تشخيص بعض المركبات الفعالة في نبات الميرمية ودراسة فعاليتها التثبيطية في بعض البكتريا وفطر *Trichoderma*

*غفران شاكر جاسم العبيدي * أ. د. صبري محمد حسين المرسومي **د. مثنى بديع فرحان
*جامعة الانبار – كلية العلوم – قسم الكيمياء
**جامعة الانبار – كلية التربية للبنات – قسم العلوم حياة
E-mail: sabri1956@yahoo.com

الخلاصة

تضمن البحث فصل بعض المركبات الفعالة من اوراق وسيقان نبات الميرمية *Salvia officinalis* بالطرق التحليلية (الاستخلاص بالمذيبات , كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة T.L.C) وتشخيصها بالطرق الطيفية , كذلك استخلصت المادةالزيتية في الاوراق والسيقان وتم تشخيصها بالطرق الطيفية , تم دراسة الفعالية الحيوية لمجموعة من مستخلصات الاوراق والسيقان (باستخدام مجموعة من المذيبات العضوية (متدرجةالقطبية)) تجاه الاحياء الدقيقة لأربعة انواع من البكتريا – موجبة وسالبة لصبغة كرام – بالاضافة الى نوع من الفطريات . أظهرت النتائج كون معظم المستخلصات لأوراق وسيقان الميرمية تأثيرا عاليا تجاه بكتريا *Escherichia coli* و*Pseudomonas aeruginosa* وفطر *Trichoderma* .

Abstract

The research included separate some effective compounds from the leaves and stems of the sage plant *salvia officinalis* by analytical ways (solvent extraction, thin layer chromatography TLC) and diagnosis it by spectral methods, also the oily materials were extracted in leaves, stems, and diagnosed by spectral methods, the biological activity was studying for a group of extracts Leaves and stems using a variety of organic solvents ((gradient polar)) towards microbiologist for four types of bacteria – Gram positive and negative - in addition to the type of fungus. The results showed that most of the extracts of leaves and stalks sagebrush high impact towards bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and fungus *Trichoderma*.

المقدمة

الميرمية هي اكبر جنس من العائلة الشفوية (Lamiaceae) التي تضم حوالي 900 نوع تنتشر في جميع أنحاء العالم بعضها مهم أقتصاديا[1] . تعتبر الميرمية من النباتات المهمة طبياً حيث استخدمت على نطاق واسع في الطب الشعبي منذ قرون عديدة وقد أجريت العديد من البحوث لتحدد المركبات الفعالة التي تحتويها اضافة الى آثارها العلاجية [2] . عثر على الميرمية لاول مرة في بلدان البحر الابيض المتوسط شمالا وانتشرت في نهاية المطاف الى انجلترا وفرنسا وسويسرا في القرن الرابع عشر [3]. تستخدم الميرمية في الطهي في المقام الأول بأعتبارها كتوابل لتعزيز طعم لحم الضأن واللحوم والنقانق كما تستخدم في المخللات والسلطات [4] . تستخدم الميرمية في صناعة مستحضرات التجميل , العطور, المشروبات و الصناعات الدوائية [5]. تمتاز الميرمية بأن لها نشاطات بايلوجية تشمل مضادات الجراثيم , مضادات الالتهابات , مضادات الاكسدة , مضادات الفيروسات , مضادات الفطريات [6,2] . تم استخدام الزيت الاساسي للميرمية في علاج طائفة واسعة من الامراض مثل الجهاز العصبي والقلب والدورة الدموية والجهاز التنفسي والجهاز الهضمي والتمثيل الغذائي وامراض الغدد الصماء [7] .

تضمن البحث تشخيص بعض المركبات الفعالة في سيقان واوراق نبات الميرمية *Salvia officinalis* وتشخيص بنيتها الكيميائية ودراسة فعاليتها ضد بعض انواع الجراثيم الشائعة حيث تم دراسة الفعالية الحيوية ضد نوع من الفطريات حيث تشير الدراسات السابقة الى احتواء الميرمية على زيوت طيارة وفلافونيدات , احماض فينولية ومواد اخرى متعددة وان المادة الفعالة تعود الى المركبات الموجودة في الزيت [8] .

الجزء العملي

جمع وتصنيف النبات

تم الحصول على نبات الميرمية من السوق المحلية وقد تم تصنيف النبات في مختبرات قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة الانبار ثم طحن في مطحنة كهربائية وحفظ المسحوق في قنينة زجاجية لحين الاستعمال وكان التصنيف كالاتي

العائلة :- Lamiaceae
الاسم العربي :- الميرمية
النوع :- officinalis
الاسم العلمي :- *Salvia officinalis*
الجنس :-*Salvia*

الكشف عن المجاميع والمركبات الفعالة الموجودة في نبات الميرمية

تم الكشف عن الكلايكوسيدات والفلافونيدات والتانينات والصابونيات والراتنجات والفينولات والقلويدات والتربينات والكاربوهيدرات والسيتيرويدات والفلوباتانينات [9].

تحديد نسبة الاستخلاص

تم استخلاص اوراق وسيقان نبات الميرمية في درجة حرارة الغرفة بطريقة النقع باستخدام مذيبات عضوية متدرجة في القطبية وهي هكسان , ايثانول , ميثانول , ميثانول 60% , ماء , استون , كلورفورم . وذلك بوزن (20) غم من المسحوق ثم اضافة (100) سم3 من المذيب ووضع الخليط على محرك مغناطيسي لمدة ساعة واحدة وفي درجة حرارة الغرفة , بعدها تم الترشيح وتبخير المذيب باستعمال المبخر الدوار والتجفيف حتى ثبات الوزن [10] وتم حساب النسبة المئوية للاستخلاص وفقا" للعلاقة :

$$\text{النسبة المئوية للأستخلاص} = \frac{\text{الوزن الناتج}}{\text{الوزن الاصلي}} \times 100$$

والجدول (2) يبين النسبة المئوية للمواد المستخلصة في نبات الميرمية .

استخلاص الزيت

أخذت (8) غرام من مسحوق الاوراق والسيقان اضيف لها (100) سم3 من ثنائي كلورو ميثان + (100) سم3 من الهكسان في جهاز سوكسيلت وتم الاستخلاص لمدة 8ساعات . تم الترشيح في قمع بخنر , بعدها تم تبخير الراشح باستعمال المبخر الدوار تم الفصل باستخدام قمع الفصل والتجفيف ووضع في مجفف يحتوي على كلوريد الكالسيوم اللامائي[11] وكان الناتج (2) غم اما النسبة المئوية فكانت (25%) .

فصل وتشخيص المركبات الفعالة في الزيت

لغرض التعرف على هوية المركبات الفعالة الموجودة في زيت الميرمية لجئنا الى تقنية كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة (T.L.C) باستعمال الواح زجاجية بقياس (3×6) مطلية بمادة السيلكا جيل كطور ثابت أما الطور المتحرك فتم استعمال خليط من خلات الاثيل وحامض الخليك بنسبة (1:8) .

ظهرت عدد من البقع كما مبين في الشكل تم تشخيص أثنان منها عن طريق مقارنتها بنماذج اصلية وتبين كونها حامض التانيك , ومركب الثايوجونThujone وتجري الان محاولات لفصل مركبات اخرى باستخدام تقنيات الفصل المعروفة .

اختبار فعالية المستخلصات النباتية

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر في قياس الفعالية البايلوجية مختبريا للمستخلصات النباتية ضد نمو أربع عزلات من البكتريا المرضية,إذ لقح الوسط الزرعي بواسطة مسحة قطنية معقمة من العالق البكتيري ، وعملت حفر بقطر 6 ملم على سطح الوسط الزرعي بواسطة ماصة راسل معقمة، ووضع 100 مايكروليتر في كل حفرة من كل مستخلص معقم، وبتراكيز مختلفة (10 ، 20 ، 30 ، 40 ، 50) ملغم /مل، وحضنت الأطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة حددت فعالية المستخلص بقياس قطر منطقة التثبيط بالملم حول كل حفرة باستخدام المسطرة المدرجة[9]. اما بالنسبة لفطر *Trichoderma* فقد أضيفت الزيوت والمستخلصات النباتية إلى الوسط الغذائي PSA المعقم ثم صب الوسط الغذائي في أطباق زجاجية قطر 9 سم وبثلاث مكررات لكل تركيز ، عدا معاملة المقارنة بدون إضافة ، لقح كل طبق بقطعة من مزرعة الفطربقطر 5 ملم،حضنت الأطباق على درجة حرارة 25 ±1مْ بعد وصول قطر المزارع الفطرية لمعاملة المقارنةإلى حافة الطبق (9 سم) تم قياس أقطار نمو الفطرفي أطباق المعاملات وأخذت النتائج بحساب متوسط قطرين متعامدين لكل مستعمرة .

تم احتساب النسبةالمئوية للتثبيط كمافي المعادلة .

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل نمو الفطر في معاملة المقارنة ـ معدل نمو الفطر في المعاملة}}{\text{معدل نمو الفطر في معاملة المقارنة}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

بين الجدول (1) كشفًا أوليا كيميائيًاعن المركبات والمجاميع الفعالة في نبات الميريمة،
حيث أظهرت النتائج احتواء اجزاء النبات المستخدمة في الدراسةعلى الكلآيكوسيدات
والفلافونويدات والراتنجات والتانينات والصابونيات والفينولات والتربينات والقلويدات بالاضافة الى السيتيرويدات و
والكاربوهيدرات والفلوباتانينات.

الجدول (1) الكشف الاولي الكيميائي للمركبات الفعالة في نبات الميرمية

المركب الفعال	نوع الكاشف	نتيجة الكشف
الكلايكوسيدات	بندكت	راسب احمر +
الفلافونويدات	محلول الامونيا (3 مولاري)	لون مصفر +
الراتنجات	حامض الهيدروكلوريك (4٪)	ظهور عكرة +
التانينات	كلوريد الحديديك (1٪)	لون اخضر مزرق +
الصابونيات	كلوريد الزئبقيك (1٪)	راسب ابيض +
التربينات	سالكوفيسكي	لون احمر مسمر +
القلويدات	درانكدروف	لون برتقالي +
الفينولات	فري سيانيدالبوتاسيوم	لون اخضر مزرق +
السيتيرويدات	(كبريتيك/خليك)مركزة	بنفسجي-أزرق-أخضر +
الكاربوهيدرات	(0.5 %) ألفا- نفثول الكحولي	لون بنفسجي +
الفلوباتانينات	حامض الهيدروكلوريك(1٪)	راسب احمر +

أن وجودهذه المركبات الفعالة في اوراق وسيقان نبات الميرميةSalvia officinalis يدل على أهميةهذاالنبات ويبين سبب استخدامه في الطب قديماً وحديثاًوكذلك يكشف عن القيمة الدوائية لهذا النبات.

الجدول (2) النسبة المئوية للمواد المستخلصة في نبات الميرمية .

	النسبة المئوية
الرطوبة	%8,12
الرماد	%12,11
PH	6,27
المواد الدسمة (الزيت)	% 25
خلاصة خلات الاثيل	%13,35
خلاصة الميثانول	%11,45
خلاصة ميثانول 60%	%10,45
خلاصة الهكسان	%10,38
خلاصة الايثر	%10,35
خلاصة الماء	% 8,05
خلاصة الايثانول	%6,26
خلاصة الكلوروفورم	% 4,5
خلاصة الاستون	% 4

من الجدول تبين ان افضل نسبة استخلاص تعود الى مذيب خلات الاثيل وهذا يتفق مع ماهو متوقع من قبلنا حيث تم تسيجل طيف الاشعة فوق البنفسجية – المرئية لخلاصة (خلات الاثيل) حيث تم اذابة (1) ملغم من الخلاصة في ميثانول 60% واكمال الحجم الى 100 مل وتسيجل طيفه في مدى 200-500 نانوميتر

والشكل (1) يوضح ذلك , منه يتبين وجود حزم امتصاص عند الاطوال الموجية (230) (260) نانوميتر.
اما الشكل (2) فيبين طيف الاشعة فوق البنفسجية – المرئية لزيت الميرمية حيث يتبين منه وجود حزم امتصاص عند الاطوال الموجية (220) (260) نانوميتر .
حسب الدراسات السابقة فان فعالية نبات الميرمية تعزى الى المادة الزيتية لذلك لجئنا الى التعرف على طبيعة المركبات الفعالة الموجودة في الزيت بعد فصله بالطريقة الواردة في الجزء العملي حيث تم استخدام تقنية T.L.C لفصل مركبين رئيسين هما حامض التانيك Tannic Acid ومركب الثيوجون Thujone.

الفعالية الحيوية

1- الفطريات

جدول (3) يبين تفوق مستخلص الايثانول وخلات الاثيل في تثبيط نمو *الفطر Trichoderma*بالتركيزين80و100 بالملغم/مل وبنسبة تثبيط100%, يليه المستخلص المائي وبنفس التركيزين وبنسبة تثبيط88,8% و94,4% اما اقل نسبة تثبيط فكانت في مستخلص الايثر11,11% و22,22% على التوالي وبنفس التراكيز.

جدول (3):تأثير فاعلية الزيوت النباتية على نمو الفطر *Trichoderma*على الوسط الغذائي اكار البطاطا والسكروز(PSA).

المعاملات	التركيز بالملغم/مل	معدل نمو الفطر (ملم)	التثبيط%
المقارنة	0,0	90,0	0,0
زيت الميريمة	40	80	11,11
	80	50	44,4
	100	10	88,8
مستخلص خلات الاثيل	40	30	55,5
	80	0,0	100
	100	0,0	100
مستخلص الايثر	40	80	11,11
	80	80	11,11
	100	70	22,22
مستخلص الاستون	40	80	11,11
	80	55	38,8
	100	45	50
مستخلص الايثانول	40	15	83,3
	80	0,0	100
	100	0,0	100
مستخلص الميثانول	40	40	55,5
	80	35	61,1
	100	25	72,2
المستخلص المائي	40	12	86,6
	80	10	88,8
	100	5	94,4

2- البكتريا :

تم دراسة الفاعلية ضدالبكتريا لمستخلصات وزيت نبات الميرمية حيث تم دراسة فعاليته كل على انفراد بتراكيز مختلفة باستخدام أربعة أجناس من البكتريا السالبة (*Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa,*) والموجبة لصبغة كرام (*Staphylococcusaureus, Streptococcus*) واستعملت طريقة الانتشار حول الحفر على أطباق الاكار فأظهرت الدراسة أن الزيت ومعظم المستخلصات لها فاعلية مضادة للبكتريا (Antibacterial activity) .

جدول (4) أقطار تثبيط نمو البكتريا باستخدام تراكيز مختلفة من زيت ومستخلصات نبات الميرمية

المركب الفعال	التركيز بالملغم/مل	*S.aureus*	*P.aeruginosa*	*E.Coli*	*Strepto coccus*
زيت الميرمية	10	12	-	10	10
	20	13	-	12	11
	30	14	-	13	12
	40	14	15	15	13
	50	15	16	25	14
مستخلص خلات الاثيل	10	10	24	19	10
	20	12	25	22	11
	30	12	28	25	11
	40	13	29	35	13
	50	14	30	42	15
مستخلص الايثر	10	6	-	-	9
	20	7	-	-	10
	30	9	-	-	11
	40	10	14	-	12
	50	11	15	-	13
مستخلص الاستون	10	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
	30	-	-	-	-
	40	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
مستخلص الايثانول	10	6	8	-	-
	20	7	9	10	-
	30	10	10	11	-
	40	10	11	12	-
	50	11	13	13	-
مستخلص الميثانول	10	10	-	-	-
	20	11	-	-	-
	30	12	-	-	-
	40	13	-	-	-
	50	14	-	-	-

نلاحظ من الجدول (6) ان فعالية نبات الميرمية تجاه جراثيم *Escherichia coli* كانت اكبر مايمكن في خلاصة خلات الاثيل فوصلت الى 42ملم بتركيز 50 ملغم/مل و30 ملم تجاه جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* بنفس التركيز . اما زيت الميرمية فكانت اعلى فعالية له تجاه جراثيم *Escherichia coli* فوصلت الى 25 ملم بتركيز 50 ملغم/مل .

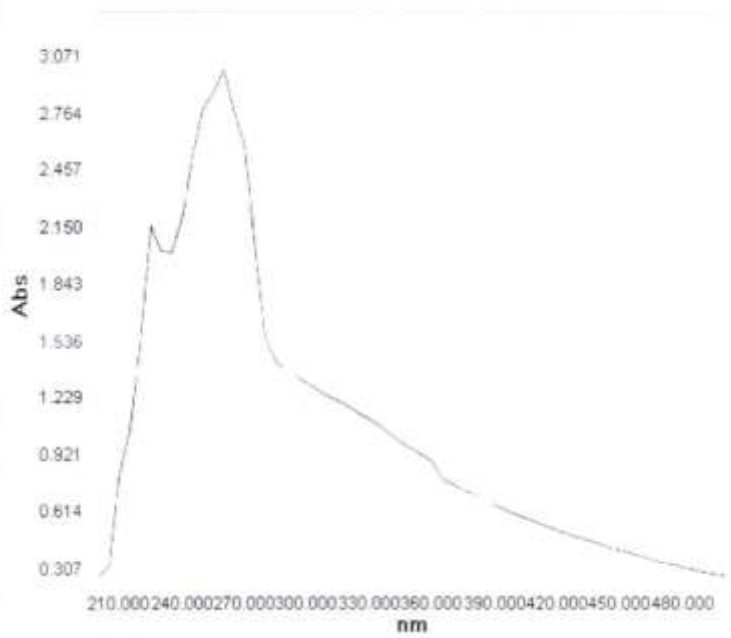
الاستنتاجات

1. دلت الدراسة التحليلة الأولية لمستخلصات نبات الميرمية على وجود الكلآيكوسيدات والفلافونويدات والراتنجات والتانينات والصابونيات والفينولات والتربينات والقلويدات بالاضافة الى السيتيرويدات ووالكاربوهيدرات والفلوباتانينات.
2. أفضل نسب الاستخلاص تم الحصول عليها في مذيب خلات الاثيل .
3. اعلى خلاصة لها تأثير عالي تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة هي خلاصة خلات الاثيل .
4. اعلى خلاصة لها تأثير عالي تجاه الفطريات هي خلاصة خلات الاثيل وخلاصة الايثانول .

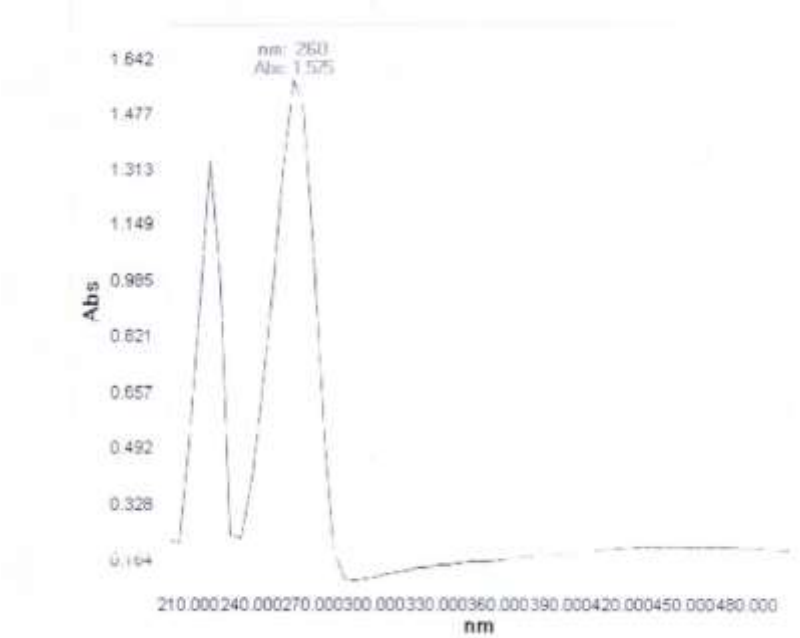
المصادر

1. B. Bozin, N. Mimica-Dukic, I. Samojlik, A. Jovin, Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis L*. and *Salvia officinalis L*. Lamiaceae) essential oils, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 7879–7885.
2. Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the Salvia genus V., Pharmacology. In: Kintzios SE, editor. Sage: the genus *Salvia*. Abingdon, Marston: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 143–84
3. Krutch, Joseph Wood, Herbal. G.P. Putnam's Sons: New York, 1965, 222
4. Grieve, M. "A Modern Herbal-Sages. " A Modern Herbal. 17 Feb. 2008
5. Mayer, B., Baggio, C.H., Freitas, C.S., dos Santos, A.C., Twardowschy, A., Horst, H., Pizzolatti, M.G., Micke, G.A., Heller, M., dos Santos, E.P., Otuki, M.F., Marques, M.C., 2009.
6. S. Glisic, J. Ivanovic, M. Ristic, D. Skala, Extraction of sage (*Salvia officinalis L.)* by supercritical CO2: kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes, Journal of Supercritical Fluids 52 (2010) 62–70.
7. Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A., Menichini, F.,. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. Anticancer Res. 2007. 27 (5), 3293–3299.
8. Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y. and N. B. Perry. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage(*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. Food Chemistry(2007). 101(4), 1417-1424.
9. Muhammed: Eman Hussam, Extractions of some Active Compounds from *Capparis Spinosa*, and Study of its Antibacterial Activities, Anbar University,(2007).
10. Wanger and application ,third edition, New York, united state of America886H.BLADTS., Plant Drug,(1995).
11. Kato , M. , Mizuna , K. , Fujimura , T. , Iwama , M. , Irie , M. , Krozier , A. , Ashihara , H. , " Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves " , Plant physiology , (1999) , 12 : 579 – 586

الاشكال



الشكل (1) طيف الاشعة فوق البنفسجية – المرئية لخلاصة (خلات الاثيل)



الشكل (2) طيف الاشعة فوق البنفسجية – المرئية لزيت نبات الميرمية