وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة قاصدي مرباح ورقلة
كلية الرياضيات وعلوم المادة

قسم الكمياء

مذكرة تخرج لنيل شهادة

ماستر

مجال: علوم المادة

فرع: كيمياء

تخصص: كيمياء المنتجات الطبيعية

من إعداد: **مريم حبي**

الموضوع:

الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبات *Daphne gnidium* L.

نوقشت يوم: 30 / 09 /2020

أمام لجنة المناقشة المكونة من:

دقموش مسعودة	أستاذ محاضر (ا)	جامعة ورقلة	رئيسا
بلفار محمد لخضر	أستاذ محاضر (ا)	المدرسة العليا للأساتذة ورقلة	مناقش
رحماني زهور	أستاذ محاضر (ا)	جامعة ورقلة	مؤطر
رحماني زينب	/	جامعة ورقلة	مساعد مؤطر

السنة الجامعية 2019-2020

الاهداء

الى نور الحياة وجنة الدنيا الوالدين الكريمين

الى جميع افراد العائلة كل بإسمه

الى كل من ساهم في انجاز هذا العمل

شكر وعرفان

الشكر أولا و أخيرا لله سبحانه وتعالى على إمدادي بالقوة والعزيمة لإتمام و إنجاز هذا البحث
أما بعد:

أتقدم بالشكر الجزيل إلى كل من الأستاذة المؤطر الدكتورة رحماني زهور والأستاذة المساعدة رحماني زينب لقبولهم الإشراف على هذا العمل.

كما أتقدم بجزيل الشكر إلى الأستاذة دقموش مسعودة لقبولها رئاسة لجنة المناقشة والمشاركة في إثراء هذا العمل.

كما أتوجه بتحية احترام وتقدير إلى الأستاذ بلفار محمد لخضرعلى قبوله المشاركة في مناقشة وإثراء هذا العمل.

كما أخص بالشكر كل من بن ساسي شيماء وتاتو طواهرية على المساعدة والنصائح القيمة دون انسى جميع أعضاء مخبر الكيمياء

ولا أنسى أن أتقدم بالشكر إلى عائلتي على دعمهم ومساندتهم لي طيلة مشواري الدراسي.

الملخص

في اطار البحث على مركبات جديدة ،ونواتج الايض الثانوي نبات Daphne gnidium L. و لهذا الغرض أجرينا اختبارات الكشف الكيميائي لأهم المركبات الفعالة، حيث أظهرت النتائج وجود كل من الفينولات، الفلافونويدات، الكومارينات، القلويدات، الفلوباتانينـــــات، الستيرويـــدات، التيربينـــات و البروتينـــات في حين سجل غياب كل من الصابونيات والبروتينات ، و انطـــلاقا من هـــــــــذه النتائـــــج و بالموازاة مع هدف الدراسة قمنـــا بالاستخلاص للحصول على مستخلص الاسيتات ايثيل والبوتانول وبينت النتائج ان مردود الاستخلاص لطور اسيتات الايثيل والذي قدر ب 0.36 %، هذه القيمة تظل ضئيلة جدا اما مستخلص البيوتانول فلم نتمكن من انهاء العمل.

الكلمات المفتاحية : Daphne gnidium L ، مركبات الايض الثانوي ، الفينول ،الفلافونويد

Abstract

The present research aims to discover new compounds, and the secondary metabolites of the plant Daphne gnidium L. Thus we conducted chemical detection tests for the most important active compounds. The result showed the existence of Phenol, flavonoids, coumarin, Alkoid flopatannins, steroids, terpenes and proteins. It also marked the absence of both saponins and proteins. Based on these results and in alignment with the aim of the study, we made the extraction to obtain an extract of ethyl acetate and butanol. The results showed that the extraction yield for the ethyl acetate phase was estimated at 0.36%, this value remains very small, As for the extract of butanol, we did not obtain the result due to not fully finish the experiment.

Keywords: Daphne gnidium L, secondary metabolites, phenols, flavonoids

Résumé

Dans le cadre de la recherche sur de nouveaux composés, et les métabolites secondaires de la plante Daphne gnidium L. Pour cela, nous avons réalisé des tests de détection chimique pour les composés actifs les plus importants, où les résultats ont montré la présence de phénols, flavonoïdes, coumarines, alcaloïdes , les flopatannins, les stéroïdes, les terpènes et les protéines, tandis que les résultats ont été enregistrés. En l'absence de savons et de protéines, et sur la base de ces résultats et en parallèle avec l'objectif de l'étude, nous avons extrait un extrait d'acétate d'éthyle et de butanol, et les résultats ont montré que le rendement d'extraction pour la phase acétate d'éthyle, qui a été estimé à 0,36%, cette valeur reste très faible. Quant à l'extrait de butanol, nous n'avons pas pu terminer le travail.

Mots clés: Daphné gnidium L, métabolites secondaires, phénols, flavonoïdes

الفهرس

المقدمة 9

1. دراسة نبات *DAPHNE GNIDIUM* L.: 13

1.1 تعريف بالنبات : 13
2.1 تصنيف *DAPHNE GNIDIUM* L. 14
3.1 وصف النبات 14
4.1 التسمية 16
5.1 الاستعمالات التقليدية للنبات: 17
6.1 الخصائص البيولوجية للنبات: 17

2 مركبات الايض الثانوي في نبات *DAPHNE GNIDIUM* L. 18

1.2 الكومارينات 18
2.2 الفلافونيدات 19
3.2 التربينات TERPENES 20
4.2 سيسكو تربين SESQUITERPENES 20
5.2 DITERPENE ESTERS 21
6.2 TRITERPENES : 22
7.2 ستيرويدات : 23
8.2 LIGNANS 23

3 الاعمال السابقة حول *DAPHNE GNIDIUM* L. 24

1 الأجهزة والمحاليل المستعملة 28

2 المادة النباتية 28

1.2 تحضير العينة 28
2.2 الكشف الفيتوكيميائي على النبات : 29
1.2.2 اختبار الفلافونويد: 29
2.2.2 الكشف عن الستيرويد 29
3.2.2 الكشف عن الصابونينات 29
4.2.2 الكشف عن القلويدات 30
5.2.2 الكشف عن البروتينات : 30
6.2.2 اختبار التربينات 31
3.2 تحضير مستخلصات النبات المدروس حسب قطبية المذيب 31

1 مناقشة النتائج 35

1.1 الاختبارات الفيتوكيميائية 35
2.1 مردود الاستخلاص: 36
3.1 حساب مردود الاستخلاص 36

الخلاصة 38
المراجع 40

فهرس الاشكال :

الشكل 1 : صور لشجرة نبات DAPHNE GNIDIUM L 13
الشكل 2 : صورة لساق نبات DAPHNE GNIDIUM L 14
الشكل 3 : صورة لورقة نبات DAPHNE GNIDIUM L 15
الشكل 4: صور لثمار وأزهار نبات.*L* DAPHNE GNIDIUM [19] 15
الشكل 5: صورة لثمار وأزهار النبات.L *DAPHNE GNIDIUM* [19] 16
الشكل6 : مشتقات الكومارين في نبات .L *DAPHNE GNIDIUM* 19
الشكل 7: يوضح بنية بعض مركبات BIFLAVONOID تم عزلها من نبات DAPHNE 20
الشكل8 : بينة بعض مركبات SESQUITERPENES تم عزلها من نبات DAPHNE 21
الشكل 9: بينة بعض مركبات DITERPENES تم عزلها من نبات DAPHNE 22
الشكل 10: بينة بعض مركبات TRITERPENES تم عزلها من نبات DAPHNE 22
الشكل 11 : بعض مركبات PHYTOSTEROLS التي تم عزلها من نبات DAPHNE 23
الشكل 12 :بينى بعض مركبات LIGNANS تم عزلها من نبات DAPHNE 23
الشكل 13: الهيكل الأساسي لـ TIGLIANE 24
الشكل 14: الهيكل الأساسي لـ DAPHNANE 24
الشكل 15: الهيكل الاساسي لكومارين DAPHNETINE ET DAPHNINE 25
الشكل 16 : صور توضح المادة النباتية المستعملة 28
الشكل 17 : صور توضح جهاز ROTAVAPEUR المستعمل في الدراسة 31
الشكل 18 : صور لعملية الاستخلاص 32
الشكل 19: يوضح البروتوكول المتبع للاستخلاص سائل - سائل 33
الشكل 20 :نتائج اختبارات الكشف الكيميائي لبعض المواد الفعالة في نبات. DAPHNE GNIDIUM L 35

فهرس الجداول :

جدول 1: الادوات و الاجهزة المستعملة 28
جدول 2: يوضح نتائج الاختبارات الفيتوكيميائية 36

المقدمة

النباتات لها دور مهم في الحفاظ على الناس الصحة وتحسين نوعية حياة الإنسان. اذ تعتبر عنصر مهم في النظام الغذائي للناس بحيث تستخدم في عدة مجالات أخرى من حياة الإنسان ، مثل العلاج ، مواد التجميل ، الدهانات وغيرها.

لا تزال هذه الأعشاب مستخدمة على نطاق واسع في الطب التقليدي في جميع أنحاء العالم. في الماضي ، كانت التأثيرات العلاجية للأعشاب مختلفة - من الشفاء وتخفيف الأعراض إلى التأثيرات السامة ، وحتى الموت.

اليوم ، يتراوح عدد أنواع النباتات بين 250000 إلى 350000 نوع مختلف من الأعشاب على الأرض. تم استخدام نسبة صغيرة منه (أقل من 10٪) في تغذية الانسان أو الحيوانات ، ولكن الجزء الأكبر تم استخدام للأغراض الطبية [1]

لطالما كان استخدام النباتات جزءًا للثقافة البشرية. فقد صرحت منظمة الصحة العالمية (WHO) أن 80٪ من السكان يعتمدون على بعض طرق العلاج التقليدية في المرحلة الابتدائية للرعاية صحية [2] كما انه في بعض البلدان ، تدعو الحكومات استخدام طرق العلاج االتقليدية أكثر من استخدام الأدوية المستوردة باهظة الثمن.

في المائة عام الماضية ، كان الإنتاج الضخم للأدوية المُصنّعة كيميائيًا واستخدامها هو الجزء الرئيسي من نظام الرعاية الصحية. ومع ذلك ، لا يزال جزء كبير من السكان ، وخاصة في البلدان النامية ، يعتمد على الأساليب التقليدية للعلاج واستخدام الأدوية العشبية في إجراء الرعاية الصحية ، على سبيل المثال ، في إفريقيا 90٪ من السكان يعتمدون على طرق العلاج التقليدية ، في الهند 70٪ ، بينما في الصين ، يشكل الطب التقليدي 40٪ من جميع أنظمة الرعاية الصحية ، وأكثر من 90٪ من المستشفيات العامة لديها وحدات للعلاج الطب التقليدي [3-4]. ومع ذلك ، فإن استخدام الطب التقليدي لا يقتصر فقط على البلدان النامية. في العقدين الماضيين ، ازداد الاهتمام بطرق العلاج التقليدية ، مع التركيز بشكل خاص على العلاج بالنباتات ، في البلدان المتقدمة أيضًا. أظهر البحث الذي أجري في الولايات المتحدة الأمريكية في عام 2007 أن أكثر من 35٪ من البالغين وحوالي 12٪ من الأطفال يستخدمون بعض طرق العلاج

التقليدية [5-6]. وفقًا لبحوث المركز الوطني للطب التكميلي والبديل ، فإن العلاج بالأعشاب ، باستثناء الفيتامينات والمعادن ، هو أكثر طرق الطب البديل استخدامًا [7].

تعتبر افريقيا من بين المناطق التي تزخر بتنوع تصنيفي أدى الى استغلال هذه النباتات في العلاج التقليدي ، فالجزائر تشتهر بتنوع بيولوجي وغطاء نباتي غني ومتنوع بشكل خاص بحيث تحتوي على مايقارب 3000 نوع 15% متوطنة تضم الكثير من العائلات. هذا التنوع يحتوي على نباتات طبية وبهارات وفي بعض الأحيان نباتات سامة ، تم استكشاف القليل منها في بعض الدراسات الكيميائية والدوائية وهذا يعتبر محفز للبحث عن المواد الطبيعية[8]

المنتجات الطبيعية التي تشكل النباتات المصدر الرئيسي لها تمثل حوالي 60% من الادوية التي لدينا فيما تمثل النسبة المتبقية ادوية صناعية ، تعتبر النباتات المصدر الرئيسي للأدوية بفضل ثرائها بمركبات الايض الثانوي[9]

تحضى المواد الطبيعية ذات اصل نباتي باهتمام كبير بسبب نشاطها البيولوجي مضادات الفيروسات ، مضادات البكتيريا ، مضادات الاكسدة و مضادات السرطان .

في الوقت الحالي تحتوي العديد من النباتات العطرية والطبية على خصائص بيولوجية مهمة جدا في العديد من التطبيقات في مختلف المجالات كالطب والصيدلة والتجميل والزراعة هذا الاهتمام يرجع لكون النباتات الطبية تمثل مصدر متجدد من المواد النشطة بيولوجيا ومن ناحية أخرى بسبب الاثار الجانبية التي تسببها الادوية المصنعة[10]

اليوم تزداد الأهمية الدوائية لمركبات الايض الثانوي بسبب البحوث المستمرة حول دورها وتأثيرها في الرعاية الصحية.

يتم استخدام المنتجات العشبية الطبيعية لعلاج الأمراض المعدية المختلفة [11-12]. بصرف النظر عن الادوية المصنعة ، لا تزال المنتجات الطبيعية تعتبر مصدر مهم للعوامل العلاجية الجديدة والمبتكرة مع مجموعة واسعة من التأثيرات المضادة للميكروبات [13]. ضمن أكثر من 35٪ من العوامل المضادة للفطريات طبيعية الأصل [14]. تمثل المنتجات الطبيعية مصدرًا واعدًا للمضادات الحيوية الجديدة ومكملات المضادات الحيوية والمطهرات

الدراسة المقترحة تهدف إلى دراسة نبات *Daphne gnidium* L. دراسة فيتوكيميائية وبيولوجية فقد أثبتت دراسات سابقة لهذا النبات وجود نشاطية مضادة للتسمم والأكسدة ومضادات الالتهاب فقد بينت الدراسة وجود فعالية مضادة للتسمم لمستخلص أوراق النبات وقد أظهرت مستخلصات الميثانول فعالية

أكبر من مســـتخلصـــات خلات الاثيل وفســـر ذلك إلى وجود متعدد الفينول والفلافونويد في مســـتخلص الأوراق [15].

وجود مجموعة واسعة من الأنشطة الدوائية والبيولوجية التي تعرضها المستخلصات التي تم الحصول عليها من أجزاء مختلفة من نباتات نوع دافني. يدل على وجود مجموعات مختلفة من مركبات الايض الثانوية اي أن هذه النباتات قد تكون بمثابة مصدر للمركبات النشطة . ذات الأهمية العلاجية.

وهذا مادفعنا الى انجاز هذ العمل بحيث ينقسم هذا العمل الى ثلاث أجزاء

الجزء الأول: يتضمن الجزء النظري .

الجزء الثاني : يتضمن الجزء العملي .

الجزء الثالث : يتضمن مناقشة النتائج المتحصل عليها.

الجزء النظري

تمهيد

تلعب النباتات دورا هاما في الحفاظ على صحة الانسان وذلك بهدف تحسين حياة البشرية من خلال استغلال مزاياها في التغذية والتجميل والصباغة وكذلك العلاج فقد أثبتت الدراسات البيولوجية أن العديد من المستخلصات النباتية أثبتت نشاطا بيولوجيا.

1. دراسة نبات *Daphne gnidium* L.:

1.1 تعريف بالنبات :

شجيرة *Daphne* gnidium L. دائمة الاخضرار تنتمي إلى عائلة ثنائيات الإزهار تتكون من 1200 نوع مقسمة الى 67 فصيلة تنتشر في منطقة البحر الأبيض المتوسط وشمال أفريقيا والشرق الأوسط وتكون أكثر تواجدا في المناطق ذات الحرارة المنخفضة [16].

الشكل 1 : صور لشجرة نبات Daphne gnidium L [19]

2.1 تصنيف *Daphne gnidium* L.

لطالما كان تصنيف هذا النبات موضع تساؤلات نظرا لطبيعة المعايير المورفولوجية [17]

المملكة : نبات

الشعبة : Magnoliophyta

الفئة : Magnoliopsida

الترتيب: Myrtales

العائلة: الزعتر

الجنس: دافني

الأنواع: *Daphne gnidium* L.

3.1 وصف النبات

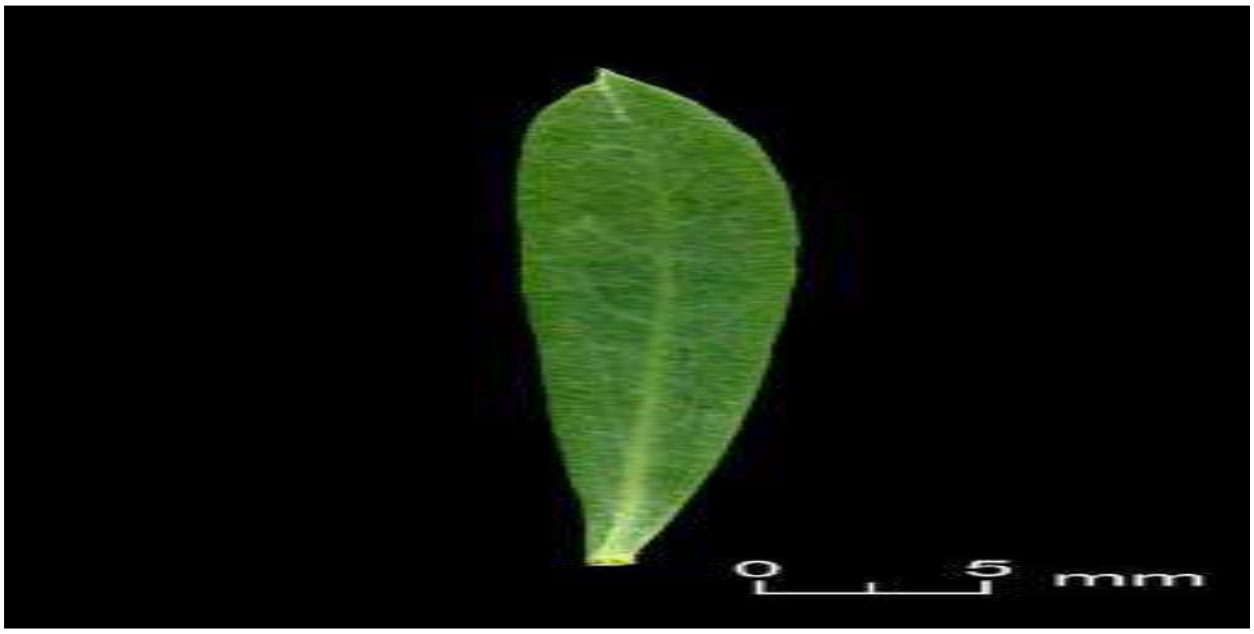
نبتـــة معمـرة يبلغ ارتفاعها 60سم الى 2متر أو أكثر، بريـة لها فروع وقضبـان كثيـرة. مخشوشبـة، دقيقـة، مكسـوة بلحاء جلـدي.

الجذور : جذور *Daphne gnidium* L. طويلة ، قوية ، خيطية ، صلبة ، حمراء في الخارج ،أبيض من الداخل وسام جدا.

الجذع: عبارة عن عدة سيقان رفيعة تشكل أغصانًا أسطوانية ملساء ذات لون بني ، مورقة على طولها بالكامل. كما هو موضح في الشكل 1

الأوراق : أوراقهـا منتصبـة تغطي الفـرع والغصن دائمة الخضرة، نصلهـا جلـدي النسيـج جامد التركيب مستطيل القـد. يبلغ طولها من 2-4سم وبعرض قدره 3-7ملم

الشكل 2 : صورة لساق نبات Daphne gnidium L [19]



الشكل 3 : صورة لورقة نبات Daphne gnidium L [19]

الازهار: أزهارهـا عنقوديـة التجميع، هاميـة الارتكاز، بيضـاء اللون، فواحــة العرف،

الشكل 4: صور لثمار وأزهار نبات.*L* Daphne gnidium [19]

الثمار ثمارا مستديـرة، حمراء اللون عند النضج، لحمية، لامعـة. وكل من أوراقهـا وثمارها وأزهارهـا حريفـة الطعم لاذعـة [18].

الشكل 5: صورة لثمار وأزهار النبات.*Daphne gnidium* L [19]

4.1 التسمية

لهذا النبات العديد من الأسماء الشائعة نذكر منها:

Garou, Daphné paniculé, Garouette, Saint bois, Thymélée de Montpellier, Thymélée à feuilles de lin, Lin bâtard, Lin sauvage, Bois d'oreilles, [20]

الاسم العلمي: *Daphne gnidium* L.

الأسماء العامية

بالعربية : لازاز ، جوزة الرعيان وبالامازيغية سبرح ، اينيت [18]

بالفرنسية: Thymèleou saint bois .

بالانجليزية: Daphne garou .

5.1 الاستعمالات التقليدية للنبات:

يستعمل النبات *Daphne gnidium* L. في:

العلاج التقليدي يستعمل كمجهض ويستعمل اللحاء كمدر للبول وعلاج آلام الأسنان وتستخدم الأوراق كمخفض للمستوى السكر في الدم والأمراض الجلدية.

والجزء الهوائي له عدة استعمالات منها: التجميل كتنعيم الشعر وعلاج القشرة، صباغة النسيج [21].

بالرغم من استعمالاته الواسعة في مجال الطب إلا أن هذا النبات يتميز بسميته القاتلة فهو يسبب صداع ورعشة والشحوب وتوسع البؤبؤ وصعوبة البلع والإسهال يصاحبه تشنجات هضمية [18] .

6.1 الخصائص البيولوجية للنبات:

كشفت الدراسات الكيميائية النباتية لنبات *Daphne gnidium* L. أنه يحتوي على مجموعة واسعة من المركبات الكيميائية بما في ذلك الفلافونويد والكومارين، الليجنين، سيسكوتربين، متعدد التربين ثلاثي تربين الستيرويد [22] [23] [24].

تعتبر الكومارينات المجموعة الكيميائية المتواجدة بكثرة في النبات كما أنه يحتوي على نسب معتبرة من البوليفينول والفلافونويد وكميات قليلة من التانينات [15، 25،26] وقد نسبت الخصائص البيولوجية المتعددة الى أجزاء مختلفة من النبات بالإضافة الى ذلك فقد أظهر المستخلص الكحولي لأوراق هذا النبات نشاطية مضادة للبكتيريا والفطريات [25] كما أظهرت الدراسة أن اللحاء يسبب تلف في الجلد وبالرغم من ذلك أظهرت بعض مركبات مستخلصة من الأوراق مثل: دافينيوريين وايجيين نشاط مضاد للأورام [27،28].

كما أظهر هذا النبات فعالية مضادة للميكروبات ناتجة عن احتواء النبات لمركبات الكومارين وفلافونويد في السيقان تعمل على تحفيز أو تثبيط الاستجابة المناعية[26] .

أظهرت بعض الدراسات الحديثة أن مستخلصات خلات الايثيل لأوراق النبات لها فعالية مضادة للالتهاب[25]

2 مركبات الايض الثانوي في نبات *Daphne gnidium* L.

اكدت الأبحاث الحديثة ان نبات *Daphne gnidium* L. يحتوي على العديد من الجزيئيات في مختلف مركبات الايض الثانوي نستعرض بعض منها المتواجدة في مختلف أنواع نبات *Daphne gnidium* L. فضلا عن الأهمية البيولوجية والعلاجية لهذه المركبات

1.2 الكومارينات

تعد الكومارينات اول الأصناف التي تم عزلها في ثلاثينيات القرن الماضي و وأول مركب تم عزله هو الكومارين heteroside daphnin ، الذي وتم اثبات تواجده في عدة أنواع نباتية [29] ومنذ لك الحين تم اكتشاف اكثر من 50 مشتق للكومارين منها البسيط والثنائي والثلاثي موضحة في شكل 6 نذكر منها

بعض الكومارينات البسيطة :

daphnetin, daphnetin-8-β-glucoside, daphnin, daphnesid, umbelliferone and acetil-umbelliferone [31-30]

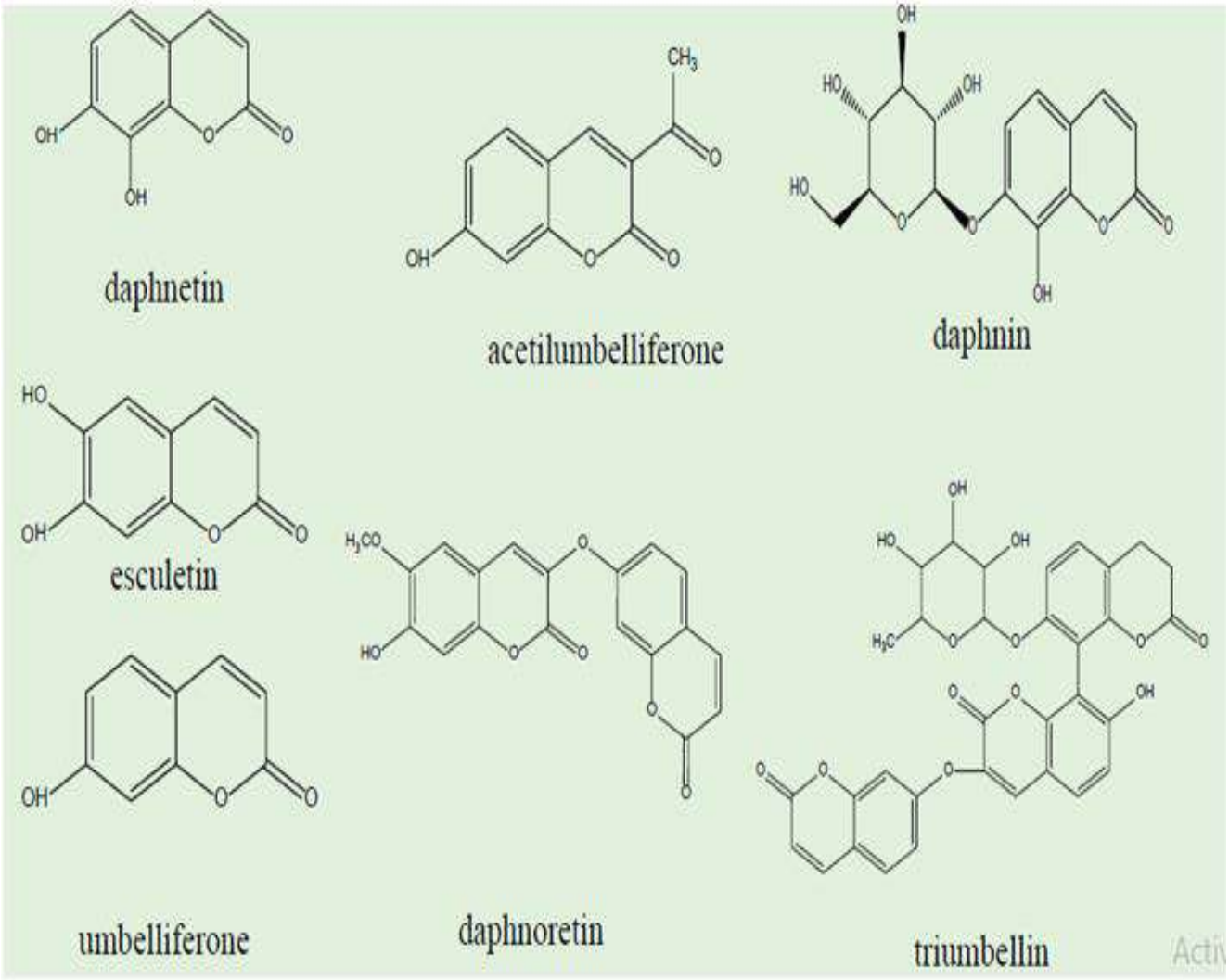
كومارينات ثنائية :

rutarensin, demethyldaphnoretin-7-O-glucoside, daphnoretin ,daphneretusin A [33-32]

Daphnoretin اظهر فعالية مضادة للاورام فقد اثبتت بعض الدراسات انه تم تثبيط نشاط الخلايا السرطانية في المرحلة الثانية [34]

Daphneretusin B و triumbellin هي من كومارينات ثلاثية

Daphneretusin A و B لديه فعالية جيدة مضادة للاكسدة [32].



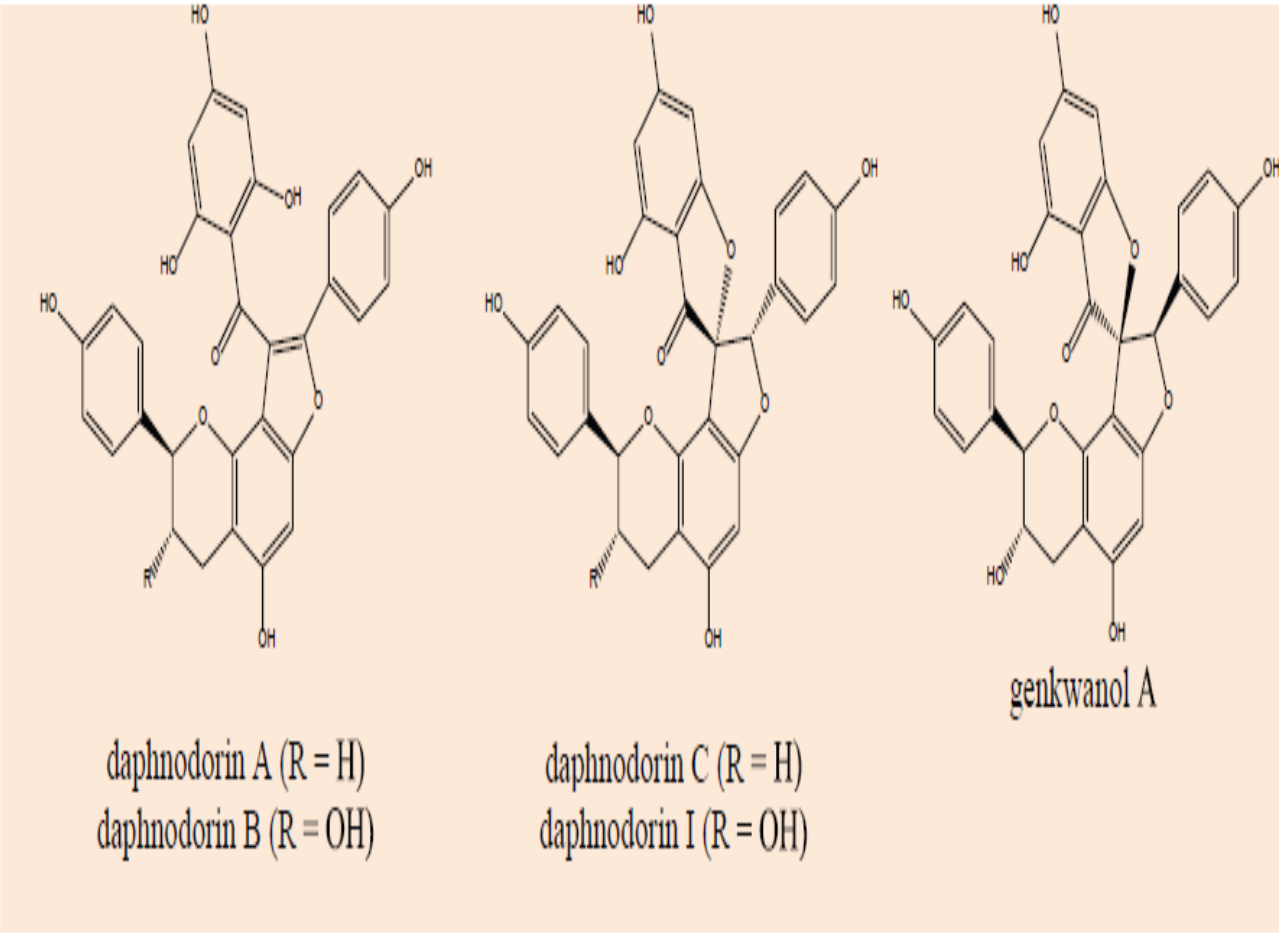
الشكل6 : مشتقات الكومارين في نبات *Daphne gnidium* L.

2.2 الفلافونيدات

Daphnodorinsو biflavonoids المتماثلة ، genkwanolو

daphnorigin، هي مركبات ايض ثانوية محددة موجودة في عائلة Thymelaeceae التي تحتوي على benzofuran مجموعة وضيفية 2،3 [35]، تم عزل Daphnodorin A لأول مرة من نبات D. odoraولها تأثيرات بيولوجية عديدة مثل تثبيط α-glucosidase ، وتثبيط K + -ATP ،

نشاط مضاد لفيروس نقص المناعة البشرية ، نشاط مضاد للفطريات ومبيد للحشرات ،والنشاط المضاد للاورم [36]. كما تم عزل مركبات أخرى موضحة في الشكل 7



الشكل 7: يوضح بنية بعض مركبات Biflavonoid تم عزلها من نبات Daphne

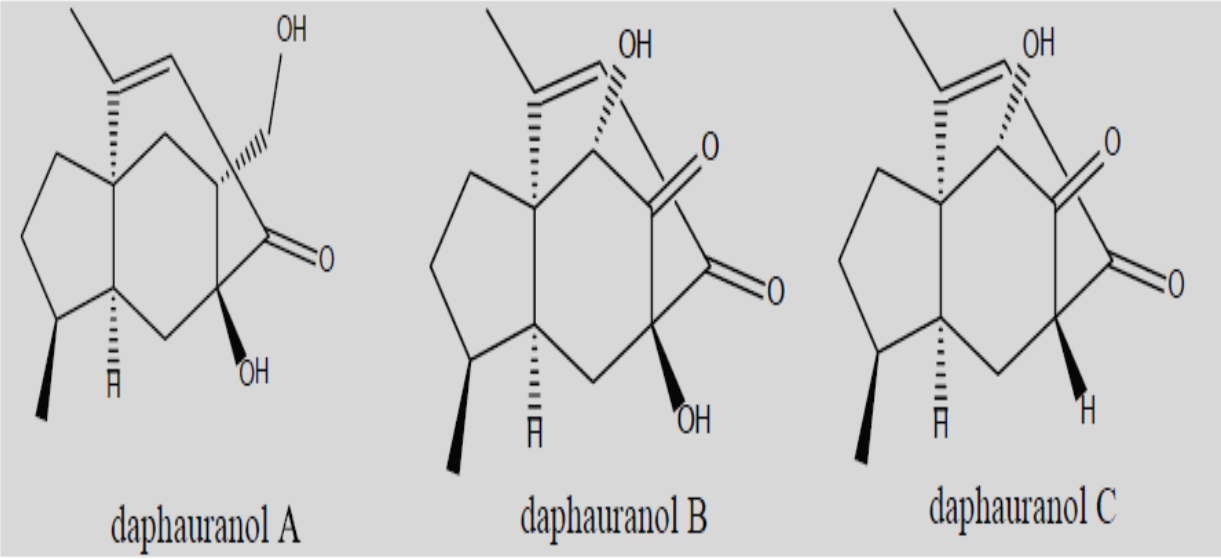
3.2 التربينات terpenes

توجد مستقلبات Terpenoid الثانوية كمكون لأجزاء مختلفة من نباتات .Daphne غالبًا ما توجد مركبات أحادية وسيسكيتيربينويد في تكوين الزيوت الإثيرية التي يتم الحصول عليها من أزهار هذه الأنواع ، مما يمنحها رائحة معينة [37]

تم العثور على Diterpenes و triterpenes كمكونات تربينويد في المستخلصات التي تم الحصول عليها من أجزاء أخرى من هذه النباتات.

4.2 سيسكو تربين Sesquiterpenes

Daphnauranolsهي مادة سيسكيتيربين ثلاثية الحلقات نشطة بيولوجيًا التي تم عزلها مؤخرًا عن D. aurantiaca (الشكل 8) [38]. تم تأكيد نشاطهم في المبيدات الحشرية ، بحيث يمكن استخدامها في حماية النباتات من الحشرات الضارة كبديل غير سام وآمن وقابل للتحلل الحيوي [39].

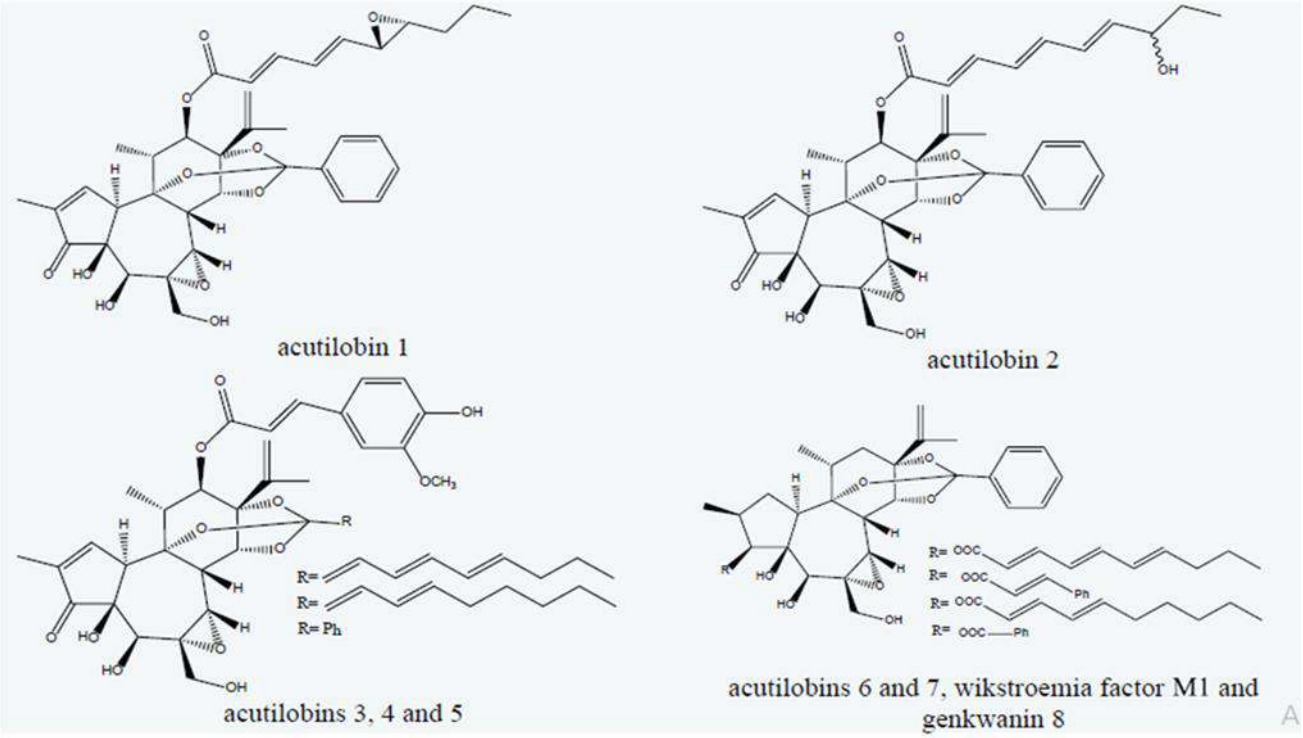


الشكل8 : بينة بعض مركبات Sesquiterpenes تم عزلها من نبات Daphne

5.2 diterpene esters

تم عزل استرات Diterpenoid من نوع daphnan بشكل أساسي من النباتات التي تنتمي إلى عائلة Thymeleaceae، ولم يتم اكتشاف سوى عدد قليل منها في نباتات من عائلة Euphorbiaceae. يظهر العديد من الأنشطة البيولوجية [40-41]. تحتوي هذه المجموعة من الجزيئات أيضًا على أكوتيلوبين ، والتي توجد في بعض أنواع نباتات دافني ، مثل D. acutiloba (الشكل 9). تظهر Acutilobins نشاطًا كبيرًا لمكافحة فيروس نقص المناعة البشرية ، بينما يظهر أقوى نشاط بواسطة acutilobin G. أيضًا ، فإنها تُظهر نشاطًا سامًا للخلايا تم اختباره في خمسة خطوط من خلايا الورم البشرية [42].

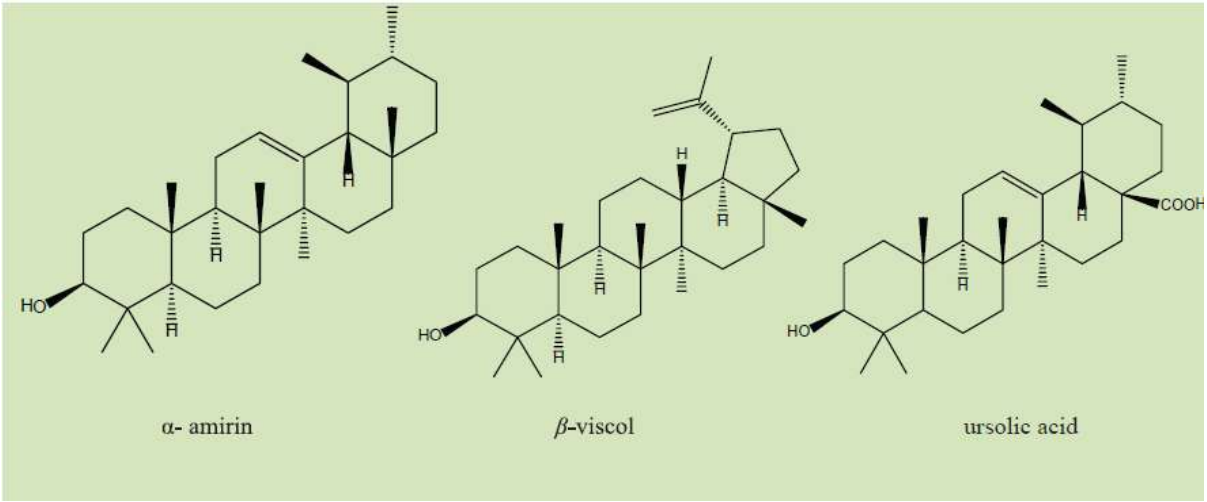
Genkwadaphninهو إستر daphnan diterpenoid المعزول من D. genkwa. يُظهر تأثيرات مضادة للأورام ومضاد لخلايا اللوكيميا ويؤدي إلى القضاء على خلايا سرطان الجلد [43].



الشكل 9: بينة بعض مركبات diterpenes تم عزلها من نبات Daphne

6.2 Triterpenes :

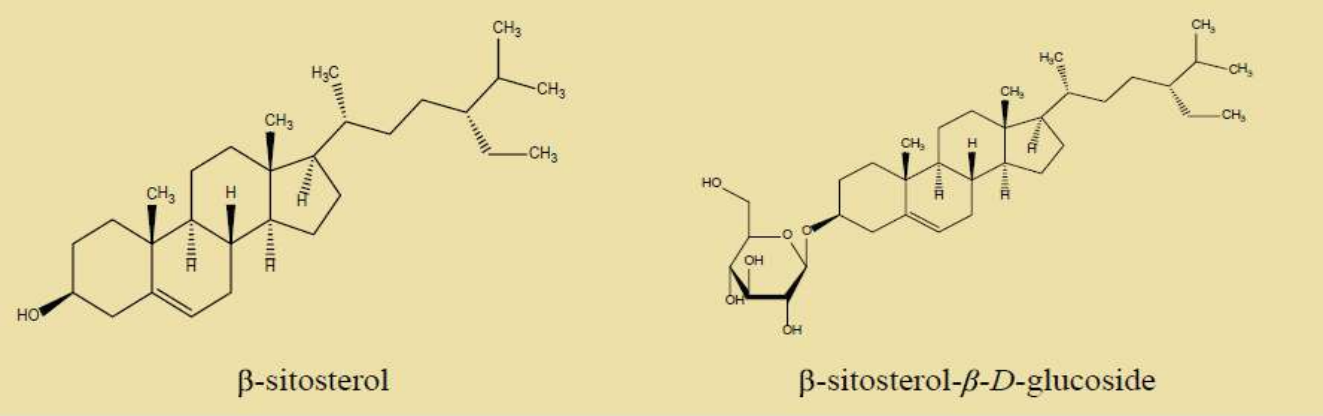
المركبات التي تم عزلها من نبات Daphne [44] موضحة في الشكل 10



الشكل 10: بينة بعض مركبات Triterpenes تم عزلها من نبات Daphne

7.2 ستيرويدات :

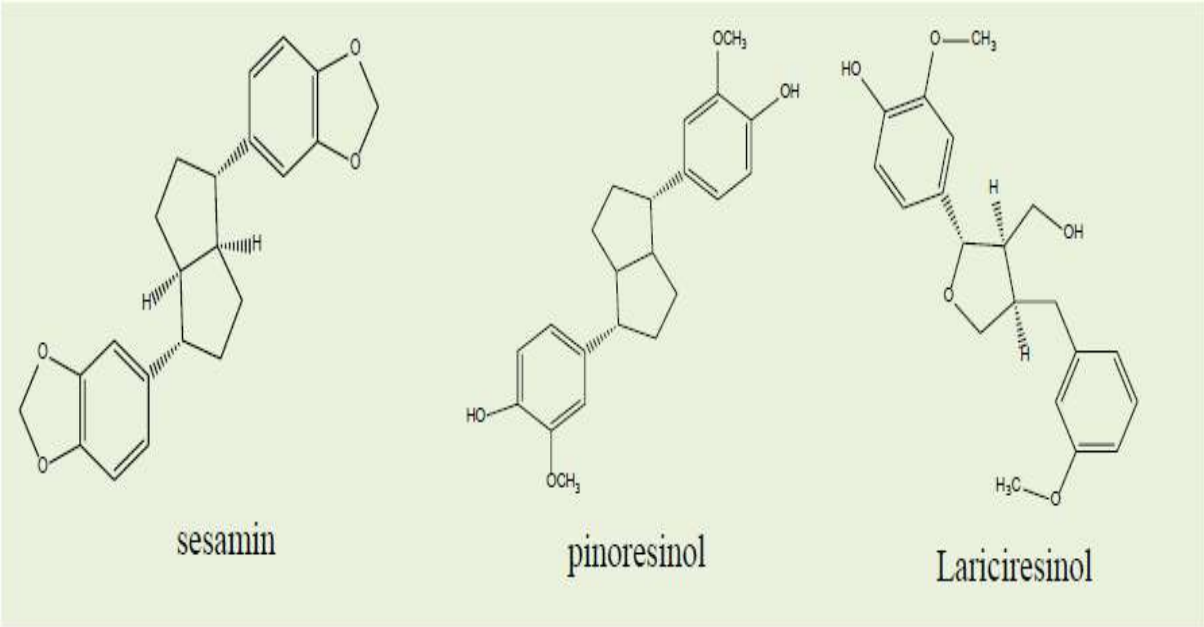
تم عزل عديد من هذه المركبات هي phytosterols [45] تم توضيحها في الشكل 11



الشكل 11 : بعض مركبات phytosterols التي تم عزلها من نبات Daphne

8.2 Lignans :

أظهرت الأبحاث الحديثة عن التركيب الكيميائي لنباتات جنس دافني وجود مركبات من مستقلبات اللجنان (الشكل 12) مثل ثنائي هيدروكسيزيسامين ، سيسامين ، لاريسيريسينول ، بينوريسينول وسيرينجاريسينول [46-47]. تم التعرف على هذه المركبات في عدة أنواع من هذا الجنس.



الشكل 12 :يبنى بعض مركبات lignans تم عزلها من نبات Daphne

3 الاعمال السابقة حول *Daphne gnidium* L.

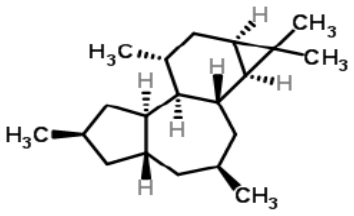
لزيادة فرص عزل المنتجات الطبيعية الجديدة من هذا النبات، انصب جل الاهتمام بالأنواع التي تمت دراستها بشكل كبير حتى الآن *Daphne gnidium* L.

ينتمي *Daphne gnidium* L. إلى Thymelaeaceae ؛ هذه العائلة غير معروفة نسبيًا (صعوبات في التصنيف النباتي) ، من ناحية أخرى ، تمتلك العديد من الاستخدامات التقليدية على الرغم من سمية بعض الأنواع.

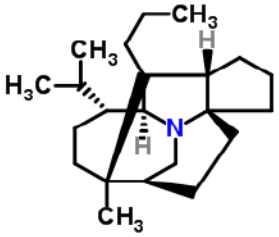
مقارنة بالأعمال والمنشورات المخصصة لـ Asteraceae و Fabaceae على سبيل المثال، فإن عائلة Thymelaeaceae لا تزال الدراسات حولها قليلة جدا .

فيما يلي، سوف نقدم لمحة عامة عن منتجات الايض الثانوية التي تنتجها Thymelaeaceae بشكل عام و*Daphne gnidium* L. على وجه الخصوص، بالإضافة إلى أنشطتها البيولوجية.

يوجد اهتمام خاص بالفئة الأكثر تميزًا من مركبات Thymelaeceae: di terpènes. في الواقع، إذ أنها هي المسؤولة عن سمية هذه النباتات التي لا تزال تستخدم في الطب التقليدي. على الرغم من أن ثنائيات التربين ذات تنوع هيكلي كبير، إلا أنها جميعًا مستمدة من الهياكل الأساسية tigliane و daphnane. [48]



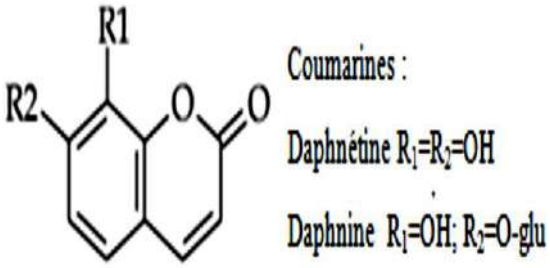
الشكل 13: الهيكل الأساسي لـ tigliane



الشكل 14: الهيكل الأساسي لـ daphnane

بالإضافة إلى ذلك، تحتوي Thymelaeceae على فئة أخرى مهمة من مركبات الايض الثانوي بحيث أن الكومارين تحضى بإهتمام كبيرا، فقد تم عزله عن أنواع مختلفة من Daphne، نجد دافنيتين ومشتقاته مثل: دافنين، daphnétine و daphnine .

من ناحية أخرى، على الرغم من انتشـار الكومارين على نطاق واسـع في النباتات، فقد تم تسـجيل كمية صـــغيرة من البيكومـارين حتى الآن في Thymelaeaceae حيث كـان أول بيكومـارين معزول من هذه الفصيلة هو daphnorétine . [49]



الشكل 15: الهيكل الاساسي لكومارين Daphnétine et Daphnine

بالإضافة إلى ذلك فإن هذه العائلة تتميز بتنوع الفلافانويد فنجد فلافون، فلافونول، فلافانون، C-glycosyl flavones [50].

هناك العديد من الدراســات التي أظهرت أن هذه العائلة تحتوي على العديد من مركبات الايض الثانوي على غرار الكومارينات، الفلافونيد، التربينات فقد تم توثيق العديد من الدراســات التي تظهر عدة أنشــطة بيولوجية مثل مضادات الالتهاب، مضادات الاكسدة والسمية، مضادات الأورام ومضادات الميكروبات.

إن الدراسة الفيتوكيمائية لسيقان Daphne gnidium L. سمحت بعزل أربع كومارينات :

Daphnétine; daphnine; acétylumbelliférone; daphnorétine.

وسبعة مركبات فلافونويد:

Lutéoline; orientine; isoorientine; apigénine-7-O-glucoside; genkwanine; 5-O-β-D-primeverosylgenkwanine; 2,5,7,4 – tétrahydroxyisoflavanol.

وقد تم تحديد الصــيغ الكيمائية لهذه المركبات بمقارنة خصــائصــها الفيزيائية بمركبات تتميز بتأثيرها المضاد للمكروبات[26] .

بالإضــافة إلى ذلك، تم إجراء اختبارات فيتو كيميائية لمســتخلص أســيتات الإيثيل لأوراق *Daphne gnidium* L. من أجل تســليط الضــوء على التانينات والفلافونيدات والكومارينات باســتخدام الكواشــف المحددة Folin-Ciocalteau و $AlCl_3$ و Folin-Denis على التوالي[25].

أما بالنســبة للأعمال الأخرى حول *Daphne gnidium* L.، فقد تم إجراء العديد من الاختبارات واسعة النطاق بحثًا عن الأنشطة البيولوجية الأكثر تنوعًا.

في الواقع، خضـعت العديد من المسـتخلصـات الخام لاختبارات بيولوجية وكيميائية حيوية، من أجل تقييم إمكاناتها النشطة بيولوجيًا.

تتكون المجموعات الكيميائية النباتية المذكورة أعلاه من مركبات مضـــادات الميكروبات التي يمكن لوجودها في المستخلصات النباتية أن يبرر فقط النشاط الملاحظ.

ففي سنتي 1996 و 1997، Lauk و رفاقه تم تقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا ومضادات الفطريات لمستخلص الميثانولي لأوراق ولحاء *Daphne gnidium* L . [28، 27] ، بعد عام أثبتت الدراسة أن مستخلص اللحاء يسبب تلف موضعي للجلد[51].

ومع ذلك، فقد أظهرت بعض المركبات مثل: daphnoretin و apigenin الموجودة في الأوراق نشاطًا مثيرًا للاهتمام لمكافحة الأورام[52]، واستمر البحث حول هذا النشاط حتى سنة 2014 حيث درس كل من Chaabane و رفاقه القدرة التثبيطية لمستخلصات الكلوروفورم والميثانول والبيوتانول من *D.gnidium* لتكاثر نوعين من خلايا سرطان الجلد في الفئران [53].

في دراســة أخرى، تم تحديد تأثير مســتخلص أســيتات الإيثيل من أوراق *D. gnidium* على وظيفة الخلايا المناعية للفئران في المختبر، حيث أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذا المستخلص يعمل كمضاد للالتهابات عن طريق تثبيط أنشطة الضامة والخلايا الليمفاوية في هذه الفئران[25] .

حاليا، أظهرت الدراسات أن بعض المستخلصات من أوراق *D. gnidium* تمتلك نشاطًا قويًا مضادًا للأكسدة ومضادًا للسموم الجينية، والذي يمكن أن يعزى إلى مركبات مثل الفلافونويد و البوليفينول[27] .

الجزء التطبيقي

تم انجاز هذا العمل في مخبر الكيمياء التابع لقسم الكيمياء لكلية الرياضيات وعلوم المادة في جامعة ورقلة

1 الأجهزة والمحاليل المستعملة

الأجهزة والادوات	المواد الكيميائية المستعملة
انابيب اختبار بياشر ارلينة قارورات قمع فصل بأحجام مختلفة جهاز التبخير الدوار ميزان الكتروني	حمض الكبريت حمض كلور الهيدروجين ثلاثي كلوريد الالمنيوم ،ثلاثي كلور الميثان ،ثلاثي كلور الحديد ، اسيتات الرصاص كواشف *Wagner* و*Mayer* ، محلول فهلنج مغنزيوم، كبريتات الحديد المائية ، هدروكسيد الصوديوم

جدول 1: الادوات و الاجهزة المستعملة

2 المادة النباتية

نستعمل في هذه الدراسة الأجزاء الهوائية لنبات . *Daphne gnidium* L

1.2 تحضير العينة

تم قطف النبات شهر ديسمبر 2019 بولاية قالمة، بعد ذلك تم تنظيفها من كل الشوائب ثم تترك لتجف في مكان بعيدا عن الضوء والغبار وتهوية جيدة، تخزن في أكياس ورقية.

الشكل 16 : صور توضح المادة النباتية المستعملة

2.2 الكشف الفيتوكيميائي على النبات :

تم نقع 5غ من الأوراق في نظام 8/2 ماء ايثانول لمدة 24ســـاعة ثم قمنا بالترشـــيح ، تم الاحتفاظ بالمستخلص الخام لإجراء الاختبارات الكيميائية التالية :

1.2.2اختبار الفلافونويد:

يتم الكشف عن الفلافونيدات بمزج 1 مل من المستخلص مع 1مل من اسيتات الرصاص 10%، ظهور اللون الأصفر دليل على وجود الفلافونيدات

2.2.2 الكشف عن الستيرويد

تم إجراء اختبارين لتأكيد النتيجة:

1.2.2.2 *اختبار Salkowski:*

تم خلط 2 مل من المستخلص الخام مع 2مل من$CHCl_3$ ، ثم نضيف 2 مل من H_2SO_4 المركز ، ظهور لون أحمر يشير إلى ان الاختبار إيجابي.

2.2.2.2 *اختبار Librman Burchard:*

تمت إذابة 2 مل من المستخلص الخام في $CHCl_3$ ، ثم نضيف 2 مل من H_2SO_4 المركز و 2 مل من حمض الأسيتيك ، ظهور اللون الأخضر على وجود الستيرويدات.

3.2.2.2 *اختبار التانين*

يضـــاف 0.5 مل من محلول $FeCl_3$ مائي بنســبة 1٪. إلى 1 مل من المســتخلص الخام، ظهور اللون الأخضر أو الأزرق الداكن يدل على وجود تانينات.

4.2.2.2 *اختبار التربينات*

يضاف 5 مل من المستخلص الخام إلى 2 مل من الكلوروفورم و 3 مل من حامض الكبريتيك المركز. تكون طورين و ظهور لون بني في الطور البيني يدل على وجود التربينات.

3.2.2 الكشف عن الصابونينات

في أنبوب اختبار، نضع 5 مل من المستخلص المائي ونرجه لبضع ثوان ثم نتركه لمدة 15 دقيقة. يشير ظهور الرغوة الثابتة إلى وجود مادة الصابونين.

4.2.2 الكشف عن القلويدات

يتم إجراء الاختبارات عن طريق تفاعلات الترسيب مع كواشف *Wagner* و *Mayer* نأخذ 2 مل من المستخلص الخام نقسمه إلى حجمين متساويين، ثم نضيف 2 مل من حمض الهيدروكلوريك المركز لكل حجم .

يتم اضافة 1 مل من كاشف *Mayer* الى الحجم الأول، والحجم الاخر نضيف له 1مل من كاشف *Wagner* ، كل خليط يتم تسخينه في حمام مائي. تشكل الراسب الأبيض أو البني، على التوالي يكشف عن وجود قلويدات.

1.4.2.2 *الية تفاعل*

مع كاشف *Mayer*: يشكل يوديد البوتاسيوم مع ايون Hg^{2+} راسب برتقالي محمر HgI_2 حسب التفاعل التالي :

$$HgCl_2+2KI \longrightarrow HgI_2 +KCl$$

نذيب الراسب في كمية من المذيب للحصول على الايون المركب $[HgI_4]^{2-}$ وفق التفاعل التالي :

$$HgI_2 + 2KI \longrightarrow [HgI_4]^{2-} + 2K^+$$

مع كاشف *Wagner* : بما ان اليود ضعيف لذوبانية نضيف يوديد البوتاسيوم لزيادة الذوبانية

$$I_2+KI \longrightarrow I_3^- + K^+$$

5.2.2 الكشف عن البروتينات :

1.5.2.2 *اختبار Biuret*

نضيف 1 مل من 4NaOH ٪ و 1 مل من $1CuSO_4$ ٪ إلى 3 مل من المستخلص الخام. تغير لون المحلول إلى اللون الأرجواني أو الوردي يدل على وجود البروتين.

2.5.2.2 *اختبار النينهيدرين*

نضيف 3 قطرات من محلول استيات الرصاص 5 ٪ إلى 3 مل من المستخلص ، نضعه في حمام مائي لمدة 10 دقائق. تغيير لون المحلول إلى اللون الأرجواني أو الأزرق يدل على وجود الأحماض الأمينية.

6.2.2 اختبار التربينات

1.6.2.2 *اختبار Salkowaski*

تمت إضافة 5 قطرات من H_2SO_4 المركز إلى 2 مل من المستخلص، ظهور لون الأخضر يدل على وجود التربينات.

2.6.2.2 *اختبار كينون الحر*

نضيف بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم (1٪) إلى 5 مل من المستخلص. يتغير اللون إلى اللون الأصفر، اللون الأحمر أو الأرجواني يدل على وجود كينونات حرة.

3.2 تحضير مستخلصات النبات المدروس حسب قطبية المذيب

في دراستنا تم اتباع البروتوكول التجريبي التالي:

تم اخذ عينة وزنها 80 غ من النبات الجاف اوراق المقطع رقيق تم نقعها في 400مل من ايثر البترول لمدة 24 ساعة بعيدا عن الضوء ثم نقوم بترشيح وتجفيف العينة، نحتفظ بالرشاحة.

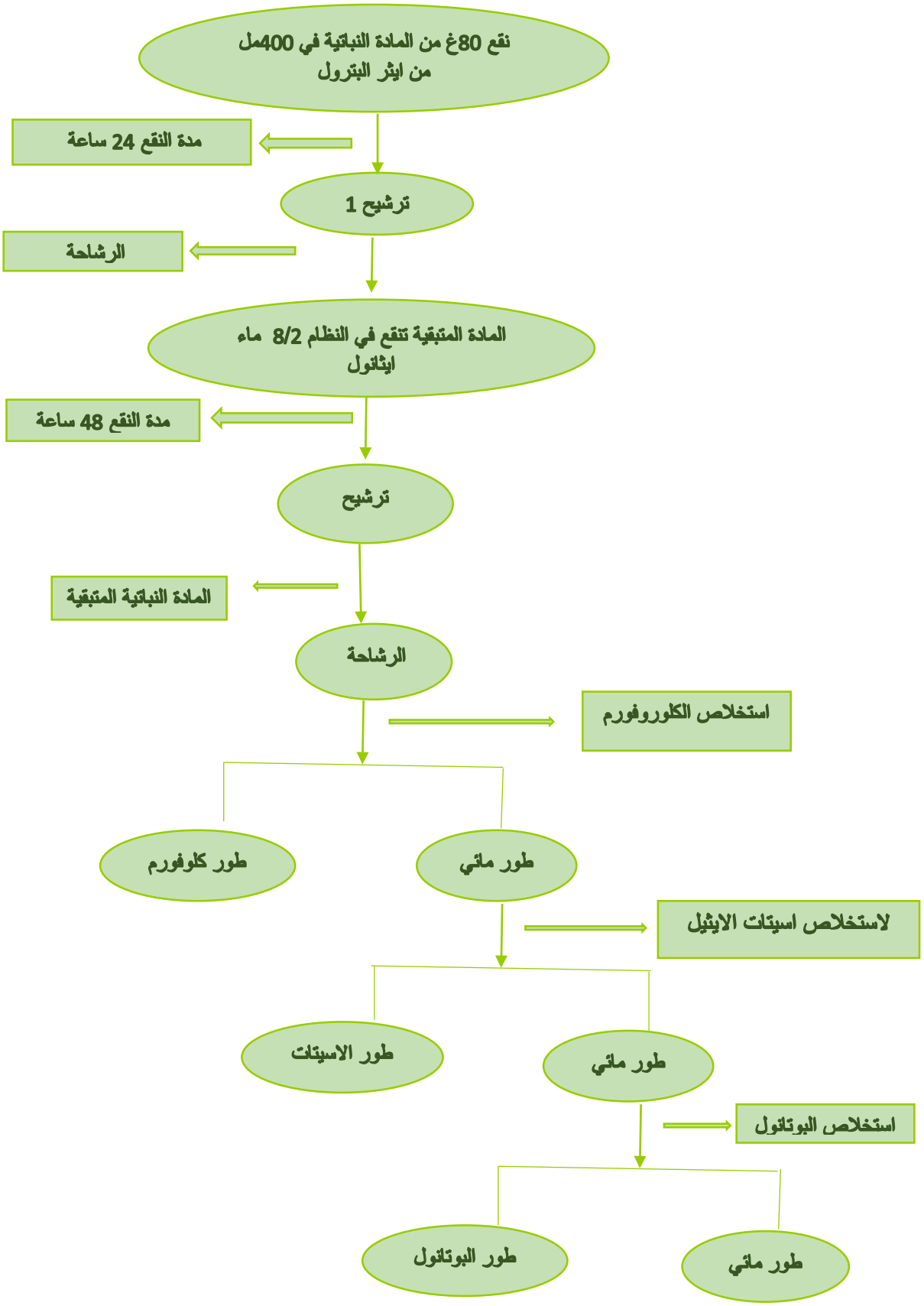
بعد تجفيف العينة نقوم بالنقع الثاني في 400 مل نظام 2/8 كحول ماء لمدة 48 ساعة في درجة حرارة الغرفة نرشح ثم نبخر .

الشكل 17 : صور توضح جهاز Rotavapeur المستعمل في الدراسة

بعد التبخير نضيف للعينة 50 مل من الماء المقطر الدافئ ونتركها لمدة 24 ساعة ثم نرشحها .

نبدأ عملية الاستخلاص سائل –سائل باستعمال الاطوار التالية: كلوروفورم، اسيتات الاثيل و بوتانول وفق البرتوكول الموضح في الشكل(7)

الشكل 18 : صور لعملية الاستخلاص



الشكل 19: يوضح البروتوكول المتبع للاستخلاص سائل – سائل

مناقشة النتائج

1 مناقشة النتائج

1.1 الاختبارات الفيتوكيميائية

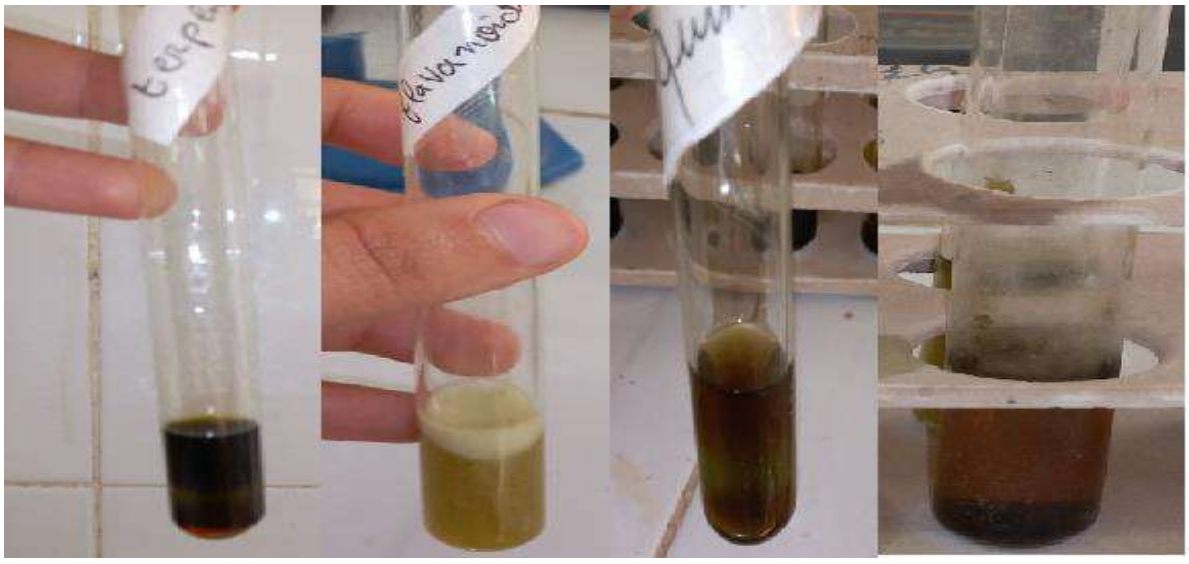
اختبارات الكشف الكيميائي، تتضمن الكشف عن مختلف المركبات الفعالة الموجودة في النبات المدروس و ذلك من خلال اختبار تفاعلات نوعية .و تعتمد هذه التفاعلات إما بتشكل راسب أو بتغير في اللون بواسطة الكواشف الخاصة بكل عائلة من المركبات الفعالة، وكانت نتائج اختبارات الكشف النوعية المطبقة في نبات. *Daphne gnidium L* كالتالي :

القلويدات : بالنسبة للقلويدات بعد إضافة قطرات من كاشف *Wagner* نلاحظ تشكل راسب بني، هذا دليل على وجود القلويدات في هذا النبات.

الفلافونيدات : بالنسبة للفلافونيدات بعد إضافة اسيتات الرصاص الى للمستخلص تغير لون المحلول الى اللون الأصفر الفاتح وهذا يدل على وجود الفلافونيدات في هذا النبات.

التربينات : بالنسبة للتربينات بعد إضافة كل من الكلوروفورم و حامض الكبريتيك المركز الى المستخلص الخام نلاحظ تكون طورين و ظهور لون بني في الطور البيني يدل على وجود التربينات.

إذن أظهرت نتائج الاختبارات الكشف الكيميائي الأولي أن النبات يحتوي على مختلف العائلات للمنتجات الطبيعية: التربينات و الفلافونيدات والكينونات و القلويدات ، كما هو موضح في الشكل 20



القلويدات	الكينون	الفلافونيد	التربين

الشكل 20 :نتائج اختبارات الكشف الكيميائي لبعض المواد الفعالة في نبات. Daphne gnidium L

نتائج الاختبارات الفيتوكيميائية اظهرت وجود مركبات الفلافونويدات والقلويدات والتانينات التربينات والستيرويدات الكينونات .

هذه النتائج *الاختبارات الفيتوكيميائية للأجزاء الهوائية (أوراق) من نبات* . D*aphne gnidium L* *نلخصها في الجدول التالي :*

جدول 2: يوضح نتائج الاختبارات الفيتوكيميائية

مركبات الايض الاولي والثانوي	النتيجة
فلافونويدات	++
قلويدات	++
كومارينات	++
ستيرويدات	++
التانينات	++
تربينات	++
تربينات ثلاثية	+
كينونات حرة	++
بروتينات	-
صابون	-

(+) نتيجة إيجابية (-) نتيجة سلبية

النبات يحوي مركبات الفلافونويد والقلويدات والعفص والستيرويدات والصابونين و الكينونات بكميات كبيرة. إن ثراء نبات *Daphne gnidium* L. بالقلويدات مقارنة بالفلافونويد يفسر سمية هذا النبات مما يفسر استخدامه في علاج الأمراض مثل: اللوكيميا والجرب والزهري [19] .

2.1 مردود الاستخلاص:

3.1 حساب مردود الاستخلاص

مردود الاستخلاص هو النسبة بين كتلة المادة النباتية الجافة المستخلصة التي تم الحصول عليها والتي نرمز لها ب M_{ext} على كتلة المادة النباتية الابتدائية ويرمز لها بالرمز M_0 ويحسب بالعلاقة التالية:

$$R\% = \frac{Mext}{M_0} X\ 100$$

R مردود الاستخلاص ب :%

M_{ext} كتلة المستخلص بعد تبخر المذيب ب (g)

M_0: كتلة النبات الابتدائية ب (g).

تم حساب مردود الاستخلاص لطور اسيتات الايثيل والذي قدر ب 0.36 %، هذه القيمة تظل ضئيلة جدا مقارنة بنتائج الدكتورة أمنى جميلة [19] حيث سجلت مردود 2.71% لنفس النبتة ونفس الطور الفرق كان في استخدام نظام استخلاص ميثانول/ماء 15/85 كذلك زمن القطف في شهر ماي بولاية سطيف بينما نحن استخدمنا نظام ايثانول/ماء 20/80 وقطفنا النبات في شهر ديسمبر من ولاية قالمة أين تسجل درجات حرارة منخفضة جدا في هذا الشهر، نذكر أن النبتة تمتد فترة ازهارها من مارس إلى سبتمبر.

سبب اخر نراه مهما وهو أن الدكتورة استخلصت بمذيب الاسيتات الايثيل عدة مرات وكان هو آخر طور تحصل عليه مما يؤدي الى زيادة المردود ونحن استخلصنا بمرة واحدة ثم غيرنا المذيب واستخدمنا البيوتانول .لهذا نفسر ضعف المرود إلى الاسباب المذكورة آنفا وخاصة زمن القطف .

لم نتكمن من حساب مردود مختلف الاطوار بسبب توقفنا عن مزاولة العمل مخبريا. بالنسبة الالوان مختلف الاطوار تراوحت بين الاخضر الغامق والفاتح وكذلك البني الغامق والفاتح.

الخلاصة

يعرف الغطاء النباتي في الجزائر تنوعا كبيرا مما جعلها محط اهتمام الباحثين من اجل انجاز عدة دراسات

العمل المنجز هو عبارة عن دراسة فيتو كيميائية وبيولوجية لنبات *Daphne gnidium* L. .

بدأنا الدراســـة بالاختبارات الكيميائية لمســـتخلص هذا النبات حيث اظهرت النتائج وجود عديد من العائلات لمركبات الايض الثانوي على غرار الفلافونويد والتانينات ..... الخ

تبعها استخلاص سائل – سائل باستعمال مذيبات متزايدة القطبية .

تحصلنا على مستخلص واحد وهو مستخلص اسيتات الاثيل الذي بلغ مردود استخلاصه نسبة 0.36%

وبكل اسف تم توقف العمل المخبري عند هذ النقطة نظرا للظروف الصحية وظهور وباء covid19.

،الا ان الدراسات السابقة اثبتت غنى هذا النبات بمركبات الايض الثانوي والتي قد يكون لبعضها أهمية دوائية محتملة. من المهم أيضًا أنه لا تزال هناك أنواع لم يتم فحصها بالتفصيل خاصة من جانب تركيبها الكيميائي ومعرضها للنشاط البيولوجي ، مما يفتح إمكانيات اكتشاف جزيئات جديدة. يجب أن تسير الأبحاث المستقبلية في اتجاه توصيف كيميائي أكثر تفصيلاً وأوسع نطاقاً للمكونات النشطة بيولوجياً ، وكذلك في اتجاه فحص الأنشطة البيولوجية الأخرى

المراجع

[1] . Vickers A & Zollman C. Herbal medicine. (1999). Bmj. 319(7216), 1050-1053.

[2] National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey. (2005). World Health Organization, Geneva. Available to: http:// whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593237.pdf

[3] Li WF, Jiang JG & Chen J. (2008). Chinese medicine and its modernization demands. Arch. Med. Res. 39(2), 246-251.

[4] . Harrison RA, Holt D, Pattison DJ & Elton PJ. (2004). Who and how many people are taking herbal supplements? A survey of 21923 adults. Int. J. Vitam NutrRes. 74(3): 183-186.

[5] Florence M., 2012, Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles. Etude de cas en maison de retraite, pp 7-10.

[6] Schmidt B, Ribnicky DM, Poulev A, Logendra S, Cefalu WT & Raskin, I. (2008). A natural history of botanicaltherapeutics. Metabolism. 57, S3-S9.

[7] Barnes PM, Bloom B & Nahin R. (2008). Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States: CDC National Health Statistics Report.

[8] Quezel P., et Santa S., 1963.- Nouvelle flore de l‟‟Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 670p

[9] De Abreu IN, Sawaya ACH, Eberlin MN & Mazzafera P. (2005)Production of pilocarpine in callus of jaborandi (pilocarpus microphyllus stapf). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 41(6), 806-811.

[10] Boudjouref Mourad, 2011, Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Université Ferhat Abbes, Sétif. Magister.

[11] Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. MicrobioL. Rev. 12(4), 564-582.
[12] McCutcheon AR, Ellis SM, Hancock REW & Towers GHN. (1992). Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. J. Ethnopharmacol. 37(3), 213-223.
[13] Clardy J & Walsh C. Lessons from natural molecules. (2004). Nature. 432(7019), 829-837.
[14]. Freiesleben SH & Jäger AK. (2014). Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms-A Review. J. Med. Arom. Pl.3(2), 154.
[15] Chaabane F., Boubaker J., Loussaif A., Neffati A., Kilani-Jaziri S., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L., 2012, Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of daphne gnidium leaf extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **12**, p. 153.
[16] Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A., 1988, Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae, J. Ethnopharmacol. **24**, pp 41-91.
[17]Chase, M.W., and Reveal, J.L., 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. Bot J Linn Soc. **161**, pp122–127.
[18] النباتات الطبيبة الدكتور حليمي عبد القادر
[19] AMENI Djamila, 2015, Effets Antioxydants des Extraits de la plante médicinale Daphne gnidium L. utilisée en Algérie, thèse de doctorat Université Ferhat Abbas Sétif 1.
[20] LEANDRI Jacques - Structure particulière d'un rhizome de Daphne, 1928, Bulletin de la Société Botanique de France, 4, Tome 75, pp 243- 248.
[21]Guide illustré de la flore algérienne.pdf
[22]Okunishi T., Takaku N., Wattanawikkit P., Sakakibara N., Suzuki S., Sakai F., Umezawa T. et Shimada M., 2002, Lignan production in Daphne odora cell cultures. *Journal of Wood Science*. **48**, pp 237-241.

[23]Murray R. D., Mendez J. et Brown S. A., 1982, The Natural Coumarins, Occurrence, Chemistry and Biochemistry. *John Wiley and Sons Ltd*. New York.

[24]Kreher B, Neszmelyi A, Wagner H., 1990, Triumbellin, a tricoumarin rhamnopyranoside from Daphne mezereum. *Phytochemistry*. **29** (11), pp 3633-3637.

[25] Harizi H., Chaabane F., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L., 2011, Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from Daphne gnidium. *Cellular Immunology*. **267**, pp 94-101.

[26] Cottiglia F., Loy G., Garau D., Floris C., Casu M., Pompei R. et Bonsignore L., 2001, Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of Daphne gnidium L., *Phytomedicine*. **8**, pp 302-305.

[27] Iauk L., Aleo G., Caccamo F., Rapisarda A., Ragusa S. et Speciale A. M., 1997, Comparative evaluation of antibacterial and antimycotic activities of Daphne gnidium leaf and bark extracts. *Farmaci Terapia*. **14**, pp 37-43.

[28] Iauk L., Aleo G., Caccamo F., Rapisarda A., Ragusa S. et Speciale A. M., 1996, Antibacterial and antimycotic activities of *Daphne gnidium* L. leaf extracts. *Phytotherapy Research*. **10**, pp 166-168.

[29] . Xu WC, Shen JG & Jiang JQ. (2011). Phytochemical and biological studies of the plants from the genus Daphne. Chem. Biodivers. 8 (7), 1215-1233.

[30] . Cottigli F, Loy G, Garau D, Floris C, Caus M, Pompei R & Bonsignore L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of Daphne gnidium L. Phytomedicine. 8(4), 302-305.

[31] Hu XJ, Jin HZ, Su J, Zhang W, Xu WZ, Yan SK & Zhang WD. (2009). Coumarins from Daphne retusa. Chin. J. Nat. Med. 7, 34-36.

[32] Mansoor F, Anis I, Ali S, Choudhary MI & Shah MR. (2013). New dimeric and trimeric coumarin glucosides from Daphne retusa Hemsl. Fitoterapia 2013; 88: 19-24.

[33] Yeşilada E, Üstün O, Sezik E, Takaishi Y, Ono Y &Honda G. (1997). Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1α, interleukin-1β and tumor necrosis factor α. J. Ethnopharmacol. 58(1), 59-73.
[34] Gu S & He J. (2012). Daphnoretin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. Molecules. 17(1), 598-612.
[35] Yuan H, Bi K, Chang W, Yue R, Li B, Ye J & Zhang W. (2014). Total synthesis of Daphnodorin A. Tetrahedron. 70(47), 9084-9092.
[36] Yusa K, Oh-hara T, Tsukahara S, Baba K, Taniguchi M, Kozawa M & Tsuruo T. (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by daphnodorins. Antiviral Res. 25(1), 57-66
[37] Watanabe I, Yanai T, Awano KI, Kogami K & Hayashi K. (1983). Volatile components of Zinchoge flower (Daphne odora Thunb.). Agric. Biol. Chem. 47(3), 483-490.
. [38] Liang S, Shen YH, Feng Y, Tian JM, Liu XH, Xiong, Z & Zhang WD. (2010). Terpenoids from Daphne aurantiacaand their potential anti-inflammatory activity. J.Nat. Prod. 73(4), 532-535.
[39] Huang SZ, Li XN, Ma QY, Dai HF, Li LC, Cai XH & Zhao YX. (2014). Daphnauranols A–C, new antifeedant sesqui terpenoids with a 5/6/7 ring system from Daphne aurantiaca.Tetrahedron Lett. 55(27), 3693-3696.
[40] Hong JY, Nam JW, Seo EK & Lee SK. (2010). Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from Daphne genkwa. Chem. Pharm. Bull. 58(2), 234-237.
[41] Inamori Y, Takeuchi K, Baba K & Kozawa M. (1987). Antifungal and insecticidal activities of daphnodorins A, B and C. Chem. Pharm. Bull. 35(9), 3931-3934.
[42] Huang SZ, Zhang XJ, Li XY, Kong LM, Jiang HZ, Ma QY & Zhao YX. (2012). Daphnane-type diterpene esters

with cytotoxic and anti-HIV-1 activities from Daphne acutiloba Rehd. Phytochemistry. 75, 99-107.

[43] Li ZJ, Li XM, Piao YJ, Choi DK, Kim SJ, Kim JW & Lee JH. (2014). Genkwadaphnin induces reactive oxygen species (ROS)-mediated apoptosis of squamous cell carcinoma (SCC) cells. Biochemical and biophysical research communications. 450(2), 1115-1119.

[44] . Katti SB & Tandon JS. (1979). Chemical Investigation on Daphne papyracea. Indian J. Chem., Sect. B. 18(2), 189-190.

[45] . Ulubelen A, Terem B & Tuzlacı E. (1986). Coumarins and Flavonoids from Daphne gnidioides. J. Nat. Prod. 49, 692-694.

[46] . Lin-gen Z, Seligmann O, Lotter H & Wagner H. (1983). (−)Dihydrosesamin, a lignan from Daphne tangutica.Phytochemistry. 22(1), 265-267.

[47] . Pan L, Zhang XF, Deng Y, Zhou Y, Wang H & Ding LS. (2010). Chemical constituents investigation of Daphne tangutica. Fitoterapia. 81(1), 38-

[48]Freeman, P. W., Ritchie, E. et Taylor, W. C., 1979, *Aust. J. Chem.*, **32**, pp 2495–2506.

[49]Lin, L. C., Yang, K.Y., Chen, Y. F., Wang, S. C. et Tsai, T. H., 2005, Measurement of daphnoretin in plasma of freely moving rat by liquid chromatography. Journal of Chromatography A. **1073**, pp 285–289.

[50] Julien Ferrari, 2002, 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 université de Lausanne.

[51] Rapisarda, A., Germanò, M.P., Iauk, L., La Rosa, M., Sanogo, R. et Ragusa, S., 1998, *Daphne gnidium* L. bark and leaf extracts: skin damage by topical application. Phytotherapy Research. **12**, pp 49–51.

[52] Mak, P., Leung, Y.K., Tang, W.Y., Harwood, C. et Ho, S. M., 2006, Apigeninsuppresses cancer cellgrowththrough ERβ1. Neoplasia. **8**, pp 896–904.

[53]Chaabane, F., Pinon, A., Simon, A., Ghedira, K. et Chekir-Ghedira, L., 2014, Chloroform leaf extract of *Daphne gnidium* inhibits growth of melanoma cells and enhances melanogenesis of B16-F0 melanoma. South African Journal of Botany. **90**, pp 80–86.

[54] Marques R., Sousaa M. M., Oliveira M. C. et Melo M. J., 2009, Characterization of weld (Reseda luteola L.) and spurge flax (Daphne gnidium L.) by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry in Arraiolos historical textiles. Journal of Chromatography A., 1216, pp 1395-1402.