Archive of SID

شناسایی گلیکوزیدهای قلبی گونه دیژیتال ایران به روش HPLC

محمد آزادبخت(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 روش ها : در روش HPLC، از حلال متانل برای استخراج و از استونیتریل و آب مقطر به روش گرادیان برای کروماتوگرافی و از بتا متیل دیگوکسین 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 آنجایی‌که در کشورهای مختلف از گونه‌های متفاوت دیژیتال جهت تهیه داروهای مؤثر در بیماری نارسایی احتقانی قلب استفاده می‌شود، در صورت مطالعات تکمیلی به‌ویژه مطالعات فارماکولوژی و توکسیکولوژی، از گونه دیژیتال ایران نیز می‌توان به این دسته از داروها دسترسی یافت.

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

مقدمه

گیاهان دارویی علاوه بر این‌که خود به تنهایی در درمان بیماری‌ها به‌کار می‌روند، به‌عنوان منبع عظیم و بالقوه مواداولیه دارویی،صنعتی، وغذایی مطرح‌می‌باشند. ازگیاهان دارویی مهم،گیاهان جنس Digitalis می‌باشند که نه تنها خود به‌صورت استاندارد در بیماری نارسایی احتقانی‌قلب(CHF)به‌کارمی‌روند بلکه منبع‌گلیکوزیدهای قلبی مهمی همچون دیگوکسین، دیژیتوکسین و انواع لاناتوزیدها می‌باشند(۱). در پزشکی ازگونه پورپوره‌آ و لاناتا بیشتر استفاده می‌گردد، به‌طوری‌که گونه پورپوره‌آ منبع تجاری تهیه دژیتوکسین و گونه لاناتا منبع تجارتی تهیه دیگوکسین می‌باشد. همچنین پودربرگ دیژیتال به صورت قرص،کپسول،ساشه وبه فرم قطره دربیماری‌های 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).

* متخصص فارماکوگنوزی- استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** متخصص فارماکوگنوزی- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
✉ ساری- خیابان سلمان فارسی- دانشکده داروسازی

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

Archive of SID

تاکنون بیش از ۲۰۰ترکیب کاردنولیدی شناسایی شده‌است که‌معروفترین آنهایعنی‌دیگوکسین،دیژیتوکسین، انواع لاناتوزیدها، و ژیتوکسین در گونه‌های دیژیتال وجود دارند، به طوری که در برگ گونه لاناتا حدود ۵۰ گلیکوزید قلبی شناسایی شده است (۴). مهمترین ترکیبات برگ دیژیتال، کاردیواکتیوهایی از دسته کاردنولیدها می‌باشند. کاردنولیدها جزو ترکیبات گلیکوزیدی بوده‌که ازقسمت قندی(گلیکون) و قسمت غیر قندی (آگلیکون) تشکیل شده‌اند که اثرات فارماکودینامیک آنهامربوط به قسمت غیرقندی می‌باشد. به‌طور کلی دستجات معدودی آگلیکون وجود دارد و عمده تفاوت کاردنولیدها قسمت قندی آنها می‌باشد. آگلیکون کاردنولیدها ساختمان استروییدی 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 ازمهمترین روش‌های جداسازی و شناسایی مواد مؤثره گیاهان دارویی استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) [1] 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 دربرگ‌های گونه‌های دیگر دیژیتال می‌باشد.برای انجام این آنالیز،کاردنولیدها ابتدا با محلول هیدورالکلی و قبل از تغلیظ به‌وسیله حلال‌های آلی استخراج می‌گردند وسپس حاصل تغلیظ 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، به‌طوری که غلظت مواد متشکله فاز متحرک در طول آنالیز یکسان نبود و برای شناسایی کاردنولیدهای‌جداسازی شده ازکاردنولیدهای استاندارد استفاده گردید(۶،۵).

مواد و روش ها

استخراج گليكوزيدهاي قلبي: ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم از پودر برگ دیژیتالیس نروزا را وزن نموده و به آن ۲۰۰ گرم متانل ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه رفلاکس گردید. آنگاه ۵۰۰ گرم آب مقطر صاف شده و۱۰۰۰ میلی‌گرم 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 میلی‌لیتر ازاین محلول، ۶۰ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر متانل حل نموده و ۲ میلی‌لیتر از محلول ۴ میلی‌گرم ۱۰۰ میلی‌لیتر بتامتیل دیگوکسین در متانل را به عنوان استاندارد داخلی به آن اضافه کرده و۲۰ میکرولیتر آن به دستگاه HPLC تزریق گردید.

شرايط HPLC :

نوع دستگاه : Waters 600E System Controller
Waters Lambda Max
Model 481 LC Spectrophotometer
Water 745 Data Module

فاز ثابت : Lichrocart®, Merck,
125×4mm, Fullmaterial Lichrosphor®
100RP-18(5µm)

1. High Performance Liquid Chromatography

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

Archive of SID

(پمپA) آب مقطر صاف شده : فاز متحرک

(پمپ B) Lichrosdt®, Merck استونیتریل

Detection: UV-Detection 225 nm

روش جداسازی با HPLC :

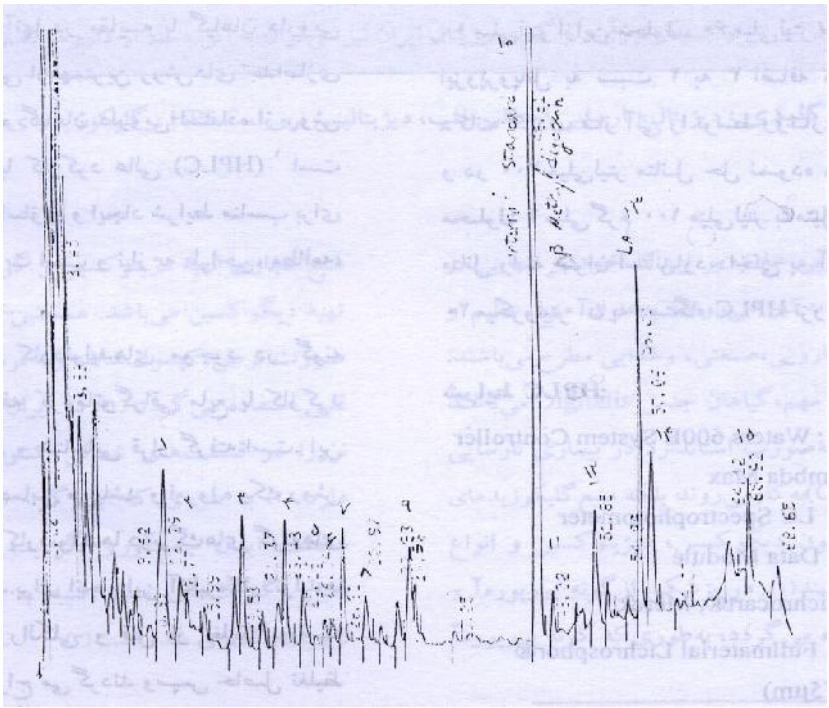
برای جداسازی کاردنولیدهای گیاه دیژیتالیس نروزا از سیستم حلال به‌صورت گرادیان استفاده شد. زمانبندی و مقدار هر یک از حلال های دو پمپ (A,B) و همچنین سرعت حرکت حلال در ستون و دمای ستون در جدول شمارهٔ ۱ نشان داده شده است.

نتایج

آنالیز و کروماتوگرام HPLC گلیکوزیدهای قلبی دیژیتالیس نروزا در تصویر شمارهٔ ۱ نشان داده شده است. در این آنالیز از بتامتیل دیگوکسین به عنوان استاندارد داخلی استفاده شده است که پیک بزرگ در RT=۴۵-۴۶/۶۱ دقیقه مربوط به این ترکیب می‌باشد (پیک شمارهٔ۱).جهت مشخص‌شدن انواع گلیکوزیدهای قلبی موجود در این گیاه از استانداردهایی استفاده شده است. جدول شمارهٔ۲ مربوط به انواع استانداردها، ساختمان شیمیایی، زمان نگهداری، و زمان نگهداری نسبی آنها نسبت به بتامتیل دیگوکسین را نشان می‌دهد.

جدول شمارهٔ۱ : شرایط آنالیزHPLC کاردنولیدهای دیژیتالیس‌نروزا

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



تصویر شمارهٔ۱ : گلیکوزیدهای قلبی موجود در دیژیتالیس نروزا.

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

Archive of SID

جدول شماره۲ : جدول استانداردهای کاردنولیدها، ساختمان شیمیایی، زمان نگهداری، و زمان نگهداری نسبی(۵)

نام ترکیب	ساختمان شیمیایی	RT (min)	RRT	نام ترکیب	ساختمان شیمیایی	RT (min)	RRT
	Dtl-D	4.57	0.099		AcDx-Dx-C	37.33	0.806
Digo xigerin	C	8.23	0.178		Xyl-Dx-A	39.93	0.862
	Dtl-C	12.97	0.280				
Digitalinum verum	Gl-Dtl-B	13.88	0.300	PB	Gl-Dx-Dx-Dx-B	40.69	0.879
Sulsalpiosid	Gl-Dtl-F	14.49	0.313	Lanadoxin	Dx-E	40.87	0.883
	Dx-C	15.08	0.326				
	Glum-Dx-C	15.45	0.334				
	Gl-Dx-Dx-C	15.69	0.339				
	Gl-A	19.09	0.412				
	Xyl-Dx-Dx-C	20.26	0.437				
Gluvoverodoxin	Gl-Dtl-E	21.06	0.455	Digitoxigenin	A	41.15	0.889
	Didesagl-Dx-C	21.38	0.462				
Strospesid	Dtl-B	22.62	0.488	Digoxosid	Dx-Dx-Dx-Dx-C	41.53	0.897
					Gl-Dx-Dx-A	44.23	0.955
Gluvgitorosid	Gl-Dx-B	23.15	0.500	α-Acetyldigoxin	α-AcDx-Dx-Dx-C	45.48	0.982
Gitoxigenin	B	23.77	0.513	β-Methyldigoxin	β-MethylDx-Dx-Dx-C	46.31	1.000
Desacetyl-LC	Gl-Dx-Dx-Dx-C	24.15	0.521	Glucogitaloxin	Gl-Dx-Dx-Dx-E	46.34	1.001
	Gl-Acdx-Dx-C	24.61	0.531				
	Dx-Dx-C	24.90	0.538				
Digmatin	Dx-Dx-Dx-D	24.92	0.538	LB	Gl-AcDx-Dx-Dx-B	47.62	1.028
	Glum-Dx-Dx-C	25.51	0.551				
Neo- Glucodigifucosid	N-Gl-Fuc-A	26.04	0.562	Evatromonosid	Dx-A	48.45	1.046
	Gl-Glum-A	26.57	0.574				
Glucedigitucosid	Gl-Fuc-A	26.71	0.577	β-Acetyldigoxin	β-AcDx-Dx-Dx-C	48.47	1.047
Glucolanadoxin	Gl-Dx-E	28.33	0.612	Gitoxin	Dx-Dx-Dx-B	49.80	1.075
Neo-Odorobiosid G	N-Gl-Dtl-A	28.33	0.612	PA	Gl-Dx-Dx-Dx-A	51.27	1.107
Odorobiosid G	Gl-Dtl-A	30.28	0.654	LE	Gl-AcDx-Dx-Dx-E	51.48	1.112
Verodoxin	Dtl-E	30.80	0.665	LF	Gl-AcDx-Dx-Dx-F	52.49	1.133
	Didesgl-Dx-Dx-C	30.98	0.669		Dx-Dx-A	54.15	1.169
Glucodigoxesid	Gl-Dx-Dx-Dx-Dx-C	32.68	0.706	LA	Gl-AcDx-Dx-Dx-A	55.62	1.231
LC	GR-AcDx-Dx-Dx-C	33.43	0.722	α-Acetyldigoxin	α-AcDx-Dx-Dx-B	56.26	1.215
digoxin	Dx-Dx-Dx-C	33.51	0.724	β-Acetyldigoxin	β-AcDx-Dx-Dx-B	58.31	1.259
Glucoevatromonosid	Gl-Dx-A	14.31	0.741	Digitoxin	Dx-Dx-Dx-A	58.57	1.265
	GLUM-A	36.00	0.777				
				α-Acetylgitoxin	α-AcDx-Dx-Dx-E	59.88	1.294
				α-Acetyldigitoxin	α-AcDx-Dx-Dx-A	63.54	1.381
				β-Acetyldigitoxin	β-AcDx-Dx-Dx-A	66.29	1.431

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

www.SID.ir

Archive of SID

با مقایسه زمان نگهداری (RT) و زمان نگهداری نسبی (RRT) انواع استانداردها (جدول شمارهٔ۲) و پیک‌های انواع گلیکوزیدهای قلبی در HPLC دیژیتالیس نروزا (در تصویر شمارهٔ۱)، ۱۵ گلیکوزید قلبی قابل شناسایی است که در جدول شمارهٔ ۳، این ۱۵ ترکیب، RT و RRT آنها نسبت به بتامتیل دیگوکسین نشان داده شده است. ضمناً همان‌طوری که از تصویر شمارهٔ۱ (HPLC) گلیکوزیدهای قلبی دیژیتالیس نروزا) مشخص می‌باشد ترکیب لاناتوزید A ، بیشترین مقدار کاردنولید موجود در برگ گیاه دیژیتالیس نروزا را تشکیل می‌دهد.

جدول شمارهٔ۳: آنالیز HPLC کاردنولیدهای دیژیتالیس نروزا

شماره ترکیب	نام ترکیب	RT(Min)	RRT
۱	—	۱۰–۱۲	۰/۲۳۴
۲	دیژیتالینوم وروم	۱۳–۱۴	۰/۳۰۰
۳	دیژیتوکسی‌ژنین‌گلوکز	۱۸–۱۹	۰/۴۱۲
۴	گلوکوژیتوروزید	۲۲–۲۳/۴	۰/۵۰۰
۵	نئوگلوکودیژیفوکوزید	۲۵–۲۶	۰/۵۶۲
۶	گلوکودیژیفوکوزید	۲۶–۲۷	۰/۵۷۷
۷	گلوکولانادوکسین	۲۷–۲۹	۰/۶۱۲
۸	اودروبیوزید G	۳۰–۳۱	۰/۶۵۴
۹	گلوکواواترومنوزید	۳۳/۵–۳۴/۵	۰/۷۴۱
۱۰	βمتیل 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	αاستیل ژیتوکسین	۵۶–۵۷	۱/۲۱۵
۱۵	αاستیل دیژیتوکسین	۶۲–۶۴	۱/۳۸۱

بحث

از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی برای شناسایی و تعیین مقدار هر یک از کاردنولیدهای گونه‌های دیژیتال به‌طور موفقیت آمیزی می‌توان استفاده نمود (۹،۸،۷). در HPLC گلیکوزید قلبی دیژیتالیس نروزا ده ترکیب به‌خوبی جداسازی شد که عبارتند از: گلوکوژیتوروزید، گلوکودیژیفوکوزید، اودوروبیوزید G ، گلوکواواترومنوزید، لاناتوزید B ، لاناتوزید E ، لاناتوزید A ، α استیل ژیتوکسین، دیژیتالینوم وروم، دیژیتوکسی ژنین گلوکز.

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

لیشیوس (Lichius) با استفاده از HPLC ، وجود کاردنولیدهایی همچون اواترومنوزید، ژیتوروزید، و لاناتوزید B را درگونه ساب‌آلپیناگزارش 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 کمّی، استاندارد کردن عصاره گیاه، و کنترل داروهای حاوی آنها به‌طور دقیق و سریع استفاده کرد.

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

Archive of SID

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: Akademiche Druk-u. Vol. 147. 1979: 169-170.

۳. قاسمی دهکردی، نصراله؛ آزادبخت، محمد. ***گونه دیژیتال ایران.*** ماهنامه دارویی رازی. شماره۱۱، 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 f1-hybrids of species of Digitalis, Especially of Digitalis carrcusis.*** Planta Medica. 1991; 52(2): A71-A72.
8. Lichius J.J, Wichtl M. ***Vergleivhende untersuchumgen 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-21]

www.SID.ir