التقدير النوعي و الكمي للأحماض الامينية للبروتين المعزول من زهرة الخطمي *Marsh Mallow* F. الجزء (1)

بسمة نافع نعيمي
شعبة العلوم الأساسية / كلية الزراعة والغابات
جامعة الموصل

الاستلام	القبول
2010 / 12 / 19	2011 / 06 / 01

Abstract

The research was concerned with Amino Acid Analysis of the proteins isolated from the crude aqueous extract of ***Marsh Mallow*** F.

Acidic and Alkaline hydrolysis were performed. All amino acids had been appeared in Acidic hydrolysis, while in Alkaline hydrolysis for the same aqueous extract two amino acids serine and aspartic acid disappeared.

The research also involved separation of the proteinous components from the aqueous extract of ***Marsh Mallow*** F. Two major proteins peaks (a and b) were isolated and their molecular weight were determined by gel filtration and showed the following values (281838, 281) dalton. respectively.

Key words: *Marsh Mallow* F., Amino acid analysis, Gel-filtration technique

الخلاصة

تضمن البحث تحليل الأحماض الامينية للبروتين المعزول من المستخلص المائي الخام لزهرة الخطمي ***Marsh Mallow* F.** استخدم نوعين من التحاليل المائية الحامضية والقاعدية.

لوحظ بالتحلل المائي الحامضي ظهور جميع الأحماض الامينية بينما في التحلل القاعدي لنفس المستخلص المائي فقد الحامضين الامينيين السيرين والاسبارتك.

كما تضمن البحث فصل مركبات بروتينية من المستخلص المائي لزهرة الخطمي، حيث تم فصل جزئتين بروتينيتين رئيسيتين (a و b) وقدرت اوزانها الجزيئية بتقنية الترشيح الهلامي وكانت (281838 و 282) دالتون على التوالي.

الكلمات المفتاحية: زهرة الخطمي، تحليل الاحماض الامينية، تقنية الترشيح الهلامي.

المقدمة

منذ اقدم العصور التي عاشها الانسان جرب وعرف صفات واحوال النباتات التي تنمو حوله وعلى الرغم من الشوط الكبير الذي قطعه الباحثون في علوم العقاقير والكيمياء الا ان النباتات مازالت تحتوي على كنوز دفينة يكمن فيها الاهمية البايولوجية (1)، وعلى الرغم من التطور الكبير في مجال الصيدلة وعلم الدواء الا ان الانسان عاد من جديد للتداوي بالاعشاب والنباتات الطبية (2) ومن هذه النباتات نبات الخطمي (الخبيزة المخزنية) (*Marsh Mallow*) ينتمي هذا النبات الى العائلة (Malvaceae) ويعرف علميا باسم *Althaea officinalis* L., وهو عشبة حولية معمرة اكثر من سنتين يصل ارتفاعها الى حوالي مترين ذات جذور مميزة بيضاء غليظة واوراق قلبية الشكل و سيقان مخملية ملتفة يزهر في منتصف الصيف في المراعي والمروج والخنادق والاسيجة الشجرية بألوان مبهجة قرنفلية اللون (الشكل 1)(3)، وينتشر هذا النبات في الأقطار الأوربية في المناطق الرطبة وفي التربة الملحية بصورة خاصة ويوجد أيضا شمال وغرب أسيا وفي الولايات المتحدة الامريكية (4), ويحتوي النبات على العديد من المركبات الكيميائية منها الصمغيات والسكريات المتعددة والفلافونيدات مثل الكورستين والكامفيرول ويحتوي على التانين واللستثين والبكتين والنشا والسيليلوز والزيوت والاسبارجين (5) كما انه غني بالفيتامينات مثل فيتامين A و B-complex و C وغني بالمعادن خاصة الكالسيوم والخارصين والحديد والصوديوم فضلا عن احتوائه على الاحماض الفينولية(6).

الشكل (1): زهرة الخطمي

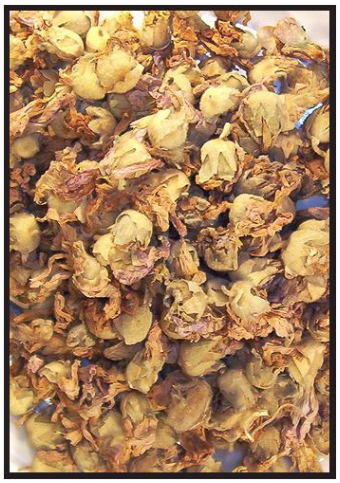
والاجزاء المستخدمة من نبات الخطمي الجذور والاوراق والازهار، وتحتوي ازهار الخطمية على مواد لعابية بنسبة تصل الى 35% هذا الامر الذي يمنحها مزايا علاجية حيث تقبل العامة على اقتنائها بحماس واهتمام (7) واستخدم الخطمي منذ الالاف السنين كنبات طبي لخواصه الدوائية لعلاج العديد من الأمراض (8)، إذ تستخدم أزهار الخطمي بشكل واسع لمعالجة الجروح ولسعة الحشرات كما يستخدم على نطاق واسع لمعالجة الربو ومشاكل الجهاز التنفسي كالتهابات القصبات الهوائية والآلام الحنجرة والسعال وطاردة للبلغم (9) ومضاد للالتهاب وللقرحة المعدية والاثني عشر ومسكن عام للجسم ومفيد للالتهابات المجاري البولية (UTI)، Urinary Tract Infection (10) كما يستخدم في تفتيت حصى الكلية ولحالات عسر الهضم ويستخدم كمضاد للأكسدة وهو مخفض لسكر الدم كما يستخدم كعلاج لمرض كرون (Crohn's Disease) (11), ولأهمية نبات الخطمي يوجد مستحضر منه لدى محلات الاغذية الصحية التكميلية (12).

الغاية من البحث :

إجراء دراسة تحليلية للبروتين المعزول من زهرة الخطمي (***Marsh Mallow***) من خلال الفصل وتحليل الأحماض الامينية (**Amino acid analysis**) لمعرفة نوعية وكمية الأحماض الامينية الموجودة في البروتين المعزول وتعيين الوزن الجزيئي للأجزاء البروتينية المعزولة باستخدام تقنية كروماتوغرافي الترشيح الهلامي.

المواد وطرائق العمل

تحضير المستخلص المائي الخام



الشكل (2): زهور الخطمي المجففة

لغرض الحصول على المستخلص المائي الخام تم وزن (500) غم من زهور الخطمي التي تم جمعها في الفترة من شهر ايار إلى ايلول في عام 2009 بعد غسلها وتجفيفها (شكل 2) ثم مزجت بالماء المقطر بنسبة (3:1) وزن (غم)/حجم (مل), وسحق المزيج باستخدام آلة الثرم (Blender) مدة 10 دقائق مع التبريد بعدها سحقت جدران الخلايا باستخدام التجميد والتذويب (كررت العملية أربع مرات) وباستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية Ultra sound (المجهز من شركة MSC الانكليزية نوع PC−1545) لمدة 30 دقيقة . بعدها حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تاثير المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد في الحمام الثلجي بعدها رشح المحلول باستخدام عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (6000xg) للتخلص من المواد غير الذائبة ثم قلص حجم المستخلص الذي تم الحصول عليه بواسطة جهاز التجفيد بالتبريد (Lypholyzer) إلى الثلث وبذلك تم الحصول على المستخلص المائي الخام (13 و14).

التقدير الكمي للبروتين

قدرت الكميات الدقيقة من البروتين في المستخلصات التي تم الحصول عليها في كل خطوة باستخدام طريقة الباحث لاوري المحورة (15)، استخدم البومين مصل البقر (BSA)، Bovine Serum Albumin بوصفه محلولا قياسياً له امتصاص مساوي لـ 0.67 عند 280 نانوميتر.

فصل البروتين الكلي بواسطة المذيب العضوي (الاسيتون)

تم فصل البروتين الكلي من المستخلص المائي الخام الذي تم الحصول عليه بإضافة الاسيتون البارد وبنسبة (60:40) مستخلص: حجم اسيتون على التوالي ببطء مع التحريك

المستمر عند درجة حرارية (4 ْم) ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة وأجريت عملية الفصل بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (6000xg) ولمدة 20 دقيقة ثم فصل الراسب عن الراشح, بعد ذلك وضع الراسب البروتيني في جهاز التجفيد بالتبريد (Lypholyzer) لعدة ساعات للحصول على المادة البروتينية المفصولة على هيئة راسب (16) .

تحليل الأحماض الامينية

تحضير العينة

لغرض تحضير العينة وقبل وضعها في جهاز محلل الأحماض الامينية وتحويل البروتين أو الببتيد إلى أحماض امينية حرة تم إجراء عملية التحلل المائي بالحامض والقاعدة وذلك باذابة (1غم) من المسحوق البروتيني في 10 مل ماء مقطر قاعدي (ماء مقطر مضاف اليه قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم) ثم سحب منه 3مل وأضيف له 3 مل من حامض الهيدروكلوريك (6 عياري) و3 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (5 عياري) كلا على حدة ووضعا في أنابيب خاصة ضيقة العنق تم تصنيعها يدوياً بعد تفريغها من الهواء (under vacuum) ثم أغلقت فوهة الأنابيب باللهب ووضعت بالفرن بدرجة (110 ْم) ولمدة (72 ساعة) لتصبح المحاليل جاهزة للتحليل بجهاز محلل الأحماض الامينية (Amino acide analyzer) المجهز من شركة (Model No L-8900-Hitachi) (تم إجراء التحليل بجامعة حلب/سوريا) (13، 17).

فصل البروتينات باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي

تم فصل البروتين الكلي الخام الذي تم الحصول عليه مسبقاً باستخدام تقنية الترشيح الهلامي (Gel Filtration) باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (2.5 ×105) سم الحاوي على مادة السيفادكس نوع G-100 (SephadexG-100) وتم جمع العينات بوساطة جهاز جامع الأجزاء (Fraction collector) ثم حساب حجم سائل الروغان (الماء المقطر) بإزاحة كل جزء بروتيني من عمود الفصل وعزلت الأجزاء البروتينية بناء على قراءة الامتصاص عند الطول الموجي 280 نانوميتر (18).

تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للأجزاء البروتينية المعزولة باستخدام تقنية الترشيح الهلامي

استخدم نفس عمود الفصل المذكور سابقاً لتعين الوزن الجزيئي التقريبي للأجزاء البروتينية المفصولة وبمقارنة حجم الروغان للأجزاء البروتينية المفصولة من زهرة الخطمي مع حجوم الروغان للمحاليل القياسية المعلومة الوزن الجزيئي يمكن تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للبروتين المجهول (18).

النتائج والمناقشة

جدول (1): يوضح كمية البروتينات المقدرة بطريقة العالم لاوري المحورة ونسبها المئوية وكفاءة ترسيبها بالأسيتون في المستخلص المائي الخام لزهرة الخطمي.

نوع المستخلص	تركيزالبروتين (ملغم/مل)	الحجم الكلي (مل)	كمية البروتين الكلي في المستخلص (ملغم)	النسبة المئوية للبروتين (%)	وزن النبات (غم)	كمية البروتين المستحصل عليه عملياً (ملغم)	كفاءة الترسيب (%)
المستخلص المائي الخام لزهرة الخطمي	1.5	1800	2700	0.54	500	2600	96.2

يلاحظ من الجدول(1) انه تم الحصول على اكبر كمية ممكنة من البروتينات الموجودة في زهرة الخطمي باستخدام السحق واستخدام جهاز الامواج فوق الصوتية حيث يعمل على تكسير جدران الخلايا ويسهل عملية ذوبان المواد البروتينية واستخلاصها بالماء من داخل الخلايا (13، 14).

التحليل النوعي والكمي للاحماض الامينية

تم فصل وتشخيص الأحماض الامينية للبروتين المعزول من زهرة الخطمي باستخدام جهاز محلل الاحماض الامينية Amino acids analyzer حيث استخدم نوعين من التحاليل المائية الحامضية والقاعدية لتحليل الاحماض الامينية المكونة للبروتين ويعزى السبب في ذلك الى ان قسم من الاحماض الامينية قد تتأثر وتنعدم بالتحلل القاعدي وتظهر بالتحلل الحامضي وربما العكس لذلك كان من الضروري اجراء التحليلين الحامضي والقاعدي لضمان وجود جميع الاحماض الامينية وتقدير نسبة تكوينها في البروتين. فلكسر الاواصر الببتيدية التي تربط الاحماض الامينية في جزيئة البروتين استخدم حامض الهيدروكلوريك (6 عياري) وهيدروكسيد البوتاسيوم (5 عياري) على الراسب البروتيني المفصول من المستخلص المائي الخام لزهرة الخطمي كلا على حدة, بعد ان تم وضعهما في انابيب جافة وتسخينها بدرجة حرارة (110 مْ) وبمعزل عن الهواء (13 و 17 و 19 و 20) استمرت عملية التحلل لمدة (72ساعة) لغرض تحسين كمية تحلل الاحماض الامينية وبالاخص الحامضين الامينيين السيرين (Serine) والثريونين (Threonine) لتحطمهما الجزئي والحامضين الامينيين الايزوليوسين (Isoleucine) والفالين (Valine) وذلك لكون عملية تحطمها تتم ببطيء (21، 22) بعد ذلك اجري تحليل نوعي وكمي للاحماض الامينية الناتجة من عملية التحلل المائي بالحامض والقاعدة وذلك باستخدام جهاز محلل الاحماض الامينية, والذي يعتمد بالدرجة الأساس على راتنجات ذات القابلية على التبادل الايوني ثم شخصت جميع الاحماض الامينية للعينة عند طول موجي يتراوح من (440-570) نانوميتر مع زمن الاحتباس (R_t) والموضحة في التقارير (تقرير 2 و3 شكل+جدول) وبمقارنة زمن الاحتباس والمساحة تحت الحزمة لمزيج الاحماض القياسية (المتضمنة 18 حامضاً امينياً) والتي مررت أولا تحت نفس الظروف (تقرير 1، شكل+جدول) تم التعرف على نوعية وكمية الاحماض الامينية في العينة.

ويلاحظ من الجدول (2) المبين ادناه والمستحصل من التقارير (1 و2 و3) الأحماض الامينية ونسبها المئوية وتراكيزها بالتحلل المائي القاعدي والحامضي مقارنة بالأحماض الامينية القياسية حيث لوحظ غياب او فقدان حامضي الاسبارتك Aspartic acid والسيرين Serin بالتحلل المائي القاعدي وظهور جميع الاحماض الامينية المحقونة بالتحلل المائي بالحامض (20 و 23–28).

من حسابنا للتراكيز[*] (29) لكلا النوعين التحلل المائي للاحماض الامينية لزهرة الخطمي بالحامض والقاعدة وكما مبين في الجدول (2) لوحظ زيادة التراكيز لمعظم الاحماض الامينية المحللة بالقاعدة مقارنة بالتحلل المائي للاحماض الامينية بالحامض لذلك كان لابد من اجراء عملية التحلل المائي للاحماض الامينية بالقاعدة (30، 31).

جدول (2): يوضح الأحماض الامينية ونسبها المئوية وتراكيزها بالتحلل المائي القاعدي والحامضي مقارنة بالاحماض الامينية القياسية

اسم الحامض الاميني	رمز الحامض	%			التركيز	
		الحامض الاميني القياسي	التحلل القاعدي	التحلل الحامضي	بالتحلل القاعدي	بالتحلل الحامضي
Cystice acid	Cys. OH	2.77	1.96	0.32	104.221	18.306
Methionine sulfone	Mes	2.77	9.35	40.46	495.239	2281.474
Aspartic acid	Asp	5.5	–	9.81	–	553.518
Theronine	Thr	5.5	0.79	0.97	42.143	55.136
Serine	Ser	5.5	–	0.3	–	16.970
Glutamic acid	Gla	5.5	6.02	4.09	318.734	320.705
Glycine	Gly	5.5	11.48	5.42	607.650	305.708
Alanine	Ala	5.5	14.65	6.25	775.661	352.410
Cystine	Cys	5.5	5.36	2.86	282.567	217.942
Methionine	Met	5.5	0.89	0.27	52.207	15.406
Isoleucine	Ile	5.5	2.39	2.74	126.883	155.006
Leucine	Leu	5.5	8.71	4.26	461.086	240.290
Tyrosine	Tyr	5.5	3.40	3.07	180.422	173.115
Phenyl alanine	Phe	5.5	4.25	2.40	225.323	135.448
Lysine	Lys	5.5	3.07	3.68	162.814	207.606
Histidine	His	5.5	1.36	6.49	72.485	43.643
Arginine	Arg	5.5	0.75	0.77	40.172	61.468
Proline	Pro	5.5	10.69	1.09	565.861	208.13

[*] يتم حساب التركيز حسب القانون التالي:

K = المساحة تحت الحزمة A / تركيز الاحماض الامينية القياسية (a.a) concentration

حيث تمثل K الثابت اللوني للاحماض الامينية القياسية.

بعد ذلك يتم حساب تركيز الاحماض الامينية المجهولة = المساحة تحت الحزمة لكل حامض اميني K / A

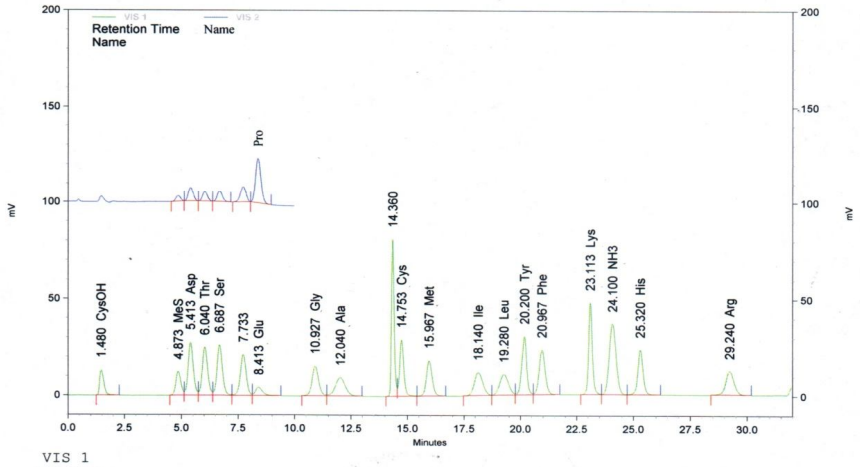
إن وجود هذه الاحماض المكونة للبروتين تدخل في التصنيع الحيوي لبعض المركبات ولها وظائف ايضية اخرى إذ تستخدم في مجموعة متنوعة من التطبيقات في مجال الصناعة وكإضافات لعلف الحيوانات إذ يعد اللايسين والمثيونين والثريونين هي أكثر هذه الاحماض أهمية في الإنتاج من هذه الاعلاف وتعد الصناعات الغذائية ايضاً مستهلكاً رئيسياً للاحماض الامينية وخاصة حامض الكلوتاميك الذي يستخدم كأساس محسن للنكهة وقد ظهرت لدينا الحامضين الامينيين اللايسين والثريونين بتراكيز عالية بالتحلل المائي الحامضي والمثيونين وحامض الكلوتاميك بتراكيز عالية بالتحلل المائي القاعدي (32-34) .

ويستخدم الانتاج المتبقي من الاحماض الامينية في تركيب العقاقير ومستحضرات التجميل (33).

تقرير (1) شكل + جدول: يوضح تحلل الاحماض الامينية القياسية

Hitachi Amino Acid Analyzer Report

Analyzed: 11/5/2009 12:30:56 PM Reported: 11/5/2009 2:36:57 PM
Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\st. dahan 2-11-2009-Rep1.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Std-PH operating Method.met
Sample ID: st.dahan
Vial Number: 1 Inj. Volume(uL): 20
Data Description: {Data Description}



VIS 1 Results

Pk #	RT	Name	Height	Area	%	ESTD Conc	Units
1	1.48	CysOH	52205	681402	2.77	125.000 CAL	nmol/ml
2	4.87	MeS	49384	772246	=	125.000 CAL	nmol/ml
3	5.41	Asp	109747	1761060	5.5	250.000 CAL	nmol/ml
4	6.04	Thr	99834	1676940	=	250.000 CAL	nmol/ml
5	6.69	Ser	104548	1744982	=	250.000 CAL	nmol/ml
7	8.41	Glu	17566	385180	=	250.000 CAL	nmol/ml
8	10.93	Gly	61356	1254233	=	250.000 CAL	nmol/ml
9	12.04	Ala	38027	1178935	=	250.000 CAL	nmol/ml
11	14.75	Cys	116546	1494019	=	250.000 CAL	nmol/ml
12	15.97	Met	73117	1314808	=	250.000 CAL	nmol/ml
13	18.14	Ile	48084	1268200	=	250.000 CAL	nmol/ml
14	19.28	Leu	43144	1198861	=	250.000 CAL	nmol/ml
15	20.20	Tyr	121544	1854925	=	250.000 CAL	nmol/ml
16	20.97	Phe	92637	1737732	=	250.000 CAL	nmol/ml
17	23.11	Lys	189989	2195118	=	250.000 CAL	nmol/ml
18	24.10	NH3	146274	3131011	=	250.000 CAL	nmol/ml
19	25.32	His	92875	1496500	=	250.000 CAL	nmol/ml
20	29.24	Arg	49412	1274061	=	250.000 CAL	nmol/ml
Totals			1506289	26420213	93.54	4250.000 CAL	

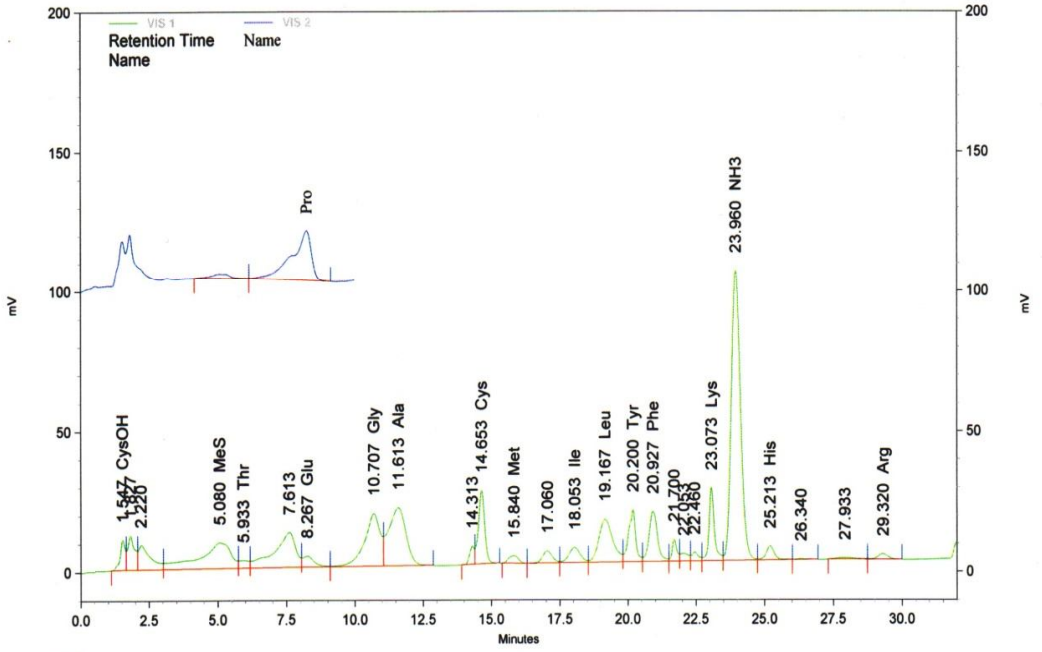
VIS 2 Results

Pk #	RT	Name	Height	Area	%	ESTD Conc	Units
6	8.387	Pro	94025	1584909	5.5	250.000 CAL	nmol/ml
Totals			94025	1584909	5.5	250.000 CAL	

تقرير (2) شكل + جدول: يوضح التحلل المائي للأحماض الامينية لزهرة الخطمي بالقاعدة

Hitachi Amino Acid Analyzer Report

Analyzed: 11/5/2009 3:36:07 PM Reported: 11/5/2009 4:29:16 PM
Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\faleh -1- 5-11-Rep1.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Std-PH operating Method.met
Sample ID: faleh -mb- 5-11
Vial Number: 2 Inj. Volume(uL): 15
Data Description: {Data Description}



VIS 1
Results

Pk #	RT	Name	Height	Area	%	ESTD Conc	Units
1	1.55	CysOH	43326	568132	1.96	104.221	nmol/ml
4	5.08	MeS	37172	3059573	9.35	495.239	nmol/ml
5	5.93	Thr	11519	282684	0.79	42.143	nmol/ml
7	8.27	Glu	15989	491080	6.02	318.734	nmol/ml
8	10.71	Gly	75141	3048540	11.48	607.650	nmol/ml
9	11.61	Ala	82915	3657816	14.65	775.661	nmol/ml
11	14.65	Cys	104632	1688640	5.34	282.567	nmol/ml
12	15.84	Met	10736	274568	0.98	52.207	nmol/ml
14	18.05	Ile	21756	643651	2.39	126.883	nmol/ml
15	19.17	Leu	61003	2211114	8.71	461.086	nmol/ml
16	20.20	Tyr	74202	1338680	3.40	180.422	nmol/ml
17	20.93	Phe	71475	1566202	4.25	225.323	nmol/ml
21	23.07	Lys	104204	1429584	3.07	162.814	nmol/ml
22	23.96	NH3	414246	9738720	40.69	777.602	nmol/ml
23	25.21	His	20058	433895	1.36	72.485	nmol/ml
26	29.32	Arg	8024	204724	0.75	40.172	nmol/ml
Totals			1156398	30637603	89.19	4725.209	

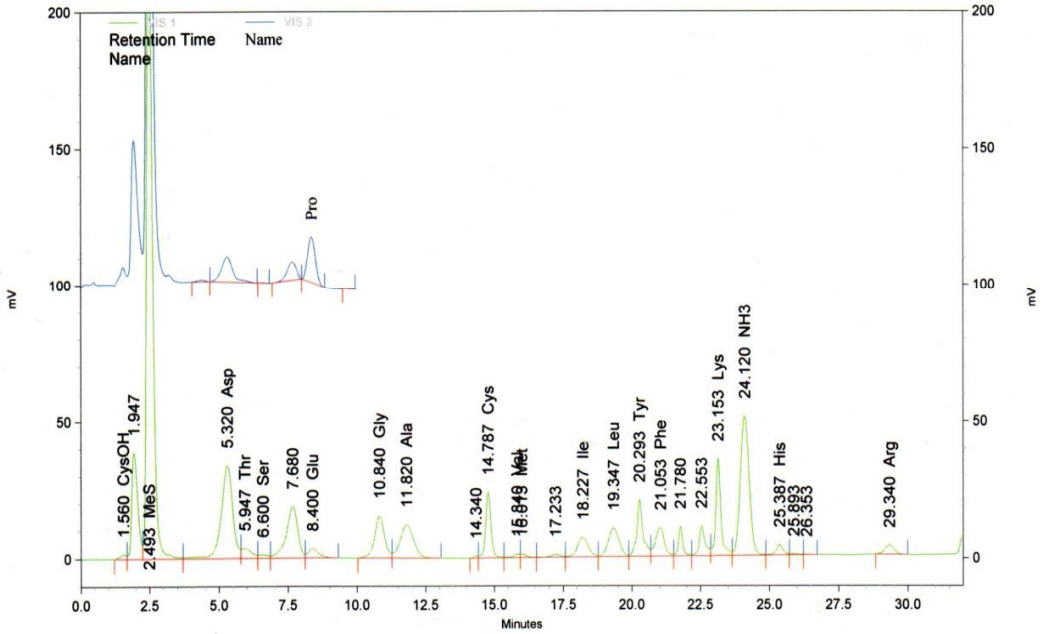
VIS 2
Results

Pk #	RT	Name	Height	Area	%	ESTD Conc	Units
2	8.240	Pro	71580	3587353	10.69	565.861	nmol/
Totals			71580	3587353	10.69	565.861	

تقرير (3) شكل + جدول: يوضح التحلل المائي للأحماض الامينية لزهرة الخطمي بالحامض

Hitachi Amino Acid Analyzer Report

Analyzed: 11/5/2009 9:35:53 AM Reported: 11/5/2009 2:39:39 PM
Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\adib 1 5-11.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Std-PH operating Method.met
Sample ID: adib 1 5-11
Vial Number: 2 Inj. Volume(uL): 15
Data Description: b1 at 1.5min



VIS 1 Results

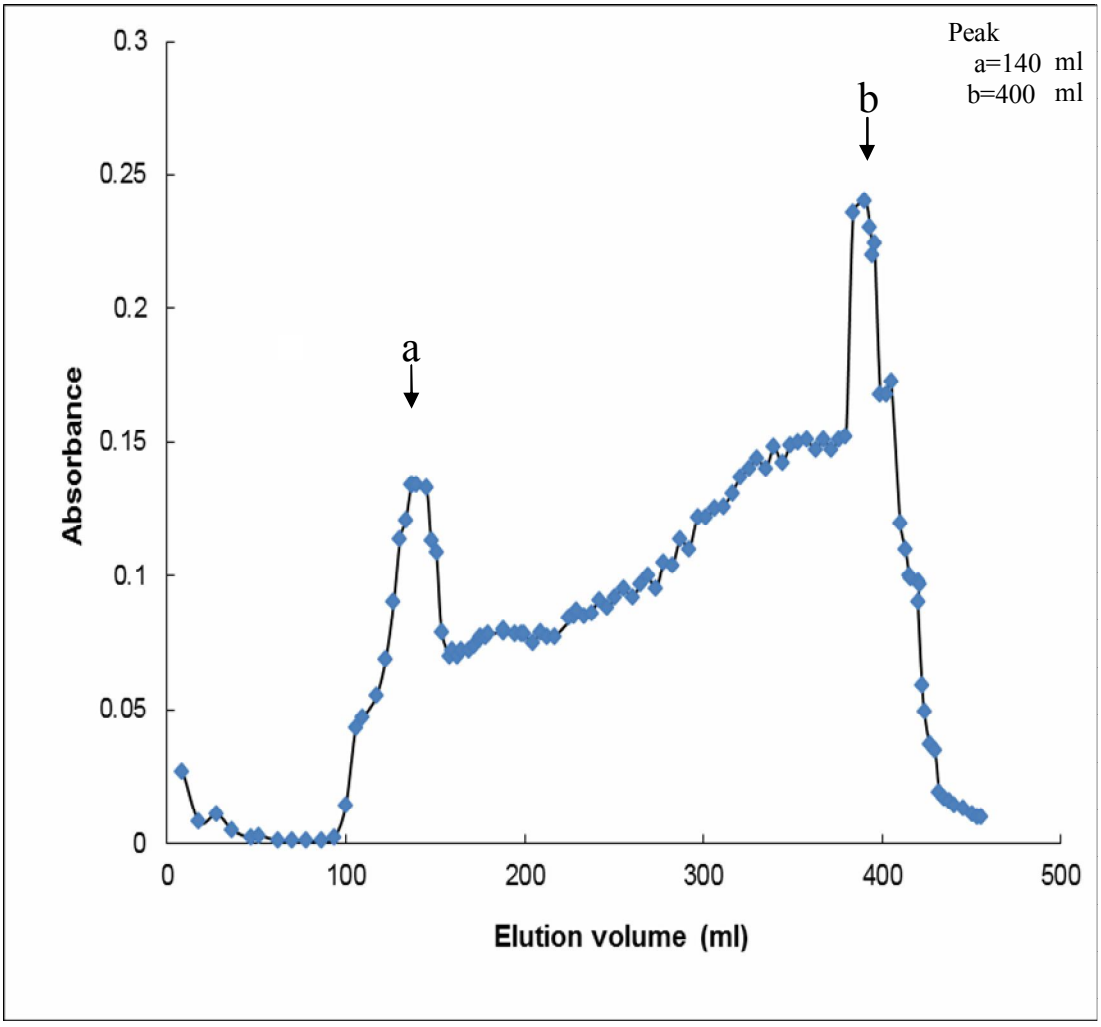
Pk #	RT	Name	Height	Area	%	ESTD Conc	Units
1	1.56	CysOH	6779	99789	0.32	18.306	nmol/ml
3	2.49	MeS	956086	14094874	40.46	2281.474	nmol/ml
4	5.32	Asp	135407	3899116	9.81	553.518	nmol/ml
5	5.95	Thr	14359	369841	0.97	55.136	nmol/ml
6	6.60	Ser	4942	118450	0.3	16.970	nmol/ml
8	8.40	Glu	13438	355452	4.09	230.705	nmol/ml
9	10.84	Gly	60900	1533718	5.42	305.708	nmol/ml
10	11.82	Ala	48278	1661876	6.25	352.410	nmol/ml
12	14.79	Cys	95450	1302440	3.86	217.942	nmol/ml
13	16.01	Met	4877	81339	0.27	15.466	nmol/ml
14	18.23	Ile	28547	786316	2.74	155.006	nmol/ml
16	19.35	Leu	41668	1152299	4.26	240.290	nmol/ml
17	20.29	Tyr	82754	1284459	3.07	173.115	nmol/ml
18	21.05	Phe	41311	941491	2.40	135.448	nmol/ml
19	23.15	Lys	141364	1822878	3.68	207.606	nmol/ml
22	24.12	NH3	203213	4586134	6.49	366.186	nmol/ml
23	25.39	His	14762	261246	0.77	43.643	nmol/ml
24	29.34	Arg	13233	313254	1.09	61.468	nmol/ml
Totals			1912564	34755088	97.37	5430.399	

VIS 2 Results

Pk #	RT	Name	Height	Area	%	ESTD Conc	Units
5	8.367	Pro	66929	1319493	1.09	208.134	nmol/ml
Totals			66929	1319493	1.09	208.13	

الترشيح الهلامي باستخدام الهلام من نوع (Sephadex G-100) للراسب البروتيني الناتج بالترسيب بالاسيتون

أظهرت نتائج الترسيب بالاسيتون البارد للراسب البروتيني بعد إمراره على عمود الفصل ذي الأبعاد (2.5 × 105) سم والحاوي على الهلام (Sephadex G-100) باستخدام الماء المقطر لإزاحة الاجزاء البروتينية الى وجود جزئين بروتينيين (قد يشمل كل جزء مادة واحدة او اكثر) والموضحة في الشكل (3) إذ ان (a و b) تمثل القمم الأولى والثانية والتي حجوم روغانها تساوي (140 و 400) مل على التوالي وبعد الحصول على الأجزاء البروتينية (a و b) قدرت تراكيزها بطريقة العالم لاوري المحورة, ومن ثم تم إيجاد كفاءة الفصل والجدول (3) يبين النتائج التي تم الحصول عليها.



الشكل (3): المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني لزهرة الخطمي (*Marsh Mallow*) بتقنية الترشيح الكروماتوغرافي باستخدام عمود ذي الابعاد (2.5 × 105) سم الحاوي على الهلام (Sephadex G-100), إذ (a و b) تمثل الاجزاء البروتينية المفصولة, حجم كل جزء (7) مل وبسرعة جريان (42) مليلتر/ساعة

جدول (3): يوضح كمية البروتين للراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام لزهرة الخطمي قبل تمريره في عمود الفصل و الأجزاء البروتينية الناتجة من الترشيح الهلامي في عمود الفصل ذي الأبعاد (2.5 × 105) سم والحاوي على الهلام من نوع (Sephadex G-100)

نوع المستخلص	تركيز البروتين (ملغم/ مل)	الحجم الكلي (مل)	كمية البروتين الكلي (ملغم)	النسبة المئوية (%)	كفاءة الفصل (%)
الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام لزهرة الخطمي	3.5	3	10.5	100	
الجزء البروتيني (a) المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.04	102	4.08	38.8	93.6
الجزء البروتيني (b) المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.06	96	5.76	54.8	

لوحظ من الجدول (3) ان استخدام المذيب العضوي الاسيتون البارد بدرجة (4) ْم لمنع عملية المسخ واعتباره مرسب جيد لقابليته على الامتزاج والتطاير في درجات حرارية واطئة، وقد أعطى كفاءة فصل عالية 93.6% (14).

تعين الأوزان الجزيئية

تم إمرار مزيج من المواد المعلومة الوزن الجزيئي تراوحت أوزانها الجزيئية بين (204–2000000) دالتون على عمود الفصل ذي الأبعاد (2.5 × 105) سم والحاوي على الهلام (Sephadex G-100) وذلك لتقدير الأوزان الجزيئية التقريبية للأجزاء البروتينية المفصولة (a و b) (35 و36) وكما مبين في الجدول (4).

الجدول (4): يوضح المواد القياسية المعلومة الوزن الجزيئي وأوزانها الجزيئية وحجوم روغانها التي مررت على عمود الفصل ذي الابعاد (105X 2.5) سم والحاوي على الهلام (Sephadex G-100).

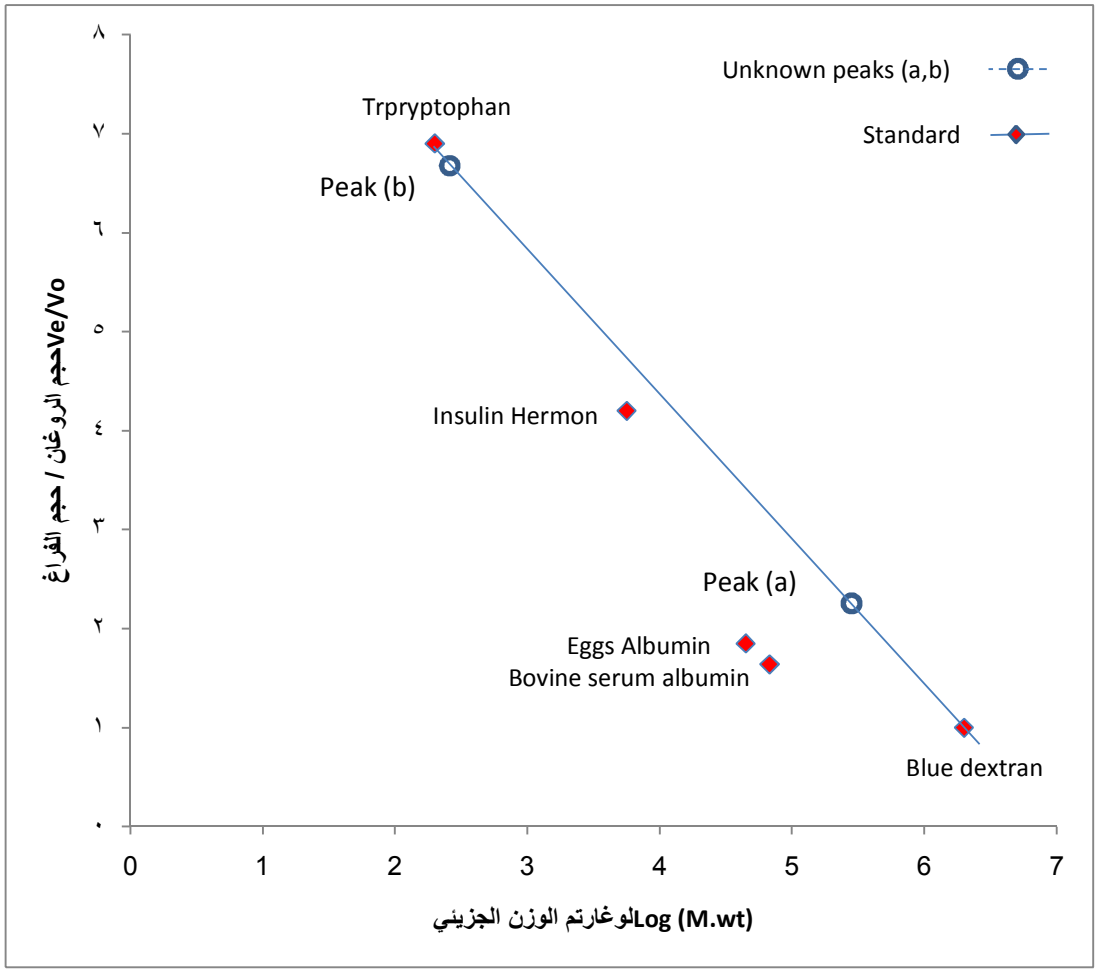
المواد القياسية	الوزن الجزيئي (دالتون)	لوغارتم الوزن الجزيئي	حجم الروغان (مل) (V_e)	حجم الروغان/الحجم الخالي (V_e / V_o)
Blue dextran	2000000	6.30	59. 4	1.00
Bovine serum albumin	67000	4.83	98	1.64
Egg albumin	45000	4.65	110	1.85
Insulin hormone	5750	3.75	250	4.20
Tryptophan	204	2.30	410	6.90

وعند رسم حجوم الروغان (V_e) Elution volume مقسوماً على الحجم الخالي الفارغ من الحبيبات (V_o) Void volume لكل مادة مقابل لوغارتيم الوزن الجزيئي لها نلاحظ ظهور خط مستقيم كما موضح بالشكل (4) والذي من خلاله تم تقدير الاوزان الجزيئية التقريبية للاجزاء

البروتينية (a و b) والمفصولة بوساطة الترشيح الهلامي, وعند اسقاط قيم حجوم الروغان للاجزاء البروتينة المفصولة (a و b) (140 و400) مل على التوالي مقسوما على الحجم الخالي الفارغ من الحبيبات (V_o) المساوي لـ (59.4) مل على منحني العلاقة الخطية بين نسبة حجم الروغان الى الحجم الخالي من الحبيبات (V_e/V_o) للبروتينات القياسية المعلومة الوزن الجزيئي وتحت نفس الظروف شكل (4) تبين بان الأوزان الجزيئية التقريبية للاجزاء البروتينية المفصولة (a و b) لزهرة الخطمي تقع بحدود (281838 و282) دالتون على التوالي. وحسب القانون الآتي :-

الوزن الجزيئي للبروتين = عدد الاحماض الامينية × 120

ويمثل الرقم 120 متوسط الوزن الجزيئي للاحماض الامينية القياسية المستخدمة في التحليل والبالغ عددها 18 حامضا امينيا بدون الحامضين الامينيين التربتوفان (Tryptophan) والفالين (Valine) لذا فان عدد الاحماض الامينية التقريبية للاجزاء البروتينية (a و b) هي (≃2348 و2) على التوالي وعليه يعد الجزء (a) بروتين اما الجزء (b) فهو ببتيد (36 و37).



الشكل (4): المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للأجزاء البروتينية (a و b)

المصادر:

(1) Basch E.; Ulbricht C.; Hammerness P.; Vora M.; Marshmallow (*Althaea officinali* L.) monograph. *J Herb Pharmacother*. 3(3):71-81 (2003).

(2) Buechi S.; Vogelin R.; Von Eiff M.M.; Ramos M.; Melzer J.; Open trial to assess aspect of saftety and efficacy of a combined herbal coungh symp with ivy and thyme. *Forsch Kompleme-ntarmed Klass Naturhelkd.* Dec; 12(6):328-32 (2005).

(3) سعد الدين، شروق محمد كاظم "الاعشاب الطبية" الطبعة الأولى، ص 62، دار الشؤون الثقافية العامة / بغداد، (1986).

(4) Blumenthal M.; Goldbreg A.; Brinckmann J.; *Herbal Medicine: Expanded Commissin E Monographs*. Newton, MA: Ingegrative Medicine Communications: 244-248 (2000).

(5) Franz G.; Polysaccharides in pharmacy. Current applications and future concept. *Planta Med.*; 55:495-497 (1989).

(6) Newall C.; Anderson L.; Phillipson J.; *Herbal Medicines: A Guide for Health-CareProfessionals*. London: Pharmaceutical Press:188 (1996).

(7) Brinker F. "*Herb Contraindications and Drug Interactions*". 2nd Ed. Sandy, OR: Eidetic Medical Publications,99 (1998).

(8) Nosal'ova G.; Strapkov'a A.; Kardosov'a A.; Capek P.; Zathureck'y L.; Bukovsk'a E.; Antitussive aefion of ectraets and polysaccharides of *Maosh Mallou* (*Althea officinalis* L., var. robusta) [German]. *Pharmazie.*47(3): 224-226 (1992)..

(9) Schulz V.; Hansel R.; Tyler V.; *Rational Phytotherapy: "A Physicians' Guide to Herbal Medicin".* 4th Ed. Springer Berlin, 29, 182 (2000).

(10) Sutovska M.; Nosalova G.; Franova S.; Kardosova A.; The antitussive activity of polysaccharides form *Althaea officinalis* l. var. Robusta, *Arctium lappa* L. var Heokules and prunsupersisca L., Batsh. Bratisl Lek Listy,. (2):93-99 (2007).

(11) Tomoda M.; Shimizu N.; Oshima Y.l; Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. *Planta Med;* 53:8-12 (1987).

(12) Blumenthal M.; Busse W.R.; Goldberg A.. The complete commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Boston, MA: Integrative Medicine Commu-nications. 166-7 (1998).

(13) Elmore, D.T. "Peptides and proteins". Cambridge University Press, USA. 1-24 (1968).

(14) Whitaker, J.R. "Principle of Enzymology for the Food Science". 2nd Ed. Uni. California (1972)..

(15) Schactele, G. R. and Pollack, J. K., A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials, Anal. Biochem., 51: 654-655 (1973).

(16) Church, F. C.; H. E., Swais good; D. H. Porte; G.L. Catignani. Spectrophotometric assay using O-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins., J. Dairy Sci., 66: 1219 (1983).

(17) Clark, J. M.; Switzer, R. L.. "Expermintal Biochemistry" 2nd Ed. W.H. Freeman and company, San Francisco., 67 (1977).

(18) Andrews, P. The gel-filtration behavior of proteins related to their Molecular weight over a wide range. J. Biol. Chem., 96(3): 595-606 (1965).

(19) Colawic, S. P.; Kaplan, N. O., "Methods in Enzymology". Acadcmic press New york and London. 6: 819 (1963).

(20) Farmer E.; E. Uchytil; T. F. Helgcson; J. P.; Durbin R. D. Chromatographic, amino acid analysis of protein hyrolysed in polyacrylamide after removal of ammonia., J. chromatogra. 23:115-117 (2006).

(21) Miedel, M. C.; Hulmes, J. D.; Pan, Y. C,. Overview of hydrolysis methods, J. Biochem. Biophys. Methods. 18:37-52 (1989).

(22) Moor, S.; Stain, W. H,. Chromatographic determination of amino acids by use automatic recoding equipment s. p. Colawic; N. O. kaplan, Method in enzymology 6: 819-831 (1963).

(23) Kaiser, F. E.; Gerke, C. W.; Zumalt, R.W.; Kuo, K. C.. Hydrolysis Ion exchange clean up derivatization and quantitation by gas-liquid chromatography ,J. Chromatogr. 94: 113 (1974).

(24) Moor, S.; Stain, W. H., Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids J. Biol. chem. 176: 367-388 (1948).

(25) Soby, L. M.; Johnson, P., Determination of asparagines and glutamine in polypeptides using bis (1,1–trifluoroacetoxy) iodobenzen, Anal. Biochem. 113, 149-153 (1981).

(26) Yano, J., Aso, K.; Tsugita, A.. Further study on gas phase acid hydrolysis of protein: Improvement of recovers for tryptophan, tyrosin and methionine., J. Bio. Chem. 108, 4:579-582 (1990).

(27) West, K.; Carbb, J. W. "In Techniques in Protein Chemistry" (Angeltti, r. H.,ed.) academic press, San Diago CA, 233-242 (1992).

(28) Michael, F. and Hans, W.L. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. J. Chromatogra. 826:109-134 (1998).

(29) Karen A.W.; Jeffrey, D.J.; John, W.C., "ABRF 96: Biomolecular techniques". Amino acid analysis tutorial, Improving the art and practice of amino acid analysis protein chemistry facility, California room, Holiday Inn Golden Gateway, San Francisco, CA (1998).

(30) Todd, T.M.; Marable, N.L. and Kehrberg, N.L., Methionine sulfoxide determination ion after alkaline hydrolysis of amino acid mixtures, Model protein system soy products and infant formulas. J. food sci. 49, 6:1547-1551 (2006).

(31) AoAc. Official method. Complete amino acid profile CAAP 982.30E (a,b,c) chap. 45. 3.05 (2006).

(32) Vauquelin, L.N.; Robiquet. P.J., Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. Applied microbiology and biotechnology 69(1):1-8 (2005)..

(33) Garattini, S. Glutamic acid twenty years later. The J. Nut. 130 (4554ppl). 901S-9S (2000).

(34) Stegink, L.D., The aspartam storg amodel for the clinical testing of a food additive, the American J. Clini. Nut. 46 (suppl): 204-15 (1987).

(35) Skoog, D.A., "Principles of Instrumental Analysis" 6th Ed. Thompson Books/cole Belmont, CA. Chapt. 28 (2006).

(36) Töpel, A., "Chemic und Physic" dr. Milch VEB Fachbuch verag leipzing (1976).

(37) Ezzeddine, S.; Al-Khalidi, U., Ashort note on the molecular weight determination by gel filtration in minutes, Mol. Cell. Biochem. 45:2: 127-128 (1981).