

## بررسی آکالوئیدهای گیاه نرگس (*Narcissus tazetta* L.)

سیده حمیرا سلیمانی<sup>۱\*</sup>، فرانسواز برنارد<sup>۲</sup>، محسن امینی<sup>۳</sup>، رمضانعلی خاوری نژاد<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی

۳- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- استاد، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

\*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی گیاهی

تلفن: ۴ - ۴۴۸۱۷۱۷۰ (۰۲۱)، نمابر: ۴۴۸۱۷۱۷۵ (۰۲۱)

پست الکترونیک: moho\_plant@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۵/۶/۸

تاریخ تصویب: ۸۶/۶/۲۴

### چکیده

مقدمه: گیاه نرگس متعلق به خانواده Amaryllidaceae گیاهی است تک لپه، پایا و دارای پیاز. این گیاه زینتی معطر، دارای آکالوئیدهای متنوعی است که خواص ضدتوموری، ضدویروسی و آنتی‌کولینرژیک دارند. هدف: این تحقیق به منظور شناسایی آکالوئیدهای موجود در پیازهای گیاه نرگس متعلق به استان گیلان در مرحله پس از گل‌دهی صورت گرفته است.

روش بررسی: از پیازهای گیاه نرگس ابتدا یک عصاره اتانولی تهیه شد. این عصاره با کمک حلال‌های متفاوت (دی‌اتیل اتر، کلروفرم و محلول آبی کربنات سدیم) استخراج شد تا در نهایت عصاره روغنی حاوی مخلوطی از آکالوئیدها به دست آمد. عصاره حاصل توسط TLC به اجزای تشکیل‌دهنده خود تفکیک شد. پس از جداسازی آکالوئیدهای موجود، شناسایی آن‌ها با بررسی طیف‌های IR، NMR و MASS صورت گرفت.

نتایج: پژوهش حاضر وجود سه آکالوئید همولیکورین، تازتین و ایسمین را در پیازهای گونه *N. tazetta* متعلق به کشور ایران نشان داد.

نتیجه‌گیری: آکالوئیدهای تازتین و مشتق دمتیله همولیکورین که دارای خواص مهم دارویی هستند در این گونه گیاهی قبلاً توسط سایر محققین گزارش شده است ولی آکالوئید ایسمین با خاصیت کاهندگی فشار خون، برای اولین بار در این تحقیق از گونه *N. tazetta* استخراج گردید.

کل واژگان: گیاه نرگس، آکالوئید، تازتین، همولیکورین، ایسمین



## مقدمه

گیاه نرگس<sup>۱</sup> از تیره Amaryllidaceae گیاهی پایا، دارای پیاز به قطر ۵ - ۳ سانتی متر و برگ‌های قاعده‌ای، تخت یا ناودانی است. ساقه آن به ارتفاع ۵۲ سانتی متر و معمولاً استوانه‌ای شکل است. گل‌آذین به صورت چتر و دارای ۲ تا ۱۱ و به ندرت ۱۵ گل است. گل‌ها دارای گلبرگ‌های سفیدرنگ و تخم‌مرغی و تاج آن به رنگ زرد یا کم و بیش نارنجی است. میوه آن به صورت کپسول و زمان گل‌دهی آن از بهمن تا فروردین است [۱].

این گونه بومی فرانسه، پرتغال، اسپانیا و نواحی مدیترانه‌ای بوده [۲] و محل رویش آن در ایران مازندران، گیلان، گرگان، استان فارس، بهبهان و بوشهر است [۳].

این گیاه زیتنی به جهت دارا بودن خواص دارویی بسیار مورد توجه است [۴]. به عنوان مثال گل‌ها و پیازهای آن در درمان تب دوره‌ای و اسهال خونی و ریشه‌های آن در درمان آبه، جوش‌ها و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود [۵]. لکتن‌های جدا شده از این گیاه نیز فعالیت ضد HIV-1 از خود نشان می‌دهند [۶]. از گیاه نرگس آلكالوئیدهای متنوعی استخراج گردیده است که دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و فارماکولوژیکی بسیاری است [۷].

آلكالوئیدها یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین گروه‌های متابولیت‌های ثانویه گیاهان، موادی هستند قلبایی که در مولکول خود دارای یک یا چند اتم ازت است که معمولاً در حلقه هتروسیکل قرار دارند [۸]. آلكالوئیدها اغلب برای انسان سمی بوده ولی فعالیت بیولوژیکی برخی از آن‌ها منجر به استفاده آن‌ها به عنوان داروها، محرک‌ها، سموم و مواد مخدر شده است [۹].

بررسی بر روی آلكالوئیدهای آماریلیداسه با جداسازی لیکورین از *N. pseudonarcissus* در سال ۱۸۷۷ آغاز شد [۱۰] و تاکنون بالغ بر ۱۰۰ آلكالوئید مشتق از فنیل‌آلانین و تیروزین از اعضای خانواده آماریلیداسه جدا شده است [۱۱، ۱۲]. آلكالوئیدهای مختلفی شامل بوفانیزین<sup>۲</sup>، همولیکورین<sup>۳</sup>، همانتامین<sup>۴</sup> و تورتوسین<sup>۵</sup> در گونه‌های مختلف *Narcissus* گزارش شده است [۱۳، ۱۴]. آلكالوئیدهای آماریلیداسه

فعالیت‌های ضدتوموری، ضدویروسی و آنتی‌کولنیرژیک نشان می‌دهند [۴]. به عنوان مثال گالاتامین که آلكالوئید اصلی در *N. confusus* است در درمان ضعف عضلانی و بیماری سیستم عصبی و هم‌چنین آلزایمر استفاده می‌شود [۱۵]. سنتز شیمیایی آلكالوئیدها اغلب غیرممکن بوده و تنها منبع استخراج آن‌ها گیاهان است. تاکنون تحقیقی بر روی آلكالوئیدهای گیاه نرگس در ایران صورت نگرفته است. بر این اساس در این تحقیق استخراج و شناسایی برخی آلكالوئیدهای گیاه *N. tazetta* بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه گیاهی

گیاه *Narcissus tazetta* از روستای ضیابر از توابع بندرانزلی در تاریخ ۸۴/۲/۱۵ در مرحله پس از گل‌دهی جمع‌آوری گردید. پس از جداکردن اندام‌های هوایی، ریشه‌ها و فلس‌های خشک سطحی پیازها در شرایط سایه و هوای آزاد خشک شده و سپس برای استخراج و شناسایی آلكالوئیدها استفاده شدند.

### استخراج آلكالوئیدها

یک کیلوگرم از پیازهای مذکور با اتانول ۹۶ درصد آسیاب شد. پس از ۴۸ ساعت این عصاره اتانولی صاف شده و در دستگاه تقطیر دورانی در خلأ<sup>۱</sup> تحت دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به حجم یک پنجم رسانده شد. pH این عصاره الکلی تغلیظ شده به کمک اسید استیک گلاسیال بر روی ۴ تنظیم شد. عصاره اسیدی پس از فیلتر شدن، چهار مرتبه با دی‌اتیل‌اتر شستشو داده شد تا مواد آلی و ترکیب‌های رنگی موجود در آن خارج شود. در ادامه فاز آبی، چهار مرتبه توسط کلروفرم استخراج شد تا آلكالوئیدهای محلول در کلروفرم جدا شوند. این آلكالوئیدهای محلول در کلروفرم پس از پراندن حلال، عصاره A نامیده شدند.

<sup>۱</sup> Rotary evaporator

<sup>۱</sup> *Narcissus tazetta* L.

<sup>۲</sup> Buphanisine

<sup>۳</sup> Homolycorine

<sup>۴</sup> Haemanthamine

<sup>۵</sup> Hortuosine



با مقایسه طیف‌های حاصل با طیف‌های آلکالوئیدهایی که تاکنون شناسایی شده‌اند، نام ترکیبات جدا شده از پیازهای *N. tazetta* تعیین شد.

## نتایج

مقدار ۳۴۲ میلی‌گرم (۰/۰۳۴ درصد) عصاره A و ۴۳۵ میلی‌گرم (۰/۰۴۴ درصد) عصاره C از پیازهای *N. tazetta* استخراج شد. ویژگی‌های ترکیب‌های جدا شده از عصاره C به شرح زیر است:

ترکیب ۱ آلکالوئیدی با فرمول مولکول  $C_{18}H_{21}NO_4$  و جرم مولکولی ۳۱۵ است که بر اساس مقایسه داده‌های طیف‌های آن با طیف‌های آلکالوئیدهای موجود با نام همولیکورین شناخته شد. ساختمان مولکولی آن در شکل a - (۱) ملاحظه می‌شود. این ماده به مقدار ۵۰ mg از عصاره C جدا گردید.

مشخصات طیف‌های  $^1H$ NMR،  $^{13}C$ NMR، IR و MASS این ماده به صورت زیر هستند.

$^1H$ NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.50 (s, 1H, H7), 6.95 (s, 1H, H10), 5.40-5.50 (m, 1H, H3), 4.73-4.75 (m, 1H, H1), 3.89 and 3.88 (two s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.04-3.12 (m, 1H, H12- $\alpha$ ), 2.66-2.71 (m, 1H, H4- $\alpha$ ), 2.60-2.65 (m, 1H, H10- $\beta$ ), 2.60-2.65 (m, 2H, H11), 2.40-2.50 (m, 2H, H2), 2.24 (dd, J = 18, 9.2 Hz, 1H, H12- $\beta$ ), 1.95 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).

IR (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 1715(CO), 1603(C=C).

MASS (m/z), (rel.int.): 315[M]<sup>+</sup> (5), 257 (10), 206 (15), 178 (62), 109 (100), 108 (29), 94 (7), 82 (8).

$^{13}C$ NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 166 (CO), 153.4 (C9), 149.5 (C8), 141 (C4), 138 (C13), 117.1 (C14), 115.6 (C3), 112.1 (C7), 111.1 (C10), 66.9 (C-4 $\alpha$ ), 56.8 (C12), 56.7 (OCH<sub>3</sub>), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 44.2 (NCH<sub>3</sub>), 44.0 (C10b), 31.5 (C2), 28.29 (C11).

ترکیب ۲، با فرمول مولکولی  $C_{18}H_{21}NO_5$  و جرم مولکولی ۳۳۱ که براساس مقایسه طیف‌های آن با طیف‌های آلکالوئیدهای شناخته شده، تازتین<sup>۱</sup> نامیده می‌شود. ساختمان

محلول آبی با کربنات سدیم<sup>۱</sup> یک مولار قلبایی شده (۹ - ۸ pH) و سپس چهار مرتبه با کلروفرم استخراج شد. با افزودن سولفات سدیم انیدر، ابتدا عصاره بی آب و سپس تغلیظ شد. بعد از آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از صاف کردن این محلول کلروفرمی، حلال آن تقطیر گشت تا یک عصاره روغنی قهوه‌ای رنگ حاصل شد (عصاره C). این عصاره که مخلوطی از آلکالوئیدهای نسبتاً خالص است اصطلاحاً آلکالوئید خام<sup>۲</sup> نامیده می‌شود [۱۶].

## تفکیک و خالص‌سازی آلکالوئیدها

آلکالوئید خام حاصل توسط کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۳</sup> به اجزای تشکیل‌دهنده خود تفکیک گردید. به این ترتیب که عصاره C در مقداری کلروفرم حل شده و بر روی پلئیت‌های سیلیکاژل لکه‌گذاری شد و در تانکی با حلال ۱:۲ (اتیل‌استات: متانول) قرار گرفت. در بررسی پلئیت‌ها با UV (۲۵۴ nm) سه باند مشاهده شد که پس از رنگ‌آمیزی با معرف دراژندورف مشخص شد هر سه دارای ساختار آلکالوئیدی هستند. این اجسام از روی پلئیت جدا شده و پس از جداسازی سیلیکاژل از آن‌ها، شناسایی شدند.

## شناسایی آلکالوئیدها

جهت تشخیص ساختمان و جرم مولکولی هریک از آلکالوئیدهای جدا شده، طیف‌های  $^1H$ NMR،  $^{13}C$ NMR، IR و MASS آن‌ها سنجیده و ارزیابی شد. طیف NMR با استفاده از کلروفرم دوتره<sup>۴</sup> توسط دستگاه FT-NMR (Bruker) با قدرت ۷ تسلا و فرکانس ۳۰۰ MHz حاصل شد. طیف IR (مادون قرمز) اجسام توسط دستگاه طیف سنج Bomem - MB100 به دست آمد و طیف جرمی این اجسام نیز توسط دستگاه طیف سنج جرمی Finnigan MaT - TSQ حاصل گردید.

<sup>۱</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

<sup>۳</sup> TLC

<sup>۲</sup> Crude alkaloid

<sup>۴</sup> CDCl<sub>3</sub>

<sup>۱</sup> Tazettine



ترکیب ۳ آلکالوئیدی با فرمول  $C_{15}H_{15}NO_3$  و جرم مولکولی ۲۵۷ است که براساس مقایسه داده‌های طیف‌های آن با طیف‌های آلکالوئیدهای شناسایی شده، ایسمین<sup>۱</sup> نام دارد. ساختمان آن در شکل (۱ - c) مشاهده می‌شود.

مشخصات طیف‌های ایسمین به صورت زیر است:

$^1H$ NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.30 (ddd,  $J = 8.1, 7.2, 1.6$  Hz, 1H, H3), 7.04 (s, 1H, H10), 6.98 (dd,  $J = 7.3, 1.7$  Hz, 1H, H1), 6.85 (ddd,  $J = 7.3, 7.3, 1.1$  Hz, 1H, H2), 6.76 (dd,  $J = 8.1, 1.1$  Hz, 1H, H4), 6.70 (s, 1H, H7), 6.02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4.24 (d,  $J = 12$  Hz, 1H, H6), 2.76 (s, 3H, NMe).

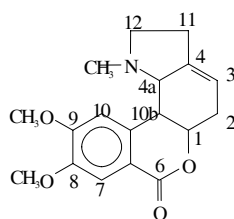
IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3430, 1605, 1580, 1250, 1050, 930.

MASS ( $m/z$ ), (rel. int.): 257 [M] + (35), 238 (100), 196 (20), 109 (29).

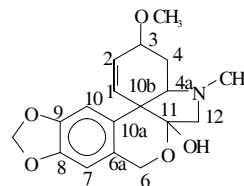
$^{13}C$ NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 148.01 (C9), 147.94 (C8), 147.03 (C-NMe), 134.33 (C11), 131.5 (C5), 130.32 (C2), 129.43 (C4), 127 (C12), 118.55 (C3), 111.28 (C1), 110.66 (C7), 110.33 (C10), 101.67 (OCH<sub>2</sub>O), 64.20 (CH<sub>2</sub>OH), 30.10 (NMe).

این ماده به مقدار ۲۰ mg از یک کیلوگرم پیاز *N. tazetta*

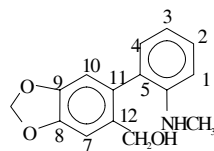
جدا شد.



a



b



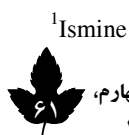
c

شکل شماره ۱- ساختمان مولکولی آلکالوئیدهای استخراج شده از پیازهای *Narcissus tazetta*

c - ایسمین

b - تازتین

a - همولیکورین



فصلنامه گیاهان دارویی، سال ششم، دوره چهارم،

شماره مسلسل بیست و چهارم، پاییز ۱۳۸۶

## بحث

لیابرس<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۸۶) [۱۶] با همین روش استخراج موفق به جداسازی ۲۲۲ mg عصاره A و ۱۷۷ mg عصاره C از یک کیلوگرم اندام‌های هوایی گونه *N. requienii* رویش یافته در استرالیا در مرحله گل‌دهی شدند. در حالی‌که در بررسی صورت گرفته ۳۴۲ mg عصاره A و ۴۳۵ mg عصاره C از یک کیلوگرم پیازهای گونه *N. tazetta* در مرحله پس از گل‌دهی حاصل شد، و این مطابق با یافته‌های برگونون<sup>۲</sup> و همکاران است که مقدار آلکالوئیدها در مرحله پس از گل‌دهی بیشتر از زمان گل‌دهی است [۱۷]. اگرچه بیوسنتز آلکالوئیدها به طور ژنتیکی و طی مراحل نمو سلول و بافت کنترل می‌شود [۱۸، ۱۹]، اما توسط عوامل محیطی مختلف مانند نور، دمای بالا و مواد معدنی نیز تاثیر می‌پذیرد [۲۰]. از این رو کمیت و کیفیت آلکالوئیدها بسته به گونه گیاه، فصل برداشت، مکان برداشت و نوع اندامی که جهت استخراج استفاده می‌شود، متفاوت گزارش شده است.

تاکنون از گونه *N. tazetta* آلکالوئیدهای بوفانیسین، همانتامین، گالاتامین، تازتین، 9-O-demethylhomolycorine و 3-epihydroxybulbispermine استخراج شده است [۱۳]، در

حالی‌که در تحقیق حاضر علاوه بر تازتین آلکالوئیدهای همولیکورین و ایسمین نیز از پیازهای *N. tazetta* جدا گردید. تازتین که در گونه‌های *N. confusus* [۱۷]، *N. contabricus* [۲۱] و *N. tazetta* [۱۳] وجود دارد، آلکالوئیدی است که با جلوگیری از رشد پلاسمودیوم فالسپاروم<sup>۳</sup>، خاصیت ضدملاریایی نشان داده است. این ترکیب مسکن نیز محسوب می‌شود.

همولیکورین اثر سمیت سلولی علیه سلول‌های LMTK فیروپلاستیک دارد و تاکنون از گیاه کامل *N. bujei* [۲۲] و *N. confusus* [۶] جدا گردیده است. در گونه *N. tazetta* شکل دمتیل این آلکالوئید (9-O-demethylhomolycorine) گزارش شده است [۱۳]. در حالی‌که در پژوهش حاضر از این گونه گیاهی ترکیب همولیکورین در مرحله پس از گل‌دهی استخراج گردیده و آلکالوئید 9-O-demethylhomolycorine در مرحله قبل از گل‌دهی در پیازها حضور دارد (نتایج منتشر نشده است).

ایسمین کاهنده فشار خون است [۲۳]. این آلکالوئید که تاکنون فقط در دو گونه *N. asturiensis* [۲۴] و *N. bulbocodium* [۲۵] شناسایی شده است، در تحقیق حاضر، برای اولین بار از پیازهای گونه *N. tazetta* استخراج گردید.

<sup>1</sup> Liabres                      <sup>2</sup> Bergonon

<sup>3</sup> *Plasmodium falciparum*

## منابع

1. Rechinger KH. Flora Iranica. *Academische Druck-u. Verlagsanstalt*. 1984; 67: 7.
2. Judd WS, Campbl CS, Kellogg EA, Stevens PF. Plant systematics: A phylogenetic Approach, Sinauer Associates, Inc. USA. 1999, pp: 180 - 191.
3. Ghahreman A. Flore de l'Iran en couleur naturelle. 1<sup>nd</sup> ed. Institut des recherches des forets et des paturages departement botanique, Iran. 1978, 1, pp: 115.
4. Martin F. The Amaryllidaceae alkaloids. In: The Alkaloids, Academic press. Newyork. 1987, pp: 251 - 376.
5. Duke JA. Ayensu ES. Medicinal Plants of China. Reference Publications Inc. Michigan. 1985; pp: 283.
6. Lopez S, Armand - Ugon M, Bastida J, Viladomat F. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV - 1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta Med*. 2003; 69: 109 - 112.
7. Arrigoni O, De Gara L, Pacilla C. Lycorine: A powerful inhibitor of L - galactono-γ-lactone



- dehydrogenase activity. *J. Plant Physiol.* 1997; 150: 362 - 364.
8. Pelletier SW. The nature and definition of an alkaloid. In: Pelletier SW. John Wiley & Sons, NewYork. 1983, pp: 1 - 31.
9. Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in Plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001; 52: 29 - 66.
10. Cook JW, Loudon JD. The Alkaloids. Academic press. NewYork. 1952, pp: 439 - 457.
11. Ghosal SH, Saini KS, Razdan S. Crinum alkaloids: Their chemistry and biology. *Phytochem.* 1985; 24: 2141 - 2156.
12. Suau R, Gomez AI, Rico R, Vazquez Tato MP, Castedo L, Riguera R. Alkaloid N - Oxides of amaryllidaceae. *Phytochem.* 1988; 27: 3258 - 3287.
13. Sener B, Koyuncu M, Bingol F, Muhtar F. production of bioactive alkaloids from Turkish geophytes. <http://www.iupac.Org/symposia/proceedings>.
14. Bastida J, Viladomat F, Liabres JM, Codina C, Feliz M, Rubiralta M. Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochem.* 1987; 26: 1519 - 1524.
15. Ghous T, Townshend A. Flow injection determination of neostigmine and galanthamine by immobilised acetylcholinesterase inhibition. *Analytica chimica Acta.* 1998; 372: 379 - 389.
16. Liabres JM, Viladomat F, Bastida J, Codina C, Serrano M, Rubiralta M. Two alkaloids from *Narcissus requienii*. *Phytochem.* 1986; 25: 1453 - 1459.
17. Bergonon S, Codina C, Bastida J, Mele E. Galanthamine production in shoot - clump cultures of *Narcissus confusus* in ilquid - shake medium. *Plant Cell, Tissue. Org. Cult.* 1996; 45: 191 - 199.
18. Deluca, V, Culter A. J. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 1987; 85: 1099 - 1102.
19. Deluca V, St- Pierre B, Vazquez - Flota F. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: The establishment of a model system. In: Lo Schiavo F, Last L, Morelli G. *Cellular Integration of Signaling Pathway In Plant Development*. Springer - Verlag. Beriln. 1998, pp: 17 - 87.
20. Chatterjee SK, Nandi RP, Bharati P, Yonjan B, Yonzon MK. Improvement studies on some alkaloid yielding medicinal plants. *Med. Arom. Spice plants.* 1988, 188: 39 - 46.
21. Bastida J, Contreras JL, Codina C, Wright CW, Philipson JD. Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochem.* 1995; 40: 1549 - 1551.
22. Labrana J, Choy G, Solans X, Font-Bardia M, De la Fuente G, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochem.* 1999; 50: 183 - 188.
23. Schmeda - Hirschmann G, Rodriguez JA, Loyola JI, Astudillo L, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Activity of amaryllidaceae alkaloids on the blood Pressure of normotensive rats. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2000; 6: 309 - 312.
24. Viladomat F, Selles M, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus asturiensis*. *Planta Med.* 1997; 63: 583.
25. Seijas JA, Vazquez- Tato MP, Seijo- Muras J, Ramil - Rego P. Alkaloids from *Narcissus bulbocodium* L. 8th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. 2004, 1 - 30 November.

