

جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای قسمت های هوایی گیاه گلوسیوم گرنديفلوروم منطقه سرخه حصار

مجید سعیدی (Ph.D.) *

کتایون مرتضی سمنانی (Ph.D.) *

چکیده

سابقه و هدف : گیاه گلوسیوم گرنديفلوروم متعلق به خانواده خشخاش از گیاهان بومی ایران می باشد که در طب سنتی ایران جایگاه خاصی را داراست. با توجه به اهمیت آلکالوئیدهای خانواده خشخاش، جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای این گونه برای اولین بار در ایران مورد مطالعه قرار گرفت. مواد و روش ها : پس از عصاره گیری گیاه به روش پرکولاسیون و انجام خالص سازی مقدماتی، جداسازی آلکالوئیدها با استفاده از کروماتوگرافی ستونی و لایه نازک انجام گرفت و پس از خالص نمودن نهایی آلکالوئیدها، با استفاده از طیف های MS، NMR و IR شناسایی انجام پذیرفت. نتایج : با توجه به یافته های حاصل از آنالیز دستگاهی، آلکالوئیدهای به دست آمده عبارت بودند از: پروتوپین (۰/۲٪)، آلوکریپتوپین (۰/۲۹٪)، کریدین (۰/۱۵٪)، ایزوکریدین (۰/۱۴٪)، و N-متیل لیندکارپین (۰/۰۳٪). استنتاج : بر اساس نتایج به دست آمده N-متیل لیندکارپین برای اولین بار در این گونه شناسایی شد که بیانگر تأثیر تغییر منطقه بر نوع آلکالوئیدهای گیاه می باشد. واژه های کلیدی : شناسایی، آلکالوئید، قسمت های هوایی، گلوسیوم گرنديفلوروم

مقدمه

است نمونه ای از آنها مشاهده گردد. گیاهان دارویی مهمی در این تیره جای دارند که ارزش درمانی ارزنده آنها سبب گردیده است که در بسیاری از مداواها با اثر قاطع به کار روند و از برخی از آنها، مواد مؤثره بسیار مهمی استخراج می گردد که در پزشکی اهمیت زیادی دارند. یکی از جنس های مهم این تیره، گلوسیوم (Glaucium) می باشد که در طب سنتی برای گونه های مختلف آن کاربردهای گوناگونی را ذکر نموده اند. به عنوان مثال، قسمت های هوایی

تیره خشخاش به دلیل دارا بودن آلکالوئیدهای ایزوکینولینی (که خود شامل دستجات مختلفی از جمله آپورفینی، پروتوپینی، پروتوبربرینی، پروآپورفینی و غیره می باشد) از تیره های مهم گیاهی محسوب می شود. تیره خشخاش گیاهانی عموماً علفی، به ندرت دارای اعضای چوبی و یا به صورت درختچه اند. وسعت انتشار آنها در کره زمین زیاد است، به طوری که در غالب نواحی معتدله نیمکره شمالی و حتی در مناطق سردسیر یافت می شوند ولی در نیمکره جنوبی به ندرت ممکن

این تحقیق طی شماره ۴۲-۷۸ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت گردیده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام پذیرفته است.

✉ ساری- خیابان سلمان فارسی، دانشکده داروسازی

* دکترای داروسازی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

گلوسیوم کورنیکولاتوم (*Glaucium corniculatum*) در طب عوام به عنوان مخدر و خواب آور و در اطفال به صورت دم کرده یا جوشانده مصرف می شود و در گذشته از آن برای رفع بیماری قند استفاده به عمل آمده است. دانه گیاه گلوسیوم فلاووم (*Glaucium flavum*) اثرملین دارد. به علاوه از برگ های له شده آن برای رفع التهاب های جلدی استفاده به عمل می آید (۱). در ادامه مطالعات بر روی گیاهان تیره خشخاش بومی ایران و با توجه به اهمیت آلکالوئیدها، انتشار فراوان گیاهان این تیره در ایران و اثرات درمانی مفید و متنوع آنها، به مطالعه فیتوشیمیایی گیاه گلوسیوم گرندیفلوروم (نام فارسی: شقایق گل درشت) پرداخته شد (۲ تا ۶).

مواد و روش ها

مواد و دستگاه ها

حلال های شیمیایی (شامل متانول، کلروفرم، اتردیپترول)، آمونیاک، اسید استیک، سیلیکاژل کروماتوگرافی لایه نازک (۴۰۰-۲۳۰ mesh، Type 60)، و سیلیکاژل کروماتوگرافی ستونی (60 HF 254-366) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. معرف درازندورف نیز در آزمایشگاه تهیه شد. از قسمت های هوایی گیاه گلوسیوم گرندیفلوروم (*Glaucium grandiflorum*) (Boiss & Huet جمع آوری شده از منطقه سرخه حصار واقع در اطراف تهران استفاده شد. دستگاه های (PERKIN-ELMER 267)، (FINNIGAN، (BRUKER FT-80 MHz)، NMR (TSQ-70) MASS و سایر دستگاه های معمولی آزمایشگاهی در این تحقیق به کار برده شده اند.

روش عصاره گیری و به دست آوردن محتوای نام آلکالوئید
پس از خشک و آسیاب نمودن قسمت های هوایی گیاه، ۶۰۰ گرم از پودر آن در یک ظرف مناسب قرار گرفت. پس از مرطوب کردن پودر با آمونیاک به آن

متانول اضافه گردید و حدود ۲۴ ساعت در آزمایشگاه قرار داده شد. در این فاصله گاهی نمونه مخلوط می شد و پس از ۲۴ ساعت با استفاده از قیف بوخنر صاف گردید. حلال حاوی عصاره به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء تبخیر گردید. مجدداً به پودر، متانول افزوده و عمل صاف کردن و تغلیظ عصاره تکرار گردید تا مرحله ای که در کروماتوگرافی روی لایه نازک با معرف درازندورف رنگ نارنجی ایجاد نشد، که این امر به معنای استخراج کامل آلکالوئیدها می باشد. بعد از سه مرتبه تکرار این مراحل، استخراج کامل انجام گردید و عصاره ای به دست آمد که حاوی آلکالوئیدها و سایر مواد موجود در گیاه از قبیل رنگ دانه های گیاهی و کلروفیل بود. در این مرحله برای جدا کردن مواد ناخواسته از آلکالوئیدها به ترتیب زیر عمل شد:

ابتدا با افزودن محلول اسید استیک ۵۰ درصد، آلکالوئیدها به ملح استات محلول در آب تبدیل گردید. سپس عصاره اسیدی شده صاف گردید و محلول صاف شده وارد یک قیف جدا کننده شد. به این محلول مقداری اتردیپترول افزوده و تکان داده شد تا مواد رنگی و آلی موجود در فاز مایی وارد فاز آلی شوند. سپس دو فاز از هم جدا گردید و فاز مایی مجدداً در قیف جدا کننده ریخته شد و عمل شستشو با اتردیپترول آنقدر تکرار گردید تا فاز آلی بی رنگ شد. قسمت آبی که حاوی ملح آلکالوئیدها بود جهت عملیات بعدی نگهداری شد. پس از جدا کردن رنگ ها و مواد ناخواسته می بایست آلکالوئیدها را که به صورت ملح استات بودند، به باز آزاد تبدیل نمود. برای این امر به عصاره آبی مقداری کلروفرم افزوده شد و به محلول، در حالی که به وسیله همزن مغناطیس در حال اختلاط بود، قطره قطره آمونیاک ۲۵ درصد اضافه گردید. در این مرحله، در نتیجه ترکیب اسید و باز حرارت زیادی تولید می شود که باعث تجزیه آلکالوئیدها می گردد. بنابراین

افزودن کلروفرم پلارите حلال شستشو افزایش داده شد تا در نهایت به کلروفرم ۱۰۰ درصد رسید. آنگاه با افزودن متانول پلارите حلال باز هم افزایش یافت و به این ترتیب هر یک از آلکالوئیدها در پلارите مناسب خود از دیگر آلکالوئیدها جدا و از ستون خارج شدند. معمولاً هر فراکسیون حاوی چند ماده بود که به وسیله روش کروماتوگرافی لایه نازک با سیستم حلالی مناسب و سپس کریستالیزاسیون از یکدیگر جدا گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه بر حسب نوع آلکالوئیدها، درصد هر یک در پودر گیاه، سیستم حلال در کروماتوگرافی ستونی و میزان R_f در کروماتوگرافی لایه نازک در جدول شماره ۱ مشاهده می شود.

باید در تمام مدت آمونیاک قطره قطره افزوده شود و ظرف به وسیله یخ، سرد گردد. پایان عمل قلیایی کردن با استفاده از کاغذ تورنسل تعیین گردید. سپس فاز مایه چندین مرتبه با کلروفرم استخراج شد و به این ترتیب آلکالوئیدها وارد فاز آلی شدند. پس از خشک نمودن عصاره کلروفرمی با سولفات سدیم، حلال به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء، تبخیر گردید. محتوای تام آلکالوئیدی ۵/۳۴ گرم (۰/۸۹٪) حاصل گردید.

جداسازی و خالص نمودن آلکالوئیدها

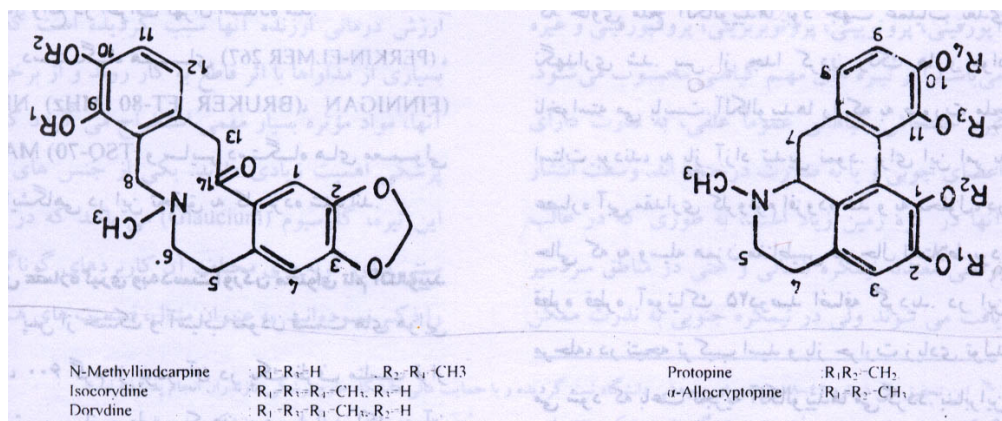
برای جداسازی و خالص نمودن آلکالوئیدها، از روش کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی ستونی استفاده گردید.

برای جدا نمودن آلکالوئیدها به وسیله ستون ابتدا با حلال اتردوپترول ستون شستشو شد. سپس به تدریج با

جدول شماره ۱: نتایج کروماتوگرافی آلکالوئیدهای گیاه گلو سیوم گرندیفلوروم

نوع آلکالوئید	درصد آلکالوئید	سیستم حلال برای شستشو (٪)	ارزش R_f ***
N-متیل لیند کارپین	۰/۰۳	* ۶۰ : ۴۰	۰/۵۸
پروتوپین	۰/۲	* ۳۰ : ۷۰	۰/۷۷
α -آلو کریپتوپین	۰/۲۹	* ۳۰ : ۷۰	۰/۵۸
ایزوکریپیدین	۰/۱۴	** ۹۰ : ۱۰	۰/۷۳
کریپیدین	۰/۱۵	** ۹۰ : ۱۰	۰/۶۸

* اتردوپترول- کلروفرم
** کلروفرم- متانول
*** سیستم حلال در کروماتوگرافی لایه نازک: اتیل استات- متانول- آمونیاک (۸۵ : ۱۰ : ۵)



تصویر شماره ۱: ساختمان شیمیایی آلکالوئیدهای شناسایی شده.

α -آلوکریپتوپین (Allocryptopine):

این آلکالوئید از گروه آلکالوئیدهای پروتوپینی می باشد که با استفاده از اتانول و اتر کریستال گردید و نقطه ذوب آن ۱۶۰ تا ۱۶۱ درجه سانتی گراد بود. نتایج آزمایشات طیف سنجی به قرار زیر است:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm)

6.95 (s, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 6.85 (q, 2H, $\text{C}_{11}\text{-H}$, $\text{C}_{12}\text{-H}$, $J = 8.5\text{Hz}$), 6.63 (s, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$), 5.94 (s, 2H, OCH_2O), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.5-4.0 (m, 4H, $2 \times \text{-CH}_2\text{-}$), 2.90 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-}$), 2.65 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-}$), 1.91 (s, 3H, N-CH_3).

MS: m/z (%)

369(M^+ , 2), 325(3), 283(8), 268(6), 206(24), 164(100), 163(45), 149(56), 134(14).

IR: ν (cm^{-1})

2800, 1650, 1615, 1580, 1485, 1055, 1040, 920.

ایزوکریدین (Isocorydine):

این آلکالوئید از گروه آلکالوئیدهای آپورفینی می باشد که توسط کلروفرم کریستال گردید و نقطه ذوب آن ۱۸۵ درجه سانتی گراد بود. نتایج آزمایشات طیف سنجی به قرار زیر است:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm)

6.84 (s, 2H, $\text{C}_8\text{-H}$, $\text{C}_9\text{-H}$), 6.69 (s, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 3.89 (s, 6H, $\text{C}_2\text{-OCH}_3$, $\text{C}_{10}\text{-OCH}_3$), 3.70 (s, 3H, C_1OCH_3), 2.52 (s, 3H, N-CH_3).

MS: m/z (%)

341(M^+ , 6), 340(14), 326(100), 324(24), 310(68), 295(18), 154(34).

IR: ν (cm^{-1})

3200-3400, 2960, 1600, 1460, 1370, 1320, 1290, 1240, 1210.

کریدین (Corydine):

این ماده از گروه آلکالوئیدهای آپورفینی می باشد که توسط کلروفرم کریستال گردید و نقطه ذوب آن

پس از جداسازی آلکالوئیدهای فوق (تصویر شماره ۱) شناسایی آنها با استفاده از طیف های MS, $^1\text{H-NMR}$ و IR صورت پذیرفت که نتایج حاصل به شرح زیر مشاهده گردید:

N-متیل لیند کارپین (N-Methylindcarpine):

آلکالوئید فوق از گروه آلکالوئیدهای آپورفینی می باشد که با استفاده از حلال اتانول کریستال گردید و نقطه ذوب آن ۱۹۸ تا ۲۰۰ درجه سانتی گراد بود. آزمایشات طیف سنجی به قرار زیر است:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm)

6.85 (s, 2H, $\text{C}_8\text{-H}$, $\text{C}_9\text{-H}$), 6.73 (s, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 3.92 (s, 3H, $\text{C}_{10}\text{-OCH}_3$), 3.66 (s, 3H, $\text{C}_1\text{-OCH}_3$), 2.55 (s, 3H, N-CH_3).

MS: m/z (%)

327(M^+ , 6), 312(100), 296(5), 281(27), 149(22).

IR: ν (cm^{-1})

3200-3500, 2960, 1600, 1470, 1240, 1215.

پروتوپین (Protopine):

این آلکالوئید از گروه آلکالوئیدهای پروتوپینی می باشد که با متانول کریستال گردید و نقطه ذوب آن ۲۰۷ درجه سانتی گراد بود. نتایج آزمایشات طیف سنجی به قرار زیر است:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm)

6.89 (s, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 6.66 (s, 2H, $\text{C}_{11}\text{-H}$, $\text{C}_{12}\text{-H}$), 6.64 (s, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$), 5.94 (s, 2H, OCH_2O), 5.91 (s, 2H, OCH_2O), 3.78 (s, 2H, $\text{H-C}_{13}\text{-H}$), 3.57 (s, 2H, $\text{H-C}_8\text{-H}$), 2.85 (m, 2H, $\text{H-C}_5\text{-H}$), 2.54 (m, 2H, $\text{H-C}_6\text{-H}$), 1.92 (s, 3H, N-CH_3).

MS: m/z (%)

353(M^+ , 3), 267(6), 190(14), 148(10), 134(10).

IR: ν (cm^{-1})

1670, 940.

۱۴۹ درجه سانتی گراد بود. نتایج آزمایشات طیف سنجی به قرار زیر است:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm)

6.86, 7.09 (ABq, 2H, $\text{C}_8\text{-H}$, $\text{C}_9\text{-H}$, $J=8$ Hz), 6.69 (s, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 3.91 (s, 6H, $\text{C}_2\text{-OCH}_3$, $\text{C}_{10}\text{-OCH}_3$) 3.73 (s, 3H, $\text{C}_{11}\text{-OCH}_3$), 2.55 (s, 3H, N-CH_3).

MS: m/z (%)

341(M^+ , 60), 340(19), 326(19), 324(19), 310(47), 267(10), 42(100).

IR: ν (cm^{-1})

3200-3400, 2960, 1600, 1470, 1290, 1240, 1220.

بحث

آلکالوئیدهای جدا شده از قسمت های هوایی گیاه گلوسیوم گرنديفلوروم در ایران برای اولین بار گزارش می گردد که نتایج حاصل نشان دهنده تفاوت آلکالوئیدهای جدا شده از این گیاه در مقایسه با مطالعات انجام شده در کشورهای ترکیه، عراق، و اردن می باشد (۷-۱۱).

براساس مطالعات گوزلر (Gozler) آلکالوئیدهای جدا شده از قسمت هوایی گیاه گلوسیوم گرنديفلوروم کشور ترکیه عبارتند از: گلو سین (Glaucine)، ایزو کریدین (Isocorydine)، آلو کریپتوپین (Allocryptopine)، پروتوپین (Protopine)، کریپتوپین (Cryptopine)، ترانس - کانادین متوکلراید (Trans-Canadine methochloride)، و کریدین (Corydine) (۹).

براساس مطالعات فیلیسون و همکاران (Philipson et al.) آلکالوئیدهای جدا شده از قسمت هوایی گیاه گلوسیوم گرنديفلوروم کشور عراق عبارتند از: آلو کریپتوپین (Allocryptopine)، پروتوپین (Protopine)، ایزو کریدین (Isocorydine) و بربرین (Berberine) (۱۰). آلکالوئیدهای جدا شده از قسمت هوایی گیاه گلوسیوم گرنديفلوروم کشور اردن برپایه مطالعات

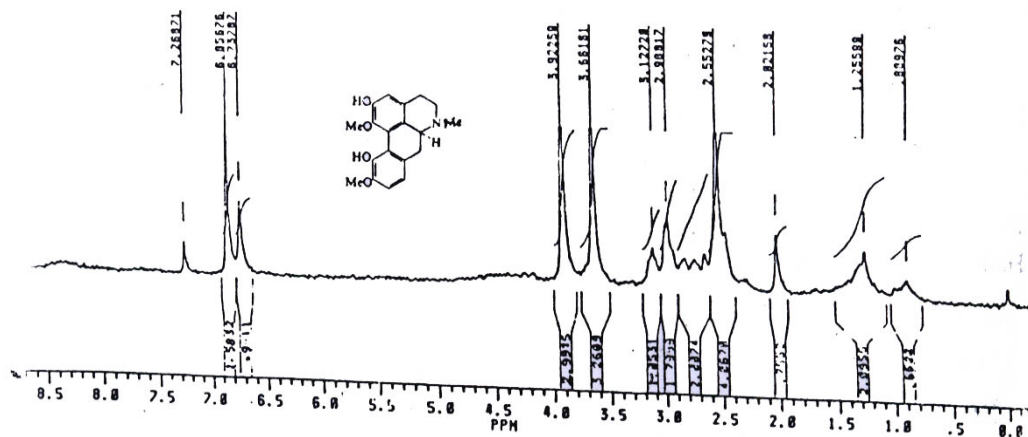
الافیفی و همکاران (El-Afif et al.) به شرح زیر معرفی گردیده است: (-) - نور کلیدونین ((-)-Norchelidonine)، دی هیدروکلریترین (Dihydrochelerythrine)، (-) - استونیل

هیدروکلریترین (Acetyldihydrochelerythrine) -8-((-))، پروتوپین (Protopine)، آلو کریپتوپین (Allocryptopine)، (±) - تتراهیدرو جاتروریزین ((±)-Tetrahydrojatrorrhizine) و (±) - تتراهیدرو پالماتین ((±)-Tetrahydropalmatine) (۱۱).

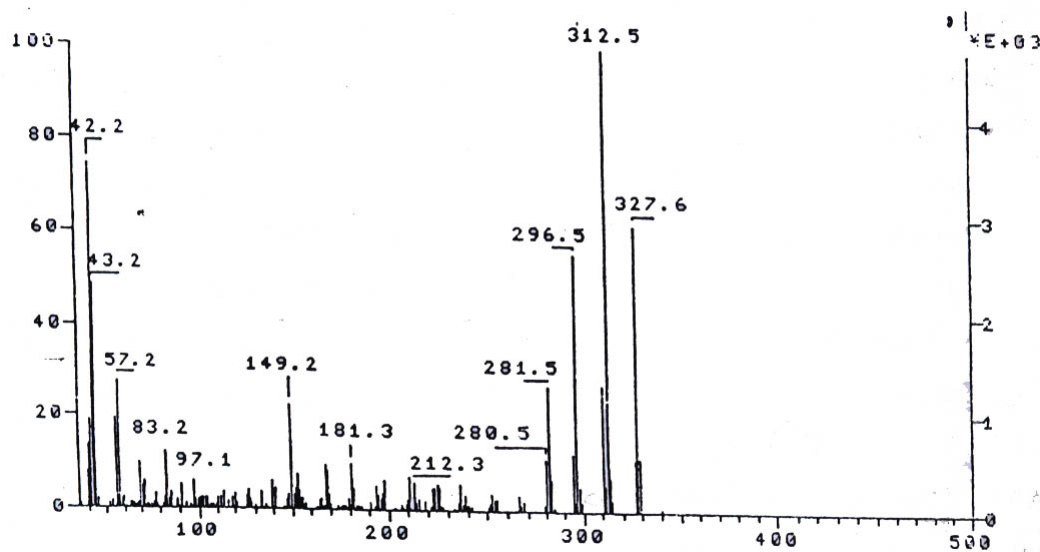
از گیاه گلوسیوم گرنديفلوروم ایران منطقه سرخه حصار، آلکالوئیدهای N- متیل لیند کارپین، پروتوپین، α- آلو کریپتوپین، ایزو کریدین، و کریدین جدا گردید. در میان آلکالوئیدهای جدا شده از گلوسیوم گرنديفلوروم ایران، آلکالوئید N- متیل لیند کارپین برای اولین بار در این گونه گزارش می گردد. این آلکالوئید توسط اتردوپترویل-کلروفرم (۴۰:۶۰) از ستون کروماتوگرافی خارج شد و با استفاده از سیستم حلال اتیل استات- متانول- آمونیاک (۵:۱۰:۸۵) کروماتوگرافی لایه نازک انجام گردید ($R_f = 0.58$). در زیر به تفسیر طیف های $^1\text{H-NMR}$ و MS این آلکالوئید می پردازیم:

در طیف $^1\text{H-NMR}$ پیک موجود در δ ۲/۵۵ مربوط به سه هیدروژن گروه متیل روی نیتروژن می باشد که به صورت تک شاخه در طیف دیده می شوند. پیک های موجود در δ ۳/۶۶ و ۳/۹۲ به ترتیب مربوط به هیدروژن های گروه های متوکسی روی کربن ۱ و کربن ۱۰ این آلکالوئید می باشد که هر کدام به صورت تک شاخه در طیف وجود دارند. پیک δ ۶/۷۳ مربوط به هیدروژن متصل به کربن شماره ۳ حلقه آروماتیک می باشد که به صورت تک شاخه در طیف نمایان است. پیک موجود در δ ۶/۸۵ مربوط به هیدروژن های ۸ و ۹

حلقه آروماتیک می باشد که به صورت تک شاخه در طیف مشاهده می شود (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: طیف $^1\text{H-NMR}$ آلکا لوئید N-متیل لیند کارپین



تصویر شماره ۳: طیف MS آلکالوئید N-متیل لیند کارپین

می باشد. پیک موجود در $m/e = 312$ با فراوانی نسبی ۱۰۰ درصد مربوط به از دست دادن یک گروه متیل از مولکول اولیه می باشد. پیک موجود در $m/e = 296$ با

در طیف MS چهار پیک عمده وجود دارند که عبارتند از: پیک موجود در $m/e = 327$ مربوط به جرم مولکولی این آلکالوئید با فراوانی نسبی ۶۲ درصد

مطالعه قرار گرفته است. این امر بیانگر اهمیت شناسایی مواد موجود در گونه های یکسان گیاهی در نقاط مختلف می باشد.

سپاسگزارى

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که ما را در انجام این طرح یاری نمودند، تشکر می گردد.

- A. Angoline and other alkaloids from the roots of *Glaucium oxylobum*. *Daru*. 1999; 7:31-35.
- 7- Guinaudeau H, Leboeuf M, Cave A. Aporphine alkaloids. *Lloydia*. 1975; 38: 294,295,297.
- 8- Guinaudeau H, Shamma M. The Protopine alkaloids. *J Nat Prod*. 1982; 45: 237-46.
- 9- Gozler T. Alkaloids of Turkish *Glaucium* species. *Planta Med*. 1982; 46: 179-80.
- 10- Philipson JD, Gray AI, Askari AAR, Khalil AA. Alkaloids from Iraqi species of Papaveraceae. *J Nat Prod*. 1981; 44: 296-307.
- 11- El-Afifi F, Al-Eisawi D, Al-Khalil S, Schiff PL. Alkaloids of *Glaucium grandiflorum*. *J Nat Prod*. 1986; 46: 1166-7.

فراوانی نسبی ۵۵ درصد مربوط به از دست دادن یک گروه متوکسی از مولکول اولیه می باشد. پیک موجود در $m/e=281$ با فراوانی نسبی ۲۷ درصد مربوط به از دست دادن یک گروه متوکسی و یک گروه متیل از مولکول اولیه می باشد (تصویر شماره ۳). بدین ترتیب وجود آلکالوئید N- متیل لیندکارپین اثبات گردید. تفاوت آلکالوئیدها ناشی از تفاوت های منطقه ای ایران با سایر کشورهایی است که گیاه مذکور در آنها مورد

فهرست منابع

- ۱- زرگری، علی. *گیاهان دارویی*. جلد اول، چاپ ششم، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۱، ۱۵۷-۱۲۱.
- ۲- مظفریان، ولی الله. فرهنگ نامه های گیاهان ایران. چاپ اول، تهران: مؤسسه معاصر، ۱۳۷۵، ۲۴۸.
- 3- Shafiee A, Morteza-Semnani K. Crabbine and other alkaloids from the aerial parts of *Glaucium paucilobum*. *Planta Med*. 1998; 64: 680.
- 4- Shafiee A, Morteza-Semnani K, Amini M. (+)-Bulbocapnine- β -N-oxide from *Glaucium fimbriigerum*. *J Nat Prod*. 1998; 61: 1564-5.
- 5- Shafiee A, Morteza-Semnani K. Alkaloids of *Glaucium paucilobum* population Golestan Forest. *J Sci I R Iran*. 1999; 10: 229-32.
- 6- Hadjiakhoondi A, Morteza-Semnani K, Inanloo HR, Pirali-Hamedani M, Shafiee