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

كلية العلوم الدقيقة **قسم الكيمياء**
رقم الترتيب: .....
رقم التسلسل:.....

مذكرة

مقدمة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية
تخصص تحاليل فيزيوكيميائية و كيمياء عضوية
تحت عنوان

دراسة فيتوكيميائية لنبات
Thymelaea microphylla!!Coss. et Dur.
وتثمين الفعالية البيولوجية

تقديم الطالب : لبيب علي سعيد نعمان **تحت إشراف الدكتور : زلاقي عمار**

لجنة المناقشة:

أ.د. غواطي صالح	**أستاذ التعليم العالي بجامعة منتوري قسنطينة**	**رئيسا**
د. زلاقي عمار	**أستاذ محاضر بجامعة أم البواقي**	**مقررا**
أ.د. عكال صالح	**أستاذ التعليم العالي بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**
د. غراف نور الدين	**أستاذ محاضر بجامعة أم البواقي**	**ممتحنا**
د. بن كنوار رشيد	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحنا**

2010

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

كلية العلوم الدقيقة قسم الكيمياء

رقم الترتيب: .....
رقم التسلسل:.....

مذكرة

مقدمة لنيل شهادة الماجستير في الكيمياء العضوية
تخصص تحاليل فيزيوكيميائية و كيمياء عضوية
تحت عنوان

دراسة فيتوكيميائية لنبات
Thymelaea microphylla!!Coss. et Dur.
وتثمين الفعالية البيولوجية

تقديم الطالب : لبيب علي سعيد نعمان تحت إشراف الدكتور : زلاقي عمار

لجنة المناقشة:

أ.د. غواطي صالح	أستاذ التعليم العالي بجامعة منتوري قسنطينة	رئيسا
د. زلاقي عمار	أستاذ محاضر بجامعة أم البواقي	مقررا
أ.د. عكال صالح	أستاذ التعليم العالي بجامعة منتوري قسنطينة	ممتحنا
د. غراف نور الدين	أستاذ محاضر بجامعة أم البواقي	ممتحنا
د. بن كنوار رشيد	أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة	ممتحنا

2010

الإهداء

إلـــــى روح أمي الغالية

إلـــــى عائلتـــــي الكريمـــة

إلـــى محبـــي العلـــم

شكر و تقدير

الحمد لله على كل نعمه الصغيرة منها قبل الكبيرة، الحمد لله الذي وفقني لإنجاز هذا العمل.

أتقدم بالشكر الخاص إلى الأستاذ زلاقي عمار الذي كان لي المشرف و الموجه و المعين خلال مراحل إنجاز هذا العمل.

أتوجه بشكري الجزيل إلى الأستاذ غواطي صالح عميد كلية العلوم الدقيقة على قبوله ترأس لجنة المناقشة.

أتوجه بالشكر إلى الأستاذ عكال صالح أستاذ التعليم العالي وللأستاذ بن كنوار رشيد أستاذ محاضر بقسم الكيمياء بجامعة منتوري قسنطينة على قبولهما مناقشة وإثراءهذه الرسالة كما أتوجه بالشكر الجزيل للأستاذ تاذغ رافع نور الدين من جامعة أم البواقي على قبوله مناقشة وإثراء هذه الرسالة كما لا أنسى أن أتوجه بالشكر للأستاذة فضيله بن عياش على كل المساعدات والتوجيهات المقدمة.

كما أتقدم بالشكر الخالص إلى جميع أفراد مخبرنا على ما قدموه لي من نصائح و مساعدات.

كذلك إلى كل أفراد دفعتي متمنيا لهم النجاح و التوفيق في جميع الميادين.

وتحية عرفان وتقدير لأحفاد الأمير عبدالقادر أبناء جميله بوحيرد الشعب الجزائري الشقيق.

وأشير الى أن التجارب المخبرية أجريت في:

مخبر المنتجات الطبيعية ذات الأصل النباتي قسم الكيمياء جامعة منتوري قسنطينة.

مخبر الميكروبيولوجيا والبيوكيماء بقسم علوم الطبيعة والحياة جامعة أم البواقي.

شكرا لكل من ساعدني و لو بالكلمة الطيبة.

قائمة المختصرات

CC : Column Cromatography.

CCM : Cromatography Couche Mince.

^{13}C-NMR : ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance**.**

d : doublet.

dd : doublet of doublet.

DPPH : 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl

ES : Electro Spray.

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.

^{1}H-NMR : ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance.

HPLC : High Performance Liquid Cromatography.

Hz : Hertz.

F : Flours.

GC-MS : Gaz chromatography-Mass Spectrometry.

***J* :** Coupling constant.

L : Leaves.

ppm : parts per million.

R : Roots .

Rt : Retation time.

s : singlet.

St : Stems.

TLC : Thin-Layer Chromatography .

T : *Thymelaea*

UV : Ultraviole

الفهرس

مقدمة

الجزء النظري

الفصل الأول نواتج الأيض الثانوي

1- الزيوت الأساسية 01

1- 2- الفوائد الطبيعية للزيوت الأساسية.....01

1-3- التطبيقات الصناعية للزيوت الأساسية.....02

2- المركبات الفينولية.....02

2-1 الكومارينات.....02

2-1-1 تواجد وتوزع الكومارينات.....03

2-1-2 تسمية الكومارينات.....03

2-1-3 تقسيم الكومارينات.....04

أ) كومارينات بسيطة.....04

ب) Furocoumarin.....04

ج) Pyranocoumarins.....05

2-1-4 دور الكومارينات في النبات.....06

2-1-5 الفعالية البيولوجية للكومارينات.....06

2-2- الليجنانات.....06

2-3 الفلافونيدات.....07

2-3-1 تعريف الفلافونويدات.....07

2-3-2 أقسام الفلافونيدات.....08

أ - الفلافون.....08

ب – الفلافونول.....08

ج - الفلافانون.....09

د - نيوفلافون.....09

هـ - إيزوفلافون.....09

الفصل الثاني فيتوكيمياءالعائلة Thymelaeaceae

1 العائلــة Thymelaeaceae.....12

2 الخواص المورفولوجية العمة للعائلة Thymelaeaceae.....12

3- عائلة Thymelaeaceae فيتوكيميائيا.....13

3 – 1 الزيوت الأساسية.....13

3 – 2 التربينات الأحادية.....14

3 – 3 التربينات الثنائية.....15

3 – 4 الكومارينات.....15

3 – 4 – 1 كومارينات بسيطة.....15

3 – 4 – 2 كومارينات بسيطة ذات حلقة فيورانية.....16
3 – 4 – 3 كومارينات ثنائية.....16
3 – 4 – 4 كومارينات على شكل dibenzofuranique 17
3 – 4 – 5 كومارينات ثلاثية.....18
3 – 5 الفلافونويدات.....18
3 – 6 الليجنانات.....21
4 – الجنس *Thymelaea* 23
5 – التصنيف النظامي للنبتة .*Thymelaea microphylla* Coss et Dur..... 25
6 – الخواص المورفولوجية للنبتة .*Thymelaea microphylla* coss. et dur..... 25

الفصل الثالث الفعالية ضد مكروبية

1- بعض الإستخدامات التقليدية للعائلة Thymelaeaceae..... 26
1 – 1 الإستخدامات الطبية.....26
1 – 2 الإستخدامات غير الطبية..... 26
2 – الفعالية البيولوجية للجنس *Thymelaea* 29
3- أهمية الفعالية البيولوجية.....29
4 – خصائص السلالات البكتيرية المختبرة.....30
4 – 1 السلالات سالبة الجرام.....30
4 – 1 – 1 *Escherichia coli* 30
4 – 1 – 2 *Klebsiell pneumonia*.....30
4 – 2 السلالا ت الموجبة الجرام 31
4 – 2 – 1 *Staphylococcus* 31
4 – 2 – 2 *S.aureus* 31
4 – 2 – 3 *S.blanc*.....31
4 – 2 – 4 *Pseudomonas aerogenosa*.....32
5- فطريات *Aspergillus niger*.....32
6- الفعالية المضاده للاكسدة.....32
6-1 ماهي مضادات الاكسدة.....32
6-2 أهمية مضادات الاكسدة.....32
6-3 الأسباب البيئية المسببة لتكوين الجذور الحرة.....33
6-4 أنواع مضادات الأكسدة.....33
6-5 أضرار الجذور الحرة..... 34

الجزء العملي

الفصل الأول الطرق و الوسائل

1– المادة النباتية.....35
2 – الكشف عن المواد الفعالة المختلفة الموجودة في نبات *Thymelaea microphylla* coss. et dur.....35

2 – 1 الكشف عن الكومارينات 35
2 – 2 الكشف على القلويدات 37
2 – 3 الكشف على الفلافونويدات 39
2 – 4 الكشف على الصابونيات 40
2- 5 الكشف على الزيوت الأساسية.....40
2 – 6 الكشف على التنينات 40
3-الاستخلاص.....42
3 – 1 استخلاص االزيوت الأساسية.....42
3 – 1 – 2 تحليل الزيوت الأساسية باستعمال GC-MS.....42
3 – 2 الاستخلاص الكلي للفينولات والفينولات المتعددة.....42
2 – 2 – 1 عملية الفصل الأولي (عمود التجزئة Fractionation column) ….43
2 – 2 – 2 معالجة الكسور المتحصل عليها 44
3- التعرف على البنى الكيميائية للمركبات.....47
4 – الفعالية البيولوجية 47
4 – 1 مكان التجربة.....47
4 – 2الأدوات والوسائل المستعملة 47
4 – 3العينات البيولوجية.....48
4– 4 دراسة الأثر التثبيطي للمستخلص الخام بإستعمال طريقة الإنتشار على الأقراص.....48
5- الفعالية المضادة للأكسدة.....50
5-1 الطرق والوسائل.....50

الفصل الثاني النتائج و المناقشة

1 – نتائج المسح الكيميائي للنبتة *Thymelaea microphylla* Doss. et Dur ….52
2 – نتائج تحليل الزيوت الأساسية للنبتة *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. 53 .....
3 – دراسة للمركب LC12 60
4 – دراسة للمركب LF2 65
5 – نتائج الفعالية البيولوجية 79
5-1- نتائج الفعالية ضد ميكروبية للزيوت الأساسية للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.....79
5-1-2 نتائج الفعالية ضد ميكروبية للمستخلص الخام للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. ..... ::::::: 79
6- نتائج الفعل المضاد للاكسدة للمستخلص الخام للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. 81
الخاتمة
الملحق
قائمة المراجع
الملخص بالعربية
الملخص بالفرنسية
الملخص بالانجليزية

مقدمـــة

لقد خلق الله سبحانه وتعالى الإنسان وسخر له كل ما هو على وجه الأرض من نعم ظاهرة وباطنة لتلبي كافه احتياجاته وتساعده في حياته اليومية والمضي في إعمار الأرض وجعلها بيئة مناسبة يعيش فيها بيسر وسهوله وللأجيال المتعاقبة.

قال تعالى((**ألم تروا أن الله سخر لكم ما في السموات وما في الأرض وأسبغ عليكم نعمه ظاهرة وباطنة ومن الناس من يجادل في الله بغير علم ولا هدى ولا كتاب منير**)) سورة لقمان20.

وقد استخدم الإنسان نعمة العقل في تسخير ما خلقه الله سبحانه وتعالى له من خلال التفكير في كل ما يدور من حوله واكتشاف أسرار الطبيعة، فمنذ القدم ربط الإنسان الأول العلاقة بين النباتات البرية التي تغطي وجه الأرض وبين الأمراض التي يصاب بها، فاستعمل هذه النباتات أو جزءًا منها في التداوي حتى وصل إلى درجه عاليه من المهارة دلت عليها الآثار الباقية من الحضارات القديمة خاصة الحضارة المصرية والصينية والهندية، كما أنه لا ننسى ما أسهم به المسلمون وما جاء عن رسولنا الكريم صلى الله عليه وسلم من طبٍ نبوي يتداول إلى يومنا هذا.

ولقد ظهرت بصمات المسلمين واضحة من خلال علماء أبدعوا في هذا المجال وغيرهم من العلماء الذين ترجمت مؤلفاتهم وكانت أساس الحضارة في القرن التاسع عشر، وبتقدم العلوم الكيميائية وطرق التحليل الحديثة فصلت المواد الفعالة من النباتات الطبية على صورة نقية، وأصبحت تستخلص من النباتات وتحدد بنيتها الكيميائية، وتصنع في شركات الأدوية على شكل أقراص، وحقن، ودهانات، وخلافه بما يتماشى مع آلية العلاج [1].

لا تزال العقاقير النباتية الطبيعية تستعمل في الطب الشعبي في أكثر من بلدان العالم، وقد أصبح اهتمام الكيميائيين الصيادلة والبيولوجيين أكثر من سابقيهم في الاهتمام باكتشاف الجديد من المواد العلاجية وينظرون إلى النباتات الطبية كمصدر وذخيرة كبيرة لإنتاج هذه الأدوية، ومن جملة الاهتمامات استعمال كثير من الأدوية في الطب الشعبي لتثبيط البكتيريا الممرضة، خاصة تلك التي اكتسبت مقاومة طبيعية من المضادات الحيوية المعروفة، أما الاهتمام الأكبر في العشرين سنة الأخيرة فهو ذلك المتمثل في دراسة مضادات الأكسدة على أنها مواد حافظة للمواد الغذائية وكذا المساهمة في حماية الخلايا من السرطنة.

ولكون الشعوب العربية لازالت تهتم بالتطبيب والتداوي بالأعشاب، نجد أن الجزائر احدى هذه الدول التي لازالت فيها هذه الممارسة قائمة ونظرا لغنى هذا البلد بكثير من النباتات الهامة, دفعنا التفكير في الربط بين نوعية النبات المختار واستعماله في الطب الشعبي.

من هذا المنطلق تم إختيارنا للمادة النباتية للنوع *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.

على أسس كيميائية من جهة وبيولوجية من جهة أخرى و ذلك بعد اختيار نبات آخر من العائلة المركبة *Cynara cardinculus* ولكن كون الأول لم يحظ بالدراسة شجعنا أكثر على البحث فيه.

ويهدف هذا البحث إلى إجراء:

- ❖ مسح فيتوكيميائي.
- ❖ استخلاص المواد الفعالة من النبات قيد الدراسة.
- ❖ فصل، تنقية، وتعريف البنى الكيميائية للمركبات المعزولة.
- ❖ دراسة الفعالية ضد ميكروبية والمضادة للأكسدة.

!!

الجزء النظري

الفصل الأول

نواتج الأيض الثانوي

!

نواتـج الأيـض الثـانـوي:

قسمت نواتج الأيض الثانوي إلى ثلاث أقسام رئيسة هي:

1. التربينات : تربينات أحادية، سيسكويتربينات ، تربينات ثنائية، تربينات ثلاثية، تربينات رباعية، [2].
2. القلويدات.
3. الفينولات والفينولات المتعددة : الأحماض الفينولية، الكومارينات، الفلافونويدات، التنينات، جميع هذه الأنواع ذات أهمية كبيرة حيث تلعب دوراً هاماً في مجال الطب والصيدلة ولها تأثيراً فزيولوجياً على الكائن الحي لاسيما الإنسان [3].
4. ستيرولات، سترويدات، صابونينات.

ولأن الهدف من هذا البحث هو دراسة الزيوت الأساسية والمركبات الفينولية، سنورد لمحة عن هذه المواد.

1- الزيوت الأساسية:

الزيوت الأساسية خليط من مواد ذات رائحة عطرية وطيارة تستعمل في العطارة والتغذية، وأهم مكونات الزيوت العطرية التريبينات الأحادية والسسكوتربينات [4].

1- 2- الفوائد الطبيعية للزيوت الأساسية [5]**:**

تعتبر المواد التربينية المكونة للزيوت الأساسية إحدى أهم المنتجات الأولية التي تفرزها النباتات العطرية لتنفيذها مباشراً تبعاً لإحدى هذه الفوائد الذاتية كما يلي:

1- مقاومة المواد السامة بيولوجيا لبعض المركبات الناتجة من عمليات الهدم الكيميائي في داخل الأنسجة النباتية.
2- جذب بعض الحشرات من أجل القيام بعمليات التلقيح الحشري في النباتات لرفع عقد ثمارها وإنتاجها البذري.
3- طرد الكائنات من الحشرات والحيوانات، منعاً لتلف وضرر النباتات المفرزة لهذ الزيوت الأساسية.
4- إنتاج بعض المركبات التربينية لمقاومة الإصابة الفطرية المهاجمة من بعض الفطريات نتيجة تكوينها ضمن مكونات الزيوت الأساسية.

!

5- إنتاج خليط من المركبات التربينية في أوراق العوائل النباتية غير النباتات التابعة للنباتات العطرية مثل جنس اللوبيا والقطن والبطاطس لجذب الحشرات لكي تضع تجمعات بيضها الذي يفقس متحولاً إلى يرقات دودية كي تلتهم الأوراق الخاصة بأوراق العائل.

1- 2-3- التطبيقات الصناعية للزيوت الأساسية:

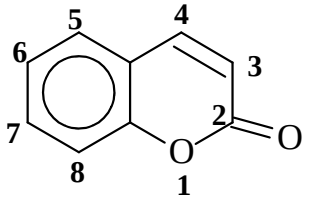
1- الروائح والعطور.
2- مستحضرات التجميل .
3- العلاج الحيوي الطبي.
4- حافظات الطعام .
5- المطهرات البيولوجية.
6- المانعات الحشرية.

2- المركبات الفينولية:

2-1- الكومارينات:

اشتقت كلمة كومارين من الإسم Coumarou، وهو الإسِم المحلي للنوع *Dipterix odorata* Willd (Fabaceae) الذي فصل منه الكومارين سنة 1820 [3].

يعتبر الكومارين البسيط الموجود في الطبيعة المركب الأم للعديد من الكومارينات وذلك بإستبدال موضع أو أكثر من المواضع غير المستبدلة من 3 إلى 8 في نواة الكومارين.



Coumarin

أكثر المجموعات البديلة الموجودة على حلقة الكومارين هي المجموعات الأكسجينية التي توجد على هيئة فينولية أو إيثيرية OR- أو مرتبطة بوحدة سكر O-Glycoside. ويعتبر 7-hydroxy coumarin

!

(Ombelliferone) المركب الأم لمعظم الكومارينات التي تم فصلها من الطبيعة. القليل من هذه المركبات الطبيعية يحتوي مجموعة هيدروكسيل في الموضع 4، بينما يكون وجود مجموعة هيدروكسيل على الموضع 3 نادراً، كما يندر وجود مجموعات ألكيلية على نفس ذرة الكربون، كما نشير إلى أن هناك كومارينات في الطبيعة تحوي سلاسل إيزوبرين إما أن تكون مرتبطة إلى ذرات الأكسجين أو مرتبطة مباشرة إلى ذرة كربون أو أكثر من المواضع غير المستبدلة في مركب كومارين ،كما يوجد في حالات قليلة نوعي الارتباط في المركب الواحد. وتتميز أغلب الكومارينات في الطبيعة بوجود حلقة إضافية إما أن تكون خماسية وهي حلقة Furane ويطلق عندئذ على الكومارينات من هذا النوع Furocoumarins نإما أن تكون حلقة سداسية وهي حلقة Pyrane وتسمى Pyranocoumarins، وقد تكون كل من حلقة Furaneو Pyrane مختزلة وتسمى في هذه الحالة Dihydrofurocoumarins و Dihydropyranocoumarins على التوالي، وتنشأ كل من حلقة Furane و Pyrane من تحلق وحدة إيزوبرين على حلقة كومارين مع مجموعة هيدروكسيل [7,6].

1-1-2 تواجد وتوزع الكومارينات:

تنتشر الكومارينات في المملكة النباتية وتغزر في فصائل نباتية من ثنائيات الفلقة Dicotyledonae خاصة : الفصيلة الخيمية Ombellifereae، السذبية Rutaceae ، كما تتواجد في الفصيلة البقولية Fabaceae، المركبة Compositae، الوردية Rosaceae الروبية Rubiaceae، وبعض فصائل أحاديات الفلقة هي الفصيلة النجيلية Gramineae، الأراشيدية Orchideae وتكون الكومارينات في حالتها الحرة أو الإتروزيدية [9,8].

وعن مكان الاصطناع الحيوي يبقى الاقتراح المرجح هو الأوراق الفتية ، غير أن تراكم الكومارينات يكون في الثمار بتراكيز أعلى ، مع مراعاة بعض الاختلافات بين الأنواع النباتية مثلا Furanocoumarins في النوع *Pastinaca sativa* يتم تخليقها الحيوي واكتنازها في الثمار بينما نفس النوع من الكومارينات لدى النوع *Angelica archangelica* يتم تخليقها الحيوي وتخزينها في الأوراق إلا أن هناك استثناء حول كومارين بسيط Osthenol يعتقد أن يتم اصطناعه في الجذور . أما بالنسبة لتواجد الكومارينات تتوزع في كل أجزاء النبات حسب مراحل النمو[6].

2-1-2 تسمية الكومارينات:

كما هو الحال في كثير من المواد الفعالة فإن تسمية الكومارينات لم تخضع لنظام معين أو تسمية محددة وعلية فالتسمية المتبعة تشتق من الفصيلة مثلا Ombelliferone، أو من الجنس وهي التسمية الغالبة مثل مركب Rutaretin من الجنس *Ruta* ، والمركب xantoxyletin من الجنس *Xantoxylum* ،كما تشتق كذلك

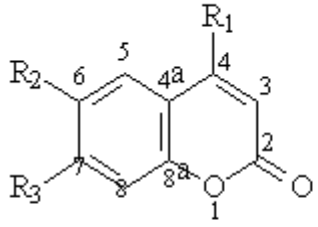
!

من النوع مثل مركب Scoparin من النوع *Artemisia scoparia*، والمركب Mogoltadone من النوع *Ferula mogoltravica* [10].

2-1-3 تقسيم الكومارينات:

تقسم الكومارينات إلى [6] :

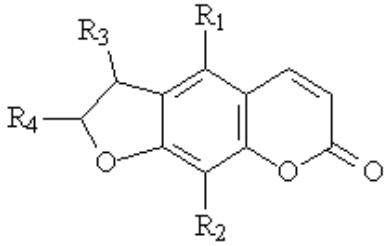
أ) كومارينات بسيطة: وتشمل المشتقات الهيدروكسيلية مثل Aesculetin، الألكوكسيدية مثل Herniarine، الألكيلية مثل Ostenol لجزيئ الكومارين الأصلي مع بعض جليكوسيداته كما هو موضح في الشكل- 01-.



اسم المركب	R1	R2	R3
coumarine	H	H	H
herniarine	H	H	OCH3
méthylombelliférone	CH3	H	OH
scopolétine	H	OCH3	OH
ombelliférone	H	H	OH

شكل- 01- بنية بعض المركبات الكومارينية البسيطة

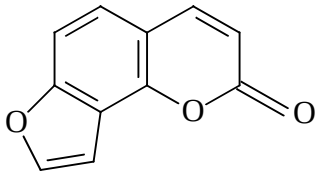
ب) Furocoumarins: تتألف هذه المجموعة القليلة الإنتشار في الطبيعة والتي تعتبر من حيث القيمة الطبية نوعية وعالية من اتحاد حلقة Furane مع الكومارين في الموقع 7 وتضم هذه المجموعة نموذجين يسمى الأول الخطي والثاني الزاوي والأمثلة كما يوضحها الشكلان 02 و 03.



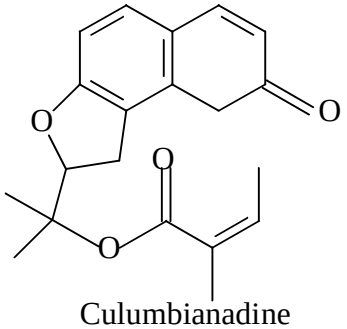
اسم المركب	R1	R2	R3	R4
bergaptène	OCH3	H	H	H
isopimpinelline	OCH3	OCH3	H	H
peucédanine	H	H	OCH3	CH
psoraléne	H	H	H	H
xanthotoxine	H	OCH3	H	H

شكل 02 : بنية بعض المركبات الكومارينية من النوع Furocoumarine الخطي

!



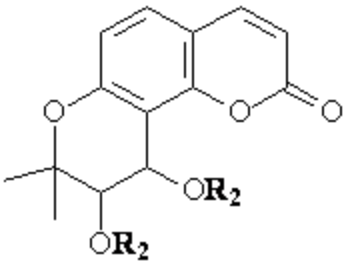
Angélicine



Culumbianadine

شكل 03: بنية بعض المركبات الكومارينية من النوع Furocoumarine الزاوية

جـ) Pyranocoumarins: هي مجموعة شبيهة بالسابقة لكن تحتوي على حلقة Pyrane بدلا من Furane (الشكل 04).



اسم المركب	R_1	R_2
Anomaline	Valeryl	Valeryl
Visnadine	$COCH_3$	$COCH(CH_3)CH2CH3$

شكل04 : بنية بعض المركبات الكومارينية من النوع Pyranocoumarins الزاوية.

4-1-2 دور الكومارينات في النبات :

!

تتميز الكومارينات بدور دفاعي تجاه بعض الكائنات مثل بعض الحشرات واللافقاريات الأرضية، لاسيما دورها في تثبيط نمو بعض أنواع الفطريات على الأوراق والثمار أين يتم تراكمها كما تساهم الكومارينات في بعض الأنشطة الأيضية كتنظيم النمو ،كما تشتهر الـ Furocoumarins بكونها مثبطة للنمو القمي للجذر كما أن إفرازها على سطح البذور يؤخر إنتاشها [9,8].

5-1-2 الفعالية البيولوجية للكومارينات:

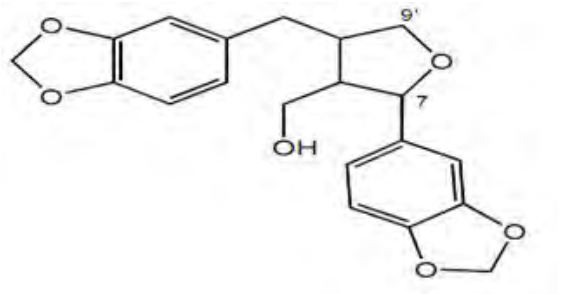
إن الكومارينات شأنها شأن أغلبية المنتجات الطبيعية الأخري، تبدي فعالية عالية ضد بعض الكائنات الممرضة أو علاج أمراض معينة فهي :

- مضادة للبكتريا، الفطريات والفيروسات [15,14,13,12,11].
- مضادة للملاريا، السرطان والإلتهابات [18,17,16] .
- مضادة للنشاط الإنزيمي الكبدي [20,19].
- تثبيط تخثر الدم مثل المركب Cyclocoumarol [21] .
- بعض الكومارينات الهيدروكسيلية لها القدرة على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية UV مما ينصح بها في الاستطبابات الجلدية [22].

2-2 الليجنانات:

- مركبات عبارة عن تكاثف وحدتين من phénylpropaniques وهي مركبات تلعب دورا هاماً في عملية الحماية للنباتات ، كما أن لها فعالية بيولوجية ضد بيكترية وفطرية [23].

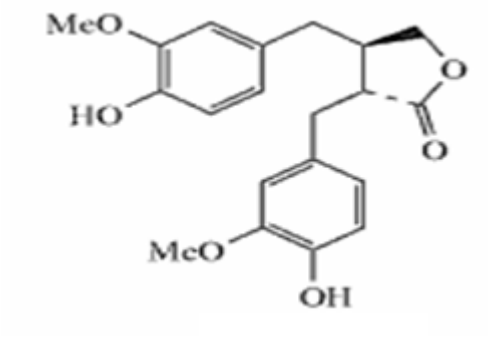
وتتواجد على شكل ليجنان ذو حلقة فيورانية أو أكثر كما يمكن أن ترتبط بمركبات أخرى كالكومارينات، شكل – 05 - [24].



شكل - 05- dihydrosésamine .

كما أنها يمكن أن تتواجد مرتبطة بحلقة لاكتونية، شكل – 06- [25].

!



.

شكل – 06- matairesinol

3- الفلافونيدات:

3- 1 تعريف الفلافونويدات:

الفلافونويدات عبارة عن مركبات طبيعية من نواتج الأيض الثانوي، وهي صبغات نباتية تتواجد في مختلف أجزاء النبتة وتساهم بإعطاء اللون للنبات [26] ، غير أنها تتركز بنسب عالية في القسم الهوائي وكلمة فلافونويد تعود إلى (Flavus) وهي في الأصل كلمة لاتينية تعني اللون الأصفر[27]. توجد في معظم الأصناف النباتية خاصة الراقية منها، و بشكل واسع عند كاسيات البذو كذلك عند نباتات أحادية الفلقة، ونسبي عند عاريات البذور وشحيحه لدى الطحالب[28] كما توجد عند الحزازيات[29] .

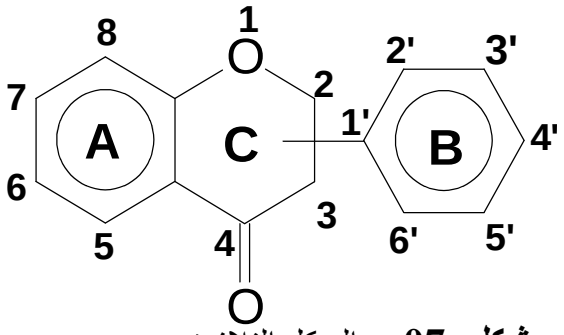
تتواجد بصفة عامة في الخلايا السطحية للأنسجة النباتية، حيث تؤمن لها الحماية من الأشعة فوق البنفسجية المضرة[30]. كما أنها تتواجد ذائبة في الفجوات على شكل إيتيروزيدات hétéroside (أي الفلافونويدات التي تنحل في الماء) أما بقية الفلافونويدات التي تذوب في مذيبات غير قطبية (أي الفلافونويدات عديدة الميتوكسيل) فنجدها في سيتوبلازما الخلية [31]، بالنسبة للأجليكونات فتتوضع على سطح النبات بخاصة الأوراق [32].

توجد في العادة على شكل جليكوزيدات التي قد تكون على هيئة سكر أحادي أو ثنائي , أو ربما يدخل في بناء السكر أكثر من وحدتي سكر أحادي. لحد الآن يوجد أكثر من 2000 جليكوزيد (فلافونات , فلافونولات) تم عزله [33] .

بالرغم من العدد الكبير للفلافونويدات المعروفة واختلاف الصيغ البنائية لها إلا أن لها قاسماً مشتركاً بإحتوائها على 15 ذرة كربون في الهيكل الأساسي لها موزعة على شكل حلقتين عطريتين تسمى

!

الوحدتين A وB ترتبطان بسلسلة من ثلاث كربونات من الشكل $Ar\text{-}C_3\text{-}Ar$ بحيث تتصل الحلقتان البنزينيتان "A" و "B" بحلقة غير متجانسة "C" تحتوي على عنصر الأكسجين[34]. شكل - 7 - .



شكل- 07 - الهيكل الفلافونويدي

2- 3-2- أقسام الفلافونيدات:

تقسم حسب نوع التحلق، ودرجة عدم تشبع وأكسدة الحلقة C في حين يحدد نوع الفلافونيد داخل المجموعة الواحدة من خلال المستبدلات على الحلقتين A و B:

أ - **الفلافون:** يمكن للحلقة B المشار إليها سابقا أن تتواجد في الموضع 2، وإذا كانت الرابطة 2-3 غير مشبّعة ، سمّى المركب حينئذ فلافون، وتتضمن هذه المركبات مجوعات بديلة تكون في الغالب مجموعة هيدروكسيل أو ميتوكسيل وقد يحوي بناؤها على وحدات سكرية على هيئة سكر أحادي أو ثنائي أو أكثر، وقد ترتبط هذه الوحدات بذرة أكسجين المكونة لمجموعة الهيدروكسيل أو ترتبط مباشرة بإحدى ذرات الكربون للهيكل الفلافونيدي و من أشهرهذه السكريات نجد : الهكسوزات Hexoses (D-glucose، D-galactose).

والبنتوزات Pentoses (D-apioses، L-arabinose، ، D-xylose).

ب - **الفلافونول:** إذا وجدت مجموعة هيدروكسيل(OH) حرة أو مستبدلة (OR) في الموقع(3) لمركب الفلافون حيث يتم تثبيت مجموعة الهيدروكسيل في مرحلة الشالكون سمي المركب بالفلافونول وهو يشكّل نواة أساسية للعديد من المركبات الطبيعية.

تنتشر كل من الفلافونات و الفلافونولات بشكل واسع في الطبيعة إذ تمثل حوالي٪ 80 من الفلافونيدات حيث تكون الحلقة A مستبدلة بأكثر من ٪90 بواسطة مجموعة هيدروكسيل حرة في الموضعين C-5,C-7

!

أو ممثيلة أو مرتبطة بسكريات، كما أن هناك استبدالات أخرى تتم بواسطة مجموعات هيدروكسيلية حرة بنسب متفاوتة في الموقعين8-C,6-C وقد تكون مرتبطة بمثيل أو بجموعات سكرية أو بجذور أخرى كما يمكن لهذا الإرتباط أن يكون من نوع C-C.

الحلقة B تكون مستبدلة بحوالي٪ 80 في الموقع'4-C ويتم ذلك قبل مرحلة تكوين الشالكون ،أو ثنائية الإستبدال في الموقعين'4-C,'3-C بعد غلق الحلقة (C) أي بعد تكوين الشالكون، وتكون ثلاثية الإستبدال في المواقع'4-C,'3-C و '5-C بنسبة ضعيفة.أما الموقعين '2-Cو'6-C فنادرا ما تكون مستبدلة [27].

ج - الفلافانون: إذا كانت الرابطة 2-3 في هيكل الفلافون مشبعة يسمى المركب فلافانون . كما هو موضح في الشكل (8) الذي يبيّن مختلف الهياكل الأساسية للفلافونيدات.

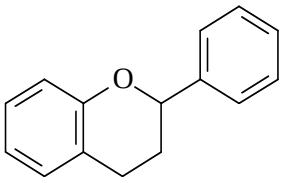
د - نيوفلافون: إذا وجد استبدال بين مجموعة الكربونيل والحلقة B في هيكل الفلافون سُمّي المركب نيوفلافون والذي تمّ عزله من عدّة أنواع للعائلة البقولية [34]. فهو يشكّل مع الإيزوفلافون الفلافونيدات الشاذّة وذلك لقلة انتشارها في الطبيعة خلافا عن الفلافونات والفلافونولات المنتشرة على نطاق واسع في العائلة البقولية [35].

هـ - إيزوفلافون : وهي لا تختلف في بنائها عن الفلافونات إلاّ باختلاف ارتباط الحلقة B حيث تتواجد في الموضع رقم 3. ويعود تاريخ إكتشاف أول إيزوفلافون formononetin كمركب طبيعي إلى منتصف القرن التاسع عشر.من جذور النبتة البقولية .*Ononis spinosa* L [36] .

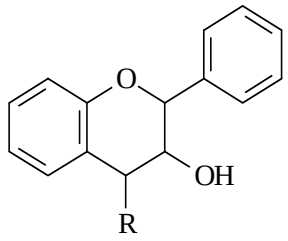
ومع نهاية 2004 تم إحصاء ما يزيد عن 1600 إيزوفلافون أغلبها مفصول من العائلة البقولية [37] التي تعتبر ثالث أهم عائلة زهرية .

كما يشهد محدودية الإيزوفلافونات عند العائلات غير البقولية إذ فصل منها أول إيزوفلافون في أواخر القرن التاسع عشر من النوع (Iridaceae) *Iris florentina* [38] . وفي ماي 2007 تم إحصاء 225 إيزوفلافون مفصول من 59 عائلة غير بقولية مع العلم أن أغلب هذه المركبات تم الكشف عنها لدى العائلة البقولية [39] .

!

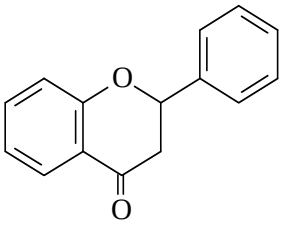


Flavane

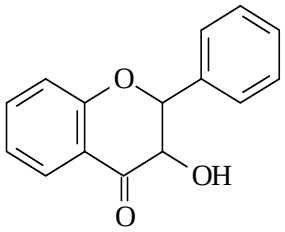


R=H : Flavan–3– ol

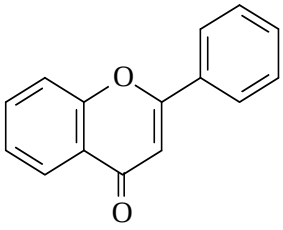
R=OH : Flavan–3,4–di-ol



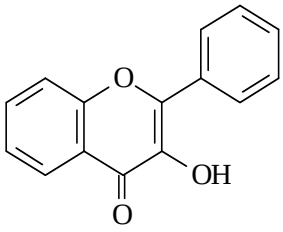
Flavanone



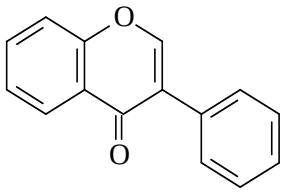
Dhydroflavonol



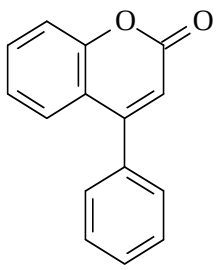
Flavone



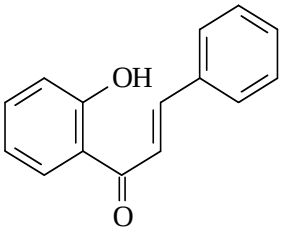
Flavonol



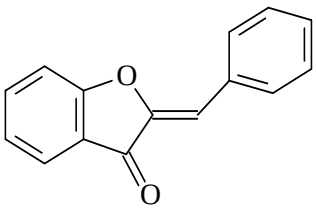
Isoflavone



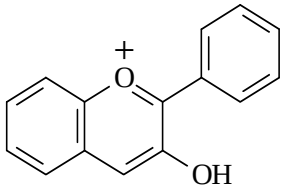
Neoflavone (4–phenyl–coumarine)



Chalcone



Aurone



Anthocyanidol

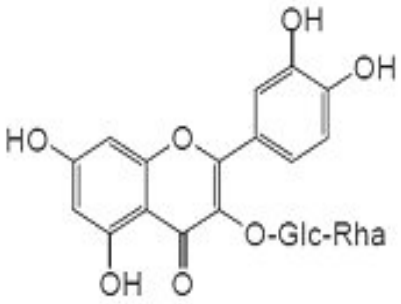
الشكل ـ 8ـ الهياكل الأساسية لمختلف الفلافونيدات[33].

!

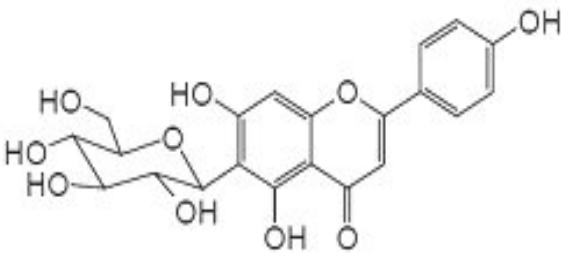
الجدير بالذكرأن الفلافونيدات تتواجد في الشكل الأجليكوني غير المستبدل بسكريات و العديد منها يوجد طبيعيا في الشكل الإيتيروزيدي [40] و هي غالبا من النوع flavone، flavonol ، flavanone ، dihydroflavonol.

مستبدلة بسكر في الموضع 3 لكن كذلك في المواقع 5 و7، حيث الشق الجليكوزيدي يكون مرتبط من الشكل (O- سكر) كما يمكن أن يكون الإرتباط من النوع (C- سكر) خاصة إذا كان الإستبدال من الموقعين 6 و 8.

ويمكن أن تكون هذه السكريات أحادية أو متعددة منها: glucose، galactose، arabinose، rhamnose، xylose، mannose.[41].



Rutine



Isovitexine

الشكل 9: فلافونويدات جليكونية

الفصل الثاني

فيتوكيمياء العائلة Thymelaeaceae

- العائلــة Thymelaeaceae:

إن اختيارنا للعائلة Thymelaeaceae كموضوع لهذا البحث يعود إلى الاستعمالات العديدة في الطب لهذه العائلة، وتعد هذه العائلة عائلة صغيرة تنتمي إلى ذوات الفلقتين وهي تتكون من 1200 نوع مقسم إلى 67 جنس.

تتوزع هذه العائلة في المناطق الاستوائية والمعتدلة حراريا خاصة في إفريقيا وتنعدم في المناطق الباردة [42].

شكل -10- خريطة توزيع العائلة Thymelaeaceae في العالم .

2 الخواص المورفولوجية العامة للعائلة Thymelaeaceae [30] :

2-1 الأوراق :

- متبادلة ونادراً ما تكون متقابلة.

2-2 الأزهار:

- مختلطة بإنتظام على شكل نوارة أو حزم .
- في الشكل الكأسي : قرص الزهرة مجوف على شكل أنبوب عميق ومن حوافه عموماً يحمل الأجزاء الزهرية.

- o البتلات تظهر وكأنها متصلة بالأنبوب، الأسدية بداخل الأنبوب والتاج شبه منعدم أولا وجود له.
- o النباتات ذات المبيض المرتفع ذات نمط بسيط ومثبتة إلى قاعدة قرص الزهرة وتمتلك 1أو 2 (ونادراً 3-8) كربلات ملتحمة.

3-2 الثمار :

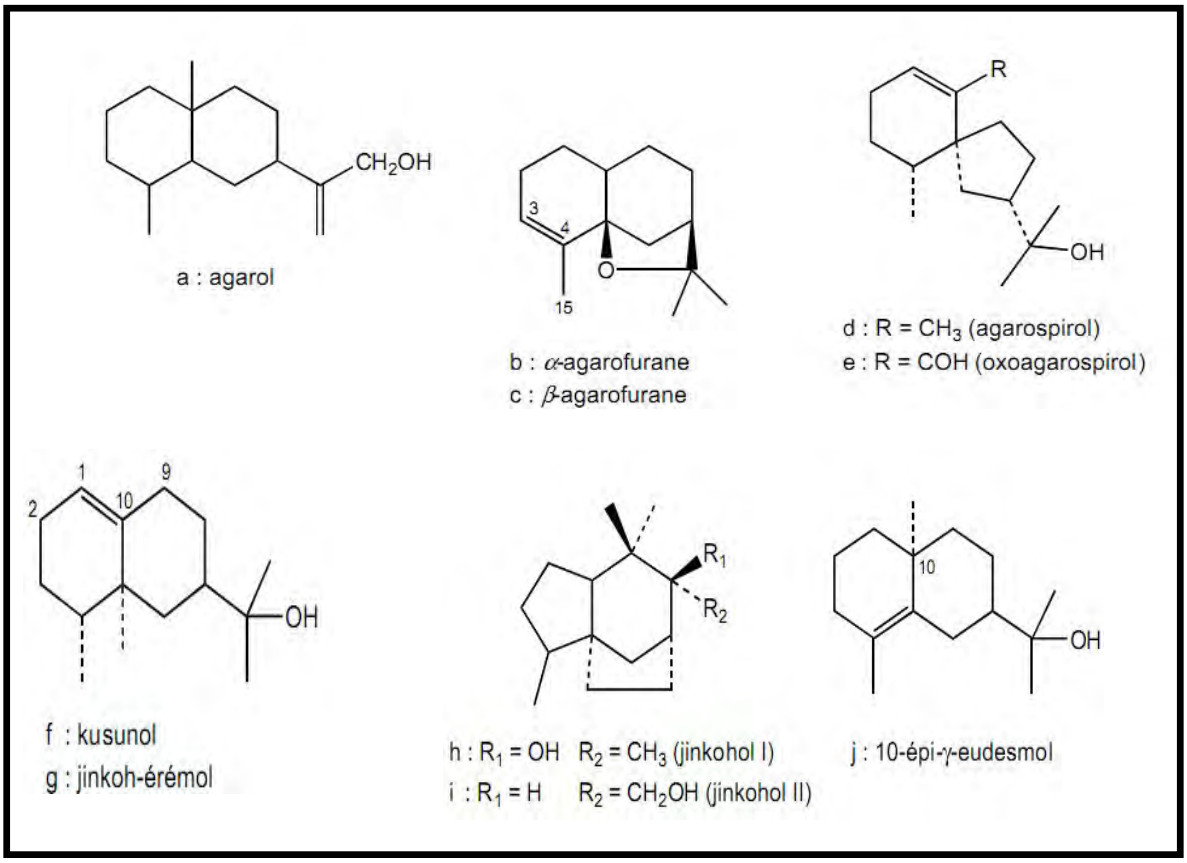
- ❖ ثمرة يابسة وحيدة البذرة.
- ❖ ثمرة عنبية.
- ❖ ثمرة منفردة النواة.
- ❖ ثمرة متفتحة لها أشكال مختلفة.
- ❖ البذرة تمتلك قليلاً من الألبومين أو قد يكون منعدما.

3- عائلة Thymelaeaceae فيتوكيميائيا:

لقد أجريت على هذه العائلة العديد من الدراسات خلال السنوات السبعين الأخيرة تم خلالها عزل عدة مركبات كيميائية تتمثل في : الزيوت الأساسية، التربينات الثنائية، الإسترات ثنائية التربين، الكومارينات، الفلافونويدات، الليجنينات، الإسترويدات[43].

3 – 1 الزيوت الأساسية:

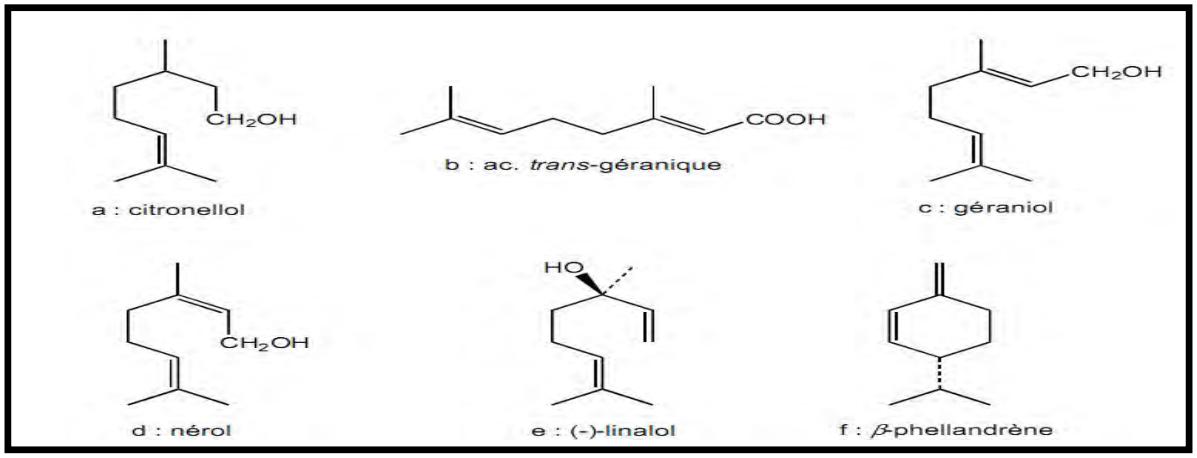
بعض الأشجار القديمة لهذه العائلة والمصابة ببعض الفطريات تصبح غنية بالزيوت الأساسية والتي يمكن تصنيع العطور والبخور وذلك في كل من الهند وباكستان وإندونوسيا وجنوب شرق آسيا وفي باكستان تم تحديد الفطر *Cytosphaera mangiferae* المسؤول عن إصابة هذه الأشجار بالفطريات وإنتاج الرائحة العطرية الجيدة. تذكر أن إصابة هذه الأشجار بالفطريات تعمل على زيادة كمية الزيوت الأساسية كما هو الحال في نباتات *A. agallocha* حيث أن العينات المصابة بالفطريات تكون غنية بالسيسكوتربينات الأكسيجينية بنسبة 0,4 % من الزيوت الأساسية ، أما الغير مصابة منها فتكون بنسبة 0,08%، وأثبتت الدراسات لكل من النبتتين *Aquilaria agallocha* و *Aquilaria malaccensis* أن المركب الأكثر وفرة هو agarol، المركبات الأقل وفرة هي *α,β-agarofurane* ، *agarospirol* ، *oxoagarospirol , kusunol, jinkoh- érémol,* و I, II *jinkohols* ، المبينة في الشكل - 11 - [44].



شكل - 11 - بعض الزيوت الأساسية في عائلة Thymelaeaceae

3 – 2 التربينات الأحادية:

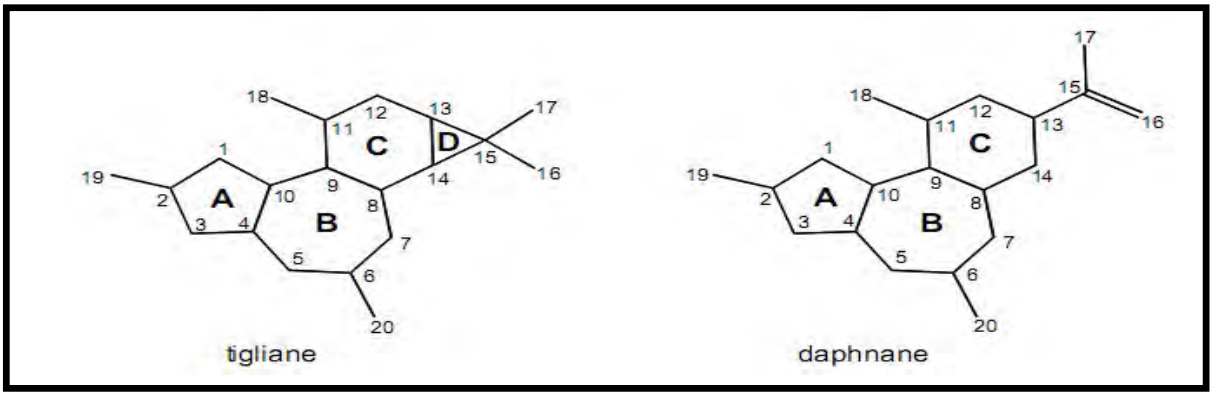
يعزى امتلاك هذه العائلة للعديد من النباتات التي تستخدم كعطور أو بخور إلى إحتوائها على العديد من الزيوت العطرية ومنها التربينات الأحادية ، المبينة في الشكل - 12- [45،46،47].



شكل - 12- التربينات الأحادية

3 – 3 التربينات الثنائية:

تعتبر المركبات الأكثر تمييزاً لهذه العائلة، ويمكن أن تتواجد في جميع أجزاء النبتة، الطبيعة الكيمائية للتربينات السامة التي توجد في هذه العائلة لم تكن معروفة منذ 30 سنة، وبالرغم من تنوع صيغ هذه المركبات إلا أن معظمها مشتقة من الهيكل الأساسي للمركبين daphnan، tigliane، المبينة في الشكل - 13- [48] .

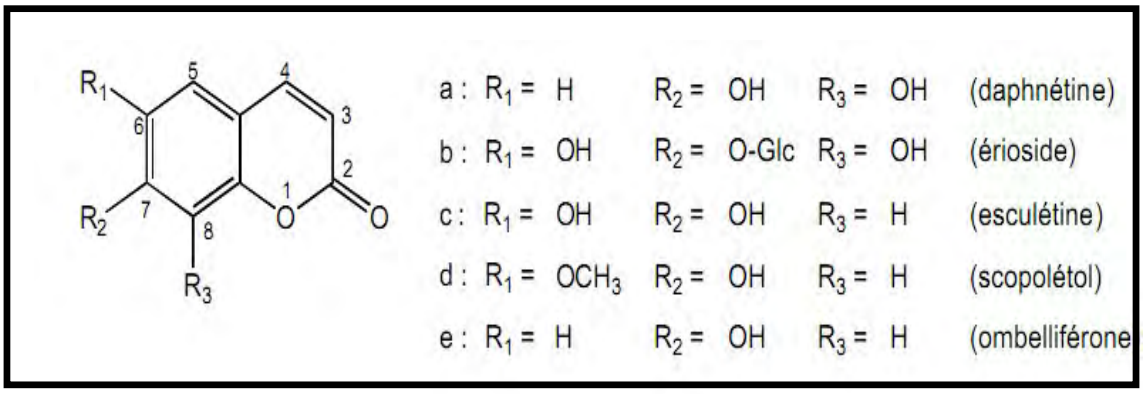


شكل - 13- التربينات الثنائية.

3 – 4 الكومارينات:

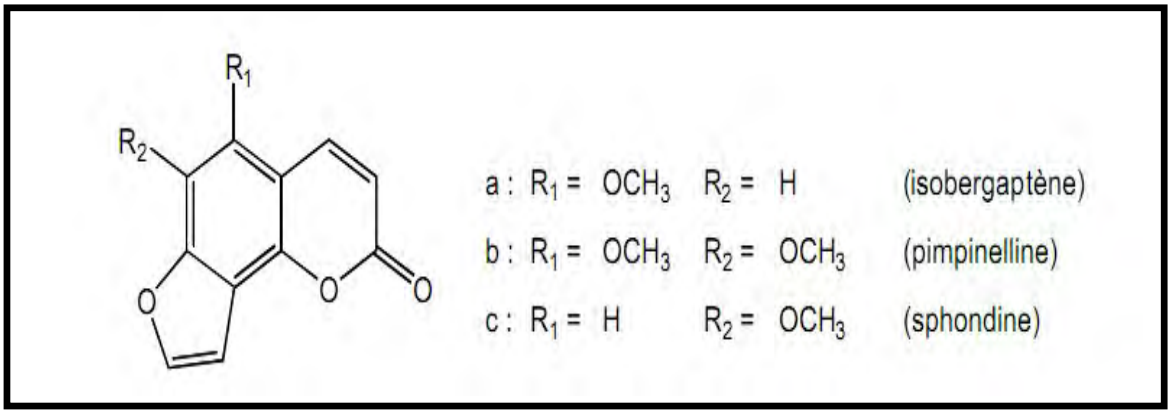
الكومارينات هي الأخرى من المركبات المهمة في هذه العائلة وتوجد على هيئة كومارينات بسيطة كما أنها توجد على شكل كومارينات ثنائية وثلاثية عن طريق رابطة كربونية أوعن طريق رابطة إيثيرية أو على شكل dibenzofuranique.

3 – 4 – 1 كومارينات بسيطة، المبينة في الشكل - 14 - :



شكل- 14 - كومارينات بسيطة[3،49،50].

3 – 4 – 2 كومارينات بسيطة ذات حلقة فيورانية، المبينة في الشكل – 15– :

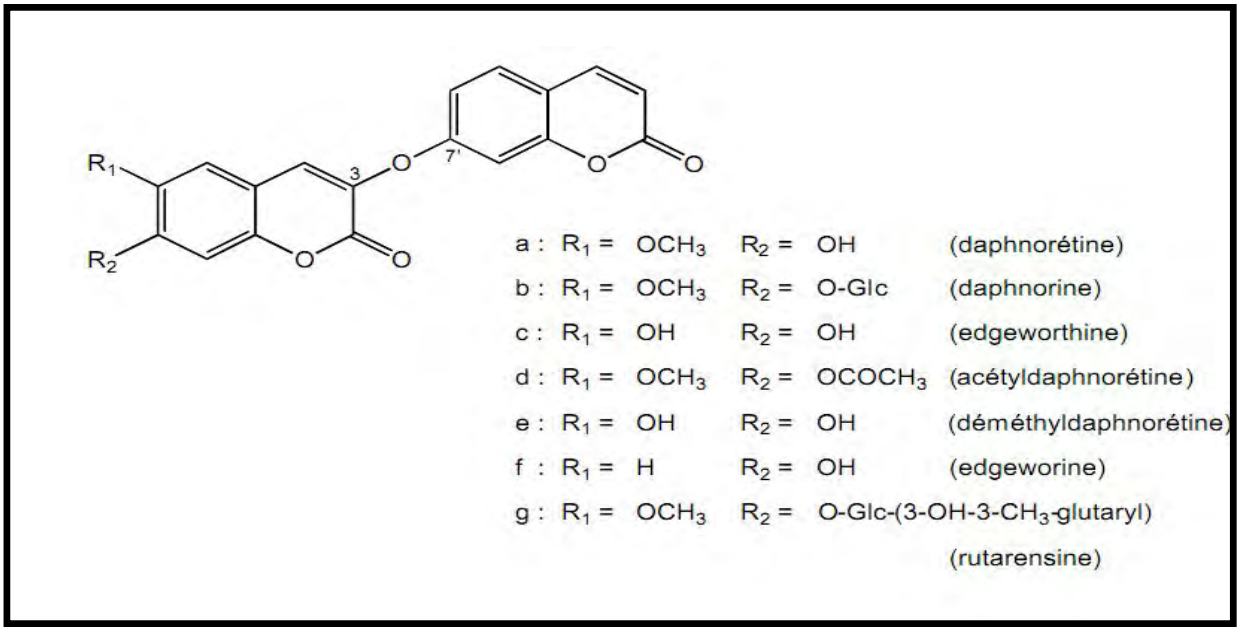


شكل – 15– كومارينات بسيطة ذات حلقة فيورانية[52،51].

3 – 4 – 3 كومارينات ثنائية :

وتاريخياً أول كومارين ثنائي فصل من هذه العائلة في عام 1936 هو مركب daphnorétine

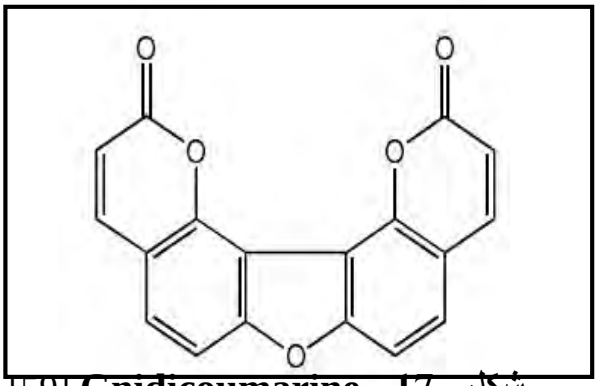
وذلك من النبتة *Daphne mezereum* [53] والشكل التالي يبين بعض الكومارينات الثنائية، المبينة في الشكل - 16 - [58، 57،56،55،54] :



شكل - 16 - كومارينات ثنائية .

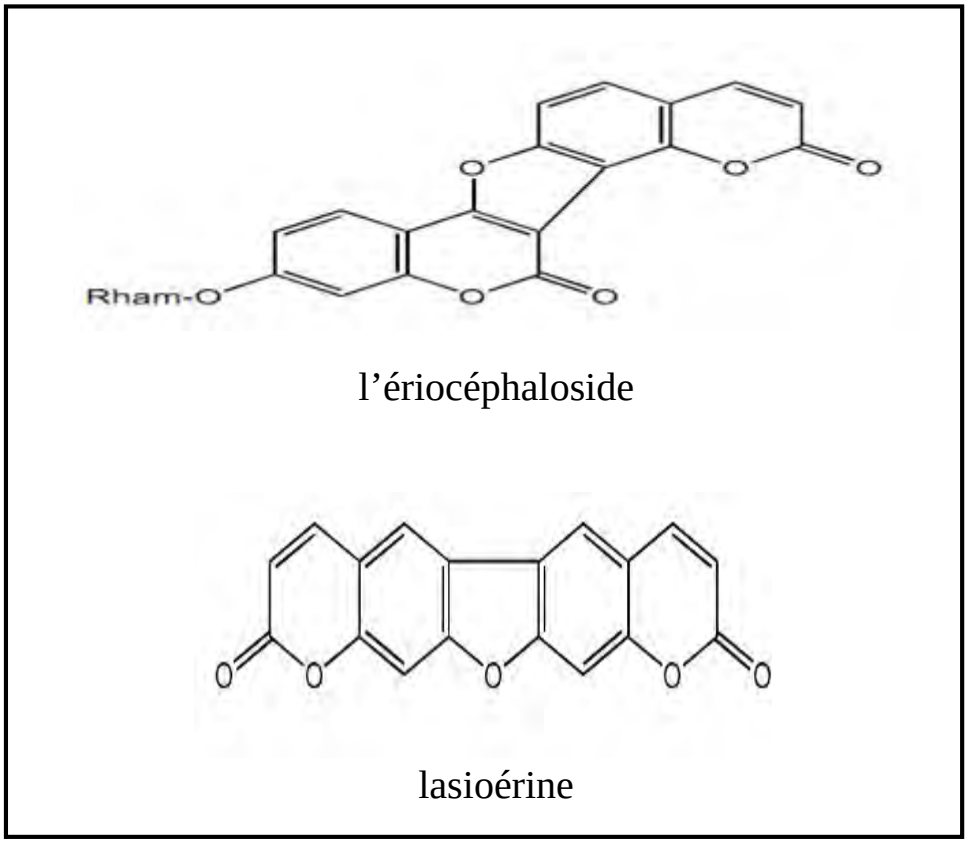
3 – 4 – 4 كومارينات على شكل dibenzofuranique :

كومارين تم فصله من *Gnidia lamprantha* المبين في الشكل - 17 - :



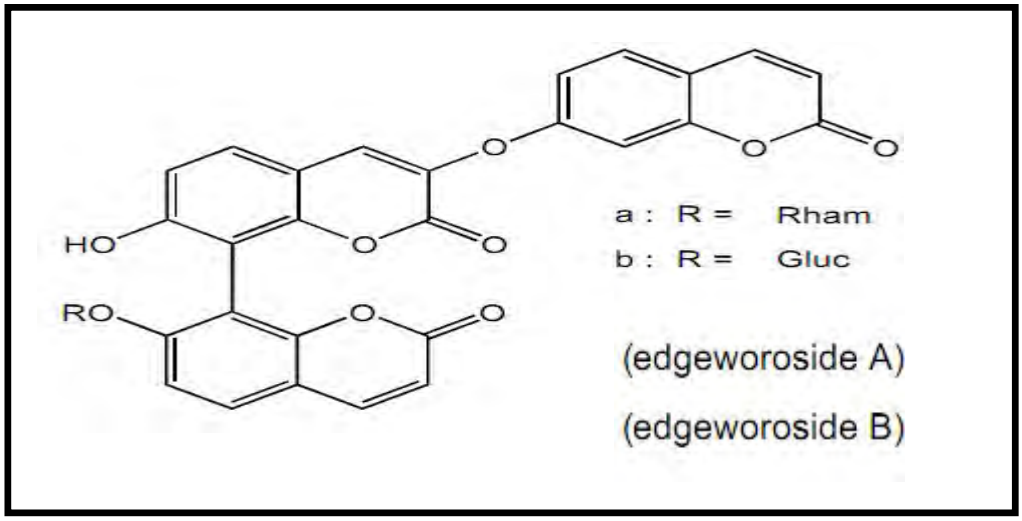
شكل - 17- Gnidicoumarine [59].

Dibenzofuraniques تم فصلهما من *Lasiosiphon eriocephalus*، مبين في الشكل - 18 -:



شكل - 18- كومارينات على شكل dibenzofuranique[61,60] .

3 – 4 – 5 كومارينات ثلاثية، المبينة في الشكل - 19 -:



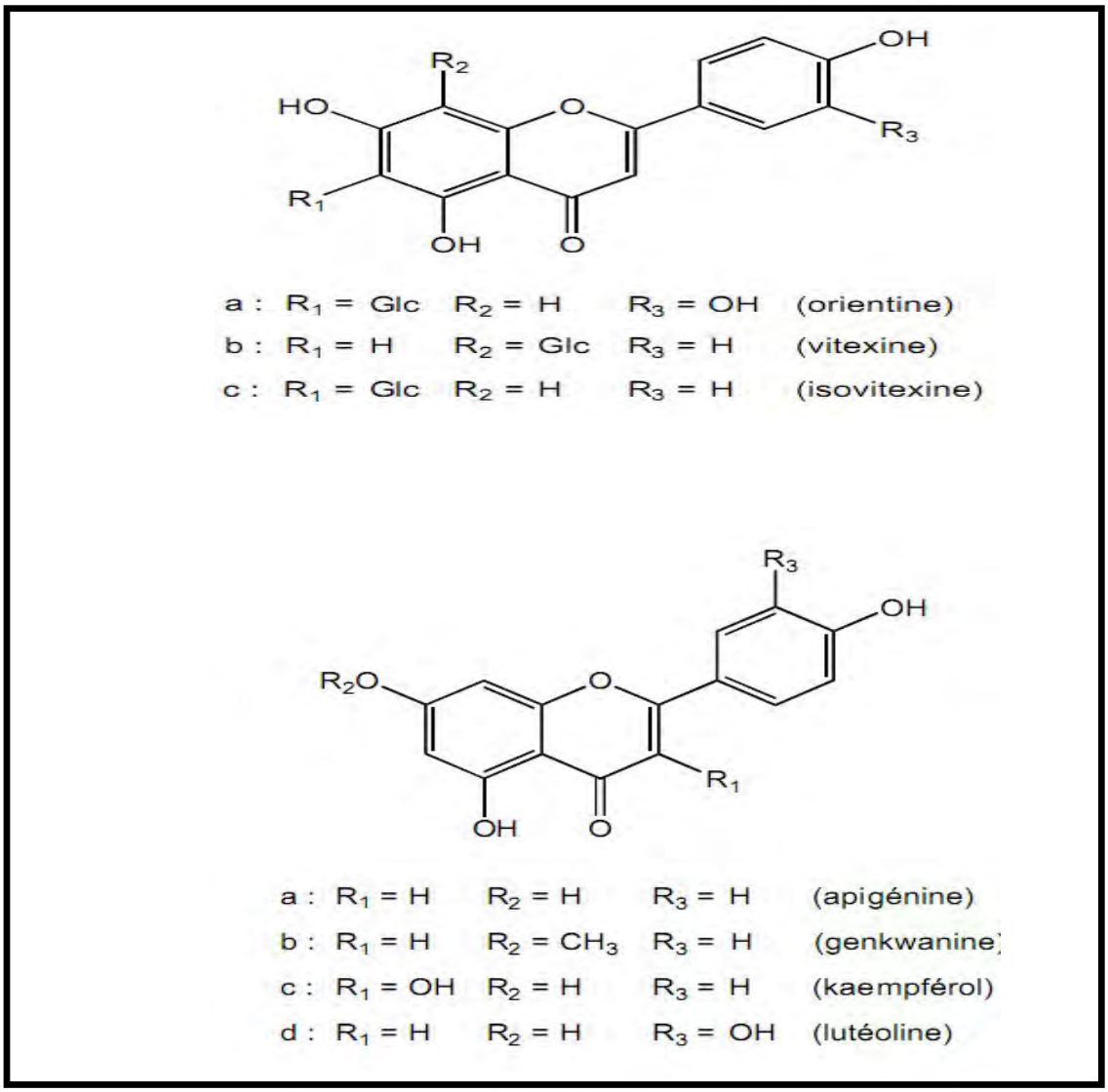
شكل - 19- كومارينات ثلاثية[62،63].

3 ـ 5 الفلافونويدات:

تتميز هذه العائلة بإحتوائها على flavones، flavonols، flavanones، C- biflavonoides glycosylflavones.[64]

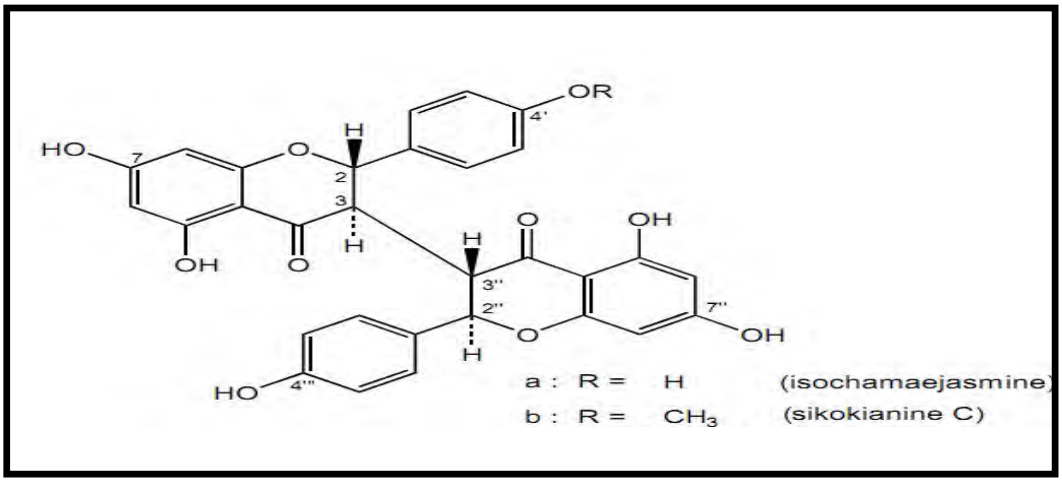
والفلافونويدات الأكثر شيوعا في هذه العائلة هى من نوع ا لــ méthylés،

O-glycosylés لكل من apigénine، genkwanine، kaempférol، lutéoline، المبينة في الشكل - 20 -[42].



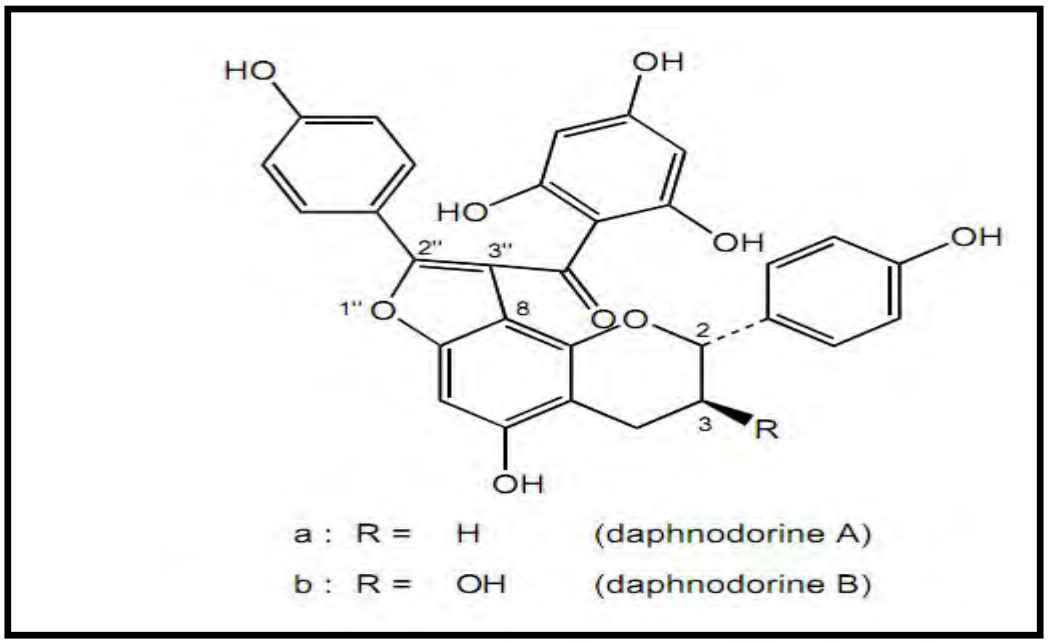
شكل – 20- الفلافونويدات الأكثر شيوعا في العائلة Thymelaeaceae.

فلافونويدات ثنائية تم فصلها من *Wikstroemia sikokiana*، المبينة في الشكل - 21 -:



شكل - 21- فلافونويدات ثنائية[65،66].

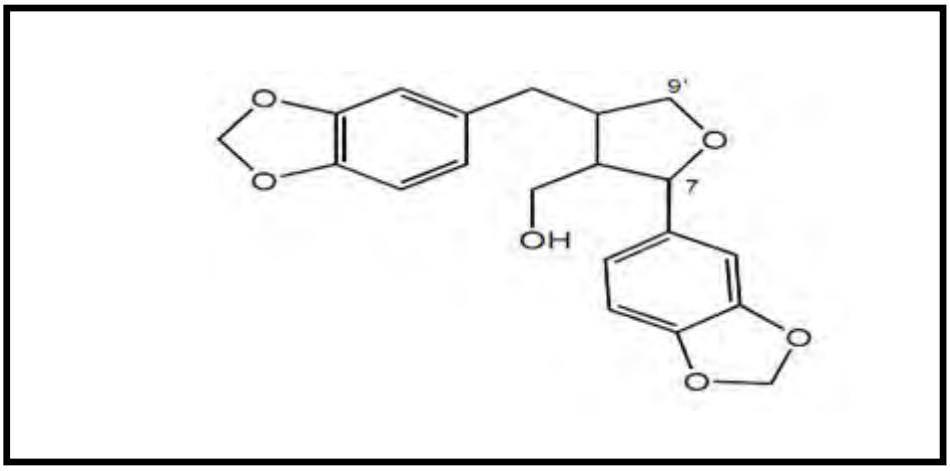
فلافونويدات ثنائية من نوع furanobiflavonoides فصلت من *Daphne odora Thunb*، المبينة في الشكل - 22 -:



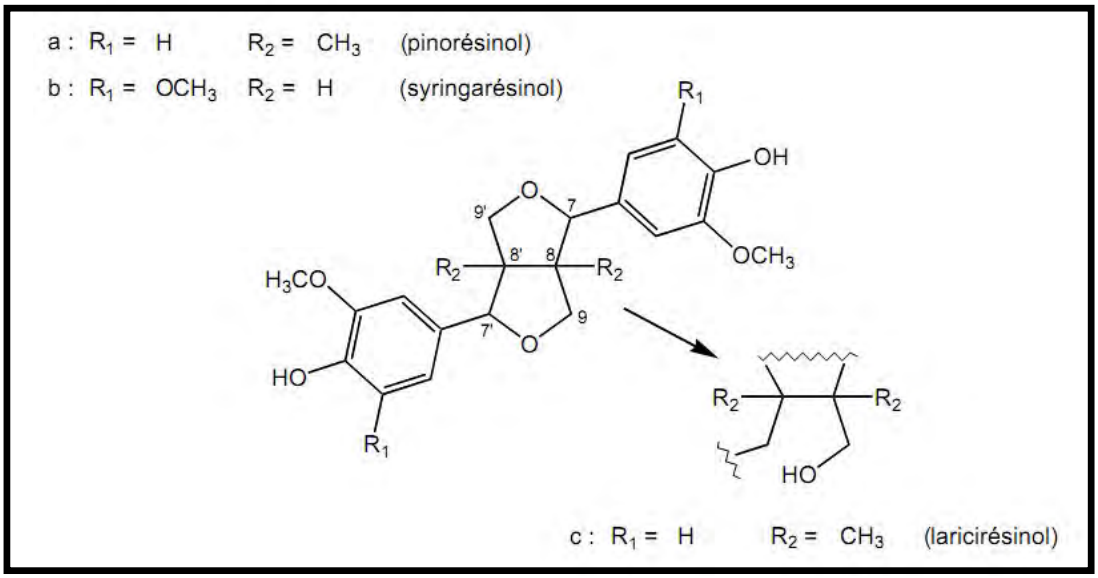
شكل - 22- furanobiflavonoides [67].

3 – 6 الليجنانات:

الليجنانات المتواجدة في العائلة تتواجد على شكل ليجنان ذو حلقة فيورانية[23]أو أكثر[24]لمبينة في الشكلين - 23 - 24- :

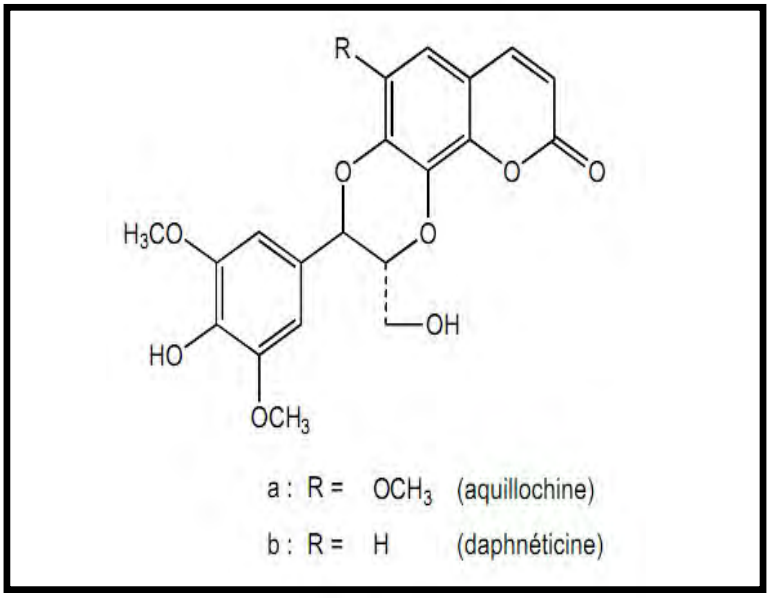


شكل - 23- ليجنان ذو حلقة فيورانية **dihydrosésamine**



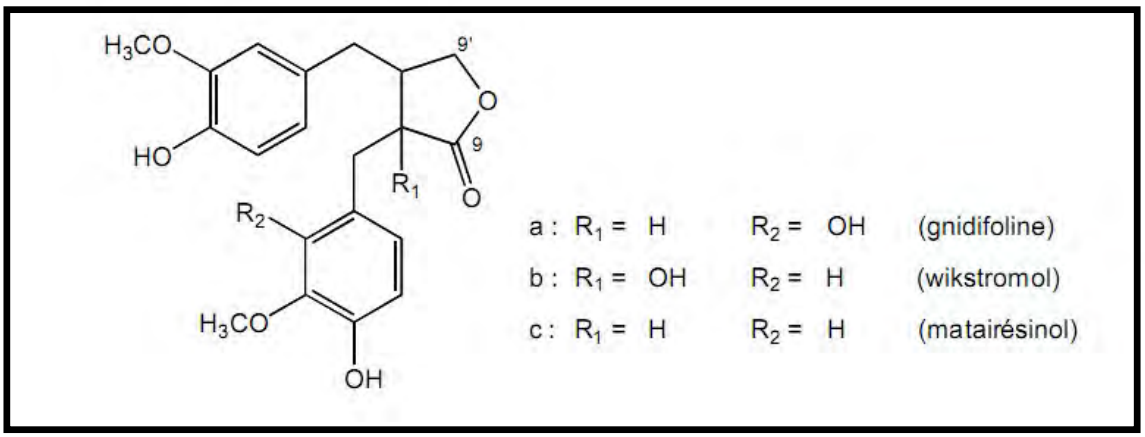
شكل - 24- ليجنان بأكثر من حلقة فيورانية.

كما تتواجد مرتبطة مع مركبات أخرى كالكومارينات، المبينة في الشكل ـ 27 ـ:



شكل ـ 25ـ ليجنان كوماريني[24،68].

كما تتواجد على شكل ليجنانات لاكتونية، المبينة في الشكل ـ 26 ـ:



شكل ـ 26ـ ليجنانات لاكتونية [70,69,25].

4 ـ الجنس *Thymelaea*:

يشمل حوالي 31 نوعاً *في العالم* [71]:

- *Thymelaea antiatlantica* Maire
- *Thymelaea aucheri*
- *Thymelaea broteriana* Cout.
- *Thymelaea calycina* (Lapeyr.) Meisn.
- *Thymelaea cilicica*
- *Thymelaea coridifolia* (Lam.).
- *Thymelaea dioica* (Gouan) All.
- *Thymelaea granatensis* Pau ex Lacaita
- *Thymelaea gussonei*
- *Thymelaea hirsuta* (L.).
- *Thymelaea lanuginosa* (Lam.) Ceballos & C.Vicioso
- *Thymelaea lythroides*
- *Thymelaea mesopotamica*
- *Thymelaea microphylla* Coss et Dur
- *Thymelaea myrtifolia*
- *Thymelaea nitida* (Vahl).
- *Thymelaea passerina* (L.) Coss. & Germ.
- *Thymelaea procumbens* A.Fern. & R.Fern.
- *Thymelaea pubescens* (L.) Meisn.
- *Thymelaea putorioides*
- *Thymelaea ruizii* Loscos ex Casav.
- *Thymelaea salsa*
- *Thymelaea sanamunda* All.
- *Thymelaea sempervirens*
- *Thymelaea subrepens*
- *Thymelaea tartonraira* (L.) All.
- *Thymelaea tinctoria* (Pourr.)
- *Thymelaea velutina* Meiss.
- *Thymelaea virescens*
- *Thymelaea villosa* (L.) l.

أما بالنسبة لتواجد الجنس *Thymelaea* في الجزائر فيوجد 8 أنواع هي:

T . velutina, T . virgata, T . nitida, T . virescens, T. microphylla, T. Meisn, T. hirsuta, T. passerine.[72]

وقد أظهرت الدراسات إحتواء أنواع جنس *Thymelaea* على الفلافونويدات والكومارينات و التربينات الثنائية بالإضافة إلى مركبات أخرى كما هي مبينة في الجدول 01.

<u>جدول - 01-</u> يبين بعض المركبات المفصولة من جنس *Thymelaea* :

المركبات المفصولة	الجزء المستخدم	النوع
flavones, terpènes et autres [73,74] thymélol ((C H O)) [75] stigmasterol, β-sitosterol, alcool aliphatique $C_{12}H_{22}O$, lactone $C_{19}H1_8O$ [76] daphnoretine, β -sitosterol-β - D-glucoside [77] alcanes en C27 à 31, alcanols en C22, 24, 26 et 28, -sitostérol et campestérol [78] daphnorine, daphnorétine, daphnine, daphnétine, daphnétine-glucoside, ombelliférone, scopolétine et esculétine (coumarines) [79] 2-vicénine (C-flavone) [80] tiliroside (3-p - coumaroylglucosylkaempférol) (flavanol) [81] lupéol, β-sitostérol, phytol, β-amyrine, bétuline, erythrodiol, cholestérol et lanostérol [82] 5,12-dihydroxy-6,7-époxy-résiniféronol [83] proteines [84] gnidicine, gniditrine, genkwadaphnine, 12-O - heptadécenoyl-5-hydroxy-6,7-époxy- résiniféronol-9,13,14-orthobenzoate et 12-O - buténYl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol- 9,13,14-orthobenzoate (diterpènes daphnane)[85] daphnorétine (éther de dicoumaryl). [86] Tanins. [87]	الأوراق _ _ _ الأوراق الجذور	*Thymelaea hirsuta* (L.)
pentacosane, triacontanol, sitostérol, stigmastérol, β-amyrine, ombelliférone et scopolétin. [88]	الجزء الهوائي	*Thymelaea passerina* (L.) Coss. & Germ.
orientine, isoorientine, vitexine, 2-vicénine, kaempférol, daphnorétine, genkwanine, 5-o- D-genkwanine, primevérosyl (flavone- coumarine). [89] Lipides, sucres et amidon. [90]	الجزء الهوائي الأوراق والأغصان والجذور	*Thymelaea tartonraira* (L.) All.

5 ـ التصنيف النظامي للنبتة .*Thymellaea microphylla* Coss. *et* Dur : [71]

Phylum	Spermatophyta	شعبة
Sub- Phylum	Angiospermes	تحت شعبة
Sub-Classe	Dicotyledonae	الصف
Sub- classe	Rosidae	تحت الصف
Ordre	Malvales	الرتبة
Family	Thymelaeaceae	العائلة
Sub-family	Thymelaeoideae	تحت العائلة
Tribe	Gnidieae	القبيلة (الفصيلة)
Genus	*Thymelaeae*	الجنس
Especie	*T.microphylla* Coss. et Dur.	النوع

6 ـ الخواص المورفولوجية للنبتة.*Thymellaea microphylla* Coss. et Dur :

تسمى المثنان وهو شجيرات صغيرة طولها لا يتعدى المتر، متفرعة وأغصانها كثيفة متشابكة، السوق الحديثة مرتبة مبيضة اللون لوجود زغبات صوفية ناعمية تكسو السطح الخارجي.

الأوراق حرشفية صغيرة خطية طولها لا تتعدى

7 ميليمتر، أزهارها بيضاء مصفرة تتوزع على طول الساق ولا تتجمع نورات محددة[72].

الفصل الثالث

الفعالية البيولوجية

- **مدخل:**

أظهرت الدراسات والأبحاث أهمية العائلة التيميلية والجنس *Thymelaea* بإمتلاكهما خواص مضادة للبكتيريا والفطريات وخواص أخرى شجعتنا على دراسة الفعالية البيولوجية للنوع *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.

1 ـ بعض الإستخدامات التقليدية للعائلة Thymelaeaceae :

1 ـ 1 الإستخدامات الطبية :

في الطب الشعبي العديد من الثقافات تستخدم هذه العائلة لتحضير الأدوية وعلاج العديد من الأمراض نظراً لإحتوائها على أنواع مختلفة من المركبات، وعلى سبيل المثال تستخدم كمقيئات ومسهلات وفي علاج البثوروالأمراض الجلدية وذلك استخداماً للتأثير السمي لمركبات التربينات الثنائية السامة التي تحتويها نباتات هذه العائلة، وفي هذه التطبيقات تستخدم الجرع بكميات قليلة ومنخفضة حتى تكون الفعالية أفضل ونسبة التأثيرات الجانبية أقل. الجدول-2- [42،91].

1 ـ 2 الإستخدامات غير الطبية :

تنتشر هذه العائلة في أنحاء العالم ولديها استعمالات وأهمية اقتصادية في البلدان المتواجدة فيها حيث أن بعض أنواع العائلة تستخدم لإنتاج مواد البناء أو الزينة ،والعديد من الأنواع التي لديها لحاء ليفي تصنع منها الأوراق والحبال، كما أن بعض الأنواع المصابة بالفطريات تباع كروائح أو بخور. الجدول-3- [29 ،91 ،92].

جدول -02- يبين بعض الإستخدامات الطبية لنباتات العائلة Thymelaeaceae:

النبات	الجزء المستخدم	الإستخدام	البلد
***Aquilaria agallocha* Roxb**	الأغصان	منشط ،مثير جنسي	الهند،الصين
Arthrosolen chrsyanthus	الجذور	مستخلص مضاد للملاريا والروماتيزم	تنزانيا
***A. gymnostachys* C.A. Mey**	الأوراق	دخان لألم الرأس	افريقيا
***A. polycephalus* C.A. Mey.**	الجذور	مضاد للربو	افريقيا
***Craterosiphon scandens* Enlg**	الجذور	مجهض	نيجيريا
C. quarrei Staner	الأوراق والساق	ألم الظهر،إلتهاب المفاصل،مقوي	افريقيا
***Daphne gnidium* L**	اللحاء	التهاب الكبد	تونس
***Dicranolepis lacinata* Gilg.**	اللحاء	منشط	افريقيا
D. persei Cummins.	اللحاء	اظطراب الكبد	افريقيا
D. persei Cummins	الزهور	ملين	غانا
D. persei Cummins	الفاكهة	مطهر	غانا
D. persei Cummins	الجذور	مستخلص مطهر	ساحل العاج
D. persei Cummins	البذور	مستخلص مطهر،مساعد للتوليد	غانا
***Gnidia buchananii* Gilg**	الجذور	مستخلص مضاد لإلتهاب الشعب الهوائية ،ألم البطن	افريقيا
***G. capitata Linn.* F**	الجذور	دخان مضاد الربو،نقيع مضاد للأمراض التناسلية ،مستخلص مضاد لإلتهاب اللوزتين	زيمبابوي
***G. chrysantha* Gilg**	الجذور	تقليص فتحة المهبل	زيمبابوي
***G. chrysantha* Gilg**	الجذوروالأزهار	مجهض ، مطهر	افريقيا
***G. glabra* H.H.W. Pearson**	الجذور	بودر مخلوط مع حليب الجمل كمسهل،أومع مرق اللحم كمقيئ	الصومال
***G. glauca* Steud**	الجذور	مستخلص لعسر الهضم	افريقيا
***G. goetzeana* Gilg**	الجذور	ممضوغ كمضاد للسعال	افريقيا
***G. involucrata* Steud. Ex A**	الجذور	مسهل طارد للدود	اثيوبيا
***W. viridiflora* Meissn.**	اللحاء	مطهر	مدغشقر

جدول -03- يبين بعض الإستخدامات الغيرطبية لنباتات العائلة Thymelaeaceae:

النبات	الجزء المستخدم	الإستخدام	البلد
***Aquilaria agallocha* Roxb.**	الأغصان اللحاء	بخور،أغصان عطرية،منحوتات صناعة الورق	الهند،الصين
***A. malaccensis* Lamk.**	اللحاء الأغصان	صناعة الحبال بخور	الهند،اندونيسيا
***Dais glaucescens* Decne.**	اللحاء	صناعة الخيوط	افريقيا،مدغشقر
***Daphne* spp.**	اللحاء	سم لصيد السمك صناعة الورق والحبال	افريقيا، الصين، الهند،دول الأبيض المتوسط
***D. mezereum* L.**	الفاكهة	بديل للفلفل الأحمر	اوروبا
***Daphnopsis brasiliensis* Mart. et Zucc.**	اللحاء	صناعة الورق	البرازيل
Dicranolepis persei Cummins.	الفاكهة	للأكل	غانا
***Dirca pallustris* L.**	اللحاء	يستخدمه الهنود لصناعة النعال،أوتار القوس،السلال	هنود أمريكا
***Edgeworthia* spp.**	اللحاء	صناعة الورق	اليابان، النيبال، التشيك
***Gnidia* spp.**	اللحاء	صناعة الملبوسات صناعة الورق والحبال	افريقيا ،مدغشقر
***Gnidia* spp**	المستخلص	سم للأسهم،سم لصيد السمك، يستخدم في الجرائم	افريقيا
***G. kraussiana* Meissn**	الأغصان	صناعة الألواح	اليابان،ماليزيا
***Gonystylus* spp.**	الأغصان	أغصان عطرية	اندوسيا

2- الفعالية البيولوجية للجنس *Thymelaea*:

أشارت الدراسات المتعلقة بالفعالية البيولوجيية لبعض نباتات الجنس *Thymelaea* على إظهار فعالية ناجعة ضد كثير من الأمراض أمكن حصرها منها:

جدول - 04 – يبين الفعالية البيولوجية للجنس *Thymelaea*:

النوع	الإستخدام	المرجع
Thymelaea hirsuta (L.)	مضاد للسكري	[93]
Thymelaea lythroides	مضاد للفطريات	[94]
Thymelaea lythroides	لالتهاب البروستاتا وآلام المعدة	[95]

3- أهمية الفعالية البيولوجية:

لاشك في أن دراسة النباتات الطبية وتحديد فعاليتها في تثبيط البكتريا والفطريات هي طريقة علمية فتحت المجال للاستفادة من الدراسات السريرية من هذه النباتات الطبيعية، وهناك الكثير من النباتات المعتمد علميا بفعاليتها في تثبيط جراثيم في معالجة مرض الالتهابات مثل استخدام مستخلص الثوم *Allium sativum* L. ومستخلص حبة البركة المائية والكحولية في معالجة مرض التهاب المجاري البولية وفعاليتهما في تثبيط جراثيم *E.coli*، والجراثيم العنقودية *Staphylococcus aureus* كما أن مقاومة البكتريا والفطريات للمضادات الحيوية زاد من أهمية البحث عن مضادات حيوية جديدة أو معالجات جديدة تعتمد على ما هو موجود في الطبيعة، ويُعد نشوء المقاومة عند هذه الجراثيم تهديد ينذر بالخطر

والتي لم تكشف الدراسات عن الآليات الخلوية والوظيفية المعقدةللكائنات الحية المقاومة،والتي نقصت حساسيتها للمضادات الحيوية بشكل ملحوظ بينما حافظت على درجتها الممرضة. إن دراسة تأثير المضادات الحيوية تخص "الكائن الحي" المسبب للمرض وليس "المريض" لذلك ينبغي وضع حد لما تعرف التداخلات المعقدة بين المضادات الحيوية من جهة والأحياء الدقيقة والمريض من جهة أخرى.

رغم النجاح الكبير الذي تمَّ تحقيقه من اكتشاف المضادات الحيوية وتطور الصناعات الدوائية، والتغلب على الأمراض الناتجة عن الإصابات الميكروبية، فإن العديد من الأمراض الجرثومية لا تزال تنتظر علاج جديد أكثر فاعلية بسبب تطور مقاومة الجرثومية للمضادات الحيوية وتعدد مقاومتها بسبب تعرضها المستمر للمضادات الحيوية وسوء استعمالها.

4 ـ خصائص السلالات البكتيرية المختبرة:

4 – 1 السلالات Gram-negatives:

4 – 1 – 1 *Escherichia coli*:

عزلت لأول مرة من قبل العالم Escheriche عام 1885م

- بكتيريا عصوية متحركة.
- تعيش عند درجة حرارة مثالية 37 ° .
- تعيش في الأنبوب الهضمي للإنسان والحيوان.
- ذات أبعاد 2-3 ميكرومتر طولاً و 0,6 ميكرومتر عرضاً.
- تنتج الأندول والغاز إنطلاقاً من التريبتوفان.
- لا تنتج H_2S.

4 – 1 – 2 *Klebsela pneumonia*:

- غير متحركة.
- تتميز خلاياها بوجود المحفظة.
- تنتج الغاز أثناء تخمر الجلوكوز.
- تتواجد في الأنبوب الهضمي للإنسان والأنبوب التنفسي للحيوان.
- توجد أيضاً في الماء والتربة.

4 – 2 السلالا ت Gram-positives :

4 – 2 – 1 *Staphylococcus* :

- غير متحركة.
- غير متجرثمة وخالية من المحفظة.
- قطرها 1 ميكرومتر.

4 – 2 – 2 *S.aureus* :

- تتواجد على الجلد واللعاب والأمعاء للإنسان والحيوان ، كما تتواجد في التربة والهواء.
- هوائية إختياريا.
- تنمو عند درجة حرارة مثلى 10- 42° م.
- قطرها 1 ميكرومتر.
- تسبب تعفن دموي وإلتهاب السحايا.
- مقاومة للحرارة والجفاف.
- تموت حال تعرضها للمطهرات بما في ذلك الفينول.
- ذات مستعمرات ذهبية.
- تفرز أنزيم التخثر Coagulasse.

4 – 2 – 3 *S.blanc*:

- هوائية إختيارياً.
- غير متجرثمة.
- تكون مستعمرات بيضاء صغيرة بحجم 1,2 ملم نتيجة إفرازها لصبغة بيضاء عند زرعها في وسط صلب.
- تعيش في المجاري التنفسية العليا وعلى مخاطيات وبشرة الإنسان و الحيوان.
- تنتمي إلى صنف المكورات Cocci.

4 – 2 – 4 *Pseudomonas aerogenosa*:

- تم عزلها من طرف العالم Gessard سنة 1882 تنتشر في كل مكان : التربة، الماء الهواء وتوجد في الأنبوب المعوي بصورة طبيعية للإنسان والحيوان تعرف بمصاحبتها للعديد من الآفات التقيحية (الجروح-الحروق) بالإضافة إلى التهابات القنوات الكلوية وهي تتميز بما يلي :
  - متحركة وتمتلك أهدابا قطبية.
  - تنتج السترات .
  - لا تنتج الأندول .
  - تنتج اليوريا . [96].

5- فطريات *Aspergillus niger* :

- هي فطريات أسكية دنيا ، جهازها الكونيدي متميز الى سلاسل كونيدية موجهة في كل الاتجاهات. [97]

6- الفعالية المضاده للاكسدة:

6-1 ماهي مضادات الاكسدة:

هي نظام دفاعي لحماية خلايا الجسم من أضرارها ، وتتكون مضادات الأكسدة من بعض الإنزيمات التي يصنعها الجسم وبعض العناصر الغذائية التي يتناولها الإنسان ضمن طعامه اليومي وتعمل عناصر مضادات الأكسدة بإضافة كم هائل من الالكترونات إلى الأوعية الدموية مما يحقق التوازن للجذورالحرة،

ومضادات الأكسدة تزيل الجذور الحرة بعد تكوينها ومقاومتها وتحويلها إلى صورة أخرى فاقدة للمقدرة على الأكسدة.

الجذور الحرة عبارة عن جزئ أو ذرة تحتوي في المدار الخارجي على إلكترون أعزب ($O^{\bullet}$، OH^{-}، H_2O_2، $N^{\bullet}$، $HOO^{\bullet}$، ROO^{-}، RO^{-}، $NO^{\bullet}$، $ONOO^{-}$، ClO^{-})، وهذا يجعلها تحاول استعادة الإلكترون المفقودة من مركبات الجسم الأخرى وبذلك تسبب تلف لخلايا الجسم عن طريق تكسير الحاجز الواقي الذي يحيط بالخلايا وذلك من خلال تفاعلها مع الدهون الفسفورية للأغشية الخلوية. مما يؤدي إلى إصابة كل شيء بالضرر بدءاً بالحامض النووي وحتى طبقة الكولاجين بالجلد .

6-2- أهمية مضادات الاكسدة :

كلما زادت الجذور الحرة فإن قدرتها على إختراق غشاء الخلية ونفاذها للداخل يكون أكبر وهنا يكون الضرر الذي تلحقه هذه الشوارد أكبر وتصل الى الميتوكوندريا والكروموسومات أهم مكونات الخلية وتدمرها ،وبالرغم من أن الخلية لديها حماية ذاتيه وخط دفاعي لإفرازها مضادات الاكسدة الذاتية ولكن زيادة الجذور تضعف تلك القدرة من مضادات الاكسدة الذاتية والإنزيمات التي تفرزها الخلايا وهنا تبرز أهمية مضادات الاكسدة.

3-6- الأسباب البيئية المسببة لتكوين الجذور الحرة :

- أشعة التأين الصادرة من الصناعة .
- التعرض لأشعة الشمس والأشعة الكونية .
- أشعة X.
- الأوزون ،عوادم السيارات ، المعادن الثقيلة (الزئبق ،الكاديوم ،الرصاص، الكيماويات الأخرى).
- التدخين .
- تعاطي المشروبات الكحولية .
- الدهون غير المشبعة والكيماويات التي تلوث الماء والهواء والغذاء ومبيدات الحشرات.

4-6- أنواع مضادات الأكسدة :

مضادات الأكسدة نظام دفاعي ضد الأكسدة التي تسببه الجذورالحرة لحماية الخلايا من أضرار هذه الذرات وهي تشمل مايأتي:

مضادات الأكسدة الأنزيمية :

- Glutathione peroxydase.
- Catalase.
- Super oxide dismutase.

مضادات الأكسدة غير الأنزيمية :

- Glutathione,
- Thioredoxines.
- Métal cathioneines.
- vitamines A, C, E.

6-5- أضرار الجذور الحرة:

- زيادة سرعة أعراض الشيخوخة.
- أمراض القلب والأوعية الدموية.
- أمراض الجهاز الهضمي.
- أمراض العيون واضطرابات الرؤية.
- أمراض الكلى.
- الأمراض الجلدية.
- الاضطرابات العصبية.
- أمراض الكبد. [98،99]

الجزء العملي

!!

!!

الفصل الأول

!!

الطرق و الوسائل

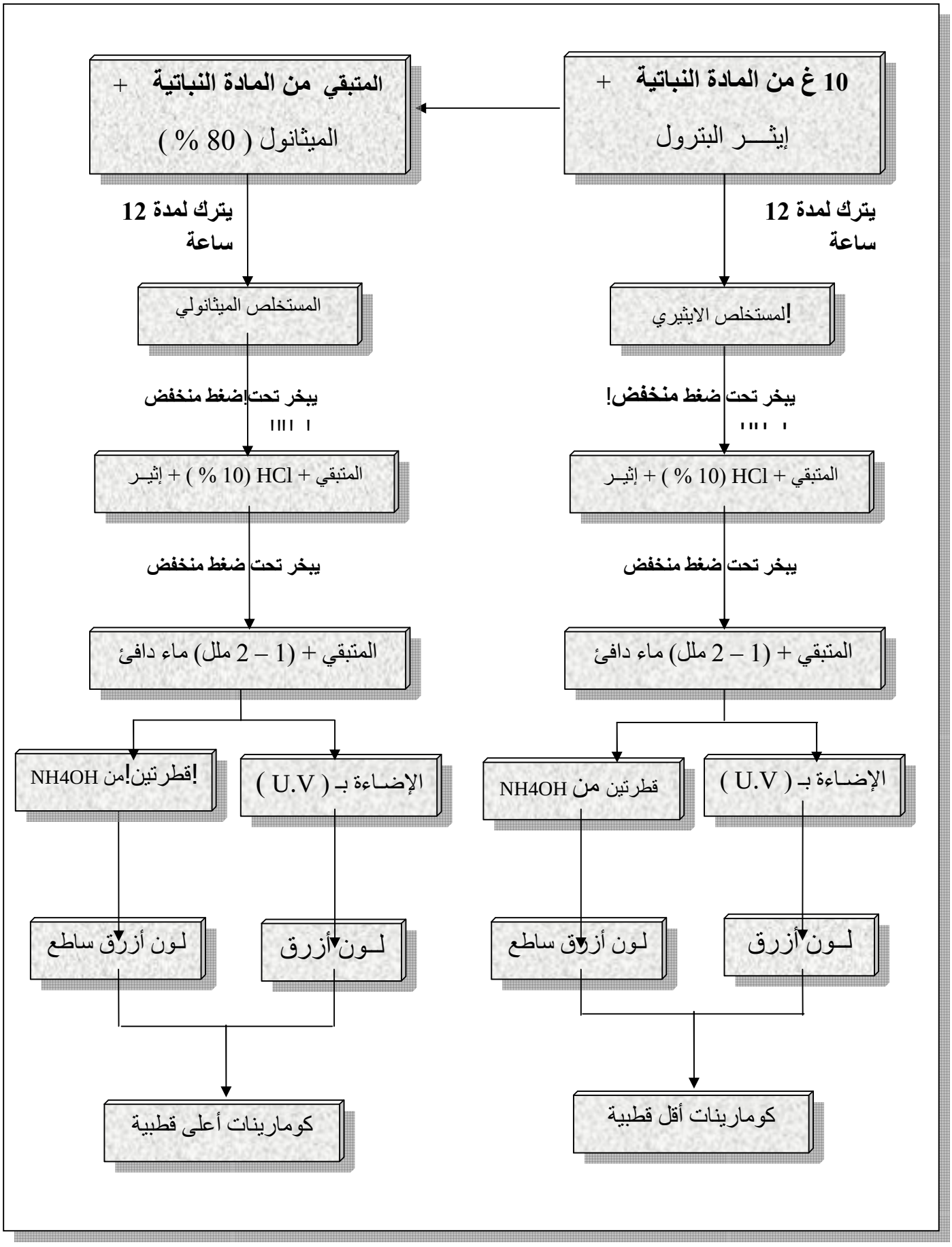
1ـ المادة النباتية:

تم جمع الجزء الهوائي لنبات *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. من منطقة وادي سوف بالجنوب الشرقي الجزائري في شهر يناير 2009 في مرحلة التزهير التي أجريت لها عملية التجفيف وضعها بعيدا عن الشمس والرطوبة، ومن ثم طحنها لإجراء عملية الاستخلاص لها.

2 ـ الكشف عن المواد الفعالة المختلفة الموجودة في نبات *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. [99]:

2 ـ 1 الكشف عن الكوماريات :

تم وضع 10 غ من مسحوق العضو النباتي الجاف في الإيثر البترولي لمدة ليلة كاملة، رشح المزيج والمتبقي من المادة النباتية يضاف له كحول الميثانول (80 %) ، المستخلص الكحولي المحصل عليه بخر تحت ضغط منخفض باستعمال جهاز التبخير الدوراني ، المتبقي يضاف إليه HCl (10 %) والإيثير ثم يبخر المزيج والمتبقي يضاف إليه (1-2 ملل) من الماء الدافئ ، يقسم المحلول المائي إلى جزئين متساويين حيث يضاف 0.5 مل من NH_4OH (10 %) إلى الأنبوب الأول، ويدل ظهور اللون الأزرق الساطع على وجود الكومارينات ، كما يدل ظهور اللون الأزرق لخلاصة الأنبوب الثاني تحت (U.V) على وجود الكومارينات شكل (29).



الشكـل (29) : مخطط يوضح الكشف عن الكومارينات

2 – 2 الكشف على القلويدات :

2 – 2 – 1 باستعمال كاشف دراجندوف المعدل :

- **تحضير الكاشف :** يتكون هذا الكاشف من:

المحلـول (أ) : يتكـون من (8.5 غ) من نترات البزموت مع (40 ملل) ماء مقطـر يضاف للمزيج 10 ملل حمض الخليك.

المحلـول (ب) : يتكون من (8 غ) من يوديت البوتاسيوم مذابـة في (20 ملل) ماء مقطـر.

و عند الكشف عن القلويدات يخلط (5 ملل) من الجزء (أ) مع (5 ملل) من الجزء الثاني (ب) مضافا إليها (20 ملل) من حمض الخليك مع (100 ملل) ماء مقطر و يحفظ الخليط في زجاجة دليل داكنة.

- **طريقة الكشف :**

يؤخذ 10 غ من مسحوق النبات الجاف لكـل عضو على حدة : جذور ، سوق ، أوراق ، أزهار ، ثمار

، بـ ذور داخـ ـل أنبوبـ ـة اختبـ ـار سـ ـعتها 25 سم³ إضافة محلـ ـول مـ ـائي محمـ ـض مـ ـن حمـ ـض كلـ ـور

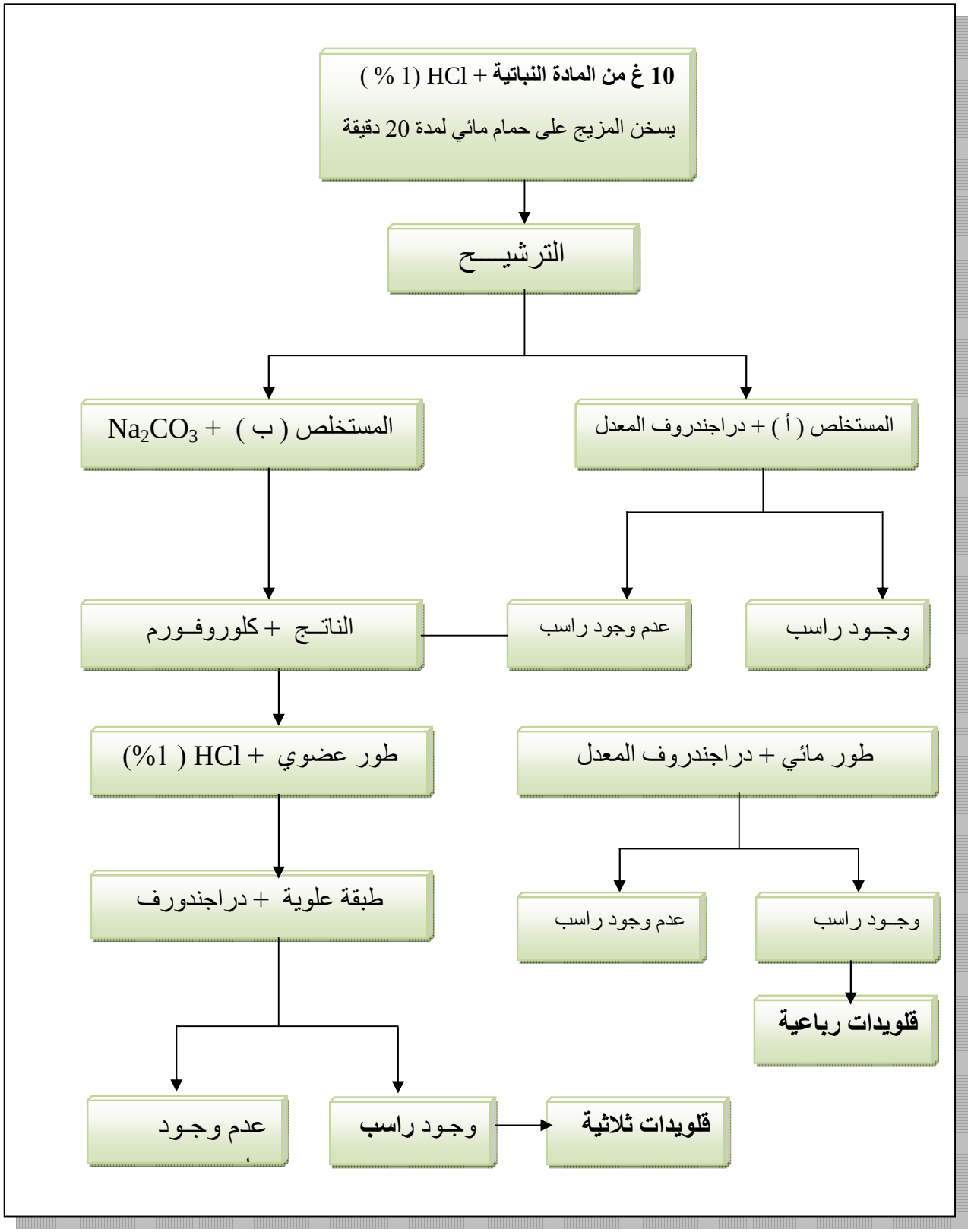
المـ ـاء HCl (1 %) وسخن لمدة ساخـ ـن حمـ ـام مـ ـائي مـ ـن 15 – 20 دقيقة . ح المسـ ـتخلص خـ ـلال

ط ن نقـ ـي و الرشـ ـاحة تقسـ ـم إلـ ـى قسـ ـمين متسـ ـاويين حجمـ ـا الكـ ـل منهمـ ـا فـ ـي أنبوبـ ـة اختبـ ـار

متساوية السعة ولتكن (أ) و (ب).

يضاف للأنبوبـة (أ) بضع نقط من دليل دراجندوف المعـدل لإختبار و جـود القلويدات.

يضاف للأنبوبـة (ب) المحـلول المشبع من كربونـات الصوديوم حتى pH= 9 ، ثم يضاف لها مذيب الكلوروفورم (15 سم^3) داخـل قمع الفصل ، تسحب الطبقة المائية و يضاف لها بضع قطرات من محلول دراجندوف المعدل إذا ظهر الراسب فدليل على وجود القلويدات من النوع الرباعي ، ثم تسحب الطبقة العضوية من المستخلص و تعامل بمحلول حمض كلور المـاء HCl (1 %) مع رجها جيدا ثم تسحب الطبقة العلويـة و يضـاف لها دليل دراجندوف المعدل إذا ظهر الراسب فدليل على وجود قلويدات من النوع الثلاثي.


10 غ من المادة النباتية + HCl (1 %)
يسخن المزيج على حمام مائي لمدة 20 دقيقة
الترشيـــح
المستخلص (أ) + دراجندروف المعدل
المستخلص (ب) + Na_2CO_3
وجـود راسب
عدم وجود راسب
الناتـج + كلوروفـورم
طور مائي + دراجندروف المعدل
طور عضوي + HCl (1%)
وجـود راسب
عدم وجود راسب
طبقة علوية + دراجندورف
قلويدات رباعية
وجـود راسب
عدم وجـود
قلويدات ثلاثية

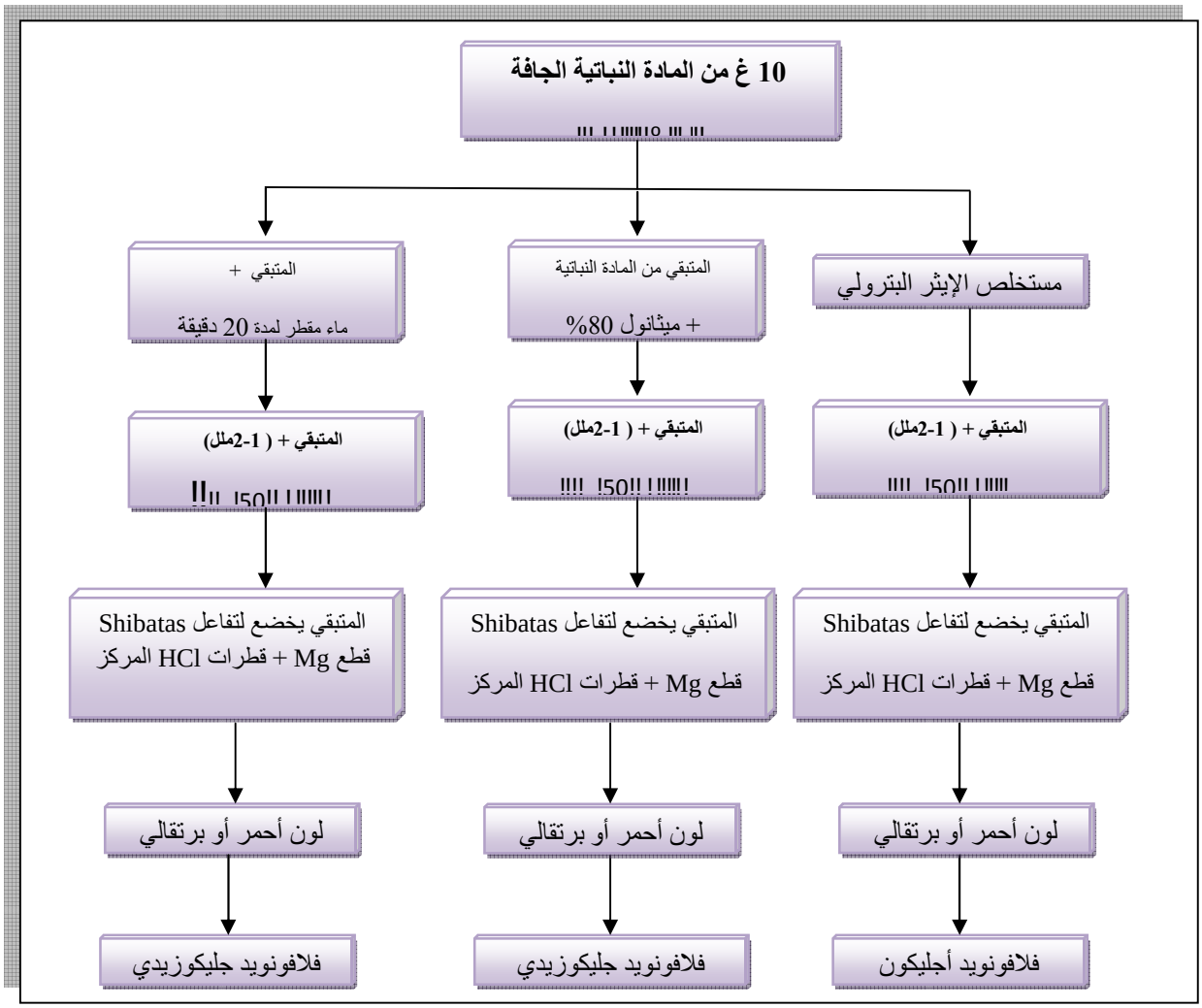
2 ـ 3 الكشف على الفلافونويدات :

تم وضع 10 غ من المادة النباتية الجافة في الإيثر البترولي لمدة ليلة كاملة تم رشح المزيج بحيث:

1- مستخلص الإثير البترولي يبخر تحت ضغط منخفض في جهاز Rotavapeur المتبقي يضاف إليه (1-2 ملل) ميثانول (50%) ثم يبخر و المتبقي يخضع لتفاعل Shibatas

تضاف قطع من Mg مع HCl المركز إلى الميثانولي لون أحمر أو برتقالي يدل على وجود فلافونويد أجليكوني .

2- المتبقي من المادة النباتية يضاف إليه كحول الميثانول (80 %)ثم يرشح المزيج ويبخر المستخلص الكحولي تحت ضغط منخفض في جهاز Rotavapeur المتبقي يضاف إليه (1-2ملل)ميثانول (50 %) ثم يبخر المزيج تحت ضغط منخفض ، المتبقي يخضع لتفاعل Shibatas إن ظهور لون أحمر برتقالي يدل على وجود فلافونويد جليكوسيدي.



الشكـل (31) : مخطط الكشف عن الفلافونويـدات

2 – 4 الكشف على الصابونيات :

سخن 2 غ من المسحوق النباتي مع 80 ملل ماء مقطر ، وبعـد الترشيح و التبريد يرج رجـا قويـا ، ظهـور الرغوة الثابتة دليل على وجود الصابونيات.

2 – 5 الكشف على الزيوت الأساسية:

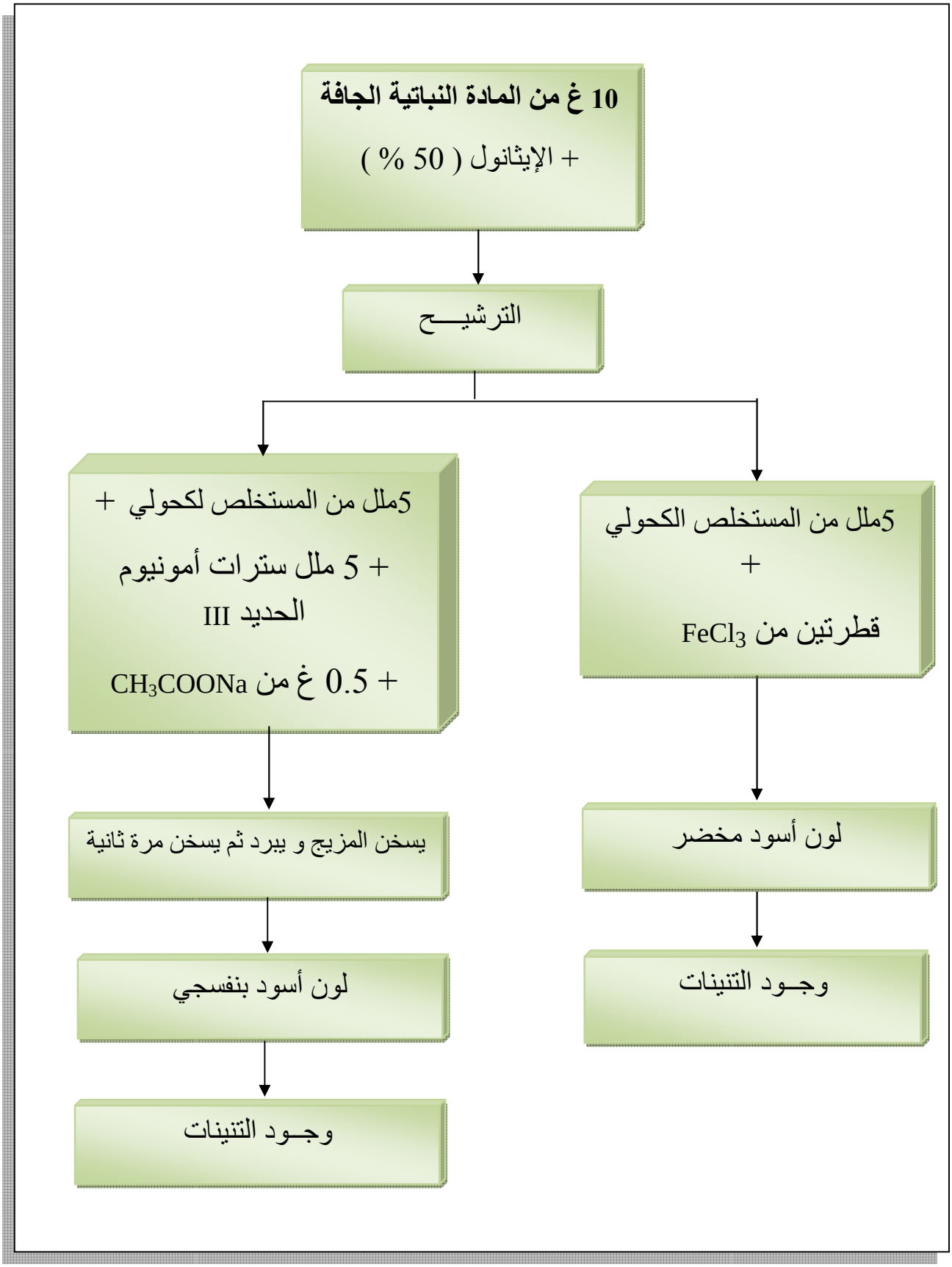
وضعت كمـية من مسحوق المادة النباتيـة الجافـة فـي جهـاز تقطيـر Clevenge type ويجـرى عليهـا عمليـة الإستخلاص بالماء المقطر إن ظهور الطبقة الزيتية يدل على وجود الزيوت الأساسية.

2 – 6 الكشف على التنينات :

تم أخذ 10غ من مسحوق كل عضو من النبتة و استخلص بالإيثانول (50 %) يرشح ثـم يكشـف بـالطرق التالية.

-أ- بواسطة كلوريد الحديديك ($FeCl_3$) تؤخذ بضع ميليلترات من المستخلص يضـاف لـه قطـرتين أو ثلاث من كلوريد الحديديك ، يدل ظهور اللون الأسود المخضر على وجود التنينات .

-ب- بواسطة معقد الحديد: تؤخذ 5 مل من المستخلص الكحولي ، يضاف إليه 5 مل من سترات أمونيوم الحديد III 15 % مع بمقدار 0.5 غرام من أسيتات الصوديوم (CH_3COONa) يسخن المزيج و يبرد ثم يسخن مـرة ثانية ، يدل ظهور اللون الأسود البنفسجي على وجود التنينات.


10 غ من المادة النباتية الجافة
+ الإيثانول (50 %)
الترشيـــح
5ملل من المستخلص الكحولي
+
قطرتين من $FeCl_3$
لون أسود مخضر
وجـود التنينات
5ملل من المستخلص لكحولي +
+ 5 ملل سترات أمونيوم الحديد III
+ 0.5 غ من CH_3COONa
يسخن المزيج و يبرد ثم يسخن مرة ثانية
لون أسود بنفسجي
وجـود التنينات

3 – الاستخلاص:

3 ـ 1 ـ 1 استخلاص الزيوت الأساسية:

تحصلنا على الزيت الأساسي بواسطة عملية التقطير المائي لكمية قدرها 100 غ من الجزء الهوائي للنبتة وغمرها بالماء المقطر واستخدمنا لذلك جهاز Clevenger type بحيث تم ضبط درجة الحرارة عند 100C° ولمدة ثلاث ساعات، بعد عملية التقطير وجمع الماء المشبع بالزيت قمنا بإضافة 10مل من ثنائي إيثيل إيثر وذلك كمذيب جامع للزيت وتكوين طبقة مائية وعضوية ، بعد فصل الطبقة العضوية ، تم تجميع الزيت في أنبوب مغلق وحفظ عند درجة حرارة 4 C° قبل عملية التحليل.

3 ـ 1 ـ 2 تحليل الزيت الأساسي باستعمال GC-MS :

تم تحليل عينة الزيت الأساسي بواسطة جهاز كروماتوا غرافيا الغاز الموصولة بمطيافية الكتلة

(GC/MS Gas chromatography/mass spectrometry)، والمستخدم فيه كاشف اختياري Agilent 5973EI mass وذلك بالاقتران مع Agilent GC6890A gas chromatograph، مزودة بـعمود شعري (0.25, mm film thickness 0.25 µm 30 mm)، وظروف التحليل:

تدفق الغاز 1.6 ml He/min ، ظغط العمود 100 Kpa، درجة حراارة الحاقن والكاشف 220 °C

و 250°C على التوالي، درجة حرارة العمود 60 °C لمدة دقيقة ثم تزداد تدريجيا بمقدار10 °C في الدقيقة من60 °C الى 200 °C ولمدة 5 دقائق، وتزداد تدريجيا بمقدار10 °C في الدقيقة من 200 °C الى 240 °C ولمدة 6 دقائق.

3 ـ 2 الاستخلاص الكلي للمركبات الفينولية ومركبات أخرى :

بعد تنقية النبتة و طحنها أخذنا منها كمية (2200غرام) أجريت لها عملية الاستخلاص بواسطة الميثانول والثنائي كلورو ميثان (CH_2Cl_2:MeOH)(1: 1 حجم/ حجم) وذلك بتركها منقوعة في هذا المحلول لمدة 72ساعة وكررت العملية مرتين متتالتين مع تجديد المذيب في كل مرة للحصول على كمية معتبرة من المستخلص حيث تجمع الرشاحة في دورق في كل مرة بعدها تركيزهذه الأخيرة بواسطة التبخيرعند درجة حرارة أقل من 60 °C حتى التخلص من أكبر كمية من الميثانول والثنائي كلورو ميثان (CH_2Cl_2،MeOH) تحت ضغط منخفض للحصول على مستخلص خام في الحالة الجافة تقريبا.

المادة النباتية المتبقية تم نقعها في الميثانول والماء (H_2O:MeOH)(7:3حجم/ حجم) لمدة 72ساعة وكررت نفس عملية الإستخلاص السابقة وتركت للعمل عليها لاحقاً.

3 ـ 2 ـ 1 عملية الفصل الأولي (عمود التجزئة Fractionaction):

بعد عملية التبخير حصلنا على كمية 103.7غرام) جافة لمستخلص الميثانول و الثنائي كلورو ميثان (1:1) أجريت عليها عملية الفصل بواسطة عمود التجزئة سيلكا جيل.

بعد وضع المستخلص الجاف في عمود التجزئة سيلكا جيل استخدمنا مذيب n-Hexane كمملص بنسبة 100% ومن ثم أضفنا إليه مذيب CH_2Cl_2 تدريجيا للحصول على عدة كسور تحوي مركبات ذات قطبية مختلفة ، وبالوصول إلى نسبة 100% لمذيب ثنائي كلورو ميثان أضفنا إليه مذيب الميثانول تدريجياً حتى الوصول إلى نسبة 100% لمذيب الميثانول[100].

وبذلك قمنا بتجزئة المستخلص إلى عدة كسور تحوي مركبات ذات قطبية مختلفة ليتسنى لنا إختيار الكسور المناسبة لغرض عملية الفصل والتنقية من خلال إختبارها بواسطة التحليل على كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ذلك حسب الجدول (5).

جدول رقم (05) : عملية الفصل الأولي (عمود التجزئة Fractionation column)

الكسر	الهكسان	الثنائي كلوروميثان	الميثانول	وزن الكسر
F1	٪100	-	-	0,19غ
F2	٪75	٪25	-	0,25غ
F3	٪50	٪50	-	0,4غ
F4	٪25	٪75	-	0,6غ
F5	-	٪100	-	0,87غ
F6	-	٪90	٪10	6,7غ
F7	-	٪80	٪20	45,78غ
F8	-	٪50	٪50	37,1غ
F9	-	-	٪100	1,3غ

بعد الفصل الأولي لمكونات المستخلص عن طريق كروماتوغرافيا عمودالتجزئة، تم اختيار الكسور غير متماثلة المظهر في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لدراستها، بحيث اعتمدنا على فحصها ومقارنتها في عدة أنظمة، و على الوزن المتحصل عليه لكل كسر، وطبيعة المركبات الموجودة في كل كسر ومن ثم تحديد نوع الكروماتوغرافيا المطبقة على كل منهم لعملية الفصل.

2 ـ 2 ـ 2 معالجة الكسور المتحصل عليها :

بواسطة كروموتوغرافيا الطبقة المحضرة بالسيلكا جيل(TLC) تمت عملية الفصل للكسر F5 وذلك بتحضير طبقة رقيقة من دعامة صلبة على شريحة من الزجاج (20 سم x 20 سم) تم وضع الخليط عرضيا على بعد 1.5سم من خط الانطلاق ثم وضع الشريحة في حوض به المملص:

(n-Hexane:CH_2Cl_2:AcEt) (1:0.5:1).

بعد أن جفت الصفائح كشطت الحزم كلا على حده بعد تحديدها بواسطة مصباح UV, ووضعت في قمع زجاجي وغسلت مرتين،الأولى بالمملص المستعمل و الثانية بالميثانول، ركز الراشح وأجريت له عمليات فحص متعددة للتأكد من نقاوته.

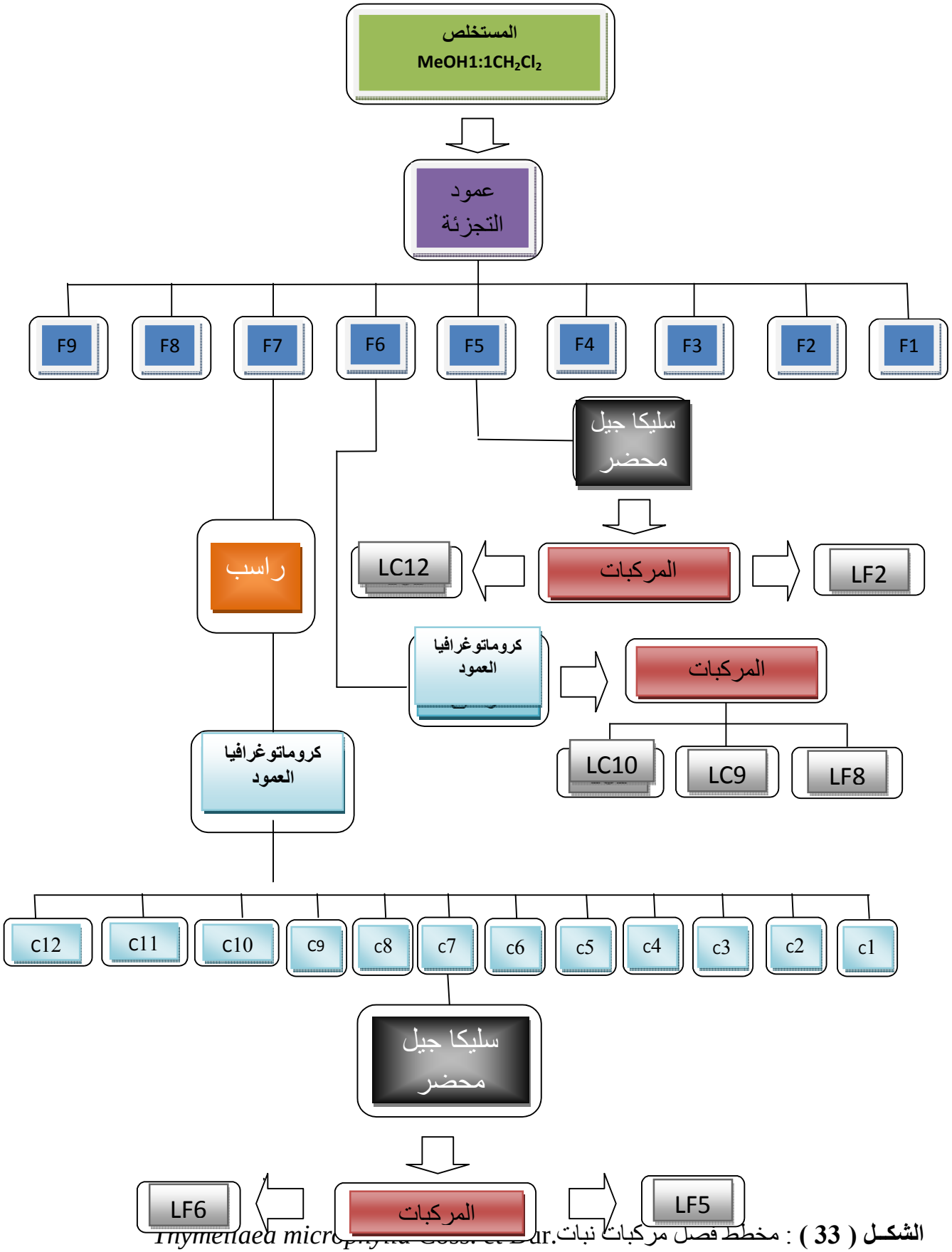
ملاحظة:

هناك مركبات تم فصلها من الكسورF7،F6 لم يتم التطرق لها هنا ومبينة في الجدول (02) ومخطط الفصل وهي قيد الدراسة للتعرف على بنيتها الكيميائية

<u>جدول رقم (06)</u> : طرق فصل المركبات المتحصل عليها من كسور عمود التجزئة:

الكسر	طريقة الفصل	المملص	المركبات المفصولة	الوزن
F5	كروماتوغرافيا الطبقة المحضرة بالسيليكا جيل	(n-Hexane:CH_2Cl_2:AcEt) (1:0.5:1)	LF2 LC12	4.13ملغ 6.39ملغ
F6	كروماتوغرافيا العمود	–	LF8 LC9 LC10	
F7	كروماتوغرافيا العمود + كروماتوغرافيا الطبقة المحضرة بالسيليكا جيل	–	LF5 LF6	

تمت دراسة كل من المركبين LF2, LC12 أما المركبات المتبقية فتحتاج إلى تحليل طيفية كافية للتعرف على بنيتها الكيميائية.



الشكـل (33) : مخطط فصل مركبات نبات *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.

3- التعرف على البنى الكيميائية للمركبات:

طريقة تحليل الزيت الطيارتمت باستعمال GC-MS أما من أجل التحديد البنيوي للمركبات استخدمنا مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مطيافية الكتلة.

4 ـ الفعالية البيولوجية :

4 ـ 1 مكان التجربة :

مكان التجربة : تم إجراء التجربة العملية بمختبر الميكرو بيولوجيا بقسم العلوم الطبيعية و الحياة التابع لجامعة العربي بن مهيدي - أم البواقي -.

4 ـ2 الأدوات والوسائل المستعملة :

- ◊ أوساط مغذية.
- ◊ أنابيب إختبار معقمة
- ◊ أطباق بتري معقمة .
- ◊ ماء مقطر معقم .
- ◊ ورق واتمان رقم 3.
- ◊ إبرة تلقيح.
- ◊ ماصات معقمة .
- ◊ السلالات البيكتيرية والعزلات الفطرية .
- ◊ المستخلص النباتي لنبات.*Thymellaea microphylla* Coss. et Dur .
- ◊ ملقط معقم .
- ◊ موقد بنزن .
- ◊ ماء جافيل .
- ◊ حوجلات.
- ◊ سحاحات مدرجة.
- ◊ ميزان حساس .
- ◊ حمام مائي.
- ◊ حاضنة وفور باستور.

◊ ماء فيزيولوجي

4 ـ 3 العينات البيولوجية:

المستخلص النباتي : المستخلص النباتي لـ *Thymellaea microphylla Coss. et Dur*. (MeOH :CH_2Cl_2 .1 :1).

تحضير التراكيز : لتحضير المحلول الأصلي A قمنا بوزن 0.08 غرام من المستخلص النباتي وإذابته في 10ml (8000µg/ml) من الماء المقطر المعقم وانطلاقا ً من هذا التركيز قمنا بتحضير بقية التراكيز 4000µg/ml، 2000µg/ml، 1000µg/ml، 500µg/ml، 250µg/ml.

تحضير الأقراص : تم تحضبر أقراص من ورق (Wattman n°3) ذات قطر 5 ملم بوضعها في طبق بتري ونضيف لها 10 ملل ماء مقطر ثم تعقم في جهاز Auto clave لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 120°م ونشبعها بوضعها في التراكيز المختلفة للمستخلص.

العزلات الفطرية : تم الحصول عليها عن طريق مختبر الميكرو بيولوجيا بقسم العلوم الطبيعية التابع لجامعة العربي بن مهيدي - أم البواقي.

تحضير الماء الفزيولوجي : تم تحضيره بإذابة 9غ من NaCl 1 ل من الماء المقطر ومن ثم توزيعه في أنابيب إختبار بأحجام متساوية (2 ملل في كل أنبوب) بعد ذلك قمنا بتعقيمها في جهازAuto clave لمدة 30 دقيقية عند 120م°.

4 - 4 دراسة الأثر التثبيطي للمستخلص الخام بإستعمال طريقة الإنتشار على الأقراص :

أ - إستعمال الأوساط الغذائية:

- وسط Muller Hinton: وهو عبارة عن وسط خاص بعملية الفعالية البيولوجية بالنسبة للبكتيريا، حيث نقوم بإذابة هذا الوسط في حمام مائي ثم توزيعه على أطباق بترية ويترك ليبرد ويتجمد.
- وسط Sabouadud: وهو عبارة عن وسط خاص بعملية الفعالية البيولوجية بالنسبة للفطريات، حيث نقوم بإذابة هذا الوسط في حمام مائي ثم توزيعه على أطباق بترية ويترك ليبرد ويتجمد.

ب - تحضير اللقاح البادئ Inoculum:

نأخذ مسحة من مستعمرات بكتيرية ثم زرعها على وسط جيلوز المغذي وحقنها لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م° بواسطة إبرة تلقيح ونضعها في 2 مل من الماء الفيزيولوجي المعقم للحصول على المعلق البكتيري ثم تترك لمدة 15 دقيقة.

ج - طريقة الزرع :

نضع المعلق المحضر في الطبق البتري المقسم إلى 8 أجزاء والمحتوي على وسط muller Henton ثم يوزع المعلق البكتيري على كامل مساحة الطبق ونتخلص من الفائض بتفريغه في إناء يحتوي على ماء جافيل.

تعامل الغزلات الفطرية بنفس الطريقة باستثناء وسط الزرع الذي يستعمل وسط Saboudaud.

د - إستعمال الأقراص:

وزعنا الأقراص بواسطة ملقط معقم حيث نضع كل قرص مشبع بتركيز المستخلص المخفف المعين في أحد الأجزاء للطبق المقسم بحيث نكون قد إستخدمنا كل التخفيفات لكل سلالة في طبق واحد.

هـ - عملية الحضن :

بعد الإنتهاء من عملية وضع الأقراص وضعنا الأطباق البترية المحتوية على السلالات البكتيرية في الحاضنة لمدة 18-24 ساعة عند درجة حرارة 37 م° أما الأطباق البترية المحتوية على العزلات الفطرية فنضعها في الحاضنة لمدة 18-24 ساعة ولكن عند درجة حرارة 28 م **[101]** .

و - عملية قراءة النتائج :

بواسطة قياس منطقة التثبيط حول القرص الذي لم تنمو فيه سلالات البكتيريا والفطريات.

5- الفعالية المضادة للأكسدة :

5-1- الطرق والوسائل :

أ) الأدوات والوسائل المستعملة:

- ◊ مركب DPPH (الجذر الحر) .
- ◊ الشاهد فيتامين C .
- ◊ جهاز UV Spectrophotometer لقياس شدة الامتصاص.
- ◊ العينة المراد إختبارها.

ب) طريقة العمل :

- استخدمنا لذلك مركب DPPH (2,2diphenyl 1- picryl hydrazyl) ،قمنا بوزن 3.375 ملغ من DPPH وإذابتها في 863 ميكرولتر من الإيثانول بعد عملية الإذابة الكلية قمنا بأخذ 300 ميكرولتر من العينة المذابة وأكملنا الحجم بإضافة 29.7 مل ماء مقطر فيصبح الحجم الكلي 30 مل.
- بعد ضبط الجهاز على تردد 517 نانومتر ، قمنا بوضع الماء المقطر في خلية القياس الخاصة بالجهاز ومن ثم ضبط الجهاز على الصفر.
- قمنا بأخذ 1.5 مل من DPPH المحضر وحقناها في خلية القياس الخاصة بالجهاز ثم أخذنا القراءة على فترات زمنية مختلفة 30 ثانية – 60 ثانية ، إلى 5 دقائق.
- بعد ذلك أخذنا 1.5 ميكرولتر من الشاهد(فيتامين C) وحقناها في عينة DPPH وأخذنا قياس الأثر التثبيطي للشاهد على فترات زمنية مختلفة 30 ثانية – 60 ثانية ، إلى 5 دقائق.
- أعدنا عملية وضع 1.5 ميكرولتر من DPPH من جديد وأخذنا أيضا القراءة على فترات زمنية كالسابق.
- قمنا بحقن 1.5 ميكرولتر من العينة (A) للمستخلص الخام لنبات *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. في عينة DPPH وأخذنا قراءة الأثر التثبيطي للمستخلص على فترات زمنية مختلفة كالسابق.
- كررنا أخذ قراءة الأثر التثبيطي لتراكيز مخففة من المستخلص الخام لنبات *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. على فترات زمنية مختلف كالسابق.

- لحساب نسبة الاختزال يتم التعويض بالقراءات المأخوذه في المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الاختزال} = \frac{\text{قراءةالشاهد} \quad \text{قراءةالعينة}}{\text{قراءةالشاهد}} \times 100$$

ج) تحضير التراكيز :

لتحضير المحلول الأصلي A قمنا بأخذ 1ملغ من المستخلص النباتي وإذابته في10مل من الماء المقطر المعقم وانطلاقاً من هذا التركيز(1/10 ملغ) قمنا بتحضير بقية التراكيز(1/100 ملغ) ،(1/1000 ملغ) ، (1/1000 ملغ).

!!

الفصل الثاني

النتائج و المناقشة

1 – نتائج المسح الفيتوكيميائي للنبتة. *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur :

أظهرت نتائج المسح الفيتوكيميائي للنوعين النباتيين .*Thymellaea microphylla* Coss. et Dur و *Cynara cardinculus* التي أجريت على كل الأجزاء النباتية من أجل الكشف عن سبع عائلات كيميائية معروفة وهي :

الزيوت الأساسية، الفلافنويدات الأجلوكينية والجليكوزيدية، الصابونيات، التانينات، الكومارينات والقلويدات. كما هو مبين في الجدولين-07- و -08-.

نلاحظ أن النتائج أظهرت إحتواء النباتين على كل العائلات المختبرة ماعدا القلويدات . كما أظهرت النتائج أفضلية تواجد بعض المواد الفعالة مثل الزيوت الأساسية في الأوراق، والسوق ،واحتوائها على الفلافونويدات الأجلوكينية والجليكوزيدية، والكومارينات كما هو عليه في نبات .*Thymellaea microphylla* Coss. et Dur في كل من الأوراق، والسوق والأزهار في نبات نبات أصيل .*Thymellaea microphylla* Coss. et Dur زيادة على هذا فإن نبات *Cynara cardinculus*الحرشوف ولم تحقق لحد الان دراسة فيتو كيميائية ولا بيولوجية عليه وهو عامل أساسي حفزنا لاختيار هذه الدراسة وفصل المركبات الزيتية والفينولية التي يحتويها وكذلك الفعالية البيولوجية.

الجدول - 07- : نتائج المسح الفيتوكيميائي للنبتة .*Thymellaea microphylla* Coss. et Dur :

***Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.**				
العائلات الكيميائية	R	L	St	Fl
Volatile oils	-	++	++	+
Flavonoides Aglycone	-	+	+	+
Flavonoides glycoside	-	+++	++	+++
Tannins	+	++	++	++
Coumarins	++	+++	+++	+++
Saponins	-+	-+	-+	-+
Alkaloids	-	-	-	-

الجدول - 08- : نتائج المسح الفيتوكيميائي لنبتة *Cynara cardinculus* :

Cynara cardinculus				
العائلات الكيميائية	R	L	St	Fl
Volatile oils	-	+	+	+

Flavonoides Aglycone	-	+	+	+
Flavonoides glycoside	-	++	++	++
Tannins	+	+++	+++	+++
Coumarins	-	+	+	+
Saponins	-+	-+	-+	-+
Alkaloids	-	-	-	-

F = (Flowers)أزهار , St (Stems)سوق , L = (Leaves) أوراق, R = (Roots) جذور

2 ـ نتائج تحليل الزيت الأساسي للنبتة *Thymeleae microphylla* Coss. et Dur. :

إن إخضاع الزيت المتحصل عليه من عملية الاستخلاص لعملية التحليل الكروماتوغرافي للطور الغازي GC الموصول بمطيافية الكتلة GC/MS لتحليل الأطياف الكروماتوغرافية المتحصل عليها بينت بأن هذه الأطياف تدل على وجود 11 مركب في عينة الزيت ومن خلال الجدول– 09 نلاحظ أن النتائج أظهرت أن مركب D-menthone يتواجد بنسبة عالية (41.86 %) حيث يعتبر المركب الأكثر وفرة في عينة الزيت الأساسي للنبتة *Thymeleae microphylla* Coss. et Dur. يليه مركب 2-Undecanone بنسبة (23.74 %) ثم مركب بنسبة Pulegone (11.74%) ومركب Perillal بنسبة(9.34 %)، أي مايعادل (86.68 %) من إجمالي عينة الزيت المتحصل عليه وتمثل بقية المركبات المتحصل عليها نسبة (13.32 %).

الجدول - 9- :

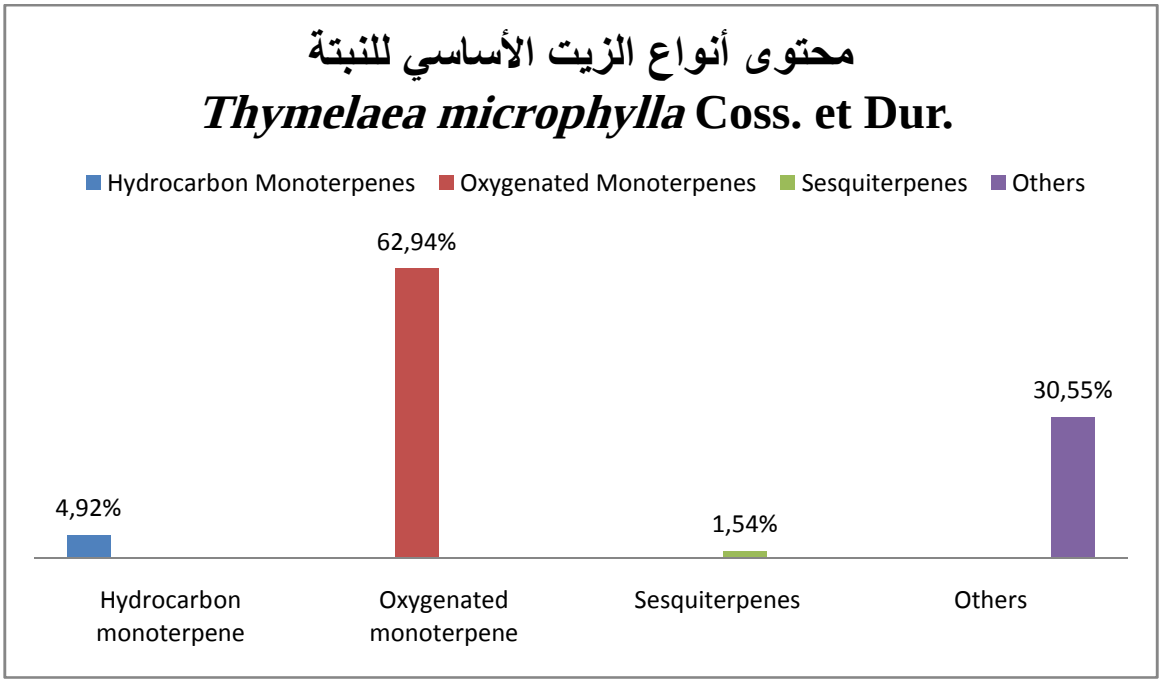
نتائج تحليل الزيوت الأساسية للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. :

المحتوى الكيميائي	الزيوت الأساسية	Rt	%
5,5Dimethylbicyclo[2.1.1]hexane-1-carboxylic acid		2.634	3.88
Limonene	Hydrocarbon monoterpene	9.695	1.92
Isobutyranilide		10.376	0.58
D-menthone	Oxygenated monoterpene	16.432	**41.86**
Pulegone	Oxygenated monoterpene	21.006	**11.74**
(6E)-2,5-Dimethyl-1,6-octadiene	Hydrocarbon monoterpene	21.784	1.40
Perillal	Oxygenated monoterpene	22.876	**9.34**

2-Undecanone		25.649	**23.94**
(Z,E)-α-Farnesene	Hydrocarbon sesquiterpene	33.018	1.54
1-(2-Bromovinyl)-adamantane		36.556	2.15
Artemesia triene	Hydrocarbon monoterpene	37.494	1.66
Total			100

يتبين أن عينة الزيت الأساسي للنبتة.*Thymeleae microphylla* Coss. et Dur كما هو موضح في الشكل ـ 34 ـ تحتوي على :

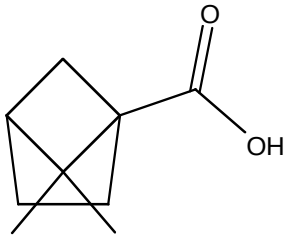
- ❖ التربينات الأحادية (% 62.94) متمثلة في :
  - التربينات الأحادية الأكسيجينة (% 67.84).
  - التربينات الأحادية الهيدروكربونية (% 4.92).
- ❖ سيسكوتربينات هيدروكربونية (% 1.54).
- ❖ مركبات أخرى بنسبة (% 30.55) .



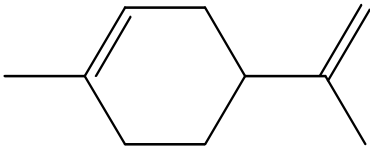
شكل 34- محتوى أنواع الزيت الأساسي للنبتة

***Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.**

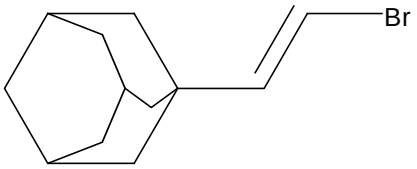
2 ـ 2 بنية الزيوت الأساسية المفصولة:



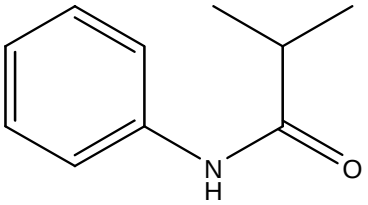
5,5Dimethylbicyclo[2.1.1]hexane-1-carboxylic acid



Limonene

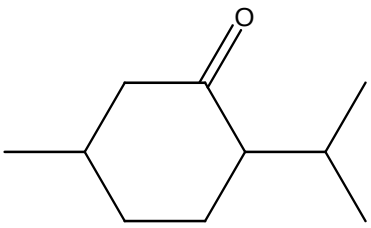


1-(2-Bromovinyl)-adamantane

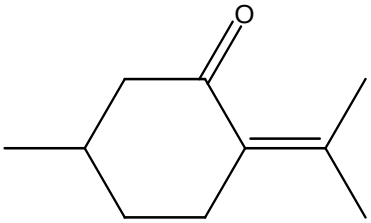


isobutyranilide

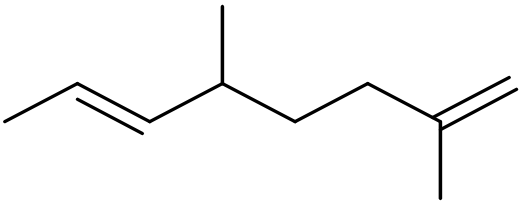
D-menthone



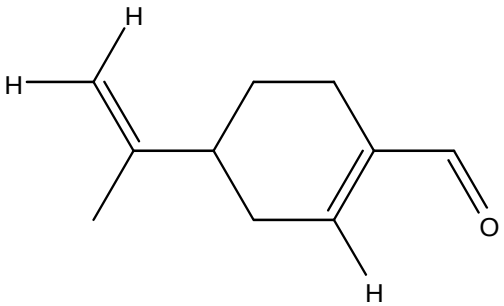
pulegone



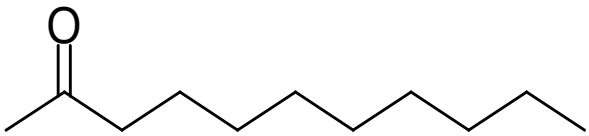
(6E)-2,5-Dimethyl-1,6-octadiene



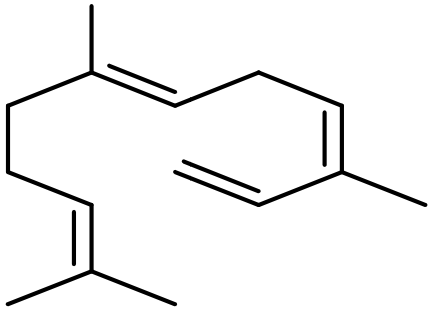
Perillal



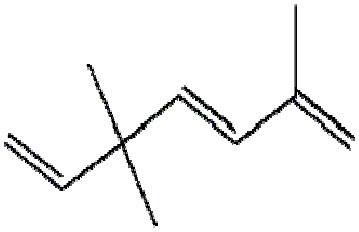
2-Undecanone



(Z,E)-α-Farnesene



Artemesia triene



❖ نشير إلى أن هذه النتائج لم يسبق نشرها في المراجع وقد توجت بإنجاز نشرية في مجلة دولية محكمة كما هو مبين في الملحق.

3 ـ دراسة للمركب LC12 :

3 – 1 اللون الإستشعاعي:

تحت مصباح WOOD (254-365nm) أعطى هذا المركب لونا أزرقا مما يقربنا من التفكير بأن المركب **LC12** كومارين.

3 – 2 مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^{1}H- NMR:

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون ^{1}H -NMR (للطيف 01) الذي دونت نتائجه في الجدول - 4 - وجود :

إشارة ثنائية (J = 9.5Hz) بتكامل 1H عند δ = 6.29 ppm يمكن نسبها للبروتون H_3.

إشارة ثنائية (J = 9.5Hz) بتكامل 1H عند δ = 7.92 ppm يمكن نسبها للبروتون H_4.

H_4، H_3 هما إشارتان مميزتان لمركب كومارين .

إشارة ثنائية (J = 8.1Hz) بتكامل 1H عند δ= 6.80 ppm يمكن نسبها للبروتون H_6 متداخلة مع إشارة أحادية بتكامل 1H خاصة بالبروتون H_8 و ذلك عند δ = 6.82 ppm .

كما نلاحظ وجود إشارة ثنائية (J = 8.1Hz) بتكامل 1H عند δ = 7.49 ppm يمكن نسبها للبروتون H_5.

عدم وجود أي إشارة أخرى في طيف ^{1}H -NMR للمركب LC12 يؤكد وجود مستبدل على ذرة الكربون في الموضع 7 .

جدول - 10 - نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي ^{1}H -NMR (CD_3OD, 400MHz).

التعين	الإزاحة الكيميائية δ(ppm)	التكامل	التعددية	ثابت التزاوج *J* (*Hz*)
H_3	6.29	1H	*d*	9.5
H_4	7.92	1H	*d*	9.5
H_6	6.80	1H	*d*	8.1
H_5	7.49	1H	*d*	8.1
H_8	6.82	1H	*s*	-

3 – 3 مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C- NMR:

جدول -11- نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C- NMR ($CDCl_3$, 400MHz).

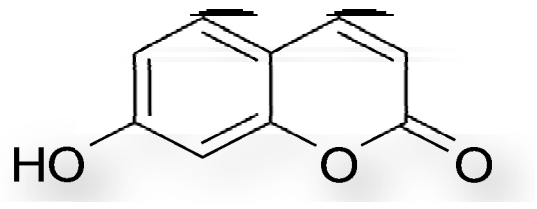
لإزاحة الكيميائية δ(ppm)	ذرة الكربون
δ = 160.9ppm	C_2
δ = 113.7ppm	C_3
δ = 148.7ppm	C_4
δ = 128.8ppm	C_5
δ = 111.9ppm	C_6
δ = 158.1ppm	C_7
δ = 109.0ppm	C_8
δ = 115.3 ppm	$C_{4'}$
δ = 151.1 ppm	$C_{8'}$

يؤكد طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C- NMR (للطيف 02) الذي دونت نتائجه في **الجدول - 4-** على وجود 9 ذرات كربون غيرمتكافئة والمميزة للهيكل الكوماريني عن وجود مستبدل في الموضع 7 يمكن أن يكون مجموعة هيدروكسيل .

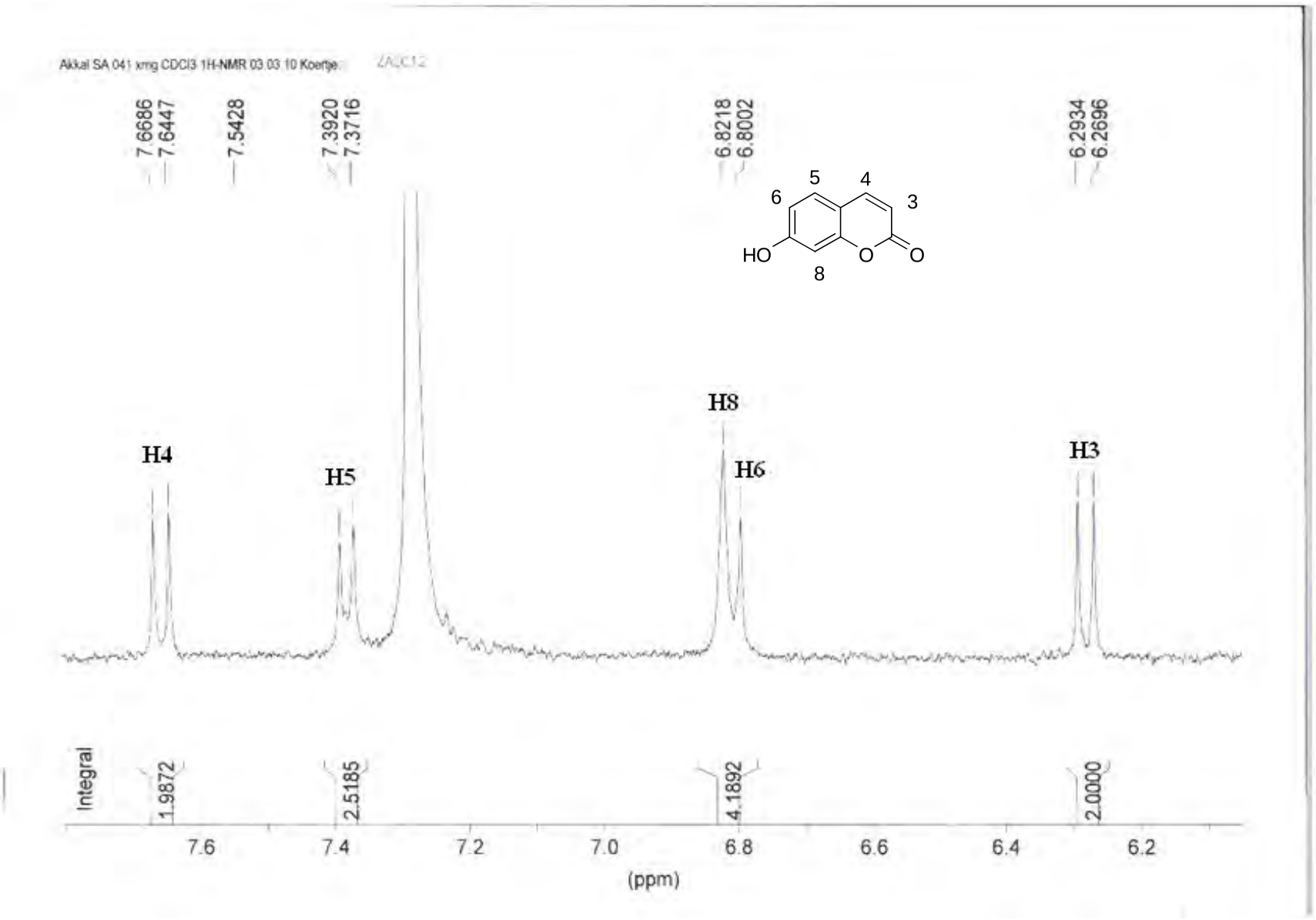
وحسب الدرااسات السابقة المتعلقة بالمركبات الكومارينية **[102]**، يمكن تحديد ذرات الكربون المتمثلة في الطيف المتحصل عليه كالتالي :

- ذرة الكربون C_2 عند $\delta =$ 160.9 ppm والمميزة للوظيفة الكربونيلية.
- ذرة الكربون C_3 عند $\delta =$ 113.7 ppm
- ذرة الكربون C_4 عند $\delta =$ 148.7 ppm
- ذرة الكربون C_5 عند $\delta =$ 128.8 ppm
- ذرة الكربون C_6 عند $\delta =$ 111.9 ppm
- ذرة الكربون C_7 عند $\delta =$158.1 ppm وتؤكد قيمة هذه الإزاحة وجود مجموعة هيدروكسيل على هذه الذرة
- ذرة الكربون C_8 عند $\delta =$ 109.0 ppm
- ذرة الكربون $C_{4'}$ عند $\delta =$ 115.3 ppm
- ذرة الكربون $C_{8'}$ عند $\delta =$ 151.1 ppm

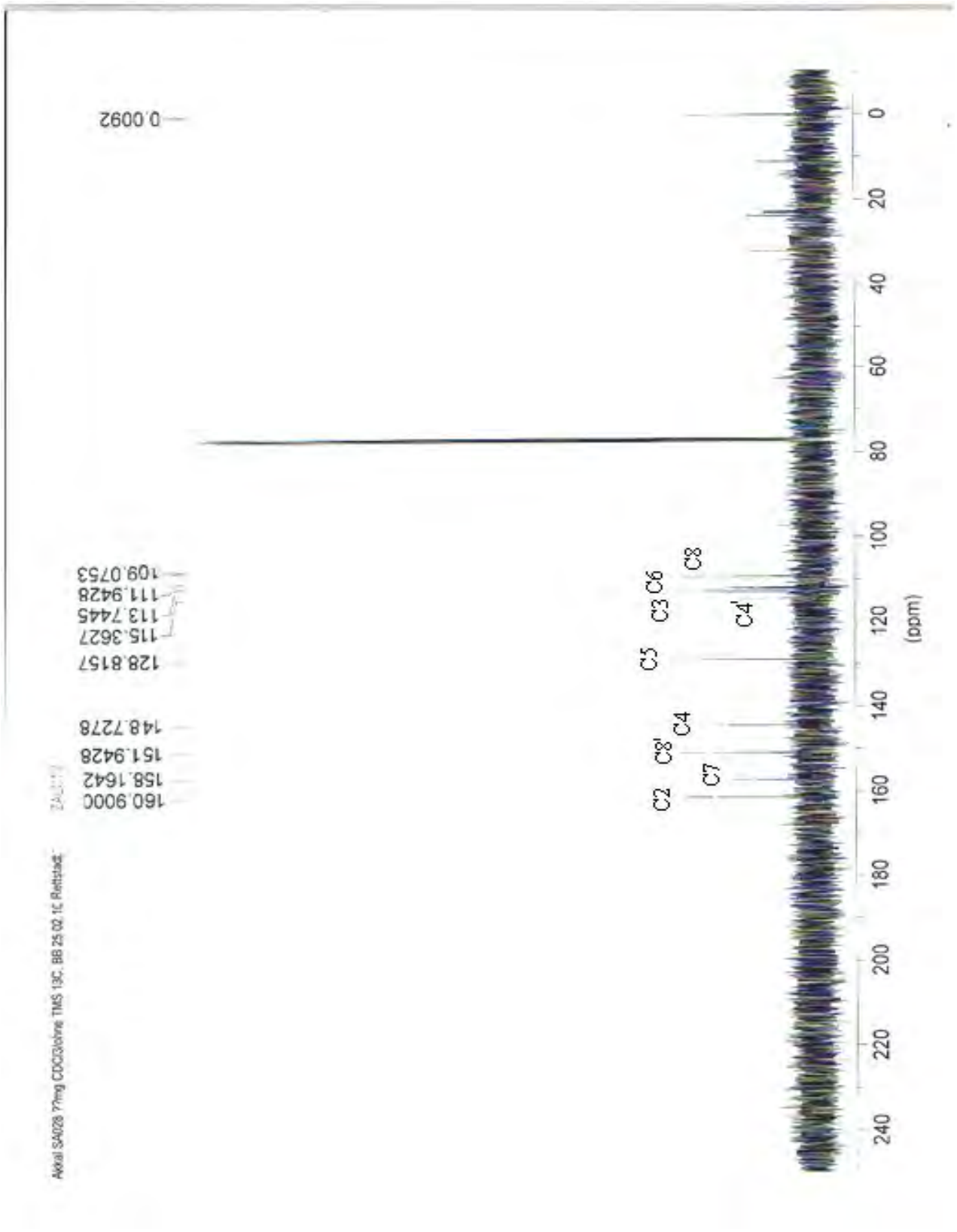
ومنه مجموعة هذه المعلومات تقودنا إلى أن المركب LC12 هو مركب كوماريني بسيط ويعرف بإسم **Ombelliferone** (7-Hydroxychromen-2-one) وصيغته مبينة في الشكل التالي :



نود الاشارة الى أن المركب **LC12 Ombelliférone تم فصله من جنس *Thymelaea*** من الأنواع التالية: *T. hirsuta* ,*T. passerine* [74]، ولكن لأول مرة فصل من النوع ***Thymelaea microphilla*** Dur ***et*** coss.


Akkal SA 041 xmg CDCl3 1H-NMR 03 03 10 Koertje
7.6686
7.6447
7.5428
7.3920
7.3716
6.8218
6.8002
6.2934
6.2696
5
4
6
3
HO
O
O
8
H4
H5
H8
H6
H3
Integral
1.9872
2.5185
4.1892
2.0000
7.6
7.4
7.2
7.0
6.8
6.6
6.4
6.2
(ppm)

طيف -1- ^{1}H -NMR للمركب C12



طيف -2- ^{13}C- NMR للمركب C12

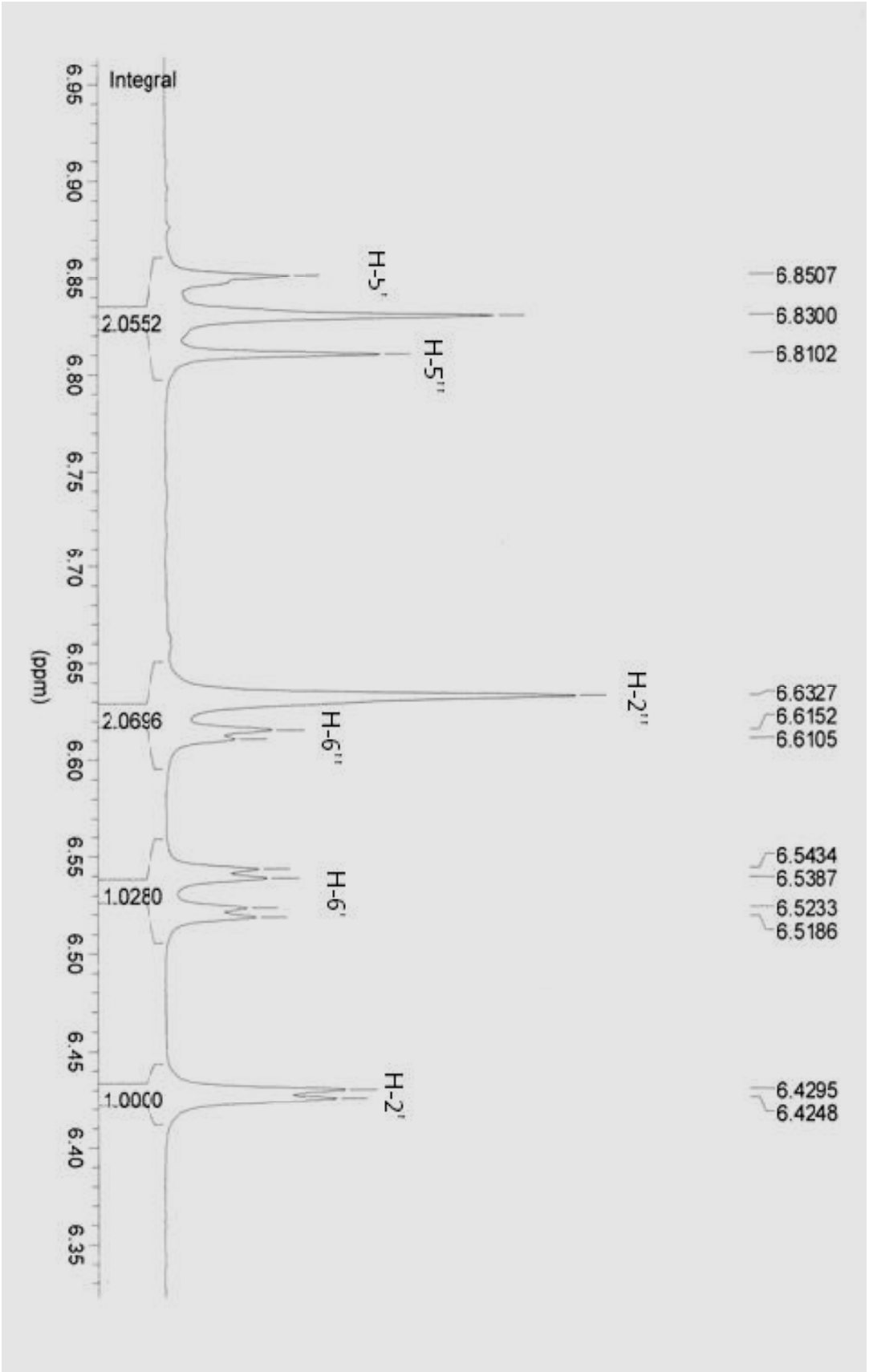
4 ـ دراسة للمركب LF2:.

دراسة طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون للمركب يبين وجود عشرين بروتون ممثلة كالتالي:

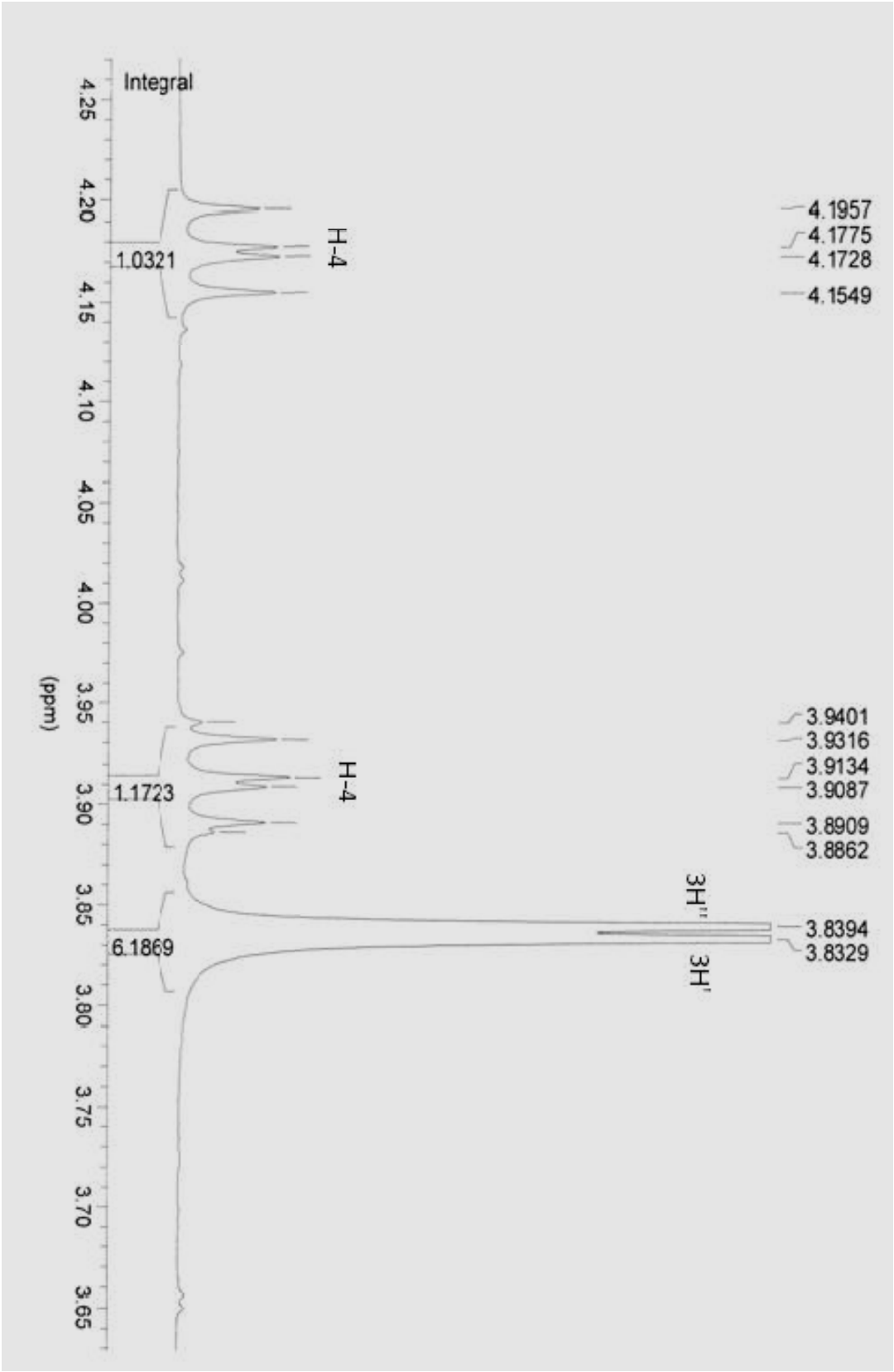
- 6 بروتونات خاصة بالحلقه البنزينية بين ppm 7 و ppm 6.
- بروتونين أكسيجنيين على شكل إشاره ثنائية ثنائية لكل منهما الأولى تظهرعند ppm 4.2 و 3.9ppm .
- مجموعتي ميثوكسي عند ppm 3.84 و 3.83ppm .
- 6 بروتونات مابين ppm 3 و ppm 2 .

<u>جدول رقم -12-</u> :يبين توزيع بروتونات و كربونات المركب LF2:

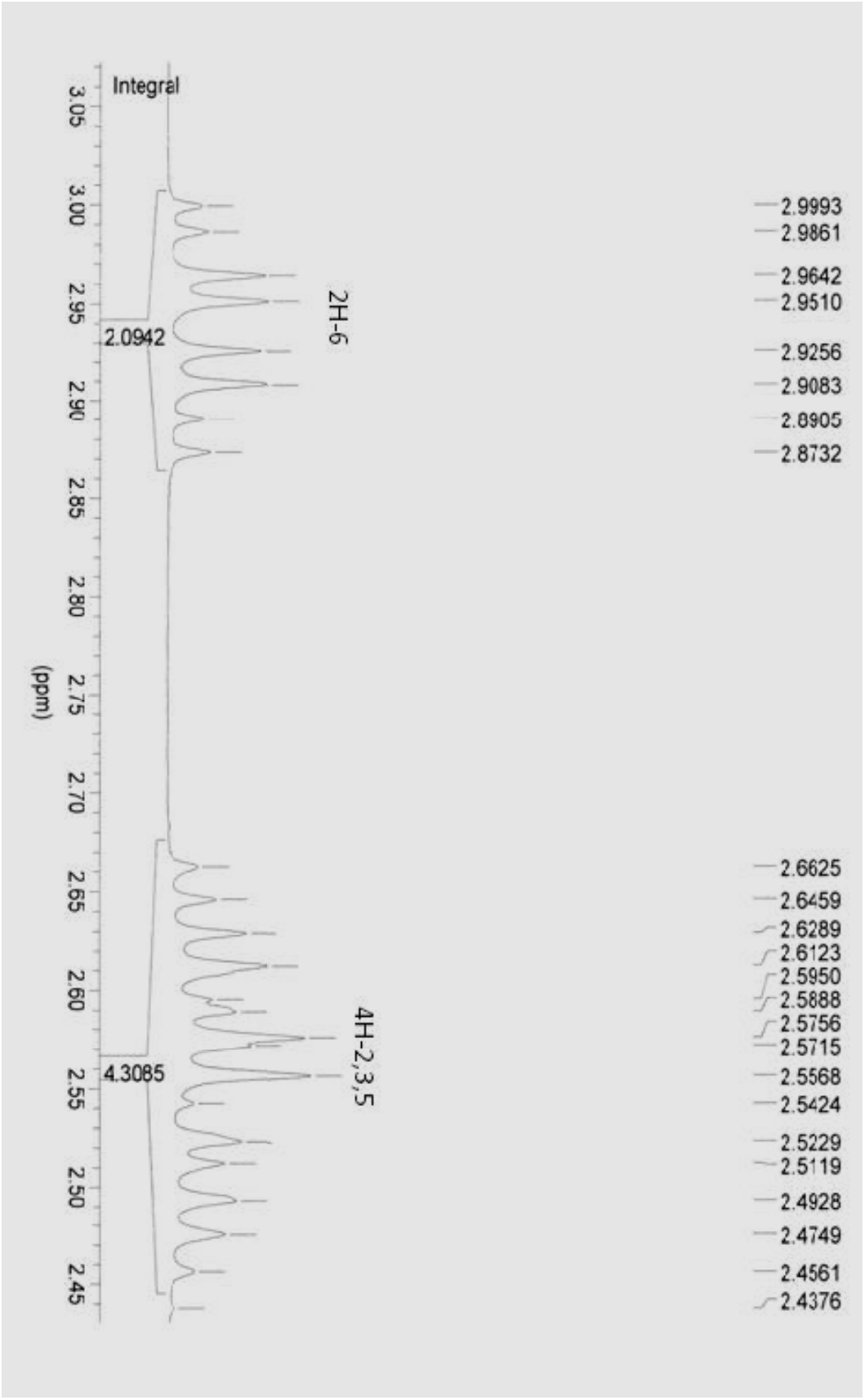
رقم الكربون	^{1}H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	-	181
2	2.48m	46.56
3	2.55m	40.98
4	3.91(dd, *J* =9 .1.1Hz, *J* =7.2Hz) 4.17(dd, *J* =9 .1.1Hz, *J* =7.2Hz)	71.35
5	2.61m	38.32
6	2.97(dd, *J* =14.0Hz, *J* =5.3Hz) 2.85(dd, *J* =14.0Hz, *J* =6.9Hz)	34.57
1’	-	129.53
2’	6.42 (d, *J* = 1.8 Hz)	110.89
3’	-	146.58
4’	-	144.37
5’	6.84 (d , *J* = 8.3Hz)	114.04
6’	6.52(dd, *J* =8.4Hz, *J* =1.8Hz)	121.32
1’’	-	129.76
2’’	6.83 (s *large*)	111.43
3’’	-	146.57
4’’	-	144.52
5’’	6.82(d , *J* =7.9Hz)	114.37
6’’	6.62(dd, *J* =8.0Hz, *J* =1.8Hz)	122.07
C’	3.83(s)	55.77
C’’	3.84(s)	55.84



طيف -1- ^{1}H -NMR للمركب LF2 في المجال 6. 35 ppm و 6.95 ppm



طيف ^{1}H -NMR للمركب LF2 في المجال 3. 65 ppm و 4.25 ppm



طيف ^{1}H -NMR للمركب LF2 في المجال 2.45 ppm و 3.05 ppm

ومن جهة أخرى يبين كلا من طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون وDEPT135 ثلاثة مجموعات CH_2 بتهجين sp^3 عند 34 ppm, 38 ppm وppm 72 على التوالي هذا الأخير يوافق ميثلين أكسجيني تم الإشارة إليه في طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون.

بالإضافة إلى وجود مجموعتي CH بتهجين sp^3 عند 40.98 ppm وppm 46.56.

الإشارتين الخاصة بمجموعتي ميثوكسي تظهران عندppm 55.6 .

أما بالنسبة إلى الستة مجموعات من CH الخاصة للحلقة البنزينية تظهرعند 110,89 ppmو 111,43ppm 114,04 ppm وppm 114,38 121,32 ppm وppm 122,07 تؤكد على ماجاء في معطيات مطيافية الرنين النووي المغناطيسي للبروتون.

وجود ستة كربونات رباعية و ذلك لظهورها في طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون و غيابها في طيف DEPT135 و هي تظهر عند 129,54ppm وppm 129,74 و 144,38 ppm و 144,52ppm و 146,58 ppm وppm 146,60 .

وقيمة إزاحة الكربونات عند 144,38 ppm و 144,52 ppm و 146,58 ppm وppm146,60 يدل على اتصالها بذارت أكسجينية.

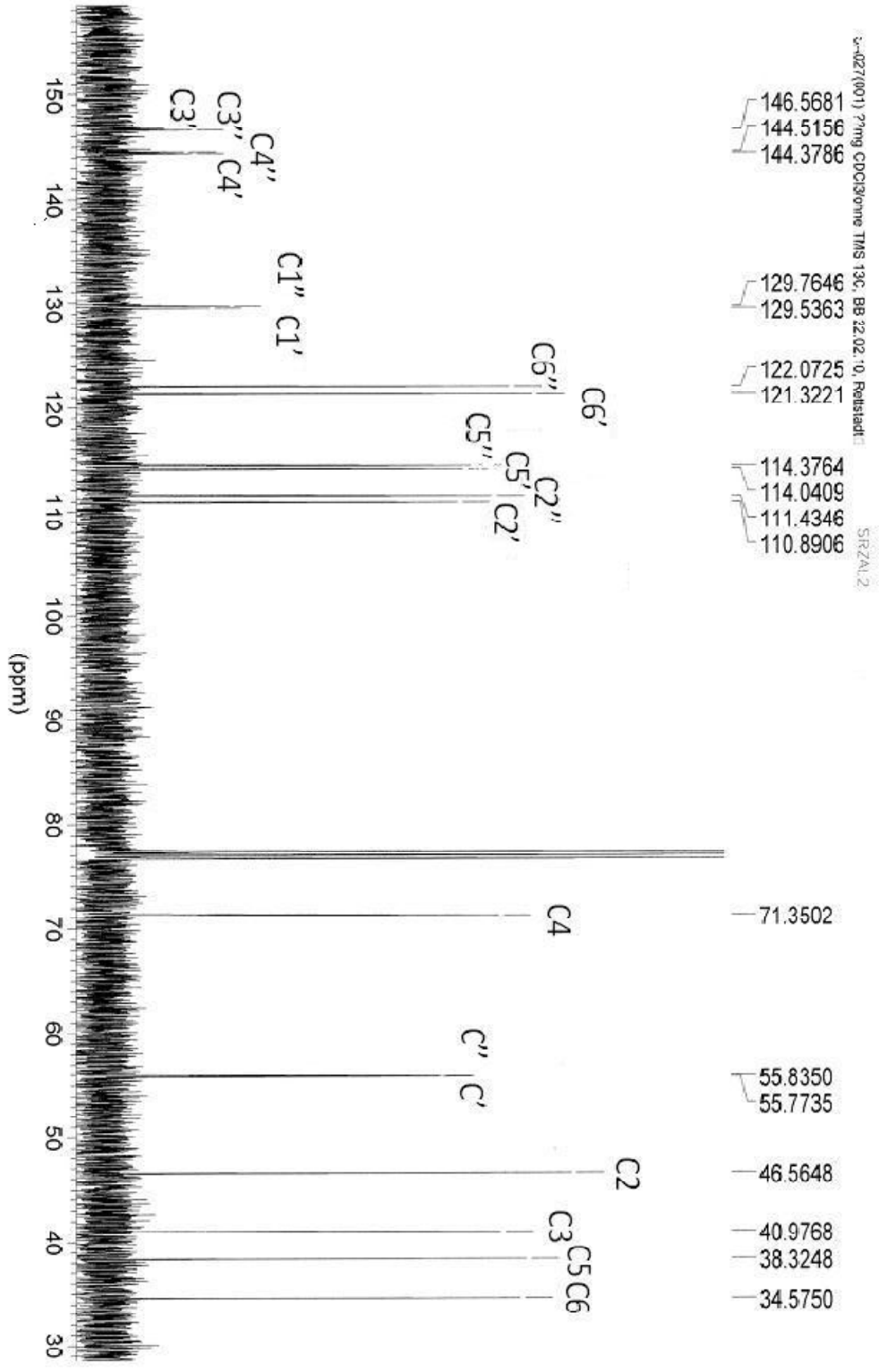
طيف الكتلة بتقنية ES+ تظهر لنا إشارة عند m/z=381 للأيون الجزيئي $[M+Na]^+$ وإشارة أخرى عند m/z=359 للأيون الجزيئي $[M+H]^+$ وبالتالي فإن الكتلة الجزيئية هي M=358 ، الإشارة m/z= 341 والإشارة m/z= 323 يوافقان على التوالي $[M+H-H_2O]^+$ و$[M+H-2H_2O]^+$ الموافقة للصيغة المجملة $C_{20}H_{22}O_6$.

كما تبين لنا الإشارة m/z= 137 على وجود تكسيرة بنزيلية.

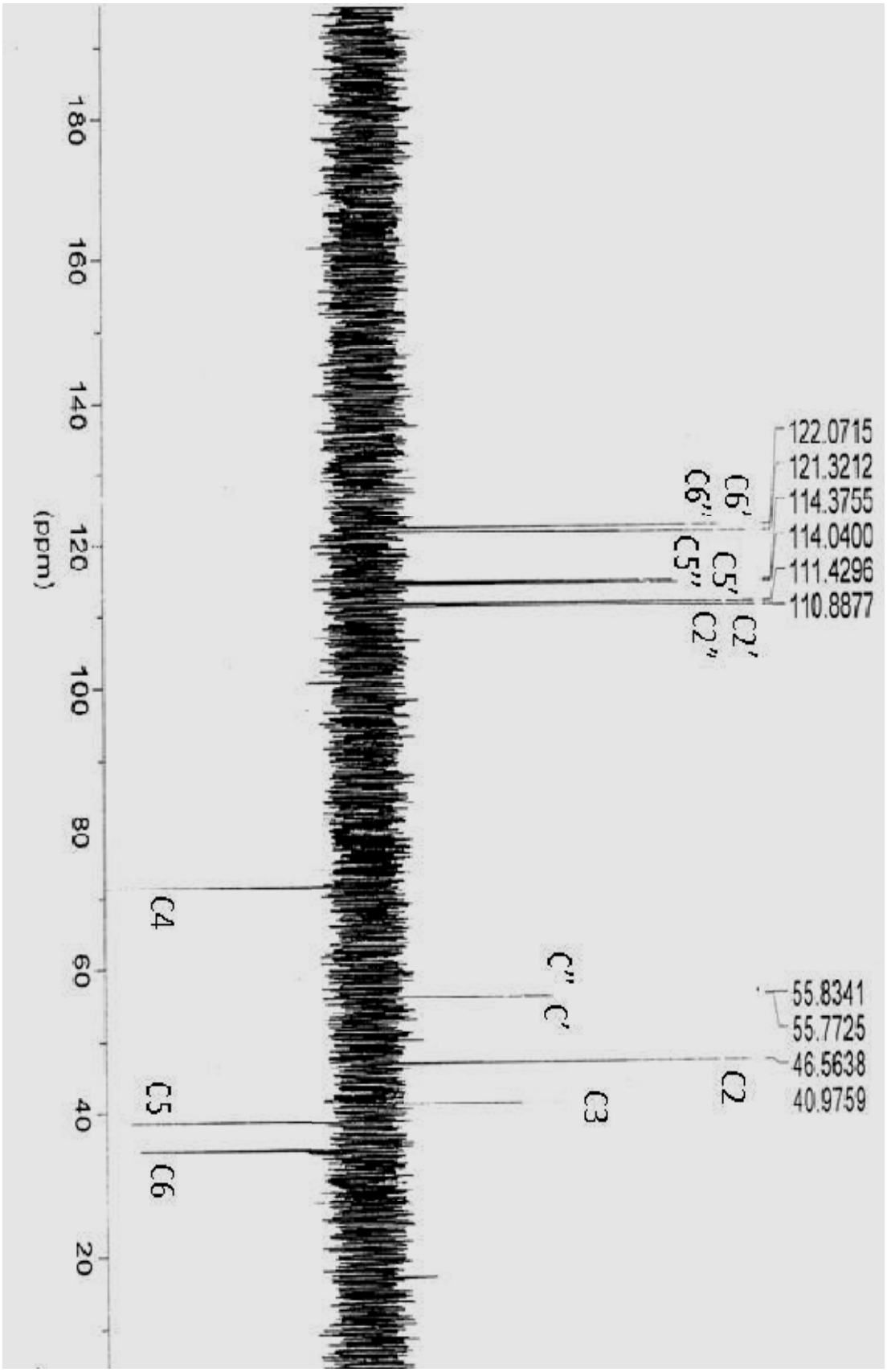
ومن خلال دراستنا لكل من مطيافية HMQC و مطيافية HMBC كل المعطيات في هذه الأطياف أكدت النتائج السابقه لكل من مطيافية البروتون والكربون، كذلك يبين لنا طيف HMBC معلومة

إضافية تتمثل في وجود إشارة عند 181ppm تدل على وجود وظيفة كربونيل وهي إزاحة تميز المركبات اللاكتونية.

حيث أن طبيعة تعددية الميثيلين الأكسجيني (CH_2 72ppm) تدل على ارتباطه مع CH لاتناظري كذلك بإزاحته الكيمائية توافق وتؤكد وجود المركب اللاكتوني.

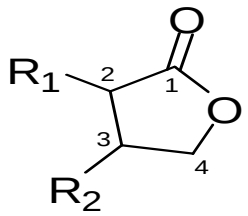


طيف ^{13}C- NMR للمركب LF2 في المجال 30 ppm و 150 ppm

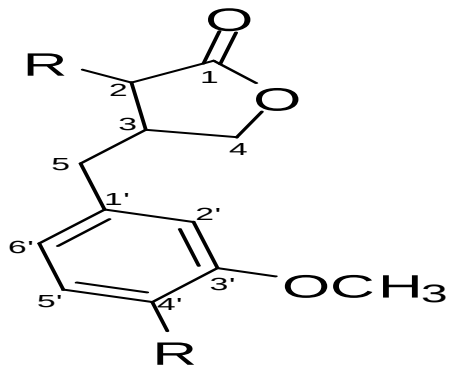


طيف DEPT135 للمركب LF2 في المجال 10 ppm و 150 ppm

كما تشير نقاط التعالق أن المركب اللاكتوني مرتبط عند كربون 2 (C2) و الكربون 3 (C3), والذي يمكن من خلال تتبع نقاط التعالق لكل تفرع تحديد بقية بنية المركب, و يمكن ذلك بتحديد نقاط التعالق من مطيافية HMBC ابتداءً من CH_2 الخاص بحلقة اللاكتون حيث نلاحظ :



- نقطة تعالق بين H-4 الخاص بحلقة اللاكتون و C5 عند 38ppm التي توافق CH_2
- نقطة تعالق بين H-2' الخاص بالحلقة البنزينية و C5 عند 38ppm التي توافق CH_2
- نقطة تعالق بين H-2' الخاص بالحلقة البنزينية و C6' عند 121.32 ppm.
- نقطة تعالق بين H-2' الخاص بالحلقة البنزينية و C4' عند 144.37 ppm.
- نقطة تعالق بين H-6' الخاص بالحلقة البنزينية و C4' عند 144.37 ppm.
- نقطة تعالق بين الهيدروجينات الخاصة بمجموعة الميثوكسي و C3' عند 146.57 ppm.
- نقطة تعالق بين H-5' الخاص بالحلقة البنزينية و C3' عند 146.58 ppm الحامل لمجموعة الميثوكسي .
- نقطة تعالق بين H-5' الخاص بالحلقة البنزينية و C1' الرباعي عند 129.53 ppm .

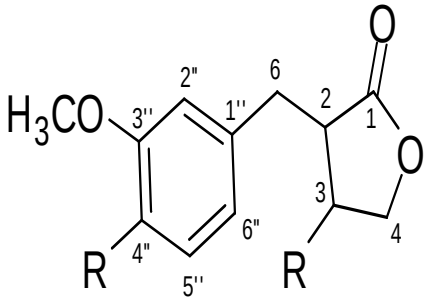


تبين لنا الإشارة m/z= 137 في طيف الكتلة على وجود تكسيرة بنزيلية .مما يعني أن:

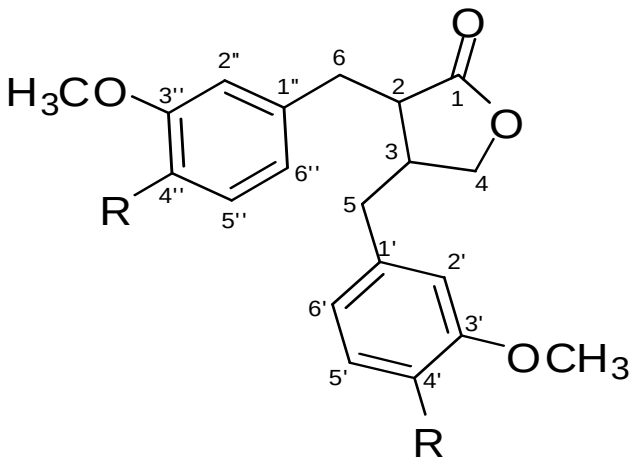
$$137 = 75(C_6H_3) + 14(CH_2) + 31(OCH_3) + R \Rightarrow R = 17\ (OH).$$

وابتداءً من مجموعة الكربونيل الخاصة بحلقة اللاكتون نلاحظ :

- نقطة تعالق بين H-6 الخاص بـ CH_2 و مجموعة الكربونيل الخاصة بحلقة اللاكتون عند 181ppm .
- نقطة تعالق بين H-2'' الخاص بالحلقة البنزينية و C6 عند 34.57 ppm التي توافق CH_2
- نقطة تعالق بين H-2'' الخاص بالحلقة البنزينية و C6'' عند122.07 ppm .
- نقطة تعالق بين H-2'' الخاص بالحلقة البنزينية و C4'' عند144.52 ppm.
- نقطة تعالق بين H-6'' الخاص بالحلقة البنزينية و C4'' عند144.52 ppm.
- نقطة تعالق بين الهيدروجينات الخاصة بمجموعة الميثوكسي و C3'' عند 146.57 ppm.
- نقطة تعالق بين H-5'' الخاص بالحلقة البنزينية و C3'' عند 146.57 ppm الحامل لمجموعة الميثوكسي.
- نقطة تعالق بين H-5'' الخاص بالحلقة البنزينية و C1'' الرباعي عند 144.52 ppm.

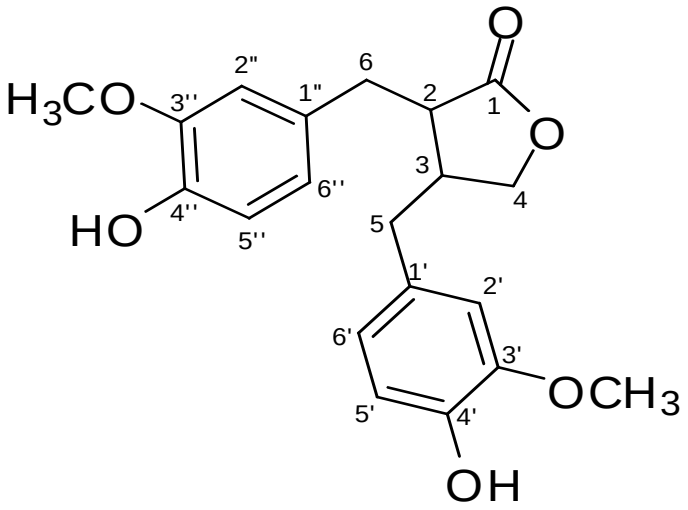


وعليه فإن صيغة المجملة للمركب هي:



من خلال مطيافية الكتلة نلاحظ أن كلا من الإشارة m/z= 341 والإشارة m/z= 323 يوافقان على التوالي $[M+H-H_2O]^+$ و $[M+H-2H_2O]^+$ ومنه نستنتج أن أن المركب يحتوي على مجموعتي هيدوكسيل.

وعليه فإن الصيغة النهائية للمركب هي:

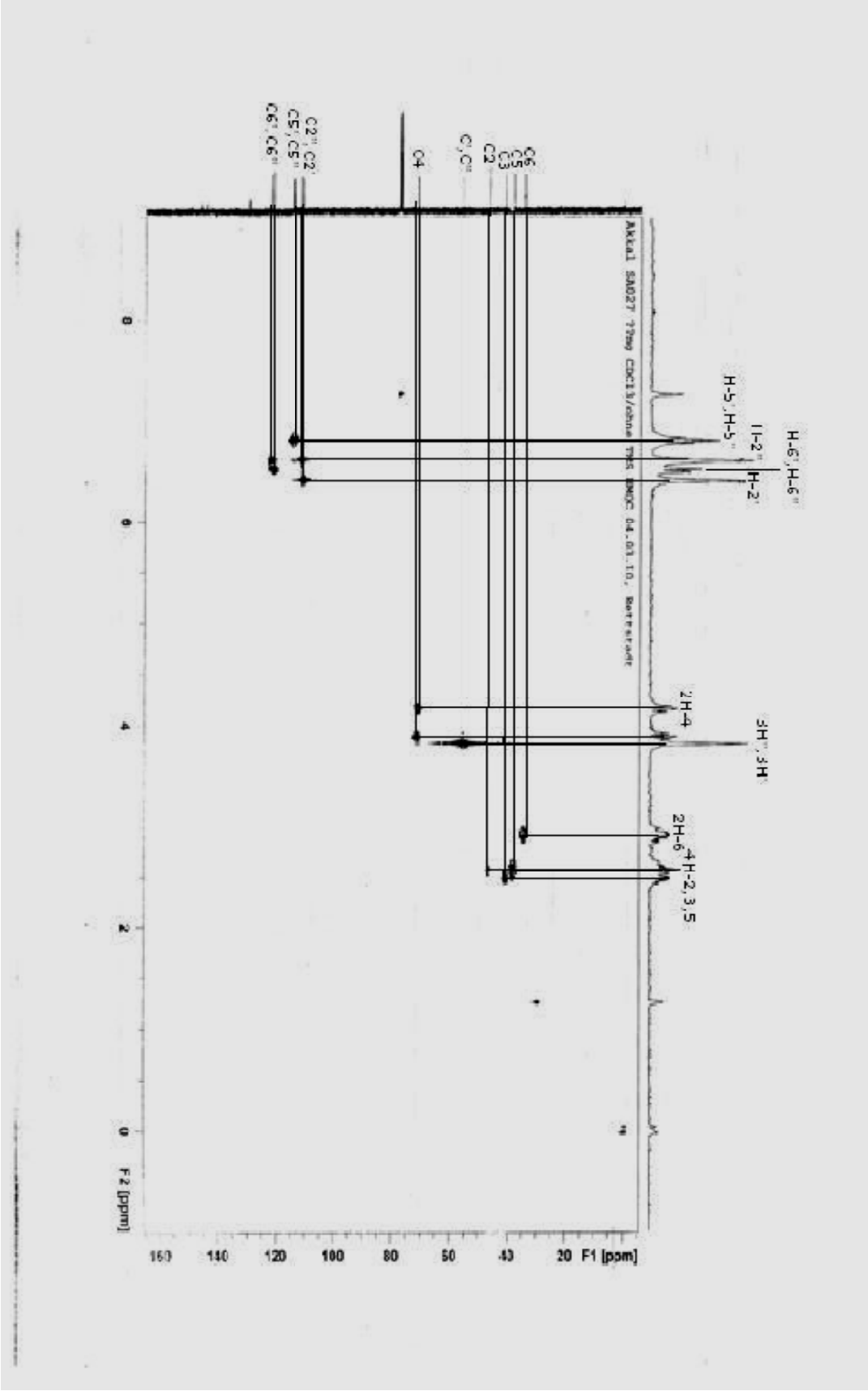


2 (4”-hydroxy-3”-methoxybenzyl)-3(4’-hydroxy-3’-methoxybenzyl) butrolacton.[103] (**matairesinol**)

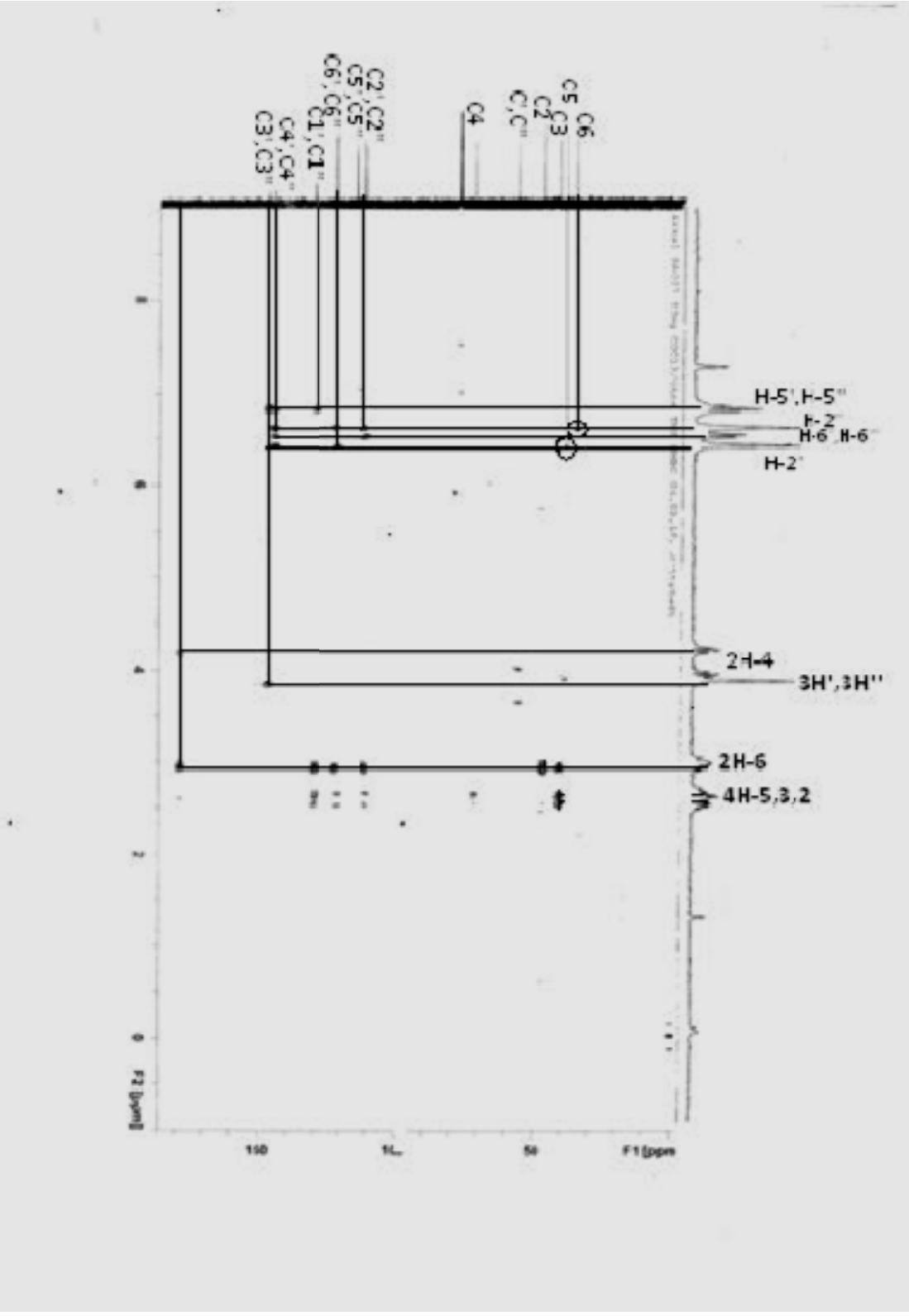
- الجدير بالذكر أن هذا المركب تم فصله في العائلة التيميلية من *Stellera chamaejasme* [25] ولكن لأول مره تم فصله من الجنس *Thymelaea* في هذا النوع قيد الدراسة.

جدول - 13- تعالقات الـHMBC والـ HMQC للمركب :

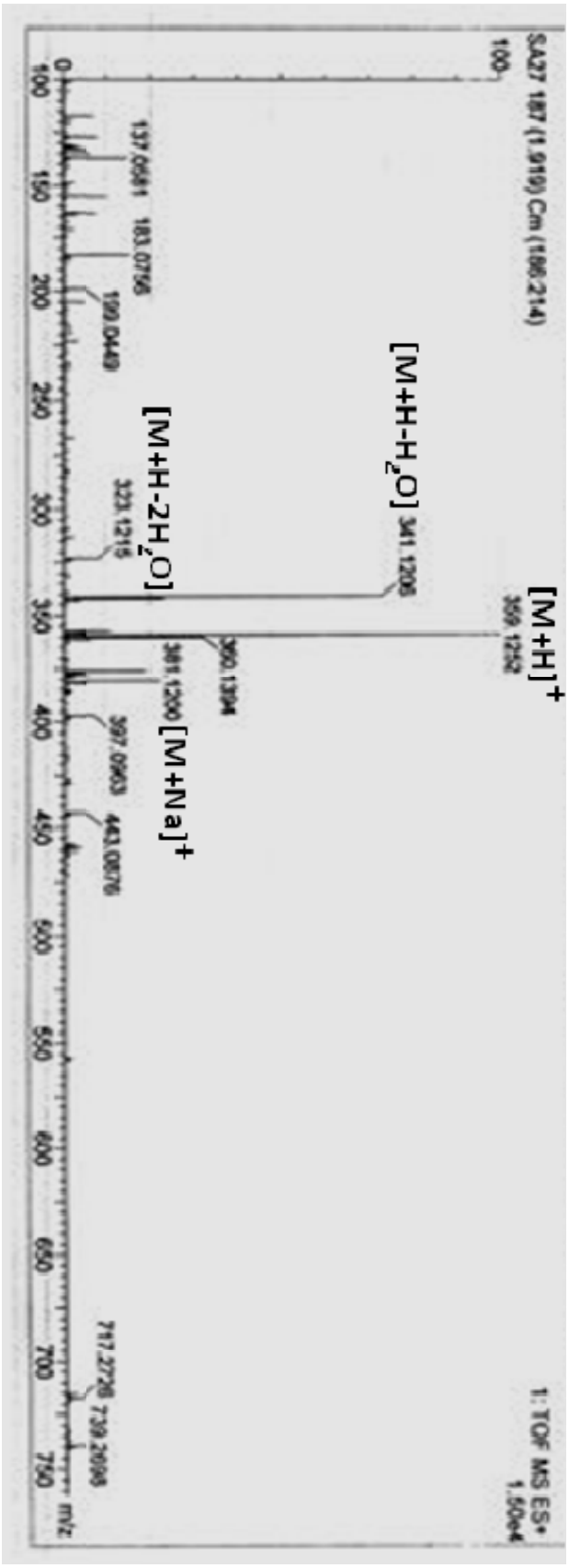
البروتون	^1H (ppm)	الكربون الذي يرتبط به البروتون HMQC (ppm)	الكربون الذي يجاوره HMBC (ppm)
H-2	2.48m	46.56	-
H-3	2.55m	40.98	-
H-5	2.61m	38.32	-
H-6	2.97(dd, *J* =14.0Hz, *J* =5.3 Hz)2.85(dd, *J* =14.0Hz, *J* = 6.9 Hz)	34.57	40.98 (C3) ; 181 (CO)
H''	3.84(s)	55.84	146.57 (C3'')
H'	3.83(s)	55.77	146.58 (C3')
H-4	3.91(dd, *J* =10.1Hz, *J* =8.0Hz) 4.17(dd, *J* =10.1Hz, *J* =8.1 Hz)	71.35	181 (CO)
H-2'	6.42 (d, *J* = 1.8 Hz)	110.89	152.35 (C5) ; 121.32 (C6') ; 71.35 (C4)
H-6'	6.52(dd, *J* =8.0Hz, *J* =1.8Hz)	121.32	110.89 (C2') ; 71.35 (C4)
H-6''	6.62(dd, *J* =8.0Hz, *J* =1.8Hz)	122.07	111.43 (C2'') ; 144.52 (C4'')
H-2''	6.83 (s *large*)	111.43	34.57 (C6) ; 122.07 (C6'') ; 144.52 (C4'')
H-5''	6.82(d , *J* =7.9Hz)	114.04	129.76 (C1'') ; 146.57 (C3'')
H-5'	6.84 (d , *J* = 8.3Hz)	114.37	129.53 (C1') ; 146.58 (C3')



طيف ^{1}H -NMR ثنائية البعد HMQC للمركب LF2



طيف ^{1}H -NMR ^{1} ثنائية البعد HMBC للمركب LF2



طيف الكتلة للمركب LF2

5ـ نتائج الفعالية البيولوجية:

5-1- نتائج الفعالية ضد ميكروبية للزيوت الأساسية للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur:

أظهرت نتائج الإختبار البيولوجي للفعالية ضد بكتيرية للزيت الأساسي أن هذا الأخير أثر على نمو البكتيريا في التراكيز المختلفة المتغيرة وأن قطر التثبيط يزداد بزيادة تركيز الزيت الأساسي وبلغ أقصى حد له عند التركيز 2000µ /ml خاصة مع البكتريا *E.coli* و *S. aureus* . بينما ينعدم تأثيره عند التركيز25µ/ml في كل من *E.coli* و *P. aerogenosa* .

جدول - 14 - يبين نتائج الفعالية ضد ميكروبية للزيت الأساسي للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. :

السلالات البكتيرية	25µg/ml	100µg/ml	500µg/ml	2000µg/ml
Bacteria *:* *E.coli*	-	18.66±01.5	25±1,73	27,33±0,57
Klebsela pneumoniae	9.0±0.0	10.00±0.0	23.66±2.51	27±1
Staphylococcus aureus	15.33±1.15	20±0.0	25.66±0.57	27.33±3.78
Pseudomonas aerogenosa	-	16.00±0.0	10.66±01.15	11.33±01.15

5-1-2 نتائج الفعالية ضد ميكروبية للمستخلص الخام للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.:

اختبار الفعالية ضد ميكروبية بالانتشار أجري على أربعة كائنات مجهريه إحداها فطر *Aspergillus niger* والبقية عبارة عن بكتيريا موجبة الجرام *Staphylococcus blanc*، *Staphylococcus aureus* وسالبة الجرام *E.coli*.

أظهرت النتائج الملخصة في الجدول (15) أن المستخلص الخام (MeOH :CH_2Cl_2 1 :1) للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. ثبط نمو الكائنات المهجرية المختبرة وأن قطر منطقة التثبيط يتزايد نسبيا مع زيادة التركيز للمستخلص .

سجلت أعلى قيمة لقطر منطقة التثبيط لدى بكتيريا *Staphylococcus blanc* وذلك عند القيمة 8000µg/ml .

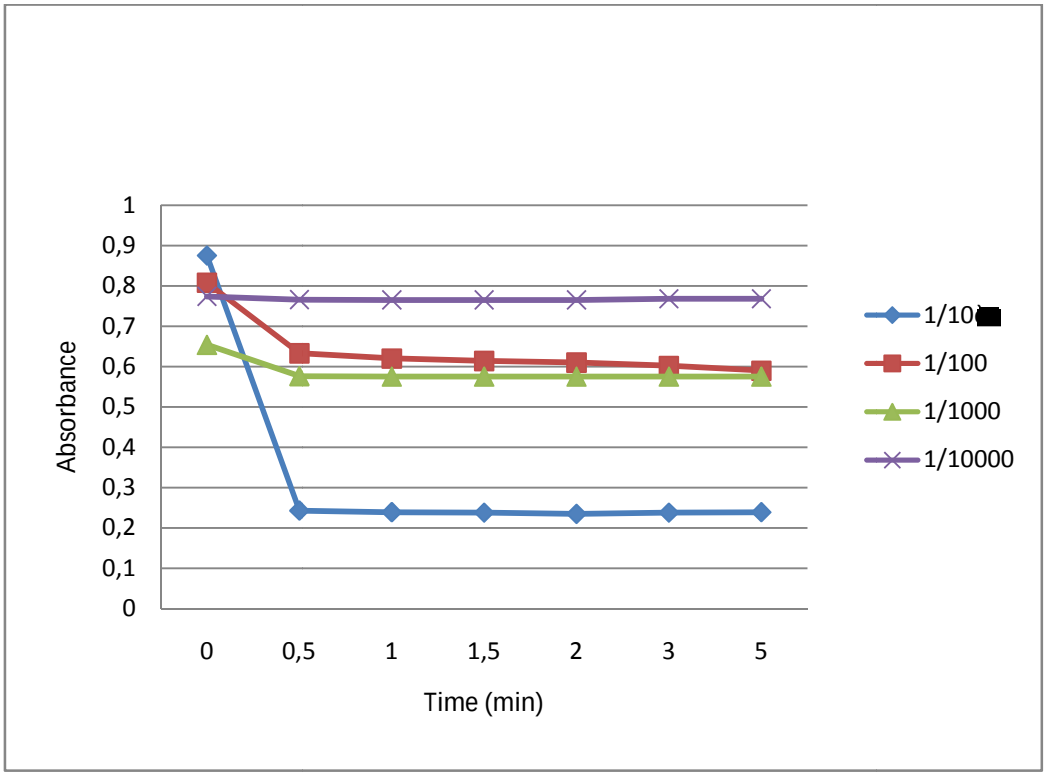
بالرغم من ذلك فإن الفطر *Aspergillus niger* قطر منطقة التثبيط التي سجلت له صغيرة حتى مع التركيز المرتفع للمستخلص عند 4000µg/ml بالمقارنة مع كل السلالات البكتيرية المختبرة، كما أنه لا توجد فعالية ضد كلا من *Staphylococcus aureus* عند و الفطر *Aspergillus niger* عند التراكيز المنخفضة.

جدول - 15 - يبين نتائج الفعالية ضد ميكروبية للمستخلص الخام للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.:

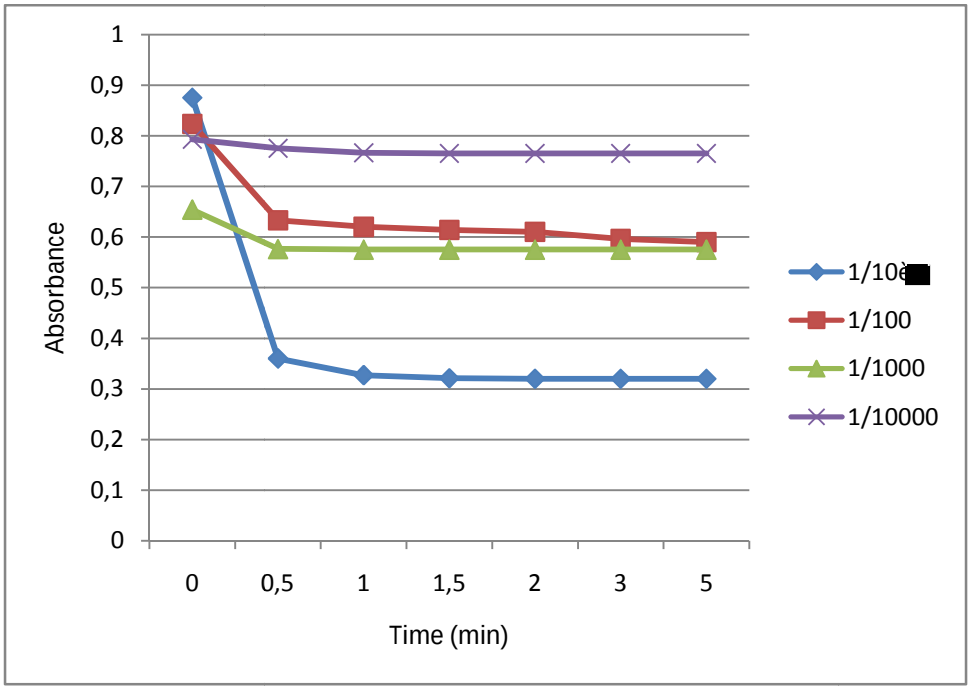
السلالات البكتيرية والفطرية	250µg/ml	500µg/ml	1000µg/ml	2000µg/ml	4000µg/ml	8000µg/ml
Bacteria : *E.coli ATCC 25922*	-	6.75± 0.57	7.25±0.86	11±01.47	17.75±02.1	23±00
Staphylococcus blanc ATCC 27853	7±01.47	17.5±1.15	18.50±01.5	18.75±02.1	27.5±01.47	**30.5±1.15**
Staphylococcus aureus	-	-	10.25±00	16.5±0.81	18 ±1.75	26.25±1.15
Fungus *Aspergillus niger*	-	-	-	-	10±01.47	16.75±00

6- نتائج الفعل المضاد للاكسدة للمستخلص الخام للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.:

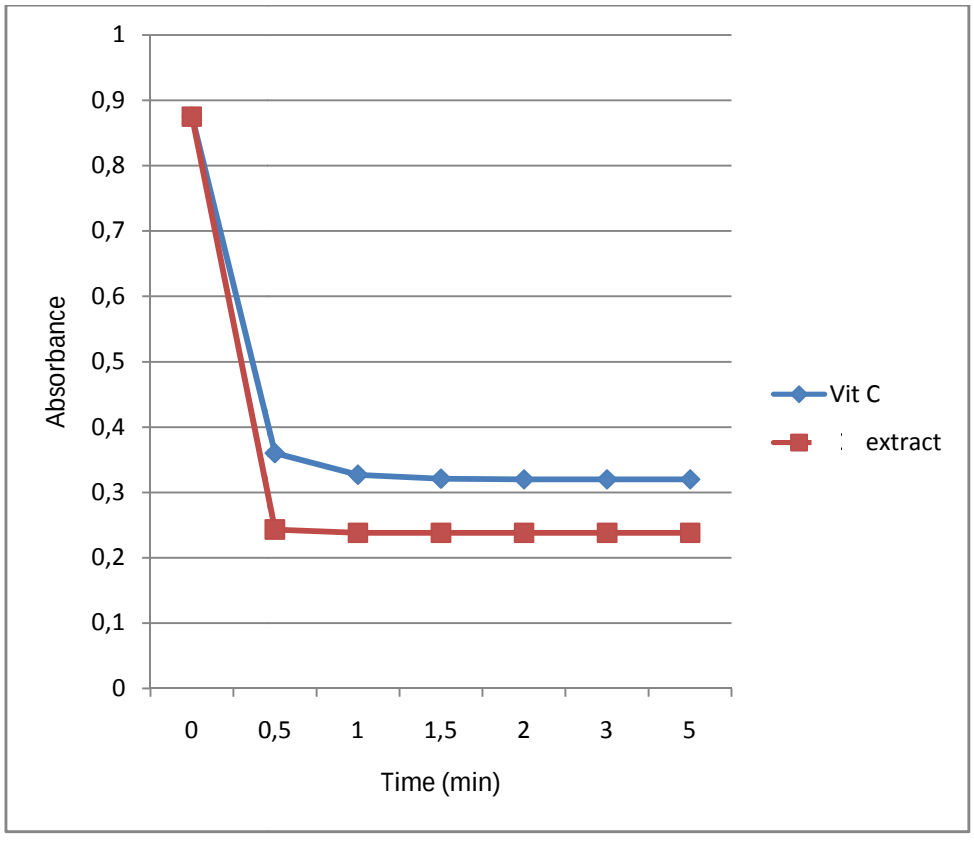
يتضح من خلال المدرجات والمنحنيات البيانية في الأشكال أن الفعل المضاد للأكسدة الذي أجري على المستخلص الخام لنبات*Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. وذلك بتحضير 1 ملغ /10 مل من هذا المستخلص ثم إجراء التخفيفات الموضحة في الأشكال البيانية بأنه عالي جدا مقارنة بالشاهد المستعمل و هو فيتامين C خاصة التركيز 1/10 حيث بلغ حد أقصى من نسبة الاختزال 73,00%.



شكل ـ 35- المنحنى البياني الفعل المضاد للأكسدة المستخلص الخام لنبات *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.

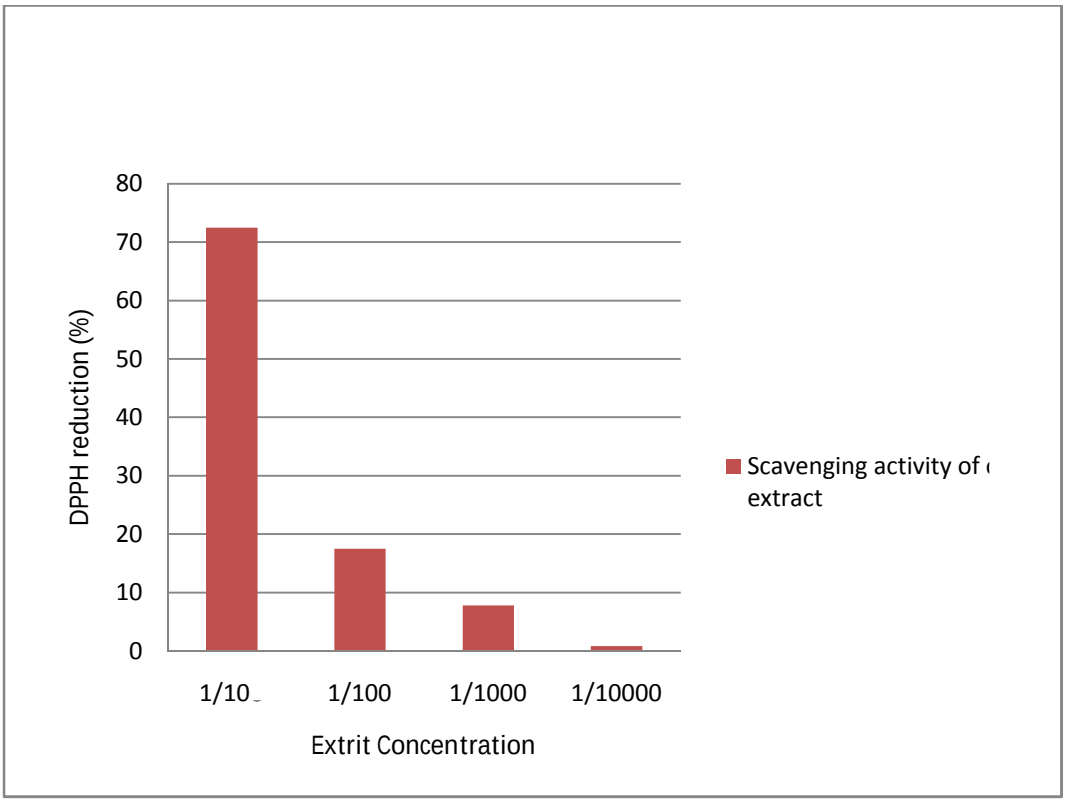


شكل -36- المنحنى البياني الفعل المضاد للأكسدة Vit C

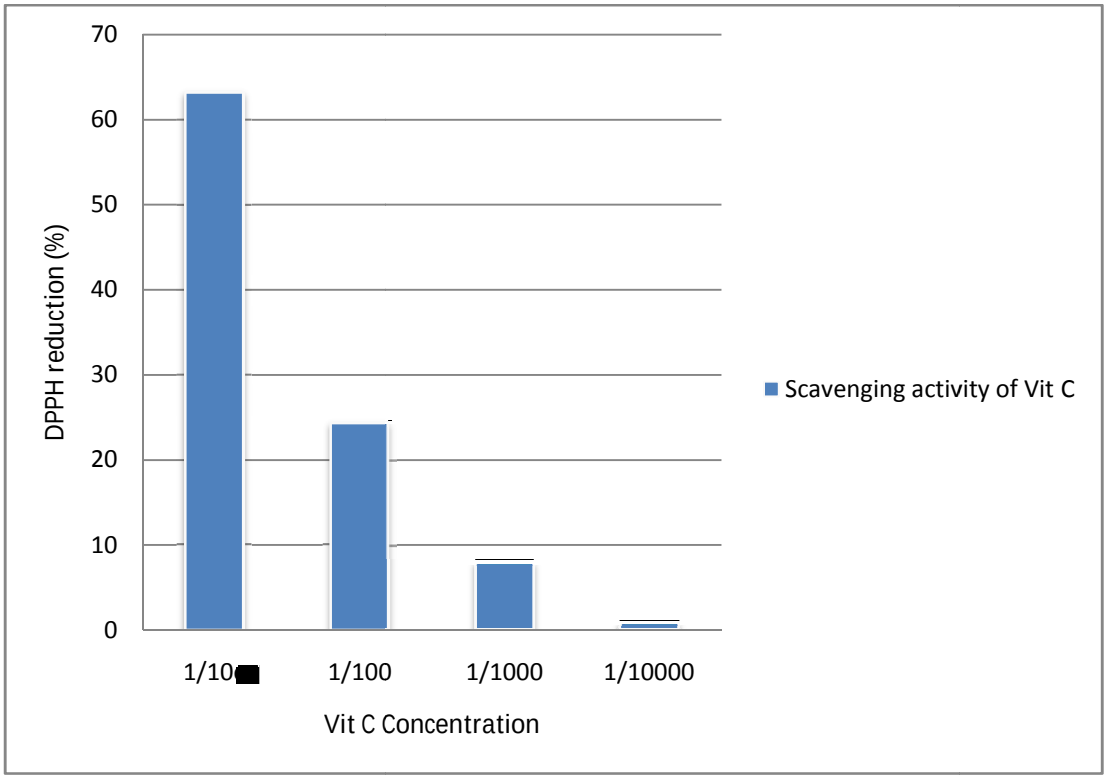


شكل - 37- المحنى البياني مقارنة الفعل المضاد للأكسدة للمستخلص الخام و Vit C

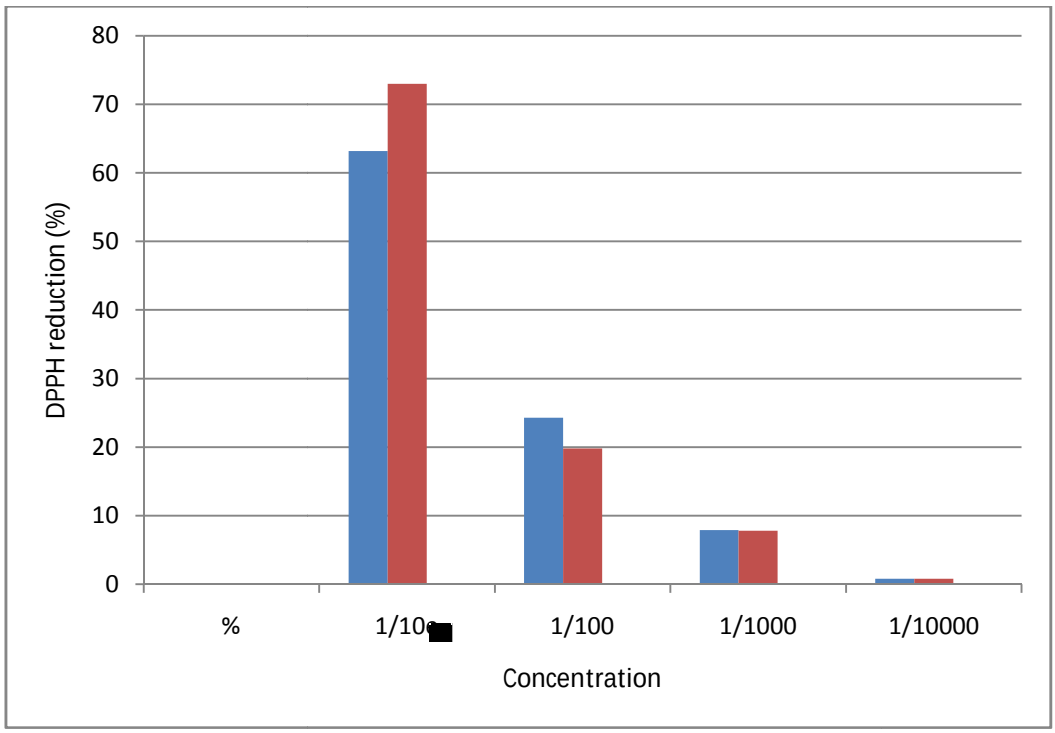
الشكل-35- يبين مقدار الفعل المضاد للاكسدة للمستخلص الخام للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. وذلك في العلاقة بين الامتصاصية والتراكيز المختلفة للمستخلص ، حيث نلاحظ التزايد في الفعل التثبيطي مع زيادة التراكيز من خلال نقصان الامتصاصية المسجلة للمركب DPPH وبالمقارنة مع الفعل المضاد للأكسدة لفيتامين C في الشكل -36- والمبينة في الشكل -37- نلاحظ أن المستخلص الخام *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. عند التركيز 1 ملغ /10 مل أعطى نتيجة تثبيطية أكبر من فيتامين C .



شكل - 38 - المدرج التكراري نسبة إختزال الفعل المضاد للأكسدة للمستخلص الخام *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.



شكل ـ 39 ـ المدرج التكراري نسبة إختزال الفعل المضاد للأكسدة Vit C



شكل ـ 40- المدرج التكراري مقارنة نسبة إختزال الفعل المضاد للأكسدة للمستخلص الخام و Vit C

شكل - 38 - يبين مقدار الفعل المضاد للاكسدة للمستخلص الخام للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. وذلك في العلاقة بين نسبة إختزال الفعل المضاد للأكسدة للمستخلص الخام والتراكيز المختلفة له حيث نلاحظ التزايد في إختزال الفعل المضاد للأكسدة مع زيادة التراكيز وبالمقارنة مع نسبة إختزال الفعل المضاد للأكسدة فيتامين C في الشكل -39 - والمبينة في الشكل -40- نلاحظ أن المستخلص الخام *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. عند التركيز 1 ملغ /10 مل أعطى نتيجة تثبيطية بنسبة إختزال 73,00% أكبر من فيتامين C بمقدار 10 %.

وحسب المراجع العلميه المتاحة لا يوجد بحث منشور حتى الان متعلق بالفعالية البيولوجية سواء المضادة للبكتريا والفطريات أو المضادة للأكسدة للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur.

!

الخـاتمـة

إن الغاية الرئيسية من هذا البحث هي التعرف على نواتج الأيض الثانوي للنبتة *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur. و دراسة جانب من الفعالية البيولوجية لها.

خلال إنجازنا لهذا البحث قمنا بدراسة بيبليوغرافية لنواتج الأيض الثانوي عن الطرق المستخدمة في فصل و تنقية هذه المركبات و الطرق الفيزيو كميائية لتحديد بنيتها.

اتبعنا في عملية الفصل جملة من الخطوات ابتداء من الاستخلاص يليه فصل أولي بواسطة كروماتوغرافيا العمود بعدها القيام بعملية الفصل باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

من أجل التحديد البنيوي للمركبات استخدمنا مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مطيافية الكتلة. و قد تم فصل مركب كومارياني **(Ombelliferone)** ومركب ليجنان لاكتوني **(matairesinol)** بالإضافة إلى تحليل الزيوت الأساسية الذي نتج عنه وجود احدى عشر مركبا أكثرها **وفرة D-menthone، 2-Undecanone و Perillal .**

كما قمنا بدراسة الفعالية البيولوجية المتمثلة في نوعين مختلفين الأول خاص بالفعالية ضد ميكروبية بواسطة عملية الانتشار، وقد كانت نتائجها إيجابية جدا خاصة مع *Staphylococcus blanc* في المستخلص الخام للنبتة (1:1) (CH_2Cl_2 : MeOH) و كانت نتائج إيجابية خاصة مع *Staphylococcus aureus* و ذلك مع الزيوت الأساسية. أما الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص استخدمنا فيه DPPH كانت نتائجه معتبرة جدا.

من خلال النتائج المشجعة لهذا البحث نتطلع لإستكمال دراسة بنية بقية المركبات المفصولة، وفصل المستخلص (H_2O:MeOH)(7:3حجم/ حجم) للنبتة، والتعمق أكثر في دراسة الفعالية البيولوجية للمركبات المفصولة.

الملحق

Available online at www.scholarsresearchlibrary.com

Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2010, 2(5): 428-431
(http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html)

ISSN 0975-5071
USA CODEN: DPLEB4

Essential oil Composition of *Thymelea microphylla* Coss et Dur.

[1]Said Noamane Labib, [1]Zellagui Amar*, [1]Mesbah Khaled,[1]Gherraf Noureddine, [2]Lahouel Mesbah and [1]Rhouati Salah

[1]*Laboratory of Natural Products and Organic Synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Mentouri–Constantine, Algeria.*
[2]*Laboratory of Pharmacologie and phytochemistry, Department of natural and life science, Faculty of Science, University of Jijel, Algeria.*

ABSTRACT

Essential oil components of the aerial parts of Thymelea microphyla Coss et Dur. have been studied by gas chromatography-mass spectrometry to afford 11 components. The major components were found to be: D-menthone (41.86 %), 2-Undecanone (23.74 %), Pulegone(11.94%) and Perillal (9.34 %). Some other compounds were only present in minor amounts. In total, volatile oil composition of Thymelea microphyla Coss et Dur. was considered as a rich source of oxygenated monoterpenes **.**

Key words: *Thymelea microphyla* Coss. et Dur., *Essential oil, GC-MS.*

INTRODUCTION

Essential oils are secondary metabolites that plants usually synthesize to combat infectious or parasitic agents or generate in response to stress conditions. Essential oils are aromatic components obtained from different plant parts. They are important natural products used for their flavour and fragrances in food, pharmaceutical and perfumery industries. They are also sources of aroma chemicals, particularly of enantiomers and useful chiral building blocks in syntheses [3].

The investigation of essential oil of all species belonging to the Thymeleaceae family is very poor especially the genus Thymelea.

Thymelea is a Mediterranean genus belonging to a primarily tropical and subtropical family. This genus is here presented as a particular case on which the hypothesis of an in situ evolution of the Mediterranean flora from a Tertiary subtropical stock can be phylogenetically tested.

Thymelea Mill. comprises 31 species [2]. In Algeria it is represented by 7 species one of which named *Thymelea microphyla* Coss et Dur. (Endemic plant) [1].
Thymelea species are reported to be medicinal plants in the literature as well as in folklore, and their medicinal values are well documented. Their properties are attributed to a variety of active phytochemical constituents. Many flavonoids and coumarins have been isolated from various species [4].

The present work deals with the chemical composition of the hydrodistilled oils obtained from the aerial parts of the Algerian *Thymelea microphyla* Coss. et Dur., previously not investigated. Noneless, some studies have been reported on the species *Thymelea* where, Odeh *et al.* (2007) investigated the volatile components of *Thymelea hirsuta* and identified the major components as hexanol, nonanal, decanal, benzaldehyde, 3,7- dimethyl-1,6-octadien-3-ol, nonanal, 9 – benzyl alcohol, dodecanal, tetradecane , phenylethyl alcohol [5]. Another study has been carried out on the antifungal activity of *Thymelea lythroides* extract [6].

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial parts of *Thymelea microphyla* Coss. et Dur. were collected in March 2008 (flowering stage) in Ouargla, Algeria. The plant was identified by Dr. Chahma A. M. university of Ouargla,. A voucher specimen was deposited at the chemistry Department University of Mentouri-Constantine under the code number ZA 107.

Extraction

Essential oils were obtained by hydrodistillation of 100g of dried fruits using a Clevenger-type apparatus for 3 h. diethyl ether (10 ml) was used as the collector solvent as reported in literature. After evaporation of the solvent, the oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored in sealed vials protected from the light at −20 °C before analyses to afford 0.02 g (02 %) of crude oil. The oil sample was subsequently analyzed by GC-MS .

Identification of components

Gas Chromatography/Mass Spectroscopy.

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)
The oil was analyzed by GC/MS using a Agilent 5973EI mass selective detector coupled with an Agilent GC6890A gas chromatograph, equipped with a cross-linked 5% PH ME siloxane HP-5MS capillary column (30 m · 0.25 mm · film thickness 0.25 μm). Operating conditions: The carrier gas flow was 1.6 ml He/min, column pressure was 100 Kpa. The injector and detector temperatures were 220°C and 250°C respectively. The column temperature was held at 60°C for 1 min, then raised from 60°C to 200°C at 10°C/min and held there for 5 min and from 200°C to 240°C at 10°C /min and held there for 6 min. The program was run in the splitless mode with a mass range of 50–400 u, and the scan interval was 0.5 s. Detector voltage was set at 1.5 kV.

Identification of components

Identification of oil components was achieved on the basis of their retention indices RI, (determined with reference to a homologous series of normal alkanes), and by comparison of their mass spectral fragmentation patterns with those reported in the literature [7] and stored on the MS library (NIST database). The concentration of the identified compounds was computed from the GC peak total area without any correction factor.

RESULTS AND DISCUSSION

Prior to carrying out the hydrodistillation, a phytoscreening study has been conducted focussing on 7 chemical groups. The results revealed the presence of essential oil, flavonoids, , saponins, tannins, and Coumarins, not previously reported in the literature (Table:1).

Table 1 : Phytochemical survey from *Thymelea microphyla* Coss et Dur.

Chemical Groups	R	L	St	Fl	F&S
Volatile oils	-	++	++	+	+
Alkaloids	-	-	-	-	-
Flavone Aglycone	-	+	+	+	+
Coumarins	++	+++	+++	+++	+++
tanins	+	++	++	++	+
Saponins	-+	-+	-+	-+	-
Flavone glycoside	-	+++	++	+++	++

(+) present, (++) present, (+++) present, (±) Traces, (-) absent
R:Roots, L : Leaves, St : Steams, Fl : Flowers, F&S: Fruits and Seeds

The GC analysis identified 11 compounds representing 100 % of the total volatile content. The major components were found to be: D-menthone (41.86 %), 2-Undecanone (23.74 %), Pulegone (11.94%) and Perillal (9.34 %). some other compounds were only present in minor amounts. The oil composition is dominated by the Monoterpenes (67.84 %) dominated by oxygenated compounds (62.94%). Among the sesquiterpenes, oxygenated compounds represent the whole content (1.54 %).

Table 2: Essential oil composition from *Thymelea microphyla* Coss et Dur.

Chemical constituents	Essential oil	Rt	%
1-carboxylic acid bornane		2.634	3.88
Limonene	Hydrocarbon monoterpene	9.695	1.92
isobutyranilide		10.376	0.58
D-menthone	Oxygenated monoterpene	16.432	41.86
Pulegone	Oxygenated monoterpene	21.006	11.74
(6E)-2,5-Dimethyl-1,6-octadiene	Hydrocarbon monoterpene	21.784	1.40
Perillal	Oxygenated monoterpene	22.876	9.34
2-Undecanone		25.649	23.94
(Z,E)-α-Farnesene	Hydrocarbon sesquiterpene	33.018	1.54
1-(2-Bromovinyl)-adamantane		36.556	2.15
Artemesiatriene	Hydrocarbon monoterpene	37.494	1.66

Table 3: main class and subclasses of essential oil components of *Thymelea microphyla* Coss et Dur.

Hydrocarbon Monoterpenes	**4,92**
Oxygenated Monoterpenes	**62,94**
Sesquiterpenes	**1,54**
Others	**30,55**

CONCLUSION

Based on the above study, it may be summarized that the flowering aerial parts of *Thymelea microphyla* Coss et Dur. may be utilized for separation of the essential oil and a source of Oxygenated monoterpenes.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Chahma A. M. university of Ouargla for his help in identifying the plant material.

REFERENCES

[1] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridianales, Paris :CNRS,**1962**, 672

[2] D. Galicia-Herbada, *Syst. Evol*. **2006,** 257: 159–187

[3] S. Bakkali, D. Averbeck, M. Averbeck Idaomar– A review *Food and Chemical Toxicology* **, 2008,**46 446–475

[4] F. Julien,.Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich, Thèse de doctorat ,Lausane, **2002**, p 43-51.

[5]. I. Odeh S. Abu-Lafi H.Dewik I.m Al-Najjar A. Imam V. M. Dembitsky Lumı O. Hanus A *Food Chemistry* 101, **2007**, 1393–1397.

[6].N. Douhou ,K. Yamni , A. Badoc , A. Doura ., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **2004**, 143, 31-38

[7] R.P. Adams. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, **2007.**

قائمة المراجع

[1] غسان حجاوي, غ. (2002). علم العقاقير والنباتات الطبية الصيدلاني, 122.

[2] Simpson, T. J. (1988). In the Chemistry of Natural Product (ed. R. H. Thomson), Blackie, Glasgow, 107.

[3] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Tec et Doc éditions, 784-799.

[4] Renfen, E.V., Wray, V, Witte, L., Canto, E., Greinwilb, R., Veen, G., Veit, N. and Richter, G. (1933). Metabolisme de Végétaux. Physisiologie et Biochimie, 376.

[5] أبو زيد،أ.ن.، (2000) الزيوت الطيارة.الدار العربية للنشر والتوزيع. 396 .

[6] Murray, R. D. H., Mendez, J., and Brown, S. A. (1982) The natural coumarins – occurrence ,chemistry and biochemistry, John Willey & Souns Ltd., Chichester., dihydrocoumarin and 6-methylcoumarin in the rat. *Fd. Chem. Toxic*, *32*, 743-751.

[7] Keating, G. L., and O'Kennedy, R. (1997) The chemistry and occurrence of coumarins. pp : 23-66.in: O'Kennedy, R. and Thornes, R. D. (Eds.1997). Coumarins – Biologie application s and mode of action, John Willey & Souns Ltd., Chichester.

[8] I. Weinmann, (1997) History of the development and application of coumarin and coumarin related compounds, 1-22.

[9] Matern, U., Luer,P. and Kreusch, D. (1999) Biosynthesis of coumarins, 623-637. In : Barton ,D., Nakanishi, K., Meth – Cohn, O. and Sankawa, U. (Eds.) : Comprehensive natural products chemistry , Vol.1, Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. Elsevier Science Ltd., Oxford ,Uk.

[10] Kenedy, O. R. and Thornes, R. D. (1991) Coumarins, biologie, applications and mode of action;1st edition,john wiley & sons, 384.

[11] Fuller, R. B., Bokesch, H. R., Gustafson, K. R., Mckee, T. C., Cardellina, J. H., memahon, J. B., Cragg, G. M., Sojaerto, D. D., and Boyd, M. R. (1994). HIV-inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmanii*, *Med.Chem.Lett, 4*, 1961-1964.

[12] Kwon, Y. S., Kobayashi, A., Kajiyama, S.I., Kawazu, K., Kanzaki, H., and Kim, C. M. (1997). Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* roots. *Phytochemistry*, 44, 887-889.

[13] Kayser, O. and Kolodziej, H. (1997). Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *P.reniforme*. *Planta med*, 63, 508-510.

[14] Okuyama, T., Takata, M., Nishino, H., Nichino, A., Takayasu, J., and Iwashima, A. (1990). Studies on the antitumer – promoting activity of naturally occurring substances. Inhibition of tumer- promoter- enhanced phospholipid metabolism by umbelliferous materials, *Chem.Pharm.bull*, *38*, 1084-1086.

[15] Yang, Y, Z., Ranz, A. Pan, H. Z., Zhang, Z. N., Lin, X. B. and Meschnick, S. R. (1992). Daphnetin: a novel anti malarial agent with in vitro and in vivo activity. Am. *J. Trop. Med. Hyg*. *46*. 15-20.

[16] Mizuno, A., takata, M., Okada, Y., Okuyama, T., Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J., and Iwasshima, A. (1994). Structures of new coumarins and antitumer-promoting activity of coumarins of *Angelica edulis*. *Planta.Med*, *60*, 333-336.

[17] Lake, B.G., Evans, J. G., Lewis, D. F. V. and Price, R. G (1994). Comparison of the hepatic effects of coumarin, 3,4-dimethylcomarin.

[18] Koengs, L. L., Peter, R. M., Thompson, S. J., Rettie, A. E. and Trager, W.F. (1997). Mecanism Based inactivation of human liver cytochrome 450 2A6 by 8-Méthoxypsoralen, Drug. *Metab. Dispos*, *25*, 1407-1415.

[19] Brockmeyer, N. H., Fruhauts, S., Mertins, L., Barthel, B., and Goos, M., (1998). Effeccts of antipsoriatic therapie on hepatic micromosomal enzyme activity In patients with psoriasis. *Eur.J.Med.Res*, *3*, 361-366.

[20] Egan, D., O'Kenedy, R., Moran, E., Cox, D., Procer, E., and Thornes, D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis and application of coumarin and coumarin related compounds. *Durg Metabolism Reviews*, 22, 503-529.

[21] Lewis, H.M., (1994). Therapeutic progress: Treatment of psoriasis. *J. Clin*. *Pharm.Therap*, *19*, 223-232.

[22] Meneely, W., and Goa, K.L. (1998). 5-Methoxypsoralen – A review of its effects in psoriasis and vitiligo. *Drugs*. *56*, 667-690.

[23] Bruneton, J. (1987) Eléments de Phytochimie et de pharmacognosie. Tec et Doc. Lavoisier, 345-356.

[24] Zhuang, L. G., Seligmann, O., Jurcic, K., Wagner, H. (1982). Constituents of Daphne tangutica. *Planta Med*, *45*, 172-176

[25] Bryan, R. F., Shen, M. S. (1978). Mataiserin. *Acta Crystallogr*, B 34, 327-329.

[26] Marfak, A. G. (2003). Thèse de doctorat, Université de Limoges.

[27] Harborne, J. B. (1989). The flavonoids, advances in research since 1980, eds. Chapman and Hall, New York.

[28] Harborne, J. B. (1975). Progress in phytochemistry, 5, eds. Swin, T, Pregamon press. Oxford.

[29] Harborne, J. B. (1980). The flavonoids,. Academic press. London.

[30] Pawank, A. (1992). NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligo saccharids glycosides. *phytochemistry*. 10, 3307-3330.

[31] Melcent, R. (2003). Chimie organique hétérocyclique, eds, EDP sciences.

[32] Satyajit, D. (2007). Chemistry for Pharmacy Students, John Wiley & Sons Ltd, England.

[33] Harborne, J. B. (1973). Flavonoids in phytochemistry, eds, J. B. Litton educational publishing inc. London.

[34] Eyton, W.B., Ollis, W. D., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R., Tavira Magalhaes, M. (1965). *Proc*. *Tetrahedron*, 21, 2683.

[35] El hazimi, H. (1995). *Natural* product, 149-190.

[36] Reinsch, H., Repert. (1842). *Pharm*. 26, 12-31. Reinsch, H., Repert. (1842). *Pharm*. *28*, 18-25.

[37] Andersen, M., and Markham, K. (2006). In Flavonoids, chemistry, Biochemistryb and Application, RCRC Press, Boca raton, 1129-1197.

[38] De Laire, G., Tiemann, F. (1893). Iridin, the glucoside of the iris root. *J. Am.Chem. Soc. 15*, 400-411.

[39] Lapčĭk, O. (2007). Isoflavonoids in non-leguminous taxa: Ararity or a rule. *Phytochemistry*, 68, 2909-2916.

[40] KiJhnau, J. (1976). "The Flavonoids. A class of semi-essential food componen Their role in human nutrition". *Wld. Rev. Nutr. Diet,* 24, 117191.

[41] Havsteen, B. (1983). " Biochem. Pharmacol ".Flavonoids, a class of natural products high pharmacological potency. 32, 1141-1148.

[42] Borris, R. P., Blaskó, G., Cordell, G. A. (1988). Ethnopharmacologic and phytochemical studies of Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol, 24*, 41-91.

[43] Julien, F. (2002). Thèse de doctorat “Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l’une d’elles : Gnidia involucrata Steud. ex A. Rich”

[44] Heywood, V. H. (1996). Les Plantes à Fleurs. Editions Nathan, Paris, 159-160.

[45] Yoneda, K., Yamagata, E., Nakanishi, T., Nagashima, T., Kawasaki, I., Yoshida, T., Mori, M., Miura,I. (1986). Sesquiterpenoids in two different kinds of agarwood. *Phytochemistry*, 23, 2068-2069.

[46] Sisido, K., Kurozumi, S., Utimoto, K. (1967). Fragrent flower constituents of Daphne odoraThunberg. Perfum. Essent. Oil Rec, 58, 528-529.

[47] Watanabe, I., Yanai, T., Awano, K., Kogami, K., Hayashi, K. (1983). Volatile components of Zinchoge flower (Daphne odora Thunb.). Agribiol. Res, 47, 483-690.

[48] Hegnauer, R. (1973). Chemotaxonomie der Pflanzen – Band 6. Birkhäuser Verlag, Basel, 508-518, 759 et 790.

[49] Ergenç, N. (1968). The daphnin and daphnetin content of *Daphne pontica* L. *J. Fac. Pharm. Istambul, 4*, 72-76.

[50] Rizk, A. M., Hammouda, F. M., Ismail, S. I. (1975). Phytochemical investigation of *Thymelea hirsuta* –III. Coumarins. *Acta Chim. Hung*. *85*, 107-115.

[51] Tikhomirova, L.I., Markova, L.P., Tumbaa, Kh., Kuznetsova, G.A. (1974). Coumarins from Stellerachamaejasme. Kim. Prir. Soedin. 10, 404.

[52] George, V., Rishi, A.K. (1982). Constituents of *Thymelaea passerina*. *Fitoterapia*, 53, 191-192.

[53] Tschesche, R., Schacht, U., Legler, G. (1963b). Über Daphnorin, ein neues Cumaringlukosid ausDaphne mezereum. *Naturwissenschaften* , 50, 521-522.

[54] Tschesche, R., Schacht, U., Legler, G. (1963). Über Daphnoretin, ein natürlich vorkommendesDerivat des 3,7'-Dicumaryläthers. Liebigs Ann. *Chem*. 662, 113-125.

[55] Majumder, P.L., Sengupta, G.C., Dinda, B.N., Chatterjee, A. (1974). Edgeworthin, a new bis-coumarin from Edgeworthia gardneri. *Phytochemistry*, 13, 1929-1931.

[56] Chakrabarti, R., Das, B. Banerji, J. (1986). Bis-coumarins from Edgeworthia gardneri. *Phytochemistry*, 25, 557-558.

[57] Ulubelen, A., Terem, B., Tuzlaci, E. (1986). Coumarins and flavonoids from Daphne gnidioides. *J. Nat. Prod*, *49*, 692-694.

[58] Baba, K., Yoshikawa, M., Taniguchi, M., Kozawa, M. (1995). Biflavonoids from Daphne odora.Phytochemistry 38, 1021-1026.

[59] Kupchan, S.M., Sweeny, J.G., Murae, T., Shen, M.S., Bryan, R.F. (1975). Structure ofgnidicoumarin, a novel pentacyclic dicoumarin from Gnidia lamprantha. *J. Chem. Soc. Chem. Comm*, 94-95.

[60] Sengupta, S., Das, S.C. (1978). Structure of lasioerin : a novel coumarin from Lasiosiphoneriocephalus Decne (*Thymelaeaceae*). Chem. Ind. (London), 954-955.

[61] Bhandari, P., Rastogi, R.P. (1981). A novel type of bicoumarin rhamnoside from Lasiosiphon eriocephalus. Phytochemistry 20, 2044-2047.

[62] Baba, K., Tabata, Y., Taniguti, M., Kozawa, M. (1989). Coumarins from Edgeworthia chrysantha. *Phytochemistry*, 28, 221-225.

[63] Baba, K., Taniguti, M., Yoneda, Y., Kozawa, M. (1990). Coumarin glycosides from Edgeworthiachrysantha. *Phytochemistry*, 29, 247-249.

[64] Hegnauer, R. (1990). Chemotaxonomie der Pflanzen – Band 9. Birkhäuser Verlag, Basel, 6326-639.

[65] Niwa, M., Jiang, P. F., Hirata, Y. (1986a). Two new C-3/C-3''-biflavones from Wikstroemiasikokiana. *Chem. Pharm. Bull*, *34*, 3631-3634.

[66] Baba, K., Taniguchi, M., Kozawa, M. (1994). Three biflavonoids from Wikstroemia sikokiana. *Phytochemistry*, 37, 879-883.

[67] Taniguchi, M., Fujiwara, A., Baba, K. Wang, N.H. (1998). Two biflavonoids from Daphne acutiloba. *Phytochemistry*, 49, 863-867.

[68] Bhandari, P., Pant, P., Rastogi, R.P. (1982). Aquillochin, a coumarino-lignan from *Aquilaria agallocha*. *Phytochemistry*, 21, 2147-2149.

[69] Tandon, S., Rastogi, R. P. (1976). Wikstromol, a new lignan from *Wikstroemia viridiflora*. *Phytochemistry*, 15, 1789-1791.

[70]Tatematsu, H., Kurokawa, M., Niwa, M., Hirata, Y. (1984). Piscicidal constituents of Stellera chamaejasme L. II. *Chem. Pharm. Bull*, *32*, 1612-1613.

[71] Royal, R. (2002). Botanic Garden Edinburgh, Inverleith Row, Edinburgh, EH3 5LR, United Kingdom.

[72] Quezel, P. Santa, S. (1962) Nouvelle flore d'Algerie et des regions desertiques meridianales. Paris :CNRS, tome1.

[73] Dohou, N., Yamani, K., Gmira, N., Idrissi Hassani, L. M. (2004). Polyphénols des *Thymelaea lythroides* . *Acta Botanica Malacitana*, 29: 233-239.

[74] Yazine, L. & J. CHUNRU -1987-Chemicalconstituents and pharmacological actions of *Thymelaeaceous* plants. *Zhongcaoyao*, 18, 80-89.

[75] Salem, M. R. I., D. Y. Hadadda, & T. M. Sarag-1965- Isolation of thcrystalline principle,thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsuta*. U. Arab Rep. *J. Pharm. Sci*, 4, 49-56.

[76] Gharbo, S. A., S. M. Khafagy, & T. M. Sarg-1970- Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. U. Arab Rep. *J. Pharm.Sci*, 11,101-106.

[77] Rizk, A. M.& H. Rimpler. (1972). Isolation of daphnoretin and glucoside from *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 11, 473-475.

[78] Rizk, A. M. F. M. Hammouda, & S. I. Ismail. (1974). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. II. Lipid fraction. *Plant*. *Med*, 26, 346-358.

[79] Rizk, A. M., F. M. Hammouda, & S. I. Ismail. (1975). Phytochemical investigationof Thymelaea hirsuta, III, Coumarins. Actachimica Academiae scientiarum Hungaricae, 85,107-115.

[80] Nawwar, M. A. M., M. S. Ishak, A. D.Sherbieny & S. A. Meshaal -1977- Flavonoids of Reaumuria mucronata and *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 16, 1319-1320.

[81] Ismail, S. I. -1978-Tiliroside (kaempferol-3-p-coumaroylglucoside) from *Thymelaea hirsuta*. IV. *Fitoterapia* 49, 156 - 159.

[82] Garcia-Granados, A. & A. Saenz Deburuaga -1980-Thymeleaceae photochemistry. I. Diterpenes, triterpenes andsterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. AnalesQuim., Ser. C: Quim. Org. Bioquim, 76, 94-95.

[83] Rizk, A. M., F. M. Hammouda, &. S. Ismail, M. M. EL-Missiry & F. J. Evans -1984-Irritant resiniferonol derivatives from Egyptian *Thymelaea hirsuta* L. Experientia, 40, 808-809.

[84] Sammour, R. H. & A. El-Din Sharaf -1988- Qualitative study on seed proteins of *Thymelaea hirsuta L*. Populations. *DeltaJournal of Science*, 12, 290-312.

[85] Brooks, G., Evans, A.T., Aitken, A., Evans, F. J., Rizk, A. F. M., Hammouda, F. M., El-Missiry, M. M., Ismail, S. E. (1990). Daphnane diterpenes of *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry* , 29, 2235-2237.

[86] Abou-Karam, M., El-Shaer, N. S., Shier, W. T. (1998). Inhibition of oncogene productenzyme activity as an approach to cancerchemoprevention. Tyrosine-specific proteinkinase inhibition by daphnoretin from*Thymelaea hirsuta root*. *Phytother*. *Res*. 12, 28284.

[87] EL-Beheiry, M. A. H. (2000). Evaluation of theorganic composition of *Thymelaea hirsute* populations in Egypt. Bull. Fac. Sci., AssiutUniv., D: Botany, 29, 375-383.

[88] George, V., RISHI, A. K. (1982). Constituents of *Thymelaea passerina*. *Fitoterapia*, 53,191-192.

[89] Garcia-Granados, A., Saenz-Deburuaga, J. M. (1980). *Thymeleacea* photo chemistry. II. Flavone and coumarincomponents of *Thymelea tartonraira L*.Anales Quim., Ser. *C: Quim.Org. Bioquim*,76, 96-97.

[90] Meletiou-Christou, M. S., Banilas, G. P., Diamantoglou, S. (1998). Seasonaltrends in energy contents and storagesubstances of the Mediterranean speciesDittrichia viscosa and *Thymelaea tartonraira*.Environmental and Experimental Botany, 39, 21-32.

[91] Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R. B., Ndemera, B. (1985). The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe. Mambo Press, Gweru, 191-192, 268-269 et 304.

[92] Iwu, M. M. (1993). Handbook of African Medicinal Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, 66-67.

[93] Kokwaro, J. O. (1993). Medicinal Plants of East Africa.2ndedition, Kenya Literature Bureau, Nairobi, 228-229

[94] Gmira, N., Doumi, L., Bsaibis F., Hmamouc, S. (2007). Bordeaux, (2004), 143, 31-38

[95] Bnouham, M., Merhfour f, Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maallem, S., Ziyyat, A. (2007). Pharmazie ISSN 0031-7144 Coden pharat, 62, 630-632 .

[96] Bernard, B. (1997).¨plant et champignoin¨, Paris, 70, 138, 605.

[97] خليل محمد, س. (2009). مضادات الأكسدة, 1-5.

[98] Drog, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Cell Phynol, 82, 42.

[99] Ciulel I. (1983) Methdologie for analysis of vegetable drug. Romania:1-26.

[100] زلاقي, ع. (2006). مسح فيتو كيميائي متبوع بدراسة السكوتربينات و القلويدات في النوعين: *Genista microcephala* Coss. et Dur. و *ferula vescertensis* Coss. et Dur. مع إشارة للفعالية الضد ميكروبية.

[101] Carbonnelle, B. F., Denis, A., Marmonier, G. and Rivargues, P. (1987). Bacteriologie Medicale-techniques usuelles. 224-243 .

[102] Wei., Kazuo, K .,yoshiihisa . A ., Taka. Fumi. Y.,Tamosa,N(2002). Biotransformation of ombelliferone by panax ginseng. Rootcultures, *Tetrahedron letter*., 42,32.

[103] Byung. Sun,M., Min. Kyun, N., Sei-Ryng, O.,Kyung-Seep, A.,Gil-Saeng, J., Gao, L., (2002). New furofuran and butyrolactone lignans with antioxidatant activity from the stem bank of *Styax japonicia*. J. Nat. pord. 67,1980-1984.

الملخص

إن الهدف الرئيسي من هذا البحث هو الإستخلاص و الفصل و التعرف على نواتج الأيض الثانوي للنبتة *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. ، وتثمين الفعالية ضد ميكروبية، والفعالية المضادة للأكسدة.

وقد تمكنا من فصل المركب الكومارِيني (Ombelliférone) ومركب ليجنان لاكتوني (matairesinol) بالإضافة إلى تحليل الزيت الأساسي الذي نتج عنه أحدى عشر مركباً أكثرها وفرة D-menthone ، 2-Undecanone و Perillal .

كما استخدمنا طريقة الانتشار في تحديد الأثر التثبيطي الذي كانت نتائجه معتبرة على السلالات البكتيرية الموجبة والسالبة الجرام، وكذلك الفطرية، بالإضافة إلى الفعالية المضادة للأكسدة التي كانت نتائجها معتبرة جداً مماثلة لحد كبير فيتامين C.

استخدمت عدة تقنيات كروماتوغرافية (كروماتوغرافيا العمود CC ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC) في عمليات الفصل و تقنيات فيزيائية (GC/MS)، مطيافية الرنين النووي المغناطيس (RMN ^{1}H, RMN ^{13}C) في تحديد بنى المركبات المفصولة .

Résumé

Le but de notre travail est orienté vers l'extraction, l'isolement etl'identification des métabolites secondaires issues de *Thymellaea microphylla* Coss. et Dur**.** et suivi d'une évaluation de l'activité antimicrobienne

et l'activité antioxydante.

L'etude phytochimique a permis d'isoler et d'identifier une coumarine (ombelliférone) et un composé de type lignane lactonique (matairesinol) ainsi l'analyse des huiles essentielles, nous a fourni onze produits, parmi les plus abondants on décèle le D-menthone, 2-undécanone et Perillal.

L'utilisation de la méthode de diffusion pour determiner l'effet unhibitrice nous a fourni des résultats de souches bactériennes positives et gram-négatives, on note également des résultats considerable de l'efficacité de l'activité antioxydante .

Le processus de séparation s'est basé sur les techniques de chromatographie telle la chromatographie sur colonne (CC) et sur couche mince (CCM) ainsi une techniques physiques (GC / MS), en ce qui concerne l'identification structurale on a fait appelle aux techniques de RMN monodimensionnelle (RMN - ^{1}H et ^{13}C) et bidimensionnelle (HMQC et HMBC).

abstract

The main objective of this research is the extraction and separation and to identify the secondary metabolites of the plant *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. and evaluation of effectiveness against microbial, and effectiveness of anti-oxidant.

We separated the coumarin compound (Ombelliférone) and the lignan lactonic compound (matairesinol), also made the analysis of essential oils, which resulted eleven compounds, most abundants compounds

D-menthone, 2-Undecanone and Perillal.

We used the diffusion method, which were considering the results of bacterial strains positive and Gram-negative, and fungus, as well as to the effectiveness of anti-oxidant which results were very significant.

We used several techniques (column chromatography CC, thin layer chromatography TLC) in separation processes and physical techniques (GC / MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H -NMR, ^{13}C- NMR) and (HMQC, HMBC) for determine the structures of compounds separated.