



الفعالية المضادة للفطريات للمستخلصات الفلافونويدية Flavonoids والتانينات Tannins لنبات

Geranium lucidum L ضد بعض الفطريات المرضية

مصطفى قحطان مصطفى¹، طالب عويد الخزرجي¹، سيروان حسن صالح²

¹ قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة تكريت، تكريت، العراق

² قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة كرميان

المخلص

هدفت الدراسة الحالية الى التعرف على الفعالية المضادة للفطريات لمستخلصات (مائية و ايثانولية و ميثانولية) نبات *Geranium lucidum* النامي شمال العراق على اربعة انواع فطرية مرضية *Pencillium chrysogenum* و *Trichophyton mentagrophytes* و *Microsprum canis* و *Fusarium oxysporeum* وعلى المحتوى الدباغي Tannins والفلافونويدي Flavonoids باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا عالية الاداء HPLC , و هدفت الى استخلاص المحتوى الكلايكوسايدي Glycoside content و الدباغي Tannin content واختبار فعاليته ضد الفطريات انفة الذكر ومقارنة ذلك بفعل المستخلصات , وبينت النتائج احتواء النبات المدروس على جميع المركبات الفعالة التي تم الكشف عنها , كما تبين فعالية جميع المستخلصات المدروسة ضد الفطريات المختبرة على ان المستخلص المائي (الساخن بمتوسط 11.19 ملم والبارد بمتوسط 10.27 ملم) والمستخلص الميثانولي بمتوسط 10.66 ملم هي الاكثر فعالية مقارنة بالسيطرة السالبة وبقية المستخلصات المدروسة , كما بينت النتائج ان الفطرين *T.mentagrophytes* بمتوسط 12.11 ملم و *F.oxysporeum* بمتوسط 11.48 ملم هما الاكثر تأثراً بالمستخلصات النباتية مقارنة ببقية الفطريات المختبرة . كما تبين وجود تراكيز مختلفة من المركبات الفلافونويدية Quercetin و Catechim و Rutin و Kampferol و الدباغ Tannins على ان المركبين Quercetin و Catechim بتركيز 0.2 و 0.36 ppm على التوالي هما الاكثر تركيزاً من بقية المركبات المدروسة .

معلومات البحث

تأريخ الاستلام: 2017 / 3 / 6

تأريخ القبول: 2017 / 8 / 23

الكلمات المفتاحية:

المراسلة مع:

الاسم: مصطفى قحطان مصطفى

البريد الالكتروني:

رقم الهاتف:

المقدمة

المجهرية وفي دراسة [4] التي بينت ان للمستخلص الايثانولي لكامل نبات *G.stepporum* فعالية تثبيطية ضد الفطريات *Candida albicans* و *C. parapsilosis* و *C. krusei* وضد بعض انواع البكتريا (مثل *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis* الموجبة لصبغة كرام وبكتريا *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* السالبة لصبغة غرام) ودراسة [5] التي بينت ان للمستخلص الميثانولي [لكامل النبات] لاناوع لفطريات الخميرة *Candida albicans* و *C.kusei* و *C.parapsilosis* . كما بينت دراسة [3] على المحتوى الفعال للاجزاء

يضم جنس *Geranium* 430 نوع والذي يعود الى عائلة الجيرانيوم Geraniaceae التي تعود الى رتبة geraniales من ذات الفلقتين وتوصف افرادها بانها معمرة perennials او حولية annuals , شجيرية او عشبية لها انتشار واسع في المناطق المعتدلة وشبه الاستوائية من الكرة الارضية ولكثير منها قيمة اقتصادية كنباتات زينة او كمصادر صناعية , و الجنس *Geranium* له انتشار واسع في شمال العراق [1 , 2] , وتستخدم انواع الجنس *Geranium* في مجال الطب التقليدي لشعوب ودول مختلفة من العالم فضلاً عن بعض صفاتها الطبية وبالتحديد على زيوتها الطيارة Ethereal oils وادوارها الفسلجية [3] , كما تستخدم انواع جنس *Geranium* ضد الاحياء

- 2- حرك بعدها المزيج ثم ترك ليبرد
- 3- وضع في الثلاجة لمدة 24 ساعة ، ورشح بعد ذلك خلال عدة طبقات من الشاش الطبي، ورشح مرة ثانية بواسطة قمع بخنر باستخدام أوراق ترشيح No. 1 Whatmann للتخلص من الاجزاء غير المسحوقة والالياف للحصول على المستخلص النباتي الخام السائل .
- 4- وضع بعدها في جهاز المبخر الدوار بدرجة حرارة لا تزيد عن 40°م إذ يعمل على اساس التبخير تحت ضغط مخلخل تم الحصول على طبقة كثيفة من المستخلص .
- 5- جفف المستخلص بدرجة حرارة المختبر (30-35°م) ثم وُضِعَ المستخلص بعد جفافه في قناني ذات غطاء محكم وحُفِظَتْ بالتجميد لحين استخدامها .
- وفي الاستخلاص بالماء البارد تم إتباع الخطوات السابقة نفسها في تحضير وحفظ المستخلصات المائية الساخنة عدا استعمال الماء البارد بدلاً من الماء الساخن .

الاستخلاص الإيثانولي Ethanolic Extracts

- تم تحضير المستخلص الإيثانولي والميثانولي بحسب طريقة [6] ، و كما يلي :
- 1- تم تحضير المستخلص الإيثانولي وذلك بإذابة 20 غم من المسحوق النباتي (كامل النبات فوق التربة) في 200 مل من كحول الإيثانول بتركيز 80% مع التحريك (أي بنسبة 1: 10 وزن: حجم)
- 2- ترك المزيج في الثلاجة لمدة [24] ساعة للنقع
- 3- بعد ذلك رشح المستخلص خلال عدة طبقات من الشاش ثم رُشَّحَ ثانيةً باستخدام أوراق الترشيح (No. 1 . Whatman) للتخلص من الأجزاء النباتية غير المسحوقة والالياف المتبقية
- 4- بعدها وضع في جهاز المبخر الدوار بدرجة حرارة لا تزيد عن 40°م وبعد تبخير الكحول الموجود في المزيج ، تم الحصول على طبقة كثيفة من المستخلص
- 5- جفف المستخلص على الهواء وبدرجة حرارة المختبر (30-35°م) ثم وُضِعَ المستخلصات بعد جفافها في قناني ذات غطاء محكم وحُفِظَتْ بالتجميد لحين استخدامها .
- تم إتباع الخطوات نفسها في تحضير وحفظ المستخلصات الإيثانولية عدا استعمال الكحول الميثانولي Methanol بدلاً من الماء الكحول الإيثانولي

استخلاص الكلايكوسايدات Glycosidic Extraction:

- اتبعت طريقة [7] في استخلاص الكلايكوسايدات وكما يلي :
- 1- أُضيف 10 غم من المسحوق النباتي الى 100 مل من الكحول الإيثانولي بتركيز 80 % وترك المزيج مدة 24 ساعة في الثلاجة بدرجة حرارة (4-7°م) ورشح للحصول على المستخلص الإيثانولي.
- 2- ركز المستخلص إلى ثلث حجمه بواسطة المبخر الدوار، وأضيف إليه 50 مل من الإيثانول و 5 مل من محلول خلات الرصاص 0.3 مولاري في قمع الفصل مع الرج وسحبت الطبقة المائية. 3-

الهوائية للنوع *G. lucidum*.L انه يحتوي على انواع من الزيوت الطيارة (مثل Chrysanthenone و trans-Pinocarveol و Camphor و E,Z-2,6-Nonadienal و Pinocamphone و Benzoic acid و Octanoic acid و Borneol و cis-trans-Linalool oxide و [Linalool oxide [pyranoid و p-Terpinen-4-ol و Isopinocampheol و Myrtenol و Dodecane و α-Terpineol و Cymen-8-ol و Decanal و Phenylacetic acid و Nonanoic acid و Tridecane و Decanoic acid و Tetradecene-1 و Tetradecane و Tetrahydrogeranyl acetone و Dodecanal (Monoerpenoid) كما اوضح فعالية مستخلصات الزيوت العطرية للوعين سالفى الذكر في تثبيط عدة انواع ميكروبية (بكتريا *S.aureus* و *Clostridium perfringens* و *C. sporogenes* و *Bacillus subtilis* و *Sarcina lutea* و *Micrococcus flavus* الموجبة لصيغة كرام وبكتريا *E. coli* و *Klebsiella pneumoniae* و *K. pneumoniae* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus vulgaris* و *Salmonella enterica* السالبة لصيغة كرام والفطريات *Candida albicans* و *Saccharomyces cerevisiae* و *Aspergillus restrictus* و *A. fumigatus* و *Penicillium chrysogenum*) وبين ان النشاط ضد الميكروبي ناتج عن الزيوت الطيارة بصورة عامة . وفي ضوء ما تقدم فقد هدفت الدراسة الحالية الى :-

التعرف على الفعالية المضادة للفطريات للمستخلصات المائية والكحولية ضد الفطريات الممرضة على الانسان ، و فصل بعض المركبات الفعالة ودراسة تأثيرها المضاد لأنواع الفطرية المنتخبة ، و التعرف على المحتوى الكيميائي الفعال الفلافونويدي Flavonoid و الدباغي Tannin لنبات *G.lucidum* باستخدام تقنية HPLC .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات النباتية :

تم جمع عينات نبات *G.lucidum* النامي في محافظة السليمانية(بيرة مكرون و طويلة) خلال الفترة من اذار - حزيران 2015/ 2016 وذلك خلال مرحلة التزهير وشملت هذه العينات كامل النبات فوق التربة وبعدها غسلت العينات بالماء المقطر وجففت بدرجة حرارة الغرفة بعيداً عن الضوء (منعاً للاكسدة الضوئية) وطحنت ووضعت في علب معتمة محكمة الغلق وحفظت في المجمدة لحين الاستخدام.

الاستخلاص المائي Aqueous Extraction

تمت عملية الاستخلاص بالماء وذلك بحسب ما ورد في دراسة [6] مع بعض التحوير عند الحاجة ، وكم في ادناه :

- 1- الاستخلاص بالماء الحار بمزج 40 غم من المسحوق النباتي (كامل النبات فوق التربة) مع 160 مل من الماء المقطر (أي بنسبة 1 : 4 وزن : حجم) الذي سخن لدرجة الغليان 100°م وبعدها رفع عن مصدر الحرارة واضيف اليه المسحوق النباتي.

الكشوفات الكيميائية للمركبات الفعالة

تم الكشف عن المركبات الفعالة في النوع *G.lucidum* , عن الكلايكوسايدات Glycosides والدباغيات Tannins استنادا الى [9] والراتنجات Resins والفلافونات Flavones [10] و القلويدات Alkaloids [11] و الصابونيات Saponins والفينولات Phenols [12].

تحضير العينات لتقدير المحتوى الفلافونويدي والتانين :

تم اخذ 1 ملغم من العينة النباتية الجافة و اذيت في 150 مل كلوروفورم و وضعت على هيتز stirrer hotplate لمدة 10 ساعات واضيف اليها 0.5 غم حامض الترترك، ونقلت الى جهاز ultrasonic لمدة ساعتين ورشح النموذج باستخدام ورق ترشيح 0.45 ملم ونقل الى جهاز المبخر الدوار للتخلص من المذيب واخذ المتبقي واضيف اليه كمية من الميثانول للحقن في جهاز HPLC وتم فحص العينات في مختبر كلية العلوم والاكولوجيا - بغداد ثم قدرت تراكيز المكونات المفصوله اعتمادا على المركبات القياسية وحسب المعادلة ادناه: [13].

$$\text{تركيز العينة المجهولة مايكروغرام / غرام} = \frac{\text{تركيز المحلول القياسي} \times \text{مساحة العينة}}{\text{مساحة المحلول القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف}}$$

وتم الحصول عليها مشخصة من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى وقد تم التنشيط المباشر لها قبل الاستخدام على وسط PDA البطاطا دكستروز اكار . واستخدمت طريقة الانتشار في الاكار (agar diffusion method) بواسطة الحفر وفق ما جاء في [15] لملاحظة حساسية الفطريات لمستخلصات النبات المدروس عند التراكيز اعلاه، وتم تحضير معاملتين للسيطرة Control (الاولى سالبة والثانية موجبة) هي:

- 1- بالطريقة السابقة باستثناء عمل حفرة بدلاً من 3 حفر واخذ 0.5 مايكرو لتر/حفرة من الماء المقطر المعقم ووضع الحفرة المخصصة له وبواقع ثلاثة اطباق (ثلاثة مكررات للمعاملة الواحدة) (سيطرة سالبة)
- 2- الطريقة الاولى نفسها باستثناء اخذ 0.5 مايكرو لتر/حفرة من مضاد النستاتين Nystatin (100 ملغم/مل) الذي يعمل كمضاد فطري ويكتيري (السيطرة الموجبة للفطريات).

النتائج والمناقشة

نتائج الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة في *G.lucidum*

بينت نتائج الكشف الكيميائي لبعض المواد الفعالة احتواء العينة النباتية المدروسة لكامل النبات فوق التربة على كل من الكلايكوسايدات و التانينات والراتنجات والفلافونات والصابونين والفينولات والقلويدات (جدول 1) .

كررت العملية ثلاث مرات وجففت الطبقة المائية المسحوبة في درجة حرارة 30° م م حتى تمام الجفاف ثم وضعت المستخلصات في قناني ذات غطاء محكم وحفظت بالتجميد لحين استعمالها

استخلاص التانينات Tannic extract

اتبعت طريقة [8] في استخلاص الكلايكوسايدات. وكما يلي :

- 1- حضر المستخلص المائي بغلي 0.5 غم من مسحوق العينة النباتية في 50 مل من الماء المقطر لمدة 30 دقيقة.
- 2- رشح المستخلص وعرض الى النبذ المركزي (2000 دورة/دقيقة) مدة 20 دقيقة.
- 3- نقل الجزء الطافي الى دورق حجمي سعة 100 مل واضيف 20 مل من محلول خلات الرصاص بتركيز 4% واكمل الحجم بالماء المقطر الى 100 مل.
- 4- رشح المستخلص وجفف في فرن كهربائي Oven بدرجة حرارة 60° م حتى تمام الجفاف ثم وضعت المستخلصات في قناني ذات غطاء محكم وحفظت بالتجميد لحين استعمالها

ظروف الفصل Separation conditions

- 1- عمود الـ HPLC : C18 (25×4.6mm I.D. 5µm).
- 2- الطور المتحرك
- 3- A = MeOH:Acetic Acid:D.W (10:2:88)
B= MeOH:Acetic Acid:D.W (90:3:7) ml
- 3- الطول الموجي 348 نانوميتر
- 4- نسبة الجريان 1 مل / دقيقة .
- 5- درجة الحرارة 28 م
- 6- التركيز القياسي 3 ملغم / مل (الاشكال 1-6)

دراسة الفعالية المضادة للفطريات Antifungal activity study

اعتمدت طريقة [14] في تحضير المحلول الخزين Stock solution وتعقيمه وذلك لغرض استخدام المستخلصات في تجارب التنشيط اذ تم أخذ 1 غرام من مسحوق المستخلص النباتي الجاف وأذيب في 5 مل من الماء المقطر المعقم ، فأصبح لدينا محلول خزين بتركيز 200ملغم/مل . وعُقم المحلول بالترشيح (ورق ترشيح قطر 0.45 مايكرون) والحصول على محلول خزين معقم ، واستخدم هذا المحلول كمصدر لتحضير التخافيف 25 و 50 و 100 ملغم/مل. تم في هذه الدراسة استخدام اربعة انواع من الفطريات الممرضة وهي *Microsprum canis* و *Trichophyton mentagrophytes* و *Pencillium chrysogenum* و *Fusarium oxysporum* .

جدول (1) نتائج الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة في *G.lucidum*

<i>G.lucidum</i>	النتيجة الموجبة للكشف	طرق الكشف	مجاميع المركبات الفعالة
		الكاشف المستخدم	
+	راسب احمر	كاشف بندكت	الكلايكوسايدات
+	راسب احمر	كاشف فهلنك	
+	راسب ابيض هلامي	خلات الرصاص 1%	الدباغيات
+	عكارة	غلي المستخلص الكحولي وازدادة ماء محمض	الراتنجات
+	ظهور لون اصفر	كحول اثيلي 50% وهيدروكسيد البوتاسيوم 50%	الفلافونيات
+	راسب برتقالي	دراجندروف	القلويدات
+	راسب ابيض	ماير	
+	راسب بني	واكنر	
+	رغوة كثيفة لفترة طويلة	رج المستخلص المائي	الصابونين
+	راسب ابيض	كلوريد الزئبقيك	
+	ظهور لون اخضر	كلوريد الحديدك	الفينولات

وبين الجدول ان في المستخلص المائي الساخن بتركيز 25 ملغم/مل فطر *M.canis* هو الاكثر تأثراً مقارنة بالفطرين *P.chrysogenum* و *F.oxysporeum* بقطر تثبيط 12.67 ملم ، اما عند التركيز 50 ملغم/مل فان الفطر *M.canis* هو الاكثر تأثراً مقارنة بالفطر *P.chrysogenum* بقطر تثبيط 11.67 ملم وعدم وجود فرق معنوي بين الفطر اعلاه والفطرين *T.mentagrophytes* و *F.oxysporeum* ، وعند التركيز 100 ملغم/مل الفطرين *M.canis* و *F.oxysporeum* هما الاكثر تأثراً مقارنة بالفطر *P.chrysogenum* بقطر تثبيط 11.67 ملم و 12.33 ملم على التوالي ، وتبين في الفطريات *M.canis* و *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* و *F.oxysporeum* لا توجد فروق معنوية بين التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل في تثبيط الفطريات اعلاه. ويلاحظ من الجدول في المستخلص المائي البارد بتركيز 25 ملغم/مل الفطرين *M.canis* و *T.mentagrophytes* هما الاكثر تأثراً مقارنة بالفطر *P.chrysogenum* بقطر تثبيط 10.67 ملم و 10.33 ملم على التوالي ، وعند التركيزين 50 و 100 ملغم/مل لا يوجد فرق معنوي بين الفطريات *M.canis* و *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* و *F.oxysporeum* في تأثرها بالتركيزين اعلاه ، وتبين في الفطريات *M.canis* و *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* و *F.oxysporeum* لا يوجد فرق معنوي بين التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل في تثبيط الفطريات اعلاه. وتأتي فعالية المستخلصات المائية للنبات المنتخب الى وجود المواد الفعالة التي هي من نوع الذائبة بالماء لا سيما المركبات الفلافونويدية و الكلايكوسايدات اذ تبين ان انواع الجنس *Geranium* تحتوي انواع عدة من المركبات الفلافونويدية التي تمتاز بفعاليتها المضادة للميكروبات [16] اما بالنسبة للمستخلص المائي الساخن فان الفعالية ضد البكتريا والفطريات قد تعود الى الدباغيات Tannins كون الماء الساخن هو افضل مذيب يستخدم لعزلها ، كما قد تعود الفعالية ضد

الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية (مائي ساخن وبارد) والكحولية (ايثانولية وميثانولية) والكلايكوسايدية والتانين للنوع *G.lucidum* ضد بعض الفطريات الممرضة

اظهرت نتائج الدراسة الحالية فعالية المستخلصات المختلفة وبالتراكيز 25 و 50 و 100 ملغم /مل في تثبيط فطر *M.canis* و *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* و *F.oxysporeum* ، مقدرة بقطر منطقة التثبيط (ملم) مقارنة بمعاملة السيطرة (1 و 2). (جدول 2).

يلاحظ من الجدول ان التركيز 100 ملغم/مل من المستخلص المائي الساخن والمستخلص التانيني هو الاكثر فعالية في تثبيط الفطريات مقارنة بالسيطرة (1) و جميع تراكيز المستخلصات بمتوسط تركيز 12.16 ملم و 12.92 ملم على التوالي ، وان معاملة السيطرة 2 هي الاكثر فعالية في تثبيط الفطريات بقطر تثبيط 33 ملم.

كما تبين ان التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل من المستخلص المائي الساخن والمستخلص المائي البارد والتركيز 100 ملغم/مل من المستخلص التانيني هي الاكثر فعالية في تثبيط فطر *M.canis* مقارنة بالسيطرة 1 وجميع تراكيز المستخلصات وان معاملة السيطرة 2 هي الاكثر فعالية في تثبيط الفطر اعلاه ، علاوة على ذلك فان التركيز 100 ملغم/مل من المستخلص التانيني هو الاكثر فعالية في تثبيط فطر *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* مقارنة بالسيطرة (1) وجميع تراكيز المستخلصات بقطر تثبيط 15.33 ملم و 13.67 ملم على التوالي ، وان معاملة السيطرة 2 هي الاكثر فعالية في تثبيط الفطر ، اما في *F.oxysporeum* فانه لا توجد فروق معنوية بين التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل من طرائق الاستخلاص المختلفة (المائي الساخن والمائي البارد والايثانولي والميثانولي والكلايكوسايد والتانيني) في فعاليتها التثبيطية ضد الفطر اعلاه مقارنة بالسيطرة 1 ، وان معاملة السيطرة 2 هي الاكثر فعالية في تثبيط الفطر بقطر تثبيط 33 ملم.

و flavonoids [وتجدد الإشارة الى ان دراسة [17 و 19] ذكرت ان الفعالية المضادة للميكروبات Antimicrobial التي تظهرها المستخلصات الميثانولية تعود الى محتوى الزيوت الطيارة من المواد الفعالة (مثل Previfolin Carboxylic acid و Ellagic acid و gallic acid و previfolin protocatchuice acid و Methyl gallate ester و caffeic acid و Perivilin و Carboxylic acid). على ان ذلك لا يستبعد تأثير القلويدات الذائبة في الكحولات [20].

ويبين الجدول في المستخلص الكلايكوسايدي بتركيز 25 و 100 ملغم/مل فطر *F.oxysporeum* هو الاكثر تأثراً مقارنة بالفطريات *M.canis* و *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* بقطر تثبيط 11 ملم و 12.67 ملم على التوالي ، اما عند التركيز 50 ملغم/مل فان الفطرين *T.mentagrophytes* و *F.oxysporeum* هما الاكثر تأثراً مقارنة بالفطرين *M.canis* و *P.chrysogenum* بقطر تثبيط 10.33 ملم و 11.67 ملم على التوالي، علاوة على ذلك تبين في الفطرين *M.canis* و *T.mentagrophytes* التركيزين 50 و 100 ملغم/مل هما الاكثر فعالية في تثبيط الفطرين مقارنة بالتركيز 25 ملغم/مل ، وفي الفطرين *P.chrysogenum* و *F.oxysporeum* لا يوجد فرق معنوي بين التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل في فعاليتها التثبيطية ضد الفطرين اعلاه . وتعود فعالية المستخلص الكلايكوسايدي المائي ضد الفطريات المختبرة الى دور الكلايكوسايدات لا سيما الفلافونويدية منها مثل الروتين Rutin المشخص في هذه الدراسة. وتجدد الإشارة الى ان هناك ندرة في الدراسات على المحتوى الكلايكوسايدي وفعالياته البيولوجية مما يستدعي مزيداً من البحث والتقصي.

كما يتضح من الجدول في المستخلص التانيني بتركيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل الفطريات *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* هي الاكثر تأثراً مقارنة بالفطرين *M.canis* و *F.oxysporeum* ، وتبين في الفطريات *M.canis* و *T.mentagrophytes* التركيز 100 ملغم/مل هو الاكثر فعالية في تثبيط الفطريات مقارنة بالتركيزين 25 و 50 ملغم/مل بقطر تثبيط 12.67 ملم و 15.33 ملم و 10 ملم على التوالي، اما في الفطر *P. chrysogenum* فانه لا يوجد فرق معنوي بين التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل في تثبيط الفطر اعلاه.

يلاحظ من الجدول ان المستخلص المائي الحار والمستخلص المائي البارد والمستخلص الايثانولي لنبات *G.lucidum* بمتوسط 11.195 و 10.279 و 10.663 ملم هي الاكثر فعالية في تثبيط الفطريات مقارنة بجميع المستخلصات المدروسة على ان السيطرة 2 هي الاكثر فعالية في التثبيط بمتوسط 16.5 ملم .

ويبين الجدول ان الفطرين *T.mentagrophytes* و *F.oxysporeum* هما الاكثر تأثراً بتركيز مستخلصات نبات

الميكروبات الى حامض Gallic acid الذي وجد في *G.lucidum* الذي يذوب في الماء الساخن 60 °م ويمتاز بفعالته المضادة للبكتيريا والفطريات [17] ، وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة [4] التي بينت فعالية المستخلص المائي لكامل نبات *G.stepporum* ضد الفطريات *Candida albicans* و *C. parapsilosis* و *C. krusei* ونتائج دراسة [9] التي بينت ان للمستخلص المائي [كامل النبات] للأنواع *G.tubersum.lasiopus* و *G.purpureum* و *C.kusei* فعالية مضادة لفطريات الخميرة *Candida albicans* و *C.parapsilosis* و

ويبين الجدول في المستخلص الايثانولي بتركيز 25 ملغم/مل الفطر *T. mentagrophytes* هو الاكثر تأثراً مقارنة بالفطريات *M.canis* و *P.chrysogenum* و *F.oxysporeum* بقطر تثبيط 13 ملم ، وعند التركيزين 50 و 100 ملغم/مل الفطرين *T. mentagrophytes* و *F.oxysporeum* هما الاكثر تأثراً مقارنة بالفطرين *M.canis* و *P.chrysogenum* ، علاوة على ذلك في الأنواع الفطرية *M.canis* و *T.mentagrophytes* و *F. oxysporeum* لا يوجد فرق معنوي بين التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل في تثبيط الفطريات اعلاه ، اما في النوع *P. chrysogenum* فان التركيز 100 ملغم/مل هو الاكثر فعالية في التثبيط مقارنة بالتركيزين 25 و 100 ملغم/مل بقطر تثبيط 8 ملم .

ويلاحظ من الجدول في المستخلص الميثانولي بتركيز 25 ملغم/مل الفطر *M.canis* هو الاكثر تأثراً مقارنة بالفطريات *T.mentagrophytes* و *P.chrysogenum* و *F. oxysporeum* بقطر تثبيط 13 ملم ، اما عند التركيزين 50 و 100 ملغم/مل فان الفطرين *T.mentagrophytes* و *F.oxysporeum* هما الاكثر تأثراً بالتركيزين اعلاه ، وتبين في الفطريات *M.canis* و *T.mentagrophytes* و *F. oxysporeum* لا يوجد فرق معنوي بين تأثير التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/مل في تثبيط الفطريات اعلاه ، اما في فطر *P.chrysogenum* التركيز 100 ملغم/مل هو الاكثر فعالية في تثبيط الفطر مقارنة بالتركيز 100 ملغم/مل اكثر فعالية في تثبيط الفطر مقارنة بالتركيزين 25 و 50 ملغم/مل بقطر تثبيط 8 ملم. وتأتي الفعالية التثبيطية للمستخلصات الكحولية الايثانولية و الميثانولية للنبات المختبر وبصورة رئيسة الى وجود المواد الذائبة في الايثانول والميثانول لا سيما الفينولات Phenols مثل الفلافونويدات Flavonoids (مثل Quercetin و Kampferol) او الدباغيات Tannins والكلايكوسايدات الفلافونويدية (مثل الروتين Rutin) او تداخلها فيما بينها او مع مركبات فعالة اخرى ذائبة بالكحولات وفي هذا الخصوص اشار [17] الى ان الفعالية المضادة للبكتيريا والفطريات تعود الى المحتوى الفلافونويدي للمستخلص الايثانولي من الدباغيات Tannins والروتين Rurin و Quercetin و Kampferol . كما اشارت دراسة [18] الى ان هذه الفعالية تعود الى المركبات متعددة الفينول polyphenols [الدباغيات Tannins

G.lucidum مقارنة بالانواع *M.canis* و *P.chrysogenum* بمتوسط قطر 10.54 ملم و 11.93 ملم على التوالي.

جدول (2) تأثير مستخلصات نبات *G.lucidum* في الانواع الفطرية المدروسة [قطر منطقة التشييط مقاس بالملمتر]

المتوسط المستخلص	التركيز	الفطريات				التركيز ملغم/مل	المستخلص
		<i>F. oxysporum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M.canis</i>		
b 11.195	10.668 bc	B10.67 b	C8.33 c	AB11 cd	A12.67 b	25	مائي ساخن
	10.750 bc	AB11 b	B9.33 c	AB11 cd	A11.67 b	50	
	12.168 b	A13.33 b	B10.67 bc	AB12 cd	A12.67 b	100	
b10.279	9.918 cd	AB10 b	B8.67 c	A10.33 d	A10.67 b	25	مائي بارد
	10.250 bc	A10.67 b	A9.67 c	A10.33 d	A10.33 b	50	
	10.670 bc	A11.67 b	A9.67 c	A10.67 d	A10.67 b	100	
b10.663	9.16 cd	B10.33 b	C3.33 d	A13 bcd	B10 b	25	ايتانولي
	10.91 bc	A13.33 b	C7.33 cd	A12.33 cd	B10.67 b	50	
	11.92 bc	A13.33 b	C8 c	A14.33 bc	B11.67 b	100	
bc 9.773	8.83 de	B11 b	C2 d	A13 bcd	B9.33 bc	25	ميثانولي
	9.58 cd	A12.67 b	C3.33 d	A13 bcd	B9.33 bc	50	
	10.91 bc	A 13 b	B8 c	A13.33 bcd	B9.33 bc	100	
c8.467	6.75 e	A11 b	B7.33 cd	B6.67 e	C2 ef	25	كلايكوسايد
	9.08 cd	A11.67 b	B8.33 c	A10.33 d	C6 cd	50	
	9.75 cd	A12.67 b	B10 bc	B10.33 d	C6 cd	100	
bc 10	7.58 e	B 4.33 c	A10 bc	A 10.67 de	B 5.33 d	25	تانيني
	9.50 cd	C 6.67 c	A 10.33 bc	A 12 cd	B 9 bc	50	
	12.92 b	C10 b	B 13.67 b	A 15.33 b	B 12.67 b	100	
d 0	0.000 e	A 0 d	A 0 d	A 0 f	A 0 f	ماء مقطر [1]	السيطرة
a 32.75	33.000 a	32 A a	A 33.33 a	A 32.67 a	A 33 a	100 [Nystatine 2 ملغم/مل	
		11.484A	9.066 B	12.116 A	10.150 B	متوسط الفطر	

*الارقام تمثل متوسط ثلاثة مكررات

- الأحرف الكبيرة المتشابهة الاحتمالية تعني عدم وجود اختلافات معنوية بينها عند مستوى الاحتمالية [0.05].

- الأحرف الصغيرة المتشابهة العمودية تعني عدم وجود اختلافات معنوية بينها عند مستوى الاحتمالية [0.05] .

المحتوى الكيميائي الفعال لنبات *G.lucidum* Quercetin بتركيز 0.2 ppm و Catechin بتركيز 0.36 ppm

بينت نتائج الدراسة الحالية احتواء النوع *G.lucidum* على جميع المركبات الفعالة المدروسة ، [جدول 3] ، ويلاحظ من الجدول ان هي الاكثر مقارنة Tannins و Rutin و Kampferol التي توجد بتركيز قليلة (اقل من 0.001 ppm) . [شكل 1-6].

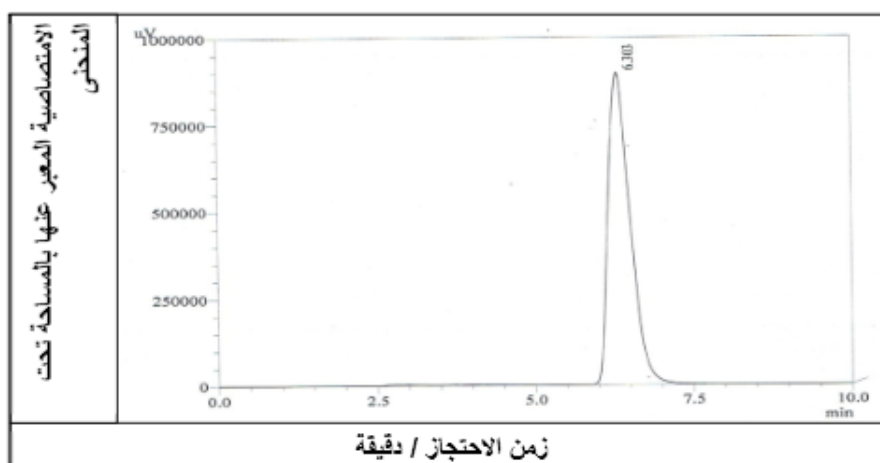
جدول (3) المحتوى الكيميائي الفعال للنوع *Geranium lucidum*

ت	نوع النبات	المركب الفعال ppm				
		Kampferol	Rutin	Catechin	Quercetin	Tannins
1	<i>G.lucidum</i>	+	+	0.36	0.2	+

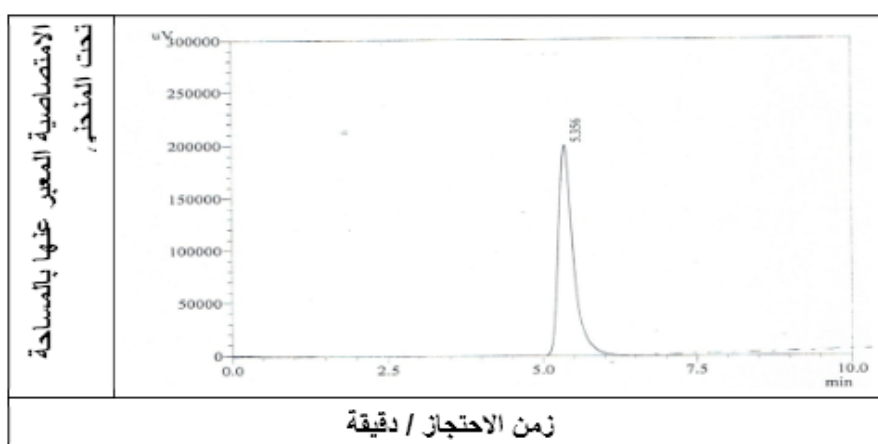
علامة [+] تعني وجود المركب الفعال بتركيز اقل من 0.001



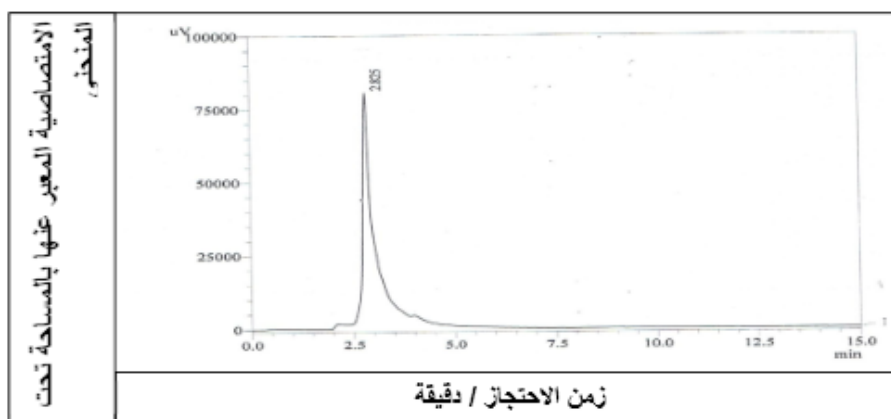
شكل 1. منحنى مركب الدباغ Tannin القياسي بتقنية HPLC المستخدم مع النبات المدروس



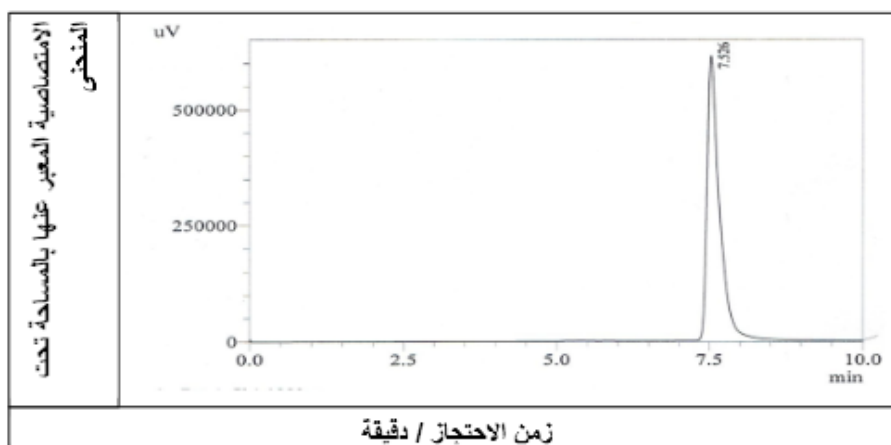
شكل 2. منحنى مركب الكيرستين Quercetin القياسي بتقنية HPLC المستخدم مع النبات المدروس



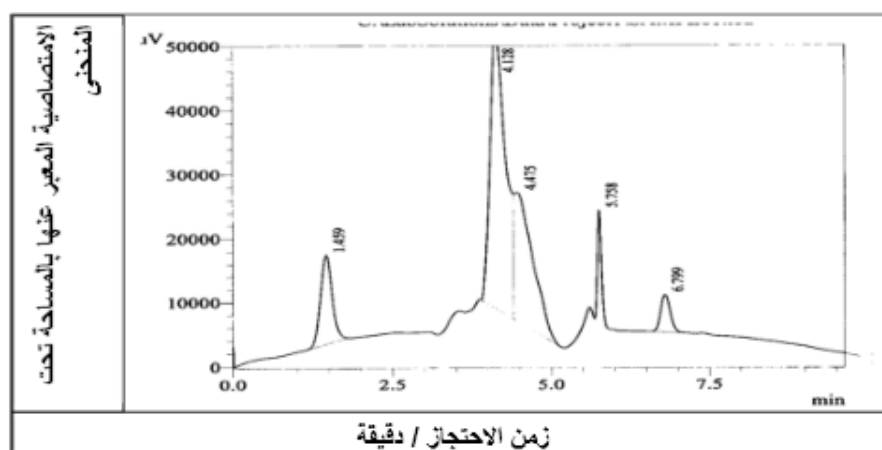
شكل 3. منحنى مركب Catechin القياسي بتقنية HPLC المستخدم مع النبات المدروس



شكل 4. منحنى مركب Rutin القياسي بتقنية HPLC المستخدم مع النبات المدروس



شكل 5. منحنى مركب Kaempferol القياسي بتقنية HPLC المستخدم مع النبات المدروس



شكل 6 . منحنى المركبات الفلافونويدية Flavonoids ومركب التانين Tannin بتقنية HPLC

المستخدم مع النوع *G.lucidum* [كامل النبات]

quercetin 3-O-β-galactopyranoside و glucopyranoside و quercetin 3-O-(6"-O-galloyl)-β-glucopyranoside و quercetin 3-O-(6"-Ogalloyl)-β-galactopyranoside . كما وبينت نتائج دراسة [21] ان كامل النبات فوق التربة *G.purpureum* يحتوي على المركبات:

وتتفق نتائج الدراسة الحالية ودراسات عدة على انواع من جنس *Geranium* مثل دراسة [4] التي بينت ان كامل النبات فوق التربة للنوع *G.stepporum* يحتوي على quercetin-3-O-(3"-O-galloyl)-β-glucopyranoside و quercetin-3-O-(3"-O-galloyl)-β-galactopyranoside و فلافونويدات في الاجزاء الهوائية هي quercetin 3-O-β-

gallic acid derivative (methyl و glucopyranoside
, tannin (pusilagin hydrolysable و gallate
Geranium دراسة [22] التي بينت ان كامل النبات فوق التربة
hexahydroxybiphenyl-D- يحتوي *pusillum*
. 1-O-galloyl- 3,6- galactopyranoside

Geranioside A(kaempferol3-(3- α -rhamnopyranosyl)-
methyl-3,4-dihydropyran-2H -2--4-oxy-5-hydroxy-6
Geranioside B quercetin3-3-(α - و pyranoside
oxy-5-hydroxy-6-methyl-3,4--rhamnopyranosyl)-4
و quercetin و [[dihydropyran-2H-2-pyranoside
و quercetin 4-O- β -glucopyranoside و kaempferol
aemferol-3-O- β - و quercetin3-O- β -glucopyranoside

المصادر

- 1- Miller. D.M. (2002). The taxonomy of Pelargonium species and cultivars, their origins and growth in the wild. *Geranium* and *Pelargonium*. The genera *Geranium* and *Pelargonium*. In Maria Lis-Balchin [ed.]. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Published by Taylor and Francis, London. pp. 49-79.
- 2- Meran . S.H.S.(2009) . Systematic study of the genera Biebersteinia Stephan and *Geranium* L. [Geraniaceae] in Iraqi Kurdistan Region. Doctoral thesis , University of Sulaimany .Iraq.
- 3- Radulovic . N, Dekic . M , Stojanovic Radić C. Z .(2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. and *G.lucidum* L. [Geraniaceae]. Turk J Chem. Tubitak. 499 – 512
- 4- Öhretoulu. D. Sakar. M.K. Ekizoulu. M. Özalp. M. (2007). Free Radical Scavenging and Antimicrobial Activities of Three *Geranium* Species Growing in Turkey. Fabad J. Pharm. Sci., 32, 59-63.
- 5- Şöhretoğlu. D, Ekizoğlu. M, Özalp. M, Sakar.M.K.(2008). Free Radical Scavenging and Antimicrobial Activities of Some *Geranium* Species . Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy Volume 28 . Number 2 . pp. 115-124
- 6- Grand, A ., Verpoort , R., Wondergem, P.A . and Pousset , J.L.(1988). Anti-infection phytotherapies of tree-Sarannah Sengal [west-africa]. 11-Antimicrobial activity of 33 species. J. Ethanopharmacol., 22:25-31.
- 7- Ukida, M.; Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Tokuda, H.; Suzuki, T. & Kimura, Y.(2006). Anti- in inflammatory, anti- tumor promoting and cytotoxic activities of constituents of Marigold [Calendula officinalis] flowers. J. Nat. Prod., 96:1692- 1696.
- 8- Ahmad, M. & Nazil, S. (1989). Studies on tannins from bark of pinus roxburghi. J . Chem. Soc. Pakis., 15: 213- 217.
- 9- Shihata, I.M.(1951).Apharmacolo-gical study of Anagallis arvensis M.D. vet. Thesis Cairo University.
- 10-Newall, C. A.; Anderson, L. A. and Phillipson, J. D. (1996). Herbal Medicines . A guide for Health care Professionals. The Pharmaceutical Press. London . pp:69-70.
- 11-Fahmy, I.R.(1933). "Constituents of plant crud drugs. Ist". Ed-Poul Barbey-Cairo. Egypt.
- 12-Harborne, J.B. (1973). Phtochemica methods, Aguide to modern techniques of plant analysis chapman and Hall Ltd. London. pp: 159-165.

- 13-Seal .T.(2016). Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, Sonchus arvensis and Oenanthe linearis of North-Eastern region in India. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (02), pp. 157-166
- 14-Mitscher, L.A. ,Leu, R. ,Bathala, M.S. ,Beal, J.L. and White, R.(1972). Antimicrobial agents from higher plants. lioydia ; 35:157-166 .
- 15-Egorove, N.S. [1985]. Antibiotics a scientific approach. Mir Publishers. Moscow.
- 16-Leyton, S,M; Beltramino. J.B. (2015). Evaluation of a Nipple Sealer Based on Brad Infusion. "Science Stays True Here .Biological and Chemical Research, Volume, 345-355 | Science Signpost Publishing
- 17-Pantev. A., Ivancheva. S., Staneva. L And Serkedjieva. J. (2006). Biologically Active Constituents of a Polyphenol Extract from *Geranium sanguineum* L. with Anti-Influenza Activity . Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen . Naturforsch. 61c, 508-516
- 18-Fazary, A. E., Taha, M., & Ju, Y. H. (2008). Iron complexation studies of gallic acid. Journal of Chemical & Engineering Data, 54(1), 35-42
- 19-Fecka. I. Kowalczyk. A. Cisowski. W. (2001). Phenolic Acids and Depsides from Some Species of the Erodium Genera. Z. Naturforsch. 56c, 943-950
- 20-Igwenyi, I. O. & Elekwa, A. E.(2016). Phytochemical Analysis and Determination of Vitamin Contents of Geranium Robertianum. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences [IOSR-JDMS], e-ISSN: 2279-0853, p-ISSN: 2279-0861. Volume 13, Issue 6 Ver. , PP 44-47.
- 21-Öhretoulu. D. Sakar. M.K. Sterner. O. (2011). Polyphenolic compounds from Geranium purpureum Vill. growing in Turkey. Turk J Chem 35, 809 – 814..0420
- 22-Bautista.M; Madrigal –Santillán.E; Morales-González. A; Gayosso-del ucio. J.A; Madrigal-Bujaidar.E; Chamorro -Cevallos. G; Álvarez -González.I; Benedi.J; Aguilar -Faisal.J.L; Morales-González. J.A. (2015). An Alternative hepatoprotective and Antioxidant agent: The Geranium . Afr J Tradit Complement Altern Med. . 12(4): 96-105.

Antifungal activity of Flavonoids and Tannins Extracted from *Geranium lucidum* L against some pathogenic fungi

Mostafa Q. Mostafa , Talib O.H. Al-Khesraji , Sirwan H. Salih

¹ Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, Tikrit University, Tikrit, Iraq

² Department of Biology , College of Education for Pure Sciences, University of Karaman

Abstract

The present study aimed to identify the effectiveness of anti-fungal extracts Aqueous[hot and cold water] and alcoholic (ethanolic and Methanolic) plant *Geranium lucidum* developing northern Iraq on four types innate nurse (*Microsprum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Pencillium chrysogenum* and *Fusarium oxysporeum*) and the content Tannins content and Flavonoids content using HPLC technique, and aimed to draw Glycoside content and Tannin content and test its effectiveness against fungi aforementioned and compared it by extracts, The results showed that the studied plant contained all the active compounds that were detected. The effectiveness of all studied extracts against the tested fungi showed that the water extract (hot at an average of 11.19 mm and cold with an average of 10.27 mm) and the methanol extract at an average of 10.66 mm were the most effective compared to the negative control and the rest of the extracts, The results showed that *T.mentagrophytes* with an average of 12.11 mm and *F.oxysporeum* with an average of 11.48 mm were the most affected by plant extracts compared to other tested fungi .

as demonstrated by the presence of different concentrations of flavonoids vehicles and Catechim , Quercetin , Rutin , Kampferol and Tannins and that the two compounds Quercetin and Catechim two most focused ppm 0.2 and 0.36, respectively.