تاثير الزيت الاساسي ومكوناته الفعالة لنبات القرنفل *Eugenia caryophyllus* في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام

مثنى جاسم محمد
قسم علوم الحياة-كلية التربية
جامعة الموصل

عمر موسى رمضان
قسم الكيمياء-كلية التربية
جامعة الموصل

رغيد يوسف غزال
قسم الكيمياء-كلية التربية
جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2005/9/19
تاريخ القبول 2006/1/23

ABSTRACT

In this study, the essential oil was isolated from dried flower buds of *Eugenia caryophyllus* (clove), then the eugenol and the acidic compounds were isolated from the essential oil. The inhibiting effect of these compounds were investigated on growth of some bacteria which are: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella typhi*. The steam distillation was used to isolate the essential oil while the chemically active extraction was used to isolate eugenol and neutral compounds. The eugenol was identificated by Thin layer chromatography (TLC) plate and determination the Rate of flow (Rf) of it.

The essential oil showed better inhibiting effect on the all bacteria which was used in this study compared to commercial antibiotics as a control. Also, eugenol was showed an inhibiting effect on the all bacteria which was compared to commercial antibiotics but it's effect was stronger than the effect of essential oil. The neutral compounds have no effect on *Ps. aeruginosa* and *Prot. mirabilis*, but have an inhibiting effect which are less than that indicated for essential oil and eugenol compound compared to a control (Augmentin and Ciprofloxacin).

الخلاصة

تم في هذه الدراسة فصل الزيت الاساسي Essential oil من البراعم الزهرية الجافة Dried flower buds لنبات القرنفل العطاري *Eugenia caryophyllus* وفصل مركب اليوجينول Eugenol وبعض المركبات المتعادلة (Neutral compounds) وهي (Eugenol acetate and α,β-caryophyllene) من الزيت. وحدد التاثير التثبيطي لهذه المركبات في نمو عدد من الجراثيم وهي: *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و

Pseudomonas aeruginosa و *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* و *Salmonella typhi* . اذ استخدمت تقنية التقطير البخاري Steam distillation في فصل الزيت الاساسي، كما استخدمت خاصية الاستخلاص بالفعالية الكيميائية في فصل اليوجينول والمركبات المتعادلة وشخص اليوجينول باستخدام تقنية الطبقة الرقيقة (Thin layer chromatography) (TLC) وحساب قيمة (Rate of flow) (Rf).

اذ اظهر الزيت الاساسي فعالية تثبيطية عالية على جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة مقارنة بعينات السيطرة. كما اظهر اليوجينول ايضا فعالية تثبيطية ضد جميع انواع الجراثيم ولكن اقوى من تاثير الزيت مقارنة بعينات السيطرة.

اما المركبات المتعادلة لم تظهر أي تاثير تثبيطي في جرثومتي *Ps. aeruginosa* و *Prot. mirabilis* في حين اظهرت تاثيرا تثبيطيا ولكن اقل من تاثير اليوجينول والزيت الاساسي مقارنة بعينات السيطرة (Augmentin و Ciprofloxacin).

المقدمة

اسهمت النباتات الطبية وبشكل ملحوظ في تطور الصناعات الدوائية، اذ فصلت وشخصت الكثير من المركبات الطبية من هذه النباتات وتم تصنيعها مختبريا[1]. ان مبدأ عمل بعض الادوية المخلقة صناعيا قد تم استنباطه من المركبات الطبيعية المفصولة من النباتات[2]، ولهذا يعود الفضل للنباتات الطبية ونواتجها الثانوية في التغلب على الكثير من المشاكل الصحية التي يعاني منها بعض الناس[3]، وفي الاونة الاخيرة شاع استخدام النباتات الطبية سواء في الطب الشعبي او في صناعة الادوية وبعض المستحضرات الطبية، كما اعتبر نبات القرنفل العطاري (clove) *Eugenia caryophyllus* من بين اكثر النباتات استخداما في هذا المجال[4]. ويعتبر الفلبين الموطن الاصلي للنبات ومنه انتشرت زراعته في بعض الدول المجاورة مثل الهند وسومطرة وجامايكا والبرازيل وبعض المناطق الاستوائية[5]. ولنبات القرنفل عدة تسميات منها على سبيل المثال لا الحصر Clove و Clovas و Charyophyllus Carophyllus و Ding xiang و Lavanga[6]. وان اصل كلمة (Clove) الانكليزية جاءت من الكلمة اللاتينية (Clavus) والتي تعني (Nail) دلالة على شكل البراعم الزهرية الجافة التي تشبه المسمار[7] ولهذه البراعم رائحة عطرة قوية وطعم لاذع مما جعلها تستخدم في صناعة التوابل[8].

وتحتوي البراعم على كمية لا بأس بها من الزيت الاساسي Essential oil المعروف بزيت القرنفل[9] والذي يشكل نسبة 20% من الوزن الجاف لهذه البراعم[10]. ويحتوي الزيت على (60-95%) Eugenol ، 2-27% Eugenol acetate وكذلك 5-10% α and β-caryophyllene [9]. واستخدم الزيت في صناعة غسول الاسنان وعدد من المراهم التي تعنى بمعالجة الم الاسنان[11]. ولزيت القرنفل استخدامات طبية عديدة منها استخدامه في تطهير وتخدير قنوات جذور الاسنان[12]، وتاثيره الفعال في

معالجة بعض الامراض المعوية مثل سوء الهضم، قتل الديدان المعوية والاسهال، واستخدم كمشهي عند اضافته للطعام وبعض الحلويات[13]. كما يتميز بفعالية بايولوجية عالية في تثبيط نمو عدد لا بأس به من الجراثيم، اذ عزى العلماء السبب في ذلك الى احتوائه على مادة Eugenol التي تشكل نسبة عالية من الزيت تصل احيانا الى 95%[5].

ان الطب الشعبي الذي اعتمد بالدرجة الاساس في علاجه على النباتات كان ولا زال مصدرا غنيا لم يكتشف الا القليل منه[16]. ومن هنا ازداد الاهتمام وبشكل واضح بالدراسات المعنية بفصل وتشخيص المركبات الفعالة من النباتات واستخدامها بشكل علمي في صناعة الادوية[17].

وفي دراستنا الحالية على البراعم الزهرية الجافة Dried flower buds لنبات القرنفل العطاري (clove) *Eugenia caryophyllus* فصل الزيت الاساسي مباشرة من النبات وتم تجزئته للحصول على Eugenol وبعض المركبات المتعادلة واستخدامها في تثبيط نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام وهو الهدف من الدراسة.

المواد وطرائق العمل

انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة:

Bacillus subtilis
Staphylococcus aureus
Pseudomonas aeruginosa
Escherichia coli
Proteus mirabilis
Salmonella typhi

تم الحصول على انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة من قسم علوم الحياة-كلية التربية، فيما عدا جرثومتي *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* تم الحصول عليهما من قسم علوم الحياة-كلية العلوم.

جمع النبات وتصنيفه:

استخدم في هذه الدراسة البراعم الزهرية الجافة لنبات القرنفل العطاري، اذ تم الحصول عليها من احد المعاشب المحلية في بيع النباتات الطبية، وجرى التأكد من صنف النبات في كلية الزراعة والغابات وكلية العلوم / قسم علوم الحياة بالاعتماد على مصادر تصنيف النبات[18].

فصل الزيت الاساسي لنبات القرنفل:

تم فصل الزيت الاساسي لنبات القرنفل باستخدام طريقة التقطير البخاري Steam distillation ، اذ تم سحق 250 غم من البراعم الزهرية الجافة ثم وضع المسحوق في دورق دائري يعود لجهاز التقطير البخاري ومرر عليه بخار الماء المقطر ومن ثم جمعت المادة المتقطرة وهي عبارة عن زيت وماء، وكررت العملية اكثر من مرة لنفس المسحوق النباتي، وفي كل مرة تستغرق العملية من 2-3 ساعات للتأكد من الحصول على جميع الزيت الموجود في المسحوق النباتي. وبعد اتمام عملية التقطير تم فصل الماء عن الزيت باستخدام قمع الفصل، اما الطبقة المائية فتهمل وتؤخذ الطبقة الزيتية التي تحتوي على Eugenol وكذلك عدد من المركبات الطبيعية[19].

فصل اليوجينول Eugenol :

تم فصل اليوجينول باستخدام طريقة كيميائية، اذ استخلص الزيت الاساسي الذي تم فصله في الخطوة السابقة باستخدام المحلول المائي لهيدروكسيد الصوديوم، تفصل الطبقة المائية وتحمض للحصول على اليوجينول. اما الطبقة العضوية التي تحتوي على المركبات المتعادلة (α,β-caryophyllene, eugenol acetate) فتفصل وتحفظ لحين الاستخدام[20].

تعقيم المركبات المفصولة:

اذيب (1) غم من المركبات المفصولة في (5) سم^3 من مادة ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO) للحصول على تركيز (200) ملغم/مل وعقم المزيج بطريقة البسترة وبدرجة حرارة (62) °م لمدة (10) دقائق[21].

اختبار الفعالية التثبيطية:

اتبعت طريقة Levne وآخرون (1997)[22] المعتمدة على طريقة (Vandepitte) وآخرون (1991)[23]. اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات مفردة من الجراثيم الستة التي سبق ذكرها اعلاه كلا على حدى وحضنت بدرجة (37 °م) مدة (18-24) ساعة، ثم خفف العالق الجرثومي بعد ذلك بالمحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline بالمقارنة مع انبوبة الاختبار القياسية ماكفرلاند رقم (1) Macferland No. 1 بحيث يحتوي على (10^8) خلية/سم^3 من العالق الجرثومي ونشر على سطح وسط الاكار المغذي الاعتيادي باستخدام الناشر الزجاجي، وحضنت الاطباق في الحاضنة لمدة (30) دقيقة لكي يحصل التشرب، ولدراسة الفعالية المضادة للمواد المفصولة من النبات على نمو الجراثيم فقد حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatman No. 1) بقطر (6) ملم المشبعة بتراكيز مختلفة من المواد المراد اختبارها..ثم ثبتت الاقراص بواسطة ملقط معقم وحضنت بدرجة حرارة (37 °م) مدة (18) ساعة. بعدها

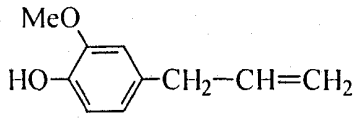
تم قياس مناطق التثبيط ومقارنتها مع المضادات الحيوية القياسية (Ciprofloxacin, Augmentin) كعينة سيطرة موجبة[24].

كشف وتشخيص المركبات الفعالة المفصولة من الزيت الاساسي:

اعتمدت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC لقياس سرعة الجريان (Rf) لكشف وتشخيص مركب اليوجينول المفصول من الزيت الاساسي للنبات باستخدام نظام المحلول المتكون من (n-hexane:$CHCl_3$) بنسبة (3:2). وتم اظهار البقعة باستخدام كاشف (Vanillin-H_2SO_4) وتم التأكد من تشخيص مركب اليوجينول عند مقارنة (Rf) العينة المفصولة من النبات مع (Rf) العينة القياسية[25].

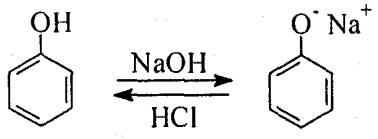
النتائج والمناقشة

حدد في هذه الدراسة التاثير التثبيطي لليوجينول النقي والمركبات المتعادلة المفصولة من البراعم الزهرية الجافة لنبات القرنفل العطاري (clove) *Eugenia caryophyllus* على ستة انواع من الجراثيم. واظهرت الدراسة ان للمركبات المفصولة من النبات فعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم المستخدمة في الدراسة مقارنة مع المضادين الحيويين (Augmentin و Ciprofloxacin). وقد تم فصل اليوجينول من الزيت الاساسي ذو الصيغة التركيبية الاتية:



Eugenol

اذ اعتمدت طريقة الفصل على الفعالية الكيميائية التي يمتاز بها اليوجينول من خلال الاستخلاص بمذيب عضوي مع الوسط القاعدي فان اليوجينول يكون ذائبا في الطبقة المائية وعندما يكون الاستخلاص بمذيب عضوي مع الوسط الحامضي فانه سيذوب في الطبقة العضوية وهذا ما يعرف بالاستخلاص بالفعالية الكيميائية، كما موضح في المعادلة الاتية:



وهي الطريقة الاساسية المستخدمة لفصل اليوجينول[26].

اظهر الزيت الاساسي للنبات تاثيرا تثبيطيا ضد جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة، اذ اظهر الزيت اعلى تاثير تثبيطي على جرثومتي *S. typhi* و *E. coli* مقارنة بالانواع الاخرى من

الجراثيم، كما اظهر الزيت تاثيرا تثبيطيا على جرثومتي *Staph. aureus* و *B. subtilis* اقل من تاثير الجراثيم انفة الذكر، وفي نفس الوقت اكبر من تاثير عينات السيطرة. واخيرا اظهر الزيت تاثيرا تثبيطيا على جرثومتي *Prot. mirabilis* و *Ps. aeruginosa* اقل من تاثيره على الجراثيم الاخرى واكبر من تاثير عينات السيطرة على نفس الجراثيم، وكما مبين في الجدول (1).

اما اليوجينول فبدى تاثيره واضحا على جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة الحالية، اذ اظهر تاثيرا تثبيطيا متساوي على جرثومتي *Staph. aureus* و *S. typhi* وهو اكبر من تاثيره على انواع الجراثيم الاخرى. كما اظهر اليوجينول تاثيرا تثبيطيا متفاوتا ضد الجراثيم *E. coli* و *B. subtilis* و *Prot. mirabilis* و *Ps. aeruginosa* على التوالي وهو اكبر من تاثير عينات السيطرة على نفس الانواع كما مبين في الجدول (2).

واخيرا اظهرت المركبات المتعادلة (α,β-cryophyllene, eugenol acetate) تاثيرا تثبيطيا متفاوتا على الجراثيم، اذ ظهر اعلى تاثير تثبيطي لهذه المركبات على جرثومة *B. subtilis* ، اما جرثومتي *Staph. aureus* و *E. coli* فقد كان تاثير المركبات المتعادلة عليهما متساوي. اما جرثومة *S. typhi* فقد كانت اقل الجراثيم تاثرا بهذه المركبات، فيما لم يظهر أي تاثير للمركبات المتعادلة على جرثومتي *Ps. aeruginosa* و *Prot. mirabilis* مقارنة بعينات السيطرة Augmentin و Ciprofloxacin كما مبين في الجدول (3).

وعند المقارنة بين التاثير التثبيطي لكل من الزيت الاساسي واليوجينول والمركبات المتعادلة مع بعضها البعض وكذلك مع عينات السيطرة المستخدمة في الدراسة. لوحظ ان اليوجينول كان تاثيره على الجراثيم *B. subtilis* و *Staph. aureus* و *Ps. aeruginosa* و *Prot. mirabilis* افضل من تاثير الزيت الاساسي مقارنة بعينات السيطرة. اما الزيت الاساسي فقد كان تاثيره على جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة اكبر من تاثير المركبات المتعادلة مقارنة بعينات السيطرة، لذا يعد اليوجينول اكثر المركبات تاثيرا على الجراثيم يليه الزيت الاساسي ثم المركبات المتعادلة كما مبين في الجدول (4).

يعد الزيت الاساسي المفصول من البراعم الزهرية لنبات القرنفل من الزيوت المستخدمة في المجال الطبي وبشكل واسع فقد ثبت ان هذا الزيت يمتاز بفعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم[27،28]، ويعزى السبب في قابليته الكبيرة في تثبيط نمو الجراثيم لاحتوائه على اليوجينول Eugenol الذي يمثل نسبة 60-95% من الزيت الاساسي، اذ يعتبر اليوجينول من المركبات الفينولية التي تتميز بفعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم[29،30]. كما يحتوي الزيت الاساسي على عدد من المركبات المتعادلة التي لها القابلية في القضاء على الجراثيم[31].

الجدول (1): الفعالية التثبيطية للزيت الاساسي في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Conc. mg/ml	*B. subtilis*	*Staph. aureus*	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	*Prot. mirabilis*	*S. typhi*
200	22	23	18	24	20	25
100	18	20	13	17	15	19
50	10	15	10	12	12	15
25	7	9	-	9	7	11
12.5	-	7	-	-	-	7

الجدول (2): الفعالية التثبيطية لمركب اليوجينول Eugenol في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Conc. mg/ml	*B. subtilis*	*Staph. aureus*	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	*Prot. mirabilis*	*S. typhi*
200	23	25	20	24	22	25
100	19	20	17	18	17	20
50	15	12	13	13	14	17
25	10	8	9	7	10	12
12.5	7	-	-	-	-	7

الجدول (3): الفعالية التثبيطية للمركبات المتعادلة في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Conc. mg/ml	*B. subtilis*	*Staph. aureus*	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	*Prot. mirabilis*	*S. typhi*
200	16	15	-	15	-	13
100	12	10	-	9	-	10
50	-	7	-	-	-	7
25	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-

الجدول (4): الفعالية التثبيطية للزيت الاساسي، اليوجينول والمركبات المتعادلة عند تركيز (200) ملغم/سم^3 في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام مقارنة بعينات السيطرة (قطر دائرة الثبيط مقاس بالملم)

Compound	*B. subtilis*	*Staph. aureus*	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	*Prot. mirabilis*	*S. typhi*
Essential oil	22	23	18	24	20	25
Eugenol	23	25	20	24	22	25
Neutral compounds	16	15	-	15	-	13
Augmentin (30 µg)	19	20	-	-	-	-
Ciprofloxacin (5 µg)	-	-	16	18	18	20

المصادر

1. Abeywichrama K. and Bean G.A.: J. Mycopathologia, 113: 187-190, (1991).
2. Kostova I., Dinchev D., Rentsch G.H. and Dimitrov V.: Z. Naturforsch [c]: 57(1-2): 33-38, (2002).
3. Ody P., The Complete Guide Medicinal Herbal, London, Dorling Kindersley, p. 223, (2000).
4. Kramer R.E.: Journal of the American Oil and Chemical Society, 62: 111-113, (1985).
5. Iwu M.M., Handbook of African Medicinal Plants, Boca Raton, FL, CRC Press, (1993).
6. Blaschek W., Hagers Handbuch der Pharmazeutischun Praxis, Folgeband 2: Drogen A-K, 5th ed., Berlin, Springer-Verlag, (1998).
7. British Herbal Pharmacopoeia, London, British Herbal Medicine Association, (1996).
8. African Pharmacopoeia, Vol. 1, 1st ed., Lagos Organization of African Unity, scientific Technical and Research Commission, (1985).
9. Bisset N.G.: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Baca Raton, FL, CRC Press, (1994).
10. Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Paris, Lavoisier, (1995).
11. Perez C. and Anesini C.: American Journal of Chinese Medicine, 22: 169-174, (1994).
12. Fitzpatrick F.K.: J. Antibiotics and Chemotherapy, 4: 528, (1954).
13. Al-Khayat M.A. and Blank G.: Journal of Food Science, 50: 971-980, (1985).
14. Sharma A.: Journal of Agricultural Food and Chemistry, 32: 1061-1063, (1984).
15. Himejima A.: Journal of Natural Productd, 55: 620-625, (1992).
16. Yan W., Ohtani K. and Kasai R.: J. Phytochemistry, 42: 1417-1422, (1996).
17. Borke C.A.: Aust. Vet. J., 69: 163-165, (1992).
18. Bailey L.H., Manual of Cultivated Plant, 15th ed., Macmillan Publishing Co., New York, USA, (1977).
19. Donald L.P., Gary M.L., Georgs S.K. and Randall G.E., Introduction to Organic Laboratory Techniques Amiroscale Approach, Saunders College Publishing, pp. 48-667, (1990).
20. Palleros D.R., Experimental Organic Chemistry, John Wiley and Sons, Inc., New York, (2000).
21. Riose J.L., Recio M.C. and Villar A., J. Ethnopharmacol., 21: 139-152, (1987).
22. Bauer A.W., Kirbay W.A.M., Sherris J.S. and Turk M., Amer. J. Clin. Pathol., 45: 493-496, (1966).

23. Todar K., J. Med. Microbiol., 1-9, (1991).
24. Vandpitte J., Engloback K., Piote P. and Heuk C., World Health Organization, Geneva, (1991).
25. Harborne J.B., Phytochemical Methods, Halsted Press, John Wiley and Sons, New York, (1973).
26. Lehman J.W., Operational Organic Chemistry: A Problem-Solving Approach to the Laboratory Course, 3rd ed., Prentice Hall, Saddle River, New York, (1999).
27. Breslow R., J. Chem. Educ., 75: 705-717, (1998).
28. Agosta W.C., J. Chem. Educ., 74: 857-860, (1997).
29. Himejima A. and Kubo I., Journal of Natural Products, 55: 620-625, (1992).
30. Deans S.G. and Svoboda K.P., Journal of Horticultural Science, 63: 503-508, (1988).
31. Kubo I., Journal of Natural Products, 57: 9-17, (1994).