دراسة تاثير مركب السينامالديهايد الفعال بايولوجيا المفصول من نبات *Cinnamomum zeylanicum* في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام

مثنى جاسم محمد	عمر موسى رمضان	قيدار سالم جرجيس
قسم علوم الحياة - كلية التربية	قسم الكيمياء - كلية التربية	قسم الكيمياء - كلية التربية
جامعة الموصل	جامعة الموصل	جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2005/5/30 — تاريخ القبول 2005/12/5

ABSTRACT

This research work was aimed to separate ethanolic extract and cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum*. The isolated compounds were used to study the inhibiting effect on the growth of bacteria. These are *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Salmonella typhi, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. The isolation was performed by using column chromatography packed with activated silica gel. Furthermore, the compound was identificated by TLC plate technique and infrared spectroscopy (IR). Ethanolic extract showed strong inhibiting effect on *B. subtilis* and *Ps. aeroginosa* as compared with control samples (Tetracycline and Chloramphenicol). It showed effect inhibitory on *E. coli*, *Salmonella typhi* and *Proteus mirabilis* less than control samples. Also no clear effects on *Staph. aureus* and *Strept. Pyogenes* was indicated. Cinnamaldehyde showed stronger effects (compared with ethanolic extract) on *E. coli*, *Ps. aeroginosa*, *Salmonella typhi* and *Ptroteus mirabilis* in comparison to control samples. It showed effect on *Strept. pyogenes* equal to that of control samples, but no effects on *Staph. aureus* were observed.

الخلاصة

تم في هذه الدراسة فصل المستخلص الايثانولي والسينامالديهايد من قلف اشجار القرفة *Cinnamomum zeylanicum* (bark) وتحديد التاثير التثبيطي لهذه المركبات في نمو عـــدد مـــن الجـــراثيم وهـــي *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Proteus*

Staphylococcus aureus و *Bacillus subtilis* و *Salmonella typhi* و *mirabilis* و *Streptococcus pyogenes* واستخدم المضادين الحيويين (Tetracycline و Chloramphenicol) اذ تمت عملية الفصل باستخدام تقنية كروماتوكرافيا العمود على هلام السليكا. وشخص مركب السينامالديهايد باستخدام تقنية الطبقة الرقيقة (TLC plate) وكذلك طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) ، وقد اظهر المستخلص الايثانولي ومركب السينامالديهايد تاثيرا واضحا في الجراثيم المستخدمة قيد الدراسة، اذ اظهر المستخلص الايثانولي تاثير كبير على جرثومتي *B. subtilis* و *Ps. aeruginosa* مقارنة بعينات السيطرة (Tetracycline, Chloramphenicol) بينما اظهر تاثير تثبيطي اقل على الجراثيم *E. coli* و *Salmonella typhi* و *Proteus mirabilis* مقارنة بعينات السيطرة. فيما لم يظهر المستخلص أي تاثير في جرثومتي *Staph. aureus* و *Strept. Pyogenes* . بينما اظهر السينامالديهايد تاثيرا اكبر (مقارنة بالمستخلص الايثانولي) في الجراثيم *E. coli* و *Ps. aeruginosa* و *Salmonella typhi* و *Proteus mirabilis* مقارنة بعينات السيطرة. وكذلك اظهر هذا المركب تاثيرا تثبيطيا في جرثومة *Strept. Pyogenes* اعلى من تاثير عينات السيطرة. بينما لم يظهر المركب أي تاثير على جرثومة *Staph. aureus* .

المقدمة

لقد توسعت الدراسات المهتمة بالمملكة النباتية بوصفها احد اهم المصادر الطبيعية المتجددة للمركبات العضوية والبايولوجية التي تدخل في صناعة العقاقير. وتاتي اهمية هذه المركبات كونها خالية من أي تاثيرات جانبية تحدثها مثيلاتها المخلقة كيمياويا(1).

وتتكون هذه المواد احيانا نتيجة لاسباب مرضية يصاب بها النبات مما يؤدي الى حدوث افرازات لمواد طبيعية نادرة يتعذر على الانسان في كثير من الحالات تخليقها مختبريا بسبب وجود عدد من الانزيمات والهرمونات المرافقة للعمليات الايضية في الطبيعة(2).

تمتاز المواد التي يتم الحصول عليها من النباتات الطبية باستقرارية عالية والوان زاهية وروائح مقبولة وملائمة في الاستخدام(3).

ان الاهتمام بالنباتات الطبية بوصفها موارد اساسية للمواد الكيميائية التي تدخل في صناعة الادوية والعقاقير ازدادت بنسبة كبيرة بسبب النمو المتزايد للطلب على الادوية وتخليقها بصورة كيمياوية(4).

اظهرت الفينولات الاحادية والمتعددة ومعوضاتها الكاربوكسيلية التي تم الحصول عليها من الزيوت المفصولة من النباتات الطبية عامة والقرفة خاصة فاعلية كبيرة تجاه الاحياء المجهرية وان هذه الفينولات حامض اورثو-هيدروكسي بنزويك وحامض السيناميك

وغيرها(5). ولقد اوضحت بعض دراسات المجمع الاوربي المتعلقة بتقييم الزيوت المستخرجة من النباتات الطبية ان نبات القرفة ينتج زيتا بنسبة (0.5-2.5%) ويحتوي هذا الزيت في تركيبه على السيناماالديهايد بنسبة (70-76%) و eugenol (5-18%) و safrol (2%) فضلا عن وجود حامض السيناميك وخلات السيناميك واورثو-فينوكسي سينامليديهايد بنسب متفاوتة(6). واكد الباحث Sakariah وجماعته(5) ان مكونات زيت نبات القرفة المفصول يحتوي على خلات السينامون والسينامليديهايد والكافور. كما ثبت ان زيت القرفة يحتوي على التربينات بانواعها المختلفة ومشتقاتها الاوكسجينية(5،6).

كما اظهرت دراسة اخرى قام بها Jennings and Shibamoto(7) ان اخشاب القرفة تعطي زيتا شبيها بذلك المنتج من جذورها وهو غني بالكافور والسينامليديهايد اذ يمتاز زيت الكافور بكونه زيتا عطريا ناعم الملمس بنكهة البهارات ومذاق حلو فضلا عن رائحته النفاذة.

ولقد اشارت مجموعة من الدراسات الى احتواء كثير من النباتات الطبية ومنها نبات القرفة على زيوت اساسية تضم في تراكيبها مواد مضادة للاحياء المجهرية(8). اذ اجريت العديد من الدراسات على الزيوت المفصولة من عدد من النباتات الطبية وخصوصا زيت نبات القرفة لتحديد مدى فاعليتها التثبيطية على عدد من الاحياء المجهرية المرضية وامكانية استغلالها في السيطرة على التلوث المايكروبي الذي يصيب بعض المنتوجات الغذائية المصنعة والمعلبة وبشكل آمن ومستقر من دون حدوث أية تاثيرات جانبية لهذه الزيوت على المواد الغذائية المصنعة(9).

ومن خلال دراستنا الحالية على قلف اشجار القرفة *Cinnamomum zeylanicum* (bark) تم استخلاص نبات القرفة مباشرة وتمت تجزئته. وهدف البحث الى بيان مدى فعالية المركبات المفصولة من النبات على نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام.

مواد وطرائق العمل

انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة:

استخدمت في هذه الدراسة اربعة انواع من الجراثيم السالبة لصبغة كرام وهي:

Pseudomonas aeruginosa
Escherichia coli
Proteus mirabilis
Salmonella typhi

واستخدمت ايضا ثلاث انواع من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وهي:

Bacillus subtilis
Staphylococcus aureus
Streptococcus pyogenes

تم الحصول على كافة الانواع الموجبة والسالبة لصبغة كرام من قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل ماعدا النوع *Streptococcus pyogenes* تم الحصول عليه من كلية الطب البيطري / جامعة الموصل.

جمع وتصنيف النبات:

استخدم في هذه الدراسة قلف اشجار القرفة، حيث تم الحصول على النبات من الاسواق المحلية. وتم التحقق من صنف النبات المستخدم في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/جامعة الموصل وكلية الزراعة والغابات بالاعتماد على مصادر تصنيف النبات(10،11).

تحضير المستخلصات الكحولية الخام:

حضرت المستخلصات باستخدام ثلاث انواع من المذيبات العضوية وهي (ايثر بترولي (60–80 °م) والكلوروفورم والايثانول) واتبعت طريقة Grand et al. (1998)(12) في تحضير المستخلصات. اذ تمت عملية الاستخلاص بسحق النبات وخلطه مع المذيب بنسبة (1 غم/10 سم^3) داخل حمام ثلجي وترك في الثلاجة مدة (24 ساعة) ورشح خلال قمع بوخنر ثم بخر المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار. واجريت العملية اعلاه باستخدام المذيبات العضوية الثلاثة على التوالي على مسحوق النبات نفسه.

فصل المركبات الفعالة بايولوجيا من المستخلص الخام:

تم فصل مركب السينامالديهايد من المستخلص الايثانولي للنبات وذلك بعد تبخير الايثانول ومن ثم اذابته بالايثر واستخلاصه بواسطة محلول من هيدروكسيد الصوديوم. تهمل الطبقة المائية وترج طبقة الايثر مع محلول بيكبريتيت الصوديوم ثم تفصل الطبقة المائية وتحمض باستخدام حامض الهيدروكلوريك المخفف للحصول على مركبات الكاربونيل (السينامالديهايد).

استخدام عمود الفصل الكروماتوكرافي (هلام السليكا mesh 60-120) لفصل المركبات الفعالة بايولوجيا:

استخدم عمود الفصل الكروماتوغرافي على هلام السليكا لفصل المركبات الفعالة، اذ تم غسل عمود الفصل بالمذيبات الاتية: الايثر البترولي، الايثر البترولي–الكلوروفورم (V/V 1:1) والكلوروفورم–الميثانول (V/V 1:1) على التوالي. ثم ركزت المستخلصات المفصولة بوساطة جهاز المبخر الدوار(13).

الكشف عن المركبات الفعالة بايولوجيا باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC):

تم الكشف عن المركبات الفعالة بايولوجيا باستخدام تقنية (TLC) ، اذ تم الكشف عن مركب السينامالديهايد باستخدام نظام المحلول المتكون من حامض الخليك-الكلوروفورم (V/V 9:11) وتم اظهار البقع بواسطة كاشف بلورات اليود(18).

تشخيص المركبات المفصولة:

تم تشخيص مركب السينامالديهايد باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) ومقارنته مع طيف الاشعة تحت الحمراء للعينة القياسية لنفس المركب(19) باستخدام جهاز Infrared Spectrophotometer Model Tensor 27 Bruker Co., Germany .

تعقيم المستخلصات المفصولة:

تم اذابة المركب المفصول في مادة ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO) بنسبة (V/W 5:1) والذي استخدم في تحضير التراكيز الاخرى لاحقا. وعقم المزيج بطريقة البسترة وبدرجة حرارة (62 °م) لمدة (10 دقائق)(14).

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات المفصولة باستخدام طريقة اختبار الحساسية:

اتبعت طريقة (Bauer *et al.*, 1966)(15) وذلك باضافة (1) سم^3 من المستخلص المفصول من النبات المحضر والمعقم الى قنينة حاوية على (100) قرص معقم(16). ثم ثبتت الاقراص بطريقة معقمة على اطباق الوسط المغذي الملقح بالجراثيم قيد الدراسة وحضنت الاطباق مباشرة عند درجة حرارة (37) ^{o}م لمدة (14-16) ساعة. واستخدمت طريقة (Vandepitte *et al.*, 1991)(17) لبيان الحساسية للمستخلصات المفصولة التي تعتمد على قطر دائرة التثبيط. واستخدمت المضادات الحيوية (Chloramphenicol و Tetracyclin) كعينات سيطرة.

النتائج والمناقشة

حدد في هذه الدراسة التاثير التثبيطي للمستخلص الايثانولي ومركب السينامالديهايد المفصول من نبات القرفة *Cinnamomum zeylanicum* في نمو سبعة انواع من الجراثيم الواسعة الانتشار *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* و *Salmonella typhi* و *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes*. وتبين من خلال هذه الدراسة ان المستخلص الايثانولي والسينامالديهايد لها فعالية تثبيطية كبيرة على الجراثيم المستخدمة قيد الدراسة مقارنة مع المضادات الحيوية (Chloramphenicol و Tetracyclines) .

وبعد الحصول على المستخلص الايثانولي للنبات تم تجزئته باستخدام تقنية كروماتوكرافيا العمود بواسطة هلام السليكا وكشف عن المواد الناتجة من عملية التجزئة باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC plate وحسبت قيمة (Rf) للمركب المفصول ومقارنته مع قيمة (Rf) للعينة القياسية لنفس المركب وعززت هذه الكشوفات باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) تبين ان المركب المفصول من العمود هو السينامالديهايد.

اذ اظهر المستخلص الايثانولي تاثيرا تثبيطيا ضد الجراثيم *B. subtilis* و *Ps. aeroginosa* مساوية لتاثير عينات السيطرة، في حين اظهر هذا المستخلص تاثير اقل من تاثير المضادات الحيوية على الجراثيم *Proteus mirabilis* و *Salmonella typh.* و *E. coli* . ولم يظهر أي تاثير ضد جرثومتي *Strept. pyogenes, Staph aureus* ، كما مبين في الجدول (1).

واكدت دراسة Lyoo وجماعته(20) ان مجموعة المركبات الفينولية التي يحتويها المستخلص الفينولي لنبات القرفة لها فعالية تثبيطية على الجراثيم لما لهذه المركبات من خاصية النفوذ الى داخل الخلية البكتيرية ثم احداث اضرار داخل السايتوبلازم وتحطيم عدد من البروتينات الموجودة في الخلية ثم موت الخلية.

واظهر السينامالديهايد تاثيرا تثبيطيا كبيرا على الجراثيم *E. coli* و *Ps. aeruginosa* و *Salmonella typhi* و *Prot. mirabilis* اكبر من تاثير المضادات الحياتية المستخدمة قيد الدراسة على نفس البكتريا. وكذلك اظهر المركب تاثيرا تثبيطيا على *Strept. pyagenosa* اعلى من تاثير المضادات الحيوية. وفيما اظهر السينامالديهايد تاثيرا تثبيطيا على جرثومة *B. subtilis* مساوي لتاثير المضاد الحيوي (Chloramphenicol) . فيما لم يظهر السينامالديهايد أي تاثير على جرثومة *Staph. aureus* كما مبين في الجدول (2).

وعند المقارنة بين التاثير التثبيطي للمستخلص الايثانولي والسيناماالديهايد يلاحظ ان السيناماالديهايد كانت له فعالية تثبيطية اكبر من فعالية المستخلص كما مبين في الجدول (3).

وتميز السيناماالديهايد بوزن جزيئي كبير اهله لامتلاك فعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم(21)، كما يعمل السيناماالديهايد على ايقاف عدد من العمليات الايضية داخل الخلية ولهذا فان الزيوت الطيارة الغنية بالسيناماالديهايد تستخدم كمضادات بكتيرية وفطرية قوية وخصوصا ضد الانواع الاتية *Salmonella typhi* و *E. coli* و *B. subtilis* و *Ps. aeruginosa* (5).

ويمكن توضيح قيم الاشعة تحت الحمراء (IR) للسيناماالديهايد المفصول وذلك من خلال القيم الاتية: حيث اظهر الطيف امتصاص مط اصرة (C-H) الاوليفينية عند ($3000\ cm^{-1}$) . وكذلك اعطت حزمة امتصاص مط عند ($1432\text{-}1606\ cm^{-1}$) تعود للنظام الارروماتي، وكذلك حزمة امتصاص مط عند ($1765\ cm^{-1}$) تعود لمجموعة الكاربونيل المقترنة مع الاصرة المزدوجة. وحزمة امتصاص مط الاصرة (C=C) المقترنة مع كل من مجموعة الكاربونيل من جهة وحلقة الفنيل من جهة اخرى عند ($1638\ cm^{-1}$) . وكذلك حزمة انحناء للاصرة المزدوجة عند ($795\ cm^{-1}$) وحزمة انحناء للنظام الاروماتي عند ($850\ cm^{-1}$) وكما مبين في الشكل (1) ومقارنته مع العينة القياسية لنفس المركب في الشكل (2).

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

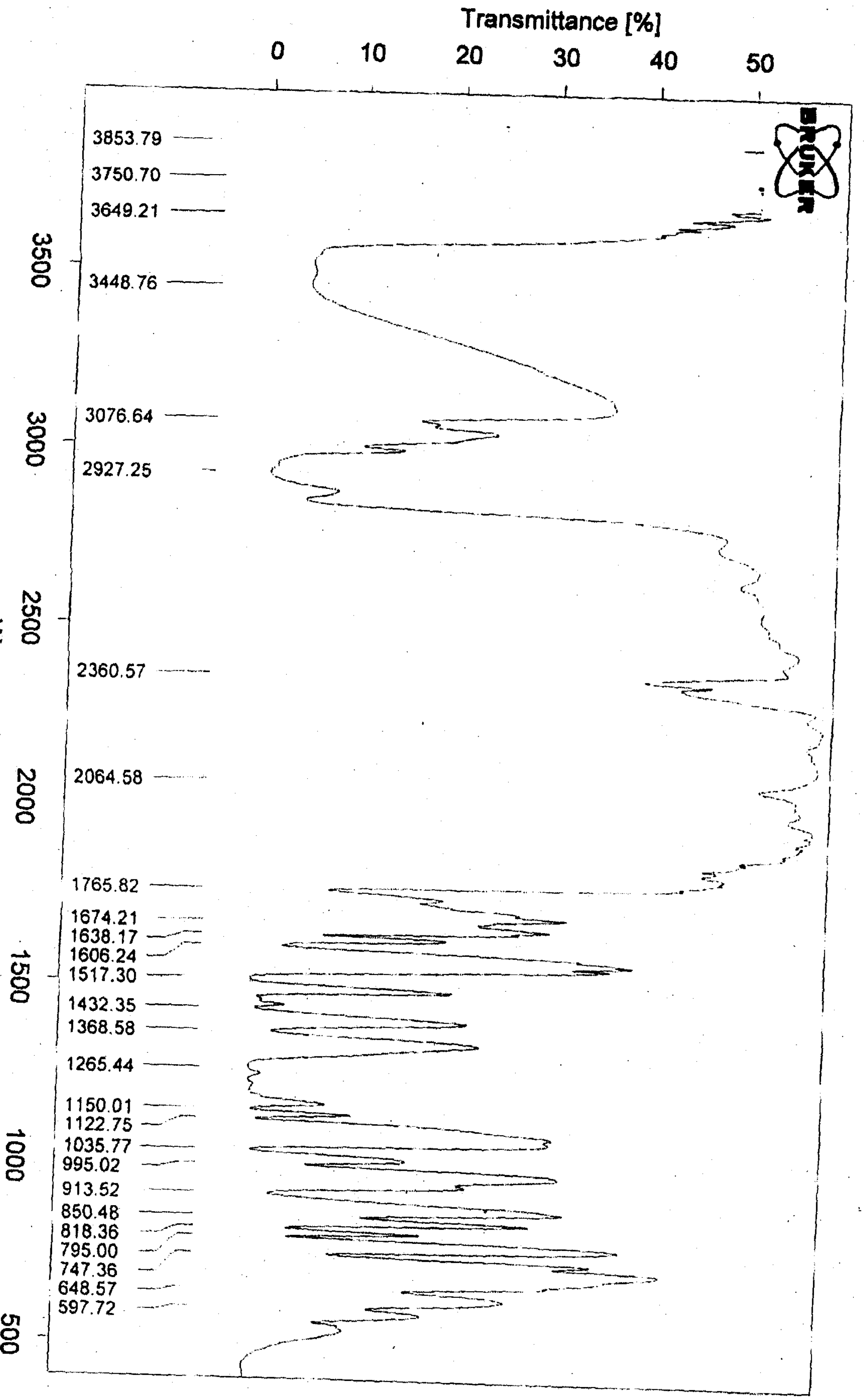
Conc. (mg/ml)	Ps. aeruginosa	E. coli	Prot. mirabilis	S. typhi	B. subtilis	Staph. aureus	Strept. pyogenes
200	18	17	15	16	19	-	-
100	13	15	13	8	17	-	-
50	10	13	11	7	15	-	-
25	-	9	-	-	9	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-

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

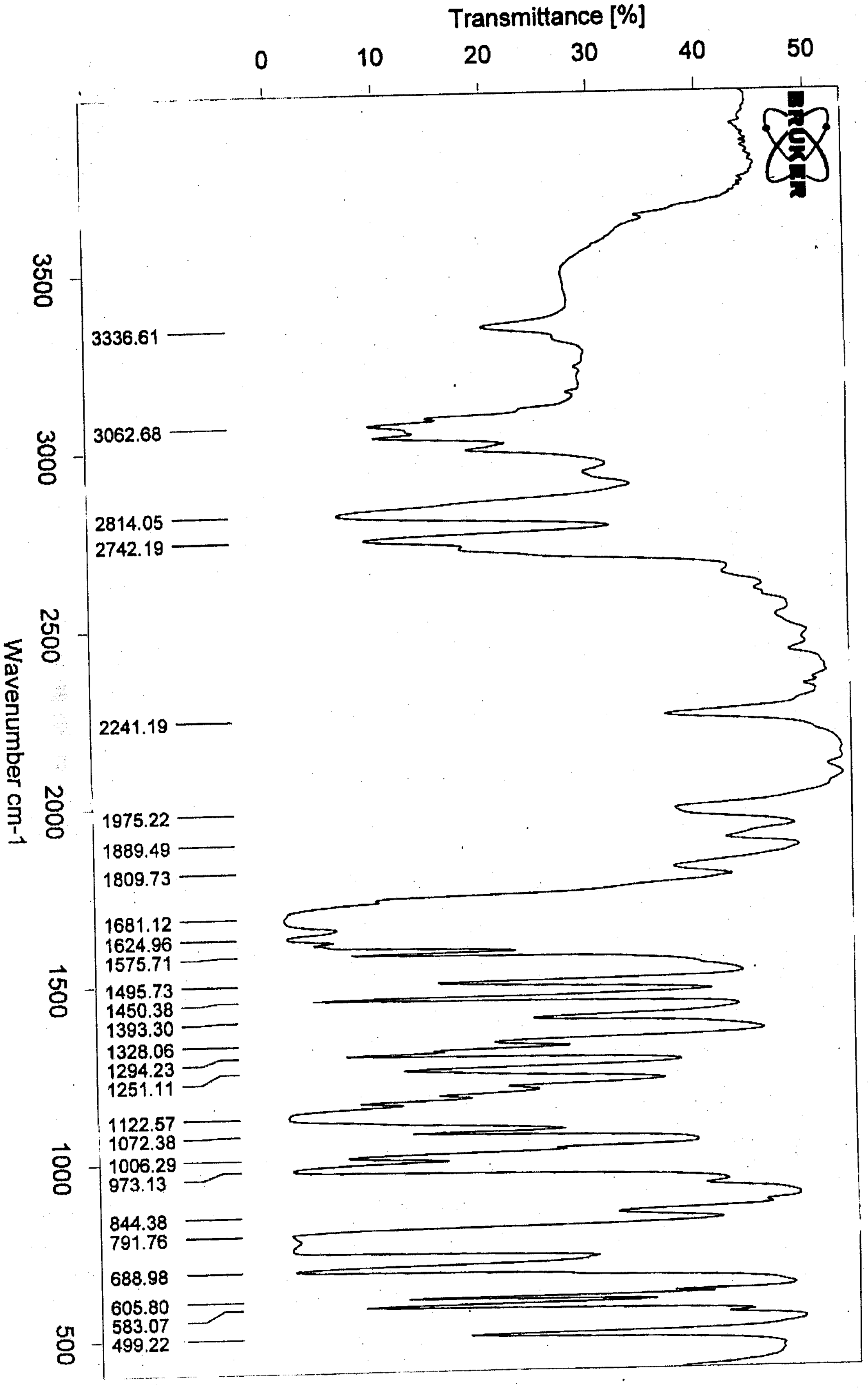
Conc. (mg/ml)	Ps. aeruginosa	E. coli	Prot. mirabilis	S. typhi	B. subtilis	Staph. aureus	Strept. pyogenes
200	27	30	22	26	18	-	20
100	23	25	18	23	15	-	13
50	18	20	13	17	10	-	10
25	12	13	11	10	-	-	-
12.5	-	7	-	-	-	-	-

الجدول (3): الفعالية التثبيطية للمستخلص الايثانولي والسينامالديهايد عند تركيز (200) ملغم/سم^3 في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام مقارنة بالمضادات الحياتية (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Comp.	Ps. aeruginosa	E. coli	Prot. mirabilis	S. typhi	B. subtilis	Staph. aureus	Strept. pyogenes
p-hydroxy benzoic acid	18	17	15	16	19	-	-
Cinnamaldehyde	27	30	22	26	18	-	20
Tetracycline 30 mg	22	21	18	23	-	-	-
Chloramphenicol 30 mg	13	18	16	17	18	13	14



الشكل (1): طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) للسيناملدهايد المفصول من النبات



الشكل (2): طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) للسينامالديهايد القياسي

المصادر

1. الحمود، محمد حسن وبطيحة، احمد محمود، مجلة العلوم الاساسية والتطبيقية، ليبيا، 10: 77-92 (1995).
2. قطب، فوزي طه، النباتات الطبية، زراعتها ومكوناتها، دار المريخ للنشر، الرياض، (1981).
3. Mark B., American Potential Council, Herpclip. TM: 80: 167-179 (2004).
4. Cowan M.M., American Society for Microbiology, 12: 564-582 (1999).
5. Sakariah K., Z. Naturforsch, 57: 990-993 (2002).
6. Mallavarapu C.R., Ramesh S. and Chandrasekhara R.S., Fragr. J.: J. Plant Physiol., 10: 239-242 (1995).
7. Jennings W. and Shibamoto T., Medicinal Plants, Academic Press, New York, 9-15 (1980).
8. Noeverde Brauw M.C.T., Bouwman J., Tas C. and Lavos G.F., CIVO Food Analysis Institute, 3700, Ajzeist, The Netherland, 1-16 (1988).
9. Bintu O.A.: Fitoterapia, 68: 184-185 (1997).
10. Townsed C.C. and Guest E.: Flora of Iraqi Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad, Iraq, Vol. 3: 402-405, (1980).
11. Bailey L.H.: Manual of cultivated plant. 5th ed., Macmillan Publishing Co., New York, USA, (1977).
12. Grand A., Woudergem P.A., Verportes R. and Poussef J.L.: J. Ethnopharmacol., 22: 25-31, (1988).
13. Harborne J.B.: Phytochemical Methods, Halsted Press, John Wiley and Sons, New York, (1973).
14. Riose J.L., Recio M.C. and Villar A.: J. Ethnopharmacol., 12: 139-152, (1987).
15. Bauer A.W., Kirbay W.A.M., Sherris J.S. and Turk M.: Amer. J. Clin. Pathol., 45: 493-496 (1966).
16. Todar K.: J. Med. Microbiol., 1-9 (1991).
17. Vandpitte J., Engloback K., Piote P. and Heuk C.: World Health Organization, Geneva (1991).
18. Robyt J.F. and White B.: J. Biochemical Techniaues Theory and Practice Brous / Cole Pub. Com. USA, 87-88 (1987).
19. Silverstein R.M., Bassler G.C. and Morill T.C.: Spectrometric identification of organic compounds. 4th Ed., John Wiley and Sons, USA (1981).
20. Lyoo Y., Park D., Lee S. and Choi Y.: J. Microbiol. Biotech., 11: 350-353 (2001).
21. Hinton M.: J. Appl. Bactriol., 70: 81-90 (1991).