فصل المركبات البروتينية من ثمار نبات الهيل Elettaria cardamomum وتقدير اوزانها الجزيئية

ناهدة سعيد حمودي الجلبي على الجبوري

قسم الكيمياء / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة الموصل

(أستلم 28 / 5 /2018 ؛ قُبل 11 /11 /2018

الملخص

تضمنت هذه الدراسة تحضير المستخلص المائي لثمار نبات الهيل Elettaria cardamomum وترسيبها بواسطة المذيب العضوي الاسيتون ومن ثم فصل البروتينات المتحصل عليها وتتقيتها بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي اعتمادا على حجم جزيئاتها وعلى اوزانها الجزيئية باستخدام مادة الهلام السفدكس من نوع 75 – Sephadex G – 75 أوضحت النتائج فصل مركبين بروتين A و B من الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي البارد لثمار نبات الهيل بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي، فضلا عن ذلك تم تعيين الاوزان الجزيئية التقريبية لهذه المركبات البروتينية المفصولة وباستخدام نفس التقنية (الترشيح الهلامي) وذلك بمقارنتها مع مواد بروتينية معلومة الوزن الجزيئي، وكانت الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبين A و B هي 29940 و 10627 دالتون على التوالي.

الكلمات الدالة :Elettaria cardamomum ، نبات الهيل، بروتين، الترشيح الهلامي، المستخلص المائي.

Isolation of Protein Compounds from *Elettaria cardamomum* Fruits Plant and Determination of their Molecular Weights

Nahida S. Al-Chalabi

Rasha H. Al -Juboory

Department of Chemistry/ College of Education for Pure Science/University of Mosul

ABSTRACT

This study included preparation of aqueous extract for fruits of *Elettaria cardamomum* plant, isolation of their proteins and precipitation takes place by using acetone. The precipitate of the isolated proteins were purified using gel filtration chromatography depending on the volume of their molecules (proteins) and their molecular weights by a gel of Sephadex G – 75. The results were shown that there are two protein compounds A and B isolated from the protein precipitate resulted from cold aqueous extract for this plant by gel filtration chromatography. Then the molecular weight was determined for these compounds isolated using the same techniques (gel filtration) by comparison these compounds with proteins known molecular weights. The approximate molecular weight of two compounds A and B are 29940, 10627 Dalton respectively.

Keywords: *Elettaria cardamomum*, protein, gel filtration, aqueous extract.

المقدمة

يعد الهيل من النباتات الطبية والعطرية، النبات الطبي مصطلح يقصد به النبات الذي يحوي فوائد دوائية مؤثرة ويستعمل في مجال الطب وقد حل هذا التعريف محل كلمة (عشب) التي أطلقت منذ قديم الأزمنة على أي نبات يستعمل في المداواة العشبية

وذلك قبل ان تعرف الفوائد المؤثرة (يحيى، 2003). فالإنسان منذ القدم تعرف على الكثير من النباتات والاعشاب الطبيعية التي تتمو بريا في بيئته حيث وجد ان الكثير منها يفيد في الغذاء والقليل منها يصلح كدواء (الشحات، 1988). يعرف الهيل بعدة تسميات منها حب الهال، قاقلة، فول مالابار، سرنديب، ويعود الى فصيلة القاقليات Amonaceae (يحيى، 2003) ويطلق عليه باللاتينية Elettaria cardamonum وبالانكليزية Cardamon seed

Oparle and Bonsal, 2010). الهيل نبات عشبي معمر دائم الخضرة استوائي يعود الى العائلة الزنجبارية ويزرع بارتفاع 6–12 (Purseglove et al.,1981) تكون الثمار بشكل شفاف (محافظ) مخضوضرة سمراء بيضوية او Purseglove et al.,)

Purseglove et al.,) عمرية وتكون اندوسبرمية (1981).

يوجد الهيل مزروعاً او برياً وينمو في المناطق الرطبة القريبة من خط الاستواء (يحيى،2003) وتعد الهند الموطن الاصلي لهذا النبات وله قيمة تجارية عظيمة (يحيى،2003; 2003; Bartle andSpechy, 2010; 2003) وهناك إشارات إلى استخدامه من قبل البابليين والاشوريين وذكر ان الملك البابلي زرع الهيل في حدائقه عام 720 ق.م (Modhusoodamn, 2004) ويعتقد انه تم إحضار الهيل إلى أوربا من موطنه الأصلي الهند من قبل احد جنود الاسكندر العظيم، واليوم تتوجه الولايات المتحدة في شراء اغلب بذور الهيل من غواتيمالا بسبب ولع الهنود في استهلاك معظم ما ينتجه بلدهم من الهيل (المشهداني، 2009) وينمو الهيل في الظل ويحتاج إلى رطوبة ثابتة وحرارة حوالي (22)°م. ويتضرر في درجات الحرارة المنخفضة (10)°م. وينمو على ارتفاع 5 أقدام في غابات الأمطار الاستوائية ويحتاج مدارات دافئة لتكوين البذور (Christman, 2006).

يحتوي الهيل زيتا عطريا ومواد دسمة اخرى ومواد معدنية اهمها الكالسيوم، ومواد مشهية وهاضمة (يحيى، 2003) ومن مكونات الهيل، Pinene ، ملح حامض الخليك، ميرسين Myrcene، سايمين Cymene، ليمونين (Lawrence,1979). تحوي بذور الهيل زيوتا طيارة (غير ثابتة)، إضافة إلى ملح البوتاسيوم، ويصل المحتوى الرطوبي للبذور بين 70–100% من مكونات البذرة (Grieve, 2006; Sarathkumara et al., 1985) أما القيمة الغذائية للبذور فتتكون من بروتين، كاربوهيدرات، كالسيوم، رايبوفلافين، ونياسين (Christman, 2006).

لنبات الهيل قيمة طبية عالية اذ يستخدم كمكون طبيعي لعلاج الأسنان وذلك من خلال استخدامه كمعجون ولغرغرة الاسنان واللثة (يحيى، 2003 ؛ 2008 ؛ Nambiar and Raveendran, 2008 ؛ 2003) ويستخدم الهيل كتابل حيث يعرف الهيل بملك التوابل ويعد من الفاكهة المجففة ويستخدم زيت الهيل في الغذاء والعطارة وفي الصناعات الدوائية وطارد للغازات ويدخل في صناعة المواد الغذائية وفي المخللات ولتحسين النكهة يستخدم في الشوربات المعلبة (Purseglove et al.,1981) كذلك يستخدم ضد البكتريا النهذائية وفي المخللات ولتحسين النكهة يستخدم في الشوربات المعلبة (Daris and Fraser,1992) كذلك يستخدم ضد البكتريا التي تسبب قشرة الراس وحب الشباب (Enuresis) ويستعمل مغليه مع البابونج او الزعتر البري غسولا للاكزما النازة، وغرغرة الفم وفركاً لفروة الرأس في النخالية (القشرة) ومضغا في حالة نخر الاسنان (يحيى، 2003) وايضا يستخدم لتخفيف ادمان وغرغرة الفم وفركاً لفروة الرأس في النخالية (القشرة) ومضغا في حالة نخر الاسنان الكل بضعة بذور من الهيل يمكن ان يكون موصى السبجارة وهذا معترف به من قبل دستور الادوية البريطاني والامريكي حيث ان أكل بضعة بذور من الهيل يمكن ان يكون موصى (Natarajan et al., 1968; Kastupi and Tyer, 1955) ويتلاءم طعم الهيل الى حد ما مع الطعام البحري وذلك لصفاته الحامضية ويستخدم الهيل المطحون كعنصر منكه للقهوة العربية ويتلاءم طعم الهيل الى حد ما مع الطعام البحري وذلك لصفاته الحامضية ويستخدم الهيل المطحون كعنصر منكه للقهوة العربية (المشهداني، 2009)

المواد وطرائق العمل

تحضير المستخلص المائى لثمار نبات الهيل

Preparation of the aqueous extract of Elettaria cardamomum fruit of the plant

وزن (100) غرام من حبات الهيل التي تم الحصول عليها من السوق المحلي، وطحنت باستخدام الطاحونة الكهربائية لحين الحصول على مسحوق ناعم لمدة 10 دقائق ومزجت مع الماء المقطر البارد بنسبة (1 وزن: 9 حجم) بعدها جمدت عند (-20) م ثم تركت تنوب عند درجة حرارة الغرفة. كررت العملية سبع مرات وبعدها استخدم جهاز الامواج فوق الصوتية و(30) م ثم تركت تنوب عند درجة حرارة الغرفي وذلك بتعريض الأنموذج لمدة (30) ثانية للموجات فوق الصوتية و (30) ثانية السراحة كررت العملية حتى اتمام تكسير الجدار الخلوي بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تأثير المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد في حمام ثلجي. رشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد للتخلص من المواد غير الذائبة لمدة (20) دقيقة بسرعة (2×3520) للحصول على راشح رائق (عبد المانع ، 2002) وقيس حجم الراشح من المستخلص الخام الرائق المستحصل عليه تقريبا إلى الثلث بوساطة جهاز التجفيف بالتبريد (التجفيد) (Lyophilizer)، قسم حجم المستخلص الخام الرائق المستحصل عليه بعد التجفيد الى قسمين، الاول يكون معدا لاجراء العملية اللاحقة وهي الترسيب بالاسيتون والقسم الاخر جفف بتقنية التجفيد لحين الحصول على مسحوق منه حيث حفظ في انبوبة محكمة الغطاء وفي المجمدة (-20) محبن استخدامه.

عزل البروتينات وترسيبها بوساطة المذيب العضوي

Isolation and organic solvent precipitation of the proteins

أضيف الأسيتون البارد إلى المستخلص بنسبة (3:2) حجم: حجم ببطء مع التحريك المستمر عند درجة حرارة (4°م) ثم تركت إلى اليوم التالي لكي يتم الترسيب بصورة تامة، واجريت بعد ذلك عملية الفصل بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (33520×3352) لمدة 20 دقيقة. بعد ذلك وضع الراسب البروتيني في جهاز التجفيد (Lyophilizer) لعدة ساعات للحصول على المادة بشكل مسحوق، وحفظ في انبوبة محكمة الغطاء في المجمدة لحين اجراء عملية تجزئته بتقنية كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي. تم التخلص من الاسيتون في الجزء الرائق من ذلك المستخلص بوساطة جهاز المبخر الدوار تحت ضغط مخلخل عند درجة (40)°م وتم التاكد من عدم وجود البروتين في الجزء الرائق وذلك بتقدير كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة (40)°م وتم التاكد من عدم وجود البروتين في الجزء الرائق وذلك بتقدير كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة المادة بشكل مسحوق اطلق عليها المواد غير البروتينية. حفظت بعد ذلك في المجمدة في انابيب محكمة الغطاء.

تجزئة البروتين بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

Partition of protein by Gel-filtration chromatography technique

المبدأ الأساسي للتقنية: Basic principle for technique

تعد تقنية الترشيح الهلامي احدى التقنيات المهمة في مجال الكيمياء الحياتية، وهي احدى الطرق المستخدمة لفصل المركبات مثل البروتينات وتنقيتها اعتمادا على حجم جزيئاتها وعلى اوزانها الجزيئية. فالمركبات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة لاتنفذ من خلال حبيبات الهلام لان حجمها اكبر من حجم الحبيبات، اذ انها تتحرك خارج طبقة الهلام وتكون حركة نزولها من العمود اسرع ، اما المركبات ذات الاوزان الجزيئية الصغيرة (اصغر من حجم ثقوب الهلام) فباستطاعتها الدخول إلى حبيبات الهلام. وبذلك تكون حركة نزولها أبطأ وتترشح أخيرا، بعد ذلك يتم جمع الأجزاء المفصولة من الترشيح الهلامي باستخدام جامع الأجزاء الاوتوماتيكي (Fraction collector). ويقاس حجم المحلول المنظم او الماء المقطر لازاحة كل حزمة بروتينية من عمود

الفصل. ويتم التعرف على المواد البروتينية من خلال قراءة شدة الامتصاص عند طول موجي (280) نانوميتر (Clark and Switzer). كما تعد تقنية الترشيح الهلامي طريقة لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للمواد البروتينية المجهولة (1977,) وذلك من خلال تسقيط حجم الروغان للبروتين المجهول على الرسم البياني الذي يوضح العلاقة بين حجم الروغان ولوغاريتم الوزن الجزيئي (Anderws, 1965; Robyt and White, 1987).

تعبئة عمود الفصل Packing of the column

استخدمت مادة الهلام السفدكس من نوع 75 (Sephadex G-75) في تعبئة عمود الفصل ذي الأبعاد (120 x1.8) سم وهذا الهلام يفصل المركبات البروتينية ذات الاوزان الجزيئية بمدى(70000-20000) دالتون (120 x1.8) دالتون (120 and White, 1987). واعتمادا على حجم العمود الذي يساوي (219) مل. وضعت مادة الهلام إلى ارتفاع (86) سم وذلك بسكبها على الجدران الداخلية للعمود بهدوء لمنع تكون الفقاعات الهوائية، وغسل العمود بمقدار مرة ونصف بقدر حجمه بالماء المقطر (Morris and Morris, 1976)، وبذلك اصبح العمود جاهزا لإمرار الأنموذج (محلول مادة الراسب البروتينية).

إضافة المادة البروتينية المعزولة من المستخلص المائي البارد لثمار نبات الهيل

حضر محلول مركز من المادة البروتينية المعزولة من المستخلص المائي البارد لثمار نبات الهيل والذي تم تقدير كمية البروتين فيه بطريقة لاوري المحورة قبل امراره على العمود، ثم مرر حجم (2) مل منه على عمود الفصل الحاوي على الهلام وتبع ذلك اضافة (2) مل من الماء المقطر لدفع الأنموذج داخل العمود، بعدها تم استرداد المادة البروتينية باضافة الماء المقطر بمعدل جريان (33.5 مل /ساعة) أي بمعدل 10 دقائق لكل جزء من جامع الاجزاء الاوتوماتيكي الذي يعمل على نظام الدقائق وتم متابعة المحتوى البروتيني من خلال قراءة شدة الامتصاصية عند الطول الموجي (280) نانوميتر وباستخدام جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية ثم جمعت كل حزمة ناتجة عن فصل مادة الراسب البروتينية على حدة حسب الرسم البياني للامتصاصية مقابل حجم الروغان، وقدرت كمية البروتين في كل حزمة بطريقة العالم لاوري المحورة، اعيدت عملية الفصل لهذه المادة البروتينية عدة مرات لجمع كمية كافية من الحزم البروتينية المفصولة بهذه التقنية، وتم الحصول على المركبات البروتينية الجافة بشكل مسحوق والتي تمثل المركبات البروتينية وذلك بجمع هذه الحزم الناتجة وهي حزمتين A) و B) وتجفيفها بجهاز التجفيد وحفظت هذه المركبات في انابيب محكمة الغطاء عند درجة (20-)°م في المجمدة لحين الاستعمال. وتقدير وزنها الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي.

تعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي

استخدم عمود الفصل نفسه المشار اليه سابقا لغرض تعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة لثمار نبات الهيل واعتمادا على حجم العمود الذي يساوي (219) مل الذي يكون جاهزا لإمرار النماذج وهي

أ/ المواد القياسية:

- 1. الدكستران الازرق Blue dextran بتركيز 1ملغم/مل وزنه الجزيئي20000000 دالتون لتعيين الحجم الخالي الفارغ من الحبيبات Vo=void volume.
 - 2. البومين مصل البقر Bovine serum albumin) BSA) بتركيز 1ملغم/ مل وزنها الجزيئي 67000 دالتون.
 - 3. البومين البيض (Egg albumin) بتركيز الملغم/ مل وزنه الجزيئي 45000 دالتون.
 - 4. الببسين (Pepsin) بتركيز الملغم/ مل وزنه الجزيئي 36000 دالتون.

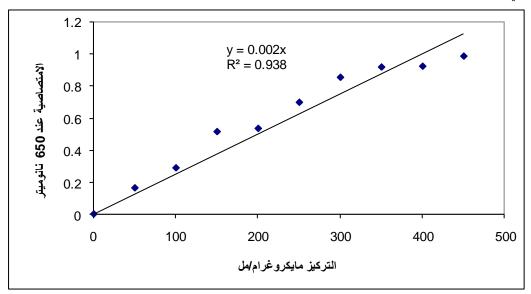
- 6. التربسين (Trypsin) بتركيز 1ملغم/ مل وزنه الجزيئي 23000 دالتون.
- 7. البابايين Papain) بتركيز الملغم/ مل وزنه الجزيئي 21000 دالتون.
- 8. الحامض الاميني التربتوفان Tryptophan بتركيز 1ملغم/ مل وزنه الجزيئي 204 دالتون لتعيين الحجم الداخلي للعمود Vi =internal volume .

ب/ المركبات البروتينية المفصولة والمجهولة الوزن الجزيئى:

تم امرار المواد القياسية والمركبات البروتينية كلا على حدة بحجم (2) مل في عمود الفصل، وتم استردادها ثم حسب حجم الروغان (قمة الحزمة) لكل من المركبات البروتينية والمواد القياسية بدقة من خلال متابعة المحتوى البروتيني بعدها رسم لوغاريتم الوزن الجزيئي التقريبي المجهول للمركبات البروتينية المفصولة.

التقدير الكمي للبروتينات Quantitative determination of proteins

عينت كمية البروتينات في المستخلص المستحصل عليه باستخدام طريقة العالم لاوري المحورة (Schacterle and) عينت كمية البروتينات في المستخلص المستحصل عليه باستخدام طريقة العالم (Bovine serum albumin -BSA) بتركيز 1ملغم/ مل بوصفه محلولاً قياسياً له معامل امتصاصية مولارية Extinction coefficient يساوي (0.67) (Holme and Peck, 1988). والشكل (1) يوضح المنحنى القياسي للبروتين.



الشكل 1: المنحنى القياسى لتقدير البروتين

الكشوفات اللونية

Biuret test

كشف بايوريت:

لمعرفة فيما اذا كان المستخلص غير البروتيني خاليا من البروتين، كذلك التأكد من وجود البروتين في المستخلص تم استخدام كشف بايوريت وضع (2) مل من المحلول (المستخلص غير البروتيني) في انبوبة اختبار ثم أضيف إليه (2) مل من (10%) هيروكسيد الصوديوم ورج جيدا ثم أضيفت إليه (5) قطرات من محلول (0.5%) (كبريتات النحاس المخفف) حيث النتيجة الموجبة ملاحظة ظهور اللون البنفسجي مما يدل على وجود البروتين أما النتيجة السالبة فهي عدم ظهور اللون البنفسجي.

كشف مولش: Molish's test

يستخدم هذا الكاشف لمعرفة فيما اذا كانت المادة البروتينية تحتوي على جزيئات سكرية متصلة بها من نوع (Glycoprotein) ام لا. تضمن الكشف اضافة (4) قطرات من محلول (الفا- نفثول) الكحولي إلى (2) مل من المحلول البروتيني المراد الكشف عنه، ورج المزيج جيدا ثم اضيف (2) مل من حامض الكبريتيك المركز بشكل قطرات إلى جدران الانبوبة الداخلية بهدوء مع ملاحظة تكون الحلقة البنفسجية مابين الطبقتين.

النتائج والمناقشة

مستخلص نبات الهيل وفصل بروتيناته وتقديرها تحضير المستخلص المائي المتجانس

Preparation of homogenous extract

استخلصت المواد البروتينية الموجودة داخل خلايا ثمار نبات الهيل باستخدام التجميد والتذويب (Freezing) مدا من المحلفة الماء الى اجزاء النبات تؤدي الى امتصاصه من قبل الخلايا ، وبعد تجميده يتمدد ويعمل هذا على تكسير جدران الخلايا ومن ثم خروج المادة الخلوية منها الى الماء. كما تم استخدام جهاز الموجات فوق الصوتية للحصول على معظم المكونات الموجودة داخل الخلايا النباتية اثناء تحضير المستخلص كما ذكر سابقا في طريقة العمل.

ترسيب البروتينات باستخدام المذيب العضوى

Precipitation of proteins by organic solvents

تترسب البروتينات في المحاليل المائية بوساطة المذيبات العضوية مثل الاسيتون والكحول حيث تعمل كل من هذه المذيبات تأصراً هيدروجينياً مع جزيئات الماء، مما يقلل التداخل الحاصل بين البروتين وجزيئات الماء (المذيب) ومن ثم يؤدي الى ترسيب البروتين. ويعزى ترسيب البروتين بهذه الطريقة الى امتلاك كل من الاسيتون والكحول قيمة ثابت عزل كهربائي Dielectric constant اقل من الماء وبهذا فان اضافة كل منهما الى المحلول البروتيني المائي يؤدي الى زيادة قوة التجاذب بين الشحنات المتعاكسة مما يقلل درجة تأين مجاميع R للاحماض الامينية، وهذا يسبب تكتل جزيئات البروتين وترسبه (ال فليح، 2000) والمعادلة الآتية توضح ذلك:

$$F = e_1 - e_2 / Dr^2$$

اذ ان F قوة التجاذب بين ايونين لهما شحنات مختلفة

شحنات الايونات (e_1, e_2)

D ثابت العزل.

المسافة ما بين الجزيئات $=r^2$

من هذه المعادلة نجد انه كلما ازداد ثابت العزل قلت قوة التجاذب بين الايونين ذوي الشحنات المختلفة (Robyt and White, 1987). بناءً على ذلك استخدم الاسيتون لترسيب البروتينات من المستخلص المائي. ولتجنب حدوث المسخ الناتج من حرارة المزج عند إضافة المذيب العضوي (الاسيتون) الى المحلول المائي للبروتين استخدم واختير الاسيتون المثلج الذي يضاف على نحو تدريجي للمحافظة على درجة حرارة المحلول عند درجة (4)°م وذلك لكونه مرسباً جيداً ولسهولة التخلص منه في الدرجات الحرارية المنخفضة.

كما وجد ان نسبة المذيب العضوي (V/V 40/60) الى المستخلص تعطي اكبر كمية من البروتين المترسب (Robyt بعد ذلك تجفف المادة البروتينية الناتجة الى ان تصبح بشكل مسحوق باستخدام جهاز التجفيد (1987)

Lyophilizer وذلك لمنع تلوثها بالأحياء المجهرية لأنها تعد وسطاً غذائياً جيداً للعديد من الإحياء المجهرية، ومن ثم يحفظ في المجمدة بدرجة (-20)°م لحين استخدامها في تجارب لاحقة.

تقدير البروتين بطريقة لاوري المحورة والكشوفات اللونية

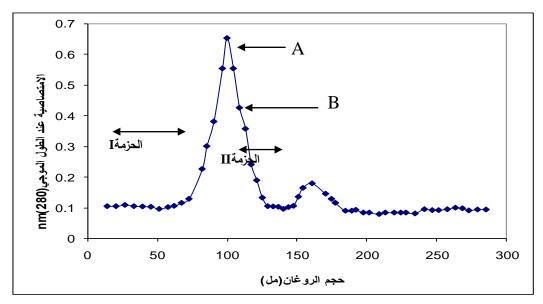
استخدمت طريقة لاوري المحورة (Schacterle and Pollack, 1973) في هذه الدراسة لغرض تقدير البروتين، وتعد هذه الطريقة من اكثر الطرائق شيوعاً لتقدير البروتين نظراً لحساسيتها العالية اذ انها تستخدم في حالات التراكيز القليلة جداً من البروتين وهي تعطي ناتجاً بعد 40 دقيقة. تتضمن الطريقة استخدام كاشف فولن في وسط قاعدي الذي يعطي معقداً ازرق اللون مع البروتين اذ يتم اختزال املاح الفوسفومولبيدات والفوسفوتتكستات بوساطة التايروسين والتربتوفان الموجودين في البروتين، ويوضح الجدولان (1) و (2) كمية البروتين الكلي في المستخلص المائي البارد والراسب البروتيني والمركبات البروتينية الناتجة من الترشيح الهلامي وكفاءة الترسيب، وبعد اجراء كشف مولش وبايوريت على مادة الراسب البروتينية اعطى كشف مولش نتيجة سالبة دلالة على عدم وجود السكريات اما كشف بايوريت اعطى نتيجة موجبة مع الراسب البروتيني لون بنفسجي دلالة على وجود البروتين ونتيجة سالبة مع المستخلص غير البروتيني دلالة على عدم وجود البروتين.

الجدول 1: كمية البروتين الكلي والنسبة المئوية وكفاءة الترسيب بالاسيتون في المستخلص المائي الخام البارد لثمار نبات الهيل.

| كفاءة الترسيب بالأسيتون(%) | وزن البروتين المحصل عليه عملياً (ملغم) | وزن النبات (غم) | نسبة البروتين في النبات (%) | كمية البروتين الكلي في المستخلص (ملغم) | الحجم الكلي للمستخلص (مل) | تركيز البروتين (ملغم/مل) | نوع المستخلص |
|-------------------------------|--|-----------------------|-----------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------------|---|
| 73.65 | 1521 | 50 | 4.13 | 2065.854 | 303 | 6.818 | المستخلص المائي الخام البارد لثمار نبات الهيل |

فصل مادة الراسب البروتينية المعزولة من المستخلص المائي البارد لثمار نبات الهيل بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

أعطى روغان مادة الراسب البروتينة المعزولة من المستخلص المائي البارد لثمار نبات الهيل قمتين واضحتين عند امرار محلولها في عمود الفصل المذكور سابقا في طريقة العمل والمبينة في الشكل (2).



الشكل 2: المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام البارد لثمار نبات الهيل بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (1.8 x120) سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-75 الاسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم الاولى (99.9) مل والثانية (160.9) مل على حجم كل جزء (5) مل ويمعدل جريان (33.5 مل/ساعة) للحزم البروتينية المفصولة .

إيجاد كمية البروتين الكلي في مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام البارد لثمار نبات الهيل قبل التمرير في عمود الفصل والحزم البروتينية الناتجة عن تقنية الترشيح الهلامي

بعد فصل الحزم البروتينية من المحلول المركز لمادة الراسب البروتيني التي مررت في عمود الفصل كما ذكر انفا في طريقة العمل، قدرت كمية البروتين بطريقة العالم لاوري المحورة ومن ثم تم ايجاد كفاءة الفصل في العمود المستخدم في تقنية الترشيح الهلامي، و(الجدول 2) يبين النتائج التي تم الحصول عليها.

الجدول 2: كمية البروتينات للمحاليل المركزة قبل تمريرها في عمود الفصل والمركبات (الحزم) البروتينية الناتجة من الترشيح الجدول 2: Sephadex G-75 سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-75.

| كفاءة الفصل (%) | النسبة المئوية (%) | كمية البروتين الكلي (ملغم) | الحجم الكلي (مل) | ترکیز البروتین (ملغم/مل) | نوع البروتين |
|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------------------|--|
| | 100 | 11.392 | 2 | 5.696 | الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام البارد لثمار نبات الهيل قبل التمرير في عمود الفصل |
| 86.71 | 66.74 | 7.6037 | 58.49 | 0.130 | المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني البارد |
| | 19.97 | 2.275 | 25 | 0.091 | المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني البارد |

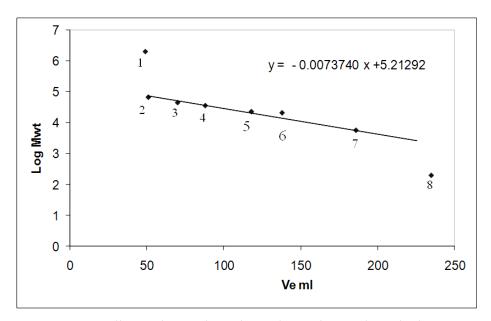
الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة

لغرض تعيين الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي استخدم عمود الفصل ذي الأبعاد (120×120) سم، اذ تم امرار عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي، تراوحت أوزانها الجزيئية بين (204-200000) دالتون، بعد ذلك تم تعيين حجوم الروغان لهذه المواد كما هو مبين في (الجدول 3).

| الوزن الجزيئى | المعلومة | القياسية | الموإد | ر وغان | حجم | :3 | الجدول |
|---------------|----------|----------|--------|--------|-----|----|--------|
| | | | | | | | |

| حجم الروغان(سم ³) | الوزن الجزيئي | المادة | التسلسل |
|-------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------|
| 42 | 2000000 | ككستران الازرق Blue dextran | 1 |
| 51 | 67000 | بومين مصل البقر Bovine serum albumin | 2 |
| 70 | 45000 | Eggs albumin لبومين البيض | 3 |
| 88 | 36000 | بسین Pepsin | 4 |
| 118 | 23000 | رېسىن Trypsin | 5 |
| 138 | 21000 | Papain بابايين | 6 |
| 186 | 5734 | الانسولين Insulin Hormone | 7 |
| 235 | 204 | تربتوفان Tryptophan | 8 |

وعند رسم حجم الروغان (Elution volume) لكل مادة مقابل لوغارتم الوزن الجزيئي تم الحصول على المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي كما هو مبين في الشكل (3) والذي من خلاله يمكن تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات المفصولة.



الشكل 3: المنحنى القياسى لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للبروتينات

ومن خلال إسقاط حجوم الروغان التي تم الحصول عليها للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي على المنحني القياسي في (الشكل 3).

الجدول 4: الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي التي تم الحصول عليها

| الوزن الجزيئي التقريبي(دالتون) | حجم الروغان(مل) | المادة |
|--------------------------------|-----------------|--|
| | | المركب البروتيني A المفصول من الراسب |
| 29940.3 | 99.9 | البروتيني للمستخلص المائي الخام البارد لثمار |
| | | نبات الهيل |
| | | المركب البروتيني B المفصول من الراسب |
| 10627.8 | 160.9 | البروتيني للمستخلص المائي الخام البارد لثمار |
| | | نبات الهيل |

المصادر العربية

آل فليح، خولة احمد (2000). "مدخل الى الكيمياء الحيانية". دار الكتب للطباعة والنشر، الطبعة الثانية، جامعة الموصل، ص331، 331، 341، 417.

عبد المانع، خالد صالح عمر (2002). " عزل البروتينات والاجزاء غير البروتينية من نباتي السبحبح وخس الزيت ودراسة تأثيرها على مستوى السكر في الدم". رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق.

يحيى، توفيق الحاج (2003). "النبات والطب البديل". الدار العربية للعلوم، مطبعة المتوسط، بيروت، لبنان. ص 13٠-385.

المصادر الأجنبية

- Andrews, P. (1965). The Gel filtration behaviour of protein related to their molecular weight over a wide range. *Biochem*. *J.*, **96**, 596-606.
- Bartle, E.M.; Spechy, D.S. (2010). Evidence for the involvement of Glo Bos A-like, in duplications and expression diver game in the evolution of flaval morphology in zingiberales. *J. Comp. New phyto.*, *Chem. Abst.* 94720.
- Christman, S. (2006). "Flavidata: *Elettaria cardamomum*". www. flavidata.com. LC. Tallahasse flavide. A., pp.2-3.
- Clark, J.M.; Switzer, R.L. (1977). "Experimental Biochemistry". San Francisco, USA, pp. 73-77.
- Daris, L.; Franser, L. (1992). "Fight varieties with cardamom". Health. 6(2), 8.
- Grieve, M. (2006). Cardamons Botanical: *Elettaria cardamonum* Maton Amodern Herbal. *Ind. J.*, 1-4.
- Holme, D.J.; Peck, H. (1988). "Analytical Biochemistry". John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 86-88.
- Kastupi, T.R.; Tyer, B.H. (1955). Fixed oil from *Elettaria Cardamomum* seeds. *J. Indian. Inst. Sci.*, **37** A,106.
- Lawrence, B.M. (1979). "Major Tropical Spices-cardamom (*Elettaria cardamoum*) in Essential Oils". Allured publ., whcat. on, III, 104.
- Morris, C.J.; Morris, P. (1976). "Separation Method in Biochemistry". 2nd ed., pitman publishing, 442 p.
- Nambiar, R.; Raveendran, K. (2008). Indigenous medicinal plants scripted in amarakosam. *Am. J. Bot.*, **1**(3), 68-72.

- Natarajan, P.; Kuppnswawy, S.; Krishnamurthy, M.N. (1968). A study on the maturity regional variation and retention of green colour of cardamoum. *J. Food Sci. Technol.*, **5**, 65.
- Parle, M.; Bonsal, N. (2010). Antiamensic activity of an ayurvedic formulation chyarran prash in mice. *CAM*, 1-10.
- Pureseglove, J.W.; Brewn, E.G.; Green, C.L.; Robbins, S.R. (1981). "Biochemistry of Zingiberis Rhizoma Species". Vol. 2 . Longman. Inc. New York.
- Ravindran, P.N.; Madhusoodana, K.J. (2004). "Cardamoum the Genus *Elettaria*". CPC press. London and New York. pp.3-90.
- Robyt, F.J.; White, J.B. (1987). "Biochemical Techniques, Theory and Practice". Brookes/Cole publishing company, Monterey, California, pp. 115-118.
- Sarathkumara, S.J.; Paciasothy, E.V.; Janz, E.R. (1985). Some studies on the effect of maturity and storage on the chlorophy11 content and essential Oils of the cardamomum fruit (*Elettaria cardamomum* Maton). *J. Sci. Food and Agri.*, **36**(6), 491-198.
- Schacterle, G.R.; Pollack, J.K. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials. *Anal. Biochem.*, **51**, 654-655.
- Stanton, P. (2003). "Gel Filtration Chromatography". Human a press., 251, pp. 55-74.