جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقایسه چهل وسه کولتیوار گیاه پروانش از نظر مقدار آلکالوئید ضد سرطان وینبلاستین

دکتر سید ابراهیم سجادی[1]؛ پروفسور رابرت ورپورت[2]

چکیده مقاله.

مقدمه. وینبلاستین یکی از آلکالوئیدهای دارویی است که از گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) استخراج می‌گردد. وجود مقادیر بسیار کم این آلکالوئید در گیاه - که تنها منبع تهیه آن نیز می‌باشد- تحقیقات زیادی را با هدف دستیابی به راههای جدید افزایش تولید این دارو به دنبال داشته است. مطالعهٔ حاضر به منظور انتخاب بهترین کولتیوار از نظر مقدار تولید وینبلاستین انجام شده است.

روشها. برگهای کولتیوارهای مختلف گیاه پروانش به کمک نیتروژن مایع، منجمد و سپس به روش خشک کردن، از حالت جامد (Freeze drying)، خشک گردید. آلکالوئیدهای گیاه توسط حلال تری‌فلورو استیک اسید ۰/۰۶ درصد استخراج و سرانجام آلکالوئید وینبلاستین با استفاده از یک روش گرادیان وتوسط دستگاه HPLC آنالیز شد.

نتایج. کولتیوارهای مختلف مورد بررسی از لحاظ نظر تولید مقدار وینبلاستین در شرایط یکسان متفاوت می‌باشند. کولتیوار *C. roseus* L. (G.DON) با بیشترین مقدار تولید، بیش از ۵/۱ برابر میانگین وینبلاستین تولید شده از مجموع کولتیوارها تولید داشته و کولتیوار *C. roseus* L. (Pacifica Punch) در مقایسه با بقیه کولتیوارها، کمترین مقدار این آلکالوئید را تولید کرده است.

بحث. شناسایی کولتیوارهای مختلف و توصیهٔ کشت کولتیوار برتر گیاه، کمک مؤثری در زمینهٔ افزایش بهره‌دهی تولید وینبلاستین و کاهش قیمت این دارو خواهد بود.

● *واژه‌های کلیدی.* وینبلاستین، پروانش، کاتارانتوس، خرزهره، آلکالوئید.

مقدمه.

آلکالوئید وینبلاستین یکی از داروهای مهم مورد مصرف در شیمی درمانی انواع مختلف سرطان، خصوصاً بیماریهای هوچکین، لنفوم و لوسمی می‌باشد (۱). این داروکه به صورت نمک سولفات و به صورت تزریقی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲)، به طور اختصاصی با باند شدن به میکروتوبولها، سبب متلاشی شدن آنها شده و از تقسیم سلولی جلوگیری می‌نماید. این آلکالوئید در دوز بالا برای سلول، کشنده و در غلظتهای پایین از تقسیم سلولی در مرحله متافاز میتوز جلوگیری می‌کند (۳). علی‌رغم پیشرفتهای زیاد در زمینه سنتز ترکیبات دارویی، آلکالوئید وینبلاستین هنوز از طریق استخراج از گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) که یکی از گیاهان مهم دارویی متعلق به خانواده خرزهره (Apocynaceae) است، به دست می‌آید (۴، ۵).

مهمترین ترکیبات ثانویه در گیاه پروانش، آلکالوئیدهای نوع ایندول هستند که با توجه به ساختمان مولکولی‌شان به دو دسته آلکالوئیدهای منومر و دیمر تقسیم می‌شوند. آلکالوئیدهای دیمر که از لحاظ دارویی حایز اهمیت بالاتری هستند، درصد بسیار پایینی از مجموعه آلکالوئیدهای گیاه را تشکیل می‌دهند (۶). مقادیر بسیار پایین آلکالوئیدهای دیمر در گیاه و اهمیت آنها به عنوان داروهای پر مصرف ضد سرطان، سبب گردیده است که داروی وینبلاستین از قیمت بسیار بالایی برخوردار گردیده و قیمت آن یک میلیون دلار به ازای هر کیلوگرم باشد (۷). ارزش دارویی و اقتصادی این آلکالوئید، موجب تشویق محققان برای بررسی روشهای جدید سنتز (۸) و مطالعه راههای بیوتکنولوژیکی برای تولید ارزانتر این داروی مهم گردیده (۹، ۱۰) ولی تاکنون آلکالوئید دیمر مورد بحث، فقط در کالوس و کشت اندام تولید و تلاش برای تهیه آن به روش کشت سلول بی‌نتیجه مانده است (۱۱).

با توجه به موارد بالا، استراتژی سومی را که می‌توان برای افزایش تولید در نظر گرفت، اصلاح نژاد و بررسی امکان انتخاب کولتیوارهای مختلفی است که احتمالاً درصد بالاتری از این آلکالوئید را تولید می‌کنند. بیش از چهل و سه کولتیوار از این گیاه تاکنون تولید شده که تعدادی از مهمترین آنها عبارتند از:

1- *Catharanthus roseus* (Icy Pink Cooler)
2- *Catharanthus roseus* (Morning Mist)
3- *Catharanthus roseus* (Tropicana Pink)
4- *Catharanthus roseus* (Tall Crimson)
5- *Catharanthus roseus* (Little Blanche)
6- *Catharanthus roseus* (Polka Dot)

با توجه به قیمت بالای آلکالوئید ضد سرطان وینبلاستین و این

۱- گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان، اصفهان.
۲- گروه فارماکوگنوزی، دانشگاه لایدن، لایدن، هلند.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

که تنها راه تهیه این دارو استخراج از گیاه *C. roseus* بوده، هر گونه افزایشی در مقدار درصد این آلکالوئید در گیاه می‌تواند از جنبه اقتصادی ارزش زیادی داشته باشد. هدف اصلی این تحقیق نیز بررسی و مقایسه کولتیوارهای مختلف *C. roseus* به منظور انتخاب بهترین کولتیوار از نظر تولید آلکالوئید وینبلاستین و توصیه کشت آن می‌باشد.

روشها.

● **تهیه و خشک نمودن نمونه.** با توجه به این که خشک نمودن برگها به روش خشک کردن از حالت جامد (Freeze drying) نسبت به روش خشک کردن در هوای آزاد از نظر درصد آلکالوئیدهای استخراجی، دارای راندمان بالاتری بوده و با عنایت به این مطلب که میزان آلکالوئیدهای گیاه در بوته‌های جوان نسبت به بوته‌های مسن بیشتر می‌باشد (در برگهای جوان گیاه هفت ماهه گلدار بالاترین مقدار است) (۱۲)، بنابراین در تاریخ ۷۷/۷/۱۰ برگهای جوان ۴۳ کولتیوار مختلف با شرایط ذکر شده در بالا که در بخش باغ گیاهان دارویی دانشگاه لایدن در کشور هلند مورد شناسایی قرار گرفته بود (۱۳)، جمع آوری و پس از قرار دادن در ورقه‌های آلومینیومی، بلافاصله توسط نیتروژن مایع منجمد و سپس توسط دستگاه خشک‌کن از این حالت، جامد و در مدت ۴۸ ساعت خشک گردید.

● **انتخاب حلال مناسب برای استخراج آلکالوئید.** حدود ۱۰ میلی‌گرم از پودر برگهای خشک شده گیاه پروانش (سه نمونه در مورد هر حلال) توزین و پس از اضافه نمودن ۱۰ میکروگرم از دی‌هیدروکینین (Dihydroquinine) به عنوان استاندارد داخلی به هر کدام از نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر از حلالهای مختلف ذکر شده در جدول ۱ به آن اضافه و پس از مخلوط کردن توسط دستگاه ورتکس (Vortex)، عمل استخراج آلکالوئید به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اولتراتوراکس (Ultra Turrax) انجام گردید. پس از سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها (۱۶۰۰ جی و به مدت ۲۰ دقیقه)، محلول فوقانی جداسازی و پس از اضافه نمودن مجدد یک میلی لیتر از حلال و مخلوط کردن آن توسط دستگاه ورتکس، عمل استخراج توسط دستگاه سونیکاتور (Sonicator) به مدت ۳۰ دقیقه پی‌گیری شده و پس از سانتریفوژ کردن مجدد در شرایط ذکر شده در بالا، محلولهای فوقانی به هم اضافه و از هر کدام از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق گردید (۱۲). مقدار وینبلاستین و دی‌هیدروکینین که به کمک حلالهای مختلف استخراج شده بود تعیین و با هم مقایسه شد و مناسب‌ترین حلال برای انجام این پژوهش انتخاب گردید.

● **استخراج وینبلاستین از کولتیوارهای مورد بررسی.** پس از انتخاب حلال تری‌فلوراستیک اسید ۰/۰۶ درصد به عنوان مناسب‌ترین حلال، وینبلاستین موجود در کولتیوارهای مختلف گیاه پروانش (از هر کولتیوار سه نمونه) به روش ذکر شده در بالا استخراج گردید.

● **آنالیز وینبلاستین در عصاره‌های تهیه شده.** برای آنالیز آلکالوئید مورد بررسی از دستگاه HPLC با مشخصات زیر استفاده گردید:

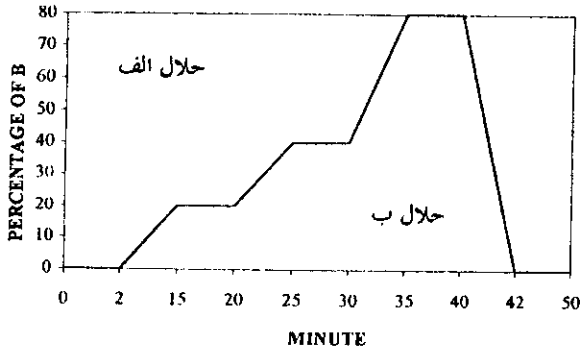
Waters 712 WISP Automated Injection System
Waters 600E System Controller
Waters 991 Photodiod Array Detector
μ Bondapack Phenyl Coulumn (3.9 i.d., 200mm, 10μm)

فاز متحرک مورد استفاده در این پژوهش که توسط یک برنامه گرادیان مورد استفاده قرار گرفت عبارتست از:

● حلال الف: محلول فسفات بافر ۴۰ میلی مولار (pH=۳/۹):
۲-متوکسی اتانل: استونیتریل (۱۵:۵:۸۰)

● حلال ب: محلول فسفات بافر ۴۰ میلی مولار (pH=۳/۹):
۲-متوکسی اتانل: استونیتریل (۵۰:۵:۴۵)

همچنین برنامه غلظتی مورد استفاده در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد. در این برنامه زمان لازم برای یک تزریق کامل ۵۰ دقیقه می‌باشد.



نمودار ۱. برنامه گرادیان مورد استفاده در آنالیز وینبلاستین در چهل و سه کولتیوار گیاه پروانش.

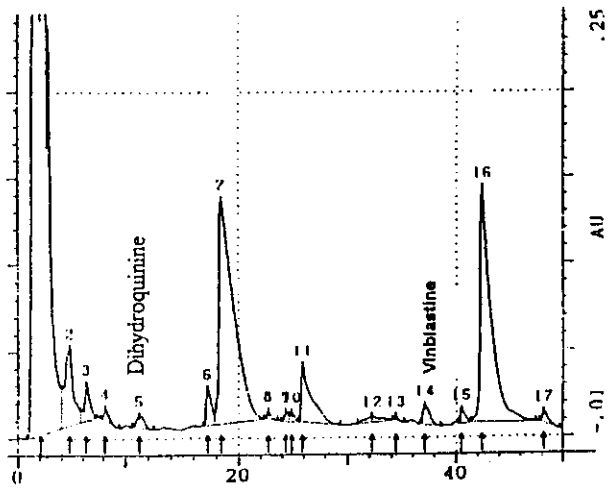
نتایج.

● **انتخاب بهترین حلال.** جدول ۱ نتایج مقایسه‌ای استخراج وینبلاستین و دی‌هیدروکینین توسط حلالهای مختلف و همچنین pH محلول که در رسوب کلروفیل می‌تواند نقش داشته باشد را نشان می‌دهد. همانطوری که مشاهده می‌گردد حلال تری‌کلرو استیک اسید قابلیت استخراج وینبلاستین را ندارد و از بین بقیه حلالها، اسید فسفریک ۰/۰۲۵ مولار، اسید سولفوریک ۰/۰۲۵ مولار و تری فلورو استیک اسید ۰/۰۶ درصد، بهترین استخراج را داشته‌اند. با توجه به اینکه کلروفیل تنها در موردی که از تری‌فلورواستیک اسید ۰/۰۶ درصد استفاده می‌گردد، کاملا رسوب نموده و در نتیجه حلال فوقانی عاری از کلروفیل می‌گردد و در این حالت برای تزریق به دستگاه HPLC بسیار مناسب می‌باشد، بنابراین، تری‌فلورواستیک اسید ۰/۰۶ درصد به عنوان بهترین حلال در این آنالیز مورد انتخاب قرار گرفت.

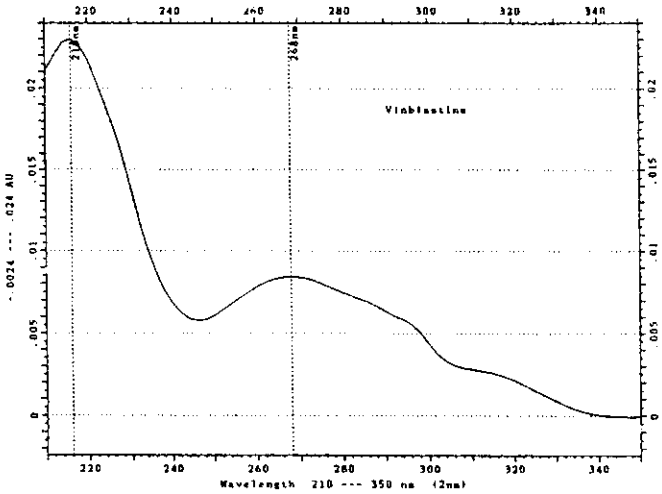
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱. نتایج مقایسه‌ای استخراج وینبلاستین و دی هیدروکینین توسط منتخبی از بهترین حلالهای مورد استفاده در استخراج آلکالوئیدهای گیاه پروانش

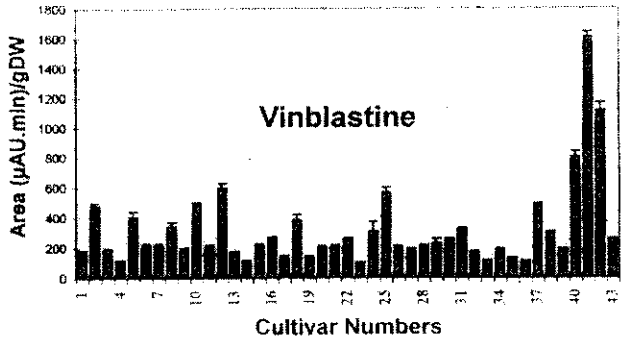
حلال مورد استفاده	pHمحلول	pHرسوب	وضعیت کلروفیل	درصد مقایسه‌ای استخراج وینبلاستین	درصد مقایسه‌ای استخراج دی‌هیدروکینین
اسید کلریدریک ۰/۱ملار: متانول ۱:۱	۱/۵	۱/۵	در محلول فوقانی	٪۹۳	٪۹۴
اسید کلریدریک ۰/۰۲۵ملار	۱/۵	۱/۵	در محلول فوقانی	٪۸۹	٪۹۸
اسید سولفوریک۰/۰۲۵ملار	۱/۵	۱/۵	در محلول فوقانی	٪۹۷	٪۶۳
تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪	۰/۵	۰/۵	در محلول فوقانی	٪۰	٪۲۹
تری‌فلورواستیک اسید ۰/۰۶	۱/۵	۳	کاملا در رسوب	٪۹۹	٪۱۰۰
اسید فسفریک ۰/۰۲۵ ملار	۱/۵	۲/۵	دررسوب وکمی‌درمحلول‌فوقانی	٪۱۰۰	٪۹۸



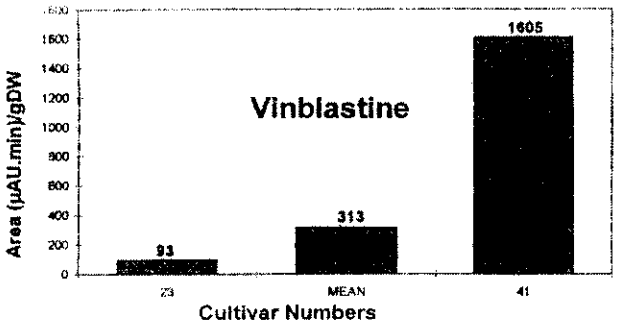
نمودار ۲. کروماتوگرام HPLC حاصل از تزریق یک نمونه از عصاره آلکالوئیدی برگ گیاه پروانش



نمودار ۳. طیف ماورای بنفش وینبلاستین.



نمودار ۴. مقایسه آلکالوئید وینبلاستین تولید شده در برگ چهل و سه کولتیوار گیاه پروانش



نمودار ۵. مقایسه بین کولتیوارهایی که بیشترین و کمترین مقدار آلکالوئید را تولید کرده‌اند با میانگین آلکالوئید تولید شده در کل کولتیوارهای مورد مطالعه.

پس از تزریق ۱۲۹ نمونه از ۴۳ کولتیوار مورد بررسی، آلکالوئید وینبلاستین در طول موج ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. زمان خروج از ستون (Rt) برای وینبلاستین ۳۷/۱ دقیقه می‌باشد. کروماتوگرام حاصل از یکی از نمونه‌های تزریق شده در نمودار ۲ مشاهده می‌گردد. شناسایی ترکیب به کمک زمان خروج از ستون، طیف ماورای بنفش آن (نمودار ۳) و با استفاده از وینبلاستین استاندارد صورت گرفت.

نمودار ۴ مقایسه انجام شده بین کولتیوارهای مختلف را از نظر تولید وینبلاستین در برگ آنها نشان می‌دهد. همان طوری که مشاهده می‌شود محور افقی نمودار، شماره کولتیوارهای مورد

بررسی و محور عمودی نمودار، مقدار سطح زیر منحنی (برحسب μAU.min) مربوط به یک گرم از پودر خشک شده برگ گیاه را نشان می‌دهد. با مقایسه اعداد به دست آمده، مشخص می‌شود که کولتیوار شماره چهل ویک *C. roseus* L. (G. DON) بیشترین مقدار وینبلاستین را تولید کرده است که این مقدار در مقایسه با میانگین آلکالوئید تولید شده در کل کولتیوارها ۵/۱ برابر است. از طرف دیگر، کولتیوار شماره بیست و سه *C. roseus* L (Pacifica Punch) کمترین مقدار وینبلاستین را در بین کولتیوارها دارا می‌باشد (نمودار ۵).

بحث.

کولتیوارهای مختلف این گیاه از لحاظ میزان درصد آلکالوئید وینبلاستین دارای تفاوت قابل توجهی هستند. اگر چه کولتیوارهای مختلف یک گیاه زیر مجموعه‌های یک گونه محسوب می‌شوند، ولی به هرحال، مشاهده تفاوتهای مواد ایجاد شده در کولتیوارهای مختلف قابل بحث می‌باشد. این مسأله در مورد تولید ترکیبات اوّلیه مانند نشاسته، به خوبی در کولتیوارهای مختلف گندم مشاهده می‌گردد. بنابراین، با توجه به این مطلب که ترکیبات ثانویه از ترکیبات اوّلیه در گیاه ایجاد می‌گردند، مشاهده می‌شود که کولتیوارهای مختلف یک گیاه، مقادیر متفاوتی از یک آلکالوئید را در شرایط یکسان ایجاد نموده‌اند. این مسأله علاوه بر قابلیت تعمیم به مواد مؤثر دیگر، در این مورد، به خصوص با توجه به ارزش اقتصادی وینبلاستین، می‌تواند اهمیت بسیار بالایی داشته باشد. با توصیه کشت کولتیوار برتر در زمینه تولید وینبلاستین می‌توان کمک زیادی به افزایش راندمان تولید و کاهش قیمت این داروی مهم نمود.

مراجع.

1- Dollery C. Therapeutic drugs. Vol. 2, London: Churchill Livingstone Co. 1999: 34.

2- Martindale, The extra pharmacopoeia. 31st Ed. London: Royal Pharmaceutical Society 1996: 605.

3- Anderson PO, Knoben E, Troutman WG. Handbook of clinical drug data. 9th Ed. Illinois: Appleton & Lang 1999: 254.

4- Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. Pharmacognosy. 9th Ed, Philadelphia: Lea & Febiger, 1985; 225.

5- Morten JF. Major medicinal plants. Illinois: Charles C Thomas Publisher 1977: 237.

6- Evans WC. Trease and Evans pharmacognosy. 13th Ed. London: Bailliere Tindall 1989: 651-3.

7- Moreno PR. Influence of stress factors on the secondary metabolism in suspention cultured Catharanthus roseus cells. PhD. thesis, Leiden University 1997: 9.

8- Kuteny JP, Choi LS, Nakano J, Tsukamoto H, Mchugh M, Boulet CA. A highly efficient and commercially important synthesis of antitumor Catharanthus alkaloids vincristine and vinblastine and leurosidine from catharanthine and vindoline, Heterocycles, 1988: 27: 1845-53.

9- Verpoorte R, Van der Heijden R, Schripsema J, Hoge JH, Ten Hoopen HJ. Plant biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects. J Nat Products 1993; 56: 186-207.

10- Van der Heijden R, Verpoorte R, Ten Hoopen HJ, Ten Hoopen HJ. Plant biotechnology for the production of alkaloids; Present status and prospects. J Nat Products 1993; 56: 186-207.

11- Miura Y, Hirata K, Kurano N, Myamoto K, Uchida K. Formation of vinblastine in multiple shoot culture of Catharanthus roseus. Planta Med 1988; 54: 18-20.

12- Holton FL. Verslag van stage op de ofdeling farmacognosie van de Rijks Universiteit, Leiden: Leiden University 1996: 24.

13- Snoeijer W. Catharanthus roseus, The Madagascar perwinkle, A review of it's cultivars, Wageningnen: Wageningen Agricultral University 1998: 6-41.