بررسی تنوع آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف گیاه *Physalis divaricata* D. Don.، شهر کرد

الهام معلم[۱]، عبداله قاسمی‌پیربلوطی[۲*]، ایرج مهرگان[۳]، طاهر نژادستاری[۳]، علیرضا ایرانبخش[٤]

[۱]دانش‌آموخته دکتری، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

[۲]استاد مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرقدس، تهران، ایران

[۳]دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

[٤]استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۳/۲٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۷/۲

چکیده

عروسک پشت پرده با نام علمی *Physalis divaricata* D. Don.، گیاهی علفی متعلق به تیره سیب زمینی یا تاج‌ریزی (Solanaceae) دارای آلکالوئیدهای تروپانی: آتروپین، اسکوپولامین و فیزالین از سکواستروئیدها، می‌باشد. در این پژوهش، از اندام‌های مختلف (برگ، ساقه، ریشه، گل و میوه) گیاه عروسک پشت پرده در گل‌خانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و زمان گلدهی در اردیبهشت ۱۳۹۴ برداشت گردید، عصاره اتانولی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سوکسلوله استخراج و به‌ترتیب میزان آتروپین، اسکوپولامین و فیزالین B با استفاده از کرماتوگرافی مایع با کارآیی بالا HPLC با محاسبه سطح زیر منحنی‌های و مقایسه آن‌ها با منحنی‌های استاندارد با میانگین سه تکرار برای هرنمونه اندازه‌گیری شد. نتایج مقایسه میانگین در سطح ۵ درصد حاکی از آن است که بیشترین میزان فیزالین، اسکوپولامین و آتروپین، به‌ترتیب در عصاره‌های میوه، گل و برگ‌های گیاه مشاهده گردید. بررسی یافته‌ها حاکی از تنوع فیتوشیمیایی مواد موثره در اندام‌های مختلف گیاه بود.

واژه‌های کلیدی: آتروپین، اسکوپولامین، شهر کرد، عروسک پشت پرده، فیزالین B، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

*نویسنده مسئول: ghasemi@Qodsiau.ac.ir & ghasemi955@yahoo.com

مقدمه

جنس *Physalis* شامل ۹۰ گونه است که این گیاه در برخی نقاط از ایران، پاکستان، افغانستان و هند گسترش یافته است (Khatamsaz, 1998). عروسک پشت پرده با نام علمی *Physalis divaricata* D. Don گیاهی یکساله با ارتفاع ۱۵ تا ۴۵ سانتی‌متر، برخی مواقع با کرک‌های پراکنده بر روی ساقه می‌باشد. این گیاه دارای برگ‌هایی صاف، سبز تیره و گل‌های سفید متمایل به زرد است. میوه گیاه گرد، زرد تا نارنجی، اندازه یک گیلاس، با کاسه گل ۵ شکافی که بعد از افتادن جام گلبرگ اندازه آن افزایش می‌یابد، میوه حاوی تعداد زیادی دانه مسطح کلیوی شکل در میان کاسه ای بزرگ قرار می‌گیرد. سیلوا و آگرا (Silva and Agra, 2005) بیان داشتند که هرچند گیاه عروسک پشت پرده(*Physalis*) دارای بیش از ۱۰۰ گونه است اما کمتر مورد بررسی قرار گرفته است ولی مطالعات آناتومیکی بر روی آنها نیز مقدماتی، ابتدایی و جدید هستند. در این خصوص می‌توان به مطالعه مقایسه‌ای دو گونه از گیاه *P. angulata* L. و *P. peruviana* L. به‌عنوان مدل برای درک ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی، آناتومیکی و ساختاری برگ جهت دستیابی به اهداف تاکسونومیکی و تجاری توسط تپسیتار و تنگ پکدی (Thepsithar and Thongpukdee, 2013) اشاره کرد. از سویی نتایج مطالعات روی آناتومی اندام‌های رویشی و هیستوشیمی دانه *Physalis peruviana*L. انجام شده است (Rodrigues et al., 2014). هم‌چنین گزارش مطالعه تنوع آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف گیاه داتوره (*Datura stramonium* L.) در مراحل مختلف رشد و تکوین، رویشگاه، ساختار و فراساختار سلول‌های سازنده آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف گیاه رشد یافته در شرایط طبیعی و شرایط کشت شده، منتشر شده است (Iranbakhsh et al., 2006). در یک تحقیق میزان اسید آسکوربیک در گونه دیگری فیزالیس با نام علمی *Physalis alkekengi* در برگ مرحله رویشی نسبت به مرحله گلدهی کمتر مشاهده شد (Hoshani et al., 2012).

تروپان آلکالوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که با هدف افزایش مقاومت گیاهان به پاتوژن‌ها و دفع آفات و گیاه‌خواران در انواع گونه‌های مختلف جنس داتوره یا تاتوره، تاج ریزی، عروسک پشت پرده و غیره تولید می‌شوند. این ترکیبات خصوصیات‌هالوسینوژنیک (توهم زا) داشته و بر سیستم عصبی مرکزی موثرند. تعدادی از آنها مثل آتروپین و اسکوپولامین در صنایع داروسازی سنتی، داروسازی و پزشکی نوین نیز دارای کاربردها و موارد استفاده متعدد هستند (Tsialtas et al., 2018). آلکالوئیدهای تروپان در تیره‌های Solanaceae و Erythroxylaceae به وفور وجود دارد و مهمترین گروه آلکالوئیدها محسوب می‌شوند البته این گروه ترکیبات آلکالوئیدی از دیگر خانواده‌های گیاهان عالی نظیر Rhizophoraceae، Euphorbiaceae، Convolvulaceae، Brassicaceaeو Moraceae نیز استخراج شده‌اند (Tsialtas et al., 2018; MarínSáez et al., 2018).

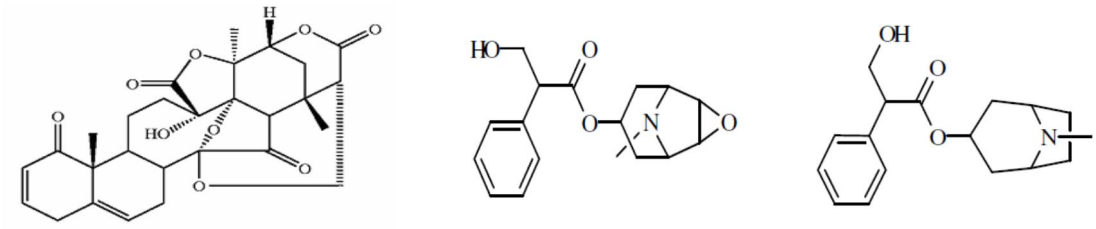
آلکالوئیدهای تروپان شامل هیوسیامین، آتروپین و اسکوپولامین (شکل ۱) که عمدتاً در گیاهان تیره سیب زمینی یا تاجریزی یافت می‌شوند به دلیل وظایف تدافعی در برابر عوامل بیماری‌زا و آفات نقش مهمی در افزایش سازگاری و در نهایت بقای این گیاهان را دارند (Alves et al., 2007; Tsialtas et al., 2018). جنس‌های متعددی از تیره‌های مختلف بالاخص خانواده تاجریزی نظیر *Datura*، *Brugmansi*، *Hyoscyamus*، *Atropa*، *Scopolia*، *Anisodus*، *Przewalskia*، *Atropanthe*، *Physochlaina*، *Mandragora*، *Anthotroche*،

Cyphantera و *Duboisia* غنی از آلکالوئیدهای تروپان هستند و از این نظر حائز اهمیت دارویی در صنایع داروسازی هستند (Grynkiewicz and Gadzikowska, 2008). به‌طورکلی میزان و نوع آلکالوئید موجود در گیاهان دارویی تحت تأثیر عوامل داخلی گیاه مانند فیزیولوژیکی و ژنتیکی مانند مرحله فنولوژیکی یا نمو گیاه، اکوتیپ، ژنوتیپ، و غیره، عوامل محیطی شامل آب و هوایی، خاکی، تنش‌های محیطی غیر زنده و زنده و اثرات متقابل عوامل محیطی و وراثتی هستند (Moghaddam et al., 2018; Torki-Harchegani et al., 2018). در همین راستا نتایج تحقیقات امیدی و همکاران (Omidi et al., 2011) نشان داد که آلکالوئیدهای گروه مورفین در گیاه خشخاش در بافت‌های مختلف گیاه وطی مراحل مختلف رشد متفاوت می‌باشد. بیشترین میزان مورفین، کدئین و تبائین در اندام‌های هوایی این گیاه و در مرحله گلدهی مشاهده شد. آلکالوئید غالب در تمام بخش‌های این گیاه مورفین بود. از طرفی مشخص شد که میزان سه آلکالوئید: مورفین، کدئین و تبائین در مرحله بعد از گلدهی، هم در ریشه‌ها و هم در اندام‌های هوایی به مراتب بیشتر از مقدار آن در مراحل اولیه رشد و بذرها می‌باشد و بیشترین مقدار مورفین در مرحله بعد از گلدهی مشاهده شد (Tsialtas et al., 2018; MarínSáez et al., 2018).

از مهمترین ترکیبات دارویی عروسک پشت پرده نوعی آلکولوئید به نام فیزالین است که در میوه و برگ این گیاه جمع می شود. برگ و ساقه و غلاف میوه آن با طعم تلخ و داروی پالاینده خون است (Lijing, 2012). نتایج بدست آمده از تحقیقات دیلمخانی و همکاران (Dialmaghani et al., 2007) روی *Hyoscyamus pusillus* نشان داد آلکالوئید غالب این گیاه در مراحل مختلف رشد، به استثنای بذرها، هیوسیامین است.

نتایج مطالعات فیتوشیمیایی در چندین گونه از گیاه عروسک پشت پرده انجام شده و از آن‌ها تروپان آلکالوئیدها، استرول‌ها و فلاونوئیدها استخراج شده است (Ismail and Alam, 2001). فیزالین A، B (شکل ۱) و F فعالیت ضدتوموری دارند (Antoun et al., 1981; Chiang et al., 1992). فیزالین E به‌طور طبیعی در سکو- استروئید جداسازی شده از ساقه‌ها و اندام‌های هوایی گونه *Physalis angulata* L. یافت می‌شود (Bastos et al., 2008). این نوع فیزالین در التهاب پوستی حاد و مزمن موثر شناخته شده است (Pinto et al., 2010).

با توجه به بررسی منابع به عمل آمده تاکنون ارزیابی دقیقی بر خصوصیات فیتوشیمیایی خصوصاً بر روی ترکیبات ثانویه گیاه عروسک پشت پرده و تنوع میزان آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف این گیاه انجام نشده است؛ لذا تحقیق حاضر با هدف مقایسه میزان آلکالوئیدهای تروپانی هم‌چون آتروپین، اسکوپولامین و فیزالین B از سکواستروئیدها در اندام‌های هوایی و ریشه گیاه *P. divaricata* کشت شده در شرایط گلخانه و در مرحله‌ی انتهای دوره گل دهی مورد ارزیابی قرار گرفت.



آتروپین　　اسکوپالامین　　فیزالین B

شکل ۱: ساختارهای شیمیایی اسکوپولامین و آتروپین از تروپان آلکالوئیدها و فیزالین B

شکل ۲: گیاه عروسک پشت پرده *Physalis divaricata* در مراحل مختف رشد (عکس از نگارندگان)

مواد و روش‌ها

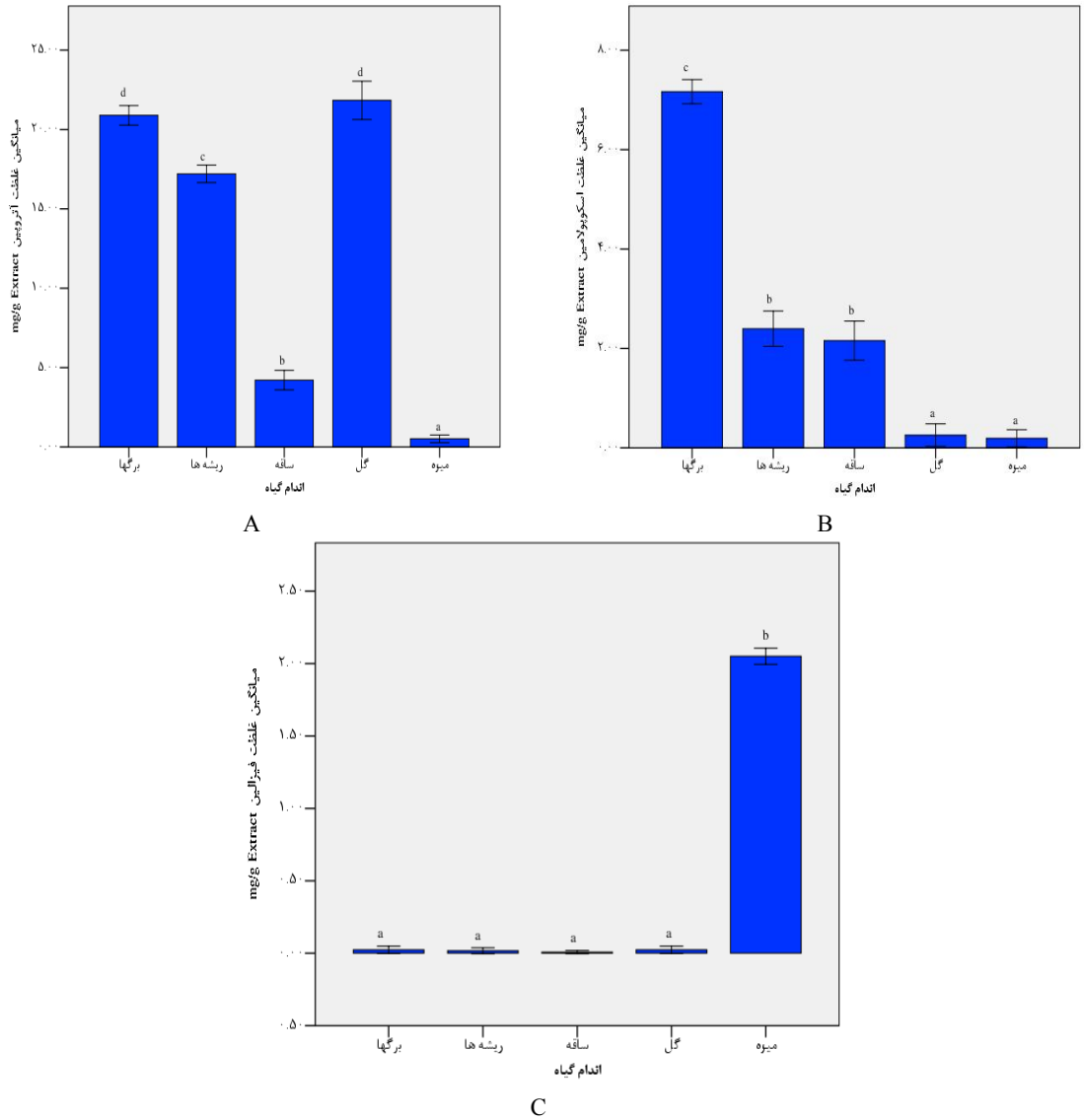
تهیه نمونه گیاهی: بذور جمع‌آوری شده گیاه عروسک پشت پرده *Physalis divaricata* در گل‌خانه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در فروردین سال ۱۳۹۴ کشت شد و اقدام به نمونه‌بردای از اندام‌های مختلف گیاه شد (شکل ۲). ریشه، ساقه، برگ، گل و میوه به‌طور جداگانه جمع‌آوری شد و در ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شد وپس از گذراندن از الک، پودر یکنواختی از نمونه‌ها تهیه شدو در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان تجزیه فیتوشیمیایی نگهداری شدند (Demeyer and Dejaegere, 1992).

عصاره گیری: جهت عصاره گیری از اندام‌های مختلف گیاه عروسک پشت پرده به میزان ۵۰ گرم ماده گیاهی خشک شده، به‌طور جداگانه از دستگاه سوکسیله به‌مدت ۱۲ ساعت هم عصاره آبی و هم عصاره اتانولی تهیه شد. سپس جهت جدا سازی حلال آلی و آبی از عصارها از دستگاه روتاری در خلأ (مدل استریک ۲۰۲، ساخت کشور ایتالیا) استفاده شد.

مواد شیمیایی: حلال‌های مورد نیاز دستگاه HPLC و استانداردهای اسکوپولامین و آتروپین از شرکت سیگما- آلدریش، آلمان و کلروفرم، آمونیاک، $CHCl_3$، اسید سولفوریک و آمونیوم هیدروکسید از شرکت مرک، آلمان خریداری شدند.

استخراج آلکالوئید: برای استخراج آلکالوئیدها مقدار ۰/۵ گرم از ماده گیاهی خشک پودر شده با ۱۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۲M تکان داده شد و به‌مدت یک ساعت به حال خود رها شد. پس از گذراندن از صافی محلول با افزایش یک میلی‌لیتر محلول NH_3 غلیظ قلیایی و در ۱۵ ml اتر استخراج شد. هر مرحله برای اطمینان از استخراج کامل سه بار تکرار شد (Kamada et al., 1986).

آلکالوئیدهای مرجع: محلول استاندارد اسکوپولامین و آتروپین (۰/۰۱ گرم) در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول آماده گردید (Kamada et al., 1986).



شکل ۳: مقایسه میانگین غلظت A: آتروپین، B: اسکوپولامین و C: فیزالین B در اندام‌های مختلف *P. divaricata* در انتهای دوره‌ی گلدهی (به تفکیک نوع ماده موثره). حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC): تشخیص کمی آلکالوئیدهای تروپان اصلی، شامل آتروپین و اسکوپولامین به وسیله دستگاه HPLC شرکتKanure ساخت آلمان با تجهیزات پمپ K-1001و تزریق دستی انجام شد. نشانگر UV 210 λmax بود و ستون مورد استفاده با ۲۵ x 0.46 cm یوروسفر- ۱۰۰ C8و لیکروسفر ۱۰۰ RP8 با ذرات ۵ میکرومتری پر شده بود. در این روش از فاز ثابت ستون C۱۸ با دتکتور UV در ۲۱۰ nm و فاز متحرک دی اکسان ۲ درصد در بافر فسفات (pH =۶/۲) ، متانول (۵: ۹۵) و میزان جریان ml/min استفاده شد. سیستم با آتروپین (RT =۱۶/۸ min)، اسکوپولامین (RT =۱۳/۱min) و فیزالین B (RT =۱۵/۲ min) استاندارد در گستره غلظت ۵-۵۰ µ g / ml تنظیم شد (Ashtiani and Sefidkon, 2011; Masrournia et al., 2011).

تعیین کمیت آلکالوئیدها: تشخیص کمی به روش استاندارد خارجی انجام شد. محلول‌های استاندارد حاوی آتروپین و اسکوپولامین ۴، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ قسمت در میلیون در متانول تهیه شدند. حجم ۲۰ میلی‌لیتری هر محلول استاندارد به ستون HPLC تزریق شد. منحنی‌های کالیبراسیون آتروپین و اسکوپولامین با مکان یابی سطح زیر منحنی در نمونه‌های مجهولرا رسم می‌کنیم (Ashtiani and Sefidkon, 2011; Masrournia et al., 2011).

تجزیه آماری: برای تمام آزمایشات مختلف سه تکرار در نظر گرفته شد. با استفاده از نرم‌افزار SPSS، به منظور بررسی معناداری اختلاف میانگین مقدار سه ترکیب آتروپین، اسکوپولامین و فیزالین B در هر یک از اندام‌های گیاه به صورت جداگانه، از تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد. به منظوربررسی دقیق، و دو به دو میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.رسم نمودارها نیز به کمک نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی میزان آتروپین، اسکوپولامین و فیزالین B با محاسبه سطح زیر منحنی‌های HPLC و مقایسه آنها با منحنی‌های استاندارد با میانگین سه تکرار برای هر نمونه تهیه شد. مقایسه مقادیر میانگین این سه ترکیب دارویی مهم در هر یک از اندام‌های برگ، ساقه، ریشه، گل و میوه گیاه *P. divaricata* به‌صورت جداگانه در جدول ۱ و مقایسه میانگین مقادیر هر یک از اسکوپولامین، آتروپین و فیزالین B به‌صورت جداگانه در اندام‌های مختلف این گیاه در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: مقایسه مقادیر تروپان آلکولوئیدها و فیزالین B بر حسب میلی‌گرم بر گرم عصاره (mg/g extract) در هریک از اندام‌های مختلف گیاه *P. divaricata* (به تفکیک اندام گیاه).

اندام	اسکوپولامین	آتروپین	فیزالین B	سطح معنی داری
برگ‌ها	۷/۱۶۶۳^{b}	۲۰/۸۹۲۳^{c}	۰/۰۲۳۳^{a}	۰/۰۰۱
ریشه‌ها	۲/۳۹۷۰^{b}	۱۷/۲۰۴۷^{c}	۰/۰۱۶۷^{a}	۰/۰۰۱
ساقه	۲/۱۵۶۳^{b}	۴/۲۱۱۷^{c}	۰/۰۰۶۷^{a}	۰/۰۰۱
گل	۰/۲۵۴۳^{a}	۲۱/۸۳۵۳^{b}	۰/۰۲۳۳^{a}	۰/۰۰۱
میوه	۰/۱۹۱۰^{a}	۰/۵۱۲۰^{a}	۲/۰۵۰۰^{b}	۰/۰۰۱

حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف‌معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۲: مقایسه میانگین مقادیر هر یک از تروپان آلکولوئیدها و فیزالین B بر حسب میلی‌گرم بر گرم عصاره (mg/g extract) دراندام‌های مختلف گیاه *P.divaricata* (به تفکیک نوع ماده).

اندام	اسکوپولامین	آتروپین	فیزالین B
برگ‌ها	۷/۱۶۶۳^{c}	۲۰/۸۹۲۳^{d}	۰/۰۲۳۳^{a}
ریشه‌ها	۲/۳۹۷۰^{b}	۱۷/۲۰۴۷^{c}	۰/۰۱۶۷^{a}
ساقه	۲/۱۵۶۳^{b}	۴/۲۱۱۷^{b}	۰/۰۰۶۷^{a}
گل	۰/۲۵۴۳^{a}	۲۱/۸۳۵۳^{d}	۰/۰۲۳۳^{a}
میوه	۰/۱۹۱۰^{a}	۰/۵۱۲۰^{a}	۲/۰۵۰۰^{b}
سطح معنی‌داری	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

هر یک از حروف متفاوت در هر سطر، نشان دهنده یک سطح متفاوت معنادار در محدوده اطمینان ۹۵ درصد و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

بحث

نتایج مقایسه میانگین در سطح ۵ درصد حاکی از آن است که بیشترین میزان فیزالین، اسکوپولامین و آتروپین، به ترتیب درعصاره‌های میوه، برگ و گل گیاه عروسک پشت پرده وجود دارد. بررسی یافته‌ها حاکی از تفاوت‌های فیتوشیمیایی مواد موثره در اندام‌های مختلف گیاه است. از بین سه ماده موثره ذکر شده، در دوره گلدهی گیاه عروسک پشت پرده، آتروپین در همه اندام‌ها بجز میوه ترکیب غالب به شمار می‌آید (جدول ۲) اما در میوه گیاه ترکیب غالب، فیزالین است. نتایج تحقیقات متعدد نشان می‌دهد، محتویات آلکالوئیدهای تروپانی مانند هیوسیامین و اسکوپولامین می‌تواند به ژنتیک و عوامل فیزیولوژیکی گیاهی (گونه، زیرگونه، رقم، اکوتیپ، شیمیوتیپ، نوع بافت گیاه، مرحله رشد گیاه و غیره)، شرایط محیطی و مدیریتی نظیر شرایط اقلیمی نظیر عوامل خاکی، آب و هوایی، تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده، روش‌های خشک کردن، فرآوری و روش استخراج آن‌ها بستگی دارد (Bahmnazadegan et al., 2008; Dehghan et al., 2013; Alaghemand et al., 2013; Fattahi et al., 2015; Moghaddam et al., 2018; Torki-Harchegani et al., 2018).

یافته‌های مطالعه حاضر (جدول ۱) حاکی از آن است که میانگین غلظت آتروپین در برگ‌ها، ریشه‌ها و ساقه‌هادر بالاترین سطح، پس از آن در سطح دوم، غلظت اسکوپولامین در این اندام‌ها و در نهایت، کمترین میانگین ترکیب درسطح سوم، مربوط به فیزالین بی بوده است. تفاوت میانگین این سه نوع ترکیب دارویی در برگ‌ها معنی دار است (جدول ۱).

نتایج به‌دست آمده از تحقیقات دیلمخانی و همکاران (Dialmaghani et al., 2007) روی گونه‌ای از بذرالبنج *Hyoscyamus pusillus* نشان داد که میزان آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین در مراحل مختلف رشد و در اندام‌های مختلف گیاه تفاوت دارند. بیشترین میزان آلکالوئید هیوسیامین را در برگ-های این گیاه درمرحله گلدهی اعلام کردند. آلکالوئید غالب این گیاه در مراحل مختلف رشد، به استثنای بذرها، هیوسیامین است. در حالی که از بین ۳ ترکیب دارویی در مطالعه ما، آتروپین به عنوان ترکیب غالب در گیاه شناخته شد. نتایج بررسی غلظت ترکیبات موثره و دارویی در گل، نشان می‌دهد که میانگین مقدار آتروپین در بالاترین سطح قرار دارد و اختلاف معنی داری با دو ترکیب آلکالوئیدی دیگر دارد (جدول ۱). در حالی که نتایج مطالعات **ایران‌بخش**و همکاران (Iranbakhsh et al., 2006) نشان داد که تولید آلکالوئیدها از هفته دوم جوانه زنی دانه داتوره (*Datura stramonium* L.) شروع شده و در اندام‌های مختلف تا هفته دهم رشد افزایش یافته، سپس کاهش می‌یابد. در این تحقیق همچنین مشخص شد برگ‌ها و کپسول بیشترین آلکالوئیدها در دوره رویشی و زایشی را دارند.

میانگین اسکوپولامین و فیزالین، در گل، کم و از نظر آماری در یک سطح است. در حالی‌که فلاونوئیدها و استروئیدها از ترکیبات اصلی کاسه گل-های *Physalis alkekengi* است که استخراج شده‌اند (Qiu et al., 2008). در مرحله گل دهی، افزایش مشاهده شده درنسبت آتروپین (- هیوسیامین) به اسکوپولامین ممکن است نتیجه نموگل به‌سبب مرحله نموی گیاه روی فعالیت آنزیم 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 جوان‌تر آمینواسیدهای بیشتری را برای متابولیسم اولیه به کار می برند، درحالی که گیاهان بالغ ترمی‌توانند متابولیسم ثانویه رابهتر حمایت کنند (Grynkiewicz and Gadzikowska, 2008). در گیاهان تیره سیب زمینی، آلکالوئیدهای تروپان در

ریشه ساخته می‌شوند (Tsialtas et al., 2018). نتایج تحقیقات روی آلکالوئیدهای تروپان گونه‌های داتوره یا تاتوره (*Datura*) (Tsialtas et al., 2018) و در مورد گونه‌های هیوسیاموس (Hashimoto et al., 1998) نشان داده است که ریشه‌ها جایگاه بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپان هستند. کیتامارا و همکاران (Kitamura et al., 1992) اظهار داشتند که آلکالوئیدهای تروپان در ریشه‌ها بیوسنتز و بعد در اندام‌های هوایی منتشر می‌شوند و سپس به ریشه‌ها جایی که تجزیه می شوند بر می‌گردند. از سویی به نظر الشیخو و همکاران (El- Sheikh et al., 1982)، هیوسیامین آلکالوئید اصلی در همه اندام‌های گیاه *H. muticus* مطرح شد. بنابراین تفاوت میزان این دو تروپان آلکولوئید در اندام‌های مختلف *P. divaricata* به توانایی بیوسنتز آن‌ها در ریشه‌های این گیاه، انتقال آن‌ها، گاه تغییر همزمان و ذخیره آن‌ها در اندام‌های هوایی گیاه برمی‌گردد. توان بالای سنتز آلکالوئیدهای تروپانی در ریشه، نشان می‌دهد که در این اندام، پیش ساز آلکالوئیدها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آرژینین دکربوکسیلاز و ارنیتین دکربوکسیلاز که مسئول سنتز پوترسین هستند، را بیشتر عرضه می‌کند (Nyman et al., 1995). البته وجود عواملی از جمله وجود برخی یون‌ها در ریشه، به‌طور مستقیم فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها، از جمله آنزیم‌های مربوط به بیوسنتز آلکالوئیدها را با تأثیر روی کنفورماسیون پروتئین تنظیم می‌کند (Dialmaghani et al., 2007).

در میوه، میانگین مقدار فیزالین به‌صورت معناداری بیشتر از دو ماده اسکوپولامین و آتروپین نشان داده شد. اما تفاوت معناداری بین مقدار اسکوپولامین و آتروپین نشان داده نشده است (جدول). نتایج مطالعات زوگلان آزلان وهمکاران (Azlan et al., Juaglan_2005) نیز نشان داد که مقدار فیزالین A و B در سطوح بالاتری در میوه نسبت به سایر اندام‌ها انباشته است که این نتایج موافق با نتایج به دست آمده از پژوهش ماست. از سوی دیگر، در پژوهشی که روی ساقه‌ها، برگ‌ها و میوه‌های *Physalis solanaceus*، انجام شد، از ساقه‌ها و برگ‌ها چندین نوع فیزالین و از میوه‌ها، استرهای ساکارز و یک نوع فیزالین گزارش شده است (Perez-Castorena et al., 2012). نتایج نشان داده شده در این تحقیق (جدول ۲) حاکی است، که هر یک از اسکوپولامین، آتروپین و فیزالین B به‌طور جداگانه، در کدام اندام گیاه به میزان بیشتری تجمع می یابد. بیشترین تجمع اسکوپولامین در ساقه، برگ‌ها و ریشه‌ها است و از نظر آماری، مقادیر میانگین این ماده در این اندام‌ها تفاوت معناداری ندارد. هم‌چنین میزان این ماده در گل و میوه اختلاف معنادار نشان داده نشده، و مقادیر آنها کمتر از اندام‌های رویشی است (جدول ۲)، که با نتایج حاصل از استخراج اسکوپاتین فراوان ازعصاره برگ-های خشک عروسک پشت پرده *P.alkekengi* توسط بتنرا و همکاران (Butnaru et al., 2010) مشابهت دارد. مشابه نتایج ما، اکسامان کالدنتی و همکاران (Oksman Caldenty et al., 1987) در مورد گیاه *H. muticus* اعلام کردند که بیشترین مقدار هیوسیامین در طی مرحله اوج گلدهی در برگ‌ها وجود دارند. همچنین نتایج آنها نشان داد که مقادیر تروپان آلکالوئیدها در ساقه‌ها کمتر از ریشه‌ها یا برگها است. البته در مقابل، آلکالوئیدهای پیرولیدین (Basey et al., 2007) و نورتروپان (Azemi et al., 2006) متابولیت‌های اصلی ثانویه جدا شده از ریشه گونه‌های مختلف *Physalis*، به‌ویژه *Physalis divaricata* است. در حالی‌که، میزان اسید آسکوربیک *Physalis alkekengi* در برگ مرحله رویشی کم ولی در مرحله گلدهی افزایش یافت (Hoshani et al., 2012)(PMT)[1] و (H6H) آنزیم‌های اولین و آخرین

1. Putrescine metyl transferase

مرحله ی بیوسنتز اسکوپالامین، در بافت پریسیکل ریشه‌های *A.belladonna* و *H. muticus* است. PMT در اولین مرحله بیوسنتز آلکالوئید نیکوتین در سلول‌های آندودرم، کورتکس و زایلم ریشه در *Nicotiana sylvestris* است (Ziegler and Facchini,. 2008). بنابراین با توجه به جایگاه آنزیم‌های کلیدی تولید کننده‌ی آلکالوئیدها در ریشه، طبیعی است که تولید آلکاولوئیدها بیشتر در ریشه، اما ذخیره ی آن‌ها دراندام‌های هوایی خصوصاً در برگ‌ها و سپس گل‌ها باشد. میانگین میزان فیزالین در میوه از سایر بخش‌ها بیشتر است. همچنین میانگین آن در گل، ساقه، ریشه‌ها و برگ‌ها از نظر آماری فاقد تفاوت معنی‌دار و کمتر از میانگین مقدار آن در میوه نشان داده شد (جدول ۲). مطالعه ای دیگر (Jualang Azlan et al., 2005) در تایید نتایج ما نشان داد که محتوای فیزالین‌های D و N در برگ‌های جوان به طور قابل توجهی کاهش می یابد. نتایج مشابهی برای تجمع سایر فیزالین‌ها در برگ‌های بالغ قابل مشاهده است (Jualang Azlan et al., 2005).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، از بین اندام‌های عروسک پشت پرده، میوه این گیاه دارای فیزالین B فراوان، برگ‌ها و گل‌ها دارای حداکثر آتروپین و نیز برگ‌ها دارای حداکثر اسکوپالامین است. حال پس از شناسایی اندام‌هایی از گیاه که دارای حداکثر هر یک از این ترکیبات مهم دارویی هستند، می‌توان در مطالعات بعدی با کشت این اندام‌ها به تفکیک، در شرایط ایده آل آزمایشگاهی به تولید و استخراج انبوه هر یک از این مواد دست پیدا کرد.

سپاسگزاری

از آقایان دکتر بهزاد حامدی، مهندس منوچهر مومنی و شهرام قلی پور کارشناسان مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و گل‌خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بابت تمام همکاری‌های شایسته ایشان در زمینه‌های تجزیه دستگاهی و کشت گیاهان کمال تشکر را داریم.

References

1. Alaghemand, A., Ghorbanpour, M., Eradatmand, Asli, D. and Moghaddasian, B. 2013. Influence of urea fertilization on tropane alkaloids content of henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under hydroponic culture conditions. Journal Advances in Environmental Biology, 7: 307-318.
2. Alves, M.N., Sartoratto, A. and Trigo, J.R. 2007. Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): Defense, allocation, costs, and induced response. Journal of Chemical Ecology, 33: 297–309.
3. Antoun, M.D., Abramson, D., Tyson, R.L., Chang, C.J., McLaughlin, J.L., Peck, G. and Cassady, J.M. 1981. Potential antitumor agents XVII Physalin B and 25, 26-epidihydrophysalin C from *Witheringia coccoloboides*. Journal Natural Products, 44: 579-585.
4. Ashtiania, F. and Sefidkon, F. 2001. Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 6515- 6522 .
5. Azemi, M. E., Mosaddegh, M., Cheraghali, A. M. and Namjooyan, F. 2006. Isolation and identification of calystegines in root cultures of four *Physalis* species. Iranian Journal Pharmaceutical Research, 5: 69-72.
6. Bahmnazadegan. A., Sefidkon, F., Sonboli,A. and Jaimand ,K. 2008. Extraction and determination of tropane alkaloids, hyoscyamine and scopolamine, form different parts of *Hyoscyamus reticulatus* L. and *Hyoscyamus pusillus* L. Pajouhesh va Sazandegi, 79: 145 - 53.

7. Basey, K., McGaw, B. A. and Woolley, J.G. 1992. Phygrine, an alkaloid from *Physalis*species. Phytochemistry, 31: 4173-4176.
8. Bastos, G. N., Silveira, A. J., Salgadod, C. G., Picanco-Diniz, D. L. and Nascimento, J. L. 2008. *Physalis* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. Journal of Ethnopharmacology, 118: 246-5.
9. Butnaru, C., Butnaru, E., Vlase, L. and Laza, M. 2010. Determination of Scopoletin in *Physalis alkekengy* and *Solanum dulcamara* by high-performance liquid chromatography. Farmacia, 58(6): 711-717.
10. Chiang, H.C., Jaw, S.M., Chen, C.F. and Kan, W.S. 1992. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. Anticancer Research, 12: 837-844.
11. Dehghan, E., Shahriari Ahmadi, F., Ghotbi Ravandi, E., Reed, D.W. and Covello, P.S. 2013. An atypical pattern of accumulation of scopolamine and other tropane alkaloids and expression of alkaloid pathway genes in *Hyoscyamus senecionis*. Journal Plant Physiology and Biochemistry, 70: 188-195.
12. 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.
13. Dialmaghani, K., Karvari-Nejad, R., Fahimi,H. and Hekmat-shoar, H. 2007. Comparison of tropane alkaloids content of *Hyoscyamus reticulatus* .L and *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark at different growth stages. Journal of Science Islamic Azad University, 66: 51 – 61.
14. Dialmaghani, K., Kharvari-Nejad, R., Fahimi1 , H. and Hekmat-shoar, H. 2006. Extraction and determination of tropan alkaloids, hyoscyamine and scopolamine, from different parts of *Hyoscyamus pusillus* L. in different stages of plant growth. Journal of Medicinal Plants, 22: 1-10.
15. 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 I I I: Indigenous *Hyoscyamus muticus* as commercial source hyoscyamine. Planta Medica, 53(4): 349-354.
16. Fattahi, F., Shojaeiyan, A., Ashkari, H., Naghdi Badi, H., Ayyari, M., Mokhtassi Bidgoli, A. and Palazon, B. 2015. Quantitative assessment of Hyoscyamine and Scopolamine tropan alkaloids in root and shoot of *Hyoscyamaus* spp. Iranian Journal of Medicinal Plants, 14: 105-114.
17. Grynkiewicz, G. and Gadzikowska, M. 2008. Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. Pharmacological Reports, 60: 439–463.
18. Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K. and Yamada, Y. 1998. Molecular cloning of plant spermidine synthases. Plant and Cell Physiology, 39:73–79.
19. Hoshani**,** M., Aghdasi, M. A. and Mohseni, M. 2012. Inhibitory effect of *Physalis alkekengi* extracts in different phenological stages on xanthine oxidase activity. Physiology and Pharmacology, 16 (3): 300-309.
20. Iranbakhsh, A., Oshaghi, M. A. and Majd, A. 2006. Distribution of Atropane and Scopolamine in Different Organs and Stages of Development in *Datura stramonium* L. (Solanaceae) Structure and Ultra structure of biosynthesizing Cells. Acta Biologica Cracoviansia, 48(1): 13-18.
21. Ismail, N. and Alam, M. 2001. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. Fitoterapia, 72: 676-689.
22. Jualang Azlan, G., Marziah, M., Radzali, M. and Johari, R. 2005. Accumulation of Physalin in cells and tissues of *Physalis minima* L. Wocmap III, 2: 53- 59.
23. Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa bella*donna. Plant Cell Reports, 5: 239-242.
24. Khatamsaz, M. 1998. Flora of Iran *(Solanaceae)* (1st Edition), Forage and

Range- land Research Institute Publication, Tehran, Iran, 55 pp.
25. 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.
26. Lijing, L. 2012. Study on callus induction and regeneration of *Physalis alkekengi*. Agricultural Biotechnological, 6: 39-41.
27. Marín-Sáez, J., Romero-González, R., Frenich, A.G. and Egea-González, F.J. 2018. Screening of drugs and homeopathic products from *Atropa belladonna* seed extracts: tropane alkaloids determination and untargeted analysis. Drug Testing and Analysis, DOI:10.1002/dta.2416.
28. Masrournia, M., Es'haghi, Z. and Amini, M. 2011. Liquid chromatographic determination of scopolamine in hair with suspended drop liquid phase microextraction technique. American Journal of Analytical Chemistry, 2: 232-235.
29. Moghaddam, M., Ghasemi Pirbalouti, A. and Farhadi, N. 2018. Seasonal variation in *Juniperus polycarpos var. turcomanica* essential oil from northeast of Iran. Journal of Essential Oil Research, 30(3): 225-231.
30. Nyman, S., Soderman, A. and Simola, L.K. 1993. Metabolism of Arginine and ornithine in suspension-cultured cells and Aseptic roots of interact plants of *Atropa belladonna*. Journal of Experimental Botany, 44 (262): 869-877.
31. 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.
32. Omidi, M., Koohzadi, F., Solouki, M., Taghizad Farid, R. and Alizadeh H. 2011. Comparison of morphinan alkaloids during different stages of growth in the medicinal plant opium poppy (*Papaver somniferum* L.). Journal of Giahan Daroee, 44: 144-149.
33. Perez-Castorena, A.-L., Luna, M., Martínez, M. and Maldonado, E. 2012. New sucrose esters from the fruits of *Physalis solanaceus*. Carbohydrate Research, 352: 211-214.
34. Pinto, J. G. A., Hornby, K. R., Jones, D. G. and Murphy, K. M. 2010. Developmental changes in GABAergic mechanisms in human visual cortex across the lifespan. Front Cell Neuroscience, 4: 16-22.
35. Qiu, L., Zhao, F., Jiang, Z.-H., Chen, L.-X., Zhao, Q., Liu, H.-X., Yao, X.-S. and Qiu, F. 2008. Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their inhibitory effects on nitric *oxide* production. Journal of Natural Products, 71: 642-646.
36. Rodrigues, F.A., Soares,J.D.R. and Silva, R.A.L. 2014. Anatomy of vegetative organs and seed histochemistry of *Physalis peruviana* L. Australian Journal of Crop Science, 8(6):895-
37. Silva, K.N. and Agra, M.F. 2005. Comparative pharmacobotanical study on *Nicandra physalodes* and *Physalis angulata* (Solanaceae). Revista Brasileira de Farmácia, 15: 344-351.
38. Thepsithar, C. and Thongpukdee, A. 2013. Comparative micro-morphology, anatomy and architecture of leaf of *Physalis*. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. 7(8): 143-156.
39. Torki-Harchegani, M., Ghasemi Pirbalouti, A. and Ghanbarian, D. 2018. Influence of microwave power on drying kinetic, chemical composition and antioxidant capacity of peppermint leaves. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 21: 430-439.
40. Tsialtas, J.T., Kostoglou, E., Lazari, D. and Eleftherohorinos, I.G. 2018. Annual Datura accessions as source of alkaloids, oil and protein under Mediterranean conditions. Industrial Crops and Products, 121: 187-194.
41. Ziegler, J. and Facchini, P.J. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annual Review of Plant Biology, 59: 735-69.

Investigation on variation of alkaloids content in different parts of *Physalis divaricata* D. Don. From Shahrekord region

Moallem E.[1], Ghasemi Pirbalouti A.[2*], Mehregan I.[3], Nejhad Sattari T.[4], Iranbakhsh A.[4]

[1]Ph.D. in Plant Biology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Professor, Research Center for Medicinal Plants, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3]Associate Prof., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4] Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received Time: 2017/6/14 Accepted Time: 2017/9/24

Abstract

Physalis divaricata D. Don. is a medicinal plant belonging to Solanaceae family. It consists of different tropane alkaloids, especially atropine, scopolamine, and physalin. In this study, *P. divaricata* was cultivated at greenhouse conditions in the field experimental of Islamic Azad University of Shahrekord. So various parts of plant, including root, stem, leaf, fruit, and flower at the late flowering stage were harvested in Spring 2015 and then the ethanolic extracts of the samples were obtained by soxhlet extraction method. The contents of atropine, scopolamineand physalin B were measured by calculating the curve of HPLC with three replications. The comparison results at the 5% level indicated that the fruits extract had the highest content of physalin B, the highest content of atropine was reported from the leaves extract and the highest content of scopolamine was reported from the flower extract. In conclusion, the main source of the secondary metabolites seemed to be a difference in type parts of the herb.

Keywords: Atropine, HPLC, *Physalis divaricate* D., Physalin B, Scopolamin, Shahrekord