مروری جامع بر آلکالوئیدهای ارزشمند تروپانی: اسکوپلامین، آتروپین و هیوسیامین

فاطمه نوه‌سی[۱]، حسنعلی نقدی‌بادی[۲]، علی مهرآفرین[۲]*، شمسعلی رضازاده[۲]، سیدحمید مصطفوی[۲]، منصور قربانپور[۳]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم باغبانی، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۳- دانشیار گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک، ایران
* آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، صندوق‌پستی: ۱۳۶۹-۳۱۳۷۵
تلفن: ۱۹-۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)
پست الکترونیک: A.Mehrafarin@gmail.com, Mehrafarin@imp.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۵ **تاریخ تصویب:** ۹۷/۱۰/۱۷ doi: 10.29252/jmp.2.70.21

چکیده

آلکالوئیدهای تروپانی نظیر اسکوپولامین ($C_{17}H_{21}NO_4$)، آتروپین ($C_{17}H_{23}NO_3$) و هیوسیامین ($C_{17}H_{23}NO_3$) به دلیل فعالیت آنتی‌کولینرژیک، رقابت با گیرنده‌های موسکارین و همچنین استفاده در درمان بیماری‌های مختلف از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی در صنعت داروسازی می‌باشند. آلکالوئیدهای اسکوپولامین، هیوسیامین و آتروپین جزء مهم‌ترین آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشند که به عنوان داروهای ضدکولیک و اسپاسمولیتیکی در دستگاه گوارش و دفع ادرار مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آلکالوئیدهای تروپانی ترکیبات فیتوشیمیایی طبیعی هستند که در هفت خانواده مختلف گیاهی وجود دارند. این ترکیبات، متابولیت‌های ثانویه اصلی گیاهان خانواده سولاناسه مانند بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) و شابیزک (*Atropa belladonna*) می‌باشند. منبع اصلی ماده خام برای تولید آلکالوئیدهای تروپانی در جهان برگ‌های گیاه *Duboisia* spp. است که حاوی ۲ الی ۴ درصد آلکالوئید (بیش از ۶۰ درصد آن اسکوپولامین و ۳۰ درصد آن هیوسیامین) می‌باشد. روش‌های رایج آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی شامل کروماتوگرافی گازی، کرومانوگرافی مایع با کارآیی بالا و الکتروفورز مویینه می‌باشد، که در حال حاضر کروماتوگرافی مایع متداولترین روش برای آنالیز این ترکیبات است. آنزیم‌های مختلفی در بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی دخالت دارند که در این بین N-*پوتریسین متیل ترانسفراز* (PMT)، *تروپینون ردوکتاز* I و II و *هیوسیامین ۶-بتا هیدروکسیلاز* (H6H) نقش کلیدی دارند. به منظور افزایش بیوسنتز این آلکالوئیدهای مهم، تحقیقات گسترده‌ای روی دستکاری ژن‌های بیان‌کننده آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی مانند ژن‌های *pmt* و *h6h* تمرکز شده است. اگرچه برای افزایش کارآیی بیوسنتز این متابولیت‌ها، تحقیقات بیوتکنولوژیکی و زراعی بسیاری انجام شده است، اما انجام مطالعات بیشتر ضروری است. این مقاله با هدف ارائه مروری جامع بر این نوع آلکالوئیدهای تروپانی ارزشمند نگارش شده است.

گل‌واژگان: آتروپین، آلکالوئیدهای تروپانی، اسکوپولامین، هیوسیامین

مقدمه

با افزایش مصرف داروهای با منشاء گیاهی در جامعه و رویکرد جدی با این دسته از داروها، سبب افزایش تقاضای مواد مؤثره گیاهان دارویی شده است. اگرچه در زمینه تولید مواد مؤثره گیاهی به روش سنتتیک پیشرفت‌هایی حاصل شده است ولی هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها راه دستیابی به بسیاری از این مواد دارویی ارزشمند است. زیرا مواد مؤثره گیاهی یا به طور کلی دارای ساختمان شیمیایی ناشناخته‌ای هستند و یا به دلیل برخورداری از ساختمان شیمیایی و یا چرخه‌های تولید بسیار پیچیده، تولید آنها به روش صنعتی در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه زیاد است. آلکالوئیدها از مهم‌ترین مواد مؤثره گیاهان دارویی می‌باشند که کاربردهای گسترده‌ای در صنعت داروسازی دارند.

آلکالوئیدها به گروهی از متابولیت‌های ثانویه با وزن مولکولی کم گفته می‌شود که از آمینواسیدها یا فرآبندهای ترانس آمیناسیون (Transamination) ساخته شده و دارای یک یا چند اتم نیتروژن در ساختار هتروسیکلیک خود هستند و غالباً به عنوان ترکیبات دفاعی در برابر حمله‌ی جانوران و میکروارگانیسم‌ها می‌باشند [۱]. این ترکیبات یکی از بزرگ‌ترین گروه ترکیبات طبیعی می‌باشند که فرآورده‌های دارویی متنوعی از آنها تولید می‌شود. تعداد آلکالوئیدهای شناخته شده ۱۲۰۰۰ است. آلکالوئیدها از پرکاربردترین ترکیبات مورد استفاده بشر در عهد باستان بوده است. به عنوان مثال برگ *Papaver somiferum*، ترکیبات فعال مورفین و کدئین را دارد و برای مقابله با درد و سرفه، ۵۰۰ سال مورد استفاده بوده است. استفاده دیگری که از این گونه‌ی گیاهی صورت گرفته، کاربرد آن به عنوان داروهای روانی است. پمادهای که توسط جادوگرها استفاده می‌شده، آغشته به عصاره‌های مختلف *Solanaceae* (تروپان آلکالوئیدها) بوده که استفاده از آن‌ها در ناحیه زیربغل باعث ایجاد توهم پرواز می‌شده است [۲].

گروه‌بندی آلکالوئیدها

آلکالوئیدها از دیدگاه‌های متفاوتی نظیر تاکسونومیکی، داروشناسی و شیمیایی طبقه‌بندی شده‌اند. بر اساس ساختمان شیمیایی، آلکالوئیدها به گروه‌های زیر طبقه‌بندی شده‌اند:

الف) آلکالوئیدهای هتروسیکلیک (Heterocyclic Alkaloids)

این ترکیبات دارای یک اتم نیتروژن در یک سیستم هتروسیکلیک هستند، که از آمینواسید مربوطه طی فرآیند دکربوکسیلاسیون بیوسنتز می‌شوند. بر حسب منشاء آمینواسید، ۶ گروه مختلف آلکالوئید شناسایی شده‌اند. این ترکیبات مشتقات آمینواسیدهای ال-تیروزین (آلکالوئیدهای ایزوکوینولین)، ال-اورنیتین (آلکالوئیدهای تروپانی، آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی)، مشتقات آسپاراژینات و گلوتامات (آلکالوئیدهای پورینی)، مشتقات ال-تریپتوفان (آلکالوئیدهای ایندولی، آلکالوئیدهای کینولینی)، مشتقات آنترانیلیک اسید (آلکالوئیدهای فوروکینولینی)، مشتقات ال-لیزین (آلکالوئیدهای پیریدینی و پیپریدینی)، مشتقات هیستیدین (پیلوکارپین)، سایر آلکالوئیدها (آلکالوئیدهای ترپنوئیدی، آلکالوئیدهای استروئیدی) [۳].

ب) آلکالوئیدهای غیرهتروسیکلیک (Nonheterocyclic Alkaloids)

آلکالوئیدهای غیرهتروسیکلیک ترکیبات مشتق شده از آمینواسیدها یا آمین‌های بیوژنیک هستند که فاقد واحد نیتروژن هتروسیکلی هستند. افدرین و کاپساسین مهم‌ترین نماینده‌های این گروه می‌باشند.

آلکالوئیدهای تروپانی

آلکالوئیدهای تروپانی بیش از ۲۰۰ ترکیب با حلقه تروپانی در ساختارشان هستند که مهم‌ترین آنها آتروپین، هیوسیامین و اسکوپلامین می‌باشند [۴]. بخش اعظم این آلکالوئیدها استرهای بین اسیدهای آلی و هیدروکسی تروپان‌هاست. ۳-هیدروکسی تروپان که تروپین نامیده می‌شود، آمینوالکلی است که اکثراً در ساختارهای تروپانی به کار می‌رود [۱]. آلکالوئیدهای تروپانی به علت فعالیت کنترل سیستم عصبی (CNS)، بیشتر مورد سوء استفاده قرار می‌گیرند. در بین آلکالوئیدهای تروپانی، کوکائین از اهمیت جهانی برخوردار است. این ترکیب پس از کانابیس (Cannabis) محبوب‌ترین داروی روانپزشکی است که به طور موقت می‌تواند در بهبود عملکرد روانی و جسمی مؤثر واقع شود [۱]. این ترکیب مانع

جذب سروتونین، نوراپی نفرین و دوپامین می‌شود. کوکائین در مقادیر بالاتر باعث انسداد کانال‌های سدیمی شده که درنهایت سبب از کار افتادن قلب می‌شود. استعمال بیش از حد کوکائین ممکن است موجب اختلالات شدید در سطوح فرستنده شده و درنهایت منجر به افسردگی، خودکشی، بی‌خوابی یا عقب ماندگی روانی شود [۵]. در سال ۲۰۱۳، استعمال بیش از حد این ترکیب سبب مرگ بیش از ۴۰۰۰ نفر شد.

آلکالوئیدهای اسکوپولامین، هیوسیامین و آتروپین جزء مهم ترین آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشند که به عنوان داروهای ضد کولیک و اسپاسمولیتیکی در دستگاه گوارش و دفع ادرار مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۶]. آتروپین در جنس‌های مختلف خانواده Solanaceae مانند Atropa، Datura، Duboisia و Hyoscyamus یافت می‌شود و آلکالوئید اصلی در ریشه‌های گیاه شابیزک *Atropa belladonna* است. این ترکیب بیشتر به خاطر اثرات آنتی‌کولینرژیک (Anti-cholinergic) که روی گیرندگان موسکارین (Muscarinicreceptors) عمل می‌کند، شناخته می‌شود [۷]. اسکوپولامین آلکالوئیدی از خانواده *Solanaceae* بویژه جنس‌های Scopolia و Datura می‌باشد. این ماده مانند آتروپین به عنوان آنتی‌موسکارین عمل می‌کند، اما تأثیر بیشتری روی سیستم عصب مرکزی دارد. این متابولیت بیشتر از گیاهان بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) و شابیزک (*Atropa belladonna*) تهیه می‌شود [۸]. به دلیل اینکه از نظر ساختاری بسیار شبیه به استیل کولین می‌باشد، اسکوپولامین آنتاگونیست فعالیت استیل کولین است که توسط گیرندگان موسکارین تنظیم می‌شود. از این ماده برای ایجاد میدریاز (mydriasis)، سیکلوپلژیا (Cycloplegia) و جهت کنترل ترشح بزاق و اسید معده و کاهش حرکات معده و جلوگیری از استفراغ استفاده می‌شود [۸]. هیوسیامین شکل چپ گرد آتروپین راسمیک است که از گیاهان بذرالبنج *Hyoscyamus niger* یا شابیزک *Atropa belladonna* جداسازی می‌شود و فعالیت آنتی کولینرژیک را نشان می‌دهد [۹]. هیوسیامین به صورت آنتاگونیست غیرانتخابی و رقابتی گیرندگان موسکارین عمل کرده و به موجب آن از فعالیت‌های پاراسمپاتیک استیل کولین روی بزاق، نایژه و غده‌های عرق و همچنین چشم، قلب، مثانه و دستگاه گوارش ممانعت می‌کند [۱۰]. این اثرات مهارکنندگی باعث کاهش بزاق، مخاط برونشیت، اسید معده و عرق می‌شود. به علاوه، عمل مهار کنندگی آن روی ماهیچه نرم از انقباض مثانه جلوگیری کرده و باعث کاهش حرکات دودی روده می‌شود [۱۰].

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی تروپان آلکالوئیدها

الف) اسکوپولامین

اسکوپولامین ($C_{17}H_{21}NO_4$) با نام ایوپاک: (۱R، ۲R، ۴S، ۵S، ۷S)-۹-متیل-۳-آزاتریسیکلو (۳،۳،۱،۰) نون-۷-ایل (۲S)-۳-هیدروکسی-۲-فنیل پروپانوات) وزن مولکولی برابر با ۳۰۳/۳۵۸ گرم بر مول دارد. این ترکیب در ساختارش دارای یک مکان دهنده و ۵ مکان گیرنده برای پیوند هیدروژنی می باشد. همچنین، این ترکیب دارای ۵ پیوند قابل چرخش بوده و جرم مونوایزوتوپیک آن ۳۰۳/۱۴۷ است. اسکوپولامین مایع چسبناکی بوده که دارای نقطه ذوب ۵۹ درجه سانتی‌گراد است. قابلیت حل شدن در آب بالا و حدود ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است و در الکل، اتر، کلروفورم و استون به راحتی حل می شود، اما در بنزن حلالیت کمی دارد. با بالا رفتن دمای آب حلالیت این ماده نیز افزایش پیدا می‌کند [۱۱]. دارای فشار بخار برابر با $۷/۱۸ \times ۱۰^{-۹}$ میلی‌متر جیوه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. اسکوپولامین باید در دمای اتاق بین ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. اسکوپولامین هیدروبرومید باید در محفظه‌های مقاوم به نور ذخیره گردد. این ماده دارای ثابت حلالیت pK_a برابر با ۷/۷۵ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. اسکوپولامین دارای شاخص بازداشت ۲۱۳۰ است [۱۲].

ب) آتروپین

آتروپین ($C_{17}H_{23}NO_3$) (نام ایوپاک: (۱*R*، ۵*S*-۸-متیل-۸-آزابی سایکلو (۳،۲،۱) -اکتان-۳-ایل-۳هیدروکسی-۲-فنیل پروپانوات) یک استر آلی است که توسط ترکیبی از اسید آروماتیک (اسید تروپیک) و یک باز آلی (تروپین) تشکیل می یابد [۱۳] و دارای وزن مولکولی ۲۸۹/۳۷۵ گرم بر مول است. این ماده به صورت کریستال یا پودر سفید رنگ یا به صورت

ماده ابریشم نما، با ساختار چهارضلعی دیده می‌شود [۱۴]. آتروپین تحت شرایط خلاء و در دمای ۹۳ تا ۱۱۰ درجه سانتی گراد تصعید شده و دارای نقطه ذوب ۱۱۴ تا ۱۱۶ درجه سانتی گراد است [۱۵]. حلالیت این ماده در آب بسیار کم (تقریباً یک گرم آتروپین در ۴۵۵ میلی‌لیتر آب)، اما در الکل (یک گرم در ۲ میلی‌لیتر الکل)، اتر، بنزن و کلروفرم حلالیت بالایی دارد [۱۶]. هرچند که سولفات آتروپین حلالیت بالایی در آب داشته و یک گرم آن در ۰/۴ میلی‌لیتر آب حل می‌شود. این ماده به شدت حساس به نور و حرارت بوده و در حضور نور غیرفعال می‌شود [۱۷]. به طوری که محصول دارویی آن (سولفات آتروپین) باید در دمای زیر ۴۰ درجه سانتی‌گراد (ایده آل دمای اتاق) نگهداری و از یخزدگی نیز جلوگیری شود. هیدرولیز حداقل در pH ۳/۵ رخ می‌دهد [۱۸]. زمانی‌که این ماده تجزیه حرارتی می‌شود کف سمی اکسید نیتروژن از خود متصاعد می‌نماید [۱۹]. دارای ثابت تجزیه pK_a برابر ۹/۸ است [۱۱]. محلول اشباع آتروپین در آب قلیایی است، هر چند محلول ۲ درصد سولفات آتروپین در آب pH ۴/۵ تا ۶/۲ دارد [۲۰].

ج) هیوسیامین

هیوسیامین ($C_{17}H_{23}NO_3$) با نام ایوپاک: بنزیل استیک اسید، آلفا-(هیدروکسی متیل)-۸-متیل-۸-آزابی سایکلو (۳،۲،۱)-اوکت-۳-ایل استر (3S)-اندو) وزن مولکولی برابر با ۲۸۹/۳۷ دارد [۲۱]. تعداد مکان دهنده پیوند هیدروژنی یک بوده و دارای ۴ مکان گیرنده برای پیوند هیدروژنی است. تعداد پیوندهای قابل چرخش ۵ بوده و مساحت سطح قطبی توپولوژیکی ۴۹/۸ آنگستروم مربع دارد. جرم مونوایزوتوپی آن ۲۸۹/۱۶۸ گرم بر مول است. این ترکیب به شکل ابریشم مانند و پودر کریستالی سفید رنگ موجود است. هیوسیامین نقطه ذوب برابر با ۱۰۸/۵ درجه سانتی‌گراد داشته و حلالیت ۳۵۶۰ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد آب دارد [۱۴]. یک گرم هیوسیامین در ۲۸۱ میلی‌لیتر آب با pH برابر ۹/۵، ۶۹ میلی‌لیتر اتر، ۱۵۰ میلی‌لیتر بنزن، ۱ میلی‌لیتر کلروفرم حل می شود. در الکل و اسیدها به راحتی حل می‌شود. پایداری این ترکیب تحت تأثیر نور و حرارت قرار می‌گیرد و ثابت pK_a برابر با ۱۱/۴ دارد. ثابت تجزیه برابر با $۱/۹ \times ۱۰^{-۱۲}$ در ۱۹ درجه سانتی‌گراد دارد [۲۲].

گیاهان دارای آلکالوئیدهای تروپانی اسکوپولامین، آتروپین و هیوسیامین

همانند دیگر متابولیت‌های ثانویه گیاهی، آلکالوئیدهای تروپانی توزیع زیادی در بین نهان دانگان داشته و در چندین خانواده نظیر Proteaceae، Convolvulaceae، Brassicaceae، Euphorbiaceae، Rhizophoraceae، Solanaceae و Erythroxylaceae گزارش شده‌اند، که بسیاری از این خانواده‌ها از نظر تاکسونومی فاصله زیادی از یکدیگر دارند [۲۳]. گونه‌هایی که آلکالوئیدهای تروپانی را تولید می‌کنند در سرتاسر دنیا پخش شده، اما منبع اصلی این متابولیت‌های ثانویه مهم در مرکز و جنوب آمریکا، نواحی مدیترانه‌ای و برخی از کشورهای آسیایی است. گریفین و لین [۲۳] شموتاکسونومی و توزیع جغرافیایی آلکالوئیدهای تروپانی را مطالعه و گزارش کردند که خانواده Solanaceae بیشتر آلکالوئیدهای تروپانی مورد استفاده در پزشکی بویژه آتروپین و اسکوپولامین را تولید می‌کند. آلکالوئیدهای تروپانی مانند اسکوپولامین، آتروپین و هیوسیامین به طور عمده در جنس‌های Duboisia، Datura، Hyoscyamus، *Atropa* و Scopolia یافت می‌شوند. اسکوپولامین در مقادیر بسیار زیاد فقط در گیاهان *Duboisia* spp و *Datura metel* تولید می شود. منبع اصلی ماده خام برای تولید آلکالوئیدهای تروپانی در جهان برگ‌های گیاه *Duboisia* است که حاوی ۲ الی ۴ درصد آلکالوئید می‌باشد که بیش از ۶۰ درصد آن اسکوپولامین و ۳۰ درصد آن هیوسیامین است [۶].

در خانواده Solanaceae قبیله‌های Datureae، Solandreae، Solaneae، Hyoscyameae، Anthocercideae، Nicandreae و Salpiglossidea. دارای جنس‌های تولید کننده این آلکالوئیدهای تروپانی مهم هستند. قبیله Datureae شامل جنس‌های Datura و Brugmansia است که گونه‌های علفی و درختی را تشکیل می‌دهند. در جدول شماره ۱ مهم‌ترین گونه‌های جنس Datura که از

گیاهان تولیدکننده آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشد، فهرست شده است (جدول شماره ۱). جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که برگ ها و ساقه‌های گونه‌های جنس Datura می‌توانند حاوی مقادیر مشابه یا بالای آلکالوئیدهای تروپانی در مقایسه با بذر و گل باشند. اگرچه سطح کلی آلکالوئیدهای تروپانی ممکن است در چندین گونه Datura مشابه باشد، نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین به طور قابل توجهی از گونه‌ای به گونه دیگر متغیر است. در گیاه *D. stramonium* هیوسیامین غالب بوده (که ۵۰ الی ۸۰ درصد آلکالوئیدها را تشکیل می‌دهد) اما در *D. metel* دو آلکالوئید در مقادیر مشابهی یافت می‌شوند و در *D. ferox* اسکوپولامین آلکالوئید اصلی است. همچنین ممکن است در جمعیت‌های مختلف گیاهان حاوی این آلکالوئیدهای تروپانی، محتوای هیوسیامین، اسکوپولامین و عملکرد این آلکالوئیدها متفاوت باشد. [۲۴]. در جدول شماره ۲ محتوی هیوسیامین، اسکوپولامین، عملکرد هیوسیامین و اسکوپولامین، نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین در جمعیت‌های مختلف گیاه بذرالبنج *H. niger* آورده شده است.

سنتز، انتقال و ذخیره آلکالوئیدهای تروپانی در گیاهان

مکان بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی دایره محیطیه در ریشه‌های جوان و ریشه‌هایی که فاقد رشد ثانویه هستند می‌باشد [۳۷]، وآنزیم‌های عمده مسیر ساخت آنها تنها در این محل قرار دارند (شکل شماره ۱). مقدار زیادی از این آلکالوئیدها پس از سنتز به اندام‌های هوایی منتقل و در واکوئل بافت‌های مختلف متمرکز می‌شوند. نخستین مرحله بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی توسط آنزیم *پوترسین* N*–متیل ترانسفراز* (PMT) کاتالیز می‌شود. تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین از طریق ماده واسطه ۶- بتا- هیدروکسی هیوسیامین صورت می گیرد. آنزیم *هیوسیامین ۶- هیدروکسیلاز* (H6H) مسئول تشکیل ماده واسطه ۶- بتا هیدروکسی هیوسیامین است. در مرحله بعد و به واسطه عمل همین آنزیم اپوکسیداسیون ۶-بتا- هیدروکسی هیوسیامین روی می‌دهد که منجر به تشکیل اسکوپولامین می‌شود. ژن h6h که بیوسنتز آنزیم مذکور را بر عهده دارد، تنها در گونه‌های سولاناسه تولیدکننده اسکوپولامین یافت می‌شود. این آنزیم در ریشه‌های جوان سایر گیاهان حاوی اسکوپولامین نیز مانند Datura، Scopolia و Atropa مستقر است و در اندام‌های هوایی دیده نمی‌شود [۳۹، ۳۸].

به طور معمول آلکالوئیدها در گیاهان به صورت نمک اسیدهای آلی مختلف از قبیل اسیدهای استیک، اگزالیک، سیتریک، مالیک، لاکتیک و تارتاریک وجود دارند؛ این ترکیب آلکالوئیدها با اسیدها در برخی موارد راهکاری در جهت ذخیره و انتقال شکل غیرمحلول آنها محسوب می‌شود. در این مورد می‌توان به استرهای تروپان اشاره نمود که در ریشه گیاهان تیره سولاناسه تشکیل می‌شوند و سپس به قسمت‌های هوایی گیاه منتقل می‌شوند؛ پس از انتقال، این ترکیبات هیدرولیز و به اسیدهای آزاد تبدیل می‌شوند. از سوی دیگر، برخی آلکالوئیدهای ضعیف نظیر نیکوتین به صورت آزاد یافت می شوند و تعداد اندکی نیز به صورت گلیکوزید و در ترکیب با قندهایی چون گلوکز، رامینوز و گالاکتوز قرار دارند [۴۱].

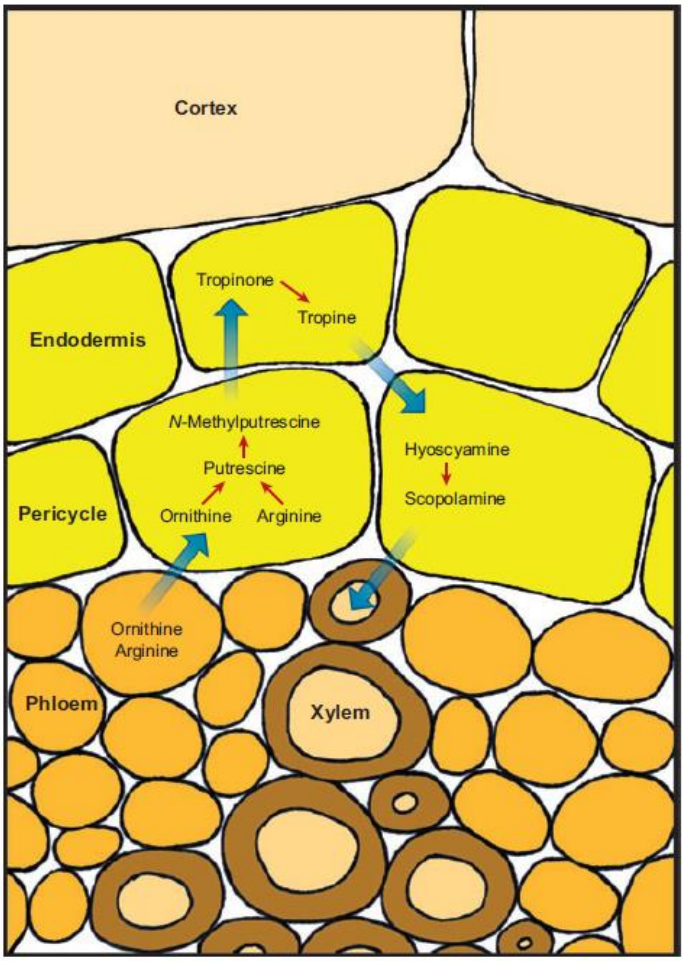
اندام‌های حاوی بیش‌ترین میزان آلکالوئید لزوماً مکان بیوسنتز این ترکیبات نیستند. بدین دلیل در برخی گیاهان انتقال فعال آلکالوئیدها از اندامی به اندام دیگر مشاهده می‌شود. چنین فرآیندی را می‌توان با استفاده از آزمایشات پیوند به سهولت مورد مطالعه قرار داد و در این رابطه گیاهان تیره سولاناسه بسیار مناسب به نظر می‌رسند. به عنوان مثال، پیوند گوجه فرنگی که گیاهی فاقد تروپان آلکالوئید است بر روی ریشه شابیزک که یک گونه مولد این ترکیبات به شمار می‌رود، منجر به تجمع تروپان آلکالوئیدها در بخش‌های هوایی گوجه فرنگی می‌شود. از سوی دیگر، پیوند اندام‌های هوایی شابیزک بر روی ریشه گوجه فرنگی به تدریج زوال محتوای تروپان آلکالوئیدهای آن را در پی دارد. از این مطالعات اینگونه استنباط می‌شود که تروپان آلکالوئیدها ابتدا در ریشه‌ها تشکیل یافته و به تدریج برای ذخیره‌سازی به برگ‌ها یا سایر اندام‌های هوایی منتقل می‌شوند [۴۳-۴۱]. انتقال آلکالوئیدهای تولید شده در ریشه به نظر می‌رسد که عمدتاً از طریق آوندهای چوبی صورت گیرد، چرا که هنگامی که انتقال آب در گیاه بسیار فعال می‌باشند، این ترکیبات هم در آوندها و هم در قطرات خروجی از نوک برگ‌ها قابل تشخیص هستند.

جدول شماره ۱- گیاهان حاوی آلکالوئیدهای تروپانی اسکوپولامین و هیوسیامین در گونه‌های مختلف جنس *Datura*

ردیف	نام انگلیسی	نام علمی	توضیحات	منبع
۱	Jimsonweed	*D. stramonium* L.	• ۱۰۵۳ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین از کشت ریشه حاصل شد. از برگ‌ها ۰/۸۴ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین و ۱۶۱ میکروگرم بر گرم وزن تر اسکوپولامین حاصل شد.	۲۵
۲	Chinese thorn-apple	*Datura quercifolia*	• از ریشه‌ها ۴۱۹ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین به دست آمد. اما اسکوپولامین حاصل نشد. از برگ‌ها ۰/۷ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین و ۳۰/۸۹ میکروگرم اسکوپولامین به دست آمد.	۲۶
۳	Fierce thornapple	*Datura ferox*	• از ریشه‌ها ۸۴۹ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین و ۴۳ میکروگرم بر گرم وزن تر اسکوپولامین حاصل شد. از برگ‌ها ۱۷/۸۳ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین و ۱۵۶/۵۶ میکروگرم بر گرم وزن تر اسکوپولامین حاصل شد.	۲۷
۴	Desert thorn-apple	*Datura discolor*	• از برگ‌های گیاه ۱/۱۳ میکرو گرم بر گرم وزن تر هیوسیامین و ۱۸۳/۷۶ میکروگرم بر گرم وزن تر اسکوپولامین حاصل شد.	۲۸
۵	Pricklyburr	*Dature innoxia*	• از ریشه‌ها ۴۸۶ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۱۱۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه اسکوپولامین حاصل شد. از برگ‌ها ۴۳/۱ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۱۸۶/۳۴ میکروگرم بر گرم اسکوپولامین حاصل شد.	۲۹
۶		*Datura kymatocarpa*	• برگ‌ها حاوی ۰/۵۶ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۲۶۴/۰۲ میکروگرم بر گرم اسکوپولامین بودند.	۳۰
۷	Sacred datura	*Datura pruinosa*	• در برگ‌ها ۱/۸۳ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین و ۵۹/۰۵ میکروگرم بر گرم وزن تر اسکوپلامین وجود داشت.	۳۱
۸		*Datura reburra*	• برگ‌ها ۲/۸۶ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۱۹۷/۴۷ میکروگرم بر گرم اسکوپلامین داشتند.	۳۲
۹		*Datura wrighti*	• از ریشه‌ها ۸۲۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۱۵ میکروگرم بر گرم وزن تازه اسکوپولامین به دست آمد. از برگ‌ها ۳۲/۴۳ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۹۹ میکروگرم بر گرم وزن تازه اسکوپولامین به دست آمد.	۳۳
۱۰		*Datura lanosa*	• برگ‌ها حاوی ۸/۶۷ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۲۹۱/۵۸ میکروگرم بر گرم اسکوپلامین بودند.	۳۴
۱۱	Devil's trumpet	*Datura metel*	• ریشه‌ها حاوی ۵۶۱ میکروگرم بر گرم وزن تازه هیوسیامین و ۹ میکروگرم بر گرم وزن تازه اسکوپولامین بودند. برگ‌ها حاوی ۰/۹۸ میکروگرم بر گرم وزن تر هیوسیامین و ۱۸۶/۲۸ میکروگرم بر گرم اسکوپولامین بودند.	۳۵
۱۲	Brugmansia ceratocaula	*Datura ceratocaula*	• از ریشه‌ها ۱۶۰ میکروگرم بر گرم هیوسیامین و ۷۰ میکروگرم بر گرم اسکوپلامین به دست آمد. محتوی هیوسیامین در ساقه ۴۲۰ میکروگرم بر گرم و اسکوپلامین ۲۰۰ میکروگرم بر گرم وزن تر بود. برگ‌ها حاوی ۴۷۰ میکروگرم بر گرم هیوسیامین و ۲۹۰ میکروگرم بر گرم وزن تر اسکوپلامین بودند. در گل‌ها ۴۱۰ میکروگرم بر گرم هیوسیامین ۳۴۰ میکروگرم بر گرم وزن تر اسکوپلامین به دست آمد.	۳۶

جدول شماره ۲- محتوی هیوسیامین، اسکوپولامین، عملکرد هیوسیامین و اسکوپولامین، نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین در برخی از جمعیت‌های مختلف گیاه بذرالبنج *H. niger* [۲۴].

صفت	واحد	جمعیت						
		تهران (فیروزکوه)	قم (انویان)	مازندران (سیاه بیشه)	گلستان (مراوه تپه)	همدان (رزن)	گیلان (سیاهکل)	زنجام (طارم)
محتوی هیوسیامین	درصد ماده خشک	۰/۴۵۵±۰/۰۵	۰/۹۱۶±۰/۰۷	۰/۵۸۲±۰/۰۴	۰/۲۸۲±۰/۰۳	۰/۳۶۴±۰/۰۴	۰/۶۷۵±۰/۵	۰/۱۸۸±۰/۲
محتوی اسکوپولامین	درصد ماده خشک	۰/۱۳۳±۰/۰۲	۰/۰۴۰±۰/۰۱	۰/۲۰۹±۰/۰۳	۰/۰۷۴±۰/۰۱	۰/۲۵۷±۰/۰۳	۰/۲۹۳±۰/۵	۰/۳۰۵±۰/۲
عملکرد هیوسیامین	میلی گرم در گیاه	۲۰/۰۷±۰/۳	۵۱/۰۱±۰/۸	۳۸/۷۹±۰/۴	۱۶/۷۶±۰/۳	۳۳/۵۷±۰/۵	۶۸/۳۷±۰/۷	۱۸/۳۵±۰/۴
عملکرد اسکوپولامین	میلی گرم در گیاه	۵/۸۶۱±۰/۲	۲/۱۹۰±۰/۱	۱۳/۸۷±۰/۳	۲/۳۵۶±۰/۳	۲۴/۰۵±۰/۷	۴۹/۷۵±۰/۸	۲۹/۴۵±۰/۴
اسکوپولامین/ هیوسیامین		۰/۲۹۶±۰/۰۴	۰/۰۴۹±۰/۰۱	۰/۳۷۱±۰/۰۷	۰/۲۸۰±۵۰/۰	۰/۷۲۷±۰/۰۸	۰/۷۶۰±۰/۶	۱/۸۰±۰/۴۱
عملکرد کل گیاه	میلی‌گرم در گیاه	۲۵/۹۳±۰/۶	۵۳/۲±۰/۸	۵۲/۶۶±۰/۴	۵۷/۶۲±۲/۱	۱۱/۷۱±۳/۴	۱۱/۷۱±۳/۴	۴۷/۸±۱/۶

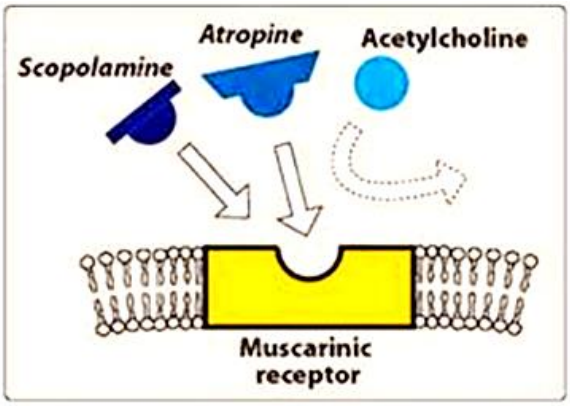


شکل شماره ۱- بیوسنتز و تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین با حضور آنزیم *PMT* و *H6H* در دایره محیطیه ریشه و انتقال آن به آوند چوبی [۴۰]

ارزش دارویی و خواص فارماکولوژیکی و مکانیسم اثر دارویی آلکالوئیدهای تروپانی

اسکوپولامین یک آنتاگونیست موسکارین (ماده‌ای که میل اتصال بالایی به گیرنده‌های موسکارینی داشته اما فعالیت درونی ندارد). مشابه با انتقال دهنده عصبی استیل‌کولین است و با مهار گیرنده‌های موسکارین استیل کولین عمل کرده و از این رو به عنوان یک آنتی‌کولینرژیک عمل می‌نماید [۴۴]. شکل شماره ۲، اتصال آنتاگونیست‌ها به گیرنده‌های کولینرژیک و ممانعت از اتصال استیل کولین را نشان می‌دهد.

اسکوپولامین کاربردهای زیادی نظیر جلوگیری از بیماری حرکت دارد و از استفراغ در نتیجه بیماری حرکت جلوگیری می‌کند. بخش وستیبولار (*Vestibular*) گوش (گوش میانی) برای تعادل بسیار مهم است. وقتی تعادل شخصی در نتیجه حرکت به هم می‌خورد، وستیبول سیگنالی از طریق اعصاب به مرکز استفراغ در مغز می‌فرستد و استفراغ رخ می‌دهد. استیل کولین یک ماده شیمیایی است که اعصاب برای انتقال پیام‌های عصبی به یکدیگر استفاده می‌کنند. اعتقاد بر این است که اسکوپولامین مانع ارتباط بین اعصاب وستیبول شده و از استفراغ جلوگیری می‌کند. اسکوپولامین باید قبل از آغاز بیماری حرکت مصرف شود. میل ترکیبی اسکوپولامین جهت اتصال به گیرنده موسکارین تقریباً ۱ نانومولار در مغز موش صحرایی بود [۴۵]. همچنین اسکوپولامین مردمک را گشاد و انطباق عدسک را معیوب می کند، اثری که احتمالاً توسط گیرنده *M3* موسکارین تنظیم می‌شود [۴۶]. در مطالعه‌ای [۴۷] افزایش وابسته به دوز در اندازه مردمک بعد از تزریق اسکوپولامین مشاهده شد (۰/۰۱ تا



شکل شماره ۲- اتصال آنتاگونیست‌های آتروپین یا اسکوپولامین مانع از اتصال استیل کولین می‌شود.

۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم). به علاوه، اسکوپولامین بزاق را کاهش می‌دهد که به احتمال زیادی با مهار کولینرژیک گیرندگان موسکارین *M3* تنظیم می‌شود. به خاطر این اثر خشکی دهان اسکوپولامین مصرف غذاهای جامد مشکل می‌شود و باعث کاهش مصرف غذا می‌شود [۴۸].

در سیستم تنفسی، عروقی و گوارشی گیرندگان *M2* و *M3* به نظر می‌رسد که انقباض ماهیچه صاف را کنترل می‌کنند. دوزهای زیاد اسکوپولامین می‌تواند باعث اختلال گوارشی (یبوست) گردد و منجر به تغییرات در جریان خون و مصرف گلوکز به علت گشاد شدن عروق/تنگ شدن عروق شود که به نوبه خود می‌تواند در عملکرد رفتاری مداخله کند [۴۹]. مشخص شده است که اسکوپولامین فعالیت حرکتی عضلات را در دوز ۰/۰۵۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا دوزهای بالا بیشتر می‌کند [۵۰]. سیگنالینگ کولینرژیک در هیپوکامپوس، استراتوم و یا کورتکس قدامی به طور مثبت با افزایش فعالیت القاء شده توسط اسکوپولامین ارتباط دارد [۵۱]. به خاطر فعالیت آنتی‌کولیترژیک، اسکوپولامین اختلالاتی در توجه و حافظه ایجاد می‌کند. بیان شده است که اختلال در حافظه حسی ممکن است با از دست دادن گیرندگان موسکارین در سیستم عصب مرکزی و با انتقال کولینرژیک معیوب مرتبط باشد [۵۲].

آتروپین، آلکالوئید موجود در گیاه شابیزک، مخلوط راسمیک *d*- و *l*- هیوسیامین است که تقریباً کل فعالیت آن به خاطر ایزومر چپ گرد ترکیب است. آتروپین بیشتر به عنوان ترکیب آنتی‌کولینرژیک یا آنتی‌پاراسمپاتیک طبقه‌بندی می‌شود. با این حال، آن به عنوان ماده آنتی‌موسکارین مصطلح شده زیرا آنتاگونیست اعمال شبه موسکارین استیل‌کولین و دیگر استرهای کولین است [۵۳]. آتروپین می‌تواند درجه انسداد قلبی را کم کند زمانی که فعالیت واگال (*vagal*) عامل مسبب باشد. آتروپین در مقادیر بالینی با اتساع محیطی مقابله کرده و کاهش فشار خون ایجاد شده توسط استرهای کولین را متوقف می‌کند. آتروپین به عنوان آنتاگونیست سمپاتیک و رقابتی گیرندگان موساکارینیک کولینرژیک عمل می‌کند که به موجب آن اثرات تحریک پاراسمپاتیک را از بین می‌برد. این ماده همچنین می‌تواند باعث تپش قلب و آرام‌سازی ماهیچه‌های نرم شود [۵۴].

هیوسیامین آنتاگونیست گیرندگان موسکارین است و عمل استیل کولین در مکان‌های پاراسمپاتیک در غده‌های عرق، غده‌های بزاق، ترشحات معده، ماهیچه قلب، گره‌های لنفاوی، ماهیچه صاف در دستگاه گوارش و سیستم عصب مرکزی را مهار می‌کند. این ماده سرعت ضربان قلب را زیاد کرده و فشار خون را کاهش و ترشحات را خشک می‌کند. همچنین ممکن است که آنتاگونیست سروتونین باشد. در دزهای برابر، هیوسیامین ۹۸ درصد از فعالیت آنتی‌کولینرژیک آتروپین را داراست [۵۵]. هیوسیامین از اختصاصیت اعمال استیل کولین روی ساختار اعصاب کولینرژیک پست گانگلیون و ماهیچه‌های نرم که به استیل کولین پاسخ می‌دهند جلوگیری می‌کند. این گیرندگان کولینرژیک سطحی در سلول‌های افکتور اتونومیک ماهیچه نرم، ماهیچه قلبی، گره لنفاوی، غده‌های برون‌ریز قرار دارند [۵۵]. در جدول شماره ۳ برخی از اثرات دارویی آلکالوئیدهای تروپانی اسکوپولامین، آتروپین و هیوسیامین در انسان و موجودات مدل مطالعه شده آورده شده است.

جدول شماره ۳– برخی از اثرات دارویی آلکالوئیدهای تروپانی اسکوپولامین، آتروپین و هیوسیامین در انسان و موجودات مدل مطالعه شده

نوع ترکیب	اثر دارویی	نوع آزمایش	نتیجه	منبع
آتروپین	ضدفراموشی	حیوانی	– آتروپین به طور کامل از فراموشی القاء شده توسط شرایط اکسیژن کم و محتوی نیتروژن بالا جلوگیری نمود اما روی افزایش یادگیری در موش اثری نداشت.	۵۶
	بیماری pulmonary hypertrophic osteoarthropathy	انسان	پاسخ بالینی خوبی با افزایش قدرت دست، محدوده حرکت و ترموگرافی کمّی به دست آمد.	۵۷
	بی‌هوشی	حیوان	مدت زمان بی‌هوشی موش توسط ماده متوکسی فلوران با استفاده از آتروپین زیاد شد. تأثیر آتروپین به سن موش بستگی داشت. به طوری که در موش‌هایی با سن کمتر از ۲۵	۵۸
	رفتار تحریک جنسی	حیوان	روز کاهش یافت، ولی در موش‌های ۲۶ الی ۲۸ روزه رفتار جنسی زیاد و در موش‌هایی با عمر ۳۰ روز و بیشتری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.	۵۹
	ریتم تتای هیپوکامپوس	حیوانی	آتروپین باعث کاهش شدید ریتم تتای هیپوکامپوس حتی پس از میکرودیالیز شد. این اثر ناشی از فعالیت آنتی‌موسکارینی آتروپین است.	۶۰
اسکوپولامین	رفتار اجتناب غیرفعال	حیوان	اسکوپولامین رفتار اجتناب غیرفعال را به طور معنی‌داری در موش‌های ۱۸، ۲۱ و ۳۰ روزه زیاد نمود، اما موش‌هایی با عمر ۱۵ روز و کمتر کاهش رفتار اجتناب غیرفعال را نشان داد. داده‌ها از بین رفتن حافظه وابسته به سن در زمان تجویز یک هفته‌ای اسکوپولامین را نشان دادند. این اثر به مهار کولینرژیک اسکوپلامین اشاره دارد.	۶۱
	عملکرد پردازش اطلاعات	انسان	اسکوپولامین باعث کاهش عملکرد پردازش اطلاعات شد.	۶۲
	فعالیت جنبشی	حیوان	هیدروبرومید اسکوپولامین افزایش معنی‌دار در فعالیت جنبشی ایجاد کرد در حالی که متیل برومید اسکوپولامین کاهش در فعالیت جنبشی ایجاد نمود. این اثرات نشان داد که اسکوپولامین می‌تواند اثرات غیرشناختی ایجاد کند.	۶۳
	مطالعه اثرات جانبی	انسانی	کاهش تیزفهمی بصری، گشاد شدن مردمک و عدم پاسخ به نور از عوارض جانبی اسکوپولامین بود.	۶۴
	کنترل خودایمنی قلبی عروقی	انسانی	اسکوپلامین فشار عروقی را کاهش داد اما تغییرپذیری فشار خون را متأثر ننمود. مهار واگال کاردیک را زیاد نمود.	۶۵
هیوسیامین	مهار عمل گیرندگان موسکارین	حیوانی	سنتز AMP حلقوی تحریک شده توسط فورسکولین در غشاء بطنی موش را ۲۴ درصد زیاد کرد. نتایج این تحقیق بیان داشت که آدنیلات سیکلاز در قلب در معرض مهار متوسط گیرندگان موسکارین در غشاء میوسیت‌های قلبی است.	۶۶
	تپش نامنظم قلب	حیوانی	عمل ضدتپش نامنظم قلب هیوسیامین ثابت شد که به ویژگی‌های آنتی‌کولینرژیک این ماده بستگی داشت.	۶۷

مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای تروپانی اسکوپولامین، هیوسیامین و آتروپین

مسیر بیوسنتزی تروپان آلکالوئیدها در ابتدای مسیر با مسیر بیوسنتزی ترکیبات کوکائین و کالیستژین مشترک است. به طور کلی، تولید این آلکالوئیدها با تشکیل یون *N*–متیل ۱*Δ*– پیرولینیوم از آمینواسیدهای اورنیتین و آرژینین آغاز می‌شود. ابتدا اورنیتین توسط آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (*ODC*) دکربوکسیله شده و پوترسین را تولید می‌کند. البته آرژنین هم با دکربوکسیله شدن توسط آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز (*ADC*) به آگماتین تبدیل شده و آگماتین با یک واسطه تبدیل به پوترسین می‌شود. بنابراین هر دو آمینواسید می‌توانند مسیر را شروع کنند [۶۸].

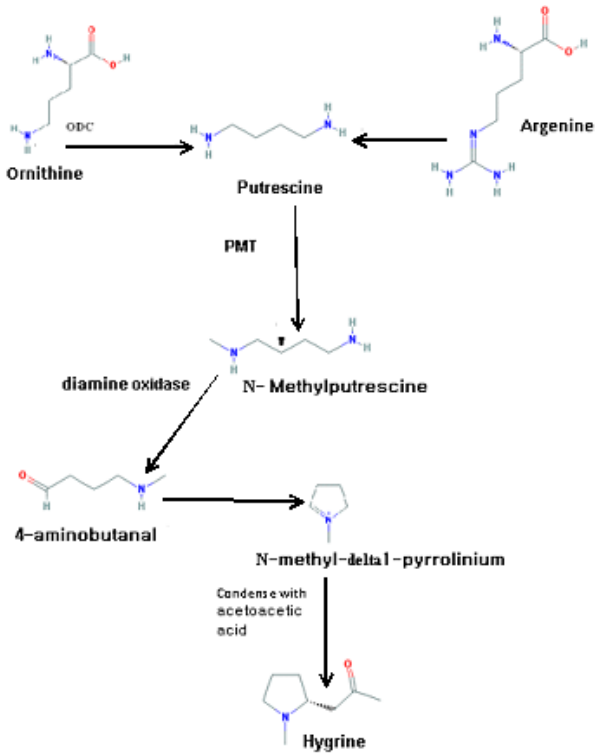
بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی با *N*–متیلاسیون پوتریسین وابسته به *S*– آدنوزیل متیونین (*SAM*) توسط آنزیم پوتریسین *N*– متیل ترانسفراز (*PMT*) (*EC 2.1.1.53*) آغاز می‌شود [۶۹]

(شکل شماره ۳)، که *cDNA* آن از گیاه شابیزک (*Atropa belladonna*) و بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) جداسازی شده است [۷۰]. *N*- متیل پوتریسین توسط دی‌آمین اکسیداز (*EC 1.4.3.21*) به ۴- متیل آمینوبوتانال دآمینه می‌شود که جهت تشکیل کاتیون فعال *N*-متیل-*Δ*۱-پیرولینیوم به طور خود به خودی حلقوی می‌شود. تصور می‌شود که کاتیون *N*-متیل-*Δ*۱- پیرولینیوم با اسید استواستیک برای ایجاد هیگرین به عنوان پیش نیازی برای حلقه تروپانی یا با اسید نیکوتینیک جهت تشکیل نیکوتین متراکم می‌گردد (شکل شماره ۳).

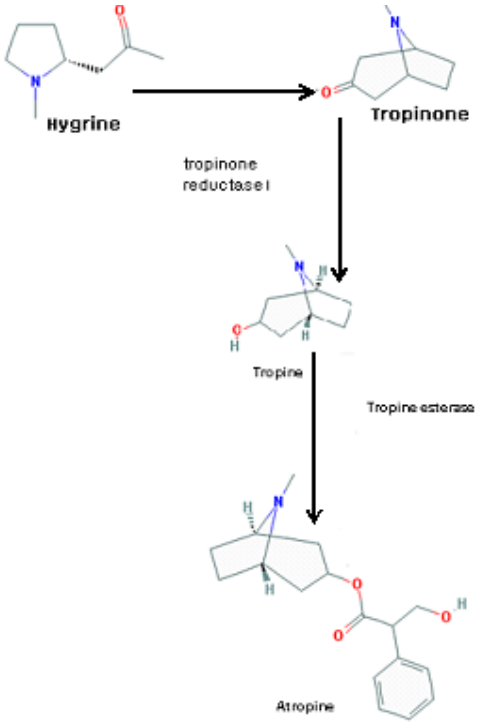
برای اعضایی از خانواده *Solanaceae*، آنزیم‌های تروپینون ردوکتاز (*TR*) احیاء گروه‌های کتو در حلقه تروپان را کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها بخشی از زنجیره کوتاه خانواده دهیدروژناز/ردوکتاز (*SDR*) است و واکنش‌های اکسیدوردوکتاز مونومریک وابسته به *NAD (P)(H)* را کاتالیز می‌کنند. فعالیت آن جریان متابولیکی به سمت بیوسنتز هیوسیامین را کنترل می‌کند. در گیاهان *Solanaceae*، دو نوع تروپینون ردوکتاز وجود دارند، تروپینون ردوکتاز *I* (*TRI*) و تروپینون ردوکتاز *II* (*TRII*). تفاوت فاحش این دو آنزیم در وابستگی آنها به سوبسترای تروپینون می‌باشد. هر دو آنزیم متعلق به گروه *B* اکسیدوردوکتازها می‌باشند که نقش آنها در انتقال *pro-s* هیدروژن *NADPH* به سوبسترای آنها می‌باشد و میل ترکیبی متفاوتی سنبت به تروپینون از خود نشان می‌دهند (*TR-II* میل ترکیبی بیشتری نسبت به *TR-I* دارد). تروپینون ردوکتازهای ۱ و ۲ وابسته به *NADPH* تشکیل دهنده یک نقطه انشعاب در بیوسنتز تروپان آلکالوئیدها هستند: آنزیم *TR-I* تروپینون را از طریق *NADPH*، گروه ۳-کربونیل تروپینون را به یک گروه *α*-هیدروکسیل، به تروپین کاتالیز می‌کند که در پایان مسیر به آلکالوئیدهای تروپانی هیوسامین و اسکوپولامین ختم می‌شود، در حالی که آنزیم *TR-II* آن را با استفاده از *NADPH* احیا و زودوترپین به همراه یک گروه *β*-هیدروکسیلی و در نهایت آلکالوئید غیرتروپانی کالستیژن را تولید می‌کند [۶۸]. بنابراین تبدیل تروپینون به تروپین یا زودوتروپین، نقطه اصلی انشعاب در بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی است. ژن‌های کد کننده *TR-I* و *TR-II* در گونه‌های تولید کننده آلکالوئید تروپینون *A. belladonna* و *H. niger* شناسایی شده‌اند [۷۲، ۷۱]. تروپین تولید شده با تروپات حاصل از اسید آمینه *L*- فنیل آلانین در نتیجه عمل آنزیم تروپین استراز (*EC 3.1.1.10*) به آتروپین تبدیل می‌شود (شکل شماره ۴). این آنزیم از خانواده هیدرولاز بوده و روی پیوندهای استری عمل می‌نماید [۷۳].

همچنین تروپین می‌تواند با فنیل لاکتاتیل کوآنزیم *A* حاصل از متابولیسم فنیل آلانین ترکیب شود و ایجاد لیتورین نماید [۷۶ -۷۴]. سپس لیتورین تبدیل به هیوسیامین می‌شود. هیوسیامین می‌تواند توسط آنزیم ۶ بتا- هیوسیامین هیدرولاز و با هیدروکسیلاسیون حلقه تروپان و تشکیل اپوکسید درون مولکولی از طریق حذف ۷ بتا- هیدروژن به اپوکسید اسکوپولامین تبدیل شود (شکل شماره ۵). هر دوی واکنش‌ها توسط دی‌اکسیژناز وابسته به ۲ اگزوگلوتارات، ۶ بتا-هیدروکسیلاز (*H6H*) (*EC 1.14.11.11*) کاتالیز می‌گردد که *cDNA* این ژن از گیاهان *H. niger* [۷۵] و *A. belladonna* [۷۸] جداسازی شده است. فقط گیاهان تولید کننده اسکوپولامین فعالیت *H6H* را نشان می‌دهند [۷۹]. توزیع هیوسیامین در خانواده *Solanaceae* بسیار گسترده‌تر از اسکوپولامین است که بیان کننده این می‌باشد فقط لینه‌های فیلوژنتیکی معینی ژن کد کننده *H6H* را اکتساب کرده‌اند (شکل شماره ۵).

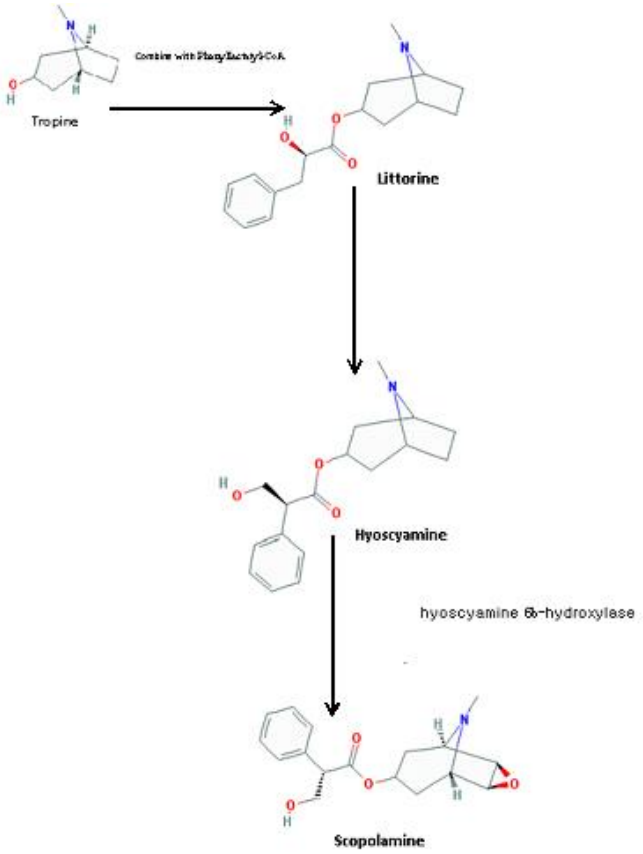
اسکوپولامین، با اکسیداسیون مستقیم هیوسیامین بدون وساطت پیوند دوگانه تشکیل می‌یابد. هیوسیامین ۶- بتا هیدروکسیلاز (*H6H*) یک دی‌اکسیژناز وابسته به اگزوگلوتارات است که واکنش دو مرحله‌ای برای تولید اپوکسید را واسطه می‌کند. اولین مرحله شامل هیدروکسیلاسیون به ۶- بتاهیدروکسی هیوسیامین بوده و همان آنزیم بسته شدن حلقه اپوکسید را برای تولید اسکوپولامین وساطت می‌کند. در جدول شماره ۴ آنزیم‌های دخیل در سنتز آلکالوئیدهای تروپانی آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین آورده شده است.



شکل شماره ۳- تشکیل حلقه تروپانی لازم برای سنتز آلکالوئیدهای تروپانی آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین. تشکیل پوتریسین از اسید آمینه‌های اورنیتین و آرژنین و سپس مراحل متعدد واکنش آنزیمی جهت تشکیل هیگرین که تشکیل‌دهنده حلقه تروپانی آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشد.



شکل شماره ۴- مسیر بیوسنتز آلکالوئید تروپان آتروپین. ماده هیگرین تولید شده در اثر مکانیسم ناشناخته‌ای تبدیل به تروپینون می‌شود. تروپینون حاصل بر اثر عمل آنزیم تروپین ردوکتاز *I* به تروپین تبدیل می‌شود. آنزیم تروپین استراز باعث تبدیل تروپین به آتروپین می‌شود.



شکل شماره ۵– مسیر بیوسنتز دو آلکالوئید تروپانی مهم: هیوسیامین و اسکوپولامین

جدول شماره ۴– آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی اسکوپولامین، آتروپین و هیوسیامین

ردیف	EC. number	نام پذیرفته شده	رده	دخیل در بیوسنتز آلکالوئید	منبع
۱	[EC:2.1.1.53]	N–پوتریسین متیل ترانسفراز	ترانسفرازها	مشترک	۸۰
۲	[EC:1.4.3.21]	آمین اکسیداز	اکسیدازها	مشترک	۸۱
۳	[EC: 3.1.1.10]	تروپین استراز–آتروپیناز	هیدرولازها	آتروپین	۸۲
۴	[EC:1.14.11.11]	هیوسیامین–(6s)–دی اکسیژناز	هیدرولازها	اسکوپلامین	۸۳
۵	[EC:1.4.3.21]	آمین اکسیداز	اکسیدازها	هیوسیامین	۸۴
۶	[EC 1.1.1.206]	تروپینون ردوکتاز I	اکسیدازها	مشترک	۸۴
۷	[EC 1.1.1.236]	تروپینون ردوکتاز II	اکسیدازها	مشترک	۸۴

دست‌ورزی ژن‌های مسیربیوسنتزآلکالوئیدهای تروپانی آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین

در موارد زیادی، عملکرد طبیعی آلکالوئیدهای تروپانی برای تجاری‌سازی بسیار کم است. لذا نیاز برای افزایش سرعت تولید آلکالوئید برای بهره‌برداری تجاری وجود دارد. تحقیقات زیادی برای مهندسی ژنتیک آلکالوئیدهای تروپانی مهم مانند اسکوپلامین و هیوسیامین انجام شده است. در مورد مهندسی ژنتیک مراحل برای افزایش فعالیت آنزیم، فرابیان ژن های درونی یا القاء ژن‌های مناسب‌تر و به موجب آن غلبه بر مراحل محدودکننده سرعت در مسیر تا متوقف ساختن مسیرهای رقابت کننده و کاهش کاتابولیسم هیوسیامین می توانند در نظر گرفته شوند. آنزیم هترولوگ می‌تواند ویژگی‌های مطلوب‌تری نظیر عدم وجود مهار پس خوری توسط محصولات پایین دستی یا تمایل بیشتر برای سوبسترا داشته

باشند. اینگونه آنزیم می‌تواند از منبع دیگر باشد اما همچنین می‌تواند مهندسی شود. تاکنون، بیشتر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز هیوسیامین و اسکوپلامین با روش‌های کلاسیکی شناسایی و خالص‌سازی آنزیم و جداسازی ژن کدکننده همسانه‌سازی شده‌اند. *cDNA* های کد کننده *PMT*، که *N*–متیلاسیون پوتریسین وابسته به *S*–آدنوزین متیونین را در اولین مرحله بیوسنتز کاتالیز می‌کند، از گیاهان شابیزیک و بذرالبنج جداسازی شده‌اند [۸۶، ۸۵].

الف) دستکاری ژن *pmt*

بیان شده است که فرابیان *pmt* در گیاهان تراریخته *Nicotiana sylvestris*، محتوی نیکوتین را افزایش داد، در حالیکه مهار فعالیت *PMT* درونی به شدت محتوی نیکوتین را کاهش و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی را زیاد کرد [۸۶]. در سال‌های اخیر، فرابیان *pmt* در *A. belladonna* سطوح آلکالوئیدهای تروپانی آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاهان تراریخته یا ریشه‌های موئین را متأثر نکرد. در تحقیقی [۸۷] ژن *pmt* تنباکو در ریشه‌های موئین هیبرید *Duboisia* قرار داده شد و سطوح *N*–متیل پوتریسین ریشه‌های موئین مهندسی شده حاصل در مقایسه با ریشه‌های غیرتراریخته زیاد شد اما افزایشی در تروپان یا پیریدین مشاهده نشد. در تحقیقی دیگر *T-DNA* پلاسمید *Ri* همراه با ژن *pmt* تنباکو به ژنوم *Datura metel* و *Hyoscyamus muticus* انتقال یافت تا بر تولید آلکالوئیدهای تروپان اثر بگذارد. این برای اولین بار بود که فرابیان ژن *pmt* تنباکو برای بهبود تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در کشت‌های ریشه موئین نشان داده می‌شد. کشت‌های ریشه موئین فرابیان کننده ژن *pmt* سریع‌تر پیر شدند و مقادیر زیادی از آلکالوئیدهای تروپانی نظیر هیوسیامین و اسکوپلامین را در مقایسه با ریشه‌های موئین شاهد تجمع دادند. تولید هیوسیامین و اسکوپلامین در کشت‌های ریشه موئین *D. metel* زیاد شد در حالی‌که در *H. muticus* فقط محتوی هیوسیامین با فرابیان ژن *pmt* زیاد گشت. نتایج نشان می‌دهد که مسیر بیوسنتزی یکسان در دو گونه خویشاوند می تواند به طور متفاوت تنظیم شود و فرابیان یک ژن لزوماً منجر به الگوی تجمع یکسان متابولیت ثانویه نمی‌شود [۸۸]. علاوه بر این، زمانی که ژن *pmt* در گیاه شابیزک و هیبرید گیاه چوب پنبه‌ای استرالیا فرابیان شد، هیچ افزایش معنی‌داری در غلظت های آلکالوئید تروپان و پیریدین مشاهده نشد [۸۹].

به منظور افزایش تولید آلکالوئیدهای هیوسیامین و اسکوپولامین، سیستم باینری برای وارد نمودن *T-DNA* پلاسمید *A. rhizogenes Ri* همراه با ژن *pmt* از گیاه تنباکو به گیاه داتوره تحت کنترل پروموتر *35SCaMV* و ژن *nptII* طراحی شد به طوری که هر دو ژن درون پلاسمید *B* قرار گرفتند. تنظیم بیان ژن *pmt* نشان داده شد که برای تولید آلکالوئیدها در چندین گونه مهم است. نتایج نشان داد که ریشه های تراریخته حاوی ژن *pmt* الگوی آلکالوئید مشابه با ریشه های شاهد داشتند [۸۸]. با توجه به تحقیقات صورت گرفته در زمینه دست‌ورزی ژن *pmt* در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی به نظر می‌رسد که فرابیان نمودن این ژن راهکار مؤثری برای افزایش سطوح ایندول آلکالوئیدهاست.

ب) دستکاری ژن *h6h*

اسکوپولامین که ۶،۷، بتا–اپوکسید هیوسیامین است توسط ۶ بتا–هیدروکسی هیوسیامین تولید می‌شود. هیوسیامین ۶ بتا–هیدروکسیلاز (یک دی‌اکسیژناز وابسته به ۲–اکسوگلوتارات)، هیدروکسیلاسیون هیوسیامین به هیدروکسی هیوسیامین و همچنین اپواکسیداسیون ۶ بتا–هیدروکسی هیوسیامین به اسکوپولامین را کاتالیز می‌کند. از این رو *H6H* یک هدف آنزیمی امیدبخشی بوده و در صورت فرابیان شدن در بافت‌های تجمع دهنده هیوسیامین می‌تواند منجر به افزایش سطوح اسکوپولامین در گیاهان تراریخته یا ریشه‌ها شود. به همین نحو، چندین گیاه غنی از هیوسیامین اما فقیر از نظر اسکوپولامین مانند بذرالبنج می‌تواند به یک منبع صنعتی اسکوپولامین تبدیل شوند.

محققان تحقیقات مربوط به مهندسی ژنتیک تروپان آلکالوئید مهم اسکوپولامین را انجام داده‌اند که در آنها تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین هدف اصلی بوده است. به نظر می رسد که افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز

اسکوپولامین باعث افزایش این محصول می‌شود. همبستگی بین فعالیت *H6H* و نسبت اسکوپولامین به هیوسیامین در ریشه‌های موئین تولید کننده اسکوپولامین یافت شده است [۹۰]. ژن هیدروکسیلاز از گیاه بذرالبنج *Hyoscyamus niger* درون گیاه شابیزک *Atropa belladonna* وارد شده است. چندین کلون ریشه تراریخته افزایش غلظت ۵ برابری اسکوپولامین در مقایسه با ریشه‌های موئین غیرتراریخته داشت. با فرابیان کردن ژن *h6h* در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Hyoscyamus muticus*، بهترین کلون تراریخته افزایش ۱۰۰ برابری اسکوپولامین را نشان داد [۹۱]. به علاوه، این کلون هیوسیامین را به عنوان آلکالوئید اصلی در مقادیر قابل مقایسه با شاهدها تولید کرد.

صفحات برگی هیبرید *Duboisia* با سویه *A. rhizogenes LBA4402* حامل *pRi* و حامل دوگانه *pLAL21* آلوده شدند که حاوی ژن *h6h* گیاه بذرالبنج تحت کنترل پروموتر *35SCaMV* و ژن *nptIIT-DNA* بود. نتایج تفاوت‌های معنی دار در تولید آلکالوئید در بین لاین‌های مختلف ریشه نشان داد، اما به طور متوسط ریشه‌های تراریخته حامل ژن *h6h* گیاه بذرالبنج محتوی اسکوپولامین بالا در مقایسه با ریشه‌های شاهد در انتهای دوره کشت مشاهده گردید. این تحقیق نشان داد که فرابیان ژن *35S-h6h* نه تنها ظرفیت لاین‌های ریشه برای تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین را افزایش می‌دهد بلکه تولید آلکالوئید از این ریشه‌ها را نیز بیشتر می‌کند [۹۱]. از این رو فرابیان ژن *h6h* ابزار امیدبخشی بوده که می‌تواند منجر به افزایش سطوح اسکوپولامین در گیاهان تراریخته یا ریشه‌ها گردد.

دستکاری ژن‌های مختلف دخیل در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی

زمانی‌که یک آنزیم محدود کننده سرعت، هدف‌گذاری می شود، ممکن است تولید به مقدار قابل توجهی افزایش یابد، هر چند ممکن است، بیش از یک مرحله محدود کننده سرعت در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه موجود باشد. مثال مناسب وارد کردن و فرابیان همزمان ژن‌های کد کننده *PMT* و *H6H* در مسیر بیوسنتز هیوسیامین و اسکوپلامین در کشت ریشه‌های موئین گیاه بذرالبنج است. لاین‌های ریشه موئین تراریخته *pmt* و *h6h* به طور معنی‌داری سطوح بالای هیوسیامین و اسکوپلامین در مقایسه با لاین‌های نوع غیرتراریخته نشان دادند. بهترین لاین ۴۱۱ میلی‌گرم بر لیتر هیوسیامین تولید کرد که ۹ برابر بیشتر از نوع غیرتراریخته است [۸۵]. بنابراین فرابیان ژن‌های بیوسنتز متعدد در مهندسی مسیر متابولیک راهکار امیدبخش برای تغییر تجمع محصولات متابولیت معین می‌باشد. با بیان عملکردی ژن‌های *tr-I* و *h6h* گیاه بذرالبنج در تنباکو، افزون بر محصولات واکنش *tr-I* و *H6H*، شکل‌های استیله شده تروپین در گیاهان تراریخته تولید شدند که نشان می‌دهد بیان آنزیم‌های مسیر آلکالوئید در زمینه تراریختگی می تواند مواد غیرمنتظره‌ای را تولید کند. سطوح هیوسیامین تقریباً ۳ تا ۱۳ برابر بیشتر در لاین‌های تراریخته در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته بود.

نحوه تهیه نمونه و آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی آتروپین، اسکوپولامین و هیوسیامین

- روش‌های مختلف تهیه نمونه

امروزه با ابداع روش‌های آنالیز سریع (مانند کروماتوگرافی گازی (*GC*)، الکتروفورز موئینه (*CE*)، کروماتوگرافی مایع با عملکرد فوق بالا (*UHPLC*)، روش‌های استخراج مهم‌ترین محدودیت برای بیشتر فرایندهای تحلیلی می‌باشند [۹۲، ۹۳]. لذا، نیازی برای مراحل استخراج سریع و مؤثر برای نمونه‌های گیاهی وجود دارد.

الف) استخراج با استفاده از میکروویو (*Microwave-assisted extraction*)

استخراج با کمک امواج میکروویو (*MAE*) تکنیکی است که از انرژی میکروویو برای گرم کردن نمونه جامد غوطه‌ور در حلال جهت استخراج/جذب آنالیت‌ها از ماتریکس بهره می‌برد. میکروویوها تابش الکترومغناطیسی با بسامد در محدوده ۳۰۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز هستند. این امواج دو موج مغناطیسی و الکتریسیته در حال نوسان دارند که نسبت به هم عمودی هستند. نوسان سریع باعث تولید حرارت می‌شود. اثر انرژی میکروویو به شدت به ماهیت حلال و ماتریکس جامد بستگی دارد. چون امواج میکروویو کل نمونه را به طور همزمان گرم می

کند، از این رو منجر به استخراج سریع و مؤثر می‌شود [۹۴]. گزارش شده است که عصاره‌های تولید شده توسط امواج میکروویو مشابه با آنهایی بود که توسط استخراج جامد- مایع متعارف حاصل شده بود اما با بازدهی بالا و زمان ۳۰ ثانیه برای استخراج آلکالوئیدهای تروپانی از برگ‌ها کافی بود [۹۳].

ب) استخراج با مایع تحت فشار (*Pressurized liquid extraction*)

استخراج با مایع تحت فشار (*PLE*) یک تکنیک استخراج دوستدار محیط زیست است چون به مقدار کمی از حلال نیاز دارد. در این روش از دماهای بالا (معمولاً بین ۵۰ و ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد) و فشارهای بین ۱۰ و ۱۵ مگاپاسکال در ظروف سربسته‌ای استفاده می‌شود که باعث می‌شود استخراج در کوتاه ترین زمان ممکن شود. در بیشتر موارد، چرخه استخراج به مدت ۵ تا ۲۰ دقیقه در دمایی در محدوده ۵۰ تا ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. مشخص شده است که متانول بهترین حلال برای استخراج آلکالوئیدهای تروپانی از طریق این روش است. گزارش شده است که شرایط بهینه برای استخراج کمی آلکالوئیدهای تروپانی از برگ‌های گیاه کوکا، ۲۰ مگاپاسکال فشار، دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه زمان استخراج و توزیع اندازه ذرات بین ۹۰ و ۱۵۰ میکرون می‌باشد [۹۵].

ج) استخراج سیال فوق بحرانی (*Supercritical fluid extraction*)

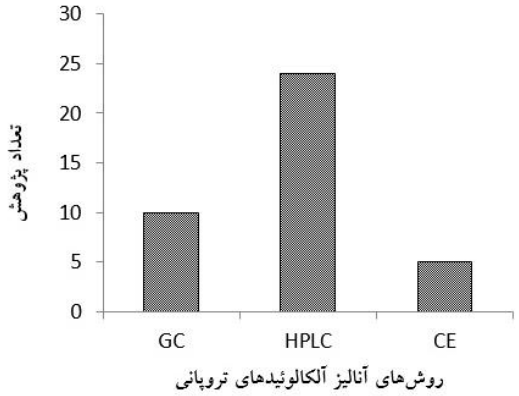
استخراج سیال فوق بحرانی (*SFE*) یک جایگزین بسیار عالی برای روش‌های متعارف است. سیالات فوق بحرانی دارای ویژگی‌های جالبی نظیر چگالی کم و انتشارپذیری مواد حل شونده بالا می‌باشد. متداول‌ترین حلال استفاده شده در این روش برای استخراج ایندول آلکالوئیدها، دی‌اکسید کربن است. در این روش، استخراج تحت شرایط ملایم صورت می‌پذیرد، لذا خطرات تجزیه حرارتی ترکیبات را می‌کاهد. ویژگی‌های حل شوندگی کم را می‌توان با افزودن ۱۰ الی ۲۰ درصد اصلاح‌کننده قطبی مانند متانول یا اتانول بهبود داد. غلظت‌های بیشتر منجر به شرایط زیر بحرانی می‌شود. چویی و همکاران [۹۶] نشان دادند که *CO2* فوق بحرانی همراه با متانول به عنوان تغییردهنده قطبی می‌تواند هیوسیامین و اسکوپولامین را در شکل بازهای آزاد استخراج نماید. همچنین هیوسیامین، اسکوپولامین و کوکائین با استفاده از این روش جداسازی شده‌اند [۹۸، ۹۷].

روش‌های آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی

پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های تحلیلی که در آن یک ابزار با حسگرهای ایجادکننده اطلاعات طیفی ادغام می‌شود به طور قابل توجهی زمینه آنالیز ماتریس‌های زیستی پیچیده را گسترده‌تر کرده است. بررسی تعدادی از پژوهش‌های اخیر استفاده‌کننده از کروماتوگرافی مایع (*HPLC-UV/MS*)، کروماتوگرافی گازی (*GC-MS*) و الکتروفورز موئینه (*CE*) برای آنالیز کیفی و کمی آلکالوئیدهای تروپانی نشان داد که در آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی، کروماتوگرافی مایع از کاربرد بیشتری برخوردار است (شکل شماره ۶).

الف) کروماتوگرافی مایع

کروماتوگرافی مایع در حال حاضر متداول‌ترین روش برای آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی نظیر آتروپین، اسکوپولامین و هیوسیامین می‌باشد. این روش، امکان آنالیز ترکیبات حساس به حرارت، قطبی و با وزن مولکولی بالا را فراهم می‌کند [۹۹]. شرایط کروماتوگرافیک به تغییرات ماتریس آنالیز شده و آنالیت ها بستگی دارد. در بیشتر موارد، ستون‌هایی با فاز ثابت *C18* معکوس برای تفکیک اسکوپلامین، آتروپین و هیوسیامین استفاده می‌شود. کاردیلو و همکاران [۱۰۰] آلکالوئیدهای تروپانی را با اسید اکتان سولفونیک در مخلوط متانولی با *pH* ۳ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تفکیک کردند. استثناء کار آندرولا و همکاران [۱۰۱] بود که تفکیک آلکالوئیدهای تروپانی در شرایط بازی *pH* ۸ روی ستون *C18Phenomenex Hypersil* با ۲۵ میلی‌مولار بافر فسفات استونیتریل به دست آوردند.



شکل شماره ۶- روش‌های آنالیز مورد استفاده در ۳۹ پژوهش مورد مطالعه

کروماتوگرافی مایع غالباً با *UV*، آرایه‌های دیود، *ELSD*، *MS* و به ندرت با *NMR* جهت تشخیص پیک ادغام می‌شود. هسته تروپانی خودش هیچ کروموفر و حساسیت تشخیص *UV* و حسگرهای آرایه دیور بسته به بخش استریفیه شده ندارد. *UV* و *DAD* برای تشخیص آلکالوئیدهایی با بخش‌های حاوی کروموفور مانند هیوسیامین و اسکوپولامین مناسب است. برای اینگونه آلکالوئیدها، کار تحلیلی و کمیت سنجی بین ۲۱۰ نانومتر و ۲۲۰ نانومتر انجام می‌شود [۱۰۲]، اما آنالیز در طول موج ۲۵۴ نانومتر نیز گزارش شده است [۱۰۳]. حسینی و همکاران [۱۰۴] محدوده تشخیص (*LOD*) و محدوده اندازه‌گیری ۵/۱۵ و ۱۷/۴ *ppm* برای آتروپین و ۱/۹۲ و ۶/۴ *ppm* برای اسکوپولامین ذکر کردند.

HPLC-UV به طور معمول برای اندازه‌گیری هیوسیامین و اسکوپولامین تولید شده در کشت‌های بافت در شرایط این ویترو مورد استفاده قرار گرفته است [۱۰۴]. محتوی اسکوپولامین و هیوسیامین چهار گونه *Hyoscyamus* رشد یافته در مناطق مختلف جغرافیایی توسط بهمن‌زادگان و همکاران اندازه‌گیری شده است [۱۰۵]. در این مطالعه مشخص شد که در بین چهار گونه، اسکوپولامین آلکالوئید تروپان غالب در *H. pusillus*، *H. niger* و *H. kurdicus* بود، در حالی که *H. reticulatus* حاوی مقادیر بالایی از هیوسیامین بود.

ب) کروماتوگرافی گازی

کروماتوگرافی گازی تکنیک تحلیلی متداول در بسیاری از تحقیقات آزمایشگاهی می‌باشد. بعد از اینکه *HPLC* معمول شد، آلکالوئیدهای تروپانی به دلیل جذب ضعیف نور *UV* باز هم با *GC* مورد آنالیز قرار می‌گرفتند. تشخیص آلکالوئیدهای تروپانی با استفاده از *GC* و *FID* حساس‌تر از تشخیص بوسیله‌ی *HPLC* و *UV* است. امروزه کروماتوگرافی گازی در ترکیب با طیف سنج جرمی به عنوان یک روش معمول برای کروماتوگرافی آلکالوئیدهای تروپانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰۶]. پیرولیدین، پیرولیزیدین، ایزوکوئینولین، پیپریدین، ایندول و آلکالوئیدهای تروپانی به طور معمول توسط کروماتوگرافی گازی آنالیز می‌شود [۱۰۷].

آلکالوئیدهای تروپانی در شوک‌های گرمایی ناپایدار هستند و در تزریق به کروماتوگرافی گازی به آپوآتروپین و آپواسکوپولامین تجزیه می‌شوند. بنابرین، برای بهبود پایداری، آلکالوئیدهای تروپانی به صورت مشتقات تری متیل سیلیل مورد آنالیز قرار می‌گیرند. تلاش برای مشتق سازی هیوسیامین و اسکوپولامین با هپتافلوئوروبوتیریک آنیدرید (*heptafluorobutyric anhydride*) ناکام بود. برخی از واکنش‌های سیلایت کردن (*BSTFA*، *BSTFA-TMCS*، *BSA* و *MBTFA*) مورد بررسی قرار گرفتند. مشتق *BSTFA-TMCS* (۹۹:۱) به دست آمد و مشتقات کروماتوگرافی خوبی را نشان دادند [۱۰۸]. از موقع کار هارتمن و همکاران [۱۰۹]، رویکرد تحلیلی غالب برای جستجو، شناسایی و اندازه‌گیری آلکالوئیدهای تروپانی نظیر اسکوپولامین، هیوسیامین و آتروپین، *GC* موئینه همراه با جرم سنج توده‌ای با اثر الکترون (*GC/EI/MS*) است. مزیت‌های اصلی *GC-MS* قدرت تفکیک بالای ستون‌های موئینه و اطلاعات ساختاری توسط

حسگر جرمی است. محدودیت‌ها و مزیت‌های *GC-MS* برای تفکیک و روشن‌سازی ساختار مخلوط‌های پیچیده آلکالوئیدهای تروپانی در کار البزویی و همکاران [۲۷] نشان داده شده است. در عصاره‌های آلکالوئیدی اندام‌های مختلف *Datura stramonium* کشت شده در مراکش، نویسندگان بیش از ۷۰ آلکالوئید در کمتر از ۵۵ دقیقه شناسایی کردند. که در بین آنها ۶۷ آلکالوئید تروپانی در اندام‌های ریشه، ساقه، برگ، بذر و گل‌ها شناسایی شدند.

ج) الکتروفورز موئینه

الکتروفورز موئینه به دلیل بازدهی، دقت و وضوح بالا در آنالیزهای دارویی و پزشکی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است [۱۱۰]. این یک روش بسیار جامع و جایگزین *HPLC* بوده که در مدت زمان آنالیز کم، بازدهی بسیار بالایی را دارد. همچنین، حجم حلال آلی استفاده شده برای تفکیک توسط الکتروفورز موئینه به شدت کم شده و می‌تواند به چند میلی‌لیتر در هر روز برسد [۱۱۱].

کاربرد الکتروفورز موئینه برای آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی در ماتریس‌های مختلف مرور شده است. یکی از مزیت‌های اصلی الکتروفورز موئینه در آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی که می تواند برجسته شود سادگی کاربرد آن برای تفکیک انتیومرهای آتروپین و دیگر ترکیبات مربوطه می‌باشد [۱۱۲]. رن و همکاران [۱۱۳] روشی را برای تعیین همزمان آنیزودامین، اسکوپولامین، آتروپین و آنیزودین توسط الکتروفورز موئینه با تشخیص الکتروشیمولومینس (*CE-ELC*) ابداع کردند. غلظت و *pH* بافر و همچنین محتوی اتانول برای بهبود انتخابی و حساسیت مورد بررسی قرار گرفت. این چهار آلکالوئید در ظرف مدت ۶ دقیقه تحت شرایط اپتیمال در بافری حاوی ۲۰ میلی‌مولار بر لیتر فسفات و ۷٪ متانول در *pH* ۸ جداسازی شدند. اتصال *CE* به حسگر *MS* به طور قطع بهترین فرصت برای آنالیز ترکیبات طبیعی به طور کلی و آلکالوئیدهای تروپانی به طور اختصاصی ارائه می‌کند. روش‌های استفاده‌کننده از *CE-MS* برای آنالیز آلکالوئیدهای تروپانی عمدتاً در آزمایشگاه‌های بالینی و جنایی توسعه یافته‌اند.

نتیجه‌گیری

آلکالوئیدهای تروپانی آتروپین، اسکوپولامین و هیوسیامین از اهمیت شایانی در صنایع داروسازی برخوردار هستند. گیاهان خانواده *Solanaceae* نظیر بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*)، شابیزک (*Atropa belladonna*) و دوبوزیا (*Duboisia* spp.) مهم‌ترین گیاهان تولیدکننده آلکالوئیدهای تروپانی می‌باشند. بیشتر تحقیقات انجام شده در زمینه بیوتکنولوژی و بیوسنتز متابولیت‌های مهم تروپانی بر روی فرابیان ژن‌های مهم مسیر سنتز این متابولیت‌ها نظیر ژن‌های *pmt* و *h6h* معطوف بوده است. همچنین کشت ریشه‌های موئین گیاهان تولیدکننده آلکالوئیدهای تروپانی ابزار امیدبخشی برای تولید و افزایش محتوی این آلکالوئیدهای مهم خواهند بود. به طور کلی، تولید این متابولیت‌های مهم با بازدهی بالا و در سطح تجاری توسط روش‌های نوین تحت بررسی و مطالعه است. به نظر می‌رسد که با بهره‌گیری از روش‌های نوین نظیر ژنومیکس و ترانسکریپتومیکس و نیز شناسایی ژن‌های مهم دخیل در بیوسنتز این متابولیت‌ها که تاکنون ناشناخته مانده‌اند و دست ورزی آنها می‌توان به اهداف تولید انبوه این متابولیت‌های مهم و مواد اولیه گیاهی با کیفیت در سطح تجاری برای صنایع داروسازی دست یافت.

منابع

1. Kukula-Koch WA and Widelski. J. Alkaloids. In: Simone Badal and Rupika Delgoda, pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies. Academic Press. 2017, pp: 163-98.

2. Dewick PM. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. 3rd ed. The Atrium, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd. 2009, pp: 311-481.

3. Aniszewski T. Alkaloidssecrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role, vol. 56, 710. The Netherlands: Elsevier B.V. 2007, pp: 182-9.
4. Lounasmaa M and Tamminen T. The tropane alkaloids. In: Cordell GA. (eds.). The Alkaloids. Academic, New York. 1993, 44, pp: 1–114.
5. O'Leary ME, Hancox JC. Role of voltage-gated sodium, potassium and calcium channels in the development of cocaine-associated cardiac arrhythmias. *Br. J. Clin Pharmacology*. 2010; 69 (5): 427-42.
6. Keil M Fine chemicals from plants. In: Oksman-Caldentey KM, Barz WH (eds) Plant Biotechnology and Transgenic Plants, Marcel Dekker, Inc., NY. 2002, pp: 347-72.
7. Chevallier, MA. The encyclopedia of medicinal plants; Dorling kindersly. 1996, pp: 336.
8. Brown JH., Taylor P.Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: Hardman, J.G., et al. (Eds.), The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, New York. 1996, pp: 141–60.
9. Kitagawa I, Ishizu T, Ohashi K, Shibuya H. Chirality of natural products: hyoscyamine and scopolamine. *Yakugaku Zasshi*. 2000; 120: 1017–23.
10. Budavari S, Windholz M. Hyoscamine. In: The merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 12th edn. Merck. 1996, pp: 148–9.
11. O'Neil MJ. The merck index - An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. whitehouse station, NJ: Merck and Co., Inc. 2006, p. 1450.
12. Lide DR. Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL. 2007, p. 3-458.
13. Budavari S, Windholz M. Atropine. In the merck index: An encyclopedia of chemicals, Drugs, and Biologicals, 12th edn. Merck. 1996, pp: 148–9.
14. The Merck Index. 9th ed. Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc. 1976, p: 647.
15. Lide, DR. Handbook of Chemistry and Physics. 81st Edition. CRC Press LLC, Boca Raton: FL. 2000, p: 3-27.
16. Weast RC. Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc. 1979, p: C-346.
17. Sunshine I. Handbook of Analytical Toxicology. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1969, p: C-13.
18. Trissel LA. Handbook on Injectable Drugs. 9th ed. Bethesda, MD. American Society of Health-System Pharmacists' Product Development. 1996, p: 109.
19. Lewis RJ. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 9th ed. Volumes 1-3. New York, NY: Van Nostrand Reinhold. 1996, p: 289.
20. Parfitt K. Martindale: The complete drug reference, 32nd ed. The Pharmaceutical Press London 1999, p: 455-7.
21. Dei S, Bartolini A, Bellucci C, Ghelardini C, Gualtieri F, Manetti D, Romanelli MN. Scapecchi S, Teorodi E. Differential analgesic activity of the enantiomers of atropine derivatives does not correlate with their muscarinic subtype selectivity. *Eur. J. Med. Chem.* 1997; 32: 595–605.
22. Osol, A. (ed.). Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co. 1980, p: 856.
23. Griffin WJ, Lin GD. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochem*. 2000; 53: 623–37.
24. Ghorbanpour M, Salehi Arjmand H, Hatami M, Hosseini N. Evaluation of morphological and tropane alkaloids variability in some populations of *Hyosscyamus niger* L. *JMP*. 2018; 17 (2): 105-24.
25. El Bazaoui A, Bellimam MA, Soulaymani A. Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS. *Fitoterapia*. 2011; 193–7. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.010.
26. Ionkova I, Witte L, Alfermann HA. Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of *Datura*

quercifolia and *Hyoscyamus* × *gyorffyi* cultivated in vitro. *Planta Med*. 1994; 60: 382-4.

27. Vitale AA, Archer A, Pomilio AB.Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *J. Ethnopharmacol*. 1995; 49: 81-9

28. Evans WC, Somanabandhu, A. Alkaloids of *Datura discolor*. *Phytochem*. 1974; 13:304-305.

29. Evans W. C. and Wellendorf M. The alkaloids of the roots of datura. *J. Chem. Soc*., 1959; 0: 1406-9.

30. Strahil Berkov, Rawia Zayed, Tsvetelina Doncheva. Alkaloid patterns in some varieties of Datura kymatocarpa. *Fitoterapia* 2006; 77: 179–82.

31. Evans WC and Major VA. The alkaloids of the genus Datura. Part V. Alkaloids of *Datura sanguinea* R. and P. and related esters of tropane-3a. *J. Chem. Soc* (C). 1968; 22: 2775-8.

32. Kariñho-Betancourt A, Agrawal AA, Halitschke R, Núñez-Farfán J. Phylogenetic correlations among chemical and physical plant defenses change with ontogeny. *New Phytol*. 2014; 206: 796–806.

33. Rätsch C. The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and its applications. Park Street Press, Rochester, USA. 1998.

34. Bye R, Mata R, Pimentel J. Botany, ethnobotany and chemistry of *Datura lanosa* (Solanaceae) in Mexico. Anales del Instituto de Biologia de la Universidad Nacional Autónoma de México, *Serie Botánica* 1991; 61: 21-42.

35. Lindequist UDatura. In: Hagers handbuch der pharmazeuti-schen Praxis, 5th edn. Springer, Berlin. 1992, pp: 1138–54.

36. Parr J, Payne J, Eagles J, Champan BT, Robins RJ, Rhodes MJC. Variation in tropane alkaloids accumulation within the Solanaceae and strategies for its exploitation. *Phytochem*. 1990; 29: 2545–50.

37. Samanani N, and Facchini P J. Compartmentalization of plant secondary metabolism. Recent Advances in Phytochemistry. 2006; 40: 53-83.

38. Zhang L. Ding, R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Kaldenty K.M, Xu T, Pi Y, Wang Z, Zhang H, Kai G, Liao Z, Sun X, Tang, K. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2004; 101: 6786-91.

39. Kutchan TM, Frick S, Weid M. Engineering plant alkaloid biosynthetic pathways: progress and prospects. *Adv. Plant Biochem. Mol. Biol*. 2008; 1: 283-310.

40. Ziegler J, Facchini, PJ. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2008; 59: 735–69.

41. Samuelsson G. Drugs of natural origin: A Textbook of pharmacognosy. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm. 2001.

42. Ghorbanpour M, Majnoun Hoseini N, Rezazadeh Sh, Omidi M, Khavazi K, Hatami M. Variations of root and shoot tropane alkaloids production of *Hyoscyamus niger* under two rhizobacteria strains inoculation and water deficit stress. *JMP*. 2011; 10 (40): 160-70.

43. Ghorbanpour M, Khavazi K, Ghafarzadegan R, Hatami M. Two main tropane alkaloids variations of black henbane (*Hyoscyamus niger*) under PGPRs inoculation and water deficit stress induction at flowering stage. *JMP*. 2013; 12 (45): 29-42.

44. Aigner TG, Mishkin M. The effects of physostigmine and scopolamine on recognition memory in monkeys. *Behav Neural Biol*. 1986; 45: 81–7.

45. Spinks A. and Wasiak J. Scopolamine (hyoscine) for preventing and treating motion sickness. Cochrane database *Syst. Rev*. DOI: 10.1002/14651858 (2011).

46. Shiraishi K and Takayanagi I. Subtype of muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rat iris dilator smooth muscle. *Gen. Pharmacol*. 1993; 24 (1): 139 – 42.

47. Jones DNC and Higgins GA. Effect of scopolamine on visual attention in rats. *Psychopharmacol*. 1995; 120: 142–9.

48. Tobin G, Giglio D. and Gotrick, B. Studies of muscarinic receptor subtypes in salivary gland function in anaesthetized rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2002; 100: 1–9.

49. Eglen RM, Hedge SS. andWatson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev*. 1996; 48 (4): 531–65.

50. Chintoh A, Fulton J, Koziel N, Aziz M, Sud M. and Yeomans JS. Role of cholinergic receptors in locomotion induced by scopolamine and oxotremorine-M. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2003; 76: 53–61.

51. Dai Y, Ambudkar IS, Horn VJ, Yeh C, Kousvelari EE, Wall SJ, Li M, Yasuda RP, Wolfe BB and Baum BJ. Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am. J. Physiol*. 1991; 261: 1063–73.

52. McGaughy J, Everitt BJ, Robbins TW and Sarter, M., The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins. *Behav. Brain. Res*. 2000; 115: 251–63.

53. DeFrates LJ, Hoehns JD, Sakornbut EL, Glascock DG, Tew AR. Antimuscarinic intoxication resulting from ingestion of moonflower seeds. *Ann. Pharmacother*. 2004; 39: 173-6.

54. Bruce N. Alkaloids. In: Rehm HJ. Reed G. and Bruce NC. (Eds.), Biotechnology Set. Wiley, Cambridge, UK. 2008, pp: 332-50.

55. Guggisberg G. and Hesse, M. The alkaloids: chemistry and pharmacology. Academic, New York. 1983, 22: 85-188.

56. Ghelardini C.Galeotti N. Gualtieri F. Bellucci C. and Bartolini A. Memory facilitation with atropine: A paradoxical effect. *Phytotherapy Res*. 1998; 12: 7–9.

57. Lopez-Enriquez E, Raphael Morales A, and Robert F.Effect of atropine sulfate in pulmonary hypertrophic osteoarthropathy. *Arthritis Rheum*. 1980; 23: 7.

58. Clement JG and Lee MJ. Pharmacokinetics of the acetylcholinesterase oxime reactivator, HI-6, in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Effect of atropine, diazepam, and methoxyflurane anesthesia. *Biopharm. Drug Dispos*. 1990; 11: 227-32.

59. Blozovski D and Bachevalier J. Effect of atropine on behavioral arousal in the developing rat. *Dev. Psychol*. 1975; 8 (2): 97-102.

60. Li S, Topchiy I, and Kocsis B. The effect of atropine administered in the medial septum or hippocampus on high- and low-frequency theta rhythms in the hippocampus of urethane anesthetized rats. *Synapse* 2007; 61: 412–9.

61. Wilson LM and Ricci DC. Scopolamine's effect on passive avoidance behavior in immature rats. *Dev. Psychobiol*. 1976; 9 (3): 245-4.

62. David M. Warburton. Commentary on: Effects of scopolamine and nicotine on human rapid information processing performance. *Psychopharmacology* 1984; 82: 147–50.

63. Poorheidari G, Pratt JA and Dehghan N. Effects of low-dose scopolamine on locomotor activity: No dissociation between cognitive and non-effects. *Neurosci. Res. Comuni*. 31 (3): 1520-6769.

64. Firth AY and Walker K. Visual side-effects from transdermal scopolamine (hyoscine). *Dev. Med. Child. Neurol*. 2006; 48: 137–8.

65. Vesalainen RK, Tahvanainen KUO, Kaila TJ, Kantola IM, Kuusela TA and Eckberg DL. Effects of low-dose transdermal scopolamine on autonomic cardiovascular control in healthy young subjects. *Clin. Physiol*. 1997; 17: 135 – 48.

66. Ricng J, Gualtierib F and Tucek S. Constitutive inhibitory action of muscarinic receptors on adenylate cyclase in cardiac membranes: effects of atropine, S-(−)-

hyoscyamine, and R-(+)-hyoscyamine. 5th International Symposium on Cholinergic Mechanisms. 1998.

67. Rozear M. Bircher RP. Chai CY. Wang SC. Effects of intracerebroventricular L-hyoscyamine, ethybenztropine and procaine on cardiac arrhythmias induced in dogs by pentylenetetrazol, picrotoxin or deslanoside. hat. *J. Neurophurmucol*. 1968; 7: 1-6.

68. Kim N, Estrada O, Chavez B, Stewart C and D'Auria JC. Tropane and granatane alkaloid biosynthesis: A systematic analysis. *Molecules*. 2016; 21: 1510; doi: 10.3390/molecules21111510.

69. Hibi N, Fujita T, Hatano M, Hashimoto T and Yamada Y. Putrescine N-methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*: n-Butylamine as a potent inhibitor of the transferase both in vitro and in vivo. *Plant Physiol*. 1992; 100: 826.

70. Stenzel O, Teuber M and Drager B. Putrescine N-methyltransferase in *Solanum tuberosum* L., a calystegine-forming plant. *Planta*. 2006; 223: 200.

71. Scholl Y, Hoke D and Drager B. Calystegines in calystegia sepium derived from the tropane alkaloid pathway. *Phytochem*. 2001; 58: 883.

72. Scholl Y. Schneider B. and Drager B. Biosynthesis of calystegines: 15N NMR and kinetics of formation in root cultures of Calystegia sepium. *Phytochem*. 2003; 62: 325.

73. Sato F. Takeshita N. Fitchen JH. Fujiwara H. and Yamada Y. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Phytochem*. 2001; 98 (1): 367–72.

74. Duran-Patron R. Hagan DO. Hamilton JT. and Wong CW. Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. *Phytochem*. 2000; 53: 777.

75. Lanoue A, Boitel-Conti M, Portais JC, Laberche JC, Barbotin JN, Christen P and Sangwan-Norreel B. Kinetic study of littorine rearrangement in *Datura innoxia* hairy roots by (13) C NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod*. 2002; 65: 1131.

76. Eich E. Ornithine-Derived Alkaloids. In: Eich E. (Eds.) Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008, pp: 33-212.

77. Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T and Yamada Y. Molecular cloning of hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J. Biol. Chem*. 1991; 266: 9460-4.

78. Suzuki K, Yun DJ, Chen XY, Yamada Y and Hashimoto T. An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6beta-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Mol. Biol*. 1999; 40: 141.

79. Hashimoto T, Hayashi A, Amano Y, Kohno J, Iwanari H, Usuda S and Yamada Y. Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *J. Biol. Chem*. 1991; 266: 4648.

80. Ahmad A, and Leete E. Biosynthesis of tropine moiety of hyoscyamine from δ-Nmethylornithine. *Phytochem*. 1970; 9: 2345–7.

81. Humphrey AJ and O'Hagan D. Tropane alkaloid biosynthesis. A century old problem unresolved. *Nat. Prod. Rep*. 2001; 18: 494–502.

82. Dräger B. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 2006; 67: 327–37.

83. Portsteffen A, Dräger B.and Nahrstedt A. The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. *Phytochem*. 1994; 37: 391–400.

84. Hashimoto T and Yamada Y. Alkaloid biogenesis: Molecular aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1994; 45: 257–85.

85. Zhang L, Ding R, Chai Y, Bonfill M, Moyano E, Oksman-Caldentey KM, Xu T, Pi Y, Wang Z, Zhang H, Kai G, Liao Z, Sun X and Tang K. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *PNAS*. 2004; 1001: 6786-91.

86. Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura K, Choi K, Morishige T, Fujimoto H and Yamada Y. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *PNAS*. 2001; 98: 367-72.

87. Moyano E, Fornalé S, Palazón J, Cusidó R.M, Bagni N and Piñol M.T. Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the pmt gene. *Phytochemistry* 2002; 59: 697-702.

88. Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P, Palazón J, Cusido RM, Piñol MT, Teeri TH and Oksman-Caldentey KM. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J. Exp. Bot*. 2003; 54: 203-11.

89. Rothe G, Drager B. Tropane alkaloids-metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Sci*. 2002; 163: 979-85.

90. Jouhikainen K. Lindgren L, Jokelainen T, Hiltunen R, Teeri TH. and Oksman-Caldentey KM. Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta*. 1999; 208: 545-51.

91. PalazónJ. Moyano E. Cusido RM. Bonfill M. Oksman-Caldentey KM. and Piñol MT. Alkaloid production in Duboisia hybrid hairy roots and plants overexpresing the h6h gene. *Plant Sci*. 2003, 165: 1289-95.

92. Aehle E. and Draeger B. Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: an update. *J Chromatogr B*. 2010; 1391–406. doi:10.1016/j.jchromb. 2010.03.007

93. Bieri S, Brachet A, Veuthey J-L, and Christen P. Cocaine distribution in wild Erythroxylum species. *J Ethnopharmacol*. 2006; 439–47. doi:10.1016/j.jep. 2005.08.021

94. Kaufmann B, and Christen P.Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem Anal*. 2002; 105–13. doi:10.1002/pca.631.

95. Brachet A, Rudaz S, Mateus L, Christen P, and Veuthey J-L Optimization of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from Coca leaves. *J Sep Sci*. 2001; 865–73. doi:10.1002/1615-9314 (20011101) 24: 10/11

96. Choi YH, Chin Y-W, Kim J, Jeon SH.and Yoo K-P. Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers. *J Chromatogr, A*. 1999; 47–55. doi:10.1016/s0021-9673 (99) 00962-0.

97. Brachet A, Christen P, Gauvrit JY, Longeray R, Lanteri P.and Veuthey JL. Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves. *J Biochem Biophys Methods*. 2000; 353–66. doi: 10.1016/s0165-022x (00) 00062-2.

98. Brachet A, Mateus L, Cherkaoui S, Christen P, Gauvrit JY, Lanteri P. and Veuthey JL. Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of tropane alkaloids in plant extracts. *Analysis*. 1999; 772–8. doi: 10.1051/analusis: 1999143.

99. Leicach SR, Chludil HD. and Yaber GMA. Chromatography and spectroscopy of alkaloids. Science Publishers, Enfield, NH, USA. 2009; 175-201. doi: 10.1201/b10195-10.

100. Cardillo AB, Talou JR, and Giulietti AM.Expression of *Brugmansia candida* Hyoscyamine 6beta-Hydroxylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential use as biocatalyst. *Microb Cell Fact*: 2008; 7: 17. https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-17.

101. Andreola B, Piovan A, Da DL, Filippini R. and Cappelletti E.Unilateral mydriasis due to Angel's trumpet. *Clin Toxicol*. 2008; 329–31.

102. Pramod KK, Singh S, and Jayabaskaran C. Expression of hyoscyamine 6b-hydroxylase in the root pericycle cells and accumulation of its product scopolamine in leaf and stem tissues of *Datura metel* L. *Plant Sci*. 2009; 178, 202–6. doi:10.1016/j.plantsci. 2009.11.004

103. Hosseini N, Ebrahimi SN, Salehi P, Asghari B. and Ahmadi M Simultaneous determination of

atropine and scopolamine in different parts of *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark plants by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Med Plants Res*. 2011; 5: 3552–57.

104. Ibrahim AI, Abd EKM, Nower A, Abdel MA, and Abd EAA.Alkaloid production and organogenesis from callus of *Hyoscyamus muticus* L. in vitro. *J Appl Sci Res*. 2009; 5: 82–92.

105. Bahmanzadegan A, Sefidkon F.and Sonboli A. Determination of hyoscyamine and scopolamine in four *Hyoscyamus* species from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2009; 8 (1): 65–70.

106. Aehle E, and Dräger B. Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *J. Chromatography B.* 2010; 878 (17-18): 1391-406.

107. Muzquiz M. Separation of alkaloids by gas chromatography. In: Wilson ID, Adlard ER, Cooke M, Poole CF (eds) Encyclopedia of separation science. Academic, San Diege. 2000, pp: 1938–49.

108. Namera A, Yashiki M, Hirose Y, Yamaji S, Tani T, Kojima T. 2002. Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Sci Int*.; 130: 34–43

109. Hartmann T, Witte L, Oprach F, Toppel G. Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures, and cell suspension cultures. *Planta Med*. 1986; 390–5. doi: 10.1055/s-2007-969194.

110. Altria K, Marsh A, and Sanger-van GC. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis*. 2006; 27, 2263–82. doi:10.1002/elps.200600030.

111. Ganzera M. Quality control of herbal medicines by capillary electrophoresis: potential, requirements and applications. *Electrophoresis*. 2008; 29: 3489–503. doi:10.1002/elps.200700901.

112. Cucinotta V, Contino A, Giuffrida A, Maccarrone G, and Messina M. Application of charged single isomer derivatives of cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral analysis. *J Chromatogr A.* 2010; 1217 (7): 953–67. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.094

113. Ren X, Ma Y, Zhou M, Huo S, Yao J, and Chen H. Determination of tropane alkaloid components in *Przewalskia tangutica* Maxim. by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Se Pu*. 2008; 26: 223–7. doi:10.1016/s1872-2059 (08) 60015-2.

A Comprehensive Overview on Valuable Tropane Alkaloids: Scopolamine, Atropine, and Hyoscyamine

Navasi F (M.Sc)[1], Naghdi Badi H (Ph.D.)[2], Mehrafarin A (Ph.D.)[2]*, Rezazadeh Sh (Ph.D.)[2], Mustafavi Sh (Ph.D.)[2], Ghorbanpour M (Ph.D.)[3]

1- Department of Horticulture, Science and Research Branch, Islamic Azad University (IAU), Tehran, Iran
2- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
3- Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.
*Corresponding author: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, 55th Kilometer of Tehran-Qazvin Freeway, Karaj, P.O.Box: 31375-1369, Iran
Tel: +98-26-34764010-19, Fax: +98-26-34764021
E-mail: A.Mehrafarin@gmail.com

Abstract

Tropane alkaloids such as scopolamine ($C_{17}H_{21}NO_4$), atropine ($C_{17}H_{23}NO_3$) and hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$) are the most important plant secondary metabolites in the pharmaceutical industry due to anticholinergic activity, competition with muscarinic receptors and also treating different human diseases. Scopolamine, hyoscyamine and atropine are the most important tropane alkaloids used as anticoagulants and spasmolytic drugs in the digestive system and urinary excretion. Tropane alkaloids are natural phytochemical compounds, which are present in different plant families. These compounds are the main secondary metabolites in Solanaceae family plants such as *Hyoscyamus niger* and *Atropa belladonna.* The main source of raw material for the production of tropane alkaloids in the world is *Duboisia* spp. leaves which contain 2-4% alkaloids (more than 60% scopolamine, and 30% hyoscyamine). Common methods of analysis of tropane alkaloids include gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE), in which liquid chromatography is mostly adopted. Various enzymes involved in the biosynthesis of tropane alkaloids, in which *N- Putrescine methyltransferase* (*PMT*), *tropinone reductase I and II*, and *hyoscyamine 6-beta-hydroxylase* (*H6H*) have a key role. To increase the biosynthesis of these important alkaloids, many studies were focused on the manipulation of key genes expressing enzymes in the biosynthesis pathway such as *pmt* and *h6h* genes. Although many biotechnological and agronomic studies have been done to increase the biosynthesis efficiency of these metabolites, further investigations are necessary. This paper is intended to provide a comprehensive overview of these tropane alkaloids.

Keywords: Atropine, Hyoscyamine, Scopolamine, Tropane alkaloids