المجلة الليبية لوقاية النبات

Libyan Journal of Plant protection

http://www.ljpp.org.ly

إستخدام عمود الفصل الكروماتوجرافي وجهاز LC–MS/MS في فصل وتعريف عدد من المركبات العضوية من بعض المستخلصات النباتية الفعالة ضد خنفساء الطحين المتشابهة *Tribolium confusum* (Tenebrionidae : Coleoptera).

عبدالكريم عامر[1]، محمد بلح[2] وبشرى كمال رمضان[1]

(1) قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة عمر المختار – ص ب 919 البيضاء – ليبيا

(2) مركز بحوث الصحراء – المطرية - القاهرة – مصر

Received – August 1, 2018; Revision – August 12, 2018; Accepted – September 26, 2018
Available Online – October 10, 2018
* Corresponding author E-mail: dr.abdelkrimamer@gmail.com (Abdelkrim Amer)

الملخص

خلال الأربعين سنةً الماضية زاد القلق على صحة الانسان والبيئة من الاستخدام المكثف للمواد الكيميائية المصنعة في عدة مجالات، ومن بين هذه المواد المبيدات الكيميائية التي تستخدم ضد أفات المخازن لأنها تستخدم على المنتج النهائي وهي بذلك قريبة جداً من المستهلك، لذلك اصبح البحث عن بدائل اكثر أمان من مهام العلماء في هذا العصر، وتعد النباتات أكبر مخزن للمركبات الطبيعية على وجه الأرض لذلك تركز البحث على محتوياتها، وفي هذه الورقة تم تكملة نتائج بحث سابق اثبت من خلاله قدرة ستة مستخلصات إيثانولية لنباتات الحرمل والعرعر والسدر والقبار والزعتر وإكليل الجبل على قتل بالغات خنفساء الطحين المتشابهة *Tribolium* confusum في وقت قياسي وبتركيزات مناسبة بطريقة إختبار السمية بالملامسة على ورق الترشيح (C.T.B.)، وعليه تم فصل مكونات هذه المستخلصات عن طريق عمود الفصل الكروماتوجرافي بطول 33سم وقطر 4سم معبأ بمادة السليكا جل بحجم حبيبات من 60 -100 مش وتم الفصل بإستخدام ستة مذيبات متدرجة القطبية من الأقل إلى الأعلى وهي (methanol : 1-butanol : ethyl acetate : chloroform : dichloromethane : petroleum ether) حيث تم تمريرها على كل مستخلص على حدى بشكل متسلسل ومنها تم الحصول على 36 راشح تم تبخيرها في جهاز التبخير الحلزوني للتخلص من المذيب ومن ثم تم إختبار فعاليتها ضد الحشرة بنفس الأسلوب السابق (C.T.B.) فوجد إن سبعة رواشح فقط كانت فعالة في قتل الحشرة بنسبة زادة عن 70% خلال 24 ساعة، عليه تم التركيز على هذه الرواشح السبعة وحقنت في جهاز LC–MS/MS لغرض تعريف مكوناتها وقد تم تعريف عدد 24 مركب موضحة في جدول (2) وجدول (3)، منها عدد 6 مركبات من نبات أكليل الجبل Rosemary مفصولة بواسطة مذيب البترولیوم ايثر وعدد 5 مركبات من نفس النبات فصلت بواسطة مذيب الايثايل اسيتات، اما نبات الزعتر Thyme فقد نجح مذيب 1-بيوتانول في فصل عدة مركبات من مستخلصه الايثانولي وعرف منها عدد 6 مركبات، ومن نبات السدر Nabq تم تعرف عدد 5مركبات فصلت بواسطة مذيب 1-بيوتانول، أما

نبات العرعر الفينيقي Juniper فقد تم فصل وتعريف عدة مركبات من مستخلصه الايثانولي وهي 4 مركبات من راشح مذيب 1-بيوتانول و 5 مركبات من راشح مذيب الميثانول. وجل هذه المركبات تتبع مجموعة التربينات ومجموعة الفينولات.

الكلمات الدالة: مستخلصات نباتية، عمود الفصل الكروماتوجرافي، LC–MS/MS.

المقدمة

خلال العقود الأربعة الماضية تم التركيز على المنتجات ذات الأصل النباتي في كثير من الاستخدامات، حيث تم استخدامها في مجالات الادوية ومواد التجميل ومواد التنظيف ومكافحة عدة أنواع من الآفات وعلى رأسها الحشرات الزراعية وحشرات الصحة العامة، وقد أظهرت كثير من المركبات ذات الأصل النباتي فعالية عالية في مكافحة الحشرات مع قدر كبير من المحافظة على البيئة وصحة الانسان وهذا هو السبب الرئيسي الذي شجع كثير من الباحثين والشركات لبذل مزيد من الجهود لاختبار وتصنيع هذه المنتجات حيث استخدمت الزيوت العطرية النباتية ومكوناتها كمواد طاردة للحشرات وكمانعات للتغذية ووضع البيض وكمنظمات نمو وكمبيدات حشرية (1 ؛ 5 ؛ 22)، وفي الواقع لا يخفى على أحد حجم وأنواع المخاطر التي تترتب على كثرة إستخدام المبيدات الكيميائية التقليدية لمكافحة حشرات المحاصيل الزراعية وخاصة حشرات المخازن حيث تصل متبقيات هذه المواد الى السلسلة الغذائية والأماكن غير المستهدفة وتحدث كثير من المشاكل على المدى القصير والبعيد ومن هذه التأثيرات على صحة الانسان ضعف جهاز المناعة وخلل في الأنظمة الهرمونية ونقص معدلات الذكاء والتأثير على الخلايا التكاثرية وقد يصل الامر الى تكون أنواع من الأورام، وحالياً أصبحت المبيدات المنتجة من بعض المستخلصات النباتية تشكل وسيلة مستقبلية فعالة لتقليل المخاطر الناتجة عن المبيدات التقليدي (20) ، حيث تبين إنه من بين العائلات النباتية عائلات واعدة في مجال مكافحة الحشرات ومنها (*Asteraceae : Rutaceae : Meliaceae : Annonaceae : Piperaceae : Labiateae*) (11) ، ويوجد حوالي 2000 نوع نباتي معروفة لها تأثيرات قاتلة للحشرات (18) وتتميز هذه المركبات ذات الأصل النباتي بمواصفات رائعة تجعلها متفوقة على المبيدات الكيميائية السامة منها قابليتها للتكسر الحيوي السريع في البيئة وهي بشكل عام مواد صديقة للبيئة وقليلة الضرر للكائنات غير المستهدفة ورخيصة مقارنةً بالمواد الكيميائية المصنعة (7). وقد أشار كثير من الباحثين في هذا المجال الى أن المنتجات الميتابولزمية الثانوية التي تنتجها النباتات مثل (alkaloids : flavonoids : tannins : terpenes : chalcones : amides : polypeptides : phenols : neolignans : lignans : kawapirones) هي المسئولة عن التأثيرات البيولوجية لهذه النباتات ضد كثير من الكائنات الحية الأخرى (16 ؛ 10؛ 4 ؛ 13 ؛ 12)، حيث تلعب هذه المركبات ذات النشاط الحيوي دوراً رئيسياً لحماية هذه النباتات المنتجة لها من الآفات أو أنها تحافظ على صحة النبات أثناء الظروف البيئية غير المناسبة كالحرارة والجفاف (14)، وتشكل المستخلصات النباتية وما بها من مركبات متطايرة مواد واعدة لإنتاج مدخنات جديدة لمكافحة أفات المخازن متفوقة بذلك على المدخنات التقليدية عالية السمية في كونها قليلة السمية للثديات وسريعة التحلل ويمكن الحصول عليها بسهولة محلياً (6 ؛ 15 ؛ 8). وقد ركزت كثير من الدراسات المعاصرة على إمكانية إستخدام المواد ذات الأصل النباتي في معاملة الحبوب المخزونة كوسيلة لمكافحة الآفات الحشرية (19 ؛ 17). وفي هذه الدراسة تم استثمار نتائج البحث المقدم من (2) والتي أظهرت تفوق بعض المستخلصات النباتية في قتل حشرة خنفساء الطحين المتشابهة ليتم التركيز على هذه المستخلصات الفعالة من خلال العمل على فصل وتعريف بعض محتوياتها من المركبات العضوية.

المواد و طرائق البحث

أجريت هذه الدراسة بمعمل المبيدات بقسم وقاية النبات بكلية الزراعة – جامعة عمر المختار خلال العام 2017م.

اختيار المستخلصات المستهدفة: من الدراسة التي تقدم بها (2) تبين إن المستخلصات الايثانولية لنباتات الحرمل *Peganum harmala* والعرعر *Juniperus phoenicea* والسدر *Zizphus spine-christi* والقبار *Capparis spinosa* والزعتر *Thymus vulgaris* وإكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* كانت فعالة

بشكل متميز في قتل بالغات خنفساء الطحين المتشابهة بطريقة إختبار السمية بالملامسة على ورق الترشيح (C.T.B.) حيث أظهرت نسبة موت 100% في غضون 24 ساعة من المعاملة، وبهذا تم التركيز على هذه المستخلصات الستة بإجراء عملية الفصل والاختبار بعد الفصل ومن ثم التعريف.

إعداد المستخلصات: تم إعداد المستخلصات المستخدمة في الدراسة حسب الطريقة التي وضحها (3). حيث تم سحق 200 جرام من العينة النباتية المكونة من الأوراق والاغصان الصغيرة بعد تجفيفها على درجة حرارة الغرفة لمدة 24ساعة مع 500مل من الماء المقطر في الخلاط الكهربائي بسرعة 16 000 R.P.M، وتم ترشيح الخليط من خلال ورق ترشيح Whatman no. 40; Whatman International Ltd., Maidstone, UK وجمع المستخلص المائي الراشح في طبق زجاجي بقطر 9سم وحفظ في غرفة التجفيف لمدة 24 ساعة لغرض تركيزه، وللحصول على المستخلص الايثانولي فقد تمت إضافة 200مل من الايثانول 99.9% إلى الراسب المتبقي في ورقة الترشيح بعد نفاذ المستخلص المائي وتم تجميع المستخلص الايثانولي في طبق زجاجي قطر 9سم وتم تجفيفه في غرفة التجفيف لمدة 6ساعات. بعد التجفيف يعتبر المستخلص جاهز وبتركيز 100% (9).

إختبار التقييم الحيوي للمستخلصات: تم التقييم الحيوي للمستخلصات بطريق إختبار السمية بالملامسة على ورقة الترشيح Contact toxicity bioassay (C.T.B.) حسب الطريقة المستخدمة بواسطة (2). حيث تم وضع 20 حشرة بالغة *T. confusum* على ورقة ترشيح مشربة بمقدار 1مل من المستخلص المختبر بتركيز 50% داخل طبق بتري بقطر 9سم وتم حساب نسبة الموت بعد 24 ساعة من المعاملة، حيث تعد الحشرة ميتة اذا فقدت قدرتها على الحركة حتى بعد لمسها والانتظار لعدة دقائق، كررت كل معاملة 3مرات ويوجد عدد 2 شاهد لكل تجربة إحداها بالماء المقطر والأخرى بتركيز 10% ايثانول في الماء المقطر.

عمود الفصل الكروماتوجرافي: تم اعداد عمود الفصل عن طريق عمود زجاجي(EXELO 24/29) بقطر 4 سم وطول 66 سم مزود بصنبور من أسفل حيث تم تثبيته على الحامل الحديدي ووضع بأسفله كمية من الصوف الزجاجي ثم تمت تعبئته بالوجه الثابت وهي مادة السليكا جل (Silica Gel) بحجم حبيبات 60-100 مش حتى ارتفاع 33سم ثم تم قفل العمود من اعلى بكمية من الصوف الزجاجي، وتمت تهيئة العمود بواسطة 160مل من الميثانول وذلك لحساب كمية التشرب عن طريق طرح الكمية التي خرجة من أسفل العمود وكانت 100مل من الكمية المضافة من الميثانول وبهذا تكون كمية التشرب لهذا العمود 60مل من الميثانول.

المذيبات المستخدمة للفصل: استخدمت للفصل في هذه الدراسة ستة مذيبات متدرجة من الأقل قطبية إلى الأكثر قطبية وهي على النحو التالي (petroleum ether : ethyl acetate : chloroform : dichloromethane : methanol : 1-butanol) حيث تم وضع 200مل من المستخلص المستهدف للفصل في صورته الخام في أعلى عمود الفصل ومن ثم جرى تمرير المذيبات بشكل متسلسل من الأقل قطبية الى الأعلى قطبية بمعدل 60مل لكل مذيب ويتم استقبال المذيب ومعه المواد المفصولة من أسفل العمود في كأس زجاجي، وتم بعد ذلك تركيز المواد المفصولة بواسطة جهاز التبخير الحلزوني Rota evaporator للتخلص من المذيب (9)، وبهذا تم الحصول على عدد 36 راشح من ستة مذيبات وستة مستخلصات، وبعد ذلك تم إختبار هذه المواد المفصولة ضد بالغات الحشرة بنفس الطريقة السابقة (C.T.B.).

تعريف المحتويات بإستخدام جهاز LC–MS/MS : من خلال إعادة إختبار السمية للرواشح، سبعة رواشح فقط اثبتت فعاليتها في قتل بالغات خنفساء الطحين المتشابهة حيث أظهرت نسبة موت زادت عن 70% في غضون 24 ساعة من الاختبار وبذلك تم التركيز على هذه الرواشح السبعة الموضحة في **جدول (1)** لتعريف مكوناتها، واستخدم لذلك جهاز

Agilent Triple Quad LC–MS/MS Model 6420 Mass Spectrometer. HPLC system (Agilent, USA)

وكان الوسط المتحرك هو الماء المقطر والميثانول بداية بنسبة 5% ميثانول لمدة خمسة دقائق ثم ترفع النسبة تدريجياً لتصل الى 95% ميثانول خلال 37دقيقة ثم 95% ميثانول خلال 62دقيقة ومعدل تدفق 0.33 مل/دقيقة وكمية الحقن لكل عينة 5 ميكرو ليتر والوسط العاكس المستخدم (column) هو C18.

النتائج والمناقشة

نتائج تقييم سمية الرواشح المفصولة: من خلال عمود الفصل الكروماتوجرافي تم الحصول على عدد 36 راشح من ستة مستخلصات إيثانولية هي الحرمل والعرعر والسدر والقبار والزعتر وإكليل الجبل حيث فصلت بواسطة ستة مذيبات هي البترول ايثر و ثنائي كلوروايثان و الكلوروفورم و الايثايل اسيتات و 1-بيوتانول و الميثانول، وتم اختبار سمية هذه الرواشح ضد بالغات الحشرة المستهدفة واظهرت النتائج المدونة في **جدول (1)** ما يلي، كان افضل هذه الرواشح هو راشح مستخلص السدر مع مذيب 1-بيوتانول حيث اعطى نسبة موت 100% في غضون 24ساعة من المعاملة، يليه في الفعالية كان راشح مستخلص العرعر مع مذيب الميثانول بنسبة موت بلغت 88.33% بعد 24ساعة، وفي الترتيب الثالث كانت رواشح كل من مستخلص الحرمل ومستخلص اكليل الجبل مع مذيب البتروليوم ايثر بنسبة قتل بلغت 83.33% لكل منهما على حدى، وفي الترتيب الرابع جاءت كل من راشح مستخلص العرعر مع مذيب 1-بيوتانول وراشح مستخلص اكليل الجبل مع مذيب ايثايل اسيتات بنسبة موت 80% لكل منهما على حدى، والمرتبة الخامسة كانت من نصيب راشح مستخلص الزعتر مع مذيب 1-بيوتانول بنسبة قتل 73%، أما بقية الرواشح فقد كانت سميتها لبالغات الحشرة متدنية لذلك تم استبعادها من عملية التعريف.

جدول (1). النسب المئوية لموت بالغات خنفساء الطحين المتشابهة التي تعرضت للرواشح الناتجة من عملية الفصل بعد 24ساعة من معاملتها بطريقة (C.T.B.).

المذيب The solvent	اكليل الجبل Rosmary	الزعتر Thyme	القبار Caper	السدر Nabq	العرعر Juniper	الحرمل Harmel
Petroleum ether	**83.33%**	0%	40%	0%	0%	**83.33%**
Dichloromethane	13.33%	%13.33	60%	0%	0%	0%
Chloroform	0%	6.67%	34.33%	0%	0%	0%
Ethyl acetate	**80%**	26.67%	16.67%	50%	13.33%	3.33%
1-butanol	6.67%	**73%**	23.33%	**100%**	**80%**	0%
Methanol	20%	23.33%	0%	17%	**88.33%**	0%

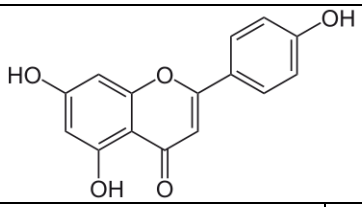
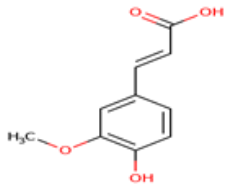
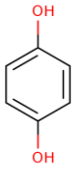
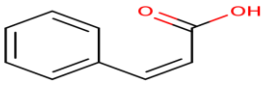
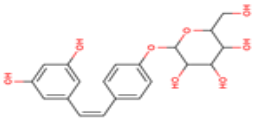
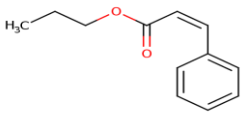
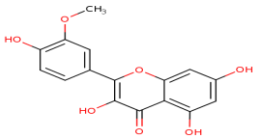
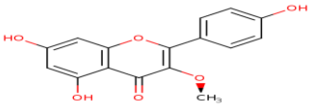
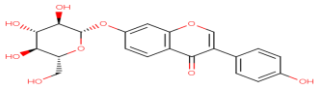
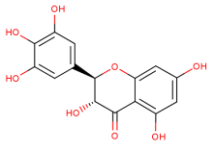
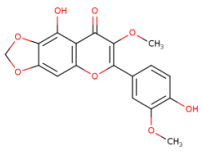
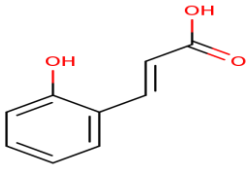
نتائج تعريف المركبات العضوية المكونة للرواشح الفعالة: بعد حقن الرواشح السبعة ذات الفعالية العالية في قتل الحشرة والمبينة في **جدول (1)** في جهاز LC–MS/MS أمكن تعريف عدد 24 مركب موضحة في **جدول (2)** و**جدول (3)**، حيث تم تعريف عدد 6 مركبات من نبات أكليل الجبل Rosemary مفصولة بواسطة مذيب البترول ايثر وعدد 5 مركبات من نفس النبات فصلت بواسطة مذيب الايثايل اسيتات، اما نبات الزعتر Thyme فقد نجح مذيب 1-بيوتانول في فصل عدة مركبات من مستخلصه الايثانولي وعرف منها عدد 6 مركبات، ومن نبات السدر Nabq تم تعرف عدد 5مركبات فصلت بواسطة مذيب 1-بيوتانول، أما نبات العرعر الفينيقي Juniper المنتشر في مرتفعات الجبل الأخضر فقد تم فصل وتعريف عدة مركبات من مستخلصه الايثانولي وهي 4 مركبات من راشح مذيب 1-بيوتانول و 5 مركبات من راشح مذيب الميثانول **جدول (2)**. مع العلم إن بعض المركبات قد تكرر ظهورها في أكثر من نبات ومع أكثر من مذيب.

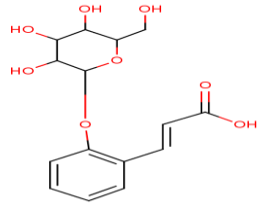
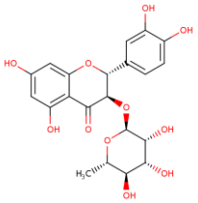
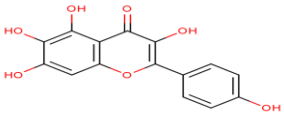
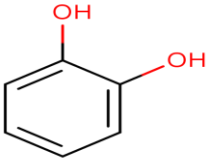
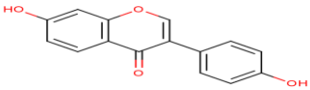
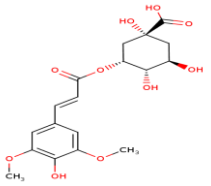
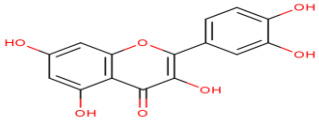
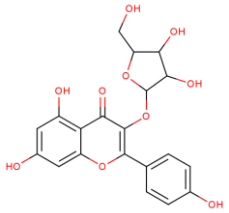
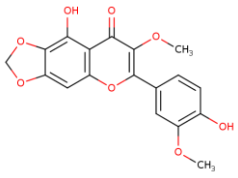
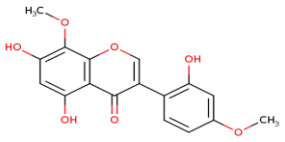
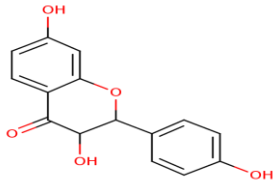
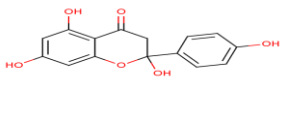
جدول (2). أسماء ومصادر المركبات التي تم فصلها وتعريفها من الرواشح السبعة ذات الفعالية العالية في قتل الحشرة.

رم	إسم النبات	إسم المذيب	المركبات التي تم فصلها وتعريفها
1	Rosemary	Petroleum ether	(Ferulic acid)؛ (Apigenin)؛ (Cinnamic acid)؛ (Hydroquinone)؛ (Propyl cinnamate)؛ (Resveratrol 4-glucoside)
2	Rosemary	Ethyl acetate	(Coumaric acid)؛ (Quercetin)؛ (5,7-Dihydroxy-8,4'-dimethoxyisoflavone)؛ (Daidzin)؛ (4',5-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone)
3	Thyme	1-butanol	(3-O-Methylkaempferol)؛ (Isorhamnetin)؛ (Ferulic acid)؛ (Cinnamic acid)؛ (Dihydromyricetin)؛ (Daidzin)
4	Nabq	1-butanol	(Coumaric acid 2-glucoside)؛ (Catechol)؛ (Cinnamic acid)؛ (6-Hydroxykaempferol)؛ (Sinapoylquinic acid)
5	Juniper	1-butanol	(Ferulic acid)؛ (Hydroxynaringenin-2)؛ (Cinnamic acid)؛ (3,4,7-Trihydroxyflavanone)
6	Juniper	Methanol	(Cinnamic acid)؛ (Coumaric acid)؛ (Ferulic acid)؛ (4,5-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone)؛ (Dihydroquercetin 3-rhamnoside)
7	Harmel	Petroleum ether	(Daidzein)؛ (Kaempferol 3-arabinoside)؛ (Coumaric acid)؛ (Isorhamnetin)؛ (Cinnamic acid)

ومن هذه النتائج تبين إن جميع هذه المركبات التي تم تعريفها تنتمي إلى فئة النواتج الميتابولزمية الثانوية Secondary Metabolites وهذه المركبات عرفت دائماً بأنها هي المسئولة عن الوظائف الدفاعية التي تحمي النبات من كثير من الآفات حيث يتم من خلالها توجيه مجموعة من الرسائل الكيميائية التي تمنع المتغذيات النباتية من إستخدام هذا النبات المفرز لهذه المادة كغذاء لها، ولهذه المركبات تأثيرات كثيرة على عدة أنواع من الكائنات الحية لا يتسع المجال لذكرها ولكن قد نلخص تأثيراتها على المتغذيات النباتية الحشرية في عدة فعاليات تبدأ بمنع التغذية ومنع وضع البيض لتصل الى تعطيل التمثيل الغذائي وظهور التشوهات بالتداخل مع منظمات النمو والتطور الحشرية وتصل الى حد السمية الحادة والموت، وقد ذكر (21) إن النواتج الميتابولزمية الثانوية تتلخص في ثلاث مجموعات رئيسية هي التربينات والفينولات والمركبات المحتوية على النيتروجين ومن الواضح أن مركباتنا التي تم تعريفها كلها تنتمي الى القسمين الاولين ولم يتم تعريف أي مركب من المركبات المحتوية على النيتروجين وذلك لا يعني خلو هذه العينات من هذه المركبات ولكن قد يعزى الامر إلى عدم قدرة الطرق والمواد المتبعة على التعامل مع هذا القسم من المركبات، وبالرغم من أن هذه المركبات المعرفة قد فصلت من رواشح ذات فعالية عالية في قتل حشرة خنفساء الطحين المتشابهة وهي من أقوى الحشرات إلا أنه لا يمكن القول بشكل قاطع إن هذه المركبات هي المسئولة عن التأثير القاتل لتلك الرواشح فمن المعلوم إن التعريف غالباً ما يستهدف المركبات الأكثر تركيز في العينة والتي يمكن للمذيب والجهاز التعامل معها من بين الاف المركبات العضوية التي توجد في العينات النباتية الخام، وعليه فنحن نوصي بإجراء دراسة متقدمة لاختبار هذه المركبات بشكل منفرد وبتركيزات مختلفة وتقييمها حيوياً ضد هذه الحشرة وغيرها من أنواع الحشرات الأخرى.

جدول (3). التراكيب البنائية والاوزان الجزيئية للمركبات التي تم تعريفها من المستخلصات الفعالة.

			
Apigenin	**270 = Mwt**	**Ferulic acid**	**194 = Mwt**
			
Hydroquinone	**110 = Mwt**	**Cinnamic acid**	**148 = Mwt**
			
Resveratrol 4'-glucoside	**390 = Mwt**	**Propyl cinnamate**	**190 = Mwt**
			
Isorhamnetin	**316 = Mwt**	**3-O-Methylkaempferol**	**300 = Mwt**
			
Daidzin	**416 = Mwt**	**Dihydromyricetin**	**320 = Mwt**
			
4',5-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone	**358 = Mwt**	**Coumaric acid**	**164 = Mwt**

			
Coumaric acid 2-glucoside	**326 = Mwt**	**Dihydroquercetin 3-rhamnoside**	**450 = Mwt**
			
6-Hydroxykaempferol	**302 = Mwt**	**Catechol**	**110 = Mwt**
			
Daidzein	**254 = Mwt**	**Sinapoylquinic acid**	**398 = Mwt**
			
Quercetin	**302 = Mwt**	**Kaempferol 3-arabinoside**	**418 = Mwt**
			
4',5-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone	**358 = Mwt**	**5,7-Dihydroxy-8,4'-dimethoxyisoflavone**	**330 = Mwt**
			
3,4',7-Trihydroxyflavanone	**272 = Mwt**	**2-Hydroxynaringenin**	**288 = Mwt**

المراجع

1) **Amer, A. and H. Mehlhorn (2006).** Repellency effect of forty-one essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex mosquitoes. Parasitol Res (2006) 99 : 478 – 490.
2) **Amer, A. and B. K. Ramadan (2017).** Screening the insecticidal effect of thirty plant extracts from Jabel Akhdar region northeast Libya against adults of confused flour beetle, *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) using contact toxicity bioassay and fumigation toxicity bioassay. J. Sciences and humanitarian studies. Under publishing.
3) **Amer, A., M. A. Zaeid and A. H. Al-Mabrouk (2013).** Effects of twenty-eight plant Extracts as insecticides against adults of the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. International Conference on Applied Life Sciences, *UAE. September 15-17, 2013.*
4) **Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Méndez, M., Rodríguez, R., Reyes, A. and Aguilar,C.N., (2010).** In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against Rhizoctonia *solani* Kühn. Ind. Crop Prod. 32, 324–328.
5) **Chermenskaya T. D., Stepanycheva E. A., Shchenikova A. V. and Chakaeva A. S. (2010).** Insecto acaricidal and deterrent activities of extracts of Kyrgyzstan plants against three agricultural pests. Ind. Crop. Prod. 32, 157–163, doi: 10.1016/j.indcrop.2010.04.009.
6) **Dubey, N.K., Srivastava, B. and Kumar, A., (2008).** Current status of plant products as botanical pesticides in storage pest management. J. Biopestic. 2, 182e186.
7) **Haldar, K. M., P. Ghosh and G. Chandra (2011).** Evaluation of target specific larvicidal activity of the leaf extract of Typhonium trilobatum against Culex quinquefasciatus Say. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2011)S199-S203.
8) **Hamzavi, F. and Moharramipour, S. (2017).** Chemical composition and antifeedant activity of essential oils from *Eucalyptus camaldulensis* and *Callistemon viminalis* on *Tribolium confusum* . International Journal of Agricultural Technology 2017 Vol. 13(3): 413-424.
9) **Houghton, P. and Raman, A. (1998).** Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Chapman & Hall.199p.
10) **Isman M. B. (2000).** Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot. 19, 603–608, doi: 10.1016/S0261-2194(00)00079-X.
11) **Jacobson, M. (1990).** Glossary of plant-derived insect deterrents. CCR press.
12) **Loko, Laura Yêyinou, O. Alagbe, E. A. Dannon, B. Datinon, A. Orobiyi, A. T. Odjo, A. Dansi, and M. Tamò (2017).** Repellent Effect and Insecticidal Activities of *Bridelia ferruginea*, *Blighia sapida*, and *Khaya senegalensis* Leaves Powders and Extracts against *Dinoderus porcellus* in Infested Dried Yam Chips Volume 2017, Article ID 5468202, 18 pages . Psyche: A Journal of Entomology.
13) **Martínez L. C., Plata-Rueda A., Zanuncio J. C. and Serrão J. E. (2015).** Bioactivity of six plant extracts on adults of *Demotispa neivai* (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Insect Sci. 15, 34, doi: 10.1093/jisesa/iev021.
14) **Ojaghian, M., L. Wang, Z. Cui, C. Yang, T. Zhongyun and G. Xie (2014).** Antifungal and SAR potential of crude extracts derived from neem andginger against storage carrot rot caused by Sclerotinia sclerotiorum. Industrial Crops and Products 55 (2014) 130–139.

based on neem leaf powder. Journal of Hazardous Materials 177 (2010) 290–299 Society Symposium Series No. 387, Washington, D.C, pp. 1–10.

21) **Taiz, L. and Zeiger, E. (2002).** Plant Physiology, chapter 3 Secondary Metabolites and Plant Defense. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

22) **Zanuncio J., S. A. Mourao, L. C. Martínez, C. F. Wilcken, F. S. Ramalho, A. Plata-Rueda, M. A. Soares and J. E. Serrao (2016).** Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Sci. Rep. 6, 30261, doi: 10.1038/srep30261.

15) **Pandey, A. K., P. Singh, U. T. Palni and N. N. Tripathi (2014).** In vivo evaluation of two essential oil based botanical formulations (EOBBFs) for the use against stored product pathogens and pests, Aspergillus species and Callosobruchus species (Coleoptera: Bruchidae) Journal of Stored Products Research xxx (2014) 1e7 Phile` ne, B.J.R., Morand, P. (Eds.), Insecticides of Plant Origin. American Chemical.

16) **Parmar V. S., S. C. Jain, K. S. Bisht, R. Jain, P. Taneja, A. Jha, OMD. Tyagi, A. K. Prasad, J. Wengel, C. E. Olsen and P. M. Boll (1997).** Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry 46, 597–673, doi: 10.1016/S0031-9422(97)00328-2.

17) **Plata-Rueda, A., L. C. Martínez, M. H. Dos-Santos, F. L. Fernandes, C. F. Wilcken, M. A. Soares, J. E. Serrão and J. C. Zanuncio (2017).** Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sci. Rep.* **7**, 46406; doi: 10.1038/srep46406.

18) **Rajasekaran, A. and G. Duraikannan (2012).** Larvicidal activity of plant extracts on Aedes Aegypti L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012)S1578-S1582.

19) **Singh S. , D. K. Sharma , S. Bhatia and A. Singh. (2017).** Effect of various plant powders on rice weevil (*Sitophilus oryzae* Linn.) in stored wheat. Journal of Environmental Biology. Vol.38 : 501-508.

20) **Singh, B., D.K. Sharma, R. Kumar and A. Gupta (2010).** Development of a new controlled pesticide delivery system

Abstract

Use Of Chromatographic Separation Column And LC-MS/MS For Separation And Identification Of Some Organic Compounds From Some Effective Plant Extracts Against Confused Flour Beetle *Tribolium Confusum* (Coleoptera : Tenebrionidae).

Abdelkrim Amer[1], Mohamed Balah[2], and Bushra Kamal Ramadan[1]

1. Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Omar Almokhtar University, P. O. Box 919 Al-Beida, Libya. E-Mail (Dr.AbdelkrimAmer@gmail.com).

2. Desert Research Center, Almatariya, Cairo, Egypt.

Abstract

Over the past four decades, concern about human health and the environment has increased from the intensive use of manufactured chemicals in several areas. Among these chemicals are the chemical pesticides especially that used against the stores pests, because they are used on the final product and are very close to the consumer. In this paper the results of previous research have been confirmed in which the ability of six ethanolic extracts of plants of Harmel, Juniper, Nabq, Caper, Thyme, and Rosemary to kill the adults of confused flour beetle *Tribolium confusum* in record time and at appropriate concentrations in the contact toxicity bioassay method (C.T.B.), this initial results were used as start point in this study. The ingredients of these extracts were separated by chromatographic separation column filled with silica gel granule size 60-100 mish, 33 cm long and 4 cm diameter, using six solvents are graduated polarity from low to high (petroleum ether: dichloromethane: chloroform: ethyl acetate: 1-butanol: methanol) were running on each extract in a sequential manner. 36 leachates were obtained and evaporated using route evaporator, then tested against the insect by the same previous method (C.T.B.). The results indicated that, only seven leachates were effective in killing the insect insomuch as they given 70% mortality within 24 hours. These seven candidates were injected on LC-MS/MS for the purpose of defining their components. In Table (2) and Table (3), 24 compound were identified including 6 compounds from Rosemary are isolated by the petroleum ether solvent and 5 compounds from the same plant separated by ethyl acetate solvent. From Thyme the 1-butanol solvent was success for extract several compounds from their ethanolic extract which 6 of them were known, and of the Nabq plant, 5 compounds were separated by 1-butanol solvent, however from the Juniper several compounds has been separated and defined from their ethanol extract, whereas 4 compounds of leachate 1-butanol solvent and 5 compounds of leachate methanol solvent. While numerous of these compounds were identified several times in this trial and most of these compounds follow the group of terpenes and phenols.

Key Words: Plant Extract, Chromatographic Separation Column, LC-MS/MS.