التقدير النوعي والكمي للروتين والكورستين في الكالس الناتج من أجزاء نبات الحنظل *Citrullus colocynthis* L. باستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC

م.م. إسلام ياسر الحمداني
قسم علوم الحياة
كلية التربية / جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث: ٢٠١٣/٢/١٨ ؛ تاريخ قبول النشر: ٢٠١٣/٤/١١

ملخص البحث:

تمكنت الدراسة الحالية من استحداث مزارع كالس نبات الحنظل *Citrullus colocynthis* L. من قطع (الأوراق والسيقان والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية) على وسط MS الصلب المدعم بتراكيز مختلفة من الاوكسينات والسايتوكاينينات وقد بلغت نسبة استحداث الكالس 100% في جميع القطع النباتية المزروعة في وسط MS المزود بـ 1.0 ملغم/لتر BA و0.5 ملغم/لتر NAA لذلك انتخب هذا التركيز كوسط قياسي لغرض استحداث الكالس من نبات الحنظل.

لقد اظهر التقدير النوعي والكمي للمستخلص الكحولي لكالس أوراق نبات الحنظل باستخدام تقانة HPLC احتواءه على أعلى تركيز لمركب الروتين بلغ 40.613% قبل عملية التحلل الحامضي، وكذلك أعلى تركيز لمركب الكورستين بلغ 39.182% في هذا المستخلص بعد إجراء عملية التحلل الحامضي.

الكلمات المفتاحية: نبات الحنظل، زراعة الأنسجة النباتية، كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء، المركبات الفينولية.

Quantitative and Qualitative Determination of Rutin and Quercetine in Callus Resulting from Parts of *Citrullus colocynthis* L. Using the High Performance Liquid Chromatography HPLC

Asst. Lect. Islam Yaser AL-Hamdany
Department of Biology
College of Education / Mosul University

Abstract:

The present study arrived at initiated callus from *Citrullus colocynthis* L. namely from these parts (leaves, stems, cotyledons and hypocotyls)on the

solid MS medium supported with different concentrations of auxins and cytokinins. The originate callus average estimated at 100% in all plant parts under study in the MS medium provided with 1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA. Therefore, this was selected as the best medium to product callus from the plant. The quantitative and qualitative measuring of alcohol extract of callus resulting from *Citrullus colocynthis*L.utilizing the HPLC technique showed that it contains the highest concentration of the Rutin compound. This was amounted to 40.613% before hydrolysis similarly the highest concentration of the quercetine compound was amounted to 39.182% in this extract after the hydrolysis.

Key wordes: *Citrullus colocynthis*, plant tissue culture, high performance liquid chromatography, phenolic compound.

المقدمة:

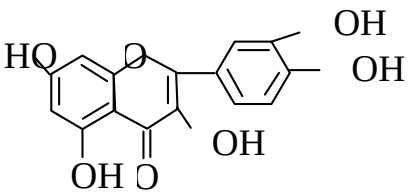
أصبحت تقانات زراعة الأنسجة النباتية من أهم الحقائق العلمية الثابتة في العديد من المسارات البحثية فضلاً عن تطبيقاتها المتعددة (دلالي،1993)، كما ساعدت هذه التقنية على تطور وفهم العديد من العلوم الأخرى كالبايولوجي الجزيئي وعلم الوراثة وعلم الكيمياء الحيوية (Fell,1972) ويطلق على هذه التقانة عدة مصطلحات منها الإكثار الدقيق *Micro propagation* والزراعة خارج الجسم الحي *Invitro* ويقصد بها زراعة أجزاء نباتية صغيرة Explants مثل أجزاء الورقة أو الساق أو الجذور أو الأجنة والمتوك على أوساط غذائية صناعية معقمة وفق ظروف مسيطر عليها من ضوء وحرارة وغيرها (Edwin et.al., 2008) وبإمكان تقانة زراعة الأنسجة النباتية إنتاج نباتات كاملة ومهمة من الناحية الاقتصادية وخالية من الأمراض دون الاعتماد على موسم معين(Hartmann et.al.,2002).

بدأت تقانة زراعة الأنسجة النباتية تلفت أنظار العديد من المؤسسات الدوائية والمختبرات المهتمة بصناعة الأدوية لغرض الحصول على بعض المركبات الكيميائية النباتية الأصل بشكل مباشر أو غير مباشر (Briskin,2000) والتي هي عبارة عن نواتج طبيعية لعمليات الأيض الثانوي داخل جسم النبات والتي يتعذر إنتاجها باستخدام الأحياء المجهرية أو تصنيعها كيميائياً إذ يتم زيادة تركيز هذه المركبات داخل المزارع النسيجية للنبات الطبي من خلال تطبيقات هذه التقانة ودراسة العديد من العوامل المؤثرة في إنتاج هذه المركبات وأصبح بالإمكان تصنيع هذه المركبات الدوائية وعلى نطاق تجاري واسع وبشكل مستمر على مدار السنة مما عزز وطور هذا المجال (Mulabagal & Tsay, 2004) ونبات الحنظل *Citrullus colocynthis* L. الطبي يعود إلى العائلة القرعية Cucurbitaceae ويعرف باسم التفاح المر أو العلقم أو حرارة الصحراء (Najafi et.al.,2010) وهو نبات زاحف معمر وله أوراق كبيرة مجزأة راحية والبذور بيضيه قاتمة والثمرة هي الجزء المستعمل طبياً كروية تشبه ثمرة البطيخ لكنها في حجم البرتقالة (Murugesan & Muthusamy,2011) ينمو برياً في الأماكن الصحراوية الدافئة والحارة في قارتي أسيا

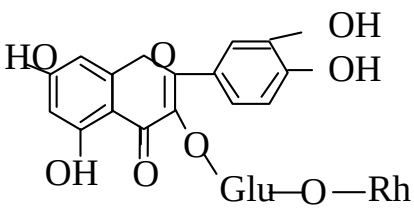
وأفريقيا. ويعد نباتاً طبياً نظراً لاحتوائه على عدة مركبات طبية مثل المركب الدوائي Colocynth والذي يعد ملينا للأمعاء كما انه يحفز عمل الكبد وبشكل شائع يكثر استخدامه كمضاد للأورام السرطانية وتستخدم ثمرة النبات في معالجة أمراض المثانة والبول السكري diabetes واليرقان jaundice (Savitha et.al.,2010) كما أن أوراق النبات تحتوي على مركبات مضادة للالتهابات كما تستخدم كمخدر موضعي ويعد مستخلص هذا النبات طارداً لديدان الأمعاء ومفيداً في علاج الحمى والروماتيزم ويستخدم أحياناً كمبيد حشري (Gurudeeban et.al.,2011) ويحتوي نبات الحنظل على مركبات الفلافونويدات وأهمها الروتين و الكورستين والتي تعد من المضادات الحيوية الطبيعية ومضادات للحساسية وتعمل على تنظيم سير مجرى الدم (Kosanovic et.al.,2011).

تصنف الفلافونويدات إلى عدة مجاميع منها مجموعة Flavonal التي يعود إليها مركب الكورستين الذي يوجد على شكل كلايكون لمركب (روتين كلايكوسيد) وهو المركب الثاني ضمن مجموعة Flavonal الذي هو عبارة عن كلايكوسيد الكورستين ويسمى (Vit-P) (Lim et.al.,2006) ويطلق على مركب الروتين عدة تسميات منها quercetin-3-0-rutinoside و rutoside و shophorin وهو يعالج الكثير من حالات النزيف الناتجة عن تمزق الشعيرات الدموية ويساهم في التقليل من هشاشة العظام عن طريق تحفيزه لتكوين الكولاجين داخل مادة العظم (Wang et.al.,2011).

أما الكورستين فيوجد بشكل واسع في الفاكهة وا لخضار وله تأثيرات حيوية فعالة داخل جسم النبات ويعد من المركبات التي يكون أيضها سهلاً داخل الأحشاء خاصة في الكبد من أسمائه الشائعة Sophretin و Meletin و Citrus- bioflavonoids (Zheng et.al.,2005). وفيما يأتي الصيغة التركيبية لهذين المركبين:



Quercetin



Rutin

(Wang et.al,2011 ; Kosanovic et.al,2011)

الهدف من هذا البحث:

التعرف على قابلية أجزاء نبات الحنظل للاستجابة لنظام الزراعة النسيجية كذلك التعرف على بعض المركبات الفينولية ذات الأهمية الطبية داخل هذا النبات بتقانة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC.

مواد العمل وطرائقه:

إعداد جهاز النقل ذي الجو المعقم:

تشغل كابينة الزرع لمدة نصف ساعة قبل البدء بالعمل مع مسح الجهاز سطحياً بقطعة من الشاش باستخدام الايثانول 70% لضمان كفاءة التعقيم، وتهيئة اللهب لتعريض المشارط أو الملاقط وفوهات الدوارق والأنابيب المستخدمة في الزرع والمعقمة مسبقاً له. وتمت جميع مراحل العمل ابتداء من تعقيم البذور وزراعتها ومن ثم زراعة الأجزاء النباتية المتكونة من النباتات السليمة ونقل الكالس المستحدث وإدامته تحت ظروف معقمة. اجري البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية/ قسم علوم الحياة / كلية التربية.

مصدر بذور الحنظل:

تم الحصول على بذور نبات الحنظل. *Citrullus colocynthis* L من السوق المحلية لمحافظة نينوى وقد صنفت من قبل الأستاذ طلال طه مدير قسم النباتات الطبية في دائرة مشروع تطوير النباتات الطبية واختبرت نسبة الإنبات لهذه البذور.

تحضير الوسط الغذائي وتعقيمه:ـ

حضر وسط MS (Murashige & Skoog,1962) الصلب مختبريا وذلك بإذابة جميع المواد الداخلة في تركيبه في حجم مناسب من الماء المقطر وأضيف إليه الاكار بمقدار 8 غم/لتر والسكروز 30 غم/لتر، ثم وضع على الجهاز الحراري الدوار Magnatic Stirrer Hot Plate لضمان تحريك الوسط وغليانه بعدها برد قليلاً وقيست الدالة الهيدروجينية بجهاز pH-meter بحدود (5.8–6). وزع الوسط في قناني حجمية سعة 100 مل بمقدار 25–50 مل. وغطيت الفوهات بقطع من رقائق الألمنيوم ثم وضعت في جهاز المؤصدة Autoclave لغرض التعقيم وبدرجة حرارة 121مْ وضغط 1 جو لمدة 20 دقيقة.

التعقيم السطحي لبذور نبات الحنظل:ـ

عقمت بذور نبات الحنظل .*Citrullus colocynthis* L سطحياً بعد أن تم نقعها لمدة 3ساعات على الأقل وتقشيرها باستخدام محلول من هايبوكلورايت الصوديوم (القاصر التجاري) مع الماء المقطر كالأتي:–

معقم : ماء (حجم): (حجم)	مدة التعقيم (دقيقة)
2:1	5
2:1	10
1:1	5
1:1	10

بعدها غسلت البذور جيداً بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة 5 دقائق / مرة لإزالة آثار محلول التعقيم ثم جففت البذور بوساطة أوراق الترشيح المعقمة. ثم زرعت على وسط MS الخالي من منظمات النمو MSO بمعدل 30 بذرة لكل معاملة.

استحداث مزارع الكالس من الأجزاء النباتية:ـ

أخذت قطع الأجزاء النباتية (الأوراق والسيقان والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية) من البادرات السليمة بعمر 20 يوماً وزرعت على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من منظمات النمو (الاوكسينات والسايتوكاينينات) وهي:

منظمات النمو (ملغم/لتر)	
* 2,4-D	BA
0.0	0.0
1.0	1.5
1.0	2.0
1.0	2.5
* NAA	BA
0.0	0.0
0.5	1.0
0.5	2.0

*التراكيز المتقابلة/معاملة

منظم النمو (ملغم / لتر) *2,4-D
0.0
1.0
2.0
2.5
3.0
3.5

*كل معاملة لوحدها.

التقدير النوعي والكمي لبعض المركبات الفينولية باستخدام تقانة HPLC.

تحضير المستخلصات الكحولية قبل التحلل الحامضي:

تم الحصول على مستخلصات كالس الأوراق والسيقان والأوراق الفلقية والسيقان تحت الفلقية لنبات الحنظل *Citrullus colocynthis* L. إذ تم سحق الكالس المنقوع في الايثانول 96% بجهاز Mechanical Stirror لمدة 24 ساعة لغرض تمزيق جدران الخلايا والحصول على محتوياتها بعد ذلك رشح الكالس بقمع بخنر لغرض الحصول على الراشح الذي يتم تركيزه بجهاز المبخر الدوار (RVE) ثم تؤخذ بعد ذلك هذه المستخلصات الكحولية لغرض حقنها في جهاز HPLC لأجل تقدير مركب الروتين فيها (Kosanovic et al., 2011).

التحلل الحامضي للمستخلصات الكحولية:

تجرى عملية التحلل الحامضي Acid Hydrolysis على المستخلصات أعلاه لغرض كسر الأواصر وفصل الكاربوهيدرات عن الكلايكوسيدات فنحصل فقط على المركبات الفينولية الحرة.اخذ 5 مل من المستخلص الكحولي الخام وإضافة 20 مل من HCl (1N) له وإبقائه في

حمام مائي ليغلي لمدة نصف ساعة، ثم يبرد المحلول ويضاف له 30 مل من خلات الاثيل وعلى مرحلتين ليفصل بوساطة قمع الفصل إذ تؤخذ طبقة خلات الاثيل العليا مرتين لغرض تقدير الكورستين فيها، وتحفظ في الثلاجة لحين إجراء التحليل بوساطة جهاز HPLC (Harborne, 1973).

تم قياس العينات في شركة الحكماء لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية/ نينوى باستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC من نوع Shimadzo موديل Manual injection 20ALCوقد فحصت العينات بعد تنقيتها بمرشحات غشائية قطر (0.1$_{\mu}$M) وبالطول الموجي 260 نانوميتر وسرعة جريان 1 مل /دقيقة وطور متحرك Acetonitrile 85% + H_2O 15%، وباستخدام العمود C18 وبأبعاد 4.60×240 ملم. ظروف الفصل لكروماتوغرافيا السائل عالي الأداءHPLC للمواد الفلافينويدية في مستخلصات كالس نبات الحنظل *C. colocynthis* L.

ت	مفردات ظروف الفصل	مواصفات ظروف الفصل
1	عمود الفصل	C18(4.60×240 ملم)
2	الطور المتحرك	85٪ اسيتونايتريل +15٪ماء
3	سرعة جريان الطور المتحرك	1 مل/دقيقة
4	حجم الخلية	2 مل
5	نوع الكاشف	UV-Vis
6	درجة حرارة الفصل	40 مْ

المركبات القياسية للمواد الفينولية المستخدمة في الدراسة:

استخدم المركبين القياسيين الروتين و الكورستين في هذه الدراسة وكان مصدرهم(كلية العلوم/ قسم الكيمياء/ جامعة الموصل وهي من منتجات شركة فلوكا السويسرية فضلاً عن شركة BDH).

النتائج والمناقشة:

كفاءة التعقيم السطحي للبذور:

أظهرت نتائج (الجدول1) إمكانية إنتاج بادرات سليمة بنسبة 100% من بذور نبات الحنظل *Citrullus colocynthis* L. (الشكل1) عند استخدام مادة هايبوكلورايت الصوديوم بتركيز 1حجم معقم:1 حجم ماء مقطر ولمدة 10 دقائق لذلك تم اختيار هذا التركيز كأفضل تركيز في تكوين بادرات نبات الحنظل واعتمد في هذا البحث. بعد أن تكونت البادرات السليمة وأصبحت بعمر 20 يوماً أصبحت مصدراً للحصول على أجزاء نبات الحنظل لغرض استحداث كالسها ويعد تعقيم الجزء النباتي المستخدم واختيار نوع وتركيز ملائم من المعقمات أساساً يعتمد عليه في زراعة

الأنسجة النباتية (محمد وعمر، 1990) وهذه النتائج توافقت مع دراسة (Mahmoud وجماعته، 2008) على نبات الرقي احد نباتات العائلة القرعية.

الجدول1: كفاءة تعقيم بذور نبات الحنظل *C. colocynthis* L. في محلول هايبركلورايت الصوديوم.

محلول التعقيم		مدة التعقيم	كفاءة التعقيم
المعقم (حجم)	الماء (حجم)	(دقيقة)	(٪)
1	2	5	45
1	2	10	65
1	1	5	88
1	1	10	100

الشكل1: بادرة نبات الحنظل *C. colocynthis* L. بعمر 20 يوماً

تبين أن استجابة نبات الحنظل كانت متميزة لظروف الزراعة النسيجية من حيث استحداث الأجزاء النباتية المختلفة لبادراته والحصول على مزارع الكالس، إذ لوحظ من خلال نتائج (الجدول2) أن تداخلات السايتوكاينين BA مع الاوكسين NAA أعطت نتائج جيدة لاستحداث الكالس بنسبة 100% ولجميع الأجزاء المدروسة (الشكل2) خاصة باستخدام وسط MS المزود بـ 1.0 ملغم/لتر BA مع 0.5 ملغم/لتر NAA وبفترات زمنية تتراوح بين 5–12 يوماً لبدء الاستحداث وربما يعود السبب وراء تفوق استخدام هذا التداخل إلى التوافق بين المحتوى الداخلي من الهرمونات النباتية مع المضاف من منظمات النمو (سلمان،1988)، إذ تعد منظمات النمو من المكونات الحرجة للأوساط الغذائية التي لها تأثير مباشر على نمو وتضاعف الجزء النباتي

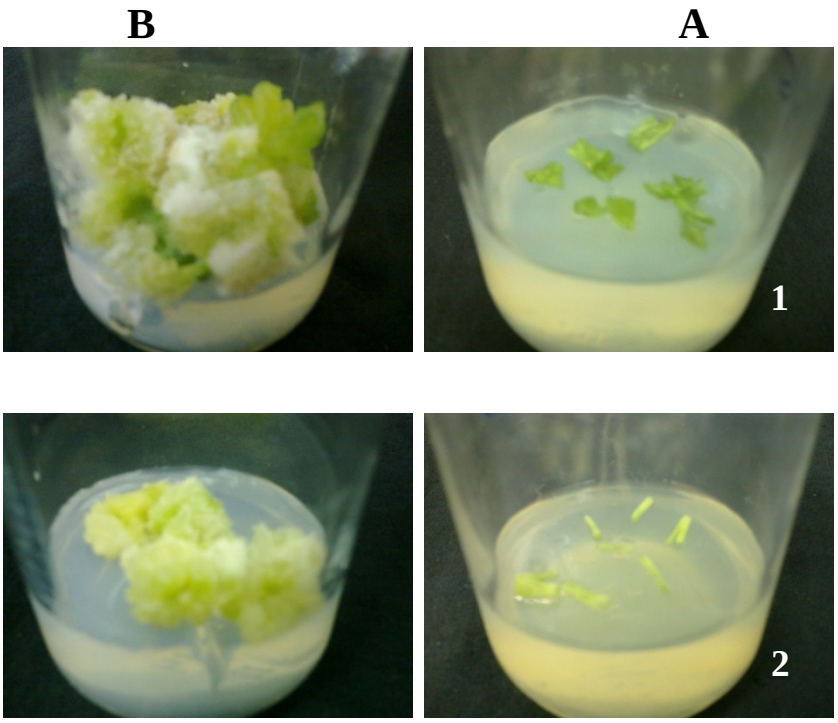
المزروع (Chand & Roy, 1980)، عُدّ هذا الوسط وسطاً زرعيا منتخباً لاستحداث كالس نبـــات الحنظل في هذه الدراسة.

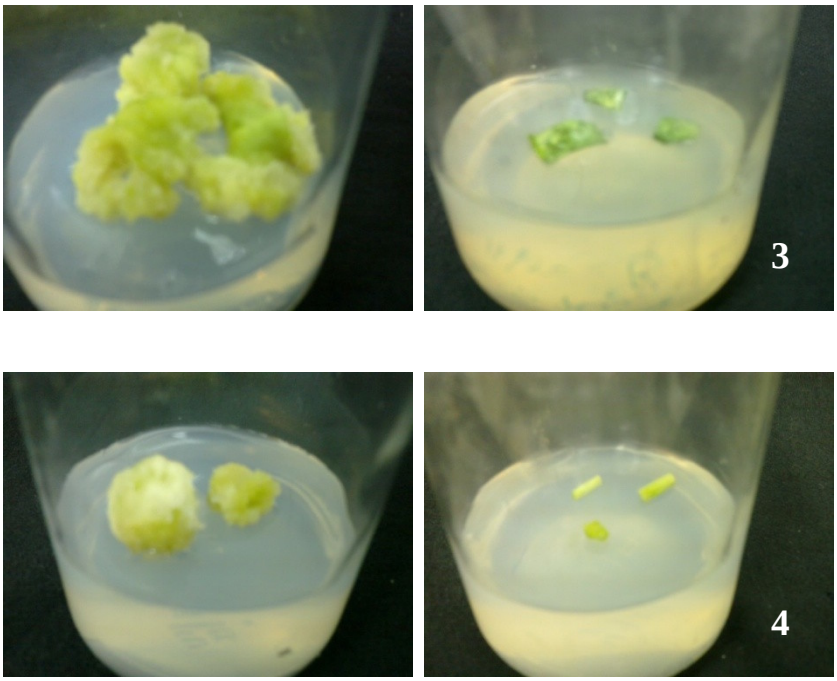
الجدول2: استجابة الأجزاء المختلفة من نبات الحنظل *C.colocynthis* L. لاستحداث الكالس في وسط MS الحاوي على تداخلات BA مع NAA.

الوسط الغذائي MS ملغم/لتر		الأوراق			السيقان			الأوراق الفلقية			السيقان تحت الفلقية		
BA	NAA	نسبة الاستحداث ٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث ٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث ٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث ٪	بدء يوم	اكتمال يوم
1.0	0.5	100	12	30	100	12	17	100	9	30	100	5	24
2.0	0.5	-	-	-	100	8	27	-	-	-	80	8	32

– عدم حصول استجابة

مع ملاحظة أن زيادة BA إلى 2.0 ملغم/لتر أخفقت في استحداث كـــالس الأوراق والأوراق الفلقية وربما يعود سبب ذلك إلى أن زيادة تركيز منظم النمو عن الحد الأقصى له يثبط النمو بـــدلاً من تحفيزه وهذا ما أشار إليه (Raven et.al., 1986).





الشكل 2 : **كالس الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الحنظل** .*C.colocynthis* L **في الوسط المنتخب**.

A– الأجزاء النباتية المختلفة بعمر20يوما B– كالس الأجزاء النباتية المختلفة بعمر30يوما

A–1 الأوراق. B–1 كالس الأوراق.

A–2 السيقان. B–2 كالس السيقان.

A–3 الأوراق الفلقية. B–3 كالس الأوراق الفلقية.

A–4 السيقان تحت الفلقية. B–4 كالس السيقان تحت الفلقية.

لم تكن تداخلات BA مع 2,4-D ملائمة لاستحداث الكالس بعد استبدال NAA بـ 2,4-D (الجدول3) ربما يعود السبب في ذلك إلى قابلية الخلايا على امتصاص NAA بشكل أفضل مقارنة بالاوكسينات الأخرى أو ربما يعود السبب إلى طول مدة فعاليةNAA داخل الخلية عكس بقية الاوكسينات الأخرى إذ إن بعض الاوكسينات لها قابلية على الأكسدة الضوئية في وسط الزراعة وهذا ما أشار إليه (Hartmann وجماعته، 2002). إذ لوحظ أن أعلى نسبة استحداث كانت 77% لكالس السيقان وخلال 18 يوماً تلاه كالس الأوراق الفلقية 66% وخلال 23 يوماً في الوسط MS المدعم بـ2.0 ملغم/لتر BA مع 1.0 ملغم/لتر 2,4-D.

الجدول3: **استجابة الأجزاء المختلفة من نبات الحنظل** .*C.colocynthis* L **لاستحداث الكالس في وسط** MS **الحاوي على تداخلات** BA **مع** 2,4-D

الوسط الغذائي MS ملغم/لتر		الأوراق			السيقان			الأوراق الفلقية			السيقان تحت الفلقية		
BA	2,4-D	نسبة الاستحداث ٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث ٪	بدء يوم	اكتمال يوم

-	-	-	20	18	56	30	23	30	-	-	-	1.0	1.5
30	25	40	27	23	66	25	18	77	25	20	55	1.0	2.0
24	21	66	32	26	45	25	20	56	30	22	50	1.0	2.5

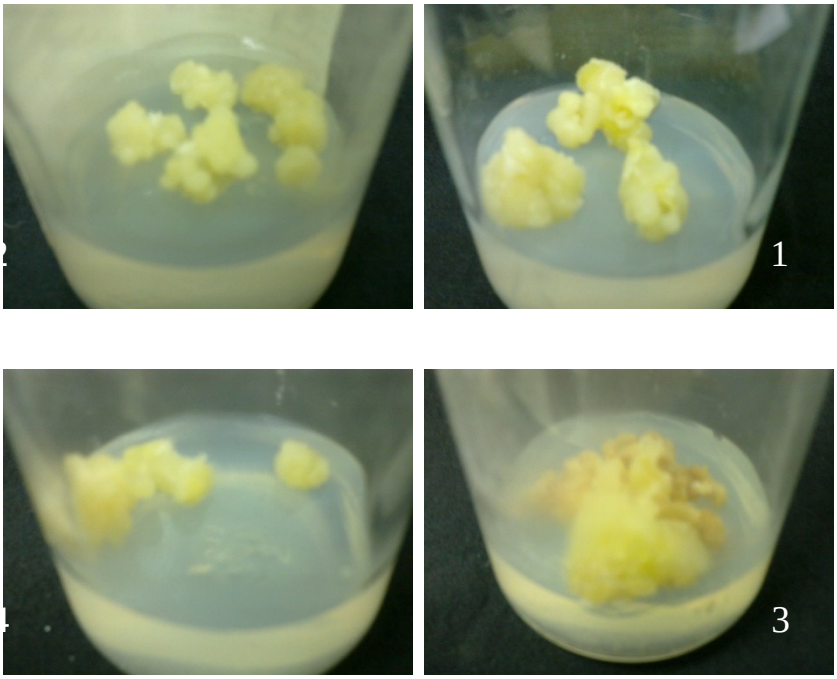
-عدم حصول استجابة

لوحظ أن وسط MS المزود بـ 2.5 ملغم/لتر 2,4-D لوحده أعطى نسب استحداث جيدة (الجدول4) وكان الأفضل بين التراكيز المستخدمة لهذا الاوكسين، إذ سجل هذا الوسط أعلى نسبة استحداث بلغت 100% لكالس الأوراق وخلال مدة أسبوعين فقط تلاها كالس السيقان بنسبة 88% وخلال أسبوع فقط من بدء زراعة الجزء النباتي فضلاً عن كالس السيقان تحت الفلقية وبنسبة 83% أيضاً خلال أسبوع تقريباً لكن اخفق الوسط في استحداث كالس الأوراق الفلقية إذ بلغت نسبة الاستحداث 14% فقط (الشكل3) لذلك لم يتم اختياره كوسط منتخب ثاني وفضل الوسط المنتخب الأول لكونه حقق نسب استحداث عالية ولجميع الأجزاء. وهذا يتفق مع ماتوصلت إليه دراسة (Sultana et al., 2004) في هذا المجال على نبات الرقي *Citrullus lanatus* ضمن العائلة القرعية، وربما يعود سبب التباين في استحداث الكالس من أجزاء نبات الحنظل المختلفة إلى نوع القطعة النباتية ومصدرها والطاقة الكامنة Totipotency في خلايا الأجزاء النباتية والاختلاف في أعداد الخلايا القادرة على الانقسام في هذه الأجزاء (Jimenez, 2001; Acquaah, 2004)،فضلاً عن المحتوى الداخلي للهرمونات النباتية،كما لوحظ من خلال (الجدول 4) أن زيادة تركيز 2,4-D إلى 3.5 ملغم/لتر شجعت قطع السيقان على استحداث الكالس بنسبة 100% فضلاً عن قطع الأوراق الفلقية وبنسبة 83% على الوسط نفسه.

الجدول4: استجابة الأجزاء المختلفة من نبات الحنظل *C.colocynthis* L. لاستحداث الكالس في وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من 2,4-D

الوسط الغذائي MS ملغم/لتر	الأوراق			السيقان			الأوراق الفلقية			السيقان تحت الفلقية		
2,4-D	نسبة الاستحداث٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث٪	بدء يوم	اكتمال يوم	نسبة الاستحداث ٪	بدء يوم	اكتمال يوم
1.0	66	14	24	84	9	29	80	15	23	28	17	18
2.0	-	-	-	85	14	24	-	-	-	100	5	30
2.5	100	14	21	88	7	14	14	9	22	83	8	27
3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.5	-	-	-	100	16	22	83	13	22	50	19	30

-عدم حصول استجابة



الشكل3 :**كالس الأجزاء النباتية المختلفة على وسط** MS **المزود بـ** 2.5 **ملغم/لتر**2,4-D

1 - كالس الأوراق.

2 – كالس السيقان.

3 – كالس الأوراق الفلقية.

4 - كالس السيقان تحت الفلقية.

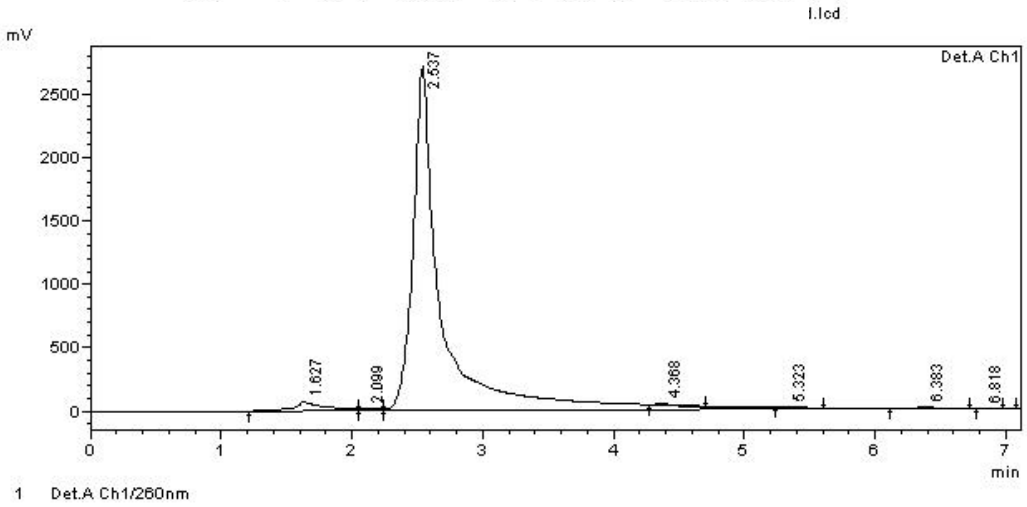
التقدير النوعي و الكمي للمركبات الفينولية:

المنحنيات القياسية لمركبي الروتين والكورستين:

لوحظ من خلال نتائج (الجدول5) أن النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني للمركب القياسي الروتين بلغت 96.286 وخلال زمن احتجاز بلغ 2.537 دقيقة في حين كانت النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني للمركب القياسي الكورستين 36.701 وخلال زمن احتجاز بلغ 3.124 دقيقة(الشكل 4-5)،وقد وجد Nuengchamnong وآخرون سنة2004 إن أفضل طريقة لتشخيص هذه المركبات الفلافينويدية وأسرعها يتم عن طريق كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC.

الجدول5: **النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني وزمن الاحتجاز القياسي لمركبي الروتين والكورستين حسب ظهورهما باستخدام تقانة** HPLC.

المركبات الفينولية القياسية	النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني	زمن الاحتجاز القياسي
الروتين	96.286	2.537
الكورستين	36.701	3.124

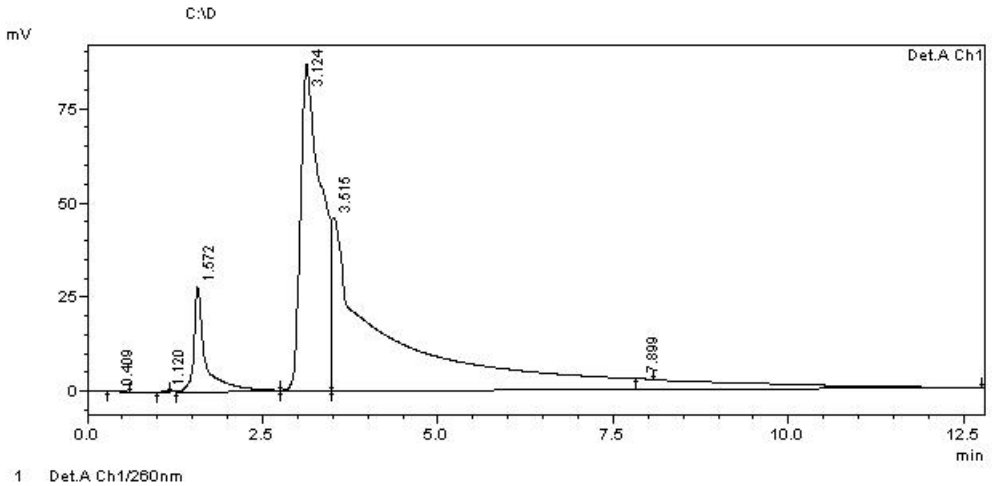


PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.627	1219048	71066	2.741	2.514
2	2.099	228838	22230	0.515	0.787
3	2.537	42816558	2714781	96.286	96.056
4	4.368	53740	5377	0.121	0.190
5	5.323	18072	2187	0.041	0.077
6	6.383	129554	10285	0.291	0.364
7	6.818	2354	326	0.005	0.012
Total		44468163	2826252	100.000	100.000

الشكل 4: المخطط الكروماتوغرافي القياسي لمركب الروتين.



PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.409	2030	273	0.041	0.169
2	1.120	1075	191	0.022	0.119
3	1.572	330937	27774	6.683	17.223
4	3.124	1817386	86833	36.701	53.846
5	3.515	2799310	46013	56.530	28.533
6	7.899	1178	177	0.024	0.109
Total		4951916	161261	100.000	100.000

الشكل5: المخطط الكروماتوغرافي القياسي لمركب الكورستين.

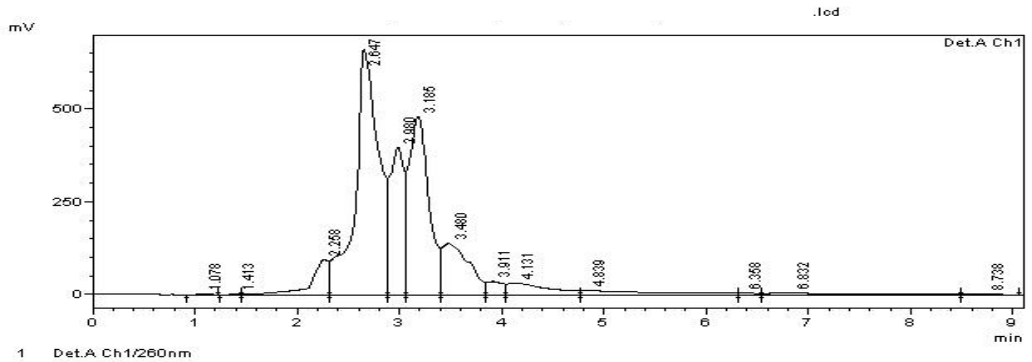
تقدير المركبات الفينولية في كالس نبات الحنظل .*C.colocynthis* L:

تقديرمركب الروتين قبل التحلل الحامضي:

وجد من خلال نتائج (الجدول6) و(الاشكال6-7-8-9) أن أعلى تركيز لمركب الروتين وجد في المستخلص الكحولي لكالس أوراق الحنظل قياسياً لبقية المستخلصات الكحولية للعينات الأخرى، إذ بلغت النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني 40.613 وخلال زمن احتجاز بلغ 2.647 دقيقة كما كان تركيز هذا المركب عالياً أيضاً في المستخلص الكحولي لكالس السيقان بلغ 37.076 وخلال زمن احتجاز 2.635 أما في مستخلص كالس الأوراق الفلقية فقد كان تركيز المركب 25.345 % في حين أن اقل تركيز لهذا المركب قد ظهر في ا لمستخلص الكحولي لكالس السيقان تحت الفلقية19.149% وخلال زمن قدره 3.183 دقيقة وهذا يتفق مع دراسة Vrchotova وجماعته سنة2010 إذ أكدت الدراسة وجود تراكيز مختلفة من هذه المركبات الفلافينويدية من عضو نباتي إلى أخر في نفس النبات الحاوي على هذه المركبات وربما يعود سبب ذلك إلى تأثير عمليات الزراعة النسيجية على ذلك الجزء النباتي خاصة تراكيز منظمات النمو المستخدمة في وسط الزراعة(Larkin & Scowcroft,1998).

الجدول6: النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني وزمن الاحتجاز للروتين والكورستين في مستخلصات كالس نبات الحنظل .*C.colocynthis* L **قبل التحلل الحامضي.**

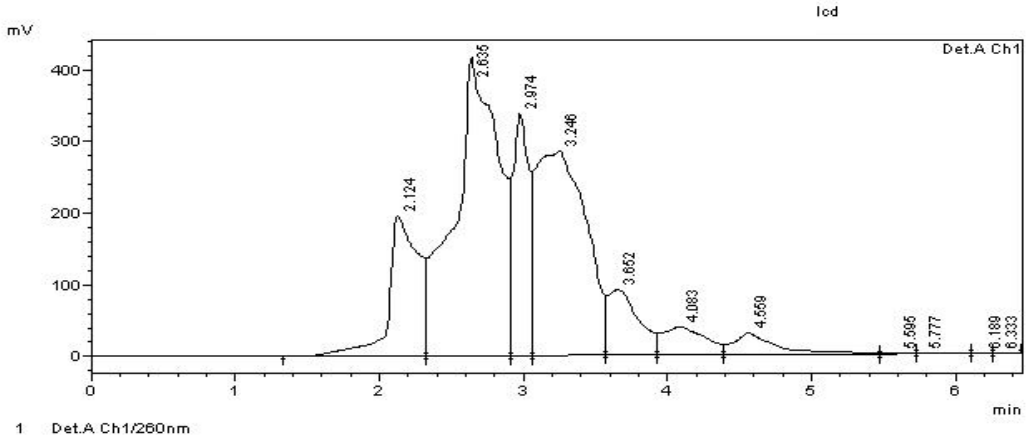
العينة (مستخلص كحولي)	النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني		زمن الاحتجاز	
	الروتين	الكورستين	الروتين	الكورستين
كالس الأوراق	40.613	24.699	2.647	3.185
كالس السيقان	37.076	28.682	2.635	3.246
كالس الأوراق الفلقية	25.345	11.817	2.587	3.147
كالس السيقان تحت الفلقية	19.149	12.357	3.183	3.471



Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.078	3779	666	0.014	0.036
2	1.413	2852	497	0.011	0.027
3	2.258	1069791	93264	4.029	5.033
4	2.647	10782456	660518	40.613	35.643
5	2.980	3579907	396744	13.484	21.409
6	3.185	6557356	478637	24.699	25.829
7	3.480	2489915	137749	9.378	7.433
8	3.911	373705	35202	1.408	1.900
9	4.131	862766	30405	3.250	1.641
10	4.839	580787	11427	2.188	0.617
11	6.358	45503	3465	0.171	0.187
12	6.832	190827	3816	0.719	0.206
13	8.738	9682	738	0.036	0.040
Total		26549328	1853128	100.000	100.000

الشكل6: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الروتين في المستخلص الكحولي لكالس الأوراق.

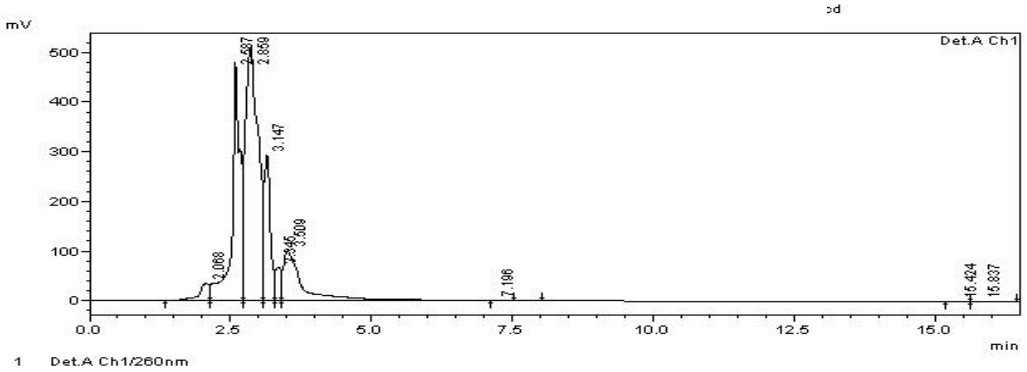


PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.124	2853182	195657	11.834	13.975
2	2.635	8938816	416403	37.076	29.742
3	2.974	2591732	336736	10.750	24.052
4	3.246	6915119	285486	28.682	20.391
5	3.652	1324662	91521	5.494	6.537
6	4.083	803008	39485	3.331	2.820
7	4.559	625391	29892	2.594	2.135
8	5.595	25244	1890	0.105	0.135
9	5.777	22924	1414	0.095	0.101
10	6.189	4854	835	0.020	0.060
11	6.333	4778	712	0.020	0.051
Total		24109711	1400031	100.000	100.000

الشكل7: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الروتين في المستخلص الكحولي لكالس السيقان.

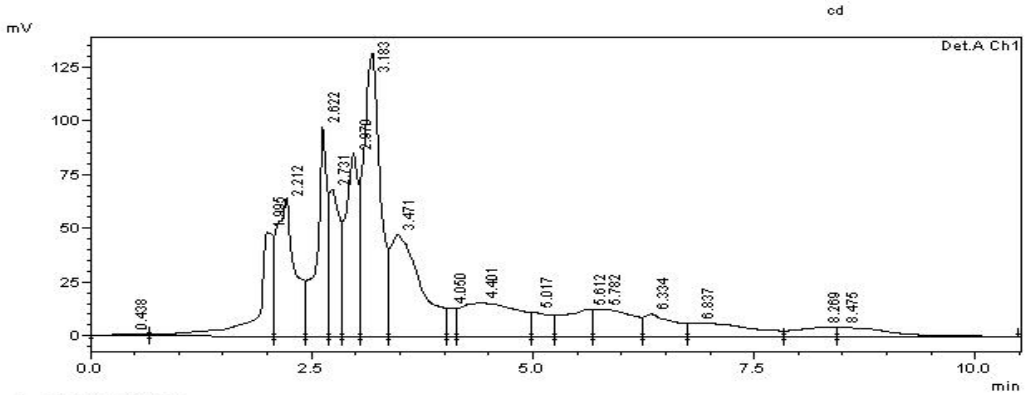


PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.068	469674	35186	2.496	2.367
2	2.587	4768201	480307	25.345	32.313
3	2.859	8295724	509322	44.094	34.265
4	3.147	2223219	292437	11.817	19.674
5	3.345	482442	67066	2.564	4.512
6	3.509	2569360	101769	13.657	6.847
7	7.196	1543	170	0.008	0.011
8	15.424	1091	65	0.006	0.004
9	15.837	2282	105	0.012	0.007
Total		18813537	1486428	100.000	100.000

الشكل8: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الروتين في المستخلص الكحولي لكالس الأوراق الفلقية.



PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.438	22949	793	0.254	0.125
2	1.995	576916	48472	6.397	7.664
3	2.212	926254	64157	10.270	10.144
4	2.622	819866	97273	9.091	15.380
5	2.731	551104	68134	6.111	10.773
6	2.970	809504	84947	8.976	13.431
7	3.183	1727044	131279	19.149	20.757
8	3.471	1114489	47183	12.357	7.460
9	4.050	92137	13280	1.022	2.100
10	4.401	702584	15819	7.790	2.501
11	5.017	164492	11005	1.824	1.740
12	5.612	279699	12643	3.101	1.999
13	5.782	376283	12670	4.172	2.003
14	6.334	244160	10370	2.707	1.640
15	6.837	302616	6262	3.355	0.990
16	8.269	129551	4137	1.436	0.654
17	8.475	179103	4031	1.986	0.637
Total		9018750	632455	100.000	100.000

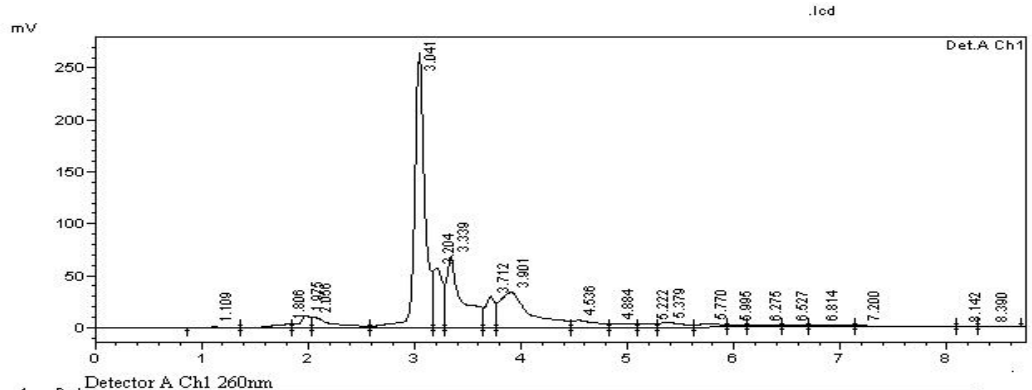
الشكل9: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الروتين في المستخلص الكحولي لكالس السيقان تحت الفلقية.

تقديرمركب الكورستين بعد التحلل الحامضي:

تبين أن أعلى تركيز لمركب الكورستين ظهر في مستخلص كالس الأوراق بعد إجراء عملية التحلل الحامضي إذ كانت النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني 39.182 وخلال زمن احتجاز قدره 3.041 دقيقة (الجدول7) تلاه مستخلص كالس الأوراق الفلقية إذ بلغت النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني 33.279 وخلال زمن احتجاز 3.022 دقيقة وكان اقل تركيز للمركب قد ظهر في مستخلص كالس السيقان تحت الفلقية إذ ظهرت المساحة تحت المنحني بمقدار 25.518 وخلال زمن احتجاز 3.171 دقيقة (الأشكال 10–11–12–13)،وقد وجد Phani وآخرون سنة 2010 إن محتوى اغلب النباتات الطبية من مركب الكورستين يتراوح بين 21.1 % إلى98.6 % عند تشخيصه كميا بجهازHPLC وهذا يفسر سبب بقاء نبات الحنظل لأطول فترة ممكنة دون تعفنه أو إصابته بالبكتريا والأمراض النباتية نظراً لاحتوائه على تراكيز عالية من مركبات الروتين و الكورستين والتي تعد أقوى مضادات الأكسدة والبكتريا و الفطريات (Vrchotova et.al,2010) .

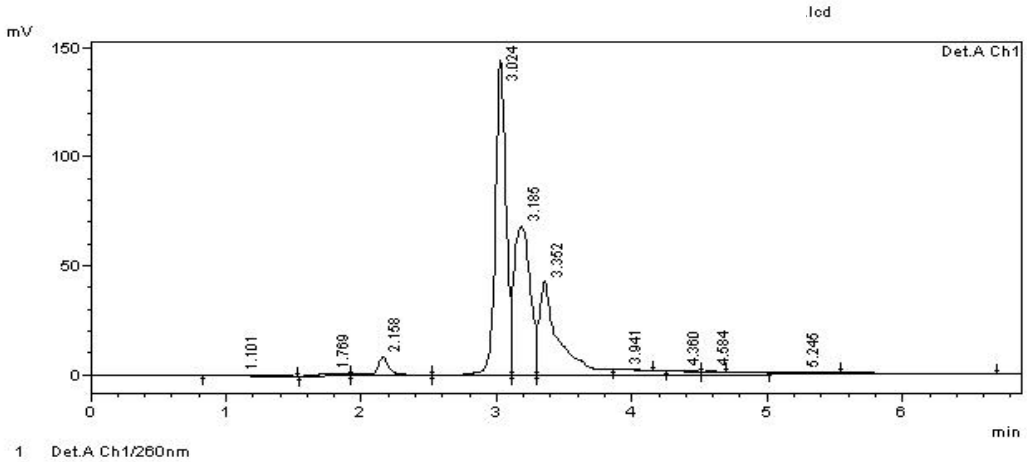
الجدول7: النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني وزمن الاحتجاز للروتين و الكورستين في مستخلصات كالس نبات الحنظل *C.colocynthis* L. **بعد التحلل الحامضي.**

العينة (مستخلص كحولي)	النسبة المئوية للمساحة تحت المنحني		زمن الاحتجاز	
	الكورستين	الروتين	الكورستين	الروتين
كالس الأوراق	39.182	1.769	3.041	1.975
كالس السيقان	27.629	2.962	3.185	2.158
كالس الأوراق الفلقية	33.279	0.187	3.022	1.011
كالس السيقان تحت الفلقية	25.518	1.315	3.171	2.358



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.109	5723	736	0.131	0.144
2	1.806	40116	3085	0.917	0.606
3	1.975	77376	11887	1.769	2.334
4	2.056	126468	9538	2.891	1.873
5	3.041	1714248	264276	39.182	51.895
6	3.204	359878	56763	8.226	11.146
7	3.339	693885	67857	15.860	13.325
8	3.712	185244	29528	4.234	5.798
9	3.901	675454	33942	15.439	6.665
10	4.536	108608	6642	2.482	1.304
11	4.884	50105	3494	1.145	0.686
12	5.222	35670	3475	0.815	0.682
13	5.379	71807	4866	1.641	0.955
14	5.770	51390	3499	1.175	0.687
15	5.995	24743	2251	0.566	0.442
16	6.275	37144	2079	0.849	0.408
17	6.527	25223	1754	0.576	0.345
18	6.814	38654	1732	0.883	0.340
19	7.200	44650	1130	1.021	0.222
20	8.142	4416	408	0.101	0.080
21	8.390	4323	313	0.099	0.061
Total		4375122	509252	100.000	100.000

الشكل10: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الكورستين في مستخلص كالس الأوراق.

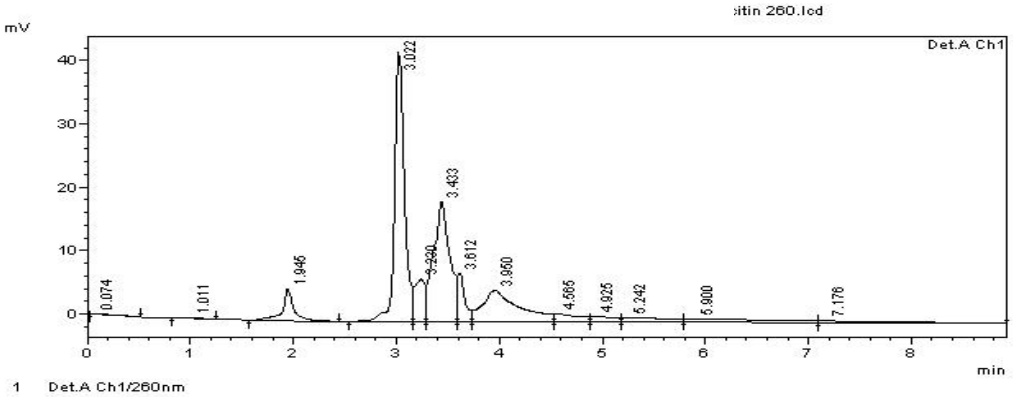


PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.101	8046	426	0.393	0.159
2	1.769	15771	1174	0.770	0.439
3	2.158	60638	8631	2.962	3.227
4	3.024	802959	144474	39.218	54.006
5	3.185	565671	68356	27.629	25.552
6	3.352	581828	43111	28.418	16.115
7	3.941	4229	464	0.207	0.173
8	4.360	3044	462	0.149	0.173
9	4.584	1190	207	0.058	0.078
10	5.245	4034	209	0.197	0.078
Total		2047410	267515	100.000	100.000

الشكل11: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الكورستين في مستخلص كالس السيقان.

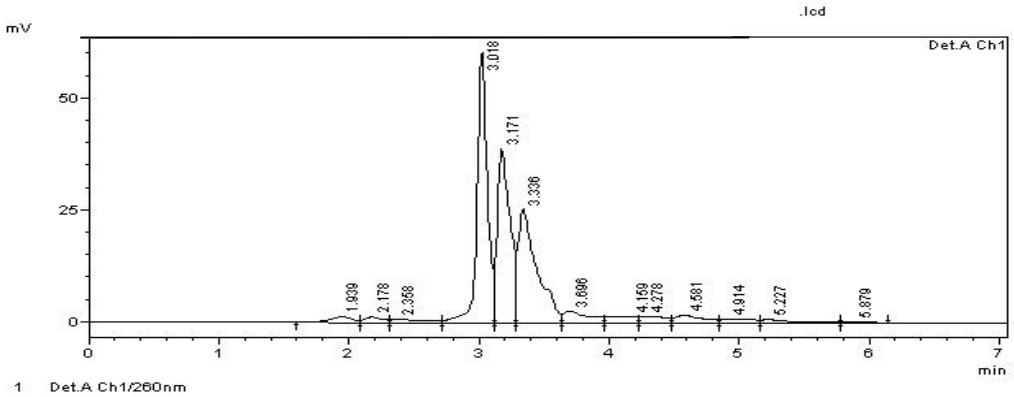


PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	0.074	1312	72	0.159	0.081
2	1.011	1549	143	0.187	0.160
3	1.945	38202	5083	4.620	5.680
4	3.022	275165	42453	33.279	47.440
5	3.230	42771	6649	5.173	7.430
6	3.433	209743	18952	25.367	21.178
7	3.612	40507	7670	4.899	8.571
8	3.950	120317	4942	14.551	5.522
9	4.565	20674	1217	2.500	1.360
10	4.925	13658	817	1.652	0.913
11	5.242	21859	714	2.644	0.798
12	5.900	29783	511	3.602	0.571
13	7.176	11298	266	1.366	0.297
Total		826840	89488	100.000	100.000

الشكل12: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الكورستين في مستخلص كالس الأوراق الفلقية.



PeakTable

Detector A Ch1 260nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.939	16214	1438	1.588	1.055
2	2.178	11581	1232	1.134	0.904
3	2.358	13428	672	1.315	0.493
4	3.018	343539	60285	33.641	44.201
5	3.171	260584	38917	25.518	28.534
6	3.336	252877	25377	24.763	18.606
7	3.696	33601	2557	3.290	1.875
8	4.159	20844	1323	2.041	0.970
9	4.278	17501	1305	1.714	0.957
10	4.581	24630	1687	2.412	1.237
11	4.914	13711	826	1.343	0.605
12	5.227	11217	636	1.098	0.467
13	5.879	1459	133	0.143	0.098
Total		1021185	136388	100.000	100.000

الشكل13: المخطط الكروماتوغرافي لتقدير مركب الكورستين في مستخلص كالس السيقان تحت الفلقية.

المصادر:

1- **دلالي**، باسل كامل(1993).موضوعات مختارة في التكنولوجيا الحيوية.دار الكتب للطباعة و النشر.جامعة الموصل.

2- **سلمان**، محمد عباس (1988).أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية .مطبعة جامعة الموصل،العراق.

3- **محمد**،عبدالمطلب سيد; عمر، مبشر صالح(1990).المفاهيم الرئيسة في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء للنبات.دار الكتب للطباعة والنشر.جامعة الموصل.

4-**Acquaah**.G(2004).Understanding Biotechnology Pearson Education. Inc. U.S.A.

5-**Briskin**,D.B.(2000).Medicinal plants and phytomedicines. Link Plant Biochemistry and Physiology to human health. Plant Physiol. 124: 507-514.

6-**Chand**,S; and Roy, S.C(1980).Study of callus from different parts of *Nigella sativa* (Ranunculaceae) Experiential,36:305-306.

7-**Edwin**,F.G;Michael,A.H;and Klerk, G.J.(2008).Plant Propagation by Tissue Culture.3rd Edition Volume(1).published by Siprenger

8-**Fell**,H.B.(1972).Tissue culturte and its contribution to biology and medicine J.Exp.Biol, 57:1-13.

9-**Gurudeeban**.S;Ramanathan.T and Satyavani.K(2011).Characterization of volatile compounds from Bitter Apple *Citrullus colocynthis* using GC- MS.International Journal of Chemical and Analytical Science. Issn: 0976-1206.

10-**Harborne**,T.B(1973).Phytochemical Methods:A Guide to Modern Technique of Plant Analysis.1st ed. ,Cox and Wyman,London.52-73.

11-**Hartmann**,H.T;Kester,D.E;Davies,F.T;andGeneve,R.L. (2002).Plant Propagation Principles and Practices.7th.ed.Prentice Hall, Inc, U.S.A.

12-**Jimenez**,V.M(2001).Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Rev. Bars. Fisiol. Veg. 13(2):196-223.

13-**Kosanovic**,M.M;Samardzic .M; Malatesti, N and Bosnar, M.S(2011). Electroanalytical Characterization of a Copper (II)-Rutin Complex .Int.J. Electrochem. Sci.,1075-1084.

14-**Larkin**,P.J; and Scowcroft, W.R(1998).Somaclonal variations a novel source of variability from cell culture for plant improvement. theor. Appl. Genet.60:197-214.

15-**Lim**,T.H;Park.J;Min.D;Choi.K andKown. T(2006).Antioxidant activity of four endemic stachys Taxa.Biol.Pharma.Bull.29(4):725-729.

16-**Mahmoud**, I.N; Ibrahim, A.I; Haga, M.H and Tarek, K.(2008). Rapid micropropagation of diploid and tetraploid watermelon (*Citrullus*

lanatus) cultivars. Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute (GEBRT), sadat city, cairo university.

17-**Mulabagal**,V.and Tsay,H.S.(2004).Plant cell culture an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int.J. Appl.Sci.Eng2(1):29-48.

18-**Murashige**,T and Skoog, F(1962).A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, Physiol Plant .15:473-497.

19-**Murugesan**,S ; and Muthusamy, M.(2011).Screening and Quantitative Estimation of Phytochemical Constituents in *Citrullus colocynthis* (L.)Schrad.J.Res.Phytochem.Pharmacol.,1(3):176-179.

20-**Najafi**, S;Sanadgol,N; Nejad,B.S; Beiragi,M.A and Sanadgol, E. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad aginst *Staphylococcus aureus*.4(22): 2321-2325.

21-**Nuengchamnong**, N; Lokkerbol, A.H;and Ingkaninan,K(2004).Separation and detection of the antioxidant flavonoids, Rutin and Quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidantactivity. Naresuan University Journal.12(2):25-37.

22-**Phani**, Ch. R.S; Vinaykumar, Ch; Umamaheswararao, K; and Sindhuja,G (2010). Quantitative Analysis of Quercetin in Natural Sources by RP-HPLC- International Journal of Research in Pharmacentical and Biomedical Sciences,1(1):19-22.

23-**Raven**,P.H;Evwrt,R.F;and Eichhor, S.E(1986).Biology of Plants. 4th. ed., Worth publishers,Inc.

24-**Savitha**,R;Shasthree,T;and Mallaiah,S.B.(2010).High freguency of plantlet regeneration and multiple shoot induction from leaf and stem explants of *Citrullus colocynthis*(L.) Schrad, an endangered medicinal cucurbit. International Journal of Pharma and Bio Sciences.V1(2). 25-**Sultana**,R.S;Bari,M.A;Rahman,M.H;Rahman,M.M; Siddique,N.A; and Khatun,N(2004). In vitro rapid regeneration of plantlets from leaf explants of water melon *Citrullus lanatus* Thumb.Biotechnology. 3(2):131-135.

26-**Vrchotova**, N; Sera, B; and Dadakova, E (2010). HPLC and CE analysis of stilbens and quercetin in flowers and stems of *Polygonum cuspidatum*, *P. sachalinense* and *P. xbchemicum*, J.Indian Chem. Soc., Vol. 87: 1-6.

27-**Wang**,J; Zhao, L.L; Sun,G.X;Liang,Y;Wu, F.A; Chen, Z. L; and Cui, S.M (2011). Acomparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin.African Journal of Biotechnology10(8):1460-1466.

28-**Zheng**, Y; Haworth,I.S; Zuo ,Z; Chow, M.S.S; and Chow,A.H.L(2005). Physiochemical and structural characterization of quercetin-B-cyclodextrin complexes.Journal of Pharmaceutical Sciences.94(5).

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.