دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۳، صفحه ۴۱۷-۴۰۶ (۱۳۹۴)

بررسی فیتوشیمیایی گیاه دارویی و چند منظوره پنیرباد *Withania coagulans* (Stocks) Dunal در رویشگاه‌های طبیعی استان سیستان و بلوچستان

محرم ولی‌زاده[۱*]، عبدالرضا باقری[۲]، جعفر ولی‌زاده[۳]، محمدحسین میرجلیلی[۴] و نسرین مشتاقی[۵]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترا، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

پست الکترونیک: m.valizadeh@anrs.usb.ac.ir

۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان

۴- استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۵- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح نهایی: دی ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۲

چکیده

گیاه پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dunal)، متعلق به خانواده سولاناسه، ازجمله گیاهان دارویی و چند منظوره است که در ایران، منحصراً در برخی از رویشگاه‌های جنوب‌شرقی استان سیستان و بلوچستان پراکنش دارد. عمده ویژگی دارویی این گیاه مربوط به حضور گروهی از لاکتون‌های استروییدی به نام ویتانولوئیدها می‌باشد. در بین ویتانولیدهای موجود، ترکیب ویتافرین A به دلیل ویژگی بازدارندگی رشد سلول‌ها و تومورهای سرطانی، دارا بودن ویژگی آنتی‌آنژیوژنرو القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در صنایع دارویی از ارزش بالایی برخوردار می‌باشد. در این پژوهش نمونه ریشه ۲۰ توده مختلف گیاه *W. coagulans* از رویشگاه‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شده و حضور ترکیب دارویی ویتافرین A با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و محتوای ترکیب‌های فنل کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که ترکیب ویتافرین A در ریشه تمامی توده‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های استان وجود دارد. بررسی‌های فیتوشیمیایی نیز وجود مقادیر قابل‌توجهی از ترکیب‌های فنلی (۱۴/۹۱-۲۳/۷μgGAE/mg D.W)، فلاونوئیدی (۶/۵۰-۵/۷۰٪) و آنتوسیانینی (۴/۵۱-۹/۵۱μmol/g) را نشان داد. نتایج تجزیه واریانس نیز بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین رویشگاه‌های مختلف بود ($p<۰/۰۵$). به‌طور کلی نتایج این تحقیق کاربرد تکنیک TLC را در شناسایی ترکیب دارویی ویتافرین A و همچنین قابلیت رویشگاه‌های مختلف استان را در خصوص تولید این ترکیب با ارزش مورد تأیید قرار می‌دهد. علاوه‌بر این، محتوای بالای ترکیب‌های فنلی حکایت از توانمندی قابل توجه این گیاه در راستای بکارگیری آن در صنایع دارویی و غذایی دارد.

واژه‌های کلیدی: بررسی فیتوشیمیایی، پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dunal)، سیستان و بلوچستان، ویتافرین A.

مقدمه

استان سیستان و بلوچستان در جنوب‌شرقی ایران و حدفاصل '۳ °۲۵ تا '۲۷ °۳۱ عرض شمالی و '۵۰ °۵۸ تا '۲۱ °۶۳، طول شرقی واقع شده و وسعتی برابر ۱۸۱۴۷۱ کیلومتر مربع دارد. شرایط آب و هوایی و ژئومورفولوژیکی این استان سبب سازگاری و وجود گونه‌های مربوط به رویشگاه‌های خاص این ناحیه شده‌است که برخی از آنها بومی (اندمیک) ایران و یا به‌طور خاص بومی منطقه سیستان و بلوچستان می‌باشند. گیاه دارویی پنیر باد با نام علمی *Withania coagulans* (Stocks) Dunal متعلق به خانواده Solanaceae و یکی از گونه‌های اندمیک بلوچستان می‌باشد. در جنس *Withania*، ۲۳ گونه گیاهی وجود دارد که دو گونه آن شامل *W. somnifera* و *W. coagulans* از نظر دارویی و اقتصادی حائز اهمیت است و در بعضی کشورها نظیر هند و پاکستان به‌طور وسیع کشت می‌شوند (Negi *et al.*, 2000؛ Panwar & Tarafdar, 2006). گونه پنیرباد گونه‌ای باارزش است که پراکنش محدودی در سطح دنیا داشته و به‌طور عمده در مناطق شرقی مدیترانه تا جنوب آسیا ازجمله پاکستان، شمال‌غربی هند، افغانستان و ایران می‌روید. پراکنش این گونه دارویی و باارزش در ایران منحصراً محدود به رویشگاه‌های معدودی در استان سیستان و بلوچستان بوده و به‌طور عمده در رویشگاه‌های اطراف سراوان، گشت، خاش، ایرانشهر، دامن، نیک‌شهر، قصر قند و شهرستان سرباز پراکنش دارد (Valizadeh & Valizadeh, 2011). این گیاه به‌صورت بوته‌ای یا تقریباً درختچه‌ای و همیشه سبز به ارتفاع ۱۲۰-۳۰ سانتی‌متر، برگ‌هایی به رنگ سبز کدر و با جام گلی به رنگ زرد می‌باشد. میوه در این گونه از نوع سته و به رنگ کرم یا قهوه‌ای روشن دیده می‌شود (شکل ۱).

شکل ۱- A: گونه دارویی پنیرباد (*W. coagulans*) در رویشگاه منطقه سراوان، B: میوه‌های گیاه پنیرباد، C: فرم ریشه در گیاه پنیرباد، D: پنیر تولید شده با پروتئاز حاصل از میوه گیاه پنیرباد

گونه *W. coagulans* گیاهیست چند منظوره که به‌دلیل سازگاری بسیار وسیع نسبت به شرایط دشوار اکولوژیکی، ازجمله گرما و خشکی، می‌تواند در تثبیت شن‌های روان در مناطق استان سیستان و بلوچستان بکار رود. این گونه به‌عنوان پنیربند یا رنین گیاهی نیز شناخته می‌شود، زیرا از عصاره (پروتئاز) میوه‌های آن به‌عنوان عامل منعقدکننده شیر برای تهیه پنیر استفاده می‌شود (شکل ۱). در برخی از مناطق استان سیستان و بلوچستان و همچنین در ایالت پنجاب هند به فراوانی از میوه‌های این گیاه به‌عنوان منبع آنزیم منعقدکننده شیر برای تولید پنیر استفاده می‌شود (Mathur *et al.*, 2011). در برخی کشورها نیز استفاده از عصاره ریشه این گیاه به عنوان مکمل غذایی مورد توجه قرار گرفته است (Abouzid *et al.*, 2010).

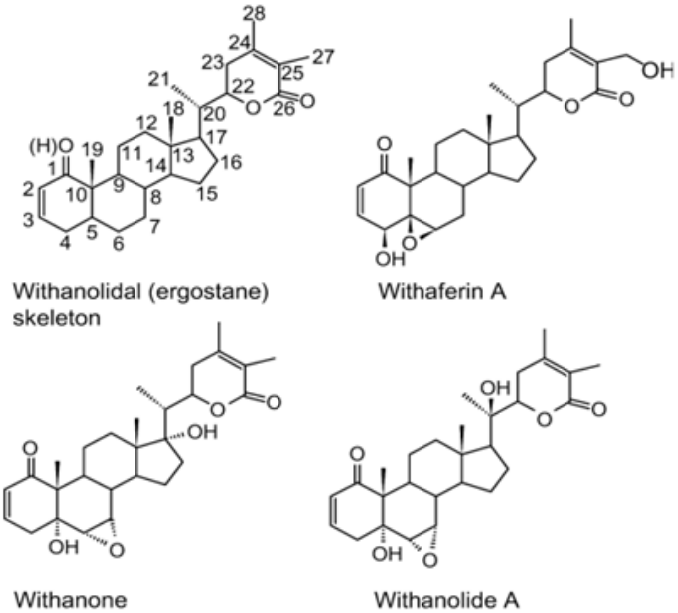
ویژگی‌های فارماکولوژیکی گونه *W. coagulans* متنوع بوده و شامل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضداسترس و اثرات ضدمیکروبی می‌باشد. بسیاری از این ویژگی‌ها به‌دلیل وجود گروهی از ترکیب‌های استروییدی ۲۸ به نام ویتانولیدها در این گیاه است (Rahman *et al.*, 2003). تاکنون ۱۲ نوع آلکالوئید، بیش از ۳۵ نوع ویتانولید و تعدادی گلیکوویتانولید به نام سیتوایندوزید از اندام‌های هوایی، ریشه و میوه، از دو گونه دارویی *W. somnifera* و *W. coagulans* جداسازی و مطالعه شده‌است (Baldi *et al.*, 2008؛ Arora *et al.*, 2004). مهمترین انواع ویتانولیدهای موجود در این گونه، ویتافرین A (withaferin A)، ویتانولید A (withanolide A) و ویتانون (withanon) می‌باشد (شکل ۲).

اهمیت بهبود کیفیت مواد گیاهی و مواد مؤثره مورد استفاده در صنعت داروهای گیاهی از یکسو و جستجو برای یافتن ترکیب‌های جدید دارویی از سوی دیگر منجر به افزایش روزافزون تحقیقات بر روی گیاهان دارویی شده‌است. در این میان شناخت دقیق ترکیب‌های فیتوشیمیایی موجود در گیاهان مقدمه‌ای برای شناسایی هویت و ویژگی‌های شیمیایی-تولیدی ژرم‌پلاسم گونه دارویی مورد نظر بوده و امکان دستیابی به منابع گیاهی اولیه با ایمنی، پایداری و کارایی مناسب را در راستای بهره‌مندی صحیح از این منابع با اررزش فراهم می‌آورد. تاکنون مطالعات فیتوشیمیایی گسترده‌ای برای ارزیابی توده‌ها و تیپ‌های شیمیایی (chemotype) *W. somnifera* در سایر مناطق جهان انجام شده است و انواع مختلفی از ترکیب‌های آلکالوئیدی و لاکتون‌های استروییدی (ویتانولیدها) از اندام‌های مختلف این گیاهان استخراج و شناسایی شده‌است (Rahman *et al*, 2003؛ Mishra *et al.*, 2000؛ Mahadevan *et al.*, 2003). با وجود این، در خصوص ترکیب های فیتوشیمیایی گونه *W. coagulans* و به‌ویژه در ایران اطلاعات بسیار کمی وجود دارد. از این‌رو این پژوهش با هدف بررسی مقدماتی حضور ترکیب دارویی و باارزش ویتافرین A در توده های مختلف پنیرباد و همچنین ارزیابی مقادیر کمی متابولیت‌های ثانویه دارویی ازجمله ترکیب‌های فنلی تام، فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌ها انجام شد.

مواد و روشها

انتخاب رویشگاه و جمع‌آوری نمونه

به‌منظور شناسایی مناطق پنیربادخیز در استان سیستان و بلوچستان، ابتدا محدوده رویشگاهی گونه دارویی پنیرباد با استفاده از منابع اولیه موجود، گزارش‌های کارشناسی، مصاحبه با کارشناسان اداره منابع طبیعی شهرستان‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان و پیمایش‌های صحرایی مشخص گردید. پس از مشخص شدن محدوده پراکنش، ۲۰ رویشگاه انتخاب و با عزیمت به رویشگاه‌های مورد نظر نمونه ریشه گیاه برداشت و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشوی ریشه‌ها و حذف بقایای خاک، نمونه‌ها به مدت ۱۲ روز و در شرایط سایه و دمای آزمایشگاه خشک و در نهایت پودر گردید.



شکل ۲- ساختار شیمیایی برخی از ویتانولوئیدهای مهم موجود در گیاه دارویی پنیرباد (*W. coagulans*)

استخراج و شناسایی ویتافرین A به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

به‌منظور استخراج ترکیب دارویی ویتافرین A، از روش Sangwan و همکاران (۲۰۰۵) همراه با کمی تغییرات استفاده شد. بدین منظور مقدار یک گرم نمونه پودر خشک شده ریشه با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول: آب (۲۵:۷۵) به‌صورت هموژنیزه درآمده و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام التراسونیک قرار گرفت. در ادامه محلول رویی جمع‌آوری شده و با استفاده مقادیر هم حجم از *n*-هگزان به ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد چربی‌زدایی شد. در نهایت پس از حذف حلال *n*-هگزان، بر روی محلول باقی‌مانده معادل هم حجم آن کلروفرم افزوده شد. مخلوط حاصل نیز به مدت ۱۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و در ادامه بخش کلروفرمی با استفاده از قیف جداکننده از بخش متانولی جدا گردید. بخش کلروفرمی جمع‌آوری شده در شرایط خلأ تبخیر و عصاره باقی‌مانده در ۵ میلی‌لیتر متانول به‌صورت محلول درآمده و تا زمان آنالیز بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

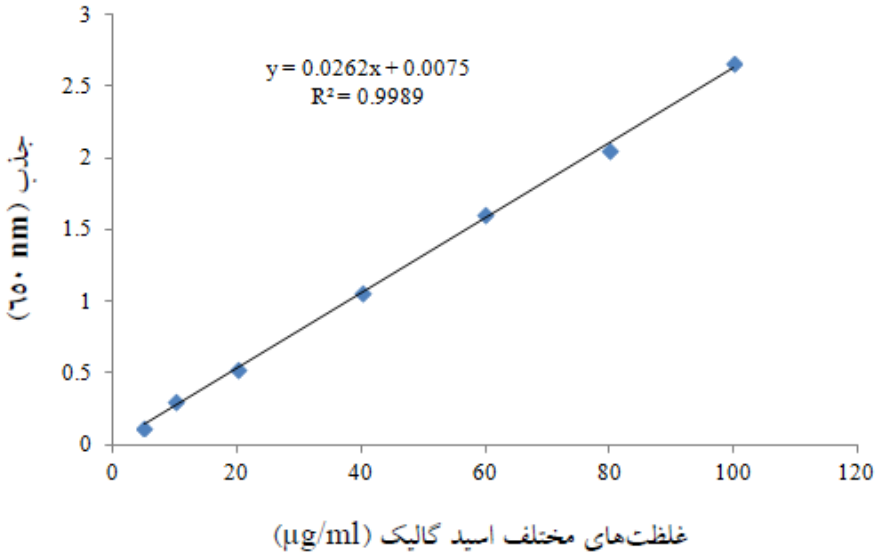
به‌منظور جداسازی اجزای مختلف عصاره به روش TLC، مقدار ۱۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده همراه با استاندارد ویتافرین A بر روی صفحات سیلیکاژل $60\ F_{254}$ (Merk) به ابعاد ۱۰×۲۰ بارگذاری گردید. پس از خشک شدن لکه‌ها، صفحات به داخل تانک اشباع شده با فاز متحرک منتقل و پس از صعود حلال، صفحه از تانک خارج و پس از خشک شدن با استفاده از معرف وانیلین-اسید سولفوریک (۱۰٪) اسپری شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Chitturi *et al.*, 2010). در این تحقیق از حلال‌های کلروفرم، متانول و اتیل استات با نسبت‌های مختلف مندرج در جدول ۱ به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. تمامی حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک (Merck) و استاندارد ویتافرین A از بخش بیوشیمی، بیوتکنولوژی و بیوانفورماتیک، دانشگاه Avinashilingam هند تهیه گردید.

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدهای کل

برای سنجش غلظت آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدهای موجود در ریشه توده‌های مختلف گیاه دارویی پنیرباد، به‌ترتیب از روش Wagner (۱۹۷۹) و Krizek و همکاران (۱۹۹۸) و با کمی تغییرات استفاده گردید. بدین منظور ۰/۱ گرم از پودر ریشه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول: اسید کلردریک یا اسید استیک به نسبت ۱:۹۹) هموژنیزه شده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر برای آنتوسیانین‌ها و ۳۰۰ نانومتر برای فلاونوئیدها با استفاده از اسپکتروفتومتر (HACH, DR500, Germany) خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی $۳۳۰۰۰M^{-1}cm^{-1}m$ و رابطه $A=\varepsilon bc$ استفاده گردید. در این فرمول A میزان جذب خوانده شده در طول موج ۵۵۰ نانومتر، ε ضریب خاموشی، b عرض کویت (یک سانتی‌متر) و C غلظت حسب میکرومول می‌باشد. برای فلاونوئیدها نیز مقادیر براساس درصد جذب در گرم وزن خشک محاسبه گردید.

اندازه‌گیری محتوای فنل کل

برای تعیین محتوای ترکیب های فنلی از روش Folin-Ciocalteus استفاده گردید (Matta & Giai, 1969). بدین منظور ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه پودر ریشه با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ هموژنیزه شده و به مدت یک ساعت بر روی شیکر و در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و به ۱ میلی‌لیتر از عصاره رویی یک میلی لیتر معرف فولین و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰٪ اضافه و در نهایت به مدت یک دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (HACH, DR500, Germany) خوانده شد. برای محاسبه میزان فنل کل از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف اسید گالیک (شکل ۳) استفاده و در نهایت نتایج براساس میکروگرم در گرم وزن خشک (µg/mg D.W) گزارش گردید.



شکل ۳- منحنی استاندارد مربوط به غلظت‌های مختلف اسید گالیک

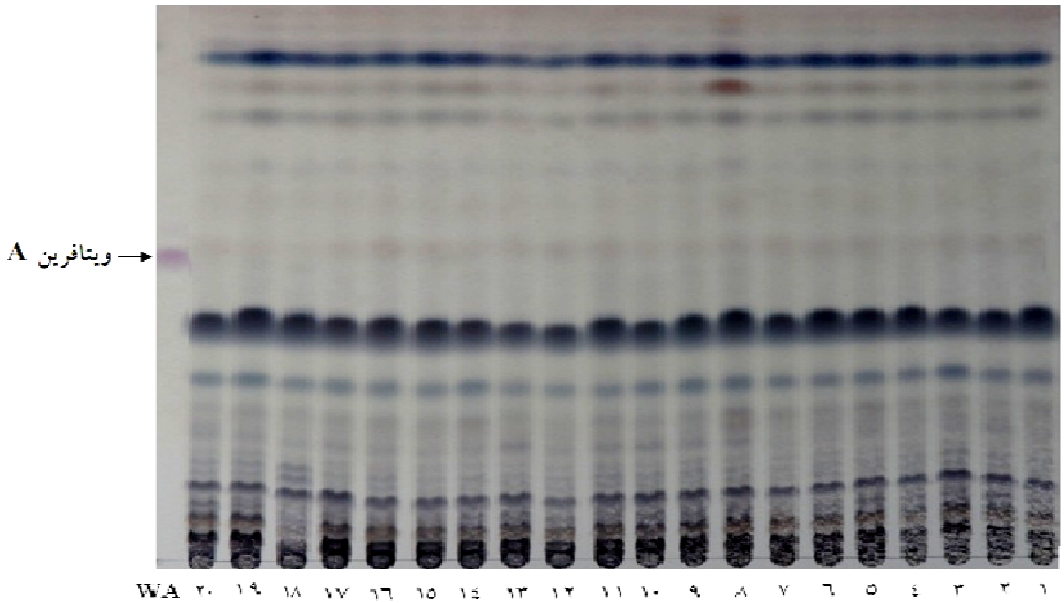
محاسبات آماری

داده‌های بدست آمده از این پژوهش پس از آزمون نرمال بودن بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با در نظر گرفتن ۵ تکرار مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

در این پژوهش از فاز متحرک کلروفرم، متانول و هچنین کلروفرم، متانول و اتیل استات با نسبت‌های مختلف برای جداسازی ترکیب ویتافرین A بر روی صفحات TLC استفاده گردید (جدول ۱). نتایج نشان داد که با افزایش قطبیت فاز متحرک، صعود ترکیب ویتافرین A بر روی صفحه کروماتوگرافی تا مکان پیشروی حلال انجام شده و به‌دلیل عدم تفکیک این ترکیب از سایر ترکیب‌های موجود در عصاره، امکان شناسایی آن وجود ندارد. بهترین حلال در این پژوهش برای شناسایی این ترکیب دارویی، حلال D بود که شامل کلروفرم: متانول با نسبت ۹ به ۱ می‌باشد (جدول ۱). به دلیل استفاده از این سیستم حلال اجزاء مختلف عصاره به خوبی از یکدیگر تفکیک شده و ترکیب دارویی ویتافرین A در حرکت نسبی (R_f: Rate of flow) ۰/۵۳ جداسازی و با کمک ویتافرین استاندارد که تحت شرایط یکسان در همان صفحه بارگذاری شده بود به رنگ بنفش شناسایی گردید. بررسی مقدماتی و مقایسه‌ای ترکیب ویتافرین A در توده‌های گیاه پنیرباد با لکه‌گذاری عصاره ریشه ۲۰ توده مختلف بر روی صفحات TLC به‌طور همزمان انجام شد و نتایج بدست آمده حضور این ترکیب دارویی باارزش را در تمامی توده‌های بدست آمده از رویشگاه‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- الگوی TLC عصاره ریشه در توده‌های مختلف گیاه دارویی پنیرباد (۱ تا ۲۰) و مقایسه آن با ترکیب ویتافرین استاندارد (WA) (اطلاعات تکمیلی در خصوص توده‌ها در جدول ۱ آورده شده است.)

جدول ۱- مقدار حرکت نسبی (R_f) ترکیب ویتافرین A در سیستم‌های حلال مختلف

ردیف	سیستم حلال	نسبت حجمی	حرکت نسبی (R_f)
A	کلروفرم: متانول	۶ :۴	-*
B	کلروفرم: متانول: اتیل استات	۶: ۲ :۲	-*
C	کلروفرم: متانول	۸:۲	۰/۹۶
D	کلروفرم: متانول	۹:۱	۰/۵۳

*: مقادیر مشخصی وجود ندارد.

محتوای فنل کل

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های مربوط به مقادیر کمّی ترکیب‌های فیتوشیمیایی مورد بررسی نشان داد که بین رویشگاه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اندازه‌گیری میزان فنل کل با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی داری را بین نمونه‌های مختلف نشان داد ($p<۰/۰۵$). میانگین محتوای فنل کل در این گیاه برحسب گالیک اسید ۲۰/۴۱ میکروگرم در میلی‌گرم وزن خشک می باشد (جدول ۳). بیشترین محتوای فنل کل (۲۳/۸۰±۰/۱۴µg/mgD.W) در نمونه بدست آمده از رویشگاه پیگل مشاهده گردید. با این حال بین میزان فنل کل نمونه‌های حاصل از رویشگاه سیاهکان (۲۳/۶۲±۰/۴۵)، تنگه‌سرحه (۲۳/۷±۰/۲۰) و پیرگل اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. کمترین مقادیر فنل کل (۱۴/۹۱±۰/۴۲µg/mgD.W) نیز در نمونه مربوط به رویشگاه هیدوچ مشاهده گردید.

جدول ۲- تجزیه واریانس محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین در ۲۰ توده مختلف گیاه دارویی پنیرباد (*W. coagulans*)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فنل کل	فلاونوئید کل	آنتوسیانین
تیمار (رویشگاه)	۱۹	۱۸/۸۶ *	۰/۱۹ *	۱۱/۳۶ *
خطا	۸۰	۰/۳۳	۰/۰۵	۰/۹۰
ضریب تغییرات (٪)	-	۱۲/۳۵	۴/۳۸	۲۲/۱۶

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

نتایج تجزیه واریانس مربوط به مقادیر کمّی فلاونوئید کل اختلاف معنی‌داری را بین توده‌های مختلف پنیرباد نشان داد (جدول ۳). از میان ترکیب‌های فیتوشیمیایی مورد بررسی در این پژوهش، مقدار فلاونوئیدهای کل کمترین ضریب تغییرات را نشان داد (۴/۳۸٪). میانگین محتوای ترکیب‌های فلاونوئیدی ۶/۱۵٪بوده، به‌طوری که بیشترین مقادیر این ترکیب‌ها در توده جمع‌آوری شده از منطقه تنگه‌سرحه مشاهده گردید (۶/۵۰±۰/۶۷٪). با وجود بالا بودن مقادیر ترکیب‌های فلاونوئیدی در نمونه حاصل از منطقه تنگه‌سرحه، بررسی آماری اختلاف معنی‌داری را بین این نمونه و نمونه‌های بدست آمده از مناطق اسفندک، گشت، مچکور، پیپ، سیاهکان، دیگزان، کاروانده‌ر، ناهوک و پسکوه نشان نداد ($p<۰/۰۵$). کمترین مقادیر کمّی فلاونوئیدها نیز در نمونه‌های مربوط به زابلی و سیرکان مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی فیتوشیمیایی ریشه توده‌های مختلف گیاه دارویی پنیر باد در رویشگاه‌های استان سیستان و بلوچستان

ردیف	رویشگاه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	آنتوسیانین (µmol/g D.W)	فلاونوئید کل (٪ جذب)	فنل کل (µg/gD.W)
۱	کوهک	۰۶۳° ۱۷′ ۲۱/۵″	۲۷° ۱۰′ ۳۶/۵″	۸۹۳	۸/۵۱±۰/۸۹ b-f*	۶/۱۶±۰/۰۴ b-f	۱۹/۸۳±۰/۲۰ d
۲	اسفندک	۰۶۲° ۸۴′ ۰۱/۷″	۲۷° ۱۰′ ۴۶/۲″	۱۰۳۵	۷/۱۹±۰/۴۱ f-h	۶/۴۴±۰/۶۴ ab	۲۲/۷۳±۰/۲۵ b
۳	سیرکان	۰۶۲° ۵۹′ ۵۶/۶″	۲۶° ۸۶′ ۶۹/۹″	۱۲۳۵	۴/۵۱±۰/۳۹ k	۵/۸۷±۰/۰۶ fg	۲۲/۷۳±۰/۱۴ b
۴	ناهوک	۰۶۲° ۳۶′ ۴۹/۸″	۲۷° ۶۲′ ۸۸/۲″	۱۲۷۲	۶/۶۸±۰/۳۹ j-i	۶/۰۴±۰/۰۷ c-f	۱۵/۹۸±۰/۲۰ f
۵	هیدوچ	۰۶۲° ۱۰′ ۰۶/۵″	۲۷° ۰۰′ ۵۳/۶″	۱۲۳۱	۷/۳۵±۰/۴۹ e-h	۵/۹۰±۰/۰۳ e-g	۱۴/۹۱±۰/۴۲ g
۶	سراوان	۰۶۲° ۲۹′ ۴۰/۹″	۲۷° ۴۲′ ۳۴/۹″	۱۱۹۶	۸/۶۸±۰۱/۸۷ b-e	۶/۰۵±۰/۰۵ c-f	۱۸/۴۰±۰/۵۰ e
۷	گشت	۰۶۱° ۹۲′ ۶۵/۶″	۲۷° ۷۹′ ۲۷/۲″	۱۴۱۱	۹/۵۱±۰/۰۸ ab	۶/۲۰±۰/۰۹ a-e	۲۱/۶۳±۰/۲۰ c
۸	پیگل	۰۶۰° ۸۰′ ۷۷/۵″	۲۷° ۹۵′ ۸۸/۰″	۱۴۸۹	۷/۳۷±۰/۹ e-h	۶/۱۰±۰/۰۳ c-f	۲۳/۸۰±۰/۱۴ a
۹	لهاباد	۰۶۱° ۲۶′ ۵۴/۴″	۲۶° ۴۵′ ۸۵/۵″	۶۷۵	۵/۸۴±۰/۴۸ ij	۶/۰۲±۰/۰۴ d-f	۱۸/۳۶±۰/۴۵ e
۱۰	مچکور	۰۶۱° ۰۹′ ۹۹/۹″	۲۶° ۷۲′ ۶۴/۸″	۱۱۰۲	۱۰/۳۴±۰/۵۳ a	۶/۲۹±۰/۱۱ a-d	۲۱/۵۵±۰/۶۱ c
۱۱	دامین	۰۶۰° ۷۸′ ۴۸/۷″	۲۷° ۶۲′ ۳۱/۶″	۹۷۶	۹/۱۳±۱/۵۸ a-c	۶/۰۷±۰/۰۴ c-f	۱۹/۴۳±۰/۳۱ d
۱۲	چاهشاهی	۰۶۲° ۰۶′ ۰۰/۰″	۲۷° ۳۴′ ۵۶/۰″	۱۳۰۰	۷/۴۰±۰/۲۷ e-h	۶/۱۵±۰/۰۷ b-f	۱۸/۰۳±۰/۲۲ e
۱۳	پیپ	۰۶۰° ۰۶′ ۵۴/۲″	۲۶° ۳۷′ ۲۲/۶″	۱۱۳۴	۷/۹۹±۰/۱۸ c-h	۶/۲۲±۰/۰۵ a-e	۱۸/۵۵±۰/۲۵ e
۱۴	تنگه سرحه	۰۵۹° ۵۹′ ۴۳/۰″	۲۶° ۳۴′ ۲۶/۰″	۱۲۲۹	۶/۷۹±۰/۸۶ g-i	۶/۵۰±۰/۶۷ a	۲۳/۷±۰/۲۰ a
۱۵	سیاهکان	۰۵۹° ۲۵′ ۵۶/۸″	۲۶° ۳۹′ ۱۶/۷″	۸۶۰	۸/۷۸±۰/۸۲ bcd	۶/۳۶±۰/۰۷ a-c	۲۳/۶۲±۰/۴۵ a
۱۶	دیگزان	۰۶۰° ۲۴′ ۴۷/۱″	۲۶° ۴۴′ ۲۹/۱″	۱۰۹۹	۷/۵۹±۰/۳۰ d-h	۶/۲۲±۰/۰۹ a-e	۲۱/۴۷±۰/۰۸ c
۱۷	کاروانذر	۰۶۰° ۴۶′ ۱۳/۲″	۲۷° ۵۱′ ۳۶/۶″	۱۲۳۳	۹/۰۲±۲/۴۱ a-c	۶/۳۱±۰/۱۹ a-d	۱۹/۳۳±۰/۳۰ d
۱۸	ناهوک	۰۶۲° ۲۱′ ۱۱/۵″	۲۷° ۳۳′ ۵۳/۳″	۱۳۹۳	۶/۴۸±۰/۹۳ hi	۶/۲۴±۰/۰۹ a-d	۲۲/۳۶±۰/۰۸ b
۱۹	پسکوه	۰۶۱° ۴۱′ ۳۱″	۲۷° ۳۰′ ۱۸/۰″	۱۲۳۸	۹/۱۵±۰/۹۰ a-c	۶/۳۴±۰/۰۵ a-d	۲۲/۳۱±۰/۰۷ b
۲۰	زابلی	۰۶۱° ۴۲′ ۰۵″	۲۷° ۱۲′ ۳۳/۰″	۱۳۰۱	۵/۱۳±۰/۳۲ jk	۵/۷۱±۰/۰۳ fg	۱۹/۵۷±۰/۲۴ d

*: نتایج براساس میانگین±SE مربوط به ۵ تکرار نشان داده شده‌است. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقادیر آنتوسیانین ریشه نیز اختلاف معنی‌داری را بین نمونه‌های بدست آمده از رویشگاه‌های مختلف نشان داد ($p<۰/۰۵$). میانگین محتوای آنتوسیانین ریشه در رویشگاه‌های مختلف ۷/۶۷µmol/gD.W بوده و علاوه‌بر این محتوای آنتوسیانین حداکثر ضریب تغییرات (۲۲/۱۶٪) را در مقایسه با محتوای فلاونوئید و فنل کل از خود نشان داد. بیشترین محتوای آنتوسیانین (۱۰/۳۴±۰/۵۳µmol/gD.W) در توده متعلق به منطقه مچکور مشاهده گردید (جدول ۳). کمترین مقدار این ترکیب نیز متعلق به نمونه بدست آمده از رویشگاه سیرکان بود (۴/۵۱±۰/۳۹µmol/gD.W).

بحث

تحقیقات اخیر اثرات ضد سرطانی ویتافرین A را در خصوص طیف وسیعی از سلول‌های سرطانی ازجمله سلول‌های لوکیمیا (Leukemia cells)، سلول‌های سرطانی

سینه (Breast cancer cells)، پروستات و سلول‌های ملانوما (Melanoma cells) نشان داده‌است (Siriwadane *et al.*, 2013). علاوه‌بر این مشخص شده است که ویتانولوئیدها به‌عنوان محرک‌های هورمونی، قادر به تنظیم فعالیت‌های هورمونی بدن می‌باشند. این ترکیب‌ها همچنین باعث تسهیل واکنش‌های فیزیولوژیکی و افزایش مقاومت عمومی بدن در مواجه با تنش‌ها می‌شوند. ترکیب ویتافرین A می‌تواند در درمان اختلالات عصبی مانند آلزایمر و پارکینکسون نیز مورد استفاده قرار گیرد (Sangwan *et al.*, 2007). با توجه به اینکه رویشگاه‌های گونه *W. coagulans* منحصراً در مناطق محدودی از استان سیستان و بلوچیستان قرار دارد، از این‌رو به‌نظر می‌رسد این استان از توانایی متابولیتی قابل‌توجهی برای گونه مورد نظر برخوردار بوده و به‌دلیل دارا بودن رویشگاه‌های طبیعی می‌تواند منطقه مستعد برای حفاظت، اهلی‌سازی و اصلاح تیپ شیمیایی برتر در نظر گرفته شود.

استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک می‌تواند به‌عنوان تکنیکی قدرتمند در بررسی‌های اولیه و قبل از شروع آنالیزهای کمّی بکار گرفته شود تا ضمن بررسی مقدماتی حضور ترکیب‌های مورد نظر، تعداد نمونه‌های لازم برای بررسی‌های کمّی بعدی مشخص گردد. نتیجه قابل توجه بکارگیری این رویکرد منجر به کاهش قابل توجه زمان و هزینه‌های مربوط به بررسی‌های کمّی بعدی خواهد شد. البته استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک یک تکنیک مؤثر، ارزان و سریع برای مطالعه و بررسی مقدماتی عصاره‌های گیاهیست. موفقیت در کروماتوگرافی تا حد زیادی به انتخاب فاز متحرک بستگی داشته و انتخاب حلال مناسب اولین گام در انجام کروماتوگرافی می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش از حلال‌های مختلف و با نسبت‌های متفاوت استفاده گردید. نتایج بررسی الگوی لکه بر روی صفحات TLC نشان داد که از بین حلال‌های مورد استفاده حلال کلروفرم: متانول با نسبت ۹ به ۱ به خوبی لکه‌ها را تفکیک نموده و R_f مطلوبی برای ترکیب ویتافرین A در محدوده ۰/۵۳ ایجاد می‌نماید. Mansi و همکاران (۲۰۱۱) به‌منظور استانداردسازی فرمولاسیون ترکیب دارویی حاصل از گونه *W. somnifera* از روش HPTLC و حلال‌های تولوئن، اتیل استات و کلروفرم و متانول استفاده نموده و گزارش کردند که حلال کلروفرم و متانول با نسبت ۹/۵ به ۰/۵ به‌عنوان مناسب‌ترین حلال برای بررسی ترکیب ویتافرین A بوده و R_f مربوطه در حدود ۰/۲۶ مشاهده گردید.

نتیجه حائز اهمیت تحقیق حاضر، مشخص شدن وجود ترکیب ویتافرین A در تمامی توده‌های مورد بررسی بود. البته تاکنون فقط یک مورد گزارش در مورد بررسی محتوای ترکیب دارویی ویتافرین A در جمعیت‌های گیاه دارویی پنیرباد در ایران انجام شده است (Mirjalili *et al.*, 2009). مطابق این گزارش، با بررسی محتوای کمّی ترکیب ویتافرین A در جمعیت‌های مختلف پنیر باد مشاهده گردید که این ترکیب دارویی فقط در ریشه ۲ نمونه از ۲۰ جمعیت مورد بررسی حضور داشته و سایر نمونه‌ها فاقد ویتافرین A بودند (Mirjalili *et al.*, 2009). این تفاوت در مقایسه با گزارش قبلی (Mirjalili *et al.*, 2009)، ممکن است به‌دلیل تفاوت توده‌های مورد بررسی و در نتیجه وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه در توده‌های گیاه دارویی پنیرباد از نظر ترکیب ویتافرین A باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش وجود ترکیب‌های فیتوشیمایی ازجمله فلاونوئید، آنتوسیانین و پلی‌فنل‌ها در ریشه گیاه دارویی پنیرباد را مورد تأیید قرار می‌دهد. ترکیب‌های فنلی ازجمله متابولیت‌های ثانویه‌ای می‌باشند که شامل بسیاری از ترکیب‌های حلقوی مانند ترکیب‌های فنل، فلاون، فلاونوئید، تانن و غیره می‌باشند. این ترکیب‌ها دارای ساختار شیمیایی ایده‌آل برای فعالیت بوده و نشان داده شده که در مقایسه با ویتامین E و C مؤثرتر می‌باشد (Rice-Evans *et al.*, 1997). ترکیب‌های فنلی موجود در منابع گیاهی به‌عنوان یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدانی شناخته می‌شوند. این ترکیب‌ها به‌صورت مؤثری به‌عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده، از این‌رو به‌عنوان آنتی‌اکسیدان نقش عمده‌ای در پاسخ‌های فیزیولوژیکی و دفاعی دارد (Andre *et al.*, 2009؛ Golluce *et al.*, 2007). تحقیقات انجام شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه (Mathur *et al.*,

2011) و برگ (Salwan *et al.*, 2012) گیاه دارویی پنیرباد را مورد تأیید قرار داده‌است. عصاره این گیاه اثر بازدارندگی بر روی مسمومیت القائی توسط پراکسید هیدروژن و تخریب DNA در فیبروبلاست‌های بدن نشان داده‌است که حکایت از قابلیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه این گیاه دارد (Parihar & Hemani, 2003).

فلاونوئیدها ازجمله ترکیب‌های فنلی هستند که به‌طور مستقیم باعث مهار مولکول‌های فعال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیل می‌گردد. گزارش شده‌است که گیاهان دارای ترکیب‌های فلاونوئیدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان می‌دهند (Sharma *et al.*, 2012). این فعالیت آنتی‌اکسیدانی عمدتاً مربوط به توانایی این ترکیب‌ها به دادن الکترون یا اتم‌های هیدروژن بوده و به همین دلیل از نظر دارویی حائز اهمیت می‌باشند (Sakihama *et al.*, 2000). علاوه‌بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی این ترکیب‌ها، بررسی اثرات ضدمیکروبی فلاونوئیدهای گونه *W. somnifera* نیز توانمندی قابل توجهی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی ازجمله *Candida albicans*، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* نشان داده‌است (Singh & Kumar, 2011).

تفاوت در مقادیر کمّی ترکیب‌های فیتوشیمایی ازجمله ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در بین توده‌های مناطق مختلف می‌تواند ناشی از تنوع ژنتیکی یا شرایط اکولوژیکی حاکم بر رویشگاه‌ها باشد. Sharma و همکاران (۲۰۱۲) اختلاف معنی‌داری را بین مقادیر فنل کل، محتوای فلاونوئیدها و قابلیت آنتی‌اکسیدانی گونه *W. somnifera* حاصل از رویشگاه‌های مختلف گزارش نمودند. از این‌رو بررسی تنوع ژنتیکی توده‌ها از یک طرف و بررسی قابلیت رویشگاه‌های مختلف در تولید ترکیب‌های دارویی دارای اهمیت قابل توجهی می‌باشد. علاوه‌بر این به‌نظر می‌رسد که تفاوت موجود بین محتوای متابولیت‌های ثانویه در رویشگاه‌هایی که دارای شرایط جغرافیایی و اکولوژیکی مشابهی هستند می‌تواند ناشی از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها باشد.

با توجه به بومی بودن گیاه دارویی پنیرباد در استان سیستان و بلوچستان و همچنین قابلیت بالای این گیاه در استقرار و تحمل شرایط دشوار اکولوژیکی حاکم بر این منطقه، به‌نظر می‌رسد که علاوه‌بر کاربرد آن در غنی‌سازی پوشش گیاهی منطقه که عامل قابل‌توجهی در راستای جلوگیری از جریان روان‌آبهای مخرب و همچنین تثبیت شن‌های روان می‌باشد، بتوان از این گیاه در راستای اهدافی مانند صنایع دارویی و غذایی استفاده کرد. علاوه‌بر این با توجه به اینکه گونه دارویی پنیرباد در ایران به‌صورت اهلی شده کشت نمی‌گردد و به‌منظور اهداف دارویی از عرصه‌های طبیعی برداشت می‌شود، از این‌رو به‌شدت ناهمگن بوده و علاوه‌بر لزوم استفاده از رویکردهای حفاظت از ژرم‌پلاسم آن، بکارگیری برنامه‌های اصلاحی به‌منظور اهلی‌سازی و وارد نمودن آن به سیستم زراعی، افزایش همگنی توده‌های مختلف و دستیابی به کیفیت پایدار مواد مؤثره آن ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه کارشناسان اداره منابع طبیعی شهرستان‌های زاهدان، خاش، سراوان، ایرانشهر، نیکشهر، سرباز و چابهار که به‌نحوی ما را در اجرای این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abouzid, S.F., El-Bassuony, A.A., Nasib, A., Khan, S., Qureshi, J. and Choudhary, M.I., 2010. Withaferin A production by root cultures of *Withania coagulans*. International Journal of Applied Research in Natural Products, 3(1): 23-27.
- Andre, C.M., Schafleitner, R., Leagy, S., Lefever, I., Aliaga, C.A.A., Nomberto, G., Hoffman, L., Hausman, J.F., Larondelle, Y. and Evers, D., 2009. Gene expression change related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. Phytochemistry, 70(9): 1107-1116.
- Arora, S., Dhillon, S., Rani, G. and Nagpal, A., 2004. The *in vitro* antibacterial/synergistic activities of *Withania somnifera* extracts. Fitoterapia, 75(3-4): 385-388.
- Baldi, A., Singh, D. and Dixit, V.K., 2008. Dual elicitation for improved production of withaferin A by cell

- Parihar, M.S. and Hemani, T., 2003. Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced exitoxicity. Journal of Biosciences, 28: 121-128.
- Rahman, A., Shahwar, D., Naz, A. and Choudhary, M.I., 2003. Withanolides form *Withania coagulans*. Phytochemistry, 63(4): 387-390.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2(4): 152-159.
- Sakihama, Y., Mano, J., Sano, S., Asada, K. and Yamasaki, H., 2000. Reduction of phenoxyl radicals mediated by mono dehydroascorbate reductase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 279(3): 949-954.
- Salwan, C., Kumar, R. and Mann, A.S., 2012. Evolution of antioxidant activity of leaves of *Withania coagulans* Dunal. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 1(1): 126-132.
- Sangwan, R.S., Chaurasiya, N.D., Lal, P., Misra, L., Uniyal, G.C., Tuli, R. and Sangwan, N.S., 2007. Withanolide A biogeneration in *in vitro* shoot cultures of ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal), a main medicinal plant in *Ayurveda.* Chemical and Pharmaceutical bulletin, 55: 1371-1375.
- Sangwan, R.S., Chauraslya, N.D., Misra, L.N., Lal, P., Uniyal, G.C. and Sangwan, N.S., 2005. An improved process for isolation of withaferin A from plant materials and products therefrom. US Patent 7, 108, 870.
- Sharma, R.K., Samant, S.S., Sharma, P. and Devi, S., 2012. Evaluation of antioxidant activities of *Withania somnifera* leaves growing in natural habitats of north-west Himalaya, India. Journal of Medicinal Plants Research, 6(5): 657-661.
- Singh, G. and Kumar, P., 2011. Evaluation of antimicrobial efficacy of flavonoids of *Withania somnifera* L. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 73(4): 473-478.
- Siriwadane, A.S., Dharmadasa, R.M. and Samarasinghe, K., 2013. Distribution of Withaferin A, an anticancer agent, in different parts of two varieties of *Withania somnifera* (L.) Dunnal. grown in Srilanka. Pakistan Journal of Biological Science, 16(3): 141-144.
- Valizadeh, J. and Valizadeh, M., 2011. Development of efficient micropropagation protocol for *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. African Journal of Biotechnology, 10(39): 7611-7616.
- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology, 64: 88-93.
suspension cultures of *Withania somnifera*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 151: 556-564.
- Chitturi, D., Venisetty, R.K., Molmoori, R.K., Kokate, C.K. and Apte, S.S., 2010. Enhanced bioproduction of withaferin A from suspension cultures of *Withania somnifera.* Annals of Biological Research, 1(2): 77-86.
- Golluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. and Ozken, H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. Food Chemistry, 103: 1449-1456.
- Krizek, D.T, Britz, S.J. and Mirecki, R.M., 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum, 103: 1-7.
- Mahadevan, N., Kasar Rahul, P., Subburaju, T. and Suresh, B., 2003. HPTLC analysis of withaferine A from an herbal extract and polyherbal formulation. Journal of Separation Science, 26: 1707-1709.
- Mansi, G., Deepa, B., Pandey Madan, M., Ojha Sanjeev, K., Sayyada, K., Subha, R. and Rawat Ajay, K.S., 2011. Standardization of Ashwagandhadi lehya-an important *Ayurvedic* formulation of *Withania somnifera.* Indian Journal of Traditional Knowledge, 10(4), 594-598.
- Mathur, D., Agrawal, RC. and Shrivastava, V., 2011. Phytochemical screening and determination of antioxidant potential of fruits extracts of *Withania coagulans*. Recent Research in Science and Technology, 3(11): 26-29.
- Matta, A.J. and Giai, I., 1969. Accumulation of phenol in tomato plant is affected by different forms of Fusariumoxysporum. Planta Medica, 50: 512-513.
- Mirjalili, M.H., Fakhr-Tabatabaei, S.M., Alizadeh, H., Ghassempour, A. and Mirzajani, F., 2009. Genetic and withaferin A analysis of Iranian natural populations of *Withania somnifera* and *W. coagulans* by RAPD and HPTLC. Natural Product Communications, 4: 337-346.
- Mishra, L.C., Singh, B.B. and Dagenais, S., 2000. Scientific basis for therapeutic use of *Withania somnifera* (Ashwagandha): a review. Alternative Medicine Review, 5: 334-346.
- Negi, M.S., Singh, A. and Lakshmikumaran, M., 2000. Genetic variation and relationship among and with in *Withania* species as revealed by AFLP markers. Genome, 43: 975-980.
- Panwar, J. and Tarafdar, J.C., 2006. Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Arid Environments, 5: 337-350.

Phytochemical investigation of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal in natural habits of Sistan and Baluchestan province of Iran

M. Valizadeh[1*], A. Bagheri[2], J. Valizadeh[3], M.H. Mirjalili[4] and N. Moshtaghi[2]

1*- Corresponding author, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, E-mail: m.valizadeh@anrs.usb.ac.ir
2- Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Department of Biology, College of Science, University of Sistan and Baluchistan, Zahedan, Iran
4- Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: October 2013 Revised: December 2013 Accepted: January 2014

Abstract

Withania coagulans (Stocks) Dunal (fam. Solanaceae) is a multipurpose medicinal plant, mainly distributed in southeastern parts of Sistan and Baluchestan province. The important medicinal properties of *W. coagulans* are attributed to the presence of steroidal lactones called withanolides. Among withanoloids, withaferin A is an important phytoconstituent showing antitumor, antiangiogenesis and apoptosis induction properties. This study was aimed to investigate the variability of phytochemical composition of *Withania coagulans* roots. Twenty accessions of *W. coagulans* roots, collected from different natural habits of Sistan and Baluchestan province, were used in the present study. The withaferin A was assayed through thin layer chromatography (TLC) method and phytochemical estimation was carried out by standard methodologies to detect the presence of secondary metabolites, like total phenol, flavonoids and anthocyanin. Our findings revealed that withaferin A was found in all accessions collected from different natural habits. The photochemical investigation showed the presence of flavonoids (5.70-6.50%), anthocyanin (4.51-9.51µmol/g) and total phenol (14.91-23.7µgGAE/mgD.W), varying significantly among the habitats ($p<0.05$). In the present study, TLC analysis confirms the exsistance of withaferin A in all *W. coagulans* accessions as well as the potential of Sistan and Baluchestan natural habits to produce this valuable component. However, the root extracts of *W. coagulans,* growing in natural habitats of Iran, have higher phenolic content. Hence, it can be used as a source of natural components for the pharmaceutical and food industries.

Keywords: Phytochemical investigation, *Withania coagulans* (Stocks) Dunal, Sistan and Baluchestan, withaferin A.