بررسی کمی مادهٔ ضد مالاریایی آرتمیزینین (Artemisinin) در عصارهٔ گیاه گندواش (*Artemisia annua L.*) مناطق شمالی ایران

حسین لاری یزدی[1*]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[2]، عبدالحسین روستائیان[3]

۱- استادیار زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد
۲- استاد زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران
۳- استاد شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران
*آدرس مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، گروه زیست شناسی

چکیده

آرتمیزینین ماده‌ای با خاصیت ضد مالاریایی است که در گیاه *A. annua* L. از خانوادهٔ Asteraceae به‌طور طبیعی وجود دارد. برگ‌های گیاه *A. annua* از رویشگاه‌های مختلف شمال ایران جمع‌آوری و پس از خشک کردن در سایه، به‌منظور بررسی کمی آرتمیزینین عصاره‌گیری شدند. با استفاده از دستگاه HPLC و نمونهٔ شاهد، مقدار آرتمیزینین موجود در عصاره‌ها اندازه‌گیری گردید. بررسی‌های انجام شده نشان داد که مقدار آرتمیزینین موجود در عصارهٔ گیاه *A. annua* جمع‌آوری شده از مناطق شمالی ایران حداقل ۰/۰۲۴ درصد در نمونهٔ دوآب و حداکثر ۰/۰۹۷ درصد در نمونهٔ مکارود می‌باشد.

گل واژگان: *Artemisia annua L.*، آرتمیزینین، ضدمالاریا، گندواش

مقدمه

آرتمیزینین، که قبلاً آرتنویین (Artenoin) نامیده می‌شد، تحت عنوان Qinghaoso (در زبان چینی: Su= استخراج از، Qinghao= علف سبز) نیز شناخته می‌شود و یک سزکویی‌ترپن‌لاکتون کمیاب با پراکسید داخلی متعلق به گروه کادینان می‌باشد [۳،۱۹].

هرچند استخراج آرتمیزینین برای اولین بار به محققین چینی در سال ۱۹۷۲ نسبت داده می‌شود، اما Klayman در سال ۱۹۹۳ گزارش داده است که D. Jeremic برای اولین بار آرتمیزینین را جدا ساخته ولی ساختار اوزونید (Ozonide) نادرستی از ترکیب گزارش کرده است [۱۰]. در اواخر ۱۹۷۲ آرتمیزینین و مشتقات آن در ۱۰ ناحیه از چین برای حدود ۶۰۰۰ بیمار مورد آزمایش قرار گرفت [۱۱].

استخراج و تشخیص خواص آرتمیزینین سبب افزایش علاقه به ***A. annua*** L. به طور گسترده گردید و به‌عنوان یکی از کشفیات تازه در تحقیقات اخیر گیاهان دارویی در نظر گرفته می‌شود [۹]. آرتمیزینین ترکیب پایه برای ساخت داروهای ضد مالاریایی موثر با سمیت کمتر برای انسان می‌باشد. آرتمیزینین در برابر پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم (دو گونه از چهار گونه بیماری‌زای مالاریا در انسان) موثر می‌باشد. پلاسمودیوم فالسیپاروم اغلب عامل نوع کشنده مالاریا با مراحل پیشرفته بیماری است [۱۲].

اگرچه ساخت کامل آرتمیزینین در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است [۱، ۱۶] اما محصول کم و نیازهای پیچیده ساخت آن، نشان می‌دهد که گیاه *A. annua* هنوز اقتصادی‌ترین منبع آرتمیزینین قابل استفاده می‌باشد [۵، ۶، ۷]. مقالاتی در خصوص شیمی و جنبه‌های درمانی آرتمیزینین به چاپ رسیده است [۱۴،۱۸، ۲۲]. در سال ۱۹۹۳ سمپوزیوم بین المللی آرتمیزینین در لندن برگزار شد [۲] و در این تاریخ گزارشی در مورد نقش ضد مالاریایی آرتمیزینین به‌وسیلهٔ Wordenbag و همکاران [۲۱] منتشر شد. گیاه *A. annua* در استان‌های شمالی ایران (گیلان و مازندران) به صورت گسترده‌ای رویش دارد. از حاشیه دریا، در خاک‌های شنی ساحلی تا ارتفاع ۱۴۰۰-۱۵۰۰ متری دامنه شمالی البرز دیده می‌شود.

هدف از انجام پژوهش حاضر مطالعه مقدار آرتمیزینین به‌عنوان یک ماده موثر ضد مالاریایی طبیعی در گیاه *A. annua* جمع‌آوری شده از مناطق شمالی ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف ـ روش تهیه عصاره جهت بررسی مقدار آرتمیزینین گیاه *A. annua* با استفاده از HPLC

برای تعیین مقدار کمی آرتمیزینین موجود در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق شمالی ایران با استفاده از HPLC به روش زیر عمل گردید [۸،۱۳]:

به ۲/۵ گرم از برگ‌های خشک شده گیاه *A. annua*، ۲۰۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر اضافه کرده و نمونه به‌مدت ۶ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از صاف کردن محلول، حلال را تبخیر کرده تا نمونه خشک شود. ۴ میلی‌لیتر اتانول به نمونه اضافه کرده و پس از صاف کردن، باقیمانده توسط ۲ میلی‌لیتر اتانول شسته شد. تمام محلول صاف شده، با اتانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول نهایی با ۴ میلی‌لیتر محلول سود ۲ درصد رقیق شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. پس از سرد شدن، ۱ میلی‌لیتر اتانول افزوده، با اسید استیک ۰/۲ نرمال به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بدین ترتیب نمونه جهت HPLC آماده گردید. هر نمونه ۳ بار تزریق شد.

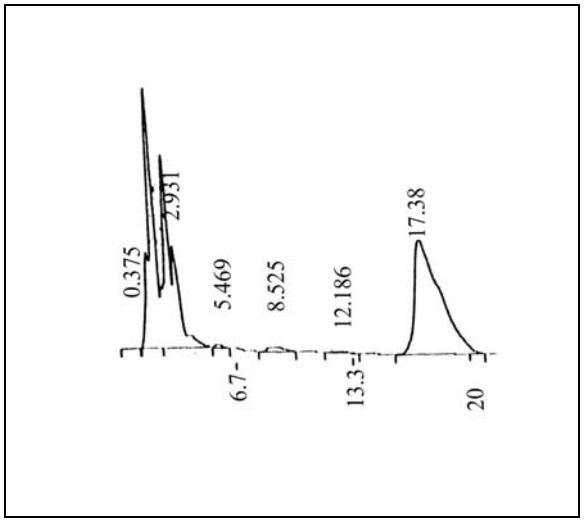
مشخصات دستگاه HPLC	
ستون	KNAUER C18, 5 µm
طول ستون	۱۵ cm
قطر ستون	۴/۵ mm
سرعت جریان دستگاه	۰/۷ ml min^{-1}
دتکتور	KNAUER K2500
پمپ	Bischoff
ثبت کننده	Shimadzu. C-R5A. Chromatopac
طول موج UV	۲۶۰nm

محلول بافر: فسفات دی سدیم و فسفات مونوسدیم متانولی به نسبت ٦:٤ با H=٧/٩

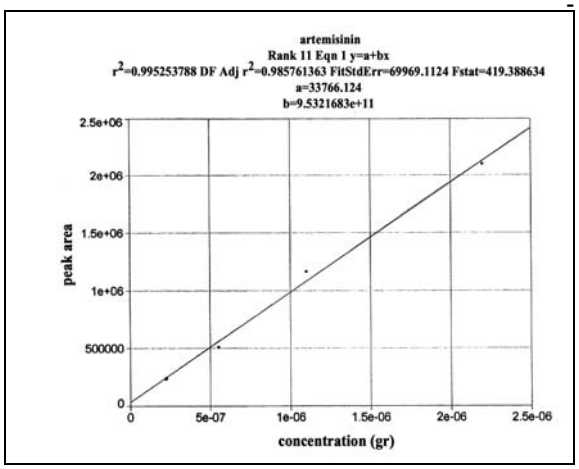
ب ـ رسم منحنی کالیبراسیون آرتمیزینین

روی 10^{-4} آرتمیزنین استاندارد (Artemisinin 98%, F.W. 282.34, m.p. 156-157°. Aldrich Chem. Co.)، ۱ میلی‌لیتر اتانول ریخته، و با اضافه کردن ٤ میلی‌لیتر محلول سود ۲ درصد رقیق شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. پس از سرد شدن، ۱ میلی‌لیتر اتانول افزوده، با اسید استیک ۰/۲ نرمال به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از این محلول، حجم‌های ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق گردید.

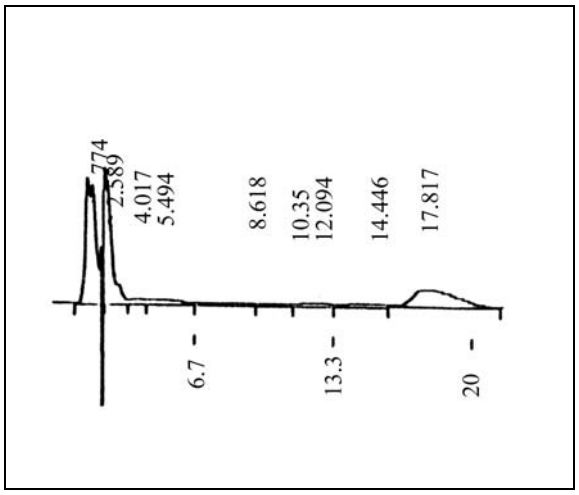
با توجه به مقدار نمونه‌های استاندارد تزریق شده به دستگاه و سطح زیر منحنی هر یک از آنها (تصویر شماره ۱)، رابطه خطی بین غلظت آرتمیزینین با سطح زیر منحنی آن ترسیم و معادله مربوطه به دست آمد (تصویر شماره ۲). با استفاده از منحنی و معادله به‌دست آمده، مقدار آرتمیزینین موجود در نمونه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۱- منحنی *HPLC* حاصل تزریق ۵ میکرولیتر محلول استاندارد آرتمیزینین. پیک با زمان بازداری ۱۷/۳۸ مربوط به آرتمیزینین است.



تصویر شماره ۲- منحنی کالیبراسیون آرتمیزینین استاندارد



تصویر شماره ۳- منحنی *HPLC* عصاره گیاه *A. annua* نمونه کلوده. بر مبنای محاسبه سطح زیر منحنی غلظت آرتمیزینین تعیین شده است. پیک با زمان بازداری ۱۷/۸۱۷ مربوط به آرتمیزینین است.

ج ـ تعیین حداکثر جذب آرتمیزینین با استفاده از دستگاه UV

پس از تهیه نمونه استاندارد آرتمیزینین با روش Liersch [۱۳]، جهت تعیین حداکثر جذب از دستگاه UV با مشخصات زیر استفاده شد:

Camspec
M 350 Double Beam
UV- Visible Spectrophotometer

نتایج این بررسی نشان داد که حداکثر طول موج جذبی نمونه استاندارد پس از مشتق‌سازی در حدود ۲۶۰ نانومتر می‌باشد، به‌همین منظور طول موج UV دستگاه HPLC برای بررسی نمونه‌های مجهول آرتمیزینین روی ۲۶۰ نانومتر تنظیم گردید.

نتایج

نتایج مربوط به تعیین درصد آرتمیزینین در عصاره گیاه *A. annua* L. جمع‌آوری شده از مناطق شمالی ایران در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین مقدار آرتمیزینین در نمونه مکارود با ۰/۰۹۷ درصد و کمترین مقدار در نمونه دوآب با ۰/۰۲٤ درصد مشاهده می‌شود. مقدار آرتمیزینین موجود در نمونه‌های مرزن‌آباد با ۰/۰۷۸ درصد و محمودآباد با ۰/۰٦۸ درصد به ترتیب بیشترین مقدار بعد از نمونه مکارود می‌باشند که تفاوت معنی‌داری را با سایر نمونه‌ها نشان می‌دهند.

جدول شماره ۱- درصد آرتمیزینین در عصاره گیاه *A. annua* مناطق شمالی ایران

مناطق شمالی ایران	آرتمیزینین (درصد)
مکارود	۰/۰۹۷
مرزن‌آباد	۰/۰۷۸
محمود آباد	۰/۰٦۸
نظام آباد	۰/۰٤۸
ساقی کلایه	۰/۰٤۷
کلوده	۰/۰٤٥
نوشهر	۰/۰٤۱
سیکاپل	۰/۰۳۹
چالوس	۰/۰۳۷
آهنگرکلا	۰/۰۳٤
دوآب	۰/۰۲٤

بررسی اخیر نشان می‌دهد که مقدار آرتمیزین موجود در عصاره گیاه *A. annua* جمع‌آوری شده از مناطق شمال ایران حداقل ۰/۰۲٤ درصد در نمونه دوآب و حداکثر ۰/۰۹۷ درصد در نمونه مکارود می‌باشد.

بحث

در سال ۱۹۹۷، Ram و همکاران مقدار آرتمیزینین موجود در گیاه *A. annua* را بین ۰/۰۲ تا ۰/۰٤ درصد در نمونه‌های مورد بررسی گزارش کرده‌اند [۱٥]. در سال ۱۹۹۳، Woerdenbag میزان آرتمیزینین را در گیاه *A. annua* روییده در ویتنام بین ۰/۱٦ تا ۰/۸٦ درصد به‌دست آورند [۲۰]. بازده آرتمیزینین و استخراج آن از نمونه‌های *A. annua* در ایالات متحده ۰/۰٦ درصد بوده است [۱۲] که برای بهره‌برداری اقتصادی اندک است.

غلظت متوسط آرتمیزینین گزارش شده در مقالات بین ۰/۰۱ تا ۰/۲۱ درصد می‌باشد [٤،۱۷] و در برخی نمونه‌های گیاهی بیش از ۰/۳۹ درصد اندازه‌گیری شده است [٤]. تنها بازده حاصل از اندام هوایی گیاه *A. annua* در چین تا ۰/٥ درصد گزارش شده است [۱۷].

با توجه به نتایج حاصله در بررسی اخیر و میزان آرتمیزینین موجود در نمونه‌های جمع‌آوری شده، و مقایسه با گزارش‌های موجود، می‌توان نتیجه گرفت که مقدار آرتمیزینین در گیاه *A. annua* مناطق شمالی ایران قابل ملاحظه می‌باشد. بر این اساس جا دارد تا در آینده به بررسی اکوتیپ‌های (شیمیوتیپ‌های) مختلف *A. annua* در مناطق شمالی ایران و گزینش و پرورش نمونه‌هایی با بازده آرتمیزینین بالا پرداخته شود. همچنین، توجه شرکت‌های داروسازی را به تهیهٔ فرآورده‌های دارویی از گیاه *A. annua* که امروزه در کشورهایی نظیر چین، ویتنام، آلمان، فرانسه، و آفریقای جنوبی تهیه شده و مورد مصرف درمانی قرار می‌گیرد معطوف می‌دارد.

منابع

1. Avery MA, Chong WKM and Jennings-White C. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. *J. Am. Chem. Soc.*1992; 114:974-9.

2. Baker J. (ed). (1994). April 1993, Worcestershire, UK. [No authors listed] *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 Jun;88 Suppl 1:S1-S65. No Abstract Available) Artemisinin: proceedings of a meeting convened by the Wellcome Trust. 25-27. April (1993). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88. Suppl. 1, London. UK.

3. Brown GD. Annulide, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua. Phytochemistry*. 1993a; 32:391-3.

4. Charles DJ, Simon JE, Wood KV and Heinstein P. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. *J. Nat. Prod.* 1990; 53:157-60.

5. Elhag HM, El-Domiaty M, El-Feraly FS, Mossa JS and El-Olemi MM. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua L. Phytother. Res*. 1992; 6:20-4.

6. Ferreira JFS and Janick J. Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua*. *Acta Hort*. 1995b; 390:41-9.

7. Ferreira JFS and Janick J. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant, Cell, Tissue Organ Cult*. 1996b; 44:211-17.

8. Ferreira JFS, Charles DJ, Wood K, Simon JE, and Janick J. A comparison of gas chromatography and high performance liquid chromatography for artemisinin analyses. *Phytochem. Anal*. 1994; 5:116-20.

9. Jain DC and Miathur AK. Isolation of high artemisinin yielding clones of *A annua* L. *Phytochemistry*. 1996; 4: 993-1001.

10. Jeremic D, Jockic A, Behbud A and Stefanovic M. A new type of sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia annua* L. *Terahedron Lett*. 1973; 32:3039-42.

11. Klayman DL. *Artemisia annua*: From weed to respectable antimalarial plant. P. 242-255. In: A. D. Kinghorn and M. F. Balandrin (eds.), Human medicinal agents from plants. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. Washington, DC. 1993

12. Klayman DL, Lin AJ, Acton N, Scovill JP, Hoch JM, Milhous WK and Theorides AD. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J. Nat. Prod.* 1984; 47:715-17.

13. Liersch RH, Soicke H, Stehr C, and Tullner H-U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Med.* 1986; 52:387-90.

14. Luo XD and Shen CC. The chemistry, pharmacology, and clinical application of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives. *Med. Res. Rev*. 1987; 7:29-52.

15. Ram M, Gupta MM, Nagvi AA and Kumor S. Effect of Planting time on the yield of essential oil and artemisinin in *Artemisia annua* L. under subtropical conditions. *J. Essent. Oil Res*. 1997; 9: 193-7.

16. Ravindranathan T, Kumar MA, Menon RB and Hiremath SV. Stereoselective synthesis of artemisinin+. *Tetrahedron Lett*. 1990; 31:755-8.

17. Trigg, PI. Qinghaosu (artemisinin) as an antimalarial drug. *Econ. Med. Plant Res*. 1990; 3:20-55.

18. White N. Foreword (Artemisinin meting). *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; 88:1.

19. Woerdenbag HJ, Pras N, Van Uden W, DeBoer A, Batterman S, Visser JF and Malingre TM. High peroxidase activity in cell cultures of *Artemisia annua* with minute artemisinin contents. *Nat. Prod. Lett.* 1992; 1:121-8.

20. Woerdenbag HJ, Pras N, Chan NC. Bang BT, Bos B, Van Uden W, Van YP, Boi NV, Batterman S and Lugt CB. Artemisinin, related sesquiterpenes. and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Planta Med.* 1994a; 60:272-5.

21. Woerdenbag HJ, Van Uden NW, Wallaart TE, Beekman AC and Lugt CB. Progress in the research of artemisinin-related antimalarials: an update. *Pharm. World Sci*. 1994b; 16:169-80.

22. Zaman SS and sharma RP. Some aspects of the chemistry and biological activity of artemisinin and related antimalarials. *Heterocycles*. 1991; 32:1593-638