دراسة تأثير موعد قطاف أوراق الدِفلى *Nerium oleander* في تركيز مادة الــ Oleandrin فيها في منطقتي دمشق و اللاذقية

مها عبد اللطيف[1]

الملخص

يعدُّ نبات الدِفلى *Nerium oleander* الذي يتبع فصيلة Apocynacea من شجيرات الزينة دائمة الخضرة التي تنمو برياً في حوض البحر الأبيض المتوسط فقط. وهي مزروعة في جميع أنحاء العالم. وهي من النباتات الشديدة السمية، حيث تكفي عدة أوراق من النبات لقتل إنسان بالغ.

وحديثاً، يصنف هذا النبات ضمن النباتات الطبية المهمة في معالجة أمراض السرطان، وذلك لما يحتويه من غليكوزيدات قلبية تزيد على 30 غليكوزيداً، من أهمها وأكثرها سمية مادة الــ Oleandrin.

وأظهرت النتائج أن تركيز المادة في أوراق النبات تختلف حسب فصول السنة، وحسب مناطق نمو النبات. حيث كان أعلى تركيز للمادة في عينات الدراسة في منطقة دمشق في شهر أيار 0.18 غ/100 غ ورقاً جافاً، في حين كان أخفض تركيز لها في منطقة اللاذقية في شهر شباط 0.097 غ/100 غ ورقاً جافاً.

الكلمات المفتاحية: الدِفلى Oleandrin غليكوزيدات.

[1] أستاذ مساعد، قسم البساتين كلية الزراعة جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

Study of the Effect of Collecting Time of *Nerium Oleander* Leaves on theire Oleandrin Concentration in Damascus and Lattakia Regions

M. Abdullatif[(1)]

ABSTRACT

Nerium oleander **from the Apocynacea family is considered an ornamental and perennial green plant which grows wildly in the Mediterranean sea area only, and is planted all over the world. This plant is very poisonous, where several leaves suffice to kill a man.**

Recently, this plant has been classified as a medicinal plant which can be used to cure some types of cancer diseases since it contains Glycosides substance (more than 30 Glycosides) with the most poisonous one being oleandrin.

The results show that the concentration of oleandrin in the *Nerium oleander* leaves vary according to season and region of planting. The higher oleandrin concentration was found in the Damascus region in May (0.18 g/ 100 g dried leaves), whereas the lowest concentration was in the Lattakia region in February (0.097 g / 100 g dried leaves) .

Key words: Nerium oleander, Oleandrin, Glycosides.

[(1)] Associate professor, Department of Horticulture, Faculty of Agronomy, Tishreen University, Lattakia, Syria.

المقدمة

ينمو نبات الدفلى *Nerium oleander* الذي يتبع الفصيلة الدفلية Apocynaceae بشكل بري في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط فقط (Hardin and Arena, 1974) وخاصة في المناطق الدافئة (Pankhurst, 2005)، كما يزرع هذا النبات في جميع أنحاء العالم، وهو من شجيرات الزينة دائمة الخضرة، ويستخدم كنبات سياج أيضاً وينمو بطول يصل حتى 4 أمتار، أوراقه خضراء قاتمة اللون، متطاولة الشكل يراوح طولها بين 10 22 سم، وهو من النباتات المتحملة للجفاف، والمقاومة لعوامل التلوث الجوي **(**Chopra, *et al.*, 1986**)** والنبات مزهر، فمنه أصناف ذات أزهار مطبقة كبيرة الحجم، وأخرى ذات أزهار مفردة صغيرة الحجم، ولون الأزهار وردي أو أبيض (البطل، 1987).

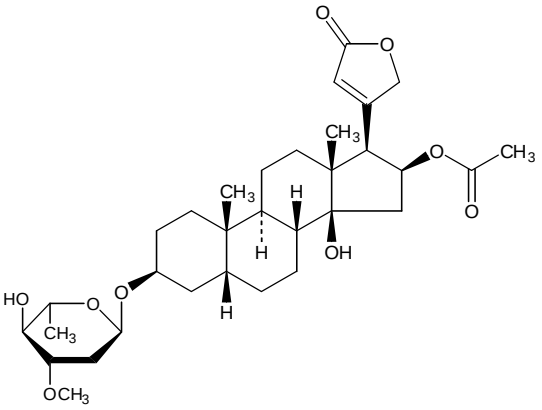
نبات الدفلى من النباتات شديدة السمية للإنسان والحيوان حيث تكفي 7 20 ورقة لموت الإنسان (Shumaik, *et al.*, 1988) وتعدُّ جميع أجزاء النبات (الأوراق، الأزهار، النسغ) سامة جداً (Lampe and McCann, 1985) كما أن العسل الناتج من تغذية النحل على أزهار نبات الدفلة سام أيضاً (Hardin and Arena, 1974).

ويصنف نبات الدفلى أيضاً ضمن النباتات الطبية، لاحتوائه العديد من المواد الفعالة (طلاس، 1989) واستخدم قديماً في معالجة العديد من الأمراض، فقد استخدمت أزهاره وأوراقه كدواء مقو للقلب، معرق، مدر للبول (Chiej, 1984)، واستخدم منقوع الأوراق خارجياً لمعالجة الجرب، وفي حالات التورم والانتفاخ (Chopra, *et al.*, 1986) واستعملت خلاصة الأوراق لمعالجة الأمراض التناسلية، والطفح الجلدي (Neuwinger, 2000**)**. إن أوراق نبات الدفلى تحوي أكثر من 30 غليكوزيداً قلبياً مختلفاً، ومن أهم هذه الغليكوزيدات: الـ Oleandrin، Neriine، Bufalin Digitoxin وأظهرت هذه الغليكوزيدات سمية للخلايا السرطانية عند الإنسان (Goetz, 1998; Newman, *et al.*, 2006)، ويبلغ تركيز هذه الغليكوسيدات في النبات قرابة 2%.

كما أظهرت الخلاصة الكحولية لأوراق الدفلى أثراً سمياً لخلايا سرطان المثانة، ومنعت ظهورها مجدداً (Lamm, *et al.*, 1999).

وأصبح لهذه المادة أهمية طبية كبيرة، فقد أنتجت إحدى شركات الدواء في تكساس، وتدعى Ozelle Pharmaceuticals عقاراً يدعى ANVIRZEL لمعالجة أمراض السرطان، ومرض الإيدز. وهذا العقار عبارة عن الخلاصة المائية لأوراق نبات الدفلى. (Ozel, 1992) كما أظهرت الخلاصة المائية حديثاً فعالية لتطوير علاج أمراض السرطان، والأمراض الفيروسية (Wang, *et al.*, 2000).

ومن أكثر غليكوزيدات نبات الدفلى أهمية مادة الــ Oleandrin: فهي مادة لا لــون لها، ولا رائحة، بللورية الشكل، طعمها شــديد المــرارة (Shaw and Pearn, 1979) صيغتها الكيميائية: $C_{32}H_{48}O_9$ ووزنها الجزيئي:576.7وصيغتها الفراغية:



وهي من أكثر المواد سمية في نبات الدفلى ويراوح تركيزها في النبات بــين 0.08 0.2%، وتبلغ الجرعة القاتلــة النــصفية لهــذه المــادة 0.3 مــغ/ كــغ للفئــران (i.v) (Merck Index, 2000).

وفي سورية ينمو النبات بشكل بري في المنطقة الساحلية والتي معدل أمطارها بحدود 700 مم/سنة، وفي منطقة دمشق التي معدل أمطارها 210 مــم/ســنة (Masri, 1991) ولكن انتشرت زراعتها بشكل كبير في المدن السورية كافة، في الحدائق وعلــى حافــات الطرقات، وذلك بسبب تحملها لعوامل التلوث الجوي من جهة، وللجفاف من جهة أخرى.

هدف البحث

يهدف البحث إلى تحديد العلاقة بين تركيز مادة الــ Oleandrin فــي أوراق نبــات الدفلى وموعد قطافها، من جهة، ومقارنة التركيز في منــاخين مختلفــين، فــي دمــشق واللاذقية، من جهة أخرى، وذلك لتحديد أفضل موعد لقطــاف أوراق الــدفلى، وأفــضل منطقة تكون مصدراً للأوراق إذا ما أريد استخدامها كنبات طبي.

وتم اختيار منطقة الشاطئ الأزرق، ممثلاً لمدينة اللاذقية، ومنطقة المحمدية في غوطة دمشق ممثلاً لمحافظة دمشق.

مـــواد البحث وطرائقه

الأجهزة المستخدمة في البحث

1 - أجهزة التحليل:

- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عاليـــة الأداء HPLC نـــوع (Sykam)، مـــزود بكاشف Diod Array (DAD)
- حجرة UV مزودة بلمبة بطول موجة 254 نانومتراً نوع Camag

أجهزة أخرى:

مبخر دوراني نوع Buchi، وفرن تجفيف نوع Binder، وهزاز أفقـــي، وصـــفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة Thin layer chromatography نوع F256 مفلورة من شركة Merck، وحجرة لترحيل صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة TLC - بخاخ رذاذ لـــصفائح الـــ TLC، ومطحنة مخبرية، ومجانس دوراني من نوع IKA وميزان مخبري حـــدود الوزن0.0001 32 غراماً، نوع Saritorius، وميزان مخبري حدود الـــوزن 0.1 3000 غرام، وورق ترشيح Watman, no.1.

المواد:

- أوراق الدفلى
- مادة عيارية للـــ Oleandrin من شركة LGC Prochem SARL, France
- كحول ميتيلي من شركة Merck
- كحول إثيلي من شركة Merck
- ماء مقطر

طريقـــة العمـــل

أخذ العينات:

حُدّدت ثلاث شجيرات برية من نبات الدفلى بعيدة عن الحقول الزراعية، خاليـــة مـــن الإصابات الحشرية، غير معرضة لأية من الأسمدة الكيماوية أو العضوية، فـــي منطقـــة الشاطئ الأزرق في اللاذقية كتمثيل للمنطقة الساحلية، وأخرى بالمواصفات نفـــسها فـــي منطقة المحمدية في غوطة دمشق كتمثيل للمنطقة الجنوبية، واختيرت هـــذه الـــشجيرات بارتفاع 4 أمتار وبعيدة عن الحقول الزراعية، وحدد موعد أخـــذ عينـــات الأوراق فـــي أشهر: أيار (تمثل عينة الربيع) آب (عينة الصيف) تشرين الثاني (عينة الخريف) شباط (عينة الشتاء). وحددت ثلاثة مكررات لكل عينة.

تحديد نسبة الرطوية:

حددت نسبة الرطوية للعينات المدروسة حسب طريقة (Official method of analysis, 1990) والتي تلخص بتجفيف الأوراق على حرارة 100م حتى ثبات الوزن.

الاستخلاص:

استخلصت عينات أوراق الدفلى حسب طريقة (Wagner and Bladt, 1995) المعدلة، والتي تلخص كالآتي: تجفف أوراق الدفلى في درجة حرارة 60 درجة مئوية، يؤخذ 100 غرام من الأوراق المجففة، وتطحن بواسطة مطحنة مخبرية حتى تصبح بشكل بودرة، ثم يستخلص مسحوق الأوراق بـ 150مل ميتانول 90% مدة 5 دقائق على المجانس الكهربائي، يؤخذ المزيج ويوضع على الهزاز الأفقي مدة 6 ساعات، يرشح المزيج على ورق ترشيح Watman رقم 1، وتجمع الرشاحة، ثم يؤخذ مسحوق الأوراق وتكرر عملية الاستخلاص مرة ثانية، بواسطة 100 مل ميتانول 90%، تجمع الرشاحتان، ثم تبخر على المبخر الدوراني حتى حجم 10 مل وتحفظ العينات في المجمدة إلى حين دراسة التركيز.

دراسة تركيز الـــ Oleandrin:

حُلّل مستخلص العينات كيفياً بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، وكمياً بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC.

بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC:

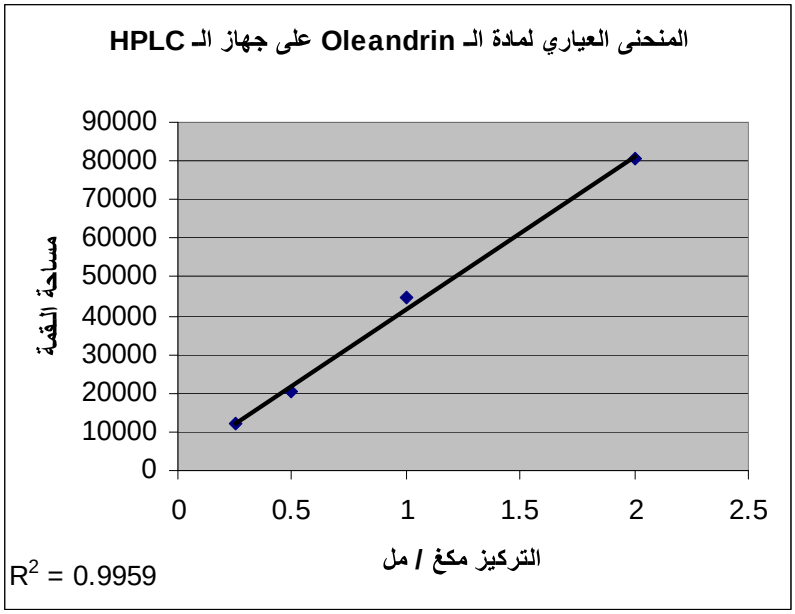
تحضر تراكيز 0.25، 0.5، 1، 2 مغ/مل من المادة العيارية للـــ Oleandrin في الإيتانول، وتخفف العينات وذلك بتمديدها بالميتانول، يطبق 10 مكل من كل تركيز من المادة العيارية على صفيحة الكروماتوغرافيا، ويطبق 10 مكل من كل عينة، ثم يتم ترحيل الصفيحة بمزيج [إيتيل أسيتات (81): ميتانول (11): ماء (8)] ولمسافة 12 سم، تجفف الصفيحة بواسطة الهواء، وتوضع الصفيحة داخل حجرة الـــ UV على طول موجة 254 نانومتراً، يلاحظ وجود بقع خفيفة اللون، يتم وضع إشارة دائرة حول البقع، ثم ترش الصفيحة بحمض الكبريت المركز، فتتحول البقع إلى اللون الأحمر، ثم يتم مقارنة البقع الناتجة في العينات مع بقع المادة العيارية لتحديد وجود مادة الـــ Oleandrin ويتم حساب قيمة الـــ RF لها.

وعند تحليل العينات كيفياً على صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة، كانت قيمة الـــ RF لمادة الـــ Oleandrin 0.7.

بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC:

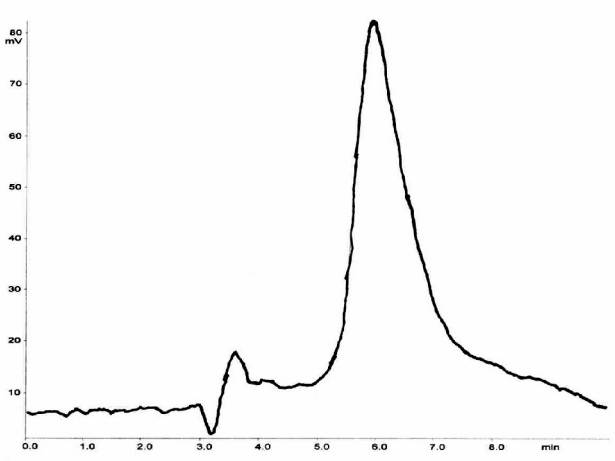
تحضر تراكيز 0.25، 0.5، 1، 2 مكغ/مل من المادة العيارية للـــ Oleandrin فـــي الإيتانول، وتخفف العينات وذلك بتمديدها بالميتانول. تحقن المـــادة العياريـــة والعينـــات ضمن جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC وفق الشروط الآتية: الجهـــاز من نوع Sykam مزود بكاشـــف مـــن نـــوع Diod Array (DAD)، ومحقـــن آلـــي Auto sampler وعمود مـــن نـــوع (300 X 4 mm ID) RP-18، والطـــور الناقـــل Mobile phase يتألف من (الأسيتونتريل:ماء) بنسبة (40:60) حجم الحقنة 100 مكل، معدل التدفق flow rate 2 مل/دقيقة، طول موجة الكشف: 220 نانومتراً.

ورسم المنحنى العياري لمادة الـــ Oleandrin بدلالة التركيز ومساحة القمة.



النتائج والمناقشـــة

وفي بدء التحليل على جهاز الكروماتوغرافيـــا الـــسائلة عاليـــة الأداء HPLC حـــدد المنحنى العياري لمادة الــ Oleadnrin .



كروماتوغرام للمادة العيارية للــ oleandrin تركيز 1 مكغ / مل

وحسب متوسط النسبة المئوية للرطوبة، ولتركيز مادة الـــ oleandrin للمكـــررات الثلاثة لكل عينة. في عينات اللاذقية تراوحت النسبة المئوية للرطوبـــة بـــين 53% فـــي عينات شهر أيار، و47% في عينات شهر آب، في حين تراوح تركيز الـــ Oleandrin بين 0.12 غ/100 غ أوراقاً جافة في عينات شهرأيار، و0.097 غ/100 غ أوراقاً جافـــة في عينات شهر شباط، (جدول 1).

الجدول (1) يبين النسبة المئوية للرطوبة، وتركيز مادة الــ Oleandrin فـــي عينـــات أوراق الدفلى من منطقة الشاطئ الأزرق في اللاذقية.

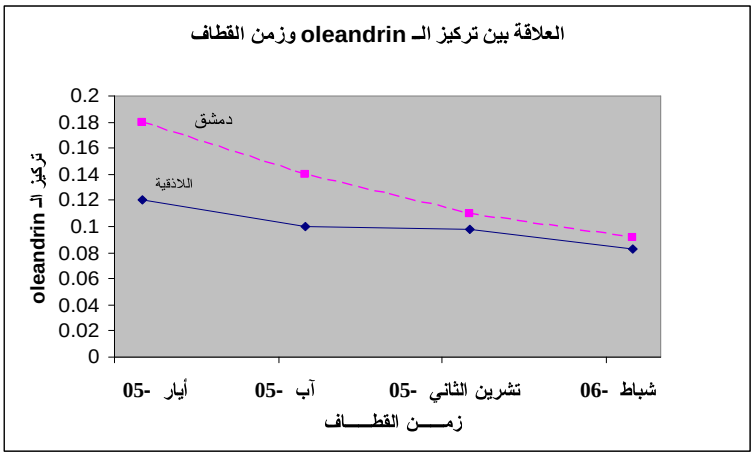
رقم العينة	تاريخ الجمع	النسبة المئوية للرطوبة	تركيز مادة الــ Oleandrin غ/100غ أوراق جافة
1	2 /أيار/ 2005	53	0.12
2	2 /آب / 2005	47	0.1
3	2 /تشرين الثاني/ 2005	50	0.098
4	2 /شباط/ 2006	51	0.097

في حين تراوحت النسبة المئوية للرطوبة في عينات غوطة دمـــشق بـــين 43% فـــي عينات شهر شباط، و33% في عينات شهر آب، وتراوح تركيز مادة الـــ Oleandrin بين 0.18 في عينات شهر أيار، و0.091 في عينات شهر شباط، (جدول 2).

الجدول (2) يبين النسبة المئوية للرطوبة، وتركيز مادة الـــ Oleandrin فـــي عينـــات أوراق الدفلى من منطقة المحمدية في غوطة دمشق.

رقم العينة	تاريخ الجمع	النسبة المئوية للرطوبة	تركيز مادة الـــ Oleandrin غ/100 غ أوراق جافة
1	2 /أيار / 2005	43	0.18
2	2 /آب / 2005	33	0.14
3	2 /تشرين الثاني/ 2005	36	0.11
4	2 /شباط/ 2006	38	0.1

ويلاحظ من الجداول السابقة أن تركيز مادة الـــ oleandrin كان بأعلى تركيز له في دمشق واللاذقية في شهر أيار، ثم بدأ التركيز ينخفض في أشهر آب وتشرين الثاني حتى وصل إلى أدنى تركيز له في شهر شباط (الشكل 1).



الشكل (1) العلاقة بين زمن قطاف أوراق نبات الدفلى، وتركيز مادة الـــ oleandrin

كما تشير النتائج أيضاً إلى وجود اختلاف في تركيز مـــادة الـــ oleandrin بـــين منطقتي الدراسة اللاذقية ودمشق، حيث كانت التراكيز في منطقة دمشق أعلى منهـــا فـــي منطقة اللاذقية في جميع عينات الدراسة، كما كانت النسبة المئوية للرطوبة فـــي الأوراق في منطقة اللاذقية أعلى منها في منطقة دمشق في العينات المدروسة جميعها.

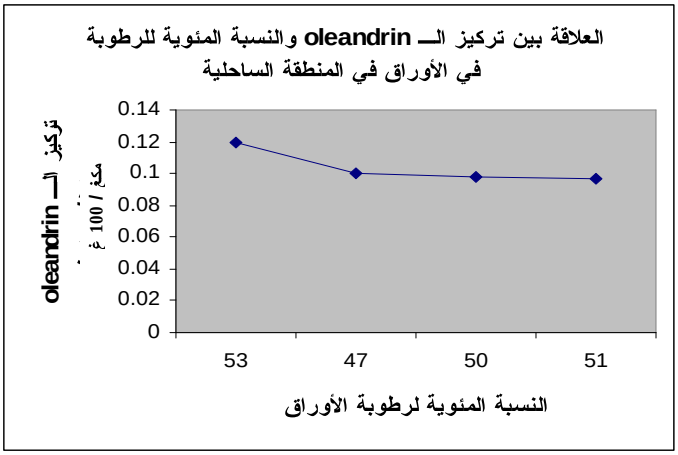
في شهر أيار كان تركيز الـــ oleandrin 0.18 غ/100غ أوراقـــاً جافـــة مقابـــل 0.12غ/100غ أوراقاً جافة في المنطقة الساحلية، أي بفارق 0.06غ/100غ أوراقاً جافة، أما نسبة الرطوبة فكانت 43% في عينات منطقة دمشق مقابل 53% في عينات المنطقـــة الساحلية. وفي شهر آب كان تركيز الـــ oleandrin 0.14 غ/100غ أوراقاً جافـــة فـــي منطقة دمشق مقابل 0.1 غ/100غ أوراقاً جافة، أي بفارق 0.02 غ/100غ أوراقاً جافة،

أما نسبة الرطوبة فكانت 33% في عينات منطقة دمشق مقابل 47% في عينات المنطقة الساحلية. وفي شهر تشرين الثاني كان تركيز الــ oleandrin 0.11 غ/100غ أوراقاً جافة في منطقة دمشق مقابل 0.098 غ/100 غ أوراقاً جافة في المنطقة الساحلية، أي بفارق 0.012 غ/100غ أوراقاً جافة أما نسبة الرطوبة فكانت 33% في عينات منطقة دمشق مقابل 50% في عينات المنطقة الساحلية. وفي شهر شباط كان تركيز الــ oleandrin 0.1 غ/100غ أوراقاً جافة في منطقة دمشق مقابل 0.097 غ/100غ أوراقاً جافة في المنطقة الساحلية، أي بفارق 0.003 غ/100 غ أوراقاً جافة. أما نسبة الرطوبة فكانت 38% في عينات منطقة دمشق مقابل 51% في عينات المنطقة الساحلية.

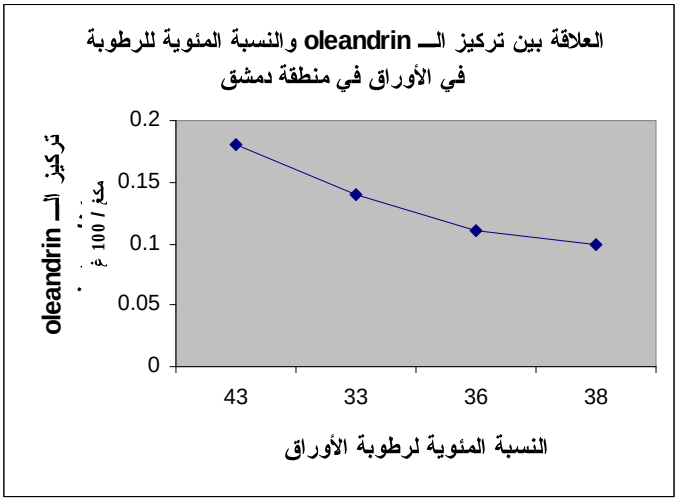
ونجد مما سبق، أن أعلى تركيز للــ oleandrin يكون في شهر أيار في منطقة دمشق، وأخفض تركيز للمادة يكون في شهر شباط في المنطقة الساحلية.

ويلاحظ أن النسبة المئوية للرطوبة في الأوراق تؤدي دوراً في تركيز المادة، فالنسبة المئوية للرطوبة في الأوراق في عينات المنطقة الساحلية كانت أعلى منها في عينات منطقة دمشق، في حين أن تركيز مادة الــ oleandrin في جميع عينات المنطقة الساحلية كانت أخفض منها في عينات منطقة دمشق كما في الجدولين (1 و2).

ويلاحظ من النتائج أن تركيز مادة الــ Oleandrion قد وصل إلى أعلى نسبة له وهي 0.18غ/100 غ من الأوراق في شهر أيار في منطقة دمشق، وهي أعلى بكثير من تركيز المادة التي ذكرها (Schvartsman, 1979) وهي 0.08% وتوضح الأشكال (2 و3) العلاقة بين تركيز مادة الــ oleandrin والنسبة المئوية للرطوبة في الأوراق في المنطقة الساحلية ومنطقة دمشق.



الشكل (2)



الشكل (3)

الاستنتاج والمقترحات

يُستنتج مما سبق، أن أنسب موعد لقطاف أوراق الدفلى بغرض الحصول على المـــادة الفعالة الـــ oleandrin هو شهر أيار في المنطقتين. أما أفضل منطقة للحـــصول علـــى أعلى تركيز من هذه المادة فهي منطقة دمشق.

ويجب الاهتمام بهذا النبات بشكل كبير، وذلك لما له من اهتمام عالمي كبير به كنبات طبي، لذلك من المفيد متابعة دراسة مقارنة تركيز هذه المادة في مناطق النمـــو البـــري الأخرى للنبات مثل منطقة الغاب، والمنطقة الشرقية (دير الزور) جسر الشغور، ودراسة السبل المتاحة لاستثمار هذا النبات طبياً.

REFERENCES المراجع

طلاس مصطفى، المعجم الطبي النباتي، دار طلاس للدراسات والترجمة والنشر، 1989

البطل نبيل، نباتات الزينة، جامعة دمشق، 1987

Chiej, R. (1984). Encyclopaedia of Medicinal Plants. MacDonald Press

Chopra, R. N., Nayar. S. L. and Chopra. I. C. (1986). Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.

Goetz, R. J. (1998). Oleander. Indiana Plants Poisonous to Livestock and Pets, Purdue University, 1998

Hardin, J.W. and Arena, J.M. (1974). Human poisoning from native and cultivated plants, 2nd ed. Kingsport, Tennessee, Duke University Press.

Lamm D., Kamat, A., DeHaven, J. (1999). Cytotoxic effect of Nerium Oleander extract (ANVIRZEL) on bladder cancer cell, ASCO Annual Meeting,

Lampe, K.F. and McCann, M.A. (1985). AMA handbook of poisonous and injurious plants, Chicago, Illinois, American Medical Association.

Masri, A. (1991). Range Rehabilitation, Consultancy report. FAO/GCP/ SYR/003/ITA

Merck Index. (2000). CD-ROM Windows, Version 12.3 (CD-ROM), Chapman & Hall/CRC

Neuwinger, H.D. (2000). African Traditional Medicine . A Dictionary of Plant Use and Applications. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart

Newman, R. A., Yang, P., Hittelman, WN., Lu, T., Ho, D. H., Ni, D., Chan, D., Vijjeswarapu, M., Cartwright, C., Dixon, S., Felix, E., Addington, C. (2006). Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells, J.Exp. Ther Oncol., 5 (3) : 167 - 81

Official Methods of Analysis. (1990). 15th Ed., Methods 926.08, 925.09, Assoc. of Off. Analytical Chemists, Arlington, VA

Ozel HZ, inventor. (1992). Extracts of Nerium species, methods of preparation, and use therefore. US patent 5,135,745. Aug 4.

Pankhurst, R. (ed.). (2005). Nerium oleander L.. Flora Europaea. Royal Botanic Garden Edinburgh

Schvartsman, S. (1979). Plantas venenosas. Sarvier Sao Paulo

Shaw, D. and Pearn, J. (1979) Oleander poisoning. Med J Aust, 2: 267-269

Shumaik, J.M., Wu, A.W. and Ping, A.C. (1988) Oleander poisoning: treatment with digoxin-specific Fab antibody fragments. Ann Emerg Med, 17(7): 732-735.

Wagner, H., Bladt, S. (1995) Plant drug analysis, 2nd ed., Berlin Springer, 1995

Wang, X., Plomley, J.B., Newman, R., Cisneros, A. (2000). LC/MS/MS Analysis of an oleander extract for cancer treatment. Anal. Chem., 72: 3547 . 3552.

Received	**2006/12/19**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2007/05/20**	**قبول البحث للنشر**