

تعیین مقدار تروپان آلکالوئید تام به روش تیتراسیون و آلکالوئید: هیوسیامین به روش HPLC در داتوره‌های بومی شمال ایران

سیدمحمدحسین زاده (Ph.D.)**

محمدآزادبخت (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف: گونه‌های داتورا منبع تهیه تروپان آلکالوئیدهایی چون آتروپین و فرم چپ گرد آن یعنی هیوسیامین می‌باشند. جنس داتورا دارای ۱۰ تا ۱۵ گونه می‌باشد، که گونه‌ی *D. Stramonium L.* در برخی از منابع به عنوان گونه‌ی اندمیک کناره‌ی دریای مازندران شناخته شده است. علاوه بر گونه‌ی استرامونوم، گونه‌ی *D. Innaxia Mill.* نیز با فراوانی کم‌تر در شمال ایران پراکندگی دارد. که افتراق این دو گونه با توجه به خصایص مرفولوژیک امکان‌پذیر می‌باشد. به نظر می‌رسد مقدار آلکالوئیدها در گیاه داتورا، به شدت به سن، اندام و گونه گیاه، جغرافیای منطقه‌ی رویش (اعم از ساختار خاک و سیستم آب و هوا)، و فصل گیاه وابسته باشد. حتی این مقادیر در ساعات مختلف روز هم متفاوت است.

مواد و روش‌ها: ابتدا مقدار تروپان آلکالوئید تام به روش تیتراسیون در اندام‌های مهم این دو گونه اندازه‌گیری و سپس مقایسه شدند. سپس مقدار هیوسیامین به عنوان یکی از مهم‌ترین تروپان آلکالوئیدها در این اندامها با روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت

یافته‌ها: بیش‌ترین مقدار به دست آمده از ریشه و برگ دی. استرامونوم و مقدار آن ۰/۴ درصد و کم‌ترین مقدار از ریشه دی. اسنوکسیا با ۰/۱۸ درصد به دست آمد. مقادیر تروپان آلکالوئیدها برای اندام‌های دیگر دو گونه، در محدوده‌ی این دو عدد به دست آمد

استنتاج: مقادیر به دست آمده‌ی تروپان آلکالوئیدها در برخی از اندامها تقریباً بالا و در برخی از اندامها کم بود، اما مقادیر هیوسیامین به یکدیگر نزدیک بود. اگرچه مقدار آن در گونه اینوکسیا کمتر از استرامونوم بود.

واژه های کلیدی: داتورا، هیوسیامین، تروپان آلکالوئید تام، تیتراسیون، HPLC

مقدمه

Datura innoxia Mill, Datura stramonium L.

داتورا استرامونوم در سرتاسر نواحی ساحلی شمال ایران از آستارا تا شرق مازندران به وفور دیده می‌شود (۱).

از خانواده سولاناسه، دو گیاه روینده، شمال ایران می‌باشند.

E این تحقیق طی شماره ۶۰-۸۳ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه مازندران انجام شده است.

* متخصص فارماکوتوزی، عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

* ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد - دانشکده داروسازی

** دکترای داروساز دانشگاه علوم پزشکی مازندران

E تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۱۲ تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۹/۹ تاریخ تصویب: ۸۳/۱۰/۲۳

به هیوسین یا اسکوپولامین در گیاه مسن نسبت به گیاه جوان بالاتر است (۳). از هیوسیامین به عنوان یک تروبان آلکالوئید در داتورا جهت ارزیابی استفاده می‌شود. GC, HPLC و تیتراسیون متدهایی هستند که جهت شناسایی و اندازه گیری تروبان آلکالوئیدها در نقاط مختلف جهان مورد استفاده قرار گرفته اند (۷ و ۶).

مواد و روش ها

الف) مواد: آمونیاک، اتانول، دی اتیل اتر بدون پراکساید، کلروفرم، اسید سولفوریک، پتاسیم تترایدو مرکورات، سدیم سولفات انیدر، سدیم هیدروکساید، متیل رد، استاندارد هیوسیامین، یدورپتاسیم، کلرومرکور (همگی از نوع مرک (MERCK) تهیه شد).

دستگاههای مورد استفاده: دستگاه HPLC (مدل دستگاه: KNAUER، ساخت آلمان، UV Detector K-2600، HPLC Pump K-1001، فاز متحرک: متانول، آب (۶۰:۴۰)، نوع ستون: Eurospher-C18، سایز ستون: ۲۵ سانتی متر، طول موج UV به کار رفته: ۲۵۴nm).

دستگاه تبخیر در خلا، ROTARY EVAPORATOR Laborata 4000، ساخت: آلمان، دمای استفاده شده؛ ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد

ب) **تهیه گیاه و تایید نام علمی:** هر اندام در زمان مشخصی که دارای بیشترین مقدار آلکالوئید جمع آوری شد. محدوده‌ی زمانی جمع آوری بین اواسط تابستان تا اواخر پاییز بود. نام علمی این دو گونه توسط متخصص سیستماتیک گیاهی از گروه زیست شناسی دانشگاه گیلان مورد تایید قرار گرفت و نمونه هر بار یومی آن در در آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی ساری موجود بود.

ج) **روش تعیین مقدار آلکالوئید تام به روش تیتراسیون (۴) در اندامهای مختلف این دو گیاه:** ابتدا مقدار آب موجود در هر اندام گیاه اندازه گیری شد.

داتورا اینوکسیا نیز در همین مناطق دیده می‌شود ولی نسبت به گونه‌ی استرامونوم، اولاً گسترش کمتری داشته و ثانیاً پراکندگی آن در مناطق نزدیک تر به سواحل کمتر شده و گسترش بیشتری در حاشیه‌ی شهرهایی که از دریا فاصله‌ی بیشتری دارند (مثل رشت و ساری) و یا حتی در ارتفاعات (نوشهر و چالوس) دارند دنداندار تر بودن (Dentate) حاشیه‌ی برگ‌ها در گونه‌ی استرامونوم در مقابل منظم تر بودن آن در گونه‌ی اینوکسیا، بالاروندگی ساقه‌ی داتورا استرامونوم در برابر رونده بودن (Runner) آن در داتورا اینوکسیا، رنگ و شکل دانه و ریشه و کپسول خاردار نیز از تفاوت‌های مورفولوژیک جهت افتراق این دو گونه می‌باشد (۲).

تروبان آلکالوئیدها از مهم‌ترین ترکیبات موجود در تعدادی از گیاهان خانواده‌ی سولاناسه (سیب زمینی) می‌باشند. اثرات آنتی کولینرژیک این ترکیبات کاربرد آن‌ها را در پزشکی متداول کرده است، آتروپین، اسکوپولامین یا هیوسین و هیوسیامین از مهم‌ترین تروبان آلکالوئیدهای باشند (۳). درصد توتال آلکالوئید بر حسب هیوسیامین به عنوان مهم‌ترین معیار، جهت ارزیابی ارزش دارویی داتورا مورد بررسی قرار می‌گیرد (۴). برگ و میوه نیز دو اندام مهم دارویی گونه‌های داتورا می‌باشند. گونه و اندام مورد نظر باید حداقل دارای ۰/۲۸ - ۰/۲۳ درصد تروبان آلکالوئید باشند تا بتوان از آن در فراورده‌ها و اشکال دارویی مختلف استفاده کرد. درصد این ترکیبات به فاکتورهای زیادی وابسته است (۵) و از اهداف این تحقیق اندازه گیری درصد این ترکیبات با توجه به ویژگی‌های جغرافیایی منطقه‌ی شمال ایران و مقایسه آن با مقادیر دیگر نقاط جغرافیایی می‌باشد. هیوسیامین یکی از مهم‌ترین تروبان آلکالوئیدهای موجود در این گیاه می‌باشد. آتروپین فرم راسمیزه هیوسیامین است که در جریان استخراج به وجود می‌آید (۳). نسبت هیوسیامین

محاسبه شد. سپس با استفاده از یک تناسب ساده ، درصد هیوسيامین محاسبه گردید.

یافته ها

اندازه گیری تروپان آلکالوئید بر روی برگ ، ریشه و دانه ی داتورا اینوکسیا، داتورا استرامونیم و بر روی هر اندام سه بار صورت گرفت. همان طور که در جدول ۱ دیده می شود، مقدار تروپان آلکالوئید در تمام اندامهای استرامونیم نسبت به اندامهای مشابه در گونه ی اینوکسیا بالاتر است.

اندازه گیری مقدار هیوسيامین: با قرار دادن سطح زیر منحنی (AREA) مربوطه نمونه های مجهول (عصاره ها) در منحنی بیر لامبرت به دست آمده از نمونه های استاندارد (نمودار شماره ی ۱) و سپس به دست آوردن معادله ی خط، غلظت هیوسيامین در نمونه های مجهول به دست آمد . سپس با انجام محاسبات مورد نظر مقدار هیوسيامین در ۴۰ گرم پودر اندام گیاه مورد نظر محاسبه شد. در شکل (کروماتوگرام) ۲، نتایج حاصل از HPLC عصاره های اندام های مختلف دو گونه ی داتورای شمال ایران ارائه شده است. جدول شماره ۲، زمان نگهداری (R.T) و سطح زیر منحنی مربوط به استانداردهای هیوسيامین و پیک مربوط به در برگ و دانه ی دو گونه ی داتورای شمال ایران را نشان می دهد. برای محاسبه ی درصد هیوسيامین موجود در تروپان آلکالوئید تام، با توجه به عدد به دست آمده از تعیین درصد تروپان آلکالوئید تام، مقدار آن را در ۴۰ گرم از اندام مورد نظر محاسبه کرده، با استفاده از معادله ی خط منحنی بیر لامبرت به دست آمده از تریق استانداردها، مقدار هیوسيامین را در این اندامها محاسبه سپس با استفاده از آن، درصد هیوسيامین محاسبه گردید.

۱۰ گرم از اندام مورد نظر پودر شده و به اندازه ی ذره ای ۰/۲۵ میلی متر درآمده و اندازه مورد نظر وزن شد. به روش پرکولاسیون و با استفاده از حلال استخراج کننده ای مشتمل بر اتر بدون پراکساید، آمونیاک و اتانول از گیاه عصاره گیری شد. عصاره ی به دست آمده طی روندهای متوالی که اساس آن قطبی و غیرقطبی کردن نیتروژن حلقه ی تروپان با استفاده از محلول حاوی اسید سولفوریک و آمونیاک، می باشد، عصاره از وجود سایر دسته های شیمیایی عاری گردید. کلروفرم به عنوان حامل آلکالوئید در حالت باز آزاد آن و محلول آبی اسید سولفوریک به عنوان حامل ملح آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تبخیر حلال های باقی مانده و خشک کردن عصاره، ۲۰ سی سی سولفوریک اسید ۰/۱ مولار به آن افزوده شده و با سدیم هیدروکساید ۰/۲ مولار تیترا گردیده، مقدار بیش تر از ۲۰ میلی لیتر از سود جهت خنثی کردن عصاره ی حاوی اسید سولفوریک مورد استفاده قرار گرفت. از طریق مقدار اضافی سود، مقدار توتال آلکالوئید بر اساس هیوسيامین محاسبه گردید.

د) تعیین مقدار هیوسيامین به روش HPLC: ابتدا نمونه های جداگانه از استاندارد هیوسيامین با غلظت های ۵۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۲۰۰۰ و ۱۴۰۰۰ ppm در حلال متانول ساخته شد و تزریق مکرر به روش اینزو کراتیک تا به دست آوردن اعداد تکرارپذیر بود. مقدار تزریق در هر بار ۲۰ میکرولیتر و تعداد آن حداقل سه بار صورت گرفت. پس از تهیه عصاره به روش B.P و افزودن ۲ میلی لیتر متانول به آن، ۱ میلی لیتر از آن پس از صاف شدن تا حجم ۵ میلی لیتر رقیق شد. این کار برای اندام های مورد نظر انجام شد و برای هر کدام حداقل سه تزریق صورت گرفت. با استفاده از منحنی بیر لامبرت، مقدار هیوسيامین موجود در هر یک از اندام های گیاهی و درصد آن نسبت به کل گیاه و توتال آلکالوئیدها

جدول شماره ۱- نتایج اندازه گیری درصد تروپان آلکالوئید در برگ، دانه و ریشه‌ی دو گونه‌ی داتورای شمال ایران به روش تیتراسیون

اندام	برگ (درصد)	دانه (درصد)	ریشه (درصد)
دی. استرامونیوم	۰/۳۲ - ۰/۴۰	۰/۲۰ - ۰/۲۵	۰/۳۲ - ۰/۴۰
دی. اینوکسیا	۰/۲۰ - ۰/۲۸	۰/۲۵ - ۰/۳۰	۰/۲۱ - ۰/۲۷

نمودار شماره ۱ نمودار بیر لامبرت و معادله‌ی خط به دست آمده از تزریق نمونه‌های استاندارد هیوسامین
جدول شماره ۳: مقدار تروپان آلکالوئید و درصد هیوسامین در برگ دو گونه‌ی داتورای شمال ایران

گیاه	مقدار تروپان آلکالوئید در ۴۰ گرم از برگ (میلی گرم)	مقدار هیوسامین در ۴۰ گرم برگ (میلی گرم)	درصد هیوسامین موجود در تروپان آلکالوئید (درصد)
دی. استرامونیوم	۱۴۴	۵۹,۴۴	۴۱,۲۷%
دی. اینوکسیا	۹۶	۴۳,۷۰	۴۵,۵۲%

جدول شماره ۲- نتایج آنالیز استانداردهای هیوسامین و عصاره‌ی اندام‌های مختلف دی. استرامونیوم. دی و اینوکسیا. به روش HPLC

نمونه‌ها	زمان نگهداری (دقیقه)	سطح زیرمنحنی
میانگین استاندارد ۱ 5000 ppm	۱۰/۹۹۲	۵۷/۰۷
میانگین استاندارد ۲ 8000 ppm	۱۱/۲۵	۸۹/۱۷
میانگین استاندارد ۳ 12000 ppm	۱۱/۶۹	۱۰۳/۸۶
میانگین استاندارد ۴ 14000 ppm	۱۱/۶۵	۱۱۹/۲۸
STRAMONIUM Leaf	۱۰/۷۷	۵۸/۶۰
STRAMONIUM SEED	۱۰/۱۷	۴۹/۲۱
INNOXIA LEAF	۱۰/۱۰	۴۵/۵۴
INNOXIA SEED	۱۰/۰۹	۴۳/۲۱

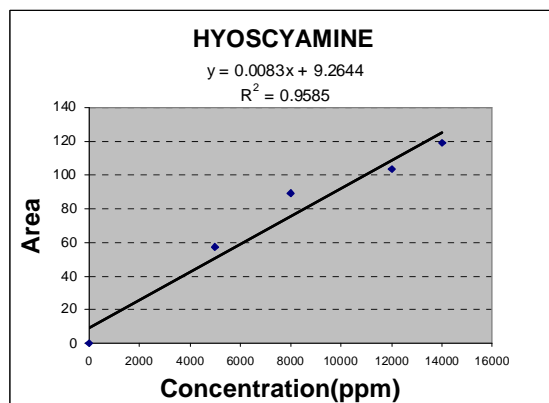
جدول شماره ۴: مقدار تروپان آلکالوئید و درصد هیوسامین در دانه‌ی دو گونه‌ی داتورای شمال ایران

گیاه	مقدار تروپان آلکالوئید در ۴۰ گرم دانه (میلی گرم)	مقدار هیوسامین در ۴۰ گرم دانه (میلی گرم)	درصد هیوسامین موجود در تروپان آلکالوئید (درصد)
دی. استرامونیوم	۹۰	۴۸,۱۲	۵۳,۴۶%
دی. اینوکسیا	۱۱۰	۴۰,۸۸	۳۷,۱۶%

بحث

از بین ۱۰ گونه‌ی گیاهی داتورا، گونه‌ی استرامونیوم (۸) و علاوه بر آن گونه‌ی اینوکسیا در شمال ایران رویش می‌یابند. با استفاده از تفاوت‌های مرفولوژیک، افتراق این دو گونه امکان پذیر می‌باشد. در فارماکوپه بریتانیا از گونه‌ی استرامونیوم به عنوان گونه‌ای که از آن فرآورده‌ی دارویی استحصال می‌شود، نام برده شده است (۴). اما در منابع معتبر فارماکولوژی از هر دو گونه‌ی مذکور به این منظور یاد شده است (۳). از ترکیبات موجود در اندام‌های این دو گیاه که در بازار فرآورده‌ی دارویی وجود دارد، می‌توان به آتروپین (فرم راسمیک هیوسامین)، هیوسین یا اسکوپولامین اشاره کرد. این ترکیبات دارای اثرات پاراسمپاتولایتیک آنتی‌موسکارینی می‌باشند و بنابراین از برخی از آنها مانند آتروپین در ایست قلبی و برادیکاردی سینوسی و قبل از بیهوشی جهت کاهش

* بر اساس نمودار بیر لامبرت (نمودار شماره ۱)، میزان هیوسامین در اندام‌های مختلف دو گونه‌ی استرامونیوم و اینوکسیا محاسبه شده و در جدول شماره ۲ ارائه گردیده است.



با این توصیف، برگ و ریشه‌ی گونه‌ی استرامونوم و دانه‌ی گونه‌ی اینوکسای قابل رویش در شمال ایران دارای ارزش دارویی خواهند بود. اگرچه اندام‌های دیگر نیز به این محدوده بسیار نزدیک‌اند و مطالعات دقیق‌تر و کامل‌تر، شاید ارزش آنها را نیز به اثبات برساند. در بررسی که در کشور ایتالیا (۱۳) صورت گرفته است، مقادیر تروپان آلکالوئیدها در برگ، بین ۰/۲ تا ۰/۴۵ درصد و در دانه ۰/۲ درصد گزارش شده است. در تحقیقی که در کشور آرژانتین بر روی آلکالوئیدهای دانه‌ی داتورا فروکسا صورت گرفت مقدار تروپان آلکالوئیدها بین ۰/۶۹ - ۰/۲۸ درصد به دست آمد که مقدار ماکزیم آن با مقدار ماکزیم به دست آمده در این تحقیق تفاوت فاحشی دارد. نیز در HPLC آن هیوسیامین شناسایی نشده است اما در HPLC گونه‌های قابل رویش در ایران این آلکالوئید شناسایی شده است در یک جمع‌بندی کلی، مقدار تروپان آلکالوئیدها در تمام اندام‌های استرامونوم و اکثر اندام‌های اینوکسیا در حد مجاز معرفی شده در منابع و بالاتر از آن می‌باشد. این مساله اثبات‌کننده‌ی ارزش دارویی داتورا‌های شمال ایران می‌باشد. با توجه به مقدار بالای هیوسیامین شناسایی شده در اندام‌های این دو گونه به نظر می‌رسد این آلکالوئید از مهم‌ترین آلکالوئیدهای موجود در این دو گیاه باشد. تحقیقات بیش‌تر در مورد سایر آلکالوئیدهای موجود در این دو گیاه و مقایسه با نتایج این تحقیق می‌تواند تکمیل‌کننده‌ی این تلاش باشد.

ترشحات مجاری تنفسی و غدد بزاقی و نیز به عنوان آنتی‌دوت در مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها و جهت ایجاد میدریاز در چشم استفاده می‌شود. از هیوسین مانند بلادونا جهت تخفیف اسپاسم‌های عضلات صاف، مانند عضلات صاف دستگاه گوارش استفاده می‌شود (۹). پیچ‌های اسکوپولامین به تازگی جهت بیماری مسافرت استفاده می‌شود (۱۰).

با توجه به نتایج این تحقیق، محتوای تروپان آلکالوئیدها در برگ و ریشه‌ی اینوکسیا و استرامونوم موجود و به طور واضحی از مقدار آن در برگ و ریشه‌ی اینوکسیادی بیش‌تر می‌باشد. اما این تفاوت در دانه‌ی این دو گیاه چندان قابل ملاحظه نیست. در مقایسه‌ی بین اندام‌ها ریشه و برگ به نظر می‌رسد محتوای آلکالوئیدی بالاتری داشته باشند. مقادیر به دست آمده تروپان آلکالوئیدی داتورا استرامونوم شمال ایران (به عنوان مثال به طور متوسط 0.36 درصد برای برگ استرامونوم) در این تحقیق چندان با مقدار به دست آمده در دو تحقیق قبلی که بر روی گونه‌ی استرامونوم صورت گرفته بود، (۰/۲۰۳ - ۰/۲۷۸) درصد به عنوان درصد توتال آلکالوئید در برگ) مطابقت ندارد (۱۱ و ۱۲). البته روش به کار برده شده دو تحقیق قبلی با روش استفاده شده در این پژوهش تفاوت دارد. در کتب فارماکوگنوزی حداقل محدوده‌ی مورد نیاز توتال آلکالوئیدی جهت ارزیابی دارویی داتورا استرامونوم، ۰/۲۸ - ۰/۲۳ درصد ذکر شده است.

فهرست منابع

3. Trease GE, Evans WC. *pharmacognosy*. 14th ed. London: saunders, 1996: 350
4. *British pharmacopoea*. HMSO. London. 1998 :1229

۱. قهرمان احمد: فلورا ایران. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع دانشگاه تهران. ۱۳۷۷، ص ۱۷
۲. مظفریان ولی. ... رده‌بندی گیاهی. موسسه انتشارات امیرکبیر. تهران. ۱۳۷۹. ص ۳۹۳

6. Verpoort R, Baerheim svendsen . High performance Liquid Chromatography of some Tropane Alkaloids. J chromatogr. 1996, 120:203-5
7. Vital A.A, Acher A., Pomilio A.B: Alkaloids of *Datura ferox* from Argentiniana. Journal of Ethnopharmacology. 1995, 49:81-9
8. Rechinger K H. *Flora Iranica*. graz: Academische Druck verlgstantatt. 1972; (vol.100):45
9. شهراز سعید. غازیانی. طاهره: ایران فارما. انتشارات تیمورزاده. تهران. ۱۳۸۱
۱۰. کاتزونگ برترام جی. فارماکولوژی پایه و بالینی. ویرایش هشتم. ترجمه بیژن جهانگیری. انتشارات تیمورزاده. تهران. ۱۳۸۲
5. Griffin W.J, Lin G.D. *Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids* , phytochemistry, 2000, 53:623-637
۱۱. حسینزاده کبری. تعیین مقدار و جدا کردن مواد موثره‌ی داتوراها‌ی منطقه‌ی البرز. دانشکده‌ی داروسازی تهران ۱۳۴۸. پایان نامه‌ی شماره‌ی ۱۶۲۴.
۱۲. قاسملو ناصر. بررسی و استخراج آلکالوئیدهای تاتوره. دانشکده‌ی داروسازی تهران. ۱۳۶۱. پایان‌نامه‌ی شماره‌ی ۲۲۱۱ ص
13. Miraldi e, Masti A, ferr s, Comparinis I.B: *Distribution of hyoscyamine and scopolamine in Datura stramonium*. Fitoterapia. 2001, 72:644-648