

وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی: روش معرف‌های آلکالوئیدی در مقایسه با بروموکرزول گرین

چکیده

روح ا... قموشی^۱
فاضل شمس^{۲*}
حمیدرضا منصف اصفهانی^۳

۱- دانشجوی داروسازی

۲- گروه شیمی دارویی

۳- گروه فارماکولوژی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

زمینه و هدف: اغلب آلکالوئیدها، اثرات فیزیولوژیکی قوی در پستانداران و سایر ارگانیزم‌ها دارند و تعدادی از آنها، عوامل مهم دارویی می‌باشند. غنی‌ترین منبع آلکالوئیدها، گیاهان می‌باشند. لذا بررسی وجود آنها در گیاهان، اهمیت زیادی دارد. ما در این مطالعه سعی کرده‌ایم تا روشی سریع، ارزان و با حساسیت بالا، برای بررسی وجود آلکالوئیدها در گیاهان ارائه کنیم. **روش بررسی:** ۱۲ نمونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفتند که طبق تحقیقات قبلی، تعداد ۱۱ نمونه حاوی آلکالوئید و یک نمونه فاقد آلکالوئید بودند. عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی با متانول انجام شد. در مورد هر نمونه، بعد از حل کردن حدود ۰/۵g از عصاره آن در مقداری اسید کلریدریک ۲N و صاف کردن آن، بررسی وجود آلکالوئید در آن، توسط معرف‌های درازندروف، واگنر و میر با روش پیشنهادی تشکیل کمپلکس با BCG، انجام شد. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی توسط روش تشکیل کمپلکس با BCG نیز بر حسب آتروپین، مشخص شد. **یافته‌ها:** نتیجه بررسی وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی با معرف‌های درازندروف، واگنر و میر در مورد چای سیاه، گل گاوزبان و چای کوهی، منفی و در بقیه موارد مثبت بود. نتیجه بررسی وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی با روش پیشنهادی تشکیل کمپلکس با BCG در مورد چای سیاه و چای کوهی، منفی و در بقیه موارد مثبت بود. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی از طریق تشکیل کمپلکس با BCG، معادل $40\mu\text{g}$ آتروپین بود. **نتیجه‌گیری:** در تمام مواردی که نتیجه ردیابی آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی با استفاده از معرف‌های درازندروف، واگنر و میر مثبت بود، نتیجه ردیابی با روش پیشنهادی تشکیل کمپلکس با BCG نیز مثبت بود. تحقیقات قبلی حاکی از وجود آلکالوئید در این نمونه‌ها می‌باشند. نتیجه ردیابی آلکالوئید با هر دو روش، در مورد چای سیاه و چای کوهی منفی بود. چای سیاه، حاوی آلکالوئیدهای گزانتینی می‌باشد. آلکالوئیدهای گزانتینی با روش تشکیل کمپلکس با BCG قابل ردیابی نمی‌باشند. چای کوهی نیز طبق تحقیقات قبلی، حاوی آلکالوئید نمی‌باشد. حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی با روش تشکیل کمپلکس با BCG، معادل $40\mu\text{g}$ آتروپین می‌باشد که مقدار بسیار کمی است و نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد.

کلمات کلیدی: آلکالوئید گیاهان دارویی، تشخیص، معرف بروموکرزول گرین، مقایسه با روش‌های کلاسیک

* نویسنده مسئول، تهران، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۶۶۹۵۹۰۶۳
email: shamsa@sina.tums.ac.ir

مقدمه

آلکالوئیدها ارگو، عامل ایجاد مسمومیت‌های اپیدمیکی بوده‌اند و به طور وسیع، به این منظور استفاده می‌شوند. از این دسته می‌توان به آرکولین، کافئین و غیره اشاره کرد. آلکالوئیدها در حیوانات، قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان وجود دارند. ولی غنی‌ترین منبع آنها، گیاهان می‌باشند. لذا بررسی وجود آنها در گیاهان، اهمیت زیادی دارد. روش‌های مختلفی، جهت ردیابی و شناسایی آلکالوئیدها، وجود دارند: استفاده از معرف‌های میر (Mayer's reagent)، واگنر (Wagner's reagent)، درازندروف (Dragendorff's reagent)، هاگر

آلکالوئیدها (Alkaloids)، سال‌ها است که شناخته شده‌اند و اغلب آنها، اثرات فیزیولوژیکی قوی در پستانداران و سایر ارگانیزم‌ها دارند. تعدادی از آنها، عوامل مهم دارویی می‌باشند و از نظر مصرف در داروسازی و پزشکی، مورد توجه بوده‌اند. آتروپین، مرفین، کینین، وین کریستین و غیره معرف تعدادی زیادی از آلکالوئیدهایی هستند که برای درمان بیماری‌های مختلف، از مالاریا تا سرطان استفاده می‌شوند. تعدادی از آلکالوئیدها، سمی می‌باشند. به عنوان مثال

معرف Bromocresol Green با غلظت $1 \times 10^{-4} M$ ، ۵ml بافر استات با $pH=4/7$ و ۴ml کلروفورم اضافه شد و آمپول دکانتاسیون، چندین بار تکان داده شد و اجازه داده شد تا دو فاز از هم جدا شوند. در این حالت، وجود رنگ زرد در فاز کلروفورمی، نشان‌دهنده وجود آلکالوئید در محیط می‌باشد که به صورت کمپلکس آلکالوئید BCG وارد فاز کلروفورمی شده است و آن را زرد رنگ کرده است. برای تعیین حداقل مقدار آلکالوئید قابل ردیابی از طریق تشکیل کمپلکس با BCG، از محلول مائی آتروپین استفاده شد. برای این کار بعد از ریختن ۱ml معرف BCG با غلظت $1 \times 10^{-4} M$ ، ۵ml بافر استات با $pH=4/7$ و حدود ۴ml کلروفورم، در یک آمپول دکانتاسیون ۵۰ml، قطره قطره از محلول مائی آتروپین با غلظت $40 \mu g/ml$ به آن اضافه شد و هر بار آمپول دکانتاسیون چندین بار تکان داده شد و اجازه داده شد تا دو فاز از هم جدا شوند و آنقدر ادامه یافت تا بعد از جدا شدن دو فاز، در فاز کلروفورمی، رنگ زرد ایجاد شود. برای تایید کار این عمل با برداشتن حجم مشخصی از محلول مائی آتروپین، تکرار شد.

یافته‌ها

در این تحقیق، بررسی وجود آلکالوئید در ۱۲ نمونه گیاهی با استفاده از روش استفاده از معرف‌های آلکالوئیدها (دراژندروف، واگنر و میر) و روش تشکیل کمپلکس با BCG، مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه این بررسی در جدول ۱ آمده است. نتیجه ردیابی آلکالوئید با استفاده از معرف‌های آلکالوئیدها، در مورد چای سیاه، گل گاوزبان و سرشاخه چای کوهی، منفی و در سایر موارد مثبت بود. نتیجه ردیابی آلکالوئید با روش تشکیل کمپلکس با BCG، در مورد چای سیاه و سرشاخه چای کوهی منفی و در بقیه مثبت بود. حداقل مقدار آلکا لوئید قابل ردیابی با روش کمپلکس با BCG با استفاده از محلول‌های مائی آتروپین، اندازه‌گیری شد که معادل $20 \mu g$ آتروپین بود.

بحث

تحقیقات قبلی حاکی از وجود آلکالوئید در ۱۱ نمونه از ۱۲ نمونه مورد بررسی می‌باشند: سرشاخه زرشک قرمز،^{۹-۱۲}، سرشاخه آدمک،^{۱۳} گل همیشه بهار،^{۱۲} چای سیاه،^{۱۶-۱۷} و^{۱۱} و^{۱۸} مامیران،^{۱۸} و^{۱۶-۱۸} گل گاوزبان،^{۱۹} سرشاخه دم اسب،^{۱۷} و^{۱۸} سرشاخه بذرالبنج،^{۱۷} و^{۱۸} سرشاخه شاه‌تره‌ای،^{۱۷} دانه سفید.^{۱۷} نتیجه بررسی وجود آلکالوئید

(Hager's reagent)، مارکینز (Marquin's reagent)، یدوپلاتینات (Iodoplatinate)، ارلیش (Erlisch's reagent)، Ceric Ammonium Sulfate، محلول ۵٪ اسید سیلیکوتنگستیک (Silicotungstic acid)، محلول اسید پیکرولونیک (Picrolonic acid)^{۳-۶} استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography=TLC)، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-Performance Liquid Chromatography=HPLC)، روش گاز کروماتوگرافی (Gas Chromatography=GC)^۷، روش الکتروفورز روی کاغذ یا لایه نازک (Electrophoresis on Paper or Thin Layer)، طیف سنجی ماوراء بنفش - مادون قرمز (UV-IR spectrophotometry)^۱ و به علت اختلاف در ساختمان مولکولی، تنوع فراوان، حلالیت‌های گوناگون و سایر خواص آلکالوئیدها، بررسی جهت جستجوی آلکالوئیدها در گیاهان، ممکن است مشکل باشد.^۴ در این تحقیق، سعی شد روشی سریع، ارزان و با حساسیت بالا، جهت بررسی وجود آلکالوئید در گیاهان، بر پایه تشکیل کمپلکس با Bromocresol Green ارائه شود.

روش بررسی

از ۱۲ نمونه گیاهی در این بررسی استفاده شد. نمونه‌های گیاهی در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. طبق تحقیقات قبلی، ۱۱ نمونه، حاوی آلکالوئید و یک نمونه فاقد آلکالوئید بودند. محلول مائی Bromocresol Green (BCG) با غلظت $1 \times 10^{-4} M$ به این صورت تهیه شد: $69/8 mg$ از آن در $1/5 ml$ سود $0/2 N$ حل شد و بعد با آب مقطر به حجم ۱lit رسانده شد. بافر استات با $pH=4/7$ طبق USP و محلول مائی آتروپین با غلظت $40 \mu g/ml$ تهیه شد. عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی، با متانول انجام شد و عصاره‌های حاصل، تغلیظ و خشک شدند. در مورد هر نمونه، ۱g از عصاره خشک آن در $20 ml$ اسیدکلریدریک $2N$ ، حل شد و حاصل، صاف شد. سپس $10 ml$ از آن برداشته شد و بررسی وجود آلکالوئید در آن، با معرف‌های دراژندروف، واگنر و میر، انجام شد. $10 ml$ محلول آب-اسیدی عصاره نمونه گیاهی، به یک آمپول دکانتاسیون $10 ml$ منتقل شد. بعد برای حذف مواد رنگی موجود در آن، محلول، چندین بار با کلروفورم (هر بار $10 ml$) شستشو داده شد. تا جایی که همه مواد رنگی حذف شوند و کلروفورم حاصل از شستشو، رنگی نشود. در نهایت، به محلول باقیمانده آنقدر سود اضافه شد تا ختشی شود و به آن $10 ml$

جدول-۱: نتایج بررسی وجود آکالوئید در نمونه‌های گیاهی با استفاده از عصاره متانولی نمونه‌های گیاهی، با روش استفاده از معرف‌های آکالوئیدها و روش تشکیل کمپلکس با BCG

ردیف	نام علمی گیاه	نام فارسی گیاه	بخش مورد استفاده	نتیجه ردیابی آکالوئید	
				روش تشکیل کمپلکس با BCG	استفاده از معرف‌های آکالوئیدها
۱	<i>Berberis vulgaris</i> L.	زرشک قرمز	سرشاخه	+	+
۲	<i>Berberis vulgaris</i> L.	زرشک قرمز	میوه	+	+
۳	<i>Biebersteinia multifida</i> L.	آدمک	سرشاخه	+	+
۴	<i>Calendula officinalis</i>	همیشه بهار	گل	+	+
۵	<i>Camellia sinensis</i>	چای	چای سیاه	-	-
۶	<i>Cheelidonium majus</i> L.	مامیران	سرشاخه	+	+
۷	<i>Echium ammoenum</i> Fisch & Mey	گاوزبان	گل	+	-
۸	<i>Equisetum arvense</i> L.	دم اسب	سرشاخه	+	+
۹	<i>Hyoscyamus niger</i> L.	بذرالنچ	سرشاخه	+	+
۱۰	<i>Hypecoum pendulum</i> L.	شاه‌تره‌ای	سرشاخه	+	+
۱۱	<i>Peganum harmala</i> L.	اسفند	دانه	+	+
۱۲	<i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl	چای کوهی	سرشاخه	-	-

صورتی که وزن مولکولی آکالوئید موجود در محیط، کمتر از وزن مولکولی آتروپین ($MW=578/75$) باشد، مقدار فوق به مراتب کمتر خواهد بود. بنابراین حساسیت روش تشکیل کمپلکس با BCG در ردیابی آکالوئید، بالا می‌باشد و نتایج به دست آمده نیز موید آن می‌باشند گل‌گاوزبان حاوی مقادیر بسیار کمی آکالوئید بوده^{۱۹} و توسط روش استفاده از معرف‌ها، قابل ردیابی نمی‌باشد. ولی با این روش، ردیابی می‌شود. بنابراین با توجه به حساسیت بالای روش تشکیل کمپلکس با BCG در ردیابی آکالوئید در گیاهان، سرعت بالا و عدم نیاز به لوازم و تجهیزات خاص و ارزان بودن آن، روشی بسیار مناسب، جهت بررسی وجود آکالوئید در گیاهان و غربالگری آنها، جهت وجود آکالوئید می‌باشد. *سپاسگزار:* این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. از خانم‌ها قلعه نوی و فریدی بابت تایپ نهایی مقاله تشکر می‌شود.

با معرف‌های درازندروف، واگنر و میر، در مورد تمام نمونه‌های فوق غیر از گل‌گاوزبان و چای سیاه، مثبت بود. نتیجه ردیابی توسط روش تشکیل کمپلکس با BCG نیز در تمام موارد فوق غیر از چای سیاه، مثبت بود. چای سیاه حاوی آکالوئیدهای گزانتینی می‌باشد که با معرف‌های درازندروف، واگنر و میر، قابل ردیابی نمی‌باشند.^۵ نتیجه آن‌که آکالوئیدهای گزانتینی به روش تشکیل کمپلکس با BCG نیز قابل ردیابی نمی‌باشند. نتیجه ردیابی آکالوئید در مورد سرشاخه چای کوهی، با هر دو روش استفاده از معرف‌های آکالوئیدها و روش تشکیل کمپلکس با BCG، منفی بود و تاکنون در مورد وجود آکالوئید در این گیاه، گزارشی وجود ندارد. حداقل مقدار آکالوئید قابل ردیابی توسط روش تشکیل کمپلکس با BCG، معادل $20\mu\text{g}$ آتروپین می‌باشد که مقدار بسیار کمی می‌باشد و با توجه به اینکه تشکیل کمپلکس آکالوئید BCG، یک واکنش مولی می‌باشد، در

References

۱. ایزددوست محمد. در ترجمه شیمی گیاهی، رابینسون ترور (مؤلف). تهران: موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۳۶۳.
۲. Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Baltimor: Williams and Wilkins: 1996.
۳. Evans WC. Trease and Evans' Pharmacognosy. 15th ed. London: WB Saunders Company Ltd: 2002.
۴. Harbone JB. Phytochemical Methods. 3rd ed. London: Chapman and Hall: 1989.
۵. Othmer K, Kirk RE, Othmer DF, Herman FM, Grayson M, Eckroth D. Encyclopedia of Chemical Technology. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons: 1978.
۶. Bulter GW, Bailey RW. Chemistry and Biochemistry of Herbage. London: Academic Press: 1973.
۷. Carker LE, Simon JE. Herbs, spices and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology. Phoenix, AZ: Oryx Press: 1986.
۸. Dey PM, Harborne JB. Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press: 1995.

9. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis*. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag: 1995.
 ۱۰. کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران. تهران: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت غذا و دارو: ۱۳۸۱.
11. Duke JA, Bogenschutz-Godwin MJ, duCellier J. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: CRC Press: 2000.
12. Duke JA. *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants*. Boca Raton: CRC Press: 2001.
13. Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11543-6.
14. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. *Pharmacognosy*. 9th ed. Philadelphia: Lea and Febiger: 1988.
15. DerMarderosian A, Beutler J. *The review of natural products*. 2nd ed. St. Louis: Facts and Comparisons: 2002.
16. Grainger-Bisset N, Wichtl M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press: 2001.
17. Buckingham J. *Dictionary of natural products*. London: Chapman and Hall: 1994.
18. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T, Riggins CW, et al. *The Complete German Commission E Monographs*. Austin, Texas: American Botanical Council: 1998.
19. Wassel G, el-Menshawi B, Saeed A, Mahran G. Toxic pyrrolizidine alkaloids of certain boraginaceous plants. *Acta Pharm Suec* 1987; 24: 199-204.

Visual identification of alkaloids in some medicinal plants: common alkaloid reagents versus bromocresol green

Shamsa F.¹
Esfahani H.R.^{2*}
Gamooshi R.A.³

1- Pharmacology student
2- Department of
Pharmaceutical Chemistry
3- Department of
Pharmacognosy, Faculty of
Pharmacy and Pharmaceutical
Sciences Research Center

Tehran University of Medical
Sciences

Abstract

Background: Alkaloids are a group of nitrogenous compounds with potential effects on the physiological behavior of human and animals. Some of these compounds are considered important drugs in modern medicine, such as atropine and morphine. Plants are considered the most important source of alkaloids. Therefore, investigating the presence of alkaloids in different plants is very important. Usually, alkaloids in plants are identified by methods such as those of Dragendorf, Wagner and Meyer, among others, which require milligrams of alkaloids for identification. In the present study, a fast and sensitive procedure for detecting of alkaloids in plants is presented.

Methods: Twelve dried plants samples were investigated for the presence alkaloids. After extracting the total alkaloid into methanol using a Soxhlet extractor, a few milligrams of the extract was transferred to a separatory funnel, buffered to pH 4.7, the bromocresol green (BCG) solution (10^{-4} M) was added, mixed and extracted with CHCl_3 until a yellow color was observed in the CHCl_3 layer, indicating the presence of the alkaloid. The crude extracts were also investigated by the standard methods of Dragendorf, Wagner and Meyer for the presence of alkaloids.

Results: Investigation of the 12 plant samples for the presence of alkaloids by the standard reagents of Dragendorf, Wagner, and Meyer showed that only *Camelia sinensis* (flowers), *Echium amoenum* Fisch & Mey (flowers), and *Stachys* (aerial parts) are devoid of alkaloids, with all other samples positive for alkaloids. By the BCG procedure, similar results were obtained, except for the *E. amoenum* flower, which was positive. The minimum detectable limit for alkaloids by the BCG method is the equivalent of approximately $40\mu\text{g}$ atropine.

Conclusions: According to previous reports, only one of these plants does not contain alkaloids. All studied plants positive for alkaloids by standard reagents were positive by the BCG procedure. *Stachys* was negative for alkaloids by both the standard reagents and the BCG method, in agreement with previous reports. However, black tea, reported to contain xanthine alkaloids, was negative for alkaloids by both the standard reagents and the BCG method. Therefore, the BCG method is not suitable for the detection of xanthine alkaloids. Nevertheless, the microgram detectable limit for alkaloids indicates that the BCG method is very sensitive.

Keywords: Medicinal plants, alkaloids, visual, identification, ion pair, formation, bromocresol green.

*Corresponding author: Faculty of
Pharmacy and Pharmaceutical
Sciences Research Center
Tel: +98-21-66959063
email: shamsa@sina.tums.ac.ir