مقایسه میزان آلکالوئیدهای گروه مورفین طی مراحل مختلف رشد در گیاه دارویی خشخاش (*Papaver somniferum* L.)

منصور امیدی[1]*، فرزانه کوهزادی[2]، محمود سلوکی[3]، رحیم تقی‌زادفرید[4]، هوشنگ علیزاده[5]

۱- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران، کرج
۲- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه زابل، زابل
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه زابل، زابل
٤- کارشناس، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
٥- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران، کرج
*آدرس مکاتبه: کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات
صندوق‌پستی: ۱۱۱٦۷ - ۳۱۵۸۷، تلفن: ۳۲۲۳۲۱۸۷ (۰۲٦)، نمابر: ۳۲۲۲۷٦۰۵ (۰۲٦)
پست الکترونیک: momidi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۰ **تاریخ تصویب:** ۹۱/۲/۳۱

چکیده

مقدمه: گیاه خشخاش حاوی آلکالوئیدهای دارویی مهمی از جمله مورفین، کدئین، تبائین، نوسکاپین، پاپاورین و سنگوئینارین می‌باشد که دارای ارزش اقتصادی بالایی در صنایع داروسازی است. با توجه به اینکه میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی بسیار کم می‌باشد تاکنون استراتژی‌های مختلفی جهت تجاری کردن استحصال آنها به کار گرفته شده است.

هدف: این آزمایش جهت بررسی روند تجمع آلکالوئیدهای گروه مورفین در گیاه خشخاش طی مراحل مختلف رشد انجام گرفت.

روش بررسی: گیاه خشخاش در شرایط گلخانه‌ای کشت شد و طی سه مرحله بذر، رویشی و بعد از گلدهی از بافت‌های ریشه و اندام‌های هوایی نمونه‌برداری صورت گرفت و پس از استخراج آلکالوئید از هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه، میزان آلکالوئیدهای مورفین، کدئین و تبائین با استفاده از دستگاه کروموتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان دادند که میزان این آلکالوئیدها در بخش‌های مختلف گیاه و طی مراحل مختلف رشد متفاوت می‌باشد. بیشترین میزان مورفین، کدئین و تبائین در اندام‌های هوایی این گیاه و در مرحله گلدهی مشاهده شد. آلکالوئید غالب، در تمام بخش‌های این گیاه مورفین بود.

نتیجه‌گیری: با بررسی نتایج مشخص شد که مرحله رشد و نمو گیاه نقش مهمی در میزان تجمع آلکالوئیدهای مورد بررسی دارد، به طوری که میزان هر سه آلکالوئید مورفین، کدئین و تبائین در مرحله بعد از گلدهی هم در ریشه‌ها و هم در اندام‌های هوایی به مراتب بیشتر از مقدار آن در مراحل اولیه رشد و بذرها می‌باشد. از آنجایی که بیشترین مقدار مورفین در مرحله بعد از گلدهی مشاهده شد به نظر می‌رسد به کار گرفتن تکنیک‌های نوین از جمله مهندسی متابولیت‌های ثانویه در این مرحله نتایج بهتری را در بر خواهد داشت.

گل‌واژگان: خشخاش، مورفین، متابولیت‌های ثانویه، HPLC

مقدمه

گرایش روز افزون جوامع بشری به استفاده از داروهای دارای منشای گیاهی سبب افزایش تقاضای مواد مؤثره گیاهان دارویی شده است. علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در زمینه سنتز مصنوعی مواد مؤثره گیاهی، به دلیل ناشناخته بودن و پیچیدگی ساختمان شیمیایی اغلب آنها، تولید این ترکیبات به صورت سنتتیک مشکل و مستلزم هزینه‌های زیاد است. در نتیجه تاکنون موفقیت چشمگیری در تولید این ترکیبات دارویی ارزشمند حاصل نشده است و هنوز هم استخراج از منابع گیاهی تنها منبع به صرفه اقتصادی دستیابی به این ترکیبات است. لذا برای به دست آوردن مناسب‌ترین مرحله رشدی جهت استحصال حداکثر میزان مواد مؤثره گیاهی در واحد سطح، لازم است اطلاعاتی در مورد این ترکیبات و زمان تشکیل آن مورد بررسی قرار گیرد [۱،۲].

متابولیت‌های ثانویه بخشی از ساختمان مولکولی پایه سلول نیستند، در مقادیر کم یافت می‌شوند و ممکن است نقش آشکاری در رشد و نمو نداشته باشند و در صورت وجود، در بافت‌ها، اندام‌های خاص یا در مراحل خاصی از رشد یافت می‌شوند. همچنین تولید آنها ممکن است در سطحی گسترده و یا به خانواده و یا جنس خاص و یا حتی گونه خاصی از گیاهان محدود باشد [۳،٤]. متابولیت‌های ثانویه در فرآورده‌های صنعتی کاربرد فراوانی دارند و در ساخت دارو، صابون، اسانس، رنگ‌ها، صمغ‌ها، رزین، کائوچو، چاشنی غذا و نوشیدنی و غیره به کار می‌روند. در خود گیاه نیز دارای وظایف مهمی مانند هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد، رفع آلودگی میکروبی، جذب عوامل گرده‌افشان و همچنین دور کردن علف‌خواران و حشرات می‌باشند که به این واسطه موجب کاهش خسارت حیوانات و حشرات شده و به گیاهان تولیدکننده کمک می‌کنند تا در اکوسیستم خود زنده بمانند [٥،٦].

گیاه خشخاش (Opium poppy) از جمله گیاهانی است که حاوی متابولیت‌های ثانویه بسیاری می‌باشد که اکثر آنها از گروه آلکالوئیدها هستند. خشخاش با نام علمی *Papaver somniferum* L. متعلق به خانواده *Papaveraceae* گیاهی است دیپلوئید (۲n = ۲۲) علفی و یک ساله که بومی غرب آسیا و جنوب شرقی اروپا است. امروزه مشخص شده است که خواص دارویی خشخاش از آلکالوئیدهای موجود در آن ناشی می‌شود. یکی از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین این گروه از ترکیبات، آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین (Benzylisoquinoline Alkaloids) (BIAs) می‌باشد که شامل بیش از ۲۵۰۰ ترکیب شناخته شده است که تنها در پنج خانواده گیاهی یافت می‌شوند [۷]. در بین این پنج خانواده گیاهی، گیاه خشخاش بیش از ۱۰۰ نوع بنزیل ایزوکوئینولین متفاوت را تولید می‌کند که گروهی از آنها از اهمیت دارویی منحصر به فردی برخوردارند. در این میان می‌توان به مورفین (Morphine) و کدئین (Codeine) (مسکن و ضددرد)، پاپاورین (Papaverine) (سست‌کننده‌ی ماهیچه و گشادکننده رگ‌ها)، نوسکاپین (Noscapine) (ضدسرفه و ضدتومور)، و سنگوئینارین (Sanguinarine) (نوعی آنتی‌بیوتیک) اشاره کرد. این گروه از آلکالوئیدها از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند، چرا که از حدود ۲۹ آلکالوئیدی که به طور خالص در صنعت داروسازی غرب استفاده می‌شود، شش عدد از آنها از نوع آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین می‌باشد [۸،۹]. سطح زیر کشت خشخاش در دنیا طی سال‌های ۲۰۰۰ – ۱۹۹۰ میلادی بالغ بر ۲۸۰/۰۰۰ هکتار بوده است. در دهه اخیر کشورهای مختلف و به خصوص اروپایی، سرمایه‌گذاری بزرگی بر روی جنبه‌های مختلف زراعت، فرآوری و کنترل قاچاق مشتقات خشخاش انجام داده‌اند. امروزه در برخی کشورها تولید تریاک غدغن شده است و به جای آن عصاره تغلیظ شده پوسته خشک کپسول خشخاش که اصطلاحاً (Concentrate of poppy straw) CPS نامیده می‌شود، به منظور تهیه آلکالوئیدهای موردنیاز صنایع دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا سوء استفاده غیرقانونی و قاچاق مواد مخدر در این روش بسیار مشکل‌تر از تریاک است [۱۰،۱۱].

در این تحقیق بنا است روند تغییرات ترکیبات مورفین، کدئین و تبائین طی مراحل مختلف رشد مورد بررسی قرار گیرد تا در تحقیقات بعدی از استراتژی‌های هدف‌دارتری جهت افزایش آلکالوئیدهای دارویی خشخاش استفاده شود.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

بذرهای گیاه خشخاش واریته افغان از پژوهشکده گیاهان دارویی کرج (ACECR) تهیه شد و در گلخانه‌ی این پژوهشکده تحت شرایط تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. طی مدت زمان رشد سه بار نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌برداری اول زمانی انجام گرفت که گیاهان شش هفته‌ای شدند. در این مرحله گیاه به طور کامل از گلدان خارج شد و خاک اطراف ریشه به آرامی شسته شد. سپس ریشه‌ها و اندام‌های هوایی (ساقه و برگ) هر یک به طور جداگانه به مدت یک هفته در سایه خشک و آسیاب شدند. پس از گذراندن از الک تا زمان آنالیز در تاریکی و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مرحله‌ی دوم نمونه‌برداری زمانی بود که گیاهان دوازده هفته‌ای به گل رفته بودند و کپسول‌ها تقریباً در مرحله رسیدگی کامل خود قرار داشتند ولی گیاه هنوز سبز بود و خشک نشده بود. در این مرحله نیز مانند مرحله قبل ریشه‌ها و اندام‌های هوایی (ساقه و برگ به همراه کپسول‌ها) به طور جداگانه خشک و آسیاب شد. در مرحله سوم نمونه‌برداری زمانی انجام شد که بذرها از نظر فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی کاملاً رسیده بودند و گیاه کاملاً زرد و خشک شده بود در این مرحله بذر جدا شد و پس از خشک شدن آسیاب شد. سپس عصاره‌گیری از نمونه‌ها به روش فاچینی و دلوکا (۱۹۹۵) با اندکی تغییر انجام شد [۱۲،۱۳]. بر اساس این روش، مقدار یک گرم از پودر خشخاش را به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده و حلال استخراجی، شامل ۵ میلی‌لیتر آمونیاک ۲۵ درصد، ۲۵ میلی‌لیتر متانول و ۷۵ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه شد و درب آن بسته و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در مکانی تاریک قرار نگهداری شد و بعد به وسیله کاغذ صافی و پنبه صاف شد و به کمک ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم محتویات باقیمانده در ارلن نیز از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده، در یک بالن ۲۰۰ میلی‌لیتری به دستگاه روتاری متصل شد تا حلال‌های آن تبخیر و خارج شود. به رسوب حاصل، ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد. برای بهتر حل شدن رسوب می‌توان از دستگاه اولتراسونیک برای مدت زمان کوتاهی استفاده کرد. محلول فوق را به یک دکانتور منتقل کرده و پس از ایجاد دو فاز مجزا، فاز پایینی که فاز کلروفرمی بود، از دکانتور خارج و فاز بالایی را که فاز آبی بود، نگه داشته شد. در صورت ایجاد اینترفاز (یک لایه بین دو فاز آبی و کلروفرمی) از چند میلی‌لیتر محلول آب نمک اشباع برای جداسازی بهتر دو فاز استفاده گردید. با استفاده از چند قطره محلول آمونیاک pH محلول بین ۱۱ - ۱۰ تنظیم شد. با ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم عمل استخراج انجام شد، در این مرحله فاز کلروفرمی (فاز پایینی) در بالن‌های کوچکتر جمع‌آوری و فاز آبی مجدداً با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم استخراج و جمع‌آوری شد. برای آبگیری از محلول حاصل، به محلول کلروفرمی جمع‌آوری شده، سدیم سولفات انیدرید اضافه و سپس به وسیله کاغذ صافی صاف شد. سپس با دستگاه روتاری حلال آن کاملاً خارج شد و مواد باقیمانده با ۵ میلی‌لیتر متانول ویژه HPLC جمع‌آوری شد. برای انحلال کامل رسوب در متانول، به مدت چند دقیقه در اولتراسونیک قرار داده شد. به این ترتیب عصاره خشخاش برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شد.

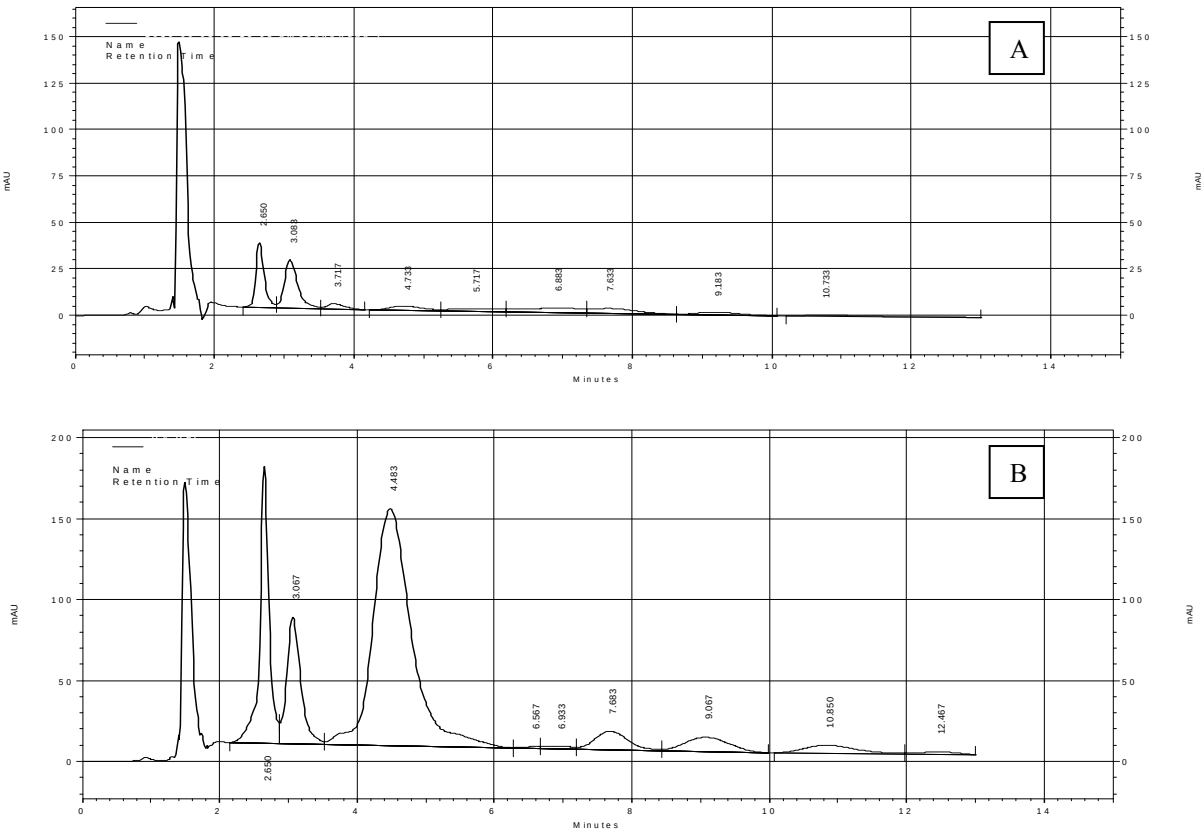
مشخصات دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

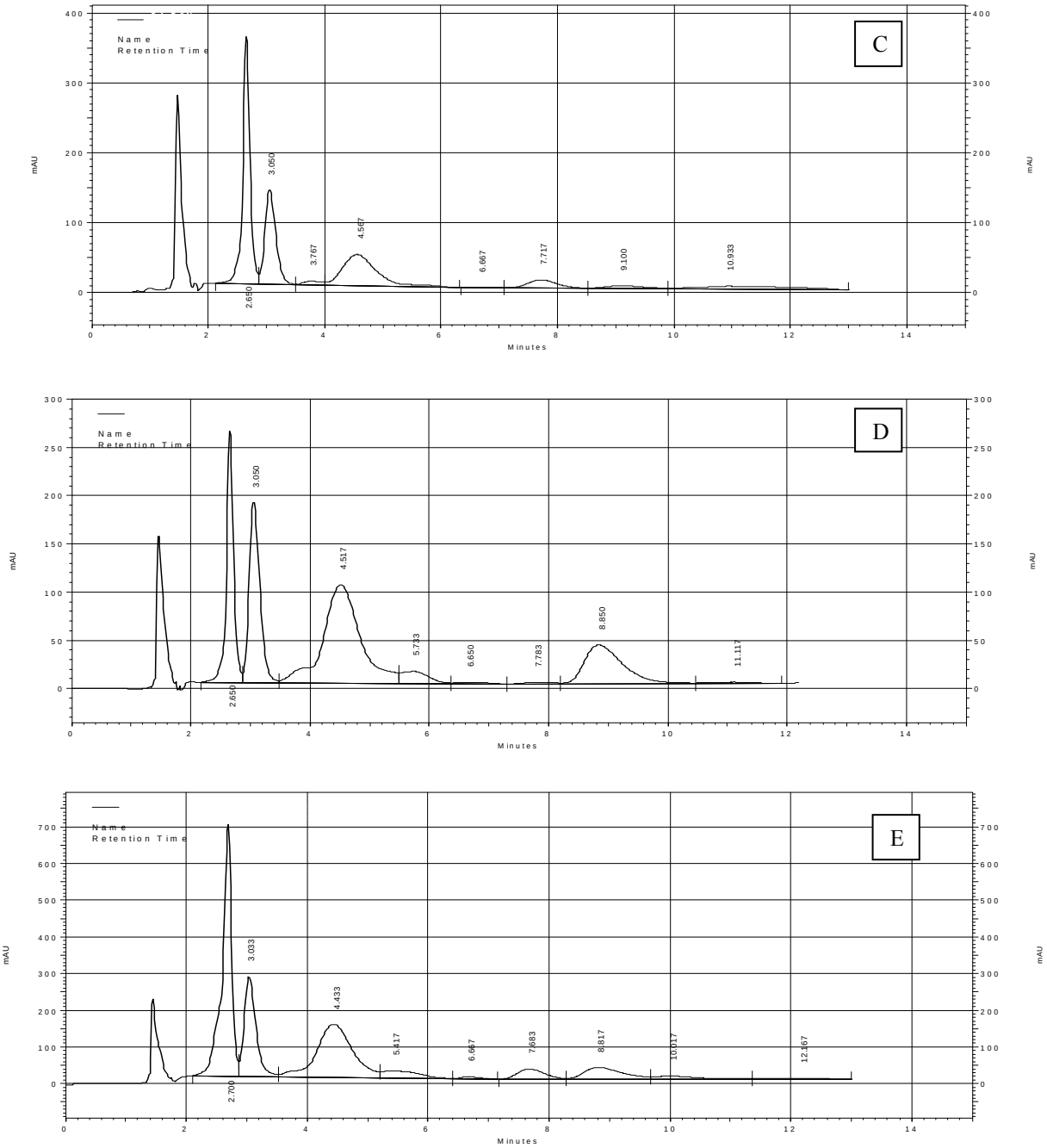
روش کروماتوگرافی مورد استفاده جهت جداسازی و تعیین مقدار فلاونوئیدهای موجود در گیاه خشخاش، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High performance liquid chromatography) (HPLC) است. در بین

روش‌های گوناگون آنالیز آلکالوئیدها، روش HPLC با ردیاب ماورای بنفش، به دلیل گزینش‌پذیری مناسب و حساسیت بالا، بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد. در این تحقیق برای آنالیز عصاره از دستگاه HPLC مدل Knauer با Flow rate، ۲ میلی‌لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک به کار برده شده، آمونیوم استات ۱۰۰ mM، دی‌اکسان، استونیتریل، به نسبت (۴۰:۵۰:۵۰:۸۶۰) با اسید استیک pH= ۵/۶ و دتکتور UV با طول موج ۲۵٤ nm، ستون CN 5micrometer (4.9*250) استفاده شد. حجم هر بار تزریق ۵۰ میکرولیتر بود.

روش آنالیز و کالیبراسیون

برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، ابتدا غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از استانداردهای هر یک از آلکالوئیدهای مورفین، کدئین و تبائین خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich در متانول تهیه شد و هر یک در سه تکرار به دستگاه HPLC تزریق و سطح زیر منحنی در مقابل مقدار تزریق ترسیم شد و معادله خط و ضریب همبستگی (r_2) استاندارد کدئین، مورفین و تبائین محاسبه شد و بر اساس آن منحنی کالیبراسیون آن رسم شد. سیستم در گستره غلظت نمونه‌های استاندارد تنظیم شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های عصاره‌گیری شده، به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام آنها ثبت شد (شکل شماره ۱).





شکل شماره ۱- کروماتوگرام نمونه‌های مورد آنالیز. A) بذر B) ریشه در مرحله رویشی (نمونه‌های شش هفته‌ای) C) ساقه و برگ در مرحله رویشی D) ریشه در مرحله بعد از گلدهی (نمونه‌های دوازده هفته‌ای) E) ساقه و برگ در مرحله بعد از گلدهی.

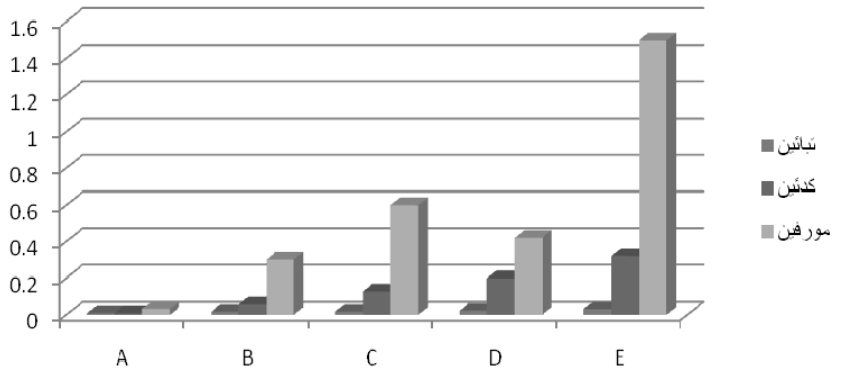
(مورفین ۲/٦٥٠ دقیقه، کدئین ۳/۰۵۰ دقیقه و تبائین ۸/۸۵۰ دقیقه)

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز با دستگاه HPLC نشان داد که پیک‌های مورفین، کدئین و تبائین به ترتیب در ۲/۶۵۰، ۳/۰۵۰ و ۸/۸۵۰ دقیقه خارج شدند. میزان غلظت آلکالوئیدهای گروه مورفینی موجود در اندام‌های مختلف در جدول شماره ۱ و کروماتوگرام‌های حاصل از دستگاه HPLC در شکل شماره ۱ نشان داده شده‌اند. همچنین مقایسه مقدار آلکالوئیدهای گروه مورفینی اندام‌های مختلف طی مراحل مختلف رشد در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. با توجه به اینکه بیشترین میزان مورفین در مرحله‌ی بعد از گلدهی مشاهده می‌شود، بذرها به طور جداگانه از نظر میزان آلکالوئیدهای گروه مورفینی مورد آنالیز و مقایسه قرار گرفتند تا مشخص شود چه میزانی از این آلکالوئیدها در بذر تجمع می‌یابد. نتایج حاصل در جدول شماره ۱ آمده است. نتایج حاصل از آنالیز آلکالوئیدها در مرحله رویشی گیاه نشان داد که نه تنها در اندام‌های هوایی بلکه در ریشه‌ها نیز مورفین دارای بیشترین مقدار نسبت به دو آلکالوئید دیگر می‌باشد. ولی در مجموع میزان هر سه آلکالوئید مورد بررسی در این تحقیق در اندام‌های هوایی بالاتر از میزان آنها در ریشه‌ها می‌باشد (شکل شماره ۲). آنالیز آلکالوئیدها در مرحله بعد از گلدهی نیز نشان داد که میزان آلکالوئیدهای مورفین، کدئین و تبائین در اندام‌های هوایی بالاتر از میزان آنها در ریشه‌ها می‌باشد. اگرچه میزان هر سه آلکالوئید مورفین، کدئین و تبائین در مرحله بعد از گلدهی نسبت به مرحله رویشی افزایش یافته است ولی میزان تغییرات مورفین در این مرحله با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به طور چشمگیری بیشتر از میزان تغییرات کدئین و تبائین می‌باشد. با مراجعه به جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود که در تمام نمونه‌های مورد آنالیز کدئین از نظر کمیت بعد از مورفین و در درجه دوم قرار دارد.

جدول شماره ۱- مقادیر مورفین، کدئین و تبائین طی مراحل مختلف رشد در گیاه خشخاش بر حسب (mg/ml)

مرحله جمع‌آوری	اندام گیاهی	تبائین	کدئین	مورفین
بذر	بذر	۰/۰۰۹	۰/۰۰۱	۰/۰۳۳
رویشی	ریشه	۰/۰۱۳	۰/۰۵۶	۰/۳۰
	ساقه و برگ	۰/۰۱۸	۰/۱۳	۰/۶۲
بعد از گلدهی	ریشه	۰/۰۲۱	۰/۲۲	۰/۴۱
	ساقه و برگ	۰/۰۳۲	۰/۳۲	۱/۵



شکل شماره ۲- نمودار تغییرات میزان مورفین، کدئین و تبائین طی مراحل مختلف رشد A) میزان آلکالوئیدها در بذر B) ریشه در مرحله رویشی C) ساقه و برگ در مرحله رویشی D) ریشه در مرحله بعد از گلدهی E) ساقه و برگ در مرحله بعد از گلدهی

بحث

با توجه به کروماتوگرام‌های موجود در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود که آلکالوئیدهای مورفین، کدئین و تبائین در همه بخش‌ها و در تمام مراحل رشد گیاه خشخاش وجود دارند. در تمام نمونه‌های مورد آنالیز مورفین همیشه در مقدار بیشتری نسبت به کدئین و تبائین می‌باشد. به عبارتی مورفین آلکالوئید اصلی در تمام نمونه‌های تهیه شده از گیاه خشخاش است. از طرفی در تمام نمونه‌های مورد آنالیز تبائین همیشه در مقدار کمتری نسبت به مورفین و کدئین مشاهده شد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، مقدار تبائین بر خلاف مورفین، طی رشد و نمو تغییرات چشمگیری نداشت. در تحقیقاتی که به منظور شناسایی مسیر سنتز مورفین انجام شده است، تبائین یکی از ترکیبات ناپایدار و میانی مسیر سنتز این گروه آلکالوئیدی ذکر شده است که در مراحل بعدی، طی واکنش‌های شیمیایی به کدئین و سپس مورفین که محصول نهایی این مسیر می‌باشد، تبدیل می‌شود. به نظر می‌رسد در این تحقیق نیز عدم مشاهده تغییرات قابل ملاحظه طی مراحل مختلف رشد در میزان تبائین، از این مساله ناشی می‌شود. کدئین پایدارتر از تبائین بوده و با افزایش میزان مورفین در طی دوره رشد، مقدار کدئین نیز افزایش یافته و در اندام‌های مختلف تجمع می‌یابد (جدول شماره ۱). با این حال، به علت افزایش بیشتر میزان مورفین در مرحله گلدهی، نسبت کدئین به مورفین در اندام‌های مورد مطالعه در مقایسه با مرحله رویشی کاهش یافته است. این موضوع که غلظت مورفین به طور چشمگیری از دیگر آلکالوئیدهای موجود در این مسیر بیشتر است باعث شد که برای مدت‌ها تصور شود مورفین محصول نهایی مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین می‌باشد ولی امروزه مشخص شده است که مورفین ماده نهایی مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین نیست و تحت شرایط خاص، به ویژه در کپسول‌ها، به سرعت به نورمورفین (Normorphine) و در نهایت به مواد غیرآلکالوئیدی تبدیل می‌شود [۱٤]. آنالیز عصاره‌های تهیه شده از اندام‌های مختلف گیاه خشخاش نشان داد که بالاترین میزان مورفین، کدئین و تبائین در مرحله گلدهی در اندام‌های هوایی و کمترین میزان آن در بذرها تولید می‌شود (شکل شماره ۲).

با بررسی نتایج مشخص شد که مرحله رشد و نمو گیاه نقش مهمی در میزان تجمع آلکالوئیدهای مورد بررسی دارد، به طوری که میزان هر سه آلکالوئید مورفین، کدئین و تبائین در مرحله گلدهی هم در ریشه‌ها و هم در اندام‌های هوایی به مراتب بیشتر از مقدار آن در مراحل اولیه رشد و بذرها می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده و عدم اطلاع از مکانیسم تجمعی این ترکیبات با ارزش مطالعات بیشتر بر اساس مارکرهای مولکولی و مهندسی متابولیت‌های ثانویه در نقاط کلیدی مسیر سنتز مورفین حائز اهمیت می‌باشد و به فهم کامل‌تر این مسیر و نقاط کلیدی در کنترل مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین کمک شایانی خواهد کرد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق مبنی بر تولید و تجمع چشمگیر مورفین در مراحل انتهایی رشد در اندام‌های هوایی تأکید کننده این مطلب است که احتمالاً سیستم‌های کشت بافت و ریشه مویی گزینه‌های مناسبی به منظور تولید تجاری مورفین و کدئین نمی‌باشند. چرا که در تحقیقاتی که تاکنون در دیگر گیاهان دارویی انجام گرفته سیستم‌های کشت بافت و ریشه مویی در مواردی که محل تجمع متابولیت‌های ثانویه ریشه می‌باشد نتایج بهتری در برداشته است. در مقابل تولید تجاری ترکیباتی که در اندام‌های هوایی مانند برگ‌ها، کپسول و بذر تجمع می‌یابند اغلب با شکست مواجه بوده است. از طرفی تولید دیگر اندام‌های تخصصی در محیط‌های کشت پرهزینه و گاهی اوقات ناممکن بوده است. نتایج به دست آمده در آزمایش‌های فاچینی و همکاران (۱۹۹٦) در رابطه با اثر Elicitor ها در میزان تجمع آلکالوئیدهای گروه مورفین در کشت سوسپانسیون خشخاش تأییدکننده این مطلب می‌باشد. در تحقیق انجام گرفته توسط این محققین افزودن پاتوژن محرک بوترایتیس (Botrytis sp) به کشت

سوسپانسیون خشخاش منجر به افزایش تجمع سنگوئینارین (Sanguinarine) شد. سنگوئینارین یکی از ترکیبات میانی در مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین می‌باشد که در ریشه تولید و در همین اندام تجمع می‌یابد. اگرچه همه آنزیم‌های شناخته شده در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین در کشت سوسپانسیون خشخاش در این تحقیق تشخیص داده شد ولی تجمع مورفین و کدئین که از جمله ترکیبات پایانی مسیر سنتز آلکالوئیدهای گروه مورفین می‌باشند، در کشت سوسپانسیون سلولی هرگز مشاهده نشد. این محققین در تحقیقات بعدی با استفاده از تکنیک‌های دو رگه‌سازی در محل (In situ hybridization) و مکان‌یابی ایمونوفلورسنس (Immunofluorescence localization) نشان دادند که، تولید و تجمع مورفین در خشخاش به سلول‌های تمایز یافت‌های به نام مجاری شیرابه‌ای (Laticifers) و فاکتورهای مرتبط با آن، که به مقدار زیاد در دستجات آوندی ساقه و کپسول خشخاش در مراحل انتهایی رشد مشاهده می‌شوند، وابسته می‌باشد [۱۵،۱۶،۱۷]. همان‌طور که در شکل شماره ۲ قابل مشاهده می‌باشد، نتایج به دست آمده توسط این محققین با نتایج به دست آمده در این تحقیق همسو می‌باشد. بنابراین افزایش آلکالوئیدهای گروه مورفین در مرحله‌ی گلدهی و تشکیل کپسول‌ها به علت تکامل یافتن هر چه بیشتر مجاری شیرابه‌ای می‌باشد.

از آنجایی که در حال حاضر استحصال مستقیم از گیاهان تنها منبع به صرفه اقتصادی در تولید این ترکیبات دارویی می‌باشد، امروزه یکی از چالش‌های محققین، ابداع تکنیک‌های نوین جهت تولید بیشتر این ترکیبات در خود گیاه می‌باشند. به نظر می‌رسد مهندسی متابولیت‌های ثانویه می‌تواند پاسخگوی این مشکل باشد. مهندسی متابولیت‌های ثانویه یا مهندسی چندژنی روشی قدرتمند جهت طراحی هوشمندانه مسیرهای بیولوژیکی جدید و در نهایت فنوتیپ‌های جدید، با استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب می‌باشد و نگرش اصلی آن تمرکز و فهم شبکه متابولیک سلول می‌باشد. زیرا بدون درک خوبی از مسیر سنتز متابولیت‌ها، رسیدن به نتیجه مطلوب مشکل است. یکی از موانع اصلی در کاربرد این تکنولوژی، فقدان اطلاعات کافی در مورد مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه و به ویژه مکانیسم کنترل تجمع آنها می‌باشد [۱۸،۱۹،۲۰]. بنابراین بررسی محل تجمع این متابولیت‌های با ارزش، طی مراحل مختلف رشد، اولین گام در طراحی استراتژی‌های هدف‌دار جهت افزایش تولید آلکالوئیدهای دارویی خشخاش می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی کرج جهت در اختیار نهادن امکانات و بودجه این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Davies K M and Schwinn K E.Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Funct Plant Biol.* 2003; 30: 913 - 25.

2. Allen R S, Miller J A C, Chitty J A, Fist A J, Gerlach W L and Larkin P J. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over expression and RNAi suppression of salutarinol 7-O-acetyltransferase opium poppy. *Plant Biotechnology Journal* 2008; 6: 22 - 30.

3. Ahmadi A, Ehzanzadeh P and Jabbari F. Introduction to Plant Physiology. Vol 1. Translate. University of Tehran press. 1383; p 653.

4. De Luca V, St Pierre B. The Cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci*. 2000; 5: 168 - 73.

5. Kutchan T M. Alkaloid biosynthesis the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell.* 1995; 7: 1059 - 79.

6. Verpoorte R, Alfermann A W. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers 2000, p: 253.

7. Facchini P J and Bird D A. Developmental regulation of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plant and tissue cultures. In Vitro Biology 1997, pp: 69 - 79.

8. Huang F and Kutchan T M. Distribution of morphinan and benzophenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in Papaver somniferum. *Phytochem.* 2000; 53: 555 - 64.

9. Facchini P J and Park S U. Development and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochem*. 2003; 64: 177 - 86.

10. Park S U, Yu M and Facchini P J. Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* 2003; 51: 153 - 64.

11. Allen R S, Millgate A G, Chitty J A, Thistleton J, Miller J A C, Fist A J, Gerlach W L and Larkin P J. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat. Biotechnol.* 2004; 11: 1559 - 66.

12. Facchini P J and De Luca V. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell*. 1995; 7: 1811 - 21.

13. Frick S, Chitty J A, Kramell R, Schmidt J, Allen R S, LarkinP L and Kutchan T M. Transformation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) with antisense berberine bridge enzyme gene (anti-bbe) via somatic embryogenesis results in an altered ratio of alkaloids in latex but not in roots. *Transgenic Res*. 2004; 13: 607 – 13.

14. Yazdani D, Shahnazi S, Piralihamedani M. Review on opium poppy. *Journal of Medicinal Plants* 1381; 5: 1 - 12.

15. Facchini P J and Park S U. The influence of elicitation on the subcellular localization and content of sanguinarine in callus cells of papaver somniferum L. *Biologia Plantarum* 1996; 48: 177 - 92.

16. Samanani N, Alcantara J, Bourgault R, Zulak K G and Facchini P J. The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *Plant J.* 2006; 47: 547-563.

17. Weid M, Ziegler J and Kutchan T M. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 13957 - 62.

18. Smolke C D. The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals. CRC Press. 2010, p: 680.

19. Smolke C D. The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Tools and Applications. CRC Press. 2010, p: 584.

20. Stephanopoulos G N, Aristidou A and Nielsen J. Metabolic Engineering Principles and Methodologies. Acadmic Press. USA. 1998, p: 725.

Comparison of Morphinan Alkaloids During Different Stages of Growth in the Medicinal Plant Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.)

Omidi M (Ph.D.)[1*], Koohzadi F (M.Sc.)[2], Solouki M (Ph.D.)[2], Taghizad Farid R (M.Sc. student)[3], Alizadeh H (Ph.D.)[4]

1- Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
3- Pharmacognosy & Pharmaceutics Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
4- Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
*Corresponding author: Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
Tel: +98-26-32223187, Fax: +98-26- 32227605
E-mail: momidi@ut.ac.ir

Abstract

Background: Opium poppy contains important pharmaceutical alkaloids such as Morphine, Codeine, Thebaine, Noscapine, Papaverine and Sanguinarine which are of a high economic value in pharmaceutical industries. Since production volume of secondary metabolites is very low, many strategies have been so far adopted for commercialization of its production.

Objective: this research has been carried out to investigate accumulation process of morphinan alkaloids in opium poppy plant during different stages of growth.

Methods: Opium poppy plant was cultured in greenhouse condition and during three stages of seed, development and flowering, samples have been taken from root and aerial organs' tissues and after extraction of alkaloid from each specimen separately, amount of Morphine, Codeine and Thebaine using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was measured.

Results: results indicated that amount of these alkaloids differs in various parts of plant during different stages of growth. Highest content of Morphine, Codeine and Thebaine was observed in aerial organs and at flowering stage of this plant. Morphine was the dominant alkaloid in all parts of plant.

Conclusion: after study of the results, it was found that the plant's growth stage has a crucial role in the under study alkaloids concentration amount, so as the amount of all the three alkaloids, Morphine, Codeine, and Thebaine after flowering stage, both in the roots and aerial organs, is by far more than their amount at growth and seeds stages. Since the largest amount of morphine was observed in flowering stage, it seems that application of new techniques such as metabolic engineering will yield better results at this stage.

Keywords: ***Papaver somniferum* L., Morphine, Secondary Metabolites, HPLC**