التاثير البايولوجي للقلويدات المفصولة من بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* في نمو بعض انواع الجراثيم

مثنى جاسم محمد و سيماء احمد بكر و نور نبيل يحيى

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

(تاريخ الاستلام: / /٢٠٠٧ ، تاريخ القبول: / / ٢٠٠٧)

الملخص

تم في هذه الدراسة فصل وتشخيص بعض المركبات القلويدية من بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* وحدد التاثير التثبيطي لهذه المركبات في نمو عدد من الجراثيم هي: *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* و *Klebsilla pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* واستخدم المضادين الحيويين (Chloramphenicol و Gentamicin) للمقارنة.

تمت عملية الفصل باستخدام الطرق الكيمياوية، ثم شخصت المركبات المفصولة باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) . اظهرت هذه المركبات تثبيطا متباينا في جميع انواع الجراثيم المستخدمة قيد الدراسة مقارنة مع المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الفعالية البايولوجية، بذور الحلبة، القلويدات

المقدمة

لقد اصبح استعمال الادوية المصنعة من النباتات شائعا في السنوات الاخيرة بعد ما غابت لفترة من الزمن بسبب انتشار الادوية المخلقة صناعيا[٢،١]. لاسيما بعد ان اصبح استخدامها قائما على اسس علمية كيميائية حيوية[٣]، خصوصا وان للنباتات الطبية تاريخ عريق في حياة الشعوب منها نبات الحلبة الذي استخدمه المصريون القدامى في تحنيط الجثث، اما اليونانيون والرومان استخدموه علف للماشية[٤]. والحلبة عبارة عن نبات عشبي موطنه الاصلي جنوب شرق اوربا وشمال افريقيا وغرب اسيا ثم بدأت زراعته تنتشر على نحو واسع في مناطق متعددة من العالم[٥]. ينتمي هذا النبات الى العائلة البقلية Leguminosae وله عدة تسميات شائعة منها Fenugreek و Greek Hay و Billy goat clover و Gume crass و Common fonugrec و Hu-Lu-ba و Methi و Trigonella و Bird's food[٦]. وان اصل التسمية الانكليزية للنبات Fenu greek جاءت من اللغة اللاتينية القديمة وتعني (القش اليوناني)[٧] وتعد البذور الجزء الاهم في النبات لاحتوائها على مجموعة من المركبات الفعالة منها: الزيوت الطيارة مثل 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2-furanone, dihydrobenzofuran, dihydroactinidiolide, muurolene, elemene, selinene والقلويدات مثل trigonelline, gentianine, carpaine والصابونينات مثل diosgenin sapogenins والفلافونويدات مثل vitexin, isovitexin, orientin, vicenins[٨] .

لتنوع المركبات الفعالة التي تحتويها بذور الحلبة فقد استخدمت لعلاج حالات مرضية عديدة، اذ تحتوي البذور على مادة 4-hydroxy isoleucine التي تحفز زيادة انتاج الانسولين عندما يكون مستوى السكر مرتفع في الدم[٩]. وكذلك مادة a-gatactosidas التي تخفض مستوى الكوليستيرول في الدم[١٠] وايضا مادة Lecithin التي تزيد من معدل نمو الشعر[١١] كما تحتوي البذور على الالياف المخاطية التي لا تذوب في الماء بل تنتفخ عنده اضافة السوائل اليها مما يجعلها تستخدم كعلاج فعال للاسهال[١٢]. اما الاستخدامات الخارجية لهذه البذور فهي كثيرة ومتنوعة اذ تعد علاجا فعالا في تخفيف الام الجلد المتورم[١٣].

اضافة لما تقدم فقد استخدمت البذور كمهدئ، مقشع، مقوي جنسي[١٤] ولبذور الحلبة تاثيرات خاصة تميزت بها عن باقي انواع النباتات وهي زيادة ادرار اللبن عنده الام المرضعة وتخفيف اعراض الدورة الشهرية والامها[١٥] واخيرا فان استخدام النباتات الطبية كمصادر للعلاج سوف يساهم في حل مشكلة المقاومة المكتسبة للجراثيم[١٦].

تهدف الدراسة الحالية الى فصل عدد من المركبات القلويدية من بذور نبات *Trigonella foenum-graecum* وتحديد الفعالية التثبيطية لها في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام.

مواد وطرائق العمل

انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة:

Staphylococcus aureus
Bacillus subtilis
Salmonella typhi
Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Pseudomonas aeruginosa

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 بذور نبات الحلبة، اذ تم الحصول عليها من احد المعاشب المتخصصة في بيع النباتات الطبية، وجرى التحقق من صنف النبات في كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل[١٧].

فصل المركبات الفعالة (القلويدات Alkaloids) :

تم استخدام الطريقة الكيميائية لفصل القلويدات، وذلك بمعاملتها مع حامض الكبريتيك ومن ثم معادلتها واستخلاصها باستخدام الكلوروفورم للحصول عليها بشكل نقي[١٨].

الكشف عن المركبات المفصولة:

تم الكشف عن القلويدات باستخدام كاشف ماير Mayer's reagent وذلك باضافة عدة قطرات منه الى (٥ مل) من النموذج، ان ظهور الراسب الابيض يعد دليلا على وجود القلويدات[١٩].

تشخيص المركبات المفصولة

استخدم طيف الاشعة تحت الحمراء لتشخيص المركبات المفصولة[٢٠] بواسطة جهاز: Infrared Spectrophotometer Model Tensor 27 . Bruker Co., Germany

تعقيم المركبات المفصولة:

تم اذابة المركبات المفصولة في ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO) بنسبة (٥:١) (V/W) للحصول على تركيز (٢٠٠ ملغم/مل) والذي استخدم في تحضير التراكيز (١٠٠ و ٥٠ و ٢٥ و ١٢,٥) ملغم/مل، عقم المزيج بطريقة البسترة وبدرجة حرارة (٦٢ °م) لمدة (١٠) دقائق[٢١].

اختبار الفعالية التثبيطية للمركبات:

اتبعت طريقة Levne وآخرون (١٩٩٧)[٢٢] المعتمدة على طريقة (Vandepitte) وآخرون (١٩٩١)[٢٣]. اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات مفردة من الجراثيم الستة التي سبق ذكرها اعلاه كلا على حدى وحضنت بدرجة حرارة (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) Macferland No. 1 بحيث يحتوي على ($١٠^{٨}$) خلية/سم^{٣} من العالق الجرثومي ونشر على سطح وسط الاكار المغذي الاعتيادي باستخدام الناشر الزجاجي، وحضنت الاطباق في الحاضنة لمدة (٣٠) دقيقة لكي يحصل التشرب، ولدراسة الفعالية المضادة للمواد المفصولة من النبات على نمو الجراثيم فقد حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatman No. 1) بقطر (٦) ملم المشبعة بتراكيز مختلفة من المواد المراد اختبارها. ثم ثبتت الاقراص بواسطة ملقط معقم وحضنت بدرجة حرارة (٣٧ °م) مدة (١٨) ساعة. بعدها تم قياس مناطق التثبيط ومقارنتها مع المضادات الحيوية القياسية (Chloramphenicol و Gentamicin) كعينة سيطرة موجبة[٢٤].

النتائج والمناقشة

تم في هذه الدراسة تحديد التاثير التثبيطي للمركبات القلويدية المفصولة من ثمار نبات الحلبة(*Trigonella foenum-graecum*) في نمو ستة انواع من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام. وتبين من خلال الدراسة ان لهذه المركبات فعالية تثبيطية متباينة على الجراثيم المستخدمة مقارنة بالمضادات الحيوية (Chloramphenicol و Gentamicin)، اذ اظهرت المركبات تاثيرا تثبيطيا عاليا على جرثومة *E. coli* وكذلك جرثومة *S. typhi* ولكن بدرجة اقل من الاولى تليها جرثومة *S. aureus* مقارنة بالمضادات الحيوية المستخدمة. فيما كان تاثير هذه المركبات على الجراثيم *B. subtilis* و *P. aeruginosa* اقل ولكن في نفس الوقت كان تاثيرها اعلى من تاثير المضادات الحيوية المستخدمة في حين اظهرت هذه المركبات تاثيرا تثبيطيا اقل على جرثومة*K. pneumonia* مقارنة بالمضادات الحيوية. كما مبين في الجدول (١).

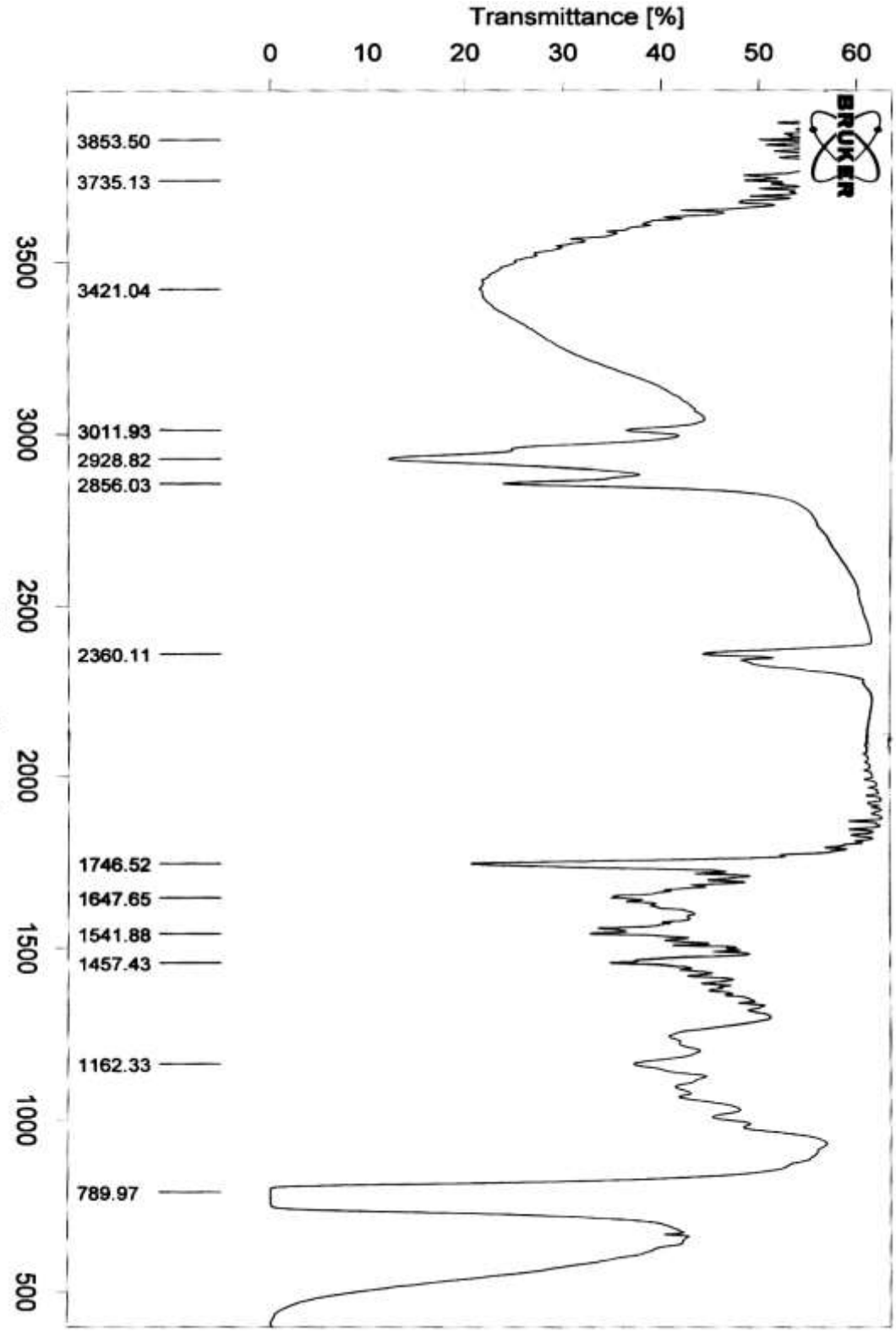
الجدول (١): الفعالية التثبيطية للمركبات القلويدية المفصولة من بذور نبات الحلبة في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Conc.	*S. aureus*	*B. subtilis*	*S. typhi*	*E. coli*	*K. pneumonia*	*P. aeruginisa*
200	22	18	23	25	8	16
100	18	18	22	20	-	15
50	11	13	18	16	-	10
25	-	10	13	16	-	-
12.5	-	9	10	13	-	-
Chloramphenicol 30 mg/disk	17	13	15	10	9	-
Gentamicin 10 mg/disk	14	-	13	-	10	12

لقد اجريت العديد من البحوث على النباتات الطبية بهدف عزل بعض المركبات واستخدامها كمضادات حيوية[٢٥]. ومن النباتات المستخدمة في هذا المجال باحتوائها على مركبات فعالة بايولوجيا مثل القلويدات في بذور نبات الحلبة[٢٦،٢٧].

اذ ان لهذه المركبات قابلية كبيرة للقضاء على الجراثيم[٢٨] اذ تعمل هذه المركبات على تحليل جدار الخلية وبالتالي تغيير شكلها[٢٩] كما تعمل على التاثير على DNA الجرثومة من خلال تثبيط بناءه وبالتالي موت الخلية[٣٠].

ويظهر طيف الاشعة تحت الحمراء (IR)عدد من الامتصاصات الواضحة تعود للمركبات المفصولة التي تكون ذات صفات حامضية ضعيفة، اذ اعطت امتصاصا لمجموعة الهيدروكسيل (O-H) عند ٣٤٢١ سم$^{-١}$ وامتصاصا واضحا اخر لمط الاصرة (C-H) عند (٢٨٥٦-٣٠١١) سم$^{-١}$ وامتصاص مط مجموعة الكاربونيل عند (١٧٤٦) سم$^{-١}$، اما النظام الاروماتي فيبدو واضحا عند القيم (١٤٥٧-١٦٤٧) سم$^{-١}$.اما الامتصاص عند (١١٦٢ سم$^{-١}$) فيعود للاصرة (C-O) المرتبطة بالنظام الاروماتي كما مبين في الشكل (١).



الشكل (١): طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) للقلويدات المفصولة من بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-*

المصادر

1. C. Andrew, The Encyclopedia of Medicinal Plants. New York: DK Publishing, Inc., 1996.
2. B. Steven and D. Kroll, Natural Health Bible. Rocklin, CA: Prima Publishing, 1999.
3. S.K. Ahsan and *et al*., J. Ethnopharmacology, 26 (1989) 249-54.
4. L. Skye, The Natural Pharmacy. Rocklin, CA: Prima Health, 1999.
5. B. Bin and *et al*., International Immun opharma--cology, 3 (2003) 257-265.
6. S.K. Ahsan, M. Tariq, A.M. Ageel, M.A. Al-Yahya and A.H. Shah, Planta. Med. 17 (1969) 14-8.
7. M.A. Ajabnoor and A.K. Tilmisany, J. Ethnoph--armacol, 26 (1989) 3, 249-54.

-unds. 4th Ed., John Wiley and Sons, USA , 1981.
21. J.L. Riose, M.C. Recio and A. Villar, Antimicr--obial activity of selected plant employed in the Spanish Mediterranean and area, (1987).
22. M. Leven, D.A. Vandenberghe, F. Metens, A. Vlietinck and E. Lammens, (1997).
23. J. Vandpitte, K. Engloback, P. Piote and C. Heuk, Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva , 1991.
24. K. Todar, J. Med. Microbiol., (2002) 1-9.
25. R.M. Herrera, M. Perez, D.A. Martin -Herrera, R. Lopez- García and R. M. Rabanal, Phytothera p. Res., 10 (1996) 364-366.
26. S. Yoshikazu, H. Murata, T. Nakanishi and Y. Inatomi, J. Health Sci., 47 (2001) 473-477.
27. P. Khosla, D.D. Gupta and R.K. Nagpal, Indian J. Physiol. Pharmacol., 2 (1995) 173-174.
28. A. Paulo, E.T. Gomes and P.J. Houghton, J. Nat. Prod., 58 (1995) 1485-1491.
29. K. Cimanga, T. De Bruyne, L. Pieters, J. Totte, L. Tona, K. Kambu, D. Vanden Berghe and A.J. Vlietinck, Phytomedicine. 5 (1998) 209-214.
30. K. Bonjean, M.C. De Pauw - Gillet, M.P. Defre--sne, P. Colson, C. Houssier, L. Dassonneville, C. Bailly, R. Greimers, C. Wright, J. Quentin-Leclercq, M. Tits and L. Angenot, Biochemistry, 37 (1998) 5136-5146
8. T. Ghafghazi, H.S. Sheriat, T. Dastmalchi, R.C. Barnett, I. Elmadfa and M. Koken, J. Ethnopharmacol, 22 (1988), 1, 45-9.
9. T. Ghafghazi, H.S. Sheriat, T. Dastmalchi and R.C. Barnett, Z. Ernahrungswiss, 19 (1980) 4, 280-9.
10. J.S. Mishkinsky, A. Goldschmied, B. Joseph, Z. Ahronson and F.G Sulman, Pahlavi. Med. J., 8 (1977), 1, 14-25.
11. R.D. Sharma and *et al*., Eur. J. Clin. Nutr., 44 (1990) 301-6.
12. A. Bordia, Prostagland Leukotrienes Essential Fatty Acids, 56 (1997) 379–84.
13. R.D. Sharma and *et al*., Phytother Res., 5 (1991) 145–7.
14. R. Sharma *et al*., Phytotherapy Research, 10 (1996) 332-334.
15. H.B. Bin *et al*., International Immunopharmaco--logy 3 (2003) 257-265.
16. A.D. Omoloso and *et al*., Natural Product Sciences, 7 (2001) 13-16.
17. L.H. Baily, Manual of cultivated plant. 15th ed., Macmillan Publishing Co., New York, USA, 1977.
18. N.M. Ferguson, A Textbook of Pharmacognosy, Macmillan Company, p. 19, 1956.
19. S.W. Pelletier and R. Aneja, J. Nat. Prod., 59 (1968) 277-279.
20. R.M. Silverstein, G.C. Bassler and T.C. Morill, Spectrometric Identification of Organic Compo-

Biological Effect of Alkaloids from *Trigonella foenum-graecum* (seeds) on Growth of Some Bacteria

Muthana J. Mohammed , Sema'a A. Baker , Noor N. Yahia
Department of Biology, College of Education, University of Mosul
(Received / / 2007, Accepted / / 2008)

Abstract
This study has designed for isolation and identification of some alkaloids from (seed) *Trigonella foenum-graecum*, the inhibitory effect of these compounds were investigated on the growth of some bacteria, including: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsilla pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*.
These compounds was isolated by using chemical methods, infrared spectroscopy was used for their identification. The alkaloid compounds showed significant inhibiting effect on all the bacteria which was used in this study compared to commercial antibiotics.
Keywords: Biological effect, *Trigonella foenum-graecum* (seeds), alkaloids