نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 29، شماره 3، پاییز 1394، ص. 473-466
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 29, No. 3, Fall 2015, P. 466-473
ISSN: 2008 - 4730

استخراج و شناسایی ترکیبات فرار دو گونه مریم‌گلی بومی ایران (*Salvia limbata* و *Salvia multicaulis*) با استفاده از روش میکرواستخراج با فاز جامد

صدراله رمضانی[1]- علیرضا عباسی[2*]- عبدالعلی شجاعیان[3]- نورالله احمدی[4]- رزاریا کوزولینو[5]- سونیا پیاچنته[6]

تاریخ دریافت: 1393/07/22
تاریخ پذیرش: 1393/10/15

چکیده

تعداد 58 گونه از جنس مریم‌گلی به صورت گیاه علفی یکساله و چندساله در نقاط مختلف ایران وجود دارد که 17 گونه آن انحصاری ایران و دارای خواص دارویی متعدد مانند آنتی‌بیوتیک، آرام‌بخش، ضد نفخ، ضد اسپاسم است و به طور معمول در درمان بیماری‌های تنفسی مانند عفونت، سرفه، سرماخوردگی و گلو درد و صنایع آرایشی-بهداشتی کاربرد دارد. بخش‌های هوایی دو گونه مریم‌گلی لبه‌دار (*Salvia limbata*) و ارغوانی (*Salvia multicaulis*) کشت شده در مرحله گلدهی در خرداد 1391 برداشت شدند. ترکیبات فرار این گیاهان با روش میکرواستخراج با فاز جامد برای اولین مرتبه در ایران استخراج شد و ترکیبات اسانس های استخراج شده آن توسط دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی تعیین شدند. تعداد 66 ترکیب فرار در گیاه مریم‌گلی لبه‌دار شناسایی شد. سابینن (19/16 درصد)، بتا-پینن (19 درصد)، آلفا-پینن (16/30درصد)، آلفا-ترپینولن (14/41 درصد)، ۱،۸-سینئول (10/86 درصد) و لیمونن (3/73 درصد) بالاترین مقدار ترکیبات فرار این گیاه را تشکیل دادند. 58 ترکیب فرار در گیاه مریم‌گلی ارغوانی شناسایی شد. بیشترین میزان ترکیبات فرار گیاه مریم‌گلی ارغوانی به ترتیب کامفن (28/85 درصد)، آلفا-پینن (12/33 درصد)، کامفور (10/73 درصد)، لیمونن (9/01 درصد)، ۱،۸-سینئول (5/47 درصد)، بتا-پینن (4/58 درصد) و بورنیل استات (3/75 درصد) بود. بخش اصلی ترکیبات فرار گیاهان مریم‌گلی لبه‌دار و ارغوانی از نوع مونوترپن‌ها (به ترتیب 91/57 و 84/28 درصد) و سزکوئی‌ترپن‌ها (به ترتیب 5/12 و 7/58 درصد) بودند. با توجه به نتایج بدست آمده در روش میکرواستخراج با فاز جامد که به ترکیبات در گیاه نزدیک‌تر است، استفاده از این روش توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سزکوئی‌ترپن‌ها، متابولیت های ثانویه، مریم‌گلی ارغوانی، مریم‌گلی لبه‌دار، مونوترپن‌ها.

مقدمه

مریم‌گلی یکی از گیاهان دارویی مهم و از بزرگ‌ترین جنس‌های تیره نعنا است که حدود 700 گونه از آن در سراسر جهان پراکنش دارد (17). 58 گونه از این جنس به صورت گیاه علفی یکساله و چندساله در نقاط مختلف ایران شناسایی شده است و 17 گونه آن انحصاری ایران می‌باشد (17و 20). ماده مؤثره گیاه مریم‌گلی از نوع اسانس است. در گونه‌های مختلف جنس مریم‌گلی، ترکیبات اسانس در کرک‌های ترشحی متمایز شده مربوط به کرک‌های سپری، تولید می‌شوند و سپس از طریق مجراهای ذخیره‌ای زیرپوستی منتقل و ذخیره می‌شوند (26). همه بخش‌های رویشی و زایشی گیاه دارای اسانس است و مقدار اسانس در قسمت‌های مختلف گیاه متفاوت می‌باشد (11، 13 و 25).

به طور عمومی، مهم‌ترین موارد مصرف اسانس مریم‌گلی در صنایع عطرسازی، دارویی، فرآورده‌های آرایشی-بهداشتی و غذایی (به عنوان چاشنی، طعم‌دهنده و دمنوش) می‌باشد (12 و 21). مهم‌ترین خاصیت دارویی گیاه مریم‌گلی شامل اثر ضدعفونی کننده، آنتی‌بیوتیک، آرام‌بخش، کرم‌کُشی، ضد اسپاسم، مسهل و بهبود دهنده عمل هضم است (18). ترکیبات فرار در این گونه‌ها دارای خواص مهم و کاربرد وسیع در صنایع گوناگون هستند که به طور مختصر به برخی از آن‌ها اشاره خواهد شد. آلفا-پینن یک ترکیب ضد التهاب و

1، 3 و 4- به ترتیب دانشجوی سابق دوره دکتری تخصصی علوم باغبانی (فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی و معطر) و استادیاران گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: rezabbasi@ut.ac.ir
5- استاد پژوهش موسسه علوم غذایی، آوولینو، ایتالیا
6- دانشیار گروه داروسازی، دانشگاه سالرنو، فیشانو، ایتالیا

آنتی‌بیوتیک است و به طور گسترده در صنایع عطرسازی و دارویی و به صورت سنتز شده در تولید اسانس‌های مصنوعی کاربرد دارند. 1، 8-سینئول (اکالیپتول) یک ترپن است که بخاطر عطر دلپذیر و مزه آن به عنوان طعم‌دهنده در صنایع عطرسازی و لوازم آرایشی، مواد غذایی و نوشیدنی‌ها و به عنوان ترکیب اصلی در دهان‌شویه‌ها و ضدسرفه‌ها کاربرد دارد و به عنوان حشره‌کش طبیعی و دورکننده طبیعی حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. لیمونن تب‌بر است و در درمان بسیاری از سرطان‌ها به ویژه تومور مغزی و همچنین بیماری ریفلاکس معده نقش دارد. کامفور یک ترپن با بوی تند و دارای خاصیت ضد میکروبی است و به عنوان دورکننده حشره بید، طعم‌دهنده شیرینی‌ها و دسرها استفاده می‌شود. این ترکیب در عطرسازی و خوشبو کردن مواد غذایی کاربرد دارد. کامفن و آلفا-ترپینولن با فرمول $C_{10}H_{16}$ از نوع مونوترپن هستند که به‌طور گسترده برای معطر کردن مواد آرایشی-بهداشتی و مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مریم‌گلی لبه‌دار[1] گیاهی چندساله، ایستاده، به ارتفاع 30 سانتی‌متر و دارای برگ‌های تخم مرغ و قلبی شکل و بدون بریدگی است و در امتداد رگبرگ‌ها با کرک‌های متعدد مویی و غده‌دار پوشیده شده است. گل‌آذین آن پانیکولی پهن و سفید رنگ با لب پایینی زرد کم‌رنگ است (17). سجادی و شاهپیری (24) با تجزیه بخش‌های هوایی گیاه مریم‌گلی لبه‌دار جمع‌آوری شده از عرصه طبیعی استان چهار محال و بختیاری، ترکیبات اصلی اسانس را بی‌سیکلو جرماکرن (21/1 درصد)، آلفا-پینن (15/5 درصد)، ۱،۸-سینئول (11 درصد)، سابینن (10/6 درصد)، بتا-پینن (9/2 درصد) و اسپاتولنول (8/2 درصد) گزارش کردند. بخشی‌خانیکی و لاری‌یزدی (5) اسپاتولنول، لیمونن، آلفا-پینن، بتا-کاریوفیلن، میرسن و بتا-پینن را به عنوان ترکیبات مهم مریم‌گلی لبه‌دار گزارش نمودند. کورکوگلو و همکاران (10) تعداد 48 و 42 ترکیب را در اسانس مریم‌گلی لبه‌دار جمع‌آوری شده از دو منطقه شناسایی کردند و مهم‌ترین آن‌ها، آلفا پینن (24/3-11/2 درصد)، بتا-پینن (20/9-10 درصد) و سابینن (17/4-14/6 درصد) بودند.

مریم‌گلی ارغوانی (گل اروانه)[2] گیاهی خشبی، ایستاده، با ارتفاع 50 سانتی‌متر، دارای ساقه‌های متعدد کرکی بلند تا کرکی غده‌ای، برگ‌های بدون بریدگی و بیضوی تا دایره‌ای شکل و گل‌ها به رنگ بنفش است (17). باگچی و کوچاک (3) با بررسی ترکیبات اسانس حاصل از قسمت‌های هوایی مریم‌گلی ارغوانی دریافتند که ۱،۸-سینئول (17 درصد) و کامفور (13/2 درصد) ترکیبات اصلی اسانس آن می‌باشند. هم‌چنین احمدی و میرزا (2) ترکیبات بورنیل استات (18/1 درصد)، بتا-کاریوفیلن (16/5)، آلفا-پینن (15/6 درصد)، کامفور (10 درصد)، 1، 8-سینئول (8/3 درصد) و لیمونن (8/3 درصد) را در اسانس مریم‌گلی ارغوانی گزارش نمودند. در پژوهش دیگر، آلفا-پینن (26 درصد)، 1، 8-سینئول + لیمونن (20 درصد) و کامفور (19 درصد) و آلفا-توجن (0/7 درصد) به عنوان ترکیبات مهم اسانس آن گزارش شد (22). محمدحسینی (16) در بررسی ترکیبات فرار این گیاه، 1، 8-سینئول (25/3 درصد)، آلفا-ترپینن (18/3 درصد)، کامفور (12/4 درصد)، کامفن (8/4 درصد) و بورنیل استات (7/9 درصد) را به عنوان ترکیبات اصلی بیان کرد.

مانچینی و همکاران (15) مهمترین ترکیبات فرار از بین 72 ترکیب شناسایی شده در گیاه مریم‌گلی ارغوانی را آلفا-کوپائن (6/6 درصد)، آلفا-ترپینن (5/5 درصد)، میرتنول (4/6 درصد)، سابینیل استات (4/6 درصد) و بتا-کاریوفیلن (4/4 درصد) گزارش کردند. همچنین باگچی و کوکاک (3) 1، 8-سینئول (17 درصد)، بتا-پینن (13/7 درصد)، کامفور (13/2 درصد)، آلفا-پینن (9/3 درصد)، والرانون (8/5 درصد) و آلفا-اودسمول (5/7 درصد) را به عنوان ترکیبات اصلی مریم گلی ارغوانی گزارش کردند.

متداولترین روش استخراج اسانس گیاهان، تقطیر مستقیم بافت‌های گیاه، با آب یا بخار آب است. با توجه به اینکه در این روش‌ها دمای اعمالی در سیستم بالا است، امکان ایجاد مواد تخریبی و یا تغییر یافته در اسانس وجود دارد. بنابراین انتظار تفاوت بین نتایج حاصل از این روش و اسانس استنشاق شده در شرایط طبیعی از گیاه وجود دارد. امروزه علاوه بر روش تقطیر، روش‌های دیگری مانند استخراج با حلال، استخراج با دی اکسید کربن فوق بحرانی و روش‌های مختلف جذبی مورد توجه گسترده‌ای قرار گرفته است. در این میان، توجه محققان بیشتر به روش‌های میکرواستخراج فاز جذبی معطوف شده است که به دلیل عدم نیاز به حلال‌های آلی سمی و یا مصرف بسیار ناچیز آنها در زمره‌ی روش‌های دوستدار محیط زیست قرار می‌گیرد. به علاوه عدم استفاده از دماهای بالا برای مدت زمان‌های طولانی در این روش‌ها، امکان به حداقل رساندن تغییر در ماهیت طبیعی اسانس استخراج شده را ایجاد می‌سازد (16). تکنیک میکرواستخراج با فاز جامد به طور ویژه برای نمونه‌های دارای مواد فرار و معطر استفاده می‌شود. این نمونه‌ها بطور کلی دارای ترکیباتی هستند که در مقابل گرما و اکسیداسیون و فتولیز ساختارشان تغییر می‌کند. این فرآیندهای نامطلوب طی این تکنیک کاهش می‌یابد که این امر مربوط به سادگی آماده‌سازی نمونه در این روش می‌باشد (8 و 9). در واقع، میکرواستخراج با فاز جامد یک روش با آماده‌سازی ساده است که فیبر پوشش‌دار شده توسط سلیکا به طور مستقیم وارد نمونه یا محفظه فوقانی نمونه شده و ترکیبات فرار توسط فیبر جذب می‌شوند و سپس برای تجزیه، فیبر درون محفظه تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی قرار می‌گیرد (4).

باج و همکاران (4) با مقایسه تجزیه اسانس گیاه مریم‌گلی بدست

1- *Salvia limbata* C. A. MEY.

2- *Salvia multicaulis* Vahl.

آمده با روش تقطیر با کلونجر و روش میکرواستخراج با فاز جامد دریافتند ترکیبات اصلی مونوترپنی مانند کامفور و آلفا-توجن در هر دو مشابه بودند و تفاوت‌هایی در سزکوئی‌ترپن و دی‌ترپن‌ها مشاهده کردند به طوریکه مقدار این ترکیبات در روش تقطیر بیشتر بودند.

گزارش‌های متعددی در مورد شناسایی ترکیبات اسانس دو گونه حاضر از نقاط مختلف ایران و جهان وجود دارد اما گزارشی در مورد استخراج ترکیبات فرار با روش میکرواستخراج با فاز جامد[1] و همچنین در شرایط کشت شده در مورد این دو گونه گیاه مریم‌گلی وجود ندارد و بررسی ترکیبات فرار این گیاهان در شرایط کشت شده با این روش ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین پژوهش حاضر با هدف استخراج و تجزیه ترکیبات شیمیایی فرار دو گونه مریم‌گلی بومی ایران شامل مریم‌گلی لبه‌دار و مریم‌گلی ارغوانی در شرایط کشت شده بوسیله روش میکرواستخراج با فاز جامد انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذر دو گونه مریم‌گلی لبه‌دار و ارغوانی از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور تهیه شد. جهت تولید نشاء گیاهان مورد نظر، بذر آن‌ها در سینی کاشت حاوی کوکوپیت و پرلیت در گلخانه در بهمن 1390 کشت شد. گیاهان بعد از گذشت 40 روز در مرحله چهار برگ حقیقی به گلدان حاوی کوکوپیت و پرلیت منتقل شدند. بعد از گذشت یک ماه گیاهان به گلدان با قطر 25 و ارتفاع 30 سانتی متر حاوی خاک باغچه، خاکبرگ و ماسه (به نسبت 1:1:2) منتقل شدند و در طول دوره رشد در شرایط کنترل شده و یکسان از نظر نور، درجه‌حرارت و رطوبت نسبی گلخانه قرار گرفتند. از زمان کاشت نشاء تا به گل رفتن، 5 ماه بود. بخش‌های هوایی گیاهان در زمان گلدهی در اواخر خرداد 1391 برداشت شدند و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند. در ادامه نمونه‌های گیاهی در دمای منفی 80 درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شدند.

مواد شیمیایی و معرف‌ها

کربوهیدراتهای استاندارد از قبیل آلکان C8–C20 با غلظت 40 میلی‌گرم بر لیتر در هگزان (Fluka)، سولفات سدیم (سیگما) و اتانول (ROMIL Ltd) تهیه شدند. آماده‌سازی آب فوق خالص (18/2 میلی‌پور) با استفاده از سیستم تصفیه میلی‌پور (Millipore Corp) انجام شد. گاز هلیوم با درجه خلوص بسیار بالا (Rivoira) به عنوان گاز حامل در کروماتوگرافی گازی مورد استفاده قرار گرفت. فیبرهای جاذب و محفظه‌های شیشه‌ای مورد استفاده در روش میکرواستخراج با فاز جامد از شرکت Supelco و ستون HP-Innowax (30 متر× 0/25میلی‌متر× 0/5 میکرومتر) در کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی از شرکت آجیلنت خریداری شد. آماده‌سازی فیبرهای SPME طبق دستورالعمل شرکت سازنده و کمتر از حداکثر درجه‌حرارت انجام شد. قبل از اولین مرتبه آنالیز در هر روز، فیبرها به مدت 5 دقیقه در درجه‌حرارت عملیاتی متصل به انژکتور کروماتوگرافی گازی جهت حذف هر گونه ترکیب پوشش داده شده روی فیبر آماده‌سازی شدند و سطح خالی آن بررسی شد. تمام آنالیزها سه مرتبه تکرار شدند.

آماده‌سازی نمونه و روش میکرواستخراج با فاز جامد

بهینه‌سازی شرایط استخراج و واجذب[2] در روش میکرواستخراج با فاز جامد با استفاده از برگ‌های خشک گیاه مریم‌گلی[3] به عنوان ماتریکس انجام شد. میزان 15 میلی‌گرم برگ خشک در ویال HS 20 میلی‌لیتری دارای درپوش ریخته شد. سپس 0/5 گرم سولفات سدیم و 5 میلی‌لیتر محلول اتانول 5 درصد به آن اضافه و به مدت 1 دقیقه به شدت ورتکس شد. بعد از ورتکس، ویال‌ها با سپتوم از جنس تفلون و یک درب آلومینیومی برای ایجاد شرایط فضای فوقانی و آنالیز متوالی بسته شدند. ویال نمونه در قسمت گرم کننده دستگاه قرار داده شد و به مدت 20 دقیقه در درجه‌حرارت 40 درجه سانتی‌گراد جهت تعادل سیستم قرار گرفت. فرآیند استخراج و تزریق به صورت خودکار با استفاده از اتوسمپلر MPS 2 (آلمان) انجام شد. سپس فیبرها به صورت خودکار به مدت 10 دقیقه درون سپتوم ویال قرار گرفت و اجازه داده شد که ترکیبات فرار جذب سطح فیبر SPME شود.

کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

به منظور واجذب ترکیبات فرار، فیبر SPME در قسمت ورودی انژکتور دستگاه کروماتوگرافی گازی (آجیلنت مدل 7890A) متصل به طیف سنج جرمی (Agilent 5975 C) قرار داده شد. ترکیبات فرار به صورت حرارتی واجذب شدند و بطور مستقیم به ستون HP-Innowax دارای طول 30 متر، قطر 0/25 میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن 0/25 میکرومتر منتقل و تجزیه شدند. در برنامه دمایی، دمای آون ابتدا 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و در ادامه با شیب 4 درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا 200 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس با سرعت 10 درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا 240 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و به مدت 5 دقیقه در همان دما نگهداری شد. درجه‌حرارت منبع یونیزاسیون و آنالایزر چهار قطبی به ترتیب در 230 و 150 درجه سانتی‌گراد بود.

1- Solid-Phase Microextraction

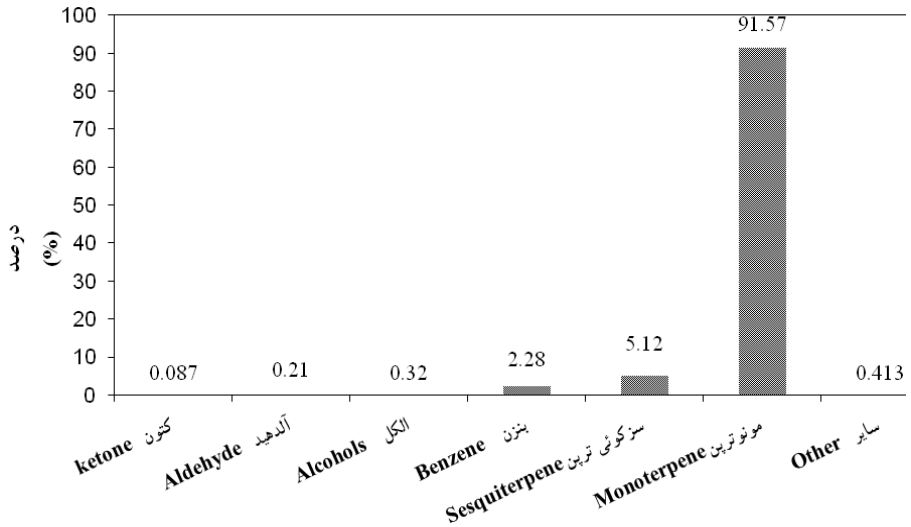
2- Desorption

3- *Salvia officinalis* L.

جدول ۱- ترکیبات فرار شناسایی شده در گیاهان مریم‌گلی لبه‌دار و ارغوانی

Table 1- Identified volatile compounds in *Salvia limbata* (S. L.) and *Salvia multicaulis* (S. M.) plants

ردیف No.	ترکیب Compound	شاخص بازداری RI	زمان بازداری RT	مریم‌گلی ارغوانی S. M. (٪)	مریم‌گلی لبه‌دار S. L. (٪)	ردیف No.	ترکیب Compound	شاخص بازداری RI	زمان بازداری RT	مریم‌گلی ارغوانی S. M. (٪)	مریم‌گلی لبه‌دار S. L. (٪)
1	2-Pentanone	-	4.10	-	0.02	**41**	α-Copaene	1497	18.80	0.21	0.36
2	2-Methyl-3-Pentanone	-	4.50	-	0.04	**42**	2-Ethyl-1-Hexanol	1497	18.90	0.13	-
3	Tricyclene	1015	4.60	-	0.05	**43**	Decanal	1498	19.40	0.06	0.02
4	2-Pentanone-4-Methyl	1018	4.70	-	0.003	**44**	Camphor	1532	19.80	10.73	0.01
5	Isobutyl Acetate	1024	4.80	-	0.01	**45**	β-Cubebene	1549	20.50	0.09	0.14
6	α-Pinene	1032	4.90	12.33	16.30	**46**	Delta Selinene	1551	20.60	0.15	-
7	α-Thujene	1035	5.00	0.60	1.14	**47**	Linalool	1553	20.88	0.12	0.04
8	α-Fenchene	1063	5.70	-	0.02	**48**	Linalyl Acetate	1556	21.10	1.77	-
9	Camphene	1076	5.90	28.85	1.17	**49**	Pinocarvone	1580	21.40	0.42	0.06
10	Hexanal	1093	6.30	-	0.01	**50**	Bornyl Acetate	1597	21.70	3.75	0.17
11	β-Pinene	1118	6.80	4.58	19.00	**51**	Calarene	1611	22.00	1.51	0.20
12	Sabinene	1132	7.20	0.06	19.16	**52**	Caryophyllene	1612	22.20	1.21	0.03
13	α-Phellandrene	1150	7.80	-	0.02	**53**	Terpinene-4-ol	1613	22.40	0.27	0.04
14	Delta 3-Carene	1160	8.10	-	0.43	**54**	Aromadendrene	1628	22.60	-	0.29
15	β-Phellandrene	1218	8.50	-	0.59	**55**	Myrtenal	1648	23.10	1.10	0.04
16	β-Myrcene	1174	8.70	0.79	1.88	**56**	allo-Aromadendrene	1661	23.70	-	0.04
17	α-Terpinene	1188	9.00	0.08	1.05	**57**	Trans-Pinocarveol	1664	23.90	-	0.03
18	Limonene	1203	9.60	9.01	3.73	**58**	α-Humulene	1689	24.30	0.24	-
19	1,8- Cineole	1213	9.90	5.47	10.86	**59**	(+) Epi-Bicyclo-sesquiphellandrene	1694	24.40	0.03	0.14
20	Trans 2-Hexenal	1237	10.40	0.23	0.18	**60**	Myrtenyl Acetate	1698	24.90	1.87	-
21	Cis-β-Ocimene	1246	10.90	0.10	0.02	**61**	α-Amorphene	1702	25.00	-	0.12
22	Gamma Terpinene	1256	11.20	0.19	1.05	**62**	α-Terpineol	1706	25.10	0.75	0.17
23	Trans-β-Ocimene	1266	11.40	0.11	0.05	**63**	Borneol	1719	25.20	1.42	0.07
24	P-Cymene	1278	12.00	2.69	1.91	**64**	Germacrene D	1721	25.50	0.57	1.53
25	O-Cymene	1278	12.10	0.25	0.14	**64**	Dodecanal	1730	25.60	0.10	-
26	α-Terpinolene	1286	12.30	0.05	14.41	**66**	α-Muurolene	1740	26.00	0.10	0.03
27	2 Octanone	1292	12.59	0.09	-	**67**	Bicyclo-Germancrene	1755	26.20	-	1.97
28	2-Hexen-1-Ol Acetate	1306	14.20	-	0.01	**68**	Delta Cadinene	1773	26.90	0.54	0.29
29	Sulcatone	1338	14.30	-	0.004	**69**	β-Citronellol	1776	27.00	-	0.02
30	Allocimene	1375	15.40	0.01	-	**70**	Cadina-1,4-diene	1779	27.50	-	0.02
31	1-Octen-3-Yl Acetate	1403	15.60	0.09	-	**71**	Myrtenol	1784	27.70	1.23	0.01
32	3- Octanol	1417	16.00	0.48	0.32	**72**	α-Cadinene	1795	27.80	-	0.03
33	α –Thujone	1430	16.80	0.05	0.01	**73**	Nerol	1797	28.00	-	0.01
34	1,1- Dimethyethyl	1442	17.10	0.92	0.11	**74**	Cis Calamenene	1739	28.90	0.18	0.03
35	Ethyl Octanoate	1449	17.30	0.02	0.02	**75**	Geranyl Acetone	1854	29.50	0.03	0.003
36	β -Thujone	1451	17.40	0.14	-	**76**	α-Calacorene	1941	31.00	0.03	0.03
37	Benzene 1-Methoxy-3-Methyl	1462	17.60	0.10	0.12	**77**	Caryophyllene Oxide	2008	32.70	0.12	-
38	α-Cubebene	1466	18.00	0.05	0.09	**78**	Nerolidol	2050	34.10	2.58	-
39	Trans (Cis) Sabinene Hydrate	1573	18.20	0.02	-	**79**	Thymol	2198	38.20	0.08	0.01
40	Bicycloelemene	1612	18.70	0.02	0.12						



شکل 1- طبقه‌بندی ترکیبات فرار در گیاه مریم‌گلی لبه‌دار بر اساس گروه‌های شیمیایی

Figure 1- Classification of volatile compounds in *Salvia limbata* based chemical groups

گاز هلیوم با سرعت 1/5 میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد. درجه‌حرارت انژکتور 240 درجه سانتی‌گراد بود و از حالت بدون تقسیم پالسی برای تجزیه استفاده شد. فیبر به مدت 10 دقیقه درون انژکتور قرار گرفت. طیف‌های جرمی در یک ولتاژ یونیزاسیون 70 الکترون ولت بدست آمدند و توسط شناساگر طیف‌سنجی شناسایی شدند. فعالیت شناساگر در دامنه بین 30 و 300 جرم به بار[1] با سرعت اسکن 2/7 اسکن در ثانیه بود. تمام آنالیزها سه مرتبه تکرار شدند.

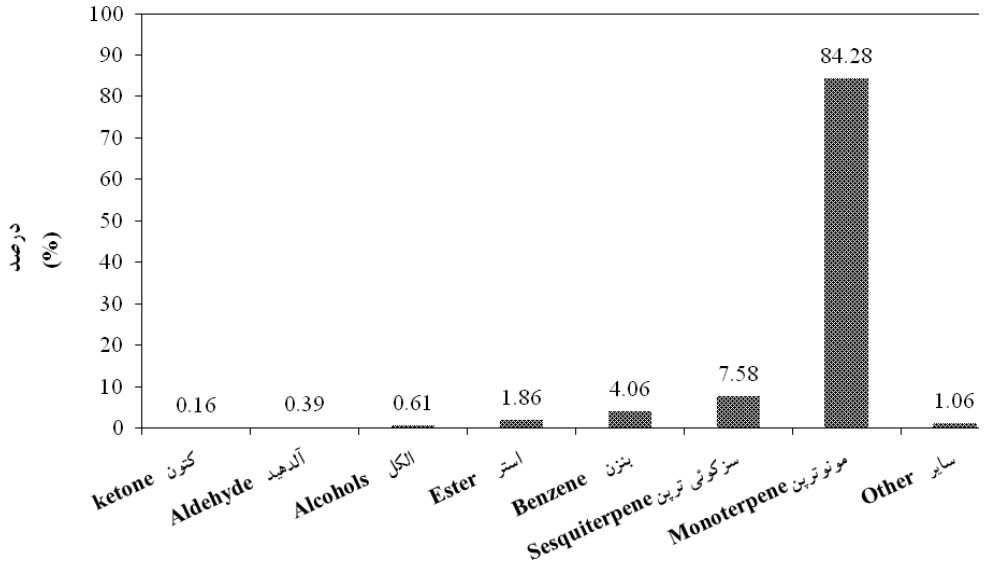
شناسایی ترکیبات فرار با مقایسه زمان بازداری و طیف‌های جرمی با استانداردهای معتبر تزریق شده در شرایط یکسان انجام شد. در مورد برخی ترکیبات فرار که استانداردهای معتبر وجود نداشت، شناسایی آن‌ها از طریق مقایسه شاخص‌های بازداری بدست آمده وابسته به زمان بازداری سری‌های آلکان C8–C20 دارای الحاق خطی با ترکیبات معتبر و منابع انجام شد (1، 27). شناسایی ترکیبات از طریق جستجوی طیف‌های جرمی موجود در پایگاه اطلاعاتی NIST تایید شد. مساحت زیر پیک هر متابولیت خاص نسبت به مساحت کل پیک بیان شد. بر اساس تفکیک‌پذیری پیک، سطوح آن از میزان کل یون محاسبه شد.

نتایج و بحث

مریم‌گلی لبه‌دار: کلیه ترکیبات فرار شناسایی شده همراه با درصد نسبی، زمان و شاخص بازداری گیاه مریم‌گلی لبه‌دار در جدول شماره 1 آمده است. نتایج بدست آمده وجود 66 ترکیب فرار در گیاه مریم‌گلی لبه‌دار را نشان داد که 100 درصد ترکیبات فرار این گیاه را به خود اختصاص داده است. در میان ترکیبات فرار شناسایی شده به ترتیب، سابینن (19/16 درصد)، بتا-پینن (19 درصد)، آلفا-پینن (16/30درصد)، آلفا-ترپینولن (14/41 درصد)، ۱،۸-سینئول (10/86 درصد) و لیمونن (3/73 درصد) بالاترین مقدار ترکیبات تشکیل دهنده اسانس این گیاه را تشکیل داده اند که در مجموع حدود 80 درصد ترکیبات فرار این گیاه می‌باشد. بخش اصلی ترکیبات فرار این گیاه از نوع مونوترپن‌ها به میزان 91/57 درصد است و پس از آن سزکوئی‌ترپن‌ها (5/12 درصد) مهمترین ترکیبات فرار را تشکیل داده است. از بین ترکیبات سزکوئی‌ترپن، بی سیکلوجرماکرن (1/97 درصد)، جرماکرن D (1/53 درصد) و آلفا-کوپائن (0/36 درصد) نیز بیشترین مقدار را دارا هستند (شکل 1). مقدار سایر ترکیبات فرار در جدول 1 آمده است.

با مقایسه نتایج تجزیه اسانس مریم‌گلی لبه‌دار با پژوهش‌های پیشین مشاهده شد که وجود برخی ترکیبات در این پژوهش مانند آلفا-پینن، بتا-پینن، 1، 8-سینئول و سابینن با پژوهش‌های پیشین به عنوان ترکیبات اصلی مشابه است. از سوی دیگر برخی ترکیبات از جمله آلفا-ترپینولن به عنوان یک ترکیب اصلی جدید در پژوهش حاضر مشاهده شد که در پژوهش های پیشین گزارش نشده است. (5 و 24). بخشی‌خانیکی و لاری‌یزدی (5) مهم‌ترین ترکیبات اسانس حاصل از برگ مریم‌گلی لبه‌دار شامل میرسن (7/2 درصد)، بتا-پینن (6/5 درصد)، لیمونن (5/2 درصد) و اسپاتولنول (4/3 درصد) گزارش کردند که از نظر بتا-پینن و لیمونن به عنوان ترکیبات اصلی با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

1- Mass-to-charge ratio (m/z)



شکل 2- طبقه‌بندی ترکیبات فرار در گیاه مریم‌گلی ارغوانی بر اساس گروه‌های شیمیایی

Figure 2- Classification of volatile compounds in *Salvia multicaulis* based chemical groups

مریم‌گلی ارغوانی: تعداد 58 ترکیب فرار در گیاه مریم‌گلی ارغوانی شناسایی شد (جدول 1). بیشترین میزان ترکیبات فرار گیاه مریم‌گلی ارغوانی به ترتیب کامفن (28/85 درصد)، آلفا-پینن (12/33 درصد)، کامفور (10/73 درصد)، لیمونن (9/01 درصد)، 1، 8-سینئول (5/47 درصد)، بتا-پینن (4/58 درصد) و بورنیل استات (3/75 درصد) بود که در مجموع حدود 75 درصد ترکیبات فرار آن را تشکیل داده‌اند. بیشترین میزان ترکیبات فرار موجود در اسانس متعلق به گروه مونوترپن‌ها به میزان 84/28 درصد می‌باشد و پس از آن سزکوئی‌ترپن‌ها (7/58 درصد) بود (شکل 2). مهم‌ترین سزکوئی‌ترپن‌های موجود در اسانس مریم‌گلی ارغوانی نرولیدول (2/58 درصد)، کالارن (1/51 درصد)، تری سیکلن (1/25 درصد)، کاریوفیلن (1/21 درصد) و جرماکرن D (0/57 درصد) بود.

نتایج بدست آمده از تجزیه ترکیبات فرار گیاه مریم‌گلی ارغوانی از نقطه نظر نوع ترکیبات اصلی تا حدودی با یافته‌های محمدحسینی (16)، احمدی و میرزا (2) روستائیان و همکاران (22) و باگچی و کوچاک (3) مطابقت داشت اما از نظر مقدار ترکیبات اصلی تفاوت وجود داشت. برخی ترکیبات نظیر بتا-کاریوفیلن که به عنوان یکی از ترکیبات اصلی اسانس مریم‌گلی ارغوانی در تحقیق احمدی و میرزا (2) گزارش شده است در مطالعه حاضر در مقدار پایینی وجود داشت.

با مقایسه ترکیبات فرار اصلی در این دو گیاه، مشاهده شد که بتا-پینن، آلفا-پینن، 1، 8-سینئول و لیمونن در هر دو گیاه مشابه هستند و بخش زیادی از ترکیبات فرار این گیاهان را تشکیل می‌دهند. ترکیباتی مانند کامفن، کامفور و بورنیل استات به عنوان ترکیبات اصلی و اختصاصی در مریم‌گلی ارغوانی وجود داشت در حالیکه ترکیبات مانند سابینن و آلفا-ترپینولن در گیاه مریم‌گلی لبه‌دار شناسایی شدند. با توجه به اینکه این روش بر پایه فاز گازی می‌باشد، بیشترین ترکیبات فرار در هر دو گیاه از نوع ترپنوئیدی به ویژه مونوترپن بودند. با مقایسه طبقه‌بندی گروه‌های شیمیایی موجود در دو گیاه مشخص شد که به طور نسبی گروه‌های شیمیایی مشابهی در هر دو گیاه وجود دارد. میزان مونوترپن‌ها در مریم‌گلی لبه‌دار بیشتر از مریم‌گلی ارغوانی بود در حالیکه مقدار سزکوئی‌ترپن‌ها در مریم‌گلی ارغوانی بیشتر بود. همچنین در مریم‌گلی ارغوانی برخی ترکیبات متعلق به دسته استرها وجود داشت که در مریم‌گلی لبه‌دار مشاهده نشد.

مقایسه ترکیبات شناسایی شده در این تحقیق با سایر گزارش‌ها، وجود شباهت‌ها و تفاوت‌هایی را از نظر نوع و مقدار ترکیبات شناسایی شده نشان می‌دهند. همچنین برخی ترکیبات مانند آلفا-ترپینولن در مقادیر کم در این پژوهش وجود داشت که در پژوهش‌های پیشین گزارش نشده است و بالعکس. این تفاوت‌ها ممکن است به دلایل گوناگونی به شرح زیر باشد: الف) تفاوت در زمان جمع‌آوری گیاهان و شرایط اکولوژیک منابع بذری اولیه گیاهان می‌تواند بر میزان و نوع ترکیبات تاثیرگذار باشد (19). ب) در پژوهش‌های پیشین، پژوهشگران نمونه‌های گیاهی را از عرصه‌های طبیعی جمع‌آوری نموده و اقدام به اسانس‌گیری نموده‌اند که نتایج بدست آمده ناشی از برهمکنش عامل ژنتیک و محیط می‌باشد، در صورتیکه در پژوهش حاضر از گیاهان کشت شده در شرایط کنترل شده استفاده شده است (19، 7 و 14). ج)

در استخراج اسانس از گیاه که با روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر که از درجه‌حرارت بالا به مدت 2 تا 3 ساعت استفاده می‌شود، بسیاری از ترکیبات فرار با وزن مولکولی و نقطه جوش پایین تحت تاثیر فرآیندهای هیدرولیز، پلیمیریزاسیون و رزینی شدن از بین رفته و یا به ترکیبات دیگر تبدیل می‌شوند (23). بنابراین با توجه به انجام روش میکرواستخراج با فاز جامد در مطالعه حاضر برای استخراج ترکیبات فرار و عدم استفاده از درجه‌حرارت بالا، ترکیبات شناسایی شده با ترکیبات موجود در گیاه تشابه بیشتری داشته و به واقعیت نزدیک‌تر می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی و پیشنهاد

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، از بین ترکیبات اصلی، بتا-پینن، آلفا-پینن، 1، 8-سینئول و لیمونن در هر دو گیاه مشابه بودند. کامفن، کامفور و بورنیل استات به صورت اختصاصی در گیاه مریم‌گلی ارغوانی و سابینن و آلفا-ترپینولن در گیاه مریم‌گلی لبه‌دار شناسایی شدند. بیشترین ترکیبات فرار هر دو گیاه از نوع ترپنوئیدی به ویژه مونوترپن بودند که میزان مونوترپن‌ها در مریم‌گلی لبه‌دار بیشتر از مریم‌گلی ارغوانی بود و مقدار سزکوئی‌ترپن‌ها در مریم‌گلی ارغوانی بیشتر بود. در مریم‌گلی ارغوانی برخی ترکیبات متعلق به گروه استرها مشاهده شد. آلفا-ترپینولن به عنوان یکی از ترکیبات اصلی تنها در مریم‌گلی لبه‌دار گزارش شد. با توجه به اینکه نتایج استفاده از روش میکرواستخراج با فاز جامد از نظر استخراج ترکیبات اصلی در گیاهان مریم‌گلی لبه‌دار و ارغوانی شباهت زیادی با روش معمول تقطیر برای استخراج اسانس می‌باشد و هم‌چنین وجود مزایای مختلف این روش مانند نیاز به ماده گیاهی بسیار کم، زمان کوتاه استخراج، عدم استفاده از دماهای بالا برای مدت زمان طولانی، ارزان بودن و کاربرد بسیار ساده، مطالعات بیشتر برای استفاده از این روش در استخراج ترکیبات فرار گیاهان دارویی و معطر توصیه می‌شود.

منابع

1- Adams R.P. 1995. Identification of essential oil components by Gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Crop, Carol Stream. IL, USA.

2- Ahmadi L. and Mirza M. 1999. Essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl from Iran. Journal of Essential Oil Research, 11(3):289-290.

3- Bagci E. and kocak A. 2008. Essential Oil Composition of the aerial parts of two *Salvia* L. (*S. multicaulis* Vahl. Enum and *S. tricochlada* Bentham) species from East Anatolian region (Turkey). International Journal of Science & Technology, 3(1):13-18.

4- Baj T., Ludwiczuk A., Sieniawska E., Wozniak K.S., Widelski J., Zieba K. and Glowniak K. 2013. GC-MS analysis of essential oils from *Salvia officinalis* L.: comparison of extraction methods of the volatile components. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 70(1):35-40.

5- Bakhshi Khaniki Gh., and Lari Yazdi H. 2009. The survey of essential oils composition in *Salvia limbata* & *Salvia macrosiphon*. Biology journal of Islamic Azad University (Garmsar Branch), 4 (1):33-42.

6- Chen Y., Guo Z., Wang X. and Qiu C. 2008. Sample preparation, Journal of Chromatography A, 1184:191-219.

7- Duarte A.R., Naves R.R., Santos S.C., Seraphin J.C. and Ferri P.H. 2010. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. Journal of the Brazilian Chemistry Society, 21(8):1459-1467.

8- Ghiasvand A.R., Setkova L. and Pawliszyn J. 2006. Determination of flavor profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fiber SPME- GC- TOF- MS. Flavour and Fragrance Journal, 22: 377-391.

9- Ghiasvand A.R., Hosseinzadaeh S. and Pawliszyn J. 2006. New cold-fiber headspace solid-phase micro extraction (SPME) device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment. Journal of chromatography, 1124:35-42.

10- Kürkçüoglu M., Demirci B., Baser K.H.C., Dirmenci T., Tümen G. and Özgen U. 2005. The Essential Oil of *Salvia limbata* C.A. Meyer Growing in Turkey. Journal of Essential Oil Research, 17(2): 192-193

11- Lakušić B.S., Ristić M.S., Slavkovska V.N., Stojanović D.L. and Lakušić D.V. 2013. Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. Botanica SERBICA, 37(2):127-139.

12- Lambert Ortiz E. 1996. Encyclopedia of herbs, spices and flavouring. Dorling Kinderslei, London.

13- Lari Yazdi H., Goudarzi M., Yazdani D. and Chehregai A.K. 2005. Essential oils composition of leaves and flowers of *Salvia syriaca* L. and *S. reuterana* Boiss. from Borujerd-Iran. Quarterly Journal of Medicinal Plants, 4(16):15-21.

14- Loziene K. and Venskutonis P.R. 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. Biochemical Systematics and Ecology, 33(5):517-525.

15- Mancini E., Arnold N. A., De Martino L, De Feo V., Formisano C., Senatore F. and Rigano D. 2009. Chemical

Composition and Phytotoxic Effects of Essential Oils of *Salvia hierosolymitana* Boiss. and *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. Growing Wild in Lebanon. Molecules, 14:4725-4736.
16- Mohammadhosseini M. 2012. Hydrodistilled volatile oils of the flowers of *Salvia leriifolia* Bench. and *Salvia multicaulis* Vahl. as two growing wild plants in Iran. Asian Journal of Chemistry, 24(4):1432-1434.
17- Mozafarian V. 2008. Ilam Flora. Farhang Moaser Publication. Tehran.
18- Odymnimh P. 1995. Complete medicinal herbal, Dorling Kindersley.
19- Omidbaigi R. 2005. Production and processing of medicinal plants. volume 1. Behnashr Publication. Mashhad.
20- Rechinger K.H. 1992. Flora Iranica . No: 150, Graz: Akademische Druck-uVerlagsanstalt, Graz, Austria.
21- Reineccius G. 1994. Source book of flavors. Chapman and Hall, New York/London.
22- Rustaiyan A., Masoudi Sh., Monfared A. and Komeilizadeh H. 1999. Volatile constituents of three *Salvia* species grown wild in Iran. Flavour and Fragrance Journal, 14:276-278.
23- Sefidkon F. 2007. Chemistry and industrial production of essential oils. Zavash Publication. Tehran.
24- Sajjadi S.E. and Shahpiri Z. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Salvia limbata* C. A. MEY. DARU, 12(3):94-97.
25- Santos-Gomes P.C. and Fernandes-Ferreira M. 2001. Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:2908-2916.
26- Schmidere C., Grassi P., Novak J., Weber M. and Franz C. 2008. Diversity of essential oil glands of clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). Plant Biology (Stuttg), 10(4):433-440.
27- Van den Dool H. and Kratz P.D. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. Journal of Chromatography A, 11:463-471.