بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

ریزازدیادی و بررسی آلکالوئیدهای دارویی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) در شرایط آزمایشگاهی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

فروغ اعتصام

اساتید راهنما

دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی

دکتر مجید طالبی

استاد مشاور :

دکتر محمد سراجی

۱۳۹۰

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی خانم فروغ اعتصام

تحت عنوان

ریزازدیادی و بررسی آلکالوئیدهای دارویی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) در شرایط آزمایشگاهی

در تاریخ ۱۳۹۰/۱/۱۷ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱-استاد راهنمای پایان نامه	دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی
۲-استاد راهنمای پایان نامه	دکتر مجید طالبی
۳-استاد مشاور پایان نامه	دکتر محمد سراجی
٤-استاد داور	دکتر سیروس قبادی
٥-استاد داور	دکتر مهدی رحیم ملک
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر احمد ریاسی

سپاس بر آستان معبودی می ستایم که حکمت و دست پرتوان اراده‌اش مرا در اقیانوس ژرف و پر تلاطم زندگی، بی یار و ناامید نگذاشت و شالوده علم و دانش را در وجودم سرشت و جانم را تشنه آموختن آفرید.

زلال ترین سپاس‌ها را تقدیم می کنم به خانواده عزیزم برای خالصانه ترین محبت‌ها و سبزترین فداکاری‌هایشان.

از همسر عزیزم که همواره یار و یاور من بوده است، برای فداکاری‌ها، دلگرمی‌ها و حمایت‌هایش بسیار سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر طباطبایی و دکتر طالبی، برای زحمات بی دریغ، پشتیبانی‌ها و راهنمایی‌های ارزنده ایشان و همچنین جناب آقای دکتر سراجی که در طول این دوره، توفیق بهره گیری از مشاوره‌های مفیدشان را داشتم کمال تشکر و قدردانی را دارم.

صمیمانه ترین سپاس‌ها را تقدیم می کنم به اساتید ارجمند، جناب آقای دکتر قبادی و دکتر رحیم ملک که زحمت بازخوانی این پایان نامه را به عهده گرفتند و کمال همکاری را با اینجانب نمودند.

از آقایان مهندس بهرامی، مهندس محمدی، فرجمند، عباسیان و خانم‌ها خاکسار، شمس، محب محمدی و قنبری برای کمک‌های صمیمانه و زحمات بی دریغشان سپاسگزارم.

از تمام اساتید، دوستان و همکلاسی‌هایم که در آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی، شیمی و صنایع غذایی از تجربه‌ها، کمک‌ها و دوستی‌هایشان بهره بردم تشکر می کنم.

فروغ اغتصام

بهار ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه (رساله) متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به:

دو بیکران بی همتا — پدر و مادر عزیزم

تجلی گاه عشقی پاک — همسر مهربانم

یاران همیشگی ام — خواهران خوبم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب..... هشت
فهرست جدول‌ها.....یازده
فهرست شکل‌ها.....دوازده
چکیده.....۱

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- اهداف و اهمیت پژوهش.....۲
۱-۲- تاکسونومی پروانش.....۳
۱-۳- نیازهای اکولوژیک و بیماری‌های پروانش.....۶
۱-۴- اهمیت، کاربرد و خواص دارویی پروانش.....۶
۱-۵- متابولیت‌های ثانویه.....۹
۱-۶- آلکالوئیدها.....۱۰
۱-۷- اهمیت وینکا آلکالوئیدها.....۱۲
۱-۸- نحوه عملکرد وینکا آلکالوئیدها.....۱۳
۱-۹- وین‌بلاستین.....۱۶
۱-۱۰- وین‌کریستین.....۱۷
۱-۱۱- کشت بافت و کشت سوسپانسیونی پروانش ۱۸
۱-۱۲- روش‌های متداول استخراج آلکالوئیدها.....۲۷
۱-۱۳- ریزاستخراج فاز مایع(LPME) ۲۸
۱-۱۴- کاربرد روش HF-LPME در استخراج آلکالوئیدها.....۳۱
۱-۱۵- پارامترهای موثر بر بازیابی استخراج HF-LPME.....۳۳
۱-۱۵-۱- فیبر توخالی ۳۳
۱-۱۵-۲- حلال آلی ۳۴
۱-۱۵-۳- سرعت هم زدن محلول.....۳۴
۱-۱۵-۴- pH محلول های پذیرنده و دهنده.....۳۴

۱-۱۵-۵- زمان استخراج ۳۵
۱-۱۶- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۳۵

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت بافت و مواد گیاهی..... ۳۶
۲-۱-۱- تهیه مواد شیمیایی..... ۳۶
۲-۱-۲- تهیه مواد گیاهی..... ۳۷
الف- ضدعفونی گیاه..... ۳۷
ب- انتقال قطعات گیاه به محیط کشت..... ۳۷
۲-۲- آزمایش‌های کشت بافت..... ۳۹
۲-۳- تولید ریشه در نمونه‌های باززا شده..... ۴۲
۲-۴- اندازه‌گیری پارامترها..... ۴۲
۲-۴-۱- اندازه‌گیری میزان کالوس..... ٤۲
۲-۴-۲- اندازه‌گیری تعداد شاخه‌ها..... ۴۲
۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری..... ۴۴
۲-۶- آنالیز نمونه‌ها با HPLC ۴۴
۲-۶-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز..... ۴۴
۲-۶-۲- مواد شیمیایی و محلول‌های مورد نیاز..... ۴۵
۲-۶-۳- تهیه محلول‌های استاندارد..... ۴۵
۲-۷- روش کلی استخراج..... ۴۵
۲-۸- بررسی برخی پارامترهای موثر در استخراج..... ۴۶
۲-۹- آماده سازی نمونه‌های حقیقی..... ۴۷
۲-۱۰- آنالیز نمونه‌های حقیقی..... ۴۷

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- کشت جوانه (گره) در محیط کشت حاوی زغال و بدون زغال فعال..... ٤۸
۳-۲- باززایی غیر مستقیم ریزنمونه برگ..... ۵۰

۳-۲-۱- تولید کالوس از ریزنمونه برگ..... ۵۰
۳-۲-۲- باززایی کالوس‌ها..... ۵۳
۳-۳- باززایی مستقیم ریزنمونه گره..... ۵۷
۳-۳-۱- تعیین بهترین محیط کشت از نظر غلظت زغال فعال..... ۶۰
۳-۳-۲- تعیین بهترین نوع هورمون سایتوکنین در تکثیر شاخه‌ها..... ۶۱
۳-۳-۳- تعیین بهترین محیط کشت برای رشد طولی مناسب شاخه‌ها..... ۶۳
۳-۳-۴- استفاده از PVP در محیط کشت تکثیر شاخه‌ها..... ۶۵
۳-٤- ریشه‌دهی ساقه‌ها..... ۶۶
۳-۵- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک..... ۶۷
۳-۶- آنالیز نمونه‌ها با HPLC..... ۶۸
۳-۶-۱- روش استخراج آلکالوئیدها..... ۶۸
۳-۶-۲- بررسی برخی پارامترهای موثر در استخراج..... ۶۹
۳-۶-۳- آنالیز نمونه‌های حقیقی..... ۷۱
۳-۶-۴- آنالیز آلکالوئیدهای گیاهان باززا شده در محیط کشت‌های مناسب برای ریز ازدیادی..... ۷۶

فصل چهارم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۴-۱- نتیجه‌گیری کلی..... ۸۲
۴-۲-پیشنهادها..... ۸۴

منابع..... ۸۶
پیوست‌ها..... ۹۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

فصل اول

جدول ۱-۱- جزئیات رده‌بندی گیاه پروانش..... ٤

جدول ۱-۲- جزئیات برخی روش‌های HF-LPME مورد استفاده در استخراج آلکالوئیدها..... ۳۲

فصل دوم

جدول ۲-۱- ترکیب نمک‌های پرمصرف محیط کشت MS..... ۳۷

جدول ۲-۲- ترکیب نمک‌های کم مصرف محیط کشت MS..... ۳۸

جدول ۲-۳- ویتامین‌ها وترکیبات آلی محیط کشت MS..... ۳۸

جدول ۲-۴- باززایی مستقیم ریزنمونه گره..... ۴۰

جدول ۲-۵- باززایی غیر مستقیم ریزنمونه برگ (تولید کالوس)..... ۴۱

جدول ۲-۶- باززایی کالوس‌های ریز نمونه برگ..... ۴۲

فصل سوم

جدول ۳-۱- نتایج تجزیه واریانس صفت کالوس‌دهی..... ۵۱

جدول ۳-۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌دهی در تیمارهای هورمونی مختلف..... ۵۱

جدول ۳-۳- نتایج تجزیه واریانس صفت تکثیر شاخه..... ۵۸

جدول ۳-۴- مقایسه میانگین تعداد شاخه‌ها در محیط کشت‌های مختلف..... ۵۹

جدول ۳-۵- مقدار آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در گیاهان باززا شده..... ۷۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

فصل اول

شکل ۱-۱- شکل ظاهری گیاه پروانش.....۵
شکل ۱-۲- ساختار مولکولی برخی از آلکالوئیدهای گیاه پروانش.....۸
شکل ۱-۳- ساختار میکروتوبول‌ها.....۱٤
شکل ۱-٤- سازمان‌دهی رشته‌های دوک در مرحله متافاز تقسیم میتوز ۱٤
شکل ۱-۵- به دام افتادن کروموزوم‌ها توسط میکروتوبول‌ها.....۱۵
شکل ۱-۶- مقایسه نحوه تاثیر وینکا آلکالوئیدها و تاکسان‌ها در توقف تقسیم میتوز.....۱۶
شکل ۱-۷- مسیر سنتز برخی آلکالوئیدهای ایندولی‌ترپنوئیدی.....۲۰
شکل ۱-۸- نقش بخش‌های مختلف سلول در بیوسنتز آلکالوئیدها.....۲۲
شکل ۱-۹- تصویری میکروسکوپی از سطح مقطع یک غشاء پلیمری متخلخل.....۲۹
شکل ۱-۱۰- نحوه قرارگیری فازها در HF-LPME دو فازی و سه‌فازی.....۳۰
شکل ۱-۱۱- طرحی از پیکربندی HF-LPME سه فازی آرایش U شکل.....۳۳
شکل ۱-۱۲- طرحی از پیکربندی HF-LPME سه فازی آرایش میله‌ای.....۳۳

فصل دوم

شکل ۲-۱- تخمین مقدار کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ.....۴۳
شکل ۲-۲- تخمین تعداد شاخه‌های حاصل از باززای مستقیم ریزنمونه گره.....۴۳

فصل سوم

شکل ۳-۱- گیاه پروانش در محیط کشت MS حاوی زغال فعال پس از حدود ۲ ماه.....۴۹
شکل ۳-۲- گیاهان کشت شده در محیط کشت بدون زغال فعال و حاوی زغال فعال.....۵۰
شکل ۳-۳- ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت بدون زغال فعال.....۵۲
شکل ۳-۴- کالوس‌های ریزنمونه برگ.....۵۳
شکل ۳-۵- کالوس، گیاهان باززا شده در محیط بدون زغال فعال و انتقال گیاهان باززا شده به محیط حاوی زغال فعال..۵۵
شکل ۳-۶- نمودار اثر افزایش غلظت هورمون NAA (mg/l) در تولید کالوس ریزنمونه برگ.....۵۶

شکل ۳-۷- نمودار اثر افزایش غلظت BAP (mg/l) در تولید کالوس ریزنمونه برگ در تیمارهای 2,4-D.....۵۷
شکل ۳-۸- نمودار اثر افزایش غلظت IAA (mg/l) در تولید کالوس ریزنمونه برگ.....۵۷
شکل ۳-۹- نمودار اثر غلظت‌های مختلف زغال فعال و هورمون BAP در تکثیر شاخه‌ها.....۶۰
شکل ۳-۱۰- تکثیر شاخه در محیط حاوی BAP در محیط کشت حاوی زغال فعال و بدون زغال فعال.....۶۱
شکل ۳-۱۱- نمودار اثر نوع هورمون سایتوکنین در تکثیر شاخه‌ها در محیط حاوی ۱g/l زغال فعال.....۶۱
شکل۳-۱۲- تکثیر شاخه در محیط کشت حاوی ۱ g/l زغال فعال، رشد طولی زیاد ریزنمونه‌ها در محیط حاوی هورمون Kin. بدون تکثیر جوانه‌ها و تکثیر شاخه در محیط حاوی هورمون Zea.....۶۳
شکل ۳-۱۳- تشکیل بافت کالوس در زیر ریزنمونه در محیط کشت حاویBAP و NAA.....۶۴
شکل ۳-۱۴- گیاهان با رشد طولی کم و افزایش رشد طولی گیاهان در محیط کشت حاوی NAA.....۶۵
شکل ۳-۱۵- شاخه‌های تکثیر شده در محیط کشت حاوی PVP.....۶۵
شکل ۳-۱۶- تشکیل ریشه شاخه‌های انفرادی در محیط کشت فاقد هورمون و حاوی ۲ گرم در لیتر زغال فعال.....۶۶
شکل ۳-۱۷- تشکیل مستقیم ریشه در گیاهان چند شاخه در محیط کشت حاوی BAP.....۶۷
شکل ۳-۱۸- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک.....۶۷
شکل ۳-۱۹- پیکربندی سیستم استخراج HP-LPME برای استخراج آلکالوئیدها.....۶۹
شکل ۳-۲۰- بهینه‌سازی روش استخراج عصاره گیاه. A: با اسید استیک- B: با اسید فسفوریک.....۷۰
شکل ۳-۲۱- بهینه‌سازی روش استخراج. A: اسید استیک ۰/۰۵ درصد و pH=۸/۵- B: اسید استیک ۰/۱ درصد و pH=۸/۵- C: اسید استیک ۰/۱ درصد و pH=۱۱/۵.....۷۱
شکل ۳-۲۲- طیف جذب UV آلکالوئیدهای وین‌بلاستین، وین‌کریستین، وین‌دولین و کاتارانتین.....۷۴
شکل ۳-۲۳- نمودار غلظت آلکالوئید وین‌کریستین در گیاهان باززا شده.....۷۶
شکل ۳-۲۴- نمودار غلظت آلکالوئید وین‌بلاستین در گیاهان باززا شده.....۷۸

چکیده

گونه گیاهی *Catharanthus roeus* (L.) G. Don که عمدتا با نام پروانش ماداگاسکاری شناخته می‌شود گیاهی از خانواده آپوسیناسه می‌باشد که منشا آن مناطق حاره و گرمسیر مانند جنوب هند، اندونزی و ماداگاسکار گزارش شده اما امروزه در سراسر دنیا گسترش یافته است. این گیاه حاوی بیش از ۱۳۰ نوع آلکالوئید ایندولی ترپنوئیدی (TIAs) می‌باشد که در میان آن‌ها، دو آلکالوئید دایمری وین‌بلاستین و وین‌کریستین دارای خاصیت ضد تومور بوده و برای درمان بسیاری از سرطان‌ها کاربرد دارند. اما در مقابل تقاضای بالا برای این داروها، مقدار آن‌ها در گیاه پروانش که تنها منبع آن نیز می‌باشد بسیار کم است. پیچیدگی و چند مرحله‌ای بودن مسیر سنتز این دو آلکالوئید و وجود مراکز کایرال چندگانه، تولید اختصاصی برخی پیش‌ماده‌های مسیر سنتز آن‌ها در بافت‌های تخصص یافته، اثر بخشی کمتر داروهای نیمه‌سنتزی نسبت به انواع طبیعی و تقاضای بالا برای این دو دارو از مهمترین دلایلی می‌باشند که توجه محققان را به استفاده از روش‌های بیوتکنولوژیک و کشت بافت برای افزایش تولید این آلکالوئیدهای حیاتی در گیاه جلب نموده است. در این پژوهش با هدف تعیین بهترین محیط کشت جهت ریزازدیادی و افزایش میزان آلکالوئیدهای ضد سرطان وین‌بلاستین و وین‌کریستین در گیاه پروانش، ۲۵ ترکیب هورمونی برای تولید کالوس از ریزنمونه برگ، ۷ تیمار برای باززایی کالوس‌ها و ۳۰ محیط کشت برای باززایی مستقیم ریزنمونه گره در نظر گرفته شد. سپس آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در گیاهان باززا شده به روش ریز استخراج فاز مایع مبتنی بر فیبر توخالی (HF-LPME) استخراج و توسط کروماتوگرافی مایع جفت یونی آنالیز شدند. نتایج نشان داد که باززایی غیر مستقیم ریزنمونه برگ، به‌دلیل باززایی مشکل کالوس‌ها، احتمال ایجاد جهش و تعداد کم شاخه‌های تولید شده در این روش نسبت به باززایی مستقیم، روشی مناسب برای ریزازدیادی گیاه پروانش نمی‌باشد. اما استفاده از هورمون BAP در محیط کشت حاوی g/l ۱ زغال فعال بهترین باززایی مستقیم ریزنمونه گره و تکثیر شاخه را نشان داد. همچنین با افزایش غلظت BAP و کاهش غلظت زغال فعال، مقدار آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین افزایش یافت. بنابراین اگرچه به دلیل وجود ترکیبات فنلی فراوان در گیاه پروانش، استفاده از زغال فعال در محیط کشت برای رشد گیاه الزامی می‌باشد اما به دلیل اثر منفی آن در جذب هورمون‌ها و در نتیجه آن کاهش تکثیر شاخه و تولید آلکالوئیدها، مقدار مصرفی آن در محیط کشت مهم می‌باشد و به‌نظر می‌رسد غلظت g/l ۱ زغال فعال مقدار مناسبی برای تهیه محیط کشت های تکثیر شاخه باشد. همچنین انتقال شاخه‌های باززا شده به محیط کشت حاوی NAA، سبب افزایش رشد طولی شاخه‌ها شد اما مقدار آلکالوئیدهای دایمری را کاهش داد. این کاهش غلظت در مورد آلکالوئید وین کریستین بیش از آلکالوئید وین بلاستین می‌باشد. در روش استخراج HF-LPME نیز بهترین استخراج آلکالوئیدها در اسید استیک ۰/۱مولار به عنوان فاز پذیرنده، pH:۱۱/۵ برای فاز دهنده و اسید فسفوریک ۰/۱ مولار برای استخراج عصاره گیاه انجام شد. به دلیل شویش همزمان آلکالوئیدهای دایمری و مونومرهای آن‌ها به‌نظر می‌رسد، استفاده از جفت یون منفی سدیم‌بوتان‌سولفونات ($C_4H_9NaO_3S$) در بافر HPLC روش مناسب‌تری برای جداسازی آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌باشد.

کلمات کلیدی: پروانش؛ ریزازدیادی؛ وین‌بلاستین؛ وین‌کریستین؛ ریزاستخراج فاز مایع؛ کروماتوگرافی جفت یونی.

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- اهداف و اهمیت پژوهش

قدمت شناخت خواص دارویی گیاهان بسیار طولانی است. یکی از دلایل مهم این قدمت، حضور باورهای ریشه‌دار مردم سرزمین‌های مختلف در خصوص استفاده از گیاهان دارویی است. اطلاعات مربوط به اثرها و خواص دارویی گیاهان، از زمان‌های بسیار دور سینه به سینه منتقل گشته، با آداب و سنن قومی درآمیخته و سرانجام در اختیار نسل‌های معاصر قرار گرفته است [۲]. تاکنون خصوصیات دارویی حدود سی هزار گونه از ششصد هزار گونه گیاهی جهان شناخته شده است و از میان باقی آن‌ها، گهگاه مواد موثره جدید و بسیار ارزشمندی کشف می‌گردد. در حال حاضر یک سوم داروهای مورد استفاده بشر، منشا گیاهی دارند و این میزان مسلما رو به افزایش است. براساس گزارش بانک جهانی، در سال ۱۹۹۶، میزان تجارت گیاهان دارویی تا سال ۲۰۵۰ بالغ بر ۵ تریلیون دلار خواهد بود [۵۱].

تهیه برخی از مواد موثره که در صنایع دارویی اهمیت بسیاری دارند به طور مصنوعی امکان‌پذیر نیست و فقط به صورت طبیعی از گیاهان مورد نظر قابل استخراج هستند. این دسته از مواد یا به طور کلی ساختار شیمیایی ناشناخته‌ای دارند و یا به دلیل داشتن ساختمان شیمیایی بسیار پیچیده، تهیه آنها به صورت مصنوعی در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه بسیار زیاد است. گلیکوزیدهای موجود در گل انگشتانه‌ای[1] و آلکالوئیدهای موجود در پروانش[2] از این دسته می‌باشند [۲].

---

[1]- *Digitalis lanata*
[2]- Periwinkle

از میان ۱۳۰ نوع آلکالوئیدی ایندولی ترپنوئیدی که در گیاه پروانش شناسایی شده است، آلکالوئیدهای وین‌بلاستین[۱] و وین‌کریستین[۲] از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. زیرا این دو آلکالوئید از طریق اتصال به میکروتوبول‌ها و توقف تقسیم سلولی در طی متافاز میتوز، خاصیت ضد توموری داشته و در شیمی‌درمانی بسیاری سرطان‌ها کاربرد دارند. مقدار بسیار کم این دو آلکالوئید در گیاه پروانش که تنها منبع تهیه آن‌ها نیز می‌باشد، پیچیدگی و چند مرحله‌ای بودن مسیر سنتز این دو آلکالوئید و وجود مراکز کایرال چندگانه، تولید اختصاصی برخی پیش‌ماده‌های مسیر سنتز آن‌ها در بافت‌های تخصص یافته، اثر بخشی کمتر داروهای نیمه‌سنتزی نسبت به انواع طبیعی و تقاضای بالا برای این دو دارو از مهمترین دلایلی می‌باشند که توجه محققان را به استفاده از روش‌های بیوتکنولوژیک و کشت بافت برای افزایش تولید این آلکالوئیدهای حیاتی در گیاه جلب نموده است. روش‌های ریزازدیادی به دلیل تکثیر غیر جنسی گیاهان در شرایطی کنترل شده، امکان تکثیر یکنواخت گیاه در مدت زمان کوتاه‌تر و افزایش تولید فراورده‌های مفید آن‌ها را فراهم می‌کند. هدف از این تحقیق ارائه تکنیکی مناسب برای ریزازدیادی و تکثیر گیاه پروانش در شرایطی است که تاثیری مثبت بر میزان آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین داشته باشد و همچنین معرفی روشی مناسب برای استخراج این دو آلکالوئید و بهینه سازی روش آنالیز آن‌ها توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۳] (HPLC) می‌باشد.

۱-۲- تاکسونومی پروانش

تیره خرزهره[۴] به دلیل دارا بودن آلکالوئیدهای فراوان، یکی از ارزشمندترین تیره‌های گیاهی به شمار می‌آید و تقریبا تمام گیاهان متعلق به این تیره حاوی آلکالوئید یا گلیکوزید می‌باشند. گیاهان این تیره شامل حدود ۳۰۰ جنس و ۱۳۰۰ گونه‌اند که عمدتا در نواحی گرمسیری می‌رویند اما فقط تعداد معدودی از گونه‌های آن به عنوان گیاه دارویی شناخته شده‌اند. شاخص ترین گیاه این تیره، وینکا روزه‌آ[۵]یا پروانش نام دارد که بر اساس مطالعات کموتاکسونومیک و به‌دلیل تفاوت نوع آلکالوئیدهای آن با جنس وینکا، به جنس کاتارانتوس منتقل شده و کاتارانتوس روزئوس[۶] نامیده می‌شود. این گیاه به‌دلیل خواص دارویی شگفت انگیز خود، از حدود یکصدسال پیش، در طب سنتی کاربرد داشته و پژوهش‌های بسیاری پیرامون آن انجام شده است [۱، ۷]. جدول ۱-۱ جزئیات رده‌بندی این گیاه را نشان می‌دهد.

---

[1]- Vinblastine
[2]- Vincristine
[3]- High performance liquid chromatography
[4]- Apocynaceae
[5]- *Vinca rosea*
[6]- *Catharanthus roseus*

جدول۱-۱- جزئیات رده‌بندی گیاه پروانش

Kingdom	*Plantae* – Plants
Subkingdom	*Tracheobionta* – Vascular plants
Superdivision	*Spermatophyta* – Seed plants
Division	*Magnoliophyta* – Flowering plants
Class	*Magnoliopsida* – Dicotyledons
Subclass	*Asteridae*
Order	*Gentianales*
Family	*Apocynaceae* – Dogbane family
Genus	*Catharanthus* G. Don – periwinkle
Species	*Catharanthus roseus* (L.) G. Don – Madagascar periwinkle

پروانش (*Catharanthus roeus* (L.) G. Don) گیاهی دولپه، چند ساله و همیشه سبز است که در مناطق سرد به‌صورت یکساله کشت می‌شود و در جهان با نام‌های مختلفی مانند Madagascar Periwinkle، *Vinca rosea* و *Lochnera rosea* شناخته شده است. منشا آن مناطق حاره و گرمسیر مانند جنوب هند، اندونزی و ماداگاسکار گزارش شده اما امروزه در سراسر دنیا گسترش یافته است. این گیاه در دشت‌ها و تپه‌هایی که ۵۰۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارند، می‌روید. طول ریشه اصلی پروانش ۲۰ تا۴۰ سانتیمتر است و انشعاب‌های کمی دارد. ساقه آن، استوانه‌ای ومستقیم وارتفاع آن در شرایط اقلیمی مختلف، متفاوت و بین۴۰ تا ۹۰ سانتی‌متر می‌باشد. رنگ ساقه سبز یا قرمز کمرنگ است و پای ساقه گیاهان چندساله، چوبی می‌شود. قسمت فوقانی ساقه انشعاب‌های بیشتری دارد. برگ‌ها ساده، براق، چرمی، تخم مرغی شکل، کشیده و متقابل هستند و دمبرگ کوتاهی نیز دارند. گل‌ها دارای ۵ گلبرگ و در گیاهان وحشی به رنگ صورتی کمرنگ با مرکز ارغوانی می‌باشند اما امروزه واریته‌های مختلفی (بیش از ۱۰۰ واریته) با رنگ‌های صورتی، سفید و ارغوانی از این گیاه تولید شده است که برخی دارویی (مانند نیرمال[1] و پرابال[2]) و برخی زینتی (مانند پاسیفیکا بلاش[3]) هستند. گل‌ها معمولا اواخر بهار (خرداد)، در انتهای ساقه‌های اصلی و فرعی پدیدار می‌شوند و تا قبل از فصل سرما روی گیاه باقی می‌مانند. میوه آن فولیکولی، استوانه‌ای شکل و بذرهای سیاه رنگ در داخل آن قرار گرفته‌اند. میوه پس از رسیدن با شکاف‌های طولی باز شده و بذرهای داخل آن بیرون می‌ریزد. طول بذر ۳ میلی‌متر و پهنای آن یک میلی‌متر است. این گیاه دوره رویشی نسبتا بلندی دارد و رشد اولیه آن بسیار کُند است. از ابتدای رویش

[1]- Nirmal
[2]- Prabal
[3]- Pacifica blush

بذر تا رسیدن و کامل شدن میوه، ۱۸۰ تا ۲۰۰ روز به طول می‌انجامد. شکل ۱-۱ شکل ظاهری گیاه پروانش را نشان می‌دهد.

از پروانش عمدتا به عنوان گیاهی باغچه‌ای برای زینت فضای سبز و حاشیه باغ‌ها بهره می‌برند. تکثیر آن از طریق بذر و یا قلمه ساقه انجام می‌شود. همچنین واریته‌های دارویی آن در کشورهای آمریکا، آلمان، چین، اسپانیا، مجارستان، ایتالیا، انگلستان، هند و فلسطین اشغالی در سطح وسیع کشت می‌شود [۸۹، ۹۹، ۱، ۱۷، ۳۴]. امروزه هند سومین کشور پرورش دهنده پروانش در جهان برای تولید آلکالوئیدهای ضد سرطان آن (وین‌بلاستین و وین‌کریستین) است که این آلکالوئیدها را به کشورهای اروپایی صادر می‌کند زیرا شرایط آب و هوایی این کشورها برای کشت پروانش مناسب نبوده و میزان آلکالوئیدهای آن نیز کم می‌باشد [۱۷، ۸۱].

شکل ۱-۱- شکل ظاهری گیاه پروانش. پایین سمت راست: جوانه‌های جانبی- پایین سمت چپ: میوه فولیکول نشان داده شده است.

۱-۳- نیازهای اکولوژیک و بیماری‌های پروانش

منشا پروانش مناطق گرم و حاره می‌باشد و این گیاه در طول رویش به نور کافی، گرمای مناسب و بارندگی زیاد نیاز دارد. درجه حرارت مطلوب برای رویش بذر، ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتیگراد است. رشد این گیاه در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد متوقف شده و در صفر درجه سانتی‌گراد در اثر سرمازدگی خشک می‌شود. بارندگی سالانه مورد نیازبرای رویش پروانش، ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌متر است [۱]. پروانش به ترکیب خاکی با تخلخل بالا نیاز دارد. افزودن مقادیر زیادی از مواد آلی پوسیده، شن یا پرلیت به خاک‌های بافت سنگین، سبب بهبود خاک برای کشت این گیاه می‌شود. همچنین pH مناسب خاک برای آن بین ۵/۴ تا ۶/۲ می‌باشد [۱۰].

آبیاری منظم و به موقع، تاثیر عمده‌ای در افزایش آلکالوییدهای پروانش دارد. خاک باید از نوع سبک (شنی) و حاوی مقدار مناسبی مواد و عناصر غذایی باشد. برای کشت در سطوح وسیع، خاک‌های سبک شنی که از مواد هوموسی غنی‌اند، توصیه می‌شود. خاک‌های اشباع از آب و خاک‌های قلیایی، برای کاشت این گیاه مناسب نیستند. تحقیقات نشان می‌دهد استفاده از کود حیوانی، باعث افزایش عملکرد ریشه و پیکر رویشی پروانش می‌گردد. افزودن ۴۰ تا ۵۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن، ۶۰ تا ۸۰ کیلوگرم در هکتار اکسیدفسفر و ۴۰ تا ۶۰ کیلوگرم در هکتار اکسیدپتاس در فصل پاییز به خاک، سبب تسریع در رویش و افزایش عملکرد می‌شود. افزودن ۵۰ تا ۷۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن در طول رویش گیاهان،نتایج مطلوبی در افزایش ماده موثره پروانش خواهد داشت [۱].

مهمترین بیماری این گیاه بلایت هوایی[1]است که بسیاری از واریته‌های پروانش به آن حساس هستند. این بیماری توسط قارچ *Phytophthora parasitica* ایجاد می‌شود و سبب تولید لکه روی برگ، پوسیدگی ساقه، رشد کم ریشه و در نهایت مرگ گیاه می‌شود [۲۳].

۱-۴- اهمیت، کاربرد و خواص دارویی پروانش

استفاده از پروانش در اروپا به ۵۰ سال قبل از میلاد مسیح باز می‌گردد که در آن زمان عوام از این گیاه برای جلوگیری از خونریزی‌ها، درمان زخم‌ها و دندان درد استفاده می‌کردند. همچنین مردم هند و آفریقا از آن به عنوان ماده کاهش‌دهنده قند خون بهره می‌بردند [۱]. تحقیقات اخیر نشان‌داده است که ساقه و برگ های پروانش حاوی چندین نوع آلکالوئید، تانن‌ها، ساپونین‌ها، پکتین و رنگدانه‌های آلی می‌باشند که سبب خصوصیات دارویی مانند آرام بخش، قابض، کاهش دهنده فشار خون، گشادکننده

[1]- Aerial blight

رگ‌ها و مدر برای این گیاه می‌شود بنابراین در درمان‌های سنتی از آن برای جلوگیری از خونریزی بینی و لثه، اسهال، سرفه، تنگی نفس و تورم لثه‌ها بهره می‌برند [۸۶]. همچنین جوشانده برگ پروانش، قند خون را کاهش داده و در بسیاری کشورها برای درمان دیابت استفاده می‌شود. دلیل این خاصیت عصاره گیاه، افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتای لوزالمعده گزارش شده است [۷۳]. در هند عصاره برگ‌ها برای درمان نیش زنبور و در هاوایی جوشانده گیاه به صورت ضماد برای جلوگیری از خونریزی استفاده می‌شود. درچین از آن به عنوان قابض، مدر و داروی ضد سرفه بهره می‌برند. در آمریکای مرکزی و جنوبی برای کاهش التهاب و در جزایر کاریب از محلول عصاره گل‌ها برای درمان عفونت و ناراحتی‌های چشمی استفاده می‌کنند. مردم اروپا عقیده دارند که پروانش یک گیاه جادویی است و ارواح شیطانی را دور می‌کند، به همین سبب در فرانسه آن را "جادوگر بنفش[۱]" می‌نامند [۱۷]. در سال ۱۹۵۰ هنگامی که پژوهشگران به دنبال پیدا کردن خواص ضد دیابتی پروانش بودند، متوجه شدند که عصاره این گیاه سبب کاهش گلبول‌های سفید خون شده و از پیشرفت سرطان جلوگیری می‌کند [۱۷، ۷].

پروانش منبع غنی از آلکالوئیدها است که در همه بخش‌های گیاه پراکنده‌اند. محتوای آلکالوئیدهای *C. roseus* در قسمت‌های مختلف آن بسیار متفاوت است و بیشترین مقدار در پوست ریشه و بین ۰/۱۵ تا ۱/۳۴ درصد می‌باشد [۱۷]. وجود آلکالوییدهای ارزشمند در تمام بخش‌های گیاه سبب شده است که در اکثر کتب داروشناسی[۲] به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی و خواص آن بیان شود [۱]. تاکنون ۱۳۰ نوع آلکالوییدِ ایندولی از این گیاه استخراج شده است که ۲۵ نوع آن دایمری است. آلکالوئیدهای وین‌بلاستین (وینکالوکوبلاستین[۳]) و وین‌کریستین (لئوروکریستین[۴])، دو آلکالوئید دایمری مهم پروانش هستند که در ساقه و برگ‌ها ساخته و ذخیره می‌شوند. هر دو این آلکالوئیدها اثر آنتی نیوپلازی[۵] (ضد تومور) داشته و بیش از ۴۰ سال است که در شیمی درمانی برخی سرطان‌ها استفاده می‌شوند [۸۰، ۴۹، ۱۷].

در میان آلکالوئیدهای مونومری آن، آجمالیسین (روباسین)[۶] و سرپنتین[۷] که در ریشه‌ها وجود دارد، کاربرد گسترده‌ای در درمان بیماری‌های گردش خون به ویژه بهبود جریان خون مغزی و کاهش فشار خون دارد [۱، ۱۷، ۷، ۵۳، ۳۴]. بذر پروانش نیز دارای آلکالوئیدهای دایمری وین‌گرامینه[۸] و

---

[1]- Violet of the sorcerer
[2]- Pharmacopoeia
[3]- Vincaleucoblastine
[4]- Leurocristine
[5]- Anti-neoplasy
[6]- Ajmalicine (Raubasine)
[7]- Serpentine
[8]- Vingramine