

استخلاص وتنقية بعض المركبات القلويدية الاندوليه الخام من فطر المشروم Mushroom جنس *Psilocybe*

د. محمد عبد الله جبر الخفاجي

د. كريم طالب خشان الحاتمي

كلية العلوم / جامعة بابل

كلية العلوم / جامعة الكوفة

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة في مختبرات كلية العلوم – جامعة الكوفة عام 2010 - 2011 وشملت استخلاص وتنقية المركبات القلويدية الاساسيه من الجزء الثمري لفطر المشروم جنس *Psilocybe*. جرى استخلاص كحولي لثمار الفطر المدروسة باستخدام مزيج من المذيبات هي 1 – الايثانول (Gartz, 1992). 2 – الميثانول (Beug و Bigwood, 1982)

3- الايثانول + الميثانول (Wurst وآخرون 1992) (4- حامض الاستك أسد (Casale, 1985).

تم فصل المركبات الأخرى المرافقة للقلويدات كالفينولات وغيرها باستخدام مادة الكلوروفورم 30%. وتم الكشف عن المركبات الفينولية باستخدام كاشف خلاص الرصاص 1% والكشف عن المركبات القلويدية باستخدام كواشف دراجندورف وماير وجرى تقدير الكمية الكلية للمركبات المدروسة. نفذت التجربة باستخدام اختبار T (T – test) في المقارنة بين كمية المركبات القلويدية في المذيبات العضوية المستخدمه في الاستخلاص.

أظهرت النتائج وجود فروقات معنوية في محتوى المركبات القلويدية الاندوليه المدروسة باختلاف المذيبات المستخدمه في الاستخلاص وكانت السيادة للمركب (*psilocybin*) في المذيب الميثانول مقارنة بمحتواها في باقي المذيبات في حين سجل المذيب العضوي (الايثانول + الميثانول) اكبر محتوى من المركب القلويدي Psilocin قياسا بالمذيبات الأخرى وسجل المركب Baeocystin انخفاضا واضحا في جميع المذيبات المستخدمه في الاستخلاص.

المقدمة Introduction

بعد فطر mushroom من أكثر الفطريات شيوعا حيث يمكن مشاهدته بجانب جذوع الأشجار المتعفنة والأعشاب في الحقول والغابات وخاصة بعد هطول الأمطار وهناك أنواع تنمو في فصل الصيف وأخرى في الشتاء. ويوجد أكثر من مائة ألف نوع من الفطريات الذي يعيش على مخلفات النباتات والحيوانات بالترربة. وكان فطر المشروم Mushroom أو المصله الذي ينتمي إلى عائلة *Strophariaceae* وهو من الفطريات البازيدية التي تؤكل ثمارها وتشكل أهميه اقتصاديه وتجاريه للعديد من الدول المتقدمه و معروف لدي الإغريق والرومانيين وكان يؤكل على مدي واسع في العصور الوسطي، ثم انتشرت زراعته في أوروبا الشرقية وأمريكا في بداية القرن السابع عشر وينتشر حاليا في بريطانيا وفرنسا والولايات المتحدة الأمريكية (Chang, 1999). يعيش الفطر تحت الأشجار وفي الأماكن الرطبة وفي الكهوف والأفاق وهناك أنواع برية عديدة من هذا الفطر وتختلف أنواع الفطر اختلافا بينيا من حيث صلاحيتها للأكل، فبعضها سام قاتل وبعضها يسبب القيء أو الإغماء، والبعض مفيد صالح للأكل وهو المهم من الناحية الزراعية. وهناك حوالي 10 أنواع من المشروم الصالح للأكل منتشرة على المستوى التجاري العالمي. ومن أهمها الأنواع (*Volvariella*, *Agaricus sp*, *Pleurotus sp*, *sp*). ومع خبرة الإنسان أكتشف الفوائد الطبية المتعددة لبعض أنواع فطر المشروم، فاستخدامها لعلاج عديد من الأمراض العضوية والنفسية (Royse, 2002). يحتوي على العديد من المركبات القلويدية الاندوليه ذات الاستخدام الطبي الواسع (Gartz, 1993) ومنها قلويدات Psilocybin وتركيبه الكيميائي العام (C₁₂H₁₇N₂O₄P) وكذلك قلويد Psilocin وتركيبه الكيميائي العام (C₁₂H₁₆N₂O) بالإضافة إلى احتواء ثمار المشروم على العديد من المركبات القلويدية الاندوليه ذات الاستخدام التي تعد مواد مانعه للاكسده الخلوية (Cellular protector against oxidative damage) (Valentao وجماعته 2005) والمركبات التريبينية (Chang, 1999). ويعتبر الفطر غذاء بروتيني ينخفض فيه محتوى الكربوهيدرات والدهون ولكن ترتفع نسبة البروتين فيه إلى حوالي 50% من وزنه الجاف ويعد مخفض لارتفاع ضغط الدم ويعمل على خفض نسبة الكولسترول والفطر الصالح للأكل يحتوي على معادن الكالسيوم والمنجنيز والصوديوم والمغنيسيوم والفسفور والكلور واليوتاسيوم والحديد والزنك والنحاس واليود). (Kysilka و Wurst, 1990) كما يحتوي الفطر على كمية كبيرة من الفيتامينات والعناصر اللازمة لصحة الإنسان وكذلك بعض الأنزيمات التي تساعد على الهضم. تحتوي ثمار الفطر على عديد من الأحماض الأمينية الأساسية لجسم الإنسان مثل الأيزوليوسين، الليوسين، الميثونين، الفينيل الأنين، الثيرونين بنسب متفاوتة. معظم الكربوهيدرات الموجودة في ثمار الفطر عبارة عن مانيتول وتحتوي على نسب مختلفة من الفركتوز

والجلوكوز والسكروروز ولذا يعتبر ثمار الفطر حلقة وسيطة بين الخضراوات واللحوم لارتفاع نسبة البروتين فيها . وتمثل الدهون حوالي 0.5% من الوزن الطازج للفطر وذلك على صورة بعض الأحماض الدهنية مثل حمض الستريك والبالمتيك والأولييك وغيرها . وتوجد هذه الأحماض الدهنية على صورة ستيروولات وليست في صورة كولسترول مما يمنع تراكمه في الشرايين (Gartz, 1992). لأهمية فطر المشروم الغذائية المتزايدة وزيادة معرفه ألعلميه لهذا الغرض وجدت الحاجة إلى إجراء دراسات متنوعة عن هذا المصدر الغذائي المهم من اجل بيان أهميته الغذائية والطبية جاء هذا البحث للتحري والكشف عن المركبات ألكيميائيه الثانوية ومنها القلويدات الاندوليه التي ينتجها فطر المشروم وبيان الالهيمه الغذائية والطبية لها .

المواد وطرائق العمل

عينات الفطر

تم الحصول على فطر المشروم من الأسواق المحليه في محافظة النجف الاشرف وشخص على انه فطر المشروم Mushroom ينتمي إلى جنس *Psilopyn* في كلية العلوم /جامعة الكوفه وجفف باستخدام طريقة التجفيد ثم جرى طحن ثمار الفطر باستخدام الخلاط الكهربائي وخرن عند درجه حرارية مقدارها 10م لحين الاستخلاص.

الاستخلاص والتنقيه Extraction and Purification

اتبعت طريقة (Gartz (1994) في استخلاص المركبات الايضييه الثانوية من فطر المشروم باستخدام أربعة أنواع من المذيبات ألعضويه وبكميات متساويه .أخذ وزن 5 غرام من مسحوق ثمار الفطر ووضعت في دورق زجاجي سعة 250 مل أضيف إليها 150مل من مذيب الايثانول تركيز 80 % مع التحريك المستمر لمدة 12 ساعة باستخدام جهاز التحريك المغناطيسي Stirrer في درجه حرارية ألعرفه ,وتحت نفس الظروف كررت ألعمليه باستخدام الميثانول تركيز 80 % مع التحريك المستمر لمدة 1 ساعة باستخدام جهاز التحريك المغناطيسي Stirrer في درجه حرارية مقدارها 45 م وكذلك استخدام مزيج من المذيبات الميثانول و الايثانول تركيز 80 % (Wurst, 1992), اما الاستخلاص بالمذيب الاستك أسد فقد استخدم تركيز 80 % مع التحريك باستخدام حمام مائي لمدة 10 دقائق(Casale , 1985). ثم جرى ترشيع المستخلص ولكل ماده على حده باستخدام ورق الترشيع نوع 1 Whitman .واتبعت نفس الخطوات ألعلميه من قبل(الحاتمي, 2006) في فصل المركبات القلويديه عن المركبات الفينوليه وغيرها من المركبات بعدها وضعت المركبات القلويديه الخام في دورق زجاجي سعة 250 مل كلا على حده وجرى نبذ المستخلصات الخام مركزيا في 3000 دوره/دقيقه لمدة 10 دقائق ,

تنقيه وفصل المركبات القلويديه

قسمت المستخلصات القلويديه إلى أربعة مجاميع وأخذ من كل مجموعه نصف الكميه منها وأضيف مقدار 20 مل من الماء المقطر لكل منهما على حده وكماياتي:

1- المستخلص الخام للمذيب الايثانول لتحويل أو فسفرة المركب القلويدي **psilocybin** إلى **psilocin** (CartZ,1993)

2- المستخلص الخام الايثانول و الميثانول لتحويل أو فسفرة المركب القلويديه **psilocybin** إلى **psilocin** (CartZ,1993) .

3-تحريك المستخلص الخام الاستك أسد باستخدام الحمام المائي لتحويل المركب القلويديه **psilocybin** إلى **psilocin** (Casale,1985) .

4- إضافة 10 مل من المذيب الكلوروفورم chloroform إلى المستخلص الخام الايثانول و الميثانول لتحويل أو فسفرة المركب القلويديه **psilocybin** إلى **psilocin** (CartZ,1993) .

تقدير المحتوى الكلي للمركبات القلويدية

اعتمدت طريقة British Pharma-Copiea (1968) في تقدير المحتوى الكلي للمركبات القلويدية الاندولية في المستخلصات العضوية لثمار فطر المشروم لكل مستخلص على حده بعد أن تم فصل المركبات الفينولية عن باقي المركبات الثانوية التي تتواجد في مستخلصات ثمار فطر المشروم باستخدام مادة الكلوروفورم وذلك بإضافة 10 مل منه إلى المستخلص وكلا على حده في قمع الفصل حيث تشكل الطبقة العليا من المستخلص المركبات الفينولية وغيرها من المركبات وأما الطبقة السفلى فهي عبارة عن المركبات القلويدية وبصورتها النقية (الحاتمي , 2006) وكرر عملية الاضافه ثلاث مرات لضمان عملية فصل للمركبات الفينولية أكثر كفاءة ثم عزلت المركبات الفينولية ولكل نوع من المستخلصات في دورق زجاجي سعة 250 مل ووضعت في الثلجة وفي ظروف ظلام لحين الاستخدام .

التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم اختبار المتوسط العام لمركبات (Psilocybin و Psilocin و Baeocystin) وفق اختبار T للترجيح في أفضلية الحصول عليها من المستخلصات المدروسة (الراوي وخلف الله , 1980) .

النتائج Results

الكشف الكيميائي

يتبين من الجدول (1) بان جميع الكواشف المستخدمه في الكشف الكيميائي عن المركبات القلويديه و الفينوليه قد أعطت كشفا ايجابيا وبينت الكواشف الألوان الاستدلاليه على وجود هذه المركبات في جميع المستخلصات الخام في فطر المشروم , إذ أعطى كاشف دراجندورف راسبا برتقاليا (السلامي ,1998) وأعطى كاشف ماير راسبا ابيض (Harborne , 1984) وقد ذكر بعض الباحثين بأنه يمكن الاستدلال على وجود المركبات القلويديه في المستخلصات الخام للأجزاء النباتية باستخدام الكواشف ومواصفاتها المذكورة في أعلاه (الخالدي ,2005) ومن خلال الجدول نفسه يتضح وجود المركبات القلويديه قيد الدراسة في المستخلصات الكحولية لثمار فطر المشروم . أما بخصوص بالمركبات الفينوليه فقد أعطى كاشف خلات الرصاص كشفا ايجابيا من خلال ظهور اللون الرصاصي الذي يستدل به على المركبات الفينوليه .

جدول (1) الكشف الكيميائي القلويدات الاندولية في مستخلص ثمار الفطر المشروم *Psilocybe bohemica* باستخدام مذيبات عضويه مختلفة

المذيبات solvents	الكواشف	القلويدات		
		Psilocybin	Psilocin	Baeocystin
Methanol	Dragendorffe	+	+	+
Ethanol	Dragendorffe	+	+	+
Methanol + Ethanol	Mayer	+	+	-
Acetic acid	Mayer	+	+	-

التقدير الكلي للمركبات القلويديه

تشير النتائج ألموضحة في الجدول (2) إلى الكميات التي تم قياسها للمركبات القلويدية في المستخلصات الكحولية فقد وجد ارتفاعا بسيطا لكمية المركب القلويدي Psilocybin في مستخلص الميثانول وسجل فرقا معنويا في كميته مع الكميات ألمسجلة في مستخلص مزيج (الميثانول + الأيثانول) ولم يختلف معنويا مع الكميات ألمسجلة في المستخلصات الكحولية الأخرى في حين سجل مستخلص (الميثانول+ الأيثانول) أكبر كمية من قلويد Psilocin واختلف معنويا مع كميته في باقي المستخلصات , وبخصوص قلويد Baeocystin فقد سجل انخفاضا ملحوظا في جميع المستخلصات الكحولية ولم يختلف معنويا فيما بينها . أما فيما يخص المذيبات أعضوية فقد سجل مستخلص (الميثانول) لوحده أكبر كمية من قلويد Psilocybin و قلويد Baeocystin وأقل كمية من قلويد Psilocin في حين سجل أقلها في مستخلص (الميثانول+ الأيثانول) ولم يختلف جميع المستخلصات اختلافا معنويا فيما بينهما باستثناء مستخلص (الميثانول الأيثانول) . ومن الجدول نفسه يتبين بان مستخلص مزيج (الميثانول و الأيثانول) كان متفوقا في كمية المركبات القلويدية ولم يختلف معنويا مع المستخلصات الأخرى في الكمية الكلية . وقد سجل مذيبا (الميثانول الأيثانول) و الاستك أسد اختفاء المركب القلويدي Baeocystin وانخفاض كميته بشكل ملحوظ في باقي المستخلصات وتبين النتائج ألموضحة في الجدول (3) إلى الكميات التي تم قياسها للمركبات القلويدية في المستخلصات الكحولية والماء المقطر فقد وجد ارتفاعا واضحا لكمية المركب القلويدي Psilocin في مستخلص (الميثانول) وسجل فرقا معنويا في كميته مع الكميات ألمسجلة في مستخلص مزيج (الميثانول + الأيثانول) ولم يختلف معنويا مع الكميات ألمسجلة في المستخلصات الكحولية الأخرى في حين سجل مستخلص (الميثانول+ الأيثانول) أكبر كمية من قلويد Psilocin واختفاء قلويد Baeocystin واختلف معنويا مع كميته في باقي المستخلصات , وبخصوص قلويد Baeocystin فقد سجل انخفاضا ملحوظا في جميع المستخلصات الكحولية ولم يختلف معنويا فيما بينها . أما فيما يخص المذيبات أعضوية فقد سجل مستخلص (الميثانول +الماء) أكبر كمية من قلويدBaeocystin فحين سجل مستخلص (الميثانول+ الأيثانول +الماء) اختفاء باقي المركبات القلويدية واختلف مع

جدول (2) كمية القلويدات الاندولية الكلية في مستخلص ثمار الفطر المشروم *Psilocybe bohemica* باستخدام مذيبات عضوية نقيه مختلفة

Solvents	كمية القلويدات الكلية /ملغم/غرام وزن جاف			
	Psilocybin	Psilocin	Baeocystin	Total
Methanol	0.98 **	0.11**	0.07 **	1.16
Ethanol	0.96	0.21	0.01	1.18
Methanol + Ethanol	0.28**	0.95**	—	1.23
Acetic acid	0.94**	0.25	—	1.19

جدول(3) كمية القلويدات الاندولية الكلية في مستخلص ثمار الفطر المشروم *Psilocybe* باستخدام مذيبات عضوية مع الماء المقطر

Solvents	كمية القلويدات الكلية /ملغم/غرام وزن جاف			
	Psilocybin	Psilocin	Baeocystin	Total

Methanol + water	0.08 **	0.86**	0.11 **	1.05
Ethanol +water	0.05	0.91	0.01	0.92
Methanol+Ethanol +water	0.00**	0.95**	0.00	0.95
Acetic acid + water	0.54*	0.20	0.66**	1.40

سجل مستخلص (الميثانول + الماء) أكبر كمية من قلويد Baeocystin فحين سجل مستخلص (الميثانول + الايثانول + الماء) اختفاء باقي المركبات القلويدية واختلف مع جميع المستخلصات اختلافا معنوياً فيما بينهما. ومن الجدول نفسه يتبين بان مستخلص مزيج (الاستك أسد + الماء) كان متوقفاً في كمية المركبات القلويدية واختلف معنوياً مع المستخلصات الأخرى في الكمية الكلية وقد سجل أكبر كمية من قلويد Baeocystin وانخفاض كميته بشكل ملحوظ في باقي المستخلصات.

المناقشة Discussions

يتضح من خلال النتائج بان المذيبات العضوية المستخدمة في استخلاص المركبات القلويدية الأساسية في ثمار فطر المشروم قد أعطت نتائج ايجابية في استخلاص وعزل هذه المركبات ولكنها كانت متفاوتة في كميته وقد يعود السبب في ذلك إلى تفاوت قدرات هذه المذيبات في استخلاص المركبات القلويدية بالإضافة إلى الطبيعة الكيميائية المعقدة لهذه المركبات وصعوبة فصلها عن المركبات المتداخلة معها ومنها المركبات الفينولية والتربينية، وبينت النتائج الموضحة في الجدول (3) بان إضافة الماء إلى المستخلصات العضوية لهذه المركبات قد أعطت نتائج ايجابية في عملية عزل وفصل القلويدات الاندولية من مستخلصات ثمار فطر المشروم وقد يعود السبب في ذلك إلى تحول Baeocystin إلى Psilocybin بفعل عملية ال methylation التي تحدث بعد أكسدة Psilocin إلى Psilocybin ثم تحول هذا الأخير إلى مركب Psilocin بفعل عملية ال dephosphorelation ونشاط أنزيمات الفوسفوتيز (Semerdzieva وآخرون 1986) ، وقد ذكر (CarZ, 1993) بان إضافة الماء إلى المستخلصات الكحولية لثمار الفطر المشروم تؤدي إلى حدوث عملية dephosphorelation للمركب Psilocybin إلى Psilocin وبواسطة عزل هذه المركبات عن بعضها يمكن قياس كميته كلاً على حده. وذكر العديد من الباحثين بان إضافة الكلوروفورم لعزل المركبات القلويدية عن باقي المركبات الثانوية في المستخلصات يساهم بشكل كبير إلى تحول مركب Psilocybin إلى Psilocin (Beug و Bigwood و (1982) و Chang (1999) و Kysilka و Wurst (1990).

المصادر

- الحاتمي، كريم طالب (2006). دراسة مقارنة لإنتاج قلويدات التروبين داخل وخارج الجسم الحي في نوعي الداتوره *Datura metel* Linn و *Datura innoxia* Mill , أطروحة دكتوراه , جامعة بابل , ص 35
- الخالدي , مؤيد صبري شوكت (2005) إنتاج بعض القلويدات من نوعي نبات الداتوره *Datura Stramonium* و *Datura Innoxia* باستعمال تقنية زراعة الانسجة النباتية , أطروحة دكتوراه , كلية العلوم , جامعة بغداد .
- الراوي , خاشع محمود و عبد العزيز محمد خلف الله (1980) تصميم وتحليل التجارب الزراعيه , دار الكتب للطباعة والنشر , جامعة الموصل , العراق .
- أسلامي, وجيه مظهر (1998). تأثير مستخلصات نبات المديد *Arvensis Convolvulus* والهندال *Ipomea Cairica* في الأداء الحيوي لحشرة من الحنطة *Schizaphis Araminum* , أطروحة دكتوراه فلسفه , كلية العلوم , جامعة بابل .
- تخيلان , عبد العزيز مجيد (2008) . ألمقدمه إلى علم الفطريات , دار دجلة للنشر , الطبعة الأولى , مصر.

□ British Pharma - Copia , (1968). The Pharmaceutical press 17 , Bloomsbury square , London, Wcl, pp, 84-88.

□ **Beug MW, Bigwood J. (1982).** Psilocybin and psilocin levels in twenty species from several genera of wild mushrooms in the Pacific Northwest, U.S.A. *J. Ethnopharm.*, 5, 271-289.

□ **Casale JF. (1985).** An aqueous-organic extraction method for the isolation and identification of psilocin from hallucinogenic mushrooms. *J. Forensic Sci.*, 30, 247-250.

□ **Chang, S. T. (1999).** World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *International J. Med. Mush.* 1: 291–300.

□ **Gartz ,J .(1994).** Extraction and analysis of indole derivatives from fungal biomass. *Journal of Basic microbiology*, Vol 34; 17-22.

□ **Gartz ,J .(1992).** New aspects of the occurrence chemistry and cultivation of European hallucinogenic mushrooms. *Ann.Mus.Civ.Rovereto (Italy),Sec.sci.nat.,8,107-124.*

□ **Gartz J. (1993).** *Narrenschaemme. Psychotrope Pilze in Europa.* Herausforderung an Forschung und Wert system. Editions Heuwinkel. Genf/Neuallschwill.

□ **Harborne, J.B.(1984) .** *Phytochemical methods 2-nd ed* , London , new York , Chapman and Hall, p.288.

□ **Kysilka R, Wurst M. (1990).** A novel extraction procedure for psilocybin and psilocin determination in mushroom samples. *Planta Med.*, 56, 327-328

□ **Royse, D. J. (2002).** Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. *Appl. Microbial. Biotechnol.*58: 527–531.

□ **Semerdzieva M, Wurst M, Koza T, Gartz J.(1986).** Psilocybin in Fruchtkoerpern von *Inocybe aeruginascens*. *Planta Med.*, 47, 83-85.

□ **Wurst M, Kysilka R, Koza T.(1992).** Analysis and isolation of indole alkaloids of fungi by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatograph.*, 593, 201-208

Valentão, P ; Paula B.; Rangel, J ; Ribeiro, B ; Branca M; and Rosa M.(2005). Effect of the Conservation Procedure on the Contents of Phenolic Compounds and Organic Acids in Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) Mushroom, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (12), pp 4925–4931.

[psilocybin from Mushroom](#) Extraction and Purification of Indole Alkaloid Compounds Psilocin, Baeocystin and (*Psilocybe bohemica*)

Abstract

This work was conducted in 2009 to 2010 to extract and purification of some alkaloids compound(Psilocin, [psilocybin](#) and Baeocystin) from Mushroom(*Psilocybe bohemica*) and the content of these compounds were done by Uv-Spectrophotometer at 250 nm , This study include alcohol extraction by using four types of Solvents (ethanol ,methanol , ethanol +methanol and

Acetic acid). Dragendorff and Mayer method were used to test alkaloids. The result revealed that , the high value of [psilocybin](#) were found in methanol solvent in compare with other alkaloids compounds, and showed that increased in Psilocin contents in mixture of methanol + ethanol) solvents in compare with other alkaloids compounds, and decreased in Baeocystin contents in all solvents .