التقدير الكيميائي الكمي لمركبات المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل *Syzygium aromaticum* وتقييم التأثير التثبيطي له في بعض العزلات البكتيرية الملوثة للأغذية

صبا طالب هاشم@[1] وعصام شاكر حمزة[2] و منال عبد اللطيف حسن[2]
[1] كلية العلوم - الجامعة المستنصرية ، [2] دائرة البيئة والمياه - وزارة العلوم والتكنولوجيا – بغداد - العراق
E-mail: dr.sabatalib@yahoo.com
قبل للنشر :2013/6/11

الخلاصة

إن الهدف من هذه الدراسة هو لمعرفة تأثير المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل على نمو البكتريا الموجبة والسالبة . أجري الكشف الكيميائي الكمي والنوعي للمركبات الفعالة في المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل وبأستخدام تقنية الكروماتوكرافي السائل عالي الأداء (HPLC) أظهرت النتائج احتوائه على المركبات التالية (Eugenol، Caffeic acid ، Kaempferol، Vallinic acid، Ferulic acid ، Ellagic acid)، Chlorogenic acid ، Borneal. تم تقييم الفعالية التثبيطية للمستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل بالتراكيز(0.039 و0.0781 و0.156 و0.312 و0.625 و1.25و2.5 و5 و10و 20) ملغم /مليلتر كل على أنفراد في نمو عزلتين من البكتريا الموجبة لصبغة غرام هما *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* وثلاثة عزلات من البكتريا السالبة لصبغة غرام هي *Escherichia coli*، *Pseudomonase aeruginosa* ، *Salmonella typhimurium* وبطريقة الحفر في الأكار ،فضلاً عن قياس التركيز المثبط الادنى للمستخلص النباتي حيث أظهرت النتائج فعالية تثبيطية عالية تجاه جميع العزلات البكترية قيد البحث وتنوعت بأختلاف التراكيز والبكتريا المختبرة.

الكلمات المفتاحية: المضادات الحيوية، المستخلص الفينولي، بذورالقرنفل ،الكروماتوكرافي السائل عالي الاداء.

المقدمة

بعد تزايد القلق من سلامة استعمال المضافات الغذائية الكيميائية وتزايد الاهتمام بالتوجه نحو حفظ الأغذية بطرق تضمن بقائها بشكل طبيعي للحفاظ على خواصها الطبيعية لأطول وقت ممكن، ولان التساؤلات كانت وما زالت تدور حول نوعية وسلامة الغذاء بإضافات غذائية محددة ومنتخبة ، أظهرت البحوث شكوكاً حول المضادات الميكروبية مثل Nitrites ، Benzoic acid التي تشكل خطراً كامناً بسبب امتلاكها للسمية، وأدت هذه المشاكل إلى التوجه نحو إنتاج مضادات ميكروبية طبيعية وإضافتها بشكل مباشر للأغذية (1).

شكلت المستخلصات النباتية أساسا للعديد من التطبيقات الغذائية سواء للغذاء الطازج أوالمصنع باعتبارها مواد تمتلك فعالية مضادة للأحياء المهجرية فهي تستخدم في حفظ الأغذية وتدخل في تركيب المستحضرات الصيدلانية وبدائلا للأدوية وعلاجات طبيعية (2) . لقد شملت الدراسة الحالية نبات القرنفل *Syzygium aromaticum* الذي ينتمي الى العائلة النباتية Myrtaceae وهو من النباتات التي تمتلك فعالية مضادة للبكتريا والفطريات(3و4) ، وذلك لاحتوائه على مركب اليوجينول Eugenol الذي يعتبراحد المركبات الأساسية لزيت القرنفل ويمثل حوالي 72-90 % حيث اكدت الدراسات امتلاكه فعالية مضادة للاكسدة (5)،بالأضافة الى احتواء نبات القرنفل على العديد من المركبات الفعالة منها Vanillic acid ، Kaempferol (4). كذلك احتوائه على العديد من المجاميع الفعالة منها التانينات والصابونيات والقلويدات والفينولات (6) . إن الهدف من هذه الدراسة هو لمعرفة تأثير المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل على نمو البكتريا.

المواد وطرائق العمل

أتبعت طريقة (7) في تحضير المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل أذ أخذ 10غم من المسحوق النباتي الجاف وضع في دورق زجاجي 100 مل وأضيف اليه 40 مل من حامض الخليك (2%) و جرت عملية الاستخلاص بواسطة المكثف العاكس باستخدام حمام مائي بدرجة حرارة 80 مْ ولمدة 8 ساعات بعد ذلك ترك المحلول ليبرد ثم رشح بورق ترشيح بعده أضيف اليه حجم مناسب من البروبانول واشبع المحلول باضافة كمية من كلوريد الصوديوم رج المحلول بشكل جيد فتكونت طبقتان، عزلت الطبقة العليا التي تحتوي على المركبات الفينولية بأستخدام قمع الفصل وجففت بالمبخر الدوار وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال. تم الكشف عن المركبات والمجاميع الفعالة الموجودة في النبات للتحري عن الراتنجات ،التانينات ،الصابونيات ،الكلايكوسيدات ،القلويدات ،الفينولات والفلافونات حسب ما ورد في (8) .

استعمل محلول الطور المتحرك في تغذية الكروموتوكراف السائل عالي الاداء لتقدير جميع المركبات الفينولية في المستخلص النباتي فقد أستعمل المحلول المتكون من ميثانول : حامض الخليك :ماء مقطر معاد تقطيره خال من الأيونات وبالنسبة (60:0.01:40) مزجت جيداً بالمازج vortex للتخلص الفقاعات الهوائية لتصبح جاهزة للاستعمال .اجريت عملية الفصل بأستخدام العمود C-18 4.6 mm (50× ID) ،معدل جريان Flow rate 1.4 مل/ دقيقة ،الطول الموجي 264 نانوميتر ، حقن 20 مايكروليتر من مستخلص الفينولات الكلية في الجهاز وقورن زمن الاحتجاز للمواد الموجودة مع زمن احتجاز المركب القياسي(9).

اجري أختبار التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لنبات القرنفل تجاه البكتريا الملوثة للأغذية حيث تم تحضير المحلول الخزين للمستخلص الفينولي لنبات القرنفل المراد اختبار تأثيره التثبيطي تجاه البكتريا المعزولة خارج الجسم الحي (in vitro) بتركيز 50 ملغم /مل وذلك بأذابة 5غم من المستخلص في 100مليلتر من محلول (10)% (Dimethysulfoxide DMSO). رشحت المستخلصات

بأستعمال المرشحات البكترية 0.45 ملم لغرض تعقيم المستخلص(10).

تم دراسة تأثير المستخلص النباتي في نمو البكتريا المعزولة من الأغذية حيث تم الحصول على عزلات كل من بكتريا *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonase aeruginosa* و *Salmonella typhimurium* من مختبرات قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية في كلية الزراعة / جامعة بغداد زرعت العزلات البكتيرية على سطح الآكار المغذي Nutrient agar وحضنت في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة. ثم حفظت العينات في درجة حرارة الثلاجة 5 م لحين الأستعمال. أستخدمت طريقة الحفر (Agar well diffusion) لتحديد فعالية المستخلص.أذ حضر العالق البكتيري لكل عزلة بنقل مستعمرة من المزروع البكتريا النقي المنمى على الوسط الأكار المغذي الى أنابيب حاوية على محلول الملح الفسلجي مع الرج بشكل جيد ومقارنة العكورة الحاصلة في الأنابيب مع العكورة القياسية لمحلول ماكفرلاند الذي يعطي $1.5X10^8$ خلية /مليلتر. تم نشر0.1 مليلتر من العالق البكتيري على وسط اكار مولر هنتون (Mueller Hinton agar) وعملت ثقوب في الوسط الزرعي بأستخدام ثاقب الفلين المعقم قطره 5ملم اضيف الى كل حفرة (0.05) مليلتر من المستخلص النباتي، اضافة الى عمل حفرة وسط كل طبق اضيف لها (0.05) مليلتر من محلول DMSO%10 المستخدم في اذابة المستخلص كسيطرة. درس تأثير المستخلص النباتي بتراكيز (0.039 و0.0781 و0.156 و 0.312 و0.625 و1.25و2.5 و5 و10و 20) ملغم /مليلتر وحضنت الأطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة، تم بعدها قياس منطقة التثبيط حول كل حفرة بالملمتر.

اجري قياس التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص النباتي باستعمال طريقة التخفيف المضاعفة المتسلسلة Tow fold dilution method) لحساب التركيز المثبط الأدنى (Minimum Inhibitory Concentration MIC) للمستخلص النباتي اعتماداً على ما ورد في (11)، اذ حضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين(20-0.039) ملغم/مليلتر للمستخلص. سحب 10 مايكروليتر من العالق البكتيري المحضر مسبقاً ولجميع العزلات البكتيرية بوساطة ماصة دقيقة ولقح به الأنابيب الحاوية على الوسط السائل لمولر هنتون الحاوي على تراكيز مختلفة من المستخلص ،وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة37 م ولمدة 24 ساعة، ثم قيس طيف الأمتصاص لأنابيب العالق البكتيري عند طول موجي 620 نانومتر. تم حساب (MIC) على انه اقل تركيز من المستخلص النباتي يمنع ظهور نمو واضح للبكتريا.

تم تحديد السمية الخلوية للمستخلص حسب طريقة (12) أذ حضر محلول رنكر الفسيولوجي Ringer solution المعقم من أذبة (0.9) غم NaCl ، (0.092) KCl ، (0.024) غم CaCl، (0.03) غم NaHCO، (0.0200) غم glucose في 100مل ماء مقطر. ثم اضيف (18) مليلتر من محلول رنكر الى 2 مليلتر من الدم المسحوب من الأنسان حضرت سلسلة من التخافيف للمستخلص الكحولي Phosphate buffer (1:1 ، 1:10، 1:100 ، 1:1000) استخدم لكل مستخلص معامل سيطرة سالبة تحتوي على Normal saline فقط ،ثم وضع (0.8) مليلتر من كل تخفيف في انبوبة اختبار معقمة واضيف لكل انبوبة (0.2) مليلتر من الدم ليصبح الحجم النهائي لكل انبوبة واحد مل حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة.حللت النتائج وفق التباين ANOVA (Analysis of Variance) بأتجاهين (13).

النتائج والمناقشة

تعد النباتات مصدراً مهماً للحصول على مركبات فعالة تستخدم مضافات طبيعية بدلاً من المضافات الكيميائية الصناعية. تستخدم الأعشاب أو النباتات لأغراض متعددة منها غذائية Nutrition وطبية Medical ومنكهات Flavoring وملونات Coloring ومواد حافظة Preservatives وأستعمالات أخرى (14). ونظراً لاحتواء نبات القرنفل على العديد من المركبات الفعالة التي تثبط او تحد من فعالية الأحياء المجهرية في الأغذية لذا استهدفت الدراسة معرفة التأثير التثبيطي للمستخلص الفينولي .بينت نتائج الكشف النوعي عن بعض المركبات الفعالة بأستخدام عدة طرائق للكشف عن هذه المركبات (جدول، 1) أحتواء المستخلص الكحولي على العديد من المجاميع الفعالة وهي القلويدات والصابونينات والفينولات والكلايكوسيدات والتانينات والفلافونيدات والتربنينات وجاءت هذه النتائج مشابهة لما جاء به (15).

أظهرت نتائج الكشف بأستخدام تقنية الكروموتوكرف السائل عالي الأداء (HPLC) أن زمن الأحتجاز القياسي لكل مركب (Kaempferol ، Caffeic acid، Eugenol ، Ellagic acid، Ferulic acid ،Vallinic acid، Chlorogenic acid ، Borneal) كان (2.16 و 3.07 و3.09 و4.99 و 5.99 و 6.91 و7.81 و 9.16) دقيقة على التوالي (جدول ،2). ويتضح من (الشكل ،1) المكونات الكلية لمستخلص الفينولات الخام الذي يظهر احتوائه على كل من(Kaempferol ، Caffeic acid، Eugenol ، Ellagic acid، Ferulic acid ،Vallinic acid، Chlorogenic acid ، Borneal) مقارنة مع المركبات القياسية (شكل ،2) وبنسب متفاوتة كما موضح في (جدول ،3) .حيث أكد (4) أحتواء نبات القرنفل على كل من (Kaempferol ، Vanillic acid ، Eugenol). وكانت اعلى نسبة تعود لليوجينول 16.18% وبتركيز 35694.94 مايكروغرام/مليلتر حيث تم حساب التركيز وفقاً للمعادلة

Concentration of sample (µg/ml) = Area of sample/ Area of standard ×Concentration of standard × Dilution factor

هذا يتفق مع ما جاء به (16) حيث أكد احتواء نبات القرنفل على نسبة عالية من مركب اليوجينول، يليه حامض الكلوروجنك وحامض اللاجيك بنسبة % 12.56 و12.8)وبالتراكيز (33059.33و22883.37) مايكروغرام/ مليلترعلى التوالي فيما جاء حامض الفانيل وحامض الكفائيك بأقل نسبة % (6.55و6.94) وبالتراكيز (12931.50و1398.49) مايكروغرام/ مليلتر على التوالي. تبين نتائج الدراسة الموضحة في (شكل، 2) الفعالية التثبيطية تجاه الأنواع البكتيرية المدروسة كافة، فلم يظهر المستخلص القينولي لنبات القرنفل عند التراكيز (0.039و1.25) ملغم /مليلتر تأثيراً في نمو العزلات البكتيرية

الخمسة قيد الدراسة ،أما عند التركيز2.5 ملغم / مليلترفأظهرالتحليل الأحصائي وجود فروق معنوية (P<0.05) في تثبيط بكتريا *B. subtilis* وباقي العزلات ،وبينت نتائج المعاملة بتركيز 20 ملغم/مليلتر تأثيراً معنوياً في تثبيط جميع الأنواع البكتيرية (P<0.05) وبمعدلات أقطار(22و17و14و9و8) ملم *S. aureus* , *B. subtilis*, *S. typhymurium* ، *Ps aeruginosa* ، *E. coli* ، على التوالي (ملحق ،1) . وهذا يتفق مع ما جاء به (17) حيث اكد الفعالية التثبيطية للمستخلص الفينولي لنبات القرنفل تجاه كل من بكتريا *Ps. aeruginosa* و*B. subtilis*. كما بينت نتائج الباحثان (3) فعالية المستخلص الكحولي تجاه كل من بكتريا *Staph. aureus* ، *E. coli* ، *aeruginosa* . *Ps*. فضلاً عن ما جاء به الباحث (18) عن الفعالية التثبطية لنبات القرنفل تجاه البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام الملوثة للغذاء. أظهرت نتائج الدراسة تأثير المستخلص الفينولي لنبات القرنفل في نمو الأنواع البكتيرية الملوثة للاغذية بأستعمال طريقة التخفيف المضاعفة المتسلسلة وأيجاد التركيز المثبط الأدنى (MIC) (جدول ،4)، أن تركيز 2.5 ملغم/مليلتر هو التركيز المثبط الأدنى لبكتريا *B subtilis* ،أما التركيز 5 ملغم/مليلتر فكان هو التركيز االمثبط الأدنى لبكتريا *Staph. aureus* في حين كان التركيز 20 ملغم/مليلتر هو التركيز المثبط الأدنى لجميع الأنواع البكتيرية قيد الدراسة الأخرى (ملحق، 2) ، حيث بين (19) فعالية المستخلص الكحولي تجاه كل من بكتريا *E. cloi* وبكتريا *B. subtilis* .يعود السبب في فعالية مستخلص بذور نبات القرنفل لكونه غني بالمركبات الفينولية والفلافونويدات والتي تمتلك فعالية مضادة للبكتريا (5) . يعتبراليوجينول واحد من المركبات الأروماتية الذي يحتوي مجموعة الفينول أذ يمتلك فعالية مضادة للأحياء المجهرية تزداد هذه الفعالية بزيادة المجاميع الفينولية (20) ،كما أظهرت نتائج الدراسة التي قام بها الباحث (16) فعالية مستخلص اليوجينول ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام أفضل من فعاليته ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام ويعزى السبب الى أحتواء البكتريا السالبة لصبغة غرام على متعدد السكرايد الشحمي Lipopolysaccharid (LPS) فضلاً على قدرة الجزيئات المحبة للماء من المرور خلال الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة لصبغة غرام بسهولة لاحتواء جدارها على طبقة الببتيدوكلايكون Peptidoglycan فقط . كذلك يحتوي المستخلص الفينولي لنبات القرنفل على حامض اللاجيك كما موضح في جدول (3) الذي يمتلك فعالية مضادة للبكتريا من خلال تأثيرها على تضاعف الحامض النووي DNA فقد بينت دراسة (21) أن حامض اللاجيك يعمل على تثبيط نمو البكتريا *E. coli* من خلال أيقافه لعملية تخليق شريط DNA وذلك بتثبيط فعالية أنزيم DNA gyrase مما يثبط عملية اللف الفائق لشريطي DNA للبكتريا وهو بذلك يشابه في عمله مضادات مجموعة الكونولون Quinolones واسعة الطيف .فضلاً عن امتلاكه فعالية في تثبيط الأنزيمات وتكوين معقدات مع متعدد السكرايد الشحمي (LPS) (22) .كما ويحتوي المستخلص الفينولي على مركب Caffeic acid، Kfaempferol الذي يمتلك فعالية مضادة للبكتريا (23 و 24). أما السمية الخلوية فلم تظهر جميع التراكيز المستخدمة اي تحللاً دموياً.

جدول ،1:المركبات الكيمائية الفعالة في بذور نبات القرنفل *Syzygium aromaticum*

النبات	المركبات الفعالة						
Syzygium aromaticum	القلويدات	الكلايكوسيدات	الفلافونات	التانينات	الصابونيات	الراتنجات	الفينولات
	+	+	+	+	+	+	+

جدول ،2: زمن الاحتجاز القياسي للمركبات القياسية

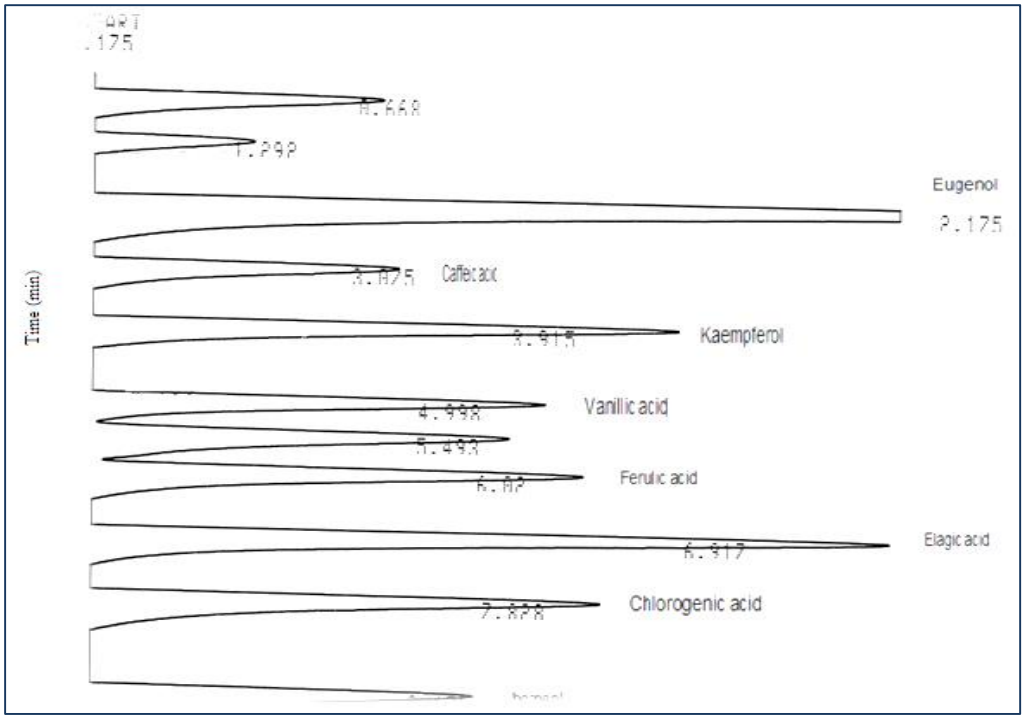
Compound	Retention time (minute)	Area of sample
Eugenol	**2.16**	**36705**
Caffeic acid	**3.07**	**49652**
Kaempferol	**3.90**	**54382**
Vanillic acid	**4.99**	**52977**
Ferulic acid	**5.99**	**55533**
Elagic acid	**6.91**	**52811**
Chlorogenic acid	**7.81**	**41635**
borneol	**9.16**	**38627**

جدول ،3: تراكيز ونسب المركبات في المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل *Syzygium aromaticum*

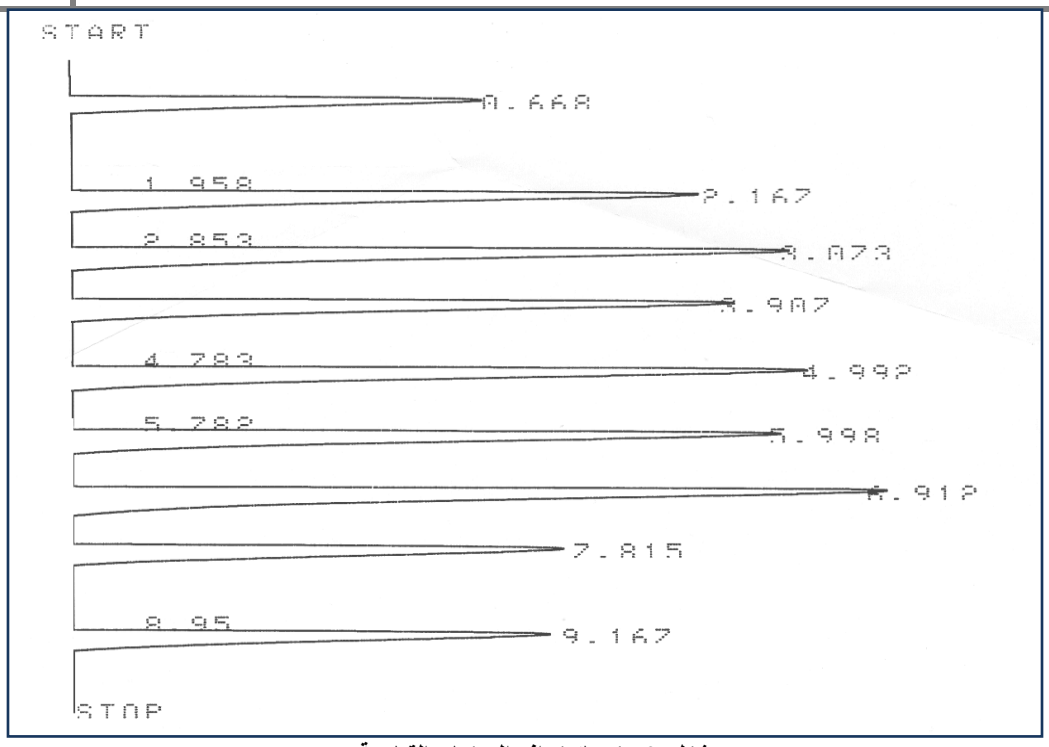
Compound	concentration (µg/ml)	Percentage %
Eugenol	**35694.94**	**16.18%**
Caffeic acid	**1398.49**	**6.94%**
Kaempferol	**17324.03**	**8.37%**
Vanillic acid	**12931.50**	**6.55%**
Ferulic acid	**20665.44**	**9.96%**
Ellagic acid	**22883.37**	**12.80%**
Chlorogenic acid	**33059.33**	**12.56%**
Borneol	**23437.62**	**8.26%**

جدول ،4: معدلات طيف الأمتصاص لنمو البكتريا عند التراكيز المختلفة من المستخلص الفينولي لبذور

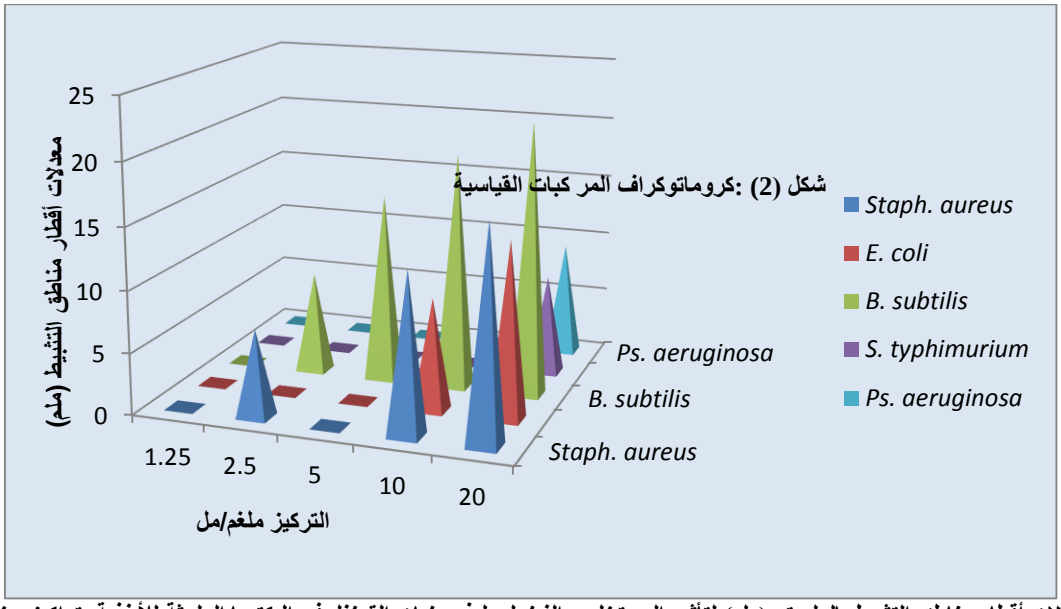
تراكيز المستخلص (ملغم/مل)	نوع العزلة البكتيرية				
	Staph. aureus	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. typhimurium*	*Ps. aeruginosa*
	طيف الأمتصاص عند الطول الموجي 260 نانوميتر ± الخطأ المعياري				
معامل السيطرة	a0.671± 0.049	b0.593± 0.023	d0.518± 0.012	bc0.566± 0.044	cd0.520± 0.047
0.039	a0.656± 0.05	b0.573± 0.046	d0.410± 0.024	c0.501± 0.056	c0.503± 0.053
0.0781	bc0.498± 0.027	a0.505± 0.034	d0.394± 0.023	c0.465± 0.041	bc0.490± 0.038
0.156	bc 0.388± 0.016	a0.496± 0.012	c0.314± 0.016	ab0.475± 0.033	b0.402± 0.029
0.312	b0.298± 0.011	a0.412± 0.012	b0.290± 0.021	a0.412± 0.037	ab0.398± 0.036
0.625	c0.201± 0.014	a0.389± 0.023	c0.210± 0.032	b0.304± 0.024	ab0.363± 0.038
1.25	b0.152± 0.014	a0.298± 0.021	c0.119± 0.016	a0.255± 0.031	ab0.289± 0.022
2.5	cd0.032± 0.013	bc0.201± 0.026	d0.012± 0.010	a0.212± 0.016	b0.212± 0.021
5	0.000± 0	bc0.112± 0.011	0.000± 0	a0.143± 0.013	c0.098± 0.025
10	0.000± 0	cb0.018± 0.012	0.000± 0	a0.011± 0.012	c0.012± 0.010
20	0.000± 0	0.000± 0	0.000± 0	0.000± 0	0.000± 0



شكل ،1: كروماتوكراف الكشف عن مكونات مستخلص الفينولات الكلية لبذور نبات القرنفل بأستخدام تقنية HPLC عند الطول الموجي 264 نانوميتر.



شكل ،2 : كرماتوكراف المركبات القياسية



شكل ،3: معدلات أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر (ملم) لتأثير المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل في البكتريا الملوثة للأغذية بتراكيز مختلفة .

المصادر

1. Oiye, S. O. and Muroki, N. M. (2002). Use of spices in food.The The Journal of Food Technology in Africa, 7(2) :39-44.
2. Nychas, G.J. ; Skandamis, P. and Tassou, C. (2003). Antimicrobials from Herbs and Spices. In: *Natural* Antimicrobials for the Mini-mal Processing of Foods, S.Roller (Ed.), CRC Press, Wood-head Publishing Limited, Cambridge, UK., PP: 176– 200.
3. Pandey, A. and Singh, P. (2011). Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. Asian J. Plant Sci. Res., 1(2):69-80.
4. Bhowmik, D.; Kumer, K.P.; Yaday, A.; Srivastava, S. and Paswan, S. (2012). Recent Trends in Indian Traditional Herbs Syzgium aromaticum and its Health Benefits. J. Pharmacognosy and Phytochemistry,1(2):6-17.

clove buds marketed in Tehran city of Iran. Inter. J. Chem. Tech. Res., 4(1) :105-108.

17. Ababutain, I.M. (2011). Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts From Some Medicinal Plant. Australian J. Basic and Appl. Sci., 5(11): 678-683.
18. Lopez, P.C. Sanchez, R. Batlle and Nerin, C. (2005). Solid- and Vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. J. Agric. Food Chem., 53(17): 6939-6946.
19. Soniya, M. ; Kuberan, T. ; Anitha, S. and . Sankareswari, P. (2013). In vitro antibacterial activity of plant extracts against Gram positive and Gram negative pathogenic bacteria. Internat. J. Microbi. and Immunol. Res., 2(1):001-005.
20. Al-Zubaydi, S.R.; Al-Hmdany, M.A and Raesan, S.J. (2009). Antibacterial effect of some medicinal plant extracts against some pathogenic bacteria strains. J. Duhok University, 12(1): 244-249.
21. Weinder, M.;Alton, J.;Fernandez, J.;Fraga, S.; Hilliard. J.;Ohemeng,K.and Barret, J. (1998). DNA gyraseinhibitory activity of ellagic acid derivative. Bioorg. Med. Chem. Lett., 8(1):97-100.
22. Loo, T.W.; Jin, L.J. Cheung, M.N. and Chow, L.W. (2010). Evaluation of *Ellagic acid* on the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay. African J. Biotech., 9(25):3938-3943.
23. Montaño,G.M.; Morón, E.B.; Guerrero, C.P. and Lázaro, M.L. (2011). A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. Mini-Reviews in Med. Chem., 11:298-344.
24. Lin, C.L.; Chen, R.F.; Chen, J.F; Chu, Y.C.; Wang, H.M.; Chou,W.C.; Chang, W.C.; Fong, Y.; Chang, W.T.; Wu,CY.; Chiu, C.C. (2012). Protective Effect of Caffeic Acid on Paclitaxel Induced Anti-Proliferation and Apoptosis of Lung Cancer Cells Involves NF-κB Pathway. Int. J. Mol. Sci., 13(5): 6236-6245.

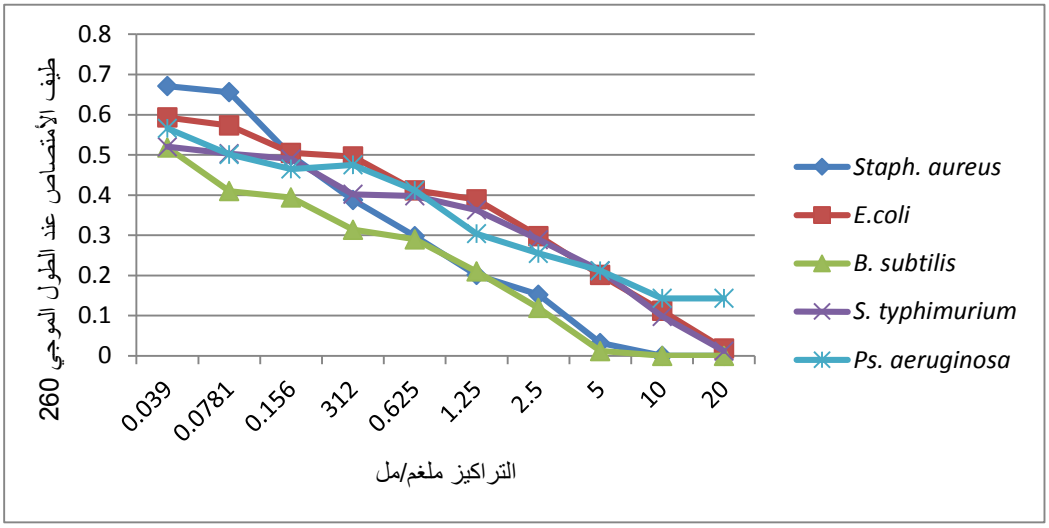
5. Singh, J. ;Anupama B.and Goel, S.P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. Internat. J. Res. in Pharmaceut. and Biomed. Sci., 3 (4):1469-1475.
6. Kumar, K.P.; Yadav, A.; Srivastava, S.; Paswan, S. and Dutt, A.S. (2012). Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum a*nd health benefits. J. Pharmacongnocy and Phytochemistry, 1(1):6-17.
7. Gayon, T.A. (1972). Plant Phenolic.Oliver and Boyyed Edinberg. P:254.
8. Harbone, J.B. (1984). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysisChapman and Hall. Ltd London, PP:149-188.
9. Yan, X.; Murphy, B.T.; Hammond, G.B.; Vinson, J.A. and Neto, C.C. (2002). Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*) J. Agr. Food Chem., 50:5844–5849.
10. Ronald M.A. (1995). Micro-organisms in our World. Mosby Year Book, Inc. St. Louis.,P: 765.
11. Stokes, E.J. and Ridgway, G.L.(1987). Handling Clinical Specimens for Microbiology Studies, (5^{th}) ed. Churchill Livingstone Edinburgh, PP:173-188.
12. Xian-guo and He. , Ursula, M. (1994). Antifungal compound from Solanum. Ethnopharmacol., 43:173-177.
13. Sanders, D.H. (1990). Statistics; a Fresh Approach. 4th Edn., McGraw Hill Inc., Singapore.Pp:380-385.
14. Arora, D.S. and Kaur, G.J. (2007). Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. J. Natural Med., 61:313-317.
15. Sunil, K.G.; Saikishore, M.B. and Shashikant, P. (2012). Evaluation of flower buds of *Syzygium aromaticum f*or antimicrobial and wound healing activity in Rats. Inter. J. Pharmaceutical Sci., 4(1):1746-1750.
16. Rahimi, A.A., Ashnagar, A.and Nikoei, H. (2012). Isolation and characterization of 4-allyl-2-methoxyphenol (eugenol) from

الملاحق

ملحق ،1: معدلات أقطار مناطق التثبيط بالمليلتر عند التراكيز المختلفة للمستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل

نوع العزلة	التراكيز ملغم/ مل				
	1.25	2.5	5	10	20
	معدلات أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر				
Staph. aureus	0	B 7.1± 0.076	B 10.0± 0.155	B 13.012± 0.144	B 17.250± 0.1802
E. coli	0	0	0	C 9.100± 0.25	C 14.250± 0.206
B. subtilis	0	A 8.120± 15.310	A 15.310± 0.25	A 19.120± 0.153	A 22.122± 0.289
S. typhimurium	0	0	0	0	E 8.120± 0.115
Ps. aeruginosa	0	0	0	0	DE 9.250± 0.168

الأحرف المختلفة تعني وجود فرق معنوي (P<0.05) للمقارنة بين الأسطر.



ملحق ،2 :معدلات طيف الأمتصاص لتأثير المستخلص الفينولي لبذور نبات القرنفل للبكتريا الملوثة للأغذية بتراكيز مختلفة.

Appreciation quantitative chemical compounds phenolic extract of the seeds of *Syzgium aromaticum* and study its inhibitory effect in some food-born pathogenic bacteria

S.T. Hashim[1]; I. Sh. Hamza[2] and M. A. Hassan[2]

[1.]College of Science, Al-Mustanserya University, [2.] Department of Environment and Water, Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq

Summary

Qualitative and quantitative detection of the active compounds in the phenolic extract of *Syzygium aromaticum* seeds was conducted by using HPLC. Results showed it contains all of the following compound (Eugenol, Caffeic acid, Kaempferol,Vallinic acid, Ferulic acid, Ellagic acid, Chlorogenic acid and Borneal).Inhibitory effectiveness was evaluated for different concentration of phenolic extract of seeds inlclude (0.039, 0.0781, o.156,0.312, 0.625,1.25,2.5,5,10 and 20) mg/ml separately against gram positive bacteria *Bacillus subltilis* and *Staphylococcus aureus* and three isolates of gram negative bacteria *E.coli* , *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* by Agar well diffusion method. The results showed high inhibition effect aganist all bacterial isolates with the effect of concentration and genus of bacteria.

Keywords:Antibacterial, Phenolic extract, *Syzygium aromaticum* seeds, HPLC.