DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109325

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۶، صفحه ۱۰۸۷-۱۰۷۳ (۱۳۹۵)

مقایسه محتوای آرتمیزنین و اثر ضد مالاریایی درمنه خزری (*Artemisia annua* L.) و درمنه جارویی (*Artemisia scoparia* Waldst. & Kit.)

عذرا عطائی عظیمی[1*]، بابک دلنواز هاشملویان[2]، مهدی سلیمی[3]، علیرضا عمان[3]، ابوالفضل ناظمی[3] و انوش اقدامی[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست گیاهی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

پست الکترونیک: attaei@iau-saveh.ac.ir

۲- دانشیار، گروه زیست گیاهی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۳- کارشناس آزمایشگاه، گروه زیست گیاهی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۴- استادیار، گروه زیست گیاهی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۴

چکیده

درمنه خزری (*Artemisia annua* L.) و درمنه جارویی (*Artemisia scoparia* Waldst. & Kit.) دو گیاه مهم دارویی هستند که در بسیاری از مناطق دنیا و ایران انتشار دارند. مالاریا یک بیماری واگیر در انسان و جانوران است که علت آن انگل تک‌یاخته‌ای آغازی پلاسمودیوم (Plasmodium) است. در این پژوهش ترکیب‌های ترپنوئیدی و آرتمیزنین از اندام‌های هوایی و ریشه این دو گونه درمنه استخراج شد. میزان ترپنوئیدها و آرتمیزنین به روش اسپکتروفتومتری سنجش و ترکیب‌های ترپنی با روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک و گاز کروماتوگرافی جرمی شناسایی شدند. در نهایت اثر ضد مالاریای عصاره‌ها، با اندازه‌گیری اثر بازدارنده این عصاره‌ها بر تشکیل بتا-هماتین (*همازواین*) در شرایط درون شیشه، اندازه‌گیری شد. نتایج سنجش نشان داد که ظاهراً همه عصاره‌ها دارای آرتمیزنین هستند ولی کروماتوگرافی لایه نازک و جرمی نشان داد که عصاره استونیتریلی (آرتمیزنینی) درمنه خزری دارای آرتمیزنین و چندین نوع ترپنوئید و عصاره درمنه جارویی با تعداد زیادی ترپنوئید، فاقد آرتمیزنین است. بررسی خاصیت ضد مالاریایی براساس اثر بازدارنده عصاره‌ها بر تشکیل *همازواین* در شرایط درون شیشه، نشان داد که عصاره استونیتریلی و آبی اندام‌های هوایی و ریشه درمنه خزری و عصاره آرتمیزنینی اندام‌های هوایی درمنه جارویی اثر ضدمالاریا دارند. اثر بازدارنده عصاره استونیتریلی اندام‌های هوایی درمنه خزری دو برابر عصاره استونیتریلی اندام‌های هوایی درمنه جارویی و ریشه و عصاره آبی اندام‌های هوایی درمنه خزری بود. عصاره استونیتریلی درمنه خزری دارای آرتمیزنین بود. اثر بازدارنده باقی عصاره‌ها بر تشکیل *همازواین* نشان‌دهنده اثر ضدمالاریایی ترپن‌های دیگر موجود در این عصاره‌ها بود. اثر بازدارنده همه عصاره‌ها بجز عصاره آبی اندام‌های هوایی و عصاره استونیتریلی ریشه درمنه جارویی از اثر بازدارنده کلروکوئین فسفات بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: مالاریا، همازواین، ترپن، کلروکوئین فسفات.

مقدمه

با توجه به اینکه پیشرفت‌های زیادی در شناخت بیماری و انگل شده‌است ولی هنوز هم مالاریا یکی از عوامل اصلی بیماری و مرگ و میر انسان است. در مناطق حاره تقریباً ۵۰۰ میلیون نفر به این بیماری آلوده و یک میلیون نفر می‌میرند. تقریباً نصف جمعیت دنیا در خطر ابتلا به بیماری مالاریا

هستند. مرکز شیوع مالاریا مناطق گرمسیری به‌ویژه آفریقا، جنوب آمریکا و جنوب آسیا است ولی در مناطق با آب و هوای مشابه مثل شمال ایران هم خطر ابتلا به این بیماری وجود دارد. مالاریا یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در این مناطق است. آفریقا بیشترین بیمار مالاریایی را دارد که ۹۰٪ آنها می‌میرند (Goldberg *et al.*, 1990؛ Kumar *et al.*, 2007). پلاسمودیوم یک انگل تک سلولی است که در ابتدای ورود به بدن میزبان، با آلوده‌سازی کبد و بعد خون، آسیب رساندن به انسان را آغاز می‌کند (Pagola *et al.*, 2000). در سال‌های اخیر نژادهای جدیدی از انگل مالاریا به‌وجود آمده که به داروهای موجود مقاوم و احتمال واگیری و انتشار آنها بیشتر است (Martens & Hall, 2000). به‌طور کلی انسان مستعد مبتلا به مالاریا با ۵ گونه پلاسمودیوم شامل *Plasmodium vivax*، *P. knowlesi*، *P. ovale* و به‌ویژه *P. Malariae* و *P. falciparum* می‌باشد که دو گونه اخیر، عامل مرگ و میر ۹۰٪ از مبتلایان به مالاریا هستند (Rathore, 2006؛ Weissbuch & Leiserowitz, 2008). انگل مالاریا (*P. falciparum*) در مرحله زندگی و رشد در خون حدود ۶۰٪ تا ۸۰٪ هموگلوبین موجود در گلبول‌های قرمز خون را هضم می‌کند (Krugliak *et al.*, 2002). نتیجه این رخداد، تشکیل بی‌اندازه و سمّی آهن III (Fe(III)PPIX) است. انگل برای سم‌زدایی، از ماده سمّی Fe(III)PPIX، همازوئین می‌سازد که بلوری و به‌شدت نامحلول است (Oliveira *et al.*, 2002).

اسانس گیاهان مخلوطی از ترکیب‌های چربی‌دوست با وزن مولکولی کم به نام ترپنوئیدها هستند که از مسیرهای مختلف زیست‌آمایی تولید می‌شوند. این ترکیب‌ها، نقش مهمی در فنون دفاعی در برابر ریزموجودات (میکروارگانیسم‌ها) و تنش‌های محیطی و در تنکارشناسی (فیزیولوژی)ها با کاربری‌های متفاوت، همکاری دارند (Maffei *et al.*, 2011). برخی از ترکیب‌های این اسانس‌ها، خاصیت ضدمالاریایی دارند (Göpfert *et al.*, 2009؛ Nguyen *et al.*, 2010). درمنه خزری (*Artemisia annua* L.) و درمنه جارویی (*Artemisia scoparia* Waldst. & Kit.) دو گیاه مهم دارویی هستند که در بسیاری از مناطق دنیا و ایران انتشار دارند. درمنه خزری با توجه به شرایط آب و هوایی جایگاه رشد، دارای ۱/۴٪ تا ۴٪ اسانس می‌باشد. در آنالیز اسانس این گیاه ۶۰ ترکیب شناسایی شده که مهمترین آنها کامفور، آرتمیزیا کتون، جرماکرن دی و سینئول می‌باشد. این گیاه علاوه‌بر اسانس دارای سسکویی‌ترپن لاکتون‌ها، فلاونوئید، پلی‌آلکین‌ها و کومارین‌هاست (Ma *et al.*, 2007). میزان اسانس درمنه خزری در مراحل قبل از گلدهی، گلدهی و بعد از گلدهی به‌ترتیب ۰/۹۷، ۱/۲۳ و ۰/۸۷ درصد گزارش شده است. ترکیب‌های اصلی اسانس قبل از گلدهی کامفور، سینئول، کامفن و اسپاتولنول، در زمان گلدهی شامل ترکیب‌های قبلی با مقادیر متفاوت به اضافه آرتمیزیا کتون و در زمان بعد از گلدهی شامل ترکیب‌های قبل از گلدهی بجز کامفن و به‌جای آن پینن بوده‌است (Verdian-rizi, 2008). آرتمیزنین در ریشه‌ها و گرده درمنه خزری پیدا نشده‌است ولی در ساقه‌ها، شاخه‌ها، برگ‌ها و گل شناسایی شده‌است. جایگاه اصلی آرتمیزنین کرک‌های غده‌ای سطح این اندام‌هاست. وجود ترپن‌های تلخ مثل آرتمیزنین از گیاه در برابر گیاه‌خواران محافظت می‌کند (Ferreira & Janick, 1995).

در طب سنتی، درمنه جارویی برای درمان تصلب شرائین، کاهش تب و عفونت و گرفتگی رگ‌ها استفاده می‌شود (Mirjalili *et al.*, 2007؛ Singh *et al.*, 2009). بخش‌های هوایی این گیاه دارای اسانس معطری است که ارزش دارویی دارد. ماده اسکوپارون و عصاره آن برای کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید در خون استفاده می‌شود (Liu *et al.*, 2003). اسانس درمنه جارویی تاجیکستان دارای ۳۴/۲٪ ۱–فنیل–۲و۴ پنتادین و ترکیب‌های دیگری مثل بتا–پینن، متیل اوژنول، آلفا–پینن، میرسن، لیمونن و بتا–اوسیمن است (Singh *et al.*, 2010، Kapoor, 2004؛ Singh *et al.*, 2008). اسانس درمنه جارویی خاصیت ضدمالاریایی، ضد رادیکال‌های آزاد (آنتی‌اکسیدانی) و حشره‌کشی نیز دارد (Afshar, 2011). ترپنوئیدها از ترکیب‌های ضد مالاریا هستند. تری‌ترپن‌ها (Steele *et al.*, 1999)، دی‌ترپن‌ها (Miyaoka *et al.*, 1998)، سسکویی‌ترپن‌ها (کاریوفیلن، آلفا–فارنسن و فارنزول)

(Monzote *et al.*, 2013)، سسکویی لاکتون‌هایی مثل آرتمیزنین و منوترپنوئیدها (Wink, 2012) از این ترکیب‌ها هستند. مشخص شده است که آلفا–توژون و بتا–توژون از ترکیب‌های اصلی اسانس انواع درمنه هستند (Lutgen, 2012). توژون‌ها از ترکیب‌های حدواسط در ایمنی سلول‌ها هستند (Siveen & Kuttan, 2011). اسانس درمنه سیبری (*A. sieberi*) با کمترین سمّیت برای انسان، اثر ضدمالاریا در برابر پلاسمودیوم برقی (*P. berghei*) دارد (Nahrevanian *et al.*, 2012). گزارش شده که درمنه جارویی دارای خاصیت ضد انگل مالاریا (Afshar, 2011) و یکی از منابع جدید آرتمیزنین می‌باشد (Renu & Aditi, 2010) ولی در نتایج گاز کروماتوگرافی جرمی اسانس و عصاره‌های درمنه جارویی، آرتمیزنین مشاهده نشده است (Mirjalili, 2007).

آرتمیزنین یک سسکویی‌ترپن لاکتون اندوپراکسید ضد مالاریا است که از برگ‌های درمنه خزری (*A. annua*) استخراج و جدا می‌شود (Yann *et al.*, 2012). از یک تن برگ درمنه خزری (*A. annua*)، فقط ۳–۲ کیلوگرم آرتمیزنین قابل استخراج است. در شرایط مناسب از یک هکتار کشت درمنه فقط ۲ تن برگ بدست می‌آید (Laughlin *et al.*, 2002؛ Ferreira *et al.*, 2005). اگرچه آرتمیزنین و مشتقاتش به‌صورت سنتزی نیز تولید می‌شوند ولی از نظر اقتصادی و اثر، قابل مقایسه با تولید آنها در گیاه نیست (Zhao *et al.*, 1986؛ Xu *et al.*, 1986). پژوهش‌ها نشان داده‌است که مصرف خوراکی قرص برگ‌های درمنه خزری روی انگل مالاریا مؤثرتر از آرتمیزنین خالص بوده‌است (Elfawal *et al.*, 2012). مخلوط پودر برگ‌های درمنه خزری با برخی دیگر از درمنه‌ها، باعث تحریک ایمنی و افزایش اثرات پیشگیری‌کننده آن می‌شود (Ogwang *et al.*, 2011). درمان بیماری مالاریا در موش‌های آلوده با خوردن برگ‌های خشک درمنه خزری، قابل مقایسه با آرتمیزنین خالص است. یک دوز از برگ خشک گیاه کامل (دارای ۲۴ میلی‌گرم آرتمیزنین در یک کیلوگرم برگ خشک)، مؤثرتر از یک دوز از آرتمیزنین خالص است (Elfawal *et al.*, 2012). در پزشکی قدیم از سال‌های خیلی گذشته تاکنون، دو گروه از مواد شامل آرتمیزنین و کواینین و مشتقاتشان، از داروهای اصلی ضد مالاریا بوده‌اند (Willcox & Bodeker, 2004). آرتمیزنین در کنترل و از بین بردن انواع پلاسمودیوم مقاوم به دارو (*P. falciparum* و *P. vivax*)، دو پلاسمودیوم اصلی بیماری مالاریا در انسان (*P. malariae* و *P. ovale*) و عامل بیماری خواب بسیار مؤثر است (Klayman, 1985). اثر این ماده در از بین بردن پلاسمودیوم خیلی سریعتر و بهتر از کلروکوئین و مفلوکوئین است (White *et al.*, 1999). آرتمیزنین علاوه‌بر خاصیت ضد مالاریایی دارای خاصیت ضد سرطان بوده و می‌تواند مانع از رشد سلول‌های سرطانی پستان شود (Efferth *et al.*, 2001). آرتمیزنین ماده‌ای نامحلول در آب است که باید به‌صورت خوراکی مصرف شود. آرتمیزنین به سرعت از روده جذب و در عرض ۱ تا ۲ ساعت غلظت آن در پلاسمای خون به حداکثر مقدار می‌رسد. آرتمیزنین می‌تواند انگل‌ها و باکتری‌ها را از بین ببرد (Butler & Wu, 1992). قیمت داروهای ضد مالاریای مشتق از آرتمیزنین بسیار گرانتر از داروهای دیگر برای درمان مالاریا هستند. قیمت آرتمیزنین بیش از ۱۲ برابر قیمت دیگر داروهای ضد مالاریاست (Willcox & Bodeker, 2004).

مشتقات پیریمیدین (Aljazzar *et al.*, 2010)، ترکیب‌های ترپنوئیدی درمنه‌ها و مریم‌گلی‌ها (Akkawi *et al.*, 2012b) در شرایط درون شیشه بازدارنده تشکیل بتا–هماتین (*همازواین*) هستند. مواد طبیعی دیگری از انواع درمنه (*A. afra*، *A. herbaalba*، *A. sieberi* و *A. absinthium*) برای درمان مالاریا استفاده می‌شوند (Lutgen, 2012). عصاره الکلی ساقه *A. sieberi* در شرایط درون شیشه مانع تشکیل *همازواین* شده‌است. این اثر بازدارندگی ۱۹٪ بوده‌است (Akkawi *et al.*, 2014a). اثر بازدارندگی عصاره آبی درمنه خزری بر تشکیل بتا–هماتین در شرایط درون شیشه، حدود ۲۰–۱۸ و بسیار بیشتر از کلروکوئین است (Akkawi *et al.*, 2014b).

انگل مالاریا به برخی از داروهای ضد مالاریا مقاوم می‌شود و از آنجایی‌که داروهای ضد مالاریا برای همه کسانی که در معرض خطرند، در دسترس نیست و یا برخی از آنها بی‌اثرند، نیاز به تحقیق برای پیدا کردن داروهای ضد مالاریای جدید، پیدا کردن گیاهان و یا داروهای گیاهی

مؤثر در درمان مالاریا را بسیار مهم کرده است (Akkawi *et al*., 2012a ؛Wright, 2005).

مواد و روشها

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

آرتمیزنین، هماتین پروسین، کلروکوئین دی فسفات، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، سدیم استات، سولفات منیزیم، سدیم هیدروژن فسفات، اولئیک اسید و سدیم بی‌کربنات از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Chemical Company)، اولئیک اسید از فلوکا (Fluka)، دی‌متیل سولفواکسید، هیدروکلریک اسید، استونیتریل و صفحات سلیکاژل با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر از شرکت مرک (Merck) تهیه شد.

بن‌ماری، دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Visible Shimatzu)، دستگاه گاز کروماتوگراف جرمی (HP Agilent 6800 N/(61530N) با ستون CPSil5CB پر شده با ۱۰۰٪ دی‌متیل پلی سیلوکسان ۶۰، با قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و قطر ذرات ۰/۲۵ میکرومتر)، ترازو، شیکر افقی، انکوباتور (Shlmaz co) و سانتریفیوژ رومیزی ۲۱ هزار دور در دقیقه با دمای قابل تنظیم مورد استفاده قرار گرفت.

برداشت گیاه و آماده‌سازی برای استخراج

در مرداد ۱۳۹۳، درمنه خزری (*Artemisia annua*) از اطراف لاهیجان در استان گیلان و درمنه جارویی (*Artemisia scoparia*) از محوطه دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد ساوه در استان مرکزی، گردآوری شدند. شناسایی هر دو گونه در هرباریوم مرکزی دانشگاه آزاد ساوه انجام شد. اندام‌های هوایی گیاه بعد از چیده شدن و شستشو، از ریشه‌ها جدا، و هر یک جداگانه خشک و پودر و برای استخراج و پژوهش استفاده شد.

استخراج ترپنوئید و آرتمیزنین

برای تهیه عصاره آبی ۱ گرم پودر خشک گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه قرار داده و پس از آن صاف شد. عصاره صاف شده با دستگاه تبخیر در خلأ، در دمای ۵۰ درجه خشک و در ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط ۵۰:۵۰ اتانول–استونیتریل حل و برای سنجش و اثبات وجود ترپنوئید استفاده شد (Akkawi *et al*., 2014a).

جداسازی ترکیب‌های آرتمیزنینی (عصاره استونیتریلی)

۵۰ گرم پودر خشک گیاه با ۲۵۰ میلی‌لیتر اترنفت به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه قرارگرفته و پس از آن صاف شد. عصاره صاف شده با دستگاه تبخیر در خلأ، در دمای ۵۰ درجه خشک و با ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط هگزان و استونیتریل (۵۰:۵۰) مخلوط شد. فاز استونیتریلی از مخلوط جدا، بعد از خشک شدن با دستگاه تبخیر در خلأ، در یک ظرف دربسته برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شد (Ferreira & Janick, 1995).

برای آنالیز گاز کروماتوگرافی، ۲ گرم پودر خشک گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر اترنفت به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه قرارداده و پس از آن صاف شد. عصاره صاف شده با دستگاه تبخیر در خلأ، در دمای ۵۰ درجه خشک و با ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط هگزان و استونیتریل (۵۰:۵۰) مخلوط شد. فاز استونیتریلی از مخلوط جدا، بعد از خشک شدن با دستگاه تبخیر در خلأ، در ۵ میلی‌لیتر اتانول خالص حل و برای سنجش گاز کروماتوگرافی استفاده شد.

سنجش ترکیب‌های آرتمیزنینی و ترپنوئیدی کل

۱۰ میلی‌گرم آرتمیزنین استاندارد در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد. شش غلظت مختلف (۰–۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با مخلوط ۵۰:۵۰ اتانول–استو نیتریل از محلول آرتمیزنین آماده و برای رسم منحنی استاندارد، جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۲۹۱ نانومتر خوانده شد. از عصاره آبی و عصاره استونیتریلی بخش‌های هوایی و ریشه برای سنجش استفاده شد (Bharati & Sabat, 2010).

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استونیتریلی (آرتمیزنینی) برای لکه‌گذاری روی صفحه کروماتوگرافی استفاده شد. فاز

متحرک شامل اترنفت: اتر (۳:۲) بود. برای ظهور ترپنوئیدهای جدا شده روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک از معرف آبی آنیلین (۱۰ میلی‌گرم آبی آنیلین در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ) استفاده شد.

گاز کروماتوگرافی عصاره استونیتریلی

۰/۱ میکرولیتر از عصاره استونیتریلی حل شده در اتانول- استونیتریل، برای تزریق به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) با مد اسپلیت تزریق، استفاده شد. برنامه تغییر دمای دستگاه، از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش ۳ درجه به ازای هر دقیقه، با زمان بازداری ۳ دقیقه برای ۱۰۰ درجه و ۵ دقیقه برای ۲۵۰ درجه بود.

روش مطالعه اثر بازدارندگی عصاره استونیتریلی بر تشکیل بتا-هماتین

مشخص کردن فعالیت ضد مالاریایی عصاره‌های گیاهی با روش Fitch و Kanjananggulpan (۱۹۸۷) انجام شد. مقادیر ۰ تا ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شده در DMSO ۱۰٪ از عصاره استونیتریلی هر بخش از هر گیاه با ۳۰۰ میکرومولار هماتین (محلول تازه ۰/۱ مولار در سود)، ۱۰ میلی‌مولار اولئیک اسید و ۱۰ میکرومولار اسید کلریدریک (HCl) مخلوط و حجم با بافر سدیم استات ۵۰۰ میلی‌مولار، به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد.

کلروکوئین فسفات به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه و در حال تکان خوردن روی شیکر افقی، نگهداری شدند. بعد از آن نمونه‌ها در دمای ۲۱ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۴ هزار دور در دقیقه (14,000 x g) سانتریفیوژ شدند. *همازواین* رسوب کرده در لوله سانتریفیوژ شده، سه بار با سدیم دو دسیل سولفات (۲/۵٪) تهیه شده با بافر نمکی فسفات و در ادامه ۵-۳ بار با سدیم بی‌کربنات ۰/۱ مولار (pH 9.0) تا شفاف شدن روشناور، شستشو شدند. در نهایت رسوب *همازواینی* در یک میلی‌لیتر سود ۰/۱ مولار حل و محتوای همازواین با اندازه‌گیری جذب در ۴۰۰ نانومتر و با فرمول زیر بدست آمد.

$$I\% = ((AB-AA)/AB) \times 100$$

(I%): درصد بازدارندگی تشکیل *همازواین*

(AB): جذب کنترل منفی (شاهد)

(AA): جذب نمونه‌های دارای عصاره (جذب نمونه)

روش تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به‌صورت آزمون فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورها شامل گونه گیاهی در دو سطح و غلظت آرتمیزنین، در سه سطح صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. آنالیز واریانس‌ها و مقایسه میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ و با استفاده از نرم‌افزار آماری Mini-tab14 بررسی شدند.

نتایج

این پژوهش شامل سنجش آرتمیزنین و ترپنوئیدها، کروماتوگرافی لایه نازک و گاز کروماتوگرافی جرمی و اثر عصاره‌ها بر تشکیل بتا-هماتین (همازواین) عصاره‌ها بود.

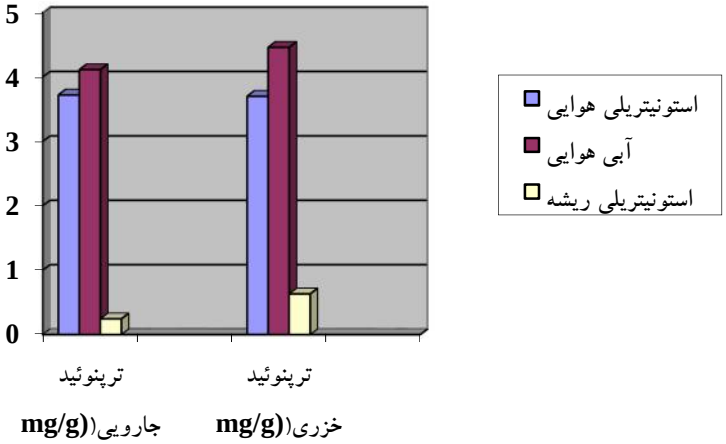
سنجش آرتمیزنین و ترپنوئیدها

رنگ عصاره آبی در اتانول خالص متمایل به سبز و رنگ عصاره استونیتریلی اندام‌های دو گیاه درمنه خزری و درمنه جارویی در اتانول خالص زرد بود.

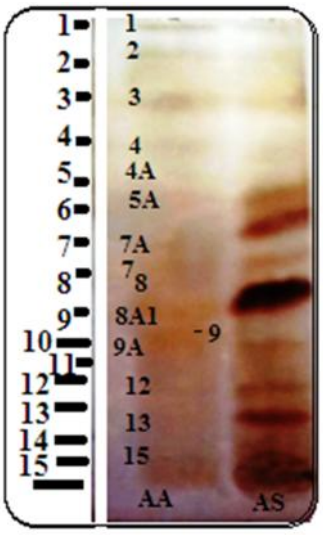
میزان ترپنوئید کل عصاره آبی اندام‌های هوایی درمنه خزری و جارویی به‌ترتیب ۴/۴۶ و ۴/۱۱۳۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک ($mggdw^{-1}$) گیاه بود. میزان ترکیب‌های آرتمیزنینی (ترپنی) کل عصاره استونیتریلی اندام‌های هوایی درمنه خزری و جارویی به‌ترتیب برابر ۳/۷ و ۳/۷۲ و در ریشه آنها ۰/۶۳۱۷ و ۰/۲۴۴۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک ($mggdw^{-1}$) گیاه بود (جدول ۱ و شکل ۱). مقایسه آنالیز واریانس و اختلاف میانگین ترپن کل نشان داد که اختلاف بین دو گونه معنی‌دار نیست و در هر دو گونه اختلاف بین اندام‌ها معنی‌دار بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین ترپنوئیدهای عصاره آبی و استونیتریلی درمنه خزری و درمنه جارویی

اندام	عصاره	درمنه جارویی (mgg^{-1})	درمنه خزری (mgg^{-1})
هوایی	آبی	۴/۱۱۳۳±۰/۰۶۴ a	۴/۴۶±۰/۰۲۵ a
هوایی	استونیتریلی	۳/۷۲±۰/۱۴ b	۳/۷۰±۰/۰۵۸ b
ریشه	استونیتریلی	۰/۲۴۴۳±۰/۰۳۵ f	۰/۶۳۱۷±۰/۰۹۲ e



شکل ۱- نمایش میزان ترپنوئید عصاره‌های آبی و استونیتریلی اندام‌های هوایی و ریشه درمنه خزری و درمنه جارویی



شکل ۲- نمای باندهای ترپنوئیدی جدا شده با کروماتوگرافی لایه نازک

روی صفحات سلیکاژل (با فاز متحرک اترنفت: اتر (۳:۲) و ظهور با معرف آبی آنیلین) عصاره استونیتریلی

جدول ۲- نتایج کروماتوگرافی لایه نازک عصاره استونیتریلی (ترپنوئیدی)

اندام‌های هوایی درمنه خزری و درمنه جارویی

گیاه	شماره باند ترپنوئید															
درمنه خزری	۱	۲	۳	۴	۴A	–	۵A	–	۷A	۷	۷	۸A1	۹	۹A	۱۰	۱۱	۱۲	–	۱۳	–	۱۵
درمنه جارویی	۱	۲	۳	۴	–	۵	–	۶	–	۷	–	–	–	–	۱۰	۱۱	۱۲	۱۲S	۱۳	۱۴	۱۵

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

نتایج کروماتوگرافی لایه نازک عصاره استونیتریلی بخش هوایی هر گیاه نشان داد که این عصاره از تعدادی ترپنوئید تشکیل شده است. شباهت ترپنوئیدهای دو گونه ۴۸٪ بود (جدول ۲ و شکل ۲). برخی از ترپنوئیدها شامل A4، A5، A7، A18 و A9 فقط در عصاره درمنه خزری مشاهده شد. ترپنوئید شماره A18 در مقایسه با ترپنوئید استاندارد در کروماتوگرافی لایه نازک، آرتمیزنین بود. نتایج این کروماتوگرافی نشان داد که در درمنه جارویی آرتمیزنین وجود ندارد.

گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) عصاره استونیتریلی

در جداسازی ترپنوئیدها از عصاره استونیتریلی درمنه خزری و جارویی، نوع و میزان هر یک از ترپنوئیدها بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بخش هوایی گیاه مشخص شد. در جداسازی ترپنوئیدها با گاز کروماتوگرافی جرمی ۵۵ ترپنوئید در عصاره استونیتریلی درمنه خزری و ۵۸ ترکیب در درمنه جارویی مشخص شد (جدول ۳).

ترکیب‌های اصلی درمنه خزری شامل کامفور ($۱/۷۷۹ mgg^{-1}dw$)، آرتمیزنین ($۰/۳۶۵ mgg^{-1}dw$)، ۸،۱-سینئول ($۰/۳۴۷۱ mgg^{-1}dw$)، آرتمیزیا الکل ($۰/۳۳ mgg^{-1}dw$)، کامفن ($۰/۲۵۸۱ mgg^{-1}dw$)، کاریوفیلن اکسید ($۰/۲۵۲ mgg^{-1}dw$)، اسپاتیونول ($۰/۱۸۱ mgg^{-1}dw$)، آلفا-پینن ($۰/۱۱۵۵ mgg^{-1}dw$)، لدن‌اکسید ($۱۱۳۲ mgg^{-1}dw$) و آرتمیزیا کتون ($۰/۰۹۹ mgg^{-1}dw$) بود (جدول ۳).

ترکیب های اصلی عصاره استونیتریلی درمنه جارویی شامل بتا-پینن ($۰/۵۹۵۷ mgg^{-1}dw$)، ۸،۱-سینئول ($۰/۴۸۴ mgg^{-1}dw$)، لیمونن ($۰/۳۲۶۳ mgg^{-1}dw$)، سیس-اوسیمن ($۰/۳۱ mgg^{-1}dw$)، متیل‌اوژنول ($۰/۲۸۱۹ mgg^{-1}dw$)، ترانس-اوسیمن ($۰/۲۶۵۳ mgg^{-1}dw$)، کامفن ($۰/۲۴۹۳ mgg^{-1}dw$)، میرسن ($۰/۲۱۲۳ mgg^{-1}dw$)، جرماکرن-دی ($۰/۱۳۶۱ mgg^{-1}dw$)، دی‌اپی-آلفا-سدرنI ($۰/۱۲۵۴ mgg^{-1}dw$)، سانتولینا-تری‌ان ($۰/۱۲۴۳ mgg^{-1}dw$)، بی‌سیکلوجرماکرن ($۰/۱۰۴ mgg^{-1}dw$) و سابینن ($۰/۱ mgg^{-1}dw$) بود (جدول ۳). برخی از ترکیب‌ها در عصاره درمنه جارویی، از پیش‌سازهای آرتمیزنین هستند ولی هیچ آرتمیزنینی در این عصاره شناسایی نشد. البته آرتمیزنین فقط در عصاره درمنه خزری پیدا شد. شباهت ترکیب های ترپنوئیدی بین درمنه خزری و درمنه جارویی حدود ۲۴٪ بود.

نتایج اثر عصاره‌های اندام‌های درمنه خزری و جارویی نشان داد که این عصاره‌ها دارای اثر بازدارندگی بر تشکیل بتا-هماتین (*همازواین*) در شرایط درون شیشه هستند.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تفاوت بازدارندگی تشکیل بتا-هماتین، بین دو گونه، عصاره‌ها و اندام‌ها معنی‌دار است.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اختلاف میزان بازدارندگی بین درمنه خزری و درمنه جارویی معنی‌دار بوده و درصد بازدارندگی عصاره خالص ترپنوئیدی (عصاره استونیتریلی) اندام‌های هوایی درمنه خزری (۴۷/۷٪) بیش از دو برابر درمنه جارویی (۲۳/۱٪) است. اختلاف میانگین اثر بازدارندگی عصاره خالص ترپنوئیدی ریشه درمنه خزری (۱۹/۶٪) با اندام‌های هوایی درمنه جارویی (۲۳/۱٪)، با عصاره آبی اندام‌های هوایی درمنه خزری (۲۴/۷٪) و با اثر بازدارندگی کلروکوئین فسفات (۱۳/۸٪)، فاقد اختلاف معنی‌دار بود. میانگین اثر عصاره استونیتریلی ریشه (۱/۴٪) و عصاره آبی اندام‌های هوایی درمنه جارویی (۳/۶٪)، با کمترین بازدارندگی، فاقد اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۴ و شکل ۳).

جدول ۳- نوع و میزان ترکیب‌های ترپنوئیدی عصاره استونیتریلی درمنه خزری و درمنه جارویی بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک (mgg^{-1})

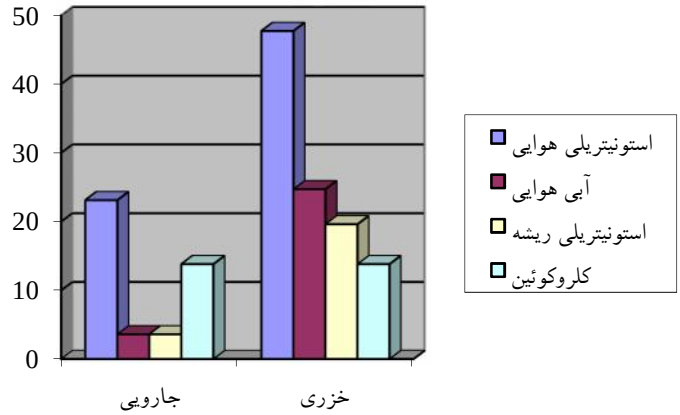
درمنه جارویی			درمنه خزری		
شماره	نام ترکیب	شاخص بازداری (RI)	مقدار (mgg^{-1})	نام ترکیب	شاخص بازداری (RI)	مقدار (mgg^{-1})
۱	santolina triene	۹۶۲	۰/۱۲۴۳	α-thujene	۹۱۹	۰/۰۱۰۳
۲	α-pinene	۹۸۱	۰/۵۹۵۷	α-pinene	۹۲۶	۰/۱۱۵۵
۳	β-pinene	۹۸۲	۰/۰۸۵۱	camphene	۹۴۱	۰/۲۵۸۱
۴	myrcene	۹۹۰	۰/۲۱۲۳	sabinene	۹۶۷	۰/۰۰۵۶
۵	camphene	۹۹۸	۰/۲۴۹۳	myrcene	۹۷۰	۰/۰۷۰۱
۶	o-cymene	۱۰۱۸	۰/۰۱۱۵	δ-carene	۹۷۲	۰/۰۰۲۷
۷	sabinene	۱۰۲۳	۰/۱۰۰	β-pinene	۹۷۴	۰/۰۰۵۳
۸	limonene	۱۰۲۸	۰/۳۲۶۳	dehydro–1,8-cineole	۹۸۱	۰/۰۰۳۱
۹	cis-ocimene	۱۰۴۳	۰/۳۱۰۰	δ-3-carene	۹۹۷	۰/۰۲۴۲
۱۰	trans-ocimene	۱۰۵۳	۰/۲۶۵۳	α-terpinene	۱۰۰۸	۰/۰۰۷۸
۱۱	α-terpinene	۱۰۶۴	۰/۰۶۹۵	p-cymene	۱۰۱۷	۰/۰۴۸۳
۱۲	1,8-cineole	۱۰۷۰	۰/۴۸۴۰	1,8-cineole	۱۰۲۴	۰/۳۴۷۱
۱۳	γ-terpinene	۱۱۰۰	۰/۰۴۸۸	γ-terpinene	۱۰۴۹	۰/۰۱۴۱
۱۴	butanoic acid	۱۱۰۹	۰/۰۱۸۹	artemisia ketone	۱۰۵۵	۰/۰۹۹۰
۱۵	trans-sabinene hydrate	۱۱۱۳	۰/۰۲۵۵	*cis*-sabinene hydrate	۱۰۵۸	۰/۰۱۰۷
۱۶	artemesia alcohol	۱۱۲۷	۰/۰۲۹۶	terpinolene	۱۰۷۸	۰/۰۴۷۰
۱۷	α-terpineol	۱۱۷۳	۰/۰۶۰۰	artemisia alcohol	۱۰۸۲	۰/۳۳۰۰
۱۸	pinocarvone	۱۱۷۵	۰/۰۲۹۶	*trans*-sabinene hydrate	۱۰۹۴	۰/۰۱۷۴
۱۹	carvacrol	۱۲۹۲	۰/۰۱۹۰	camphor	۱۱۴۸	۱/۷۷۹۰
۲۰	δ-terpinyl acetate	۱۳۰۱	۰/۰۲۵۵	pinocarvone	۱۱۵۱	۰/۰۷۸۴
۲۱	myrtenyl acetate	۱۳۱۰	۰/۰۰۹۶	borneol	۱۱۶۲	۰/۰۹۳۰
۲۲	7-azatricyclo [4.2.2.0(2,5)]decan	۱۳۲۰	۰/۰۴۹۲	terpinne-4-ol	۱۱۷۰	۰/۰۵۱۵
۲۳	2-carene	۱۳۲۵	۰/۰۷۱۸	α-terpineol	۱۱۷۶	۰/۰۴۵۰
۲۴	phenol,2-methoxy-4-(2-propenyl)	۱۳۳۲	۰/۰۲۹۲	myrtenal	۱۱۸۴	۰/۰۲۷۰
۲۵	β-elemene	۱۳۵۴	۰/۰۱۰۷	myrtenol	۱۱۸۷	۰/۰۳۴۱
۲۶	eugenol	۱۳۶۰	t	*trans*-carveol	۱۲۰۹	۰/۰۲۹۱
۲۷	cis-jasmone	۱۳۶۹	۰/۰۵۰۳	*cis*-carveol	۱۲۱۹	۰/۰۱۵۳
۲۸	trans-caryophyllene	۱۳۷۴	۰/۰۹۶۲	carvone	۱۲۲۵	۰/۰۰۳۱

ادامه جدول ۳- نوع و میزان ترکیب‌های ...

	درمنه جارویی			درمنه خزری	
شماره	نام ترکیب	شاخص بازداری (RI)	مقدار (mgg^{-1})	نام ترکیب	شاخص بازداری (RI)	مقدار (mgg^{-1})
۲۹	1h-3a,7-methanoazulene	۱۳۹۰	۰/۰۰۲۲	pregeijerene	۱۲۸۲	۰/۰۱۹۲
۳۰	methyl eugenol	۱۳۹۵	۰/۲۸۱۹	eugenol	۱۳۴۲	۰/۰۰۶۵
۳۱	gymnomitr-3(12)-en-15-oic acid	۱۴۰۷	۰/۰۵۲۵	benzyl 2-methyl butyrate	۱۳۷۲	۰/۰۱۹۲
۳۲	β-selinene	۱۴۰۹	۰/۰۰۹۲	α-neoclovene	۱۴۴۲	۰/۰۰۴۴
۳۳	germacrene-D	۱۴۱۳	۰/۱۳۶۱	α-copaene	۱۳۷۵	۰/۰۱۲۲
۳۴	β-caryophyllene	۱۴۲۱	۰/۰۳۷۷	β-bourbonene	۱۳۷۸	۰/۰۰۵۱
۳۵	bicyclogermacrene	۱۴۲۸	۰/۱۰۴۰	β-cubebene	۱۳۸۱	۰/۰۰۳۱
۳۶	germacrene A	۱۴۳۱	۰/۰۱۴۱	β-caryophyllene	۱۳۸۵	۰/۰۱۵۲
۳۷	α-amorphene	۱۴۳۸	۰/۰۲۰۳	α-hummulene	۱۳۹۰	۰/۰۰۳۳
۳۸	δ-cadinene	۱۴۴۳	۰/۰۰۷۴	farnesene	۱۴۴۷	۰/۰۴۶۰
۳۹	caryophyllene oxide	۱۴۶۱	۰/۰۱۲۹	α-selinene	۱۴۵۰	۰/۰۵۳۰
۴۰	nerolidol	۱۴۶۹	۰/۰۱۲۲	calarene	۱۴۵۵	۰/۰۰۵
۴۱	β-gurjunene	۱۴۷۸	۰/۱۶۰۲	α-amorphene	۱۴۵۹	۰/۰۰۳۰
۴۲	spathulenol	۱۴۸۸	۰/۱۴۲۰	germacrene D	۱۴۶۲	۰/۰۱۱۰
۴۳	salvial-4(14)-en-1-one	۱۴۹۰	۰/۰۱۶۸	B-selinene	۱۴۶۸	۰/۰۳۷۱
۴۴	–	–	–	artemisinin	۱۴۸۶	۰/۳۶۵
۴۵	trans-Z-α-bisabolene epoxide	۱۵۰۷	۰/۰۱۹۱	germacrene A	۱۵۰۷	۰/۰۲۰۰
۴۶	farnesol	۱۵۱۶	۰/۰۱۲۰	δ-cadinene	۱۵۱۸	۰/۰۰۵۵
۴۷	diepi-α-cedren i	۱۵۲۳	۰/۱۲۵۴	caryophyllene oxide	۱۵۲۲	۰/۲۵۲۰
۴۸	sinularene	۱۵۳۰	۰/۰۰۹۶	γ-selinene	۱۵۲۶	۰/۰۳۳۴
۴۹	germacrene B	۱۵۳۴	۰/۰۲۰۳	vulgarol B	۱۵۳۲	۰/۰۳۳۱
۵۰	caryophyllenol	۱۵۳۹	۰/۰۳۵۱	aromadendrene	۱۵۳۸	۰/۰۲۳۰
۵۱	α-bisabolol	۱۵۵۲	۰/۰۰۸۸	isospathulenol	۱۵۵۷	۰/۰۲۸
۵۲	globulol	۱۵۷۸	۰/۰۷۷	dehydro-aromadendrene	۱۵۶۰	۰/۰۰۸۲
۵۳	γ-costol	۱۵۸۶	۰/۰۰۸۱	spathulenol	۱۵۶۴	۰/۱۸۱۰
۵۴	alloaromadendren oxide-(1)	۱۵۹۶	۰/۰۱۴۱	ledenoxid	۱۶۱۱	۰/۱۱۳۲
۵۵	caryophylla-3,8(13)-dien	۱۶۰۱	۰/۰۱۰۲	δ-cubenol	۱۶۱۵	۰/۰۶۸۱
۵۶	cadinol	۱۶۴۲	۰/۳۹۲۲			
۵۷	dibutyl phthalate	۱۷۳۰	۰/۰۰۸۸			
۵۸	phytol	۱۸۱۷	۰/۰۱۲۲			

جدول ۴- اثر بازدارندگی عصاره‌های استونیتریلی و آبی اندام‌های هوایی و ریشه درمنه خزری و جارویی بر تشکیل بتا-هماتین

اندام	عصاره	درصد بازدارندگی خزری	درصد بازدارندگی جارویی
هوایی	استونیتریلی	a۶/۲±۴۷/۷	۲۳/۱±۱/۱ b
ریشه	استونیتریلی	۱۹/۶±۰/۴ b	۱/۴±۰/۳ c
هوایی	آبی	۲۴/۷±۵/۵ b	۳/۶±۰/۷ c
-	کلروکوئین	۱۳/۸±۰/۲ b	۱۳/۸±۰/۲ b



شکل ۳- نمایش درصد بازدارندگی تشکیل *همازواین* تحت تأثیر عصاره‌های استونیتریلی (خالص ترپنوئیدی) و آبی اندام‌های هوایی و ریشه درمنه خزری و جارویی

بحث

سنجش آرتمیزنین عصاره استونیتریلی و آبی درمنه خزری و درمنه جارویی

نتایج سنجش این پژوهش نشان داد که میزان ترکیب‌های ترپنی (یا آرتمیزنینی) در ریشه‌ها بسیار کمتر از اندام‌های هوایی است. گزارش شده‌است که آرتمیزنین ضد مالاریا از برگ‌های درمنه خزری (*A. annua*) جدا می‌شود، چون اندام‌های هوایی این گیاه سرشار از آرتمیزنین هستند (Yann *et al.*, 2012). آرتمیزنین در ریشه‌ها و گرده درمنه خزری پیدا نشده است ولی در ساقه‌ها، شاخه‌ها، برگها و گل شناسایی شده‌است. جایگاه اصلی آرتمیزنین کرک‌های غده‌ای سطح این اندام‌هاست. وجود ترپن‌های تلخ مثل آرتمیزنین از گیاه در برابر گیاه‌خواران محافظت می‌کند (Ferreira & Janick, 1995).

یک گرم پودر خشک برگ درمنه خزری دارای ۳-۲ میلی‌گرم آرتمیزنین است (Laughlin *et al.*, 2002؛ Ferreira *et al.*, 2005). یک گرم برگ خشک درمنه خزری دارای ۲/۴ میلی‌گرم آرتمیزنین است (Elfawal *et al.*, 2012). عصاره استونیتریلی درمنه خزری و درمنه جارویی نیز نشان‌دهنده ۳/۷ میلی‌گرم ترکیب آرتمیزنینی (ترپنی) در یک گرم اندام هوایی هر دو گیاه بود که فقط کمی بیشتر از میزان گزارش شده است. ولی کروماتوگرافی لایه نازک و گازکروماتوگرافی جرمی نشان داد که عصاره استونیتریلی که برای استخراج آرتمیزنین استفاده می‌شود

(Ferreira *et al.*, 2005) دارای انواعی از ترپن‌های مختلف بوده و درمنه جارویی به‌طور کلی فاقد آرتمیزنین است.

میزان عصاره‌های آبی و استونیتریلی نشان داد که میزان ترپنوئید کل عصاره آبی اندام‌های هوایی درمنه خزری و جارویی بدون اختلاف معنی‌دار، تقریباً برابر است. در گزارشی درمنه جارویی به‌عنوان یکی از منابع جدید آرتمیزنین معرفی شده‌است (Renu & Aditi, 2010)، در حالیکه پژوهشگر دیگری عدم وجود آرتمیزنین در اسانس و عصاره‌های درمنه جارویی را گزارش کرده‌است (Mirjalili, 2007). با آنکه نتایج سنجش عصاره استونیتریلی درمنه جارویی در این پژوهش وجود مقدار مشابهی ترکیب آرتمیزنینی در این عصاره را نشان داد ولی نتایج کروماتوگرافی لایه نازک و گازکروماتوگرافی جرمی این عصاره نشان داد که درمنه جارویی فاقد آرتمیزنین ولی عصاره درمنه خزری هم با آنکه آرتمیزنین دارد ولی بخش اصلی آن شامل ترکیب‌های ترپنی دیگری است. در این پژوهش مشخص شد که میزان ترکیب‌های ترپنی در عصاره آبی بیشتر از عصاره استونیتریلی است. بنابراین با توجه به اینکه آرتمیزنین ماده‌ای نامحلول در آب است (Butler & Wu, 1992)، این تفاوت احتمالاً نشان‌دهنده وجود برخی ترکیب‌های غیر ترپنی در این عصاره بوده که با آب جدا شده است.

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) عصاره استونیتریلی درمنه خزری و درمنه جارویی

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره استونیتریلی در درمنه خزری علاوه‌بر آرتمیزنین دارای انواع دیگری از ترپن‌هاست که احتمالاً مشتقات آرتمیزنین هستند ولی درمنه جارویی با تعداد کمتری از انواع ترپنوئید فاقد آرتمیزنین بود. شباهت انواع ترپنوئید در دو گونه حدود ۲۴٪ بود.

گاز کروماتوگرافی عصاره استونیتریلی درمنه خزری و درمنه جارویی

در جداسازی ترپنوئیدها از عصاره استونیتریلی درمنه خزری و جارویی، نوع و میزان هر یک از ترپنوئیدها برحسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بخش هوایی گیاه مشخص شد. در جداسازی ترپنوئیدها با گاز کروماتوگرافی جرمی ۵۵ ترپنوئید در عصاره استونیتریلی درمنه خزری و ۵۸ ترکیب در درمنه جارویی مشخص شد. ترکیب‌های اصلی درمنه خزری شامل کامفور (۱/۷۷۹$mgg^{-1}dw$)، آرتمیزنین (۰/۳۶۵$mgg^{-1}dw$)، ۸،۱–سینئول (۰/۳۴۷۱$mgg^{-1}dw$)، آرتمیزیا الکل (۰/۳۳$mgg^{-1}dw$)، کامفن (۰/۲۵۸۱$mgg^{-1}dw$)، کاریوفیلن اکسید (۰/۲۵۲$mgg^{-1}dw$)، اسپاتیونول (۰/۱۸۱$mgg^{-1}dw$)، آلفا–پینن (۰/۱۱۵۵$mgg^{-1}dw$)، لدن‌اکسید (۱۱۳۲ $mgg^{-1}dw$) و آرتمیزیا کتون (۰/۰۹۹$mgg^{-1}dw$) بود (جدول ۳ و ۴).

ترکیب‌های اصلی عصاره استونیتریلی درمنه جارویی شامل بتا–پینن (۰/۵۹۵۷$mgg^{-1}dw$)، ۸،۱–سینئول (۰/۴۸۴$mgg^{-1}dw$)، لیمونن (۰/۳۲۶۳$mgg^{-1}dw$)، سیس–اوسیمن (۰/۳۱$mgg^{-1}dw$)، متیل‌اوژنول (۰/۲۸۱۹$mgg^{-1}dw$)، ترانس–اوسیمن (۰/۲۶۵۳$mgg^{-1}dw$)، کامفن (۰/۲۴۹۳$mgg^{-1}dw$)، میرسن (۰/۲۱۲۳$mgg^{-1}dw$)، جرماکرن–دی (۰/۱۳۶۱$mgg^{-1}dw$)، دی‌ایپی–آلفا– سدرن I (۰/۱۲۵۴$mgg^{-1}dw$)، سانتولینا تری‌ان (۰/۱۲۴۳$mgg^{-1}dw$)، بی‌سیکلوجرماکرن (۰/۱۰۴$mgg^{-1}dw$) و سابینن (۰/۱$mgg^{-1}dw$)، بود.

بسیاری از ترکیب‌هایی که در عصاره استونیتریلی در این گزارش بدست آمده است به‌وسیله دیگر پژوهشگران از اسانس گزارش شده‌است. برخی از ترکیب‌های حاصل از این پژوهش از نظر نوع و میزان کمی متفاوت از دیگر گزارش‌هاست و این اختلاف احتمالاً به این دلیل است که در این پژوهش بررسی روی عصاره ترپنوئیدی بود و از اسانس استفاده نشده است.

آنالیز اسانس درمنه خزری نشان داد که ترکیب‌های اصلی اسانس قبل از گلدهی شامل کامفور، سینئول، کامفن و اسپاتولنول، در زمان گلدهی شامل ترکیب‌های قبلی با مقادیر متفاوت به اضافه آرتمیزیا کتون و در زمان بعد از گلدهی شامل ترکیب‌های قبل از گلدهی بجز کامفن و

به‌جای آن پینن بوده است (Verdian-rizi, 2008). اسانس درمنه جارویی تاجیکستان دارای ۳۴/۲٪ ۱-فنیل-۲و۴ پنتادین بوده است (Singh *et al.*, 2010؛ Singh *et al.*, 2012). Singh و همکاران (۲۰۰۸) وجود ترکیب‌های میرسن، ترپینن، پارا-سیمن و لیمونن را در اسانس درمنه جارویی گزارش کرده‌اند. با آنکه برخی از ترکیب‌های درمنه جارویی، از پیش‌سازهای آرتمیزنین هستند ولی هیچ آرتمیزنینی در این عصاره شناسایی نشد. آرتمیزنین فقط در عصاره استونیتریلی درمنه خزری پیدا شد. شباهت ترکیب‌های ترپنوئیدی بین درمنه خزری و درمنه جارویی حدود ۳۳٪ و کمتر از کروماتوگرافی لایه نازک بود. میزان آرتمیزنین خالص درمنه خزری در این آزمایش ۰/۳۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک اندام هوایی بود که بسیار کمتر از میزان سنجش شده به روش اسپکتروفتومتری همین پژوهش یعنی ۳/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک اندام هوایی و دیگر گزارش‌ها یعنی ۲-۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک اندام هوایی (Laughlin *et al.*, 2002؛ Ferreira *et al.*, 2005؛ Elfawal *et al.*, 2012) بود.

اثر بازدارندگی عصاره استونیتریلی درمنه خزری و درمنه جارویی بر تشکیل بتا-هماتین

نتایج اثر عصاره‌های اندام‌های درمنه خزری و جارویی نشان داد که این عصاره‌ها دارای اثر بازدارندگی بر تشکیل بتا-هماتین (*همازواین*) در شرایط درون شیشه هستند و به‌عبارتی خاصیت ضد مالاریایی دارند. این خاصیت در درمنه خزری خیلی بیشتر از درمنه جارویی بود.

اثر بازدارندگی عصاره استونیتریلی درمنه خزری بیشتر از درمنه جارویی بود. این مسئله احتمالاً مربوط به وجود ترکیب‌های ترپنی دیگر و کم بودن میزان آرتمیزنین در این عصاره می‌باشد. آرتمیزنین مهمترین ماده ضد مالاریاست که عمدتاً از درمنه خزری استخراج می‌شود ولی گزارشی وجود دارد که در آن، درمنه جارویی خاصیت ضد انگل مالاریا داشته است (Afshar, 2011). در گزارش دیگری این گیاه به‌عنوان یکی از منابع جدید آرتمیزنین معرفی شده‌است (Renu & Aditi, 2010). از طرفی آرتمیزنین در آنالیز عصاره‌های درمنه جارویی مشاهده نشده‌است (Mirjalili, 2007). اگرچه نتایج سنجش میزان آرتمیزنین عصاره استونیتریلی درمنه خزری و درمنه جارویی نشانگر مشابهت این دو بود ولی مقایسه میزان بازدارندگی تشکیل بتا-هماتین عصاره آرتمیزنینی اندام‌های هوایی درمنه خزری (۴۷/۷٪) بیش از دو برابر درمنه جارویی (۲۳/۱٪) بود. این اثر سه برابر اثر کلروکوئین فسفات (۱۳/۸٪) بود. عصاره الکلی ساقه *Artemisia sieberi* در شرایط درون شیشه مانع تشکیل *همازواین* شده است. این اثر بازدارندگی ۱۹٪ بوده است (Akkawi *et al*., 2014a). اثر بازدارندگی عصاره آبی درمنه خزری بر تشکیل بتا-هماتین در شرایط درون شیشه، حدود ۱۸-۲۰ و بسیار بیشتر از کلروکوئین است (Akkawi *et al*., 2014b).

با توجه به یافته‌های کروماتوگرافی و این نتیجه می‌توان گفت که دلیل اثر بازدارندگی عصاره درمنه خزری می‌تواند مربوط به حضور آرتمیزنین در این عصاره باشد ولی بازدارندگی عصاره درمنه جارویی احتمالاً مربوط به وجود ترکیب‌های ترپنی دیگری است که خاصیت ضد مالاریایی دارند ولی یا مقدار آنها در این عصاره کم و یا اینکه اثر آنها از آرتمیزنین کمتر بوده است. عصاره استونیتریلی ریشه درمنه خزری دارای ۱۹/۶٪ اثر بازدارندگی و مشابه اندام هوایی درمنه جارویی بود که می‌تواند نشان‌دهنده وجود ترکیب‌های ترپنی ضدمالاریای دیگری باشد.

ترپنوئیدها از ترکیب‌های ضد مالاریا هستند. تری‌ترپن‌ها (Steele *et al.*, 1999)، دی‌ترپن‌ها (Miyaoka *et al.*, 1998)، سسکویی‌ترپن‌ها (کاریوفیلن، آلفا-فارنسن و فارنزول) (Monzote *et al.*, 2013)، سسکویی لاکتون‌هایی مثل آرتمیزنین و منوترپنوئیدها (Wink, 2012)، از این ترکیب‌ها هستند. اسانس درمنه سیبری (*Artemisia sieberi*) اثرات ضد مالاریای مثبت در برابر پلاسمودیوم برقی (*Plasmodium berghei*) و کمترین سمّیت برای انسان را داشته است (Nahrevanian *et al*., 2012).

منابع مورد استفاده

- Afshar, F., 2011. Evaluation of antimalarial, free-radicalscavenging and insecticidal activities of *Artemisia scoparia* and *A. spicigera*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 21(6): 986-990.
- Akkawi, M., Aljazzar, A., Abul Haj, M. and Abu-Remeleh, Q., 2012a. The effect of *cis*-2-(1h imidazole 2-yl)-1H-imidazole dichloro platinum (II) on the *in-vitro* formation of β-hematin. British Journal of Pharmacol. Toxicol, 3(2): 65-69.
- Akkawi, M., Sharif, A., Salem, K., Saleh A. and Abu-Remeleh, Q., 2012b. Wild sage (*Salvia officinalis*) as a potential anti-malarial drug. Malaria Journal, 11(Suppl1): 1-3.
- Akkawi, M., Jaber, S., Abu-Remeleh, Q., Engeu, O.P. and Lutgen, P., 2014a. Investigations of *Artemisia annua* and *Artemisia sieberi* water extracts inhibitory effects on β-hematin formation. Medical Aromatic Plants, 3(1): 150-155.
- Akkawi, M., Aburemeleh, Q., Jaber, S., Qutob, M. and Lutgen P., 2014b. The effect of *Artemisia sieberi* extracts on the formation of β-hematin. British Journal of Pharmacology and Toxicology, 5(1): 49-54
- Aljazzar, A., Abu-Remeleh, Q., Alsharif, A., Abul Haj, M. and Akkawi, M., 2010. *In vitro* inhibition of β-hematin by 2,4-diamino-6-mercaptopyrimidine and 2-mercaptopyrimidine. Journal of Chemistry, 4(12): 57-65.
- Bharati, A. and Sabat, S.C., 2010. A spectrophotometric assay for quantification of artemisinin. Talanta, 15; 82(3):1033-1037.
- Butler, A.R. and Wu, Y.L., 1992. Artemisinin (qinghaosu), a new type of antimalarial drug. Chemical Society Review, 21: 85-90.
- Efferth, T., Dunstan, H., Sauerberry, A., Miyachi, H. and Chitambar, C.R., 2001. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. International Journal of Oncology, 18: 767-773.
- Elfawal, M., Towler, M., Reich, N., Golenbock, D., Weathers, P. and Rich, S., 2012. Dried whole plant *Artemisia annua* as an antimalarial therapy. PLoS ONE, 7(12): 522-546.
- Ferreira, J.F.S. and Janick, J., 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. International Journal of Plant Science, 156: 807-815
- Ferreira, J.F.S., Laughlin, J.C., Delabays, N. and Magalhaes, P.M., 2005. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* for increased production of the anti-malarial artemisinin. Plant Genetic Research, 3: 206-229.
- Fitch, C.D. and Kanjananggulpan, P., 1987. The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. Journal of Biology and Chemistry, 262: 15552-15555.
- Goldberg, D., Slater, A., Cerami, A. and Henderson, G., 1990. Hemoglobin degradation in the malaria parasite Plasmodium falciparum: An ordered process in a unique organelle. Plant. Natural Academic Science, 87: 2931-2935.
- Göpfert, J.C., MacNevin, G., Ro, D.K. and spring, O., 2009. Identification, functional characterize-ation and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitate glandular trichomes. BMC plant biology, 9(1): 86.
- Klayman, D.L., 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. Science, 228: 1049-1055.
- Krugliak, M., Zhang, F. and Ginsburg, H., 2002. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. Molecular Biochemistry Parasitology, 119: 249-256.
- Kumar, S., Guha, M., Choubey, V., Maity, P. and Bandyopadhyay, U., 2007. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: A mechanistic update. Life Science, 80(9): 813-828.
- Laughlin, J.C., Heazlewood, G.N. and Beattie, B.M., 2002. Cultivation of *Artemisia annua* L.: 159-195. In: Wright, C.W., (Ed.). *Artemisia*. Taylor and Francis, London, 344p.
- Liu, C.Z., Murch, S.J., EL-Demerdash, M. and Saxena, P.K., 2003. Regenration of Egyption medicinal plant *Artemisia judicia.* Plant Cell Reports, 21(6): 525-530.
- Lutgen, P., 2012. Retreieved form: http://www.malariaworld. Org/blog/artemisia-absinthium forgotten antimalarial.
- Ma, C., Wang, H., Lu, X., Li, H., Liu, B. and Xu, G., 2007. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1150: 50-53.
- Maffei, M.E., Gertsch. J. and Appendino, G., 2011. Plant volatiles: production, function and pharmacology. Natural Product Reports, 28(8): 1359-1380.
- Martens, P. and Hall, L., 2000. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. Emerging Infectious Diseases, 6: 103-109.
- Mirjalili, M.H., 2007. Phenological variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit

Kohli, R.K., 2009. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. Journal of Chemistry and Ecology, 35: 154-162.
- Singh, H.P., Kaur, S., Mittal, S., Batish, D.R. and Kohli, R.K., 2008. Phytotoxicity of major constituents of the volatile oil from leaves of *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit. Z. Naturforsch, 63: 663-666.
- Siveen, K.S. and Kuttan, G., 2011. Augmentation of humoral and cell mediated immune responses by Thujone. International Immuno Pharmacology, 11(12): 1967-1975.
- Steele, J., Warhurst, D., Kirby, G. and Simmonds, M., 1999. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. Phytotherapy Research, 13(2): 115-119.
- Verdian-rizi, M.R., 2008. Variation in the essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different growth stages cultivated in Iran. African Journal of Plant Science, 2(2): 016-018.
- Weissbuch, I. and Leiserowitz, L., 2008. Interplay between malaria, crystalline hemozoin formation and antimalarial drug action and design. Chemistry Research, 108(11): 4899-4914.
- White, N.J., Nosten, F., Looareesuwan, S., Watkins, W.M., Marsh, K., Snow, R.W., Kokwaro, G., Ouma, J., Hien, T.T. and Olliaro, P., 1999. Adverting a malaria disaster. Lancet, 353: 1965-1967.
- Willcox, M.L. and Bodeker, G., 2004. Traditional herbal medicines for malaria. British Medical Journal, 329(7475): 1156-1163.
- Wink, M., 2012. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. Molecules, 17(11): 12771-12791.
- Wright, C.W., 2005. Plant derived antimalarial agents: new leads and challenges. Phytochemistry Reviews, 4(1): 55-61.
- Xu, X.X., Zhu, J., Huang, D.Z. and Zhou, W.S., 1986. Total synthesis of artemisinin and deoxyartemisinin. Tetrahedron, 42: 819-828.
- Yann, L.K., Babaeian-Jelodar, N. and Lai-Keng, C., 2012. Investigation on the effect of subculture frequency and inoculum size on the artemisinin content in a cell suspension culture of *Artemisia annua* L., Applied Journal of Chemistry Science, 6(5): 801-807.
- Zhao, Y., Hantan, W.K. and Lee, K.H., 1986. Antimalarial agents, artesunate, an inhibitor of cytochrome oxidase activity in *Plasmodium berghei*. Journal of Natural Products, 49: 139-142.

from Iran. Journal of Essential Oil Research, 19: 326-329.
- Miyaoka, H., Shimomura, M., Kimura, H., Yamada, Y., Kim, H.S. and Yusuke, W., 1998. Antimalarial activity of kalihinol A and new relative diterpenoids from the Okinawan sponge. *Acanthella* sp. Tetrahedron, 54(44): 13467-13474.
- Monzote, L., Alarcón, O. and Setzer, W.N., 2013. Antiprotozoal activity of essential oils. Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS), 77(4): 167-175.
- Nahrevanian, H., Sheykhkanlooye Milan, B., Kazemi, M., Hajhosseini, R., Soleymani Mashhadi, S. and Nahrevanian, S., 2012. Antimalarial effects of Iranian flora *Artemisia sieberi on Plasmodium berghei in vivo* in mice and phytochemistry analysis of its herbal extracts. Malaria Research Treatment, 8: 727-732.
- Nguyen, D.T., Göpfert, J.C., Ikezawa, N., MacNevin, G., Kathiresan, M. and Conrad. J., 2010. Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in Asteraceae. Journal of Biological Chemistry, 285(22): 16588-16598.
- Ogwang, P.E., Ogwal, J.O., Kasasa, S., Ejobi, F., Kabasa, D. and Obua, C., 2011. Use of *Artemisia annua* L. infusion for malaria prevention: mode of action and benefits in a Ugandan community. British Journal of Pharmacology Research, 1(4): 124-132.
- Oliveira, M.F., Timm, B. and Machado, E.A., 2002. On the pro-oxidant effects of haemozoin. FEBS Lett, 512: 139-144.
- Pagola, S., Stephens D., Kosar, A. and Madsen, S., 2000. The structure of malaria pigment β-hematin. Nature, 404: 307-310.
- Rathore, D., 2006. Strategies for malaria control: 49-53. In: Sobral, B., (Ed.). Virginia Bioinformatics Institute at Virginia Tech. VBI Scientific Annual Report, 111p.
- Renu, S. and Aditi, S., 2010. *Artemisia scoparia*-A new source of artemisinin. Bangladesh Journal of Pharmacology, 5(1): 1-17.
- Singh, A., Sarin, R. and Yaduvanshi, A., 2012. Genetic studies of *Artemisia scoparia* ET kit subject to salt stress. Scholarly Journal of Agricultural Science, 2(4): 80-82.
- Singh, H.P., Kaur, S., Mittal, S., Batish, D.R. and Kohli, R.K., 2010. *In vitro* screening of essential oil from young and mature leaves of *Artemisia scoparia* compared to its major constituents for free radical scavenging activity. Food Chemistry Toxicology, 48: 1040-1044.
- Singh, H.P., Kaur, S., Mittal, S., Batish, D.R. and

Comparison of artemisinin content and anti-malaria effects of *Artemisia annua* L. and *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit.

A. Ataei Azimi[1*], B. Delnavaz Hashemloian[2], M. Salimi[2], A.R. Oman[2], A. Nazemi[2] and A. Eghdami[2]

1*- Corresponding author, Department of Plant Biology, Faculty of Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
E-mial: attaei@iau-saveh.ac.ir
2- Department of Plant Biology, Faculty of Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: November 2015 Revised: February 2016 Accepted: March 2016

Abstract

Artemisia annua L. and *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit. are two important medicinal plants, distributed in many parts of the world. Malaria is an infectious disease in humans and animals caused by various species of the genus *Plasmodium*, protozoan parasite begins. In this study, artemisinin and terpenoids were extracted from *Artemisia annua* and *Artemisia scoparia*. The terpenoids and artemisinin content was measured by spectrophotometry methods. The terpenoids were detected by Thin-Layer Chromatography and Mass Gas Chromatography. The antimalarial effects of the study extracts were measured based on the inhibitory effect of the extracts on *in vitro* formation of β-hematin (hemazoin). According to the results, it seemed that all extracts contained artemisinin. However, the results of Thin-Layer Chromatography (TLC) and Mass Gas Chromatography (GC-Mass) showed that the acetonitrile extract (artemisininic extract) of *Artemisia annua* contained artemisinin and several kinds of terpenoids. The extract of *A. scoparia* was lack of artemisinin despite containing lots of terpenoids. The inhibitory effects of the study extracts on the *in vitro* formation of β-hematin (hemazoin) showed that the acetonitrile and aquatic extracts of the shoots and roots of *A. annua* and *A. scoparia* had antimalarial effects. The inhibitory effects of acetonitrile extract of *A. annua* shoots was double of the artemisininic extract of *A. scoparia* shoots and the aquatic extract of *A. annua* shoots and roots. The acetonitrile extract of *A. annua* contained artemisinin. The inhibitory effect of other extracts on the *in vitro* formation of β-hematin (hemozoin) showed the antimalarial effects of other terpenes in the extracts. The inhibitory effect of all extracts, except the aqueous extract of shoots and the acetonitrile extract of roots in *A. scoparia*, was more than that of chloroquine phosphate.

Keywords: Malaria, hemazoin, terpenes, chloroquine phosphate.