Archive of SID

در
منابع طبیعی شماره ۷۹، تابستان ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

استخراج و اندازه‌گیری تروپان آلکالوییدهای L– هیوسیامین و (–)– اسکوپولامین (هیوسین) از اندام‌های مختلف *Hyoscyamus reticulatus* L. و *Hyoscyamus pusillus* L.

• **عاطفه بهمن‌زادگان جهرمی**
کارشناس ارشد فیتوشیمی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
• **فاطمه سفید کن**
دانشیار موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
• **علی سنبلی**
عضو هیأت علمی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی
• **کامکار جایمند**
دانشیار موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
تاریخ دریافت: دی‌ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۸۶
Email: frsef@yahoo.com

چکیده

آلکالوییدهای تیره سیب زمینی کاربردهای دارویی فراوانی دارند. از جمله آن‌ها می‌توان هیوسیامین و اسکوپولامین را نام برد که به عنوان داروهای ضد انقباض و تشنج و داروهای چشمی مصرف دارند. در میان تیره سیب زمینی، جنس Hyoscyamus با نام فارسی بنگ دانه با گونه‌های مختلف خود دارای ارزش دارویی ویژه‌ای است. در این تحقیق، گیاهان *Hyoscyamus reticulatus* L. و *Hyoscyamus pusillus* L. از تیره سیب زمینی، از نظر میزان آلکالوییدهای تروپان مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور، اندام‌های مختلف، گیاهان *H. pusillus* L. از قم در مرحله گلدهی و *H. reticulatus* L. از دو منطقه تهران- سد لتیان و باراجین قزوین در مرحله اواخر گلدهی و شروع میوه دهی (میوه نارس)، جمع آوری و پس از استخراج تروپان آلکالوییدها از بخش‌های مختلف آن‌ها به طور جداگانه، میزان آلکالوییدهای L- هیوسیامین و (–)- اسکوپولامین (هیوسین)، با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان دادند که میزان آلکالوییدهای L- هیوسیامین و (–)-اسکوپولامین در بخش‌های مختلف گیاه تفاوت دارند. آلکالوییدغالب در بخش‌های گوناگون *Hyoscyamus pusillus* L. (–)- اسکوپولامین است و L- هیوسیامین، آلکالوییدعمده در بخش‌های مختلف *Hyoscyamus reticulatus* L. از دو منطقه می‌باشد. به علاوه نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان تروپان آلکالوییدها نشان داد که میزان این دو آلکالویید در گیاه *Hyoscyamus reticulatus* L. از تهران نسبت به منطقه قزوین بالاتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: HPLC *Hyoscyamus pusillus* L. *Hyoscyamus reticulatus* L. تیره سیب زمینی، هیوسیاموس، L- هیوسیامین، (–)- اسکوپولامین (هیوسین) و تروپان آلکالوییدها

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No 79 pp: 145-153

Extraction and determination of tropane alkaloids, hyoscyamine and scopolamine, from different parts of *Hyoscyamus reticulatus* L. and *Hyoscyamus pusillus* L.

By: Bahmanzadegan. A, Department of Phytochemistry, Research Institute of Forests and Rangelands.
Sefidkon. F, Associate Professor, Research Institute of Forests and Rangelands.
Sonboli. A,. Medicinal Plants and Drugs, Research Institute, Shahid Beheshti University.
Jaimand, K., Associate Professor, Research Institute of Forests and Rangelands.

The alkaloids of solanaceae family have very medicinal usages. From these hyoscyamine and scopolamine are used as antispasmodic and mydriatic medicines. Hyoscyamus from solanaceae family with different species has specific medicinal value. In this research, *Hyoscyamus reticulatus* L. and *Hyoscyamus pusillus* L. are investigated for tropane alkaloids value. The plant material of *H. reticulatus* were collected during the end of flowering stage and beginning of fruit formation, from two regions of Tehran - Latyan dam and Ghazvin- Barajin and the plant material of *H. pusillus* were collected at the flowering stage from Qom. After extraction of tropane alkaloids from different parts of plants, distinctly, the tropane alkaloids value of L-hyoscyamine and (-)-scopolamine were assayed by HPLC. The results showed that L- hyoscyamine and (-)- scopolamine content varied in different parts of plants. L- hyoscyamine in all organs of *H. reticulatus* in two regions and (-)- scopolamine in different parts of *H. pusillus* were dominant alkaloids. Futthermore, the results of determination of tropane alkaloids value showed that, in Tehran region there was higher tropane alkaloids than Ghazvin.

Key words: *Hyoscyamus reticulatus, Hyoscyamus pusillus*, HPLC, Solanaceae, Hyoscyamus, L- hyoscyamine, (-)-scopolamine, Tropane alkaloids

مقدمه

گیاهـان دارویی منابعی غنی از متابولیت‌های ثانویه هسـتند. در میان متابولیت‌های ثانویه گیاهان، آلکالوییدها گروه مهمی را تشـکیل می‌دهند. گروهـی از آلکالوییدها به نام آلکالوییدهای تروپان به طور عمده در گیاهان تیره سیب زمینی[1] یافت می‌شوند (۱۰). یکی از جنس‌های مهم تیره سیب زمینی، جنس بنگ دانه (هیوسیاموس[2]) می‌باشد که ۹ گونه آن منحصراً در ایران و ۱۸ گونه در ایران و کشورهای اطراف پراکندگی دارند (۶). شناخته شـده‌ترین تروپـان آلکالوییدها را می‌توان هیوسـیامین[3]، اسـکوپولامین[4] و آتروپیـن[5] را نام بـرد. آتروپین مخلوط راسـمیک D و L- هیوسـیامین می‌باشـد که از راسمیزاسـیون هیوسـیامین در حین اسـتخراج به دست می‌آید. بیشـترین فعالیت فارماکولوژی هیوسـیامین به ایزومر چپ گرد آن (L- هیوسیامین)، نسبت داده می‌شود. اسکوپولامین چپ گرد به هیوسین نیز معروف می‌باشد (۱۹).

هیوسـیامین و اسـکوپولامین به عنـوان داروهای مهارکننـده اعصاب پاراسـمپاتیک می‌باشـند و در واقع آنتاگونیست رقابتی اسـتیل کولین در گیرنده‌های موسکارینی می‌باشند (۱۸).

هیوسـیامین در درمان بیماری‌های اعصاب و روان و همچنین در تهیه داروهـای ضد تهوع و ضد دریازدگی کاربرد فراوانی دارد (۲). این آلکالوییدها در گشـاد کردن مردمک چشـم کاربـرد دارد (۷). از این آلکالوییدها بـرای برطرف کردن حالت‌های اسپاسـم و در بیماری‌های مسـافرتی نیز استفاده می‌شود (۲۳). اسکوپولامین دارای خاصیت آرام کننده سلسله عصبی با اثر بسـیار قوی است و از آن برای تسـکین ناراحتی‌های عصبی، پارکینسون، لرزش‌هـای زمان کهولت، داء الرقـص و رفع تحریکات شـدید مجنونین، استفاده می‌شود. اسکوپولامین خواب آور است و می‌توان با به کارگیری آن اثـر مورفین را تقویت کرد. ایـن آلکالوییدها دارای اثر قوی باز کننده مردمک چشم است (۴).

در مطالعـات صورت گرفته توسـط دیلمقانی و همـکاران (۳)، میزان آلکالوییدهای تروپان هیوسـیامین و اسـکوپولامین درمراحل مختلف رشد رویشـی، گلدهی و میوه دهـی از دو منطقه در آذربایجـان و از اندام‌های مختلف *H. pusillus* L. مورد سنجش قرار گرفته است. این محققین اعلام نموده‌انـد که آلکالوییدها غالـب در بخش‌های گوناگون این گیـاه در مراحل مختلف رشد، به استثنای بذرها، هیوسیامین است. همچنین نشان داده‌اند کـه برخی عوامـل محیطی مانند ارتفـاع منطقه، میزان نیتروژن، فسـفر و پتاسـیم خاک روی میزان تولید آلکالوییدهـای تروپان در این گیاه تأثیر می‌گذارند.

تایید تفاوت‌های کمی مشـخص درون یک جنس به روشـنی می‌تواند نشـان دهد که خزانه اختلاف‌های ژنتیکی بزرگی در میان گونه‌های جنس هیوسـیاموس وجود دارد که می‌تواند در تولید تروپـان آلکالوییدها به کار گرفته شـود. این تفـاوت تا اندازه‌ای بازتـاب اثرات انتقال و ذخیـره و نیز توانایی بیوسـنتزی گیاهان می‌باشد. در گیاهان تیره سیب زمینی، تروپان آلکالوییدها در ریشـه سـاخته می‌شـوند و از آنجا مقادیر زیادی، گاهی با تغییر همزمان، ممکن اسـت به بخش‌های هوایی منتقل شـوند. همچنین هدف دیگر، بررسـی وجود اختلاف در نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین اسـت. هـردوی این آلکالوییدها مـورد علاقه تجارتی هسـتند و وجود این

www.SID.ir

Archive of SID

اختلاف نسبت می‌تواند مزیتی برای انتخاب گونه تولید کننده هیوسیامین یا اسکوپولامین، به عنوان فرآورده اصلی باشد. از طرف دیگر اگرچه سنتز این مواد در اصل تحت کنترل فرآیندهای ژنتیکی است، ولی به طور آشکار تحت تأثیر عوامل محیطی و تغییرات آن‌ها قرار می‌گیرند. بنابراین از آنجایی که عوامل محیطی نقش عمده‌ای در فرایند بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه دارند، باید به بررسی تأثیر آن‌ها روی این فرآورده‌ها پرداخت (۳).

آلکالوییدهای تروپان در همه بخش‌های گیاهان حاوی آن‌ها یافت می‌شوند و نسبت هریک از آن‌ها در بین گونه ها، زمان‌های مختلف سال، محل رویش و بخش‌ها و اندام‌های مختلف یک گونه گیاهی متفاوت است (۵). گیاهان *H. reticulatus* L. و *H. pusillus* L. از تیره سیب زمینی از نظر وجود آلکالوییدهای تروپان حایز اهمیت هستند.

تحقیق برای بازدهی بالاتری از تولید اسکوپولامین و هیوسیامین در سیستم‌های کشت در شیشه به آزمایش متغیرهای بسیاری نظیر تأثیر فیتو هورمون‌های برون زاد، تغییر ماکروالمان ها، میکروالمان ها، قند و غیره هدایت می‌شود. Christen و همکاران (۹)، با تغییر مقدار ساکارز، نیترات و کلسیم در ریشه‌های کشت شده گیاه *H. albus* گفته‌اند که، افزایش غلظت ساکارز، کاهش مقدار نیترات و افزایش کلسیم در تحریک بیوسنتز آلکالوییدهای تروپان در این گیاه نقش دارند. Doerk- Schmitz با تحقیق درباره آلکالوییدهای تروپان گونه‌های تاتوره (۱۱) و بعد Hashimoto و همکاران (۱۴)، با تحقیق در مورد گونه‌های هیوسیاموس نشان دادند که ریشه‌ها جایگاه بیوسنتز آلکالوییدهای تروپان هستند. به نظر El-Sheikh و همکاران (۱۳)، هیوسیامین آلکالویید اصلی در همه بخش‌های گیاه *H. muticus* است، در حالی که هیوسین در مقادیر کم به ویژه در ریشه‌ها وجود دارد. Klan (۱۶)، اعلام کرد که میزان آلکالوییدهای تروپان با رشد گیاهان *H. niger* L. کاهش می‌یابد و بالاترین میزان آلکالویید در زمان گلدهی کامل گیاه به دست می‌آید. با افزایش سن گیاه، مقدار آلکالویید بیشتری قبل از گلدهی در گیاه هیوسیاموس مشاهده شده است. نور در میزان آلکالویید نقش مهمی دارد. مطالعات برروی گیاه هیوسیاموس نشان داده‌اند که این گیاه در وضعیت روز بلند، میزان قابل توجهی هیوسیامین تولید می‌کند (۱).

هدف از این تحقیق، استخراج و اندازه‌گیری آلکالوییدهای تروپان L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین موجود در گیاهان *H. reticulatus* و *H. pusillus* بوده که علاوه بر این میزان آلکالوئیدهای مربوط به *H. reticulatus* در دو منطقه با هم مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی *H. reticulatus*.L ازدو منطقه، قزوین- کوه‌های اطراف بوستان باراجین در ارتفاع ۱۴۸۰ متری و همچنین از تهران بعد از سد لتیان- نزدیک معدن آهک در ارتفاع ۱۷۵۰ متری و *H. pusillus* L. از رویشگاه‌های طبیعی آنها، اتوبان تهران- قم، ۵۰ کیلومتری قم و در ارتفاع ۱۳۰۰ متری، در سال ۱۳۸۵، جمع آوری شدند. جمع آوری گیاهان *H. pusillus* L. در مرحله گلدهی آن‌ها و *H. reticulatus* L. از دو منطقه در مرحله اواخر گلدهی و شروع میوه دهی، انجام گرفت. از گونه‌های جمع‌آوری شده، نمونه‌های هرباریومی (MP-۱۰۰۵, MP-۱۰۰۷, MP-۱۰۱۵)، تهیه و توسط گیاه شناسان هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی در دانشگاه شهید بهشتی مورد شناسایی قرار گرفتند. قسمت‌های مختلف گیاهان جمع آوری شده (ریشه، ساقه، برگ، گل و بذر)، به طور جداگانه در شرایط آزمایشگاه خشک و آسیاب شدند. برای اطمینان از وجود تروپان آلکالوییدها در بخش‌های گوناگون گیاهان نمونه برداری شده، از تست ویتالی- مورین استفاده شد (۲۲). به این ترتیب که یک گرم ازپودر خشک شده گیاه با ۱۰ میلی لیتر سولفوریک اسید ۰/۱ نرمال مخلوط و به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد. بعد از صاف کردن آن را با آمونیاک قلیایی کرده و با کلروفرم (دوبار، هربار با ۱۰ میلی لیتر)، دکانته شد. در صورت تشکیل امولسیون بین دو فاز می‌توان با بهم زدن امولسیون ایجاد شده را از بین برد. بعد از آبگیری با سولفات سدیم انیدر، جداسازی دو فاز انجام شد. محلول استخراج شده در یک کروزه چینی ریخته و تا حد خشک شدن روی حمام آبگرم تغلیظ و بعد از سرد شدن به محتویات داخل کروزه ۱۰ قطره نیتریک اسید غلیظ اضافه گردید. در صورت تولید رنگ زرد، دومرتبه کاملا" تغلیظ می‌گردد. پس از سرد شدن کروزه، ۱۰ میلی لیتر استن به آن اضافه و قطره قطره پتاس ۳٪ در اتانول به محتویات کروزه اضافه شد. ایجاد رنگ بنفش- آبی نشانه وجود آلکالوییدهای تروپان می‌باشد که بسته به میزان آن‌ها در بخش‌های مختلف گیاهان شدت رنگ متفاوت می‌باشد.

پس از اطمینان از وجود آلکالوییدهای تروپان، جهت استخراج این دسته از آلکالوییدها از روش Kamada و همکاران (۱۵)، استفاده گردید. در این روش ۰/۵ گرم از ماده گیاهی خشک پودر شده با کلروفرم- متانول- آمونیاک ۲۵٪ به نسبت ۱۵:۵:۱ و به مدت ۳۰ دقیقه در معرض التراسونیک قرار گرفت. جهت استخراج کامل این فرایند سه مرتبه تکرار شد. عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و روی صافی دو بار با ۱ میلی لیتر کلروفرم شسته شد.

فازکلروفرمی به کمک دستگاه تبخیر کننده دوار خشک شد. ۵ میلی لیترکلروفرم و ۲ میلی لیتر سولفوریک اسید ۱ نرمال اضافه و کاملا" به هم زده شد. فاز کلروفرمی جدا و دور ریخته شد و فاز آبی حاوی آلکالوییدها تا ۱۱- ۱۰ = pH با محلول آمونیاک ۲۸٪ روی یخ تنظیم شد. آلکالوییدها یک بار با ۲ میلی لیتر و دوبار با ۱ میلی لیتر کلروفرم، استخراج شدند. حاصل با سدیم سولفات انیدر آبگیری و صاف شد. روی صافی با ۲-۱ میلی لیتر کلروفرم شسته و نمونه در ۲-۱ میلی لیتر متانول HPLC۶ پیش از آنالیز حل شد.

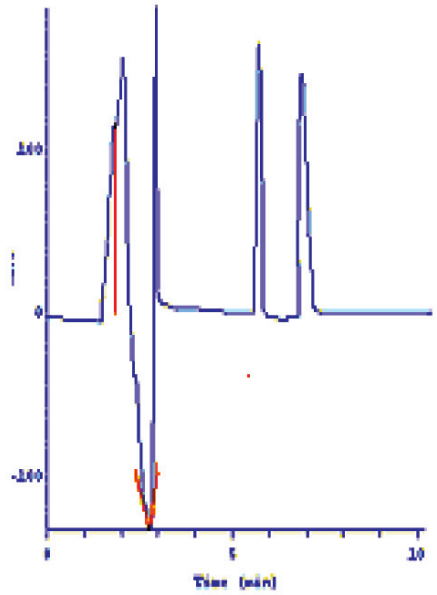
شرایط دستگاه HPLC

برای جداسازی و اندازه‌گیری میزان آلکالوییدهای تروپان از دستگاه HPLC به مدل Well Chrom ۲۰۰۰ از شرکت Knuer آلمان، ستون C۱۸ ۱۰۰ Eurospher به طول ۲۵ سانتی متر و قطر ۴ میلی متر، دتکتور UV در طول موج ۲۱۰ نانومتر استفاده شد. برنامه شویش ایزوکراتیک و ترکیب در صد حلال‌ها به صورت زیر انتخاب شد: ۳۰ میلی مولار فسفریک اسید در pH ۶/۲ با تری اتیل آمین: استونیتریل (۲۵: ۷۵) و با سرعت شویش ۱ml/min. حجم هر تزریق ۲۰µl استفاده شد.

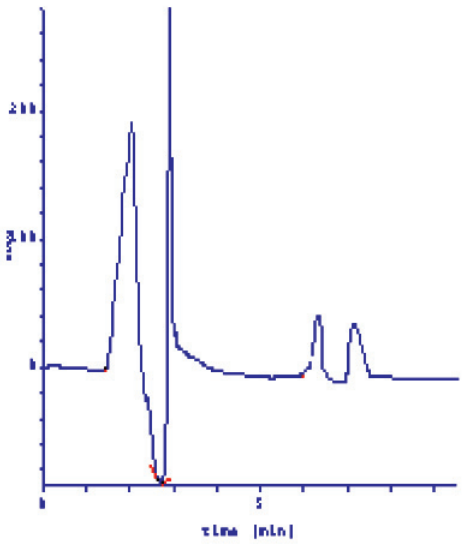
شکل شماره۱ کروماتوگرام حاصل از HPLC محلول‌های استاندارد و شکل شماره ۲ تا ۱۲ کروماتوگرام حاصل از عصاره آلکالوییدی اندام‌های مختلف در دو گونه مختلف هیوسیاموس را نشان می‌دهند.

www.SID.ir

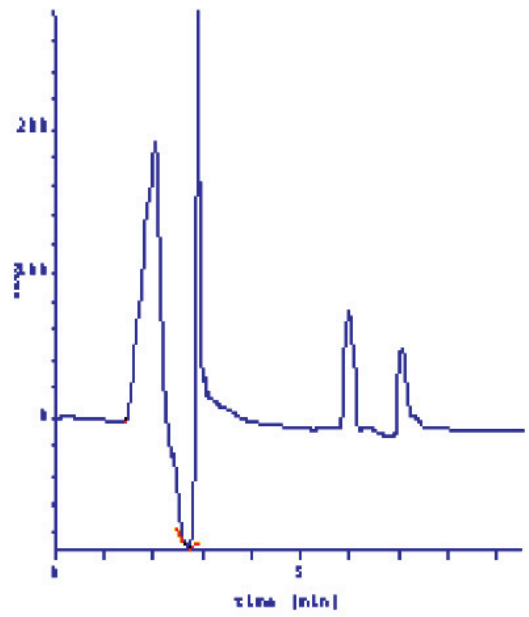
Archive of SID



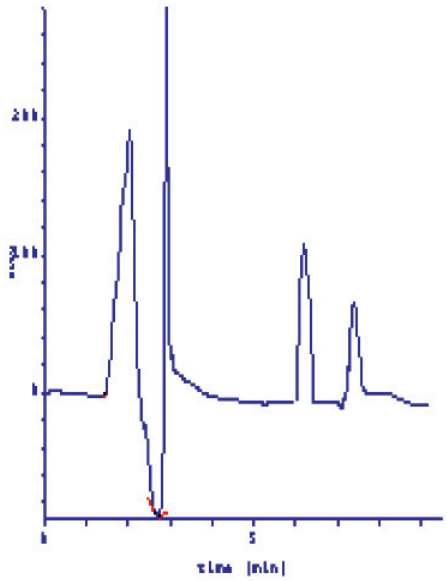
شکل ۱- کروماتوگرام HPLC محلول‌های استاندارد L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین



شکل ۱۳- کروماتوگرام ساقه *H. pusillus*



شکل۲- کروماتوگرام ریشه *H. pusillus*



شکل ۴- کروماتوگرام برگ *H. pusillus*

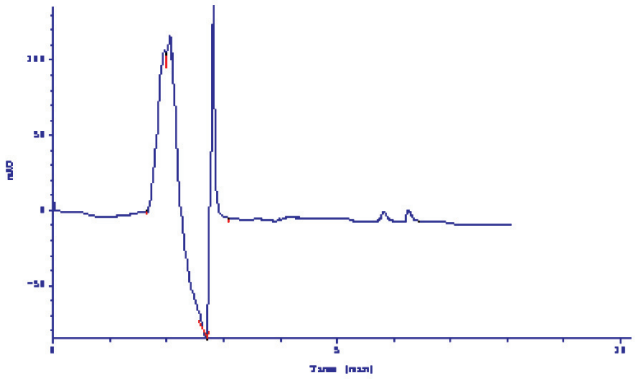
اندازه گیری کمی

از محلول‌های اســتاندارد L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین هیدرو بروماید تــری هیدرات خریــداری شــده از Sigma-Aldrich، بــه طور جداگانــه غلظت‌هــای ۵۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۴۰، ۲۰، ۵ و ۱ ppm تهیه شــدند. اندازه گیری کمی آلکالوییدهای تروپان به روش اســتاندارد خارجی انجام شد.

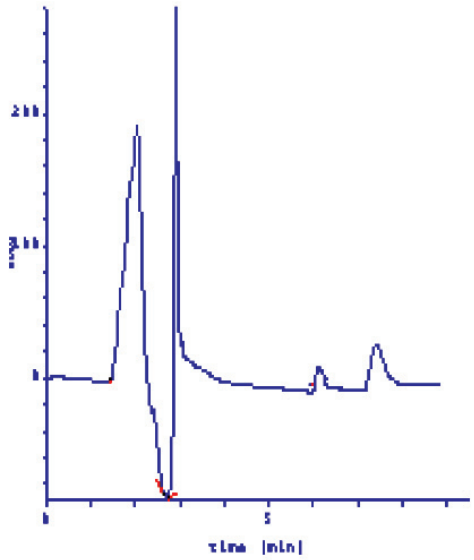
منحنی کالیبراســیون از ترسیم ســطح زیر پیک استانداردها برحسب غلظت محلول های اســتاندارد به دست آمد. در محدوده غلظتی ۱ تا ۵۰۰ ppm بــرای L- هیوســیامین و (-)- اســکوپولامین ایــن منحنی‌ها خطی هستند(جدول ۱-۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- کروماتوگرام ریشه *H. reticulatus* ازمنطقه باراجی ن قزوین



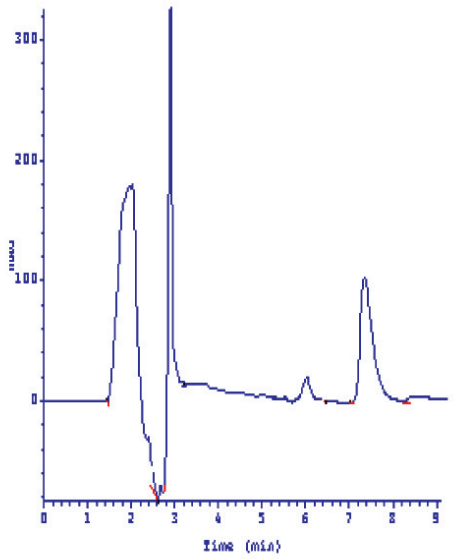
شکل ۶- کروماتوگرام ساقه *H. reticulatus* ازمنطقه باراجین قزوین

نتایج

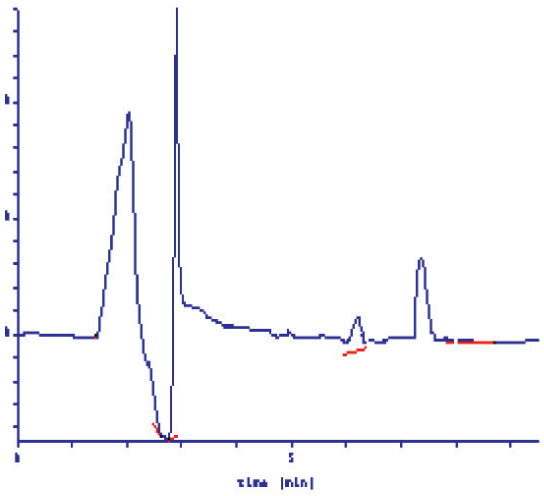
نتایج حاصل از بررسی میزان L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین با محاسبه سطح زیر منحنی‌های HPLC و با مقایسه آن‌ها با منحنی‌های استاندارد با میانگین ۲ تکرار برای هر نمونه به دست آمد. مقدار آلکالوییدهای تروپان موجود در اندام های مختلف گونه های هیوسیاموس مورد مطالعه، در جدول ۱ نشان داده شده است.

آنالیز عصاره‌های تهیه شده از اندام‌های مختلف گیاهان مورد تحقیق نشان داد که:

(-)- اسکوپولامین (هیوسین)، آلکالوییدهای اصلی در بخش‌های گیاه *H. pusillus* و L- هیوسیامین، آلکالوییدهای غالب در همه بخش‌های گیاه *H. reticulatus* می‌باشد (جدول ۱). به علاوه نتایج به دست آمده از بررسی میزان آلکالوییدهای تروپان در *H. reticulatus* دو منطقه نشان دادند که میزان این دو آلکالوییدها در گیاهان منطقه تهران بالاتر از میزان آن‌ها در گیاهان منطقه باراجین قزوین است. نتایج این بررسی نشان می‌دهند که



شکل ۷- کروماتوگرام برگ *H. reticulatus* از منطقه باراجین قزوین



شکل ۸- کروماتوگرام گل *H. reticulatus* از منطقه باراجین قزوین

مقادیر L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین در اندام‌های مختلف این گیاهان تفاوت دارند(جدول ۱).

بالاترین میزان L- هیوسیامین به ترتیب در بذر، برگ، گل، ساقه و ریشه *H. reticulatus* منطقه باراجین قزوین و در بذر، برگ و ساقه *H. reticulatus* منطقه تهران و بالاترین مقادیر هیوسین در *H. pusillus* به ترتیب در برگ، ریشه و ساقه مشاهده شد.

مقایسه میزان آلکالوییدهای L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین در اندام‌های مختلف گیاهان *H. pusillus* و *H. reticulatus*(دو منطقه)، در نمودارهای ۱۱ تا ۳ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱-۱- مشخصات مربوط به منحنی های کالیبراسیون ترکیبات مورد مطالعه

نمونه	معادله خطی	ضریب تصحیح	حد آشکار سازی (mg/l)	حد اندازه گیری (mg/l)
L- هیوسیامین	Y=۰/۳۳۰۷ X+ ۲۴/۴۶۳	۰/۹۹۷۲	۰/۵	۱/۰
(-)- اسکوپولامین هیدرو بروماید تری هیدرات	Y= ۰/۳۰۳۶ X+ ۸/۴۶۱	۰/۹۹۶۰	۰/۵	۱/۰

جدول ۱-۲- مقایسه مقدار آلکالوییدهای تروپان استخراج شده از اندام های مختلف گیاه هیوسیاموس برحسب درصد وزنی جرم خشک گیاه

نام گیاه	محل برداشت	اندام گیاه	L- هیوسیامین	RSD٪	(-)- اسکوپولامین	RSD٪	نسبت L- هیوسیامین به (-)- اسکوپولامین
H. pusillus L.	تهران- قم	ریشه	۰/۰۲۰۵	۴/۶۰۷	۰/۰۸۷۶	۲/۷۶۸	۰/۲۳۴۰
		ساقه	۰/۰۱۸۲	۸/۹۴۷	۰/۰۵۷۳	۷/۰۵۳	۰/۳۱۷۶
		برگ	۰/۰۳۸۵	۱/۱۴۵	۰/۰۹۰۳	۲/۷۶۴	۰/۴۲۶۳
H. reticulatus L.	قزوین-باراجین	ریشه	۰/۰۱۸۹	۵/۱۵۷	۰/۰۰۹۷	۸/۷۸۴	۱/۹۴۸۴
		ساقه	۰/۰۵۱۸	۵/۷۸۵	۰/۰۳۸۶	۷/۸۰۹	۱/۳۴۱۹
		برگ	۰/۰۹۶۵	۸/۲۰۴	۰/۰۵۸۵	۶/۳۱۵	۱/۶۴۹۵
		گل	۰/۰۸۷۳	۳/۲۱۷	۰/۰۴۳۴	۸/۳۵۶	۲/۰۱۱۵
		بذر	۰/۱۱۶۸	۱/۶۰۷	۰/۰۷۵۵	۲/۵۶۸	۱/۵۴۷۰
H. reticulatus L.	تهران- سد لتیان	ساقه	۰/۱۰۸۱	۱/۹۵۸	۰/۰۶۹۱	۲/۳۹۴	۱/۵۶۴۳
		برگ	۰/۱۲۱۴	۷/۵۶۸	۰/۰۸۱۳	۸/۷۱۴	۱/۴۹۳۲
		بذر	۰/۱۹۱۴	۶/۴۳۲	۰/۱۶۴۷	۴/۰۶۴	۱/۱۶۲۱

بحث

این نتیجه که مقدار اسکوپولامین نسبت به هیوسیامین در اندام‌های گیاه *H. pusillus* بیشتر است با نتایج حاصل از مطالعات دیلمقانی و همکاران (۳) در اندام‌های گیاه *H. pusillus* (به استثنای بذر) و در مراحل رویشی مختلف، ناسازگار است. اما با نتایج حاصل از مطالعات Shimomura و همکاران در مورد گیاهان *H. niger* و *H. muticus* همسو می‌باشد. طبق نتایج آن‌ها مقدار اسکوپولامین در این گیاهان نسبت به هیوسیامین بیشتر می‌باشد (۲۳). بر طبق پژوهش‌های محققان در گذشته، آلکالویید عمده گونه H. niger، اسکوپولامین گزارش شده است (۲۴). با مطالعه تغییرات آلکالوییدها در طی دوره‌های زمانی مختلف رشد بخش‌های هوایی H. muticus، که در آن هیوسیامین آلکالویید عمده می‌باشد، Oksman و همکاران (۲۰) اعلام نمودند که سنتز هیوسیامین در مرحله شکوفه زنی کامل و سنتز اسکوپولامین در ابتدای گلدهی به حداکثر مقدار خود می‌رسند.

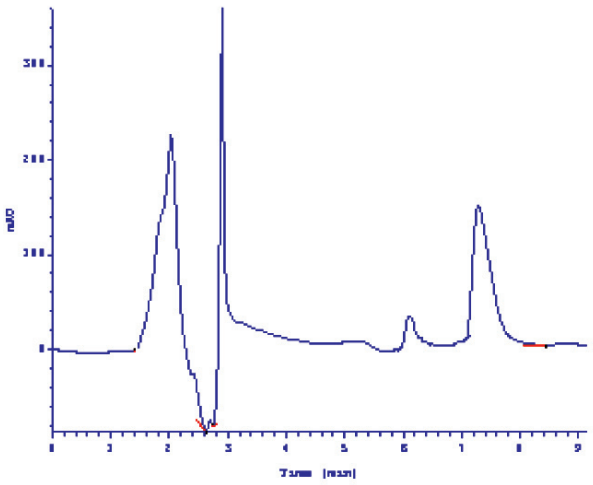
کاهش نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در مرحله گلدهی ممکن است نتیجه نمو گل (به سبب مرحله نموی گیاهان) روی فعالیت آنزیم‌های مسئول در تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین باشد. به علاوه، هنگامی که گیاهان بالغ شوند، نیتروژن نسبتاً بیشتری وارد ساختار هیوسیامین و در نتیجه اسکوپولامین می‌شود. زیرا گیاهان جوان‌تر بخش بزرگ تری از اسید آمینه هایشان را برای متابولیسم اولیه به کار می‌برند، در حالی که گیاهان بالغ‌تر می‌توانند متابولیسم ثانویه را بهتر حمایت کنند. (۳)

با توجه به جدول ۲ به نظر می‌رسد که از میان دو گونه مورد تحقیق، گونه *H. pusillus* به علت غنی بودن از (-)- اسکوپولامین برای بهره برداری از این ماده مناسب‌تر است و با توجه به میانگین مقادیر نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین، گونه *H. pusillus* از نظر تبدیل L- هیوسیامین به (-)- اسکوپولامین نسبت به گونه *H. reticulatus*، ارجح است و گونه مناسب تری برای انتقال ژن آنزیم H۶H۷ از آن به شمار می‌رود. گونه *H. reticulatus* غنی از L- هیوسیامین می‌باشد. که این نتیجه با تحقیقات Jonkova (۱۷) نیز، همسو می‌باشد.

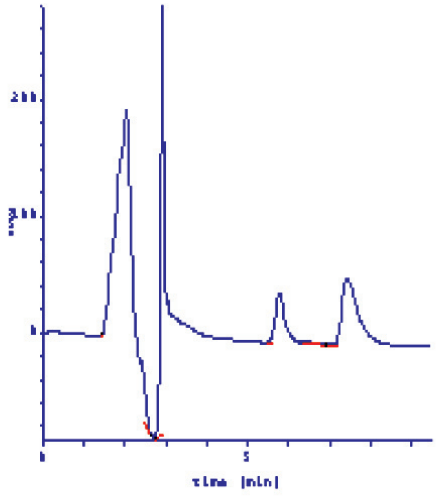
با توجه به بخش نتایج، مشخص گردید که در مرحله گلدهی برگ‌های *H. pusillus* دارای مقادیر(-)- اسکوپولامین بالاتری نسبت به اندام‌های ریشه و ساقه می‌باشد. در مرحله میوه دهی گونه *H. reticulatus* دو منطقه

www.SID.ir

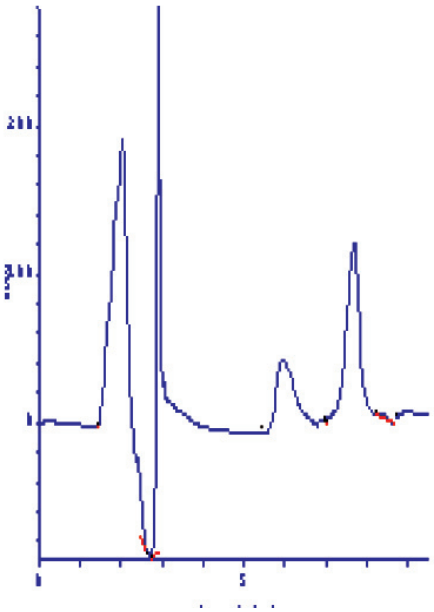
Archive of SID



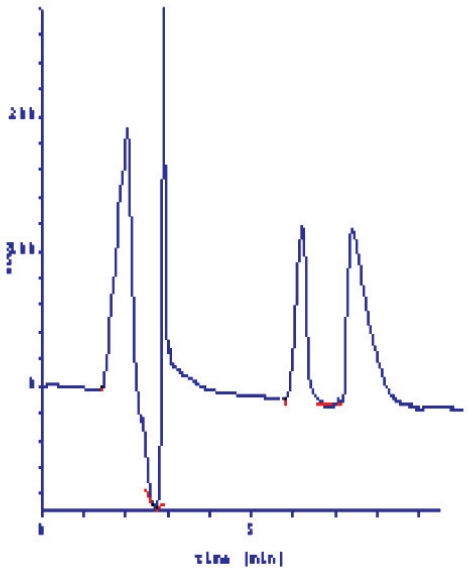
شکل ۹: کروماتوگرام بذر *H. reticulatus* ازمنطقه باراجین قزوین



شکل ۱۱: کروماتوگرام برگ *H. reticulatus* از منطقه تهران



شکل ۱۰: کروماتوگرام ساقه *H. reticulatus* از منطقه تهران



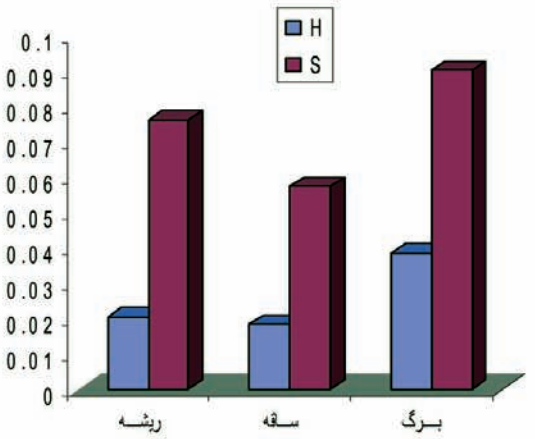
شکل ۱۲: کروماتوگرام بذر *H. reticulatus* از منطقه تهران

مورد مطالعه، دانه‌های سبز و نارس دارای بیشترین مقدار آلکالوییدها می‌باشند. با توجه به فرآیند تغییر تروپان آلکالوییدها در ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ ها، گل‌ها و دانهها، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با تشکیل بخش‌های هوایی (ساقه‌های گل دهنده)، انتقال آلکالوییدها از ریشه‌ها به ساقه و برگ‌ها صورت می‌گیرد و میزان آلکالوییدها در ریشه کاهش می‌یابد. در مرحله گلدهی، تروپان آلکالوییدها در بخش‌های هوایی نیز سنتز می‌شوند. در مرحله میوه دهی، گیاه بالغ است، سنتز تروپان آلکالوییدها در ریشه ها، ساقه‌ها و برگ‌های *H. reticulatus* کاهش یافته است. کاهش مشاهده شده احتمالاً به سبب انباشته شدن آلکالوییدها در بذرها در طی این دوره است. این یافته با نتایج به دست آمده از تحقیقات Demeyer و Dejaegere (۱۲))، در مورد گیاه *Datura stramonium* که نشان دادند که تقریباً معادل میزان کل آلکالوییدهایی که از بخش‌های رویشی ناپدید می‌شوند در بذرها یافت می‌شوند، همسو است. این یافته با نتایج Klan (۱۶) که اعلام کرد، میزان تروپان آلکالوییدها به موازات رشد گیاه *H. niger* در اندام هایش کاهش می‌یابد، ناسازگار است.

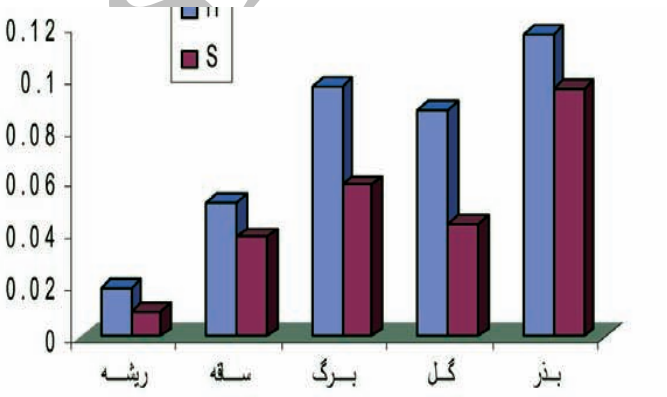
دانه‌های سبز و نارس دارای بیشترین میزان آلکالوییدها هستند، این افزایش سبب حفظ دانه‌ها در مقابل کرم ها، حشرات، شته ها، میکروارگانیسم‌ها و جانوران دانه خوار می‌گردد. در مورد مقادیر هیوسیامین و اسکوپولامین و در بخش‌های مختلف گیاهان تولید کننده آلکالوییدهای تروپان گزارش‌های متضادی وجود دارند. نتایج آزمایش‌های Klan (۱۶) در

www.SID.ir

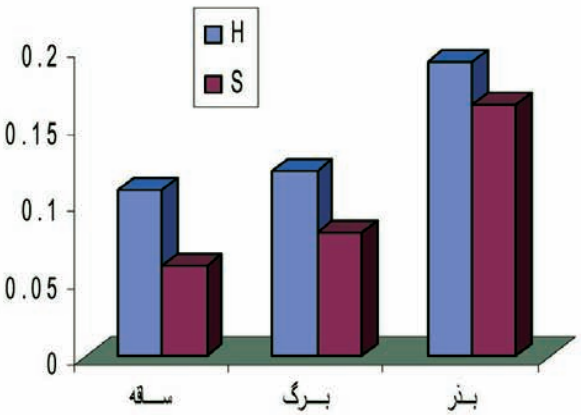
Archive of SID



نمودار ۱-۱-۱- مقایسه آلکالویید های L-هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین در اندام های مختلف گیاه *H. pusillus* در منطقه تهران- قم



نمودار ۱-۱- ۲- مقایسه آلکالویید های L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین در اندام های مختلف گیاه *H. reticulatus* در منطقه قزوین- باراجین



نمودار ۱-۱-۳- مقایسه آلکالویید های L-هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین در اندام های مختلف گیاه *H. reticulatus* در منطقه تهران- سد لتیان

L = H- هیوسیامین

S = (-)- اسکوپولامین

مورد گیاهان *H. niger* یک ساله و دوساله نشان می‌دهند که رئوس فاقد گل از نظر آلکالوییدها فقیرتر از رئوس گل دار می‌باشند و برگ‌ها نیز از نظر آلکالوییدها نسبت به رئوس گل دار فقیرتر هستند. نتایج او ترتیب محتوی آلکالوییدی اندام‌های مختلف گیاه را به ترتیب در ریشه ها، رئوس گل دار، میوه ها، برگ‌ها و ساقه نشان می‌دهد. نتایج Oksman- Caldenty و همکاران (۲۰)، در مورد گیاه *H. muticus* نیز نشان داد که مقادیر آلکالوییدها در ساقه‌ها کمتر از از ریشه‌ها و برگ‌ها می‌باشد. نتایج Parr و همکاران (۲۱)، با مطالعه در مورد گیاه *H. albus* نشان می‌دهد که در جنس هیوسیاموس اندام‌های سبز تن‌ها نقش کوچکی در ذخیره آلکالوییدها بازی می‌کنند.

Klan (۱۶)، با مطالعه محتوای آلکالوییدی ریشه‌ها و برگ‌های گیاهان *H. niger* بین میزان هیوسیامین و اسکوپولامین ارتباطی را کشف کرد. نتایج او نیز مانند یافته‌های ما نشان می‌دهد که با افزایش میزان آلکالوییدهای کل و میزان هیوسیامین، میزان اسکوپولامین نیز افزایش می‌یابد.

با توجه به اینکه گیاهان جمع آوری شده از منطقه تهران نسبت به منطقه باراجین قزوین دارای میزان تروپان آلکالوییدهای بالاتری می‌باشند و از طرفی گونه گیاهان جمع آوری شده نیز یکسان می‌باشند (reticulatus)، به نظر می‌رسد که بعضی از شرایط محیطی خاص منطقه تهران مانند ارتفاع، نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم خاک موجب افزایش بیوسنتز این متابولیت‌ها می‌شود. این نظریه در کل پذیرفته شده که غلظت آلکالوییدهای تروپان در گیاهان با کاهش میزان پتاسیم افزایش می‌یابد (۳). افزایش آلکالوییدهای تولید شده در گیاهان در هنگام کمبود پتاسیم نشان می‌دهد که کمبود یون پتاسیم عرضه پیش ساز آلکالویید را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آرژنین دکربوکسیلاز و اورنی تین دکربوکسیلاز که مسئول تولید پوترسین هستند، افزایش می‌دهد.

یون پتاسیم به طور مستقیم فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها، از جمله آنزیم‌های مربوط به بیوسنتز آلکالوییدها را با تأثیر روی کنفورماسیون پروتئین تنظیم می‌کند (۳). همچنین نتایج بررسی‌های El- Sheikh و همکاران (۱۳)، در مورد گیاه *H. muticus* نشان می‌دهد که افزایش فسفر به خاک میزان آلکالوییدها را افزایش می‌دهد. نتایج El- Sheikh و همکاران (۱۳)، Fahmi و Ahmed (۸) و Demeyer و Dejaegere (۱۲)، نیز نشان می‌دهند که با افزایش میزان نیتروژن میزان آلکالوییدها افزایش می‌یابد.

به دلیل آنکه دو آلکالویید هیوسیامین و اسکوپولامین از میان تروپان آلکالوییدها در داروسازی مورد استفاده بیشتری هستند و به دلیل سنتز (-)- اسکوپولامین از L- هیوسیامین در گیاه، میزان و نسبت این دو در گیاهان مورد تحقیق اهمیت زیادی دارد.

با توجه به این که گونه‌های مورد بررسی هر کدام غنی از یکی از آلکالوییدهای تروپان می‌باشند و با توجه به پراکنش آن‌ها در نقاط مختلف ایران و اینکه نوع و شرایط منطقه روی میزان آلکالوییدها موثر می‌باشند، بررسی گونه‌های Pusillus و Reticulatus از نظر میزان هیوسیامین و اسکوپولامین در بقیه نقاط کشور ضروری به نظر می‌رسد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه شیمی گیاهی بخش تحقیقات گیاهان دارویی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران انجام گرفته است. از همکاران آن مجموعه وآقای دکتر طالبی برای همکاری‌های بسیار مفید و در اختیار قرار دادن اطلاعات مورد نیاز، بسیار متشکریم.

پاورقی‌ها

1-Solanaceae
2-Hyoscyamus
3-Hyoscyamine
4-Scopolamine
5-Atropine
6-High Performance Liquid Chromatography
7-Hyoscyamine 6□hydroxylase

منابع مورد استفاده

۱ - امید بیگی، ر، ۱۳۷۴؛ رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد اول، انتشارات طراحان نشر، تهران.

۲ - امید بیگی، ر، ۱۳۷۶؛ رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات طراحان نشر، تهران، ص ۲۴۶-۲۳۹.

۳ - دیلمقانی، ک، خاوری نژاد، ر، فهیمی، ح، حکمت شعار، ح، ۱۳۸۵؛ استخراج و اندازه‌گیری آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین از اندام‌های مختلف *Hyoscyamus pusillus* L. در مراحل مختلف رشد. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۲، شماره ۱، صفحه ۲۰-۱.

۴ - زرگری، ع ، ۱۳۶۸؛ گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۹۲۶صفحه.

۵ - صمصام شریعت، س. هـ ، ۱۳۷۱؛ عصاره‌گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزش یابی آنها. انتشارات مانی، اصفهان، ۴۲۲صفحه.

۶ - مظفریان، و، ۱۳۸۲؛ فرهنگ نامهای گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، چاپ سوم، تهران.

۷ - میرحیدر، ح، ۱۳۷۳؛ معارف گیاهی (کاربرد گیاهان درپیشگیری و درمان بیماری ها)، جلد پنجم، دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ص ۴۶-۴۳.

8- Ahmed, Z.F. and Fahmy , I.R. , 1994; The effect of environment on the growth and alkaloidal content of *Hyoscyamus muticus* L. Journal of the American Pharmaceutical Association. P 484-487.

9- Christen, P., Aoki, T., Shimomura, K., .1992; Characteristics of growth and tropan alkaloids production in Hyoscyamus albus hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A. Plant cell reporets. 11: 597-600.

10- Cordell , G. A. , 1981; Introduction to alkaloids. John Willey and Sons , New york , 567 p.

11- Doerk – Schmitz , K. , Witte , L., and Alfermann , W. , 1993; Tropan alkaloid patterns in plants and hairy roots of *Hyoscyamus albus.* Phytochemistry. 33 (4):107-110.

12- Demeyer , K., and Dejaegere , R. , 1992; Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO^{-3} , NH^{+}_{4}) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. Plant and Soil. 147: 79 – 86.

13- El Sheikh , M. O. A. , El Hassan , G. M. , Tayeb. Abdel Hafeez , A. R. , Abdalla, A. A., and Antoun, M. D. , 1982; Studies on Sudanese medicinal plants I I I: Indigenous *Hyoscyamus muticus* as commercial source hyoscyamine.Plant Medica. 45:1

14- Hashimoto , T. , Hagashi , A. , Amono , Y., Kohono , J. , Jwanari , H. , Usada , S., and Yamada , Y. , 1991; Hyoscyamine-6 b hydroxylase , an enzyme involved in tropan alkaloid biosynthesis is localized at pericycle of root. J. Bio. Chem. 266(7): 4648-4653.

15- Kamada , H., Okamura , N., Satake , M., Harada , H., Shimomura , K., 1986; Alkaloid production by hairy root cultures in *A. belladonna.* Plant cell Rep. 5: 239-242.

16- Klan, Z. F. , 1931; Influence of period of vegetation and development of plant on the alkaloidal content of *Hyoscyamus niger* L. Amer Pharm Assoc. XX (11): 1163- 1174.

17- Jonkova , I., 1992; Alkaloids production of *Hyoscyamus reticulates* plant and transformed root culture clone. Biotechnology and biotechnological equipment. 6: 50-52.

18- Kutchan , T. M., 1995; Alkaloid biosynthesis- The basis for metabolic engineering of medicinal plants. Plant Cell. 7:1059-1070.

19- Manske, R.H.F.,1954; The alkaloids chemistry and physiology. Dominion Rubber Laboratory Guelph, Ontario, H. L. holmes university of British Columbia Vancouver, Canada, Vo.1.

20- Oksman- Caldenty , K. M., Vrurela , H. , Straub , A., and Hiltunen , R. , 1987; Variation in the tropane alkaloid content of *Hyoscyamus muticus* plant and cell culture clones. Planta Medica. 53(4):349-354.

21- Parr , A. J., Payne , J. , Eagles, J. , Chapman , B. T. , Robins , R. J., and Rhodes , M. J. C., 1990;Variation in tropan alkaloid accumulation within the solanaceae and strategies for its exploitation. Phytochemistry. 29(8):2545-2550.

22- Peter, J., Houghton, Amata Raman., 1998; Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. Pharmacognosy Reasearch Laboratories, Department of Pharmacy, King, s College London.

23- Trease , G.E., and Evans, W.C.,1989; Pharmacognosy, 13 th Ed. Bailliere and T indall, London, 548- 564.

24- Woo, S. H. , Park, J. M., and Yang, J. W., 1995; Production of scopolamine by normal root culture of *Hyoscyamus niger*. Biotechnology letters. 17(9): 921-926.

www.SID.ir