مجلة جامعة النهرين المجلد ١٧ العدد(٣) أيلول، ٢٠١٤ ص 50-56
العلوم

التقدير الكمي والتنقية الجزئية لمركبي الفنبلاستين و الفنكرستين لثلاثة نباتات من العائلة الدفلية Apocynaceae

صباح مهدي هادي* و واثق عباس حتيت**
* المختبر البيئي المركزي، كلية العلوم، جامعة بغداد، العراق.
** معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الآحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد، العراق.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة على ثلاثة من نباتات العائلة الدفلية وهي نبات الدفلة *Nerium oleander*، نبات الثفشيا *Thevetia peruviana* ونبات الكاريسيا *Carissa grandaiflora*. شملت استخلاص مركبات القلويدات الاندولية من أوراق النبات والكشف عن وجود مركبي الفنبلاستين والفنكرستين باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC والتنقية الجزئية للمركبين بوساطة كروماتوغرافيا العمود ثم التقدير الكمي للمركبين باستخدام كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي بوساطة جهاز HPLC بينت النتائج أن أعلى تركيز كان لمركب الفانبلاستين في مستخلص أوراق نبات الثفشيا *Thevetia peruviana* بتقدير 4.35 جزء بالمليون/ 0.5 غم وزن جاف و3.725 جزء بالمليون/0.5غم وزن جاف في مستخلص اوراق نبات الدفلة و0.893 جزء بالمليون/ 0.5 غم وزن جاف لمركب الفنكرستين في مستخلص اوراق الكاريسيا.

TLC : Thin layer Chromatography كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

HPLC: High performance liquid Chromatography كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي.

Rf:Retardation Factor عامل الآعاقة.

VIB: Vinblastine مركب الفنبلاستين.

VIC:Vincristine مركب الفنكرستين.

الكلمات مفتاحية: *Nerium oleander*، *Carissa grandaiflora*، *Thevetia peruviana* مركب الفنبلاستين، مركب الفنكرستين.

المقدمة

تنتشر نباتات العائلة الدفلية Apocynaceae في كل أنحاء العالم [1] وخاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية ويوجد منها في العراق ستة أجناس [2] منها الدفلة*Nerium oleander* الثفشيا*Thevetia peruviana* عين البزون *Catharanthus roseus* والكاريسيا *Carissa grandaiflora*. تمتاز نباتات العائلة بأنها ذات قيمة جمالية كبيرة، دائمة الخضرة [24] ومعظم نباتاتها سامة[3] لاحتوائها على مركبات القلويدات والجيوكلوسيدات [4] والتي تدخل في الاستخدامات الطبية. تعد مركبات القلويدات محورا للعديد من الدراسات والبحوث وخاصة مركبات القلويدات الآندولية مزدوجة الصيغة الجزيئية مثل مركبي الفنبلاستين والفنكرستين ذات الفعالية الفسيولوجية والتي تستخدم في علاج الأمراض السرطانية مثل مرض هوجكنز و اللوكيميا الحادة [5،28] وغيرها. تم في هذه الدراسة الكشف عن وجود هذين المركبين في نباتات الدفلة، الثفشيا والكاريسيا وهي نباتات ذات انتشار واسع في البيئة العراقية. يعد نبات الدفلة *N. oleander* من نباتات العائلة الدفلية واسعة الانتشار، الجزء الفعال في النبات هو الأوراق والقلف والجذور وتحتوي الأوراق والسيقان والإزهار على القلويدات والنبات غني بمركبات Cardenolides والتي تستعمل كدواء منشط أو مقوي للقلب ومنها مركب الاولیندرین Oleandrin والفولينيرين Folinerin والنيرين Neriin [4،6] والتي توجد ايضآ في الحليب أو العصارة النباتية والتي تحتوي على مركبات

الكالسيوم، الحديد، البوتاسيوم، كلوريد المغنيسيوم والفسفور [7]. يستخدم كنبات طبي [8،27] وكل أجزاء النبات سامة [9،27] تستخدم أوراقه في الطب الشعبي ضد لدغات الأفاعي وكمدرر diuretic ومضاد للبكتيريا antibacterial 27]،25،[24 وكمبيد حشري insecticidal [10]. آما نبات الثفشيا *peruviana T.* فهي شجيرة دائمة الخضرة، يستخدم الحليب والقلف النباتي في العلاج، يستخدم القلف كمسهل قوي ومهدئ للحمى [25] والتركيز العالي منه يكون سام [11] لاحتوائها على مركبات Cardiac glycosides وأهمها Theretoxin و Thevetin ويعد من النباتات السامة [3]، أما نبات الكاريسيا *C. grandaiflora* فهو نبات شجيري متقزم شوكي [12،26]. تستعمل الأوراق والسيقان وقلف الجذور في معالجة مرض فقر الدم ألمنجلي، الم الأسنان وكمسهل [26]، أما الجذور فتستخدم لمعالجة الم الصدر، السعال، قرحة المعدة وكطارد للديدان وخاصة الديدان الشريطية [13]. تم استخلاص مركبات القلويدات الاندولية من أوراق نباتات الدفلة، الدفلة الصفراء والكاريسيا والكشف عن وجودها باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC والتنقية الجزئية للمركبين بوساطة كروماتوغرافيا العمود ثم التقدير الكمي للمركبين بواسطة كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي بوساطة جهاز HPLC .

المواد وطرق العمل

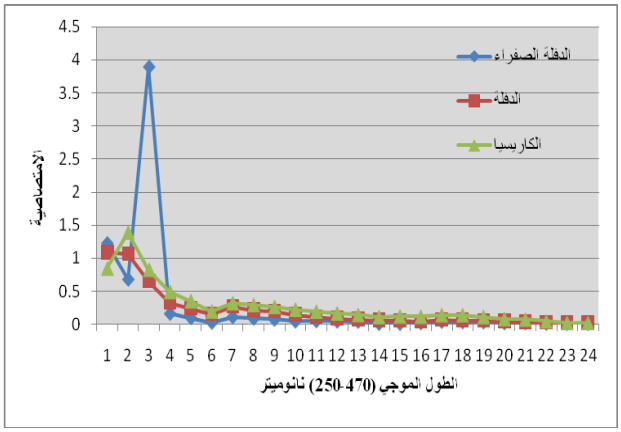
فصلت الأوراق من وسط الأفرع للنباتات المدروسة، جففت وطحنت، وزن 2 غم من مسحوق الأوراق واستخلصت بطريقة استخلاص القلويدات الاندولية [14]. تم قياس طيف الامتصاص الالكتروني بجهاز Spectrophotometer PD-303UV المجهز من شركة APEL للمستخلصات الخام في المدى (250-470) نانوميتر وكشف عن وجود مركبات القلويدات الاندولية في المستخلصات الخام بوساطة كروما توغرافيا الطبقة الرقيقة [15]. اجري التحليل على صفائح السليكاجل وباستعمال نظام المذيب المكون من مزيج مذيبي الكلورفوم وخلات الاثيل بنسبة (1:1) واظهر الكروماتوغرام بكاشف دريجندروف [16] وبعد التأكد من وجود مركبات القلويدات الاندولية أجريت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC على مستخلصات النباتات الخام وبوجود مركبي الفنبلاستين والفنكرستين القياسيين وباستعمال صفائح السليكاجل ونظام المذيب اعلاه. أجريت عملية التنقية الجزئية لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود باستخدام عمود السليكاجيل (1x30) سم ومزيج مذيبات الميثانول وخلات الاثيل وحامض الخليك بنسبة (0.2:5:5) وتمت متابعة عملية شطف العمود من خلال تحليل النازل من العمود بطريقة قياس طيف الامتصاص الالكتروني Spectrophotometer PD-303UV المجهز من شركة APEL لكل 2مل وعلى الطول ألموجي 254 نانوميتر. اجري التقدير الكمي لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين في المستخلص الناتج من التنقية الجزئية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC المجهز من شركة Shimadza نوع LC-6A المزود بمقياس الطيف بالأطوال الموجية المتغيرة 6A-UV spectrophotometer إذ تم حقن مركبي الفانبلاستين والفانكرستين القياسية في الجهاز للتعرف على مساحة وارتفاع النموذج القياسي وزمن الاحتجاز وارتفاع الحزم وباستخدام عمود السليكاجيل نوع ODS بأبعاد (250x4.6) مل والطور المتحرك المكون من الميثانول وداريْ الامونيوم فوسفيت بنسبة (60:40) قدرت العينات على طول موجي 254 نانوميتر ثم تم حقن نموذج المستخلص الناتج من التنقية بكروماتوغرافيا العمود في جهاز HPLC ومقارنة الحزم الناتجة مع حزم المحلول القياسي لمركبي الفانبلاستين و الفانكرستين الناتجة تحت الظروف نفسها، و حسب تركيز المركبين في النموذج من المعادلة الاتية: التركيز ppm = (مساحة العينة / مساحة النموذج القياسي)x تركيز النموذج القياسي.

النتائج والمناقشة

الكشف عن المحتوى القلويدي للمستخلصات الكحولية

أظهرت نتائج قياس طيف الامتصاص الالكتروني بوساطة جهاز Spectrophotometer للمستخلصات الكحولية لأوراق نباتات الدفلة والثفشيا والكاريسيا والمبينة في الشكل (1) إن المعدل القلويدي للنباتات الثلاثة اعطى طيف امتصاص واضح في الطول الموجي 250 نانوميتر بلغ (1.09و1.22و0.84) نانوميترعلى التوالي. ارتفع طيف

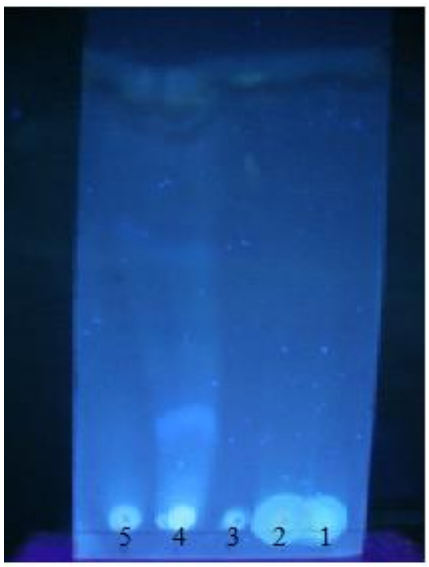
الامتصاص في مستخلص نبات الكاريسيا في الطول الموجي 260 نانوميتر إلى 1.392 ثم بدء في الانخفاض حتى وصل الى اوطىء قيمة له في الطول الموجي 470 نانوميتر. أما في مستخلص نباتي الدفلة والدفلة الصفراء فقد ارتفع طيف الامتصاص في الطول الموجي 270 نانوميتر (3.890،6.540) ارتفاعا ملحوظا ثم انخفض حتى وصل الى اوطىء قيمة له في الطول الموجي 470 نانوميتر. نلاحظ أن سلوك طيف الامتصاص اظهر تناسبا عكسيا مع الزيادة في الطول الموجي وهذا ماذكره [17]، إن أعلى طيف امتصاص لمستخلصات النباتات الثلاثة كان في الطول الموجي من (250-270) نانوميتر وهذا يدل على وجود مركبات القلويدات الاندولية فيها اذ بين كل من [16،17] بان قياس طيف الامتصاص للقلويدين الاندوليين الفنبلاستين والفنكرستين كان على الطول الموجي 254 نانوميتر.



شكل (١) طيف امتصاص المحتوى القلويدي لمستخلصات نباتات الدفلة والثفشياوالكاريسيا في المدى من (250-470) نانوميتر.

الكشف عن وجود مركبي الفنبلاستين والفنكرستين في المستخلص الكحولي للنباتات المدروسةباستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

بينت النتائج ظهور بقع وحزم ذات ألوان مختلفة عند فحصها تحت أشعة الطيف في الطول ألموجي 254 نانوميتر، وعند رش الكروماتوغرام بكاشف دريجندروف أظهر لونا بنفسجيا دلالة على تفاعل الكاشف مع القلويدات الآندولية في الكروماتوغرام وهذا يتوافق مع ما ذكره [14]. أجري تحليل (TLC) لمركبي الفنبلاستين والفنكرستين القياسيين ولوحظ ظهور بقعة ذات قيمة عامل أعاقة Rf تساوي (0.94)، ثم أجري تحليل (TLC) على المستخلصات الخام لأوراق النباتات وبوجود مركبي الفنبلاستين والفنكرستين القياسيين للكشف عنهما في هذه المستخلصات والشكل (2) يبين ظهور حزمة واضحة للمركبين القياسيين ذات قيمة عامل أعاقة تساوي (0.94)، وقد أعطت المستخلصات الثلاثة حزم واضحة موازية لحزمة المركبين القياسيين مما يدل على وجود المركبين في المستخلصات الخام، أما مستخلص نبات الدفلة فقد أعطى أربعة حزم أضافية ذات قيم عامل أعاقة Rf مبينة في الجدول رقم (1) وهذه النتائج تتوافق مع ماتوصل إليه [18].



شكل (2) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام صفائح السليكا جيل لمستخلصات أوراق نباتات الدفلة والثفشيا والكاريسيا. وباستخدام نظام المذيب الكلوروفورم : خلات الآثيل بنسبة (1:1).

التنقية الجزئية للمستخلصات الكحولية للنباتات المدروسة باستعمال كروماتوغرافيا العمود

استعمل مركبي الفنبلاستين والفنكرستين القياسيين في تجارب التنقية وكما ذكرها [16,18]. يلاحظ وجود قمة واضحة لكلا المركبين مما يدل على ان اعلى طيف امتصاص للمركبين يكون في الطول الموجي 254 نانوميتر. أظهرت النتائج المبينة في الشكل (4) لطيف سيماء شطف مستخلص نبات الدفلة وجود قمة واسعة متمثلة في الأجزاء (5-11) وهذا يدل على وجود مركب الفنبلاستين

في مستخلص النبات (16) أما طيف سيماء شطف مستخلص نبات الدفلة الصفراء فقد ظهرت فية القمة بوضوح في الاجزاء (5-8)، في حين طيف سيماء شطف مستخلص نبات الكاريسيا فقد ظهرت فيه قمة حادة متمثلة في الأجزاء-7 (5) وبمقارنة الأشكال الثلاثة مع طيف سيماء شطف مركبي الفنبلاستين والفنكرستين القياسيين يستدل على وجود المركبين في مستخلصات النباتات الثلاثة.

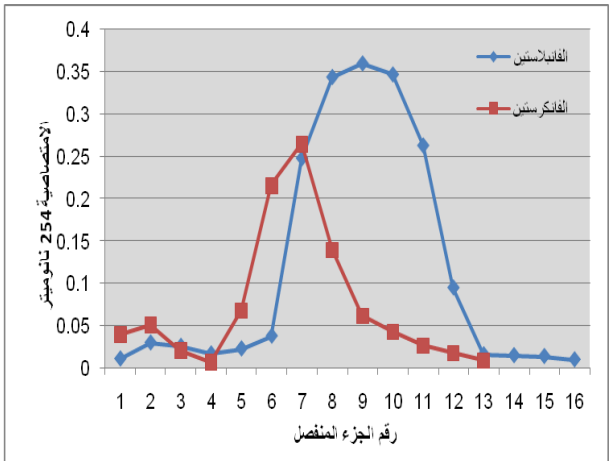
نتائج التقدير الكمي لمركبي الفنبلاستين والفنكرستين في المستخلصات الكحولية للنباتات المدروسة باستخدام تقنية HPLC

بينت النتائج المدرجة في الجدول (2) وجود مركب VIB و VIC في المستخلص الكحولي للنباتات المدروسة وبتراكيز مختلفة.

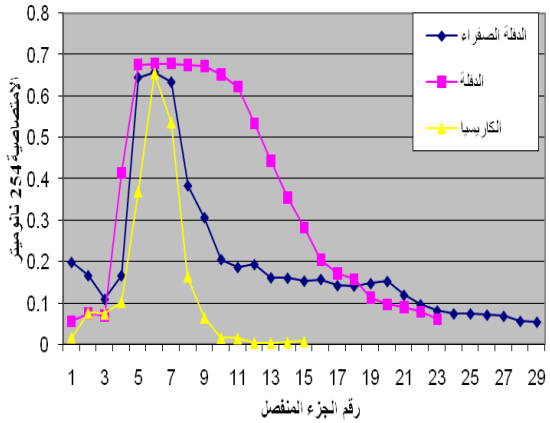
جدول (1)

قيم عامل الآعاقة لمستخلصات نباتات الكاريسيا، الدفلة و الثفشيا وبوجود مركبي الفنكرستين و الفنبلاستين القياسية وباستعمال صفائح السليكا جيل.

التسلسل	نوع المستخلص	قيم عامل الآعاقة Rf
1	مركب VIB القياسي	0.94
2	مركب VIC القياسي	0.94
3	مستخلص نبات الكاريسيا	0.94
4	مستخلص نبات الدفلة	0.94, 0.88, 0.823, 0.56, 0.25
5	مستخلص نبات الثفشيا	0.94



شكل (3) طيف سيماء شطف عمود السليكا جيل لمركبي الفنبلاستين والفنكرستين القياسيين.



شكل (4) طيف سيماء شطف عمود السليكا جيل لمستخلصات نباتات الدفلة والثفشيا والكاريسيا.

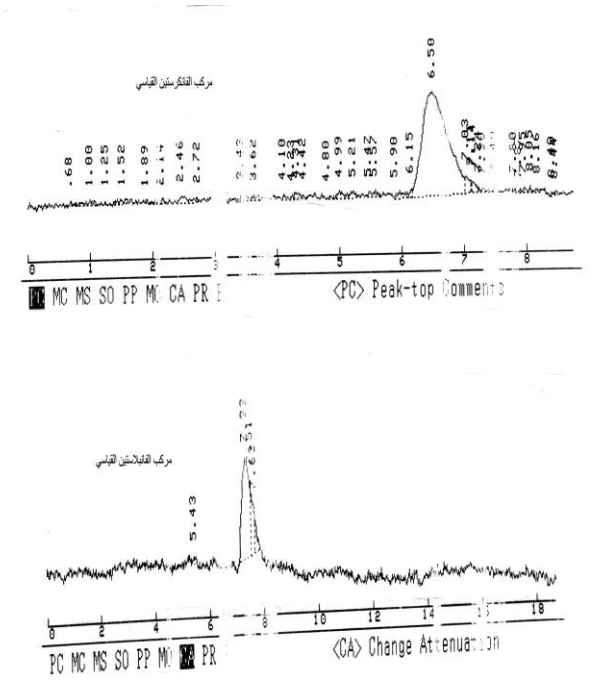
جدول (2)

تركيز مركبي الفنبلاستين و الفنكرستين في المستخلصات الكحولية لأوراق نباتات الدفلة والثفشيا والكاريسيا باستعمال تقنية HPLC.

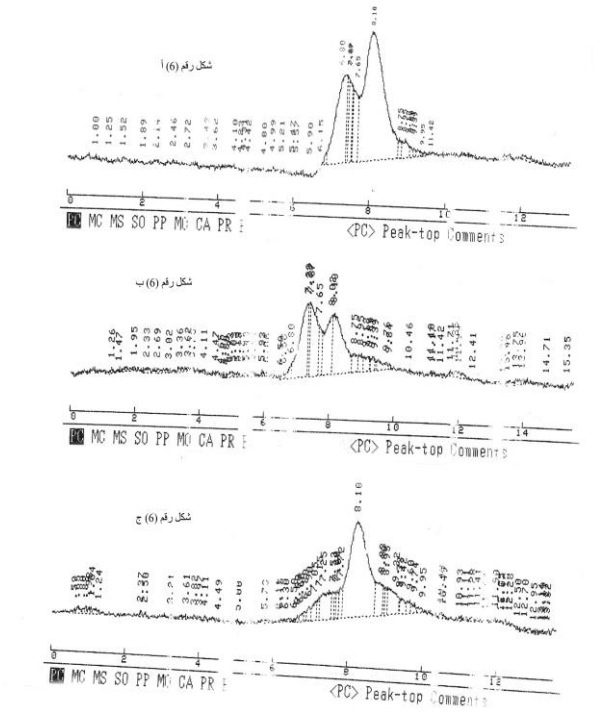
نوع المستخلص	تركيز مركب الفنبلاستين جزء بالمليون\0.5 غم وزن جاف	تركيز مركب الفنكرستين جزء بالمليون\ 0.5 غم وزن جاف
أوراق الدفلة	3.725	--------
أوراق الثفشيا	4.35	---------
أوراق الكاريسيا	--------	0.893

أن أعلى قيمة لمركب VIB و VIC بالمقارنة مع قيم المركبين القياسيين والتي يمثلها الشكل (5) كانت في المستخلص الكحولي لنباتي الثفشيا والكارسيا وكما مبين في الشكل (6) إذ أعطى المستخلص الكحولي لأوراق نبات الثفشيا أعلى تركيز لمركب VIB وهو (4.35) جزء بالمليون\ 0.5 غم وزن جاف ولم يوجد أي تركيز لمركب VIC، أما نبات الدفلة فقد كان تركيز مركب VIB فيه 3.725 جزء بالمليون\ 0.5 غم وزن جاف ولم يعطي أي تركيز لمركب

VIC. ذكر كل من [19,20] بأنهما لم يتمكنا من الحصول على أي تراكيز تذكر لمركب VIC في المستخلص الكحولي لنبات عين البزون *C. roseus*، وهي أفضل مما توصل إليه كل من [21] الذي حصل على تركيز 5 غم\ 2 طن من المستخلص الكحولي للأوراق لطرية من مركب VIB لنبات عين البز ون و [19] الذي حصل على تركيز 3 ملغم\ 100 غم وزن طري للأوراق من مركب VIB في المستخلص الكحولي لنبات عين البزون، ولم يتم الحصول على أي تركيز لمركب VIC في المستخلص الكحولي لنباتي الدفلة والثقشيا وبين كل من [2,20] قلة تركيز هذا المركب في نبات عين البزون والذي يعد المصدر الرئيس لهذين المركبين. أما المستخلص الكحولي لنبات الكاريسيا فقد ظهر فيه مركب VIC بتركيز (0.89) جزء بالمليون\ 0.5 غم وزن جاف وهذه النتيجة هي أفضل مما توصل إليه [23] الذي حصل على تركيز (0.002) ملغم\ 100 غم وزن طري من مركب VIC في المستخلص الكحولي لنبات عين البزون، ومقاربة لما توصل إليه [24] الذي حصل على تركيز (1.35) جزء بالمليون\ 0.5غم وزن جاف من مركب VIC في المستخلص الكحولي لنبات عين البزون، ولم يتم الحصول على أي تركيز لمركب VIB في المستخلص. ومن النتائج أعلاه نلاحظ وجود مركبي الفنبلاستين و الفنكرستين في أغلب نباتات العائلة الدفلية ولكن بتراكيز مختلفة، أن هذا الاختلاف في تراكيز المركبين التي تم الحصول عليها بالمقارنة مع نتائج الابحاث المذكورة قد يعود إلى اختلاف الظروف البيئية التي تنمو فيها النباتات وقدرتها على إنتاج مركبات القلويدات الاندولية وتراكمها داخل خلاياها.



شكل (٥) كروموتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي HPLC لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين القياسية.



شكل (٦) كروموتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي HPLC لمستخلصات اوراق نباتات.

أ. الدفلة الصفراء.

ب. الدفلة.

ج. الكاريسيا.

"Preliminary photochemical and antimicrobial studies of the leaves of Varissa edulis VAHL"; Chem Class Journal. 2, 15-18, 2005.

[16] Cone, N. J.; Miller, R.; Neuss, N. "Alkaloids of Vinca rosea linn. analysis of vinca alkaloids by thin layer chromatograghy" J. of pharmaceutical sciences 52, 688-692, 1963.

[17] Mohammed, A. S.; Hadi, S. M.; Saour, K. Y. "Production of vinblastine compound from callus cells of *Catharanthus roseous*"; Iraqi Journal of Yeterinary Sciences. 13, 79-109, 2000.

[18] Sovoboda, G. H.; Blak, D. A.; "The photochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* in the Cathranthus Alkaloids"; Marcel Dekker, INC. New York; pp 45-85; 1975.

[19] Saour, K.Y.; Hadi S. M.; Mohammed A. S. "Extraction, purification and quantitative determination of indole alkaloids compound (vincristine) in the callus cells of ain AL-Bazone paint *Catharanthus roseous*"; Journal of Biotechnology Research. 2 1, 35-53, 2000.

[20] Ivan, M. J.; David, L. S.; Reginald, W. S. "Assay methods for some Vinca rosea alkaloids" J. of Pharm Sci. 53, 553-557, 1964.

[21] Rahman, A. U.; Bachir, M.; Hafeez, M.; Preveen, N.; Fatima, J. Mistry, A. N. "A rapid procedure for the isolation of catharanthine, vindoline and vinblastine"; Planta Medica. 47, 246-247, 1983.

[22] Endo, T.; Goodbody, A.; Misawa, M. "Alkaloids production in root and shoot culture of *Catharanthus roseous*"; Planta Medica. 53, 479-482, 1987.

[23] Hadi, S. M.; "Production of vinblastine and vincristine from callus culture *Catharanthus roseous* using plants tissue culture technique"; A thesis submitted to the college of Science, University of Baghdad; 1999.

[24] Kumar, A. R.; Yadav, D. "Antibacterial activity of *Nyctanthes arbortristis*, *Nerium oleander* and *Catharanthus roseus"*; Int. J. of Res. in Pharmacy and Chemistry. 3, 509-512, 2013.

Reference

[1] AL-Musawi, A. H.;"Plant Taxonomy"; National Herbarium of Iraq, Baghdad; pp 171; 1987.

[2] Townsend, C. C.; Guest; E. "Floura of Iraq"; Ministry of Agriculture and Agrarian Reform of Iraq, Baghdad; pp526-539; 1980.

[3] AL-Rawi, A. "Poisonous plants of Iraq"; Ministry of Agriculture and Agrarian Reform of Iraq, Baghdad; pp371; 1988.

[4] AL-Rawi, A. and Chakavartuy, H.L.; "Medicinal planta of Iraq"; National Herbarium of Iraq; pp134; 1988.

[5] Swgh, R. P.; Jawal, P. K.; "Plant Genetic Engineering" Vol.1; pp 279-309; 2006.

[6] Thonner, R. F.; "Flowering Plants of Africa"; Dulauand Company Ltd. Soho, London; pp: 176; 1988.

[7] Steenkamp, P. A.; "Chemical analysis of medicinal and poisonous plants of forensic importance in Africa"; A Thesis in Chemistry submitted to the University of Johannesburg; 2006.

[8] Hussain, M. A. and Gorsi, M. S. "Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn"; Asian J. of Plant Sciences. 3, 177-180, 2004.

[9] Almahy, H. A. and Khalid, H. E. "Chemical Examination of the leaves of Nerium oleander"; International Journal of Tropical Medicine. 1, 58-61, 2006.

[10] Mulas, M.; Perinu, B.; Francesconi, A.; Johnson, C. and Franz, C. "spontaneous *Nerium oleander* and *Nerium indicum* as a medicinal plants" J. Herbs Species and Med. Plants. 9, 121-125, 2002.

[11] Hughes, K.; Dart, A. and Hodgson, D. "Suspected *Nerium oleander* poisoning in a horse"; Australian Vet. J. 80, 412-415, 2002.

[12] Sushma, S.; Singh, D. and Singh, S. "Molluscicidal activity of Nerium indicum leaf"; Fitoterapia. 68, 545-546, 1997.

[13] Eddleston, M.; Persson, H. "Acute plants poisoning and antitoxin antibodies" J. Toxicol Clin Toxicol. 41, 309-315, 2003.

[14] Willis, J. C.; "Dictionary of the flowering plants and ferns"; 1972.

[15] Ibrahim, H.; Bolaji, R. O.; Abdurahman, E. M.; Shok, M.; Ilyas, N.; Habib, A. G.

[25] Singh, S. K.; Singh, S. K.; Singh, K. "Molluscicidal and piscicidal properties of three medicinal plants of family Apocynaceae- areview"; J. of Bio. and Earth Sciences. 3, 194-205, 2013.
[26] Motwani, S. M.; Pandey, E. P.; Desal, T. R.; Patel, V. L.; Pandya, D. J. "Pharmacognostic and phytochemical study of aerial parts of *Carissa carandas* "; Int. J. of Biological and Pharmaceutical Research. 3, 75-81, 2012.
[27] Yadav, C. S.; Bharadwaj, N. S.; Kumar, A. R. "Phytochemical evalution of *Nyctanthes arbortristis, Nerium oleander* and *Catharanthus roseus* "; Indain J. of Research in Phar. And Biotechnology. 1, 333-338, 2013.
[28] Wong, S. K.; Lim, Y. Y.; Chan, E. W."Botany, uses phytochemistry and pharmacology of selected Apocynaceae species: A review"; Pharmacogensy communication. 3, 2-11, 2013.

Abstract

This study was carried out on three Apocynaceae family plants namely, *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana* and *Carissa grandaiflora*. Thin layer chromatography TLC, column chromatography and high performance chromatography HPLC were used for identification, partial purification and quantities determination for Vinblastine and Vincristine compounds. Results showed that the highest concentration was 4.35ppm/o.5 g d.w. for Vinblastine in leaves extract of *Thevetia peruviana* and 3.725 ppm /o.5 g d.w. in leaves extract of *Nerium oleander* and 0.893 ppm /o.5 g d.w for Vincristine in leaves extract of *Carissa grandaiflora*.

TLC: Thin layer Chromatography
HPLC: High performance liquid Chromatography
Rf: Retardation Factor
VIB: Vinblastine
VIC: Vincristine

Keywords: *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana*, *Carissa grandaiflora*, Vinblastine and Vincristine compounds.