الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

التشخيص النوعي والتقدير الطيفي والكمي لبعض المكونات الفعالة لأوراق نبات الآس (*Myrtus communis* L.) ودراسة فعاليتها ضد البكتريا والفطريات المرضية

عمر حمد شهاب العبيدي ، بشرى تركي مهدي ، رغد خالد خماس

قسم الكيمياء ، كلية التربية للبنات ، جامعة الانبار ، رمادي ، العراق

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية: الآس ، التانينات ، الزيوت الطيارة ، تطبيقات حيوية ، مضاد البكتريا والفطريات

الاسم: عمر حمد شهاب العبيدي

البريد الاليكتروني:

رقم الهاتف:

الملخص

يتضمن البحث عزل بعض المواد الفعالة من اوراق نبات الاس (*Myrtus communis* L.) كالتانينات والزيوت الطيارة وكانت نسبتها المئوية في النموذج (11.5%) , (13.56%) على التوالي وكذلك تعيين بعض العناصر المعدنية في أوراق الآس كالصوديوم Na والكالسيوم Ca والبوتاسيوم K وكان تركيزها في النموذج (141 ppm)، (95 ppm) ، (168 ppm) على التوالي باستعمال قياس طيف الانبعاث. كذلك أنجزت دراسة الفعالية المضادة للبكتريا للمستخلصات من اوراق نبات الآس باستخدام نوعين من البكتريا المرضية وهي *Escherichia Coli* و *Staphylococcus aurous* أظهرت قدرة تثبيطية مختلفة للمستخلصات المختلفة وبأقطار تثبيط مختلفة حسب المواد الفعالة وتراكيزها وجنس البكتريا. كما تم استخدام نوع واحد من الخطوط الخلوية السرطانية لدراسة مدى تأثير المستخلصات اوراق الآس على نمو الخلايا في المختبر وبالتالي معرفة مواصفات المستخلصات كمضادة للأورام وخط الخلايا المستخدم هو ($L_{20}B$) وهي خلايا فأر متحولة (Mice Transformed cell Line).

المقدمة

أدرك الإنسان منذ القدم دور النباتات الطبية كعلاج لبعض الأمراض واستعمل العديد من الأعشاب في تطبيقات علاجية ، واتجه الباحثون في السنوات القليلة الماضية إلى دراسة الخواص العلاجية والمكونات الكيماوية لهذه الأعشاب لمعرفة الفعالية الحيوية والصناعية لهذه المكونات ، ونبات الاس من النباتات دائمة الخضرة واسمه العلمي (*Myrtus communis L.*) [1] ، حيثَ ينتمي لعائلة (*Myrtaceae*) ويزرع في مناطق عديدة من العالم، كما تعتبر هذه العشبة مقدسة ومظهر من مظاهر الزينة في العصور اليونانية والرومانية .[2]

عشبة الآس لها عدّة استخدامات منها: العناية بالبشرة لكونها تحتوي على مركبات مضادات الاكسدة التي تساعد على شفاء الخلايا بسرعة، ودعم صحة القلب وذلك لوجود الفلافونيدات بما فيها مادة الميريسيتين التي تعمل على تقليل الكوليسترول السيء (LDL cholesterol) أي تبقى مستويات الكوليسترول في الجسم متوازنة ، والوقاية من السرطان وذلك لاحتواء كميات عالية من الكيرسيتين (Quercetin) والميريستين (Myricetin) والكاتشين (Catechin)، كما يعتبر مهم في تعزيز صحة الكلى والتوازن الهرموني بالاضافة الى تعزيز جهاز المناعة. لهذه العشبة اضرار جانبية منها زيت الآس غير آمن لاحتواءه على مادة تسبب هجمات تشبه الربو ، فشل الرئة ، انخفاض ضغط الدم وايضا اضطرابات الدورة الدموية. [3]

ولهذا تم فحص مستخلص نبات الآس بايلوجيا و تم اختيار كل من العزلتين الجرثومتين (Escherichia Coli و aurous Staphylococcus) وذلك لأهميتها الطبية بالنسبة للإنسان لكونها تعتبر من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة ألكرام المسببة للعديد من الأمراض [4].

طرائق العمل

أولاً: مصدر وتصنيف النبات : استخدم في البحث الآس حيث تم الحصول عليه من السوق المحلي في محافظة الانبار . تم تجفيف ثم طحن النبات بواسطة المطحنة الكهربائية وذلك لتحويل اوراق الآس إلى مسحوق ناعم ومن ثم حفظ المسحوق في مكان بارد بعلبة زجاجية معقمة وذات سداد محكم و بعيدا عن أشعة الشمس لحين استخدامه في انجاز تجارب البحث.

ثانيا:- تحضير المستخلصات:

تحضير المستخلص المائي[5] تم اخذ (40)غم من مسحوق الاس ووضعت في دورق مخروطي يحتوي على (200) سم ماء مقطر حيث خلطت باستخدام الخلاط الكهربائي لمدة (30) دقيقة ووضع جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة بعدها وضع المحلول الرائق في الفرن الكهربائي وبدرجة حرارة 35 مئوية ولحين الحصول على المستخلص المركز ومنه حضرت التراكيز (25, 20,15,10,5)%.

أما المستخلص الكحولي فتم الحصول عليه من وضع (50)غم من مسحوق الآس في وحدة الاستخلاص Soxhelt وأضيف لها (350) مل من الكحول الاثيلي بتركيز (99.5)% واستمرت عملية الاستخلاص لمدة (12) ساعة وبدرجة حرارة 40 مئوية باستخدام جهاز المبخر الدوار Vacuum Rotary Evaporator وعلى درجة حرارة (35) مئوية [6] وحضرت التراكيز بنفس طريقة تحضر تراكيز المستخلص المائي .

ثالثا: الدراسة الكيميائية (الكشوفات النوعية)

لغرض التعرف على مكونات الآس أجريت عدة كشوفات كيميائية نوعية للمستخلص الأولي لاوراق الآس وكما يلي :

- **الكشف عن أشباه القلويدات Alkaloids** [7]
- **الكشف عن الكاربوهيدرات** [8]
- **السابونينات Saponin** [9]
- **الفلافونيدات Flavonoids** [10]
- **الدهون Lipids** [11]
- **البروتينات**
- **التانينات**

1. **كاشف خلات الرصاص** [12]

ظهور راسب بني فاتح دلالة على وجود هذه التانينات.

2. **كاشف كلوريد الحديديك** [12]

ظهور اللون الأخضر أو الأزرق الغامق دلالة على وجود مجموعة الكاتيكول Catechol .

3. **كاشف كاربونات البوتاسيوم** [12]

ظهور راسب احمر دلالة على وجود هذه التانينات.

4. **كاشف الفورمالديهايد** [12]

ظهور راسب بني دلالة على وجود الكاتيكول .ظهور راسب ابيض كثيف دلالة على وجود مجموعة البايروكالول Pyrogallol .

5. **كشف الحامضية** [12]

فإذا كانت قيمة الـ pH تتراوح مابين (3.6-5.9) دل ذلك على وجود التانينات المكثفة .

6. **كشف اللوكوانثوسيانيدين** [13]

تكون راسب احمر دلالة على وجود اللوكوانثوسيانيدين .

7. **كشف الجيلاتين** [14]

يستخدم هذا الكاشف للكشف عن التانينات بصورة عامة ،ظهور راسب بني – حليبي دليل على وجود التانينات.

رابعاً: تعيين العناصر:

تم تعيين العناصر واستخدمت تقنية المطياف اللهبي (Flame photometer) لتقدير العناصر باستخدام جهاز نوع **GENWAY PFP7** ذو المنشأ الانكليزي حيث تم في البداية إعداد النموذج للتحليل اخذ (1) غم من مسحوق الآس وأذيب في (20) مللتر من الماء الملكي (HNO_3+3HCl) وترك لمدة نصف ساعة بعدها رشح المزيج ثم أكمل الراشح إلى (100) مللتر بالماء المقطر . حيث حضرت سلسة من المحاليل القياسية ثم تم قياس شدة انبعاث المحاليل القياسية المحضرة ومحاليل النماذج [10].

خامسا: تقدير المكونات الرئيسية:

أ- التانينات (Tannins):

تم عزل التانينات من الآس وذلك بإضافة (75) مللتر من الماء المقطر إلى (0.5)غم من مسحوق الآس ووضع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة (30) دقيقة ثم اجري للمزيج طرد مركزي بسرعة (200 دورة ادقيقة) ولمدة (20) دقيقة. نقل الرائق إلى دورق سعة(100) مللتر وأكمل الحجم إلى العلامة بالماء المقطر بعدها أضيف للمزيج (20) مللتر من 4% خلات الرصاص مع الرج المستمر لمدة ساعة واحدة، ثم نرشح ويؤخذ الراسب ويجفف في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة (40) °م [15] .

ب- تقدير نسبة الرماد

تم تقدير نسبة الرماد وذلك بأخذ (2)غم من مسحوق الآس وحرقه في فرن بدرجة حرارة (550) °م إلى أن يتحول إلى اللون الرمادي المائل للأبيض ومن ثم وزن النموذج مرة ثانية لحساب النسبة المئوية للرماد.[13]

ت- تقدير نسبة الرطوبة

تم تقدير النسبة المئوية للرطوبة وذلك بوزن (2) غم من مسحوق الآس ووضع في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة (60) °م ولمدة (24) ساعة . ومن ثم برد النموذج ووزن مرة ثانية لتقدير نسبة الرطوبة.[13]

ث- الزيوت الطيارة (Volatile oil)

استخلصت الزيوت الطيارة في الآس بطريقة الاستخلاص المستمر وباستخدام جهاز (Soxhlet) وباستخدام الايثر كمذيب عضوي حيث وضع (5) غم من مسحوق الآس مع (150) مللتر من الايثر وأجريت عليه عملية الاستخلاص لمدة (24) ساعة بعدها فصل المذيب عن الزيوت الطيارة[9].

ج- قياس الرقم الهيدروجيني pH measurement

مزج (10)غم من المسحوق مع 100 مل ماء مقطر باستخدام المازج المغناطيسي لمدة (10) دقائق ثم رشح وقيس الرقم الهيدروجيني باستخدام pH- Meter .

سادسا: دراسة الفعالية المضادة للبكتريا المرضية :

اتبعت طريقة الانتشار بالحفر (Agar-well diffusion method) حسب طريقة استعمال طريقة kirby Baauer [11] في قياس مدى حساسية البكتريا المستخدمة في البحث للتراكيز المختلفة للمواد

المستخلصة من الآس حيث تم الحصول على بكتريا (Escherichia Coli و Staphylococcus aurous) معزولة ومشخصة في مختبر الزرع لمستشفى الأطفال في الرمادي كما تم استخدام وسط (Mueller Hinton ager) لإجراء اختبار حساسية البكتريا للمستخلصات من الآس وحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة ، بعدها وضع الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة (37) م°ولمدة (24) ساعة وبعد ذلك تم قياس قطر التثبيط (Inhibition Zone)[12، 13] في كل حفرة بوساطة المسطرة وتسجيل النتائج.

تحضير المحاليل القياسية للمواد المعزولة من الاس :

تم تحضير سلسة من المحاليل للمستخلصات المختلفة وبتراكيز (5,10,15 , 20 , 25%).

سابعا :اختبار تأثير المستخلصات ضد الخلايا السرطانية :

تم استخدام نوع واحد من الخطوط الخلوية السرطانية لدراسة مدى تأثير مستخلصات الآس على نمو الخلايا في المختبر وبالتالي معرفة مواصفات المستخلصات كمضادة للأورام وكان العمل في قسم أبحاث السرطان في مركز بحوث التقنيات الإحيائية بجامعة النهرين .

وخط الخلايا المستخدم هو ($L_{20}B$) وهي خلايا فأر متحولة (Mice Transformed cell Line). في هذه الطريقة يتم حساب نسبة عدد الخلايا ضمن الظروف المثلى للنمو بدون إضافة المستخلصات المعنية وعندها يكون الناتج يمثل المجموعة الضابطة (control). بعد ذلك يتم إضافة المستخلصات لغرض معرفة تأثيراتها على نمو الخلايا في الخطوط المنتخبة.

النتائج والمناقشة

الكشوفات الكيميائية:

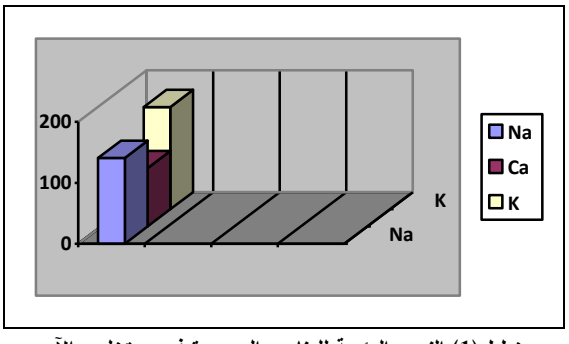
جدول (1) يبين الكشوفات الكيميائية للمواد الفعالة الموجودة في الآس، وقد أظهرت الكشوفات تواجد أصناف مهمة من المركبات والمعروفة بفعاليتها الدوائية.

جدول رقم (1) : نتائج الكشوفات الكيميائية للمواد الفعالة في الآس (*Myrtus communis* L.)

ت	الصنف	نوع الكاشف	التغير	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
1	القلويدات	دارجندروف	لون برتقالي	+	+
2	التانينات	كلوريد الحديديك	لون اخضر مزرق	+	+
3	التانينات المكثفة	خلات الرصاص	راسب بني فاتح	+	+
4	الفلافونيدات	محلول الامونيا	لون اصفر	–	–
5	الأحماض الامينية	النهايدرين	لون ارجواني	+	+
6	الفينولات	فيروسيانيد البوتاسيوم	لون اخضر مزرق	+	+
7	الراتنجات	حامض الهيدروكلوريك	ظهور عكرة	+	+
8	التربينات	سالكوفسكي	لون احمر داكن	+	+
9	السابونينات	كلوريد الزئبقيك	راسب ابيض	–	–
10	الكاربوهيدرات	الفانفثول	لون بنفسجي	+	+
11	اللوكوانثوسيانيدين	حامض الهيدروكلوريك	راسب احمر	–	–
12	الكلايكوسيدات	كاشف بندكت	راسب احمر	–	–

(+) وجود المادة الفعالة، (–) عدم وجود المادة الفعالة

إن وجود هذه المركبات الفعالة يفسر أهمية الآس ويفسر سبب استخدامه في الطب القديم والحديث وكذلك يثبت القيمة الدوائية للآس وجاء مطابقا للدراسات في هذا المجال [16]، مما يدعو إلى الاهتمام بهذه الأجزاء من النباتات والكشف عن مركباته وعزلها وتنقيتها لتوظيفها في الاستعمالات العلاجية.



مخطط (1) النسب المئوية للعناصر الموجودة في مستخلص الآس

تقدير المكونات الفعالة:

تقدير العناصر المعدنية :

يبين المخطط (1) كمية العناصر المعدنية في الاس بتقنية الانبعاث أللهبي حيث أظهرت نتائج البحث أنه يحتوي على الصوديوم (141 ppm) ، الكالسيوم (95 ppm) والبوتاسيوم (168 ppm) .

1- تقدير المكونات الأساسية والحامضية للآس

يبين الجدول (2) النسب المئوية للمكونات الأساسية للآس يوضح احتواءه على نسبة (10.12 %) من الرطوبة ونسبة (5.44%) من الرماد و (43.55%) من الزيت و (5.9 %) k من التانينات والآس الهيدروجيني (5.15).

وتعتمد نسبة الطوبة والرماد في النبات إلى عدة عوامل منها مناخية تتعلق باختلاف درجات الحرارة واختلاف فصول السنة حيث أن ارتفاع درجة الحرارة يؤدي إلى فقدان الماء أكثر [17].

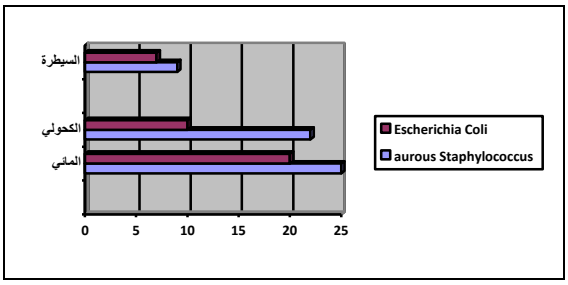
الجدول (2) : النسب المئوية للمكونات الأساسية وقيم الحامضية للاس

المكونات الأساسية	النسبة المئوية
الرطوبة (Moisture)	10.12
الرماد (Ash)	5.44
الزيت (Oil)	43.55
التانينات	5.9
الأس الهيدروجيني	5.15

الدراسة الحيوية ضد البكتريا

تم دراسة الفعالية البايولوجية ضد البكتريا المرضية لمستخلصات الاس حيث تم دراسة فعالية تلك المستخلصات كلاً على حدة وباستخدام نوعين من البكتريا المرضية (*Escherichia Coli* و *Staphylococcus aurous*) وقد أظهرت المستخلص المائي للآس أعلى فعالية حيث بلغ قطر التثبيط (25) ملم بالنسبة للبكتريا (*Staphylococcus aurous*) (20) ملم بالنسبة للبكتريا (*Escherichia Coli*) تليها المستخلص الكحولي مخطط (2).

إن الفعل التثبيطي للمستخلصات المائية يعود إلى احتواءها على معظم المركبات الفعالة التي يحتويها الآس في حين أن المستخلص الكحولي كان الأقل فعالية من المستخلص المائي وقد يعود السبب بذلك إلى إمكانية تحلل واحد أو أكثر من المكونات الفعالة في الآس بسبب الكحول مما يقلل من فعاليته التثبيطية ضد البكتريا المرضية، ولغرض تفسير التأثير على البكتريا فقد يكون بسبب وجود مجاميع الهيدروكسيل (-OH) الموجودة في الآس والتي لها القدرة على تكوين أواصر هيدروجينية بين مجموعة الهيدروكسيل في تلك المركبات وجزيئات الماء في الخلية البكتيرية والتي يكون الماء(90%) من وزنها مما يؤدي إلى تعطيل الأعمال الحيوية في الخلية البكتيرية [18]، فضلا عن المركبات الفينولية لها القدرة على تخثير بروتينات الخلية البكتيرية وتحطيم الأنزيمات التي تشترك في تصنيع الحوامض الامينية الضرورية في زيادة انقسام الخلوي [19].



مخطط (2) يوضح نسبة التثبيط لمستخلصات الآس

اختبار تأثير المستخلصات ضد الخلايا السرطانية :

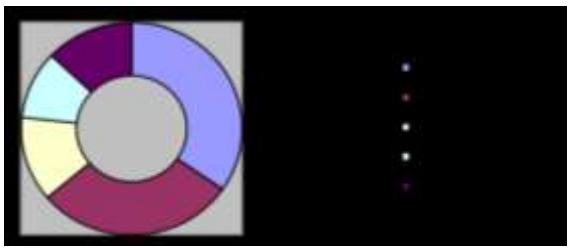
تم استخدام نوع من الخطوط الخلوية السرطانية لدراسة مدى تأثير مستخلصات الآس على نمو الخلايا في المختبر وبالتالي معرفة مواصفات المستخلصات كمضادة للأورام.

خط الخلايا السرطانية المستخدم هو ($L_{20}B$) وهي خلايا فأر متحولة (Mice Transformed cell Line).

في هذه الطريقة يتم حساب نسبة عدد الخلايا ضمن الظروف المثلى للنمو بدون إضافة المستخلصات المعنية وعندها يكون الناتج يمثل المجموعة الضابطة (control). بعد ذلك يتم إضافة المستخلصات لغرض معرفة تأثيراتها على نمو الخلايا في الخطوط المنتخبة.

تم تقسيم المستخلصات إلى ثلاث مجموعات، تضمنت الأولى المستخلص المائي والمجموعة الثانية تضمنت المستخلص الكحولي، أما المجموعة الثالثة فشملت المجموعة الضابطة.

تم تحليل النتائج المستحصلة إحصائيا بطريقة (one way ANOVA) فبينت النتائج التالية ، حسب المخطط (3) والذي يوضح تأثير المركبات على نسبة عدد الخلايا عند استخدام الخط الخلوي ($L_{20}B$)، يتضح أن المستخلص الكحولي الحار كان لهُ التأثير الأكبر على نسبة عدد الخلايا النامية وكان التأثير معنوياً ($P<0.05$) وهذه النتيجة مطابقة لما منشور في الأدبيات [20]. كما كان تأثير المستخلص المائي ذا تأثير معنوي ($P<0.05$) لكن نسبة التثبيط – كما في الشكل – اقل تأثيرا من المستخلص الكحولي. وللمستخلصات الأخرى تأثيرات تثبيط على نمو الخلايا المتحولة.



مخطط (3): تأثير المستخلصات على نمو الخلايا في الخط الخلوي ($L_{20}B$)

المصادر

1- Al-Rawi A. (1988),"Medicinal Plants of Iraq" Baghdad, Second Edition .

2- Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., & Komaitis, M. (2008). "Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food" chemistry, **107(3)**, 1120-1130.

3- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2006). "Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L.

and Myrtus communis L. essential oils". Phytochemistry, **67(12)**, 1249-1255.
4- Mansouri, S., Foroumadi, A., Ghaneie, T., & Najar, A. G. (2001). "Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of Myrtus communis". Pharmaceutical biology, **39(5)**, 399-401.
5- Ba - Angood, S.A.; Ermel, K. and Schmutterer, H.(1996). "Azadirachtin ontent of Yemeni neem seed kernels "(Azadirachta) india A.(Juss) and its effect on the Development of the Mexican bean beetle Epilachna varivests muls. Univ. of Aden J. of Natural and APL. Sci. 1:13-25 .
6- British Journal of Nutrition, (2002), 88, 587–605.
7- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., & Becker, K. (2002). "The biological action of saponins in animal systems: a review". *British journal of Nutrition*, ***88*(6)**, 587-605.
8- Mohammed R., Peng J., Kelly And Mark T., Cyelic "Heptapeptides From The Jamaican Sponge Stylissa Caribica" J. Nat. Prod **69 (12)**, (2006), p.1739-1744.
9- Al-hakeem et al., (1991).
10-Approved methods .Apse, M.P. and BlumwaldE. (2002), "Engineering salt tolerance in plants" Biotechnology, 13, p144-150 .
11-Vandpitte J., Engback K., Piot P. and Heuck C.C(1991), "Basic laboratory procedures in clinical bacteriology "WHO., Geneva., p.(78-110).
12- Brown R. and Poxton I.R. (1996) , "Centrifuges, colorimeters and bacterial counts in: Mackie and Mc Careney practical medical microbiology "by Collee , J. G. ; Fraser , A.G.; Marmion, B.P. and Simmons A., fourteenth edition , Vol. l, Churchill Livingstone , New York, p. (845-852).
13-Sageska y. M., uemura T. (1997), "Anti-microbial and anti- inflammatory actions of tea leaves saponin", Yaugaku zasshi, Mar., **116(3)**:238.
14-Vishwanath M. Saradesai, (1997)."Introduction to clinical Nutrition", New York, Marcel Dekker, NC.
15-Faittin S., (1981)."The Complete book of Minerals for Health", pennsalnania.
16-Allan G. , Robert A. , Denis St. J. Michael J. S. and James S. (1999) ,"An illustrated colour text clinical biochemistry ,ed. 2ed ,UK, p.106 -114.
17-Grimshow, J.(1976). "Depsides, Hydrolysable Tannins, Lignans, Lignin and Humic Acid". Coffeys.(ed), Vol. 111, Part D. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co.
18-Reed, J.D. (1995). "Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes", J. Animal Society, 73, 1516-1528.
19-Haslam, E. (1966). Chemistry of Vegetable Tannins. London: Academic Press INC.
20-Jing, Y. O. N. G. K. U. I., & Waxman, S. (1995). Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavones. Anticancer research, **15(4)**, 1147-1152.

Specific diagnosis, spectral and quantification of some effective components of (*Myrtus communis L.*) and study of its biological activity against bacterial and pathogenic fungi

Omar H. Al-Obaidi, Bushra Turky Mahdi , Raghed Khaled Khammas
Chemistry department, Education College for Girls, University of Anbar

This study included isolation of some active materials from *Myrtus communis* L. Such as tannins and volatile oils with percentage of 5.9%, 43.55 % respectively. Also the study included the determination of minerals in *Myrtus communis* L. such as " Na , Ca and K" using Flame photometer. The concentrations of these minerals were (141 ppm), (95ppm) and (168 ppm) respectively.
The anti-bacterial activity study was performed for the active materials isolated from *Myrtus communis* L. against two geneses of pathogenic bacteria, *Escherichia Coli and aurous Staphylococcus* by using agar-well diffusion method. It appeared from this study that all of the extraction 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. Also used one type of lines cellular cancer to study the effect of extracts sumac on cell growth in vitro and therefore see specifications extracts as antitumor line cells used is (L20B) a mouse cells mutant (Mice Transformed cell Line).