J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 30 (10): 6411 - 6420, 2005

EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE OIL OF *Salvia fruticosa* AND ITS ANTIMUTAGENIC ACTIVITY USING HGPRT TEST IN OIDIA OF *Coprinus cinereus*

Benkhayal, F. A.*; M. H. Al-Saadi ** and Hamida M. Al-Sanousi ***

*** Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, University of Omar EL- Mukhtar, Libya**

**** Faculty of Pharmacy , University of Omar EL- Mukhtar, Libya**

*****Department of Botany , College of Science, University of Omar EL- Mukhtar, Libya**

استخلاص وتوصيف الزيت الطيار لنبات المريمية *Salvia fruticosa* والكشف عن فعاليته المضادة للتطفير بأستخدام أختبار الـ(HGPRT) في أويديا الفطر *Coprinus cinereus*

فهيم عبد الكريم بن خيال *، محمد حمود السعدي وحميدة مصطفى السنوسي *****

*** قسم علوم وتقنية الأغذية – كلية الزراعة – جامعة عمر المختار – البيضاء – ليبيا**

**** كلية الصيدلة – جامعة عمر المختار – البيضاء – ليبيا**

***** كلية العلوم – قسم النبات – جامعة عمر المختار – البيضاء – ليبيا**

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص الزيت الطيار لنبات *Salvia fruticosa* بطريقة التقطير المائي ودراسة مكونات الزيت باستخدام كروموتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatography وكروموتوجرافيا الغاز المدمج بطيف الكتلة Chromatography Mass Gas Spectroscopy (GC-MS) وذلك لتحليل مكوناته الكيميائية نوعيا وكميا. جمعت أوراق النبات من منطقة الجبل الأخضر بليبيا في شهر مارس ٢٠٠٥ والزيت الطيار المتحصل عليه كانت نسبته ٠,٧ % لونه اصفر ورائحة عطرية . بينت النتائج المتحصل عليها باستخدام تقنية كروموتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) إلى أن هناك التفاوت في ألوان وقيمة ألـ (RF) للحزم المفصولة عند فحصها بالضوء المرئي والتي كان عددها ستة حزم رئيسية . بينما أوضحت نتائج التحليل الذي أجري باستخدام تقنية كروموتوجرافيا الغاز المدمج بطيف الكتلة (GC-MS) إلى وجود (٢٣) مركبا ، تواجد عالي (١٠) مركبات بنسبة عالية تمثلت بمركبات الـ 1,8-Cineole ، 1,8-Cineol Isomer، Camphor ، Trans-β-Caryophyllene، α-Pinene ، β-Myrcene ، Linaloi ، α-Terpineol ،α- Terpineol isomer ، α-Camphene .

وللكشف عن الدور التثبيطي للزيت الطيار لنبات المرمية *S. fruticosa* ضد الفعل السمي والتطفري لعقار السايكوفوسفومايد بجرعته التطفيرية والتي تبلغ ٧ ميكرو جرام/مل استخدمت خمس تراكيز تدريجية من الزيت الطيار (١٠ ، ٢٠ ، ٣٠ ، ٤٠ ، ٥٠) ميكروليتر/مل وأجريت معاملتين سثلت باستخدامه قبل وبعد المطفر . أظهرت النتائج المتحصل عليها عدم كفاءة الزيت الطيار في الحد من الفعالية السمية للمطفر بل على العكس أظهرت كل من المعاملتين (قبل وبعد المطفر) فعلا سميا تعاونيا من خلال حفظها لحيوية الأويديا لفطر *Coprinus cinereus* خصوصا عند استخدام التركيز العالي (٥٠ ميكروليتر/مل) فبل المطفر والتركيزين ٤٠ و ٥٠ ميكروليتر/مل بعد المطفر . وقد يعزى ذلك لارتفاع مستوى المركبين 1,8-Cineole و Camphor ذات التأثير السمي في التراكيز العالية على العكس من التراكيز المعتدلة والتي تظهر فعلا مضادا للتطفير من خلال خفض معدل الطفرة في جين HGPRT لأويديا الفطر ، حيث لوحظ أن التركيزين ٢٠ و ٣٠ ميكروليتر/مل أظهرت كفاءة أعلى في خفض معدل

الطفرة عند استخدام الزيت الطيار قبل المطفر عنه بعد المطفر وبتركيز واحد فقط (٣٠ ميكروليتر/مـل) مما يشير إلى كفاءة الزيت الطيار كمضاد للتطفير في التراكيز المعتدلة.

المقدمة

يعتبر نبات المريمية والمعروف باسم (Sage) أحد النباتات العطرية الهامة ، التي تنتمي الى العائلـة الشفوية (Lamiaceae) المنتشرة في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط ، ويوجد منه عشرة أنواع في ليبيا خمسة منها في منطقة الجبل الأخضر وأكثرها انتشارا النوع *Salvia fruticosa* .

ولقد أشار كثير من البحاث منهم Daniela (١٩٩٣) وBlumenttal وآخـرون (٢٠٠٠) وMantle وآخرون (٢٠٠٠) وBaricevic وآخرون (٢٠٠١) و Dauksas وآخرون (٢٠٠١) ، انه نظـرا لمـا تحتويه أوراق هذا النبات على العديد من المركبات الهامـة مثـل مركـب Salvialannis والتانينـات (Catechin) والأحمـاض الفينوليـة(Rosmarinic ، Caffeic، Gallic ، Ferulic، Ursolic، Oleanolic، Chlorogenic) والفلافونيـدات (Luteolin و Apigenin) وبعـض الراتنجـات والتربينات الأحادية والثنائية والثلاثية والمتعددة ، فقد استخدم سواء في الطب الشعبي أو في صناعة الكثيـر من العقاقير والأدوية المستخدمة في علاج العديد من الإمراض مثل الصرع والتهـاب القنـوات التنفسـية والحنجرة والقصبة الهوائية وتسكين السعال ونزلات البرد وكعامل مضاد للالتهابات المتسببة عن الجـروح وتخفيف الأضطرابات الهضمية وعلاج آلام المعدة وعسر الهظم ولعلاج الزهايمر والتوتر العصـبي ، كما استخدم في صناعة معاجين الأسنان والصابون وبعض أنواع المنظفات .

أما عن استخدام الزيوت الطيارة كمضادات للطفرة والسرطان فقد الزيت الطيار المستخلص من أزهار نبات القرع *Cucrbita pepo* كفاءة مضادة للتسرطن حيث انخفضت نسبة الأورام إلـى ٥٥,٦% بعـد استحداثها باستخدام المطفر 7,12-Dimethyl benz alanthracen (DMBA) (Villasenor and Domingo, 2000). كما كان للزيت الطيار المستخلص من كل مـن النعنـاع *Mentha cordifolia* (Villasenor *et al*., 2002) والزيتـون (Fabiani *et al*., 2002) والكوبيبـا *Copaifera multijuga* (Lima *et al*., 2003) والبـابونج *Matricaria chamomilla* (-Hernades *et al*., 2004) والميركا *Myrica gale* (Sylvestere *et al* ., 2005) والشاي *Melaleuca alternifolia* واللافندر *Lavandula angustifolia* (Evandri *et al*., 2005) تاثيرا مثبطا للاورام السرطانية من خلال تثبيطها لفاعلية المطفرات .

وفي الجماهيرية الليبية وبالرغم من تواجد العديد من النباتات العطرية والتي من بينها المريمية وخاصة في منطقة الجبل الأخضر الغنية بهذه النباتات إلا أن الدراسات التي أجريت عليها كانت قليلة مقارنة ببعض الدول الأخرى واستكمالا للدراسات السابقة في هذا المجال فإن هذه الدراسة تهدف الى اسـتخلاص الزيـت الطيار كمكون أساسي هام واسع الاستخدام لنبات المريمية نوع *Salvia fruticosa* أو ما يعرف بـتفاح الشاهي ومن ثم توصيفه والتعرف على مكوناته الفعالة باستخدام كروماتـوغرافيا الطبقـة الرقيقـة Thin Layer Chromatography (TLC) وكروماتوغرافيا الغاز المـدمج بمطيـاف الكتلـة (GC-MS) Gas Chromatography–Mass Spectroscopy. واختبار فعاليته المضادة للتطفير مـن خـلال تقليله معدل الطفرة في جـين الـ(HGPRT) Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase بعد استحثاثها بالمطفر سايكلوفوسفومايد Cyclophosphomide في أويـديا الفطـر *Coprinus cinereus* .

المواد وطرق العمل

١- المادة النباتية :

جمعت الأوراق الطازجة لنبات المريمية *Salvia fruticosa* من منطقة الجبل الأخضر بليبيا في شهر مارس ٢٠٠٥ وتم التعرف عليها بالاعتماد على سلسلة الفلورا الليبية والجزء الخاص بالعائلة الشفوية (Jafri and EL-Gadi , 1985).

٢- استخلاص الزيت الطيار :

استخلص الزيت الطيار من الأوراق الطازجة بالتقطير المائي Hydrodistillation باستخدام طريقة Balbaa وآخرون (١٩٨١)، حيث تم وزن ١٠٠ جم من أوراق النبات مع ٦٠٠ مل من الماء المقطر ووضعت في منظومة التقطير وأجريت عملية التقطير لمدة ٥- ٦ ساعات، ثم أخذ ناتج عملية التقطير (الزيت والماء) بعد التكثيف وشبع بكلوريد الصوديوم Nacl ثم الاستخلاص بالايثر وإزالة الماء باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية anhydrous . NaSO4 ، ثم التخلص من المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator والاحتفاظ بالزيت الناتج لإجراء الاختبارات .

٣- كروموتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) :

فصلت مكونات الزيت الطيار (١٠ مايكرليتر) على صفائح TLC المغطاة بالسليكا جل F245 وذلك بمذيب بنزين: خلات الاثيل بنسبة (٩٦:٤ v/v) واستخدم الفانلين / حامض الكبريتيك ١% كجوهر كاشف لإظهار الحزم بالتسخين ثم حسبت قيمة Relative fractionation (RF) لكل حزمة Vekiari (١٩٩٣) .

٤- كروموتوجرافيا الغاز- المدمج بمطياف الكتلة (GC- MS):

أجريت التحليلات الكيميائية للزيت بجهاز كروموتوجرافيا الغاز المدمج مع مطياف الكتلة (Shimadzu GC/MS – QPSOSOA, Software class 5000) في المركز الإقليمي للفطريات وتطبيقاتها - جامعة الأزهر- جمهورية مصر العربية . تم التعرف على عدد المركبات ومعامل الاحتجاز Retention time (RT) وتحديد نسبة المركب في الخليط. كما تم التعرف على نوعية المركبات عن طريق منظومة التحليل الطيفي للكتلة من مكتبة ويللي (Wiley Mass Spectrum database) وتحديد المجموعة الكيميائية التي ينتمي إليها المركب بمطابقة كل من القيمة الدالة للكتلة (M^+) Molecular ion peak والقيمة الأعلى نسبة (Base Peak) والنظام ألتجزيئي الطيفي مع العينة قياسية .

٥- تحضير العالق الأويدي والتعامل معه عند أجراء التدخل بين الزيت والمطفر :

استخدم في هذه الدراسة السلالة البرية للفطر *Coprinus cinereus* وهو أحد الفطريات البازيدية التي تنتمي إلى الفصيلة الكوبرينية Coprinaceae حيث تم الحصول على عينة الفطر من كلية الصيدلة- جامعة عمر المختار. زرعت لقاحه صغيرة منه في كل طبق بتري يحتوي على الوسط الغذائي الكامل (CM) والذي وصف من قبل Moor (١٩٦٨) وبعد ٥-٦ أيام من الحضن وعند درجة حرارة ٣٧ ^{o}م تم الحصول على الغزل الفطري وحضر العالق الأويدي بحجم ١٥٠٠ مل اعتمادا على طريقة Anderson (١٩٧١).

تم التعامل مع الأويديا بإتباع طريقة Whong (١٩٧٩) مع بعض التحوير واستخدم ٢ مل من العالق الأويدي في كل أنبوبة مع مراعاة عزل الأويديا من محلولها أو الزيت أو المطفر من خلال الطرد المركزي بسرعة ١٥٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة ، وأجريت جميع خطوات التجربة في درجة حرارة المعمل .

ولدراسة التداخل بين الزيت الطيار والمطفر استخدمت خمس تراكيز تدريجية للزيت (١٠،٢٠،٣٠،٤٠،٥٠) مايكروليتر/مل وتركيز امثل للمطفر سايكلوفوسفومايد هو ٧ ميكروجرام/مل كما ورد في AL-Saadi (١٩٩٧) حيث أجريت معاملتين تمثلت في إضافة الزيت قبل وبعد المطفر وفي كل معاملة خصصت ثلاث أنابيب للقياسي السالب (بدون معاملة) وثلاث أنابيب للقياسي الموجب (المطفر فقط) وثلاث أنابيب لكل تركيز مع المطفر.

٦- زرع الأويديا :

بعد الحصول على ٢ مل من العالق الأويدي الحاوي على الأويديا المعاملة والجاهزة لعملية الزرع أجريت عملية الزرع لكل أنبوبة ، ثم أخذ ١ مل من العالق الأويدي وزرع في (٤) أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي لكامل (CM) وذلك بواقع ٠,٢٥ مل لكل طبق ، واخذ المتبقي من العالق الأويدي والذي يبلغ ١ مل وزرع بنفس الطريقة على الوسط الاختياري Selective Medium (SM) والمتمثل بالوسط الغذائي الكامل مضافا له النظير القاعدي ٨-ازوجوانين (8-Azoguanine) بتركيز نهائي في وسط النمو قدره ٥٠ مايكرو جرام / مل. حضنت جميع الأطباق لمدة ٤٨ ساعة على درجة ٣٧ ^{o}م ثم عُدت المستعمرات التي تمثل عدد الأويديا الحية (الطافرة وغير الطافرة) عند نموها على الوسط الزرعي الكامل والأويديا الطافرة لجين HGPRT عند نموها على الوسط الزرعي الاختياري واستخرج معدل كل ثلاثة

أنابيب مكررة. بعد ذلك تم حساب النسبة المئوية للحيوية بالنسبة للسيطرة السالبة باعتبار أن حيويتها ١٠٠%
وحساب معدل الطفرة باستخدام المعادلتين:

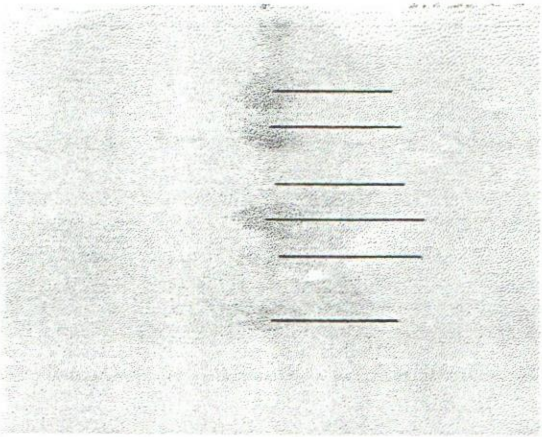
$$\text{النسبة المئوية للحيوية} = \frac{\text{عدد الأويديا النامية بعد المعاملة}}{\text{عدد الأويديا النامية غير المعاملة}} \times ١٠٠$$

$$\text{معدل الطفرة} = \frac{\text{عدد الأويديا الطافرة في جين HGPRT}}{\text{عدد الأويديا الحية (الطافرة وغير الطافرة)}}$$

النتائج والمناقشة

١- توصيف الزيت الطيار

سجلت طريقة الاستخلاص بالتقطير المائي لأوراق نبات المريمية *Salvia fruticosa* النامي في منطقة شحات من الجبل الأخضر في ليبيا حاصل زيتي طيار ذو لون اصفر ورائحة عطرية قدر بـ ٠,٧ % وبينت النتائج المتحصل عليها باستخدام تقنية كروموتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وجود تفاوت في ألوان وقيمة الـ (RF) عند الفحص بالضوء المرئي للمجموعات الرئيسية التي تم فصلها لتسجل (٦) حزم (الشكل ١ و الجدول ١) .



الشكل (١) نمط ترحيل للزيت الطيار المستخلص بواسطة التقطير المائي لنبات المريمية *S. Fruticosa* على صفائح (TLC) باستخدام مزيج البنزين: خلات الاثيل (٩٦:٤)

بينما بينت نتائج تقنية كروموتوجرافيا الغاز المدمج بطيف الكتلة GC/MS لنفس العينة أن المركبات المتعرف عليها وصلت الى ٢٣ مركبا مع نسبة عالية لـ ١٠ مركبات (1,8-Cineole ، 1,8-Cineol Linalol ، β-Myrcene ، α-Pinene ، Trans-β-Caryophyllene ، Camphor ، Isomer α-Camphene ، α-Terpineol Isomer ، α-Terpineol ،) مع انخفاض لمستوى الـ Thujone بنوعيه alpha و beta ذو التأثيرات السامة مع المركبات الأخرى (جدول ٢) . وفي دراسة لكمية ونوعية زيت هذا النبات في اليونان أشار Sivropoulou وآخرون (١٩٩٧) الى احتواءه على ٣٧ مركب شكلت النسبة العظمى منها مركبات الـ (α-Pinene ، β-Pinene ، Camphene ، Camphor) لتصل الى 4.7 ، ٤,٥ ، ٣,٨ ، ٩,٠٠ % على التوالي مع سيادة للمركب 1.8-Cineole ليصل الى ٤٧,٤ % و ١- . Thujone بنوعيه alpha و beta ليصل الى ٤,٣ و٧,٦ % على التوالي .

وقد ذكر Sokovic وآخرون (٢٠٠٢) ان مركبات 1.8-Cineole ، Camphor ، Carvacrol هي من المكونات الأساسية للزيت الطيار لنوعين من المريمية هما S. Fruticosa و S. pomifera . كما أشار Pitarokili وآخرون (٢٠٠٣) في دراسة للزيت الطيار لنفس النوع من النبات النامي في مناطق برية في اليونان عند استخلاصه وتحليله بنفس الطريقة الى ارتفاع نسب مركبـات الـــ Camphor ، Cineole، E-Caryophyllene مع ارتفاع لمركب Thujone بنوعيه alpha، beta والذي كـان منخفض في هذه الدراسة (جدول ٢) مما يشير الى انخفاض سمية نفس هذا النوع في ليبيا مقارنة باليونان .

جدول (١) توصيف الحزم المتكونة على صفائح (TLC) للزيت الطيار المستخلص بواسطة التقطير المائي لنبات المريمية *S. Fruticosa* في الضوء المرئي

RF	لون الحزمة
٠,١٥	بنفسجي داكن
٠,٢٥	ازرق مخضر
٠,٤٠	ازرق
٠,٥٣	اصفر
0.58	ازرق فاتح
٠,٦٩	بنفسجي

جدول(٢) تحاليل كروموتوجرافيا الغاز المدمج مع طيف الكتلة للزيت الطيار المستخلص بواسطة التقطير المائي لنبات المريمية *S. fruticosa*

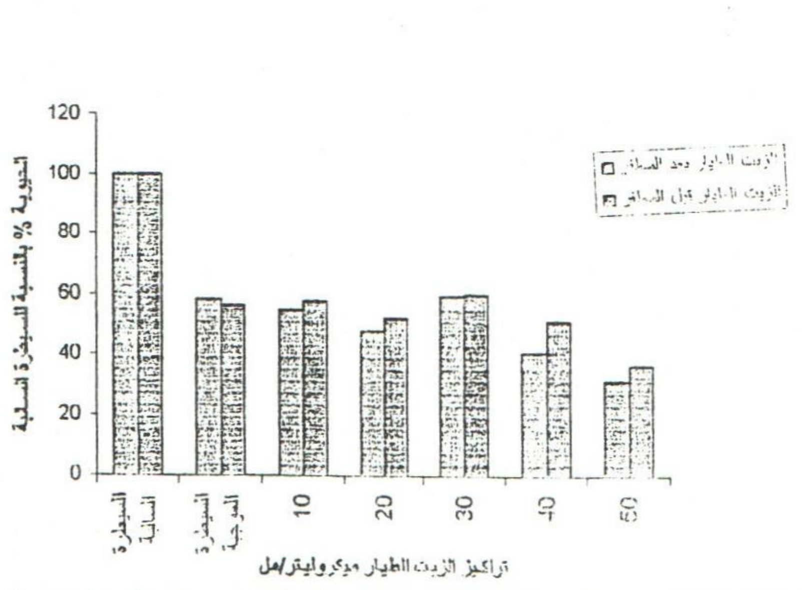
الاسم	الرمز الكيميائي	القمة العظمى	الكتلة	النسبة المئوية	معامل الاحتجاز
α-Pinene	$C_{10}H_{16}$	93	136	5.39	12.71
α-Camphene	$C_{10}H_{16}$	93	136	3.7	13.13
3-Octanon	$C_8H_{16}O$	43	128	0.24	13.51
β-Myrcene	$C_{10}H_{16}$	41	136	9.58	14.26
1,8-Cineole	$C_{10}H_{18}O$	43	154	8.12	15.1
1,8-Cineol Isomer	$C_{18}H_{18}O$	43	154	7.7	15.28
γ-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	93	136	1.16	16.008
Linalool Oxide	$C_{10}H_{18}O_2$	59	170	0.36	16.31
Linalool	$C_{10}H_{18}O$	71	154	6.42	16.6
α-Thujone	$C_{10}H_{16}O$	81	152	1.93	16.94
β-thujone	$C_{10}H_{16}O$	81	152	1.79	17.25
Camphor	$C_{10}H_{16}O$	95	152	15.58	18.31
α-Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	59	154	4.17	18.92
Terpineol-4	$C_{10}H_{18}O$	71	154	2.09	19.39
α-Terpineol Isomer	$C_{10}H_{18}O$	59	154	10.62	19.86
1-Borneol	$C_{10}H_{18}O$	95	154	2.18	20.62
α-Copaene	$C_{15}H_{24}$	119	204	0.18	29
β-Bournene	$C_{15}H_{24}$	81	204	0.12	29.6
Trans-β-Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	41	204	8.11	31.78
Trans-β-Caryophyllene Isomer	$C_{15}H_{24}$	41	204	0.97	32.94
α-Humulene	$C_{15}H_{24}$	93	204	2.65	33.73
Ledene	$C_{15}H_{24}$	105	204	0.38	36.17
Cadinene Isomer	$C_{15}H_{24}$	159	204	0.83	37.45

٢- الدور التثبيطي للزيت الطيار

ومن الأهداف الرئيسية في هذه الدراسة هو الكشف عن الدور التثبيطي للزيت الطيار لنبات المريمية *S. fruticosa* ضد الفعل السمي والتطفري لعقار السايكوفوسفومايد بجرعته التطفيرية والتي تبلغ ٧ ميكروجرام/مل ولأجل الوصول الى تفسير معقول لهذا الدور أجريت معاملتين تمثلت بأستخدام الزيت الطيار قبل وبعد المطفر حيث أن عملية تعاقب أعطاء المثبط بالنسبة للمطفر له تأثير واضح فمثلا بعض الفينولات الصناعية تلعب دوراً كعامل مضاد للأكسدة والسرطان عند أعطائها قبل المطفر ولكنها تعزز السرطان عند أعطائها بعد المطفر، كما أن أجراء مثل هذا التعاقب يساعدنا في الوصول الى تفسير معقول للميكانيكية التي تعمل من خلالها المثبطات وبالتحديد المرحلة التي تعترض بها عملية التطفير والتسرطن ، حيث أن وقت أعطاء المثبط بالنسبة للمطفر يكون بالاعتماد على المرحلة التي من خلالها تمارس هذه المثبطات دورها (Alekperov, 1982 ; Alekperov, 1984).

وعند استعراض نتائج الأويديا للفطر *Coprinus cinereus* المعاملة بالزيت الطيار لنبات المريمية يلاحظ أن المعاملة الأولى (قبل استخدام المطفر) والمعاملة الثانية (بعد استخدام المطفر) لم تؤدي إلى رفع الحيوية في أي تركيز من التراكيز بل على العكس سجلت كلا المعاملتين تأثير سمي تعاوني مع المطفر لتساهم في خفض الحيوية إلى ٣٦,٦٢% عند التركيز ٥٠ ميكروليتر/مل للمعاملة الأولى والى ٣١,٢٥، ٤١، ٤٠,٤% للتركيزين ٤٠ ، ٥٠ ميكروليتر/مل على التوالي للمعاملة الثانية وبفرق معنوي (P< ٠,٠١) عن حيوية الأويديا عند استخدام المطفر بدون الزيت في السيطرة الموجبة بعد إن سجلت ٥٦,٠٣% في المعاملة الأولى و ٥٨,١٤% للمعاملة الثاني الشكل(٢). وعند المقارنة بين سمية المعاملتين في التراكيز العالية سجلت المعاملة الثانية سمية أعلى مقارنة بالأولى وبفرق معنوي (P<٠,٠٥) .

حيث أن التعامل مع المستخلصات النباتية سواء كانت طبية أو غذائية تحتاج إلى الأنتباه الشديد لأنها قد تحتوي على تراكيز مرتفعة من بعض العناصر والمركبات مما يظهر فعاليتها السلبية فمثلا حامض الأسكوربك يثبط تكوين بعض المطفرات التي يدخل النتروجين في تركيبها ولكنه يعجل تكوين مركبات أخرى مطفرة كما أن التركيز العالي الفاتيكوفيرول والفينول يستحث سرطان المعدة (Ramel *et al.*, 1986 ; Deflora and Ramel , 1988).

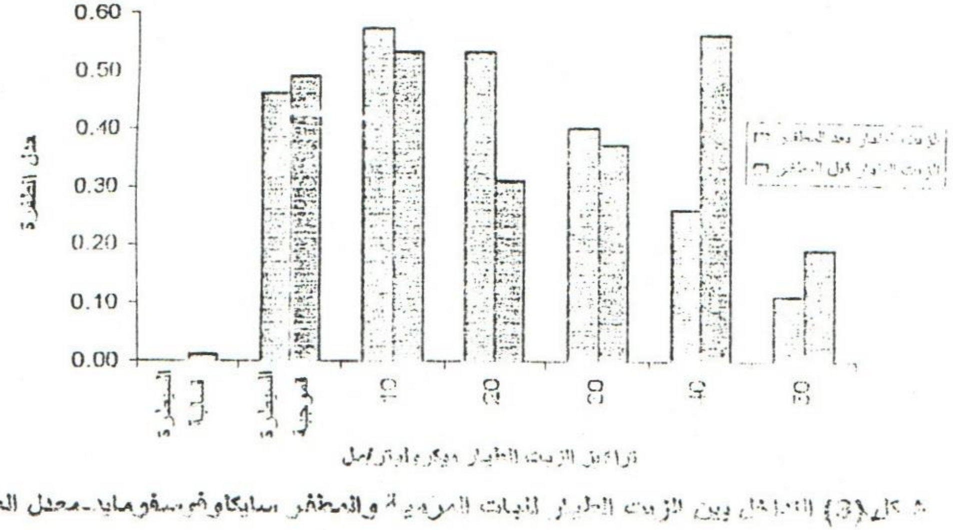


شكل (2) التداخل بين الزيت الطيار لنبات المرمية والمطفر سايكلوفوسفومايد-الحيوية %

فعلى الرغم من انخفاض لمركب Thujone بنوعيه alpha و beta في هذا النبات كمركب رئيسي سام ألا أن هذا لا يعني خلو النبات من مركبات سمية أخرى حتى وان كانت أقل فعالية والتي يظهر فعلها من خلال زيادة التركيز مثل مركبي 1,8-Cineol ، Camphor حيث أشارت الكثير من الدراسات (Sivropoulou *et al*., 1997 ; Pitarokili *et al*., 2003) الى سمية هذين المركبين في زيت هذا النوع من خلال فعلها في قتل الإحياء الدقيقة كالفيروسات والبكتريا والفطريات وخلايا اللبائن مثل خلايا الـ Vero في كلية القرود الخضراء الإفريقية.

كذلك أكد Lazutta وآخرون (٢٠٠١) على أن التراكيز العالية للزيوت الطيارة لنباتات النعناع *Mentha xpiperita* والكمون *Anethum graveolens* والصنوبر *Pinus slyrestris* تستحث التشوهات الكروموسومية بأنواعها المختلفة والتبادل الكروماتيدي الشقيقي في الخلايا الجسمية لحشرة الدروسوفيلا وخلايا الدم اللمفاوية بأسلوب معتمد على الجرعة بالإضافة الى التسمم الخلوي في النوع الأخير من الخلايا على العكس من التراكيز المعتدلة من هذه الزيوت والتي تمتلك تأثيرات مضادة للتطفير بصورة مماثلة لهذه الدراسة ، ومن ثم تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما أشار أليه Vujosevic و Blagojevic (٢٠٠٤) على أن التراكيز العالية للزيت الطيار لنبات المرمية النوع *S. officinalis* قد سبب تأثيرات سمية تعاونية مع المطفر Mitomycin-C (MMC) عند إعطاءها للفئران البيضاء وخصوصا عند الجرعة ١٠٠ ميكروليتر/كغم من وزن الجسم من خلال زيادة التشوهات الكروموسومية في خلايا نخاع العظم على الرغم من أن التراكيز المعتدلة ٢٥ و ٥٠ ميكروليتر/كغم تظهر فعالية مضادة للتطفير من خلال خفضها لمثل هذه التشوهات بعد استحثاثها بالمطفر وهذا ما أظهرته نتائج هذه الدراسة والخاصة بمعدل الطفرة في جين ألHGPRT في أويديا الفطر .

ويلاحظ من الشكل(٣)كفاءة التركيزين ٢٠،٣٠ ميكروليتر/مل في خفض معدل الطفرة الى ٠,٣١ ، ٠,٣٧ على التوالي وبفرق معنوي (P<٠,٠٥) عن السيطرة الموجبة والذي بلغ ٠,٤٩ في حين سجل التركيز ٤٠ ميكروليتر/مل فعل تعاوني مع المطفر في رفع معدل الطفرة من جديد بصورة مقاربة للسيطرة الموجبة ليصل الى ٠,٥٦ . في حين أظهرت نتائج العاملة الثانية كفاءة التركيز ٣٠ ميكروليتر/مل في خفض معدل الطفرة الى ٠,٤٠ وبفرق معنوي (P<٠,٠٥) عن السيطرة الموجبة والذي بلغ ٠,٤٦ .وعند المقارنة بين كفاءة المعاملتين أظهرت المعاملة الأولى فعلا تثبيطيا مقارنة بالثانية وبفرق معنوي (P<٠,٠٥) ، وعلى الرغم من انخفاض معدل الطفرة للتركيز الأخير في المعاملة الأولى والتركيزين الأخيرين في المعاملة الثانية وبفرق معنوي (P< ٠,٠١) عن السيطرة الموجبة ألا أن هذا لا يعتبر فعلا تثبيطيا يبديه الزيت الطيار اتجاه المطفر سايكلوفوسفومايد كونه ترافق مع انخفاض الحيوية تحت مستوى ٥٠% بالمقارنة مع الشكل (٢) الذي تم لتطرق إليه سابقا.



شكل (3): التداخل بين الزيت الطيار لنبات المرمية والمطفر سايكلوفوسفومايد-معدل الطفرة

أن النـشاط التثبيطي المضاد للتطفير الذي يبديه الزيـت الطيار لنـبات المريميـة *S. fruticosa* سجل لأول مرة وهو بذلك يماثل بنشاطه زيوت طيارة أخري تناولتها دراسات سابقة كالدراسة التـي أجريت من قبل Hastak وآخرون (١٩٩٧) التي توصل فيها الى كفاءة الزيت الطيـار لنبـات الكـركم *Curcuma longa* في التقليـل مـن التشـوهات الكروموسـومية مـن نـوع النويـات الدقيقـة Micronucleus في خلايا الدم اللمفاوية للإنسان بعد استحثاثها بـالمطفر benzo(a) pyrenc . فـي حين أشار Hiramatsu (٢٠٠٤) في نفس هذا المجال الى امتلاك الزيت الطيار لبعض الأعشاب الطبية المستخدمة في الطب الشعبي التقليدي الياباني وخصوصا الشيح *Artemisia lactiflora* وعرق السوس *Glycyrrhiza glabra* فعالية تثبيطه اتجاه المطفر Benzo(a) pyrene عند أجراء أختبـار أميـز وباستخدام السلالتين TA100 و TA98 من بكتريا السالمونيلا وهذا الأختبار مماثل للاختبار محل الدراسة كونه يعتمد على الكشف عن معدل الطفرة الجينية في الكائنات الدقيقة .

أن النشاط التثبيطي الذي يبديه الزيت الطيار لنبات *S. fruticosa* اتجاه المطفر بكلا المعاملتين يساعد في التفسير المنطقي للميكانيكية التي تعمل بها المركبات الكيميائية الفعالة في الزيت الطيار وعليه يمكـن تصنيف هذا الزيت ضمن المثبطات التي تعمل داخل الخلية فعند استخدامه قبل المطفر يعمل علـى غلـق المواقع الحساسة في الـDNA عن طريق الألتصاق بها ومنع المطفر من الأرتباط معها وهذه الميكانيكية تتوافق بشكل أكبر مع طبيعة المركبات الموجودة في الزيت الطيار من خلال كفاءة المعاملة الأولـى فـي التثبيط مقارنة بالثانية والتي تمثلت باستخدام الزيت الطيار بعد المطفر والتي يظهر نشاطها من خلال حثها لأنظمة الإصلاح في الخلية لإصلاح التلف الوراثي بعد حدوثه على الرغم من ضعف هـذه الميكانيكيـة مقارنة بالأولى. كما أن الزيت الطيار بنشاطه وميكانيكيته هذا يتفق مع التصنيف العام والذي يسمح بتنظيم عدد كبير من العناصر والمركبات التي تؤدي بدورها الى النهاية البيولوجية نفسها وهي منع الطفرة والوقاية من السرطان (Kada *et al.*, 1982 ; Deflora and Ramel,1988) .

المراجع

Alekperov, U. (1982) .Antimutagens and the problem of controlling the action of enviromental mutagens .In: Sugimura, T.;Kondo,S. and Takebe ,H.(Eds.). Environmental, mutagens and carcinogens .Liss .,New York : 361-368.

Alekperov, V. (1984) . Antimutagenesis : theoretical and practical aspects . Nauka , Moscow : 120 pp.

AL-Saadi , M.H. (1997). Inhibition of mutagenic activity of some chemical carcinogens by AL-Zahdi date extraction . M.Sc. Thesis , Baghdad univ. , Iraqi .

Anderson , G.E. (1971). The life history and genetics of *Coprinus lagopus* . Harris Biological supplies Ltd .

Balbaa , S.I. , Hilal , S.H. and A.Y., Zaki (1981). Medicinal plant constituents, 3rd., Edition , General Organisation for University and School Books.

Baricevic ,D., Sosa ,S., Della ,R., Tubora ,A., Simonovska ,B. and A.,Zpancic .(2001). Topical anti-inflammatory activity of salvia officinalic L. leaves the relevance of ursolic acid. J. Ethnopharmacol 75(2-3): 125-132.

Blumenthal , M. , Goldberg , A. and J., Brinckmann . (2000). Herbal Medicine : Expanded Commission E monographs. Copyright American Botanical council . Publ . by Integrative medicine communications , 1029 chestnut street , Newton, MAO 2464. 330-334.

Daniela ,T.(1993). *Salvia officinalis* Botanic characteristics , use and cultivation . cesk . Farm .42(3) : 111-116.

Dauksas ,E. Venskutions ,P.R., Povilaityte ,V. and B., Sivik . (2001). Rapid Screening of antioxidant activity of sage (salvia officinalis L.) extracts obtained by supercritical carbon dioxide at different extraction conditions ; Nahrung . 45(5) : 338-341.

Deflora, S. and Ramel , C. (1988) .Mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis classification and over view . Mutat. Res ., 202: 285-306.

Evandri ,M.,G., Battinelli ,L., Daniele ,C., Mastrangelo ,S., Bolle ,P. and G., Mazzanti . (2005). The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (Lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. food. chem. Toxical.

Fabiani , R., De Batolomeo , A., Rosignoli , P., Servili , M ., Montedoro ,G.F ,and G., Morozzi . (2002).Cancer chemoprerention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 Cell Cycle arrest and apoptosis . Eur. J. Cancer. Prev . *11* (4) : 351- 358

Hastak , K ., Lubri, N., Jakhi , S.D., Moer , C., John , A. and S.D. , Ghaisas . (1997). Effect of turmeric oil and turmeric oleoresin on cytogenetic in patients Suffering from oral Submucous fibrosis . Cancer . Lett .(2) : 265-269.

Hernandez –Ceruelos,A., Madrigal- Bujaidar ,E.and C., de la cruz. (2004) .Inhibitory effect of chamomile assential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulf fonate in mouse bone marrow . Toxicol . lett. *135* (1-2) : 103-110.

Hiramatsu ,N., Xiufen ,W.,Takechi ,R., Itoh ,Y., Mamo ,J. and S., pal . (2004). Antimutagenicity of Japanese traditional herbs, gennoshoko , yomogi , senburi and iwa-tobacco . Biofactors. *22*(1-4): 123-125.

Jafri ,S.M.S.H. and El-Gadi ,A.(1985). Flora of Libya . Department of Botany , Al-Faateh Univ ., Tripoli. 25-144.

Kada,T.;Inoue,T.and M., Namiki . (1982).Environmental desmutagens and antimutagens .In : Klekowski , E.J. (Ed.). Environmental Mutaenesis and Plant Biology. Praeger, New York : 137-151.

Lazutka ,J.R., Mierauskiene , J., Slapsyte ,G. and V., Dedonyte. (2001) .Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens*), peppermint (Mentha xpiperita) and pine (*Pinus slyrestris*) essential oils in human lymphocytes and Drosophila melanogaster . Food . Chem . Toxicol . *39* (5): 485-492 .

Lima , S.R., Junior ,V.F., Christo , H.B., pinto ,A.C. and P.D., Fernandes . (2003) .In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. phytother . Res.*17* (9) : 1048-1053 .

Mantle ,D., Pi [illegible]ening ,A.T. and E.K., perry . (2000). Medicinal plant extracts for the treatment of dementia : A review of their pharmacology , efficacy and tolerability . C[illegible] . Drugs .13(3): 201-213.

Moor, D. (1968). The effect of 2-deoxy –D- glucose on the growth and respiration of Coprinus lagopus . J. Gen. Microbiol., 52:433-439.

Pitarokili ,D., Tzakou ,O., Loukis,A. and C., Harvala . (2003).Volatile metabolites from *Salvia Fruticosa* as antifungal agent soil borne pathogens .J.Agric.Food Chem. *51*(11) : 3294-3301.

Ramel ,C.; Alekperov , V.K.; Ames , B.N ; Kada , T.and L.W., Wattenberg . (1986). Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis .Report ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens ICPEMC Publ . No . 12. Mutat . Res ., 168: 47-65 .

Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras , T. and M., Aresnakis . (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *salvia fruticosa* essential oil. J. Agric. Food chem. *45*(8) : 3197-3201.

Sokovic ,M.,Tzakou, O., pitarokili ,D. and M., couladis . (2002). Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild Greece. Nahung .*46* (5) : 317-320 .

Sylvester , M., Legault ,J., Dufour ,D .and A., Pichette . (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L . phyto medicine . *12* (4) : 299-304.

Vekiari , S.A. , Orcopoulo , V. , Tzia, C. and C.D., thomopoulos . (1993). Oregano flavonoids as lipid antioxidants. JAOCS. 70(5): 483-487.

Villasenor , I .M., and Domingo , A.P.(2000) .Anticarcino-genicity potential of spinasterol isolated form Squash flowers. Teratog . Carcinog Mutagen .*20* (3) :99-105 .

Villasenor ,I.M., Echegoyen ,D.E. and J.S., Angelada.(2002).A new antimutagen from *Mentha cordifolia* Opiz. Mutat.Res.*515*(1-2):141-146.

Vujosevic ,M. and Blagojevic ,J.(2004). Antimutagenic effects of extracts from sage (*salvia officinalis*) mammalian system *in vivo* . Acta . vet . Hung .*52*(4) : 439-443.

Whong ,W.L. (1979). Effect of N2 on the mutagenic and lethal activities of Icr-170 *Neuospora crassa*. Mutat. Res. 60: 301-312

EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE OIL OF *Salvia fruticosa* AND ITS ANTIMUTAGENIC ACTIVITY USING HGPRT TEST IN OIDIA OF *Coprinus cinereus*

Benkhayal, F. A.*; M. H. Al-Saadi ** and Hamida M. Al-Sanousi ***

*** Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, University of Omar EL- Mukhtar, Libya**

**** Faculty of Pharmacy , University of Omar EL- Mukhtar, Libya**

*****Department of Botany , College of Science, University of Omar EL-Mukhtar, Libya**

ABSTRACT

This study was conducted in an attempt to study the antimutagenic effect of volatile oil of *Salvia fruticosa* plant in HGPRT gene of the fungus *Coprince cinereus*. On wet weight basis, the leaves of the plant contained 0.7% volatile oil which was yellow in color and had aromatic odour. The oil was characterized using TLC and GC-MS. The latter showed the presence of twenty three components, ten of them were found in high percent (1,8-Cineole ، 1,8-Cineol Isomer ، Camphor ، Trans-β-Caryophyllene ، α-Pinene ، β-Myrcene ، Linalol ، α-Terpineol، α-Terpineol isomer). Five different concentration were tested for their antimutagenic effect against the cyclophosphamid (CP) drug at the mutagenic dose (7µg/ml). The results indicating that the volatile oil was ineffective in preventing the toxic effect of the mutagenic drug. Further more, the tow treatment (before and after mutagenic drug application) showed synergistic toxic effect on *Coprinus cinereus* oidia particulary at the high concentration (50 µl/ml) before mutagenic drug application and tow concentration (40 and 50 µl/ml) after mutagenic drug application. On other hand, the lower concentration 20 and 30 µl/ml showed a significant increase in the protective effect of mutagenic level in HGPRT gene, in both treatment before and after the mutagenic drug application, it could be possible that the use of volatile oil of *Salvia fruticosa* plant a moderate concentration more effective in preventing mutagenicity