دراسة التاثير البايولوجي للقلويدات والفينولات المفصولة من نبات السذاب .Ruta graveolens L في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام

مثنى جاسم محمد

قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

الكلمات الدالة: السذاب، القلويدات، الفينولات، الجراثيم

الملخص:

تم في هذه الدراسة فصل المستخلص الميثانولي من ثمار نبات السذاب *Ruta graveolens L.* (fruits) ، ثم جزئ المستخلص الميثانولي للحصول على القلويدات والفينولات بشكل نقي، وحدد التاثير التثبيطي لهذه المواد في نمو خمسة انواع من الجراثيم هي: *Escherichia Coli* و *Salmonella typhi* و *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* . واستخدم المضادين الحيويين (Ciprofloxacin و Chloramphenicol) كعينات سيطرة.

اظهر المستخلص الميثانولي تاثيرا تثبيطيا عاليا ضد الجراثيم *S. typhi* و *Staph. aureus* و *K. pneumoniae* و *Bacillus subtilis* اعلى من تاثيرات المضادات الحيوية. فيما كان تاثير المستخلص على جرثومة *E. coli* اقل من تاثير المضادات الحيوية. كما اظهرت القلويدات تاثيرا تثبيطيا عاليا ضد جميع الجراثيم المستخدمة. اذ ظهر اعلى تاثير للقلويدات على جرثومة *Staph. aureus* تليها جرثومة *S. typhi* ثم جرثومة *K. pneumoniae* وجرثومة *Bacillus subtilis* اعلى من تاثير المضادات الحيوية. فيما كان تاثير القلويدات على جرثومة *E. coli* اقل من تاثيرات المضادات الحيوية.

واظهرت الفينولات تاثيرا تثبيطيا ضد الجراثيم*Staph. aureus* و *S. typhi* و *K. pneumoniae* و *Bacillus subtilis* اعلى من تاثير المضادات الحيوية. اما جرثومة *E. coli* فقد كان تاثير الفينولات عليها اقل من تاثير المضادات الحيوية. ومن هنا يتضح بان الفعالية التثبيطية للقلويدات اعلى من المستخلص الميثانولي والفينولات. اما المستخلص الميثانولي فقد اظهر فعالية تثبيطية اعلى من الفينولات.

المقدمة:

تعد النباتات الطبية مصدرا طبيعيا لا ينضب كان ولازال الناس يستخدمونها في معالجة مشاكلهم الصحية(٢١)، اذ تم استخدام النباتات الطبية اليوم في مجال الصناعات الدوائية المتطورة بعدما كان استخدامها مقتصرا في الطب الشعبي(١٩). ان الكثير من المواد التي مصدرها النباتات بدأت تستخدم وبشكل واسع في الصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل ويعزى ذلك لقلة تاثيراتها الجانبية واستقراريتها(١٠)، على عكس المواد المخلقة صناعيا والتي وان امتازت بسرعة التاثير الا انها ذات اثار جانبية تسبب اضرار صحية لمستخدميها(١١)، لذا فقد لجأت العديد من الشركات المختصة في صناعة الادوية ومستحضرات التجميل الى استخدام النباتات الطبية مصدرا رئيسا لصناعتها ومن هذه النباتات نبات السذاب Ruta الذي ينتمي الى العائلة Rutaceae (٣) ولهذا النبات تسميات شائعة ذكرت بعدة لغات منها اللغة اللاتينية Rada واللغة الاسبانية Arruda و Erruda و Arroda واللغة الانكليزية Rue و Country man's treacle و Herbygrass واللغة الفرنسية Rueofficinale و Reufelide و Herbedgrace(١٤).

ان اصل كلمة Ruta مشتق من الكلمة اليونانية (Reuo) والتي تعني (to set free) أي اطلاق (١٨) والسذاب نبات عطري موطنه جنوب اوربا وشمال افريقيا ويزرع اليوم عموما في اوربا والولايات المتحدة (٢). كما يوصف بكونه شجيرات صغيرة دائمة الخضرة واوراق صفراء اللون ذات شكل معلقي وثمار خضراء(٥). وتتمثل فعالية النبات بكونه طارد للغازات Antiseptic ، مضاد للتشنج Antispasmodic ، مطهر Carminative ومنبه Irritant (١٣). كما يستخدم في معالجة بعض الامراض منها داء النقرس، الروماتيزم ومعالجة بعض مشاكل القلب مثل الخفقان الذي يصيب بعض النساء في سن اليأس، كما انه طارد للديدان ومخفف للآم المعدة (١٢)، اذ يحتوي النبات على العديد من المواد الفعالة مثل الزيوت الطيارة Volatile oil التي تحتوي على 2-undecanone و 2-heptanol و 2-nonanol . وكذلك يحتوي على الفلافونويدات Flavonoids مثل quercitin و rutin والكيومارين Cumarins مثل bergapten و daphnortin كما يحتوي على القلويدات Alkaloids مثل arborinine و g-fagarine و graveoline و graveolinine (٢٢). وخلال السنوات القليلة الماضية ازدادت مقاومة البكتريا للادوية المضادة لها وقد اعزى الباحثون هذا التغيير في مقاومة البكتريا الى زيادة قابليتها على تعطيل او تهشيم (تحطيم) الادوية المضادة بواسطة تنشيط بعض الانزيمات التي تعمل على تقليل او تغيير نفاذية غشاء جدار الخلية البكتيرية للمضاد الحيوي(٣٠). كما تعمل بعض انواع البكتريا على تغيير او تعديل في البروتين الذي يمثل في اغلب الاحيان الهدف الرئيسي للمضادات الحيوية المستخدمة وبالتالي افشال عمل المضادات(٦). ولهذا السبب بدأ الاهتمام بالمركبات الطبيعية المفصولة من النباتات ومنها القلويدات والفينولات التي تمتاز بفعالية بايولوجية عالية (٤)، اذ استخدمت القلويدات والفينولات في تصنيع الكثير من الادوية المضادة للجراثيم (٢٤). وفي دراستنا الحالية على ثمار نبات السذاب Ruta والذي يتميز باحتوائه عدة انواع من المركبات القلويدية والفينولية. تهدف الدراسة الى فصل هذه المركبات ودراسة تاثيرها في نمو بعض انواع الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام. ومعرفة ايهما اكثر تاثيرا في نمو هذه الاحياء.

المواد وطرائق العمل:

انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة:

Escherichia coli
Salmonella typhi
Klebsiella pneumoniae
Staphylococcus aureus
Bacillus subtilis

تم الحصول على الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام من قسم علوم الحياة/كلية التربية فيما ماعدا جرثومة *Staphylococcus aureus* تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري/جامعة الموصل.

جمع النبات وتصنيفه:

استخدم في هذه الدراسة ثمار نبات السذاب، اذ تم الحصول عليها من احد المعاشب المتخصصة في بيع النباتات الطبية، وجرى التحقق من صنف النبات في كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل بالاعتماد على مصادر التصنيف(٢٨،١).

تحضير المستخلص الخام:

اتبعت طريقة Grand وآخرون (١٩٩٨) في تحضير المستخلص الميثانولي، اذ تمت عملية الاستخلاص بسحق النبات وخلطه مع المذيب بنسبة (١ غم/١٠ مل V/W)، ثم رج المزيج جيدا وترك في الثلاجة مدة (٢٤) ساعة. رشح المزيج خلال قمع بخنر ثم بخر المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary vacuum evaporator بدرجة حرارة لا تزيد عن ٤٠ °م وبعد تبخير جميع الميثانول الموجود في المزيج لوحظ تكون طبقة ثخينة من المستخلص الذي جفف بالتجفيد.

فصل المركبات الفعالة:

١. فصل القلويدات Alkaloids :

تم استخدام الطريقة الكيميائية لفصل القلويدات، وذلك بمعاملتها مع حامض الكبريتيك ومن ثم معادلتها واستخلاصها باستخدام الكلوروفورم للحصول عليها بشكل نقي(٢٠).

٢. فصل الفينولات Phenols :

تم استخدام الطريقة الكيميائية لفصل الفينولات، وذلك من خلال استخلاصها باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم ومن ثم معادلة الوسط باستخدام حامض الهيدروكلوريك للحصول على الفينولات(١٩).

الكشف عن المركبات المفصولة:

١. تم الكشف عن القلويدات باستخدام كاشف ماير Mayer's reagent وذلك باضافة عدة قطرات من الكاشف الى (٥ مل) من النموذج، ان تكون الراسب الابيض يدل على ان الكشف موجب(٢٠).
٢. لقد تم الكشف عن الفينولات باستخدام كلوريد الحديديك، وذلك باذابة المركب المفصول في كمية قليلة من الماء ثم اضافة عدة قطرات من محلول كلوريد الحديديك ولوحظ ظهور لون ارجواني وهذا يدل على انه كشف موجب(٢٥،٧).

تعقيم المواد المفصولة:

تم اذابة المواد المفصولة في ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO) بنسبة (٥:١) (V/W) للحصول على تركيز (٢٠٠ ملغم/مل) والذي يستخدم في تحضير التراكيز (١٠٠ و ٥٠ و ٢٥ و ١٢,٥) ملغم/مل. ثم عقم المزيج بطريقة البسترة وبدرجة حرارة (٦٢ °م) لمدة (١٠) دقائق(٢٣).

اختبار الفعالية التثبيطية:

اتبعت طريقة Leven واخرون (١٩٩٧) المعتمدة على طريقة Vandepitte واخرون (١٩٩١)، اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات مفردة من الجراثيم التي سبق ذكرها كلا على حدى ثم حضن الوسط بدرجة (٣٧) °م مدة (١٨-٢٤) ساعة، ثم خفف العالق الجرثومي بعد ذلك بالمحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline بالمقارنة مع انبوبة الاختبار القياسية ماكفرلاند رقم (١) Macfrland No. 1 بحيث يحتوي على 10^8 خلية/مل من العالق الجرثومي ونشر على سطح وسط الاكار المغذي الاعتيادي باستخدام الناشر الزجاجي، ثم حضنت الاطباق في الحاضنة مدة (٣٠) دقيقة لكي يحصل التشرب. ولدراسة الفعالية المضادة للمركبات المفصولة من النبات في نمو الجراثيم فقد حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatman No. 1) بقطر (٦) ملم المشبعة بتراكيز مختلفة من المواد المفصولة من النبات المراد اختبارها، ثم ثبتت الاقراص بواسطة ملقط معقم وحضنت بدرجة حرارة (٣٧) °م مدة (٢٤) ساعة. بعدها تم قياس مناطق التثبيط ومقارنتها مع المضادات الحيوية القياسية (Ciprofloxacin و Chloramphenicol) كعينة سيطرة موجبة(٢٧).

النتائج والمناقشة:

تم في هذه الدراسة فصل المستخلص الميثانولي من ثمار نبات السذاب *Ruta graveolens L.*، ثم جزئ المستخلص للحصول على القلويدات والفينولات بشكل نقي، كما جرى التحقق من المركبات المفصولة باستخدام الكواشف الخاصة بها. حدد التاثير التثبيطي للمستخلص الميثانولي، القلويدات والفينولات المفصولة من النبات في نمو خمسة انواع من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام. فتبين من خلال الدراسة ان المستخلص المثانولي والقلويدات والفينولات المفصولة من الثمار لها فعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم المستخدمة في الدراسة مقارنة بالمضادات الحيوية (Ciprofloxacin و Chloramphenicol).

اظهر المستخلص المثانولي اعلى تاثير وبالتساوي ضد جرثومتي *Staph. aureus* و *S. typhi* . بالاضافة الى تاثيره التثبيطي العالي ضد جرثومتي *K. pneumoniae* و *Bacillus subtilis* وبصورة اعلى من تاثير المضادات الحيوية. بينما كان تاثيره التثبيطي ضد جرثومة *E. coli* اقل من تاثير المضادات الحيوية (Ciprofloxacin و Chloramphenicol) كما مبين في الجدول (١).

الجدول (١): الفعالية التثبيطية للمستخلص الميثانولي المفصول من نبات السذاب في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام(قطر دائرة التثبيط بالملم)

conc. mg/ml	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*	*Staph. aureus*	*Bacillus subtilis*
200	9	25	18	25	16
100	-	23	15	23	13
50	-	18	12	18	10
25	-	15	12	17	9
12.5	-	14	10	15	9

واظهرت القلويدات تاثيرا تثبيطيا عاليا ضد جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة، خاصة على جرثومة *Staph. aureus* تليها جرثومة *S. typhi* ، بالاضافة الى تاثيرها التثبيطي

ضد جرثومتي *K. pneumoniae* و *Bacillus subtilis* وبصورة اعلى من تاثير المضادات الحيوية المستخدمة، اما جرثومة *E. coli* فقد كان تاثير القلويدات عليها اقل من تاثير المضادات الحيوية (Ciprofloxacin و Chloramphenicol) كما مبين في الجدول (٢).

الجدول (٢): الفعالية التثبيطية للقلويدات المفصولة من نبات السذاب في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام

(قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

conc. mg/ml	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*	*Staph. aureus*	*Bacillus subtilis*
200	15	26	20	27	17
100	13	21	18	21	12
50	10	20	15	16	11
25	10	18	12	15	9
12.5	9	17	8	12	-

كما اظهرت الفينولات تاثيرا تثبيطيا واضحا ضد الجراثيم المستخدمة، اذ ظهر اعلى تاثير تثبيطي لهذه المركبات ضد جرثومة *Staph. aureus* تليها جرثومة *S. typhi* . اما جرثومتي *K. pneumoniae* و *Bacillus subtilis* فقد كان تاثير الفينولات عليها اقل ولكن في نفس الوقت اعلى من تاثير المضادات الحيوية. فيما كان تاثير الفينولات على جرثومة *E. coli* اقل من تاثير المضادات الحيوية (Ciprofloxaxin و Chloramphenicol) كما مبين في الجدول (٣).

الجدول (٣): الفعالية التثبيطية للفينولات المفصولة من نبات السذاب في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام(قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

conc. mg/ml	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*	*Staph. aureus*	*Bacillus subtilis*
200	10	20	18	23	15
100	9	18	13	20	13
50	7	13	10	17	9
25	-	10	-	12	7
12.5	-	9	-	10	-

وعند مقارنة التاثير التثبيطي لكل من المستخلص الميثانولي والقلويدات والفينولات لوحظ وجود تفاوت في التاثير التثبيطي لهذه المواد، اذ ظهر التاثير التثبيطي للقلويدات اعلى من تاثير المستخلص الميثانولي والفينولات ضد جميع انواع الجراثيم المستخدمة. كما لوحظ وجود فعالية تثبيطية للمستخلص الميثانولي افضل من الفعالية التثبيطية للفينولات على جميع الجراثيم فيما عدا جرثومة *E. coli* . واخيرا اظهرت المركبات الفينولية فعالية تثبيطية اقل من القلويدات والمستخلص الميثانولي، وكما مبين في الجدول (٤).

الجدول (٤): الفعالية التثبيطية للمستخلص الميثانولي، القلويدات والفينولات المفصولة من ثمار نبات السذاب عند تركيز (٢٠٠) ملغم/مل في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Compounds	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*	*Staph. aureus*	*Bacillus subtilis*
المستخلص الكحولي	9	25	18	25	16
القلويدات	15	26	20	27	17
الفينولات	10	20	18	23	15
Ciprofloxacin 5 µg/disk	17	16	15	-	-
Chloramphenicol 30 µg/disk	14	16	9	17	13

يعد نبات السذاب من النباتات الطبية الفعالة بايولوجيا، اذ يحتوي هذا النبات على العديد من المركبات الكيميائية التي تتميز بفعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم، منها الفلافونويدات والكيومارين والقلويدات والفينولات(١٧). ان لهذه المركبات قابلية كبيرة للقضاء على الجراثيم من خلال تاثيرها على تركيب الاحماض الامينية وبالتالي التاثير على تركيب الـ DNA مما يؤدي الى موت الخلية(٢٦). كما تعرف المركبات القلويدية والفينولية بتثبيطها لنمو الجراثيم من خلال التاثير على جدار الخلية البكتيرية واختراقها وبالتالي احداث الاضرار في السايتوبلازم والتسبب بموت الخلية(١٦).

References:

1. Baily L.H. (1977). Manual of cultivated plant. 15th ed., Macmillan Publishing Co., New York, USA.
2. Baumert A. and Kuzovkina I.N. (1982). Biosynthesis of rutacridone in tissue culture of Ruta graveolens L. Plant Cell Reports, 1: 168-171.
3. Browner C.H. (1985). Plants used for reproductive health in Oaxaca. Mexico Econ Bot., 39: 482-504.
4. Clark A.M. (1996). Natural products as a resource for new drugs. Pharm. Res., 13.
5. Defeo V. (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of Ruta graveolens. Phytochem., 61: 573-578.
6. Dever L.A. and Dermody T.S. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. Arch. Int. Med., 151: 886-895.
7. Fernandez M.A. and Kohn F. (1996). Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of Scrophularia Frutescens. H. Ethnopharmacol., 53: 11-14.
8. Grand A., Woudergem P.A., Verports R. and Pousset J.L. (1988). Infection phytotherapies of tee-savannah single (West Africa). II. Antimicrobial activity of 33 species. J. Ethanopharmacol., 22: 25-31.
9. Harborne J.B. (1973). Phytochemical Methods. Halsted Press, John Wiley and Sons, New York.
10. Harvery A.L. (1999). Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery. In Tips, 196-198.
11. Hostettmann K. and Marston A. (1993). Strategy in the search for new biological active plant constituents. Phytochemistry of Plant Traditional Medicine, Oxford University Press, New York, 17-45.
12. Kinghorn A. and Balandrin M.F. (1993). Human Medicinal Agents from Plants. ACS Symposium Series 534, Washington DC.

13. Kong Y.C. (1998). Antifertility principle of Ruta graveolens. Planta Med., 55: 176-178.
14. Kong Y.C., Lau C. and Cheng K.F. (1984). Quinoline alkaloids from Ruta graveolens. Fitoterapia, 55: 67-71.
15. Leven M., Vandenberghe D.A., Metens F., Vlietinck A. and Lammens E. (1997). Screening of higher plants for biological activities. I. Antibacterial activity. Planta. Medica., 36: 311-321.
16. Mendoza L. and Wilkens M. (1997). Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpernoids and flavonoids isolated from some Chilean. J. Ethnopharmacol., 58: 85-88.
17. Odebiyi O. and Sofowora E.A. (1979). Antimicrobial alkaloid from a Nigerian chewing stick. Planta Med., 36: 204-207.
18. Oliva A. and Laho Z.E. (1999). Fungistatic activity of Ruta graveolens L. extract and its allelochemicals. J. Chem., 25: 519-526.
19. Patrick G. (2001). Medicinal Chemistry-Instant Notes. 1st ed., Bios Scientific Publishers Limited, UK, Leeds, 77-83.
20. Pelletier S.W. and Aneja R. (1968). The alkaloids from Aconitum Leucostomum. J. Nat. Prod., 59: 277-279.
21. Philipson J.D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. J. Phytochemistry, 56: 237-243.
22. Prance G. and Chadwick (1994). Ethnobotany and the search for new drug discovery. John Wiley and Sons, England.
23. Riose J.L., Recio M.C. and Villar A. (1987). Antimicrobial activity of selected plant employed in the Spanish Mediterranean and area. J. Ethnopharmacol., 12: 139-152.
24. Roberts M.F. and Wink M. (1998). Introduction Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Application. Plenum Press, New York, 1-7.
25. Shriner R.L., Fuson R.C. and Curtin D.Y. (1964). The Systematic Identification of Organic Compounds. 5th ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.
26. Sota M. and Fujiwaw S. (1996). Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. J. Ethnopharmacol., 54: 171-176.
27. Todar K. (2002). Staphylococcus. J. Med. Microbiol., 1-9.
28. Townsend C.C. and Guest E. (1980). Flora of Iraq. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad, Iraq, 3: 402-405.
29. Vandpitte J., Engloback K., Piote P. and Heuk C. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva.
30. Walsh W. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature, 406: 775-781.

Study the Biological Effect of Alkaloids and Phenols Separated from *Ruta graveolens L.* (fruits) on Growth of Some Gram Positive and Negative Bacteria

Muthana J. Mohammed

Department of Biology, College of Education, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract:

In this study, the methanolic extract was isolated from Ruta graveolens (fruits), then the alkaloids and phenols were obtained pure by isolation the methanolic extract, and determined the inhibiting effect for these compounds on growth five types of bacteria: Echerichia coli, Salmonella typhi, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis, and used the antibiotics (Ciprofloxacin and Chloramphenicol) as control samples.

The methanolic extract showed higher inhibitory effect from the antibiotics effect on S. typhi, Staph. aureus, K. pneumoniae and Bacillus subtilis, while its effect less than the antibiotics on E. coli.

Alkaloids showed high inhibitory effect against all bacteria which used in this study. Alkaloids showed higher effect from antibiotics on Staph. aureus, S. typhi, K. pneumoniae and Bacillus subtilis, while its effect on E. coli less than the antibiotics effect.

Phenols showed higher inhibitory effect from antibiotics against Staph. aureus, S. typhi, K. pneumoniae and Bacillus subtilis, while its effect on E. coli less than the antibiotic effect.

From all we showed that the inhibitory effect for alkaloids higher from methanolic extract and phenols while the methanolic extract showed inhibitory effect higher then phenols effect.