بررسی فیتوشیمیایی دو گونه سرو کوهی (*Juniperus spp*) در استان گیلان

خورشید سلیمانی کیساری[1*]، دکتر امیر صحراروا[1]، دکتر داود بخشی[1] و دکتر سیامک غیبی[2]

[1*] گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، رشت

[2] گروه صنایع غذایی، دانشگاه گیلان، رشت

نویسنده مسئول: Khorshed solimane2028@gmail.com

چکیده

در این پژوهش میزان فنول، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو گونه پیرو (*J. communis* L.) و مای‌مرز (*J. sabina* L.) در رویشگاه‌های مختلف استان گیلان بررسی شد. به همین منظور این گیاهان از ارتفاعات مختلف (۲۶۸۰، ۲۴۰۰ و ۲۲۸۰ متر از سطح دریا) از مناطق اشکورات، لاهیجان و لنگرود از محل رویشگاه طبیعی آن‌ها جمع‌آوری، خشک و عصاره متانولی سرشاخه‌های آن به منظور انجام بررسی‌های فیتوشیمی به روش اسپکتروفومتری تهیه شد. نتایج بدست آمده نشان داد، میزان فنل و فلاونوئید گونه پیرو بیشتر از مای‌مرز بوده ولی تفاوت معنی‌داری از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین دو گونه وجود نداشت. همچنین بررسی‌ها نشان داد گونه‌های جمع‌آوری شده از ارتفاعات (۲۶۸۰ متر از سطح دریا) دارای میزان فنول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر، ولی میزان فلاونوئید کمتری نسبت به ارتفاعات (۲۴۰۰ و ۲۲۸۰ متر از سطح دریا) دارد.

کلمات کلیدی: سرو کوهی، فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

تیره سرو (Cupressaceae) در دنیا دارای ۱۳ تا ۱۵ جنس و نزدیک به ۱۴۰ گونه است، که مهمترین جنس این تیره سرو کوهی (*Juniperus*) می‌باشد. در این جنس گونه‌های پیرو[1] مای‌مرز[2] و ارس[3] از گونه‌های دارویی با ارزش و معطر نام برده شده هستند (رضوانی، ۱۳۸۸). این جنس شامل ۷۵ گونه است که در مناطق معتدل نیمکره شمالی از جمله آسیا، اروپا و شمال آمریکا پراکنده (Adams, 2008; Dahmane *et al*., 2015) می‌باشند. پنج گونه سرو کوهی به دو صورت درخت یا درختچه‌های در ارتفاعات ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ متری شمال و شمال‌شرقی ایران وجود دارند که حدود ۱/۲ میلیون هکتار از ۱۲ میلیون هکتار جنگل‌های ایران را می‌پوشانند (Shahmir *et al*., 2003; Emami *et al*., 2007; Kasaian *et al*., 2011). طبق تحقیقاتی که مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان در سال‌های اخیر انجام داده است در حدود ۳۴۲ گونه گیاه دارویی در استان شناسایی شده که شامل ۹۵ خانواده و ۲۲۹ جنس گیاهی می‌شود که برخی از آنها اندمیک گیلان می-باشند (اکبرزاده و همکاران، ۱۳۸۸). در این جنس گونه‌های اسانس‌ها گروه عظیمی از متابولیت‌های ثانویه هستند که ترکیباتی فرار و معطر بوده که در مسیرهای بیوشیمیایی ویژه در گیاه، تولید و ذخیره می‌شوند. گزارش‌ها نشان داده است که تمام گیاهان اسانس‌دار در مکان معینی سنتز ترپن را انجام نمی‌دهند. گزارشات دیگر حاکی از آن است که محل تولید اسانس‌ها جدا از محل تولید سایر فرآورده‌های متابولیکی است. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها از نظر ساختار شیمیایی همگن نیستند اما جزء غالب ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌ها را ترپن‌ها و فنیل پروپان‌ها تشکیل می‌دهند. ایوانو (۱۹۱۵) برای اولین بار تأثیر عوامل محیطی را بر تولید مواد شیمیایی و متابولیت‌های ثانوی بررسی کرد. او ثابت کرد که افراد یک گونه گیاهی معین تحت شرایط مختلف محیطی دارای مواد شیمیایی (متابولیت ثانویه) متفاوتی‌اند. به عبارت دیگر، محیط در به وجود آمدن این تغییرات زیرگونه‌ای مؤثر بوده است. در منطقه اصلی مواد شیمیایی که توسط گیاه تولید می‌شوند در حد متعارف خود می‌باشد ولی زمانی که گیاهان به نقاط دورتر از مرکز اولیه انتقال داده شوند، میزان متابولیت‌های ثانویه آن‌ها بی‌نهایت متفاوت است. این موضوع بعداً توسط ایوانف و مکتایر (۱۹۲۶) به طور جداگانه تأیید شد (Smith and Montogomery, 1959). دروگانوسکی (۱۹۵۳) ثابت کرد که تغییرات جغرافیایی گیاهان با تغییرات متابولیسم درونی آن‌ها متناسب است. وی پس از تحقیق روی میزان ماده مؤثره لیمونن[1] مهمترین ماده مؤثره در اسانس گشنیز) بیان کرد که تولید این ماده به شرایط آب و هوایی محیط

IrHC2019

وابستگی زیادی دارد، همچنین خشخاش‌های حاوی ماده مخدر «مورفین» در مناطق مرکزی روسیه از لحاظ آلکالوییدی خیلی فقیرتر از انواع کاشته شده در آسیای مرکزی است (Smith and Montogomery, 1959؛ امیدبیگی، ۱۳۸۸). تغییر در ترکیبات مواد مؤثره دارویی به شدت تحت تأثیر محیط می‌باشد. به طور کلی می‌توان گفت که عامل اصلی ایجاد تیپ‌های شیمیایی، فاکتورهای اکولوژیکی وجغرافیایی می‌باشد. بطور مثال سرو پیرو در اکثر فارماکوپه‌ها به عنوان گیاه دارویی یاد شده است. قدرت شفاء بخشی میوه‌ها نسبت به شاخ و برگ‌ها بیشتر است. ترکیبات معطر گیاه، محرک بوده و دارای خواص ضدمیکروبی، ضدرماتیسم، مدر و معرق، اشتهاآور و ضدعفونی کننده می‌باشند (Butkine *et al.*, 2004). در خصوص گونه مای‌مرز نیز خواص دارویی متعددی گفته شده است. قسمت‌های دارویی این گیاه سرشاخه‌های آن می‌باشد که در اسانس آن ترکیبی به نام سابینن[۲] وجود دارد که با تانن و رزین همراه می‌شود .سابینن دارای اثر تحریک‌کنندگی پوست و مخاط‌های بدن است و تأثیر آن بر پوست باعث ایجاد ناراحتی و تاول شدید می‌شود. این ترکیب دارای اثر ضدرماتیسمی است و باعث تحریکات شدید در عضلات معده، روده و زحم گشته و در گذشته برای سقط جنین نیز از آن استفاده می‌شده است (میرجلیلی، ۱۳۸۷). همانطور که پیش-تر نیز اشاره شد خواص هر اسانس بسته به نوع گونه، شرایط اقلیم محل رویش گیاه، زمان نمونه‌گیری و همچنین زمان برداشت اندام حاوی اسانس می‌تواند تغییر یابد (اکبرزاده، ۱۳۸۲). با توجه به اهمیت این گیاهان و نیز از آنجا که این دو گونه در گیلان نیز رشد می‌کنند و نیز اهتمام کشوری به مقوله تولید ملی و خودکفایی در زمینه تولید دارو و موارد بهداشتی و آرایش و بطور کلی حوضه سلامت و همچنین دقت نظر مسئولین استانی به لزوم توجه به گیاهان دارویی بومی استان گیلان و در نهایت از آنجا که پژوهش آنچنانی درخصوص آنالیز اسانس گونه‌های نامبرده انجام نگرفته است، پژوهش حاضر به آنالیز اسانس آنها در استان گیلان خواهد پرداخت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش اندام گیاهی شامل سرشاخه‌های جوان در ارتفاعات مختلف (۲۶۸۰، ۲۴۰۰ و ۲۲۸۰ متر از سطح دریا) از مناطق اشکورات، لاهیجان و لنگرود از محل رویشگاه طبیعی آن‌ها جمع‌آوری شد. جهت جلوگیری از فساد، نمونه‌ها در سینی‌های آلومینیومی مخصوص به صورت یک لایه قرار داده شده و در حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد در محیط آون به مدت ۷۲ ساعت خشک گردیدند. برای عصاره‌گیری، یک گرم سرشاخه‌های خشک آسیاب شده و به همراه ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی بر روی شیکر نگهداری شد. سپس عصاره استحصالی با کاغذ صافی صاف شد و با دور ۱۰۰۰۰ در مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. اندازه‌گیری فلاونوئید کل مطابق روش دو و همکاران (۲۰۰۹) صورت گرفت. ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده به ترتیب با ۱۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۳۰ درصد، ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم ($NaNO_2$) ۰/۵ مولار و ۷۵ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) ۰/۳ مولار مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) یک مولار اضافه شد و ورتکس گردید، پس از ۱۵-۱۰ دقیقه میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل(T80+ PG InstrumenntUV/Vis Spectrometer) در طول موج ۵۰۶ نانومتر قرائت گردید. غلظت فلاونوئید کل بر حسب استاندارد کاتچین (mg Catechin/kg oil) محاسبه گردید.

برای به دست آوردن منحنی استاندارد فلاونوئید کل از کاتچین استفاده گردید. ۲میلی‌گرم کاتچین در محلول اتانول: استون (v/v ۷:۳) به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. سپس غلظت‌های مختلف (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از آن تهیه گردید. ۱۵۰ میکرولیتر از هر یک از این محلول‌های رقیق شده در داخل لوله‌های آزمایش تمیز ریخته شد و به ترتیب به آنها ۱۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۳۰ درصد، ۷۵ میکرولیتر نیتریت‌سدیم ($NaNO_2$) ۰/۵ مولار و ۷۵ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) ۰/۳ مولار اضافه و مخلوط شد. پس از گذشت ۵ دقیقه ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) ۱ مولار اضافه شد و ورتکس گردید. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۶ نانومتر قرائت گردید.

برای اندازه‌گیری مقدار فنل کل عصاره‌ها با استفاده از روش فولین سیکالچو تعیین شد (Singleton and Rossi, 1965) به طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر از عصاره به ۲۵۰۰ میکرولیتر فولین رقیق شده با آب مقطر (۱۰ برابر رقیق شده) افزوده شد. پس از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی، ۲۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت

IrHC2019

در تاریکی قرار گرفت، سپس میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای تهیه محلول‌های استاندارد، مقدار ۰/۱ گرم گالیک اسید را با متانول خالص به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس از این محلول استاندارد به ترتیب مقادیر حجمی ۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و داخل لوله آزمایش شیشه-ای ریخته شد. به هر کدام از آن‌ها مقدار ۲۵۰۰ میکرولیتر فولین رقیق شده با آب مقطر افزوده شد. پس از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، ۲۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم اضافه گردید. میزان جذب محلول‌های استاندارد پس از ۱/۵ساعت قرائت گردید.

مطابق روش دو و همکاران (2009) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از طریق خاصیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد ۲ و۲ دی‌فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)[1] با کمی تغییر تعیین شد. برای این منظور با استفاده از سمپلر مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره داخل لوله آزمایش ریخته شد و ۹۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH به آن‌ها اضافه گردید. محلول حاصل به سرعت به هم زده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه تاریک در دمای اتاق نگهداری گردید. نمونه بلانک (صفر) و استاندارد به ترتیب شامل یک میلی‌لیتر حلال استخراج و یک میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH بود. سپس میزان جذب استاندارد و نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/Vis Spectrometer T80+ PG Instrumennt) در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین گردید. حجم آزمون برای نمونه‌ها، بلانک (صفر) و استاندارد یک میلی‌لیتر بود. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه ذیل محاسبه شد.

رابطه (۱-۱) $\text{Antioxidant activity (\%DPPHSce)} = (A_{cont} - A_{samp})/A_{cont} \times 100$

رابطه(۱-۲)

$\%DPPH_{sc}$= درصد بازدارندگی DPPH A_{cont}= میزان جذب DPPH، A_{samp} = میزان جذب (نمونه + DPPH)

نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها توسط نرم افزار SAS نشان داد گونه پیرو و مای مرز از لحاظ میزان فنل و فلاونوئید در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ولی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی دو گونه معنی‌دار نبود. همچنین اختلاف بسیار معنی‌داری از لحاظ فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی بین ارتفاعات مختلف وجود داشت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که گونه پیرو میزان فنل و فلاونوئید بیشتری نسبت به گونه مای‌مرز دارد ولی از لحاظ فعالیت آنتی اکسیدانی تفاوت زیادی با هم نداشتند (جدول۲). همچنین میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان جمع آوری شده از ارتفاعات (۲۶۸۰ متر از سطح دریا) بطور کلی بیشتر از سایر ارتفاعات (۲۴۰۰ و ۲۲۸۰ متر از سطح دریا) بود (جدول ۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر گونه و ارتفاع محل رشد بر میزان مواد موثره گونه‌های گیاهی پیرو و مای‌مرز.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فنل	فلاونوئید	آنتی اکسیدان
بلوک	۲	۰,۰۰۱ ns	۰,۰۱۴۶ ns	۰,۰۰۱۱ ns
گونه	۱	۰,۰۶۶۳ *	۰,۰۳۷۲**	۰,۰۶۶۳ ns
منطقه	۲	۰,۰۷۴۷**	۰,۰۴۲۷**	۰,۰۰۸۷**
گونه*منطقه	۲	۰,۰۶۶۸**	۰,۰۱۱۷**	۰,۰۰۱۴ ns
خطا	۱۰	۰,۰۸۶۰	۰,۰۲۴۹	۰,۰۰۳۶
CV		۱۸,۱	۹,۷۰	۷,۸۵

ns، *، ** به ترتیب نشان دهنده‌ی عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

1. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

IrHC2019

جدول۲- مقایسه میانگین اثر گونه بر میزان مواد موثره گونه های گیاهی پیرو و مای‌مرز

تیمار	فنول	فلاونوئید	آنتی اکسیدان
J. sabina	۰,۴۴۵۸ B	۰,۴۶۸۷ B	۰,۲۳۴۰ A
J. communis	۰,۵۶۷۳ A	۰,۵۵۹۷ A	۰,۲۶۹۱ A

جدول۳- مقایسه میانگین اثر ارتفاع محل رشد بر میزان مواد موثره گونه‌های گیاهی پیرو و مای‌مرز.

تیمار		فنل	فلاونوئید	آنتی اکسیدان
منطقه	ارتفاع ۲۶۸۰	۰,۶۲۹۸ A	۰,۴۹۲۱ B	۰,۲۰۰۷ B
	ارتفاع ۲۴۰۰	۰,۴۱۲۱ B	۰,۴۶۸۸ B	۰,۲۴۹۱ A
	ارتفاع ۲۲۸۰	۰,۴۷۷۸ B	۰,۵۸۱۸ A	۰,۲۷۵۳ A

عوامل محیطی از جمله دما، نور (شدت و تناوب)، ارتفاع محل رشد، شیب منطقه، میزان آب و تغذیه گیاه بر کمیت و کیفیت اسانس گیاهان معطر موثرند ولی چگونگی و میزان اثر آنها در گیاهان مختلف متفاوت است. در این رابطه مطالعه روی گیاه پیرو نشان داد که ارتفاع محل در مقدار و نوع ترکیبات اسانس موثر است (روستائی‌فر و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بیانگر تأثیر قابل توجه ارتفاع و نوع گونه گاه بر محتوی و ترکیبات اسانس سرشاخه‌های سرو پیرو است. با توجه به نتایج حاصل گونه اندمیک پیرو رشد یافته در ارتفاعات (۲۶۸۰ متر از سطح دریا) بهترین تیمار می باشد. لذا با توجه به نوع کاربرد مورد انتظار می‌توان نسبت به برداشت سرشاخه‌های این گونه از ارتفاع مربوطه اقدام نمود.

منابع

اکبرزاده، م.، ۱۳۸۲. گیاهان دارویی از خانواده نعناعیان در منطقه مازندران تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۱۹. ص ۳۶-۴۵.

اکبرزاده، م.، کامکار، ج.، همتی، ا. و بابا خانجانی، ش. ۱۳۸۸. گیاهان دارویی استان گیلان و قسمت‌های مورد استفاده آنها. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۶. شماره۳. ص۳۲۶- ۳۴۷.

امید بیگی، ر. ۱۳۸۴. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول، شرکت به نشر، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد. ۳۴۷صفحه.

ایزد دوست، م.، ۱۳۶۳. شیمی گیاهی. ترجمه. انتشارات دانشگاه تهران، تهران. ۳۴۵ صفحه.

رضوانی امامزاده هاشمی، س. (۱۳۸۸). بررسی و مقایسه تانن‌های حاصل از دو گونه سرو کوهی *Juniperus polycarpos* & *Juniperus communis* از استان گلستان. شماره ۳۳ . فصلنامه گیاهان دارویی.

میرجلیلی، س.ع (۱۳۷۳). شناخت گیاهان دارویی و معطر ۱. تهران انتشارات موسسه آموزش عالی. علمی کاربردی جهاد دانشگاهی، ص ۲.

Adams, R.P. 2007. Identification of essention ofil components by Gas chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing.

Adams, R.P. 2008. The Junipers of the World: The Genus *Juniperus*. 2nd ed. Trafford Publ., Victoria, BC, Canada.

Butkiene, R., Nivinskiene, O. and Mockute, D. 2004. Chemical composition of unripe and ripe berry essential oils of *Juniperus communis* L. growing wild in Vilnius district. CHEMIJA. 4:57-63 pp.

IrHC2019

Dahmane, D., Dob, T. and Chelghoum, C. 2015. Chemical composition of essential oils of *Juniperus communis* L. obtained by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. Journal of Materials and Environmental Science, 6(5): 1253-1259.

Ebadi, M. 2007. Pharmacodynamic basis of herbal medicine. 2nd Ed. Taylor and Francis, Boca Raton, 699 p. 15.Emami, S.A., Asili, J., Mohagheghi, Z. and Hassanzadeh, M.K. 2007.

Kasaian, J., Behravan, J., Hassany, M., Emami, S.A., Shahriari, F. and Khayyat, M.H. 2011. Molecular characterization and RAPD analysis of *Juniperus* species.

Shahmir, F., Ahmadi, L., Mirza, M. and Korori, S.A.A. 2003. Secretory elements of needles and berries of *Juniperus communis* L. ssp. communis and its volatile constituents. Flavour and Fragrance Journal, 18(5): 425-428.

Smith, F. and Montogomery, R. 1959. The chemistry of plant gums and mucilages.

Phytochemical study of two species of (*Juniperus spp*) in Guilan province

[4]Khorshed Soliemane[1] *, Sahraroo. A[1], Davood Bakhshi[1] & Siamak Gheibi[2]
[1]Department of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht.
[2] Assistant Prof, University of Guilan, Rasht.
[*]*Corresponding Author: Khorshedsolimane2018@gmail.com*

Abstract

In this study, phenol, flavonoids and antioxidant activity of two species of (*J. communis* L.) and *J. sabina* L. in different habitats of Guilan province were investigated. For this purpose, the plants were collected from different heights (2680, 2400 and 2280 m above sea level) from the areas of Ashkhvarat, Lahijan and Langroud from their natural habitat, dried and methanolic extract of their branches in order to conduct a survey Phytochemicals were prepared by spectrophotometry. The results showed that the phenol and flavonoid content of the follow-up species was higher than that of the mussel, but there was no significant difference in the antioxidant activity between the two species. Also, surveys showed that the species collected from the elevations (2680 m above sea level) had a higher phenol content and more antioxidant activity, but the flavonoid content was less than the altitudes (2400 and 2280 m above sea level).

***Keywords*:** Medicinal plants, phenol, flavonoids and antioxidant

IrHC2019