مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۶ ،شماره ۴، تیر، ۱۳۸۷، ۲۴۱-۲۳۷

وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی: روش معرف‌های آلکالوئیدی در مقایسه با بروموکرزول‌گرین

روح ا... قموشی[۱]
فاضل شمسا*[۲]
حمیدرضا منصف اصفهانی[۳]

۱- دانشجوی داروسازی
۲- گروه شیمی دارویی
۳- گروه فارماکوگنوزی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: اغلب آلکالوئیدها، اثرات فیزیولوژیکی قوی در پستانداران و سایر ارگانیزم‌ها دارند و تعدادی از آنها، عوامل مهم دارویی می‌باشند. غنی‌ترین منبع آلکالوئیدها، گیاهان می‌باشند. لذا بررسی وجود آنها در گیاهان، اهمیت زیادی دارد. ما در این مطالعه سعی کرده‌ایم تا روشی سریع، ارزان و با حساسیت بالا، برای بررسی وجود آلکالوئیدها در گیاهان ارائه کنیم. ***روش بررسی:*** ۱۲ نمونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفتند که طبق تحقیقات قبلی، تعداد ۱۱ نمونه حاوی آلکالوئید و یک نمونه فاقد آلکالوئید بودند. عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی با متانول انجام شد. در مورد هر نمونه، بعد از حل کردن حدود ۰/۵g از عصاره آن در مقداری اسید کلریدریک ۲N و صاف کردن آن، بررسی وجود آلکالوئید در آن، توسط معرف‌های دراژندروف، واگنر و میر با روش پیشنهادی تشکیل کمپلکس با BCG، انجام شد. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی توسط روش تشکیل کمپلکس با BCG نیز بر حسب آتروپین، مشخص شد. ***یافته‌ها:*** نتیجه بررسی وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی با معرف‌های دراژندروف، واگنر و میر در مورد چای سیاه، گل گاوزبان و چای کوهی، منفی و در بقیه موارد مثبت بود. نتیجه بررسی وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی با روش پیشنهادی تشکیل کمپلکس با BCG در مورد چای سیاه و چای کوهی، منفی و در بقیه موارد مثبت بود. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی از طریق تشکیل کمپلکس با BCG، معادل ۴۰μg آتروپین بود. ***نتیجه‌گیری:*** در تمام مواردی که نتیجه ردیابی آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی با استفاده از معرفهای دراژندروف، واگنر و میر مثبت بود، نتیجه ردیابی با روش پیشنهادی تشکیل کمپلکس با BCG نیز مثبت بود. تحقیقات قبلی حاکی از وجود آلکالوئید در این نمونه‌ها می‌باشند. نتیجه ردیابی آلکالوئید با هر دو روش، در مورد چای سیاه و چای کوهی منفی بود. چای سیاه، حاوی آلکالوئیدهای گزانتینی می‌باشد. آلکالوئیدهای گزانتینی با روش تشکیل کمپلکس با BCG قابل ردیابی نمی‌باشند. چای کوهی نیز طبق تحقیقات قبلی، حاوی آلکالوئید نمی‌باشد. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی با روش تشکیل کمپلکس با BCG، معادل ۴۰μg آتروپین می‌باشد که مقدار بسیار کمی است و نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد.

کلمات کلیدی: آلکالوئید گیاهان دارویی، تشخیص، معرف بروموکرزول‌گرین، مقایسه با روش‌های کلاسیک

*نویسنده مسئول، تهران، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن: ۶۶۹۵۹۰۶۳
email: shamsa@sina.tums.ac.ir

مقدمه

آلکالوئیدها (Alkaloids)، سال‌ها است که شناخته شده‌اند و اغلب آنها، اثرات فیزیولوژیکی قوی در پستانداران و سایر ارگانیزم‌ها دارند. تعدادی از آنها، عوامل مهم دارویی می‌باشند و از نظر مصرف در داروسازی و پزشکی، مورد توجه بوده‌اند. آتروپین، مرفین، کینین، وین کریستین و غیره معرف تعدادی زیادی از آلکالوئیدهایی هستند که برای درمان بیماری‌های مختلف، از مالاریا تا سرطان استفاده می‌شوند. تعدادی از آلکالوئیدها، سمی می‌باشند. به عنوان مثال آلکالوئیدها ارگو، عامل ایجاد مسمومیت‌های اپیدمیکی بوده‌اند و به طور وسیع، به این منظور استفاده می‌شوند. از این دسته می‌توان به آرکولین، کافئین و غیره اشاره کرد. آلکالوئیدها درحیوانات، قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان وجود دارند. ولی غنی‌ترین منبع آنها، گیاهان می‌باشند. لذا بررسی وجود آنها در گیاهان، اهمیت زیادی دارد. روش‌های مختلفی، جهت ردیابی و شناسایی آلکالوئیدها، وجود دارند: استفاده از معرف‌های میر (Mayer's reagent)، واگنر (Wagner's reagent)، دراژندورف (Dragendorff's reagent)، هاگر

Archive of SID
www.SID.ir

(Hager's reagent)، مـارکینز (Marquin's reagent)، یـدوپلاتینات (Iodoplatinate)، ارلـیش (Erlich's reagent)، Ceric Ammonium Sulfate، محلـول ۵٪ اسـید سیلیکوتنگـستیک (Silicotungetic acid)، محلـول اسـید پیکرولونیـک (Picrolonic acid)[۱و۳-۶] اسـتفاده از کروماتوگرافی لایـه نـازک (Thin Layer Chromatography=TLC)، روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (High-Performance Liquid Chromatography=HPLC)، روش گـاز کروماتوگرافی (Gas Chromatography=GC)[۱و۳و۷و۸]، روش الکتروفورز روی کاغذ یا لایه نازک (Electrophoresis on Paper or Thin Layer)، طیف سنجی ماوراء بنفش- مادون قرمز (UV-IR spectrophotometry)[۱] و به علت اختلاف در ساختمان مولکولی، تنوع فراوان، حلالیت‌های گوناگون و سایر خواص آلکالوئیدها، بررسی جهت جستجوی آلکالوئیدها در گیاهان، ممکن است مشکل باشد.[۴] در این تحقیق، سعی شد روشی سریع، ارزان و با حساسیت بالا، جهت بررسی وجود آلکالوئید در گیاهان، بر پایه تشکیل کمپلکس با Bromocresol Green ارائه شود.

روش بررسی

از ۱۲ نمونه گیاهی در این بررسی استفاده شد. نمونه‌های گیاهی در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. طبق تحقیقات قبلی، ۱۱ نمونه، حاوی آلکالوئید و یک نمونه فاقد آلکالوئید بودند. محلول مایی Bromocresol Green (BCG) با غلظت ۴M-۱×۱۰ به این صورت تهیه شد: ۶۹/۸mg از آن در ۱/۵ml سود ۰/۲N حل شد و بعد با آب مقطر به حجم ۱lit رسانده شد. بافر استات با pH=۴/۷ طبق USP و محلول مایی آتروپین با غلظت ۴۰µg/ml تهیه شد. عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی، با متانول انجام شد و عصاره‌های حاصل، تغلیظ و خشک شدند. در مورد هر نمونه، ۱g از عصاره خشک آن در ۲۰ml اسیدکلریدریک ۲N، حل شد و حاصل، صاف شد. سپس ۱۰ml از آن برداشته شد و بررسی وجود آلکالوئید در آن، با معرف‌های دراژندروف، واگنر و میر، انجام شد. ۱۰ml محلول آب- اسیدی عصاره نمونه گیاهی، به یک آمپول دکانتاسیون ۱۰ml منتقل شد. بعد برای حذف مواد رنگی موجود در آن، محلول، چندین بار با کلروفرم (هر بار ۱۰ml) شستشو داده شد. تا جایی که همه مواد رنگی حذف شوند و کلروفرم حاصل از شستشو، رنگی نشود. در نهایت، به محلول باقیمانده آنقدر سود اضافه شد تا خنثی شود و به آن ۱۰ml معرف Bromocresol Green با غلظت $1\times10^{-4}M$، ۵ml بافر استات با pH=۴/۷ و ۴ml کلروفرم اضافه شد و آمپول دکانتاسیون، چندین بار تکان داده شد و اجازه داده شد تا دو فاز از هم جدا شوند. در این حالت، وجود رنگ زرد در فاز کلروفرمی، نشان‌دهنده وجود آلکالوئید در محیط می‌باشد که به صورت کمپلکس آلکالوئید BCG وارد فاز کلروفرمی شده است و آن را زرد رنگ کرده است. برای تعیین حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی از طریق تشکیل کمپلکس با BCG، از محلول مائی آتروپین استفاده شد. برای این کار بعد از ریختن ۱ml معرف BCG با غلظت ۴M-۱×۱۰، ۵ml بافر استات با pH=۴/۷ و حدود ۴ml کلروفرم، در یک آمپول دکانتاسیون ۵۰ml، قطره قطره از محلول مائی آتروپین با غلظت ۴۰µg/ml به آن اضافه شد و هر بار آمپول دکانتاسیون چندین بار تکان داده شد و اجازه داده شد تا دو فاز از هم جدا شوند و آنقدر ادامه یافت تا بعد از جدا شدن دو فاز، در فاز کلروفرمی، رنگ زرد ایجاد شود. برای تایید کار این عمل با برداشتن حجم مشخصی از محلول مایی آتروپین، تکرار شد.

یافته‌ها

در این تحقیق، بررسی وجود آلکالوئید در ۱۲ نمونه گیاهی با استفاده از روش استفاده از معرف‌های آلکالوئیدها (دراژندروف، واگنر و میر) و روش تشکیل کمپلکس با BCG، مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه این بررسی در جدول ۱ آمده است. نتیجه ردیابی آلکالوئید با استفاده از معرف‌های آلکالوئیدها، در مورد چای سیاه، گل گاوزبان و سرشاخه چای کوهی، منفی و در سایر موارد مثبت بود. نتیجه ردیابی آلکالوئید با روش تشکیل کمپلکس با BCG، در مورد چای سیاه و سرشاخه چای کوهی منفی و در بقیه مثبت بود. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی با روش کمپلکس با BCG با استفاده از محلول‌های مایی آتروپین، اندازه‌گیری شد که معادل ۲۰µg آتروپین بود.

بحث

تحقیقات قبلی حاکی از وجود آلکالوئید در ۱۱ نمونه از ۱۲ نمونه مورد بررسی می‌باشند: سرشاخه زرشک قرمز،[۹-۱۲] سرشاخه آدمک،[۱۳] گل همیشه بهار،[۱۲] چای سیاه،[۳و۹و۱۱-۱۴و۱۶] مامیران،[۱۲و۱۶-۱۸] گل گاوزبان،[۱۹] سرشاخه دم اسب،[۱۲و۱۷] سرشاخه بذرالبنج،[۷و۹و۱۴و۱۸] سرشاخه شاه‌تره‌ای،[۱۷] دانه سفید.[۱۱و۱۲و۱۷] نتیجه بررسی وجود آلکالوئید

Archive of SID
www.SID.ir

جدول- ۱: نتایج بررسی وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی با استفاده از عصاره متانولی نمونه‌های گیاهی، با روش استفاده از معرف‌های آلکالوئیدها و روش تشکیل کمپلکس با BCG

ردیف	نام علمی گیاه	نام فارسی گیاه	بخش مورد استفاده	نتیجه ردیابی آلکالوئید	
				روش تشکیل کمپلکس با BCG	استفاده از معرف‌های آلکالوئیدها
۱	Berberis vulgaris L.	زرشک قرمز	سرشاخه	+	+
۲	Berberis vulgaris L.	زرشک قرمز	میوه	+	+
۳	Biebersteinia multifida L.	آدمک	سرشاخه	+	+
۴	Calendula officinalis	همیشه بهار	گل	+	+
۵	Camellia sinensis	چای	چای سیاه	−	−
۶	Cheelidonium majus L.	مامیران	سرشاخه	+	+
۷	Echium ammoenum Fisch & Mey	گاوزبان	گل	+	−
۸	Equisetum arvense L.	دم اسب	سرشاخه	+	+
۹	Hyoscyamus niger L.	بذرالنبج	سرشاخه	+	+
۱۰	Hypecoum pendulum L.	شاه‌تره‌ای	سرشاخه	+	+
۱۱	Peganum harmala L.	اسفند	دانه	+	+
۱۲	Stachys lavandulifolia Vahl	چای کوهی	سرشاخه	−	−

با معرف‌های دراژندروف، واگنر و میر، در مورد تمام نمونه‌های فوق غیر از گل گاوزبان و چای سیاه، مثبت بود. نتیجه ردیابی توسط روش تشکیل کمپلکس با BCG نیز در تمام موارد فوق غیر از چای سیاه، مثبت بود. چای سیاه حاوی آلکالوئیدهای گزانتینی می‌باشد که با معرف‌های دراژندروف، واگنر و میر، قابل ردیابی نمی‌باشند.[5] نتیجه آن‌که آلکالوئیدهای گزانتینی به‌روش تشکیل کمپلکس با BCG نیز قابل ردیابی نمی‌باشند. نتیجه ردیابی آلکالوئید در مورد سرشاخه چای کوهی، با هر دو روش استفاده از معرف‌های آلکالوئیدها و روش تشکیل کمپلکس با BCG، منفی بود و تاکنون در مورد وجود آلکالوئید در این گیاه، گزارشی وجود ندارد. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی توسط روش تشکیل کمپلکس با BCG، معادل ۲۰µg آتروپین می‌باشد که مقدار بسیار کمی می‌باشد و با توجه به اینکه تشکیل کمپلکس آلکالوئید BCG، یک واکنش مولی می‌باشد، در صورتی که وزن مولکولی آلکالوئید موجود در محیط، کمتر از وزن مولکولی آتروپین (MW=۵۷۸/۷۵) باشد، مقدار فوق به مراتب کمتر خواهد بود. بنابراین حساسیت روش تشکیل کمپلکس با BCG در رد یابی آلکالوئید، بالا می‌باشد و نتایج به‌دست آمده نیز موید آن می‌باشند گل‌گاوزبان حاوی مقادیر بسیار کمی آلکالوئید بوده[19] و توسط روش استفاده از معرف‌ها، قابل ردیابی نمی‌باشد. ولی با این روش، ردیابی می‌شود. بنابراین با توجه به حساسیت بالای روش تشکیل کمپلکس با BCG در ردیابی آلکالوئید در گیاهان، سرعت بالا و عدم نیاز به لوازم و تجهیزات خاص و ارزان بودن آن، روشی بسیار مناسب، جهت بررسی وجود آلکالوئید در گیاهان و غربالگری آنها، جهت وجود آلکالوئید می‌باشد. *سپاسگزاری:* این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. از خانم‌ها قلعه نوی و فریدی بابت تایپ نهایی مقاله تشکر می‌شود.

References

۱. ایزددوست محمد. در ترجمه شیمی گیاهی، رابینسون ترور (مولف). تهران: موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۳۶۳.

2. Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Baltimor: Williams and Wilkins: 1996.
3. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy. 15th ed. London: WB Saunders Company Ltd: 2002.
4. Harbone JB. Phytochemical Methods. 3rd ed. London: Chapman and Hall: 1989.
5. Othmer K, Kirk RE, Othmer DF, Herman FM, Grayson M, Eckroth D. Encyclopedia of Chemical Technology. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons: 1978.
6. Bulter GW, Bailey RW. Chemistry and Biochemistry of Herbage. London: Academic Press: 1973.
7. Carker LE, Simon JE. Herbs, spices and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology. Phoenix, AZ: Oryx Press: 1986.
8. Dey PM, Harborne JB. Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press: 1995.

Archive of SID
www.SID.ir

9. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag: 1995.
۱۰. کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران. تهران: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت غذا و دارو: ۱۳۸۱.
11. Duke JA, Bogenschutz-Godwin MJ, duCellier J. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton: CRC Press: 2000.
12. Duke JA. Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. Boca Raton: CRC Press: 2001.
13. Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11543-6.
14. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. Pharmacognosy. 9th ed. Philadelphia: Lea and Febiger: 1988.
15. DerMarderosian A, Beutler J. The review of natural products. 2nd ed. St. Louis: Facts and Comparisons: 2002.
16. Grainger-Bisset N, Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press: 2001.
17. Buckingham J. Dictionary of natural products. London: Chapman and Hall: 1994.
18. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T, Riggins CW, et al. The Complete German Commission E Monographs. Austin, Texas: American Botanical Council: 1998.
19. Wassel G, el-Menshawi B, Saeed A, Mahran G. Toxic pyrrolizidine alkaloids of certain boraginaceous plants. *Acta Pharm Suec* 1987; 24: 199-204.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 4, July 2008: 237-241

Visual identification of alkaloids in some medicinal plants: common alkaloid reagents versus bromocresol green

Shamsa F.[1]
Esfahani H.R.[2*]
Gamooshi R.A.[3]

1- Pharmacology student
2- Department of Pharmaceutical Chemistry
3- Department of Pharmacognozy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center

Tehran University of Medical Sciences

*Corresponding author: Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center
Tel: +98-21-66959063
email: shamsa@sina.tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** Alkaloids are a group of nitrogenous compounds with potential effects on the physiological behavior of human and animals. Some of these compounds are considered important drugs in modern medicine, such as atropine and morphine. Plants are considered the most important source of alkaloids. Therefore, investigating the presence of alkaloids in different plants is very important. Usually, alkaloids in plants are identified by methods such as those of Dragendorf, Wagner and Meyer, among others, which require milligrams of alkaloids for identification. In the present study, a fast and sensitive procedure for detecting of alkaloids in plants is presented.

Methods: Twelve dried plants samples were investigated for the presence alkaloids. After extracting the total alkaloid into methanol using a Soxhlet extractor, a few milligrams of the extract was transferred to a separatory funnel, buffered to pH 4.7, the bromocresol green (BCG) solution (10^{-4} M) was added, mixed and extracted with $CHCl_3$ until a yellow color was observed in the $CHCl_3$ layer, indicating the presence of the alkaloid. The crude extracts were also investigated by the standard methods of Dragendorf, Wagner and Meyer for the presence of alkaloids.

Results: Investigation of the 12 plant samples for the presence of alkaloids by the standard reagents of Dragendorf, Wagner, and Meyer showed that only *Camelia sinensis* (flowers), *Echium amoenum* Fisch & Mey (flowers), and *Stachys* (aerial parts) are devoid of alkaloids, with all other samples positive for alkaloids. By the BCG procedure, similar results were obtained, except for the *E. amoenum* flower, which was positive. The minimum detectable limit for alkaloids by the BCG method is the equivalent of approximately 40µg atropine.

Conclusions: According to previous reports, only one of these plants does not contain alkaloids. All studied plants positive for alkaloids by standard reagents were positive by the BCG procedure. *Stachys* was negative for alkaloids by both the standard reagents and the BCG method, in agreement with previous reports. However, black tea, reported to contain xanthine alkaloids, was negative for alkaloids by both the standard reagents and the BCG method. Therefore, the BCG method is not suitable for the detection of xanthine alkaloids. Nevertheless, the microgram detectable limit for alkaloids indicates that the BCG method is very sensitive.

Keywords: Medicinal plants, alkaloids, visual, identification, ion pair, formation, bromocresol green.

Archive of SID

www.SID.ir