جداسازی و بـــــــــــررسی پلی ساکاریدهای موسیلاژی برگ ها و پـــــــــیاز گونه لوشه (*Allium chrysantherum Boiss. & Reu*t.)

محمد پیری قارنایی[۱*]، رضا حیدری[۲]، عباس صیامی[۳]، صمد زارع[٤]، رشید جامعی[٥]

گروه زیست شناسی ،دانشکده علوم، دانشگاه ارومیـــــــــه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۰/۳۰ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۷

Isolation and determination of mucilage polysaccharides from the bulb and leaves of the *Allium chrysantherum* species.

Pirigharnaei M.[*1], Hydari R[2]., Siami A[3]., Zaree S[4]., Jamei R[5].

[1,2,3,4,5]Biology department, Faculty of Science ,Urmia University, Uremia, Iran.

Received: 20 Jan. 2008, Accepted: 28 Oct. 2008

Objectives: **Mucilage polysaccharides costitute a structurally diverse class of biological macromolecules which are the basis for the different applications in the broad field of pharmacy and medicine.Some examples will be given for the so-called immune-modulating antitumor polysaccharides which have been shown to be prominent candidates for an adjuvant tumor therapy.** Methods: **In the present research, plant mucilages, has been isolated from the leaves and bulbs of Allium chrysantherum from important bulbous plants of iran(Liliaceae). Each organ was pretreated to remove interfering substances and the extracted mucilage (by cold and hot methods) was also purified from contaminants. The chemical composition of the mucilage was studied by analysing the hydrolysates quantitatively and qualitatively by TLC and GLC of their alditol acetate derivatives.** Results: **Purified mucilages extracted from leaves and bulbs of Allium chrysantherum, were shown to be acidic polysaccharides, containing: glucose(65%),mannose (22%), galactose (12%) and glucoronic acid was also present in the leaf mucilage and the bulb mucilage of this species was composed of rhamnose (10%), mannose (12%)glucose (29%) and galactose was the predominant sugar (48.5%), glucoronic acid and galacturonic acid were also present .** Conclusion**: The findings of the present study suggest that two mucilages of the leaves and bulbs , containing acidic polysaccharide and hegsuses are the predominant sugars.**

Key words: *mucilage, polysaccharide, Allium chrysantherum.*

زمینه و هدف: پلی ساکاریدهای موسیلاژی از نظرساختمانی یک گروه متنوع از درشت مولکولهای زیستی را تشکیل می دهند که پایه واساس برای کاربردهای متفاوت در زمینه ی پهناور دارویی و داروسازی می باشند. بعضی از نمونه ها که به اصطلاح به پلی ساکاریدهای ضد سرطانی باخواص تنـــــظیم کننده ی ایمنی معروف هستند، نشان داده اند که نامزدهای آشکاری برای کمک به معالجه ی تومورها می باشند. **روشها:** درتحقیق اخیر، موسیلاژهای گیاهی، از برگها و پیاز *A. chrysantherum* از گیاهان پیازدار مهم ایران (تیره Liliaceae) جداسازی شده اند.هراندام گیاهی جهت از بین بردن مواد مداخله کننده، تیمار داده شد و استخراج موسیلاژآن صورت گرفت (بوسیله ی روشهای سرد و گرم) وهمچنین ازآلاینده هاخالص شد.ترکیب شیمیایی موسیلاژ از نظر کمّی و کیفی بوسیله یTLC و GLC مطالعه شد. **یافته ها:** موسیلاژ خالص استخراج شده از برگها و پیازهای *A. chrysantherum* پلی ساکاریدهای‌اسیدی را نشان دادند، که در موسیلاژ برگ آن قندهای گلوکز (٦٥٪)، مانوز (۲۲٪)، گالاکتوز (۱۲٪) وهمچنین اسید گلوکورونیک وجود داشتند وموسیلاژ پیاز آن از رامنوز (۱۰٪)، مانوز(۱۲٪)، گلوکز (۲۹٪) وقند غالب گالاکتوز (٤۸/٥٪) تشکیل شده است واسید گلوکورونیک واسیدگالاکتورونیک(کروماتوگرام حاصل از TLC)هر دو در موسیلاژ پیاز گیاه مذکور حضور داشتند. **نتیجه گیری:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که هر دو موسیلاژ برگ وپیاز، دارای پلی ساکارید اسیدی می باشند وقند غالب هگزوزها هستند .

واژه های کلیدی: *موسیلاژ، پلی ساکارید، لوشه.*

*نویسنده مسئول: محمد پیرقارنایی، دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن: ٤٢٣٢٤١١- ٤٤٤ ۰، نمابر: ۰٤٤٤-٤٢٣٢٤١٢

**Corresponding Author: Mohammad Pirigharnaei, Ph.D. student of plant physiology, biology, faculty of science ,Urmia University, Urmia, Iran. Tel: +98-444-4232411; Fax: +98-444-4232412; E-mail: m.pirigharna@gmail.com*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

موسیلاژها، بیوپلیمرهای باوزن مولکولی زیاد هستند که بطور طبیعی و درطی رشد عادی گیاه ، در گیاهان بوجود می آیند. عمومی ترین منابع موسیلاژ، دانه ها هستند. لیکن در پوسته، برگ،گل، ریشه، پیاز، غده ومیوه نیز یافت می شوند. (۱) هیدرولیز موسیلاژها، صرف نظر از اسیدهای اورونیک ،پنتوزها و هگزوزها را نیز نشان می دهد که عمومی ترین آنها، آرابینوز، گزیلوز، رامنوز، مانوز، گالاکتوز و گلوکز می باشند (۲).

اهمیّت موسیلاژها، بعنوان هیدروکلوئیدهای پلی ساکاریدی در کاربردهای داروسازی ،قدمت تاریخی طولانی دارد و در طی این دهه بطور قابل توجهی افزایش یافته است . این مواد بعنوان پایدار کننده[۱] ، عامل سوسپانسیون کننده[۲] و قوام دهنده[۳]، و عامل تشکیل لایه نازک[۴]، عامل نگهدارنده آب[۵]، عامل انعقاد[۶]،روان کننده کلوئیدی یا کاهش دهنده اصطکاک به کار می روند .از جنبه های بسیار جالب این مواد، نقش آنها در دسترس قرار دادن دارو در معالجه زخم، در تشخیص ودرمان سرطان ، پیشگیری و معالجه بیماریهای باکتریایی و ویروسی می باشد (۳).

پلی ساکاریدهای موسیلاژی از نظرساختمانی یک گروه متنوع از درشت مولکولهای زیستی بادامنه ی وسیعی ازخواص فیزیکوشیمیایی راتشکیل می دهندکه پایه واساس کاربردهای متفاوت درزمینه ی پهناورداروپی وپزشکی وصنعتی می باشند.(۳). Tomoda وهمکاران(۱۹۸۷)، درطی آزمایشات بالینی متعدد فعالیت مستقیم کاهش قندخون (Hypoglycemia) پلی ساکاریدهای موسیلاژی را در تیره های مختلف گیاهی به اثبات رسانده اند (٤). در سالهای قبل Tomoda وهمکاران ،گلوکومانانهای مختلفی را از پیازهای گیاهان تیره ی نرگس (۷-۵) وگیاهان تیره لاله (۱۱-۸) جداسازی وگزارش نموده اند. پلی ساکاریدهای موسیلاژی بدلیل اهمیت وکاربردهای وسیعی که در صنعت و پزشکی دارند، توجه بسیاری ازمحققان و پژوهشگران را به خود جلب کرده اند ولی در ایران، کارهای تحقیقی انجام شده در زمینه ی بررسی وشناسایی این فراورده های طبیعی گیاهان، کم بوده است.

بنابراین کار تحقیقی حاضر، به منظور استخراج موسیلاژ برگ وپیاز گیاهان به وسیله ی روشهای سرد وگرم و بررسی کمّی و کیفی ترکیب شیمیایی پلی ساکارید های موسیلاژی برگ وپیاز *Allium chrysantherum Boiss. & Reut* از پیاز داران مهم ایران، بوسیله ی تکنیکهای TLC وGLC صورت گرفته است.

۲-مواد وروشها

۲-۱: استخراج سرد وگرم موسیلاژ

قبل از استخراج موسیلاژ، مواد گیاهی (پیازها و برگها). در اتانول ۹٦٪ جوشانده شدند تا حتّی الامکان از موادی که ایجاد مزاحمت می کنند (نظیر پیگمان ها و ...) پاک شوند. تفاله باقی مانده در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ ساعت خشک و بوسیله آسیاب برقی به پودری با اندازه ذرات حدود ۰/۲۵ میلی متر تبدیل شدند (۱۲،۱۳).

۱۰ گرم از هر نمونه مورد نظر بوسیله استخراج سردموسیلاژ (CEM) مورد آزمایش قرار گرفت . طبق این روش ماده‌ی گیاهی با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر اسیدی شده با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال (pH = ۳/۵) مخلوط شدوبه مدت ۱۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بوسیله ی شیکر مکانیکی به هم زده شد واین عمل سه بار متوالی تکرار شد و عصاره های حاصل از استخراج را با هم ترکیب نموده و به محلول موسیلاژی و با به هم زدن آرام ، ٤ حجم اتانول ۹٦ درصد افزوده و اجازه داده شد تا موسیلاژ طی شب و در سرما (٤ درجه سانتی گراد) رسوب نماید (۱۲،۱۳). جهت استخراج بیشتر موسیلاژ از اندامهای گیاهی ، تفاله ی حاصل از استخراج سرد موسیلاژ اندامهای گیاهی، توسط استخراج گرم موسیلاژ (HEM) دنبال گردید (موسیلاژ باقیمانده در تفاله، دربن ماری تحت دمای ۹٦ درجه سانتیگراد وبه مدت ۱۲ ساعت ،با به هم زدن گاهگاهی استخراج گردید) وهمانند روش سرد رسوب داده شد (۱۳).

۲-۲: تخلیص (Purification)

موسیلاژ خام بدست آمده از مرحله قبل چندین بار بوسیله اتانول خالص شستشو گردید (۲،۵،٦) تا از یونهای کلراید عاری شود و سپس بشدت در استون و اتر تکان داده شد و پس از حل کردن مجدد موسیلاژ در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ، کلروفرم را به آن افزوده و به

---

[۱] - Stabilizer
[۲] - Suspending
[۳] - Thickener
[۴] - Film forming agent
[۵] - Water retention agent
[۶] - Coagulant

Archive of SID

www.SID.ir

شدت تکان داده شد تا دپروتئینه شود (پروتئینهای دناتوره شده در حدفاصل بین محلول موسیلاژ وکلروفرم تشکیل ژل داده و بادکانتور جدا شدند) ومحلول موسیلاژ حاصل بوسیله ی کیسه های دیالیز با قدرت جداسازی وزن مولکولی (MWCO) ۱۲۰۰۰ دالتون ، دیالیز شد(۱۳،۱٤) و سپس لیوفیلیزه گردید (۲،۱۳).

۳-۲:هیدرولیز موسیلاژ

جهت هیدرولیز موسیلاژ،۵۰ میلی گرم از هر نمونه در ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک نرمال در یک لوله شیشه ای درب دار به مدت ۲۲ ساعت در حمام آب جوش حرارت داده شد . رسوب کم باقیمانده در پایان هیدرولیز با صاف کردن بوسیله کاغذ واتمن ۱ جدا شد و محلول حاصل با افزودن کربنات باریم از یونها سولفات (SO_4^{-2}) عاری گـردیـد (۳،۱۳،۱۵). رسوب سولفات باریم بوسیله سانتریفوژ (g ٤۰۰۰ و۱۰ دقیقه) وسپس بوسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جداسازی شدو۵۰۰میکروگرم از هر نمونه بدست‌آمده جهت مشتق سازی ترکیبات قندی مورد استفاده قرارگرفت (۱۳،۱٦).

٤-۲: استفاده از رزینهای مبادله کننده یون

عصاره مونوساکاریدی حاصل از مراحل قبل، به دلیل وجود کاتیونهایی مانند کلسیم، منیزیم، پتاسیم و همچنین آنیونها باید عاری از این یونها گردد (۱۷) در غیر اینصورت، مونوساکاریدها ضمن کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) بخوبی از هم جدا نمی شوند. برای این منظور از رزین کاتیونی ورزین آنیونی استفاده شد. جهت استفاده از رزینهای مبادله کننده ی یونی ابتدا آنها را فعال نموده وسپس عصاره های موسیلاژی، ابتدا از رزین کاتیونی وسپس از رزین آنیونی عبور داده شدو فاقد یون گردید وسپس عصاره، تا حد ۰/۵ میلی لیتر تغلیظ و جهت شناسایی کمّی وکیفی اجزای سازنده ی موسیلاژ بوسیله یTLC وGLC مورد استفاده قرار گرفت. (۱۸،۱٦)

۵-۲: کـــروماتـــــوگرافی لایـــــه نـــازک (Thin-Layer Chromatography)

جهت TLC نمونه ها از صفحات کروماتوگرافی متنوّعی استفاده بعمل آمد . پس از آزمایش صفحات مختلف کروماتوگرافی ، صفحات خاک دیاتومه[۷] اشباع شده با بافر فسفات pH=۵ انتخاب گردید (۱٦،۱۹،۲۰).

پس از آزمایش حلالهای مختلف برای کالیبره کردن، حلال n –بوتانول: استون: بافر فسفات pH=۵ (از چپ به راست، ۱۰: ۵۰: ٤۰) مورد استفاده قرار گرفت (۱۳). برای آشکارسازی لکه ها از معرف اختصاصی آنیلین ـ دی فنیل آمین ـ اورتوفسفریک اسید استفاده بعمل آمد (۲۰).

٦-۲:کروماتوگرافی گاز ـ مایع (Gas – Liquid Chromatography)

در این بخش از مطالعات، جـــــهت GLC کردن نمونه هـــای موسیلاژی، از مشتقات استیله‌ی(استاتهای آلدیتول) قندها استفاده بعمل آمد. مشتق سازی نـــمونه ها با استفاده از روش Chaplin و همکاران، انجام شد (۲۱).

مشتق سازی ترکیبات قندی :

به منظور تهیه مشتقات آلدیتول استات مونوساکاریدها، دو معرف مورد نیاز است :

ـ معرف A : دی متیل سولفوکسید خشک شده.

ـ معرف B : ۲ گرم سدیم بوروهیدرید در ۱۰۰ میلی لیتر دی متیل سولفوکسید بی آب (معرف A) در ۱۰۰ درجه ی سانتیگراد حل می گردد. این معرف در دمای ٤ درجه ی سانتیگراد پایدار است.

ـ در حدود ۵۰۰ میکروگرم نمونه و استاندارد در ۰/۱ میلی لیتر آمونیاک ۱ مولار حل می گردد . (برای تهیه محلول ۱ مولار آمونیوم ، ۳ میلی لیتر محلول آمونیاک غلیظ به ۵۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده می شود .)

ـ هیدرات های کربن در حضور ۱ میلی لیتر از معرف B و دمای٤۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه احیاء می گردد .

ـ پس از احیاء با افزودن ۰/۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال ، بوروهیدرات سدیم اضافه، تخریب می شود.

ـ مونوساکاریدهای احیاء شده با افزودن ۰/۲ میلی لیتر ۱-متیل ایمیدازول و سپس ۲ میلی لیتر آنهیدرید استیک، با هم زدن استیله می گردد .

ـ پس از ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه ی سانتی گراد ، تخریب آنهیدرید استیک باقیمانده بوسیله افزودن ۵ میلی لـــیتر آب انجام می پذیرد.

ـ پس از سرد شدن ، به محلول فوق ۱ میلی لیتر دی کلرو متان افزوده و به شدت هم زده می شود و لایه تحتانی را که حاوی استات های آلدتیول محلول در دی کلرومتان می باشد . بوسیله پیپت پاستور به ویال کوچکی منتقل می گردد.

[۷] -Keiselgur

Archive of SID

www.SID.ir

پس ازانجام مراحل فوق ،ویال های دربسته دردمای ۲۰- درجه ی سانتیگراد تا زمان تزریق نـــگهداری می شوند (۲۱).

شرایط تزریق :

به منظور کروماتوگرافی گاز ـ **مایع** از دستگاه GC مدل B ۱۰۱ ساخت شرکت صنایع طیف گستر استفاده بعمل آمد. نوع گاز حامل ، نیتروژن (N_2)، آشکارساز از نوع یونیزاسیون شعله ای (FID)، گاز هیدروژن (H_2) و دریچه تزریق از نوع Split/Splitless می باشد. به منظور GLC نمونه ها، از دو نوع ستون کروماتوگرافی استفاده بعمل آمد و پس از مقایسه نتایج حاصل، یکی از آنها انتخاب گردید.

ـ مشخصات ستون انتخاب شده : ستون از نوع کاپیلاری و با مشخصات زیر می باشد .

Machery Nagel Optima – 17 capillary Column

(30m,0/25 mm i.d , Film thickness 0/25µm)

ـ خلوص گازهای N_2 و H_2 (۹۹/۹۹۹ درصد ، شرکت سبلان تهران) می باشد.

- دمای دریچه ی تزریق[۸] و آشکارساز[۹] به ترتیب ۲۰۰ و ۲۵۰ درجـه ی سانتی گراد می باشد.

ـ میزان شار نیتروژن ، هیدروژن و هوا هر کدام ۱/٤ بار می باشد.

ـ برنامه ریزی دمایی : ستون به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد باقی می ماند ، سپس با سرعت ۱۵ درجه ی سانتی گراد در دقیقه تا دمای ۲۲۵ درجه ی سانتی گراد بالا رفته و بمدت ۲۰ دقیقه در این دما ثابت نگه داشته می شود .مقدار نمونه تزریقی برای آنالیز استانداردها و نمونه های مجهول، ۱ میکرولیتر میباشد.

۳- نتایج

۳-۱: تشخیص نوع قندهای سازنده ی موسیلاژ بوسیله ی TLC

یکی از مسائل اساسی در کروماتوگرافی لایه نازک، تعیین مقدار مناسب برای لکه گذاری می باشد؛ زیرا در صورت لکه گذاری مقادیر زیاد نمونه، لکه های مربوط به مونوساکاریدهای غلیظ، کشیدگی پیدا می کنند. هرچند گاهی سبب می شود که لکه های مربوط به مونوساکاریدهای رقیق ، آشکارتر شوند .

پس از انتخاب معرف آنیلین ـ دی فنیل آمین به عنوان معرف مناسب ، مقایسه سیستم های مختلف ژل ـ حلال با محاسبه Rf برای مونوساکاریدهای مختلف (که بطور مشترک به منظور کالیبره کردن بکار رفته بودند) صورت گرفت و مشخص گردیدکه‌لایه نازک‌خاک‌دیاتومه‌اشباع شده بابافرفسفات ۵ = pH باحلال‌مرکب‌از n- بوتانول ـ استون‌ـ بافرفسفات ۵ = pH (۲۰ : ۱۰۰ : ۸۰) بهترین تفکیک را بین مونوساکاریدها ایجاد می نماید(جدول۱) . از اینرو برای شناسایی اجزای سازنده موسیلاژ از این سیستم استفاده بعمل آمد و کروماتوگرافی عصاره های موسیلاژی پردازش شده برگها و پیازها وجود مونوساکاریدهای سازنده را به طور متمایز از یکدیگر نشان دادند.کروماتوگرافی لایه نازک عصاره ی موسیلاژی هیدرولیز شده برگ و پیاز گونه گیاهی مذکور به حصول نتایج زیر منتهی گردید :

الف) کروماتوگرام لایه ی نازک عصاره ی موسیلاژی هیدرولیز شده حاصل از برگ گیاه لوشـه A.Chrysantherum در شکل (۱) نشان داده شده است .واحدهای سازنده ی موسیلاژی برگ لوشـه شامل اسید گلوکورونیک، گالاکتوز، گلوکوز و مانوز می باشد.

لکه های مربوط به گلوکز قند غالب را نشان می دادند. از دو اسید اورونیک موجود در عصاره های موسیلاژی فقط اسید گلوکورنیک در کروماتوگرام لایه نازک برگ لوشـه مشاهده گردید و هیچکدام از پنتوزها مشاهده نشدند و مقدار نمونه تزریقی ۳۰ میکرولیتر بود.

ب) کروماتوگرام لایه ی نازک عصاره ی موسیلاژی هیدرولیز شده حاصل ازپیاز لوشـه نیز در (شکل ۱) نشان داده شده است. واحدهای سازنده موسیلاژ پیاز لوشـه شامل رامنوز (نسبتاً کمرنگ)، مانوز، گلوکز، گالاکتوز و دو اسید اورونیک می باشد از دو اسید اورونیک موجود در عصاره ی موسیلاژی هیدرولیز شده که حرکت کمی روی صفحه ی لایه نازک داشتند، اسید گلوکورونیک غلظت بیشتری را نسبت به اسید گالاکتورونیک نشان داد. اسید گالاکتورونیک بطور کمرنگ، ولی‌مشخص در زیر اسید گلوکورونیک ظاهر شد. درکروماتوگرام لایه نازک موسیلاژ پیاز لوشـه، گالاکتوز قند غالب را نشان داد و مانوز و رامنوز بسیارکمرنگ تولید لکه کردند (شکل۱). درگونه مورد مطالعه، واحدهای سازنده‌ی موسیلاژ برگ و پیاز تفاوت های قابل ملاحظه ای از نظر کیفی (تنوع قندها)، نشان دادند.

۸ - Injector

۹ - Detector

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۳: تعیین مقدارنسبی قندهای سازنده موسیلاژ بوسیله کروماتوگرافی گازـ مایع (GLC)

قبل از آزمایش بر روی موسیلاژهای استخراج شده از برگ و پیاز گونه مورد مطالعه، به منظور کالیبره کردن سیستم، استات های آلـــدیتول قنـــدهای استاندارد تهیه و به ستون کروماتوگراف کاپیلاری Optima – 17 تزریق شدند تا زمان بازداری آنها بدست آید.پس از بررسی شرایط های مختلف تزریق به منظور حصول نتایج بهتر، مشتقات استیله استانداردها را به نسبت های مساوی باهم مخلوط کرده و مخلوط مشتقات استیله استانداردها به ستون تزریق شدواز دو روش هم دمایی[10] و حالت گرادیان دمایی، حالت اخیر مورد استفاده قرار گرفت .

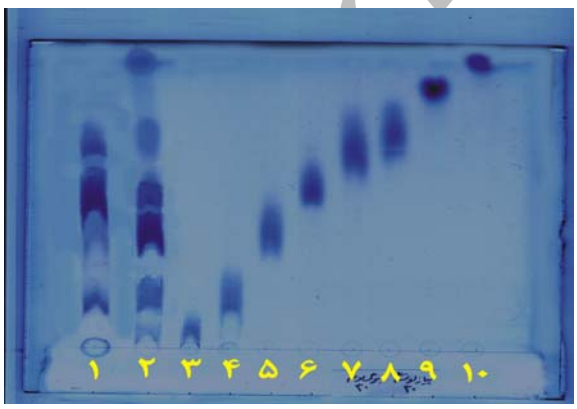
بین مقادیر R_f محاسبه شده بر روی لایه ی نازک (TLC) و زمان بازداری نمونه های استاندارد (GLC) ، رابطه ویژه ای وجود دارد .مونوساکاریدهایی که تحرک کمی برروی صفحات نازک ژل داشتند ، مشتقات استیله آنها در GLC ، دارای زمان بازداری بیشتر ولی برعکس نمونه های با R_f زیاد ، زمان بازداری کمتری نشان می دهند ولی دو قند آرابینوز و گزیلوز از این رابطه مستثنی بودند. مونوساکارید آرابینوز نسبت به گزیلوز دارای R_f کمتری بر روی لایه نازک بود و مشتق استیله‌ی‌آرابینوز نیز زمان بازداری کمتری نسبت به مشتق استیله گزیلوز نشان داد(جداول۱و۲) ، واین مورد درنتایج کار دیگران نیز مشاهده شده است (۱۶،۲).

در موردسایرمونوساکاریدها، ارتباط بین R_f آنها با زمان بازداری آنها کاملاً عکس هم می باشد.(R_f بیشتر = Rt کمتر). بعنوان مثـال ، مشتق قند رامنوز (استات رامنیتول)، که پیشاپیش سایر قندها در صفحه ی لایه نازک حرکت می کرد (۹۵٪)، زمان بازداری کوتاهتری را نسبت به بقیه داشت (۱۱/٤ دقیقه) در حالیکه نمونه گالاکتوز (استات گالاکتیتول) که تحرک کمی بر روی ژل لایه نازک دارا بود (۱۱٪)، زمان بازداری بیشینه را به خود اختـــصاص می داد (۲۱/۳۰ دقیقه). زمان بازداری مشتقات سایر قندها به ترتیب آرابینوز، گزیلوز، مانوز و گلوکز در بین این دو کمّینه و بیشینه قرار می گرفت. (شکل ۲ و جدول۲).

عصاره های موسیلاژی برگ و پیازگونه گیاهی مذکور، پس از هیدرولیز و مشتق سازی تحت شرایط تقریباً یکسان با قندهای استاندارد، کروماتوگرافی شدند. کروماتوگرافی گاز ـ مایع عصاره ی موسیلاژی هیدرولیز و مشتق استیله شده برگ و پیاز گونه گیاهی مذکور به حصول نتایج زیر منتهی گردید:

الف) کروماتوگرام مشتقات استیله موسیلاژ برگ لوشـه (*A.Chrysantherum*) نشان دهنده‌ی وجود واحدهای سازنده‌ی مانوز،گلوکزوگالاکتوزاست. در کروماتوگرام اخیر ، واحد اصلی سازنده ی موسیلاژ ، مشتق استیله ی گلوکز (گلوسیتول) می باشد که مقدار آن نسبت به کل قندهای خنثی حدود ٦٥ درصد محاسبه گردیده است و همچنین مقادیر نسبی سایر واحدهای سازنده ی موسیلاژ برگ در (شکل۳و۵) گزارش شده است. قابل ذکر است که اسید گلوکورونیک موجود در موسیلاژ برگ که‌وجودآن به وسیله ی TLC ، قابل مشاهده بود، به دلایلی که قبلاً ذکر شد در کروماتوگرافی گاز ـ مایع فاقد پیک بود.

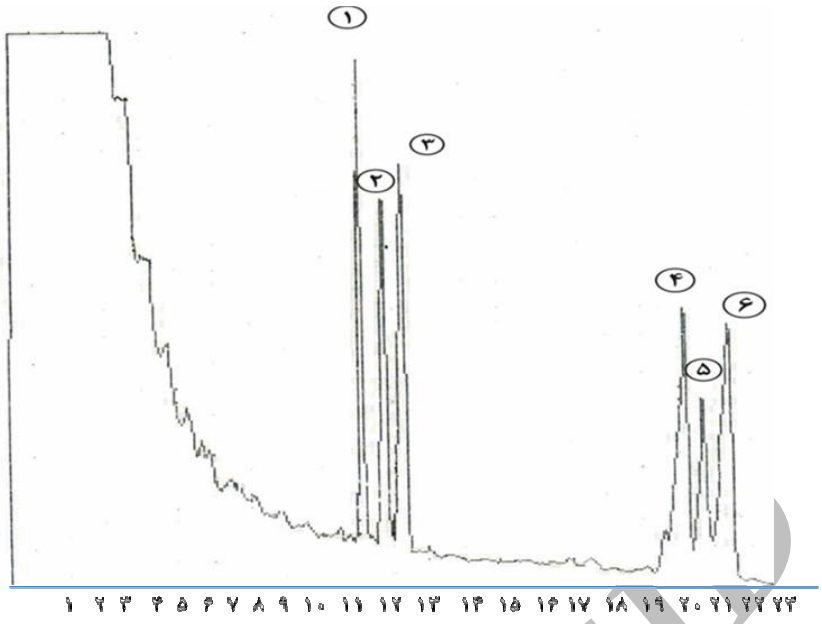
ب) همانند سایر موارد قبلی، نتایج حاصل از کروماتوگرافی گاز ـ مایع موسیلاژی پیاز لوشـه نیز کاملاً تأیید کننده ی نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک موسیلاژ مذکور می باشد . کروماتوگرافی حاصل از GLC مشتقات استیله موسیلاژ پیاز لوشه وجود واحدهای سازنده رامنوز، مانوز، گلوکز و گالاکتوز را نشان می دهد.در این کروماتوگرام قند غالب ، مشتق گالاکتوز (گالاکتیتول) با مقدار تقریبی ٤٨/٥ درصد و مشتق رامنوز (رامنیتول) با مقدار حدود ۱۰ درصد کمترین مقدار را نسبت به کل قندهای خنثی، نـــــشان می دهد (شکل٤و۵).



شکل ۱. کروماتوگرام لایه نازک عصاره های موسیلاژی هیدرولیز شده برگ و پیاز لوشه*A.Chrysantherum Boiss. & Reut* در کنار قندهای استاندارد : (۱ـ عصاره ی موسیلاژ برگ ۲ـ عصاره ی موسیلاژ پیاز ۳ـ اسید گالاکتورنیک ٤ـ اسید گلوکورونیک ۵ـ گالاکتوز ٦ـ گلوکز ۷ـ مانوز ۸ـ آرابینوز ۹ـگزیلوز۱۰ـرامنوز).

10 - Isotermal

www.SID.ir



شکل۲. کروماتوگرام استات های آلدیتول استانداردها که بوسیله‌ستون Optima-17 بدست آمده است . نمونه ها به ترتیب شماره عبارتند از :

1-Rhamnitol Acetate; 2-Arabinitol Acetate; 3-Xylitol Acetate; 4-Manitol Acetate; 5-Glucitol Acetate; 6- Galacitol Acetate.

۲۰ ۱۰۰ ۸۰

جدول۱. مقادیر Rf قندها بر روی لایه ی نازک کزل گور G . سیستم حلال : n– بوتانول : استون : بافرفسفات pH = ۵ معرف : آنیلین ـ دی فنیل آمین ـ اورتوفسفریک اسید .

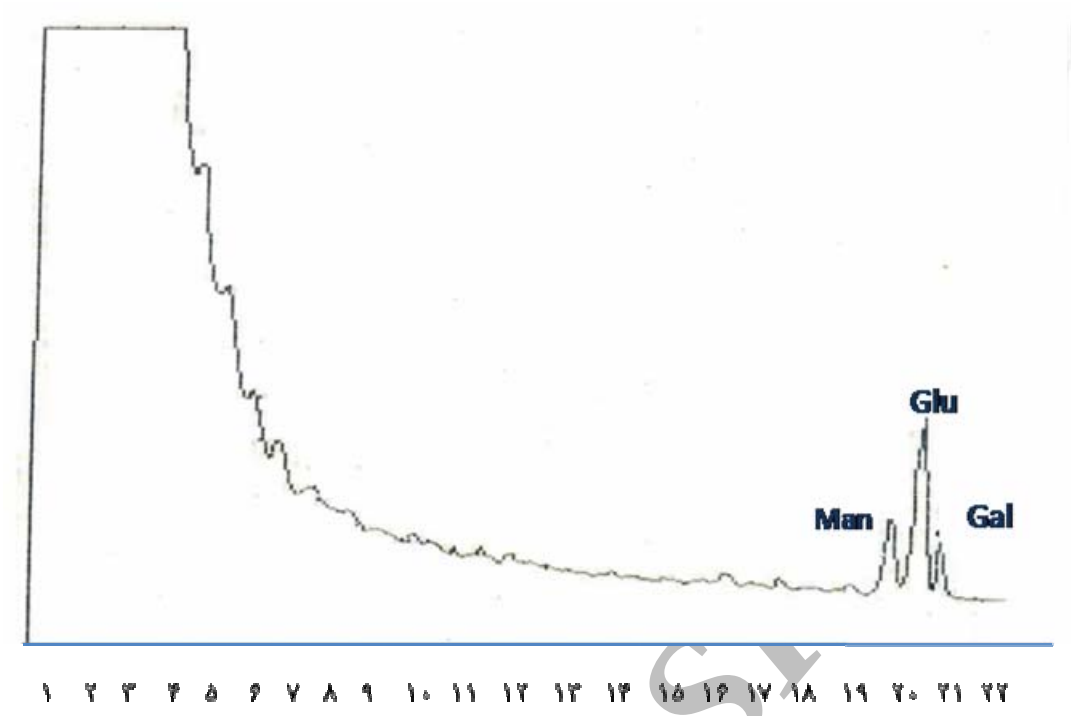
نوع مونوساکارید	R_f	رنـگ
اسیدگالاکتورونیک	۱۱	بنفش روشن
اسید گلوکورونیک	۱۹/٤	بنفش روشن
گالاکتوز	٤٤	آبی روشن
مانوز	٥۹/٤	آبی روشن
گلوکز	٦۲/۲	قهوه ای روشن
آرابینوز	٦٤/٤	آبی تیره
گزیلوز	۷٥	آبی تیره
ریبوز	۷٦/٦	خاکستری
رامنوز	۹٥	سبز تیره

جدول۲. زمان بازداری مونوساکاریدهای استانداردبااستفاده ازستون کاپیلاری Optima-17 وروش گرادیان دمایی .

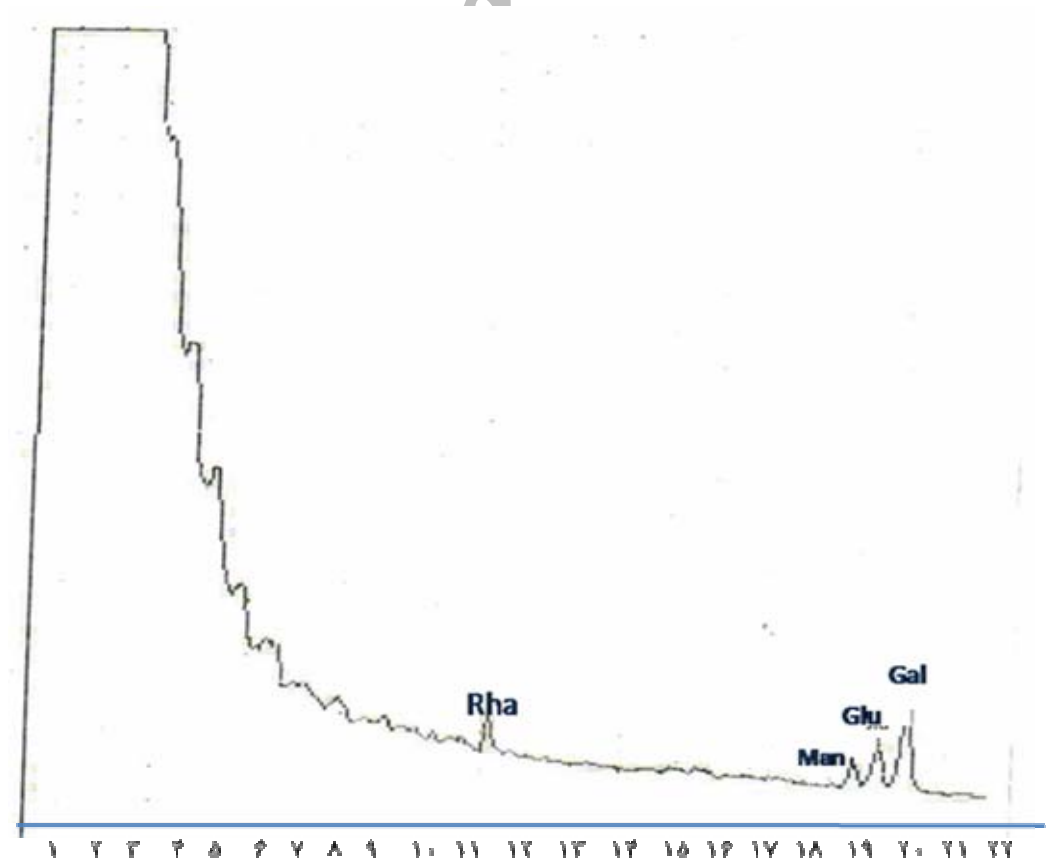
نوع قند	زمان بازداری (دقیقه)
رامنوز	۱۱/٤
آرابینوز	۱۱/۷۰
گزیلوز	۱۲/۱۸
مانوز	۲۰/۱۰
گلوکز	۲۰/٥۸
گالاکتوز	۳۰

Archive of SID

www.SID.ir

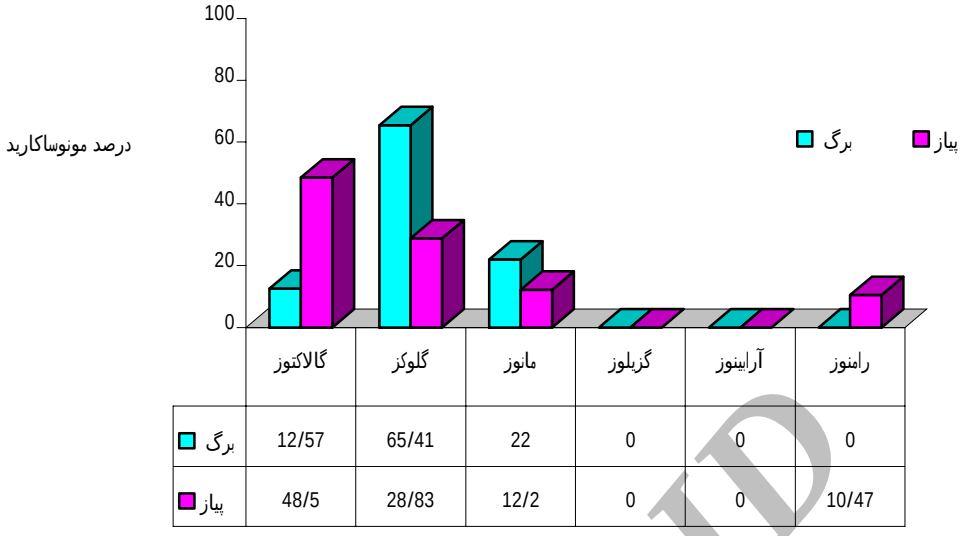


شکل ۳. کروماتوگرام گازـ مایع استاتهای آلدتیول واحدهای سازنده موسیلاژبرگ لوشه (*A.chrysantherum*).(قندهابترتیب عبارتنداز :۱- رامنوز ۲- مانوز۳-گلوکز ٤- گالاکتوز)



شکل ٤. کروماتوگرام گازـ مایع استاتهای آلدتیول واحدهای سازنده موسیلاژپیاز لوشه (*A.chrysantherum*).((قندها بترتیب عبارتند از : ۱- مانوز ۲-گلوکز ۳- گالاکتوز)

www.SID.ir



شکل ۵. درصد مونوساکاریدهای سازنده موسیلاژ برگ وپیاز لوشه (A.chrysantherum)

٤- بـحث

قدم اول برای تعیین نوع واحدهای سازنده ی موسیلاژ ، انتخاب سیستم کروماتوگرافی لایه نازک مناسبی بود که بتواند تمام اجزای سازنده ی آن را از همدیگر تفکیک نماید. پس از امتحان ژل ها ، حلال ها و معرف های مختلف و مقایسه آنها با استفاده از قندهای استاندارد ، مبنای آزمایش بر ژل لایه نازک کزل گور اشباع شده با بافرفسفات pH = ۵ و حلال n– بوتانول ـ استون، بافرفسفات (pH = ۵) به نسبت ۸۰ : ۱۰۰ : ۲۰ وبا معرف آنیلین ـ دی فنیل آمین،گذاشته شد .حلال اخیر ، بهترین تفکیک را بین مونوساکاریدها ایجاد می کرد و معرف مذکور نیز با مونوساکاریدها، رنگهای ویژه ای ایجاد می کرد (جدول۱). سیستم کروماتوگرافی لایه نازک مذکور در برخی منابع و مقالات نیز پیشنهاد شده است (۲٤-۲۲،۱٦،۱۳،۲). البته در غلظت های زیاد، در لکه ها کشیدگی ایجاد می شد، ولی روی هم رفته، سیستم انتخاب شده در فوق از قدرت جداسازی نسبتاً مناسبی برخوردار بود. با توجه به اینکه گونه مورد مطالعه از پیازداران مهم و نادر ایران می باشد و هیچ منبع تحقیقی، در ارتباط با مطالعه ترکیب شیمیایی موسیلاژ گونه مذکور و سایر گونه های مرتبط با آنها، بویژه درکشورمان انجام نگرفته بود و بحث و مقایسه آن با کارهای سایر محقّقین کشورمانکه روی موسیلاژهای دانه وکشت بافت انجام گرفته به طور مستقیم امکان پذیر نبود. ولی همچنانکه از برخی منابع بر می آید موسیلاژها دارای منشاء های مختلف مانند بذر، برگ، غده، میوه ، جوانه گل، پیاز، ریشه و ... از گیاهان می باشند (۲۹-۵،٦،۱٤،۱۷،۲۵) ولی کارهای مشابهی بر روی گونه های گیاهی دیگر بویژه درکشور ژاپن که برگ و پیاز آنها منشاء موسیلاژهای گیاهی می باشد انجام گرفته است.

این نتایج با گزارشات تومودا (Tomoda) و همکارانش(۷-۵) که بویژه روی موسیلاژهای پیازداران ژاپن داشته اند هماهنگی جزئی را نشان می دهد ، زیرا در این پژوهشها ، فقط دو قند مانوز و گلوکز در موسیلاژ پیازها گزارش شده است.تومودا وهمکارانش درسال۱۹۸۳یک گلوکومانان بنام لیکوریس-اس- گلوکومانان(Lycoris-S-glucomannan) با وزن مولکولی۱/۸۰۰/۰۰۰که ازقندهای مانوز و گلوکز به نسبت مول ۷ به۲ تشکیل شده بود از پیازهای *Lycoris squamigera* (تیره ی نرگس) جداسازی کرده اند (۷).

و در سال ۱۹۸۲ یک موسیلاژ دیگر به نام لیکوریس ـ آر ـ گلوکومانان با وزن مولکولی ٤٦۸۰۰۰ که از قندهای مانوز و گلوکز به نسبت مولی ۱۲ به ۱ ساخته شده است ازپیازها *Lycoris radiata* (تیره ی نرگس)، توسط تومودا و همکارانش گزارش گردیده است (٦). و در سال ۱۹۸۰ یک موسیلاژ دیگر به نام Narcissus-T-glucumannan با وزن مولکولی ۱۱۹۰۰۰ حاوی قندهای مانوزو گلوکز به نسبت مولی ۵ به ۱ ازپیازهای *Narcissus tazetta* ازتیره ی نرگس جداسازی و تخلیص گردیده است (۵). همچنین تومودا

Archive of SID

www.SID.ir

وهمکارانش درسال ۱۹۷۵ یک موسیلاژ به نام لیلیوم ـ آ ـ گلوکومانان (Lilium-A-glucomannan) با وزن مولکولی ۳۵۷۰۰ از پیازهای *Lilium auratum* و در سال ۱۹۷٦ دو موسیلاژ به نام های لیلـــــیوم ـ اس ـ گلوکومانان (Lilium-S-glucomannan) و لیلیوم ـ لا ـ گلـــــــــــوکومانان (Lilium-La-glucomannan) به ترتیب با وزن مولکولی ۳۸۸۰۰۰ و ٤۱۷۰۰۰ از پیاز گونه های *Lilium speciosum* و *Lilium Lancifolium* گزارش داده اند (۹،۸) و تومودا و همکارانش در سال ۱۹۷۸ دو موسیلاژ دیگر به نام های Lilium-Ma-glucomanna و Lilium-Lo-glucomannan به ترتیب با وزن مـولکولی ۱۸٤۰۰۰ و ۲٦۳۰۰۰ از پیاز گونـــــه های *L. maculatum* و *L. langiflorum* وابسته به تیره لالـــه (Liliaceae) جداسازی و شناسایی نموده اند (۳۰و۱۰). ونیز توسط آنها در سال ۱۹۷۹ یک موسیلاژ دیگر به نام Lilium-J-glucomannan با وزن مولکولی ۳۱۸۰۰۰ از پیازهای *L. Japonicum* جداسازی و شناسایی گردیده است (۱۱). چنانچه در پژوهشهای تومودا و همکارانش مشاهده می شود ، در تمام مقالات روشهای استخراج و تخلیص یکسان منجر به تولید یک پلی ساکارید گلوکومانانی ولی با اوزان مولکولی متفاوت و نسبتهای مولی مختلف مانوز به گلوکز شده است ، ولی در کار تحقیقی ما علاوه بر مانوز و گلوکز قندهای مانند اسید گالاکتورونیک، اسید گلوکورونیک، گالاکتوز، رامنوز، در پیازهای‌گونه مورد مطالعه یافت شده اند. دلیل تفاوت نتایج پژوهش اخیر با گزارشات تومودا و همکارانش، ممکن است به روشهای متفاوت استخراج، هیدرولیز، چگونگی خـــنثی کردن عصاره های مونوساکاریدی و یا به نوع معرف اسپری شده جهت آشکارسازی لکه ها و نوع ژل کروماتوگرافی لایه نازک، بستگی داشته باشد.

درکروماتوگرافی لایه ی نازک مقدار تزریق عصاره ی هیدرولیز شده ی موسیلاژی برگ ها درگونه مذکور تقریباً دو برابر عصاره ی موسیلاژی پیازها بود و این نـــــشان می دهد که لکه های حاصل از موسیلاژ هیدرولیز شده ی پیازها پررنگتر بوده و مرغوبیّت موسیلاژ پیازها را نسبت به برگها مورد تأیید قرار می دهد.

در کروماتوگرامهای مـربـوط به کروماتوگرافی گاز ـ مایع عصـاره های موسیلاژ مشتق شده ، اسیدهای اورونیک (اسید گالاکتورونیک‌واسیدگلوکورونیک) به دلیل احیاء شدن ضمن مشتق سازی موسیلاژ،فاقدپیک بودند و این نتایج گزارشات موافقی در ۱۳۷۱ (۲) و میقانی در ۱۳۷٤ (۱٦) را تأیید می نماید. نتایج کروماتوگرافی گاز ـ مایع مشتقات موسیلاژی برگ و پیاز لوشـه با نتایج کروماتوگرافی لایه ی نازک آن هماهنگی کامل را نشان می دهد .نتایج حاصل از GLC موسیلاژ برگ لوشـه نشان می دهد که قند گلوکز با بیشترین مقدار (حدود ٦۵ درصد) قند اصلی و غالب پلی ساکارید موسیلاژی را نشان می دهد ، بنابراین می توان گفت که موسیلاژ مذکور دارای ساختمان پایه ی« گلوکانی» بوده و هیچ کدام از واحدهای پنتوزی در ساختمان موسیلاژ برگ لوشـه مشاهده نشدند (شکل ۳و۵)واین نتایج در مورد موسیلاژ پیاز لوشـه، نشان می دهد که قند گالاکتوز، واحد اصلی سازنده ی موسیلاژ را تشکیل می دهد و مقدار نسبی آن نسبت به کل قندهای خنثی حدود ٤۸/۵ درصد می باشد (شکل ٤و۵). نتایج نشان می دهد که موسیلاژ پیاز لوشـه دارای ساختمان پایه« گالاکتانی» می باشد.

۵- نتیجه گیری

در پایان بایستی بر این مطلب مهم تأکید نمود که به دلیل کاربردهای وسیع دارویی و صنعتی و وظایف متعدد فیزیولوژیک موسیلاژها در گیاهان، بررسی گونه های گیاهی، به عنوان منابع طبیعی این ترکیبات و بررسی ترکیب شیمیایی آنها حائز اهمیّت است و پیشنهاد ما این است که در ایران گونه های گیاهی نسبتاً خوبی وجود دارند که بدلیل گسترش زیاد ، تنوع گونه ای و عدم بررسی موسیلاژها در آنها موضوع مطالعه بسیار مناسبی هستند و همچنین توجه به تفاوت های کمّی و کیفی موسیلاژهای درون گونه ای و بین گونه ای گیاهان، بعنوان موضوع مهمی در علم شیمیو تاکسونومی پیشنهاد می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References:

1. Niknam V. Identification of secondary metabolits (N- aliphatic composition, mucilage polyssacharides, saponines, sterols, phenolic compositions) Ph.D. Thesis, School of science, Tehran University, 1999.
2. Moafeghy A. Isolation and determination of mucilage polysaccharides from plantagoes with tissue and farming cultivated. MSc. Thesis, School of science, Tehran University, 1992.
3. Franz G. Polysaccharides in pharmacy: Current Applications and future concepts. Planta Medica,1989, 55: 493-497.
4. Tomoda M., Shimizo N., Oshima Y., Takahashi M., Murakami M., Hikino H. Hypoglycemi activity of twenty plant mucilage and three modified products. Planta Medica, 1987, 53: 8-12.
5. Tomoda M.,Yokoi M., Torigoe A., Maru K. Plant Mucilages. XXVII. Isolation and characterization of a mucous polysaccharide, ‟ Narcissus-T-glucomannan,‟ from the Bulbs of Narcissus tazzeta Var. chinensis. Chem. Pharm. Bull., 1980, 28(11): 3251-3257.
6. Tomoda M., Shimizo N. Plant Mucilages. XXXI. An Acetyl-rich mucous polysaccharide, ‟Lycoris-R-glucomannan, ‟from the Bulbs of Lycoris radiate, Chem. Pharm. Bull.,1982, 30(11): 3965-3969.
7. Tomoda M., Shimizo N., Shimada K., Ishii T., Ogawa M. Plant Mucilages. XXX III. An Acetyl-rich mucilage,‟Lycoris-S-glucumannan,‟from the Bulbs of Lycoris squamigera, Chem. Pharm. Bull., 1982, 31(11): 3878-3882.
8. Tomoda M., Kaneko S. Plant Mucilages. XIII. Isolation and chracterization of a mucous polysaccharide," Lilium-S-glucomannan" from the Bulbs of Lilium speciosum. Chem. Pharm. Bull., 1976, 24(9): 2157-2162.
9. Tomoda M., Kaneko S., Ohmori C., Shiozaki T. Plant Mucilages .XIV. Isolation and characterization of a mucous polysaccharide," Lilium-La-glucomannan," from the Bulbs of Lilium lancifolium. Chem. Pharm. Bull., 1976, 24(11): 2744-2750.
10. Tomoda M., Odaka C. Plant Mucilages. XXI. Isolation and characterization of a mucous polysaccharide, "Lilium-Ma-glucomannan" from the Bulbs of Lilium maculatum, Chem. Phrm. Bull., 1978, 26(11): 3373-3377.
11. Tomoda M., Satoh N. Plant Mucilages. XXII. Isolation and characterization of a mucous polysaccharide, ‟Lilium-J-glucomannan,‟ from the Bulbs of Lilium japonicum, Chem. Pharm. Bull., 1979, 27(2): 468-474.
12. Brautigan M. , Franz G., Structural features of Plantago lanceolata Mucilage.Plana Medica, 1985,4:293-297.
13. Arawya M.S., Wassel G.M., Baghdadi H.H., Amma N.M. Mucilagenous content of certain Egyptian plants. Planta Medica, 1980, 38: 73-78.
14. Biliaderis C.G., Fedeniuk R.W., Composition and physicochemical properties of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Mucilage. J. Agric. Food chem., 1994, 42: 240-247.
15. Moyna P., Difabio J.L. Composition of Cactaceae Mucilage. Plata Medica, 1978, 34: 207-210.
16. Mighani f. Isolation and determination of gum's polysaccharides from two species of Astragalus with tissue and farming cultivated. MSc. Thesis, School of science, Tehran University, 1994.
17. Cui W., Kennedy N.A.M., Biliaderis C.G. "Chemical and physical properties of Yellow mustard (*Sinapis alba* L.) Mucilage". Food chemistry, 1993, 46: 169-176.
18. Martinez M.C., Depinto G.L., Composition of Acacia macracantha gum exudates. Phytochemistry, 1980, 31 (2): 535-535.
19. Emami kebriaei K. Identification of morphologic and determination of mucilage polysaccharides in the Ocimum basilicum seeds. Pharm.D. Thesis, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, 2000.
20. Dey P.M. Methods in plant Biochemistry, vol.2, Carbohydrates. Academic Press, 1993, 19-24.
21. Chaplin M.N., Kennedy J.F. Carbohydrate analysis: a practical approach. IRL press limited. Oxford, 1986, 8-33.
22. Jork H., Funk W., Fisher W., Thin-Layer chromatography: Reagents and detection Method, 1990.
23. Moyna P., Tubio R., Mucilagenous in Succulent plants. Planta medica, 1977, 32: 201-205.
24. Stahl E. Thin-Layer chromatography: A laboratory hand book. Springer-verlay, Newyork; 1989, 807.
25. Tomoda M. Nakatsuka S. Tamai M., Nagata M., PlantMucilages. VII. Isolation and characterization of a mucous polysaccharide, "Bletilla-glucomannan," of Bletilla striata Tuburs, Chem. Pharm. Bull., 1973, 21(12): 2667-2671.
26. Tomoda M., Shimada K., Saito Y., Sugi M., Plant Mucilages,‟ Okra-Mucilage F‟ from the Immature fruits of Abelmoschus esculentus. Chem. Pharm. Bull., 1980, 28(10): 2933-2940.
27. Tomoda M., Shimizo N., Gonda R., Plant Mucilages. XXXVI. Isolation and characterization of a Mucilage, ‟ Okra-Mucilage R‟ from the Roots of Abelmoschus esculentus. Chem. Pharm. Bull., 1984, 33(8): 3330-3335.
28. Tomoda M., Ichikawa M. Plant Mucilages. XXI. A Representative Mucilage, ‟Hibiscus-Mucilage-SF‟ from the flower buds of Hibiscus syriacus. Chem. Pharm. Bull.,1986, 35(6): 2360-2365.
29. Tomoda M., Gonda R., Shimizo N., Nakanishi S., Hhikino H., A mucilage from Hibiscus moscheutos leaves. Phytochemistry, 1987, 26(8): 2297-2300.
30. Tomoda M; Satoh N. , Ohmori C., Plant Mucilages. X I X. Isolation and characterization of a mucous polysaccharide, "Lilium-Lo-glucomannan" from the Bulbs of Lilium longiflorum, Chem. Pharm. Bull., 1978, 26(9): 2766-2773.

Archive of SID

www.SID.ir