

شناسایی گلیکوزیدهای قلبی گونه دیژیتال ایران به روش HPLC

محمد آژادبخت (Ph.D.) * نصرالله قاسمی دهکردی (Ph.D.) *

چکیده

سابقه و هدف : گونه‌های دیژیتال و گلیکوزیدهای قلبی آنها در بیماری نارسایی احتقانی قلب (CHF) کاربرد دارند. در ایران تنها گونه دیژیتالیس نروزا در قسمت‌های شمالی به فراوانی رویش دارد. گلیکوزیدهای قلبی سایر گونه‌های این گیاه به روش‌های مختلف از جمله روش HPLC شناسایی شده‌اند. هدف این تحقیق شناسایی گلیکوزیدهای قلبی گونه دیژیتال ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها : در روش HPLC، از حلال متانل برای استخراج و از استونیتریل و آب مقطر به روش گرادیان برای کروماتوگرافی و از بتا متیل دیگوسکین به عنوان استاندارد داخلی استفاده شده است. نتایج : در برگ گیاه دیژیتالیس نروزا با روش HPLC، پانزده گلیکوزید قلبی شناسایی شد که بیشترین مقدار گلیکوزید قلبی در این گیاه را لاناتوزید A تشکیل می‌داد.

استنتاج : با توجه به شناخت گلیکوزیدهای قلبی این گیاه، از آنجایی که در کشورهای مختلف از گونه‌های متفاوت دیژیتال جهت تهیه داروهای مؤثر در بیماری نارسایی احتقانی قلب استفاده می‌شود، در صورت مطالعات تکمیلی به ویژه مطالعات فارماکولوژی و توکسیکولوژی، از گونه دیژیتال ایران نیز می‌توان به این دسته از داروها دسترسی یافت.

واژه‌های کلیدی : دیژیتال، نارسایی احتقانی قلب، دیژیتالیس نروزا، HPLC، گلیکوزیدهای قلبی

مقدمه

منبع تجاری تهیه دژیتوکسین و گونه لاناتا منبع تجاری تهیه دیگوسکین می‌باشد. همچنین پودر برگ دیژیتال به صورت قرص، کپسول، ساشه و به فرم قطره در بیماری‌های قلبی استفاده می‌گردد (۱). در ایران تنها گونه دیژیتالیس نروزا در قسمت‌های شمالی کشور به فراوانی رویش دارد (۲) به طوری که این گونه از بیش از ۲۵ منطقه مختلف ایران جمع‌آوری گردیده است. این گونه به دلیل رگبرگ‌های منظم شبیه به رشته‌های عصبی به نروزا نام‌گذاری شده است (۳).

گیاهان دارویی علاوه بر این که خود به تنهایی در درمان بیماری‌ها به کار می‌روند، به عنوان منبع عظیم و بالقوه مواد اولیه دارویی، صنعتی، غذایی مطرح می‌باشند. از گیاهان دارویی مهم، گیاهان جنس Digitalis می‌باشند که نه تنها خود به صورت استاندارد در بیماری نارسایی احتقانی قلب (CHF) به کار می‌روند بلکه منبع گلیکوزیدهای قلبی مهمی همچون دیگوسکین، دژیتوکسین و انواع لاناتوزیدها می‌باشند (۱). در پزشکی از گونه پورپوره آ و لاناتا بیشتر استفاده می‌گردد، به طوری که گونه پورپوره آ

* ساری - خیابان سلمان فارسی - دانشکده داروسازی

* متخصص فارماکونوزی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران

** متخصص فارماکونوزی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

در متانل حل گشته و با اضافه کردن استاندارد داخلی به محلول حاصل، برای تزریق به دستگاه HPLC آماده می‌گردد. در آنالیز HPLC برای جداسازی از روش گرادیان استفاده شد، به طوری که غلظت مواد متشکله فاز متحرک در طول آنالیز یکسان نبود و برای شناسایی کاردنولیدهای جداسازی شده از کاردنولیدهای استاندارد استفاده گردید (۶،۵).

مواد و روش ها

استخراج گلیکوزیدهای قلبی: ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی گرم از پودر برگ دیژیتالیس نروزا را وزن نموده و به آن ۲۰۰ گرم متانل ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه رفلکس گردید. آنگاه ۵۰۰ گرم آب مقطر صاف شده و ۱۰۰۰ میلی گرم استات سرب [Pb(AC)₂] ۱۵ درصد (w/v) افزوده و پس از ۵ دقیقه انکوبه کردن، به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. به ۱۰ میلی لیتر از این محلول، ۶۰ میلی لیتر محلول کلروفرم- ایزوپروپانل به نسبت ۲ به ۳ اضافه نموده و پس از دکانته کردن، فاز آلی را توسط روتاری تغلیظ کرده و در ۲۰۰ میلی لیتر متانل حل نموده و ۲ میلی لیتر از محلول ۴ میلی گرم ۱۰۰ میلی لیتر بتامتیل دیگوکسین در متانل را به عنوان استاندارد داخلی به آن اضافه کرده و ۲۰ میکرو لیتر آن به دستگاه HPLC تزریق گردید.

شرایط HPLC:

نوع دستگاه: Waters 600E System Controller
 Waters Lambda Max
 Model 481 LC Spectrophotometer
 Water 745 Data Module
 Lichrocart®, Merck: فاز ثابت
 125×4mm, Fullmaterial Lichrospher®
 100RP-18(5µm)

تاکنون بیش از ۲۰۰ ترکیب کاردنولیدی شناسایی شده است که معروفترین آنها یعنی دیگوکسین، دیژیتوکسین، انواع لانانوزیدها، و ژیتوکسین در گونه‌های دیژیتال وجود دارند، به طوری که در برگ گونه لانانا حدود ۵۰ گلیکوزید قلبی شناسایی شده است (۴). مهمترین ترکیبات برگ دیژیتال، کاردیواکتیوهای از دسته کاردنولیدها می‌باشند. کاردنولیدها جزو ترکیبات گلیکوزیدی بوده که از قسمت قندی (گلیکون) و قسمت غیر قندی (آگلیکون) تشکیل شده‌اند که اثرات فارماکودینامیک آنها مربوط به قسمت غیر قندی می‌باشد. به طور کلی دستجات معدودی آگلیکون وجود دارد و عمده تفاوت کاردنولیدها قسمت قندی آنها می‌باشد. آگلیکون کاردنولیدها ساختمان استروئیدی داشته که یک حلقه لاکتون ۵ ضلعی به کربن شماره ۱۷ آن متصل است (۴،۱).

استفاده از گیاهان بومی در درمان بیماری‌ها مستلزم شناسایی مواد مؤثره آنها در مقایسه با گیاهان دارویی استاندارد می‌باشد. یکی از مهمترین روش‌های جداسازی و شناسایی مواد مؤثره گیاهان دارویی استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) ^۱ است که انتخاب روش جداسازی و ایجاد شرایط مناسب برای هر گونه گیاهی متفاوت است و نیاز به طراحی، مطالعه، و انجام مکرر آن دارد.

در این تحقیق، کاردنولیدهای موجود در گونه دیژیتال ایران به طریقه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفته است. این روش آنالیز ساده و حساس می‌باشد و امروزه یک روش استاندارد برای آنالیز کاردنولیدها در برگ‌های گونه‌های دیگر دیژیتال می‌باشد. برای انجام این آنالیز، کاردنولیدها ابتدا با محلول هیدورالکلی و قبل از تغلیظ به وسیله حلال‌های آلی استخراج می‌گردند و سپس حاصل تغلیظ

قلبی موجود در این گیاه از استانداردهایی استفاده شده است. جدول شماره ۲ مربوط به انواع استانداردها، ساختمان شیمیایی، زمان نگهداری، و زمان نگهداری نسبی آنها نسبت به بتامتیل دیگوکسین را نشان می دهد.

جدول شماره ۱: شرایط آنالیز HPLC کاردنولیدهای دیژیتالیس نروزا

زمان (دقیقه)	درصد آب مقطر	درصد استونیتریل	سرعت حلال (ml/Min)	دمای ستون (°C)
۰۰/۰۰	۷۸	۲۲	۱/۲۰	۴۰
۰۲/۰۰	۷۸	۲۲	۱/۲۰	۴۰
۳۰/۰۰	۶۸	۳۲	۱/۲۰	۴۰
۴۰/۰۰	۶۰	۴۰	۱/۲۰	۴۰
۴۶/۰۰	۵۴	۴۶	۱/۲۰	۴۰
۴۸/۰۰	۷۸	۲۲	۱/۲۰	۴۰
۶۰/۰۰	۷۸	۲۲	۱/۲۰	۴۰

(پمپ A) آب مقطر صاف شده : فاز متحرک

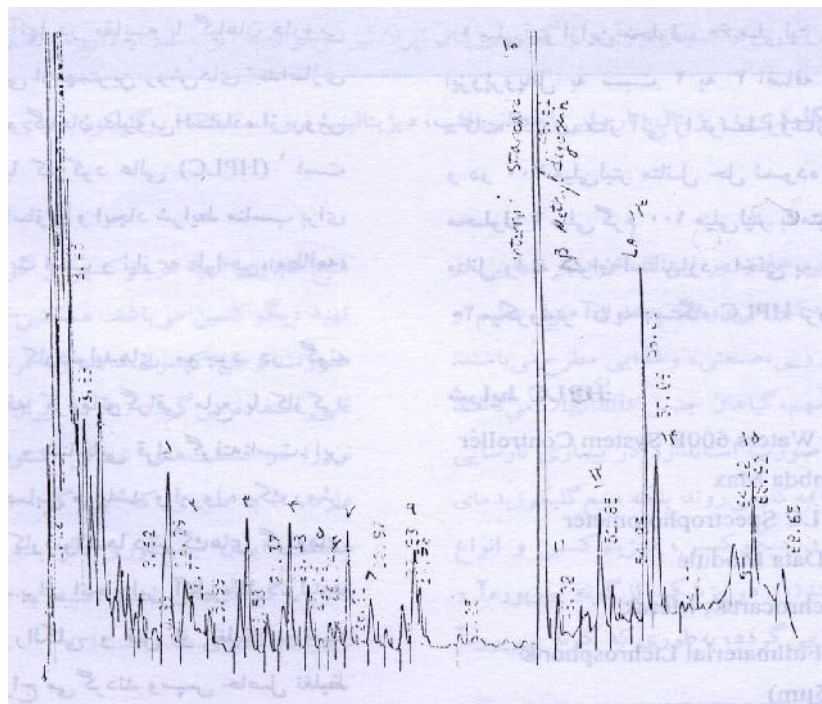
(پمپ B) Lichrosdt®, Merck استونیتریل

Detection: UV-Detection 225 nm

روش جداسازی با HPLC :
برای جداسازی کاردنولیدهای گیاه دیژیتالیس نروزا از سیستم حلال به صورت گرادیان استفاده شد. زمانبندی و مقدار هر یک از حلال های دو پمپ (A,B) و همچنین سرعت حرکت حلال در ستون و دمای ستون در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

نتایج

آنالیز و کروماتوگرام HPLC گلیکوزیدهای قلبی دیژیتالیس نروزا در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. در این آنالیز از بتامتیل دیگوکسین به عنوان استاندارد داخلی استفاده شده است که پیک بزرگ در $RT=45-46/61$ دقیقه مربوط به این ترکیب می باشد (پیک شماره ۱). جهت مشخص شدن انواع گلیکوزیدهای



تصویر شماره ۱: گلیکوزیدهای قلبی موجود در دیژیتالیس نروزا.

جدول شماره ۲۵: جدول استانداردهای کارنولیدها، ساختمان شیمیایی، زمان نگهداری، و زمان نگهداری نسبی (۵)

نام ترکیب	ساختمان شیمیایی	RT (min)	RRT	نام ترکیب	ساختمان شیمیایی	RT (min)	RRT	
Digo xigerin	Du-D	4.57	0.099		AcDx-Dx-C	37.33	0.806	
	C	8.23	0.178		Xyl-Dx-A	39.95	0.862	
Digitalinum verum Subalposid	Du-C	12.97	0.280	PB Lanadoxin	Gl-Dx-Dx-Dx-B	40.69	0.879	
	Gl-Du-B	13.88	0.300		Dx-B	40.87	0.883	
	Gl-Du-F	14.49	0.313					
	Dx-C	15.08	0.326					
	Glum-Dx-C	15.45	0.334					
Glucoverosidin	Gl-Dx-Dx-C	15.69	0.339	Digitoxigenin	A	41.15	0.889	
	Gl-A	19.09	0.412					
	Xyl-Dx-Dx-C	20.28	0.437					
	Gl-Du-E	21.06	0.455					
Strospesid	Didesgl-Dx-C	21.38	0.462	Digoxosid	Dx-Dx-Dx-C	41.53	0.897	
	Du-B	22.62	0.488					
Glucoglorosid Gitoxigenin Desacetyl-LC	Gl-Dx-B	23.15	0.590	α -Acetyldigoxin β -Methyldigoxin Glucogitaloxin	Gl-Dx-Dx-A	44.23	0.955	
	B	23.77	0.513		α -Ac-Dx-Dx-Dx-C	45.48	0.982	
	Gl-Dx-Dx-Dx-C	24.15	0.521		β -Methyl-Dx-Dx-Dx-C	46.31	1.000	
	Gl-Acdx-Dx-C	24.61	0.531		Gl-Dx-Dx-Dx-B	46.34	1.001	
Diginatin	Dx-Dx-C	24.90	0.538	LB	Gl-AcDx-Dx-Dx-B	47.62	1.028	
	Dx-Dx-Dx-D	24.92	0.538					
Neo- Glucodigifucosid	Glum-Dx-Dx-C	25.51	0.551	Eivatromonosid	Dx-A	48.45	1.046	
	N-Gl-Fuc-A	26.04	0.562					
Glucodigifucosid	Gl-Glum-A	26.57	0.574	β -Acetyldigoxin Gitoxin	β -AcDx-Dx-Dx-C	48.47	1.047	
	Gl-Fuc-A	26.71	0.577		Dx-Dx-Dx-B	49.80	1.075	
Glucianadoxin	Gl-Dx-E	28.33	0.612	PA	Gl-Dx-Dx-Dx-A	51.27	1.107	
Neo-Odorobiosid G	N-Gl-Du-A	28.33	0.612	LE	Gl-AcDx-Dx-Dx-B	51.48	1.112	
Odorobiosid G	Gl-Du-A	30.28	0.654		Gl-AcDx-Dx-Dx-F	52.49	1.133	
Verodoxin	Du-E	30.80	0.665	LF				
Glucodigoxosid LC digoxin Glucovivatromonosid	Didesgl-Dx-Dx-C	30.98	0.669	LA	Dx-Dx-A	54.15	1.169	
	Gl-Dx-Dx-Dx-Dx-C	32.68	0.706		Gl-AcDx-Dx-Dx-A	55.62	1.221	
	GR-AcDx-Dx-Dx-C	33.43	0.722		α -Acetyldigoxin	α -AcDx-Dx-Dx-B	56.26	1.215
	Dx-Dx-Dx-C	33.51	0.724		β -Acetyldigoxin	β -AcDx-Dx-Dx-B	58.31	1.259
	Gl-Dx-A	14.31	0.741		Digitoxin	Dx-Dx-Dx-A	58.57	1.265
GLUM-A	GLUM-A	36.00	0.777	α -Acetylgitoxin α -Acetyldigoxin β -Acetyldigoxin	α -AcDx-Dx-Dx-F	59.88	1.294	
					α -AcDx-Dx-Dx-A	63.54	1.381	
					β -AcDx-Dx-Dx-A	66.29	1.451	

C=Digoxigenin, B=Gitoxigenin, Gl=Glucose, Dx=Digitoxose, A=Digitoxigenin, E=Gitaloxigenin,
Dtl=Digitalose, F=Oleandrigenin, xyl=xylose, D=Digitatigenin, Fuc=Fucose

گونه‌های دیژیتال به‌طور موفقیت آمیزی می‌توان استفاده نمود (۹۸،۷). در HPLC گلیکوزید قلبی دیژتالیس نروزا ده ترکیب به‌خوبی جداسازی شد که عبارتند از: گلوکوژیتوروزید، گلوکوژیتوفوکوزید، اودورویوزید، G، گلوکواواترومنوزید، لاناتوزید B، لاناتوزید E، لاناتوزید A، α استیل ژیتوکسین، دیژتالینوم وروم، دیژیتوکسی ژنین گلوکز.

HPLC گلیکوزید قلبی دیژتالیس نروزا نشان می‌دهد که لاناتوزید A بیشترین مقدار کاردنولیدهای موجود در برگ گیاه را تشکیل می‌دهد. به‌طور کلی کاردنولیدهایی که در گونه مذکور وجود دارند از دسته دیژیتوکسی ژنین و ژیتالوکسی ژنین می‌باشند و در این گونه کاردنولیدهایی از دسته دیگوکسی ژنین و دیژیناتی ژنین شناسایی نشده است و همچنین عمده کاردنولیدها از دسته دیژیتوکسی ژنین می‌باشند که لاناتوزید A که بیشترین مقدار کاردنولید در گیاه را تشکیل می‌دهد نیز در دسته دیژیتوکسی ژنین می‌باشد.

لیشیوس (Lichiu) با استفاده از HPLC، وجود کاردنولیدهایی همچون اواترومنوزید، ژیتوروزید، و لاناتوزید B را در گونه ساب‌آلپینا گزارش نموده است (۵). شونر (Schonr) و رینهارد Reinhard در مطالعه کشت طولانی مدت کلون‌های D.Lanata در *in vitro* با استفاده از HPLC ترکیباتی همچون لاناتوزید C، دیگوکسین، لاناتوزید A، و دیژیتوکسین را گزارش نموده‌اند (۱۰).

به‌طور کلی پس از یافتن روش مناسب HPLC برای گونه گیاهی، می‌توان مکرراً از این روش جهت تعیین مقدار کمی، استاندارد کردن عصاره گیاه، و کنترل داروهای حاوی آنها به‌طور دقیق و سریع استفاده کرد.

با مقایسه زمان نگهداری (RT) و زمان نگهداری نسبی (RRT) انواع استانداردها (جدول شماره ۲) و پیک‌های انواع گلیکوزیدهای قلبی در HPLC دیژتالیس نروزا (در تصویر شماره ۱)، ۱۵ گلیکوزید قلبی قابل شناسایی است که در جدول شماره ۳، این ترکیب، RT و RRT آنها نسبت به بتامتیل دیگوکسین نشان داده شده است. ضمناً همان‌طوری که از تصویر شماره ۱ (HPLC) گلیکوزیدهای قلبی دیژتالیس نروزا مشخص می‌باشد ترکیب لاناتوزید A، بیشترین مقدار کاردنولید موجود در برگ گیاه دیژتالیس نروزا را تشکیل می‌دهد.

جدول شماره ۳: آنالیز HPLC کاردنولیدهای دیژتالیس نروزا

شماره ترکیب	نام ترکیب	RT (Min)	RRT
۱	—	۱۰-۱۲	۰/۲۳۴
۲	دیژتالینوم وروم	۱۳-۱۴	۰/۳۰۰
۳	دیژیتوکسی ژنین گلوکز	۱۸-۱۹	۰/۴۱۲
۴	گلوکوژیتوروزید	۲۲-۲۳/۴	۰/۵۰۰
۵	نئوگلوکوژیتوفوکوزید	۲۵-۲۶	۰/۵۶۲
۶	گلوکوژیتوفوکوزید	۲۶-۲۷	۰/۵۷۷
۷	گلوکولانادوکسین	۲۷-۲۹	۰/۶۱۲
۸	اودورویوزید G	۳۰-۳۱	۰/۶۵۴
۹	گلوکواواترومنوزید	۳۳/۵-۳۴/۵	۰/۷۴۱
۱۰	β امتیل دیگوکسین	۴۵-۴۶/۶۱	۱/۰۰
۱۱	لاناتوزید B	۴۷-۴۸	۱/۰۲۸
۱۲	لاناتوزید E	۵۱-۵۲	۱/۱۱۲
۱۳	لاناتوزید A	۵۴/۵-۵۶	۱/۲۰۱
۱۴	α استیل ژیتوکسین	۵۶-۵۷	۱/۲۱۵
۱۵	α استیل دیژیتوکسین	۶۲-۶۴	۱/۳۸۱

بحث

از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی برای شناسایی و تعیین مقدار هر یک از کاردنولیدهای

- فهرست منابع
1. Trease G.E, Evans W.C. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 14th ed. London: Saunders Company Ltd. 1998; 313-316.
 2. Rechinger K.H. *Flora Iranica*. Austria: Akademie Druk-u. Vol. 147. 1979: 169-170.
 3. قاسمی دهکردی، نصراله؛ آزادبخت، محمد. *گونه دیژیتال ایران*. ماهنامه دارویی رازی. شماره ۱۱، آذر ۱۳۷۳: ۳۵-۳۶.
 4. Samuelson G. *Drugs of natural origin*. A textbook of pharmacognosy. Swedish: pharmaceutical press. 1992: 131-140, 181-185.
 5. Lichius J.J. *Phytochemische Analyse Seltener Digitalisarten. Digitalis Subalpine and reziproker Digitaliskreuzungen*. Dr. rer nat thesis. Germany: Berlin. Stuttgart. 1991: 3-60.
 6. Weigrebe H, Wichtl M. *High performance liquid chromatographic determination of cardenolides in Digitalis leaves after solid-phase extraction*. J. of Chromatography. 1993; 63(3): 402-407.
 7. Fingerhat T, Bugge G, Lichius J.J, Wichtl M. *Cardiac glycosides in the leaves of some fl-hybrids of species of Digitalis, Especially of Digitalis carrecusis*. Planta Medica. 1991; 52(2): A71-A72.
 8. Lichius J.J, Wichtl M. *Vergleivhende untersuchungen des cardenolide-spektrums deriver-variation von Digitalis subalpina*. Planta Medica. 1992; 58(1): 102-104.
 9. Connolly J.D, Hill R.A. *Sources, biosynthesis, Isolation and Identification of cardenolides*. Methods Plant Biochem. 1991; 7(1): 361.
 10. Schoner S, Reinhard E. *Long-term cultivation of Digitalis lanata clones propagate in vitro: cardenolide content of the regenerated plants*. Planta Medica. 1986; 50(1): 478-481.