متوفرة على الموقع: http://www.basra-science-journal.org

ISSN –1817 –2695

تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلصات الزنجبيل *Zingiber offcinale* المائي و الكحولي و زيوته الأساسية ضد الجرثومة الحلزونية *Helicobacter pylori*

ليلى ناصر حرب

قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة البصرة

الاستلام 11-11-2012 ، القبول 17-4-2013

الخلاصة

تمت دراسة تأثير مستخلصات الزنجبيل ***Zingiber offcinale*** المائي والكحولي وكذلك الزيوت الأساسية **Essential oil** على 6 عزلات من الجرثومة الحلزونية ***Helicobacter pylori*** و قد أبدت المستخلصات المائي و الكحولي تأثيراً تثبيطياً ضد عزلات الجرثومة تراوح قطر منطقة التثبيط بين (15 – 18) ملم بتركيز 400 ملغم/مل، بينما أعطت الزيوت الأساسية تأثيراً تثبيطياً أعلى تراوحت أقطاره بين (20 – 24) ملم بتركيز 250 ملغم/مل. أما التركيز المثبط الأدنى **MIC** للزيوت الأساسية فقد تراوح بين (250 – 400) ملغم/مل، كما أظهرت الدراسة أن تأثير المستخلصات كان مقارباً لتأثير المضادات الحيوية **Tetracycline** و **Erythromycine** و **Kanamycin**.

الكلمات المفتاحية: الزنجبيل – الزيوت الأساسية– الفعالية التثبيطية

1- المقدمة

توجد أنواع كثيرة من النباتات منتشرة في جميع أنحاء العالم تحتوي في جزء منها أو في جميع أجزاءها على مواد ذات قيمة علاجية للإنسان و الحيوان و توصف هذه النباتات بأنها نباتات طبية **Medicinal plants** [1]. و يعتبر الزنجبيل ***Zingiber offcinale*** من العائلة **Zingiberaceae** أحد هذه النباتات الطبية ، و هو نبات معمر، ريزومي عطري، الرايزومات غليظة ذات قشور (أوراق حرشفية) تتفرع كأصابع اليد ذات لب أصفر أو أبيض و للزنجبيل زهور ذات لون أخضر ممزوج بطبقة من اللون البنفسجي [2]. تتلخص فوائد الزنجبيل في القدرة على تقوية الذاكرة و النظر و علاج الصداع و دوار البحر و بحّة الصوت و تنقية الحنجرة و القصبات الهوائية و علاج السعال و طرد البلغم و تدفئة الجسم من نزلات البرد و تخفيف التوتر العصبي و الأرق و تهدئة الأمعاء و إزالة الإمساك و التقليل من إضطرابات الجهاز الهضمي [3].

إن السر في الفوائد الصحية للزنجبيل هو في تلك المجموعة الخاصة من المركبات الكيميائية المختلفة، منها الزيوت الطيّارة **Volatile oil** و منها مركبات لاذعة **Pungent** غير طيّارة **Nonvolatile**، إذ يحتوي الزنجبيل على أحد عشر مركباً لها تأثيرات صحية و هذه المركبات هي: **Zingerone** و **Beta-Bisalone** و **gingediol -6** و **shogaol -8** و **6-gingerol** و**6-gingerdicone** و **8-gingesol** و **Pingerol -10** و **anr-curcumene** و **6-gingerdicone** و **Betasesquiphell and rene** [4].

تعد مركبات **Zingerone** و **6-gingerol** و **shogaol-8** و **Zingibereane** من الزيوت الأساسية [5]، و هي مركبات توجد كمواد أيضية في النبات، و يطلق عليها أحياناً إسم الزيوت الطيارة [6] و لهذه المركبات قابلية على تثبيط الجراثيم إذ تبين أن الفعالية التثبيطية لبعض النباتات تكمن في زيوتها الأساسية [7].

و قد ذكر الباحثون أن هناك عدة إضطرابات في الجهاز الهضمي يمكن بتناول الزنجبيل التخفيف منها أو إزالتها [4]. لذلك هدفت هذه الدراسة إلى إستخلاص الزيوت الأساسية من نبات الزنجبيل *Z. offcinale* و إختبار فعاليتها التثبيطية ضد الجرثومة الحلزونية*H. pylori* المسببة لقرحة المعدة و بالتالي إمكانية إستعمال هذه الزيوت كبدائل دوائية لعلاج القرحة بدلاً من العقاقير الطبية ذات التأثيرات الجانبية و ذلك بعد إجراء الدراسات السريرية تفصيلياً.

2- طرائق العمل

2-1 نبات الدراسة

تم شراء الزنجبيل *Z. offcinale* من السوق المحلية و طحن في مطحنة كهربائية و حفظ المسحوق في قنينة زجاجية لحين الإستعمال.

2-2 العزلات الجرثومية المستعملة في الدراسة

تم إختيار 6 عزلات سريرية عشوائية من مجموع 70 عزلة من جرثومة *H. pylori* و المشخصة في مختبر أبحاث الأحياء المجهرية – قسم علوم الحياة – كلية التربية و المشخصة من الدكتورة آلاء يعقوب بالإعتماد على [8] و المحفوظة في وسط **Trypton Soy Broth**.

2-3 تحضير المستخلص المائي

مزج 20 غم من مسحوق نبات الزنجبيل مع 200 مل من الماء المقطر المعقم و ترك المحلول مع التحريك المستمر بواسطة الجهاز الهزاز **Lab – Shaker** لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة، بعدها رشح المحلول خلال عدة طبقات من الشاش ثم وضع المستخلص في طبق بتري **Petri dish** و ترك مكشوفاً ليجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع ثم حفظ المسحوق في قناني زجاجية معقمة لإختبار فعاليته ضد جرثومية لاحقاً [9].

2-4 تحضير المستخلص الكحولي

حضر المستخلص الكحولي بالطريقة السابقة نفسها بإستثناء إستبدال الماء بالإيثانول 70% [9].

2-5 إختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصين المائي و الكحولي

نشطت عزلات الجرثومة الحلزونية *H. pylori* قيد الدراسة في الوسط الغذائي **Trypton Soy Broth** المحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، أتبعت طريقة الإنتشار بالآكار **Agar Diffusion Method** حسب طريقة [10] و تضمنت الطريقة تحضير وسط **Muller – Hinton Agar** المحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، صب الوسط

في أطباق بتري **Petri dish** و بعد التصلب لقح الوسط بـ **0.1** مل من العالق الجرثومي تركيزه **1 × 10^6** خلية جرثومية/مل و المقاس بجهاز **Spectrophotometer** على طول موجي مقداره **540 nm**، نشر العالق الجرثومي بإستعمال قطيلات قطنية معقمة **Swab**، تركت الأطباق لمدة **15** دقيقة لتشرب العالق في الوسط الزرعي، ثم عملت حفرتان في كل طبق بقطر **6** ملم بوساطة ثاقب فليني معقم، و أضيف **10** مايكرولتر من المستخلص النباتي بتركيز **0.5** ملغم/مل لكلا المستخلصين المائي و الكحولي بإستعمال ماصة دقيقة **Micropipette**، حضنت الأطباق عند درجة حرارة **37** مْ لمدة **24** ساعة، ثم سجلت النتائج بقياس أقطار منطقة التثبيط بالمليمتر (جدول – 1)، كررت الطريقة لجميع العزلات قيد الدراسة كما إستعمل طبق سيطرة **Control** حاوي على وسط غذائي خالي من المستخلص.

2-6 عزل الزيوت الأساسية من نبات الزنجبيل بطريقة الإستخلاص المستمر

تم وزن 40 غم من مسحوق نبات الزنجبيل و وضع في دوارق الفصل **Thimble** و أجريت عملية الإستخلاص المستمر **Sexhlet continuous extraction** لمدة 16 – 24 ساعة بإستعمال 400 مل من مذيب **N- Hexane (Merck)** بعدها جفف المحلول بوضعه في طبق بتري **Petri dish** و تجفيفه بدرجة حرارة الغرفة حيث تم الحصول على سائل لزج القوام [11]. و كان وزن الزيوت المستخلصة **2.14** غم.

2-7 التحليل النوعي لمستخلص الزيوت الأساسية لنبات الزنجبيل

تم إجراء التحليل النوعي لمستخلص الزيوت الأساسية لنبات الزنجبيل بإستعمال كواشف نوعية للكشف عن المركبات الفعالة في مستخلص الزيوت المعزولة (جدول -2) [12].

2-8 إختبار الفعالية التثبيطية للزيوت المعزولة من نبات الزنجبيل

أتبعت الطريقة السابقة المذكورة في الفقرة (5) لإختبار فعالية الزيوت المعزولة من نبات الزنجبيل و ذلك بإستخدام تركيزين **0.5** غم/مل، **1** غم /مل، و سجلت النتائج بقياس أقطار منطقة التثبيط بالمليمتر (جدول – 3).

2-9 تحديد التراكيز المثبطة الدنيا MIC للمستخلصات و الزيوت المعزولة

حددت التراكيز المثبطة الدنيا لمستخلصات الزنجبيل الخام و الزيوت المعزولة منه ضد عزلات الجرثومة الحلزونية قيد الدراسة حسب طريقة [13]. و تضمنت الطريقة تحضير المحلول الخزين **Stock Solution** لكل مستخلص من إذابة **2** غم من المستخلص في **5** مل من المذيب **Dimethyl Sulfoxaide (DMSO)**، و حضرت سلسلة من التخافيف (**400، 300، 250، 200، 150، 100، 50، 25، 10**) ملغم/مل ثم مزج **1** مل من كل تخفيف من التخافيف أعلاه مع **2** مل من وسط **Muller – Hinton Agar**، أضيف لكل طبق **10** مايكروليتر على شكل قطرات من اللاقح الذي كثافته **0.1** و المقاسة بواسطة جهاز **Spectrophotometer US** على طول موجي **540 nm** أي ما يعادل **1 × 10^6** خلية/مل ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة **37** مْ لمدة **24** ساعة. سجلت النتائج و حدد التركيز المثبط الأدنى لكل مستخلص (جدول – 4).

2-10 إختبار حساسية الجرثومة للمضادات الحيوية

إستعمل وسط **Muller – Hinton Agar** لغرض قياس الفعالية البايولوجية لستة أنواع من المضادات الحيوية **Tetracycline 30µg** و **Cefodizine 30 µg** و **Erythromycin 15 µg** و **Amoxicillin 30 µg** و **Kanamycine 30 µg** و المجهزة من شركة **Bioanlyas**، إذ نشر **0.1** مل من مزرعة الجرثومة **Broth Culture** في الوسط الزرعي بوساطة قطيلات قطنية معقمة **Swab**، تركت الأطباق المزروعة لمدة **30** دقيقة لإمتصاص السائل المضاف، وضعت الأقراص المشبعة بالمضاد

الحيوي بوساطة ملقط معقم في أماكنها بالطبق و حضنت الأطباق عند درجة حرارة **37** مْ لمدة **24** ساعة [14]. سجلت النتائج بقياس أقطار منطقة التثبيط بالمليمتر (جدول – 5).

3- النتائج

3-1 الفعالية التثبيطية لمستخلصات الزنجبيل المائي و الكحولي ضد العزلات الجرثومية

يوضح الجدول (1) الفعالية التثبيطية لمستخلصات الزنجبيل المائي و الكحولي و قد كان التأثير متقارباً لكلا المستخلصين إذ تراوحت أقطار منطقة التثبيط بين **(15 – 18)** ملم لجميع العزلات قيد الدراسة.

جدول (1): الفعالية التثبيطية لمستخلصات الزنجبيل المائي و الكحولي ضد جرثومة *H. Pylori*

رقم العزلة	قطر منطقة التثبيط (ملم)	
	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي
56	17	16
37	16	16
31	16	16
41	18	17
28	16	15
45	16	16

صورة (1) مناطق التثبيط لمستخلصين المائي و الكحولي ضد الجرثومة الحلزونية *H. pylori*

3-2 لتحليل النوعي لمستخلص الزيوت الأساسية

يوضح الجدول (2) نتائج الكشوفات النوعية لمستخلص الزيوت الأساسية لنبات الزنجبيل *Z. offcinale* و يتضح من الجدول أن المستخلص يحتوي على التربينات الثلاثية و التربينويدات و الفينولات و الفلافونيدات و هذه المركبات لها تأثير تثبيطي ضد الجراثيم.

جدول (2): التحليل النوعي لمستخلص الزيوت الأساسية

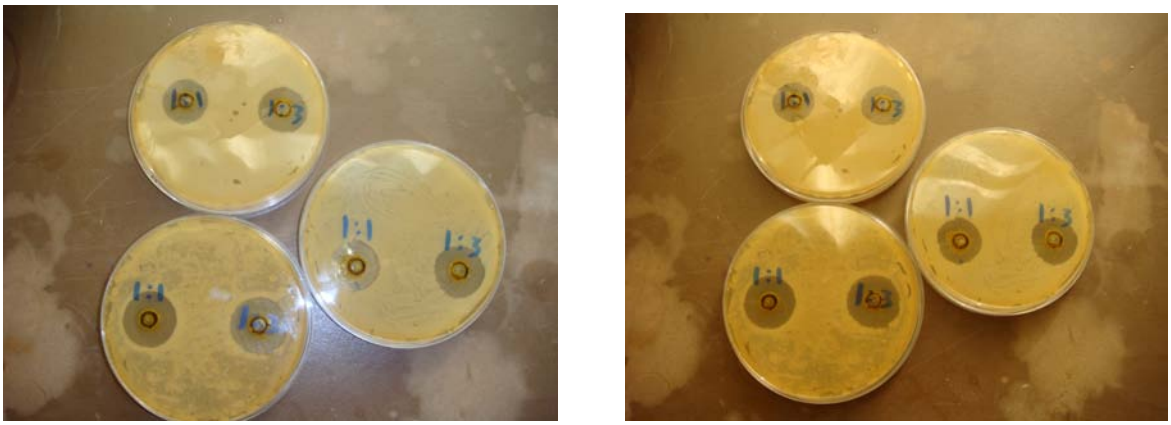
اسم الكشف	اسم الكاشف	النتيجة
فلافونيدات	هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي **KOH**	+
فينولات	كلوريد الزئبقيك **1%**	+
تربينات	ليبرمان – بورفارد **Liberman – Burchard**	–
تربينويدات	حامض الكبريتيك المركز + الكلوروفورم	+
صابونين	كلوريد الزئبقيك المائي	–

3-3 الفعالية التثبيطية لمستخلص الزيوت الأساسية لنبات الزنجبيل *Z. offcinale*

يوضح الجدول (3) الفعالية التثبيطية لمستخلص الزيوت الأساسية ضد الجرثومة الحلزونية *H. pylori*.

جدول (3): الفعالية التثبيطية لمستخلص الزيوت الأساسية ضد جرثومة *H. Pylori*

رقم العزلة	قطر منطقة التثبيط (ملم)	
	التركيز	
	0.5 mg/ml	1 mg/ml
56	22	23
37	20	21
31	21	24
40	21	23
28	20	22
45	22	23



صورة (2) مناطق التثبيط لمستخلص الزيوت الأساسية ضد الجرثومة *H. pylori*

3-4 التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات و الزيوت المعزولة من نبات الزنجبيل *Z. offcinale*

يوضح الجدول (4) التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصين المائي و الكحولي و الزيوت الأساسية المعزولة من نبات الزنجبيل ***offcinale*** ضد الجرثومة الحلزونية ***H. pylori***.

جدول (4): التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصين المائي و الكحولي و الزيوت الأساسية

اسم المستخلص	MIC mg/ml
المائي	400
الكحولي	400
الزيوت الأساسية	250

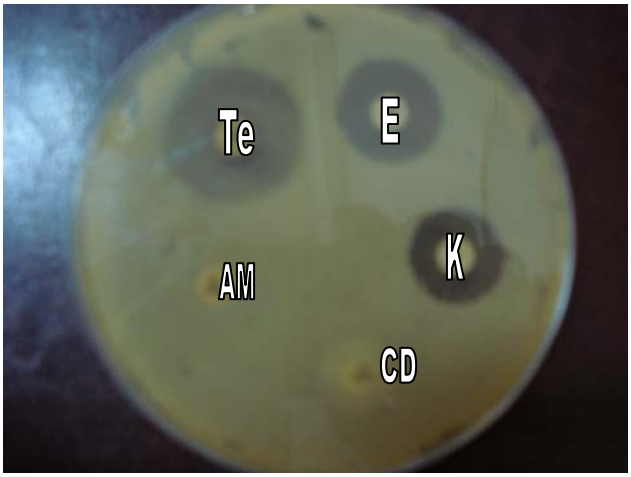
3-5 حساسية بكتريا *H. pylori* للمضادات الحيوية

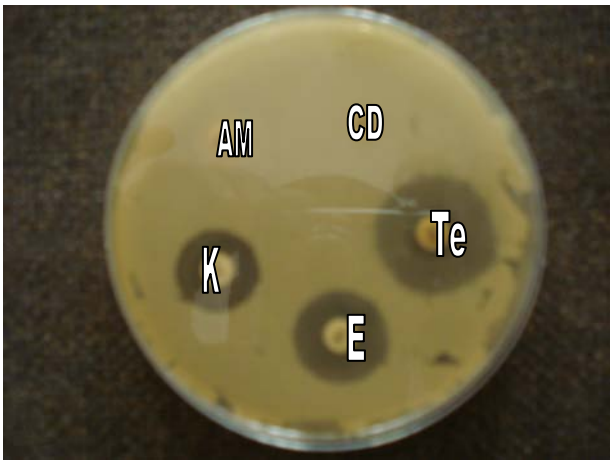
يشير الجدول (5) إلى حساسية الجرثومة الحلزونية تجاه المضادات الحيوية.

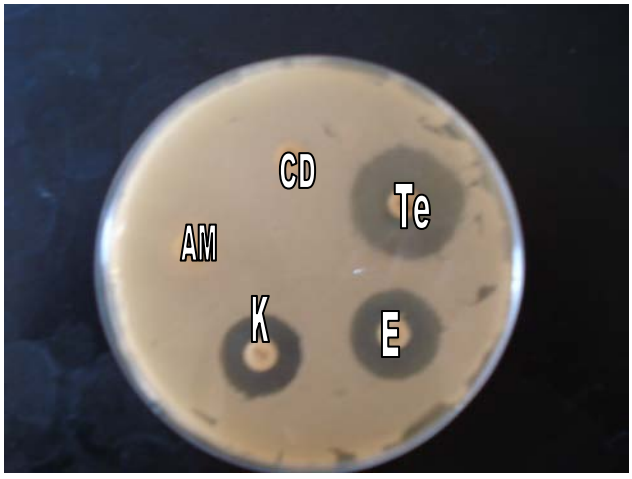
جدول (5): حساسية الجرثومة الحلزونية تجاه المضادات الحيوية

المضادات الحيوية	المختصر	التركيز µg	رقم عزلات *H. pylori* / قطر منطقة التثبيط (ملم)					
			56	37	31	40	28	45
Tetracycline	TE	30	23	23	25	23	22	21
Cefodizine	CDZ	30	R*	R	R	R	R	R
Erthromycine	E	15	16	16	17	16	16	17
Amoxicillin	AMC	30	R	R	R	R	R	R
Kanamycine	K	30	15	15	16	15	16	18

R*= Resistance (**مقاومة**)







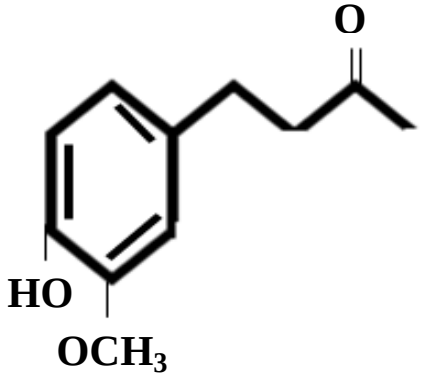
صورة (3) حساسية الجرثومة الحلزونية *H. pylori* تجاه المضادات الحيوية

4- في المائي

أظهرت النتائج المبينة في جدول (1) وجود فعالية تثبيطية لكل من المستخلصين المائي و الكحولي لنبات الزنجبيل ***Zingiber offcinale*** إذ بلغ قطر منطقة التثبيط للمستخلص المائي و الكحولي **17** ملم وذلك لأن نبات الزنجبيل غني بالمركبات الكيميائية الفعالة مثل الزيوت الطيارة و الأحماض الأمينية والأحماض العضوية وبعض الأملاح والفيتامينات [15] قد يحدث تضاد بين هذه المركبات فلا تظهر الفعالية الحيوية الحقيقية للنبات إذ أن المكونات غير الفعالة تؤثر في إمتصاص وإنتشار المكونات الفعالة[16]، و هذا ما أظهرته هذه الدراسة فقد أعطت الزيوت المعزولة من نبات الزنجبيل ***Z. offcinale*** فعالية تثبيطية أعلى مما أعطاه المستخلص المائي و الكحولي للنبات إذ تراوح قطر منطقة التثبيط للعزلات قيد الدراسة بين **(20 – 24)** ملم، بينما أعطى المستخلص الخام فعالية قدرت بـ **16** ملم و هذا يتفق مع ما ذكره [17 و 18] إذ ذكر بأن الفعالية التثبيطية لبعض النباتات تكمن في زيوتها الأساسية، كما ذكر [19] أن الفعالية التثبيطية للزنجبيل ***Z. offcinale*** تكمن في زيوته الطيارة إذ كانت هذه الزيوت فعالة في الحد من تكون القرحة المعدية في الحيوانات المختبرية بنسبة **54.5** %. و قد يعود السبب في فعالية الزيوت المعزولة من الزنجبيل ***Z. offcinale*** إلى إحتواءها على العديد من المركبات مثل التربينات و التربينويدات و الفينولات و الفلافونيدات فأن الفعالية التثبيطية للتربينات و التربينويدات تكمن في خصائصها الوظيفية كونها محبة للدهون **Lipophilic** إذ أنها تتفاعل مع الأجزاء الدهنية في الأغشية الخلوية الجرثومية و بالتالي فأنها تؤثر في آلية التبادل الأيوني [20].

و تحتوي الزيوت الأساسية للزنجبيل على الليمونين **Limonen** و الزنجبرين **Zingebrene** و هي من الهيدروكاربونات التربينية و كذلك مركب **Sesquiter Penoidis** و هو من مركبات السكسوتربينات [21].

أما الفينولات فأنها تمتلك فعالية مضادة للجراثيم الموجبة و السالبة لصبغة كرام إذ أنها تسبب التحطم الكامل للأغشية و الجدران الخلوية للجراثيم [22]، و يمكن أن تعزى فعالية الزيت إلى وجود الحلقة الأروماتية الحاوية على مجموعة الهيدروكسيل **OH** الفينولية القطبية التي تمتلك قابلية التفاعل و الإرتباط بوساطة أواصر هيدروجينية مع المجاميع الفعالة المرافقات الإنزيمية **Coenzyme** للجراثيم [23]. إذ تحتوي الزيوت الأساسية لنبات الزنجبيل على مركب **Zingerone** و هو من مشتقات **Phenyl Propanoid – derived** و يدعى **Vanillyl acetone** و تركيبه الكيمياوي.



4- (4- Hydroxy -3- Methoxyphenyl) 2- butanone. [5]

و هذا ما أكده [19] إذ ذكر أن الفعالية القاتلة للجراثيم في نبات الزنجبيل ***Z. offcinale*** تعود إلى مركبات **Shogaol** و **Zingerone**.

أما الجدول (4) فيوضح التركيز المثبط الأدنى **MIC** لكل من مستخلصات نبات الزنجبيل ***Z. offcinale*** و زيوته الأساسية و قد تراوح بين **(400 – 250) mg/ml** بينما يوضح الجدول (5) حساسية العزلات الجرثومية تجاه المضادات الحيوية، فقد أبدت العزلات حساسية تجاه المضادات **Tetracyclene** و **Erthromycin** و **Kanamycin**، بينما كانت مقاومة لكل من **Cefodizine** و **Amoxicillin**.

عند مقارنة الجداول (1 و 3 و 4) نلاحظ أن مستخلصات الزنجبيل ***Z. offcinale*** قد أعطت تثبيطاً مقارباً لبعض المضادات بينما كان تثبيط الزيوت الأساسية أعلى منها و على ذلك فأنه بالإمكان إستعمال الزيوت الأساسية لنبات الزنجبيل ***Z. offcinale*** لتثبيط الجرثومة الحلزونية ***H. pylori*** بدلاً من المضادات الحيوية و بأقل كلفة و أقل تأثيرات جانبية و ذلك بعد إجراء الدراسات السريرية تفصيلياً.

المصادر

1. WHO, World Health Organization (1996). Supplementary guide lines for manufacture of herbal medicinal product. WHO Tech. Reb. Ser., Geneva Annex; 8: 109 – 113.
2. المياح، عبد الرضا علوان. (2001). النباتات الطبية و التداوي بالأعشاب. جامعة تعز – جامعة البصرة.
3. http://fashion.azyya.com/639.HTML.
4. http://www.Shammel.net/herbs/gorhaa.php.
5. http://en.wikipedia.org/wiki/zengirone.
6. Baranowska, K.; Marekmar, D. and Marian, W. (2002). Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. Z. Nature For Sch.; 57: 478 – 482.
7. Kivanc, M. (1988). Antimicrobial activity of Cortuk species its essential and methyl – eugenol. Dic Nahvung.; 32 (6): 635 – 637.
8. Holt, J. C.; Kriej, H. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T. and William, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology.
9. عطوان، زينة وحيد؛ فاطمة صيوان و فردوس نوري جعفر. (2005). إختبار الفعالية الحياتية لمستخلص زهرة العصفر تجاه الجراثيم و الفطريات. مجلة أبحاث البصرة (العلميات)، 31 (3): 39 – 47.
10. WHO, World Health Organization (1987). Manual for laboratory investigation of acute enteric infection. CCD, 183: 83 – 93.
11. Plummer, D. T. (1971). Introduction on practical biochemistry. Magraw Hill Book Co. LTD., England. Pp. 186 – 190.
12. Harborne, J. B. (1984). Phytochemical methods. 2nd ed. Chapman and Hall. London, UK.

13. National committee for clinical laboratory standards methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. (1997). Approved standard M7-A4. Wayne. PA., USA.

14. الجبوري، محيميد مد الله. (1990). علم البكتريا الطبية. وزارة التعليم العالي و البحث العلمي، جامعة الموصل.

15. السنافي، علي إسماعيل عبيد. (2009). الزنجبيل و خواصه العلاجية. كلية الصيدلة – جامعة تكريت.

16. Balchin, M.; Simmonds, M.; Hart, S. and Deans, S. G. (1999). Agroch-emical and Medicinal usage of essential oils of representative species of the Geraniaceae. J. Appl. Microbiol., 67 (3): 187 – 195.

17. Cowan, M. M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review, 12 (4): 564 – 582.

18. Dorman, H. J. and Deans, S. G. (1999). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. J. Appl. Micro., 88: 308 – 316.

19. http//www.ibtesam.com/vb/showthread-145199/HTML.

20. Knobock, K.; Pauli, A.; Iberi, B.; Wegand, H. and Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. Essen. Oil Res., 1: 119 – 128.

21. www.cobarty.com.

22. Smith – Palmer, A.; Steeart, J. and Frfe, L. (1997). Antimicrobial properties of plant essential oil and essences against five important food – borne pathogen. Appl. Micro., 26: 118 – 122.

23. Dorman, H. J. and Deans, S. G. (1999). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plants volatile oils. J. Appl. Micro., 88: 308 – 316.

Antibacterial Activity Evaluation of *Zingiber offcinale* Extracts against *Helicobacter pylori*

Abstract

In this study, the antimicrobial effect of aqueous alcoholic extract and essential oils extract of Zingiber *offcinale* were assayed against six isolates of *Helicobacter pylori*. The crude extracts gave activity against the tested isolates by the range from 15-18 mm, while the essential oils gave activity higher than crude extract by the range from 20 – 24 mm.

The MIC was determinate by the range from 250 – 400 mg/ml. also the sensitivity was tested towards a number of common antibiotics, the results showed that the *Zingiber offcinale* have activity near the antibiotics.

Key words: *Zingiber offcinale*, Essential oil, antibacteria