مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (1) / المجلد (23) : 2015

أستخلاص وتنقية الفلافونويدات من البروبوليس وتقييم فعاليتها ضد بعض انواع الاحياء المجهرية المرافقة لتسوس الإسنان

ميس ابراهيم محمد حسين

جامعة كربلاء / كلية العلوم

علي عبد الكاظم

جامعة كربلاء / كلية العلوم

ali.jasim@uokerbala.edu.iq

الخلاصة :

تم تحديد الظروف المثلى لاستخلاص نوعين من الفلافونويدات هما (Flavone/Flavonol, (FF و Flavanone/Dihydroflavonols, (FD) من البروبوليس وأظهرت النتائج أن الايثانول بتركيز 70% بمدة استخلاص 96 ساعة أعطت أعلى حصيلة من الفلافونويدات.وتمت تنقية الفلافونويدات المذكورة واشتملت خطوات التنقية على الاستخلاص بالايثانول 95 % فكروماتوغرافيا الأدمصاص باستخدام الهلام Sephadex LH-20 اذ بلغت الحصيلة النهائية للفلافونويدات19.31 % .

تم تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبوليس الأيثانولي ضد بعض أنواع الاحياء المجهرية المرافقة لتسوس الأسنان والتي شملت ثمانية أنواع من بكتريا *Streptococcus* اضافة الى الخميرة *Candida albicans* واتضح من النتائج أن لمستخلص البروبوليس فعلا تثبيطيا قويا ضد الأحياء المجهرية قيد الدراسة . كما درس الفعل التآزري لمستخلص البروبوليس مع المضاد الحيوي الكلوروهكسيدين Chlorohexidine (CHX) ضد نوعين من بكتريا *Streptococcus* واتضح ان الفعل التثبيطي للبروبوليس ازداد عند اضافة المضاد المذكور اذ ارتفع قطر التثبيط ضد البكتريا *S. mutans* من 18 ملم ليصبح (21و21.5 و24) ملم باستخدام التراكيز (0.01 و0.1 و0.2)% من المضاد ,على التوالي , كما لوحظ التاثير ذاته عند دراسة الفعل التآزري للبروبوليس مع المضاد CHX ضد بكتريا *S.salivarius*.

الكلمات المفتاحية : البروبوليس, الفلافونويدات, الايثانول, الاستخلاص, التنقية ,الهلام Sephadex LH-20 بكتريا (*Streptococcus*), المضاد الحيوي الكلوروهكسدين (Chlorohexidine) .

Abstract:-

Extraction conditions for two types of flavonoids [Flavone/ Flavonol, (FF)and FlavanoneDihydroflavonols, (FD)] from propolis were optimized .The results revealed that 70% ethanol as extraction solvent with 96 hours extraction time gave the highest yield of flavonoids . The menthioned flavonoids were purified ,the purification steps included extraction with 95% ethanol and adsorption chromatography using sephadex LH-20 .

The purification procedure resulted in (19.31%) yield for the flavonoids.

The inhibitory activity of ethanolic propolis extract was evaluated against some microorganisms associated with dental caries .The tested microorganisms included eight species of the genus *Streptococcus* isolated from human mouth as well as the yeast *Candida albicans* .The results showed that the propolis extract gave strong inhibitory activity against the microorganisms used in this study .

The synergsim effect of propolis and the antibiotic Chlorohexidine (CHX) was studied against two types of *Streptococcus* .Results showed that inhibition zone against *S.mutans* was increased from 18 mm to (21 ,21.5 and 24) mm with the addition of (0.01,0.1 and 0.2)% of the CHX , respectively.

The same inhibitory effect was noticed against *S. salivarius* when the synergism action of propolis with CHX was studied .

Key words:-

Propolis , Flavonoids, Ethanol, Extraction, Purification, Sephadex LH-20 gel, *Streptococcus* bacteria, Chlorohexidine.

المقدمة :

يعد البروبوليس أحد منتجات نحل العسل, وقد نال هذا المنتج النصيب الأوفر من الدراسات الصيدلانية والكيميائية في الثلاثين سنة الاخيرة. وهو عبارة عن مادة لزجة داكنة اللون تتكون من شمع النحل (Bee wax) وراتنجات (Resins) يقوم نحل العسل بجمعها من النباتات ويستخدمها سلاحا كيميائيا

(Chemical Weapon) ضد الأحياء المجهرية الممرضة فضلا عن استخدامها كمادة بنائية في الخلية (Bankova,2005).

بينت نتائج التحليل الكيميائي للبروبوليس أنه منتج معقد ذو تركيب كيميائي متباين, وعموما فأن هذا المنتج يتكون من 50% راتنج وبلسم (Vegetable balsam) و30% شمع و10% زيوت اساسية وعطرية و5% غبار طلع و 5% مواد اخرى (Coneac *et al*.,2008).

يظهر البروبوليس فعاليات حياتية متنوعة تشتمل على فعاليته المضادة للبكتريا (Antibacterial) والفطريات(Antifungal) والألتهابات (Antiinflammatory) والأكسدة (Antioxidant) والأورام (Antitumors) والواقية للكبد (Hepatoprotective)وغيرها (Bankova,2005). تعزىفعاليات البروبوليس الحياتية (وخاصة الفعاليتين لمضادة للاكسدة والمضادة للاحياء المجهرية) الى بعض مكوناته الكيميائية والتي تتمثل بالفلافونويدات(flavones و flavonols و flavanones وdihydroflavonols) والمركبات الفينولية (أحماض السينامك المستبدلة واستراتها) (Banskota *et al* .,2002) .

تعد بكتريا المكورات السبحية الفمية (Oral *Streptococcus*) واحدة من المجاميع البكتيرية المهمة التي حظيت بأهتمام الباحثين في جميع انحاء العالم نظرا لأمراضيتها العالية للأنسان المتمثلة بأحداثها لكل من الأصابات القيحية (Pyogenic infections) واصابات الجسم الأخرى في كل من الفم والقلب والمفاصل والجلد فضلا عن الجهاز العصبي المركزي (Holt *et al*.,1994).

يضم هذا النوع من المكورات مجاميع عديدة ,وتعد مجموعة (*Mutans* group) المجموعة الأهم من بينها نظرا لتواجد بكتريا *Streptococcus mutans* ضمن انواعها اذ تبرز الأهمية الطبية للأخيرة من خلال كونها المسبب الرئيس لتسوس الأسنان (Dental caries) فضلا عن كونها مصدرا لأصابات بطانة القلب الداخلية (endocarditis) (Banas,2004).

ويعد التسوس واحدا من أهم أمراض الأسنان والذي عادة مايقترن ظهوره بألم السن واصابته وفقدانه وفي بعض الحالات القاسية جدا قد تنتهي بالموت (Keyes,1998) .

وتشير احدى الأحصائيات العالمية الى أن حوالي 90% من اطفال المدارس ومعظم البالغين يعانون من هذا المرض الذي أصبح الأكثر شيوعا في أقطار اسيا وأمريكا اللاتينية (Ophori *et al* .,2010).

ونظراً لأهمية البروبوليس الكبيرة لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى تحديد الظروف المثلى لأستخلاص الفلافونويدات من البروبوليس فضلا عن تقييم كفاءة البروبوليس في تثبيط بعض أنواع الأحياء المجهرية المرافقة لتسوس الأسنان.

المواد وطرائق العمل:

تهيئة البروبوليس للدراسة:

تم الحصول على البروبوليس من المناحل المحلية وقد تم طحنه مرات عدة للحصول على مسحوق ناعم.

أستخلاص المواد الفينولية:

أستخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (Ahmed *et al*.,1998) في أستخلاص المواد الفينولية من نماذج البروبوليس قيد الدراسة . كما تم تقدير المحتوى الفينولي الكلي لمستخلص البروبوليس بحسب الطريقة الموصوفة من قبل Budrat and Shotipruk (2008) .

تقدير الفلافونويدات :

1- تقدير الفلافون - فلافونول (Flavone/Flavonol,FF):

تم تقدير الفلافونويدات FF على وفق الطريقة الموصوفة من قبل Kosalec *et al.*(2005) واعتمادا على المنحني القياسي للكويرستين (Quercetin) .

2- تقدير الفلافانون(Flavanone/Dihydroflavonols,FD):-

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Chang *et al.*(2002) في تقدير الـ FD و اعتمادا على المنحني القياسي للنارنجنين(Naringenin) .

تحديد الظروف المثلى لأستخلاص الفلافونويدات (FF وFD) من البروبوليس:

1- تحديد المذيب الافضل للأستخلاص:

استخدمت مذيبات مختلفة لأستخلاص الفلافونويدات (FF وFD) من البروبوليس أشتملت هذه المذيبات على : الايثانول و الميثانول وخلات الاثيل و الاسيتون و الايزوبروبانول وثنائي مثيل سولفوكسايد Dimethyl sulfoxide فضلا عن الماء المقطر اذ استخدمت المذيبات اعلاه بتركيز 70% عدا الماء المقطر.

2- تحديد تركيز المذيب الامثل للأستخلاص : -

تم استخدام التراكيز (10 و 30 و 50 و 70 و 80)% من الايثانول في استخلاص الفلافونويدات FF وFD لتحديد التركيز الأمثل من المذيب.

3- تحديد مدة الاستخلاص المثلى:-

تمت متابعة إستخلاص الفلافونويداتFF وFD من البروبوليس خلال (24 و 48 و 72 و 96 و120) ساعة لتحديد مدة الأستخلاص المثلى .

التنقية الجزئية للفلافونويدات من البروبوليس:

تمت تنقية الفلافونويدات من البروبوليس باتباع طريقة تنقية التانينات الموصوفة من قبل Hagerman (2002) والمحورة من قبل Al-Ghanimi *et al.*(2007).

إذ أستخلصت الفلافونويدات من البروبوليس باستخدام 70% ايثانول كمذيب استخلاص لمدة 96 ساعة عند سرعة رج 150دورةادقيقة , وبحسب طرائق الاستخلاص الموصوفة سابقا , ثم خضع المستخلص لخطوتي التنقية الاتيتين :-

1- الاستخلاص بالايثانول 95% :

اذيب 1 غم من مستخلص البروبوليس الأيثانولي الجاف في 5 مل من الايثانول 95% واجريت له عملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة و لمدة 5 دقائق , اذ اهمل الراسب في حين احتفظ بالراشح لاستخدامه في خطوة التنقية التالية.

2- كروماتوغرافي الادمصاص باستخدام الهلام Sephadex LH-20:

أضيف راشح مستخلص البروبوليس المستحصل عليه من خطوة التنقية بالأيثانول 95 % الى سطح عمود الهلام Sephadex LH-20 وجرت عملية الفصل بمرحلتين: الاولى، مرحلة الغسل (Wash) و فيها تم غسل العمود بما يعادل ضعفي حجمه باستخدام الايثانول 95% و ذلك للتخلص من جميع المواد غير المرتبطة بالهلام, اذ تم جمع الاجزاء بواقع 3 مل لكل جزء و بسرعة جريان مقدارها 1 مل/دقيقة. والثانية،

مرحلة الاسترداد (Elution) و فيها تم استرداد الفلافونويدات من الهلام بتغيير المذيب و ذلك باستخدام الاسيتون 70% بدلا من الايثانول 95% و جرت عملية الاسترداد بجمع الاجزاء بواقع 3 مل لكل جزء و بسرعة جريان مقدارها 1 مل/دقيقة ايضا.

الفعالية التثبيطية للبروبوليس :

1- الفعالية التثبيطية للبروبوليس ضد بكتريا *Streptococcus* :-

أستخدمت 8 عزلات من جنس *Streptococcus* أشتملت هذه العزلات على *S.faecalis* و*S.pyogenes* و*S.salivarius* و *S . mutans* و *S.defectivus* و *S.anginosus* و *S. constellatus* و *S. sanguis* تم اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبوليس ضد انواع البكتريا الثمانية اعلاه وبتراكيز تراوحت من (1-25) ملغم/مل وعلى وفق طريقة الأنتشار في الاكار بوساطة الحفر (Egorove ,1985) كما تم تحديد التركيز المثبط الادنى للبروبوليس لكل عزلة من العزلات قيد الدراسة.

2- دراسة الفعل التثبيطي التآزري للبروبوليس والمضاد الحيوي Chlorohexidine ضد بكتريا *Streptococcus mutans* و *Streptococcus salivarius* :-

تم اختبار الفعل التازري للبروبوليس والمضاد Chlorohexidine ضد كل من بكتريا S.*mutans* و*S. salivarius* باستخدام تراكيز من البروبوليس تراوحت من (0.5-25) ملغم / مل وتراكيز من المضاد تراوحت بين (0.01-0.2)%. كما تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمضاد لكلا عزلتي *Streptococcus* المستخدمة في هذه الدراسة .

3- الفعالية التثبيطية للبروبوليس ضد الخميرة *Candida albicans*

تم الحصول على عزلة نقية من الخميرة *C.albicans* من قسم علوم الحياة /كلية العلوم/جامعة كربلاء. اذ تم استخدام العزلة المذكورة في دراسة الفعل التثبيطي للبروبوليس ضد الخميرة اعلاه , كما تم تحديد التركيز المثبط الادنى للبروبوليس ضد الخميرة قيد الدراسة.

النتائج والمناقشة

تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الفلافونويدات من البروبوليس:

1-**تحديد نوع المذيب** :

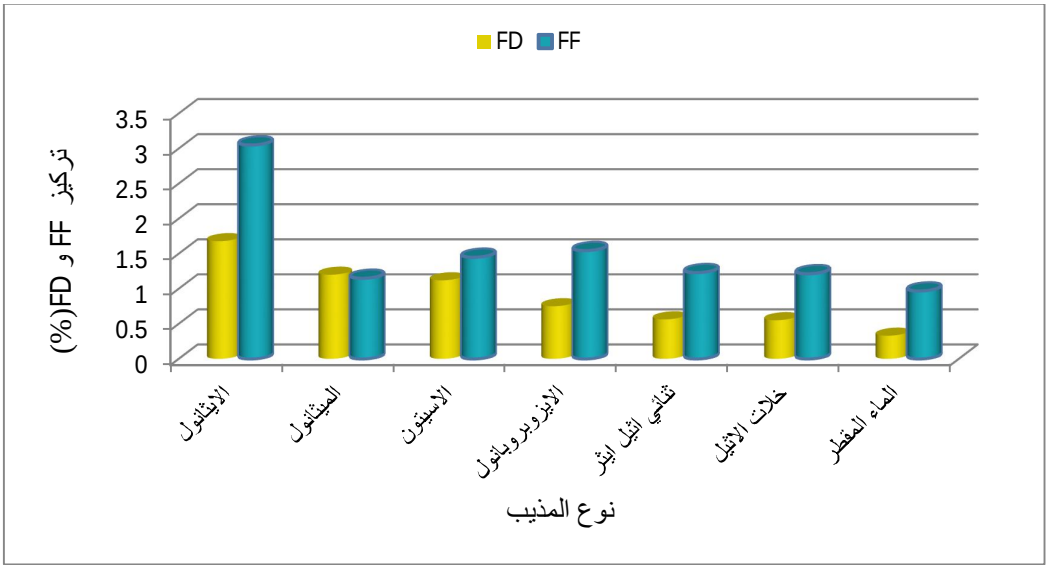
تعد عملية الاستخلاص بالمذيبات من الطرائق الشائعة والاكثر استخداما لتحضير المستخلصات لسهولة استخدامها وكفاءتها وتطبيقاتها الواسعة .إن حصيلة الاستخلاص تعتمد على نوع المذيب وقطبيته ومدة الاستخلاص ودرجة الحرارة ونسبة العينة/المذيب اضافة الى التركيب الكيميائي والفيزيائي للعينات (Dai and Mumper,2010) .

يوضح الشكل(1) تفوق الايثانول على المذيبات الأخرى المستخدمة في الدراسة في استخلاص الفلافونويدات FF و FD من البروبوليس اذ بلغت نسبتاهما (3.0507 و 1.678) % للمركبين, على التوالي , يليه الاسيتون والميثانول وبنسب بلغت (1.449 و1.18) و(1.149 و1.2)% ,على التوالي ايضا , في حين ابدى المستخلص المائي وخلات الاثيل وثنائي اثيل ايثر محتوى واطئ من المركبين بنسب بلغت (0.966 و0.33) و (1.2148و0.551) و (1.233 و0.563)% ,على التوالي .

وبشكل عام يتم ازالة الشمع وبقايا الحطام العضوي للبروبوليس بأستخدام الكحول الاثيلي الذي يتميز برخص ثمنه وقابلية اعادة استخدامه وعدم سميته فضلا عن قابليته على ازالة الشمع واستخلاص صبغة

البروبوليس (البلسم) التي تحوي على معظم المركبات الفعالة حيويا (Tylkowski *et al.*,2010) ، اذ ان الشمع لايذوب في الايثانول ويستقر بشكل راسب (Selvan *et al.*,2010) .

تتفق نتائج هذه الدراسة مع النتائج المستحصلة من دراسات سابقة فقد اوضح Paviania *et al.* (2010) كفاءة الايثانول والاسيتون مقارنة بعدد من المذيبات مختلفة القطبية منها الهكسان وخلات الاثيل والماء في استخلاص الفلافونويدات من نوعين من البروبوليس (الأخضر والاحمر) كما تفوق الاسيتون على الايثانول والكلوروفورم في استخلاص كل من FF و FD من البروبوليس الايطالي وبنسبة 0.42±5.83% و1.86±7.34% على التوالي (Papotti *et al.*,2012) ولاتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه Shouqin *et al.* (2005) اذ كان الميثانول اكفأ من الايثانول و بيكاربونات الصوديوم والماء في استخلاص الفلافونويدات من البروبوليس , وعلى الرغم من ان الاسيتون 70% ذو فعالية في استخلاص الفلافونويدات الا انه ليس شائع الاستخدام وذلك لارتفاع كلفة المذيب كما انه لايستخدم في الانتاج الغذائي بسبب بقايا المذيب (Jang *et al.*,2009) .



الشكل (1): تأثير نوع المذيب في استخلاص FF و FD من البروبوليس

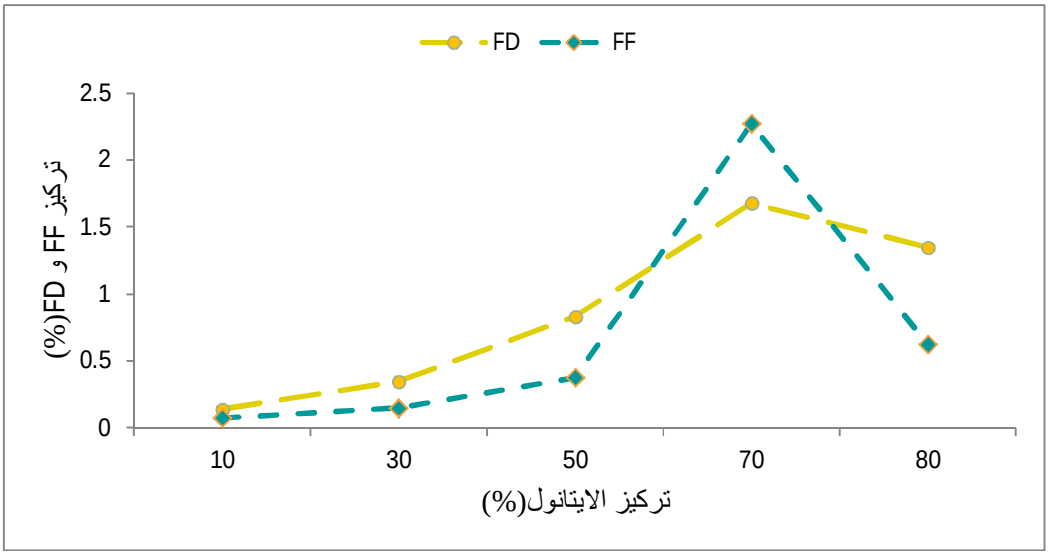
2- تأثير تركيز المذيب:-

يوضح الشكل (2) استخلاص FF و FD من مستخلص البروبوليس بأستخدام تراكيز مختلفة من الايثانول تراوحت بين (10-80)% اذ تزداد نسبة الاستخلاص مع زيادة تركيز المذيب الى ان تم الحصول على اعلى نسبة استخلاص بأستخدام الايثانول 70% والتي بلغت(2.27 و1.678)% للمركبين قيد الدراسة ,على التوالي .

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ورد في دراسة سابقة تضمنت استخدام تراكيز مختلفة من الايثانول تراوحت بين (55-85)% اذ وجد ان الايثانول 71.99% الاكفأفي استخلاص الفلافونويدات الكلية من مستخلص البروبوليس Margeretha *et al.*(2012) بينما كان الايثانول80% اكفأ في الحصول على اعلى نسبة من الفلافونويدات الكلية من مستخلص البروبوليس الأيراني والتي بلغت 7.3% (Yaghoubi *et al.*,2007) .

تتأثر حصيلة استخلاص الفلافونويدات من البروبوليس بشكل كبير بتركيز الايثانول اذ تــزداد بزيــادة تركيز هذا المذيب ولغاية التركيز 75 % ويعود السبب لذائبية الفلافونويدات في المحاليل الايثانولية ولكن عند التراكيز الاعلى من 75% تقل حصيلة الفلافونويدات وقد يكون السبب ان التراكيز العالية من الايثانول تؤثر على نوعية وتركيب الفلافونويدات (Shouqin *et al.*,2005) لذا يفضل الايثانول 70% فــي اســتخلاص معظم المكونات الفعالة من البروبوليس وليس الشمع (Bankova *et al.*,1992).

يعمل الماء على تحسين معدل الاستخلاص ولكن المحتوى العالي للماء يزيد من الاســتخلاص المصــاحب للمركبات الاخرى ,وبالتالي يقلل من تركيز المواد الفينولية في المستخلصات (Spigno *et al.*,2007).



الشكل (2): تأثير تركيز الايثانول في استخلاص FF و FD من البروبوليس

3- تأثير مدة الاستخلاص :

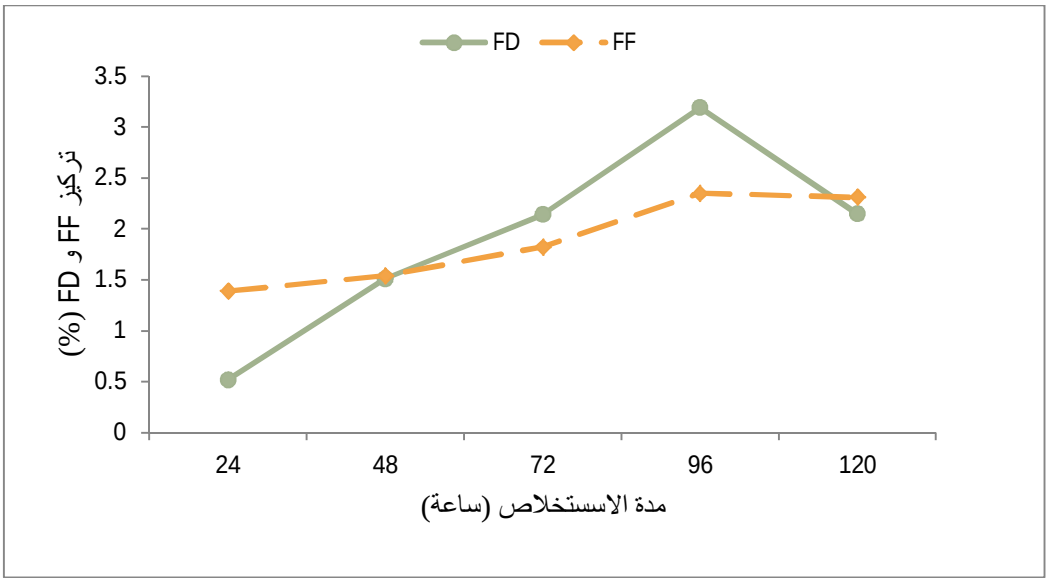
تم حضن مسحوق البروبوليس مع الايثانول 70% في الحاضنة الهزازة عند درجة حــرارة الغرفــة لاستخلاص الفلافونويدات (FF و FD) من كلا المستخلصين باستخدام خمس فترات للحضن (24 و48 و 72 و96 و120) ساعة .

يلاحظ من الشكل (3) ارتفاع تركيز الفلافونويدات مع تقدم فترة الحضن الى ان تم الحصول على اعلــى تركيز منها عند مدة استخلاص قدرها 96 ســاعة وبمقدار (23.51 و31.9) ملغم/غــم وبنســبة (2.351 و3.19)%,للمركبين FF و FD ,على التوالي.

لاتتفــق نتــائج الدراســة الحاليــة مــع العديــد مــن الدراســات الســابقة فقــد أشــار Agarwal *et al.* (2012) الى ان مدة 24 ساعة كانت كافية للحصول على اعلى نسبة من الفلافونويدات من مستخلص البروبوليس والتي بلغت (2.61 و16.7)% للمركبين FF و FD , على التوالي .

بالرجوع الى النتائج الموضحة في الشكل (3) يتضح ان اطالة مدة الحضن لـ 120 ساعة لم تكن ذات فائدة في زيادة تركيز الفلافونويدات من مستخلص البروبــوليس اذ تــم الحصــول علــى (2.312 و2.15)% , للمركبين FD, FF ,على التوالي.

ان زيادة مدة الاستخلاص تؤدي الى زيادة حصيلة استخلاص الفلافونويدات وان اطالة وقت الأستخلاص قد يفضي الى الحصول على نقاوة تامة بيد أن اطالة هذا الوقت يسبب تحطم الفلافونويدات (Qun, 2010) .



الشكل (3): تأثير مدة الحضن في استخلاص FF و FD من البروبوليس.

تنقية الفلافونويدات جزئيا من مستخلص البروبوليس:

يتضح من الجدول (1) الخاص بتنقية الفلافونويدات من مستخلص البروبوليس الخام أن كمية FF و FD بلغت (23.51 و31.9) ملغم /غم على التوالي بنسبة مقدارها (2.351 و3.19)% ,على التوالي ايضا ,بينما بلغ تركيز الفينولات الكلية 22.812% .

خضع مستخلص البروبوليس الخام الى خطوتي تنقية وكالآتي :-

1- الاستخلاص بوساطة الايثانول 95% :-

ان اذابة مستخلص البروبوليس في الكحول الاثيلي 95% وطرده مركزيا يساعد في التخلص من بعض المركبات الفينولية الاخرى. اذ يتضح من الجدول (1) انخفاض كمية الفينولات الكلية المستخلصة من البروبوليس لتصبح 9.851% بعد ان كانت 22.812% كما تم الحصول على حصيلة جيدة من الفلافونويدات من خطوة التنقية هذه والتي بلغت66.45%.

جدول(1):تنقية الفلافونويدات من مستخلص البروبوليس.

خطوة التنقية	%FF	%FD	Total phenol %	FFملغم/غم	FDملغم/غم	المجموع FF و FD	الحصيلة%
المستخلص الخام	2.351	3.190	22.812	23.51	31.90	55.41	100
الاستخلاص بالايثانول95%	2.022	1.66	9.851	20.22	16.6	36.82	66.45
كروماتوغرافيا الادمصاص بأستخدام الهلام Sephadex LH-20	0.340	0.730	4.542	3.40	7.30	10.7	19.31

ان عملية الأستخلاص باستخدام الايثانول تساهم في ازالة الشمع من مستخلصات البروبوليس مما يؤدي الى الحصول على مستخلصات خالية من الشمع .كما انها تساعد في ازالة المواد الخاملة وتحافظ على الاجزاء الفينولية وبالتالي الحصول على تراكيز عالية للمركبات من المواد الخام الطبيعية (Paviania *et al.* ,2013) .

2- كروماتوغرافيا الادمصاص بأستخدام الهلام Sephadex LH-20 :-

استخدم الهلام Sephadex LH-20 في تنقية الفلافونويدات من مستخلص البروبوليس الناتج من خطوة التنقية السابقة .

ان الهلام Sephadex LH-20 يدمص التانينات في الكحول ويحررها في الاسيتون المائي (Hagerman,2000) ولهذا السبب تم استخدام هذا النوع من الهلام لغرض التنقية .

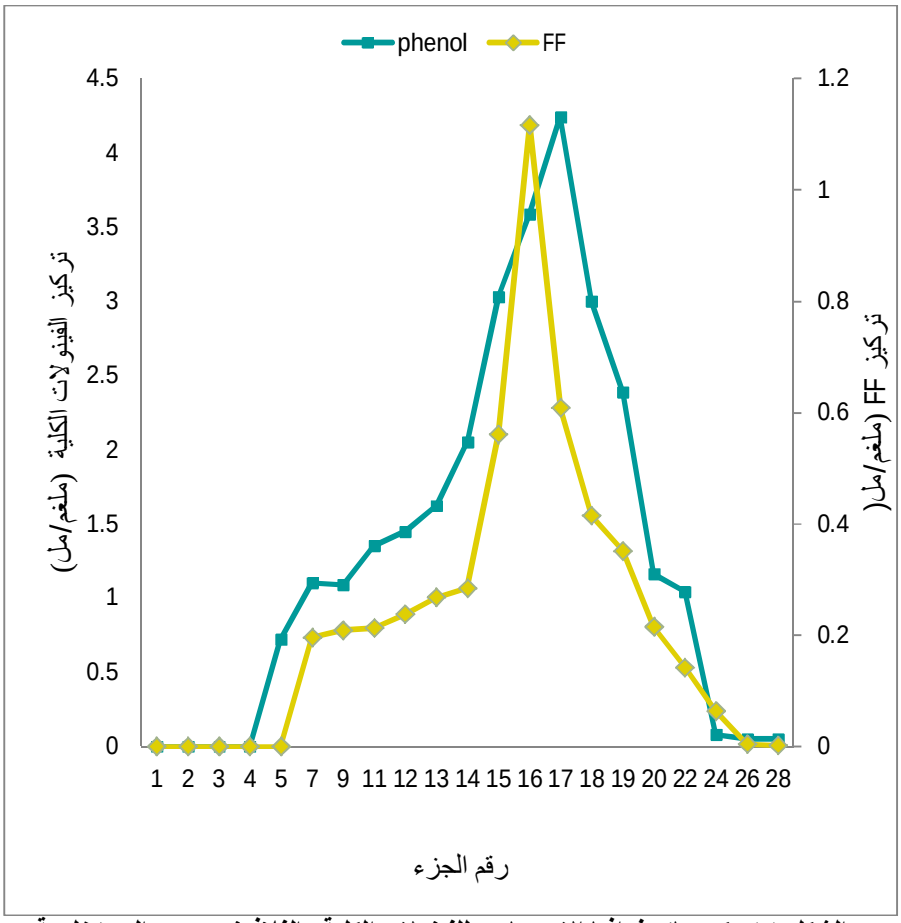
اجريت عملية التنقية على مرحلتين كالآتي :-

المرحلة الاولى :- مرحلة الغسل (wash) والتي اجريت بأستخدام الايثانول 95% وفيها تم التخلص من جميع المركبات غير المدمصة والمركبات الفينولية واطئة الوزن الجزيئي بشكل خاص (Karamac *et al.*,2006).

المرحلة الثانية :- الاسترداد (Elution) وتمت بتغيير المذيب من الايثانول 95% الى الاسيتون 70% وبعد ان تم جمع 30 جزء (Fraction) [حجم الجزء 3 مل] تم ايقاف عملية الاسترداد.

لوحظ من النتائج الموضحة في الجدول (1) والشكل (4) ظهور FF في الاجزاء (7-24) اذ كان اعلى تركيز لها في الجزء 16 بتركيز مقداره 1.1174 ملغم/ مل بينما ظهرت الفينولات الكلية في الاجزاء (7 -26) وبلغ اعلى تركيز لها في الجزء 17 وبتركيز مقداره 4.241 ملغم/مل , اذ يلاحظ انخفاض كمية الفينولات الكلية المستخلصة من البروبولس اذ بلغت النسبة المستحصل عليها من خطوة التنقية هذه 4.542% في حين كانت نسبة الفلافونويدات 19.31%.

لم تتوفر سوى دراسة عن استخدام الهلام Sephadex LH-20 في فصل المكونات الفعالة من البروبوليس فقد قام Yang *et al.*(2011) بعزل بعض المركبات المضادة للاكسدة من نموذج البروبوليس في اقليم Anhui في الصين وذلك باستخدام هذا الهلام ووسط فصل مكون من الكلوروفورم والميثانول بنسبة 1:1.كما ورد استخدام الهلام Sephadex LH-20 في فصل المكونات الفعالة من المصادر النباتية , فقد تم استخدام عمود من هذا الهلام بابعاد(2x25) سم في تجزئة المكونات الفينولية لمسحوق الكاكاو عن طريق الزيادة المتدرجة (Stepwise) لمحلول الأسترداد الماء-الاسيتون (Maleyki and Ismail,2008).



الشكل (4): كروماتوغرافيا الادمصاص للفينولات الكلية والفلافونويد FF المستخلصة من البروبوليس بأستخدام هلام Sephadex LH-20 .

الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبوليس ضد بكتريا *Streptococcus* :-

تم دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبوليس ضد ثمانية انواع من بكتريا المكورات السبحية *Streptococcus sp.* ومقارنة النتائج مع المضاد الحيوي Vancomycin ويتضح من النتائج المبينة في الجدول (2) ان هنالك تباينا واضحا في تأثير مستخلص البروبوليس على البكتريا المدروسة وبلغت اعلى فعالية تثبيطية لهذا المستخلص ضد بكتريا *S. mutans* بقطر تثبيط مقداره 18 ملم عند التركيز 25 ملغم /مل ,بينما بلغت اوطأ فعالية تثبيطية للمستخلص المذكور بقطر تثبيط 12 ملم عند التركيز ذاته ضد بكتريا *S. sanguis* وعند التمعن في الجدول (2) يتضح ان التركيز المثبط الادنى (MIC) قد بلغ 7 ملغم/مل لكل من بكتريا *S. pyogenes* و *S. salivarius* و *S. defectivus* و *S. anginosus* بينما بلغت 5 ملغم/ مل لكل من بكتريا *S. faecalis* و *S. mutans* و *S. sanguis* في حين بلغت 10 ملغم/ مل لبكتريا *S. constellatus* مما يشير الى ان البكتريا الاخيرة هي الاقل تأثرا بالفعل التثبيطي للبروبوليس .

تناولت العديد من الدراسات الفعل التثبيطي لمستخلص البروبوليس ضد بكتريا *Streptococcus* فقد قام Kashi *et al.* (2011) بدراسة الفعل التثبيطي للمستخلص المائي والايثانولي للبروبوليس الايراني ضد بكتريا *S.faecalis* و *S.salivarius* و *S.mutans* واتضح أن المستخلص الايثانولي يمتلك فعلا مثبطا (bacteriostatic) وقاتلا (bactericidal) اذا انحصر MIC وMBC بين (250-500) مايكروغرام/ مل بينما اظهر المستخلص المائي فعلا قاتلا فقط ضد بكتريا *S. mutans* بأستخدام تركيز من المستخلص مقداره 20 ملغم/ مل.

ان آلية عمل البروبوليس على الخلايا البكتيرية معقدة لاتماثل نمط فعل اي مضاد حيوي تقليدي ويمكن ايجازها كالآتي :-

1- تثبيط النمو البكتيري عبر منع انقسام الخلية مؤدياً بذلك الى تكوين Pseudomulti cellular .

2- يعمل على تشويه (disorganized) السايتوبلازم والغشاء السايتوبلازمي والجدار الخلوي مسببا بذلك تحللا جزئيا للبكتيريا.

3- منع تصنيع البروتين (Takaisi and Schilcher.,1994) .

جدول (2): الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبوليس ضد بعض أنواع بكتريا *Streptococcus*

تركيز المستخلص ملغم/مل	أقطار التثبيط (ملم)							
	S. faecalis	*S. pyogenes*	*S. salivarius*	*S. mutans*	*S. defectivus*	*S. anginosus*	*S. constellatus*	*S. sanguis.*
25	12.25	13	15.25	18	13.75	16	13	12
15	11	10.5	12	11.5	11.5	12.5	12	11
10	8	7	10.5	8	9	9.5	8	9
7	6	6	6	5.5	6	5.5	0	7.5
5	4.5	0	0	4.5	0	0	0	4.5
3	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
Vancomycin (30µg/ml)	21	22	18	19.5	20	19	18.5	18

LSD للبكتريا = 0.834 للتركيز = 0.889 للتداخل= 1.77

الفعل التآزري لمستخلص البروبوليس مع المضاد الحيوي الكلوروهكسدين (Chlorohexidine,CHX) ضد بكتريا *S. mutans* و *S. salivarius*:

تم انتقاء بكتريا *S. mutans* لدراسة الفعالية التثبيطية التآزرية وذلك لكونها المسبب الرئيس لتسوس الاسنان ,كما اختيرت بكتريا *S. salivarius* بوصفها مسببا ثانويا لهذا المرض لتقييم الفعل التآزري للبروبوليس مع المضاد الحيوي CHX .

يتضح من الجدول (4) ان الفعل التثبيطي للبروبوليس قد ازداد عند اضافة المضاد الحيوي CHX اذ ارتفع قطر التثبيط ضد بكتريا *S. mutans* من 18 ملم ليصبح (21 و21.5 و24) ملم عند التراكيز (0.01 و0.1 و0.2)% من المضاد الحيوي ,على التوالي ,مقارنة مع استخدام CHX بمفرده كما هو موضح في الجدول (3) ,مما يشير الى امكانية التوليف بين المضادات الحيوية الكيميائية والمنتجات الطبيعية للحصول على فعل تثبيطي افضل .

كما يتضح من الجدول (4) ان الفعل التآزري يزداد بزيادة تركيز الكلوروهكسيدين CHX ويبين الجدول نفسه ان التركيز المثبط الادنى لبكتريا *S. mutans* بلغ (5و3و1)ملغم/مل عند استخدام التراكيز (0.01 و0.1 و0.2)% من المضاد ,على التوالي .

تتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع نتائج دراسة Selvan *et al.* (2011) الذي حصل على فعل تثبيطي تآزري بأستخدام 0.2% من المضاد الحيوي CHX و0.5% من البروبوليس ليحصل على اقطار تثبيط تراوحت بين (28-41) ملم لعشرة ضروب من بكتريا *S. mutans* .اما فيما يخص بكتريا *S. salivarius* فيتضح من الجدول (5) ان الفعل التثبيطي التآزري للمضاد مع البروبوليس اعطى نتائج مشابهة لتلك المستحصل عليها في حالة بكتريا *S. mutans* .,وبلغ التركيز المثبط الادنى (MIC) لتوليفة البروبوليس مع المضاد الحيوي CHX (5 و3 و1) ملغم/مل عند استخدام التراكيز (0.01 و0.1 و0.2)% من المضاد على التوالي ,بعد ان كان مقداره 7 ملغم/مل عند استخدام البروبوليس بمفرده .

جدول (3): التركيز المثبط الادنى للمضاد الحيوي الكلوروهكسيدين ضد بكتريا *S. mutans* و بكتريا *S. salivarius* .

تركيز المضاد الحيوي (%) / البكتريا	0.2	0.15	0.1	0.07	0.05	0.03	0.01	0.005
S. mutans	21	16.5	14	11.5	9.5	6	4	0
S. salivarius	14	13.5	12.5	11.5	9	6.5	4	0

LSD للتركيز = 2.732

جدول (4): الفعالية التازرية لمستخلص البروبوليس مع المضاد الحيوي الكلوروهكسيدين ضد بكتريا *S. mutans*.

تركيز المستخلص (ملغم /مل) / تركيز المضاد الحيوي (%)	أقطار التثبيط (ملم)							
	25	15	10	7	5	3	1	0.5
0.2	24	21	16.5	13.5	10.5	9.5	5.5	0
0.1	21.5	16.5	15.5	13	11.5	9	0	0
0.01	21	11.5	10	5.5	4.5	0	0	0

LSD لتركيز البروبوليس= 1.37 LSDلتركيز المضاد = 0.9137 للتداخل=2.741

جدول (5): الفعالية التازرية لمستخلص البروبوليس مع المضاد الحيوي الكلوروهكسيدين ضد بكتريا *S. salivarius*

تركيز المستخلص (ملغم/مل) / تركيز المضاد الحيوي (%)	أقطار التثبيط (ملم)							
	25	15	10	7	5	3	1	0.5
0.2	21.5	20.5	15.5	14	12.5	10.5	5.5	0
0.1	19.5	16.5	15.5	12	9.5	7.5	0	0
0.01	19.5	13	10	7.5	4.5	0	0	0

LSD للبروبوليس = 1.29 LSD للمضاد=0.864 للتداخل=2.594

يمتلك CHX فعلا تثبيطيا واسع المدى ضد كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام فضلا عن الفطريات ,اذ تعد جزيئة الكلوروهكسدين موجبة الشحنة و بإمكانها أن ترتبط في المواقع السالبة الشحنة على الجدار الخلوي مما ينتج عنه عدم ثباتية الجدار الخلوي فضلا عن تداخله مع الازموزية مما يؤدي الى امكانية قتل الخلايا البكتيرية بسرعة خلال 20 ثانية .(ChlorohexidineFact,2012) .

الفعل التثبيطي لمستخلص البروبوليس ضد الخميرة *Candida albicans* :-

تم دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبوليس ضد خميرة *Candida albicans* ويتضح من النتائج المبينة في الجدول (6) ان للمستخلص المذكور فعلا تثبيطيا واضحا اذ ادى استخدام التركيز 25 ملغم/

مل الى الحصول على قطرتثبيط مقداره 14.5ملم كما يتضح من الجدول نفسه ان التركيز المثبط الادنى لمستخلص البروبوليس ضد الخميرة قيد الدراسة بلغ 5 ملغم/مل .

تتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع ماحصل عليه Liberio *et al.*(2011) اذ بلغ قطر تثبيط خميرة *C. albicans* بأستخدام البروبولس الترابي 9 ملم اما التركيز المثبط الادنى فأن نتائج الدراسة الحالية كانت مقاربة لنتائج Yaghoubi *et al.*(2007) اذ بلغ التركيز المثبط الادنى للبروبولس الايراني ضد الخميرة المذكورة 4.1 ملغم/مل.

لاتتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماوجده Hendi *et al.*(2011) الذي اشار الى عدم فعالية البروبوليس العراقي ضد خميرة *C. albicans* .

جدول (6): الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبوليس ضد خميرة *Candida albicans*.

تركيز المستخلص (ملغم/ مل)	قطر التثبيط (ملم)							
	25	15	10	5	3	1	Chloromatizol 2 ملغم/مل	Chloromatizol 1 ملغم/مل
Candida albicans	14.5	11.5	10.5	6.5	0.0	0.0	15	10

المصادر :

Agarwal,G.;Vemanaradhya,G.G.and Mehta,D.S.(2012).Evaluation of chemical composition and efficacy of Chinese propolis extract on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans:* An in vitro study. Contemporanry Clinical Dentistry;3(3):256-261.

Ahmed,I.;Mehmood,Z. and Mohammad,F.(1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. J. Ethnopharmacol. 62:183-193.

Al-Ghanimi,A.A.;Al-Ehari,A.Y.and Abdulhusain ,H.K.(2007).Partial purification of tannins from Quercus infectoria galls and the study of its effects on some isolated skin pathogenic microorganisms. Journal of Kerbala University ,Vol.5No.4 Scientific.pp:227-234.

Banas,J.(2004).Virulence properties of Streptococcus mutans.Fronties in Bioscience 9,1277-1277.

Bankova,V.(2005).Chemical diversity of propolis and the problem of standardization .Journal of Ethnopharmacology ;100:114-117.

Bankova,V.;Christov,R.;Stoev,G.and Popov,S.(1992).Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography .J. of Chromatography; 60(7):150-153.

Banskota,A.H.;Nagaoka,T.;Samioka,L.Y.;Tezuka,Y.;Awale,S.;Midorikaw,K.;Matsushinge, K.and Kadotas(2002).Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines.Journal of Ethnopharmecology, 80:67-73.

Budrat,P.and Shotipruk,A.(2008).Extraction of phenolic compounds from fruits of Bitter Melon(Momordica charantia) with subcritical water extaction and antioxidant activities of these extracts.Chiang Mai J.Sci. ;35(1):123-130.

Chang,C.C.;Yang,M.H.;Wen,H.M.andChern,JC.(2002).Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis,10 (3):178-182.

Chlorohexidine:Mechanism of Action.(2012). Chlorohexidine Facts.com.

Coneac,G.,Gafitanu,E;Hadaruga,D.I.;Hadaruga,N.G.;Pinzaru,L.A.;Bandur, G.;Ursica, L.;Paunescu,V.and Gruia,A.(2008).Flavonoid content of propolis from the west side of Romania and correlation with theantioxidantactivity.Chem. Bull."Politehica"Uni.(Timisoara).Vol.53(67):1-2.

Dai ,J. and Mumper,R.J.(2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant andAnticancer Properties.Molecules, 15: 7313- 7352.

Egorove,N.S.(1985).Antibiotics ascientific approach. Mir Publishers, Moscow.

Hagerman,A.E.(2002).Tannain Handbook.Miami University U.S.A.

Hendi ,N.K.K.;Naher ,H.S. and AL-Charrakh,A.H.(2011).Iraqi propolis:The Antimicrobial Activities.Journal of Medicinal Plants Research.

Holt,J.;Krieg,N.;Sneath,P.;Staley,J.and Williams,S. ,(1994).Bergey`s manual of determinative bacteriology,9thed.;Wilkins:Baltimore MA,USA.

Jang,M.J.; Sheu,S.R.; Wang,C.C. Yeh,Y.L. and Sung,K.H.(2009).Optimization Analysis of the Experimental Parameters on the Extraction Process of Propolis. Proceedings of the International Multi Conference of Engineers and Computer Scientists 2009Vol III MECS 2009, March 18 - 20, 2009, Hong Kong.

Karamac,M.;Kosinska,A. and Pegg,R.D.(2006).Content of gallic acid in selected plant extracts .Polish .J.Food .Nutr.Sci.;Vol. 15/56,No1, pp:55-58.

Kashi,T.S.J;Kermanshahi,R.K.;Erfan,M.;Dastjerdi,E.V.;Rezaei,Y.andTabatabaei, F.S.(2011).Evaluating the in-vitro Antibacterial effect of Iranian propolis on oral microorganisms.Iranian Journal of Pharmaceutical Research,10(2):363-368.

Keyes,P.H.C(1998).Present and future methods for dental caries control .J.Am.Coll.Dent.111:243-249.(Citted from Ophori *et al*., 2010)

Kosalec,I.;Pepljnjak,S.;Bakmaz,M.andVladimir-Knezevic,S.(2005).Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta. Pharm. 55: 423-430.

Liberio,S.A;Pereira,A.L.;Dutra,R.P.;Reis,A.S,;Araujo,M.J,;Mattar,N.S.; Sliva,L.A.;Riberio,M.N.;Nascimento,F.R.;Guerra,R.N.and Neto,V.(2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculate* Smith. BMC Complementary &Alternative Medicine ;11,108.

Maleyki,M.J.A. and Ismail,A.(2010).Antioxidant properties of coca powder . Journal of Food Biochemistry 34:111-128

Margeretha,I.; Suniarti,D.F.; Herda,E. and Mas'ud,Z.A.(2012).Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis *Trigona spp*. Journal of Natural Products, 5: 233- 242.

Ophori,E.A.;Eriagbonye,B.N. and Ugbodaga,P.(2010).Antimicrobial activity of propolis against streptococcus mutans.African Journal of Biotechnology Vol.9(31),pp:4966-4969.

Papotti,G.; Bertelli,D.; Bortolotti,L. ;Plessi,M.(2012). Chemical and Functional Characterization of Italian Propolis Obtained by Different Harvesting Methods. J.Agric.Food Chem;60(11):2852-2862.

Paviania,L.;Fiorito,G;Sacoda,P.;Cabral,F.A.(2013). Different Solvents for Extraction of Barazilian Green Propolis:Composition ana Extraction Yield of Phenolic Compounds. Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias (Colombia)

Paviania,L.; Sacoda,P.; Saitoa, E.and Cabral,F.A.(2010).Extraction techniques of red and green propolis:extraction yield of phenolic Compounds Cartagena de Indias (Colombia).

Qun,C.(2010).The effect of microwave irradiation on the structure of selected plant tissues.Msc.Thesis, Polytechnic University, Hong Kong.

Selvan,A.K.and Prabhu,T.(2010).Extraction of propolis from beehives and characterization of its constituents and medical properties:(A Review) . International Journal of Advanced EngineeringTechnology.Vol.1,Issue3.

Selvan,A.k.;Singh R.C. and Prabhu,T.(2011).Antibacterial Activity of Bee Propolis Against Clinical Strains of *Streptococcus mutans* and Synergism with Chlorhexidne. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research E-ISSN 2229-4619.

Shouqin, Z.;Jun,X. and Changzheng,W.(2005). High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. J Chem Technol Biotechnol 80:50–54 .

Spigno,G.;Tramelli,L.and Faveri,D.M.(2007).Effects of extraction time, temperature and solvent on antioxidant activity of grape marc phenolics.Journal of Food Engineering ;81,1:200-208.

Takaisi ,K.N.B. and Schilcher ,H.(1994).Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance.Plant Med ; 60 (3):222-7.

Tylkowski,B.;Trusheva,B.;Bankova,V.; Giamberini,M.;Pee G.Nikolova,A.(2010). Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration .Journal of Membrane Science 348:124-130.

Yaghoubi,S.M.J.;Ghorbani,G.R.;Soleimanian,Z.S.and Satari,R.(2007). Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition.DARU,vol.15,no.1.

Yang,H;Dong,Y.;Du,H.;Shi,H;Peng,Y. and Li,X.(2011).Antioxidant compounds from propolis collected Anhui ,China, Molecules, 16:3444-3455.