



فصلنامه‌ی داروهای گیاهی

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



شناسائی و تعیین مقدار آلکالوئیدهای مختلف گونه *Atropa belladonna* L. از نقاط

مختلف ایران به روش کروماتوگرافی گازی (GC)

سجاد صداقت^۱، رضا حاجی آقایی^۲، رحیم تقی زاد فرید*^۱، زهره کدخدای، سید وحید قاسمی^۲،

حسن علی نقدی بادی^۲، فرهاد حریری اکبری^۳، شمس‌علی رضازاده^۲

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

* مسئول مکاتبات (E-mail: r.farid@yahoo.com)

۲. پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران؛

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

چکیده

شناسه مقاله

مقدمه و هدف: گیاه شایبک از خانواده سیب زمینی و یکی از گیاهان دارویی مهم می باشد که شامل تروپان آلکالوئیدها است. تروپان آلکالوئیدها یک گروه مشخص از متابولیت‌های ثانویه خانواده سیب زمینی هستند. مهمترین آلکالوئیدهای گیاه شایبک آتروپین و هیوسین می باشد که به صورت وسیعی به سبب خواص دارویی مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین شناسایی و تعیین مقدار این آلکالوئیدها در گیاهان مناطق مختلف ایران ضروری است. هدف از این مطالعه شناسایی و تعیین مقدار آلکالوئیدهای مختلف گونه *Atropa belladonna* از مناطق مختلف به روش کروماتوگرافی گازی بود.

روش تحقیق: کل اندام‌های زمینی گیاه از پنج منطقه شامل اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر جمع آوری و خشک گردید. سپس عمل عصاره گیری انجام شد. با تغییر اسیدیته و حلال، آلکالوئیدها استخراج، شناسایی و تعیین مقدار گردید.

نتایج و بحث: مقدار آتروپین در گیاه خشک در بین شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۴۶۷، ۰/۷۶، ۱/۰۰، ۱/۶۲ و ۱/۸ درصد و مقدار هیوسین به ترتیب ۰/۰۹۱، ۰/۱۵۷، ۱/۲۳، ۰/۲۳۱ و ۰/۴۶۵ درصد و مقدار مجموع هر دو آلکالوئید به ترتیب ۰/۷۵۸۴، ۰/۹۱۸، ۲/۱۳۸، ۱/۵۸۱۱ و ۲/۶۵۶ درصد به دست آمد. در این تحقیق بیشترین مقدار آتروپین به دست آمده از کل اندام‌های زمینی گیاه در نمونه اردبیل ۱/۸ درصد بود و بیشترین میزان هیوسین ۱/۲۳ در نمونه تنکابن بود. نمونه رامسر کمترین میزان هیوسین و آتروپین (%) و مجموع آن‌ها را داشت؛ در حالی که نمونه اردبیل بالاترین آتروپین و مجموع آتروپین و هیوسین را داشت.

توصیه کاربردی/صنعتی: با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان برای استخراج بیشتر آتروپین و مجموع آتروپین و هیوسین از گیاه شایبک از نظر اقتصادی جمعیت منطقه اردبیل را پیشنهاد نمود.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۵/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۷/۲۰

نوع مقاله: پژوهشی

موضوع: فیتوشیمی

کلید واژگان:

✓ شایبک

✓ تروپان

✓ هیوسین

✓ آتروپین

✓ آلکالوئیدها

تعیین ویژگی‌های ژنتیکی، مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و

اکولوژیکی این دسته از گیاهان، به منظور بهره برداری پایدار

اقتصادی، اهداف بهداشتی و سلامتی و همچنین حفظ تنوع موجود در

۱. مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در ایران و سایر نقاط جهان به عنوان

محصولات اصلی و فرعی بسیار ارزشمند می باشد، لذا واضح است که

خواص دارویی آن مربوط به آلکالوئیدهای موجود در این گیاه است. شابیزک با بوی نامطبوع، دارای آلکالوئید مشتق از تروپان (آتروپین و هیوسین) است (Latif & Gray, 2006). زمان گل دهی این گونه بهار و زمان میوه دهی تابستان و پاییز است. این گیاه متعلق به ناحیه خزری است و در حاشیه جنگل ها و زیر درختان می روید. پراکندگی جغرافیایی این گونه در اروپا، ترکیه و شمال ایران است (قهرمان، ۱۳۵۸-۱۳۸۰).

ترکیباتی که از منابع طبیعی استخراج می شوند را ترکیبات طبیعی^۱ می نامند. که در عصاره گیاهی می توان به آلکالوئیدها، کومارین ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، لیگنان ها، استروئیدها، قندها، ترپنوئیدها و غیره اشاره کرد. امروزه بیش از ۵۵۰۰ آلکالوئید (قلیا مانند) شناخته شده است. برای اولین بار کلمه آلکالوئید توسط یک داروشناس آلمانی به کار گرفته شد که یکی از مهمترین و بزرگترین گروه های فرآورده های ثانویه متابولیکی^۲ در گیاهان می باشند. آلکالوئیدها مواد قلیایی هستند که در مولکول خود یک یا چند اتم نیتروژن دارند و معمولاً در حلقه هتروسیکل واقع شده اند و دارای ساختارهای شیمیایی مختلفی بوده و در گیاه به صورت باز های آزاد، نمک و یا N-اکسید وجود دارند (Latif & Gray, 2006; Trease & Evans, 1996).

گروهی از آلکالوئیدها به نام تروپان به طور عمده در خانواده سیب زمینی یافت می شوند. از معروف ترین تروپان آلکالوئیدها را می توان، هیوسیامین، هیوسین و آتروپین نام برد. مشخصه تروپان آلکالوئیدها یک گروه متیل متصل به اتم نیتروژن می باشد که این چنین ساختمانی در استیل کولین که انتقال دهنده امواج عصبی در سلول-های مغز می باشد مشاهده شده است (Larson & Marley, 1984; Mohammad, 1998).

آتروپین با فرمول $C_{17}H_{23}NO_3$ مخلوط راسمیک L و D هیوسیامین است که از راسمیزاسیون هیوسیامین در حین استخراج حاصل می شود و سبب فلج کامل الیاف اعصاب محیطی پاراسمپاتیک می گردد و اثرات گسترده ای روی سیستم اعصاب مرکزی^۳ (CNS)،

عرصه های طبیعی مراتع کشور و جلوگیری از حذف گونه های در حال انقراض ضروری به نظر می رسد (کریمی و هم کاران، ۱۳۸۸). گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات متابولیتی که خاصیت دارویی و صنعتی دارند از اهمیت روز افزونی برخوردار هستند و اصلی ترین ذخیره کننده منابع دارویی می باشند که در حدود ۸۰ درصد از جمعیت جهان هم چنان نیازمند این منابع در جهت حفظ سلامت و بهداشت خود هستند. در حال حاضر به دلیل مقاوم بودن عوامل بیماری زا به داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک ها نیاز به منابع جایگزین در جهت رفع نیازهای بهداشتی، سلامتی و همچنین کاهش مضرات مواد شیمیایی احساس می شود. متابولیت های ثانویه گیاهی به عنوان دارو، ترکیبات معطر، رنگ دانه، افزودنی های غذایی دارای اهمیت اقتصادی بسیار زیادی می باشند (Harriri et al., 2010). بهره گرفتن از گیاهان دارویی در درمان، به جهت دسترسی آسان، اثرات درمانی متنوع، عوارض جانبی کم، هزینه پایین درمان و اثرات روانی مثبت مورد توجه قرار گرفته است (قاسمی، ۱۳۸۸). لازمه آن شناخت خواص دارویی و سمی گیاهان و بررسی دقیق ترکیبات بیوشیمیایی موجود در آن ها است. در گذشته، به علت عدم وجود روش های پیشرفته امروزی، شناخت این ترکیبات مشکل بود. طی سال های گذشته به علت توجه خاصی که به مواد طبیعی شده است، فعالیت های زیادی جهت استخراج، خالص سازی و تعیین ساختار مولکولی ترکیبات به دست آمده از گیاهان انجام شده است (Latif & Gray, 2006). اگر چه امروزه در زمینه تولید مواد موثره گیاهی به روش سنتتیک تلاش ها و پیشرفت قابل ملاحظه ای صورت گرفته است، ولی هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از مواد دارویی ارزشمند است، زیرا مواد موثره گیاهی یا ساختمان ناشناخته ای دارند و یا از ساختمان شیمیایی پیچیده برخوردارند که تولید آن ها به روش سنتتیک در صنایع داروسازی مشکل و یا دارای هزینه بسیار زیاد و در بعضی موارد غیر ممکن می باشد (Starmans & Nijhuis, 1996; Verpoorte & Memelink, 2002).

شابیزک با نام های Belladonna, Devil's berries, Death cherries و Deadly nightshade گیاهی پایا، چند ساله، که از قدیم به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی استفاده می شده است.

^۱ Natural products

^۲ Secondary Metabolites

^۳ Central Nervous System

دمای بدن، چشم ها، دستگاه گوارش، قلب و افزایش فشار خون دارد (Miraldi, 2001).

هیوسین به اسکوپولامین چپ گرد نیز معروف و از ارزشمندترین آلکالوئید تروپانی است که تقاضای جهانی آن ده برابر بیشتر از هیوسیامین است، فرمول شیمیایی آن $C_{17}H_{21}NO_4$ و در دمای ۸۹ درجه سانتی‌گراد ذوب می‌شود. نوع راسمیزه آن را آتروسین می‌گویند. این ترکیب در روان پزشکی (در درمان بیماری‌های اعصاب) و هم‌چنین در تهیه داروهای ضد تهوع و ضد دریازدگی کاربرد فراوانی دارد. این آلکالوئید خواب آور و مسکن بوده و برای گشاد کردن مردمک چشم کاربرد دارد. از آن‌جا که هیوسین نسبت به آتروپین تأثیر بیشتری بر روی سیستم عصبی مرکزی دارد، تقاضا برای تولید این ترکیب بیشتر است (Miraldi, 2001; Mohammad, 1998).

در نهایت با توجه به اهمیت و ارزش هیوسین و آتروپین تصمیم به انجام تحقیق حاضر با هدف بررسی کمی و کیفی دو آلکالوئید مذکور در گیاه شابیزک که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بود گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۱-۲. جمع‌آوری و شناسایی گیاه

نمونه‌های گیاهی شابیزک از پنج منطقه مختلف از هر منطقه سه نمونه انتخاب، جمع‌آوری و توسط بخش گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی شد (کد هرباریومی اردبیل IMPH1469، مرزن‌آباد IMPH1471، تنکابن IMPH1472، کرج و رامسر IMPH1470). گیاهان از مرزن‌آباد (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۱۸ دقیقه و ۳۷/۵ ثانیه و با طول شرقی ۵۱ درجه و ۱۱ دقیقه و ۲/۸ ثانیه) در ارتفاع ۱۴۹۸ متری و در تاریخ ۸/۳/۸۹، رامسر (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۴۸ دقیقه و ۲۱/۵ ثانیه و با طول شرقی ۵۰ درجه و ۳۸ دقیقه و ۳۴/۸ ثانیه) از ارتفاع ۱۵۷۰ متری در تاریخ ۱۵/۳/۸۹، اردبیل (با عرض شمالی ۳۷ درجه و ۴۰ دقیقه و ۵۷/۶ ثانیه و با طول شرقی ۴۸ درجه و ۴۹ دقیقه و ۲۰/۶ ثانیه) در ارتفاع ۴۸۸ متری در تاریخ ۷/۳/۸۹، تنکابن (با عرض شمالی ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه و ۱۰/۱ ثانیه و با طول شرقی ۵۰ درجه و ۵۴ دقیقه و ۷/۸ ثانیه) از ارتفاع ۱۴۷۲ متری در تاریخ

۲-۲. وسایل و مواد مورد نیاز

استانداردهای هیوسین هیدروبروماید تری هیدرات و آتروپین از شرکت Sigma-Aldrich و متانول HPLC، کلروفرم، سدیم سولفات انیدرید از شرکت Merck تهیه شدند.

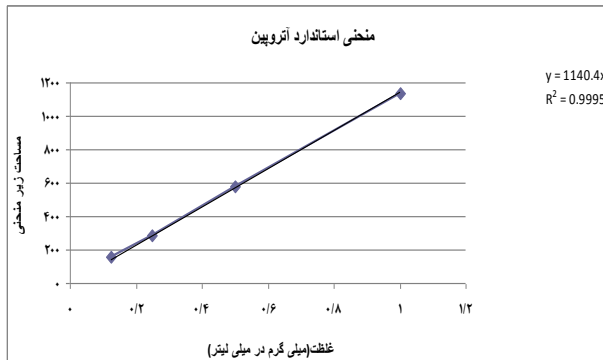
۳-۲. آماده‌سازی گیاه برای عملیات استخراج

در ابتدا ناخالصی‌های گیاهان جمع‌آوری شده از کل اندام‌های ریشه جدا شدند. سپس به مدت چند روز در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. گیاه خشک شده آسیاب و به شکل پودر درآورده شد.

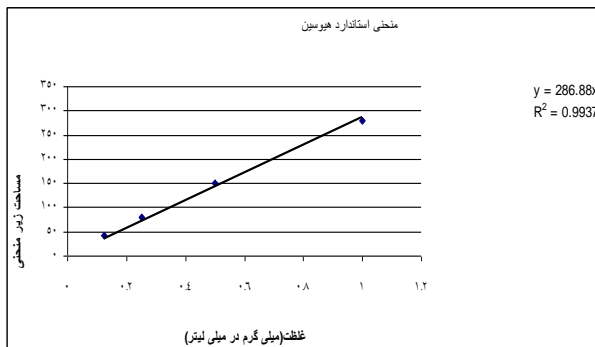
۴-۲. عملیات استخراج

برای استخراج، ابتدا اندام‌های ریشه سه گیاه جمع‌آوری شده از هر منطقه آسیاب شد و مقدار یک گرم از گیاه پودر شده را با دقت ۰/۰۰۱ وزن کرده و به داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده شد. سپس به بالون مذکور ۵ میلی‌لیتر آمونیاک ۲۵ درصد، ۲۵ میلی‌لیتر متانول و ۷۵ میلی‌لیتر 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 داده شد تا این عمل باعث تسریع و بهبود عمل استخراج گردد. سپس به مدت نیم ساعت در جای تاریک قرار گرفت و سپس عصاره حاصله از پنبه و کاغذ صافی عبور داده شد. برای شستشوی ارلن و کاغذ صافی و پنبه ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به ارلن افزوده شد و شستشو انجام گرفت. عصاره حاصل با دستگاه تقطیر در خلاء دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. به رسوبات باقی‌مانده داخل بالون ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد و در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت تا تمامی رسوبات حل گردد. اسیدی کردن محیط باعث می‌شود تا آلکالوئیدها به شکل نمکی و باردار درآیند 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-

عنوان گاز حامل با سرعت جریان 0.8 mL^3 میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید و محاسبات بر مبنای مساحت زیر پیک ها انجام گرفت. نسبت اسپلیت دستگاه روی ۵:۱ تنظیم شد.



شکل ۱. منحنی استاندارد آتروپین



شکل ۲. منحنی استاندارد هیوسین

۲-۶. تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی مقادیر متابولیت های آتروپین، هیوسین و مجموع آن ها در ریشه گیاه دارویی شاپیزک در مناطق مختلف اکولوژیکی مورد آزمایش از تجزیه واریانس یک سویه (one-way ANOVA) توسط نرم افزار SPSS ver 16 استفاده گردید و آزمون مقایسه میانگین حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مایع، فاز آبی مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از آمونیاک $\text{pH} = 10-11$ تنظیم و موجب قلیایی شدن فاز آبی گردید تا آلکالوئیدها به شکل باز آزاد درآیند و در مرحله بعد استخراج مایع- مایع به فاز کلروفرمی منتقل شوند. سپس با افزودن ۲۵ میلی لیتر کلروفرم عمل استخراج انجام شد. فاز کلروفرمی در ظرف دیگری جمع آوری شد. 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 و مجدداً حلال با دستگاه تقطیر در خلأ تبخیر شد (Starmans & Nijhuis, 1996). عصاره خشک شده را در ۵ میلی لیتر متانول خالص حل کرده و از فیلتر سرسرنگی عبور داده و یک میکرولیتر از زیر صافی به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید (تسلیمی، ۱۳۸۰).

۲-۵. تهیه محلول های استاندارد

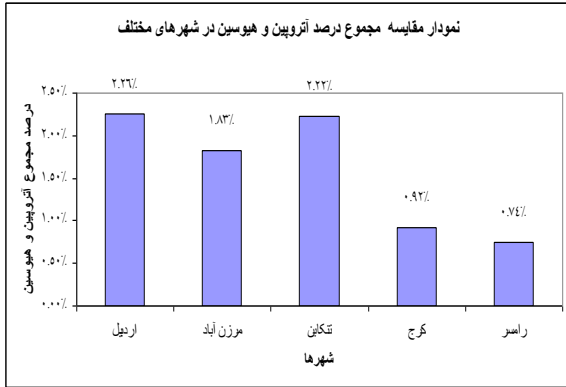
برای رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت هیوسین و آتروپین در عصاره های به دست آمده ابتدا غلظت های 0.125 ، 0.25 ، 0.5 میلی گرم در میلی لیتر از استاندارد های هیوسین و آتروپین تهیه شد (جدول ۱ و ۲). سپس با تزریق این محلول ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی GC مساحت زیر منحنی بر حسب غلظت به دست آمد (شکل ۱ و ۲).

۲-۶. مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی GC

برای تجزیه نمونه ها از روش کروماتوگرافی گازی استفاده گردید، علت این انتخاب عملکرد بالا، دقت خوب و سازگاری این روش در انجام اندازه گیری های کمی است. دستگاه کروماتوگرافی گازی استفاده شده از نوع Yangline 6000 مجهز به ستون مویین DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی 0.25 میلی متر و ضخامت لایه 0.25 میکرومتر و دتکتور FID انتخاب گردید.

دمای ابتدایی آن روی 50 درجه سانتی گراد تنظیم گردید و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه و با سرعت 3 درجه سانتی گراد در هر دقیقه، دما تا 240 درجه سانتی گراد افزایش یافت. سپس با سرعت 15 درجه در هر دقیقه، دما تا 300 درجه سانتی گراد، افزایش داده شد و دمای آن در همین دما به مدت 3 دقیقه نگه داشته شد. دمای اتاق تزریق 290 درجه سانتی گراد بود و از گاز هلیوم به

۳. نتایج و بحث



شکل ۵. مقدار مجموع هیوسین و آتروپین موجود در ریشه خشک ۵ جمعیت مختلف شایبک

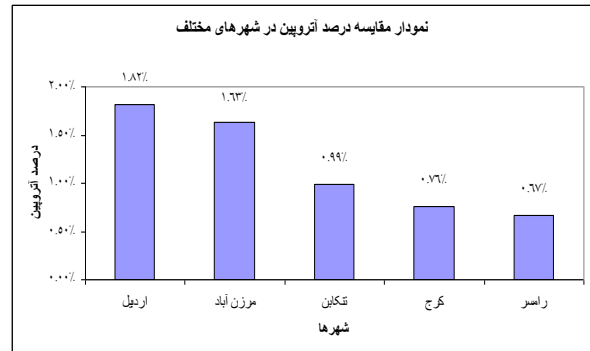
بر اساس مقایسه میانگین به روش LSD از بالا و پایین رامسر (e)، کرج (d)، تنکابن (c)، مرزن آباد (b) و اردبیل (a) (حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار)

مقدار درصد مجموع هیوسین و آتروپین در ریشه خشک در شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۷۴، ۰/۹۲، ۲/۲۲، ۱/۸۳ و ۲/۲۶ به دست آمد (شکل ۵).

بهمن زادگان جهرمی و هم‌کاران (۱۳۸۵)، در مطالعه‌ای بر روی گیاهان *Hyoscyamus reticulates* L و *Hyoscyamus pusillus* L. از خانواده سیب زمینی، میزان تولید تروپان آلکالوئیدها را مورد بررسی قرار دادند، بدین منظور اندام مختلف گیاه *H. pusillus* از قم در مرحله گل دهی و *H. reticulatus* از دو منطقه تهران و قزوین در اواخر مرحله گل دهی و شروع میوه دهی جمع آوری شد. پس از استخراج تروپان آلکالوئیدها از بخش‌های مختلف آن به طور جداگانه میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و هیوسین با دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان آلکالوئیدها در اندام های مختلف با هم متفاوت می‌باشند.

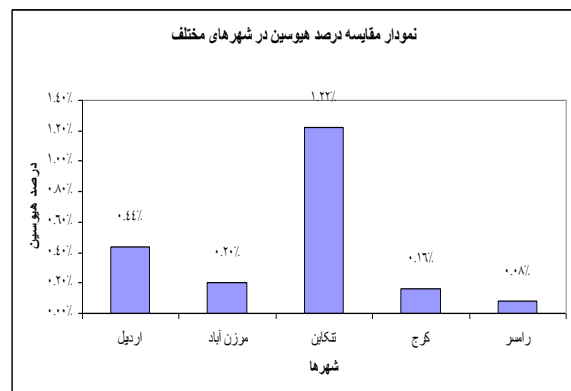
نتایج تحقیق غفارزادگان و هم‌کاران (۱۳۸۹) نشان داد که پارامترهای مختلف در راندمان فرآیند استخراج تأثیر دارد و مدل سازی معادله حاکم بر استخراج هیوسین از گیاه بذرا لنبج برای اولین بار انجام شد. در این بررسی متغیرهای مستقل در این معادله شامل دمای استخراج، زمان استخراج و اندازه ذره و متغیر وابسته مقدار هیوسین استخراج شده بود، بدین منظور آزمایش در دمای ۴۳ درجه

مقدار آتروپین در ریشه خشک در شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۶۷، ۰/۷۶، ۰/۹۹، ۱/۶۳ و ۱/۸۲ درصد به دست آمد (شکل ۳). مقدار هیوسین در ریشه خشک در شهرهای اردبیل، مرزن آباد، تنکابن، کرج و رامسر به ترتیب ۰/۰۸، ۰/۱۶، ۱/۲۲، ۰/۲۰ و ۰/۴۴ درصد حاصل شد (شکل ۴).



شکل ۳. مقدار آتروپین در ریشه خشک ۵ جمعیت مختلف شایبک

بر اساس مقایسه میانگین به روش LSD از بالا و پایین رامسر (e)، کرج (d)، تنکابن (c)، مرزن آباد (b) و اردبیل (a) (حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار)



شکل ۴. مقدار هیوسین در ریشه خشک ۵ جمعیت مختلف شایبک

بر اساس مقایسه میانگین به روش LSD از بالا و پایین رامسر (e)، کرج (d)، تنکابن (c)، مرزن آباد (b) و اردبیل (a) (حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار)

های تیمار شده با اسید سالیسیلیک در محیط کشت و دست ورزی شده با باکتری بسیار بیشتر است.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که مقدار آتروپین، هیوسین و مجموع آن‌ها در گیاه دارویی شابیزک در مناطق مختلف اکولوژیکی اردبیل، مرزن‌آباد، تنکابن، کرج و رامسر با یکدیگر دارای تفاوت معنی داری ($p \leq 0.01$) بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که اگر آتروپین و هیوسین را به تنهایی در نمونه‌ها بررسی شوند، بیشترین مقدار آتروپین (۱/۸ درصد) مختص نمونه جمع‌آوری شده از اردبیل و بیشترین مقدار هیوسین (۱/۲۲ درصد) مختص نمونه جمع‌آوری شده از تنکابن می‌باشد. کمترین مقدار درصد آتروپین (۰/۶۷ درصد) مربوط به نمونه جمع‌آوری شده از رامسر و کمترین مقدار درصد هیوسین (۰/۰۸ درصد) مربوط به نمونه جمع‌آوری شده از رامسر است. حال اگر مجموع آتروپین و هیوسین را در نمونه‌ها بررسی شود، بیشترین مقدار مجموع آتروپین و هیوسین (۲/۲۶ درصد) به نمونه جمع‌آوری شده از اردبیل و کمترین آن (۰/۷۴ درصد) به رامسر اختصاص دارد. این تغییرات در میزان آلکالوئیدها در مناطق مختلف می‌تواند ناشی از تأثیر عوامل ژنتیکی و اثرات مختلف اکولوژیکی، جغرافیایی، اقلیمی، خاکی، رطوبت هوا، دمای محیط باشد (قاسمی، ۱۳۸۸).

۴. نتیجه‌گیری

این مطالعه مشخص می‌کند که برای استخراج آتروپین از گیاه شابیزک بهترین منطقه از لحاظ اقتصادی اردبیل است. با توجه به این‌که نسبت آتروپین اردبیل به رامسر ۲/۷۲ برابر است. برای استخراج هیوسین نیز بهترین منطقه تنکابن است. لذا با توجه به قیمت بسیار گران آتروپین و هیوسین، سود سالانه استخراج و جمع‌آوری این محصولات، در این مناطق رقم قابل ملاحظه‌ای خواهد شد.

۵. سپاس‌گزاری

در این‌جا از آقای مهندس یوسف اجنی، خانم مونا غیائی یکتا و خانم نرگس عابدینی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه‌ای داشتند، تشکر می‌شود.

سانتی‌گراد، با اندازه‌مش ۴۵ و در زمان ۳۰ دقیقه انجام شد که مقدار هیوسین استخراج شده ۰/۸۳۶ درصد گزارش شد.

در تحقیقی که توسط احمدیان چاشمی و هم‌کاران (۱۳۸۹) در خصوص بررسی آلکالوئید در گیاه شابیزک انجام شد نتایج نشان داد که قطعات جدا کشت حاصل از رسته‌های گیاه شابیزک در محیط کشت MS تغییر یافته، تعداد زیادی گیاهچه نو پدید یکسان ایجاد شد که این گیاهچه‌ها در محیط MS جامد تحت اثر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک شامل ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار به مدت چهار هفته کشت داده شدند و از طرف دیگر ریشه‌های مویین تراریخت تولید شده توسط آگروباکتريوم ریزوژن نیز تکثیر و تحت تأثیر غلظت ذکر شده از اسید سالیسیلیک قرار گرفت و سپس آتروپین و هیوسین تولید شده از ریشه و اندام گیاه نو پدید مطالعه و به روش HPLC مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت مشخص شد که محتوی آتروپین ریشه‌های تراریخت با افزایش اسید سالیسیلیک به طور معنی داری افزایش می‌یابد، به طوری که وجود ۰/۱ گرم اسید سالیسیلیک مقدار آتروپین ریشه را به ۰/۳۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر می‌رساند. بیشترین مقدار هیوسین ریشه‌های تراریخت در تیمارهای ۰/۰۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد، که ۰/۲۳ میلی‌گرم در گرم، وزن تر بود و در تیمارهای بالاتر به شدت کاهش پیدا کرد. بالاترین میزان آتروپین در ریشه گیاهان جمعیت گرمستان (۰/۰۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) گزارش شد که در این ریشه‌ها مقدار آتروپین در غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک به طور معنی داری کاهش یافت. و بیشترین مقدار هیوسین در بین دو گروه گیاهی در ریشه گیاهان جمعیت گرمستان مشاهده شد که مقدار آن ۰/۰۹ گرم در گرم وزن تر بود. به طور کلی، در حضور تیمارهای اسید سالیسیلیک، بیشترین مقدار تروپان در ریشه‌های تراریخت و بعد از آن در ریشه‌های گیاهان گرمستان مشاهده شد، مقدار آتروپین و هیوسین موجود در ریشه‌های تراریخت به طور معنی داری بیشتر از اندام‌های مختلف گیاهان بوده است. نسبت به تحقیق حاضر مقدار آتروپین به‌دست آمده از نمونه اردبیل ۱/۸ درصد می‌باشد و بیشترین میزان هیوسین به‌دست آمده ۱/۲۳ در نمونه تنکابن مشاهده شده، که این میزان از هر دو مورد نسبت به نمونه-

جدول ۱. محاسبات مرتبط به رسم منحنی استاندارد آتروپین

غلظت	میانگین مساحت ها	مساحت ۱	مساحت ۲	مساحت ۳	انحراف معیار	انحراف معیار نسبی
۰/۱۲۵	۱۵۷/۳۸۱۹۳۳۳	۱۵۸/۰۳۹۲	۱۵۷/۲۸۵۳	۱۵۶/۸۲۱۳	۰/۶۱۴۶۷۳۶	۰/۳۹۰۵۶۱۷۱۳
۰/۲۵	۲۸۶/۸۱۲۳	۲۸۲/۲۴۲۱	۲۸۶/۹۳۷۱	۲۹۱/۲۵۷۷	۴/۵۰۹۰۹۵۵	۱/۵۷۲۱۴۱۶۰۲
۰/۵	۵۷۵/۵۵۰۷	۵۷۰/۹۶۲۸	۵۷۱/۰۳۷	۵۸۴/۶۵۲۳	۷/۸۸۲۳۰۴۱	۱/۳۶۹۵۲۳۸۵۴
۱	۱۱۳۵/۴۵۵۲۳۳	۱۱۵۸/۰۹۱۴	۱۱۵۲/۹۷۶۸	۱۰۹۵/۲۹۷۵	۳۴/۸۷۱۵۱۳	۳/۰۷۱۱۴۸۲۳۴

جدول ۲. محاسبات مرتبط به رسم منحنی استاندارد هیوسین

غلظت	میانگین مساحت ها	مساحت ۱	مساحت ۲	مساحت ۳	انحراف معیار	انحراف معیار نسبی
۰/۱۲۵	۴۱/۶۸۴۱	۴۱/۰۰۵۵	۴۱/۵۱۲۶	۴۲/۵۳۴۲	۰/۷۷۸۶۴۶۳	۱/۸۶۷۹۶۹۶۳۸
۰/۲۵	۷۹/۸۱۱۹۳۳۳۳	۷۷/۸۴۱۹	۸۱/۲۵۱۵	۸۰/۳۴۲۴	۱/۷۶۵۶۱۳	۲/۲۱۲۲۱۶۷۸۱
۰/۵	۱۵۱/۴۰۰۷	۱۵۳/۵۲۴۲	۱۵۰/۲۵۱۲	۱۵۰/۴۲۶۷	۱/۸۴۱۰۹۷۳	۱/۲۱۶۰۴۲۷۸۹
۱	۲۸۰/۱۵۰۵	۲۷۹/۸۰۴۸	۲۸۳/۳۳۶۵	۲۷۷/۳۱۰۲	۳/۰۲۷۹۸۶۸	۱/۰۸۰۸۴۲۹۱۸

جدول ۳. تجزیه واریانس میزان آتروپین، هیوسین و مجموع آن ها موجود در جمعیت های مختلف شاییزک

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
بین گروه ها	۴	۰/۸۱۰**
داخل گروه ها (آتروپین)	۱۰	۰/۰۰۰۰۴
جمع	۱۴	
بین گروه ها	۴	۰/۶۵۹**
داخل گروه ها (هیوسین)	۱۰	۰/۰۰۰۱
جمع	۱۴	
بین گروه ها	۴	۱/۵۴۶**
داخل گروه ها (مجموع)	۱۰	۰/۰۰۰۱
جمع	۱۴	

** بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

۶. منابع

- Starmans, D. and Nijhuis, H. 1996. Extraction of secondary metabolites from plant material. A review. *Trends in Food Science & Technology*. 7: 191-197.
- Trease, G.E. and Evans, W.C. 1996. *Pharmacognosy*. 14nd ed. W.B. Saunders Company Ltd.
- Verpoorte, R. and Memelink, J. 2002. Engineering Secondary metabolite production in plants. *Crop in Biotechnology*. 8: 181-187.

احمدیان چاشمی ن، شریفی، م، کریمی، ف. و رهنما، ح. ۱۳۸۶. بررسی مقایسه ای تولید تروپان آلکالوئیدها در ریشه های مویین تراریخت و گیاهچه های شایبک (*Atropa belladonna* L.) تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید. زیست شناسی گیاهی، ۱: ۶۳-۷۶.

بهمن زادگان جهرمی، ع، سفیدکن، ف، جایمند، ک. ۱۳۸۷. استخراج و اندازه گیری تروپان آلکالوئیدهای L- هیوسامین و (-) اسکوپولامین (هیوسین) از اندام های مختلف. *Hyoscyamus reticulates* L. و *Hyoscyamus pusillus* L. پژوهش و سازندگی، ۷۹: ۱۴۵-۱۵۳.

تسلیمی، ج. ۱۳۸۰. مطالعه کمی و کیفی آلکالوئیدهای سه گونه بذربنج. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران، صفحه ۷۹.

غفارزادگان ر، خدیوپاری، پ، خلیقی سیگارودی، ف، پیرعلی همدانی، م، کدخدا، ز، رضاده، ش. ع. ۱۳۸۹. بهینه سازی روش استخراج ماده اولیه دارویی هیوسین از گیاه بذربنج. گیاهان دارویی، ۹: ۸۷-۹۵.

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

قهرمان، ا. ۱۳۵۸-۱۳۸۰. فلور رنگی ایران، جلدهای ۱-۲۴. انتشارات موسسه جنگل ها و مراتع کشور، کرج، ایران.

کریمی، ف، امینی اشکوری، ط. و زینالی ا. ۱۳۸۸. تغییرات محتوای آلکالوئید تام، آتروپین و اسکوپولامین در برگ گیاه شاهبیزک (*Atropa belladonna* L.) از رویشگاه واز - شمال ایران، در ارتباط با برخی عوامل فنولوژیکی و محیطی. زیست شناسی گیاهی، ۱(۱-۲): ۷۷-۸۸.

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, A. 2001. Production of secondary metabolites. A historical perspective. *Plant Sci*. 161: 839 -851.
- Harriri, F., Omid, M. and Etmnan, A. Provides an easy method for DNA extraction and purification of medicinal plants. *Journal of Plant and Ecosystem Research*. 1: 70-72.
- Larson, R.A. and Marley, K.A. 1984. *Phytochemistry*. Vol. 23.
- Latif, T. and Gray, A. 2006. *Natural Product Isolation*. Humana Press: Totowa, New Jersey, USA.
- Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S. and Comparini, I. 2001. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72: 644-648.
- Mohammad, A. 1998. *Text Book of Pharmacognosy*. 2nd ed, C.B.S.