دراسات بيو كيميائية على بعض الأنواع من الأعشاب البحرية السعودية بالبحر الأحمر

إعداد

منير عبدالله عبدالرحيم بامخرمة

بحث لنيل درجة الماجستير في العلوم

(كيمياء بحرية)

المشرف

أ. د. أسامة وحيد عبدالعاطي حواس

كلية علوم البحار

جامعة الملك عبدالعزيز - جدة

رمضان ١٤٣٧هـ - يونيو ٢٠١٦ م

المستخلص

في السنوات الماضية تبيّن أن المنتجات الطبيعية البحرية ذات أهمية كبيرة في عملية اكتشاف الأدوية، لا سيّما في مجالات الأمراض التي تهدد الحياة مثل أمراض السرطان والكبد والعدوى عن طريق الجراثيم المقاومة للعقاقير المتعددة. يـعتبر البحر الأحمر مورداً هائلاً للمنتجات الطبيعية ذات المركبات الجديدة، حيث صنّف في الآونة الأخيرة على أنه أكبر خزان للمنتجات الطبيعية التي تقدّم أدوية وعلاجات ذات فاعلية كبيرة.

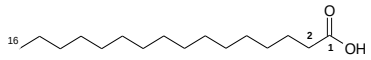
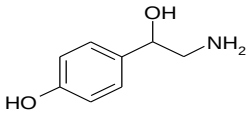
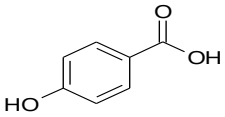
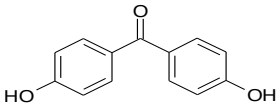
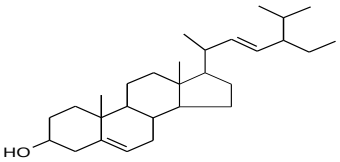
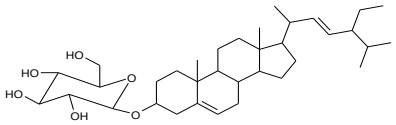
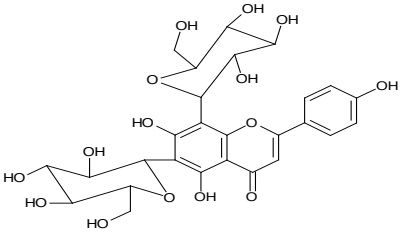
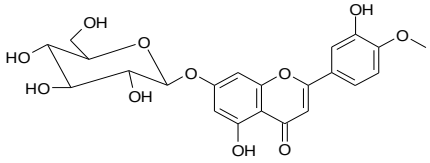
تعتبر الأعشاب البحرية (الحشائش البحرية) هي النباتات المزهرة البحرية الوحيدة التي غالباً ما تعيش مغمورة كلياً أو جزئياً في مياه البحر، حيث تكمل بقية دورة حياتها فيه. وفي الطب الشعبي استخدمت الأعشاب البحرية كمجموعة متنوعة للأغراض العلاجية، على سبيل المثال، لعلاج الحمى والأمراض الجلدية، وآلام العضلات والمفاصل، والجروح ومشاكل المعدة، وكمهدئ للأعصاب للأطفال، وأيضاً كعلاج نوعي ضد أنواع مختلفة من الأشعة كالأشعة فوق البنفسجية.

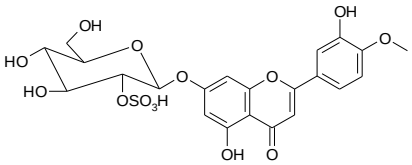
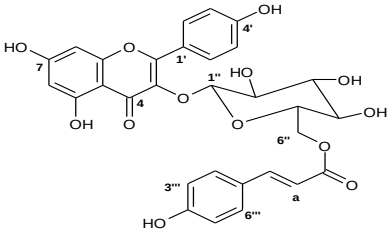
وفي هذا البحث تم العمل على نوعين من أنواع الأعشاب البحرية *Halodule uninervis* و *Thalassia hemprichii* التي تم جمعها من مواقع مختلفة من البحر الأحمر السعودي، حيث تم استخلاص المواد الكيميائية من هذه الأعشاب البحرية بواسطة المذيبات العضوية المختلفة مثل الهكسان، والكلوروفورم، والإيثانول .. إلخ، باستخدام طريقة استخلاص السائل - السائل. ومن ثم تـمَ فصل مجموعة من المركبات الكيميائية من الأعشاب البحرية لكلا النوعين مع توضيح التراكيب الكيميائية للمركبات المفصولة.

تـمّ عمل استخلاص للحشائش البحرية بالمذيبات العضوية المختلفة، حيث أخِذَ جزء من المستخلص بـواسطة الكلورفورم (مذيب عضوي) الذي أُجريت له عميلة تصبن بواسطة هيدروكسيد البوتاسيوم، والجزء المتصبن تم فصله واستخلاصه بالإيثر ثم أجريت له عملية أسترة في وجود الميثانول وتم تحليل مكونات كل من المستخلص الغير متصبن والمتصبن بجهاز كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة GC-MS. حيث كانت نسبة الأحماض الدهنية المشعبة تقريباً 50% ونسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة 35 %، وكان كلاً من المركبين hexadecanoic و Neophytadiene الأكثر تواجداً في *Halodule uninervis* و *Thalassia hemprichii*.

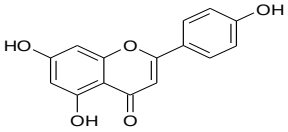
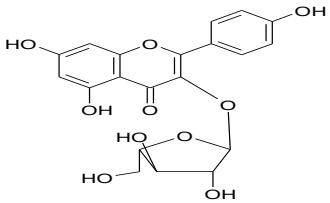
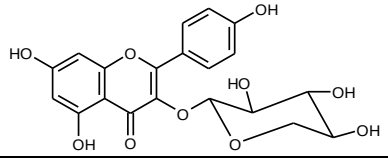
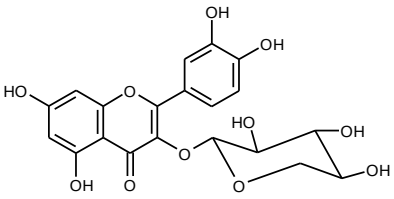
تـمّ في هذه الدراسة عزل (**17**) مركب كيميائي من الحشائش البحرية، حيث تم تحديدها والتعرف عليها بطرق التحليل الطيفية. المركبات المفصولة هي مركبات فلافونويد مع بعض مركبات الإستيرويد والأحماض الدهنية، والفينولية. وتعتبر الفلافونويدات المفصولة هي المكونات الأساسية من الحشائش البحرية وعددها (9) فلافونويد: أبيجينين، أبيجينين بيتا ثنائي الجلوكوسيد، ديسموتين بيتا الجلايكوسيد، ديسموتين بيتا الجلايكوسيد سالفيت، كامفيرول بيتا جلوكوسيد كيوماريك، كامفيرول ألفا ارابينوسيد، كامفيرول بيتا زايلوسيد، كوريستين بيتا جلوكوسيد، كوريستين بيتا زايلوسيد. بالإضافة إلى حـامض الكافيك، حامض البالميتيك الدهنى، ستيرويدات: بيتا-استيرول، بيتا-استيرول أحادي الجلوكوسيد وأيضاً فينولك أمين.

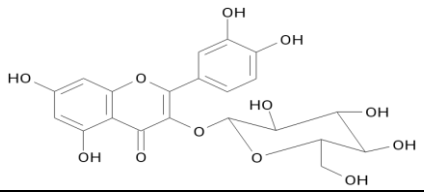
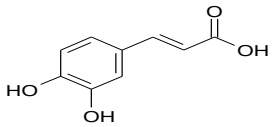
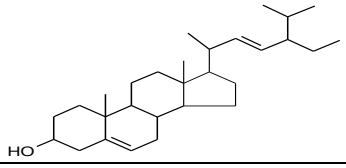
1. seagrass *Thalassia hemprichii*

Compound	Structure	Type	Class
Palmitic acid		Fatty acid	rated Fatty acid
Octopamine		Phenolic amine	ɔgen compound
p-Hydroxybenzoic acid		Phenolic acid	hydroxy-Phenolic acid
4,4'-Dihydroxybenzo-phenone		Phenolic	Phenone
β-Stigmasterol		Sterols	Steroids
β-Stigmasterol 3-*O*-*β*-glucoside			roid-glucoside
Vicenin-2		Flavonoid	ne-*C*-di-glucoside
Diosmetin 7-*O*-*β*-glucoside			Flavone-*O*-mono-glucoside

Diosmetin 7-*O*-*β*-glucoside-2''-sulfate			Flavone-*O*-glucoside-sulfate
Kaempferol 3-*O*-*β*-(6"-*E*-*p*-coumaroyl) glucoside		Flavonol glucoside	lated flavonol

2. Seagrass *Halodule uninervis*

Compound	**Structure**	**Type**	**Class**
Apigenin		Flavonoids	Flavone (Aglycone)
Kaempferol 3-*O*-*α*-arabinoside			Flavonol-*O*-mono-glucoside
Kaempferol 3-*O*-*β*-xyloside			
Quercetin 3-*O*-*β*-xyloside			

Quercetin 3-*O*-*β*-glucoside			
Caffeic acid		Phenolic acid	oxy-Phenolic acid
β-Stigmasterol		Sterol	Steroid

تـمّ تقيـيم فعالية المستخلصات من الأعشاب البحرية بيولوجياً كمضادات للأكسدة وللأورام، وكذلك مدى تأثيرها على السموم المفرزة من البعوض *Aedes aegypti* الناقل لحمى الضنك. حيث أثبت النوع *Thalassia hemprichii* انه أكثر فعالية نسبياً من النوع*Halodule uninervis* ضد يرقات بعوض *A. aegypti*.

أثبتت المستخلصات والمركبات النقية المعزولة من الحشائش البحرية فاعلية كبيرة كمضادات للأكسدة، حيث أظهر المستخلص من النوع*Halodule uninervis* فاعلية ونشاط كبير كمضاد للأكسدة مقارنه بالنوع *Thalassia hemprichii*، وأيضاً أظهرت بعض المركبات النقية المفصولة مثل الكوريستين أحادي الجلوكوسيد و الكامفيرول أحادي الأربينوسيد فعالية جيدة كمضادات للأكسدة.

تمّ اختبار السمّية لمستخلصات الحشائش البحرية والمركبات الكيميائية المفصولة منها على خلايا إيرلش السرطانية، حيث أظهر مستخلص *H. uninervis* تأثيراً واضحاً على الخلايا السرطانية، حيث انخفضت الخلايا القابلة للحياة إلى 62% مقارنة بالمستخلص من .82% *T. hemprichii*

كما تم اختبار سمّية مستخلصات الحشائش البحرية باستخدام طريقة إيرلش السرطانية على الجرذان، حيث أظهر مستخلص *T. hemprichii* له تأثيراً واضحاً على تقليل الورم وكذلك إطالة الوقت للجرذان المصابة بالورم عند تركيز 150ملجم لكل كجم وزن من الجرذان، وبعد الحقن بـ 11.5 مللي من المحلول من التركيز 150 ملجم تبين انه اختزل الورم بنسبة 66% تقريبا مع زيادة نسبية لوقت الجرذان قبل زيادة الورم. تعتبر نتائج دراسة تلك الأعشاب البحرية كمضادات للأورام مشجعة لمزيد من الدراسات الفاراماكولوجية للتمكن من الاستفادة الدوائية منها.

Bio-Chemical Studies on Some Species of Saudi Red Sea Seagrasses

By

Munir Abdullah Abdrrheem Ba-makhramah

A thesis submitted for the requirements of the degree

of Master of Science [Marine Chemistry]

Supervised by

Prof. Dr. Usama Wahid Abd El-Atty Hawas

FACULTY OF MARINE SCIENCES

KING ABDULAZIZ UNIVERSITY

JEDDAH – SAUDI ARABIA

Ramadan 1437 H – June 2016G

Abstract

Red Sea offers an enormous resource of novel compounds and it has been classified as the largest remaining reservoir of natural molecules to be evaluated for drug activity. We have interested to focus our study for searching new medical agents as antioxidants and antitumor agents (Ehrlich ascites carcinoma cells) from sea grasses *Halodule uninervis* and *Thalassia hemprichii*.

The selected seagrasses were extracted by organic solvents, and partionated by chloroform which saponified by alcoholic KOH. The GC-MS analyses of unsaponified and methylated saponified fractions revealed ~ 50% saturated and ~ 35% unsaturated fatty acids in both seagrasess, where palmitic acid and neophytadiene are the major components in the fractions.

A total of seventeen (17) chemical compounds were isolated and identified from the polar fractions of the selected seagrasses extracts. Identifications of the compounds were carried out through spectral analyses. The compounds were identified as nine flavonoids, apigenin, vicenin-2, diosmetin 7-*O*-*β*-glucoside, diosmetin 7-*O*-*β*-glucoside-2''-sulphate, kaempferol 3-*O*-*β*-(6''-*E*-*p*-coumaroyl) glucoside, kaempferol 3-*O*-*α*-arabinoside, kaempferol 3-*O*-*β*-xyloside, quercetin 3-*O*-*β*-xyloside, and quercetin 3-*O*-*β*-glucoside; two phenolic acids caffeic acid, *p*-hydroxybenzoic acid; two steroids, *β*-stigmasterol and *β*-stigmasterol 3-*O*-

glucoside; fatty acid, palmitic acid; and 4,4'-dihydroxybenzophenone; and nitrogen compound, octopamine.

The seagrasses extracts were evaluated for their different biological activities such as antioxidant and antitumor as well as the toxicology effect on the dengue fever vector *Aedes aegypti*. *Thalassia hemprichii* was proved to be relatively more effective extract than *H. uninervis* against mosquito larvae of *A. aegypti* with LC_{50} values 190 and 203 ppm, respectively.

Seagrasses extracts and their isolated pure compounds have been shown to have various antioxidant activities. *Halodule uninervis* extract possess high antioxidant effect compared to *T. hemprichii* and quercetin 3-*O*-*β*-glucoside and kaempferol 3-*O*-*α*-arabinoside are the active principle at 25 µg/ml, respectively. The total reducing power of kaempferol 3-*O*-*α*-arabinoside exhibited the highest total reducing power ability compared to the standard antioxidant (BHT) at 0.45 and 0.463 nm, respectively.

The toxicity of both seagrasses extracts and their isolated compounds was examined on Ehrlich ascites carcinoma cell line (EACC). The viable cells were decreased by *H. uninervis* extract which demonstrated tumoricidal effect with 62% compared to 82% for *T. hemprichii* extract. Quercetin 3-*O*-*β*-glucoside exhibited a moderate antitumor activity; it reduces the viability of EACC to ~ 51% dead cells.

The seagrasses extracts were also examined against *in vivo* Ehrlich ascites carcinoma through estimation of tumor volume and survival time of animals. It was found that the tumor volume of the mice administrated intraperitoneal with 150 mg/Kg of *T. hemprichii*

extract after injection with Ehrlich ascites carcinoma was 11.5 ml and the reduction of tumor volume was found to be 65.66% and slight increase in life span.