Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۱۲-۱۰۳، ۱۳۸۹

مقالهٔ پژوهشی

# اثر کلرامفنیکل بر مقدار آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در گیاه *Datura stramonium* L.

نسرین عاقل[*1]، هیبت‌الله کلانتری[2]


## خلاصه

**مقدمه:** با توجه به اهمیت آتروپین و اسکوپولامین به‌عنوان داروهایی با منشأ طبیعی، هدف از این تحقیق بررسی اثر کلرامفنیکل (به‌عنوان یک وقفه دهنده سنتز پروتئین) در افزایش احتمالی سنتز آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در گیاه داتوره (*Datura stramonium* L.) می‌باشد.

**روش:** پس از کشت تخم گیاه در چهار کرت مساوی در مزرعه آزمایشی دانشکده، غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ واحد در میلیون) و آب به‌ترتیب در سه کرت نمونه و یک کرت شاهد و در طی ۱۸ هفته به‌صورت هفته‌ای یک بار به گیاه پاشیده شد. هفته‌ای یک بار پس از نمونه‌برداری از اندام‌های مختلف گیاه، مراحل استخراج، جداسازی و خالص‌سازی آلکالوئیدها انجام شد. با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک تهیه‌ای، دو آلکالوئید به‌صورت خالص تهیه شدند و پس از تأیید ساختمان شیمیایی آنها با روش‌های اسپکتروسکوپی ( IR, UV, $^{13}$C NMR و Mass)، تعیین مقدار کمی با اسپکتروسکوپی ماوراء بنفش انجام شد.

**یافته‌ها:** حداکثر مقدار آلکالوئیدها در هفته دهم بررسی یعنی پیش از گل‌دهی بود. بهترین نتیجه در افزایش غلظت آلکالوئیدهای مورد نظر با استفاده از افشانه حاوی غلظت 200 ppm از کلرامفنیکل حاصل شد. کلرامفنیکل با این غلظت، مقادیر آتروپین و اسکوپولامین را در کل گیاه به‌ترتیب به میزان ۱۱۰ و ۱۰۰ درصد، نسبت به کنترل افزایش داد ($P< ۰/۰۰۵$).

**نتیجه‌گیری:** تعیین نسبت اسکوپولامین به آتروپین نمایانگر کاهش واضح این نسبت با گذشت زمان بود که مرحله گل‌دهی را می توان به عنوان مرزی در نظر گرفت که قبل از آن اسکوپولامین و پس از آن آتروپین آلکالوئید در گیاه غالب می‌باشند. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که افزایش دسترسی به اسیدهای آمینه، به‌دنبال وقفه سنتز پروتئین‌ها، می‌تواند باعث افزایش سنتز آلکالوئیدها شود.


**واژه‌های کلیدی:** آتروپین، اسکوپولامین، کلرامفنیکل، *Datura stramonium*

۱- دانشیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز ۲- استاد گروه سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، شهر دانشگاهی، بلوار گلستان، اهواز ● **آدرس پست الکترونیک:** aghelnas@yahoo.com

**دریافت مقاله:** ۱۳۸۷/۱۰/۱۱ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۸/۷/۲۶ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۸/۸/۷



www.SID.ir

Archive of SID



**مقدمه**

در مورد گونه‌های مختلف گیاه داتوره (*Datura stramonium* L.) و آلکالوئیدهای آن تحقیقات متعددی در زمینه‌های مختلف از قبیل بیوسنتز آلکالوئیدها (۱،۲)، ساختمان آلکالوئیدها (۳)، توزیع و تجمع آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف (۷-۴)، گونه‌های مختلف این جنس و همین‌طور جداسازی و تعیین مقدار کمی آلکالوئیدهای آن انجام شده است (۸،۹). افزایش سنتز پروتئین در گیاه، پیشتازهای لازم برای مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها را کاهش داده و نتیجه احتمالی آن کاهش سنتز آلکالوئید در گیاه خواهد بود. کلرامفنیکل یک وقفه‌دهنده سنتز پروتئین در ریبوزوم کلروپلاست‌های گیاهی است (۱۰). این تحقیق به‌منظور بررسی این نظریه که آیا به‌کارگیری یک وقفه‌دهنده سنتز پروتئین (مانند کلرامفنیکل) می‌تواند در پی کاهش سنتز پروتئین و به‌دنبال آن افزایش اسیدهای آمینه آزاد، موجب افزایش سنتز آلکالوئیدها شود، انجام شد. در یک پژوهش، با هدفی تقریبا مشابه تحقیق فعلی، کلرامفنیکل به محیط کشت بافت دو گونه داتوره اضافه شده است (۱۱).

با توجه به اهمیت گسترده اسکوپولامین و آتروپین به‌عنوان دو آلکالوئید اصلی و تمایل به افزایش سنتز آنها در این گیاه، در این بررسی اهداف زیر دنبال گردید:

۱- جداسازی آلکالوئیدهای گیاه به‌طور مجزا

۲- بررسی اثر کلرامفنیکل به‌عنوان یک وقفه دهنده سنتز پروتئین بر مقدار کمی آلکالوئیدهای سنتز شده در گیاه

۳- انجام یک بررسی انتوژنیک به منظور تعیین بهترین زمان برداشت محصول داتوره متناسب با نوع آلکالوئید مورد نظر به منظور راه‌گشایی برای استخراج صنعتی آتروپین و اسکوپولامین.

**روش بررسی**

**مواد مورد استفاده**

استانداردهای آتروپین و اسکوپولامین به‌صورت پودر از بوهرینگر اینگلهایم آلمان و کلرامفنیکل سدیم سوکسینات USP از مرک آلمان تهیه گردید. سایر حلال‌های شیمیایی مورد استفاده همگی از مرک آلمان بودند.

**کاشت و برداشت**

در مزرعه آزمایشی دانشکده داروسازی اهواز، زمینی به‌مساحت ۳۰ مترمربع تقسیم شده به چهار کرت مساوی (یک کرت شاهد و سه کرت نمونه) در ابعاد ۲/۵ × ۳ متر آماده گردید. با انجام آنالیز خاک زمین توسط گروه خاک‌شناسی دانشکده کشاورزی اهواز این نتایج حاصل گردید:

رطوبت = ۴/۴٪، پی اچ= ۸/۱، شن= ۴۵/۷٪، رس=۲۱/۶٪، کربن آلی = ۱/۰۳٪ و وزن مخصوص حقیقی= ۲/۷۲

دانه‌های شناسایی شده گیاه *Datura stramonium* از باغ گیاه‌شناسی ایران، وابسته به مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران (کرج) تهیه گردید و در فروردین ماه ۱۳۸۳ به‌صورت خطی و با فواصل ۵۰ سانتی‌متر از هم کاشته شد. پس از یک هفته و در حالیکه گیاه تازه روییده بود، در سه کرت نمونه غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ واحد در میلیون (ppm) از کلرامفنیکل با آبپاش معمولی به گیاهان پاشیده شد. برای هر کرت دو لیتر از کلرامفنیکل با غلظت‌های یاد شده استفاده شد. بر روی کرت شاهد نیز آب پاشیده شد. این کار هفته‌ای یک‌بار و تا ۱۸ هفته، در ساعت ۱۹ بعد از ظهر، تکرار گردید.

نمونه‌برداری در ۹ مرحله و هر دو هفته یک بار از قسمت‌های مختلف کرت‌ها و به‌صورت کاملا تصادفی، در ساعت ۹ صبح انجام می‌شد. اولین نمونه‌برداری دو هفته پس از اولین اسپری و در شرایطی که گیاه حداکثر ۴ برگ داشت، انجام گردید. ظهور غنچه‌ها در مرحله پنجم، گل‌دهی در مرحله ششم و مشاهده میوه‌ها در مرحله هفتم اسپری بود. در هر مرحله نمونه‌برداری، ۲ بوته از هر کرت خارج شده و هر نمونه به سه اندام: برگ، ساقه (لیفی) و ریشه تقسیم شده و به‌طور جداگانه در سایه خشک می‌گردید. نمونه‌ها پس



www.SID.ir

Archive of SID



از آسیاب، از الک ۱۸ مش عبور داده شده و در ظروف مناسب تا زمان استخراج در یخچال نگهداری می‌شدند.

**استخراج آلکالوئیدها**

یک گرم پودر گیاه در ۸ میلی لیتر اتانول و ۴ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در ارلن مایر برای ۲۴ ساعت خیسانده شد. پس از صاف کردن با قیف بوخنر، برای اطمینان از کفایت استخراج کامل، تست مایر روی تفاله انجام شد.

عصاره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در خلاء تغلیظ گردید. عصاره‌ها سه بار با کلروفرم، برای جداسازی رنگدانه‌ها و چربی‌ها، شسته شدند. عصاره با آمونیاک غلیظ قلیائی شد و چهار بار و هربار با ۱۵ میلی‌لیتر کلروفرم دکانته شد و بدین ترتیب آلکالوئیدها به فاز آلی منتقل شدند. برای خالص‌سازی بیشتر، پس از اسیدی کردن استخراج کلروفرمی با اسید کلریدریک، عصاره مجدداً با آمونیاک قلیایی گردید و خالص‌سازی نهایی با متیلن کلراید انجام شد. حلال در خلأ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً جدا گردید و حاصل استخراج در شیشه‌های مناسب دربسته تا انجام مراحل بعدی در فریزر نگهداری شد (۱۲).

**آنالیز کمی آلکالوئیدهای استخراجی**

برای به‌دست آوردن آلکالوئیدها به‌طور مجزا و خالص، کروماتوگرافی تهیه‌ای انجام شد. حاصل استخراج نهایی مرحله قبل، در ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول حل شده و به‌صورت یک نوار روی پلیت سلیکاژل ۶۰G به همراه لکه‌هایی از آتروپین و اسکوپولامین استاندارد قرار داده شد. فاز متحرک، مخلوط استن: آب: آمونیاک غلیظ (۳: ۷: ۹۰)بود. پس از آنکه سیستم حلال طول پلیت را طی کرد، از تانک خارج شده و پلیت خشک گردید. در محاسبه، $R_f$ برابر با ۰/۱۱ و ۰/۸ به‌ترتیب برای آتروپین و اسکوپولامین به‌دست آمد که با استانداردها مطابقت دارد. سپس لکه‌ها اسکراپ شده و نقطه ذوب آنها به روش کاپیلاری و حمام پارافین تعیین شد. نقاط ذوب به‌دست آمده برای آتروپین و اسکوپولامین با نقاط ذوب استاندارد (به‌ترتیب ۱۱۴ و ۵۹ درجه سانتی‌گراد) مطابقت دارد. این کروماتوگرافی دوباره تکرار شد و پس از خشک شدن پلیت و اسپری با معرف دراژندورف، عمل اسکراپ در دو منطقه وجود آلکالوئیدها، در مقایسه با استانداردها، انجام گردید. تعیین مقدار کمی با روش اسپکتروفتومتری ماوراءبنفش انجام گردید. جذب کلیه نمونه‌ها برای آتروپین در حضور بلانک (آب) و در طول موج ۲۵۷/۸ نانومتر و برای اسکوپولامین در ۲۵۷/۹ نانومتر قرائت گردید (۱۳،۱۴).

برای آنالیز آماری نمونه‌ها از آنالیز واریانس یک و دوطرفه استفاده شد و $P<0/005$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**شناسایی ساختمان شیمیایی آتروپین و اسکوپولامین**

برای شناسایی ساختمان شیمیایی آلکالوئیدهای استخراج شده از طیف‌های $^{13}C$ NMR (این طیف با دستگاه FT – NMR – Brucker 80 گرفته شده است)، IR, UV (این طیف به‌صورت قرص KBr و با دستگاه FT – IR, 4300, Shimadzu, Japan گرفته شده است) و Mass (این طیف با دستگاه Varian Mat, 311-A, Germany گرفته شد) در مقایسه با استاندارد استفاده گردید.

## نتایج

**شناسایی ساختمان آتروپین**

نتایج طیف‌های اسپکتروسکوپی IR, $^{13}C$ NMR و Mass مربوط به شناسایی ساختمان آتروپین در جداول شماره ۱ تا ۳ آورده شده است. نتایج گرفته شده با استاندارد آتروپین مطابقت دارد.

**طیف ماوراء بنفش شناسایی آتروپین**

این طیف با دستگاه Jasco–7800 (ساخت ژاپن) و در حلال متانول گرفته شد. این طیف ساختمان آروماتیکی آتروپین را با جذب‌های در محدوده nm ۲۷۱–۲۵۰ تأیید می‌کند.



www.SID.ir

Archive of SID



**جدول ۱.** *طیف IR شناسایی آتروپین*

| ساختمان | عدد موجی |
|---|---|
| حلقه آروماتیک | C=C (str): 1600 and 1492 $cm^{-1}$<br>=C-H (bend.; Out of plane): 727.1 and 694.3 $cm^{-1}$<br>=C-H (str): 3084 $cm^{-1}$<br>Harmonic/Combination: 1963.4 – 1876.6 $cm^{-1}$ |
| گروه استری | C=O (str): 1730 $cm^{-1}$<br>C –O (str): 1170.7 and 1035.7 $cm^{-1}$ |
| گروه الکلی | O – H (str): (3446.8-3000) $cm^{-1}$<br>C – O (str): 1070 $cm^{-1}$ |
| گروه‌های آلکان‌ها | $CH_{ali}$ (str): 2943.2 $cm^{-1}$<br>$CH_3$ (bend.): 1377 $cm^{-1}$<br>$CH_2$ (bend.): 1470 $cm^{-1}$ |

**جدول ۲.** *طیف $^{13}C$ NMR شناسایی آتروپین*

| ساختمان | تغییر مکان |
|---|---|
| کربن‌های حلقه بنزنی | چهار پیک در ۱۲۷–۱۳۷ ppm<br>(چهار نوع کربن حلقه بنزنی، دو جفت کربن‌های ارتو و متا یکسان بوده و حلقه آروماتیک تک استخلافی تأیید گردید.) |
| کربن گروه کربونیل استری | ۱۷۲/۵ ppm |
| گروه‌های متیل، متیلن و متین | ۰–۷۰ ppm<br>(تأیید با طیف‌های Dept 90° و Dept 135°) |

**جدول ۳.** *طیف جرمی شناسایی آتروپین*

| m/e | شدت |
|---|---|
| ۲۸۹ (یون ملکولی) | ۵/۶ |
| ۲۷۱ | ۲/۸ |
| ۱۴۰ | ۱۷/۳ |
| ۱۲۴ | ۹۷/۶ |
| ۱۰۳ | ۱۲/۱ |
| ۹۵ | ۲۳/۴ |
| ۹۴ | ۴۶/۷ |
| ۸۲ | ۱۰۰ |
| ۶۷ | ۵۳/۳ |
| ۵۷ | ۲۰/۱ |
| ۴۱ | ۳/۳ |
| ۲۸ | ۳/۳ |

**شناسایی ساختمان اسکوپولامین**

نتایج طیف‌های اسپکتروسکوپی IR, $^{13}C$ NMR و Mass (این طیف با دستگاه Varian Mat, 311-A, Germany گرفته شده است) مربوط به شناسایی ساختمان اسکوپولامین در جداول شماره ۴ تا ۶ آورده شده است. نتایج گرفته شده با استاندارد اسکوپولامین مطابقت دارد

**طیف ماوراء بنفش**

این طیف ساختمان آروماتیکی اسکوپولامین را با جذب‌های موجود در محدوده nm ۲۷۰–۲۵۰ تأیید می‌نماید که با استاندارد مطابقت دارد.

**جدول ٤.** *طیف IR شناسایی اسکوپولامین*

| ساختمان | عدد موجی |
|---|---|
| حلقه آروماتیک | C=C (str.): 1627.8 and 1600 $cm^{-1}$<br>=C – H (bend.; out of plane): 702 and 734.7 $cm^{-1}$<br>= C – H (str.): 3030.6 $cm^{-1}$<br>Harmonic/Combination: 1976-1838 $cm^{-1}$ |
| گروه استری | C=O (sztr.): 1730.0 $cm^{-1}$<br>C – O (str.): 1236.3 and zz1164.0 $cm^{-1}$ |
| گروه اپوکساید | C – O (str.): 904.5 and 850.5 $cm^{-1}$ |
| گروه الکلی | O – H (str.): 3600-3300 $cm^{-1}$<br>C – O (str.): 1043.4 $cm^{-1}$ |
| گروه‌های آلکان‌ها | $CH_{ali.}$ (str.): 2846.7 $cm^{-1}$<br>$CH_3$ (bend.): 1342.3 $cm^{-1}$<br>$CH_2$ (bend.): 1458.1 $cm^{-1}$ |

**جدول ۵.** *طیف $^{13}C$ NMR شناسایی اسکوپولامین*

| ساختمان | تغییر مکان |
|---|---|
| کربن‌های بنزنی | چهار پیک در 127/34-136/19 ppm<br>(چهار نوع کربن حلقه بنزنی، دو جفت کربن‌های ارتو و متا یکسان بوده و حلقه آروماتیک تک استخلافی تأیید گردید.) |
| کربن گروه کربونیل استری | ۱۲۷/۵ ppm |
| گروه‌های متیل، متیلن و متین | ۲۵–۶۳ ppm<br>(تأیید با طیف‌های Dept 90° و Dept 135°) |



www.SID.ir

Archive of SID



**جدول٦.** *طیف جرمی شناسایی اسکوپولامین*

| m/e | شدت |
|---|---|
| ۳۰۳ (یون ملکولی) | ۴/۶۷ |
| ۲۸۵ | ۱۷/۹۶ |
| ۱۳۸ | ۲/۷۲ |
| ۱۰۸ | ۳۹/۴۶ |
| ۹۷ | ۲۵/۱۷ |
| ۹۶ | ۲۸/۵۷ |
| ۹۴ | ۵۲/۳۸ |
| ۸۲ | ۴۳/۵۴ |
| ۴۲ | ۴۰/۸۲ |
| ۲۷ | ۱۰۰ |

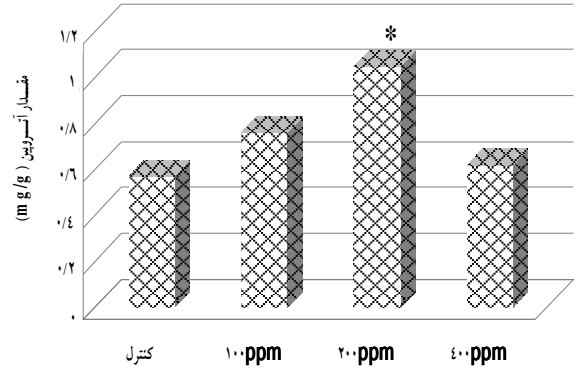
**آنالیز کمی آلکالوئیدها**

برای این کار از اسپکتروفتومتر ماوراءبنفش استفاده شد. مقادیر جذب رقت‌های مختلف استانداردهای دو آلکالوئید تهیه شده در محلول آب طول موج‌های حداکثر آنها یعنی ۲۵۷/۸ و ۲۵۷/۹ نانومتر به‌ترتیب برای آتروپین و اسکوپولامین قرائت شده و منحنی استاندارد برای آنها رسم گردید. جذب نمونه‌های مورد بررسی نیز در این طول موج‌ها خوانده شد و با استفاده از منحنی رسم شده غلظت آنها تعیین گردید.

با استفاده از آنالیز واریانس یک و دو طرفه، داده‌ها آنالیز شدند. در مرحله اول، دو عامل اندام‌های مختلف گیاه و سطوح مختلف غلظت کلرامفنیکل برای آنالیز واریانس دوطرفه برای آتروپین و اسکوپولامین به‌طور جداگانه در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که هر دو عامل برای دو آلکالوئید با P< ۰/۰۰۵ معنی‌دار است یعنی میانگین دو آلکالوئید در چهار سطح غلظت کلرامفنیکل و نیز در اندام‌های مختلف گیاه، متفاوت است. آنالیز واریانس یک‌طرفه برای آتروپین و اسکوپولامین برگ، ساقه و ریشه و نیز روش دانکن (Duncan new multiple range test) برای مقایسه میانگین‌ها به‌طور مجزا انجام شد.

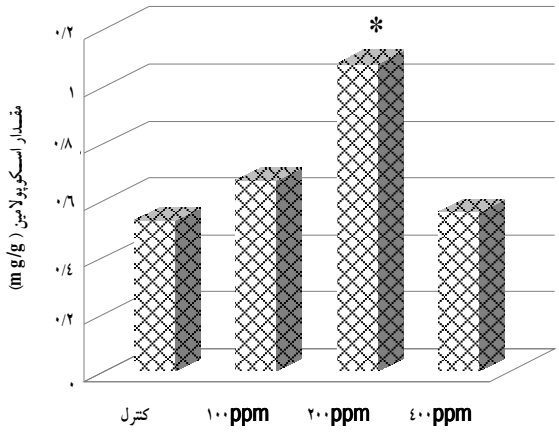
مقایسه اثر کلرامفنیکل بر مقادیر آتروپین و اسکوپولامین اندام‌های برگ، ساقه و ریشه و نیز در کل گیاه در نمودارهای ستونی ۱ تا ۸ آورده شده است.

نتایج نشان می‌دهد که کلرامفنیکل بیشترین اثر خود را با غلظت ppm ۲۰۰ ایجاد نموده و در این غلظت نتایج با کنترل تفاوت معنی‌دار داشته است. بیشترین اثر کلرامفنیکل با این غلظت بر میزان آتروپین ریشه بوده است که حدود ۱۱۵٪ افزایش را نشان می‌دهد. جالب توجه آنکه کمترین اثر کلرامفنیکل با همین غلظت، بر روی اسکوپولامین ریشه بوده است که تنها افزایشی حدود ۸۷٪ را نشان می دهد.




**نمودار ۱.** *مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر آتروپین برگ گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

*نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به کنترل است (P<۰/۰۵)




**نمودار ۲.** *مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر اسکوپولامین برگ گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

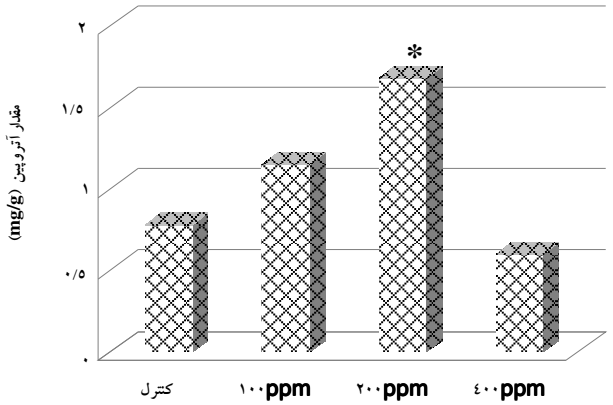
*نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به کنترل است (P<۰/۰۰۵)



www.SID.ir

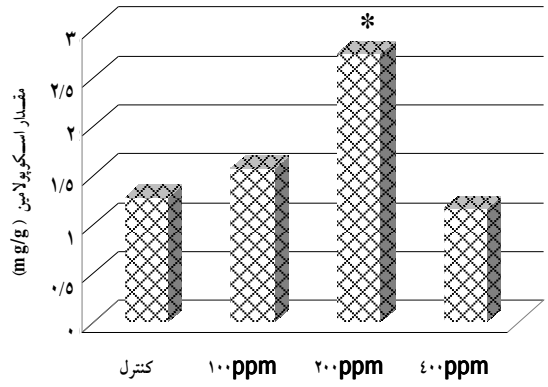
Archive of SID





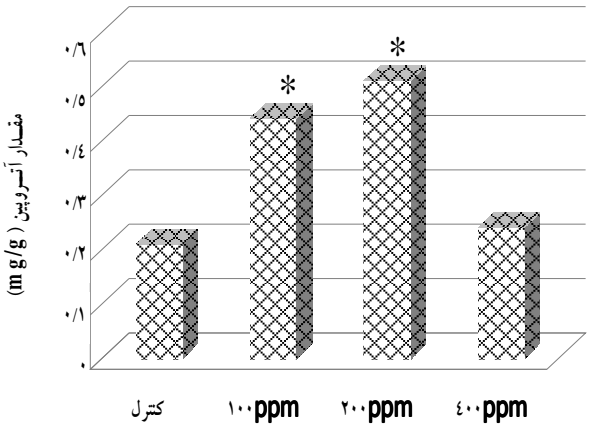

**نمودار ۳.** *مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر آتروپین ساقه گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به کنترل است ($P<0/005$)



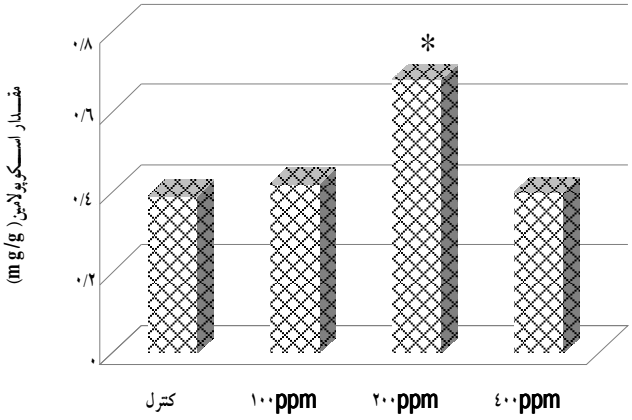

**نمودار ٤.** *مقایسه اثرغلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر اسکوپولامین ساقه گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به کنترل است ($P<0/005$)



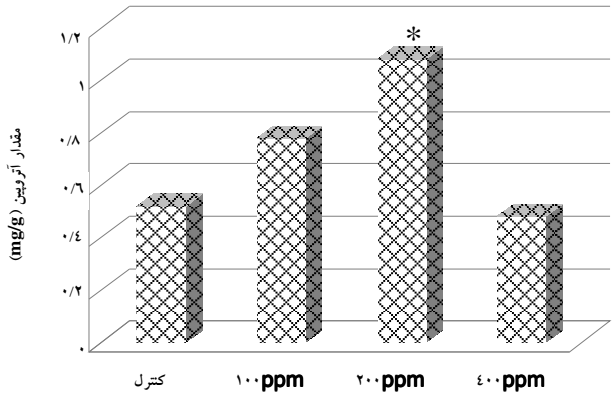

**نمودار ۵.** *مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر آتروپین ریشه گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

*نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری با کنترل است ($P<0/005$)



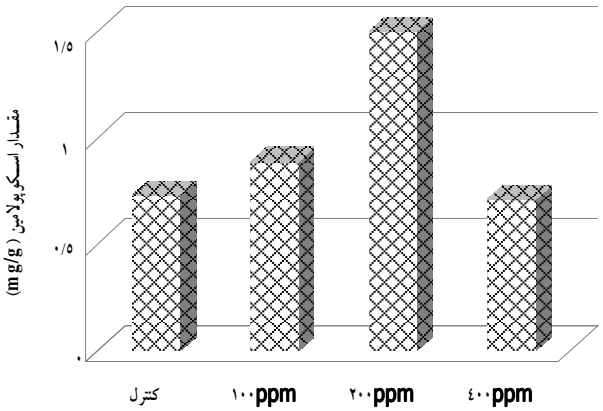

**نمودار ٦.** *مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر اسکوپولامین ریشه گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به کنترل است ($P<0/005$).




**نمودار ۷.** *مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر اتروپین کل گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به کنترل است ($P<0/005$).




**نمودار ۸** *مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل بر مقادیر اسکوپولامین کل گیاه Datura stramonium نسبت به کنترل*

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به کنترل است ($P<0/005$)



www.SID.ir

Archive of SID



از نتایج به‌دست آمده این‌گونه استنباط می‌شود که اثر دو غلظت ppm ۱۰۰ و ppm ۴۰۰ کلرامفنیکل در افزایش دو آلکالوئید برگ و ساقه در مقایسه با کنترل معنی‌دار نبوده است. اثر دو غلظت ppm ۱۰۰ و ppm ۲۰۰ کلرامفنیکل بر افزایش آتروپین و غلظت ppm ۲۰۰ بر افزایش اسکوپولامین موجود در ریشه و نیز در کل گیاه، در مقایسه با کنترل معنی‌دار بوده است.

در مرحله بعد، با استفاده از مقادیر آلکالوئیدهای برگ، ساقه و ریشه، مقادیر آتروپین و اسکوپولامین برای هر گرم پودر گیاه محاسبه گردید و آنالیز واریانس و نیز آزمون مقایسه میانگین‌ها روی آنها انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که غلظت ppm ۲۰۰ کلرامفنیکل توانسته است آتروپین را در کل گیاه به میزان ۱۱۰٪ و اسکوپولامین را به میزان ۱۰۰٪ افزایش دهد و اختلاف در هر دو مورد با کنترل معنی‌دار بوده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهند که آتروپین و اسکوپولامین در همه مراحل رشد در کلیه اندام‌های مورد بررسی وجود داشته‌اند. طبق منابع در دسترس، آلکالوئیدهای گیاه داتورا در مرحله قبل از گل دادن به حداکثر مقدار خود می‌رسند (۱۵).نتایج این تحقیق نیز با منابع مطابقت داشته و نشان می‌دهد که به حداکثر رسیدن مجموع دو آلکالوئید در مرحله قبل از گل دادن (هفته دهم) می‌باشد. این افزایش در ریشه کمی زودتر از سایر اندام‌های گیاه مشاهده می‌شود (هفته هشتم). تغییر قابل توجهی که در منابع به آن اشاره نشده است، مربوط به مراحل اولیه رشد گیاه در حدود هفته ششم است که در مطالعه حاضر یک افزایش قابل ملاحظه در میزان اسکوپولامین به‌خصوص در ساقه مشاهده شد. میزان اسکوپولامین ساقه دارای مقدار حداکثر در هفته ششم، با کاربرد کلرامفنیکل در غلظت ppm ۲۰۰ به میزان ۸۴/۳٪ افزایش یافت.

بیشترین مقدار آلکالوئیدها، برخلاف گزارشات قبلی که دربرگ مشاهده شده بود، در ساقه گیاه ثبت گردید و در کل سرشاخه‌های گیاه از لحاظ استخراج آلکالوئیدها قابل اهمیت هستند.

مقدار آتروپین کل گیاه در هفته دهم حداکثر بود، در حالی‌که حداکثر مقدار اسکوپولامین در هفته‌های ششم و دهم بود. به‌کارگیری غلظت ppm ۲۰۰ کلرامفنیکل باعث افزایشی به میزان ۱۰۱٪ در میزان آتروپین هفته دهم و افزایش‌های ۸۴/۵٪ و ۱۲۰٪ در اسکوپولامین هفته‌های ششم و هشتم، به‌ترتیب، نسبت به کنترل گردید.

تغییرات نسبت اسکوپولامین به آتروپین نیز مطابق نتایج مطالعات قبلی یعنی کاهش این نسبت با افزایش سن گیاه بوده است (۱۶). در برگ این نسبت تا هفته ششم به حداکثر میزان خود رسید و به‌تدریج با افزایش سن گیاه کاهش یافت و در حدود هفته دوازدهم این نسبت برابر یک گردید. مرحله گل دهی را می‌توان مرزی در نظر گرفت که قبل از آن اسکوپولامین و پس از آن آتروپین، آلکالوئید غالب است. با به‌کارگیری غلظت‌های مختلف کلرامفنیکل، تغییرات نسبت اسکوپولامین به آتروپین دارای حداکثری در هفته‌های چهارم تا ششم بود و بتدریج با افزایش سن گیاه، این نسبت کاهش یافت.

در گیاهان عالی، کلرامفنیکل از طریق تأثیر روی تشکیل mRNA باعث مهار سنتز پروتئین می‌شود. در این حالت اسیدهای آمینه آزاد در دسترس بیشتری وجود خواهند داشت و این احتمال وجود دارد که به‌طرف سنتز بیشتر آلکالوئیدها متمایل شوند. نتایج تحقیق انجام شده در سال ۱۹۹۷ نشان داد که افزودن ppm ۲-۱ کلرامفنیکل به محیط کشت بافت گیاهان *Datura stramonium* و *Datura innoxia* باعث افزایش رشد کالوس و نیز افزایش تولید هیوسیامین به میزان ۱۱۲ درصد نسبت به کنترل می‌شود (۱۱).

تأثیر اضافه نمودن ترکیبات نیتروژنه ( مثل اسیدهای آمینه) به محیط رشد گیاهان مختلف، مانند داتوره، در افزایش تولید آلکالوئیدها از قبل بررسی شده است (۱۷،۱۸).



www.SID.ir

Archive of SID



تحقیقات قبلی روی گیاهان جنس داتورا ثابت کرده که یک ارتباط معکوس بین محتوای آلکالوئیدها و مقدار اسیدهای آمینه موجود در گیاه (به‌ویژه آرژنین، اورنیتین و پرولین) وجود دارد (۱۹). بررسی‌های دیگر نشان داده که اضافه کردن اسیدهای آمینه فنیل آلانین و تیروزین به محیط کشت بافت *Datura metel* موجب افزایش سنتز آلکالوئیدها توسط گیاه می‌شود (۲۰). طبق یکی از بررسی‌های انجام شده اسیدآمینه گلوتامیک اسید نمی‌تواند به‌طور معنی‌داری موجب افزایش محتوای آلکالوئیدها در محیط کشت ریشه گیاه *Datura tatula* شود (۲۱).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق (افزایش تولید آتروپین در کل گیاه به میزان ۱۱۰٪ و اسکوپولامین به میزان ۱۰۰٪ در اثر به‌کارگیری اسپری کلرامفنیکل) می‌تواند تأییدی بر نظریه تأثیر این وقفه‌دهنده سنتز پروتئین در افزایش سنتز آلکالوئیدها باشد. البته برای اظهارنظر مطمئن‌تر نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد.

پیشنهاد می‌شود برای استخراج صنعتی آلکالوئیدهای گیاه *Datura stramonium* ازروش آبیاری قطره‌ای کلرامفنیکل با غلظت ppm ۲۰۰ به‌صورت هفته‌ای یک بار استفاده شود. هم چنین بهترین زمان محصول‌برداری برای اسکوپولامین هفته هشتم و برای آتروپین هفته دهم می‌باشد.

## The Effect of Chloramphenicol on Atropine and Scopolamine Contents in *Datura Stramonium L.*

**Aghel N., Ph.D.[1*], Kalantari H., Ph.D.[2]**

1. Associate professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ahwaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran
2. Professor of Toxicology, School of Pharmacy, Ahawz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran

* Corresponding author, e-mail: aghelnas@yahoo.com

(Received 1 Jan. 2009 Accepted 29 Oct. 2009)

## Abstract

**Background & Aims:** In regard to the importance of atropine and scopolamine as medicines with natural source, this study was aimed to investigate the effect of chloramphenicol as an inhibitor of protein synthesis on the alkaloids content of *Datura stramonium*.

**Method:** After initial preparation of medicinal garden seeds, they were planted 50 cm apart in four different sections. Three different concentrations of chloramphenicol (100, 200 and 400 ppm) were sprayed on the plant once a week for a period of 18 weeks. Water was applied for the control group. Replicate samples were taken randomly every two weeks from each section. After extraction and separation of the samples, the quantitative analyses were carried out. The levels of atropine and scopolamine were determined using UV spectroscopy (13 CNMR, UV, IR, Mass).

**Results:** The maximum levels of alkaloids were observed in young stems of the plants. The best result was obtained following applying the concentration of 200 ppm, which caused a significant increase in atropine and scopolamine levels in all parts of plant by 100% and 110% respectively in comparison with the control group ($p< 0.005$).

**Conclusion:** Increase in the availability of amino acids may lead to an increase of alkaloids production following protein inhibition synthesis.

**Keywords:** Atropine, Scopolamine, *Datura stramonium*, Chloramphenicol

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2010; 17(2): 103-112



www.SID.ir

Archive of SID



## References


1. Patterson S, O'Hagan D. Biosynthetic studies on the tropane alkaloid hyoscyamine in *Datura stramonium*; hyoscyamine is stable to in vivo oxidation and is not derived from littorine via a vicinal interchange process. *Phytochemistry* 2002; 61(3):323-9.
2. Duran-Patron R, O'Hagan D., Hamilton J.T, Wong C.W. Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium. Phytochemistry* 2000; 53(7): 777-84.
3. Berkov S, Zayed R, Doncheva T. Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia,* 2006; 77(3): 179-82.
4. Berkov S, Pavlov A, Kovatcheva P, Stanimirova P, Philipov S. Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Z Naturforsch* 2003; 58(1-2):42-6.
5. Zayed R, Wink M, El-Shamy H. *In vitro* organogenesis and alkaloid accumulation in *Datura innoxia. Z Naturforsch* 2006; 61(c): 560-4.
6. Missaleva N, Petri G, Reuter G, Szoke E, Markish U, Influence of phaseolotoxin on the alkaloid accumulation in *Datura innoxia Mill. Acta Pharm Hung* 1993; 63(6): 307-12.
7. Miraldi E, Masti A, Ferri S, Barni Comparini I. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium. Fitoterapia* 2001; 72(6): 644-8.
8. Kursinszki L, Hank H, Laszlo I, Szoke E. Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6beta-hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2005; 1091(1-2): 32-9.
9. Talaty N, Takats Z, Cooks RG. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst* 2005; 130(12): 1624-33.
10. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
11. Tailang MK, Ray RK, Kharya MD. Chloramphenicol-induced *in vitro* bioproduction of hyoscyamine from *Datura stramonium Linn*. and *Datura innoxia Mill. Indian j pharmaceutical sciences* 1997; 59(1): 26-9
12. Evans WC. Alkaloids. In: Evans WC (editor) Trease and Evans'pharmacognosy. 14th ed., London, W.B. Saunders, 1999; pp 340-408.
13. Drager B. Analysis of tropane and related alkaloids. *J Chromatogr A* 2002; 978(1-2):1-35.
14. Verpoorte R, Svendsen AB. Chromatography of Alkaloids, Part B, Tropane Alkaloids. Amesterdam, Netherlands, Elsevier Science publisher, 1984; pp 61-72.
15. Verzar-Petri G. Ontogenetic changes in the alkaloid content of some *Datura species*. *Pharmazie* 1966; 21(1): 48-54.
16. Gupta S, Prabhakar VS, Madan C.L. The distribution of total alkaloids and major components in the different organs of *Datura metel var. Fastuosa* at various stages of growth. *Planta Med.* 1973; 23(4): 370-6.
17. Hussein MS, El-Sherbiny SE. Abou Leila BH. Effect of some basic nitrogen compounds on the growth, photosynthetic pigment and alkaloid contents in *Datura metel L. Egyp J Physio Sci* 1992; 16(1-2):




www.SID.ir

Archive of SID



141-50.

18. Youssef AA, El-Mergawi RA, Abd El-Wahed MSA. Effect of putrescine and phenylalanine on growth and alkaloid production of some *Datura species*. *J Agric Sci Mansoura Univ* 2004; 29: 4037-53.
19. Funny E, Dung NN, Verzar-petri G, Potoczki A. Change in the total alkaloid contents in the tissue culture of Datura innaxia Mill. In the function of the cultural circumstances. *Acta Bot Acad Sci Hung* 1982; 29: 403-10.
20. Khanna P, Nag TN. Effects of tyrosine and phenylalanine on growth and alkaloid production in *Datura metel* tissue cultures. Indian *J Pharm* 1972; 34 (2): 42-4.
21. French DI, Gibson MR. The effect of glutamic acid on *Datura tatula L.* root cultures. *J Am Pharm Assoc* 1957; 46(3): 151-5.



www.SID.ir