Journal of Environmental Studies [JES] 2012. 8: 25-29
Original Paper

تأثير طرق الفصل في تشخيص وتحديد تراكيز المواد الفعالة حياتيا

ساجدة عباس حسين[١]، منى محمود[١]، زينب طالب عبدزيد[٢]، منى عبد جعفر[١] وعلية حسين[١]
[١]داثرة بحوث كيمياء وفيزياء المواد- وزارة العلوم والتكنولوجيا/ جمهورية العراق
[٢]الجامعة المستنصرية – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ جمهورية العراق

استلام: ١٨ سبتمبر ٢٠١١، قبول: ٢٤ أكتوبر ٢٠١١

الملخص:
تهدف الدراسة الحالية إلى استخدام طرائق مختلفة في فصل وعزل المركبات الفعالة حيويا من أوراق و بذور نبات *Datura metel* وتشمل الاستخلاص المذيبي باستخدام الكلوروفورم والفصل الكروموتوغرافي باستعمال مواد مازه مثل السليكاجل المعبأة في عامود من نوع Merck Column Extrelut®1 فضلا عن دراسة تأثير إزالة الدهون من البذور على فصل وتشخيص المركبات الفعالة. بينت نتائج الدراسة أن النسبة المئوية الوزنية للقلويدات بلغت ١٥.٠,٣٦.٠,٦٠.٠ و ٨٢.٠% لكل من بذور وأوراق نبات *Datura metel* بطريقة الاستخلاص المذيبي (الكلوروفورم) وبالعمود الكروماتوغرافي على التوالي واستخدم جهاز High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) لتحليل المستخلصات والتي بينت كفاءة الفصل الكروموتوغرافي بالمقارنة مع نتائج الفصل باستخدام المذيبات العضوية.
الكلمات الدالة: الاستخلاص, *Datura metel*, القلويدات, Merck Column Extrelut®1

المقدمة:

بموجب المنشورات الصادرة من منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO) والتي أكدت على الأهمية الصيدلانية للعديد من النباتات العشبية لما تحتويه هذه النباتات من مركبات فعالة حياتيا Bioactive تم تسمية هذه النباتات على أنها نباتات طبية Medical Plants و مصدرا مهما من مصادر الطب البديل (Vaidya and Antarkar, 1994; EI-Mahmood and Amedh, 2007) لذا أصبح من المهم البحث عن أفضل طرق الفصل للمركبات الفعالة حياتيا من اجل الحصول على ناتج عال النقاوة فضلا عن كمية الناتج النهائي.

هنالك العديد من الطرائق المهمة لاستخلاص المركبات الفعالة والتي تشمل الاستخلاص المذيبي والتقطير المائي والبخاري واستخدام غاز ثاني اوكسيد الكربون المسال وغيرها [Hoareau and Dasiva, 1999; Bisset, 2001] وبالاعتماد على الخصائص الكيميائية للمركبات المطلوب استخلاصها يتم اختيار إحدى هذه الطرق المعتمدة، فغالبا ما يتم استخدام الكلوروفورم كمذيب عضوي ضعيف القطبية لاستخلاص القلويدات من النباتات العائدة لجنس الداتورا مثل نبات *Datura metel* [Snell and Hilton, 1967] وبذلك يكون مناسب لاستخلاص المركبات الحيوية المماثلة له في درجة القطبية بالإضافة إلى أن قلة النسب المئوية للمركبات الفعالة حياتيا تعمل على تحطيم الخاصية العطرية للمركبات النباتية في حال استخدام التقطير المائي أو البخاري [Surves Waram *et al*, 2007].

إن من أهم المشاكل التي تعترض عملية استخلاص القلويدات هو التشابه بالخصائص الكيميائية للمركبات الفعالة حياتيا مما يؤدي إلى عدم دقة النتائج المستحصلة من استخدام المذيبات العضوية، لذا تهدف الدراسة الحالية إلى مقارنة نتائج تحليل المستخلص لأجزاء مختلفة من نبات *Datura metel* باستخدام الاستخلاص المذيبي بالكلوروفورم فقط أو الكلوروفورم والبترول ايثر مع النتائج المستحصلة لأجزاء النبات ذاتها ولكن باستخدام الفصل الكروموتوغرافي Merck column Extrelut®1 بالعمود المعبأ بمادة السليكاجل [Berkov, (2003) ولقد استخدم جهاز كروموتوغرافيا السائل عالي الأداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) لتحليل النماذج وحسب الظروف التشغيلية المبينة لاحقا (Goren *et al*, 2004).

المواد وطرائق العمل Material and Methods:

تحضير مستخلص نبات *Datura metel*:

١- تم طحن العضو النباتي الخاضع للفحص (أوراق، بذور) بعد تجفيفه بدرجة حرارة 50C°.

٢- اخذ وزن معين من المسحوق النباتي ونقع بكمية مناسبة من محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4 (3%) ثم رشح المستخلص بورق ترشيح مناسب وتم الكشف عن وجود القلويدات بهذه المرحلة باستخدام كاشف ماير.

تم وضع رمز (A) على العينة النباتية لمستخلص الأوراق والرمز (B) لمستخلص البذور.

مستخلص الأوراق (العينة (A)):

تم رفع الدالة الحامضية للعينة (A) (PH=9-10) باستخدام محلول هيدروكسيد الامونيوم NH_4OH، ثم تم تقسيم مستخلص الأوراق (العينة (A)) إلى عينتين متساويتين وأعطي رمز A2 للعينة الأولى و A3 للعينة الثانية.

العينة A2:

تم استخلاص وفصل القلويدات من العينة A2 باستخدام المذيب العضوي Chloroform وتمت العملية باستخدام قمع الفصل حيث تم تكرار هذه الخطوة لثلاث مرات على الأقل للتأكد من خلو العينة من القلويدات، واستخدام المبخر الدوار Rotary Evaporator للتخلص من المذيب (الكلوروفورم) والحصول على القلويدات بشكل راسب اصفر اللون وتم تثبيت وزن المستخلص القلويدي النهائي للعينة الورقية باستخدام الميزان الحساس وكما هو موضح في الجدول رقم (١).

تم إجراء فحص HPLC على العينة النباتية والموضحة في الشكل رقم (٣) (حيث يمثل الشكل رقم (١) و (٢) مخطط فحص HPLC لكل من قلويد Atropine و Scopolamine القياسيتين على التوالي.

العينة A3:

تم إمرار 1ml من المستخلص النباتي للعينة A3 (مستخلص الأوراق) على عمود الفصل والتنقية

* Corresponding author:
Dr. Zainab Talib Abidzaid al-Sharify
✉Zainab_talib2009@yahoo.com

Merck column Extrelut®1 وبعد مرور ١٠-٥ دقائق، أضيف 6ml من المذيب العضوي مثلين كلورايد CH_2Cl_2 وتم تجميع النموذج النازل من العمود وتركت العينة لتجف بدرجة حرارة الغرفة، ثم استخدم الميزان الحساس لتثبيت الوزن النهائي للعينة وكما هو مبين في الجدول رقم (١).

تم إجراء فحص HPLC على العينة النباتية والموضحة في الشكل رقم (٤).

مستخلص البذور (العينة (B):

بعد طحن النموذج وتنقيعه بمحلول حامض الكبريتيك (٣%) وكما ورد سابقا تم تقسيم عينة مستخلص البذور (B) إلى ثلاث عينات B2، B3 وB4

العينة B2:

تم معاملة العينة B2 بنفس خطوات العمل التي تم إجرائها على العينة A2, ثم تم إجراء فحص HPLC للعينة B2 والموضحة في الشكل رقم (٥).

العينة B3:

تم معاملة مستخلص بذور نبات *Datura metel* (B3) بالمذيب العضوي Petroleum ether لغرض التخلص من المواد الدهنية وذلك باستخدام قمع الفصل حيث أهملت الطبقة السفلية، وتم تكرار هذه الخطوة لثلاث مرات على الأقل، ثم أكملت الخطوات التي تمت على العينة B2، وأخيرا تم إجراء فحص HPLC للعينة والموضح في الشكل رقم (٦).

العينة B4:

تم معاملة العينة B4 بنفس خطوات العمل التي تم إجرائها على العينة A3, ثم تم إجراء فحص HPLC على عينة مستخلص البذور (B4) والموضحة في الشكل رقم (٧).

فضلا عن إجراء الفحص HPLC لجميع العينات وكما تم إيضاحه , تم إخضاع جميع العينات لاختبار فحص كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) لضمان دقة النتائج.

الظروف التشغيلية لجهاز HPLC:

تم إمرار محلول المستخلص النباتي الخاضع للفحص للعينات (A2,A3,B2,B3 and B4)على عمود نوع ODSC18 (25cm 4.6mm) واستعمل الطور المتحرك المكون من ميثانول وبفر الفوسفات (0.1m) وبنسبة (30- 70) وبمعدل جريان 0.5ml/min وبمكثاف طيفي عند الطول الموجي 228nm (Goren *et al*., 2004).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

مستخلص الأوراق (العينة (A)

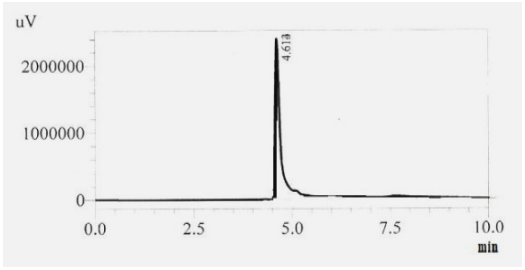
تبين النتائج المثبتة بالجدول رقم (١) والذي يمثل النسبة المئوية لمستخلص قلويدات نبات *Datura metel* لكل من بذور وأوراق النبات ارتفاع النسبة المئوية لمستخلص أوراق النبات عنها في البذور وهذا مخالف للاعتقاد السائد إلا إنه مطابق للدراسات الحديثة والتي تؤكد على احتواء أوراق النباتات العشبية على أعلى النسب من المركبات الفعالة حياتيا [Gidado *et al*, 2006].

العضو النباتي	الوزن الكلي لمستخلص القلويدات%		الوزن الكلي لمستخلص القلويدات% M.C. Extrelut®1
	الكلوروفورم	البترواليوم ايثر	
البذور	0.15	0.31	0.36
الأوراق	0.60	-	0.82

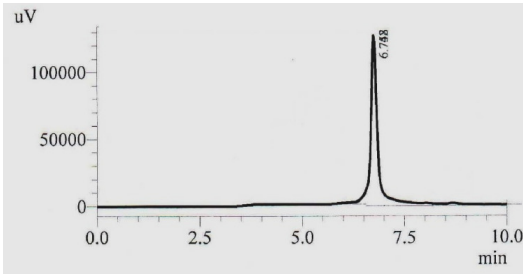
جدول رقم (١) يمثل النسب الوزنية لمستخلص قلويدات نبات *Datura metel*

غالبا ما تستخدم المذيبات العضوية المعروفة مثل الكلوروفورم، الميثانول والايثانول...الخ، في استخلاص المركبات الفعالة حياتيا والتي بدورها تكون متعددة بالعضو النباتي الواحد ولان المذيبات العضوية تختلف في درجة قطبيتها فأن قدرتها على استخلاص وفصل هذه المركبات تعتمد على مدى التقارب بين قطبية المذيب العضوي من جهة وقطبية المركب الحيوي من جهة أخرى بناءا على قاعدة المواد تذيب مثيلاتها وهذا يتوضح من خلال النتائج المبينة بالأشكال .

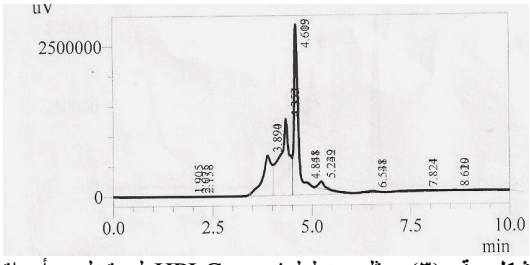
يبين الشكل رقم (٣) و (٤) واللذان يمثلان مخطط فحص HPLC لمستخلص أوراق نبات *Datura metel* باستخدام المذيب العضوي كلوروفورم وعمود الفصل (M.C. Extrelut®1) على التوالي حيث كانت السيادة واضحة لقلويد Atropine لمستخلص أوراق النبات باستخدام المذيب العضوي كلوروفورم (Rt = 4.6) وبنسبة استخلاص بلغت 57% من الوزن الكلي للمستخلص ولم يؤشر المخطط أي وجود لقلويد Scopolamine بالمقارنة مع كل من مخطط فحص HPLC لمادة Atropine (الشكل رقم (١) و Scopolamine (الشكل رقم (٢) القياسيتين، وهذه النتيجة مخالفة لكل الأدبيات العالمية المنشورة والتي تؤكد على سيادة قلويد Scopolamine لجميع أعضاء نبات *Datura metel* [Afsharypuor *et al*, 1995]، في حين تؤكد النتائج الموضحة في الشكل رقم (٤) أي باستخدام عمود الفصل (M.C.Extrelut®1) ارتفاع مؤشر وجود قلويد Scopolamine (0-36%) بالمقارنة مع مخطط فحص HPLC للشكل رقم (٢).



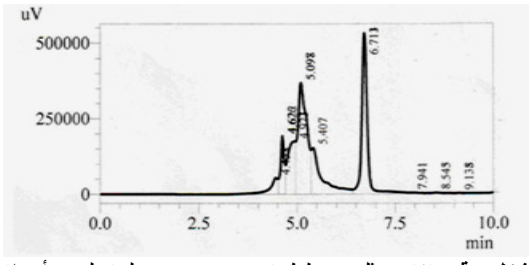
شكل رقم (١) يمثل مخطط فحص HPLC لمادة Atropine القياسية



شكل رقم (٢) يمثل مخطط فحص HPLC لمادة Scopolamine القياسية



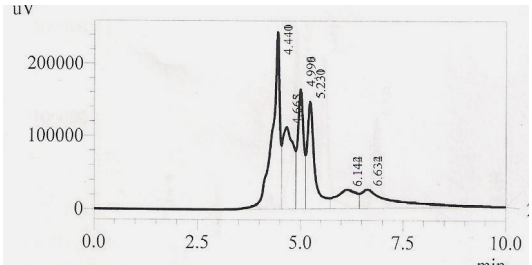
شكل رقم (٣) يمثل مخطط فحص HPLC لمستخلص أوراق نبات *Datura metel* (الكلوروفورم)



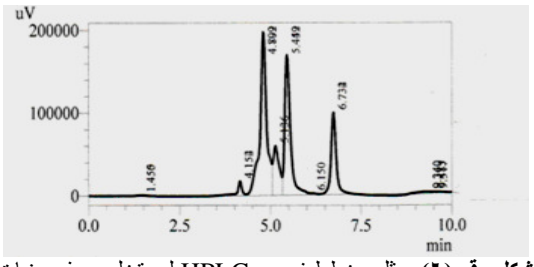
شكل رقم (٤) يمثل مخطط فحص HPLC لستخلص أوراق نبات *Datura metel* (M.C. Extrelut®1)

مستخلص البذور (العينة (B)

يوضح الشكل رقم (٥) مخطط فحص HPLC لمستخلص بذور نبات *Datura metel* باستخدام المذيب العضوي الكلوروفورم حيث تبين النتائج ظهور أنواع من القلويدات ومن ضمنها قلويدي Atropine و Scopolamine وبنسبة استخلاص 15% و 3% على التوالي ولكن السيادة واضحة للقلويد المجهول ذو زمن احتجاز (Rt = 4.4) والذي يشكل ما مقداره 34% من المستخلص الكلي للبذور، في حين كانت النتائج مختلفة عند استخدام عمود الفصل (M.C. Extrelut®1) في فصل وتنقية النموذج وكما هو موضح في الشكل رقم (٦) حيث تؤكد النتائج ارتفاع نسبة استخلاص قلويد Atropine (15-36%) وكذلك الحال لقلويد Scopolamine -3) (18% ، مع اختفاء مؤشر وجود القلويد المجهول المشار له سلفا.

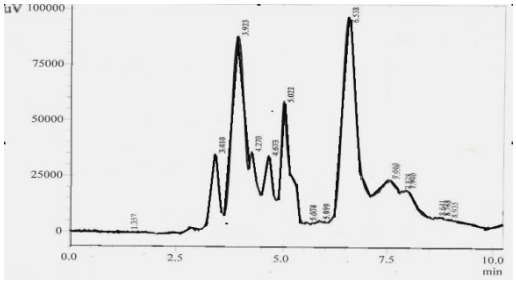


شكل رقم (٥) يمثل مخطط فحص HPLC لستخلص بذور نبات *Datura metel* (الكلوروفورم)



شكل رقم (٦) يمثل مخطط فحص HPLC لمستخلص بذور نبات Datura metel (M.C. Extrelut®1)

إن ارتفاع نسبة قلويد Atropine في البذور خاصة للنباتات العائدة لجنس الداتورا أدى إلى اهتمام العديد من الباحثين بتحديد محتوى البذور من القلويد [Bania *et al,* 2004] فضلا عن القلويدات الأخرى وبالرغم من تأكيد العديد من المصادر العلمية على إزالة الدهون من البذور قبل إجراء عملية الاستخلاص [Snell and Hilton, 1967]، ألا أن اغلب البحوث المنشورة تمت بدون مراعاة لأهمية هذه الخطوة والتي تتمثل أهميتها من خلال الشكل رقم (٧) حيث تبين النتائج ارتفاع نسبة استخلاص قلويد Scopolamine (3-23%) مع سيادة واضحة للقلويد وذلك تم بعد معاملة المستخلص بالمذيب العضوي بتروليوم ايثر فضلا عن الكلوروفورم بالمقارنة مع المخطط رقم (٥) حيث تم معاملة مستخلص البذور بالكلوروفورم فقط أي إن البتروليوم ايثر عمل على إزالة المركبات الدهنية الموجودة في البذور مما سهل من عمل الكلوروفورم (الشكل رقم (٧).



شكل رقم (٧) يمثل مخطط فحص HPLC لمستخلص بذور نبات *Datura metel* (بتروليوم ايثر+الكلوروفورم)

أما عند مقارنة نتائج الإشكال رقم ٥،٦،٧ مع بعضها البعض يتبن بان استخدام طريقة الفصل الكروموتوغرافي بالعمود (M.C. Extrelut®1) أي الشكل رقم (٦) حقق نسبة استخلاص لقلويد Scopolamine(القلويد الأساس بموجب جميع البحوث المنشورة [Iranbkhsh *et al,* 2004; Abo *et al*, 1993; Hiraoka *et al*, 1996]، مقاربة تماما لنسبة استخلاص القلويد باستخدام أكثر من مذيب عضوي أي الشكل رقم (٧) ويعتقد ان التفسير العلمي للنتائج التي تم الحصول عليها مايلي:

إن السليكاجل المعبأة بالعمود(M.C. Extrelut®1) عملت على امتزاز المواد الدهنية والمركبات القطبية الأخرى والتي كانت متأصرة فيزيائيا مع القلويدات وعلى فرض بان قطبية المذيب العضوي الكلوروفورم وكلوريد المثلين متقاربتين فعند مقارنة نتائج التحليل الآلي (HPLC) للنماذج المعاملة بالاستخلاص المذيبي والأخرى بالفصل الكروموتوغرافي تبين بان مركب Scopolamine يظهر وبشكل واضح بمستخلص الأوراق والبذور المعاملة بالعمود الكروموتوغرافي فقط (الشكل رقم (٤) و (٦))، وبمعنى أخر أن طريقة الفصل الكروموتوغرافي باستخدام العمود (M.C. Extrelut®1) فضلا عن كونها طريقة سهلة وسريعة واقتصادية مع ضمان دقة النتائج، يعمل العمود على إزالة كل المركبات الأخرى الغير مرغوب بها مثل المركبات السكرية، العطرية، الأصباغ والمركبات الدهنية التي تتسبب بتداخل قمم المركبات المطلوب تشخيصها أي انه يغني الباحث عن استخدام أكثر من مذيب عضوي فضلا عن اختصار مراحل عملية الاستخلاص.

عموما يتأثر المحتوى النباتي من القلويدات (التركيز) بجملة من العوامل من أهمها حساسية التعبير الجيني لإنزيم Putrescine-N-methyltransferase (PMT) للبيئة التي تنمو فيها جذور النبات وهو الإنزيم المحدد لعملية تحول مركبات نباتية معينة إلى قلويدات التروبان Tropane Alkaloide [Movano *et al*, 2003].

الاستنتاجات:

تبين نتائج الدراسة الحالية كفاءة أعمدة الفصل الكروموتوكرافي في تشخيص وتحديد تراكيز المواد الفعالة حياتيا للإعشاب الطبية بالمقارنة مع النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام مذيب عضوي واحد أو أكثر.

التوصيات:

بناء على النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة الحالية يوصى باعتماد أعمدة الفصل والتنقية (M.C. Extrelut®1) في تحديد المحتوى الكيماوي للنباتات الخاضعة للدراسة خاصة في حال الاستناد على هذه النتائج في تحديد الأنساب فيما بين الأنواع المختلفة أو ما يسمى بالتصنيف الكيماوي Chemotaxonomy.

المصادر:

Abo, K.A., Salami, O.O. and Abelegan, I.O. (1993). Varation of total hyoscine content of Cultivated *Datura mete*l L.Afr.J.med. Med.Sci. 22(1): 45-7.

Afsharypuor, S., Mostajeran, A. and Mokhtary, R. (1995). Variation of Scopolamine and arropine in different parts of *Datura metel* during development. *Plant. Med*. 61(4): 383-4.

Bania, T.C., Cho, J., Bailes, D. and Neill, O. (2004). Jimson weed extract as a protective agent in sever organophosphate toxicity. *Acad. Emerg. Med.,* 11: 335-8

Berkov, S. (2003). Alkaloids of *Datura Ceratocaula*. Z. Naturforsch. 58c: 455-8

Bisset, N.G. (2001). Herbal and phytopharmaceuticals. 2nd CRC Press, New York. pp 342-4

El-Mahmood, A.M. and Amedh, J.M. (2007). In vitro antibacterial activity of *Parkia biglobosa* (Jacq) root bark extract against some microorganisms associated with urinary tract infections. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6(11): 1272-5.

Gidado, A., Zainab, A.A., Hadiza, M.U., Serah, D.P., Anas, H.Y. and Milala, M.A. (2006). Toxicity studies of ethanol extract of the leaves of *Datura stramonium* in rats. *African Journal of Biotechnology* vol. 6(8): 1012-5

Goren, A.C., Bilsel, G., bilsel, M. and yenisoy-Karakas, S. (2004).Simple high-performance Liquid chromatographic method for determination of atropine and obidoxime in aparenteral injection device. *J. chromatography* A. 1057: 237. 9.

Hiraoka, N., Tashimo, K., Kinoshita, C. and Hirooka, M. (1996). Genotypes and alkaloid contents of *Datura metel* Varicties. *Biological and Pharmaceutical bulletin*. Vol.19 N.8:1086-1089.

Hoareau, L. and Dasiva, E.J. (1999). Medicinal plants: Are merging health aid**,** *Electronic Journal of Biotechnology*. 2: 1-70

Iranbkhsh, A., Oshaghi, M.A. and Majd, A. (2004). Distribution of atropine and Scopolamine in different organs on stages of development in *Datura Stramonum* L. (Solanaceae). Structure and Ultrastructure. of Biosynthesizing cells .*ACTA Biologica Cracoviens Series Botanion* 48\1:13-8.

Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazon, J., Cusido, R.M., Teresa Pinol, M., Teeri, T.H. and Oksman-Caldentey, K.M. (2003). Effect of pmt gene over expression on tropane alkaloid roduction in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus. J.Exp. Botany*., 54(381): 203-11.

Snell, F.D. and Hilton, C.L. (1967). Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis. 4: 594.

Surves Waram, S., Caioy, Z., Cork, H. and Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Journal of Food Chemistry*. 102: 938-53

Vaidya, A.B. and Antarkar, V.D.S. (1994). New drugs from medicinal plants, opportunities and approaches. *Journal Assoc Physicians India*. Vol. 42: 221-8.

Effect of Separation Methods on Identification and Determination of Concentrations the Bioactive Compounds

Sagida Abass Hussain[1], Muna Mahmud[1], Zainab Talib Abidzaid al-Sharify[2], Muna Abed Jaffar[1], Alia Hussain[1]

[1]Ministry of science and technology
[2]Environmental Engineering Department, College of Engineering, Al-Mustansiryiah University, Bab AL- Muthem, P.O. Box 14150, Baghdad, Iraq.

Abstract

The objective of this study was to use different methods to isolate and separate the bioactive compounds found in leaves and seeds of *Datura metel* and these methods include solvent extraction by chloroform and chromatography separation by sorbent material such as silica gel (Merck Column Extrelut®1), as well as to study effect of deffating operation from seeds in separation of alkaloids. Results showed that weight percentage of alkaloids were 0.15, 0.36, 0.60 and 0.82% for seeds and leaves of *Datura metel* by solvent extraction and column chromatography respectively. High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) was employed to analysis the extracts which proved that, the chromatography separation of alkaloids was more accurate and active than solvent extraction.

Key word: Extraction, *Datura metel*, Alkaloids, Merck Column Extrelut®1