عزل بعض المواد الفعالة من ثمار البنبر (*Cordia myxia*) ودراسة فعاليتها البايلوجية لبعض الجراثيم السالبة لصبغة گرام

بشرى تركي مهدي
كلية التربية للبنات/ جامعة الانبار

الخلاصة

تضمن بحثنا هذا عزل بعض المواد الفعالة من ثمار نبات البنبر *(cordia myxia)* كالتانينات والسابونينات والزيوت الطيارة وكانت نسبتها المئوية في النموذج (69.2%) , (23.1%) و (7.7%) على التوالي وكذلك تعيين بعض العناصر المعدنية في ثمار البنبر كالفسفور والصوديوم والكالسيوم والمغنسيوم وكان تركيزها في النموذج (100 ppm), (80 ppm) , (25 ppm) , (95 ppm) على التوالي باستعمال قياس شدة موجات الطيف الإمتصاص الذرّي. كذلك انجزت دراسة الفعالية المضادة للبكتريا للمواد التي تم عزلها من ثمار نبات البنبر باستخدام جنسين من البكتريا المرضية وهي (*klebsiella pneumonia* و*aeruginosa pseudomonas*) حيث اظهرت الدراسة قدرة تثبيطية مختلفة للمواد المعزولة من ثمار البنبر وباقطار تثبيط مختلفة تختلف باختلاف المواد الفعالة وتراكيزها وجنس البكتريا.

isolation of some active materials from *Cordial myxia* fruits and study its biological activity against gram negative bacteria

B. T. Mahdi
College of Edu. / AL-Anbar Univ.

Abstract

This study included isolation of some active materials from *Cordial myxia* fruits such as tannins, saponins and volatile oils with percentage of (69.2%),(23.1%), and (7.7%) respectively. Also the study included the determination of minerals in *Cordia myxia* fruit such as "P, Na, Ca and Mg" using atomic absorption spectrophotometry. The concentrations of these minerals were (100ppm),(80ppm),(25ppm) and (95ppm) respectively.

The anti-bacterial activity study was performed for the active materials isolated from *cordial myxia fruits* against two genus of pathogenic *becteria, pseclomenas* and *klebasilla* by using agar-well diffusion method. It appeared from this study that all of the isolate active material have inhibitory effect on bacteria was used. The inhibition zone diameter varies with the type of active compound, its concentration and the genus of bacteria

المقدمة

تعتبر النباتات الطبية مصدرا مهما للمواد الفعالة التي تدخل في تحضير العديد من الادوية حيث ثبت علميا ان المادة الفعالة المصنعة معمليا لاتؤدي نفس التأثير الفسيولوجي الذي تؤديه المادة الفعالة المستخلصة من النباتات الطبية اضافة الى التأثيرات الجانبية التي تتركها على جسم المادة المحضرة والتي قد لاتظهر الا بعد

فترة قد تكون طويلة ,ونبات البنبرمن النباتات الاستوائية ولالاسم الشائع لهُ *(Lasoda)* , ويعود الى جنس (*Cordia*) نوع (*myxia*) اسمه العلمي (*Cordia myxia*) ومن العائلة (*Boraginaceae*)(1-2). وثمرة البنبر ثمرة مكورة ملساء صفراء اللون تحتوي في داخلها على مادة عصيرية لزجة ودبقة مخاطية استخدمت لعلاج العديد من الامراض كمرض فقر الدم والتهاب الكبد والتهاب اللثه وفرط كولسترول الدم(3-4).كما تحتوي ثمارشجرة البنبر في تركيبها الكيمياوي على العديد من المواد الفعالة بايولوجياً كالتانينات والكلايكوسيدات والسابونينات والقلويدات والزيوت الطيارة(5) وقد تم اختيار كل من العزلتين الجرثومتين *(k. pneumonia و P. aeruginosa)* وذلك لاهميتها الطبية بالنسبة للانسان لكونها تعتبر من الجراثيم السالبة لصبغة كرام المسببة للعديد من الامراض لهُ بالاضافة مقاومة للعديد من المضادات(6-7).

المواد وطرائق العمل

أولاً مصدر وتصنيف النبات

استخدم في البحث نبات البنبر *(Cordia myxia)* و قد تركزت الدراسة على ثمار البنبر حيث تم الحصول عليها من السوق المحلي في محافظة الانبار ,تم غسل الثمار وتجفيفها ثم عزل المكونات الفعالة في كلية التربية للبنات جامعة الانبار.

ثانيا:-عزل المكونات الفعالة :

أ-التانينات (tannins):

تم عزل التانينات من ثمارالنبات وذلك باضافة (75) مللتر من الماء المقطر الى(0.5)غم من مسحوق ثمار البنبر ووضع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة (30) دقيقة ثم اجري للمزيج طرد مركزي بسرعة(200 دورة \دقيقة) ولمدة (20) دقيقة. نقل الرائق الى دورق سعة (100) مللتر واكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر بعدها اضيف للمزيج(20) مللتر من lead acetate 4% مع الرج المستمر ثم نرشح ويؤخذ الراسب ويجفف بدرجة حرارة (70) م^{o} في الفرن الكهربائي(8-10)

ب-االسابونينات (sapnins):

تم وزن (10)غم من مسحوق ثمار البنبر واضيف اليه(50) مللترمن (20% ethanol) ثم سخن باستخدام حمام مائي ولمدة نصف ساعة وبدرجة (55)مه مع التحريك المستمر بعدها رشح المحلول فصل الراشح واكمل الحجم الى(100) مللتر بـ(20% ethanol) ثم سخن المحلول باستخدام حمام مائي وبدرجة(90)م^{o} حتى اصبح المحلول النهائي بحجم (40) مللتر حيث نقل الراشح واضيف اليهِ(20) مللتر من الايثر في قمع فصل بعدها فصلت الطبقة المائية واهملت طبقة الاثير واضيف الى الطبقة المائية (10) مللتر من البيوتانول (n-butanol) ثم بخر المحلول الناتج في حمام المائي وجفف المحلول للحصول على السابونينات(11-12)

ج-الزيوت الطيارة (Volatile oil)

استخلصت الزيوت الطيارة في ثمار البنبر بطريقة الاستخلاص المستمر وباستخدام جهاز (Soxhlot) وباستخدام الايثر كمذيب عضوي حيث وضع (5) غم من مسحوق ثمار البنبر مع (150) مللتر من الايثر وأجريت عليه عملية الاستخلاص لمدة (24) ساعة بعدها فصل المذيب عن الزيوت الطيارة(13).

ثالثاً: تعيين العناصر في ثمار البنبر (Minerals determination)

تم تعيين العناصر في جامعة بغداد كلية العلوم قسم الكيمياء ,واستخدمت تقنية الامتصاص الذري لتقدير العناصر باستخدام جهاز الامتصاص الذري نوع "GBC 933 Plus" Atomic Absorption Spectrometer ذو المنشأ استرالي و("Shimadzu 24-21001"UV-visible spectroscopy) ذو المنشئ الياباني وتم في بداية اعداد النموذج للتحليل حيث اخذ (1)غم من مسحوق ثمار البنبر وأذيب في (20) مللتر من الماء الملكي (IHNO3+3HCL) وترك لمدة نصف ساعة بعدها رشح المزيج ثم أكمل الراشح إلى (100) مللتر بالماء المقطر . حيث حضرت سلسة من المحاليل القياسية لكل عنصر وضمن مدى الاطوال الموجية معينة وباستخدام مصابيح الكاثود المجوفة الخاصة بكل عنصر(14).

رابعاً: دراسة الفعالية المضادة للبكتريا :

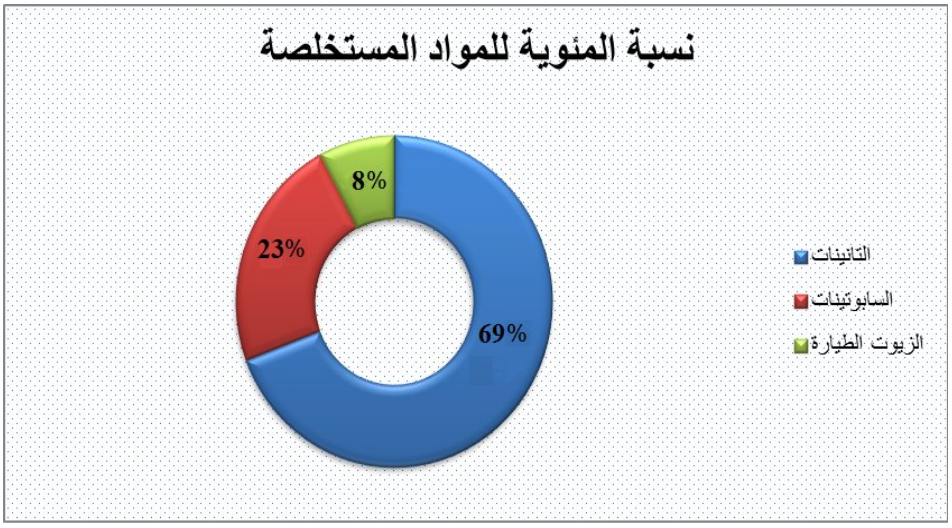
اتبعت طريقة الانتشار بالحفر (Agar-well diffusion method) حسب طريقة استعمال طريقة kirby Baauer (15–16) في قياس مدى حساسية البكتريا المستخدمة في البحث للتراكيز المختلفة للمواد المعزولة من ثمار البنبر حيث تم الحصول على بكتريا(*p .aeruginos, k. pneumonia*) معزولة ومشخصة في مختبر الزرع لمستشفى الأطفال في الرمادي كما تم استخدام وسط (Mueller Hinton ager) لاجراء أختبار حساسية البكتريا للمواد المعزولة من ثمار البنبر وحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بواسطة المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة(121^{o}) مئوي وضغط (15) باوند/انج لمدة (15) دقيقة ثم ترك ليبرد وصب في الاطباق وترك ليتصلب,وقد تم اجراء الطريقة العمل كمايلي:حضرت أطباق وسط اغار مولر هنتون ووضعت بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال, ثم تم تحضير عالق جرثومي بأخذ عدة مستعمرات معزولة نامية على وسط الاغار المغذي لمدة (18) ساعة ووضعت في المحلول الفسلجي ومزجت جيدا بالمازج vortex لمدة 15 ثانية ثم ضبط العالق الجرثومي بتركيز(1.5×10^{8}) وحدة مكونة بالمليلترالواحد باستخدام انابيب ماكفرلان(17) ,بعدها تم تلقيح أطباق وسط اغارمولر هنتون ذلك باخذ مسحة قطنية معقمة وضعت في عالق اللقاح ثم ضغطت على جوانب الانبوب للتخلص من اللقاح الزائد ثم مررت المسحة القطنية على الطبق ثلاث مرات مع تدوير الطبق بزاوية 60 في كل مرة بعدها مررت المسحةعلى حافة الطبق, ومن ثم عمل خمس حفر دائرية في كل طبق البتري بواسطة قاطع الفليني وبقطر 5 ملم,ثم أخذ حجم(25) مايكروليتر من كل تركيز بواسطة ماصة دقيقة micro pipet ووضع في الحفر, بعدها وضع الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة (37) م^{o} ولمدة (24) ساعة وبعد ذلك تم قياس قطر التثبيط(Inhibition Zone) (18–19) في كل حفرة بوساطة المسطرة وتسجيل النتائج .

تحضير المحاليل القياسية للمواد المعزولة من ثمار البنبر:

تم تحضير سلسة من المحاليل المائية للمواد المعزولة من ثمار البنبر وبتراكيز(1%,5%,10%15%25%) ملغم / مل.

النتائج والمناقشة

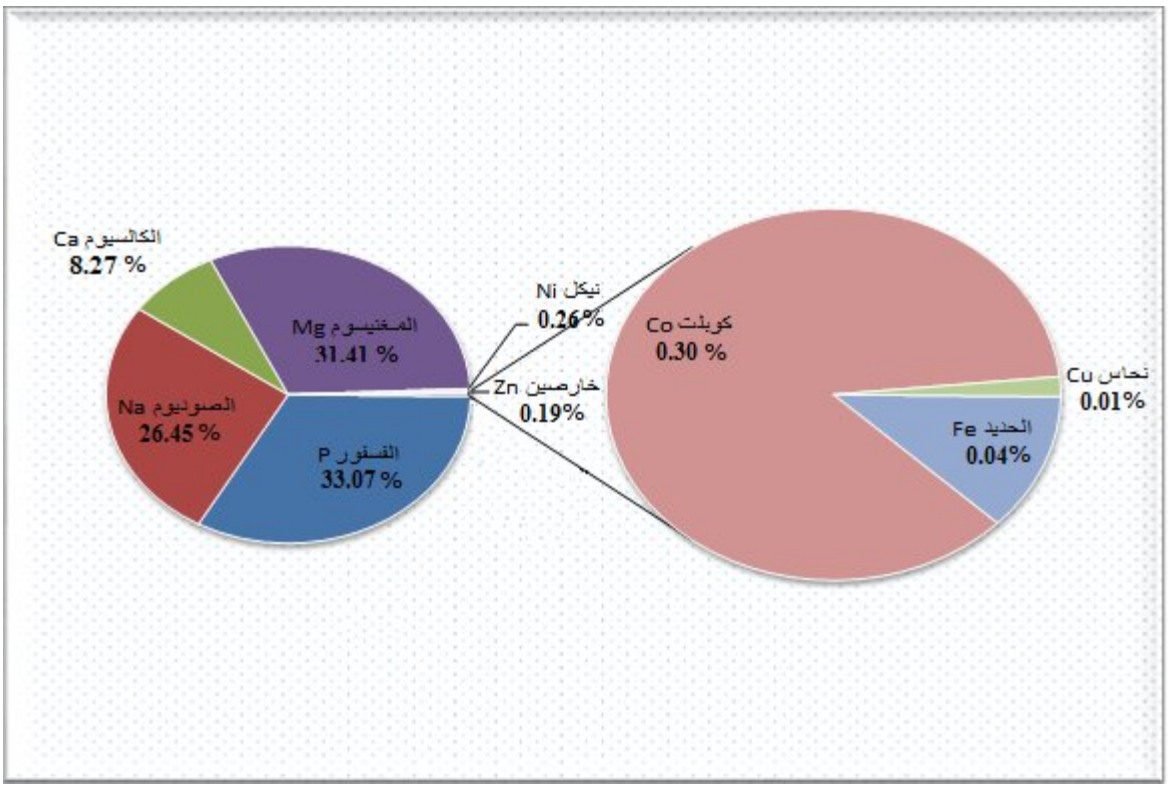
الشكل (1) يوضح النسب المئوية للمكونات الفعالة التي تم عزلها من ثمار البنبر(*Cordia myxia*) وكانت نسبتها المئوية للتانينات والسابونينات والزيوت الطيارة هي (69.2% , 23.1% 7.7%) على التوالي حيث يلاحظ ان التانينات قد سجلت اعلى نسبة وزنية في ثمار البنبر تليها السابونينات ثم الزيوت الطيارة .



شكل 1. يوضح النسبة الئوية للمواد المستخلصة

الشكل (2) يبين كمية العناصر المعدنية في ثمار نبات البنبر حيث اظهرت نتائج البحث ان ثمار البنبر تحتوي على الفسفور (100ppm) والصوديوم (80ppm) الكالسيوم (25ppm) والمغنيسيوم (95ppm) وهي عناصرمعدنية ذات اهمية وظيفية وايضية في الجسم فالفسفور دور مهم في تكوين العظام وفي الفعالية العصبية والعضلية وفي تمثيل المواد الدهنية والبروتينية والكاربوهيداراتية وفي حفظ التوازن القاعدي – الحامضي لدم الانسان, ويحتاج الاطفال الرضع والنساء الحوامل واليافعون الى كميات اكثر من الفسفور,ويدخل في تركيب الانسجة الرخوة وبلازما الدم, والصوديوم دوراً مهما في المحافظة على التوازنات للسوائل خارج الخلية في الجسم وكذلك الدالة الحامضية لتلك السوائل وكما يشترك مع البوتاسيوم في تنظيم حركة العضلات اللاارادية مثل ضربات القلب,والكالسيوم يعزز قوة العظام والاسنان ويساهم في نقل الايعازات العصبية وتنظيم نبض القلب كما يدخل المغنيسيوم في بناء انسجة الجسم وهو مكون مهم لاكثر من (300) انزيم في الجسم ذات وظائف ايضية مهمة بايولوجياً (20) أما بقية العناصر المعدنية الاخرى(الحديد والنحاس والخارصين والكوبلت والنيكل) فأن كميتها قليلة لكن لها فوائد كثير فالحديد مهم لوظائف وتكوين الهيموغلوبين والمايوغلوبين والنحاس يمتلك وظائف ايضية مهمة داخل الجسم فهو يقوم بأكسدة بعض الانزيمات مثل (Tyrosinase ,Lactase and Ascorbic acid oxidase) كما يمتلك أهمية وظيفية في تكوين البروتين Aortic elastine لذا فان نقصه يسبب بعض الامراض القلبية المزمنة,,والخارصين لهُ دورفسليوجي مهما في الجسم فهو يساعد على حماية انسجة الدماغ والانسجة العصبية وكذلك يقوي النظام المناعي في الجسم ومهم في الانقسام الخلوي وتخليق DNA, وينشط

النيكل عدد من الانزيمات المهمة في الاستفادة من الكلوكوزوالحديد في الجسم (23–21) والكوبلت هو من العناصر المعدنية المكونة لفيتامين B_{12} كمايلعب دورا مهما في حمايةالانسجة العصبيمن التلف(24)



شكل 2. يوضح النسب المئوية للعناصر الموجودة في مستخلص البنبر

جدول (3,4) تظهر نتائج الفعالية المضادة للبكتريا للمواد المعزولة من ثمار البنبر حيث تم دراسة فعالية تلك المواد (التانينات والسابونينات) كل على حدة وبتراكيز مختلفة وباستخدام نوعين من البكتريا المرضية *(p. aeruginosa, k. pneumonia)* وقد أظهرت التانينات المستخلصة في من ثمار البنبر اعلى فعالية عند التركيز (25) ملغم / مل حيث بلغ قطر التثبيط (1.4) مل بالنسبة للبكتريا*(P.aeruginos)* و(1) ملم بالنسبة للبكتريا *(K. pneumonia)* تليها بقية التراكيز وبمعدلات متباينة جدول(3).

جدول 3.تاثير التانينات المستخلصة من ثمار البنبر المجففة وبتراكيز مختلفة على نمو الاجناس البكترية المستخدمة في البحث.

Conc.in mg\ml	قطر التثبيط (mm)

	Pseudo	Klebsilla
25	1.4	1.0
15	1.3	0.6
10	1.3	R
5	1.1	0.8
1	1.7	0.7

مقاومة للمضاد R=Resistance

كما اظهرت ان السابونينات في ثمار البنبر اعلى فعالية مضادة للبكتريا *(P.aeruginos)* عند التركيز (25)مغم/مل حيث بلغ قطر التثبيط (1.5)ملم كما اظهرت السابونينات اعلى فعالية مضادة للبكتريا *(K. pneumonia)* عند تركيز (15ملغم /مل) حيث بلغ قطر التثبيط (1,5)ملم اما بقية التراكيز فكانت مؤثرة بنسب متباينة اعتمدت على تركيز المادة الفعالة جدول(4).

جدول4. تاثير السابونينات المستخلصة من ثمار البنبر المجففة وبتراكيز مختلفة على على نمو الاجناس البكتيرية المستخدمة في البحث.

Conc.in mg\ml	قطر التثبيط (mm)	
	Pseudo	Klebsilla
25	1.5	R
15	1.0	1.5
10	1.1	1.0
5	1.1	1.0
1	1.1	R

مقاومة للمضاد R=Resistance*

ان الفعل التثبيطي للتانينات يعود الى احتواء التانينات على بعض المركبات الفينولية مثل حامض الكاليك(Gallic acid) وحامض التانيك (Tannic acid) واللذان لهما تاثيراً حيوياً ضد العديد من الاجناس البكتيرية بسبب وجود مجاميع الهيدروكسيل (OH−) والتي لها القدرة على تكوين اواصر هيدروجينية بين مجموعة الهيدروكسيل في تلك المركبات وجزيئات الماء في الخلية البكتيرية والتي يكون الماء(90%) من وزنها مما يؤدي الى تعطيل الاعمال الحيوية في الخلية البكتيرية(25) , كما لتلك المركبات (Tannic , Gallic acid acid) باعتبارها مركبات فينولية لها القدرة على تخثير بروتينات الخلية البكتيرية وتحطيم الانزيمات التي تشترك في تصنيع الحوامض الامينية الضرورية في زيادة انقسام الخلوي (26−28).

أما الفعل التثبيطي للسابونينات فنعتقد انها تعود الى احتوائها على السابونينات والبتروبدية على وجه التحديد المركب جلبيرهيزين(Glycyrrhizin) وهو من الكلايكوسيدات السابونية حيث تملك مجاميع الهيدروكسيل المفقودة في المركب المذكور القدرةعلى اذابة طبقة الدهون الموجودة في جدران الخلية البكتيرية مما يوثر على انتقائية جدار الخلية وبالتالي دخول وخروج المواد من خلال جدار الخلية البكتيرية دون اي انتقائية(29).

المصادر

Al-Rawi A. ”Medicinal Plants of Iraq” Baghdad , Second Eddition , (1988).Fu P. P. ,yang y.c. , Xia , Q. , chou , M.c. Cui , y.y. and Lin. G.(2002)

pyrrolizidinealkaloids-tumorigenic and diatry supplements. Jornal of food and drugs analysis , vol.10(4):198-211

سامي هاشم و مهند جميل "النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي "بغداد ,دار الثورة للصحافة والنشر (1988)

Joy P.P. , Thomas. J. Mathew S. and Skaria B.P. (1998). Medicinal Plants. Kerala Agricultural University. India.

Rizk A. M.”ThePhyto Chemistry of Flora of Qatar”, King Print Of Richmond , Great Britian ,(1986).

العاني ,مثنى بديع فرحان"دراسة دور الجراثيم بتكوين بعض انواع حصى المرارة " ,رسالة ماجستير, كلية العلوم,جامعة بغداد,(2002), ص95-82

.Motamedi H. , Darabpour E., Gholipour M., and SeyyedNejad, SM.(2010) , Invitro assay for anti-Brucella activity of medicinal plants against tetracycline-resistantBrucellamelitensis . vol.11.No.7:506-11

Mohammed R., Peng J. , Kelly And Mark T., "CyelicHeptapeptides From The Jamaican Sponge StylissaCaribica” J.Nat. Prod 69 (12) , (2006), p.1739-1744.

Barroso,I.C. and Oliveira F."pharmacoghostic diagnosis of fruits of cordial sellowianacham. And myxal. Rev"(2009) .bras. Farmacogh. 29 (n.29):458-470.

Laleaver R.E. and Anderson P.J. 2007 , Botany –Section Tri-ology Vol:46.No.3.P1-12p

Bernadete P. da Silva, Allyne C. de Sousa, Graziela M. Silva, Tatiana P. Mendes and Jose´ P. Parente" A New Bioactive Steroidal Saponin from Agave attenuate " (2002), Naturforsch. 57c, 423-428

George F. , Zohar K., Harinder P. S. Makkar3 and Klaus B. " The biological baction of saponins in animal systems: a review"(2002), British Journal of Nutrition , 88, 587–605.

Macid N. and Yeliz B "recovery of fixed and volatile oilsfromlaurusnobilis l.fruit and leaves bysolvent extraction method" , (2005),Eskişehir Osmangazi University, Vol. XVIII, No: 2.

Philips Scientific Book , "Atomic Absorption Data Book" , 5th Ed. , England, (2000). American Association of carealchemist(AACC).(1983).Approved methods .Apse,M.P. and BlumwaldE." Engineering salt tolerance in plants" Biotechnology,(2002) , 13, p144-150 .

Motamedi H. , Darabpour E., Gholipour M., and SeyyedNejad, SM.(2010) , Invitroassay for anti-Brucella activity of medicinal plants against tetracycline-resistantBrucellamelitensis . vol.11.No.7:506-11

Vandpitte J. , Engback K. , Piot P. and HeuckC.C"Basic laboratory procedures in clinical bacteriology "WHO., Geneva.,(1991), p.(78-110).

Brown R. and Poxton I.R. "Centrifuges, colorimeters and bacterial counts in: Mackie and McCareney practical medical microbiology "by Collee ,J.G.

; Fraser , A.G.; Marmion, B.P. and Simmons A., fourteenth edition , Vol. l, Churchill Livingstone, New York,(1996) , p. (845-852).

Aiyegoro O.A. and Okoh A.I. (2009) . use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics : Implication in antimicrobial chemotherapy .vol.3(13):1147-1152

Sageska y. M., uemura T. ”Anti-microbial and anti- inflammatory actions of tea leaves saponin”, Yaugakuzasshi, Mar.,(1997), 116(3):238..

Vishwanath M.Saradesai,”Introduction to clinical Nutrition”,New York, Marcel Dekker,INC.,(1997).

FaittinS.,"The Complete book of Minerals for Health",pennsalnania,(1981).Linus P."Plant derived minerals the Refernce",2009,p.16-34.

Allan G. , Robert A. , Denis St.J. Michael J. S. and James S. "An illustrated colour text clinical biochemistry ,ed. 2ed ,UK,(1999) , p.106 -114.

Carter A.E.,"TheMiracles of Minerals", the human need of ninety plus element from cells point view (1995).

Ageel A., kursheed A.K., Q.,”Antibacterial activity of Julifloricineisolalted from proposijuliflora 39. (1989), p652-655,.

Kam,C.M.,fujikawa,K and power,J.C.,”New Anti coggulants.”,J.Biochemistry, 27 ,(1988), P.2547-2557.

Samar M. A. AL-Ani "extraction some of active compounds from trigonella foenum-graecum seeds and study their anti bacterial activity Bordia, A; Verma, S.K and Srivastava, K.C. Effect of ginger (Zingiber officinaleRosc) and fenugreek (Trigonellafoenumgraecum L) on blood lipids, blood sugar, and platelet aggregation in patients with coronary artery disease (1997).