Archive of SID

فصل‌نامه‌ی داروهای گیاهی

journal homepage: www.journal.iaushk.ac.ir

تعیین مقدار آلکالوییدهای مختلف گونه *Papaver bracteatum* Lindl. جمع آوری شده از نقاط مختلف ایران به روش HPLC

زهره کدخدا[1]*، سجاد صداقت[1]، شمس‌علی رضازاده[2]، حسن‌علی نقدی بادی[2]، رحیم تقی زاد فرید[1]، فرهاد حریری اکبری[3]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: (Email: zkadkhoda@yahoo.com)؛

۲. پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی،کرج، ایران؛

۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران؛

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۵/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۷/۲۰

نوع مقاله: پژوهشی

موضوع: فیتوشیمی

کلید واژگان:

- ✓ *خشخاش ایرانی*
- ✓ *آلکالوئید*
- ✓ *کدئین*
- ✓ *تبائین*

چکیده

مقدمه و هدف: گیاه خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) از خانواده پاپاوراسه و یکی از گیاهان دارویی مهم می باشد که شامل ایزوکینولین آلکالوییدها است. ایزوکینولین آلکالوییدها یک گروه مشخص از متابولیت‌های ثانویه تیره‌پاپاوراسه هستند. از جمله آلکالوییدهای گیاه خشخاش ایرانی کدیین و تبایین می باشد که به صورت وسیعی به سبب خواص دارویی مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین تعیین مقدار این آلکالوییدها در گیاهان مناطق مختلف ایران ضروری است. به منظور تعیین بهترین رویشگاه طبیعی گونه مذکور که بیشترین غلظت کدیین و تبایین را تولید نماید، نمونه گیاه از نقاط مختلف رویشگاهی آن جمع آوری گردید.

روش تحقیق: با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) منحنی استاندارد با حضور دو آلکالویید فوق (کدیین و تبائین) ترسیم گردید و استخراج آلکالوییدی از نمونه ها انجام و توسط دستگاه HPLC تعیین مقدار گردید.

نتایج و بحث: مقدار درصد کدیین در کپسول خشک در منطقه زنجان، پلور، جاده چالوس، سیاه بیشه و مازندران به ترتیب ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۴ و مقدار درصد تبایین به ترتیب ۰/۰۶ ، ۰/۰۳۱، ۰/۰۳۴، ۰/۶۱ و ۳/۳ به‌دست آمد. غلظت نقاط مختلف برای کدیین از ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۰۴ و برای تبایین از ۰/۰۶ تا ۳/۳ درصد متغیر بود. گیاه جمع آوری شده در منطقه زنجان بالاترین درصد کدیین و تبایین را داراست (۳/۳۴ درصد).

توصیه کاربردی/صنعتی: کپسول جمعیت های خشخاش متعلق به منطقه زنجان ایران دارای مقادیر بیشتری تبایین و کدیین می باشد که دارای کاربردهای دارویی فراوانی هستند؛ بنابراین جمعیت جمع آوری شده از زنجان با هدف استخراج کدیین و تبایین مورد مصرف صنایع دارویی توصیه می شود.

۱. مقدمه

گیاهان دارویی در طول تاریخ همیشه با انسان قرابت خاصی داشته‌اند و آثار دارویی و موارد استفاده آن بر هیچ‌کس پوشیده نیست. اگرچه علاقه‌مندی و توجه به این گیاهان مفید در سال‌های گذشته ناچیز بود ولی خوش‌بختانه اخیراً مورد توجه و عنایت بیشتری قرار گرفته است. گیاهان مواد شیمیایی مختلفی را در دیواره سلولی خود جمع می کنند که این مواد را می توان به دو دسته کلی تقسیم بندی

www.SID.ir

Archive of SID

کرد. دسته اول مـوادی کـه در نتیجـه متابولیسـم اولیـه گیـاه تولیـد می‌شوند نظیر پروتئین ها، چربی ها و کربوهیدرات‌ها، دسته دوم مواد ناشی از متابولیسم ثانویه نظیر ترکیـب هـای فنولیـک، ترپنوئیـدها و آلکالوئیدها، این ترکیب‌ها به نظر نمـی‌رسـند کـه در فعالیـت حیـاتی گیاهان نقش اساسی بـازی کننـد امـا نقـش بسـیار مهمـی در بقـا و سازگاری گیاهان ایفا می کنند (قاسمی، ۱۳۸۸). این ترکیبات به طور گسترده در صنایع غذایی و دارویـی مـورد مصـرف قـرار مـی گیرنـد. لاتکس، کپسول، دانه و ریشه گیاه خشخاش ایرانـی یـا شـقایق کبیـر (*Papaver bracteatum* Lindl.) از خـانواده پاپاوراسـه حـاوی آلکالوئیدهایی هم‌چون تبـایین و بـه مقـدار نـاچیز کـدیین مـی‌باشـد (Sharghi & Lalezari,1967; Kuppers *et al*.,1976).

روش‌های کروماتوگرافی مختلفی جهت اندازه گیـری و شناسـایی ترکیب ها وجود دارد که یکی از مهمترین آن‌ها کروماتوگرافی مایع بـا کارآیی بـالا اسـت. در کرومـاتوگرافی مـایع بـا کـارآیی بـالا اغلـب از ستون‌های پر شده با ذرات ریز ساکن استفاده مـی شـود. بـه همـین علت سطح بیشتری از فاز ساکن در ستون در معرض اجزا نمونـه قـرار می‌گیرد و در نتیجه بازده جداسازی از ایـن روش از سـایر روش‌هـای کروماتوگرافی بیشتر است.

دریک بررسی بـه روش کرومـاتوگرافی گـازی بـا دتکتـور جرمـی کـدیین را در کپسـول گیـاه شناسـایی کردنـد و مقـدار آن را حـدود ۰/۰۰۴ درصـد گـزارش کردنـد (Kuppers *et al*.,1976). تبـایین منطقه مهاباد ایران را بـه روش TLC جداسـازی و تعیـین مقـدار بـا دسـتگاه اسـپکتروفتومتری NMR و IR شناسـایی کردنـد (Lalezari,۱۹۷۴). با اندازه گیری تبـایین موجـود در کپسـول‌هـای خشخاش غرب ایران با روش استخراج بـا بنـزن و روش اسـتخراج بـا کلروفرم و سپس اندازه گیری با دستگاه اسپکتروسکوپی UV از پودر نرم، ریز و درشت از کپسول نتایج متفاوتی به دست آوردنـد کـه روش استخراج با کلروفرم از پودر نرم درصد تبائین آن را تـا ۴/۱۷ گـزارش دادند (Rostam *et al*.,1976).

در تحقیقی به روش اسپکتروسکوپی مادون قرمز [1] با اسـتفاده از اسپکتروسـکوپی NIR-FT-Raman انجـام شـد بـه طـور هـم‌زمـان آلکالوییدهای مهم گیاه خشخاش را شناسایی و تعیین مقدار کردنـد، که در این روش مقدار مصرف نمونه بسیار کم می‌باشد (۲۵ میلی‌گرم) که دیگر نیاز به صرف وقت زیـاد بـرای تیمـار کـردن نمونـه‌هـا نبـود (Schulz *et al*., 2004).

در تحقیق دیگری، پنج آلکالوییدد در ریشه و کپسـول سـه گونـه Oxytone (*Papaver bracteatum*, *P. oriental* and *P. psodo oriental*) را با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با کارآیی بـالا مـورد تجزیه قرار دادند که درصد تبایین کپسول براکته توم را ۲/۱۵ گزارش نمودند نمونه های جمع آوری شده از ایران بود (Milo *et al*.,1988).

بـا توجـه بـا ایـن‌کـه بیشـتر بررسـی هـای انجـام شـده بـر روی گونه های دیگر پاپاور بوده است. لذا هدف از این بررسی اندازه گیـری کدیین و تبایین از کپسول گونـه خشـخاش ایرانـی یـا شـقایق کبیـر (*Papaver bracteatum* Lindl.) جمع آوری شـده از چنـد منطقـه مختلف به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا بوده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جمع آوری و شناسائی گیاه

نمونه‌های گیاهی خشخاش ایرانی از پنج منطقه مختلف و از هـر رویشـگاه سـه نمونـه جمـع آوری و توسـط بخـش گیـاه شناسـی پژوهشکده گیاهان دارویی جهـاد دانشـگاهی شناسـایی شـد. نمونـه چالوس با کد هرباریومی IMPH212، سـیاه بیشـه IMPH1556، مازندران IMPH1557، پلور IMPH1558 و زنجان IMPH1559.

گیاهان از منطقه زنجان (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۳۵ دقیقـه و ۱۶/۵ ثانیه و با طول شرقی ۴۸ درجه و ۳۹ دقیقه و ۱۲/۴ ثانیه) از ارتفاع ۲۱۰۰ متری، مازندران منطقه‌پل کندوان (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه و۵۷/۶ ثانیـه و بـا طـول شـرقی ۵۱ درجـه و ۴۹ دقیقه و ۲۰/۶ ثانیه) ارتفاع ۳۰۵۹ متری، جـاده چـالوس (بـا عـرض شمالی ۳۶ درجه و ۱۰ دقیقه و۵۳/۷ ثانیه و با طول ۵۱ درجـه و ۱۹ دقیقه و ۸/۱ثانیه) از ارتفاع ۲۵۲۷ متری، سیاه یشه (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۱۰ دقیقه و۵۳/۷ ثانیه و با طول ۵۱ درجه و ۱۹ دقیقه و ۸/۱ثانیه) از ارتفاع ۲۵۳۷ متر و پلور (با عـرض ۳۵ شـمالی درجـه و ۵۲ دقیقه و۱۸/۸۵ ثانیه و بـا طـول شـرقی ۵۲ درجـه و ۴ دقیقـه و ۵۳/۷ ثانیه) در ارتفاع ۲۳۰۰ متری جمع آوری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۲. وسایل و مواد مورد نیاز

استاندارد کدئین فولکا[1]، استاندارد تبائین از شرکت سیگما آلدریچ[2] و متانول HPLC، کلروفرم و سدیم سولفات انیدرید از شرکت مرک[3] تهیه شدند.

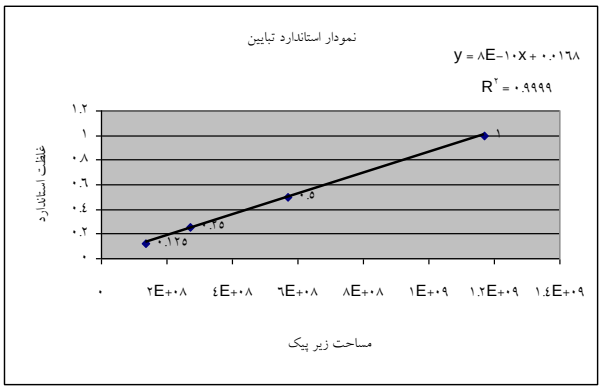
۲-۳. آماده سازی گیاه و عملیات استخراج

کپسول رسیده از مناطق مذکور جمع آوری و بذر آن تخلیه شد و به مدت چند روز در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. کپسول خشک شده آسیاب و به شکل پودر در آورده شد. برای انجام استخراج مقدار یک گرم از کپسول پودر شده را به دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن کرده و به داخل ارلن ۲۵۰ میلی لیتر انتقال داده شد. سپس به بالون مذکور ۵ میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد، 25 میلی لیتر متانول و ۷۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه کرده و درب آن‌را محکم بسته و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (امواج مافوق صوت با فرکانس بالاتر از ۲۰۰۰ هرتز قرار گرفت) تا که این عمل باعث تسریع و بهبود عمل استخراج گردد (غفارزادگان و هم‌کاران، ۱۳۸۹) .

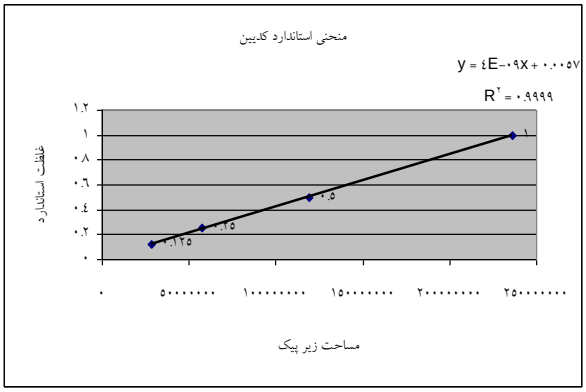
سپس عصاره حاصله از پنبه و کاغذ صافی عبور داده شد و برای شستشوی ارلن و کاغذ صافی و پنبه ۱۰ میلی لیتر کلروفرم به ارلن افزوده شد و شستشو انجام گرفت. عصاره حاصل با دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک گردید. به رسوبات باقی‌مانده داخل بالن ۲۵ میلی لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد و به کمک دستگاه اولتراسونیک تمامی رسوبات حل شد. اسیدی کردن محیط باعث می شود تا آلکالوییدها به شکل نمکی و باردار در آیند و در اثر استخراج مایع – مایع به فاز آبی منتقل شوند. محلول آبی – آلی حاصل به یک دکانتور منتقل گردید و دکانتور به مدت ۱۰ دقیقه رها شد تا دو فاز مجزا تشکیل شود، پس از استخراج مایع – مایع فازکلروفرمی دور ریخته شد. با استفاده ازآمونیاک pH=۱۰-۱۱ تنظیم و موجب قلیایی شدن فاز آبی گردید تا آلکالوییدها به شکل باز آزاد درآیند و در مرحله بعد استخراج مایع- مایع به فاز کلروفرمی منتقل شوند. سپس با افزودن ۲۵ میلی لیتر کلروفرم عمل استخراج انجام شد و فاز کلروفرمی در ظرف دیگری جمع‌آوری شد و فاز آبی را مجدداً دو مرتبه با ۱۰ میلی لیتر کلروفرم استخراج و جمع‌آوری شد. برای آب‌گیری از فاز آلی حاصل، سدیم سولفات بدون آب افزوده و از کاغذ صافی عبور داده شد و مجدداً حلال با دستگاه روتاری تبخیر شد و عصاره خشک شده را در ۵ میلی لیتر متانول خالص حل کرده و از فیلتر سرسرنگی عبور داده و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا تزریق شد (غفارزادگان و هم‌کاران، ۱۳۸۹) .

۲-۴. تهیه محلول های استاندارد

در این بررسی غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵۰، ۰/۵۰۰ و ۱/۰۰ میلی گرم در میلی لیتر از هر کدام از استانداردهای کدئین و تبائین تهیه شد. سپس هر کدام از نمونه ها سه بار به دستگاه تزریق گردید و با توجه به غلظت و ارتفاع پیک دو منحنی کالیبراسیون (نمودار ۱ و ۲) رسم گردید.



نمودار ۱. منحنی کالیبراسیون تبایین



نمودار ۲. منحنی کالیبراسیون کدیین

[1] Fluka
[2] Sigma-Aldrich
[3] Merck

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۵. مشخصات دستگاه HPLC

برای تجزیه نمونه ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده گردید. علت این انتخاب عملکرد بالا، دقت خوب و سازگاری این روش در انجام اندازه گیری های کمی است. دستگاه HPLC از نوع Knauer با ستون (250×4/9) CN مجهز به پمپ مدل K-1001 و دتکتورUV مدل K-2501 می باشد. برنامه کار این دستگاه به این نحو تنظیم گردید که سرعت فاز حامل بر روی ۲ میلی لیتر در دقیقه و طول موج دتکتور روی ۲۵۴ نانومتر و حجم تزریق نمونه ۵۰ میکرولیتر تنظیم شد. فاز متحرک آمونیوم استات ۱۰۰میلی مولار، دی اکسان، استونیتریل و متانول به نسبت (۴۰:۵۰:۵۰:۸۶۰) با pH = ۵/۶ انتخاب شد.

خطای بین آزمایش برای تمام اندازه گیری کمتر از ۵٪ می‌باشد. بنابراین صحت و تکرار پذیری روش قابل تایید است.

۲-۶. تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی مقدار کدیین و تبایین در گیاه مذکور، در مناطق مختلف مورد آزمایش، تجزیه واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین آن‌ها با سه تکرار و بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار (FLSD) انجام شد. آزمون مذکور در سطح احتمال یک درصد با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (Ver.17) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

گیاهان به محرک های محیطی پاسخ می دهند و متابولیت‌های ثانویه دارای نقش کلیدی در بر هم کنش بین گیاه و محیطشان هستند و مطابق نتایج بسیاری از تحقیقات، آلکالوییدها از جمله متابولیت‌های ثانویه ای هستند که مسیر بیوسنتز آن‌ها تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می گیرد و در مراحل نموی و شرایط محیطی دارای نوسان هستند. طبق مشاهدات و مقایسات این تحقیق به نظر می رسد شرایط محیط در تغییرات آلکالوییدهای موجود در کپسول جمع آوری شده از مناطق مختلف تأثیر گذاشته باشد و شرایط محیطی متفاوت در مقدار کدیین و تبایین تأثیر گذار بوده است. به طوری که تنوع میانگین درصد ترکیبات کدئین و تبائین در نمونه های به‌دست آمده از مناطق مختلف کشور را در جدول شماره ۱ مشاهده می کنید. میانگین درصد کدئین (نمودار شماره ۱) و مقدار درصد تبائین (نمودار شماره ۲) ترسیم شد.

نتایج این تحقیق نشان داد اگر کدئین به تنهایی در نمونه ها بررسی شود بیشترین مقدار کدئین (۰/۰۰۴ درصد) مختص نمونه جمع آوری شده از شهرهای زنجان و پلور و بیشترین مقدار تبائین (۳/۳ درصد) مربوط به نمونه جمع آوری شده از شهر زنجان می‌باشند.

کمترین مقدار کدئین (۰/۰۰۱ درصد) به نمونه جمع آوری شده از سیاه بیشه و کمترین مقدار تبائین (۰/۰۶ درصد) به نمونه جمع آوری شده از منطقه مازندران اختصاص داشت. این تغییرات در میزان آلکالوییدها در مناطق مختلف می تواند ناشی از تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی، اکولوژیکی، جغرافیایی، اقلیمی و خاکی باشد. با توجه به نتایج به دست آمده به احتمال زیاد ارتفاع تأثیر بسزایی بر تولید آلکالوییدها در این گیاه دارد (قاسمی، ۱۳۸۸). مقدارآلکالوییدهای تولید شده در این گیاه با ارتفاع رابطه عکس دارد.

جدول ۱. میانگین ترکیبات کدئین و تبائین در نمونه‌های به دست آمده از مناطق مختلف کشور

نمونه	مازندران*	سیاه بیشه	پلور	زنجان	جاده چالوس
میانگین درصد کدئین	۰/۰۰۱۹۹±۰/۰۰۰۱۴۱	۰/۰۰۰۹۸±۰/۰۰۰۱۵	۰/۰۰۳۹±۰/۰۰۰۱۵	۰/۰۰۳۹±۰/۰۰۰۴۶	۰/۰۰۲۹۹ ±۰/۰۰۰۱۵۱
میانگین درصد تبائین	۰/۰۵۹۹±۰/۰۰۳۶	۰/۳۰۹±۰/۰۱۷۰	۰/۶۰۹±۰/۰۱۹۶	۳/۲۹۹±۰/۱۱۰	۰/۳۳۹±۰/۰۰۸۱

* میانگین ± انحراف معیار

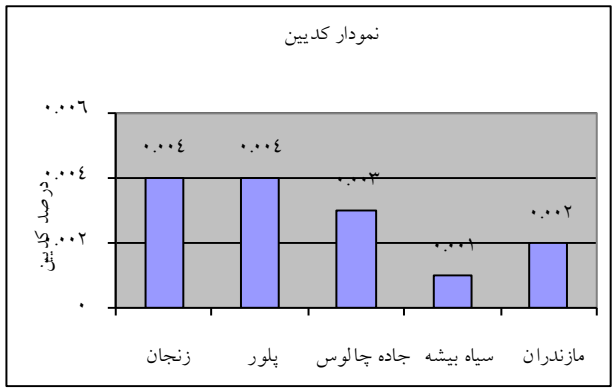
www.SID.ir

Archive of SID

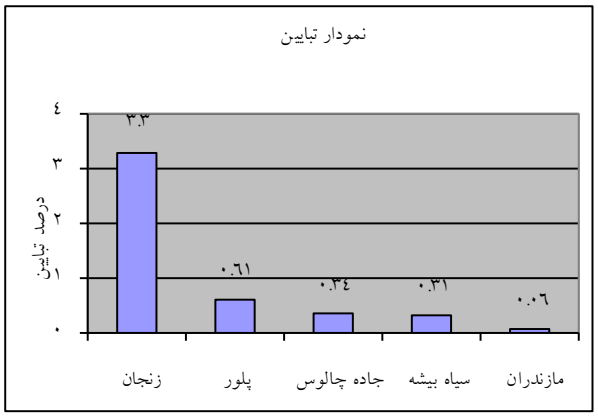
۴. نتیجه گیری

تجزیه رگرسیونی دارای رابطه معنی داری بین مجموع کدیین و تبایین و ارتفاع رویشگاه آن‌ها را نشان می دهد. نمونه های جمع آوری شده از منطقه زنجان و پلور در مقایسه با دیگر نمونه ها، در ارتفاعات پایین‌تر جمع آوری و درصد تبائین و کدیین بیشتری دارند. در این مطالعه به روشنی نشان می دهد که نمونه زنجان منبع خوبی برای تهیه آلکالوئیدهای مورد نظر می باشد.

با توجه به تحقیقات اندکی که روی این گیاه مهم دارویی انجام شده است امید است با ارزیابی وسیع تر و شناخت بیشتر منابع طبیعی این ثروت ملی و خالص سازی این نمونه ها بتوان در آینده منابعی با کیفیت بالاتر معرفی نمود .



نمودار شماره ۳. مقایسه میانگین درصدکدیین بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار محافظت شده (FLSD)در سطح ۱ درصد



نمودار شماره ۴. مقایسه میانگین درصدتبایین بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار محافظت شده (FLSD) در سطح ۱ درصد

۵. منابع

غفارزادگان، ر.، خدیوپارسی، پ.، خلیقی سیگارودی، ف.، پیرعلی همدانی، م.، کدخدا، ز.، رضازاده، ش.ع. ۱۳۸۹. بهینه سازی روش استخراج ماده اولیه دارویی هیوسین از گیاه بذرالبنج. *فصلنامه گیاهان دارویی*، ۹: ۸۷-۹۵.

قاسمی، ع. ۱۳۸۸. گیاهان دارویی و معطر (شناخت واثرات آن‌ها). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۵۶۰ صفحه.

Sharghi, N. and Lalezari, I. 1967. *Papaver bracteatum* lindl. a highly rich source of thebaine. *Nature*, 213: 1244.

Meshulam, H. and Lavie, D. 1980. The Alkaloidal Constituents of *Papaver bracteatum* Arya E. *Phytochemistry*, 19: 2633-2635.

Kuppers, F., Salemink, C., Bastart, M. and Paris, M. 1976. Alkaloids of *Papaver bracteatum* presence of codeine neopine and alpinine. *Phytochemistry*, 15: 444 - 445.

Lalezari, I., Nasseri, P. and Asgharian, R. 1974. *Papaver bracteatum* Lindl. population AryaII. *Journal Parmaceutical Scince*, 63: 1331.

Rostam, H., Maghssodi, A. and Fawzi, B. 1976. Direct spectrophotometer determination of thebainein arya II population capsule of *Papaver bracteatum* lindl. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67: 32-34.

Schulz, H., Baranska, M., Quilitzsch, R. and Schütze, W. 2004. Determination of alkaloids in capsules, milk and ethanolic extracts of poppy (*Papaver somniferum* L.) by ATR-FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Analyst*, 129: 917-920.

Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and ladizinsky, G. 1988. High - performance liquid chromatographic analysis of the alkaloid spectrum i the roots and capsules of the species and hybrids of *papaver* section *oxytona Journal of Chromatography* A, 452: 563-570.

www.SID.ir