دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۲، صفحه ۲۷۵-۲۶۶ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.121046.2280
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.266.94.2.1575.1610

استخراج و جداسازی رنگ روناس (*Rubia tinctorum* L.) با سه حلال در فصول مختلف و کاربرد آن برای مطالعات یاخته‌شناسی

عذرا عطائی عظیمی[1*] و بابک دلنواز هاشملویان[2]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

پست الکترونیک: baharana1395@gmail.com؛ hashemloian1343@gmail.com

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۷

چکیده

در مطالعات یاخته‌شناسی، برای تفکیک اجزای سلول‌ها که شفاف هستند از رنگ‌ها استفاده می‌شود. بیشتر رنگ‌های مورد استفاده سنتزی بوده به انسان و محیط صدمه می‌زنند. در حالی‌که رنگ‌های با منشأ گیاهی ایمن هستند. از دوران باستان، در ایران از ریشه‌های گیاه روناس (*Rubia tinctorum* L.) که سرشار از رنگ‌های طبیعی هستند در صنایع نساجی استفاده می‌شده است. در این پژوهش رنگ‌های ریشه‌های روناس در انتهای سه فصل بهار، تابستان و پاییز با سه حلال آب، اتانول و اسید ضعیف جدا و انواع رنگ‌های آنها با کروماتوگرافی کاغذی جدا شد. از روناس رنگ استوروناسین تهیه و برای رنگ‌آمیزی سلول‌های روپوست و نگهبان روزنه، گرده‌های گل و مطالعه تقسیم میتوز سلول‌های گیاهی استفاده شد. نتایج نشان داد که بهترین حلال برای جداسازی رنگ‌های روناس، آب است. نتایج کروماتوگرافی نشان داد که نوع و تعداد رنگ‌ها، در عصاره آبی ریشه روناس در سه فصل مشابه است ولی میزان برخی از آن ها در آخر تابستان بیشتر به دست آمد. رنگ های محلول در الکل بیشتر در عصاره اتانولی ریشه در آخر بهار مشاهده شدند. از عصاره اسیدی تنها یک رنگ زرد جدا شد که احتمالا آلیزارین باشد. رنگ آمیزی سلول ها با استوروناسین در همه موارد نشان داد که این رنگ قابل مقایسه و حتی بهتر از استوکارمن است. این رنگ، هسته و کروموزوم ها را در یک زمینه شفاف به رنگ قهوه ای در آورد. به طور کلی نتایج نشان داد که این رنگ می تواند جایگزین رنگ های سنتزی در آزمایشگاه های آموزشی و تحقیقاتی یاخته شناسی گیاهی شود.

واژه‌های کلیدی: سیتولوژی، کروماتوگرافی، روناس (*Rubia tinctorum* L.)، رنگ.

مقدمه

یاخته شناسی (سیتولوژی) یکی از علوم زیستی روز دنیاست که در علوم پایه و کاربردی استفاده‌های زیادی دارد. از آنجایی‌که بیشتر ساختارهای یاخته ها شفاف هستند، برای تفکیک اجزای بافت‌ها و یاخته‌ها در مطالعات میکروسکوپی نیاز به رنگ آمیزی آنها با رنگ‌هایی است که اجزا را از هم متمایز و به‌صورت اختصاصی برخی از آنها را مشخص کند. به‌طور مثال رنگ ایوزین سیتوپلاسم را

صورتی قرمز، فولگن کروموزوم‌ها را قرمز، سافرانین هسته گلبول‌های سفید خون را قرمز، سبز متیل که چوب را آبی یا سبز و فلوروگلوسینول ماده لیگنین را قرمز یا نارنجی می‌کند (Taylor *et al*., 2007). بیشتر رنگ‌های مورد استفاده مثل هماتوکسیلین، لیشمن و کارمن بوراکس آمایشی (سنتزی) بوده و شیمیدان‌ها آنها را از منابع نفتی ارزان می‌سازند. معمولاً این رنگ‌ها تنوع رنگی بالا داشته و ارزان‌قیمت هستند. بسیاری از رنگ های آمایشی، باعث حساسیت‌های پوستی، سرطان و دیگر بیماری‌ها در انسان شده و باقیمانده‌های سمی آنها نیز محیط‌زیست را آلوده می‌کند (Ihuma *et al*., 2012). رنگ‌های زیستی به‌ویژه گیاهی، غیر سمی و بی‌خطر بوده و باقیمانده‌های غیر سمی آنها، سریع در محیط تجزیه و آلودگی ایجاد نمی‌کنند (Goodarzian & Ekrami, 2010).

بیش از ۲۰۰۰ رنگ از بخش‌های مختلف ۵۰۰ گونه گیاهی ساخته شده که فقط ۱۵۰ عدد از آنها تجاری هستند (Ihuma *et al*., 2012). یکی از قدیمی‌ترین رنگ‌های تاریخ انسان، که ایرانیان از دوران کهن از آن استفاده می‌کردند، رنگ گیاهی روناس از گیاه روناس (*Rubia tinctorum* L.) است که رنگ قرمز تولید می‌کند. رنگ قرمز ریشه روناس برای رنگ کردن نخ، پارچه و لباس استفاده می‌شود (Cardon, 2007). رنگ‌های اصلی روناس آلیزارین، پورپورین، گزانتوپورپورین، روبیادین، پزدوپورپورین، مانژستین و لوسیدین هستند (Slyshova *et al*., 2010). مخلوط روبریتریک اسید و لوسیدین روناس ابریشم را بهتر از آلیزارین خالص رنگ می‌کند (Ford *et al*., 2018). روناس گیاهی دارویی با ریشه‌هایی سرشار از رنگ قرمز است که در صنعت نساجی استفاده می شود. عصاره‌های روناس برای درمان سنگ کلیه و مثانه برای شل‌سازی و دفع سنگ، درمان بیماری‌های دستگاه ادراری و به عنوان مسکن و تقویت‌کننده استفاده می‌شود (Blömeke *et al*., 1992).

کارمن و اورسئین از رنگ های عمومی و آمایشی هستند که برای رنگ آمیزی هسته، کروموزوم و مطالعه تقسیم یاخته به شکل استوکارمن و استواورسئین استفاده می‌شوند. اگرچه کارمن یک رنگ طبیعی است که از نوعی حشره بدست می‌آید ولی کارمن مورد استفاده در مطالعات یاخته‌شناسی، آمایشی (سنتزی) است (Taylor *et al*., 2007). البته استفاده از رنگ روناس در کشور ما سابقه تاریخی دارد.

در این پژوهش از روناس برای تهیه رنگی جهت مطالعه یاخته های گیاهی استفاده و به‌عنوان رنگ جدید با عنوان استوروناسین معرفی می‌شود تا جامعه علمی کشور بتواند از آن برای کارهای تحقیقاتی مشابه استوکارمن و استواورسئین استفاده کند.

مواد و روش‌ها

ریشه روناس در آخر سه فصل بهار، تابستان و پاییز از منطقه سیاهکن یولاق در استان مرکزی برداشت شد. پس از شستشو و خشک کردن سطح ریشه ها با دستمال پارچه‌ای، در سایه و در هوای اتاق به مدت یک هفته قرار داده شد تا خشک شود. ریشه ها پس از خشک شدن، پودر و برای استخراج رنگ استفاده شد.

استخراج رنگ با سه حلال آب، اتانول ۹۶٪ و استیک اسید ۴۵٪ انجام شد. برای استخراج، ۲ گرم پودر خشک روناس را با ۵۰ میلی‌لیتر حلال ۲۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار و بعد همان‌طور داغ با دستمال کاغذی سفید رنگ دو لایه صاف گردید.

کروماتوگرافی کاغذی، با کاغذ نوشتاری A4 معمولی که به ابعاد ۱۵ در ۲۰ سانتی‌متر بریده شد، انجام گردید. فاز متحرک مخلوط ۳ بخش آب، ۲ بخش الکل و ۰/۱٪ استیک اسید بود. در پایان کروماتوگرافی، ضریب جابجایی (RF= طول جابجایی هر باند تقسیم بر طول جابجایی حلال) رنگ‌های جدا شده محاسبه شد.

برای آماده کردن رنگ استوکارمن، ۲ گرم کارمن به استیک اسید ۴۵٪ در حال جوش اضافه و بعد از ۵ دقیقه جوشیدن، به آن چند قطره کلرید آهن ۱۰٪ اضافه و داغ صاف شد. استوروناسین (از ریشه های آخر تابستان)، مشابه استوکارمن آماده شد ولی مدت زمان جوشیدن آن ۲۰ دقیقه بود.

برای آزمایش رنگ استوروناسین، از مواد گیاهی در دسترس مانند روپوست برگ غده جوانه زده پیاز و برگ گل نرگس، دانه گرده نرگس و گل گندم زرد، مریستم ریشه پیاز خوراکی، پیاز نرگس و دانه‌رُست گل گندم زرد استفاده شد.

برای رنگ‌آمیزی یاخته‌های روپوست، قطعه‌ای از روپوست سطح برگ پیاز (*Allium cepa* L.) و نرگس (*Narcissus pseudonarcissus* L.) با ناخن جدا و روی لام قرار گرفت، روی آن چند قطره رنگ ریخته و لامل گذاشته، بعد از ۵-۳ دقیقه با میکروسکوپ مطالعه شد.

برای رنگ آمیزی دانه‌های گرده، بساک پرچم گل نرگس و گل گندم زرد (*Centuarea behen* L.) را با سوزن باز و گرده‌های آن را با سوزن در یک قطره رنگ مخلوط کرده، سپس ۳ دقیقه بعد از قرار دادن لامل، با میکروسکوپ مطالعه شد.

برای تهیه ریشه پیاز خوراکی، سطح ریشه‌ای یک پیاز را درون آب یک لیوان قرار داده و در یک جای گرم در سایه گذاشته شد. بعد از ۵ روز ریشه ها در فیکساتور (مخلوط ۳ بخش اتانول ۹۶٪ با ۱ بخش استیک اسید گلاسیال) تثبیت شدند.

برای تهیه ریشه پیاز نرگس، در آخر مهر پیازهای نرگس از خاک بیرون آورده شد و بعد از شستشوی گل و خاک آن ریشه‌ها در فیکساتور تثبیت شدند.

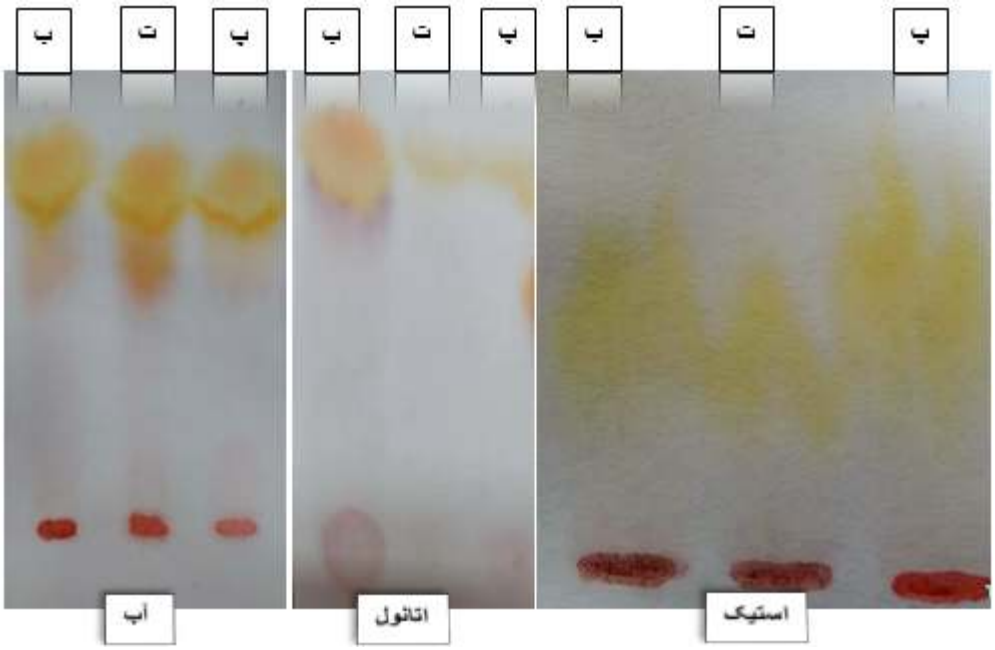
برای تهیه ریشه گل‌گندم زرد، ده دانه گل‌گندم روی کاغذ مرطوب درون پتری‌دیش قرار داده شد؛ در پتری را بسته و برای جلوگیری از تبخیر آب، درون کیسه پلاستیکی قرار داده و در کیسه گره زده شد و در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. بعد از ده روز دانه‌رُست‌ها تثبیت شدند.

برای رنگ‌آمیزی یاخته‌های مریستمی نوک ریشه، ریشه های ۱ تا ۲ سانتی‌متری به مدت ۵ دقیقه در اسید کلریدریک یک نرمال قرار داده و بعد در ۵۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور و بعد آب کشیده شد. برای رنگ آمیزی ۲ میلی‌متر انتهای ریشه قطع و روی لام در ۳-۲ قطره رنگ قرار داده و بعد لام تا به جوش آمدن رنگ حرارت داده شد. بعد از آن رنگ جوشیده با دستمال تمیز و یک قطره رنگ جدید روی نوک ریشه ریخته و با سوزن نوک ریشه را له کرده، روی آن لامل گذاشته و اسکواش انجام شد (Gupta *et al*., 2006).

همه لام‌ها با میکروسکوپ دوربین‌دار (Vanox Olympus) مطالعه شدند.

نتایج

کروماتوگرافی: در مقایسه بین عصاره‌های آبی، الکلی و استیک اسید، رنگ عصاره آبی قرمزتر از بقیه بود. نتایج کروماتوگرافی کاغذی نشان داد (شکل ۱) که تعداد رنگ های استخراج شده با آب در سه نمونه بهار، تابستان و پاییز بیشتر از دو حلال دیگر است و این یعنی اینکه بیشتر رنگ‌های ریشه روناس در آب محلول و به‌خوبی جدا می‌شوند. مقایسه باندهای جدا شده در کروماتوگرافی نشان داد که در مقدار برابر عصاره، نوع رنگ‌های جدا شده در هر سه فصل یکسان ولی غلظت برخی رنگ‌ها در تابستان بیشتر است. در هر سه فصل، رنگ قرمز عصاره روی لکه باقی (ضریب جابجایی صفر) ولی ۴ رنگ شامل قرمز مایل به بنفش، زرد مایل به قهوه‌ای، زرد و قرمز مایل به نارنجی به‌ترتیب با ضریب جابجایی ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷ و ۰/۹ (جدول ۱) از یکدیگر تفکیک شدند. در عصاره‌های الکلی، فقط در عصاره بهار سه رنگ بنفش، زرد و قرمز مایل به نارنجی به‌ترتیب با ضریب جابجایی ۰/۶، ۰/۷ و ۰/۹ جدا شدند و یک بنفش کم‌رنگ روی لکه باقی ماند (شکل ۱ و جدول ۱). از عصاره‌های الکلی تابستان و پاییز، فقط یک باند زرد جدا شد. در عصاره‌های اسیدی، رنگ قرمز روی لکه باقی مانده و فقط یک رنگ زرد با مقدار زیاد در هر سه نمونه جدا شد که ظاهراً این باند در تابستان کمتر بود.

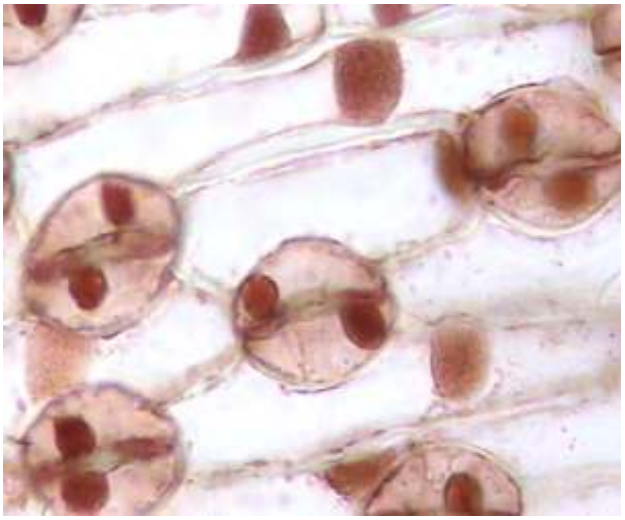


شکل ۱- کروماتوگرافی کاغذی عصاره‌های استیک اسید، اتانول و آب ریشه روناس در آخر فصل پاییز (پ)، تابستان (ت) و بهار (ب)

جدول ۱- ضریب جابجایی (RF) باندهای جدا شده از کروماتوگرافی کاغذی عصاره‌های استیک اسید، اتانول و آبی ریشه‌های روناس در آخر فصل پاییز (پ)، تابستان (ت) و بهار (ب)

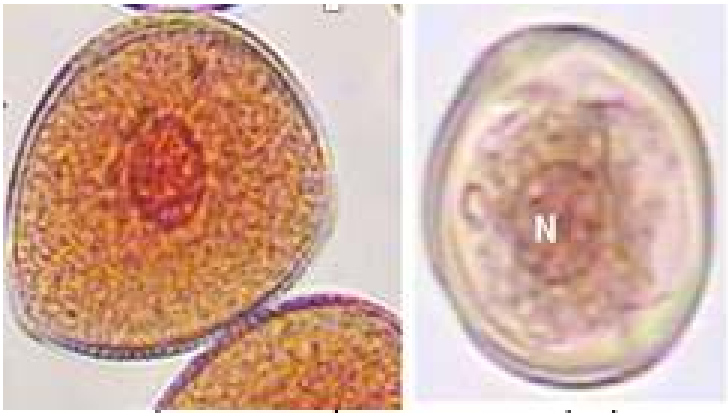
	استیک			اتانول			آب		
ش	پ	ت	ب	پ	ت	ب	پ	ت	ب
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲	–	–	–	–	–	–	۰/۱	۰/۱	۰/۱
۳	۰/۴	۰/۴	۰/۴	–	–	–	–	–	–
۴	–	–	–	–	–	–	۰/۵	۰/۵	۰/۵
۵	–	–	–	–	–	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶
۶	–	–	–	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷
۷	–	–	–	–	–	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹

اثر رنگ استوروناسین روی یاخته های روپوستی در هر دو گونه تصویری واضح از یاخته‌های روپوستی و یاخته‌های نگهبان روزنه بود. در یاخته های روپوستی با وضوحی بیشتر و بهتر از رنگ آمیزی با استوکارمن غشای پلاسمایی و هسته‌ها قهوه‌ای، سیتوپلاسم و دیواره بدون رنگ ولی سیتوپلاسم یاخته های نگهبان قهوه‌ای روشن و متمایز از هسته و یاخته‌های روپوستی بود (شکل ۲).



شکل ۲- یاخته‌های روپوستی و نگهبان روزنه برگ نرگس (رنگ‌آمیزی با استوروناسین)

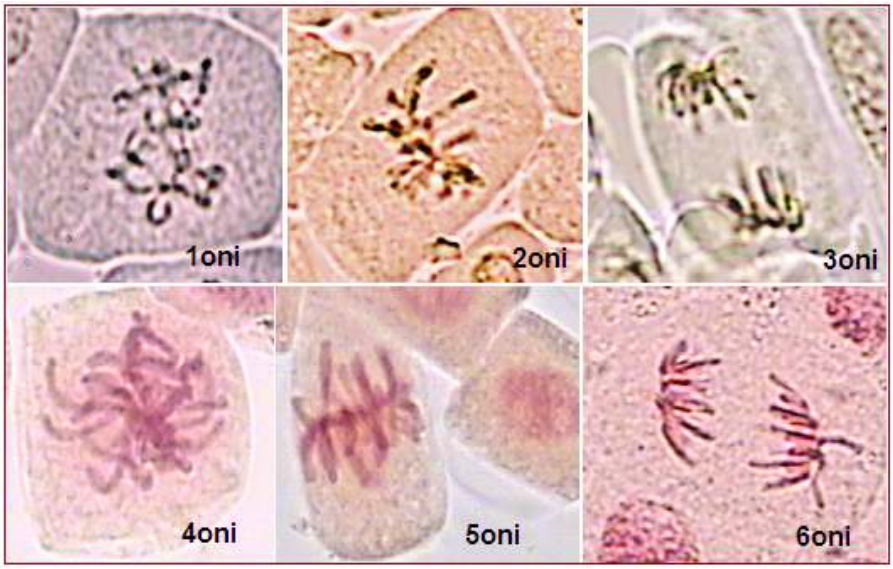
رنگ آمیزی دانه‌های گرده با استوروناسین نشان داد که دانه‌های گرده هر دو گونه رنگ می‌گیرند ولی رنگ‌پذیری گرده نرگس بهتر از گل گندم بود. در گرده نرگس هسته قرمز متمایل به قهوه‌ای، سیتوپلاسم به شکل دانه‌های قهوه‌ای در زمینه زرد و دیواره اگزینی بنفش، دیواره اینتینی زرد و غشاء قهوه‌ای شدند (شکل ۳- چپ). رنگ‌پذیری گرده گل گندم مشابه نرگس ولی با شدت کمتر بود (شکل ۳- راست).



شکل ۳- گرده‌های گل گندم (راست) و نرگس (چپ) رنگ شده با استوروناسین

رنگ آمیزی یاخته های مریستمی نوک ریشه سه گونه پیاز خوراکی، نرگس و گل‌گندم نشان داد که هسته‌ها و کروموزوم‌ها در همه مراحل تقسیم میتوز با استوروناسین به‌خوبی استوکارمن رنگ می‌شوند و حتی در مواردی به نظر شفاف‌تر و واضح‌تر از استوکارمن هستند (شکل‌های ۷-۴). مقایسه رنگ آمیزی با این دو رنگ نشان داد که هسته‌ها و کروموزوم‌ها با استوکارمن قرمز تا صورتی ولی با استوروناسین قهوه‌ای تا سیاه می‌شوند. هستک‌ها با هر دو رنگ بی‌رنگ بودند. رنگ کروموزوم‌ها با استوکارمن یکنواخت‌تر از استوروناسین بود. کروموزوم‌ها با استوروناسین ظاهری بند بند داشتند.

شکل ۴- نمایش مراحل اینترفاز و تلوفاز یاخته‌های مریستم نوک ریشه پیاز خوراکی رنگ شده با استوکارمن (راست) و استوروناسین (چپ): ۱- فراگموپلاست، ۲- هسته، ۳- هستک و ۴- تلوفاز



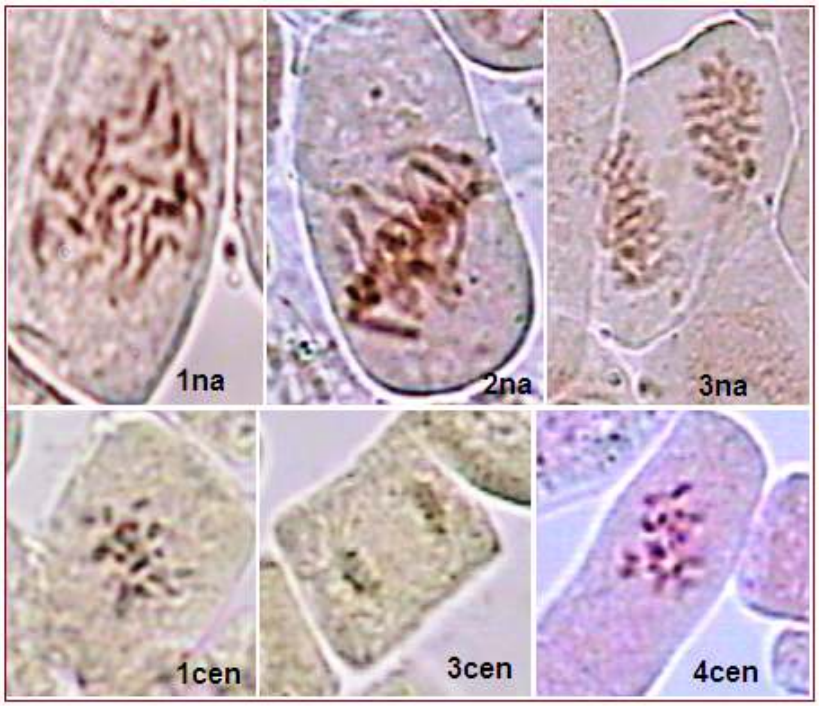
شکل ۵- مراحل تقسیم میتوز یاخته‌های مریستمی نوک ریشه پیاز (oni)، رنگ‌آمیزی شده با استوروناسین (بالا) و استوکارمن (پایین) (۱ و ۴- پروفاز، ۲ و ۵- متافاز و ۳ و ۶- آنافاز)

بحث

آب بهترین حلال برای جدا کردن رنگ‌های روناس است ولی اتانول و استیک اسید خیلی مناسب نبودند. گزارش شده که استفاده از اتانول حلال خوب و مناسب برای استخراج رنگ از روناس است (Bechtold & Mussak, 2009؛ Slyshova *et al*., 2010). با توجه به بیشتر بودن غلظت و تعداد رنگ‌ها در عصاره الکلی ریشه بهاری می‌توان نتیجه گرفت که رنگ‌های محلول در الکل به مقدار کمتری در تابستان و پاییز در ریشه انباشته می‌شوند ولی همواره ریشه غنی از رنگ‌های محلول در آب است. در کروماتوگرافی کاغذی عصاره اسیدی، تنها یک ماده زرد رنگ جدا شد که احتمالا آلیزارین است.

شکل ۶- رنگ‌آمیزی با استوروناسین یاخته‌های مریستم ریشه پیاز خوراکی؛

تلوفاز با تشکیل اولین قطعه دیواره جدید سفید در استوای یاخته (راست) و آنافاز غیر عادی با تأخیر یک کروموزوم (چپ)



شکل ۷- مراحل تقسیم میتوز یاخته‌های مریستم ریشه نرگس (بالا) و گل‌گندم (پایین)،

رنگ‌آمیزی شده با استوروناسین (na ۱-۳ و cen۱، ۳ و۴) و استوکارمن (cen ۴): ۱ و ۴- پروفاز، ۲- متافاز و ۳- آنافاز

آلیزارین در محیط بازی قرمز رنگ ولی در محیط اسیدی زرد رنگ است (Hostettmann, 1980). یکی از عوامل مؤثر بر رنگ آمیزی اختصاصی یاخته ها و بافت، اسیدی و بازی بودن رنگ‌هاست. رنگ‌های اسیدی، ساختارهای بازی و رنگ های بازی ساختارهای اسیدی را رنگ می‌کنند (Chukwu *et al*., 2011). استوروناسین با

پودر ریشه روناس مشابه استوکارمن با اسید ضعیف استیک اسید تهیه شد. استوروناسین توانست مثل استوکارمن که به‌طور عمومی برای مطالعات سیتولوژی استفاده می‌شود عمل کند و هسته و کروموزوم‌های یاخته ها را به‌خوبی استوکارمن به جای رنگ قرمز به رنگ قهوه‌ای رنگ نماید. البته رنگ‌آمیزی یاخته‌های روپوست پیاز با عصاره الکلی برگ لاوزونیا (*Lowsonia inarmis*) در مقایسه با رنگ آمایشی سافرانین تا حدودی موفق بوده است (Aguoru *et al*., 2015). جداسازی رنگ از گیاهانی مانند ختمی، روناس و چندین گیاه دیگر برای رنگ‌آمیزی یاخته‌های قارچ‌ها، جانوران، گیاهان و چند تک یاخته‌ای نشان داده است که این گونه رنگ‌ها قابل استفاده هستند ولی اثر کلی آنها و به‌ویژه روناس ضعیف است (Marhaba & Haniloo, 2018؛ Deepali *et al*., 2014). پژوهشگران زیادی برای بدست آوردن رنگ‌های گیاهی در حال تحقیق هستند. به نظر این پژوهشگران رنگ زیستی خوب رنگی است که سمی نباشد، با محیط‌زیست دوست و ارزش اقتصادی داشته باشد. برخی از رنگ های گیاهی ازجمله رنگ روناس نه فقط سمی نیستند بلکه خاصیت دارویی داشته و مفیدند (Chengaiah *et al*., 2010). نتایج این تحقیق نشان داد که در رنگ‌آمیزی یاخته‌ها با استوروناسین، اجزای یاخته‌ها به همان خوبی رنگ آمیزی با استوکارمن و در مواردی با وضوح بیشتر قابل مشاهده و مطالعه هستند. پس می‌توان نتیجه گرفت که برخی از رنگ‌های گیاهی مانند استوروناسین برای مطالعات یاخته‌شناسی مناسب هستند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید اشاره کرد که نتایج این پژوهش نشان دهنده این است که به جای کاغذ کروماتوگرافی و کاغذ صافی، می‌توان از مواد در دسترس مثل کاغذ نوشتاری A_4 و دستمال کاغذی استفاده و نتایج خوبی هم بدست آورد. استوروناسین که کاملاً ارگانیک بوده و به بدن و محیط صدمه نمی‌زند، به سادگی از گیاه دارویی و صنعتی روناس که تقریباً در همه جای کشورمان می‌روید (و حتی صادر می‌شود) و در بازار قیمتی برابر کیلویی ۱۸ هزار تومان (جهاد کشاورزی نایین) دارد (کیلویی یک دلار به خارج صادر می‌شود)، آماده می‌شود. رنگ استوروناسین را می‌توان با کمی تغییر، تجاری‌سازی و جایگزین رنگ های سنتزی خارجی مثل استوکارمین کرد که قیمت هر بسته ۵ گرمی کارمین آن از شرکت مرک (sigmaaldrich-Merk) ۶۶ یورو (کیلویی ۱۳۲۰۰ یورو) و به‌عبارتی قیمت آن پانزده هزار برابر قیمت روناس است.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه که در این پژوهش از تجهیزات آزمایشگاه‌های آن استفاده شد، قدردانی می‌کنیم.

منابع مورد استفاده

- Aguoru, C.U., Okpe, F.O. and Olasan, J.O., 2015. Comparative staining efficacy of safranin and *Lawsonia inermis* L. aqueous ethanolic leaf extract on epidermal cells of *Allium cepa* L. International Journal of Current Research in Bioscience of Plant Biology, 2(4): 108-111.
- Bechtold, T. and Mussak, R., 2009. Natural Colorants, Quinoid, Naphthoquinoid and Anthraquinoid Dyes. John Wiley and Sons Publications Ltd, Chichester, 371p.
- Blömeke, B., Poginsky, B., Schmutte, C., Marquardt, H. and Westendorf, J., 1992. Formation of genotoxic metabolites from anthraquinone glycosides present in *Rubia tinctorum* L. Mutatation Research, 265: 263-272.
- Cardon, D., 2007. Natural Dyes: Sources, Tradition, Technology and Science. Archetype Publications Ltd, London, 325p.
- Chengaiah, B., Rao, K.K., Kumar, K.M., Alagusundaram, M. and Chetty, C.M., 2010. Medicinal importance of dyes: a review. International Journal of PharmTech Research, 2: 144-154.
- Chukwu, O., Odu, C., Chukwu, D., Hafiz, N., Chidozie, V. and Onyimba, L., 2011. Application of extracts of henna (*Lawsonia inamis)* leaves as a counter stain. African Journal of Microbiology Research, 5(21): 3351-3356.
- Deepali, K., Lalita, S. and Deepika, M., 2014. Application of aqueous plant extracts as biological stains. International Journal of Scientific and Engineering Research, 5(2): 1586-1589.

- Ford, L., Rayner, C.M. and Blackburn, R.S., 2018. Comparative sorption isotherms for colorants present in Dyers' madder (*Rubia tinctorum* L.) provide new insights into historical dyeing. Color Technology, 134(1): 3-12.
- Goodarzian, H. and Ekrami, E., 2010. Extraction of dye from madder plant (*Rubia Tinctorium* L.) and dyeing of wool. World Apply Science Journal, 9(4): 434-436.
- Gupta, K.C., Bhamarah, H.S. and Sandhu, G.S., 2006. Reaserch Techniques in Biological Science. Dominant Publishers, 221p.
- Ihuma, J., Asenge, G., Abioye, K. and Dick, S., 2012. Application of meth-anolic extracts from *Hibiscus Sabdariffa* line as a biological staining agent for some fungal species. International Journal of Plant, Animal and Environment Science, 2(3): 543-549.
- Hostettmann, K., 1980. Droplet counter-current chromatography and its application to the preparative scale separation of natural products. Planta Medica, 39: 1-18.
- Marhaba, Z. and Haniloo, A., 2018. Staining of parasitic helminths by extracts of *Allium cepa*, *Juglans regia* and *Rubia tinctorum*: an approach to herbal dye. Iranian Journal of Parasitology, 13(2): 293-300.
- Slyshova, A.V., Rogov, A.V., Krutov, P.V., Sokolov, I.V., Lukashina, T.V., Sheichenko, V.I., Sokol'skaya, T.A., Bykov, V.A., Kislina, E.F. and Osokin, D.M., 2010. Studying anthraglycosides in common runas dry extract obtained from root and rhizome of *Rubia tinctorum*. Voprosy Biologicheskoi, Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii, 2: 24-27.
- Taylor, D.J., Green, N.P.O. and Stout, G.W., 2007. Microscopic Preparations and Histology. In: Biological Sciences. 6th Edn, 163-186.

Dye extraction and separation in *Rubia tinctorum* L. with three solvents in three seasons and its application for cytological studies

A. Ataei Azimi[1*] and B. Delnavaz Hashemloian[2]

1*- Corresponding author, Biological Department, Saveh branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
E-mail: baharana1395@gmail.com; hashemloian1343@gmail.com
2- Biological Department, Saveh branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: March 2018 Revised: October 2018 Accepted: January 2019

Abstract

In cytology studies, colors are used to differentiate the components of cells that are transparent. Most of the dyes are synthetic and can harm human and environment. Herbal dyes are safe. Since ancient times in Iran, the natural dye of madder (*Rubia tinctorum* L.) has been used in the textile industry. In this research, the madder root dye was extracted with water, ethanol and acid at the end of spring, summer and autumn and its colors were separated by paper chromatography. Acetoronacin was prepared from the dye extracted from madder. Acetoronacin was used to stain epidermal cells, stomata guard cells, pollen, and the plant mitosis. The results showed that the best solvent to isolate the dye of madder was water. Chromatography results showed that the type and number of colors (5 colors) in the aqueous extract of madder root in the three seasons were similar, but some of them were higher at the end of the summer. Soluble colors in alcohol (3 colors) were observed in the ethanolic extract at the end of spring. Only one yellow color, probably alizarin, was isolated from the acid extract. Staining the cells with acetoronacin in all cases showed that the color was comparable and even better than acetocarmine. Nuclei and chromosomes of cells were stained brown by staining with acetoronacin in a transparent background. In general, the results showed that this dye can replace the synthetic dyes in the plant cell research laboratories.

Keywords: Cytology, chromatography, madder (*Rubia tinctorum* L.), dye.