

جدازای و شناسایی مونوساکاریدهای موجود در موسیلاز بالنگوی سیاه به روش کروماتوگرافی لایه نازک

نساء فکری^{۱*}، مسعود خیامی^۲، رضا حیدری^۳ و محمدعلی جوادی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۴- مریبی، ایستگاه آموزش و تحقیقات بهداشتی ارومیه

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: n_f_best@yahoo.com

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۷

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۸۷

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۶

چکیده

بالنگوی سیاه (*Lallemantia iberica* F. & C. M.) گیاهی یک ساله، علفی و کوتاه است و از نواحی قفقازی منشأ می‌گیرد، به عنوان گیاه زینتی کشت می‌شود و بومی اروپای مرکزی و اروپای شرقی است. بالنگوی سیاه به خاطر دانه‌های پرورش داده می‌شود و دانه آن نزدیک به ۳۰ روغن خشک دارد. یکی از مواد مؤثره موجود در این گیاه موسیلاز می‌باشد. موسیلازها امروزه کاربردهای دارویی زیادی دارند. در این تحقیق موسیلاز بالنگو استخراج شده و توسط کروماتوگرافی لایه نازک مورد شناسایی قرار گرفت. روشها شامل مراحل زیر بودند: استخراج، خالص سازی، تراکافت کردن، خشکاندن انجمادی، یون زدائی، هیدرولیز و در آخر کروماتوگرافی لایه نازک. برای انتخاب سیستم جدازای مناسب فازهای ساکن و حلالهای زیر این مورد استفاده قرار گرفت: ۱- سیلیکاژل G با حلal-n-بوتanol: اسید استیک: آب (۵۰:۲۵:۷/۷) ۲- سیلیکاژل G با حلal - کلرفرم : متانول ۷/۷ و ۳- کرل گور G با حلal-n-بوتanol: استون: بافر فسفات (۴۰:۵۰:۱۰/۷/۷). با استفاده از سیستم آخری ۷ لکه از موسیلاز بالنگو جدازای و شناسایی شد. موسیلاز بالنگوی سیاه شامل: مونوساکاریدهای گالاكتورونیک اسید، گالاكتوز، مانوز، آرابینوز، گزیلوز، گلوکز و رامنوز هست. این تحقیقات برای خلوص و شناسایی ترکیبها انجام شده است.

واژه‌های کلیدی: بالنگوی سیاه، موسیلاز، مونوساکارید، استخراج، هیدرولیز، کروماتوگرافی لایه نازک.

متمايل به سفيد و متنه به گل آذين؛ برگهای پايین دراز، دارای دمبرگی به طول ۵-۱۰ ميلی متر. گلهای آبی یا بنفش، بندرت سفید، مجتمع در چرخه‌های دارای ۴ تا ۶ گل واقع در سنبله انتهائي، موسم گل خرداد تیر ماه است.
[\(.Http://www.Hear.org/gcw/html/index.htm\)](http://www.Hear.org/gcw/html/index.htm)

مقدمه

بالنگوی سیاه (*Lallemantia iberica* F. & C. M.) که به تیره نعناع تعلق دارد گیاهی است یک‌ساله، تقریباً بدون کرک، به ارتفاع ۱۰-۵۰ سانتی متر، ساقه منفرد، باریک علفی، ساده یا از قاعده منشعب با شاخه‌های ایستاده، برگدار، سبز مات،

به عنوان روان کننده به خاک و آب اطراف تیغه‌های حفاری اضافه می‌شود و همچنین مقداری از آن به آب پمپ شده به داخل زمین اضافه می‌شود تا فشاری برای مهار نفت و گاز ایجاد نماید و به آب پایداری دهد و حرکتش را آرام کند. آب خالص به سرعت در بین سنگها نفوذ کرده و از طغیان Simpson & Conner-ogorzaly, (چاه جلوگیری می‌نماید (1986).

با توجه به کاربردهای فراوان موسیلاژ، این تحقیق با هدف استخراج و شناسایی مونوساکاریدهای موسیلاژ دانه بالنگوی سیاه انجام گرفت. نتایج این نوع تحقیقات راه را برای کاربرد بهتر و بیشتر ترکیب‌های موسیلاژی روشن تر می‌سازد.

مواد و روشها

استخراج

استخراج با استفاده از روش ماهرانی و همکاران (1۳۸۳) با اندکی تغییرات صورت گرفت. در این روش، دانه‌ها به نسبت معین با آب مخلوط شده و در مدت سه ساعت عمل استخراج انجام گردید. در تمام مدت استخراج مخلوط با مگنت ۲/۵ سانتی‌متر بر روی گرمکن در دمای ثابت هم زده شد. مخلوط دانه با آب، با صافی مش ۴۰ صاف گردید. سپس با افزودن اتانول ۹۶٪ به نسبت ۳:۱ رسوب داده شد. رسوبات با سانتریفیوژ جداسازی شد. در تحقیق حاضر، مواد موسیلاژی با مخلوط کردن دانه‌ها با آب مقطر با نسبت ۱ به ۲۰ (w/w)، تکان دادن مخلوط به مدت ۳ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد استخراج شد. عصاره موسیلاژی از دانه‌ها از طریق پارچه ململ (پارچه توری ساده) جدا شد و با ۳ برابر حجمش با اتانول ۹۶ درصد رسوب داده شد.

موسیلاژها به علت دارا بودن ویژگیهای بالارزش مانند پایدارکننده، سوسپانسیون کننده، امولسیون کننده در صنعت نساجی و داروسازی کاربردهای گسترده‌ای دارند. در داروسازی جهت تهیه امولسیونها، سوسپانسیونها و به عنوان یک عامل امولسیون کننده پودرهای نامحلول، روغنها و رزینها و به عنوان چسب در ساخت گرانولها و قرصهای مکیلنی و ساخت مسهل‌ها بکار می‌رود. اما بیشترین کاربرد آنها به عنوان جزء ضروری در داروهاست. این پلیمرهای آب دوست به عنوان همبند در قرصها، امولسیون کننده، عوامل ژله کننده، عوامل سوسپانسیون کننده و پایدارکننده بکار می‌روند (میرمعصومی، ۱۳۷۱). موسیلاژها از بهترین هیدروکلوفئیدهای پلی‌ساکاریدی دارویی هستند؛ چون با هیدروکلوفئیدهای دیگر که منشأ گیاهی دارند، همچنین نشاسته، قندها و پروتئینها سازگاری دارند و بر خلاف بیشتر هیدروکلوفئیدهای پلی‌ساکاریدی نسبتاً به pH پایین مقاوم هستند و در شرایطی که pH اسیدی است بکار می‌روند. از بعضی هیدروکلوفئیدهای پلی‌ساکاریدی مخصوصاً نوع متوكسیله برای تهیه غذاهای کم کالری استفاده می‌شود. این مواد در ژله‌ها، چاشنی‌ها و نوشیدنی‌ها نیز بکار می‌روند و به همراه کاراژینان‌ها با آژینات کهنه شدن انواع نان را به تعویق می‌اندازد. موسیلاژها در ترکیب‌های غذایی نیز کاربرد داشته و به عنوان تغلیظ کننده و تثیت کننده دسرها بکاربرده می‌شوند (بقالیان، ۱۳۷۸).

علاوه بر صنایع غذایی در تهیه فرآورده‌های آرایشی جهت مجعد کردن موها و محلولهای پوستی، همچنین در صنایع رنگ‌آمیزی پارچه، کاغذسازی، تهیه مرکب چاپ، تهیه واکس و صنایع دفاعی (تهیه مواد منفجره ضد آب) نیز استفاده زیادی دارند (بقالیان، ۱۳۷۸). صنعت نفت هم از مصرف کنندگان بزرگ موسیلاژها به شمار می‌رود. موسیلاژ

هوای اتاق خشک شد. جهت آشکارسازی از معرف آنلین- دی فنیل آمین- اسید ارتو فسفوگیریک استفاده شد. برای ظهور لکه‌ها صفحات به مدت نیم ساعت در آون ۱۰۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (میقانی، ۱۳۷۴، Jork et al., 1990)

نتایج

از میان صفحه‌های بکار برده شده، صفحه کزل گور G با سیستم حلالش برای جداسازی قندها مناسب بود. مقادیر حرکت نسبی (Rf) آنها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (موافقی، ۱۳۷۱):

$$Rf = \frac{100 \times \text{فاصله طی شده توسط حلال}}{\text{فاصله طی شده توسط ماده مورد نظر}}$$

(Dey, 1993). سیلیکاژل مورد استفاده نوع مرک (merc) و کزل گور G از نوع merc:8129 بود. به فاصله ۲ سانتی‌متری از لبه هر صفحه محلول مونوساکاریدهای استاندارد و عصاره‌های مجھول با استفاده از سرنگ هامیلتون روی صفحات فعال شده (صفحات بعد از لایه نشانی و خشک شدن برای فعال شدن به مدت نیم ساعت در ۱۰۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند) تزریق گردید. درون تانکها حلال ریخته شد و به مدت ۱ ساعت به حال خود رها شد تا اشباع گردد سپس صفحات به طور مایل درون تانک قرار داده شد و بعد از پیشروی حلال تا نقطه مورد نظر (۲ سانتی‌متر مانده به انتهای) خارج شده و در





شکل ۲- لکه‌های تشکیل شده در صفحه کزل گور G (به دو حالت جداگانه و مخلوط استانداردها)

جدول ۲- مقادیر RF متوسط لکه‌های حاصل از مونوساکاریدهای استاندارد

RF	منوساکارید	ردیف	RF	منوساکارید	ردیف
*۶۸ - ۷۲	گلوکز	۵	۸ - ۱۶	گالاکتورونیک اسید	۱
*۷۹ - ۷۷	آرابینوز	۶	۱۸ - ۳۰	گلوکورونیک اسید	۲
۸۰ - ۸۶	گزیلوز	۷	۴۸ - ۵۹	گالاكتوز	۳
۹۲ - ۹۸	رامنوز	۸	۶۶ - ۷۶	مانوز	۴

-Rf های بدست آمده متوسط می‌باشد و با وجود همپوشانی این دو متوسط براساس تکرارهای مختلف، نوع مونوساکارید موجود بدست می‌آید.

در کروماتوگرافی لایه نازک نمونه موسیلاژی هیدرولیز شده دانه بالنگوی سیاه در طی بررسی نتایج زیر حاصل شد:

جدول ۳- مقادیر Rf بدست آمده برای غلظتها مختلف نمونه موسیلاژی بالنگوی سیاه

Rf مقادیر ۱/۵ غلظت میکرولیتری	Rf مقادیر غله غله میکرولیتری غله	Rf مقادیر ۰/۵ غلظت میکرولیتری رقيق*	Rf مقادیر مونوساکاریدها	نمونه ها
۷/۲۷	۷/۲۷	۴۲/۲۸	۸/۵۷	گالاکتورونیک اسید
-	-	-	-	گلوکورونیک اسید
۵۴/۵۴	۵۵/۲۵	۵۴/۲۸	۵۷/۱۴	گالاکتوز
۶۶/۰۶	۶۷/۸۷	***۷۵/۴۲	۶۹/۷۱	مانوز
-	-	۶۵/۷۱	-	گلوکز
۷۲/۷۲	۷۵/۱۵	۷۷/۷۱	۷۶	آرابینوز
۸۳/۶۳	۸۴/۲۴	-	۸۵	گزیلوز
۹۶/۹۶	۹۶/۹۶	۹۵/۴۲	۹۸	رامنوز

*، برای رقيق کردن غلظت اول به نمونه ۰/۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه شده است. برای غلظت دوم یک میکرولیتر آب مقطر؛ در غلظت سوم رقيق شدن صورت نگرفته و در غلظت چهارم ۰/۵ میکرولیتر آب مقطر به یک میکرولیتر نمونه اضافه شده است.
**، مانوز در این قسمت در محدوده بالاتری تفکیک شده است.



شکل ۳- لکه های غلظت ۱ میکرولیتر رقيق بالنگو که خیلی به هم نزدیک هستند
(سمت چپ مونوساکاریدهای استاندارد و سمت راست نمونه بالنگو می باشد.)

تصادفی بودند. در مورد غلظت $0/5$ میکرولیتری تمام واحدها به جز گلوکز جداسازی شده‌اند. در غلظت یک میکرولیتری رقیق گالاکتورونیک اسید بالاتر از محل پیش‌بینی شده و گلوکز پایین‌تر از آن جدا شده‌اند که این را می‌توان به خلوص واحدهای تزریقی و یا قطبیت حلال نسبت داد. در یک میکرولیتری غلیظ گالاکتورونیک اسید کمی پایین‌تر جدا شده و لکه گلوکز حاصل نشده است. در غلظت $1/5$ میکرولیتری گالاکتورونیک اسید کمی زودتر جدا شده و لکه‌های آرابینوز و گلوکز دارای همپوشانی هستند. این نتایج و ترتیب مونوساکاریدها در جدا شدن و مقادیر حرکت نسبی آنها با مقایسه کل غلظتها و Rf‌ها ذکر شده است و قرار گرفتن لکه‌ای بالاتر یا پایین‌تر از مقدار متوسط Rf بدست آمده برایش با توجه به کل بدست آمده است. مونوساکاریدهای تشکیل دهنده موسیلاژ بالنگوی سیاه طی آزمایشهای بالا با خلوص و دقیق بیشتری بدست آمدند و این نتایج ما را در کاربرد بهتر این ترکیبها در زمینه‌های مختلف صنعتی و دارویی یاری خواهد کرد. در ضمن این تحقیق در مورد بالنگوی برای اولین بار صورت گرفته است و منبعی برای مقایسه وجود ندارد.

سیاسگزاری

از مساعدتهای دکتر محمدزاده و مهندس جباری (ایستگاه آموزش و تحقیقات بهداشتی ارومیه) که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، تشکر می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- امامی کبریائی، ک. ۱۳۷۹. بررسی ریختاری، خرد نگاری و شناسایی ترکیبات موسیلاژی دانه ریحان (*Ocimum basilicum*).

براساس نتایج فوق، مونوساکاریدهای نمونه هیدرولیز شده بالنگوی سیاه، گالاکتورونیک اسید، گالاکتونز، مانوز، آرابینوز، گریلوز، رامنوز و گلوکز می‌باشد.

بحث

در این تحقیق برای انتخاب صفحه و سیستم جداسازی مناسب مونوساکاریدها از سه گزینه استفاده شد، همان‌طور که از نتایج برمی‌آید، در صفحه سیلیکاژل G تهیه شده با آب، لکه‌های استاندارد دارای جداسازی مناسب نمی‌باشند. به‌طوری که هگزووها و پنتووها دارای کشیدگی نزدیک به هم می‌باشند، در ضمن از لحاظ رنگ هم تفاوت مشخصی با هم ندارند. در مورد صفحه سیلیکاژل G تهیه شده با استات سدیم نیز جداسازی کیفیت خوبی ندارد. در مقایسه با این صفحه‌ها، صفحه کرل گور G تهیه شده با بافر فسفات دارای جداسازی بهتری می‌باشد و از لحاظ رنگی نیز لکه‌ها دارای تفاوت مشخصی با هم می‌باشند. چون این نوع کار در مورد بالنگوی سیاه برای اولین بار صورت گرفته است، برای مقایسه نتایج آن منبعی در دست نمی‌باشد. برای بدست آوردن غلظت مناسب، غلظتها مختلفی امتحان گردید و نتایج نشان داد که تمامی غلظتها برای بدست آوردن واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده موسیلاژ بالنگوی سیاه لازم می‌باشد. در مورد غلظتها مقادیر رقیق شده به معنای افزودن همان مقدار آب مقطر به نمونه هیدرولیز شده در زمان تزریق می‌باشد، یعنی $0/5$ میکرولیتر رقیق شده شامل $0/5$ میکرولیتر نمونه هیدرولیزی و $0/5$ میکرولیتر آب می‌باشد. در مورد نمونه غلیظ نیز آبی اضافه نشده است، در نمونه $1/5$ میکرولیتری، $0/5$ میکرولیتر آب اضافه شده است. این غلظتها و رقیق کردنها به طور

- میرمعصومی، م.، ۱۳۷۱. بررسی موسیلائزها در تیره بارهنگ با کشت بافت و کشت مزرعه. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تهران.

- Dey, P.M., 1993. Methods in Plant Biochemistry, Vol. 2, Carbohydrates. Academic Press, London, 441p.
- Fedeniuk, W.R. and Biliaderis, G.C., 1994. Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum L.*) mucilage. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 42: 240-247.
- Http://www.Hear.org/gcw/html/index.htm Global Compendium of weeds home page.
- Jork, H., Funk, W. and Fisher, W., 1990. Thin- Layer Chromatography: Reagents and detection Methods, VCH, Germany, 256p.
- Karawya, M.S., Wassel, M.G., Baghdadi, H.H. and Amma, M.N., 1980. Mucilagenous content of certain Egyptian plants. *Planta Medica*, 38: 73-78.
- Martinez, M.C. and Depinto, L.G. 1992. Composition of *Acacia macracantha* gum exudates. *Phytochemistry*, 31(2): 535-535.
- Mayna, P. and Difabio, L.J., 1978. Composition of *Cactaceae* mucilage. *Planta Medica*, 34: 207-210.
- Simpson, B.B. and Conner-ogorzaly, M., 1986. Economic botany. McGraw-Hill, Inc., Singapore, 640p.
- Stahl, E., 1989. Thin- Layer Chromatography: A laboratory handbook. Springer Verlay, New York, 751p.

پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران.
- بقالیان، ک.، ۱۳۷۸. اثر رطوبت خاک و هوا بر کمیت و کیفیت موسیلائز اسفرزه. پایان نامه کارشناسی ارشد، رشته علوم باگبانی، دانشگاه تهران.

- شفیع زاده، ف.، ۱۳۸۱. گیاهان دارویی لرستان. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی حبان، خرم آباد، ۸۲ صفحه.

- زمان، م.، ۱۳۷۳. گیاه دارویی، روش‌های کشت و برداشت. انتشارات ققنوس تهران، ۳۶۸ صفحه.

- ماهرانی، ب.، بروزگر، م.، سحری، م. و دهقانی، ح.، ۱۳۸۳. بهینه‌سازی شرایط استخراج صمغ دانه بزرگ ایرانی به روش صفحه پاسخ. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۴: ۱۵۵-۱۳۵.

- موافقی، ع.، ۱۳۷۱. بررسی کمی و کیفی پلی ساکاریدهای موسیلائزی در بارهنگ‌ها با کشت بافت و کشت مزرعه‌ای. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تهران.

- میقانی، ف.، ۱۳۷۴. بررسی کمی و کیفی پلی ساکاریدهای کتیرا در گیاه کامل و کشت بافت دو گونه گون. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تهران.

Isolation and identification of monosaccharide of Mucilage in Dragon's head by thin layer chromatography

N. Fekri^{*1}, M. Khayami², R. Heidari³, M.A. Javadi⁴

1- M.Sc Student of Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Iran.

2- Scientific Member of Urmia University

3- Scientific Member of Urmia University

4- Educational and Research Medical Station of Urmia

*Corresponding Author, E-mail: n_f_best@yahoo.com

Received: March: 2008

Revised: March 2008

Accepted June : 2008

Abstract

Dragon's head (*Lallemantia iberica* F. & C. M.) an annual or perennial herb, or dwarf shrub that originates in the Caucasian region and was cultivated for ornament and may be domesticated in East and East Central Europe. Dragon head was cultivated for its seeds from which oil is extracted. The seed contains up to 30% of a drying oil. One of effective compounds in this plant is mucilage. Mucilage has different applications in the broad field of pharmacy and medicine now. Mucilage was extracted from dragon's head seed and was identified by using thin-layer chromatography. Method involves the following steps: first by extraction, purification, dialysis, lyophilization, deionization, hydrolyze and TLC analysis for choosing the best separation system, these separation systems were: 1- Silica gel G 60 HF plate using n-butanol: acid acetic: water (50:25:25 v/v) as mobile system. 2- Silica gel G 60 HF plate using chloroform: methanol (60:40 v/v) as solvent system. 3- Kieselguhr G plate using n- butanol: acetone: phosphoric acid (40:50:10 v/v) as mobile system. Finally, the best results achieved by using n-butanol: acetone: phosphoric acid (40:50:10 v/v) as mobile system on the Kieselguhr G plate as stationary phase. *Lallemantia iberica* mucilage was separated into seven spots. Mucilage of *Lallemantia iberica* seeds was composed of galacturonic acid, galactose, mannose, arabinose, xylose, glucose and rhamnose monosaccharide. This result is useful for more and better characterization of dragon's head mucilage for application in food industry.

Key words: Dragon's head, Mucilage, monosaccharide, Extraction, Hydrolysis, TLC.