

جداسازی Taxezopidine - G از برگ‌های سوزنی و ساقه‌های جوان *Taxus baccata* L.

مرتضی پیرعلی همدانی^۱، محمدرضا وردیان ریزی^۲، شمسعلی رضازاده^{۳*}، رضا دولت‌آبادی^۴، عباس حاجی‌آخوندی^۵، محسن امینی^۶، داراب یزدانی^۳

- ۱- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 - ۲- دستیار فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 - ۳- هیأت علمی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، تهران
 - ۴- استادیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 - ۵- دانشیار، گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- *آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان قدس، خیابان بزرگمهر غربی، پلاک ۹۷، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۱۴۴۶-۱۳۱۴۵، تلفن: ۶۴۶۲۱۷۹ (۰۲۱)، نمابر: ۶۴۶۵۵۵۴ (۰۲۱)
پست الکترونیک: shrezazadeh@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۴/۳/۱

چکیده

مقدمه: گونه‌های *Taxus* به دلیل وجود Paclitaxel، Baccatin-III، 10-Deacetyl baccatin و تاکسوییدهای دیگری که قابل تبدیل به مواد فعال بیولوژیکی که به عنوان داروهای ضد نئوپلاسم استفاده می‌شوند اهمیت خاصی دارند. مطالعات روی تاکسوییدهای مختلف جنس *Taxus* در چهار دهه اخیر منجر به شناسایی بیش از ۳۵۰ ترکیب تاکسوییدی از گونه‌های مختلف این جنس گردیده است.

هدف: این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی تاکسوییدهای موجود در *Taxus baccata* L. شمال ایران انجام گرفت. روش تحقیق: استخراج با حلال آلی و زدودن چربی‌های برگ‌های سوزنی گیاه، سپس خالص‌سازی با ستون کروماتوگرافی و لایه نازک صورت گرفت و شناسایی ترکیبات با استفاده از طیف‌های NMR آنها انجام گردید. یافته‌ها: ترکیب Taxezopidine-G به صورت خالص جداسازی و شناسایی گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ترکیب Taxezopidine-G از برگ‌های سوزنی و سرشاخه‌های جوان *Taxus baccata* برای اولین بار جداسازی و شناسایی گردید که قبلاً در این گونه گزارش نشده بود.

کل واژگان: *Taxezopidine G*، *Taxus baccata* L.



C-9 (20) exocyclic، رایج‌ترین می‌باشند [۸].
به لحاظ تاکسونومی، گونه‌های مختلف سرخدار در جنس *Taxus* قرار دارند که به خانواده Taxaceae تعلق دارد. گونه‌های مختلف سرخدار براساس ناحیه رویش سرخدار هیمالیایی، سرخدار اروپایی و سرخدار کانادایی و غیره تقسیم‌بندی می‌شوند. این گونه‌ها در نیمکره شمالی زمین به صورت گسترده‌ای رویش دارند و در اروپا، آمریکای شمالی، شمال هند، چین و ژاپن دیده می‌شوند [۹]. گونه *Taxus baccata* L. تنها گونه‌ای می‌باشد که در ایران رویش دارد [۱۰]. تا حال بر روی سرخدار ایرانی گزارش فیتوشیمیایی خاصی صورت نگرفته است. بنابراین در این تحقیق به بررسی فیتوشیمیایی سرشاخه‌های هوایی این گیاه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برگ‌های سوزنی گیاه در دی ماه ۱۳۸۲ از محل رویش آن در ارتفاعات استان مازندران (جاده ساری-کیاسر، منطقه ارم) جمع‌آوری و در شرایط سایه در دمای محیط خشک و سپس پودر شده و تا زمان عصاره‌گیری در یخچال نگهداری شدند.

عصاره‌گیری [۴،۵،۱۱]

۲/۹ کیلوگرم پودر حاصل از سرشاخه‌های خشک شده گیاه *Taxus baccata* L. در حلال متانول (۳ لیتر) به مدت یک هفته خیسانده شد. این کار ۲ بار دیگر نیز تکرار گردید و عصاره‌های حاصل جمع‌آوری شده و بعد از صاف شدن خشک گردیدند. عصاره خشک حاصل (۹۰۰g) با آب (۹۰۰ میلی‌لیتر) مخلوط گردید و توسط هگزان عصاره‌گیری شد (۳ × ۹۰۰ میلی‌لیتر). عصاره هگزانی دور ریخته شد. این عمل به منظور خارج کردن مواد غیر قطبی موجود در عصاره انجام گرفت. مخلوط مایه موجود از مرحله قبل توسط دی‌کلرومتان (۳ × ۹۰۰ میلی‌لیتر) استخراج شد. فاز آلی جدا شده پس از افزودن سدیم سولفات به منظور بدون آب کردن و پس از صاف کردن خشک شد (۱۹۰g).

تحقیقات برای دستیابی به مواد ضدسرطان با منشای طبیعی به سال‌های قبل از میلاد برمی‌گردد ولی تحقیقات علمی در این زمینه از سال‌های اخیر و با کار Hartwell و همکاران بر روی Podophyllotoxin و مشتقات آن به عنوان ضدسرطان شروع شد. تعداد زیادی از گیاهان، منابع دریایی و میکروبی برای این منظور مورد آزمایش قرار گرفتند و صدها ترکیب از این منابع جداسازی و تعیین ساختار گردید. تعداد کمی از این ترکیبات مورد مطالعه دقیق و زیاد برای اثرات بالینی ضدسرطانی قرار گرفتند و مواد ارزشمندی مثل Mitomycin، Adriamycin، Vincristine، Vinblastine و سایر ترکیبات در چرخه درمان سرطان وارد شوند. ترکیبات طبیعی در درمان سرطان ارزشمند هستند که این ارزش آنها تنها به جداسازی آنها از منابع طبیعی بر نمی‌گردد بلکه این ترکیبات به عنوان ترکیب مادر (Lead compound) در طراحی و ساخت ترکیبات ارزشمند دیگر به عنوان الگو استفاده می‌شوند. به عنوان مثال مطالعه ترکیبات Podophyllotoxins توسط Hartwell و همکاران، منجر به ورود داروهای Etoposide و Teniposide به چرخه درمان سرطان گردید [۱].

ترکیب دی‌ترپنوییدی Taxol به عنوان یک داروی ضدسرطان قوی از منشای طبیعی وارد بازار دارویی گردید. این ترکیب اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط Wall و همکاران جداسازی گردید و اثر خوبی بر علیه انواع لوسمی، کارسینوسارکوما، سارکوما و سرطان ریه نشان داد [۲]. با ورود Taxol به بازار دارویی توسط شرکت Bristol Myers Squibb، تحقیقات فیتوشیمیایی روی گیاه سرخدار را از جمله موضوعات مهم قرار داد و گروه‌های تحقیقاتی زیادی را بر آن داشت تا مشتقات Paclitaxel را جداسازی کنند [۳،۴،۵]. بیش از ۳۵۰ دی‌ترپنویید از دسته تاکسان‌ها از جنس سرخدار جداسازی شده‌اند [۶]. سرشاخه‌ها و برگ‌های وارپته‌های تاکسوس دارای اهمیت کاربردی به عنوان منبعی برای آنالوگ‌های Taxol و پیش‌سازهای آن می‌باشند [۷]. در بین این مشتقات تاکسانی، تاکسویدهایی با یک پیوند دو گانه



خالص سازی [۴،۵،۱۱]

مقداری از عصاره حاصل (۱۱۰ گرم) بر روی یک ستون کروماتوگرافی (۵ × ۱۵۰ سانتی متر و سیلیکاژل ۶۰ مش ۳۵ - ۷۰) اضافه و با سیستم سیکلو هگزان - اتیل استات (۷۵:۲۵ و ۵۰:۵۰) استخراج گردید و دو فزاکسیون به دست آمد. فزاکسیون دوم (۵۰:۵۰) بر روی ستون کروماتوگرافی دیگری اضافه گردیده و این بار توسط سیستم حلالی هگزان - استون (۹:۱، ۸:۲ و ۷:۳) استخراج گردید و سه فزاکسیون به دست آمد. فزاکسیون شماره ۳ (هگزان - استون ۷:۳) توسط TLC Preparative بر روی شیشه و توسط سیستم کلروفرم - متانول (۹۵:۵) به عنوان فاز متحرک خالص سازی شد (Rf = ۰/۸) و مشخصات ساختار شیمیایی آن توسط روش های دستگاهی شامل $^1\text{H-NMR}$ و $^{13}\text{C-NMR}$ تعیین گردید.

نتایج و بحث

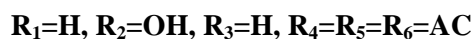
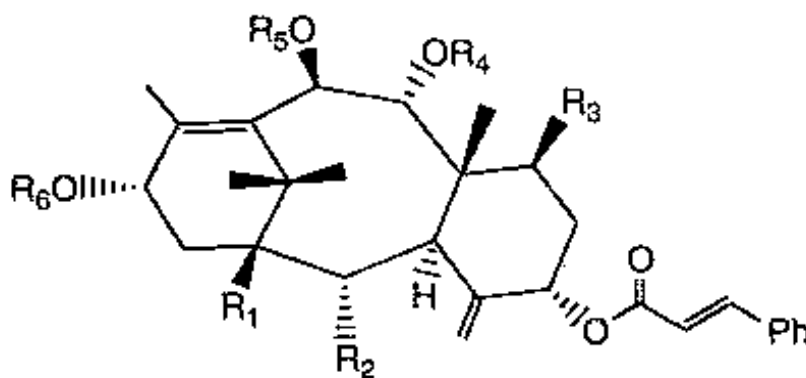
بعد از خالص سازی ترکیب مورد نظر جسم حاصل به

صورت یک ماده صمغی بی رنگ در آمد. آنالیز این ترکیب توسط طیف NMR در حلال CDCl_3 انجام گردید. ساختار آن توسط مقایسه اطلاعات طیفی آن با اطلاعات طیفی ترکیبات تاکسوییدی به دست آمد [۱۲].

طیف $^1\text{H-NMR}$ این ترکیب وجود یک ساختمان تاکسانی و چهار گروه متیل را نشان می دهد: (0.96, 1.07, 1.14, 2.2 ppm). همچنین وجود ۳ گروه استیل نیز در ترکیب در مقایسه با اطلاعات طیفی موجود اثبات شد (2.06, 2.01, 1.77 ppm). همچنین وجود یک گروه سینامویل با اختصاصات زیر نیز تایید شد:

[6.65 (1H, d, J = 16 Hz), 7.78 (1H, d, J = 16 Hz), 7.41 (3 H, m - Phe and p-Phe.), 7.49 (2H, o-Phe)]

با توجه و مقایسه این اطلاعات با اطلاعات طیفی تاکسوییدهای دیگر مطابقت دقیق آن، ترکیب Taxezopidine G برای ترکیب حاصل از استخراج پیشنهاد گردید (شکل شماره ۱). اطلاعات طیفی $^{13}\text{C-NMR}$ موجود نیز در جدول شماره ۲ به خوبی با رفرانس مطابقت نشان می دهد و تایید کننده است.



شکل شماره ۱ - Taxezopidine-G

جدول شماره ۱ - مقایسه جابجایی شیمیایی هیدروژن‌های Taxezopidine - G و ترکیب خالص‌سازی شده

Position	Taxezopidine - G	Sample	Position	Taxezopidine - G	Position
1	2.09 (d, J= 11.0Hz)	2.1 (d, J= 11.0Hz)	17	1.14 (s)	1.14 (s)
2	4.22 (d, J= 6.4Hz)	4.24 (d, J= 6.4Hz)	18	2.28 (s)	2.29 (s)
3	3.21 (d, J= 6.4Hz)	3.32 (d, J= 6.4Hz)	19	0.96 (s)	0.96 (s)
5	5.45 (s)	5.45 (s)	20a	5.56 (s)	5.57 (s)
6a	1.91 (dd, J=13.2, 1.0Hz)	1.91 (dd, J=13.2, 1.0Hz)	20b	5.50 (s)	5.51 (s)
6b	1.81 (dd, J= 9.9, 1.0Hz)	1.81 (dd, J= 9.9, 1.0Hz)	22	6.65 (d, J = 16 Hz)	6.66 (d, J = 16 Hz)
7a	1.68-1.80 (m)	1.68-1.80 (m)	23	7.78 (D, J = 16 Hz)	7.78 (D, J = 16 Hz)
7b	1.68- 1.80 (m)	1.68- 1.80 (m)	25, 29	7.49 (m)	7.50 (m)
9	5.88 (d, J= 10.5Hz)	5.88 (d, J= 10.5Hz)	26, 28	7.41 (m)	7.41 (m)
10	6.05 (d, J= 10.5Hz)	6.05 (d, J= 10.5Hz)	27	7.41 (m)	7.41 (m)
13	5.84 (dd, J= 12.5, 12.5Hz)	5.84 (dd, J= 12.5, 12.5Hz)	2-OH	1.63 (br)	1.56 (br)
14a	2.65 (m)	2.66 (m)	9-OAc	2.06 (br)	2.06 (br)
14b	1.31 (dd, J= 15.0, 8.1Hz)	1.31 (dd, J= 15.0, 8.1Hz)	10-OAc	2.01 (s)	2.02 (s)
16	1.7 (s)	1.7 (s)	11-OAc	1.77 (s)	1.77 (s)

جدول شماره ۲ - مقایسه جابجایی شیمیایی کربن‌های Taxezopidine - G و ترکیب خالص‌سازی شده

Position	Taxezopidine - G	Sample	Position	Taxezopidine - G	Position
1	51.26	51.15	17	31.73	31.68
2	70.35	70.25	18	15.31	15.32
3	45.67	45.54	19	17.93	17.82
4	143.59	143.44	20	119.42	119.40
5	78.56	78.46	21	166.33	166.31
6	28.35	28.30	22	118.74	118.57
7	26.91	26.78	23	145.53	145.53
8	44.45	44.37	24	134.32	134.18
9	77.10	76.98	25	129.04	129.0
10	72.40	72.32	26	128.05	128.01
11	133.61	133.49	27	130.56	130.55
12	136.62	136.52	28	128.05	128.01
13	70.53	70.48	29	129.04	129.0
14	29.19	29.13	9-OAc	170.26, 21.00	170.28, 21.03
15	37.35	37.26	10-OAc	169.81, 20.80	169.48, 20.80
16	27.57	27.48	13-OAc	170.69, 21.00	170.70, 21.03

گزارش *Taxus cuspidata* شده است [۱۲] ولی تا به حال حضور این گونه ترکیبات در *Taxus baccata* مورد تحقیق و گزارش واقع نشده است. در این تحقیق برای اولین بار Taxezopidine- G در این گونه گیاهی جداسازی و تعیین

تاکسوییدهای مختلفی از گونه *Taxus baccata* گزارش شده است که در مقالات مروری به آنها اشاره شده است و Taxine I, Taxine II, Taxusine, 10-deacetyltaxine و ده‌ها ترکیب دیگر که ساختار تاکسوییدی دارند از این گونه گزارش شده‌اند. Taxezopidine B-H از گونه

ساختار گردید. اطلاعات طیف NMR ترکیب خالص شده مورد نظر در جدول شماره ۱ و ۲ ارایه گردیده است.

منابع

- Kingston DGI, Samaranyake G and Ivey CA. The Chemistry of Taxol, a clinically useful anticancer gent. *J. Nat. Prod.* 1990; 53 (1): 1-12.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P and Mcphail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 1971; 93: 2325-2327.
- Erdemoglu N, Sener B, Ide S. Structural features of two taxoids from *Taxus baccata* L. growing in Turkey. *J. Mol. Struct.* 2001; 559: 227-233.
- Das B, Rao P, Srinivas KVNS, Yadaw JS and Das R. A taxoid from needles of himalyan *Taxus baccata*. *Phytochemistry* 1995; 38: 671-674.
- Soto J and Castedo L. Taxoids from European yew, *Taxus baccata* L. *Phytochemistry* 1998; 47: 817-819.
- Nguyen NT, Banskota AH, Tezuka Y, Nobukawa T, Kadota S. Diterpens and sesquiterpens from the bark of *Taxus yunnanensis*. *Phytochemistry* 2003; 64 (6) 1141-7.
- Kingston DGI. Natural Taxoids; Structure and Chemistry in: Suffness M. (Ed.), *Taxol: Science and Applications*. CRC press, Boca Raton. FL. 1995: 287-316.
- Kosugi K, Sakai J, Zhang S, Watanabe Y, Sasaki H, Suzuki T, Hagiwara H, Hirata N, Hirose K, Ando M, Tomida A. and Tsuruo T., Neutral taxoids from *Taxus cuspidata* as modulators of multidrug- resistant tumor cells. *Phytochemistry* 2000; 54: 839-43.
- Parmar VS, Jha A, Bisht KS, Taneja P, Singh SK, Kumar A, Poonam Jian R, and Olsen CE. Constituents of the yew trees. *Phytochemistry* 1999; 50: 1267-1304.
- Davis PH, Cullen J. In: Davis PH. (Ed.), *Taxus L., Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 1. University Press, Edinburgh. 1965: 67-70.
- Cociancich F and Pace R. *Process for the extraction of taxol and derivatives thereof from roots of plants of the genus Taxus*. United States Patent. 1998; patent number 5,744,333.
- Wang X, Shigemori M, and Kobayashi J. Taxezopidine B-H, new taxoides form Japanese Yew *Taxus cuspidata*. *J. Nat. Prod.* 1998; 61, 474-479.

