DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.7682

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۳، صفحه ۴۷۵-۴۶۳ (۱۳۹۳)

شناسایی ترکیب‌های شیمیایی اسانس *Salvia reuterana* Boiss. و *Salvia palaestina* Benth. و مقایسه میزان فلاونوئید و رزمارینیک اسید در آنها

بهمن فتاحی[1*]، وحیده ناظری[2]، سیامک کلانتری[3] و مرسدس بونفیل[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
پست الکترونیک: bahman.fattahi@yahoo.com

۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴- دانشیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه بارسلونا- اسپانیا

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۰ — تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۱ — تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۱

چکیده

گیاه دارویی مریم‌گلی اصفهانی با نام علمی *Salvia reuterana* Boiss.، متعلق به تیره نعناعیان و دارای مواد مؤثره‌ای همچون اسانس، فلاونوئید، رزمارینیک اسید و ... می‌باشد که باعث شده تا این گیاه خواص دارویی مهمی ازجمله ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی را دارا باشد. این پژوهش به‌منظور بررسی ترکیب‌های شیمیایی اسانس، ترکیب‌های فلاونوئیدی و رزمارینیک اسید در گونه‌های *Salvia reuterana* Boiss. و *Salvia palaestina* Benth. جمع‌آوری شده از چهار منطقه از ایران می‌باشد. توسط دستگاه GC/MS، ۴۳ ترکیب شیمیایی از اسانس گونه اولی و ۲۴ ترکیب از اسانس گونه دومی شناسایی گردید که از غالب‌ترین ترکیب‌های شیمیایی در گونه *S. reuterana* می‌توان بتا-المن، آلفا-گورجونن، جرماکرن-D، n- هگزیل‌استات و اسپاتولنول را نام برد و ترکیب‌های غالب در گونه *S. palaestina* شامل کاریوفیلن، دی‌هیدرو کاروئول، جرماکرن-D، لینالول و اسپاتولنول بودند. عصاره دی‌اتیل اتری برگ به‌منظور تعیین فلاونوئید کل و رزمارینیک اسید و شناسایی ترکیب‌های فلاون، به دستگاه LC-DAD-ESI-MS تزریق گردید. نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید کل در گونه *S. palaestina* ۳۸۲۸/۳۵ میکروگرم بر گرم و در گونه *S. reuterana* بین ۳۲۵۲/۷۶ تا ۵۱۳۲/۹۲ متغیر است. میزان رزمارینیک‌اسید نیز در گونه *S. reuterana* ۱۲۲-۹۸/۴۶ میکروگرم بر گرم و در گونه *S. palaestina* ۱۹/۷۲ میکروگرم بر گرم است. همچنین چندین ترکیب فلاونی نیز شناسایی گردید. نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید در دو گونه تقریباً برابر اما میزان فلاونوئید گونه *S. reuterana* در منطقه شهمیرزاد افزایش معنی‌داری نسبت به بقیه مناطق نشان داد. میزان رزمارینیک اسید در تمامی جمعیت‌های گونه *S. reuteranae* بیشتر از *S. palaestina* بود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، فلاونوئید کل، رزمارینیک اسید، GC/MS، *Salvia reuteranae* Boiss.، *Salvia palaestina* Benth.

مقدمه

مریم‌گلی (*Salvia*) گیاهی از تیره نعناعیان با بیش از ۷۰ گونه خودرو در ایران می‌باشد (مظفریان، ۱۳۷۵). فعالیت ضدمیکروبی این گیاهان بیشتر به فلاونوئیدها و ترپنوئیدها نسبت داده شده‌است (Nickavar *et al.*, 2008). گونه *S. reuterana* گیاهیست بوته‌ای، پایا و پوشیده از پرز، با ساقه‌ای به ارتفاع ۲۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر و گل‌هایی سفید یا سفید متمایل به آبی، که بومی ایران بوده و در مناطق وسیعی از ایران ازجمله استان‌های تهران، قم، البرز، آذربایجان شرقی، سمنان و

لرستان پراکنش دارد (Rechinger, 1982). این گونه دارای خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، همچنین در عطرسازی و نیز تهیه چاشنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Amiri *et al*., 2006).

گونه *S. palaestina* گیاهی چندساله، بوته‌ای و پوشیده از کرک است؛ با ساقه‌ای به ارتفاع ۲۰ تا ۸۰ سانتی‌متر، که در برخی از مناطق ایران ازجمله استان مازندران، آذربایجان و گیلان پراکنش دارد (Rechinger, 1982).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیب هایی آلی هستند که مستقیماً در رشد، نمو یا تولیدمثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیب ها دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌تری نسبت به متابولیت‌های اولیه (مثلاً اسیدهای امینه) که برای بقاء زندگی سلول‌ها ضروری‌اند می‌باشند. اسانس‌ها، فلاونوئیدها و رزمارینیک اسید ازجمله مهمترین این ترکیب‌ها هستند. اسانس‌ها یکی از ترکیب‌های معطر و فرّار گونه‌های مریم‌گلی هستند که در قسمت‌های مختلف گیاهی یافت می‌شوند که ضدباکتری، ضدنفخ، ضدمیکروب و آنتی‌اکسیدان می‌باشند (Miguel *et al*., 2011). در گزارشهای قبلی میزان اسانس در *S. reuterana* ۰/۱۵٪ وزنی به وزنی گزارش گردید (Mirz & Sefidkon, 1999).

آنالیز اسانس گونه *S. reuterana* توسط Mirza و Sefidkon (۱۹۹۹) منجر به شناسایی ۲۱ ترکیب شد که ترکیب‌های اصلی آن شامل ترانس-بتا-اوسیمن (۳۲/۳٪)، آلفا-گورجونن (۱۴/۱٪)، جرماکرن-D (۱۱/۲٪) و هگزیل‌استات (۷/۶٪) گزارش گردید. آنالیز اسانس گونه *S. reuterana* توسط Amiri و همکاران (۲۰۰۶) منجر به شناسایی ۴۶ ترکیب از اسانس شد که ۹۱/۷٪ از کل اسانس را تشکیل می‌دادند. از مهمترین ترکیب‌های شمیایی اسانس که از گیاهان منطقه شهرستان الشتر واقع در استان لرستان جمع آوری شده بود، شامل جرماکرن-D (۲۷/۵٪)، بتا-کاریوفیلن (۱۵/۵٪)، لینالول (۱۲/۵٪)، بی سیکل‌جرماکرن (۹/۲٪)، کاریوفیلن اکسید (۶/۳٪) و اسپاتولنول (۵/۷٪) بودند. آنالیز اسانس گونه *S. palaestina* منجر به شناسایی ۶۰ ترکیب شده‌است که ترکیب‌های اصلی آن شامل جرماکرن-دی (۱۴٪)، بتا-بیسابولن (۱۱/۹٪)، کوبنول (۹/۸٪)، دکانال (۷٪)، بتا-کاریوفیلن (۶/۱٪) و ایزوبورنیل بوتانوات (۵/۸٪) می‌باشد (Salehi *et al*., 2005). آنالیز اسانس گونه *S. palaestina* منجر به شناسایی ۳۴ ترکیب شده‌است که ترکیب‌های اصلی آن شامل اسکلارئول (۲۶/۸٪)، کاریوفیلن (۱۶/۹٪)، لینالول (۷/۸٪)، گوایول (۵/۴٪) و ۸،۱-سینئول (۵/۲٪) می‌باشد (AI-Howiriny, 2007).

فلاونوئیدها با توجه به نوع گیاه می‌توانند نقش محرک یا دفاعی داشته باشند و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی عمل نمایند. این ترکیب‌ها از رنگیزه‌های محلول در آب هستند و محافظ خوبی در برابر سرطان و سایر امراض می‌باشند. همچنین دارای خواص ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند. رزمارینیک اسید یک ترکیب اسید فنلی است که در گیاه به‌عنوان ضدویروس، ضدباکتری و ضدالتهاب عمل کرده و همچنین از خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار می‌باشد (Parnham & Kesselring, 1985). رزمارینیک اسید در برخی از گونه های سالویا ازجمله *S. limbata* گزارش شده‌است (Gohari *et al*., 2010).

این پژوهش با هدف شناسایی و بررسی بازده و ترکیب‌های شیمیایی اسانس و فلاونوئیدها، میزان فلاونوئید کل و رزمارینیک اسید در دو گونه سالویا انجام گردید.

مواد و روشها

مواد گیاهی

گیاهان گونه *S. reuterana* از سه منطقه کاسوا از استان قم، شهمیرزاد از استان سمنان و دلی‌چای از استان تهران و گیاهان گونه *S. palastinae* از منطقه رودبارک مازندران، در اواخر بهار سال ۱۳۸۹ از طبیعت جمع آوری و در هرباریوم گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران شناسایی شدند. نمونه‌های گیاهی در پاکت‌های کاغذی نگهداری و در سایه خشک گردید. اطلاعات مربوط به رویشگاه‌ها در جدول ۱ آورده شده‌است.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به رویشگاه های مورد مطالعه

محل جمع‌آوری	استان	ارتفاع (m)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	میانگین دمای سالیانه (°C)	میانگین بارش سالیانه (mm)
شهمیرزاد	سمنان	۱۹۴۳	۳۵° ۴۵′ N	۵۳° ۲۰′ E	۱۸/۳	۸۴
کاسوا	قم	۱۹۱۰	۳۴° ۴۳′ N	۵۰° ۱۰′ E	۱۸/۱	۸۳
دلی‌چای	تهران	۲۲۷۱	۳۵° ۳۴′ N	۵۲° ۲۸′ E	۵/۵	۲۳۳
رودبارک	مازندران	۱۲۱۶	۳۶° ۲۸′ N	۵۲° ۰۷′ E	۱۸	۹۷۷

تهیه اسانس

نمونه‌های گیاهی هر منطقه، به مقدار ۵۰ گرم توزین و خرد شده و بعد به روش تقطیر با آب مقطر با استفاده از دستگاه کلونجر مدت ۴ ساعت (طبق فارماکوپه بریتانیا) در سه تکرار و بر حسب درصد (حجمی به وزنی) گزارش گردید.

دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS)

نمونه‌های اسانس در آزمایشگاه دانشکده فیزیک دانشگاه بارسلونا واقع در کشور اسپانیا آنالیز گردید. برای شناسایی ترکیب‌های شیمیایی اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. دستگاه GC/MS با استفاده از مدل Hewlett Packard، ساخت کشور آمریکا بوده که ستون مورد استفاده از نوع HB-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون بود. برنامه‌ریزی حرارتی از ۱۰۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در دقیقه، ۱۸۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه در دقیقه و در دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. حرارت محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. از گاز هلیم به‌عنوان گاز حامل که با سرعت ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه بود، استفاده شد. به مقدار یک میکرولیتر از اسانس به دستگاه GC/MS تزریق گردید.

شناسایی ترکیب‌ها به کمک GC/MS

برای شناسایی ترکیب‌های اسانس از نرم‌افزار Xcalibur 2.0.7 استفاده گردید که مجهز به کتابخانه‌های mainlib، Nist_msms، Nist_ri و rep lib شده بود. با استفاده از جرم مولکولی بدست آمده و محاسبه شاخص بازداری (RI: Retention index) و نیز مقایسه با رفرنس‌های معتبر، ترکیب‌ها شناسایی شدند.

تهیه عصاره جهت تعیین میزان فلاونوئید کل و رزمارینیک اسید

به‌منظور تهیه عصاره برای تزریق به HPLC، ابتدا نیم گرم از برگ خشک در ۱۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. بعد از ۲۴ ساعت محلول فوقانی برداشته شد و مجدداً باقیمانده گیاه با دی‌اتیل اتر دو بار دیگر شستشو داده شد. عصاره حاصل سپس تبخیر و تغلیظ گردید. مواد موجود در ته ویال در متانول ۸۰٪ حل شده و با فیلترهای HPLC به ویال‌های مخصوص تزریق خودکار HPLC فیلتر شدند.

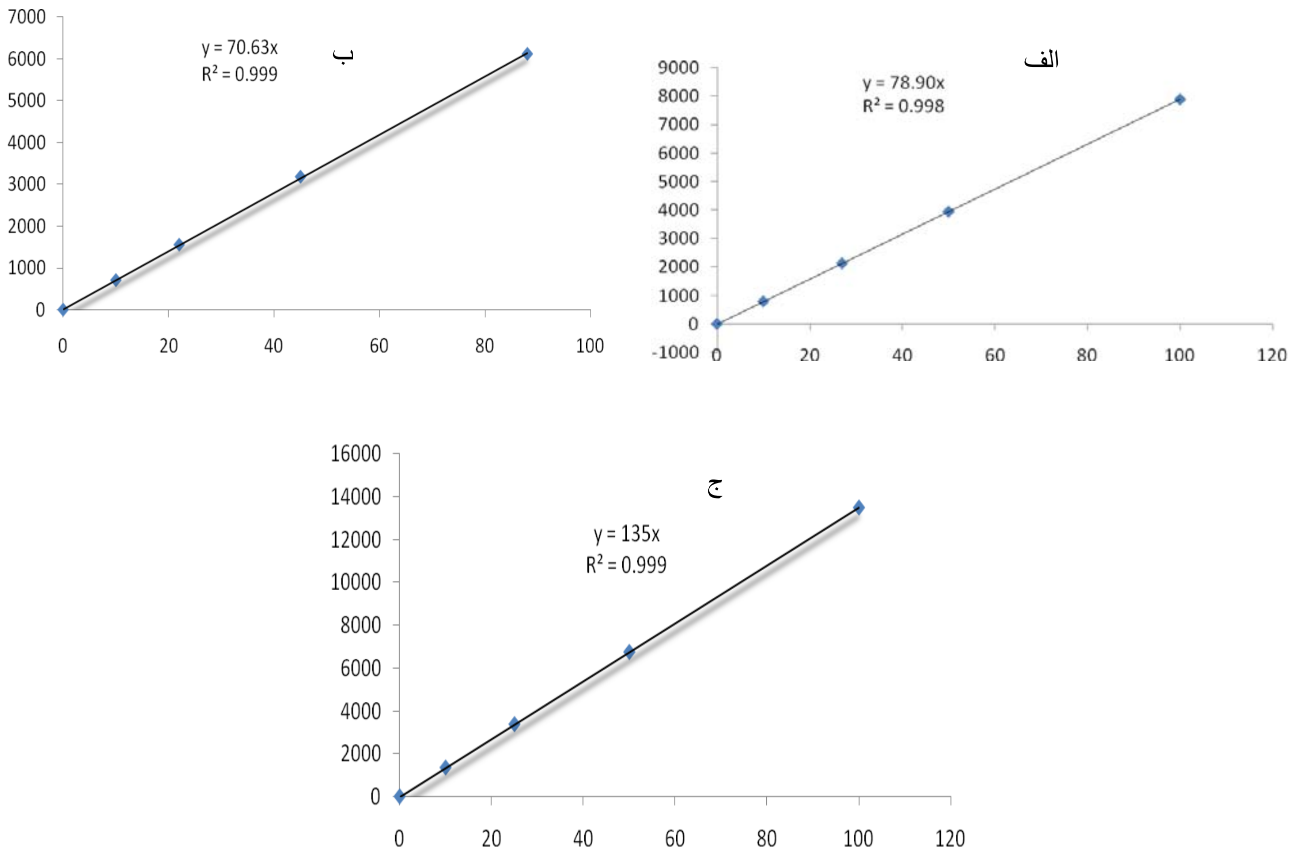
کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

در پژوهش حاضر کروماتوگرام مربوط به ترکیب‌ها به کمک LC-DAD-ESI-MS شامل یک سیستم HPLC (اجیلنت-۱۱۰۰) با دِیودِ اری دتکتور متصل با LC-MSD-TOF (۲۰۰۶) اجیلنت-تکنولوژی بود که LC-DAD-ESI-TOF با روش یونیزاسیون الکتروسپرای (ESI-MS) برای این مطالعه استفاده شد. این دستگاه مجهز به ستون سیمتری واتر (C8. 4.6×150 mm)، با جریان ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه بدست آمد. دمای آون در ۳۰ درجه، ایزوگرادیان فاز متحرک شامل اسید استیک ۲٪ و استونیتریل با نسبت ۶۰ به ۴۰ به مدت ۳۲ دقیقه انجام گردید. برای کمّی‌سازی فلاونوئیدها، جذب در ۳۳۳ نانومتر تنظیم شد. جذب UV برای بدست آوردن الگوی جذب توسط DAD در شدت جذب بین ۲۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر برای هر نمونه ثبت گردید. با روش یونیزاسیون

الکتروسپرای (ESI-MS) برای این مطالعه استفاده شد و طیف جذبی در یونیزاسیون الکتروسپرای مد منفی در ولتاژ ۱۷۵، گاز حامل (N2) در دمای ۳۵۰ درجه با جریان ۱۰ لیتر بر دقیقه، فشار نبولیزر psi ۴۰، ولتاژ کاپیلاری KV ۳/۵ برای منفی و طیف جرمی از رنج ۱۰۰ تا ۱۲۰۰ m/z در نظر گرفته شد.

کالیبراسیون استانداردها

در این مرحله منحنی خطی کالیبراسیون برای هر یک از استانداردها رسم شد. معادله رگرسیونی با توجه به فرمول $y = ax + b$، که در آن y و x سطح زیر پیک و غلظت بودند، بدست آمد. ضرایب همبستگی بالا و منحنی‌های کالیبراسیون خطی مناسبی (R^2 > ۰/۹۹۸) برای تمام استانداردها بدست آمد (شکل ۱). کمّی‌سازی فلاونوئیدها برای تمام ترکیب‌هایی که مقدار کافی از استانداردشان وجود داشت انجام شد که شامل لوتئولین، سیرسیماریتین، پنتولوتین و رزمارینیک اسید بودند. به دلیل مقدار کم استانداردها و اهمیت دو ترکیب غالب جاس اوسیدین و ۵- هیدروکسی تترامتوکسی فلاون پیک‌های این ترکیب‌ها به‌دلیل تشابه در جذب UV با منحنی استاندارد زانتومیکرول کمّی‌سازی شدند. برای ارزیابی فلاونوئید کل، ابتدا با استفاده از الگوی جذب ترکیب‌ها در بازه طول موج ۲۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر نور UV، ترکیب‌های فلاونوئیدی ابتدا مشخص شده و بعد مساحت زیر منحنی این ترکیب‌ها نسبت به منحنی استاندارد زانتومیکرول (استاندارد خارجی) کمّی‌سازی شدند.



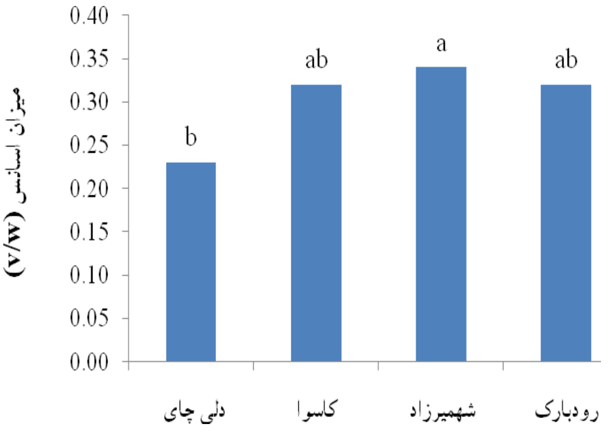
شکل ۱- منحنی کالیبراسیون: الف) رزمارینیک اسید، ب) زانتومیکرول، ج) سیرسیمارتین

محاسبه پارامترها و آنالیز داده‌ها

در پایان آزمایش، اعداد بدست آمده از نتایج اسانس و عصاره، به‌وسیله نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و مقایسه میانگین با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ محاسبه گردید.

نتایج

بازده اسانس حاصل از بخش‌های هوایی دو گونه *S. reuterana* و *S. palaestina* به روش تقطیر با آب به‌ترتیب ۰/۲۳٪ تا ۰/۳۴٪ حجمی به وزنی در گونه اول و ۰/۳۲٪ حجمی به وزنی در گونه دوم بدست آمد. بیشترین بازده اسانس در گونه *S. reuterana* در نمونه‌های جمع‌آوری شده از گیاهان منطقه شهمیرزاد و کمترین میزان اسانس در گیاهان منطقه دلی‌چای مشاهده شد (شکل ۲). میزان اسانس در پیکره رویشی گیاهان شهمیرزاد اختلاف معنی‌داری با اسانس گیاهان منطقه دلی‌چای داشت (A) و گیاهان رویشگاه کاسوا نیز اختلاف معنی‌داری را با رویشگاه شهمیرزاد نشان نداد و در یک گروه قرار گرفتند (B و AB) (شکل ۲).



شکل ۲- محاسبه بازده اسانس برحسب حجمی به وزنی در چهار منطقه جمع‌آوری در دو گونه مریم‌گلی

(حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.)

ترکیب‌های شیمیایی اسانس

در مجموع در اسانس سرشاخه‌های گلدار در گونه مریم‌گلی اصفهانی (*S. reuterana*) در رویشگاه دلی‌چای، شهمیرزاد و کاسوا به‌ترتیب ۲۴، ۲۵ و ۳۱ ترکیب و در گونه *S.palaestina* در منطقه رودبارک ۲۲ ترکیب شناسایی شدند که در جدول ۲ آورده شده‌اند. ترکیب‌های شناسایی شده از رویشگاه شهمیرزاد ۹۶/۸٪، رویشگاه کاسوا ۹۴/۵٪، رویشگاه دلی‌چای ۹۵/۵٪ و رویشگاه رودبارک ۹۴٪ از کل اسانس را به خود اختصاص دادند. عمده‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس مریم‌گلی اصفهانی، شامل بتا-المن (۹/۸-۱۳/۹٪)، آلفا-گورجونن (۷/۹-۱۳/۵٪)، جرماکرن-D (۶/۲-۱/۷٪) و اسپاتولنول (۱-۹/۷٪) بودند. غالب‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس در گونه *S. reuterana* در منطقه شهمیرزاد شامل شش ترکیب بتا-المن (۱۳/۹٪)، آلفا-گورجونن (۱۳/۷٪)، ایزوآرومادندرن اپوکسید (۱۱/۹٪)، ان-هگزیل ایزووالرات (۹/۵٪)، ان-هگزیل استات (۶/۸٪) و هگزیل بوتیرات (۵/۴٪)؛ مهمترین ترکیب‌ها در گیاهان منطقه کاسوا شامل شش ترکیب بتا-المن (۱۰/۳٪)، آلفا-گورجونن (۹/۹٪)، ان-استیل استات (۷/۴٪)، اسپاتولنول (۷/۳٪)، ان-هگزیل دلی‌چای شامل شش ترکیب آلفا-گورجونن (۹/۷٪)، اسپاتولنول (۹/۷٪)، بتا-المن (۸/۹٪)، ان هگزیل بنزوات (۸/۰٪)، جرماکرن-D (۷/۱٪) و بتا-کوببن (۵/۲٪) بودند (جدول ۲).

از غالب‌ترین ترکیب‌های شیمیایی اسانس در مریم‌گلی اصفهانی می‌توان به بتا-المن و آلفا-گورجونن اشاره کرد که در همه مناطق مورد مطالعه وجود دارد. نقش ضدسرطانی (پیشگیری‌کننده و درمان‌کننده) ترکیب بتا-المن به اثبات رسیده‌است (Edris, 2009). اسانس گونه *Cyperus rotundus* خاصیت ضدمیکروبی دارد که از مهمترین ترکیب‌های شیمیایی آن می‌توان به آلفا-گورجونن اشاره کرد (Bisht, 2011).

جدول ۲- ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس دو گونه مریم‌گلی مورد مطالعه

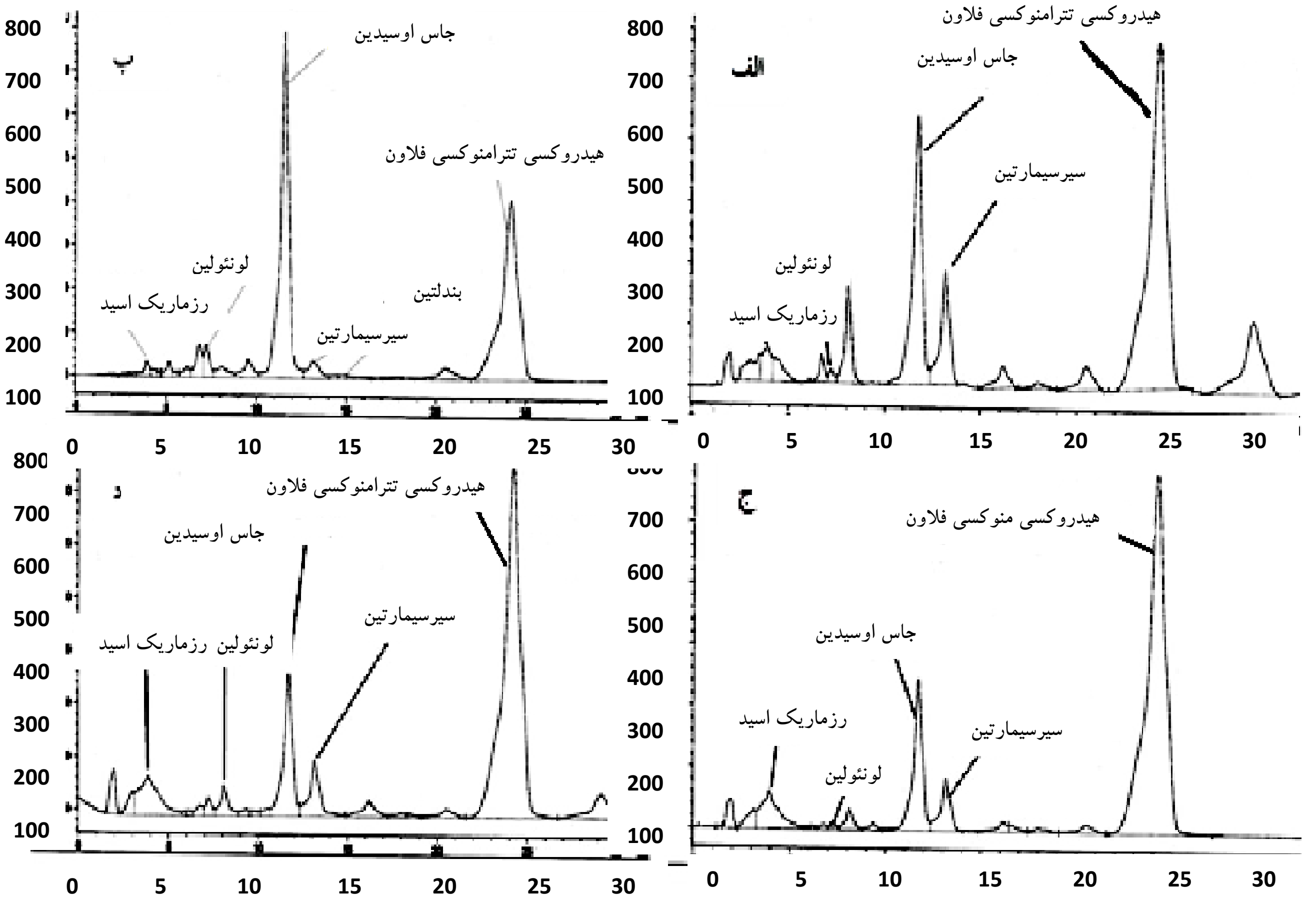
ردیف	ترکیب‌ها	شهمیرزاد	کاسوا	دلی‌چای	رودبارک	شاخص بازداری
		S. reuterana			*S. palaestina*	
۱	iso-amyl-2 methyl butyrate	–	–	۰/۸	–	۹۴۸
۲	β-pinene	–	۳/۸	–	۲/۶	۹۸۱
۳	n-hexyl acetate	۶/۸	۲/۷	۰/۳	–	۱۰۱۴
۴	Z-β-ocimene	۳/۴	–	۰/۲	۱/۸	۱۰۳۸
۵	*p*-menthene		–	–	۳/۸	۱۰۳۰
۶	linalool	–	–	–	۱۱/۱	۱۱۰۰
۷	isovaleric acid	۲/۱	۰/۹	۳/۴	–	۱۰۳۹
۸	isobutyric acid, hexyl ester	–	–	–	–	۱۰۶۶
۹	2-methyl hexyl butyrate	۰/۱	۳/۶	–	–	۱۰۹۶
۱۰	hexyl butyrate	۵/۴	۱/۸	۱/۴	–	۱۱۰۵
۱۱	iso pinocampheol	–	۰/۵	–	–	۱۱۵۸
۱۲	n-octyl acetate	۳/۶	۷/۴	–	–	۱۱۶۲
۱۳	α-terpineol	۰/۳	–	–	۳/۹	۱۱۶۸
۱۴	linalyl formate	–	–	–	۰/۱	۱۲۲۴
۱۵	n-hexyl isovalerate	۹/۴	۵/۷	۴/۴	–	۱۲۴۲
۱۶	dihydro carveol	–	–	–	۱۲/۲	۱۲۶۴
۱۷	geraniol	–	–	–	۰/۷	۱۲۷۶
۱۸	geranyl formate	–	–	–	۲/۱	۱۳۲۴
۱۹	δ-elemene	۰/۷	۳/۲	۳/۷	۰/۵	۱۳۴۹
۲۰	α-copaene	۱/۴	۰/۷	۴/۲	۴/۹	۱۳۶۵
۲۱	geranyl acetate	–	–	–	۴/۱	۱۳۷۲
۲۲	β-elemene	۱۳/۹	۱۰/۳	۸/۹	۱/۳	۱۳۸۸
۲۳	n-decyl acetate	–	۱/۴	۲/۷	–	۱۳۹۳
۲۴	Z-caryophyllene	–	–	–	۱۳/۱	۱۳۹۵
۲۵	α-gurjunene	۱۳/۷	۹/۹	۹/۷	–	۱۴۰۶
۲۶	isoamyl banzoate	–	۱/۹	–	–	۱۴۴۸
۲۷	β-cubebene	۶/۲	–	۵/۲	–	۱۴۵۹
۲۸	iso-pentyl benzoate	–	–	–	–	۱۴۵۶
۲۹	T-muurolene	–	۰/۷	۴/۷	۳/۸	۱۴۵۸
۳۰	α-muurolene	۲/۱	۱/۲	–	–	۱۴۶۳
۳۱	α-amorphene	۱/۴	–	–	–	۱۴۷۵
۳۲	seychellene	–	۲/۶	–	–	۱۴۷۶
۳۳	germacern D	۲/٦	٤/۰	۷/۱	۱۲/۷	۱٤۷۸
۳٤	α-selinene	–	۱/٤	–	–	۱٤۹۲

ادامه جدول ۲-

ردیف	ترکیب‌ها	شهمیرزاد	کاسوا	دلی‌چای	رودبارک	شاخص بازداری
		S. reuterana			*S. palaestina*	
۳۵	α-farnesene	–	۱/۷	۲/٦	–	۱۵۰۲
۳٦	caryophyllene oxid	–	–	۰/٤	۱/٤	۱۵٤۸
۳۷	β-maaliene	۱/۵	۱/٤	–	–	۱۵۵۷
۳۸	α-elemol	۱/۸	۲/۰	–	–	۱۵٦۲
۳۹	β-guaiene	۰/۵	–	–	–	۱۵٦۵
٤۰	spathulenol	۱	۷/۳	۹/۷	۷	۱۵۸۹
٤۱	calarene epoxid	–	۰/۷	–	–	۱٦۰۲
٤۲	β-eudesmol	–	۵/۳	۱/۸	۱/۷	۱٦۸۵
٤۳	aromadendrene epoxide	۱۱/۹	۰/۸	–	–	۱٦۸۸
٤٤	α-bisabolone oxide A	–	۱/۵	۳/۰	–	۱۷۰۵
٤۵	ledene oxide	–	–	۱/۵	–	۱۷٤۲
٤٦	n-hexyl benzoate	–	۵/٦	۸/۰	۲/٤	۱۷۹۳
٤۷	benzoic acid, phenyl methyl ester	۱/۱	–	۲/٤	–	۱۸۱۵
٤۸	sclareol oxide	۱/۵	۳/٤	–	۰/۷	۱۹۱۵
٤۹	E-nusifrol	۳/٦	۲/٦	٤/۷	–	۱۹۷۷
۵۰	sclareol	۰/۸	۲/٤	٤/۷	۲/۱	۲۲۲۵
	درصد مجموع ترکیب‌ها	**۹٦/۸**	**۹٤/۵**	**۹۵/۵**	**۹٤/۰**	
	بازده اسانس	**۰/۳٤**	**۰/۳**	**۰/۲۳**	**۰/۳۲**	

شناسایی ترکیب‌های عصاره دی‌اتیل اتری با استفاده از LC-DAD-ESI-MS

نتایج داده‌ای LC-DAD-ESI-MS حاصل از عصاره‌ها در جدول ۳ نشان داده شده‌است. فرمول‌های مولکولی ممکن برای ترکیب‌های پیشنهادی بدست آمد. برای بدست آوردن فرمول تجربی برای تمام جمعیت‌ها با استفاده از جرم مولکولی از سیستم MS–LC-DAD-ESI استفاده شد. ترکیب‌های شناسایی شده شامل رزمارینیک اسید (زمان بازداری (RT) ۳/۸۹، *m/z* [M-H]⁻۳۵۹/۰۷۸، حداکثر جذب UV (λmax) ۲۳۴، ۲۸۶ و ۳۲۹)؛ لوتئولین (RT، ۷/۱۸، *m/z* [M-H]⁻۲۸۵/۰۴، λ_{max} ۲۳۲، ۲۶۷ و ۳۴۴)؛ سیرسیماریتین (RT، ۱۳/۱۶، [M-H]⁻ *m/z*۳۱۳/۰۷۱، λ_{max} ۲۳۴، ۲۳۲ و ۲۷۶)؛ جاس اوسیدین (RT، ۱۱/۶۷، *m/z* [M-H]⁻ ۳۲۸/۰۵۸، λ_{max} ۲۳۴، ۲۵۲، ۳۴۲ و ۲۷۶)؛ پندولوتین (RT، ۱۴/۸۸، [M-H]⁻ *m/z*۳۴۳/۰۸۲۵، λ_{max} ۲۳۲، ۲۷۲sh و ۳۴۰)؛ ۵ هیدروکسی ترامتوکسی فلاون (RT، ۲۴/۱۸، [M-H]⁻ *m/z* ۳۵۸/۱۰۶، λ_{max} ۳۳۲-۲۷۶-۲۳۲) بود. مقایسه بین RT و UV λmax و داده‌های جرم مولکولی بدست آمده از عصاره‌های مریم‌گلی از جمعیت‌ها با استانداردهای موجود از لوتئولین، سیرسیماریتین، پنتولوتین و رزمارینیک اسید به شناسایی راحت این ترکیب‌ها کمک نمود. برای سایر ترکیب‌ها نیز شناسایی با جرم مولکولی بدست آمده و شدت جذب نور UV و مقایسه آنها با رفرنس‌های معتبر قبلی انجام گردید (Greenham *et al.*, 2003).



شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از عصاره دی‌اتیل اتری دو گونه ***Salvia***؛ شهمیرزاد (الف)، رودبارک (ب)، کاسوا (ج)، دلی‌چای (د) با استفاده از دستگاه **HPLC** (نمودار **X**: مدت زمانی (دقیقه)، نمودار **Y**: میزان جذب **UV**)

کمّی‌سازی فلاونوئیدها و رزمارینیک اسید

مطابق شکل ۳، ستون و فاز متحرک استفاده شده در این آزمایش توانست ترکیب‌ها را به‌طور موفقیت‌آمیزی جدا سازد. دو ترکیب غالب در عصاره دو گونه مریم‌گلی مورد مطالعه مشاهده شد. مقدار جاس‌اوسیدین در گونه *S. reuterana* در منطقه دلی‌چای ۴۸۰/۰۷، در منطقه کاسوا ۴۶۹/۷۷ میکروگرم بر گرم و در منطقه شهمیرزاد ۸۴۹/۳۷ میکروگرم بر گرم متغیر بود و میزان ترکیب مذکور در منطقه رودبارک مربوط به گونه *S. palaestina* ۲۳۰۷/۴۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود که این ترکیب در گونه مذکور بیشتر از گیاهان مریم‌گلی اصفهانی گزارش گردید. مقدار ۵- هیدروکسی تترامتوکسی فلاون در گونه *S. reuterana* در منطقه دلی‌چای ۲۴۰۷/۴۷، در منطقه کاسوا ۲۱۴۲/۶۱ میکروگرم بر گرم و در منطقه شهمیرزاد ۲۰۱۷/۲۳ میکروگرم بر گرم متغیر بود و میزان ترکیب مذکور در منطقه رودبارک مربوط به گونه *S. palaestina*، ۱۴۰۸/۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک (DM) گزارش گردید (جدول ۳). رزمارینیک اسید به‌عنوان یکی از مهمترین ترکیب‌های فنولی در جمعیت‌های مریم‌گلی مشاهده شد که با استفاده از منحنی استاندارد میزان آن بین ۱۹ تا ۱۷۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک (DM) متغیر بود. رزمارینیک اسید در گونه *S. reuterana* در منطقه شهمیرزاد ۹۸/۴۶، در منطقه کاسوا ۱۲۲ و در منطقه دلی‌چای ۱۷۷/۱۱ میکروگرم بر گرم محاسبه گردید.

همچنین رزمارینیک اسید در گونه *S. palaestina* ۱۹/۷۲ میکروگرم بر گرم بود (جدول ۳).

مقدار لوتئولین در گونه *S. reuterana*، در منطقه شهمیرزاد ۱۳/۴۸، در منطقه دلی‌چای ۱۵/۱۱ و در منطقه کاسوا ۹/۵۹ میکروگرم بر گرم بود. همچنین میزان لوتئولین در گونه *S. palaestina* از منطقه رودبارک نسبت به میزان آن در گونه *S. reuterana* در سه منطقه ذکر شده بیشتر بود (۳۳/۴ میکروگرم بر گرم). سیرسیمارتین در گونه *S. reuterana* در منطقه شهمیرزاد ۱۸۴/۷۳، در منطقه کاسوا ۹۴/۵۸ و در منطقه دلی‌چای ۱۰۰/۵۸ میکروگرم بر گرم محاسبه گردید. همچنین سیرسیمارتین محاسبه شده در گونه *S. palaestina* منطقه رودبارک، ۳۹/۹۱ میکروگرم بر گرم گزارش گردید (جدول ۳).

پندولتین (Penduletin) تنها در گونه *S. palaestina* و به مقدار ۳۸/۸۷ میکروگرم بر گرم شناسایی شد و در هیچکدام از نمونه‌های *S. reuterana* مشاهده نشد (جدول ۳). شکل ۴ ساختار ترکیب های شناسایی شده فلاونی را نشان می‌دهد.

فلاونوئید کل

فلاونوئید کل برای گیاهان چهار منطقه مورد بررسی محاسبه گردید (جدول ۳). در گونه *S. reuterana*، میزان فلاونویید کل در منطقه کاسوا ۳۲۵۲/۷۶ میکروگرم بر گرم، در منطقه دلی‌چای ۳۶۹۷/۱۹ میکروگرم بر گرم و در منطقه شهمیرزاد ۵۱۳۲/۹۲ میکروگرم بر گرم گزارش گردید؛ همچنین فلاونوئید کل در گونه *S. palaestina* ۳۸۲۸/۳۵ میکروگرم بر گرم بود. منطقه شهمیرزاد سمنان بیشترین میزان فلاونوئید کل را در بین چهار منطقه مورد بررسی به خود اختصاص داد.

بحث

بازده و ترکیب‌های شیمیایی اسانس در گیاهان جمع‌آوری در مناطق مختلف متغیر می‌باشد. قبلاً بازده اسانس در *S. reuterana* ۰/۱٪ محاسبه شده بود (میرزا، ۱۳۷۸). در این پژوهش، بازده اسانس در مناطق مختلف از ۰/۲۳٪ تا ۰/۳۵٪ متغیر بود. افزایش یا کاهش در میزان مواد مؤثره و متغیر بودن ترکیب‌های شیمیایی اسانس در مناطق مختلف می‌تواند بدلیل شرایط محیطی و یا ژنتیکی باشد.

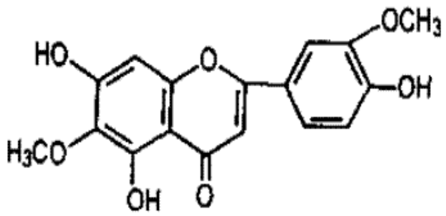
آنالیز اسانس گونه *S. reuterana* توسط Mirza و Sefidkon (۱۹۹۹)، منجر به شناسایی ۲۱ ترکیب شده‌است که ترکیب‌های اصلی آن شامل ترانس-بتا-اوسیمن (۳۲/۳٪)، آلفا-گورجونن (۱۴/۱٪)، جرماکرن-D (۱۱/۲٪) و هگزیل‌استات (۷/۶٪) بوده‌اند. مقایسه نتایج تحقیق حاضر با نتایج Mirza و Sefidkon (۱۹۹۹)، به غیر از بتا-اوسیمن، که در تحقیق حاضر کمتر از ۶٪ را تشکیل می‌دهد، در بقیه ترکیب‌ها اغلب مطابقت می‌کند.

آنالیز اسانس گونه *S. reuterana* توسط Amiri و همکاران (۲۰۰۶) منجر به شناسایی ۲۸ ترکیب از اسانس شد که ۹۱/۵٪ کل اسانس را شامل می‌شد. از مهمترین ترکیب‌های شیمیایی اسانس این گیاهان که از منطقه شهرستان الشتر واقع در استان لرستان جمع‌آوری شده بود، شامل جرماکرن-D (۲۷/۵٪)، بتا-کاریوفیلن (۱۵/۵٪)، لینالول (۱۲/۵٪)، بی‌سیکلو جرماکرن (۹/۲٪)، کاریوفیلن اکسید (۶/۳٪) و اسپاتولنول (۵/۷٪) بودند. در مقایسه این نتایج با نتایجی که از بررسی اسانس این گونه در تحقیق حاضر بدست آمده است، تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای وجود دارد که از مهمترین تفاوت می‌توان به درصد بالای لینالول و بتا-کاریوفیلن و درصد ناچیز یا عدم وجود این دو ترکیب در تحقیق حاضر اشاره نمود. تفاوت‌های مشاهده شده در مواد تشکیل‌دهنده اسانس در گونه مورد نظر می‌تواند به دلیل تفاوت در زمان جمع‌آوری گیاه، شرایط اکولوژیکی محل جمع‌آوری گیاه و ژنتیک باشد.

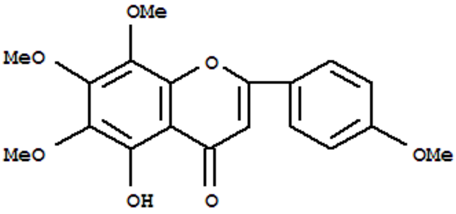
آنالیز اسانس گونه *S. palaestina* توسط صالحی و همکاران (۲۰۰۵) منجر به شناسایی ۶۰ ترکیب شده است که ترکیب‌های اصلی آن شامل جرماکرن-D (۱۴٪)،
بتا-بیسابولن (۱۱/۹٪)، کوبنول (۹/۸٪)، دکانال (۷٪)، بتا-کاریوفیلن (۶/۱٪) و ایزوبورنیل بوتانوات (۵/۸٪) می‌باشد.

جدول ۳- مقادیر رزمارینیک اسید و برخی ترکیب‌های شناسایی شده فلاونوئیدی (**µg/ gram**) در دو گونه سالویا

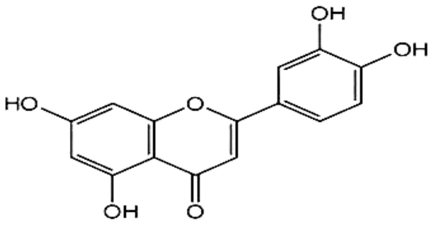
[M-H]⁻			حداکثر جذب	فرمول	*S. reuteranea*			*S. palaestina*	روش
(m	**Calc *m/z***	***Diff(ppm)***	**(λmax) UV**	مولکولی	شهمیرزاد	دلی‌چای	کاسوا	رودبارک	شناسایی
۳۵۹	۳۵۹/۰۷۷	-۴/۳۸	۲۳۴-۲۸۶-۳۲۹	$C_{18}H_{16}O_8$	۹۸/۴۶	۱۷۷/۱۱	۱۲۲	۱۹/۷۲	Mass, UV, St
۲۸۵	۲۸۵/۰۴۰	-۱/۷۵	۲۶۷-۲۳۲-۳۴۴	$C_{15}H_{10}O_6$	۱۳/۴۸	۱۵/۱۱	۹/۵۹	۳۳/۴	Mass, UV, St
۳۲۸	۳۲۸/۰۵۸	-۱/۸	۲۷۶-۳۴۲-۲۵۲-۲۳۴	$C_{17}H_{14}O_7$	۸۴۹/۳۷	۴۸۰/۰۷	۴۶۹/۷۷	۲۳۰۷/۴۷	Mass, UV
۳۱۲	۳۱۳/۰۷۱۸	۲/۴۲	۲۷۶ -۲۳۲-۲۳۴	$C_{17}H_{14}O_6$	۱۸۴/۷۳	۱۰۰/۵۸	۹۴/۵۸	۳۹/۹۱	Mass, UV, St
۳۴۳/	۳۴۳/۰۸۲۳	-۰/۵۷	۳۴۰-۲۳۴-۲۷۲	$C_{18}H_{16}O_7$	-	-	-	۳۸/۸۷	Mass, UV, St
۳۵۸	۳۵۸/۱۰۵	-۴/۲	۲۳۲-۲۷۶-۳۳۲	$C_{19}H_{18}O_7$	۲۰۱۷/۲۳	۲۴۰۷/۴۷	۲۱۴۲/۶۱	۱۴۰۸/۷	Mass, UV
	-	-	-	-	۵۱۳۲/۹۲	۳۶۹۷/۱۹	۳۲۵۲/۷۶	۳۸۲۸/۳۵	-



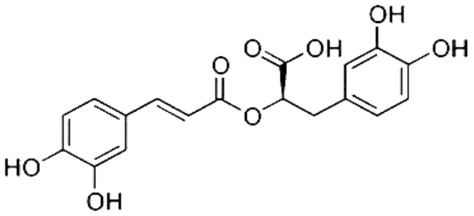
جاس اوسیدین



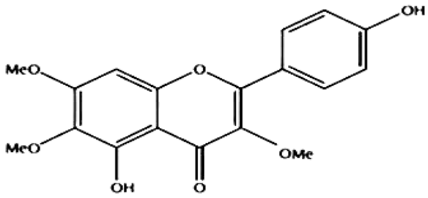
۵ هیدروکسی تترا متوکسی فلاون



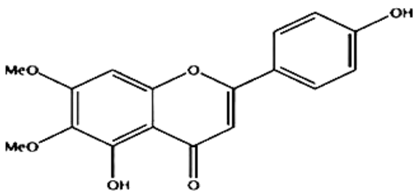
لوتئولین



رزمارینیک اسید



پندولوتین



سیرسیمارتین

شکل ۴- ساختار ۶ فلاونوئید شناسایی شده در دو گونه مریم‌گلی مورد مطالعه

بنابر نتایج بدست آمده در این تحقیق و گزارشهای قبلی، میزان و نوع ترکیب‌های اسانس با توجه به محل جمع‌آوری متفاوت است، بنابراین با توجه به نیاز کمّی و یا کیفی از محل مناسب نمونه‌برداری انتخاب گردد.

یکی از مکانیسم‌های گیاه در رابطه با اثرات مضر نور UV تجمع فلاونوئیدها در اندامهای سطحی می‌باشد و تحت عنوان فلاونوئیدهای سطحی معروف هستند (Tomás-Barberán & Wollenweber, 1990). منطقه شهمیرزاد سمنان بیشترین فلاونوئید کل را در بین چهار منطقه مورد بررسی به خود اختصاص داد. با توجه به اینکه گیاهان منطقه شهمیرزاد از شیب جنوبی جمع‌آوری گردیده بود، گیاهان در شیب جنوبی اغلب بیش از سایر شیب‌ها در معرض نور قرار می‌گیرند. بنابراین به نظر می‌رسد اشعه UV موجود در نور خورشید باعث تجمع زیاد فلاونوئید در گیاهان این منطقه شده است. میزان رزمارینیک اسید در منطقه دلی‌چای با دمای پایین‌تر نسبت به سایر مناطق (جدول ۱) بیشتر بود که با یافته‌های Fattahi و همکاران (۲۰۱۱) در گیاه بادرنجبویه دنایی مطابقت دارد.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که گیاه دارویی *S. reuterana* در مناطق مختلف رویشی میزان و ترکیب‌های شیمیایی اسانس و رزمارینیک اسید متفاوتی را دارا می‌باشد. در این پژوهش گیاهان منطقه شهمیرزاد بیشترین میزان فلاونوئید و درصد اسانس را داشتند، در حالی‌که بیشترین میزان رزمارینیک اسید در منطقه دلی‌چای گزارش گردید. بنابراین کشت این گیاه با توجه به نوع مواد مؤثره در رویشگاه شهمیرزاد و دلی‌چای، یا در اقلیم‌های مشابه با این مناطق (طبیعت به‌عنوان الگو)، می‌تواند کمک شایانی در تولید بیشتر فلاونوئیدها و رزمارینیک اسید نماید.

منابع مورد استفاده

- مظفریان، و.ا.، ۱۳۷۵. فرهنگ نامهای گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۴۷۷ صفحه.
- Al-Howiriny, T.A., 2007. Composition and anti-microbial activity of the essential oil of *Salvia palaestina* growing Saudi Arabia. Saudi pharmaceutical Journal, 15: 218-223.
- Amiri, H., Meshkat Al Sadat, M.H., Lari Yazdi, H. and Goodarzi, A., 2006. Essential oil composition of *Salvia reuterana* Boiss. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 22(3): 270-275.
- Bisht, A., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of tubers of *Cyperus rotundus* Linn. collected from Dehradun (Uttarakhand). International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2(2): 661-665.
- Edris, A.E., 2009. Anti-cancer properties of *Nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene. Current Clinical Pharmacology, 4: 43-46.
- Fattahi, M., Nazeri, V., Sefidkon, F., Zamani, Z., Palazon, J., Mercedes, B. and Cusido, R., 2011. Screening of *Dracocephalum kotschyi* accession for surface flavonoids and rosmarinic acid. Planta Medica, 77(12): 1385-1385.
- Gohari, A.R., Saeidnia, S., Malmir, M., Hadjiakhoondi, A. and Ajani, Y., 2010. Flavones and rosmarinic acid from *Salvia limbata*. Natural Product Research, 24(20): 1902-1906.
- Greenham, J., Harborne, J.B. and Williams, C.A., 2003. Identification of lipophilic flavones and flavonols by comparative HPLC, TLC and UV spectral analysis. Phytochemical Analysis, 14(2): 100-118.
- Miguel, G., Cruz, C., Faleiro, M.L., Simoes, M.T.F., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. and Pedro, L.G., 2011. *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 25(5): 526-541.
- Mirza, M. and Sefidkon, F., 1999. Essential oil composition of two *Salvia* species from Iran, *Salvia nemorosa* L. and *Salvia reuterana* Boiss. Flavour and Fragrance Journal, 14(4): 230-232.
- Nickavar, B., Abolhasani, L. and Izadpanah, H., 2008. α-Amylase inhibitory activities of six *Salvia* species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 7(4), 297-303.
- Parnham, M.J. and Kesselring, K., 1985. Rosmarinic acid. Drugs Future, 10: 756-757.
- Rechinger, K.H., 1982. Flora Iranica. No.150, Graz: Akademisch Druck-u.Verlagsanstal, 462p.
- Salehi, P., Sefidkon, F., Bazzaz tolami, L. and Sonboli, A., 2005. Essential oil composition of *Salvia palaestina* Benth. from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 20(5): 525-527.
- Tomás-Barberán, F.A. and Wollenweber, E., 1990. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. Plant Systematics and Evolution, 173(3): 109-118.

Identification of compounds in the essential oil and quantification of flavonoids and Rosmarinic acid in *Salvia reuterana* Boiss. and *Salvia palaestina* Benth.

B. Fattahi[1*], V. Nazeri[2], S. Kalantari[2] and M. Bonfill[3]

1*- Corresponding author, M.Sc. Student, Department of Horticulture, University of Tehran, Karaj, Iran
E-mail: bahman.fattahi@yahoo.com
2- Department of Horticulture, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received: November 2011 Revised: November 2012 Accepted: November 2012

Abstract

Genus *Salvia*, belonging to the Labiatae family, has valuable active ingredients including essential oils, flavonoids and rosmarinic acid. Pharmacological researches on *Salvia* genus have confirmed medicinal properties of the plant including antibacterial and antioxidant effects. Total flavonoids, rosmarinic acid and the content and chemical compounds of essential oil of three populations of *Salvia reuterana* Boiss., collected from three regions of Iran (Deli chai, Kaswa and Shahmirzad), as well as *Salvia palaestina* Benth.*,* collected from Rodbarak, were evaluated in present study. Fifty-six compounds of *S. reuterana* and *S. palaestina* were identified by GC-MS. The most important chemical compositions for *S. reuterana* were *α*-gurjunen, *β*-elemene, germacern-D, N-hexyl acetate and spatholenol and for *S. palaestina* were caryophyllen, dihydro carveol, germacern-D, linalool and spatholenol. Diethyl ether extract of leaves was used for quantification and identification of flavonoids and rosmarinic acid. The crushed leaves of the plant were dissolved in diethyl ether solvent and then were injected into the LC-DAD-ESI-MS system. Total flavonoids amount of *S. reuterana*, collected from Kaswa, Deli chai and Shahmirzad were calculated to be 3252.76, 3697.19 and 5132.92 µg/ g, respectively. Also the amount of rosmarinic acid in plants, collected from Kaswa, Deli chai and Shahmirzad was 122, 177.11 and 98.46 µg/ g, respectively. *S. palaestina* Rodbarak showed 3808 and 19.72 µg/g of total flavonoids and rosmarinic acid, respectively.

Key words: Essential oil, total flavonoid, rosmarinic acid, GC/MS, *Salvia reuteranae* Boiss., *Salvia palaestina* Benth.