

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۳۸۱ / ۴ / ۲۶



دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

وزارت بهداشت و امور درمانی ایران
سازمان اسرار

جداسازی، شناسایی و استخراج ترکیبات ضد سرطان
وین بلاستین و وین کریستین از گیاه پروانش رشد یافته در ایران

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

ندا قسامی

استاد راهنما

دکتر سید حسن قاضی عسکر

۱۳۸۰

۱۳۸۱/۴/۲۶

۱۳۸۱/۴/۲۶



دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

وزارتخانه بهداشت و درمان استان اصفهان
تعمیرات بیمارستان

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه
تحت عنوان:

جداسازی، شناسایی و استخراج ترکیبات ضد سرطان وین بلاستین و وین کریستین از گیاه پروانش رشد یافته در ایران

در تاریخ ۱۳۸۰/۱۱/۲۰ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه

دکتر سید حسن قاضی عسکر

۲- استاد مشاور پایان نامه

دکتر محمد یلپانی

۳- استاد داور

دکتر مهران غیاثی

۴- استاد داور

دکتر عبدالحسین ویاغ

دکتر غلامعباس پارسافر

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده

- خدایا:** بر اراده ، دانش، عصیان، بی نیازی، حیرت، لطافت روح، شهامت و تنهایی ام بیفزای.
- خدایا:** به من توفیق تلاش در شکست، صبردر نومییدی، رفتن بی همراه، جهاد بی صلاح، کار بی پاداش، فداکاری در سکوت، دین بی دنیا، مذهب بی عوام، عظمت بی نام، خدمت بی نان، ایمان بی ریا، خوبی بی نمود، گستاخی بی خامی، مناعت بی غرور، عشق بی هوس، تنهایی در انبوه جمعیت، دوست داشتن بی آنکه دوست بداند، روزی کن.
- خدایا:** مرا یاری ده تا جامعه ام را بر سه پایهٔ کتاب، ترازو، و آهن استوار کنم، و دلم را از سه سرچشمه حقیقت، زیبایی و خیر سیراب سازم.
- خدایا:** در برابر هر آنچه انسان ماندن را به تباهی می کشاند، مرا، با "نداشتن" و "نخواستن" روئین تن کن.
- خدایا:** مرا در ایمان، "اطاعت مطلق" بخش، تا در جهان، "عصیان مطلق" باشم.
- خدایا:** به من "تقوای ستیز" بیاموز، تا در انبوه مسئولیت نلغزم، و از "تقوای پرهیز" مصونم دار تا در خلوت عزلت نیوسم.
- خدایا:** مرا از چهار زندان بزرگ انسان: "طبیعت"، "تاریخ"، "جامعه" و "خویشتن"، رها کن، تا آنچنان که تو ای آفریدگار من مرا آفریده ای خود آفریدگار خود باشم، نه که - همچون حیوان - خود را با محیط که محیط را با خود، تطبیق دهم.
- خدایا:** به من زیستنی عطا کن که در لحظهٔ مرگ، بر بی ثمری لحظه ای که برای زیستن گذشته است، حسرت نخورم، و مردنی عطا کن که، بر بیهودگیش، سوگوار نباشم. بگذار تا آن را من، خود انتخاب کنم، اما آنچنان که تو دوست داری.
- خدایا:** "چگونه زیستن" را تو به من بیاموز، "چگونه مردن" را خود خواهم دانست.

خدایا به من اخلاص:

یکتایی در "زیستن"،

یکتایی در "بودن"،

یکتایی در عشق!

عطا فرما.

تشکر و قدردانی

از استاد بزرگواریم آقای دکتر سیدحسن قاضی عسکر که مسئولیت راهنمایی این رساله را بر عهده داشتند کمال تشکر را دارم.

از استاد ارجمندم آقای دکتر محمدیلپانی که مشاور پایان نامه اینجانب بر عهده ایشان بود، صمیمانه سپاسگزارم. همچنین از اساتید محترم آقایان دکتر مهران غیائی، آقای دکتر عبدالحسین دباغ که زحمت خواندن رساله اینجانب را بر عهده داشتند و آقای دکتر غلامعباس پارسافر رئیس محترم تحصیلات تکمیلی و کلیه اساتید گرانقدر دانشکده تقدیر و تشکر می کنم.

در خاتمه لازم است از کلیه پرسنل محترم و زحمتکش دانشکده شیمی تشکر نمایم. همچنین از کلیه دوستانم که در طول این مدت از همفکریها و راهنمایی هایشان بهره مند شدم سپاسگزاری می نمایم.

با آرزوی توفیق الهی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به پدر و مادر دلسوز و بزرگوارم:

که در امر تحصیل من از هیچ کوششی دریغ ننموده و زحمات بی شائبه ای
برای پیشرفت من کشیده اند.

خواهر و برادر عزیز و مهربانم که همواره مشوق اصلی من در امر تحصیل بوده اند.

تمام آموزگاران محترمی که از محضرشان کسب فیض نموده ام.

تقدیم به دو گل زیبای وجودم
زندگی ام، احسان
دنیا، عرفان

فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
شش ۱	فهرست مطالب چکیده
	فصل اول: مقدمه
۳	۱-۱- پیشگفتار
۴	۲-۱- تاریخچه
۹	۳-۱- تولید وین بلاستین از واکنش وین دولین استخراج شده با سیال فوق بحرانی
۹	۱-۳-۱- استخراج وین دولین از پروانش
۹	۲-۳-۱- استخراج کاتارانتاین از ریشه های کشت داده شده پروانش
۱۰	۳-۳-۱- واکنش جفت کردن شیمیایی وین دولین و کاتارانتاین
۱۴	۴-۱- مروری بر تحقیقات انجام شده در ایران
	فصل دوم: آلکالوئیدها و گل پروانش
۱۷	۱-۲- آلکالوئیدها و پراکندگی آنها در گیاهان
۲۰	۱-۱-۲- توارث
۲۰	۲-۱-۲- مراحل رشد
۲۰	۳-۱-۲- عوامل محیطی
۲۱	۲-۲- بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه ایندول
۲۳	۳-۲- اعمال و وظایف آلکالوئیدها
۳۰	۴-۲- موارد استعمال گل پروانش
۳۲	۱-۴-۲- وین بلاستین سولفات
۳۳	۲-۴-۲- وین کریستین سولفات
۳۴	۵-۲- روشهای مختلف استخراج آلکالوئید کل گیاهان
۳۵	۶-۲- عوامل موثر در میزان ترکیبات آلکالوئیدی گیاهان دارویی
۳۵	۱-۶-۲-۱- برداشت و بهره برداری گیاهان
۳۵	۲-۶-۲-۱- زمان جمع آوری
۳۵	۳-۶-۲-۱- اندامهای مختلف گیاه

۳۵	۲-۶-۱-۴- سن گیاه
۳۶	۲-۶-۲- نگهداری و خشک کردن
۳۶	۲-۶-۲- ۱ - خشک کردن در هوای آزاد
۳۷	۲-۶-۲- ۲ - خشک کردن با حرارت مصنوعی
۳۷	۲-۶-۲- ۳ - خشک کردن در حرارت پایین
۳۷	۲-۶-۲- ۴- روش پایدار سازی
۳۷	۲-۶-۵- آسیاب کردن
۳۷	۲-۷- نیازهای اکولوژیکی
۳۸	۲-۸- تناوب کاشت
۳۸	۲-۹- مواد و عناصر غذایی مورد نیاز پروانش
۳۸	۲-۱۰- روش شناسایی آلکالوئیدها
۳۹	۲-۱۱- معرفهای عمومی برای آلکالوئیدها

فصل سوم: بخش تجربی

۴۲	۳-۱- دستگاهها
۴۳	۳-۲- تهیه استانداردهای وین بلاستین و وین کریستین
۴۳	۳-۲-۱- تهیه استاندارد وین بلاستین از داروی وین بلاستین سولفات
۴۳	۳-۲-۲- تهیه استاندارد وین کریستین از داروی وین کریستین سولفات
۴۴	۳-۳- آماده سازی نمونه ها
۴۵	۳-۴- روش استخراج و تعیین مقدار آلکالوئید کل در گیاه پروانش
۴۶	۳-۵- استخراج توسط دستگاه سوکسله
۴۷	۳-۶- استخراج با سیال فوق بحرانی

فصل چهارم: جداسازی و شناسایی دو آلکالوئید گیاه پروانش

۵۰	۴-۱- جداسازی دو آلکالوئید وین بلاستین و وین کریستین
۵۱	۴-۲- جداسازی ترکیبات استخراج شده با حلال کلروفرم توسط روش TLC
۵۲	۴-۳- جداسازی ترکیبات استخراج شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی
۵۳	۴-۴- جداسازی ترکیبات استخراج شده توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۵۴	۴-۵- شناسایی اجزاء استخراج شده
۵۵	۴-۵-۱- طیف UV-Vis اجزاء استخراج شده
۵۸	۴-۵-۲- طیف مادون قرمز اجزاء استخراج شده
۶۳	۴-۵-۳- طیف رزونانس مغناطیسی هسته پروتون
۶۸	۴-۵-۴- کروماتوگرام اجزاء استخراج شده توسط HPLC

۷۴

۷۴

۷۶

۴-۶-نتیجه گیری

۴-۷-آینده نگری

منابع

چکیده:

هدف از انجام این پروژه تحقیقاتی دستیابی به شیوه مناسب جهت استخراج آلکالوئیدهای موجود در گیاه پروانش و جداسازی و شناسایی وین کریستین و وین بلاستین در این گیاه، بوده است. روش استخراج باید به گونه ای باشد که در مقیاس نیمه صنعتی قابل بکار گیری باشد و با امکانات داخلی بتوان آن را انجام داد. استخراج بعد از خشک کردن قسمتهای هوایی نمونه های مختلف جمع آوری شده از مکانهای متفاوت در شهر اصفهان و شمال کشور، استخراج با حلال اتیل استات، کلروفرم و غیره، و دستگاه سوکسله و همچنین با استفاده از سیال فوق بحرانی دی اکسید کربن انجام شد. سپس روشهای مختلف جداسازی آلکالوئیدهای استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا به روش کروماتوگرافی ستونی با حلال اتیل استات - اتانل به نسبتهای مختلف و بعد از آن جداسازی اجزاء به روش TLC با حلال کلروفرم انجام شد. خالص سازی دو آلکالوئید وین بلاستین و وین کریستین با حلال اتیل استات: اتانل (۷۵:۲۵) و توسط TLC انجام شد. شناسایی دو آلکالوئید مورد نظر با بررسی طیفهای UV-Vis، ¹H-NMR و FT-IR انجام گردید. مقدار کل آلکالوئید بدست آمده از گیاه پروانش رشد یافته در ایران ۳/۹ درصد به ازاء هر گرم وزن گیاه خشک می باشد. از این گیاه حدود ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۰۳ درصد آلکالوئید وین کریستین و ۰/۰۰۷ تا ۰/۰۰۹ درصد آلکالوئید وین بلاستین به ازاء هر گرم وزن خشک گیاه بدست آمد.

فصل اول

مقدمه

۱ - ۱ - پیشگفتار

با اینکه تا کنون تحولات عظیم و قابل توجهی در صنایع داروسازی در ارتباط با روش تهیه دارو های مختلف صورت گرفته با این وجود از اهمیت گیاهان دارویی نه تنها کاسته نشده است، بلکه در اثر اعتقاد و گرایش خاص مردم به سوی مواد طبیعی و آثار جانبی کمتر آنها در موارد متعددی مواد حاصل از این گیاهان جایگزین داروهای سنتزی شده اند که از چند دید قابل بررسی هستند [۱].

داروهای سنتزی در عین حال که دارای اثرات درمانی انتخابی بر روی بیماریهای مشخص هستند ولی از عوارض فراوان این داروها نیز نباید غافل ماند. در برخی موارد عوارض جانبی که ایجاد می کنند شاید خطراتی کمتر از خود بیماری نداشته باشند در حالیکه گیاهان دارویی اغلب اثرات درمانی کافی و عوارض جانبی بسیار ناچیز دارند [۲].

اکثر داروهای سنتز شده در اثر امکانات مادی و صنعتی کشورهای پیشرفته در کارخانجات این کشورها تهیه میشوند و بعد از طی مراحل مختلف به اشکال گوناگون و با قیمت بالا در اختیار مصرف کننده قرار می گیرند در نتیجه مبلغی از بودجه سالانه کشورها صرف خرید این داروها می شوند.

شرایط اقلیمی کشور ما متنوع و جایگاه مناسبی برای رشد و پرورش انواع گیاهان می باشد به همین خاطر می توان انواع مختلف گیاهان دارویی را بصورت خودرو یا کشت داده شده و به مقدار فراوان تهیه کرد. خوشبختانه در کشور ما نیز روز به روز گرایش به طب سنتی بیشتر شده و مطالعه درباره اثرات درمانی و مکانیسم تأثیر مواد مؤثر گیاهان دارویی در مراکز علمی و تحقیقاتی کشور رو به گسترش است [۴،۳]. انتظار می رود در جهت کشت گیاهان دارویی، افزایش مواد مؤثر و استخراج آنها و تولید اشکال متنوع دارویی قابل مصرف از این ترکیبات کوشش های بیشتری بعمل آید. در همین راستا در این پروژه به دنبال آن بوده ایم، که به روش مناسبی برای استخراج آلکالوئیدهای گیاه دارویی پروانش دست یابیم. سپس میزان کل آلکالوئیدهای این گیاه که در مکانهای مختلف رشد یافته اند را اندازه گیری و دو عدد از ترکیبات با ارزش دارویی آن بنامهای وین بلاستین و وین کریستین را جداسازی و شناسایی نماییم.

در حالیکه انواع بیماری سرطان در حال افزایش می باشد و بیماران مبتلا به آن احتیاج به دارویی برای جلوگیری از پیشرفت این بیماری ها و افزایش عمرشان دارند. دو داروی گیاهی مؤثر در جلوگیری از بعضی از سرطانها به نامهای وین بلاستین و وین کریستین در ایران تهیه نمی شوند و هر دو محصول وارداتی می باشند. این دو دارو از گیاه زینتی - دارویی پروانش استخراج می شوند که می توان این گیاه را جهت تزئین فضاهای سبز شهر ها به کمک شهرداری ها کاشت و پس از اتمام عمر مفید آنها، از گیاه رشد یافته داروهای وین بلاستین و وین کریستین را استخراج نمود. متأسفانه علی رغم زمینه های رشد مناسب این گیاه در کشور ما تا کنون در جهت استحصال و استفاده مفید از این گیاه کاری صورت نگرفته است.

مصرف سالانه برگها و ریشه این گیاه در آمریکا حدود ۱۰۰ تن (براساس وزن خشک هریک) می باشد. در سال ۱۹۷۵ نیاز جهانی به آلکالوئید وین کریستین در سال ۴ کیلوگرم و به آلکالوئید آجمالایسین که یکی دیگر از آلکالوئیدهای این گیاه می باشد، ۳۰۰ کیلوگرم گزارش شده است [۴]. قیمت هر گرم داروی وین کریستین سولفات برابر ۳۵۹۰۰ دلار و داروی وین بلاستین سولفات به ازاء هر گرم برابر ۸۶۰۰ دلار می باشد.

۱-۲- تاریخچه

پربوش (پروانش) یا گل تلگرافی گیاهی است از تیره خرزهره^۱، از جنس وینکا^۲ و گونه آن وینکا مینور^۳ می باشد [۳، ۵]، گونه بومی آمریکایی آن وینکا روزیا^۴ و گونه بومی ایرانی آن وینکالیباروتیکا زاک^۵ می باشد. نظر به اینکه در گیاه پروانش، مواد مؤثره فراوانی وجود دارد که از آلکالوئیدهای گروه ایندول^۶ می باشند و در صنایع داروسازی نیز کاربرد دارند و با توجه به شرایط اقلیمی خاک اصفهان که یک خاک کربناته و قلیایی است برای رشد این گیاه مناسب است و این گیاه به عنوان هدف تحقیق، انتخاب گردید [۱، ۲].

اسامی مترادف عبارتند از:

Perwinkle , Runningmyrtle

به انگلیسی

Kleines Immergrun , Sinngrum

به آلمانی

Premiore , Perevinca

به ایتالیایی

Petite Pervenche , Violette des marts , Voinchere

به فرانسه

قصاب مصری ، ونکه صغیره

به عربی

پربوش ، پروانش ، گل تلگرافی

به فارسی

و دارای یک سری اسامی محلی نیز می باشند که به قرار زیر است: [۵].

Sadabahar , Sadaphul , Nayan tara , Rattanjot, Billaganneru , Gul Feringhi , Ainskati , Sudukadu . mallikai

پروانش گیاهی است علفی، دائمی و پایا با ساقه ای خزنده و ریشه دار که جوانه های بالا رونده

ای از آن می رویند. دارای گلهایی با پنج گلبرگ به رنگهای آبی، بنفش، قرمز و سفید می باشند که از

کنار برگها خارج می شوند، برگهای آن بیضی شکل و براق و مقاومت آن در برابر سرما زیاد است. میوه

آن به شکل کیسه ای بوده که محتوی دانه های ریزی است. سر شاخه های آن حاوی مقدار زیادی از

آلکالوئیدها، تانن ها ، ساپونین ها ، پکتین ها و مواد رنگی می باشند.

جداسازی و شناسایی آلکالوئیدها ی مفید در گل پروانش توسط بسیاری از محققین مختلف در

بعضی از کشورهای جهان انجام شده است که در این بخش خلاصه ای از این فعالیتها آورده میشود.

1- Apocyanaceas

2- Vinca

3- Vinca minor

4- Vinca rosea

5- Vinca Libarotica Zucc

6- Indole Alkaloids

وینکامینور برای اولین بار در سال ۱۸۵۹ توسط لوکاس بررسی شد و از آن یک آکالوئید بدست آورد. اما تا سال ۱۹۵۳ فقط ۴ آکالوئید وینکا شناخته شده بود. بعد از جدا کردن رزوپین از راولفیا (تیره آپوسیانا سه) تعداد زیادی از گیاهان این تیره به منظور یافتن آکالوئید مورد بررسی قرار گرفته اند.

در سال ۱۹۵۹ اسوبدا^۱ و همکارانش ۹ کیلوگرم گیاه خشک پروانش را بعد از خیساندن، در آب اسیدی کرده و ترکیبات غیرآکالوئیدی (خنثی) آنها را توسط حلالهای کلروفرم و بنزن استخراج کردند. سپس توانستند به روش استخراج پیوسته و استفاده از کروماتوگرافی ستونی با بستر آلومینا و حلالهای شستشوی بنزن - کلروفرم (با نسبتهای مختلف) به مقدار ۰/۴۳ گرم وین دولین، ۰/۲۵ گرم کاتارانتاین و ۰/۱۲۶ گرم سولفات وینکالتوکوبلاستین دست یابند [۷].

گردن اسوبدا^۱ در سال ۱۹۶۱ بر روی استخراج و شناسایی دو نوع آکالوئید لئوروسیدین و لئوروکریستین از گل پروانش کار کرد و با استفاده از TLC و روش تغییر در pH محلول توانست این آکالوئیدها را جداسازی نماید و با تکنیک طیف بینی جذبی IR آنها را شناسایی نماید [۸].

ویلیام لوب^۲ و همکارانش در سال ۱۹۶۴ بر روی جدا سازی و شناسایی آکالوئیدهای وین دولین، یوهیم باین^۳، لئوروزین^۴ و پریواین^۵ از گل پروانش کار کردند و توانستند توسط روش کروماتوگرافی ستونی آنها را جدا سازی نمایند و با روش طیف بینی جذبی IR آنها را شناسایی کنند [۹].

در سال ۱۹۶۷ فرانسورت^۶ و همکارانش توانستند با استفاده از حلالهای متانل، بنزن، کلر فرم و استون حدود ۵٪ کاتارانتاین و وین دولین را به ترتیب از ریشه و برگهای گیاه استخراج نمایند [۱۰].

نورمن فرانسفورت و هیلینسکی^۷ در سال ۱۹۶۵ به کمک روش کروماتوگرافی لایه نازک موفق به جدا سازی آکالوئیدهای لئوروسیدین^۸، وینکالتوکوبلاستین، لئوروکریستین^۹ و لئوروزین شدند به علاوه مقدار عددی فاکتور بازداری^{۱۰} و رنگ آنها را نیز گزارش کردند [۱۱].

1- Gordon H. Svoboda

2- William.D.Loub

3- Yohimbine

4- Leurosine

5- Perivine

6- Norman.R.Farnsworth

7- Irene M.Hilinski

8- Leurosidine

9- Leurocristine

10- Retention Factor