئات عينة معينة و يفصل مقياس الطيف الأول المعين MS<sup>1</sup> هذه الأيونات نسبة للكتلة إلى الشحنة (غالبا ما تعطى على أنها m/z أو m/Q). يتم اختيار الأيونات ذات نسبة m/z معينة قادمة من MS<sup>1</sup> ثم يتم تقسيمها إلى أيونات شظية أصغر، على سبيل المثال عن طريق التفكك الناتج عن التصادم أو تفاعل الجزيء الأيوني أو التفكك الضوئي ثم يتم إدخال هذه الأجزاء في مطيافية الكتلة الثاني (MS<sup>2</sup>) الذي بدوره يفضل الأجزاء عن نسبة m/z و يكشفها . تتيح خطوة التجزئ تحديد و فصل الأيونات التي لها نسب m/z متشابهة جدا في مقياس الطيف الكتلي العالي

## البنية

يتضمن مطيافية الكتلة مطيافية الكتلة الثلاثي رباعي القطب (q,q,q)، و وقت الرحلة الرباعي الأول و الثالث كمرشح للكتلة. عندما تجتاز التحليلات الرباعية الثانية، يستمر التأين من خلال التصادم مع الغاز، تستخدم عادة لصناعة الأدوية.

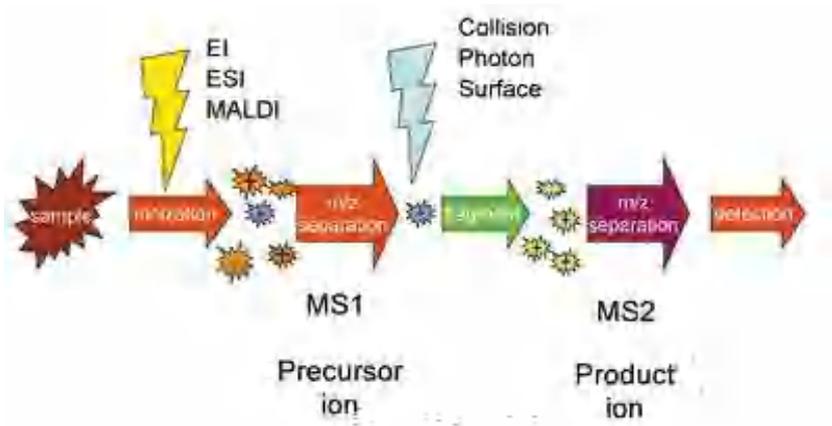
## III-3-1- وقت الرحلة رباعي القطب (Q-Tof).

يجمع مطيافية الكتلة Q-Tof بين أدوات Tof و رباعية القطب ، و التي تتسبب في دقة الكتلة العالية لأيونات المنتج ، و القدرة الكمية ، و تطبيق تجربة التجزئة ، هذه طريقة لقياس الطيف الكتلي تحدد بنية تجزؤ الأيونات (m/z) خلال فترة قياس الطيران (Time of flight measurement).

## III-3-2- مطيافية الكتلة الهجينة

تتكون مطيافية الكتلة الهجينة من أكثر من اثنين من أجهزة تحليل الكتلة.

## الأجهزة



الشكل III-1- مخطط طيف الكتلة الترادفية tandem

**III-3-3-ترادف في الفضاء Tandem**

في مطيافية الكتلة الترادفية في الفضاء ، يتم فصل عناصر الفصل و تميزها ماديا ، على الرغم من وجود اتصال مادي بين العناصر للحفاظ على فراغ عالي .  
يمكن أن تكون هذه العناصر قطاعات ، أو رباعي أو وقت الرحلة و عند استخدام عدة أرباع ، يمكن أن تعمل كمحطات كتلة و فرق تصادم.

**III-4-4-تحليل عديد الفينولات بتقنيات SM مع مختلف التزاوجات**

متعدد الفينول هو عائلة من الجزيئات العضوية الموجودة على نطاق واسع في الابوجية النباتية . تتميز بوجود العديد من المجموعات الفينولية المرتبطة بهياكل معقدة أكثر أو أقل بشكل عام ذات وزن جزيئي مرتفع . حيث أصبحت مادة الفينول حاليا ذات أهمية كبيرة ، فهي مفيدة للصحة [2].  
مضادة للأكسدة ، تستعمل للوقاية والعلاج من السرطان[3]، الأمراض الالتهابية [4]، القلب و الأوعية الدموية [5] و الأعصاب[6].

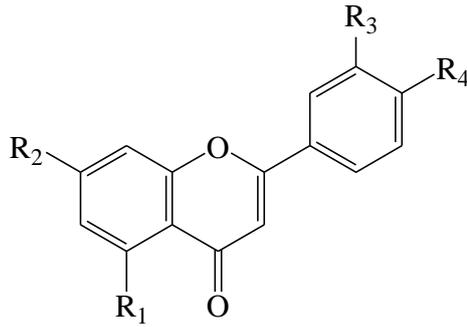
متعدد الفينول هو مجموعة كبيرة من المواد الكيميائية بما في ذلك نواة عطرية واحدة على الأقل ، تحمل مجموعة هيدروكسيل واحدة أو أكثر .

**III-4-1-تقنية استعمال تزاوج المطيافية في تحليل الفلافونويدات**

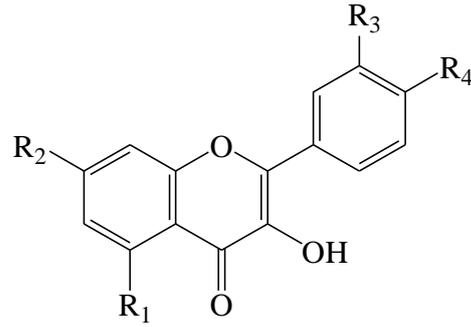
الاستفادة المثلى من 11 من مركبات الفلافونويد الطبيعية و وفقا للدراسة التي أجراها Nicolas Fabre و Isabelle Rustan من مخبر العقاقير، لجامعة Bruxelles , belgique Louvain [7] و لغرض الفحص الكيميائي النباتي لمركبات الفلافونويد، مع استخدام HPLC مقرونا بمقياس الطيف .تم تطوير جهاز الرش الكهربائي لفصل و كشف مركبات الفلافونويد التي يبلغ عددها 11 فلافونويد طبيعي و 5 مركبات من الفلافونويدات الاصطناعية التي تحدث بشكل متكرر من aglycone (1-4,7,9-10,11-14) الجدول (III-1.1-2) في وضع الأيونات السالبة من أجل التحقق من سلوكها بواسطة مطيافية الكتلة .

تم إجراء تحليل ل 11 فلافونويد أجليكون طبيعي بواسطة LC-MS بواسطة مقياس الطيف الكتلي لتوفير نمط تجزئة معقولة لكل مركب تمت دراسته. كان تحليل المركبات الاصطناعية التكميلية (5،6،8 و 15) المعروضة في الشكل مفيدا في الدعم المعقول للتجزئة.

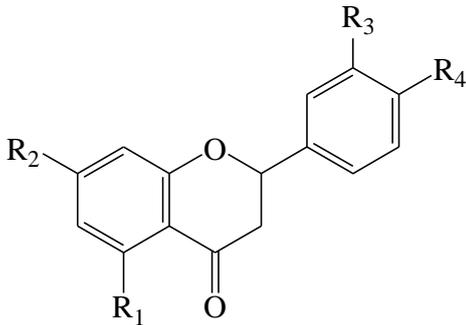
تعرض الجداول ( III-4, III-5, III-6 و III-7) أكثر الأجزاء المميزة التي تمت ملاحظتها لكل مركب حصل عليه MS<sup>2</sup> من أيونين 2M[H] .



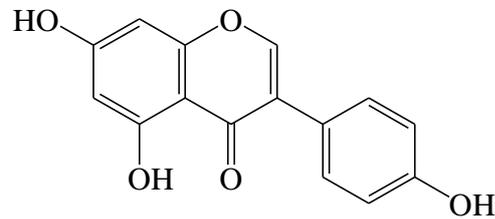
Flavone



Flavonol



Flavaone



Isoflavone

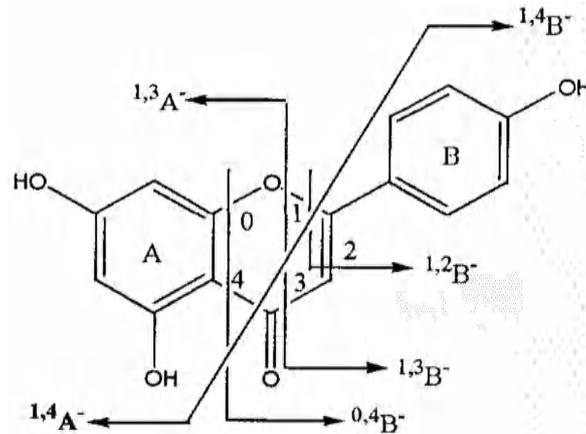
الجدول III-1: البنيات المختلفة للفلافونويدات الأليكونية المدروسة

R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	الاسم
<b>Flavone</b>					
OH	OH	OH	OH	285	Lutéoline -1
OH	H	OH	OH	269	Apigénine -2
OH	H	OCH <sub>3</sub>	H	283	Genkwanine -3
H	H	OH	OH	253	Chrusine -4
H	H	OH	H	237	7-OH flavone -5
H	H	H	H	221	Flavone -6
<b>Flavonol</b>					
OH	OH	OH	OH	301	Quercétine -7
OH	OH	OH	H	285	Fistine -8
OH	H	OH	OH	285	Kaempférol -9
H	H	OH	OH	269	Galangine -10
OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	299	Kaempféride -11

					Flavanone	
OH	OH	OH	OH	287	Eriodictyol -12	
OH	H	OH	OH	271	Narinénine -13	
OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	285	Isosakurametine -14	
H	H	H	H	223	Flavanone -15	

### III-4-2-تأين مركبات الفلافون:

يمكن تطبيق سلوك التأين الذي تم إنشاؤه لمركب luteoline على المركبات الأخرى .عموما دراسة جميع مركبات الفلافونات المدروسة( ما عدا مركب genkwanine التي لا تفقد جذر CH) تبين خسائر محايدة في CO و CO<sub>2</sub>(الجدول III-2).



الجدول III-2:التسميات المعتمدة لإعادة التدوير و الانشقاقات المختلفة التي لوحظت من خلال هذه الدراسة

m/z	1	2	3	4	5	6
[M-H] <sup>-</sup>	285	269(60)	283(5)	253(5)	237(100)	221
[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	(100) <sup>a</sup>	-	268	-	-	(100)
[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	-	(100)	-	-	-
[M-H-CO] <sup>-</sup>	267 (1)	241(1)	-	225(1)	209(6)	-
[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	257 (3)	227(3)	-	-	-	193
[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	243 (28)	225	-	209(75)	193(5)	-
[M-H-C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	241 (65)	(100)	-	-	-	-
[M-H-CO <sub>2</sub> -CO] <sup>-</sup>	217 (23)	201(40)	-	181(2)	165(1)	-
[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	213 (3)	-	-	-	-	-
[M-H-2CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	199 (23)	183(4)	-	165(1)	-	-

[M-H-C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> -	197(1)	181(2)	-	143(1)	-	-
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	175(35)	159(1)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	151(4)	151(10)	151(1)	-	-	-
<sup>1,4</sup> B+2H	-	149(36)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> A-CO <sup>2</sup>	-	107(1)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup>	133(1)	117(1)	-	-	-	-

### III-4-3-تأين مركبات الفلافونولات:

التأينات الموضحة في الجدول 3-III توضح الأيونات الجزئية الكاذبة للفلافونول أجلكون (pseudo moléculaire) الذي يظهر نفس النوع من الخسائر المحايدة مثل تلك الموصوفة للجليكون من الفلافون .

الجدول 3-III: تنشيطية الفلافونولات (10-7) بواسطة بتقنية ESI-MS/MS

m/z	7	8	9	10	11 <sup>b</sup>
[M-H] <sup>-</sup>	301(1) <sup>a</sup>	285(36)	285(100)	269(100)	-
[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	-	284(47)
[M-H-CO] <sup>-</sup>	273(11)	257(22)	257(3)	241(3)	256(3)
[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	-	243(2)	227(11)	-
[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	257(5)	241(15)	241(15)	225(3)	240(5)
[M-H-2CO] <sup>-</sup>	-	229(3)	229(3)	213(10)	228(10)
[M-H-CO <sub>2</sub> -CO] <sup>-</sup>	229(1)	213(3)	213(3)	197(12)	212(1)
[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	199(1)	183(1)	-
[M-H-cycleB] <sup>-</sup>	193(1)	177(1)	-	-	-
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup>	179(100)	163(100)	-	-	-
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup> CO(7,8) ; <sup>1,2</sup> A <sup>-</sup>	151(67)	135(54)	151(1)	-	151(100)
(9,11)	-	-	-	-	132(1)
<sup>1,3</sup> B	121(1)	121(4)	-	-	-
<sup>1,3</sup> B	107(1)	91(2)	-	-	107
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> CO-CO <sub>2</sub>					

### III-4-4-تأين مركبات الفلافونون:

يتم عرض أيونات المنتجة المختلفة التي توفرها الأيونات الجزئية الكاذبة الأربعة للفلافونون aglycones التي تمت دراستها في الجدول 4-III.

الجدول III-4: تشظية الفلافونونات (12- 15) بواسطة بتقنية ESI-MS/MS

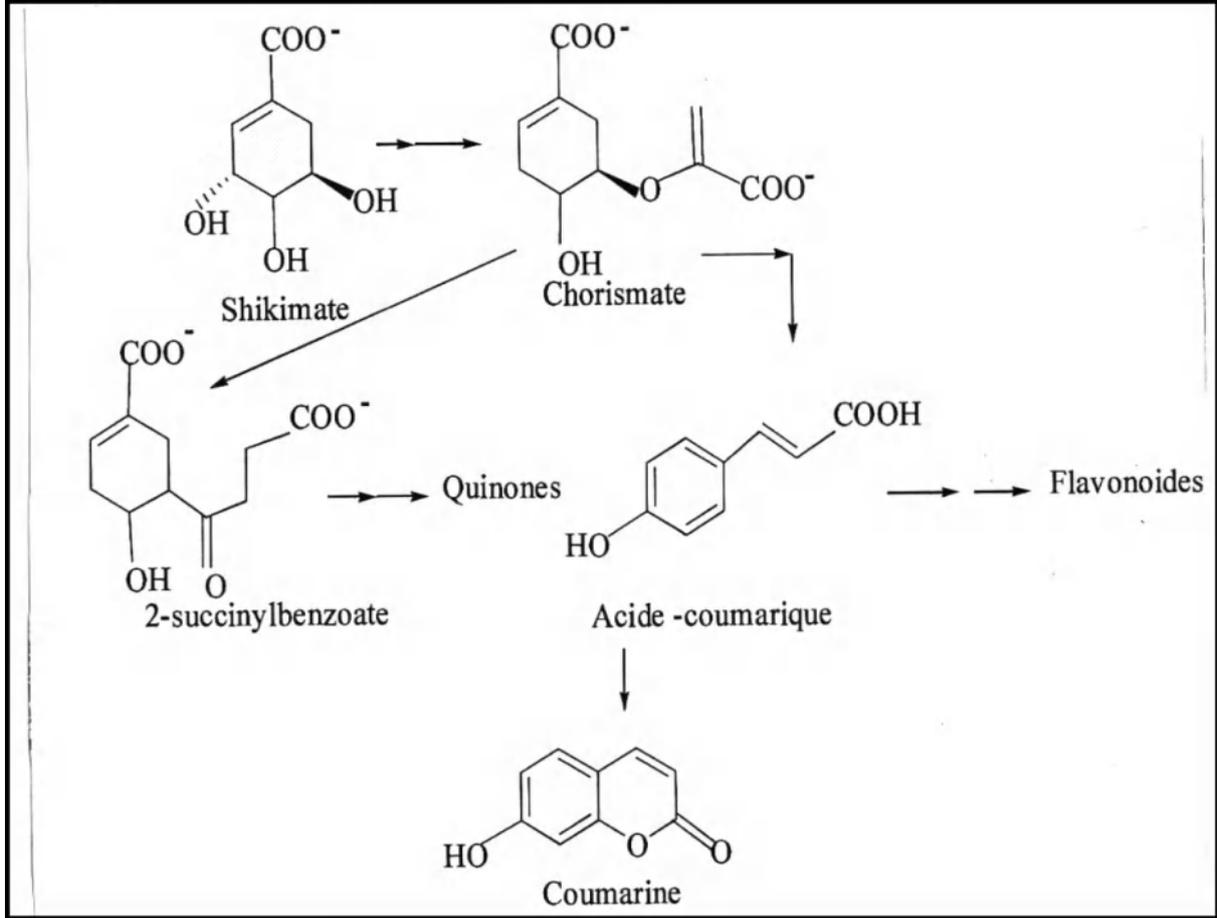
m/z	12	13	14	15
[M-H] -	287(0) <sup>a</sup>	271(0)	285(2)	223(70)
[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	270(75)	
[M-H-CO] <sup>-</sup>	-	-	257(1)	195(100)
[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	243(100)	-
[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	227(1)	241(18)	-
[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	228(1)	-
[M-H-CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	226(8)	-
[M-H-C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	217(8)	-
[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	199(2)	-
[M-H-cycle B] <sup>-</sup>	-	177(18)	-	-
[M-H-C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	-	175(6)	-
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	151(100)	151(100)	151(12)	-
-CH <sub>3</sub> <sup>0,4</sup> B <sup>-</sup>	-	-	164(88)	-
-CH <sub>3</sub> <sup>0,4</sup> B <sup>-</sup> -CO] <sup>-</sup>	-	-	136 (3)	-
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup>	135 (3)	119(3)	-	-
<sup>1,4</sup> A <sup>-</sup>	125(1)	-	125(1)	-
<sup>1,3</sup> A -CO <sub>2</sub>	107(1)	107(3)	107(1)	-

## III-5-المركبات الفينولية

## III-5-1-تعريف المركبات الفينولية

تشكل المركبات الفينولية حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية ، نظرا لكثرة عددها و تباين هيكلها ، و قد تم عزل و التعرف على أكثر من 8000 مركب فينولي و تم تقسيمها بدلالة هيكلها الكربوني [8]. تعرف المركبات الفينولية من بين أهم المركبات النباتية لنواتج الأيض الثانوي ،حيث تحتل حيزا كبيرا في حقل المنتجات الطبيعية ،تتميز بنيتها الأساسية بوجود حلقة عطرية أو أكثر مرتبطة بعدة مجاميع هيدروكسيلية حرة [9,10] ، و الاختلاف في عدد الحلقات و عدد و نوع المجاميع المرتبطة بها يجعلها تنقسم إلى عدة مجاميع أهمها الأحماض الفينولية ،الفلافونيدات ،الدباغ، حيث تمثل الفلافونيدات القسم الأكبر منها [11].

ويتم التخليق الحيوي للمركبات الفينولية من مسلكين أساسيين فالأول يتم عبرمسلك الشكيمات الذي يقود إلى تكوين حمض ،الكومارين ،الفلافونويدات ،التنينات واللقتين .... أما المسلك الثاني فيتم إنطلاقا من أسيتات المألونات ويقود إلى تكوين الكرومون.



الشكل III-2:مخطط التخليق الحيوي للمركبات الفينولية [7]

### III-5-2-مصدرها:

توجد عديدات الفينول في العديد من الأطعمة ذات المصدر النباتي تحديدا في الفواكه الخضروات و المشروبات (النبذ الأحمر ، عصير الفاكهة ، القهوة و الشاي) و الحبوب و البذور الزيتية و البقوليات يمكن أن تصل ما بين 100-500 mg/g في بعض الفواكه.بينما توجد بصورة أقل في الخضر و الحبوب ، حيث يحتوي الخضر على ما يقارب 25-100 mg/g [8].

### III-5-3-أقسام عديدات الفينولات:

توجد العديد من التصنيفات التي قسمت المركبات الفينولية إلى مجموعات ، فقد صنفها العالم Dacosta حسب بنيتها إلى أقسام أهمها ،الأحماض الفينولية ،الفلافونويد ، التانينات ، الستلبيينات و الصبونات [12].أما العالمان Harborne و Simonds فصنفاها حسب انتشارها و تعقيدها إلى عائلة المركبات

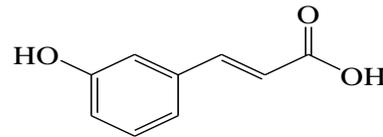
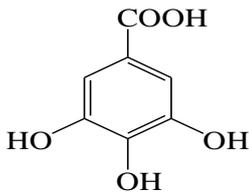
الفينولية قليلة الانتشار (فينولات بسيطة) ، و أخرى واسعة الانتشار (أحماض فينولية ، الفلافونويدات ، الكومارينات) و أيضا المركبات الفينولية المتواجدة على شكل بوليميرات [12]. فالكثير صنفها وفقا لعدد ذرات الكربون في الهيكل الأساسي إلى عدة أقسام كما هو مبين في الجدول التالي :

الجدول III-5: بعض أصناف المركبات الفينولية [8] :

عدد الكربونات	الهيكل	التصنيف	الأمثلة
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acide phénols	Acide gallique
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénones	Gallacetophénone
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinamiques	Acide p-coumarique
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	coumarines	Esculitine
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthonnes	Mangiferine
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stibénes	Resveratrol
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes	Naringénine

### III-5-3-1- الاحماض الفينولية :

وهي عبارة عن مركبات فينولية (شكل III-3) ، تقسم إلى قسمين رئيسيين : أحماض فينولية مشتقة من حمض cinnamique ذات هيكل كربوني (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) وأحماض فينولية مشتقة من حمض benzoïque ذات هيكل كربوني (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) ، وتتواجد في الخضروات والفواكه خاصة في البذور والقشور. كما تظهر الأحماض الفينولية على شكل مرتبط مع سكريات أو أسترات [13, 14] ، ويمكن أن تتحول إلى شكل حر بإماتها بواسطة الأحماض أو القواعد أو الإنزيمات.

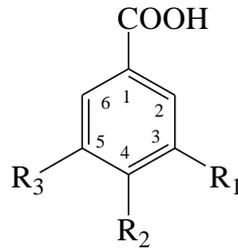


Acide Gallique (Acide Hydroxybenzoïque) Acide Coumarique (Acide Hydroxycinnamique)

شكل III-3: البنية الكيميائية للأحماض الفينولية [15] .

### III-5-3-1-1- مشتقات حمض البنزويك :

تمتلك هذه الأحماض الهيكل (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) كما في الشكل III-4، وهي واسعة الإنتشار سواء مرتبطة أو حرة أو في حالة سكريات أو أسترات [16]. تتواجد في عاريات البذور angiosperms [7]. من بين المركبات الأكثر شيوعا هي : حمض p-hydroxybenzoique، حمض الفانليك، حمض الـsyringique وحمض protocatechique. يوجد حمض الغاليك في العديد من النباتات الخشبية، تشارك مشتقات ثلاثية الهيدروكسيل هذه في تشكيل الدباغ الغاليكية المميهة (hydrolysable gallotannins). يستعمل الفانيلين (Vaniline) مثلا على نطاق واسع في المستحضرات الصيدلانية [17]. ويوضح الجدول التالي بعض مشتقات حمض بنزويك.



الشكل III-4: الهيكل الأساسي لمشتقات حمض البنزويك

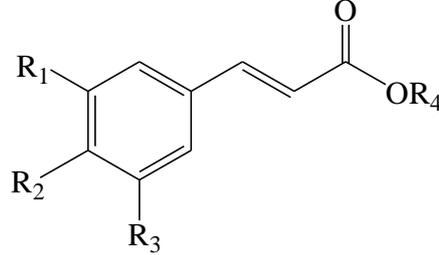
الجدول III-6 : بعض الأحماض الفينولية المشتقة من حمض البنزويك

R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	الاسم
H	H	H	Acide benzoique
H	OH	H	Acide Hydroxy-4-benzoique
H	OCH <sub>3</sub>	H	Acide Methoxy-4-benzoique
H	OH	OH	Acide protocatechique
OH	OH	OH	Acide Gallique
H	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide Vanillique
OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	Acide Syringique

### III-5-3-2- مشتقات حمض السيناميك:

أغلبية الأحماض الفينولية من الهيكل (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) كما في الشكل III-5 هي أحماض الكوماريك، الكافيك، الفيريليك، ذات إنتشار واسع، أما بقية الأحماض الأخرى مثل (Acide 2-coumarique) تعد الأقل تكرارا ونادرا ما تكون حرة، وهي في غالب الأحيان أسترات مصنعة [18] وتشمل أحماض هيدروكسي سيناميك

أربعة مركبات (هي أحماض الكوماريك، الكافيبك، الفيريليك، سينايك) لا يكاد عضو نباتي يخلو تقريبا من أحدها على الأقل [19]. ويوضح الجدول III-7 بعض مشتقات حمض السيناميك.



الشكل III-5: الهيكل الأساسي لمشتقات حمض السيناميك.

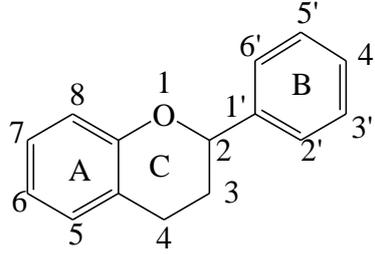
الجدول III-7: بعض الأحماض الفينولية المشتقة من حمض السيناميك

R <sub>4</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	الإسم
H	H	H	H	Acide cinnamique
H	H	OH	H	Acide p-coumarique
H	H	OH	OH	Acide Caféique
H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide Férulique
H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Acide Isoféruique
H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide Senapique

### III-6-الفلافونويدات:

كلمة الفلافونويدات مشتقة من اسم يوناني Flavu التي تعني الأصفر فهي عبارة عن صبغيات ملونة ، تنتشر في الأجزاء المختلفة من النبات و تتميز بصفة خاصة في الجزء الهوائي منه ,تعتبر الفلافونويدات من أهم المركبات الفينولية التي تتميز بهيكل أساسي يحتوي على 15 ذرة كربون موزعة

على حلقتين عطريتين A و B مرتبطتين بحلقة C غير متجانسة تحتوي على ذرة أوكسجين من الصيغة  $C_6-C_3-C_6$  كما موضح [12 , 20]:

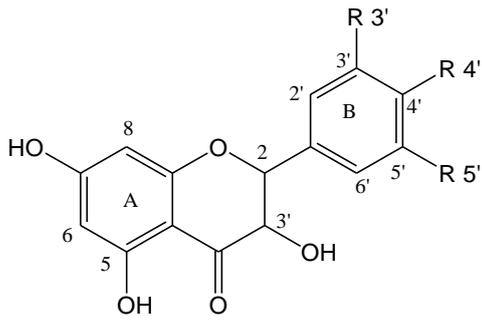


الشكل III-6: الهيكل العام للفلافونويدات.

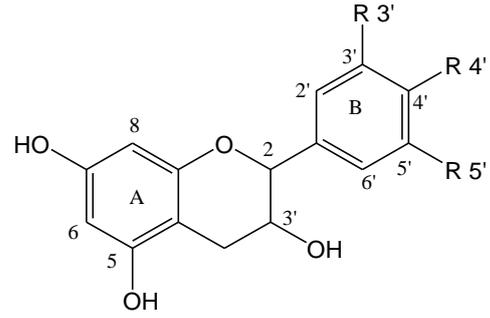
### III-6-1- تقسيم الفلافونويدات:

على أساس التغير في درجة تأكسد الحلقة C تقسم الفلافونويدات إلى :

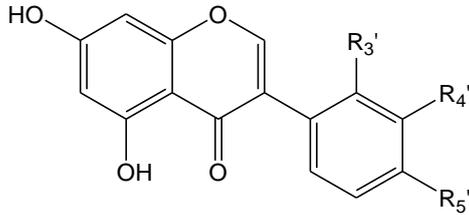
Flavanone، flavone، isoflavone، dihydroflavonol، flavanol، chalcon، flavan-3-ol، anthocyanine .



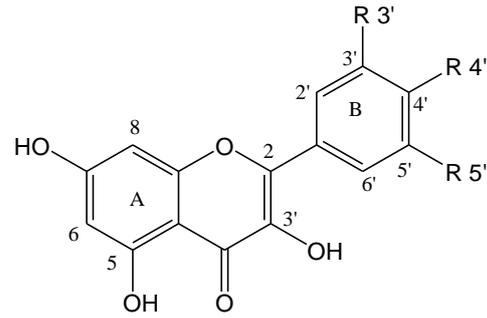
flavanonol



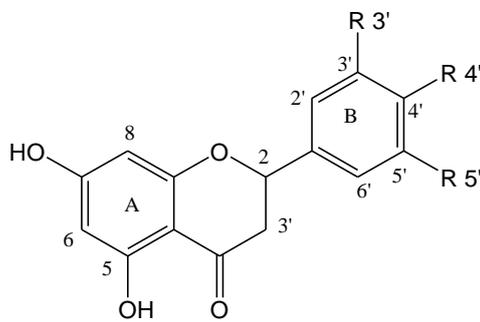
flavan-3-ol



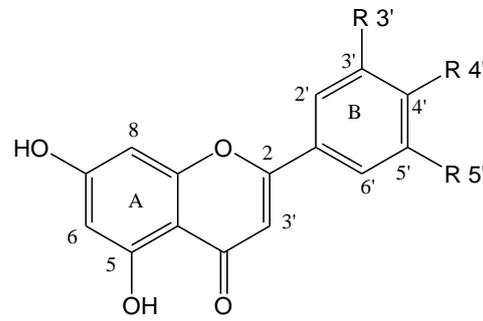
isoflavone



flavonol



flavanone



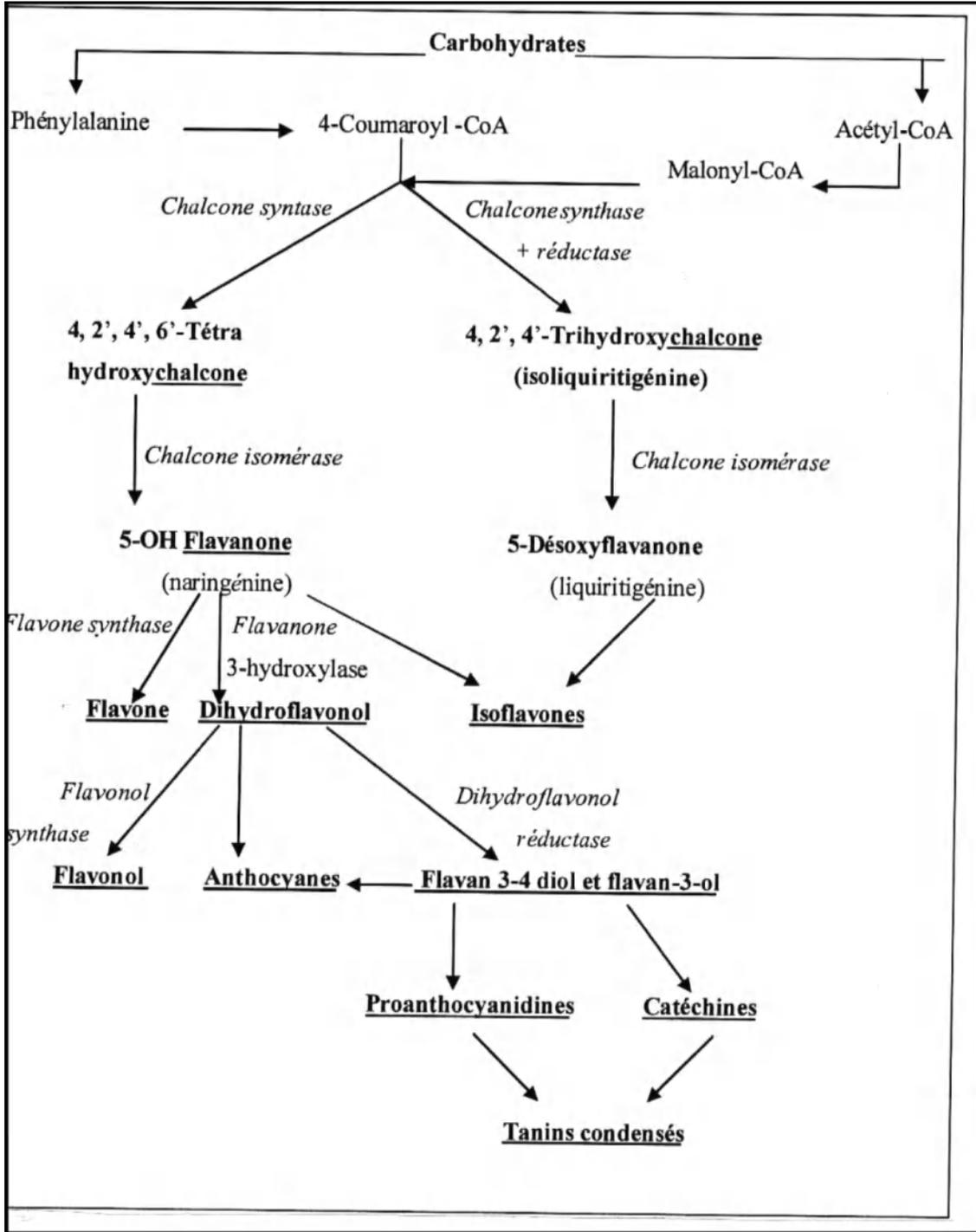
flavone

الشكل III-7: الهيكل العام لأهم أقسام الفلافونويدات [12]

### III-6-2. التخليق الحيوي للفلافونويدات:

تنشأ الحلقات الثلاث للمركب الفلافونويدي من أيض الكربوهيدرات (الغلوكوز) في الحلقة A تتكون عبر مسلك المألونات من إلتحام 3 جزيئات من Malonyl-CoA وكل جزيئة من هذه الأخيرة هي ناتجة بدورها من تكاثف جزيئتين من Acetyl-CoA. أما الحلقة B و C فينتجان من مسلك الشيكيمات انطلاقاً من الحمض الأميني Phénylalanine الذي يتحول إلى *p*-Coumaroyl-CoA كما يوضحه

الشكل III-8) [21].



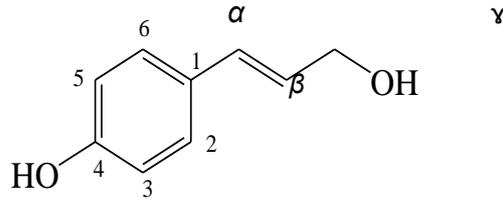
الشكل III-8: مخطط التصنيع الحيوي للفلافونويدات [12].

### 7-III: الجينينات:

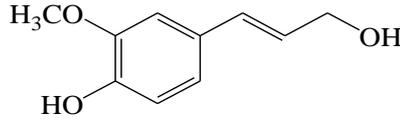
اقترح مصطلح lignane من قبل العالم Haworth سنة 1936 على أنها مركبات كيميائية طبيعية تخلق في النبات و تصنف ضمن المنتجات متعددة الفينول ، و من خواصها أنها عديمة اللون و الرائحة ذات الشكل البلوري، مئات من مركبات اللجينان تم عزلها من 70 عائلة نباتية تقريبا ففي عاريات البذور تتركز في الأخشاب بينما في كاسيات البذور تتواجد في جميع الأنسجة (الجزور،الأوراق،الأزهار،الثمار والبذور).

ما زلنا لا نتفق على تعريف واحد ودقيق للجنين بسبب تنوعه الكبير وهذا حتى داخل نوع معين ، لأن تكوينه يعتمد على البيئة الفيزيائية والكيميائية التي ينمو فيها النبات. لذلك فإن اللجنين هو اسم عام يجمع الجزيئات ذات الهياكل المتنوعة للغاية. هيكل من ثلاثة أحاديات فهو عبارة عن بوليمر مركب حيويًا من ثلاثة أحادي ليجينول ، مونومراته. هذه تختلف فقط في عدد مجموعات الميثوكسي (-OCH<sub>3</sub>) على الحلقة العطرية :

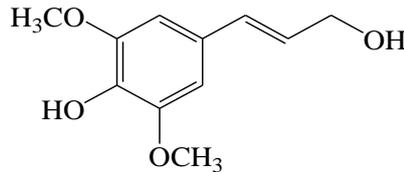
- كحول باراكوماريل (alcool paracoumarylique) : تسمى وحدة H (hydroxyphényle) ، بدون مجموعة ميثوكسي.



- كحول كونيفريل (alcool coniférylique) : تسمى وحدة G (guaiaicyl) توجد بها مجموعة من الميثوكسي.

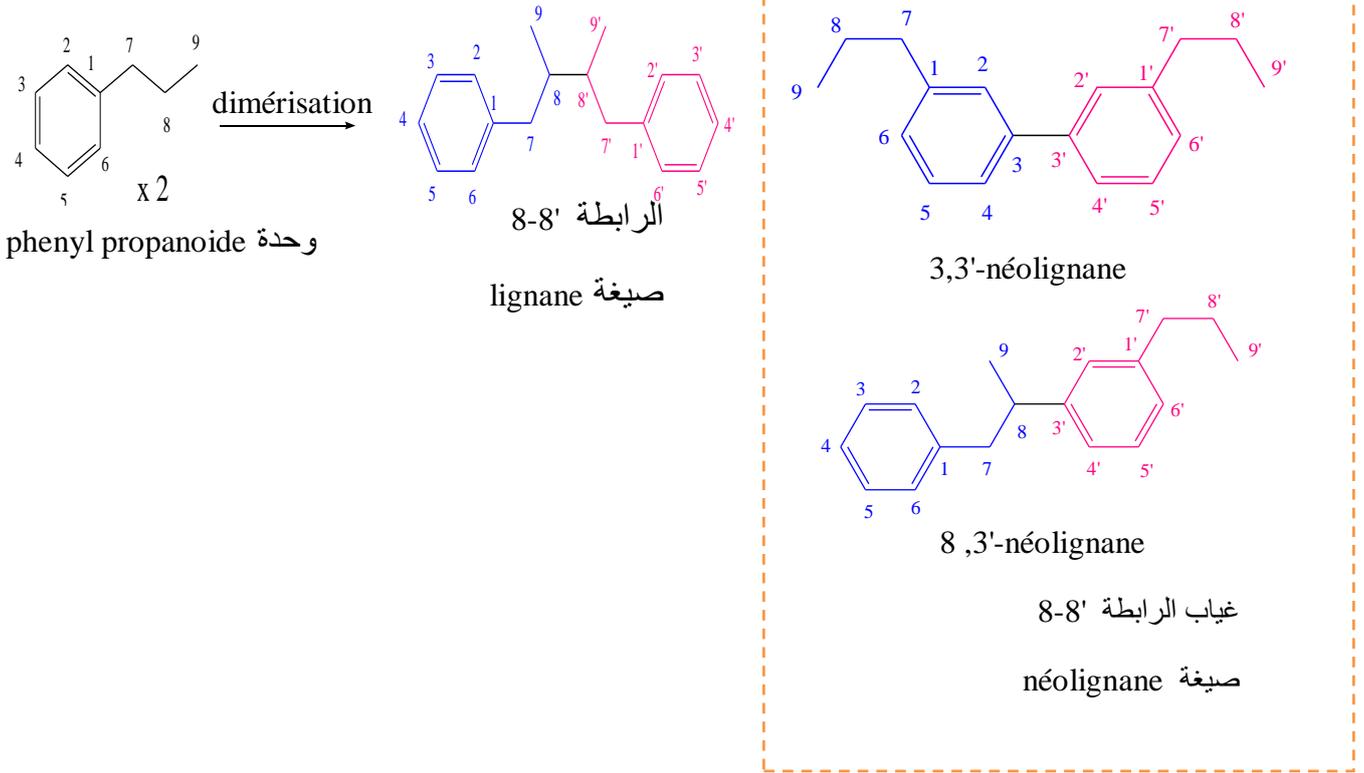


- كحول سينابيل (alcool sinapylique) : تسمى وحدة S (syringyle) توجد بها مجموعتين من الميثوكسي.



الليجينات هي عبارة عن مركبات ناتجة عن اتحاد وحدتي الفينيل- بروبان (C<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>) و التي ترتبط مع ذرة كربون مركزية للسلسلة الجانبية (الكربون بيتا ) [22].

تسمى ثنائيات C6-C3 phenylpropanes (الشكل III-9) ، ليجينان عندما تكون وحدات فينيل بروبان مرتبطة بـ C8-C8 من مجموعة البروبان ، و neolignans عندما يتم ربط اثنين من phenylpropanes بخلاف C8-C8 [23] .

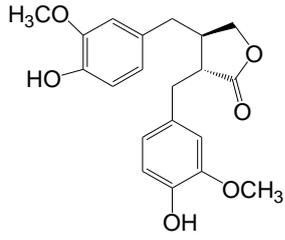


الشكل III-9: ارتباط ثنائي فنيل بروبان (néolignane - lignane) [24]

### III-7-1- أقسام اللجينيئات

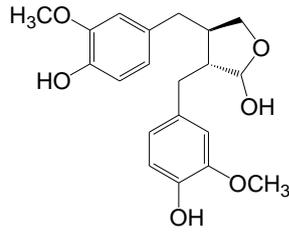
وفقا لطريقة دمج ذرة الأوكسجين و نوع التحلق ، تم تصنيف اللجينيئات إلى ثماني مجموعات هيكلية (الشكل III-10) [25].

1- dibenzylbutyrolactones



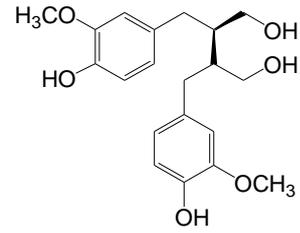
Matairensinol

2- dibenzylbutyrolactols



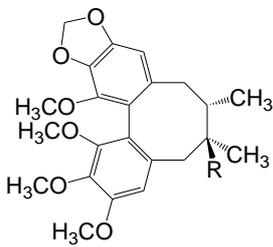
Lactol

3- dibenzylbutane



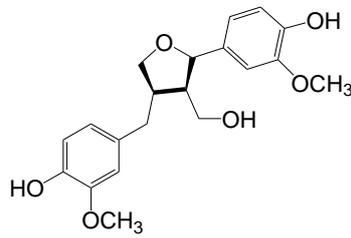
Sécoisolarisirsinol

4- dibenzocyclooctadiènes



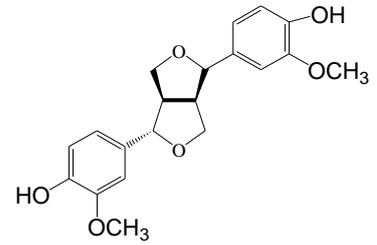
Gimisine

5- Furane



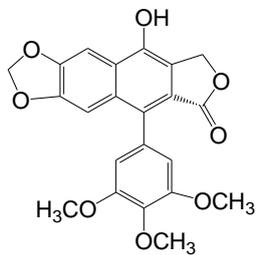
Larisirsinol

6- Furanofurane



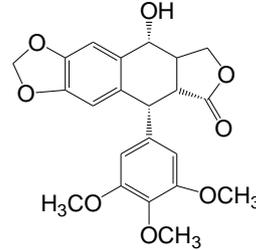
Pinorsinol

7- aryltetralines



podophyllotoxine

8- arylnaphtalènes



Déhydropodophyllotoxine

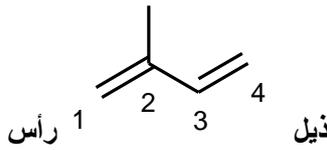
الشكل III-10 : مجموعات هياكل الليجيان [25].

### 7-III-2-الفعالية البيولوجية لمركبات الليجيانينات

مركبات الليجيانينات تتميز بنشاط بيولوجي عالي ففي النبات لها دور دفاعي ضد البكتيريا، الفطريات و الفيروسات، علاوة على ذلك ففي الطب الصيني تستعمل ثمار نبات *Schisandra chinensis* و جذور و سيقان نبات *Kadsura coccinea* الغنية بمركبات اللجان مثل enterodiol ضد مكافحة فيروس نقص المناعة البشرية و ضد السرطان .

8-III- السيسكويتربينات Sesquiterpène

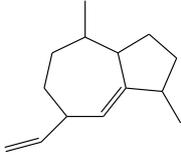
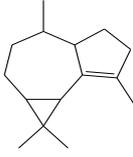
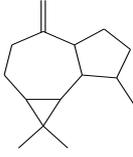
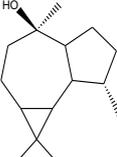
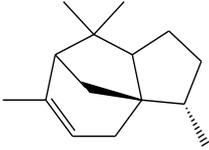
صيغتها الكيميائية  $C_{15}H_{24}$ ، غالبا ما تتواجد في شكل لاكتونات (Lactones)، و هي مركبات هشة تتشكل من ارتباط ثلاث وحدات ايزوبرين، لها هياكل كثيرة حوالي 3000 مركبا ، تنقسم إلى مركبات ذات سلاسل مفتوحة (لا حلقية Farnesol) و مركبات أحادية الحلقة ( $\alpha$ -humulene)، ثنائية الحلقة (Cadinène) أو متعددة الحلقات. و قد تحتوي على مجموعات كحولية ، كيتونية ألدهيدية و إسترات [ Breneton hur, 1999 ], السيسكويتربينات أحادية الحلقة أكثر انتشارا في الطبيعة من نظيرتها غير الحلقية تتمثل في أربع هياكل بنائية [7] :



2-Methylbuta-1,3-diène (isoprène)

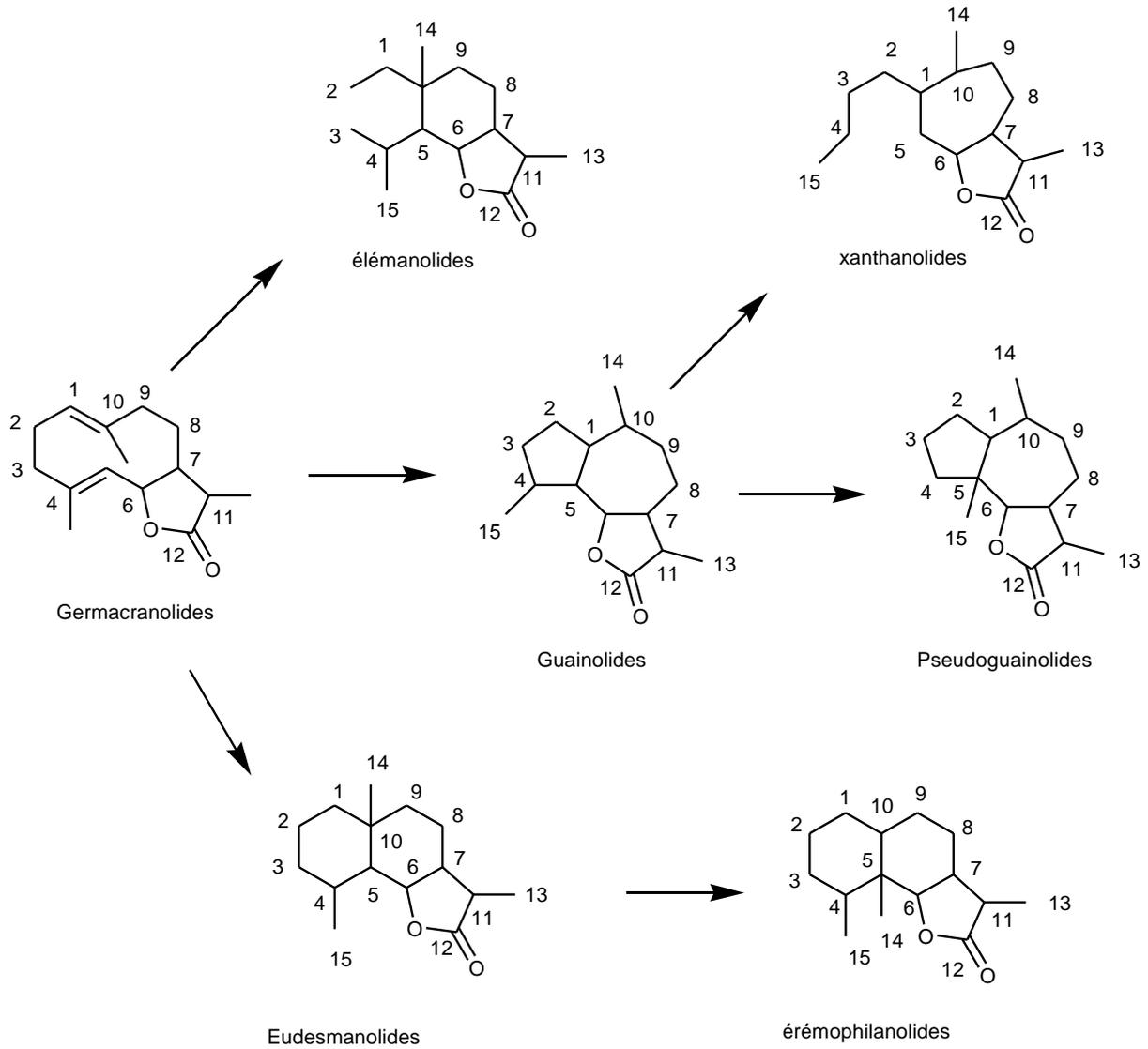
الجدول 8-III : هياكل السيسكويتربينات

سسكويتربينات لاحلقية			سسكويتربينات أحادية الحلقة		
			هيكل ال-bisabolene		هيكل germacrene
(E)- $\beta$ -farneséne	(E)-Nerolidolo		(E)- $\beta$ -bisaboléne	(Z)- $\alpha$ -bisaboléne	D germacrène
سسكويتربينات ثنائية الحلقة					
هيكل Eudesmano			هيكل Cadinene		
$\alpha$ -selinène	$\beta$ -selinène	$\gamma$ -eudesmol	$\alpha$ -muroléne	$\delta$ -cadinéne	

هيكل الـ <i>guaiano</i>	هيكل الـ <i>Aromadendrene</i>		
			
$\gamma$ -gurjunéne	$\alpha$ -gurjunene	$\alpha$ -aromadendrene	viridiflorol
<b>سسكويتربينات ثلاثية الحلقة</b>			
<i>Cedrano</i> هيكل الـ			
			
$\alpha$ -cedréne			

### III-8-1-أقسام السيسكيتربينات اللاكتونية

تنقسم الى مجموعات هيكلية تعتمد على هيكل هياكل الكربون و التي تضاف اليها لاحقة (olide) التي تشير الى وظيفة لاكتون وفقا ل [4] Schmidt, هناك 100 مجموعة سيسكويتربينية مختلفة فهي تتضمن عدة فئات cardenolides ، germacranolides، guainolides ، pseudoguainolides ، heliangolides و eudesmanolides [26].



الشكل III-11 : المجموعات السبع الأساسية للسيكويتربينات اللاكتونية

### وعلاقتها المتبادلة وفقاً ل Fisher

#### III-8-2- التخليق الحيوي للسيكويتربينات:

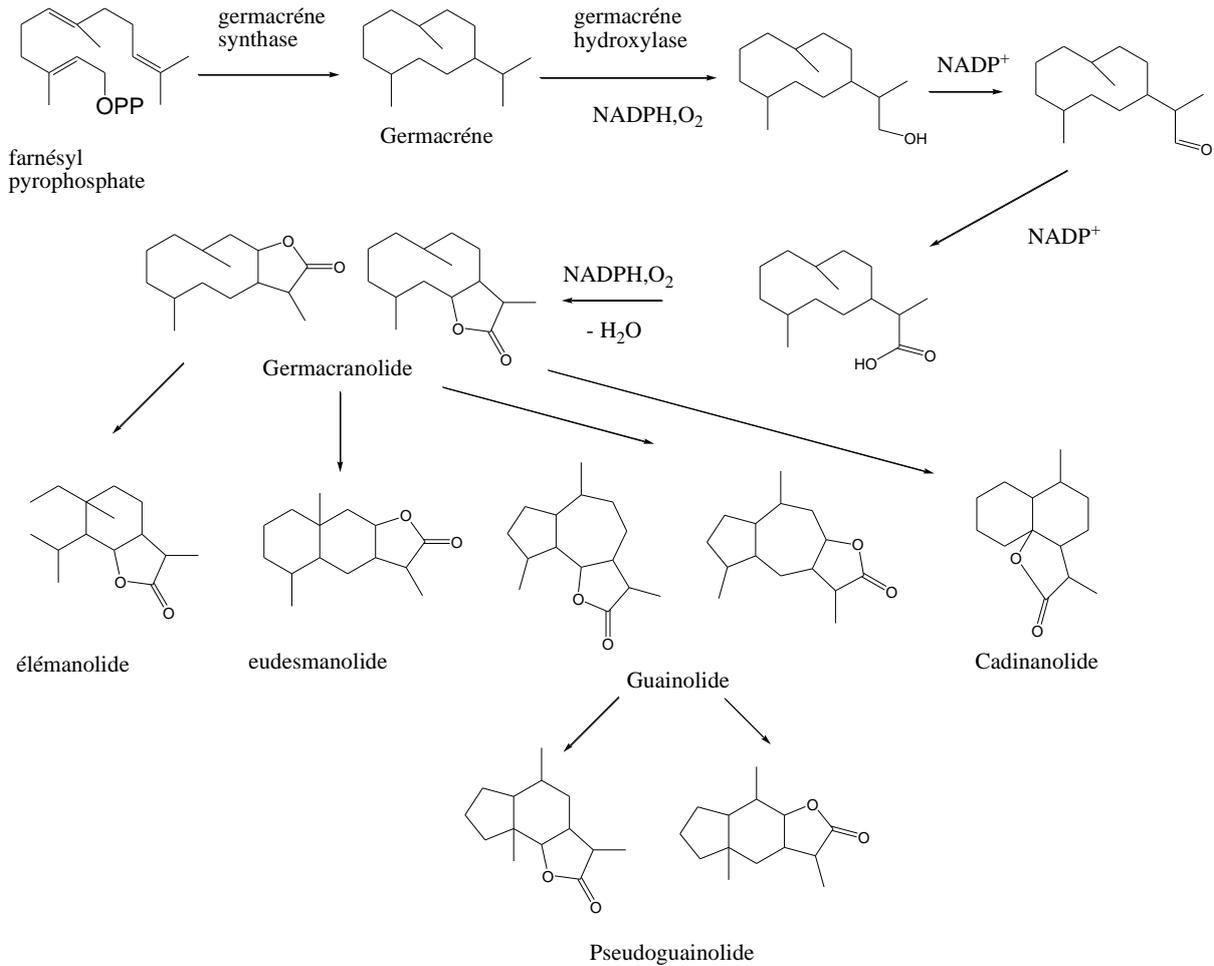
ينشأ التخليق الحيوي للسيكويتربينات من التفاعل بين isopentenyl pyrophosphate (IPP) و dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) لتشكيل جيرانيل بيروفوسفات. يتفاعل Geranyl pyrophosphate مع isopentenyl pyrophosphate لتشكيل farnesyl pyrophosphate وهو المؤشر الذي يتم تحليقه لتكوين 15 كربوناً لجميع السيكويتربينات.

نظراً لأن الهدف هو تطوير تخليق متباين تجاه لاكتونات سيكيتيربين ، فمن المثير للاهتمام أولاً دراسة تركيبها الحيوي.

هذا في الواقع قادر على إنتاج مجموعة واسعة من المركبات الطبيعية ذات التركيبات المتنوعة للغاية من عنصر رئيسي واحد farnesyl pyrophosphate ( الشكل III-12). يمكن تقسيم هذا التخليق إلى مرحلتين رئيسيتين.

في المرحلة الأولى ، يكون farnesyl pyrophosphate يتم تحليقه إلى germacrène بواسطة germacrène synthase ، يخضع هذا الهيكل العظمي لأكسدة متتالية لتثبيت اللاكتون وتشكيل المجموعة الأولى لل germacranolide.

يخضع الهيكل الأساسي الذي تم الحصول عليه بهذه الطريقة إلى سلسلة من عمليات إعادة الترتيب الكاتيونية لإحداث العديد من الهياكل الحلقية الأخرى (متعددة) ، مثل élémanolides ، eudesmanolides ، cadinanolides أو guaianolides التي يمكن إعادة ترتيبها في pseudoguaianolides. ، ثم في المرحلة الثانية ، يتم أكسدة المركبات التي تم الحصول عليها وتوظيفها لإنتاج لاكتونات سيسكيتيربين الطبيعية ، مثل hélénaline أو déoxyéléphantopine ( الشكل III-12 ).



الشكل III-12: مجموعة البنيات الأساسية للسيسكويتربينات اللاكتونية

## III-8-3- الفعالية البيولوجية للسيسكويتربينات اللاكتونية

تملك السيسكويتربينات اللاكتونية فعالية بيولوجية كبيرة ,حيث أنها تعتبر مركبات مضادة للأكسدة، مضادة للسرطان ، مضادة للورم ، مضادة للالتهاب ، مضادة للقرحة المعدية، مضادة للبكتيريا والفطريات كما أنها تعتبر منشطة للقلب [27-32].

## الخلاصة

LC/MS/MS يقيس  $m/z$  للمركب بالإضافة إلى المركبات الوسيطة (المنتجات الثانوية) وهذا يوفر دقة إضافية و حساسية أكبر و التي يمكن أن تعطينا المزيد من المعلومات الهيكلية حول مركباتنا. تظل ميزة LC/MS/MS على LC/MS في المثال ،إذا كان من الممكن تحديد مركبين لهما نفس الوزن الجزيئي و الذي سينتج نفس الأيون الجزيئي ، على أساس الاختلافات بين الأيونات المتكونة بعد ذلك تجزئة هذه الدراسة لفلافونويدات aglycone المختلفة باستخدام مقياس الطيف الكتلي في وضع الأيونات السالبة , كشفت مسارات جديدة للتجزئة. هاته التأينات تعطي معلومات هيكلية ربما تكون مهمة في الفحص الكيميائي للمستخلص الخام النباتي يجب أن يكون وضع الايونات السالبة أكثر انتقائية و حساسية من وضع الايونات الموجبة. تعطينا الأجزاء معلومات هيكلية يمكن أن تكون شيقة للغاية في الفحص الكيميائي النباتي . في التحليل الكيميائي النباتي لمستخلص النبات الخام يجب أن يكون وضع الأيونات السالبة أكثر انتقائية و حساسية من وضع الأيونات الموجبة.

## المراجع باللغة العربية

- [11] جرموني ،م.(2009).النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة الخياطة *Teucrium polium*. مذكرة لنيل شهادة الماجستير في البيوكيمياء و الفيزيولوجيا التجريبية .جامعة فرحات عباس سطيف .

## المراجع باللغة الاجنبية

- [1] Tal'roze, V.L., Gorodetskii, I.G., Zolotoy, N.B., Karpov, G.V., Skurat, V.E., Maslennikova, V.Ya. (1978). Capillary system for continuous introducing of volatile liquids into analytical MS and its application. *Adv. Mass Spectrom.* 7: 858.
- [2] Benzie, I. F., Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry.*, 239, 70-76.
- [3] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice- Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical. Biology. Medicine.*, 26, 1231-1237.
- [4] Sharma, O. P., Bhat., T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry.* 113(4), 1202.
- [5] Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., Dommès, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of *phenolic compounds* measured by various tests. *Food Chemistry.* 113, 1226-1233
- [6] Degaulejac, S. C., Provost, N., Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 47, 425-431.
- [7] Bruneton, J. (1993). Composés phénoliques: Shikimate-acétates. In: "Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales". Technique et Documentation-Lavoisier (Paris); Chap 3: 199-383.
- [8] Benhammou, N. (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse doctorat. Université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen. p 174.
- [9] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability *The American Journal of Clinical Nutrition.* 79, 727-747.
- [10] Kanoun, K., (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des Extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaïne). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister Université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen. 86-118.
- [12] Bouheroum, M. (2007). Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes : *Rhanterium adpressum* et *Ononis angustissima*, Thèse de doctorat d'état en chimie organique, Université Mentouri-Constantine. p21, 42.

- [13] Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.58, 6706–6714.
- [14] Gotti, R. (2011). Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.55, 775-801.
- [15] Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*.2, 1231-1246.
- [16] Harborne ,J.B. (1999) .biochemisty of phenolic compounds , academic press, London and New York.
- [17] Morton, L.W., Caccetta, R.A.A., Puddey, I.B., Croft, K.D.( 2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.27: 152-159.
- [18] Bruneton,J.(1999) . Pharmacognosie et phytochimie des plantes medicinales ,ed .(3<sup>ème</sup> edition ) Technique.et Documentation , Lavoisier. Paris,1120 .
- [19] Zeghd , N . (2009) .Etude du contenu polyphenolique de deux plantes medicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris, rosmarinus officinalis* ) et évaluation de leur activite antibactérienne.Universite Mentouri Constantine.13046–475
- [20 ]Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medicinal significance of the flavonoides, *Pharmacology Therapeutics*, 96, 67-202.
- [21] Banahmed, M. (2009). Contribution a l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des Apiaceae:*Carumm ontanum Coss. Dur.et Bupleurumm ontanum Coss.*, Thèse de doctorat d'état en chimieorganique, Université Mentouri – Constantine.
- [22] Marouf,A . Reynaud, J. (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod.Paris. 167.
- [23] Gottlieb, O. R. (1972). Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, 11(5),1537-1570.
- [24] Zálešák, F., Bon, D. J. Y. D., Pospíšil, J. (2019). Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacological Research*, 146, 104284.
- [25] Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371- 390.
- [26] Schmidt, T.J., A.M.M. Nour, S.A. Khalid, M. Kaiser, et R. Brun. (2009). Quantitative

structure-antiprotozoal activityrelationships of sesquiterpene lactones. *Molecules* 14(6), 2062-76.

[27] Kubo, I., Chaudhuri, S. K., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T., Ishikawa, H., Haraguchi, H. (1996). Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterothe cainuloides*. *Planta Med*, 62(5), 427-430.

[28] Picman, A. K. (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. et Ecol*, 14(3), 255-281

[29] Robles, M.; Aregullin, M.; West, J., Rodriguez, E. Review, (1995). Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones. *Planta Med*, 61(3), 199-203.

[30] Gören, N., Woerdenbag, H. J., Bozok-Johansson, C. (1996). Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum*. *Planta Med*, 62(5), 419- 422.

[31] Almogboul, A. Z.; Bashir, A. K.; Khalid; S. A.; Farouk, A. (1997). Antimicrobial activity of vernolepin and vernodaline. *Fitoterapia*, LXVIII, 83-84.

[32] Skaltsa, H.; Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., Sokovic, M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry* 2000, 55(8), 903-908.

## الفصل الرابع

### الفعالية البيولوجية

**IV-الفعالية المضادة للأكسدة:**

يطلق مصطلح مضادات الأكسدة على كل مادة أو مركب له فعالية ضد الأضرار التأكسدية و يعمل على تأخير أو الوقاية من فعل الجذور الحرة ، تعمل مضادات الأكسدة على الحماية بعدة طرق .

إما بالتنشيط المباشر لإنتاج ROS، منع انتشارها أو هدمها [1] .

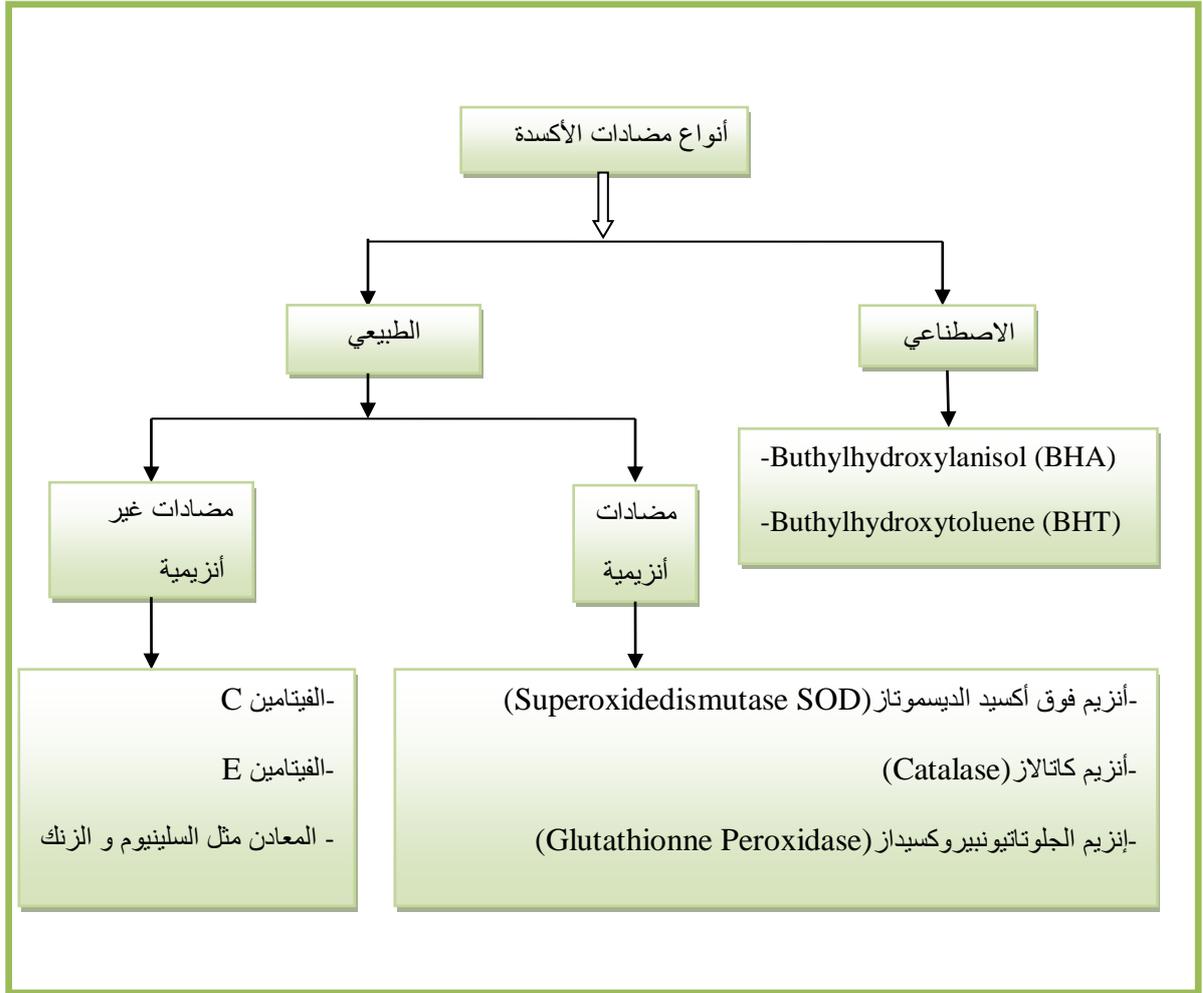
تستعمل الخلية العديد من الآليات المضادة للأكسدة ، و تختلف طبيعة هذه الأنظمة المضادة للأكسدة حسب الأنسجة و النوع الخلوي و حسب تواجدها في الوسط داخل و خارج الخلوي ، تقسم الأنظمة المضادة للأكسدة إلى أنظمة إنزيمية و أخرى غير انزيمية .

**IV-1-الجذور الحرة (المؤكسدات):**

تعرف الجذور الحرة بأنها أنواع كيميائية لذرات أو جزيئات ، تملك إلكترون أو أكثر حر في المدار الخارجي ، وجود إلكترون حر يجعل هذه الأنواع غير مستقرة أو أكثر نشاطية مما يجعله في حالة بحث دائم ونشط عن الإلكترون المفقود ليكون زوجا من الإلكترونات المستقرة ، و هذا ما يجعله ينتزع إلكترونات من الجزيئات المجاورة مما يسبب إتلاف جزيئات الخلية , الطبيعية في الجسم [2]. كثيرا من التفاعلات البيولوجية تقوم بأكسدة مواد التفاعل يكون فيها الأوكسجين الجزيئي هو المستقبل النهائي للإلكترونات التي تدخل في تشكيل الأنواع الأوكسجينية النشطة (Reactiv eoxygen, species) التي يمكن أن تكون جذرية أو غير جذرية [3] .

**IV-2-أنواع مضادات الأكسدة:**

إن الدور الأساسي لمضادات الأكسدة هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة من الأكسدة و تقسم مضادات الأكسدة من حيث مصدرها إلى طبيعية و مصنعة كالتالي:



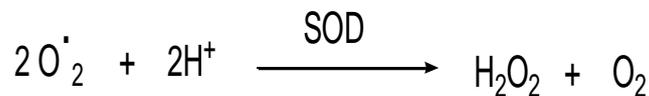
الشكل 1-IV: أنواع مضادات الأكسدة

#### 1-2-IV- مضادات الأكسدة الأنزيمية:

يملك الجسم العديد من الأنزيمات المضادة للأكسدة أهمها SOD و Cat و GPX [4] ، كما أنها تعتبر خط دفاعي أول ضد الجذور الحرة وهي عبارة عن أنزيمات خاصة.

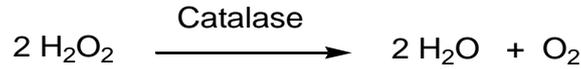
#### 1-1-2-IV- فوق أكسيد الديسموتاز (SOD) Super oxide dismutase

يعتبر أنزيم (SOD) Superoxide dismutase من الأنزيمات التي تدخل في تحليل النواتج السامة للميتابوليزم الخلوي فهو يقوم بإزالة الجذر  $O_2^{\cdot}$  و ذلك بتسريع معدل تحوله إلى  $H_2O_2$  بمساعدة بعض المعادن مثل السليسيوم و الزنك [5,6].



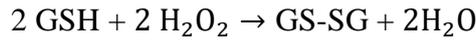
**IV-2-1-2-الكاتالاز (Catalase) :**

هو عبارة عن إنزيم يوجد في الأجسام البيروكسومية Peroxysomes في خلايا أنسجة الكائنات الراقية كالدّم ، نخاع العظام ، الأغشية المخاطية ، الكلى و الكبد ، كما أن هذه الأجسام غنية بأنزيم آخر هو الأكسيداز (Oxidase) فبينما يعمل هذا الأخير على تكوين  $H_2O_2$  يقوم الكاتالاز بتكسيّره و تحويله إلى ماء و أكسجين [7] ، كما يوضح التفاعل .

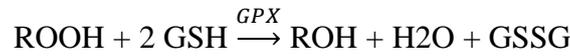


**IV-3-1-2- Glutathion peroxydase (Gpx) :**

يوجد هذا الإنزيم في خلايا الدم الحمراء والأنسجة الأخرى ويقوم هذا الإنزيم بتحفيز تكسير الماء الأوكسيجيني  $H_2O_2$  و اللبيدات بواسطة الجلوتاثيون المختزل GSH hydroperoxydases و ليعطي الجلوتاثيون المؤكسد (2GS) والماء حسب المعادلة:



يقوم الجلوتاثيون بيروكسيداز بحماية دهون الأغشية الحيوية والهيموغلوبين ضد الأكسدة بواسطة Peroxides التي يمكن أن يستخدمها كركائز أخرى حسب المعادلة التالية [8].



**IV-2-2-مضادات الأكسدة غير الأنزيمية :**

هي الجزيئات المصنعة من قبل الجسم البشري أو التي يتم الحصول عليها من الغذاء مثل الفيتامينات ، البروتينات، الفلافونويدات و الكاروتينات وتشمل على [9] :

**IV-1-2-2-الفيتامين C:**

Vit C أو حمض L- ascorbic يتكون من ست ذرات كربون فهو من المركبات المضادة للأكسدة الذائبة في الماء, يعمل بمساعدة النظام الدفاعي للجسم على إزالة سمية بعض المواد الكيميائية و ذلك عن طريق عملية الأكسدة و الاختزال في الجسم [10-12].

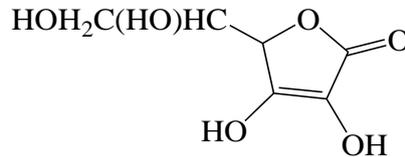
كما أن له دور مانع للأكسدة في البلازما و السوائل الخارج خلوية ( Extra cellulaires ) و يعتبر أهم مضاد أكسدة حيث يؤثر مباشرة على مركبات ROS و بطريقة غير مباشرة بتجديد Vit E و GSH [13,14].

يتواجد فيتامين C في 3 أشكال : صورة مختزلة لحمض الأسكوربيك ،صورة مؤكسدة لحمض dehydroascorbic (DHA) ، و صورة وسيطة غير ثابتة و قابلة للتفاعل تسمى الجذر الحر أسكوربيل .للشكل المؤكسد و المختزل لنفس الوظيفة الفيتامينية [15] .

فيتامين C من العناصر الصغرى التي يحتاجها الجسم لأداء وظائفه العادية ،إذ يسبب نقصه داء الحفر الذي يمكن أن نتفاده بتناول 10 mg فيتامين C في اليوم على الأقل من أهم مصادره الفواكه ،الحمضيات و الخضر الطازجة .

يعتبر فيتامين C من أهم مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء ،داخل السوائل البيولوجية و بين الخلايا [16] ، القدرة على التداخل مع الغشاء البلازمي بإعطائه إلكترون لجذر tocopheroxy [17] . كما يعمل على اقتناص الأشكال النشطة للأكسجين (جذور الهيدروكسيل ، الأكسجين المفرد ، جذور فوق الأكسيد و جذور hydroperoxy و hypochlorous HClO) و أشكال النيتروجين خاصة ، ثاني أكسيد النيتروجين و جذر nitroxide [19,18,16] .

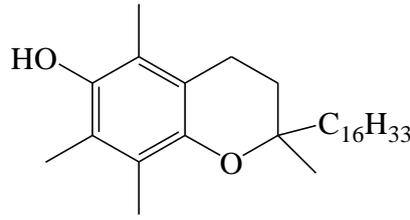
كما يعمل الفيتامين C على ركسلة glutation ، β- carotene ، urate ، انطلاقا من جذور glutathyl ، جذور urate و β - carotene radical cations على التوالي .



الشكل 2-IV : الصيغة الكيميائية لفيتامين C (ascorbic acid) [20].

#### 2-2-2-IV-الفيتامين E:

فيتامين E مصطلح عام و شامل يطلق على 4 مواد قابلة للذوبان في الدهن تسمى α-tocopherol و يعتبر α-tocopherol الشكل أهم مركبات α-tocopherol انتشارا في الطبيعة و أكثرها أهمية لتمتعه بنشاط بيولوجي مرتفع ، تتواجد مركبات tocopherol بتراكيز مختلفة في الأغذية النباتية و الحيوانية و أهم مصادرها الطبيعية نذر الزيوت النباتية [21].

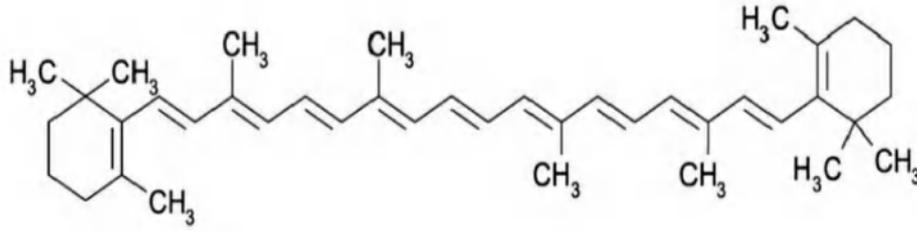


الشكل 3-IV: الصيغة الكيميائية لفيتامين E ( $\alpha$ -tocopherol) [22]

يعتبر  $\alpha$ -tocopherol و المعروف باسم ال Vit E الذي يتكون من حلقتين إحداهما Hétérocyclique مع ذرة أوكسجين و سلسلة جانبية عديدة الايزوبرينات, شكل 'يعتبر من المركبات المضادة للأكسدة الذاتية في الدهون, يتواجد على مستوى الأغشية و يثبط سلسلة تفاعلات فوق أكسيد الدهون [23,15]. تعتمد الوظيفة المضادة للأكسدة للفيتامين E على قدرته على اقتناص الجذور الحرة مثل اللأكسجين المفرد، فوق الأوكسيد و البيروكسيد [25,24] ، و بالتالي اخمد نشاط الجذور الحرة على مستوى الأغشية في مرحلتها الابتدائية ، و هذا على عكس Gpx الذي يقضي على الأكسدة الفوقية بعد إتلافها للأغشية، بالإضافة إلى هذا يتميز بنشاطه المضاد للجذور الليبيدية alcoxyl وجذور [24,21] Hydroperoxy. يتفاعل الفيتامين E مع الجذور الليبيدية و يمنع انتشارها حيث يعمل على استحلاب هذه الجذور و يتحول بدوره إلى جذر حر لكنه أقل نشاطا مقارنة بجذور البيروكسيل. كما يعمل الفيتامين C على الرفع من فعالية الفيتامين E و ذلك بإرجاع الجذر. ( $\alpha$ -TO•) $\alpha$ -tocopheryl [27,26].

#### IV-2-2-3: $\beta$ كاروتين (caroténe) :

عبارة عن صبغة صفراء أو حمراء طبيعية ، توجد في بعض الأطعمة النباتية، تتحول في جسم الإنسان إلى فيتامين ( أ ) ، ويعتمد الإمتصاص على كمية الفيتامين التي يحتاجها الجسم والباقي يخزن بصورة  $\beta$  كاروتان في الكبد وأنسجة الجسم الدهنية المختلفة. كاروتان من المواد المانعة للأكسدة وتستخدم للتخلص من الزيادة التي قد تسبب ضرر من  $\beta$  - الجذور الحرة في الجسم، ومن أهم المصادر النباتية لها الجزر والطماطم [28]. و تعتبر المصدر الرئيسي في تكوين الفيتامين A [29].

الشكل 4-IV :  $\beta$ - carotène [30].

#### 4-2-2-IV- أنزيم الجلوتاثيون (Glutathion)

الجلوتاثيون (GSH) عبارة عن ببتيدي مكون من ثلاثة أحماض أمينية هي glycine، cysteine و glutamic يوجد الجلوتاثيون في الأنسجة الحيوانية و يلعب دورا مهما كمضاد للأكسدة داخل الجسم حيث يحمي الخلية من التلف التأكسدي ، عبر اختزال البيروكسيداز وجذر  $\alpha$ -TO [31].

يستطيع (GSH) التفاعل مباشرة مع الجذور الحرة مثل  $O_2^{\cdot-}$  ،  $OH^{\cdot-}$  ،  $LO\cdot$  و  $LOO\cdot$  ، حيث تفقد مجموعة الكبريت ذرة هيدروجين مما يؤدي إلى إنتاج جذر  $(GS)thiyl$  ، بإمكانه الانضمام إلى جذر آخر لتكوين جزيئة  $(GS)^{\cdot-}$  [32].

#### 3-IV- الفعالية المضادة للبكتيريا

##### 1-3-IV- مقدمة

بعد أن شاع استعمال مجموعة كبيرة من النباتات الطبية في علاج الكثير من الأمراض منذ عصور قديمة ، نالت اهتماما كبيرا في ميدان البحث العلمي ، حيث تم اختبار تأثيرها و تحديد مكوناتها النشطة بيولوجيا. تختلف هذه المكونات اختلافا كبيرا من نوع نباتي لآخر، و تنتوع مجالات تأثيرها.

تعد الفلافونويدات كمواد قاتلة للبكتيريا إضافة إلى مركبات عديدة ذات نفس التأثير [3، 5].

و في بحثنا هذا قمنا بتقدير النشاط المضاد للبكتيريا التي تعتبر بأنها كائنات دقيقة (Micro-organisme) وحيدة الخلية تنتمي إلى بدائيات النواة (Procaryotes) . و تكون المادة الوراثية على شكل ADN يتوضع على شكل كروموزوم حلقي [33] و يتراوح حجمها بين (0.3-2) ميكرون [34]. لوحظت لأول مرة من قبل (Leenwenhook) سنة 1675 شديدة الانتشار و التنوع ، البعض منها ممرض (Pathogènes) و البعض الأخر متعايشا (Commensales) [35].

و منذ اكتشاف البنيسلين (المضاد الحيوي) من قبل Alexander Fleming سنة 1929 و بداية استعمال المضادات الحيوية للقضاء على البكتيريا (antibiothérapie) ظهرت قدرة البكتيريا على التحول، و بالتالي قدرتها على مقاومة المضادات الحيوية [5]. فأصبح الإنسان في أمس الحاجة للحصول على مركبات

جديدة باستمرار، لذا و منذ تلك الفترة كثرت الأبحاث في هذا المجال، و هو الهدف نفسه من وراء بحثنا هذا.

تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص نبتة طبية *Ormenis Praecox* على سلالات بكتيرية متنوعة موجبة الغرام  $gram^{(+)}$  و سالبة الغرام  $gram^{(-)}$  و هي مسؤولة عن عدد كبير من الأمراض (infection) التي تصيب الإنسان خلال فترة تواجده بالمستشفى *Les infections nosocomiales*.

*Echerichia coli ATCC 25922* , *Staphylococcus aureus ATCC 25922*

*Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.*, *Klebsiella* , *proteus mirabilis*

فقد تم عزلها من خلال أخذ عينات من المرضى بالمستشفى الجامعي قسنطينة.

#### 2-3-IV- الخصائص المرفولوجية و مميزات السلالات البكتيرية المدروسة

##### 1-2-3-IV نوع *Escherchia coli*

عزلت لأول مرة من قبل Escherich سنة 1885 م تعتبر من الأنواع البكتيرية الأكثر دراسة من طرف مؤسسي الميكروبيولوجيا [35].

تنتمي إلى عائلة *Entérobactériaceae*، تتميز بانها عصويات سالبة الغرام عادة ما تكون متحركة و منتجة للغازات عند تخميرها للسكر. و هو عائلي طبيعي في الجهاز الهضمي ، ممرضة للجهاز البولي عند تواجدها بأعداد كبيرة ، كذلك تعتبر واحدا من أهم أسباب الإسهال الحاد في العالم و هي تحدث عدد كبير من القتلى في الدول النامية وهذا راجع لإنتاجها سموم داخلية (enterotoscine) [36,35].

##### 2-2-3-IV نوع *Pseudomonas aerouginosa*

هي بكتيريا هوائية كروية الشكل لصبغة سالبة الغرام  $gram^{(-)}$  تنتمي إلى عائلة *Pseudomonadaceae*, ويعتبر النوع *P. aerouginosa* المشتق من الاسم اللاتيني *aeruginosa=ouvert de rpuille* الأكثر انتشارا [36,23] يسمى بالعصويات بيوسيانيك (Pyocyanique) يتراوح طولها من 1.5 إلى 3ميكرومتر و عرضها من 0.5 إلى 0.8 ميكرومتر كثيرة الحركة و هذا راجع لامتلاكها لسوط واحد قطبي [36,23] ، و هي مسؤولة عن التعفنات الخطيرة الملاحظة بعد العمليات الجراحية، تنمو بسهولة على كل الأوساط الهوائية في درجة حرارة 37°م أو 30°م ، تطرح رائحة عطرية مميزة راجعة إلى إنتاج المركب أرتوأمينوا أسيتو فينون Ortho amino acéto phénone [36] ، تتواجد في التربة و المياه و في السوائل المخاطية للأنف و المجاري التناسلية و البولية و كذلك في القيح ، و هي عامل ممرض لكل من الإنسان و الحيوان [37].

##### 3-2-3-IV نوع *Staphylococcus aureus*

اكتشفت *Staphylococcus aureus* لأول مرة في القيح من طرف العالم باستور سنة 1880. وهي عبارة عن بكتيريا موجبة لصبغة سالبة الغرام  $gram^{(-)}$  تنتمي إلى العائلة *Micrococcaceae* و إلى جنس

*Staphylococcus* المنقسم إلى شطرين *Staphylos* ، لا تنتج أبواغا و لا تحتوي على محفظة، تكون بشكل مكورات عنقودية ذهبية ، يتراوح قطرها ما بين (0.8-1.4) ميكرومتر ، غير متحركة تنمو عند مدى حراري قدر بين (10-42) م ° ، و لقد وجد أنها المسببة في التسمم الغذائي ، و الأمراض القاتلة [38-40] ، تموت عند تعرضها للمطهرات مثل الفينول و كلوريد الزئبق . تتواجد هذه البكتيريا على مستوى الجلد ، الأغشية المخاطية ، الأمعاء و المعدة ... الخ [40,41] .

#### IV-3-2-4- نوع *Klebsiella pneumonia*

تنتمي إلى عائلة البكتيريا المعوية و هي عبارة عن عصويات سالبة الغرام غير متحركة، تتميز بشكلها الدائري محدبة، قطرها من 3 إلى 4 mm ، غير مكونة للأبواغ على شكل عصيات قصيرة سلبية الغرام محاطة بكبسولة مكونة من عديد السكر لذلك تصنف ضمن اللاهوائيات الاختيارية المخمرة للاكتوز . سميت نسبة إلى العالم اودين كليبيس، تعيش عادة في الأمعاء بشكل طبيعي ، لذا فوجودها في البراز أمر معتاد، و لكن إذا انتشرت إلى أجزاء أخرى من الجسم فإنها تسبب عدوى خطيرة . أي أنها تسبب العديد من الأمراض مثل ذات الرئة و التهاب الجهاز البولي و إنتان الدم و غيرها [35,36,43].

#### IV-3-2-5- جنس *Entérobacter*

تنتمي جرثومة *Entérobacter* إلى فصيلة الامعائيات (entérobacteriaceae) وهي عصيات سالبة الغرام كثيرة الحركة و هذا راجع لامتلاكها لأسواط جسمية و عدم احتوائها علي كبسولة باستثناء بعض الأنواع مثل: *E.aerugenes* ، كذلك إنتاجها لصبغات صفراء مثل النوع: *E.cloacae* . تتواجد طبيعياً علي الجلد و في السوائل المخاطية لكن تتواجد بكمية قليلة بالخصوص في الجهاز الهضمي ، الجهاز التنفسي و الشرج ، و هي تعتبر جد خطيرة و هذا راجع لإفرازها لإنزيمات خارجية [35,36] .

#### IV-3-2-6- جنس *Salmonilla*

هي إحدى الكائنات الحية الدقيقة وحيدة الخلية مجهرية الحجم ، و هي بكتيريا اختيارية لاهوائية سالبة الغرام لا تشكل أبواغا و تنتج كبريت الهيدروجين. طولها من 1 إلى 7 ميكرون. و ثخنها من 0.3 إلى 0.7 ميكرون حيث يعود الفضل في اكتشافها قبل حوالي مئة عام إلى العالم الأمريكي دانييل سلمون علما أنه يوجد حوالي منها 2500 نوع، ومن أشهرها *Selmonilla Enteritidis* و *Selmonilla typhimurium* و هي المسببة للإصابة بمرض التيفوئيد ، و تؤدي الإصابة ببكتيريا *Selmonilla* إلى الإصابة بالعديد من المشكلات الصحية التيفوئيد و التسممات الغذائية. توجد في أمعاء الحيوانات و الإنسان. تنتقل من براز الإنسان أو الحيوان المصاب من الإنسان أو غيره من الحيوانات السليمة.

#### IV-3-2-1-7- نوع *Shigella dysenteriae* :

هي عبارة عن عصيات سالبة الغرام ، لا هوائية اختيارية ، غير متحركة ، غير متحركة غير مخمرة للاكتوز ، عصوية الشكل على شكل قضيب و ترتبط ارتباطا وثيقا بالبكتيريا الاشريكية القولونية .

تمت تسمية الجنس على اسم Kiyoshi shiga، الذي اكتشفه لأول مرة في عام 1897. تسبب مرض يدعى shigellosis و هو مرض معدي ينتقل إلى الشخص السليم نتيجة لتناوله أغذية ملوثة (الإسهال مصحوب بالدم في معظم الأحيان). و مرض shigellosis أساسا هو بكتيري حاج يصيب الأمعاء الغليظة و الجزء الأخير من الأمعاء الدقيقة ، تسببه عصيات الـ *Shigella* و التي تضخم الغشاء المخاطي مسببة التهابه و الذي قد يمتد إلى جدران الأمعاء.

#### 4-IV- التركيز الأدنى المثبط للنمو البكتيري (CMI) :

**CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)**

#### تعريف CMI [44] :

تعرف CMI بأنها أصغر تركيز ممكن من المضاد الحيوي الذي يؤدي إلى تثبيط النمو أو التضاعف البكتيري خلال 18 إلى 24 ساعة من الحضان على درجة حرارة 37م° و يمكن تحقيقها :  
\* طريقة التخفيف (méthode par dilution): و نستطيع تحقيقها سواء على وسط صلب أو سائل.  
\* طريقة الانتشار (méthode par diffusion):

أما حاليا فتستعمل طريقة ثالثة في المستشفيات تسمى E-test بها يكون المضاد الحيوي موجود بتراكيز متناقصة على أشرطة ورقية خاصة.

#### 5-IV-دراسة التأثير المضاد للبكتيريا:

دراسة التأثير المضاد للبكتيريا لمستخلصات نبتة طبية ذات أهمية علاجية *Ormenis praecox* تم بمخبر علم البكتيريا بمستشفى الجامعي قسنطينة U. C.H الهدف من هذه الدراسة هو معرفة هل لهذه المستخلصات النباتية تأثير مضاد للبكتيريا أم لا. تم إجراء هذا الاختبار على سلالات بكتيرية مختلفة (موجبة الغرام ,سالبة الغرام). السلالات المرجعية :

, *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Escherichia coli* SH, *Entero bacter aerogenes* SH  
*Staph* ATCC, *Staph* SH, *Klebsiella* ,*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
و *Shigella sonnei* SH, *Salmonella heidelberg* SH ,

#### 6-IV-تحضير السلالات البكتيرية:

لقد تم الاحتفاظ بنفس هذه السلالات المذكورة طيلة هذا البحث و من أجل ذلك فقد كنا نجدد عملية الزرع بداية كل أسبوع إذ يتم زرع كل نوع بكتيري على الوسط الملائم له, فنزرع *S.aureus* على وسط خاص (Chapman) أما Streptocoque فنزرع على الوسط chocolat (Mueller- Hinton % 5+ دم خروف) أما باقي الأنواع الأخرى فنزرع فوق الوسط (Héktoen).

#### IV-7-تحضير الأقراص:

توضع الأقراص المصنوعة بواسطة ورق واتمان رقم (3) و التي تكون بقطر 6 mm في أنبوب اختبار زجاجي يحوي 10 mm من الماء المقطر في جهاز (Autoclave) لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 120 م° بعدها يتم التخلص من الماء ثم توضع الأقراص في الحاضنة حتى تجف [34].

دراسة النشاط أو التأثير المضاد للبكتيريا تم على مرحلتين:

**Antibiogramme عن طريق الانتشار على وسط صلب (طريقة الأقراص):**

#### Antibiogramme par diffusion sur milieu gélose (méthodes des disques)

من أجل تحديد مدى حساسية السلالات البكتيرية للعوامل المضادة للبكتيريا و تقدير جرعة المضاد الحيوي القادرة على إحداث هذا التأثير نلجأ إلى طريقة Antibiogramme عن طريق الانتشار على وسط صلب, حيث تحضر الأقراص بورق واتمان التي تشيع بالتركيز المحدد من المضادات الحيوية (أو المواد المراد معرفة تأثير المضاد للبكتيريا عليها كمستخلصات النبات في حالة بحثنا هذا) و توضع في أحواض بترية على الوسط الصلب تكون مشبعة مسبقا بلقاح بكتيري بطريقة المسح, و تعتبر هذه الطريقة شائعة في مخابر الميكروبيولوجيا و هذا راجع لسهولة تحقيقها كما أنها أيضا تعتبر طريقة غير مكلفة بالمقارنة مع الطرق الأخرى و بالمقابل تعطي نتائج جيدة حيث تمكننا من معرفة مدى حساسية البكتيريا للمضاد الحيوي [46-51] [11, 12, 23, 26, 44].

في بحثنا هذا استعملنا طريقة NCCLS (National Committee for clinical laboratory standards) . و يختلف تطبيق هذه التقنية حسب نوع البكتيريا إذا كانت متطلبة لشروط خاصة أو غير متطلبة لهذه الشروط . و أهم الخطوات المتبعة لتحقيق الانتبيوغرام حسب تقنية (NCCLS) مع البكتيريا التي لا تتطلب لشروط خاصة هي :

#### الوسط [47,48]

الوسط الملائم لتحقيق Antibiogramme هو وسط Mueller-Hinton (MH) حيث يعتبر الوسط المثالي على حسب قوانين (O.M.S) (Organisation mondiale de la santé) يسكب الجيلوز M.H في علب بيتري بحيث يكون ارتفاعه 4 مم ثم يترك ليُجف في درجة حرارة 37 م° لمدة 30 دقيقة قبل الاستعمال.

#### اللحاق البكتيري Inoculum :

لتلقيح اللقاح البكتيري يجب أن تكون السلالة البكتيرية نقية من 2 إلى 3<sup>6</sup> بكتيريا/ملل ، و هذا من أجل الحصول على مستعمرات متفرقة سهلة العزل، و هذا بعد الحضانة مدة 18 إلى 24 ساعة في وسط غير مغذي يتم اللقاح انطلاقا من مزرعة بكتيرية عمرها 18 سا في وسط العزل , تكشف خمس مستعمرات متفرقة و متشابهة تماما بواسطة ابرة التلقيح (lance de platine) أو ماصة باستور دائرية.

تفرغ ماصة باستور في أنبوب يحوي 10 mL من الماء الفيزيولوجي المعقم 0.9 % يرج الأنبوب جيدا حتى الحصول على معلق بكتيري متجانس ذا كثافة ضوئية ما بين 0.08 إلى 0.1 عند طول الموجة 625 nm .

#### الزراع L'ensemencement :

-بعد مرور 15 دقيقة على تحضير اللقاح البكتيري تغمر ممسحة (écouvillon) في الأنبوب الحاوي على المعلق البكتيري.

- يمسح كامل سطح علبه بيتري المحضرة سابقا في اتجاه واحد من الأعلى للأسفل تكرر العملية مرتين بحيث تدار العلبه بزواوية في 60° كل مرة.

-في حالة زرع عدة أطباق ، يجب أن تبلل المسحة في كل مرة.

- بواسطة ملقط معقم (pince stérile) توضع الأقراص المشبعة بالمستخلصات الطبيعية على السطح الصلب أو بواسطة موزع الأقراص (Distributeur) بالنسبة للمضادات الاصطناعية.

#### قبل التحضين après-incubation :

تترك الأطباق مدة 15 دقيقة في حرارة الغرفة لتجف و كذلك من أجل انتشار جيد للمادة الفعالة (مضادات حيوية أو مستخلصات طبيعية) انطلاقا من القرص.

تحضن الأطباق مدة 18 ساعة في درجة حرارة 37°م ، باستثناء جنسي *Bacillus, steptocopque* اللذان يتطلبان حاضنة تحوي CO<sub>2</sub>.

#### القراءة la lecture :

بعد مرور 18 ساعة يقاس قطر منطقة التثبيط (la zone d'inhibition) ب mm بالتدقيق بواسطة المسطرة.

#### التعليق interprétation :

يتم مقارنة النتائج بالقيم المرجعية (valeur critique) أي بعد قياس قطر منطقة التثبيط يتم مقارنتها مع Diagrammes المرجعية و هذا من أجل تصنيف البكتيريا ضمن الأصناف :حساسة ، متوسطة الحساسية و أخيرا مقاومة.

\* عندما يكون قطر منطقة التثبيط بالنسبة للسلالة المختبرة يساوي القطر المرجعي يقال عن السلالة أنها متوسطة (intermédiaire).

\* عندما يكون قطر منطقة التثبيط بالنسبة للسلالة المختبرة صغيرة جدا مقارنة بالقطر المرجعي يقال عن السلالة أنها مقاومة (résistante).

\* عندما يكون قطر منطقة التثبيط بالنسبة للسلالة المختبرة أكبر من القطر المرجعي يقال عن السلالة أنها حساسة (Sensible).

**8-IV- الفعالية المضادة للتكاثر: Activité Antiproliférative**

تعتبر الخلايا المناعية المسؤولة عن القضاء عن الأجسام الغريبة المضرة بالجسم بما في ذلك البكتريا و الميكروبات الأخرى، و من أهم هذه الخلايا البالعة المسؤولة بالدرجة الأولى على ابتلاع الأجسام الغريبة بهدف التخلص منها التي يعتبر أهمها الكائنات الدقيقة مثل *Escherichia coli*. لكن هذه الخلايا البالعة أيضا مسؤولة عن إحداث ظاهرة الالتهاب أثناء العدوى الميكروبية عن طريق إنتاج جزيئات مسؤولة عن هذا الالتهاب مثل NO، cyclooxygenase-2 (COX-2). و رغم كون الالتهاب ظاهرة ايجابية تدل على سلامة الجهاز المناعي و ردة فعله الطبيعية على العدوى الخارجية لحماية الجسم، فإنه تأثير غير مرغوب فيه و يسبب بدوره بعض المشاكل. لذلك اتجهت العديد من الدراسات الحديثة للبحث عن حلول للتقليل من الالتهاب و حدته مع الإبقاء على حياة و نشاط الخلايا المناعية خاصة البالعة منها. و من أهم الدراسات التي تحظى باهتمام واسع هي تلك التي تبحث عن بدائل و جزيئات طبيعية مستخرجة من نباتات طبية بهدف استعمالها لاحقا كأدوية. هناك أكثر من مائة نوع من السرطان ، أو الورم الخبيث ، الذي يمكن أن يستقر في أنسجة وأعضاء مختلفة ، ويهدد حياة الإنسان ، من ناحية أخرى ، كانت المنتجات الطبيعية دائما مصدرا لا ينضب للكيانات العلاجية التي أساسها تم تطبيق غالبية العلاجات. في هذا السياق ، كنا مهتمين بتقييم النشاط المضاد للتكاثر للمركبات النقية المعزولة من *Ormenis Mixta*.

**1-8-IV MTT وأملاح التترازوليوم ذات الصلة**

يُرجع MTT وهو تترازول (terazole) أصفر اللون إلى فورمازان بنفسجي اللون في الخلايا الحية. يُضاف محلول إذابة (إما dimethyl sulfoxide وهو محلول إيثانول حمضي، أو محلول sodium dodecyl sulfate المطهر ممدداً في حمض هيدروكلوريدي) ليحلّ الفورمازان البنفسجي غير المنحل في الماء ويحوّله إلى محلول ملون. يمكن تحديد امتصاصية هذا المحلول الملون بالقياس في طول موجة معين (عادة بين 500 و600 نانومتر) باستخدام مقياس الضوء الطيفي. تعتمد درجة امتصاص الضوء على تركيز الفورمازان المتراكم داخل الخلية وعلى سطح الخلية. كلما زاد تركيز الفورمازان، زاد اللون البنفسجي وقلت الامتصاصية.

اقترح (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) XTT ليحل محل MTT لأنه يتحلّى بحساسية أعلى ومدى حيوي أكبر. صباغ الفورمازان الناتج ينحل بالماء ما يغني عن خطوة الحل الأخيرة .

تشكل أملاح التترازوليوم المنحلة بالماء بدائل أحدث للـ MTT طُورت بإضافة شحنات سلبية أو إيجابية ومجموعات هيدروكسي إلى حلقة الفينيل من ملح التترازوليوم، أو الأفضل بإضافة مجموعات سلفونات إلى حلقة الفينيل بشكل مباشر أو غير مباشر .

MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

بوجود phenazine methosulfate(PMS) ينتج فورمازان يتمتع بأقصى قدرة امتصاصية عند طول موجة 490 nm في محلول أملاح مخفف بالفوسفات.

يُوصف اختبار MTS عادة بأنه اختبار MTT من خطوة واحدة ما يتيح إضافة الكاشف مباشرة إلى المزرعة الخلوية بدون الخطوات الوسيطة في اختبار MTT. لكن هذه الإمكانية تجعل اختبار MTS معرضاً لتداخل لوني لأن الخطوات الوسيطة في اختبار MTT تزيل بقايا المركبات الملونة في حين تبقى هذه البقايا في طبق المعايرة في اختبار MTS وحيد الخطوة. هناك حاجة لاحتياطات من أجل ضمان الدقة عند استخدام هذا الاختبار وهناك آراء قوية تدعم التأكد من نتائج MTS عبر الرصد النوعي تحت المجهر.

WSTs أو أملاح التترازوليوم المنحلة بالماء هي سلسلة من الأصبغة الأخرى المنحلة بالماء لاختبارات MTT : طُورت لتعطي طيف امتصاص مختلف لأنواع الفورمازان المتشكلة .

WST-1 وبالتحديد

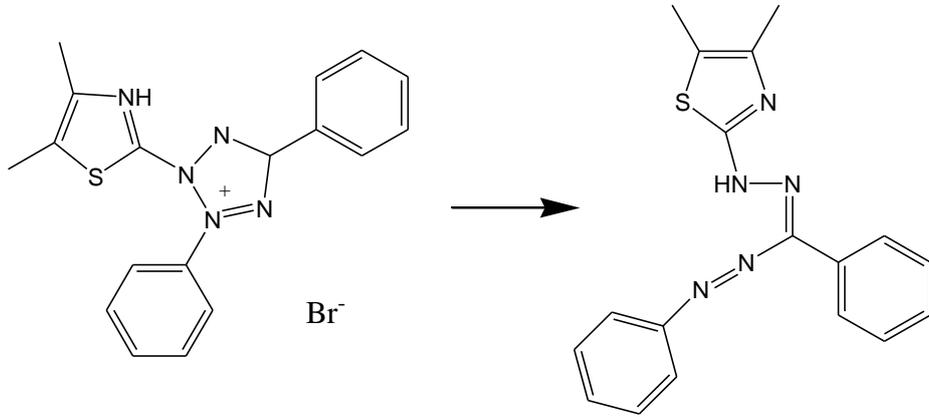
WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)

ملائمة أكثر من MTT لكونها تُرجع خارج الخلايا بالارتباط مع وسيط الإلكترون PMS وتطلق فورمازان ينحل بالماء. أخيراً، يمكن لاختبارات (1) WST أن تُقرأ مباشرة (بخلاف MTT الذي يحتاج إلى خطوة الحل)، (2) تعطي إشارة أكثر فعالية من MTT ، (3) تقلل من تسمم الخلايا (بخلاف اختبار MTT النافذ للخلية والفورمازان غير المنحل الناتج عنه الذي يتراكم داخل الخلايا .

IV-2-8-أهمية اختبار MTT

يُفترض بشكل عام أن إرجاع صباغ التترازوليوم يعتمد على أنزيمات الأوكسيدوريدكتاز المعتمدة على NAD(P)H في حجرة العصارة الخلوية في الخلية. لهذا يعتمد إرجاع MTT وأصبغة تترازوليوم أخرى على النشاط الخلوي الاستقلابي الراجع إلى تدفق NAD(P)H. تُرجع الخلايا ذات الاستقلاب القليل مثل

الخلايا التيموسية والخلايا الطحالية القليل من MTT . بالمقابل ، تظهر الخلايا سريعة الانقسام نسباً عاليةً من إرجاع MTT . لا بد من الأخذ بعين الاعتبار أن ظروف الاختبار قد تغير النشاط الاستقلابي وتغير بالتالي إرجاع أصبغة التترازوليوم بدون التأثير على حيوية الخلية. علاوة على ذلك، آلية إرجاع أصبغة التترازوليوم -داخل الخلية (MTS, MTT) أو خارج الخلية - (WST-1) ستحدد أيضاً كمية الناتج. بالإضافة لذلك، ظهر دليل على إرجاع MTT العفوي في بنى الخلية وحجراته الدهنية بدون تحفيز أنزيمي. ومع ذلك، تحت هذا النموذج البديل، ما زال اختبار MTT يقيم قدرة الإرجاع الخلية (بمعنى آخر: توفر المركبات المرجعة لتحريك عمليات الخلية. ولهذا تبقى ترجمة حيوية الخلية النهائية غير متغير.



الشكل 5-IV: صيغة MTT [30].

## المراجع باللغة العربية

- [33] لعابد، إ. (2009). دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum*. مذكرة الماجستير في الكيمياء العضوية التطبيقية , جامعة قاصدي مرباح ورقلة. الجزائر. ص 106.
- [34] الحلو، س.أ. (1999). القاموس الجديد للنباتات الطبية , دار المنارة . ص 103.
- [38] إسماعيلي، أ. (2015). دراسة الزيوت الأساسية ، المركبات الفينولية و فعاليتها البيولوجية في بعض الأنواع التابعة للفصيلة الخيمية Umbellifereae. رسالة دكتوراه في العلوم. جامعة أم البواقي. ص 55.
- [39] هيكل، م .، عبد الرزاق ، ع. (1993). النباتات الطبية و العطرية كيمياؤها ، إنتاجها ، فوائدها . الطبعة الثانية ص 96-97.
- [40] علاوي ، م. أ. (2003). مساهمة في دراسة مركبات العضوية الفعالة في نبات الرمث *Haloxylon Scoparium*. مذكرة ماجستير جامعة ورقلة.

## المراجع باللغة الأجنبية

- [1] Miquel, J.(2002). Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 959, 508-516.
- [2] BuakCimen, M.Y. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. 390, 1.
- [3] Medow ,M. S., Bamji N., Clarke D., Ocon A. J. and Stewart J. M.(2011). Reactive oxygen species(ROS) from NADPH and xanthine oxidase modulate the cutaneous local heating response in healthy humans. *Journal of Applied Physiology*.301,763-768.
- [4] Desai P. B., Manjunath S., Kadi S., Chetana K.and Vanishree J. (2010). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*.4, 959-967.
- [5] Kanoun K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Magister. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.118 .
- [6] Fukai T., Ushio-Fukai M.(2011). Superoxide Dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 15, 1583-1606.
- [7] Jefferies H., Coster J., Khalil A., Bot J., Rosalie D. John C.(2003). Glutathione. *ANZ Journal of Surgery*.73(7), 517-522.
- [8] Shalayel, M. H. F., Elhoussein, A. B., Fadlelseed, O.E., Naeem, A & Elsheikh, O. M. (2014). Glutathione peroxidase (GPx) activity in platelets of patients with malaria parasitaemia caused by *Plasmodium falciparum*. *Sky. Journal of Biochemistry Research*. 3(4), 037- 041.
- [9] Ziad, M., Judeh, Z. M., & Ahmed, S. A.(2019). Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. In *Free Radical Medicine and Biology*. IntechOpen.
- [10] Malan K. Dusart G. Marion. C.(1986). *Plantes Médicinales et phytothérapie*.20. 323. 329.
- [11] Bary, AL. (1986). Procedure for testing antimicrobial agents in agar media theoretical considerations-pp1-26 in :lorian antibiotics in laboratory medicine Williams, Wilking , Baltimore 2<sup>nd</sup> édition .
- [12] Bauer, A.W., Kirby.W., Sherris, F., Turk, M. (1986). Antibiotic susceptibility testing by standardized .single dix method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493-496 .
- [13] Calabrese, V., Cornelius, C., Mailolino, L., Luca, M., Chiaramonte, R., Toscano, M. A. Serra, A. (2010). Oxidative stress, redox homeostasis and cellular stress response in Meniere's disease: role of vitagenes. *Neurochemical Research*. 35, 2208-2217.

- [14]Traber M. G. (2007). Heart disease and single-vitamin supplementation. *Am J Clin Nutr.* 85 S 11: S293- S299.
- [15]Rougereau, A. (1997). Vitamine C. Thérapeutique, 25-202-F-10.
- [16]Carr, A.C., Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in human. *The American of Clinical Nutrition.* 69(6), 1086-1107.
- [17]May, J.M. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for plasma membrane. *The FASEB Journal.* 13, 995-1006.
- [18]Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence *Lancet.* 344 (8924),721–724.
- [19]Pilardeau, P. (1995). Biochimie et nutrition des activités physique et sportives. Masson.p 28-370.
- [20]Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces Réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique,* 91-96.
- [21]Bermond, P. (1997). Vitamin E. Therapeutic, 8 (4).25-202-10.
- [22]Hennbelle, T.(2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota pseudodictamnus*(Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Univ Lille- Lille 1. p304.
- [23] Avril, J.L., Dabermat, H., Denis, F., Monteil, H. (1992). Bactériologie clinique. Edition Marketing (1ère édition) Paris.
- [24]Magnin P. (1992). Les vitamines. Presse Universitaires de France. p73-104
- [25]Packer, P. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 53, 1050S-5S.
- [26]Comité OMS d'experts de la standardisation biologique, 28<sup>ème</sup> rapport ,série de rapports .technique n°610,OMS Genève,(1977).p106-138.
- [27]Ryan, M.J., Dudash, H.J., Docherty, M., Geronilla, K.B., Baker, B.A., Haffg, G., Cutlip, R.G., Alway, S.E. (2010).Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental Gerontology.* 45, 882-895.
- [28] Deshpande, S.S., Deshpande, U.S., Salunkhe, D.K. (1996). Nutritiona land health aspects of food. In Madhavi .FoodsAntioxidants. Marcel Dekker. INC. P 361-469.

- [29]Burri, B. J. (1997). Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutrition Research*.17(3), 547-580.
- [30] Moraes, M. N., Zobot, G. L., Prado. J. M & Meireles. M. A. A. (2013). Obtaining Antioxidants from Botanic Matrices Applying Novel Extraction Techniques. *Food and Public Health*. 3(4),195-214.
- [31]Jan, A. T., Ali, A., Haq, Q.(2011). Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. *Postgraduate Medical Journal*. 57, 72-77.
- [32]Biljak, V. R., Rumora, L., Cepelak, I., Pancirov, D., Popovic-Grle, S., Soric, J., Grubisic, T. Z.(2010).Glutathione cycle in stable chronic obstructive pulmonary disease. *CellBiochemistry and Function*. 28, 448-453.
- [35] Ferron, A. (1976). *Bactériologie (à l'usage des étudiants en médecine)* Edition Gouan et Roque (8emeedition).
- [36] Berche, P., Gaillard, J.L., Simont, M. (1989). *Bactériologie: les bactéries des infections humaines*, Flammarion (1ereedition), Paris.
- [37]Singleton, P.(2004).*Bactériologie pour la médecine la biologie et le biotechnologie* .Ed dunod .Paris .P542.
- [41]Faucher, J.L.,Avril,J.L.(2002).*Bacteriologie généraleet médicale* ,edition ellipses,paris.P 165.
- [42] Orhue, P.O,Momoh A.R.M.(2012).The antibiogram types of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers from irrua Specialist teaching hospital,Edo state ,Negeria E3 .*Journalof biotechnologie and pharmaceutical Research*.3(6),1-8.
- [43] Leclerc, H. (1975). *Microbiologie générale* . Edition Dund.
- [44] Le Minor, L., Véron, V. (1989). *Bactériologie médicale*. Edition Flammarion. Paris.
- [45]Carbonelle,B., Denis,E., Marmonier, A., Pinon,G.,Varguas,R.(1987) .*Bactériologie médicales :technique usuelles* .Edition STMP (2<sup>ème</sup> tirage ) .Paris .
- [46] Malan, K., Dusart, G., Marion, C.(1986).*Plantes Médicinales et phytothérapie*.20. 323.329.
- [47] ECCLS Standard for antimicrobial susceptibility testing diffutionmethods .ECCLS documents .5 :4 .
- [48] Erissson, H.M., Sherris,J.C. ( 1971).Antimicrobial susceptibility testing.Report of an intrnational.collaborativestudy.*Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. SectionB.217, 5-4.
- [49] Le Minor,L., Veron,M.(1885).*Bactériologie médicale-édition Flammarion* 2<sup>ème</sup> édition.Paris.

- 
- [50] El-Shazly,A., Dorait, G., Wink, M.(2002). Composition and Antimicrobial Activity of Essential oil and Hescame –ether Exact Of tamacetum S antolimoid (DC)-feinbr-and fertig Z .*Naturforsh.* 57C, 620-623.
- [51] Bankova,V., chritov,R., Popov,S., Marucci,M.C., Tsvetkova,I., kujungiev.(1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia.*7, 190-193.
- [52] Van Beek,T.A., Kuijlaars.F.L.C., Thomassen.p.H.A.M., Verpoorte R., Baerhein Svendsen, A.(1984).Antimicrobiallyactive alkaloids From Tabernaemontana pachysiphon .*photochemistry.* 29(1-0), 1771-1778.

**الجزء الثاني**

**الدراسة الفيتوكيميائية كيميائية**

**للنبات المدروسة**

الفصل الأول  
تحليل المستخلص الهيدروميثانولي  
للنبته *Ammoides atlantica*

بتقنية RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS

و تحديد نشاطه المضاد للأكسدة

## I-الدراسة الكيميائية للنبتة *Ammoides atlantica*

### I-1-المادة النباتية

تم جمع النبتة من ضواحي ولاية جيجل بالشرق الجزائري حيث تم اقتلاع الجزء الهوائي في شهر ماي 2016 أجريت لها عملية التجفيف بوضعها في أماكن خاصة تحت الظل بعيدا عن الرطوبة بعد ذلك طحنت فكانت الكتلة المستعملة منها 4g و لقد تم التعرف على النبتة من طرف الأستاذ (Gérard De Bélair) كلية العلوم جامعة باجي مختار عنابة).

### I-2- طريقة استخلاص النبتة

لقد تم سحق حوالي 4g من النبتة في مطحنة ميكانيكية , ثم استخلصت في محلول هيدروكحولي ميثانول- ماء بنسبة (20:80 ، v/v) في الظلام عند درجة حرارة الغرفة تحت الإثارة الميكانيكية لمدة 24 سا. المستخلص ركز في المركز حوالي 20 000 ppm عند درجة حرارة 4°C ، و بعدها تم تبخيره في جهاز دوار تحت درجة حرارة 37°C ، بعد ذلك حل في 4mL من ميثانول ماء بنسبة (2/8 ، v/v).

### I-3-شروط الكروماتوغرافيا و قياس الطيف الكتلي

تم إجراء تحليل HPLC باستخدام أداة سلسلة Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) طراز 1200 مع نظام LC عالي الدقة، مجهز بمزيل غازات التفريغ ، وجهاز أخذ عينات تلقائي ، ومضخة ثنائية DAD . كما تم استخدام عمود للفصل الكروماتوغرافي

في فصل المركبات لمستخلص الهيدروكحولي لنبتة *Ammoides atlantica* بمعدل التدفق المستخدم 80.0 Luna C18 column (1.8µm, 150mm×4.6 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) بعدها أجريت عملية شطف متدرجة باستخدام 0.1% حمض الفورميك (مذيب A) و acetonitrile (مذيب B) بمعدل تدفق ثابت قدره 0.8 mL/min. تم إجراء التحليل في درجة حرارة الغرفة [2,1].

(الأطوار المتحركة و المستخدمة هي خليط من الماء مع حمض الفورميك بنسبة % 0.1 (المملص A) ، و acetonitrile (المملص B). التدرج المطبق (0 min, 5% B; 45 min, 100% B; 55 min, 5% B). و أخيرا دورة تكثيف 5 دقائق مع نفس الشروط التحليل التالي. حجم الحقن في نظام HPLC هو 10 µL.

تمت متابعة المركبات المفصولة مع كاشف DAD ، و سجلت الأطياف بين 190 nm و 450 nm. بالإضافة إلى ذلك تمت إضافة HPLC مع microTQFTI (Brukerdultonik, Bréne, Allemagne) و هو مطيافية

الكتلة TOF المتعامد المتسارع باستخدام واجهة ESI طراز G1607A من (Agilent Technologies ,PaloAlto,CH,USA) التي تعمل في وضعي التأين. تستخدم هذه الواجهة للحصول على رذاذ ثابت و نتائج قابلة للتكرار.

تم الكشف عن المركبات في نطاق كتلة من  $m/z$  50 إلى  $m/z$  1000. تمت معالجة بيانات الكتلة الدقيقة للأيونات الجزيئية باستخدام برنامج تحليلات بيانات Agilent Mass Hunter Workstation, و التي قدمت قائمة بالصيغ الابتدائية الممكنة باستخدام الصيغة الجزيئية Editor TM Générer. يستخدم خوارزمية CHNO تقدم وظائف قياسية مثل الحد الأدنى / الحد الأقصى من الفاصل الأولي ، التكوين الإلكتروني و الروابط المزدوجة المكافئة مع الرنين بالإضافة إلى المقارنة النظرية المعقدة مع النموذج النظائري المقاس «Sigma-القيمة» ، لمزيد من الدقة في الصيغة الجزيئية المقترحة ، تم تحديد عتبة الدقة المقبولة على نطاق واسع لتأكيد التركيبات الأولية عند خمسة أجزاء من المليون لمعظم المركبات. نظيف الكثير ، حتى و لو كانت دقة الكتلة عالية جدا أقل جزء من المليون يمكن الحصول على الصيغ الكيميائية ، اعتمادا على مناطق الكتلة التي تم النظر فيها أيضا. دقة الكتلة العالية أقل جزء في المليون , ليست في حد ذاتها كافية لاستبعاد الصيغ المرشحة الكافية مع التراكيب الأولية المعقدة. إن استخدام نماذج محتوى النظائر في اجهاد اضافي واحد يلغي أكثر من 95% من العناصر المرشحة الزائفة. يتيح هذا المرشح المتعامد يجعل من إمكانية تقليل عدة آلاف من الصيغ المرشحة الى عدد صغير من الصيغ الجزيئية [3] .

#### I-4- الطريقة المستخدمة HPLC-DAD-MS/MS

##### I-4-1- منحنى المعايرة

تم إجراء معايرة خارجية لمطيافية الكتلة باستخدام محقنة (74900-00-05) مضخة Cole Palmer (Vernon Hills, Illinois, USA) متصلة مباشرة بالواجهة ، و مجهزة بحقن Hamilton (Etats-Unis, Nevada, Reno) تحتوي على مجموعات من محلول ester de formiate de sodium 5 mM (hydroxyde de sodium مع الماء : 2-propanol) بنسبة (v / v) 1 : 1 مع 0,2 % acide formique تم حقن محلول المعايرة في بداية التشغيل و تمت معايرة جميع الأطياف قبل التعرف عليها للحصول على قيم كتلة دقيقة عن طريق تعويض التغير في درجة الحرارة في محلل الكتلة. من أجل التحديد الكمي ، كانت أربعة مخاليط من المركبات المرجعية. تم استخدامه لمعايرة مطيافية الكتلة عن طريق استخدام مركبات مرجعية أصلية مع الميثانول طور متحرك : ماء كمرحلة متنقلة بنسبة (20 : 80) الجدول I-1.

تطبيق ملف تعريف تدرج خطي مع النسب التالية (v / v) للمذيب و أخيرا دور تكثيف مدتها 5 دقائق مع نفس الظروف للتحليل التالي [4]. ثم إجراء تصحيح شامل للكتلة لكل عينة من خلال الترسيب المستمر لمزيج Agilent TOF الذي يحتوي على ملح

.hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine و trifluoroacetic acid ammonium salt  
المسح الشامل بين 70 m/z و 1100، كان وضع الاستحواذ يستخدم Auto MS2 وفي وضع التوصيف  
عبر محطة

Agilent Mass Hunter Work station B.05.01. Mass Hunter Qualitative Analysis B.06.00  
software (Agilent Technologies) لتحليل البيانات.

الجدول I-1: المعايير LC/MS/MS في وجود المركبات المرجعية

عمود Zorbax أكثر كسوف C <sub>18</sub>						خليط من المعايير
TR <sub>a</sub> (mn)	m/z monoisotopique	الصيغة	التركيز في الكارورة	الحجم المضاف (mL)	التركيز (ppm, mg/L)	خليط المعايير 1
9.2	167.0350	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	20	1	10000	1 Acide vanillique
4.193	169.0142	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	10	10	500	2 Acide gallique
8.378	289.0718	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	20	10	1000	3 (+)-catechine
9.072	289.0718	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	20	10	1000	4 (-)-epicatechine
12.497	575.1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	20	10	1000	5 Procyanidine A2
12.197	463.0882	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	2	10	100	6 Quercetine 3-O-glucoside
13.259	447.0933	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	20	10	1000	7-Kaempférol 3-O-glucoside
12.621	593.1512	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	20	10	1000	8-Kaempférol 3-O-rutinoside
19.515	285.0405	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	20	10	1000	9-Kaempférol
24.876	299.0561	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	12	10	600	10-Kaempféride
<b>خليط المعايير 2</b>						
8.285	353.0878	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	20	10	1000	1-Acide chlorogénique
9.504	179.0350	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	10	10	1000	2- Acide caféique
11.603	163.0401	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	20	10	1000	3-Acide p-coumarique
	121.0295	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	20	10	1000	4- Acide benzoïque
8.595	153.0193	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	20	10	1000	5- Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque
8.471	137.0244	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	20	10	1000	6-Acide p-hydroxybenzoïque
11.77	609.1461	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	10	10	1000	7- Quercetine- 3-O-rutinoside

13.449	447.0933	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	20	10	1000	8-Quercétine -3-O-rhamnoside
17.185	301.0354	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	20	10	1000	9-Quercétine
14.648	317.0303	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	20	10	1000	10-Myricétine
<b>خليط المعايير 3</b>						
9.718	197.0455	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	10	1000	1-Acide syringique
12.429	193.0506	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	20	10	1000	2-Acide ferulique
12.973	163.0401	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	20	10	1000	3-Acide <i>m</i> -coumarique
12.367	223.0612	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	20	10	1000	4-Acide sinapique
12.182	463.0882	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	20	10	500	5-Quercetine 3-O-galactoside
9.78	153.0193	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	20	10	1000	6-Acide 2,4 Dihydroxybenzoique
19.152	271.0612	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	20	10	1000	7-Naringenine
12.305	447.0933	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	6,66	10	333	8-Luteoline 7-O-glucoside
17.118	285.0405	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	10	10	500	9-Luteoline
19.214	269.0455	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	20	10	1000	10-Genisteine
<b>خليط المعايير 4</b>						
12,284	300.9990	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	غير معروف	10	غير معروف	1-Acide Ellagique
6.555	153.	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	20	10	1000	2-Acide 3,4 Dihydroxybenzoique
12.284	161.0244	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	20	10	1000	3-7-hydroxycoumarine
19.136	269.0455	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	10	10	500	4-Apigenine
6.493	203.0826	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16	10	800	5-Tryptophane
2.702	180.0666	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	10	10	500	6-Tyrosine
4.426	164.0717	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	10	10	500	7-Phenylalanine

الطريقة : تدرج المملص B من 5% حتى 100% خلال 45 min .

المملص A : 0.1% acide formique

المملص B : acetonitrile , Temps de rétention , T<sub>Ra</sub>

#### I-2-4-المواد الكيميائية و الكواشف

تم الحصول على الماء فائق النقاء بواسطة نظام (Milli-Q 0193 (Millipore, Bedford, MA, USA).

الميثانول ، حمض الفورميك من (Fisher Chemicals (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

، TCA ، ABTS ، حمض اللينوليك ، حمض الأسكوربيك ، BHT ، BHA ، DPPH ، Folin-Ciocalteu's ، EDTA و NTB. جميع المواد الكيميائية و المذيبات كانت من الدرجة التحليلية.

#### I-5- تحديد نشاط مضادات الأكسدة :

مع التطور العلمي في السنوات الأخيرة تم اكتشاف عدة تقنيات لتحديد و معرفة ما إذا كان المركب له فعالية مضادة للأكسدة أم لا و من أكثر الاختبارات استعمالا [4] :

- اختبار DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)
- اختبار CUPRAC (Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre)
- اختبار ABTS (acide 2,2-azio-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)

خلال هذا البحث قمنا بإجراء فعالية DPPH ، ABTS ، superoxide radical-scavenging assay ، CUPRAC, reducing power assay ، ونشاط أيونات الحديد ferrous ions chelating activity على قارئ صفيحة 96-Well ، لوحة (Watman, MA, USA) Pekin Elmer Multimode plate Reader en spire لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الهيدروكحولي للنبتة *Ammoides atlantica*. بالمركز الوطني للبحوث التكنولوجية الحيوية ، حيث تم إجراء كل فحص لجميع العينات ثلاث مرات ، مع استخدام BHT, BHA و حمض الأسكوربيك كشواهد مضادة للأكسدة.

#### I-6- التقدير الكمي للمركبات الفينولية و الفلافونويدية للمستخلص الهيدروكحولي

##### I-6-1- التقدير الكمي للمركبات الفينولية الكلية

تم استخدام طريقة Folin-Ciocalteu لتقدير عديدات الفينول لمستخلص AA-E و هذا حسب الطريقة التي وضعها Muller مع بعض التعديلات الطفيفة [5] .

تم خلط 20µL من المستخلص مع 100 µL بنسبة (5:1) من كاشف Folin-Ciocalteu المخفف و 75µL من محلول كربونات الصوديوم (75g /L) في 96-well microplate بعد ساعتين . تم قياس الامتصاصية عند 740 nm في قارئ الألواح الدقيقة المذكورة.

استخدمنا Gallic acid كفينول مرجعي و بناء على المنحنيات البيانية. تم حساب المحتوى الفينولي على أنه مكافئ ل Gallic acid (GAE) في 100g /mg .

##### I-6-2- التقدير الكمي للمركبات الفلافونويدية:

تم تقدير المركبات الفلافونويدية للمستخلص النباتي AA-E باتباع طريقة Tel و الآخرين [6] مع تعديلات طفيفة. تمت إضافة جزء من 1 mL من المحلول (يحتوي على 1mg) من خلاصات الميثانول إلى أنابيب الاختبار المحتوية على 0.1 mL من 10% نترات الألومنيوم ، و 0.1 mL من 1 مولار من أسيتات البوتاسيوم و 3.8 mL من الميثانول. بعد 40 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة ، تم تحديد الامتصاصية عند طول موجة 415 nm.

يستعمل مركب الكرسيتين Quercetin كشاهد لتحديد منحى العيارية ، يتم التعبير عن النتائج بعدد الملغرامات الموافقة للكرستين لكل غرام من وزن المستخلص (MgEQ /g Extrait).

### 3-6-I- مضادات الأكسدة

تم إجراء نشاط إزالة الجذور الحرة DPPH اختبار إزالة تلوين جذري ل ABTS ، اختبار إزالة الجذور بأكسيد الفوق أكسيد ، تخفيض مقياسية الطاقة ، قدرة مضادات الأكسدة المخفضة لل (Cupprac) و نشاط مخلب الايونات الحديدية على قارئ صفيحة 96- Well (MA.USA) بالمركز الوطني للتقنية الحيوية (C.R.B.T) تم إجراء كل اختبار لجميع العينة ثلاث مرات ، و استخدمت BHT ، BHA و حمض الأسكوربيك كشواهد مضادة للأكسدة.

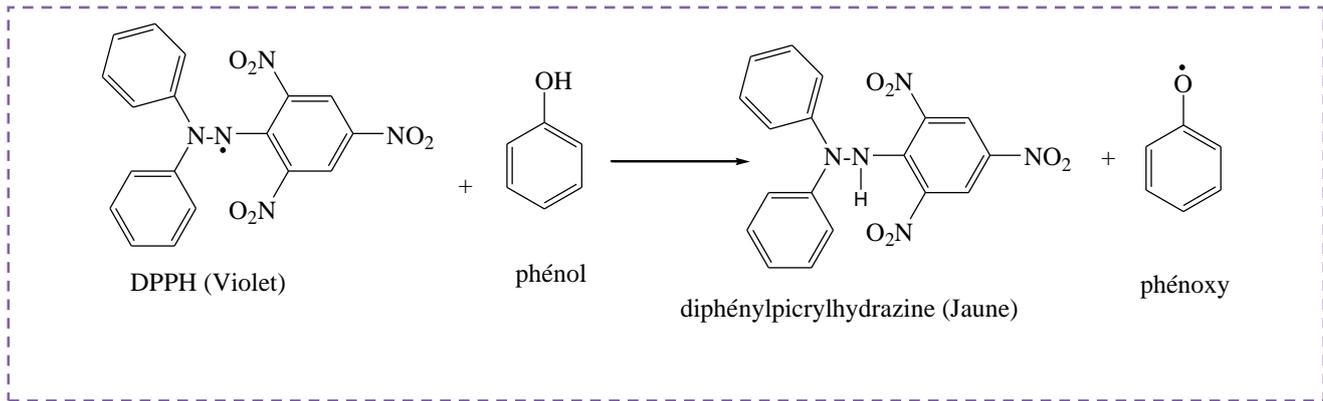
### 7-I- تقدير الفعالية المضادة للأكسدة

#### • اختبار DPPH

لغرض تقدير الفعل الكاسح للجزيئات المضادة للتأكسد للمستخلص النباتي AAE (الايثانولي) قمنا بإجراء اختبار DPPH (1-1 diphenylpicryl-hydrazyl) اعتمادا على الطريقة التي وضعها Yavuz و آخرون [7]، و التي تعتمد على التلوين و نزع التلوين عند طول موجة معينة.

#### • مبدأ اختبار الDPPH

الجذر DPPH هو 1, 1 ثنائي فنيل بيكريلهيدرازيل (1-1 diphenylpicryl-hydrazyl) يعرف كجذر حر مستقر نسبيا ، صلب ، ذو لون بنفسجي مسود ، يصبح أرجواني إلى بنفسجي عند التحضير ، في حالة التفاعل يتحول لونه إلى أصفر [8] و ذلك وفقا للمعادلة التالية :



الشكل 1-I: إرجاع الجذر DPPH بواسطة الفينول [9].

تم تحضير محلول DPPH من خلال إتباع الطريقة التي وضعها Ben Taârit و آخرون [10] .  
نقيس امتصاص الطيف الضوئي لتركيز العينة عند طول موجة 517 nm ، بعد الحضان لمدة 30 دقيقة و في درجة الحرارة العادية 37°م. نستخدم حمض الأسكوربيك كأساس مرجعي في اسر الجذور الحرة ،  
تحسب نسبة التثبيط وفق العلاقة التالية:

$$\text{DPPH scavenging effect(\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

تم حساب قدرة الكسح ل DPPH باستخدام المعادلة التالية أعطيت  $IC_{50}(\mu\text{g} / \text{mL})$  المقابلة لتركيز تثبيط 50%. حيث  $A_{\text{Control}}$  هو التركيز المتبقي ل DPPH في وجود المستخلص و التحكم الايجابي ، تم استخدام BHT ، BHA و حمض الأسكوربيك كمقياس مضادة للأكسدة.

#### • اختبار ABTS

تم تحديد التحليل الطيفي لنشاط تكثيف  $ABTS^+$  وفقا لطريقة Re و آخرون [11] ، تم تخفيف محلول  $ABTS^+$  للحصول على امتصاص  $0.700+0.020$  عند 734 nm بالماء . ثم م إضافة  $160 \mu\text{L}$  من محلول ABTS إلى  $40 \mu\text{L}$  من محلول العينة في الميثانول بتركيزات مختلفة بعد 10 دقائق ، تم قياس الامتصاصية عند 734 nm. تم استخدام الميثانول كعنصر تحكم ، تم استخدام BHT و BHA كمعيار مضادة للأكسدة لمقارنة النشاط.

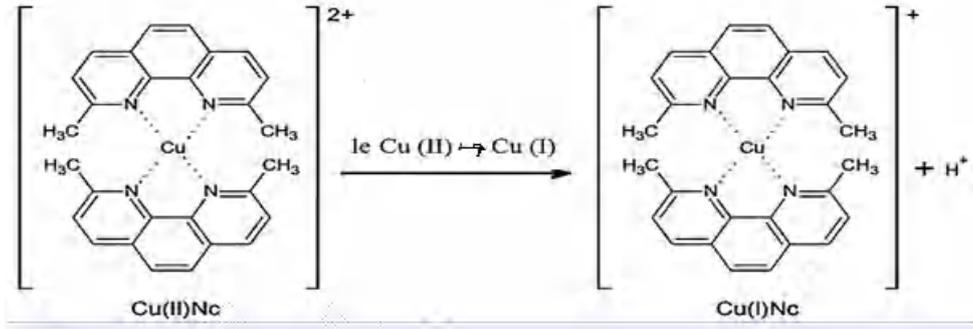
تم إعطاء النتائج  $IC_{50}(\mu\text{g} / \text{mL})$  ، و التي تم حسابها باستخدام المعادلة الآلية :

$$\text{ABTS}^{++} \text{ Scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

حيث  $A_{\text{control}}$  هو التركيز الأولي ل ABTS و  $A_{\text{sample}}$  هو امتصاص التركيز المتبقي من DPPH في وجود استخراج و السيرة الايجابية التي استخدمت و كمعايير مضادة للأكسدة.

#### • مبدأ اختبار CUPRAC

يعتبر هذا الاختبار من الاختبارات الأكثر دقة في تقييم الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات و يعتمد أساسا على إرجاع  $Cu(II)$  إلى  $Cu(I)$  من خلال إرجاع معقد  $cuivre-neocuproéne(Cu-NC)$  حسب التفاعل الموضح في الشكل (2-2) وذلك من خلال الجزيئات المضادة للأكسدة الموجودة في المستخلص ، هذا الإرجاع يصاحبه نقصان في الامتصاص بدلالة الزمن عند طول موجة 450 nm.



الشكل 2-I : إرجاع Cu(II) إلى Cu(I)

### • اختبار FRAP

*Ferrous ions chelating activity* و هو اختبار مضاد للأكسدة يدرس فاعلية مضادات الأكسدة الارجاعية في تفاعل الإرجاع اللوني , أي يدرس مدى قدرة المستخلص كمتبط لعملية الأكسدة يعتمد مبدأ الطريقة على تلوين أو عدم تلوين المعقد :

ثلاثي بيريديل ثلاثي أزين فريك (TPTZ) 2,4,6-Tripyridil-s-triazine ferrique في الوسط الحامضي [13,12].

تم تحديد نشاط المخلب وفقا لطريقة Decker مع تعديلات طفيفة [14], تم تحضير ثنائي كلوريد الحديد في الماء المقطر. تمت إذابة العينات في الميثانول و تم خلط جميع العينات (80µL) مع محلول ثنائي كلوريد الحديد (40µL) في اللوحة . بعدها تمت إضافة (80µL) من كاشف حديد (0.5 mM) ferene لبدء التفاعل و تم تحضير الخليط لمدة 10د . بعد اكتمال الحضانة ، تم قياس الامتصاصية عند 593nm. تم حساب تثبيط النسبة المئوية باستخدام المعادلة التالية :

$$\text{Metal chelating activity (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

أعطيت النتائج كقيمة  $IC_{50}$  (µg/mL) المقابلة للتركيز الذي يشير إلى تثبيط 50%: حيث  $A_{\text{Control}}$  هو التركيز الأولي الخالي من العينة و  $A_{\text{Sample}}$  هي امتصاص العينة في وجود المخلب . تم استخدام EDTA كمعايير مضادة للأكسدة .

### • اختبار Superoxide radical scavenging

تم إنشاء أكسيد الفائق وفقا لنظرية DMSO القلوية ، و تم تحديد تقليل NBT بواسطة Superoxide في وجود و غياب المستخلصات . إلى خليط التفاعل المحتوي على (NBT 1 mg/mL من محلول في الماء المقطر) وأضيف 40µL من العينة بتركيزات مختلفة إلى 130µL من DMSO قلوي يحتوي على 1.0 mL ( من 5mM NaOH, DMSO في 0.1 ml من الماء المقطر) لإعطاء حجم نهائي 200µL و قياس الامتصاصية عند 560 nm باستخدام قارئ الصفيحة الدقيقة. يشير الانخفاض في الامتصاص عند 560

nm مع مضادات الأكسدة إلى الاستهلاك الفائق للأكسيد المتولد. تم تكرار التجربة ثلاث مرات و تم حساب النسبة المئوية للكسح باستخدام الصيغة :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Control}}}{A_{\text{Sample}}} \times 100$$

#### • اختبار Reducing power assay

من أجل تحديد نشاط الطاقة المختزل [15] تمت إضافة 10 µl من العينة المخففة التسلسلية الى لوحة ذات قاع مستدير جيدا. بعد ذلك تمت إضافة 40µl من 0.2 µl فوسفات العازل (PH = 6.6) و 50 µL من (1%) potassiumferricyanide, الى كل نقطة وتم تحضيرها للوحة عند 50 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة. أخيرا تمت اضافة 50 µL من (10%) TCA و الماء المقطر 40µl و 10µl من كلوريد الحديدك (0.1%), في كل نقطة لقياس نشاط الطاقة المختزل. بعد أن تم قياس الامتصاصية في قارئ صفيحة ميكروسكوبية عند 700 nm يشير الامتصاص العالي لخليط التفاعل إلى قدرة تخفيض أكبر.

## المراجع

- [1] Nicolas, F., Isabelle R., Edmond de Hoffmann, Joe'ille QL. (2001). Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 12, 707–715.
- [2] Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. (2007). Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. 1161(1-2), 132-145.
- [3] Linares, I. B., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospraytime-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7682-7690.
- [4] Noui, A., Boudiar ,T., Bakhouché ,A. Contreras ,M.D.M., Lozano-S\_ánchez J, Segura-Carretero ,A., Laouer ,H., Akkal S. (2017). Chemical characterization of polyphenols from *Daucus muricatus* growing in Algeria by RP-UHPLCESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Research* :1–6. doi:10.1080/14786419.2017.1371162.
- [5] Müller, L.,Gnoyke, S., Popken, A.M.V., Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT. Food Science and Technology*. 43, 992–999.
- [6] Tel, G., Ozturk, M., Emin Duru, M., Dogan, B., Harmandar, M. (2013). Fatty acid composition antioxidant, anticholinesterase and tyrosinase inhibitory activities of four *Serratula* species from Anatolia. *Records of Natural Products*; 7 (2), 86–95.
- [7] Yavus, S.C., Murat, K., Meltem, A.O. (2014). Biochemical compositionand bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. *EXCLI Journal*. (13) 697-690.
- [8] Saadaoui, B., Bekir, J., Akrou, J., Ammar, S., Mahjoub, A., Mars, M.N . (2006). Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. *Actes du séminaire international « les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales* .87-92.

- [9] Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). Lebanese Science journal.7(1), 3-8.
- [10] Ben Taârit, M., Msaada, K., Hosni, K., Marzouk, B. (2012). Fatty acids, phenolic changes and antioxidant activity of clary sage (*Salvia sclarea*L.) rosette leaves grown under saline conditions. Industrial Crops and Products. 38, 58-63.
- [11] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999).Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26, 1231–1237.
- [12] Uchiyama, M., Suzuki . Y., fukuzawa, K. (1968).Etudebiochimiaues de K. " de la fonction physiologique du tcopherolactome.Japanese for "Pharmaceutical Science Journal. 88, 68 -683.
- [13] Benzine, I.F.F., Stain,J.J. (1996). the ferric reducing ability of plasma ( FRAP) as A mesure of antioxidant power , ehe FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239, 70 – 76.
- [14] Decker, EA., Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38 (3), 674–677.
- [15] Bouratoua, A., Khalfallah, A., Bensouici, C., Kabouche, Z., AlabdulMagid, A., Harakat, D., Voutquenne-Nazabadioko, L., Kabouche, A. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss.ex Bonnier and Maury. Natural Product Research.1478-642

## الفصل الثاني

الدراسة الفيتوكيميائية لنبته

*Ormenis mixta*

ودراسة الفعالية المضادة للتكاثر

II- الدراسة الكيميائية للنبتة *Ormenis mixta*

## II-1- الدراسة النباتية

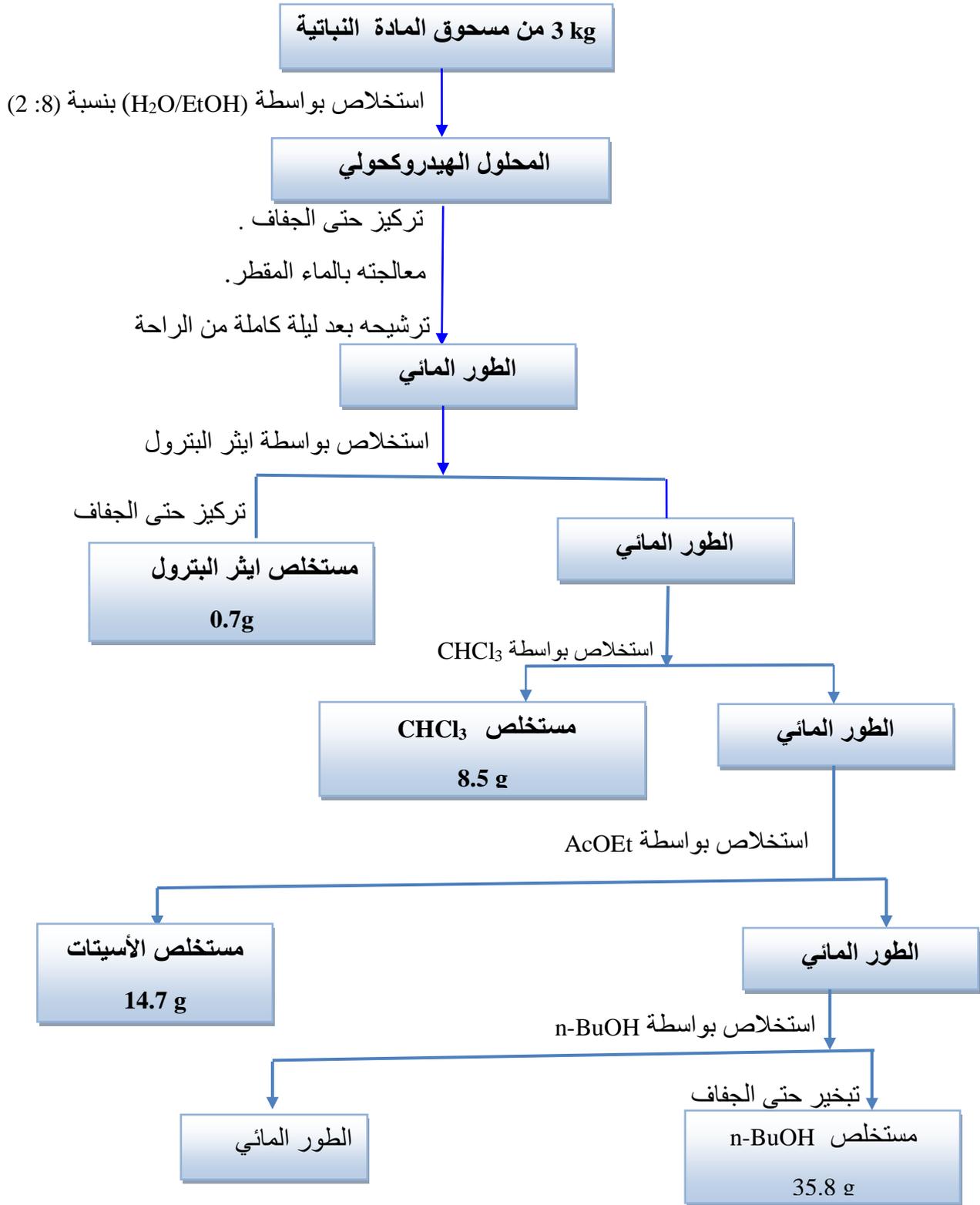
قطفت النبتة من منطقة جبل الوحش (قسنطينة) في أواخر شهر جويلية 2014، بعد التجفيف في مكان مناسب بعيدا عن حرارة الشمس ، قمنا بقص الجزء الهوائي إلى أجزاء صغيرة فكانت الكتلة المتحصل عليها حوالي 3000 g .

## II-2 – طريقة الاستخلاص :

تم نقع النبتة في محلول هيدروكولي من الايثانول و الماء بنسبة % 80 من الايثانول لمدة 24 سا . المحلول الهيدروكولي رشح و ركز تحت ضغط منخفض ,كررت هذه العملية 3 مرات و في الأخير جمعت الرشاحة التي ركزت إلى غاية الجفاف فكان وزن المستخلص الخام 510 g، عولج هذا الأخير ب1L من الماء المقطر و ترك ليلة كاملة للراحة بعدها رشح ، لنحصل على الطبقة المائية ، هذه الأخيرة أجريت لها عملية استخلاص من نوع سائل – سائل بواسطة مذيبات متفاوتة القطبية بدءا من ايثرالبترو، الكلوروفورم (500 x3mL) ثم يليه خلاص الاثيل (500 x3mL) وأخيرا البوتانول النظامي (500 x3mL) . بعدها جمعت هذه المستخلصات كلا على حدى و ركزت حتى الجفاف فكانت الأوزان على التوالي :

الجدول رقم II-1:كمية مستخلصات الجزء الهوائي لنبتة *O mixta*.

الكتلة (g)	الطور	المستخلص الخام (g)
0.7	ايثر البترول	510
8.5	الكلوروفورم	
14.7	خلاص الاثيل	
35.8	البوتانول	

الشكل II-1: مخطط استخلاص النبتة *Ormenis mixta*

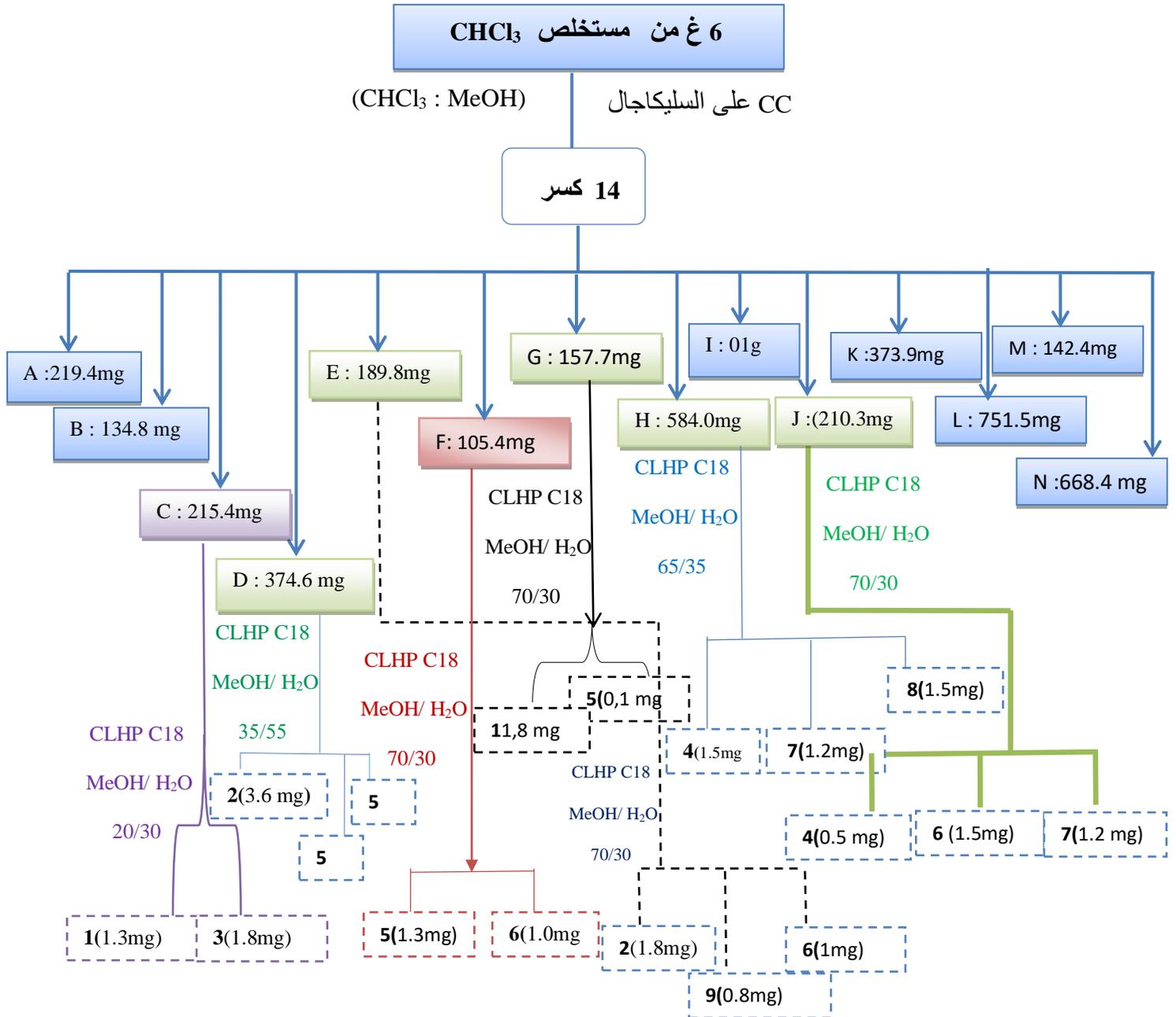
## II-3- طريقة الفصل و التنقية :

تم فصل 6g من مكونات المستخلص الكلوروفورمي ، باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود و ذلك باستعمال السليكاجال كدعامة ثابتة ، الكلوروفوم كملص مع إشباعه تدريجيا بالميثانول. نتيجة لهجرة الحزم المفصولة نغير قطبية المملص في كل مرة ، تستقبل الكسور أسفل العمود في أريان بكميات تقدر بين 50 mL و 100 mL ، يتم تركيزها تحت الضغط المنخفض حتى يجف و يعاد تذويبها في أقل كمية ممكنة من الميثانول و الجدول (II-2) يبين الكسور المتحصل عليها. تم تجميع هذه الكسور باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية على السليكاجال و ذلك باستعمال نفس الأنظمة كملصات: (0:100 , 1:9 , 2:8,3:5,7:5) (CHCl<sub>3</sub> : MeOH) الجدول II-2 : تمليص العمود الكروماتوغرافي للمستخلص الكلوروفورمي.

الملاحظة	الكسور قبل و بعد التجميع	
خليط غير قابل للفصل	A	7-1
خليط غير قابل للفصل	B	12-8
خليط غير قابل للفصل	C	15-13
خليط قابل للفصل	<u>D</u>	21-16
خليط قابل للفصل	<u>E</u>	25-17
خليط قابل للفصل	F	40-26
خليط قابل للفصل	<u>G</u>	50-41
خليط قابل للفصل	<u>H</u>	61-51
خليط غير قابل للفصل	I	70-62
خليط غير قابل للفصل	<u>J</u>	80-71
خليط غير قابل للفصل	K	85-81
خليط غير قابل للفصل	L	90-86
خليط غير قابل للفصل	M	93-91
خليط غير قابل للفصل	N	100-94

تم إجراء الكشف عن المركبات المفصولة عن طريق تحليل الأشعة فوق البنفسجية بأطوال موجية 254 و 366 nm و بعد ذلك باستخدام كاشف رش يتكون من محلول مشبع من كبريتات السيريوم 65 % ، مخفف

إلى 5% بالايثانول ، متبوعا بالتسخين إلى  $120^{\circ}\text{C}$  لمدة 15 دقيقة. تم الحصول على 14 كسر و هذا بعد التجميع.



الشكل II- 2 : مخطط فصل المستخلص الكلوروفورمي

### II-3-1- معالجة الكسور :

تم اختيار الكسور C، D، E، F، J، H و G لعملية الفصل فهي الأكثر اهتماما و هذا من خلال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، ثم استخدام تقنية HPLC باستخدام عمود RP-C-18 بنظام مناسب تحت تدفق 2mL/S، حيث تم حقن 10mg/ $\mu\text{L}$  وهذا عند كل تحليل .

**II-3-1-1-الكسر C :**

أجرينا Flash chromatographie على (215.4 mg) من الكسر C باستعمال عمود من RP-C18 والنظام (MeOH : H<sub>2</sub>O / 20 : 30) كملص بتدفق 25mL /min في أنابيب اختبار حجمها 25mL و لمدة 1سا و 30 د, تحصلنا على المركبين 1: (t<sub>R</sub> =18min , 1.3mg) و 3 (t<sub>R</sub> =40min , 1.8mg).

**II-3-1-2-الكسرD:**

تمت إذابة (374.6mg) هذا الكسر في الميثانول بعدها ركز لمدة 10 د عند 3000 دورة في الدقيقة، تم جمع المادة الطافية و حقنها في RP-HPLC ، على عمود (Waters)  $\mu$ -Bondapak RP-18 باستخدام النظام (MeOH : H<sub>2</sub>O, 3.5 : 5.5) تحصلنا من هذا الكسر على المركبات النقية التالية :  
2 (t<sub>R</sub> =15min , 3.6 mg) ، 5 (t<sub>R</sub> =10min , 1.3mg) و 3 (t<sub>R</sub> =40min , 1.8mg)

**II-3-1-3-الكسرE:**

تمت إذابة (157.7 mg) من هذا الكسر في الميثانول بعدها ركز لمدة 10 د عند 3000 دورة في الدقيقة, تم جمع المادة الطافية و حقنها في RP-HPLC ، على عمود (Waters)  $\mu$ -Bondapak RP-18 باستخدام النظام CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (7:3) تحصلنا من هذا الكسر على المركبات النقية التالية.  
2 (t<sub>R</sub> =15 min , 1.8mg) , 9 (t<sub>R</sub> =37 min , 0.8mg) و 6 (t<sub>R</sub> =51 min , 1mg)

**II-4-1-3-الكسرF:**

في النظام (MeOH : H<sub>2</sub>O, 7 : 3) أعطى هذا الكسر ذو الوزن (105.4mg) مركبين نقيين  
5, (t<sub>R</sub> =8 min , 1.3mg) و 6 (t<sub>R</sub> =28 min , 1mg).

**II-5-1-3-الكسرG:**

تمت إذابة (157.7 mg) من هذا الكسر في الميثانول بعدها ركز لمدة 10 د عند 3000 دورة في الدقيقة, تم جمع المادة الطافية و حقنها في RP-HPLC , على عمود (Waters)  $\mu$ -Bondapak RP-18 باستخدام النظام CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (7:3) تحصلنا من هذا الكسر على المركبات النقية  
1 (1,8 mg, t<sub>R</sub>= 20 min) , 5 (0,1 mg, t<sub>R</sub>= 30 min).

**II-6-1-3-الكسرH:**

تحصلنا من هذا الكسر (584.0mg) في النظام (MeOH : H<sub>2</sub>O, 6.5 : 3.5) كملص على المركبات  
4 (t<sub>R</sub> =12 min , 1.5 mg) , 8 (t<sub>R</sub> =36.5 min , 1.5mg) و المركب 7 (t<sub>R</sub> =54 min , 1.2 mg).

**II-7-1-3-الكسرJ:**

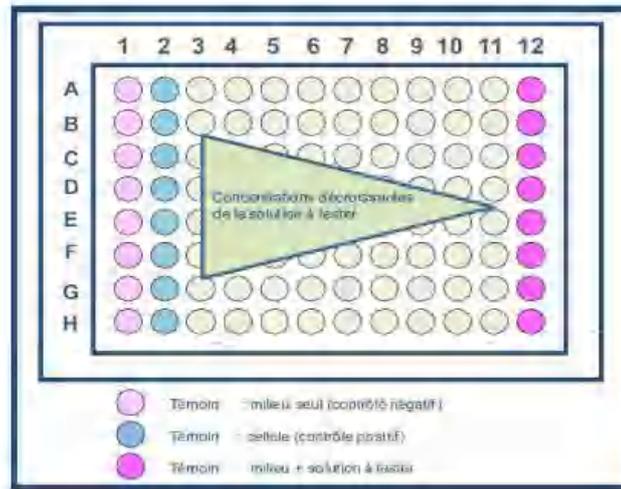
تحصلنا من هذا الكسر (210.3mg) في النظام (MeOH : H<sub>2</sub>O, 7 : 3) كملص على المركبات  
4 (t<sub>R</sub> =12 min , 0.5 mg) , 6 (t<sub>R</sub> =36 min , 1.5mg) و المركب 7 (t<sub>R</sub> =54 min , 1.2 mg).

## II-4-الفعالية المضادة للتكاثر Activité Antiproliférative

## صلاحية الخلية

تم نشر الخلايا على صفيحة تحتوي على 96 بئر (puits) بتركيز مختلفة و زرعت الخلايا Jurkat بكثافة  $2 \times 10^4$  / puits بينما تم زرع خلايا Hela عند  $1 \times 10^4$  / puits ، في اليوم السابق للعلاج .تم تحديد عدد الخلايا القابلة للحياة من خلال اختبار MTT و هي طريقة سريعة لتعداد الخلايا الحية .و يستخدم ملح رباعي الترازوليوم MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium) الذي يشكل راسبا في الميتوكوندريا للخلايا ذات اللون البنفسجي ، ثم بمقايسة بسيطة للكثافة الضوئية عند 550 nm عن طريق التحليل الطيفي ، يتم التعرف على الكمية النسبية للخلايا الحية و النشطة الأيضية .في بعض التجارب ، تم أيضًا التحقق من صلاحية الخلية من خلال اختبار استبعاد trypanblue باستخدام غرفة عد Bürker .

- حساب قيم  $IC_{50}$  من جرعة حيوية الخلية وتم تعريفها على أنها التركيز الذي أدى إلى تثبيط بقاء الخلية بنسبة 50% مقارنةً بالضوابط.
- استخدام Etoposide كعنصر تحكم إيجابي.تم اختبار كل حالة تجريبية مرة واحدة لكل أربعة أضعاف.
- حساب قيم  $IC_{50}$  باستخدام برنامج Graph Pad .



الشكل II-3 : رسم تخطيطي للوحات 96 جيدا في اختبار MTT

## الفصل الثالث

الدراسة الفيتوكيميائية لنبته

*Ormenis Praecox*

وتحديد الفعالية البيولوجية

### III- دراسة فيتوكيميائية للنبته *Ormenis praecox*

#### III-1-الماده النباتية

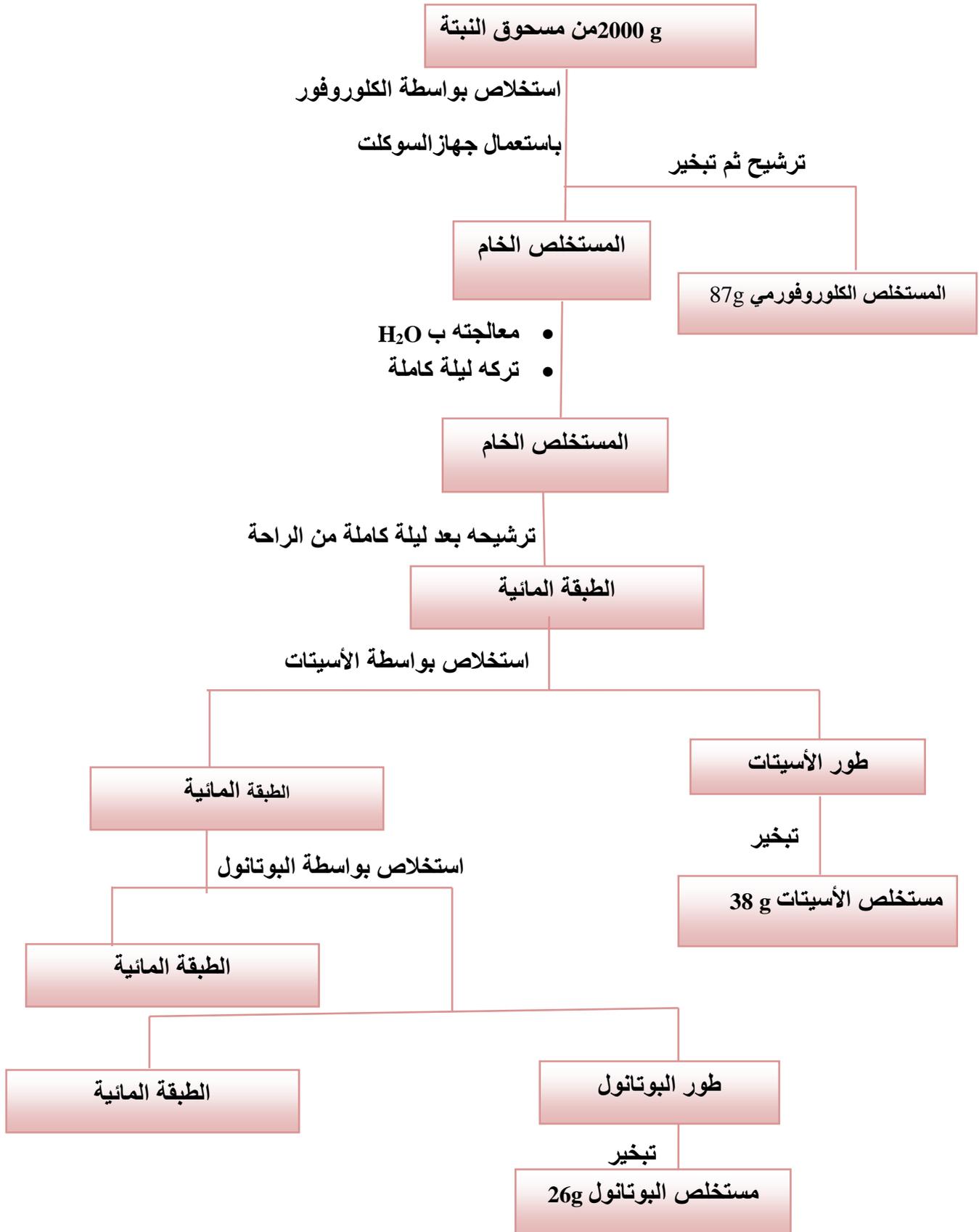
تم جمع الجزء الهوائي لنبات *Ormenis praecox* خلال مرحلة التزهير في شهر ماي 2014 من منطقة جبل الوحش بقسنطينة ، جففت هذه النبته تحت الظل بعيدا عن الرطوبة ، بعد ذلك طحنت فكانت الكتلة المتحصل عليها 2000 g.



صورة للنبته *Ormenis praecox*

#### III-2-طريقة الاستخلاص

بعد سحق الجزء الهوائي للنبته (2000g) تم نفعها و استخلاصها بواسطة الكلوروفورم باستعمال جهاز سوكسليت، بعدها رشحت و المتبقي من هذه النبته نفع مرة أخرى في محلول كحولي (الايثانول/الماء) (8:2 v/v) و ركز هذا المستخلص تحت ضغط منخفض بعدها أضيفت إليه كمية من الماء المقطر ليلة كاملة ، و بعد الترشيح تم استخلاصها بمذيبات خلات الايثيل و البيوتانول . جمعت و جففت الاطوار العضوية ركزت جيدا تحت الضغط المنخفض و أدت إلى مستخلصات الكلوروفورم ، أسيتات الاثيل و البيوتانول.



الشكل رقم 1-III: مخطط استخلاص النبتة *Ormenis praecox*

### III-3-المسح الفيتوكيميائي للنبته *Ormenis praecox*

إن الفحص الكيميائي النباتي يسمح لنا بتسليط الضوء على وجود المركبات الكيميائية تم الحصول عليها من مختلف الأطوار الموجودة في المستخلص. و يستند الكشف عن هذه المواد الكيميائية على ذوبان مكونات الاختبار و هذا عن طريق تغير اللون [2,1].

#### III-3-1-الكشف عن المركبات الفينولية

عولجت المستخلصات الثلاث ( $n$ - ButOH ,AcOEt ,CHCl<sub>3</sub>) بثلاث قطرات من (1%) FeCl<sub>3</sub> تشكل اللون الأسود ، أخضر دليل على وجود متعدد الفينولات.

#### III-3-2-الكشف عن الفلافونويدات

للكشف عن الفلافونويدات للمستخلصات الثلاث ( $n$ - BuOH ,ACOEt ,CHCl<sub>3</sub>) نستعمل تفاعل Cyanidine الذي يستخدم 1mL من حمض الهيدروكلوريك HCl و 1mL من الماء المقطر و بعض رقائق المغنيزيوم Mg ، تشكل اللون البرتقالي (فلافون) ، الوردية الأرجواني (فلافونول) أو أحمر الكرز (فلافونون) دلالة على وجود الفلافونويدات [3] .

#### III-3-3-الكشف عن القلويدات

اتبعت الطريقة الواردة في المقال لـ De, P. T., Urones و آخرون [4] إذ غلي 10 g من الجزء النباتي في 50 mL من ماء مقطر محمض بقطرات من حامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز 4 % برد المحلول رشح ثم بعد ذلك أجريت عملية الكشف باستخدام كاشف Dragendroff يتكون هذا الأخير من خليط من 0.8 g نترات البزميث و 10 mL من حامض الخليك مع 40mL من الماء المقطر فتشكل راسب ملون أحمر برتقالي مع الأنابيب التي تحتوي على المستخلصات الثلاث ( $n$ - BuOH ,ACOEt ,CHCl<sub>3</sub>) .

#### III-4-3-الكشف عن التانينات Tanins

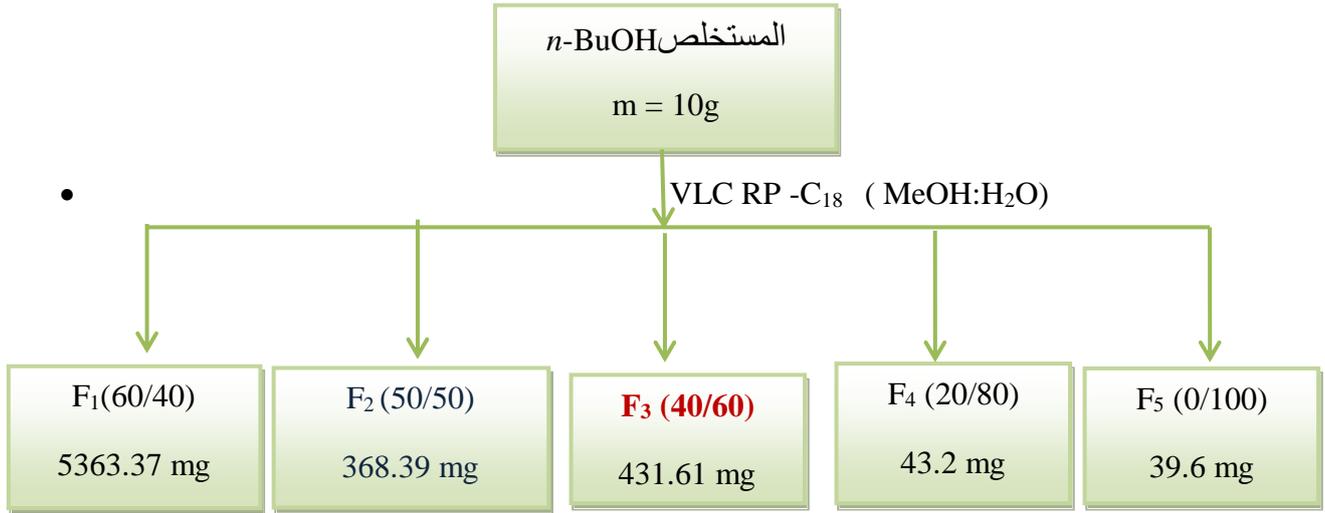
تحفف المستخلصات الثلاث ( $n$ - BuOH ,ACOEt ,CHCl<sub>3</sub>) بالماء المقطر ثم تضاف لها قطرتين أو ثلاث قطرات من محلول كلوريد الحديد المخفف 1% ، وبظهور اللون المخضر يعني وجود التانينات الكاتيكولية Catéchol tannins .

#### III-4-4-الفصل و التنقية :

#### III-4-1-دراسة المستخلص البيوتانولي :

اخترنا الطور البيوتانولي ، أخذنا منه 10 g و قمنا بعملية التجزئة بطريقة VLC للطور العكسي Rp-C<sub>18</sub> كدعامة ثابتة و التدرج في المملص بنسب متفاوتة (MeOH:H<sub>2</sub>O) (0 :100,20 :80,40 :60,50:50,60:40)

[5] ، يتم جمع الكسور 250 (مل3x) لكل خليط ( الشكل III-2 ) .



### الشكل رقم 2-III : مخطط التجزئة للمستخلص *n*-BuOH للنبتة *Ormenis praecox*

تم تحليل الكسور الخمسة التي تم الحصول عليها بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على هلاما السليكا جال على دعامة من الألمنيوم باستعمال مملصات مختلفة (CHCl<sub>3</sub> : MeOH / 9 : 1) و (AcOEt : MeOH : H<sub>2</sub>O / 30 : 6 : 4). من بين الكسور التي تم الحصول عليها، قمنا باختيار الكسرين F<sub>2</sub> و F<sub>3</sub> للدراسة.

#### III-2-4-2- معالجة الكسور المحصل عليها

نظرا لنتشابه الكسرين F<sub>2</sub> و F<sub>3</sub> إلى حد كبير، تم دمجهما لنتحصل على الكسر F<sub>a</sub> (800mg)، عولج هذا الأخير بواسطة كروماتوغرافيا العمود (متعدد الأמיד SC6، 80x30cm)، و استعمال النظام (Toluène/MeOH) كمخلص مع تغير القطبية في كل مرة. تم إجراء عملية التجزئة في قوارير سعتها 250mL. تمت مراقبة الكسور بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على هلاما السليكا (SiO<sub>2</sub> 60 F254, Merck, Darmstedt, Allemagne) على دعامة من الألمنيوم في النظام (AcOEt : MeOH : H<sub>2</sub>O / 8 : 1 : 1). يتم تصوير اللوحات تحت الضوء الأشعة فوق البنفسجية و نتائج تجزئة الكسر F<sub>a</sub> مدونة في الجدول رقم 1-III.

الجدول 1-III : الكسور المحصل عليها من ا لطور العكسي Rp-C<sub>18</sub> للكسر Fa

	النظام			الكسور
	MeOH (%)	Toluène (%)		
خليط غير قابل للفصل	100	0	F <sub>1</sub>	3-1
خليط من المركبات	98	2	F <sub>2</sub>	7-4
خليط من المركبات	96	4	F <sub>3</sub>	11-8
خليط من المركبات قابلة للفصل	94	6	F <sub>4</sub>	15-12
خليط من المركبات	90	10	F <sub>5</sub>	19-16
خليط من المركبات	85	15	F <sub>6</sub>	27-20
تشكل راسب أبيض	80	20	F <sub>7</sub>	47-28
تشكل راسب أصفر	75	25	F <sub>8</sub>	55-48
خليط من المركبات	70	30	F <sub>9</sub>	71-56
مركب أعظمي	65	35	F <sub>10</sub>	84-72
خليط من المركبات	60	40	F <sub>11</sub>	10-185
خليط من المركبات	10	90	F <sub>12</sub>	103-102
أثار	0	100	F <sub>13</sub>	105-104

#### III-4-2-1-دراسة الكسر F<sub>7</sub>:

لاحظنا ظهور راسب أصفر في الكسر F<sub>7</sub> ، تم غسله باستعمال الخليط (4:6:60 :AcOEt :MeOH :H<sub>2</sub>O). ثم الخليط (1:1:1 :MeOH :CHCl<sub>3</sub>) لنتحصل في الأخير على مركب نقي P<sub>6</sub> (10mg).

#### III-4-2-2-دراسة الكسر F<sub>8</sub>:

لاحظنا وجود راسب أصفر باهت. تم غسله باستعمال الخليط (4:6:60 :AcOEt :MeOH :H<sub>2</sub>O). ثم ترشيح الراسب مع الشطف ب الMeOH لإعطاء المركب P<sub>7</sub> (125.5 mg) .

#### III-4-2-3-دراسة الكسر F<sub>10</sub> :

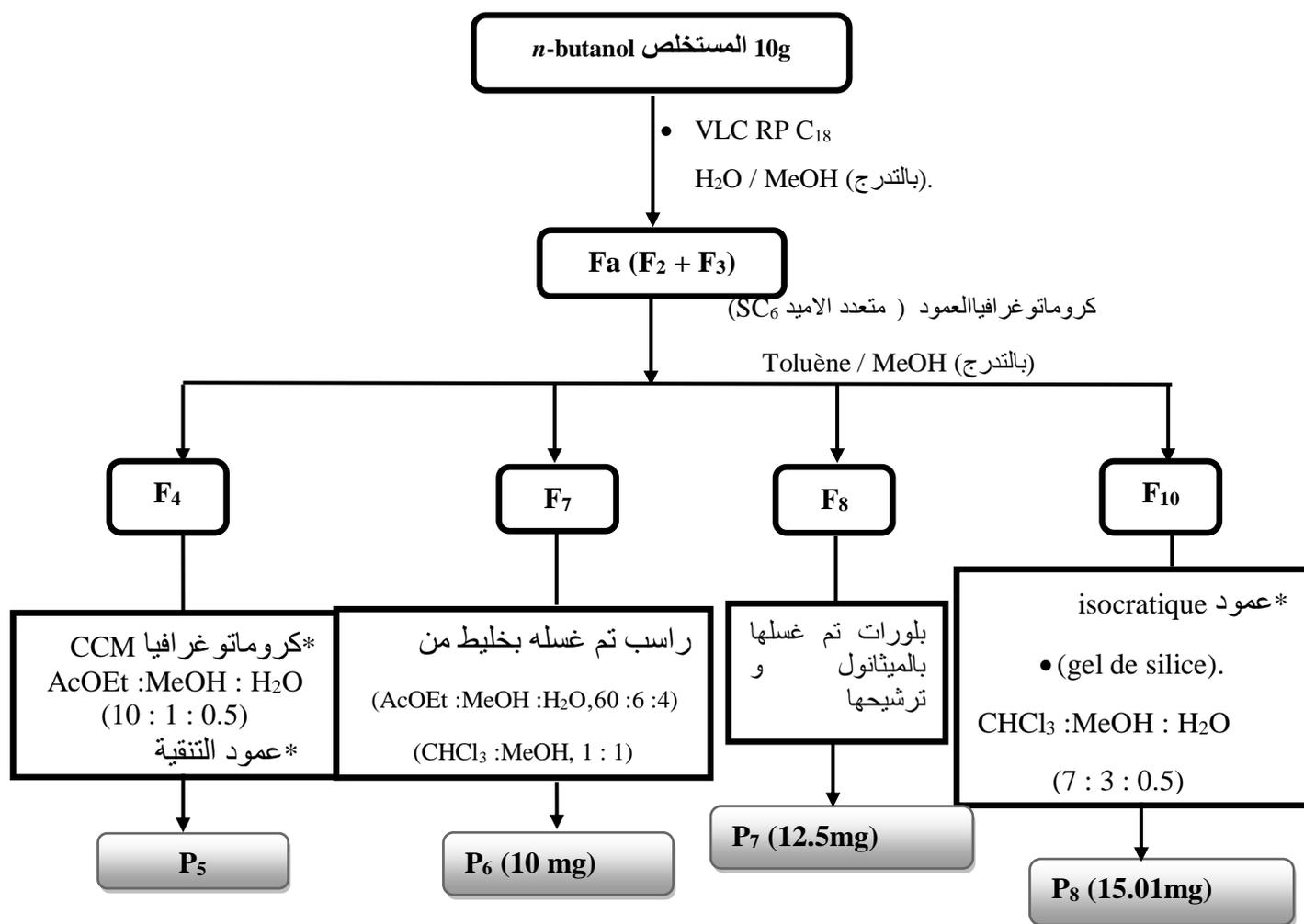
تمت معالجته بواسطة كروماتوغرافيا العمود باستعمال السليكاجال كدعامة ثابتة و النظام (0.5:3:7 :CHCl<sub>3</sub> : MeOH :H<sub>2</sub>O) النتائج مدونة في الجدول التالي(الجدول III- 2).

الجدول III-2 : تحت الكسور المحصل عليها من الكسر F<sub>10</sub>

الملاحظة	الكتلة (mg)	تحت الكسور	الكسر
خليط معقد	41.50	F' <sub>1</sub>	6-1
	29.50	F' <sub>2</sub>	12-7
مركب	15.01	F' <sub>3</sub>	26-13
خليط قابل للفصل	8.00	F' <sub>4</sub>	31-27

. دراسة تحت الكسر F'<sub>3</sub>

عولج هذا الكسر بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التي أظهرت وجود مركب أساسي F'<sub>3</sub> كميته 30 mg تم فصله باستعمال النظام (CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O, 7 : 3 : 0.5) فتحصلنا على المركب P<sub>8</sub> بشكل نقي ، لكن لم تمكننا كميته الضئيلة من تحديد بنيته .



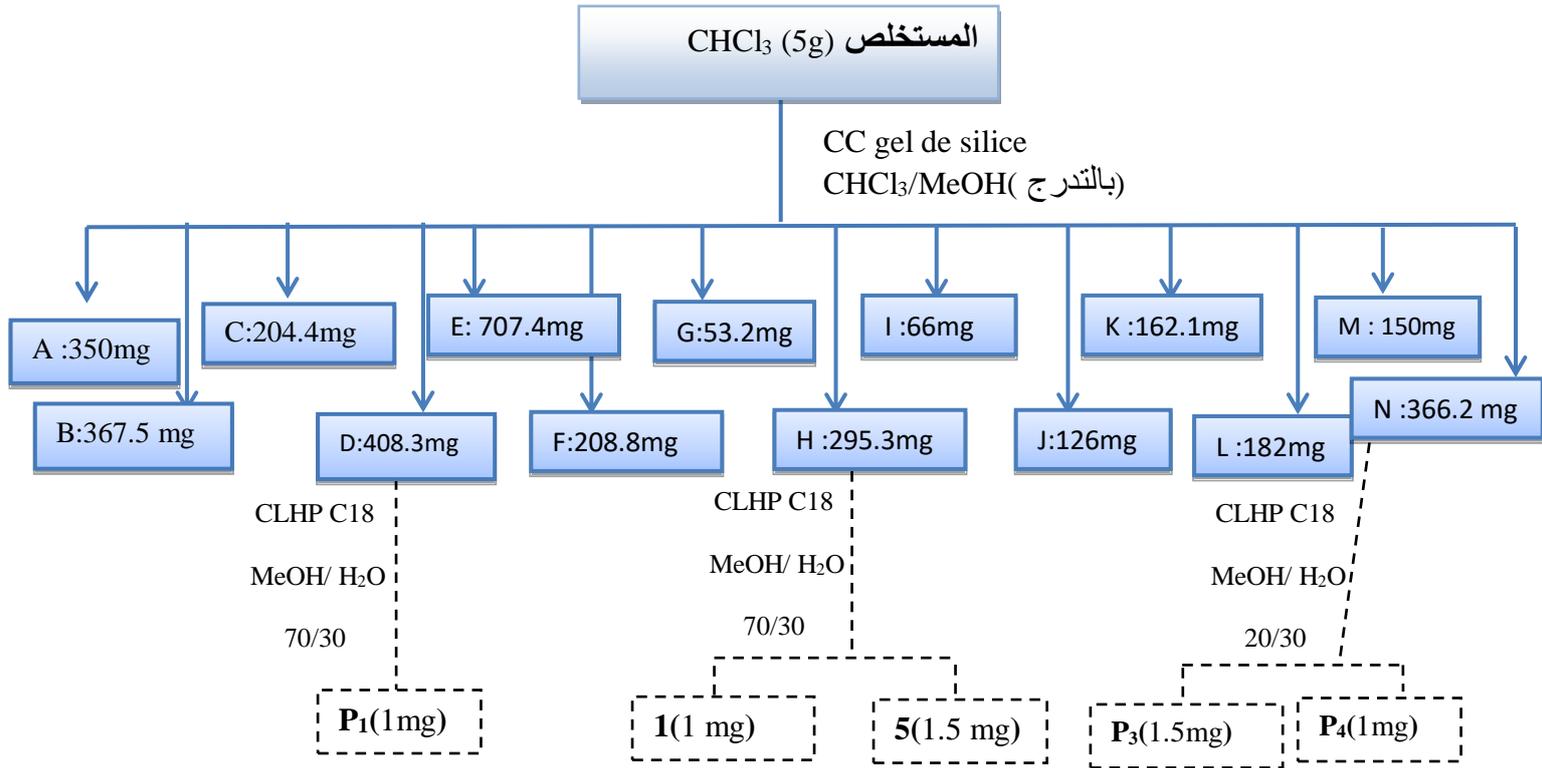
شكل III-3 : مخطط يوضح مراحل الفصل و التنقية لكسور مستخلص البوتانول

### III-4-2-دراسة المستخلص الكلوروفورمي:

تمت معالجة 5g من المستخلص الكلوروفورمي باستعمال كروماتوغرافيا العمود و استعمال السليكاجال كدعامة ثابتة، و  $CHCl_3$  و MeOH كملص {1:4,1:9,3:97,1:49,1:99}، تم استقبال الحزم النازلة في أنابيب سعتها 25mL ليتم جمع المتشابه منها بالاعتماد على التحليل للأشعة فوق البنفسجية في الأطوال الموجية 254 و 336 nm .

الجدول III-3: الكسور المحصل عليها من الطور الكلوروفورمي

الملاحظة	الكسور قبل و بعد التجميع	
خليط غير قابل للفصل	A	11-1
خليط غير قابل للفصل	B	16-12
خليط غير قابل للفصل	C	23-17
خليط قابل للفصل	D	31-24
خليط قابل للفصل	E	40-32
خليط قابل للفصل	F	55-41
خليط قابل للفصل	G	64-56
خليط قابل للفصل	<u>H</u>	69-65
خليط غير قابل للفصل	I	79-70
خليط غير قابل للفصل	J	90-80
خليط غير قابل للفصل	K	102-91
خليط غير قابل للفصل	L	112-103
خليط غير قابل للفصل	M	120-113
خليط قابل للفصل	<u>N</u>	140-121



الشكل III-4: مخطط فصل المستخلص الكلوروفورمي للنبته *Ormenis praecox*

III-4-3-معالجة الكسور :

III-4-3-1-الكسر D:

اعتمادا على كروماتوغرافيا ال Semi-prep HPLC و استعمال عمود RP-C18 و النظام (MeOH : H<sub>2</sub>O, 7 : 3) كملص ثابت بتدفق 5ml/ min أين تحصلنا من هذا الكسر (408.3mg) على 1 mg من المركب P<sub>1</sub> عند (t<sub>R</sub> =15 min).

III-4-3-1-الكسر H:

قمنا بإجراء على هذا الكسر (295.3 mg) Flash chromatography باستعمال عمود RP-C18 و النظام (MeOH : H<sub>2</sub>O, 7 : 3) كملص أين تحصلنا على 1 mg من المركب 1 عند (t<sub>R</sub> =20 min) و 1.5 mg من المركب 5 عند (t<sub>R</sub> =30 min).

III-4-3-2-الكسر N:

أعطى هذا الكسر ذو الوزن (366.2mg) في النظام (MeOH : H<sub>2</sub>O, 2 : 3) المركبات النقية P<sub>3</sub> (1.5mg , t<sub>R</sub> =45 min) و P<sub>4</sub> (1mg , t<sub>R</sub> =48 min).

### III-5-الفعالية البيولوجية :

- لقياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات : البوتانولي و خلات الإيثيل ، أجرينا اختبارين على الأخير:
- التقدير الكمي لمتعدد الفينول باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu .
  - تثبيط الجذور المستقرة DPPH .

### III-5-1-تقدير المحتوى الكلي للفينولات لنبات *Ormenis praecox*

#### III-5-1-1- تقدير المحتوى الكلي للفينولات

تم تقدير المحتوى الفينولي الكلي بواسطة الكاشف اللوني Folin-Ciocalten حسب طريقة Singleton و حمض الغاليك كأساس مرجعي ، كاشف الFolin يتغير لونه من الأصفر إلى الأزرق باستعمال جهاز المطياف UV-Vis Spectrophotométre [6] .

#### • رسم المنحنى القياسي لحمض الغاليك:

تم تحضير تراكيز مختلفة من حمض الغاليك من 50 ، 100 ، 200 ، 300 ، 400 إلى 500 mg/L ، نضع في كل أنبوب 125 µl من كل مستخلص مخفف مع 500 µl من الماء المقطر و 125 µl من كاشف Folin-Ciocalteu .

بعد اهتزاز قوي للخليط متبوعاً براحة لمدة 3 دقائق ، يضاف 1250 µl من  $Na_2CO_3$  (2 %) (2 غ/100 مل ماء مقطر) يتم ضبط الخليط الناتج بالماء المقطر إلى 3 ml . نرج الأنابيب جيدا و نضعها في الظلام لمدة 90 دقيقة ، تتم قراءة الامتصاصية بجهاز UV-Visible عند طول الموجة 760 nm . يتم التعبير عن محتويات عديد الفينولات بالملجم من مكافئ حمض الغاليك لكل غرام من المادة الجافة (mg EAG.g-1MS) ويتم التعبير عن التركيز التجريبي لعديد الفينولات لكل مستخلص بـ  $mg.mL^{-1}$  .

قيم الامتصاصية مدونة في الجدول III-4:

الجدول III-4: كميات البوليفينول المقاسة لكل مستخلص

DO	كميات البوليفينول للمستخلصات (mg/g)		
	التجربة الاولى	2.308	418.61
التجربة الثانية	2.379	432.53	
التجربة الاولى	0.713	105.86	مستخلص n-BuOH
التجربة الثانية	0.774	117.82	

### III-2-الفعالية المضادة للأكسدة :

وهي قياس لقدرة المستخلص أو المركب على تثبيط الجذر الحر أو توقيف عملية الأكسدة ، و تقدر الفعالية المضادة للأكسدة بعدة طرق نذكر منها :

- اختبار DPPH
- اختبار ABTS

هذه الطريقة تعتمد على التلوين و نزع التلوين في طول موجي معين، و في دراستنا هذه قمنا باختبار DPPH .

**طريقة العمل :** تتم إضافة 30 ميكرو لتر لتراكيز مختلفة : المستخلص الخام (Extrait brut) وأربعة تخفيفات من كل عينة إلى 3 مل من محلول DPPH الميثانولي ذو تركيز (100 µM)، يَرَج الخليط بقوة بواسطة رَجّاج (vortex). ثم يوضع في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة في الظلام ، بعد ذلك تقاس الامتصاصية لمختلف التركيزات المتفاعلة مع DPPH عند طول موجي (517 nm) مقابل الشاهد بواسطة جهاز UV-VIS spectrometer .

الجدول III-4-1: التراكيز النهائية المخففة (لكل مستخلص).

D <sub>5</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>0</sub>	التراكيز المخففة
2,5	5	10	20	30	50	التركيز النهائي (µg/mL)

**قراءة النتائج :** تحول اللون البنفسجي العادي لمحلول DPPH الميثانولي إلى أصفر دليل على تزاوج الإلكترونات مع ذرة الهيدروجين القادمة من مضادات الأكسدة المحتملة ( المستخلصات المختبرة).

• يتم حساب النسبة المئوية لتثبيط تكوين الجذور الحرة DPPH بالصيغة التالية:

$$PI = \frac{Abs (blanc) - Abs (échantillon)}{Abs (blanc)} \times 100$$

Abs(blanc) : امتصاصية الشاهد.

Abs(échantillon) : امتصاصية التركيز المتفاعل مع DPPH .

تم التعبير عن النتائج من حيث IC<sub>50</sub> ( تركيز المستخلص يثبط 50% من جذور DPPH الموجودة في وسط التفاعل) [7-9].

### III-5-2. الفعالية المضادة للبكتيريا

لتقدير النشاط الفعال ضد البكتيريا للمتخلصات الثلاث للنبات المدروس ، نتبع طريقة الانتشار في وسط اجار مغذي (Gelose Nutritive)[10] .

قمنا بإذابة 20 mg من المستخلصات الثلاث المذكورة سابقا على حدى في 10 mL من الماء المعقم ، تسمى المحاليل المحصل عليها بمحاليل الأم ، مع الإشارة إلى أن هذه المستخلصات قد تم تجفيفها تماما و هذا لتسهيل عملية الوزن و حفظت في الثلاجة طيلة فترة انجاز هذا البحث في درجة حرارة 4°م ، انطلاقا من هذه المحاليل تم تحضير سلسلة من التراكيز المتناقصة حسب الجدول III-5 .

الجدول 5-III : تحضير مجموعة التراكيز:

التركيز النهائي ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	حجم الماء المعقم بالمليتر	الحجم بالمليتر	التركيز الابتدائي (المادة الفعالة، $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
SM 1280	3.6+	6.4 ملل من المحلول الأم	2000
D1 640	2+	2	1280
D2 320	3+	1	
D3 160	3.5+	0.5	
D4 80	7.5+	0.5	
D5 40	2+	2	80
D6 20	3+	1	
D7 10	3.5+	0.5	
5	7.5+	0.5	
2.5	2+	2	5
1.25	3+	1	
0.63	3.5+	0.5	
0.32	7.5+	0.5	

#### في اليوم الأول:

تم 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 *P.aeruginosa* و 0.6 مل *Streptococcus aureus*)

من هذه المزرعة ، و توضع في أنبوب اختبار يحوي 10 مل من الوسط *Mueller-Hinton* .

- ثم وضع الأنابيب في حمام مائي درجة حرارته 37 °م لمدة تتراوح ما بين 3 إلى 5 ساعات مع الرج لحين بداية ظهور تعكر طفيف (حوالي 5 10<sup>7</sup> بكتيريا/مل).

- يؤخذ 1 مل من كل أنبوب ،أخر يحوي 10 مل من الوسط (M-H) درجة حرارته 37°م.

- تؤخذ علب بتري فارغة و يوضع في كل علبه 2 مل من كل تخفيف من مجموعة التراكيز المحضرة مسبقا ابتداء من أقل تركيز مع وضع طبق شاهد ( يحوي 18 مل من M-H و 2 مل من الماء المقطر المعقم).

- يضاف إلى كل علبه 18 مل من (M-H) ذاتية ذات حرارة 45°م ، تحرك الأطباق جيدا لأجل ضمان الانتشار الجيد للمادة الفعالة للمستخلص النباتي في كامل العلبه.

- تترك الأطباق لعدة دقائق فوق الطاولة في شروط التعقيم و هذا حتى يتم تصلب الوسط.

- تجف الأطباق لمدة دقيقة في الحاضنة تحت درجة 37 °م.
- تمت عملية الزرع في كل علبه بشكل خطوط (Strie) بواسطة إبرة التلقيح أو بواسطة ماصة باستور دائرية, على جميع الأطباق المحتوية على مستخلص و الطبق الشاهد .
- حالة بكتيريا Bacillus يعوض الوسط M-H بالوسط الاختياري chocolat (وسط مضاف إليه 5% من دم الخروف).
- تحضن الأطباق في حاضنة تحوي 5% من CO<sub>2</sub>.
- أما في اليوم الموالي تقرأ النتائج من أجل تحديد التراكيز الدنيا المثبطة (التركيز من أجل لا تظهر أي مزرعة بكتيرية مرئية) [12،11]

### المراجع

- [1] Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., Vlietinck, A. J. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 61, 57-65.
- [2] Longaga, A., Otshudi, Vercruyssen, A., Foriers, A. (2000). Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomola area, Democratic Republic of Congo (RDC). *Journal of Ethnopharmacology*. 71, 411-423.
- [3] Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A. et Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaelythroïdes*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 142, 61-78.
- [4] De, P. T., Urones, J., Marcos, I., Basabe, P., Cuadrado, M. S., and Moro, R. F. (1987). Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*. 26, 1767-1776.
- [5] Toure, A., Bahi, C., Ouattara, K., Djaman, A.J., Coulibaly. (2011). Phytochemical screening and in vitro antifungal activities of extracts of leaves of *Morinda morindoides* (*Morinda* Rubiaceae). *Journal of medicinal plants research*. 5 (31), 6780-6786.
- [6] Slinkard, K.; Singleton. V. L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28, 49-55.
- [7] Kujala, T.S., Lojonen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. (2000). Phenolic and betacyanins in redbeet root (*Beta vulgaris*): distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 5338-5342.
- [8] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. 181, 1199-1200.
- [9] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 28, 25-30.
- [10] Touré, A., Bahi, C., Ouattara, K., Djaman, A. J & Coulibaly. (2011). Phytochemical screening and in vitro antifungal activities of extracts of leaves of *Morinda morindoides* (*Morinda* Rubiaceae). *Journal of medicinal plants research*. 266.
- [11] Carbonelle, B., Denis, E., Marmonier, A., Pinon, G., Vargas, R. (1987). *Bactériologie médicales : technique usuelles*. Edition STMP (2<sup>ème</sup> tirage). Paris.

[12] Rhal, K.R ., Belouini, A., Benslimani, H., Tali-Maamer, M.F.K., Missoum, M. (2011).Standardisation l'antibiogramme a l'échelle nationale selon les Recommandations de L'OMS. 6 éme édition.

**الجزء الثالث**

**مناقشة النتائج**

# الفصل الأول

## تحديد المحتوى الفينولي لمستخلص هيدروكولي لنبته

*Ammoides atlantica*

بواسطة طريقة RP- HPLC--ESI-QTOF-MS<sup>n</sup>

و النشاط المضاد للأكسدة

### 1-I- التعين البنيوي للمركبات المفصولة من النبته *Ammoides atlantica* :

بناء على الدراسة البيبلوغرافية أجرينا التحاليل Rp-UHPLC-ESI-QTOF-MS للمستخلص الهيدروكحولي AA-E في وضع التأين السليبي لأنها أكثر حساسية و انتقائية من الوضع الايجابي من اللوني [1].

أعطى الطيف 66 إشارة (الشكل 1-I) مما يدل على أن المستخلص الهيدروكحولي AA-E يحتوي على 66 مركب ، تم التعرف على 45 مركب منها ، بالاعتماد على زمن الاحتفاظ  $R_t$  و مطيافية الكتلة MS و ذلك بمطابقتها بالمعطيات البيبلوغرافية (الجدول رقم 1-I) [2].

#### 1-1-I- حمض الهيدروكسي سيناميك و مشتقاته :

تم تحديد 16 حمض هيدروكسي سيناميكي و مشتقاته عند الإشارات {7،10،12،14،15،16،18،20،31،33،35،37،39،43،44،46} المبينة في الكروماتوغرام و المدونة في الجدول 1-I من بين هذه المركبات تم تحديدها سابقا ، ستة مماكبات لحمض Caffeoylquinic و مماكبين من حمض dicaffeoylquinic في النوع *Daucus mricatus* [3] و التي تنتمي إلى عائلة Apiaceae .  
قد تم تحديد أربعة مماكبات لحمض Caffeoylquinic عند الإشارات {7،15،16 و 18} لأول مرة في النوع *Ammoides atlantica* التي تم تحديدها بواسطة أيونات شظايا MS/MS التشخيصية عند  $m/z$  191.06 الموافقة ل-[Quinic-H] ، عند  $m/z$  353 الموافقة ل (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>) [4] و سبعة مماكبات من حمض dicaffeoylquinic للإشارات {31،33،35،37،39 و 43} أعطت نفس الأيونات مقارنة بالدراسة البيبلوغرافية لحمض الكينيك .

تم تحديد الإشارات {31،33،35،37،43،46 و 39} على أنها 4,5-diCQA و 1, 3-diCQA على التوالي.  
عند  $m/z$  515 الموافقة ل (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>) [5]. تم تحديد هذه المركبات مقارنة بالدراسة البيبلوغرافية [6-8].  
كما تم العثور على lignine (eucommin A) عند  $m/z$  549 .

#### 1-1-I-2- أحماض الهيدروكسي بنزويك و مشتقاته

تم تحديد إشارات ESI-MS عند  $m/z$  315 على أنها مماكبات لسداسي أكسيد حمض ثنائي هيدروكسي بنزويك ( dihydroxybenzoic acid hexoside isomers )، (المركبات 4 ، 5 و 8) و فقا ل Mekky RH [9].  
بالمثل تم تعين ثنائي هيدروكسي بنزويك بنتوزيد (Dihydroxybenzoic acid pentoside) إلى إشارة 9

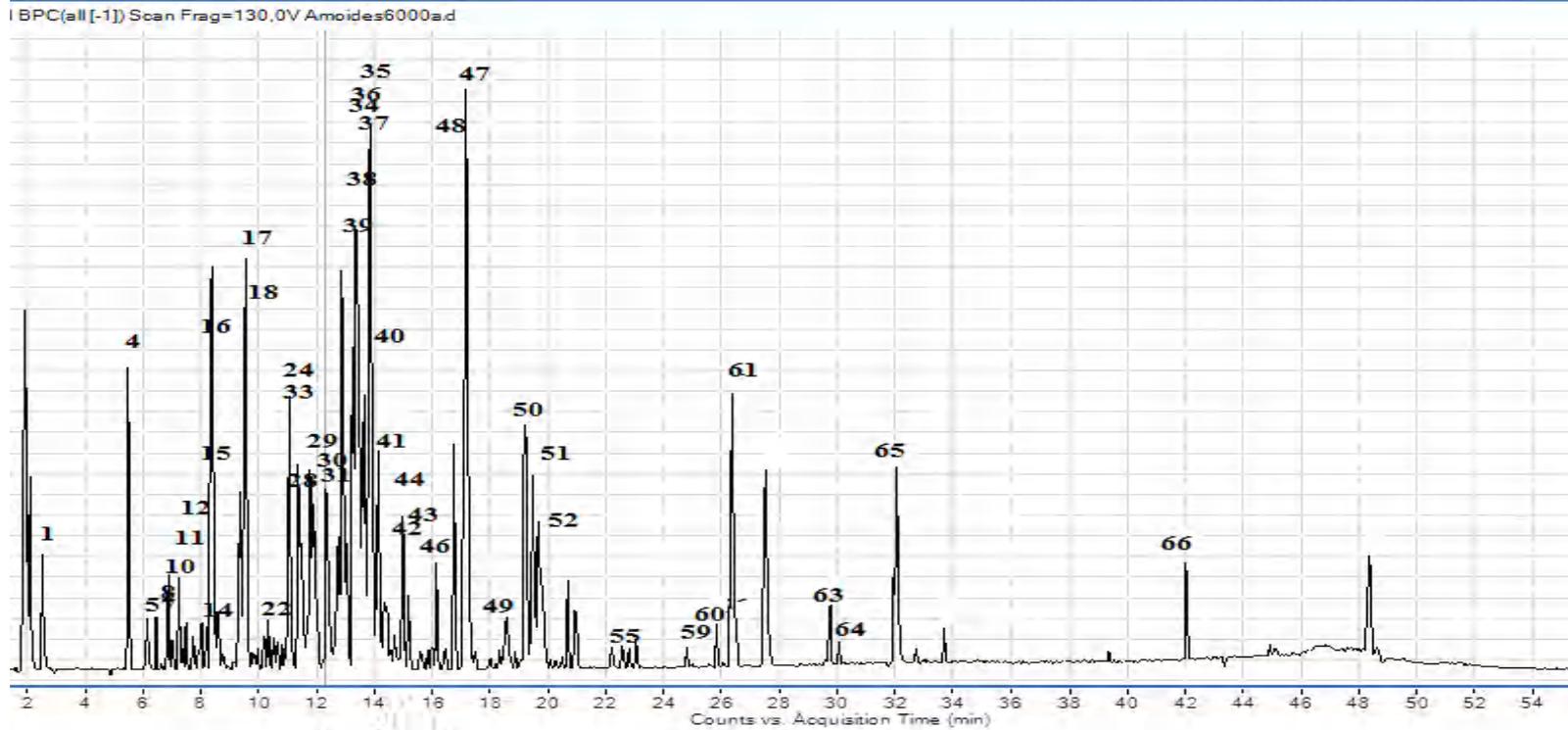
الموافقة للشضية  $m/z$  285

### 3-1-I- مركبات الفلافونويد

تم تحديد 11 فلافون للإشارات (27, 29, 30, 36, 38, 42, 45, 47, 54, 60 و 61) مع ثلاثة فلافونول للإشارات (24, 26 و 48) الجدول 1-I، هذه المركبات تصنف على أنها aglycones (luteolin, apigenin, cirsimaritin, isorhamnetin, و 3-hydroxy-6,7,4-trimethoxyflavone) و مشتقات لل O-glycosides (luteolin, apigenin و quercetin) [11,10].

### 2-I- مركبات أخرى:

بخلاف المركبات الفينولية، حمض الكنيك (1) quinic، حمض tuberonic glucoside (17)، حمض tuberonic (22)، حمض 9,12,13-trihydroxyoctadecadienoic (49) و desdimethyloctahydroisocohumulone (52)، حمض trihydroxyoctadecadienoic (57) و حمض Tihydroxyoctadecaecaenoic (64 و 65) هي عبارة عن مأكبات لحمض hydroxyoctadecadienoic، و هذا استنادا إلى الدراسة البيبلوغرافية التي أكدت ذلك [13,12,3].



الشكل 1-I: كروماتوغرام الشظايا الرئيسية للمستخلص الكحولي للنبذة  
*Ammoides atlantica* بواسطة RP-HPLC-ESI-QTOF-MS عند التأين السلبى.

الجدول 1-I: المركبات الفلافونويدية و الفينولية الحمضية المحددة للجزء الهوائي للنبته *Ammoides atlantica* بواسطة طريقة RP- HPLC--ESI-QTOF-MS<sup>n</sup>

Compounds Peak number	Retention Time(min)	Molecule Formula	m/z Experimental	m/z Calculated	Ionization mode	Error	Fragment ion (-)	Reference
2	Unknown	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	499.1673	499.1668	N	neg 0.81	499.167 (100 %), 191.0559 (10 %), 173.0453 (19 %)	-
3	Unknown	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	203.0195	203.0197	N	0.41	112.9886 (29 %), 79.0189 (100 %)	-
4	3,5-Dihydroxybenzoicacid-O-glu	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	315.0730	315.0722	N	neg 2.58	315.0736 (4 %), 153.0187 (20 %), 152.0117 (73 %), 109.0296 (41 %), 108.0221 (100 %)	15
5	3,4-dihydroxybenzoyl-glucoses isomer 1	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	315.0731	315.0722	N	neg 2.69	153.0193 (69 %), 109.0298 (100 %)	16
6	Unknown	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>	409.1509	409.1504	N	neg 0.91	361.1294 (8 %), 301.1089 (20 %), 165.0558 (100 %)	-
7	Chlorogenicacid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0884	353.0878	N	neg 1.51	191.0561 (100 %), 179.0349 (50 %), 135.0451 (71 %)	17,18
8	3,4-dihydroxybenzoyl-glucoses isomer 2	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	315.0722	315.0722	N	neg 0.04	109.0293 (100 %)	16
9	Unknown	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	285.0616	285.0616	N		153.0179 (11 %), 152.0113 (48 %), 109.0284 (17 %), 108.0216 (100%)	-
10	Caffeoyl-fructosyl-glucose	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	503.1405	503.1406	N	0.81	503.141 (31 %), 443.	14
11	Unknown	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	199.0980	199.0976	N	neg 1.81		-
12	Caffeic acid-O-hexoside isomer 1	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	341.0881	341.0878	N	neg 1.09	179.0349 (59 %), 161.0244 (100 %), 135.0448 (74 %)	19,20
13	Unknown	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	445.1349	445.1351	N	0.45	445.1349 (14 %), 162.0279 (11 %), 161.0246 (100 %)	-
14	Caffeic acid-O-hexoside isomer 2	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	341.0881	341.0878	N	neg 0.78	179.035 (100 %), 161.0246 (89 %), 135.0451 (87 %)	19
15	Cryptochlorogenic acid (4-O caffeoylquinic acid) isomer 1	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0881	353.0878	N	neg 0.72	191.0559 (100 %)	19,18
16	Cryptochlorogenic acid (4-O caffeoylquinic acid) isomer 2	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0883	353.0878	N	neg 1.09	191.0559 (100 %)	19,18
17	Tuberonic acid glucoside/5'-hydroxyjasmonic acid 5'-O-glucoside	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	387.1662	387.1660	N	neg 0.47	369.156 (4 %), 225.1116 (4 %), 207.1024 (62 %) 163.1131 (55 %), 89.0247 (96 %)	21

18	Cryptochlorogenic acid (4-O caffeoylquinic acid) isomer 3	9.473	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0880	353.0878	N	neg 0.98	191.0561 (100 %)	19,18
19	Unknown	10.151	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	191.0351	191.0349	N	neg 0.91	176.0111 (22 %), 148.0163 (41 %), 104.0267 (100 %)	-
20	Unknown	10.279	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	551.1420	551.1406	N	neg 2.12	551.1417 (100 %)	-
21	Unknown	10.465	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> HO <sub>9</sub>	367.1037	367.1037	N	neg 0.71	191.0560 (100 %), 134.0371 (18 %)	-
22	Methyldihydrojasmonicacid	10.589	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	225.1137	225.1132	N	neg 1.87	147.0822 (25 %), 135.017 (7 %), 119.0498 (7 %), 97.0669 (100 %), 95.051 (22 %), 81.0349 (75 %)	22
23	Unknown	10.775	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub>	741.1891	741.1883	N	neg 0.71	741.1891 (83 %), 375.1663 (28 %), 239.0926 (19 %)	
24	Quercetin-3-glucoside	11.023	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.0893	463.0882	N	neg 2.2	301.0357 (100 %), 300.0277 (64 %)	-
25	Unknown	11.333	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	277.1084	277.1081	N	neg 1.06	218.0945 (40 %), 175.0767 (63 %), 133.0659 (74 %), 123.0448 (45 %)	-
26	Unknown	11.457	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	595.1299	595.1299	N	0.82	595.1299 (41 %), 300.0274 (100 %)	-
27	Luteolin-7-O-rutinoside isomer 1	11.705	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593.1519	593.1512	N	neg 1.08	285.0407 (100%)	14,22,23,24
28	Unknown	11.829	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	277.1083	277.1081	N	neg 0.64	218.0948 (35 %), 175.0759 (47 %), 135.0814 (100 %), 133.0655 (69 %),	N
29	Luteolin-7-O-glucoside	12.262	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0936	447.0933	N	neg 0.62	285.0402 (100 %)	22
30	Luteolin 7-O-rutinoside isomer 2	12.696	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593.1515	593.1512	N	neg 0.54	285.0400 (100 %)	14,22,23,,24
31	1,3-O-Dicaffeoylquinic acidisomer 1	12.820	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1205	515.1195	N	neg 1.7	353.0874 (1 %), 192.0593 (6 %), 191.0562 (100 %), 179.0348 (5 %), 161.0242 (3 %), 135.045 (1 %)	25
32	Unknown	13.06	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>13</sub>	567.2084	567.2083	N	neg 0.11	342.1428 (21 %), 341.1391 (100 %), 326.1158 (42 %), 119.0349 (22 %), 89.0247 (74 %)	-
33	1,3-O-Dicaffeoylquinic acidisomer 2	13.192	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1199	515.1195	N	neg 0.75	353.0874 (1 %), 192.0593 (6 %), 191.0562 (100 %), 179.0348 (5 %), 161.0242 (3 %), 135.045 (1 %)	25
34	Genistin	13.527	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.0985	431.0984	N	neg 0.36	271.0598 (100 %)	26
35	1,3-O-Dicaffeoylquinic acidisomer 3	13.316	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1206	515.1195	N	neg 2.01	353.0875 (13 %), 191.0561 (100 %)	25
36	apigenin 7-O-glucoside	13.564	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.0985	431.0984	N	neg 0.36	431.0938 (27 %), 269.044 (40 %), 268.0378 (100 %)	27
37	1,3-O-Dicaffeoylquinic acidisomer 4	13.626	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1201	515.1195	N		353.0875 (13 %), 191.0561 (100 %)	25
38	Luteolin O-acetylhexoside	13.750	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	489.1047	489.1038	N	neg 1.51	285.0403 (100 %), 284.0327 (43 %)	14
39	4,5-O-dicaffeoylquinic acid	13.812	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1210	515.1195	N	neg 2.51	353.0883 (21 %), 191.0562 (32 %), 179.0354 (78 %), 173.0459 (100 %),	14

								161.0245 (3 %), 135.0455 (13 %)	
40	Medioresinolcaffeate	14.122	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub>	549.1981	549.1978	N	neg 0.65	549.1971 (6 %), 387.166 (100 %), 207.1025 (11 %), 161.0243 (80 %)	28
41	Apigenin-7-O-glucoside	14.308	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0932	447.0933	N	0.23	285.0402 (100 %)	29
42	LuteolinO-diglucoside	14.928	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	609.1255	609.1250	N	neg 0.61	447.093 (3 %), 323.0769 (7 %), 285.0402 (100 %), 161.024 (6 %)	29
43	1,3-O-Dicaffeoylquinic acidisomer 5	15.114	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1198	515.1195	N	neg 0.33	353.0876 (20 %), 191.056 (38 %), 179.035 (79 %), 173.0454 (100 %), 135.0451 (14 %)	19
44	Rosmarinicacid	15.548	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	359.1713	359.0772	N	neg 0.07	197.063 (11 %), 161.0145 (10 %)	30
45	Unknown	16.106	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	593.1305	593.1300	N	0.65	593.1298 (16 %), 323.0768 (48 %), 269.0452 (100 %), 161.0238 (19 %)	-
46	1,3-O-Dicaffeoylquinic acidisomer 6	16.725	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1196	515.1195	N	neg 0.12	353.0877 (16 %), 335.0777 (10 %), 284.9319 (11 %), 191.0559 (57 %), 180.0389 (11 %), 179.035 (100 %), 173.0455 (81 %), 161.0245 (24 %), 135.0447 (21 %)	25
47	Luteolin	17.097	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.0412	285.0405	N	neg 2.23	285.0401 (97 %), 151.0036 (34 %), 133.0291 (100 %)	14,31
48	Isorhamnetin	17.221	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	315.0513	315.0510	N	neg 0.72	300.0273 (100 %)	22,23,32,33,34
49	9,12,13- Trihydroxyoctadecadienoicacid	18.523	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	327.2180	327.2177	N	neg 1.06	229.144 (11 %), 211.1342 (22 %), 171.1027 (100 %)	14
50	Apigenin	19.205	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269.0463	269.0455	N	neg 2.79	269.0458 (58 %), 149.0246 (26 %), 117.0351 (100%)	14, 20, 19
51	Unknown	19.453	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	523.2342	523.2337	N	neg 0.77	461.2332 (41 %), 399.2332 (16 %), 329.1913 (15 %), 233.1182 (55 %), 215.1073 (100 %)	-
52	Desdimethyl-octahydro-iso-cohumulone	19.639	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	329.2334	329.2342	N	neg 2.38	229.1446 (40 %), 211.1342 (100 %)	35
53	Unknown	20.630	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	287.2232	287.2227	N	neg 1.63	287.2226 (100 %)	-
54	Unknown	20.940	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	359.0776	359.0772	N	neg 0.91	344.0538 (23 %), 329.0307 (100 %), 314.0068 (53 %), 286.0121 (94 %)	-
55	Unknown	22.180	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	569.2317	569.2392	N	0.07	479.2431 (35 %), 421.2016 (81 %), 403.1909 (44 %), 227.1067 (39 %)	-
56	Unknown	22.490	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	537.2708	537.2752	N	neg 0.17	387.1652 (100 %), 207.1017 (37 %), 89.0246 (16 %)	-
57	Unknown	22.738	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	329.2337	329.2333	N	neg 0.86	329.2331 (28 %), 201.1131 (99 %), 171.1027 (100 %)	-
58	Unknown	22.986	C <sub>34</sub> H <sub>38</sub> O <sub>12</sub>	637.2268	637.22	N	3.52	112.9658 (100 %)	-
59	Unknown	24.783	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	305.1755	305.1758	N	0.83	249.1497 (24 %), 135.0815 (100 %)	-

60	cirsimaritin	25.775	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	313.0716	313.0718	N	0.38	298.0474 (13 %), 284.028 (17 %), 283.0242 (100 %), 255.0294 (63 %)	23
61	3-Hydroxy-6,7, 4-trimethoxyflavone	26.333	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	343.0831	343.0823	N	neg 1.82	313.035 (54 %), 298.0113 (14 %), 285.0402 (77 %), 271.0198 (17 %), 270.0168 (100 %), 242.0213 (7 %)	15
62	Unknown	29.742	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	293.2124	293.2122	N	neg 0.57	275.2017 (34 %), 183.1388 (100 %)	-
63	Unknown	30.051	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	361.1995	361.2020	N	6.22	174.9682 (100 %)	-
64	Unknown	31.911	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	295.3285	295.2278	N	neg 2	295.2278 (64 %), 277.2175 (98 %), 195.1393 (100 %)	-
65	Unknown	32.035	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	295.2285	295.2278	N	neg 2.06	295.2278 (64 %), 277.2175 (98 %), 195.1393 (100 %)	-
66	Unknown	42.014	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	347.2208	347.2227	N	5.8	280.2365 (19 %), 279.2328 (100 %)	-

### 2-I- تحديد المحتوى الفينولي والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الهيدروكحولي AA-E

أدى تحليل المحتوى الفينولي بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu إلى قيمة ( للمستخلص AA-E GAE/g  $371.57 \pm 1.80$  mg ) في حين أن المحتوى الفلافونويدي لنفس المستخلص أعطى قيمة مقدره ب 41mg QEs/g و يمكن تفسير الفرق بين القيمتين لوجود نسبة عالية من الأحماض الفينولية بالمستخلص. كما بينت النتائج بوضوح أن المستخلص الكحولي لنبتة له تأثير واضح على اقتناص الجذور الحرة إذ يزداد النشاط القانص بزيادة التركيز. يرتبط هذا النشاط باحتواء هذا المستخلص على المركبات الفينولية القانصة للجذور الحرة مثل الفلافونويدات و الأحماض الفينولية.

### 3-I- النشاط المضاد للأكسدة

استنادا إلى اختبار الDPPH كان النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الهيدروكحولي AA-E (  $IC_{50}: 23.31 \pm 0.99$   $\mu$ g /mL ) جيدا مقارنة بالمعايير BHA (  $IC_{50}: 6.14 \pm 0.41$   $\mu$ g /mL ) , BHT (  $IC_{50}: 12.90 \pm 0.40$   $\mu$ g /mL ) و حمض ascorbic (  $IC_{50}: 14.00 \pm 2.00$   $\mu$ g /mL ). يمكن تفسير ذلك من خلال المحتوى الفينولي العالي (  $371.57 \pm 1.80$  mg/g ) , مثل حمض rosmarinic و مشتقاته (الجدول رقم 2-I). بالنسبة لاختبار  $ABTS^{+}$  assay النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص AA-E أعطى قيمة ل  $IC_{50}$  مقدره ب (  $IC_{50}: 11.31 \pm 2.00$   $\mu$ g /mL ) أقل بقليل من الشواهد BHA , (  $IC_{50}: 1.80 \pm 0.10$   $\mu$ g /mL ) و حمض ascorbic (  $IC_{50}: 1.74 \pm 0.10$   $\mu$ g /mL ) . عند اختبار superoxide DMSO القلوية للمستخلص AA-E أظهر هذا الأخير نشاطا أعلى (  $IC_{50}: 3.19 \pm 0.02$   $\mu$ g /mL ) من المعايير BHA (  $IC_{50}: >200$   $\mu$ g /mL ) و BHT (  $IC_{50}: >200$   $\mu$ g /mL ) و حمض ascorbic (  $IC_{50}: 7.59 \pm 1.16$   $\mu$ g / mL ) بينما عند اختبار CUPRAC assay نشاط المستخلص AA-E (  $A_{0.50}: 13.56 \pm 1.06$   $\mu$ g /mL ) قريبا من حمض ال ascorbic القياسي (  $A_{0.50}: 12.43 \pm 0.09$   $\mu$ g /mL ). ومع ذلك في الحد مقياسية القدرة reducing power assay (  $IC_{50}: 92.70 \pm 1.00$   $\mu$ g /mL ) و اختبار ferrous ions chelating (  $IC_{50}: 102.35 \pm 0.10$   $\mu$ g /mL ) و EDTA (  $IC_{50}: 6.40 \pm 0.40$   $\mu$ g /mL ) و (  $IC_{50}: 12.11 \pm 0.32$   $\mu$ g /mL ) على التوالي.

الجدول رقم 2-I: النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الكحولي لـ (*Ammoides atlantica* (AA-E)، قيم المحتوى الفينولي للفلافونويدات

المستخلص المعايير	DPPH assay	ABTS <sup>+</sup> assay	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> DMSO Alkaline assay	Ferrous ions Chelating assay	Reducing power assay	CUPRAC assay	المحتوى الكلي للفينولات	المحتوى الكلي للفلافونويدات
	IC <sub>50</sub> µg/mL			A <sub>0.50</sub> µg/mL			mg/g	
AA-E	23.31±0.99	11.31±2.00	3.19±0.02	102.35±0.10	92.70±1.00	13.56±1.06	371.57±1.80	41.02±6.00
BHA	6.14±0.41	1.80±0.10	>200	NA	7.99±1.87	6.62±0.05		
BHT	12.90±0.40	1.30±0.30	>200	NA	>200	9.62±0.87		
Ascorbic acid	14.00±2.00	1.74±0.10	7.59±1.16	NA	6.40±0.40	12.43±0.09		
EDTA	NT	NT	NT	12.11±0.32	NT	NT		

NT: not tested, NA: no absorbance

± SD ثلاث قياسات متوازية

#### خلاصة

تمكنا في هذه الدراسة ، من تنفيذ التنميط النباتي الكيميائي للمستخلص الهيدروكحولي للجزء الهوائي *Ammoides atlantica* باستخدام تقنية RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS و MS/MS في وضع التأين السلبي تم تحديد الوصف الكيميائي وفقاً لأطياف LC - MS / MS تم الكشف عن 66 مركب كيميائي. من بين هذه ، تم تحديد 45 مركباً : 26 حمض هيدروكسي سيناميك ومشتقاته ، 4 أحماض هيدروكسي بنزويك، 11 فلافون و 3 فلافونول. كما أظهر المستخلص الهيدروكحولي نشاطاً عالياً مضاداً للأكسدة اتجاه DMSO و CUPRAC مقارنة بالشواهد BHA، BHT و حمض الأسكوربيك.

## المراجع

- [1] Ammar, S., Contreras ,M.M., Gargouri, B., Segura-Carretero, A., Bouaziz , M. (2017). RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential Oleaeuropaea by-product “wood” and its comparison with leaf counterpart. *Phytochemical analysis*. 28(3), 217–219.
- [2] Fabre, N., Rustan ,I., De Hoffmann ,E., Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol , and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 12(6),707–715.
- [3] Noui, A., Boudiar,T., Bakhouch, A., Contreras , M.D.M., Lozano-S\_anchez, J., Segura-Carretero, A., Laouer, H., Akkal, S. (2017). Chemical characterization of polyphenols from *Daucus muricatus* growing in Algeria by RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Research*.1–6. doi:10.1080/14786419.2017.1371162VOLUME
- [4] Zhang, L., Xu, L., Ye, Y-h., Zhu, M-F., Li, J., Tu, Z-C., Yang, S-h., Liao, H. (2019). Phytochemical profiles and screening of a-glucosidase inhibitors of four *Acer* species leaves with ultra-filtration combined with UPLC-QTOF-MS/MS. *Industrial*.
- [5] Zhang, L., Tu, Z-C., Yuan, T., Wang, H., Fu, Z-F., Wen, Q-h., Wang, X-Q. (2014). Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz. *Industrial Crops and Products*. 56, 223–230.
- [6] Contreras, M.D.M., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., G\_Alvez, J., Segura-Carretero, A. (2018). Phytochemical profiling of anti-inflammatory Lavandula extracts via RP-HPLC-DAD-QTOF-MS and -MS/MS: assessment of their qualitative and quantitative differences. *Electrophoresis* .39(9–10):1284–1293.
- [7] Parejo, I., Jauregui, O., S\_anchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2004). Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5295(12), 3679–3687.
- [8] Plazoni\_c, A., Bucar, F., Male\_s, Z., Mornar, A., Nigovi\_c, B., Kujund\_zi\_c, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpus* L.), using highperformance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*. 14(7), 2466–2490.
- [9] Mekky, R.H., Contreras, M, D.M., El-Gindi, M.R., Abdel-Monem, A.R., Abdel-Sattar, E, Segura-Carretero, A. (2015). Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian

- cultivars of chickpea (*Cicerarietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study. *RSC Advances*. 5(23), 17751–17767.
- [10] Pan, S., Jun-Li, H., Gang, W., Bo-Yang, Y., Min-Jian, Q. (2010). Analysis of flavonoids and phenolic acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 8(3), 202–207.
- [11] Ma YL, V., Den Heuvel, H., Claeys, H. (1999). Characterization of 3-methoxy flavones using fast-atom bombardment and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 13(19),1932–1942.
- [12] Abaza, L., Taamalli, A., Arr\_aez-Rom\_an, D., Segura-Carretero, A., Fern\_andez-Gutierr\_erez, A., Zarrouk, M.,Ben Youssef, N. (2017). Changes in phenolic composition in olive tree parts according to developmentstage. *Food Research International*. 100, 454–461.
- [13] Jim\_enez-S\_anchez, C., Lozano-S\_anchez, J., Rodr\_iguez-P\_erez, C., Segura-Carretero, A., Fern\_andez-Guti\_erre, A. (2016). Comprehensive , untargeted, and qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS2 metabolite profiling of green asparagus (*Asparagus officinalis*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 46, 78–87.
- [14] Maria, I. D., Lillian, B., Montserrat, D., Eliana, P., Ana Maria, C.,Rita, C., Alves, M., Beatriz, P.P., Oliveira, C., Santos-BuelgacIsabel, C.F.R. Ferreira. (2013) .Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction.*Food Chemistry* . Dec 15;141(4):4152-60.
- [15] Jian, H., Min, Y., Xue, Q., Man, X.,Bao-rong, W., De-An, G. (2008). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47, 516–525.
- [16] Jaiswal, R., Karaköse,H., Rühmann, S., Goldner, K.,Neumüller, M., Treutter, D., Kuhnert, N. (2013). Identification of Phenolic Compounds in Plum Fruits (*Prunussalicina* L. and *Prunus domestica* L.) by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Characterization of Varieties by Quantitative Phenolic Fingerprints. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 12020–12031.
- [17] Cádiz-Gurrea, M.d.l.L., Fernández-Arroyo, S., Joven,J., Segura-Carretero A. (2013).Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngiumbourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities.*Food Research International*. 50, 197–204.

- [18] Yang, Y., Hong-Jie, W., Jian, Y., Adelheid, H. Brantnerb, Agnieszka, D. Lower, N., Nan S., Jian-Fang, S., Bing, B., Hai-Yu, Z., Bao-Lin, B. (2013). Chemical profiling and quantification of Chinese medicinal formula Huang-Lian-Jie-Du decoction, a systematic quality control strategy using ultra high performance liquid chromatography combined with hybrid quadrupole-orbitrap and triple quadrupole mass spectrometers. *Journal of Chromatography A*. 1321, 88–99.
- [19] Vallverdu-Queralt, A., Regueiro, J., Martinez-Huelamo, M., Alvarenga J.F.R., Neto Leal, L., Rosa, M., Lamuela-Raventos. (2014). A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry* .154, 299–307.
- [20] Rameshkumar, A., Sivasudha, T., Jeyadevi, R., Sangeetha, B., Smilin Bell Aseervatham, G., Maheshwari M. (2013). Profiling of phenolic compounds using UPLC–Q-TOF-MS/MS and nephroprotective activity of Indian green leafy vegetable *Merremia emarginata* (Burm. f). *Food Research International*. 50, 94–101.
- [21] Rosa Quirantes-Pine´ \_David Arra´ ez-Roma´ n Antonio Segura-Carretero Alberto Fernandez-Gutierrez. (2010) . Characterization of phenolic and other polar compounds in a lemon verbena extract by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 33, 2818–2827.
- [22] Benno, F., Zimmermann, Stephan, G., Walch, Laura Ngaba Tinzoh, Wolf Stühlinger, Dirk, W., Lachenmeier. (2011). Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Journal of Chromatography B*. 879, 2459–2464.
- [23] Mohammad, B., Hossain, Dilip, K., RAI, Nigel, P., Bruneton, Ana, B., Martin-Diana, Catherine Barry-Ryan. (2010). Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 10576–10581.
- [24] Ibrahim, M. Abu-Reidah, Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC–DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry* .141, 2269–2277.
- [25] Gouveia, S., Paula, C., Castilho. (2011). Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD-ESI-MS<sup>n</sup> method. *Food Chemistry*. 129, 333–344.
- [26] López-Gutiérrez, N., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Vidal, J.L.M. (2014). Identification and quantification of the main isoflavones and other phytochemicals in soy

based nutraceutical products by liquid chromatography–orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1348, 125–136.

[27] Louaar, S., Akkal, S., Bayet, C., Laouer, H., Guilet, D . (2008). Flavonoids of aerial parts of an endemic species of the apiaceae of algeria, *Ammoides atlantica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 44. 4.

[28] Ozarowski, M., Przemyslaw, L. Mikolajczak , Bogacz,A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynys-Liebert, J., Piasecka, A., Napieczynska, H., M., Szulc , Radoslaw Kujawski , Bartkowiak-Wieczorek,J.,Cichocka, J., Bobkiewicz-Kozłowska,T., Czerny,B. , Przemyslaw M. Mrozikiewicz . (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* .91, 261–271.

[29] Cvetkovikja, I., Stefkova, G., Acevskab, J., Petreska Stanoevac, J., Karapandzovaa, M., Stefovaca, M., Dimitrovskab, A., Kulevanova, S. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *Journal of Chromatography A*. 1282, 38– 45.

[30] Tuncay Agar, O., Dikmen, M., Ozturk, N., Yilmaz, M.A.,Temel, H., Pinar Turkmenoglu, F . (2015).Comparative Studies on Phenolic Composition, Antioxidant,Wound Healing and Cytotoxic Activities of Selected *Achillea* L.Species Growing in Turkey. *Molecules*. 20, 17976-18000.

[31] Almela, L.,S´anchez-Mu˜noz,B., Jos´e A., Fernandez-L´opez., Maria J. Roca., Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A* .1120, 221–229.

[32] Vassiliki, G., Kontogianni, Goran Tomic., Ivana Nikolic., Alexandra, A., Nerantzaki, Nisar Sayyad., Stanislava Stosic-Grujicic., Ivana Stojanovic., Ioannis, P., Gerothanassis, Andreas, G. Tzakos . (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*. 136, 120–129.

[33] Ferran Sanchez-Rabaneda, F., Jauregui,O., Casals,I., Andre´ s-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido,M., Rosa, M. Lamuela-Ravento. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*. 38, 35–42.

---

[34] Pellati, F., Orlandina, G., Pinetti, D., Benvenutia, S. (2011). HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis Extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 55, 934–948.

[35] Andres-Iglesias, C., Carlos, A., Blanco, J., Montero, O. (2014). Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers. Food Chemistry .157, 205–212.

# الفصل الثاني

المركبات المفصولة من النبتة

*Ormenis mixta*

ودراسة الفعالية المضادة للتكاثر

## II-المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis mixta*

### II-1-التعين البنوي للمركب 1 :

تحصلنا على المركب 1 بشكل مسحوق بلوري أبيض. سمحت لنا دراسة مطيافية الكتلة ESI-MS الحصول على الصيغة الجزيئية  $C_{15}H_{22}O_6$  ، و التي تقودنا إلى وجود 5 روابط غير مشبعة. حيث يظهر الطيف ESI-MS قمة جزيئية عند  $m/z$  299.1498 الموافقة  $[M + H]^+$  (الكتلة المحسوبة 299.1494)، كما عند  $m/z=281$  و عند  $m/z=263$  الموافقة على التوالي ل  $[M + H-H_2O]^+$  و  $[M + H-H_2O]$  و هو ما يشير إلى وجود مجموعات هيدروكسيلية.

يشير طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون  $^{13}C$  RMN- ( الشكل 1-II ) (الجدول 1-II) إلى وجود مجموعة الكربوكسيل و غياب إشارات ذات التهجين  $sp^2$  مما يؤدي إلى امتلاك بنية رباعية الحلقة (tetracyclic).

يبين طيف الكربون  $^{13}C$  RMN- ( الشكل 1-II) (الجدول 1-II) و طيف HSQC ( الشكل 2-II) للمركب 1 وجود 15 ذرة كربون حيث يسمح تحديد نوعها وفقا لإزاحتها الكيميائية حيث نجد كربونين مثيلين (-CH<sub>2</sub>-) جميعها مهجنة  $sp^3$ ، 4 كربونات رباعية منها واحد على شكل كربونيل (C=O) عند الإشارة

$\delta_c=181$  ppm ، و هو كربون مميز ل  $\gamma$  لاكتون سسكويتربيني مشبعة، 6 مجموعات CH ذات تهجين

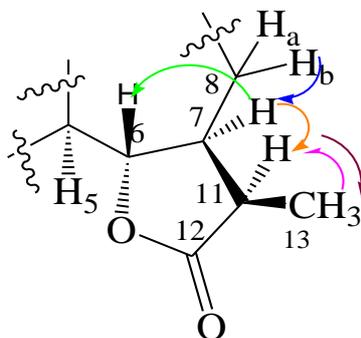
$sp^3$  منها كربون عند الإشارة  $\delta_c = 83.6$  ppm مميز لكربون غلق الحلقة الاكتونية ، بالإضافة إلى 3 مجموعات مثيل CH<sub>3</sub>.

و تقود مقارنة هذه الانزياحات الكيميائية الكربونية بتلك الكربونات الخاصة بسسكوترين guainolide البيبليوغرافية تؤكد أن المركب 1 يشارك بنفس العدد الكربوني [1].

كما يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون  $^1H$  RMN- ( الشكل 3-II) وجود إشارة ثنائية بتكامل 3H عند الإزاحة  $\delta_H = 1.18$  ppm بثابت تزواج قدره بـ  $(J = 6.8$  Hz) موافقة لبروتونات المثيل H-13 وإشارتين أحاديتين بتكامل 3H موافقتين لكل من المثيل H-14 ( $\delta_H = 1.02$  ppm) والمثيل H-15 ( $\delta_H = 1.48$  ppm) التي سنعود للتأكيد عليها فيما بعد.

وجود مجموعة  $\alpha$ -ميثيل- $\gamma$ -لاكتون (حلقة C) من خلال إشارات مميزة في كل من طيف البروتون إشاراته التي لوحظت عند  $\delta_H = 4.05$  ppm على شكل ثلاثي بتكامل 1H ( $t, J = 10.0$  Hz) الموافق للبروتون H-6، إشارة على شكل متعدد عند 2.28ppm بتكامل 1H ( $m, 1H$ ) الموافق للبروتون H-7، إشارة على شكل متعدد عند 2.32ppm بتكامل 1H ( $m, 1H$ ) الموافق للبروتون H-11، عند 1.18ppm إشارة ثنائية بتكامل 3H ( $d, J = 6.8$  Hz) الموافق للبروتونات H-13 ( الشكل 3-II) و مما يؤكد هذه

الاسنادات دراسة طيف تجربة COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) (الشكل II-4) الذي يظهر بقع تعالق بين البروتون H-7 و H-6 ، و بقعة تعالق بين H-7 و H-11 و بين H-11 و H-13 . و من ناحية أخرى نستطيع تحديد H-8b عند 1.56ppm لتعاقفه مع H-7 عند 2.28 ppm ، ثم تحديد على التوالي H-8a و H-9a و H-9b على طيف COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) و بالرجوع إلى إشارة H-6 نستطيع تحديد H-5 و الذي تظهر إشارته على شكل ثنائي عند 2.77 ppm على نفس الطيف (الشكل II-5) .

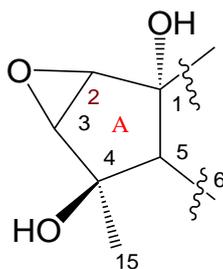


الشكل II-5 : مختلف تعالقات COSY لهيكل المركب 1

يظهر طيف HMBC (الشكل II-6) بقعة تعالق بين البروتون H-5 والكربون المميز لغلق الحلقة اللاكتونية المذكورة أعلاه ، و عليه فإن هذا اللاكتون مغلق في الكربون C-6 .  
مكننا طيف HSQC (شكل II-2) من ربط كل البروتونات السابقة بالكربونات الحاملة لها من خلال تعاقفها على التوالي بالإشارة عند 83.6ppm الموافقة للكربون C-6 و إشارة عند 49.4 ppm الموافقة للكربون C-7 و إشارة عند 42.0 ppm الموافقة للكربون C-11 و إشارة عند 11.3ppm الموافقة للكربون C-13 .  
عند الإشارتين 1.86ppm و 1.56ppm أسندا كل من البروتونين H-8a و H-8b على الترتيب ، على نفس الطيف (شكل II-4) مكننا تحديد البروتونين H-8a و H-8b من تحديد إشارتين موافقتين إلى البروتونين H-9a و H-9b واللتي تظهران عند 1.82 ppm و 1.72 ppm و أسندا إلى الكربونين C-8 ( $\delta_c = 24.6\text{ppm}$ ) و C-9 ( $\delta_c = 39\text{ppm}$ ) على الترتيب، الحاملتين هذه البروتونات اعتمادا على طيف HSQC (شكل II-2) .

- ظهور إشارات عند كل من  $\delta_c = 59.2$  ppm الموافقة للكربون (C-3) و  $\delta_c = 56.9$  ppm الموافقة للكربون (C-2) تشير إلى مجموعة الايبوكسيد عند هاته المواقع.

في طيف HSQC (الشكل II-2) هذه الاشارات تتعالق مع البروتونات عند  $\delta_H$  3.64 ppm (1H,d, $J=1.0\text{Hz}$ ) الموافقة للبروتون H-2 و عند  $\delta_H$  3.38ppm (1H,d, $J=1.0\text{Hz}$ ) الموافقة للبروتون H-3 على التوالي تعطي بروتونات Cis-époxyde [1].



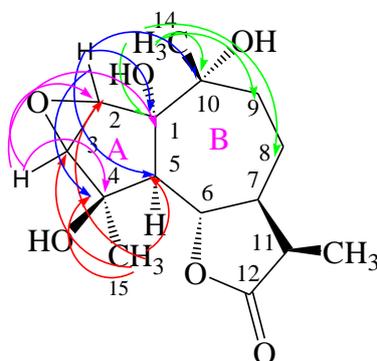
الشكل 7-II: بنية الحلقة الخماسية

تدل الانزياحات الكيميائية للكربونين C-2 و C-3 و البروتونين H-2 و H-3 على أن التوجيه الفراغي من نوع  $\beta$  [1].

يظهر طيف  $^{13}\text{C}$ -RMN ( الشكل 1-II ) إشارة عند  $\delta_{\text{C}} = 181\text{ppm}$  الموافقة للكربون C-12 وبالإضافة إلى ذلك، ظهرت خمسة إشارات تشير إلى كربونات مؤكسجة عند كل من :  $\delta_{\text{C}} = 56.9\text{ppm}$  ،  $\delta_{\text{C}} = 59.2\text{ppm}$  ،  $\delta_{\text{C}} = 72.4\text{ppm}$  ،  $\delta_{\text{C}} = 72.6\text{ppm}$  و  $\delta_{\text{C}} = 79.1\text{ppm}$  الموافقة للكربونات C-2، C-3، C-4، C-10 و C-1 على التوالي .

على طيف HMBC (الشكل II-6) أعطت بروتونات (Me-15) عند  $1.48\text{ppm}$  بقع تعالق مع الكربونات C-4، C-3، C-2، C-5 للحلقة A. كما أعطت بروتونات (Me-14) عند  $1.02\text{ppm}$  بقع تعالق مع الكربونات C-8، C-9، C-10 و C-1 للحلقة B و كذلك بقعة تعالق بعيدة المسافة مع الكربون C-2. و بين الإشارة H-9 عند  $1.82\text{ppm}$  و الكربونات C-1، C-7، C-8 و C-10.

على نفس طيف HMBC يعطي البروتون H-2 ( $\delta_{\text{H}} 3.64\text{ppm}$ ) بقع تعالق مع كل من الكربونات (C-4) ( $\delta_{\text{C}} = 72.6\text{ppm}$ ) ، (C-3) ( $\delta_{\text{C}} = 72.6\text{ppm}$ ) و (C-10) ( $\delta_{\text{C}} = 72.4\text{ppm}$ ) كما يعطي البروتون (H-3) ( $3.38\text{ppm}$ ) بقع تعالق مع كل من الكربونات (C-1) ( $\delta_{\text{C}} 79.1\text{ppm}$ )، (C-4) ( $\delta_{\text{C}} 72.6\text{ppm}$ )، (C-2) ( $\delta_{\text{C}} 56.9\text{ppm}$ )، و تشير هذه المعطيات إلى وجود حلقة خماسية تحتوي كل من C-2 و C-3 (الشكل II-8).



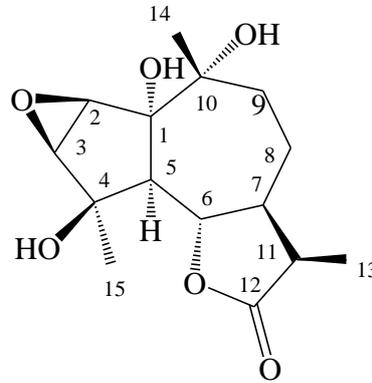
الشكل 8-II: بعض تعالقات HMBC للمركب 1

تؤكد أطياف COSY، HMBC، HSQC وجود نفس التركيبة للحلقتين A و B عند achillinin A [1] من خلال تشابه الإشارات المتعلقة بها، لكن هذه الأطياف تشير إلى أن حلقة الاكتون (C) كانت نقطة الاختلاف بين المركبين بسبب عدم وجود رابطة مزدوجة بين الكربونين C-11 و C-13 ( $\Delta^{11,13}$ ) في المركب 1.

كما بين التحليل المقارن بين أطياف COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) و 1D-TOCSY (الشكل 9-II) كيفية بناء المركب 1. و دراسة ثوابت الاقتران مقارنة بالدراسة البيبلوغرافية [2].

بمقارنة قيم التزاوج للبروتونات و الإزاحات الكيميائية لكربونات المركب 1 مع المركب الذي عزل من قبل وهو achillinine A نجد أنه باستثناء الكربونات المجاورة للرابطة الثنائية C-11 و C-13 كل الإزاحات الكيميائية للكربونات مدونة في الجدول (11-II) [3]. للمركب 1 على الترتيب متقاربة جدا مع نظيرتها للمركب achillinine A و بالتالي تكون الكيمياء الفراغية ذاتها بالنسبة للمراكز المعنية في كلا المركبين.

تجميع هذه النتائج المتحصل عليها من التجارب المختلفة للرنين النووي المغناطيسي الأحادي البعد ( $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ ،  $\text{RMN-}^1\text{H}$ ) و الثنائي البعد ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ، COSY، HSQC، HMBC، 1D-TOCSY) يؤكد أن الصيغة للمركب 1 هي :  $2\beta,3\beta$  epoxy- $1\alpha,4\beta,10\alpha$ -trihydroxyguain-12,  $6\alpha$ -olide



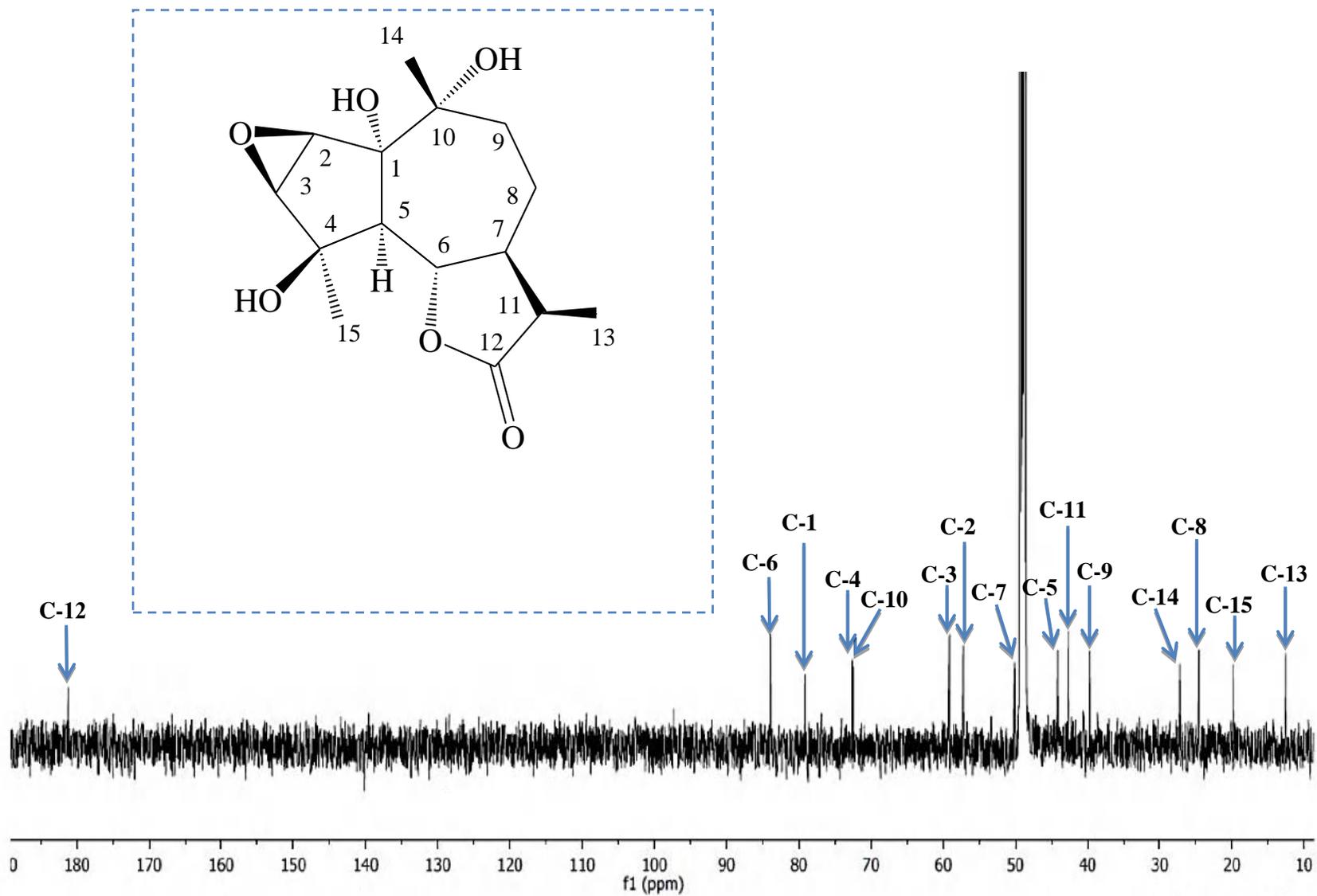
الشكل 10-II :  $2\beta,3\beta$  -époxy- $1\alpha,4\beta,10\alpha$ -trihydroxyguain-12,  $6\alpha$ -olide

كل النتائج السابقة مدونة في الجدول 1-II.

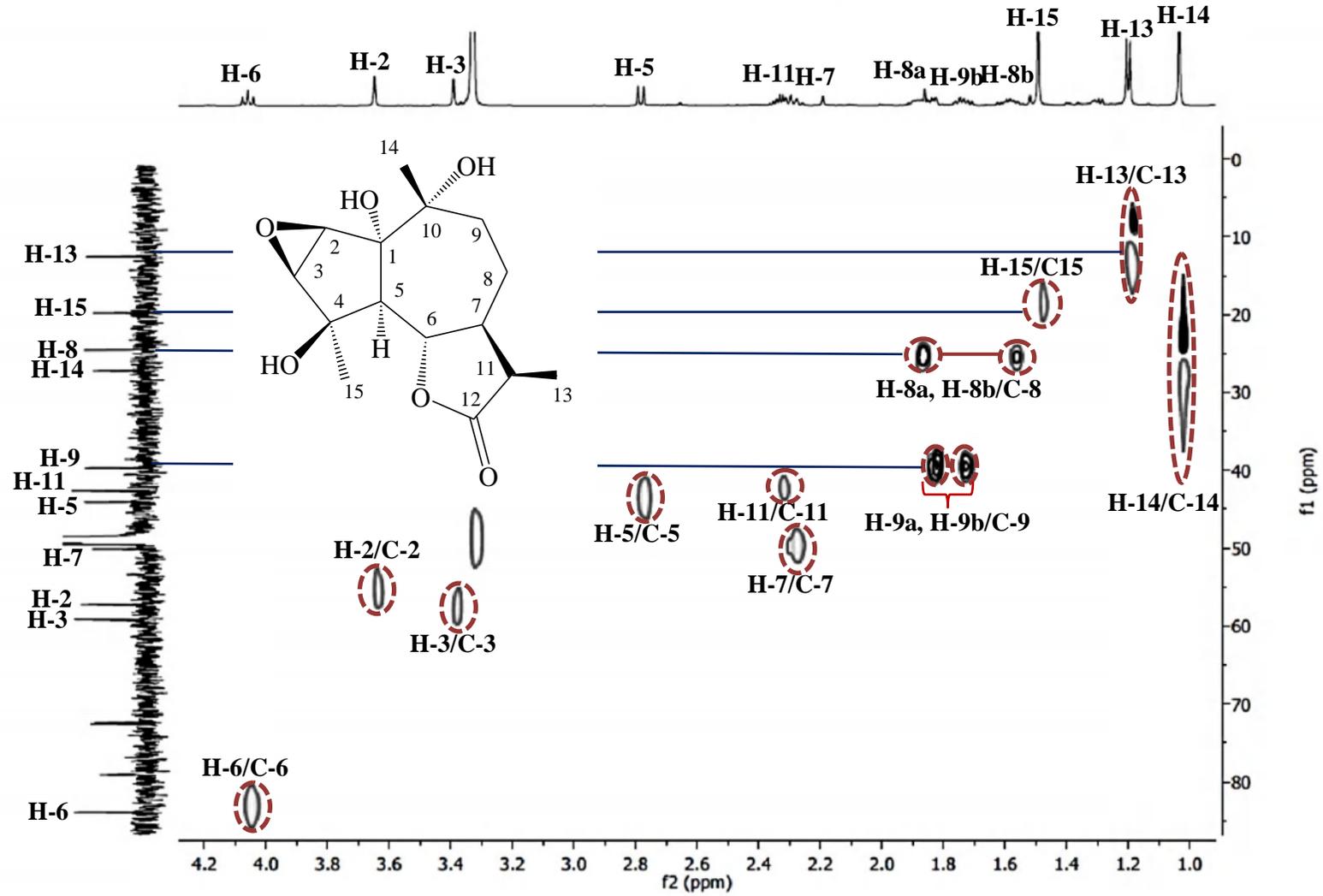
الجدول 1-II: المعطيات الطيفية لل RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz,  $\delta$ ; ppm,  $J$ ; Hz) وال RMN-<sup>13</sup>C

(150 MHz,  $\delta$ ; ppm,  $J$ ; Hz) للمركب 1 في ال-CD<sub>3</sub>OD

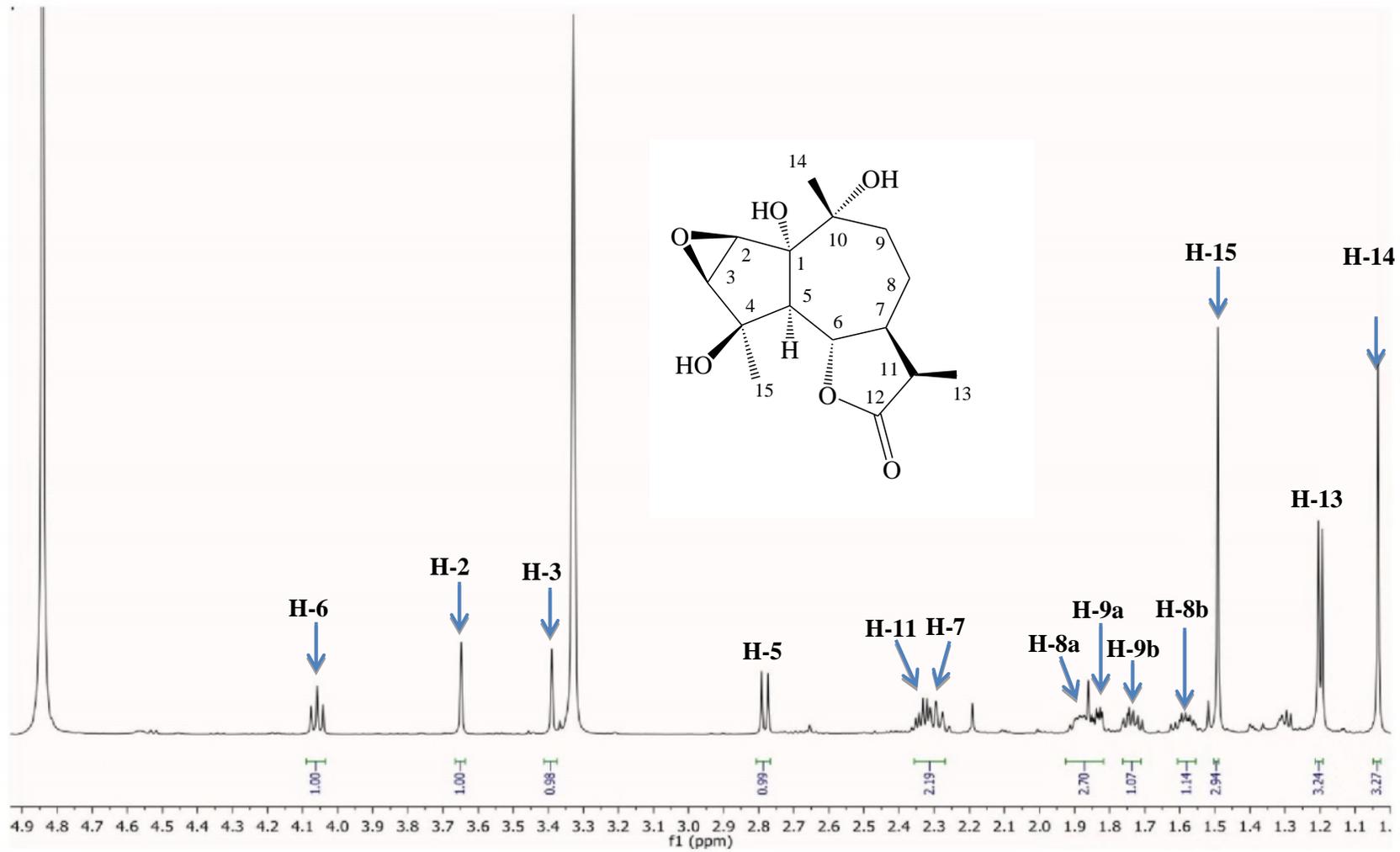
المركب 1		الموضع
$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) ( m, $J$ Hz)	
79.1	-	1
56.9	3.64 s	2
59.2	3.38	3
72.6	-	4
43.2	2.77 d(10.0)	5
83.6	4.05 t(10.0)	6
49.4	2.28 m	7
24.6	1.86 m	8a
-	1.56 m	8b
39.0	1.82 m	9a
-	1.72 m	9b
72.4	-	10
42.0	2.32 m	11
181.0	-	12
11.3	1.18 d (6.8)	13
26.8	1.02( s)	14
18.6	1.48 (s)	15



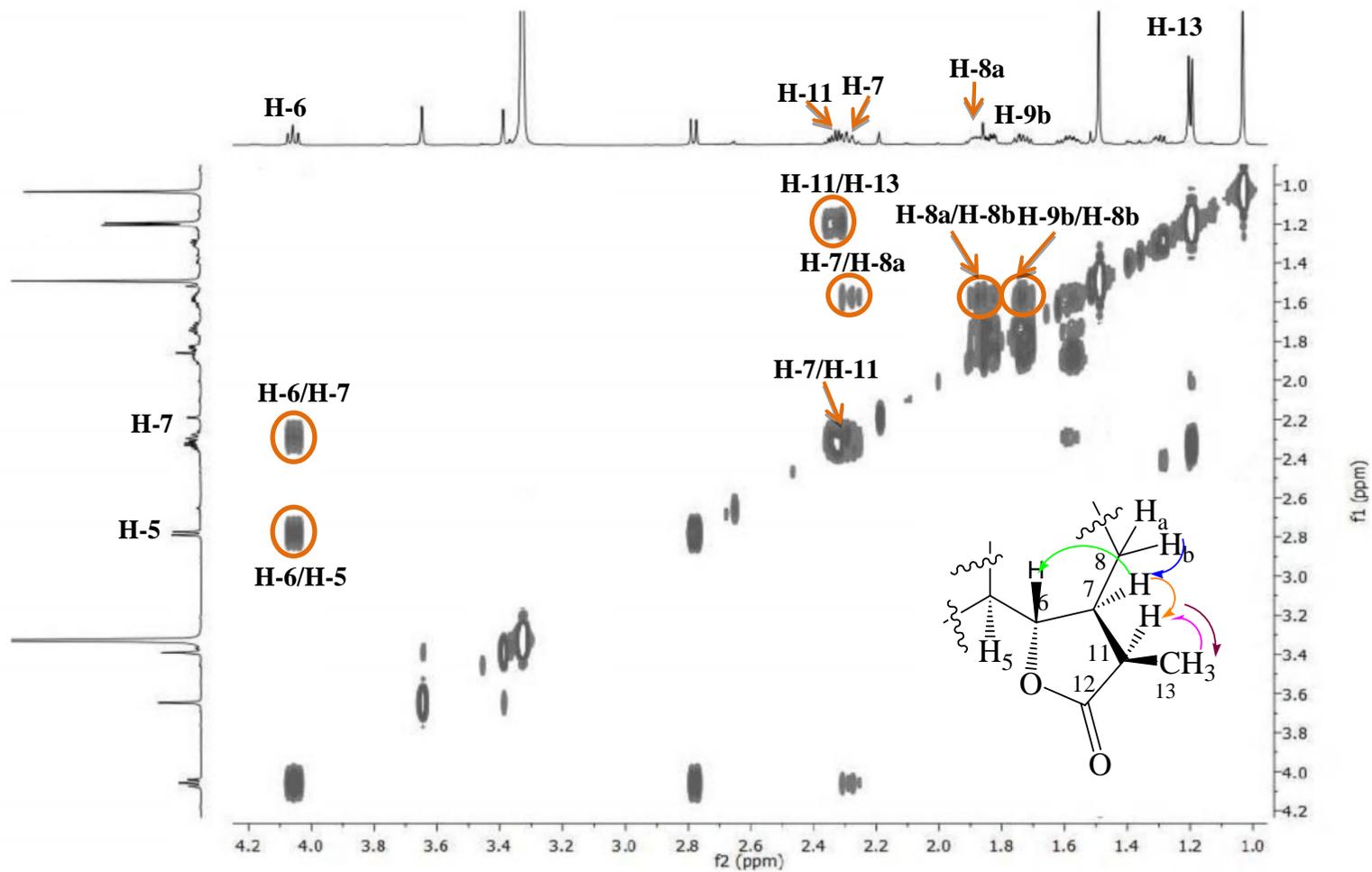
شكل رقم 1-II : طيف ال<sup>13</sup>C-RMN للمركب 1 في ال(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



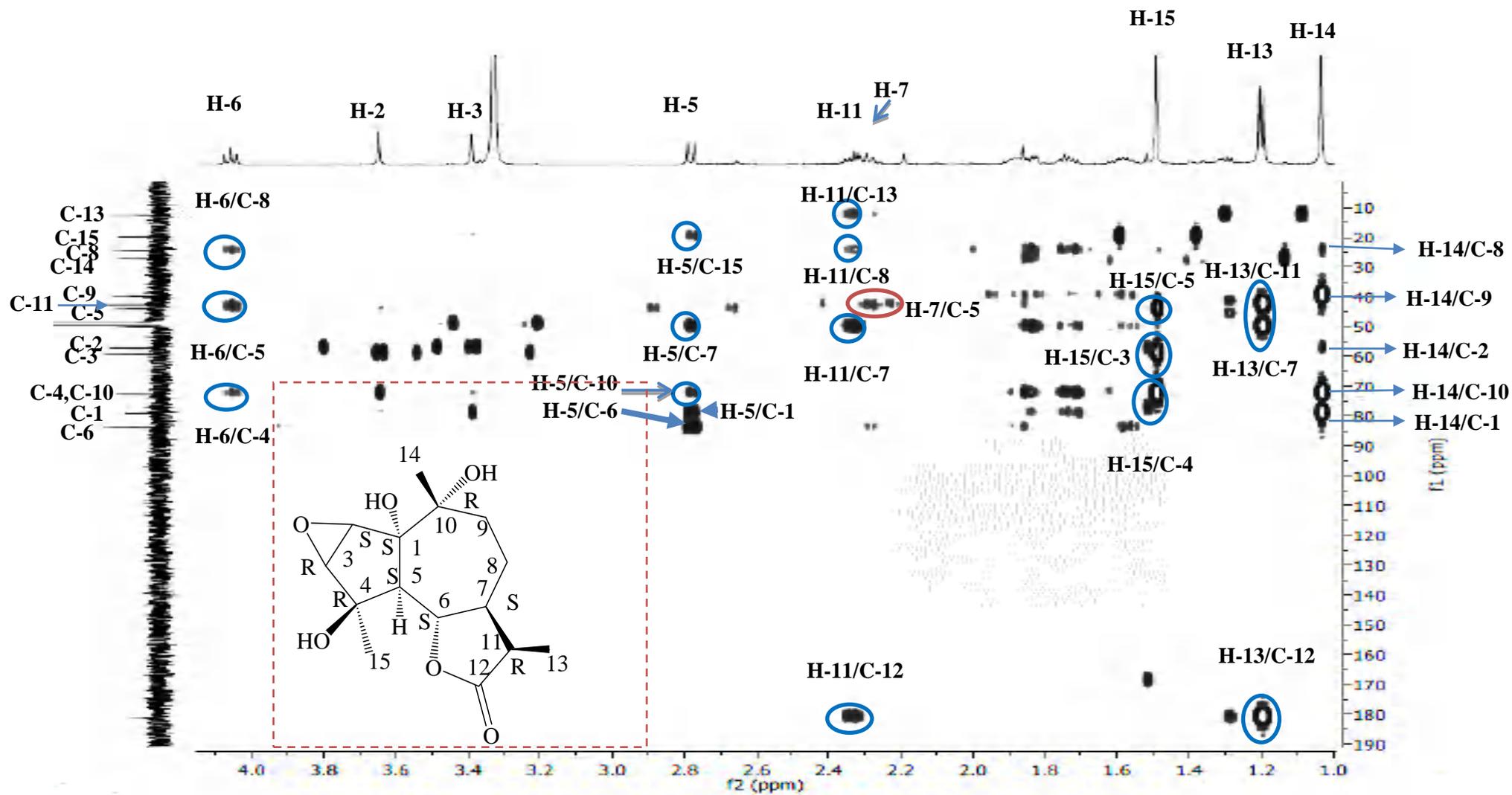
الشكل 2-II : طيف HSQC للمركب 1 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



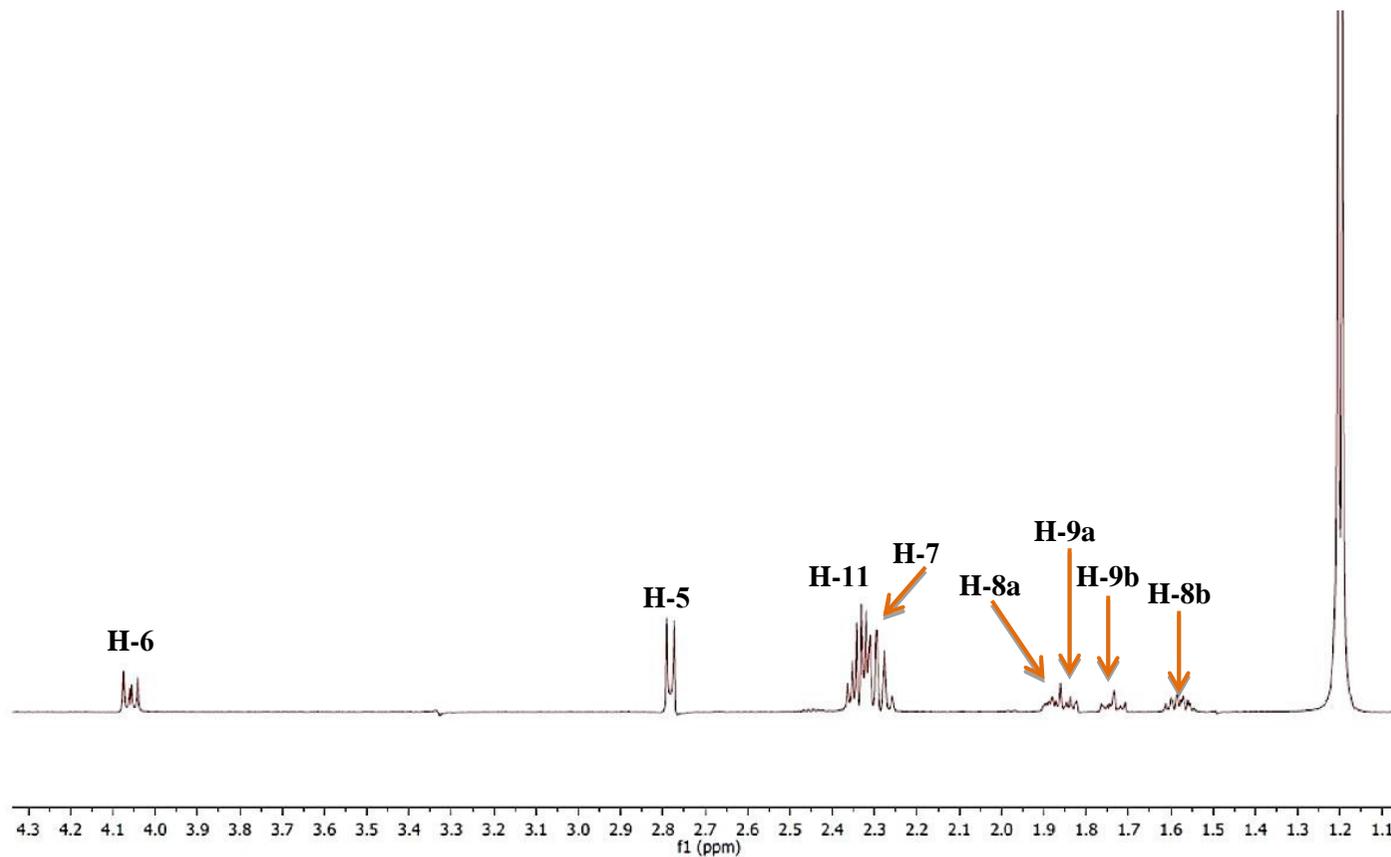
شكل رقم 3-II : طيف ال $^1\text{H}$ -RMN للمركب 1 في ال (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



الشكل 4-II: طيف ال COSY للمركب 1 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل 6-II : طيف الHMBC للمركب 1 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



شكل رقم 9-II : طيف 1D-TOCSY للمركب 1 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

## II-2-التعين البنوي للمركب 2 :

تحصلنا على المركب 2 بشكل مسحوق بلوري أبيض. سمحت لنا دراسة مقارنة الأطياف التي حصلنا عليها بما فيها طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و الكربون ( $^{13}\text{C}$ -RMN,  $^1\text{H}$ -RMN) و مطيافية الكتلة ESI-MS الحصول على الصيغة الجزيئية  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_6$  ، و التي تقودنا إلى وجود 5 روابط غير مشبعة.

أظهر الطيف ESI-MS قمة جزيئية عند  $m/z$  299.1490 الموافقة  $[\text{M} + \text{H}]^+$  ، كما عند  $m/z=281$  و عند  $m/z=263$  الموافقة على التوالي ل  $[\text{M} + \text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  و  $[\text{M} + \text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}]^+$  و هو ما يشير عن وجود مجموعات هيدروكسيلية.

أظهرت أطياف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و الكربون ( الجدول 2-II) للمركب 2 أوجه تشابه مع المركب 1 باستثناء الانزياح الكيميائي ل C-2، C-3، C-5، C-13 و C-15 مما يشير إلى أن المركب 2 مماكب للمركب 1 .

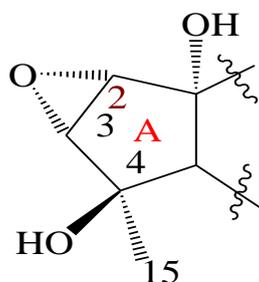
أظهر طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون  $^{13}\text{C}$ -RMN للمركب 2 ( الشكل 11-II, 12-II ) وجود 15 إشارة ، جاءت على شكل 3 مجموعات مثيل ( $\text{CH}_3$ ) ذات تهجين  $\text{sp}^3$  ، مجموعتين الميثيلين ( $\text{CH}_2$ ) ذات تهجين  $\text{sp}^3$  غير مؤكسجة عند كل من الإشارات  $\delta_c=24.0$  ppm و  $\delta_c=35.6$  ppm ، 4 كربونات رباعية مستبدلة مع مجموعة الهيدروكسيل ومجموعة الكربوكسي بما فيها كربون لاكتون واحد الذي يظهر عند  $\delta_c=181.5$  ppm مميزة ل  $\gamma$  لاكتون سسكويتريني مشبعة، 6 مجموعات مئين (CH) منها ثلاث مجموعات تحمل ذرة الأكسجين ذات تهجين من نوع  $\text{sp}^3$  ومنها مجموعة واحدة عند  $\delta_c=81.0$  ppm مميزة لكربون غلق الحلقة الاكتونية .

طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون ( الشكل 11-II) (الجدول 2-II) أكد وجود مجموعة الكربوكسيل في غياب التهجين  $\text{sp}^2$  مما أدى إلى امتلاك بنية رباعية tetracyclic. و هذه المعطيات توافق مركب سيسكويتريني لاكتون من نوع guainolide [1].

يظهر طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون  $^1\text{H}$ -RMN (الشكل 13-II) كذلك وجود إشارة ثنائية بتكامل 3H عند  $\delta_H=1.19$ ppm بثابت تزواج قدره ( $J = 6.8$  Hz) موافقة للبروتون H-13 وإشارتين أحاديتين موافقتين لكل من البروتونات H-14 ( $\delta = 1.08$ ppm) و H-15 ( $\delta = 1.49$ ppm). من خلال هذه المعطيات نستنتج أن ذرات الكربون C-13 ، C-14 و C-15 للهيكال السيسكويتريني اللاكتوني عبارة عن  $\text{CH}_3$  كل نتائج هذا الطيف مدونة في الجدول 2-II.

طيفا COSY و 1D-TOCSY أعطوا روابط مثبتة من H-9 إلى H-5 في الحلقة B و من H-13 إلى H-7 في حلقة لاكتون.

وجود حلقة الايبوكسي الممثلة بواسطة إشارتي المئين عند كل من  $\delta_c = 64.8$  ppm الموافقة ل(C-3) ،  $\delta_c = 62.7$  ppm و الموافقة للكربون (C-2) في طيف  $^{13}C$ -RMN (الشكل II-12) تم إسناد هاتين الإشارتين من خلال تعالقات إشارة C-3 بإشارة H-15 وإشارة C-2 بإشارة H-14 في طيف HMBC (شكل II-14) ، ويؤدي هذا الاستنتاج إلى إسناد إشارتين أحاديتين عند كل من  $\delta_H = 4.11$  ppm الموافقة للبروتون H-3 (H-3, 1H, s) و  $\delta_H = 3.87$  ppm الموافقة للبروتون H-2 (H-2, 1H, s) في طيف HSQC (الشكل II-16). وجود كربونات الكربينول الرباعية عند كل من  $\delta_c = 80.0$  ppm ،  $\delta_c = 73.4$  ppm و  $\delta_c = 72.7$  ppm الموافقة ل-C-1 ، C-4 و C-10 في طيف الكربون ، كما أن معطيات طيف HMBC للمركب 2 متشابهة مع التي تخص المركب 1 و بالتالي تشير إلى وجود حلقة خماسية مكونة من 2,3-époxy-1,4-dihydroxy [1] (الشكل II-17).

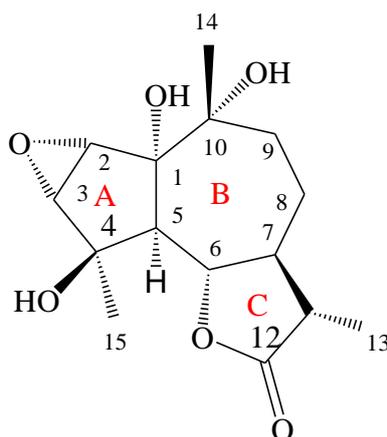


الشكل II-17 : بنية الحلقة الخماسية

أطياف COSY (الشكل II-18) ، HSQC (الشكل II-16) ، HMBC (الشكل II-14) و 1D-TOCSY (الشكل II-19) تؤكد وجود نفس التركيبة للحلقتين A و B مثل A achillinine [1] ، لكن هذه الأطياف أشارت إلى أن حلقة الاكتون كانت نقطة الاختلاف بين المركبين بسبب عدم وجود رابطة مزدوجة بين الكربونين C-11 و C-13 ( $\Delta^{11,13}$ ) في المركب 2.

كما تم تحديد التشكيل النسبي للمركب 2 انطلاقاً من الانزياحات الكيميائية للبروتونات ، ثوابت الاقتران. يؤدي ظهور الانزياحات الكيميائية للكربونين C-2 و C-3 عند  $\delta_c = 62.7$  ppm و  $\delta_c = 64.8$  ppm على التوالي و البروتونين H-2 و H-3 عند  $\delta_H = 4.12$  ppm و  $\delta_H = 3.87$  ppm في مجال منخفض للحقل المغناطيسي بالنسبة للمركب 2 إلى تحديد التشكيل النسبي للحلقة الثلاثية بأنها  $\alpha,3\alpha$  - époxy 2 مغايراً ل  $\beta,3\beta$  epoxy المتشكل في مركب achillinine و المركب 1 و كذلك نستدل على ظهور الانزياح الكيميائي للكربون C-13 عند 14 ppm بأن المثل Me-13 باتجاه  $\alpha$  .

كل هذه المعطيات المدونة نتائجه في الجدول II-2 تسمح لنا باقتراح البنية النهائية للمركب 2 (الشكل II-20).

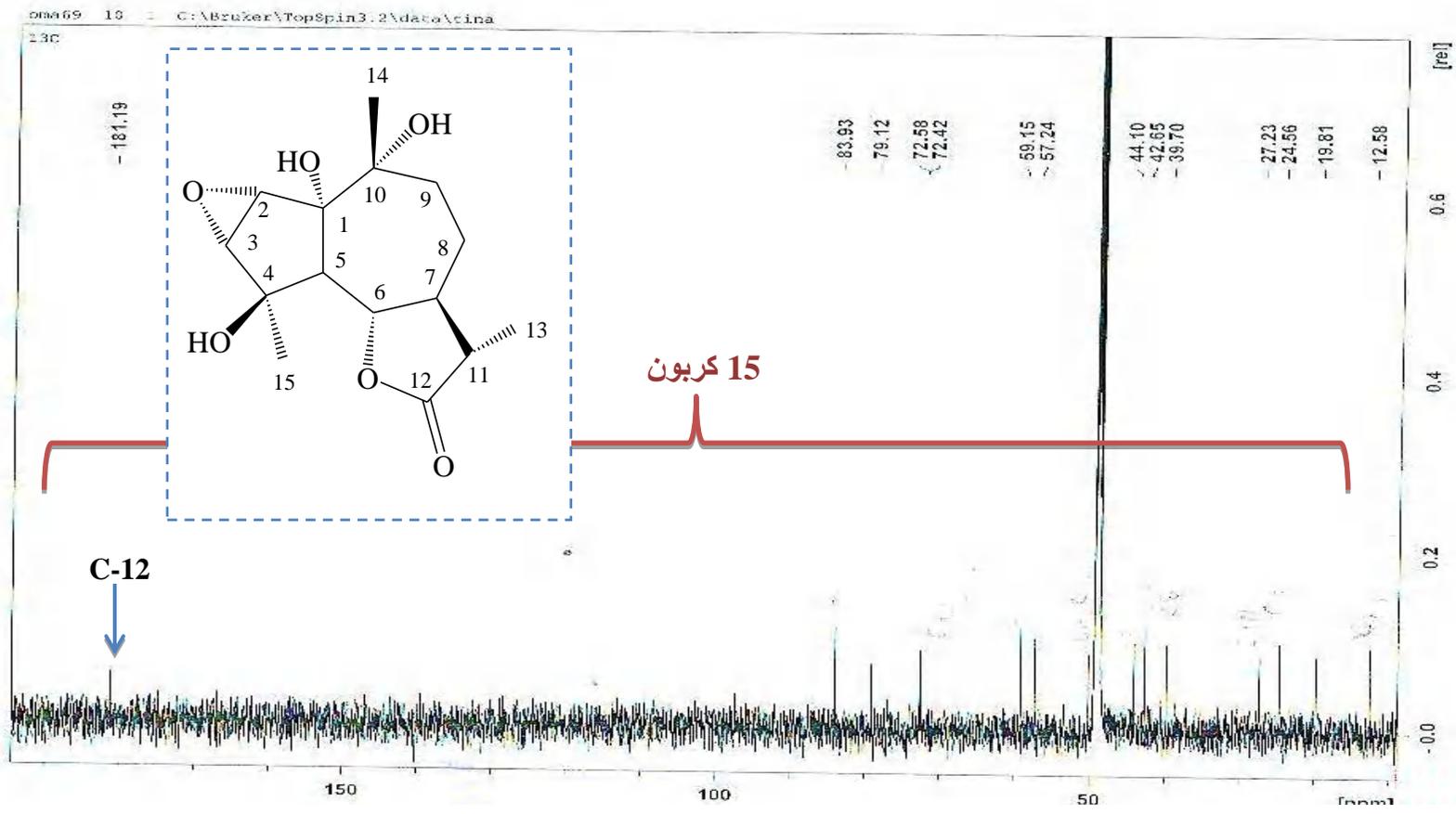


الشكل 20-II : 2  $\alpha$ ,3  $\alpha$ -époxy-1  $\alpha$ , 4  $\beta$ ,10  $\alpha$ -trihydroxyguaian-12,6 $\alpha$ -olide

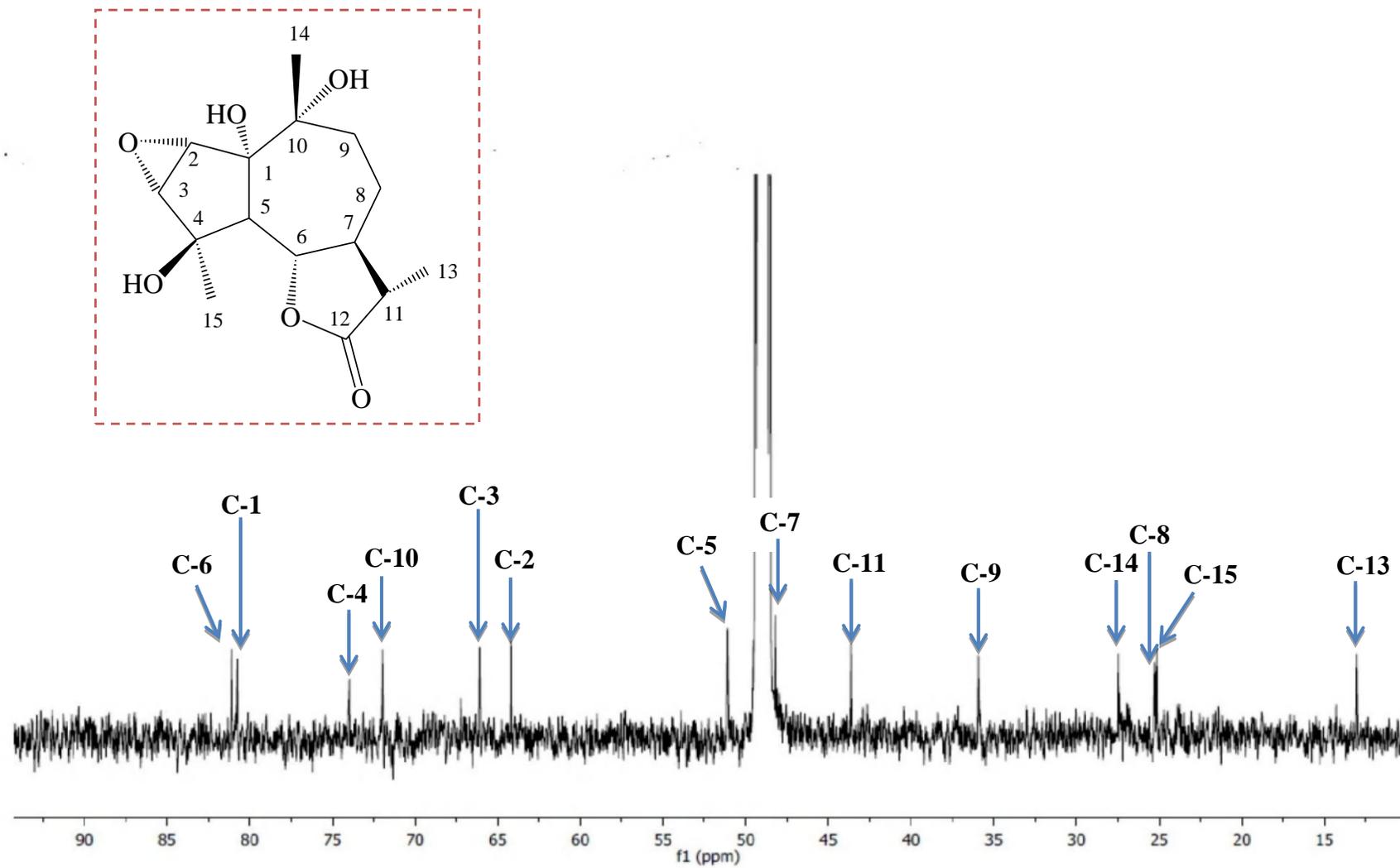
الجدول 2-II : المعطيات الطيفية لل  $RMN-^1H$  (600 MHz,  $\delta_H$  ;ppm,  $J$  ; Hz) و  $RMN-^{13}C$

في المركب 2 في  $CD_3OD$  (150 MHz,  $\delta_C$  ;ppm,  $J$  ; Hz)

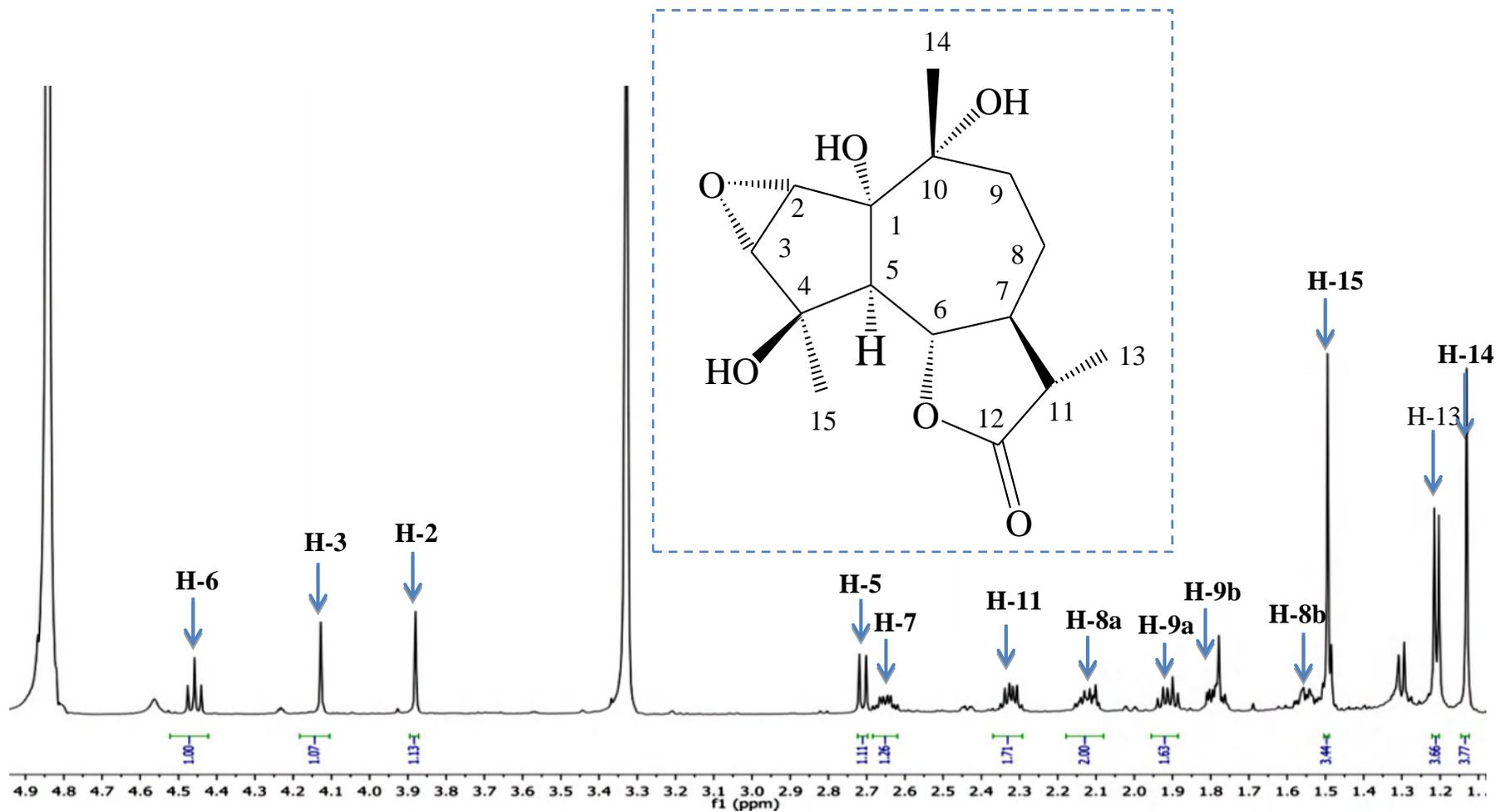
2		الموضع
$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ m (J ,Hz)	
80.0	-	<b>1</b>
62.7	3.87 s	<b>2</b>
64.8	4.11 s	<b>3</b>
73.4	-	<b>4</b>
50.6	2.70 d 9.0	<b>5</b>
81.0	4.44 t 9.5	<b>6</b>
48.0	2.64 m	<b>7</b>
24.0	2.11 m	<b>8a</b>
-	1.54 m	<b>8b</b>
35.6	1.9 m	<b>9a</b>
-	1.77 m	<b>9b</b>
72.0	-	<b>10</b>
43.2	2.32 m	<b>11</b>
181.5	-	<b>12</b>
14.0	1.19 d 6.8	<b>13</b>
26.0	1.08 s	<b>14</b>
23.7	1.49 s	<b>15</b>



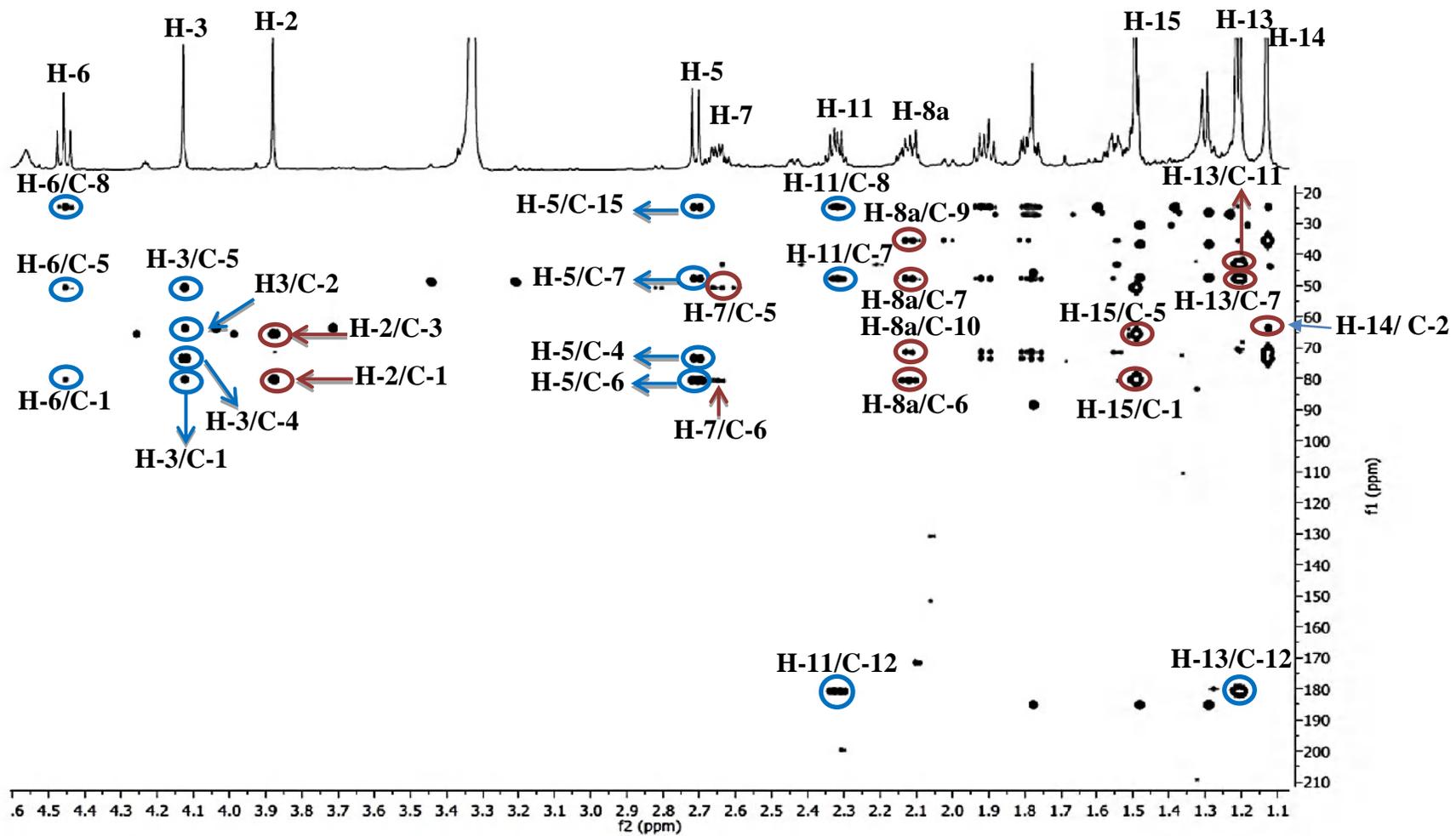
الشكل 11-II: طيف ال<sup>13</sup>C-RMN للمركب 2 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



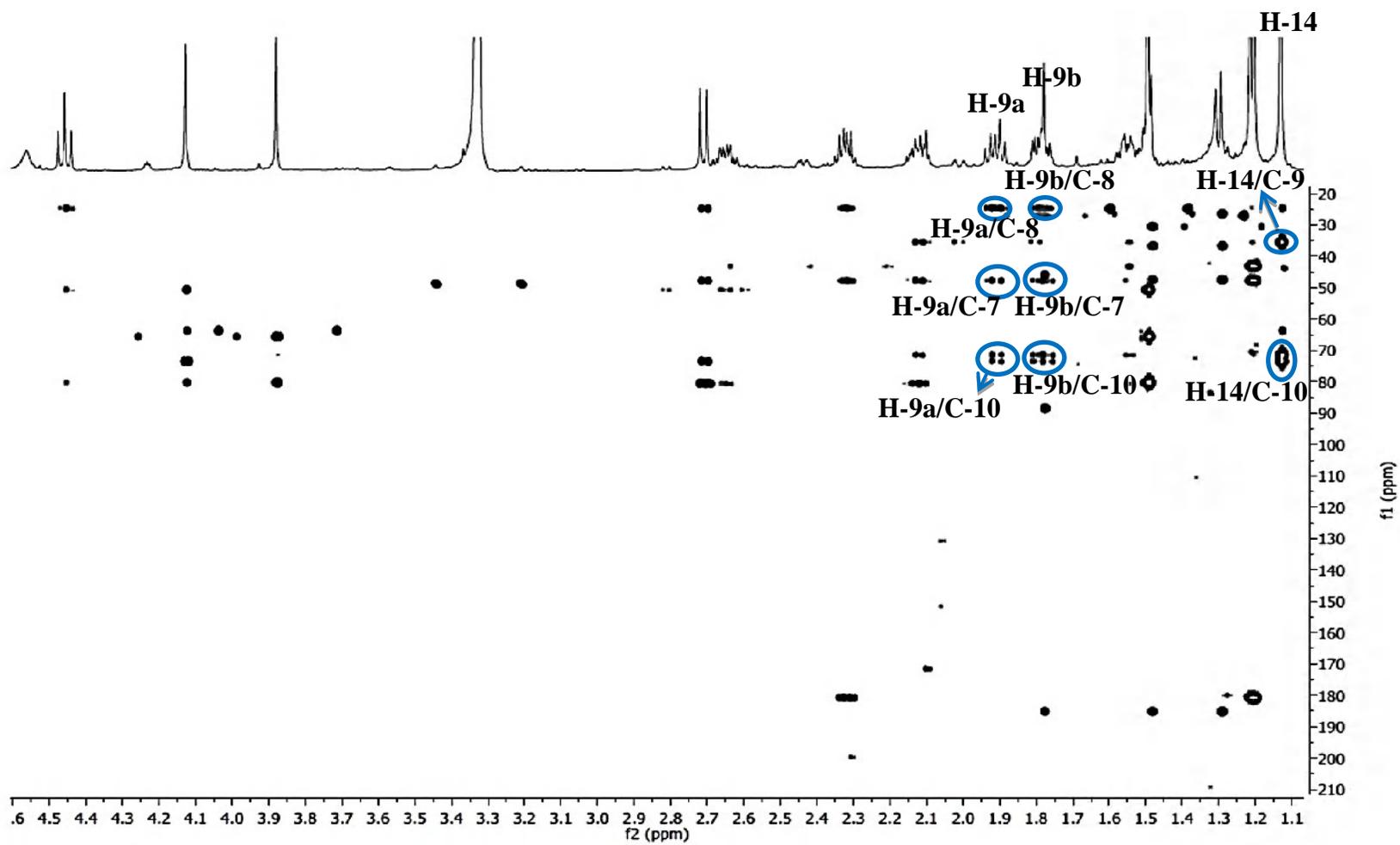
الشكل 12-II: طيف ال $^{13}\text{C}$ -RMN للمركب 2 في ال (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



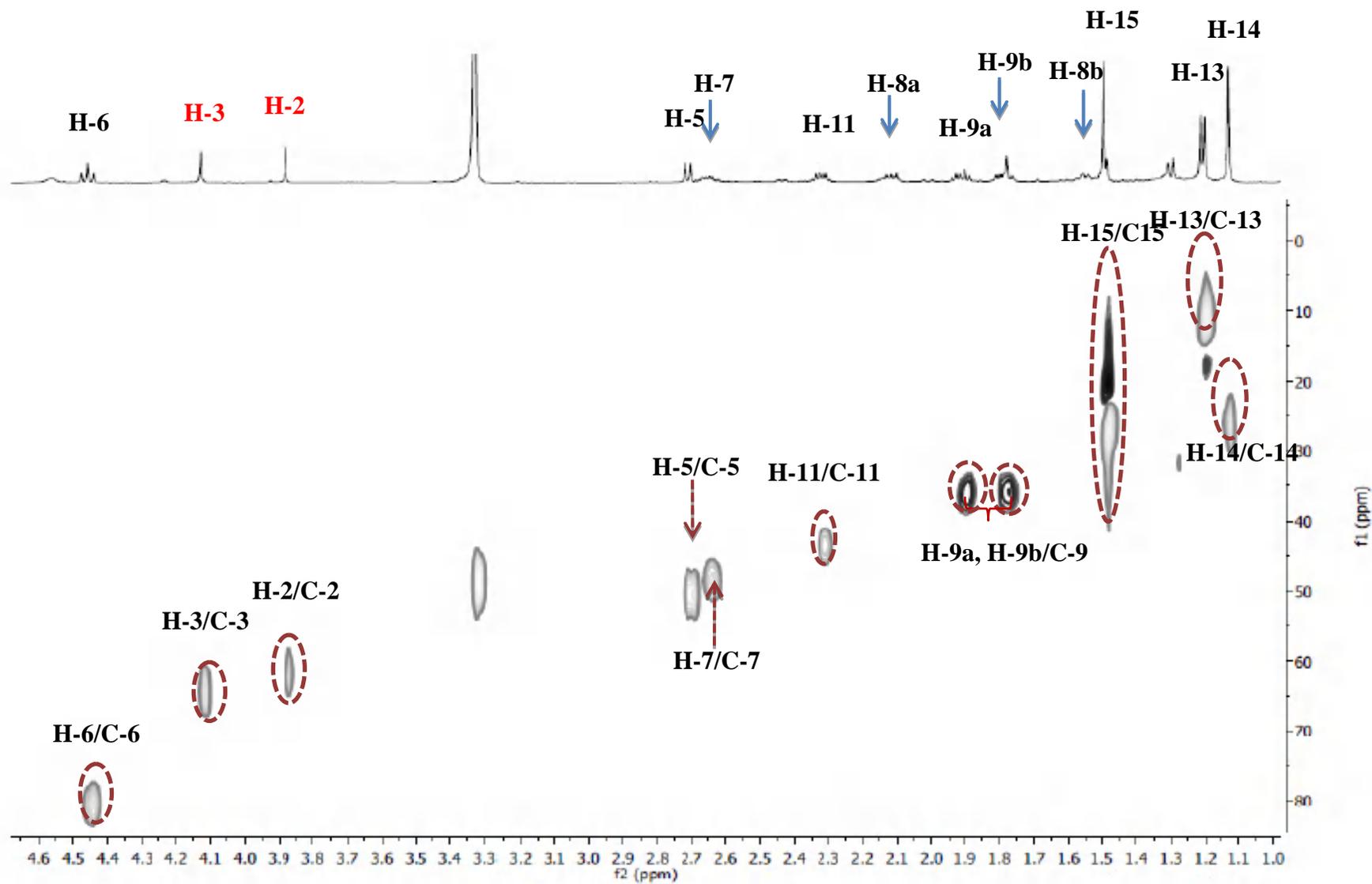
الشكل 13-II : طيف ال $^1\text{H}$  RMN للمركب 2 في ال (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



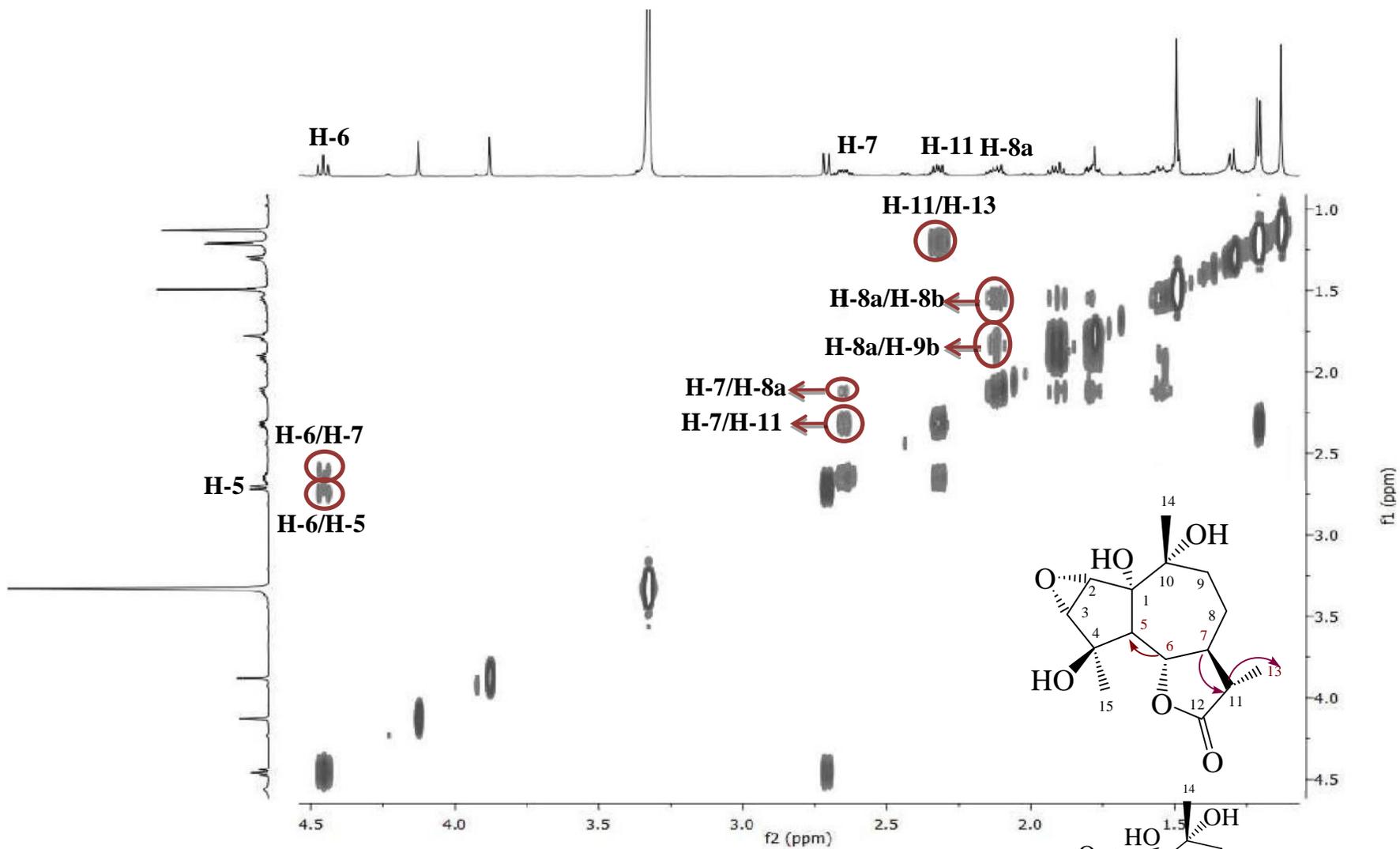
الشكل II-14: طيف الHMBC للمركب 2 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



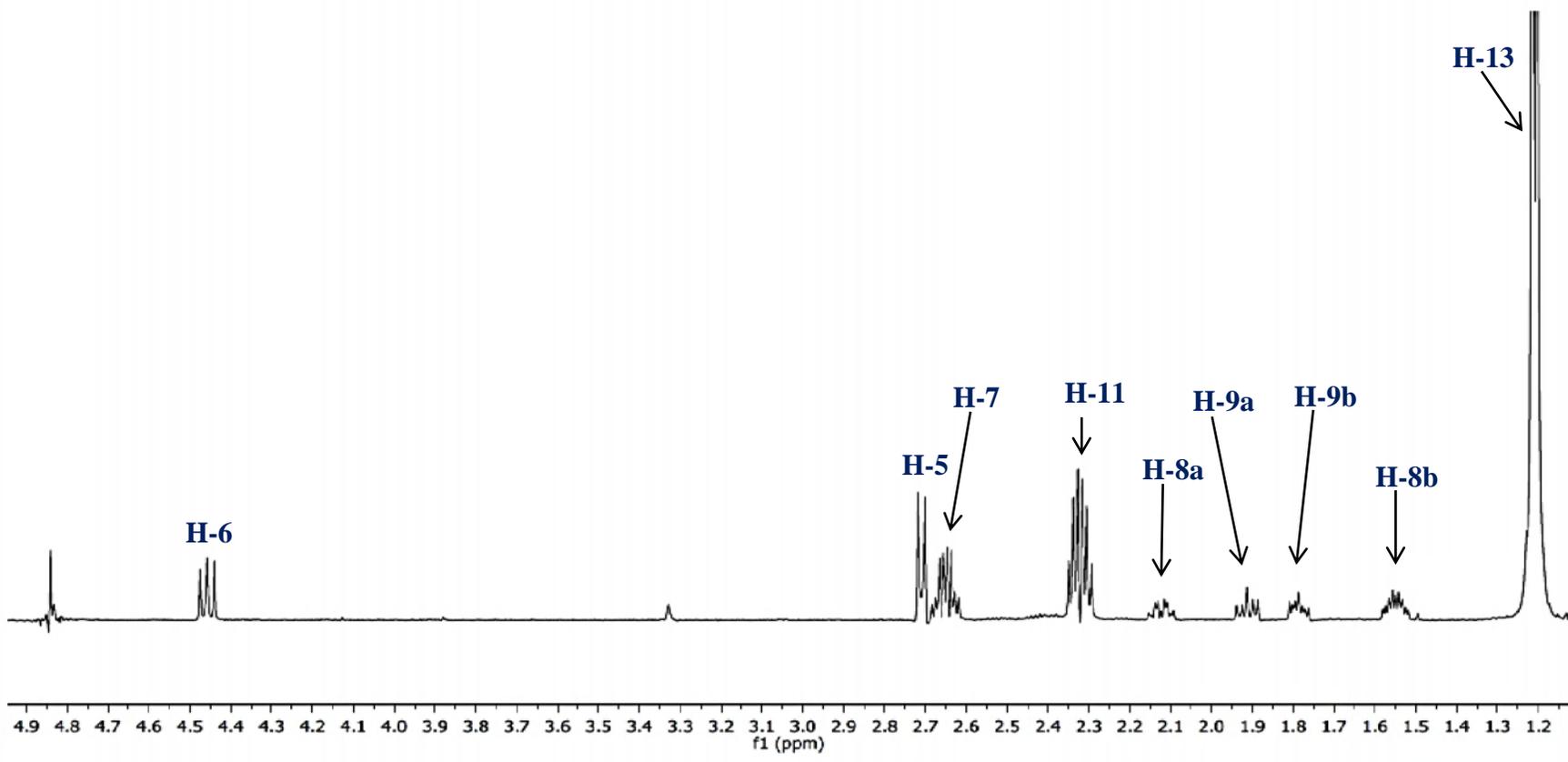
الشكل II-15 : طيف الـ HMBC للمركب 2 في الـ (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل 16-II: طيف ال HSQC للمركب 2 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل II-18: طيف ال COSY للمركب 2 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل 19-II : طيف ال 1D TOCSY للمركب 2 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

### 3-II -التعيين البنوي للمركب 3 :

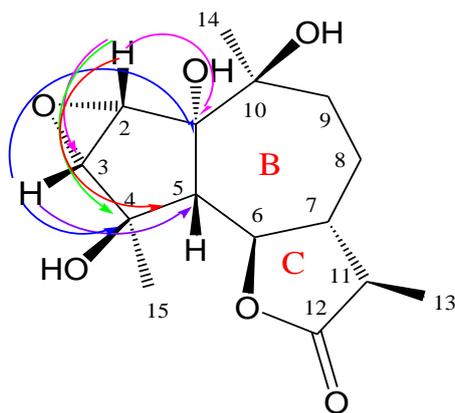
تم الحصول على المركب 3 كمسحوق أبيض. أعطى طيف الكتلة عالية الدقة HRESI MS الموجب قمة أيون شبه جزيئي عند  $m/z$  299.1483  $[M+H]^+$  و التي توافق الصيغة المجملة للمركب  $C_{15}H_{22}O_6$ . خمس مؤشرات لنقص الهيدروجين. انطلاقا من ميزاته الطيفية أن المركب 3 عبارة عن سيسكويتربين guainolide .

تشير دراسة أطيف الرنين النووي المغناطيسي أحادي البعد (الشكل 21-II، 22-II) وثنائي البعد (الشكل من 23-II إلى 28-II) إلى وجود نفس التسلسل لذرات الكربون في المركب 3 (guainolide lactone) مقارنة مع المركبين 1 و 2. مع اختلاف في قيم الانزياح الكيميائي للكربونات C-1، C-2، C-3 و C-5 و للبروتونات H-5، H-6، H-7، H-11 و H-14 وهذا يعني أن المركب 3 (Diastéréoisomé) للمركبين 1 و 2. يسمح التحليل المقارن بين طيفي COSY و 1D-TOCSY (الشكل 23-II، 26-II) بإنشاء المركب 3 انطلاقا من اتصال هذه البروتونات H5/H-9b و H-5/Me-13 فيما بينها عن طريق البروتون H-7 يدل على وجود حلقتين متجاورتين B و C. تم إسناد كل بروتون بكربونه الخاص من خلال طيف HSQC (الشكل 24-II).

طيف HMBC (الشكل 25-II) بين الارتباطات بين الإشارة (H-2)  $\delta_H$  3.70 و إشارة الكربونين C-1، C-3. بين الإشارة (Me-15)  $\delta_H$  1.49 ورنين الكربونات C-1، C-3 و C-5. بين الإشارة  $\delta_H$  1.25 (Me-14) و رنين الكربون C-10 عند  $\delta_C$  12.5. مما يسمح بتوطين مجموعة الهيدروكسيل في الكربون C-10 (الشكل 29-II).

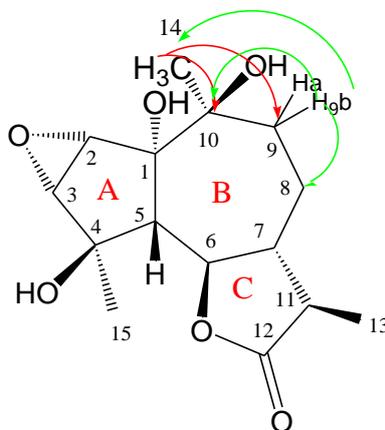
وجود في طيف البروتون (الشكل 22-II) مجموعتين من المثين لا ينتميان إلى أنظمة دوران الذي كان أكثر تعقيدا. يتضح من خلال دراسة طيف 1D-TOCSY و الانزياحات الكيميائية للكربون المعني C-2 (64.8ppm) و C-3 (66.8ppm) التي تم الحصول عليها سابقا انطلاقا من التحليل الطيفي ل HSQC، تشير إلى وجود مجموعة ايبوكسيد الحلقة الثلاثية. هذه المجموعة تتموضع في الحلقة الخماسية A في الهيكل guainolide.

طيف HMBC (الشكل 25-II) بين إشارة عند  $\delta_H$  4.05 ppm (1H, d,  $J=13.0$  Hz) الموافق ل H-3 يقع تعالق مع الكربونات C-1، C-4، C-5 لذلك اقترح نفس الهيكل كما اقترح للمركبين السابقين .



الشكل II-29 : بعض التفاعلات الخاصة بالمركب 3

علاوة على ذلك، كانت ارتباطات HMBC واضحة بين إشارة البروتون (Me-14) 1.25ppm و الكربونين C-9 و C-10. بين الإشارة عند 1.95ppm (H-9b) و الكربونات C-10، C-8 و C-14، حددت هذه الارتباطات مجموعة الهيدروكسيل الثالثة في C-10 و أكدت وجود الهيدروكسيل في الكربون C-1 (الشكل II-30)

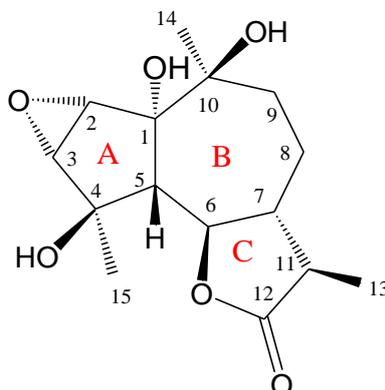


الشكل II-30 : بعض التفاعلات الخاصة بالمركب 3

عند تشيع إشارة (Me-15) نلاحظ زيادة معتبرة في إشارة H-6 و عدم تأثير إشارة H-5 (شكل II-27) يدل على تعالق بروتونات (Me-15) و H-6 حسب تشكيل Cis و يؤكد هذا الاقتراح الانزياح الكيميائي H-6 في المجال المنخفض للحقل المغناطيسي كما تبين ثابتة التزاوج ( $J=10.0$  Hz) لإشارة البروتون H-6 و التي تبدو على شكل ثلاثي بأن البروتونات H-5، H-6 و H-7 توجد في تشكيل (trans,trans).

تقارب الانزياحات الكيميائية للبروتونين H-2 و H-3 للمركب 3 مقارنة مع التي تنتمي للمركب 2 أدى إلى نفس تشكيل 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -epoxy بينما الانزياح الكيميائي للبروتون H-14 (  $\delta_H$  1.25 pm ) مقارنة مع قيمته في

المركب 2 ( $\delta_H$  1.08 ppm) يجعله في اتجاه  $\alpha$ . من خلال المعطيات السابقة الذكر تم تعيين المركب 3 على أنه :  $2\alpha,3\alpha$ -époxy- $1\alpha,4\beta,10\beta$ -trihydroxyguain-12,6 $\alpha$ -olide ( الشكل II-31 ).



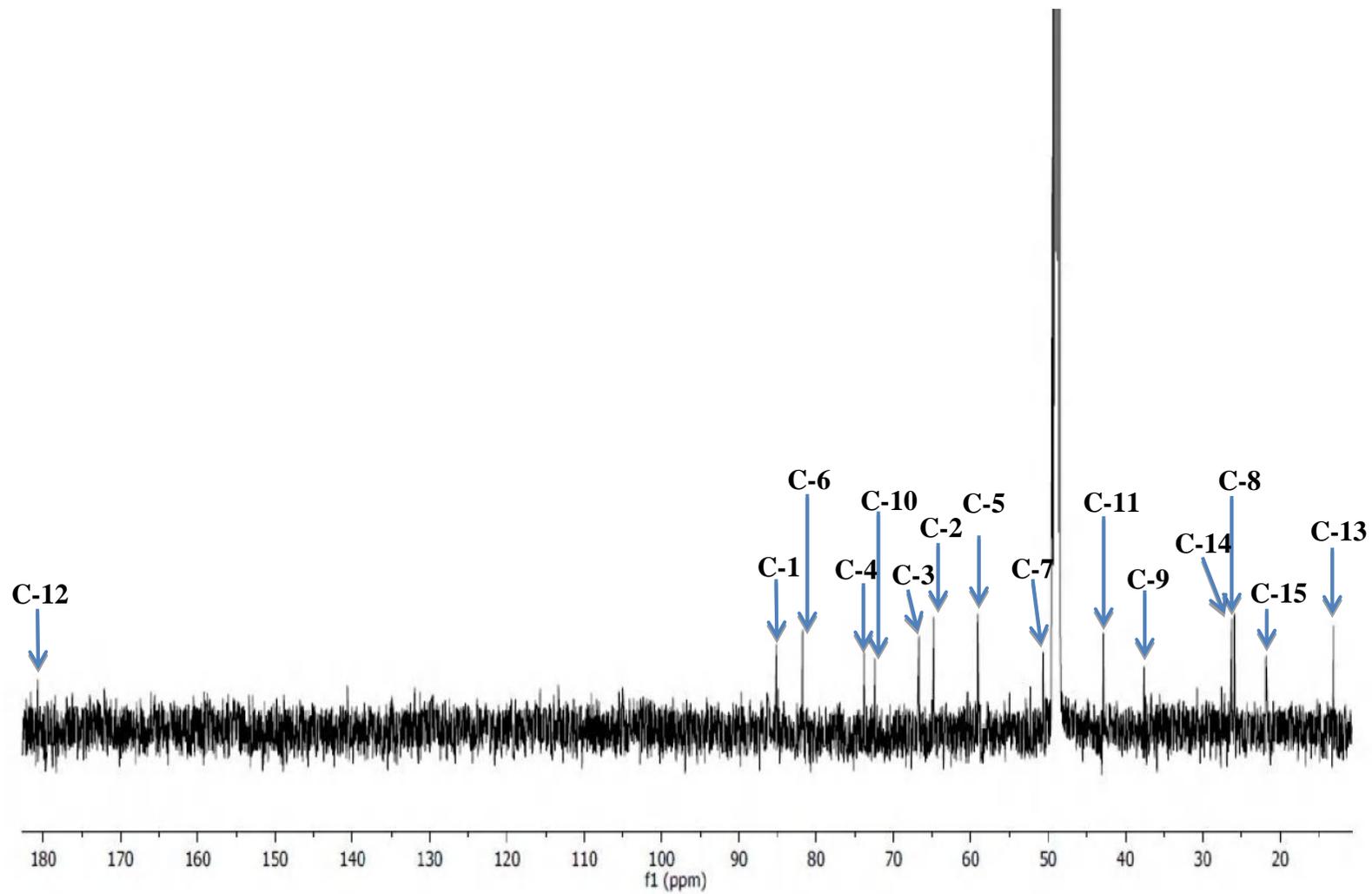
الشكل II-31 : بنية المركب 3

كل النتائج السابقة مدونة في الجدول 3-II .

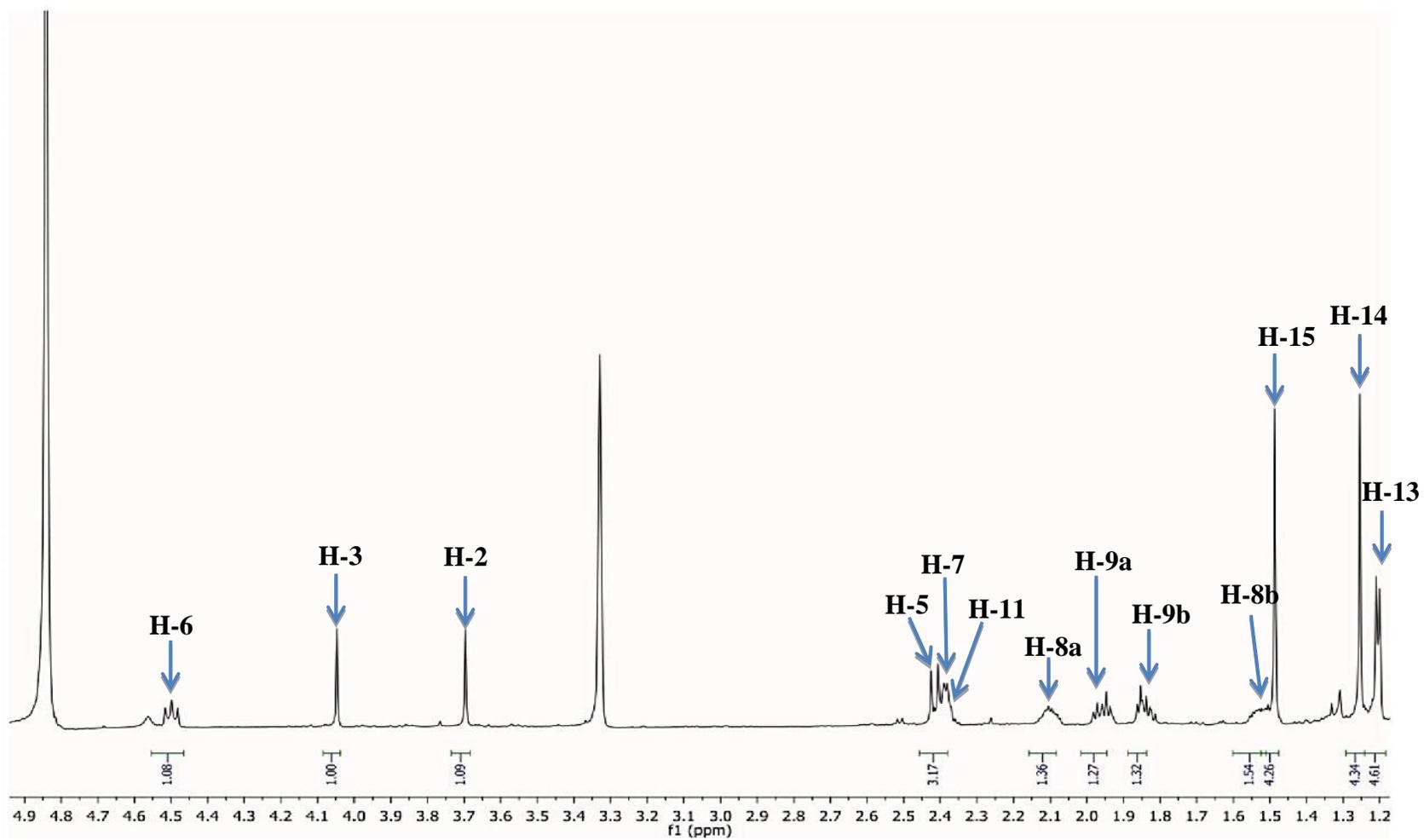
جدول 3-II : المعطيات الطيفية لل  $RMN-^1H$  (  $600\text{ MHz}$ ,  $\delta$  ;ppm,  $J$  ; Hz) وال  $RMN-^{13}C$

(  $150\text{ MHz}$ ,  $\delta$  ;ppm,  $J$  ; Hz) في  $CD_3OD$  للمركب 3

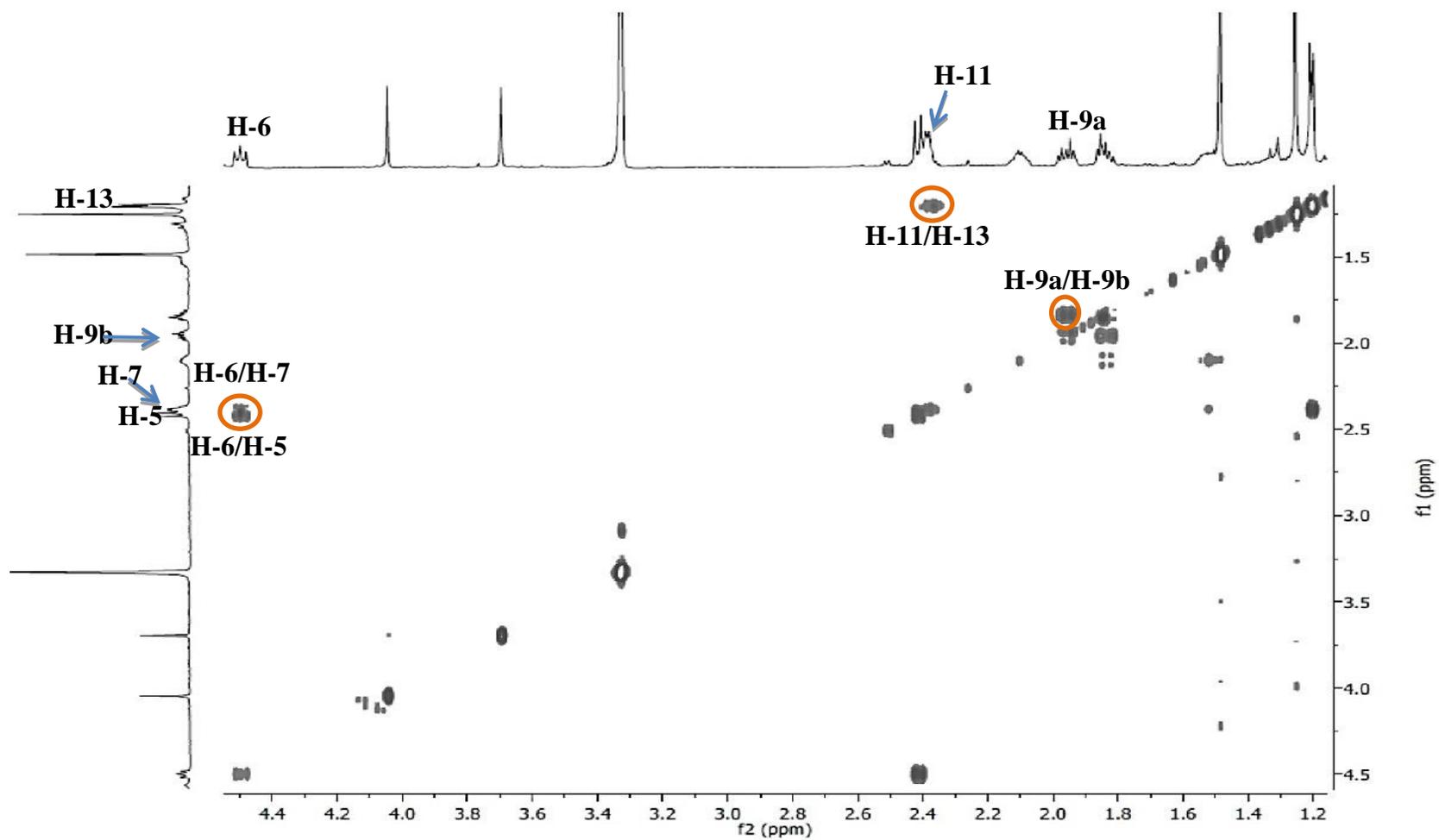
المركب 3		الموضع
$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ m (J, Hz)	
85.0	-	1
64.8	3.70 s	2
66.7	4.05 s	3
73.7	-	4
59.7	2.42d(10.0)	5
81.8	4.52 t(10.0)	6
49.3	2.40m	7
24.6	2.11m	8a
-	1.53m	8b
39.0	1.95m	9a
-	1.85m	9b
72.5	-	10
42.9	2.38m	11
181.0	-	12
13.1	1.20 d (6.8)	13
25.8	1.25 s	14
18.6	1.49 s	15



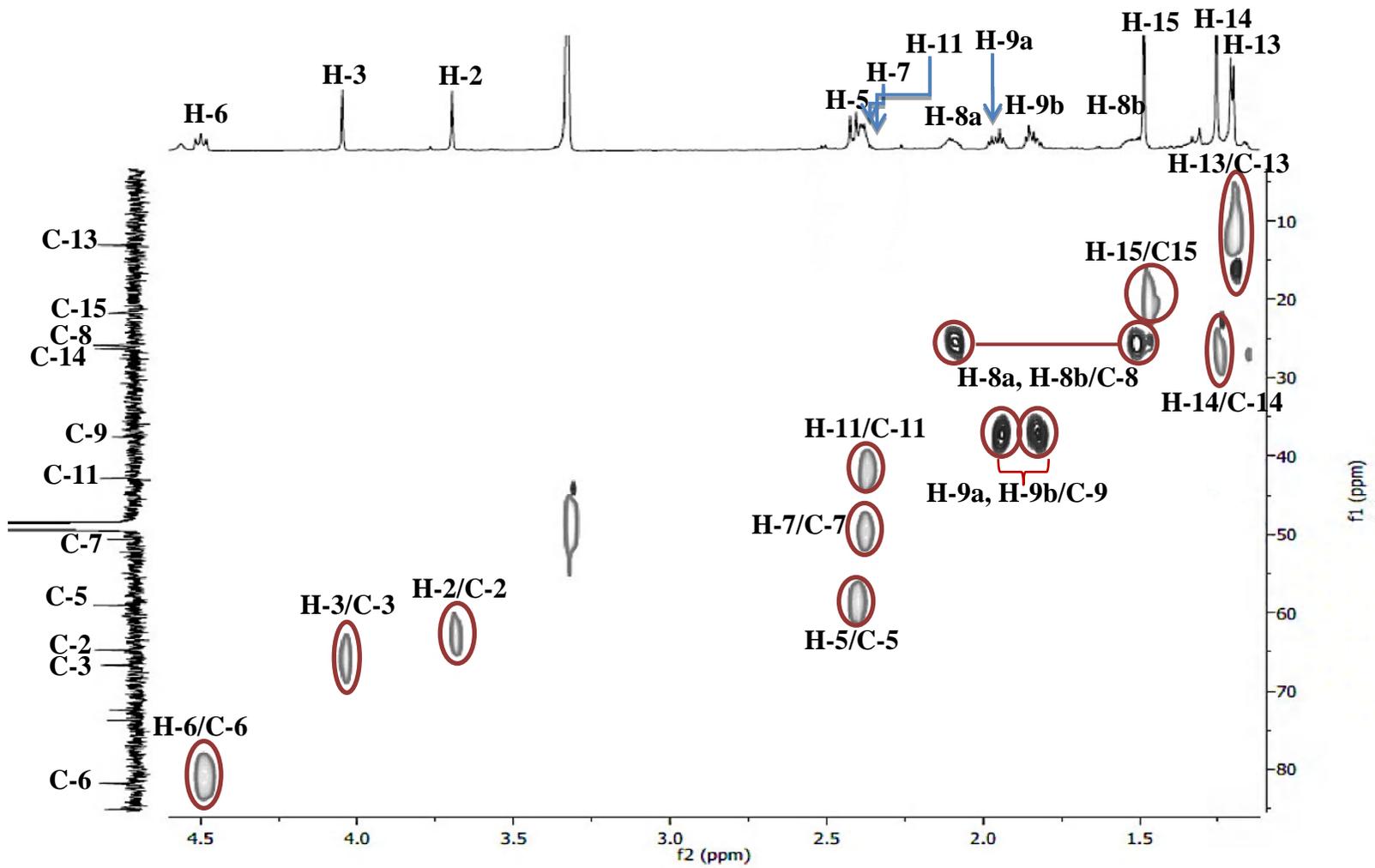
الشكل II-21: طيف ال $^{13}\text{C}$ -RMN للمركب 3 في ال (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



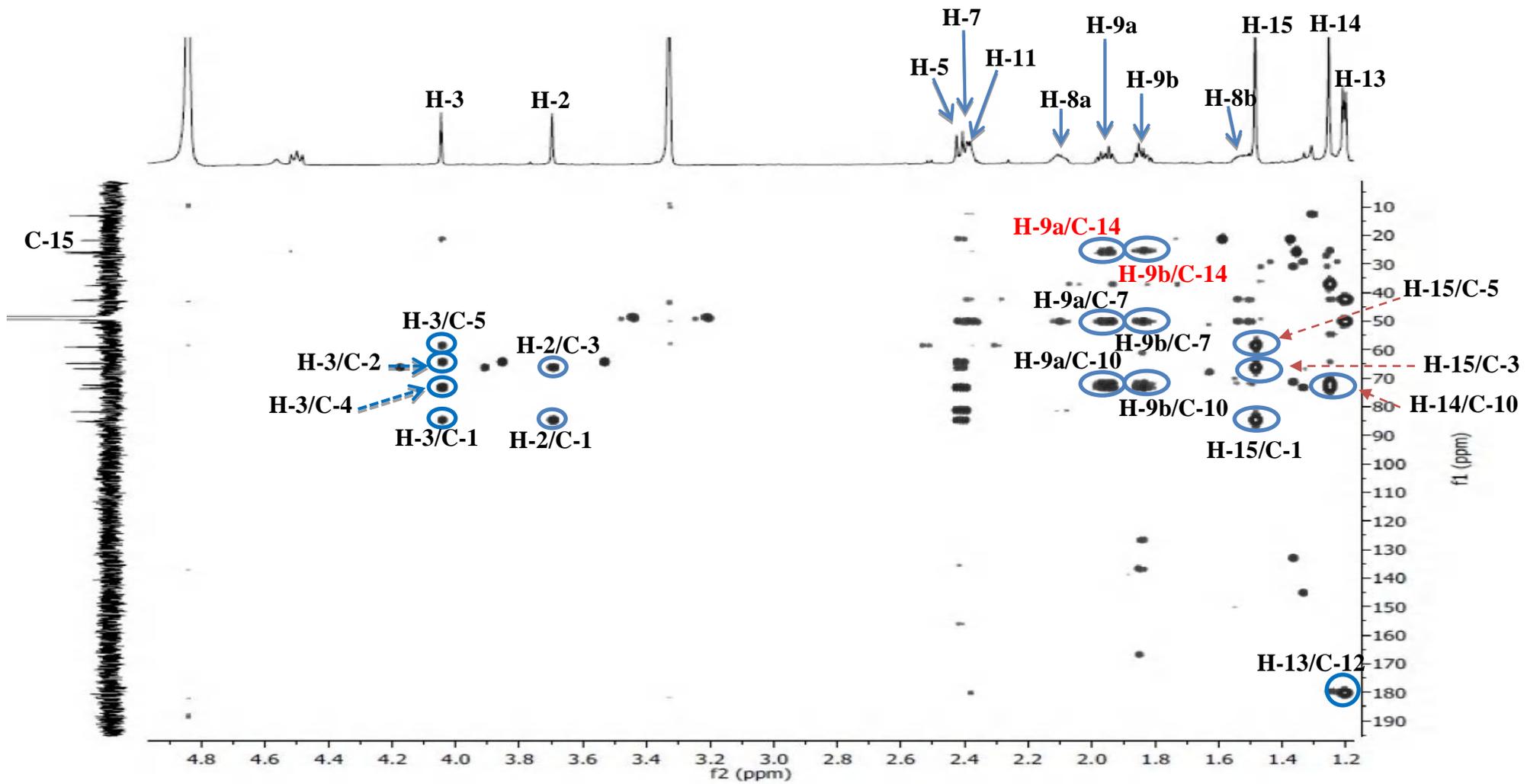
الشكل II-22 : طيف ال<sup>1</sup>H RMN للمركب 3 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



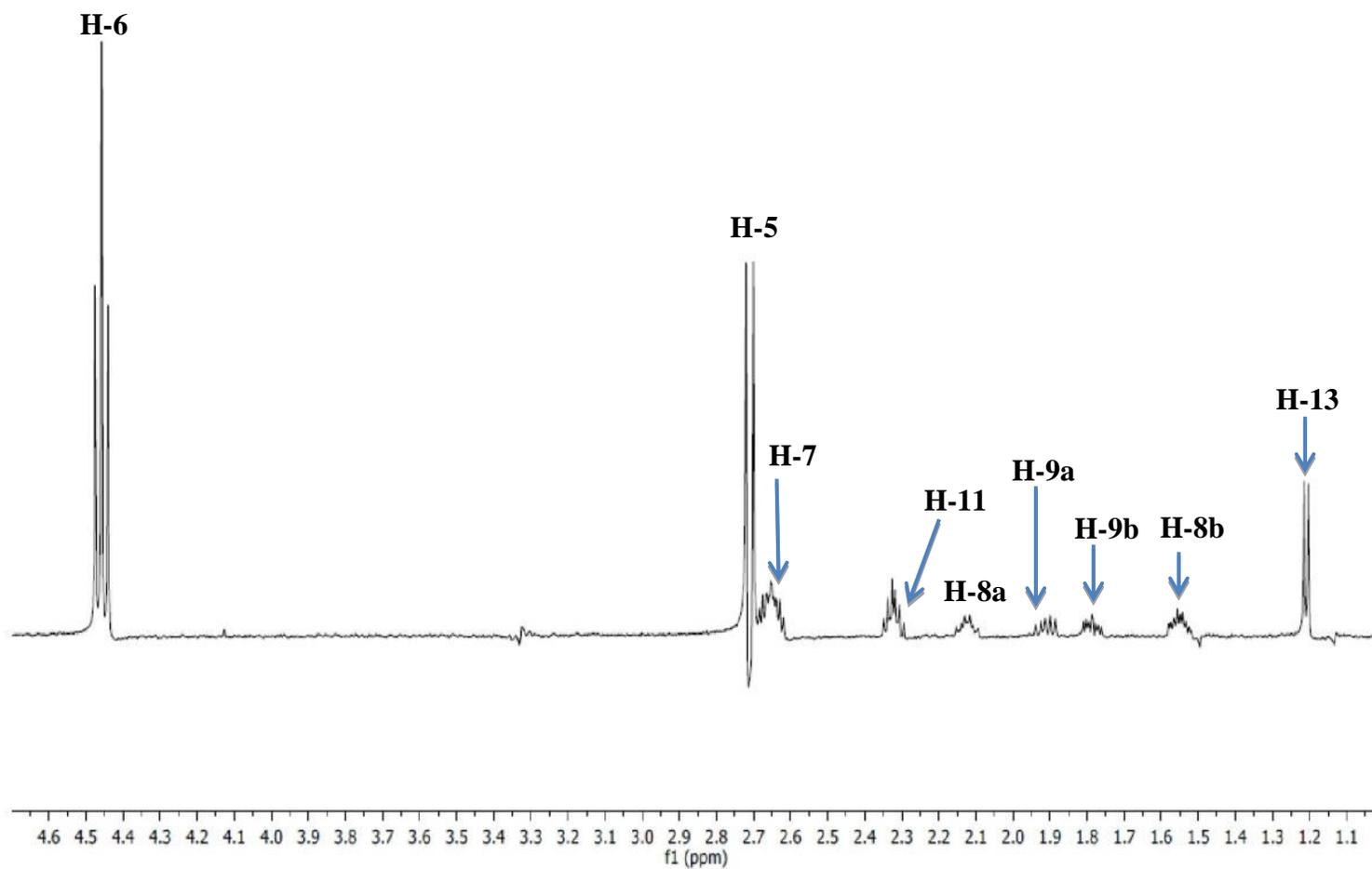
الشكل 23-II : طيف ال COSY للمركب 3 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



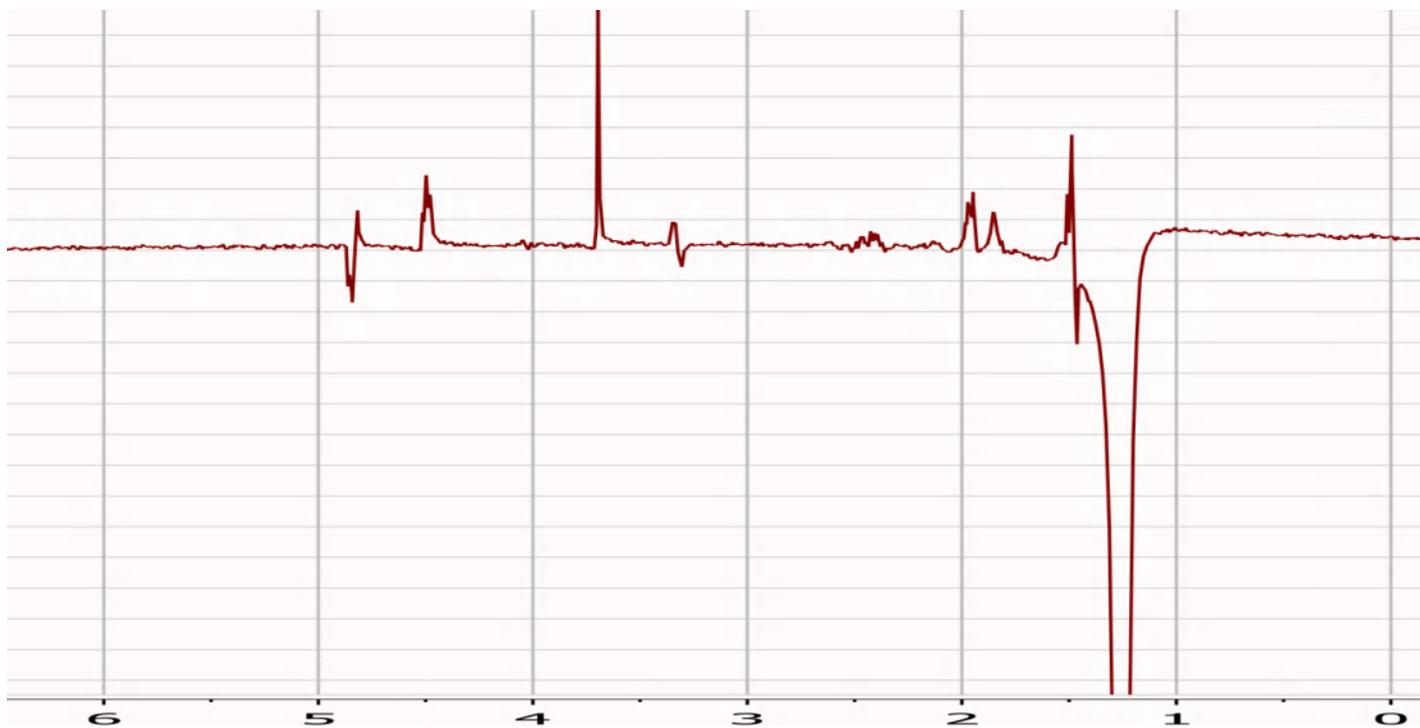
الشكل II-24: طيف ال HSQC الممدد للمركب 3 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



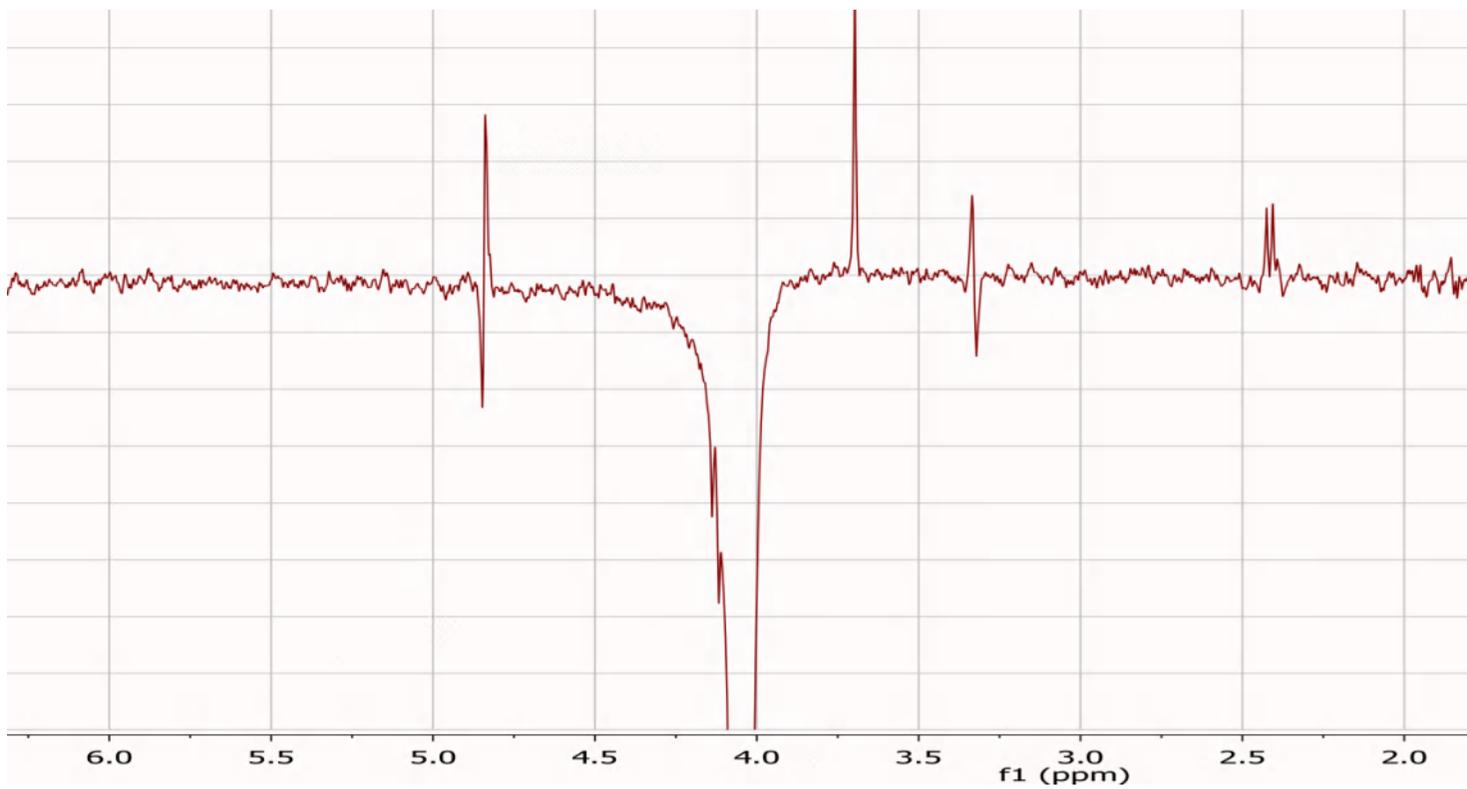
الشكل III- 25 : طيف الHMBC للمركب 3 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



شكل 26-II: طيف ال 1D TOCSY للمركب 3 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



شكل 27-II: طيف ال 1D-ROESY للمركب 3 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



شكل 28-II: طيف ال 1D-ROESY الممدد للمركب 3 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

#### II-4- التعين البنوي للمركب 4 :

المركب 4 عبارة عن مسحوق أبيض ذو الصيغة الجملة  $C_{15}H_{24}O_7$  و هذا اعتمادا على طيف كتلة عالية الدقة HR-ESIMS، لظهور الأيون الجزيئي عند  $m/z = 317.1598[M+H]^+$  و التي توافق الصيغة الجملة للمركب.

أشار طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون وجود بروتون في المجال المنخفض يعزى إلى وجود حلقة لاكتون ( $\delta_C 180.0, \delta_C 81.0, \delta_H 4.58$ ) تشير الإشارات و الإزاحات الكيميائية لكل من مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون والكربون و أطيف أحادية و ثنائية الأبعاد (شكل II-32 إلى II-36) إلى وجود هيكل من النوع guainolide.

و مما أثبت ذلك وجود 15 ذرة كربون حسب طيف  $RMN-^{13}C$  (شكل II-32) التي ظهرت بشكل : 4 ذرات كربون رباعية منها كربون كربوكسيلي  $C=O$  الذي ظهر عند  $\delta_C = 180$  ppm مميزة ل  $\gamma$  لاكتون سسكويتز بيني مشبعة

سنة مجموعات CH من بينها CH ذو تهجين  $sp^3$  مؤكسج عند  $\delta_C = 81$  ppm مميزة لكربون غلق الحلقة الاكتونية، خمس مجموعات CH كل منها ذات تهجين  $sp^3$  عند كل من  $\delta_C = 78.1$  ppm ،  $\delta_C = 63.6$  ppm ،  $\delta_C = 57.7$  ppm ،  $\delta_C = 52.8$  ppm و  $\delta_C = 42.0$  ppm الموافقة للكربونات، C-2، C-3، C-5، C-7، و C-11 على التوالي.

\*مجموعتين من  $CH_2$  كل منها ذات تهجين  $sp^3$  غير مؤكسجة عند  $\delta_C = 26.2$  ppm و  $\delta_C = 40.1$  ppm  
\*ثلاث اشارات  $CH_3$  عند  $\delta_C = 15.2$  ppm ،  $\delta_C = 28.1$  ppm ، و  $\delta_C = 29.1$  ppm أسندت الى الكربونات C-13، C-14، و C-15 للهيكل السيسكوي تربيني اللاكتوني، من خلال هذه الإزاحات الكيميائية و إزاحات بروتوناتها و تكاملها نستنتج أنها عبارة عن  $CH_3$ . كل نتائج هذا الطيف مدونة في الجدول II-4.

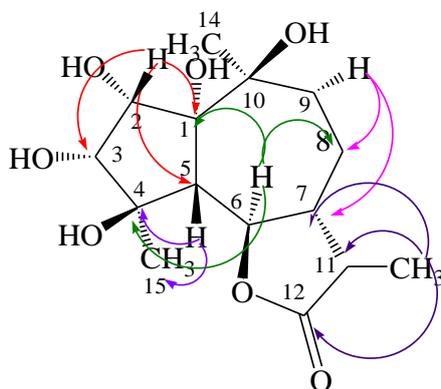
كما يظهر في طيف  $RMN-^1H$  (الشكل II-33) إشارات لبروتونين مثنيين مؤكسجين عند  $\delta_H = 3.69$  (ppm, 1H, br s) الموافقة ل H-2 و  $\delta_H = 3.68$  (ppm, 1H, br s) الموافقة ل H-3.

\*بروتون مثين لاكتون واحد عند  $\delta_H = 4.57$  ppm ( $\delta_H = 4.57$  ppm, 1H, t,  $J=9.5$ Hz) الموافقة للبروتون H-6.  
\*مجموعتين مثيل ثلاثي عند كل من  $\delta_H = 1.31$  ppm (3H, s) الموافقة ل H-14 و  $\delta_H = 1.34$  ppm (1H, s) الموافقة ل H-15 و مثيل ثانوي واحد عند  $\delta_H = 1.19$  ppm (1H, d,  $J=6.8$ Hz) الموافقة ل H-13.  
أدى طيف HSQC (الشكل II-34) إلى إسناد كل الكربونات المرتبطة بالبروتونات.

سمحت دراسة نتائج أطيف 2D-COSY (الشكل II-35) و 1D-ROESY (الشكل II-36) إنشاء نظام دوراني ، وهما H-2—H-3 ، H-5—H-9 و H-5—H-13 الاثنان الأخيران ينتميان إلى نفس نظام الدوران .

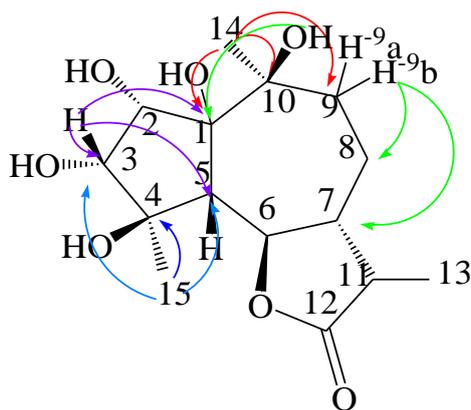
تم تأكيد هذه الملاحظات من خلال التعلقات الموجودة في طيف HMBC للمركب 4 بين الإشارة الخاصة بالبروتون H-6 وإشارات الكربونات C-1، C-4، و C-8، إشارة Me-13 وإشارات C-7، C-12، و C-11، إشارة H-9 وإشارات C-7 و C-8.

و نستدل على وجود مجموعتين الهيدروكسيل الثانويتين للكربونين C-2 و C-3 من الانزياح الكيميائي للبروتونات و الكربونات عند 3.69 ppm (H-2)، 3.68 ppm (H-3) و  $\delta_C$  63.6 ppm (C-2) و 78.5 ppm (C-3) على التوالي، ومن خلال التعلقات التي لوحظت في طيف HMBC بين H-2 والكربونات C-3، C-5، و C-1، وبين البروتون H-5 والكربونات C-4 و C-15. تم تحديد موضع المستبدلات الأخرى في البنية الثلاثية الحلقات على وجه الخصوص لمجموعات الكحول الرباعية الثلاث من خلال دراسة التعلقات التي لوحظت في طيف الارتباط غير متجانس ثنائي الأبعاد طويل المدى (الشكل II-37). وجود تعلقات في طيف HMBC بين الإشارة  $\delta_H$  3.68 ppm (H-3) والكربونات C-1، و C-5 بين إشارة Me-15 (1.34ppm) و رنين الكربونات C-3، و C-4، و C-5 بين إشارة Me-14 (1.31ppm) و رنين الكربونات C-1، C-9، و C-10. سمحت لنا بتحديد موقع مجموعة الهيدروكسيل في الكربونات C-1، C-4 و C-10.



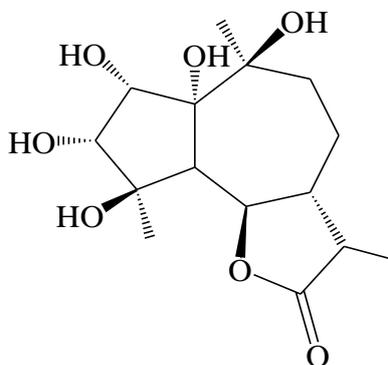
الشكل II-38 : بعض تعلقات المركب 4

علاوة على ذلك، كانت ارتباطات HMBC واضحة بين الإشارة  $\delta_H$  1.82 ppm (H<sub>b</sub>-9) والكربونات C-1، C-7 و C-8. حددت هذه التعلقات مجموعة الهيدروكسيل الثالثة في الكربون C-1. ظهرت جميع الإشارات و التعلقات التي تميز guain-12α olide [7].



الشكل II-39 : بعض تعالقات المركب 4

تقارب قيمتي الإزاحات الكيميائية للبروتون H-6 ( $\delta_H = 4.57\text{ppm}$ ) وللكربون C-6 ( $\delta_C = 81.0\text{ ppm}$ ) بالنسبة للمركب 4 مقارنة لنظيرتهما في المركب 3 يؤدي إلى توجيه  $\alpha$  للرابطة C-6-H-6 وتدل إشارة البروتون H-6 التي تظهر على شكل ثلاثي بقيمة ثابتة تزواج  $J=9.5\text{ Hz}$  أن البروتونات H-5، H-6 و H-7 تملك تشكيل *trans diaxial*. تعالق H-3 و H-5 في طيف ROESY يؤدي إلى توجيه  $\beta$  للبروتون H-3، أما تعالق H-2 و Me-14 يدل على وجودها في وضعية *Cis*. من خلال هذه المعطيات الطيفية تدل على أن المركب 4 سيسكويتربين لاكتون فهو مطابق للمركب 3 :  $1\alpha, 2\alpha, 3\alpha, 4\beta, 10\beta$ -pentahydroxyguaian-12,6 $\beta$ -olide (الشكل II-40).



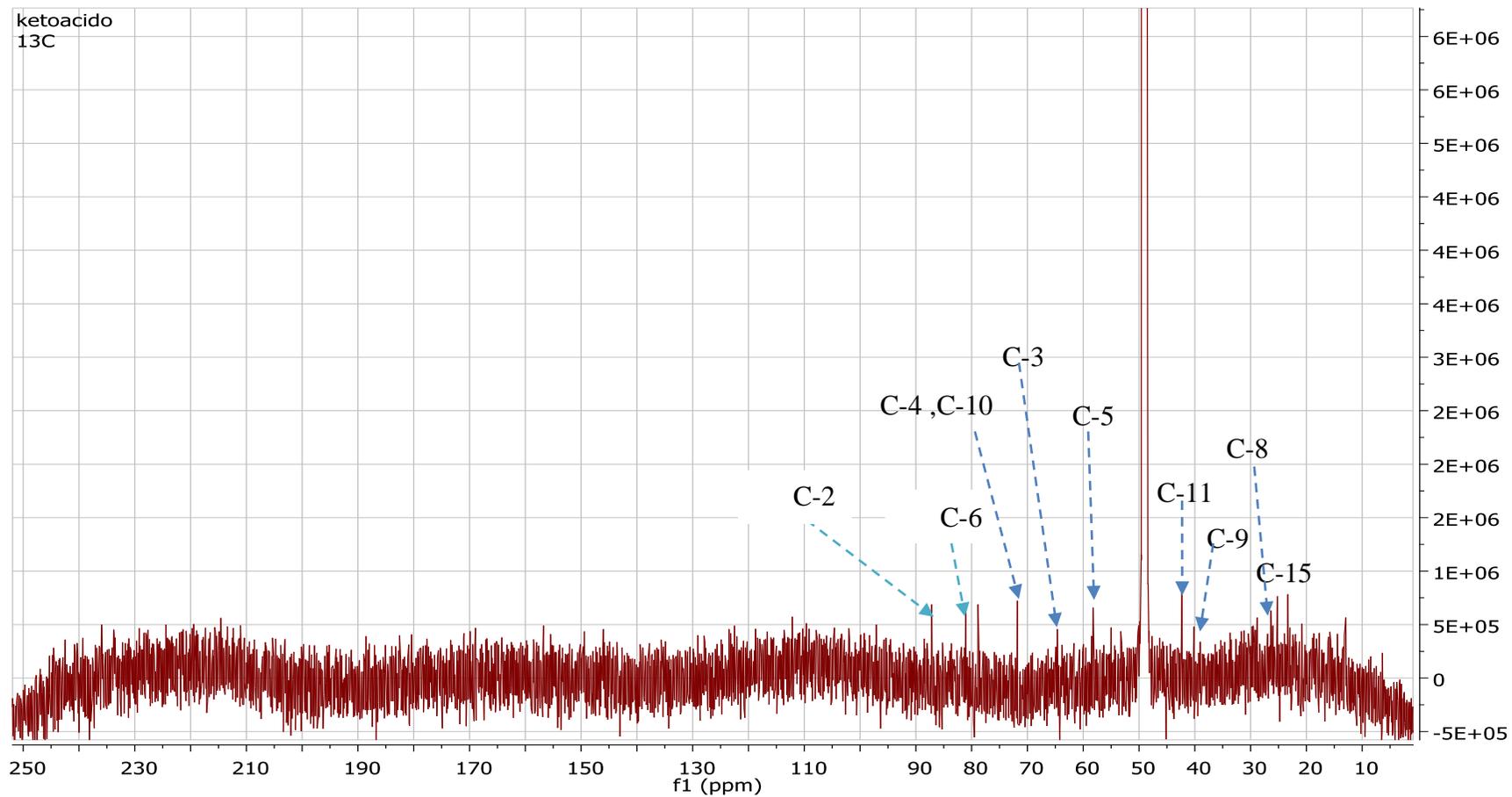
الشكل II-40 : بنية المركب 4

كل النتائج السابقة مدونة في الجدول II-4.

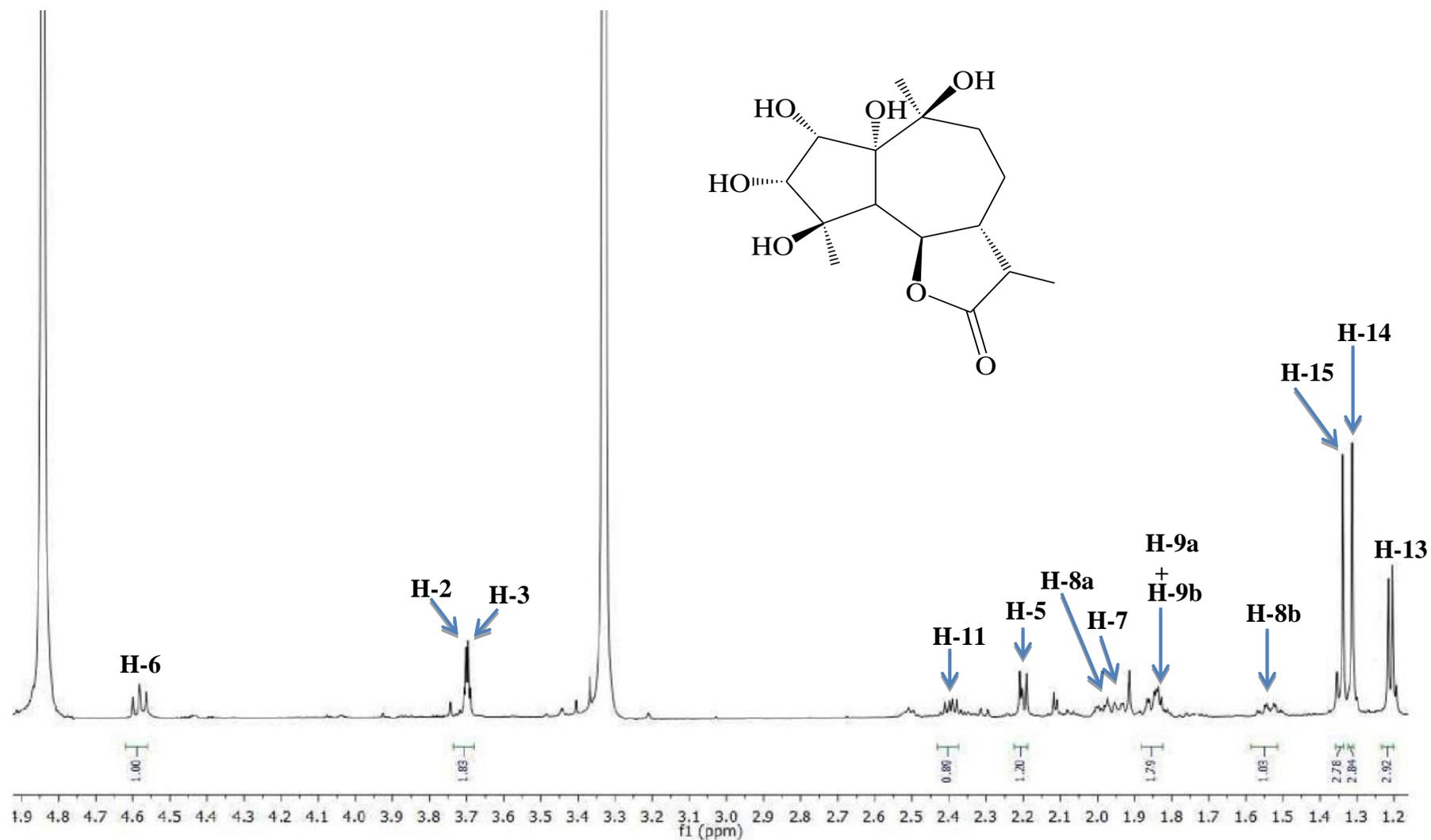
الجدول 4-II : المعطيات الطيفية لل RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz,  $\delta$ ; ppm,  $J$ ; Hz) وال RMN-<sup>13</sup>C

(150 MHz,  $\delta$ ; ppm,  $J$ ; Hz) للمركب 4 في ال-CD<sub>3</sub>OD

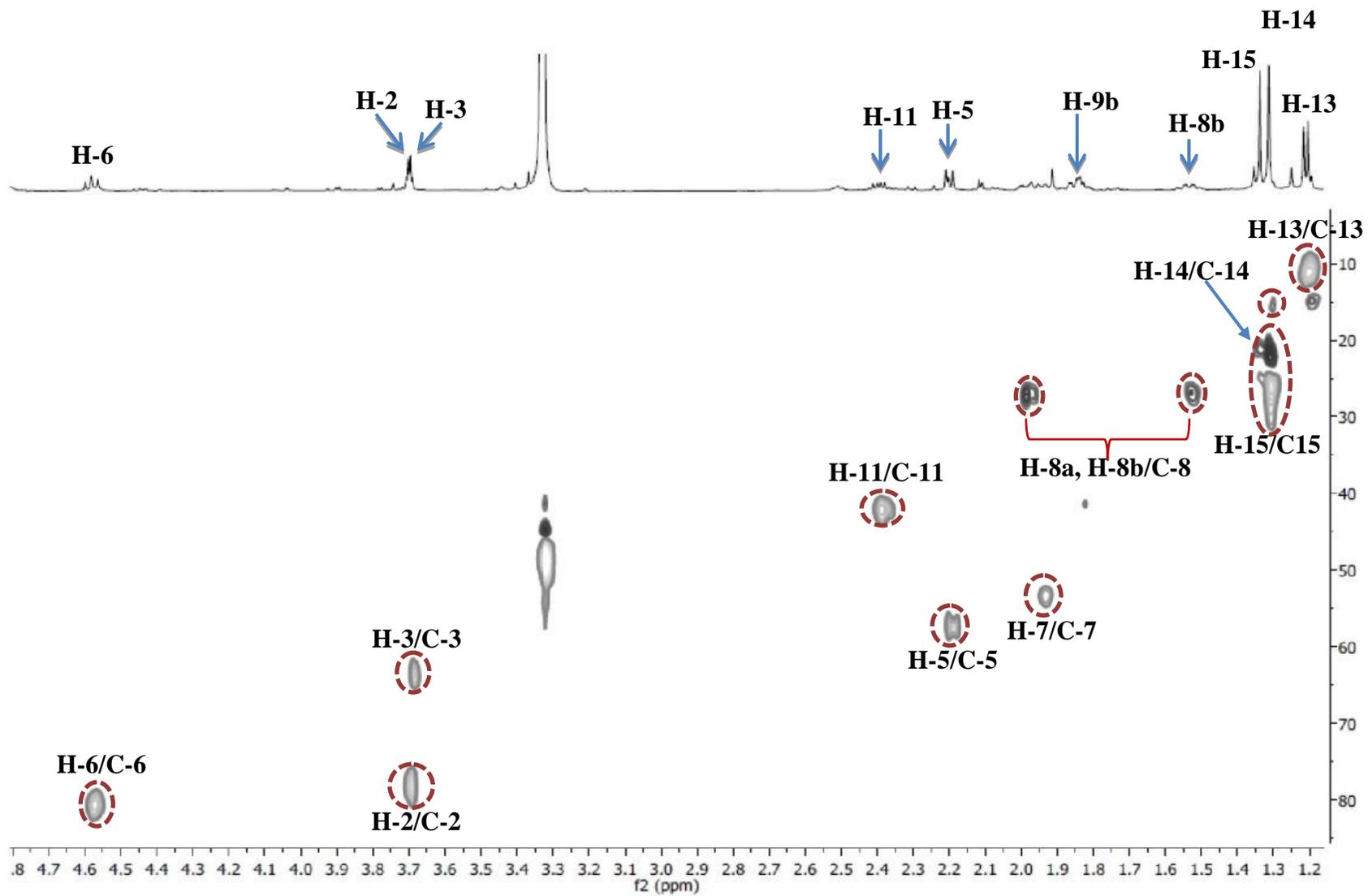
المركب 4		الوضعية
$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ m ( $J$ , Hz)	
87.3	-	1
78.1	3.69 s	2
63.6	3.68 s	3
74.0	-	4
57.7	2.19 d (9.0)	5
81.0	4.57 t (9.5)	6
52.8	1.92 m	7
26.2	1.98 m	8a
-	1.58 m	8b
40.1	1.82 <sup>b</sup>	9a
-	1.84 <sup>b</sup>	9b
71.0	-	10
42.0	2.38m	11
180.0	-	12
12.5	1.19 d (6.8)	13
15.7	1.31 s	14
23.7	1.34 s	15



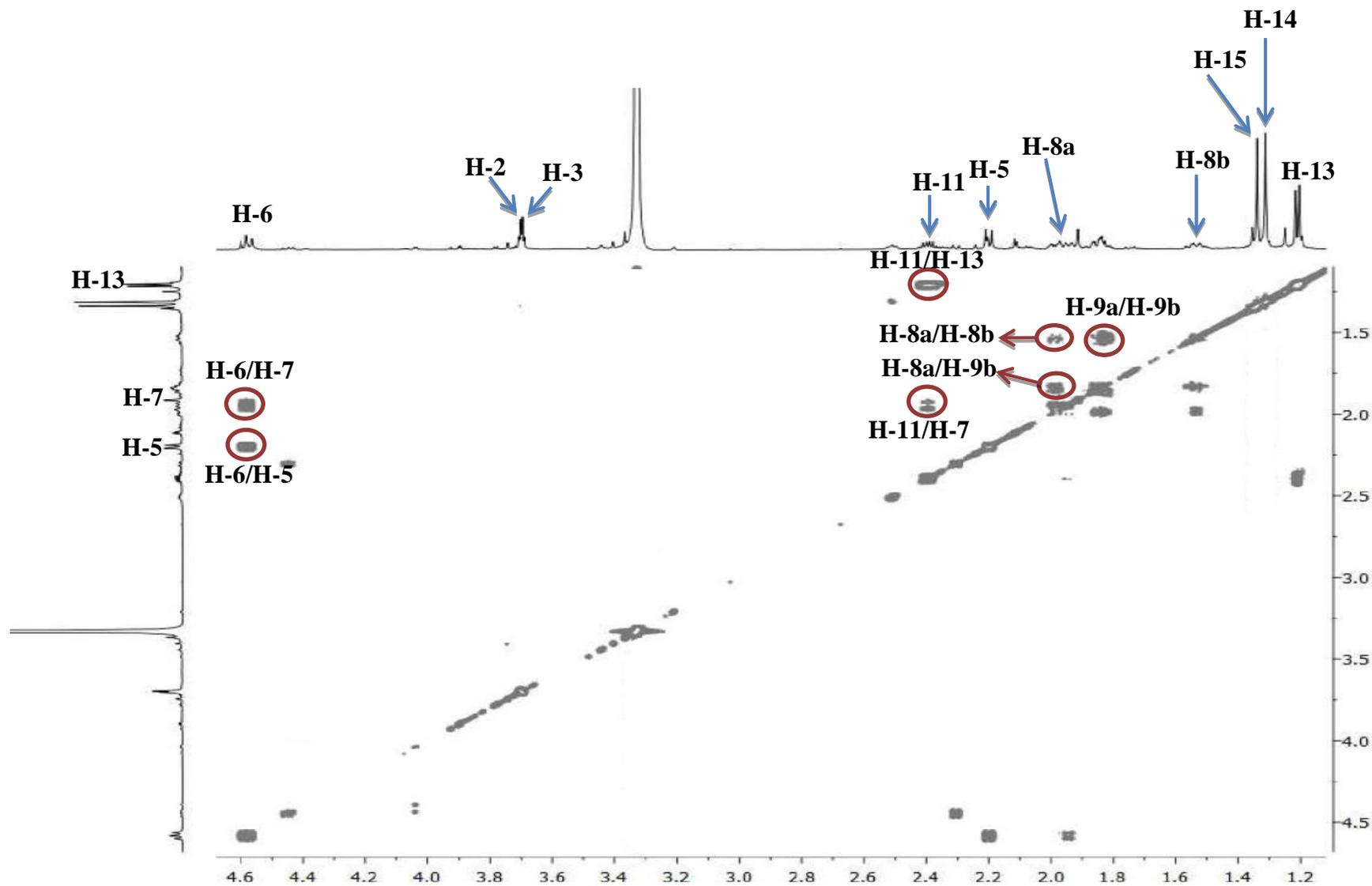
الشكل 32-II : طيف  $^{13}\text{C}$ -RMN للمركب 4 في ال (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



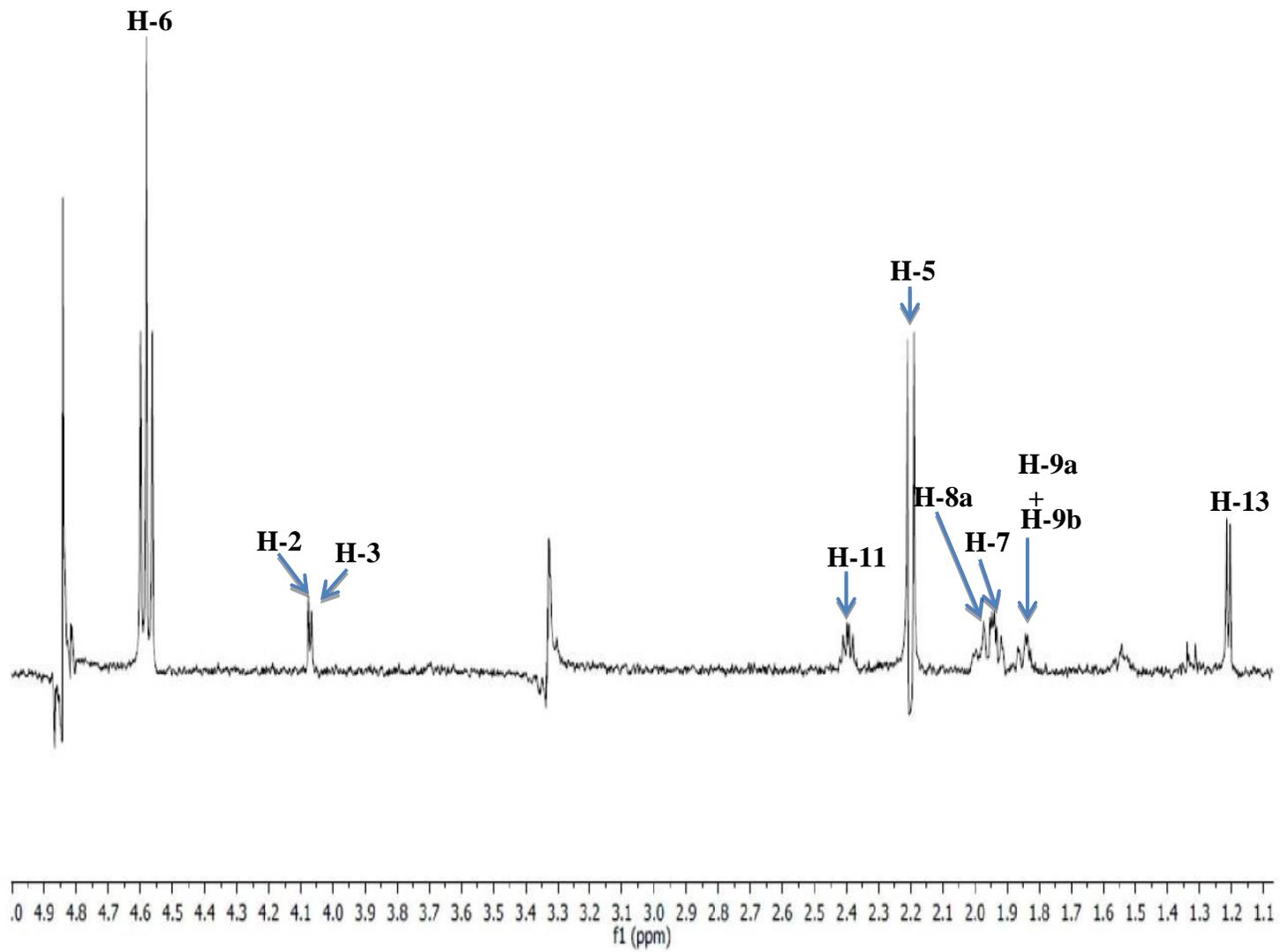
الشكل II-33: طيف الـ  $^1\text{H}$  RMN للمركب 4 في الـ  $(600 \text{ MHz}, \text{CD}_3\text{OD})$



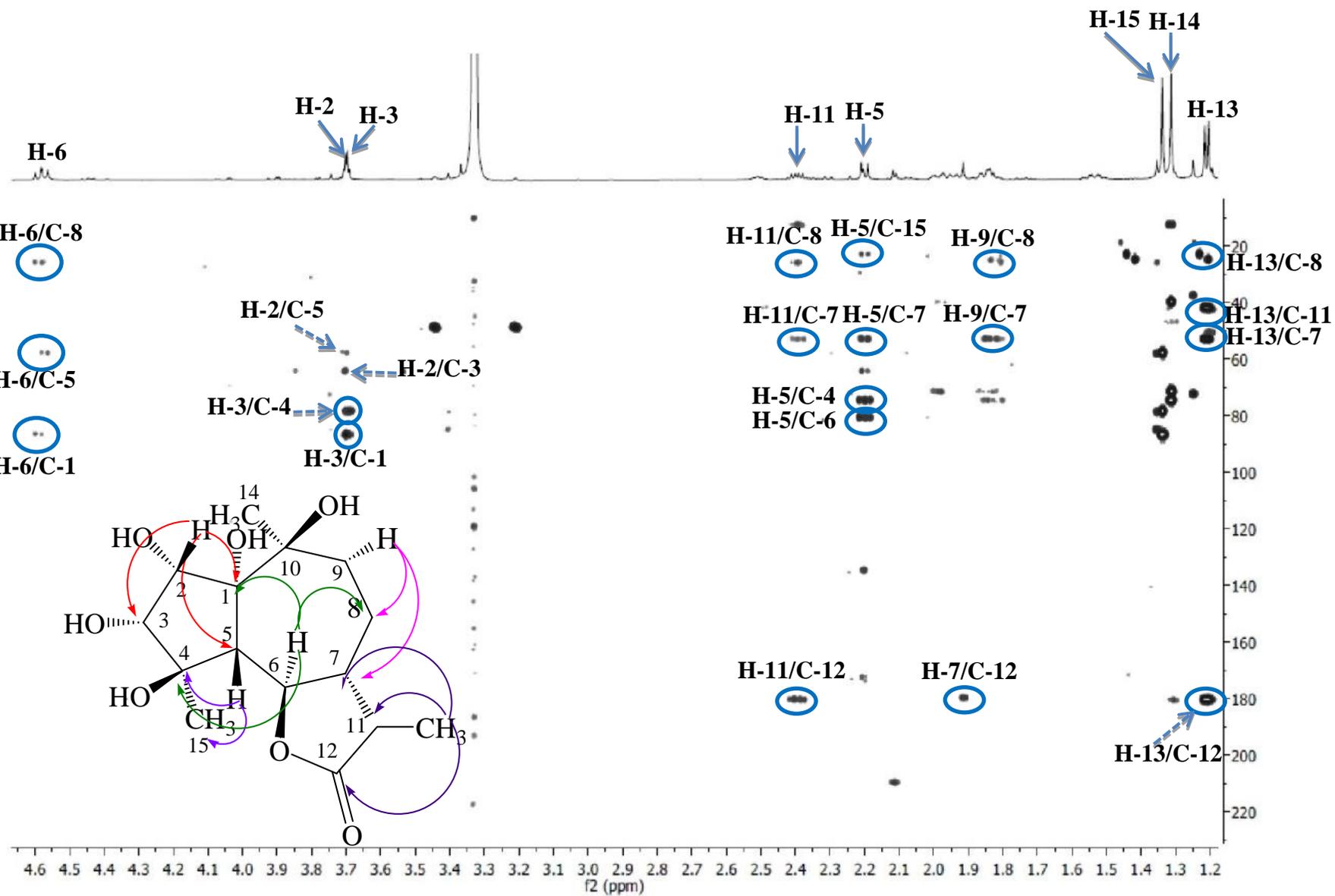
الشكل II-34 : طيف ال HSQC للمركب 4 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل II-35 : طيف ال COSY للمركب 4 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل II-36: طيف ال ROESY 1D للمركب 4 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل II-37 : طيف الـ HMBC للمركب 4 في الـ (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

## 5-II- التعين البنوي للمركب 5 :

هو عبارة عن مسحوق أبيض، سمحت لنا دراسة الأطياف التي تحصلنا عليها و المقارنة بينهما من أطياف  $^{13}\text{C}$ -RMN و HR-ESIMS بالحصول على الصيغة  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$  و بحساب عدد عدم التشبع نجد أن المركب يحتوي على 6 مواقع غير مشبعة.

أظهر طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون  $^{13}\text{C}$ -RMN (الشكل II-41) خمسة عشرة كربون ، بما في ذلك ثلاث مجموعات المثلث (CH<sub>3</sub>) ، ستة مجموعات (CH) اثنان منها مهجنة  $\text{sp}^2$ ، أربعة كربونات رباعية منها مجموعة كربونيل (C=O) مترافقة مع رابطة ثنائية غير مشبعة في الوضعية  $\alpha$  و  $\beta$  تظهر إشارتها على التوالي  $\delta_{\text{C}}=168.8\text{ppm}$  الموافقة للكربون C-2،  $\delta_{\text{C}}=133\text{ppm}$  الموافقة للكربون C-3، إضافة إلى 10 كربونات ذات تهجين  $\text{sp}^3$  منها مجموعتين من (CH<sub>2</sub>) التي تظهر عند كل من  $\delta_{\text{C}}=26.6\text{ppm}$  و  $\delta_{\text{C}}=45.4\text{ppm}$  الموافقة للكربونين C-8 و C-9 على التوالي، 3 مجموعات المثلث (CH<sub>3</sub>) التي تظهر على التوالي عند كل من  $\delta_{\text{C}}=15.2\text{ppm}$ ،  $\delta_{\text{C}}=28.1\text{ppm}$  و  $\delta_{\text{C}}=29.8\text{ppm}$  الموافقة للكربونات C-13، C-14 و C-15.

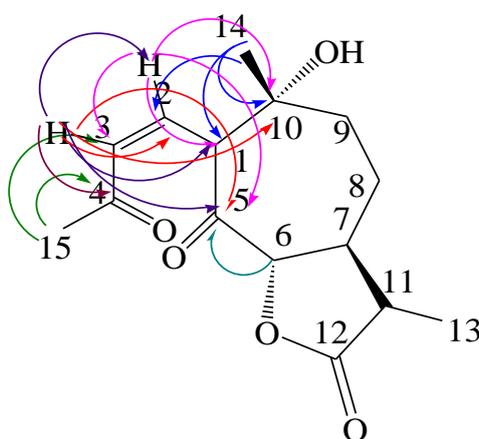
كذلك نستدل من نفس الطيف على وجود كربونين مهجنين  $\text{sp}^2$  ، اثنان كربونيل و كذلك كربون يحمل وظيفة لاكتون و هذه الملاحظات تتوافق مع 4 درجات من عدم التشبع ، لذلك يبدو أن المركب له بنية ثنائية الحلقة.

كما أكد طيف  $^1\text{H}$ -RMN (الشكل II-42) وجود رابطة مضاعفة من النوع AB عند الإشارة  $\delta_{\text{H}}=7.57\text{ppm}$  بشكل ثنائي عريض بتكامل 1H (brd,  $J=7\text{Hz}$ ) الموافقة للبروتون H-2 و إشارة ثنائية عند  $\delta_{\text{H}}=6.11\text{ppm}$  بتكامل 1H الموافقة للبروتون H-3 بثابت تزواج ( $J = 7.0\text{Hz}$ ) مما يقود وجود النظام مقرون (Cis) Cis-2-én-4-one [8].

أظهر نفس الطيف  $^1\text{H}$ -RMN وجود البروتون H-6 المميز للكربون الاكتوني C-6 بإشارة ثنائية عند  $\delta_{\text{H}}=4.52\text{ppm}$  بثابت تزواج ( $J=10.5\text{Hz}$ )، ثلاث مجموعات المثلث، إشارة ثنائية عند  $\delta_{\text{H}}=1.27\text{ppm}$  بثابت تزواج ( $J=6.8\text{Hz}$ ) الموافقة للبروتون H-13، إشارة أحادية عند  $\delta_{\text{H}}=1.51\text{ppm}$  الموافقة للبروتون H-14 و إشارة أحادية عند  $\delta_{\text{H}}=2.17\text{ppm}$  الموافقة للبروتون H-15.

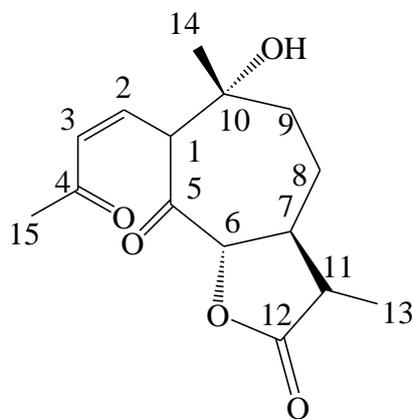
الانزياحات الكيميائية للبروتونات و الكربونات للمركب 5 أعطيت انطلاقا من ملاحظة التعالقات الموجودة في تجارب ROESY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) (الشكل II-43) HSQC (الشكل II-43) و HMBC (الشكل II-44) . نلاحظ على طيف HMBC بقعة تعالق مجموعة المثلث (Me-15) ( $\delta_{\text{H}}=2.17\text{ppm}$ ) والكربونات التي تظهر عند  $133.0\text{ppm}$  و  $207.7\text{ppm}$  موافقة للكربونات C-4 و C-3 على الترتيب. مبينة موقع مجموعة الكربونيل غير المشبعة عند المواقع C-2، C-3، C-4 .

بقعة تعالق مجموعة المثل (Me-14) ( $\delta_H = 1.51$  ppm) والكربونات التي تظهر عند 57.4ppm ،  
 77.5ppm و 168.0ppm موافقة للكربونات C-1، C-10 و C-2 على الترتيب .  
 بقعة تعالق البروتون H-2 عند  $\delta_H = 7.57$  ppm مع الكربونات C-1، C-3، C-5 و C-10 . ثم تظهر على  
 الطيف بقعة تعالق H-3 عند  $\delta_H = 6.11$ ppm مع الكربونات C-1، C-2، C-5 و C-10 (الشكل II-44).  
 و من هذه النتائج نستخلص موقع الرابطة C-4-C-5 للسكويترين و تأكسد الكربونين C-4 و C-5 حيث  
 تشكل مجموعتين كربونيل في C-4 و C-5 .  
 كل هذه المعطيات تمكننا من اقتراح البنية الكيميائية التالية :



شكل II-46: بعض تعالقات HMBC للمركب 5

حددت طريقة الكيمياء الفراغية النسبية بنية المركب 5 بواسطة تحليل 1D ROESY أحادي البعد و  
 مقارنته بالبيبيوغرافيا [9] ، لوحظت العلاقات بين البروتون H-6β عند الإشارة 4.53 ppm و المثل  
 Me-14 والبروتون H-11 مما يدل على أن هذه البروتونات بنفس الاتجاه في المركب 5 و هكذا فان الهيكل  
 الذي تم إنشاؤه للمركب 5 هو :



الشكل II-47: 10- hydroxychabrol-2(3)-en-4,5-dione-12,6α-olide

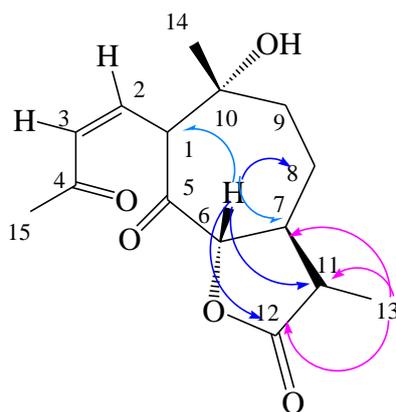
سمحت المقارنة الطيفية بين طيفي ال ROESY ( الشكل II-46 ) و 1D-TOCSY ( الشكل II-45 ) بتحديد نظامي دوران ، بتشجيع الإشارة 4.53 ppm الموافقة للبروتون H-6 في طيف 1D-TOCSY H-6/H-9 على H-6 /H-13 ، و تشجيع الإشارة 6.11ppm الموافقة للبروتون H-3 في طيف 1D-TOCSY ، نظام الدوران -CH=CH-CH- المتعلق ب H-1/ H-3 و الذي اقترح هيكل séco-4,5-guain-12,6-olide [ 9 ] . أشارت جميع المعطيات للرنين النووي المغناطيسي أحادي البعد و ثنائي البعد إلى أن المركب 5 عبارة عن séco-4,5-guain-12,6 $\alpha$ -olide .

كما سمح طيف HSQC ( الشكل II-43 ) من ربط البروتونات بكاربوناتها الخاصة، تم إنشاء موضع المستبدلات في البنية ثنائية الحلقة ، و لا سيما مجموعة الكربونيل  $\alpha$  و  $\beta$  غير المشبعة ، ومجموعة الكحول الرباعية من خلال دراسة ارتباطات C-H طويلة المدى التي لوحظت في طيف HMBC ( الشكل II-44 ) . كما ذكر سابقا عن التعالقات الموجودة في طيف HMBC .

أظهر طيف HMBC ( الشكل II-44 ) تعالقا بين الإشارة عند  $\delta_H = 2.17\text{ppm}$  (Me-15) وإشارات الكربونات C-3 و C-4 ، بين الإشارة (H-2) عند  $\delta_H = 7.57\text{ppm}$  و إشارات الكربونات C-4 ، C-5 و C-10 وبين الإشارة عند (H-1)  $\delta_H = 2.64\text{ppm}$  ورنين الكربونات C-3 ، C-9 و C-6 و بين الإشارة عند  $\delta_H = 1.51\text{ppm}$  (Me-14) و إشارات ذرات الكربون C-1 ، C-9 و C-10 مما يسمح بتوطين مجموعة الهيدروكسيل في C-10 ، مجموعة الكربونيل  $\alpha$  ،  $\beta$  غير المشبعة في C-1 ومجموعة الكربونيل الثانية في C-5 .

علاوة على ذلك ، كانت ارتباطات HMBC واضحة بين إشارة البروتون عند  $\delta_H = 4.53\text{ppm}$  (H-6) ورنين الكربون C-8 ، C-7 و C-10 . و بين الإشارة عند (Me-13)  $\delta_H = 1.27\text{ppm}$  و الإشارات C-7 ، C-11 و C-12 حددت هذه الارتباطات مجموعة 12.6 لاكتون تم الحصول على التكوين المتعلق بالكربون C-1 ، C-6 ، C-7 ، C-11 و C-10 من خلال تحليل الارتباطات التي لوحظت في أطياف 1 D-ROESY . من خلال تشجيع إشارة Me-14 ، لوحظ وجود علاقة مع H-6 ، عن طريق تشجيع الإشارة عند (H-7)  $\delta_H = 2.66\text{ppm}$  من الارتباطات مع ارتباط مع H-1 و Me-13 ، وتمت مقارنة هذه النتائج وتأكيدتها مع المعطيات الببليوغرافية [3] ، لا يزال التكوين المطلق للمركب 5 قيد الإنشاء .

كل النتائج السابقة مدونة في الجدول II-5 .

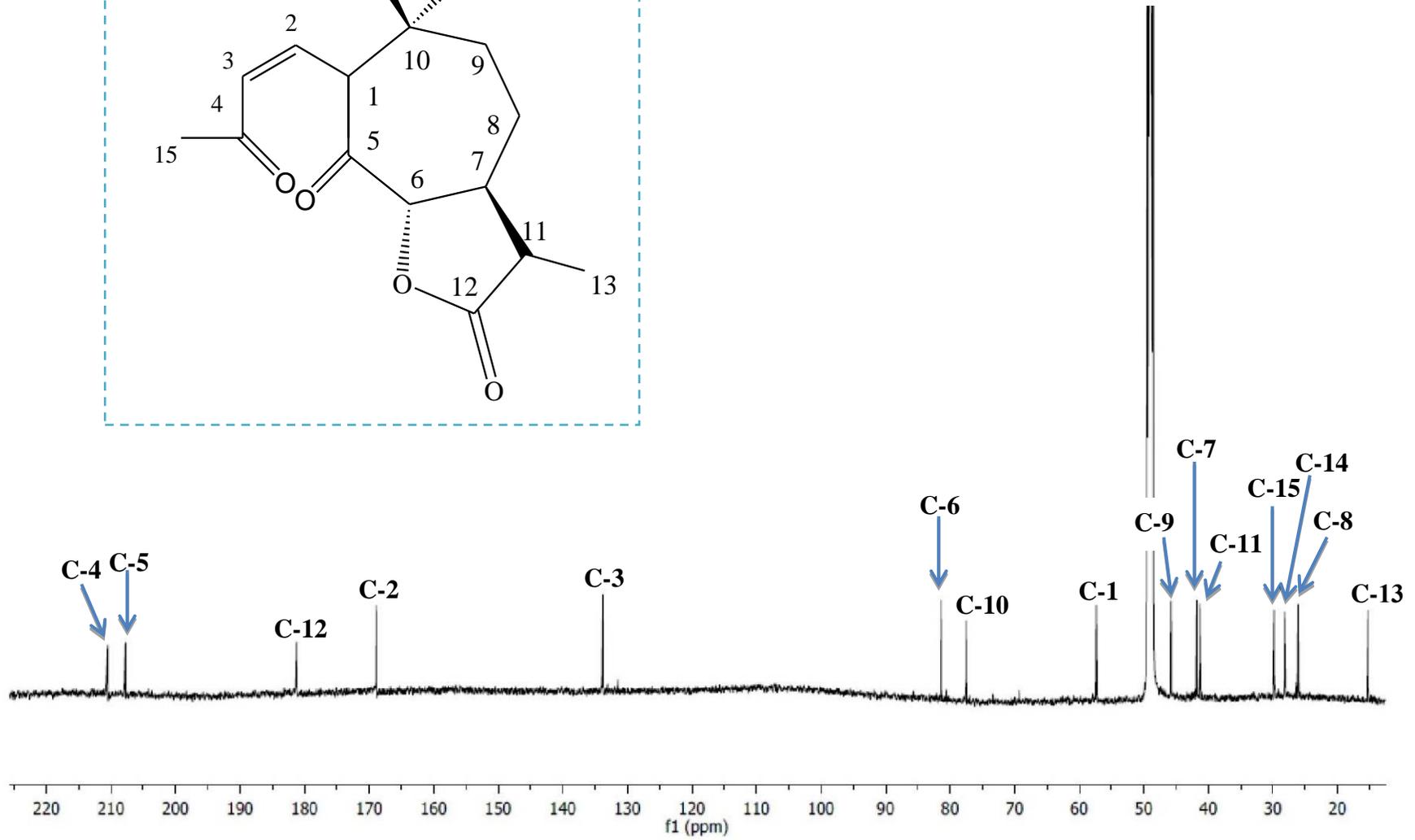
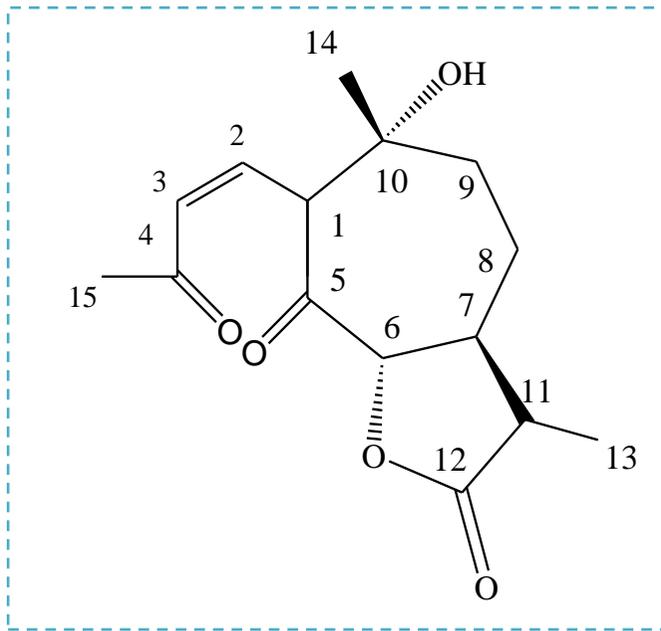


شكل II-48 : بعض تعالقات HMBC للمركب 5

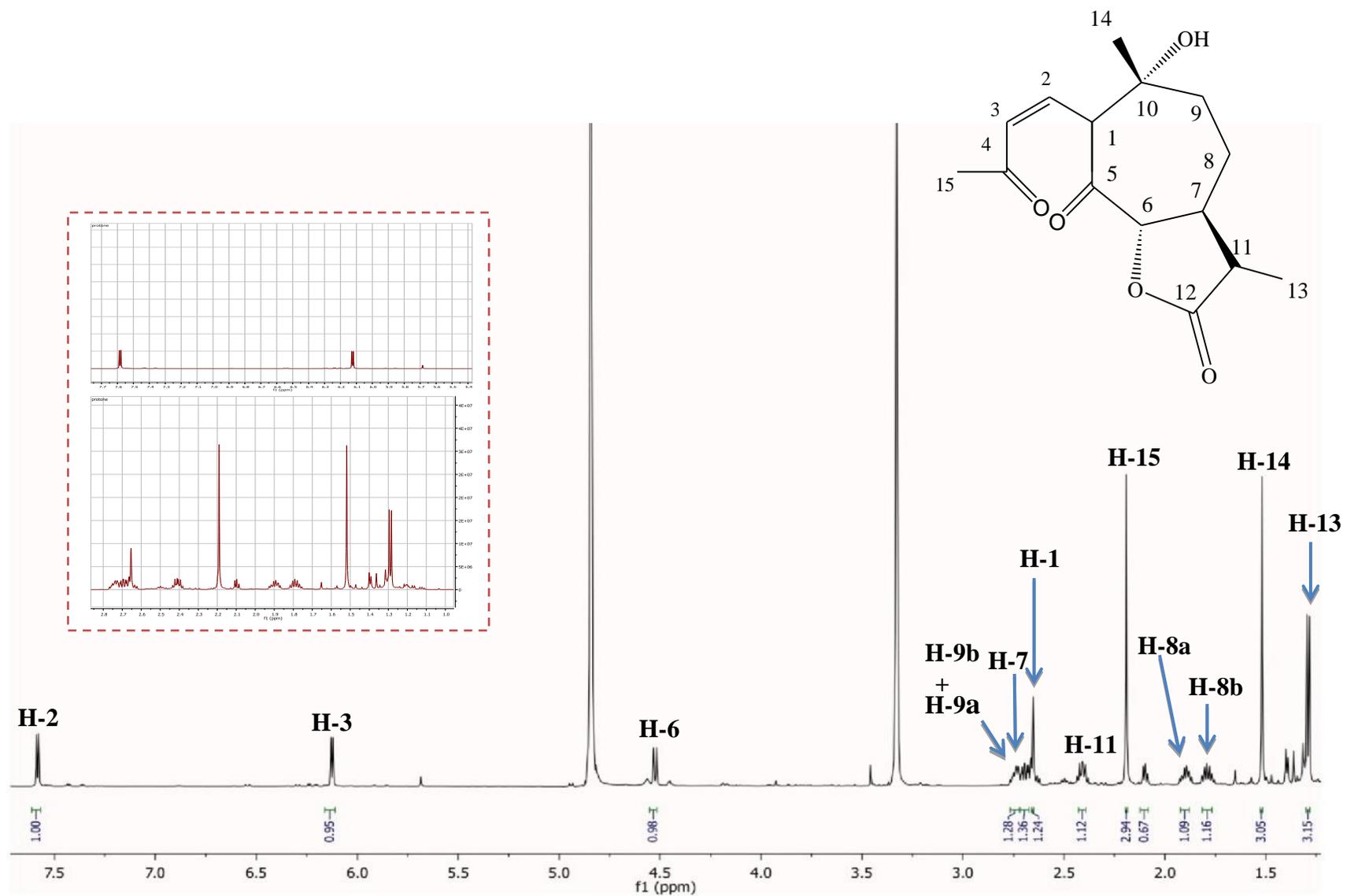
جدول II-5 : المعطيات الطيفية للـ  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\delta$ ; ppm,  $J$ ; Hz) والـ  $^{13}\text{C}$  RMN

(150 MHz,  $\delta$ ; ppm,  $J$ ; Hz) للمركب 5 في  $\text{CD}_3\text{OD}$

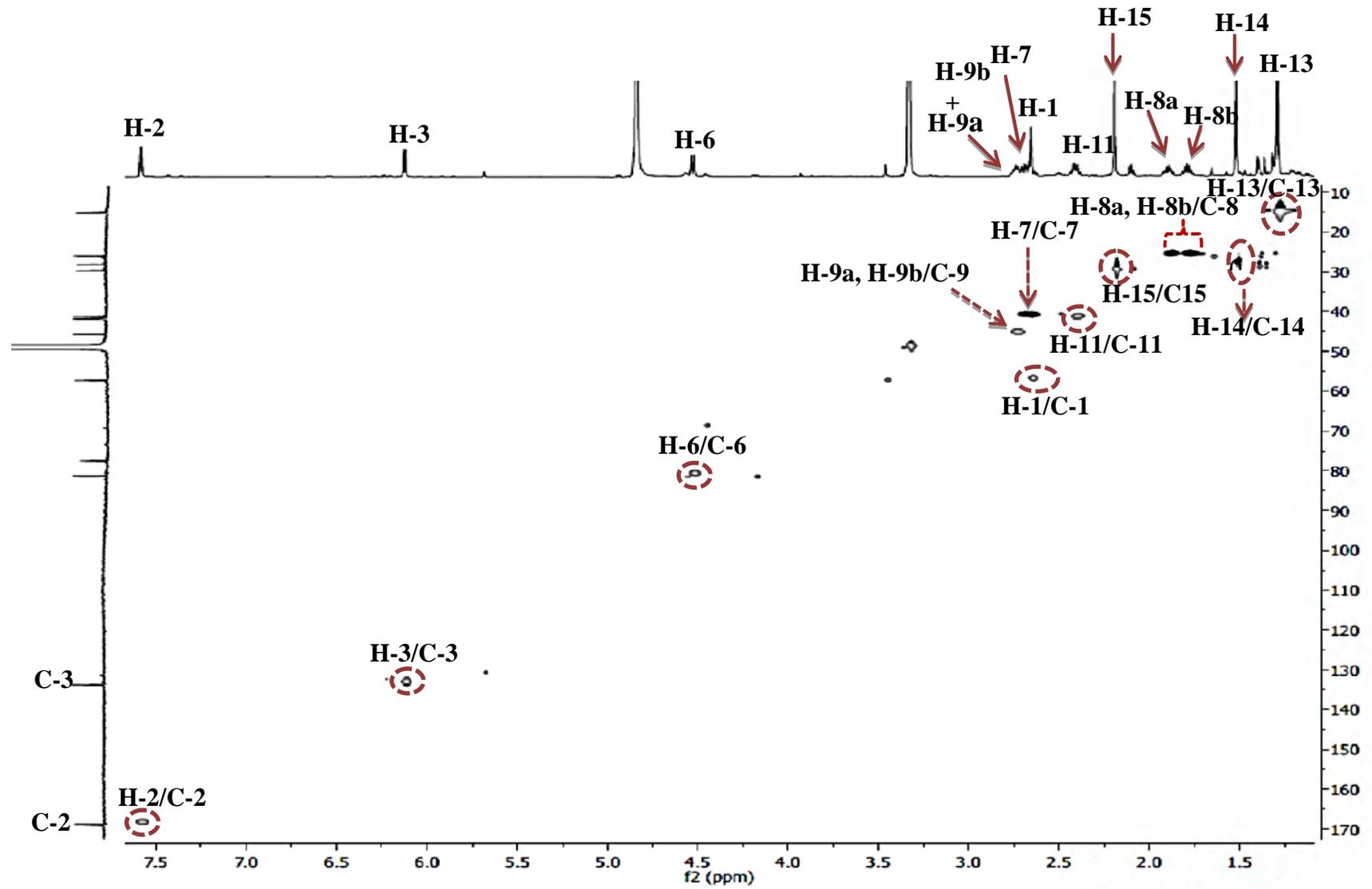
المركب 5		الموضع
$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	
57.4	2.64 br s	1
168.0	7.57 br d (7.0)	2
133.0	6.11 d (7.0)	3
210.5	-	4
207.7	-	5
81.4	4.52 t (10.5)	6
41.8	2.66m	7
26.6	1.88m	8a
	1.77m	8b
45.4	2.70m	9a
	2.74m	9b
77.5	-	10
41.3	2.39m	11
181.2	-	12
15.2	1.27 d (6.8)	13
28.1	1.51 s	14
29.8	2.17 s	15



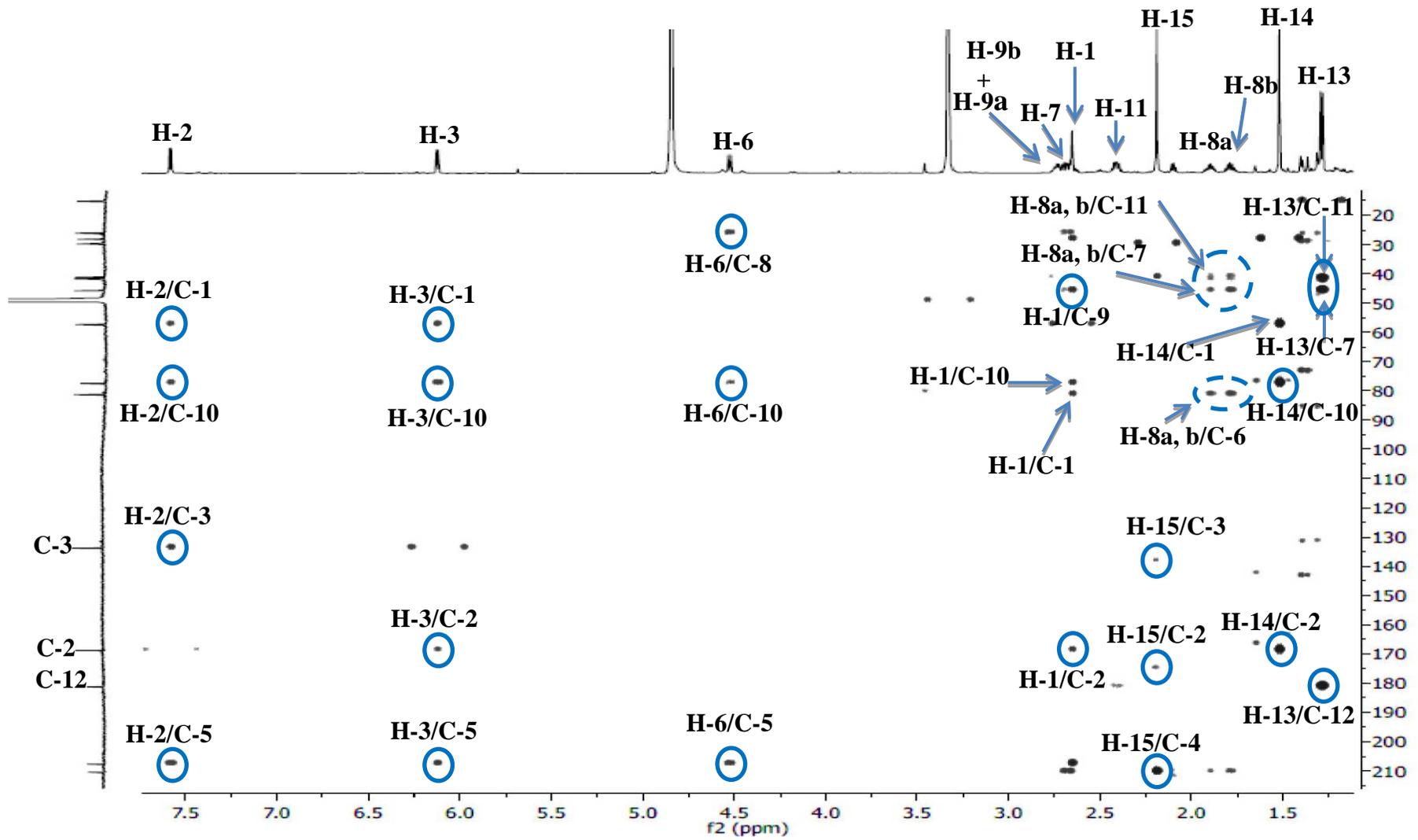
الشكل II-41 : طيف ال<sup>13</sup>C-RMN للمركب 5 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



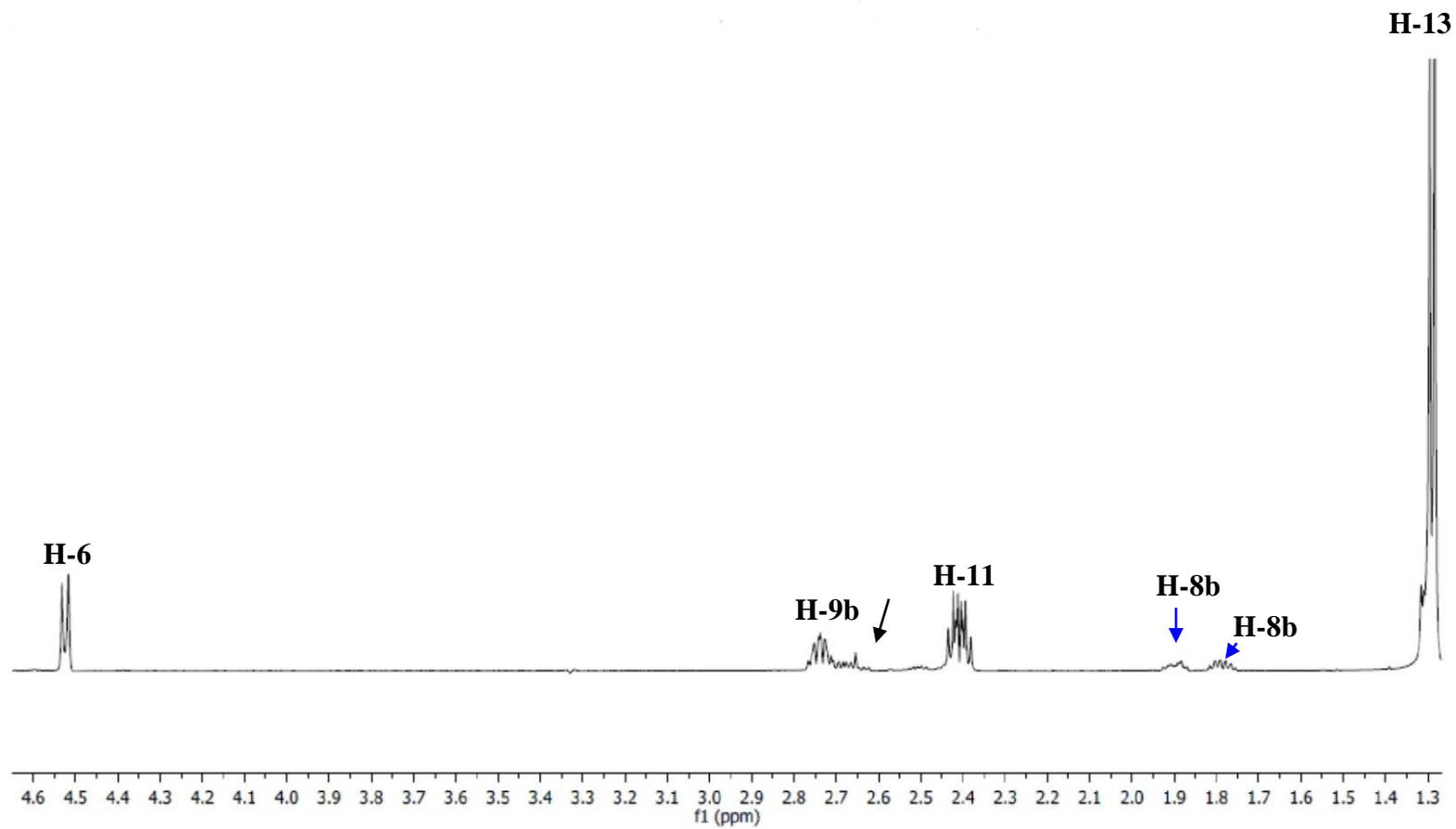
الشكل II-42 : طيف الـ  $^1\text{H}$  RMN للمركب 5 في الـ  $\text{CD}_3\text{OD}$  (600 MHz)



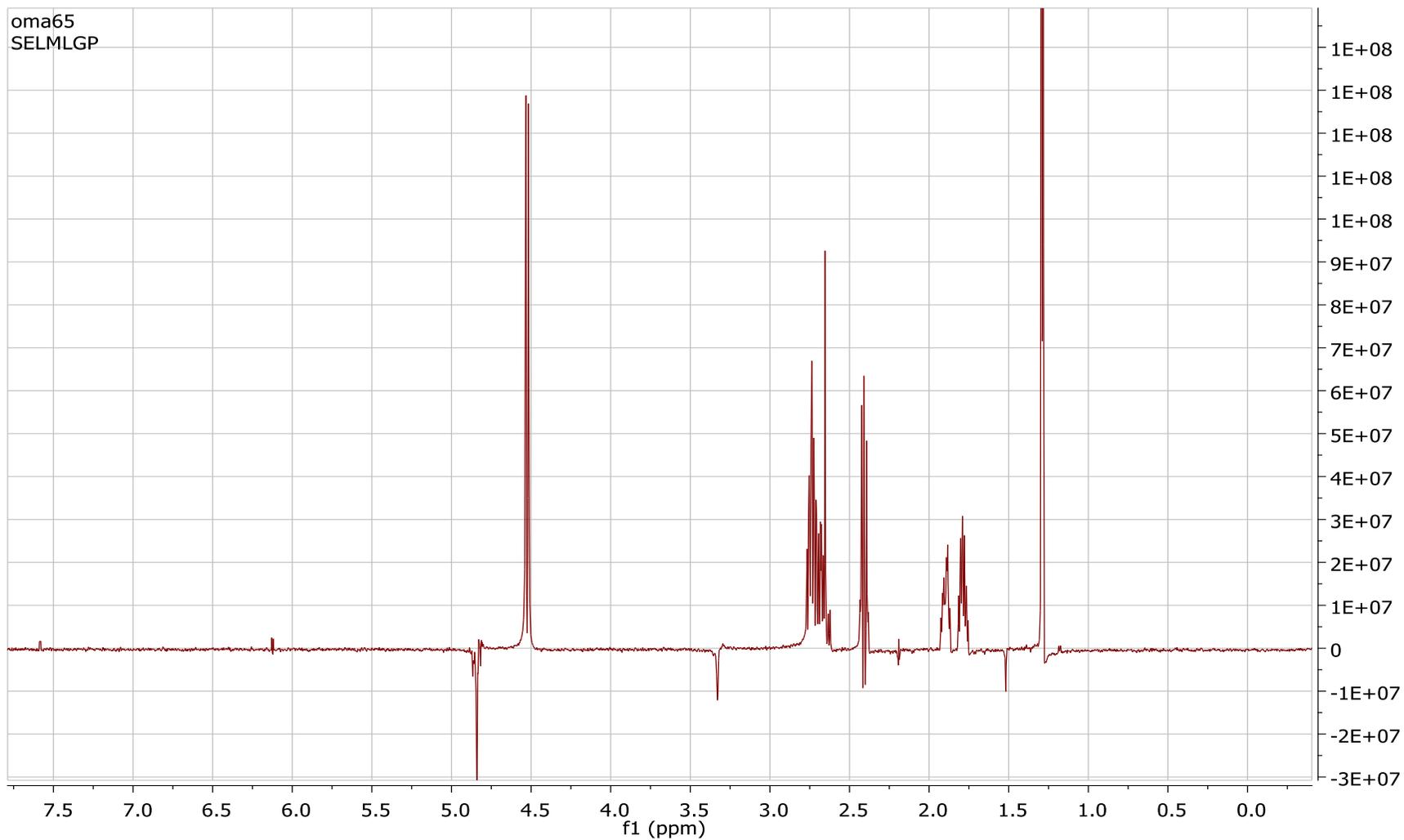
الشكل II-43 : طيف ال HSQC للمركب 5 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل II-44: طيف الـ HMBC للمركب 5 في الـ (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل II-45: طيف ال 1D TOCSY للمركب 5 في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



الشكل 46-II: طيف ال  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY للمركب 5 في ال (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

II-6- المركبات المعروفة معزولة من النبتة *O.mixta*.

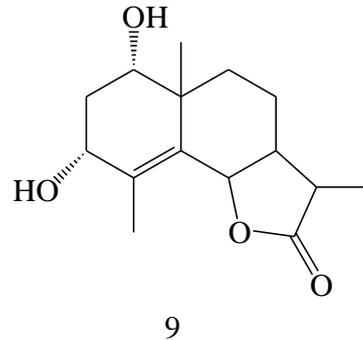
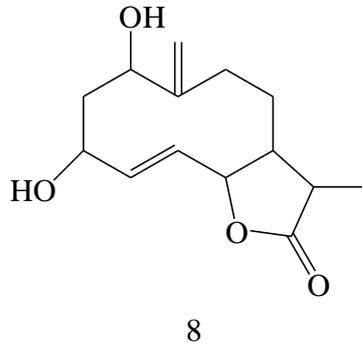
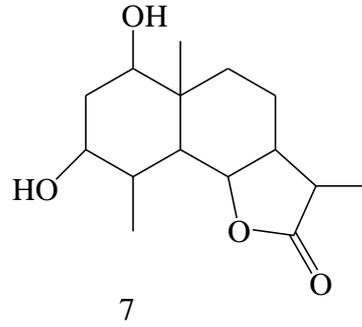
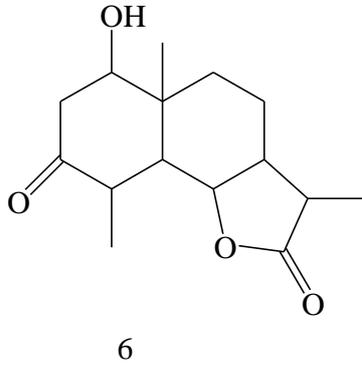
تم التعرف على المركبات المتبقية (9-6) { الشكل III-16 } بواسطة تقنية RP-HPLC حيث أعطت زمن احتباس موافق لنفس زمن احتباس المركبات التالية على التوالي

( $t_R = 37$  min (9) ,  $t_R = 65$  min (8),  $t_R = 54$  min (7),  $t_R = 36$  min (6))

و بالاعتماد على مطيافية الكتلة (MS) و ذلك بمطابقتها بالمعطيات البيبلوغرافية أعطت الصيغ التالية

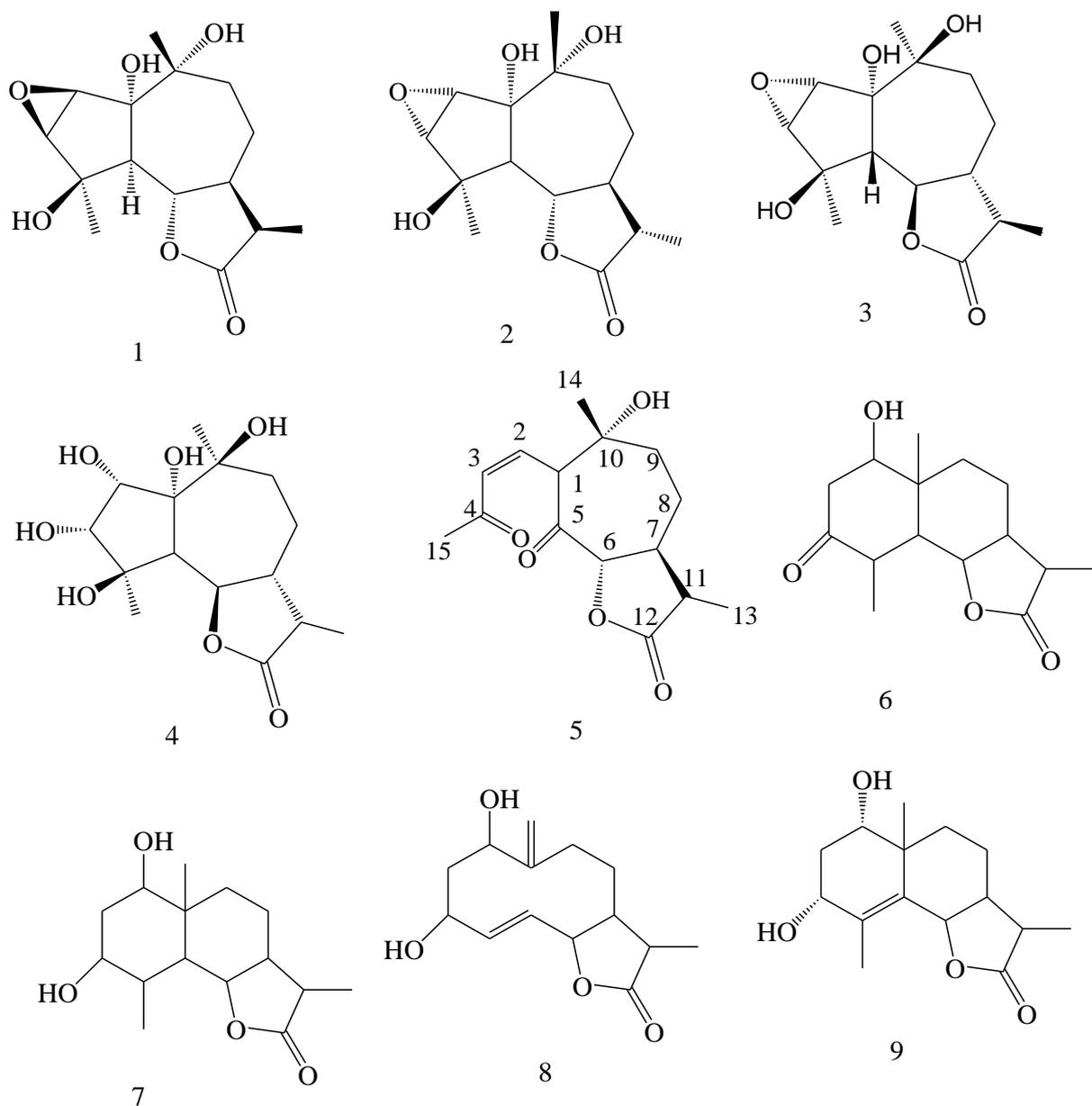
: [5-2]

- 1-hydroxy-3-oxo-eudesman-12,6 $\alpha$ -olide (6)[4]
- 11 $\beta$ ,13-dihydro-1-epireynosin (7)[5]
- 1,2 -dihydroxy-germacr-10(15)-en-12,6 $\alpha$ -olide (8)[6]
- Isoerivanin (9)[7]



الخلاصة

أدت الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلص الكلوروفورمي لنبتة *O. mixta* إلى عزل و التعرف على تسع مركبات :



شكل رقم 49-II: بنية المركبات السيسكويتربينية (1-9) المعزولة من نبتة *O. mixta*

لتوضيح تأثير المركبات الغوانوليديية من 1-9 على صلاحية البلاعم J774A ، عولجت الخلايا بالمركبات المعزولة (100- 25 ميكرومتر) لمدة 24 ساعة أشارت المعطيات قابلية بقاء البلاعم J774A و عدم تتأثرها بالمركبات المختبرة .

## II-7-النشاط المضاد للتكاثر

تم تقييم النشاط المضاد للتكاثر للمركبات المعزولة من نبتة *O. mixta* ، في خط خلوي من أصل سرطان الدم Jurkat ، و في خلايا سرطان عنق الرحم HeLa ، عولجت هاتاه الخلايا بتركيز متزايدة لكل مركب ، و تم تقييم عدد الخلايا القابلة للحياة بعد 72 سا بواسطة MTT. لمقارنة التأثير السام للخلايا ، تم حساب  $EC_{50}$  من منحنيات الجرعة و التأثيرات الخاصة لكل منهما من البيانات التي تم الحصول عليها ، تبين أن المركب 3 فقط له تأثير سمي معتدل لجميع خطوط الخلايا التي تم إختبارها (الجدول II-6) ،  $EC_{50}$  للمركبات المعزولة.

تمثل البيانات التي تم الحصول عليها متوسط قيمة  $\pm SD$  لـ 3 تجارب مستقلة. من النتائج التي تم الحصول عليها ، تم العثور على المركب 3 فقط ، وهو مشتق سيكو غويانيوليديك ، بسمية معتدلة لجميع خطوط الخلايا التي تم إختبارها.

الجدول II-6: قيم  $EC_{50}$  للمركبات المعزولة لنبتة *O. mixta*

Hela $EC_{50}$ ( $\mu M$ )	Kurta $EC_{50}$ ( $\mu M$ )	الخلايا المركبات
>100	>100	1
>100	>100	2
$73 \pm 2.2$	$65 \pm 1.6$	3
>100	>100	4
>100	>100	5
>100	>100	6

## المراجع

- [1] Li ,Y., Zhang, M.L ., Cong, B., Wang ,S.M., Dong ,M., Sauriol ,F., Huo C.H ., Shi Q.W., Gu ,Y.C., Kiyota ,H., Achillinin ,A . (2011). a cytotoxic guaianolide from the flower of Yarrow, *Achillea millefolium*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* . 75: 1554–1556. Volume 75, 2011.
- [2] Bifulco ,G., Dambruoso ,P., Gomez-Paloma, L., Riccio ,R. (2007). Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods. *Chemical Reviews*. 107: 3744–3779.
- [3] Di Micco S., Chini MG., Riccio R., Bifulco G. (2010). Quantum mechanical calculation of NMR parameters in the stereostructural determination of natural products. *European Journal Organique Chemistry*. 1411–1434.
- [4] Yamakawa K, Nishitani K. (1976). Studies on the terpenoids and related alicyclic compounds. VIII. Chemical transformation of  $\alpha$ -santonin into arsanin and arsanin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 24: 2810–2817.
- [5] Marco JA, Sanz JF, Jakupovic J, Huneck S. (1990). New sesquiterpene lactones and acetylenes from *Chrysanthemum lavandulifolium*. *Tetrahedron*. 46: 6931–6938.
- [6] Marco JA, Sanz-Cervera JF, Manglano E, Sancenon F, Rustaiyan A, Kardar M. (1993) . Sesquiterpene lactones from Iranian *Artemisia* species. *Phytochemistry* . 34: 1561–1564
- [7] Boriky D, Berrada M, Talbi M, Keravis G, Rouessac F. (1996). Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*; 43: 309–311.

# الفصل الثالث

المركبات المفصولة من النبتة

*Ormenis praecox*

ودراسة الفعالية المضادة للأكسدة و  
المضادة للبكتيريا

الفصل 3 : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox*

III-1-نتائج الكشف عن نواتج الأيض الثانوي

نتائج الفحص الفيتوكيميائي (Screening phytochimique) للمستخلصات الثلاث الكلوروفورمي ،خلات  
الاثيل و البوتانولي للنبتة *Ormenis praecox* مدونة في الجدول (III-1) :

الجدول III-1: نتائج الكشف عن نواتج الأيض الثانوي

الأيض الثانوي	المستخلصات		
	CHCl <sub>3</sub>	AcOEt	n-BuOH
Polyphénols	-	+	+
Flavonoïdes	-	+	+
Tanins	-	-	-
Triterpènes	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-

تبين النتائج بأن المستخلصين AcOEt و n-BuOH يحتويان على كل من متعددات الفينولات و  
الفلافونويدات على عكس المستخلص CHCl<sub>3</sub>.

بينما تفتقر النبتة ككل بجميع مستخلصاتها إلى كل من التانينات ، التربينات الثلاثية و القلويدات ، هذه  
النتائج جاءت مطابقة للدراسة البيبلوغرافية لجنس *Ormenis* [2,1] .

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

III-2-التعين البنيوي للمركبات المفصولة من نبتة *Ormenis praecox* :

III-2-1-تحديد بنى المركبات المفصولة من المستخلص الكلوروفورمي :

III-2-1-1-التعين البنيوي للمركب P<sub>1</sub> [4,3] :

\* الخصائص الطيفية:

● مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ( <sup>1</sup>H-RMN, CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz ) :

جدول III-2: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب P<sub>1</sub>

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج (Hz)	التكامل	δ <sub>H</sub> (ppm)
H-1	/	/	/
H-2	br s	1H	6.97
H-3	/		/
3-OMe	s	3H	3.84
H-4	/		/
H-5	d (8.0 Hz)	1H	6.67
H-6	brd (8.0 Hz )	1H	6.85
H-7	d (6.3 Hz)	1H	5.50
H-8	m	1H	3.47
H-9a	m	1H	3.84
H-9b	m	1H	3.75
H-1'	/	1H	/
H-2'	s	1H	6.74
H-3'	/	/	/
3'-OMe	s	3H	3.80
H-4'	/	/	/
H-5'	/	/	/
H-6'	br s	1H	6.74
H-7'	(t, J=7.7Hz)	2H	2.64
H-8'	(t, J=7.7Hz)	2H	1.89
H-9'	(t, J=6.4Hz)	2H	3.56

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

• مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ( $^{13}\text{C}$ -RMN,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) :

جدول III-3: نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب  $\text{P}_1$

الكربون الموافق	$\delta\text{c}$ (ppm)	الكربون الموافق	$\delta\text{c}$ (ppm)
C-1'	136.9	C-1	134.0
C-2'	117.9	C-2	110.6
C-3'	129.5	C-3	149.1
3'-OMe	56.8	3-OMe	56.4
C-4'	147.4	C-4	147.5
C-5'	145.3	C-5	116.1
C-6'	114.1	C-6	119.7
C-7'	32.9	C-7	89.0
C-8'	35.8	C-8	55.4
C-9'	62.2	C-9	65.0

• قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب:

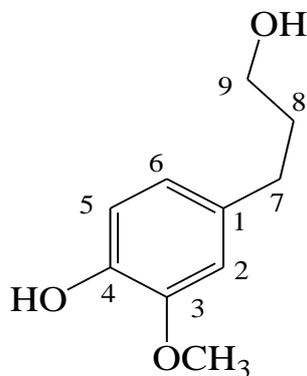
مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون  $^{13}\text{C}$ -RMN (الشكلين III-1، III-2) للمركب  $\text{P}_1$  المدونة

نتائجه في الجدول (III-2) تشير إلى وجود 20 ذرة كربون من بينها :

- سبع مجموعات مثنى CH منها خمس مجموعات ذو تهجين  $\text{sp}^2$  و مجموعتين ذات تهجين  $\text{sp}^3$ .

- أربع مجموعات ميثيلين  $-\text{CH}_2-$  ، إضافة إلى سبع كربونات رباعية. مطابقة هذه المعطيات مع

المعطيات الببليوغرافية تدل على وجود dihydroconiferyl alcohol (الشكل A) [5,3].



الشكل A : هيكل dihydroconiferyl alcohol

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

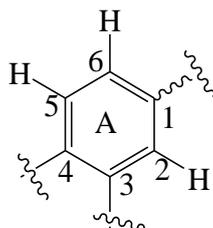
يظهر طيف  $^1\text{H-NMR}$  ( الشكل III-3) بروتونات عطرية على شكل نظام ABX تدل على وجود حلقة ثلاثية الاستبدال حيث جاءت بروتوناتها كما يلي :

◀ إشارة عريضة بتكامل 1H عند  $\delta_{\text{H}} = 6.97 \text{ ppm}$  أسندت للبروتون H-2 ( الشكل III-3-1).

◀ إشارة ثنائية عريضة بتكامل 1H عند  $6.84 \text{ ppm}$  بثابتي تزاوج ( $J=8.6\text{Hz}$ ) الموافقة للبروتون H-6 ( الشكل III-3-1).

◀ إشارة ثنائية بتكامل 1H عند  $\delta_{\text{H}} = 5.50\text{ppm}$  بثابته تزاوج ( $J=6.3\text{Hz}$ ) أسندت للبروتون H-5 ( الشكل III-3-2) هذه البروتونات خاصة بالحلقة A.

- طيف HSQC ( الشكل III-4) مكننا من ربط البروتونات السابقة بالكربونات الحاملة لها و التي تظهر عند  $\delta_{\text{C}} = 110.57 \text{ ppm}$  ,  $\delta_{\text{C}} = 116.14 \text{ ppm}$  و  $\delta_{\text{C}} = 119.70 \text{ ppm}$  الموافقة على التوالي للكربونات C-2 , C-5 و C-6 .



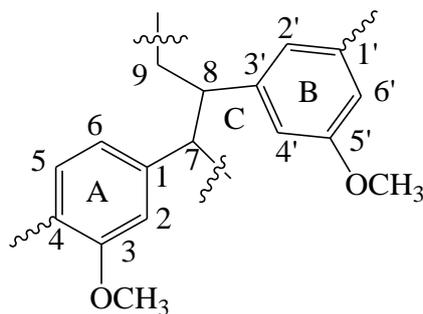
الشكل III-5 : تمثيل جزئي أول للمركب P<sub>1</sub>

كما بين طيف البروتون وجود مجموعتي ميثوكسي التي تظهر على شكل إشارتين أحاديتين بتكامل 3H عند كل من  $\delta_{\text{H}} = 3.84 \text{ ppm}$  الموافقة ل-OMe و  $\delta_{\text{H}} = 3.80 \text{ ppm}$  الموافقة ل-OMe<sup>3</sup> ( الشكل III-3-3) و التي تظهر في طيف الكربون على شكل إشارتين عند كل من  $\delta_{\text{C}} = 56.38 \text{ ppm}$  و  $\delta_{\text{C}} = 56.77 \text{ ppm}$  على التوالي .

◀ إشارة ثنائية بتكامل 1H عند  $\delta_{\text{H}} = 5.50\text{ppm}$  بثابته تزاوج  $J=6.3\text{Hz}$  الموافقة ل H-7 ( الشكل III-3-2).

◀ إشارة بتكامل 1H عند  $\delta_{\text{H}} = 3.47 \text{ ppm}$  موافقة للبروتون H-8 ( الشكل III-3-3).

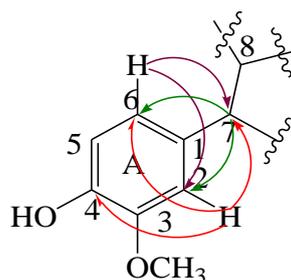
كلتا الإشارتين متعلقة في طيف COSY ( الشكل III-6 ) نربط هاتين الإشارتين بالإشارتين التي تظهر عند  $\delta_{\text{C}} = 88.9 \text{ ppm}$  و  $\delta_{\text{C}} = 55.4 \text{ ppm}$  لتعلقهما في طيف HSQC (الشكلين III-4، III-4-1) و الموافقة على التوالي للكربونين C-7 و C-8 [4,3].



الشكل III-7: تمثيل جزئي أول للمركب P<sub>1</sub>

في طيف HMBC (الشكل III-8) نلاحظ بقعة تعالق بين البروتون H-7 و الكربونين C-2 ، C-6 و الكربون الذي يظهر عند  $\delta_c = 130.6$  ppm لا يمكن أن يكون إلا للكربون C-1 للحلقة العطرية A كذلك أعطى هذا الأخير تعالقا مع الكربونين C-8 و C-9 (الشكل III-8-1).

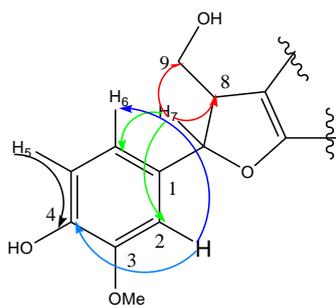
على نفس الطيف نلاحظ بقع تعالق بين البروتون H-6 و الكربون C-7 المدون في الجدول (III-3) (الشكل III-8-1) و الكربون الذي يظهر عند  $\delta_c = 145.26$  ppm الموافق للكربون C-4 ، قيمة إزاحته الكيميائية و غياب أي بقع تعالق مع المستبدلات الأخرى تؤكد أنه حامل لمجموعة هيدروكسيل ، كما نلاحظ بقع تعالق بين البروتون H-2 و الكربون C-4 ، C-6 و C-7 (الشكلين III-8 , III-8-1) و الكربون الذي يظهر عند  $\delta_c = 147.49$  ppm أسند إلى الكربون C-3 ، يعطي هذا الأخير بقعة تعالق مع مجموعة الميثوكسي ما يؤكد ارتباطها بالحلقة A في الموقع 3.



الشكل III-9 : مختلف تعالقات HMBC لهيكل المركب P<sub>1</sub>

كما أعطى طيف COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) (الشكل III-6-1) بقع تعالق البروتون H-7 مع كل من H-6 و H-2 عند كل من  $\delta_H = 6.85$  ppm و  $\delta_H = 6.97$  ppm على التوالي .

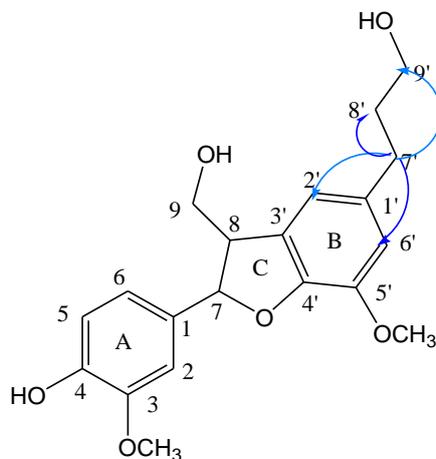
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا



الشكل III-10 : مختلف تعالقات HMBC لهيكل المركب P<sub>1</sub>

- إشارة ثلاثية بتكامل 2H عند  $\delta_H = 2.61 \text{ ppm}$  بثابتة تزاوج  $J = 6.3 \text{ Hz}$  أسندت للبروتون H-7 (الشكل III-4) طيف ال COSY و HSQC أكد ذلك [3].

بين طيف HMBC ( الشكل III-8) بقع تعالق بين البروتون H-7' و الكربونين C-2' ، C-6' و الكربون الذي يظهر عند  $\delta_C = 137 \text{ ppm}$  لا يمكن أن يكون إلا للكربون C-1' للحلقة العطرية B كذلك أعطى هذا الأخير تعالقا مع الكربونين C-8' و C-9' ( الشكل III-8-1) .



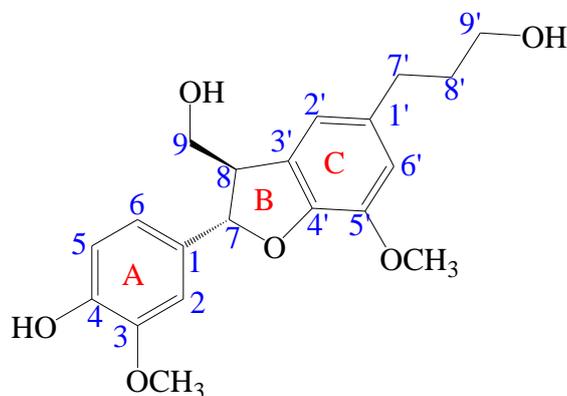
الشكل III-11 : مختلف تعالقات HMBC لهيكل المركب P<sub>1</sub>

- ◀ إشارة متعددة بتكامل 2H عند  $\delta_H = 1.89 \text{ ppm}$  الموافقة ل H-8' (الشكل III-4). كما أظهر طيف HMBC ( الشكل III-8) بقع تعالق بين البروتون H-6' و الكربونين C-2' و C-7' المدونين في الجدول (III-2) و الكربون الذي يظهر عند  $\delta_C = 149.0 \text{ ppm}$  الموافق للكربون C-4' ، كما نلاحظ بقع تعالق بين البروتون H-2' و الكربون C-4' ، C-6' و C-7' و الكربون الذي يظهر عند  $\delta_C = 145.26 \text{ ppm}$  أسند إلى الكربون C-3' ، يعطي هذا الأخير بقعة تعالق مع مجموعة الميثوكسي ما يؤكد ارتباطها بالحلقة B في الموقع 3'.

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

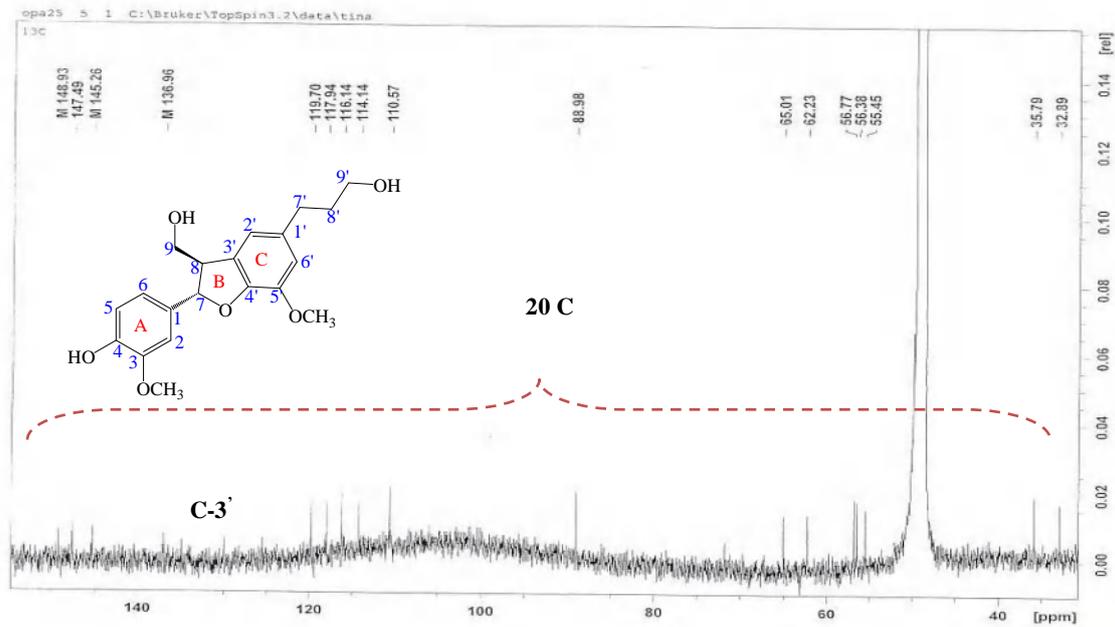
و بالرجوع إلى باقي الإشارات الأخرى المدونة في الجدول (2-III) و التي عند مقارنتها بباقي المعطيات الطيفية الأخرى بما ذكر في المرجع [5].

أظهر طيف البروتون  $^1\text{H-NMR}$  (الشكل III-3) و ثنائي البعد HSQC (الشكل III-4، III-16) وجود اشارات عند  $\delta_{\text{H}} = 3.47\text{ppm}$  (1H,m,H-8)  $\delta_{\text{H}} = 3.83\text{ppm}$  (1H,m,H-9a)  $\delta_{\text{H}} = 3.75\text{ppm}$  (1H,dd,H-9b) و التي أسندت إلى الكربونات التالية C-8 و C-9، ظهور إشارات أخرى عند كل من  $\delta_{\text{H}} = 3.56\text{ppm}$  (2H,t,J=6.4,H-9')  $\delta_{\text{H}} = 1.80\text{ppm}$  (2H,m, H-8') و التي أسندت إلى الكربونات التالية C-8' و C-9'. كل النتائج السابقة مدونة في الجدول (2-III). مجموع هذه المعطيات يسمح لنا بوضع البنية النهائية للمركب **P1** (7R,8S)-Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol (Fukiyama et al,1996)

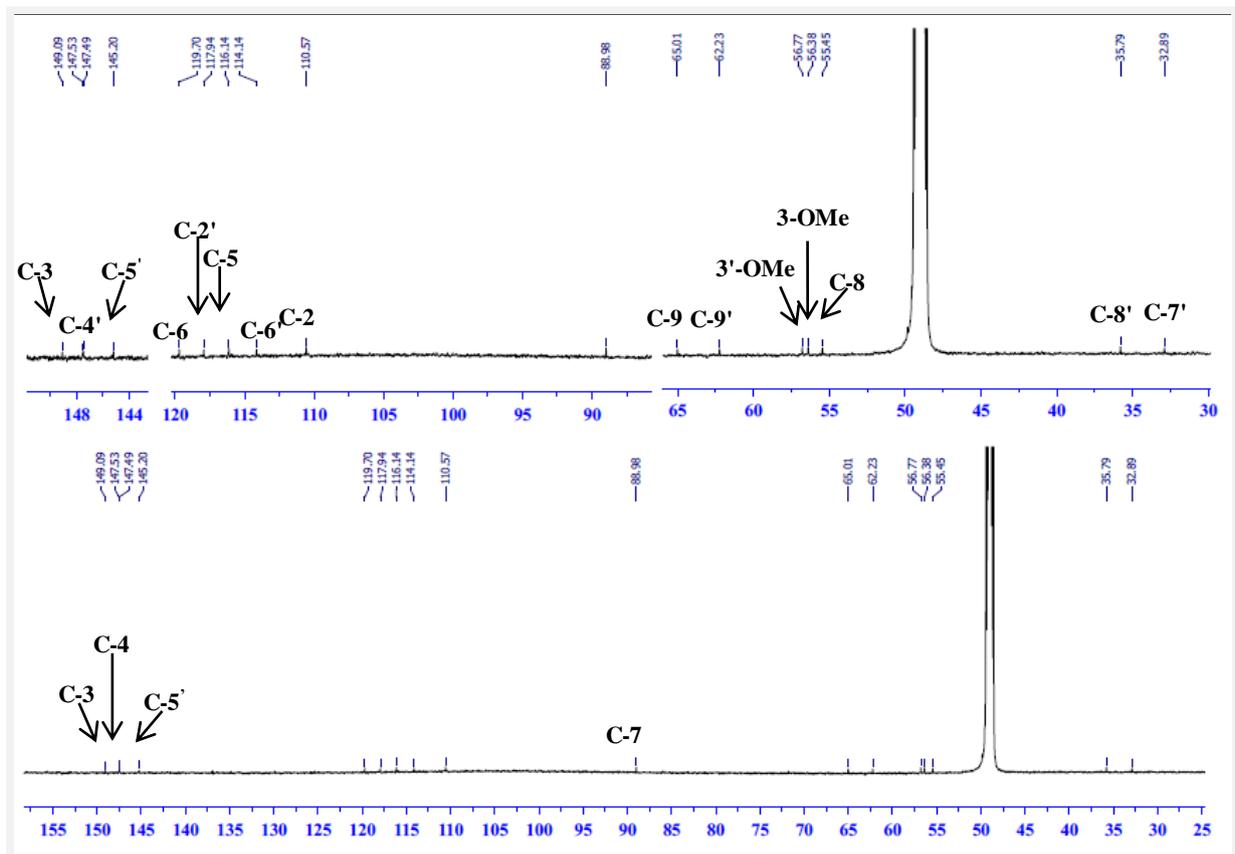


الشكل III-12 : (7R,8S)-Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا

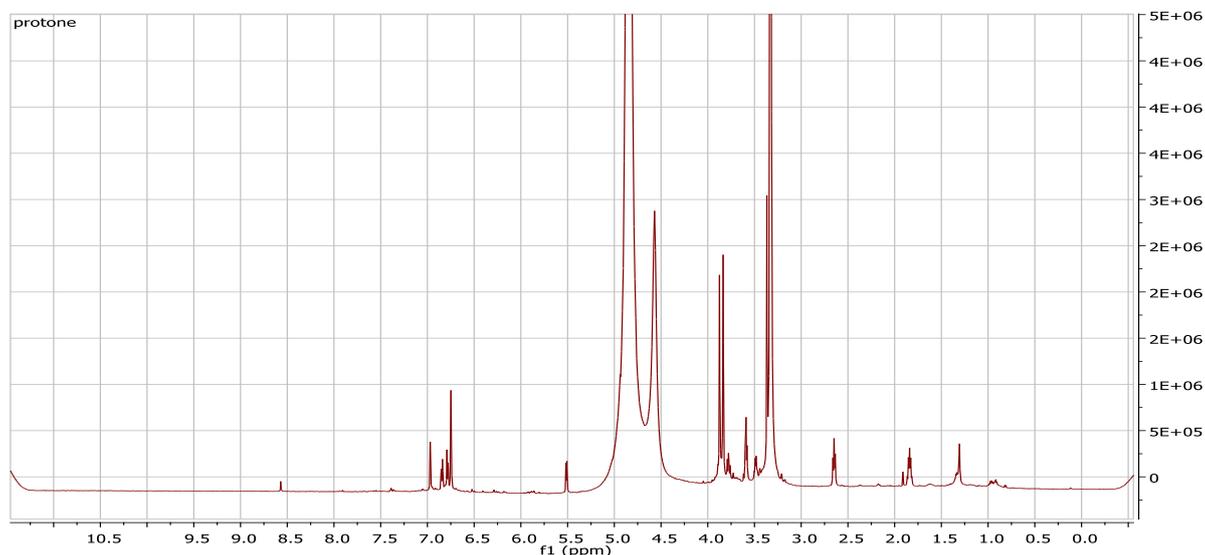


الشكل III-1: طيف RMN-<sup>13</sup>C للمركب P<sub>1</sub> المسجل في CD<sub>3</sub>OD

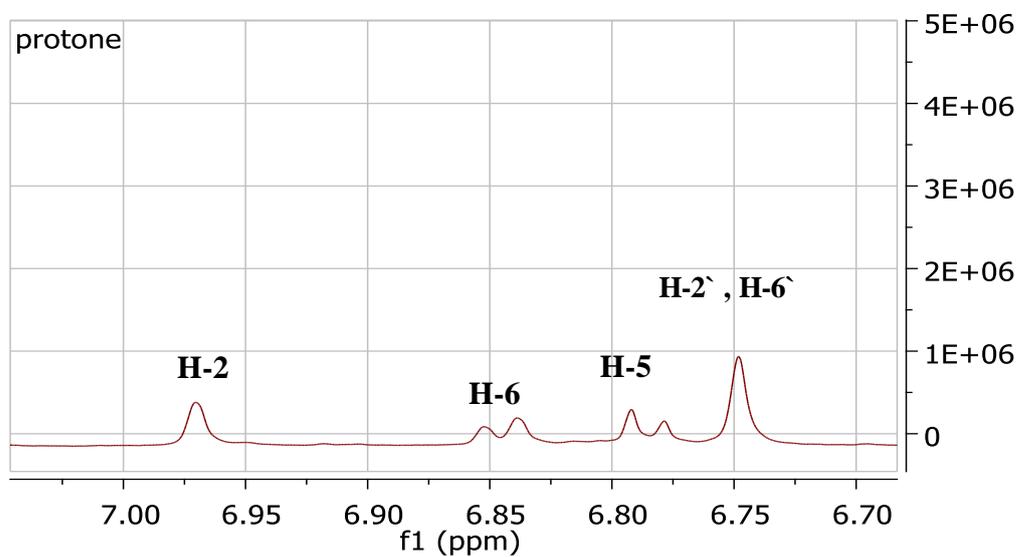


الشكل III-2: طيف RMN-<sup>13</sup>C الممدد للمركب P<sub>1</sub> المسجل في CD<sub>3</sub>OD

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

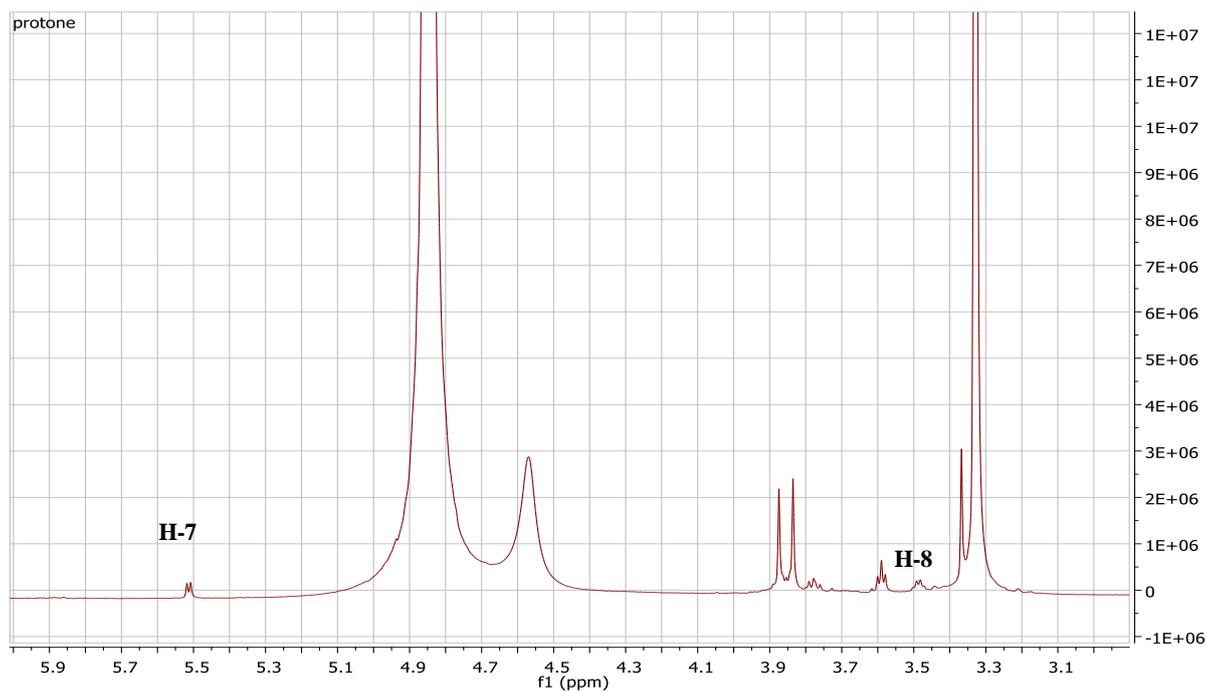


الشكل III-3: طيف ال<sup>1</sup>H RMN للمركب P<sub>1</sub> في (CD<sub>3</sub>OD)

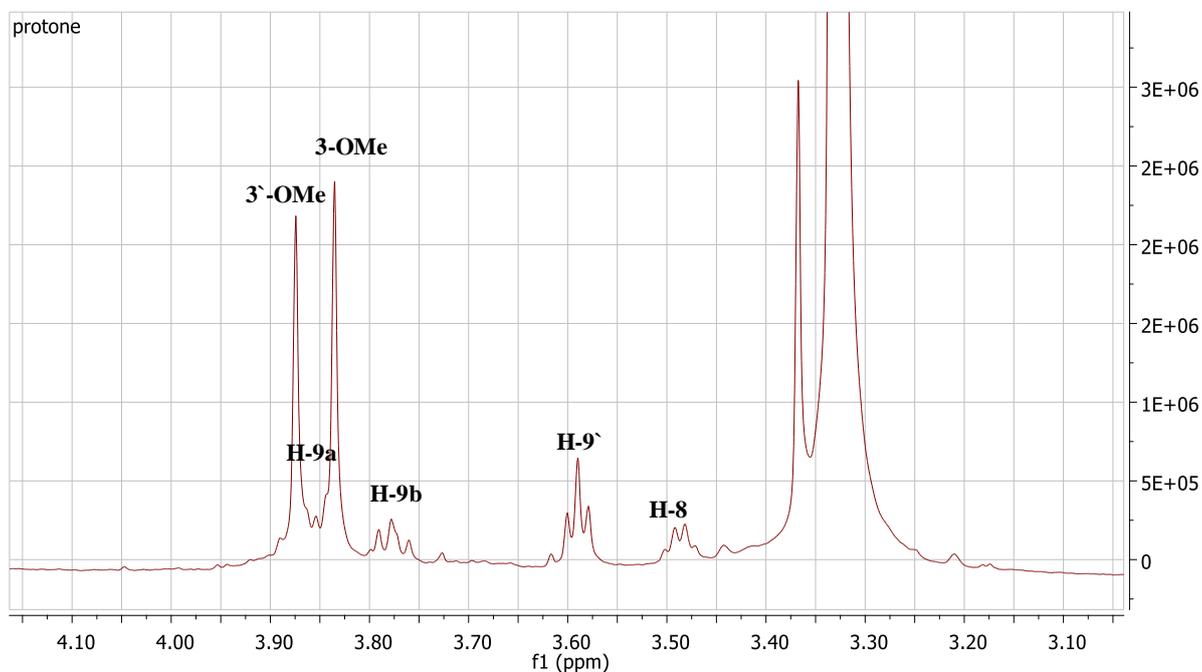


الشكل III-3-1: تمديد طيف <sup>1</sup>H RMN للمركب P<sub>1</sub> في المجال [7.00-6.70 ppm]

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

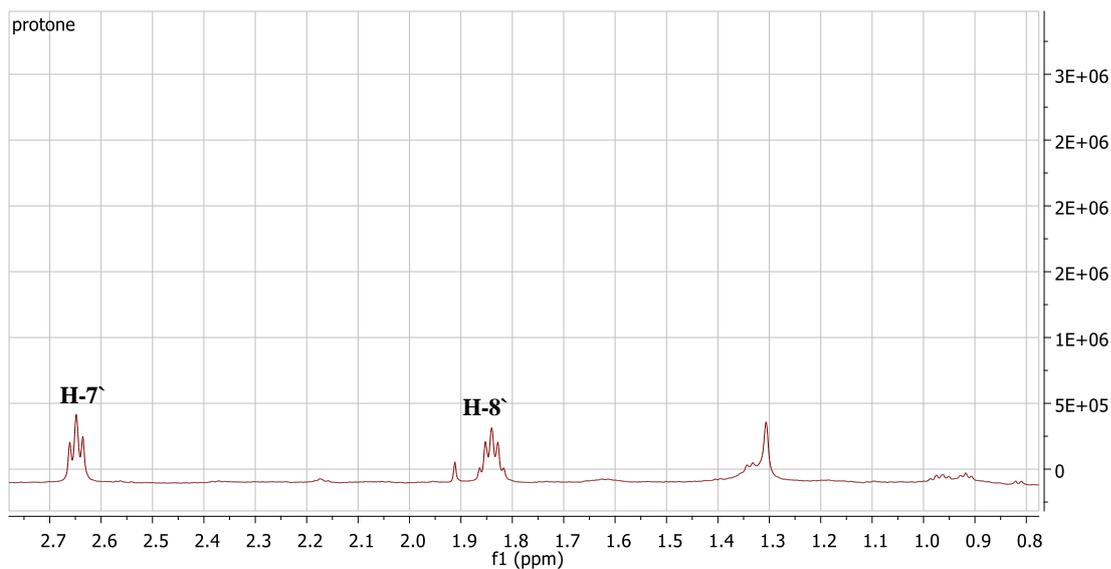


الشكل III-2-3: تمديد طيف  $^1\text{H}$  RMN للمركب  $\text{P}_1$  في المجال [6.00-3.00 ppm]

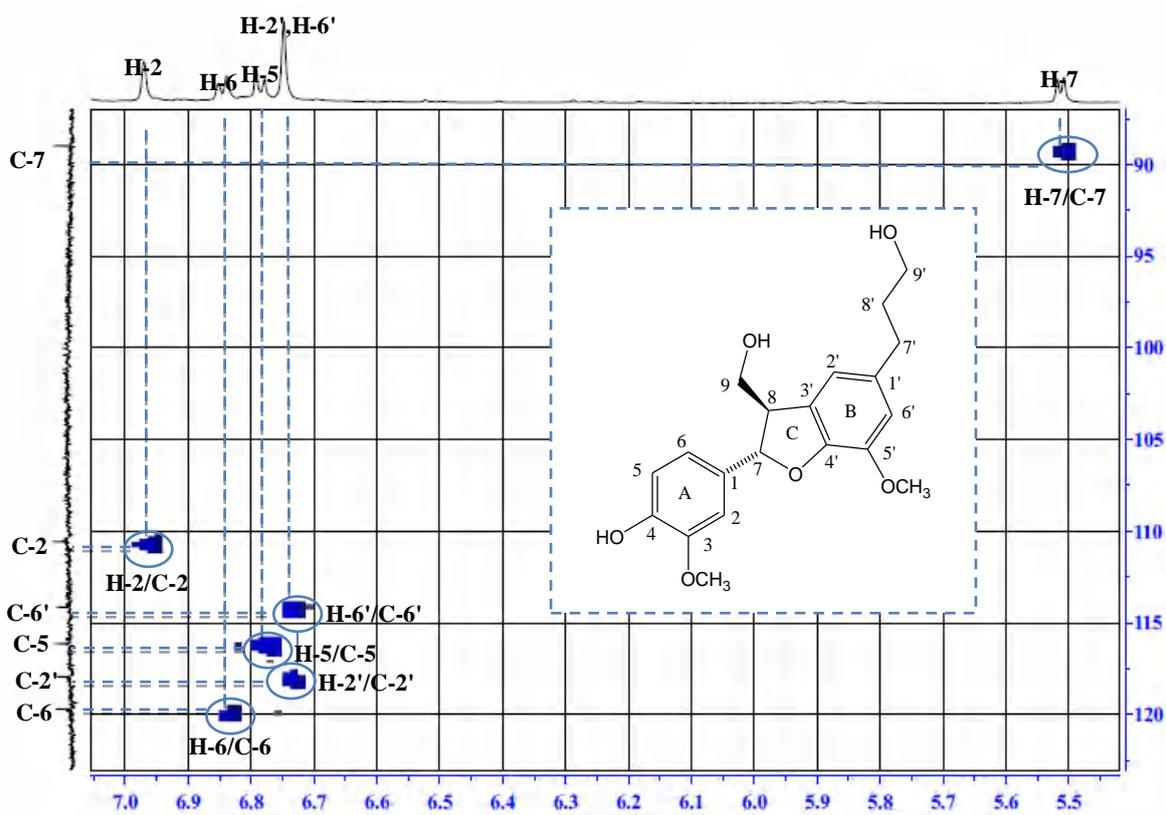


الشكل III-3-3: تمديد طيف  $^1\text{H}$  RMN للمركب  $\text{P}_1$  في المجال [7.00-6.70 ppm]

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا

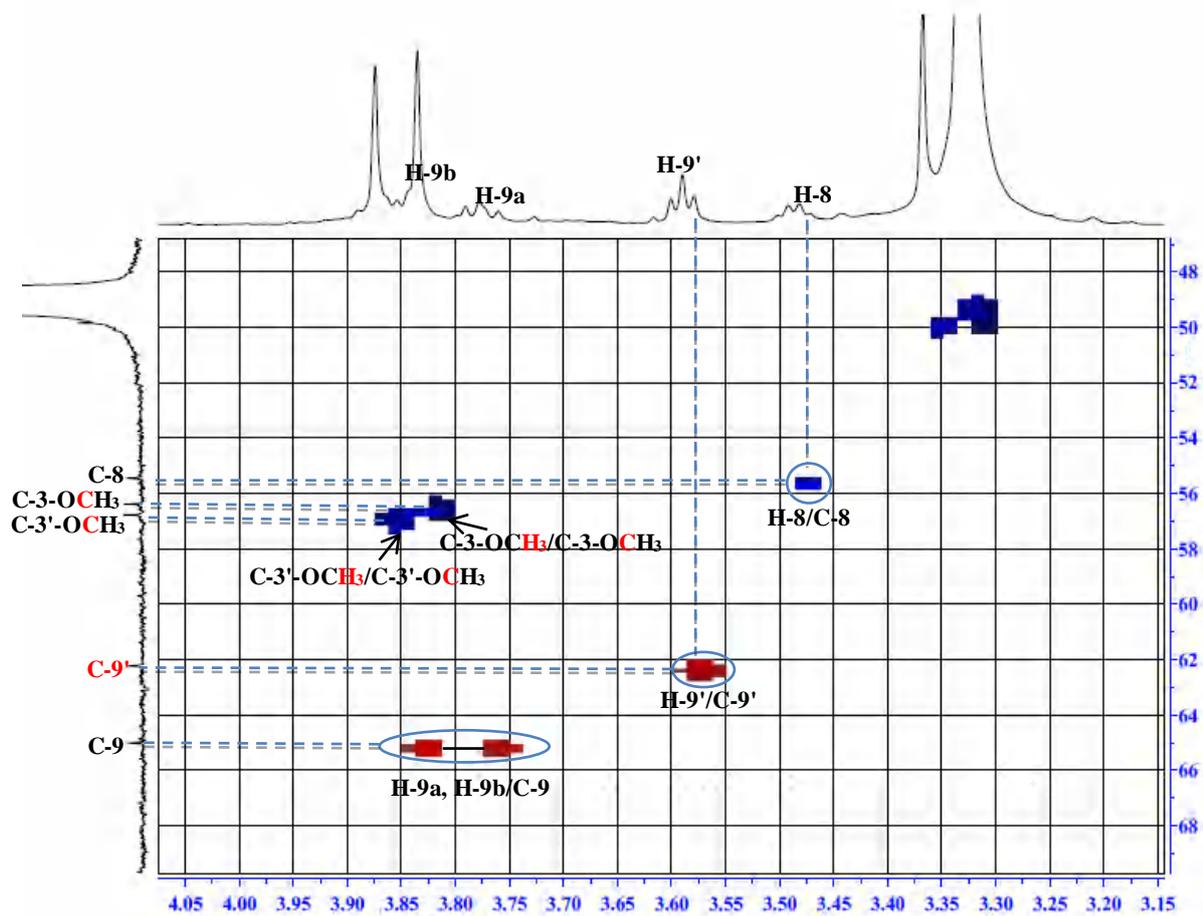


الشكل III-3-4: تمديد طيف  $^1\text{H}$ -RMN للمركب  $\text{P}_1$  في المجال [2.7-1.0 ppm]



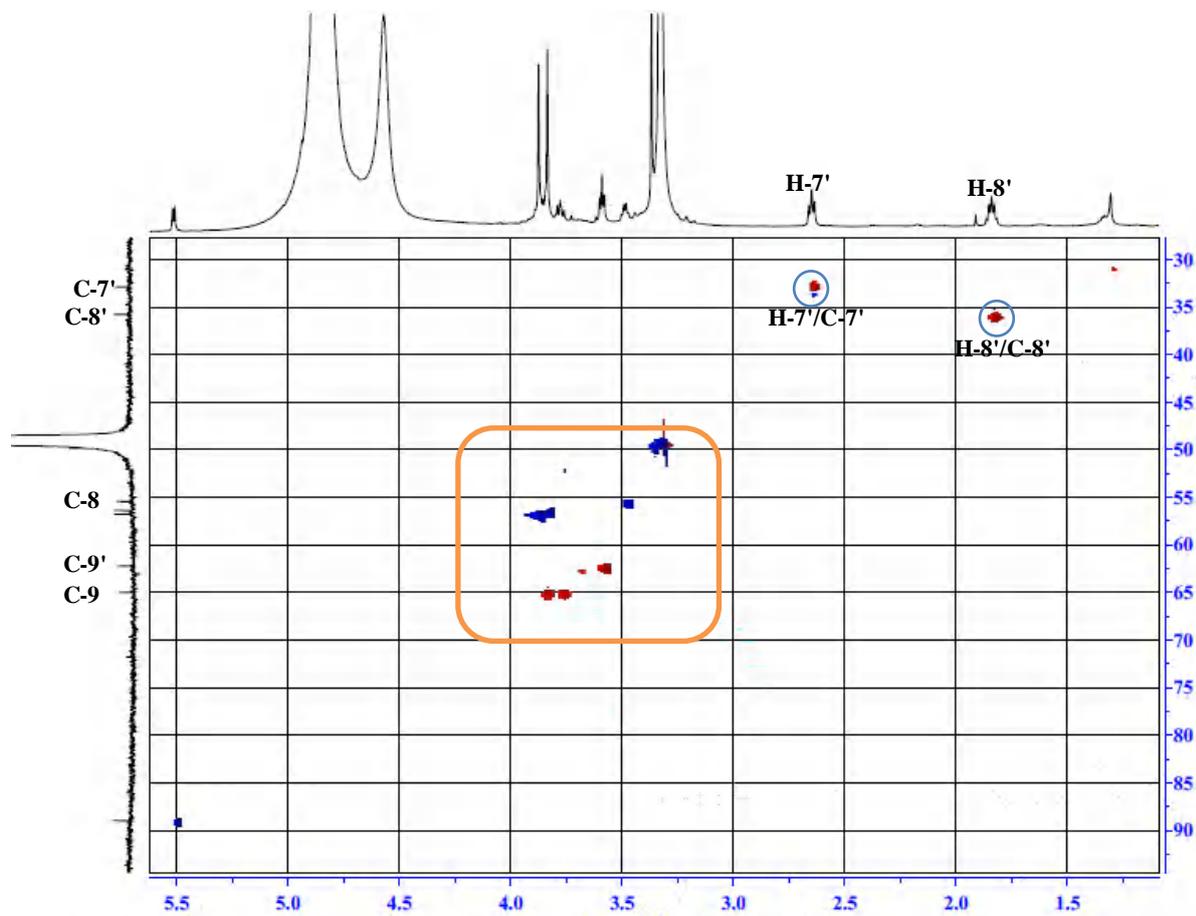
الشكل III-4-4: تمديد طيف HSQC للمركب  $\text{P}_1$  المسجل في  $\text{CD}_3\text{OD}$

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا

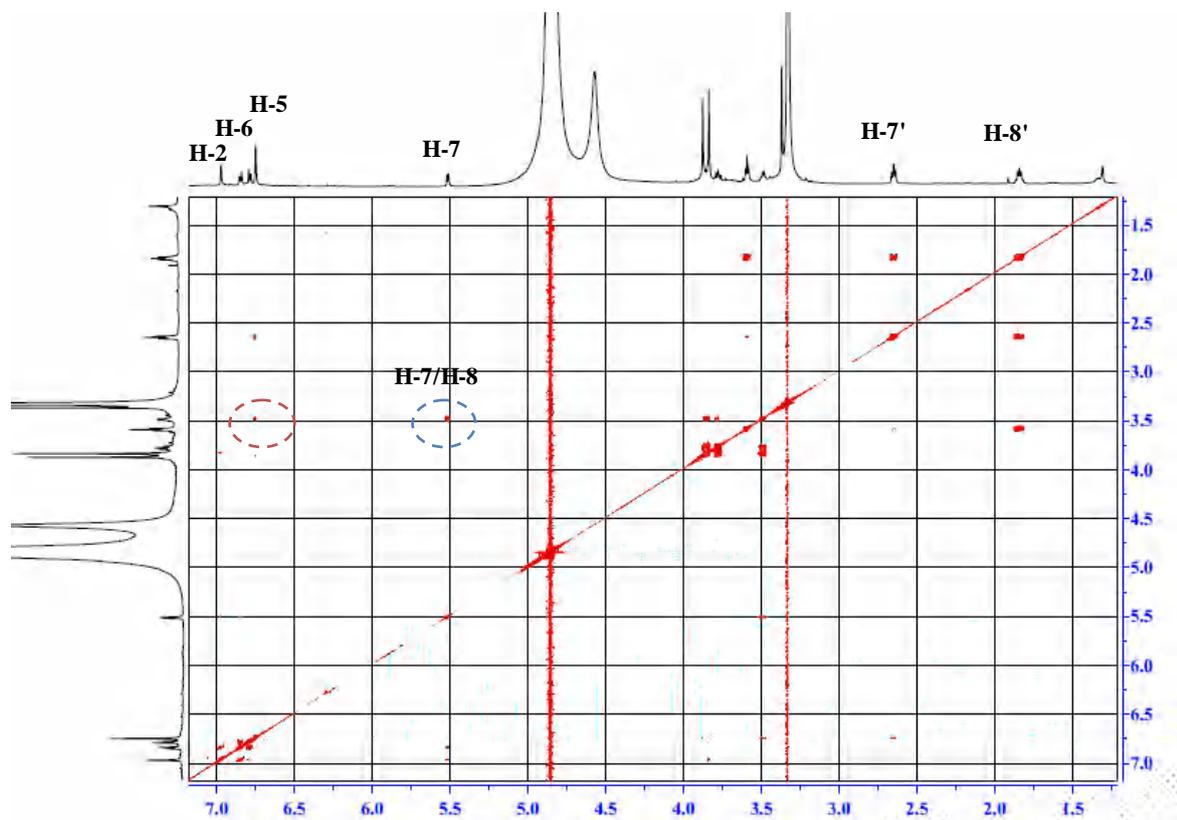


الشكل III-4-1: تمديد طيف HSQC للمركب  $P_1$  المسجل في  $CD_3OD$

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

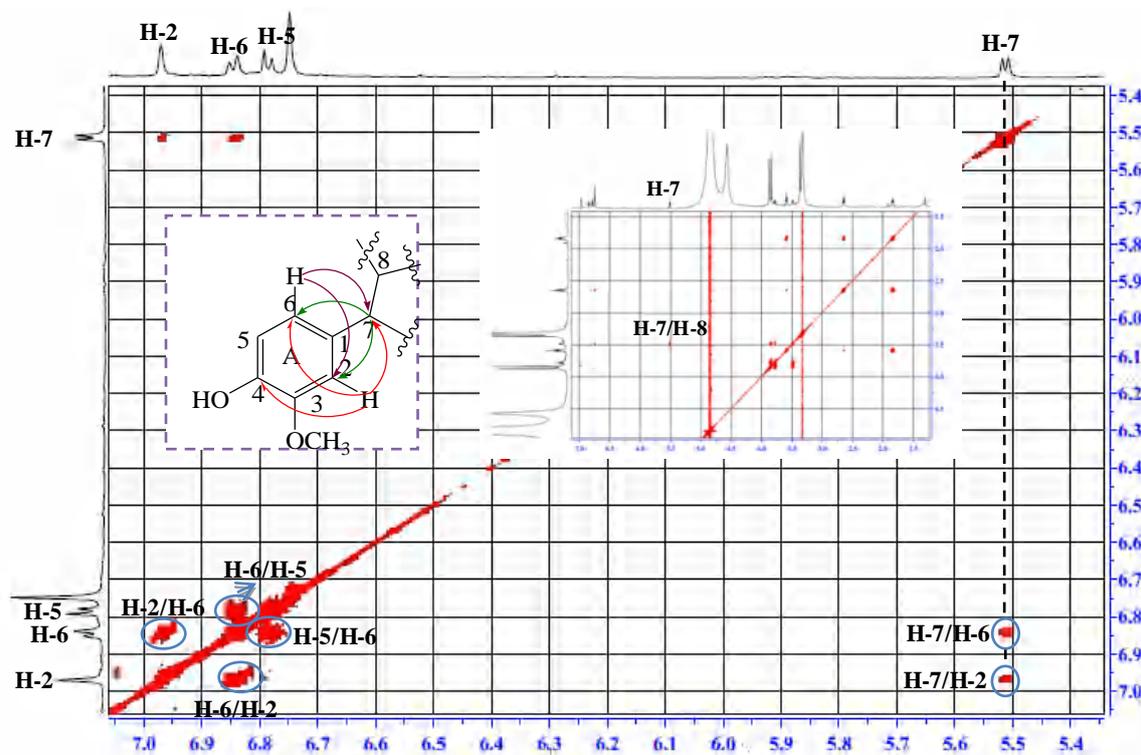


الشكل III-4-2: تمديد طيف HSQC للمركب  $\text{P}_1$  المسجل في  $\text{CD}_3\text{OD}$



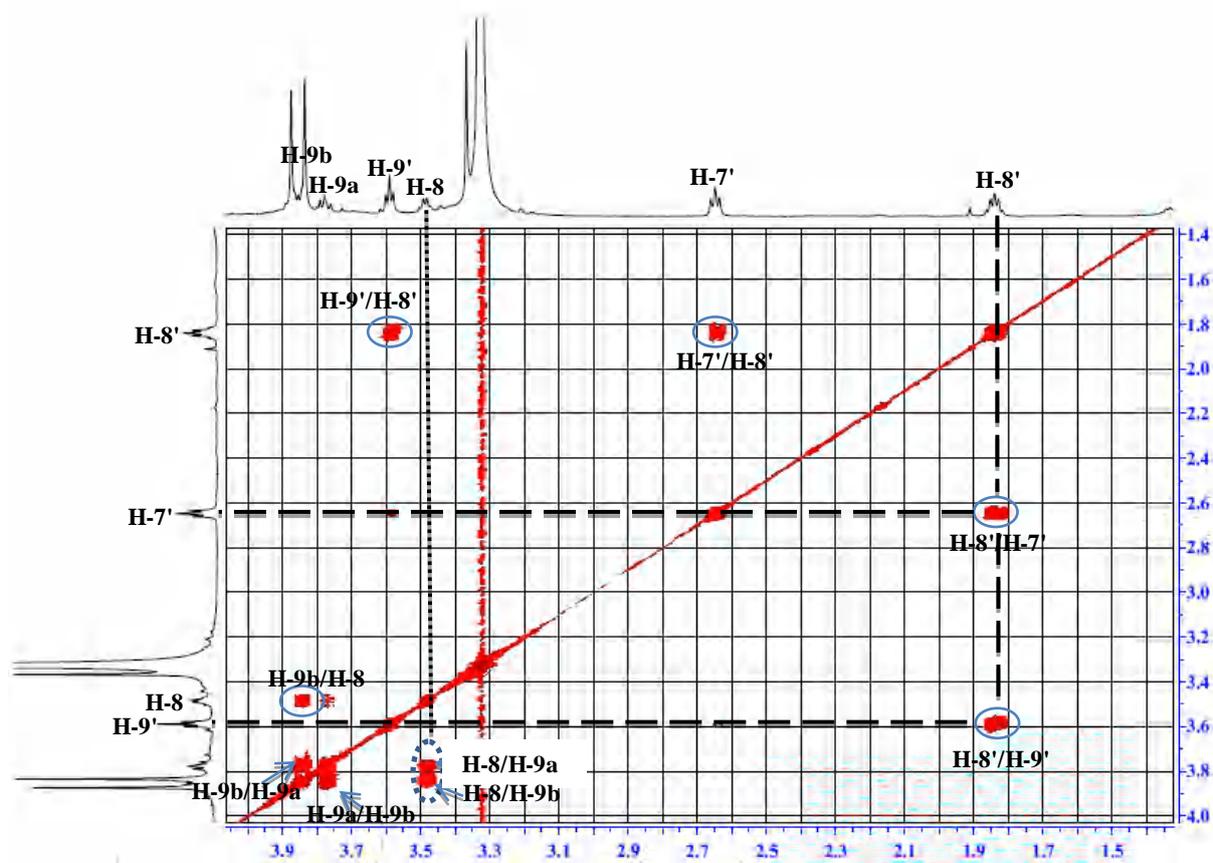
الشكل III-6 : طيف COSY(<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) للمركب P<sub>1</sub> المسجل في CD<sub>3</sub>OD

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا



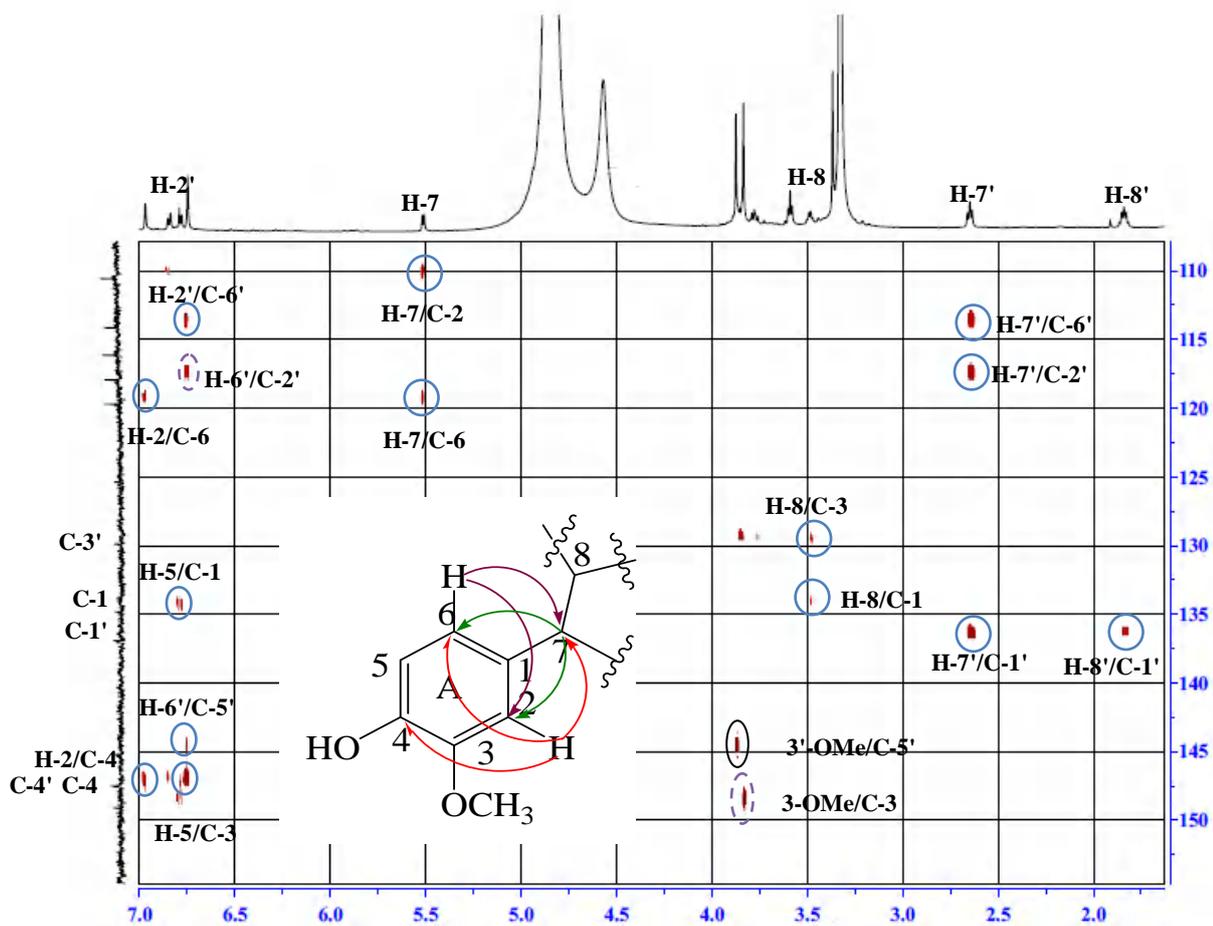
الشكل III-6-1 : تمديد طيف COSY( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) للمركب  $\text{P}_1$  المسجل في  $\text{CD}_3\text{OD}$

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا

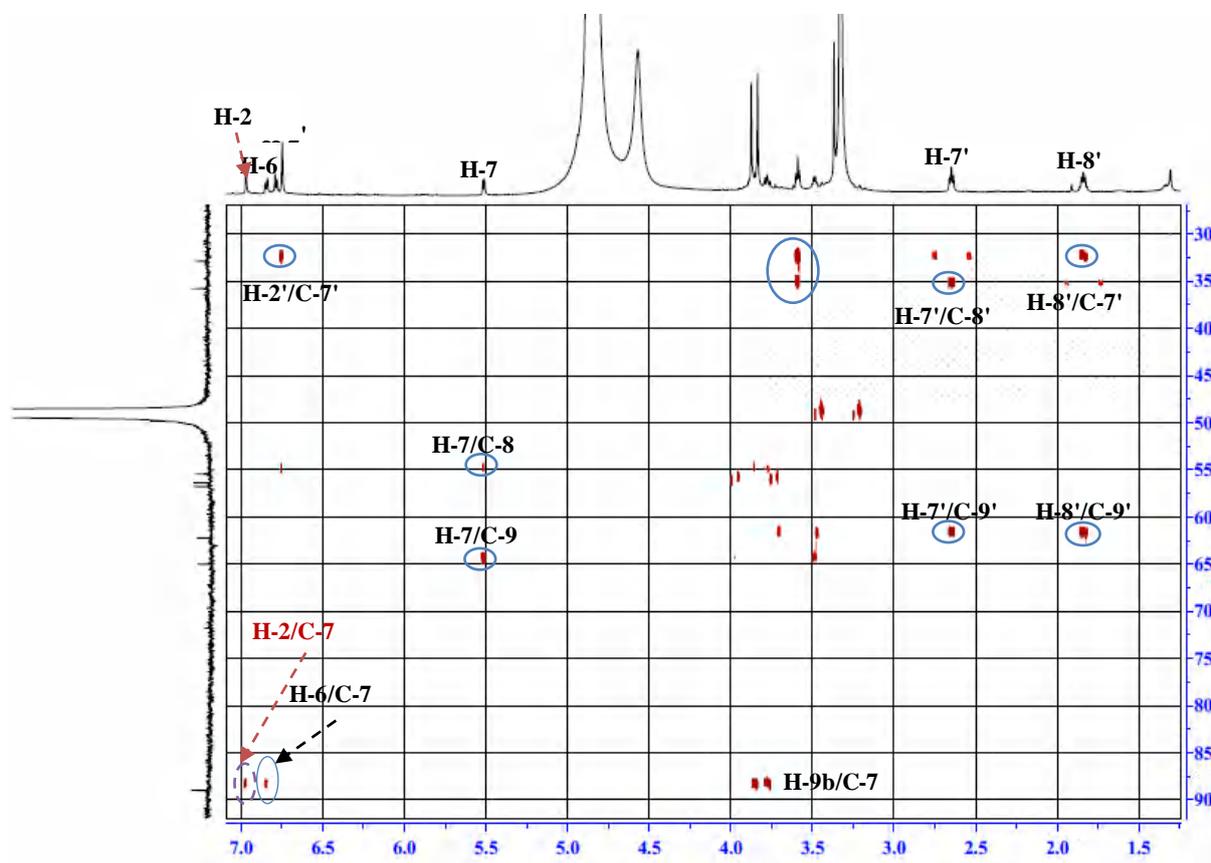


الشكل 2-6-III: تمديد طيف COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) للمركب  $\text{P}_1$  المسجل في  $\text{CD}_3\text{OD}$

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا



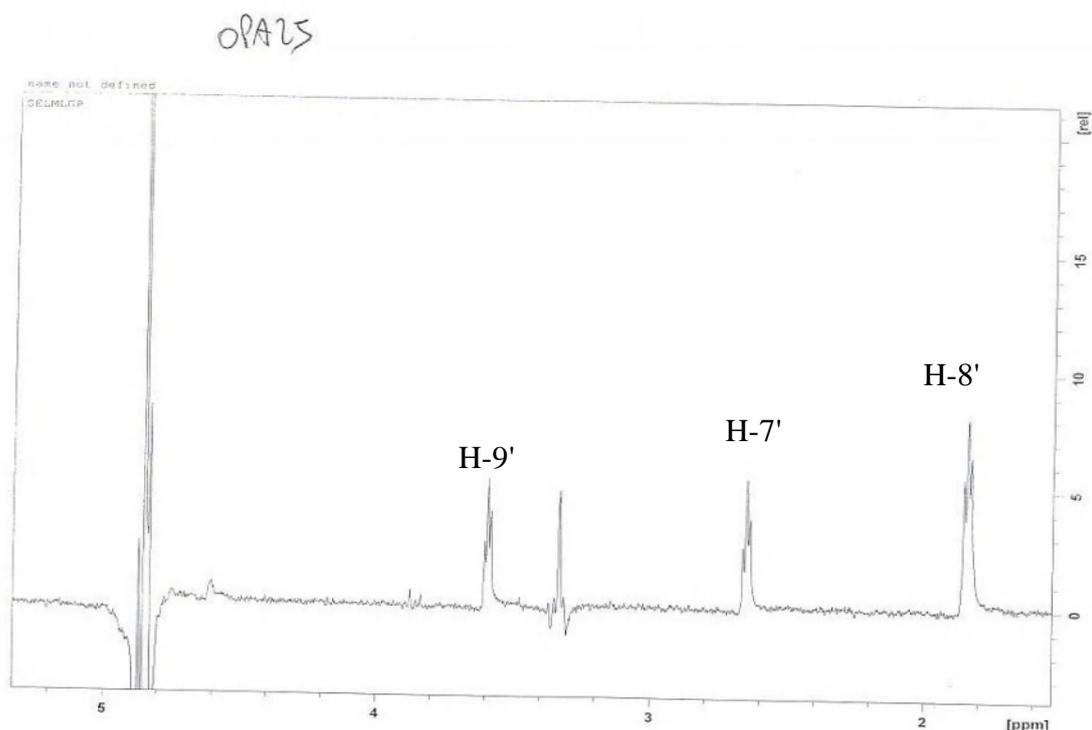
الشكل III-8: تمديد طيف الـ HMBC للمركب P<sub>1</sub> في CD<sub>3</sub>OD



الشكل III-8-1: تمديد طيف HMBC في المجال [ 7.0-1.0 ppm]

للمركب P<sub>1</sub> المسجل في CD<sub>3</sub>OD

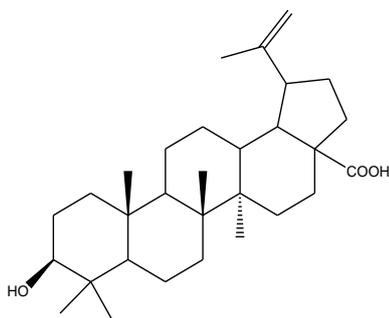
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا



الشكل III-13: طيف 1D TOCSY للمركب P<sub>1</sub> المسجل في CD<sub>3</sub>OD

III-2-1-2- التعين البنوي للمركب P<sub>2</sub> :

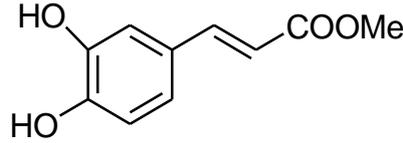
تم التعرف على المركب P<sub>2</sub> ( الشكل III-14 ) بواسطة تقنية RP-HPLC حيث أعطت زمن احتباس موافق لنفس زمن احتباس المركب Acide Bétulinique و بالاعتماد على مطيافية الكتلة (MS) و ذلك بمطابقتها بالمعطيات البيبلوغرافية أعطى الصيغة التالية [7] :



الشكل III-14 : Acide Bétulinique

### III-1-2-3 التعين البنوي للمركب P<sub>3</sub>:

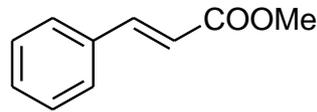
تم التعرف على المركب P<sub>3</sub> (الشكل III-15) بواسطة تقنية RP-HPLC حيث أعطت زمن احتباس موافق لنفس زمن احتباس المركب methyl ester acide caféique و بالاعتماد على مطيافية الكتلة (MS) و ذلك بمطابقتها بالمعطيات البيبلوغرافية أعطى الصيغة التالية [8] :



الشكل III-15: methyl ester Acide caféique

### III-1-2-4 التعين البنوي للمركب P<sub>4</sub>

Cinnamate de méthyle (الشكل III-16) الذي تعرفنا عليه من خلال تقنية RP-HPLC ، و زمن الانحباس و بمقارنة هذا المركب مع البيبلوغرافيا أعطت الصيغة التالية [9] .



الشكل III-16: Cinnamate de méthyle

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا

III-2-2- تحديد بنى المركبات المفصولة من المستخلص البيوتانولي :

III-2-2-1-التعين البنوي للمركب P<sub>5</sub> :

الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب :

1. الخصائص الكروماتوغرافية

- اللون الاستشعاعي للمركب P<sub>5</sub> : بنفسجي

- معامل الاحتباس (R<sub>f</sub>) :

الأنظمة المستعملة لقياس قيم R<sub>f</sub> :

S<sub>1</sub> (organique): Toluène/ Méthanol/ Méthyléthylcétone (4:3:3).

S<sub>2</sub> (aqueux): H<sub>2</sub>O /MeOH / Méthyléthylcétone/ Acétylacetone (13:3:3:1).

تم استعمال متعدد الأמיד كدعامة ثابتة مع النظامين S<sub>1</sub> و S<sub>2</sub> .

جدول III-4: قيم R<sub>f</sub> للمركب P<sub>5</sub>

S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	الجملة
0.178	0.064	R <sub>f</sub>

2-الخصائص الطيفية:

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول III-5: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب P<sub>5</sub>

الكواشف	العصابة I (nm) (λ <sub>max</sub> )	العصابة II (nm) (λ <sub>max</sub> )	عصابات أخرى (nm) (λ <sub>max</sub> )
MeOH	333	268	/
MeOH + NaOH	380	273	305. 346
MeOH+ NaOH + 5m	380	272	304. 344
MeOH +NaOAc	345	268	386
MeOH+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	338	268	/
MeOH +AlCl <sub>3</sub>	355	284	308. 391
MeOH+AlCl <sub>3</sub> +HCl	392	285	307,349

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا

• مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN-<sup>1</sup>H, CD<sub>3</sub>OD, 250 MHz) :

جدول 6-III : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب P<sub>5</sub>:

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج (Hz)	التكامل	δ <sub>H</sub> (ppm)
H-2' و H-6'	d (J = 7.4 Hz)	2H	7.92
H-3' و H-5'	d (J = 7.4 Hz)	2H	6.97
H-8	d (J = 7.4 Hz)	1H	6.85
H-6	d (J = 7.4 Hz)	1H	6.25
H-3	S L	1H	6.72
H-1'' ( anomérique)	d (J = 6.6 Hz)	1H	5.10

الحملة الحمضية :

• الشق الأجليكوني

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) :

جدول 7-III : نتائج مطيافية (UV) بعد الحملة الحمضية

التعليق	عصابات أخرى (nm) (λ <sub>max</sub> )	العصابة II (nm) (λ <sub>max</sub> )	العصابة I (nm) (λ <sub>max</sub> )	الكواشف
فلافون	/	269	337	MeOH
7-OH libre	305	276	386	MeOH + NaOAc
غياب أرثوثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B	303	271	350	MeOH+NaOAc+ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>

الشق السكري: glucose

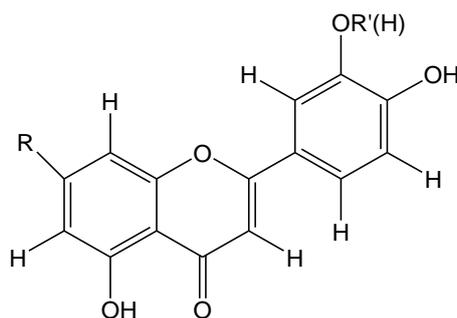
• قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب :

اللون الاستشعاعي للمركب P<sub>5</sub> و قيمة العصابة I في الميثانول و المقدره ب  $\lambda_{max} = 333 \text{ nm}$  يدلان على أنه عبارة عن فلافون، أما قيمة R<sub>f</sub> لهذا الأخير في النظامين S<sub>1</sub> و S<sub>2</sub> فتدل على أنه عبارة عن غليكوزيد. -الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I ( $\Delta\lambda_1 = +47 \text{ nm}$ ) الناتجة عن إضافة الكاشف NaOH مع الزيادة في الشدة الضوئية دليل على وجود OH حر في الموقع 4' ، مع غياب نتوء بين 320-335 nm دليل على غياب OH حر في الموقع 7 و هذا ما تؤكدته الإزاحة الباتوكرومية للعصابة II عند مقارنة طيف NaOAc بطيف الـ MeOH.

-عدم وجود إزاحة هبسوكرومية للعصابة I عند مقارنة طيف  $\text{AlCl}_3$  بـ  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  دليل على غياب نظام أرثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B .

-الإزاحة الباتوكرومية للعصابة I المقدره بـ  $\Delta\lambda_1 = 59 \text{ nm}$  عند مقارنة طيف  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  بطيف MeOH تدل على وجود OH حر في الموقع 5.

و منه فان الصيغة الأولية للمركب P<sub>4</sub> تكون كالتالي :



شكل III- 17 : البنية الأولية للمركب P<sub>5</sub>

من جهة أخرى مطيافية الكتلة أعطت قيمة للأيون الجزيئي عند  $m/z = 433$  موافقة للصيغة المجملة  $\text{C}_{21}\text{H}_{10}\text{O}_{10}$  التي تدل على أن المركب عبارة عن غليكوزيد أحادي السكر و هذا ما يؤكد ظهور الشظية  $[\text{M-gly} + \text{H}]^+$  ( $m/z = 271$ ).

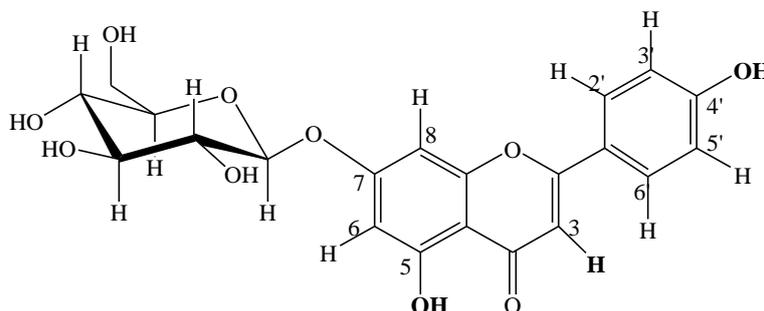
مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون أظهرت إشارتين على شكل :

- إشارة ثنائية بتكامل 2H وبتابطة تزاوج ( $J = 7,4 \text{ Hz}$ ) عند  $\delta = 6.97 \text{ ppm}$  خاصة بالبروتونين H-3' و H-5' .
- إشارة ثنائية بتكامل 2H وبتابطة تزاوج ( $J = 7,4 \text{ Hz}$ ) عند  $\delta = 7.92 \text{ ppm}$  خاصة بالبروتونين H-6' و H-2' .
- تدلان على أن الحلقة B أحادية الاستبدال (أي غياب مستبدل في الموقع 3').
- إشارة أحادية بتكامل 1H عند  $\delta = 6.72 \text{ ppm}$  موافقة للبروتون H-3 .
- إشارتين ثنائيتين عند  $\delta = 6.25 \text{ ppm}$  و  $\delta = 6.85 \text{ ppm}$  بنفس ثابتة التزاوج ( $J = 7.4 \text{ Hz}$ ) موافقتين للبروتونين H-6 و H-8 على التوالي.

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

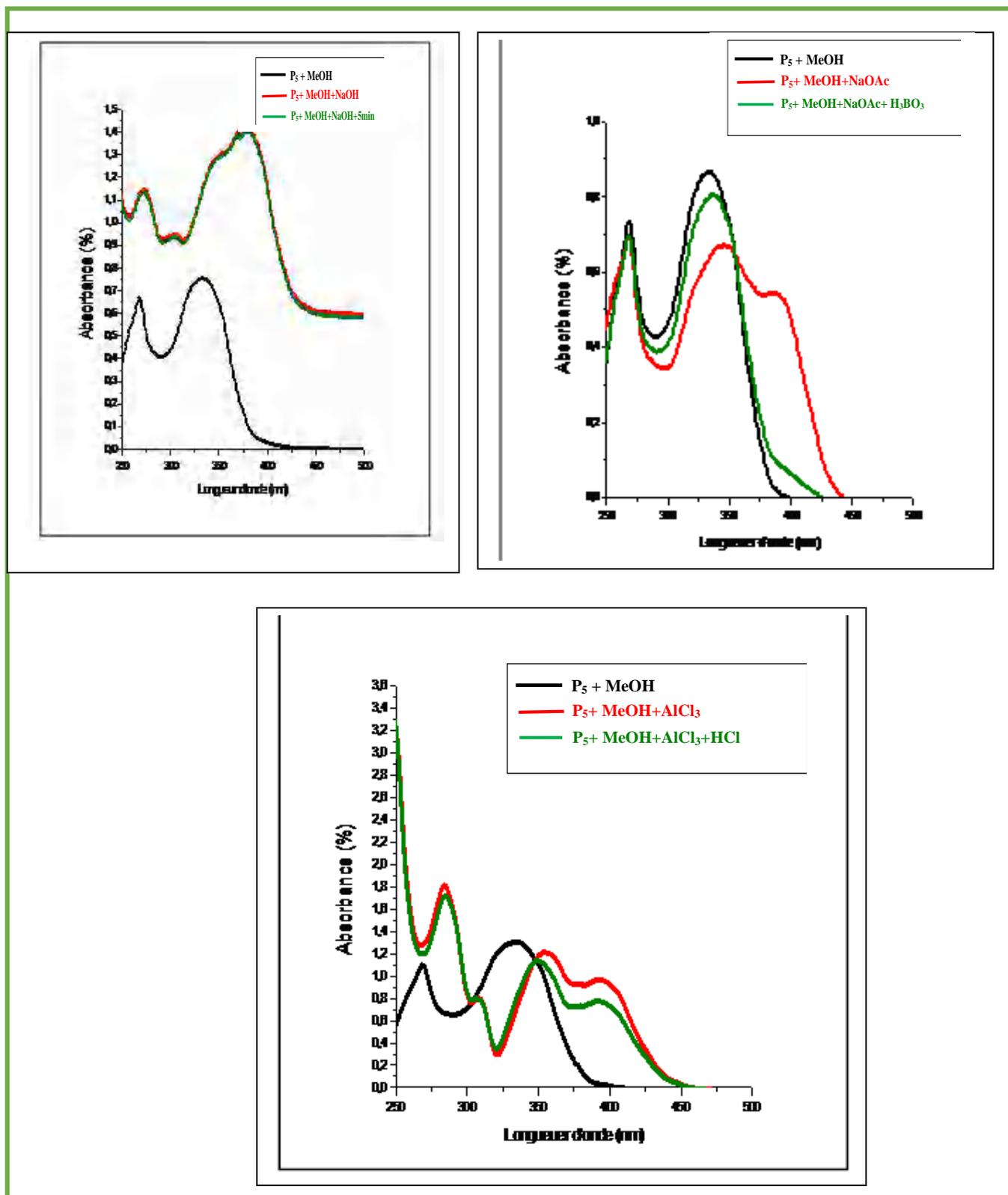
-إشارة ثنائية بتكامل 1H عند  $\delta = 5.10$  ppm بثابتة تزاوج  $J = 6.6$  Hz مميزة للبروتون الأنونوميري H-1'' لسكر .

- الإشارات المتبقية ما بين [4 -3. 4 ppm] فهي إشارات موافقة لبروتونات السكر.  
للتعرف على طبيعة السكر لجأنا إلى الحلمهة الحمضية حيث حررت هذه الأخيرة أغليكونا مطابقا لهيكل Apigénine لون بنفسجي و بثابت إنحباس  $R_f = 0.65$  في النظام 4:3:3 و سكر الغلوكوز الذي تم التعرف عليه من خلال مطابقته مع شواهد سكرية [10].  
و عليه فإن الصيغة المفصلة للمركب P<sub>5</sub> هي :



الشكل 18-III : Apigénine-7-O-β-D-glucoside

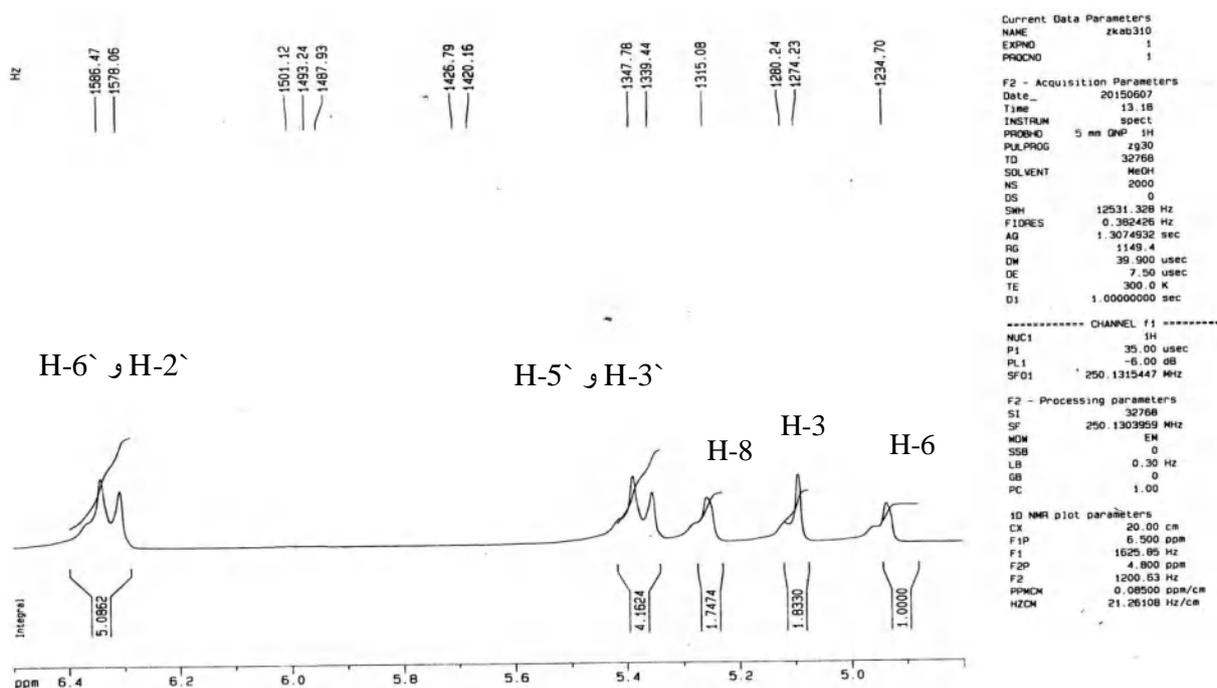
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا



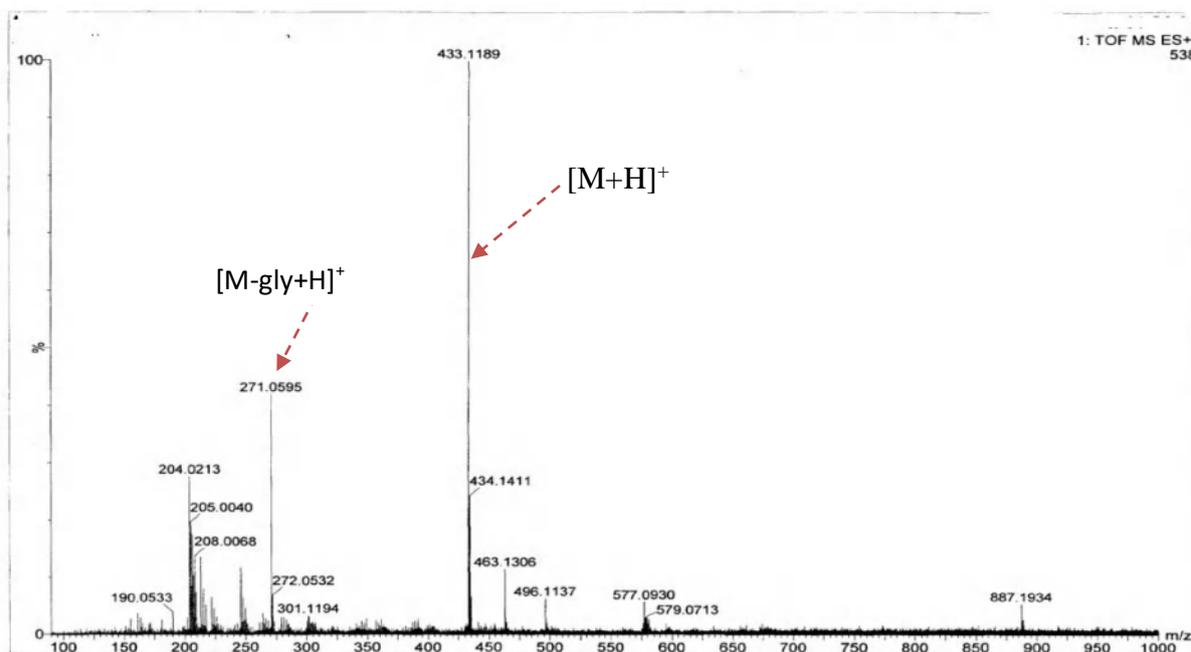
شكل III-19 : أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب P5



الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا



الشكل III-22: تكبير المجال [6.4ppm-4.9ppm] للمركب P<sub>5</sub>



الشكل III-23: مطيافية الكتلة (ES<sup>+</sup>) للمركب P<sub>5</sub>

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

III-3- التعين البنوي للمركب P<sub>6</sub>

الخصائص الكروماتوغرافية و الطيفية للمركب:

1. الخصائص الكروماتوغرافية

- اللون الاستشعاعي للمركب P<sub>6</sub> : بنفسجي

- معامل الاحتباس (R<sub>f</sub>) :

الأنظمة المستعملة لقياس قيم R<sub>f</sub> :

S<sub>1</sub>: Toluène/ Méthanol/ Méthyléthylcétone (4:3:3)

S<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O /MeOH / Méthyléthylcétone/ Acétylacetone (13:3:3:1)

جدول III-8: قيم R<sub>f</sub> للمركب P<sub>6</sub>

S <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	الجملة
0.180	0.223	R <sub>f</sub>

تم استعمال متعدد الأמיד كدعامة ثابتة مع النظامين S<sub>1</sub> و S<sub>2</sub> .

2. الخصائص الطيفية:

مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV):

جدول III-9: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية للمركب P<sub>6</sub>

عصابات اخرى $\lambda_{max}(nm)$	العصابة II $\lambda_{max}(nm)$	العصابة I $\lambda_{max}(nm)$	الكاشف
/	256	349	MeOH
/	272	393	MeOH + NaOH
/	267	392	MeOH+ NaOH + 5min
399	261	371	MeOH +NaOAc
/	260	371	MeOH+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
431	274	421	MeOH +AlCl <sub>3</sub>
360	274	390	MeOH+AlCl <sub>3</sub> +HCl

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

● مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN-<sup>1</sup>H, CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) :

جدول III-10 : نتائج طيف البروتون RMN-<sup>1</sup>H للمركب P<sub>6</sub>

الهيدروجين الموافق	الإشارة مع ثابت التزاوج (Hz)	التكامل	δ <sub>H</sub> (ppm)
H-3	s	1H	6.75
H-6	s L	1H	6.45
H-8	sL	1H	6.81
H-2'	d (J = 2.1Hz)	1H	7.42
H-5'	d (J = 8.3Hz)	/	6.92
H-6'	dd (J = 8.3 et J = 2.1Hz)	1H	7.46
H-1''	d (J = 7.5 Hz)	1H	5.09

● مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (RMN-<sup>13</sup>C, CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) :

جدول III-11 : نتائج طيف للكربون RMN-<sup>13</sup>C للمركب P<sub>6</sub>

الكربون الموافق	δ <sub>c</sub> (ppm)	الكربون الموافق	δ <sub>c</sub> (ppm)
C-3'	146.1	C-2	164.9
C-4'	150.2	C-3	103.7
C-5'	116.4	C-4	182.3
C-6'	119.7	C-5	161.3
C-1''	100.3	C-6	101
C-2''	73.5	C-7	163.4
C-3''	76.7	C-8	95.3
C-4''	69.9	C-9	157.4
C-5''	77.5	C-10	105.3
C-6''	60.9	C-1'	121.8
/	/	C-2'	113.9

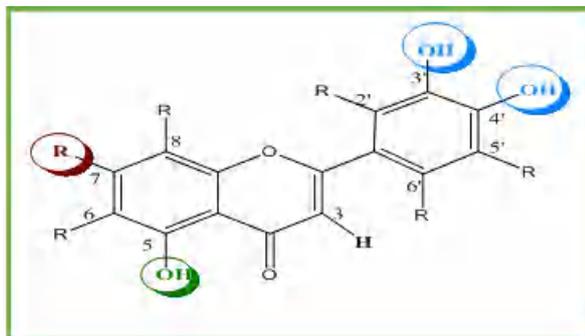
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

الجدول III-12: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية بعد الحلمهة الحمضية للمركب P<sub>6</sub>

الكواشف	العصابة I (nm) ( $\lambda_{max}$ )	العصابة II (nm) ( $\lambda_{max}$ )	عصابات أخرى ( $\lambda_{max}$ ) (nm)	التعليق
MeOH	360	265	/	فلافون
MeOH +NaOAc	407	272	/	7-OH libre

• قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب :

- اللون الاستشعاعي للمركب P<sub>6</sub> و قيمة العصابة I في طيف الميثانول المقدر بـ 349 nm يدلان على أن المركب فلافون أي وجود H في الموضع 3 .
- الإزاحة الباثوكرومية للعصابة I المقدر بـ  $\Delta\lambda = +44$  nm عند مقارنة طيف NaOH بطيف الميثانول دون تناقص في الشدة, تدل على وجود OH حر في الموقع 4', في حين عدم ظهور عصابة جديدة بين (320 nm و 330nm). يوحي لنا بأن الموقع 7 ليس حرا و نتأكد من ذلك عندما نلاحظ عدم تغير قيمة العصابة II بعد إضافة كاشف NaOAc إلى محلول المركب المنحل في الميثانول .
- الإزاحة الهيبسوكرومية للعصابة I والمقدرة بـ ( $\Delta\lambda = - 31$ nm) الملاحظة بعد إضافة كاشف HCl إلى محلول المركب في  $AlCl_3$  تدل على وجود ثنائي هيدروكسيل على الحلقة B و يؤكد ذلك الطيف المسجل في ( $NaOAc+H_3B0_3$ ) مقارنة مع طيف MeOH حيث نلاحظ وجود ازاحة باتوكرومية للعصابة I مقدر بـ ( $\Delta\lambda = +22$ nm) .
- أما وجود مجموعة هيدروكسيل حر OH في الموقع 5 فتستدل عليها بمقارنة طيف ( $AlCl_3+HCl$ ) بطيف المركب المنحل في الميثانول حيث نلاحظ انزياح للعصابة I بمقدار ( $\Delta\lambda = +41$  nm).  
و منه يمكن اقتراح الصيغة الأولية للمركب P<sub>6</sub> كالتالي :



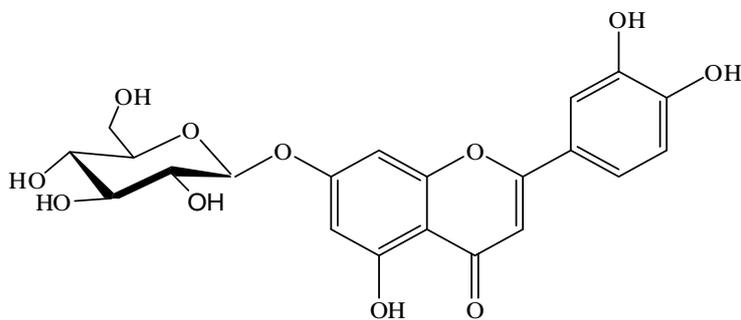
شكل III-24 : الصيغة الأولية للمركب P<sub>6</sub>

- مطيافية الكتلة عالية الكفاءة (شكل III-29) أعطت قمة جزئية عند  $m/z = 449.0996$  موافقة للصيغة المجملة  $C_{21}H_{20}O_{11}$  و هذه الأخيرة تشير إلى أن المركب P<sub>6</sub> غليكوزيد أحادي السكر .
- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون جاءت مؤكدة للنتائج السابقة حيث أعطت :  
إشارة ثنائية ثنائية بثابتي تزاوج  $J=2.1$  Hz ,  $J=8.3$  Hz عند  $\delta_H = 7.46$ ppm موافقة ل H-6' و إشارة ثنائية بثابته تزاوج  $J=2.1$  Hz عند  $7.42$  ppm موافقة ل H-2' و الأخرى ثنائية أيضا بثابته تزاوج  $J=8.3$  Hz عند  $(\delta_H = 6.92$  ppm) موافقة ل H-5' .
- إشارتين ثنائيتين عند  $\delta_H = 6.81$  ppm و  $\delta_H = 6.45$  ppm بنفس ثابتة التزاوج  $J=2.1$  Hz موافقتين ل H-6 و H-8 على التوالي.
- ظهور إشارة ثنائية عند  $\delta_H = 5.07$ ppm بثابت تزاوج  $J=7.5$  Hz للبروتون الأنوميري و الإشارات بين  $\delta_H = 3.18$  ppm و  $\delta_H = 3.72$ ppm تشير إلى وجود وحدة أوزيديك .يشير ثابت الاقتران ( $J=7.5$  Hz) الذي لوحظ للبروتون الانوميري للمركب P<sub>6</sub> إلى وجود رابطة تكوين  $\beta$  بين السكر و Lutéoline .
- كربونات المركب P<sub>6</sub> تم توزيعها بالاعتماد على المعطيات البيبليوغرافية [11]، و هذه الأخيرة جاءت موافقة للمعطيات الطيفية السابقة.
- الحلمهة الحمضية للمركب P<sub>6</sub> مكنتنا من التعرف على طبيعة الأجليكون و الذي كان عبارة عن Lutéoline، أما الشق السكري فكان عبارة عن سكر الغلوكوز حيث تم التعرف على هذا الأخير بمقارنته مع شواهد سكرية معروفة.

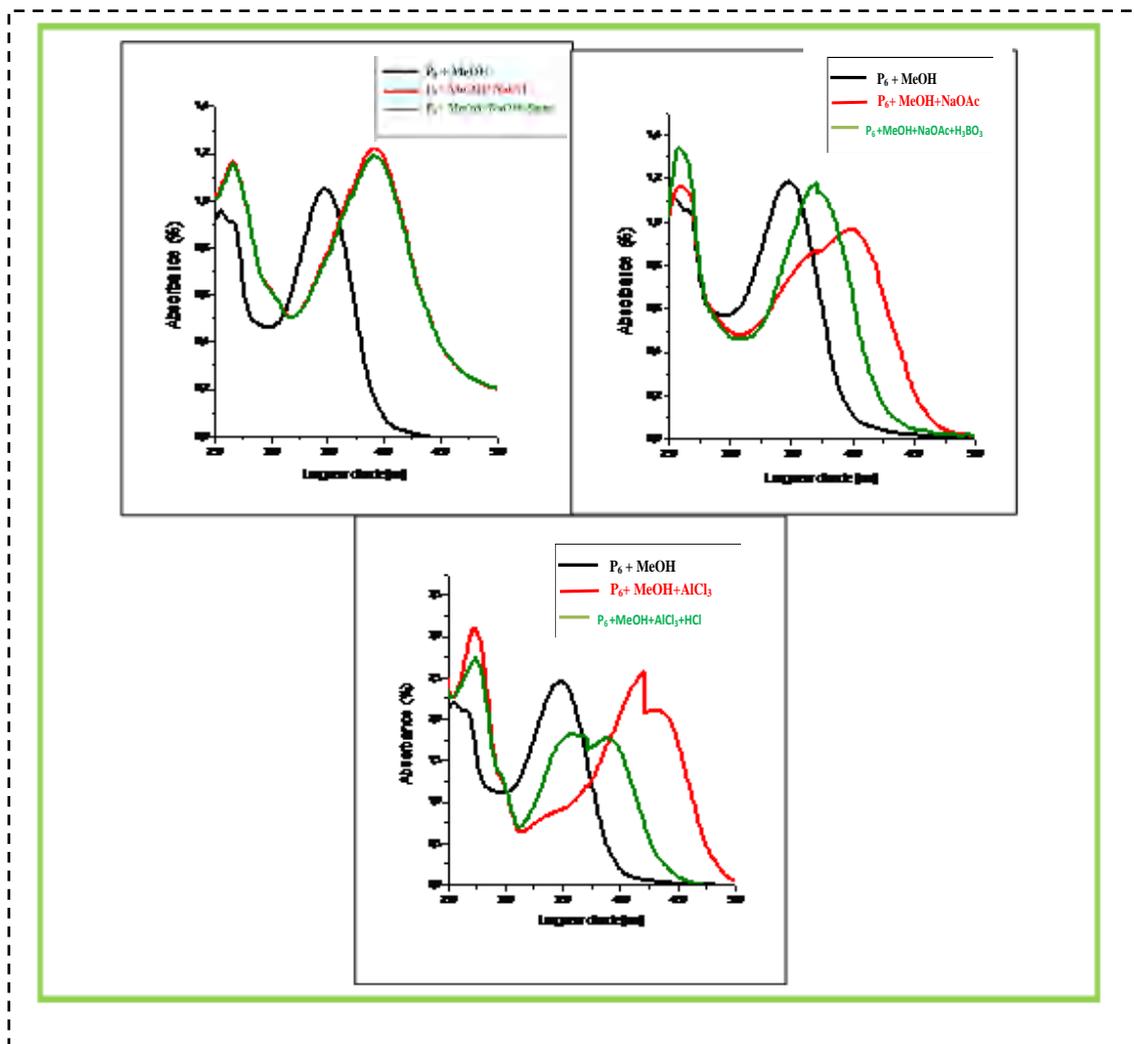
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

---

و عليه تكون الصيغة المفصلة للمركب P<sub>6</sub> كالتالي :

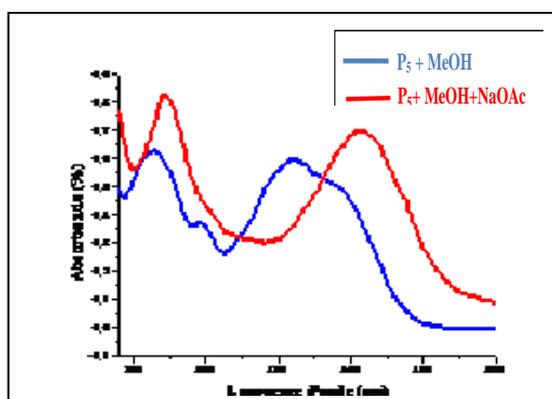


Lutéoline 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside



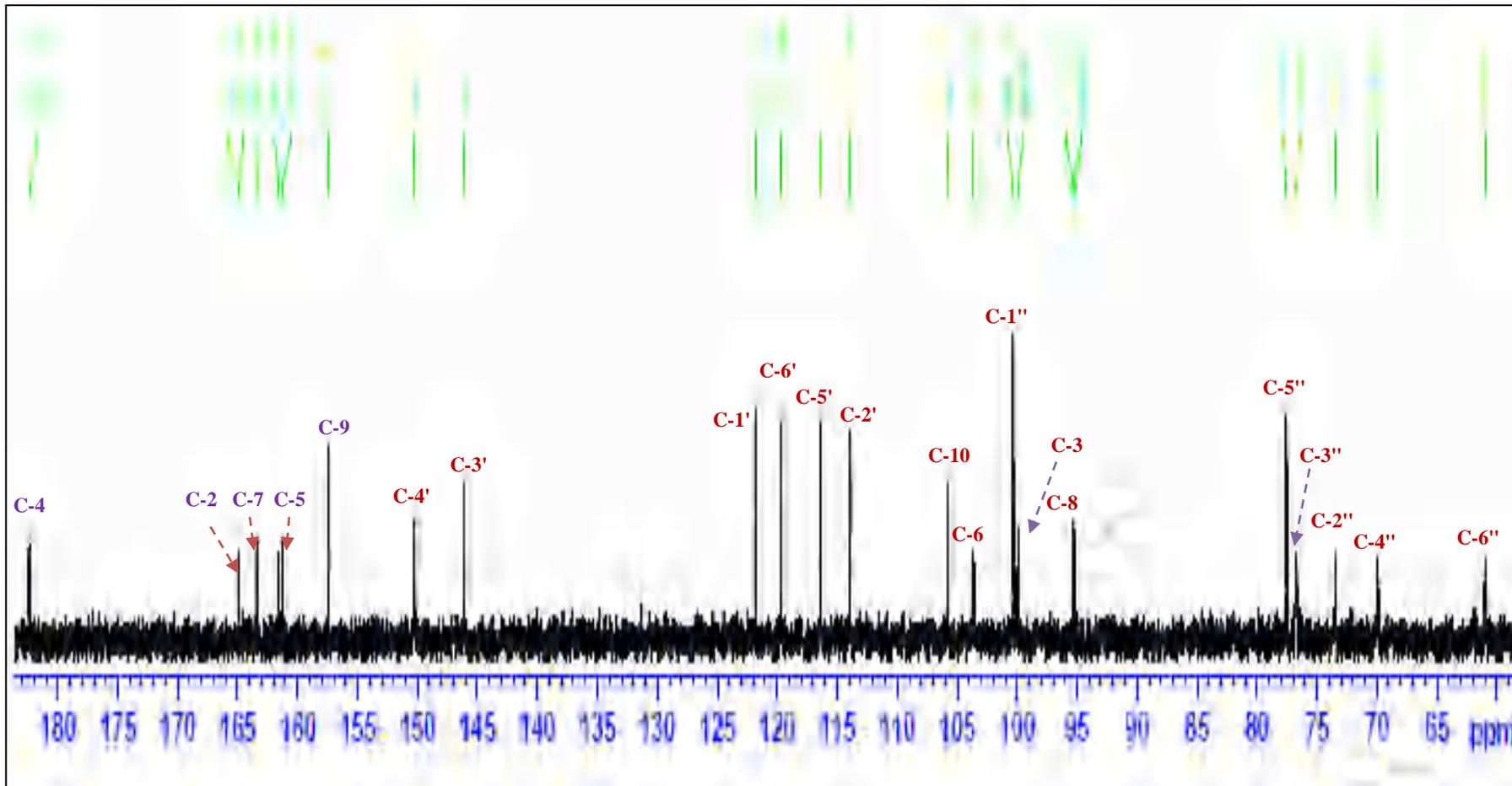
شكل III-25 : أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب  $P_6$

الحمهة الحمضية:



شكل III-26 : أطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب  $P_6$  بعد الحمهة الحمضية





الشكل 29-III : مطيافية  $^{13}\text{C}$  RMN للمركب  $\text{P}_6$  المسجل في  $(\text{CD}_3\text{OD})$

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

III-2-4-التعين البنوي للمركب P<sub>7</sub> :

● مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN-<sup>1</sup>H, CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) :

جدول III-13 : نتائج طيف البروتون RMN-<sup>1</sup>H للمركب P<sub>7</sub> :

التعيين	التعددية	التكامل	الانزياح الكيميائي (ppm)
H-2`	d (J=1.8Hz)	1H	7.97
H-6`	dd (J=8.4Hz, J=1.9Hz)	1H	7.66
H-5`	d (J=8.4Hz)	1H	6.94
H-8	d (J=1.9Hz)	1H	6.43
H-6	d (J=1.9Hz)	1H	6.23
H-1''' Rha	d (J=1.5Hz)	1H	4.55
H-1'' glu	d (J=7.5Hz)	1H	5.23
3-OCH <sub>3</sub>	s	3H	3.97
CH <sub>3</sub> Rha	d (J=6.2Hz)	3H	1.11
Protons glu+rha	-	10H	3.20-3.90

● مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون (RMN-<sup>13</sup>C, CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) :

جدول III-14 : نتائج طيف الكربون RMN-<sup>13</sup>C للمركب P<sub>7</sub> :

الكربون الموافق	δ <sub>c</sub> (ppm)	الكربون الموافق	δ <sub>c</sub> (ppm)
C-6'	121.9	C-2	158.9
C-1''	105.8	C-3	135.5
C-2''	75.8	C-4	179.4
C-3''	77.4	C-5	163.0
C-4''	72.3	C-6	100.1
C-5''	78.2	C-7	166.4
C-6''	68.6	C-8	95.0
C-1'''	102.5	C-9	158.5
C-2'''	71.7	C-10	102.5
C-3'''	72.3	C-1'	123.1
C-4'''	73.7	C-2'	114.6
C-5'''	69.8	C-3'	148.3
OCH <sub>3</sub>	56.8	C-4'	150.9
CH <sub>3</sub>	17.9	C-5'	116.1

• قراءة النتائج و تحديد البنية المفصلة للمركب :

طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (RMN-1H) للمركب P<sub>7</sub> (الشكل III-31)، الجدول (III-13) أظهر وجود إشارات تمثل بروتونات الحلقة العطرية الموافقة للإزاحات الكيميائية ذات القيم المحصورة بين 6 و 8 ppm و هي تمثل الإشارات التالية:

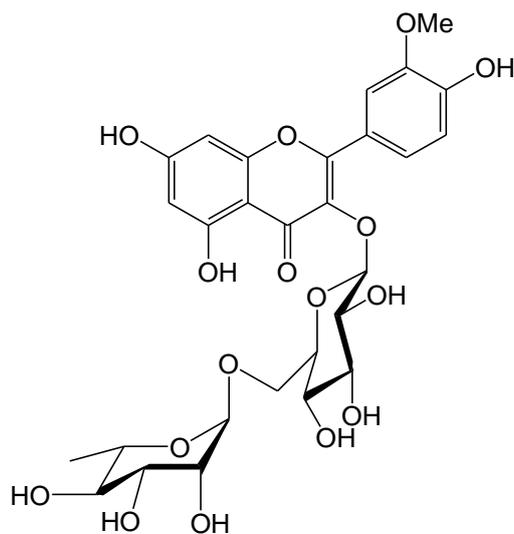
- وجود الحلقة العطرية B ثلاثية الاستبدال و يتجلى ذلك من خلال ظهور ثلاث إشارات بتكامل 1H لكل واحدة، الأولى عند  $\delta_H=7.97$  ppm على شكل ثنائية بثابتة تزاوج  $J=1.8$  Hz ، الثانية عند  $\delta_H=7.66$  ppm على شكل ثنائية ثنائية بثابتتي تزاوج  $J=8.4$  Hz و  $J=1.9$ Hz والثالثة عند  $\delta_H=6.94$  ppm على شكل ثنائية بثابتة تزاوج ( $J=8.4$  Hz) موافقة للبروتونات H-2' ، H-6' و H-5' على التوالي.
- غياب الإشارة الأحادية في المجال [6.5-6ppm] التي تميز مركبات فلافون تؤكد بأن المركب P<sub>7</sub> عبارة عن فلافونول مستبدل في الموقع 3.
- أما إشارتا الحلقة A فظهرتا بشكل ثنائية بتكامل 1H لكل واحدة بنفس ثابت التزاوج  $J=1.92$  Hz عند 6.23 ppm خاصة بالبروتون H-6 والأخرى عند 6.43 ppm خاصة بالبروتون H-8. هاتان الإشارتان تؤكدان أن الحلقة A ثنائية الاستبدال .
- كذلك أظهرت مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ( شكل III-31) إضافة إلى بروتونات الحلقتين A و B إشارة أحادية عند 3.97ppm بتكامل 3H دليل على وجود مجموعة OMe ، هذا بالإضافة إلى إشارتين ثنائيتين عند 4.55 ppm و 5.23ppm بثابتي تزاوج  $J=1.5$  Hz و  $J=7.5$  Hz على التوالي بتكامل 1H تشيران إلى بروتونين أنوميرين لسكرين و عليه فإن المستبدلين عبارة عن OMe وسكرين.
- للتعرف على طبيعة هذين السكرين نبدأ بمطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون حيث:
- ظهرت إشارة ثنائية عند 4.55 ppm بثابتة تزاوج  $J=1.5$  Hz و الإشارة الثنائية عند 1.11 ppm بثابتة تزاوج  $J=6.2$ Hz بتكامل 3H تشير لمثيل الرانوز هذا دليل على وجود سكر الرانوز.
- كذلك ظهور إشارة ثنائية عند 5.23 ppm بثابتة تزاوج  $J=7.5$  Hz تشير لسكر ثنائي و الدراسة الطيفية ثنائية البعد تسمح بتحديد.
- دراسة طيفي ال COSY و HSQC لهذا المركب أدت إلى تحديد الإزاحات الكيميائية للبروتون و الكربون على التوالي و هي متطابقة مع التي تخص سكر + glucose .
- و لمعرفة مكان ارتباط هذه المستبدلات نلجأ إلى تقنية الرنين النووي المغناطيسي ثنائية البعد HMBC (الأشكال III-35-III-) حيث أعطت هذه الأخيرة بقعة تعالق لإشارة OMe ذات الإزاحة 3.97 ppm مع كربون الموقع 3' ذو الإزاحة 148.35 ppm (شكل III-38) مما يدل على إن مجموعة OMe مرتبطة بالموقع 3' و عليه فإن الهيكل الفلافونويدي عبارة عن Isorhamnetine.

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا

بقي لدينا سكرين و موقع واحد شاغر و هو الموقع 3 إذن فالاحتمال الوحيد هو أن يكون هذين السكرين مرتبطين ببعض ، و لمعرفة من السكر الذي يرتبط بهيكل Isorhamnetine أي السكر الأول و السكر الثاني نلجأ إلى مطيافية HMBC حيث أعطت بقعة تعالق للبروتون الأنوميري "H-1 لسكر glucose ذو الإزاحة 5.25ppm مع الكربون رقم 3 ذو لإزاحة 135.48 ppm وعليه فإن سكر glucose يرتبط بالموقع 3 ,ويليه سكر rhamnose و لمعرفة بالتحديد مكان إرتباط هذا الأخير بسابقه دائما بمطيافية HMBC ( شكل-III-38) و التي أعطت بقعة تعالق للبروتون الأنوميري الخاص بسكر rhamnose ذو الإزاحة 4.55 ppm مع الكربون "H-6 لسكرالغلوكوز ذو الإزاحة 68.57 ppm شكل III-44 مما يدل على أن سكر rhamnose يرتبط بالموقع "6 لسكر glucose .

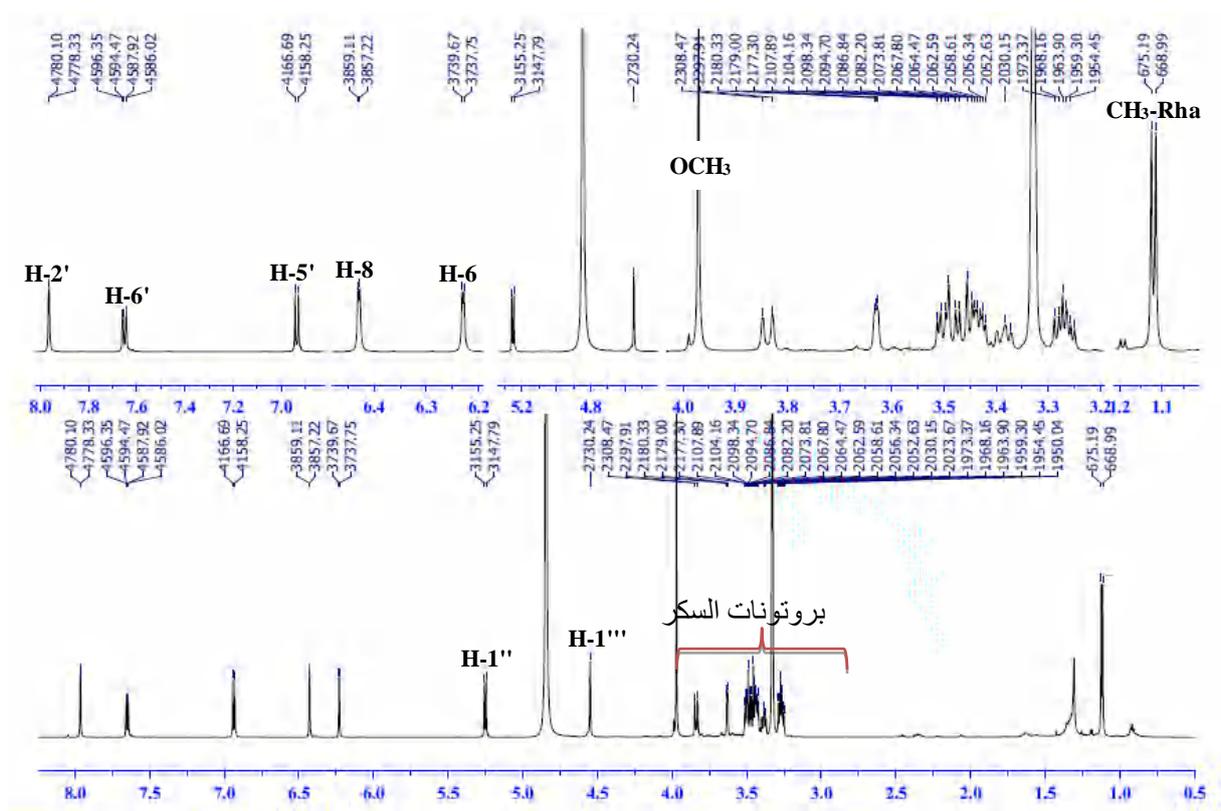
**الاستنتاج:**

- طيف الكربون  $^{13}\text{C}$ -RMN يبين وجود 27 ذرة كربون، 15 ذرة تعود للأجليكون و 12 ذرة خاصة بالسكرين .
- و بالإضافة إلى قيم مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون و الكربون التي جاءت مؤكدة لكل النتائج كما هو موضح في الجدولين 12، 13، و الأشكال III-43 و III-44 .
- و من خلال معطيات طيف HMBC يتأكد أن سكر الرامنوز مرتبط بسكر الغلوكوز في الموضع ("6-1") و سكر الغلوكوز يرتبط بدوره مع الأجليكون في الموضع 3 .
- و جاءت الأطياف ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) COSY، HSQC، HMBC مؤكدة لبنية المركب .
- و عليه اعتمادا على كل المعطيات الطيفية المذكورة سابقا نستطيع أن نصيغ بشكل تفصيلي البنية الكيميائية للمركب  $\text{P}_7$  و التي هي عبارة عن  
[Isorhamnetin-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside] و هذا بعد مقارنة البيانات الطيفية بتلك الموجودة في المرجع [6] .
- إذن فالصيغة المفصلة للمركب  $\text{P}_7$  هي :



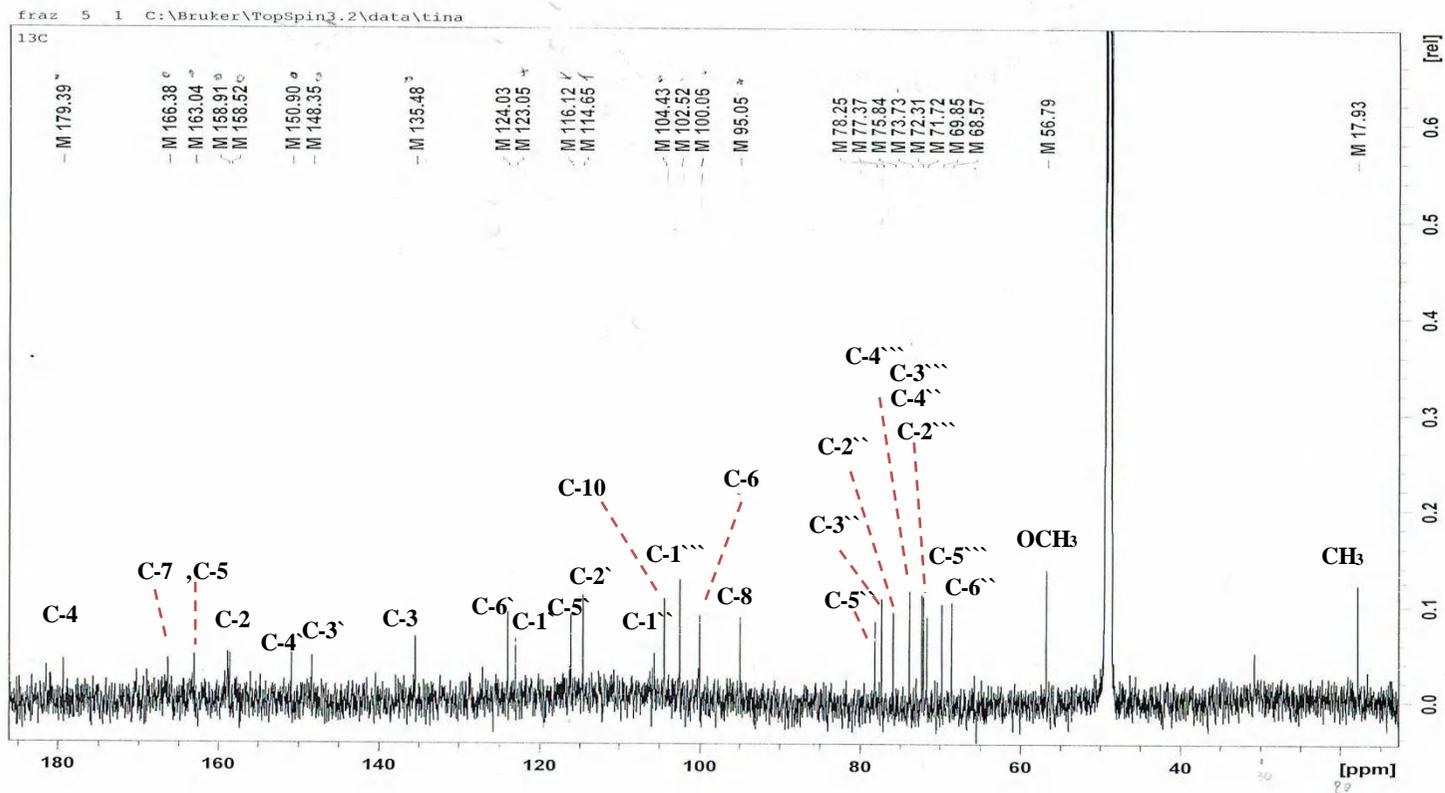
**Isorhamnetin-3-O-[\alpha-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-\beta-D-glucopyranoside]**

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا

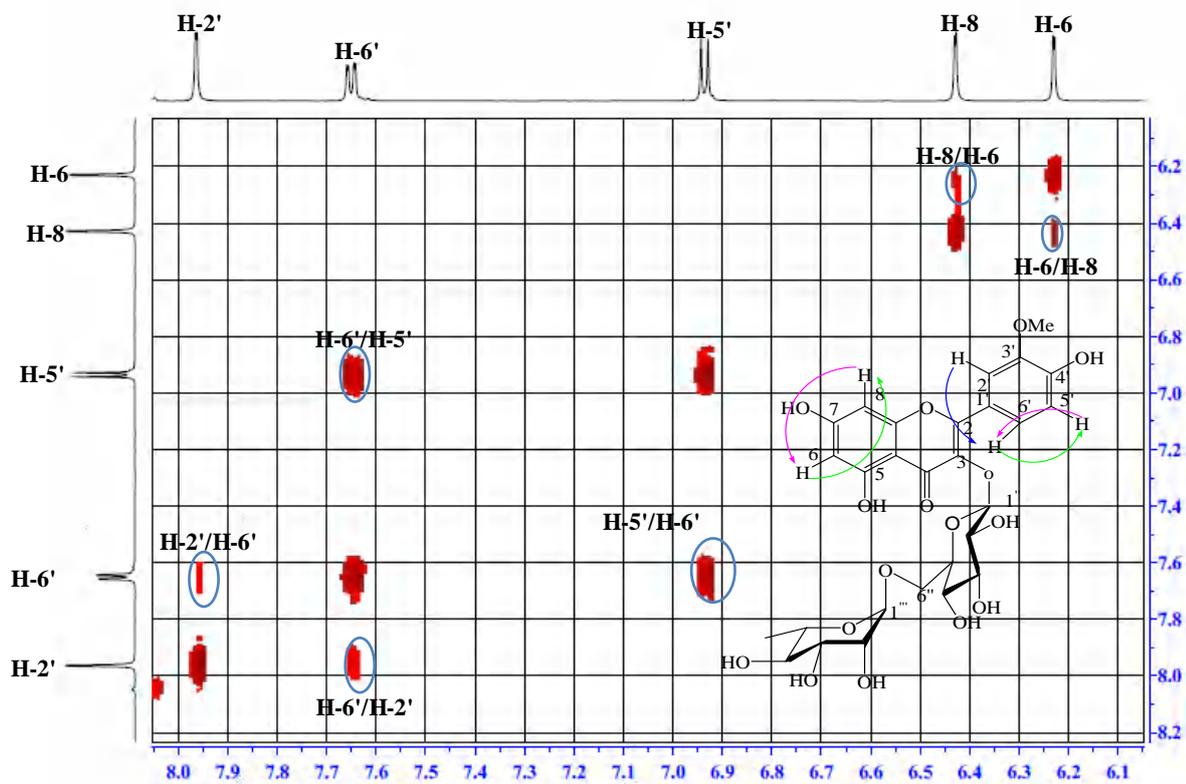


الشكل III-30: مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون <sup>1</sup>H-RMN المسجل في CD<sub>3</sub>OD للمركب P<sub>7</sub>

الشكل 31-III : طيف ال<sup>13</sup>C RMN للمركب P<sub>7</sub> في ال (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

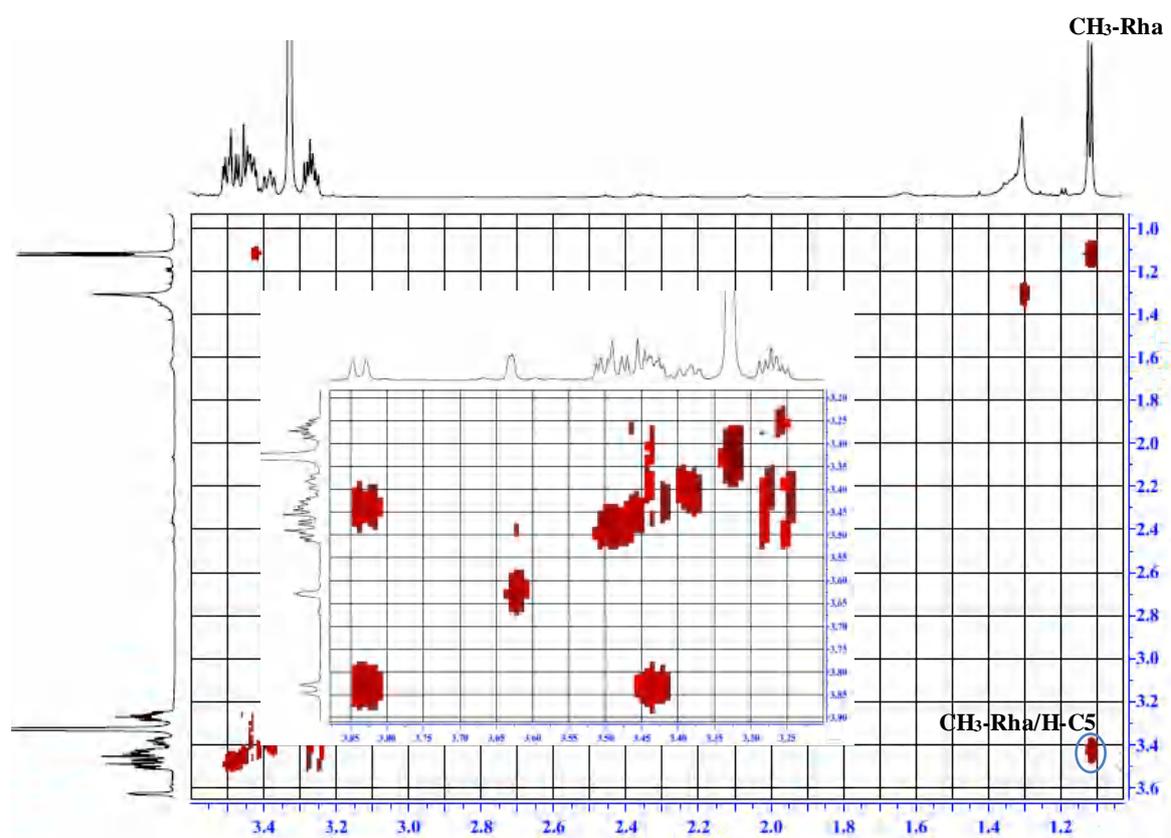


الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا

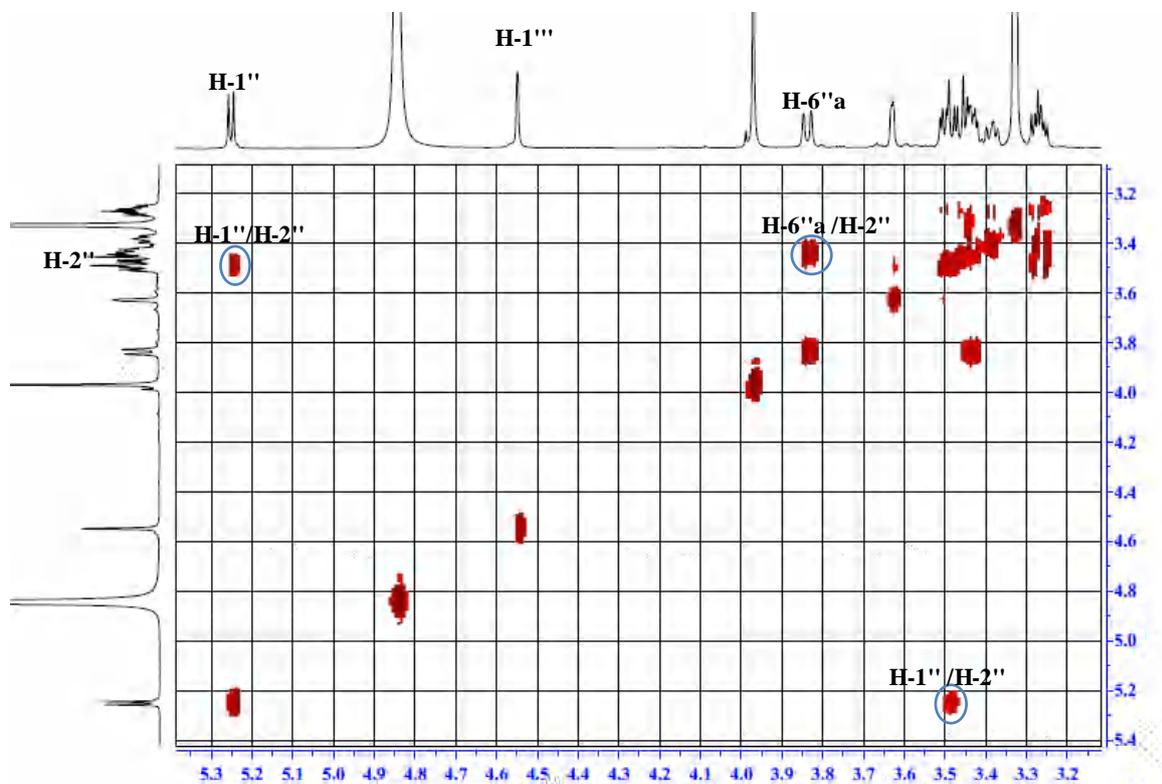


الشكل III-32 : طيف تجارب <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY المسجل في CD<sub>3</sub>OD للمركب P<sub>7</sub>

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا

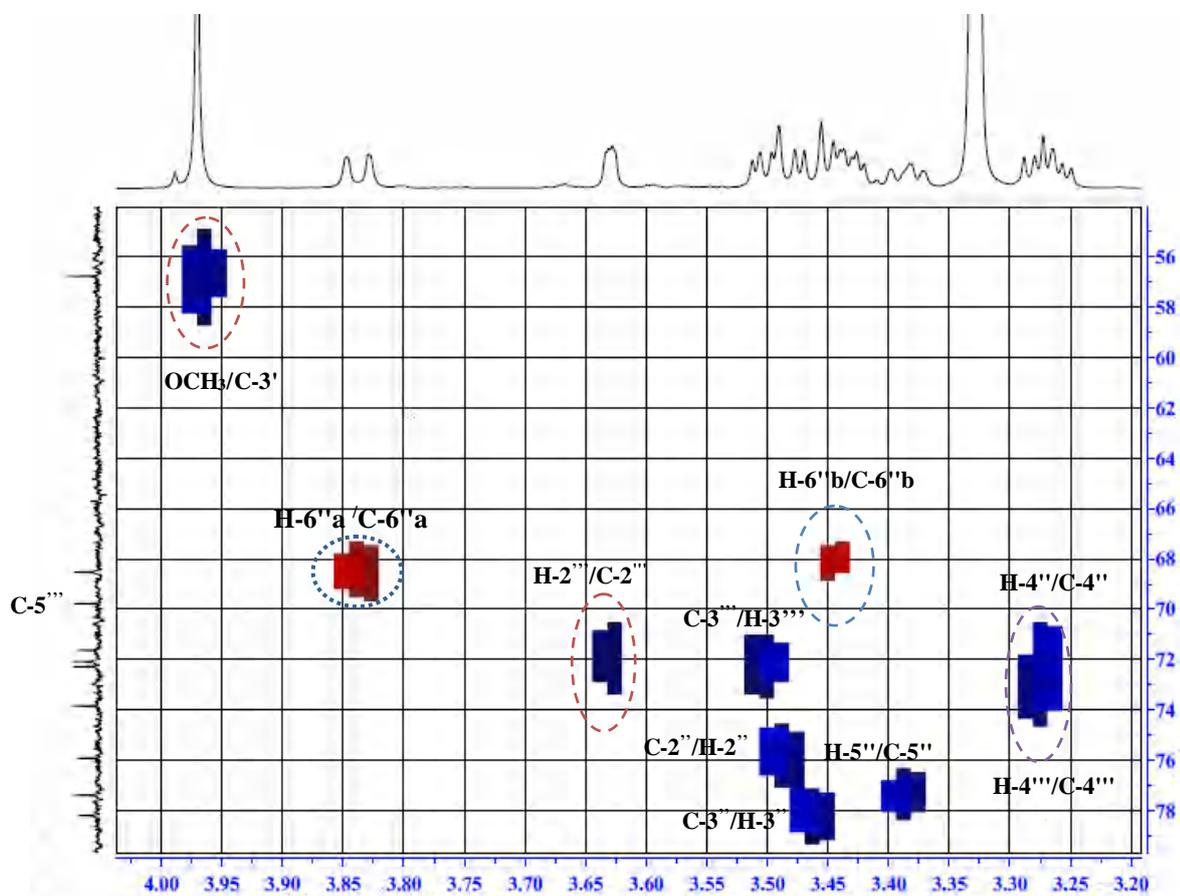


الشكل III-32-1 : طيف تجارب <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY المسجل في CD<sub>3</sub>OD للمركب P7



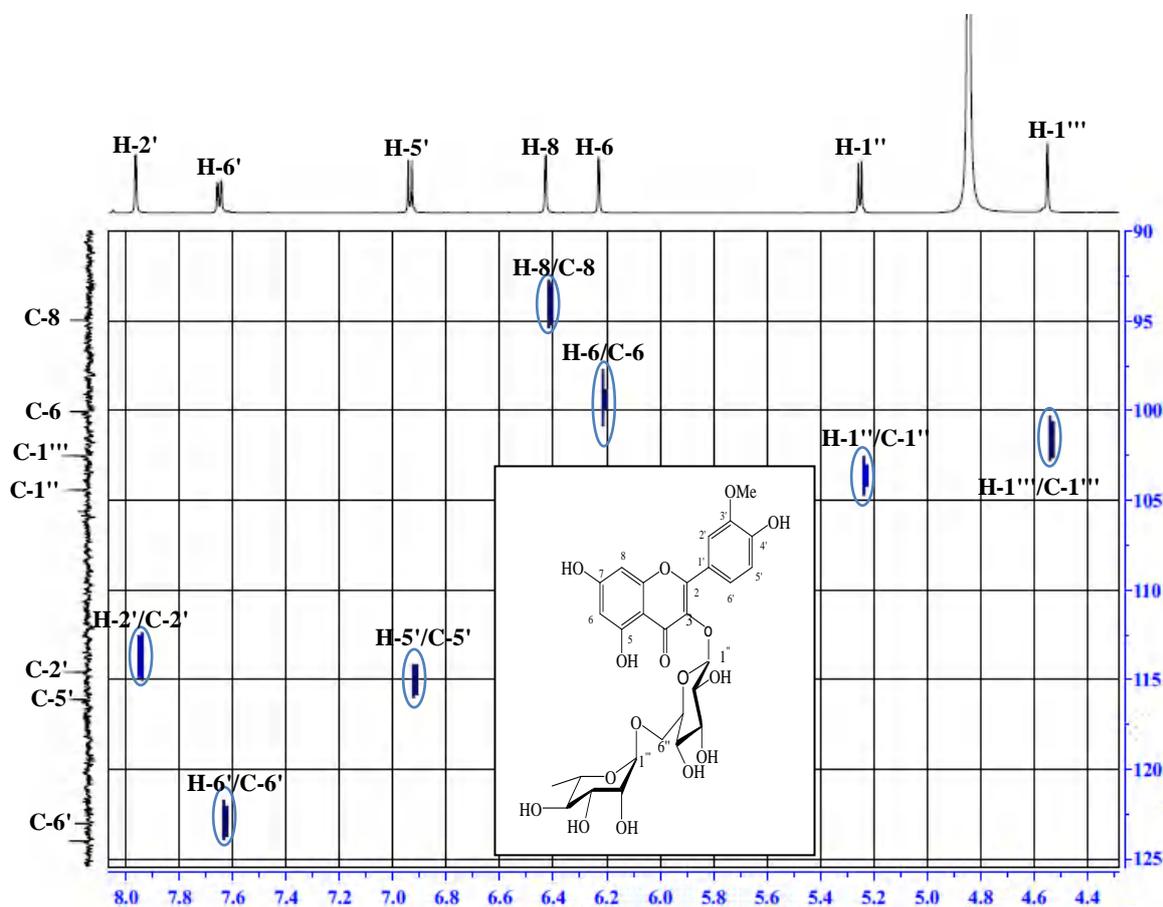
الشكل III-2-32 : طيف تجارب  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY المسجل في  $\text{CD}_3\text{OD}$  للمركب  $\text{P}_7$

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا



الشكل III- 33 : مطيافية HSQC المسجل في  $CD_3OD$  للمركب  $P_7$

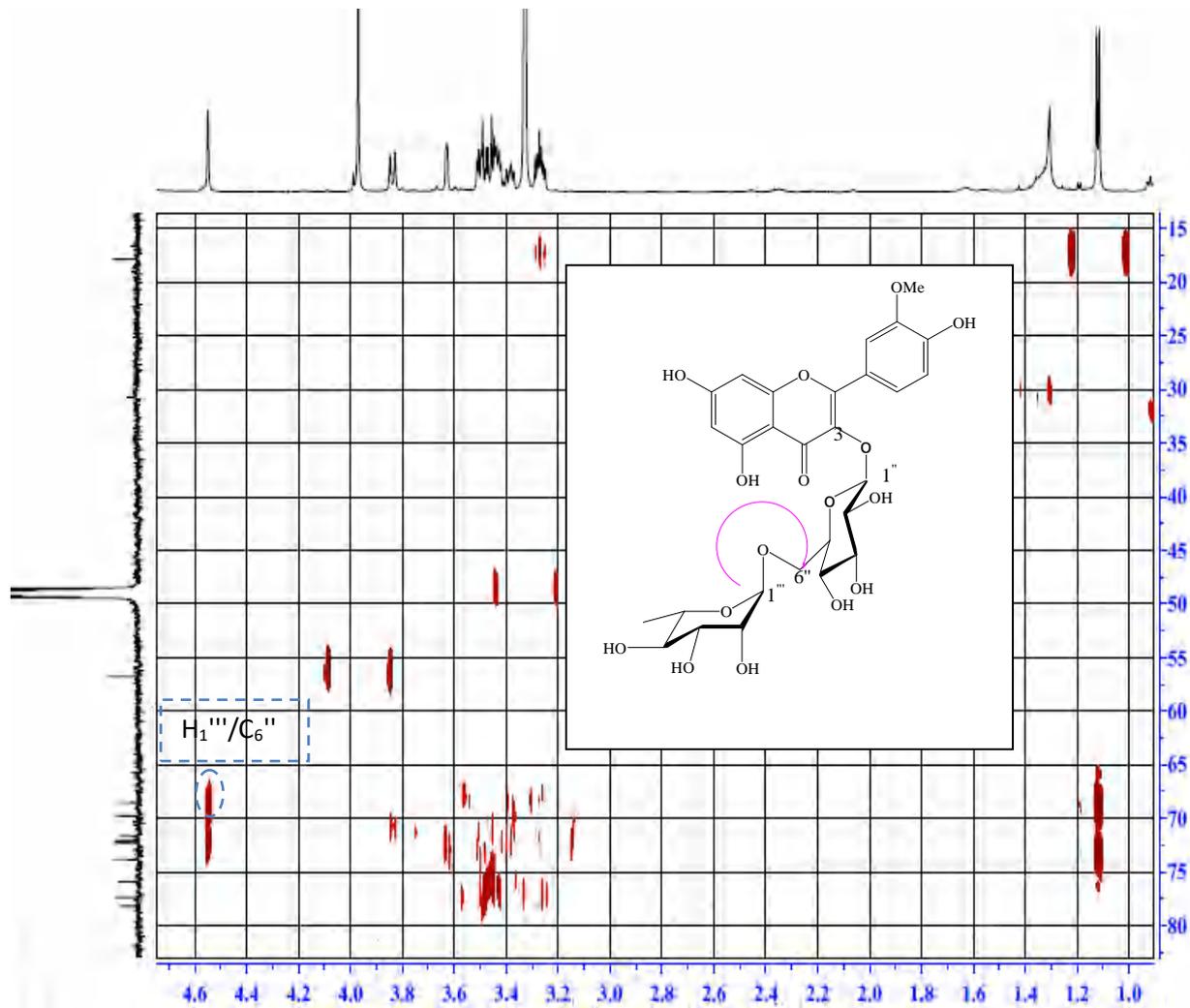
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأكسدة و المضادة للبكتيريا



الشكل III-33-1: مطيافية HSQC المسجل في للمركب P7

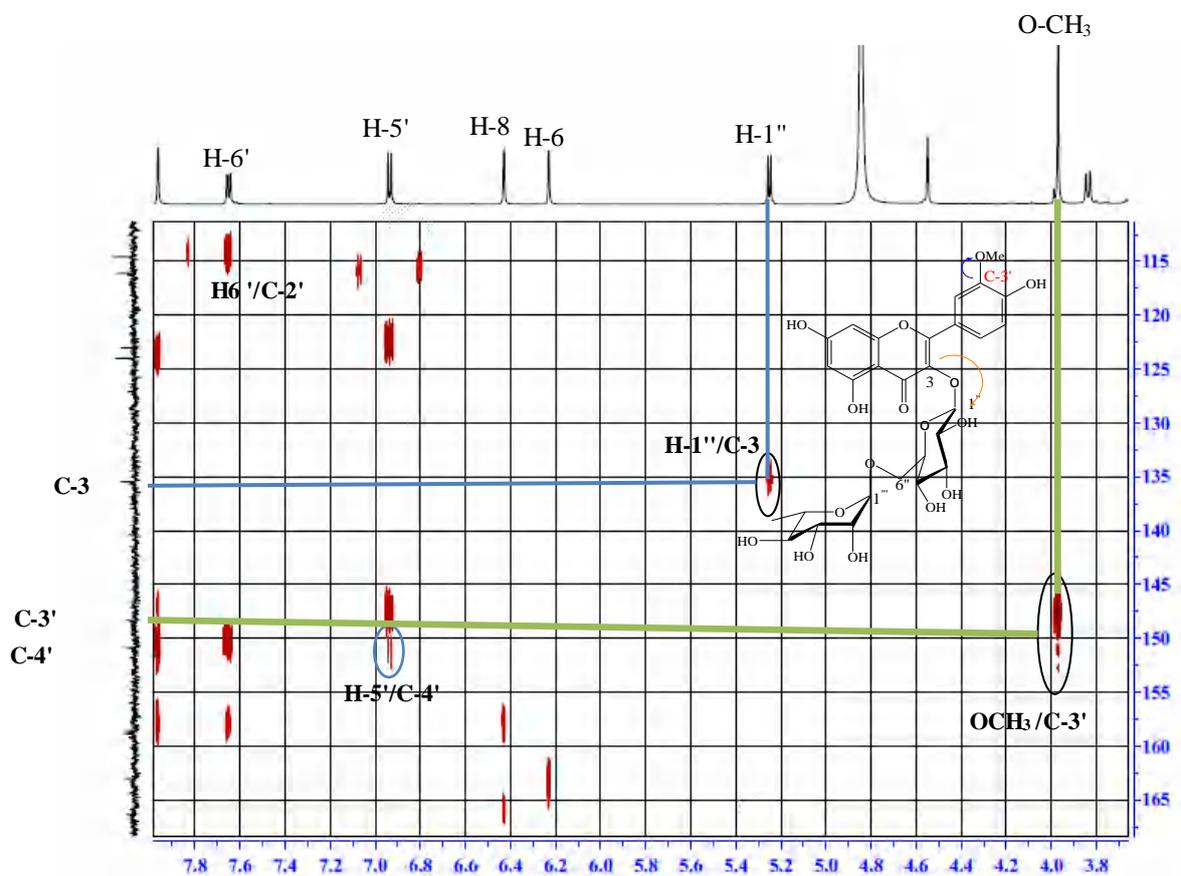
1

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا



الشكل III-34 : طيف تجارب HMBC المسجل في  $CD_3OD$  للمركب  $P_7$

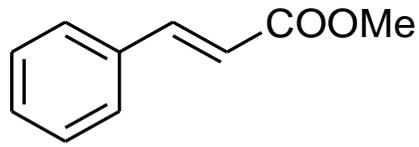
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
لأوكسدة و المضادة للبكتيريا



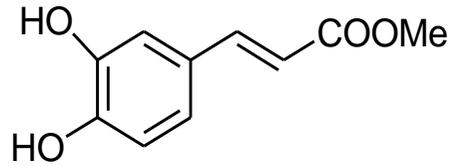
الشكل 1-34-III : طيف تجارب HMBC المسجل في CD<sub>3</sub>OD للمركب P<sub>7</sub>

### الخلاصة

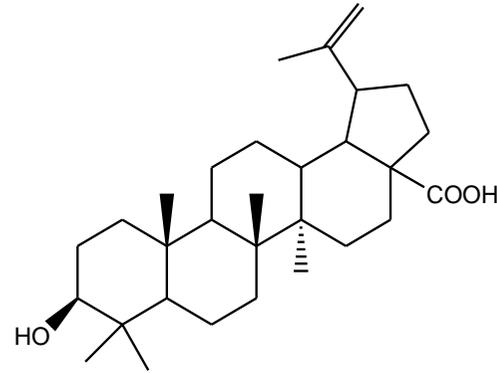
أدت الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلص البيتانول ل *O.praecox* إلى عزل و التعرف على سبع مركبات: مشتق حمض السيناميك، مشتق حمض الكافيك، حمض البتيلنيك، 3 فلافونويدات و *neolignane*.



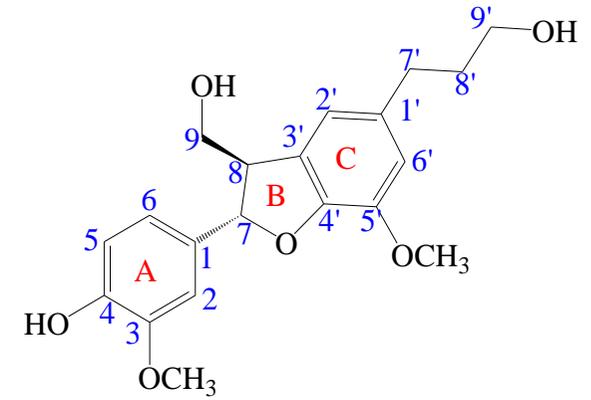
Cinnamate de méthyle



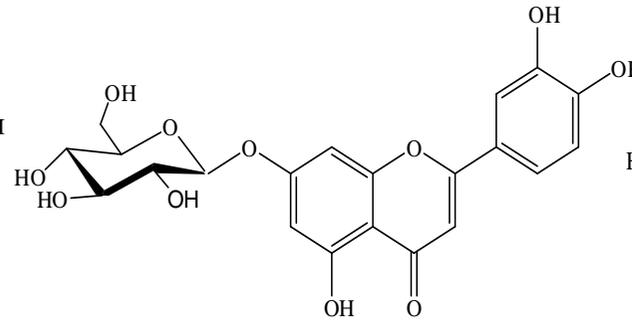
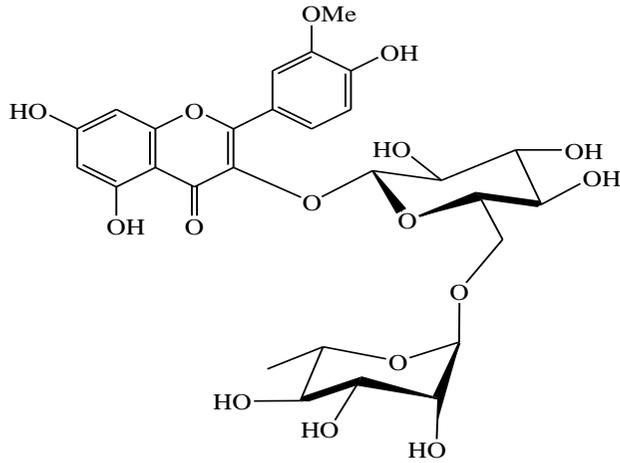
méthyl ester Acide Caféique



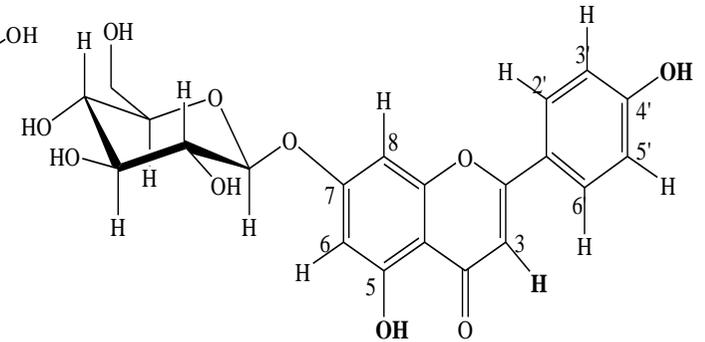
Bétulinique Acide



(7R,8S)-Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol



Lutéoline 7-O-β-D-glucoside



Apigénine-7-O-β-D-glucoside

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

الشكل III-35 : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox*

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا

III-3-تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا

III-3-1-تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلص الايثانولي للنبتة *Ormenis Praecox*:

تمت القراءة بعد مرور 18 ساعة بقياس مناطق التثبيط (Zone d'inhibition) بواسطة مسطرة ، النتائج المتحصل عليها مدونة في الجدول III-15:

جدول رقم III-15 : النشاطية ضد البكتيرية للمستخلص الايثانولي معبرا عنها بقطر التثبيط بالملتر

البكتيريا	المستخلص الايثانولي						CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
	مناطق التثبيط (mm)						
	SM	D1	D2	D3	D4	D5	
E.coli SH	20	16	14	13	12	-	80
E.coli ATCC	12	12	11	11	10	10	20
Pseudo SH	11	11	11	11	10	10	40
Pseudo ATCC	14	13	13	11	10	-	80
Staph SH	23	17	17	17	17	16	20
Staph ATCC	16	15	14	14	13	11	40
Entero SH	17	16	15	13	12	10	10
Kp SH	11	11	10	10	10	10	40
<i>Salmonella</i> SH	-	-	-	-	-	-	-
Shigella SH	17	15	12	10	10	10	40

جدول رقم III-16 : النشاطية ضد البكتيرية للمستخلص البوتانولي معبرا عنها بقطر التثبيط بالملتر

البكتيريا	المستخلص البوتانولي						CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
	مناطق التثبيط (mm)						
	SM	D1	D2	D3	D4	D5	
E.coli SH	12	12	11	11	-	-	160
E.coli ATCC	15	14	13	12	12	11	40
Pseudo SH	14	13	12	12	12	11	40
Pseudo ATCC	16	15	13	12	12	10	40
Staph SH	13	12	12	12	11	11	40
Staph ATCC	16	15	15	14	12	10	20
Entero SH	15	13	13	13	-	-	160
Kp SH	15	13	-	-	-	-	640
<i>Salmonella</i> SH	15	14	13	13	12	12	10
Shigella SH	16	15	15	15	9	-	80

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة  
للأكسدة و المضادة للبكتيريا

جدول رقم III-17 : النشاطية ضد البكتيرية لمستخلص خلات الايثيل معبرا عنها بقطر التثبيط بالملمتر

البكتيريا	مستخلص خلات الايثيل						CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
	مناطق التثبيط (mm)						
	SM	D1	D2	D3	D4	D5	
E.coli SH	14	14	10	10	-	-	160
E.coli ATCC	14	13	12	12	11	11	20
Pseudo SH	-	-	-	-	-	-	-
Pseudo ATCC	<b>19</b>	16	16	12	11	9	40
Staph SH	<b>19</b>	16	15	14	14	13	20
Staph ATCC	15	13	13	12	12	-	80
Entero SH	15	13	12	10	9	-	80
Kp SH	13	11	-	-	-	-	640
Salmonella SH	10	9	9	9	2	7	20
Shigella SH	16	14	14	10	10	10	40

-تفسر النتائج المتحصل عليها من خلال الجداول الثلاث بأن المستخلص الايثانولي له فعالية أفضل كمضاد للبكتيريا *Staph ATCC* و *E.coli SH* بمناطق تثبيط 23 mm و 20 mm على التوالي . و مع ذلك لم يلاحظ أي تثبيط للبكتيريا *Salmonella SH* .

-أما مستخلص خلات الايثيل أدى إلى تثبيط سلالة *Pseudo ATCC* و *Staph SH* بمنطقة تثبيط تبلغ 19 mm، و لكنها لم تظهر أي نشاط ضد البكتيريا *Pseudo SH* .  
مقارنة مع المستخلصات الأخرى ، قدم المستخلص البوتانولي نشاطا مضادا للبكتيريا متوسطا ضد جميع السلالات المختبرة ، و أكثر السلالات المثبطة هي *Shigella SH* .  
ربما هذا يعكس حساسية مختلفة نسبيا للبكتيريا أو وجود نشاط مضاد انتقائي محتمل للبكتيريا لمستخلصاتها .

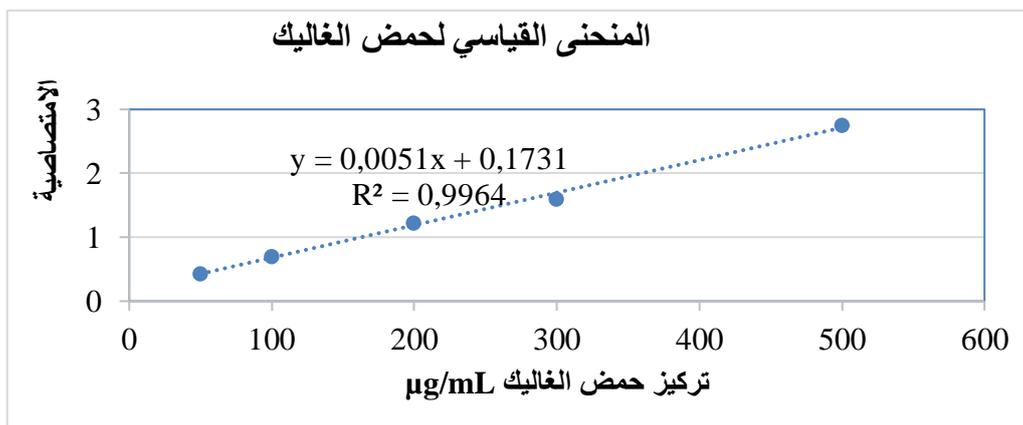
الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا

III-3-2- التقدير الكمي لمتعدد الفينول :

تم تقدير عديدات الفينول باستخدام كاشف Folin-Ciocalieو حسب طريقة Sigle و حمض الغاليك كأساس مرجعي ، كاشف الFolin يتغير لونه من الأصفر إلى الأزرق [11].

● رسم المنحنى القياسي لحمض الغاليك:

يظهر منحنى معايرة حمض الغاليك في الشكل III-36 و كميات البوليفينول المدونة في الجدول III-18 :



الشكل III-36 : المنحنى القياسي لحمض الغاليك

تم ذكر قيمة الكثافة الضوئية المقاسة (DO) لكل مستخلص وتحويله إلى mg/mL بواسطة العلاقة (y) المستمدة من المنحنى السابق في الجدول III-5 .

تم الحساب عن طريق استبدال (y) بقيمة (DO) لكل مستخلص.

الجدول III-18: كميات البوليفينول المقاسة لكل مستخلص

الجدول III-18 : نتائج المحتوى الفينولي للمستخلصين ( AcOEt و n-BuOH ) للنبتة *O.praecox* .

المحتوى الفينولي	DO		المستخلص
418.61	2.308	التجربة 1	AcOEt
432.53	2.379	التجربة 2	
105.86	0.713	التجربة 1	n-BuOH
117.82	0.774	التجربة 2	
400	/	/	مستخلص الشاي الأخضر

تشير هذه النتائج إلى أن نبات *Ormenis praecox* غني بالبوليفينول . إذ يحتوي مستخلص أسيتات الإيثيل على القيمة المقدرة ب ( 432.53 mg/g ) من مادة البوليفينول ، وهذه الكمية أعلى من قيمة البوليفينول

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا

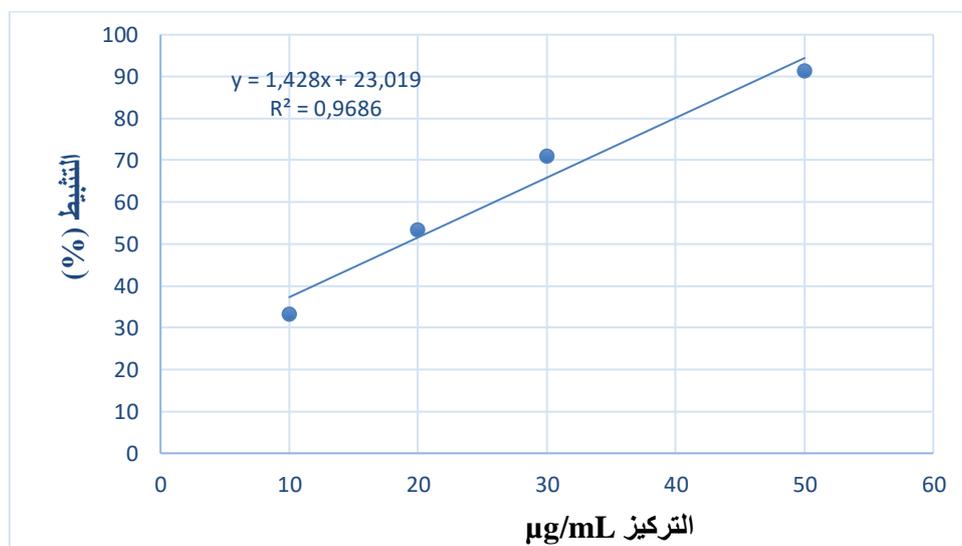
الموجودة في مستخلص البوتانول ذو القيمة (mg/g) 117.82 و القريب من مستخلص الشاي الأخضر 400 (mg/g) [12].

III-4-4- اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH

III-4-4-1- نتائج القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH

يتم حساب النسبة المئوية لتثبيط DPPH باستخدام الصيغة المذكورة (PI)، وهي مذكورة في الجدولين (III-18 و III-19) و الشكلان (III-38, III-39) يتم حساب قيم  $IC_{50}$  لكل مستخلص بواسطة معادلة خط الاتجاه لكل مستخلص ، مع استبدال (y) بـ 50. الجدول III-19: قيم  $IC_{50}$  للمستخلص *n*-BuOH

التركيز بـ $\mu\text{g/mL}$	التثبيط %						$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
	2.5	5	10	20	30	50	
مستخلص <i>n</i> -BuOH	21.75	28.28	33.23	53.48	71.14	91.30	18.71

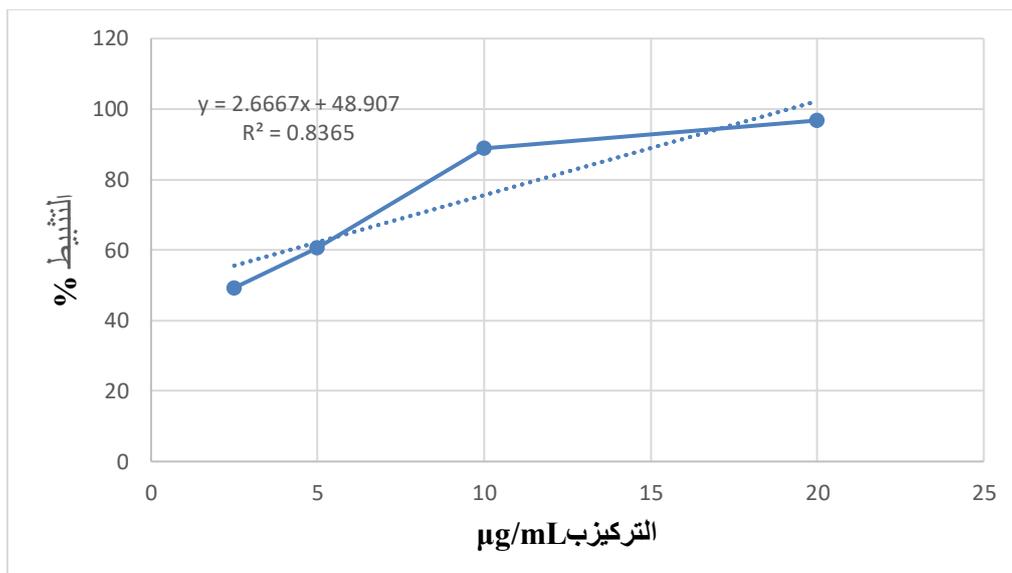


الشكل III-37 : منحنى النسبة المئوية لتثبيط DPPH بواسطة مستخلص *n*-BuOH

الجدول III-20: قيم  $IC_{50}$  للمستخلص AcOEt

التركيز بـ $\mu\text{g/mL}$	التثبيط %				$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
	2.5	5	10	20	
مستخلص AcOEt	49.28	60.7	88.9	96.75	4.10

الفصل الثالث : المركبات المفصولة من النبتة *Ormenis praecox* و دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا



الشكل III-38 : منحى النسبة المئوية لتثبيط DPPH بواسطة مستخلص AcOEt

من خلال قيم  $IC_{50}$  المثبطة للجذر الحر DPPH في مستخلص AcOEt و مستخلص *n*-BuOH لنبات *Ormenis praecox* المتمثلة في الشكلين (37-III و 38-III)، نجد أن مستخلص AcOEt أبدى أكبر فعالية في تثبيط الجذر الحر DPPH، إذ قدرت قيمة ( $IC_{50}$ ) ب  $4.10 \mu\text{g/mL}$ ، بينما قدرت قيمة ( $IC_{50}$ ) في المستخلص *n*-BuOH ب  $18.71 \mu\text{g/mL}$ .

يحتوي النبات المدروس على نشاط مضاد للجذور بشكل ملحوظ ومستخلص AcOEt أفضل من *n*-BuOH، بتركيز قدره  $4.10 \mu\text{g/mL}$  والذي سيثبط 50% من DPPH، وهذا التركيز قريب من تركيز الروتين ( $IC_{50} = 3 \mu\text{g/mL}$ ) Rutine وهذا المستخلص هو ضعف مضاد للجذور الحرة مثل مستخلص الشاي (الأخضر  $IC_{50} = 8,37 \mu\text{g/mL}$ )، وبالتالي فهو مضاد للجذور الحرة أكثر بثلاث مرات من الكيرسيتين ( $IC_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$ ).

### المراجع باللغة العربية

- [2] درويش ,ك. (2016). استخلاص وتنقية المركبات الفعالة بيولوجيا من بعض الأنواع النباتية  
. *Chrysanthemum fuscatum* , *Chrysanthemum macrocarpum* et *Chrysanthemum*  
*reboudianum* مع دراسة مقارنة لنشاطيتها ضد ميكروبية.مذكرة لنيل شهادة الدكتوراه .جامعة قسنطينة 1.

### المراجع باللغة الأجنبية

- [1] Ladjel, S., Gherraf, N., Zellagui, A., Brahim, L., Hameurlaine, S. (2011). Phytochemical and Antibacterial screening of some Algerian Saharian Medicinal Plants. *Journal of Plant Sciences feed.*, 1(10): 178-179.
- [3] Xu, W., Zhou, G. X., Yao, X. S. (2010). Lignans from the stem of *Schimasuperba*. *Natural Product Research Dev.*, 22(6), 945-948.
- [4] Takara, K., Kinjyo, A., Matsui, D., Wada, K., Nakasone, Y., and Yogi, S. (2000). Antioxidative Phenolic compounds from the non-sugar fraction in Kokuto, non-centrifuged cane sugar. *Nippon Nošgeikaga kuKaishi (in Japanese)*, 74, 885–890.
- [5] Kensaku, T., Daigo M., Koji ,W., Toshio, I., Isao ,C., Yoko, N . (2003). New Phenolic Compounds from Kokuto, Non-centrifuged Cane Sugar. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (2), 376–379 .
- [6] Chibani, S., Haba, H., Lavaud, C., Benkhaled, M., Harakat, D. (2013). Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylisflava*. *Phytochemistry Letters*, 6(1), 9-13.
- [7] Mishra, T., Arya, R. K., Meena, S., Joshi, P., Pal, M., Meena, B. Datta, D. (2016). Isolation, 11(7), Characterization and Anticancer Potential of Cytotoxic Triterpenes from *Betulautilis* Bark. *Plos one*, 0159430.
- [8] Hamid, N. A. A., Mediani, A., Maulidiani, M., Abas, F., Park, Y. S., Leontowicz, H., Gorinstein, S. (2017). Characterization of metabolites in different kiwifruit varieties by NMR and fluorescence spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 138, 80-91.
- [9] Hallnemo, G., Thomas, Ol., Christina ,U. (1985). "An NMR investigation of the reaction tween cinnamic acid esters and lithium dimethylcuprate. Initial formation of an olefin-copper  $\pi$ -complex. *Journal of organometallic chemistry*. 282.1: 133-144.
- [10] Mabry, T.J. Markham, K. R. and Thomas, M.B. (1970). *The systimatic identification of flavonoids*, Springer, New york, 45-126.
- [11] Kujala, T.S., Lopenen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. (2000). Phenolic and betacyanins in redbeet root (*Beta vulgaris*): distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5338-5342.
- [12] Sun, J., Chen, P., Lin, L.Z., Harnly, J.M. (2011). A non-targeted approach to chemical discrimination between green tea dietary supplements and green tea leaves by HPLC/MS, *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 94: 103-108.

الختمة

# 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 :

*Ammoides atlantica*. (Apiaceae)

*Ormenis mixta*, *Ormenis praecox* (Asteraceae)

حيث كان الهدف الأساسي هو التعرف على المحتوى الفينولي للمستخلص الهيدروكولي للنباتة *Ammoides atlantica* ودراسة النشاط المضاد للأوكسدة. تمكنا في هذه الدراسة ، من تنفيذ التنميط النباتي الكيميائي للمستخلص الهيدروكولي للجزء الهوائي *Ammoides atlantica* باستخدام تقنية RPUHPLC-ESI-QTOF-MS في وضع التأين السلبي تم تحديد الوصف الكيميائي وفقاً لأطياف LC - MS / MS تم الكشف عن 66 مركب كيميائي. من بين هذه ، تم تحديد 45 مركباً : 26 حمض هيدروكسي سيناميك ومشتقاته ، 4 أحماض هيدروكسي بنزويك، 11 فلافون ، 3 فلافونول ، ولنجان واحد. كما تم تحديد المحتوى الكلي للفينولات (371.57 mg/g) المحتوى الكلي للفلافونويد (41.02 mg/g). علاوة على ذلك ، أعطت اختبارات النشاط المضاد للأوكسدة للمستخلص الهيدروكولي للنباتة *Ammoides atlantica* من خلال ست طرق DPPH (IC<sub>50</sub>: 23.31 µg/mL) ، DMSO (IC<sub>50</sub>: 3.19 µg/mL O<sub>2</sub> , ABTS (IC<sub>50</sub>: 11.31 µg/mL) ، (قلوية، فحوصات مخلب الأيونات الحديدية (IC<sub>50</sub>: 102.35 µg/mL) ، قوة اختزال (A<sub>0.50</sub>: 92.70 µg/mL) واختبار ال CUPRAC (A<sub>0.50</sub>: 13.56 µg/mL) على التوالي أعطت نشاطاً عالياً مضاداً للأوكسدة اتجاه DMSO و CUPRAC مقارنة بالشواهد BHT، BHA و حمض الأسكوربيك. كما كان هدفنا أيضاً فصل و تحديد منتجات الأيض الثانوي من الجزء الهوائي لكل من النباتتين *Ormenis mixta* و *Ormenis praecox*. دراسة الفعالية المضادة للتكاثر للنباتة *Ormenis mixta* للمركبات المفصولة ضد الخلايا السرطانية Hella و Jurkat من خلال اختبار MTT. تم الكشف عن موت الخلايا المبرمج لخلايا Hella و Jurkat مع تغيير جرعات هذه المركبات المفصولة و وقت MTT، وأخيراً دراسة الفعالية المضادة للأوكسدة و المضادة للبكتيريا لبعض مستخلصات النباتة *Ormenis praecox*. حيث أعطى مستخلص خلايا الاثيل نشاط مضاد للأوكسدة أعلى من المستخلص المستخلص البيوتانولي و الايثانولي. أما النشاط المضاد للبكتيريا فأعطى مستخلص خلايا الاثيل نشاطاً

ضد: البكتيرية *Salmonella heidelberg SH* ، *Pseudomonas aeruginosa SH*

، *Staphylococcus aureus SH* ، *Escherichia coli ATCC*. أما المستخلص البيوتانولي فأعطى نشاطا

مضادا للبكتيريات التالية : *Salmonella heidelberg SH* ، *Staphylococcus aureus ATCC*.

و أخيرا أعطى المستخلص الايثانولي فأعطى نشاطا مضادا لبكتيرية *Staphylococcus aureus SH* ،

*Escherichia coli ATCC* و بكتيرية *Enterobacter aerogenes SH*.

أدت الدراسة الفيتوكيميائية للنببتين الأخيرتين على التوالي إلى فصل 16 مركب و التعرف على بنيتها ، حيث تم فصل هذه المركبات باستعمال تقنيات الفصل المعتادة بدءا بالاستخلاص الذي تليه تقنيات الفصل الكروماتوغرافية من كروماتوغرافيا العمود وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، أنهينا عمليات الفصل بتقنية 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 وفي حالات أخرى تقنية *HPLC-UV-DAD-MS* و أخيرا مطيافية الكتلة ، أما الكيميائية فتتمثل في الإماهة الحمضية و الخواص الكروماتوغرافية.

كل هذه التقنيات أدت إلى وضع الصيغ المفصلة التالية:

➤ بالنسبة للنبتة *Ormenis mixta* تم فصل 9 مركبات سيسكويترپينية منها خمسة جديدة من النوع

غوانوليد فصلت لأول مرة في النوع و هي :

- 1-  $2\alpha,3\alpha$ -Epoxy-1,4,10-trihydroxyguaian-12,6 $\alpha$ -olide
- 2-  $2\beta,3\beta$ -Epoxy-1,4,10-trihydroxyguaian-12,6 $\alpha$ -olide
- 3- 10-Hydroxychabrol-2(3)-en-4,5-dion-12,6 $\alpha$ -olide
- 4-  $1\alpha, 2\alpha, 3\alpha, 4\alpha, 10\alpha$ -pentahydroxyguaia-11(13)-ène-12,6 $\alpha$ -olide
- 5- 1-hydroxy-3-oxo-eudesman-12,6 $\alpha$ -olide

و أربعة معروفة هي:

- 6- 1-Hydroxy-3-oxo-eudesman-12,6 $\alpha$ -olide
- 7-  $11\beta, 13$ -Dihydro-1-epireynosine
- 8-  $1,2$ -Dihydroxy-germacr-10(15)-en-12,6 $\alpha$ -olide
- 9- isoerivanine

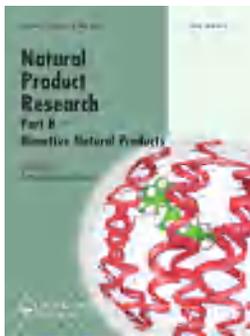
➤ أما بالنسبة للنبتة *Ormenis Praecox* تم فصل 7 مركبات و هي :

- 1- (7R,8S)-Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol
- 2- Acide Bétulinique
- 3- Cafféate de méthyle
- 4- Cinnamate de méthyle

5- Apigénine 7-*O*-β-D-glucoside

6- Lutéoline 7-*O*-β-D-galactoside

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



## Antioxidant activity and characterization of flavonoids and phenolic acids of *Ammoides atlantica* by RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS<sup>n</sup>

Mounira Benteldjouné, Tarek Boudiar, Abdelhakim Bakhouché, María del Mar Contreras, Jesús Lozano-Sánchez, Chawki Bensouici, Zahia Kabouche & Antonio Segura-Carretero

To cite this article: Mounira Benteldjouné, Tarek Boudiar, Abdelhakim Bakhouché, María del Mar Contreras, Jesús Lozano-Sánchez, Chawki Bensouici, Zahia Kabouche & Antonio Segura-Carretero (2021) Antioxidant activity and characterization of flavonoids and phenolic acids of *Ammoides atlantica* by RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS<sup>n</sup>, *Natural Product Research*, 35:10, 1639-1643, DOI: [10.1080/14786419.2019.1619722](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1619722)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1619722>

 [View supplementary material](#) 

 Published online: 29 May 2019.

 [Submit your article to this journal](#) 

 Article views: 142

 [View related articles](#) 

 [View Crossmark data](#) 

SHORT COMMUNICATION



## Antioxidant activity and characterization of flavonoids and phenolic acids of *Ammoides atlantica* by RP–UHPLC–ESI–QTOF–MS<sup>n</sup>

Mounira Benteldjoune<sup>a</sup>, Tarek Boudiar<sup>b</sup>, Abdelhakim Bakhouché<sup>c,d</sup>, María del Mar Contreras<sup>c,d</sup>, Jesús Lozano-Sánchez<sup>c,e</sup>, Chawki Bensouici<sup>b</sup>, Zahia Kabouche<sup>a</sup>  and Antonio Segura-Carretero<sup>c,d</sup> 

<sup>a</sup>Département de chimie, Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (L.O.S.T), Université des frères Mentouri-Constantine 1, Constantine, Algeria; <sup>b</sup>Biotechnology Research Centre (C.R.Bt), Constantine, Algeria; <sup>c</sup>Research and Development of Functional Food Centre (CIDAF), Granada, Spain; <sup>d</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain; <sup>e</sup>Department of Food Science and Nutrition, University of Granada, Granada, Spain

### ABSTRACT

In this study, phytochemical profiling of hydro-alcoholic extract of *Ammoides atlantica* aerial parts has been carried out using RP–UHPLC–ESI–QTOF–MS in negative ionization mode. Chemical characterization was established according to the MS and MS/MS spectra. A total of 66 chemical compounds were detected. Among these, 45 compounds were identified: hydroxycinnamic acid and derivatives (26), hydroxybenzoic acids (4), flavones (11), flavonols (3), and a lignan. Total phenolics (371.57 mg/g) and total flavonoids (41.02 mg/g) contents were also determined. Moreover, the antioxidant activity of *A. atlantica* extract was also studied by six methods: DPPH (IC<sub>50</sub>: 23.31 µg/mL), ABTS<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub>: 11.31 µg/mL), O<sub>2</sub><sup>-</sup> DMSO alkaline (IC<sub>50</sub>: 3.19 µg/mL), ferrous ions chelating assays (IC<sub>50</sub>: 102.35 µg/mL), reducing power (A<sub>0.50</sub>: 92.70 µg/mL) and CUPRAC (A<sub>0.50</sub>: 13.56 µg/mL) assays. These results suggest that the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract was comparable to common antioxidant additives in most of the tests, representing a good alternative.

### ARTICLE HISTORY

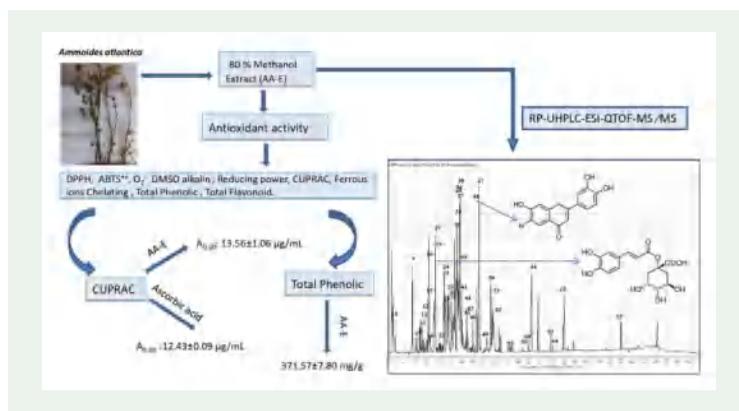
Received 14 January 2019  
Accepted 13 May 2019

### KEYWORDS

*Ammoides atlantica*;  
antioxidant activity;  
flavonoids; phenolic acids;  
RP–UHPLC–ESI–QTOF–MS2

**CONTACT** Zahia Kabouche  [zahiakabouche@umc.edu.dz](mailto:zahiakabouche@umc.edu.dz)  Université des frères Mentouri-Constantine 1, Département de chimie, Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), 25000 Constantine, Algeria; Jesús Lozano-Sánchez  [jesusls@ugr.es](mailto:jesusls@ugr.es)  Research and Development of Functional Food Centre (CIDAF), Bioregion building, PTS Granada, Avda. del Conocimiento s/n, Granada, 18016, Spain, Department of Food Science and Nutrition, University of Granada, Campus of Cartuja, Granada, 18071, Spain.

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1619722>.



## 1. Introduction

*Ammoides atlantica* (Coss. Et Dur.) Wolf is a member of family, Apiaceae. In Algerian traditional medicine, its infusion is recommended to treat headache, fever and diarrhea ailments. Also, soaked aerial part of *A. atlantica*, in alcohol or vinegar, and mixed with henna are used to treat children with mental debility (Bellakhdar 1997). Previously, *A. atlantica* essential oil compositions have also been reported (Laouer et al. 2008; Boudiar et al. 2011).

Nevertheless, minor information concerning the phenolic profile is available. In this way, only four flavonoids have been characterized in previous studies (Louaar et al. 2008).

The goal of this study was to characterize the hydroalcoholic extract of *A. atlantica* through RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS and MS<sup>2</sup>. Also, it was aimed to study the antioxidant potential of the extract.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Structural identification

Based on literature survey, phytochemicals in the hydro-alcoholic extract were performed in negative ionization mode since it is more sensitive and selective than positive mode (Fabre et al. 2001). From the RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS chromatogram, 66 peaks were detected (Figure S1) and out of these 45 compounds were characterized, according to their retention time (RT) and MS data, available in the literature (Ammar et al. 2017) (Table S1).

#### 2.1.1. Hydroxycinnamic acid and derivatives

As shown in Table S1, 16 hydroxycinnamic acids were identified (peaks 7, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 31, 33, 35, 37, 39, 43, 44, and 46). Six isomers of caffeoylquinic acid and two isomers of dicaffeoylquinic acid were previously reported in *Daucus muricatus* (Noui et al. 2017), which also belongs to the family Apiaceae. On the contrary, we found four isomers of caffeoylquinic acid (peaks 7, 15, 16 and 18) which were

identified by the diagnostic MS/MS fragment ions at  $m/z$  191.06 [quinic acid-H]<sup>-</sup>, at  $m/z$  353 (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>) (Zhang et al. 2019) and seven isomers of dicaffeoylquinic acid (peaks **31**, **33**, **35**, **37**, **39** and **43**) gave the same precursor ion at [M - H]<sup>-</sup> at  $m/z$  515.11 and MS/MS fragments at  $m/z$  353.09 [caffeoylquinic acid-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  191.06 [quinic acid-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  179.04 [caffeic acid-H]<sup>-</sup> and  $m/z$  173.05 [quinic acid-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup> were characterized as diCQA isomers. Peaks **31**, **33**, **35**, **37**, **43**, **46** and **39** were identified as 1,3-diCQA and 4,5-diCQA respectively, at  $m/z$  515 (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>) (Zhang et al. 2014). These compounds were identified according to the literature (Parejo et al. 2004; Plazonić et al. 2009; Contreras et al. 2018). A lignin (eucommin A) was also found at  $m/z$  549.

### 2.1.2. Hydroxybenzoic acids and derivatives

The ESI-MS signals at  $m/z$  315 were identified as dihydroxybenzoic acid hexoside isomers (compounds **4**, **5** and **8**) according to Mekky et al. (2015). Similarly, dihydroxybenzoic acid pentoside was assigned to peak **9** ( $m/z$  285).

### 2.1.3. Flavonoids

A total of 11 flavones were identified (peaks **27**, **29**, **30**, **36**, **38**, **42**, **45**, **47**, **50**, **60** and **61**) together with three flavonols (**24**, **26** and **48**) (Table S1). These compounds could be classified as aglycones (luteolin, apigenin, isorhamnetin, cirsimaritin, and 3-hydroxy-6,7,4-trimethoxyflavone) and O-glycosides derivatives of quercetin, luteolin and apigenin (Ma et al. 1999; Pan et al. 2010).

### 2.1.4. Other compounds

Other than phenolic compounds, quinic acid (**1**), tuberonic acid glucoside (**17**), tuberonic acid (**22**), 9,12,13-trihydroxyoctadecadienoic acid (**49**) and desdimethyloctahydroisocohumulone (**52**), trihydroxyoctadecadienoic acid (**57**), and trihydroxyoctadecaenoic acid, (**64** and **65**) hydroxyoctadecadienoic acid isomers were also characterized, based on previously available literature (Abaza et al. 2017; Noui et al. 2017; Jiménez-Sánchez et al. 2016)

## 2.2. Total bioactive compounds

The analysis of total phenolics by Folin-Ciocalteu method resulted in value of 371 mg GAE/g of AA-E whereas the total flavonoid content was 41 mg QEs/g of AA-E. Therefore, the difference between both values can be explained by the presence of high content of phenolic acids in the extract.

## 2.3. Antioxidant activity

Based on DPPH assay, the AA-E antiradical activity (IC<sub>50</sub>: 23.31 ± 0.99 µg/mL) was good compared to the standards BHA (IC<sub>50</sub>: 6.14 ± 0.41 µg/mL), BHT (IC<sub>50</sub>: 12.90 ± 0.40 µg/mL) and ascorbic acid (IC<sub>50</sub>: 14.00 ± 2.00 µg/mL). That can be explained by its high polyphenolic content (371.57 ± 1.80 mg/g), such as rosmarinic acid and its derivatives (table S1). In the ABTS<sup>•+</sup> assay, the antioxidant activity of AA-E (IC<sub>50</sub>: 11.31 ± 2.00 µg/mL) was slightly lower than the standards BHA (IC<sub>50</sub>: 1.80 ± 0.10 µg/mL), BHT (IC<sub>50</sub>: 1.30 ± 0.

30 µg/mL) and ascorbic acid ( $IC_{50}$ :  $1.74 \pm 0.10$  µg/mL). In superoxide DMSO alkaline assay, the AA-E showed a higher activity ( $IC_{50}$ :  $3.19 \pm 0.02$  µg/mL) than the standards BHA ( $IC_{50}$ :  $>200$  µg/mL), BHT ( $IC_{50}$ :  $>200$  µg/mL) and ascorbic acid ( $IC_{50}$ :  $7.59 \pm 1.16$  µg/mL) whereas in the CUPRAC assay, the activity of AA-E ( $A_{0.50}$ :  $13.56 \pm 1.06$  µg/mL) was close to the standard ascorbic acid ( $A_{0.50}$ :  $12.43 \pm 0.09$  µg/mL). However, in reducing power assay ( $IC_{50}$ :  $92.70 \pm 1.00$  µg/mL) and in the ferrous ions chelating test ( $IC_{50}$ :  $102.35 \pm 0.10$  µg/mL), the activity of AA-E was weak compared with the standards ascorbic acid ( $IC_{50}$ :  $6.40 \pm 0.40$  µg/mL) and EDTA ( $IC_{50}$ :  $12.11 \pm 0.32$  µg/mL), respectively.

### 3. Experimental

The experimental section is available online in [supplementary material](#).

### 4. Conclusions

The methodology based on RP-UHPLC-ESI-MS and MS/MS allowed the identification of 45 compounds in the *A. atlantica* hydro-alcoholic extract (AA-E). The largest classes were hydroxycinnamic acids (16 compounds) and flavones (11 compounds). The AA-E exhibited a high antioxidant activity towards DPPH free radical scavenging, ABTS, CUPRAC and reducing power assays, respectively.

### Funding

The authors are grateful to the MESRS-DGRSDT (Algeria) for financial support.

### ORCID

Zahia Kabouche  <https://orcid.org/0000-0002-3738-6387>

Antonio Segura-Carretero  <http://orcid.org/0000-0002-5564-5338>

### References

- Abaza L, Taamalli A, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Zarrouk M, Ben Youssef N. 2017. Changes in phenolic composition in olive tree parts according to development stage. *Food Res Int.* 100:454–461.
- Ammar S, Contreras MM, Gargouri B, Segura-Carretero A, Bouaziz M. 2017. RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential *Olea europaea* by-product “wood” and its comparison with leaf counterpart. *Phytochem Anal.* 28(3):217–219.
- Bellakhdar J. 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Medecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Paris: Ibis Press; p. 739.
- Boudiar T, Bensouici C, Safaei-Ghomi J, Kabouche A, Kabouche Z. 2011. GC-MS analysis of *Ammoides atlantica* (Coss. et Dur) Wolf. from Algeria. *J Essent Oil Bear Plants.* 14(2):172–174.
- Contreras MDM, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Gálvez J, Segura-Carretero A. 2018. Phytochemical profiling of anti-inflammatory *Lavandula* extracts via RP-HPLC-DAD-QTOF-MS and -MS/MS: assessment of their qualitative and quantitative differences. *Electrophoresis.* 39(9–10):1284–1293.

- Fabre N, Rustan I, De Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. 2001. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 12(6):707–715.
- Jiménez-Sánchez C, Lozano-Sánchez J, Rodríguez-Pérez C, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2016. Comprehensive, untargeted, and qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS2 metabolite profiling of green asparagus (*Asparagus officinalis*). *J Food Compos Anal.* 46:78–87.
- Laouer H, Boulaacheb N, Akkal S, Singh G, Marimuthu P, De Heluani C, Catalan C, Baldovini N. 2008. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ammoides atlantica* (Coss. Et Dur.) Wolf. *J Essent Oil Res.* 20(3):266–269.
- Louaar S, Akkal S, Bayet C, Laouer H, Guilet D. 2008. Flavonoids of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Ammoides atlantica*. *Chem Nat Compd.* 44(4):516–517.
- Ma YL, V, Den Heuvel H, Claeys H. 1999. Characterization of 3-methoxyflavones using fast-atom bombardment and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 13(19):1932–1942.
- Mekky RH, Contreras MDM, El-Gindi MR, Abdel-Monem AR, Abdel-Sattar E, Segura-Carretero A. 2015. Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study. *RSC Adv.* 5(23):17751–17767.
- Noui A, Boudiar T, Bakhouch A, Contreras MDM, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Laouer H, Akkal S. 2017. Chemical characterization of polyphenols from *Daucus muricatus* growing in Algeria by RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Nat Prod Res.*:1–6. doi:10.1080/14786419.2017.1371162
- Pan S, Jun-Li H, Gang W, Bo-Yang Y, Min-Jian Q. 2010. Analysis of flavonoids and phenolic acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. *Chin J Nat Med.* 8(3):202–207. —
- Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabaneda F, Viladomat F, Bastida J, Codina C. 2004. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 52(12):3679–3687.
- Plazonić A, Bucar F, Maleš Z, Mornar A, Nigović B, Kujundžić N. 2009. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules.* 14(7):2466–2490.
- Zhang L, Xu L, Ye Y-h, Zhu M-F, Li J, Tu Z-C, Yang S-h, Liao H. 2019. Phytochemical profiles and screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors of four *Acer* species leaves with ultra-filtration combined with UPLC-QTOF-MS/MS. *Ind Crops Prod.* 129:156–168.
- Zhang L, Tu Z-C, Yuan T, Wang H, Fu Z-F, Wen Q-h, Wang X-Q. 2014. Solvent optimization, antioxidant activity, and chemical characterization of extracts from *Artemisia selengensis* Turcz. *Ind Crops Prod.* 56:223–230.

# Guaianolides from *Ormenis mixta*: Structural Insights and Evaluation of Their Anti-inflammatory Profile\*

## Authors

Mounira Benteldjoune<sup>1\*\*</sup>, Maria Giovanna Chini<sup>2\*\*</sup>, Anna Maria Iannuzzi<sup>3</sup>, Ahmed Kabouche<sup>1</sup>, Zahia Kabouche<sup>1</sup>, Massimiliano D'Ambola<sup>2</sup>, Stefania Marzocco<sup>2</sup>, Giuseppina Autore<sup>2</sup>, Giuseppe Bifulco<sup>2</sup>, Nunziatina De Tommasi<sup>2</sup>

## Affiliations

- 1 Laboratoire D'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Département de Chimie, Université des Frères Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria
- 2 Dipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Fisciano (SA), Italy
- 3 Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa, Italy

## Key words

*Ormenis mixta*, Asteraceae, sesquiterpenes, DFT/NMR approach, anti-inflammatory activity

received February 19, 2019

revised May 15, 2019

accepted May 20, 2019

## Bibliography

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0941-0364>

Published online June 4, 2019 | *Planta Med* 2019; 85: 947–956 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York | ISSN 0032-0943

## Correspondence

Prof. Nunziatina De Tommasi  
Dipartimento di Farmacia, Università di Salerno  
Via Giovanni Paolo II, 84084 Fisciano, Italy  
Phone: + 39 0 89 96 97 54, Fax: + 39 0 89 96 96 02  
[detommasi@unisa.it](mailto:detommasi@unisa.it)



Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/products>

## ABSTRACT

In this paper, the isolation of five new guaianolides (1–5) and four (6–9) known sesquiterpenes from *Ormenis mixta* aerial parts is reported. The structural determination of the guaianolides was obtained by NMR spectroscopic data, as well as MS experiments. Their relative configurations were assigned by a combined quantum mechanical/NMR approach, comparing the experimental <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H NMR chemical shift data and <sup>1</sup>J<sub>H-H</sub> homonuclear coupling constants with the related predicted values. The isolates were assayed for their anti-inflammatory potential evaluating nitric oxide release and cyclooxygenase-2 expression in J774A.1 macrophages treated with lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. Our results indicated that, among the tested compounds, 1–3, and 7 were able to inhibit nitric oxide release, while all were able to inhibit cyclooxygenase-2 expression with different potencies.

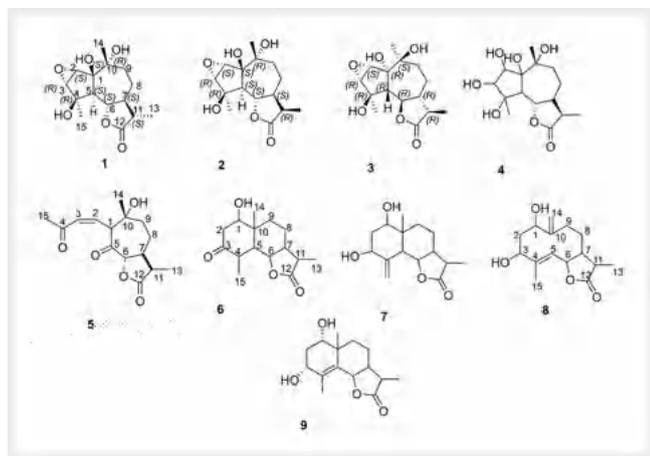
## Introduction

*Ormenis* (Asteraceae family) is a small genus of which the most famous species is *Ormenis nobilis*, also called Roman chamomile. Plants of this genus are annual or perennial herbaceous species, rarely exceeding half a meter in height and usually with solitary white flowers with yellow centers, and are used in traditional medicine for different therapeutic purposes. In Algeria, the genus is represented by five species: *Ormenis africana*, *Ormenis lonadioides*, *Ormenis mixta*, *Ormenis nobilis*, and *Ormenis praecox* [1]. In Morocco, *O. mixta* (L.) Dumort [*Cladanthus mixtus* (L.) Chevall, *Chamae-*

*melum mixtum* (L.) All, *Anthemis mixta* L.] is used in decoctions to treat fever and gastric diseases. It is also cultivated for the extraction of essential oil from its aerial parts, which is sold in numerous preparations and used in aromatherapy as an aphrodisiac, anxiolytic, and antibacterial remedy [2]. Preparations with stomachic, abortifacient, emmenagogue, and anthelmintic activity are obtained from the aerial parts of African *Ormenis*, and these phytochemicals have also shown efficacy in the treatment of diabetes [3, 4]. Phytochemical work on this species has revealed the presence of several mono- and sesquiterpenoids, particularly guaianolides derivatives. These molecules exerted promising potential

\* Dedicated to Professor Dr. Cosimo Pizza 70th birthday in recognition of his outstanding contribution to natural product research.

\*\* These two authors contributed equally to this work.



► **Fig. 1** Molecular structures of sesquiterpenes (1–9) isolated from *O. mixta*.

anti-inflammatory activities [5]. Motivated by this finding and considering the structural diversity of sesquiterpenes in Asteraceae plants, the chemical constituents of *O. mixta* were investigated. In the present study, the isolation and structural characterization of five new (1–5) and four known sesquiterpenes (6–9) from *O. mixta* are reported (► **Fig. 1**). Inflammatory response, which occurs as a result of different stimuli, involves an enormous expenditure of metabolic energy, damage, and destruction of host tissues, and can induce severe risks for health. In particular, the persisting inflammatory response, thus becoming chronic, actively contributes to the pathogenesis of various diseases [6]. Macrophages are cells primary involved in the host defence during the inflammatory and immune response. It is known that, in response to lipopolysaccharide, a component of gram-negative bacteria cell walls, macrophages produce and release inflammatory mediators, like nitric oxide (NO), and proinflammatory enzymes, such as cyclooxygenase-2 (COX-2).

Thus, the isolates were assayed in a murine macrophage cell line (J774A.1) under inflammatory conditions, induced by lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS) treatment, to evaluate their potential anti-inflammatory activity.

## Results and Discussion

Compound 1, obtained as a white powder, gave a molecular formula of  $C_{15}H_{22}O_6$  according to a  $[M + H]^+$  ion at  $m/z$  299.1490 (calcd. for 299.1494) in its HRESIMS spectrum, requiring five degrees of unsaturation. The  $^{13}C$  NMR data (► **Table 1**) showed fifteen carbon signals, attributable to three methyls, two methylenes, six methines, three of which were oxygenated, three oxygenated quaternary carbons, and one lactone carbon. A comparison between these carbon chemical shifts and those of the related guaianolide sesquiterpenes suggested that compound 1 shared the same carbon skeleton [7]. COSY and 1D-TOCSY experiments of 1 established connectivities of H-5–H-9 in ring B, and H-7–H-13 in the lactone ring. The presence of an epoxy ring was suggested by the methine signals at  $\delta_C$  64.8 and 62.7 in the  $^{13}C$  NMR spectrum, and the resonances at  $\delta_H$  4.11 (1H, s) and 3.87

(1H, s) in the  $^1H$  NMR spectrum. Additionally, two quaternary carbinol carbons ( $\delta_C$  80.0 and 73.4) were observed in the  $^{13}C$  NMR spectrum, suggesting the presence of a 2,3-epoxy-1,4-dihydroxy five-membered ring [7]. Analysis of 1D-TOCSY, COSY, HSQC, and HMBC experiments of 1 showed the presence of the same partial structure of rings A and B as achillinin A [7], but indicated that the lactone ring was the point of difference between the two molecules due to the absence of the  $\Delta^{11,13}$  double bond in 1. The relative configuration of 1 was determined based on proton signal coupling constants (► **Table 1**) and 1D-ROESY experiments. Thus, 1 was characterized as 2,3-epoxy-1,4,10-trihydroxyguaian-12,6 $\alpha$ -olide (► **Fig. 1**).

Compound 2 was isolated as an amorphous white powder. Its HRESIMS spectrum displayed a molecular ion peak at  $m/z$  299.1498  $[M + H]^+$  (calcd. for 299.1494), suggesting a molecular formula  $C_{15}H_{22}O_6$ , equating to five double bond equivalents. The  $^1H$  NMR spectrum displayed signals due to two tertiary methyl groups at  $\delta$  1.02 (3H, s) and 1.48 (3H, s), one secondary methyl at  $\delta$  1.18 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz), and three hydroxymethine groups at  $\delta$  4.05 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz), 3.64 (1H, s), and 3.38 (1H, s). The  $^{13}C$  NMR data (► **Table 1**) showed 15 carbon signals attributable to a guaianolide sesquiterpene. The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR features of 2 (► **Table 1**) were closely related to those of 1, demonstrating that 1 was a diastereoisomer of 2. Thus, 2 was characterized as 2,3-epoxy-1,4,10-trihydroxyguaian-12,6 $\alpha$ -olide (► **Fig. 1**).

Compound 3 was obtained as a white powder. The positive HRESIMS gave a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  299.1483  $[M + H]^+$ , in accordance with the molecular formula  $C_{15}H_{22}O_6$ , and five indices of hydrogen deficiency. Its spectroscopic features suggested that 3 was a guaianolide sesquiterpene. The  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data (► **Table 1**) of 3 showed marked similarities with 1 and 2, except for the chemical shift of C-1, C-2, C-3, and C-5, thus indicating that 3 was a diastereoisomer of 1 and 2. The HMBC cross-peaks between the signal at  $\delta$  3.70 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz, H-3) with C-1, C-4, and C-5 suggested the same tricyclic skeleton as both 1 and 2. Moreover, the assignments were confirmed by COSY, HSQC, and HMBC spectra. Thus, the structure of 2,3-epoxy-1,4,10-trihydroxyguaian-12,6 $\alpha$ -olide was assigned to 3 (► **Fig. 1**).

After defining the same 2D structure for 1, 2 and 3, the correct stereoassignment was established by a combined QM (quantum mechanical)/NMR approach [8–11] by comparing the experimental  $^{13}C/^1H$  NMR chemical shift data and homonuclear coupling constants ( $^1J_{H-H}$ ) with the related predicted values.

Assuming the presence of an epoxy ring in the *cis* conformation at C-2 and C-3 for 1–3, the total number of centers with unknown stereochemistry was reduced from nine (► **Fig. 1**) to eight. Accordingly, starting from all the possible 256 stereoisomers, the QM/NMR study was performed only on the 128 diastereoisomers differing for the relative configurational patterns and all endowed with the epoxy ring in the alpha orientation ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ).

Furthermore, considering that the high values of  $J_{5,6} = \sim 10.0$  is compatible with both the *trans*-diaxial and *cis*-diaxial relationship of H-5 and H-6 [7], to facilitate the computational analysis of the DFT/NMR results, the 128 diastereoisomers, endowed with a  $2S^*$ ,  $3R^*$  relative configuration at C-2 and C-3, were separated into four different families, A–D (► **Fig. 2**). In more detail, the two possible families showing a *trans*-diaxial relationship of H-5 and H-6

► **Table 1**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds 1–3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz)<sup>a</sup>.

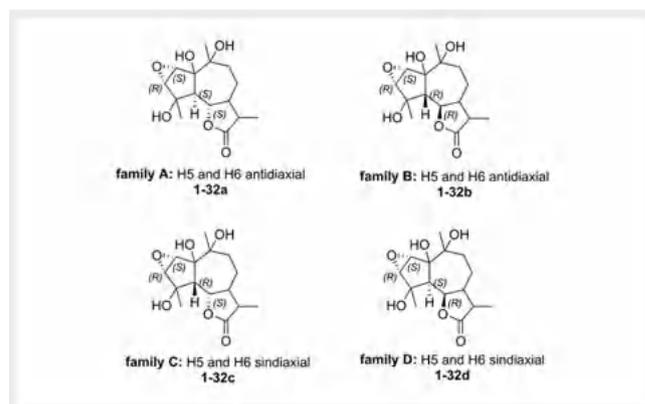
Position	1		2		3	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	–	80.0	–	79.1	–	85.0
2	4.11 s	64.8	3.64 s	56.9	4.05 s	66.7
3	3.87 s	62.7	3.38 s	59.2	3.70 s	64.8
4	–	73.4	–	72.6	–	73.7
5	2.70 d (9.)	50.6	2.77 d (10.0)	43.2	2.42 d (10.0)	59.7
6	4.44 t (9.5)	81.0	4.05 t (10.0)	83.6	4.52 t (10.0)	81.8
7	2.64 m	48.0	2.28 m	49.4	2.40 m	49.3
8°	2.11 m	24.0	1.86 m	24.6	2.11 m	24.6
8b	1.54 m	–	1.56 m	–	1.53 m	–
9°	1.94 m	35.6	1.82 m	39.0	1.95 m	39.0
9b	1.77 m	–	1.72 m	–	1.85 m	–
10	–	72.0	–	72.4	–	72.5
11	2.32 m	43.2	2.32 m	42.0	2.38 m	42.9
12	–	181.5	–	181.0	–	181.0
13	1.19 d (6.8)	14.0	1.18 d (6.8)	11.3	1.20 d (6.8)	13.1
14	1.08 s	26.0	1.02 s	26.8	1.25 s	25.8
15	1.49 s	23.7	1.48 s	18.6	1.49 s	18.6

<sup>a</sup>/ Values are in parentheses and reported in Hz, and chemical shifts are given in ppm. Assignments were confirmed by COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments

are named (i) family A ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $5S^*$ , and  $6S^*$ ), with H-5 in *trans* arrangement with respect to the protons of the epoxy ring, and (ii) family B ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $5R^*$ , and  $6R^*$ ), with H-5 in *cis* arrangement with respect to the protons of the epoxy ring. In a parallel manner, the two possible families endowed with a *cis*-diaxial relationship of H-5 and H-6 are named (i) family C ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $5R^*$  and  $6S^*$ ), with H-5 in *cis* arrangement with respect to the protons of the epoxy ring, and (ii) family D ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $5S^*$ , and  $6R^*$ ), with H-5 in *trans* arrangement with respect to the protons of the epoxy ring.

On these premises, a conformational search related to the 128 diastereoisomers ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ) related to 1, 2, and 3 (1–32a, 1–32b, 1–32c, and 1–32d) (► Fig. 2), required for the subsequent phases of computation of the NMR parameters ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1J_{\text{H-H}}$ ), was performed at the empirical level (molecular mechanics, MM), combining Monte Carlo molecular mechanics (MCMM), low-mode conformational sampling (LMCS), and molecular dynamics (MD) simulations (see the “General experimental procedures” section) [12]. The starting MM sampling generated conformers for four families of possible diastereoisomers were subsequently submitted to geometry and energy optimization steps at the MPW1PW91/6–31G(d) [13] density functional level of theory in methanol (IEFPCM) to reproduce the effect of the solvent [14].

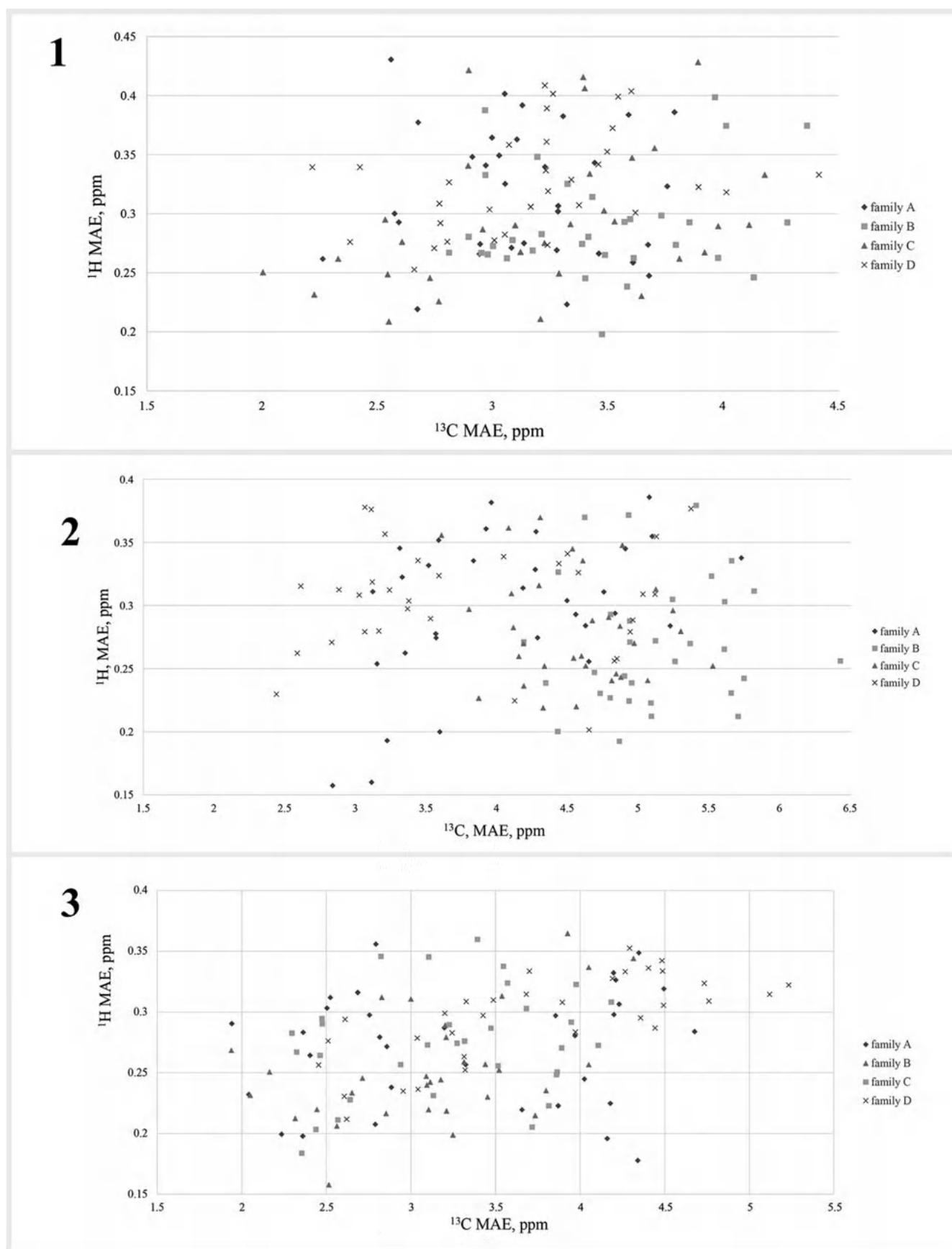
After the optimization of the geometries, the conformers were inspected in order to avoid further possible redundant conformers. For each family, the NMR chemical shift data were computed for all the possible diastereoisomers featuring a specific relative configuration at the stereogenic centers (families A–D) (► Fig. 2) at the MPW1PW91/6–31G(d,p) functional/basis set in methanol (IEFPCM) [14]. For each of them, the weighted averages of the



► **Fig. 2** Molecular structures of the four families related to the possible 128 diastereoisomers for 1, 2, and 3 (1–32a, 1–32b, 1–32c, and 1–32d).

predicted  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts were computed at the density functional level of theory, accounting for the energies of the sampled conformers on the final Boltzmann distribution, using tetramethylsilane (TMS) as a reference compound. In more detail, for each atom of the investigated molecules, experimental and calculated  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts were compared, and afterward, the mean absolute errors (MAEs) for all the possible diastereoisomers were computed (► Fig. 3).

The results highlighted the different pattern of accordance between  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  MAEs for each family and the different experimental



► **Fig. 3** Two-dimensional representation of  $^{13}\text{C}$  (x) and  $^1\text{H}$  (y) mean absolute error (MAE) obtained by comparison of calculated  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  chemical shifts for all four families (A–D) of diastereoisomers with the experimental data of 1, 2, and 3.

data of **1**, **2**, and **3**, singling out the most probable diastereoisomers (► **Table 2**) with the best-related ranking.

By the reported data, we combined the analysis of MAE values with the values of  $^1J_{\text{H-H}}$  TAD (total absolute deviation) of  $J_{5,6}$  and  $J_{6,7}$  calculated at the MPW1PW91/6–31G(d,p) functional/basis set in methanol (IEFPCM) and, subsequently, with the experimental ROE (rotating-frame Overhauser enhancement) analysis. In more detail, considering **1**, the lack of ROE between H-3 and H-5 suggested that H-5 was in *trans* arrangement concerning the epoxy ring and, in consequence, the real structure of **1** was included in family A or D (► **Fig. 2**). Moreover, the further absence of an ROE effect between H-5 and H-6 proved their *trans*-diaxial relationship, excluding family D. These results highlighted a critical result in the stereoassignment process: the real structure of **1** is restricted to those of family A ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $5S^*$ , and  $6S^*$ ) and, in particular only six possible diastereoisomers belonging to this family (► **Table 2**).

Considering the relative configuration at  $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $5S^*$  and  $6S^*$  as fixed, the ROE between Me-13 and H-7, Me-14 and H-3, and Me-15 and H-5 suggested the relative configuration of the other unknown stereogenic centers as  $1S^*$ ,  $4R^*$ ,  $11S^*$ ; moreover, the  $S^*$  configuration at C-7 was also suggested considering the TAD values related only to  $J_{6,7}$  (data not shown). Considering this multi-step analysis, we propose a tentative stereoassignment for **1**, in particular, we suggest the stereoisomer **14a** at the sixth position of family A ranking as the **1** real structure endowed with  $1S^*$ ,  $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $4R^*$ ,  $5S^*$ ,  $6S^*$ ,  $7S^*$ ,  $10R^*$ ,  $11S^*$  configuration patterns.

We applied the same type of analysis for **2**. Also in this case, the lack of an ROE effect between H-3 and H-5 and between H-4 and H-6 suggested that its stereostructure was included in family A (► **Fig. 2**). The combined and compared analysis of the ROE effect and  $J$  values concerning those of **1** singled out the difference of the relative configuration of C-11. In consequence, we propose  $1S^*$ ,  $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $4R^*$ ,  $5S^*$ ,  $6S^*$ ,  $7S^*$ ,  $10R^*$ ,  $11R^*$  as the tentative stereoassignment for **2** (diastereoisomer **13a** at the fourth position in the family A ranking) (► **Table 2**).

On the other hand, considering the case of **3**, the presence of the ROE effect between H-5 and H-3 (**Fig. 19S**, Supporting Information) suggested a *cis* arrangement between this couple of protons, indicating that the real structure of **3** belonged to family B or C (► **Fig. 2**). The absence of an ROE effect between H-5 and H-6, together with the high values of  $^1J_{\text{H-H}}$  TAD of  $J_{5,6}$  and  $J_{6,7}$ , excluded family C. These data allowed to assess that the stereostructure of **3** belonged to family B ( $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $5R^*$ , and  $6R^*$ ) with H-5 in a *cis* arrangement with respect to the protons of the epoxy ring. Moreover, the ROE effect of Me-13 with H-7, Me-14 with H-2 and H-6, Me-15 with H-6 (**Fig. 20S**, Supporting Information) suggested the following tentative stereoassignment:  $1R^*$ ,  $2S^*$ ,  $3R^*$ ,  $4R^*$ ,  $5R^*$ ,  $6R^*$ ,  $7R^*$ ,  $10S^*$ ,  $11R^*$  (diastereoisomer **3b** at the first position in the relative ranking of family B) (► **Table 2**).

Compound **4** was a white residue and had a molecular formula of  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_7$  as deduced from the molecular ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$  at  $m/z$  317.1598 observed in the HRESIMS. The  $^1\text{H}$  NMR data (► **Table 3**) indicated that **4** was a guaianolide, displaying the presence of two oxygenated methine protons at C-2 [ $\delta$  3.69 (1H, br s)] and [ $\delta$  3.68 (1H, br s)], one lactone methine proton at C-6 [ $\delta$  4.57 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz)], two tertiary methyl groups at C-4 [ $\delta$  1.34 (1H, s)] and

C-10 [ $\delta$  1.31 (1H, s)], and one secondary methyl at C-11 [ $\delta$  1.19 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz)]. All these assignments were confirmed by COSY, HSQC, and HMBC spectra. Particularly, the HMBC cross-peaks observed between Me-14 and C-1, C-9, and C-10, H-5 and C-1, H-8 and C-7 and C-10 were in agreement with the presence of two hydroxy groups at C-1 and C-10, respectively. 1D-TOCSY, COSY, and HSQC data allowed the assignments of all signals and revealed the spin systems, which were characteristic of guaian-12,6 $\alpha$ -olide [15]. This assumption was confirmed by the HMBC correlations between H-5–C-1, H-5–C-6, H-5–C-7, H-7–C-6. The relative stereochemistry of **4** was established based on the coupling constant values (► **Table 3**) and 1D-ROESY data and comparison with the literature [16]. ROE interactions between  $\delta$  2.19 (H-5) and 1.92 (H-7), and  $\delta$  4.57 (H-6) and 1.31 (Me-14) indicated the  $\alpha$ -orientation of H-5 and H-7, and the consequential  $\beta$ -orientation of H-6 and Me-14. The spectral data of the sesquiterpenoid core of **4** matched those reported for  $1\alpha,2\alpha,3\alpha,4\alpha,10\alpha$ -pentahydroxyguaia-11(13)-ene-12,6 $\alpha$ -olide [15]. The only difference was the absence of a  $\Delta^{11,13}$  double bond in **4**. Therefore, compound **4** was identified as  $1\alpha,2\alpha,3\alpha,4\alpha,10\alpha$ -pentahydroxyguaian-12,6 $\alpha$ -olide.

Compound **5** was a white residue and had a molecular formula of  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$ , equating to five double bond equivalents, as obtained from its HRESIMS molecular ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$  at  $m/z$  281.1387. The  $^{13}\text{C}$  NMR data of **5** showed signals relative to fifteen carbons, including three methyls, two methylenes, three methines, one hydroxymethine, one quaternary carbinolic carbon (► **Table 3**), one lactone carbon, one carbonyl group, and one  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl group. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum (► **Table 3**) showed a pair of AB doublets at  $\delta$  7.57 (H-2) and 6.11 (H-3) with a coupling constant ( $J = 7.0$  Hz), confirming the presence of a *cis*-2-en-4-one system [17]. The  $^1\text{H}$  NMR data showed the presence of a C-6 lactone proton ( $\delta$  4.52, d,  $J = 10.5$  Hz) and three methyl groups at  $\delta$  1.27 (d,  $J = 6.8$  Hz), 1.51 (s), and 2.17 (s). The proton and carbon chemical shifts of **5** were obtained from the correlations observed in COSY, HSQC, and HMBC experiments. The HMBC spectrum showed correlations between the methyl signal at  $\delta$  2.17 and C-2, C-3, the methyl signal at  $\delta$  1.51 and C-1, C-2, C-10, the signal at  $\delta$  7.57 and C-4, C-10, C-15, and the signal at  $\delta$  2.39 and C-7, C-8, C-11, C-12, locating the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl group at C-2, C-3, and C-4, the carbonyl group at C-5, and the carbinol carbon at C-10. The relative stereochemistry of **5** was determined by 1D ROESY experiments and comparison with literature data [18]. Correlations were observed between H-6 $\beta$  at  $\delta$  4.53 and Me-14 and H-11, showing that these protons were located on the same side of the molecule. Thus, the structure established for **5** was 10-hydroxychabrol-2(3)-en-4,5-dion-12,6 $\alpha$ -olide.

Compounds **6**–**9** turned out to be known sesquiterpenes identified as 1-hydroxy-3-oxo-eudesman-12,6 $\alpha$ -olide (**6**) [19], 1,2-dihydroxy-germacr-10(15)-en-12,6 $\alpha$ -olide (**8**) [20], 11 $\beta$ ,13-dihydro-1-epireynosin (**7**) [21], and isoverivanin (**9**) [22] by comparison of their NMR and MS literature data.

To elucidate the influence of guaianolides **1**–**9** on J774A.1 viability, cells were treated with the isolated compounds (100–25  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. Data indicated that J774A.1 macrophage viability was not affected by the tested compounds (data not shown). NO is synthesized from L-arginine in a reaction catalyzed by a family of NO synthase enzymes. NO is a signalling molecule that plays a key

► **Table 2**  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  MAE and TAD reported for stereoisomers with the best-related ranking for each family related to the experimental data set of 1–3.

Ranking		$^{13}\text{C}$ MAE, ppm <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ MAE, ppm <sup>b</sup>	TAD <sup>c</sup>	Relative configuration
<b>Compound 1</b>					
1	family A	2.26	0.26	1.27	30a1S*2R*3S*4S*5S*6S*7S*10R*18S*
2	family A	2.57	0.30	2.65	26a1S*2S*3R*4S*5S*6S*7R*10R*11S*
3	family A	2.59	0.29	1.93	25a1S*2S*3R**4S*5S*6S*7R*10R*11R*
4	family A	2.67	0.22	1.12	29a11S*2S*3R*4S*5S*6S*7S*10R*11R*
5	family A	2.94	0.27	1.15	17a1R*2S*3R*4S*5S*6S*7R*10R*11R*
6	family A	2.95	0.27	1.56	14a1S*2S*3R*4R*5S*6S*7S*10R*11S*
1	family B	2.81	0.27	1.24	3b1R*2S*3R*4R*5R*6R*7R*10S*11R*
2	family B	2.90	0.28	6.13	22b1R*2S*3R*4S*5R*6R*7S*10R*11S*
3	family B	2.95	0.27	2.83	24b1R*2S*3R*4S*5R*6R*7S*10S*11S*
4	family B	2.98	0.27	2.40	8b1R*2S*3R*4R*5R*6R*7S*10S*11S*
5	family B	3.00	0.27	1.55	17b1R*2S*3R*4S*5R*6R*7R*10R*11R*
1	family C	2.00	0.25	1.13	24c1R*2S*3R*4S*5R*6S*7S*10S*11S*
2	family C	2.33	0.23	3.90	8c1R*2S*3R*4R*5R*6S*7S*10S*11S*
3	family C	2.33	0.26	0.92	22c1R*2S*3R*4S*5R*6S*7S*10R*11S*
4	family C	2.53	0.30	3.88	19c1R*2S*3R*4S*5R*6S*7R*10S*11R*
5	family C	2.54	0.25	6.77	20c1R*2S*3R*4S*5R*6S*7R*10S*11S*
6	family C	2.55	0.21	0.65	6c1R*2S*3R*4R*5R*6S*7S*10R*11S*
7	family C	2.61	0.28	6.63	18c1R*2S*3R*4S*5R*6S*7R*10R*11S*
8	family C	2.73	0.25	6.78	2c1R*2S*3R*4R*5R*6S*7R*10R*11S*
9	family C	2.77	0.23	7.20	4c1R*2S*3R*4R*5R*6S*7R*10S*11S*
10	family C	2.96	0.29	3.87	3c1R*2S*3R*4R*5R*6S*7R*10S*11R*
1	family D	2.38	0.28	1.19	25d1S*2S*3R*4S*5S*6R*7R*10R*11R*
2	family D	2.66	0.25	2.95	17d1R*2S*3R*4S*5S*6R*7R*10R*11R*
3	family D	2.75	0.27	6.58	7d1R*2S*3R*4R*5S*6R*7S*10S*11R*
4	family D	2.77	0.29	7.93	5d1R*2S*3R*4R*5S*6R*7S*10R*11R*
5	family D	2.80	0.28	4.51	24d1R*2S*3R*4S*5S*6R*7S*10S*11S*
6	family D	2.99	0.30	6.58	6d1R*2S*3R*4R*5S*6R*7S*10R*11S*
<b>Compound 2</b>					
1	family A	2.69	0.14	1.07	30a1S*2R*3S*4S*5S*6S*7S*10R*18S*
2	family A	2.84	0.16	0.92	29a11S*2S*3R*4S*5S*6S*7S*10R*11R*
3	family A	3.11	0.16	1.36	14a1S*2S*3R*4R*5S*6S*7S*10R*11S*
4	family A	3.22	0.19	1.23	13a1S*2S*3R*4R*5S*6S*7S*10R*11R*
5	family A	3.59	0.20	1.12	15a1S*2S*3R*4R*5S*6S*7S*10S*11R*
1	family D	2.44	0.23	0.99	25d1S*2S*3R*4S*5S*6R*7R*10R*11R*
2	family D	2.59	0.26	0.54	9d1S*2S*3R*4R*5S*6R*7R*10R*11R*
3	family D	2.83	0.27	0.84	26d1S*2S*3R*4S*5S*6R*7R*10R*11S*
4	family D	2.88	0.31	7.11	29d1S*2S*3R*4S*5S*6R*7S*10R*11R*
5	family D	2.61	0.32	7.62	13d1S*2S*3R*4R*5S*6R*7S*10R*11R*
<b>Compound 3</b>					
1	family A	1.94	0.29	1.66	22a1R*2S*3R*4S*5S*6S*7S*10R*11S*
2	family A	2.04	0.23	1.59	25a1R*2S*3R*4S*5S*6S*7S*10R*11R*
3	family A	2.23	0.20	1.00	17a1R*2S*3R*4S*5S*6S*7R*10R*11R*
4	family A	2.36	0.20	2.39	1a1R*2S*3R*4R*5S*6S*7R*10R*11R*
1	family B	1.94	0.27	1.19	3b1R*2S*3R*4R*5R*6R*7R*10S*11R*

continued

► **Table 2** Continued

Ranking		<sup>13</sup> C MAE, ppm <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H MAE, ppm <sup>b</sup>	TAD <sup>c</sup>	Relative configuration
2	family B	2.05	0.23	1.27	1b1R*2S*3R*4R*5R*6R*7R*10R*11R*
3	family B	2.51	0.16	1.12	2b1R*2S*3R*4R*5R*6R*7R*10R*11S*
4	family B	2.32	0.21	2.35	8b1R*2S*3R*4R*5R*6R*7S*10S*11S*
5	family B	2.16	0.25	1.50	17b1R*2S*3R*4S*5R*6R*7R*10R*11R*
6	family B	2.44	0.22	2.77	7b1R*2S*3R*4R*5R*6R*7S*10S*11R*
1	family C	2.35	0.18	6.73	2c1R*2S*3R*4R*5R*6S*7R*10R*11S*
2	family C	2.44	0.20	7.15	4c1R*2S*3R*4R*5R*6S*7R*10S*11S*

<sup>a</sup><sup>13</sup>C MAE = (Σ|( $\delta_{\text{exp}}$  -  $\delta_{\text{calcd}}$ )|)/n, summation through n of the absolute error values (difference of the absolute values between corresponding experimental and <sup>13</sup>C chemical shifts), normalized to the number of chemical shifts. TMS as a reference compound for sp<sup>3</sup> <sup>b</sup><sup>1</sup>H MAE = (Σ|( $\delta_{\text{exp}}$  -  $\delta_{\text{calcd}}$ )|)/n, summation through n of the absolute error values (difference of the absolute values between corresponding experimental and <sup>1</sup>H chemical shifts), normalized to the number of chemical shifts. TMS as a reference compound for sp<sup>3</sup> <sup>c</sup>Total absolute deviation (TAD) (Σ|<sup>j</sup>J<sub>H-Exp</sub> - <sup>j</sup>J<sub>H-Calcd</sub>|) values.

role in the pathogenesis of inflammation and is considered as a proinflammatory mediator that induces inflammation due to its over production [23]. To assess if isolates influenced NO production, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> release, a stable end-product of NO, in the cellular medium of the murine macrophage cell line J774A.1 stimulated with the tested compounds (100–25 μM) in inflammatory conditions, LPS (1 μg/mL) was measured. Results indicated that only some of the tested compounds significantly inhibited NO release (p < 0.05 vs. LPS). In particular, **1** inhibited from 50.6 ± 4.6, 35.0 ± 10.0, 25.3 ± 9.1%, **2** from 48.6 ± 7.3, 39.6 ± 7.7, 34.0 ± 11.0%, **7** from 63.0 ± 9.0, 61.0 ± 10.6, 50.0 ± 14.0%, and **3** inhibited NO release from 67.3 ± 9.6, 55.0 ± 12.7, and 19.0 ± 0.7%, respectively, for 100, 50, and 25 μM in respect to LPS alone. L-NAME, used as a reference compound, inhibited NO release from 66.0 ± 4.2% vs. LPS. An interaction between the NO and COX pathway represents an important mechanism for inflammatory response modulation. COX-2 is a well-known proinflammatory enzyme triggered by agents, such as LPS, and is involved in the macrophage response; moreover, its expression is also influenced by NO [24]. In order to further evaluate the potential anti-inflammatory activity of the isolates, COX-2 expression, an enzyme primary involved in the inflammatory response was analyzed using cytofluorimetric techniques. The results indicated that the tested compounds (100–25 μM) determined a significant inhibition on LPS-induced COX-2 expression in J774A.1 macrophages (p < 0.05 vs. LPS) (► Fig. 4). In particular, **3** significantly inhibited COX-2 expression at all the tested concentrations, while **5** exerted an inhibitory effect only at the highest tested concentration. All the other tested compounds significantly inhibited COX-2 expression at the two higher tested concentrations (► Fig. 4).

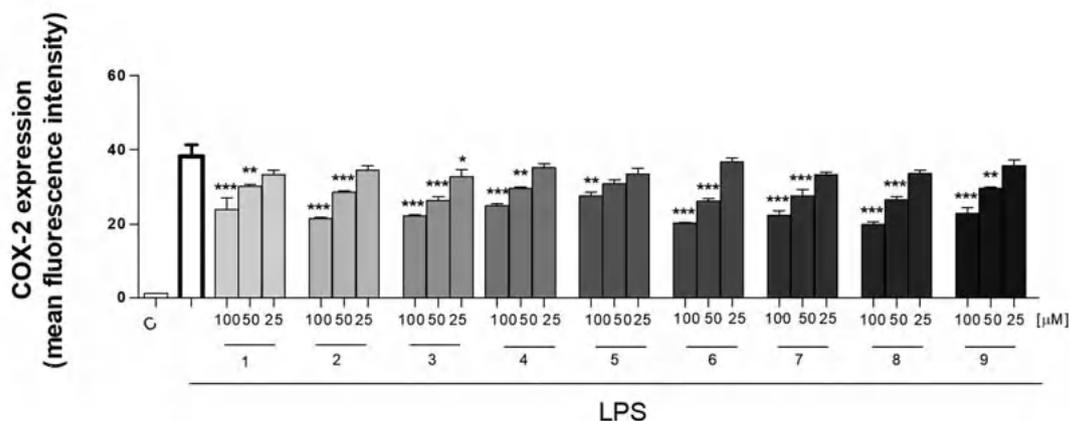
In summary, a multistep protocol was applied to the isolation and structural and biological characterization of five unreported compounds from *O. mixta*. The 2D structures of **1**–**5** were defined by following the standard combination of isolation, purification, and characterization of the natural products using general techniques (HPLC, NMR, MS experiments). The stereoassignment of sesquiterpenes **1**–**3** was determined with the comparison of the experimental and calculated NMR parameters (<sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H NMR and <sup>j</sup>J<sub>H-H</sub>), allowing the assignment of **1** and **2** as two diastereoisomers showing the same relative pattern between the epoxy ring at C-2

► **Table 3** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds **4** and **5** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)<sup>a, b</sup>.

Position	<b>4</b>		<b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	–	87.3	2.64 br s	57.4
2	3.69 s	78.1	7.57 br d (7.0)	168.0
3	3.68 s	63.6	6.11 d (7.0)	133.0
4	–	74.0	–	207.7
5	2.19 d (9.)	57.7	–	210.5
6	4.57 t (9.5)	81.0	4.52 t (10.5)	81.4
7	1.92 m	52.8	2.66 m	41.8
8a	1.98 m	26.2	1.88 m	26.6
8b	1.58 m	–	1.77 m	–
9a	1.82 <sup>b</sup>	40.1	2.70 m	45.4
9b	1.84 <sup>b</sup>	–	2.74 m	–
10	–	71.0	–	77.5
11	2.38 m	42.0	2.39 m	41.3
12	–	180.0	–	181.2
13	1.19 d (6.8)	12.5	1.27 d (6.8)	15.2
14	1.31 s	15.7	1.51 s	28.1
15	1.34 s	23.7	2.17 s	29.8

<sup>j</sup>J Values are in parentheses and reported in Hz, and chemical shifts are given in ppm. Assignments were confirmed by COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. <sup>b</sup>Overlapped signal

and C-3 and H-5 and H-6 (family A, 2S\*, 3R\*, 5S\*, and 6S\*), and **3** with a different relative one (family B, 2S\*, 3R\*, 5R\*, and 6R\*). Furthermore, the complete relative stereoassignment for these guaianolides suggested combining the values of <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H MAE and <sup>j</sup>J<sub>H-H</sub> TAD with ROE analysis, disclosing **1** as 1S\*,2S\*,3R\*,4R\*,5S\*,6S\*,7S\*,10R\*,11S\*, **2** as 1S\*,2S\*,3R\*,4R\*,5S\*,6S\*,7S\*,10R\*,11R\*, and **3** as 1R\*,2S\*,3R\*,4R\*,5R\*,6R\*,7R\*,10S\*,11R\*. Compounds **1**–**9** were assayed for their anti-inflammatory potential evaluating NO release and COX-2 expression in J774A.1 macrophages treated with LPS. The obtained data indicated that,



► **Fig. 4** J774A.1 cells were treated with 1–9 (100–25  $\mu$ M) for 1 h and then co-exposed to LPS (1  $\mu$ g/mL) for a further 24 h, and COX-2 expression was detected by cytofluorimetric analysis. Data were analyzed by an ANOVA test, and multiple comparison was made by Bonferroni's test. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , and \* $p < 0.05$  vs. LPS.

among the tested compounds, 1–3 and 7 were able to inhibit NO release while all the isolates were able to inhibit COX-2 expression with different potencies.

## Material and Methods

### General experimental procedures

Optical rotations were measured on an Atago AP-300 digital polarimeter equipped with a sodium lamp (589 nm) and a 1 dm microcell. 1D and 2D NMR experiments ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 1D-TOCSY, 1D-ROESY, COSY, HSQC, and HMBC) were recorded at 300 K in  $\text{CD}_3\text{OD}$  on a Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker BioSpin GmbH). HRESIMS were acquired in the positive ion mode on a Q-TOF premier mass spectrometer (Waters). ESI-MS spectra were obtained from an LCQ Advantage ThermoFinnigan spectrometer (ThermoFinnigan) equipped with Xcalibur software (version 2.1). TLCs were performed on precoated Kieselgel 60 F254 plates (Merck), and compounds were detected by spraying with  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  solution. Column chromatography was performed over silica gel (70–220 mesh; Merck). Reversed-phase (RP) HPLC separations were conducted on a Shimadzu LC-20AT series pumping system equipped with a Shimadzu RID10A refractive index detector and a Shimadzu injector using a C18  $\mu$ -Bondapak column (30 cm  $\times$  7.8 mm, 10  $\mu$ m; Waters-Milford).

### Plant material

Aerial parts of *O. mixta* were collected from Djebel El-Ouahch (Constantine) in July 2014. The plant was authenticated by Mr. Kabouche Ahmed, University frères Mentouri-Constantine and deposited at the herbarium of the laboratory LOST, University frères Mentouri-Constantine 1 (voucher specimen LOST. Om.07.14).

### Extraction and isolation

Aerial parts of *O. mixta* (3 Kg) were dried and pulverized then macerated three times with a hydroalcoholic mixture (3 L for each

times) (EtOH-H<sub>2</sub>O, 8:2) by replacing the solution every day with fresh solvent. The EtOH-H<sub>2</sub>O solutions were concentrated under reduced pressure to dryness, and the residue (510 g) was dissolved in distilled water (1 L). After filtration, the aqueous solution was successively extracted with petroleum ether (500 mL),  $\text{CHCl}_3$  (500 mL), EtOAc (500 mL), and *n*-BuOH (500 mL) three times for each solvent, then the petroleum ether (0.7 g),  $\text{CHCl}_3$  (8.5 g), EtOAc (14.7 g), and *n*-BuOH (35.8 g) extracts were concentrated to dryness. The  $\text{CHCl}_3$  (6 g) extract was dissolved in chloroform and separated on silica gel chromatography using gradients of  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (100:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, and 0:100) as eluents. Fractions of 25 mL were collected, analyzed by TLC, and grouped into 11 main fractions (A–K). Fraction C (215.4 mg) was subjected to semipreparative RP-HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 2:3) to yield compounds 1 (1.3 mg,  $t_R$  18 min) and 3 (1.0 mg,  $t_R$  24 min). Fraction D (374.6 mg) was subjected to RP-HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 3.5:5.5) to give pure compounds 2 (3.6 mg,  $t_R$  15 min), 5 (1.3 mg,  $t_R$  10 min), and 3 (1.8 mg,  $t_R$  40 min). Fraction E (157.7 mg) was subjected to RP-HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 7:3) to give pure compounds 2 (1.8 mg,  $t_R$  15 min), 9 (0.8 mg,  $t_R$  37 min), and 6 (1 mg,  $t_R$  51 min). Fraction F (105.4 mg) was subjected to RP-HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 7:3) to give pure compounds 5 (1.3 mg,  $t_R$  8 min) and 6 (1 mg,  $t_R$  28 min). Fraction H (584.0 mg) was separated by RP-HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 6.5:3.5) to yield pure compounds 4 (1.5 mg,  $t_R$  12 min), 8 (1.5 mg,  $t_R$  36.5 min), and 7 (1.2 mg,  $t_R$  54.0 min).

**Compound 1:** white amorphous powder;  $[\alpha]_D + 13.1$  (c 0.1, MeOH);  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see ► **Table 1**; HRESIMS  $m/z$  299.1490  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , (calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_6$ , 299.1494).

**Compound 2:** white amorphous powder;  $[\alpha]_D + 23.1$  (c 0.1, MeOH);  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see ► **Table 1**; HRESIMS  $m/z$  299.1498  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , (calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_6$ , 299.1494).

**Compound 3:** white amorphous powder;  $[\alpha]_D + 73.1$  (c 0.1, MeOH);  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see ► **Table 1**; HRESIMS  $m/z$  299.1483  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , (calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_6$ , 299.1494).

**Compound 4:** white amorphous powder;  $[\alpha]_D +35.1$  (c 0.1, MeOH);  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see ► **Table 3**; HRESIMS  $m/z$  317.1598  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , (calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{H}$ , 317.1594).

**Compound 5:** white amorphous powder;  $[\alpha]_D +53.1$  (c 0.1, MeOH);  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see ► **Table 3**; HRESIMS  $m/z$  281,1391  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , (calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{H}$ , 281.1383).

## Computational details

Maestro 10.2 of Schrödinger Suite [25] was used for generating the starting 3D chemical structures of the possible relative 32 diastereoisomers of all four families, A–D (1–32a, 1–32b, 1–32c, and 1–32b) (► **Fig. 2**). As a first step, exhaustive conformational searches at the empirical MM level with the MCMM method (50 000 steps) and LMCS method (50 000 steps) were performed in order to allow a full exploration of the conformational space. Furthermore, molecular dynamics simulations were performed at different temperatures (450, 600, 700, 750 K) with a time step of 2.0 fs, an equilibration time of 0.1 ns, and a simulation time of 10 ns. All the conformers obtained from the conformational searches were minimized using the Optimized Potentials for Liquid Simulation (OPLS) force field and the Polak-Ribier conjugate gradient algorithm. The “Redundant Conformer Elimination” module of MacroModel 10.2 [12, 25] was used to select non-redundant conformers. All the mentioned QM calculations were performed using Gaussian 09 software [26]. In detail, the obtained conformers were optimized at the QM level using the MPW1PW91 functional and the 6–31G(d) basis set in methanol (IEFPCM) to reproduce the effect of the experimental solvent [14].

The selected conformers for the different diastereoisomers were accounted for the subsequent computation of the  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts and  $^1J_{\text{H-H}}$  using the MPW1PW91 functional and the 6–31G(d,p) basis set. Final NMR parameters (chemical shifts and homonuclear coupling constants) values for each of the investigated diastereoisomers were built considering the influence of each conformer on the total Boltzmann distribution taking into account the relative energies. Calibrations of calculated  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  chemical shifts were performed using TMS as the reference compound. We evaluated the data considering the MAE and TAD parameters.

## Cell cultures

The J774A.1 murine monocyte macrophage cell line (American Type Culture Collection) was grown adjacent to petri dishes with DMEM, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere.

## Cellular viability assay

Cells ( $5.0 \times 10^4$ /well) were plated on 96-well plates and allowed to adhere for 4 h. After that, the medium was replaced with fresh medium alone or containing serial dilutions of the nine compounds considered (100–25  $\mu\text{M}$ ), and incubation was performed for 24 h. 6-Mercaptopurine (6-MP) was used as a positive control. Cell viability was assessed using the MTT assay as previously reported [27]. Briefly, 25  $\mu\text{L}$  of MTT (5 mg/mL) were added, and cells were incubated for an additional 3 h. Thereafter, cells were lysed and the dark blue crystals solubilized with 100  $\mu\text{L}$  of a solution

containing 50% (v:v) N,N-dimethylformamide and 20% (w:v) SDS with an adjusted pH of 4.5. The optical density (OD) of each well was measured with a microplate spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC/340-DASIT) equipped with a 620-nm filter. Macrophage viability in response to treatment was calculated as follows: % dead cells =  $100 \times [(\text{OD treated}/\text{OD control}) \times 100]$

## Cell treatment for anti-inflammatory potential evaluation

Macrophages J774A.1 were plated in 96-well plates ( $5.0 \times 10^4$ ) and allowed to adhere for 4 h. Thereafter, the medium was replaced with pure fresh medium or medium containing serial dilutions of the tested compounds (100–25  $\mu\text{M}$ ) for 1 h, and then co-exposed to a final concentration of the murine macrophage cell line (J774A.1) under inflammatory conditions induced by LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for a further 24 h for NO and COX-2 detection.

## Measurement of nitric oxide release

NO generation was measured as nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), an index of NO levels released by cells, in the culture medium of J774A.1 macrophages 24 h after cell treatment by Griess reaction as previously reported [28]. Briefly, 100 mL of cell culture medium were mixed with 100 mL of Griess reagent, equal volumes of 1% (w:v) sulphanylamine in 5% (v:v) phosphoric acid, and 0.1% (w:v) naphthylethylenediamine-hydrogen chloride, and incubated at room temperature for 10 min. Then, the absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader Titertek (Dasit). The amount of  $\text{NO}_2^-$  in the samples is expressed as  $\mu\text{M}$  concentration, calculated via a sodium  $\text{NO}_2^-$  standard curve. L-NAME (1  $\mu\text{M}$ ) was used as a reference compound.

## Evaluation of cyclooxygenase-2 expression

J774A.1 macrophages were plated into 96-well plates ( $5.0 \times 10^4$  cells/well) and allowed adhere for 4 h at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. After that, the medium was replaced with fresh medium, and cells were treated with serial dilutions of the tested compounds (100–25  $\mu\text{M}$ ) added 1 h before and simultaneously to LPS for 24 h. Cells were collected, washed twice with PBS, incubated in Fixing Solution for 20 min at 4 °C, and then incubated in Fix Perm Solution for 30 min at 4 °C. Anti-COX-2 (1 : 100; BD Laboratories) was added to J774A.1 cells for a further 30 min. The secondary antibody was added in Fix Perm solution and cells were evaluated using fluorescence-activated cell sorting (FACSscan; Becton Dickinson) and elaborated with Cell Quest software [29].

## Data analysis

Data are reported as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) values of at least three independent experiments, each in triplicate. Statistical analysis was performed by an analysis of variance test, and multiple comparisons were made by Bonferroni's test using Prism 5 (GraphPad Software). A p value of less than 0.05 was considered significant.

## Supporting information

NMR spectra of compounds 1–5 are available as Supporting Information.

## Author contributions

M.B. and M.G.C. designed the study, performed part of the experiments, interpreted the data, and performed data analysis. A.K. and Z.K. performed the ethnobotanical study, plant selection, and botanical identification. A.M.I. and M.D.A. performed the phytochemical study: isolation and chromatographic analysis. S.M. and G.A. performed the biological evaluation. G.B. and N.D.T. interpreted the data, drafted the manuscript, and revised it critically for intellectual content. All authors read and approved the final version of the manuscript before submission.

## Acknowledgements

Financial support was provided by the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) Italy, PRIN 2017 projects: 2017A95NCJ and 2017WN73PL\_003.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Beneden-Gonzalez C. Taxonomic review of the genus *Chamaemelum* Miller (Asteraceae) in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Botanica Collectanea* 1987; 17: 55–65
- Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M, Hseini S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Rev Bot Lejeunia* 2009; 186: 1–2
- Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Fougrach H, Bourkhiss B, Bousta D, Talbi M. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* 2007; 146: 85–89
- Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Paris: Ibis Press; 1997
- Hilmi F, Gertsch J, Bremner P, Valovic P, Heinrich M, Sticher O, Heilmann J. Cytotoxic versus anti-inflammatory effects in HeLa, Jurkat T and human peripheral blood cells caused by guaianolide-type sesquiterpene lactones. *Bioorg Med Chem* 2003; 11: 3659–3663
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1073–1081
- Li Y, Zhang ML, Cong B, Wang SM, Dong M, Sauriol F, Huo CH, Shi QW, Gu YC, Kiyota H. Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from the flower of Yarrow, *Achillea millefolium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75: 1554–1556
- Bifulco G, Dambruoso P, Gomez-Paloma L, Riccio R. Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods. *Chem Rev* 2007; 107: 3744–3779
- Di Micco S, Chini MG, Riccio R, Bifulco G. Quantum mechanical calculation of NMR parameters in the stereostructural determination of natural products. *European J Org Chem* 2010; 2010: 1411–1434
- Khalifaoui A, Chini MG, Bouheroum M, Belaabed S, Lauro G, Terracciano S, Vaccaro MC, Bruno I, Benayache S, Mancini I, Bifulco G. Glucopyranosylbiantrones from the Algerian *Asphodelus tenuifolius*: structural insights and biological evaluation on melanoma cancer cells. *J Nat Prod* 2018; 81: 1786–1794
- Chini MG, Malafronte N, Vaccaro MC, Gualtieri MJ, Vassallo A, Vasaturo M, Castellano S, Milite C, Leone A, Bifulco G, De Tommasi N, Dal Piaz F. Identification of limonol derivatives as heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors through a multidisciplinary approach. *Chem Eur J* 2016; 22: 13236–13250
- Schrödinger Suite. New York, NY: Schrödinger LLC; 2015
- Cimino P, Gomez-Paloma L, Duca D, Riccio R, Bifulco G. Comparison of different theory models and basis sets in the calculation of <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of natural products. *Magn Reson Chem* 2004; 42: S26–S33
- Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem Rev* 2005; 105: 2999–3093
- Tan RX, Jia ZJ, Jakupovic J, Bohlmann F, Huneck S. Sesquiterpene lactones from *Artemisia rutifolia*. *Phytochemistry* 1991; 30: 3033–3035
- Tan Z, Jia Z. Guaianolides from *Artemisia Xerophytica*. *Phytochemistry* 1992; 31: 191–193
- Pereira MD, da Silva T, Lopes LM, Krettl AU, Madureira LS, Zukerman-Schpector J. 4,5-seco-guaiane and a nine-membered sesquiterpene lactone from *Holostylis reniformis*. *Molecules* 2012; 17: 14046–14057
- Su JH, Lin FY, Dai CF, Wu YC, Hsu CH, Sheu JH. New steroids from the soft coral *Nephtea chabrolii*. *Bull Chem Soc Jpn* 2007; 80: 2208–2212
- Yamakawa K, Nishitani K. Studies on the terpenoids and related alicyclic compounds. VIII. Chemical transformation of  $\alpha$ -santonin into arsanin and arsanin. *Chem Pharm Bull* 1976; 24: 2810–2817
- Marco JA, Sanz JF, Jakupovic J, Huneck S. New sesquiterpene lactones and acetylenes from *Chrysanthemum lavandulifolium*. *Tetrahedron* 1990; 46: 6931–6938
- Marco JA, Sanz-Cervera JF, Manglano E, Sancenon F, Rustaiyan A, Kardar M. Sesquiterpene lactones from Iranian *Artemisia* species. *Phytochemistry* 1993; 34: 1561–1564
- Boriky D, Berrada M, Talbi M, Keravis G, Rouessac F. Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry* 1996; 43: 309–311
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169–181
- Ahmad N, Chen LC, Gordon MA, Laskin JD, Laskin DL. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 1005–1011
- Schrödinger Release 2015: Maestro 10.2. New York, NY: Schrödinger, LLC; 2015
- Frisch MJ, Trucks G, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA jr., Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ. Gaussian 09, Revision A02. Wallingford CT: Gaussian, Inc.; 2009
- Marzocco S, Adesso S, Alilou M, Stuppner H, Schwaiger S. Anti-inflammatory and anti-oxidant potential of the root extract and constituents of *Doronicum austriacum*. *Molecules* 2017; 22: E1003
- Pepe G, Sommella E, Cianciarulo D, Ostacolo C, Manfra M, Di Sarno V, Musella S, Russo M, Messori A, Parrino B, Bertamino A, Autore G, Marzocco S, Campiglia P. Polyphenolic extract from Tarocco (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Clone “Lempso” exerts anti-inflammatory and antioxidant effects via NF- $\kappa$ B and Nrf-2 activation in murine macrophages. *Nutrients* 2018; 10: E1961
- Pompermaier L, Marzocco S, Adesso S, Monizi M, Schwaiger S, Neinhuis C, Stuppner H, Lautenschlager T. Medicinal plants of northern Angola and their anti-inflammatory properties. *J Ethnopharmacol* 2018; 216: 26–36

## الملخص

في الجزء الأول من أبحاثنا كان هدفنا هو التعرف على المحتوى الفينولي للمستخلص الهيدروكولي للنبته *Ammoides atlantica* التي تنتمي الى العائلة الخيمية بواسطة استخدام تقنية

RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS في وضع التأين السلبى و تم تحديد المحتوى الكيمايى وفقاً لأطياف LC/MS/MS تم الكشف عن 66 مركب كيميائى و تم تحديد 45 مركباً: 26 مركب مشتق لحمض هيدروكسى سيناميك، و 4 أحماض هيدروكسى بنزويك، 11 فلافون، 3 فلافونول، و لنيان واحد. علاوة على ذلك، أظهر المستخلص الهيدروكولي للنبته *Ammoides atlantica* نشاطاً عالياً مضاداً للأكسدة اتجاه DMSO و CUPRAC مقارنة بالست طرق المدروسة (DPPH، ABTS، O<sub>2</sub> قلوية DMSO، مخلب الأيونات الحديدية، قوة اختزال و CUPRAC). كما تم تحديد المحتوى الكلي للفينولات و المحتوى الكلي للفلافونويدات للمستخلص الذي بين غنى و ثراء المستخلص بهذا النوع من المركبات.

في الجزء الثانى تمكنا من فصل و تحديد البنى الكيمايية لنواتج الأيض الثانوى للجزء الهوائى لنبتهين من جنس *Ormenis* (*O. praecox* و *O. mixta*) المنتمية للعائلة النجمية Asteraceae باستعمال التقنيات الكروماتوغرافية الحديثة (VLC, CC, TLC, HPLC) و الطرق التحليلية منها الفيزيائية و الكيمايية، حيث تتمثل الفيزيائية في مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية الرنين النووي المغناطيسى للبروتون، مطيافية الرنين النووي المغناطيسى للكربون، مطيافية الرنين النووي المغناطيسى ثنائية البعد من HMBC، HMQC، COSY في حالات و في حالات أخرى تقنية HPLC-UV-DAD-MS و أخيراً مطيافية الكتلة، أما الكيمايية فتتمثل في الإماهة الحمضية. تم عزل تسع مركبات من النبته *O. mixta* منها خمسة guaianolides جديدة في المملكة النباتية فصلت لأول مرة. كما تم تقييم التأثير المضاد للتكاثر للمركبات المفصولة ضد الخلايا السرطانية Hella و Jurkat من خلال اختبار MTT. تم الكشف عن موت الخلايا المبرمج لخلايا Hella و Jurkat.

تم عزل خمس مركبات من النبته *O. praecox*. و بغية الكشف عن مدى الفعالية البيولوجية للنبته أجريت بعض التحاليل ضد البكتيرية على المستخلصات الثلاث (الايثانول، خلات الايثيل و البوتانول) التي أظهرت فعالية مضادة معتبرة على السلالات البكتيرية المرجعية و هذا يفتح المجال لدراسات أخرى لأنواع بكتيرية سواء كان على المستخلص أو على المركبات المفصولة.

كما واصلنا الدراسة البيولوجية على مستخلصات الطورين (خلات الايثيل، البوتانول) للنبته و ذلك بدراسة الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات بالاعتماد على طريقة تقدير الالتقاط الجذري DPPH. حيث أظهر مستخلص خلات الايثيل فعالية جيدة، كما تم تحديد المحتوى الكلي للفينولات و المحتوى الكلي للفلافونويدات لمستخلصات السابقة.

**الكلمات المفتاحية:** *Ammoides atlantica*, *Apiaceae*, *Ormenis mixta*, *Ormenis praecox* Asteraceae, RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS, نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للتكاثر، نشاط مضاد للبكتيريا.

## Résumé

Dans la première partie de notre recherche, notre objectif était d'identifier le contenu phénolique de l'extrait hydroalcoolique de la plante *Ammoides atlantica*, qui appartient à la famille des Apiacées, en utilisant la technique RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS.

En mode d'ionisation négative et la teneur chimique a été déterminée selon les spectres LC/MS/MS, 66 composés chimiques ont été détectés et 45 composés ont été identifiés : 26 dérivés d'acide hydroxycinnamique, 4 acide hydroxybenzoïque, 11 flavones, 3 flavonols et 1 linane.

Par ailleurs, l'extrait hydroalcoolique de la plante *Ammoides atlantica* a montré une activité antioxydante élevée vis-à-vis du DMSO et du CUPRAC par rapport aux six méthodes étudiées (DPPH), ABTS, O<sub>2</sub>, alcalinité du DMSO, chélation des ions ferreux, pouvoir réducteur et CUPRAC. et la teneur totale en flavonoïdes de l'extrait ont été déterminées entre la richesse et la richesse de l'extrait avec ce type de composés.

Dans la deuxième partie, nous avons pu séparer et déterminer les structures chimiques des métabolites secondaires de la partie aérienne de deux plantes du genre *Ormenis* (*O. mixta*) et *O. praecox* appartenant à la famille étoilée des Asteraceae, en utilisant des techniques chromatographiques modernes (VLC, CC, TLC, HPLC) et méthodes analytiques, y compris physiques et chimiques, où la physique est la spectroscopie UV, la spectroscopie RMN du proton, la spectroscopie RMN du carbone, la spectroscopie RMN bidimensionnelle de COSY, HMQC, HMBC dans certains cas et dans d'autres HPLC-UV-DAD-MS et Enfin, la spectrométrie de masse, et la chimie est représentée par la réhydratation acide. Neuf composés ont été isolés de la plante *O. mixta*, dont cinq nouveaux guaianolides du règne végétal ont été séparés pour la première fois. L'effet anti-prolifératif des composés isolés contre les cellules cancéreuses Hella et Jurkat a été évalué par le test MTT Détection de l'apoptose des cellules Hella et Jurkat.

Cinq composés ont été isolés de la plante *O. praecox* Afin de détecter l'étendue de l'efficacité biologique de la plante, des analyses de cultures bactériennes ont été menées sur les trois extraits (éthanol, acétate d'éthyle et butanol), qui ont montré une activité antibactérienne importante contre les souches bactériennes de référence, ce qui ouvre la voie à d'autres études d'espèces bactériennes, que ce soit sur l'extrait ou sur les composés séparés.

Nous avons également poursuivi l'étude biologique sur les extraits des deux phases (acétate d'éthyle, butanol) de la plante en étudiant l'activité antioxydante de ces extraits selon la méthode de capture radicalaire DPPH.

Où l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une activité unique, et la teneur totale en phénols et la teneur totale en flavonoïdes ont été déterminées pour les extraits précédents.

**Mots clés :** *Ammoides atlantica*, Apiaceae, *Ormenis mixta*, *Ormenis praecox*, Asteraceae, RPUHPLC-ESI-QTOF-MS, activité antioxydante.

## Abstract

In the first part of our research, our aim was to identify the phenolic content of the hydroalcoholic extract of the plant *Ammoides atlantica*, which belongs to the family Apiaceae, by using the RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS technique.

In the negative ionization mode and the chemical content was determined according to the LC/MS/MS spectra, 66 chemical compounds were detected and 45 compounds were identified: 26 hydroxycinnamic acid derivative, 4 hydroxybenzoic acid, 11 flavones, 3 flavonols, and 1 linane.

Moreover, the hydroalcoholic extract of the plant *Ammoides atlantica* showed high antioxidant activity towards DMSO and CUPRAC compared to the six methods studied (DPPH), ABTS, O<sub>2</sub>, alkalinity of DMSO, ferrous ion chelation, reducing power and CUPRAC. The total content of phenols and the total content of flavonoids of the extract were determined. Which between the richness and richness of the extract with this type of compounds.

In the second part, we were able to separate and determine the chemical structures of the secondary metabolites of the aerial part of two plants of the genus *Ormenis* (*O. mixta*) and *O. praecox* belonging to the stellate family Asteraceae, using modern chromatographic techniques (VLC, CC, TLC, HPLC) and analytical methods, including physical and Chemical, where the physical is UV spectroscopy, proton NMR spectroscopy, carbon NMR spectroscopy, two-dimensional NMR spectroscopy from COSY, HMQC, HMBC in some cases and in others HPLC-UV-DAD-MS and Finally, mass spectrometry, and the chemical one is represented by acidic rehydration. Nine compounds were isolated from the plant *O. mixta*, of which five new guaianolides in the plant kingdom were separated for the first time. The anti-proliferative effect of the isolated compounds against Hella and Jurkat cancer cells was evaluated through the MTT test. Detection of Hella and Jurkat cell apoptosis.

Seven compounds were isolated from the plant *O. praecox*. In order to detect the extent of the biological effectiveness of the plant, some analyzes of bacterial cultures were conducted on the three extracts (ethanol, ethyl acetate and butanol), which showed significant antibacterial activity against the reference bacterial strains. This opens the way for other studies of species bacterial, whether on the extract or on the separated compounds.

We also continued the biological study on the extracts of the two phases (ethyl acetate, butanol) of the plant by studying the antioxidant activity of these extracts based on the method of DPPH radical capture. Where the ethyl acetate extract showed a unique activity, and the total content of phenols and the total content of flavonoids were determined for the previous extracts.

**Keywords :** *Ammoides atlantica* Apiaceae, *Ormenis mixta*, *Ormenis praecox*, Asteraceae, RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS, antioxidant activity.