مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (40) العدد (5) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (40) No. (5) 2018

دراسة المركبات الكيميائية العضوية لمستخلص أوراق نبات الحندقوق (Melilotus Officinal) باستخدام تقانة GC- MS و تأثيره على بعض الأحياء الدقيقة المرضية

الدكتور حسن البودي*
الدكتور نزيه داؤد**
لما محمود مايلا***

(تاريخ الإيداع 7 / 3 / 2018. قُبِل للنشر في 2 / 10 /2018)

□ ملخّص □

نظراً لأهمية نبات الحندقوق من الناحية الإقتصادية والطبية، ولانتشاره الواسع في البيئة السورية ، فقد شكل ذلك أساساً للقيام بدراسة أولية للمكونات الأساسية للزيت العطري المستخلص من أوراق هذا النبات. تم استخلاص الزيت العطري وتنقيته، ومن ثم درست المستخلصات باستخدام جهاز (الكروماتوغرافيا الغازية كاشف مطيافية الكتلة GC-Mass spectrometry). واستخلص الزيت العطري بالميتانول باستخدام جهاز سوكسيليه ، وطريقة النقع بالهكسان. وتم التعرف على 34 مكونا شكلت حوالي 99.91% من مكونات الزيت العطري يذكر منها :

n-Docosane(39.82%) , Hydrocoumarin(15.39%) ,

Methyl 3-(2-hydroxyphenyl)propionate(14.29%).

كما استخلص الزيت العطري بطريقة النقع بالهكسان وكانت المكونات الرئيسة هي :

1,2-Benzenedicarboxylic acid(17.77%) , 9,12,15-octadecatrienoic acid(12.85%)

تمت دراسة تأثير الزيت العطري المستخلص لأوراق نبات الحندقوق على بعض الأحياء الدقيقة المرضية من خلال تحديد التركيز المثبط الأصغري لها.

الكلمات المفتاحية: الفصيلة البقولية، الحندقوق، الزيت العطري، الكروماتوغرافياGC\MS ، الأحياء الدقيقة

* استاذ مساعد – قسم الكيمياء- كلية العلوم- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.
** استاذ – قسم علم الحياة- كلية العلوم- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.
*** طالبة دراسات عليا(ماجستير)- قسم الكيمياء- كلية العلوم- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (40) العدد (5) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (40) No. (5) 2018

Study of the Main components of the organic matter extracted from the leaves of Syrian Melilotus Officinal plant using GC-MS and their effects on some of Pathogenic Microorganisms

Dr. Hasan Al boudi *
Dr. Nazih Daood **
Lama Mahmoud Mayla ***

(Received 7 / 3 / 2018. Accepted 2 / 10 /2018)

□ ABSTRACT □

Due to the economical and medical importance of the Melilotus plant and the wide distribution of this plant in the Syria environment, it was of necessity to study the the composition of organic matter extracted from the leaves of this plant.
The Melilotus Officinal organic matter was extracted and purified their where were studied by GC-Maas spectrometry.
The organic matter was obtained by Soxhlet extractor and by solvent n-Hexane. Components have been found which was about (99.91%) from the total of Essential Oil.
The major components were extracted by Soxhlet extractor and the following components were determined : n-Docosane(39.82%) , Hydrocoumarin(15.39%) ,
Methyl 3-(2-hydroxyphenyl)propionate(14.29%).
The major components were determined by solvent n-Hexane:
1,2-Benzenedicarboxylic acid(17.77%) , 9,12,15-octadecatrienoic acid(12.85%)
The effects of the extracted aromatic oil from the leaves of Melilotus plant on some of Pathogenic Microorganisms were studied.

Kewords: Leguminosae, essential oil, GC-MS, Microorganisms .

* **Associate professor; Department of Chemistry, Faculty of Scienses, University of Tishreen, Lattakia, Syria.**
** **professor; Department of Life Science, Faculty of Scienses, University of Tishreen, Lattakia, Syria.**
*** **High Studies Student(Master Degree), Department of Chemistry, Faculty of Scienses, University of Tishreen, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يعد نبات الحندقوق Melilotus Officinals نبات بري من الفصيلة البقولية Fabaceae Family [1] والجنسMelilotus، وينتمي إلى شعبة مستورات البذور ولرتبة الفوليات، وتعد هذه الفصيلة أحد أهم الفصائل النباتية بسبب الأهمية الطبية للأنواع المصنفة ضمنها. يتميزهذا النبات برائحة حلوة ومميزة يزيد ارتفاعه عن (1.2 m)وتكون الأوراق بيضوية الشكل موزعه على الجذع تحمل كل ورقة ثلاث وريقات صغيرة مسننة وتحمل ساق الزهرة من 12الى 65 زهرة، وتنتج ثمارها في القرون التي تحتوي عادة على بذرة واحدة.من أسمائه العربية الشائعة:

الدخن الأصفر،دخن الحقل ،إكليل الملك الرسمي[2]، البرسيم الحلو الأصفر[3]

تعد منطقة البحر الأبيض المتوسط ووسط وجنوب أوروبا وفي آسيا الموطن الأصلي لنبات الحندقوق وهو نبات شائع نظرا لقدرته على النمو في أنواع مختلفة من المناخ والتربة(تربة قلوية في الغالب)[4] ولا ينمو في التربة الحمضية ولا في درجات الحرارة الباردة ولا في الظل وهو أكثر تحمل للجفاف[5]، ينمو الحندقوق في البراري والحقول وعلى جوانب الطرق ويصادف بكثرة في المناطق الساحلية وأكثر قبولاً في الربيع وأوائل الصيف.

بينت الدراسات ومن خلال المعطيات المتوفرة عن إكليل الملك بأنه نبات متعدد الاستخدامات الغذائية والعلاجية فهو:

يستخدم في علاج الحساسية وأمراض الغشاء المخاطي[6] ، ويستخدم لعلاج أمراض الكبد ، ولعلاج أعراض الكدمات ولدغ الحشرات ، ويستخدم لعلاج ارتفاع ضغط الدم والقصور الوريدي المزمن[7] ويثبط نمو الفطريات[8]، ولعلاج التهاب المفاصل والتهاب الشعب الهوائية والبواسير والروماتيزم، ولهذا النبات خواص مطرية وطاردة للريح [9].

يستخدم أيضا كمحاصيل علفية وكمصدر لرحيق العسل، تعد أزهاره مصدراً للرحيق الذي تجمعه عاملات النحل.

أظهرت دراسة الزيت العطري Essential Oil لنبات الحندقوق، أجريت من قبل(Grigorresco E,Ciulei I) عام 1986[10]و(Bunney) عام 1992 [11] أن هذا النبات يحتوي على كمية من الفلافونويدات ومن أهمها:

1)- روبينين(Robinin)

2)- كامفيرول-3-O-β-غلوكوبيرانوزيد (Kaempferol-3-O-β-glycopyranoside)

3)- كامفيرول-7-O-غلوكوزيد(Kaempferol-7-O-glycosides)

4)- الروتين (Rutin)

أجرى(Razavi et al) عام 2009 [12] تحليل الزيت المستخلص من ثمار البرسيم الحلو الأصفرباستخدام تقانة GC-Mass فحصل على كومارينات ذات تأثير مضاد للجراثيم ومضاد للفطريات يذكر من هذه الكومارينات : الكومارين (2H-1-Benzopyran-2-one).

وبعض مشتقات البسورالين Psoralen المستبدلة مثل:(5-8-dimetoxy , 5-metoxy , 8-metoxy psoralen)

ثنائي الكوماروول(dicoumarol).

- وبينت دراسة أخرى قام بها(Kovaleva et al) عام 2009 [13] بأن المكونات الرئيسة للزيت العطري للجزء العلوي المجفف من نبات الحندقوق هي هكسا هيدرو فارنيزيل اسيتون (16.64%)، وبيتا ايديزمول (11.49%) وغلوبولول (8.65%).

وفي دراسة ثانية لـ Kovaleva [14]على أوراق الحندقوق عثر منها على وجود المركبات الآتية: بيتا أيونون-B ionone، الكومارينCoumarin، السكوالينSqualene. فيما يتراكم في أزهار الحندقوق بشكل أساسيα-Curcumene، السكوالين ، وحمض البالميتيك.

- أما الدراسة التي أجراها (Krzakowa)عام 2000 [15] على نبات الحندقوق فقد لاحظ امتلاك المستخلصات على حموض فينولية تلعب دور في حماية النبات من العوامل البيئية وتلعب دور وقائي من تطور السرطان وأمراض القلب ومن أهم هذه الحموض: حمض الكافيئيكCaffeic acid ،حمض الكلوروجينيكChlorogenic acid

في حين قام الباحث (Anwer et al) عام 2008 [16] باختبار وجود الحموض الدهنية (تصادف بشكل استرات) في هذا النبات فعزل بعضها باستخدام تقنية الكروموتوغرافيا الغازيةGC وأهمها حمض البالميتيك(2.25%) حمض اللينوليك (1.90%) حمض الميليلوتيك(89%) .

- في دراسة قام فيها(Mutasher et al) [17] عن الفعالية التثبيطية لمستخلص الايتانول 80%لأوراق الحندقوق تجاه العزلات البكتيرية المرضية للانسان وكانت النتائج تشير إلى أن تأثير مستخلص الإيتانول80% ضد العزلات البكتيرية المرضية Ps. Aeruginosa وC.Ferundii و E. coli و *K.* pneumonia و B. subtilis و S. aureus إذ كانت قيم MICحوالي3.3 و 4.2 و 5.4 و 6.5 و 6.2 و 5.4 ملغم/مليلتر، على التوالي .يتضح من النتائج أعلاه إن البكتريا *Ps. Aeruginosa* هي الأكثر تأثراً بالمستخلص الخام مقارنةً بباقي الأنواع.

أهمية البحث وأهدافه:

التعرف على أحد من النباتات التي تشكل أهمية من الناحية الاقتصادية التي توجد في الساحل السوري وخاصة مدينة اللاذقية وبيان أهميتة في الأستخدامات الطبية العلاجية وأيضا الغذائية وبالتالي أظهار أهمية النبات المدروس محليا.

تم إجراء عملية استخلاص للزيت العطري من الأجزاء الهوائية وتحديد النسبة المئوية للزيت والمكونات الأساسية له وذلك باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية مع كاشف مطيافية الكتلة GC-MS. ودراسة تأثير وجود المستخلص على بعض الأحياء الدقيقة المرضية.

طرائق البحث و مواده:

1)- الأجهزة المستخدمة:جهاز سوكسيلية، المبخر الدوار، جهاز GC/MS، وأدوات زجاجية متنوعة .

المحاليل والمواد المستخدمة: ماء ثنائي التقطير، n-هكسان، ميتانول، كبريتات الصوديوم اللامائية، صبغة ريزازورينresazurin .

2)-استخلاص الزيت العطري Isolation Essential Oil:

تم استخلاص المادة العضوية من أوراق نبات الحندقوق بطريقتين:

- الاستخلاص المستمر بالمذيبات باستخدام جهاز سوكسيليه:

تم جمع أوراق نبات الحندقوق في الفترة الممتدة من شهر نيسان الى شهر تموز من عام 2016 من محافظة اللاذقية. ونظفت وجففت في مكان ظليل جيد التهوية عند درجة حرارة الغرفة (C^o 25-20) مدة شهر تقريبا، ثم طحنت جيدا ووضع المسحوق النباتي في علبة زجاجية محكمة الإغلاق لحين الإستخلاص، استخلص الزيت العطري بالميتانول

باستخدام جهاز سوكسيليه لمقدار 100غ من العينة الجافة، يستمر التسخين لفترات (6-8 ساعات)، يرشح المستخلص الناتج ويبخر بهدف التخلص من المذيب باستخدام المبخر الدّوار ويجفف الناتج باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية Na_2SO_4. ان الخلاصة الناتجة ذات لون أصفر شاحب، بلغ مردوده 0.91% وزنا من وزن العينة الجافة. وحفظ الزيت النقي في أمبولة مغلقة عاتمة اللون في الثلاجة عند درجة حرارة $4C^o$ حتى وقت التحليل.

- الاستخلاص بالنقع بالهكسان:

تم نقع 100غ من الأوراق المطحونة والمجففة جيدا، في500ml من نظامي الهكسان مدة خمسة أيام مع التقليب مرتين على الأقل يوميا. تم بعد عملية الترشيح والتجفيف باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية Na_2SO_4 التخلص من المذيب بالتبخير تحت الضغط المنخفض عند درجة حرارة $40C^o$. وكان وزن الخلاصة الناتجة 1.04 gr ومردود 1.81% من العينة النباتية الجافة. وطبيعة الخلاصة الناتجة سائلاً لزجاً بنياً مصفراً ، تم حفظه في أمبولة مغلقة عاتمة اللون عند درجة حرارة $4C^o$ حتى وقت التحليل.

3)- تحديد المكونات الأساسية للزيت العطري المستخلص من أوراق نبات الحندقوق بطريقة سوكسيليه وطريقة النقع بالهكسان:

أجري التحليل الكيفي باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة GC/MS، وذلك للتعرف على المكونات الأساسية للزيت العطري المستخلص من أوراق نبات الحندقوق.

جرى الفصل باستخدام جهاز GC/Ms من طراز SHIMADZU مزود بعمود شعري من نوع HP-5 MS.

استخدم غاز الهيليوم كغاز الجرف (الغاز الحامل)،

وضخ في العمود الشعري بسرعة تدفق Flow rate He 1ml/min.

بدأ البرنامج الحراري من الدرجة60 مئوية، ثم رفعت درجة الحرارة 4 درجات مئوية في الدقيقة حتى الدرجة$180C^o$، وتم تثبيت درجة الحرارة عند هذه الدرجة مدة3 دقائق، ثم تم رفع درجة الحرارة بمعدل $10C^o$في الدقية حتى الدرجة260 مئوية. وتم تثبيت درجة الحرارة عند هذه الدرجة مدة 5 دقائق. ليكون زمن القياس الكلي هو46دقيقة. بعدها تم تسجيل أطياف الكتلة 45-550amu. ومنه تم التعرف على مكونات الزيت العطري بمقارنة أطياف الكتلة الناتجة لكل قمة من الكروماتوغرامGC/MS مع أطياف الكتلة الموجودة في المكتبات المتوفرة في الجهاز. تم نتيجة ذلك الحصول على الكروماتوغرامين الموضحين في الشكلين(1و2).

3)- اختبار الخواص الضدميكروبية للخلاصة الورقية لنبات الحندقوق :

تم اختبار الخواص الضد ميكروبية للخلاصة الورقية لنبات الحندقوق على بعض أنواع الأحياء الدقيقة (جراثيم و فطور) من خلال تحديد قيم التركيز الأصغري للتثبيط (MIC) باعتماد طريقة التخفيف في الأنابيب و باستخدام صبغة ريزازورين resazurin. تم استخدام وسط زرعي موللر-هنتون Mueller-Hinton broth من أجل تنمية كل السلالات الجرثومية، كما استخدم وسط سابورد Sabouraud dextrose broth لزراعة خمائر المبيضات البيض. استخدمت أنابيب اختبار معقمة صغير احتوت على 1 مل من أي من الوسطين الزرعيين. زرعت الأنابيب بالسلالات الميكروبية بحيث حققت تراكيز خلوية 5.10^5 للسلالات الجرثومية و 5.10^3 لخمائر المبيضات البيض. و من ثم تمت إضافة التراكيز المحددة من الخلاصات العائدة لنبات الحندقوق، تزايدت التراكيز في الأنابيب بالتدريج بدءاً من10 ملغ و انتهاءاً بـ40 ملغ. حضنت الأنابيب جميعاً في الحاضنة الهوائية بالدرجة $35\ C^o$ لمدة 2-3 أيام. تمت مراقبة حدوث تثبيط ميكروبي من عدمه من خلال مراقبة وجود العكارة. سجلت النتائج على شكل قيم الـ MIC مقدرة بالملغ.

الأنواع الجرثومية المختبرة هي:

- جراثيم سالبة غرام:

- الايشيرشيا القولونية: Escherchia coli
- الكليبسيلا الرئوية: Klebsiella pneumonia
- المتقلبة الرائعة: Proteus mirabilis
- الزائفة الزنجارية : Pseudomonas aeruginosa

- جراثيم ايجابية غرام:

- مكورة عنقودية ذهبية: Staphyliococcusaureus
- العصية الرقيقة: Bacillus subtilis
- العصية الشمعية: Bacillus cereus

- **الخمائر**: خميرة المبيضات البيض Candida albicans

زرعت الأحياء الدقيقة المختبرة أعلاه في مزارع سائلة معقمة نقية قبل اجراء الاختبار ب 24 ساعة.

تم تحضير سلاسل من أنابيب الاختبار سعة 5 مل، يحتوي كل انبوب فيها على 1 مل من وسط مرق موللر-هنتون Mueller-Hinton broth (للجراثيم) و 1 مل من وسط مرق سابورو Sabouraud dextrose broth.

تم اختبار تراكيز متدرجة من الخلاصة الورقية لنبات الحندقوق ابتداءاً من التركيز 0.20 ملغ و حتى 35 ملغ. تم تحضير هذه التراكيز من خلال إذابة الخلاصة الورقية الخام في 10% من dimethylsulfoxide (DMSO).

تمت زراعة الأحياء الدقيقة في أنابيب الاختبار بحيث تحقق عدد خلايا مقداره 10^5 / 1 مل، ثم أضيف إلى كل أنبوب التركيز المحدد من الخلاصة النباتية.

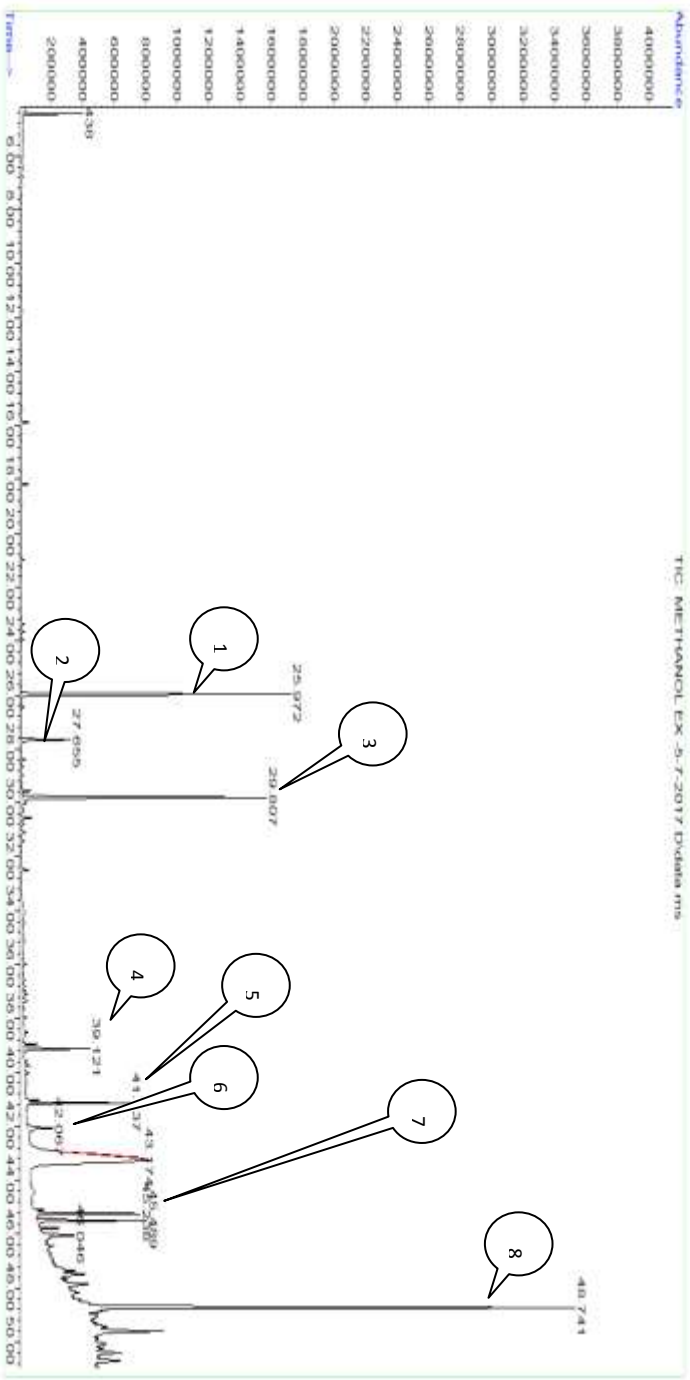
حضنت سلاسل الأنابيب في الحاضنة في الدرجة $37C^{\circ}$ لمدة تتراوح من 24- 72 ساعة.

تمت قراءة النتائج عيانياً من خلال تحديد الأنابيب التي أنعدم فيها النمو (زوال العكر)، و تم تأكيد النتائج من خلال ملاحظة تغير لون صبغة الرايزازورين (resazurin) بعد إضافتها إلى أنبوب الاختبار الذي يشك بوجود نمو جرثومي فيه حيث يتحول لون الصبغة من الأزرق إلى اللون الأحمر القرنفلي في حال وجود خلايا حية.

النتائج والمناقشة:

1)- تحديد المكونات الأساسية للزيت العطري المستخلص بالميتانول من أوراق نبات الحندقوق بطريقة سوكسيليه:

تم التعرف من خلال الكروماتوغرام GC-MS (الشكل(1) والجدول (1)) التابع للزيت العطري المستخلص من أوراق نبات الحندقوق بطريقة سوكسيليه، على12مكوناً من مكوناته التي تشكل حوالي (99.95%) من وزن العينة المحقونة .



الشكل(1) الكروماتوغرام GC-MSللزيت العطري المستخلص بالميثانول من أوراق نبات الحندقوق بطريقة سوكسليه

1- Hydrocoumarin	4- Hexahydrofarnesyl acetone
2- Coumarin	5- Palmitic acid, methyl ester
3- Methyl3-(2-hydroxyphenyl)propionat	6- Palmitic acid
	7- Neophytadiene
	8- n-Docosane

يتبين من الجدول (1) أن المكونات الرئيسة لهذا الزيت العطري هي على التوالي بحسب نسبها المئوية كالآتي:

n-Docosane (39.82%), Hydrocoumarin (15.39%),

Methyl 3-(2-hydroxyphenyl)propionate(14.29%).

كانت نسبة المكونات المتبقية للمستخلص ضئيلة ومتفاوتة، وكان مجموع نسبها الكلي يساوي99.95% .

الجدول(1)النسب المئوية لمكونات الزيت العطري لأوراق نبات الحندقوق المستخلص بالميتانول باستخدام جهاز سوكسيليه:

Peak	Compound	R.Time(S)	Percentage%
1	Methylbenzene(Methacide)	4.438	1.9323
2	Hydrocoumarin	25.9715	15.3924
3	Coumarin (cis-o-Coumarinic acid lactone)	27.6551	2.9296
4	Methyl3-(2-hydroxyphenyl)propionate	29.8071	14.2915
5	Hexahydrofarnesyl acetone	39.1211	3.5305
6	Palmitic acid, methyl ester	41.1373	4.8294
7	Palmitic acid	42.0674	2.361
8	n-Docosane	43.1739	2.4189
9	Methyl linolenate	45.2377	5.0221
10	Neophytadiene	45.4889	5.8419
11	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	46.0455	1.6291
12	n-Docosane	48.7406	39.8214
	المجموع الكلي		99.95%

2)- تحديد المكونات الأساسية للزيت العطري المستخلص من أوراق نبات الحندقوق بطريقة النقع بالهكسان:

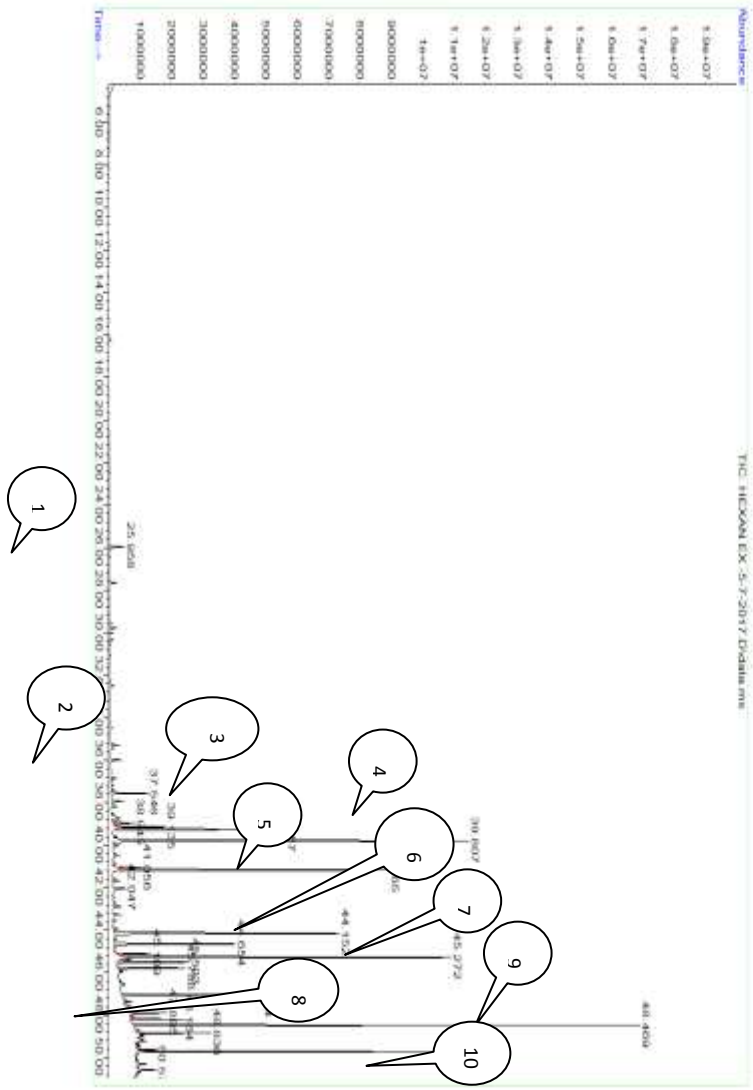
تم التعرف من خلال الكروماتوغرامGC-MS (الشكل(2)والجدول(2)) العائد للزيت العطري المستخلص من أوراق نبات الحندقوق بطريقة النقع بالهكسان، على22مكوناً من مكوناته التي تشكل حوالي(99.88%) من وزن العينة المدروسة.

يتبين من الجدول (2) أن المكونات الرئيسية لهذا الزيت العطري هي على الترتيب بحسب نسبها المئوية كالآتي:

Palatinol (17.77%) ، 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester(12.85%) ,

1-(Dimethylamino)-5-[(4'-ethynylphenyl)ethynyl]naphthalene(12.59%)

2,4-Dioctylphenol(9.73%),Hexadecanoic acid, methyl ester (8.99%), ecosane(8.53%).



الشكل(2) الكروماتوغرام GC-MS للزيت العطري المستخلص من أوراق نبات الحندقوق بطريقة النقع بالهكسان

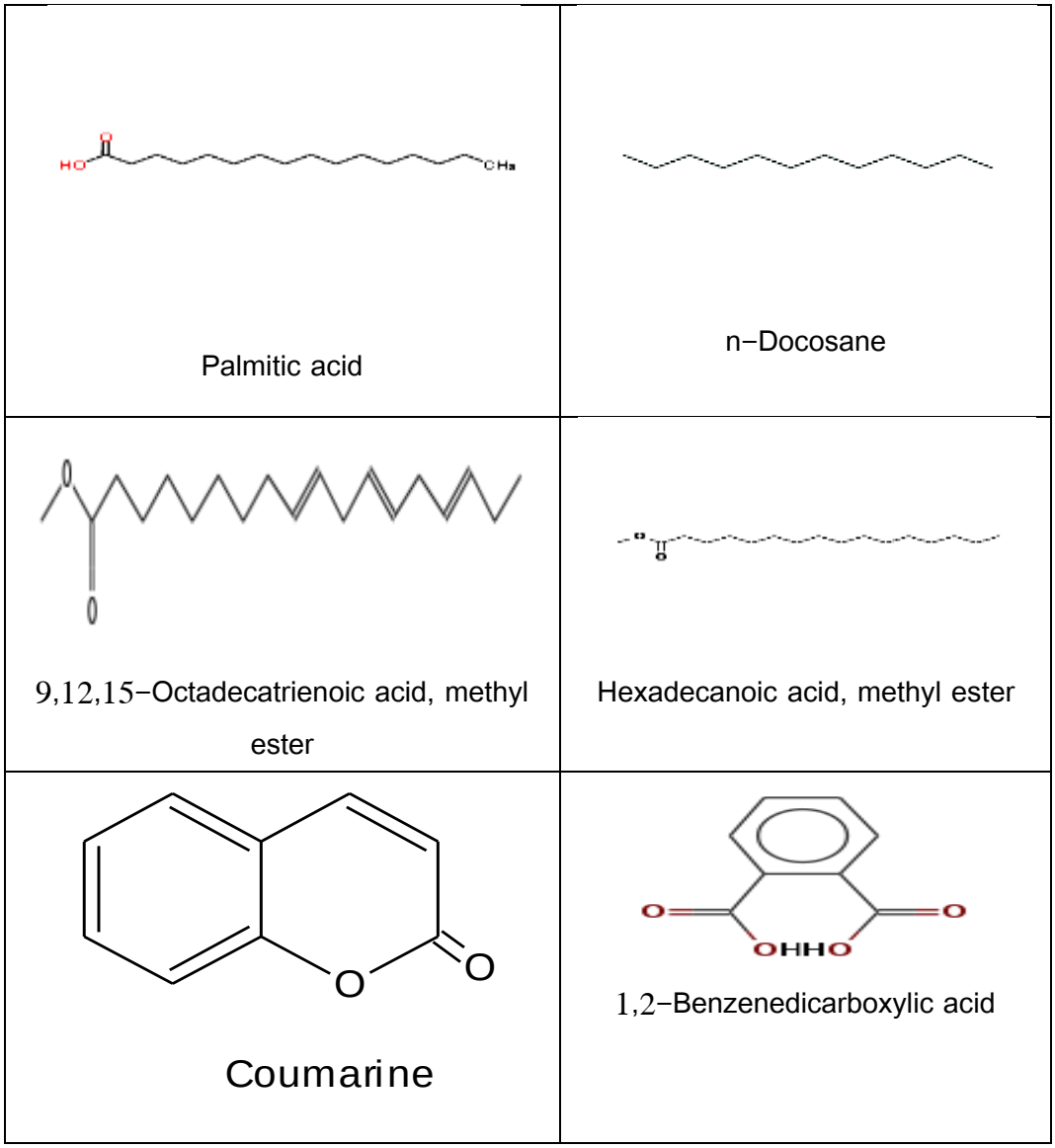
الجدول(2)النسب المئوية لمكونات الزيت العطري لأوراق نبات الحندقوق باستخدام طريقة النقع بالهكسان:

Peak	Compound	R.Time(s)	Precentage%
1	Hydrocoumarin (Benzodihydropyrone)	25.958	0.5705
2	Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-	37.5462	1.2804
3	2-Isopropyl-4,5,7,8-tetramethylazulene	38.9447	0.7818
4	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- (Hexahydrofarnesyl acetone)	39.1348	1.5476
5	4-Hydroxy-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracen-1-one	39.257	5.9516
6	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (CAS) (Palatinol IC)	39.8068	17.7791
7	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS) (Methyl palmitoleate)	41.056	0.7049
8	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) (Methyl palmitate)	41.1646	8.9958
9	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (CAS) (Butyl phthalate)	42.0471	0.6759
10	2,4-Dioctylphenol	44.1516	9.7325
11	9-methoxy-11-methyl-5-methyliminomethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole	44.6539	4.1673
12	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	45.1088	1.103
13	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)- (CAS)	45.2717	12.8598
14	Neophytadiene (7,11,15-TRIMETHYL,3-METHYLENE-1-HEXADECENE)	45.5025	2.4096
15	Octadecanoic acid, methyl ester (Stearic acid, methyl ester)	45.7876	2.0713
16	n-Docosane	47.0435	3.6494
17	(1R,2R)-10-(Morpholino)isoborneol	47.8853	1.0774
18	ENDO-BENZYLINDEN	48.184	1.2892
19	1-(Dimethylamino)-5-[(4'-ethynylphenyl)ethynyl]naphthalene	48.4691	12.5969
20	Methyl 18-methylnonadecanoate	48.8357	1.4689
21	Docosane	49.7183	8.5351
22	N,N-Dimethyldodecanamide (N,N-dimethyl- Dodecanamide)	50.5736	0.7518
	المجموع الكلي		99.88%

لحظ بمقارنة مكونات الزيت العطري لأوراق نبات الحندقوق المستخلص بطريقة سوكسيليه مع مكونات الزيت العطري المستخلص من الأوراق بطريقة النقع بالهكسان أن هناك تفاوت بسيط في النسب المئوية للمكونات الرئيسة بين طريقتي الاستخلاص المذكورين.

على سبيل المثال نسبة Neophytadiene بطريقة سوكسيليه كانت5.84% فيما كانت نسبة المركب نفسه بطريقة النقع بالهكسان2.40% .

كما لُحظ تفاوت ملحوظ بين النسبة المئوية للمركب Hydrocoumarin بطريقة سوكسيليه15.39% و بطريقة النقع بالهكسان0.57%، ويعزى هذا الإختلاف في النسب المئوية للمكونات الأساسية وغيرها إلى أن المذيب يمكن أن يذيب مكونات أخرى إضافة إلى المكونات العطرية. ويوضح الشكل(3) بعض الصيغ الكيميائية لمكونات الزيت العطري المستخلص للحندقوق



الشكل(3) بعض الصيغ الكيميائية لمكونات الزيت العطري لمستخلص الحندقوق

2- دراسة تأثير الخلاصات الورقية لنبات الحندقوق السوري Melilotusofficinalis على بعض الجراثيم و الفطور:

يعرف عن نبات الحندقوق الطبي امتلاكه لخواص مضادة للميكروبات، ففي إيران تستخدم الخلاصة الجافة له لعلاج إصابات تقرح القدم الفطرية لكونه يمتلك خواص ضد فطرية، تعود لغليكوزيدات الكومارين الذي استخدم طويلاً في الطب الشعبي لعلاج أمراض مُعدية [18,19,20].

درس تأثير وجود المستخلصات الميتانولية في الأنابيب المعدة لنمو الجراثيم والفطريات التجريبية خلال ذلك سجلت النتائج المبينة في الجدول3:

الأحياء الدقيقة	قيم ال MIC للخلاصة النباتية (ملغ)
جراثيم سالبة غرام	
الايشيرشيا القولونية: Escherchia coli	15
الكليبسيلا الرئوية: Klebsiella pneumonia	18
المتقلبة الرائعة: Proteus mirabilis	20<
الزائفة الزنجارية : Pseudomonas aeruginosa	25
جراثيم ايجابية غرام	
مكورة عنقودية ذهبية: Staphyliococcusaureus	25<
مكورة عقديةقيحية: Streptococcuspyogenes	30
العصية الرقيقة: Bacillus subtilis	25<
العصية الشمعية: Bacillus cereus	25
خميرة المبيضات البيض: Candida albicans	35

يلاحظ من هذه النتائج أن تأثير الخلاصة الورقية الميتانولية لنبات الحندقوق كان أكبر على الجراثيم سالبة غرام ثم إيجابية غرام ثم الخمائر.

المناقشة:

تتوافق نتائجنا مع نتائج (Elvira Nacsa-Farkas et. Al) عام 2013 [21]، من حيث حدوث تأثير للخلاصات المائية و الكحولية على مجموعة كبيرة من سلالات الخمائر بما فيها خمائر المبيضات البيض المدروسة لدينا. تتوافق نتائجنا مع نتائج [22] من حيث كون تثبيط الجراثيم إيجابية غرام و الخمائر تطلب استخدام التراكيز الأعلى من الخلاصات العائدة للحندقوق. في المقابل، فإن هناك دراسات أخرى حصلت على نتائج تؤكد أن خلاصات نبات الحندقوق كانت أقل فعالية في التأثير على الخمائر و على الجراثيم بشقيها إيجابية غرام و سالبة غرام بما فيها تلك الجراثيم المختبرة في دراستنا [23,24].

الاستنتاجات والتوصيات :

من خلال استخدام طرائق الاستخلاص والفصل المختلفة وإجراء القياسات والتحاليل الكروماتوغرافية من التوصل إلى النتائج الآتية :

1. أوضحت الدراسة أن مردود الزيت العطري المستخرج من أوراق نبات الحندقوق(بطريقة النقع بالهكسان) قد وصلت الى 1.8% من وزن العينة الجافة.
2. فيما كان مردود الزيت العطري المستخرج من أوراق نبات الحندقوق(بطريقة سوكسيليه) نسبته 0.9% من وزن العينة الجافة.
3. تم من خلال تحليل الزيت العطري المستخلص من أوراق نبات الحندقوق تحديد 33 مكوناً من مكوناته التي شكلت مايقارب 99.91% من المجموع الكلي للزيت العطري المستخلص بطريقتي الاستخلاص المعتمدة في البحث، وكانت المكونات الرئيسة للزيت العطري الناتجة بطريقة سوكسيليه:

n-Docosane (39.82%), Hydrocoumarin (15.39%),

Methyl 3-(2-hydroxyphenyl)propionate(14.29%).

أما المكونات الرئيسة للزيت العطري الناتجة بطريقة النقع بالهكسان :

Palatinol (17.77%) ، 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester(12.85%) ,

1-(Dimethylamino)-5-[(4'-ethynylphenyl)ethynyl]naphthalene(12.59).

4. تمت دراسة تأثير الخلاصات الورقية لنبات الحندقوق السوري *Melilotusofficinalis* في بعض الجراثيم و الفطور و كان تأثير الخلاصة أكبر في الجراثيم سالبة غرام ثم إيجابية غرام ثم الخمائر

وتم تحديد قيم التركيز الأصغري للتثبيط (MIC) باعتماد طريقة التخفيف في الأنابيب وكانت أدنى قيمة للتركيز الأصغري للتثبيط في حالة جرثومة الايشيرشيا القولونية(Escherchia coli) 15ملغ.

وفي النهاية لا بد من الانتباه إلى التوصيات الآتية:

- استكمال دراسة هذا النبات من خلال استخلاص الزيت العطري بطرائق استخلاص مختلفة بهدف التعرف على مكوناته الكيميائية وتحديد البنى الكيميائية له بطرائق طيفية مختلفة.
- زيادة الأبحاث باتجاه عزل وتنقية المواد الفعالة الموجودة في المستخلصات الكحولية لنبات الحندقوق ودراسة تأثيراتها وفعاليتها الحيوية اتجاه الكثير من الأحياء الدقيقة الممرضة.
- نظرا لاعتبار نبات الحندقوق من النباتات الطبية الهامة فلا بد من ضرورة التوسع في زراعة وإجراء دراسات بيئية لاحقة على هذا النبات لانتخاب أفضل الطرز من حيث الإنتاجية و النوعية.
- استكمال هذه الدراسة من الناحية الطبية والصيدلانية لإمكانية قبوله كتطبيق مناسب للعلاج أم مساعد للعلاج.
- العمل على حفظ الأنواع البرية للنباتات في قطرنا من التدهور والانقراض من خلال تعزيز النوعية الشعبية في المحافظة على هذه الأصول الوراثية من النباتات الطبية.

المراجع:

[1] SCHEUER, M. L.; PDLEY, T. A."*The evaluation and treatment of seizures*". The New England Journal of Medicine**.**323(21),1990,pp:74-1468.

[2] NASSER, N. M.; AL-ANI, W."*Isolation of coumarin from Melilotus Officinalis of Iraq*". Pharmacie Globale ,2(6),2014,pp:1.

[3] NASSER, N. M.; AL-ARAJI, M.; AL-ANI, M. K."*Antifungal activity of Melilotus Officinalis of Iraq*".Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,6(11),2014,pp:611-617.

[4] GUDZENKO, A. V.; VINOGRADOV, B. A."*Chemical composition of the Essential Oil from Melilotus Officinalis(L)pall*".World Applied Sciences Jornal.29(2),2014,pp:171-172.

[5] OGLE, D.; JOHN, L. S.; STANNARD, M.; HOLZWORTH, L."*Legume and woody species for the Intermountain West*". Washington, DC, USA: USDA-NRCS Tech-nical Note, TN Plant Materials. 24,2008,pp:43.

[6] SHAMIM, S.; AHMED, S.; HASAN, M. M.; ANWER, M. S.; AZHAR, I."*Hypotensive Activity of Melilotus Officinalis(L)pall*".European Journal of Medicine.3,2015,pp:80-85.

[7] MENKOVI´C, N., ˇSAVIKIN, K., TASI´C, S., ZDUNI´C, G., STEˇSEVI´C, D., MILOSAVLJEVI´C, S., VINCEK, D." *Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro)*".*Journal of Ethnopharmacology.* 133,2011,pp: 97–107.

[8] RAZAVI, S. M., ZARRINI, G.; ZAHRI, S.; MOHAMMADI, S. "*Biological activity of Prangos uloptera DC*". Natural Product Research. 24,2010,797-803.

[9] MADOUS, G.; " *Lehrbuch der Biologisch Heilmittel Band II, Gery Olms Verlag*". 1976,PP:1862.

[10] BUNNEY, S."*The Illustratcd Encyclopedia of Herb*".Their Medicinal and Culinary uses, Chanceller Press London,1992,PP:190.

[11] BRUNETON, J."*Pharmacognosie, Phytochimie, Plants medicinales*". Tec et Doc, Paris.1999,PP:263-265.

[12] RAZAVI, S. M., GHASEMIYAN, A.; SALEHI, S.; ZAHRI, F." *Screening of biological activity of Zosima absinthifolia fruits extracts*".Eur asia J Bio sci.3,2009,PP:25-28.

[13] *GUDZENKO, A. V.; VINOGRADOV, B. A." Chemical Composition of the Essential Oil from Melilotus officinalis(L.)Pall".*World Applied Sciences Journal.29 (2),2014,pp:171-172.

[14] KOVALEVA, A. M., GRUDKO, A. M.; ALEKSANDROV, A. N.; KOMISSARENKO, A. N."*chemical composition of the Essential oil from Melilotus Officinalis".*Chem.Nat.Comp.45,2009,PP:585-586.

[15] KRZAKOWA, M.; GRZYWACZ, E." *Phenolic compounds pattern in sweet clover (Melilotus officinalis)vs white clover (M. alba) revealed by 2D TLC (two-dimentional thin-layer chromatography) and its taxonomic significance*".
Adam Mickiewicz University, 56,2010,PP:3.

[16] ANWER, M. S., MOHTASHEEM, M., AZHAR, I., AHMED, S. W., BANO, H. "*Chemical constituents from Melilotus officinalis".*Journal of Basic &Applied Sciences,4(2),2008,PP: 89-94.

[17] MUTASHER, F. K.; AZIZ, G. M.; ABDUL-RAZZAK, A. W." *STUDIES ON Coumarin compounds isolated*

from Melilotus indica and its effect on some pathogenic bacteria and hela cell line".Iraqi Journal of Life Technologies ,8(1),2009,PP:386-399.

[18] KRZAKOWA, M." *Keriapolonic"*.56(3),2010,PP:53-61.

[19] CLARA, E.; QUIJANO, C.; JORGE, A.; GUSTAVO, M." *The chemical composition of the leaves oil of Melilotus officinalis (L.)*". Journal of Essential Oil Bearing Plants. 13(3),2010,PP: 313-315.

[20] PLESCA, L.; PARVU, A. E.; PARVU, M.; TAAMAS, M.; BUIA, R." *Effects of Melilotus officinalis on acute inflammation"*. Phytotherapy Research.16, 2002,pp: 316.

[21] NACSA-FARKAS, E.; PAULIUK, I."*Anticandidal Effect Of The Extracts From MelilotusOfficinalisAnd AristolochiaClematitis"*. Review On Agriculture And Rural Development.2(1), *2013,pp: 2063-4803*.

[22] OLGICA, D.; STEFANOVI et al."*Melilotusalbus and Dorycniumherbaceumextracts as source of phenolic compounds and their antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potentials*". journal of food and drug analysi.23,2015,PP:417-424 .

[23] CAOVI, A.; DJOKOVI_C, G.; DJUKI_C, D.; MANDI_C, L.; KALINI_C, S.; BO_SKOVI_C, T. "*Antimicrobial activity of the petrol-ether and ethyl-acetate extracts of Melilotusofficinalis (L.) Pall, Melilotusalbus Medic. and MelitismelissophyllumL*". Lekovitesirovine,22,2002,PP:59-63 .

[24] KARAKAS, F.P.; YILDIRIM, A.; TU¨ RKER, A. "*Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities*". Turk J Biol.2012,36,PP: 52-641 .