**فصل‌نامه‌ی داروهای گیاهی**

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


# شناسائی و تعیین مقدار آلکالوئیدهای مختلف گونه *Atropa belladonna* L. از نقاط مختلف ایران به روش کروماتوگرافی گازی (GC)


**سجاد صداقت[۱]، رضا حاجی آقایی[۲]، رحیم تقی زاد فرید[۱]*، زهره کدخدا[۱]، سید وحید قاسمی[۲]، حسن‌علی نقدی بادی[۲]، فرهاد حریری اکبری[۳]، شمس‌علی رضازاده[۲]**

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

** مسئول مکاتبات (E-mail: r.farid@yahoo.com)*

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

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



**شناسه مقاله**

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۳۹۰/۰۵/۱۵

**تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۰/۷/۲۰

**نوع مقاله:** پژوهشی

**موضوع:** فیتوشیمی

**کلید واژگان:**

- ✓ *شابیزک*
- ✓ *تروپان*
- ✓ *هیوسین*
- ✓ *آتروپین*
- ✓ *آلکالوئیدها*



**چکیده**

**مقدمه و هدف:** گیاه شابیزک از خانواده سیب زمینی و یکی از گیاهان دارویی مهم می باشد که شامل تروپان آلکالوییدها است. تروپان آلکالوییدها یک گروه مشخص از متابولیت‌های ثانویه خانواده سیب زمینی هستند. مهمترین آلکالوییدهای گیاه شابیزک آتروپین و هیوسین می باشد که به صورت وسیعی به سبب خواص دارویی مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین شناسایی و تعیین مقدار این آلکالوییدها در گیاهان مناطق مختلف ایران ضروری است. هدف از این مطالعه شناسائی و تعیین مقدار آلکالوئیدهای مختلف گونه *Atropa belladonna* از مناطق مختلف به روش کروماتوگرافی گازی بود.

**روش تحقیق:** کل اندام‌های زمینی گیاه از پنج منطقه شامل اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر جمع آوری و خشک گردید. سپس عمل عصاره گیری انجام شد. با تغییر اسیدیته و حلال، آلکالوییدها استخراج، شناسایی و تعیین مقدار گردید.

**نتایج و بحث:** مقدار آتروپین در گیاه خشک در بین شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۶۷، ۰/۷۶، ۱/۰۰، ۱/۶۲ و ۱/۸ درصد و مقدار هیوسین به ترتیب ۰/۰۹۱، ۰/۱۵۷، ۱/۲۳، ۰/۲۳۱ و ۰/۴۶۵ درصد و مقدار مجموع هر دو آلکالویید به ترتیب ۰/۷۵۸۴، ۰/۹۱۸، ۲/۱۳۸، ۱/۵۸۱۱ و ۲/۶۵۶ درصد بدست آمد. در این تحقیق بیشترین مقدار آتروپین بدست آمده از کل اندام‌های زمینی گیاه در نمونه اردبیل ۱/۸ درصد بود و بیشترین میزان هیوسین ۱/۲۳ در نمونه تنکابن بود. نمونه رامسر کمترین میزان هیوسین و آتروپین (٪) و مجموع آن‌ها را داشت؛ در حالی که نمونه اردبیل بالاترین آتروپین و مجموع آتروپین و هیوسین را داشت.

**توصیه کاربردی/صنعتی:** با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان برای استخراج بیشتر آتروپین و مجموع آتروپین و هیوسین از گیاه شابیزک از نظر اقتصادی جمعیت منطقه اردبیل را پیشنهاد نمود.


## ۱. مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در ایران و سایر نقاط جهان به عنوان محصولات اصلی و فرعی بسیار ارزشمند می باشد، لذا واضح است که تعیین ویژگی‌های ژنتیکی، مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و اکولوژیکی این دسته از گیاهان، به منظور بهره برداری پایدار اقتصادی، اهداف بهداشتی و سلامتی و هم‌چنین حفظ تنوع موجود در

عرصه‌های طبیعی مراتع کشور و جلوگیری از حذف گونه های در حال انقراض ضروری به نظر می‌رسد (کریمی و هم‌کاران، ۱۳۸۸). گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات متابولیتی که خاصیت دارویی و صنعتی دارند از اهمیت روز افزونی برخوردار هستند و اصلی‌ترین ذخیره کننده منابع دارویی می‌باشند که در حدود ۸۰ درصد از جمعیت جهان هم‌چنان نیازمند این منابع در جهت حفظ سلامت و بهداشت خود هستند. در حال حاضر به دلیل مقاوم بودن عوامل بیماری‌زا به داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک‌ها نیاز به منابع جایگزین در جهت رفع نیازهای بهداشتی، سلامتی و هم‌چنین کاهش مضرات مواد شیمیایی احساس می شود. متابولیت های ثانویه گیاهی به عنوان دارو، ترکیبات معطر، رنگ‌دانه، افزودنی های غذایی دارای اهمیت اقتصادی بسیار زیادی می‌باشند (Harriri *et al.*, 2010). بهره گرفتن از گیاهان دارویی در درمان، به جهت دسترسی آسان، اثرات درمانی متنوع، عوارض جانبی کم، هزینه پایین درمان و اثرات روانی مثبت مورد توجه قرارگرفته است (قاسمی، ۱۳۸۸). لازمه آن شناخت خواص دارویی و سمی گیاهان و بررسی دقیق ترکیبات بیوشیمیایی موجود در آن ها است. در گذشته، به علت عدم وجود روش‌های پیشرفته امروزی، شناخت این ترکیبات مشکل بود. طی سال های گذشته به علت توجه خاصی که به مواد طبیعی شده است، فعالیت‌های زیادی جهت استخراج، خالص سازی و تعیین ساختار مولکولی ترکیبات به دست آمده از گیاهان انجام شده است (Latif & Gray, 2006). اگر چه امروزه در زمینه تولید مواد موثره گیاهی به روش سنتتیک تلاش‌ها و پیشرفت قابل ملاحظه ای صورت گرفته است، ولی هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند است، زیرا مواد موثره گیاهی یا ساختمان ناشناخته‌ای دارند و یا از ساختمان شیمیایی پیچیده برخوردارند که تولید آن‌ها به روش سنتتیک در صنایع داروسازی مشکل و یا دارای هزینه بسیار زیاد و در بعضی موارد غیر ممکن می‌باشد (Starmans & Nijhuis, 1996; Verpoorte & Memelink, 2002).

شابیزک با نام‌های Belladonna، Devil's berries ، Death cherries و Deadly nightshade گیاهی پایا، چند ساله، که از قدیم به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی استفاده می شده است. خواص دارویی آن مربوط به آلکالوییدهای موجود در این گیاه است. شابیزک با بوی نامطبوع، دارای آلکالویید مشتق از تروپان (آتروپین و هیوسین) است (Latif & Gray, 2006). زمان گل دهی این گونه بهار و زمان میوه دهی تابستان و پاییز است. این گیاه متعلق به ناحیه خزری است و در حاشیه جنگل ها و زیر درختان می روید. پراکندگی جغرافیایی این گونه در اروپا، ترکیه و شمال ایران است (قهرمان، ۱۳۵۸-۱۳۸۰).

ترکیباتی که از منابع طبیعی استخراج می شوند را ترکیبات طبیعی[1] می‌نامند. که درعصاره گیاهی می‌توان به آلکالوئیدها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، لیگنان‌ها، استروئیدها، قندها، ترپنوئیدها و غیره اشاره کرد. امروزه بیش از ۵۵۰۰ آلکالوییدد (قلیا مانند) شناخته شده است. برای اولین بار کلمه آلکالویید توسط یک داروشناس آلمانی به کار گرفته شد که یکی از مهمترین و بزرگترین گروه‌های فرآورده های ثانویه متابولیسمی[2] در گیاهان می‌باشند. آلکالوییدها مواد قلیایی هستند که در مولکول خود یک یا چند اتم نیتروژن دارند و معمولاً در حلقه هتروسیکل واقع شده اند و دارای ساختارهای شیمیایی مختلفی بوده و در گیاه به صورت باز های آزاد، نمک و یا N- اکسید وجود دارند (Latif & Gray, 2006; Trease & Evans, 1996).

گروهی از آلکالوییدها به نام تروپان به طور عمده در خانواده سیب زمینی یافت می‌شوند. از معروف ترین تروپان آلکالوییدها را می‌توان، هیوسیامین، هیوسین و آتروپین نام برد. مشخصه تروپان آلکالوییدها یک گروه متیل متصل به اتم نیتروژن می‌باشد که این چنین ساختمانی در استیل کولین که انتقال دهنده امواج عصبی در سلول-های مغز می‌باشد مشاهده شده است (Larson & Marley, 1984; Mohammad, 1998).

آتروپین با فرمول $C_{17}H_{23}NO_3$ مخلوط راسمیکL و D هیوسیامین است که از راسمیزاسیون هیوسیامین در حین استخراج حاصل می‌شود و سبب فلج کامل الیاف اعصاب محیطی پاراسمپاتیک می‌گردد و اثرات گسترده‌ای روی سیستم اعصاب مرکزی[3] (CNS)،

[1] Natural products
[2] Secondary Metabolites
[3] Central Nervous System

دمای بدن، چشم ها، دستگاه گوارش، قلب و افزایش فشار خون دارد (Miraldi, 2001).

هیوسین به اسکوپولامین چپ گرد نیز معروف و از ارزشمندترین آلکالویید تروپانی است که تقاضای جهانی آن ده برابر بیشتر از هیوسیامین است، فرمول شیمیایی آن $C_{17}H_{21}NO_4$ و در دمای ۸۹ درجه سانتی‌گراد ذوب می شود. نوع راسمیزه آن را آتروسین می گویند. این ترکیب در روان پزشکی ( در درمان بیماری‌های اعصاب) و هم‌چنین در تهیه داروهای ضدتهوع و ضد دریازدگی کاربرد فراوانی دارد. این آلکالویید خواب آور و مسکن بوده و برای گشاد کردن مردمک چشم کاربرد دارد. از آن‌جا که هیوسین نسبت به آتروپین تأثیر بیشتری بر روی سیستم عصبی مرکزی دارد، تقاضا برای تولید این ترکیب بیشتر است (Miraldi, 2001; Mohammad, 1998). در نهایت با توجه به اهمیت و ارزش هیوسین و آتروپین تصمیم به انجام تحقیق حاضر با هدف بررسی کمی و کیفی دو آلکالوئید مذکور در گیاه شابیزک که از مناطق مختلف ایران جمع آوری شده بود گردید.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱. جمع آوری و شناسایی گیاه

نمونه‌های گیاهی شابیزک از پنج منطقه مختلف از هر منطقه سه نمونه انتخاب، جمع آوری و توسط بخش گیاه شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی شد (کد هرباریومی اردبیل IMPH1469 ، مرزن آباد IMPH1471 ، تنکابن IMPH1472 ، کرج و رامسر IMPH1470 ). گیاهان از مرزن آباد (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۱۸ دقیقه و۳۷/۵ ثانیه و با طول شرقی ۵۱ درجه و ۱۱ دقیقه و ۲/۸ ثانیه) در ارتفاع ۱۴۹۸ متری و در تاریخ ۸۹/۳/۱۸، رامسر (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۴۸ دقیقه و۲۱/۵ ثانیه و با طول شرقی ۵۰ درجه و ۳۸ دقیقه و ۳۴/۸ ثانیه) از ارتفاع ۱۵۷۰ متری در تاریخ ۸۹/۳/۱۵، اردبیل (با عرض شمالی ۳۷ درجه و ۴۰ دقیقه و۵۷/۶ ثانیه و با طول شرقی ۴۸ درجه و ۴۹ دقیقه و ۲۰/۶ ثانیه) در ارتفاع ۴۸۸ متری در تاریخ ۸۹/۳/۷ ، تنکابن (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه و۱۰/۱ ثانیه و با طول شرقی ۵۰ درجه و ۵۴ دقیقه و ۷/۸ ثانیه) از ارتفاع ۱۴۷۲ متری در تاریخ ۸۹/۳/۲ و کرج (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۳۵ دقیقه و ۵۷ ثانیه و با طول شرقی ۵۳ درجه و ۱۷ دقیقه و ۵۳ ثانیه) از ارتفاع ۱۵۲۶ متری در تاریخ ۸۹/۳/۲ جمع آوری شدند.

### ۲-۲. وسایل و مواد مورد نیاز

استانداردهای هیوسین هیدروبروماید تری هیدرات و آتروپین از شرکت Sigma-Aldrich و متانول HPLC، کلروفرم، سدیم سولفات انیدرید از شرکت Merck تهیه شدند.

### ۲-۳. آماده سازی گیاه برای عملیات استخراج

در ابتدا ناخالصی های گیاهان جمع آوری شده از کل اندام‌های ریشه جدا شدند. سپس به مدت چند روز در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. گیاه خشک شده آسیاب و به شکل پودر درآورده شد.

### ۲-۴. عملیات استخراج

برای استخراج، ابتدا اندام‌های ریشه سه گیاه جمع آوری شده از هر منطقه آسیاب شد و مقدار یک گرم از گیاه پودر شده را با دقت ۰/۰۰۱ وزن کرده و به داخل ارلن ۲۵۰ میلی لیتر انتقال داده شد. سپس به بالون مذکور ۵ میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد، ۲۵ 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 داده شد تا این عمل باعث تسریع و بهبود عمل استخراج گردد. سپس به مدت نیم ساعت در جای تاریک قرار گرفت و سپس عصاره حاصله از پنبه و کاغذ صافی عبور داده شد. برای شستشوی ارلن و کاغذ صافی و پنبه ۱۰ میلی لیتر کلروفرم به ارلن افزوده شد و شستشو انجام گرفت. عصاره حاصل با دستگاه تقطیر در خلاء دوار 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 در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت تا تمامی رسوبات حل گردد. اسیدی کردن محیط باعث می شود تا آلکالوییدها به شکل نمکی و باردار درآیند 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، فاز آبی مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از آمونیاک 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. فاز کلروفرمی در ظرف دیگری جمع‌آوری شد. 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 و مجدداً حلال با دستگاه تقطیر در خلأ تبخیر شد (Starmans & Nijhuis, 1996). عصاره خشک شده را در ۵ میلی لیتر متانول خالص حل کرده و از فیلتر سرسرنگی عبور داده و یک میکرولیتر از زیر صافی به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید (تسلیمی، ۱۳۸۰.).

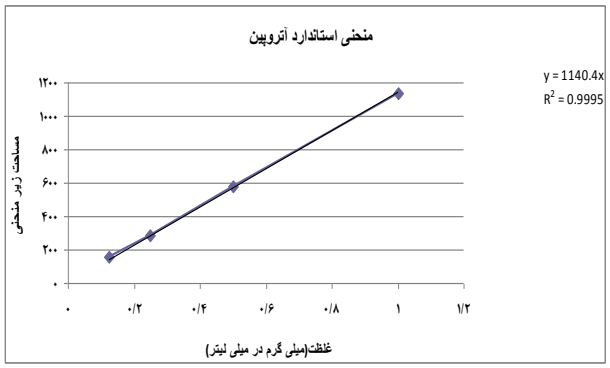
### ۲-۵. تهیه محلول های استاندارد

برای رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت هیوسین و آتروپین در عصاره های به دست آمده ابتدا غلظت‌های ۰/۱۲۵ ، ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر از استاندارد های هیوسین و آتروپین تهیه شد (جدول ۱ و ۲). سپس با تزریق این محلول ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی GC مساحت زیر منحنی بر حسب غلظت به دست آمد (شکل ۲ و۱).

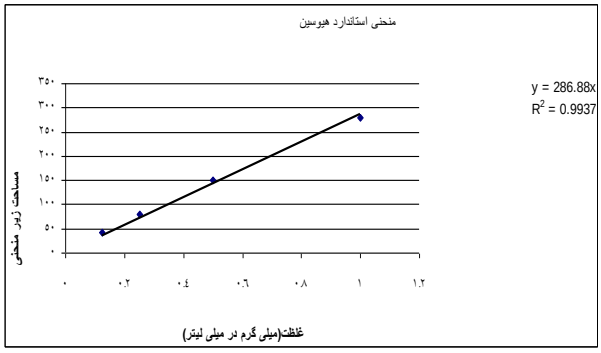
### ۲-۶. مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی GC

برای تجزیه نمونه ها از روش کروماتوگرافی گازی استفاده گردید، علت این انتخاب عملکرد بالا، دقت خوب و سازگاری این روش در انجام اندازه گیری های کمی است. دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده شده از نوع Yangline 6000 مجهز به ستون مویین DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر و دتکتور FID انتخاب گردید.

دمای ابتدایی آون روی ۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، افزایش داده شد و دمای آون در همین دما به‌مدت ۳ دقیقه نگه داشته شد. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان[۳] ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید و محاسبات بر مبنای مساحت زیر پیک ها انجام گرفت. نسبت اسپلیت دستگاه روی ۱:۵تنظیم شد.




**شکل ۱.** منحنی استاندارد آتروپین




**شکل ۲.** منحنی استاندارد هیوسین

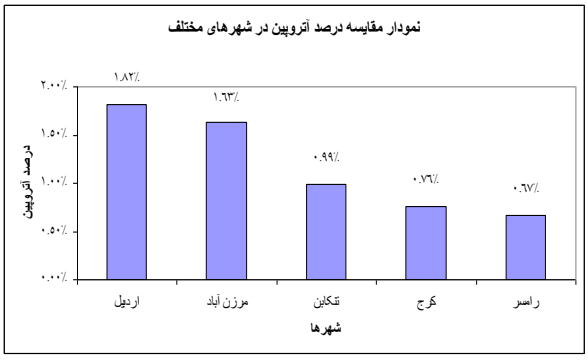
### ۲-۶. تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی مقادیر متابولیت های آتروپین، هیوسین و مجموع آن‌ها در ریشه گیاه دارویی شابیزک در مناطق مختلف اکولوژیکی مورد آزمایش از تجزیه واریانس یک سویه ( one-way ANOVA) توسط نرم افزار SPSS ver 16 استفاده گردید و آزمون مقایسه میانگین حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

[۱] Flow

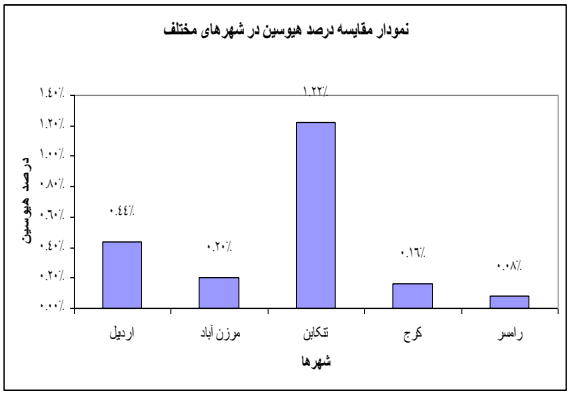
## ۳. نتایج و بحث

مقدار آتروپین در ریشه خشک در شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۶۷، ۰/۷۶، ۰/۹۹، ۱/۶۳ و ۱/۸۲ درصد به دست آمد(شکل ۳). مقدار هیوسین در ریشه خشک در شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۰۸، ۰/۱۶، ۱/۲۲، ۰/۲۰ و ۰/۴۴ درصد حاصل شد (شکل ۴).



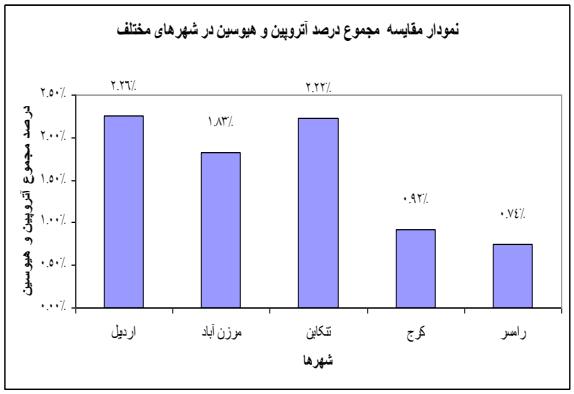

**شکل ۳.** مقدار آتروپین در ریشه خشک ۵ جمعیت مختلف شابیزک

بر اساس مقایسه میانگین به روش LSD از بالا و پایین رامسر (e)، کرج (d)، تنکابن (c)، مرزن آباد (b) و اردبیل (a)
(حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار)




**شکل ۴.** مقدار هیوسین در ریشه خشک ۵ جمعیت مختلف شابیزک

بر اساس مقایسه میانگین به روش LSD از بالا و پایین رامسر (e)، کرج (d)، تنکابن (c)، مرزن آباد (b) و اردبیل (a)
(حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار)




**شکل ۵.** مقدار مجموع هیوسین و آتروپین موجود در ریشه خشک ۵ جمعیت مختلف شابیزک

بر اساس مقایسه میانگین به روش LSD از بالا و پایین رامسر (e)، کرج (d)، تنکابن (c)، مرزن آباد (b) و اردبیل (a)
(حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار)

مقدار درصد مجموع هیوسین و آتروپین در ریشه خشک در شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۷۴، ۰/۹۲، ۲/۲۲، ۱/۸۳و ۲/۲۶ به دست آمد (شکل ۵).

بهمن زادگان جهرمی و همکاران (۱۳۸۵)، در مطالعه‌ای بر روی گیاهان *Hyoscyamus reticulates* L و *Hyoscyamus pusillus* L. از خانواده سیب زمینی، میزان تولید تروپان آلکالوییدها را مورد بررسی قرار دادند، بدین منظور اندام مختلف گیاه *H. pusillus* از قم در مرحله گل دهی و *H. reticulatus* از دو منطقه تهران و قزوین در اواخر مرحله گل دهی و شروع میوه دهی جمع آوری شد. پس از استخراج تروپان آلکالوییدها از بخش‌های مختلف آن به طور جداگانه میزان آلکالوییدهای هیوسیامین و هیوسین با دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان آلکالوییدها در اندام های مختلف با هم متفاوت می‌باشند.

نتایج تحقیق غفارزادگان و همکاران (۱۳۸۹) نشان داد که پارامترهای مختلف در راندمان فرآیند استخراج تأثیر دارد و مدل سازی معادله حاکم بر استخراج هیوسین از گیاه بذرالبنج برای اولین بار انجام شد. در این بررسی متغیرهای مستقل در این معادله شامل دمای استخراج، زمان استخراج و اندازه ذره و متغیر وابسته مقدار هیوسین استخراج شده بود، بدین منظور آزمایش در دمای ۴۳ درجه

سانتی گراد ، با اندازه مش ۴۵ و در زمان ۳۰ دقیقه انجام شد که مقدار هیوسین استخراج شده ۰/۸۳۶ درصد گزارش شد.

در تحقیقی که توسط احمدیان چاشمی و هم‌کاران (۱۳۸۹) در خصوص بررسی آلکالویید در گیاه شابیزک انجام شد نتایج نشان داد که قطعات جدا کشت حاصل از رست‌های گیاه شابیزک در محیط کشت MS تغییر یافته، تعداد زیادی گیاهچه نو پدید یکسان ایجاد شد که این گیاهچه ها در محیط MS جامد تحت اثر غلظت-های مختلف اسید سالیسیلیک شامل ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار به مدت چهار هفته کشت داده شدند و از طرف دیگر ریشه‌های مویین تراریخت تولید شده توسط *آگروباکتریوم ریزوژنز* نیز تکثیر و تحت تأثیر غلظت ذکر شده از اسید سالیسیلیک قرار گرفت و سپس آتروپین و هیوسین تولید شده از ریشه و اندام گیاه نو پدید مطالعه و به روش HPLC مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت مشخص شد که محتوی آتروپین ریشه‌های تراریخت با افزایش اسید سالیسلیک به طور معنی داری افزایش می یابد، به طوری که وجود ۰/۱ گرم اسید سالیسیلیک مقدار آتروپین ریشه را به ۰/۳۵ میلی گرم در گرم وزن تر می رساند. بیشترین مقدار هیوسین ریشه‌های تراریخت در تیمارهای ۰/۰۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد، که ۰/۲۳ میلی گرم در گرم، وزن تر بود و در تیمارهای بالاتر به شدت کاهش پیدا کرد. بالاترین میزان آتروپین در ریشه گیاهان جمعیت گرمستان (۰/۰۶ میلی گرم در گرم وزن تر) گزارش شد که در این ریشه‌ها مقدار آتروپین در غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک به طورمعنی داری کاهش یافت. و بیشترین مقدار هیوسین در بین دو گروه گیاهی در ریشه گیاهان جمعیت گرمستان مشاهده شد که مقدار آن ۰/۰۹ گرم در گرم وزن تر بود. به طور کلی، درحضور تیمارهای اسید سالیسیلیک، بیشترین مقدار تروپان در ریشه‌های تراریخت و بعد از آن در ریشه‌های گیاهان گرمستان مشاهده شد، مقدار آتروپین و هیوسین موجود در ریشه‌های تراریخت به طور معنی داری بیشتر از اندام‌های مختلف گیاهان بوده است. نسبت به تحقیق حاضر مقدار آتروپین به‌دست آمده از نمونه اردبیل ۱/۸ درصد می‌باشد و بیشترین میزان هیوسین به‌دست آمده ۱/۲۳ در نمونه تنکابن مشاهده شده، که این میزان از هر دو مورد نسبت به نمونه-های تیمار شده با اسید سالیسیلیک در محیط کشت و دست ورزی شده با باکتری بسیار بیشتر است.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که مقدار آتروپین، هیوسین و مجموع آن ها در گیاه دارویی شابیزک در مناطق مختلف اکولوژیکی اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر با یکدیگر دارای تفاوت معنی داری ($p \leq 0.01$) بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که اگر آتروپین و هیوسین را به تنهایی در نمونه ها بررسی شوند، بیشترین مقدار آتروپین (۱/۸ درصد) مختص نمونه جمع آوری شده از اردبیل و بیشترین مقدار هیوسین (۱/۲۲ درصد) مختص نمونه جمع آوری شده از تنکابن می‌باشد. کمترین مقدار درصد آتروپین (۰/۶۷ درصد) مربوط به نمونه جمع آوری شده از رامسر و کمترین مقدار درصد هیوسین (۰/۰۸ درصد) مربوط به نمونه جمع آوری شده از رامسر است. حال اگر مجموع آتروپین و هیوسین را در نمونه ها بررسی شود، بیشترین مقدار مجموع آتروپین و هیوسین (۲/۲۶ درصد) به نمونه جمع آوری شده از اردبیل و کمترین آن (۰/۷۴ درصد) به رامسر اختصاص دارد. این تغییرات در میزان آلکالوییدها در مناطق مختلف می تواند ناشی از تأثیر عوامل ژنتیکی و اثرات مختلف اکولوژیکی، جغرافیایی، اقلیمی، خاکی، رطوبت هوا، دمای محیط باشد (قاسمی، ۱۳۸۸).

## ۴. نتیجه گیری

این مطالعه مشخص می کند که برای استخراج آتروپین از گیاه شابیزک بهترین منطقه از لحاظ اقتصادی اردبیل است. با توجه به این‌که نسبت آتروپین اردبیل به رامسر ۲/۷۲ برابر است. برای استخراج هیوسین نیز بهترین منطقه تنکابن است. لذا با توجه به قیمت بسیار گران آتروپین و هیوسین، سود سالانه استخراج و جمع آوری این محصولات، در این مناطق رقم قابل ملاحظه ای خواهد شد.

## ۵.سپاس‌گزاری

در این‌جا از آقای مهندس یوسف اجنی، خانم مونا غیاثی یکتا و خانم نرگس عابدینی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه ای داشتند، تشکر می شود.

**جدول ۱.** محاسبات مرتبط به رسم منحنی استاندارد آتروپین

| انحراف معیار نسبی | انحراف معیار | مساحت ۳ | مساحت ۲ | مساحت ۱ | میانگین مساحت ها | غلظت |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۰/۳۹۰۵۶۱۷۱۳ | ۰/۶۱۴۶۷۳۶ | ۱۵۶/۸۲۱۳ | ۱۵۷/۲۸۵۳ | ۱۵۸/۰۳۹۲ | ۱۵۷/۳۸۱۹۳۳۳ | ۰/۱۲۵ |
| ۱/۵۷۲۱۴۱۶۰۲ | ۴/۵۰۹۰۹۵۵ | ۲۹۱/۲۵۷۷ | ۲۸۶/۹۳۷۱ | ۲۸۲/۲۴۲۱ | ۲۸۶/۸۱۲۳ | ۰/۲۵ |
| ۱/۳۶۹۵۲۳۸۵۴ | ۷/۸۸۲۳۰۴۱ | ۵۸۴/۶۵۲۳ | ۵۷۱/۰۳۷ | ۵۷۰/۹۶۲۸ | ۵۷۵/۵۵۰۷ | ۰/۵ |
| ۳/۰۷۱۱۴۸۲۳۴ | ۳۴/۸۷۱۵۱۳ | ۱۰۹۵/۲۹۷۵ | ۱۱۵۲/۹۷۶۸ | ۱۱۵۸/۰۹۱۴ | ۱۱۳۵/۴۵۵۲۳۳ | ۱ |

**جدول ۲.** محاسبات مرتبط به رسم منحنی استاندارد هیوسین

| انحراف معیار نسبی | انحراف معیار | مساحت ۳ | مساحت ۲ | مساحت ۱ | میانگین مساحت ها | غلظت |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱/۸۶۷۹۶۹۶۳۸ | ۰/۷۷۸۶۴۶۳ | ۴۲/۵۳۴۲ | ۴۱/۵۱۲۶ | ۴۱/۰۰۵۵ | ۴۱/۶۸۴۱ | ۰/۱۲۵ |
| ۲/۲۱۲۲۱۶۷۸۱ | ۱/۷۶۵۶۱۳ | ۸۰/۳۴۲۴ | ۸۱/۲۵۱۵ | ۷۷/۸۴۱۹ | ۷۹/۸۱۱۹۳۳۳۳ | ۰/۲۵ |
| ۱/۲۱۶۰۴۲۷۸۹ | ۱/۸۴۱۰۹۷۳ | ۱۵۰/۴۲۶۷ | ۱۵۰/۲۵۱۲ | ۱۵۳/۵۲۴۲ | ۱۵۱/۴۰۰۷ | ۰/۵ |
| ۱/۰۸۰۸۴۲۹۱۸ | ۳/۰۲۷۹۸۶۸ | ۲۷۷/۳۱۰۲ | ۲۸۳/۳۳۶۵ | ۲۷۹/۸۰۴۸ | ۲۸۰/۱۵۰۵ | ۱ |

**جدول ۳.** تجزیه واریانس میزان آتروپین، هیوسین و مجموع آن ها موجود در جمعیت های مختلف شابیزک

| میانگین مربعات | درجه آزادی | منبع تغییر |
|---|---|---|
| ۰/۸۱۰** | ۴ | بین گروه ها |
| ۰/۰۰۰۴ | ۱۰ | داخل گروه ها (آتروپین) |
| | ۱۴ | جمع |
| ۰/۶۵۹** | ۴ | بین گروه ها |
| ۰/۰۰۰۱ | ۱۰ | داخل گروه ها (هیوسین) |
| | ۱۴ | جمع |
| ۱/۵۴۶** | ۴ | بین گروه ها |
| ۰/۰۰۰۱ | ۱۰ | داخل گروه ها (مجموع) |
| | ۱۴ | جمع |

** بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

## ۶. منابع


احمدیان چاشمی ن.، شریفی، م.، کریمی، ف. و رهنما، ح. ۱۳۸۶. بررسی مقایسه ای تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه های مویین تراریخت و گیاهچه های شابیزک (*Atropa belladonna* L.) تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید. *زیست شناسی گیاهی*، ۱: ۶۳-۷۶.

بهمن زادگان جهرمی، ع.، سفیدکن، ف.، جایمند، ک. ۱۳۸۷. استخراج و اندازه گیری تروپان آلکالوییدهای L- هیوسیامین و (-)- اسکوپولامین (هیوسین) از اندام های مختلف. *Hyoscyamus reticulates* L. و *Hyoscyamus pusillus* L. *پژوهش و سازندگی*، ۷۹: ۱۴۵-۱۵۳.

تسلیمی، ج. ۱۳۸۰. مطالعه کمی و کیفی آلکالوئیدهای سه گونه بذرالبنج. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، صفحه ۷۹.

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. *گیاهان دارویی*، ۹: ۸۷-۹۵.

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

قهرمان، ا. ۱۳۵۸-۱۳۸۰. *فلور رنگی ایران*، جلدهای ۱-۲۴ . انتشارات موسسه جنگل ها و مراتع کشور، کرج، ایران.

کریمی، ف.، امینی اشکوری، ط. و زینالی ا. ۱۳۸۸. تغییرات محتوای آلکالوئید تام، آتروپین و اسکوپولامین در برگ گیاه شاهبیزک (*Atropa belladonna* L.)از رویشگاه واز - شمال ایران، در ارتباط با برخی عوامل فنولوژیکی و محیطی. *زیست شناسی گیاهی*، ۱(۱-۲): ۷۷-۸۸.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, A. 2001. Production of secondary metabolites. A historical perspective. *Plant Sci*. 161: 839 -851.

Harriri, F., Omidi, M. and Etminan, A. Provides an easy method for DNA extraction and purification of medicinal plants. *Journal of Plant and Ecosystem Research*. 1: 70-72.

Larson, R.A. and Marley, K.A. 1984. *Phytochemistry*. Vol. 23.

Latif, T. and Gray, A. 2006. *Natural Product Isolation*. Humana Press: Totowa, New Jersy, USA.

Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S. and Comparini, I. 2001. Distribution of hyoscyamine andscopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72: 644-648.

Mohammad, A. 1998. *Text Book of Pharmacognosy*. 2nd ed, C.B.S.

Starmans, D. and Nijhuis, H. 1996. Extraction of secondary metabolites from plant material. A review. *Trends in Food Science & Technologly*. 7: 191-197.

Trease, G.E. and Evans, W.C. 1996. *Pharmacognosy*. 14nd ed. W.B. Saunders Company Ltd.

Verpoorte, R. and Memelink, J. 2002. Engineering Secondary metabolite production in plants. *Crop in Biotechnology*. 8: 181-187.