



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

**فصل وتشخيص عدد من النواتج الطبيعية لأزهار بعض
النباتات الطبية وتأثيراتها الاحيائية والتأزرية مع الفينازين
المعزول من جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*
ضد بعض أنواع الأحياء المجررية الممرضة**

فاطمة إبراهيم سلطان الدليمي

أطروحة دكتوراه
علوم الحياة/ علم النبات

بإشراف

الأستاذ

الدكتور عبد الرزاق خضر محمود

الأستاذ

الدكتور أياد جاجان الداودي

الخلاصة

اهتمت الدراسة الحالية بكيماويات النباتات والفعالية المضادة للأحياء المجهرية لأزهار ثلاثة نباتات طبية وهي القرنفل الشجيري، الاقحوان والكجرات وشملت محورين: المحور الأول: أنجز في مختبرات كلية التربية/ علوم الحياة/ جامعة الموصل إذ تضمن فصل وتشخيص بعض المركبات الفعالة من أزهار النباتات الثلاث المختارة واختبرت فعاليتها ضد بعض أنواع الأحياء المجهرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام والخميرة *Candida albicans* لوحدها تارةً وتأثيرها التآزري مع الفينازين المفصول والمنقى من جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* تارةً أخرى.

فصلت بعض المركبات الفعالة باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي (CC) Column Chromatography وعملية الصبونة Saponification لفصل بعض الأحماض الدهنية والتحلل الحامضي لفصل بعض المركبات الفينولية الحرة وشخصت الأحماض الدهنية باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغاز - السائل (GLC) Gas Liquid Chromatography في حين شخصت المركبات الفينولية بجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) High Performance Liquid Chromatography كما استخدم جهاز التقطير البخاري المحور Clevenger لفصل الزيت الطيار الثقيل من البراعم الزهرية للقرنفل الشجيري. أظهرت نتائج التشخيص بتقانة الـGLC ان أزهار النباتات الثلاث غنية بالأحماض الدهنية إذ فصل سبع أحماض دهنية من أجزاء المستخلصات المفصولة (اللوريك، البالمتيك، اللينولينيك، الستياريك، الاوليك، الهبتانويك والاوكتانويك) وساد حامض اللوريك في براعم القرنفل الشجيري والبالمتيك في أزهار الاقحوان واللينولينيك في أزهار الكجرات. وتم تشخيص مركب الايجينول Eugenol وسلسليات المثل Methyl Salicylate بجهاز الـGLC من براعم القرنفل الشجيري.

وتم تشخيص عدة مركبات فينولية بجهاز الـHPLC مفصولة من أزهار النباتات المستخدمة قيد الدراسة، إذ شخص مركب البارو-هيدروكسي حامض البنزويك في النباتات الثلاث وحامض الكاليك في كل من القرنفل الشجيري والاقحوان، فضلاً عن تشخيص حامض المالبليك Maleic acid في أزهار الكجرات بجهاز الـHPLC.

أظهرت المستخلصات الخام وبعض المركبات الفعالة المفصولة (الأحماض الدهنية والفينولات والفينازين) كلاً حسب فصله وتنقيته تأثيراً تثبيطياً متبايناً حسب نوع النبات ضد الأحياء المجهرية قيد الدراسة عند اختبار ذلك باستخدام طريقة الانتشار بالاقراص Disc Diffusion Method والعكارة عند تقدير تركيزها المثبط الأدنى (MIC) Minimum Inhibitory Concentration.

Inhibitory Concentration وعند فصل قلويد الفينازين بشكل نقي من جرثومة الزائفة الزنجارية بقسطه من صفيحة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC مقارنة مع المركب القياسي تم تشخيصه بتقانة الـHPLC إذ اتضح ان زمن الاحتباس له مساوياً 9.220 دقيقة مقارنة مع المركب القياسي 9.227 دقيقة، وأبدى أيضاً تأثيراً تثبيطياً متبايناً ضد الأحياء المجهرية المستخدمة قيد الدراسة عند استخدامه لوحده وعند مزجه مع المركبات الفعالة المفصولة من النباتات المختارة.

المحور الثاني: أنجز في أحد مختبرات قسم الكيمياء/ جامعة بنكر Bangor/ بريطانيا، إذ تنفرد الدراسة الحالية في العراق بفصل وتشخيص حامض الاوليئانوليك Oleanolic acid والتاركساسستيرون Taraxasterol بشكل نقي Pure من النباتات قيد الدراسة وبأحدث طرق الفصل والتشخيص العالمية الكروماتوغرافية والطيفية.

تم الحصول على 0.03 غم من حامض الاوليئانوليك من أصل 1 غم من مستخلصي الاسيتوني والايثانولي الخام للبراعم الزهرية للقرنفل الشجيري بوساطة تقانة كروماتوغرافيا العمود المتكرر CC وباستخدام نظام المحلول (كلورفورم: ميثانول؛ 1:10). فصل ونقي مركب التاركساسستيرون Taraxasterol وتم الحصول على 0.005 غم منه من أصل 1 غم من مستخلص الايثر البترولي الخام لأزهار الاقحوان وتم تنقيته من الايزومرات بقسطه من طبقة الـTLC بنظام محلول (Ch:M; 20:1) وبالتقانة نفسها.

وتم أيضاً الحصول على 3 مل من مركب الايجينول Eugenol وبشكل نقي Pure من أصل 5 مل من الزيت الطيار و2.5 مل من أصل 5 مل من (مستخلص الايثر البترولي + الكلورفورمي) للبراعم الزهرية للقرنفل الشجيري ، وتم الحصول على 0.02 غم من الايجينول من أصل 1 غم من مستخلص الايثر البترولي الخام لأزهار الكجرات باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي المكرر CC ونظام محلول (الايثر البترولي: خلات الايثيل؛ 1:5) (P:E; 5:1). تم تشخيص المركبات الفعالة النقية (حامض الاوليئانولينيك، مركب التاركساسستيرون، الايجينول والفينازين) بأحدث الطرق الطيفية والكروماتوغرافية المتوفرة في جامعة بنكر البريطانية كجهاز NMR وبتردد 400 ميكاهيرتز للبروتون ¹H و101 ميكاهيرتز لقياس ¹³C، فضلاً عن استخدام تقانة COSY & HSQC لتشخيص المركب بشكل دقيق إذ ظهرت حزم تعود إلى 48 بروتون و30 ذرة كربون لحامض الاوليئانوليك وحزم تعود إلى 50 بروتون و30 ذرة كربون لمركب التاركساسستيرون وحزم تعود إلى 12 بروتون و10 ذرات كربون لمركب الايجينول و8 بروتونات و12 ذرة كربون تعود إلى قلويد الفينازين.

استخدمت أجهزة متعددة لتقدير الأوزان الجزيئية للمركبات المفصولة بشكل نقي إذ تم استخدام جهاز مطياف الكتلة Mass Spectroscopy وجهاز الـMALDI-MS

وكروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة GC-MS وتبين ان الوزن الجزيئي لحامض الاوليانوليك و 456.3621 ولمركب التاركساسستيرون 426.3830 ولمركب الايجينول 164.10 وكان الوزن الجزيئي لقلويد الفينازين 180.14 وجميعها مطابقة للأوزان الجزيئية القياسية الموجودة داخل الجهاز. وشخصت المجاميع الوظيفية للمركبات الفعالة المفصولة بواسطة جهاز طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR.

اُختبرت الفعالية التثبيطية للمركبات الفعالة المفصولة بشكلها النقي ضد ثلاثة أنواع من الأحياء المجهرية هي *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Candida albicans* باستخدام جهاز المطياف الضوئي المزود بصفحة LT-4000 Plate Reader الحاوية على 96 خلية لعشر تراكيز من (1-512) مايكروغرام/مل، ولتوضيح التأثير التآزري لهذه المركبات النقية المفصولة من النباتات الثلاث تم مزجها مع مركب الفينازين باستخدام طريقة ال-MIC، أعطى حامض الاوليانوليك والايجينول فعلاً تآزرياً متبايناً Synergism مع الفينازين ضد الأحياء المجهرية الثلاثة المختارة، في حين أعطى مركب التاركساسستيرون عند مزجه مع الفينازين فعلاً مضاداً Antagonism ضدهم.

Abstract

Phytochemical and antimicrobial screening of three medical flowers which are Clove, Marigold, and Roselle under the study and contained two pivot:

The first pivot: It was done at the laboratories of College of Education / Department of Biology/ University of Mosul. It was included the separation and identification of some active constituents from the flowers of the three selected plants and their activities were tested against some types of gram positive, gram negative bacteria and the yeast *Candida albicans* alone at time and with its synergistic effect with separated purified phenazine from *Pseudomonas aeruginosa* at other time.

The active constituents were separated using Column Chromatography (CC) and Saponification for separating of some fatty acids and by acid hydrolysis for separating of some free phenolic compounds and the identification of fatty acids using Gas Liquid Chromatography (GLC). Phenolic compounds were identified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Clevenger was used for separating heavy volatile oil from the buds of Clove.

GLC technique was indicated that the flowers of the three plants were rich with fatty acids where seven fatty acids were separated from the fractional separated extracts as Lauric, Palmitic, Linolenic, Stearic, Oleic, Heptanoic and Octanoic, where Lauric acid was dominated in the Clove buds and Palmitic in the Marigold flowers and Linolenic in the Roselle flowers. Besides, Eugenol and Methyl Salicylate were identified by GLC from Clove buds.

Many phenolic compounds were identified by HPLC which were separated from the flowers of the plants under study where P-Hydroxybenzoic acid compound and Benzoic acid were identified in the

three plants and Gallic acid in each of Clove and Marigold. Besides, identification of Maleic acid in Roselle by HPLC apparatus.

The crude extracts and some active separated compounds (fatty acids, phenolics and phenazine), each according to its separation and purification, showed a different inhibitory effect according to the plant type against the micro-organisms (m.o) under study by using Disc Diffusion Method, turbidity and Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

Separation of pure phenazine alkaloid from *Pseudomonas aeruginosa* by scratching from thin-layer chromatography (TLC) in comparison with standard compound which was identified by HPLC indicated that the retention time equals (9.220) min. While that of standard compound (9.227) min. As giving a relative inhibitory effect against m.o under study when it used as alone and also when mixed with separated active constituents from the selected plants.

The second pivot: It was done in one of the laboratories of Dept. of Chemistry/University of Bangor/British. Where the present study in Iraq is marked by separation and identification of Oleanolic acid and Taraxasterol as alone (pure) from the plants under study and by the most modern methods of world spectroscopic and chromatographic separation and identification.

Oleanolic acid 0.03 gram were obtained from (1) gram of Acetonic and Ethanolic crude extracts for the buds of Clove by multiple Column Chromatography technique (CC) and by using solvent system (Chloroform: Methanol; 10:1). Also separation and purification of Taraxasterol compound obtained about (0.005) gram of it from (1) gram of crude petroleum ether extract for Marigold and purifying it from isomers by scratching it from TLC in a solvent system (Ch:M) in a ratio about (20:1) by the same technique.

Pure Eugenol (3) ml was obtained from (5) ml of volatile oil and (2.5) ml of (5) ml of (Petroleum ether + Chloroform extract) for the Clove

buds. Besides, (0.02) gram of Eugenol from (1) gram of crude petroleum ether extract for Roselle by using multiple Column Chromatography (CC) and solvent system (Petroleum ether: ethyl acetate; 5:1) (P:E; 5:1).

Pure active compounds were identified (Oleanolic acid, Taraxasterol compound, Eugenol and phenazine) by the most modern spectroscopic and chromatographic methods available in Bangor University British as NMR apparatus in a frequency (400) megahertz for ^1H and (101) megahertz for measuring ^{13}C . Besides, using the technique COSY & HSQC for ensuring the compound 100% where some bands up to (48) protons and (30) carbon atoms for Oleanolic acid, and bands up to (50) protons and (30) carbon for Taraxasterol compound, and bands up to (12) proton and (10) carbon atoms for Eugenol and (8) protons and (12) carbon atoms up to phenazine alkaloid.

Many apparatuses were used to determine the molecular weights for the purely separated compounds using the Mass Spectroscopy, MALDI-MS system indicated Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS). The result that the molecular weight for Oleanolic acid (456.3621), Taraxasterol compound (426.3830) and for Eugenol (164.10). Besides, the molecular weight for phenazine alkaloid was (180.10) and all of them were identical to the standard molecular weights inside the apparatus. The functional groups, of the separated compounds were identified by FT-IR apparatus.

The inhibitory activity of the separated pure active compounds were tested against three types of m.o which are *Staph. aureus*, *E. coli* and *C. albicanis* using the LT-4000 Plate Reader which contains about (96) cells for ten concentrations from (512-1) microgram/ ml. For clarifying the synergistic effect of these pure compounds, which were mixed with phenazine by using MIC method. Oleanolic acid and Eugenol have given different synergism action with phenazine against the three selected m.o while Taraxasterol compound, when mixed with phenazine, have given an antagonism action against them.

Separation and Identification of Many Natural
Products from Some Flowers of Medicinal Plants
and Their Biological and Synergistic effects with
Isolated Phenazine from *Pseudomonas aeruginosa*
Against Some Pathogenic Microorganism

A Thesis Submitted
By

Fatimah Ibrahim Sultan Al-Dulayymi

To
The Council of the College of Education for Pure Science
University of Mosul In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Ph.D.

In
Biology / Botany

Supervised by

Professor
Dr. Ayad Chachan
Al-Daody

Professor
Dr. Abdel Razaq Khdher
Mahmood

2014 A.D.

1436 A.H.