



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة قاصدي مرباح ورقلة
كلية الرياضيات وعلوم المادة
قسم الكيمياء



رقم الترتيب.....
رقم التسلسل.....

رسالة مقدمة لنيل شهادة دكتوراه الطور الثالث

التخصص: التحاليل الفيزيوكيميائية وفاعلية العينات الجزيئية
بعنوان:

المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة وبعض الفعاليات البيولوجية لمستخلصات نبات النقد

تقديم:

محجر صالحة

نوقشت يوم: 2022/11/10

أمام أعضاء لجنة المناقشة المكونة من:

السيد سعدي مختار	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	أستاذ التعليم العالي	رئيسا
السيدة دقموش مسعودة	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	أستاذ التعليم العالي	مناقشا
السيد شويخ عاطف	جامعة الشهيد حمة لخضر الوادي	أستاذ التعليم العالي	مناقشا
السيد العابد ابراهيم	المدرسة العليا للأساتذة ورقلة	أستاذ التعليم العالي	مناقشا
السيد دندوقي حسين	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	أستاذ التعليم العالي	مشرفا ومقررا
السيد حجاج محمد	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	أستاذ التعليم العالي	مساعد مشرف
السيدة سمارة ونيسة	جامعة قاصدي مرباح ورقلة	أستاذ التعليم العالي	مدعو

السنة الجامعية: 2022/2021

الله أكبر

الله أكبر

الإهداء

إستعنت بالله تعالى على مجزي فأعانني ، وتوكلت عليه فساعدني في تقديم

و انجاز هذا العمل

الذي أهديه:

إلى والدي الكريمين حفظهما الله.

إلى كل أفراد العائلة : إخوتي ، أخواتي ، أعمامي ، عماتي ، أخوالي وابنائهم.

إلى أستاذي الفاضل دندوقي حسين.

إلى رفيقة دربي بكة شهرزاد

وإلى الذين ساروا في طريق العلم ومبتغاهم نشر المعرفة وطمعا في

رضا وثواب رب البشرية.

إلى كل هؤلاء جميعا أهدي لهم ثمرة جهدي

كلمة شكر

يشرفني أن أتقدم بجزيل الشكر وعظيم الإمتنان إلى أستاذي الفاضلين الدكتور دندوقي حسين: أستاذ التعليم العالي بجامعة قاصدي مرباح ورقلة وكذا الدكتور حجاج محمد: أستاذ التعليم العالي بجامعة قاصدي مرباح ورقلة اللذان تشرفت بإنجاز هذا العمل تحت متابعتهما وبذلا جهدا كبيرا في توجيهي وتعليمي أسس البحث وأفاداني بنصائحهما ولم يبخلا علي بأي شيء فشكرا جزيلًا لكما.

كما أتقدم بأسمى معاني الشكر وعظيم الامتنان للأستاذ الكريم الدكتور سعدي مختار: أستاذ التعليم العالي بجامعة -ورقلة- على قبوله رئاسة لجنة المناقشة. أتقدم بشكري الخالص إلى الأستاذ المحترم الدكتور شويخ عاطف: أستاذ التعليم العالي بجامعة جامعة الشهيد حمة لخضر الوادي؛

كما اشكر الأستاذ المحترم العابد ابراهيم: استاذ بالمدرسة العليا للأساتذة ورقلة على قبوله مناقشة هذه الاطروحة؛

جزيل الشكر للأستاذة المحترمة دقموش مسعودة: أستاذة التعليم العالي بجامعة ورقلة على قبولهم المشاركة في عضوية لجنة المناقشة . شكري الخالص للأستاذة ونيسة سمارة لقبولها الدعوة لحضور مناقشة رسالتي.

أتقدم بشكري الجزيل إلى الدكتور Mehmet ÖZTÜRK الذي فتح لي باب البحث العلمي بمخبره في موغلا التركية والذي ساعدني في إجراء التحاليل الكروماتوغرافية للمركبات المفصلة.

كما أتقدم بجزيل الشكر إلى مسؤولي وعمال مخبر تميمين وترقية الموارد الصحراوية (VPRS) والمخابر البيداغوجيا بجامعة قاصدي مرباح ورقلة، وفي الأخير أود أن أقدم شكري إلى كل من أمدني بيد المساعدة من قريب أو من بعيد، وإلى عائلتي التي أمدتني بالشجاعة ووقفت معي في أحلك الفترات بتوفير الظروف الملائمة لإتمام هذا البحث.

الفهرس

VI.....	الملخص
VII.....	Abstract
VIII.....	Résumé
IX.....	قائمة الإختصارات
X.....	قائمة الأشكال
XII.....	قائمة الجداول
1.....	المقدمة

الجزء النظري

الفصل الأول: الدراسة النظرية النباتية

3.....	1.1-الفصيلة النجمية او المركبة
3.....	1.1-1. استعمالاتها وأهميتها الإقتصادية
4.....	2.1- الجنس <i>Anvillea</i>
5.....	1.2-1. الدراسات الكيمياء-نباتية السابقة ومركبات الأيض الرئيسية لنباتات جنس <i>Anvillea</i>
10.....	3.1- نبات النقد <i>Anvillea radiater</i>
10.....	1.3-1. الوصف النباتي لنبات نقد (<i>Anvillea radiate</i> (Coss & Dur.)
11.....	2.3-1. التصنيف النباتي لنبات (<i>Anvillea radiate</i> (Coss & Dur.)
11.....	3.3-1. الإستعمالات التقليدية والخصائص الدوائية لنبات النقد <i>Anvillea radiate</i>
11.....	3.3-1. أ. الإستعمالات التقليدية
11.....	3.3-1. ب. الفعالية البيولوجية للنبات النقد <i>Anvillea radiate</i>

الفصل الثاني: معلومات عامة عن منتجات الأيض الثانوي

14.....	1.2- التربينات
14.....	1.2-1. تصنيف التربينات
15.....	1.2-1. أ. التربينات الأحادية monoterpenes
15.....	1.2-1. أ.1. التربينات الأحادية غير الحلقية
16.....	1.2-1. أ.2. التربينات الأحادية أحادية الحلقة وثنائية الحلقة
17.....	1.2-1. ب. السيسكيتيربينات
18.....	1.2-1. ب.1. السيسكيتيربينات اللاكتونية وأقسامها
24.....	1.2-2. الفوائد العلاجية للسيسكيتيربينات اللاكتونية

24.....	3-1-2. الإصطناع الحيوي للتربينات
29.....	4-1-2. الإصطناع الحيوي للسيسكيتيربينات اللاكتونية
30.....	2-2. الفلافونيدات
30.....	1-2-2. مدخل
32.....	2-2-2. الاصطناع الحيوي للفلافونيدات
34.....	3-2-2. الفوائد العلاجية للفلافونيدات

الجزء العملي

الفصل الثالث: الدراسة الكيمياء-نباتية والفعالية البيولوجية لأزهار نبات النقد

35.....	1-3. المادة النباتية
35.....	2-3. الاستخلاص
37.....	3-3. الكشوف الكيمياء-نباتية الأولية
39.....	4-3. تقدير محتوى المركبات الفينولية
	1-4.3. الدراسة الكمية لمستخلصات نبات النقد باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة
39.....	HPLC-DAD
40.....	1-4.3. أ. المستخلص الخام
41.....	1-4.3. ب. مستخلص الكلوروفورم
43.....	1-4.3. ج. مستخلص خلات الإيثيل
44.....	1-4.3. د. مستخلص البيتانول
46.....	2-4.3. تقدير محتوى عديدات الفينولات الكلي
47.....	3-4.3. تقدير كمية المركبات الفلافونويدات الكلية
48.....	4-4.3. تقدير كمية المركبات التانينية الكلية
50.....	5-3. تقدير أصباغ الدهون القابلة للذوبان
51.....	6-3. تقييم الأنشطة البيولوجية لأزهار نبتة النقد
51.....	1-6.3. طرق لتحديد النشاط المضاد الأكسدة لأزهار نبات النقد
52.....	1-6.3. أ. إختبار إجمالي القدرة الإرجاعية المضادة للأكسدة (TAC)
53.....	1-6.3. ب. إختبار 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
54.....	1-6.3. ج. إختبار القدرة الإرجاعية للحديد (FRAP)
60.....	2-6.3. طرق لتحديد النشاط المضاد للبكتريا لأزهار نبات النقد

63.....	6.3-3 طرق لتحديد النشاط المضاد للالتهاب لأزهار نبات النقد
64.....	6.3-3.1 طريقة تمسخ بروتين زلال البيض
66.....	6.3-3.3 ب. طريقة تمسخ الألبومين البقري (BSA)
الفصل الرابع: الدراسة الكيميائية لمستخلصات أزهار نبات النقد	
70.....	1.5- طرق التحليل الكروماتوغرافي
70.....	1-1.5 كروماتوغرافيا العمود (CC)
70.....	2-1.5 كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (CCM)
71.....	3-1.5 كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (CCM préparative)
71.....	2.5- الطرق الفيزياء-كيميائية المستعملة للدراسة الهيكلية
71.....	3.5- الدراسة الكروماتوغرافيا لمستخلصت ازهار نبات النقد
71.....	1-3.5 فصل مستخلص الكلوروفورم
71.....	1-3.5.1 أ. باستخدام كروماتوغرافيا العمود (CC)
73.....	1-3.5.1 ب. معالجة كسور مستخلص الكلوروفورم
73.....	1-3.5.1 ب.1 معالجة الكسر M
74.....	1-3.5.1 ب.2 معالجة الكسر H
74.....	1-3.5.1 ب.3 معالجة الكسر J
75.....	2-3.5 فصل مستخلص خلاص الإيثيل
75.....	2-3.5.1 أ. باستخدام كروماتوغرافيا العمود (CC)
76.....	2-3.5.1 ب. معالجة كسور مستخلص خلاص الإيثيل
76.....	2-3.5.1 ب.1- معالجة الكسر F+G
76.....	2-3.5.1 ب.2- معالجة الكسر H
78.....	4.5- الدراسة البنيوية للمركبات المعزولة
78.....	4.5-أ. دراسة البنيوية لمركب CHC41
85.....	4.5- ب. دراسة بنيوية مقارنة للمركبات CHC38 و POU5 بالمركب CHC41
91.....	4.5- ج. دراسة بنيوية المركب POU HEA
93.....	خلاصة عامة
95.....	المراجع
XIII.....	الملحق
XVI.....	الملتقيات والمنشورات العلمية

الملخص

أظهرت الدراسة الكيمياء-نباتية لازهار نبات النقد (*Anvillea radiata* (Coss & Dur.) وجود العديد من منتجات الأيض الثانوي مثل متعدد الفينول، التانينات، الصابونيات، الكومارينات والجلوكوزيدات. كما سمحت التحاليل المخبرية بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC- DAD بالتعرف على بعض المركبات الفينولية الفعالة في المستخلصات حسب الشواهد المتوفرة. كما تم تقدير معدل المركبات الفينولية حيث كان معتبرا في المستخلصات القطبية.

يحتوي مستخلص خلات الإيثيل والبيتانولي المعدل الأكبر من حيث عديدات الفينولات ($647.32 \pm 83.20 \text{ mg EGA/g}$ و 270.22 ± 11.21 على الترتيب)، أما أكبر معدل للفلافونويدات فسجل لدى مستخلص خلات الإيثيل ب ($46.04 \pm 0.47 \text{ mg EQ/g}$) بينما سجل أضعف معدل في مستخلص الكلوروفورم ($4.39 \pm 0.03 \text{ mg EQ/g}$) بالنسبة للتانينات كان المحتوى الأكبر في مستخلص الكلوروفورم ($6.66 \pm 0.04 \text{ mg EC/g}$).

بينما تقدير أصباغ الدهون القابلة للذوبان عند إجراء المقارنة بين محتوى الأوراق والأزهار فقد كانت الأوراق أكثر ثراء من الأزهار من حيث إحتوائها على الكلوروفيل و β -كاروتين. اعتمدنا في تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات على ثلاث طرق: اختبار DPPH، TAC وFRAP. حيث لوحظ تسجيل نشاط جد مهم مضاد للجذور الحرة باستعمال المستخلصات المدروسة فسجل أكبر معدل تثبيط للجذور الحرة مع مستخلص خلات الإيثيل وأدنى معدل مع المستخلص المائي بقيم IC_{50} 0.20 ± 0.001 و 0.59 ± 0.04 على الترتيب، أما في اختبار TAC وFRAP فإن المستخلص البيتانولي كان الأكثر قدرة بالقيم $358.58 \pm 12.55 \text{ mM}$ و $95.09 \pm 0.67 \text{ mM}$ على الترتيب.

وإذا ما عدنا الى النشاط المضاد للبكتريا فقد أظهرت تقنية الإنتشار على الأقراص في الوسط الجيلوزي نشاطا معتبرا لمستخلصات أزهار نبات النقد في تثبيط نمو *Escherishiacoli* و *Staphylococcus aureus* بينما كان النشاط ضعيفا على السلالة *Pseudomonas aeruginosa*.

تم تقييم النشاط المضاد للإلتهاب مخبريا لمستخلصات أزهار نبات النقد عن طريق تخريب البنية الثانوية نوعين من البروتين: الاول زلال البيض والثاني ألبومين المصل البقري، افادت النتائج أن كل المستخلصات تمتلك فعالية تقليص في معدل التشوه البروتيني حيث سجل أكبر معدل تثبيط لمستخلص خلات الإيثيل وكذا المستخلص البيتانولي.

وقد بينت هذه الدراسة أهمية نبات النقد واستعمالاته الواسعة في الطب التقليدي حيث أنه يمتلك نشاطا مضادا للبكتيريا والأكسدة والإلتهاب.

كما تم فصل ثلاث مركبات نقية، مركبين تربينيين ومركب فلافونيدي ولتحديد بنية هذه المركبات المفصولة لجانا الى طرق التحليل الفيزيائية – الكيمائية من ذلك طيف الرنين النووي المغناطيسي أحادي وثنائي البعد.

الكلمات المفتاحية: *Anvillea radiata*، المركبات الفينولية، مضاد الأكسدة، مضاد البكتيريا، مضاد الإلتهاب، الفيزيائية – الكيمائية، الرنين النووي المغناطيسي.

Résumé

L'étude phytochimie des fleurs d'*Anvillea radiata* (Coss & Dur.) (Nogde) a montré la présence de nombreux métabolites secondaires tels que : les polyphénols, tanins, saponines, coumarines et les glucosides. De plus, des analyses de laboratoire utilisant la chromatographie liquide à haute performante (CLHP- DAD) permet d'identifier certains composés phénoliques actifs dans les extraits, selon les témoins disponibles. Le taux de composés phénoliques a été quantifié en signalant qu'il a été considérable dans les extraits polaires.

L'extrait d'acétate d'éthyle et butanol contenait le taux le plus élevé de polyphénols ($647,32 \pm 83,20$ et $270,22 \pm 11,21$ mg EGA/g, respectivement), tandis que le taux le plus élevé de flavonoïdes a été enregistré dans l'extrait d'acétate d'éthyle ($46,04 \pm 0,47$ mg EQ/g), alors que le taux le plus faible a été enregistré dans l'extrait chloroformique ($4,39 \pm 0,03$ mg EQ/g).

Par rapport aux tanins la teneur la plus élevée était dans l'extrait chloroformique ($6,66 \pm 0,04$ mg EC/g).

L'estimation des pigments liposolubles a été mesurée en comparant la teneur des feuilles et des fleurs. Les feuilles étaient plus riches que les fleurs en termes de teneur en chlorophylle et en β -carotène.

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par trois méthodes : test DPPH, TAC et FRAP, on a constaté coexistante dans importante activité anti-radicalaire pour les extraits étudiés. Le taux le plus élevé d'inhibition des radicaux libres a été mentionné pour l'extrait d'acétate d'éthyle et le taux le plus bas pour l'extrait aqueux, avec des valeurs IC₅₀ de $0,20 \pm 0,001$ et $0,59 \pm 0,04$, respectivement, tandis que pour le test TAC et FRAP, l'extrait butanolique était le plus important avec des valeurs de $358,58 \pm 12,55$ mM et $95,09 \pm 0,67$ mM, respectivement. Et si l'on revient à l'activité antibactérienne, la technique d'étalement sur les disques dans le milieu gélatineux a montré une activité significative des extraits de fleurs de d'*Anvillea radiata* dans l'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*, tandis que la souche *Pseudomonas aeruginosa* a montré une faible activité contre les bactéries.

L'activité anti-inflammatoire des extraits de fleurs d'*Anvillea radiata* a été évaluée in vitro la détruisant la structure secondaire de deux type de protéines : le premier est d'albumine d'œuf, la seconde est l'albumine sérique bovine. Les résultats ont indiqué que tous les extraits présentaient une réduction efficace du taux de dénaturation des protéines, anise que le taux d'inhibition le plus élevé a été enregistré pour l'extrait d'acétate d'éthyle ainsi que pour l'extrait butanolique.

Cette étude a montré l'importance de la plante d'*Anvillea radiata* et ses larges utilisations en médecine traditionnelle, car elle possède une activité antibactérienne, antioxydante et anti-inflammatoire.

Trois composés purs ont également été séparés, deux composés terpéniques et un composé flavonoïdique.

Pour déterminer la structurale des composés séparés, il a eu recours à des méthodes d'analyse physico-chimiques, notamment la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire mono et bidimensionnelle.

Mots clés : *Anvillea radiata*, composés phénoliques, antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire, Résonance magnétique nucléaire, physico-chimiques.

Abstract

The phytochemical study of the flowers of *Anvillea radiata* (Coss & Dur.) (Nogde) showed the presence of many secondary metabolites such as polyphenols, tannins, saponins, coumarins, and glucosides. In addition, laboratory analyses using high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) made it possible to identify certain active phenolic compounds in the extracts, according to the available controls. The level of phenolic compounds was quantified by indicating that it was considered in the polar extracts.

The ethyl acetate and butanol extract contained the highest level of polyphenols (647.32 ± 83.20 and 270.22 ± 11.21 mg EGA/g, respectively), while the highest level of flavonoids was recorded in the ethyl acetate extract (46.04 ± 0.47 mg EQ/g), whereas the lowest rate was recorded in the chloroform extract (4.39 ± 0.03 mg EQ/g). Compared to tannins, the highest content was in the chloroform extract (6.66 ± 0.04 mg EC/g).

The fat-soluble pigment estimate was measured by comparing the content of leaves and flowers. The leaves were richer than the flowers in terms of chlorophyll and β -carotene content. The antioxidant activity of the extracts was evaluated by three methods: DPPH, TAC, and FRAP test, we remarked a significant anti-free radical activity in the studied extracts. The highest rate of free radical inhibition was recorded for the ethyl acetate extract and the lowest rate for the aqueous extract with values IC_{50} of 0.20 ± 0.001 and 0.59 ± 0.04 , respectively, while for the TAC and FRAP test, the butanol extract was the most important with values of 358.58 ± 12.55 mM and (95.09 ± 0.67 mM), respectively. The technique of spreading on the discs in the gelatinous medium showed significant activity of the extracts of flowers of *Anvillea radiata* in the inhibition of the growth of *Escherichia coli* and of *Staphylococcus aureus*. In contrast, the *Pseudomonas aeruginosa* strain showed weak activity against bacteria.

The anti-inflammatory activity of *Anvillea radiata* flower extracts was evaluated in vitro by destroying the secondary structure of two proteins: egg albumin, and bovine serum albumin. The results indicated an effective reduction in protein denaturation rate. The highest inhibition rate was recorded for the ethyl acetate extract as well as for the butanol extract.

This study showed the importance of the *Anvillea radiata* plant in traditional medicine, due to antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activity.

Three pure compounds were separated, two terpene compounds and flavonoid compound.

To determine the structure of the separated compounds we resorted to physical-chemical analysis methods, including one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Keywords: *Anvillea radiata*, phenolic compounds, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, nuclear magnetic resonance spectroscopy, physical-chemical.

قائمة المختصارات

IC₅₀	Inhibitory Concentration of 50 %
CE	Catechin Equivalent
EGA	Equivalent Gallic Acid
I(%)	Inhibition
PBS	Phosphate-Buffered Saline
BHT	Butylated Hydroxy toluene
BHA	Butylatde Hydroxy anisole
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GC-MS	Gaz Chromatography-Mass Spectrometry
ROS	Reactive Oxygen Species
MH	Muller Hinton
SOD	superoxyde dismutase
GPP	geranyl pyrophosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
CC	Colomn Chromatography
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer
HPLC-DAD-ESI-MS/MS	high performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry
HPLC-HRMS	high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry
AEAC	Ascorbic Acid Equivalent Antioxydant Capacity
GC-MS	Gaz Chromatography-Mass Spectrometry
TAC	Total antioxidant capacity
BSA	Bovine serum albumin

قائمة الأشكال

- الشكل 1: يمثل رسم تخطيطي لنوعي نباتات الجنس *Anvillea* 4
- الشكل 2: يمثل الموقع الجغرافي لأنواع نباتات الجنس *Anvillea* 5
- الشكل 3: يمثل بنى المركبات المعزولة من نبات النقد المذكورة في الجدول 1 9
- الشكل 4: يمثل صورة لنبات النقد (*Anvillea radiata* (Coss & Dur .) 10
- الشكل 5: يمثل هيكل الايزوبرين isoprene 14
- الشكل 6: يمثل(diphosphate de géranyle (GPP) 15
- الشكل 7: يمثل انواع التربينات الاحادية 15
- الشكل 8: يمثل بعض مركبات التربينات الأحادية اللاحظية 16
- الشكل 8: يمثل بعض التربينات الاحادية أحادية الحلقة وثنائية الحلقة 17
- الشكل 9: يمثل بعض مركبات سيسكيتيربينية 17
- الشكل 11: يمثل أنواع السيسكيتيربينات لاكتونية 18
- الشكل 12: يمثل الأشكال الممكنة من Germacranolides 19
- الشكل 13: يمثل الهيكل الأساسي لـ Elémnanolides 20
- الشكل 14: يمثل الهياكل الأساسية لـ Guaianolides 21
- الشكل 15: يمثل الهياكل الأساسية لـ Eudesmanolides 23
- الشكل 16: يمثل الهيكل الأساسي لـ héliangolides 23
- الشكل 17: يمثل مسار Mévalonate 25
- الشكل 18: يمثل مسار désoxyxylulose phosphate 26
- الشكل 19: يمثل مسار acide mévanolique والفئات الرئيسية من التربينات 28
- الشكل 20: يمثل الاصطناع الحيوي للسيسكيتيربينات اللاكتونية 29
- الشكل 21: يمثل أ-الهيكل الأساسي للفلافونويدات، ب- نواة الفلافون 30
- الشكل 22: يمثل الاصطناع الحيوي للمركبات الفلافونويد 33
- الشكل 23: يمثل مخطط لمختلف مراحل الاستخلاص 35
- الشكل 24: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD للمستخلص الخام لأزهار نبات النقد 40
- الشكل 25: يمثل الصيغ الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في المستخلص الخام لأزهار نبات النقد 41
- الشكل 26: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص الكلورفورم لأزهار نبات النقد 41
- الشكل 27: يمثل الصيغة الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في مستخلص الكلورفورم لأزهار نبات النقد 42
- الشكل 28: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص خلاص الايثيل لأزهار نبات النقد 43
- الشكل 29: يمثل الصيغة الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في مستخلص خلاص الايثيل لأزهار نبات النقد 43
- الشكل 30: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص البيئاتول لأزهار نبات النقد 44
- الشكل 31: يمثل الصيغة الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في مستخلص البيئاتول لأزهار نبات النقد 45
- الشكل 32: يمثل هيكل حمض الغاليك 45
- الشكل 33 : يمثل المنحنى القياسي لحمض الغاليك 46

- الشكل 34: يمثل هيكل مركب الكرسنتين..... 47
- الشكل 35: يمثل المنحنى القياسي للكرستين..... 47
- الشكل 36: يمثل هيكل مركب الكاتشين..... 48
- الشكل 37: يمثل المنحنى القياسي للكاتشين..... 48
- الشكل 38: يمثل المنحنى العياري لحمض الاسكوريك في إختبار موليبيدات الفوسفات..... 53
- الشكل 39: يمثل هيكل الـ DPPH..... 53
- الشكل 40: يمثل آلية تفاعل مضادات الأكسدة مع DPPH..... 44
- الشكل 41: يمثل أ:حمض الاسكوريك، ب: بنية BHA ج:بنية BHT..... 55
- الشكل 42: يمثل المنحنى العياري لحمض الاسكوريك في إختبار FRAP..... 56
- الشكل 43: يمثل منحنى يتمثل النشاط الكلي لمضادات الأكسدة لمختلف مستخلصات أزهار نبات النقد.. 57
- الشكل 44: يمثل النشاط المضاد للجذور (إختبار DPPH*) للمستخلصات أزهار نبات النقد..... 58
- الشكل 45: يمثل نتائج IC₅₀ (معبّر عنه mg/ml) لتثبيط DPPH مختلف مستخلصات أزهار نبات النقد.... 58
- الشكل 46: يمثل منحنى القدرة الإرجاعية للمستخلصات المختلفة لأزهار نبات النقد..... 59
- الشكل 47: يمثل آلية التمسح..... 64
- الشكل 48: يمثل النسبة المئوية لتثبيط مستخلصات أزهار نبات النقد لتمسح زلال البيض..... 65
- الشكل 49: يمثل النسبة المئوية لتثبيط مستخلصات أزهار نبات النقد لتمسح BAS..... 67
- الشكل 50: يمثل شرائح كروماتوغرافيا تمليص عمود مستخلص الكلوروفورم..... 73
- الشكل 51: يمثل مخطط مختلف مراحل فصل مكونات مستخلص الكلوروفورم..... 74
- الشكل 52: يمثل شرائح كروماتوغرافيا تمليص عمود مستخلص خلات الايثيل..... 76
- الشكل 53: يمثل مخطط مختلف مراحل فصل مكونات مستخلص خلات الايثيل..... 77
- الشكل 54: يمثل طيف ¹³C RMN (MeOH, 150 MHz) للمركب CHC41..... 78
- الشكل 55: يمثل طيف ¹³H RMN (MeOH, 600 MHz) للمركب CHC41..... 79
- الشكل 56: يمثل طيف ¹³H RMN (MeOH, 600 MHz) من 1.20 الى 3.05 ppm للمركب CHC41..... 80
- الشكل 57: يمثل طيف HSQC لمركب CHC41..... 81
- الشكل 58: يمثل طيف COSY لمركب CHC41..... 81
- الشكل 59: يمثل طيف ¹³H RMN (MeOH, 600 MHz) من 4 الى 6.32 ppm للمركب CHC41..... 82
- الشكل 60: يمثل طيف HMBC لمركب CHC41..... 83
- الشكل 61: يمثل بنية المركب 9β-hydroxyparthenolide..... 83
- الشكل 62: يمثل أطياف المركب CHC38 (1) ¹³C RMN (2) ¹H RMN (3) HSQC (4) HMBC (5)..... 87
- الشكل 63: يمثل أطياف المركب POU5 (1) ¹³C RMN (2) ¹H RMN (3) HSQC (4) HMBC (5) COSY..... 89
- الشكل 64: يمثل بنية المركب 9α-hydroxyparthenolide..... 90
- الشكل 65: يمثل أطياف المركب POUHEA (1) ¹³C RMN (2) ¹H RMN (3) HSQC (4) HMBC (5) COSY..... 89

قائمة الجداول

- الجدول 1: مركبات معزولة من نباتات جنس *Anvillea* 06
- الجدول 2: الأنواع الرئيسية لمركبات الفلافونويد 31
- الجدول 3: مردود الاستخلاص وتقدير محتوى الفينولات الكلية، الفلافونويدات، التانينات، في مستخلصات أزهار نبات النقد 36
- الجدول 4: الفحص الأولي للكيمياء-نباتية لمستخلصات أزهار نبات النقد 38
- الجدول 5: المركبات المتواجدة في المستخلص الخام باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة DAD-HPLC 51
- الجدول 6: لمركبات المتواجدة في مستخلص الكلوروفورم باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة DAD-HPLC 41
- الجدول 7: المركبات المتواجدة في المستخلص خلات الايثيل باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة DAD-HPLC 42
- الجدول 8: المركبات المتواجدة في المستخلص البيتانولي باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة DAD-HPLC 44
- الجدول 9: تقدير أصباغ الدهون القابلة للذوبان 50
- الجدول 10: الوصف والأمراض التي تسببها السلالات المختبرة 60
- الجدول 11: أقطار مناطق التثبيط لمستخلصات أزهار نبات النقد والمضادات الحيوية 61
- الجدول 12: تأثير مستخلصات أزهار نبات النقد وديكلوفيناك الصوديوم على عملية تمسخ البروتين البيض الناجم عن الحرارة في المختبر 65
- الجدول 13: تأثير مستخلصات من أزهار نبات النقد وديكلوفيناك الصوديوم عملية تمسخ المصل البقري BSA الناجم عن الحرارة في المختبر 66
- الجدول 14: تتابع تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص الكلوروفورم لأزهار نبات النقد 72
- الجدول 15: تتابع تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص خلات الايثيل لأزهار نبات النقد 75
- الجدول 16: الازاحات الكيميائية والتضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (MeO، 600MHz) للمركب CHC41 84
- الجدول 17: الازاحات الكيميائية والتضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 84
- الجدول 18: مقارنة الازاحات الكيميائية والتضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 (MeOH، 150MHz) للمركب CHC41 84
- الجدول 19: مقارنة الازاحات الكيميائية والتضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (MeOH، 600MHz) للمركبات CHC41، CHC38، و POU5 85

المقدمة

المقدمة

منذ آلاف السنين، استخدم الإنسان النباتات لتخفيف آلامه وشفاء أمراضه وعلاج جروحه. في الواقع، من بين حوالي 500000 نوع من النباتات، 80.000 لها خصائص طبية. في إفريقيا، حيث لا يزال العديد من السكان يستخدمون الأدوية العشبية للرعاية الصحية حيث كانت القوة العلاجية للنباتات معروفة تجريبياً [1].

ولطالما كانت النباتات جزءاً من الحياة اليومية للإنسان حيث تتعدد استخداماتها للغذاء، للصحة وأحياناً في الطقوس الدينية لأنهم ينسبون لها القوة مما يجعل لها قيمة في العلاج النفسي [1-3].

يرتبط تاريخ النباتات الطبية بتطور الشعوب لذا احتلت النباتات مكانة هامة في الطب وفي تحضير العطور والتوابل، مهد العلاج بالنباتات الصين وكذا الهند، الشرق الأوسط، وخاصة خلال العصر الإسلامي كمصر مثلاً، إلى جانب اليونان، روما وهي أهم الحضارات القديمة التي عرفت باستعمالها للنباتات كمصدر للعلاج [4].

وقد تجدد الاهتمام بالنباتات وخاصة في الفترات الأخيرة حيث شاع استخدامه كدواء ذو تأثير بطيء ولطيف يتحملة الجسم بشكل أفضل من الأدوية الاصطناعية، كما أنه ملاذ غالبية سكان العالم لاسيما البلدان النامية لتكلفتها المادية المتواضعة مقارنة بتلك المصنعة.

والبحث عن المركبات الطبيعية يساهم في التقدم وإثبات النجاعة العلمية للمستخلصات الفعالة من النباتات. هذه البحوث تساهم في الطب النباتي ووفقاً لما هو معمول به دولياً، حيث يتم ترخيص المنتجات النهائية خاصة المواد الخام للتسويق طبياً وتجارياً والتي يتم توفيرها حصرياً في الصيدليات وهذا ما يسمى بعلم العقاقير أو البيولوجيا الصيدلانية [4, 5].

في أوائل عام 1970، أُجبر الأطباء أخيراً على التخلي عن اعتقادهم بأن الإلتهابات البكتيرية يمكن علاجها تماماً بالمضادات الحيوية؛ غير أن تفاؤلهم قد اهتز بظهور المقاومة للعديد من المضادات الحيوية في

مسببات الأمراض مثل: *Streptococcus pneumoniae*، *Staphylococcus aureus*،

Pseudomonas aeruginosa، *Mycobacterium tuberculosis*.

بالإضافة إلى هذه المشكلة، فقد ارتبطت في أحيان كثيرة المضادات الحيوية بآثار ضارة كفرط الحساسية لذلك، توجب تطوير عقاقير بديلة مضادة للميكروبات لعلاج الأمراض المعدية من خلال العلاج بالنباتات الأقل عدوانية.

من ناحية أخرى، تلعب مضادات الأكسدة دوراً مهماً في الوقاية من الأمراض، ولأن بعض مضادات الأكسدة الاصطناعية أظهرت هي الأخرى مخاطر صحية مؤكدة، بما في ذلك تأثيرات مسرطنة؛ لدى

توجب العثور على مصادر جديدة لمضادات الأكسدة منشؤها الطبيعة حيث تكلفتها منخفضة ومخاطرها جد محدودة لتحل محل مضادات الأكسدة الاصطناعية.

لطالما استخدم طب الأعشاب في الجزائر في قطاع الطب التقليدي. ولا تزال النباتات الى اليوم تلعب دورًا مهمًا للغاية في العلاج التقليدي وحياة السكان، لكن قواعد استخدامها تفتقر في كثير من الاحيان إلى الصرامة ولا تأخذ في الاعتبار المتطلبات الفعلية للعلاج الحديث، في السنوات الأخيرة ركزت الكثير من الأبحاث على تعزيز الطب التقليدي من أجل التحقق من سلامة وفعالية النباتات المستخدمة ووضع القواعد العلمية لاستخدام هذه النباتات. في هذا السياق يندرج عمل بحثنا والهدف الرئيس منه هو التحقق من الفعالية المضادة للالتهابات ومضادات الأكسدة والبكتيريا لبعض مستخلصات ازهار نبات طبي صحراوي جزائري ينتمي إلى العائلة النجمية Asteraceae من جنس *Anvillea*،

Anvillea radiata (Coss & Dur.) يعرف بنبات النقد وهو نوع مستوطن في شمال إفريقيا (شمال الصحراء) ، و معروف باستخدامه الطبي التقليدي.

وقد قسم هذا العمل الى جزئين رئيسيين الأول في شكل ملخص نظري مقسم الى فصلين: يقدم الفصل الأول تقريراً وصفياً عن النبات المدروس من الناحية الوصفية والمسح الكيميائي (التركيبية الكيميائية) وبعض الإستخدامات.

والفصل الثاني مخصص لمركبات الأيض الثانوي ودورها وقيمة المركبات الفينولية. الجزء الثاني خصص للشق العملي ويتكون بدوره من ثلاث فصول: الفصل الاول منها يحوي المادة النباتية والطريقة العملية المتبعة بدءاً من تحضير المستخلصات، واخضاعها للفحوصات الكيمياء-نباتية وتحديد كمية بعض منتجات الأيض الثانوي، ثم طرق دراسة الانشطة البيولوجية. اما النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها ومناقشتها فمعرضة في الفصل الثاني بينما الفصل الاخير فتمحور على الدراسة الكيميائية لمستخلصات أزهار النقد، وننهي رسالتنا بخلاصة عامة.

الجزء النظري

الفصل الأول: الدراسة النظرية
النباتية

1. الدراسة النظرية النباتية1.1- الفصيلة النجمية أو المركبة:

تعتبر الفصيلة النجمية (المركبة) من أكثر فصائل النباتات المزهرة انتشاراً في العالم، بمعدل 10% من المجموع الكلي للنباتات المزهرة، موزعة في معظم أنحاء الكرة الأرضية وتكاد تكون موجودة في جميع البيئات باستثناء القطب الجنوبي [6].

وتزخر الجزائر بالعديد من نباتات هذه الفصيلة حيث تنمو على تربتها، حوالي 408 نوعاً موزعاً بين 109 جنساً. وتعد هذه الفصيلة من أهم الفصائل في رتبة الناقوسيات ثنائية الفلقة (كاسيات البذور)، وتشتمل على 1600 جنساً و25000 نوعاً [7]، تنقسم فصيلة Asteraceae إلى خمس تحت فصيلة فرعية رئيسية: Cichorioïdées و Aséroïdées، Carduoïdées، Mutisioïdées، Barnadesioïdées [8].

وقد أطلق عليها العلماء اسم الفصيلة النجمية Asteraceae بدلاً من الفصيلة المركبة Compositae بالمعنى الواسع لها، وكلمة "Aster" تعني باليونانية النجمة وتسميتها راجعة لشكل الزهرة. تزرع العديد من أنواع هذه الفصيلة لقيمتها الغذائية مثل: (عباد الشمس، الخس، البابونج و... إلخ) أو في البستنة: أقحوان (*dahlias, Dendranthema*) قرنفل (*Tagetes*)، وتوفر هذه الفصيلة العديد من الخضروات:

scorsonère (*Scorzonera hispanica*)، sifis (*Tragopogon porrifolius*)

تتميز أنواع هذه الفصيلة بتعدد استعمالاتها في الطب الشعبي التقليدي وذلك لقيمتها الطبية [9]، كالبابونج الذي له خصائص مضادة للجراثيم، الفطريات والالتهابات [10].

ففي الصين 300 نوعاً من هذه الفصيلة تُستخدم لأغراض طبية على سبيل المثال النبات *Artemisia annua* الفعالة في علاج الملاريا والنوع *Seussurea involucrata* المضاد للتعب ومكافح للالتهاب، فهو المههد بالانقراض [6].

1.1.1. إستعمالاتها وأهميتها الاقتصادية:

تكتسي نباتات الفصيلة النجمية أهمية اقتصادية كبرى، فمنها ما يستعمل كمصدر لغذاء الإنسان وتستهلك كبذور أو خضر أو توابل (*Helianthus annuus, Helianthus, intybus Artemisia dracunculus*)، ومنها ما يستعمل للزينة لروعة جمال أزهارها (*Chrysanthemum Cosmos, Zinnia, Dehlia*)، ومنها ما يستعمل للصابون ومواد الطلاء، كما

الخلو المستخرج من بذور نبات القرطم (*Cartamus tinctorius*) في صناعة الصابون ومواد الطلاء، كما ويستعمل الزيت (*Marguerite و Tagete Argyanthemum, Dentranthema, Calendula, Gerbera*) [11].

يستخرج من بتلات أزهاره مادة العصفر (Carthamine) المستعملة في الصباغة، ويستخرج من أزهار *Tanacetum pathenium* أو *Chrysanthemum coccineum* مسحوق Pyrethrum وهو مبيد حشري [12].

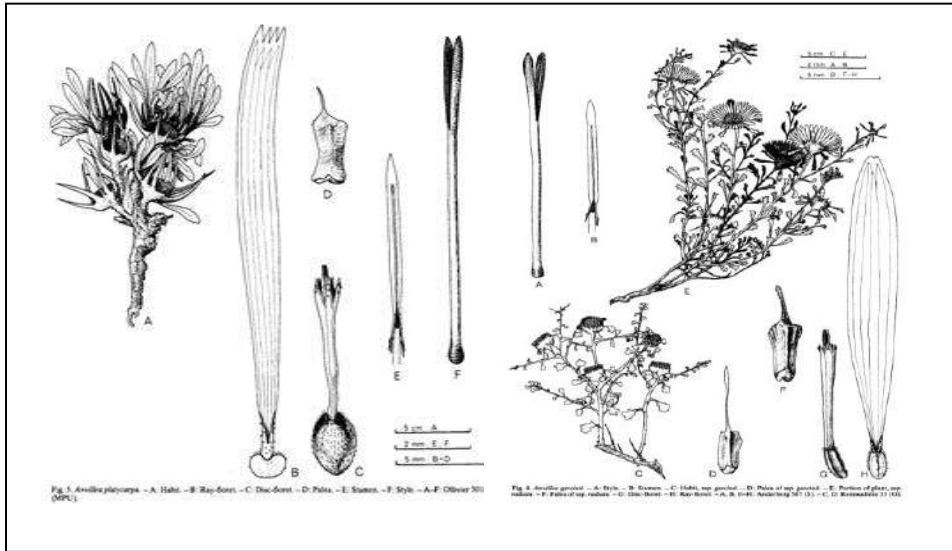
أما من الناحية الكيميائية فتتميز نباتات الفصيلة النجمية بغناها بمركبات الأيض الثانوي (المتتمثلة في Flavomoides، Triterpènes، Diterpènes، Sesquiterpènes lactones، Monterpènes، Acides phenoliques.... إلخ) ذات الفعاليات البيولوجية المتنوعة [7]. وهي من أكثر الفصائل دراسة ومن بين أهم المركبات المعزولة المميزة للفصيلة نذكر: polyactylenes [13]، الفلافونويدات [14, 15]، السيسكويتربينات اللاكتونية والتربينات الثنائية [16].

2.1- جنس *Anvillea*:

هو جنس صغير ينتمي إلى الفصيلة النجمية وتحت الفصيلة الإينولية [17]، في سنة 1977م أدى التباين الكبير في التشخيص لأنواع *Anvillea* إلى تصنيف معقد للغاية. فوجد الأنواع الأربعة الموصوفة (*A. garcinii*، *A. radiata*، *A. australis* and *A. faurei*) على أنها تنتمي إلى نوع واحد. تم إختصار كلمة *Anvilleina maire* إلى كلمة *Anvillea*. وتضم نوعين (*A. platycarpa* (Coss & Dur.)

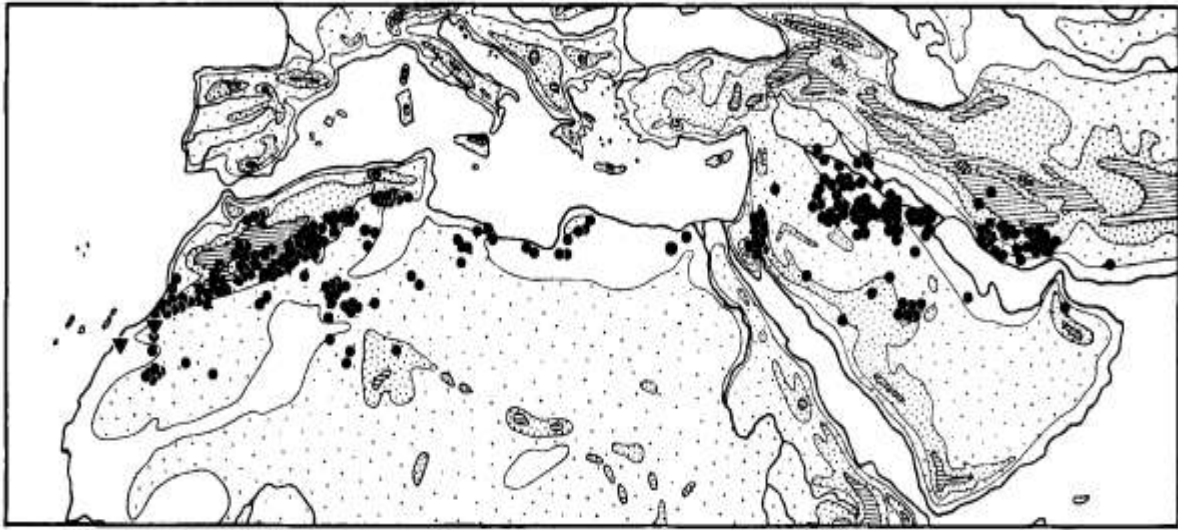
و (*A. garcinii*(burm.f.)(Coss & Dur.) ssp. *radiata* (Coss & Dur.)

و(الشكل 1) يمثل مقاطع عرضية للأوراق مأخوذة من النباتات الحية المزروعة، ويتم الإحتفاظ بالقائمة كاملة من المجموعات التي تم فحصها في المتحف السويدي للتاريخ الطبيعي، قسم علم النبات [17].



الشكل 1: يمثل رسم تخطيطي لنوعي نباتات الجنس *Anvillea* [17].

وتتوزع أنواع هذا الجنس من شمال أفريقي إلى إيران. بما في ذلك دول الشرق الأوسط، مثل مصر وفلسطين والمملكة العربية السعودية. حيث يتواجد النوع (*A. platycarpa* (Coss & Dur.) في المغرب والصحراء الغربية و(*A. garcinii*(burm.f.) (Coss&Dur.).ssp *radiata* (Coss&Dur.) في شمال أفريقيا والشرق الأوسط وشبه الجزيرة العربية. والنوع الثاني يوجد في الجزائر فقط وهو نوع أصيل يدعى محليا بالنقد أو النقد الحر *A.radiata* [18](الشكل2).



مواقع تواجد *A.garcinii* (●) و النوع *A. platycarpa* (▼) *Anvillea garcinii* ssp. *radiata* تواجد في الشرق الاوسط و *radiata* ssp في شمال افريقيا

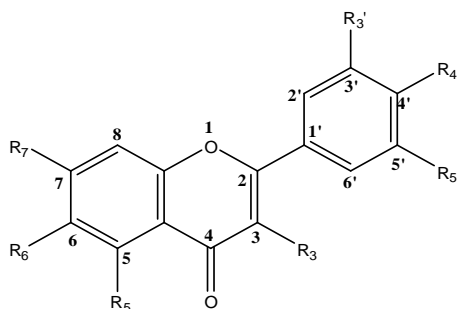
الشكل 2: يمثل الموقع الجغرافي لأنواع نباتات الجنس *Anvillea* [17].

1-2.1. الدراسات الكيميائية-نباتية السابقة ومركبات الأيض الرئيسية لنباتات جنس *Anvillea*:

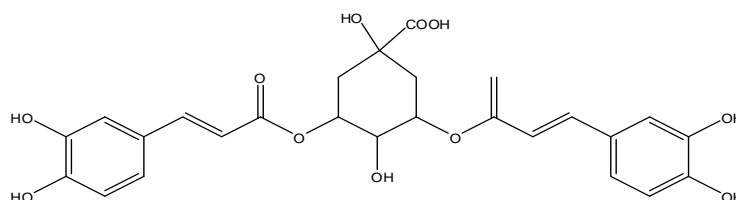
كما ذكرنا سابقاً، يعتبر جنس *Anvillea* مصدراً مهماً في المملكة النباتية التي تنتج العديد من المنتجات الطبيعية: بما في ذلك عديدات الفينولات، الفلافونويد، التربينات، السييسكيتيربينات اللاكتونية. تُعرف المركبات التي تميز هذا الجنس بأنشطتها البيولوجية المتنوعة بما في ذلك النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للسمية الخلوية.

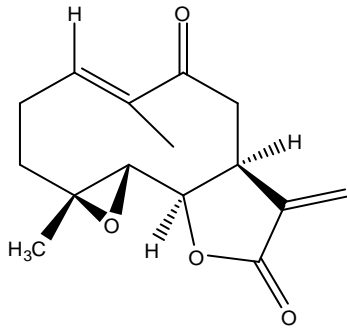
الدراسات التي أُنجزت على نباتات هذا الجنس لخصت في (الجدول 1).

الجدول 1: مركبات معزولة من نباتات جنس <i>Anvillea</i>		
رقم	إسم المركب	النبته والجزء المفصول منها
		<u>الفينولات ، فلافونيدات</u>
[19]	<i>A. radiate</i>	Hispiduline
[19]	<i>A. radiate</i>	Népétine
[20]	<i>A. garcinii</i>	
[19]	<i>A. radiate</i>	Jaceosidine
[20]	<i>A. garcinii</i>	
[19]	<i>A. radiate</i>	Spinacétine
[19]	<i>A. radiate</i>	7-Glucoside Spinacétine
[21]	<i>A. garcinii</i>	
[19]	<i>A. radiate</i>	7-diglucoside patuléline
[19]	<i>A. radiate</i>	3-glucoside quercétine
[19]	<i>A. radiate</i>	3-diglucoside Patuléline
[19]	<i>A. radiate</i>	3-diglucoside isorhamnétine
[19]	<i>A. radiate</i>	3-diglucoside- 7-glucoside quercétine
[19]	<i>A. radiate</i>	3-diglucoside spinacétine
[19]	<i>A. radiate</i>	6-méthyléther 3-glucoside kaempférol
[21]	<i>A. garcinii</i>	Rutine
[20]	<i>A. garcinii</i>	Isorhamnetin
[21]	<i>A. garcinii</i>	patuletin-7-glucoside
[19]	<i>A. garcinii</i>	quercetin 3-rhamnoglucoside 3',4'dimethyl ether,
[19]	<i>A. garcinii</i>	6-methoxykaempferol 3-galactoside
[19]	<i>A. garcinii</i>	6-methoxykaempferol 3-galactoside 7,4-dimethylether
[19]	<i>A. garcinii</i>	kaempferol 3-rhamnoglucoside
[19]	<i>A. garcinii</i>	spinacetin 3-rhamnoglucoside
[19]	<i>A. radiate</i>	quercetin 3-rhamnoglucoside
[22]	<i>A. radiate</i>	Acide 3,5-O-dicaffeoylquinique
		<u>السيكيتربينات</u>
[23 ,20 ,19]	<i>A. radiate</i>	parthenolid-9-one
[21]	<i>A. garcinii</i>	
[22 ,20 ,19]	<i>A. radiate</i>	9 α -hydroxyparthenolide
[23]		
[21]	<i>A. garcinii</i>	
[22 ,20]	<i>A. radiate</i>	9 β -hydroxyparthenolide.
[21 ,19]	<i>A. garcinii</i>	
[23 ,20 ,19]	<i>A. radiate</i>	8 α , 9 α -epoxyparthenolide
[21 ,20]	<i>A. radiate</i>	9 α -hydroxy-1 β ,10 α -epoxyparthenolide
[19]	<i>A. garcinii</i>	
[20]	<i>A. radiate</i>	9 β -hydroxy-1 β ,10 α -epoxyparthenolide
[19]	<i>A. garcinii</i>	
[20]	<i>A. radiate</i>	cis-partenolid-9-one
[24 ,19]	<i>A. garcinii</i>	
[25]	<i>A. garcinii</i>	4 α ,9 α ,10 α -trihydroxy-L-proline-guaia-12,6 α -olide
[25]	<i>A. garcinii</i>	4 α hydroxy-9 α -(β -glucopyranosyl)-oxy-guaia-10(14)en-12,6 α -olide
[25 ,21]	<i>A. garcinii</i>	13-L-phenylalanine-9 α -hydroxyparthenolide
[25 ,21]	<i>A. garcinii</i>	13-L-proline-9 α -hydroxyparthenolide
[25 ,21]	<i>A. garcinii</i>	13-L-proline-9 β -hydroxyparthenolide
[25 ,21]	<i>A. garcinii</i>	13-L-valine-9 α -hydroxyparthenolide

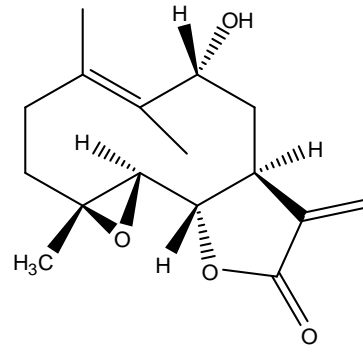


R4'	R3'	R7	R6	R3	إسم المركب	الرقم
OH	H	OH	OCH ₃	H	Hispiduline	<u>01</u>
OH	OH	OH	OCH ₃	H	Népétine	<u>02</u>
OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Jaceosidine	<u>03</u>
OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	Spinacétine	<u>04</u>
OH	H	O-Glucoside	OCH ₃	OH	7-Glucoside Spinacétine	<u>05</u>
OH	OH	O-diglucoside	OCH ₃	OH	7-diglucoside patulétine	<u>06</u>
OH	OH	OH	H	O-glucoside	3-glucoside quercétine	<u>07</u>
OH	OH	OH	OCH ₃	O-diglucoside	3-diglucoside Patulétine	<u>08</u>
OH	OCH ₃	OH	H	O-diglucoside	3-diglucoside isorhamnétine	<u>09</u>
OH	OH	O-glucoside	H	O-diglucoside	3-diglucoside- 7-glucoside quercétine	<u>10</u>
OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	O-diglucoside	3-diglucoside spinacétine	<u>11</u>
OH	H	OH	OCH ₃	O-glucoside	6-méthyléther 3-glucoside kaempférol	<u>12</u>
OH	OH	OH	H	O-rutinoside	Rutin	<u>13</u>
OH	OCH ₃	OH	H	OH	Isorhamnétine	<u>14</u>
OH	OH	O-glucoside	OCH ₃	OH	7-glucoside Patulétine	<u>15</u>
OCH ₃	OCH ₃	OH	H	O-rhamnoglucoside	3-rhamnoglucoside 3', 4'diméthyléther quercétine	<u>16</u>
OH	H	OH	OCH ₃	O-galactoside	3-galactoside 6-méthoxykaempférol	<u>17</u>
OH	H	OCH ₃	OCH ₃	O-galactoside	3-galactoside 7,4-diméthyléther6-méthoxykaempférol	<u>18</u>
OH	H	OH	H	O-rhamnoglucoside	3-rhamnoglucoside kaempférol	<u>19</u>
OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	O-rhamnoglucoside	3-rhamnoglucoside spinacétine	<u>20</u>
OH	OH	OH	H	O-rhamnoglucoside	3-rhamnoglucoside quercétine	<u>21</u>

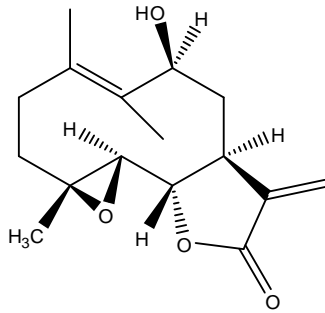




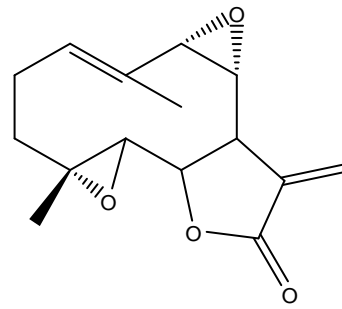
23



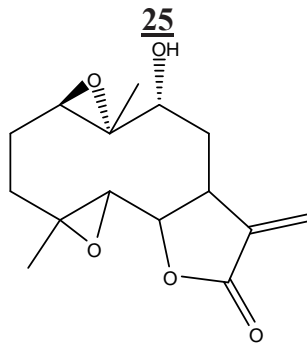
24



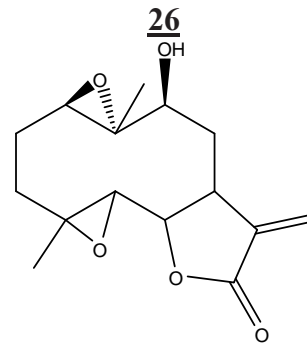
25



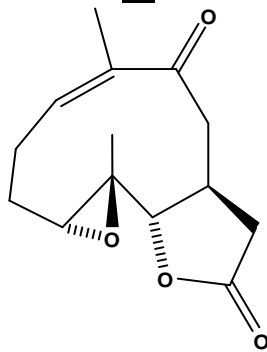
26



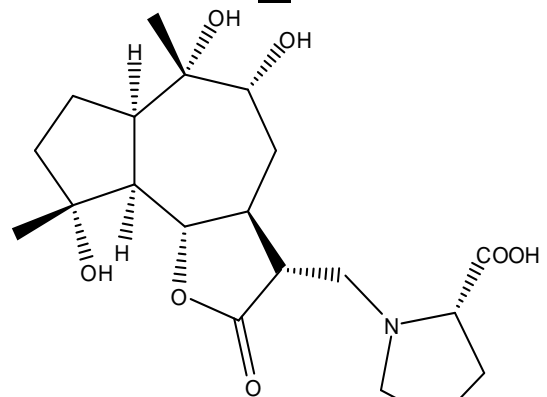
27



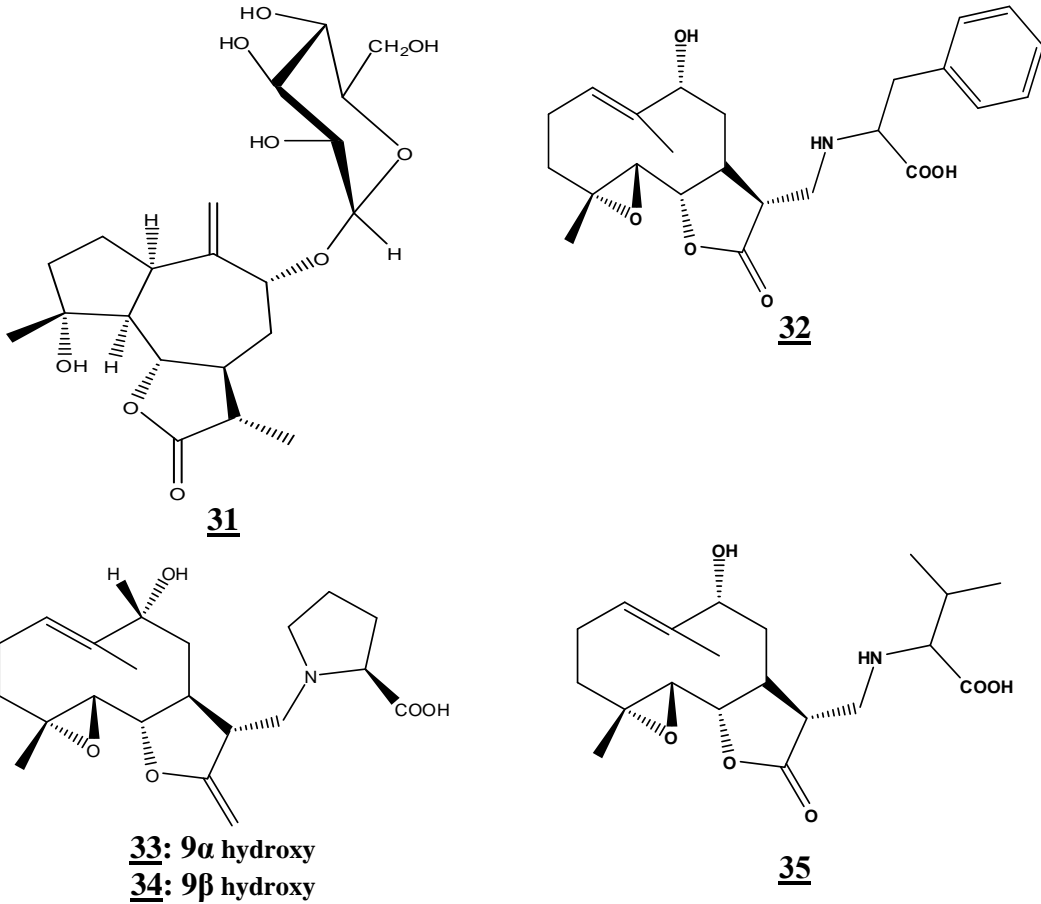
28



29



30



الشكل 3: يمثل بنى المركبات المعزولة من نبات النقد المذكورة في الجدول 1

كما حدد خمس وعشرون مركبًا فينوليًا من المستخلص الميثانولي لـ *A. radiata* (Coss & Dur.) منها سبعة مركبات من مشتقات حمض الكولينيك *acide chologinique* وحمض *dicafeoylquinique*. وثمانية عشر مركبًا فلافونويديا (خمسة أجليكونات وثلاثة عشرًا جليكوسيدات) بواسطة الاجهزة الكروماتوغرافية التالية: HPLC-DAD-ESI-MS/MS و HPLC-HRMS [26].

كما تم تحليل الزيوت العطرية في أجزاء من نبات *Anvillea garcinii* بواسطة GC-FID و GC-MS، وقد حدد إجمالي 140 مركبًا من كلا الزيتين، من بينها 130 مركبًا تم تحديده لأول مرة في جنس *Anvillea*. في

زيت الأزهار تم تحديد 126 مركبًا، بينما تم تحديد 119 مركبًا في زيت الأجزاء الهوائية لـ *A. garcinii* [27]. الزيوت العطرية المستخرجة من الجزء الهوائي من نبات *A. radiata* [28]، أظهر التحليل الكيميائي

لها وجود مركبين *6-oxocyclonérolidol* بنسبة 66.6% و *6-hydroxycyclonérolidol* بنسبة 11.4%

والتي أثبتت دراسات نشاطها المكروبي ضد الكائنات الدقيقة.

ومنه إختيارنا نبات النقد في دراستنا بسبب إستخداماته المتعددة في الأدوية التقليدية والدراسات الكيمياء-نباتية المدرجة في الأبحاث السابقة.

3.1- نبات النقد *Anvillea radiate*:

هو نبات يدعى محليا بالنقد، النقد الحر[29, 30] أو الحرف (Tamahaq) horftehetit [31]، هو نبات بري من فصيلة Astéracée ينمو غالبا في سهول شمال أفريقيا (المغرب والجزائر) [32, 33]، ومناطق الشرق الأوسط.

1-3.1. الوصف النباتي لنبات نقد (*Anvillea radiate* (Coss & Dur.):

هو عبارة عن شجيرة برية، ذات أغصان متشعبة طولها من 10- 50 سم بساق وفروع وعائية عند القاعدة، وأوراق مثلثية ممدودة، ملطفة عند القاعدة بسويقات وأعناق، النصل مسنن بحدة، رأس (هامة) كبيرة بعرض 4-5 سم حاويا اللسينات الطويلة محاطة بأوراق علوية مخططة تتحول تدريجيا إلى قنابات تكون قاسية، أزهارها صفراء، مبرقة التخت ومتناقصة عند القمة ومنتبهة بوبرة حريرية، ثمارها فقيرة موشورة، الجانبية منها ثلاثية الزوايا، بينما الخاصة بالمركز الهامة فرباعية الزوايا، الأزهار جانبية متطاولة اللسين قد تصل إلى 25 ملم وعادة ما يزهر في الربيع ولكن يمكن أن يزهر على مدار السنة [18, 33]، والصورة الفوتوغرافية في (الشكل 3) صورة لنبات النقد.



الشكل 4: يمثل صورة لنبات النقد (*Anvillea radiate* (Coss & Dur.).

2-3.1. التصنيف النباتي للنقد (*Anvillea radiate* (Coss & Dur.):

تم تصنيف النبات *Anvillea radiata* على النحو التالي: حسب: [32, 33]

Kingdum planta	النباتات	مملكة
Spermatophytae	كاسيات البذور	شعبة
Angiospermae	البذرية	تحت الشعبة النباتات
Dicotyledoneae	ذوات الفلقتين	صف
Campanulaeae	الناقوسيات	رتبة
Asteraceae ou composit	المركبة او النجمية	الفصيلة
tubuliflorae	الإنبوبية	تحت الفصيلة
Lnuleae	الإنبوية	القبيلة
<i>Anvillea</i>		الجنس
<i>A. radiata</i> (Coss & Dur.)		النوع

3-3.1. الإستعمالات التقليدية والخصائص الدوائية لنبات النقد *Anvillea radiate*:**3.1-3. أ. الإستعمالات التقليدية:**

وفقاً للتقاليد المحلية، يستخدم منقوع أوراق وسيقان *A. radiata* في علاج أمراض القصبات الرئوية والجهاز الهضمي، كعسر الهضم وأمراض الكبد [34-36] وتستخدم براعم *A. radiata* بنقعها في الماء البارد أو الساخن كعلاج لمرض السكري [37, 38]، وللتهاب المفاصل وللإفرازات الروماتويدية المهبالية وللندفة [30, 38]. ونزلات البرد في الصدر، ولعلاج سكر الدم [30, 39, 40].

3.1-3. ب. الفعالية البيولوجية للنبات النقد (*Anvillea radiate* (Coss & Dur.):

نظراً للخصائص البيولوجية النشطة لنباتات الفصيلة Asteraceae. فقد استخدم الكثير منها لعلاج أمراض مختلفة. من ذلك نجد أن لنبات النقد (*A. radiata* (Coss & Dur.) خصائص مضادة للسكري [41] مضادة للأكسدة [22, 40]، مضاد للفطريات [22, 30, 42]، النشاط المضاد للجراثيم [22, 43]، ومضادة للالتهابات [43]، النشاط ضد نقص الدهون في الدم Hypolipidemic، مضاد لإنزيم الكولين anticholinestérase، مضاد لإنزيم الغدة الدرقية anti-tyrosinase، مضاد ألفا الجلوكوزيداز anti- α -glucosidase ومضاد للسمية الخلوية anticytotoxique [40].

ومن الناحية البيولوجية تم إختبار فعالية المركب 9 α -hydroxyparthenolide (25) في نشاط ضد سمية للخلايا ضد خمسة أنواع خلايا سرطانية والنشاط المضاد للجراثيم ضد [23, 44] *Streptococcus C* و *Neurogène Proteusvulgaris, Escherichia coli* كما تم اختبار كل من المركبات (25) 9 β -hydroxyparthenolide و (24) 9 α -hydroxyparthenolide و (22) 3,5-O-dicaffeoylquinic acid في الأنشطة البيولوجية التالية: مضادات الأكسدة ، anti- α -glucosidase، anticholinestérase tyrosinase، anti-antioxidant ، أنشطة للسمية الخلوية cytotoxique ، مضادة للفطريات ومضادة للبكتيريا فأثبتت فاعليتها [22].

**الفصل الثاني: معلومات عامة
عن مركبات الأيض الثانوي**

2. معلومات عامة عن مركبات الأيض الثانوي:

المنتجات الطبيعية عبارة عن مركبات عضوية تكون في الكائنات الحية، توضيح هياكلها والإصطناع الحيوي لها، يعد من المجالات الرئيسية في كيمياء العضوية.

يمكن تقسيم المركبات الطبيعية إلى ثلاث فئات رئيسية:

- أولاً، المركبات التي توجد في جميع الخلايا وتلعب دوراً هاماً في عملية التمثيل الغذائي وتكاثر الخلايا. تشمل هذه المركبات الأحماض النووية والأحماض الأمينية والسكريات الشائعة. تُعرف باسم مركبات الأيض الأولي.

- ثانياً، المركبات عالية الوزن الجزيئي (البوليمرات) مثل السليلوز، lignine، البروتينات والتي تشكل الهياكل الخلوية.

- أخيراً، المركبات التي تتميز بمجموعة محددة من الأنواع تعرف بمركبات الأيض الثانوي.

لمعظم مركبات الأيض الأولي تأثيراً بيولوجياً داخل الخلية أو الكائن الحي المسؤول عن إنتاجها. بالإضافة إلى ذلك، غالباً ما جذبت مركبات الأيض الثانوي الانتباه الباهر بسبب تأثيرها البيولوجي على الكائنات الحية الأخرى [45].

يوفر علم الهندسة الكيميائية سبباً آخر لفحص مكونات النباتات.

يمكن أن تكشف الأبحاث الكيميائية النباتية عن المنتجات الطبيعية التي تعتبر علامات نباتية. تمت دراسة المكونات النشطة بيولوجياً للنباتات الطبية والتجارية وكذلك السامة طوال فترة تطور الكيمياء العضوية. والعديد من هذه المركبات هي مركبات الأيض ثانوي.

تشير دراسات إحصائية إلى أن أكثر من 40% من الأدوية يعود أصولها إلى هذه المنتجات الطبيعية. فقد أدت العديد من الدراسات التي أجريت على المركبات النشطة بيولوجياً إلى إنتاج أدوية جديدة، مثل: taxol الذي يستخدم في علاج الأمراض السرطانية المختلفة.

غالباً ما يكون للمنتجات الطبيعية دور بيئي في تنظيم التفاعلات بين النباتات والكائنات الدقيقة والحشرات والحيوانات. يمكن أن تكون أيضاً مواد دفاعية وجاذبات attractives وفيرومونات. phéromones.

لقد ثبت أن العديد مما يسمى بمركبات الأيض الثانوي تلعب أدواراً أساسية في العلاقات بين النباتات وبينتها: تشارك العديد من المركبات الفينولية في الترشيح بالأشعة فوق البنفسجية، والأصبغ الزهرية ضرورية لعمليات التلقيح، ووجود phytoanticipines في بعض الأحيان يحدد المقاومة لمسببات الأمراض [45, 46].

وتنقسم إلى ثلاث مجموعات رئيسية:

1- **الفينولات** : التانينات tanins ، lignine ، mélanine ، الفلافونويدات flavonoïdes ، الكومارينات والاحماض القينولية.

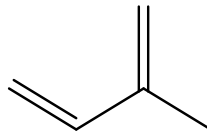
2- **المركبات الأزوتية** : قلويدات alcaloïdes ، βétalaïne ، cyanogènes والغلوسيدات glucosinolates .

3- **التربينات** : وهي فئة كبيرة من المركبات هيكلها مضاعفات $(C_5H_8)_n$ hémiterpènes (C5) ، تربينات أحادية C10)monoterpènes ، سيسكويتربينات C15) sésquiterpènes ، تربينات ثنائية diterpènes (C20) ، سيسترتربينات C25) Sesterterpènes ، تربينات ثلاثية C30) triterpènes ، تربينات رباعية C40)tétraterpènes ، تربينات عالية $(C_5)_n (n \geq 8)$ polyterpènes .

في هذه الدراسة ينصب إهتمامنا على المركبات التربينية والفلافونويدية التي كانت محل بحثنا.

1.2-التربينات:

تشكل التربينات terpénoïdes أو isoprénoïdes فئة مهمة من الجزيئات الطبيعية، وهي مركبات ناتجة عن تكثيف وحدة أساسية مكونة من خمسة كربونات من نوع أيزوبرين (الشكل 4) لها الصيغة العامة $(C_5H_8)_n$.



الشكل 5: يمثل الإيزوبرين isoprene.

الإيزوبرينويدات isoprénoïdes هي عبارة عن جزيئات ذات وزن جزيئي منخفض ومتطايرة. التي تعد مكونات رئيسية للزيوت الطيارة، والجزيئات عالية البلورة مثل المطاط [46, 47].

توجد التربينات في جميع الكائنات الحية و لها تنوع في الهياكل والخصائص الفيزيائية والكيميائية والأدشطة البيولوجية، وقد تم تحديد أكثر من 22000 مركب تربيني ، ولكن تمت دراسة نسبة صغيرة منها لتقييم أدوارها الوظيفية [48].

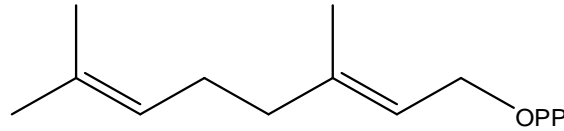
1.2.1. تصنيف التربينات:

مصطلح تربين أساسه من كلمة زيت التربينتين. حيث اكتشف هذا الزيت في عام 1818، ويعتبر زيت التربينتين على أنه خليط من الهيدروكربونات بنسبة كربون إلى هيدروجين تبلغ 5: 8. منذ ذلك الحين، تم تحديد العديد من الزيوت العطرية بنفس نسبة الكربون والهيدروجين وتصنيفها بين عائلات التربينات. إقترح الكيميائي روزيكا و معاونيه تسمية مشتقات الأيزوبرين بناءً على عدد وحدات الأيزوبرين التي تتكون منها [49].

يتم تصنيف التربينات وفقاً لعدد الوحدات الإيزوبرينية isopréniques المكونة لها، والتي مرت معنا سابقاً.

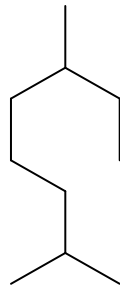
1.1.2. أ. التربينات الاحادية monoterpenes:

تُشتق جميع مركبات التربينات الأحادية من نفس المادة الأولية (GPP) diphosphate de géranyle [49] (الشكل 6). وهي أبسط مكونات هياكل التربينات الاحادية [50]، وتتشكل رفقة مركبات أخرى: سيسكويتربينات sesquiterpenes وتربينات ثنائية diterpenes، ومركبات عطرية، المكونات الرئيسية للزيوت الطيارة [51].

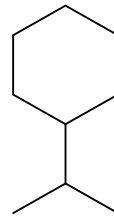


الشكل 6: يمثل (GPP) diphosphate de géranyle

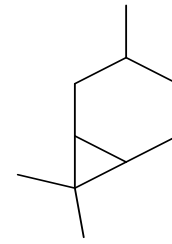
إعتماداً على مسار الإصطناع الحيوي، تنقسم التربينات الأحادية إلى ثلاث مجموعات: اللاحقية، أحادية الحلقة وثنائية الحلقة. نذكر لكل منها على الترتيب: 2,6-diméthyoctane، para menthane و carane (الشكل 7).



2, 6-diméthyoctane



Para-menthane

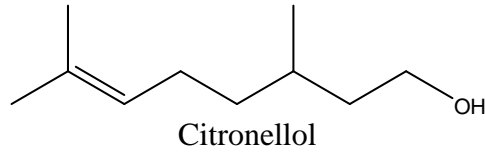
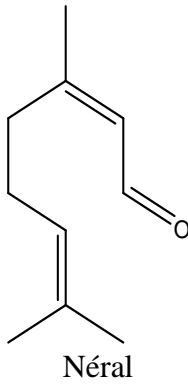
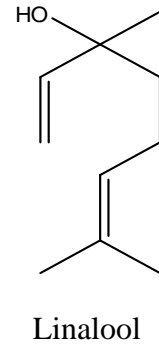
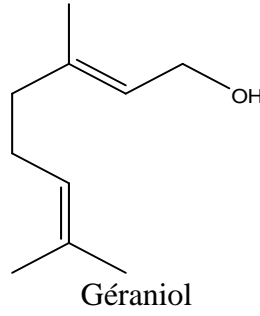
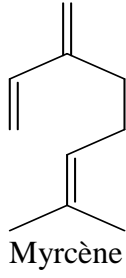


Carane

الشكل 7: يمثل أنواع التربينات الأحادية.

1.1.2. أ. التربينات الاحادية غير الحلقية:

يمكن أن تكون التربينات الأحادية اللاحقية مشتقة من الهيكل الأساسي لـ 2, 6- diméthyoctane، وتكون إما مشبعة أو غير مشبعة أو وظيفية. هيكلها يحمل كحولا، ألدهيدا، كيتونا، أستر أو وظيفة الأثيرية. نذكر من بين هذه المركبات (الشكل 7).

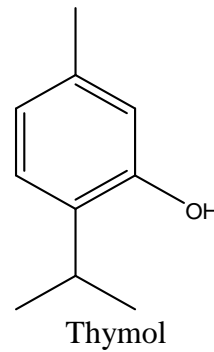
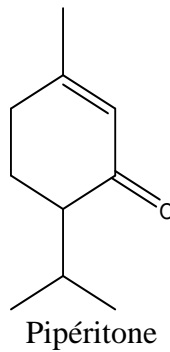
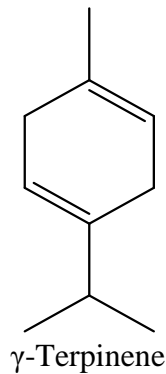


الشكل 8: يمثل بعض مركبات التربينات الأحادية الملاحقية.

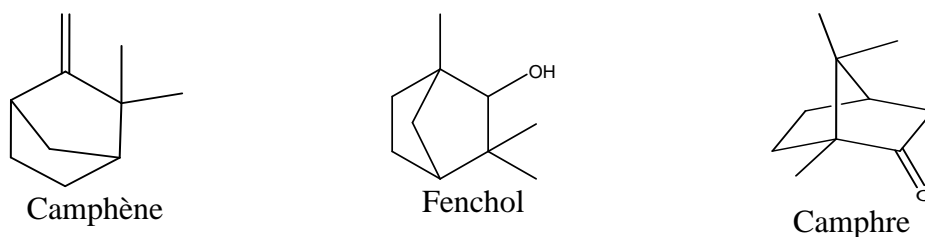
2.1.1.2. التربينات الأحادية أحادية الحلقة وثنائية الحلقة:

يمكن أيضاً أن يكون هذا النوع من المركبات المشتق من الهيكل الأساسي، para-menthane الأحادية الحلقة أو كاران carane للثنائيات الحلقية، تكون إما مشبعة أو غير مشبعة، أو يحتوي في هيكلها على مجموعات وظيفية مثل الكحول والألدهيد والكيون... إلخ. من بين هذه المركبات نجد (الشكل 8):

❖ التربينات الأحادية أحادية الحلقة



❖ التربينات الأحادية ثنائية الحلقات:

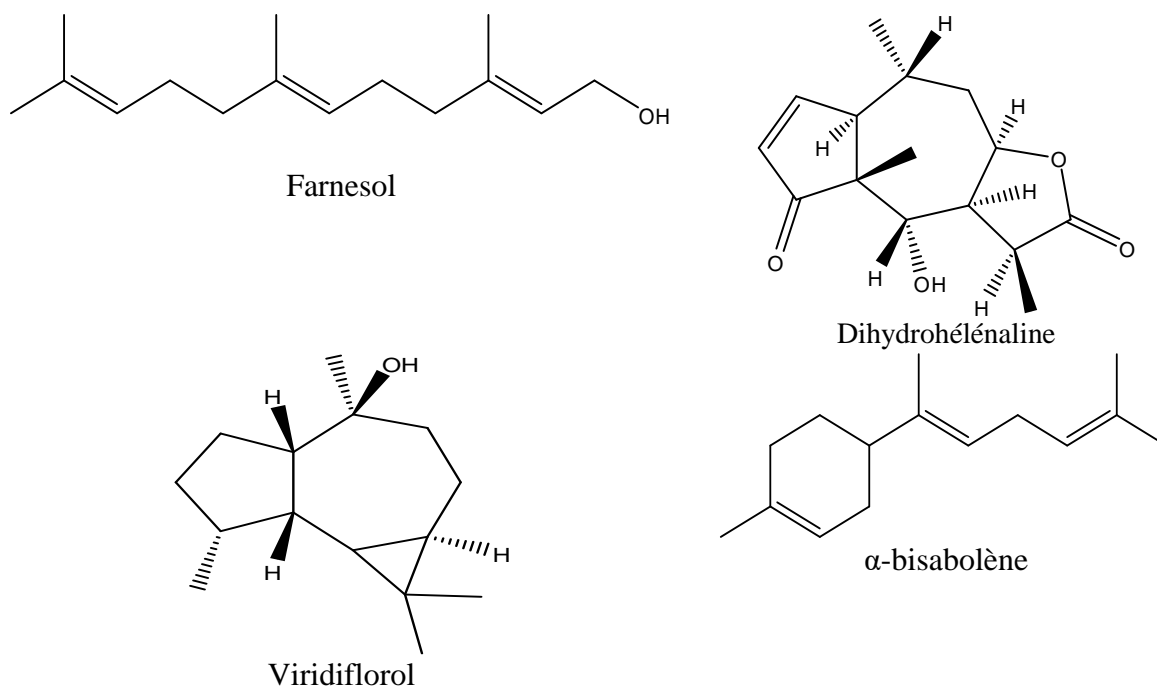


الشكل 9: يمثل بعض التربينات الاحادية أحادية وثنائية الحلقة.

1.1.2. ب. السيسكويتربينات:

Sesquiterpenes هي فئة من عائلة التربينات ، وتتكون من 15 ذرة كربون اي $C_{15}H_{24}$ (تكتيف 3 وحدات ايزوبرين) ، ويمكن أيضًا أن تكون إما لالحقية ، أحادية ، ثنائية أو ثلاثية الحلقة في شكل هيدروكربونات أو في شكل من أشكال الهيدروكربونات الأوكسوجينية مثل : كحول، كيتون، ألدهيد... إلخ. بالإضافة إلى هذه المركبات، يمكن أيضًا العثور على مركبات أخرى مثل سيسكويتربينات الاكتونية في النباتات. ينتج هذا النوع من المركبات عن أكسدة مجموعة الميثيل من مجموعة الأيزوبروبيل المرتبطة بالهيكل الأساسي لسيسكويتربينات لتوليد مجموعة اللاكتون[52].

بعض مركبات سيسكويتربينات موضحة في (الشكل 9).



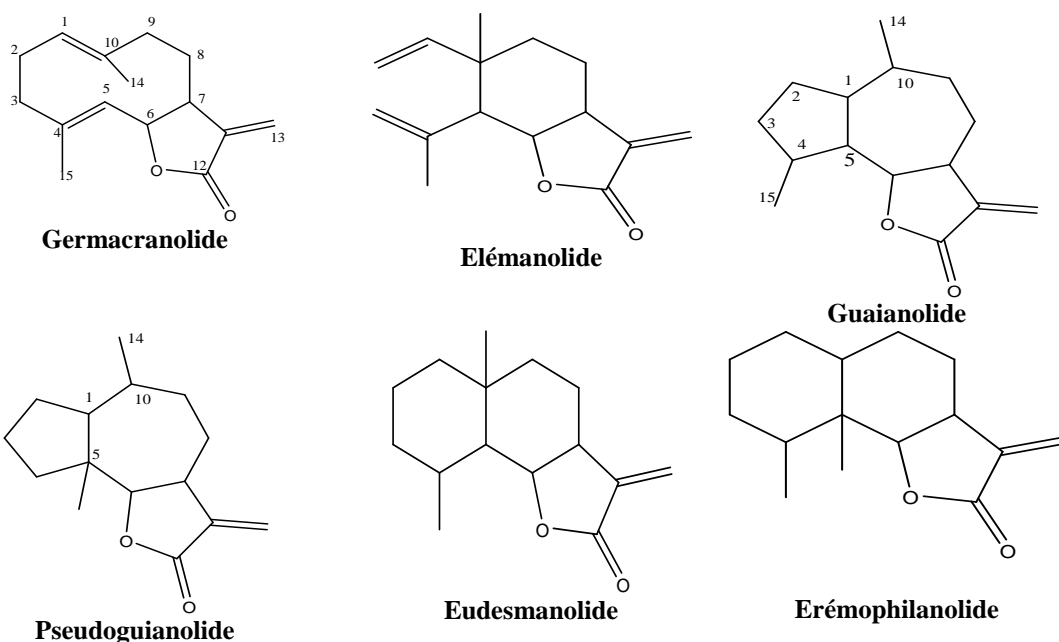
الشكل 10: يمثل بعض مركبات سيسكويتربينية.

1.1-2. ب.1. السيسكويتربينات اللاكتونية واقسامها:

تشكل السيسكويتربينات اللاكتونية مجموعة مهمة جداً من المركبات الطبيعية الموزعة على نطاق واسع خاصة في الفصيلة النجمية، وقد تم تحديد أكثر من 3000 تركيبة [50].

نقطة إنطلاق تشكل سيسكويتربينات لاكتونية هي farnésyle pyrophosphate (FPP) الذي ينتج عن تكثيف رأس إلى ذيل بين (IPP isopentényle Pyrophosphate) و (GPP géranyle diphosphate).
تحديق farnésylpyrophosphat يعطي germacradiène وهو الهيكل الأساسي لجميع أنواع السيسكويتربينات اللاكتونية.

إعتماداً على بنية السيسكويتربينات اللاكتونية، تم تقسيمها إلى عدة أنواع: germacranolide، élémanolide، eudesmanolide، érérophilanolide، guaianolide، pseudoguaianolide، ... إلخ و(الشكل 10) يشير إلى هذه الهياكل.



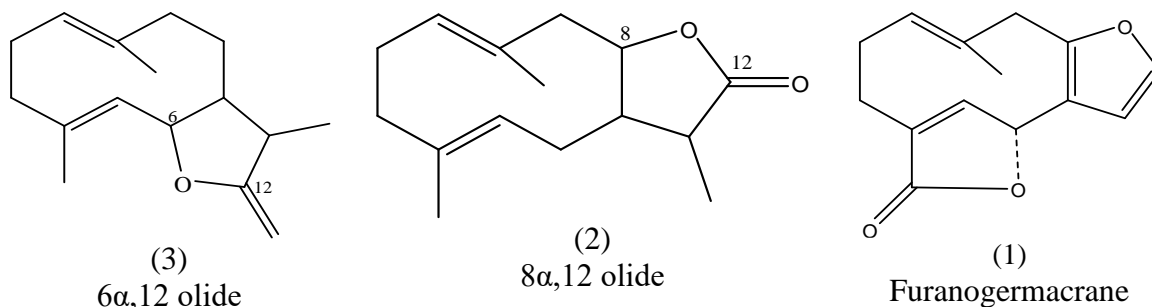
الشكل 11: يمثل أنواع سيسكويتربينات اللاكتونية.

: Germacranolides. أ.1.1-2. ب.1.

يتكون الهيكل الأساسي من حلقة ذات عشر ذرات كربون تحتوي على رابطتين مزدوجتين (أحدهما بين C10 - C1 والأخرى بين C5 - C4)، وميثيلان (أحدهما في الموضع C4 والآخر في الموضع C10) مرتبطة بحلقة أخرى من خمس ذرات كربون تميز وظيفة β-لاكتون والتي تحمل مجموعة ميثيل أورابطة مزدوجة خارج الحلقة في الموضع 11.

يمكن أن يحدث إغلاق حلقة اللاكتونية في الموضع 6 أو 8 حيث الهيدروجين في C7 يكون فراغيا في الوضعية α .

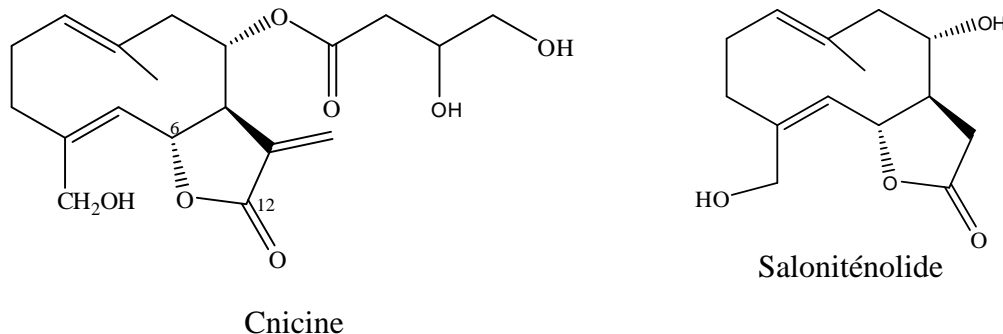
أظهرت الدراسات أن هذا النوع من السييسكويتربينات اللاكتونية يمكن أن توجد في ثلاثة أشكال مختلفة: $6\alpha,12$ olide و $8\alpha,12$ olide و furanogermacrane كما هو موضح في (الشكل 11).



الشكل 12: (3،2،1) يمثل الأشكال الممكنة من Germacranolides.

تم عزل عدة مركبات من هذا الفئة بشكل خاص من الفصيلة النجمية Asteraceae [53]. من بين هذه المركبات يمكن أن نذكر:

عزل Cnicine و Saloniténolide من *Centaurea alba*.

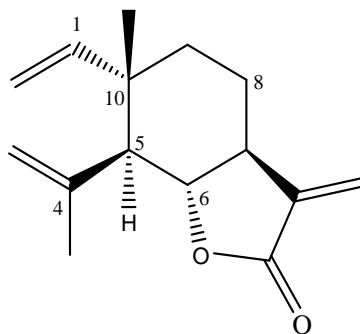


1.1.2. ب.1.ب. Elémanolides:

يتم الحصول على جميع مركبات Elémanolides أو 2,3-Seco-eudesmanolides عن طريق إعادة ترتيب Cope لهيكل germacranolides. هيكلها الأساسي يتكون من حلقة أحادية مع 6 ذرات كربون متصلة بحلقة خماسية تميز وظيفة γ -lactone مستبدلة في الوضعين 5 و 10.

بشكل عام، تتميز Elémanolides فراغيا بتشكيل E للرابطة الثنائية C1=C10، وتشكيل Z للرابطة الثنائية C4=C5، والوضعية α لكل من هيدروجين الموقع C5 وللميثيل الموقع C10.

تحمل ذرة الكربون C6 أو C8 دائماً مجموعات الإستر أو الهيدروكسيل فراغيا في الموضع α ، وعادة ما تكون الوظيفة اللاكتونية في الموضع 6، كما هو موضح في (الشكل 13).



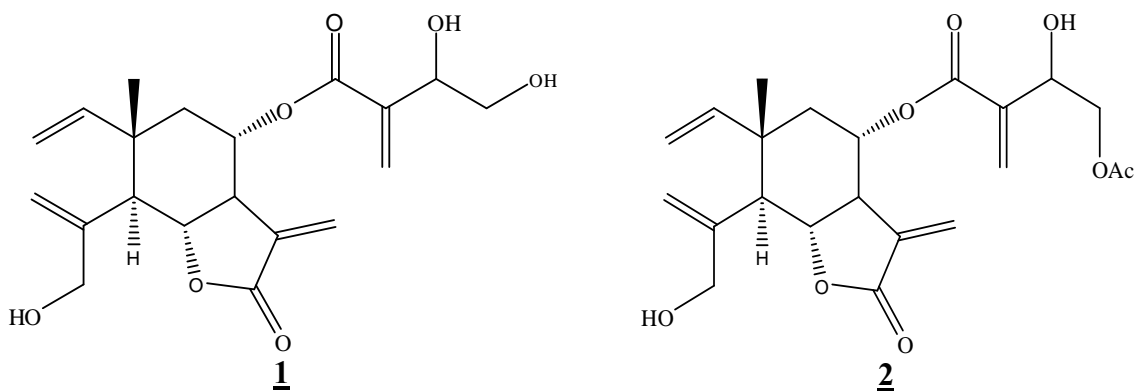
الشكل 13: يمثل الهيكل الأساسي للـ Elémanolides.

من بين المركبات المعزولة نذكر على سبيل المثال:

1: 8 α -(3,4-dihydroxy-2-methylene-butanoyloxy)-dehydro-melitensine

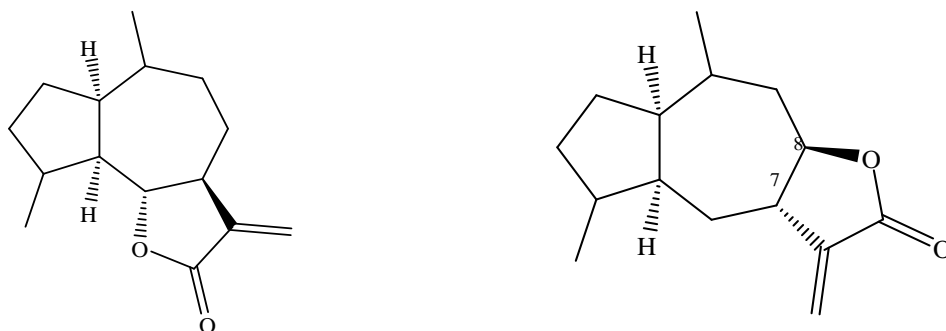
و 2: 8 α -(3-hydroxy-4-acetoxy-2-methylene-butanoyloxy)-dehydro-melitensine

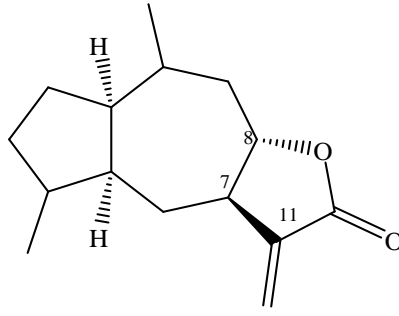
المعزولين من *Centaura thessala ssp. Drakiensis* [55,54]



1-1.2. ب.ج.1. ج. Guaianolides:

يحتوي هذا النوع من المركبات في هياكلها على حلقة سباعية متحدة من جانب مع حلقة خماسية وعلى الجانب الآخر بحلقة غير متجانسة تميز وظيفة بيتا لاکتون. تتميز هذه المركبات فراغيا بالوضعية α للبروتونان المرتبطان في الموضعين 1 و 5. يتم إغلاق وظيفة γ -lactone في C-6 كما يمكن إغلاقها في C-8 بتكوين α في C-6 أو β في C-8، كما هو موضح في (الشكل 14).





الشكل 14: يمثل الهياكل الأساسية للـ Guaianolides.

ومن بين ما فصل من مركبات هذه الفئة نذكرانه تم عزل المركبين 3 و 4 من *Centaurea musimomum* [56]:

3: 3-oxo-4 α - acetoxy-15-hydroxy-1 α H, 5 α H, 6 β H, 7 α H, 11 β H-guai-10(14)-ene-6,12-olide

و 4: 3-oxo-4 α -hydroxy-15-hydroxy-1 α H, 5 α H, 6 β H, 7 α H, 11 β H-guai-10(14)-ene-6,12-olide

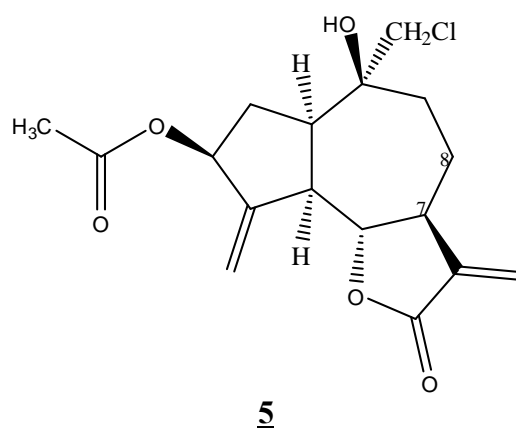
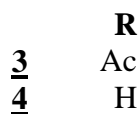
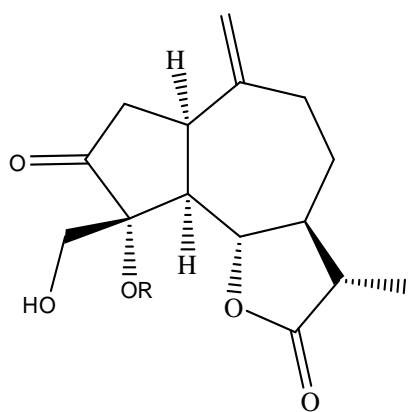
والمركب 5 عزل من *Centaurea acaulis L*.

5: 14-chloro-10 β -hydroxy-10(14)-dihydrozaluzanin

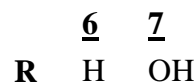
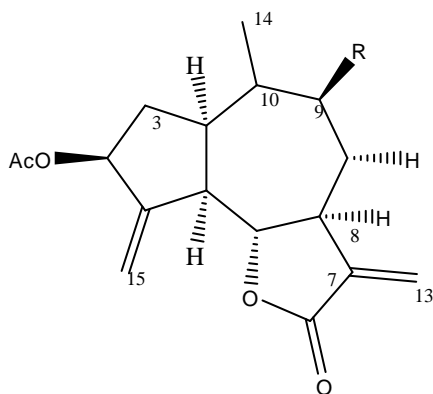
أو D [(3 β -acetoxy-14-chloro-10 β -hydroxy-1 α H, 5 α H, 6 β H, 7 α H-guain-4(15),11(13)-dien-6,12-olide)]

كما تم عزل مركبات أخرى شبيهة بالـ guaianolide من نبات *Centaurea nicolai* [57]. من بين هذه

المركبات، يمكن ذكر: 6: Kandavanolide و 7: salo-graviolide A.



5



Pseudoguianolides مركبات يوحي اسمها انها تشبه guaianolide ولكنها تتميز بميثيل في الموضع 5.

1-1.2. ب. 1.1. ع. Eudesmanolides:

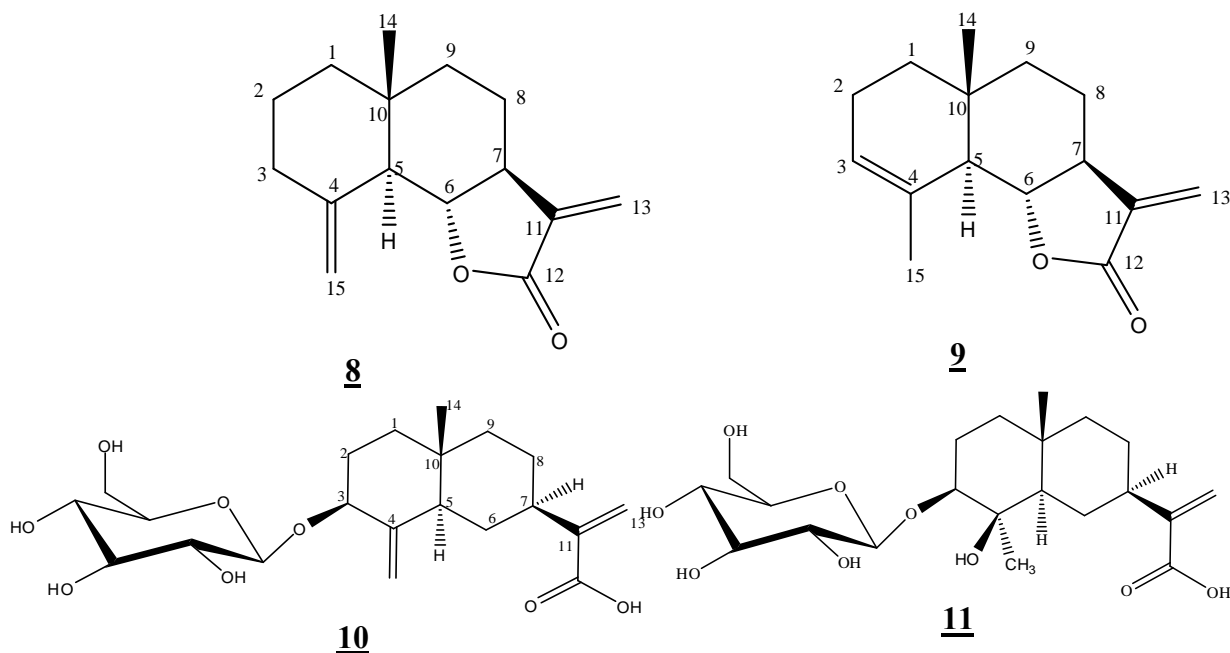
Eudesmanolides مركبات لها هيكل أساسي يتكون من حلقتين سداسيتين متصلتين بحلقة خماسية تميز وظيفة γ -lactone مع اثنين من الميثيلين مستبدلين واحد في الموضع 4 والآخر في الموضع 10 ومجموعة الميثيلين في الموضع 11 من الحلقة اللاكتونية. يمكن أن يحدث إغلاق وظيفة γ -lactone في 6 أو 8 ويكون تشكيل الرابطة الثنائية اما *cis* و *trans*. يكون الميثيل الذي يحمله الكربون 10 دائما في وضعية β والهيدروجينين اللذين يحملهما الكربون 5 و7 في الوضعية α كما هو موضح في (الشكل 15)

بعض المركبات المعزولة من جنس *Centaurea*:

- المركب **8**: β -cyclocostunolide والمركب **9**: santamarin معزولا من *C. acaulis* [56].

- المركبين **10**: hierapolitanins C و **11**: hierapolitanins D المعزولين من

Centaurea hierapolitana Boiss [58].

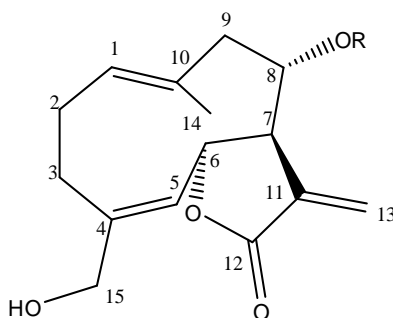


الشكل 15: يمثل الهياكل الاساسية للـ Eudesmanolides.

Eremophilanolides مركبات من نفس النوع مثل Eudesmanolides ولكن مع ميثيل في الموضع 5 بدلاً من الموضع 10.

هناك نوع آخر من السييكويتربينات اللاكتونية تسمى *héliangolides*، وهي تشبه *germacranolides* مع روابط مزدوجة ذات تشكيل E للرابطة الثنائية C10=C1 وتشكيل Z للرابطة الثنائية C5=C4.

عادة ما يتم إغلاق الحلقة اللاكتونية في الموضع 6 والكيمياء الفراغية لهيدروجين المواقع ذرات الكربون 6 و7 و8 دائماً في الوضعيات α, β و β على التوالي. بشكل عام، تحتوي *héliangolides* في بنيتها على رابطة مزدوجة غير حلقيّة في C11 ومستبدلات في C8 كما هو موضح في (الشكل 16).



الشكل 16: يمثل الهيكل الاساسي للـ *héliangolides*.

2.1.2. الفائدة العلاجية للسيسكويتربينات اللاكتونية:

تتميز السيسكويتربينات اللاكتونية بوجود وظيفة β -لاكتون. في العديد من الحالات، الى جانب مجموعة β -لاكتون، يوجد بشكل عام رابطة ثنائية خارج الحلقة α و β غير مشبعة (α exocyclique, β insaturée). هذه الخصائص تجعل هذه الجزيئات أكثر نشاطاً [59].

تستخدم السيسكويتربينات اللاكتونية أيضاً على نطاق واسع في المجالات البيولوجية والصيدلانية. فقد أظهرت الدراسات في هذا المجال أن بعض السيسكويتربينات اللاكتونية لها نشاط مضاد للجراثيم، ضد البكتيريا موجبة الجرام، على سبيل المثال، hénelanine المستخلص من *Inula helenium L* و Cnicine المستخرج من *Cnicus benedictus L* [60]. كما أظهرت اللاكتونات الأخرى أنشطة بيولوجية مختلفة مثل: مضادات الإلتهاب [61]، مضادات الأكسدة [62]، مضادات الفطريات [63]، تأثير السمية الخلوية [64].

فمادة artémisinine المعزولة من نوع *Artemisia annua* (Asteracées) لها نشاط قوي مضاد للملاريا، وكذا ambrosine، الـ pseudoguaianolide المستخرج من *Ambrosia maritima L*، هو طارد للديدان والرخويات [65].

3.1.2. الإصطناع الحيوي للتربينات:

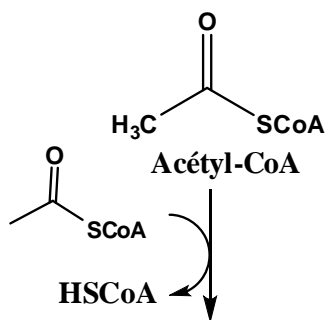
تم إجراء أول عمل على الإصطناع الحيوي للتربينات بواسطة الكيميائي Wallach في عام 1887، والذي أظهر أن التربين هو نتيجة لتكثيف متمائل رأس إلى ذيل لوحدة بها 5 ذرات كربون تسمى "الأيزوبرين". و تأكدت هذه الفرضية لاحقاً في عام 1953 من قبل Ruzicka الذي ذكر مفهوم قاعدة الأيزوبرين [49].

بعد ذلك، أظهر Hendrikson المراحل المختلفة للإصطناع الحيوي للتربين بحيث تكون الوحدة الرئيسية في تكوين جميع التربينات هي الأسيتات.

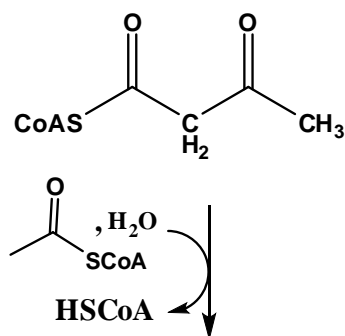
إن نقطة إنطلاق تشكل مختلف بنى للتربينات هي isopenténylpyrophosphate (IPP) أو الأيزوبرين النشط [65].

أظهرت الأبحاث الحديثة نسبياً (1993) أن diphosphateisopentényl يتم تصنيعه بيولوجياً بطريقتين مختلفتين اعتماداً على طبيعة الكائن الحي وهيكل التربين النهائي. في الحيوانات والنباتات العليا، يتم اشتقاق السيسكويتربينات والتربينات الثلاثية بشكل أساسي من mévalonate، في حين يتم تصنيع الأحادية والثنائية والرابعة من 1-désoxy-d-xylulose-5-phosphate. في البكتيريا، يستخدم كلا المسارين [66].

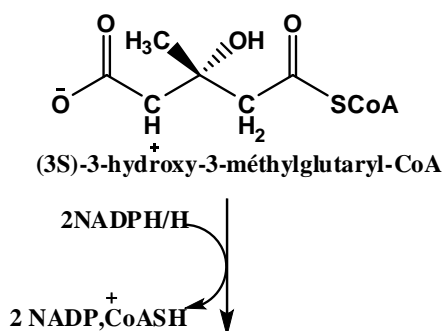
يمكن تلخيص الإصطناع الحيوي isopentényl diphosphate طريق الميفالونات في (الشكل 17) بينما تلخيص المسار الثاني فموضح في (الشكل 18).



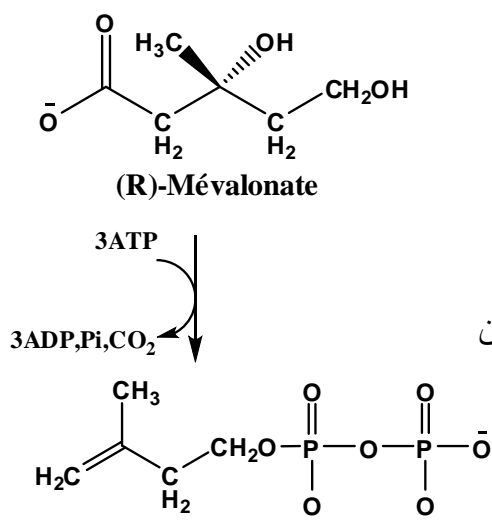
الخطوة 1. من خلال تكثيف Claisen بين جزيئين من acetyl-CoA ينتج الجزيء acetoacetyl-CoA



الخطوة 2. تكثيف acetoacetyl-CoA مع جزيء ثالث من acetyl-CoA متبوعًا بالتحلل المائي يؤدي إلى تشكيل (3S)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA

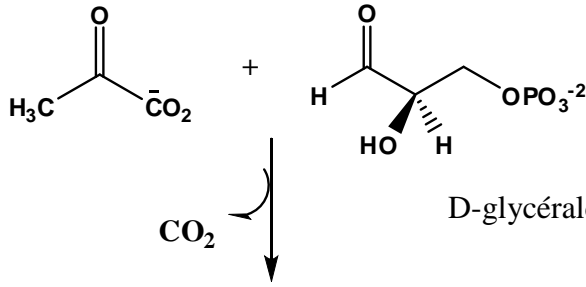


الخطوة 3. يؤدي اختزال مادة thioester بمقدار اثنين من مكافئ NADPH إلى إنتاج حمض ثنائي هيدروكسي (R)

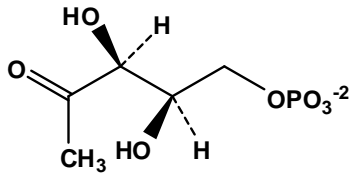


الخطوة 4. يتبع الفسفرة للهيدروكسيل الثلاثي و diphosphorylation للهيدروكسيل الأولي نزع الكربوكسيل وإزالة أيون الفوسفات مما يؤدي إلى تكوين إيزوبنتنيل ثنائي الفوسفات، وهي نقطة تشكل للترين.

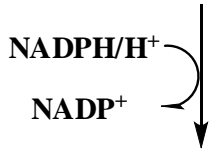
الشكل 17: يمثل مسار mévalonate.



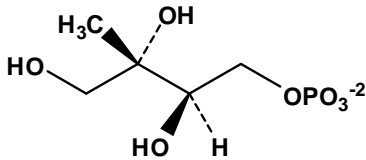
يحدث التكتيف بين pyruvate و D-glyceraldéhyde-3-phosphate الناتج عن thiamine، مع إزالة ثاني أكسيد الكربون



1-Désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP)

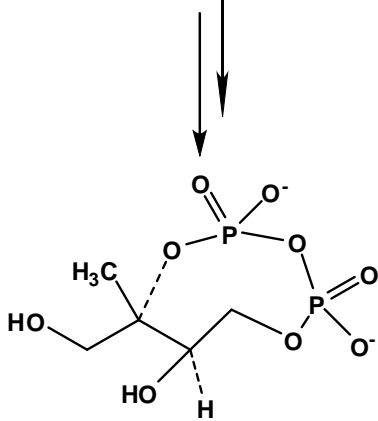


تتيح إعادة الترتيب تعديل في هيكل الكربوني للجزء قبل إرجاع مجموعة الكربونيل بواسطة NADPH.



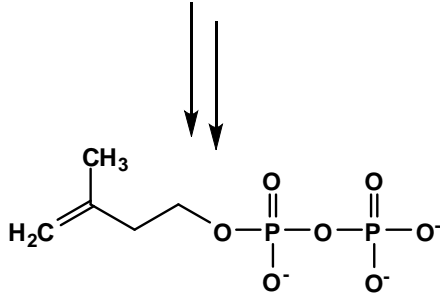
2C-Méthyl-D-érythritol-4-phosphate

تحدث عدة عمليات فسفرة.



2C-Méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate

إرجاع isopentényl diphosphate بواسطة آليات غير مفهومة حتى الآن.



Isopentényl diphosphate

الشكل 18: يمثل مسار deoxyxylulose phosphate.

- الخطوة الأولى في مسار mévalonate هي تكثيف كليزن لوحدتي أسيتيل-CoA محفزة بواسطة إنزيم acétoacetyltransférase لتكوين acétoacetyl-CoA.

- الخطوة الثانية هي تفاعل تكثيف من نوع الدولي aldolique بين acétoacetyl-CoA و Enolate d'acetyl-CoA . يتم تحفيز هذا التفاعل بواسطة 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase مما يؤدي إلى تكوين (3S)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA

- الخطوة الثالثة هي تفاعل إرجاع 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA إلى mévalonate (R)- ويحفز هذا التفاعل بواسطة إرجاع 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA وفي وجود إثنان من NADPH

- تتعلق الخطوة الأخيرة بتحويل mévalonate (R)- إلى إيزوبنتنيل ثنائي فوسفات isopentényl diphosphate. تبدأ هذه الخطوة pyrophosphorylation مباشر للهيدروكسيل الأولى لـ mévalonate (R)- لتوليد mévalonate-5-diphosphate (diphosphomévalonate) تحت تأثير إنزيم mévalonate kinase و phosphomévalonate .

يخضع mévalonate-5-diphosphate لمزيد من الفسفرة على الهيدروكسيل الثلاثي متبوعاً بنزع الكربوكسيل وإزالة مجموعة الفوسفات للحصول على IPP (pyrophosphateisopentényle) .

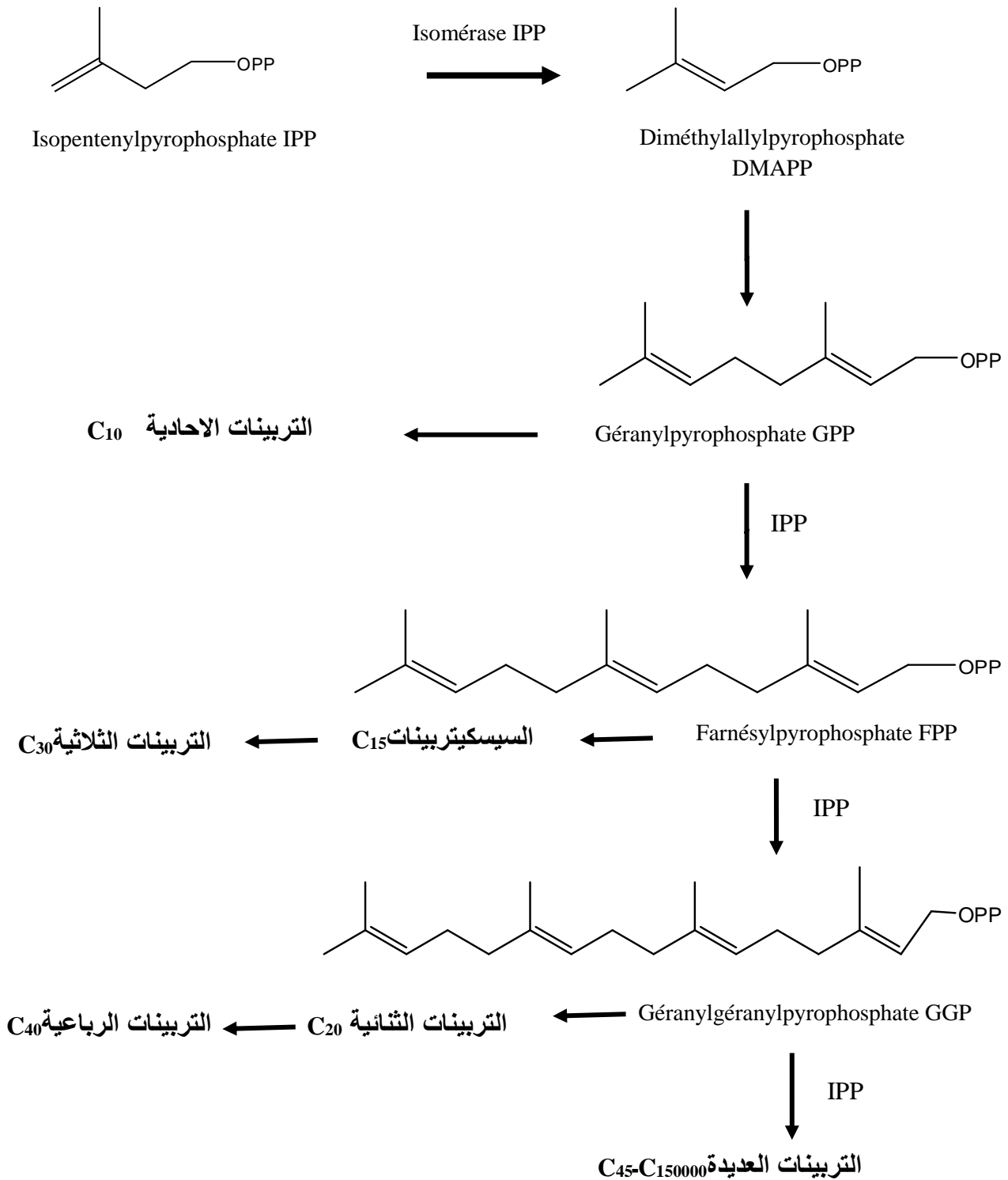
نقطة إنطلاق تشكل لجميع التربينويدات هو diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP)، والذي يتم الحصول عليه عن طريق مماكبة isomérisation للـ IPP تحت تأثير إنزيم IPP isomérase.

تكثيف DMAPP مع وحدة من IPP يشكل GPP (géranyl pyrophosphate) ، مركب من C10 يعتبر نقطة تشكل لجميع التربينات الاحادية.

يؤدي تكثيف آخر لنفس جزيء IPP مع GPP إلى مركب من C15 ، pyrophosphate farnésyle (FPP)، وهو بداية مشتركة لجميع مشتقات sesquiterpene.

تؤدي إضافة جزيء IPP جديد إلى GPP إلى ظهور مركب من C20، وهو géranylgéranylpyrophosphate (GGPP) في حين أن تكاثف جزيئين FPP يشكل مركبا من C30squalène نقطة بداية تشكل لكل من الستيرويدات والتربينات الثلاثية. من ناحية أخرى، يؤدي إندماج جزيئين من GPP إلى ظهور مركبا من C40، وهو بداية لكل التربينات الرباعية.

تكشف الإضافة المتتالية لوحدات IPP إلى GGPP يشكل التربينات المتعددة مركبات متعددة تربينات مثل المطاط caoutchouc و gutta-percha و chicle التي تحتوي على أكثر من 2000 إلى 5000 من وحدات الإيزوبرين (الشكل 19).

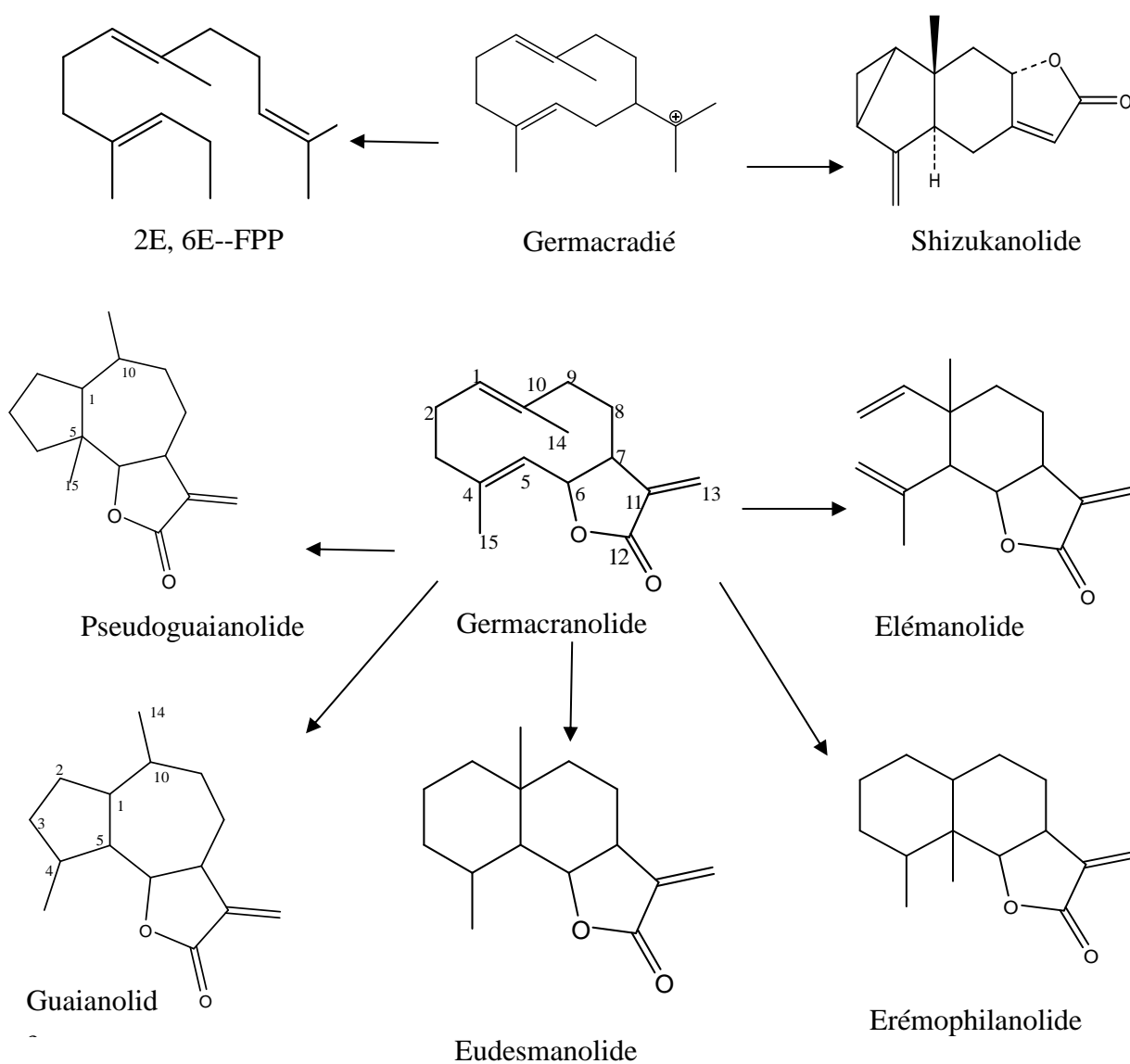
مسار l'acide mévalonique

الشكل 19: يمثل مسار l'acide mévalonique والفئات الرئيسية من التربيينات.

4-1.2. الاصطناع الحيوي للسيسكويتربينات اللاكتونية:

كما ذكرنا سابقاً، فإن farnesyl pyrophosphate FPP هو نقطة بداية تشكل جميع مشتقات sesquiterpene. يمكن أن يوجد هذا المركب، فراغياً برابطتين ثنائيتين في هيكله الاساسي: 1(10),4-Germacradiene، على شكل أربعة أيزومرات محتملة. بينما يمكن أن يؤدي تكوين حلقة الوظيفة اللاكتونية γ -lactone إلى عدة أشكال من نوع germacranolides. ينتج عن إجراء تحولات عليها سلسلة من الهياكل المختلفة، حيث تعتبر الهيكل الاساسي للسيسكويتربينات اللاكتونية [67].

يوضح (الشكل 20) بعض هياكل السيسكويتربينات التي تم الحصول عليها أثناء هذه التحولات .



الشكل 20: يمثل الإصطناع الحيوي للسيسكويتربينات اللاكتونية.

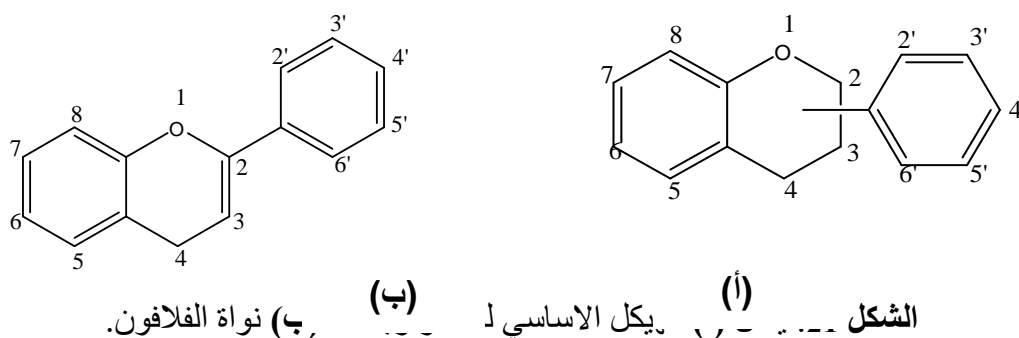
2.2-الفلافونويدات:1-2.2. مدخل:

الفلافونويدات هي مركبات طبيعية منتجة من النباتات، في جميع أعضاء النباتات العليا: الأوراق، الزهور، الجذور، اللحاء، حبوب اللقاح، الرحيق والبذور [68].

إنها الأصباغ المسؤولة عن تلوين النباتات وحماية الأنسجة من الآثار الضارة ومن الأشعة فوق البنفسجية(UV)[69].

المركبات الفلافونويدية هي مجموعة متنوعة للغاية والتي تنتمي إلى عائلة عديدات الفينولات، تشتق كلمة فلافونويد من الكلمة اليونانية "flavus" والتي تعني الأصفر [70] تحتوي جميعها على نفس نواة الفلافون flavone أو 2-phenyl chromone (الشكل 21 (أ)). تكون إما في الحالة الحرة (aglycon) أو على شكل جليكوسيدات. من الصعب معرفة العدد الدقيق لمركبات الفلافونويد؛ فقد تم الإبلاغ عن 2000 إلى 6500 [71, 72].

يتكون الهيكل الكيميائي الأساسي من حلقتين عطريتين (A) و (B) مرتبطين ببعضهما بواسطة سلسلة من ثلاثة كربونات أي على النحو التالي: C6-C3-C6. (الشكل 21 (ب)) [73, 74].



من الناحية الهيكلية، يحدد نوع النواة فئات مختلفة من مركبات الفلافونويدية [75]. وبالتالي فإننا نميز بين flavanones, chalcones, aurones, flavones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, anthocyanes, flavonols, (الجدول 2) الفئات الرئيسية من مركبات الفلافونويدية.

الجدول 2: الأنواع الرئيسية لمركبات الفلافونويد.

نوع الفلافونويد	النواة الأساسية	نوع الفلافونويد	النواة الأساسية
<i>Flavan-3,4-diol</i>		<i>Chalcone</i>	
<i>Flavan-3-ol</i>		<i>Flavanone</i>	
<i>Flavonol</i>		<i>Flavone</i>	
<i>Isoflavone</i>		<i>Dihydroflavonol</i>	
<i>Dihydrochalcone</i>		<i>Aurone</i>	
		<i>Anthocyanidine</i>	

2.2.2. الإصطناع الحيوي للفلافونويدات:

تتميز الفلافونويدات بمسار اصطناعي حيوي مشترك.

يعد المركب 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone نقطة إنطلاق تشكل الفلافونويدات ، وهو مشتق من

malonyl-CoA تحت تأثير إنزيم chalcone synthase من مسار acetate-malonate.

ومن ناحية أخرى، 4-coumaroyl-CoA عبر مسار shikimate. يتم إستقلاب هذه المادة الأولية بفعل إنزيم

يسمى chalcone isomerase لتكوين flavanone (naringenin). يتحور هذا الأخير بتأثير إنزيمي ليعطي

فلافوننا flavone- synthase ليعطي فلافوننا (Apigenine) أو مع إنزيم (2S)-flavanone-3-hydroxylase

لإعطاء مركب من نوع (2R, 3R)-dihydrokaempférol.

إن عمل إنزيم synthase flavonol أو dihydroflavonol-4-réductase على (2R,3R)-

dihydrokaempférol سوف يولد flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidol) و flavonol (kaempférol) على

التوالي ، هذا الأخير وفي وجود إنزيمات معينة، يتم إستقلابه إلى flavan-3-ols (afzéléchol)

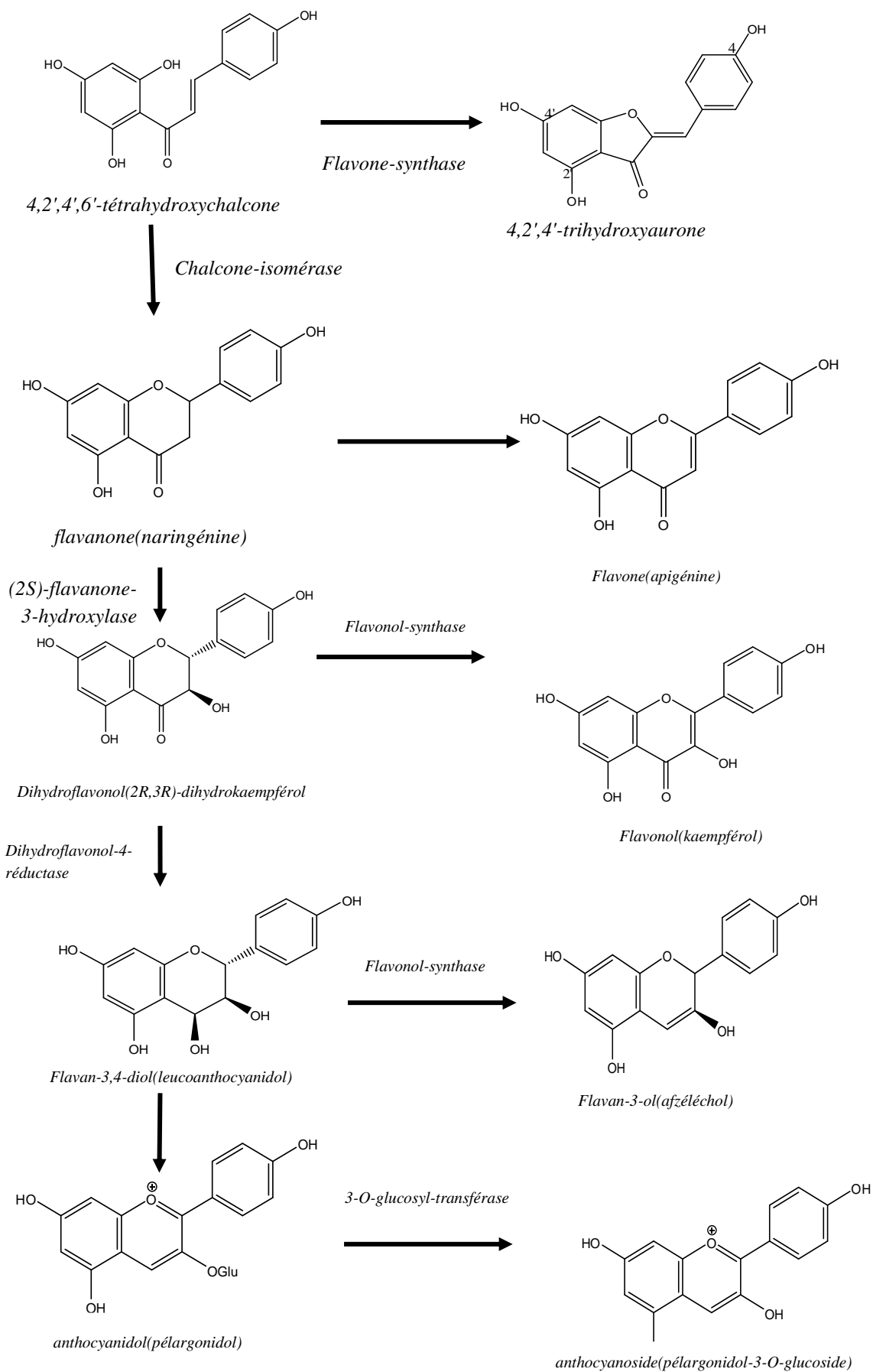
أو anthocyanidols (pélagonidol). أخيراً، في وجود 3-O-glycosyltransférerase ، يتحول pélagonidol

إلى anthocyanoside (pélagonidol-3-glucoside) [50].

يمكن حدوث تحولات للمركبات الفلافونويدية حسب كل فئة فراغيا فيتم الحصول عليها عن طريق

تفاعلات: الهيدروكسلة، المثيلة، الأسيلة وإدخال سكر glycosylation.

يمكن توضيح المراحل المختلفة في الاصطناع الحيوي للفلافونويد في (الشكل 22).



الشكل 22: يمثل الإصطناع الحيوي للمركبات

3-2.2. الفوائد العلاجية للفلافونويدات

تستهلك الفلافونويدات في الحياة اليومية على شكل فواكه وخضروات ومشروبات. تعتبر المركبات الفلافونويدية المسؤولة عن لون النباتات، فعلى سبيل المثال اللون الأصفر للأزهار ناتج عن مركبات الفلافونويدية الصفراء مثل الشالكونات والفلافونولات والأورونات؛ يرجع اللون الأحمر والأرجواني والأزرق للخضروات والفواكه والأزهار إلى مادة الأنتوسيانين الذائبة في الماء [76]. وبالتالي، فإن النباتات لها تأثير جذب حشرات والطيور للتلقيح. كما أن لها دورًا في حماية النباتات وحماية الأنسجة النباتية من الأشعة فوق البنفسجية فهي بمثابة شاشة لهذه الأشعة، كما لها دور الحماية ضد الفيروسات والبكتيريا المسببة للأمراض التي تصيب النباتات. نظرًا لتنوعها الهيكلي، فإن المركبات الفلافونويدية كاسحات للجذور الحرة مثل فوق الاكاسيد أو البيروكسيدات أو جذور الهيدروكسيل [77]. إذ تمنع إنزيمات معينة مثل: histidine aldose réductase، élastase، décarboxylase و lipooxygenase وإنزيمات الأكسدة الحلقية cyclooxygenase [78]. إذ تمنع إنزيمات معينة مثل: histidine décarboxylase، élastase، aldose réductase و lipooxygenase وإنزيمات الأكسدة الحلقية cyclooxygenase [79]، ولها أيضا العديد من الخصائص الدوائية: فهي مضادات للأكسدة [80-82]، مضادة للقرحة، مضادة للحساسية، مضادة للالتهابات [80, 83, 84]، مضادة للأورام، مضادة للفيروسات [80]، مضادة للتشنج، مضادة للسمية الخلوية، مضادة للسرطان [85] ومضادة للإكتئاب [86]. وقد أظهرت دراسات وبائية أخرى أن الاستهلاك المنتظم للفواكه والخضروات والمشروبات يقلل من خطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية وظهور بعض أنواع السرطان. لهذا الغرض، يعد وجود المركبات الفلافونويدية في النظام الغذائي البشري أمرًا ضروريًا [87, 88].

في الآونة الأخيرة، تبين أن هناك علاقة بين النشاط البيولوجي والهيكل للفلافونويدي، وخاصة في نشاط مضادات الأكسدة [72] ويرجع هذا النشاط إلى وجود:

- رابطة مزدوجة بين $C_3=C_2$
- مجموعة هيدروكسيل في C_3 .
- مجموعة للكربونيل الموقع C_4 .
- مجموعات الهيدروكسيل المختلفة المحمولة على أنوية كل من الحلقة A و B.

الجزء العملي

الفصل الثالث: الدراسة الكيمياء-نباتية
والفعالية البيولوجية لأزهار نبات النقد

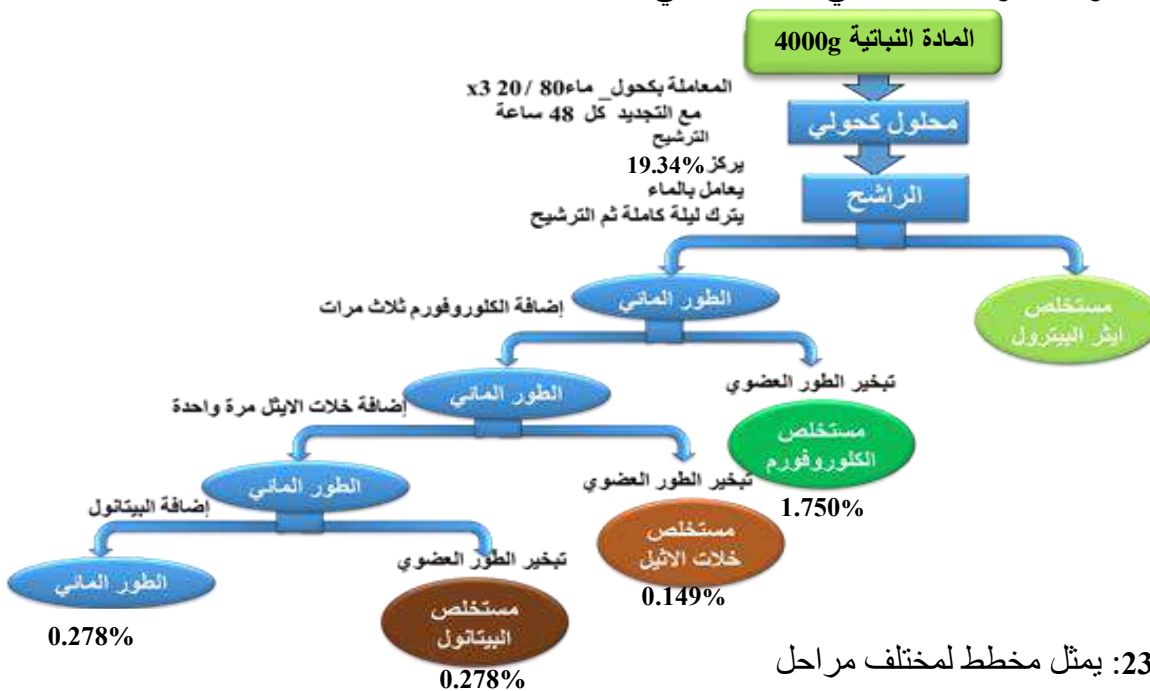
3.الدراسة الكيمياء-نباتية لأزهار نبات النقد:

1.3-المادة النباتية:

في مرحلة الإزهار، تم تجميع أزهار نبات النقد من صحراء المرارة بالقرب من تقرت (33 درجة شمالاً، وعند خط طول 6 درجات شرقاً، إرتفاع: 69 م°) جنوب شرقي الجزائر. وجنيها في شهر أفريل 2015. حددت على أنها *A. radiata* (Coss & Dur) تبعاً [33] Quezel et Santa. وكذا من قبل الباحث الأستاذ حليس يوسف بالمخبر العلمي والتقني للمناطق القاحلة في تقرت. نقيت العينة جيداً، وجففت في الهواء بعيداً عن الشمس وعن الرطوبة، وخزنت في مكان مظلم.

2.3-الإستخلاص:

سحقنا 4000 غ من الأزهار النباتية ونقعناها كمرحلة أولية في إيثر البترول مدة ليلة كاملة للتخلص من الليبيدات والكلوروفيل، بعد الترشيح والتجفيف من جديد، نعيد نقعها في خليط من الميثانول-ماء بنسبة 3/7 مدة 48 ساعة ثلاث مرات مع تجديد المذيب كل مرة، بعد الترشيح والتركيز حتى الجفاف تحت ضغط منخفض عند 35م° باستخدام جهاز التبخير الدوراني، عاملنا المستخلص المركز بالماء المقطر حيث نضيف (400-600 مل) ماء مقطر لكل 1000 غ من المادة الجافة، نتركه ليلة كاملة بعدها نجري عملية الترشيح. نعامل الراشح بإستخلاص سائل-سائل بإستخدام قمع الفصل مستعملين مذيبات غير ممتزجة مع الماء وذات قطبية متزايدة نضيف إيثر البترول مرة واحدة وذلك لإزالة بقايا الكلوروفيل والليبيدات ثم الكلوروفورم ثلاث مرات بعدها خلاص الأيثل مرة واحدة ثم البيتانول عدة مرات المراحل مجتمعة في المخطط الآتي.



الشكل 23: يمثل مخطط لمختلف مراحل

ونحسب في كل مرة مردود الإستخلاص بالمعادلة المعروفة التالية:

$$R (\%) = \left(\frac{m_{\text{المستخلص}}}{m_{\text{النبات}}} \right) * 100$$

حيث: R هو المردود %.

المستخلص m هي كتلة المستخلص بعد تبخر المذيب بالغرام.

النبات m الكتلة الجافة من عينة النبات بالغرام.

مستخلصات المركبات الفينولية المختلفة المتوفرة في أزهار نبات النقد أعطت مردوداً متفاوتاً فيما بينها فكان المحصول الأهم للمستخلص الخام والأقل لخلات الإيثيل والجدول 3 يلخص هذه النتائج.

الجدول 3: مردود الاستخلاص وتقدير محتوى الفينولات الكلية، الفلافونويدات، التانينات في مستخلصات أزهار نبات النقد.

المستخلصات	مردود الاستخلاص R%	كمية الفينولات الكلية (mg EGA/g)	كمية الفلافونويدات الكلية (mg EQ/g)	كمية التانينات الكلية (mg EC/g)
الكلوروفورمي	0.278	39.99±1.89	4.39±0.03	6.66±0.04
خلات الإيثيل	0.149	647.32±83.20	46.04±0.47	4.90±0.20
البيتانولي	1.750	270.22±11.21	17.94±0.89	1.18±0.12
المائي	3.308	68.67±3.32	2.11±0.09	2.27±0.16
الخام	19.34	220.25±18.95	10.12±0.31	4.75±0.35

بشكل عام تختلف محتويات المستخلص الخام للنباتات، ليس فقط من نبات الى آخر من نفس العائلة ولكن أيضا وفق لمعايير إستخلاص المركبات الفينولية إذا كان السائل سائل او صلب سائل، مذيب الإستخلاص، حجم الجسيمات المادة النباتية ومعامل إنتشار المذيب.

بالإضافة إلى الجوانب الكمية، وبغض النظر عن طريقة الإستخلاص المطبقة، يجب مراعاة جودة المستخلص ففي الدراسة ذكرت ان طريقة النقع المخفوق تعمل على تسريع عملية الإستخلاص والتقليل من وقت ملامسة المذيب، والحفاظ على النشاط الحيوي لمكونات المستخلص.

إن تأثير درجة الحرارة على الاستخلاص وكذلك استنفاد المذيب عند ضغط جوي منخفض يجعل من الممكن الحصول على أكبر عدد من المركبات ومنع تمسخها أو تعديلها المحتمل بدرجة الحرارة العالية. هناك ميل للإستخلاص المزيد من المركبات بالماء أكثر من المذيبات الأخرى يمكن تفسير ذلك من خلال الحقيقة البسيطة المتمثلة في إن الماء عبارة عن مذيب عالي القطبية معروف بإستخلاص مجموعة كبيرة من الجزيئات بما في ذلك مركبات غير فينولية مثل الكربوهيدرات والبروتينات [90].

3.3-الكشوف الكيمياء-نباتية الأولية:

أجريت الكشوف الكيمياء-نباتية الأولية لتحديد وجود بعض مركبات الأيض (الأولي والثانوي) في المستخلصات المختلفة لنبات النقد باستخدام الطرق القياسية كما هو موضح أدناه: تعرضت المستخلصات لإختبارات كيمياء-نباتية مختلفة لتحديد نواتج الأيض الثانوي المسؤولة عن معظم الأنشطة البيولوجية لأزهار نبات النقد. تجرى هذه الإختبارات وفقاً للتقنيات التي وصفها Archana ومعاونوه [90].

يستخدم إختبار Kellar Kiliani وحمض الكبريت المركز للكشف عن الجليكوسيدات و ثلاثي كلور الحديد $FeCl_3$ للكشف عن التانينات. و طريقة Shinoda و Alkaline للكشف عن الفلافونويدات، واستخدامنا كاشف Wagner و Mayer للكشف عن القلويدات ، طريقة Burchard -Libermen للكشف عن التربينات الثلاثية وإختبار Salkowski للكشف عن الستيرولات وطريقة حمض Ellagic للكشف عن الفينولات كما كشفنا ايضاً عن الكيتونات Quinones، و الانتراكينونات Antraquinones، الصابونيات والكومارينات كذلك [90].

أجرينا الإختبارات الكيميائية الأولية على المستخلصات المختلفة المحضرة من أزهار نبات النقد باستخدام مذيبات ذات قطبية مختلفة وكواشف محددة. سمح لنا الفحص الكيميائي النباتي بتسليط الضوء على وجود مركبات الأيض الأولي والثانوي في أنسجة النباتات. يعتمد الكشف عن هذه المركبات الكيميائية على الإختبارات قابلة لإذابة المكونات وتفاعلات الترسيب والعاكارة وتغير لون معين أو فحص تحت الأشعة فوق البنفسجية.

أظهرت النتائج التجريبية للإختبارات الكيميائية النباتية على وجود مركبات فلافونيدية والتانينات والجليكوزيدات بكميات متغيرة، وتؤكد من وجود الفلافونيدات في النبات من خلال ظهور لون أحمر كثيف عند ملامسة المغنيزيوم وتواجد التانينات بكثافة كثيرة ما يؤكد وجود التفاعل الإيجابي مع كلوريد الحديد الذي يعطي لون أزرق مخضر.

أظهر الإختبار الإيجابي للستيرويات والتربينات وجودهما وذلك بظهور حلقة حمراء بنية وطبقة طافية خضراء، وظهور إشعاع تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية إلى وجود كومارينات ولكن بكثافة منخفضة كما نلاحظ وجود الصابونيات والجليكوزيدات بكميات قليلة جداً، كما أظهر الفحص الكيميائي عدم وجود القلويدات والنتائج ملخصة في (الجدول 4).

الجدول 4: الفحص الأولي للكيمياء-نباتية لمستخلصات أزهار نبات النقد.

أنواع المركبات	الإختبار	مستخلص الكلوروفورمي	مستخلص خلاص الإيثيل	مستخلص البيتانولي	مستخلص الخام
القلويدات	ماير	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-
الجليكوزيدات	Kellar kiliani	-	+	+	+
	H ₂ SO ₄	-	+	+	+
Quinones	-	-	-	+	-
الفينولات	Ellagic acid	-	-	-	-
التانينات	FeCl ₃	-	+	+	+
الفلافونويدات	Shinoda	-	+	+	+
	Alkaline	-	+	+	+
الكومارينات	-	+	+	+	+
الستيرويدات	Salkowski	-	+	+	+
التربينات	Lieberman Burchard	-	+	+	+
Antraquinones	-	-	-	-	-
الصابونيات	-	-	-	-	+

ان طبيعة المواد الكيميائية التي كشف عنها الفحص الكيميائي النباتي يبنى بنشاط مثير للاهتمام في للنبات المدروس وهي في الأساس:

1. المركبات الفلافونيدية : غالبا ما يتم تقديمها كمضادات لكل من للالتهاب، للحساسية و للتشنجات، مخفضات للكوليسترول، مدرات للبول، مضادات للبكتريا والفيروسات[50].

2.التانينات : استعمالها في الأدوية يكون محدودًا للغاية وذلك لتقارب بنيتها مع جزيئات البروتينات خارجيا يعمل على مقاومة الطبقة الخارجية من الجلد والأغشية المخاطية للماء وبالتالي حماية الطبقات الأساسية لديها أيضا تأثير محدد مضاد للإسهال بغض النظر عن طريقة تعاطيه فإن التأثير المظهر والمضاد للبكتريا والمضاد للفطريات واضح لهذه الجزيئات مثير للإهتمام (الإسهال المعدي والتهاب الجلد)[50].

3.الصابونيات :عادة هي مسببة لتحلل الدم هذه الخاصية يجعلها تتفاعل مع ستيرويدات غشاء كرات الدم في الجسم الحي يوفر عدد كبير من الصابونيات دفاعا للنباتات ضد الهجوم الميكروبي والفطري .لها نشاط مضاد للبكتريا مثبت مخبريا و ضد الفيروسات[50].

4.3. تقدير محتوى المركبات الفينولية:

لتقدير كمية المركبات الفينولية في المادة النباتية نستخدم كروماتوغرافيا الطور السائلة عالية الكفاءة HPLC-DAD في وجود مركبا عيارية وباستخدام الطرق اللونية المعتمدة على استخدام مقياس الطيف المرئي والأشعة فوق البنفسجية.

1.4.3. الدراسة الكمية لمستخلصات نبات النقد باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة**HPLC-DAD:**

قد طورت طرق مختلفة لتحديد المكونات الفينولية والعضوية في المنتجات الطبيعية [91]. لذلك فإن أفضل أداة هي استعمال تقنية كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC، والتي يمكن تطبيقها بنجاح لتحليل مستخلصات المنتجات الطبيعية [92, 93].

بشكل عام، يستخدم في تقنية الـ HPLC طور ثابت صلب يتكون من جزيئات دقيقة جدا ناعمة موضوعة في عمود رقيق (معلوم القطر والطول) وطور متحرك سائل، وهي تقنية ذات كفاءة شائعة نظراً لإمكانية تكرار نتائجها وإمكانية تقنية الـ HPLC اقترانها أو ربطها بأدوات وأنظمة كشف أخرى.

نقوم بالتحليل لمستخلصات نبات النقد في مخبر الجامعة التركيبية بموقلا وذلك باستخدام 37 مركبا قياسيا في تقنية الـ HPLC، الطور الثابت المستخدم للفصل في العمود هو طور العكسي Japan.C18 Shimadzu Cooperation (Shimadzu.C18/RP18)، والذي يتكون من وحدة توصيل مذيب Shimadzu من طراز LC-20AT ونظام Shimadzu نموذج M20A-SPD الكشف يكون بواسطة مجموعة من الصمامات و التحكم فيها يكون بواسطة برنامج يعرف بـ LC (وحدة تحكم نظام Shimadzu CBM-20A). ضبطت درجة حرارة العمود عند 35 م°. الفصل الكروماتوغرافي يكون باستخدام عمود ذي الخصائص (Inertsil ODS-3m 4µm 150 mm × 4.0 mm) وعمود حماية Inertsil ODS-3، وكانت الأطوار المتحركة عبارة عن حمض الأسيتيك مائي 0.1% (A) وميثانول (B). وبعدها تتم عملية التمليص التدريجي من 2% إلى 100% حسب طريقة Tokul-Olmez [94]. يحضر محلول العينة في الميثانول بتركيز 8mg/ml ونرشحه باستخدام مرشح 0.45µm Agilent m بعدها يحقن في جهاز HPLC بحجم 20 µl. يكشف عن المركبات بواسطة كاشف الصمام الثنائي (DAD) باستخدام طول موجة 254nm. نميز المركبات الفينولية المكتشفة بمقارنة فترات احتباسها (Tr) يعبر عن تراكيز تواجدتها ب µg لكل غرام من وزن المستخلص.

أجرينا تحليل HPLC-DAD لمستخلصات ازهار نبات النقد، بالعمود المستخدم للفصل في الطور العكسي RP18/C18، وباستخدام كاشف الصمام الثنائي للأشعة فوق البنفسجية (DAD)، ويتم تحديد كل مركب من خلال مقارنة أزمنا الاحتباس وأطياف UV-Vis، لقمم المركبات المتواجدة في كل مستخلص مع تلك التي تم الحصول عليها عن طريق حقن 37 مركبا فينولياً كمركبات عيارية.

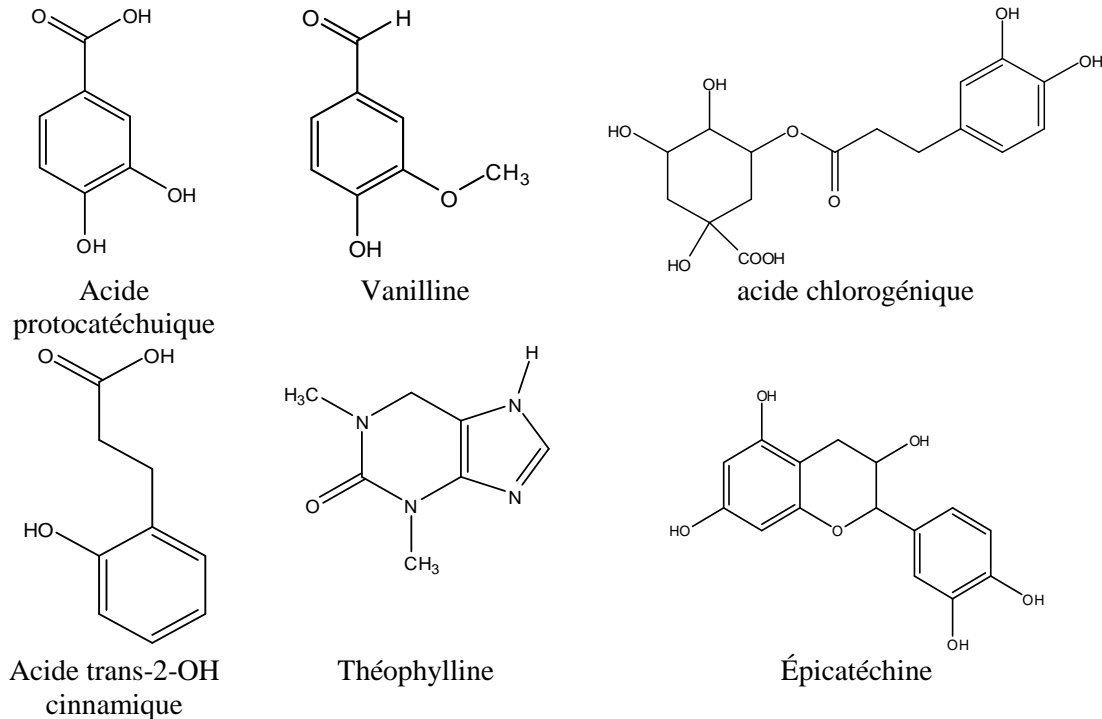
4.3.1. المستخلص الخام:

حددت ستة مركبات فينولية كما هو موضح في (الجدول 5) و(الشكل 24).

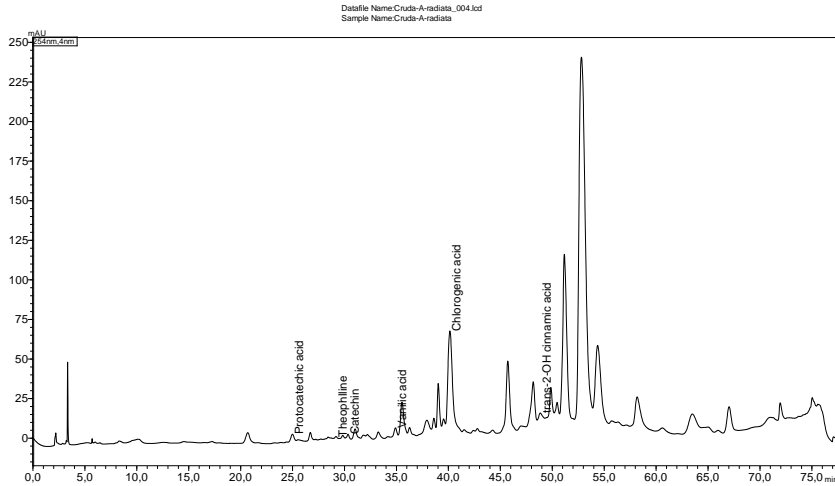
الجدول 5: المركبات الكيميائية المتواجدة في المستخلص الخام باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC-DAD.

زمن الإحتباس	نسبة التواجد μ g/ml	المركب المتواجد
14.10	0,31	Acide protocatéchuique
24.02	0.50	Vanilline
17.05	7.25	Acide chlorogénique
33.65	1.49	Acide trans-2-OH cinnamique
32	333.95	Épicatéchine
30	أثار	Théophylline

يتضح من خلال (الجدول 5) و(الشكل 25) ان الكروماتوغرام اقتصر على تحديد 6 مركبات فينولية فقط في المستخلص الخام:



الشكل 24: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD للمستخلص الخام لأزهار نبات النقد.



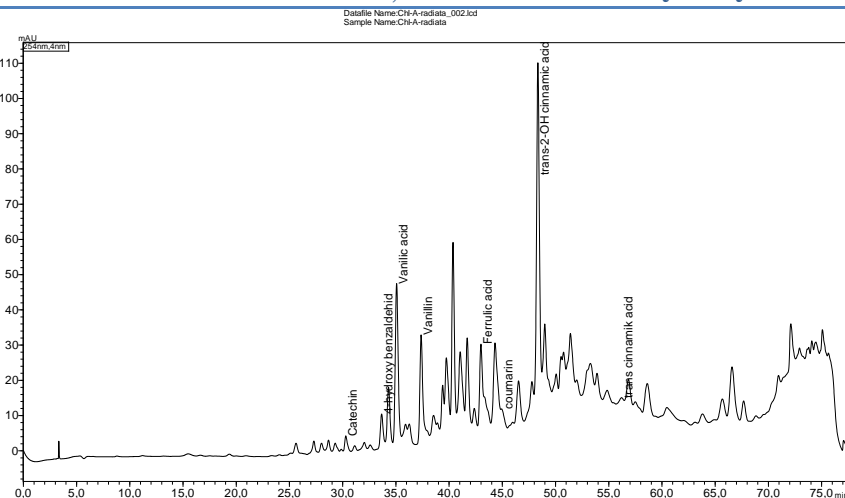
الشكل 25: يمثل الصيغ الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في المستخلص الخام لأزهار نبات النقد.

4.3.1 ب. مستخلص الكلوروفورم:

حددت سبعة مركبات فينولية بما في ذلك الأحماض الفينولية كما هو موضح في (الجدول 6) و(الشكل 26).

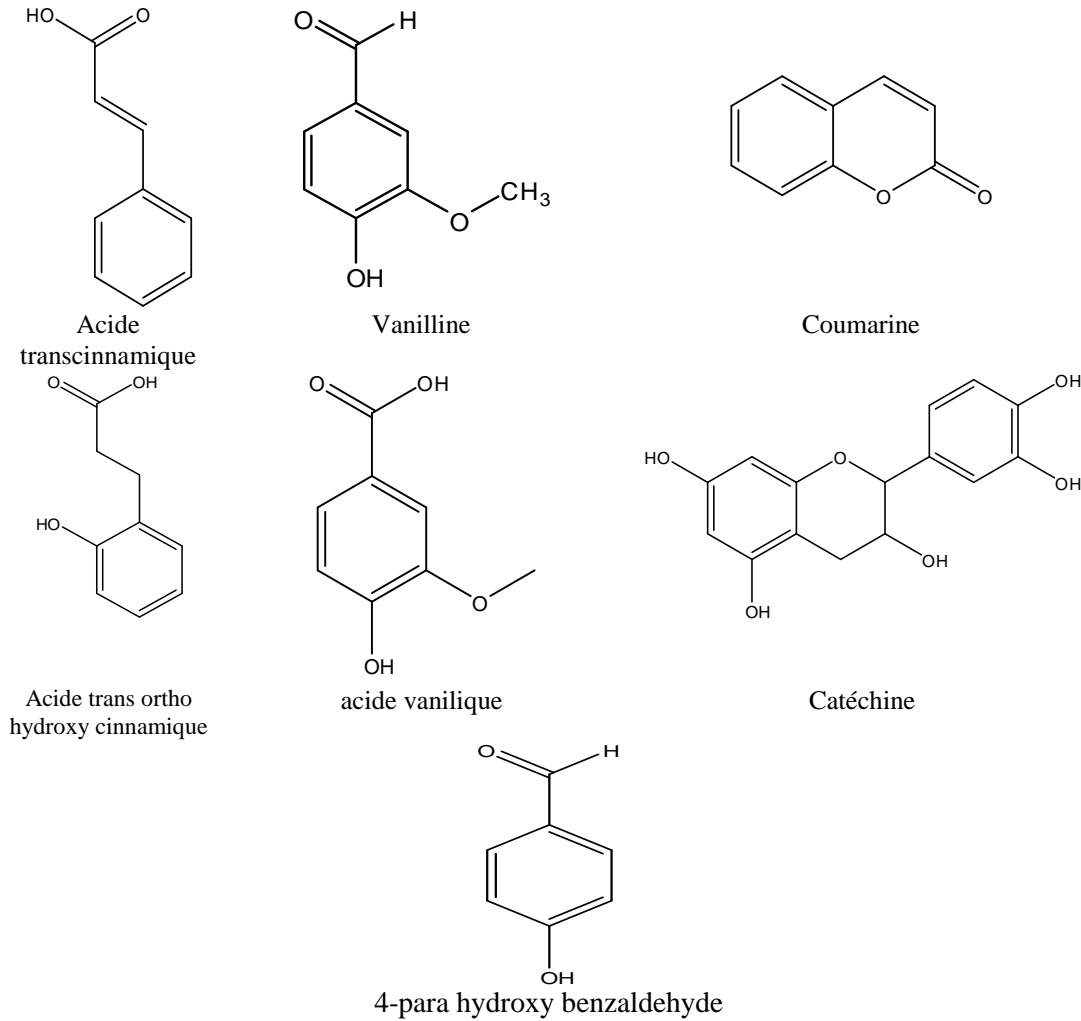
الجدول 6: المركبات المتواجدة في مستخلص الكلوروفورم باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC-DAD.

زمن الاحتجاز	نسبة التواجد $\mu\text{g/ml}$	المركب المتواجد
20.00	0,30	Catéchine
22.37	1,66	Acide vanilique
24.02	2,35	Vanilline
31.10	0,09	Coumarine
33.65	4,87	Acide trans ortho hydroxy cinnamique
41.54	0,26	Acide transcinnamique
34.50	0,69	4-hydroxy benzaldéhyde



الشكل 26: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص الكلوروفورم لأزهار نبات النقد.

يتضح من خلال (الجدول 6) و(الشكل 27) أنه تم تحديد 7 مركبات في المستخلص الكلوروفورمي. المركبات هي:



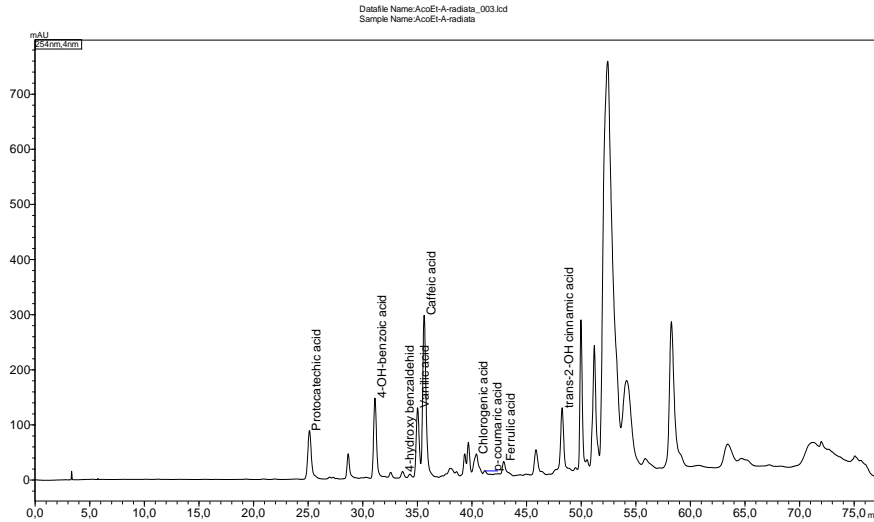
الشكل 27: يمثل الصيغ الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في مستخلص الكلوروفورم لأزهار نبات النقد.

1-4.3 ج. مستخلص خلات الإيثيل:

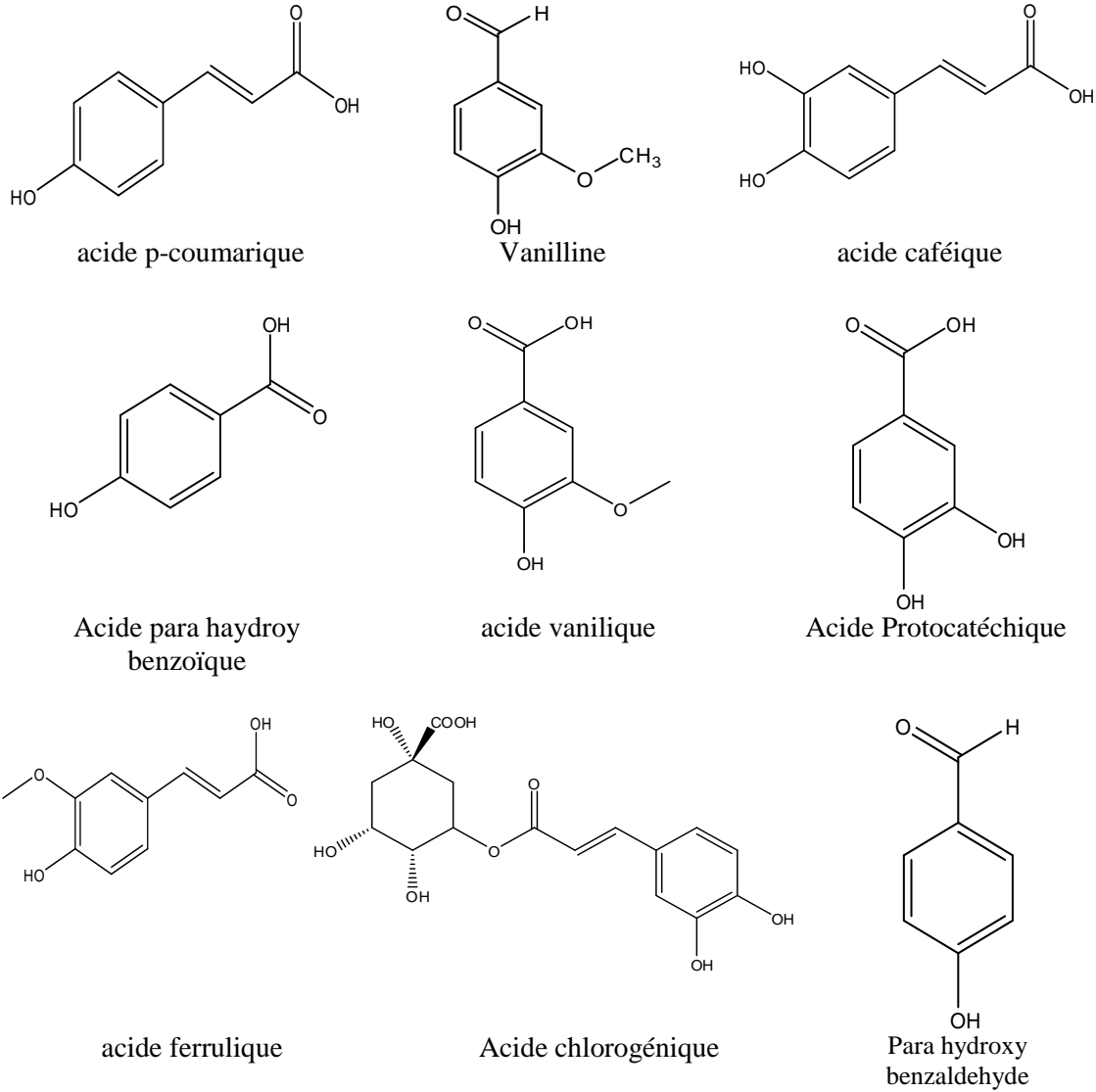
نحدد تسعة مركبات بما في ذلك الأحماض الفينولية والفلافونويد كما هو موضح في (الجدول 7) و(الشكل 28).

الجدول 7: المركبات المتواجدة في المستخلص خلات الإيثيل باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC-DAD.

المركب المتواجد	نسبة التواجد $\mu\text{g/ml}$	زمن الاحتجاز
Acide Protocatéchine	3.95	14.10
Acide 4-OH-benzoïque	2.85	19.50
Acide vanilique	4,43	22.37
Acide caféique	15,75	22.94
Acide chlorogénique	3,61	17.05
Acide ferrulique	1,67	19.76
Acide trans-2-OH cinnamica	6,29	35.02
4-hydroxy benzaldéhide	3.95	34.50
Acide p-coumarique	2.85	60.45



الشكل 28: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص خلات الإيثيل لأزهار نبات النقد. يتضح من خلال (الجدول 8) و(الشكل 29) أنه تم تحديد 9 مركبات في مستخلص خلات الإيثيل المركبات هي:



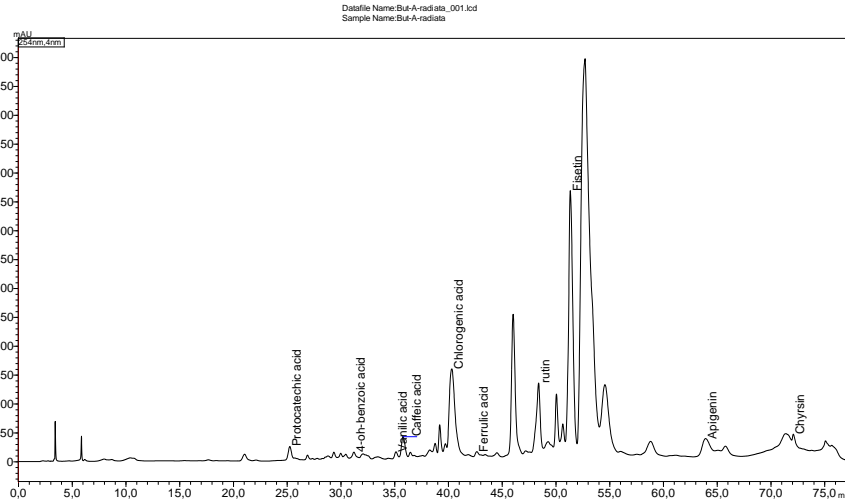
الشكل 29: يمثل الصيغ الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في مستخلص خلات الإيثيل

4.3.1 د. مستخلص البيتانول :

تم تحديد تسعة مركبات بما في ذلك الأحماض الفينولية والفلافونويدية كما هو موضح في (الجدول 8).

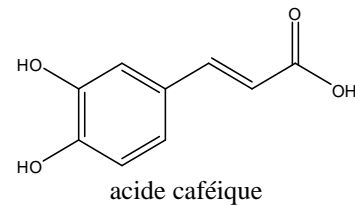
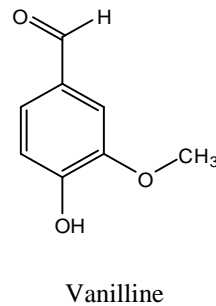
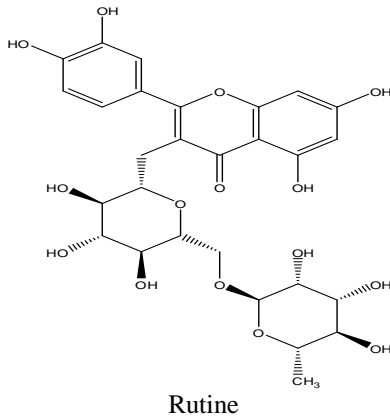
الجدول 8: المركبات المتواجدة في المستخلص البيتانولي باستخدام كروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC-DAD.

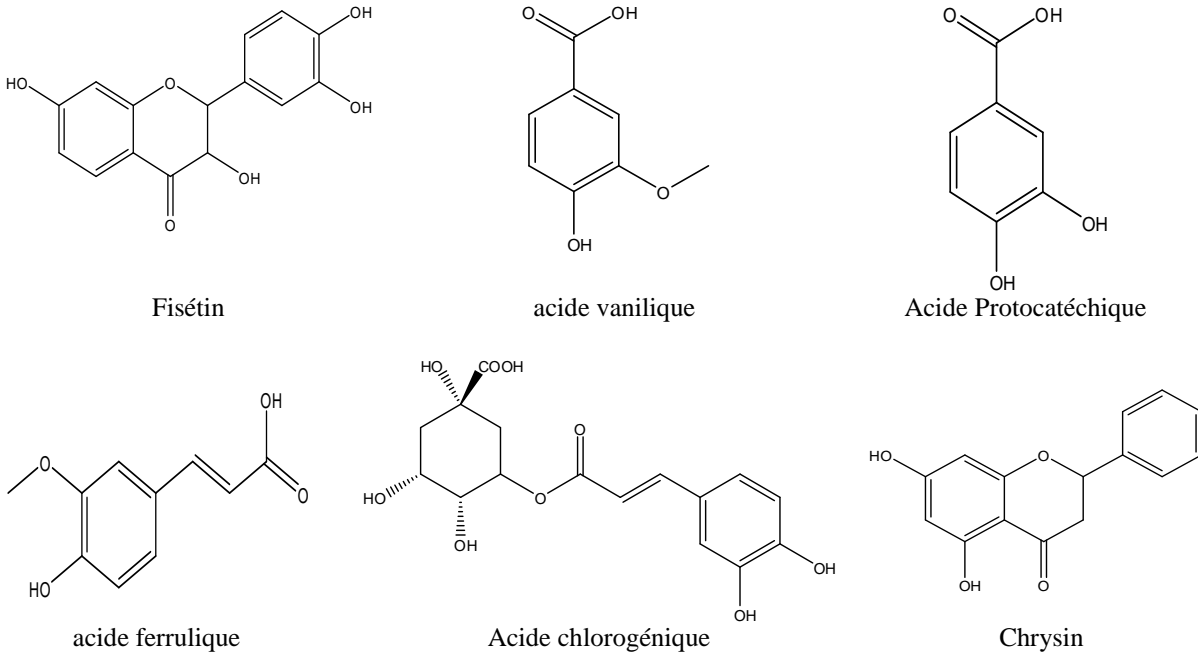
المركب المتواجد	نسبة التواجد $\mu\text{g/ml}$	زمن الاحتجاز
Acide protocatéchuique	1.18	14.10
Acide para hydroxy benzoïque	0.41	19.50
Acide vanilique	0.60	22.37
Acide caféique	2.29	22.94
L'acide chlorogénique	18.44	17.05
Acide férulique	1.01	19.76
Rutine	10.37	35.02
Fiséтин	16.60	40.23
Chrysin	9.93	60.45



الشكل 30: يمثل كروماتوغرام HPLC-DAD لمستخلص البيتانول لأزهار نبات النقد.

يتضح من خلال (الجدول 8) و(الشكل 30) أنه تم تحديد 9 مركبات في مستخلص البيتانول المركبات هي:

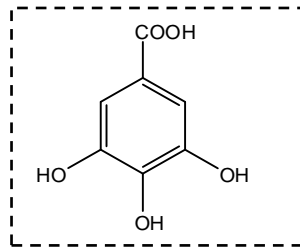




الشكل 31: يمثل الصيغ الكيميائية للمركبات الشاهدة المتواجدة في مستخلص البينانول لنبات النقد. من خلال الكروماتغرام نلاحظ غياب العديد من المركبات لعدم وجود المزيد من الشواهد ودلالة على ذلك إحتواء المستخلص الكلوروفورمي على العديد من السييسكيتربينات اللاكتونية والتي تحصلنا عليها في عملنا المنجز وتلك التي أشارت إليها الدراسات السابقة.

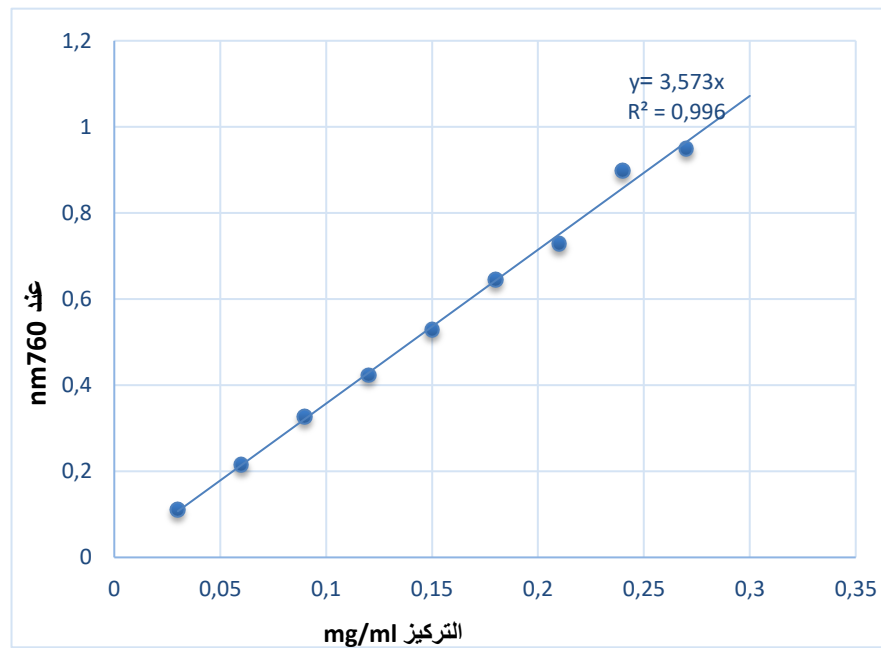
2-4.3. تقدير محتوى عديدات الفينولات الكلي:

اعتمدنا في تحديد محتوى الفينولات الكلي الطريقة التي نستعمل فيها كاشف Folin-Ciocalteu حسب Tung ومعاونيه [95]. إذ يتكون هذا الكاشف من خليط من حمض الفوسفوتنغستينيك $H_3PM_{12}O_4$ وحمض الفسفوموليبديك $H_3PW_{12}O_4$ acide phosphotungstique، الذي يُرجع بواسطة المجموعات المؤكسدة للمركبات الفينولية إلى أكاسيد معدنية (oxydes métalliques) التنجستن W_8O_{23} والموليبديوم Mo_8O_3 ذات اللون الأزرق الذي يمتص عند طول موجة 725nm، وعند شدة إمتصاصية عظمى، تظهر للأكاسيد المعدنية علاقة بكمية المركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات، ويستخدم حمض الغاليك (الشكل 31) كمركب عياري.



الشكل 32: يمثل هيكل حمض الغاليك.

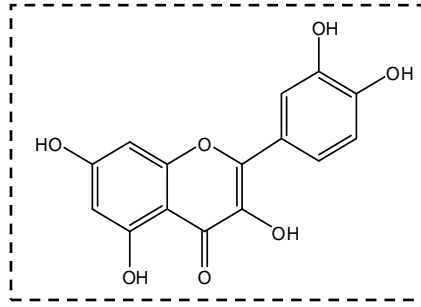
ولتحديد المركبات الفينولية الكلية نتبع الطريقة التالية: نضع 0.1 مل من المستخلص ذو التراكيز (0.01،0.02،0.03،0.04،0.05،0.06،0.07،0.08،0.09،0.1mg/ml) الممزوج بـ 0.5 مل من كاشف Folin-Ciocalteu (10 %)، بعد 5 دقائق نضيف 2.0 مل من كربونات الصوديوم (20%)، ونمزج الخليط ونحفظه عند درجة حرارة الغرفة في الظلام مدة 30 دقيقة، ثم نقيس الإمتصاصية عند طول موجة 760nm. نقوم بنفس التحليل باستخدام حمض الغاليك في نفس ظروف السابقة، يعبر عن النتائج المحصل عليها بمكافئ حمض الغاليك لكل جرام من وزن المستخلص (EGA / g ext). من خلال المنحنى العياري (الشكل 32) الذي له معامل الارتباط: $R=0.996$ وجميع النتائج المحصل عليها عبارة عن متوسطات ($EM \pm SEM$) حيث اجرينا لكل حالة ثلاث تجارب منفصلة.



الشكل 33: يمثل المنحنى القياسي لحمض الغاليك.

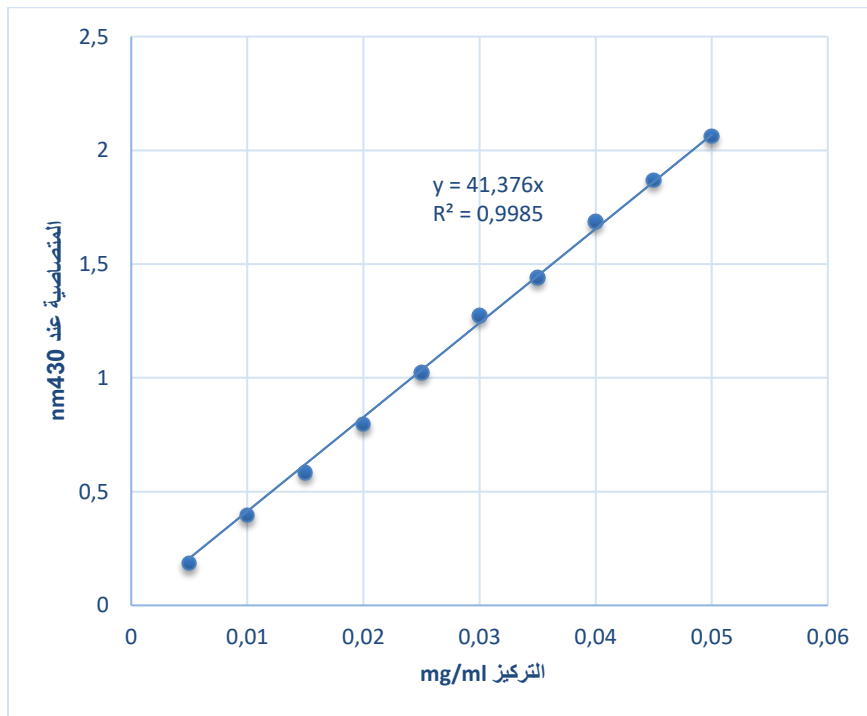
3.4.3. تقدير كمية المركبات الفلافونويدات الكلية:

لتحديد كمية الفلافونويدات الكلية نتبع الطريقة اللونية باستخدام ثلاثي كلوريد الألومنيوم $AlCl_3$ حسب طريقة Wang ومعاونيه [96] يشكل ثلاثي كلوريد الألومنيوم معقدات مع مجموعات الهيدروكسيل المتجاورة وكذا مجموعة الكربونيل وهيدروكسلي الموقعين C3 وC5 (للهيكل الفلافونويدي في مستخلصات نبات النقد) يمتص هذا المعقد الأصفر المشكل الضوء المرئي بطول موجة يبلغ 415nm، ويستخدم مركب كيرسيتين (الشكل 33) كمركب معياري عند نفس طول موجة.



الشكل 34: يمثل هيكل مركب الكرسنتين.

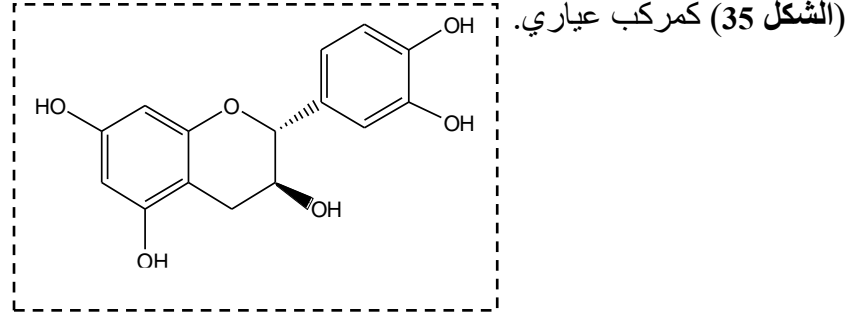
نضيف 0.5 مل من المحلول الإيثانولي $AlCl_3$ (2%) إلى 0.5 مل المستخلص ذو التراكيز (0.01، 0.02، 0.03، 0.04، 0.05، 0.06، 0.07، 0.08، 0.09، 0.1 mg/ml). بعد 30 دقيقة من الحضانة، وعند درجة حرارة الغرفة، نقيس الامتصاص عند طول موجة $\lambda=430nm$ باستخدام مقياس الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية. بنفس الإجراء الموضح أعلاه، عن طريق استبدال المستخلص بالكيرسيتين. ونعبر عن المحتوى الكلي للفلافونويدات بمكافئات كيرسيتين (EQ)، بالمليغرام لكل جرام من المستخلص باستخدام منحنى القياسي له (الشكل 34) الذي يعطي معامل الارتباط $R = 0.998$. النتائج المقدمة كانت كمتوسطات ($EM \pm SEM$) حيث أعدنا تحليل التجارب 03 مرات منفصلة.



الشكل 34: يمثل المنحنى القياسي للكرسنتين.

4-4.3. تقدير محتوى المركبات التانينية الكلية:

لتحديد كمية المركبات التانينية الكلية استخدمنا Vanillin-HCl طريقة Mariem ومعاونيه [97]، وتستند هذه الطريقة إلى إنتاج مركب لوني قابل للقياس عند $\lambda = 500 \text{ nm}$ ، واستخدم الكاتشين

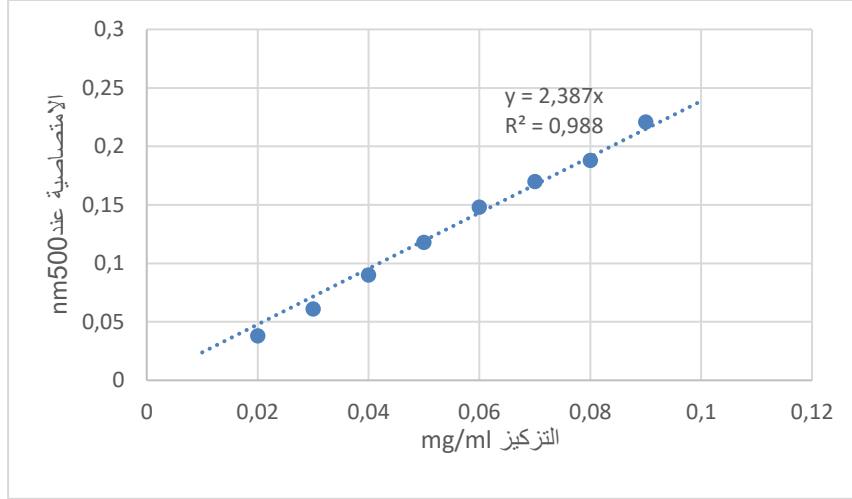


الشكل 36: يمثل هيكل مركب الكاتشين.

ولتقدير محتوى التانينات الكلي في المستخلص الخام ومستخلصات أزهار نبات النقد استخدمنا الطريقة اللونية حيث نضيف 3 مل من محلول Vanilline الإيثانولي 4% و 1.5 مل من حمض الهيدروكلوريك المركز (HCl) ذو التراكيز إلى 0.4 مل من المستخلص.

(0.01، 0.02، 0.03، 0.04، 0.05، 0.06، 0.07، 0.08، 0.09، 0.1 mg/ml)

نحفظ الخليط لمدة 15 دقيقة، ونقيس الإمتصاصية عند $\lambda = 500 \text{ nm}$.



الشكل 37: يمثل المنحنى القياسي للكاتشين.

نعبر عن المحتوى الكلي للتانينات بالملغ مكافئ للكاتشين (EC mg / g) بإستخدام المعادلة المحصل عليها من منحنى القياسي الذي أعطى معامل الارتباط $R = 0.98$ (الشكل 36)، حيث النتائج المقدمة كمتوسطات ($EM \pm SEM$) أعدنا التجارب ثلاث مرات منفصلة.

اعتمدنا في تقدير المحتوى الفينولي الكلي بإستخدام طريقة Folin-Ciocalteu، وكما عمدنا إلى تحديد محتوى الفلافونويدات بإستخدام كاشف $AlCl_3$ وأما التانينات وأصبغ الدهون القابلة للذوبان

بالطريقة اللونية، وقد جمعت النتائج المحصل عليها في تقدير المحتوى الفينولي الكلي والفلافونويدات والتانينات لمستخلصات نبات النقد قيد الدراسة في (الجدول 3).

أظهرت نتائج الإختبار (TPT) أن مستخلص خلات الايثيل يحتوي على عدد معتبر من عديدات الفينولات متبوعا بالمستخلص البيتانولي ثم المستخلص الخام أما مستخلص الماء والكلوروفورم فكانت عديدات الفينولات اقل تواجدا بهما.

كما أظهرت النتائج المتوصل إليها من قبل الباحث جريدان ومعاونيه أن مركبات عديدات الفينول وفيرة في الجزء الهوائي لنبات النقد [98]، إن هذه الوفرة من المركبات هي سمة من سمات الفصيلة النجمية. ويمكن أن تكون هذا مرتبطاً الظروف المناخية للأماكن التي تنمو فيها (ارتفاع درجة الحرارة، والتعرض العالي للشمس، والجفاف والملوحة....) التي تحفز الاصطناع الحيوي لمثل هذه الانواع من المركبات [89].

يعتبر مستخلص خلات الإيثيل أكثر ثراءً بعديدات الفينولات وهو ما تأكده نتائج أبحاث حمادة ومعاونيه [99].

وقد أظهرت النتائج أن إجمالي محتوى الفلافونويدات مختلف إختلافا كبيرا بين المستخلصات حيث سجل كحد أقصى في المستخلص خلات الإيثيل و كحد أدنى في المستخلص المائي، والنتائج مجملة في (الجدول 3)، هذه النتائج تتوافق مع أعمال مخلوفي ومعاونيه [30].

وقد أظهرت النتائج تفاوتاً في قيم محتوى التانينات في المستخلصات فنجدها قليلة مقارنة بعديدات الفينولات والفلافونويدات في كل المستخلصات. وهذه النتائج مجمعة أيضا في (الجدول 3).

على ضوء النتائج المعروضة أعلاه، يتضح أن استخلاص المركبات الفينولية هو خطوة حاسمة لتثمين المكونات النشطة. يعتمد ذلك على كل من مذيب الإستخلاص وطبيعة الجزء المدروس. لذلك يبقى إختيار نظام المذيبات المناسب أحد أهم الخطوات في تحسين إستخلاص عديدات الفينولات من الفلافونويدات والمركبات المضادة للأكسدة الأخرى.

5.3-تقدير أصباغ الدهون القابلة للذوبان:

ولتقدير كمية مركبات β -كاروتين β -carotène، اللايكوبين Lycopéne والكلوروفيل chlorophylle في المادة النباتية (الأزهار والأوراق) أنجزنا طريقة Barros ومعاونيه [100]. حيث نرج المسحوق الناعم من (أزهار وأوراق) نبات النقد (150mg) في 10 مل من خليط الأسيتون - الهكسان بنسبة (4:6) (v/v) لمدة دقيقة واحدة ونرشحها من خلال ورق WhatmanN°4. نقيس إمتصاصية المادة المرشحة عند أطوال الموجة التالية: 453 nm ، 505nm ، 663 nm ، λ_{max} = 645 nm. نحسب محتوى β -Caroténe و Lycopéne وكلوروفيل وفقاً للمعادلات التالية:

$$\beta\text{-croténe mg/100ml}=0.216*A_{663}-1.220*A_{645}-0.304*A_{505}+0.452*A_{453}$$

$$\text{Lycopéne mg/100ml}=-0.0458*A_{663}-0.204*A_{645}-0.304*A_{505}+0.452*A_{453}$$

$$\text{chlorophylle A mg/100ml}=0.999*A_{663}-0.0989*A_{645}$$

$$\text{chlorophylle B mg/100ml}=-0.328*A_{663}+1.77*A_{645}$$

من خلال فحص النتائج الموضحة في (الجدول 9) نجد ثراء أزهار نبات النقد بـ β -Caroténe، Lycopéne والكلوروفيل.

ومن خلال مقارنة مختلف أجزاء النبات النقد نلاحظ أن الأوراق تحتوي على أعلى النسب من مركبات منتجات الأيض الثانوي، التي تعطي النبات صفات غذائية وعلاجية مهمة.

الجدول 9: تقدير اصباغ الدهون القابلة للذوبان.

Chlorophylle B 100mg/ml	ChlorophylleA 100mg/ml	Lycopéne 100mg/ml	β -caroténe 100mg/ml	
73,39±6,81	152,81±0,38	39,11±2,60	4,16±0.00	أزهار
68,71±3,34	215,41±10,67	69,29±5,19	59,46±17,12	أوراق

وقد أظهرت دراسات وبائية التأثير الإيجابي لإستهلاك الفواكه والخضراوات الغنية بالكاروتينيات للوقاية من بعض الأمراض المستعصية [101].

أن مركب β -كاروتين بالإضافة إلى نشاطه المؤيد (المساعد) للفيتامينات وغيرها من الكاروتينيات (astaxanthine ، lutéine، canthaxanthine، lycopéne، zéaxanthine) لها نشاط مضاد للأكسدة جيد وهو مثبت مخبرياً. فهي ترجع بشكل خاص الأكسجين الحر O_2^{\cdot} وجذور الهيدروبيروكسي HOO^{\cdot} وتشير أعمال حديثة ان لها تأثير على التعبير الجيني [102].

على العكس من ذلك فإن β -caroténe و Lycopéne اللذان ينتميان إلى فئة الكاروتينيات فإن الكلوروفيل يعد وحده عائلة، قد أصبح بإمكاننا اليوم أن نميز أكثر من 50 كلوروفيلًا مختلفًا، مع ذلك يظل تواجد الكلوروفيلين A و B في أغلبية أصباغ الاطعمة [103]. ذكر ذلك من قبل عدة باحثين [104-106]، لقوتها المضادة للطفرات مقارنة بالمواد الكيميائية والبيولوجية المسرطنة ولا سيما benzo(a)pyréne في الواقع يسرع هذا الجزيء من تحلل المادة المسرطنة النهائية (الايوكسيد (époxyde) الناتج عن استقلاب benzo(a)pyréne [106] آخر ومنه أظهر تحسن ملحوظا لـ 47 مريضًا من إجمالي 50 مريضًا يعانون من قرحة حادة بعد استخدام مرهم يحتوي على مشتقات الكلوروفيل القابلة للذوبان في الماء [107].

6.3-تقييم الفعالية البيولوجية لأزهار نبات النقد:

نستخدم عدة طرق لتقييم الأنشطة البيولوجية للمستخلصات المختلفة لأزهار نبات النقد مثل النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للبكتريا والنشاط المضاد للإلتهاب.

6.3-1. طرق تحديد الفعالية المضادة للأكسدة لأزهار نبات النقد:

لا يمكن تخزين الاطعمة الدهنية إلا لفترات زمنية قصيرة بسبب المقاومة غير الكافية للأكسدة بالأكسجين، لذا تعتبر أكسدة الدهون سببا رئيسيا لفساد الأطعمة التي تحتوي عليها، مما يؤدي الى زيادة استخدام مضادات الأكسدة [108].

تعتبر الجذور الحرة هي ذرة أو جزيء يحتوي على إلكترون أو أكثر منفرد (عازب) في المدار الخارجي في لذرة واحدة أو أكثر. فالجذور الحرة هي وحدات تتميز بهيكل إلكتروني غير متزن، مما يمنحها تفاعلية عالية (réactivité) على المركبات العضوية والهياكل الخلوية. في نفس الوقت تضمن الأداء السليم للكائن الحي وصحته ولكن فائضها يمكن أن يكون ضارا. بصرف النظر عن الحالات المرضية، يتم تحفيز إنتاجها من خلال أي حالة مرهقة (التمارين الرياضية، البرد، الإفراط في الأطعمة، إختلال في النظام الغذائي) والتي يمكن أن تسبب أضرارا كمية ونوعية للإنتاج الحيواني [109].

تسمى مجموعة الجذور الحرة الأولية بالأنواع التفاعلية للأكسجين ERO.

«*éspes réactive de oxygène*» [110]. الأنواع التفاعلية المؤكسجة ERO بما في ذلك الجذور الحرة مثل: جذر الهيدروكسيل OH^\bullet وجذر فوق الاكسيد O_2^\bullet وشكله البروتوني HO_2^\bullet وجذر

البيروكسيل RO[•] والأنواع غير الجذرية مثل: البروكسيد الهيدروجيني H₂O₂ والأكسجين المنفرد O₂¹ جزيئات شديدة التفاعل [111].

في جميع الأنظمة الهوائية الحية يتم إنتاج هذه الانواع بواسطة مسار داخلي أثناء إستقلاب الخلية [112]، تنتج ERO أيضا في ظروف مرضية جوهريه كخلل في المتوكونديريا أو انحلال الغدة thymique والتي تسبب الإلتهاب المزمن [113].

العوامل الخارجية مثل الملوثات البيئية والإشعاعات و المذيبات العضوية والتبغ و كل مسببات الامراض هي سبب في إنتاج ERO [114]. ولمحاربة هذه الجذور الحرة الضارة، تملك أجسامنا أنظمة دفاع مضادة للأكسدة بعضها داخلي والآخر خارجي يتم الحصول عليها من الجزيئات التي يوفرها الطعام. يتكون هذا النظام الداخلي من الإنزيمات التي تعمل في تآزر synergie وهي : SOD superoxyde dismutase (SOD) و glutathionperoxydase، catalase في الواقع SOD يحول فوق الأكسيد إلى بيروكسيد الهيدروجين بينما يستقلب Catalase الأخير الى جزئ ماء وآخر من الأكسجين.

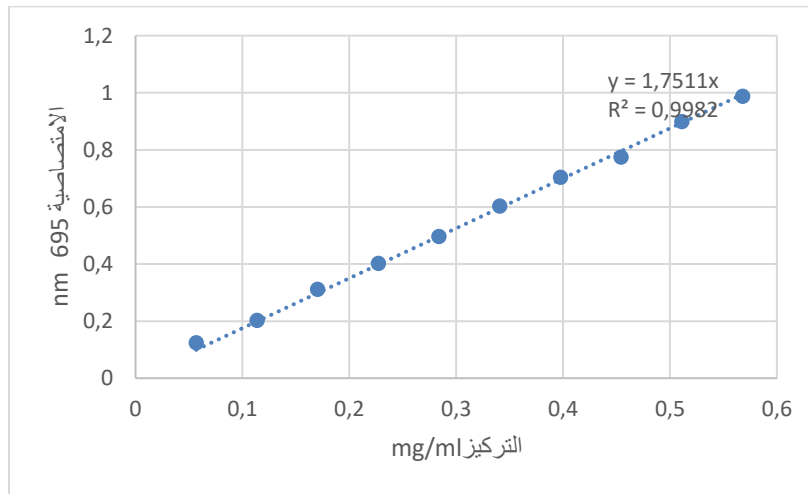
العوامل الخارجية مثل: ملوثات الهواء والاشعة فوق البنفسجية والكحولات يمكن أن تسبب في إنتاج الجذور الحرة بشكل زائد— ونتيجة لذلك فان نظامنا الدفاعي الداخلي غير قادر على تقليل كل هذه الانواع التفاعلية ERO. وللتقليل من الضرر التأكسدي تحتاج أجسامنا الى نظام غذائي غني بمضادات الاكسدة الخارجية. ومن بين هذه المواد المضادة للأكسدة الفيتامينات A،E،C. بالإضافة إلى الزيوت الطيارة والفلافونيدات [115].

الهدف من تقييم نشاط مستخلصاتنا هو تحديد الفعالية المضادة للأكسدة من أجل الإستفادة من هذه الخاصية لتطوير المجال البيولوجي. وقد عمدنا الى إجراء هذا التقييم من خلال ثلاث طرق وذلك في مخبر البحث العلمي مخبر تثمين وترقية الموارد الصحراوية (VPRS).

1-6.3.1. إختبار القدرة الكلية المضادة للأكسدة (TAC):

لتقييم القدرة الكلية المضادة للأكسدة لمستخلصات أزهار نبات النقد التي تحدد بطريقة موليبديات الفوسفات، تعتمد هذه التقنية على إرجاع الفوسفات Mo⁺⁶ السداسي الموجود في شكل موليبديات MoO₄²⁻ إلى فوسفات Mo⁺⁵ الخماسي في وجود المستخلصات لتكوين معقد فوسفاتي Mo⁺⁵ بلون اخضر مزرق في وسط حامضي [116]. قمنا بمزج التراكيز المختلفة لمستخلصات أزهار نبات

النقد (0.1 مل) مع 1 مل من محلول التفاعل والذي يتكون من 0.6M من حامض الكبريتيك، 28mM فوسفات الصوديوم، و 4 mM من أمونيوم). حضن المحلول الناتج في حمام مائي عند درجة حرارة 95م° لمدة 90 دقيقة. قمنا بقياس إمتصاصية الخليط عند طول موجة $\lambda = 695\text{nm}$ بعد التبريد، وباستخدام حمض الأسكوربيك كعيارى (الشكل 37)، حسب القدرة الكلية المضادة للأكسدة اعتماداً على العلاقة البيانية بين تركيز حمض الأسكوربيك والإمتصاصية.



الشكل 38: يمثل المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك في إختبار موليبيدات الفوسفات.

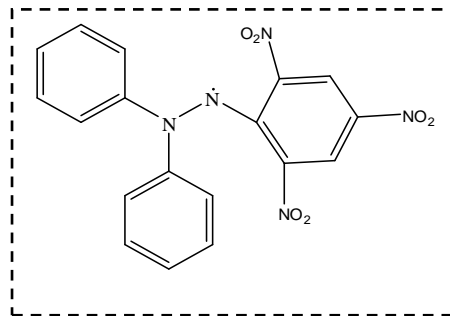
قمنا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة وفقاً لما سمي TAC (قدرة حمض الأسكوربيك المكافئ المضاد للأكسدة).

$$TAC = K/K'$$

K' ميل منحنى حمض الاسكوربيك، K ميل منحنى المستخلص.

1.6.3. ب. إختبار 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH):

طريقة الكسح الجذري لـ 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (الشكل 38) هو إختبار لوني. يقيس قدرة مضادات الأكسدة على كسح الجذر المستقر DPPH. وهو جذر عضوي حرغني بالأزوت، مستقر بلون بنفسجي داكن. حيث يرجع إلى شكله الجزئي غير الجذري DPPH-H بواسطة مضادات الأكسدة ويصبح عديم اللون أو أصفر. ومنه تلخص التفاعل وفق (الشكل 39).



الشكل 38: يمثل هيكل الـ DPPH.

وقد قمنا بقياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات عن طريق تحديد القدرة على كسح الجذر DPPH[•] كما ورد في [117] مع بعض التعديلات. حيث اضفنا 0.1 مل من المستخلصات النباتية المخففة والمحاليل العيارية بتركيز مختلفة إلى 1.9 مل من المحلول الكحولي لـ DPPH[•] بتركيز 0.1M، نحضن الخليط في الظلام في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة. بعدها نقيس الإمتصاصية الناتج عند $\lambda=517\text{ nm}$ وقد إستخدمنا حمض الأسكوربيك وكلا من المركبين BHA وBHT لمقارنة الفعالية. حسبنا تثبيط الجذر على النحو التالي: حساب قيم IC_{50} وكلما انخفضت قيمة IC_{50} كلما كانت قيم IC_{50} لمستخلصات أكثر فعالية على الجذور الحرة. وحساب IC_{50} من الإنحدار الخطي عن طريق استبدال قيمة المثبطة لـ 50%.

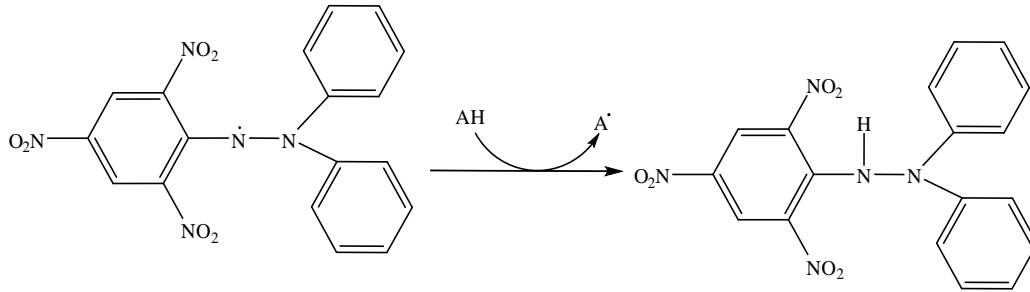
$$IC_{50}=50/K$$

K ميل منحني المستخلص.

تحسب قيمة التثبيط على النحو التالي:

$$100 \times \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] = \% \text{ التثبيط}$$

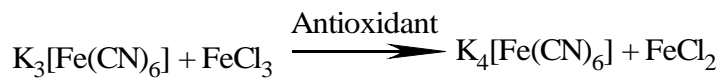
A_0 و A_1 هي الإمتصاصية في 30 دقيقة للشاهد والعينة على التوالي.



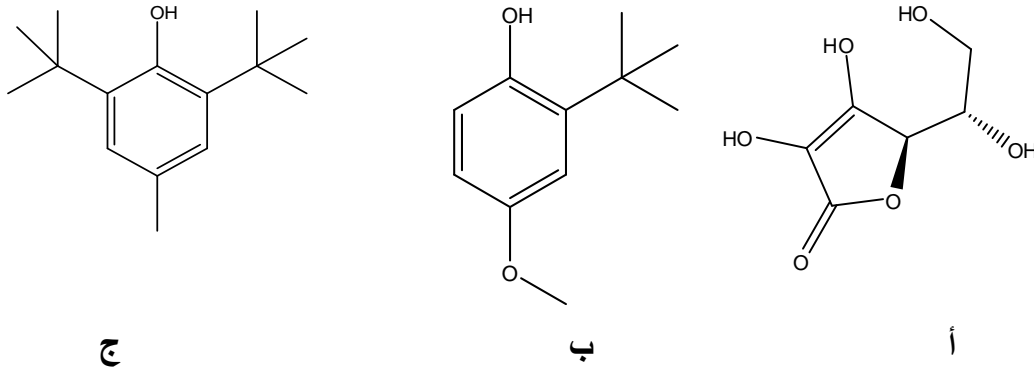
الشكل 40: يمثل آلية تفاعل مضادات الأكسدة مع DPPH[•].

1.6.3. ج. إختبار القدرة الإرجاعية للحديد (FRAP):

القدرة الإرجاعية للمركبات ترتبط بمدى فعاليتها المضادة لأكسدة المركبات الفينولية. الأساس تفاعل إرجاع الحديد الثلاثي الموجود في المركب $K_3Fe(CN)_6$ وذلك بطريقة الكشف عن تفاعل إرجاع ايون الحديد الثلاثي (Fe^{+3}) الأصفر إلى أيون الحديد الثنائي (Fe^{+2}) ذي اللون الأخضر للحديد حيث نقيس كثافة اللون الطيفي عند $\lambda=700\text{nm}$. الزيادة في امتصاص يتوافق مع القدرة الإرجاع للمركبات المختبرة ويمكن تليخيص التفاعل الكيميائي للحديد بمعادلة التفاعل التالي:



تم قياس القدرة الإرجاعية للحديد للمستخلصات إستنادا إلى طريقة Benmeddour ومعاونيه [118]. وذلك بمزج 1 مل من مختلف تراكيز المستخلصات مع 2.5 مل من محلول منظم فوسفاتي (PH6.6) و 2.5 مل من محلول (0.2 M) و 2.5 مل من محلول $K_3Fe(CN)_6$ (1% ,w/v). يحضن الخليط عند درجة حرارة 50°م لمدة 20 دقيقة ويضاف اليه 2.5 مل من محلول (TCA(10%)، تؤخذ 2.5 مل من الخليط وتضاف لها 2.5 مل من الماء المقطر و 0.5 مل من محلول $FeCl_3$ (0.1%) ونقيس إمتصاصية المحلول عند 700 nm. وحضرت العينة الشاهد بإضافة جميع المواد باستثناء إضافة 2.5 مل من الماء المقطر بدلا من المستخلصات إستخدام حمض الأسكوربيك كعيارى (الشكل أ. 40) وكل من BHA و BHT كشواهد مرجعية (الشكل 40) على الترتيب.

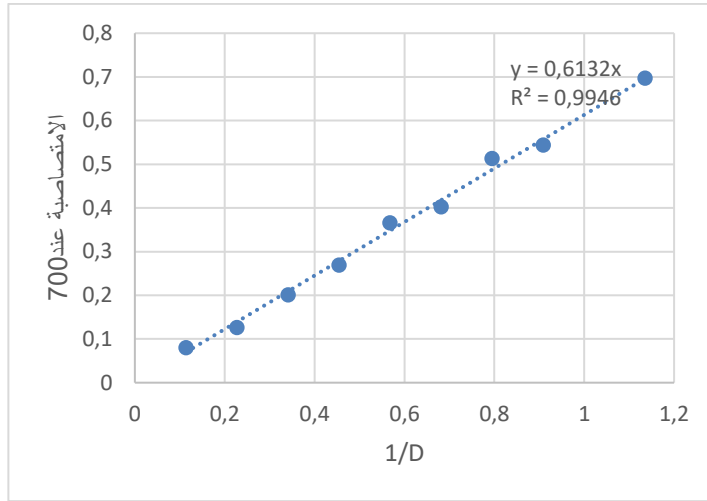


الشكل 40: يمثل أ: حمض الاسكوربيك، ب: بنية BHA، ج: بنية BHT.

بقياس النشاط مضاد للأكسدة وفقاً لمصطلح جديد يسمى AEAC (قدرة حمض الأسكوربيك المكافئ المضاد للأكسدة). نعرف الـ AEAC على أنه التركيز المولي لمحلول حمض الأسكوربيك الذي لديه قدرة تخفيضه المكافئ لمحلول تركيز 1M من مركب الاختبار (الشكل 41).

$$AEAC = K/K'$$

K ميل منحنى حمض الاسكوربيك، K ميل منحنى المستخلص.



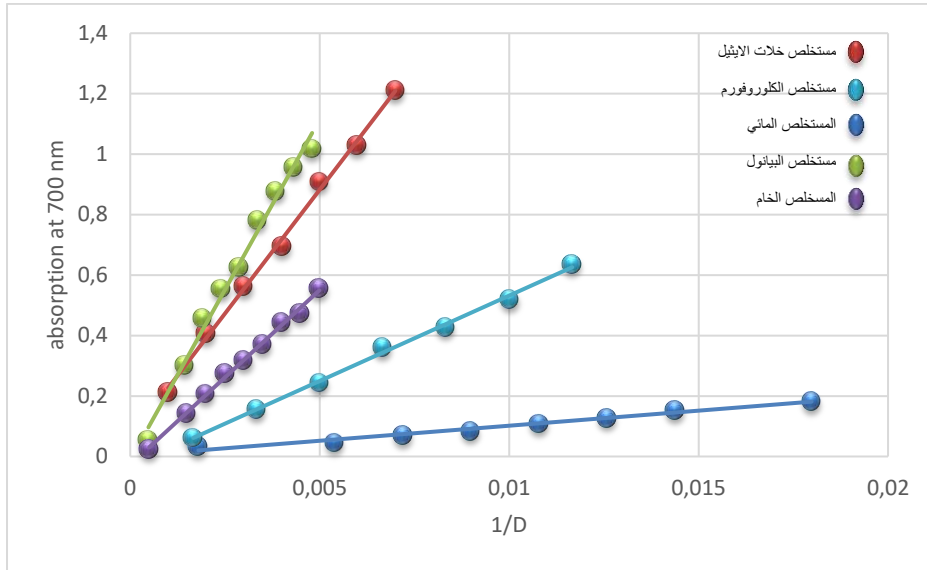
الشكل 42: يمثل المنحنى العياري لحمض الاسكوربيك في اختبار FRAP.

من خلال بحثنا البيولوجي و مراعاة تعقيد عمليات الأوكسدة، يبدو أن طريقة واحدة لاختبار نشاط مضادات الأوكسدة ليست كافية لوصف إمكانات مضادات الأوكسدة لعينة ما. لذلك من الضروري الجمع بين التقنيات التكميلية، وربط آلياتها المختلفة ليكون التقييم كاملا ودقيقا لتقييم الفعالية المضادة للأوكسدة لكل مستخلص. إستخدامنا ثلاث إختبارات كيميائية DPPH، FRAP و TAC. وقد اعتمدنا في ذلك على مبدأ تغيير اللون الذي تتبعه قراءة الإمتصاصية عند أطوال موجية محددة.

نعتبر عن إجمالي القدرة الإرجاعية لمضادات الأوكسدة للمستخلصات بالمـ mM مكافئ لحمض الأسكوربيك، على عكس الإختبارات الأخرى. إختبار الوسفومليبدنيوم لا يحدد النشاط المضاد للأوكسدة للمركبات عديدة الفينولات فقط بل المركبات المضادة للأوكسدة الأخرى أيضاً مثلا الفيتامينات: C, E [116].

وقد أظهرت المستخلصات المدروسة لأزهار نبات النقد قدرة إرجاعية جيدة حيث أبان المستخلص البيتانولي أعلى نشاطا بقيمة 95.09 ± 0.67 Mm بينما المستخلص المائي كان أقل نشاطا بقيمة 18.57 ± 0.39 Mm ولكنه أحسن بكثير من المركبات الشاهدة BHA و BHT. وجميع تلك القيم موضحة (جدول 11) و (الشكل 42).

من بين المستخلصات التي تم إختبارها، المستخلص البيتانولي الذي تأكد فيه وجود مركبات نشطة نذكر منها: 23 parthenolid-9-one، 26 8 α ,9 α -epoxyparthenolide، 9 α -hydroxyparthenolide، 24 aglycones و flavonol glycosides وهي موجودة في نبات النقد [19].



الشكل 43: يمثل منحنى يتمثل النشاط الكلي لمضادات الأكسدة لمختلفة مستخلصات أزهار نبات النقد.

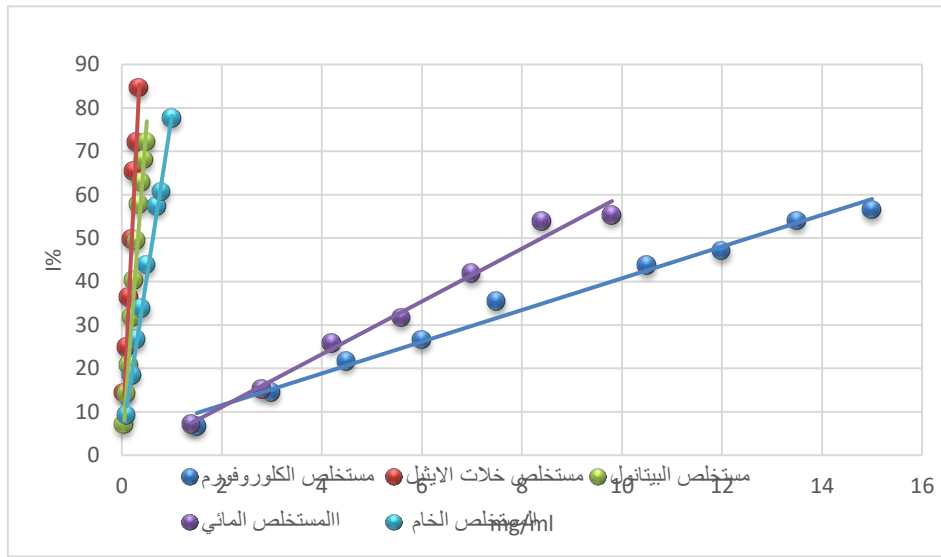
في دراسة الفعالية المضادة للجذور نفترض أن مستخلصات نبات النقد التي درست قد تكون مصدرًا محتملاً لمضادات الأكسدة الطبيعية. وقد أكدت النتائج التي لوحظت في إختبارات مضادات الأكسدة هذه الفرضية. لاحظنا أن هذه المستخلصات يمكن أن تثبط الجذور المستقرة لـ DPPH^{\bullet} . حيث أظهرت أغلب هذه المستخلصات فعالية معتبرة مشابهة إلى حد كبير أو حتى أفضل من بعض مضادات الأكسدة المرجعية.

النسب المئوية لتثبيط الجذر (%I) لكل مستخلص بالتراكيز المختلفة مدرجة في (الشكل 43). والقيم IC_{50} (تركيز مضادات الأكسدة اللازمة لتثبيط 50% من الجذور الحرة) تكشف النشاط المضاد للجذور الحرة لمستخلصات أزهار نبات النقد.

تُستخدم قيم IC_{50} الواردة في (الشكل 44) لتقييم والمقارنة فعالية المستخلصات، حيث أنه كلما انخفضت قيمة IC_{50} ، زادت فعالية المستخلص ضد الجذور الحرة. وهكذا فقد وجدنا ان المستخلصات الأكثر غنى بالمركبات الفينولية هي الأكثر نشاطاً.

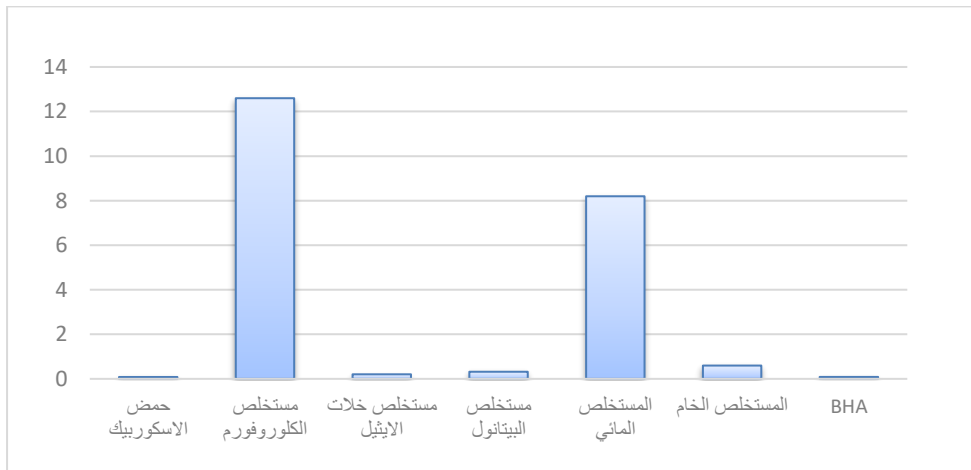
يكشف النشاط المضاد للجذور الحرة الذي حصلنا عليه أن المستخلصات المختبرة لها نشاط

يعتمد على التركيز. حيث تشير وجود مرحلة ثابتة إلى إرجاع شبه كامل لجذور DPPH^{\bullet} .



الشكل 44: يمثل الفعالية المضادة للجذور الحرة (لاختبار DPPH) لمستخلصات أزهار نبات النقد.

من خلال النتائج نجد افضل فعالية تثبيطية للجذور الحرة كانت من قبل مستخلص خلات الإيثيل ومستخلص البيتانول بنفس قيمة $IC_{50} = 0.31 \pm 0.004$ mg/ml والأقل نشاطا كان لمستخلص الكلوروفورم بقيمة $12,60 \pm 0,164$ mg/ml .



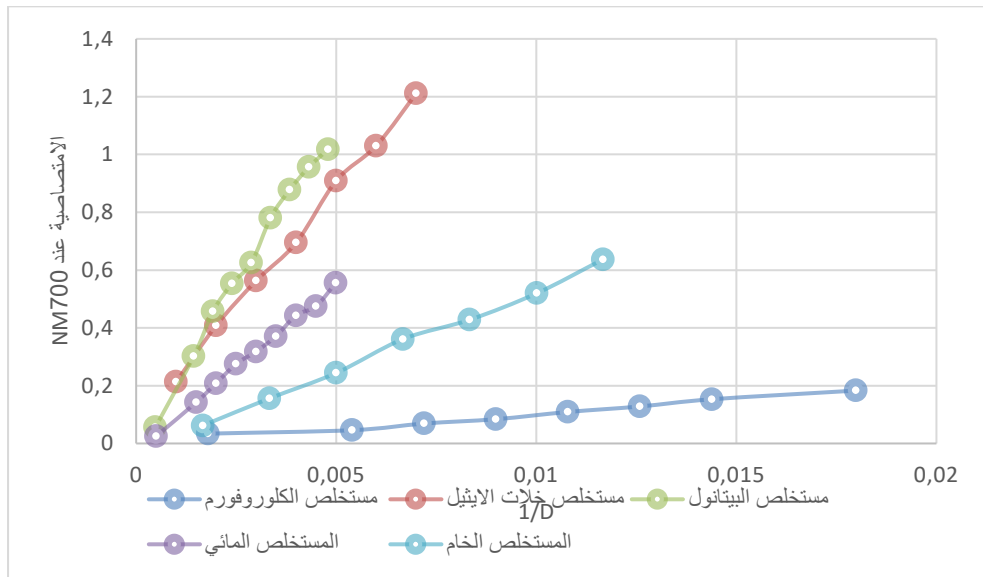
الشكل 45: يمثل نتائج IC_{50} (معبراً عنها mg/ml) لتثبيط DPPH لمختلف مستخلصات أزهار نبات النقد.

وهذه النتائج التي حصل عليها الباحث حمادة ومرافقوه [119]. والذي أظهر أن المستخلص خلات الإيثيل من الجزء الهوائي لنبات النقد له أفضل فعالية لتثبيط الجذر الحر DPPH.

إختبار القدرة الإرجاعية هو قدرة مضادات للأوكسدة على إعطاء إلكترون بإستخدام - طريقة إرجاع مركب فيروسيانيد البوتاسيوم ($FeCN_6$) وذلك بإرجاع الحديد الثلاثي (Fe^{+3}) إلى الحديد الثنائي (Fe^{+2}) عن طريق منحه إلكترونات [120]. نلاحظ من خلال (الشكل 45) ان القوة الإرجاعية لجميع المستخلصات المدروسة تزداد مع زيادة تراكيزها. ونعبر عن هذه القوة بقيم AEAC المدونة في (الجدول 11).

تشير قيم AEAC لإختبار القدرة الإرجاعية للحديد إلى أن أكبر قيمة لها توافق أعلى فعالية إرجاعية.

حيث سجلنا المستخلص البيتانولي النشاط إرجاعي الأعلى بقيمة 358.58 ± 12.55 Mm يليه مستخلص خلات الإيثيل بقيمة 296.93 ± 8.14 Mm. ونلاحظ أن جميع المستخلصات قد اظهرت قدرة إرجاعية ولكن ليس بنفس المستوى. ومنه نرتب المستخلصات من حيث القدرة الإرجاعية المتناقصة على النحو التالي: المستخلص البيتانولي، مستخلص خلات الإيثيل، المستخلص الخام، المستخلص المائي فالكوروفورمي. كما نلاحظ أيضا أن جميع المستخلصات لها فاعلية إرجاعية أفضل من الشواهد BHA وBHT.



الشكل 46: يمثل منحنى القدرة الإرجاعية للمستخلصات المختلفة لأزهار نبات النقد.

وفرة الفينولات في العديد من النباتات الطبية جعلها تمتلك أعلى قدرة إرجاعية وهو ما جعل مستخلصاتها ذات مساهمة في منح الإلكترونات. تشير النتائج المتحصل عليها أن المستخلصات المدروسة تحتوي على مركبات قادرة على منح إلكترونات.

ومنه تظهر نتائج دراسات سابقة أن قوة الإرجاعية للنباتات الطبية تقي من امراض الكبد من خلال تثبيط أو التفاعل من أكسدة الوسائط الداخلة في عملية فوق أكسدة الليبيدات البيروكسيدات الليبيدية،

وبالتالي فهي بمثابة مواد المضادة للأكسدة الإبتدائية والثانوية، و بالتالي تثبط من تشكل البيروكسيدات الليبيدية [121].

6.3-2. طرق تحديد النشاط المضاد للبكتريا لأزهار نبات النقد:

نقيم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات نبات النقد بواسطة ثلاث سلالات مسببات الأمراض ملخصة في (الجدول 10) وقد حصلنا على الكائنات الحية الدقيقة من مخبر الاستنبات بمعهد باستور بالجزائر العاصمة عن طريق مخبر البكتريا في مستشفى محمد بوضياف وتم اختبار هذه الفعالية بنفس بمخبر البكتريا لمستشفى محمد بوضياف ورقلة.

الجدول 10: الوصف والأمراض التي تسببها السلالات المختبرة.

السلالات البكتيرية المختبرة	الوصف	المرجع	أماكن تواجدها	الأمراض المسببة لها
<i>Escherichia coli</i>	Gram(-)	ATCC 25922	-مادة البراز -الغذاء الملوث -المخلفات	- التهابات المسالك البولية -جروح -تسمم الدم
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	ATCC 25923	-البلعوم الأنفي - الغبار والهواء -الغذاء الملوث	- التهابات الجلد والجروح والحروق والخراجات - التهاب نخاع العظم -التهاب داخلي بالقلب -تسمم الدم - التهابات الرئة -تسمم غذائي
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram (-)	ATCC 27853	- التربة والمياه والنباتات - المسالك التنفسية -براز - تلاجيات - الاجهزة الصحية	التهابات الجهاز التنفسي - الالتهابات الرئوية والبولية -الحروق -جروح -تسمم الدم

إستعملنا طريقة الأقراس لتحديد النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات النباتية، أي طريقة الإنتشار في وسط صلب، هذه الطريقة تبين مدى فعالية المستخلصات النباتية ضد البكتيريا نحضر المعلق البكتيري بالقراءة على جهاز السبكتروفطومتر عند طول موجة $\lambda = 620 \text{ nm}$ عند القيمة 0.5 McFarland التي توافق مجال التركيز (10^7 - 10^8 بكتيريا/مل)، ملاحظة: اذا كانت القراءة على الجهاز اكبر من 0.5 McFarland اي لا توافق هذه القيمة نقوم بإضافة الماء المقطر للمعلق البكتيري، اما اذا كانت القيمة اقل من 0.5 McFarland نضيف بعض المستعمرات البكتيرية ونرج المعلق ثم نعيد القراءة من جديد.

نضع 100 μL من المعلق البكتيري والمحضر سابقا وننشره في طبق بيتري على وسط (Mueller Hinton MH).

نحضر أقراس معقمة (القطر 6 مم، من ورق واتمان Watman N°3) وتبلل بـ 10 μL من

المستخلص والمستخلصات الكحولية المخففة بـ DMSO (توضع داخل علبه بتري على سطح وسط الزرع المحتوى على البكتيريا المختبرة).
 ✓ إنتشار المادة المستخلصة في الوسط تمنع نمو البكتيريا حول القرص.
 ✓ في حالة وجود منع لنمو البكتيريا تظهر هالة (حلقة) حول القرص منطقة التثبيط.
 ✓ قراءة النتائج تكون بعد وضع علب بتري في الحاضنة تحت درجة حرارة 32°م لمدة 24 ساعة.
 لمواجهة مشاكل المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية الإصطناعية، انجزت العديد من الأعمال حول قوة مضادات الميكروبات من المنتجات الطبيعية المستخرجة من النباتات.
 إهتمنا في هذه الدراسة بفحص تأثير مستخلصات أزهار نبات النقد ضد بعض السلالات البكتيرية بواسطة طريقة الإنتشار على القرص التقنية المستخدمة لتحديد نشاط المستخلصات المضادة للميكروبات. هذه التقنية الأسهل و الأسرع إستخداما لتقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات الخام [122].

(الجدول 11) يعرض أقطار منطقة التثبيط لنمو السلالات البكتيرية المختبرة، لاحظنا أن السلالة البكتيرية حساسية مختلفة ضد المستخلصات المختبرة حيث تصل أكبر منطقة تثبيط لـ 31 ملم ما يوضح حساسية المستخلصات.

الجدول 11: أقطار مناطق التثبيط لمستخلصات أزهار نبات النقد والمضادات الحيوية.

التركيز المختلفة للمستخلصات 500 ml/mg					نوع المستخلص او المضاد الحيوي	السلالات البكتيرية المختبرة
1/16	1/8	¼	½	1	قطر التثبيط (mm)	
6±00	7.66±00	9.66±00	12.33±00	14±00	الكلوروفورم	E.coli
6±00	7±00	7.66±00	10±00	11.33±00	خلات الايثيل	
6±00	6±00	8±00	9.66±00	11.33±00	البيتانول	
6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	الخام	
		28±00			Gentamicin 10µg	
		29±00			Amicacin 30µg	
		32±00			Chloramphenicol 30µg	
12.66±00	17±00	22.33±00	27±0.02	31±00	الكلوروفورم	
10±00	10.66±00	12.66±00	15.66±00	17.66±00	خلات الايثيل	
6±00	6±00	7.66±00	9±00	11±00	البيتانول	
6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	الخام	S.aureus
		28±00			Gentamicin 10µg	
		24.66±00			Amicacin 30µg	
		25.33±00			Chloramphenicol 30µg	
6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	الكلوروفورم	
6±00	6±00	7±00	8.33±00	11±00	خلات الايثيل	
6±00	6±00	6±00	7.33±00	9.33±00	البيتانول	
6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	الخام	
		25±00			Gentamicin 10µg	
		26±00			Amicacin 30µg	
		23.33±00			Ticarcillin+Clavulanic acid 75µg/10µg	
		24±00			Ceftazidime 30µg:	p. aeruginosa

ظهور قطر قرص 6mm يعني عدم وجود منطقة تثبيط

نقيم النشاط المضاد للبكتيريا بطريقة الإنتشار على القرص في وسط صلب. يكون تقييم هذا النشاط بقياس أقطار منطقة التثبيط لثلاث سلالات من البكتيريا الممرضة. وقد أظهرت النتائج أن نشاطا

مضاد للبكتريا ملحوظاً لبعض مستخلصات أزهار نبات النقد (الجدول 11)، وعلى وجه التحديد فإن النشاط المضاد للبكتريا الأكثر أهمية كان لمستخلص الكلوروفورم. ضد السلالتين: *Staphylococcus aureus* و *coli Escherichia* مع منطقة تثبيط قطر ها 20 و 17 ملم على التوالي. هذه الطريقة أظهرت أن جميع المستخلصات (سواء المستخلصات المائية ومستخلصات المذيبات) لها نشاطاً ضد البكتيريا المختبرة، مما يشير إلى أن النباتات الطبية يمكن أن تكون بديلاً مهماً في التحكم في نمو البكتيريا. تتفق هذه النتيجة مع اعمال الباحث Tekwu ومعاونوه [123]. وكذا جلولي ومعاونوه [124]، اللذين ذكرا أن المستخلص الكلوروفورمي لنبات *A. radiata* هو الأكثر فعالية يليه خلاص الإيثيل ثم مستخلص البوتانول. ولقد ذكر أن المركب السييسكويتريني اللاكتوني المعروف بـ 9α-hydroxyparthenolide المعزول من نبات.

A. radiata بتركيز 50µg و 100 على قرص ، منع نمو السلالات البكتيرية التالية :

Bacillus cereus (IPL 58605), *Streptococcus C* (IPT 2-035)

, *Proteus vulgaris* (CIP 58605); *Enterococcus faecalis* (CIP 103214), *Escherichia coli*

(CIP 54127) و *Pseudomonas aeruginosa* (CIP A 22).

كما أظهرت بعض المستخلصات نشاطاً ضعيفاً مضاداً للجراثيم وهو ما اثبته الباحث الحسني ومعاونوه [23].

في العقود الماضية، كان هناك إهتمام خاص باستخدام مضادات الميكروبات الوفيرة ذات المصدر الطبيعي (الأعشاب والتوابل والنباتات).

إن النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات النباتية كان محل عدد معتبر من المذشورات العالمية [125-129]. التي أثبتت نشاطها القوي على الفطريات الخيطية مقارنة بتلك التي تمارسها البكتريا والخمائر.

من ناحية أخرى، أظهرت العديد من الدراسات الحساسية العالية للبكتريا موجبة الغرام مقارنة بسالبة الغرام ومع ذلك أظهرت بعض الدراسات عدم وجود نشاط إنتقائي مضاد للميكروبات أوللبكتريا لذا تؤكد النتائج المحصل عليها مرة أخرى فعالية المستخلصات النباتية الطبيعية وقوتها المضادة للبكتريا.

وقد ذكر بأن المركبات الفينولية تستهدف أغلفة الكائنات الحية الدقيقة مثل الغشاء والجدار السيتوبلازمي وهي مرتبطة بمجموعة الهيدروكسيل الحرة التي تسمح بإذابة جيدة في الوسط المتواجدة به.

من ناحية أخرى أظهرت الدراسة التي قام بها Rhayour ومعاونوه [130]. إن المستخلصات الخام والمركبات الفينولية في الغالب وجودها منفردة كانت أو مرتبطة بالمضادات الحيوية تهاجم البكتريا بشكل مباشر عن طريق ربط نفسها بغلاف الخلية، مما يؤدي إلى إختلال نفاذية الغشاء. وقد بينت هذه النتائج كفاءة مستخلصات أزهار نبات النقد وتدعم بالتالي بالنتائج التي نشرها الباحث الحسني ومعاونوه [23].

يعتمد هذا النشاط البيولوجي للمستخلصات النباتية الخام على محتوياتها من عديدات الفينولات. بالإضافة إلى ذلك يتم شرح آليات عمل هذه المركبات الطبيعية بطرق مختلفة [131]. يرتبط النشاط البيولوجي للمكونات بقطبيتها، حيث تعتبر المركبات الأقل قطبية مثل المركبات الفلافونيدية التي تحتوي على مجموعة هيدروكسيل وحيدة OH على الحلقة B أكثر نشاطا ضد العوامل الميكروبية من تلك التي تحمل أكثر من مجموعة هيدروكسيل، على العكس فإن الباحث MORI ومعاونوه [132]، يبين أيضا أن تأثير المستخلصات ربما يرجع إلى وجود عدة مكونات متأزرة فيما بينها والتي تصبح غير نشطة عند فصلها، من خلال هذه المعطيات يتبين أن مستخلصات النباتات تنتج مجموعة واسعة ومتنوعة بكميات ضئيلة من المضادات الحيوية ذات هياكل متنوعة كالتربينات والجليكوزيدات وعديدات الفينولات [133].

ومع ذلك فإن معظم الجزيئات المعزولة من المستخلصات النباتية لها نشاط مضاد حيوي منخفض مقارنة بالمضادات الحيوية الشائعة التي تنتجها البكتريا والفطريات. وإذا ما عدنا إلى الدراسة التي أنجزها الباحث Moussaid ومعاونوه [134] فإن نشاط المستخلص مرتبط بظروف التجفيف والطحن، كما ينصح بطحن النبات بالأزوت، لأن الطحن اصل في توليد الحرارة المسؤولة عن فقدان الجزيئات الطيارة وكذلك في تحلل وأكسدة الجزيئات الحرارية [135].

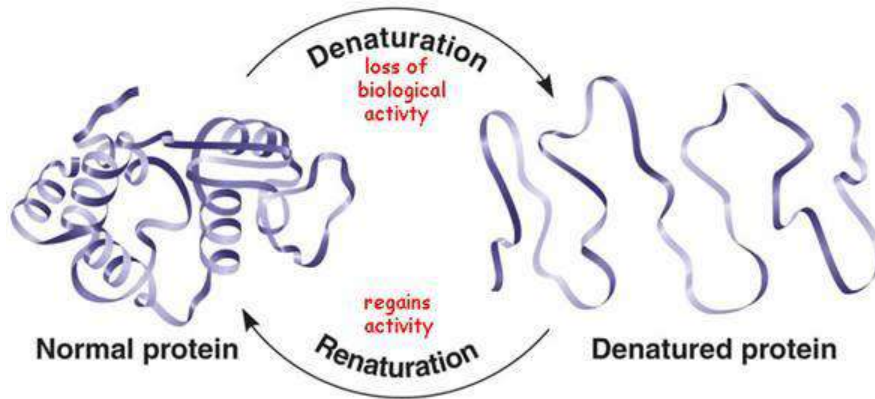
3.6.3. طرق تحديد الفعالية المضاد للإلتهاب لأزهار نبات النقد:

الإلتهاب هو آلية فسيولوجية للدفاع عن الكائن الحي ضد مسببات الأمراض. ومع ذلك يمكن أن يكون لها آثار سلبية إذا لم يتم تنظيمها. ويرافقه إنتاج العديد من مركبات وسيطية مثل: Cytokines، Prostaglandines و Leucotriènes [136]. بالإضافة إلى ذلك يمكن للخلايا الإلتهابية إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) التي يمكن أن تؤدي إلى تفاعلات الأكسدة السامة، مما يؤدي إلى تلف الأنسجة [137].

وقد يكون الإلتهاب حاداً أو مزمناً. الأول هو إستجابة فورية لمدة قصيرة، وعادة ما تختفي تلقائياً أو مع العلاج. ومع ذلك يمكن أن يتطور إلى إلتهاب مزمن و يمكن ربط ذلك بالعديد من الأمراض المسبب له [136, 138].

الأدوية المضادة للالتهابات غير الستيرويدية لها آثار جانبية مثل آفات الجهاز الهضمي والتهيج، والسمية الكلوية وإستخدام الأفيونيات المقلدة للألم الشديد من آثارها الجانبية الضارة: الإكتئاب التنفسي وتخذر الاطراف... الخ [139].

وقد أجريت هذه الدراسة لتقييم التأثير المحتمل المضاد للالتهابات في المختبر لمستخلصات أزهار النقد ضد تمسخ البروتين (الشكل 46) الاختبارات تم اجراءها في المخابر البيداعوجية لقسم الكيمياء.



الشكل 47: يمثل آلية التمسح.

تقييم الفعالية المضاد للالتهابات للمستخلصات المختلفة لأزهار نبات النقد باستخدام إختبارين لهذا الغرض هي:

- طريقة تمسخ بروتين زلال البيض.

- طريقة تمسخ الألبومين البقري BSA .

3-6.3. 1. طريقة تمسخ بروتين زلال البيض:

يتكون خليط التفاعل من 5 مل حيث 0.2 مل من بياض البيض (بيض دجاج طازج) و0.2 مل من محلول موقى فوسفاتي ملحي (PH= 6.4 PBS) و2 مل من المستخلصات مختلفة لأزهار نبات النقد. نستخدم كعينة إختبار نفس الحجم من الماء المقطر بمثابة شاهد. بعد ذلك نحضن الخليط عند 37 °م مدة 15 دقيقة ثم نقوم بتسخينه عند 70°م لمدة 5 دقائق. بعد التبريد نقياس الإمتصاصية عند 600nm. نستخدم مركب ديكلوفيناك الصوديوم كدواء مرجعي، بالتركيز التالية: (0.625، 0.315، 2.5، 1.25، 5، 10) mg/ml. ونحسب نسب تثبيط تمسخ بروتين البيض وهو مؤشر للنشاط المضاد للالتهاب بالعلاقة [140]:

$$\text{نسبة تثبيط التمسح \%} = 100 \times \left(\frac{Ac - At}{Ac} \right)$$

حيث

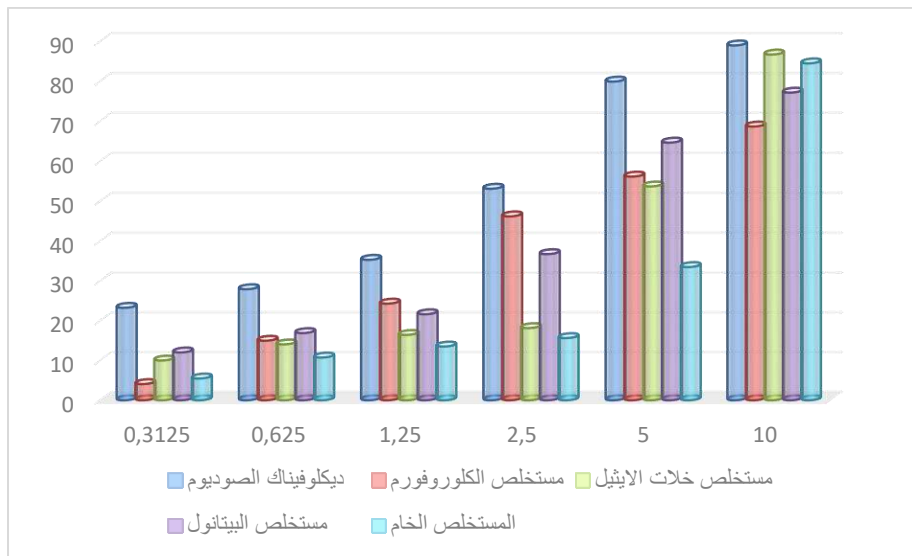
 A_c : إمتصاصية الشاهد (المذيب) A_t : إمتصاصية العينة.

يوضح (الجدول 13) و(الشكل 47) نتائج النشاط المضاد للالتهابات ازهار نبات النقد المنجزة في المخبر، والذي يتكون من قيم النسب المئوية لتنشيط تمسخ الزلال البيض. وفقاً للنتائج تمت دراسة بمقارنة معدل تنشيط تمسخ البروتين بين العقار القياسي المضاد للالتهابات (Diclofenac) والمستخلصات النباتية المختلفة. وتم التسجيل بأن المستخلص الكلوروفورمي اقل تنشيطاً للتمسخ حيث كانت نسبة التنشيط تقدر بـ $4,07\% \pm 0.007$ عند تركيز $0,3125\text{mg/ml}$. في حين كان الدواء القياسي أعلى فعالية عند نفس التركيز حيث بلغت نسبة التنشيط $23,27\% \pm 0.05$. ووفقاً لهذه للنتائج فقد سجلنا أقصى معدل تنشيط لمستخلص خلات الايثيل بتركيز 10 mg يليه المستخلص الخام فالبيتانولي ثم المستخلص الكلوروفورمي.

الجدول 12: تأثير مستخلصات أزهار نبات النقد وديكلوفيناك الصوديوم على عملية تمسخ بروتين البيض الناجم عن الحرارة في المختبر.

التركيز mg/ml	ديكلوفيناك الصوديوم	مستخلص الكلوروفورم	مستخلص خلات الايثيل	مستخلص البيتانول	المستخلص الخام
0,3125	$23,27 \pm 0.05$	$4,07 \pm 0.007$	$10,00 \pm 0.007$	$12,03 \pm 0.06$	$5,48 \pm 0.03$
0,625	$27,94 \pm 0.03$	$14,98 \pm 0.05$	$14,06 \pm 0.01$	$16,90 \pm 0.03$	$10,75 \pm 0.07$
1,25	$35,31 \pm 0.07$	$24,32 \pm 0.05$	$16,44 \pm 0.01$	$21,64 \pm 0.04$	$13,52 \pm 0.09$
2,5	$53,11 \pm 0.02$	$46,19 \pm 0.1$	$18,15 \pm 0.02$	$36,74 \pm 0.1$	$15,65 \pm 0.08$
5	$79,95 \pm 0.05$	$56,15 \pm 0.07$	$53,69 \pm 0.01$	$64,66 \pm 0.08$	$33,50 \pm 0.16$
10	$89,00 \pm 0.05$	$68,69 \pm 0.09$	$86,71 \pm 0.00$	$77,18 \pm 0.02$	$84,51 \pm 0.10$

يتم التعبير عن النتائج بمتوسط 6 قيم \pm الانحراف المعياري



الشكل 48: يمثل النسبة المئوية لتنشيط مستخلصات أزهار نبات النقد لتمسخ زلال البيض.

من هذه النتائج يمكن الإستنتاج أن المستخلصات يمكن اعتمادها كعوامل مثبتة للالتهابات.

3.6-3. ب. طريقة تمسخ الألبومين البقري (BSA):

طريقة ثانية لتقييم النشاط المضاد للالتهاب لمستخلصات أزهار نبات النقد، الذي أجريناه باستخدام المصل الزلالي البقري (BSA) بطريقة Kariawasam ومعاونه [140, 141].

حيث نمزج 0.05 مل من تراكيز مختلفة للمستخلصات أو الدواء المرجعي ديكلوفيناك الصوديوم بالتراكيز التالية: 0.315، 0.625، 1.25، 2.5، 5، 10) و 0.45 مل من الألبومين البقري بتركيز 1% (v/w)، حضنت العينة عند 37 م° مدة 20 دقيقة ثم تسخينها مدة 5 دقائق عند 70 م°. بعد تبريد العينات، نضيف 2.5 مل من محلول موقى فوسفاتي ملحي ونقيس الإمتصاصية عند $\lambda = 660 \text{ nm}$. و نحسب نسبة التثبيط لتمسخ الألبومين على النحو التالي:

$$100 \times \frac{A_c - A_t}{A_c} = \% \text{ التثبيط}$$

حيث:

A_c : امتصاصية الشاهد

A_t : امتصاصية العينة.

A_t : امتصاصية العينة.

يوضح (الجدول 13) و(الشكل 48) نتائج النشاط المضاد للالتهابات أزهار نبات النقد المنجزة في المخبر، والذي يتكون من قيم النسب المئوية لتثبيط تمسخ المصل البقري (BSA). وفقا للنتائج المحصل عليها، اجرينا مقارنة معدل تثبيط تمسخ BSA بين الدواء القياسي المضاد للالتهابات (Diclofenac) والمستخلصات النباتية المختلفة لازهار نبات النقد مع التراكيز المختلفة.

الجدول 13: تأثير مستخلصات أزهار نبات النقد وديكلوفيناك الصوديوم على عملية تمسخ المصل البقري BSA الناجم عن الحرارة في المختبر.

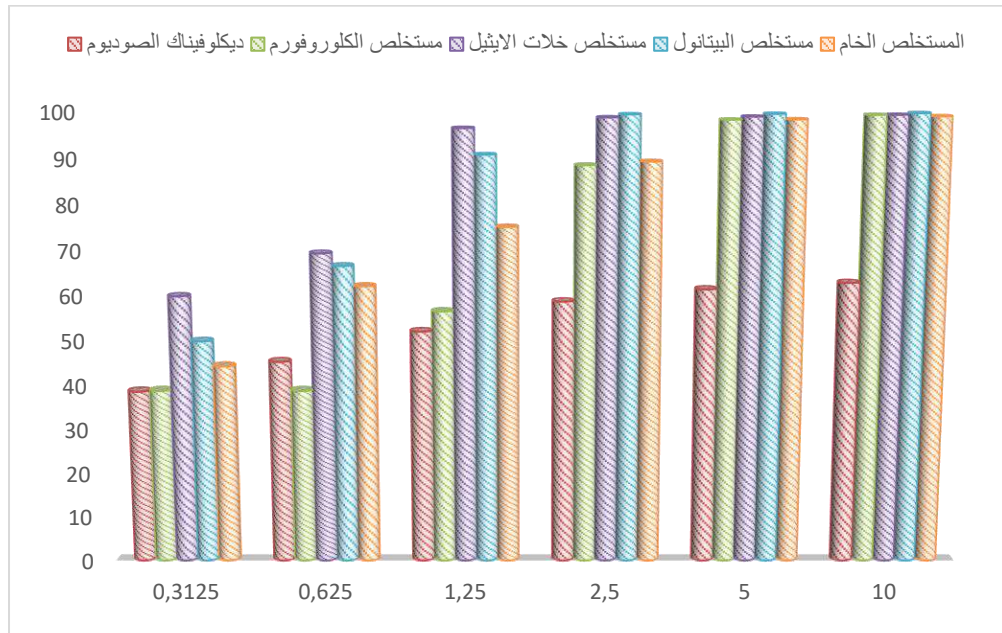
المستخلص الخام	مستخلص البيتانول	مستخلص خلاص الايثيل	مستخلص الكلوروفورم	ديكلوفيناك الصوديوم	التركيز mg/ml
50±0.00	50±0.00	60±0.00	38,88±0.09	38,73±0.021	0,3125
66,6±0.00	66,6±0.00	69,44±0.04	38,88±0.09	45,41±0.016	0,625
90,88±0.02	90,88±0.02	96,57±0.01	56,66±0.05	52,17±0.037	1,25
99,52±0.01	99,52±0.01	98,87±0.01	88,62±0.01	58,84±0.02	2,5
99,62±0.09	99,62±0.09	99,02±0.008	98,38±0.01	61,54±0.00	5
99,78±0.00	99,78±0.00	99,41±0.005	99,40±0.005	62,96±0.00	10

يتم التعبير عن النتائج بمتوسط 6 قيم ± الانحراف المعياري

أقصى معدل تثبيط كان بنسبة 99% عند تركيز 5 mg/ml لجميع المستخلصات بينما الدواء القياسي كانت قيمة نسبة تثبيط التمسح 61,54% لنفس التركيز.

كما نلاحظ ان كلا من مستخلصات خلاص الايثيل، البيتانول والخام لأزهار نبات النقد قد بلغت أقصاها إبتداء من التركيز 1.25mg/ml، ولم يعد من جدوى لزيادة تركيز المستخلصات لمعرفة مدى تعلق الفعالية بالتركيز.

وهكذا تشير النتائج أن مستخلصات أزهار نبات النقد تعتبر عاملا مضادا للإلتهابات. وقد كشف لنا هذا التحليل أن المستخلصات النباتية قادرة على التحكم في إنتاج المضادات الذاتية وتمنع تمسخ البروتين خاصة تمسخ الألبومين [16]، وهي نقطة هامة في افاق الابحاث العلمية بهذا المجال.



الشكل 49: يمثل النسبة المئوية لتثبيط مستخلصات أزهار نبات النقد لتمسخ BAS.

يعد تمسخ البروتين أحد اسباب الإلتهابات، يكون إنتاج مضادات ذاتية في الأمراض الإلتهابية ناتجا عن تمسخ البروتينات في الجسم الحي، وتتمثل الألية المحتملة للتمسخ في تغير الروابط الكهروسستاتيكية، الهيدروجينية، الكارهة للماء و الكبريتيد التي تحافظ على البنية ثلاثية الأبعاد للبروتينات [142]. أثبتت دراسة الباحث Boulahfa ومعاونوه [143]. أن العقاقير غير الستيرويدية المضادة للإلتهابات (NSAIDs)، والمستعملة كدواء شائع للتحكم في الحالات الإلتهابية. والتي لها العديد من الآثار الضارة خاصة تهيجات المعدة مثل قرحة المعدة [143]. وبالتالي يمكن التفكير بجديّة في استبدال هذه بتلك شريطة استكمال الاحاطة بالجوانب المختلفة لذلك.

**الفصل الرابع: الدراسة الكيميائية
لمستخلصات أزهار نبات النقد**

5. الدراسة الكيميائية لمستخلصات ازهار نبات النقد:**1.5- طرق التحليل الكروماتوغرافي:**

تعتبر الكروماتوغرافيا طريقة للفصل والكشف، تنقية مكونات خليط ما، وكلمة Chroma معناها باللغة اللاتينية لون، وقد نشأت هذه الفكرة على يد العالم Twett سنة 1903 وذلك لفصل المواد الملونة في الازهار والأوراق، ليتسع مجال استعمالها ويمتد إلى المواد غير الملونة سواء الصلبة أو السائلة أو الغازية [144].

كما يمكن اعتبارها طريقة فيزيائية تستعمل أساسا للفصل، أو هي طريقة تحليلية وتحضيرية لفصل المركبات أو الخلائط. وتعتمد جميعها على توزيع المادة المدروسة على طورين، أحدهما ثابت والآخر متحرك. فالطور الثابت اما صلبا أو سائلا محملا على دعامة ثابتة، أما الطور المتحرك يكون سائلا عضويا [144].

ولغرض فصل مستخلصات ازهار نبات النقد استخدمنا عدة طرق كروماتوغرافية تقليدية:

- كروماتوغرافيا العمود (CC)

- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) التحليلية و التحضيرية.

1.5-1. كروماتوغرافيا العمود (CC):

الاعدة المفتوحة من السيليكا جل Silice 60(230-400) او متعدد الأميد SC-6 وتستخدم في الخطوة الاولى والثانية للتجزئة fractionment لمستخلصات الكلوروفورم و خلات الايثيل ويشار هنا الى ان حجم الاعدة، كمية وطبيعة الطور الصلب، تدفق الطور المتحرك وحجم الكسر يتم جميعا تكييفها مع كمية وطبيعة (المستخلص والكسر) للعينات المراد فصلها.

ونشير هنا الى ان اختيار شروط التمليص ومتابعة الفصل والتجميع النهائي للكسور يتم بناء على اختبارات (CCM).

1.5-2. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية CCM:

تقنية CCM عن طريق طبقة رقيقة بسمك 0.2 مم من سيليكا جل على ورق الامنيوم اوزجاج. بعد التمليص في مذيب محدد واعتمادا على الحالات، يتم الكشف عن المركبات في الكروماتوغرام بواسطة مصباح الأشعة فوق البنفسجية 365nm و/ أو 254nm ثم بواسطة كواشف مستظهرة كحمض الكبريت H₂SO₄ محلول انيزالدهيد anisaldehyde او حمض الساليسيليك. ثم تسخن الكروماتوغرامات بتلك الكواشف الى حين ظهور ألوان البقع المختلفة.

3-1.5. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية CCMpréparative:

هي تقنية سهلة وسريعة، تستخدم بهدف الفصل والتنقية لمختلف الخلائط التي تحتوي على عدد قليل من المركبات، تعتمد على مبدأ الإمتزاز على سطح الدعامة الثابتة) سيليكاجال أو متعدد الأמיד وهي عبارة عن صفائح مصنوعة من الألمنيوم أو البلاستيك أو الزجاج، مربعة الشكل ذات أبعاد 20 x 20 سم، منها ما يباع جاهزا للاستعمال مباشرة ومنها ما يحضر في المخابر. عمليا تنجز بإستعمال ماصة شعرية توضع خط من الخليط المراد فصل مكوناته على بعد 1.5 سم من حافة الصفيحة، تغمس هذه الأخيرة في وعاء يحتوي على المملص المناسب، أثناء هجرته إلى الأعلى ومرورا بالخط يلاحظ تحرر مكونات الخليط في شكل حزم التي تحدد بواسطة مصباح UV تكشف هذه الحزم كلا على حدا، يتم إذابتها في مذيب مناسب ثم ترشح في قمع زجاجي للتخلص من الدعامة الثابتة، بعدها يركز الراشح وتجرى له فحوص متعددة للتأكد من نقاوته.

2.5- الطرق الفيزياء-كيميائية للمركبات النقية:

لقد اعتمدنا في تحديد بنى المركبات النقية المفصولة على طرق التحليل الفيزيائية-الكيميائية حيث تعد كل من مطيافية الرنين المغناطيس احادية البعد (RMN^1H و $RMN^{13}C$) وثنائية البعد (HSBC، HMBC، COSY) من اهم التقنيات.

3.5-الدراسة الكروماتوغرافيا لمستخلصات ازهار نبات النقد:

أضع مستخلصي ازهار نبات النقد: مستخلص الكلوروفورم ومستخلص خلائ الايثيل والتي كشفنا عن أنشطتها البيولوجية إلى تجزيئات متعاقبة بواسطة الطرق الكروماتوغرافية المختلفة مما سمح بفصل وعزل مركبات نقية.

بالنسبة لجميع المستخلصات، اجرينا التحليل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية بواسطة طور الثابت والطور المتحرك المناسبين الذين من شأنهما أن يعطيا أفضل النتائج. أدت نتائج عملنا التحليلي إلى اختيار مستخلص الكلوروفورم وخلائ الايثيل بسبب ثرائهما.

3.5- 1. فصل مستخلص الكلوروفورم:**3.5- 1.أ. باستخدام كروماتوغرافيا العمود (CC):**

تمت عملية الفصل الاولى لمستخلص كتلته 13.4 غ بواسطة تقنية وميض كروماتوغرافي حيث استعملنا عمودا طوله 60 سم وقطره 4 سم عبئ العمود على إرتفاع 23 سم بـ 360 غ من السيليكاجل Silicagel type 60, 230-400mech. يضاف مستخلص الكلوروفورم في صورة مسحوق مدمص على السيليكاجل. تجرى عملية التمليص بواسطة المذيب الهكسان وتم اغناؤه بالكلوروفورم ثم بخلائ الايثيل ثم الاسيتون واخيرا بالميثانول.

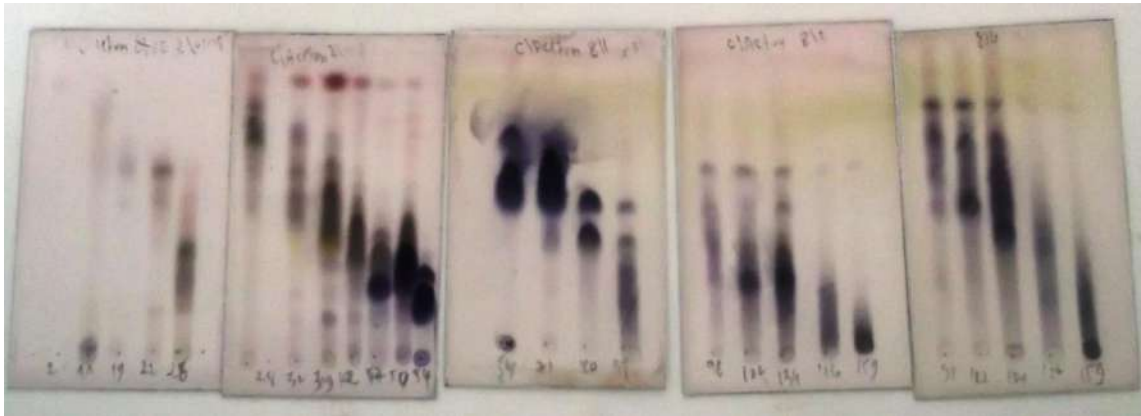
للكشف عن كروماتوغرامات مختلف الكسور على الطبقة الرقيقة من السيليكا جل بالاستعانة بمصباح الأشعة فوق البنفسجية 365nm و 254nm واستظهارها بعد الغمس في كاشف الانزالدهيد anisaldehyde بعد تسخينها عند 100م°، يتم تجميع الكسور المتماثلة والاكتفاء بـ 13 كسر و(الجدول 15) يوضح تتابع تمليص هذا العمود.

الجدول 14: تتابع تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص الكلوروفورم لازهار نبات النقد.

الملاحظات	السلسلة	اسيتون	خلاتالايثيل%	الكلوروفورم%	الهكسان%	الكسر
0.05mg	(10-1)A	00	00	00	100	3-1
		00	00	50	50	11-4
0.05mg	(18-11)B	00	00	100	00	15-12
		00	05	95	00	49-16
1.230mg	(27-19) C	00	05	95	00	
0.456mg	(31-28) D	00	05	95	00	
0.123mg	(38-32) E	00	05	95	00	
		00	05	95	00	
0.6095mg	(46-39) F	00	05	95	00	
0.532mg	(53-47) G	00	16	84	00	61-50
2000mg	(70-54)H	00	20	80	00	67-62
وجود مركب اعظمي اثر من خليط معقد	(79-71) I	00	25	75	00	73-68
		00	30	70	00	79-74
1.5799mg خليط من عدة مركبات	(97-80) J	00	35	65	00	85-80
		00	40	60	00	91-86
		00	55	45	00	97-92
1.389mg	(135-98) K	00	50	50	00	103-98
اثر قليلة		00	45	55	00	109-104
		00	40	60	00	115-110
		00	35	65	00	121-116
		00	30	70	00	126-122
		00	25	75	00	133-127
1.600mg	(157-136) L	00	20	80	00	139-134
لا اثر		00	90	10	00	145-140
		00	100	00	00	151-146
		02	98	00	00	157-152
mg 2.6789	(158-180) M	04	96	00	00	162-158
تشكل اسب		10	90	00	00	169-163
		20	80	00	00	174-170
		50	50	00	00	177-176
		100		00	00	180-178

ويمكن توضيح تتابع عملية تمليص العمود من خلال الكروماتوغرامات الطبقة الرقيقة الموضحة في الشرائح بعد استظهارها بالكاشف anisaldéhyde (الشكل 49) حيث تدل هذه الألوان على وجود لاكتونات سيسكويترپينية.

بمعالم بنيوية مختلفة و من مميزات اللاكتونات السيسكوترپينية أنها ذات قطبية متقاربة، مما يعقد عملية فصلها إلى مكونات نقية، مما يستدعي عمليات فصل متتالية بأنظمة مختلفة ومتعددة. أظهرت التحاليل الكروماتوغرافية وجود عدة مركبات موزعة على عدة كسور، تم معالجتها بطرق مختلفة.



الشكل 50: يمثل شرائح كروماتوغرافيا تمليص عمود مستخلص الكلوروفورم.

و يتحدد بعد كشف شرائح كروماتوغرافيا مختلف الكسور، ما إذا كان الحصول على مركبات معزولة بصفة نقية أو يتطلب إجراء فصل على عمود جديد أو إجراء سلسلة من الفصول على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية باستخدام الـ (Silica gel (HF254 – 366 type 60) باستعمال مذيبات ملائمة يتعين تجربتها سلفاً ، و يوضح (الشكل 50) مختلف مراحل عمليات الفصل التي سلكتها.

3.5-1. ب. معالجة كسور مستخلص الكلوروفورم:

3.5-1. ب. 1. معالجة الكسر M:

أعطى الكسر M راسباً غير قابل للذوبان في MeOH وقابل للذوبان تماماً في DMSO. غسل هذا الراسب بمزيج من $CHCl_3$ و MeOH. تم اختباره على طبقات الـ CCM التحليلية من السيليكا جل. يعطي هذا الراسب بقعة من اللون الأسود تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية (365nm). لقد قمنا بترميزه CH_{145} .

3.5-2. فصل مستخلص خلات الايثيل:

3.5-2. أ. باستخدام كروماتوغرافيا العمود (CC):

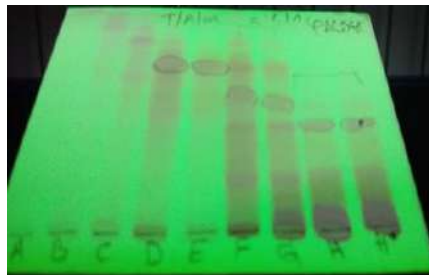
تمت عملية الفصل الاولى لمستخلص كتلته 7 غ بواسطة تقنية كروماتوغرافي حيث استعملنا عمودا طوله 50 سم وقطره 2.15 سم عبئ العمود على ارتفاع 31.5 سم ب 200 غ من السليكا جل Silicagel type 60, 230-400mechMerck. يضاف مستخلص خلات الايثيل في صورة مسحوق مدمص على السليكا جل. تجرى عملية التمليص بواسطة المذيب السيكلوهكسان وتم اغناؤه بالكلوروفرم ثم بالميثانول.

تم تنفيذ الكشف عن كروماتوغرامات مختلف الكسور على الطبقة الرقيقة من السليكا جل بالاستعانة بمصباح الاشعة فوق البنفسجية 365nm و 254nm واستظهارها بعد الغمس في كاشف حمض الكبريت بعد تسخينها عند 100م°، يتم تجميع الكسور المتماثلة والاكتفاء ب 09 كسر و(الجدول 16) يوضح نتاج تمليص هذا العمود.

الجدول 15 : نتاج تمليص العمود الكروماتوغرافي لمستخلص خلات الايثيل لأزهار نبات النقد.

الملاحظات	السلسلة	الطور المتحرك			الكسر
		السيكلوهكسان %	الكلوروفورم %	الميثانول %	
أثر بسيط	(20-1)A	00	00	100	4-1
		00	50	50	8-5
		00	100	00	12-9
		0.5	99.5	00	16-13
أكثر من بقعة لم تعالج	(21)B	1.5	98.5	00	20-17
		2.5	97.5	00	28-21
أكثر من بقعة لم تعالج	(28-22) C	04	96	00	32-29
خليط من المركبات	(33-29) D	5.5	94.5	00	36-33
خليط من المركبات	(39-34) E	07	93	00	40-37
خليط من المركبات	(46-40) F	8.5	91.5	00	44-41
خليط من المركبات	(57-47) G	11	89	00	48-45
		13	87	00	52-49
		15	85	00	56-53
		19	81	00	
خليط من المركبات تشكل راسب	(78-58) H	23	77	00	64-61
		40	60	00	68-65
		50	50	00	72-69
		80	20	00	76-73
خليط معقد	(89-79)I	90	10	00	80-77
		100	00	00	89-81

ويتم كشف شرائح الكروماتوغرافيا مختلف الكسور بنفس الطريقة الاعتيادية السابقة (الشكل 51)، بغية التأكد من نقاوتها، في حالة الاخفاق فنقوم بإجراء سلسلة من عمليات الفصل التتابعية للوقوف في الأخير على مركبات نقية وكميات تسمح بإجراء التحاليل الفيزياء-كيميائية و(الشكل 52) يبين المراحل المختلفة لهذا التتابع.



الشكل 52: يمثل شرائح كروماتوغرافيا تمليص عمود مستخلص خلاص الايثيل.

3.5-2.ب. معالجة كسور مستخلص خلاص الايثيل:

3.5-2.ب.1- معالجة الكسر F+G:

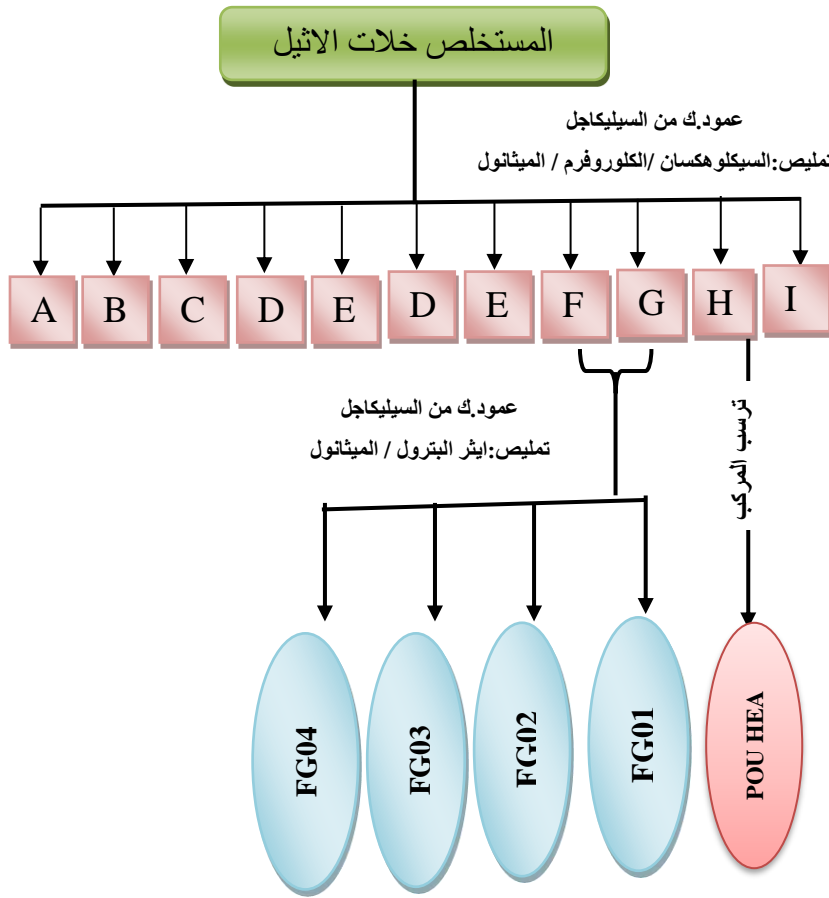
بعد فحص الكسرين F و G تبين تماثل مكوناتها فجمعناهما، ثم اجرينا لها عمود كروماتوغرافيا باستخدام السيليكاجل كطور ثابت وإيثر البترول مغنى بالميثانول كطور متحرك، وبعد تجميع الكسور المتماثلة بعد فحصها وبعد تتابع عمليات الفصل على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في أكثر من طور تضاءلت عدد المركبات المفصولة النقية الى أربعة مركبات لكن تخلت عنها لصغر كميتها مما يحول دون عرضها للتحليل.

3.5-2.ب.2- معالجة الكسر H:

يترسب جزء كبير من الكسر H على شكل مسحوق أصفر قابل للذوبان في DMSO ساخن. بعد الترشيح، أعطى الأخير منتجاً نقياً على هيئة مسحوق أبيض نرمل له بـ POU HEA . بقية الكسور الفرعية لم تعالج لأن مركباتها موجودة في الكسور السابقة أو اللاحقة لها أو بكميات قليلة.

حصلنا في عمليات الفصل السابقة على مركبين تربينيين ومركب واحد فلافونويدي في صورتها النقية، وبكميات كافية جاهزة لتحديد بنيتها الكيميائية.

بقية المركبات المفصولة لم نتمكن من تحديد بنيتها الكيميائية بدقة وهذا إما لوجود كميات قليلة منها منعنا من إجراء اختبارات طيفية أخرى مثل: ^{13}C RMN أو لعدم توفر الإمكانيات لإجراء اختبارات طيفية ثنائية البعد التي تساعدنا في التحديد الدقيق للبنى الكيميائية لهذه المركبات. اعتمدنا لأجل التعرف على البنى الكيميائية التربينية الثلاثة المفصولة على الطرق الطيفية للرنين النووي المغناطيسي RMN أحادية وثنائية البعد.

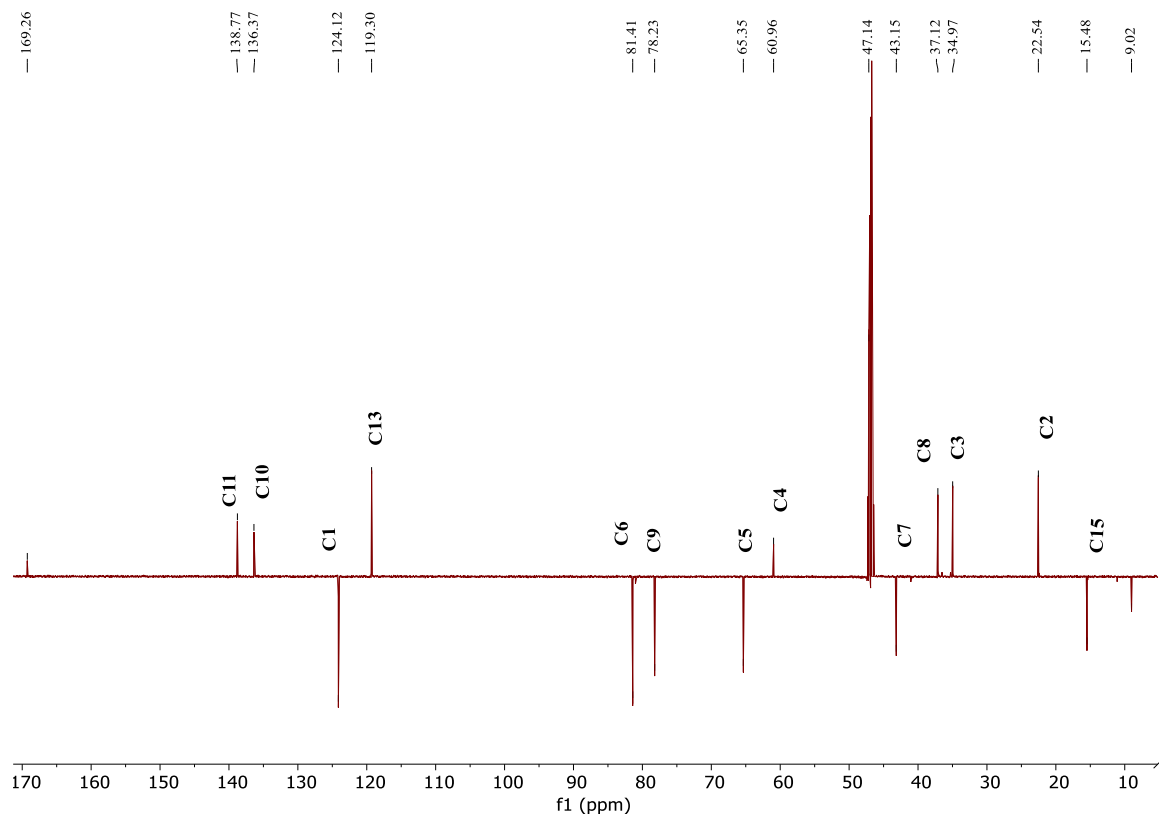


الشكل 53: يمثل مخطط مختلف مراحل فصل مكونات مستخلص خلات الايثيل.

4.5- الدراسة البنوية للمركبات المعزولة:

4.5- أ. دراسة بنوية لمركب CHC41:

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون ^{13}C RMN (الشكل 53) خمسة عشر (15) اشارة لذرات كربون ومن خلال الازاحات الكيميائية والتضاعف، مقارنة مع تلك الموجودة بالمراجع، انها تعود لهيكل سيسكوتربيني لاكتوني، اذ يمكن توزيعها كالتالي:

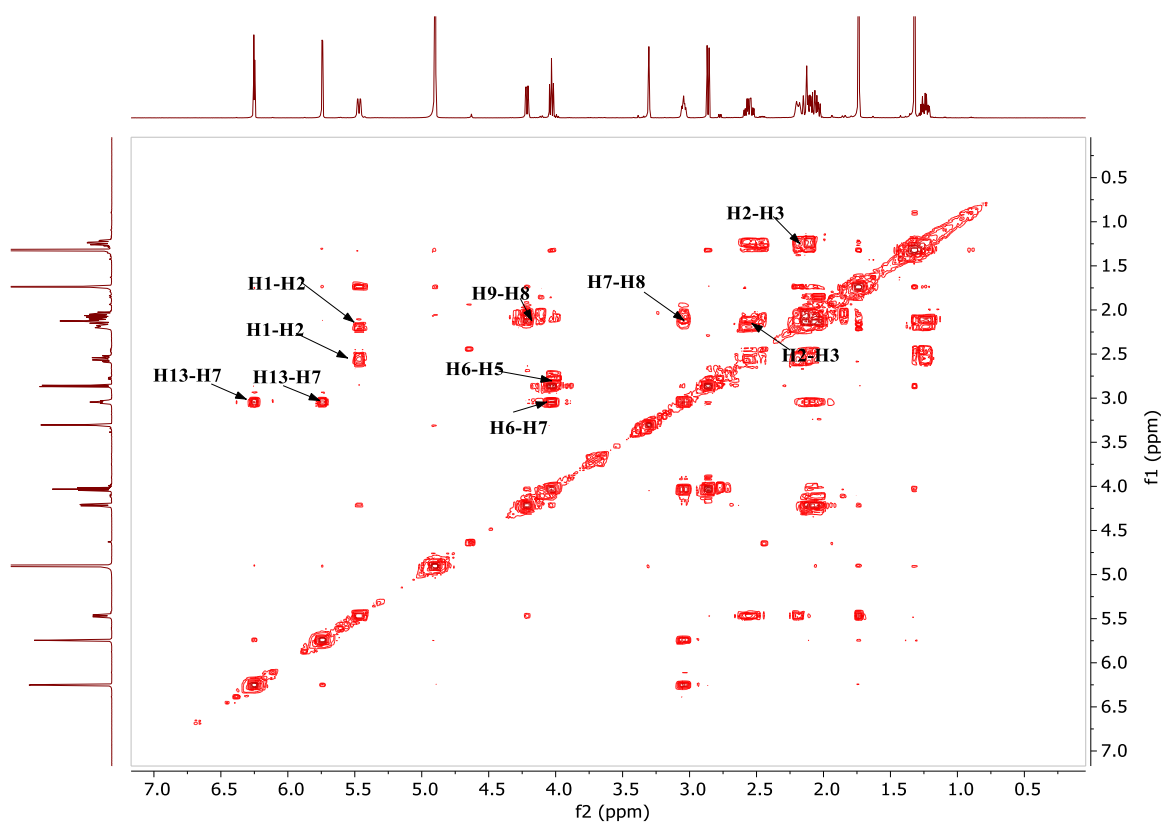


الشكل 54: يمثل طيف ^{13}C RMN (MeOH, 150 MHz) للمركب CHC41.

- (04) ذرات كربون رابعة C:
 - (03) منها تهجينها Sp^2 : واحدة منها عند $\delta_{\text{C}}=169.26$ ppm تعود لـ γ -لاكتون غير مشبع واثنان عند $\delta_{\text{C}}=138.77$ ppm وعند $\delta_{\text{C}}=136.37$ ppm والاخيرة عند $\delta_{\text{C}}=60.69$ ppm تهجينها Sp^3 ومتصلة بذرة اكسجين.

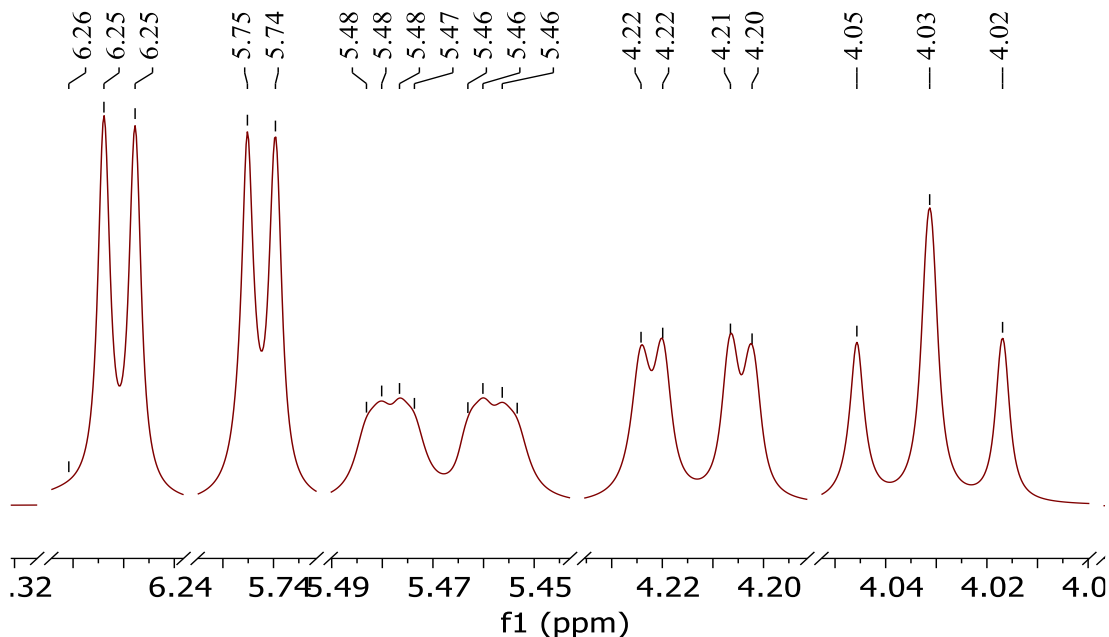
- خمس كربونات ميثينية (methynes CH)
 - احداها ذات تهجين Sp^2 عند $\delta_{\text{C}}=124.12$ ppm تعود لكربون اثيليني واما الاربعة الباقية فتعجينها Sp^3 واحدة عند $\delta_{\text{C}}=43.15$ ppm، واما الاخر الثلاثة عند $\delta_{\text{C}}=81.41$ ppm، $\delta_{\text{C}}=78.23$ ppm وعند $\delta_{\text{C}}=65.35$ ppm يبين مجال تواجدها انها مرتبطة بذرات اكسجين.

- أربعة كربونات ميثلينية (methylen CH₂):
واحدة منها ذات تهجين Sp² عند $\delta_C = 119.30$ ppm وأما الثلاثة الباقية فتهجينها Sp³ عند $\delta_C = 34.97$ ppm، $\delta_C = 37.12$ ppm وعند $\delta_C = 24.54$ ppm
- مجموعتي ميثيل (methyl CH₃) عند $\delta_C = 15.48$ ppm و $\delta_C = 9.22$ ppm
وتقود مجموع هذه التعينات ان الصيغة المجملة للمركب هي C₁₅H₂₀O₄
و يؤدي فحص الازاحات الكيميائية على طيف RMN¹³C (الشكل 53) انه بإستثناء الكربون اللاكتوني هناك اربعة ذرات كربون رابعة (02 رابعة، 01 ميثلينية، و 01 ميثينية) تهجينها Sp² تشكل فيما بينها رابطتين ثنائييتين، بحساب رقم عدم التشعب فإن 3 من اصل 6 المنتظرة قد استنفدت وبالتالي نتوقع مركبا ذي هيكل كربوني بـ —CH₃ — 3 حلقات، واذا ما اخذنا بالحسبان حلقة اللاكتون وحلقة الايبوكسيد epoxyde فلن تبقى سوى حلقة تعود للهيكل الاساسي للسيسكويتريبي احادي الحلقة فينحصر الاحتمال في هيكل Germaconolide كما تشير الابحاث السابقة الى تكرار تواجد هذا النوع من البنى في هذه البنية γ -lactone.
ونجد من خلال تفحص طيف RMN¹³H (الشكل 54).



الشكل 55: يمثل طيف RMN¹³H (MeOH, 600 MHz) للمركب CHC41.

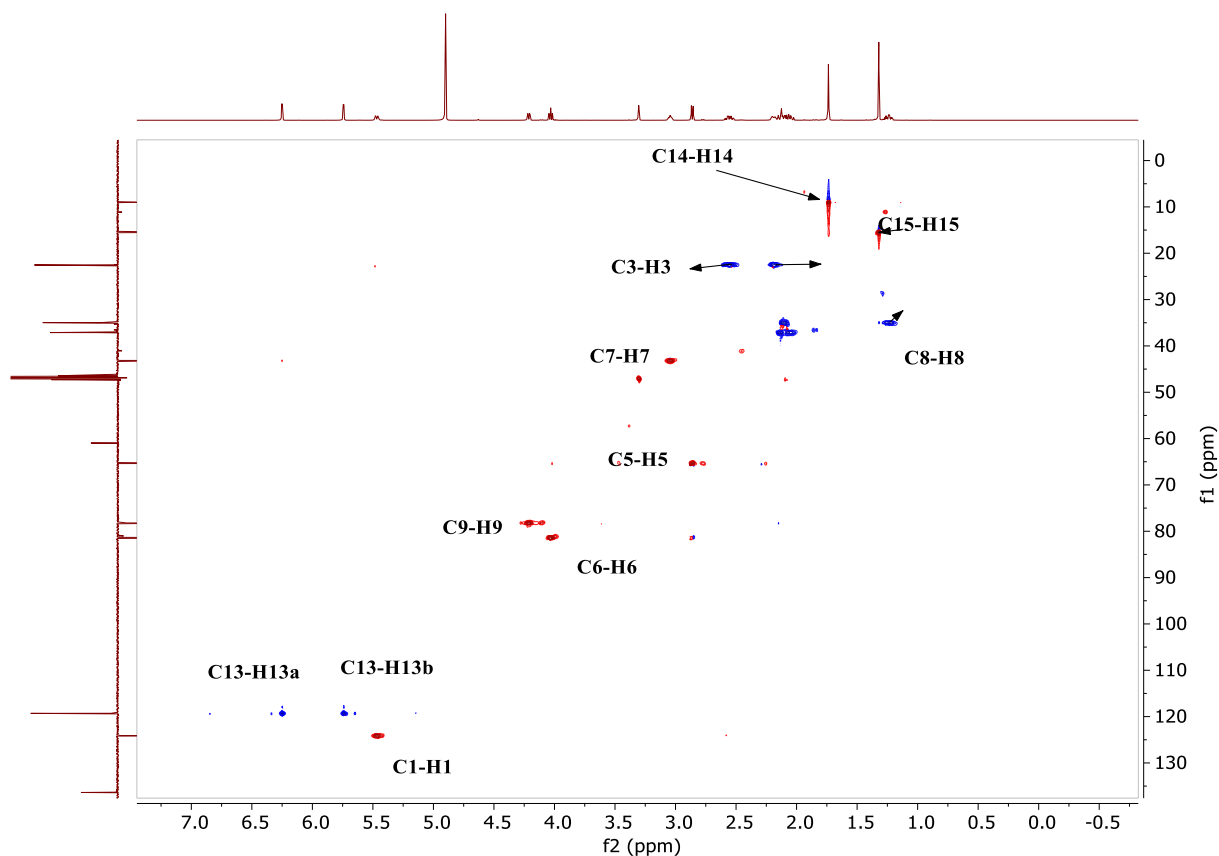
- إشارتين احاديتين بتكامل (3H) لكل منهما عند $\delta_H = 1.74$ ppm وعند $\delta_H = 1.32$ ppm تلحقان بمجموعتي الميثيل (2 CH_3)



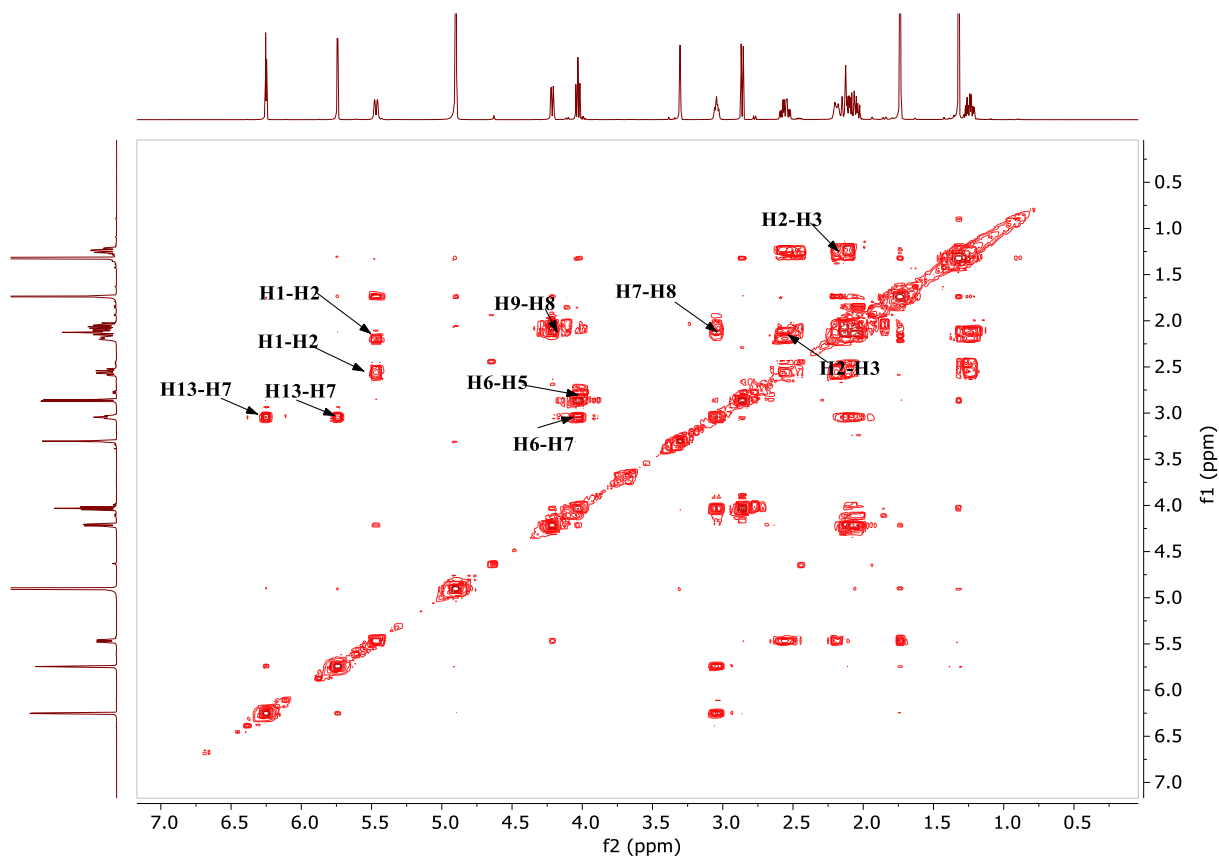
الشكل 56: يمثل طيف RMN^{13}H (MeOH, 600 MHz) من 1.20 إلى 3.05 ppm

للمركب CHC41.

- إشارتين متعدنتين بتكامل (1H) لكل منهما عند $\delta_H = 2.55$ ppm وعند $\delta_H = 2.19$ ppm يظهران ارتباطا على نفس ذرة الكربون في تجربة HSQC (الشكل 56) يلحقان بمجموعة CH_2 ميثيلين الموقع C_2 كما نجد اشارتين متعدنتين ايضا بتكامل (1H) لكل منهما عند $\delta_H = 1.24$ ppm وعند $\delta_H = 2.11$ ppm (الشكل 55) مرتبطين على نفس ذرة الكربون من خلال تجارب HSQC (الشكل 56) تلحقان بـ CH_3 الموقع C_3 نفس الشيء نجده بالنسبة للاشارتين عند $\delta_H = 2.05$ ppm، $\delta_H = 2.14$ ppm حيث تظهر أن بإشارة متعددة بتكامل (1 H) تلحقان بـ CH_2 الموقع C_8 .

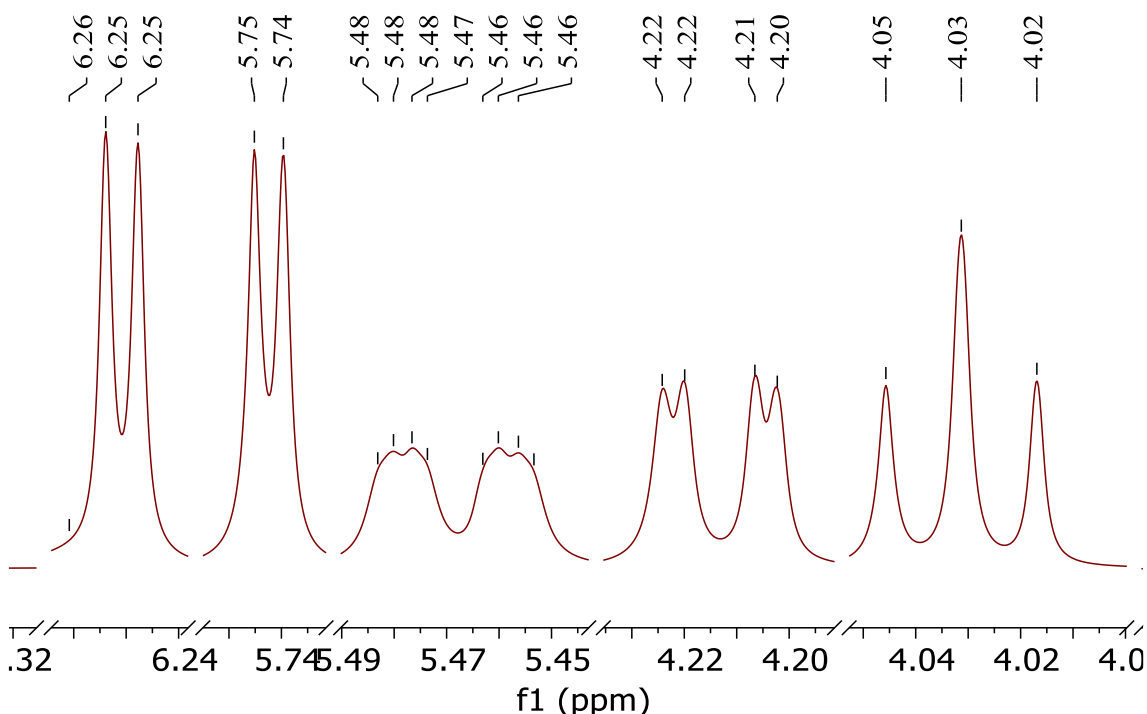


الشكل 57: يمثل طيف HSQC لمركب CHC41.



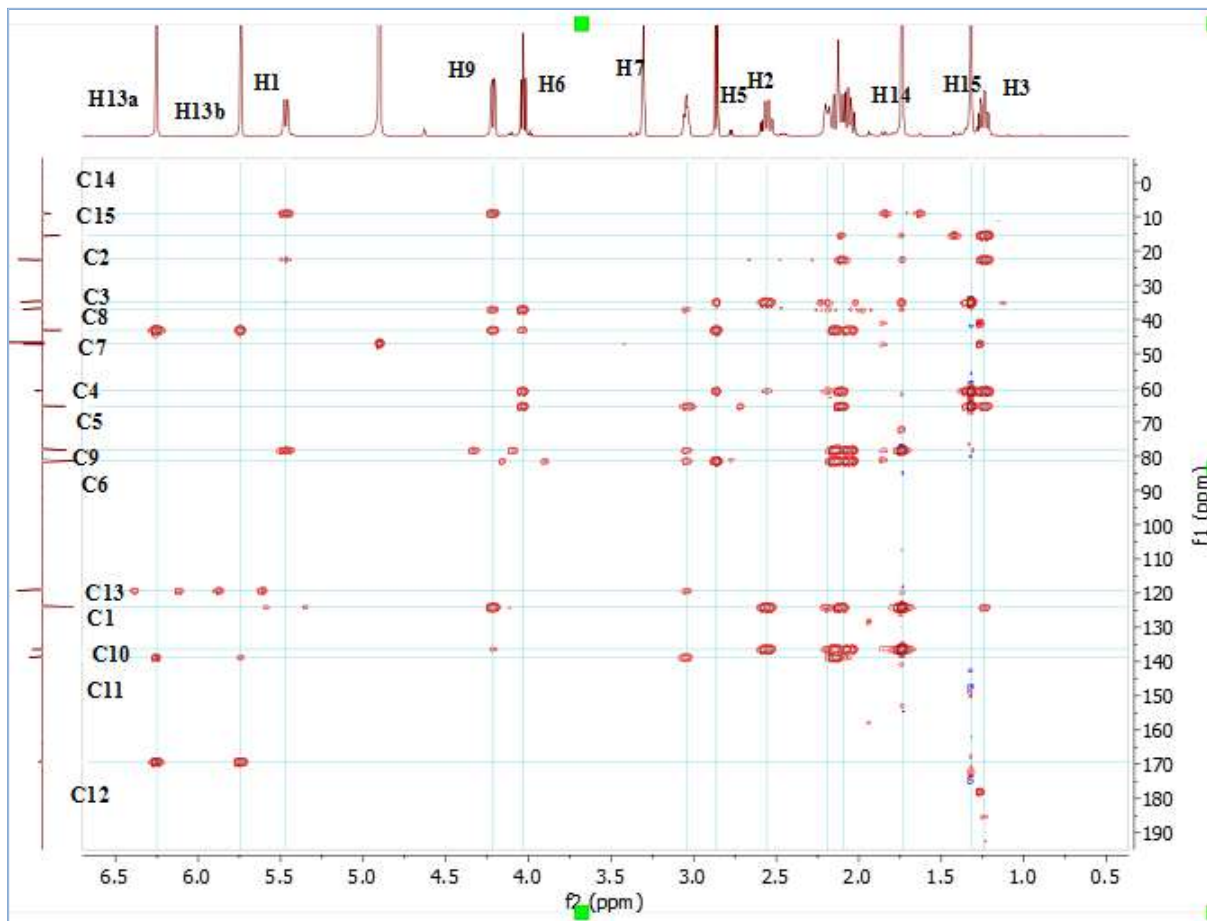
الشكل 58: يمثل طيف COSY لمركب CHC41.

- إشارة ثلاثية مميزة عند $\delta_H = 4.03\text{ppm}$ بثابت تزاوج $J=8.6\text{ Hz}$ بتلحق بمئين الموقع C_6
- إشارة متعددة بتكامل (1H) عند $\delta_H = 3.04\text{ppm}$ تظهر تجارب HMBC (الشكل 57) تعالق كربونه بكل من بروتوني الموقع (13) وبروتوني الموقع (8) وكذلك بروتون الموقع (6) والموقع (5) وهو للموقع (7).
- إشارة ثنائية-ثنائية في المجال المنخفض عند $\delta_H = 4.21\text{ppm}$ (الشكل 58) بتكامل 1H توضح ارتباطه بمجموعة اكسجينية يلحق بمئين الموقع (9).



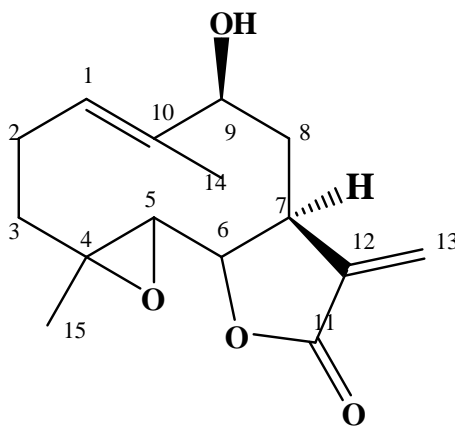
الشكل 59: يمثل طيف RMN^{13}H (MeOH, 600 MHz) من 4 إلى 6.32 ppm للمركب CHC41.

- كما يظهر على نفس الطيف اشارتين ثنائيتين بتكامل (1H) لكل منها عند: $\delta_H = 6.25\text{ppm}$ و $\delta_H = 5.74\text{ppm}$ ثابت تزاوجهما متقارب وبالرجوع الى تجارب HSQC (الشكل 54) يتضح كونهما مرتبطين على نفس ذرة الكربون مميزتان لمجموعة مثيلين خارج الحلقة exocyclique للموقع 13 المترافقة مع γ -lactone ومن خلال طيف COSY (الشكل 57) يتضح تعالق بروتونات السلسلة الحلقية من C_5 الى C_9 حيث يتعالق بروتون الموقع (5H) عند $\delta_H = 2.86\text{ppm}$ ببروتون الموقع (6 H) $\delta_H = 4.06\text{ppm}$ وهذا الاخير يظهر تعالقا مع (7 H) $\delta_H = 3.04\text{ppm}$ والذي يظهر بدوره تعالقا ببروتون الموقع (9H) $\delta_H = 4.21\text{ppm}$.
- كما يظهر من جهة ثانية تجارب COSY (الشكل 57) عالق ببروتون بقية السلسلة الحلقية من C_1 الى C_3 .



الشكل 60: يمثل طيف HMBC لمركب 41 .CHC

و بمجموع هذه المعلومات و بمقارنتها بتلك المنشورات [20, 22, 23, 44, 145-147] يمكننا الحاق هذا المركب ببنية 9 β -hydroxyparthenolide



الشكل 61: يمثل بنية المركب 9 β -hydroxyparthenolide

الجدول 16: الازاحات الكيميائية و التضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13
 CHC41 (150MHz, MeOH)

رقم الكربون	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	التعدد	الارتباطات C \rightarrow H	الملاحظات
1	124.12	CH	H ₉ H _{2α} H _{2β} H _{3α} H _{3β} H ₁₄	sp ² اثيليني
2	22.54	CH ₂	H _{3α} H _{3β} H ₅	sp ³
3	34.97	CH ₂	H _{2α} H _{3β} H _{2α} H _{2β} H ₅ H ₁₅	sp ³
4	60.96	Cq	H ₆ H ₁ H ₇ H _{3α} H _{8β} H _{8α}	sp ³ مؤكسج
5	65.35	CH	H ₆ H ₇ H _{3α} H _{3β} H ₁₅	sp ³ مؤكسج
6	81.41	CH	H _{8α} H _{8β} H ₇	sp ³ مؤكسج
7	43.15	CH	H _{13α} H _{13β} H ₉ H ₆ H ₅ H _{8α}	sp ³
8	37.12	CH ₂	H _{8β} H ₆ H ₉	sp ³
9	78.23	CH	H ₁ H ₇ H _{8α} H _{8β}	sp ³ مؤكسج
10	136.73	Cq	H ₁₄ H _{5β} H _{8α} H _{2β} H _{2β} H ₉	sp ² اثيليني
11	138.77	Cq	H ₇ H _{8β} H _{8α}	sp ² اثيليني
12	169.26	Cq	H _{13α} H _{13β}	sp ² كربونيل
13	119.30	CH ₂	H ₇	sp ² اثيليني
14	9.22	CH ₃	H ₉ H ₁	sp ³
15	15.48	CH ₃	H _{3α}	sp ³

الجدول 17: الازاحات الكيميائية و التضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون 1
 CHC41 (600 MHz, MeOH)

رقم البروتون	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	التعدد	J [Hz]
1	5.47	Ddd	12.2, 4.0, 1.8
α 2	2.55	M	-
β 2	2.19	M	-
α 3	2.11	M	-
β 3	1.24	M	-
5	2.86	D	8.9
6	4.03	T	8.6
7	3.04	Dddd	8.5, 7.1, 4.3, 2.7
α 8	2.14	M	-
β 8	2.05	M	-
9	4.21	Dd	10.6, 2.6
α 13	5.74	D	3.3
β 13	6.25	D	3.7
14	1.74	S	-
15	1.32	S	-

4.5- ب. دراسة بنيوية مقارنة للمركبات CHC38 و POU5 بالمركب CHC41 :

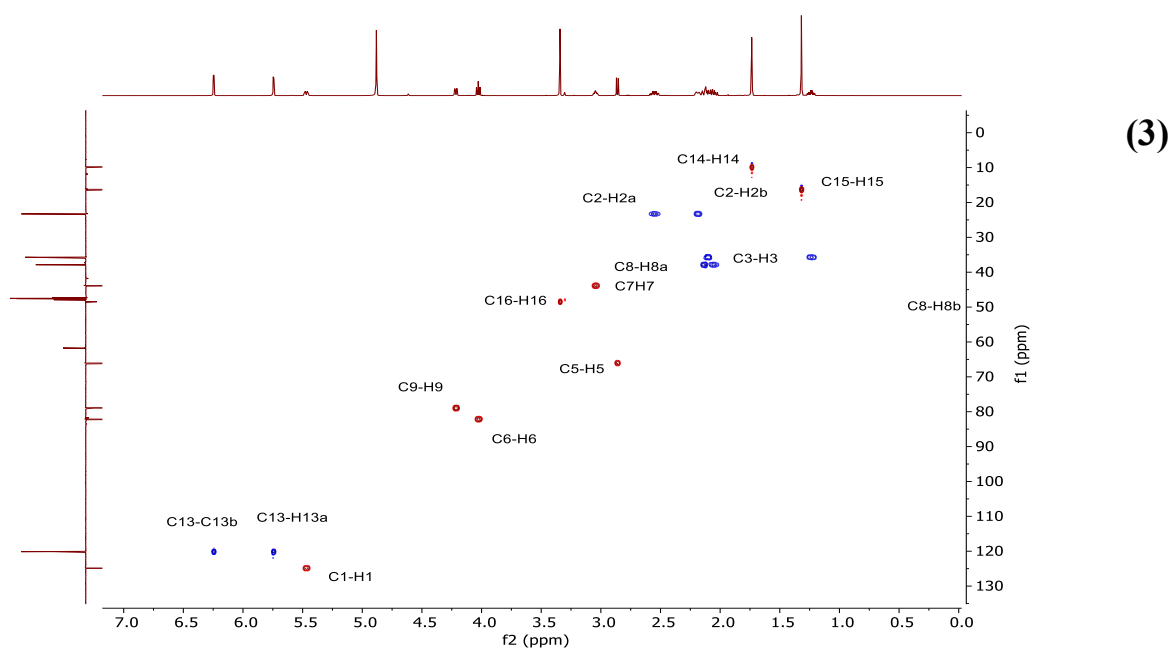
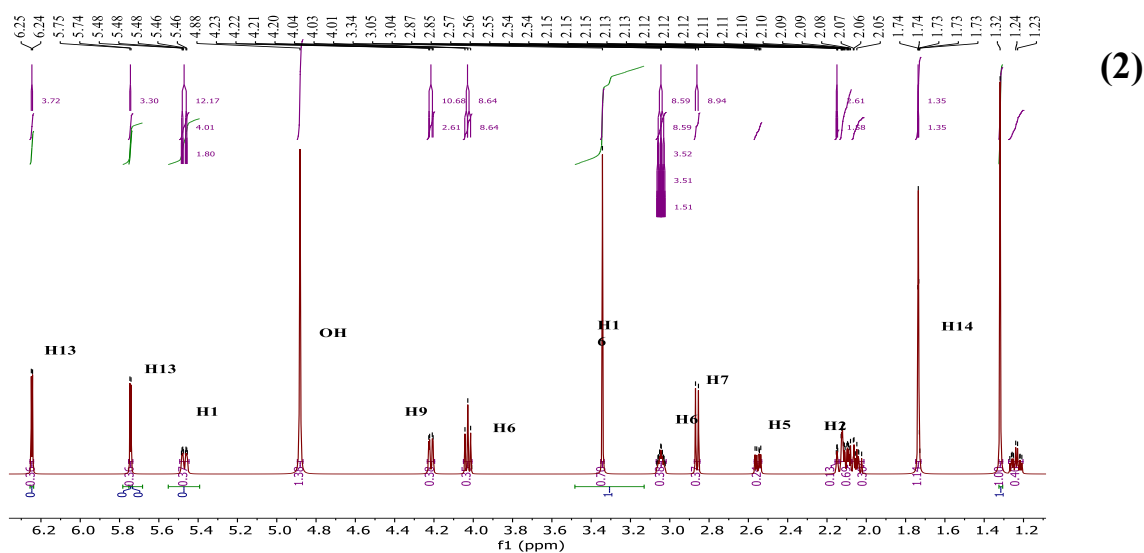
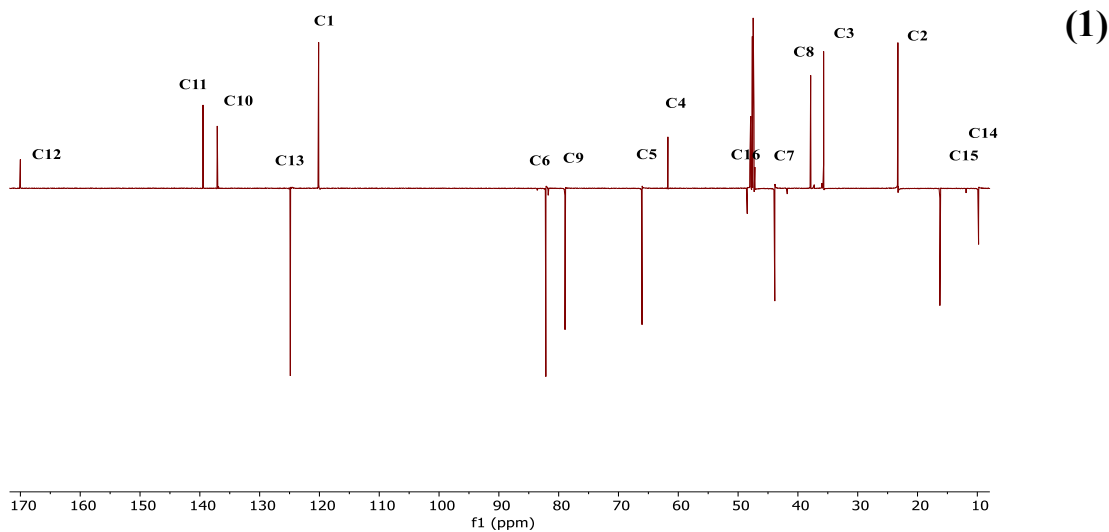
قمنا بمقارنة الازاحات والتضاعفات لاطيف هذه المركبات فكان كالتالي:

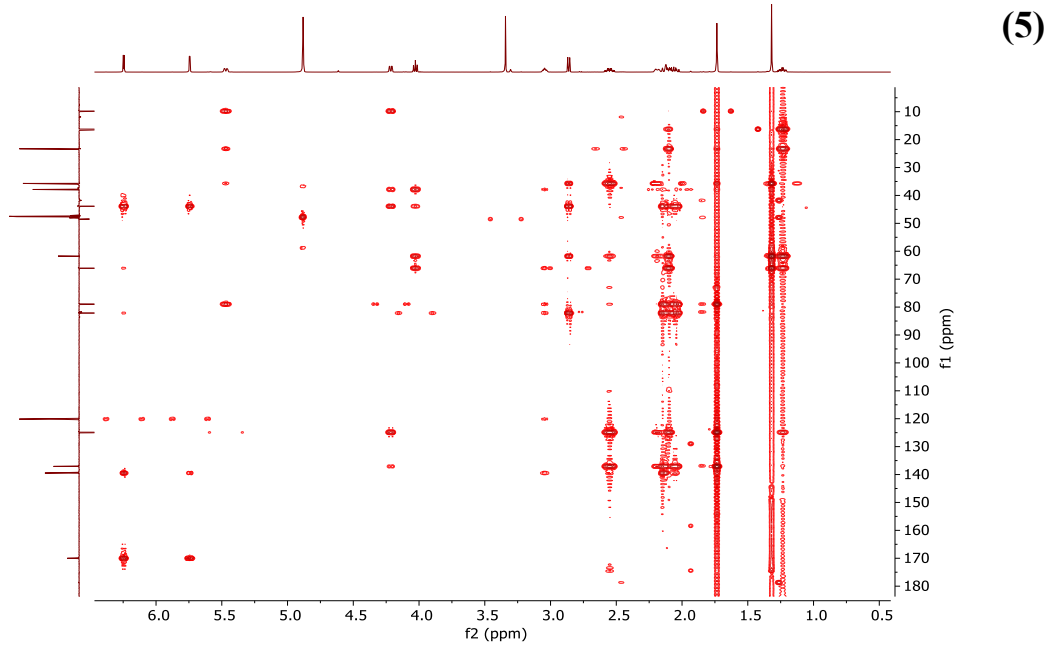
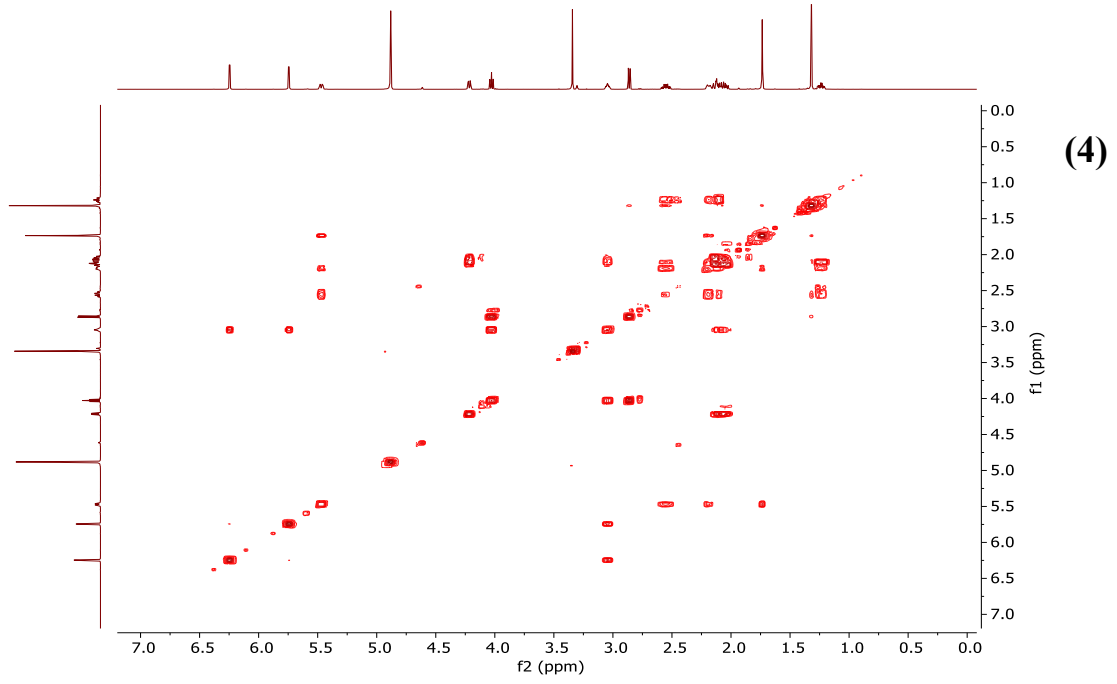
الجدول 18: مقارنة الازاحات الكيميائية والتضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للكربون 13 (150MHz·MeOH) للمركبات CHC38، CHC41 و POU5.

المركب POU5	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	المركب CHC38	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	المركب CHC41	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	رقم الكربون
CH	123.27	CH	124.87	CH	124.12	1
CH ₂	23.14	CH ₂	23.28	CH ₂	22.54	2
CH ₂	35.63	CH ₂	35.70	CH ₂	34.97	3
Cq	61.19	Cq	61.74	Cq	60.96	4
CH	65.00	CH	66.06	CH	65.35	5
CH	81.61	CH	82.15	CH	81.41	6
CH	43.96	CH	43.86	CH	43.15	7
CH ₂	38.20	CH ₂	37.86	CH ₂	37.12	8
CH	77.86	CH	78.94	CH	78.23	9
Cq	137.67	Cq	137.08	Cq	136.73	10
Cq	139.67	Cq	139.46	Cq	138.77	11
Cq	169.07	Cq	170.01	Cq	169.26	12
CH ₂	120.33	CH ₂	120.13	CH ₂	119.30	13
CH ₃	10.73	CH ₃	9.79	CH ₃	9.22	14
CH ₃	16.80	CH ₃	16.26	CH ₃	15.48	15

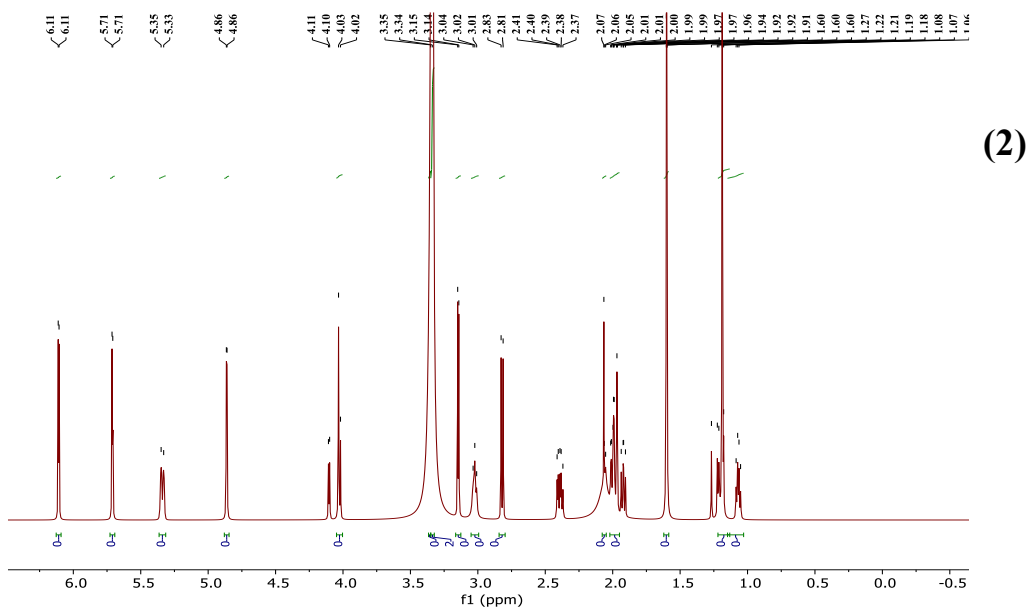
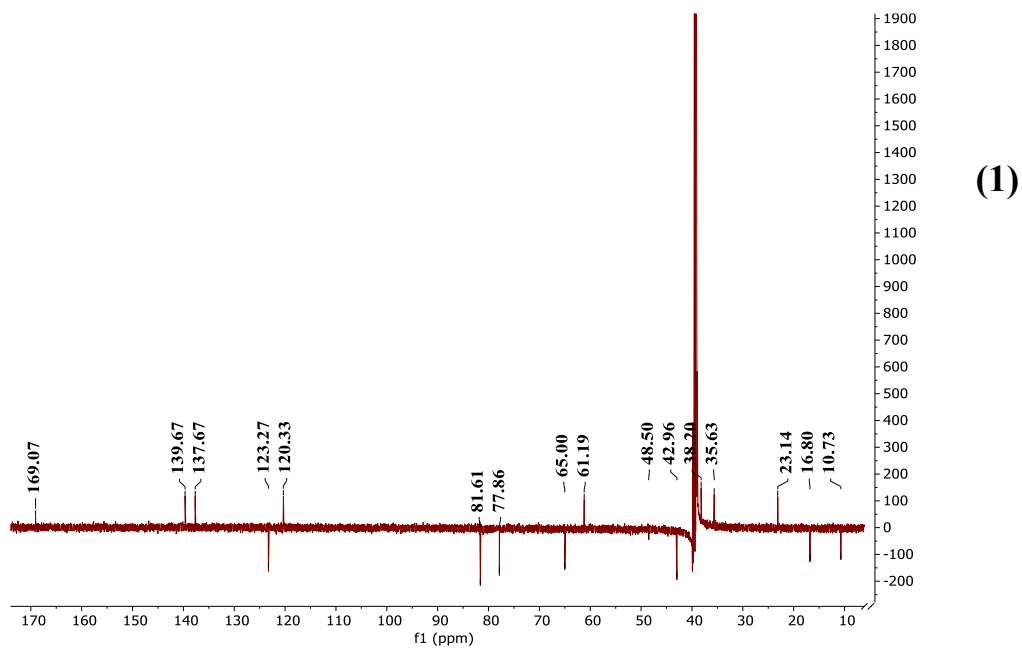
الجدول 19: مقارنة الازاحات الكيميائية والتضاعف لطيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون (600 MHz·MeOH) للمركبات CHC38، CHC41 و POU5.

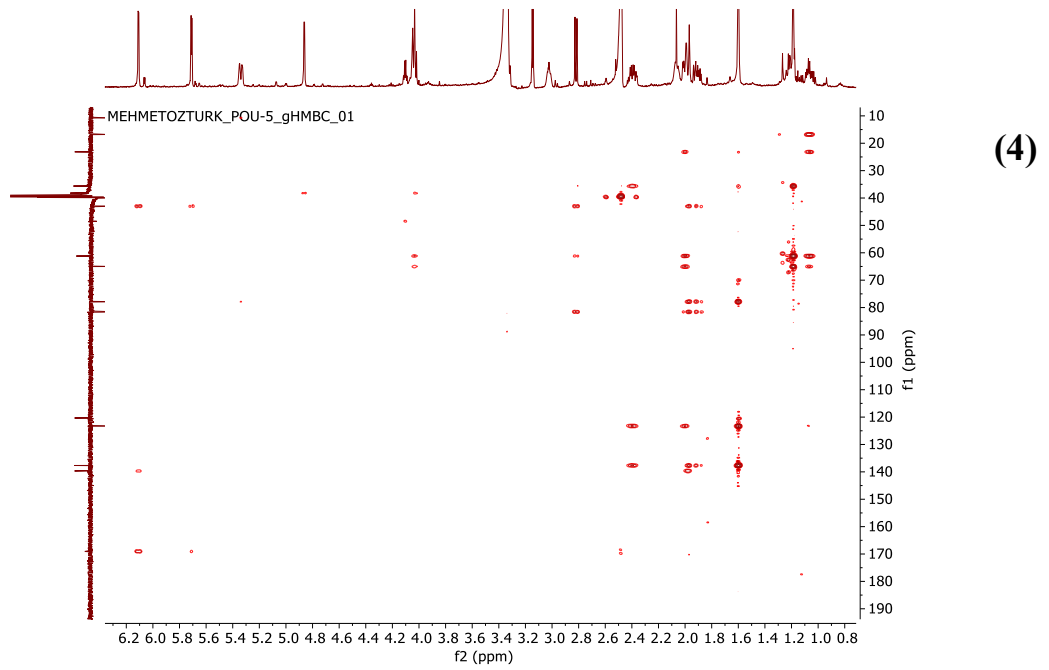
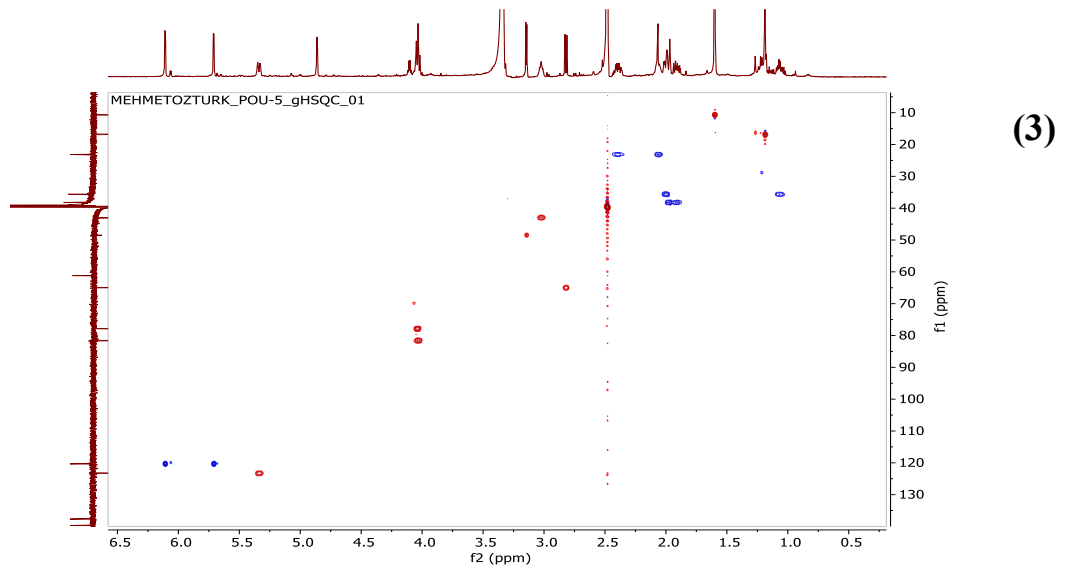
المركب POU5	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	التعدد	المركب CHC38	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	التعدد	المركب CHC41	الانزياح الكيميائي δ (ppm)	رقم البروتون
D	5.34		ddd	5.47	ddd	5.47		1
M	2.39		m	2.54	m	2.55		α 2
M	2.05		m	2.17	m	2.19		β 2
M	2.00		m	2.10	m	2.11		α 3
M	1.06		m	1.24	m	1.24		β 3
M	2.82		m	2.87	d	2.86		5
T	4.03		t	4.03	t	4.03		6
Ttd	3.02		ttd	3.04	dddd	3.04		7
M	1.97		m	2.14	m	2.14		α 8
M	1.92		m	2.06	m	2.05		β 8
D	4.04		dd	4.20	dd	4.21		9
D	5.71		d	5.75	d	5.74		α 13
D	6.11		d	6.23	d	6.25		β 13
S	1.60		s	1.74	s	1.74		14
S	1.19		s	1.32	s	1.32		15

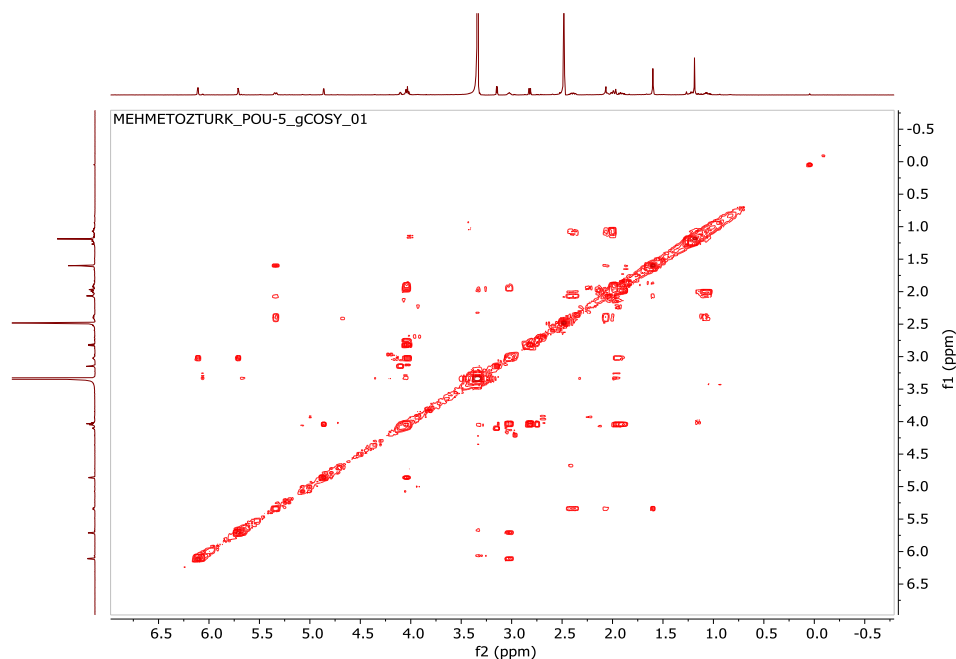




الشكل 62: يمثل اطياف المركب CHC38 (1) $RMN^{13}C$ (2) RMN^1H (3) HSQC (4) HMBC (5) .COSY



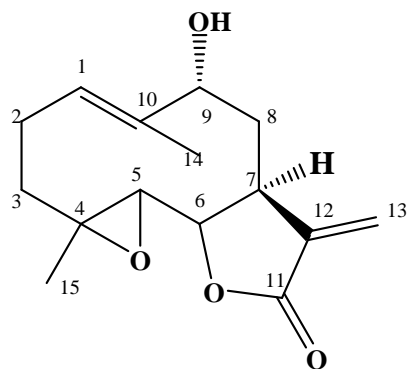




(5)

الشكل 63: يمثل اطياف المركب POU5 (1) $RMN^{13}C$ (2) RMN^1H (3) HSQC (4) HMBC (5) .COSY

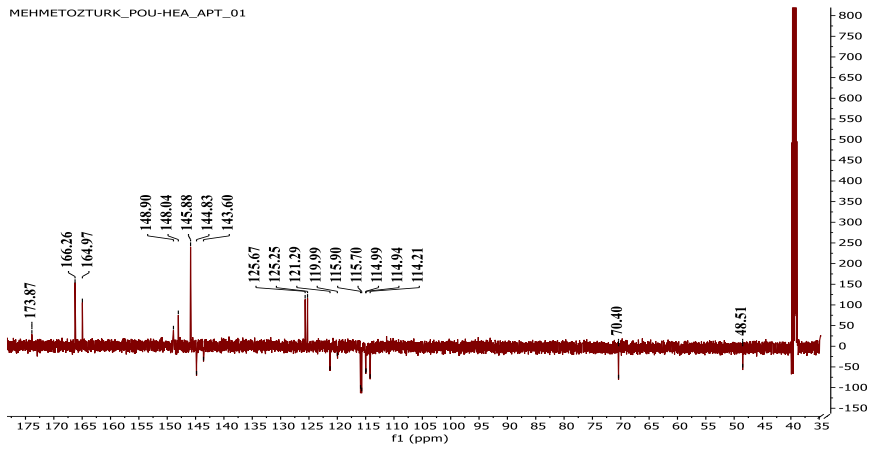
من خلال مقارنة الاطياف وجداول التضاعفات وكذا المراجع، تبين لنا المركب CHC38 هو نفسه المركب CHC41 بينما المركب POU5 عبارة عن مماكب له ومنه يمكننا الحاق هذا المركب ببنية 9 α -hydroxyparthenolide



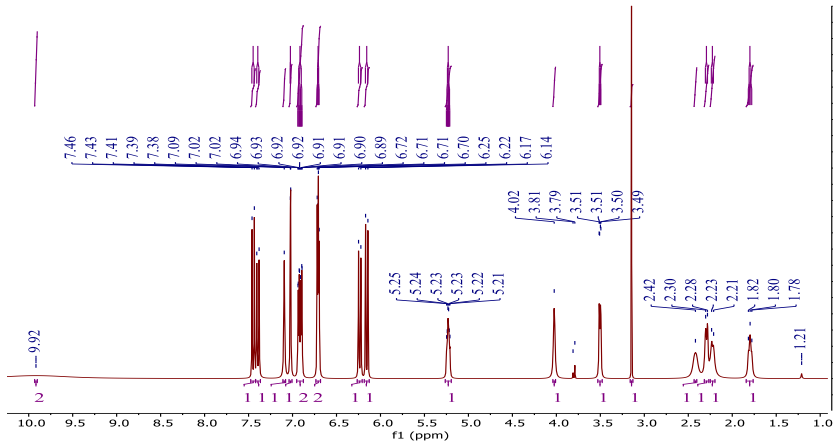
الشكل 64: يمثل بنية المركب 9 α -hydroxyparthenolide.

4.5- ج. دراسة بنيوية المركب POU HEA:

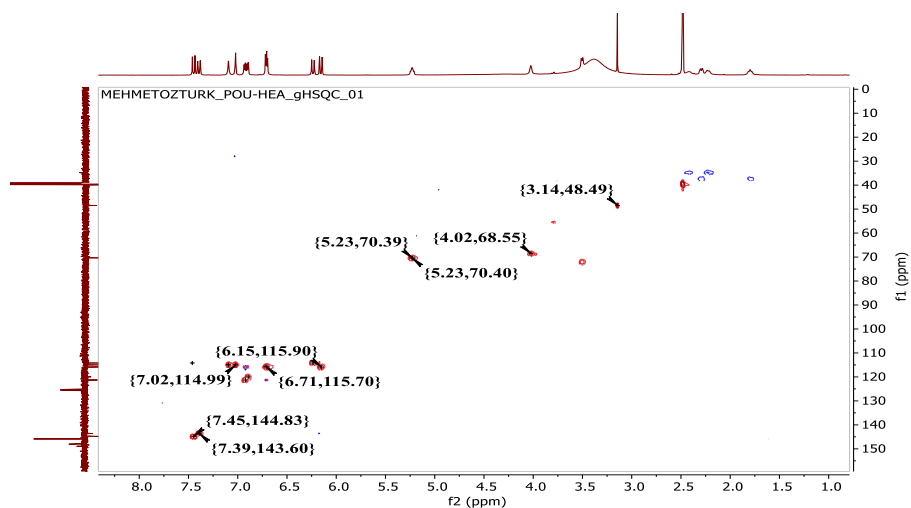
المسحوق الذي تشكل في الكسر H لمستخلص خلات الايثيل في طيف نلاحظ وجود اشارا في المجال العطري من 6.4 الى 7.5 وأيضا في طيف وجد اشارا في المجال ما بين 70 الى 119 وهي ثب وجود سكر مصتل بالهيكل ومن خلال العدد الكلي للذرات الكربون التي هي 21 ذرة مطروح منه عددذرات الكربون الستة يتبقى 15 ذرة دليل وجود الهيكل الفلافونيدي .



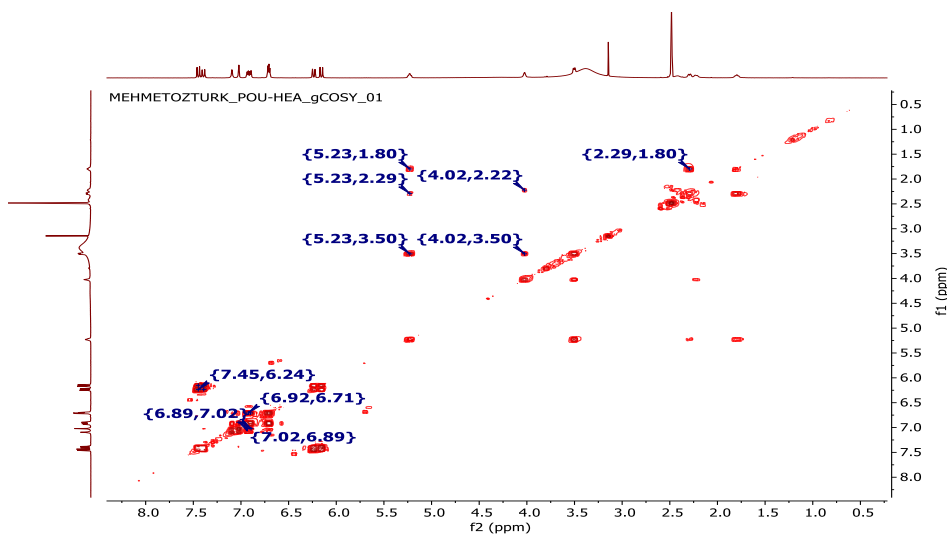
(1)



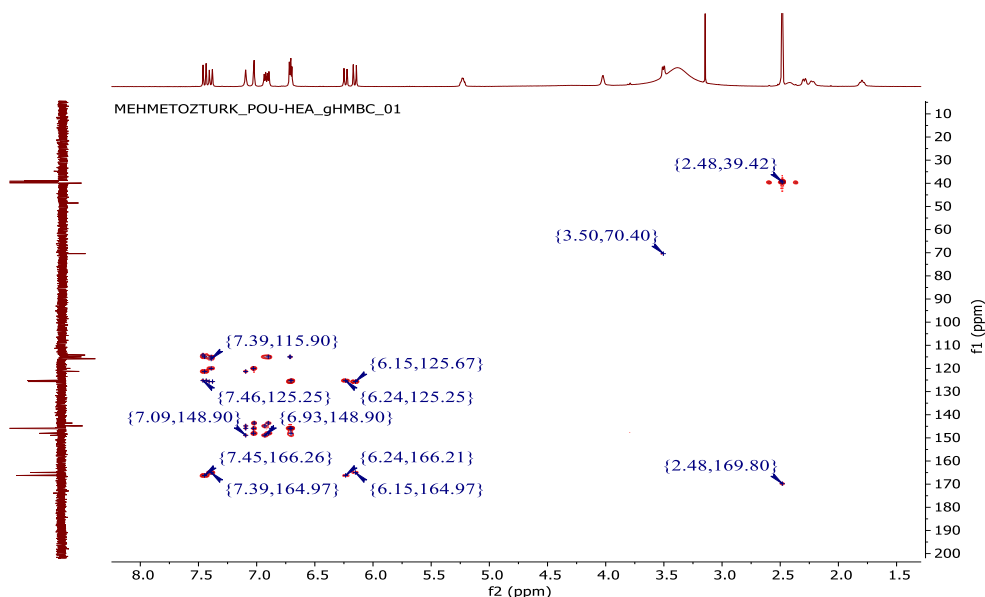
(2)



(3)



(4)



(5)

الشكل 62: اطياف المركب POUEA (1) ^{13}C RMN (2) ^1H RMN (3) HSQC (4) COSY (5).

ونظرا لغياب بعض المعلومات الإضافية لم نتمكن من تحديد البنية النهائية لهذا المركب.

خلاصة عامة

خلاصة عامة

تعتبر معرفة النباتات الطبية واستخدامها تراثاً إنسانياً حقيقياً. لقد تم إبراز أهميتها في مجال الصحة العامة بشكل كبير في السنوات الأخيرة بفضل طرق العلاج التي يقدمونها. يرتبط هذا التنوع في الخصائص البيولوجية بالفضائل العلاجية المنسوبة إلى مجموعة غير عادية من الجزيئات النشطة بيولوجياً التي يصنعها النبات ليس كعوامل بيولوجية فقط مثل: البكتيريا والفيروسات، الحيوانات العاشبة والحيوانات المفترسة ولكن أيضاً العوامل الكيميائية مثل المؤكسدات والمواد المسببة للالتهابات. هناك طلب كبير على الجزيئات الطبيعية الفينولية في الطب الشعبي للآثار الجانبية للأدوية والعواقب الضارة لمضادات الأكسدة الاصطناعية مثل: BHA و BHT.

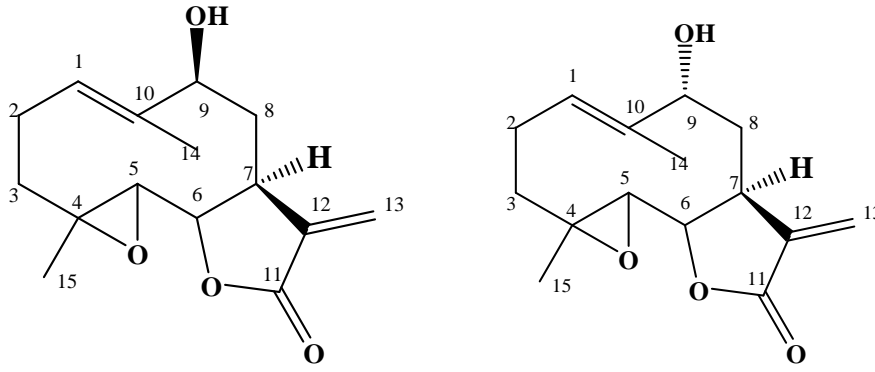
ساهمت المنتجات الطبيعية بشكل كبير في تطوير الطب الحديث. في الآونة الأخيرة يتم إعادة تقييم الطب التقليدي في جميع أنحاء العالم، من خلال البحث المكثف حول الأنواع النباتية المختلفة ومبادئها العلاجية الفعالة. إذ تمثل المملكة النباتية ثروة هائلة، ومصدراً جديداً للمركبات الحديثة ذات الأنشطة المتنوعة الهامة كالمضادات الالتهابات ومضادات الأكسدة... الخ [148] يبدو أن المزايا الرئيسية للأدوية العشبية تكمن في انخفاض معدلات الآثار الجانبية، انخفاض تكلفتها وكذلك تأثير فعاليتها المنتظرة. الهدف الأساس الذي حُدد في هذا البحث هو الدراسة الكيميائية-نباتية وتقييم الفعالية المضادة للبكتيريا، المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب وكذا المكونات الكيميائية لمستخلصات أزهار نبات النقد. حيث قمنا بالترويج للمواد الطبيعية من النباتات الجزائرية وانكب اهتمامنا بالدراسة الكيميائية لأزهار نبات النقد.

لذلك تمكننا من تحديد كمية المركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات المحضرة، حددنا بعض المركبات الكيميائية بواسطة HPLC-DAD، كما قمنا بالاختبارات البيولوجية للمستخلصات (المضادة للأكسدة، للبكتيريا وللتهاب)

أظهر الفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات عن وجود كثيف للمركبات الفينولية، ويحتوي النبات على عائلات أخرى من المركبات كالتانينات والتربينات.

كما أظهرت دراستنا للمركبات الفينولية بأن أزهار نبات النقد تحتوي على نسب معتبرة منها، وغالبا ما كانت مستخلصات البيتانول وولات الايثيل أكثر ثراءً في اجمالي عديدات الفينولات والفلافونيدات.

بينت التحليل الكروماتوغرافية (HPLC-DAD) وجود بعض المركبات المشتركة بين تلك المستخلصات. الدراسة الكيميائية لمستخلصات أزهار نبات النقد اتاحت لنا فصل، تنقية ودراسة هيكلية لثلاثة مركبات: تربينين هما: 9β-hydroxyparthenolide و 9α-hydroxyparthenolide والآخر فلافونيدي لم حدد بنيته الهيكلية.



يجب تعميق نتائج هذه الدراسة من خلال مجموعة من الاعمال كآفاق نذكر منها:

- دراسة كيمياء- نباتية متقدمة
- تجزئة المستخلصات تحديد الجزيئات المسؤولة عن الاختلاف في الانشطة البيولوجية باستخدام تقنيات تحديد ذات كفاءة.
- تقييم الانشطة البيولوجية الاخرى مثل التأثير المضاد للسرطان بعدة طرق.
- تقييم السمية المحتملة للنبات من اجل الاستخدام الآمن.

المراجع

- .1 Singh AP, BAMS M: **A treatise on phytochemistry**. *Emedia Science* 2002.
- .2 Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Topham DK: *Phytochemicals as bioactive agents*. CRC press; 2000.
- .3 Green J: *The Herbal Medicine-Maker's Handbook: A Home Manual*. Crossing Press; 20.11
- .4 Lucchesi M-E: **Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles**. 2005.
- .5 Organization WH: *WHO monographs on selected medicinal plants*. World Health Organization; 1999.
- .6 Gao T, Yao H, Song J, Zhu Y, Liu C, Chen S: **Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family**. *BMC Evolutionary Biology* 2010, **10**:324.
- .7 Zdero C, Bohlmann F: **Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist**. *Plant Systematics and evolution* 1990, **171**:1-14.
- .8 Chibani S: **Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algerien**. 2013.
- .9 Sarembaud A, Poitevin B: *Médicaments à usage homéopathe: dictionnaire pratique*. Elsevier Masson; 1996.
- .10 Matsuda H, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Yoshikawa M: **Medicinal flowers. VI. Absolute stereostructures of two new flavanone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.: their inhibitory activities for rat lens aldose reductase**. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 2002, **50**:972-975.
- .11 كمال د: استخلاص وتنقية المركبات الفعالة بيولوجيا من بعض الأنواع النباتية.
- .12 Pavela R, Sajfrtová M, Sovová H, Bárnet M, Karban J: **The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation**. *Industrial Crops and Products* 2010, **31**:449-454.
- .13 Christensen LP: **Acetylenes and related compounds in Anthemideae**. *Phytochemistry* 1992, **31**:7-49.
- .14 Williams CA, Greenham J, Harborne JB: **The role of lipophilic and polar flavonoids in the classification of temperate members of the Anthemideae**. *Biochemical systematics and ecology* 2001, **29**:929-945.
- .15 Konovalov D: **Polyacetylene compounds of plants of the Asteraceae family**. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2014, **48**:613-631.
- .16 Seaman FC: **Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae**. *The Botanical Review* 1982, **48**:121-594.
- .17 Anderberg A: **The genus *Anvillea* (Compositae)**. *Nordic Journal of Botany* 1982, **2**:297-305.
- .18 حسين د: دراسة الأيض الفلافونيدي و التريبيني لبعض أنواع نباتات ضايات الصحراء الجزائرية.
- .19 Dendougui H, Jay M, Benayache F, Benayache S: **Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae)**. *Biochemical systematics and ecology* 2006, **9**:718-720.
- .20 Destandau E, Boukhris MA, Zubrzycki S, Akssira M, El Rhaffari L, Elfakir C: **Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillea radiata***. *Journal of Chromatography B* 2015, **985**:29-37.
- .21 Perveen S, Al-Taweel AM, Yusufoglu HS, Fawzy GA, Foudah A, Abdel-Kader MS: **Hepatoprotective and cytotoxic activities of *Anvillea garcinii* and isolation of four new secondary metabolites**. *Journal of natural medicines* 2018, **72**:106-117.
- .22 Saoud D, Jelassi A, Hlila M, Goudjil M, Ladjel S, Jannet HB: **Biological activities of extracts and metabolites isolated from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae)**. *South African journal of botany* 2019, **121**:386-393.
- .23 El Hassany B, El Hanbali F, Akssira M, Mellouki F, Haidour A, Barrero A: **Germacranolides from *Anvillea radiata***. *Fitoterapia* 2004, **75**:573-576.
- .24 Abdel-Sattar E, McPhail AT: **cis-Parthenolid-9-one from *Anvillea garcinii***. *Journal of Natural Products* 2000, **63**:1587-1589.

- .25 Perveen S, Alqahtani J, Orfali R, Al-Taweel AM, Yusufoglu HS, Abdel-Kader MS, Taglialatella-Scafati O: **Antimicrobial guaianolide sesquiterpenoids from leaves of the Saudi Arabian plant *Anvillea garcinii***. *Fitoterapia* .134-134:129 ,2019
- .26 Belkheiri N: **Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes**. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2010.
- .27 Boukemara H, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Bendjedou D, El Benna J, Marie J-C: **Anvillea garcinii extract inhibits the oxidative burst of primary human neutrophils**. *BMC complementary and alternative medicine* 2016, **16**:1-10.
- .28 Hanbali FE, El Hakmaoui A, Mellouki F, El Rhaffari L, Akssira M: **Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Anvillea radiata* Coss. & Dur.** *Natural Product Communications* 2007, **2**:1934578X0700200517.
- .29 Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C: **Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea**. *Journal of ethnopharmacology* 1991, **35**:143-123
- .30 Lakhdar M, Meriem KH, Larbi B, Amina R, Aicha S: **Phytochemical analysis and antifungal activity of *Anvillea radiata***. *World Applied Sciences Journal* 2013, **26**:165-171.
- .31 Allali H, Benmehdi H, Dib M, Tabti B, Ghalem S, Benabadji N: **Phytotherapy of diabetes in west Algeria**. *Asian journal of chemistry* 2008, **20**:2701.
- .32 Ozenda P: **Flore du Sahara septentrional et centrale**. (1977).
- .33 Quezel P, Santa S, Schotter O: **Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2**. 1962.
- .34 Hammiche V, Maiza K: **Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer**. *Journal of ethnopharmacology* 2006, **105**:358-367.
- .35 el Hadj O, Didi M, Hadj-Mahammed M, Zabeirou H: **Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est)**. 2003.
- .36 Chehma A: **catalogue des plantes sptanees du sahara septentrional algerien**. *Dar elhoda ain m'ila* 2006.
- .37 Ghourri M, Zidane L, Douira A: **Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan)**. *Journal of Animal & Plant Sciences* 2013, **17**:2388-2411.
- .38 Jamila F, Mostafa E: **Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments**. *Journal of ethnopharmacology* 20.87-154:76 ,14
- .39 Senouci F, Ababou A, Chouieb M: **Ethnobotanical Survey of the Medicinal Plants used in the Southern Mediterranean. Case Study: The Region of Bissa (Northeastern Dahra Mountains, Algeria)**. *Pharmacognosy Journal* 2019, **11**.
- .40 Hebi M, Eddouks M: **Study of Hypolipidemic and Antioxidant Activities of *Anvillea radiata* Coss & Durieu in Diabetic Rats**. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)* 2.148-17:140 ,017
- .41 Kandouli C, Cassien M, Mercier A, Delehedde C, Ricquebourg E, Stocker P, Mekaouche M, Leulmi Z, Mechakra A, Thétiot-Laurent S: **Antidiabetic, antioxidant and anti inflammatory properties of water and n-butanol soluble extracts from Saharian *Anvillea radiata* in high-fat-diet fed mice**. *Journal of ethnopharmacology* 2017, **207**:251-267.
- .42 Askarne L, Talibi I, Boubaker H, Boudyach EH, Msanda F, Saadi B, Serghini MA, Oumar AAB: **Phytochemical screening and in vitro antifungal activity of several moroccan medicinal plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold**. In *Proc 12th Intl Citrus Congress Eds: B Sabater-Muñoz et al Acta Hort*. 2015: 1585-1592.
- .43 Kandouli C, Ricquebourg E, Cassien M, Mercier A, Stocker P, Leulmi Z, Mechakra A, Culcasi M, Pietri S: **In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant, antidiabetic and cardioprotective activities from the aerial parts of *Anvillea radiata* Coss. & Dur.** In *15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants*. 2015
- .44 Moumou M, El Bouakher A, Allouchi H, El Hakmaoui A, Benharref A, Mathieu V, Guillaumet G, Akssira M: **Synthesis and biological evaluation of 9 α - and 9 β -hydroxyamino-parthenolides as novel anticancer agents**. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2014, **24**:4014-4018.

- .45 Hanson JR: *Natural products: the secondary metabolites*. Royal Society of Chemistry; 2003.
- .46 Harborne JB: **Twenty-five years of chemical ecology**. *Natural product reports* 2001, **18**:361-379.
- .47 Dey P, Harborne J, Banthorpe D: **Methods in plant biochemistry. Terpenoids vol. 7**. Academic Press, New York, London; 1991.
- .48 Connolly JD, Hill RA: **Triterpenoids**. In *Second Supplements to the 2nd Edition of Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*. Elsevier; 1995:596-555 :1
- .49 Ruzicka L: **The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds**. *Experientia* 1953, **9**:357-367.
- .50 Bruneton J: **Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales**. English. 1999.
- .51 Svoboda KP, Hampson JB: **Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities**. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW* 1999, **16**:1-7.
- .52 Heywood VH, Harborne JB, Turner BL: *Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press; 1977.
- .53 Hind D: **Compositae: systematics**. In *Proceedings of International Compositae Conference, Kew, 1994*. Royal Botanic Gardens Kew; 1996
- .54 Medjroubi K, Benayache F, Benayache S, Akkal S, Khalfallah N, Aclinou P: **Guaianolides from Centaurea musimomum**. *Phytochemistry* 1997, **45**:1449-1451.
- .55 Skaltsa H, Lazari D, Panagouleas C, Georgiadou E, Garcia B, Sokovic M: **Sesquiterpene lactones from Centaurea thessala and Centaurea attica. Antifungal activity**. *Phytochemistry* 2000, **55**:903-908.
- .56 Picher MT, Seoane E, Tortajada A: **Waxes, triterpenes, steroids, and free and bound acids in leaves and stems of Centaurea aspera**. *Journal of Natural Products* 1984, **47**:184-185.
- .57 Vajs V, Todorović N, Ristić M, Tešević V, Todorović B, Janačković P, Marin P, Milosavljević S: **Guaianolides from Centaurea nicolai: antifungal activity**. *Phytochemistry* 1999, **52**:383-386.
- .58 Karamenderes C, Bedir E, Pawar R, Baykan S, Khan IA: **Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from Centaurea hierapolitana**. *Phytochemistry* 2007, **68**:609-615.
- .59 Koukoulitsa C, Geromichalos GD, Skaltsa H: **A simulation study of the interaction of sulfhydryl nucleophiles with several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek Centaurea sp**. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 2006, **759**:215-224.
- .60 Bruneton J: **Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales**. 1993.
- .61 Zidorn C, Dirsch VM, Rüngeler P, Sosa S, Della Loggia R, Merfort I, Pahl HL, Vollmar AM, Stuppner H: **Anti-inflammatory activities of hypocretenolides from Leontodon hispidus**. *Planta medica* 1999, **65**:704-708.
- .62 Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T, Saito T, Ishikawa H, Haraguchi H: **Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from Heterotheca inuloides**. *Planta medica* 1996, **62**:427-430.
- .63 Wedge D, Galindo J, Macias F: **Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs**. *Phytochemistry* 2000, **53**:747-757.
- .64 Doskotch RW, El-Ferally FS: **Antitumor agents. IV. Structure of tulipinolide and epitulipinolide. Cytotoxic sesquiterpenes from Liriodendron tulipifera L**. *The Journal of organic chemistry* 1970, **35**:1928-1936.
- .65 Nacer A: **Sesquiterpènes lactones et flavonoides extraits de deux plantes algériennes de la familles des Astéracées**.
- .66 Kolli E-h: **Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires d'espèces du genre centaurea-activité cytotoxique**. 2013.
- .67 Zhang Y, Vareed SK, Nair MG: **Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables**. *Life sciences* 2005, **76**:1465-1472.
- .68 Grotewold E: *The science of flavonoids*. Springer; 2006.

- .69 Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi M, Krishna D: **Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential.** *Indian journal of pharmacology* 2001, **33**:2-16.
- .70 Duval C: **Dictionnaire de la chimie et de ses applications.** 1959.
- .71 Tsao R, McCallum J: **Chemistry of flavonoids.** *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability* 20.153-5:131 ,09
- .72 Cook NC, Samman S: **Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.** *The Journal of nutritional biochemistry* 1996, **7**:66-76.
- .73 Erdman Jr JW, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G: **Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC.** *The Journal of nutrition* 2007, **137**:718S-737S.
- .74 Harborne JB: **Biochemistry of phenolic compounds.** *Biochemistry of phenolic compounds* 1964.
- .75 Winkel-Shirley B: **Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology.** *Plant physiology* 2001, **126**:485-493.
- .76 Halbwirth H, Wurst F, Forkmann G, Stich K: **Biosynthesis of yellow flower pigments belonging to flavonoids and related compounds.** *Research Advances in Phytochemistry* 2000, **1**:35-49.
- .77 Pietta P-G: **Flavonoids as antioxidants.** *Journal of Natural Products* 2000, **63**:1035-1042.
- .78 Havsteen B: **Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency.** *Biochemical pharmacology* 1983, **32**:1141-1148.
- .79 Hollman PCH: **Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2001, **81**:842-852.
- .80 Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S: **The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids.** *Free radical biology and medicine* 1994, **16**:845-850.
- .81 Fraga CG, Martino VS, Ferraro GE, Coussio JD, Boveris A: **Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence.** *Biochemical pharmacology* 1987, **36**:717-720.
- .82 Cavallini L, Bindoli A, Siliprandi N: **Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids.** *Pharmacological research communications* 1978, **10**:133-143.
- .83 Middleton Jr E: **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer.** *The flavonoids: advances in research since 1986* 1993:337-370.
- .84 Hope WC, Welton AF, Fiedler-Nagy C, Batula-Bernardo C, Coffey JW: **In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin.** *Biochemical pharmacology* 1983, **32**:367-371.
- .85 Weber G, Shen F, Yang H, Prajda N, Li W: **Regulation of signal transduction activity in normal and cancer cells.** *Anticancer research* 1999, **19**:3703-3709.
- .86 Butterweck V, Jurgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H: **Flavonoids from Hypericum perforatum show antidepressant activity in the forced swimming test.** *Planta medica* 2000, **66**:3-6.
- .87 Dorant E, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Sturmans F: **Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma.** *Gastroenterology* 1996, **110**:12-20.
- .88 Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Heliövaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A: **Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms.** *American journal of epidemiology* 1997, **146**:223-230.
- .89 Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C: **Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities.** *Comptes Rendus Biologies* 2008, **331**:372-379.
- .90 Archana P, Samatha T, Mahitha B, Chamundeswari NR: **Preliminary phytochemical screening from leaf and seed extracts of Senna alata L. Roxb-an ethno medicinal plant.** *Int J Pharm Biol Res* 2012, **3**:82-89.

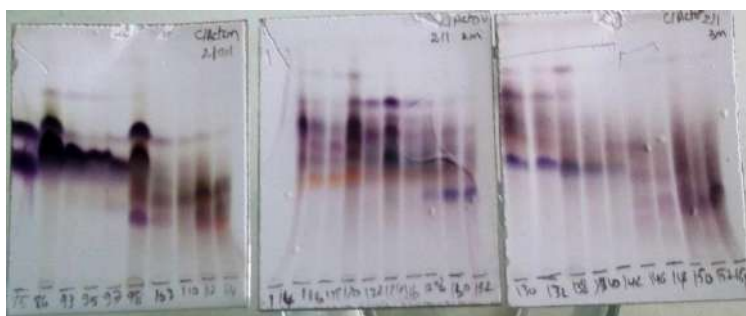
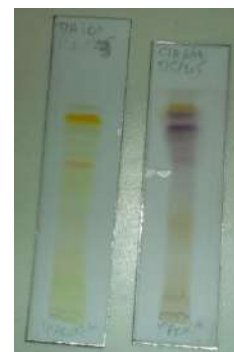
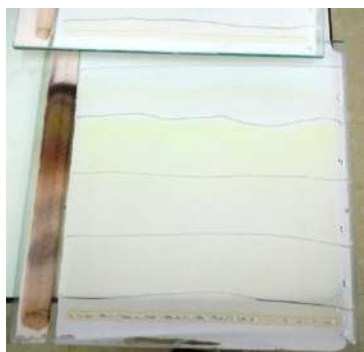
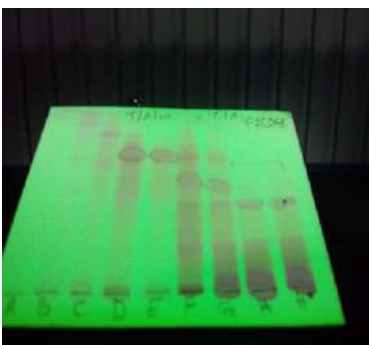
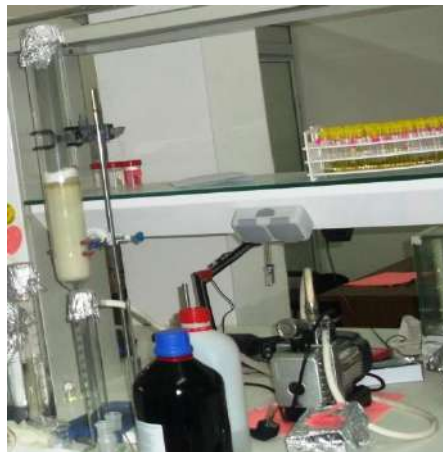
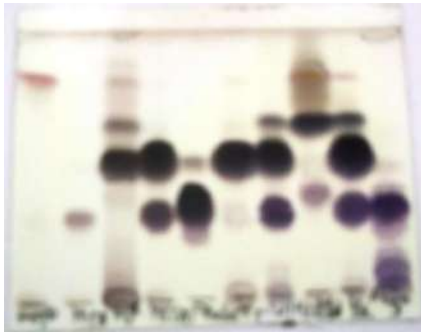
- .91 Yang L, Wang Z, Xu L: **Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene, and fluorenone) in Dendrobium species by high-performance liquid chromatography with diode array detection.** *Journal of Chromatography A* 2006, **1104**:230-237.
- .92 Carvalho MG, Aragão CF, Raffin FN, Moura TFdL: **Development and Validation of a Simultaneous RP-HPLC/UV/DAD Method for Determination of Polyphenols in Gels Containing S. terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae).** *Pharmacognosy Magazine* 2017, **13**:309.
- .93 Ballus CA, Meinhardt AD, Bruns RE, Godoy HT: **Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis.** *Talanta* 2011, **83**:1181-1187.
- .94 Tokul-Ölmez Ö, Şahin B, Çakır C, Öztürk M: **Rapid and easy method for simultaneous measurement of widespread 27 compounds in natural products and foods.** *Journal of Chemical Metrology* 2020, **14**:11.
- .95 Tung YT, Cheng KC, Ho ST, Chen YL, Wu TL, Hung KC, Wu JH: **Comparison and Characterization of the Antioxidant Potential of 3 Wild Grapes—Vitis thunbergii, V. flexuosa, and V. kelungensis.** *Journal of food science* 2011, **76**:C701-C706.
- .96 Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Yao WB: **In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from Choerospondias axillaris fruit.** *Food Chemistry* 2008, **106**:888-895.
- .97 Mariem S, Hanen F, Inès J, Mejdi S, Riadh K: **Phenolic profile, biological activities and fraction analysis of the medicinal halophyte Retama raetam.** *South African journal of botany* 2014, **94**:114-121.
- .98 Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N: **Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds.** *Food Chemistry* 2006, **97**:654-660.
- .99 HAMADA D, LADJEL S: **Etude Structure Activité des Principes Actifs de la Plante Anvillearadiata Asteraceae.**
- .100 Barros L, Cabrita L, Boas MV, Carvalho AM, Ferreira IC: **Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants.** *Food Chemistry* 2011, **127**:1600-1608.
- .101 Rémésy C: *Que mangerons-nous demain?*: Odile Jacob; 2005.
- .102 Durand G, Beaudoux J-L: *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives.* Lavoisier; 2011.
- .103 Mansour HB, Tlemcani LL: **Les colorants naturels sont-ils de bons additifs alimentaires?** *Phytothérapie* 2009, **7**:202-210.
- .104 Katoh Y, Nemoto N, Tanaka M, Takayama S: **Inhibition of benzo [a] pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds.** *Mutation Research Letters* 1983, **121**:153-157.
- .105 Dashwood RH, Breinholt V, Bailey GS: **Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1 (AFB1)-DNA binding in vivo and anti-mutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the Salmonella mutagenicity assay.** *Carcinogenesis* 1991, **12**:939-942.
- .106 Warner JR, Nath J, Ong T-M: **Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the Salmonella arabinose-resistant assay system.** *Mutation Research Letters* 1991, **262**:25-30.
- .107 Cady JB, Morgan WS: **Treatment of chronic ulcers with chlorophyll: review of a series of fifty cases.** *The American Journal of Surgery* 1948, **75**:562-569.
- .108 Branen A: **Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene.** *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1975, **52**:59-63.
- .109 Aourousseau B: **Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits.** 2002.
- .110 Favier A: **Le stress oxydant.** *L'actualité chimique* 2003, **108**:863-832.
- .111 Chu W-L, Lim Y-W, Radhakrishnan AK, Lim P-E: **Protective effect of aqueous extract from Spirulina platensis against cell death induced by free radicals.** *BMC complementary and alternative medicine* 2010, **10**:1-8.

- .112 Kumari A, Kakkar P: **Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays.** *Biomedical and environmental sciences* 2008, **21**:24-29.
- .113 Addai ZR: **Phytochemicals screening and evaluation of antioxidants and antibacterial activities of five medicinal plants.** *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2016, **8**:393-397.
- .114 Ansari K: **The free radicals--the hidden culprits--an update.** *Indian journal of medical sciences* 1997, **51**:319-336.
- .115 Sokół-Łętowska A, Oszmiański J, Wojdyło A: **Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap.** *Food Chemistry* 2007, **103**:853-859.
- .116 Prieto P, Pineda M, Aguilar M: **Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E.** *Analytical biochemistry* 1999, **269**:337-341.
- .117 Wisitsak P, Nimkamnerd J, Thitipramote N, Saewan N, Chaiwut P, Pintathong P: **Comparison the bioactive compounds and their activities between longan and litchi seeds extracts.** In *Proceeding 1st Mae Fah Luang University International Conference, Thailand.* 2012
- .118 Benmeddour Z, Mehinagic E, Le Meurlay D, Louaileche H: **Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: a comparative study.** *Journal of Functional Foods* 2013, **5**:346-354.
- .119 Hamada D, Ladjel S: **Chemical composition, in-vitro anti-microbial and antioxidant activities of the methanolic extract of *Anvillea radiata* Asteraceae.** *RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES* 2015, **6**:1367-1373.
- .120 Ferreira IC, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L: **Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity.** *Food Chemistry* 2007, **100**:1511-1516.
- .121 Yen W-J, Chang L-W, Duh P-D: **Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate.** *LWT-Food Science and Technology* 2005, **38**:193-200.
- .122 Caillet S, Lacroix M: **Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire.** *INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA* 2007:1-8.
- .123 Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP: **Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance.** *Journal of ethnopharmacology* 2012, **142**:265-273.
- .124 Djellouli M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L, Belabbes A, Badraoui M, Slimani N, Hamidi N: **Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (*Asteraceae* family) from the region of South West Algeria.** *Asian journal of natural & applied sciences* 2013, **2**:59-65.
- .125 Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M, Chaouch A: **Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc.** *BASE* 2010.
- .126 Giordani R, Kaloustian J: **Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques.** *Phytothérapie* 2006, **4**:121-124.
- .127 Hiemstra P, Maassen R, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens G, Dijkman J: **Antibacterial activity of antileukoprotease.** *Infection and immunity* 1996, **64**:4520-4524.
- .128 Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X: **Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles.** *Carbohydrate research* 2004, **339**:2693-2700.
- .129 Sotiriou GA, Pratsinis SE: **Antibacterial activity of nanosilver ions and particles.** *Environmental science & technology* 2010, **44**:5649-5654.
- .130 Rhayour K: **Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*.** 2002.
- .131 Chabot S, Bel-Rhlid R, Chenevert R, Piche Y: **Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions.** *New phytologist* 1992, **122**:461-467.

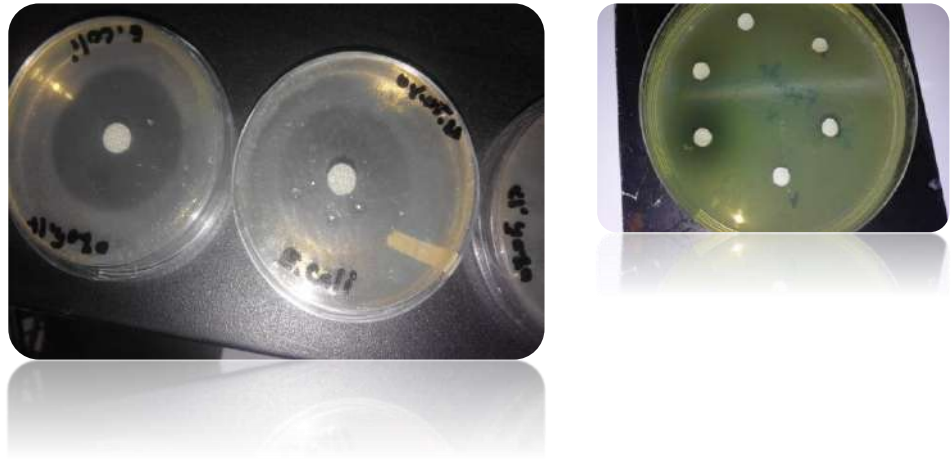
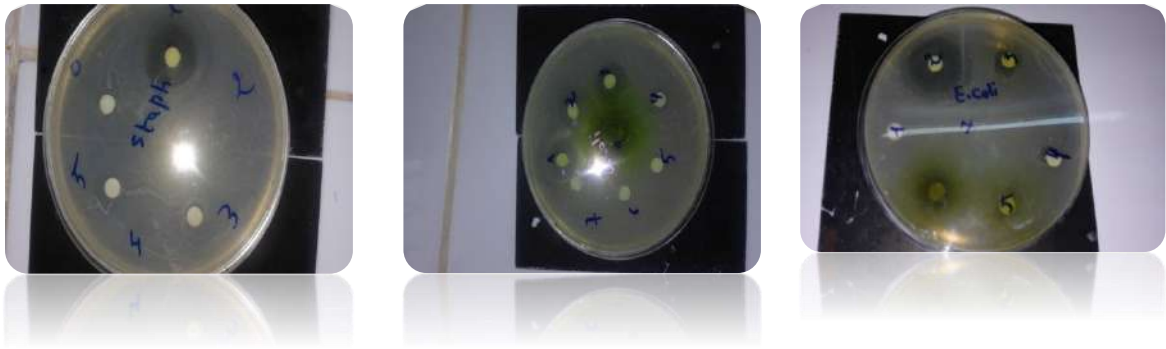
- .132 Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S: **Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus***. *Phytochemistry* 1987, **26**:2231-2.234
- .133 Seidel V: **Initial and bulk extraction of natural products isolation**. In *Natural products isolation*. Springer; 2012: 27-41
- .134 Moussaid M, Elamrani A, Berhal C, Moussaid H, Bourhim N, Benaissa M: **Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.)**. *Int J Nat Prod Res* 2012, **1**:11-13.
- .135 Jones WP, Kinghorn AD: **Extraction of plant secondary metabolites**. In *Natural products isolation*. Springer; 2012: 341-366
- .136 Noack M, Kolopp-Sarda M-N: **Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique**. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018, **2018**:28-37.
- .137 Majdalawieh AF, Fayyad MW: **Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review**. *International immunopharmacology* 2015, **28**:295-304.
- .138 Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J: **Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review**. *Canadian Journal of Cardiology* 2011, **27**:174-182.
- .139 Schenone S, Brullo C, Bruno O, Bondavalli F, Ranise A, Filippelli W, Rinaldi B, Capuano A, Falcone G: **New 1, 3, 4-thiadiazole derivatives endowed with analgesic and anti-inflammatory activities**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006, **14**:1698-1705.
- .140 Kariawasam K, Pathirana R, Ratnasooriya W, Handunnetti S, Abeysekera W: **Phytochemical profile and in vitro anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of Sri Lankan variety of *Psidium guajava* L.** *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017, **6**:22-26.
- .141 Satyanarayana V, Kumari SJ: **Evaluation of in vitro rheumatoid arthritis activity of polyherbal ethanolic extract containing formulations for selected potential Indian herbs**. *Drug Invention Today* 2018, **10**.
- .142 Mizushima Y, Kobayashi M: **Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1968, **20**:169-173.
- .143 Boulahfa Rahima Bourouba Abire BA: **Etude phytochimique et évaluation in vivo et in vitro de l'activité anti-inflammatoire de certains extraits de la plante médicinale *Inula viscosa***. 2017.
- .144 Abd Elchakour A: **Chimie organique moderne et pratique**. *Université du Roi Abd Elaziz, Djedda* 1.173 ,987
- .145 Abdel Sattar E, Galal AM, Mossa GS: **Antitumor germacranolides from *Anvillea garcinii***. *Journal of Natural Products* 1996, **59**:403-405.
- .146 Tyson R, Chang C-J, McLaughlin J, Aynehchi Y, Cassady J: **9- α -hydroxyparthenolide, a novel antitumor sesquiterpene lactone from *Anvillea garcini* (Burm.) DC1**. *Experientia* 1981, **37**:441-442.
- .147 Rustaiyan A, Dabiri M, Jakupovic J: **Germacranolides from *Anvillea garcini***. *Phytochemistry* 1986, **25**:1229-1230.
- .148 Chatterjee P, Chandra S, Dey P, Bhattacharya S: **Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative in vitro study**. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2012, **3**:136.

الملحق

الملحق



صور لبعض الكروماتوغرامات والتجهيزات المستعملة في فصل المركبات



صور موضحة للفعالية التثبيطية لبعض المستخلصات و المضادات الحيوية

الملتقيات والمنشورات العلمية

الملتقيات:

- ❖ المشاركة في الندوة الوطنية للنباتات المستوطنة. 15 نوفمبر 2017 (SNPS 2017) – جامعة غرداية - الجزائر
- ❖ الندوة الوطنية الأولى "العلاج بالنباتات والصحة" البلدية 16.17.18 ماي 2017
- ❖ المشاركة في الندوة الدولية الثانية لعلم الأحياء (SIB-VAZB الثانية) حول تقييم الموارد الحيوية في المنطقة الجافة 10-11 ديسمبر 2017 – جامعة الطاهر محمد، بشار - الجزائر.



Antioxidant Activities, Phenolic, Flavonoid and Tannin Contents and Antibacterial Activity of *Anvillea radiata* (Coss. & Dur.) Flowers from Southeast Algeria

S. MAHDIAR*, H. DENDOUGUI and M. HADIADI

Laboratory of Valorisation and Promotion of Saharan Resources, Faculty of Mathematics and Science of Matter, University of Ouargla, Ouargla, Algeria

*Corresponding author: Tel: +213 66 2927924; E-mail: salhama@gmail.com

Received: 3 March 2019;

Accepted: 27 March 2019;

Published online: 21 May 2019;

AJC-19416

Anvillea garcinii subsp. *radiata* (Coss. & Dur.) are an endemic species of Sahara region especially in Morocco and Algeria. This plant is widely used in traditional medicine. The extraction of phenolic compounds from *A. radiata* flowers is carried out using solvents of different polarity (chloroform, ethyl acetate, butanol). The yields of extraction from the flowers were 19.34, 0.278, 0.149, 1.750 and 3.308 % for the crude, chloroform, ethyl acetate, butanol and aqueous extracts, respectively. The amount of total phenolics, flavonoids, tannins and *in vitro* antioxidant and antibacterial properties of extracts of *A. radiata* flowers. The antioxidant activities were evaluated by measuring the ability of the extracts to scavenge the DPPH, ferric reducing power FRAP and phosphomolybdenum assay. The maximum extractable total phenolics and flavonoids were recorded in ethyl acetate fraction, while the tannins were present in chloroform fraction. Among the five extracts of *A. radiata* flowers, the maximum DPPH free radical scavenging activity was shown in ethyl acetate and butanol fractions ($IC_{50} = 0.20 \pm 0.001$ and 0.31 ± 0.004 mg/mL, respectively). The highest activity of FRAP assay and phosphomolybdenum reduction was observed in butanol fraction (358.58 ± 12.55 and 95.09 ± 0.67 mM, respectively). The results were compared with natural and synthetic antioxidants. In antibacterial properties, the chloroform extract has the highest activity. These results implied that these plant extracts may possess health promoting effects and might be potential sources of potent natural antioxidant and antimicrobial.

Keywords: *Anvillea radiata*, Antimicrobial activity, Phenolic, flavonoids, Tannins.

INTRODUCTION

Medicinal plants are widely used in human therapy, agricultural, scientific research and in several other areas [1]. They are rich source of natural bioactive substances and compounds called secondary metabolites that are the subject of much research *in vivo* and *in vitro* [2]. Therapeutic benefits of the medicinal plants are often attributed to their antioxidant properties in relation to their large content on antioxidant compounds such as vitamin C, vitamin E, polyphenol and flavonoids [3]. Natural antioxidants derived from plants, especially phenolics are of considerable interest as dietary supplements or food preservatives. In most cases, phenolics mediate their anti-carcinogenic effects by inhibiting all stages of chemical carcinogenesis, initiation, promotion and progression as well as formation of carcinogens from dietary precursors [4].

The genus *Anvillea* is a small genus of plants belongs to the Asteraceae daisy family, it distributed in the region from

North Africa to Iran, including several Middle Eastern countries, such as Egypt, Palestine and Saudi Arabia [5]. It is found to contain two species which occur in North Africa and Middle East [6]. *Anvilleina* Maire is reduced to a synonym of *Anvillea* and the two new combinations are made: *A. platycarpa* (Maire) and *A. garcinii* (Burm. f.) (Coss. & Dur.) ssp. *radiata* (Coss. & Dur.) [7].

In this context, specie *A. garcinii* (subsp.) *radiata* (Coss. & Dur.) is renowned for its remarkable traditional use. It is a shrub of stony pastures belonging to the family Asteraceae; *A. radiata* is a small woody shrub, densely branched, 20-50 cm high. It is tomentose, pubescent and very rameous. Its leaves attenuated in petioles, are toothed or sub-pinnate; its inflorescences, heads with spinescent involucre are formed of yellow orange florets, the outside one 25 mm long. *A. radiata* is commonly known in Arabic Nogd sahrâwi Nogd Lhor [8] and in Tamazight "Ajjerg; âwjerg" is also called Arabian oxeve [5].

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 (CC BY-NC-SA 4.0) International License which allows readers to freely read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of its articles and to use them for any other lawful non-commercial purpose as long as the original source is duly acknowledged.

Anvillea radiata is endemic between Algeria and Morocco [2,9] and used in traditional medicine for the treatment of various diseases *e.g.*, gastroenteritis [10], spasms and colic, arthritis and rheumatoid vaginal discharge, colds, hepatitis, diabetes and stomach ailments lung disease and indigestion [9-11], anti-fungal activity [1,12,13], antimicrobial activity [8], *etc.* In previous phytochemical studies, parthenolid-9-one, 9 α -hydroxy-parthenolide, 8 α ,9 α -epoxyparthenolide from *A. radiata* are reported [14]. Some other germacranolides *e.g.*, 9 α -hydroxy-1 β ,10 α -epoxyparthenolide, 9 β -hydroxyparthenolide, 9 β -hydroxy-1 β ,10 α -epoxyparthenolide, *cis*-parthenolid-9-one [9,15,16] and five flavonols glycosides were detected in *A. garcinii* [17] and thirteen flavonoids from which, four aglycones and nine flavonol glycosides were also isolated from *A. radiata* [18]. The objective of this study was to compare antioxidant and antimicrobial activities, total phenolic, flavonoid and tannin contents of extracts of *A. radiata* flowers.

EXPERIMENTAL

Plant material: The flowers of *A. radiata* were collected during the flowering period from Sahara of Merrara near of Touggourt (33° Northern latitude, longitude of 6° East at the altitude of 69 m) southeast of Algeria. It was obtained in the month of April 2018. The flower was identified and authenticated was done on the basis of Quezel and Santa [19] by Dr. Halis Youcef, Touggourt's Scientific and Technical Research Centre for Arid Areas. Plant samples were cleaned, air dried in the shade and well-ventilated place, then grounded and stored in dark.

All the chemicals and reagents were of analytical grade. Folin-Ciocalteu reagent, aluminum chloride, phosphate buffer, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ammonium molybdate, gallic acid, quercetin, catechin, ascorbic acid, BHA and BHT were procured from Sigma-Aldrich.

Preparation of extract and fractions: Flowers (100 g) of *A. radiata* were extracted thrice at room temperature with MeOH-H₂O (70:30, v/v) for 48 h. After filtration, the filtrate was evaporated till dryness (19.34 g), recovered with distilled water (60 mL) and partitioned successively using chloroform (3 × 35 mL) giving 0.278 g of chloroform fraction, ethyl acetate (35 mL) giving 0.149 g of ethyl acetate fraction and *n*-butanol (4 × 35 mL) giving 1.750 g of butanol fraction. The extracts, also the remaining water fraction 3.308 g, were concentrated under reduced pressure and then redissolved with minimum methanol or water. For antimicrobial activity, crude extract and fractions were collected separately and concentrated using a vacuum evaporator to remove the solvent. Residues were dissolved in pure dimethyl sulfoxide and stored at 4 °C until analysis.

Determination of total phenolic content (TPC): The total phenolic content in the crude extract and the fractions of *A. radiata* flowers were determined according to method [20]. Briefly; 0.1 mL of the extract sample was mixed with 0.5 mL of a (10 %) Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min, 2.0 mL of (20 %) sodium carbonate were added, the mixture was shaken and reacted for 30 min at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 760 nm. The total phenolic content

was expressed as gallic acid equivalents (GAE), in milligrams per gram of extract.

Determination of total flavonoid content (TFC): The total flavonoid content in crude extract and the fractions of *A. radiata* flowers were determined according to the reported method [21]. Briefly, 0.5 mL of 2 % AlCl₃ in ethanol solution was added to 0.5 mL of extract. After 0.5 h incubation at room temperature, the absorbance was measured at 430 nm. The total flavonoid content was expressed as quercetin equivalents (QE).

Determination of total tannin content (TTC): The total tannin content in crude extract and the fractions of flower of *A. radiata* were estimated by colorimetric method [22]. A 3 mL of 4 % ethanol vanillin solution and 1.5 mL of conc. HCl were added to 0.4 mL of extract. The mixture was allowed to stand for 15 min, and the absorbance was measured at 500 nm. The total tannin content was expressed as catechin equivalents (CE).

DPPH radical scavenging capacity: Scavenging radical activity of various extracts against stable DPPH was assessed according to reported method [23] with slight modification. Diluted plant extract (0.1 mL) was added to 1.9 mL of 0.1 mM DPPH* in ethanol solution. The solutions were placed in dark at room temperature for 0.5 h. The absorbance of the resulting solution was then noted at 517 nm and ascorbic acid was used as a positive control. The capability to scavenge the DPPH radical was calculated using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

where A₀ and A₁ are the absorbance at 30 min of control and sample, respectively. The ascorbic acid and BHA was used as positives control.

Ferric reducing power (FRAP): The ferric reducing activity was estimated based on the method of Benmeddour *et al.* [24]. Different concentrations of the sample (1 mL) were mixed with 2.5 mL phosphate buffer solution (pH 6.6) and 2.5 mL potassium ferricyanide (1 %). The resulting solutions were incubated at 50 °C for 20 min. After incubation, the reaction mixture mixed with 2.5 mL of 10 % TCA and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. 2.5 mL of the supernatant was taken and 2.5 mL distilled water and 0.5 mL of ferric chloride (0.1 %) was added to it. The absorbance was measured at 700 nm, using ascorbic acid as a positive control and the results were expressed as mM equivalent ascorbic acid.

Phosphomolybdenum assay: Total antioxidant activity was estimated by phosphomolybdenum assay method [25]. The different extracts and the fractions of flowers of *A. radiata* having different extract concentrations (0.1 mL) were mixed with 1 mL reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The resulting solutions were incubated in a water bath at 95 °C for 90 min. The mixture was left to cool at room temperature. The absorbance of the mixture was measured at 695 nm, using ascorbic acid as a positive control and the results were expressed as mM equivalent ascorbic acid.

Antimicrobial activity: The antimicrobial activity was evaluated by paper disc diffusion and micro-dilution methods against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli*

(ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853). Microorganisms were obtained from the culture collection of the Institute Pasteur.

Determination of zone of inhibition by disc diffusion assay: This test was performed by the solid medium diffusion method [26]. A diameter discs of 6 mm cut from Whatman filter paper No. 3, sterilized and impregnated with 10 μ L per disc of different concentrations of extracts and fractions of flowers of *A. radiata* deposited on the surface of a medium previously inoculated. After incubation at 37 °C for 24 h, the inhibition zones formed around the discs were measured. Each test was repeated thrice.

Statistical analysis: All experiments were performed with each assay in triplicate. Data are presented as mean \pm standard deviation. IC₅₀ was calculated from linear regression.

RESULTS AND DISCUSSION

The extraction yield for crude extract was 19.95 % for the fractions, the highest yield was found in water fraction (3.308 %) followed by butanol fraction (1.750 %), chloroform fraction (0.278 %) and the lowest yield of extraction was in ethyl acetate fraction (0.149 %). In the present study, total phenolics, tannins and flavonoids obtained from the extracts/fractions of *A. radiata* flowers are presented in Table-1.

TABLE-1
EXTRACTION YIELD, TOTAL PHENOLICS, FLAVONOIDS AND TANNINS CONTENTS OF *A. radiata* FLOWERS EXTRACTS

Extract	Yield (%)	Total phenolics (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)	Total tannin (mg CE/g)
Chloroform fraction	0.278	39.99 \pm 1.89	4.39 \pm 0.03	6.66 \pm 0.04
Ethyl acetate fraction	0.149	647.32 \pm 83.20	46.04 \pm 0.47	4.90 \pm 0.20
Butanol fraction	1.750	270.22 \pm 11.21	17.94 \pm 0.89	1.18 \pm 0.12
Water fraction	3.308	68.67 \pm 3.32	2.11 \pm 0.09	2.27 \pm 0.16
Crude extract	19.34	220.25 \pm 18.95	10.12 \pm 0.31	4.75 \pm 0.35

Total phenolics varied from 647.32 \pm 83.20 to 39.99 \pm 1.89 (mg GAE/g extract). Maximum extractable total phenolics and flavonoids were recorded in ethyl acetate fraction (647.32 \pm 83.20 and 46.04 \pm 0.47mg QE/g, respectively) followed by butanol fraction (270.22 \pm 11.21 and 17.94 \pm 0.89mg QE/g, respectively) whereas other extract showed moderate amount of phenolics and flavonoid. Chloroform fraction exhibited lower level of phenolics (39.99 \pm 1.89 mg GAE/g) and water fraction have minimum amount of flavonoid when compared to other fraction (2.11 \pm 0.09mg QE/g). The highest amount of tannins was present in chloroform fraction (6.66 \pm 0.04 mg CE/g) followed by ethyl acetate fraction (4.90 \pm 0.20 mg CE/g) and butanol fraction contained the lowest amount total tannin. The results of Amkraz *et al.* [27] showed that the extract of *A. radiata* has a polyphenol and flavonoids content equal to 24.13 mg CE/g dry matter) and 15.39 (mg ER/g dry matter) however, Mohamad *et al.* [3] estimated the highest amount of total phenols was in methanolic extract of air dried aerial parts *A. radiata*.

Antioxidant activity: In the present study, three commonly used antioxidant evaluation methods such as DPPH radical scavenging activity, reducing power assay and phosphomolybdenum scavenging capacity were chosen to determine the antioxidant potential of fractions from *A. radiata* flowers.

DPPH radical scavenging activity: The results on DPPH free radical scavenging activity of the different fractions from *A. radiata* flowers are shown in Table-2. The absorbance decreases as a result of a colour change from purple to yellow as radical is scavenged by antioxidants through donation of hydrogen to from the stable DPPH molecule.

TABLE-2
ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE EXTRACT AND FRACTIONS OF *A. radiata* FLOWERS

Extract	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP (Mm)	Phosphomolybdenum (mM)
Chloroform fraction	12.59 \pm 0.16	2.76 \pm 0.04	54.20 \pm 0.53
Ethyl acetate fraction	0.20 \pm 0.001	296.93 \pm 8.14	58.22 \pm 3.95
Butanol fraction	0.31 \pm 0.004	358.58 \pm 12.55	95.09 \pm 0.67
Water fraction	8.19 \pm 0.12	160.60 \pm 13.88	16.07 \pm 1.25
Crude extract	0.59 \pm 0.04	85.19 \pm 1.11	18.57 \pm 0.39
BHA	0.08 \pm 0.002	1.09 \pm 0.03	0.25 \pm 0.01
BHT	–	1.91 \pm 0.03	0.59 \pm 0.08

IC₅₀ values (the concentration required to inhibit radical formation by 50 %) for DPPH radical under the experimental condition was determined. Therefore, lower value of IC₅₀ indicates a higher antioxidant activity. The best free radical scavenging activity was exerted by ethyl acetate and butanol fractions showed comparable levels of free radical scavenging activity (0.31 \pm 0.004 mg/mL). The free radical scavenging activity was found to be least in chloroform fraction (12.59 \pm 0.16 mg/mL).

This result concurred with Mohamad *et al.* [3], which showed that ethyl acetate extract of *A. radiata* has the best DPPH free radical scavenging activity value was 87.06 \pm 1.43 μ g/mL.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay: The antioxidant potential of different fractions of *A. radiata* flowers were estimated from their ability to reduce the ferricyanide complex (Fe³⁺) to ferrous form (Fe²⁺), which is recorded by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm. Higher FRAP values indicates higher reducing potency. The FRAP values of fractions of *A. radiata* flowers are depicted in Table-2. Among them butanol fraction registered higher antioxidant activity (358.58 \pm 12.55 mM) followed by ethyl acetate fraction (296.93 \pm 8.14 Mm). All the samples showed reducing power but not at the same level. The order of results of the reduction capacity decrease in the following order: butanol fraction > ethyl acetate fraction > chloroform fraction > crude extract > water fraction. All the extracts showed a good ferric reducing activity, better than BHA or BHT.

An abundant total phenolics in several medicinal plants exhibited higher FRAP values. The reductive ability of samples assessed in this study suggested that all the extracts were able to donate electrons. Hence, they should be able to donate electrons to free radicals in effective biological activities.

Phosphomolybdenum assay: The phosphomolybdenum method is based on the reduction of phosphate-Mo(VI) to phosphate-Mo(V) by the sample and subsequent formation of

TABLE-3
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *A. radiata* EXTRACTS

Extract	Conc. (mg/mL)	Bacterial agent		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922 (-)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (+)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (-)
Chloroform fraction	71.6	20 mm	17 mm	9 mm
Ethylacetate fraction	71.53	11 mm	10 mm	-
Butanol fraction	423.4	11.5 mm	11.5 mm	8.5 mm
Water fraction	238.08	-	-	-
Crude extract	108.5	-	11 mm	-

Included disc diameter (6 mm); - = No zone of inhibition.

a bluish green coloured phosphate/Mo(V) complex at acidic pH. This method is applied to evaluate the total antioxidant capacity of plant extracts [25]. All the fractions exhibited good phosphomolybdenum scavenging capacity, where butanol fraction showed the highest activity (95.09 ± 0.67 mM) whereas water fraction exhibited lower activity (16.07 ± 1.25 mM). The phosphomolybdenum values of fractions *A. radiata* flowers are depicted in Table-2.

An antioxidant may be defined as 'a substance that when present at low concentrations compared with that of an oxidizable substrate significantly delays or prevents the oxidation of that substrate [28]. Among the extracts tested, butanol fraction showed promising antioxidant activity that may be due to their rich content of the compounds: aglycones, flavonol glycosides, parthenolid-9-one, 9 α -hydroxyparthenolide and 8 α ,9 α -epoxyparthenolide from *A. radiata* [18].

Antioxidant activity of *A. radiata* as shown by the assays used could be related to their different phenolic content and composition. In other words, antioxidant activity increased proportionally to the phenolic content. Phenols and polyphenolic compounds, such as flavonoids, are widely found in plants, and they showed to possess significant antioxidant activities [4]. The chemical activities of polyphenols in terms of their reducing properties as hydrogen or electron-donating agents predicted their potential for action as free-radical scavengers (antioxidants) [29].

The results of present study established that different extracts of *A. radiata* flowers could chelate the ions and the values are substantial. The hydrogen/electron transfer form antioxidant to DPPH radical and Mo(V) complex occurred in the DPPH radical and phosphomolybdenum assays, respectively. The results of the present study demonstrated that the extracts of *A. radiata* flowers possess significant antioxidant and free radical scavenging activities.

Antimicrobial activity assay: Evaluation of antibacterial activity was performed by disk diffusion method in solid medium. The evaluation of this activity was estimated by measuring the action of four fractions on the inhibition zone diameter of three strains of pathogenic bacteria. The results displayed that some fractions showed an appreciable antibacterial activity (Table-3). Among all the studied fractions, the most interesting antibacterial activity was provided by chloroform fraction. In fact, the highest power was observed against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with an inhibition zone diameter equal to 20 and 17 mm, respectively. This method has shown that all the extracts (aqueous and solvent extracts) demonstrated activity against species of bacteria tested, suggesting that the

medicinal plants could be an important alternative in control of bacterial growth (Table-3).

In the last decades, there has been particular interest in the use of abundant naturally occurring antimicrobials (herbs, spices and plants). This result concurred with Tekwu *et al.* [30] and Djellouli *et al.* [31] who reported that chloroform fraction derived from the methanol extract of *A. radiata* was found to be most effective followed by ethyl acetate and butanol fractions. Some extracts showed weakly anticandidal activity [8]. El Hassany *et al.* [14] reported that 9 α -hydroxyparthenolide isolated in *A. radiata* at a concentration of 50 and 100 μ g/disc, inhibited the growth of *Bacillus cereus* (IPL 58605), *Streptococcus C* (IPT 2-035), *Proteus vulgaris* (CIP 58605), *Enterococcus faecalis* (CIP 103214) and *Escherichia coli* (CIP 54127).

Conclusion

It is concluded that five different extracts of *A. radiata* were found to be rich in various phytochemicals and possess antioxidant properties. Further studies are needed for the isolation and identification of bioactive compounds responsible for antioxidant and antibacterial activity.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

REFERENCES

1. M. Lakhdar, K.H. Meriem, B. Larbi, R. Amina and S. Aicha, *World Appl. Sci. J.*, **26**, 165 (2013).
2. A.G. Atanasov, B. Waltenberger, E.-M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E.H. Heiss, J.M. Rollinger, D. Schuster, J.M. Breuss, V. Bochkov, M.D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V.M. Dirsch and H. Stuppner, *Biotechnol. Adv.*, **33**, 1582 (2015); <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>.
3. D.-P. Xu, Y. Li, X. Meng, T. Zhou, Y. Zhou, J. Zheng, J.-J. Zhang and H.-B. Li, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 96 (2017); <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>.
4. M.A. Ebrahimzadeh, S. Ehsanifar and B. Eslami, *Pharmacogn. Mag.*, **5**, 213 (2009).
5. M. Khan, M.M.S. Abdullah, A.A. Mousa and Z.A. Hamad, *Rec. Nat. Prod.*, **10**, 251 (2016).
6. M.A. Boukhris, É. Destandau, A. El Hakmaoui, L. El Rhaffari and C. Elfakir, *C. R. Chim.*, **19**, 1124 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.019>.
7. A. Anderberg, *Nord. J. Bot.*, **2**, 297 (1982); <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1982.tb01193.x>.
8. F. Beddou, C. Bekhechi, S. D Chabane and F.A. Bekkara, *Int. J. Pharm. Res. Bio-Sci.*, **3**, 175 (2014).

9. Centre for Mediterranean Cooperation, I.U.C.N.N.R.U., A Guide to Medicinal Plants in North Africa, IUCN Centre for Mediterranean Cooperation (2005).
10. M. Lakhdar, K.H. Meriem, B. Larbi, R. Amina and S. Aicha, *World Appl. Sci. J.*, **26**, 165 (2013).
11. M. Bammou, K.E.R. Sellam, B. Lhoussaine, D.T. Eimad, A. Daoudi, J. Ibjibijen and L. Nassiri, *Eur. Scient. J.*, **11**, 233 (2015).
12. M. Snoussi, M. Najett, M. Boumediene and M. Abdelallah, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **9**, 1297 (2018); [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(3\).1297-00](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(3).1297-00).
13. I. Talibi, L. Askarne, H. Boubaker, E.H. Boudyach, F. Msanda, B. Saadi and A. Ait Ben Aoumar, *Crop Prot.*, **35**, 41 (2012); <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.016>.
14. B. El Hassany, F. El Hanbali, M. Akssira, F. Mellouki, A. Haidour and A.F. Barrero, *Fitoterapia*, **75**, 573 (2004); <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.06.003>.
15. R. Tyson, C.-J. Chang, J. McLaughlin, Y. Aynehchi and J. Cassidy, *Cell. Mol. Life Sci.*, **37**, 441 (1981); <https://doi.org/10.1007/BF01986119>.
16. E. Abdel-Sattar and A.T. McPhail, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1587 (2000); <https://doi.org/10.1021/np000269w>.
17. A. Ulubelen, T. Mabry and Y. Aynehchi, *J. Nat. Prod.*, **42**, 624 (1979); <https://doi.org/10.1021/np50006a007>.
18. H. Dendougui, M. Jay, F. Benayache and S. Benayache, *Biochem. Syst. Ecol.*, **34**, 718 (2006); <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.05.002>.
19. P.S. Quezel, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (1963).
20. Y.T. Tung, K.C. Cheng, S.T. Ho, Y.L. Chen, T.L. Wu, K.C. Hung and J.H. Wu, *J. Food Sci.*, **76**, C701 (2011); <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02178.x>.
21. H. Wang, X.D. Gao, G.C. Zhou, L. Cai and W.B. Yao, *Food Chem.*, **106**, 888 (2008); <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.068>.
22. S. Mariem, F. Hanen, J. Inès, S. Mejdi and K. Riadh, *S. Afr. J. Bot.*, **94**, 114 (2014); <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.06.010>.
23. P. Wisitsak, J. Nimkamerd, N. Thitipramote, N. Saewan, P. Chaiwut and P. Pintathong, Comparison of the Bioactive Compounds and Their Activities between Longan and Litchi Seeds Extracts, In Proceeding of 1st Mae Fah Luang University International Conference, Thailand (2012).
24. Z. Benmeddour, E. Mehinagic, D.L. Meurlay and H. Louaiche, *J. Funct. Foods*, **5**, 346 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.005>.
25. P. Prieto, M. Pineda and M. Aguilar, *Anal. Biochem.*, **269**, 337 (1999); <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
26. V.K. Gupta, A. Roy, V.K. Nigam and K. Mukherjee, *J. Med. Plants Res.*, **4**, 1656 (2010).
27. H. Boubaker, I. Talibi, N. Amkraz, F. Msanda, B. Saadi, E.H. Boudyach and A. Ait-Benaoumar, *Afr. J. Biotechnol.*, **13**, 4515 (2014); <https://doi.org/10.5897/AJB2014.13831>.
28. R. Aeschbach, J. Löliger, B. Scott, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell and O. Aruoma, *Food Chem. Toxicol.*, **32**, 31 (1994); [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(84\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(84)90033-4).
29. C. Rice-Evans, N. Miller and G. Paganga, *Trends Plant Sci.*, **2**, 152 (1997); [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
30. E.M. Tekwu, A.C. Pieme and V.P. Beng, *J. Ethnopharmacol.*, **142**, 265 (2012); <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.005>.
31. M. Djellouli, A. Moussaoui, H. Benmehdi, L. Ziane, A. Belabbes, M. Badraoui, N. Slimani and N. Hamidi, *Asian J. Nat. Appl. Sci.*, **2**, 59 (2013).

RESEARCH ARTICLE

Phytochemical profile and *In vitro* Anti-inflammatory Activity of *Anvillea radiata* (Coss and Dur) flowers Extracts

Salha Mahdjar*, Chahrazad Bakka, Hocine Dendougui, Mohamed Hadjadj

Univ Ouargla, Fac. Des Mathématiques et Des Sciences De La Matière, Lab. Valorisation et Promotion Des Ressources Sahariennes (VPRS) Route De Ghardaïa, Ouargla, Algeria

*Corresponding Author E-mail: salhama@ymail.com

ABSTRACT:

Objective: The present study is aimed to evaluate the phytochemical screening and in vitro anti-inflammatory activities of extracts of *A. radiata* flowers by inhibition of protein denaturation method by egg albumin and bovine serum method. **Materials and Methods:** Different concentrations was incubated with bovine serum and egg albumin in a controlled experimental situation and subjected to determination of absorbance and membrane stabilization and viscosity to assess the anti-inflammatory property. Diclofenac sodium was used as the standard drug. **Result:** The results exhibited that the extracts of *A. radiata* flowers possessed a marked anti-inflammatory effect against the denaturation of protein. **Conclusion:** it is concluded that the results indicate that the extract of *A. radiata* flowers was found to possess significantly good anti-inflammatory and this can be attributed to the presence of Phenolic compounds.

KEYWORDS: *A. radiata* anti-inflammatory, egg albumin, bovine serum, Diclofenac sodium.

INTRODUCTION:

In the very last few decades, there is a tremendous growth in the region of herbal medicine. It is coming popularized in both developing and developed countries due to its natural origin because of its lesser side effects. Herbal remedies provide a lot of drugs for the treatment of internal diseases which are considered to be stubborn and incurable by other system of medicines¹

Inflammation is a protective immune response towards the invasion of any foreign body such as bacteria, viruses, and parasites. Inflammation research is one of the major fields of global healthcare research, due to the side effects of commercially available non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as renal suppression and gastrointestinal problems like ulcers²

Natural products have contributed significantly to the development of modern medicine. Recently traditional medicine worldwide is being re-evaluated by extensive research on different plant species and their active therapeutic principles. The rich wealth of plant kingdom can represent a novel source of newer compounds with significant anti-inflammatory activities. The major merits of herbal medicine seem to be their perceived efficacy, low incidence of serious adverse effects, and low cost³

A. radiata is commonly known in Arabic Nogh Sahrâwi Nogh Lhor⁴ and in Tamazight « Ajjerg; âwjerg » is also called Arabian oxeye⁵. *A. radiata* is endemic between Algeria and Morocco⁶ It is used in traditional medicine for the treatment of various diseases; gastroenteritis⁷ spasms and colic, arthritis and rheumatoid vaginal discharge, colds, hepatitis, diabetes and stomach ailments lung disease and indigestion⁸, antifungal activity^{9,10} antimicrobial activity⁴

The present study was conducted to evaluate the possible in vitro anti-inflammatory effect of *A. radiata* flowers extract against the denaturation of the protein.

Received on 31.10.2019

Modified on 31.12.2019

Accepted on 28.01.2020

©AJRC All right reserved

Asian J. Research Chem. 2020; 13(1): 44-47.

DOI: 10.5958/0974-4150.2020.00010.3

MATERIALS AND METHODS:**Collection of the Plant Materials:**

At flowering stage, flowers of *A. radiata* were collected during the flowering period from Sahara of Merrara near of Touggourt (33° Northern latitude, longitude of 6° East, altitude: 69 m, under the sea) southeast of Algeria. It was obtained in the month of April 2013. The identification was done on the basis of Quezel and Santa¹¹ by Doctor Halis Youcef researcher in Touggourt's Scientific and Technical Research Centre for Arid Areas. Plant sample was cleaned, air dried in the shade and well-ventilated place, then grounded and stored in the dark.

Preparation of the extracts of *A. radiata* Flowers:

Flowers (100g) of *A. radiata* were extracted at room temperature with MeOH-H₂O (70:30, v/v) for 48h, three times. After filtration, the filtrate was evaporated till dryness (19.34g), recovered with distilled water (60ml) and partitioned successively using chloroform (3 × 35ml) giving 0.278g of Chloroform fraction, ethyl acetate (1 × 35ml) giving 0.149g of Ethyl acetate fraction, and n-butanol (4 × 35ml) giving 1.750g of Butanol fraction. The extracts, also were concentrated under reduced pressure and then re-dissolved with the minimum of methanol or water and stored at 4°C until analysis.

Phytochemical analysis of The extracts of *A. radiata* Flowers:

The extracts of *A. radiata* Flowers were subjected to preliminary phytochemical evaluated to determine the presence of alkaloids, flavonoids, glycosides, phenols, terpenoids, sterols, tannins, coumarins, anthraquinones and quinones. According to standard methods⁹

***In vitro* egg albumin denaturation method:**

The reaction mixture (5ml) consisted of 0.2ml of egg albumin from fresh hen's egg, 2.8ml of phosphate buffered saline (PBS, pH 6.4) and 2 ml of varying concentrations of extracts of The extracts of *A. radiata* Flowers. Was used as the test sample. A similar volume of double distilled water served as the control. Next, the mixture was incubated at 37°C for 15 minutes and then heated at 70°C for 5 minutes. After cooling; the absorbance was measured at 660nm. Diclofenac sodium

in the concentrations (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 mg/ml) was used as the reference drug. The percentage inhibition of denaturation which is an index of anti-inflammatory activity was calculated using the following equation:¹²

$$\text{Inhibition of protein denaturation (\%)} = \left(\frac{A_c - A_t}{A_c} \right) \times 100$$

A_c: absorbance of the control

A_t: absorbance of the test sample

***In vitro* BSA denaturation method:**

The anti-inflammatory activity of the extracts of *A. radiata* Flowers. was performed by using bovine serum albumin denaturation (BSA) method with some modification¹³⁻¹⁵ 0.05ml of different concentration of test and reference drugs Diclofenac sodium (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10mg/ml) and 0.45 ml of bovine serum albumin (1 % w/v) mixed. The sample was incubated at 37 °C for 20 minutes and then heated at 57°C for 3 minutes. After cooling the samples, add 2.5 ml of phosphate buffer slain (pH 6.4), the absorbance was measured at 660 nm. The percentage inhibition of protein denaturation was calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left(\left(\frac{A_t - A_c}{A_t} \right) * 100 \right)$$

A_c: absorbance of the control; A_t: absorbance of the test sample

RESULTS AND DISCUSSION:

The extracts of *A. radiata* Flowers were subjected to qualitative tests for the identification of phytochemical constituents according to standard procedures. The preliminary phytochemical investigation showed the presence of phytoconstituents such as phenols, alkaloids, flavonoids, tannin.

The extracts of *A. radiata* Flowers was subjected to qualitative analytical tests for the various plant constituents (Table1) the phytochemical analysis have given the presence the flavonoids, glycosides, quinones, coummarine, tannins, sterols and triterpenoids.

Table 1: Preliminary phytochemical screening of The extracts of *A. radiata* Flowers

Phytochemical test	Test	Extracts of <i>A. radiata</i>			
		CHCl ₃	AcOEt	BuOH	Crude
Alkaloids	Mayer's test	-	-	-	-
	Wagner's test	-	-	-	-
Glycosides	Kellarkiliani test	-	+	+	+
	Conc. H ₂ SO ₄ test	-	+	+	+
Antraquinones	-	-	-	-	
Quinones	-	-	+	-	
Phenols	Ellagic acid test	-	-	-	-
Tannins	FeCl ₃ test	-	+	+	+
Flavonoids	Shinoda's test	-	+	+	+
	Alkaline Reagent test	-	+	+	+
Coumarins	-	+	+	+	
Sterols	Salkowski test	-	+	+	+
Triterpenoids	Lieberman Burchard test	-	+	+	+

Where, "+" indicates positive and "-" indicates negative

Table.2 Effect of Diclofenac sodium and extracts of *A.radiata* Flowers on in vitro heat-induced denaturation of egg albumin protein

Concentrations mg/ml	Standard solution	Chloroform fraction	Ethyl acetate fraction	Butanol fraction	Crude extract
0,3125	23,27±0.05	4,07±0.007	10,00±0.007	12,03±0.06	5,48±0.03
0,625	27,94±0.03	14,98±0.05	14,06±0.01	16,90±0.03	10,75±0.07
1,25	35,31±0.07	24,32±0.05	16,44±0.01	21,64±0.04	13,52±0.09
2,5	53,11±0.02	46,19±0.1	18,15±0.02	36,74±0.1	15,65±0.08
5	79,95±0.05	56,15±0.07	53,69±0.01	64,66±0.08	33,50±0.16
10	89,00±0.05	68,69±0.09	86,71±0.00	77,18±0.02	84,51±0.10

Results are expressed as the mean of 6 values ± standard deviation

Table.3 Effect of Diclofenac sodium and extracts of *A.radiata* Flowers on in vitro heat-induced denaturation of BSA

Concentrations mg/ml	Standard solution	Chloroform fraction	Ethyl acetate fraction	Butanol fraction	Crude extract
0,3125	38,73±0.021	38,88±0.09	60±0.00	50±0.00	44,44±0.09
0,625	45,41±0.016	38,88±0.09	69,44±0.04	66,6±0.00	62,22±0.03
1,25	52,17±0.037	56,66±0.05	96,57±0.01	90,88±0.02	75,21±0.01
2,5	58,84±0.02	88,62±0.01	98,87±0.01	99,52±0.01	89,41±0.05
5	61,54±0.00	98,38±0.01	99,02±0.008	99,62±0.09	98,44±0.03
10	62,96±0.00	99,40±0.005	99,41±0.005	99,78±0.00	99,11±0.03

Results are expressed as the mean of 6 values ± standard deviation

Anti-inflammatory activity:

Protein denaturation is a process in which proteins lose their tertiary structure and secondary structure. It is one of the causes of arthritic disease and inflammation. Mechanism of denaturation probably involves alteration in electrostatic, hydrogen, hydrophobic and disulphide bonding [16]. *In vitro* anti-arthritic activity of studied the extracts of *A.radiata* flowers were evaluated with bovine serum albumin (BSA) denaturation method and denaturation method using egg albumin.

In vitro denaturation of egg albumin:

In the present investigation, the *in vitro* anti-inflammatory effect of the extracts of *A.radiata* Flowers was evaluated against denaturation of egg albumin. The results of the extracts of *A.radiata* Flowers *in vitro* denaturation of egg albumin of extracts of are summarized in Table 2.

The extracts of *A.radiata* Flowers had shown have a similar activity inhibition of protein denaturation than standard anti-inflammatory drug Diclofenac sodium, which CHCl₃ extract has less inhibition for them. The maximum inhibition of 89% was observed at 10mg/ml in The extracts of *A.radiata* Flowers, and the maximum inhibition of Diclofenac sodium has 89.17% at the concentration also 10mg/ml. The minimum inhibition observed at the concentration of 0.3125mg/ml in the CHCl₃ extracts of fruits 4,077% and showed 23,27% in the Diclofenac sodium. This results indicating that the extracts of *A.radiata* Flowers are a more potent anti-inflammatory agent.

In vitro denaturation of BSA:

In vitro anti-inflammatory activity by bovine serum denaturation method, the results are summarized in table 3

The extracts of *A.radiata* Flowers had shown a higher inhibition of protein denaturation than standard anti-inflammatory drug Diclofenac sodium.

The maximum inhibition of 99% was observed at 10 mg/ml in all the extracts of- *A.radiata* Flowers and the maximum inhibition of Diclofenac sodium has 62,96% at the concentration also 10mg/ml. the minimum inhibition observed at the concentration of 0.3125 mg/ml in the Ethyl acetate fraction 20% and showed 38,72% in the Diclofenac sodium. These results indicating that *A.radiata* Flowers is a more potent anti-inflammatory agent.

Hence, the results of our study reveal that extracts of *A. radiata* Flowers were capable of controlling the production of auto-antigens and inhibit denaturation of protein especially denaturation of albumin [17]

The inhibition of protein denaturation, albumin denaturation, was studied to establish the mechanism of anti-arthritic activity of *A. radiata* Flowers. Therefore, our *in vitro* studies on the extract of *A. radiata* Flowers demonstrate the significant anti-arthritic activity. Hence, this *Nogd Lhor* plant can be used as a potent natural anti-arthritic agent. The results show that the extracts of *A. radiata* Flowers exhibiting anti-arthritic activities might be due to the presence of the secondary metabolites contained in this plant have interesting biological activities (antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, anti-cancer, antioxidant ...) as the active principles such as polyphenolic content, triterpenoids, alkaloids, and flavonoids. From the results of the study, it can be concluded that the extract of *A. radiata* Flowers possessed significant anti-arthritic.

The present study revealed the potential of plant extract in the management of inflammation and arthritis confirming the folk core use of medicinal plants. However, one should try to further figure out extract more as having much better activity in the quest of active candidate or chemical molecule that is mainly responsible for this activity.

CONCLUSION:

In conclusion, the results of this study conclusively show that, the extracts of the extract of *A. radiata* Flowers, possess potent and dose-dependent anti-inflammatory activity in vitro. This is a novel finding, which scientifically justifies its use as an anti-inflammatory drug in traditional medicine. Possibility also exists for the development of a safe and efficacious anti-inflammatory drug and perhaps anti-arthritis drug.

REFERENCE:

1. Vijayanthimala, P., M. Sakthipriya, and B. Sangameswaran, In Vitro anti-arthritis activity of *Cissus quadrangularis* stem extract. in vitro, 2019. 12(1).
2. Agarwal, H. and V.K. Shanmugam, Anti-inflammatory activity screening of *Kalanchoe pinnata* methanol extract and its validation using a computational simulation approach. Informatics in Medicine Unlocked, 2019.
3. Chandra, S., et al., Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012. 2(1): p. S178-S180.
4. Beddou, F., C. Bekhechi, S. D Chabane and F. A. Bekkara, evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds *Fromanvillea radiata* coss. and dur. International journal of pharmaceutical research and bio-science, 2014. 3(1): p. 175-187.
5. Khan, M., et al., Chemical composition of vegetative parts and flowers essential oils of wild *Anvillea garcinii* grown in Saudi Arabia. Records of Natural Products, 2016. 10(2): p. 251.
6. Jamal, I. and N. Laila, Activité antibactérienne (in vitro) de l'extrait aqueux des Feuilles d'*Anvillea radiata* (Coss. & Dur.) sur des bactéries multirésistantes à des antibiotiques. 2014.
7. Lakhdar, M., et al., Phytochemical analysis and antifungal activity of *Anvillea radiata*. World Applied Sciences Journal, 2013. 26(2): p. 165-171.
8. Ould, E.H.M., M. Hadj-Mahammed, and H. Zabeirou, Place Des Plantes Spontanées Dans LA Médecine Traditionnelle de la Région DE Ouargla (Sahara Septentrional Est). Courier du savoir vol3, 2003: p. 47-51.
9. Askame, L., et al. Phytochemical screening and in vitro antifungal activity of several moroccan medicinal plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. in Proc. 12th Intl. Citrus Congress. Eds.: B. Sabater-Muñoz et al. Acta Hort. 2015.
10. Talibi, I., et al., Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. Crop Protection, 2012. 35: p. 41-46.
11. Quézel, P. and S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, 1963.
12. Kariawasam, K., et al., Phytochemical profile and in vitro anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of Sri Lankan variety of *Psidium guajava* L. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2017. 6(4): p. 22-26.
13. Satyanarayana, V. and S.J. Kumari, Evaluation of in vitro rheumatoid arthritis activity of polyherbal ethanolic extract containing formulations for selected potential Indian herbs. Drug Invention Today, 2018. 10(3).
14. Leelaprakash, G. and S.M. Dass, Invitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. International Journal of Drug Development and Research, 2011. 3(3): p. 189-196.
15. Rahman, H., M.C. Eswarajah, and A. Dutta, In-vitro antiinflammatory and anti-arthritis activity of *Oryza sativa* var. Joha rice (an aromatic indigenous rice of assam). Am Eurasian J Agric Environ Sci, 2015. 15: p. 115-21.
16. Rahman, H., et al., In vitro studies suggest probable mechanism of eucalyptus oil for anti-inflammatory and anti-arthritis activity. Int J Phyto Pharm, 2012. 2: p. 81-83.
17. Sangeetha, M., et al., In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activity of leaves of *Cleodendron inerme*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2011. 2(1): p. 822-827.

المخلص: أظهرت الدراسة الكيمياء-نباتية لآزهار نبات النقد (*Anvillea radiata* (Coss & Dur.) وجود العديد من منتجات الأيض الثانوي مثل عديدات الفينولات، التانينات، الصابونينات، الكومارينات والجلوكوزيدات. كما سمحت التحاليل المخبرية بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة HPLC- DAD بالتعرف على بعض المركبات الفينولية الفعالة في المستخلصات حسب الشواهد المتوفرة. كما تم تقدير معدل المركبات الفينولية حيث كان معتبرا في المستخلصات القطبية. يحتوي مستخلص خلاص الأيثيل والبيتانولي المعدل الأكبر من حيث عديدات الفينولات (83.20 ± 647.32 mg EGA/g و 11.21 ± 270.22 على الترتيب)، أما أكبر معدل للفلافونويدات فسجل لدى مستخلص خلاص الأيثيل بـ (46.04 ± 0.47 mg EQ/g) بينما سجل أضعف معدل في مستخلص الكلوروفورم (4.39 ± 0.03 mg EQ/g) بالنسبة للتانينات كان المحتوى الأكبر في مستخلص الكلوروفورم (6.66 ± 0.04 mg EC/g).

بينما تقدير أصباغ الدهون القابلة للذوبان عند إجراء المقارنة بين محتوى الأوراق والأزهار، فقد كانت الأوراق أكثر ثراء من الأزهار من حيث إحتوائها على الكلوروفيل وβ-كاروتين. اعتمدنا في تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات بثلاث طرق: اختبار DPPH، TAC و FRAP، حيث لوحظ تسجيل نشاط جد مهم مضاد للذئور الحرة باستعمال المستخلصات المدروسة. سجل أكبر معدل تثبيط للذئور الحرة مع مستخلص خلاص الأيثيل وأدنى معدل مع المستخلص المائي، أما في اختبار TAC و FRAP فإن المستخلص البيتانولي كان الأكثر قدرة. وإذا ما عدنا إلى النشاط المضاد للبكتيريا فقد أظهرت تقنية الانتشار على الأقراص في الوسط الجيلوزي نشاطا معتبرا لمستخلصات أزهار نبات النقد في تثبيط نمو *Escherichiacoli* و *Staphylococcus aureus* بينما السلالة *Pseudomonas aeruginosa* فأبان نشاطا ضعيفا ضد البكتيريا. تم تقييم النشاط المضاد للإلتهاب مخبريا لمستخلصات أزهار نبات النقد، عن طريق تخريب البنية الثانوية لنوعين من البروتين: الأول زلال البيض والثاني ألبومين المصل البقري، أفادت النتائج أن كل المستخلصات تمتلك فعالية تراجع في معدل التشوه البروتيني حيث سجل أكبر معدل تثبيط لمستخلص خلاص الأيثيل وكذا المستخلص البيتانولي. بينت هذه الدراسة أهمية نبات النقد واستعمالاته الواسعة في الطب التقليدي حيث أنه يمتلك نشاطا مضادا للبكتيريا والأكسدة والإلتهاب. كما تم فصل ثلاث مركبات نقية، مركبين تريينيين ومركب فلافونيدي ولتحديد بنية المركبات المفصلة قمنا بتطبيق طرق طيفية أحادية وثنائية البعد للرنين النووي المغناطيسي.

الكلمات المفتاحية: *Anvillea radiata*، المركبات الفينولية، مضاد الأكسدة، مضاد البكتيريا، مضاد الإلتهاب، الرنين النووي المغناطيسي.

Résumé: L'étude phytochimie des fleurs d'*Anvillea radiata* (Coss & Dur.) (Nogde) a montré la présence de nombreux métabolites secondaires tels que : les polyphénols, tanins, saponines, coumarines et les glucosides. De plus, des analyses de laboratoire utilisant la chromatographie liquide à haute performante (CLHP- DAD) permet d'identifier certains composés phénoliques actifs dans les extraits, selon les témoins disponibles. Le taux de composés phénoliques a été quantifié en signalant qu'il a été considérable dans les extraits polaires. L'extrait d'acétate d'éthyle et butanol contenait le taux le plus élevé de polyphénols ($647,32 \pm 83,20$ et $270,22 \pm 11,21$ mg EGA/g, respectivement), tandis que le taux le plus élevé de flavonoïdes a été enregistré dans l'extrait d'acétate d'éthyle ($46,04 \pm 0,47$ mg EQ/g), alors que le taux le plus faible a été enregistré dans l'extrait chloroformique ($4,39 \pm 0,03$ mg EQ/g). Par rapport aux tanins la teneur la plus élevée était dans l'extrait chloroformique ($6,66 \pm 0,04$ mg EC/g). L'estimation des pigments liposolubles a été mesurée en comparant la teneur des feuilles et des fleurs. Les feuilles étaient plus riches que les fleurs en termes de teneur en chlorophylle et en β-carotène. L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par trois méthodes : test DPPH, TAC et FRAP, on a constaté coexistante dans importante activité anti-radicalaire pour les extraits étudiés. Le taux le plus élevé d'inhibition des radicaux libres a été mentionné pour l'extrait d'acétate d'éthyle et le taux le plus bas pour l'extrait aqueux, tandis que pour le test TAC et FRAP, l'extrait butanolique était le plus important. Et si l'on revient à l'activité antibactérienne, la technique d'étalement sur les disques dans le milieu gélatineux a montré une activité significative des extraits de fleurs de d'*Anvillea radiata* dans l'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*, tandis que la souche *Pseudomonas aeruginosa* a montré une faible activité contre les bactéries. L'activité anti-inflammatoire des extraits de fleurs d'*Anvillea radiata* a été évaluée in vitro la détruisant la structure secondaire de deux type de protéines : le premier est d'albumine d'œuf, la seconde est l'albumine sérique bovine. Les résultats ont indiqué que tous les extraits présentaient une réduction efficace du taux de dénaturation des protéines, anise que le taux d'inhibition le plus élevé a été enregistré pour l'extrait d'acétate d'éthyle ainsi que pour l'extrait butanolique. Cette étude a montré l'importance de la plante d'*Anvillea radiata* et ses larges utilisations en médecine traditionnelle, car elle possède une activité antibactérienne, antioxydante et anti-inflammatoire. Trois composés purs ont également été séparés, deux composés terpéniques et un composé flavonoïdique. Pour déterminer la structurale des composés séparés nous avons appliqué des méthodes spectrales de RMN mono et bidimensionnelle. Mots clés : *Anvillea radiata*, composés phénoliques, antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire, RMN.

Abstract: The phytochemical study of the flowers of *Anvillea radiata* (Coss & Dur.) (Nogde) showed the presence of many secondary metabolites such as polyphenols, tannins, saponins, coumarins, and glucosides. In addition, laboratory analyses using high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) made it possible to identify certain active phenolic compounds in the extracts, according to the available controls. The level of phenolic compounds was quantified by indicating that it was considered in the polar extracts. The ethyl acetate and butanol extract contained the highest level of polyphenols (647.32 ± 83.20 and 270.22 ± 11.21 mg EGA/g, respectively), while the highest level of flavonoids was recorded in the ethyl acetate extract (46.04 ± 0.47 mg EQ/g), whereas the lowest rate was recorded in the chloroform extract (4.39 ± 0.03 mg EQ/g). Compared to tannins, the highest content was in the chloroform extract (6.66 ± 0.04 mg EC/g). The fat-soluble pigment estimate was measured by comparing the content of leaves and flowers. The leaves were richer than the flowers in terms of chlorophyll and β-carotene content. The antioxidant activity of the extracts was evaluated by three methods: DPPH, TAC, and FRAP test, we remarked a significant anti-free radical activity in the studied extracts. The highest rate of free radical inhibition was recorded for the ethyl acetate extract and the lowest rate for the aqueous extract, while for the TAC and FRAP test, the butanol extract was the most important. The technique of spreading on the discs in the gelatinous medium showed significant activity of the extracts of flowers of *Anvillea radiata* in the inhibition of the growth of *Escherichia coli* and of *Staphylococcus aureus*. In contrast, the *Pseudomonas aeruginosa* strain showed weak activity against bacteria. The anti-inflammatory activity of *Anvillea radiata* flower extracts was evaluated in vitro by destroying the secondary structure of two proteins: egg albumin, and bovine serum albumin. The results indicated an effective reduction in protein denaturation rate. The highest inhibition rate was recorded for the ethyl acetate extract as well as for the butanol extract. This study showed the importance of the *Anvillea radiata* plant in traditional medicine, due to antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activity. Three pure compounds were separated, two terpene compounds and flavonoid compound. To determine the structure of the separated compounds we applied one- and two-dimensional NMR spectral methods. Keywords: *Anvillea radiata*, phenolic compounds, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, NMR.