Faculty of Science
Department of Chemistry

CHEMISTRY AND BIOLOGICAL STUDY OF LEAVES EXTRACT OF *PISTACIA ATLANTICA* DESF. GROWING IN LIBYA

A THESIS SUBMITTED

BY

SALMA OTHMAN KALIFA OTHMAN
M.Sc. Faculty of Science, Sebha University, Libya,(2008)

For the Degree of

Doctor of Philosophy in Science

Chemistry Department
Faculty of Science
Ain Shams University
Cairo, Egypt.

2019

Faculty of Science
Department of Chemistry

CHEMISTRY AND BIOLOGICAL STUDY OF LEAVES EXTRACT OF *PISTACIA ATLANTICA* DESF. GROWING IN LIBYA

A THESIS SUBMITTED for the Degree of
Doctor of Philosophy in Science

BY

SALMA OTHMAN KALIFA OTHMAN
M.Sc. Faculty of Science, Sebha University, Libya,(2008)
Chemistry Department, Faculty of Science
Ain Shams University,Cairo, Egypt.

Supervised by

Prof.Dr.MAHER ABDELAZIZE MAHMOUD EL-HASHASH
Professor of Organic Chemistry, D.Sc.
Chemistry Department, Faculty of Science
Ain Shams University Cairo, Egypt.

Prof.Dr.Sahar Awad Allah Hussein
Professor of Phytochemistry
Head of Phytochemistry and Plant Systematics, Department, National Research Center, Egypt.

Prof.Dr.Amani Diaa El-Din El-Mesallamy
Professor of Natural Product
Chemistry Department, Faculty of Science
Zagazig University, Zagazig, Egypt.

Prof. Dr. Fakhri Abdulwanis Elabbar
Professor of Organic Chemistry
Chemistry Department, Faculty of Science
Benghazi University, Benghazi, Libya.

Prof. Dr. Samh Ahmed Rizk
Professor of Organic Chemistry
Chemistry Department, Faculty of Science
Ain Shams University, Cairo, Egypt

2019

Faculty of Science
Chemistry Department

APPROVAL SHEET

Chemistry and Biological Study of Leaves Extract of *Pistacia Atlantica* Desf. Growing in Libya

SALMA OTHMAN KHALIFE OTHMAN
M.Sc. Faculty of Science, Sebha University, Libya, (2008)

Approved by:

Prof. Dr. Maher Abdelazize Mahmoud El-Hashash …...…….
Professor of Organic Chemistry, D.Sc.
Chemistry Department, Faculty of Science
Ain Shams University Cairo, Egypt.

Prof. Dr. Sahar Awad Allah Hussein …...…….
Professor of Phytochemistry
Head of Phytochemistry and Plant Systematics,
Department,National Research Center, Egypt.

Prof. Dr. Amani M. Diaa El-Din El-Mesallamy …...…….
Professor of Natural Product
Chemistry Department, Faculty of Science
Zagazig University, Zagazig, Egypt.

Prof. Dr. Fakhri Abdulwanis Elabbar …...…….
Professor of Organic Chemistry
Chemistry Department, Faculty of Science
Benghazi University, Benghazi, Libya.

Prof. Dr. Samh Ahmed Rizk …...…….
Professor of Organic Chemistry
Chemistry Department, Faculty of Science
Ain Shams University, Cairo, Egypt.

Head of Chemistry Department

Prof. Dr.: Ibrahim H. A. Badr

كليه العلوم
قسم الكيمياء

دراسة كيميائية وبيولوجية لمستخلص أوراق نبات البطم الاطلسي من عائلة البطمية الذي ينمو فى ليبيا

رسالة مقدمة من

سالمة عثمان خليفة عثمان

ماجستير الكيمياء,كليه العلوم,جامعة سبها, ليبيا (2008)

للحصول على درجه دكتوراه الفلسفه في العلوم
(الكيمياء)

قسم الكيمياء
كلية العلوم
جامعة عين شمس

2019

كليه العلوم
قسم الكيمياء

دراسة كيميائية وبيولوجية لمستخلص أوراق نبات البطم الاطلسي من عائلة البطمية الذي ينمو فى ليبيا

رسالة مقدمة من

سالمة عثمان خليفة عثمان

ماجستير الكيمياء, كليه العلوم جامعة سبها, ليبيا

للحصول علي درجة دكتوراه الفلسفة في العلوم في الكيمياء

كلية العلوم – جامعة عين شمس

تحت إشراف

أ.د. ماهر عبد العزيز الحشاش أستاذ الكيمياء العضوية المتفرغ كلية العلوم – جامعة عين شمس	أ.د. سحر عوض الله محمد حسين استاذ كيمياء المنتجات الطبيعية رئيس قسم كيمياء وتصنيف النباتات المركز القومي للبحوث
أ.د.اماني محمد ضياء الدين المسلمي أستاذ كيمياء المنتجات الطبيعية المتفرغ كلية العلوم- جامعة الزقازيق	أ.د. فخري عبدالونيس العبار أستاذ الكيمياء العضوية كلية العلوم – جامعة بنغازي
أ.د. سامح احمد رزق أستاذ الكيمياء العضوية كلية العلوم – جامعة عين شمس	

كلية العلوم

جامعة عين شمس

2019

كليه العلوم
قسم الكيمياء

أسم الطالبة	:	سالمة عثمان خليفة عثمان
الدرجة العلمية	:	دكتوراة الفلسفة في العلوم
القسم التابع له	:	الكيمياء العضويه
أسم الكلية	:	كلية العلوم
الجامعة	:	جامعة عين شمس
سنة التخرج	:	1996
سنة المنح	:	2019

كليه العلوم
قسم الكيمياء

رسالة دكتوراه الفلسفة في العلوم

اسم الطالب : سالمة عثمان خليفة عثمان

عنوان الرسالة : دراسة كيميائية وبيولوجية لمستخلص أوراق نبات البطم الاطلسي من عائلة البطمية الذي ينمو فى ليبيا

أسم الدرجة : دكتوراة الفلسفة في العلوم في الكيمياء

لجنة الاشراف :

1. **أ.د. ماهر عبدالعزيز الحشاش – كلية العلوم – جامعة عين شمس**
2. **أ.د. سحر عوض الله محمد حسين – المركز القومي للبحوث**
3. **أ.د. اماني محمد ضياء الدين المسلمي – كلية العلوم – جامعة الزقازيق**
4. **أ.د. فخري عبدالونيس العبار– كلية العلوم - جامعة بنغازي**
5. **أ.د. سامح احمد رزق- كلية العلوم – جامعة عين شمس**

لجنة الحكم :

1. أ.د.ماهر عبدالعزيز الحشاش أستاذ الكيمياء العضوية المتفرغ كلية العلوم – جامعة عين شمس
2. أ.د.سحر عوض الله محمد حسين استاذ الكيمياء المنتجات الطبيعية– المركز القومي للبحوث
3. أ.د.عبدالرحمن حسن عبدالرحمن أستاذ الكيمياء العضوية المتفرغ كلية العلوم -جامعة المنصورة
4. أ.د.محاسن سعد امين أستاذ الكيمياء العضوية المتفرغ - كلية العلوم - جامعة بنها

الدراسات العليا :

ختم الاجازة : أجيزت الرسالة بتاريخ / /2019م

موافقة مجلس الجامعة موافقة مجلس الكلية

/ /2019م / /2019م

شكر وتقدير

أول الشكر وآخره أتقدم به إلى المنعم الباري عزَّ وجل (الله) سبحانه وتعالى،الذي أحاطني برعايته الإلهية ،ويسّر لي كل عسير،وألهمني الصبر والقوة في شق طريقي نحو البحث العلمي.

جزيل الشكر وكل آيات الامتنان للأساتذة المشرفين الاجلاء على حسن تعاونهم .أننى لم ارى فيهم إلا العزيمة القوية، وصدق النية، والبذل والعطاء.

أتوجه بخالص الشكر الجزيل والعرفان بالجميل والاحترام والتقديرلمن غمرني بالفضل وتفضل عليّ بقبول الإشراف على رسالة الدكتوراه. الأستاذ الدكتور/ ماهر عبدالعزيز الحشاش أستاذ الكيمياء العضوية المتفرغ بكلية العلوم جامعة عين شمس،أنه كان لي نعم الناصح الأمين ونعم الأب الوقور ونعم الأخ الحليم أفاض عليّ بعلمه وشملني بفضله وسماحته ومنحني الثقة وغرس في نفسي قوة العزيمة ولم يدخر جهداً.

وأتوجه بخالص شكري وتقديري وعظيم امتناني إلى أستاذتي الفاضلة القديرة الأستاذ الدكتورة / سحرعوض الله حسين استاذ كيمياء المنتجات الطبيعية بالمركز القومي للبحوث ؛ لما أبداته من حسن رعاية ورحابة صدر وروح علمية مخلصة، وما قدمته لي من توجيهات ونصائح سديدة وملاحظات قيّمة ومستمرة.

وخالص الشكر والاحترام والتقدير إلى أستاذتي الأستاذ الدكتورة / اماني محمد ضياء الدين المسلمي أستاذ كيمياء المنتجات الطبيعية المتفرغ بكلية العلوم جامعة الزقازيق التى منحتني الثقة وغرست في نفسي قوة العزيمة ولم تدخر جهداً، ولم تبخل عليّ بشئ من وقتها الثمين أبقاها الله ذخراً لطلبة العلم وجعل ذلك في ميزان حسناتها .

أسمى عبارات الشكر والتقديرالأستاذ الدكتور/ سامح احمد رزق أستاذ الكيمياء العضوية بكلية العلوم جامعة عين شمس لما قدمه لى من جهد و نصح ومعرفة طيلة انجاز هذا البحث.

كلمه شكر ومحبة وامتنان إلى الأستاذ الدكتور/ فخري عبدالونيس العبار،أستاذ الكيمياء العضوية بكلية العلوم جامعة بنغازي . لقد شدَّ من أزري، وساندني وأعطاني القدرة والإصرار في تحقيق هدفي بعد رحلة بحث وجهد واجتهاد تكللت بإنجاز هذا البحث.

واتقدم بأرقى وأثمن عبارات الشكر والعرفان إلى جامعه سبها بالجمهوريه العربية الليبيه التى منحتنى فرصه الدراسه لدرجه الدكتوراه وتمويلها بالدوله الشقيقه جمهوريه مصر العربية.

وأخيراً إلى كل من شدوا أزري وشاطروني أمري لأكمل الخطوات لولاهم بعد الله سبحانه وتعالى لاعتذر القلم عن رسم الكلمات (الوالدين واخواتى) أطال الله أعماركم بالصحة والسعادة وسدد طريق الخير لخطاكم..

CONTENTS

1. INTRODUCTION..... 1

2. AIM OF THE WORK..... 6

3. REVIEW OFLITERATURE..... 7

4. TAXONOMY..... 28

5. MATERIAL AND METHODS..... 34

6. RESULT AND DISCUSSION..... 45

Part I: Phenolic constituents of the ethyl acetate extract of the leaves of *Pistacia atlantica* Desf (Anacardiaceae) 45

A. Extraction and fractionation..... **46**

B. Chromatographic investigation..... **47**

B.2. Paper chromatographic investigation..... **47**

B.3.Column chromatographic investigation..... **47**

Characteristics of the column fractions (I-VII) **48**

Isolation of compounds (1-11) from the column (I-VIII) **49**

Fraction I..... 49

Qualitative analysis of free sugars..... **49**

Fraction II..... **50**

Identification of compound (1) , **Gallic acid..... 51**

Identification of compound (2)**2, *P*-hydroxy benzoic acid..... 55**

Fraction III..... 59

Identification of compound (3) **1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl-ß-D-$^4C_1$-glupyranose 59**

Fraction IV..... 64

Isolation of compounds (4), (5), (6)..... **64**

Identification of compound (4) **1,6-di-*O*-galloyl-β-$^4C_1$ glucopyranose..... 64**

Identification of compound (5) **1, 3-di-*O*-galloyl-β--$^4C_1$-glucopyranose.... 69**

Identification of compound (6)**2, 3-di-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose 74**

Fraction V..... 80

Identification of compound (7) **2,3,6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$ glucopyranose 80**

Identification of compound (8) **2,3-di-*O*-galloyl-4,6-*O* hexahydroxy diphenoyl-(α/β)- glucopyranose ,Tellimagrandin I**..... **97**
Identification of compound (8a) **4,6-*O* hexahydroxydiphenoyl-(α/β)-glucopyranose** **98**
Fraction VI **105**
Identification of compound (9) **. Gallic acid 3-*O*-β-$^{4}C_{1}$-glucopyranoside**.. **105**
Fraction VII..... **114**
Identification of compound (10) **Ellagic acid**..... **114**
Fraction VIII..... **119**
Identification of compound (11) **3, 3'-dimethoxyellagic acid**..... **119**
Part II .Biological Assay of *Pistacia atlantica* Leaves Extracts..... **124**
In *vitro* antioxidant activity of *Pistacia atlantica* Leaves Extracts.. ..... **124**
DPPH radical scavenging assay..... **125**
Antibacterial activity..... **127**
Cytotoxicity Against Tumor Cell Line **128**
In *vitro* Cytotoxic Activity of methanol , ethyl acetate extract of and three compounds (4,7,8)..... **130**
In *vitro* Cytotoxic Activity of compound (3)..... **132**
SUMMARY..... **133**
REFERENCES..... **140**
ARABIC SUMMARY

LIST OF TABLE

TABLE		PAGE
1.	Examples of traditional plant derived medicines rich in phenolics	5
2.	Flavonoids isolated from different *Pistacia* species:	8
3.	Anthocyanins have been reported from some *Pistacia* species	10
4.	Terpenoids isolated from different *Pistacia* species	12
5.	Phenolic Compounds isolated from different *Pistacia* species	19
6.	Solvent systems for paper chromatography	35
7.	Phytochemical screening for the of ethyl acetate extract of *Pistacia atlantica* Desf	45
8.	Qualitative phenolic analysis of extract	46
9.	Characteristics of the column fractions (I – VIII) of the extract - Isolation of compounds (1-11) from the column fractions (I-VIII)	48
10.	Chromatographic and Spectral Data of Gallic acid	51
11.	Chromatographic properties and UV spectral data of compound (2)	56
12.	^{13}C and ^{1}H chemical shifts (δ ppm) and ^{1}H coupling constants J(Hz) of compound (2)	56
13.	Chromatographic and spectral data of compound (4)	65

TABLE		PAGE
14.	Chromatographic and spectral data of compound (5)	70
15.	Chromatographic and spectral data of compounds (6) ,(6a)	75
16.	Chromatographic and spectral data of compounds(7), (7a)	83
17.	Chromatographic and spectral data of compounds (8) , (8a)	101
18.	Chromatographic and Spectral Data of compound (9)	108
19.	Chromatographic and Spectral Data of compound (10)	115
20.	Chromatographic and Spectral Data of compound (11)	120
21.	Antioxidant activity of extracts Pistacia atlantica of using DPPH free radical scavenging method.	125
22.	IC_{50} values for the extract and reference standard (ascorbic acid).	127
23.	Antibacterial activity of leaves of ethyl acetate and methenolic extracts (50 mg/ml) of *Pistacia atlantica*	128
24.	In *vitro* Cytotoxic Activity of methanol and ethyl acetate extract of *Pistacia atlantica* and compound (4,7 8) on intestinal carcinoma cell line (CACO cell line)	130
25.	In *vitro* Cytotoxic Activity of methanol and ethyl acetate extract of *Pistacia atlantica* and compound (4,7,8) on Prostate carcinoma cell line (PC_3 cell line)	131
26	In *vitro* Cytotoxic Activity of 1,2,3,4,6- penta-*O*-galloyl-β-D-$^4C_1$-glucopyranose (3) on cell line(Caco-2 , PC_3, HEPG2 ,MCF7)	132

LIST OF FIGURES

Fig.	TITLE	PAGE
1.	Structure of flavonoid aglycones	4
2.	Distribution *Pistacia atlantica* in Libya	30
3.	*Pistica atlantica* tree	32
3'	*Pistacia atlantica*: A, fruiting shoot; B, fruits; C, male inflorescence, female flower, scaly leaf bud	33
4.	ESI-MS of Gallic acid	52
5.	^{1}H-NMR of Gallic acid	53
6.	^{13}C-NMR of Gallic acid	54
7.	ESI-MS of *P*-hydroxy benzoic acid	56
8.	^{1}H-NMR of *P*-hydroxy benzoic acid	57
9.	^{13}C-NMR of *P*-hydroxy benzoic acid	58
10.	ESI-MS of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-ß-$^{4}C_{1}$-glupyranose	61
11.	^{1}H-NMR of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-$^{4}C_{1}$glupyranose	62
12.	^{13}C-NMR of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-$^{4}C_{1}$glupyranose	63
13.	ESI-MS of 1, 6- di-O-galloyl-β-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	66
14.	^{1}H-NMR of 1,6- di-*O*-galloyl-β-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	67
15.	^{13}C-NMR of 1, 6- di-*O*-galloyl-β-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	68
16.	ESI-MS of 1, 3-di-*O*-galloyl-β- glucopyranose	71
17.	^{1}H-NMR of 1, 3-di-O-galloyl-β- glucopyranose	72
18.	^{13}C NMR of 1, 3-di-*O*-galloyl-β- glucopyranose	73
19.	ESI-MS of 2,3-di-*O*-galloyl-(α/β)-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	76
20.	Negative ESI-MS spectrum of the two galloyl moieties	77
21.	^{1}H- NMR of 2, 3-di-*O*-galloyl-(α/β)-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	78
22.	^{13}C -NMR of 2, 3-di-*O*-galloyl-(α/β)-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	79
23.	ESI-MS of 2,3,6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	86
24.	HRESI-MS of 2,3,6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^{4}C_{1}$-glucopyranose	87

Fig.	TITLE	PAGE
25.	ESI-MS of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	88
26.	^{1}H-NMR of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	89
27.	^{13}C-NMR of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	90
28.	^{1}H-NMR of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	91
28'	^{1}H-NMR of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	92
29.	^{13}C-NMR of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	93
30.	COSY of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	94
31.	HMBC of 2,3, 6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	95
32.	HMQC of o f 2,3,6-tri-*O*-galloyl-(α/β)-$^4C_1$-glucopyranose	96
33.	ESI-MS of 4,6-*O*-hexahydroxydiphenoyl-(α/β)-glucopyranose	102
34.	^{1}H-NMR of 4,6-*O*-hexahydroxydiphenoyl-(α/β)-glucopyranose	103
35.	^{13}C-NMR of 4,6-*O*-hexahydroxydiphenoyl-(α/β)-glucopyranose	104
36.	FAB-MS of Gallic acid 3-*O*-β-$^4C_1$-glucopyranoside	109
37.	^{1}H-NMR of Gallic acid 3-*O*-β-$^4C_1$-glucopyranoside	110
38.	HSQC of Gallic acid 3-O-β-4C1-glucopyranoside	111
39.	^{13}C-NMR of Gallic acid 3-O-β-4C1-glucopyranoside	112
40.	HMBC of Gallic acid 3-*O*-β-$^4C_1$-glucopyranoside	113
41.	FAB-MS of Ellagic acid	116
42.	^{1}H NMR of Ellagic acid	117
43.	^{13}C NMR of Ellagic acid	118
44.	ESI-MS of 3, 3'-dimethoxyellagic acid	121
45.	^{1}H -NMR of 3, 3'-dimethoxyellagic acid	122
46.	^{13}C-NMR of 3, 3'-dimethoxyellagic acid	123
47.	Comparison of radical scavenging activity of ascorbic acid and the extract of *Pistacia atlantica*	126
48.	Comparison of radical scavenging activity of ascorbic acid and the extract of *Pistacia atlantica*	126