فصلنامه علمی – پژوهشی گیاه و زیست بوم
سال ۹، شماره ۳۵، تابستان ۱۳۹۲

بررسی تنوع کمی ماده Artemisinin در جمعیت‌های گیاه *Artemisia annua* L. بومی شمال ایران

رضا بورد[۱]*، شمسعلی رضازاده[۲]، منصور امیدی[۳]، سپیده ترابی[۱]، فرهاد حریری‌اکبری[۱]،سعید پروانه[۴]، رحیم تقی‌زادفرید[۵]

چکیده

گیاه *Artemisia annua* متعلق به خانواده *Asteraceae*، گیاهی یکساله و دارویی است که حاوی ماده ضد مالاریا به نام آرتمیزینین است. در تحقیق حاضر تنوع مقدار آرتمیزینین در ۷ جمعیت گیاه درمنه خزری جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شمال ایران مورد بررسی قرار گرفته است. برگ‌های گیاه *A.annua* در سایه خشک گردید، سپس برای اندازه‌گیری آرتمیزینین عصاره‌گیری شدند. مقدار آرتمیزینین موجود در عصاره‌های گیاهی با استفاده از دستگاه HPLC-UV و نمونه استاندارد اندازه‌گیری شد. مقایسه مقادیر مختلف آرتمیزینین جمعیت‌های مختلف نشان داد که حداکثر مقدار آرتمیزینین مربوط به جمعیت جمع‌آوری‌شده از شهرستان نوشهر با ۰/۱۹۵ درصد (٪ماده خشک برگ) و حداقل مقدار آرتمیزینین مربوط به جمعیت جمع‌آوری‌شده از حویق با ۰/۰۵۳ درصد (٪ ماده خشک برگ) بود. نتایج، تنوع نسبتاً کمی را در مقدار آرتمیزینین نشان داد. مقدار آرتمیزینین محاسبه‌شده در این تحقیق در مقایسه با نمونه‌های سایر نقاط جهان قابل‌ملاحظه است.

واژه‌های کلیدی: درمنه خزری، آرتمیزینین، *Artemisia annua*، HPLC-UV

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات ،گروه بیوتکنولوژی، تهران ، ایران
۲- پژوهشکده گیاهان دارویی، گروه فارماکوگنوزی، کرج، ایران
۳- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران
۴- دانشگاه زابل، گروه باغبانی، زابل، ایران
۵- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه شیمی، شهر قدس، ایران
* مکاتبه‌کننده: (reza.bovard63@gmail.com)

تاریخ دریافت: بهار ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: تابستان ۱۳۹۰

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاه درمنه خزری با نام علمی *Artemisia annua* متعلق به خانواده *Asteraceae*، گیاهی یکساله، دارویی و آروماتیک است (شرفی و همکاران، ۱۳۸۵). این گیاه بومی شرق آسیا به‌ویژه چین است و به‌عنوان یک گیاه دارویی در نقاط مختلف آسیا، آفریقا، اروپا و آمریکا کشت می‌شود (Gupta *et al.*, 2002). گیاه *A.annua* در نوار شمالی کشور ایران به‌صورت وحشی می‌روید و با نام‌های گندواش، خارگوش، درمنه خزری و درمنه شیرین معروف است (امیریان، ۱۳۸۴).

در طب سنتی چین در حدود ۲۰۰۰ سال پیش عصاره گیاه *A.annua* به‌تنهایی و بیشتر در ترکیب با گیاهان دیگر همراه با آب داغ جهت درمان تب و مالاریا مورداستفاده قرار می‌گرفت. بعدها دانشمندان چینی از مخلوط عصاره برگ گیاه *A.annua* با دی‌اتیل‌اتر ترکیبی به‌دست آوردند که دارای فعالیت ضد مالاریایی بود، درنتیجه تجزیه این ترکیب ماده آرتمیزینین در سال ۱۹۷۲ با نام چینی Qinghaosu (عصاره گیاه سبز) شناسایی و معرفی گردید (Wright, 2002).

آرتمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون اندوپراکساید است که دارای فعالیت موثری علیه نژادهای عامل بیماری مالاریا شامل *Plasmodium falciparum*، *P.vivax*، *P.ovale* می‌باشد (لاری یزدی و همکاران، ۱۳۸۱؛ Wright, 2002). بنابراین آرتمیزینین به‌عنوان یک ترکیب پایه برای ساخت داروهای ضد مالاریایی موثر با سمیت کمتر برای انسان به‌کار می‌رود (لاری یزدی و همکاران، ۱۳۸۱).

تولید مصنوعی ترکیب آرتمیزینین به‌دلیل تولید محصول کم و نیازهای پیچیده ساخت، اقتصادی نیست بنابراین گیاه *A.annua* اقتصادی‌ترین منبع برای به‌دست‌آوردن آرتمیزینین است (شرفی و همکاران، ۱۳۸۵؛ Gupta *et al*, 2002). به همین دلیل شناسایی شیمیوتایپ‌های دارای مقدار ماده موثره بیشتر و همچنین بکارگیری روش‌های به‌زراعی، اصلاحی و زیست فناوری برای افزایش ماده موثره آرتمیزینین در گیاه *A.annua* در دستور کار محققان قرار دارد. باتوجه به پراکنش گسترده گیاه *A.annua* در ایران و عدم آگاهی کامل از سطح مقدار آرتمیزینین در جمعیت‌های بومی، در این تحقیق مقدار آرتمیزینین موجود در ۷ جمعیت گیاه *A.annua* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شمال ایران اندازه‌گیری و مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه مواد گیاهی

بذور ۷ جمعیت گیاه *A.annua* در آبان‌ماه ۱۳۸۸ از مناطق شمالی کشور جمع‌آوری شدند (جدول شماره ۱). برای دستیابی به مواد گیاهی، در اواسط فروردین‌ماه (۸۹/۱/۱۶) بذور هر جمعیت در گلدان‌های جداگانه در گلخانه گروه کشت و توسعه پژوهشکده گیاهان دارویی (مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی واقع در بزرگراه کرج- قزوین) تحت شرایط یکسان کشت گردیدند. در مرحله گلدهی (۸۹/۶/۲۲)، برگ‌های گیاهان به یک نسبت، از قسمت‌های مختلف گیاه (برگ‌های بالایی، برگ‌های وسط و برگ‌های پایینی) برداشت شدند. در این مرحله برای هر جمعیت از سه گیاه نمونه‌برداری شد و سپس نمونه‌های گیاهی حاصل به مدت یک هفته در سایه خشک گردیدند.

Archive of SID

www.SID.ir

۲- تهیه عصاره

یک گرم از مواد گیاهی پودرشده درون یک ارلن ۱۰۰ سی‌سی ریخته و ۲۰ سی‌سی کلروفرم به آن اضافه شده و درب ارلن را بسته و به مدت ۵ دقیقه درون دستگاه التراسونیک قرار داده شد تا مواد گیاهی در کلروفرم به خوبی حل شوند. عصاره حاصل، از کاغذ صافی عبور داده شد و به درون یک بالن انتقال داده شد، سپس به‌وسیله دستگاه روتاری حلال از عصاره خارج گردید و بدین ترتیب ترکیب موردنظر به‌صورت خشک در ته ظرف قرار گرفت. عصاره خشک حاصل با ۵ سی‌سی محلول فاز متحرک HPLC (استونیتریل: استیک اسید ۰/۱٪ به نسبت ۳۰:۷۰) جمع شد، آنگاه ۲ سی‌سی از آن را به درون یک تیوب منتقل و درون دستگاه سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد، دو فاز در تیوب ایجاد شد، مایع شفاف رویی را برداشته و قبل از تزریق به درون دستگاه به‌وسیله سرنگ از فیلتر سرنگی HPLC عبور داده و درون ویال جمع‌آوری گردید (Lapkin *et al.*,2009; Woerdenbag *et al.*,1991). بدین ترتیب عصاره برای تزریق در دستگاه HPLC آماده گردید. هر جمعیت دارای سه نمونه عصاره و هر نمونه نیز یکبار به دستگاه تزریق شد.

جدول شماره ۱- نمونه های مختلف گیاه *A.annua* بومی شمال ایران

شماره نمونه	استان	محل جمع آوری نمونه
۱	استان گلستان	مراوه تپه
۲	استان مازندران	قائم شهر
۳	استان مازندران	شیرود
۴	استان مازندران	نوشهر
۵	استان گیلان	اسالم
۶	استان گیلان	رودسر
۷	استان گیلان	حویق

۳- مشخصات دستگاه HPLC

دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مدل KNAUER با ستون $5\mu m$، Teknokoroma c8 به طول ۲۵ متر و قطر ۰/۴۶ میلیمتر مورد استفاده قرار گرفت. حجم عصاره تزریق شده به دستگاه $50\mu l$ و سرعت جریان در دستگاه ml/min ۱ بود. دتکتور از نوع UV مدل KNAUER K2501 استفاده شد. طول موج UV دستگاه HPLC روی ۲۱۶ نانومتر تنظیم گردید، چون حداکثر طول موج جذبی نمونه استاندارد حدود ۲۱۶ نانومتر بود. پمپ مورداستفاده مدل KNAUER k1001، و ثبات chromgate Ver.2.8 بود.

۴- رسم منحنی کالیبراسیون

استاندارد آرتمیزینین (۹۸٪) در سه غلظت mg/ml ۰/۰۲۵، ۰/۰۵mg/ml، ۰/۱ mg/ml و برای هر غلظت در سه تکرار به دستگاه HPLC تزریق

Archive of SID
www.SID.ir

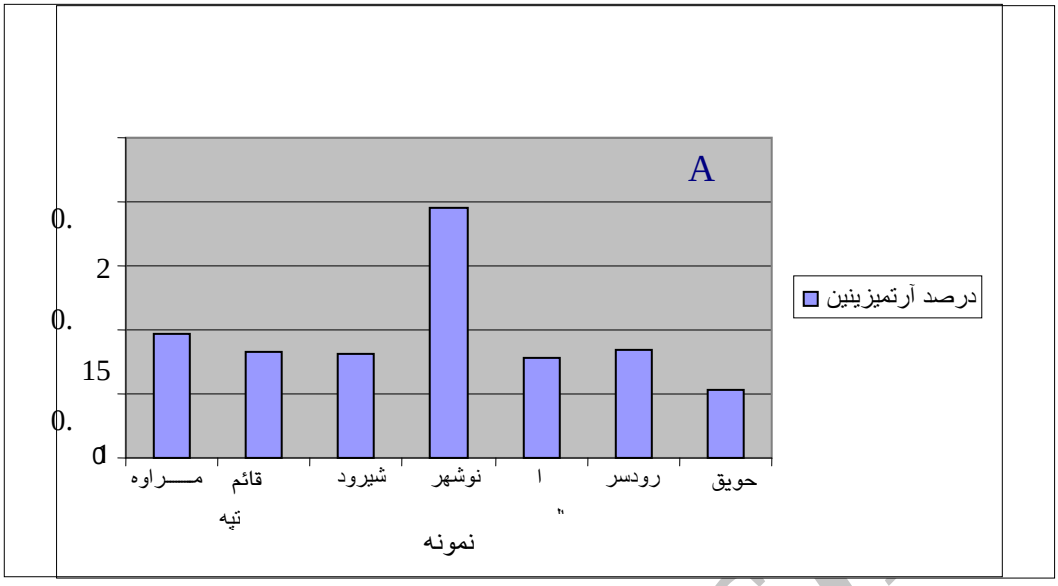
گردید. برای هر غلظت سه منحنی حاصل شد که با استفاده از انتگرال‌گیری سطح زیر منحنی‌ها به‌دست آمد. بنابراین باتوجه به غلظت نمونه‌های استاندارد تزریق‌شده به دستگاه HPLC و سطح زیر منحنی حاصل از هر یک از آنها رابطه خطی بین غلظت آرتمیزینین و سطح زیر منحنی آن ترسیم و معادله مربوط به آن به‌دست آمد. درنهایت با قراردادن عدد سطح زیر منحنی حاصل از تزریق هر نمونه عصاره گیاهی، غلظت آرتمیزینین برای جمعیت‌های مختلف برحسب درصد وزن خشک برگ محاسبه شد (لاری یزدی و همکاران، ۱۳۸۱). داده‌های حاصل با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون مقایسه میانگین LSD با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند (Mannan *et al.*, 2010).

نتایج

میزان آرتمیزینین در عصاره جمعیت‌های گیاه *A.annua* بومی شمال ایران در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین مقدار آرتمیزینین مربوط به نمونه جمع‌آوری‌شده از نوشهر (استان مازندران) با ۰/۱۹۵ درصد (٪ ماده خشک برگ) و کمترین مقدار آرتمیزینین در نمونه حویق (استان گیلان) با ۰/۰۵۳ درصد (٪ ماده خشک برگ) مشاهده گردید. جمعیت های دیگر پس از نمونه نوشهر از نظر مقدار آرتمیزینین به‌ترتیب از بیشترین مقدار به کمترین مقدار شامل نمونه‌های مراوه تپه (۰/۰۹۷ درصد)، قائمشهر (۰/۰۸۴ درصد)، رودسر (۰/۰۸۳ درصد)، شیرود (۰/۰۸۲ درصد)، اسالم (۰/۰۷۸ درصد) می‌باشند. در بین نمونه‌های قائمشهر، رودسر، شیرود، اسالم و مراوه‌تپه تفاوت معنی‌داری از لحاظ مقدار آرتمیزینین مشاهده نشد و همه این نمونه‌ها در یک گروه قرار گرفتند. اما اختلاف مشاهده شده در این نمونه‌ها با نمونه نوشهر و نمونه حویق معنی‌دار بود. اختلاف مقدار آرتمیزینین بین نمونه نوشهر و حویق نیز معنی‌دار بود.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره ۱- مقایسه مقدار آرتمیزینین در نمونه‌های مختلف گیاه *A.annua* با استفاده از آزمون LSD در سطح 0.05

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت روزافزون ترکیب آرتمیزینین به‌عنوان یک ترکیب ضد مالاریا موجب تحقیقات گسترده در این زمینه گشته است بنابراین تا به امروز روش‌های مختلفی برای استخراج، آنالیز و اندازه‌گیری ماده آرتمیزینین مورد استفاده قرار گرفته است. در تحقیقات مختلف، استخراج آرتمیزینین با استفاده از حلال‌های مختلف همچون n- هگزان (Gupta *et al.*, 2002)، تولوئن (Mannan *et al.*,2010; Towler *et al.*, 2007)، کلروفرم (Woerdenbag *et al.*, 1991)، پترولئوم اتر (Klyman *et al.*, 1984) صورت گرفته است. روش‌های مختلف عصاره‌گیری برای استخراج آرتمیزینین با استفاده از حلال‌های مذکور از چند دقیقه تا چند ساعت به طول می‌انجامد. در تحقیق حاضر، یک روش عصاره‌گیری بسیار کوتاه و سریع با استفاده از حلال کلروفرم برای استخراج آرتمیزینین مورد استفاده قرار گرفت. چندین روش آنالیز برای شناسایی و اندازه‌گیری آرتمیزینین مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به روش‌های HPLC-uv (Lapkin *et al.*, 2009; Mannan *et al.*, 2010)، HPLC-TLC (Gupta *et al.*, 2002)، HPLC-EC (Ferreira *et al.*, 1994)، GC-MS (Woerdenbag *et al.*, 1991) و غیره اشاره نمود. در این تحقیق، روش HPLC-uv (معمول‌ترین روش برای آنالیز آرتمیزینین) برای شناسایی و اندازه‌گیری آرتمیزینین به دلیل سرعت، دقت و هزینه کمتر مورد استفاده قرار گرفت.

مقدار آرتمیزینین گزارش شده از نقاط مختلف جهان بسیار متنوع است. Baraldi *et al* (2008) مقدار آرتمیزینین گیاه *A.annua* در ایتالیا را ۰/۵۴ درصد، Gupta *et al* (2002)، مقدار آرتمیزینین در یک نمونه هندی را حداکثر ۱/۳ درصد،

Archive of SID
www.SID.ir

Mannan *et al* (2010) مقدار آرتمیزینین *A.annua* در پاکستان را ۰/۴۴ درصد، Woerdenbag *et al* (1994)، مقدار آرتمیزینین *A.annua* در ویتنام را ۰/۰۸۶ درصد، Singh *et al* (1988) و مقدار آرتمیزینین گیاه *A.annua* در اروپا را ۰/۰۲ درصد گزارش کردند. به‌طور کلی غلظت آرتمیزینین در گیاه *A.annua* بین ۰/۰۲ تا ۱/۳۸ درصد گزارش شده است (Wright *et al*., 2002). احتمالاً تنوع مقدار آرتمیزینین در گزارش‌های مختلف ناشی از کاربرد روش‌های مختلف استخراج و آنالیز، نحوه جمع‌آوری و تهیه نمونه‌ها، برداشت در مراحل مختلف رشد و در زمان‌های مختلف، شرایط محیطی همچون دما و فراهم‌بودن عناصر در خاک می‌باشد. البته قسمت عمده تنوع مشاهده شده به تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی در مناطق جغرافیایی مختلف برمی‌گردد.

از ویژگی‌های برجسته این تحقیق، مقایسه جمعیت‌های مختلف گیاه *A.annua* در شرایط کاملاً یکسان و کنترل شده است. به‌گونه‌ای که همه جمعیت‌ها در شرایط یکسان مورد کاشت، داشت، برداشت و نمونه‌گیری قرار گرفتند و از یک روش استخراج و آنالیز برای آنها استفاده گردیده است بنابراین مقایسه جمعیت‌ها بسیار کارا، هدفمند و فارغ از تاثیر عوامل محیطی و یا شرایط متفاوت آزمایشی صورت پذیرفت. بنابراین اختلافات مشاهده شده در بین جمعیت‌های مورد تحقیق به مقدار زیادی ناشی از تفاوت‌های ذاتی و ژنتیکی آنها در ظرفیت تولید آرتمیزینین بوده است. نتایج این تحقیق با شناسایی جمعیت‌هایی از گیاه *A.annua* که دارای بیشترین مقدار آرتمیزینین در مقایسه با سایر جمعیت‌های این گیاه در شرایط یکسان هستند، می‌تواند در جهت پیشبرد اهداف اصلاحی گیاه *A.annua* مورد استفاده قرار گیرند.

نتایج نشان می‌دهد که جمعیت‌های مورد تحقیق در سه گروه دارای اختلاف معنی‌دار از لحاظ مقدار آرتمیزینین قرار می‌گیرند. گروه اول شامل نمونه نوشهر، گروه دوم شامل نمونه‌های مراوه تپه، رودسر، شیرود، اسالم و قائمشهر (که تفاوت معنی‌داری در مقدار آرتمیزینین آنها مشاهده نگردید)، و گروه سوم شامل نمونه حویق بود. بنابراین می‌توان گفت که نمونه‌های متعلق به هر گروه دارای منشأ متفاوت نسبت به نمونه‌های گروه‌های دیگر می‌باشند. نمونه‌های گروه دوم به احتمال زیاد دارای منشأ یکسان می‌باشند به همین دلیل در شرایط کاملاً یکسان دارای ظرفیت تولید مشابه هستند و به‌عکس ظرفیت بالای تولید آرتمیزینین در نمونه نوشهر و ظرفیت پایین تولید آرتمیزینین در نمونه حویق در شرایط مشابه ناشی از منشأ متفاوت این نمونه‌ها و به‌عبارت بهتر تفاوت ژنتیکی این نمونه‌ها می‌باشد.

مقدار آرتمیزینین محاسبه‌شده در جمعیت‌های مورد تحقیق در مقایسه با مقادیر گزارش شده از سایر نقاط جهان قابل‌توجه است. لاری یزدی و همکاران (۱۳۸۱) در نتیجه مقایسه ۹ جمعیت گیاه *A.annua* بومی شمال ایران، مقدار آرتمیزینین را بین ۰/۰۲۴ تا ۰/۰۹۷ درصد گزارش کردند. این درحالی است که در تحقیق حاضر مقدار آرتمیزینین در جمعیت‌های مورد بررسی بین ۰/۰۵۳ تا ۰/۱۹۵ درصد اندازه‌گیری شده است. این امر نشان می‌دهد که درصورت تحقیقات گسترده‌تر در بین جمعیت‌های ایرانی گیاه *A.annua* احتمال یافتن شیمیوتایپ‌هایی با عملکرد بالاتر آرتمیزینین دور از انتظار نیست. بنابراین تحقیقات بیشتر در این زمینه برای استفاده بهینه از این گیاه در کشور الزامی است.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاس‌گزاری

نویسندگان از مساعدت و همکاری کارشناسان گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی کمال تشکر را دارند.

منابع

امیریان،ر. ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های اژیلوپس تائوشی (*Aegilops tauschii*) با استفاده از نشانگرهای AFLP و مورفولوژیکی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی تهران

شرفی،ع.، ه.هاشمی سهی، و ک.کاظمی تبار. ۱۳۸۵. مروری بر کشت بافت، باززایی و انتقال ژن به گیاه *Artemisia annua* L. فصلنامه گیاهان دارویی. ۲۰ :۱۰-۱.

لاری یزدی،ح.، ر.خاوری نژاد، و ع.روستائیان. ۱۳۸۱. بررسی کمی ماده ضد مالاریایی آرتمیزینین (Artemisinin) در عصاره گیاه گندواش (*Artemisia annua*) مناطق شمالی ایران. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱ : ۴۱-۳۷.

Baraldi,R. B.Isacchi, S.Predieri, G.Marconi, and F.F.Vincieri. 2008. Distribution of artemisinin bioactive flavonoids from *Artemisia annua L.* during plant growth. Bioachem sys Ecol. 36: 340-348.

Frreira,J.F.S., J.E.Simon, and J.Janick. 1994. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. Planta Med. 61: 167-170

Gupta,S.K., P.Singh, P.Bajpai, G.Ram, D.Singh, M.M.Gupta, D.C.Jain, S.P.Khanuja, and S.Kumar. 2002. morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua* L. Industrial crops and products.16: 217-224.

Klayman,D.L., A.J.Lin, N.Acton, T.P.Scovill, J.M.Hoch, W.K.Milhous, and A.D.Theoharides. 1984. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from artemisia annua growing in the United States. J Nat Prod. 47: 715-717

Lapkin,A.A., A.Walker, N.Sullivan, B.Khambay, B.Mlambo, and S.Chemat. 2009. Deevelopment of HPLC analytical protocols for quantification of artemisinin in biomass and extracts.J Pharm Biomed Anal. 49: 908-915

Mannan,A., I.Ahmed, W.Arshad, M.F.Asim, R.A.Qureshi, I.Hussain, and B.Mirza. 2010. Survey of artemisinin production by diverse Artemisia species in northern Pakistan. Malaria journal. 9: 310

Singh,A., R.A.Vishwakarma, and A.Husain. 1988. evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. Plant medica. 7: 475-476.

Archive of SID

www.SID.ir

Towler,M.J., and P.J.Weathers. 2007. Evidence of artemisinin production from IPP steming from both the mevalonate and the ninmevalonate pathways. Plant cell rep. 26: 2129-213

Wright,C.W. 2002. *Artemisia* . Taylor and Fransis , publishe, New york 6

Woerdenbag,H.J., N.Pras, N.G.Chan, B.T.Bang, R.Bos, W.Van uden, N.V.Boi, S.Batterman, and C.B.Lugt. 1994. Artemisinin, related sesquiterpenes and essential oil in *Artemisia annua* during one vegetation period in Vietnam. Planta med. 60: 272-275

Woerdenbag,H.J., N.Pras, R.Bos, J.F.Visser, H.Hendriks, and T.M.Malingre. 1991. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from Artemisia annua by combined gas-chromatography mass-spectrometry. Phytochem Anal. 2: 215-219

Archive of SID

www.SID.ir