فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۲ شمارهٔ ۱ ، صفحهٔ ۱ - ۱۰، (۱۳۸۵)

استخراج و اندازه گیری آلکالوئیدهای تروپانی هیوسیامین و اسکوپولامین از اندام‌های مختلف *Hyoscyamus pusillus* L. در مراحل مختلف رشد

کمال الدین دیلمقانی[۱] ، رمضانعلی خاوری نژاد[۲]، حمید فهیمی[۳] و حسن حکمت شعار[٤]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، e-mail: kamaldilmaghani@yahoo.co.in
۲- استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
۳- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
٤- دانشیار دانشکده علوم، دانشگاه تبریز

چکیده

Hyoscyamus pusillus گیاهی تولید کننده آلکالوئیدهای تروپان از خانواده سیب زمینی است. برای بررسی میزان آلکالوئیدهای تروپان، گیاهان در مراحل مختلف رشد رویشی، گلدهی و میوه‌دهی از دو منطقه در آذربایجان جمع‌آوری و پس از استخراج آلکالوئیدهای بخشهای مختلف آنها به طور جداگانه، میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC) مورد سنجش قرار گرفت. همچنین در هر دو منطقه تاثیر عوامل محیطی روی میزان آلکالوئیدهای تروپان بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان دادند که میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در مراحل مختلف رشد و در بخش‌های مختلف گیاه تفاوت دارند. بیشترین میزان آلکالوئید هیوسیامین در هر دو منطقه در برگهای این گیاه درمرحله گلدهی و کمترین میزان در ساقه آن در مرحله رویشی دیده شد. آلکالوئید غالب در بخشهای گوناگون این گیاه در مراحل مختلف رشد، به استثنای بذرها، هیوسیامین است. به علاوه، نتایج حاصل از اندازه گیری میزان آلکالوئیدها نشان داد که میزان این دو آلکالوئید در گیاهان منطقه مرند در همه مراحل رشد بالاتر از میزان آنها درگیاهان منطقه تبریز بود. نتایج حاصل از بررسی تاثیر عوامل محیطی روی میزان آلکالوئیدها نشان داد که برخی عوامل محیطی روی میزان تولید آلکالوئیدهای تروپان در این گیاه تاثیر می‌گذارند. برای مثال، با افزایش ارتفاع منطقه و میزان نیتروژن و فسفر خاک میزان آلکالوئیدها افزایش می‌یابند. در حالی که، برعکس، کاهش پتاسیم خاک باعث افزایش میزان آلکالوئیدهای تروپان می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Hyoscyamus pusillus* L.، آلکالوئیدهای تروپان، هیوسیامین، اسکوپولامین.

مقدمه

گیاهان دارویی منابعی غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند. در میان متابولیت‌های ثانویه گیاهان، آلکالوئیدها گروه مهمی را تشکیل می‌ددهند. گروهی از آلکالوئیدها به نام آلکالوئیدهای تروپان به طور عمده در گیاهان تیره سیب زمینی یافت می‌شوند (Cordell, 1981). در این تیره، گونه‌های جنس هیوسیاموس دارای ارزش دارویی و تجارتی ویژه‌ای می‌باشند و اثرات دارویی آنها از زمانهای بسیار قدیم شناخته شده است (Cherallier & Kindersley, 1996). آلکالوئیدهای تروپان شامل داروهای مهارکننده اعصاب پاراسمپاتیک هیوسیامین و اسکوپولامین می‌باشند (Kutchan, 1995). این فراورده‌های مورد علاقه صنعتی و دارویی به طور گسترده‌ای در پزشکی، برای مثال در چشم پزشکی، در درمان انقباض معدی و روده ای، در درمان مسمومیت با مواد آلی فسفات دار، به عنوان سد کننده‌های سیستم عصبی پاراسمپاتیک، مانند آرام کننده و آنتی اسپاسمودیک و در بیهوشی استفاده می‌شوند (Kitamura *et al.*, 1992).

در سالهای اخیر توجه زیادی به امکان افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی معطوف شده است و رویکردهای گوناگونی برای افزایش میزان تولید آنها به وسیله تحقیقات فراوان آزموده شده است. به علاوه، در سالهای اخیر علاقه فزاینده‌ای برای مطالعه کشت اندام ریشه برای تولید آلکالوئیدهای تروپان وجود داشته است. اگر چه، کاوش درباره تولید این آلکالوئیدهای مفید توسط کشت سلولهای گیاهی به مدت بیش از ۳۰ سال انجام

شده است ودر سالهای اخیر کشت اندام تمایز یافته به پیشرفت‌های قابل توجهی در تولید در شیشه متابولیت‌های ثانویه گیاهی منتهی شده است، با این حال آلکالوئیدهای تروپان هنوز هم به طور تجارتی از گیاهان دارویی استخراج می‌شوند و تا امروز گیاهان به عنوان تنها منبع آلکالوئیدهای تروپان باقی مانده‌اند (Cherallier & Kindersley, 1997).

تائید تفاوتهای کمی مشخص درون یک جنس به روشنی می‌تواند نشان دهد که خزانه اختلافهای ژنتیکی بزرگی در میان گونه‌های جنس هیوسیاموس وجود دارد که می‌تواند در تولید آلکالوئیدهای تروپان بکار گرفته شود. این تفاوت تا اندازه‌ای بازتاب اثرات انتقال و ذخیره و نیز توانایی بیوسنتزی گیاهان می‌باشد. در گیاهان تیره سیب زمینی، آلکالوئیدهای تروپان در ریشه ساخته می‌شوند و از آنجا مقادیر زیادی، گاهی با تغییر همزمان، ممکن است به بخشهای هوایی منتقل شوند. بنابراین برآورد توان بیوسنتزی گیاه بدون تحلیل گیاه کامل غیرممکن است.همچنین هدف دیگر بررسی وجود اختلاف در نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین است. هر دوی این آلکالوئیدها مورد علاقه تجارتی هستند و وجود این اختلاف نسبت می‌تواند مزیتی برای انتخاب گونه تولید کننده هیوسیامین یا اسکوپولامین به عنوان فرآورده اصلی باشد.

از طرف دیگراگر چه سنتز این مواد در اصل تحت کنترل فرایندهای ژنتیکی است، ولی به طور آشکار تحت تاثیر عوامل محیطی و تغییرات آنها قرار می‌گیرند. بنابراین از آنجایی که عوامل محیطی نقش عمده‌ای در فرآیند بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه دارند باید به بررسی تاثیر آنها روی این فرآورده‌ها پرداخت .

آلکالوئیدهای تروپان در همه بخشهای گیاهان حاوی آنها یافت می‌شوند و نسبت هریک از آنها در بین گونه‌ها، زمانهای مختلف سال، محل رویش و بخشها و اندام‌های مختلف یک گونه گیاهی متفاوت است (صمصام شریعت، ۱۳۷۱).

H. pusillus (بنگ دانه کوتاه)، گیاهی یک‌ساله و خاص تپه‌های شنی، مزارع و مناطق بایر است (خاتم ساز، ۱۳۷۷). در شکل ۱ تصویری از این گیاه دیده‌می شود.

Klan در سال ۱۹۳۱ اعلام کرد که میزان آلکالوئیدهای تروپان در اندام‌های گیاه *H. niger L.* با رشد آن کاهش می‌یابد. Romeike در سال ۱۹۶۰ با تحقیق درباره آلکالوئیدهای تروپان گونه‌های تاتوره (Datura) (Doerk–Schmitz, 1993) و بعد Hashimoto و همکاران در سال ۱۹۹۱ با تحقیق در مورد گونه‌های هیوسیاموس نشان دادند که ریشه‌ها جایگاه بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان هستند (Hashimoto *et al.*, 1991).به نظر Kitamura (۱۹۹۲) آلکالوئیدهای تروپان در ریشه‌ها بیوسنتز و بعد به بخشه‌ای هوایی توزیع می‌شوند. آنها سپس به ریشه‌ها جایی که تجزیه می‌شوند بر می‌گردند (Kitamura *et al.*, 1992). به نظر El Sheikh و همکاران (۱۹۸۲)، هیوسیامین آلکالوئید اصلی در همه بخشهای گیاه *H. muticus* است، در حالی که هیوسین در مقادیر کم به ویژه در ریشه‌ها وجود دارد(El Sheikh *et al.*, 1982). Oksman- Caldenty و همکاران در سال ۹۸۷ ، با تحقیق در مورد گیاه *H. muticus* اعلام کردند که بالاترین میزان اسکوپولامین در برگها درست پیش از گلدهی و بیشترین مقدار هیوسیامین در طی مرحله اوج گلدهی در برگها وجود دارند. نتایج آنها نشان دادند که مقادیر آلکالوئیدها در ساقه‌ها کمتر از ریشه‌ها یا برگها است(Oksman-Caldenty *et al.*, *1987*). بررسیهای Parr و همکاران،۱۹۹۰، درباره دمبرگهای *H. pusillus* نشان داد که میزان اسکوپولامین آنها بسیار کم است (Parr *et al.*, 1990).

Demeyer وDejaegere نیزدر سال ۱۹۹۲ اعلام کردند که به نظر می‌رسد که میزان اسکوپولامین در Datura stramonium توسط مرحله نموی گیاه تحت تاثیر

واقع می‌شود (Dejaegere & Demeyer, 1992). تحقیقات Doerk -Schmitz و همکاران (۱۹۹۳) درباره گیاه *H. albus* نشان می‌دهد که ریشه نه تنها جایگاه بیوسنتز آلکالوئیدها، بلکه جایگاه مهم ذخیره آنها است و در این گیاه اندام‌های سبز تنها یک نقش فرعی در ذخیره آلکالوئید بازی می‌کنند (Doerk–Schmitz *et al.*, 1993).

مواد و روشها

نمونه‌های گیاهی از بخشهای ریشه، ساقه، برگ و رئوس گلدار گیاه *Hyoscyamus pusillus L.* در سال ۱۳۸۳ از رویشگاههای طبیعی آنها، جنوب تبریز در ارتفاع ۱۳۰۰ متر، کوه میشوداغ (مرند) در ارتفاع ۱۹۰۰ متر، جمع آوری شدند. جمع‌آوری گیاهان در سه مرحله رویشی، گلدهی و میوه‌دهی انجام گرفت. قسمتهای مختلف گیاهان جمع‌آوری شده (ریشه، ساقه، برگ، رئوس گل دار و بذر) به طور جداگانه در ٤٥ درجه سانتیگراد خشک و آسیاب شده و پس از گذراندن از الک، پودر یکنواختی از نمونه‌ها تهیه شدو در تاریکی در ٤ درجه سانتیگراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند (Dejaegere & Demeyer, 1992).

برای اطمینان از وجود آلکالوئیدهای تروپان در بخشهای گوناگون گیاهان نمونه‌برداری شده از روش Cain استفاده شد(Maldoni, 1991) برای استخراج آلکالوئیدها ماده گیاهی خشک پودر شده (۰/۵ g) با ml ۱۵ اسیدسولفوریک ۰/۲ M تکان داده شد و به مدت یک ساعت به حال خود رها شد. پس از گذراندن از صافی محلول با افزایش یک میلی لیتر محلول NH_3 غلیظ قلیایی و در ml ۱۵ اتر استخراج شد. هر مرحله برای اطمینان از استخراج کامل دو بار تکرار شد.

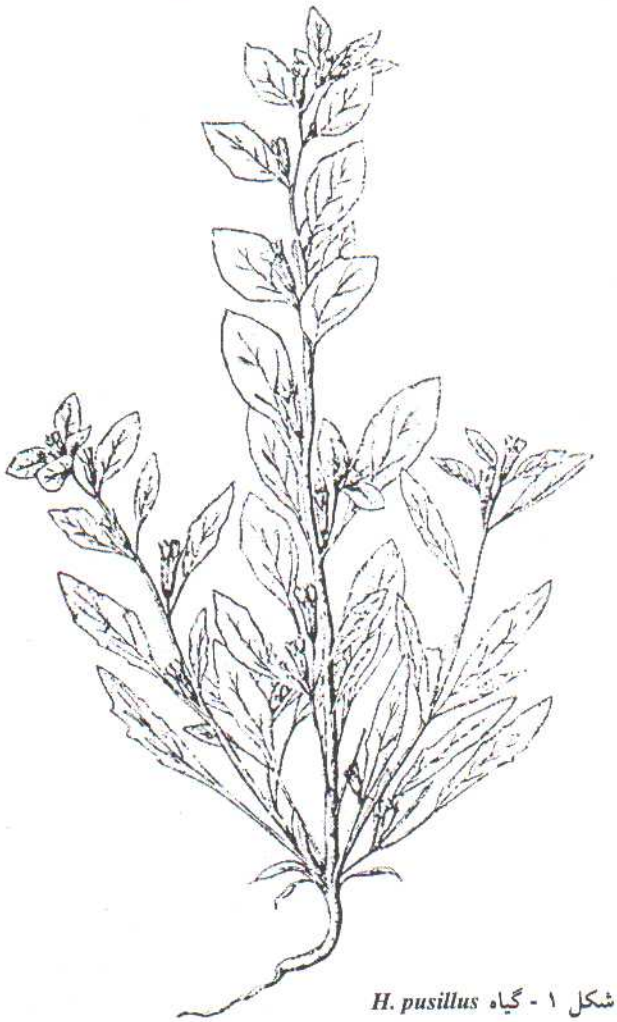
عصاره‌های اتری تبخیر و باقیمانده برای بررسی بعدی استفاده شد(Harborne, 1991). شناسایی آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در عصاره‌های اتانولی اندام‌های گیاهی با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. فاز ثابت سیلیکاژل، ۲۰×۲۰cm و فاز متحرک کلروفرم: اتانول: NH_4 ۲۸٪ (۱: ١٤: ٨٥) بود (Kitamura *et al*، ۱۹۹۲). برای آشکار سازی موقعیت آلکالوئیدها از معرف دراژندروف (Dragendroff) استفاده شد (Kitamura *et al.*, 1992). برای سنجش میزان آلکالوئیدها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. در این روش از فاز ثابت ستون C_{18} با ردیاب در ۲۱۰ nm و فاز متحرک دی اکسان ۲٪ در بافر فسفات (pH=۲/٦) – متانول (۵ : ۹۵) و میزان جریان استفاده شد. سیستم با هیوسیامین (Rt=١٦/٣ min) و اسکوپولامین (Rt=۱۲/۵ min) استاندارد در گسترده غلظت ۵۰-۵ تنظیم شد. شکل ۲ کروماتوگرام حاصل ازHPLC محلول استاندارد هیوسیامین و اسکوپولامین و شکل ۳ کروماتوگرام حاصل از یک نمونه عصاره آلکالوئیدی برگ را نشان می‌دهند.

نتایج

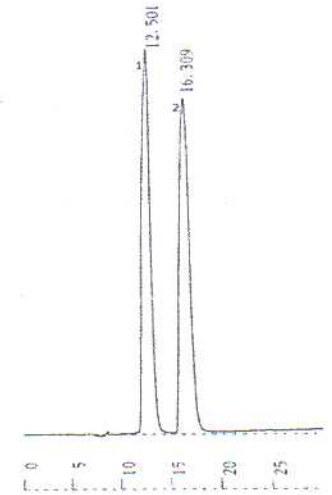
نتایج حاصل از بررسی میزان هیوسیامین و اسکوپولامین با محاسبه سطح زیر منحنی‌های HPLC و مقایسه آنها با منحنی‌های استاندارد با میانگین ۳ تکرار برای هر نمونه بدست آمد. نتایج حاصل از آنالیز عصاره‌های تهیه شده از اندام‌های گوناگون گیاهی در مراحل مختلف رشد نشان داد که:

هیوسیامین آلکالوئید اصلی در همه بخشهای گیاهان در مراحل مختلف رشد است، به استثنای بذرها که در آنها اسکوپولامین غالب می‌باشد(جداول ۱ و ۲) . به علاوه، نتایج بدست آمده از بررسی میزان آلکالوئیدهای تروپان در مراحل مختلف رشد نشان دادند که مرحله رشد و نمو گیاه نقش مهمی در میزان آلکالوئیدهای تروپان دارد، به طوری که میزان این آلکالوئیدها در مرحله گلدهی در اندام‌های مختلف گیاهی به بیشینه مقدار خود می‌رسد (جداول ۱ و۲). نتایج همچنین نشان می‌دهند که در مرحله گلدهی مقادیر اسکوپولامین گیاه افزایش و نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین (هیوسین) در اندام‌های گیاهی

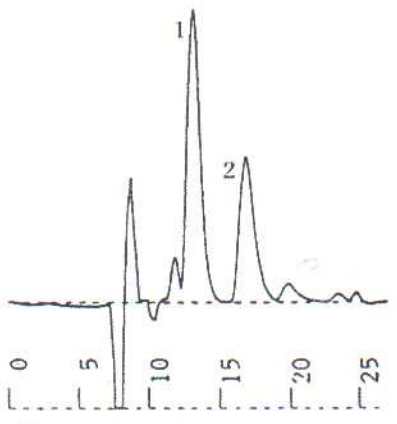
مختلف کاهش می‌یابد (جداول ۱ و۲). به علاوه نتایج نشان می‌دهند که ترکیب آلکالوئیدهای ریشه‌های این گیاهان پیچیده تر از بخش هوایی است. نتایج این بررسی نشان می‌دهند که مقادیر هیوسیامین و اسکوپولامین در اندام‌های مختلف این گیاه تفاوت دارند (جداول ۱ و۲). بالاترین میزان هیوسیامین به ترتیب در برگها، رئوس گل دار، ریشه‌ها، بذرها و ساقه‌ها و بالاترین مقادیر اسکوپولامین به ترتیب در بذرها، برگها، رئوس گل دار، ریشه‌ها، ساقه‌ها دیده شد. با بررسی نمونه‌های گیاهی در مراحل رشدی مختلف معلوم شد که آلکالوئیدهای تروپان در همه بخشهای گیاه در هر مرحله رشدی وجود دارند.



شکل ۱ - گیاه *H. pusillus*



شکل ۲-کروماتوگرام حاصل از HPLC محلول استاندارد اسکوپولامین(1) و هیوسیامین (2)



شکل ۳-کروماتوگرام حاصل از تزریق یک نمونه عصارهٔ آلکالوئیدی برگ گیاه: اسکوپولامین (1) و هیوسیامین (2)

همچنین نتایج نشان داد که در اندام‌های رویشی گیاهان اسکوپولامین همیشه در مقادیر کمتر وجود دارد و با افزایش میزان هیوسیامین میزان اسکوپولامین نیز افزایش می‌یابد (جداول ۱ و ۲). با این حال در مورد نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در اندام‌های مختلف گیاهان این دو منطقه نتایج متضادی دیده شد (جداول ۱و۲)، در حالی که در مرحله رویش این نسبت در اندام‌های مختلف

در هر دو منطقه تفاوتی نداشت، در دو مرحله دیگر، به استثنای بذر، تغییرات متضادی در این نسبت دیده شد.

بحث

این نتیجه که مقدار هیوسیامین نسبت به اسکوپولامین در اندام‌های این گیاه به استثنای بذر بیشتر است با نتایج حاصل از مطالعات Shimomura و همکاران (۱۹۹۱) در مورد گیاهان *H. niger* و *H. muticus* ناسازگار است. طبق نتایج آنها مقدار اسکوپولامین در این گیاهان نسبت به هیوسیامین بیشتر می‌باشد (Supria, 1998). اگرچه، نتیجه بدست آمده در این تحقیق با نتایج El Sheikh و همکاران (۱۹۸۲) که معتقدند هیوسیامین آلکالوئید اصلی در همه بخشهای گیاه*H. muticus* است و اسکوپولامین (هیوسین) در مقادیر کم به ویژه در ریشه‌ها وجود دارد (El Sheikh *et al.*, 1982)، تا حدودی همسو است. همچنین نتایج تحقیقات Klan (۱۹۳۱) درباره گیاهان *H. niger* یک ساله و دو ساله نشان می‌دهند که اسکوپولامین همیشه در مقدار کمتر وجود دارد و افزایش میزان هیوسیامین مقدار اسکوپولامین را نیز افزایش می‌دهد (Klan, 1931).

جدول ۱- مقادیر هیوسیامین، اسکوپولامین و نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در گیاه *Hyoscyamus pusillus* در منطقه مرند (بر حسب درصد وزن خشک .D.W/)

نسبت بین هیوسیامین و اسکوپولامین	اسکوپولامین	هیوسیامین	اندام گیاهی	مرحله برداشت
۱/۸۱۶ ± ۰/۰۸۳۸	۰/۰۶۱۶ ± ۰/۰۰۳۸۲	۰/۱۱۱۲ ± ۰/۰۰۱۷۴	ریشه	مرحله رویشی
۱/۵۶۱ ± ۰/۱۱۲۴	۰/۰۲۰۰ ± ۰/۰۰۲۰۰	۰/۰۳۰۸ ± ۰/۰۰۱۰۶	ساقه	
۱/۶۹۰ ± ۰/۰۱۵۳	۰/۰۹۳۳ ± ۰/۰۰۳۳۷	۰/۱۵۷۷ ± ۰/۰۰۶۰۷	برگ	
۱/۶۰۵ ± ۰/۰۵۰۲	۰/۱۰۰۳ ± ۰/۰۰۵۳۸	۰/۱۶۰۵ ± ۰/۰۰۴۷۴	ریشه	مرحله گلدهی
۱/۴۳۳ ± ۰/۱۰۸۲	۰/۰۳۶۳ ± ۰/۰۰۳۷۳	۰/۰۵۱۲ ± ۰/۰۰۱۶۰	ساقه	
۱/۵۹۵ ± ۰/۰۴۱۴	۰/۱۲۶۵ ± ۰/۰۰۲۰۳	۰/۲۰۲۱ ± ۰/۰۰۸۲۶	برگ	
۱/۸۱۸ ± ۰/۰۱۶۶	۰/۱۰۳۱ ± ۰/۰۰۲۶۰	۰/۱۸۷۶ ± ۰/۰۰۶۳۱	رئوس گل‌دار	مرحله میوه‌دهی
۱/۹۱۳ ± ۰/۰۵۰۷	۰/۰۷۲۸ ± ۰/۰۰۲۷۱	۰/۱۳۹۱ ± ۰/۰۰۳۹۰	ریشه	
۱/۷۹۱ ± ۰/۰۶۲۳	۰/۰۲۲۵ ± ۰/۰۰۲۲۹	۰/۰۴۰۳ ± ۰/۰۰۴۱۸	ساقه	
۱/۷۰۴ ± ۰/۰۷۱۶	۰/۱۰۹۹ ± ۰/۰۰۷۸۶	۰/۱۸۶۱ ± ۰/۰۰۶۱۵	برگ	
۰/۷۱۵۲ ± ۰/۰۰۶۷۳	۰/۱۵۹۵ ± ۰/۰۰۷۴۷	۰/۱۱۴۰ ± ۰/۰۰۴۵۸	بذر	

جدول ۲- مقادیر هیوسیامین، اسکوپولامین و نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در گیاه *Hyoscyamus pusillus* در منطقه تبریز(بر حسب درصد وزن خشک .D.W/)

نسبت بین هیوسیامین و اسکوپولامین	اسکوپولامین	هیوسیامین	اندام گیاهی	مرحله برداشت
۱/۷۹۷ ± ۰/۰۲۰۹	۰/۰۳۶۸ ± ۰/۰۰۰۹۲	۰/۰۶۶۱ ± ۰/۰۰۲۱۸	ریشه	مرحله رویشی
۱/۵۱۱ ± ۰/۱۰۶۰	۰/۰۰۹۹ ± ۰/۰۰۱۱۶	۰/۰۱۴۷ ± ۰/۰۰۰۷۱	ساقه	
۱/۶۴۹ ± ۰/۰۸۵۴	۰/۰۶۸۹ ± ۰/۰۰۴۳۲	۰/۱۱۲۹ ± ۰/۰۰۱۶۰	برگ	
۱/۶۷۲ ± ۰/۰۹۲۵	۰/۰۶۳۸ ± ۰/۰۰۶۰۶	۰/۱۰۵۶ ± ۰/۰۰۴۷۹	ریشه	مرحله گل دهی
۱/۲۹۴ ± ۰/۰۷۸۷	۰/۰۲۱۳ ± ۰/۰۰۱۶۷	۰/۰۲۷۳ ± ۰/۰۰۰۷۹	ساقه	
۱/۴۲۳ ± ۰/۰۴۳۷	۰/۱۰۴۸ ± ۰/۰۰۴۹۲	۰/۱۴۴۸ ± ۰/۰۰۳۶۰	برگ	
۱/۴۶۱ ± ۰/۰۵۱۲	۰/۰۸۴۰ ± ۰/۰۰۵۴۰	۰/۱۲۲۱ ± ۰/۰۰۳۳۶	رئوس گل‌دار	
۱/۷۰۷ ± ۰/۰۶۳۳	۰/۰۵۰۷ ± ۰/۰۰۱۴۵	۰/۰۸۶۷ ± ۰/۰۵۶۱	ریشه	مرحله میوه‌دهی
۲/۰۶۹ ± ۰/۲۳۱۸	۰/۰۰۹۳ ± ۰/۰۰۱۴۲	۰/۰۱۸۷ ± ۰/۰۰۰۸۴	ساقه	
۱/۹۲۰ ± ۰/۱۲۷۷	۰/۰۶۱۶ ± ۰/۰۰۲۲۹	۰/۱۱۷۷ ± ۰/۰۰۳۳۰	برگ	
۰/۷۴۷۹ ± ۰/۰۴۱۰	۰/۱۲۱۸ ± ۰/۰۰۴۵۹	۰/۰۹۱۴ ± ۰/۰۰۸۲۳	بذر	

نتایج مشابهی با این یافته که میزان هیوسیامین و اسکوپولامین در مرحله گلدهی به بیشینه مقدار خود می‌رسد توسط Oksman-Caldenty و همکاران (۱۹۸۷)، با تحقیق درمورد گیاه *H. muticus* گزارش شده است. این محققان بالاترین میزان اسکوپولامین را در برگها، درست پیش از گلدهی و بیشترین مقدار هیوسیامین را در طی مرحله اوج گلدهی در برگها گزارش کردند. نتایج Klan (۱۹۳۱)، نیز در تطابق با این یافته‌ها است. کارهای او نشان داد که بالاترین محتوای آلکالوئیدی در گیاهان *H. niger* در هنگام گلدهی وجود دارد (Klan, 1931).

کاهش نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در مرحله گلدهی ممکن است نتیجه نمو گل (به سبب مرحله نموی گیاهان) روی فعالیت آنزیم‌های مسئول در تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین باشد. به علاوه، هنگامی که گیاهان بالغ می‌شوند نیتروژن نسبتاً بیشتری وارد ساختار هیوسیامین و در نتیجه اسکوپولامین می‌شود. زیرا گیاهان جوان تر بخش بزرگتری از اسید آمینه‌هایشان را برای متابولیسم اولیه بکار می‌برند، در حالی که گیاهان بالغ تر می‌توانند متابولیسم ثانویه را بهتر حمایت کنند. کاهش مشاهده شده در میزان هیوسیامین و اسکوپولامین کل در اندام‌های گیاهی در مرحله میوه‌دهی احتمالاً به سبب انباشته شدن آلکالوئیدها در بذرها در طی این دوره است. این یافته با نتایج بدست آمده از تحقیقات Demeyer و Dejaegere (۱۹۹۲)، در مورد گیاه *D. stramonium* که نشان دادند که تقریباً معادل میزان کل آلکالوئیدهایی که از بخشهای رویشی ناپدیدمی شوند در بذرها یافت می‌شود (Dejaegere & Demeyer, 1992)، همسو است. این یافته با نتایج Klan در سال ۱۹۳۱ که اعلام کرد میزان آلکالوئیدهای تروپان به موازات رشد گیاه *H. niger* در اندام‌هایش کاهش می‌یابد، ناسازگار است همچنین گزارش Kitamura و همکاران در سال ۱۹۹۲ که در زمینه تحقیقات انجام شده در مورد مقادیر آلکالوئیدهای تروپان در گیاهان مختلف می‌باشد، نشان می‌دهد که میزان هیوسیامین ریشه گیاه *H. niger* با رشد گیاه کاهش می‌یابد، به طوری که بالاترین میزان در مرحله رویشی و بعد گلدهی و میوه‌دهی وجود دارد، در حالی که مقادیر این آلکالوئید در برگ و ساقه در مراحل مختلف رشد بدون تغییر باقی می‌ماند. همچنین مقادیر اسکوپولامین ریشه در مراحل رویشی و گلدهی تغییر نمی‌کند، در حالی که مقدار این آلکالوئید در مرحله میوه دهی، کاهش می‌یابد. در مورد مقادیر اسکوپولامین ساقه و برگ نیز این مساله دیده می‌شود (Kitamura *et al.*, 1992). این نتایج با یافته‌های ما سازگار نمی‌باشند. پیچیده تر بودن ترکیب آلکالوئیدهای ریشه نسبت به بخش هوایی با این موضوع که ریشه جایگاه بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان است قابل توضیح است. امروزه پذیرفته شده است که آلکالوئیدهای تروپان در سلولهای ریشه ساخته شده و به بخشهای هوایی گیاه منتقل می‌شوند. نتایج تحقیقات Doerk-Schmitz و همکاران (۱۹۹۳)، در مورد گیاه *H. albus* نیز نشان داد که ریشه‌ها به عنوان جایگاه بیوسنتز آلکالوئیدها، طیف آلکالوئیدی غنی نشان می‌دهند، در حالی که ترکیب آلکالوئیدهای بخشهای هوایی کمتر پیچیده تر است. همچنین این نتایج با نتایج بدست آمده برای Atropa belladonna، D. innoxia و Duboisia myoporoides منطبق است (Doerk- Schmitz *et al.*, 1993).

در مورد مقادیر هیوسیامین و اسکوپولامین و در بخشهای مختلف گیاهان تولید کننده آلکالوئیدها یتروپان گزارشهای متضادی وجود دارند. نتایج آزمایشهای Klan (۱۹۳۱) در مورد گیاهان *H. niger* یک ساله و دو ساله نشان می‌دهند که رئوس فاقد گل از نظر آلکالوئیدها فقیرتر از رئوس گل دار می‌باشند و برگها نیز از نظر آلکالوئیدها نسبت به رئوس گل‌دار فقیرتر هستند. نتایج او ترتیب محتوای آلکالوئیدی اندامهای مختلف گیاه را به ترتیب در ریشه‌ها، رئوس گل دار، میوه‌ها، برگها و سا قه نشان می‌دهد (Klan, 1931). نتایج Oksman- Caldenty و همکاران (۱۹۸۷)، در مورد گیاه *H. muticus* نیز نشان

داد که مقادیر آلکالوئیدها در ساقه‌ها کمتر از ریشه‌ها و برگها می‌باشد. نتایج Parr و همکاران (۱۹۹۰)، با مطالعه در مورد گیاه *H. pusillus* و نتایج Doerk-Schmitz و همکاران (۱۹۹۳)، با مطالعه در مورد گیاه *H. albus* نشان می‌دهد که در جنس هیوسیاموس اندام‌های سبز تنها نقش کوچکی در ذخیره آلکالوئیدها بازی می‌کنند.

بررسیهای کمی Doerk-Schmitz و همکاران (۱۹۹۳) معلوم کرد که در گیاهان *H. albus* ریشه نه تنها جایگاه بیوسنتز آلکالوئید، بلکه جایگاه مهم ذخیره نیز هست. مقادیر محاسبه شده بر اساس وزن خشک ریشه‌ها نسبت به اندام‌های دیگر خیلی بالاتر است. به علاوه، کاهش مقادیر آلکالوئید به ترتیب در برگها، ریشه‌ها، بذرها و ساقه‌ها گزارش شده است. تحقیقات نشان می‌دهند که میزان آلکالوئید در گذر از ریشه‌ها از طریق برگها به بذرها افزایش می‌یابد (Supria, 1998). تحقیقات انجام شده دیگر در مورد گیاهان *H. niger* نشان می‌دهند که مقدار کل آلکالوئیدها در بذرها برابر برگها می‌باشد (امید بیگی، ۱۳۷۶ ؛ زرگری، ۱۳۶۸).

Klan در سال ۱۹۳۱ با مطالعه محتوای آلکالوئیدی ریشه‌ها و برگهای گیاهان *H. niger* بین میزان هیوسیامین و اسکوپولامین ارتباطی را کشف کرد. نتایج او نیز مانند یافته‌های ما نشان می‌دهد که با افزایش میزان آلکالوئیدهای کل و میزان هیوسیامین میزان اسکوپولامین نیز افزایش می‌یابد (Klan, 1931). بالاترین میزان نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در ساقه در مرحله میوه‌دهی دیده می‌شود، با این حال، به علت کم بودن میزان هیوسیامین در ساقه استفاده از این اندام به عنوان منبع هیوسیامین مناسب به نظر نمی‌رسد.کمترین مقدار هیوسیامین به اسکوپولامین نیز در بذرها وجود دارد.

نتایج کارهای Kitamura و همکاران (۱۹۹۲) نیز در تطابق با یافته‌های ما می‌باشد که آلکالوئیدهای تروپان در مراحل نموی مختلف در هر بخش گیاهان تولید کننده آلکالوئیدهای تروپان وجود دارند.

بررسیهای بوم شناختی نشان دادند که میانگین سالانه حداقل و حداکثر درجه حرارت و میانگین بارندگی سالانه و میانگین رطوبت نسبی در هر دو منطقه تقریباً برابر می‌باشند. بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت که تاثیر عوامل آب و هوایی در تفاوت مشاهده شده بین مقادیر آلکالوئیدها درگیاهان این دو منطقه ناچیز می‌باشد و این تفاوت‌ها به طور عمده به ارتفاع و عوامل خاکی بستگی دارند. این دو منطقه از نظر ارتفاع و میزان عناصر غذایی خاک از جمله نیتروژن، فسفر و پتاسیم تفاوت دارند.

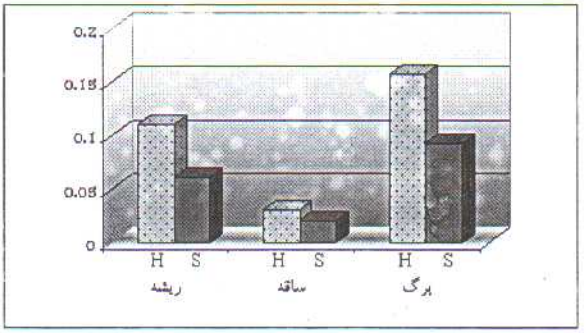
نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم خاک منطقه مرند به ترتیب ۰/۰۵ درصد، ۱۵/۱ ppm و۱۳۱ ppm، در حالی که در منطقه تبریز ۰/۰۲ درصد و ۷/۸ ppm , ۳۰۰ ppm می‌باشد. بنابراین با توجه به این که گیاهان جمع آوری شده در منطقه مرند نسبت به منطقه تبریز دارای هیوسیامین و اسکوپولامین بیشتری می‌باشند و گونه گیاهان جمع آوری شده نیز یکسان می‌باشد به نظر می‌رسد که بعضی از شرایط محیطی خاص منطقه مرند مانند ارتفاع، نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم خاک موجب افزایش بیوسنتز این متابولیت‌ها می‌شود. این نظریه در کل پذیرفته شده که غلظت آلکالوئیدهای تروپان در گیاهان با کاهش میزان پتاسیم افزایش می‌یابد. برای مثال، نتایج تحقیقات Bashir Khan & Harborne (۱۹۹۱)، بر روی گیاه *Atropa acuminata* نشان داد که کمبود پتاسیم سنتز آلکالوئیدها را افزایش می‌دهد، در حالی که کاهش آن به افزایش درصد آلکالوئیدها منجر می‌شود. افزایش آلکالوئید تولید شده در گیاه در هنگام کمبود پتاسیم نشان می‌دهد که کمبود یون پتاسیم عرضه پیش ساز آلکالوئید را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آرژینین دکربوکسیلاز وارنیتین دکربوکسیلاز که مسئول تولید پوترسین هستند، افزایش می‌دهد. یون پتاسیم به طور مستقیم فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها، از جمله آنزیم‌های مربوط به بیوسنتز آلکالوئیدها را با تاثیر روی کنفورماسیون پروتئین تنظیم می‌کند. همچنین نتایج بررسیهای El Sheikh و همکاران

(۱۹۸۲)، در مورد گیاه *H. muticus* نشان می‌دهد که افزایش فسفر به خاک میزان آلکالوئیدها را افزایش می‌دهد. نتایج El Sheikh و همکاران (۱۹۸۲)، Ahmed & Fahmi(۱۹۹٤) و Demeyer و Dejaegere (۱۹۹۲)، نیز نشان می‌دهند که با افزایش میزان نیتروژن میزان آلکالوئیدها افزایش می‌یابد.

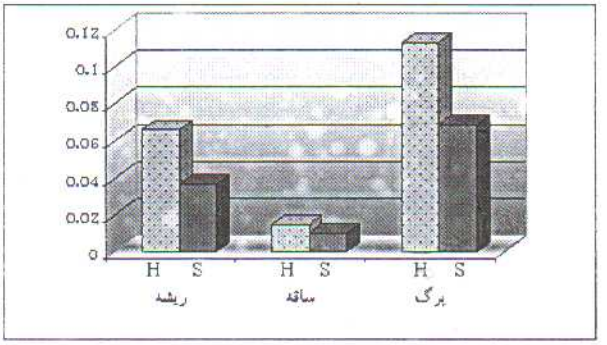
اگرچه این مساله به بررسیهای بیشتری نیاز دارد. طبق نظر Franz اطلاعات محدودی درباره تاثیر مواد معدنی بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. او ابراز می‌دارد که به دلیل نتایج ناسازگار موجود، نظرات کاملا متفاوتی درباره تاثیر عناصر غذایی بر متابولیسم ثانویه وجود دارد. با این حال، او نشان داد که عناصر غذایی به طور مستقیم بر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه موثر هستند، مانند تاثیر نیتروژن بر بیوسنتز آلکالوئیدها (Franz, 1983). Bernath (۱۹۸٦) نیز نشان داد که بین عناصر غذایی و فرآیندهای متابولیسمی که به تشکیل مواد ویژه منجر می‌شوند، ارتباط پیچیده‌ای وجود دارد (Bernath, 1986).

با توجه به این که گونه مورد بررسی و گونه‌های دیگر این جنس در نقاط مختلف ایران می‌رویند بنابراین بررسی گونه‌های مختلف این جنس از نظر میزان هیوسیامین و اسکوپولامین در بقیه نقاط کشور ضروری است.

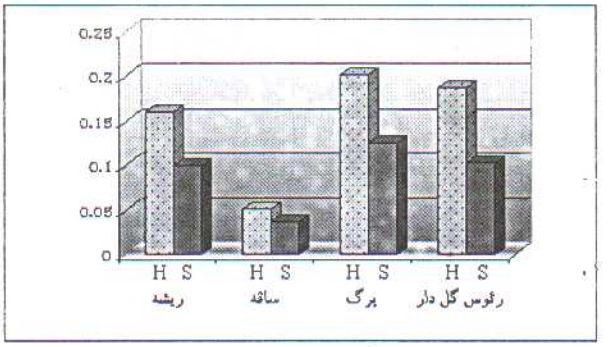
در صورت وجود اختلاف می‌توان از آن در بیوتکنولوژی استفاده کرد، چون این اختلاف تا اندازه‌ای ظرفیت بیوسنتزی ریشه‌های گیاه را منعکس می‌کند، گیاهان با تراز بالای هیوسیامین و اسکوپولامین داوطلب خوبی برای تولید کشت‌های ریشه تولید کننده مقادیر بالای این آلکالوئیدها خواهند بود. همچنین می‌توان در صورت وجود اختلاف در نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین در گونه‌های مختلف این جنس با توجه به این که هر دوی این آلکالوئیدها مصرف تجارتی دارند از آنها برای کشت‌های متفاوت تولید کننده هیوسیامین یا اسکوپولامین به عنوان فراورده اصلی استفاده کرد. یا در رویشگاههای طبیعی که از نظر اکولوژیک نقش مثبتی در افزایش میزان آلکالوئیدها دارند گونه‌های تولید کننده میزان بالای هیوسیامین و اسکوپولامین این جنس را با بکارگیری روشهای مناسب کاشت، داشت و برداشت، کشت داد.



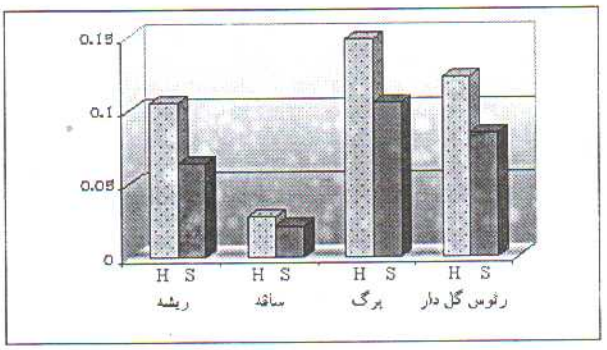
شکل ٤- مقایسه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در اندامهای مختلف گیاه *H. pusillus* در مرحلهٔ رویشی در منطقهٔ مرند



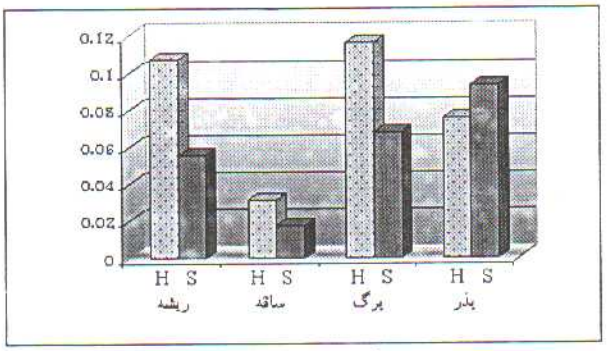
شکل ٥-مقایسه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در اندامهای مختلف گیاه *H. pusillus* در مرحلهٔ رویشی در منطقهٔ تبریز



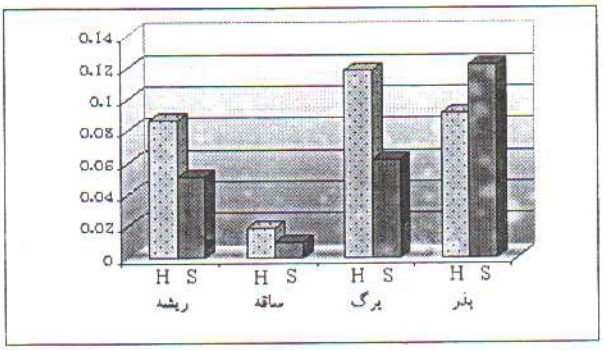
شکل ٦ - مقایسه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در اندامهای مختلف گیاه *H. pusillus* در مرحلهٔ گلدهی در منطقهٔ مرند



شکل ۷- مقایسه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در اندامهای مختلف گیاه *H. pusillus* در مرحلهٔ گلدهی در منطقهٔ تبریز



شکل ۸- مقایسه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در اندامهای مختلف گیاه *H. pusillus* در مرحلهٔ میوه‌دهی در منطقهٔ مرند



شکل ۹- مقایسه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در اندامهای مختلف گیاه *H. pusillus* در مرحلهٔ میوه‌دهی در منطقهٔ تبریز

منابع مورد استفاده

- امید بیگی، ر.، ۱۳۷٦. رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد دوم. انتشارات طراحان نشر، تهران، ۲۸۳ صفحه.
- خاتم ساز، م.، ۱۳۷۷ . فلور ایران، شماره ۲٤، تیره سیب زمینی. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ۱۱۲صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳٦۸. گیاهان دارویی. جلد سوم. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۹۲٦صفحه.
- صمصام شریعت، س. ه.، ۱۳۷۱. عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزش یابی آنها. انتشارات مانی، اصفهان، ٤۲۲ صفحه.
- Ahmed , Z. F. and Fahmy, I. R., 1994. The effect of environment on the growth and alkaloidal content of Hyoscyamus muticus L., Journal of the American Pharmaceutical Association, 484-487.
- Bashir Khan, M. and Harborne, J.B., 1991. Potassium deficiency increases tropane alkaloid synthesis in Atropa acuminata via argenine and ornithine decarboxylase levels, Phytochemistry, 30 (11): 3559-3563.
- Bernath, J., 1986. Production ecology of secondary plants products. In: herb, spice and medicinal plants. Oryx press, Arizona, Vol. 1.562 p.
- Chevallier, A. and Kindersley, D., 1996. The Encyclopedia of Medicinal Plants, 345 p.
- Cordell, G. A., 1981. Introduction to alkaloids, John Willey and sons, New york , 567 p.
- Doerk-Schmitz, K., Witte, L. and Alfermann, W., 1993. Tropane alkaloid patterns in plants and hairy roots of *Hyoscyamus albus*. Phytochemistry, 33 (4): 107-110.
- Demeyer, K. and Dejaegere, R., 1992. Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO^-_3, NH^+_4) on alkaloid production in *Datura stramonium* L., Plant and Soil, 147: 79 – 86.
- El Sheikh, M.O.A., El Hassan, G. M., Tayeb Abdel Hafeez, A.R., Abdalla, A.A. and Antoun, M.D., 1982. Studies on Sudanese medicinal plants III: indigenous Hyoscyamus muticus as commercial source hyoscyamine, Plant Medica, 45: 116-119.
- Franz, C., 1983. Nutrient and water management for medicinal and aromatic plants. Acta Horticulture, 132: 203-215.

- Oksman-Caldenty, K.M., Vrurela, H., Straub, A. and Hiltunen, R., 1987. Variation in the tropane alkaloid content of *Hyoscyamus muticus* plant and cell culture clones. Planta Medica, 53(4): 349-354.
- Parr, A.J., Payne, J., Eagles, J., Chapman, B.T., Robins, R.J. and Rhodes, M.J.C., 1990. Variation in tropane alkaloid accumulation within the Solanaceae and strategies for its exploitation. Phytochemistry, 29(8): 2545-2550.
- Sikuli, N.N. and Demeyer, K., 1997. Influence of the ion- composition of the medium on alkaloid production by "hairy roots" of *Datura stramonium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47: 261-267.
- Supria, K.B., 1998. Handbook of medicinal plants. Poiter publishers, India, 607 p.
- Woo, S.H., Park, T.M. and Yang, T. W., 1997. Induction of branch roots by cutting method in *Hyoscyamus niger* root culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48: 131-134.
- Hashimoto, T., Hagashi, A., Amono, Y., Kohono, J., Jwanari, H., Usada, S. and Yamada, Y., 1991. Hyoscyamine- 6-β-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis is localized at pericycle of root, The Journal of Biological Chemistry, 266(7): 4648-4653.
- Kitamura, Y., Sato, M. and Miura, H., 1992. Differences of atropine esterase activity between intact roots and cultured roots of various tropane-alkaloid producing plants. Phytochemistry, 31(4):1191-1194.
- Klan, Z.F., 1931. Influence of period of vegetation and development of plant on the alkaloidal content of *Hyoscyamus niger* L. American Pharmaceutical Association, XX (11): 1163- 1174.
- Kutchan, T.M., 1995. Alkaloid biosynthesis- The basis for metabolic engineering of medicinal plants. The Plant Cell, 7: 1059-1070.
- Maldoni, B., 1991. Alkaloids: isolation and purification. Journal of Chemical Education, 68(8): 700-703.

Extraction and Determination of Tropan Alkaloids, Hyoscyamine and Scopolamine, from Different Parts of *Hyoscyamus pusillus L.* in Different Stages of Plant Growth

K. Dialmaghani[1], R. Kharvari-Nejad[1], H. Fahimi[1] and H. Hekmat- shoar[2]

1- Islamic Azad University, Science and Researches Branch, e-mail: kamaldilmaghani@yahoo.co.in
2- Hekmat- shoar H. Tabriz University

Abstract

Hyoscyamus pusillus from Solanaceae family is a medicinal plant producing tropane alkaloids. For investigation of tropane alkaloids levels in *H. pusillus*, plant materials were collected during three different growth stages, vegetative stage, flowering stage and fruiting stage, from two regions of Azarbayjan, Marand and Tabriz. After extraction and purification of alkaloids from different parts of plants (root, stem, leaves, flowering tops and seeds), were assayed by HPLC. Furthermore, in two regions effects of environmental factors upon tropane alkaloid levels were investigated. The results showed that hyoscyamine and scopolamine content varied in three stages and in different parts of plants. The highest level of hyoscyamine in two regions was observed in leaves at flowering stage, whereas there was lowest level in stems at vegetative stage. Hyoscyamine was dominant alkaloid, with except of seeds, in all organs. Furthermore, the results showed that hyoscyamine and scopolamine content of plants in Marand region at all growth stages was higher than that of plants in Tabriz region. The results of investigation of effects environmental factors on alkaloid levels showed that some of this factors influenced production of tropane alkaloids. For example, as altitude up, alkaloid levels are raised. Furthermore, increased nitrogen and phosphorus concentrations in soil caused increasing alkaloid levels in plants. Whereas, in contrast, reduced potassium in soil caused increasing alkaloid levels. As plant grows alkaloid levels increase. This can be results from it when plant mature, high nitrogen enters hyoscyamine (and as a result scopolamine) structure.

Key words: *Hyoscyamus pusillus*, tropane alkaloids, hyoscyamine, scopolamine.