استخلاص وفصل بعض مركبات البروبلس propolis ودراسة فعاليتها الجرثومية

مصطفى عبد الكاظم حسين

قسم الكيمياء /كلية العلوم – جامعة الكوفة –العراق

الخلاصة:

فصل وتنقية المركبات الموجودة في البر وبولس باستخدام السكسليت Soxhlet وتقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC وتشخيص المجاميع الفعالة للمركبات باستخدام الكشوفات الأولية عنها واستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء FT-IR ومطيافية الأشعة فوق البنفسجيةّ Uv-Visible .أظهرت النتائج وجود مجموعة الكوينون الاروماتية إضافة مجاميع الالدهايد والكيتون والفينول وأظهرت مجموعها الفعالية الضد جرثومية ذات التثبيط العالي على ثلاثة من الجراثيم وهي Proteus mirabilis و Klebsiella Pneumonia و Staphylococcus Qureus.

الكلمات المفتاحية :**propolis** ،مركبات الكوينون ،الفعالية التثبيطية .

Abstract

The some found compounds was isolated and purified from Propolis by using soxhlet ,thin layer chromatography technique ,which where primary identified by detection of active groups are used including aromatic Qunonie ,Aldehyde ,Keton and Phenol, Also using FT-IR ,Uv-Visible spectra ,The compounds of Propolis have a high inhibitory activity on three bacterial including Proteus mirabilis و Klebsiella Pneumonia و Staphylococcus Qureus .

المقدمة :

يعرف البر وبولس على انه مادة صمغيه لزجه يقوم نحل العسل بجمعها من إزهار النباتات ثم معاملته بإفرازاتها اللعابية الغنية بالإنزيمات في تكوين مركب يدعى البر بولس، يستخدم من قبل النحل كمادة طاردة للحشرات ويبطن الخلية من الداخل للحفاظ عليها وعلى البيض من الحشرات والإمراض و هذه المادة تقاوم فعل بعض أنواع البكتريا والفطريات المسئولة عن عملية التفسخ والتحلل من خلال فعاليته البايولوجية [١]، للبروبولس رائحة

مميزة وقوية لاحتوائه على الزيوت الطيارة، إما إن من حيث القوام فيكون متغير حسب درجات الحرارة ،فهو صلب وسهل الكسر عند درجة حرارة (10م˚)ثم يلين ويصبح لاصقا عند درجة(25-30)م˚ وبدرجة حرارة (-70 60)م˚ يصبح قوامه سائلا لزجا[1،2]. والبروبولس مادة ذائبة في الماء والمذيبات العضوية مثل الكحول والايثر، التحليلات الكيميائية للبروبولس وجدان مكوناته تحتوي االفينولات والاسترات والاحماض والدهون وغيرها كما يحتوي على بعض العناصر المعدنية غيره و أنة يمتلك فعالية ضد البكتريا والفطريات والفيروسات [3]

المواد وطرق العمل :

١-تحضيرمستخلص البروبولس :

اتبعت الطريقة [2،4] في عمل مستخلص من البروبولس وهي طريقة الاستخلاص المستمر حيث وضع(5)غم من البروبولس في وعاء دروقي Thumble ووضع في جهاز الاستخلاص Soxhlet واستخدام مذيب الايثايول ولمدة 24 ساعة الهدف من هذا فصل الدهون عن المستخلص وبعدها ترشيح المستخلص من الدهون وحفظ في قناني نظيف للاجراء الاختبارات .

2- فصل المركبات البروبولس :

تتم استخدام تقنية thin layer Chromatography [5] فصل مركبات البروبولس واستخدام الصفائح الهلام المغطاة بهلام السليكا Silica Gel (20×20)سم وسمكه 2ملم ومجهزةمن شركةMerk بوجود طور متحرك هو Butand –Ethanal-Acetic acid(BEA) ونسبة (١:٤:٥)وبعد التاكد من موضع المركبات كما في الشكل(1) ،وتحديد نسبة الانسياب النسبي R_fمن خلال معادلة [6]

R_f = المسافة التي يقطعها المركب مع المذيب / المسافة التي يقطعها المذيب = 4/ 8=2

٣-تشخيص المجاميع الفعالة للمستخلص البروبولس :

تم الكشف عن المجاميع الفعالة وتتم قشط البعقة المتكونة على صفيحة TLCواذابتها في كحول الايثانول وتم تشخيص المجاميع الفعالة في مختبر التشخيص العضوي في قسم الكيمياء – كلية العلوم – الكوفة وكانت التالي[7،8] :

١- منصهر الصوديوم

ناخذ قطعة صغيرة من عنصر الصوديوم وتكون بحجم نصف حبة الحمص ونضعها في انبوبة اختبار نظيفة ومجففة لان الصوديوم فعال جدا مع الماء ونضيف اليه قطرات من المستخلص ونسخن حتى الاحمرار ثم نبرد

انبوبة ونضيف اليه الايثانول ونسخن مرة اخرى لكي نتخلص من الصوديوم الزائد ثم نبرد انبوية ونضيف (5-4ML) من الماء المقطر ونسخن الى ان تحدث فرقعة ثم نرشح المحلول الناتج والذي يجب ان يكون عديم اللون ثم نجري على الراشح الكشوفات التالية.

1-الكشف عن النايتروجين : ناخذ بضع قطرات من الراشح في انبوبة اختبار نظيفة تحتوي على (0.1-0.2)غم من مسحوق كبريتات الحديد الثنائي لينتج سداسي سيانيد الحديديك ثم نسخن المزيج بحذر مع الرج حتى الغليان لكي يتحول ايون الحديد الثنائي الى ايون الحديد الثلاثي ثم نضيف حامض الكبريتيك H_2SO_4 المخفف لتحميض الوسط لينتج سداسي سيانيد الحديدوز الثلاثي ذات الزرقة البروسية .

2-الكشف عن الكبريت : نحمض بضع قطرات من الراشح بحامض الخليك ونضيف بضع قطرات من خلات الرصاص لينتج راسب اسود من كبريتيد الرصاص

3-الكشف عن الهالوجينات : نمحض (2ml) من الراشح وثم نضيف بضع قطرات من حامض HNO3 ثم نضيف زيادة من محلول نترات الفضة ٠

ب- الكشف عن الفنيولات Ar-OH

نضيف (2ml) من الراشح في انبوية اختبارثم نضيف اليه قطرات من محلول كلوريد الحديديك سوف يكون لون محلول بنفسجي ٠

ج- الكشف عن الالديهايدات والكيتونات [٨]

تتم الكشف عن جميع الالديهايدات الاليفاتي والاروماتي بواسطة كاشف تولين ناخذ (2ml)من الراشح في انبوبة اختبار ونضيف اليه قطرات من كاشف سوف يتكون راسب اسود اومراة فضية ،وتتم الكشف عن الالديهايدات الاروماتي فقط بواسطة كاشف فهلنك ناخذ (2ml) من الراشح ونضيف قطرات من محلول فهلنك ثم سخن في حمام مائي لمدة (2min) سوف يتكون راسب احمر يدل على وجود على الالديهايدات الاروماتي ، وتتم الكشف الكيتونات ناخذ (1ml) من الراشح ونضيف قطرات منsodium nitroprussid ويتكون محلول احمر ٠

د- الكشف عن الكويناونات [٩]

ناخذ قطرات من الراشح ونضيف اليه قطرات من هيدروكسيد الصوديوم المخفف مع الرج المستمر يكون لون المحلول بني سوف يتحول المحلول الى لون اسود بسبب عملية الاكسدة ٠

٤- التشخيص بمطيافية الاشعة تحت الحمراء (FT- IR) والاشعة الفوق بنفسجية (Uv-visible) :

تم تشخيص طيف الاشعة تحت الحمراء وطيف الاشعة الفوق بنفسجية في المختبر البايوكيميائي في كلية الصيدلة جامعة الكوفة باستخدام (FT-IR-Prestige 21 –shimadzu spectrophotometer)، (visible 165 –Uv shimadzu) على التوالي.

٥- دراسة الفعالية البايلوجية:

اختيرت ثلاثة انواع من الجراثيم وتمت دراسة مستخلص البروبلس عليها في مختبرات قسم علوم الحياة – كلية العلوم– جامعة الكوفة والجراثيم العصيات الرئوية klebsiella Pneumoniaوالمكورات العنقودية الذهبية Staphylococcus Qureusوالمتقلبات العجيبةproteus mirabilis ،بالاعتماد على العملية التالية:

١- تحضير الوسط الزراعي : حضر الوسط الاكار الغذائي *muller_ Agar hinton* بحسب طريقة [١٠] .

٢-اختبار الفعالية التضادية للتخلص ضد البكتريا.:

اتبعت طريقة الانتشار بالاكار بواسطة الاقراص disc diffusion Method اذ تم تحضير الأقراص الورقية باستعمال ورقة ترشيح نوع (whatman no 1-) قطعت هذه الاقراص وعقت بجهاز ال Autoclave بدرجة حرارة 121م°وضغط 15 باوندانج٢ لمدة 15 دقيقة وحضرت التراكيز(١،٢،٣،٤،٥) من المستخلص و وضعت في أنبوبة بواسطة 0.1 مل من المستخلص حاوية على(10 أقراص معتمة) وجففت بعيدا عن الهواء بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة 37م ° لمدة 10 دقائق بعدها تم تنشر 0.1 مل من العالق على وسط *Muller hinton Agar* ناشر معقم حضنت الأطياف بدرجة 37م° لمدة 30 دقيقة وبعدها وضعت الأقراص الحاوية على تراكيز مختلفة من مستخلص البروبولس على الوسط الزراعي الصلب تم حضنت بدرجة 37م°لمدة 18-24 ساعة بعد ذلك تم قياس منطقة التثبيط ب (ملم) لكل قرص من الاقراص الموضوعة وحسب التركيز المستخدم أي قياس inhibition Zone بواسطة المسطرة[١١] .

<u>النتائج والمناقشة:</u>

١- استخلاص المركبات وفصلها وتنقيتها من مستخلص البر وبولس الكحولي :

لقد تم خلال هده الدراسة عملية الاستخلاص بواسطة جهاز السكسليت مع الايثانول ومن خلالها تم التخلص من كافة الدهون حيث لوحظ بعد عملية استخلاص محلول البر وبولس وجود راسب كثيف ابيض اللون وبعد الترشيح أصبح المحلول الكحولي خالي من الدهون [٤] ،وبعدها تمت عملية الفصل والتقنية حيث استخدمت طريقة كرومتوكرافيا الورقة TLC حيث ظهر إن هناك بقعة واحده من المركب موجودة الشكل (١) وباستخدام الطور المتحرك بيوتا نول –ايثانول –حامض ألخليك ،بعدها تم قشط البقعة وإذابتها بمذيب

الايثانول [١٢]ومن ثم عملية الترشيح للوصول إلى محلول البر وبولس الكحولي والذي استخدم في عملية الكشف عن المجاميع الفعالة [٩].

٢- تشخيص المركبات في محلول البروبلس الكحولي :

- **الكشف عن المجاميع الفعالة :**

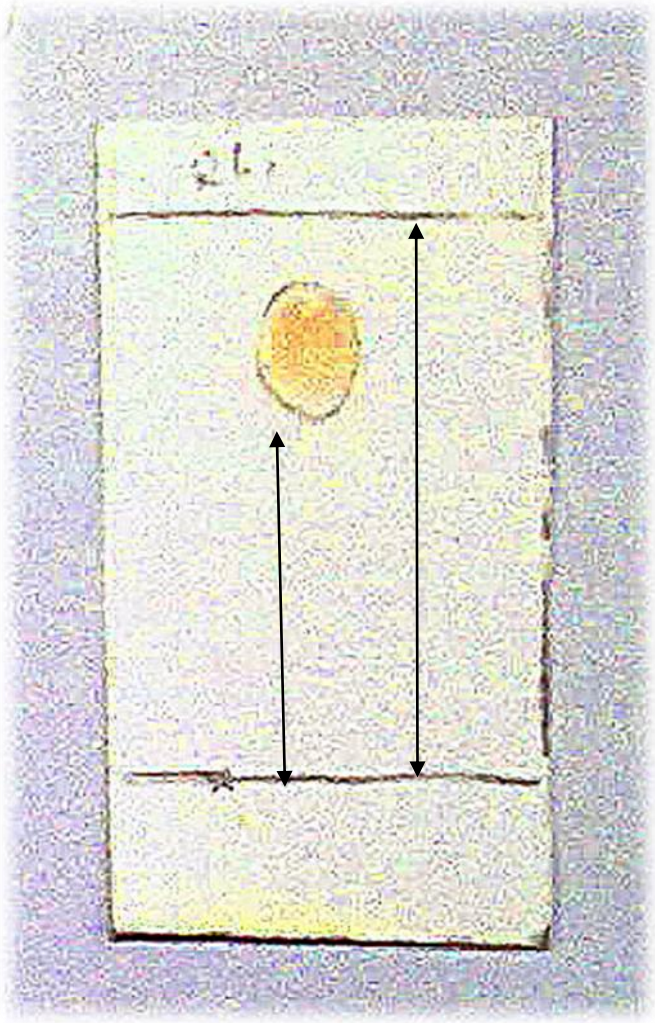
لقد أعطى الكشف عن المجاميع الفعالة نتائج مهمة والتي من خلالها توصلنا إلى نتائج جيدة في هذا الموضوع حيث أعطى الكشف عن مجاميع الكبريت والنيتروجين والهاليدات كشفا سالبا وهذا يتفق مع [١] ،وإما كشف الفينولات والالهايدات والكيتونات فقد أعطى نتيجة موجبة من خلال اللون البنفسجي وكشف المرأة الفضية والمحلول الأحمر على التوالي،أم الكشف الجديد عن الكوينونات (Anthraquinones) حيث لم أجد من الباحثين السابقين تطرق لهذا الكشف والذي نعتقد إن له الجزاء الأعظم من الفعالية البايلوجية للبر وبولس [١٣]وكما سيأتي كان كشفا موجبا حيث أصبح المحلول اسود اللون بسب عملية الاكسده الحادثة [١٤،٩].

- **استخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء :**

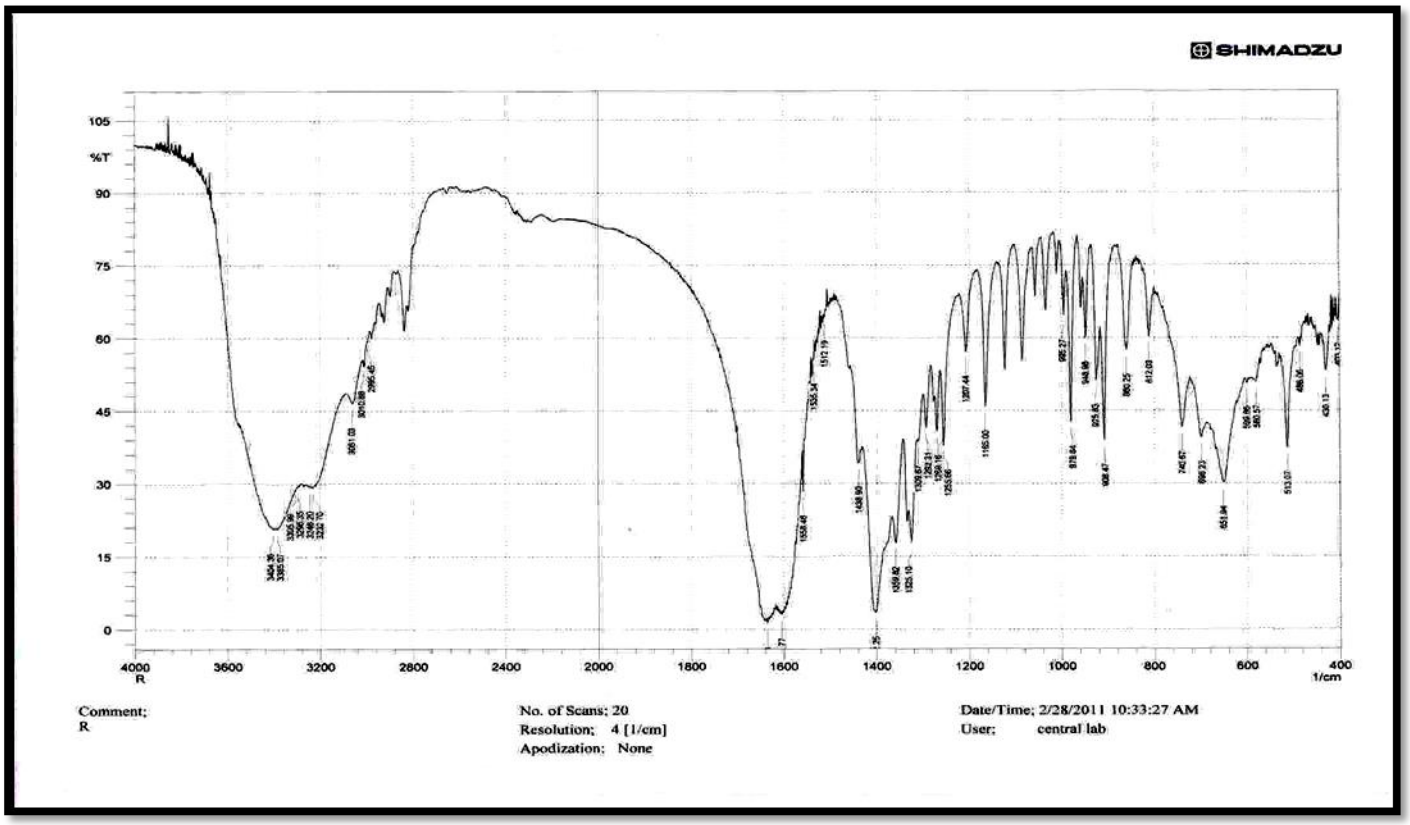
أظهرت النتائج مطيافية الأشعة ماتحت الحمراء للمركب المستخلص الشكل (2) وجود حزمة قوية عرضية من 3404nm عن تردد أنماط لمجموعة (OH) الفنيولات وجدت حزمة متوسطة (2990-2850nm) ممكن الترددلانماط الغير متماثل لمجموعة (CH_2،CH_3) وحزمة قوية وعريضة (1620-1690 nm) يمثل التردد للأنماط مجموعة (c=o) الاروماتية المرتبطة باكثر من حلقة الى الالدهايد والكيتون وهي ايضا تطابق التردد للأنماط مجموعة الكاربونيل الاروماتية العائدة إلى الكوينون[١٥] وحزمة متوسطة حادة في (1430nm- 1400) يمثل التردد الأنماط لمجموعة (CH_2 – C=O) وحزمة قوية (979nm) يمثل التردد الأنماط لمجموعة (c-o) وحزمة متوسطة في (740nm) يمثل التردد لمجموعة (CH2) وحزمة متوسطة في (651nm) يمثل التردد لمجموعة (OH) [١٦].

-استخدام مطيافية الأشعة ما فوق البنفسجية :

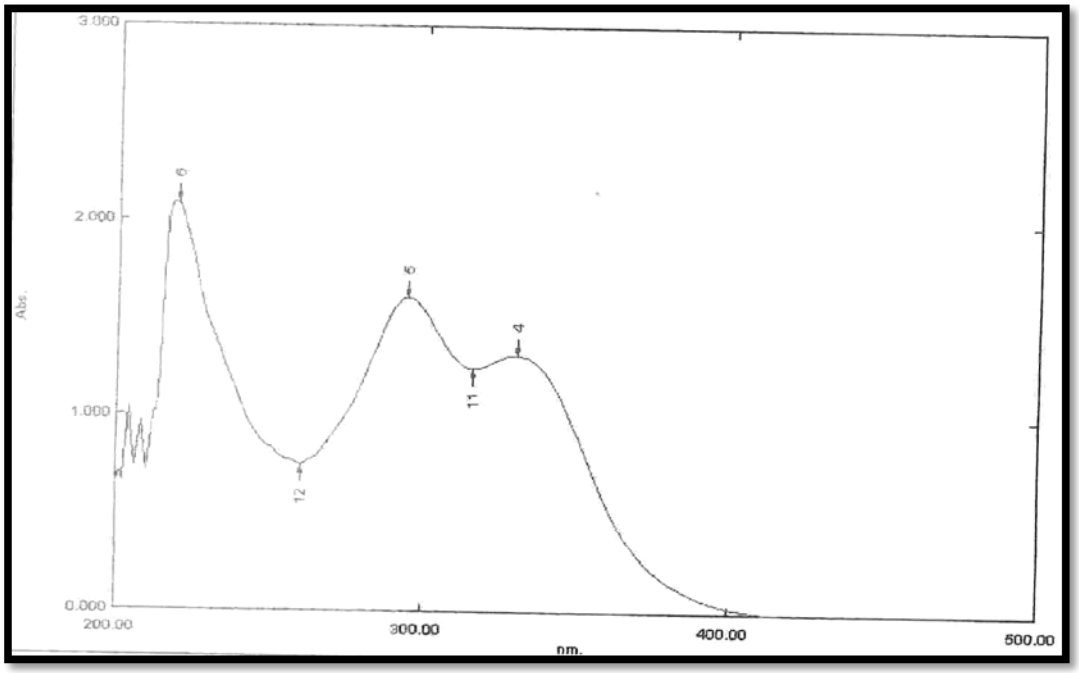
أظهرت النتائج مطيافية الأشعة ملفوق البنفسجي الشكل (٣) المركب المستخلص إن الامتصاص عند (219nm) يعود إلى الانتقال الاليكتروني من نوع $n-\pi^*$ لمجموعة الفينول المرتبطة بالحلقة الاروماتية والامتصاص عن (281 nm) يعود إلى الانتقال الاليكتروني من نوع $\mathbf{n}-\square^*$ لمجموعة الكاربونيل المرتبطة بالحلقة الاروماتية الخاصة بالكوينون والامتصاص عن(342nm) يعود إلى الانتقال الاليكتروني من نوع $\pi-\square^*$ للمجموعة الكيتون المرتبطة بالحلقة الاروماتية [١٧،١٨] .



الشكل رقم (١) فصل البروبولس بتقنية TLC



الشكل رقم (٢) مطيافية الاشعة تحت حمراء



الشكل رقم (٣) مطيافية الاشعة فوق بنفسجية

٣- الفعالية الضد جرثومية للمركبات المستخلصة من البر وبولس الكحولي :

أظهرت النتائج في جدول (1) إن جميع تراكيز المستخلص الكحولي للبر وبولس كانت فعالة في خفض معدلات نسبة التثبيط وحسب حساسية البكتريا وهذا يعود إلى المجاميع الفعالة داخل المستخلص من propolis هي مجاميع الكيوينون والتي لها الأثر الكبير في عملية التثبيط لما تحويه مجموعة الكاربونيل من ذرات الاوكسجن التي بوجود المزدوجات الالكترونية التي تعمل على التفاعل أو الارتباط مع أنزيمات المجاميع الفعالة المرتبطة بجسم الكائن مما تودي إلى ترسيب البروتينات في جسم الكائن [١٣،١٩] وبتالي توأدي التثبيط بعض الإنزيمات المهمة ،إضافة إلى ما تعمله مجاميع مجاميع الكيتونات والالديهايدات.

جدول (1) معدلات أقطار التثبيط للمستخلص الكحولي للبر وبولس propolis في نمو البكتريا الاختبارية

البكتريا / التراكيز المستخدمة/منطقة ثبطه	التراكيز 1	2	3	4	5	control
k.pneumoia	1	0	0	0	0	18.3
st.areus	1.3	0	0	0	0	14.9
p. mirabilis	0.9	0	0	0	0	11.5

المصادر:

1- J.M.Graham, (1992),The hive and the honey bee .Hamiltion, Ilinois U.S.A

2- R. Krell (1996),Value-Added products from bee-keeping food and organization of the United Nations (FAO)-Roma.p.157-193.

٣- هلال،رمضان .البروبلس صمغ النحل السحري ،النحال العربي– لبنان– بيروت ع ١١ (١٩٩٩).

4- J.T.Barre,B.F.Bowden,J.C.Coll, and *etal*,phytochemistry,45,321,(1997).

5- L.F.Fieser,K.L.Williamson (1992),Organic Experiments, D.C.Heath and Company.Toronto,p117-131.

6- E.H.Deintrop (2007),Applied Thin-Layer chromatography, Wiley-Vch Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.

7- A.I.Vogle (1958),Elementary Practical Organic Chemistry, Longman Group Limited London.

8- R.L.Shriner,and *etal*,(2004), The e Systematic Identification of Organic Compounds, John Wiley and Sons. Inc.

9- J.D.Hepworth,D.R.Waring and M.J.Waring (2002),Aromatic Chemistry, The Royal Society of Chemistry,p 131-145.

10- J.F. Macfadin (1979),Biochemical Test for inditification of medical bacteria ,The Williams and wilkinms and wilkins-CO,U.S.A.

11- Saxena,G;farmer,S; Farmer,S;Hancock,R.e.w g-h –N (1995) Antimicrobial compounds from Anus rubra of pharmcognosy,33(1);33-36.

12- L.Smart. (2002),The Molecular World Separation, Purification and Identification,The Open University ,Walton Hall,p 41-42.

13- A.Kar .(2007), Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology ,New Age International Publishers,p129-138.

14- G Tojo , M Ferna´ndez.(2002), Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones, Springer ScienceBusiness Media, Inc,p208-238.

15- B.D. Mistry.(2009), *A* Hand book of Spectroscopic Dat*a* Chemistry, Oxford Book CompanyJaipur, India.

16- R.M.Silverstein and *etal*.(2005),Spectrometric Identification of organic compounds , John Wiley and Sons. Inc

17- D Whittaker.(2000), Interpreting Organic Spectra, The Royal Society of Chemistry.

18- R.Anderson and *etal*.(2004), Organic Spectroscopic Analysis, The Royal Society of Chemistry .p9-11.
19- S. D. Sarker, L. Nahar.(2007), Chemistry for Pharmacy Students, John Wiley & Sons Ltd,p142.