دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۴، صفحه ۵۷۳-۵۶۳ (۱۳۹۴)

استخراج و اندازه‌گیری آلکالوئیدهای مورفینان از اندام‌های مختلف سه گونه *Papaver* در مرحله گلدهی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

فضه محمدی[۱*]، رضا حیدری[۲]، سیاوش حسینی[۳] و رشید جامعی[۴]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران، پست الکترونیک: fezzehmohammdi@yahoo.com

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

چکیده

گیاهان دارویی منابعی غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند. در میان این متابولیت‌ها، آلکالوئیدها گروه مهمی را تشکیل می‌دهند. *Papaver bracteatum* Lindl.، *Papaver orientale* L. و *Papaver fugax* Poir. گیاهان دارویی از خانواده خشخاش هستند. خصوصیات دارویی این گیاهان مربوط به قابلیت تولید و بیوسنتز گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین (از زیرگروه آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینولین) است. مورفینان‌ها (مورفین، کدئین و تبائین) رده‌ای از آلکالوئیدهای ایزوکوئینولین با عملکرد متنوع دارویی هستند. در تحقیق حاضر، گیاهان در مراحل آغازین گلدهی جمع‌آوری شدند. سونیکاتور و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌ترتیب برای عصاره‌گیری و اندازه‌گیری مورفینان‌ها استفاده شدند. همچنین برای سنجش آلکالوئید تام از اسپکتروفتومتر استفاده شد. نتایج نشان داد مقادیر نسبتاً بالایی از آلکالوئید تبائین در سه گونه فوق وجود دارد. میزان کدئین نسبت به تبائین کمتر بوده اما توزیع این آلکالوئیدها در قسمت‌های مختلف هر کدام از گیاهان متفاوت بود. طبق نتایج بالاترین میزان آلکالوئید تام در کپسول و ریشه *P. Bracteatum* و *P.orientale* وجود داشت، در حالی‌که بیشترین آلکالوئید *P. fugax* در ساقه مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئید، خشخاش، HPLC.

مقدمه

گیاهان دارویی منابعی غنی از متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites) هستند که از مهمترین این ترکیب‌ها، آلکالوئیدها را می‌توان نام برد (ابراهیم‌زاده، ۱۳۸۳). آلکالوئیدها موادی بسیار متنوع هستند که بر حسب خصوصیات بیوشیمیایی و شیمیایی در گروه‌های مختلفی قرار می‌گیرند و تأثیرات قابل‌توجهی روی سیستم عصبی انسان دارند. مورفین، کدئین و تبائین (مورفینان‌ها) تقریباً مهمترین ترکیب‌های طبیعی هستند که به‌عنوان آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین رده‌بندی می‌شوند. تولیدکننده‌های اصلی مورفینان‌ها به‌طور عمده در تعدادی از گونه‌های گیاهی خانواده خشخاش (Papaveraceae) وجود دارند (Pengelly, 2004). *P. somniferum* L. و *P. bracteatum* Lindl. ازجمله این گیاهان هستند، اما

این گروه از آلکالوئیدها در مقدار کم از *P. fugax* Poir.، *P. setigerum* D.C.، *P. orientale* L. و *P. rhoeas* L. نیز بدست آمده‌است (Phillipson, 1983). کدئین یک آرام‌بخش ملایم‌تر از مورفین است و برای تسکین و رفع سرفه و دردهای معدی مفید می‌باشد (زرگری، ۱۳۷۶). تبائین به‌دلیل ویژگی غیرمخدری و همچنین به‌دلیل اینکه ترکیب باارزشی برای ساخت داروهایی مثل Oxycodone، Oxymorphone، Etrophine، Naloxone، Buprenorphine و ... است، از اهمیت خاصی برخوردار است (Goldblatt, 1974). به‌طور کلی فاکتورهای مختلف محیطی مثل نور، رطوبت، دما، تغذیه، میزان دی‌اکسیدکربن محیط (Brent, 2007) و ارتفاعی که گیاه رشد می‌کند، همچنین عوامل ژنتیکی مانند ژنوتیپ و مرحله رویش گونه گیاهی (کریمی و همکاران، ۱۳۸۸) روی محتوای آلکالوئیدهای گیاه تأثیر می‌گذارد (Aniszewski, 2007). سنتز شیمیایی این ترکیب‌های ارزشمند به‌دلیل ساختار پیچیده‌ای که دارند، سخت است. با وجود تولید این مواد به روش مصنوعی، گیاهان وحشی به‌عنوان تنها منبع مهم تجاری تأمین‌کننده این ترکیب‌ها مورد توجه می‌باشند (Verpoorte & Memelink, 2002). در تحقیق حاضر میزان آلکالوئیدهای تبائین و کدئین در گونه‌های *P. orientale*، *P. bracteatm* و *P. fugax* اندازه‌گیری گردید. آنالیز این ترکیب‌ها در مراحل آغازین گلدهی انجام شد، با توجه به اینکه بیشتر مطالعات روی گونه‌های خشخاش برای آنالیز کپسول انجام شده است (Milo *et al*., 1988)، در تحقیق حاضر ریشه، ساقه و برگ این گیاهان نیز از نظر مقدار تبائین و کدئین آنالیز شد. همچنین میزان آلکالوئید تام در آنها اندازه‌گیری گردید. در این بررسی برای افزایش کارایی و کاهش مشکلات مربوط به تجزیه ترکیب‌ها به‌واسطه حرارت زیاد در روشهای سنتی، عصاره‌گیری به روش اولتراسوند انجام شد و به‌وسیله دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا) به‌دلیل گزینش‌پذیری مناسب و حساسیت بالا، مقدار کمّی این ترکیب‌ها اندازه‌گیری شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

نمونه‌های گیاهی *P. fugax* و *P. bracteatum* از گردنه زمزیران در۲۰ کیلومتری سردشت و *P. orientale* در ۵۰ کیلومتری اشنویه از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری شدند. جمع‌آوری گیاهان یک تا دو هفته بعد از باز شدن اولین گلبرگ در ۲۱ و ۲۲ خردادماه سال۱۳۹۰ انجام گردید (قسمت‌های مختلف گیاهان به‌طور همزمان جمع‌آوری شدند). گونه‌های جمع‌آوری شده توسط گیاه‌شناسان هرباریوم گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه مورد شناسایی قرار گرفتند. قسمت‌های مختلف گیاهان جمع‌آوری شده (ریشه، کپسول، برگ و ساقه) به‌طور جداگانه در تاریکی و دمای اتاق خشک و آسیاب شدند.

آماده‌سازی محلول‌های استاندارد برای HPLC

محلول‌های متانولی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کدئین و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تبائین آماده شدند. منحنی استاندارد کدئین با غلظت‌های ۱۵/۶۲۵، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام و تبائین با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام رسم شد. حجم ۲۰ میکرولیتری از استانداردها تزریق شدند.

عصاره‌گیری آلکالوئیدی برای تزریق به HPLC

برای عصاره‌گیری از روش Kern و همکاران (۱۹۹۸) و Milo و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد. ۱ گرم از بافت گیاهی پودر شده با ۴۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۲/۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه به‌وسیله سونیکاتور عصاره‌گیری شد. بعد از سانتریفوژ ۵۰۰۰g و صاف کردن، عصاره‌گیری برای بار دوم با ۴۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۲/۵٪ تکرار شد. محلول‌ها صاف شده و ترکیب شدند. سپس فاز آبی به‌منظور چربی‌زدایی با ۲۸ میلی‌لیتر هگزان مخلوط شده و تکان داده شد. دو فاز تشکیل شده به‌وسیله قیف جداکننده از هم جدا گردید. در مرحله بعد pH فاز آبی با آمونیاک قلیایی و بعد فاز آبی به‌وسیله کلروفرم-پروپانول (نسبت۳ به ۱) سه بار و

هر بار با ۴۵ میلی‌لیتر عصاره‌گیری شد و توسط روتاری تغلیظ گردید. ۲/۵ میلی‌لیتر متانول به باقی‌مانده اضافه شد و به‌وسیله کاغذ صافی ۰/۴۵μm صاف گردید.

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

برای آنالیز عصاره از دستگاه HPLC (مدل Knauer، ساخت آلمان) استفاده شد. Flow rate برابر ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک بکار برده شده استونیتریل و بافر استات سدیم با pH=۳/۲ (۱ گرم استات سدیم در ۳۹۰ میلی‌لیتر آب) بود. نوع ماده پرکننده C_{18} reversed و طول ستون ۲۵ سانتی‌متر و اندازه ذرات پایه ۵ میکرومتر بود. دتکتور استفاده شده UV با طول موج ۲۸۰ نانومتر و حجم هر بار تزریق برابر ۲۰ میکرولیتر بود. دمای اتاق برای انجام آزمایش، ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی محلول‌ها برای اندازه‌گیری آلکالوئید تام

برای آزمایش‌ها از روش قموشی و همکاران (۱۳۸۷) استفاده گردید. محلول بروموکرزول سبز $۱×۱۰^{-۴}$ با حرارت دادن ۶۹/۸ میلی‌گرم از برموکرزول سبز رنگ با ۳ میلی‌لیتر از سدیم هیدروکسید ۲ نرمال و ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط شد، محلول حاصل تکان داده شد تا حل شود و در بالن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری با آب دیونیزه به حجم رسانده شد و محلول بافر فسفات ۰/۴۳ مولار با اسید سیتریک ۰/۲ مولار به pH=۴/۷ رسید. از مورفین (تهیه شده از معاونت مواد غذا و داروی تهران) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید.

آماده‌سازی محلول استاندارد برای اندازه‌گیری آلکالوئید تام

مقادیر متفاوتی از محلول استاندارد مورفین (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ میلی‌لیتر) به یک قیف جداکننده منتقل شدند. سپس ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات با pH=۴/۷ و ۵ میلی‌لیتر بروموکرزول به قیف جداکننده اضافه شد. بعد به‌ترتیب ۵، ۸ و ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به محلول اضافه، و بشدت تکان داده شد تا عصاره‌گیری انجام شود. فاز کلروفرمی به بالن حجم‌سنجی ۲۵ میلی‌لیتر منتقل شده و به حجم رسید. سپس جذب کمپلکس در کلروفرم در ۴۱۵ نانومتر در مقابل محلول شاهد اندازه‌گیری شد (Yunusov *et al*., 1965).

عصاره‌گیری آلکالوئیدی برای اندازه‌گیری آلکالوئید تام

برای عصاره‌گیری از روش تغییر یافته Kern و همکاران (۱۹۹۸) استفاده گردید. ۱ گرم بافت گیاهی به روشی که برای تزریق به HPLC آماده شده بود عصاره‌گیری شد و بعد ۱۰ میلی‌لیتر از محلول اسیدی برای چربی‌زدایی با ۱۰ میلی‌لیتر هگزان مخلوط گردید. دو فاز تشکیل شده به‌وسیله قیف جداکننده از هم جدا شد. در مرحله بعد فاز اسید با سه بار و هر بار ۱۵ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. آنگاه pH فاز اسیدی با سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال خنثی گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۵ میلی‌لیتر از محلول برموکروزول و ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات مخلوط شد و کمپلکس در نهایت با ۵، ۸ و ۱۰ میلی‌لیترکلروفرم عصاره‌گیری گردید. عصاره نهایی به یک بالن حجم‌سنجی ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شد و با کلروفرم به حجم رسید. جذب کمپلکس در کلروفرم در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تمام آزمایش‌های انجام شده سه تکرار در نظر گرفته شد و نتایج به‌صورت مقادیر میانگین و خطای استاندارد (SE) بیان گردید. اختلاف بین قسمت‌های مختلف یک گیاه با استفاده از آنالیز واریانس تک سویه (ANOVA) در سطح آماری ۵٪ ($p\leq۰/۰۵$) انجام شد. برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار SPSS و EXCEL استفاده شد.

نتایج

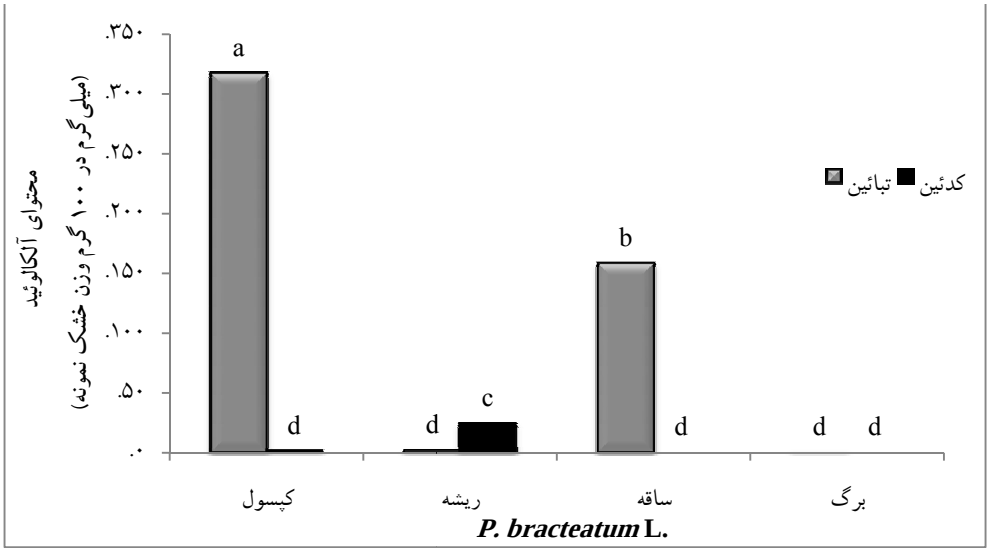
نتایج حاصل از بررسی میزان آلکالوئیدهای تبائین و کدئین با محاسبه سطح زیر منحنی‌های HPLC و مقایسه آنها با منحنی‌های استاندارد با میانگین ۳ تکرار برای هر نمونه بدست آمد. مقدار آلکالوئیدها در جدول ۱ نشان داده شده‌است.

جدول ۱- مقایسه مقدار آلکالوئیدهای مورفینان استخراج شده از اندام‌های مختلف گیاهان بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک و آلکالوئید تام برحسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک نمونه

(مقادیر، میانگین ۳ تکرار±انحراف معیار)

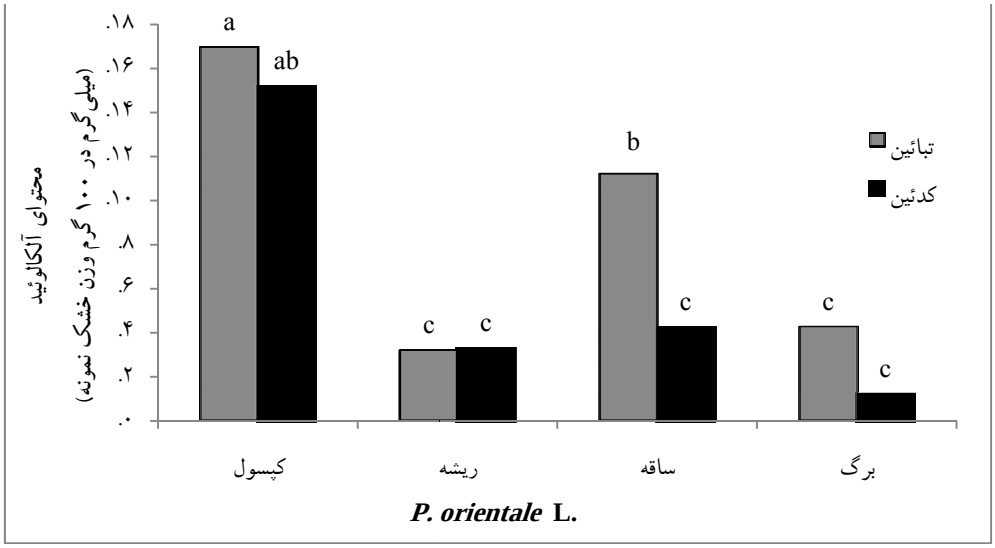
نام گیاه	اندام گیاه	محتوای تبائین	محتوای کدئین	آلکالوئید تام
***Papaver bracteatum* L.**	کپسول	۳۱۷/۰۹±۳	۱/۲±۰/۲۳	۲۹/۴۵±۰/۳
	ریشه	۱/۹±۰/۲۱	۲۴/۰۱±۲/۶	۳۱/۸±۰/۲۹
	ساقه	۱۵۸/۳±۲/۶	*	۴/۰۳±۰/۳۱
	برگ	۰/۲۱±۰/۰۲	-	۱/۵۵±۰/۱
***Papaver orientale* L.**	کپسول	۱۶/۹±۱/۲	۱۵/۱۸±۱/۱	۲۵/۸±۰/۲۴
	ریشه	۳/۲±۰/۱۴	۳/۲۷±۱	۳۰/۱۴±۰/۱۸
	ساقه	۱۱/۲±۱/۶	۴/۲۵±۱/۳	۹/۱۸±۰/۲
	برگ	۴/۲۶±۰/۶	۱/۲±۰/۰۸	۴/۰۳±۰/۴
***Papaver fugax* Poir.**	ریشه	۱/۵۴±۰/۲	۲/۴۸±۰/۱۶	۳۰/۳۶±۰/۴
	ساقه	۸۷/۵۴±۴/۳	۴۷/۶۶±۴	۱۷/۸۹±۰/۴
	برگ	-	۱۶/۵۸±۱/۴	۲/۳۶±۰/۰۹

*: قابل ردیابی



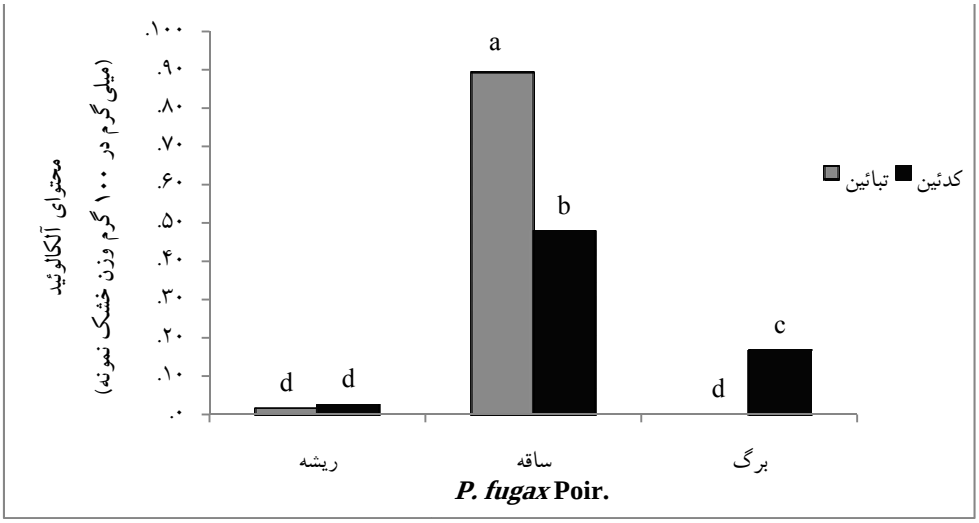
شکل ۱- مقدار آلکالوئید در ***P. bracteatum* L.**

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ است.



شکل ۲- مقدار آلکالوئید در *P. orientale* L.

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است.



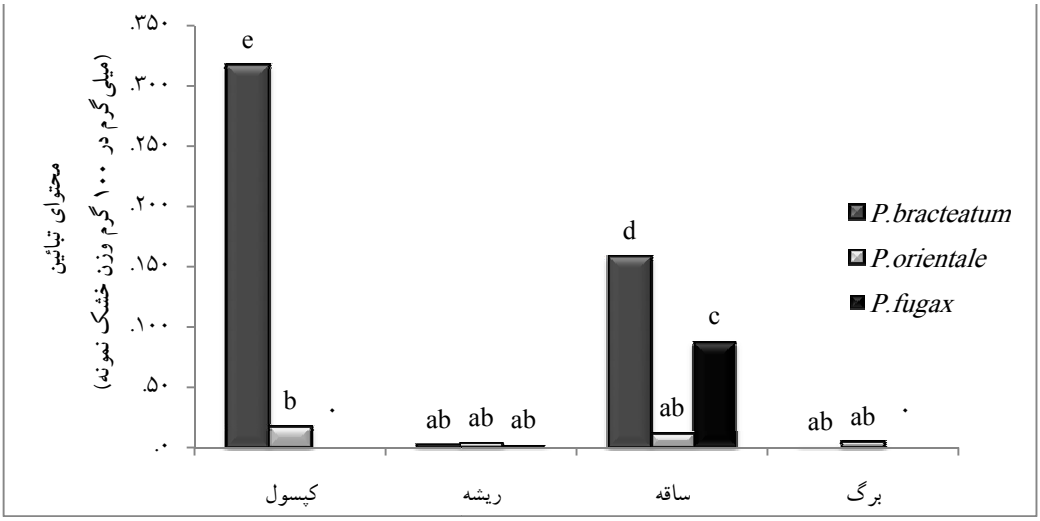
شکل ۳- مقدار آلکالوئید *P. fugax* Poir

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است.

آنالیز عصاره‌های تهیه شده از اندام‌های مختلف گیاهان مورد تحقیق نشان داد که بالاترین میزان تبائین در *P. bracteatum* و *P. orientale* به‌ترتیب از کپسول و ساقه و در *P. fugax* از ساقه بدست آمد (کپسول *P. fugax* بررسی نشده‌است). در *P. bracteatum* تبائین در ریشه بیشتر از برگ بود و در *P. orientale* برگ مقدار بالاتری تبائین داشت، در *P. fugax* میزان تبائین ریشه مشابه با *P. bracteatum* و برگ فاقد تبائین بود. در این تحقیق میزان تبائین در برگ‌های *P. bracteatum* و *P. orientale* به‌ترتیب ۰/۲۱±۰/۰۲ و ۴/۲±۰/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک نمونه بدست آمد. مقدار کدئین در اندام‌های مختلف سه گونه مورد بررسی توزیع غیرهمگنی نشان داد، به‌طوری که در *P. bracteatum* بیشترین مقدار کدئین (۲/۶±۲۴/۰۱) از ریشه بدست آمد. در کپسول به میزان کم، در ساقه در حد قابل ردیابی و برگ فاقد

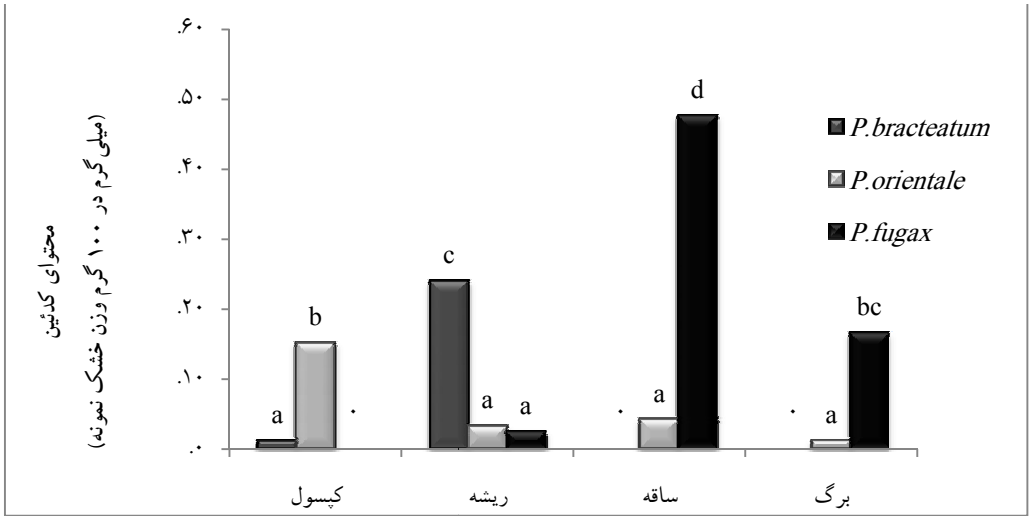
کدئین بود. در *P. orientale* بالاترین مقدار کدئین به‌ترتیب در کپسول، ساقه، ریشه و برگ مشاهده گردید و در *P. fugax* ساقه، برگ و ریشه به‌ترتیب بیشترین مقدار کدئین را داشت (شکل‌های ۳-۱).

تبائین در هر سه گونه مورد بررسی نسبت به کدئین مقدار بیشتری داشت، به استثناء ریشه که در *P. bracteatum* و *P. fugax* کدئین بیشتر بود و در *P. orientale* مقدار تبائین و کدئین اختلاف معنی‌داری نداشت. در این تحقیق بیشترین مقدار تبائین در کپسول *P. bracteatum* و بالاترین مقدار کدئین در ساقه *P. fugax* مشاهده شد و *P. orientale* از نظر تولید تبائین و کدئین در حد بین *P. bracteatum* و *P. fugax* قرار گرفت. مقایسه تبائین و کدئین گونه‌های مورد بررسی در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده‌است.



شکل ۴- مقایسه تبائین در ۳ گونه مورد بررسی

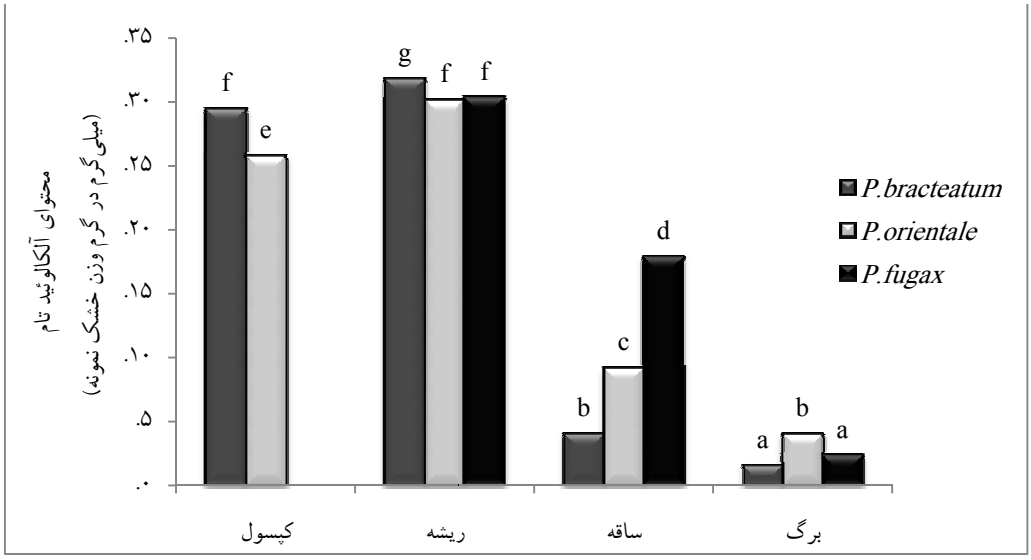
حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است.



شکل ۵- مقایسه کدئین در ۳ گونه مورد بررسی

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است.

آلکالوئید تام در هر ۳ گونه مورد بررسی به‌ترتیب در اندام ریشه، کپسول، ساقه و برگ مشاهده شد که در این میان محتوای آلکالوئید تام ریشه و کپسول *P. bracteatum* بالاترین مقدار (به‌ترتیب: ۰/۲۹±۳۱/۸ و ۰/۳±۲۹/۴۵) را نشان داد. آنالیز محتوای آلکالوئید تام در ۳ گونه نشان می‌دهد که ریشه و کپسول در مرحله آغازین گلدهی بالاترین مقدار آلکالوئید تام را داشتند و قسمت‌های اصلی دربردارنده این ترکیب‌ها بودند (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه آلکالوئید تام در ۳ گونه مورد بررسی

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq ۰/۰۵$ است.

بحث

Neubauer و Mothes (۱۹۶۳) تبائین را به‌عنوان آلکالوئید اصلی جمعیت هیبرید (Halle III) *P. bracteatum* گزارش کردند. همچنین Shargi و Lalezari (۱۹۶۷) بالاترین میزان تبائین (حدود ۲۶٪) را در کپسول‌ها یا لاتکس *P. bracteatum* گزارش کردند که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر میزان تبائین در *P. orientale* کمتر از *P. bracteatum* می‌باشد؛ همان‌طور که Milo و همکاران (۱۹۸۸) میزان تبائین کپسول و ریشه *P. bracteatum* را به‌ترتیب ۲/۱۵٪ و ۰/۹۲٪ و *P. orientale* را ۰/۰۶٪ و ۰/۰۷٪ وزن خشک گیاه اعلام کردند. در بعضی منابع آوری‌پاوین (Milo *et al.*,1988؛ Pengelly, 2004) و در بعضی دیگر اورینتالیدین و ایزوتبائین، آلکالوئید اصلی *P. orientale* معرفی شده‌است (Cheng, 1972). میزان تبائین در *P. fugax* در ساقه بالاترین مقدار را شامل می‌شد که از مقدار تبائین موجود در *P. bracteatum* کمتر و از *P. orientale* بیشتر بود که با نتایج حاصل از کارهای قبلی مطابقت داشت. Phillipson و همکاران (۱۹۷۳) و Sariyer (۲۰۰۲) تبائین را از آلکالوئیدهای اصلی *P. fugax* معرفی کردند. Salehi و همکاران (۲۰۰۷) مقدار تبائین *P. fugax* را ۰/۳±۳۴/۲ پی‌پی‌ام و Fakhari و همکاران (۲۰۱۰) ۰/۱۲±۶/۴۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گزارش کردند. الگوی توزیع تبائین در *P. orientale* در قسمت‌های مختلف از الگوی توزیع آن در *P. bracteatum* پیروی می‌کند، با این تفاوت که مقدار آن خیلی کمتر می باشد. دلیل مشابه بودن الگوی توزیع تبائین در دو گونه را می‌توان به قرابت خویشاوندی این دو گونه نسبت داد، به‌طوری که این دو گونه همراه با *P. pseudo-orientale* در یک جنس قرار می‌گیرند (Goldblatt, 1974). با توجه به نتایج این بررسی

به نظر می‌رسد کپسول *P. bracteatum* به علت غنی بودن از تبائین می‌تواند برای بهره‌برداری از این ماده مناسب‌تر باشد. کدئین در بسیاری از بررسی‌ها به‌عنوان آلکالوئید فرعی در *P. bracteatum* (Craker & Simon, 1986؛ Theuns *et al*., 1984) و *P. orientale* (Craker & Simon, 1986؛ Kassem & Jacquin, 2001) معرفی شده‌است، همچنین حضور کدئین در *P. fugax* نیز به‌وسیله Salehi و همکاران (۲۰۰۷) و Fakhari و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده‌است. در تحقیق حاضر مقدار کدئین در دو گونه *P. bracteatum* و *P. orientale* نسبت به مقدار آن در *P. fugax* کمتر بود و ساقه *P. fugax* بالاترین میزان کدئین را شامل می‌شد، نتیجه این بررسی در هماهنگی با یافته‌های قبلی است.

طبق نتایج حاصل از این بررسی میزان تبائین ریشه پایین و در عوض میزان آن در ساقه نسبتاً بالا بود، درحالی که کارهای قبلی نشان می‌دهد که علاوه‌بر کپسول، ریشه نیز از بخش های اصلی ذخیره‌کننده تبائین در گیاه است (Milo *et al*., 1988). همچنین مقدار کدئین برخلاف *P. bracteatum*، در ریشه *P. orientale* و *P. fugax* نسبت به قسمت های دیگر کم بود. عدم همخوانی این نتایج با مطالعات انجام شده را می‌توان به مرحله جمع آوری نمونه‌های گیاهی نسبت داد. Fairbairn و Helliwell (۱۹۷۷) و Aynehchi و Jaffarian (۱۹۷۳) گزارش کردند که آغاز گلدهی با کاهش معنی‌داری در محتوای تبائین ریشه همراه است که نتایج حاصل از این تحقیق کاملاً در هماهنگی با نتایج فوق بود. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که محل سنتز تبائین و کدئین ریشه است (Kassem & Jacquin, 2001). دلیل مقدار پایین آن را می‌توان به انتقال آن از محل سنتز به اندام‌های هوایی در مرحله گلدهی نسبت داد و جابجایی آنها از ریشه به ساقه، برگ و کپسول باعث کاهش مقدار آن در ریشه می‌شود. اختلاف در تنوع و مقدار آلکالوئیدهای ۳ گونه مورد بررسی را می‌توان به سطح پلوئیدی نسبت داد. همانطور که Milo و Levy (۱۹۸۹) اعلام کردند طیف آلکالوئیدی در گیاه و به‌ویژه نسبت آن بین آلکالوئیدهای مورفینان و غیرمورفینان به سطح پلوئیدی مربوط می‌شود. *P. bracteatum* با سطح پلوئیدی ۲n=۱۴ یک گیاه دیپلوئید، *P. orientale* با ۲n=۲۸ یک گیاه تتراپلوئید و *P. fugax* نیز با ۲n=۱۴ گیاهی دیپلوئید می‌باشد (Gaffari, 2008). با توجه به اینکه از نظر بیوسیستماتیکی *P. bracteatum* و *P. orientale* در بخش Oxytona و *P. fugax* در بخش Miltantha جنس *Papaver* قرار دارد، تفاوت در مقدار و طیف آلکالوئیدی در این ۳ گونه می‌تواند به‌دلیل تفاوت در ژنتیک این ۳ گیاه باشد (Goldblatt, 1974؛ Sariyer, 2002). طبق تحقیقات Milo و همکاران (۱۹۸۷) محتوای تبائین در گیاهان تتراپلوئید طی دو فصل رشد متوالی، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان دیپلوئید دارد. همچنین مشاهده شد که در مقایسه با گیاه دیپلوئید (۱۳/۲)، تعداد کپسول‌های هر گیاه در تتراپلوئید (۵) و تری‌پلوئید (۸/۳) کاهش معنی‌داری داشت، این در حالیست که در فصل اول رشد، گیاهان تریپلوئید با اینکه تعداد کپسول های کمتری دارند، مقدار تبائین (۸/۸٪) بیشتری تولید می‌کنند. البته باید اذعان کرد که علاوه‌بر عوامل ژنتیکی، تفاوت در شرایط رشد به دلیل اختلاف در شرایط محیطی رشد و عوامل تنش‌زا نیز بر روی مقدار آلکالوئیدها و نسبت آنها در یک گیاه تأثیرگذار هستند، مثلاً ترکیب‌هایی مثل سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید، ازجمله مولکول های مؤثر در مسیر علامت‌رسانی تنش‌ها هستند. نقش سالیسیلیک اسید در مقاومت گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زا و سایر عوامل تنش‌زا به خوبی شناخته شده‌است و گزارش شده‌است که باعث افزایش آلکالوئیدها در کشت‌های تعلیقی ریشه‌های تراریخته می‌شود (Alvarez *et al*., 2000). دیلمقانی و همکاران (۱۳۸۶) گزارش کردند که برخی عوامل محیطی روی میزان تولید آلکالوئیدهای تروپان در این گیاه تأثیر می‌گذارند؛ به عنوان مثال، با افزایش ارتفاع، میزان نیتروژن و فسفر خاک، و مقدار آلکالوئیدها نیز افزایش می‌یابد. در حالی‌که بعکس، کاهش پتاسیم خاک باعث افزایش میزان آلکالوئیدهای تروپان می‌شود. Brent (۲۰۰۷) تأثیر میزان دی‌اکسید کربن

روی محتوای آلکالوئیدی را بررسی و اعلام کرد که مقدار تبائین تولید شده در کشت سلولی *P. bracteatum* در غلظت ۱۰۰۰۰μL/L دی‌اکسید کربن بالاتر از غلظت ۳۵۰μL/L است.

طبق نتایج بالاترین میزان آلکالوئید تام در کپسول و ریشه ۳ گونه مورد بررسی مشاهده شده‌است، مقدار آن در ساقه و برگ در مقایسه با آنها کمتر است ولی با توجه به اینکه ساقه و برگ بیومس زیادی تولید می‌کنند مقدار کمتر محتوای آلکالوئیدی در آنها قابل چشم‌پوشی نیست و از نظر تولید آلکالوئید می‌توانند به عنوان منبع خوبی برای تولید این ترکیب ها در نظر گرفته شوند. هنگام گل دادن و تولید میوه، آلکالوئیدها اغلب در محل‌های تولید گل در میوه‌ها یا دانه‌ها جای می‌گیرند (حیدری، ۱۳۶۰). زیاد بودن مقدار آلکالوئیدها در کپسول‌ها می‌تواند به‌دلیل مرحله رشد این گیاهان باشد، همانطور که بررسی‌های Klan (۱۹۳۱) نشان می‌دهد در گیاه *Hyoscyamus niger* اندام‌های هوایی گلدار بیشتر از اندام‌های هوایی بدون گل حاوی آلکالوئید هستند. مرحله رشد گیاه یکی از عوامل اصلی و مهم در تعیین مقدار و نوع آلکالوئید در گیاه است. کریمی و همکاران (۱۳۸۸) اعلام کردند که میزان آلکالوئیدها در فصول و ارتفاعات مختلف به این صورت تغییر می‌کند که در طی یک دوره رویش مقدار آلکالوئیدها در ابتدا کم بوده، سپس به‌تدریج زیاد شده و مقدار آن درست با ابتدای گلدهی و ظهور اولین گل به بیشینه می‌رسد و بعد دوباره کاهش می‌یابد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که به‌طور کلی مقدار آلکالوئیدها در قسمت های مختلف یک گیاه تحت تأثیر عوامل متفاوتی قرار می‌گیرد که مهمترین این عوامل مرحله رشد گیاه، شرایط جوی و محل سنتز و ذخیره این ترکیب هاست و تفاوت محتوای آلکالوئیدی سه گونه مورد بررسی را می‌توان به سطح پلوئیدی، ظرفیت فتوسنتزی و قرابت خویشاوندی نسبت داد. با توجه به اینکه گونه‌های مورد بررسی هر کدام غنی از آلکالوئیدهای مورفینان می‌باشند و با توجه به تأثیر عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی روی مقدار آلکالوئیدهای این گیاهان، بررسی این گونه‌ها و دیگر گونه‌های خشخاش ضروری به نظر می‌رسد. همچنین بررسی عواملی (تنش‌زا و محیطی) که باعث تغییر مقدار این ترکیب‌ها در گیاه می‌شوند (کشت هیبرید، کشت سلولی و ...) به‌دلیل ارزش دارویی آنها حائز اهمیت است.

سپاسگزاری

از خانم مهندس ندا فرناد بدلیل همکاری بسیار مفید و در اختیار قرار دادن اطلاعات مورد نیاز، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- ابراهیم‌زاده، ح.، ۱۳۸۳. فیزیولوژی گیاهی (ترجمه). انتشارات خانه زیست‌شناسی، تهران، ۷۵۱ صفحه.
- حیدری، ر.، ۱۳۶۰. سیری در زیست شیمی گیاهی (ترجمه). مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۲۸۵ صفحه.
- دیلمقانی، ک.، فهیمی، ر.، خاوری‌نژاد، ر. ع. و حکمت شعار، ح.، ۱۳۸۶. مقایسه آلکالوئیدهای تروپان گونه‌های *Hyoscyamus reticulates* L.، *Hyoscyamus arachnoideus* L. و *Hyoscyamus pojark* L. در مراحل مختلف رشد. علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، ۶۶: ۵۱-۶۱.
- زرگری، ع.، ۱۳۷۶. گیاهان دارویی (جلد ۱). انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۹۷۶ صفحه.
- قموشی، ر.، شمسا، ف. و منصف اصفهانی، ح.ر.، ۱۳۸۷. وجود آلکالوئید در نمونه‌های گیاهی: روش معرفهای آلکالوئیدی در مقایسه با برومو کرزول گرین. دانشکده پزشکی، ۴(۶۶): ۲۴۱-۲۳۷.
- کریمی، ف.، امینی اشکوری، ط. و زینالی، ا.، ۱۳۸۸. تغییرات محتوای آلکالوئید تام، آتروپین و اسکوپولامین در برگ گیاه شاه‌بیزک (*Atropa belladonna* L.) ازرویشگاه واز- شمال ایران، در ارتباط با برخی عوامل فنولوژیکی و محیطی. زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۱(۲-۱): ۸۸-۷۷.
- Alvarez, P.S., Spollansky, T.C. and Giulietti, A.M., 2000. The influence of different biotic and abiotic elisitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root culture of *Brugmensia*

Papaver section *oxytona*. XII Eucarpia Congress, Book of Poster Abstract, Goettingen (Germany), 27 Feb-4 Mar, 20: 7.
- Milo, J., Levy, A. and Palevitch, D., 1988. High performance liquid chromatographic analysis of the alkaloid spectrum in the roots and capsules of the species and hybrids of *Papaver bracteatum* section *oxytona*. Journal of Chromatography B, 452: 563-570.
- Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G., 1987.The baine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *Papaver bracteatum* Lindl. Euphytica, 36: 361-367.
- Neubauer, D. and Mothes, K., 1963. Uber *Papaver bracteatum* I. Mitteilung, ein neuer weg zur gewinnung von morphinanen auf pflanztichef rohstoffbasis. Planta Medica, 11: 387-391.
- Pengelly, A., 2004. The constituents of medicinal plants, an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. Allen &Unwin, Australia, 184p.
- Phillipson, J.D., Sariyar, G. and Baytop, T., 1973. Alkaloids from *Papaver fugax* of Turkish origin. Phytochemistry, 12: 2431-2434.
- Phillipson, J.D., 1983. Interspecific variation and alkaloids of *Papaver* species. Planta Medica, 48: 187-192.
- Salehi, P., Sonoboli, A., Fakhari Zavareh, A., Sefidkon, F., Dayeni, M. and Cheraghi, B., 2007. Narcotic alkaloids of four *Papaver* species from Iran. Zeitschrift für Naturforschung, 62: 16-18.
- Shargi, N. and Lalezari, I., 1967. *Papaver bracteatum* Lindl. a highly rich source of thebaine. Nature, 213: 1244.
- Sariyer, G., 2002. Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* species. Pure and Applied Chemistry, 74(4): 557-574.
- Theuns, H.G., Lenting, H.B.M., Salemink, C.A., Tanaka, H., Shibata, M., Ito, K. and Lousberg, R.J.J., 1984. Neodihydrothebaine and bractazonine, two dibenz[d,f]azonine alkaloids of *Papaver bracteatum*. Phytochemistry, 23(5): 1157-1166.
- Yunusov, S.Y., Mnatsakanyan, V.A. and Akramov, S.T., 1965. Alkaloids from some species of papaver and roemeria and the structure of fugapavin. *Seriya* Khimicheskaya, 3: 502-509.
- Verpoorte, R. and Memelink, J., 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. Current Opinion in Biotechnology, 13(2): 181-187.

candida. Enzyme and Microbial Technology, 26(2-4): 252-258.
- Aniszewski, T., 2007. Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier, Amsterdam, 316p.
- Aynehchi, Y. and Jaffarian, S., 1973. Determination of thebaine in various parts of *Papaver bracteatum* during the growing season. Lloydia, 36(4): 427-429.
- Brent, H.T., 2007. Tissue culture of plant material enriched in secondary metabolites. United States Patent, US00160706 B2.
- Cheng, P.C., 1972. Cultivationand and Analysis of *Papaver bracteatum* Lindley. University of Mississippi, 120p.
- Craker, L.E. and Simon, J.E., 1986. Herbs, Spices and Medicinal Plants. Academic Press, INC. 255p.
- Fairbairn, J.W. and Helliwell, K., 1977. *Papaver bracteatum* Lindley: Thebaine content in relation to plant development. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 29: 65-69.
- Fakhari, A.R., Nojavan, S., Ebrahimi, S.N. and Evenhuis, C.J., 2010. Optimized ultrasound-assisted extraction procedure for the analysis of opium alkaloids in papaver plants by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. Journal of Separation Science, 33(14): 2153-2159.
- Gaffari, S.M., 2008. Chromosome reports for some plant species from Iran. Journal of Botany, 14(1): 39-46.
- Goldblatt, P., 1974. Biosystematic Studies in Papaver Section *Oxytona*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 297p.
- Kassem, M.A. and Jacquin, A., 2001. Somatic embryogenesis, rhizogenesis, and morphinan alkaloids production in two species of opium poppy. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 1(2): 70-78.
- Kern, L., Glantschnig, S. and Sorgner, U., 1998. Determination of the five major opium alkaloids by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a base-deactivated stationary phase. Chromatographia, 47: 21-24.
- Klan, Z.F., 1931. Influence of period of vegetation and development of plant on the alkaloidal content of *Hyoscyamus niger* L. American Pharmaceutical Association, 11: 1163-1174.
- Milo, J. and Levy, A., 1989. Effect of ploidy level on the spectrum of alkaloids in interspecific hybrids of

Extraction and determination of morphinane alkaloids from different parts of three *Papaver* species in the flowering stage using HPLC

F. Mohammadi[1*], R. Heidari[2], S. Hosieni[2] and R. Jamei[2]

1*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: fezzehmohammdi@yahoo.com
2- Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

Received: May 2013 Revised: March 2014 Accepted: March 2014

Abstract

Medicinal plants are rich sources of secondary metabolites. Among these metabolites, alkaloids are an important group**.** *Papaver bracteatum* Lindl., *Papaver orientale* L**.** and *Papaver fugex* Poir are medicinal plants from Papaveraceae family. Medicinal characteristic of these plants depend on their capability to produce and biosynthesis of benzophenanthridine alkaloids which are a sub-group of isoquinoline alkaloids. Morphinanes (morphine, codeine and thebaine) are a class of isoquinoline alkaloids with different functionality in medicine. Due to the importance of morphinanes in clinical and pharmacology fields, identification and extraction of these compounds from natural sources are a necessity. In this study, the plants were collected in the first stage of flowering. Sonicator and high-performance liquid chromatography (HPLC) were used for extracting and determining of the morphinanes, respectively. UV-Spectrophotometer was also used to determine total alkaloids. The results showed that high amounts of thebaine alkaloid were found in three studied plants. Codeine content was lower than other alkaloids; however the distribution of these alkaloids was dissimilar in different parts of the plants. According to the results, the highest total alkaloid content was found in capsules and roots of *Papaver bracteatum* L. and *Papaver orientale* L., while shoot of *Papaver fugax* Poir. contained

Keywords: Alkaloid, *Papaver*, HPLC.