تحليل المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة *Trigonella foenum graesum* L. تحت الأجهاد المائي مع الماءالممغنط بتقنية الـ (GC-MS) Gas Chromatography-Mass Spectrometry

إيلاف عبد الأمير الربيعي عمار رضا عبيس

كلية العلوم ، قسم علوم الحياة ، جامعة بابل

ammarredha@yahoo.com elafalrubaie89@yahoo.com

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى دراسة تأثير الأجهاد المائي مع الماء الممغنط بإستخدام مادة الـــ PEG مع 1000G. بتراكيز مختلفة (0, 3, 6, 9 % PEG +1000G.) في حث بعض المركبات الكيميائية في كالس نبات الحلبة *Trigonella foenum graesum* L . اذ تم استحثاث كالس نبات الحلبة خارج الجسم الحي على وسط MS باستعمال توليفة لمنظمي النمو 2,4-D بالتراكيز (0.5, 1, 1.5 mg/L) و BA بالتراكيز (0.5, 1, 1.5 mg/L) للوصول الى افضل توليفة لانتاج اعلى معدل وزن طري لكالس نبات الحلبة لاجل استخدامها في التجارب اللاحقة ، حيث كانت التوليفة (1mg/L BA) + (1mg/L2,4-D) افضل توليفة لانتاج اعلى معدل وزن طري لكالس نبات الحلبة. والتي أستعملت لأدامة الكالس المستحث. تم استخدام المذيب الكحولي الميثانول لاجل استخلاص مركبات الايض الثانوي من عينات الكالس المستحثة تحت تأثير الاجهاد المائي مع الماء الممغنط. استخدم جهاز كروموتوغرافيا الغاز المدمج بمطياف الكتلة(Gas Chromatography-Mass Spectrometry) GC-MS لتحديد مركبات الايض الثانوي في عينات المستخلص الكحولي لكالس الحلبة. وقد لوحظ من نتائج الـــ GC-MS وجود العديد من المركبات (12 مركبا كيميائيا) لجميع عينات مستخلص النبات.

الكلمات المفتاحية : كالس، نبات الحلبة، الأجهاد المائي، الماء الممغنط، GC-MS.

Abstract

This study aimed to study the effect of water stress using different concentration of (0,3,6,9% PEG+1000G.) to induce some chemical compound of *Trigonella foenum graesum* L. callus. The induction of callus has been done in vitro on MS media by using combination of 2,4-D (0.5, 1, 1.5 mg/L) and BA (0.5, 1, 1.5 mg/L) to reach the best combination for the best highest callus fresh weight for the next experiment. The results showed that the combination (1mg/L BA)+ (1mg/L2,4-D) was the best combination to produce the highest fresh callus of *Trigonella* , which was used for induced callus.

The solvent of methanol was used to extract the secondary metabolites from the induced callus under the stress condition. GC-MS technique was also used to determine the secondary metabolitein sample of methanol extracts of *Trigonella* callus, which reveald from that there were many compounds (about 12) for all plant samples.

Key words: callus , *Trigonella foenum graecum* L., water stress with magnetic water ، GC-MS.

المقدمة

ظهرت لبذور الحلبة عدة أستعمالات في مجالات الصناعات الغذائية والدوائية والتي وصفت في الكثير من مؤلفات النباتات الطبية وذلك لطبيعة تركيبها الكيميائي المتنوع وأحتوائها على الكثير من المركبات الصابونية والقلويدات وغيرها. فعلى صعيد الصناعات الغذائية وبسبب رائحتها المميزة يستعمل مطحون بذور الحلبة كتابل تجاري (Hardman and Fazli, 1972). أما على صعيد الصناعات الدوائية فتدخل بذور الحلبة في صناعة الستيرويدات (Steroids) إذ يعد ستيرويد الصابونين (Steroidal Sapogenins) مهماً تجارياً في صناعة مستحضرات صيدلية ستيرويدية (Hardman *et. al.*, 1980). مثل مركبات الـ Diosgenin التي استخدمت في صناعة مستحضرات صيدلانية منها حبوب منع الحمل (Taylor *et al.*, 2000). ويستعمل نبات الحلبة وبذوره بوصفه مضاد لداء السكري (Antidiabetic)

إذ تحتوي أوراق نبات الحلبة على كمية من الهلام النباتي وألياف فعالة ضد هذا الداء (Choudhary *et al*., 2001) .

تعد تقنية زراعة الأنسجة واحدة من التقنيات الحيوية في التحري والكشف عن العديد من المركبات الثانوية الطبية المهمة وتحسين أنتاجها مثل القلويدات والتربينات والفينولات والستيرويدات والفلافونويدات (Vijayasree *et al*., 2010).

يؤثر الماء المعالج مغناطيسياً في العمليات الفسيولوجية والكيموحيوية للبذور مما يحسن من أدائها لتصبح البذور أكثر حيوية وقوة وتنمو بشكل سريع وذلك يعود الى تحفيز البروتينات التي تؤدي الى نمو الجذير وتنشيط العمليات الأيضية في البذور (Fairgrieve,2011). وقد هدفت هذه الدراسة الى حث أنسجة بذور النبات على زيادة أنتاج مركبات الأيض الثانوي وذلك عن طريق تجهيز الوسط الحاوي على الكالس بتراكيز مختلفة من الـ PEG مع الماء الممغنط. والكشف ونوعاً عن المركبات المنتجة عن طريق التحليل بواسطة الـ GC-MS للمستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة.

المواد وطرائق العمل

جمع بذور النبات وتعقيمه:

جمعت بذور الحلبة *Trigonella foenum graecum* L. من السوق المحلية في محافظة بابل وشخصت في معشب كلية العلوم/جامعة بابل. وضعت كمية مناسبة من البذور في قارورة وغسلت بالماء المقطر ثلاث مرات للتخلص من الغبار والشوائب العالقة، ثم نقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي air flow laminer – cabinat اذ جرى تعقيمها عن طريق غمرها بـ 15% هيبوكلورات الصوديوم مع التحريك لمدة 7 دقيقة. ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة لثلاث مرات وعقمت بعدها بـ الكحول الإثيلي 70٪ ورجت لمدة 30 ثانية ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة على ثلاث مرات لإزالة الكحول الإثيلي، ثم وضعت البذور في طبق بتري حاو على ورقة ترشيح معقمة من أجل ازالة المياه العالقة (Awika and Rooney,2004).

زراعة البذور

بعد تحضير وسط MS وتعقيم البذور أخذت ثلاث بذرات و زرعت في أنابيب الزراعة الحاوية على من وسطMS (10 ml) المجهز بتراكيز مختلفة من منظمات نمو النبات 2,4-D بالتراكيز (1.5,1,0.5) ملغم /لتر وBA بالتراكيز (1.5,1,0.5) ملغم/لتر وبمعدل 15 مكرر لكل توليفة من 2,4-D وBA لغرض استحثاث الكالس، ثم حضنت تحت ظروف إضاءة (16 ساعة يومياً) و درجة حرارة$^{\circ}$C 2±24 .

طور استحثاث الكالس

استخدمت تقنية زراعة الأنسجة النباتية وفقا لـ Hirata واخرون (1990) لغرض استحثاث الكالس من بذور الحلبة ،ثم نقل الكالس الى وسط جديد لغرض تحفيز إنتاج الأيض الثانوي ودراسة بعض المؤشرات الحيوية للنبات

طور تراكم الكالس

الأجهاد المائي مع الماء الممغنط

تحضير وسط الـ PEG الذائب بالماء الممغنط

أستخدمت أفضل توليفة مابين BA و 2,4-D (1+1) ملغم/لتر لكل منهما وأذيب الوسط بالماء الممغنط (1000) G وأُضيف للوسط PEG بتراكيز مختلفة (3، 6،9%) ثم وضع الوسط على المسخن لمدة 5 دقيقة

لضمان الذوبان الكامل للمكونات ، وتم تعديل pH الوسط إلى 5.8 بأستخدام هيدروكسيد الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.1 نورمالي لكل منهما قبل إضافة الاكار.

زراعة الكالس على وسط الـــPEG مع الماء الممغنط

اخذ 250 ملغم من الكالس الطازج واعيدت زراعته على اوساط حاوية على PEG بالتراكيز المختلفة (0،3،6، 9%)مع الماء الممغنط 1000 G وزرع 15 مكررا لكل من تراكيز(PEG+ 1000G) وتمت عملية الزراعة تحت ظروف معقمة وقياس الوزن الطري والجاف بعد 6 اسبوع من الزراعة .

تحليل المركبات الفعالة للمستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة بأستخدام جهاز GC-MS

حلل المستخلص الميثانولي لكالس لنبات الحلبة وفصل المركبات الفعالة بأستخدام جهاز كروموتوغرافيا الغاز المدمج بمطياف الكتلة Gas Chromatography-Mass Spectrometry وذلك أعتماداً على الطريقة الثانية المعتمدة من قبل.Abdul-Jalill (2014) وكانت أبعاد العمود الشعري 1MS capillary column، Inert.Cap, 0.25mm، 30m ، 0.25µm ، حجم الحقن injection volume هو1µl، 5 الطور المتحرك carrier gas هو الهليوم ، ومعدل الجريان الثابت constant flow rate بلغ 1 ml/min، شخصت المركبات الفعالة بمقارنة المركبات التي ظهرت في المستخلص الميثانولي لكالس الحلبة مع المركبات القياسية من نوع NIST mass spectral search program for the NIST/EPA/NIH mass spectral library version 2.0 f 2008 and NIST08.LIB / المدمجة مع الجهاز.

النتائج والمناقشة

من نتائج تقنية الـــ GC-MS في الجداول 1-5، حدد العديد من المركبات الكيميائية، ففي الجدول 1 كشف عن المركبات الكيميائية التالية في الكالس المعامل بتركيز .0 %PEG + 1000G : 2h-pyran-2-one، 10-(2-Hydroxyethyl)-3,7,8-trimethyl-10H-، oct-[4.2.0] 2-oxabicyclo4-en-3-one benzo[g]pteridine-2,4(3H)-dione،(RT: 16.917) . وفي الجدول2 كشف عن المركبات الكيميائية التالية في الكالس المعامل بتركيز .3% PEG + 1000G :phenyl diphenylcarbamate، (RT:18.858), carbonic acid. وفي الجدول 3 كشف عن المركبات التالية في الكالس المعامل بتركيز 6% PEG +1000G : 2-Butyl-3-hexyl-1H-indene، Lumiflavin ، (RT: 18.858). وفي الجدول 4كشف عن المركبات التالية في الكالس المعامل بتركيز 9% PEG + 1000G: 2,2,3-،2,2-dimethylpentane dimethylpentane،Hexane،2,2-dimethyl-3-hexanone،2,2,3,4-tetramethylpentane (1.800 (RT:، اما الجدول 5 فهو يمثل منحنيات المركبات الكيميائية التي تم تحديدها بواسطة تقنية الـــ GC-MS.

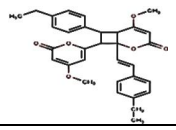
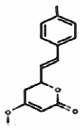
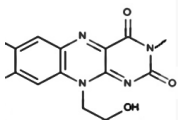
من خلال النتائج اعلاه يتبين ظهور العديد من المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة تحت تأثير الاجهاد المائي وعدم ظهورها في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المزروع بدون اجهاد مائي وقد يعود السبب في ذلك الى ان النباتات تقوم بتصنيع وتجميع العديد من مركبات الايض الثانوي ومن ضمنها المركبات الكيميائية لاجل مقاومة ضروف الاجهاد المائي من خلال انتاج العديد من المركبات التي تعمل على المحافضة على الخلية من اختلال الاوزموزية وكذلك تمنع تسرب الماء الى خارج الخلية وبالتالي المحافضة على الكميات المناسبة لدخول وخروج المواد والعناصر الغذائية، كما ذكر Cho وجماعته (2008) عند تعرض النباتات الى ظروف أجهاد شديدة (كالجفاف والملوحة والحقل المغناطيسي) تبدأ بتراكم مركبات الأيض الثانوي كمنظمات أوزموزية تمنع فقدان الماء، كما ينتج من الاجهاد المائي على النبات تكون العديد من الجذور الحرة التي تكون غير مستقرة ومن شأنها تعمل على احداث التغيرات في داخل الخلية مثل

التفاعل مع بروتينات مهمة في الخلية ومع الحامض النووي وتفاعلات اخرى تؤدي في اغلب الاحيان الى موت الخلية لذلك ينتج النبات العديد من مركبات الايض الثانوي مثل المركبات الكيميائية تعمل كمضادات للاكسدة وتمنع تكون الجذور الحرة او تتفاعل معها، كما ذكر Akula و Ravishankar (2011) أن الأجهاد يزيد من المركبات الثانوية المختلفة في النباتات كمنظمات أوزموزية مثل الترايكونيلين وباقي مركبات الأيض الثانوي في نبات الحلبة.

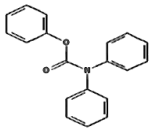
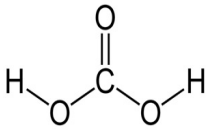
تُنسب الفعالية البايلوجية والدوائية الى مجموعة متنوعة من المكونات في الحلبة وهي: الستيرويدات, المركبات النتروجينية، المركبات الفينولية المتعددة،المركبات الطيارة، الحوامض الأمينية وغيرها (Petropoulos,2002).

تعمل بذور على خفض كولسترول الدم وخفض نسبة الدهون (Muralidhara *et al*., 1999) وتعد دواء مقويا وطاردا للأرياح من المعدة والأمعاء (Zia *et al*., 2001) ومادة مغذية ومرطبة وتستخدم محلياً في معالجة الجروح إذ تساعد في عملية التآم الجروح وتستعمل في حالات القرحة وداء النقرص والألم العضلي(.(Al-Rawi and Chakravarty, 1988) ويؤثر الفيض المغناطيسي ًايضا في زيادة عمليات الأنقسام الخيطي وأيض الخلية في الخلايا المرستيمية (Belyavskaya, 2001). ويساهم في حث النبات على زيادة تصنيع الأوكسين والسايتوكاينين في الكالس (Atak *et al*., 2003). ويزيد الماء الممغنط ايضا من نفاذية الغشاء البلازمي مما يؤدي الى زيادة تدفق وأخذ المواد الغذائية الى داخل الخلية مما يؤدي الى زيادة مقاومة النبات للجهادات (Stange *et al*., 2002).

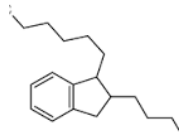
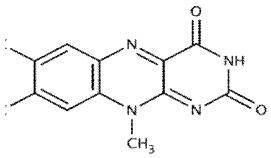
جدول (1) تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـــ 0% PEG +1000 G. بتقنية الـــ GC-MS .

RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-18.858		2-Oxabicyclo[4.2.0]oct -4-en-3-one	$C_{32}H_{32}O_6$	512	68	Flavonoids
2-18.85		2h-pyran-2-one	$C_{16}H_{16}O_3$	256	68	Phenols
3-18.85		10-(2-Hydroxyethyl)-3,7,8-trimethyl-10H-benzo[g]pteridine-2,4(3H)-dione	$C_{15}H_{16}N_4O_3$	86	68	Alkaloids

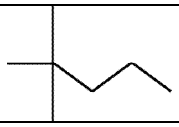
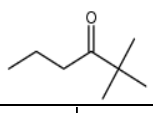
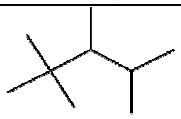
جدول (2) تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـــ 3% PEG +1000 G. بتقنية الـــ GC-MS .

RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-16.917		phenyl diphenylcarbamate	$C_{19}H_{15}NO_2$	289	39	Alkaloids
2-16.917		carbonic acid	$C_{18}H_{36}O_3$	300	39	Terpenes

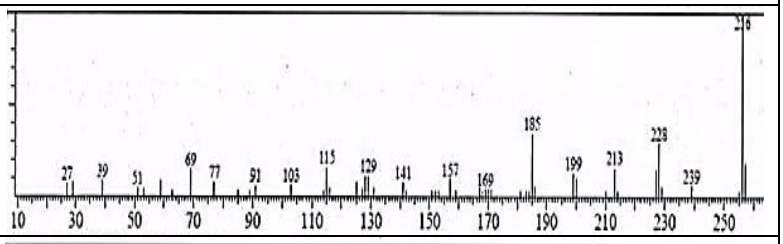
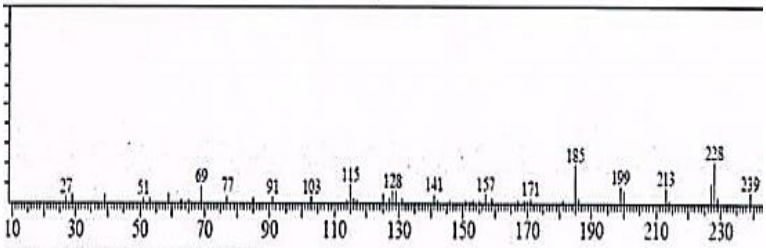
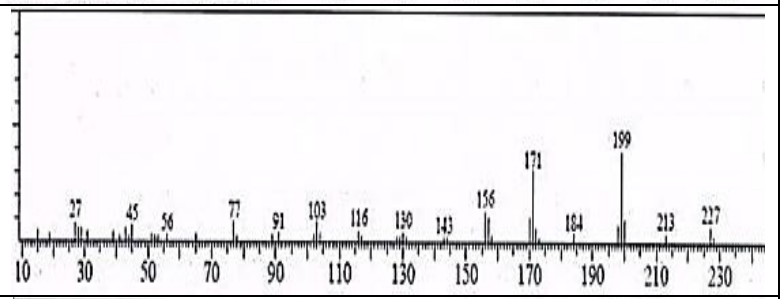
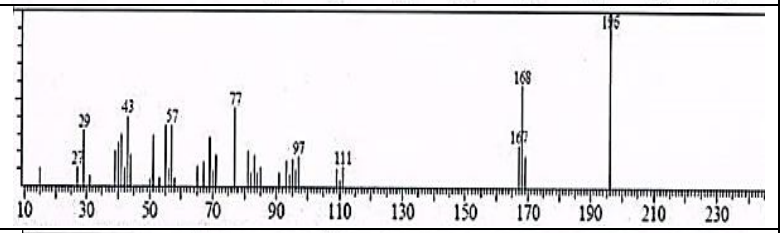
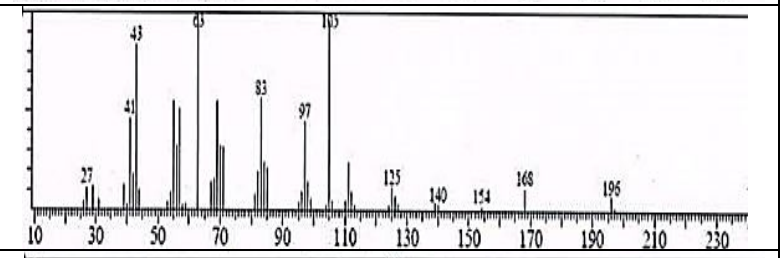
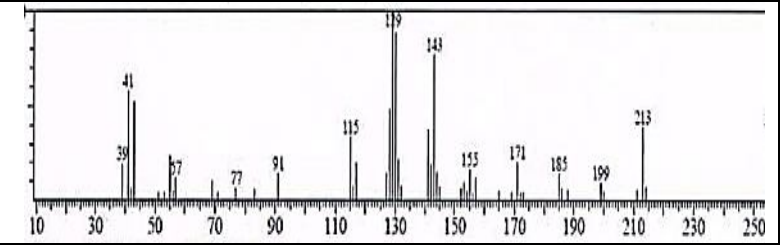
جدول (3) تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـــ 6% PEG +1000 G. بتقنية الـــ GC-MS .

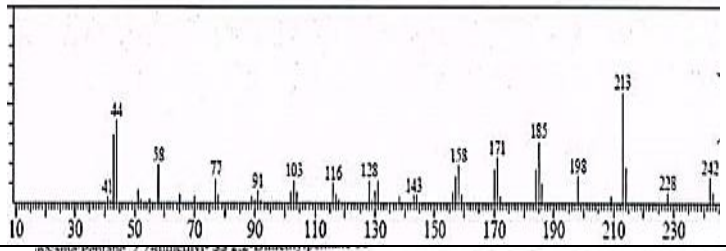
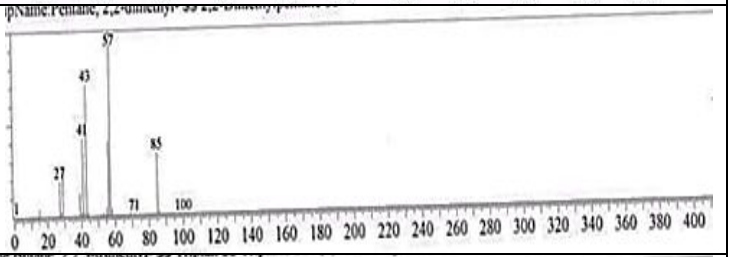
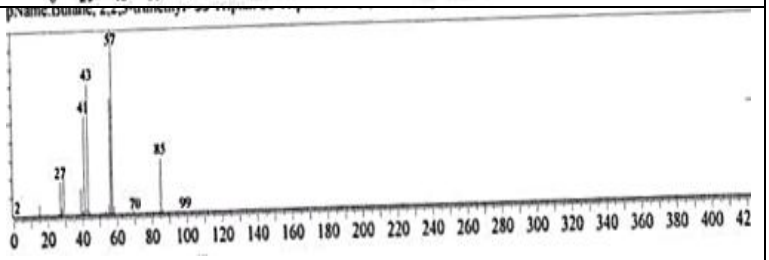
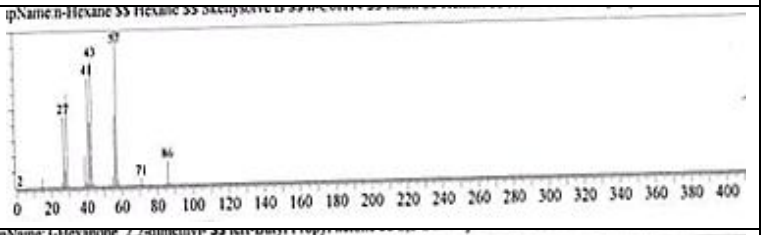
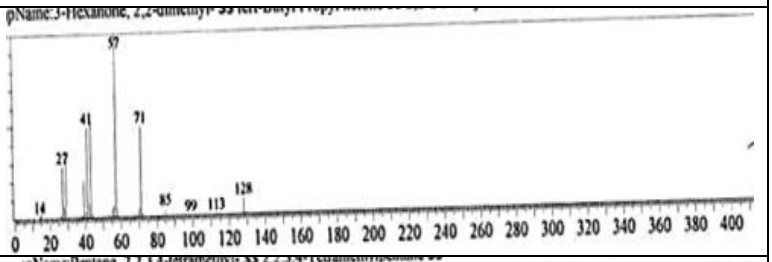
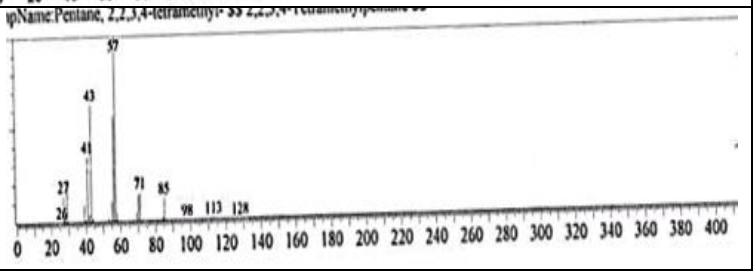
RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-18.858		2-Butyl-3-hexyl-1H-indene	$C_{19}H_{28}$	256	68	Terpenes
2-18.858		Lumiflavine	$C_{13}H_{12}N_4O_2$	256	68	Alkaloids

جدول (4) تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـ 9% PEG +1000 G. بتقنية الـ GC-MS .

RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-1.800		2,2-dimethylpentane	C_7H_{16}	100	378	Alkane
2-1.800		2,2,3-dimethylpentane	C_7H_{16}	100	378	Alkane
3-1.800		Hexane	C_6H_{14}	86	378	Alkane
4-1.800		2,2-dimethyl-3-hexanone	$C_8H_{12}O$	128	378	Terpenes
5-1.800		2,2,3,4-tetramethylpentane	C_9H_{20}	128	378	Alkane

جدول (5): منحنيات المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة تحت الاجهاد المائي والماء الممغنط.

اسم المركب	Peaks
Oxabicyclo[4.2.0]oct--2 4-en-3-one	
2h-pyran-2-one	
10-(2-Hydroxyethyl)-3,7,8-trimethyl-10H-benzo[g]pteridine-2,4(3H)-dione	
phenyl diphenylcarbamate	
carbonic acid	
2-Butyl-3-hexyl-1H-indene	

Lumiflavine	
2,2-dimethylpentane	
2,2,3-dimethylpentane	
Hexane	
2,2-dimethyl-3-hexanone	
2,2,3,4-tetramethylpentane	

المصادر

Abdul-Jalill, R. DH.,2014, GC-MS analysis of *Calendula officinalis* and cytotoxic effects of its flower crude extract on human epidermoid larynx carcinoma (Hep-2).*World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(4), pp: 237-275.

Akula, R. and Ravishankar, G. A., 2011, Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior,6(11): 1720-1730.

Al-Rawi, A. and chakravarty, H.L.,1988,Medicinal plants of Iraq. 2nd Ed. Baghdad., PP: 94.

Atak, C.; Emiroglu, O.; Alikamanogku, S. and Rzakoulieva, A.,2003, Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (*Glycine max* L. Merril) tissue cultures. J. C. Mol. Bio., 2: 113-119.

Awika, J. M.; and Rooney, L. W.,2004, Sorghum phytochemical and their potential aspects on human health.Photochemistry, 65(9):1199-1221

Belyavskaya, N.A. ,2001, Ultastructure and calcium balance in meristem cells of pea roots exposed to extremely low magnetic fields, Adv.Space Res.,28(4): 645-650.

Cho, H.Y.; Rhee, H.S.; Yoon, S.Y. and Park, J.M.,2008, Differential induction of protein expression and benzophenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholtzia californica* suspension cultures by methyl jasmonate and yeast extract. J. Microbiol. Biotechnol.,18(2): 255-62.

Choudhary, D.; chandra, D.; choudhary, S. and Kale, R. K.,2001, Modulation of glyoxalase, glutathione S-transferase and antioxididant enzymes in the liver, spleen and erythrocytes of mice by dietary administration of fenugreek seeds. Food and Chem.Toxicol., 39: 989-997.

Fairgrieve, J.D.,2011, Magnetic Treatment of Seeds. Life Streams International Mfg. Co. 5203 Moore Road, Westmoreland,NY 13490 USA.http://www.wholly-water.com/magnetizer/plant.htm.

Hardman, R. and Fazli, F.R.Y.,1972, studies in the steroidal sapogenin yield from Trigonella Foenumgraecum seed. Planta. Med., 21(3): 322-328.

Hardman, R.; Kosugi, J. and Parfitt, R.T.,1980, Isolation and characterization of a furostanol glycoside from fenugreek. Phytochemistry, 19(4): 698-780.

Hirata, K.; Yamanaka, A.; Karano, N.; Miyamoto, K. and Miura, Y.,1990, Production of indol alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. Agric. Biol. Chem. 51:1311-1317.

Muralidhara.; Narasimhamurthy, K.; Viswanatha, S. and Ramesh, B.S.,1999, Acute and subchronic toxicity assessment of debitterized fenugreek powder in the mouse and rat. Food and Chem. Toxicol., 37: 831-838.

Petropoulos, G.A.,2002,Fenugreek, The genus Trigonella. Taylor and Francis, London and New York., pp: 1 - 255.

Stange, B.C.; Rowland, R.E.; Rapley, B.I and Podd, J.V., 2002, ELF Magnetic field increase aminoacid uptake into *Vicia faba* L. roots and alter ion movement across the plasma membrane. Bioelectromagnetics., 33: 347-354.

Taylor, W.G.; Elder, J.L.; chang, P.R. and Richards, K.W.,2000, Microdetermin of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum)* seeds. J. Agric. Food. Chem., 48(11): 5206-5210.

Vijayasree, N.; Udayasri, P.; Aswani, K.Y.; Ravi, B.B.; Phani, K.Y. and Vijay, V.M.,2010, Advancements in the production of secondary metabolites. J. Nat. Prod., 3(1): 112-123.

Zia, T.;Hasnain,S.N. and Hasan, S.K.,2001,Evaluation of the oral hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum-graecum* L.J.Ethnopharmacology.,75(2–3):191–195