

بررسی فیتوشیمی جمعیت‌های مختلف *Marrubium astracanicum* Jacq. در استان فارس

وحید روشن^{۱*}، عاطفه بهمن‌زادگان جهرمی^۲، فرانہ زارعیان^۲، احمد حاتمی^۲ و لادن جوکار^۲

۱- نویسنده مسئول، استادیار، بخش منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران، پست الکترونیک: v.rowshan@gmail.com

۲- کارشناس ارشد، بخش منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

۳- مربی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

چکیده

Marrubium astracanicum Jacq. (فراسیون) گیاهی از خانواده نعناعیان یا Lamiaceae می‌باشد. در این تحقیق ۵ جمعیت از گونه فراسیون (مناطق دراک، غرب دشت ارزن، بوانات- سیمکان (لاک پستی)، پاسارگاد (قرق ابوالمهدی) و صدرا) جمع‌آوری شدند. پس از خشک کردن نمونه‌های گیاهی، از قسمت‌های هوایی آنها با استفاده از روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد و ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس با دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) و کروماتوگرافی گازی (GC)، شناسایی و تعیین مقدار گردید. عصاره متانولی به روش خوابانیدن در حلال تهیه و با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای ترکیب‌های پلی‌فنولی آنالیز شد. بازده اسانس‌ها از ۰/۲۱٪ تا ۰/۳۴٪ برحسب وزن خشک گیاه (وزنی/وزنی) بدست آمد. ترکیب‌های عمده اسانس ان-دکان، ان-دودکان، جرماکرن دی، ان-هگزادکانوئیک اسید، بتا-کاریوفیلن، بی‌سیکلوجرماکرن، فیتول، ان-تری‌کوزان، ان-پنتا‌کوزان، ان-هنتی‌کوزان و کاریوفیلن اکسید بودند. دوازده ترکیب عمده با استفاده از نرم‌افزار Minitab V.14 مورد تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با وجود اختلاف ارتفاع و آب و هوا، منطقه صدرا از نظر ترکیب‌های شیمیایی قرابت بیشتری به دو منطقه دراک و لاک پستی بوانات دارد. استانداردهای گالیک اسید، کوئرستین، کاتچین، کافئیک اسید و کلروجنیک اسید در طول موج‌های ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر بررسی شدند. میزان این پلی‌فنل‌ها در مناطق مختلف متفاوت بودند. نتایج ما نشان داد که ارتفاع و شرایط آب و هوایی در هر یک از این مناطق باعث تغییر در ترکیب‌های پلی‌فنولی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، ترکیب‌های شیمیایی، ترکیب‌های پلی‌فنولی، عصاره، *Marrubium astracanicum* Jacq. (فراسیون).

مقدمه

سطح دریا باشد. این عوامل همچنین باعث تغییر در رشد و حتی مورفولوژی گیاهان می‌شوند (Omidbaigi, 2009). تنوع آب و هوایی و وجود فصول چهارگانه در ایران، پوشش گیاهی متنوع و بسیار غنی را در کشور ما

مواد مؤثره گیاهان در رویشگاه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. از جمله دلایل این تغییرات می‌تواند عوامل محیطی و اکولوژیکی مانند آب و هوا، خاک و ارتفاع از

ارتفاع و ژنوتیپ، هر دو اثری قابل توجه بر مورفولوژی برگ گیاه دارند. Habibi و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی که انجام دادند اثر ارتفاع را بر اسانس و ترکیب‌های گیاه دارویی آویشن وحشی (*Thymus kotschyanus* Boiss.) بررسی کردند. نتیجه تحلیل‌های آماری نشان داده‌است که بین درصد اسانس و اختلاف ارتفاع از سطح دریا یک رابطه خطی منفی و معنی‌دار وجود داشته است. در پژوهشی Hajihassani و همکاران (۲۰۱۷) اثر ارتفاع و زمان برداشت را بر میزان اسانس گیاه آویشن کوهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج تجزیه‌های آماری نشان داده که اثر مرحله رشد و نیز اثرات متقابل مرحله رشد و ارتفاع بر بازده اسانس معنی‌دار بوده، اما ارتفاع محل تأثیر معنی‌داری بر بازده اسانس نداشته است. با توجه به اهمیت این گیاه از لحاظ ترکیب‌های دارویی و همچنین تأثیر عوامل اکولوژیکی در تنوع و میزان ترکیب‌های شیمیایی گیاهان، در این تحقیق برخی از ترکیب‌های شیمیایی جمعیت‌های متفاوت این گیاه در مناطق متفاوت استان فارس (منطقه دراک، غرب دشت ارژن (قرق میان کتل واقع در غرب دشت ارژن)، منطقه بوانات - سیمکان (لاک‌پشتی)، جاده شیراز به سمت پاسارگاد (قرق ابوالمهدی) و منطقه چشمه انجیری (منطقه صدرا) ارزیابی و پس از مقایسه این ترکیب‌ها، تأثیر عوامل اکولوژیکی بر روی این تغییرات مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از مجموع این اطلاعات و بررسی‌های آماری، میزان قرابت این جمعیت‌ها از لحاظ ترکیب‌های شیمیایی مشخص خواهد شد.

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس

استخراج اسانس به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر انجام شد. برای استخراج اسانس ۵۰ گرم از شاخه‌ها و برگ‌های خشک و آسیاب شده همراه آب مقطر در داخل بالن ریخته شد. به مدت ۲ ساعت عمل تقطیر انجام گردید. نمونه‌های اسانس توسط سولفات سدیم بدون آب

بوجود آورده است. فراسیون با نام علمی *Marrubium astracanicum* متعلق به جنس *Marrubium* بوده و جزو خانواده نعناعیان طبقه‌بندی می‌شود (Zargari, 1990). جنس فراسیون دارای ۴۰ گونه در دنیا و ۱۰ گونه گیاهی در ایران و ۴ گونه در فارس است (Rechinger, 1982). فراسیون گیاهی چندساله با ارتفاع حدود ۵۰ سانتی‌متر، ساقه گوشه‌دار، برگ‌های مودار با رگ‌های مشخص و به‌رنگ سبز متمایل به خاکستری می‌باشد. قسمت‌های مورد استفاده آن در اسانس‌گیری برگ و گل آن می‌باشد و زمان برداشت اواخر اردیبهشت است (Ghahraman, 1993). این گیاه در صنایع دارویی و همچنین به‌عنوان یک ماده مؤثره روی پوست در صنایع آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد (Singh & Singh, 2002). در مطالعه‌ای، جنس فراسیون *M. anisodon* از خانواده نعناعیان دارای ۴۰ گونه در دنیا و ۱۰ گونه گیاه علفی چندساله در ایران گزارش شده‌است (Rechinger, 1982). در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شده است که گونه *M. pereginum* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالا و اسانس می‌باشد (Stankovic, 2010). تحقیقی دیگر در مورد گونه *M. pereginum* و در رابطه با پلی‌فنل‌هایی مانند کافئیک اسید و ترکیب‌های فلاونوئیدی انجام شده است. فلاونوئید مهم‌ترین ترکیب شیمیایی موجود در این گیاه گزارش شده است (Khanavi et al., Hennebellea et al., 2006). (Lazari et al., 1999؛ 2005؛ 2005) Ghalichnia (۲۰۰۲) پراکنش و اکولوژی ۳۶ گونه گیاهی اسانس‌دار را مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که برخی گونه‌ها معرف شرایط خاص محیطی هستند. اسانس شمعدانی عطری با افزایش ارتفاع، افزون بر کاهش مقدار، بوی ملایم‌تری نسبت به ارتفاعات پایین داشته است (Majnoon Hosseini & Davazdah-Emami, 2007). در رابطه با اثر شرایط اقلیمی، Vander Schoor و Hovenden (۲۰۰۳) اثر عوامل طبیعی در برابر تغذیه را بر مورفولوژی برگ *Nothofagus cunninghamii* (Nothofagaceae) بررسی کردند و نتیجه گرفتند که

استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض ارتعاشات فراصوتی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها در دمای صفر درجه و ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی را جدا کرده و روی بقیه هگزان نرمال ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه و دمای صفر درجه و دور ۱۰۰۰۰ درون سانتریفیوژ قرار داده شد. سپس با سرنگ ترکیب‌های پلی‌فنلی (فاز زیرین) را کشیده و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر تا زمان آنالیز با دستگاه HPLC در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد (Justesen *et al.*, 1998). از استانداردهای گالیک اسید، کاتچین، کافئیک اسید، کلرژنیک اسید و کوئرستین برای اندازه‌گیری ترکیب‌های پلی‌فنولی در گستره غلظت ($1000-0/1 \text{ mgL}^{-1}$) و به روش استاندارد خارجی استفاده شد. منحنی کالیبراسیون از ترسیم سطح زیر پیک استانداردها برحسب غلظت محلول‌های استاندارد بدست آمد.

مشخصات دستگاه HPLC

دستگاه مورد استفاده از شرکت Agilent آمریکا سری ۱۲۰۰، ستون C_{18} به طول ۱۵ سانتی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر، دتکتور DAD (دیود آرای) در طول موج‌های ۳۲۰ و ۲۸۰ نانومتر و دمای آون ۳۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید. برنامه شویش گرادبان (فرمیک اسید ۱٪ و متانول) و با سرعت شویش ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور بررسی تغییرات درون گونه‌ای (با استفاده از صفات کمی) از تحلیل خوشه‌ای با استفاده از فاصله اقلیدسی (Euclidian distance) و درصد شباهت (Similarity level) به روش Ward روی نمودار تحلیل خوشه‌ای (Cluster analysis) استفاده شد. میزان تغییرات، شباهت‌های بین گونه‌ای و ترکیب‌های اثرگذار بر تغییرات، توسط دو نمودار طرح نمره (Score plot) و طرح بارگیری

رطوبت‌گیری شدند. بازده اسانس برحسب وزن خشک نمونه محاسبه گردید. اسانس‌ها تا زمان آنالیز با دستگاه‌های GC/MS و GC در شرایط خنک و تاریک در یخچال نگهداری شدند (Clevenger, 1928).

ویژگی‌های دستگاه GC

از گاز کروماتوگراف شرکت Agilent، مدل 7890A، ستون HP-5 به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه دمایی ستون دقیقاً مشابه برنامه دمایی GC/MS انتخاب شد. نوع آشکارساز، FID با دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد، گاز حامل، نیتروژن با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه و دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود.

ویژگی‌های دستگاه GC/MS

از گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی شرکت Agilent، مدل 5975C، ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه دمایی ستون از ۶۰ تا ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش دمای سه درجه سانتی‌گراد در دقیقه و ۲۱۰ تا ۲۴۰ با افزایش دمای بیست درجه سانتی‌گراد در دقیقه و تأخیر به مدت ۸/۵ دقیقه در دمای نهایی انتخاب شد. دمای محفظه تزریق، ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، انرژی یونیزاسیون، ۷۰ الکترون ولت و گاز حامل هلیوم با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. شناسایی با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل شاخص بازداری (RI)، طیف جرمی و مقایسه این پارامترها با اطلاعات موجود در حافظه رایانه دستگاه GC-MS (کتابخانه Nist، Adams و Wiley) و منابع انجام شد (Adams, 2001).

عصاره‌گیری برای اندازه‌گیری ترکیب‌های پلی‌فنلی

۰/۲ گرم از گیاه خشک آسیاب شده به میکروتیوپ منتقل و برای استخراج اولیه از ۲ میلی‌لیتر حلال (شامل ۸۵٪ متانول و ۱۵٪ اسید استیک) به مدت ۲۴ ساعت

۳۷ ترکیب که ۹۸/۴٪ از ترکیب‌های اسانس را تشکیل می‌دادند، شناسایی شد. شاخص‌ترین ترکیب‌ها در این منطقه ان-دکان (۲۸/۲٪)، بتا-کاریوفیلین (۱۷/۰٪)، جرماکرن دی (۱۴/۶٪)، بی‌سیکلو جرماکرن (۵/۲٪) و کاریوفیلین اکسید (۶/۵٪) گزارش شد. در منطقه بوانات-سیمکان ۴۲ ترکیب که ۹۷/۴٪ ترکیب‌های اسانس را تشکیل می‌دادند، شناسایی شد که عمده‌ترین این ترکیب‌ها ان-دکان (۱۹/۳٪)، جرماکرن دی (۱۴/۷٪)، ان-تری کوزان (۸/۱٪) و ان-دودکان (۶/۰٪) بودند. در منطقه قرق ابوالمهدی، ۳۵ ترکیب که ۹۸/۴٪ ترکیب‌های اسانس را در این منطقه تشکیل می‌داد، شناسایی شد. از میان این ترکیب‌ها، شاخص‌ترین آنها ان-دکان (۱۷/۰٪)، جرماکرن دی (۱۶/۲٪)، ان-هگزادکانوئیک اسید (۱۲/۷٪)، بتا-کاریوفیلین (۱۰/۷٪)، فیتول (۷/۳٪) و ان-دودکان (۶/۸٪) بود. در شهرک صدرا ۳۵ ترکیب که ۸۸/۲٪ ترکیب‌های اسانس را در این منطقه تشکیل می‌داد شناسایی شد. شاخص‌ترین این ترکیب‌ها، جرماکرن دی (۲۷/۰٪)، بی‌سیکلو جرماکرن (۹/۹٪)، ان-تری کوزان (۷/۴٪)، ۱۴، ۱۰، ۶-تری متیل-۲-پنتادکان (۶/۰٪) و فیتول (۵/۲٪) بودند. سایر ترکیب‌های ۵ منطقه مورد مطالعه، همراه با درصد ترکیب و شاخص بازداری آنها در جدول ۱ آمده است.

(Loadin plot) بررسی شد. ترکیب‌های عمده هر جمعیت شناسایی شد و به نرم‌افزار Minitab V.14 انتقال یافت. جدول آنالیز داده‌ها و نمودارها به‌عنوان خروجی نرم‌افزار برای تفسیر قرابت‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

بازده اسانس *M. astracanicum* در ۵ منطقه

بازده اسانس *M. astracanicum* در ۵ منطقه مورد مطالعه بر حسب وزن خشک گیاه (w/w) محاسبه گردید. بازده اسانس ۵ منطقه بین ۰/۳۴٪ و ۰/۲۱٪ بدست آمد. بیشترین بازده اسانس مربوط به منطقه صدرا (۰/۳۴٪) و کمترین مقدار مربوط به منطقه غرب دشت ارژن (۰/۲۱٪) بود. بازده اسانس منطقه دراک (۰/۳۲٪)، بوانات-سیمکان (۰/۲۸٪) و قرق ابوالمهدی (پاسارگاد) (۰/۲۵٪) بدست آمد.

ترکیب‌های موجود در اسانس *M. astracanicum* در ۵ منطقه

در منطقه دراک ۳۲ ترکیب که ۹۷/۵٪ ترکیب‌های اسانس فراسیون *M. astracanicum* را تشکیل می‌دادند، شناسایی شد. عمده‌ترین ترکیب‌های معطر و فرار شناسایی شده در این منطقه عبارت بودند از: ان-دکان (۴۸/۲٪)، جرماکرن دی (۱۷/۴٪) و ان-دودکان (۹/۵٪). در منطقه غرب دشت ارژن

جدول ۱- ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس *Marrubium astracanicum* در ۵ منطقه مورد مطالعه در استان فارس

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد اسانس			
			دراک	غرب دشت ارژن	بوانات-سیمکان	قرق ابوالمهدی (پاسارگاد)
۱	1-octen-3-ol	۹۷۵	۰/۴	۰/۴	۱/۷	۰/۶
۲	n-decane	۹۹۹	۴۸/۲	۲۸/۲	۱۹/۳	۱۷/۰
۳	limonene	۱۰۲۷	۰/۲	۰/۵	۰/۱	-
۴	linalool	۱۰۹۸	۰/۲	۰/۳	۲/۷	۰/۳
۵	n-nonanal	۱۱۰۳	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۱
۶	geijerene	۱۱۴۰	۰/۲	۰/۸	۰/۶	۰/۳
۷	n-dodecane	۱۱۹۷	۹/۵	۶/۲	۶/۰	۶/۸
۸	n-decanal	۱۲۰۴	-	-	۰/۲	۰/۱
۹	thymol	۱۲۹۰	-	جزئی	۲/۰	۰/۲
۱۰	carvacrol	۱۲۹۹	-	۰/۲	۰/۶	۰/۱
۱۱	-elemene	۱۳۳۸	-	۰/۵	۰/۵	۰/۴
۱۲	cyclosativene	۱۳۶۵	-	۰/۲	۰/۳	-
۱۳	-copaene	۱۳۷۳	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۲
۱۴	-bourbonene	۱۳۸۳	۰/۸	۰/۹	۱/۰	۰/۸
۱۵	-elemene	۱۳۹۰	۰/۵	۰/۵	۱/۱	۰/۷
۱۶	n-tetradecane	۱۳۹۷	۲/۷	۱/۹	۲/۰	۲/۵
۱۷	(E)-caryophyllene	۱۴۱۷	۲/۱	۱۷/۰	۱/۴	۱۰/۷
۱۸	-copaene	۱۴۲۷	-	۰/۲	۰/۳	۰/۳
۱۹	trans- -bergamotene	۱۴۳۳	-	جزئی	۰/۲	۰/۱
۲۰	-humulene	۱۴۵۱	۰/۲	۱/۳	۰/۳	۱/۰
۲۱	(E)- -farnesene	۱۴۵۵	۳/۳	۱/۳	۰/۲	۰/۶
۲۲	germacrene D	۱۴۷۹	۱۷/۴	۱۴/۶	۱۴/۷	۱۶/۲
۲۳	(E)- -ionone	۱۴۸۴	۰/۲	جزئی	۰/۹	۰/۴
۲۴	bicyclgermacrene	۱۴۹۴	۰/۸	۵/۲	۲/۹	۳/۳

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	درصد اسانس			
			دراک	غرب دشت ارژن	بوانات-سیمکان	قرق ابوالمهدی (پاسارگاد)
۲۵	-bisabolene	۱۵۰۶	۰/۴	۰/۳	۰/۵	۰/۲
۲۶	-cadinene	۱۵۲۱	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۵
۲۷	(3Z)-hexenyl benzoate	۱۵۶۸	-	۰/۱	۰/۴	-
۲۸	spathulenol	۱۵۷۵	۰/۲	۰/۹	۰/۸	۰/۵
۲۹	caryophyllene oxide	۱۵۸۰	۰/۴	۶/۵	۰/۴	۳/۱
۳۰	n-hexadecane	۱۵۹۷	۱/۰	۰/۸	۰/۹	۱/۳
۳۱	-cadinol	۱۶۵۲	-	-	۰/۲	۰/۲
۳۲	n-heptadecane	۱۶۹۶	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۳
۳۳	n-octadecane	۱۷۹۶	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۴
۳۴	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	۱۸۴۰	۱/۲	۱/۹	۵/۰	۲/۹
۳۵	n-Hexadecanoic acid	۱۹۶۰	-	۱/۸	۵/۴	۱۲/۷
۳۶	n-eicosane	۲۰۰۰	۰/۳	۰/۴	۰/۳	-
۳۷	n-heneicosane	۲۱۰۰	۱/۰	۰/۹	۲/۹	-
۳۸	phytol	۲۱۱۷	۰/۳	۰/۸	۵/۵	۷/۳
۳۹	n-docosane	۲۱۹۸	۰/۵	۰/۵	۱/۳	-
۴۰	n-tricosane	۲۲۹۷	۳/۳	۱/۴	۸/۱	۴/۰
۴۱	n-tetracosane	۲۴۰۰	۰/۳	۰/۳	۰/۸	-
۴۲	n-pentacosane	۲۵۰۰	۱/۱	۰/۵	۳/۳	۲/۵

جزئی = کمتر از ۰/۰۵٪

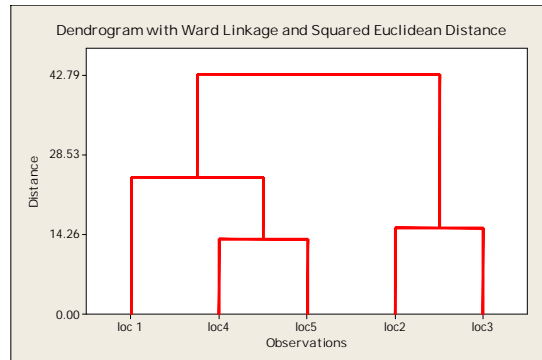
اقلیدسی است. شکل ۱ طبقه‌بندی مناطق را با در نظر گرفتن ترکیب‌های عمده ۵ منطقه صدرا (loc1) با ارتفاع ۱۷۰۰ متر، دراک (loc2) با ارتفاع ۲۱۰۰ متر، منطقه لاک‌پشتی بوانات (loc3) با ارتفاع ۲۴۰۰ متر، منطقه غرب دشت ارژن (loc4) با ارتفاع ۲۲۰۰ متر و منطقه ابوالمهدی پاسارگاد (loc5) با ارتفاع ۱۷۵۰ متر براساس فاصله نشان می‌دهد.

مقایسه نموداری ترکیب‌های عمده اسانس کموتایپ‌های مختلف

به منظور طبقه‌بندی مناطق براساس ترکیب‌های عمده آنها از روش تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. روش‌های متفاوتی برای تجزیه خوشه‌ای وجود دارد که یکی از معتبرترین آنها طبقه‌بندی براساس کمترین مقدار واریانس براساس فاصله

ارژن و ابوالمهدی پاسارگاد شامل شد. گروه سوم را دو منطقه دراک و منطقه لاک پشتهای بوانات شامل شدند.

ترکیب‌های عمده اسانس مورد آنالیز قرار گرفت که در نهایت مناطق را به ۳ گروه اصلی تقسیم کرد. گروه اول شامل منطقه صدرا گردید. گروه دوم را دو منطقه غرب دشت



شکل ۱- خط برش روی خوشه مناطق براساس روش ward با در نظر گرفتن فاصله

منطقه ۵۰۰ متر است اما از نظر عرض جغرافیایی فاصله چندانی ندارند. دو منطقه صدرا و دراک بعد از سه رده دیگر با کمترین شباهت در کنار هم قرار دارند. با توجه به جدول آنالیز تحلیل خوشه‌ای، فاصله اقلیدسی این دو منطقه ۴۲/۷ بوده که با توجه به سه رده دیگر دارای فاصله اقلیدسی بسیار زیادی است؛ بنابراین شباهت این دو منطقه نیز کمتر خواهد بود. اختلاف ارتفاع این دو منطقه ۴۰۰ متر است اما از نظر جغرافیایی همانند رده سوم چندان اختلافی ندارند.

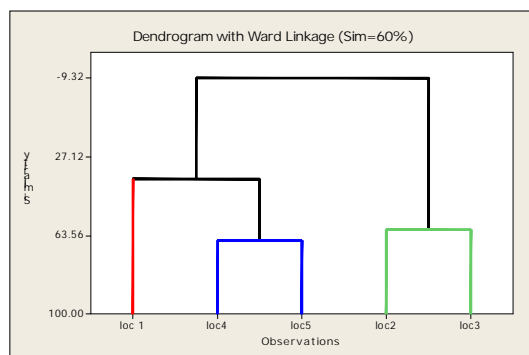
مقایسه قرابت و شباهت درون گونه‌ای با استفاده از تحلیل مؤلفه‌های اصلی

برای دستیابی به علل درک قرابت (اختلاف) و شباهت درون گونه‌ای کموتایپ‌های مناطق از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. در این روش دو نمودار بارگذاری شده (loading plot) و رتبه مناطق (score plot) رسم شدند. در نمودار بارگذاری شده، تأثیر متغیرها و در نمودار رتبه، نحوه پراکنش مناطق با توجه به کلیه متغیرها بررسی گردید (شکل ۳). مقایسه دو نمودار تحلیل مؤلفه‌های اصلی و تحلیل خوشه‌ای (خط

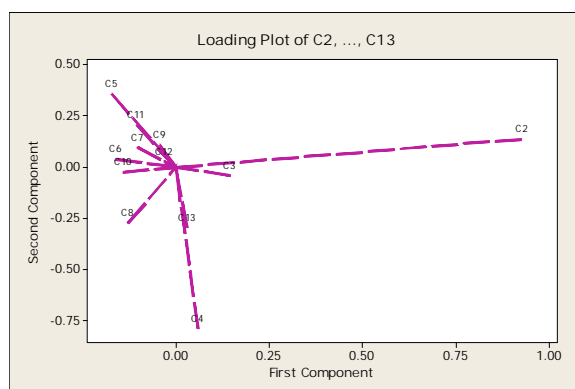
مقایسه رده‌های مناطق مختلف از نظر قرابت درون گونه‌ای مقایسه رده‌ای مناطق مختلف با استفاده از تجزیه خوشه‌ای انجام شد، در این رده‌بندی که با استفاده از روش ward و با حداقل ۶۰٪ شباهت براساس فاصله اقلیدسی انجام شد، مناطق در سه گروه عمده قرار گرفتند (شکل ۲). بین ۵ کموتایپ و ترکیب‌های بررسی شده، دو منطقه مختلف غرب دشت ارژن (loc4) و ابوالمهدی پاسارگاد (loc5) با فاصله اقلیدسی ۱۳/۳ و درصد شباهت ۶۵/۸٪ بیشترین قرابت را دارند. این دو منطقه دارای اختلاف ارتفاع ۴۵۰ متر هستند اما با این حال در یک گروه قرار دارند. با توجه به جدول تحلیل خوشه‌ای، دو منطقه دراک (loc2) و لاک پشتهای بوانات (loc3) با فاصله اقلیدسی ۱۵/۳ و درصد شباهت ۶۰/۶٪ در یک گروه قرار دارند. اختلاف ارتفاع این دو منطقه ۳۰۰ متر است و از نظر عرض جغرافیایی اختلاف زیادی دارند اما با این حال در یک گروه هستند. مقایسه فاصله اقلیدسی و درصد شباهت، دو منطقه صدرا (loc1) و غرب دشت ارژن (loc4) را نزدیک به یکدیگر قرار داده است. این دو منطقه با فاصله اقلیدسی ۲۴/۴ و درصد شباهت ۳۵/۵٪ در دو گروه مختلف قرار گرفته‌اند. اختلاف ارتفاع این دو

توجیه کردند. نتایج این تجزیه و نمودارهای آنها، مهر تأییدی بر تجزیه خوشه‌ای و نمودار خط برش روی خوشه است.

برش روی کلاستر) نشان می‌دهد که هر دو نمودار یکدیگر را تأیید کرده و گروه‌بندی‌ها نیز به یکدیگر شباهت دارد. دو مؤلفه اول بیش از ۷۵/۵٪ از تغییرات را



شکل ۲- خط برش روی خوشه مناطق براساس روش ward با در نظر گرفتن شباهت (خطوط رنگی ۶۰٪ شباهت)



شکل ۳- نمودار بارگذاری شده ترکیب‌های مختلف اسانس با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

کوئرستین مشاهده نشدند. نتایج منطقه دراک نشان داد که بیشترین میزان پلی‌فنل در این منطقه مربوط به گالیک اسید ($18/4 \text{ mg/L}$) می‌باشد. پلی‌فنل‌های کلرژنیک اسید، کوئرستین، کافتیک اسید و کاتچین در این منطقه مشاهده نشد. نتایج در منطقه غرب دشت ارژن نشان داد که بیشترین میزان پلی‌فنل در این منطقه به ترتیب مربوط به کلرژنیک اسید ($196/6 \text{ mg/L}$)، کاتچین ($93/9 \text{ mg/L}$) و گالیک اسید ($24/1 \text{ mg/L}$) می‌باشد. همچنین طبق اطلاعات بدست‌آمده پلی‌فنل‌های کوئرستین و کافتیک

ترکیب‌های پلی‌فنولی در ۵ منطقه مورد مطالعه از میان ۵ ترکیب پلی‌فنولی بررسی شده، گالیک اسید در منطقه چشمه انجیر (صدرا) شناسایی شد ($8/8 \text{ mg/L}$). پلی‌فنل‌های کوئرستین، کلرژنیک اسید، کافتیک اسید و کاتچین در این منطقه مشاهده نشدند. بررسی پلی‌فنل‌ها در منطقه لاک‌پستی بوانات نشان داد که بیشترین میزان پلی‌فنل در این منطقه به ترتیب مربوط به کاتچین ($96/8 \text{ mg/L}$) و گالیک اسید ($18/8 \text{ mg/L}$) می‌باشد. در این منطقه پلی‌فنل‌های کلرژنیک اسید، کافتیک اسید و

اسید در این منطقه وجود ندارد. نتایج در منطقه قرق ابوالمهدی (پاسارگاد) نشان داد که بیشترین میزان پلی فنل در این منطقه به ترتیب مربوط به کلرژنیک اسید کوئرتستین در این منطقه مشاهده نشدند (جدول ۲).

اسید در این منطقه وجود ندارد. نتایج در منطقه قرق ابوالمهدی (پاسارگاد) نشان داد که بیشترین میزان پلی فنل در این منطقه به ترتیب مربوط به کلرژنیک اسید کوئرتستین در این منطقه مشاهده نشدند (جدول ۲).

جدول ۲- میزان پلی فنل‌های *Marrubium astracanicum* با استفاده از دستگاه HPLC در مناطق مختلف استان فارس

ردیف	منطقه	گالیک اسید (mg/L)	کاتچین (mg/L)	کافئیک اسید (mg/L)	کلرژنیک اسید (mg/L)	کوئرتستین (mg/L)
۱	دراک	۱۸/۴	-	-	-	-
۲	غرب دشت ارژن	۲۴/۱	۹۳/۹	-	۱۹۶/۶	-
۳	بوانات-سیمکان	۱۸/۸	۹۶/۸	-	-	-
۴	قرق ابوالمهدی (پاسارگاد)	۱۷/۱	۹۲/۴	-	۱۹۱/۶	-
۵	صدرا	۸/۸	-	-	-	-

بحث

تحلیل نتایج مورد استفاده قرار گرفت. از میان ترکیب‌های مهم، ترکیب ان-دکان ۴۸/۲٪ در منطقه دراک، در غرب دشت ارژن ۲۸/۲٪، در منطقه لاک پستی بوانات ۱۹/۳٪ و در منطقه قرق ابوالمهدی ۱۷/۰٪، بیشترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. ترکیب‌های ان-دودکان ۹/۵٪ در منطقه دراک، جرماکرن دی ۲۷/۰٪ در منطقه صدرا، ۱۷/۴٪ در منطقه دراک و ۱۶/۲٪ در منطقه قرق ابوالمهدی رتبه بعدی مقادیر را به خود اختصاص دادند. ترکیب ان-هگرا دکانوئیک اسید ۱۲/۷٪ و بتا-کاریوفیلین ۱۰/۷٪ در منطقه قرق ابوالمهدی مقادیر قابل توجه مناطق این مطالعه بوده‌اند. البته نتایج تحقیقات ما روی اسانس *M. astracanicum* همسو با نتایج انجام شده در گذشته نمی‌باشد. همچنین کاریوفیلین اکساید، سیترونال و بتا-کاریوفیلین به‌عنوان ترکیب‌های اصلی در اسانس *M. astracanicum* از منطقه دماوند در استان تهران شناسایی شدند (Baher Nik & Mirza, 2003). در مطالعه دیگر، بتا-کاریوفیلین و والرانون به‌عنوان ترکیب‌های اصلی در اسانس *M. astracanicum* گزارش شدند (Javidnia et al., 2007). با توجه به تحلیل خوشه‌ای با استفاده از فاصله اقلیدسی و درصد شباهت

بازده اسانس *M. astracanicum* در ۵ منطقه بین ۰/۳۴٪ و ۰/۲۱٪ بدست آمد. در مطالعه انجام شده روی *M. astracanicum* جمع‌آوری شده از دماوند در استان تهران، مقدار درصد اسانس ۰/۲۵٪ گزارش شده است (Baher Nik & Mirza, 2003). طبق تحقیقات انجام شده درصد اسانس *M. astracanicum* جمع‌آوری شده از ارتفاعات دنا، ۰/۳۳٪ می‌باشد (Javidnia et al., 2007). بازده اسانس این گونه از فراسیون نسبت به گزارش‌های انجام شده بیشتر می‌باشد. به‌طوری که در مطالعه انجام شده بازده اسانس *M. vulgare* و *M. incanum* Desr. ۰/۰۶٪ و ۰/۰۴٪ گزارش شده است (Zawi lak, 2014). مطالعه قرابت و کموتاکسونومی، مقایسه ترکیب‌های اسانس و ترکیب‌های پلی فنلی در گونه *M. astracanicum* در ۵ منطقه استان فارس انجام شد. تحلیل خوشه‌ای با استفاده از فاصله اقلیدسی و درصد شباهت مناطق و تحلیل مؤلفه‌های اصلی با استفاده از جدول آنالیز و نمودارهای مربوطه انجام گردید. در میان ترکیب‌های موجود و شناسایی شده در اسانس هر منطقه، ۱۲ ترکیب به‌عنوان ترکیب‌های اثرگذار و مهم در آنالیز و

بوانات به دو منطقه ابوالمهدی پاسارگاد و غرب دشت ارزن شباهت نزدیکی دارد، بنابراین در این زیرگروه قرار می‌گیرد.

سیاسگزاری

این مقاله از طرح پژوهشی به شماره ثبت ۶۲۱۳ مصوب مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور می‌باشد؛ بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاران سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و رئیس محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس به‌دلیل مساعدت در تأمین هزینه‌های آن اعلام می‌داریم.

منابع مورد استفاده

- Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 455p.
- Baher Nik, Z. and Mirza, M., 2003. Composition of the essential oil of *Marrubium astracanicum* Jacq. Journal of Essential Oil Research, 15(5): 342-343.
- Clevenger, J.F., 1928. Apparatus for determination 295 of essential oil. Journal of the American Pharmaceutical Association, 17: 346-349.
- Ghahraman, A., 1993. Heraldic Herbal Cummophyte, Herald Award, Academic Publishing Center, 768p.
- Ghalichnia, H., 2002. Distribution and ecology of 36 species of oil producing plants in Mazandaran province. Medical Plants Research Journal, 13: 84-86.
- Habibi, H., Mazaheri, D., Majnoun Hosseini, N., Chaeichi, M.R., Fakhr Tabatabaei, M. and Bigdeli, M., 2007. Effect of altitude on essential oil and components in wild Thyme (*Thymus kotschyanus* Boiss.) Taleghan region. Pajouhesh va Sazandegi, 19(4): 2-10.
- Hajihassani, M., Hassani, A., Hassanpouraghdam, M.B., Meshkatalasadat, M.H., Pirzad, A., Heidari, M. and Eivazi, A.R., 2017. Wild habitat altitude and harvest time influence volatile oil content and composition of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. International Journal of Pure & Applied Bioscience, 5(3): 15-22.
- Hennebellea, T., Sahnaz, S., Skkaltsumib, A.L. and Bailleula, F., 2006. Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. Biochemical Systematics and Ecology, 35(9): 624-626.

این‌طور به نظر می‌رسد که دورترین منطقه از نظر ترکیب‌های شیمیایی، منطقه صدرا است که گروه اول را در نمودار تحلیل خوشه‌ای به خود اختصاص داده است. دو منطقه غرب دشت ارزن و ابوالمهدی پاسارگاد با فاصله اقلیدسی ۲۴/۴ و درصد شباهت ۳۷/۵ در گروه دوم قرار گرفتند که نسبت به گروه سوم که شامل دو منطقه دراک و لاک‌پشتی بوانات با فاصله اقلیدسی ۱۵/۳ و درصد شباهت ۶۰/۶ شباهت کمتری از نظر ترکیب‌ها به یکدیگر داشتند. با مقایسه جدول آنالیز و نمودار تحلیل خوشه‌ای این‌طور به نظر می‌رسد که منطقه صدرا از نظر ترکیب‌های شیمیایی قرابت بیشتری به دو منطقه دراک و لاک‌پشتی بوانات دارند؛ با این تفاوت که اختلاف زیادی از نظر ارتفاع نسبت به یکدیگر دارند. مقایسه نمودار Score plot و دندروگرام نشان می‌دهد که کدامیک از مناطق به هم نزدیکتر و کدامیک نسبت به هم روند کموتاکسونومی نزدیکتری دارند. نمودار loading plot تحلیل مؤلفه‌های اصلی نشان‌دهنده میزان اثرگذاری ترکیب‌های عمده در کموتاکسونومی است که هر یک از خطوط این نمودار میزان اثر آن و جایگاه ترکیب را در نمودار نشان می‌دهد. با مشاهده این نمودار این‌طور به نظر می‌رسد که ترکیب ان-دکان به‌عنوان اثرگذارترین ترکیب در قرارگیری منطقه دراک در نمودار Score plot شناسایی شد. ترکیب‌های بتا-کاریوفیلین و جرماکرن‌دی در رتبه‌های بعدی اثرگذارترین ترکیب‌ها قرار گرفته‌اند. با اختلاف ارتفاع ۴۵۰ متری در دو منطقه غرب دشت ارزن و ابوالمهدی پاسارگاد، این دو منطقه در کنار هم در یک گروه قرار دارند. عامل اصلی این قرابت ممکن است اثر ایجاد شده توسط هیبریداسیون را مشهود سازد که با مطالعه ژنتیکی بر روی این مناطق می‌توان آن را مورد آنالیز قرار داد. مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری پلی‌فنل‌ها در مرحله گلدهی گیاه نشان داد که از لحاظ ترکیب‌های پلی‌فنلی دو منطقه صدرا و دراک شبیه به هم و دو منطقه غرب دشت ارزن و ابوالمهدی پاسارگاد از لحاظ این ترکیب‌ها شبیه به یکدیگرند. منطقه لاک‌پشتی

- Majnoon Hosseini, N. and Davazdah-Emami, S., 2007. Crops and the Production of Medicinal Plants and Spices. Tehran University Publications, 300p.
- Omidbaigi, R., 2009. Production and Processing of Medicinal Plants (Vol. 1). Astan Quds Razavi Publications, Mashhad, 348p.
- Rechinger, K.H., 1982. Flora Iranica. Akademische Druck. Verlagsantalt: Geraz, Austeria.
- Singh, N. and Singh R.K. 2002. Efficant of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *E. coli* O157: H7 on lettuce. Food microbiology, 19: 183-193.
- Stankovic, M.S., 2010. Total phenolic content, flavonoid concentration activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. Kragujevac Journal of Science, 33: 63-72.
- Zargari, A., 1990. Medicinal Plants (Vol 3). Tehran University Publications, 923p.
- Zawi lak, G., 2014. Comparison of chemical composition of the essential oil from *Marrubium vulgare* L. and *M. incanum* Desr. during the second year of Cultivation. Acta Agrobotanica, 68(1): 59-62.
- Hovenden, M.J. and Vander Schoor, J.K., 2003. Nature vs nurture in the leaf morphology of Southern beech, *Nothofagus cunninghamii* (Nothofagaceae). New Phytologist, 161(2): 585-594.
- Javidnia, K., Miri, R., Sortani, M. and Khosravi, A.R., 2007. Constituents of the essential oil of *Marrubium astracanicum* Jacq. from Iran. Journal of Essential Oil Research, 19(6): 559-561.
- Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T., 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanons in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photodiode array and mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A, 799: 101-110.
- Khanavi, M., Ghasamian, L., Motlagh, E.H., Hajiakhoondi, A. and Shafiee, A., 2005. Chemical composition of the essential oils of *Marrubium parviflorum* Fisch. & C. A. Mey. and *Marrubium vulgare* L. from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 20: 324-326.
- Lazari, D.M., Skaltsa, H.D. and Constantinidis, T., 1999. Essential oils of *Marrubium velutinum* SM. and *Marrubium peregrinum* L., growing wild in Greece. Flavour and Fragrance Journal, 14: 290-292.

Survey of phytochemistry of *Marrubium astracanicum* Jacq. in Fars province

V. Rowshan^{1*}, A. Bahmanzadegan Jahromi², F. Zareiyan², A. Hatami² and L. Jokar²

1*- Corresponding author, Department of Natural Resources, Fars province Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran
E-mail: vahid.rowshan@gmail.com

2- Department of Natural Resources, Fars province Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

Received: August 2017

Revised: April 2018

Accepted: May 2018

Abstract

Marrubium astracanicum Jacq. is belonging to the Lamiaceae family. In this study, five populations of *M. astracanicum* (Derak, the west of Dasht Arjan, Bavanat-Simakan (Lakposhti), Ghorogh Abolmahdi (Pasargad) and Sadra areas) from Fars province were collected. After drying the plant samples, the essential oils (EOs) were extracted from the aerial parts by using the Clevenger Apparatus, and analyzed by Gas Chromatography (GC-FID) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Methanolic extract was prepared by maceration method and analyzed by HPLC for polyphenolic compounds. EO yields were from 0.21 to 0.34% (w/w) based on dried material. The major constituents of the EOs were n-decane, n-dodecane, germacreneD, n-hexadecanoic acid, (E)-caryophyllene, bicyclogermacrene, phytol, n-tricosane, n-pentacosane, n-heneicosane and caryophyllene oxide. The 12 major compounds were analyzed by Minitab V.14 software. The findings of chemical compounds showed that despite the difference in height and climate, Sadra region was more similar to Derak and Lakposhti Bavanat. The standards of gallic acid, quercetin, catechin, caffeic acid chlorogenic acid were measured in the wavelengths of 280nm and 320nm. The amount of polyphenols varied in different areas. Our results showed that the height and climate in each area caused the variation of polyphenolic compounds.

Keywords: Essential oil, chemical compounds, polyphenolic compounds, extract, *Marrubium astracanicum* Jacq.