

Qualitative and Quantitative Study of Pyrrolizidine Alkaloids in Medicinal Plants Sold in Herb Shops

Fatemeh Ebrahimi¹,
 Mohammad Azadbakht²,
 Fatemeh Akbari³,
 Ali Davoodi³,
 Saied Godarzi⁴,
 Masoud Azadbakht⁵

¹ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Student in Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Plant Systematics, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

(Received March 24, 2020 ; Accepted October 6, 2020)

Abstract

Background and purpose: Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are a group of chemical compounds that are seen as secondary metabolites in different plant families. These compounds can cause liver, kidney, and lung damages and their presence in various herbal products increases the risk of injury. This study aimed at performing qualitative and quantitative evaluation of pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants in herb shops in Sari, north of Iran.

Materials and methods: Hundred twenty-six herbal samples were collected from herb shops in Sari, Iran 2018. Ehrlich reagent was used for qualitative evaluation. Then, gas chromatography was used to identify and quantify the alkaloids.

Results: Experiments revealed that *Echium amoenum* contained supinine (6.61%), europine (12.83%), and no heliotrine. *Malva sylvestris* had 31.68% and 3.54% heliotrine and europine, respectively and no supinine. *Helicteres isora*, *Melissa officinalis*, *Triticum sp.* and *Rosmarinus officinalis* contained 11.81, 22.16, 10.17, and 5.33% supinine and 41.51, 19.31, 55.48, and 35.44% heliotrine, respectively. None of these plants showed europine. *Urtica dioica* was the only plant that contained all three compounds (14.87% supinine, 30.17% heliotrine, and 5.37% europine).

Conclusion: A small number of samples contained pyrrolizidine alkaloids. Therefore, there is no threat in using them. Further studies are required to investigate more herbal products.

Keywords: pyrrolizidine alkaloid, gas chromatography, herb shops

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (191): 109-114 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Azadbakht - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com)

بررسی کیفی و کمی آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی در گیاهان دارویی عرضه شده در عطاری ها

فاطمه ابراهیمی¹محمد آزادبخت²فاطمه اکبری³علی داودی³سعید گودرزی⁴مسعود آزادبخت⁵

چکیده

سابقه و هدف: آلکالوئیدهای پیرولیزیدین، گروهی از ترکیبات شیمیایی هستند که در خانواده‌های مختلف گیاهی به عنوان متابولیت‌های ثانویه مشاهده می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند مشکلات مختلفی مانند آسیب‌های کبدی، کلیوی و ریوی ایجاد کنند و وجود آن‌ها در محصولات گیاهی عطاری ها خطر آسیب دیدگی را افزایش می‌دهد. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی کمی و کیفی آلکالوئیدهای پیرولیزیدین در گیاهان دارویی عطاری های شهرستان ساری بود.

مواد و روش‌ها: 126 نمونه گیاهی از عطاری های ساری در سال 1397 جمع‌آوری شد. برای ارزیابی کیفی به صورت آزمایشگاهی از معرف اریلیخ استفاده شد، سپس از کروماتوگرافی گازی برای شناسایی و کمیت آلکالوئیدها استفاده شد.

یافته‌ها: در آزمایشات عصاره گیاه *Echium amoenum* حاوی 6/61 درصد سوپنین و 12/83 درصد یوروپین و فاقد هلیوترین تشخیص داده شد. عصاره گیاه *Malva sylvestris* دارای 31/68 درصد هلیوترین و 3/54 درصد یوروپین تشخیص داده شد و فاقد سوپنین بود. عصاره گیاهان *Helicteres isora*، *Melissa officinalis*، *Triticum sp.* به ترتیب حاوی 11/81، 22/16، 10/17 و 5/33 درصد سوپنین و همچنین 41/51، 19/31، 55/48 و 35/44 درصد هلیوترین بودند. هیچکدام از این عصاره های گیاهان یوروپین را در آزمایش نشان ندادند. عصاره گیاه *Urtica dioica* تنها عصاره‌ای بود که هر سه ترکیب را در خود داشت (14/87 درصد سوپنین، 30/17 درصد هلیوترین و 5/37 درصد یوروپین).

استنتاج: میزان اندکی از گیاهان مورد آزمایش حاوی آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی بودند. بنابراین خطر جدی در مصرف گیاهان عطاری ها از نظر این ترکیبات وجود ندارد. اما برای ارزیابی‌های بیش تر به جامعه آماری بیش تری از گیاهان عطاری ها نیاز است.

واژه های کلیدی: آلکالوئید پیرولیزیدینی، کروماتوگرافی گازی، عطاری

مقدمه

مقبولیت گیاهان دارویی و مصرف آن‌ها در جامعه اهمیت بررسی سمیت گیاهان و فرآورده‌های طبیعی را

یادآور می‌شود (1). یکی از ترکیبات سمی گیاهان ترکیبات پیرولیزیدین آلکالوئیدها است که نقش‌های بیولوژیک

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی E-mail: azadbakht@hotmail.com

1. دانشجوی کمیته تحقیقات، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دانشجوی PhD فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

5. استادیار، گروه سیستماتیک گیاهی، موسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/1/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/4/10 تاریخ تصویب: 1399/7/15

متعددی در گیاه ایفا می کند. از جمله آن ها می توان اثرات مهاری آنزیم استیل کولین استراز، اثرات آنتی باکتریال، ضد قارچ، ضد حشره، آنتی اکسیدانت و سایتوتوکسیک را نام برد. با این وجود مصرف خوراکی این ترکیبات آثار زیانباری بر بدن انسان می گذارد (2-4). هدف از این مطالعه بررسی کیفی و کمی آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی مانند سوپنین، هلیوترین و یوروپین در گیاهان دارویی و فرآورده های گیاهی موجود در عطاری به عنوان مکانی برای ارائه خدمات گیاهی در شهر ساری بود.

مواد و روش ها

جمع آوری و عصاره گیری از گیاهان

مطالعه با دریافت کد اخلاق به شماره IR.MAZUMS.REC.1398.931 و جمع آوری تمامی نمونه های گیاهی مشترک عرضه شده (دارای منبع تهیه و محل رویش یکسان) در عطاری های سطح شهر ساری در تابستان 1397 آغاز شد و 126 نمونه گیاهی به وسیله متخصص سیستماتیک گیاهی شناسایی شد. سپس به صورت جداگانه با استفاده از پترولتوم اتر چربی زدایی و با محلول پلی ونیل پیرولیدون (PVP) تانن زدایی شده و با اتانل 70 درصد عصاره گیری شدند. بررسی های کمی روی گیاهان صورت گرفت. برای این منظور 7 سی سی اتانول 70 درصد و 3 سی سی آب مقطر عصاره گیاهان گرفته و صاف شد و سدیم نیتروپروساید جامد به آن اضافه گردید. به مدت یک ساعت عصاره در دمای 75 درجه سانتی گراد آون انکوبه شد (2). در نهایت به عصاره ها معرف ارلیخ (پارا دی متیل آمینو بنزالدهید) اضافه شد که از این 126 گیاه، 8 گیاه پیرولیزیدین آلکالوئید داشتند.

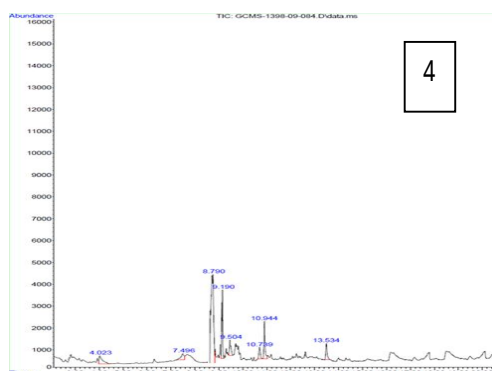
شناسایی و تعیین مقدار آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی

1 گرم از عصاره 8 گیاهی که حاوی آلکالوئید پیرولیزیدینی بودند در 10 سی سی کلروفرم پراکنده شد و با استفاده از اسید سولفوریک 1 مولار به میزان 10 سی سی

در قیف دکانتور هم خورد (دکانت شدن) و فاز مائی آن جدا گردید. به بخشی که باقی مانده بود 5 تا 10 گرم پودر زینک افزوده شد. پس از یک ساعت هم زدن، مخلوط صاف شده و با استفاده از آمونیاک غلیظ به pH معادل 9/5 رسانده شد. عمل دکانت شدن با کلروفرم دوباره صورت گرفت (سه بار) و فاز کلروفرم با سدیم سولفات انیدر خشک شد. در ادامه تغلیظ و خشک شدن فاز کلروفرمی انجام پذیرفت و عصاره نهایی (کلروفرم 10 درصد) با محلول 1 درصد 1- بوتان بورونیک اسید به نسبت 1:1 مخلوط شده و به مدت دو ساعت هم زده شد. کلروفرم آن پرانده شد و با محلول N و O بیس (تری متیل سلیل) تری فلورو استامید (BSTFA) درصد به نسبت 1:1 مخلوط شده و به مدت یک ساعت توسط دستگاه استیرر هم زده شد و سپس در دمای 80 درجه سانتی گراد به مدت 40 دقیقه گذاشته شد. در نهایت با استفاده از 1 سی سی کلروفرم، محلول رقیق شده و در فریزدرایر گذاشته شد و در نهایت از آن برای تست کروماتوگرافی گازی (GC) استفاده شد. شرایط دستگاه GC به شرح زیر است: GC مدل 5975 Agilent با زمان پایداری 0/1 دقیقه و بیشینه دمای 325 درجه سانتی گراد با برنامه دمایی سه زمانه می باشد، به این صورت که ابتدا در سه دقیقه به دمای درجه ی سانتی گراد 120 می رسد، سپس دما با سرعت 10°C/min در مدت 20 دقیقه تا دمای 230 درجه سانتی گراد بالا رفته و بعد از آن با سرعت 10°C/min به مدت 2 دقیقه تا 290 درجه ی سانتی گراد بالا می رود. زمان انجام آزمایش 26/5 دقیقه و در حالت تقسیمات کم تر، دمای 250 درجه سانتی گراد، فشار 16/089 پاسکال، جریان متوسط 47 میلی لیتر بر دقیقه، سرعت متوسط 37/606 سانتی متر بر ثانیه می باشد، همچنین سرعت شست و شو دیواره 1 میلی لیتر در دقیقه است (2). همچنین از گیاه هلیوتروپیوم *Heliotropium europaeum* به علت دارا بودن مقادیر زیاد از پیرولیزیدین آلکالوئید به عنوان شاهد استفاده شد (5).

یافته ها و بحث

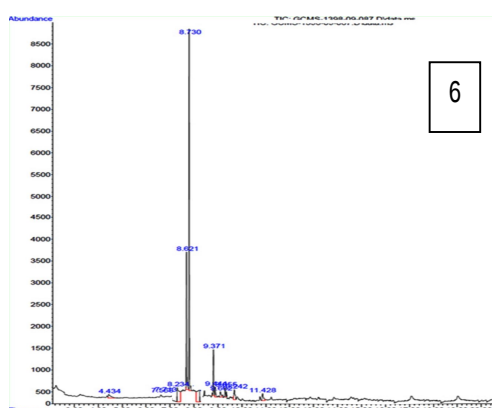
شناسایی و تعیین مقدار آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی و بررسی کروماتوگرافی گازی گیاهان حاوی ترکیبات پیرولیزیدینی طبق بررسی کیفی 128 گیاه موجود در عطاری، 7 گیاه توسط معرف اریخ، حاوی پیرولیزیدین آلکالوئید شناسایی شدند، که عصاره این 7 گیاه توسط دستگاه پ GC از لحاظ مقدار پیرولیزیدین آلکالوئید بررسی شدند (6)، نمودارها و مقادیر پیرولیزیدین آلکالوئیدهای این گیاهان مطابق نمودار شماره 1 است.



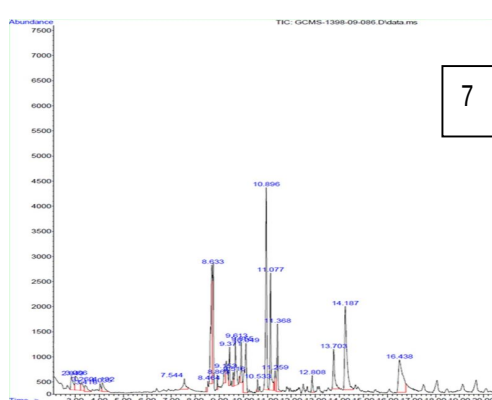
4



5



6



نتایج کروماتوگرافی گازی گیاه حاوی آکالوئید کروماتوگرافی عصاره گیاهان *Helicteres isora*, *Triticum sp*, *Meissa officinalis*, *Malva sylvestri*, *Rosmaria officinalis* و *Echium amoenum* و *Urtica dioica* میزان ترکیبات پیرولیزیدین آکالوئیدها را مطابق جدول شماره 1 نشان داد.

جدول شماره 1: میزان ترکیبات پیرولیزیدینی در ترکیبات گیاهی

نام علمی گیاه	نام و درصد ترکیبات موجود در عصاره	سوپنین (درصد)	هلیوتروپین (درصد)	پیرولیزیدین (درصد)
<i>Echium amoenum</i> Fisch. & C. A. Mey	-	6/61	-	12/63
<i>Malva sylvestris</i> L.	-	-	31/68	3/54
<i>Helicteres audersonii</i> Cristobal	-	11/81	41/51	-
<i>Melissa officinalis</i> L.	-	22/16	19/31	-
<i>Triticum aestivum</i> L.	-	10/17	55/48	-
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	-	5/33	35/44	-
<i>Urtica dioica</i> L.	-	14/87	30/17	5/37
<i>Heliotropium europaeum</i> (Standard Plant)	-	46/19	9/56	14/27

این نتایج مشابه مطالعات پیشین آزادبخت و همکاران است که حضور ترکیبات پیرولیزیدینی به صورت کیفی با معرف اریلیخ را شناسایی کردند و با تعیین میزان آکالوئید و ارزیابی های بیولوژی دریافتند که نمونه های برگ گیاه زبان ایرانی با دارا بودن میزان بیش تر ترکیبات پیرولیزیدینی در مقایسه با نمونه بذری و گلبرگی احتمال آسیب زایی بیش تری دارد. با این وجود قرار گرفتن در معرض سطوح پایینی از آکالوئیدهای پیرولیزیدینی در طولانی مدت ممکن است باعث آسیب های کبدی، کلیوی و حتی کارسینوزن شود که در مطالعه حاضر نیز عصاره گیاه گل گاوزبان با نام علمی *Echium amoenum* L. حاوی مقادیر چشمگیر از ترکیبات آکالوئید پیرولیزیدینی

می باشد (2، 7). به صورت کلی دوز کشنده پیرولیزیدین آکالوئیدها بین 6-167 mg/kg و دوز سمی غیر کشنده پیرولیزیدین آکالوئیدها بین 2-27 mg/kg است (2). اگرچه در بیش تر موارد ضایعات حاصل از مسمومیت با آکالوئیدهای پیرولیزیدینی به آهستگی و پس از مصرف مداوم به مدت بیش از چند روز یا چند هفته ایجاد خواهد شد ولی ظهور علائم بالینی به صورت ناگهانی اتفاق می افتد (8-10). در مطالعه حاضر 126 نمونه گیاهی از عطاری های سطح شهر ساری جمع آوری شد و پس از بررسی های کیفی، 7 نمونه گیاهی حاوی آکالوئید پیرولیزیدینی تشخیص داده شدند. در ادامه با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی میزان یا درصد آکالوئیدهای یوروپین، هلیوتروپین و سوپنین محاسبه شد و با میزان به دست آمده از نمونه شاهد (*Heliotropium europaeum*) مقایسه شد. میزان اندکی از نمونه های به دست آمده از عطاری های سطح شهرستان ساری حاوی آکالوئیدهای پیرولیزیدینی تشخیص داده شدند. بنابراین خطر جدی در مصرف گیاهان عطاری ها به جز محدود اندام گونه های یاد شده از نظر آکالوئیدهای پیرولیزیدینی وجود ندارد. اما برای ارزیابی های بیش تر به جامعه آماری بیش تری از گیاهان و فراورده های موجود در عطاری ها نیاز است.

سپاسگزاری

نویسندگان کمال تشکر را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت مالی دارند.

References

- Asano N, Kuroi H, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, Kato A, et al. New polyhydroxylated pyrrolizidine alkaloids from *Muscari armeniacum*: structural determination and biological activity. *Tetrahedron: Asymmetry* 2000; 11: 1-8.
- Azadbakht M, Nematzadeh G, Hosseinpour Azad N, Shokri E. Quantitative and Qualitative Investigation on Pyrrolizidine Alkaloids in Roots, Leaves, Petals and Seeds of Iranian *Echium Amoenum* Fisch. & Mey. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*.

- 2012; 21(Supplement 1): 131-137 (Persian).
3. Benamar H, Tomassini L, Venditti A, Marouf A, Bennaceur M, Nicoletti M. Pyrrolizidine alkaloids from *Solenanthus lanatus* DC. with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Natural Product Research* 2016; 30(22): 2567-2574.
4. Hooper D. Useful plants and drugs of Iran and Iraq. Chicago: Field Museum of. 1937.
5. Stegelmeier BL. Pyrrolizidine Alkaloid-Containing Toxic Plants (*Senecio*, *Crotalaria*, *Cynoglossum*, *Amsinckia*, *Heliotropium*, and *Echium* spp.). *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2011; 27: 419-428.
6. Bicchi C, D'Amato A, Cappelletti E. Determination of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio inaequidens* DC by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1985; 349(1): 23-29.
7. Azadbakht M, Khalilian A, Talavaki M. Qualitative and quantitative analysis of senecio's pyrrolizidine alkaloids in wheat and flour of mazandaran province. *Pajouhesh va Sazandegi* 2003; 16(2)(59 in agronomy and horticulture): 94-102 (Persian).
8. Dart RC. The 5 minute toxicology consult. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins 2000.
9. Hooper D, McNair JB, Field H. Useful plants and drugs of Iran and Iraq: Field Museum of Natural History; 1937; 9(3).
10. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. With contributions by Done SH, Jacobs DE, Bildfell RJ. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. Toronto: Saunders Elsevier. 2007.