

تعیین مقدار تروپان آلکالوئید تام به روش تیتراسیون و آلکالوئید: هیوسیامین به روش HPLC در داتوراهای بومی شمال ایران

سید محمد حسین زاده **(Ph.D.)

محمد آزاد بخت *(Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف : گونه‌های داتورا منع تهیه تروپان آلکالوئیدهایی چون آتروپین و فرم چپ‌گرد آن یعنی هیوسیامین می‌باشند. جنس داتورا دارای ۱۰ تا ۱۵ گونه می‌باشد، که گونه‌ی L. Stramonium D. در برخی از منابع به عنوان گونه‌ی اندمیک کثاره‌ی دریای مازندران شناخته شده است. علاوه بر گونه‌ی استرامونیوم، گونه‌ی D. Innoxia Mill نیز با فراوانی کم‌تر در شمال ایران پراکندگی دارد. که افتراق این دو گونه با توجه به خصایص مرغولوژیک امکان‌پذیر می‌باشد.. به نظر می‌رسد مقدار آلکالوئیدها در گیاه داتورا، به شدت به سن، اندام و گونه گیاه، جغرافیای منطقه‌ی رویش (اعم از ساختارخاک و سیستم آب و هوا)، و فصل گیاه و بسته باشد. حتی این مقدار در ساعت‌های مختلف روز هم متفاوت است.

مواد و روش‌ها : ابتدا مقدار تروپان آلکالوئید تام به روش تیتراسیون در اندام‌های مهم این دو گونه اندام‌گیری و سپس مقایسه شدند. سپس مقدار هیوسیامین به عنوان یکی از مهم‌ترین تروپان آلکالوئیدها در این اندامها با روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت

یافته‌ها بیشترین مقدار به دست آمده از ریشه و برگ دی. استرامونیوم و مقدار آن ۴٪ درصد و کمترین مقدار از ریشه دی. اسنوكسیا با ۱۸٪ درصد به دست آمد. مقدادر تروپان آلکالوئیدها برای اندام‌های دیگر دو گونه، در محدوده‌ی این دو عدد به دست آمد

استنتاج : مقدار به دست آمده‌ی تروپان آلکالوئیدها در برخی از اندام‌ها تقریباً بالا و در برخی از اندام‌ها کم بود، اما مقدار هیوسیامین به یکدیگر نزدیک بود. اگرچه مقدار آن در گونه اسنوكسیا کمتر از استرامونیوم بود.

واژه‌های کلیدی : داتورا، هیوسیامین، تروپان آلکالوئید تام، تیتراسیون، HPLC

مقدمه

Datura innoxia Mill, Datura stramonium L.

داتورا استرامونیوم در سرتاسر نواحی ساحلی شمال ایران از آستانه تا شرق مازندران به وفور دیده می‌شود (۱).

از خانواده سولاناسه، دو گیاه روینده‌ی شمال ایران می‌باشد.

E این تحقیق طی شماره ۸۳-۶۰ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه مازندران انجام شده است.
* متخصص فارماکوگنوژی، عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد - دانشکده داروسازی



مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره پانزدهم، شماره ۴۸، مهر و آبان، ۱۳۸۴ (۱۰-۱)

** دکترای داروساز دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ تصویب: ۸۳/۱۰/۲۳

تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۱۲ تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۹/۹ E

به هیوسین یا اسکوپولامین در گیاه مسن نسبت به گیاه جوان بالاتر است^(۳). از هیوسیامین به عنوان یک تروبان آلکالوید در داتورا جهت ارزیابی استفاده می‌شود. GC, HPLC و تیتراسیون متدهایی هستند که جهت شناسایی و اندازه گیری تروبان آلکالویدها در نقاط مختلف جهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند^(۴,۵).

مواد و روش‌ها

الف) مواد: آمونیاک، اتانول، دی‌ایل اتر بدون پراکساید، کلروفرم، اسید سولفوریک، پتاسیم تتراایدو مرکورات، سدیم سولفات انیدر، سدیم هیدروکساید، متیل رد، استاندارد هیوسیامین، یدورپتاسیم، کلروفرم کور (همگی از نوع مرک MERCK) تهیه شد.

دستگاه‌های مورد استفاده : دستگاه HPLC (مدل UV Detector KNAUER)، ساخت آلمان، K-2600، HPLC Pump K-1001، فاز متحرک: متابول، آب (۶۰:۴۰)، نوع ستون: Eurospher-C18، سایز ستون: ۲۵ سانتی‌متر، طول موج UV به کار رفته: ۲۵۴nm).

ROTARY EVAPORATOR

دستگاه تبخیر در خلا، Laborata 4000، ساخت: آلمان، دمای استفاده شده: ۳۰ تا ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

ب) تهیه گیاه و تایید نام علمی: هر اندام در زمان مشخصی که دارای بیشترین مقدار آلکالوید جمع‌آوری شد. محدوده زمانی جمع‌آوری بین اواسط تابستان تا اوخر پاییز بود. نام علمی این دو گونه توسط متخصص سیستماتیک گیاهی از گروه زیست‌شناسی دانشگاه گیلان مورد تایید قرار گرفت و نمونه هرباریومی آن در در آزمایشگاه فارماکوگنوژی دانشکده داروسازی ساری موجود بود.

ج) روش تعیین مقدار آلکالوید قائم به روش تیتراسیون^(۶) در اندام‌های مختلف این دو گیاه: ابتدا مقدار آب موجود در هر اندام گیاه اندازه گیری شد.

داتورا اینوکسیا نیز در همین مناطق دیده‌می‌شود ولی نسبت به گونه‌ی استرامونیوم، اولاً گسترش کم‌تری داشته و ثانیاً پراکنده‌گی آن در مناطق نزدیک‌تر به سواحل کمتر شده و گسترش بیشتری در حاشیه‌ی شهرهایی که از دریا فاصله‌ی بیشتری دارند (مثل رشت و ساری) و یا حتی در ارتفاعات (نوشهر و چالوس) (دارند دندانه‌دارتر بودن) (Dentate) حاشیه‌ی برگ‌ها در گونه‌ی استرامونیوم در مقابل منظم‌تر بودن آن در گونه‌ی اینوکسای بالاروندگی ساقه‌ی داتورا استرامونیوم در برابر رونده‌بودن (Runner) آن در داتورا اینوکسیا، رنگ و شکل دانه و ریشه و کپسول خاردار نیز از تفاوت‌های مورفولوژیک جهت افتراق این دو گونه می‌باشد^(۷).

تروبان آلکالویدها از مهم‌ترین ترکیبات موجود در تعدادی از گیاهان خانواده سولانا سیب‌زمینی می‌باشند. اثرات آنتی کولینرژیکی این ترکیبات کاربرد آن‌ها را در پزشکی متداول کرده است، آتروپین، اسکوپولامین یا هیوسین و هیوسیامین از مهم‌ترین تروبان آلکالویدهای باشند^(۸). درصد توتال آلکالوید بر حسب هیوسیامین به عنوان مهم‌ترین معیار، جهت ارزیابی ارزش دارویی داتورا مورد بررسی قرار می‌گیرد^(۹). برگ و میوه نیز دو اندام مهم دارویی گونه‌های داتورا می‌باشند. گونه واندام مورد نظر باید حداقل دارای ۰/۲۳ - ۰/۲۸ درصد تروبان آلکالوید باشند تا بتوان از آن در فراورده‌ها و اشکال دارویی مختلف استفاده کرد. درصد این ترکیبات به فاکتورهای زیادی وابسته است^(۱۰) و از اهداف این تحقیق اندازه گیری درصد این ترکیبات با توجه به ویژگی‌های جغرافیایی منطقه‌ی شمال ایران و مقایسه آن با مقادیر دیگر نقاط جغرافیایی می‌باشد. هیوسیامین یکی از مهم‌ترین تروبان آلکالویدهای موجود در این گیاه می‌باشد. آتروپین فرم راسمیزه هیوسیامین است که در جریان استخراج به وجود می‌آید^(۱۱). نسبت هیوسیامین

محاسبه شد. سپس با استفاده از یک تناسب ساده، درصد هیوسیامین محاسبه گردید.

یافته‌ها

اندازه‌گیری تروپان آلکالوئید بر روی برگ، ریشه و دانه‌ی داتورا اینوکسیا، داتورا استرامونیوم و بر روی هر اندام سه بار صورت گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود، مقدار تروپان آلکالوئید در تمام اندامهای استرامونیوم نسبت به اندامهای مشابه در گونه‌ی اینوکسیا بالاتر است.

اندازه‌گیری مقدار هیوسیامین: با قرار دادن سطح زیر منحنی (AREA) مربوطه نمونه‌های مجھول (عصاره‌ها) در منحنی بیر لامبرت به دست آمده از نمونه‌های استاندارد (نمودار شماره‌ی ۱) و سپس به دست آوردن معادله‌ی خط، غلظت هیوسیامین در نمونه‌های مجھول به دست آمد. سپس با انجام محاسبات مورد نظر مقدار هیوسیامین در ۴ گرم پودر اندام گیاه مورد نظر محاسبه شد. در شکل (کروماتوگرام) ۲، نتایج حاصل از HPLC عصاره‌های اندامهای مختلف دو گونه‌ی داتورای شمال ایران ارائه شده‌است. جدول شماره‌ی ۲، زمان نگهداری (R.T) و سطح زیر منحنی مربوط به استانداردهای هیوسیامین و پیک مربوط به در برگ و دانه‌ی دو گونه‌ی داتورای شمال ایران را نشان می‌دهد. برای محاسبه درصد هیوسیامین موجود در تروپان آلکالوئید تام، با توجه به عدد به دست آمده از تعیین درصد تروپان آلکالوئید تام، مقدار آن را در ۴۰ گرم از اندام مورد نظر محاسبه کرده، با اسفاده از معادله‌ی خط منحنی بیر لامبرت به دست آمده از تزریق استانداردها، مقدار هیوسیامین را در این اندامها محاسبه سپس با استفاده از آن، درصد هیوسیامین محاسبه گردید.

۱۰ گرم از اندام مورد نظر پودر شده و به اندازه‌ی ۰/۲۵ میلی‌متر درآمده و اندازه‌مورد نظر وزن شد. به روش پرکولاسیون و با استفاده از حلal آمونیاک و اتانول از گیاه عصاره‌گیری شد. عصاره‌ی به دست آمده طی روندهای متوالی که اساس آن قطبی و غیرقطبی کردن نیتروژن حلقه‌ی تروپان با استفاده از محلول حاوی اسید سولفوریک و آمونیاک، می‌باشد، عصاره از وجود سایر دسته‌های شیمیایی عاری گردید. کلروفرم به عنوان حامل آلکالوئید در حالت باز آزاد آن و محلول آبی اسید سولفوریک به عنوان حامل ملح آلکالوئید مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تبخیر حلال‌های باقی‌مانده و خشک کردن عصاره، ۲۰ سی سی سولفوریک اسید ۱/۰ مولار به آن افزوده شده و با سدیم هیدروکساید ۰/۲ مولار تیتر گردید، مقدار بیشتر از ۲۰ میلی‌لیتر از سود جهت خشک کردن عصاره‌ی حاوی اسید سولفوریک مورد استفاده قرار گرفت. از طریق مقدار اضافی سود، مقدار توتال آلکالوئید بر اساس هیوسیامین محاسبه گردید.

(د) تعیین مقدار هیوسیامین به روش HPLC، ابتدا نمونه‌های جداگانه از استاندارد هیوسیامین با غلظت‌های ۱۴۰۰۰، ۸۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۲۰۰۰ و ۱۲۰۰ ppm ساخته شد و تزریق مکرر به روش ایزو کراتیک تابه دست آوردن اعداد تکرار پذیر بود. مقدار تزریق در هر بار ۲۰ میکرولیتر و تعداد آن حداقل سه بار صورت گرفت. پس از تهیه عصاره به روش P و افزودن ۲ میلی‌لیتر متابول به آن، ۱ میلی‌لیتر از آن پس از صاف شدن تا حجم ۵ میلی‌لیتر ریقیق شد. این کار برای اندامهای مورد نظر انجام شد و برای هر کدام حداقل سه تزریق صورت گرفت. با استفاده از منحنی بیر لامبرت، مقدار هیوسیامین موجود در هر یک از اندامهای گیاهی و درصد آن نسبت به کل گیاه و توتال آلکالوئیدها

نمودار شماره ۱ نمودار بیر لامبرت و معادلهٔ خط به دست

آمده از تزریق نمونه‌های استاندارد هیوسیامین

جدول شماره ۳: مقدار تروپان‌آلکالوئید و درصد هیوسیامین در برگ دو گونه‌ی داتورای شمال ایران

	گیاه	مقدار تروپان‌آلکالوئید در درصد هیوسیامین موجود در	مقدار هیوسیامین در در	مقدار هیوسیامین در تروپان‌آلکالوئید (درصد)
	برگ (گرم)	۴۰	۴۰	۴۱.۷%
	(بلی گرم)	(بلی گرم)	(بلی گرم)	
	دی. استرامونیوم	۱۶۴	۵۹.۴۴	۴۰.۵۲%
	دی. اینوکسیا	۹۶	۴۳.۷۰	

جدول شماره ۴: مقدار تروپان‌آلکالوئید و درصد هیوسیامین در دانه‌ی دو گونه‌ی داتورای شمال ایران

	گیاه	مقدار تروپان	مقدار هیوسیامین	درصد هیوسیامین موجود در تروپان
	آلکالوئید در ۴٪ گرم	۰	۰	۰
	دانه (بلی گرم)	۰	۰	۰
	دی. استرامونیوم	۹۰	۴۸.۱۲	۵۳.۴۶%
	دی. اینوکسیا	۱۱۰	۴۰.۸۸	۳۷.۱۶%

بحث

ازین ۱۰ گونه‌ی گیاهی داتورا، گونه‌ی استرامونیوم (۸) و علاوه بر آن گونه‌ی اینوکسیا در شمال ایران رویش می‌یابند. با استفاده از تفاوت‌های مرغولوژیک، افتراق این دو گونه امکان‌پذیر می‌باشد. در فارماکوپه بریتانیا از گونه‌ی استرامونیوم به عنوان گونه‌ای که از آن فرآورده‌ی دارویی استحصال می‌شود، نام برده شده است (۴). اما در منابع معتبر فارماکوگنوزی از هر دو گونه‌ی مذکور به این منظور یاد شده است (۳). از ترکیبات موجود در اندام‌های این دو گیاه که در بازار فراورده‌ی دارویی وجود دارد، می‌توان به آتروپین (فرم راسمیک هیوسیامین)، هیوسین یا اسکوپولامین اشاره کرد. این ترکیبات دارای اثرات پاراسمپاتولایتیک آنتی‌موسکارینی می‌باشند و بنابراین از برخی از آنها مانند آتروپین در ایست قلبی و برادیکاردی سینوسی و قبل از بیهوشی جهت کاهش

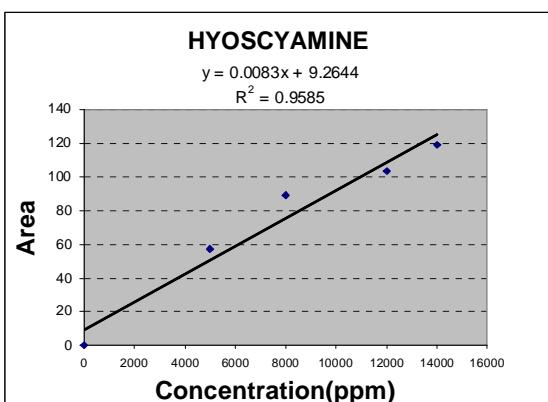
جدول شماره ۱- نتایج اندازه‌گیری درصد تروپان‌آلکالوئید در برگ، دانه و ریشه‌ی دو گونه‌ی داتورای شمال ایران به روش تیتراسیون

اندام	برگ (درصد)	دانه (درصد)	ریشه (درصد)
دی. استرامونیوم	۰/۳۲-۰/۴۰	۰/۲۰-۰/۲۵	۰/۳۲-۰/۴۰
دی. اینوکسیا	۰/۲۱-۰/۲۷	۰/۲۵-۰/۴۰	۰/۲۰-۰/۲۸

جدول شماره ۲- نتایج آنالیز استانداردهای هیوسیامین و عصاره‌ی اندام‌های مختلف دی. استرامونیوم، دی. اینوکسیا، به روش HPLC

سموئه‌ها	زمان نکهداری (دقیقه)	سطح زیرمحتی
میانگین استاندارد ۱	۱۰/۹۹۲	۵000 ppm
میانگین استاندارد ۲	۱۱/۲۵	8000 ppm
میانگین استاندارد ۳	۱۱/۶۹	12000 ppm
میانگین استاندارد ۴	۱۱/۶۵	14000 ppm
STRAMONIUM Leaf	۱۰/۱۷	
STRAMONIUM SEED	۱۰/۱۰	
INNOXIA LEAF	۱۰/۱۰	
INNOXIA SEED	۱۰/۰۹	

*بر اساس نمودار بیر لامبرت (نمودار شماره ۱)، میزان هیوسیامین در اندام‌های مختلف دو گونه‌ی استرامونیوم و اینوکسیا محاسبه شده و در جدول شماره ۲ ارائه گردیده است.



با این توصیف، برگ و ریشه‌ی گونه‌ی استرامونیوم و دانه‌ی گونه‌ی اینوکسای قابل رویش در شمال ایران دارای ارزش دارویی خواهد بود. اگرچه اندام‌های دیگر نیز به این محدوده بسیار نزدیک‌اند و مطالعات دقیق‌تر و کامل‌تر، شاید ارزش آنها را نیز به اثبات برساند. در بررسی که در کشور ایتالیا^(۱۳) صورت گرفته است، مقادیر تروپان آلکالویدها در برگ، بین ۰/۲ تا ۰/۴۵ درصد و در دانه ۰/۲ درصد گزارش شده است. در تحقیقی که در کشور آرژانتین بر روی آلکالویدهای دانه‌ی داتورا فروکسا صورت گرفت مقدار تروپان آلکالویدها بین ۰/۲۸ تا ۰/۶۹ درصد به دست آمد که که مقدار ماکزیم آن با مقدار ماکزیم به دست آمده در این تحقیق تفاوت فاحشی دارد. نیز در HPLC آن هیوسیامین شناسایی نشده است اما در HPLC گونه‌های قابل رویش در ایران این آلکالوید شناسایی شده است در یک جمع‌بندی کلی، مقدار تروپان آلکالویدها در تمام اندام‌های استرامونیوم و اکثر اندام‌های اینوکسایا در حد مجاز معرفی شده در منابع و بالاتر از آن می‌باشد. این مساله اثبات کننده‌ی ارزش دارویی داتوراهای شمال ایران می‌باشد. با توجه به مقدار بالای هیوسیامین شناسایی شده در اندام‌های این دو گونه به نظر می‌رسد این آلکالوید از مهم‌ترین آلکالویدهای موجود در این دو گیاه باشد. تحقیقات بیشتر در مورد سایر آلکالویدهای موجود در این دو گیاه و مقایسه با نتایج این تحقیق می‌تواند تکمیل کننده‌ی این تلاش باشد.

ترشحات مجاری تنفسی و غدد براحتی و نیز به عنوان آنتی‌دوت در مسمومیت با ارگانوفسفرهای و جهت ایجاد میدریاز در چشم استفاده می‌شود. از هیوسین مانند بلادونا جهت تخفیف اسپاسم‌های عضلات صاف، مانند عضلات صاف دستگاه گوارش استفاده می‌شود^(۹). پچ‌های اسکوپولامین به تازگی جهت بیماری مسافت استفاده می‌شود^(۱۰).

با توجه به نتایج این تحقیق، محتوای تروپان آلکالویدها در برگ و ریشه‌ی اینوکسایا و استرامونیوم. موجود و به طور واضحی از مقدار آن در برگ و ریشه‌ی اینوکسیادی بیشتر می‌باشد. اما این تفاوت در دانه‌ی این دو گیاه چندان قابل ملاحظه نیست. در مقایسه‌ی بین اندام‌ها ریشه و برگ به نظر می‌رسد محتوای آلکالویدی بالاتری داشته باشند. مقادیر به دست آمده تروپان آلکالویدی داتورا استرامونیوم شمال ایران (به عنوان مثال به طور متوسط ۰.۳۶ درصد برای برگ استرامونیوم) در این تحقیق چندان با مقدار به دست آمده در دو تحقیق قبلی که بر روی گونه‌ی استرامونیوم صورت گرفته بود، (۰/۲۷۸ و ۰/۲۰۳ درصد به عنوان درصد توتال آلکالوید در برگ) مطابقت ندارد^(۱۱ و ۱۲). البته روش به کار برده شده دو تحقیق قبلی با روش استفاده شده در این پژوهش تفاوت دارد. در کتب فارماکوگنوزی حداقل محدوده مورد نیاز توتال آلکالویدی جهت ارزیابی دارویی داتور استرامونیوم، ۰/۲۸ تا ۰/۲۳ درصد ذکر شده است.

فهرست منابع

3. Trease GE, Evans WC. *pharmacognosy*. 14 th ed. London: saunders, 1996:350
4. *Britishpharmacopoeia*. HMSO.london. 1998 :1229

۱. فهرمان احمد : فلورایران. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراعع دانشگاه تهران. ۱۳۷۷، ص ۱۷
۲. مظفریان ولی ا... رده‌بندی گیاهی. موسسه انتشارات امیرکبیر. تهران. ۱۳۷۹. ص ۳۹۳

6. Verpoorttw R,Baerheim svendsen . High performance Liquid Chromatography of some *Tropane Alkaloids*.J chromatogr.1996,120:203-5
7. Vital A.A,*Acher A.,Pomilio A.B: Alkaloids of Datura ferox from Argentiana*.Journal of Ethnopharmacology.1995,49:81-9
8. Rechinger K H.*Flora Iranica*. graz: Academische Druck verlgstantatt. 1972; (vol.100):45
۹. شهراز سعید. غازیانی.طاهره: ایران فارما.انتشارات تیمورزاده. تهران. ۱۳۸۱.
۱۰. کاترونگ برترام جی. *فارماکولوژی پایه و بالینی*.ویرایش هشتم. ترجمه بیژن جهانگیری. انتشارات تیمورزاده . تهران. ۱۳۸۲.
5. Griffin W.J,Lin G.D.*Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids* ,phytochemistry,2000,53:623-637
- ۱۱.حسین زاده کبری. تعیین مقدار و جدا کردن مواد موثره‌ی داتوراهای منطقه‌ی البرز.دانشکده‌ی داروسازی تهران ۱۳۴۸ پایان نامه‌ی شماره‌ی ۱۶۲۴.
۱۲. قاسملو ناصر. بررسی و استخراج آلکالوئیدهای داتوره.دانشکده‌ی تهران.. ۱۳۶۱ پایان نامه‌ی شماره‌ی ۲۲۱۱ ص
13. Miraldi e,Masti A, ferr s,Comparinis I.B: *Distribution of hyoscyamine and scopolamine in Datura stramonium*. Fitoterapia.2001,72:644-648