



فصل نامه‌ی داروهای گیاهی

journal homepage: www.journal.iaushk.ac.ir



تعیین مقدار آلکالوئیدهای مختلف گونه *Papaver bracteatum* Lindl. جمع آوری شده از نقاط مختلف ایران به روش HPLC

زهره کدخدا^{۱*}، سجاد صداقت^۱، شمس علی رضازاده^۲، حسن علی نقدی بادی^۲، رحیم تقی زاد فرید^۱، فرهاد حریری اکبری^۳

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: (Email: zkadkhoda@yahoo.com)

۲. پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

شناسه مقاله

چکیده

مقدمه و هدف: گیاه خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) از خانواده پاپوراسه و یکی از گیاهان دارویی مهم می باشد که شامل ایزوکینولین آلکالوئیدها است. ایزوکینولین آلکالوئیدها یک گروه مشخص از متابولیت‌های ثانویه تیره پاپوراسه هستند. از جمله آلکالوئیدهای گیاه خشخاش ایرانی کدیین و تباین می باشد که به صورت وسیعی به سبب خواص دارویی مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین تعیین مقدار این آلکالوئیدها در گیاهان مناطق مختلف ایران ضروری است. به منظور تعیین بهترین روشگاه طبیعی گونه مذکور که بیشترین غلظت کدیین و تباین را تولید نماید، نمونه گیاه از نقاط مختلف روشگاهی آن جمع آوری گردید.
روش تحقیق: با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) منحنی استاندارد با حضور دو آلکالوئید فوق (کدیین و تباین) ترسیم گردید و استخراج آلکالوئیدی از نمونه ها انجام و توسط دستگاه HPLC تعیین مقدار گردید.

نتایج و بحث: مقدار درصد کدیین در کپسول خشک در منطقه زنجان، پلور، جاده چالوس، سیاه بیشه و مازندران به ترتیب ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۴ و مقدار درصد تباین به ترتیب ۰/۰۰۶، ۰/۰۰۳، ۰/۰۳۴، ۰/۰۶۱ و ۰/۰۳۳ درصد است. غلظت نقاط مختلف برای کدیین از ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۰۴ و برای تباین از ۰/۰۰۶ تا ۰/۰۳۳ درصد متغیر بود. گیاه جمع آوری شده در منطقه زنجان بالاترین درصد کدیین و تباین را داراست (۳/۳۴ درصد).
توصیه کاربردی/صنعتی: کپسول جمعیت های خشخاش متعلق به منطقه زنجان ایران دارای مقادیر بیشتری تباین و کدیین می باشد که دارای کاربردهای دارویی فراوانی هستند؛ بنابراین جمعیت جمع آوری شده از زنجان با هدف استخراج کدیین و تباین مورد مصرف صنایع دارویی توصیه می شود.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۵/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۲۰
نوع مقاله: پژوهشی
موضوع: فیتوشیمی

کلید واژگان:

- ✓ خشخاش ایرانی
- ✓ آلکالوئید
- ✓ کدیین
- ✓ تباین

۱. مقدمه

اگرچه علاقه‌مندی و توجه به این گیاهان مفید در سال‌های گذشته ناچیز بود ولی خوش‌بختانه اخیراً مورد توجه و عنایت بیشتری قرار گرفته است. گیاهان مواد شیمیایی مختلفی را در دیواره سلولی خود جمع می کنند که این مواد را می توان به دو دسته کلی تقسیم بندی

گیاهان دارویی در طول تاریخ همیشه با انسان قرابت خاصی داشته‌اند و آثار دارویی و موارد استفاده آن بر هیچ‌کس پوشیده نیست.

که در این روش مقدار مصرف نمونه بسیار کم می‌باشد (۲۵ میلی‌گرم) که دیگر نیاز به صرف وقت زیاد برای تیمار کردن نمونه‌ها نبود (Schulz et al., 2004).

در تحقیق دیگری، پنج آلکالوئید در ریشه و کپسول سه گونه *Papaver bracteatum*, *P. oriental* and *P. psodo* (Oxytone) را با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا مورد تجزیه قرار دادند که درصد تبیین کپسول براکتته توم را ۲/۱۵ گزارش نمودند نمونه های جمع آوری شده از ایران بود (Milo et al., 1988). با توجه با این‌که بیشتر بررسی های انجام شده بر روی گونه های دیگر پاپاور بوده است. لذا هدف از این بررسی اندازه گیری کدیین و تبیین از کپسول گونه خشخاش ایرانی یا شقایق کبیر (*Papaver bracteatum* Lindl.) جمع آوری شده از چند منطقه مختلف به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بوده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جمع آوری و شناسایی گیاه

نمونه‌های گیاهی خشخاش ایرانی از پنج منطقه مختلف و از هر رویشگاه سه نمونه جمع آوری و توسط بخش گیاه شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی شد. نمونه چالوس با کد هر بار یومی IMPH212، سیاه بیشه IMPH1556، مازندران IMPH1557، پلور IMPH1558 و زنجان IMPH1559. گیاهان از منطقه زنجان (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۳۵ دقیقه و ۱۶/۵ ثانیه و با طول شرقی ۴۸ درجه و ۳۹ دقیقه و ۱۲/۴ ثانیه) از ارتفاع ۲۱۰۰ متری، مازندران منطقه پل کندوان (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه و ۵۷/۶ ثانیه و با طول شرقی ۵۱ درجه و ۴۹ دقیقه و ۲۰/۶ ثانیه) ارتفاع ۳۰۵۹ متری، جاده چالوس (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۱۰ دقیقه و ۵۳/۷ ثانیه و با طول ۵۱ درجه و ۱۹ دقیقه و ۸/۱ ثانیه) از ارتفاع ۲۵۲۷ متری، سیاه بیشه (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۱۰ دقیقه و ۵۳/۷ ثانیه و با طول ۵۱ درجه و ۱۹ دقیقه و ۸/۱ ثانیه) از ارتفاع ۲۵۳۷ متر و پلور (با عرض شمالی ۳۵ درجه و ۵۲ دقیقه و ۱۸/۸۵ ثانیه و با طول شرقی ۵۲ درجه و ۴ دقیقه و ۵۳/۷ ثانیه) در ارتفاع ۲۳۰۰ متری جمع آوری شدند.

کرد. دسته اول موادی که در نتیجه متابولیسم اولیه گیاه تولید می‌شوند نظیر پروتئین ها، چربی ها و کربوهیدرات‌ها، دسته دوم مواد ناشی از متابولیسم ثانویه نظیر ترکیب های فنولیک، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها، این ترکیب‌ها به نظر نمی‌رسند که در فعالیت حیاتی گیاهان نقش اساسی بازی کنند اما نقش بسیار مهمی در بقا و سازگاری گیاهان ایفا می‌کنند (قاسمی، ۱۳۸۸). این ترکیبات به طور گسترده در صنایع غذایی و دارویی مورد مصرف قرار می‌گیرند. لاتکس، کپسول، دانه و ریشه گیاه خشخاش ایرانی یا شقایق کبیر (*Papaver bracteatum* Lindl.) از خانواده پاپاوراسه حاوی آلکالوئیدهایی هم‌چون تبیین و به مقدار ناچیز کدیین می‌باشد (Sharghi & Lalezari, 1967; Kuppers et al., 1976).

روش‌های کروماتوگرافی مختلفی جهت اندازه گیری و شناسایی ترکیب‌ها وجود دارد که یکی از مهمترین آن‌ها کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است. در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اغلب از ستون‌های پر شده با ذرات ریز ساکن استفاده می‌شود. به همین علت سطح بیشتری از فاز ساکن در ستون در معرض اجزا نمونه قرار می‌گیرد و در نتیجه بازده جداسازی از این روش از سایر روش‌های کروماتوگرافی بیشتر است.

دریک بررسی به روش کروماتوگرافی گازی با دتکتور جرمی کدیین را در کپسول گیاه شناسایی کردند و مقدار آن را حدود ۰/۰۴ درصد گزارش کردند (Kuppers et al., 1976). تبیین منطقه مهاباد ایران را به روش TLC جداسازی و تعیین مقدار با دستگاه اسپکتروفتومتری IR و NMR شناسایی کردند (Lalezari, ۱۹۷۴) با اندازه گیری تبیین موجود در کپسول‌های خشخاش غرب ایران با روش استخراج با بنزن و روش استخراج با کلروفرم و سپس اندازه گیری با دستگاه اسپکتروسکوپی UV از پودر نرم، ریز و درشت از کپسول نتایج متفاوتی به دست آوردند که روش استخراج با کلروفرم از پودر نرم درصد تبیین آن را تا ۴/۱۷ گزارش دادند (Rostam et al., 1976).

در تحقیقی به روش اسپکتروسکوپی مادون قرمز^۱ با استفاده از اسپکتروسکوپی NIR-FT-Raman انجام شد به طور هم‌زمان آلکالوئیدهای مهم گیاه خشخاش را شناسایی و تعیین مقدار کردند،

۲-۲. وسایل و مواد مورد نیاز

استاندارد کدئین فولکا^۱، استاندارد تبائین از شرکت سیگما آلدریج^۲ و متانول HPLC، کلروفرم و سدیم سولفات انیدرید از شرکت مرک^۳ تهیه شدند.

۲-۳. آماده سازی گیاه و عملیات استخراج

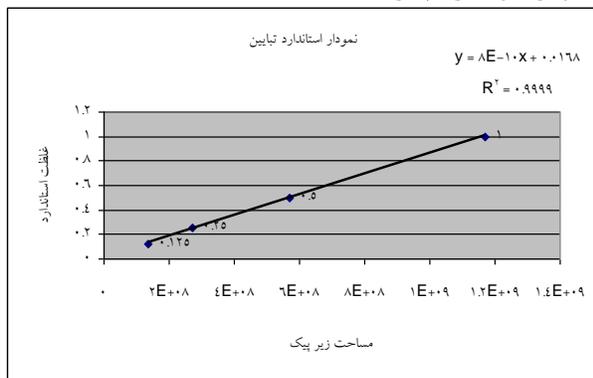
کپسول رسیده از مناطق مذکور جمع آوری و بذر آن تخلیه شد و به مدت چند روز در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. کپسول خشک شده آسیاب و به شکل پودر در آورده شد. برای انجام استخراج مقدار یک گرم از کپسول پودر شده را به دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن کرده و به داخل ارلن ۲۵۰ میلی لیتر انتقال داده شد. سپس به بالون مذکور ۵ میلی لیتر آمونیاک ۲۵ درصد، ۲۵ میلی لیتر متانول و ۷۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه کرده و درب آنرا محکم بسته و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (امواج مافوق صوت با فرکانس بالاتر از ۲۰۰۰ هرتز قرار گرفت) تا که این عمل باعث تسریع و بهبود عمل استخراج گردد (غفارزادگان و هم کاران، ۱۳۸۹).

سپس عصاره حاصله از پنبه و کاغذ صافی عبور داده شد و برای شستشوی ارلن و کاغذ صافی و پنبه ۱۰ میلی لیتر کلروفرم به ارلن افزوده شد و شستشو انجام گرفت. عصاره حاصل با دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک گردید. به رسوبات باقی مانده داخل بالن ۲۵ میلی لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد و به کمک دستگاه اولتراسونیک تمامی رسوبات حل شد. اسیدی کردن محیط باعث می شود تا آلکالوئیدها به شکل نمکی و باردار در آیند و در اثر استخراج مایع - مایع به فاز آبی منتقل شوند. محلول آبی - آلی حاصل به یک دکانتور منتقل گردید و دکانتور به مدت ۱۰ دقیقه رها شد تا دو فاز مجزا تشکیل شود، پس از استخراج مایع - مایع فاز کلروفرمی دور ریخته شد. با استفاده از آمونیاک ۱۰-۱۱ pH تنظیم و موجب قلبایی شدن فاز آبی گردید تا آلکالوئیدها به شکل باز آزاد در آیند و در مرحله بعد استخراج مایع - مایع به فاز کلروفرمی منتقل شوند. سپس با افزودن ۲۵ میلی

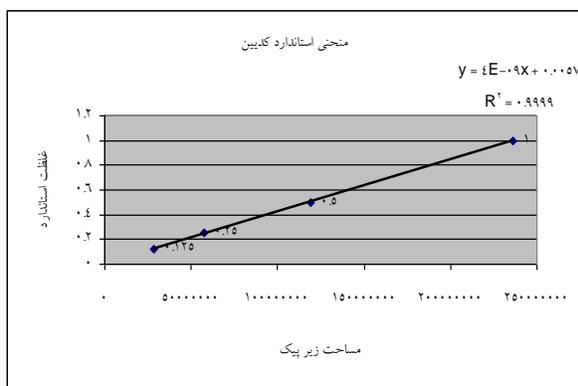
لیتر کلروفرم عمل استخراج انجام شد و فاز کلروفرمی در ظرف دیگری جمع آوری شد و فاز آبی را مجدداً دو مرتبه با ۱۰ میلی لیتر کلروفرم استخراج و جمع آوری شد. برای آب گیری از فاز آلی حاصل، سدیم سولفات بدون آب افزوده و از کاغذ صافی عبور داده شد و مجدداً حلال با دستگاه روتاری تبخیر شد و عصاره خشک شده را در ۵ میلی لیتر متانول خالص حل کرده و از فیلتر سرسنگی عبور داده و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شد (غفارزادگان و هم کاران، ۱۳۸۹).

۲-۴. تهیه محلول های استاندارد

در این بررسی غلظت های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵۰، ۰/۵۰۰ و ۱/۰۰۰ میلی گرم در میلی لیتر از هر کدام از استانداردهای کدئین و تبائین تهیه شد. سپس هر کدام از نمونه ها سه بار به دستگاه تزریق گردید و با توجه به غلظت و ارتفاع پیک دو منحنی کالیبراسیون (نمودار ۱ و ۲) رسم گردید.



نمودار ۱. منحنی کالیبراسیون تبائین



نمودار ۲. منحنی کالیبراسیون کدئین

¹ Fluka
² Sigma-Aldrich
³ Merck

۲-۵. مشخصات دستگاه HPLC

برای تجزیه نمونه‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده گردید. علت این انتخاب عملکرد بالا، دقت خوب و سازگاری این روش در انجام اندازه‌گیری‌های کمی است. دستگاه HPLC از نوع Knauer با ستون (4/9×250) CN مجهز به پمپ مدل K-1001 و دتکتور UV مدل K-2501 می‌باشد. برنامه کار این دستگاه به این نحو تنظیم گردید که سرعت فاز حامل بر روی ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج دتکتور روی ۲۵۴ نانومتر و حجم تزریق نمونه ۵۰ میکرولیتر تنظیم شد. فاز متحرک آمونیوم استات ۱۰۰ میلی‌مولار، دی‌اکسان، استونیتریل و متانول به نسبت (۸۶:۵:۵:۴) با pH = ۵/۶ انتخاب شد.

خطای بین آزمایش برای تمام اندازه‌گیری کمتر از ۵٪ می‌باشد. بنابراین صحت و تکرار پذیری روش قابل تایید است.

۲-۶. تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی مقدار کدیین و تباین در گیاه مذکور، در مناطق مختلف مورد آزمایش، تجزیه واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین آن‌ها با سه تکرار و بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار (FLSD) انجام شد. آزمون مذکور در سطح احتمال یک درصد با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (Ver.17) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

گیاهان به محرک‌های محیطی پاسخ می‌دهند و متابولیت‌های ثانویه دارای نقش کلیدی در برهم کنش بین گیاه و محیطشان هستند و مطابق نتایج بسیاری از تحقیقات، آلكالوئیدها از جمله متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که مسیر بیوسنتز آن‌ها تحت تأثیر

شرایط محیطی قرار می‌گیرد و در مراحل نمو و شرایط محیطی دارای نوسان هستند. طبق مشاهدات و مقایسات این تحقیق به نظر می‌رسد شرایط محیطی در تغییرات آلكالوئیدهای موجود در کپسول جمع‌آوری شده از مناطق مختلف تأثیر گذاشته باشد و شرایط محیطی متفاوت در مقدار کدیین و تباین تأثیر گذار بوده است. به طوری که تنوع میانگین درصد ترکیبات کدیین و تباین در نمونه‌های به‌دست آمده از مناطق مختلف کشور را در جدول شماره ۱ مشاهده می‌کنید. میانگین درصد کدیین (نمودار شماره ۱) و مقدار درصد تباین (نمودار شماره ۲) ترسیم شد.

نتایج این تحقیق نشان داد اگر کدیین به تنهایی در نمونه‌ها بررسی شود بیشترین مقدار کدیین (۰/۰۰۴ درصد) مختص نمونه جمع‌آوری شده از شهرهای زنجان و پلور و بیشترین مقدار تباین (۳/۳ درصد) مربوط به نمونه جمع‌آوری شده از شهر زنجان می‌باشند.

کمترین مقدار کدیین (۰/۰۰۱ درصد) به نمونه جمع‌آوری شده از سیاه‌بیشه و کمترین مقدار تباین (۰/۰۰۶ درصد) به نمونه جمع‌آوری شده از منطقه مازندران اختصاص داشت. این تغییرات در میزان آلكالوئیدها در مناطق مختلف می‌تواند ناشی از تأثیر عوامل مختلف ژنتیکی، اکولوژیکی، جغرافیایی، اقلیمی و خاکی باشد. با توجه به نتایج به دست آمده به احتمال زیاد ارتفاع تأثیر بسزایی بر تولید آلكالوئیدها در این گیاه دارد (قاسمی، ۱۳۸۸). مقدار آلكالوئیدهای تولید شده در این گیاه با ارتفاع رابطه عکس دارد.

جدول ۱. میانگین ترکیبات کدیین و تباین در نمونه‌های به دست آمده از مناطق مختلف کشور

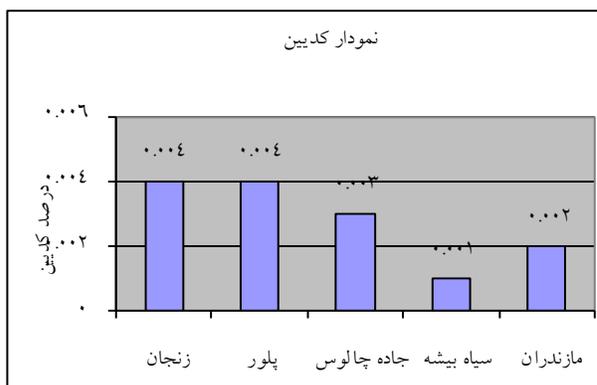
نمونه	مازندران*	سیاه‌بیشه	پلور	زنجان	جاده چالوس
میانگین درصد کدیین	۰/۰۰۱۹۹±۰/۰۰۱۴۱	۰/۰۰۰۹۸±۰/۰۰۰۱۵	۰/۰۰۰۳۹±۰/۰۰۰۱۵	۰/۰۰۰۳۹±۰/۰۰۰۴۶	۰/۰۰۰۲۹۹±۰/۰۰۰۱۵۱
میانگین درصد تباین	۰/۰۰۵۹۹±۰/۰۰۰۳۶	۰/۰۰۳۰۹±۰/۰۰۱۷۰	۰/۰۰۶۰۹±۰/۰۰۱۹۶	۳/۲۹۹±۰/۱۱۰	۰/۰۰۳۳۹±۰/۰۰۰۸۱

* میانگین ± انحراف معیار

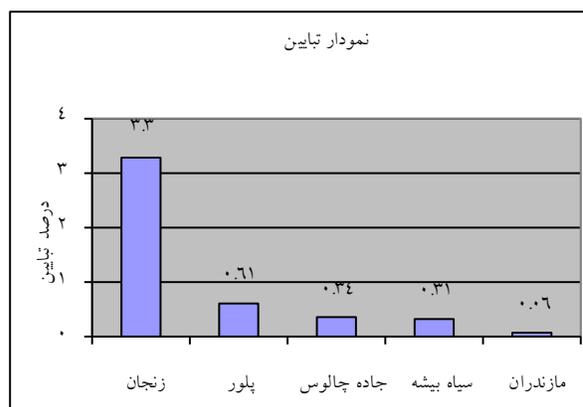
۴. نتیجه گیری

تجزیه رگرسیونی دارای رابطه معنی داری بین مجموع کدیین و تبیین و ارتفاع رویشگاه آن‌ها را نشان می دهد. نمونه های جمع آوری شده از منطقه زنجان و پلور در مقایسه با دیگر نمونه ها، در ارتفاعات پایین تر جمع آوری و درصد تبیین و کدیین بیشتری دارند. در این مطالعه به روشنی نشان می دهد که نمونه زنجان منبع خوبی برای تهیه آلکالوئیدهای مورد نظر می باشد.

با توجه به تحقیقات اندکی که روی این گیاه مهم دارویی انجام شده است امید است با ارزیابی وسیع تر و شناخت بیشتر منابع طبیعی این ثروت ملی و خالص سازی این نمونه ها بتوان در آینده منابعی با کیفیت بالاتر معرفی نمود.



نمودار شماره ۳. مقایسه میانگین درصد کدیین بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار محافظت شده (FLSD) در سطح ۱ درصد



نمودار شماره ۴. مقایسه میانگین درصد تبیین بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار محافظت شده (FLSD) در سطح ۱ درصد

۵. منابع

غفرازادگان، ر.، خدیوپارسی، پ.، خلیقی سیگارودی، ف.، پیرعلی همدانی، م.، کدخدا، ز.، رضازاده، ش.ع. ۱۳۸۹. بهینه سازی روش استخراج ماده اولیه دارویی هیوسین از گیاه بذرالبنج. فصلنامه گیاهان دارویی، ۹: ۸۷-۹۵.

قاسمی، ع. ۱۳۸۸. گیاهان دارویی و معطر (شناخت و اثرات آن‌ها). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۵۶۰ صفحه.

Sharghi, N. and Lalezari, I. 1967. *Papaver bracteatum* lindl. a highly rich source of thebaine. *Nature*, 213: 1244.

Meshulam, H. and Lavie, D. 1980. The Alkaloidal Constituents of *Papaver bracteatum* Arya E. *Phytochemistry*, 19: 2633-2635.

Kuppers, F., Salemink, C., Bastart, M. and Paris, M. 1976. Alkaloids of *Papaver bracteatum* presence of codeine neopine and alpinine. *Phytochemistry*, 15: 444 - 445.

Lalezari, I., Nasser, P. and Asgharian, R. 1974. *Papaver bracteatum* Lindl. population AryaII. *Journal Pharmaceutical Science*, 63: 1331.

Rostam, H., Maghssodi, A. and Fawzi, B. 1976. Direct spectrophotometer determination of thebainein arya II population capsule of *Papaver bracteatum* lindl. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67: 32-34.

Schulz, H., Baranska, M., Quilitzsch, R. and Schütze, W. 2004. Determination of alkaloids in capsules, milk and ethanolic extracts of poppy (*Papaver somniferum* L.) by ATR-FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Analyst*, 129: 917-920.

Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and Iadizinsky, G. 1988. High - performance liquid chromatographic analysis of the alkaloid spectrum in the roots and capsules of the species and hybrids of *papaver* section *oxytona* *Journal of Chromatography A*, 452: 563-570.

