بررسی تنوع ترکیبات اسانس سرو کوهی *Juniperus sabina* در رویشگاه‌های مختلف

امیر قربانزاده، [*۱]، عظیم قاسم نژاد[۱]، صمد نژاد ابراهیمی[۲]، مصطفی خوشحال سرمست[۱]
[*۱] گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
[۲] پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
*نویسنده مسئول: A.ghorbanzadeh2170@gmail.com

چکیده

سرو کوهی به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در بین بازدانگان با داشتن پتانسیل ویژه‌ای در تولید متابولیت-های ثانویه از دیرباز مورد توجه عموم بوده است. تحقیق حاضر با هدف شناخت بیشتر گونه *J. sabina* از منظر تنوع در ترکیبات اسانس سرشاخه در سه رویشگاه رامسر، توسکستان و رامیان صورت پذیرفت. نمونه‌گیری در خرداد ماه از سرشاخه‌های بالغ گیاه انجام شد و بلافاصله مواد گیاهی در دمای محیط خشک گردید. سپس عمل اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل ترکیبات هر کدام از اسانس‌ها از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) وکروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) استفاده شد. در نهایت نتایج حاصل از دو دستگاه به منظور شناسایی ترکیبات با یکدیگر تطبیق داده شد. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که بازده اسانس به ترتیب ۱/۶۶، ۱/۳۴و ۰/۷۱ درصد بر اساس وزن خشک در نمونه توسکستان، رامسر و رامیان متغییر بود. در تجزیه و تحلیل اجزای تشکیل دهنده اسانس ۳۹ ترکیب ترپنوئیدی شناسایی شد. بخش مهمی از اجزای تشکیل دهنده اسانس متعلق به دو گروه مونوترپن‌های هیدروکربنی و مونوترپن‌های اکسیژنی بود و در این بین سابینن (۵۸ درصد)، آلفا-ترپینئول (۹ درصد)، آلفا-پینن (۶/۹ درصد)، بتا-میرسن (۴/۳ درصد) در نمونه توسکستان، سابینن (۴۹/۸ درصد)، آلفا-ترپینئول (۹/۲ درصد)، آلفا-پینن (۷/۶ درصد)، المول (۴/۲ درصد) در نمونه رامیان و میرتنیل-استات (۷۲/۶ درصد)، سابینن (۱۲/۵ درصد)، آلفا-پینن (۲/۸)، ۴-ترپینئول (۲/۲ درصد) در نمونه رامسر اصلی‌ترین ترپنوئیدها را شامل شدند. میرتنیل-استات اصلی ترین شاخص تنوع در بین جمعیت‌ها بشمار آمد و به همین دلیل نمونه‌های گیاهی رامسر از نظر کموتایپی با دو توده دیگر که کموتایپ سابیننی بودند متفاوت بوده و در گروه کموتایپی میرتنیل استاتی قرار گرفت.

کلمات کلیدی: ارس، ترپنوئید، سابینن، گیاهان دارویی، مواد موثره

مقدمه

سرو کوهی با نام علمی *Juniperus* spp. متعلق به خانواده Cupressaceae با پراکنش وسیعی در نیم‌کره شمالی وجود دارد (Adams 2014). این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی و ژنوتیپ ارزشمند در ایران محسوب می‌شود و معمولا به صورت درختچه‌ای کوتاه و خزنده در ارتفاعات و مناطق مرزی جنگل‌ها می‌روید (Sadeghi-Aliabadi *et al.*, 2009).

ارزش دارویی و کاربردهای متنوع سرو کوهی باعث شده تا مورد توجه محققان قرار گیرد. از مهم‌ترین خواص فارماکولوژیک آن می‌توان به فعالیت‌های آنتی میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ادرار آور، ضد فسادپذیری، ضد رماتیسم، ضد صرفه، ضد التهاب، سقط جنین و ضد درد اشاره کرد (Nikolic *et al.*, 2016). تا کنون پژوهش‌های متعددی در رابطه با شناخت پتانسیل بالقوه گیاهان این خانواده در تولید ترکیبات ثانویه خصوصا ترپنوئیدها صورت گرفته است. نتایج اکثر مقالات ارائه شده بیانگر شباهت نزدیک پروفایل اسانس در بین اعضای خانواده Cupressaceae می‌باشد.

طی گزارشی توسط Radoukova و همکاران (۲۰۱۸) تنوع ترکیبات سه گونه مختلف سرو کوهی در رویشگاهای متفاوت بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که آلفا-پینن، سابینن و گاما-ترپینن و بتا-فلاندرن در گونه *J. communis* و *J. pygmaea* و آلفا-پینن، کارن و لیمونن در گونه *J. sibirica* مهم ترین اجزای سازنده اسانس بودند. در پژوهشی

IrHC2019

مشابه ترکیبات اسانس برگ گونه *J. rigida* مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۴۸ ترکیب متفاوت آشکار گردید که آلفا-پینن، کاریوفیلن، لیمونن، آلفا-میرسن، سیمن و آلفا-ترپینیل-استات مهم‌ترین ترپنوئیدهای متشکله را شامل شدند (Liu *et al*., 2019). از سوی دیگر، Emami و همکاران (۲۰۰۹) ترکیبات اسانس را در پایه‌های نر و ماده *J. sabina* بررسی کردند. تعداد ۲۵-۲۶ ترکیب در اسانس هر دو پایه کشف شد که اصلی‌ترین مونوترپن‌های موجود به ترتیب شامل سابینن، ترنس-سابینیل استات، کارن، لیمونن، آلفا-پینن و بتا-پینن بودند. به طور کلی نتایج تعدادی از تحقیقات نشان داده که این دسته از ترکیبات دارای ثبات نبوده و ممکن است در شرایط مختلف از نظر کمی و کیفی تغییر کند. لذا جهت شناخت بیشتر این موضوع Salehi Shanjani و همکاران (۲۰۱۰) اثر خشک کردن و فصل جمع‌آوری گیاه بر ترکیبات سازنده اسانس در گونه *J. excelsa* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که عملکرد اسانس در مخروط‌های بالغ به میزان ۱۶۲ درصد از بهار تا پاییز افزایش می‌یابد. درحالی که مقدار آلفا-پینن به عنوان اصلی ترین ترکیب این گیاه درطول تابستان کاهش یافت. همچنین در مقایسه اسانس سرشاخه و مخروط خشک و تازه تغییرات زیادی در مقدار ترکیبات آشکار شد. به طوری که بعد از خشک کردن میزان آلفا-پینن در سرشاخه و مخروط کاهش ولی میزان برخی دیگر از ترکیبات نیز افزایش یافت. لذا با توجه به مطالعات صورت گرفته پیرامون تنوع ترکیبات در گونه‌های متفاوت *Juniperus*، پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ترکیبات اسانس سرشاخه پایه ماده *J. sabina* در سه رویشگاه توسکستان و رامیان از استان گلستان و رامسر از استان مازندران انجام شد.

مواد و روش ها

در ابتدا با مطالعه فلور گیاهی ایران سه رویشگاه اصلی این گونه انتخاب و از هر رویشگاه در سه تکرار از گیاهان میوه‌دار نمونه‌گیری شد (جدول ۱). پس از جمع آوری نمونه‌ها مواد گیاهی در دمای محیط خشک شدند. سپس با کلونجر اسانس گیری به روش تقطیر با آب به مدت ۲ ساعت انجام شد.

تجزیه و تحلیل GC-FID و GC-MS

آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل TRACE GC ساخت شرکت Thermoquest-Finnigan مجهز به آشکار ساز FID (یونیزاسیون شعله هیدروژن) با ستون متحرک سیلیس Rtx-5 (۳۰متر طول × ۰/۲۵ قطر لایه داخلی، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون) انجام شد. نیتروژن به عنوان گاز حامل با جریان ثابت ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. دمای آون در دمای ۶۰°C برای ۱ دقیقه و سپس با سرعت ۴ درجه سانتیگراد در دقیقه با ۲۵۰°C برنامه ریزی شد.دمای انژکتور و آشکارساز (FID) به ترتیب در ۲۵۰°C و ۲۸۰°C ثابت شد.

IrHC2019

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی هر یک از نقاط نمونه‌برداری شده

استان	منطقه	موقعیت جغرافیایی	ارتفاع (متر)	میزان بارندگی سالیانه (میلی متر)	میانگین دما (°C)
گلستان	توسکستان	۳۶ درجه، ۴۰ دقیقه، ۱۰ثانیه شمالی ۵۴ درجه، ۳۳ دقیقه، ۵۱ ثانیه شرقی	۲۳۴۳	۵۸۳/۸	۱۷/۸
گلستان	رامیان	۳۶ درجه، ۵۰ دقیقه، ۵۳ ثانیه شمالی ۵۵ درجه، ۱۷ دقیقه، ۳۳ ثانیه شرقی	۲۸۴۲	۴۵۶/۲	۱۸/۶
مازندران	رامسر	۳۶ درجه، ۵۱ دقیقه، ۰۸ ثانیه شمالی ۵۰ درجه، ۲۶ دقیقه، ۵۳ ثانیه شرقی	۲۳۵۰	۱۲۰۶/۲	۶۱/۱

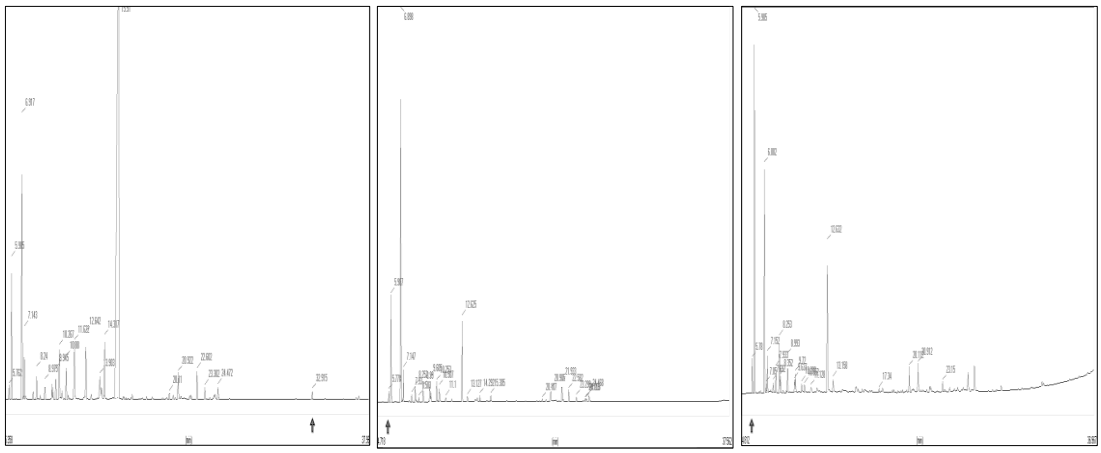
برای آنالیز اسانس با هدف شناسایی اجزای تشکیل دهنده از دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف سنج جرمی مدل TRACE GC-MS ساخت شرکت Thermoquest-Finnigan مجهز به ستون سیلیس (۳۰متر طول × ۰/۲۵ قطر لایه داخلی، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون) استفاده شد. دمای کوره از ۶۰°C تا ۲۵۰°C با سرعت ۴°C در دقیقه تنظیم شد و سپس در دمای ۲۵۰°C در مدت ۱۰ دقیقه ثابت گردید. طیف سنج جرمی چهاربعدی در طول ۴۵ تا ۴۶۵ آمو با یک ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ ولت و جریان یونیزاسیون ۱۵۰ مگاوات اسکن شد.

نتایج و بحث

بازده اسانس در سه رویشگاه رامسر، توسکستان و دیلمان به ترتیب ۱/۳۴، ۱/۶۶ و ۰/۷۱ بدست آمد. در مجموع ۳۹ ترکیب از اسانس‌های موجود آشکار شد که مونوترپن‌های هیدروکربنی و مونوترپن‌های اکسیژن دار بخش اعظم ترکیبات را شامل شدند. تعداد ۹ ترکیب سابینن (۵۸ درصد)، آلفا-ترپینئول (۹ درصد)، آلفا-پینن (۶/۹ درصد)، بتا-میرسن (۴/۳ درصد)، گاماترپینن (۳/۸ درصد)، آلفا-ترپینن (۲/۳ درصد)، المول (۲/۳ درصد)، ۳-تویون (۲ درصد) و لیمونن (۱/۸ درصد) در منطقه توسکستان، ۸ ترکیب سابینن (۴۹/۸ درصد)، آلفا-ترپینئول (۹/۲ درصد)، آلفا-پینن (۷/۶ درصد)، المول (۴/۲ درصد)، بتا-میرسن (۳/۵ درصد)، بورنیل-استات (۳/۳ درصد)، بتا-کادینن (۲/۳) و ترنس-سابینن-هیدرات (۲/۱ درصد) در منطقه رامیان و ۵ ترکیب میرتنیل-استات (۷۲/۶ درصد)، سابینن (۱۲/۵ درصد)، آلفا-پینن (۲/۸)، ۴-ترپینئول (۲/۲ درصد) و بتا-میرسن (۲ درصد) در منطقه رامسر به عنوان اصلی‌ترین اجزاء اسانس به شمار آمدند. شکل ۱ چندشکلی موجود در نمونه‌ها را به خوبی نشان می‌دهد که با نتایج Adams و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت دارد. آنها اذعان داشتند که سابینن به عنوان ترکیب اصلی بوده ولی ترانس-سابینن-استات در برخی توده‌ها شاخص ایجاد تنوع شده است. آنچه که از نتایج استنباط می‌شود، ساختار شیمیایی اسانس‌ها در ابتدا ارتباط مستقیم با ساختار ژنتیکی دارد و واضح است که این امر یکی از اصلی‌ترین دلایل تفرق صفات در بین گیاهان محسوب می‌شود اما سایر عوامل همچون فصل و زمان برداشت، موقعیت جغرافیایی و شرایط حاکم بر محل رشد گیاه اعم از نوع خاک، آب وهوا، ارتفاع از سطح دریا، میزان بارندگی و رطوبت منطقه می‌تواند منجر به تغییرات جدی در ترکیبات اسانس شود (Andrade *et al.*, 2011). همچنین Kiazolu و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که تفاوت‌های کمی و کیفی ترکیبات اسانس در رویشگاه‌های مختلف می‌تواند اثر مستقیم و یا غیر مستقیم عوامل محیطی و خصوصیات اقلیمی باشد. با این وجود، آنچه که از اطلاعات هواشناسی حاصل شده، تفاوت عمده رویشگاه‌های مورد بررسی در میزان رطوبت و بارندگی است به طوری که میزان بارندگی در رویشگاه رامسر به طور تقریبی دو برابر رویشگاه‌های دیگر در استان گلستان است. لذا به نظر می‌رسد تفاوت ایجاد شده در پروفایل اسانس این نمونه به دلیل رطوبت بالای این رویشگاه باشد. البته این نتیجه‌گیری می‌تواند تحت شعاع کموتایپ قرار گیرد. به نظر می رسد تفاوت آب و هوایی در طول سالها سبب ایجاد تفاوت کموتایپی

IrHC2019

شده است. برای درک بیشتر این موضوع و اینکه تفاوت مشاهده شده ژنتیکی است یا محیطی پیشنهاد می‌شود که گیاهان مورد نظر در یک منطقه واحد مورد بررسی قرار گیرند.



شکل ۱- کروماتوگرام حاصل از تجزیه اسانس‌ها با استفاده از GC و GC-MS

الف) توسکستان ب) رامیان ج) رامسر

منابع

Adams, R.P. 2014. Junipers of the World: The genus Juniperus. 4th Edition. Trafford Publishing Co., Bloomington, IN, USA and Canada. 1- 442.

Adams, R. P., Mataraci, T. and Tashev, A. N. 2018. The composition of the leaf essential oils of *J. sabina var. balkanensis*: chemotypes high in transsabinyl acetate and methyl eugenol discovered in three natural populations. Phytologia, 100(1): 45-50.

Andrade, E.H.A., Alves, C.N., Guimaraes, E.F., Carreira, L.M.M. and Maia, J.G.S. 2011. Variability in essential oil composition of Piper dilatatum LC Rich. Biochemical systematics and ecology, 39(4-6): 669-675.

Emami, S.A., Shahidi, N.H. and Hassanzadeh-Khayyat, M. 2009. Antioxidant activity of the essential oils of different parts of *Juniperus sabina* L. and *Juniperus foetidissima* Willd (Cupressaceae). Int J Essent Oil Ther, 3:163-170.

Kiazolu, J.B., Intisar, A., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, R., Wu, Z. and Zhang, W. 2016. Phytochemical screening and chemical variability in volatile oils of aerial parts of *Morinda morindoides*. Natural product research, 30(19): 2249-2252.

Liu, Z., Kuang, S., Qing, M., Wang, D. and Li, D. 2019. Metabolite profiles of essential oils and SSR molecular markers in *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc. from different regions: A potential source of raw materials for the perfume and healthy products. Industrial Crops and Products, 133: 424-434.

Nikolic, B., Vasiljevic, B., Mitic-Culafic, D., Vukovicgacic, B., Knezevic-vukcevic, J., Lesjak, M. and Mimica Dukic, N. 2016. Screening of the antibacterial effect of *Juniperus sibirica* and *Juniperus sabina* essential oils in a microtitre platebased MIC assay. Botanica Serbica, 40(1): 43-48.

Radoukova, T., Zheljazkov, V.D., Semerdjieva, I., Dincheva, I., Stoyanova, A., Kačániová, M., Marković, T., Radanović, D., Astatkie, T. and Salamon, I. 2018. Differences in essential oil yield, composition, and bioactivity of three juniper species from Eastern Europe. Industrial crops and products, 124(1): 643-652.

Sadeghi-aliabadi, H., Emami, A., Sadeghi, B. and Jafarian, A., 2009. In vitro cytotoxicity of two subspecies of *Juniperus excelsa* on cancer cells. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 11(4): 250-253.

Shanjani, P.S., Mirza, M., Calagari, M. and Adams, R.P., 2010. Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*. Industrial Crops and Products, 32(2): 83-87.

IrHC2019

Investigation of the diversity of *Juniperus sabina* essential oil compounds in different habitats

A. Ghorbanzadeh[1]*, A. Ghasemnejad[1], S. N. Ebrahimi[2], M. K. Sarmast[1]
[1*] Department of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan
[2] Research Institute of Medicinal Plants, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[*]*Corresponding Author: A.ghorbanzadeh2170@gmail.com*

Abstract

Juniperus is one of the most important medicinal plants among the conifers with a special potential in the production of secondary metabolites. The present study was carried out with the aim of further understanding of *J. sabina* species from the perspective of diversity in essential oil combinations in three habitats of Ramsar, Tooskestan and Ramyan. Plants were collected in May from mature plants and immediately the plant material was dried at room temperature. Then the extraction of the essential oil was done by distillation with water. To analyze the compounds of each of the essential oils, the gas chromatography (GC) and Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) were used. Finally, the results of the two devices were adapted to identify the compounds. The results of this study showed that the essential oil yield was 1.66%, 1.34%, and 0.71%, based on dry weight in Tooskestan, Ramsar and Ramyan, respectively. In the analysis of the essential oil compounds, 39 compounds were revealed. The highest amount of essential oil constituent belongs to the two groups of monoterpenes hydrocarbones and oxygenated monoterpenes. Sabinene (58%), α-terpineol (9%), α-pinene (6.9%), β-myrcene (4.3%) in Tooskestan, sabinene (49.8%), α-terpineol (9.6%), α-pinene (6.6%), elemol (4.2%) in Ramyan and myrtenyl-acetate (72.6%), sabinene (12.5%), α -Pinene (2.8%), 4-terpineol (2.2%) in the Ramsar sample included the most important terpenes. Myrtenyl-acetate was the main index of diversity among the populations, therefore, Ramsar's samples were chemotapically differentiated in the Miterhenyl-acetate chemotype group and differed from the other two groups which were sabinene chemotype.

Keywords: Medicinal plants, Sabinene, Secondary metabolites, Terpene, Juniper

IrHC2019