استخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء (HPLC) في فصل الحوامض الامينية الكلوتامك والالنين من المستخلص الايثانولي للنوع *Myriophyllum spicatum* النامي في نهر دجلة ضمن مدينة الموصل

فتحي عبدالله المنديل

مركز بحوث البيئة والسيطرة على التلوث ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: 8 / 6 / 2011 ---- **تاريخ القبول:** 15 / 2 / 2012)

الملخص

تم في الدراسة الحالية فصل وتشخيص اثنين من الحوامض الامينية هما الكلوتامك والالنين من المستخلص الكحولي للنوع *Myriophyllum spicatum* النامي في نهر دجلة ضمن مدينة الموصل الحالية وذلك باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء (HPLC) وبوساطة جهاز فصل من نوع Shimadzo الذي تضمن عمود فصل من نوع (C_8 (250 × 60 mm ، وتمت عملية الفصل باستخدام طور ناقل من كبريتات الصوديوم (40 ملي مولاري) وعند دالة حامضية 2.65 (40 mM Na_2SO_4 , pH 2.65) وبسرعة جريان 1 مللتر / دقيقة وكشف عن الاستجابات الكروماتوغرافية عند الطول الموجي 210 نانومتر.

الكلمات الدالة : النواتج الطبيعية ، الحوامض الامينية ، *Myriophyllum spicatum* ، كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء.

المقدمة

النوع *Myriophyllum spicatum* يعد من الاعشاب المائية المعمرة التي تعود الى العائلة الهالوراكية Haloragaceae وهو كثير الانتشار في جنوب العراق ويعرف محليا بذيل العتوي [1] وعالميا يعرف بالنبات ذو الالف ورقة (water milfoil) [2] ، اما في شمال العراق فانه انتشر بكثرة في المياه العذبة لمحافظة نينوى بعد الامتلاء الاول لبحيرة سد الموصل في عام 1985.[3]

نال هذا النوع اهتمام العديد من العلماء في مجالات عدة لاسيما المشتغلين في مجال كيمياء النواتج الطبيعية ، واظهرت نتائج دراساتهم دور المركبات التي ينتجها هذا النوع في ظاهرة الاليلوباثي allelopathy المتعلقة بالنباتات المائية، فقد اشار Hempel واخرون (2009) الى ان *Myriophyllum spicatum* يمتلك امكانيات عالية في الجهد الاليلوكيميائي Allelochemical potential من خلال انتاجه كميات كبيرة من المركبات متعددة الفينولات Polyphenols التي تعمل على اعاقة نمو بعض الاحياء الاخرى عند تسربها من انسجة هذا النبات الى المحيط الذي تتواجد فيه، ووجد ان الفينولات المتعددة تشكل حوالي 1.5 % من الوزن الجاف للنبات ، وتظهر تاثيرها على نمو الطحالب من خلال تعطيلها لعمل بعض الانزيمات مثل انزيم Alkaline phosphatase [5] وان فعالية مركباته المضادة للطحالب Algicidal كانت على درجة عالية ضد الطحالب الخضر المزرقة Cyanobacteria وبدرجة اقل ضد الدياتومات Diatoms والطحالب الخضراء Chlorophytes [6] .

وذكر ناكاي وجماعته Nakai واخرون (2005) ان من بين المركبات التي تم تشخيصها في هذا المجال حامض الكاليك وحامض الايلاجك (Gallic and Ellagic acid) وكذلك بعض التانينات Tannin (euquinin) ومشتقاته وفي دراسة جرت من قبل الباحث ذاته أشار إلى انه ليست الفينولات المتعددة للنوع *Myriophyllum spicatum* وحدها التي تمتلك جهد اليلوباثي ضد الطحالب ، وبين ان الاحماض الدهنية مثل الـ Nonanoic acid تمتلك هذه الخاصية ايضا ، واستطاع الباحث تشخيص خمسة انواع من الاحماض الدهنية فصلت من المستخلص الكحولي لهذا النبات وان ثلاثة منها منعت بشكل ملحوظ نمو *Microcystis aeruginosa* . [7]

ان تحليل الاحماض الامينية مهم في عدد كبير من التطبيقات التي تتراوح بين البحوث السريرية وصولا الى التحليلات الغذائية وان من اهم التقنيات المستخدمة في عملية الفصل هي تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء التي تعتمد على الضغط من اجل زيادة معدل الجريان [8] .

وعلى هذا الاساس تم اختيار النبات المائي *Myriophyllum spicatum* لتحقيق اهداف الدراسة الحالية المتمثلة في فصل الحامضين الامينيين الكلوتامك والالنين باستخدام تقنية (HPLC) من المستخلص الكحولي للنوع قيد الدراسة.

المواد وطرائق العمل

اولا: الاستخلاص Extraction

جمعت عينات النوع *Myriophyllum spicatum* من بركة قرب الضفة اليمنى لنهر دجلة ضمن مدينة الموصل عند محطة اسالة الساحل الايمن ، وبعد غسلها ثم تجفيفها في الظل تم عزل الجزء الخضري للنبات وسحق بوساطة مطحنة كهربائية ثم استخلصت المركبات الفعالة باستخدام جهاز المازج الكهربائي، اذ وضع 30 غرام من المسحوق في بيكر زجاجي واضيف اليه 300 مل من 95 % ايثانول [9] بعدها رشحت العينة ثم ركزت الى حجم 100 مل وحفظت في ظروف معتمة في الثلاجة لحين اجراء عملية الفصل.

ثانيا: اعداد المحاليل القياسية

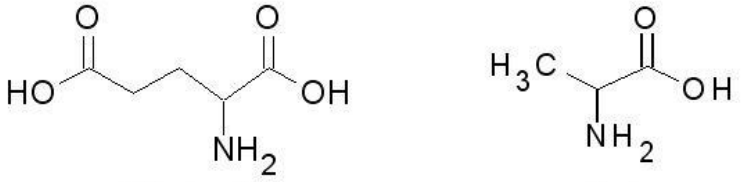
تم تحضير محاليل قياسية للحوامض الامينية الكلوتامك والالنين التي تم الحصول عليها من مخزن المواد الكيميائية في قسم الكيمياء التابع لكلية العلوم جامعة الموصل، وذلك باذابة 0.5 غرام من الحامض الاميني في 100 مل من 95 % ايثانول ثم رشح المحلول بمرشحات دقيقة Millipore حجم 0.45 مايكروميتر .

النتائج والناقشة

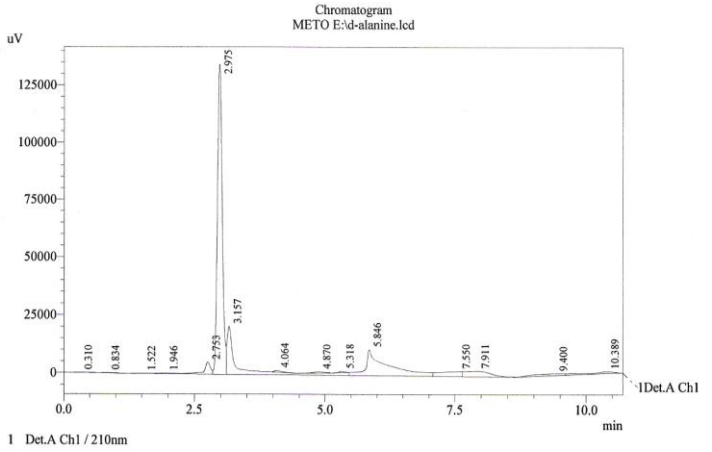
تحتوي المستخلصات النباتية على العديد من المكونات الفعالة وبتراكيز مختلفة ، وان هذا التنوع الكبير في محتواها من المركبات الكيميائية يجعل عملية تحليلها صعبة نوعا ما ، الا ان استخدام تقنيات الفصل الكروماتوغرافي تعد من الطرائق المفضلة في هذا المجال لانها تمكن المشتغلين في حقل كيمياء النبات من اجراء فصل كمي ونوعي لخليط من المركبات العضوية المستخلصة من انسجة نباتية [10]، وبالرغم من توافر العديد من الطرائق الكروماتوغرافية لفصل الاحماض الاميني [11] الا ان اكثر طرائق الفصل استخداما في وقتنا الحاضر هي تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء HPLC لانها على درجة عالية من الدقة مقارنة بتقنيات الفصل الاخرى بضمنها تقنية كروماتوغرافيا الغاز GC . [12]

في الدراسة الحالية جرت عملية الفصل بحقن 10 مايكرولتر من كل من الحوامض القياسية في جهاز HPLC من نوع Shimadzo, Lc–2010 AHT الذي تضمن عمود فصل من نوع C_8 (250×60 mm) وباعتماد مبدأ الفصل الذي ذكره Dionex (2004) وذلك باستخدام كبريتات الصوديوم (40 ملي مولاري) وعند دالة حامضية 2.65 كطور ناقل وبمعدل جريان 1 مل في الدقيقة وعند 30 درجة مئوية ، وتم الكشف عن الاستجابات الكروماتوغرافية باستخدام كاشف الأشعة فوق البنفسجية (U.V.) عند الطول الموجي 210 نانومتر.

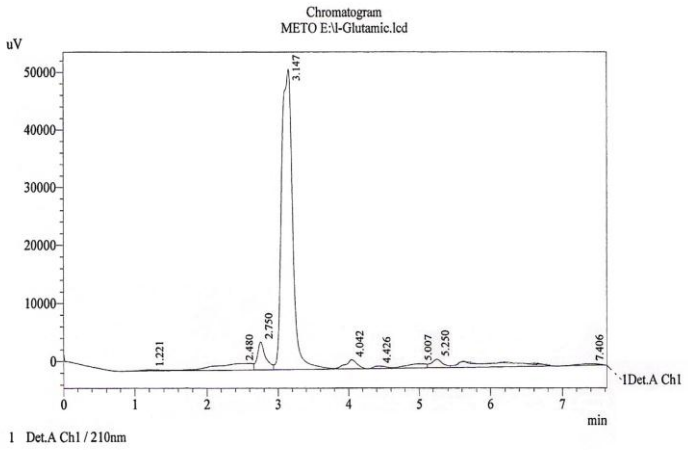
ان فصل المركبات العضوية كروماتوغرافيا يتم بصورة تفاضلية وذلك بالاعتماد على كل من الوزن الجزيئي وقطبية المركب لذا اظهر Chromatogram المتعلق بالمحاليل القياسية ان الحامض الاميني الكلوتامك المبينة صيغته التركيبية في (الشكل، 1) زمن احتباس اعلى مقارنة بالحامض الاميني الالنين اذ ظهرت ذروة تعود لحامض الكلوتامك عند 3.147 دقيقة (الشكل، 2) بينما سجل الحامض القياسي الالنين زمن احتباس قدره 2.975 دقيقة (الشكل، 3) ثم استخدم زمن الاحتباس كمؤشر لوجود تلك الحوامض الامينية في المستخلص الكحولي للنوع *Myriophyllum spicatum* وعلى هذا الاساس فان الذروة التي ظهرت عند زمن الاحتباس 3.027 دقيقة (الشكل، 4) يعود الى الحامض الاميني الالنين ، اما التي ظهرت عند 3.155 دقيقة فهي للحامض الاميني الكلوتامك.



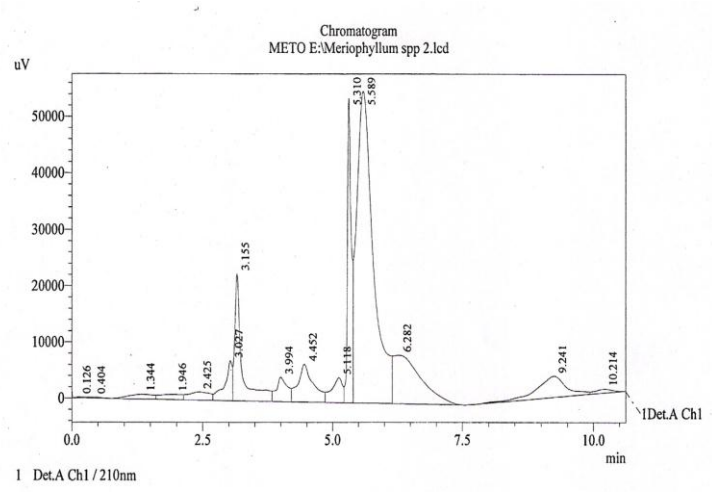
(الشكل، 1) الصيغ التركيبية للحوامض الامينية التي تم فصلها وتشخيصها خلال الدراسة الحالية [14] .



(الشكل، 2) كروماتوغرام الحامض الاميني الالنين القياسي الذي ظهر عند زمن الاحتباس 2.975 دقيقة باستخدام كبريتات الصوديوم (40 ملي مولاري) وعند دالة حامضية 2.65 كطور ناقل في تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء.



(الشكل، 3) كروماتوغرام الحامض الاميني الكلوتامك القياسي الذي ظهر عند زمن الاحتباس 3.147 دقيقة باستخدام كبريتات الصوديوم (40 ملي مولاري) وعند دالة حامضية 2.65 كطور ناقل في كطور ناقل في تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء.



(الشكل، 4) كروماتوغرام المركبات العضوية التي تم فصلها من المستخلص الكحولي الخام للنوع *Myriophyllum spicatum* باستخدام كبريتات الصوديوم (40 ملي مولاري) وعند دالة حامضية 2.65 كطور ناقل في تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء.

ومن الجدير بالاشارة ان بناء الاحماض الامينية يرتبط بايض الحامض الاميني الكلوتاميت Glutamate الذي يتكون في البلاستيدات كنتيجة لاختزال النتريت NO_2 خلال تفاعلات الضوء ، وغالبا ماتنتقل المجموعة الامينية من الكلوتاميت الى البايروفيت Pyruvate ليتكون الحامض الاميني الالنين الذي يعد مصدرا لبناء حامض اميني اخر هو الاسبارتيت Aspartate ، وذلك لان الالنين يمكن ان يمنح مجموعته الامينية الى مركب الاكزالواستيت Oxaloacetate لبناء الاسبارتيت الحامض الاميني البادىء لبناء عدد من الحوامض الامينية الاخرى من خلال مسار خاص يعرف بمسار الاسبارتيت Aspartate pathway [15] .

المصادر

1- السعدي، حسين علي والمياح، عبد الرضا أكبر علوان **(1983)**. النباتات المائية في العراق. مركز دراسات الخليج العربي، البصرة ، 192 صفحة.

2- Lawrence, G. H. **(1973)**. Taxonomy of Vascular Plants. 2nd edition. Oxford and IHB publishing Co., New Delhi.

3- الوتار، مي طه **(2009)**. "دراسة بيئية وتصنيفية للجنس *Potamogeton* L. في نهر دجلة المار بمحافظة نينوى". اطروحة دكتوراه في علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل – العراق: 221 صفحة.

4- Hempel, M., Grossart, H. P.and Gross, E. M. **(2009)**. Community Composition of Bacterial Biofilms on two Submerged Macrophytes and an

10- Daszykowski, M., Hawryl, M., Hajnos, W. and Walczak, B. **(2008)**. Identification of Similar and Orthogonal Chromatographic Thin-Layer Systems for Two-Dimensional Separations of Flavonoids and Their Analogues. Acta Chromatographica 20,3 : 283–307.
11- Kaźmierczak, D., Ciesielski, W. and Zakrzewski R., **(2005)**. Separation of Amino Acids as Phenyl Thiocarbamyl Derivatives by Normal and Reversed-Phase TLC. J. of Planar Chromatography. VOL. 18 : 427- 431.
12- Siouffi, A.-M., Piras, P. and Roussel, C. **(2005)**. Some Aspects of Chiral Separations in Planar Chromatography Compared with HPLC. VOL. 18 (Abstract).
13- Dionex, **(2004)**. Acclaim Organic Acid (OA) HPLC column. www.dionex.com
14- دلالي، باسل كامل **(1994)** اساسيات الكيمياء الحيوية. دار ابن الاثير للطباعة والنشر جامعة الموصل 552 صفحة.
15- ياسين ، بسام طه **(2001)**. اساسيات فسيولوجيا النبات . دار الكتب القطرية ، الدوحة – جامعة قطر : 634 صفحة.
Artificial Substrate in a Pre-alpine lake. Aquatic Microbial Ecology. Vol. 58: 79–94.
5- Gross, E. M., Meyer, H. and Schilling, G. **(1996)**. Release and Ecological Impact of Algicidal Hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum.* Phytochemistry, 41, pp. 133 – 138.
6- Gross, E. M. & Sütfeld, R. **(1994)**. Polyphenols with Algicidal Activity in the Submerged Macrophyte *Myriophyllum Spicatum* L. Acta Horticulturae , 381, pp. 710 – 716.
7- Nakai, S., Yamada, S. & Hosomi, M. **(2005)**. Anti-cyanobacterial fatty acids released from Myriophyllum spicatum. Hydrobiologia , 543: 71–78. (Abstract).
8- LECO Corporation, **(2008)**. LC-TOFMS Analysis of Amino Acids: Improving Chromatographic Peak Resolution by Increasing the Data Acquisition Rate. info@leco.com • www.leco.com
9- Grand , A., Woundergen, P. A., Verporte, R. and Pousset, J. L. **(1988)**. Anti infection phytotherpies of tree – savannah Senegal (west Africa) II antimicrobial activity of 33 species. J. Ethnopharmoacology , 22 : 25-31.

Using of High Performance Liquid Chromatography for Separation of Glutamic and Alanine Amino Acids from *Myriophyllum spicatum* Growing in Tigris River within Mosul City.

Dr. Fathi A. Al-Mandeel
Environmental and Pollution Control Research Center, University of Mosul, Mosul , Iraq.
(**Received:** 8 / 6 / 2011 ---- **Accepted:** 15 / 2 / 2012)

Abstract
Two amino acids (glutamic and alanine) are separated and investigated from ethanolic extract crude of *Myriophyllum spicatum* growing in Tigris River within mosul city. During this study Shimadzo HPLC which included C_8 (250×60 mm) colum chromatography used for this processes, with 40 mM Na_2SO_4 , pH 2.65 as mobile phase, again with rate flow: 1 mL / min. and detection at λ = 210 nm.

Key word : Natural products, Amino acids, *Myriophyllum spicatum*, HPLC**.**