دراسات فيتوكيميائية وبيولوجية لبعض أنواع كونيزا (البرنوف) التي تنمو في مصر

رسالة مقدمه من

أحمد اسماعيل صبري

للحصول على درجة الماجستير في العلوم الصيدلية

(عقاقير)

تحت إشراف

أ.د/ سهير محمد الزلباني

أستاذ العقاقير- كلية الصيدلة –جامعة القاهرة

أ.م.د/ مني حافظ حته

أستاذ مساعد العقاقير والقائم بعمل رئيس القسم

كلية الصيدلة – جامعة بني سويف

كلية الصيدلة-جامعة بني سويف

٢٠١٢

الملخص العربي

الملخص العربي

تعتبر العائلة المركبة من أكبر العائلات الوعائية ومعظم أنواع هذه العائلة تنمو كأعشاب ولكن حوالي ٢% ينمو كأشجار وشجيرات صغيرة. أشهر نوعان في مصر هما كونيزا ديسكوريدس وكونيزا بونارينسيز اللذان ينموان في بني سويف والفيوم.

كطاردة للحشرات .

الاسم الشعبي للنوع الثاني (كونيزا بونارينسيز) باالغه الانجليزية هو بوفامارجاردينها دو كامبو.

وقد تم عمل مسح مرجعي لأنواع الكونيزا تناول المحتوي الكيميائي، النشاط البيولوجي والاستخدامات في الطب الشعبي.

تشمل الدراسة أربعة أجزاء

الجزء الأول: وصف الحمض النووي لكل من كونيزا ديسكوريدس (ل.) و كونيزا بونارينسيز(ل.) كروكويست

تم تكبير الحمض النووي المستخلص من نوعي النبات باستخدام عشر دلائل عديدة النيكليوتيدات لتقييم الإختلاف الجيني بين النوعين. تم استخدام هذه البوادئ بنجاح لتكوين قطع من الجينوم ذات بصمة مميزة للنباتين وذلك لمعرفة مدى التباين الجينى بينهما.

أوضحت دراسة البصمة الوراثية للنباتين وجود دلائل جينية متماثلة وهى: B14 B15, B19, B20, , و G12 وتأكد ذلك بتسجيلئ معامل التشابه الجينى نسبة 100% وبالتالى يمكن استخدام هذه الدلائل لتحديد جنس كونيزا. كذلك أوضحت الدراسة أن نسبه معامل التشابه الجينى بين هذين النوعين من جنس كونيزا هو ٨٨,٨٩%.

الجزء الثاني: دراسه مقارنة فيتوكيميائية

الفصل الأول: تعيين الثوابت الدسنورية

وقد أوضحت نتائج تقدير الثوابت الدستورية للنبات الكلي للنوعين : أن نسبة الثوابت (رماد كلي، رماد غير قابلة للذوبان في الحمض، رماد قابلة للذوبان في الماء والألياف الخام) للكونيزا بونارينسيز أعلي من كونيزا ديسكوريدس ما عدا نسبة الرطوبة فهي أعلي بكثير في كونيزا ديسكوريدس عنها في كونيزا بونارينسيز.

الفصل الثاني: مسح كيميائي أولي

نتائج المسح الكيميائي لمستخلص الكحول الايثيلي ٧٠% للنبات الكلي لنوعي النبات وثلاثه أجزاء من نبات كونيزا ديسكوريديس (أوراق، أزهار وجذور) كشف عن :

١- وجود الفلافونيدات ، التانين، كربوهيدرات و/أو جليكوسيدات، أستيرولات و/أو ثلاثية التربينات في النباتين وجميع أجزاء نبات كونيزا ديسكوريديس.

٢- وجود مواد طيارة وكومارين في أوراق الديسكوريدس و في النبات الكلي للبونارينسيز.

٣-عدم وجود القلويدات، الصابونين، المكونات البلوريه، جليكوسيدات الأنثراكينون والجليكوسيدات القلبيه في النباتين.

نبات كونيزا ديسكوريدس (أوراق، أزهار ،جذور) والنبات الكلي للكونيزا بونارينسيز

أسفرت نتائج الكشف بواسطة كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة عن:

١- وجود التربينات والاستيرولات في جميع أجزاء نبات الديسكوريدس.

٢- وجود الفلافونيدات فى مستخلص خلات الأيثيل والكحول الإثيلى للجذور.

٣- وجود الفلافونيدات بوضوح في مستخلص الكحول الإثيلى للجذور.

الفصل الرابع: تقدير المكونات الفينولية

أسفرت نتائج تقدير المكونات الفينولية للنوعين الديسكوريدس والبونارينسيز أن الديسكوريدس يحتوي علي نسبه أعلي من اجمالي المركبات الفينولية والفلافونيدات والتانين (١,١٧%، ٠,٦٢% و ٢,٤٣% مجم/جم) مقارنه بالبونارينسيز (٠,٩٦%، ٠,٢٩% و ١,٨٣% مجم/جم) علي التوالي.

الجزء الثالث: دراسة مقارنة لتقييم الأنشطة البيولوجية

الفصل الأول : تقييم مقارن للأنشطه البولوجية للنبات الكلي للنوعين (الديسكوريدس والبونارينسيز)

أ. دراسه بيولوجية داخل المختبر

١. النشاط المضاد لميكروبات

تم اختيار مستخلصات الكحول الايثيلي للنباتين ضد سلالات مختلفة من البكتريا والفطريات وأوضحت الدراسه الأتي :

١. أظهر المستخلص الكحولي الكلي للديسكوريدس نشاط ملحوظ عند تركيز (٢٠٠ ميكروغرام / مل) ضد *Mycobacterium pheli* ونشاط معتدل ضد ثلاثه أنواع من السلالات وهي : *Bacillus subtilis* ، *Listeria innocua* و*Candida albicans* عند تركيز (٤٠٠ ميكروغرام / مل).

٢. لا توجد أي فاعلية لمستخلص الكحول الايثيلي الكلي للبونارينسيز ضد جميع السلالات.

٢ . التأثير المضاد للأكسدة

أثبت مستخلص الكحول الإيثيلى للبونارينسيز أكثر كفاءه (٧٣,٥٪) من الديسكوريدس (٦٩,٥٪) والروتين المرجع (٨٨,٢%).

١ . التاثير السام علي الخلايا السرطانيه

تم اختيار ثلاثه أنواع من الخلايا السرطانية لاختبار فاعلية مستخلصات الكحول الايثيلي للنباتين موضوع الدراسة وأوضحت النتائج ما يلي :

١.مستخلص الديسكوريدس أوضح أكثر فاعلية (IC_{50} = ٢,٩٧) من البونارينسيز (IC_{50} = ١٧,٥) ضد خلايا سرطان الثدي .

٢. مستخلص البونارينسيز أكثر فاعلية ضد خلايا سرطان القولون (IC_{50}=٢١) وخلايا سرطان الرحم (IC_{50} =٥,٤) من الديسكوريدس (IC_{50} = ٣٤,٦) و (IC_{50} = ١٨) علي التوالي.

ب. دراسه بيولوجية داخل الحيوان

١. تحديد نسبة السمية الحادة نصف المميتة (الجرعة التي تقتل ٥٠ % من الجرذان)

وقد أسفرت نتائج هذه الدراسة عن أن المستخلصات الكحولية ٧٠% الكليه للنباتين آمنة حتى جرعة ٥٠ جم / كجم من وزن الجسم وأوضحت عدم وجود أي سميه وهي غير قاتلة.

٢. النشاط المضاد للالتهابات

وأظهرت النتائج علي المستخلصات الكحولية (٧٠%) الكليه للنبات الكلي لكل من الديسكوريدس و البونارينسيز عن أن مستخلص كونيزا ديسكوريدس له تأثير مثبط ملحوظ (٧٤,٢%) مقارنه بالبونارينسيز(٥٩%) والاندوميثاسين المرجع (٥٧,٥١%).

٣ . النشاط الخافض لنسبه السكر في الدم

أظهرت النتائج الاتية :

أ- عند تقييم مستوي جلوتاثيون الدم (GSH) للمستخلص الكحولي الكلي للديسكوريدس وجد أنه ذات فاعلية (٣,٤٤ ± ٤٥,٠٤مجم %) أكثر من البونارينسيز(٣,٧١ ±٤٠,٧٨ مجم %) ، P < ٠,٠٥.

ب- أما مستوي المالون داي ألدهيد (MDA) للمستخلص الكحولي الكلي للديسكوريدس أظهر فاعلية (٠,٣% ± ٢,٠٤ nmol/ml) أكثر من البونارينسيز(٠,٥٣ ±٣,٠٣ nmol/ml)، P < ٠,٠٥.

ت- أما بالنسبه لتقييم مستوي الجلوكوز بالدم للمستخلص الكحولي الكلي تبين من الدراسة أن البونارينسيز ذات فاعلية (٧,٣٨% ± ١٠٤,٦٣ nmol/ml) أكثر من الديسكوريدس (٨,٢٥ ±١٠٦,٤٥ nmol/ml) ، P < ٠,٠٥.

ث- وعند تقييم مستوي الأنسولين بالدم وجد أن المستخلص الكحولي الكلي للبونارينسيز ذات فاعلية (٠,٧ ± ٦,١٣ ng/ml) أكثر من الديسكوريدس (٠,٤٠ ±٦,١٠ ng/ml) ، P < ٠,٠٥.

جميع النتائج السابقه مقارنه مع المرجع (جليكلازايد).

٤. التاثير السام علي الخلايا باستخدام تجربة حدد اليرقات المميتة لبيض الجمبري (Brine shrimp lethality)

أظهرت النتائج انه عند استخدام مستخلص الكحول الايثيلي لنباتي الديسكوريدس والبونارينسيز بجرعه ٥٠ مجم / مل فانها تعد غير سامة علي اليرقات ويقترح زياده الجرعة المستخدمة حتي يظهر التأثير السام.

الفصل الثاني: تقييم مقارن للأنشطه البيولوجية للأجزاء المختلفه لنبات الديسكوريدس

أ. دراسه بيولوجية داخل المختبر

١. النشاط المضاد لميكروبات

تم اختيار المستخلصات المتتابعة لأوراق وأزهار وجذور الديسكوريدس ضد سلالات مختلفة من البكتريا والفطريات وأوضحت الدراسه الاتي :

١. مستخلص الكحول الإثيلى للجذور ومستخلص خلات الإيثيل للأوراق لنبات الديسكوريدس لهما نشاط ملحوظ ضد *Mycobacterium pheli* عند تركيز (٥٠ ميكروغرام / مل)، يليه خلات الإيثيل ومستخلص الأثير البترولي للأزهار (١٠٠ ميكروغرام / مل)، الكلوروفورم وخلات الايثيل للجذور (١٠٠ ميكروغرام / مل) ومستخلص الاثير البترولي والكلوروفورم للأزهار (٢٠٠ ميكروغرام / مل)، وأظهرت وجود نشاط معتدل للأثير البترولي، الكلوروفورم والكحول الإثيلى للأوراق (٤٠٠ ميكروغرام / مل).

٢.وأظهر مستخلص الكحول الإثيلى للجذور نشاط ملحوظ ضد *Bacillus subtili* (١٠٠ ميكروغرام / مل)، يليه مستخلص الكلوروفورم للأزهار ومستخلص خلات الإيثيل للأوراق ومستخلص الكلوروفورم وخلات الأيثيل للجذور (٢٠٠ ميكروغرام / مل)، وأظهرت وجود نشاط معتدل بتركيز (٤٠٠ ميكروغرام / مل) لمستخلص خلات الإيثيل للأزهار، ومستخلص الكلوروفورم للأوراق ومستخلص الأثيرالبترولي، الكلوروفورم والكحول الإثيلى للأوراق والأزهار والجذور.

٣. وأظهر مستخلص الكلوروفورم للأزهار نشاط ملحوظ ضد *Listeria innocua* (٢٠٠ ميكروغرام / مل) ونشاط معتدل لمستخلص خلات الايثيل و الكحول الإثيلى للجذور(٤٠٠ ميكروغرام / مل).

٤. وأظهرت مستخلصات خلات الايثيل والكحول الإثيلى للجذور نشاط ملحوظ ضد *Candida albicans* (٢٠٠ ميكروغرام / مل) ونشاط معتدل من الأثير البترولي والكلوروفورم للأزهار و ومستخلصات الكلوروفورم للجذور (٤٠٠ ميكروغرام / مل).

٥. كما أظهر مستخلص الكلوروفورم من للأزهار والجذور نشاط ملحوظ ضد *Staphylococcus aureus* "Non-pathogenic LMG 3242" (٢٠٠ ميكروغرام / مل) .

Escherichia coli, [illegible]

Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus "pathogenic LMG 3242" و

Staphylococcus aureus "Lab. Strain"

٢ . التأثير المضاد للأكسدة

أثبت مستخلص الكحول الإيثيلى لأزهار الديسكوريدس أكثر فاعلية مثبطة (٨٧,٥%) عند المقارنه ببقيه العينات المختبرة: الجذور (٧٦,٥%) والأوراق (٧٠,٥%) والروتين المرجع (٨٨,٢%).

٣ . التأثير السام علي الخلايا السرطانية

تم اختيار ثلاثه أنواع من الخلايا السرطانية للانسان لاختبار فاعلية مستخلصات الكحول الايثيلي لأجزاء نبات الديسكوريديس الثلاثة وأوضحت النتائج أن مستخلص الأزهار للديسكوريدس هو الأكثر فاعلية (= IC_{50} ٢,٦٧) ضد خلايا سرطان الثدي مقارنة بالأوراق والجذور .

ب. دراسه بيولوجيه داخل الحيوان

١. تحديد نسبة السمية الحادة نصف المميتة (الجرعة التي تقتل ٥٠ % من الجرذان)

وقد أسفرت هذه الدراسة عن أن المستخلصات الكحولية (٧٠%) الكلية لجميع أجزاء النبات آمنة وغير قاتلة حتى جرعة ٥٠ جم / كجم من وزن الجسم.

٢. النشاط المضاد للالتهابات

وأظهرت النتائج أن المستخلص الكحولي ٧٠% للأوراق هو الاكثر فاعلية (٦٧,٢%) يليه الأزهار (٧٢,٦%) ثم الجذور(٦٦,٦%) عند المقارنه بالاندوميثاسين المرجع (٧٨,٥%).

٣ . النشاط الخافض لنسبة السكر في الدم

أظهرت النتائج الاتي :

أ- عند تعيين مستوي جلوتاثيون الدم (GSH) وجد أن المستخلص الكحولي لأوراق الديسكوريدس هو الأكثر فاعليه (٣,٢٤ ± ٤٥,١٤مجم %) مقارنه ببقيه الأجزاء، (٤,٥٨ ± ٤٤,٢٥مجم %) للجذور و (٤,١١ ± ٤٤,١٤مجم %)) للأزهار ، P < ٠,٠٥.

ب- أما بالنسبه لمستوي المالون داي ألدهيد (MDA) فقد وجد أن المستخلص الكحولي لأوراق الديسكوريدس هو الأكثر فاعلية (٠,٣١% ± ٢,٠٢nmol/ml) مقارنة ببقيه الأجزاء، (٠,٣٨% ± ٢,٢ nmol/ml) للجذور و (١,٠٧% ± ٥,٤٣ nmol/ml) للأزهار ، P < ٠,٠٥.

ت- أما عند تقييم مستوي الجلوكوز بالدم وجد أن المستخلص الكحولي لجذور الديسكوريدس هو الأكثر فاعلية (٨,٢٥% ± ١٠٦,٤٥ nmol/ml) مقارنة ببقيه الأجزاء، (٩,٨٣% ± ١٠٩,٣٦ nmol/ml) للأوراق و (٣٩,٨٢% ± ٢٨٤,٨١ nmol/ml) للأزهار ، P < ٠,٠٥.

الأكثر فاعلية (٠,٨٣ ±٦,٥٣ ng/ml) مقارنة ببقيه الأجزاء، (٠,٦٨ ±٦,١٧ ng/ml) للأوراق و (٠,٥٧ ± ٢,٥٥ ng/ml) للأزهار ، P < ٠,٠٥.

جميع النتائج السابقه مقارنة مع المرجع جليكلازايد.

٤. التأثير السام علي الخلايا باستخدام تجربة عدد اليرقات الميتة لبيض الجمبري (Brine shrimp lethality)

أظهرت النتائج ان مستخلص الكحول الايثيلي للأزهار له تأثيرا مميتا بنسبه ١٠٠% مقارنة بباقي الأجزاء (٦٤,٢٨٪) للأوراق تليه الجذور (٤٦,٦٦٪) ومقارنه مع DMSO (٣٠%) كمجموعة حاكمة .

الجزء الرابع: فصل وتعريف مركبات نبات الكونيزا ديسكوريدس

تم اختيار جذور الديسكوريدس للدراسه الكيميائيه ولفصل المركبات استنادا علي عدد من الأسباب أهمها ان الـ ذات فاعلية كبيرة لخفض مستوي السكر بالدم مقارنة ببقية أجزاء النبات وأنه أيضا لم يتم دراستها باستفاضه كي من قبل وذلك بناءا علي المسح المرجعي.

الفصل الأول: دراسة مستخلص الأيثر البترولي

- دراسة المواد الدهنية لمستخلص جذور كونيزا ديسكوريدس :

تم تجزئة مستخلص الايثير البترولي الي مواد غير قابله للتصبن ومواد متصبنه وتم تحليلها كميا وكيفيا باس جهاز كروماتوجرافيا الغاز وتتلخص النتائج في الاتي :

١. التعرف علي واحد وعشرون مركبا يمثلون (٦٧,٠٤%) منهم مواد هيدروكربونية (٣٩,٤٧%) واسيترو وتربينات ثلاثية (٢٧,٣٠%).

٢. أعلي نسبه ماده هيدروكربونية هي نوناكوزان (٩,٨٣%) وأعلي نسبه سيترولات هو استجماسي (٥,٧١%) وأعلي نسبة مادة ثلاثية التربين هي ليبيول (٩,٢٩%).

٣. تم التعرف علي سته عشر مركبا من الأحماض الدهنية يمثلون (٨٦,٤٤%) بينهم (٨٢,١%) من الأح الدهنية المشبعة و (٤,٣٤%) أحماض دهنية غير مشبعة.

٤. أكثر حمض مشبع هوحمض أوكتاكوزانويك (حمض المونتانيك) (٧٠,٩٩%) بينما أكثر حمض غير مشب حمض ايروسيك (١,٨٤%).

تم استخدام كروماتوجرافيا العمود ومذيبات متدرجة القطبية لفصل المواد غير قابله للتصبن من الجذور وقد تم وتعريف ثلاثه مركبات : ك١، ك٢وك٢.

الفصل الثاني : دراسة مستخلص الكلوروفورم

تم فصل وتعريف ثلاثه مركبات من مستخلص الكلوروفورم باستخدام كروماتوجرافيا العمود ومذيبات من القطبية وقد تم تنقية المركبات المفصولة بالطرق الكروماتوجرافية المختلفة و المركبات هي : ك٤، ك٥ وك٦.

الفصل الثالث : دراسة مستخلص الكحول الإثيلى

تم فصل المركبات في مستخلص الكحول الإثيلى باستخدام كروماتوجرافيا العمود ومذيبات متدرجة القطبية و فصل وتعريف سبعة مركبات : ك٧، ك٨، ك٩، ك١٠، ك١١،ك١٢و ك١٣.

تم التعرف علي جميع المركبات المفصولة من المستخلصات السابقة عن طريق فحص درجه الانصهار وباس الطرق الطيفية المختلفة ومقارنة مع البيانات الموضحه بالمسح المرجعي للمركبات السابقة الفصل.

المركبات المفصولة من جذور نبات كونيزا ديسكوريدس وطرق التعرف عليها

رقم المركب	المستخلص	طريقة التعرف علي المركبات	المركب
١	الاثير البترولي	m.p, ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, gHMQC, gHMBC	كوليستيرول
٢	الاثير البترولي	m.p, ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, gHMQC, gHMBC	بيتا- سيتوستيرول
٣	الاثير البترولي	m.p and by co-TLC with authentic	ألفا امايرين
٤	كلوروفورم	m.p , TLC compared to reported data	غالبا الكونايزين
٥	كلوروفورم	m.p , ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, gHMBC.	خلات الليبيول
٦	كلوروفورم	m.p and by co-TLC with authentic	بيتا-سيتوستيرول جلوكوزيد

	m.p, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, gHMQC, gHMBC	[illegible]	
٨	m.p., ^{1}H NMR	الكحول الإثيلى	حمض الكافييك
٩	m.p , ^{1}H NMR	الكحول الإثيلى	حمض السيرنجيك
١٠	m.p, UV, ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR, gHMQC, gHMBC	الكحول الإثيلى	روتين
١١	m.p, UV and by co-TLC with authentic	الكحول الإثيلى	كورسيتين
١٢	m.p, UV, ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR, gHMQC, gHMBC	الكحول الإثيلى	كورسيترين
١٣	m.p, UV and by co-TLC with authentic	الكحول الإثيلى	كمفيرول