

جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای گیاه هیوسیاموس اینسانوس (*Hyoscyamus insanus* Stocks)

محسن تفقدی^{۱*}، محمد حسن زاده خیاط^۲، محمد رحیمی زاده^۳

۱- استادیار دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی مشهد

۲- استاد دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی مشهد

۳- استاد دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

*آدرس مکاتبه: دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵، نمابر: ۸۶۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: m-tafaghodi@mums.ac.ir

چکیده

یکی از جنس‌های مهم تیره سیب‌زمینی جنس هیوسیاموس (*Hyoscyamus*) می‌باشد که تعدادی از گونه‌های آن منحصراً در ایران و کشورهای اطراف پراکندگی دارند. ماده موثر اصلی در گیاهان این جنس، آلکالوئیدها و به‌طور عمده آلکالوئیدهای تروپان هستند. یکی از گونه‌های این جنس، هیوسیاموس اینسانوس (*Hyoscyamus insanus* Stocks) است که بر اساس اطلاعات موجود تاکنون ترکیبات آن شناسایی نشده است. این گونه از بندرعباس جمع‌آوری و پس از خشک کردن در سایه و آسیاب کردن، عصاره اتانولی آن تهیه و در مرحله بعد آلکالوئید موجود در عصاره جداسازی شد. آلکالوئیدهای موجود در آلکالوئید تام با استفاده از کروماتوگرافی ستون و کروماتوگرافی لایه نازک تهیه‌ای جداسازی و خالص شدند. شناسایی آلکالوئیدهای خالص شده با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)، جرم (MS) و ماورای بنفش (UV) انجام گرفت. در این تحقیق، سه آلکالوئید اصلی هیوسیامین (آتروپین)، هیوسین و آپوآتروپین در این گیاه شناسایی گردید. بیش از ۷۰ درصد آلکالوئید تام موجود در گیاه را آلکالوئید هیوسیامین تشکیل می‌دهد که بدین ترتیب این گیاه می‌تواند به عنوان یک گونه صنعتی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

گل‌واژگان: تیره سیب‌زمینی، هیوسیاموس اینسانوس، آلکالوئیدهای تروپان، هیوسیامین، هیوسین، آپوآتروپین

مقدمه

امروزه هنوز بسیاری از مواد اولیه دارویی از گیاهان استخراج می‌شوند و به دلیل عدم صرفه اقتصادی یا پیچیده بودن ساختمان شیمیایی آنان، سنتز شیمیایی جای استخراج از طبیعت را نگرفته است و حداکثر برای اصلاح این مواد اولیه طبیعی استفاده می‌شود. در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و در نتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران، امکان شناسایی مواد موثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آنها به منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد. این کار به‌ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اهمیت ویژه‌ای دارد.

جنس هیوسیاموس (*Hyoscyamus*) دارای گونه‌های متعددی است که بسیاری از آنان در ایران به صورت وحشی می‌رویند [۱، ۲]. از این میان سه گونه *Hyoscyamus niger*، *H. muticus* و *H. albus* برای استخراج آلکالوئیدها به کار می‌روند [۳]. عمده‌ترین مواد موثر موجود در این جنس، آلکالوئیدها هستند و غالب آلکالوئیدهای این جنس از گروه تروپان می‌باشند [۴]. در اغلب این گونه‌ها آلکالوئید اصلی هیوسیامین می‌باشد که درحین استخراج راسمیزه شده و به آتروپین تبدیل می‌شود [۴، ۵].

این گونه‌ها از نظر استخراج دو ماده آتروپین و هیوسین اهمیت ویژه‌ای دارند [۴]، چرا که این دو ماده چه به صورت طبیعی و یا پس از تغییرات شیمیایی مختصر (مانند ایپراتروپیوم بروماید که با جایگزینی گروه متیل آتروپین با ایزوپروپیل به دست می‌آید و به عنوان یک ترکیب ضدآسم به صورت آتروسل فرموله شده است [۶]) هنوز استفاده وسیعی دارند.

یکی از گونه‌های این جنس که پراکنش آن منحصر به ایران و چند کشور اطراف (افغانستان و پاکستان) است، گونه *Hyoscyamus insanus* است. این جنس در نواحی جنوب، جنوب شرق و مرکز ایران پراکندگی دارد [۷، ۸]. با توجه به پراکنش این گیاه در ایران و چند کشور اطراف و با توجه به این که بر روی شناسایی آلکالوئیدهای این گونه از هیوسیاموس تحقیقی صورت نگرفته است، لذا جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای این گیاه ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق هدف جداسازی و شناسایی آلکالوئیدهای مختلف موجود در گیاه *Hyoscyamus insanus* که بومی ایران است می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

اترودیپتول، اسیدسولفوریک، آمونیاک، کلروفرم، اسیداستیک، گلاسیال، سیلیکاژل GF254، ایزوپروپانول، هیوسیامین، هیوسین، کلروفرم دوتره و تتراکلرید کربن که همگی از شرکت Merck تهیه گردیدند.

روش‌ها

جمع آوری و شناسایی گیاه

اندام‌های هوایی گیاه در مردادماه از بندرعباس جمع‌آوری شد. با توجه به توزیع نسبتاً یکنواخت آلکالوئیدها در تمام بخش‌های اندام‌های هوایی این جنس [۹] از تمامی اندام‌های هوایی برای استخراج آلکالوئید استفاده شد. شناسایی و تعیین گونه گیاه توسط خانم مهندس محبوبه خاتم‌ساز (عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهران) انجام پذیرفت (شماره هرباریومی ۴۹۴۲۳).



آماده سازی گیاهان برای استخراج آلكالوئید

به این منظور ابتدا گیاهان جمع‌آوری شده در سایه خشک شدند و پس از اطمینان از خشکی، آسیاب شده و پس از گذراندن از الک مش ۱۰، چربی‌زدایی شدند [۱۰]. برای چربی‌زدایی از سوکسله با اتردوپترول ۶۰-۴۰ به مدت ۶ ساعت استفاده گردید.

تهیه عصاره اتانولی

عمل استخراج به روش خیساندن و با استفاده از اتانول ۹۶ درجه انجام شد [۱۱، ۱۲]. این عمل به مدت ۴ روز ادامه یافت و در این مدت چندین بار حلال تعویض شد و در نهایت حلال‌های حاوی مواد استخراجی به کمک دستگاه تبخیر در خلا تغلیظ گردیدند.

تهیه آلكالوئید تام

برای استخراج آلكالوئیدهای تام از اندام‌های هوایی گیاه هیوسیاموس اینسانوس از روش John و Groger استفاده گردید [۱۳]. برای این منظور به عصاره اتانولی غلیظ، اسیدسولفوریک ۳ W/V افزوده و در دمای محیط به هم زده شد. این محلول اسیدی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰، صاف شد و محلول زیر صافی دو بار هر بار با ۲۰۰ میلی لیتر اتردوپترول ۶۰-۴۰ دکانته گردید. پس از حذف مواد رنگی و هیدروکربنی به وسیله دکانتاسیون با اتردوپترول، به فاز آبی (اسیدی)، در حمام آب یخ، آمونیاک غلیظ اضافه و به شدت به هم زده شد. این عمل تا رسیدن به $\text{pH} = ۱۱$ ادامه یافت. سپس محلول حاصل ۳ بار با کلروفرم استخراج و عصاره به دست آمده تغلیظ و حلال حذف گردید. آلكالوئید تام به دست آمده در این روش ۴۲/۰ درصد بود.

جداسازی و خالص سازی اجزا آلكالوئید تام

برای این منظور از دو روش کروماتوگرافی لایه

نازک تهیه‌ای (PTLC) و کروماتوگرافی ستون (CC) استفاده شد [۱۲]. برای انتخاب سیستم حلال مناسب برای PTLC ابتدا چند سیستم حلال معرفی شده در منابع بر روی TLC آزمایش شدند. از بین آنها سیستم حلال اتیل استات-ایزوپروپانول-آمونیاک ۲۰٪ (۳۵:۴۵:۱۵) و استون-کلروفرم-آمونیاک (۹۰:۷:۳) [۱۴] که بهترین جداسازی را نشان دادند، انتخاب شدند.

برای جداسازی آلكالوئیدها بر روی ستون، عمل شستشو از سیستم حلال کلروفرم-متانول با قطبیت پایین (۹۵٪ کلروفرم-۵٪ متانول) شروع و به تدریج قطبیت با اضافه کردن نسبت متانول تا ۱۰۰٪ افزایش یافت.

شناسایی آلكالوئیدهای خالص شده

برای شناسایی اولیه، از فاکتور کندی (R_f) آلكالوئیدهای جداسازی شده در سیستم حلال‌های مختلف استفاده شد و سپس با استفاده از طیف‌سنجی NMR، UV و MS شناسایی کامل صورت گرفت. برای شناسایی اولیه، یک نمونه از هر آلكالوئید جدا شده و دو نمونه از دو استاندارد هیوسیامین و هیوسین که در دسترس بودند بر روی صفحه TLC گذاشته شد و R_f این ترکیبات در دو سیستم حلال اتیل‌استات: ایزوپروپانول: آمونیاک ۲۰٪ (۴۵:۳۵:۱۵) و استون: کلروفرم: آمونیاک (۹۰:۷:۳) مورد مقایسه قرار گرفت.

برای کریستالیزاسیون نمونه‌های استخراجی، در صورتی که پس از حذف حلال نمونه به صورت کریستالیزه در نمی‌آمد، به آن کلروفرم یا مخلوط کلروفرم-متانول افزوده و به مدت چند ساعت درون یخچال گذاشته می‌شد. به این روش دو آلكالوئید هیوسیامین و آپوآتروپین کریستالیزه گشتند (کریستال‌های منشوری کشیده) ولی هیوسین کریستالیزه نشد که بررسی منابع نشان‌دهنده این بود که این آلكالوئید اصولاً شکل کریستالی به خود

کربن	نمونه استاندارد	ماخذ ۱۷	ماخذ ۱۸	ماخذ ۱۹	ماخذ ۱۴	نمونه استخراج شده
۱ و ۵	۲/۸۲-۲/۹۲(bd)	۲/۷۰-۳/۱۰ (bd)	۲/۹۳(bd)	۲/۹۳(bd)	-	۳/۰۲(bd)
۲ و ۴ و ۶ و ۷	۱/۰۸-۲/۰۶(m)	۱-۲ (m)	۱/۶۶ (m)	۱/۲-۲/۰۵	-	۰/۸۷-۲/۰۹(m)
۳	۴/۹۹ (t)	۵/۰۰ (t)	۴/۹۶ (t)	۴/۹۷ (t)	۵/۰۲ (t)	۵/۰۱ (t)
۲'	۴/۰۳-۴/۳۰(m)	۴-۴/۳(m)		-	۴/۱۸(t)	۴/۰۴-۴/۳۱(m)
۳'	۳/۶۵-۳/۸۹(m)	۳/۶-۳/۸(m)	۳/۹۰(m)	-	۳/۸۰(m)	۳/۶۶-۳/۹۰(m)
N-CH3	۲/۱۷(s)	۲/۱۸(s)	۲/۱۶(s)	۲/۱۵(s)	-	۲/۱۹(s)
فنیل	۷/۲۵(s)	۷/۲۰(s)	۷/۲۳(s)	-	۷/۲۶(s)	۷/۲۴(s)
	(bs) پیک یک تایی پهن	(m) پیک موندتایی	(s) پیک یک تایی	(t) پیک سه تایی		

در طول موج ۲۴۴/۸ نانومتر حداکثر جذب را نشان داد که معادل طول موج حداکثر جذب نمونه استاندارد بود.

هیوسین

شناسایی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک

پس از جداسازی و خالص سازی این آلکالوئید به وسیله کروماتوگرافی ستون و کروماتوگرافی P TLC، برای شناسایی مقدماتی با استفاده از TLC، R_f نمونه استخراج شده با هیوسین استاندارد (Merck) مقایسه شد. R_f هیوسین در سیستم حلال اتیل استات-ایزوپروپانول-آمونیاک (۲۰ : ۴۵ : ۳۵) : ۱۵ برابر ۰/۸ و در سیستم حلال استون-کلروفرم-آمونیاک (۹۰ : ۷ : ۳) برابر ۰/۲۶ بود که این R_f ها دقیقاً برابر R_f استاندارد در این سیستم حلال ها بود.

شناسایی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته

برای رسیدن به شناسایی نهایی، طیف H-NMR نمونه استخراج شده و هیوسین استاندارد در شرایط دستگاهی یکسان و در حلال کلروفرم دوتره گرفته شد و با یکدیگر و همچنین با مشخصات طیف H-NMR هیوسین که در منابع دیگر گزارش شده

بود مقایسه گردید (جدول شماره ۲). همان گونه که جدول شماره ۲ نشان می دهد اجزای طیف هیوسین استخراج شده از این گیاه با طیف هیوسین استاندارد و طیف های گزارش شده در منابع دیگر همخوانی نشان می دهد.

استفاده از اسپکتروفتومتری ماورابنفش در شناسایی هیوسین

نمونه به دست آمده پس از حل شدن در کلروفرم در طول موج ۲۴۷/۴ نانومتر حداکثر جذب را نشان داد که معادل طول موج حداکثر جذب نمونه استاندارد بود.

آپوآتروپین

پس از جداسازی و خالص سازی این آلکالوئید به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک تهیه ای، برای کریستالیزاسیون آن مقداری کلروفرم به آن افزوده و چند ساعت درون یخچال گذاشته شد. کریستال های این آلکالوئید تقریباً شبیه هیوسینامین (سوزنی و بی رنگ) بود.

R_f این ترکیب در سیستم حلال اتیل استات-ایزوپروپانول-آمونیاک (۲۰ : ۴۵ : ۳۵) برابر ۰/۹۳ و در سیستم حلال استون-کلروفرم-آمونیاک (۹۰ : ۷ : ۳) برابر ۰/۲۸ بود. با توجه به این که نمونه

جدول شماره ۲- مابجایی های شیمیایی مربوط به طیف H-NMR هیوسین استخراج شده از گیاه هیوسیناموس اینسانوس و مقایسه آن با نمونه استاندارد و منابع دیگر

کربن	نمونه استاندارد	ماخذ ۱۷	ماخذ ۱۹	نمونه استخراج شده
۱ و ۵	(tt) ۲/۸۴ و ۳/۰۳	(tt) ۳/۰۲ و ۳/۱۷	۲/۹۸	(tt) ۲/۹۲ و ۳/۰۶
۲ و ۴	(m) ۱/۱۰-۲/۱۰	(m) ۱/۲۳-۲/۲۰	۱/۱۰-۲/۳۰	(m) ۱/۲۳-۲/۲۱
۶ و ۷	(dd) ۲/۶۹ و ۳/۳۲	(dd) ۲/۶۳ و ۳/۳۸	۲/۸۴ و ۳/۳۷	(dd) ۲/۶۷ و ۳/۰۰
۳	(t) ۴/۹۴	(t) ۵/۰۲	(t) ۴/۹۸	(t) ۵/۰۰
۱۲	(m) ۳/۹۶-۴/۲۴	(m) ۴/۰۳-۴/۱۵	-	(m) ۴/۰۲-۴/۱۴
۱۳	(m) ۳/۷۵-۳/۸۳	(m) ۳/۶۹-۳/۸۹	-	(m) ۳/۶۶-۳/۸۹
N-CH ₃	(s) ۲/۳۸	(s) ۲/۴۸	(s) ۲/۴۰	(s) ۲/۴۳
فنیل	(s) ۷/۲۴	(s) ۷/۲۴	-	(s) ۷/۲۳

(tt) دو پیک سه تایی (m) پیک چندتایی (s) پیک یک تایی (dd) دو پیک دوتایی (t) پیک سه تایی



استاندارد آپواتروپین در دسترس نبود، امکان شناسایی اولیه با مقایسه R_f این ترکیب با استاندارد امکان پذیر نبود.

شناسایی با استفاده از روش اسپکترومتری جرم
برای شناسایی کامل این نمونه طیف جرم آن نیز گرفته شد. طیف جرم این ترکیب نشان دهنده $M^+ = 270$ بود که نشان دهنده $M = 271$ برای این ترکیب می باشد. با توجه به جرم مولکولی ذکر شده و احتمال وجود حلقه تروپین با توجه به اجزای طیف H-NMR، در بین آلكالوئیدهای تروپان دو ترکیب وجود دارد که دارای این جرم مولکولی بودند: آپواتروپین و آپونور هیوسین.

مقایسه طیف جرم گزارش شده در منابع [۲۰] برای آپواتروپین با طیف جرم نمونه مجهول نشان دهنده همخوانی اجزا این طیف ها تا حد زیادی بود. جرم یون های شاخص آپواتروپین که در مآخذ [۲۰] گزارش شده به شرح زیر می باشد: (۲۶) ۴۲، (۴۹) ۸۲، (۴۹) ۸۳، (۲۱) ۹۴، (۶۶) ۹۵ و (۱۳) ۱۰۳ و (۱۰۰) ۱۲۴ و (۱۴) ۱۴۰ و (۳) ۲۷۱. اعداد داخل پرانتز فراوانی این پیک ها می باشد.

شناسایی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته

برای شناسایی این آلكالوئید طیف H-NMR این

ترکیب گرفته شد و مشخصات طیف به دست آمده با اجزای طیفی گزارش شده در منابع مقایسه گردید که حاکی از همخوانی اجزای طیف بود (جدول شماره ۳). همچنین با مقایسه طیف H-NMR آپواتروپین و آپونور هیوسین [۱۹] موجود در منابع با طیف H-NMR نمونه به دست آمده مشخص شد که نمونه به دست آمده آپواتروپین می باشد (جدول شماره ۳).

استفاده از اسپکتروفتومتری ماورا بنفش در شناسایی آپواتروپین
حداکثر جذب این ترکیب در حلال کلروفرم در ۲۴۹/۲ nm دیده می شد.

نتیجه گیری نهایی

از میان سه آلكالوئید شناسایی شده، هیوسیامین (آتروپین) پراکندگی بسیار زیادی در تیره سیب زمینی دارد. اما نکته بسیار مهم در مورد این گونه درصد بالای این آلكالوئید در این گیاه می باشد. بیش از ۷۰ w/w درصد از آلكالوئید به دست آمده از این گیاه را هیوسیامین تشکیل می دهد (۰/۳ w/w درصد از اندام های هوایی گیاه) که این نکته از نظر صنعتی بسیار مهم است، چرا که علی رغم روش های بسیاری که برای سنتز این آلكالوئید پیشنهاد شده است، هنوز استخراج آن از منابع طبیعی مقرون به صرفه تر است و در این راستا در صنعت به طور عمده از گونه

جدول شماره ۳- جابجایی های شیمیایی مربوط به طیف H-NMR آپواتروپین استخراج شده از گیاه هیوسیاموس اینسانوس و

مقایسه آن با منابع دیگر

نمونه استخراج شده	مآخذ ۲۰	کربن
۳/۰۰ و ۲/۸۰ (tt)	-	۱ و ۵
۰/۷۷-۲/۵۰ (m)	۱/۲۰-۲/۶۰ (m)	۲ و ۴ و ۶ و ۷
۵/۲۲ (t)	۵/۱۳ (t)	۳
۶/۳۲ و ۵/۸۴ (dd)	۶/۳۳ و ۵/۸۵ (dd)	۳
۲/۶۳ (s)	۲/۳۰ (s)	N-CH3
۷/۲۳ (s)	۷/۲۳ (s)	فنیل

(tt) دو پیک سه تایی (m) پیک پندتایی (s) پیک یک تایی (dd) دو پیک دوتایی (t) پیک سه تایی

سومین آلکالوئید شناسایی شده آپوآتروپین است که اثر درمانی ضد تشنج دارد. این آلکالوئید نسبت به هیوسیامین و هیوسین پراکندگی کمتری دارد و براساس گزارش‌های موجود در منابع درجنس هیوسیاموس تنها در گونه هیوسیاموس رتیکولاتوس [۱۶] پیدا شده است.

نکته‌ای که در اینجا باید بیان داشت این است که هر سه آلکالوئید پیدا شده در این گونه برای اولین بار گزارش می‌شوند، چرا که تاکنون آنالیز شیمیایی دیگری بر روی این گیاه انجام نشده است و امکان بررسی بیشتر و استفاده کاربردی و صنعتی از این آلکالوئیدها و به‌ویژه هیوسیامین میسر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات خانم مهندس محبوبه خاتم‌ساز در رابطه با جمع‌آوری و شناسایی گیاه تقدیر و تشکر می‌شود.

هیوسیاموس موتیکوس که آنهم بیش از ۷۰ درصد هیوسیامین دارد استفاده می‌شود [۲۱]. بررسی منابع نشان می‌دهد که میانگین مقدار آلکالوئید هیوسیامین در بخش‌های مختلف گیاه هیوسیاموس موتیکوس حدود ۰/۵ درصد و در ساقه گیاه حدود ۰/۳ درصد است [۹]. مطالعه حاضر نشان داد که مقدار آلکالوئید هیوسیامین در اندام‌های هوایی گونه هیوسیاموس اینسانوس حدود ۰/۳ درصد است که در مقایسه با گونه هیوسیاموس موتیکوس در حد مطلوبی می‌باشد. با مشخص شدن درصد بالای هیوسیامین در این گونه، اهمیت صنعتی خاص این گونه آشکار می‌شود و می‌تواند با کار بیشتر بر روی آن و بررسی بیشتر روی پراکندگی آن به عنوان یک گونه جدید صنعتی معرفی شود.

آلکالوئید دیگر به‌دست آمده هیوسین (اسکوپولامین) می‌باشد که نسبت به دو آلکالوئید دیگر درصد کمتری از آلکالوئید تام را تشکیل می‌دهد و این آلکالوئید نیز استفاده زیادی در پزشکی دارد [۶].

منابع

۱. زرگری علی. گیاهان دارویی. چاپ ششم، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷۱، جلد سوم، صفحات ۶۳۶-۵۴۶.
۲. قهرمان احمد. کروموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). چاپ اول، مرکز نشر دانشگاهی. ۱۳۷۲، جلد سوم، صفحات ۲۳۰-۲۰۲.
3. Bown D. *Encyclopedia of Herbs and their uses*. Dorling Kindersley. UK. 1995, p: 295.
4. Parr AJ, Payne J, Eagles J, Chapman T, Robins RJ, Rhodes MJ. Variation in tropane alkaloid accumulation. *Phytochemistry* 1990; 29: 2545-50.
۵. آئینه‌چی یعقوب. مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران. چاپ دوم. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷۰، صفحات ۱۵۹ و ۴۹۳-۴۹۲.
6. Anonymus. Martindale, *The extra pharmacopoeia*. 30th ed. The pharmaceutical press. UK. 1993, pp: 418, 425-427.
۷. خاتم‌ساز محبوبه. فلور ایران، تیره سیب زمینی (Solanaceae)، چاپ اول، انتشارات موسسه جنگل‌ها و مراتع. ۱۳۷۶، صفحه ۱۵۸.
8. Rechinger KH. *Flora Iranica*, Akademische druck. Austria. 1966, Vol. 100, pp: 49-80.
9. Mandal S, Naqvi AA, Thakur RS. Analysis of some tropane alkaloids in plants by mixd column high performance liquid

16. Anonymus. *Dictionary of Natural products*. 1st ed. Chapman & Hall. UK. 1994, vol.1, pp: 465, 466, 618, 1196.
۱۷. نوری ارتیان معصومه. مطالعه آلکالوئیدها و ارایه روشی سهل برای استخراج آتروپین از گیاه آتروپابلادونا، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی مشهد، پایان نامه برای درجه دکترا داروسازی ۹۶-۸۵، (۷۴-۱۳۷۳).
18. Albadar A and Muhtadi F. Atropine, *Analytical profile of drug substances*, John wiley. USA. 1985, vol 14, pp: 325-335, 353.
19. Cordell GA. *Introduction to alkaloids*. John wiley. USA. 1981, pp: 5, 6, 109, 114.
20. Takeuchi, Y. Aminoacids and peptides. II. A one step synthesis of atropine and other related alkaloids from dl-phenylalanine 3-tropanyl ester, *Chem. pharm. Bull.* 1971; 19: 2603-8.
21. Evans WC. *Trease and Evans' pharmacognosy*, 14th ed. WB Saunders Company. pp: 353-354.
- chromatography. *J. Chromatography* 1991; 547: 468-71.
10. Anonymus. *Remington's pharmaceutical sciences*, 19th ed. Mack publishing company. pp: 1521.
۱۱. صمصام شریعت سیدهدادی، عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روشهای شناسایی و ارزشیابی آنها. چاپ اول، انتشارات مانی، ۱۳۷۱، صفحات ۷۰-۳ و ۹۴-۱۱۵.
12. Mahmood U, Shukla YN, Thakur RS. 2,3-Dimethylnonacosane and Tropane Alkaloids from *Hyoscyamus albus*. *phytochemistry* 1985; 24: 1618-9.
13. Johne S, Groger D. Tetramethylputrescine from Young Plants of *Ruellia Rosea*. *Phytochemistry* 1975; 14: 2635-2636.
14. Phillipson JD, Handa SS. N-Oxides of hyoscyamine and hyoscyne in the Solanaceae. *Phytochemistry* 1975; 14: 999-1003.
15. Anonymus. *Dictionary of Natural products*. 1st ed. Chapman & Hall. UK. 1994, vol.5, pp: 5071, 5562, 5632, 5929.

