



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<sup>۱\*</sup>، شمسعلی رضازاده<sup>۲</sup>، منصور امیدی<sup>۳</sup>، سپیده ترابی<sup>۱</sup>، فرهاد حریری اکبری<sup>۱</sup>، سعید پروانه<sup>۴</sup>، رحیم تقی‌زادفرید<sup>۵</sup>

#### چکیده

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

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

- 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 پذیرش: تابستان ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: بهار ۱۳۹۰

## مقدمه

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

در طب سنتی چین در حدود ۲۰۰۰ سال پیش عصاره گیاه *A.annua* به تنهایی و بیشتر در ترکیب با گیاهان دیگر همراه با آب داغ جهت درمان تب و مالاریا مورد استفاده قرار می گرفت. بعدها دانشمندان چینی از مخلوط عصاره برگ گیاه *A.annua* با دی اتیل اتر ترکیبی به دست آوردند که دارای فعالیت ضد مالاریایی بود، در نتیجه تجزیه این ترکیب ماده آرتیمیزینین در سال ۱۹۷۲ با نام چینی Qinghaosu (عصاره گیاه سبز) شناسایی و معرفی گردید (Wright, 2002).

آرتیمیزینین یک سزکوئی ترپن لاکتون اندوپراکساید است که دارای فعالیت موثری علیه نژادهای عامل بیماری مالاریا شامل *Plasmodium P.ovale*، *P.vivax*، *falciparum* می باشد (لاری یزدی و همکاران، ۱۳۸۱؛ Wright, 2002). بنابراین آرتیمیزینین به عنوان یک ترکیب پایه برای ساخت داروهای ضد مالاریایی موثر با سمیت کمتر برای انسان به کار می رود (لاری یزدی و همکاران، ۱۳۸۱). تولید مصنوعی ترکیب آرتیمیزینین به دلیل تولید محصول کم و نیازهای پیچیده ساخت، اقتصادی

نیست بنابراین گیاه *A.annua* اقتصادی ترین منبع برای به دست آوردن آرتیمیزینین است (شرفی و همکاران، ۱۳۸۵؛ Gupta et al., 2002). به همین دلیل شناسایی شیمیوتایپ های دارای مقدار ماده موثره بیشتر و همچنین بکارگیری روش های به زراعی، اصلاحی و زیست فناوری برای افزایش ماده موثره آرتیمیزینین در گیاه *A.annua* در دستور کار محققان قرار دارد. با توجه به پراکنش گسترده گیاه *A.annua* در ایران و عدم آگاهی کامل از سطح مقدار آرتیمیزینین در جمعیت های بومی، در این تحقیق مقدار آرتیمیزینین موجود در ۷ جمعیت گیاه *A.annua* جمع آوری شده از مناطق مختلف شمال ایران اندازه گیری و مقایسه گردید.

## مواد و روش ها

### ۱- تهیه مواد گیاهی

بذور ۷ جمعیت گیاه *A.annua* در آبان ماه ۱۳۸۸ از مناطق شمالی کشور جمع آوری شدند (جدول شماره ۱). برای دستیابی به مواد گیاهی، در اواسط فروردین ماه (۸۹/۱/۱۶) بذور هر جمعیت در گلدان های 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)، برگ های گیاهان به یک نسبت، از قسمت های مختلف گیاه (برگ های بالایی، برگ های وسط و برگ های پایینی) برداشت شدند. در این مرحله برای هر جمعیت از سه گیاه نمونه برداری شد و سپس نمونه های گیاهی حاصل به مدت یک هفته در سایه خشک گردیدند.

## ۲- تهیه عصاره

یک گرم از مواد گیاهی پودر شده درون یک ارلن ۱۰۰ سی سی ریخته و ۲۰ سی سی 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 به وسیله دستگاه روتاری حلال از عصاره خارج گردید و بدین ترتیب ترکیب مورد نظر به صورت خشک در ته ظرف قرار گرفت. عصاره خشک حاصل با ۵ سی سی محلول فاز متحرک HPLC (استونیتریل: استیک اسید ۰/۱٪ به

نسبت ۳۰:۷۰) جمع شد، آنگاه ۲ سی سی 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 به وسیله سرنگ از فیلتر سرنگی HPLC عبور داده و درون ویال جمع آوری 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 میلی متر مورد استفاده قرار گرفت. حجم عصاره تزریق شده به دستگاه  $50\mu l$  و سرعت جریان در دستگاه ۱ ml/min بود. دکتور 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 مورد استفاده مدل KNAUER k1001، و ثبات chromgate Ver.2.8 بود.

## ۴- رسم منحنی کالیبراسیون

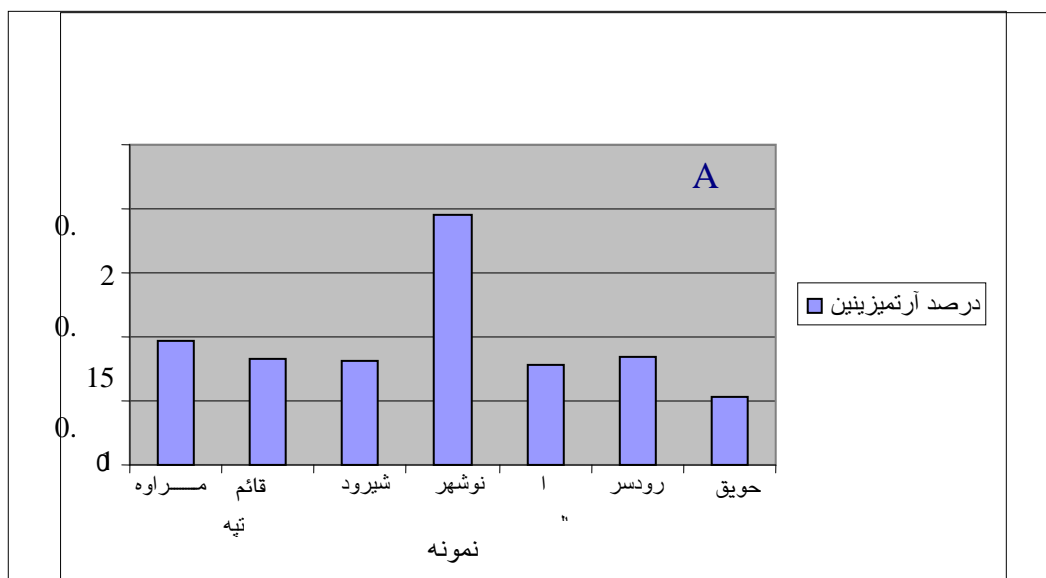
استاندارد آرتمیزینین (۰/۹۸٪) در سه غلظت ۰/۰۲۵ mg/ml، ۰/۰۵ mg/ml، و ۰/۱ mg/ml برای هر غلظت در سه تکرار به دستگاه HPLC تزریق

نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود بیشترین مقدار آرتمیزینین مربوط به نمونه جمع آوری شده 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 به ترتیب از بیشترین مقدار به کمترین مقدار شامل نمونه های مراوه تپه (۰/۰۹۷ درصد)، قائمشهر (۰/۰۸۴ درصد)، رودسر (۰/۰۸۳ درصد)، شیروود (۰/۰۸۲ درصد)، اسالم (۰/۰۷۸ درصد) می باشند. در بین نمونه های قائمشهر، رودسر، شیروود، اسالم و مراوه تپه تفاوت معنی داری از لحاظ مقدار آرتمیزینین مشاهده نشد و همه این نمونه ها در یک گروه قرار گرفتند. اما اختلاف مشاهده شده در این نمونه ها با نمونه نوشهر و نمونه حویق معنی دار بود. اختلاف مقدار آرتمیزینین بین نمونه نوشهر و حویق نیز معنی دار بود.

گردید. برای هر غلظت سه منحنی حاصل شد که با استفاده از انتگرال گیری سطح زیر منحنی ها به دست آمد. بنابراین با توجه به غلظت نمونه های استاندارد تزریق شده 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 به دست آمد. در نهایت با قراردادن عدد سطح زیر منحنی حاصل از تزریق هر نمونه عصاره گیاهی، غلظت آرتمیزینین برای جمعیت های مختلف بر حسب درصد وزن خشک برگ محاسبه شد (لاری یزدی و همکاران، ۱۳۸۱). داده های حاصل با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین LSD با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند (Mannan *et al.*, 2010).

### نتایج

میزان آرتمیزینین در عصاره جمعیت های گیاه *A. annua* بومی شمال ایران در نمودار شماره ۱



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

مورد استفاده قرار گرفت. چندین روش آنالیز برای شناسایی و اندازه‌گیری آرتیمیزینین مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به روش‌های HPLC-uv (Lapkin *et al.*, 2009; ) HPLC-TLC (Mannan *et al.*, 2010) HPLC-EC (Gupta *et al.*, 2002) GC-MS (Ferreira *et al.*, 1994) (Woerdenbag *et al.*, 1991) و غیره اشاره نمود. در این تحقیق، روش HPLC-uv (معمول‌ترین روش برای آنالیز آرتیمیزینین) برای شناسایی و اندازه‌گیری آرتیمیزینین به دلیل سرعت، دقت و هزینه کمتر مورد استفاده قرار گرفت.

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

### بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت روزافزون ترکیب آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین مورد استفاده قرار گرفته است. در تحقیقات مختلف، استخراج آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین 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 آرتیمیزینین

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، شیرو، 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 قابل توجه 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 در حالی 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 در صورت 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.

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 فراهم بودن 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

## سیاس گزاری

گیاهان دارویی مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی کمال  
تشکر را دارند.

نویسندگان از مساعدت و همکاری کارشناسان  
گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی پژوهشکده

## 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: ۱-۱۰.
- لاری یزدی، ح.، ر. خاوری نژاد، و ع. روستائیان. ۱۳۸۱. بررسی کمی ماده ضد مالاریایی آرتیمیزینین (Artemisinin) در عصاره گیاه گندواش (*Artemisia annua*) مناطق شمالی ایران. فصلنامه گیاهان دارویی. ۱: ۳۷-۴۱.
- 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. *Biochem 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. Deelopment 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.

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

**Wright, C.W.** 2002. *Artemisia*. Taylor and Francis, published, 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