

بررسی و مقایسه فیتوشیمیایی اسانس و عملکرد آنتی‌اکسیدانی سرشاخه‌های گیاه دارویی *Juniperus Sabina L.* در رویشگاه‌های مختلف مازندران و گلستان

امیر قربان‌زاده^۱، عظیم قاسم‌نژاد^{۲*}، مصطفی خوشحال‌سرمست^۳، صمد نژادابراهیمی^۴

^۱ کارشناس ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۲ دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۳ استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۴ استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۲۵

چکیده

گیاه *Juniperus sabina L.* از جمله گیاهان دارویی ارزشمند شمال ایران است که از اثرات فارماکولوژیکی بسیاری از جمله خواص ضدسرطانی، ضد مالاریا و ضد باروری برخوردار است. پژوهش حاضر باهدف ارزیابی فیتوشیمیایی اسانس و عملکرد آنتی‌اکسیدانی سرشاخه‌های گیاه مای‌مرزدر دو استان گلستان و مازندران انجام شد. نمونه‌ها از سه رویشگاه رامسر، رامیان و توسکستان در فصل تابستان سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و شناسایی ترکیبات با استفاده از دستگاه GC-FID و GC-MS انجام شد. از دو روش DPPH و TAOC جهت بررسی توانمندی آنتی‌اکسیدانی و روش رنگ‌سنجی (فولین - سیکالچو) جهت سنجش فنل کل استفاده شد. بیشترین مقدار فنل کل در نمونه رامسر (mg GAE/g 194 ± 0.333)، مهار رادیکال DPPH در نمونه رامیان ($4/99 \pm 43/1$ درصد) و آنتی‌اکسیدان کل در نمونه توسکستان ($19/05 \pm 0.12$) میلی‌گرم اسکوربیک اسید در گرم وزن خشک) مشاهده شد. اگرچه درصد اسانس و توانمندی آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های مناطق مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشتند، با این وجود تغییرات اجزای اسانس به ویژه ترکیبات قالب کاملاً متفاوت بود. مقدار ساینین به‌عنوان ترکیب غالب در سه رویشگاه مذکور به ترتیب ۱۲/۵، ۴۹/۸ و ۵۸ درصد بود. نکته قابل توجه در این پژوهش وجود ترکیب میرتنیل - استات به مقدار ۷۲/۶ درصد در نمونه رامسر بود که تاکنون در رابطه با این گیاه گزارش نشده است. با توجه به تفاوت بارز مشاهده شده در ترکیب اسیدهای چرب ضروری اسانس مای‌مرز رامسر، پیشنهاد می‌گردد که این توده گیاهی به دقت بیشتری مورد بررسی قرار گرفته و ممکن است در آینده به عنوان کموتاییپ از مای‌مرز معرفی گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ترپنوئید، ساینین، گلستان، میرتنیل - استات.

مقدمه

نشان می‌دهد که این گیاهان منبع غنی از تربنوتیدهایی همچون، آلفا-پینن، بتا-پینن، لیمونن، ساینن، آلفا-سدرول، جرماکرین و تربیننول هستند (Hojjati et al., 2019). همچنین در بررسی ترکیبات تربنوتیدی سرشاخه و مخروط‌های *J. Sabina* نشان داده شد که میزان ساینن به عنوان اصلی‌ترین ترکیب در این گونه تا حد ۴۸/۶ درصد بود (Asili et al., 2010). علاوه بر این، آلفا-پینن (۸/۱ درصد) و میرسن (۱۰/۸ درصد) از دیگر ترکیباتی بودند که از غلظت نسبتاً بالایی برخوردار بود (Asili et al., 2010). در یک بررسی مشابه ساینن به مقدار ۶۵/۹ درصد در اسانس استخراج شده از میوه وجود داشت (Asgary et al., 2013).

رادیکال‌های آزاد مولکول‌های واکنشی هستند که در بسیاری از روندهای فیزیولوژیکی باعث ایجاد بیماری‌های گوناگون به واسطه صدمه به سلول‌ها و لیپیدها می‌شوند (Rabeta and Nur, 2013). در صورتی که تعداد رادیکال‌های آزاد در بدن موجود زنده بیشتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها باشد، آسیب‌های اکسیداتیو به اندام‌ها، بافت‌ها و یا مولکول‌ها و در نتیجه بروز بیماری‌های متعددی خصوصاً بیماری‌های عفونی رخ خواهد داد (Patel and Patel, 2011; Xu et al., 2017). در بین گستره ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فنل‌ها در جایگاه ویژه‌ای قرار دارند. این گروه از مواد مؤثره که در پیکره برخی از گیاهان دارویی وجود دارند به دلیل دارا بودن قدرت احیاکنندگی بالا که به ساختار شیمیایی آن‌ها مرتبط است، قادر هستند رادیکال‌های آزاد را به فرم خنثی تبدیل کنند. در واقع انعکاس عمل فنل‌ها به نوعی با اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد و مهار واکنش‌های اکسیداسیون اتفاق می‌افتد (Pokorný, 2007). تاکنون تعدادی از محققان میزان توانمندی مهار رادیکال‌های آزاد را در برخی از گونه‌های ارس بررسی کرده‌اند (Emami et al., 2007);

استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های بسیاری از گیاهان در سال‌های اخیر به دلیل دارا بودن مواد مؤثره دارویی و فعالیت‌های زیستی آن‌ها در صنایع ارزشمندی منجمله صنایع دارویی و غذایی مورد اهتمام ویژه قرار گرفته است (Emam et al., 2009). سوزنی‌برگان (مخروط‌داران) سهم قابل توجهی از تولید این ترکیبات معجزه‌گر را به خود اختصاص داده‌اند که اغلب اثرات فارماکولوژیکی جدیدی از آن‌ها کشف می‌شود. ارس (*Juniperus spp.*) یکی از بارزترین گیاهان این راسته است که به خانواده Cupressaceae تعلق دارد. از مجموع ۶۰ گونه مختلف ارس در جهان، تنها ۵ گونه *J. oblonga*، *J. foetidissima*، *J. sabina*، *J. communis* و *J. excels* در ایران یافت می‌شوند (Korouri et al., 2011). گونه *J. Sabina* به فرم خزنده رشد می‌کند و دارای برگ‌های فلسی شکل می‌باشد. این گیاه معمولاً به دو فرم تک‌پایه و دوپایه قابل مشاهده بوده و با نام فارسی مای‌مرز برای عموم شناخته شده است (Emami et al., 2011b).

امروزه این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. خواص دارویی مهمی همچون ضدپارکینسون (Bais et al., 2015) ضددیابت (Banerjee et al., 2013) و ضدباکتری (Zheljazkov et al., 2018) برای این گیاه گزارش شده است. همچنین لیگنان‌های موجود در این گیاه خاصیت ضد توموری نشان داده‌اند (Emami et al., 2009). علاوه بر مواد مؤثره مذکور، پودوفیلوتوکسین که یکی از پرکاربردترین ترکیبات موجود در صنعت پزشکی بشمار می‌آید، در عصاره گونه *J. sabina* کشف شد که عامل جلوگیری کننده از تقسیم سلولی در این گیاه به‌شمار آمد (Xie et al., 2017). مطالعات انجام‌شده

نمونه‌برداری از سرشاخه‌های جوان و هوایی گیاه صورت گرفت. نمونه‌ها در تابستان ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. در مجموع ۳ رویشگاه با ۳ تکرار برداشت گردید. مشخصات هر یک از رویشگاه‌ها در آمده است. پس از نمونه‌برداری، بافت‌های گیاهی جهت بررسی‌های مدنظر به آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد و به دور از نور خورشید در دمای محیط خشک گردید.

استخراج اسانس: استخراج اسانس به روش تقطیر با آب^۳ و با استفاده از کلونجر به مدت ۲ ساعت انجام شد. کلیه اسانس‌ها با استفاده از سولفات سدیم آبیگری شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور تا هنگام آنالیز ترکیبات ذخیره شدند (Dahmane et al., 2015).

تجزیه و آنالیز اسانس به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی^۴ (GC-FID): آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل TRACE GC ساخت شرکت Thermoquest-Finnigan مجهز به آشکارساز FID (یونیزاسیون شعله هیدروژن) مجهز به ستون موئینه با فاز ساکن پلی دی متیل سیلوکسان^۵ با ۵ درصد فیل Rtx-5 (۳۰ متر 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 میلی‌لیتر در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. دمای اون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و سپس با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه با ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد برنامه‌ریزی شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز (FID) به ترتیب در ۲۵۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد ثابت شد.

توانمندی (Loizzo et al., 2007; Orhan et al., 2011) آنتی‌اکسیدانی تعدادی از توده‌های ارس به دو روش فریک-تیوسیانات^۱ و تیوباریتوریک اسید^۲ (TBA) مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج حاکی از توانمندی بالای گونه‌های ارس بود (Emami et al., 2007). میزان پتانسیل مهار رادیکال‌های آزاد در دو گونه *J. Foetidissima* و *J. sabina* مورد مقایسه قرار گرفت که هر دو گونه توانمندی بالا آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. محققان اذعان داشتند که اسانس و عصاره‌های این گیاه می‌تواند به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Emami et al., 2009). اگرچه در ایران تحقیقات چندی در زمینه شناسایی بهتر این گیاهان ارزشمند صورت مورد گرفته است، با این وجود در زمینه توانمندی آنتی‌اکسیدانی و همچنین مقایسه پتانسیل تولید ترکیبات اسانس در رویشگاه‌های شمالی کشور تحقیقی صورت نگرفته است. لذا در پژوهش حاضر سعی شده به دلیل اهمیت بالای گیاه‌های مرز در صنایع مختلف، ارزیابی تنوع ترکیبات اسانس در بین برخی از اصلی‌ترین رویشگاه‌های این گیاه صورت گیرد. همچنین میزان توانایی عصاره سرشاخه در مهار رادیکال‌های آزاد و تولید ترکیبات فنلی از جمله مهم‌ترین اهداف این پژوهش مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی کمیت و کیفیت اسانس، توانمندی آنتی‌اکسیدانی و سنجش میزان فنل کل برخی گونه‌های ارس، پس از مطالعه فلور گیاهی ایران و شناسایی رویشگاه‌های اصلی این گیاه برای نمونه‌برداری به مناطق رویشی مراجعه شد و

3Hydrodistillation
4Gas Chromatography-Flame Ionization
Detector
5Polydimethylsiloxane

1Ferric thiocyanate
2Thiobarbituric Acid

جدول ۱: مشخصات هر یک از رویشگاه‌های نمونه‌برداری شده از ۳ جمعیت مای مرز *J. sabina*

رویشگاه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع	علائم اختصاری
گلستان، توسکستان	۵۴ درجه، ۳۳ دقیقه، ۵۱ ثانیه شرقی	۳۶ درجه، ۴۰ دقیقه، ۱۰ ثانیه شمالی	۲۳۴۳	JST
مازندران، رامسر	۵۰ درجه، ۲۶ دقیقه، ۵۳ ثانیه شرقی	۳۶ درجه، ۵۱ دقیقه، ۰۸ ثانیه شمالی	۲۳۵۰	JSR1
گلستان، رامیان	۵۵ درجه، ۱۷ دقیقه، ۳۳ ثانیه شرقی	۳۶ درجه، ۵۰ دقیقه، ۵۳ ثانیه شمالی	۲۸۴۲	JSR2

تهیه عصاره هیدروالکلی: جهت بررسی توانمندی آنتی‌اکسیدانی و سنجش میزان فنل کل در ابتدا نیاز به تهیه عصاره بود. برای این منظور از بافت خشک نسبتاً پودر شده به همراه متانول ۸۰ درصد به نسبت ۱ به ۱۰ مخلوط گردید. پس از مخلوط حلال با ماده گیاهی، ظروف به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر گذاشته شد. سپس محلول آماده‌شده از کاغذ صافی گذرانده شد و عصاره نهایی در هرکدام از آزمایش‌ها بکار گرفته شد.

اندازه‌گیری فنل کل: محتوی فنل کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی Folin-ciocaltue مورد آزمایش قرار گرفت و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری UV-Vis 28000 اندازه‌گیری شد. بدین صورت که به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها، ۲ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو ۱۰ درصد و پس از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد کربنات سدیم به آن اضافه شد. بعد از گذشت ۲ ساعت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد (Wojdyło et al., 2007). جهت رسم منحنی کالیبراسیون از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد و میزان فنل کل براساس "میلی‌گرم گالیک اسید در گرم" (mg GAE/g dw) گزارش گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی با استفاده از ۲-۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمونه شاهد بجای عصاره از محلول

تجزیه و آنالیز اسانس به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنج جرمی (GC-MS): برای آنالیز اسانس با هدف شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده آن از دستگاه کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنج جرمی مدل TRACE GC-MS ساخت شرکت Thermoquest-Finnigan سیلیس مجهز به ستون موئینه با فاز ساکن پلی دی متیل سایلوکسان با ۵ درصد فنیل (۳۰ متر طول \times ۰/۲۵ قطر لایه داخلی، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون) استفاده شد. دمای آون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تنظیم شد و سپس در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۰ دقیقه ثابت گردید. طیف‌سنج جرمی چهار بعدی در طول ۴۵ تا ۴۶۵ آموبایک ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ ولت و جریان یونیزاسیون ۱۵۰ مگاوات اسکن شد.

شناسایی ترکیبات اسانس: شناسایی ترکیبات اسانس‌ها با محاسبه شاخص نگهداری در دمای تنظیم شده شرایط ان-آلکان (C9-C24) و اسانس بر ستون Rtx-5 تحت شرایط یکسان انجام شد. به‌منظور شناسایی دقیق ترکیبات، طیف جرمی هر کدام با کتابخانه طیف جرمی با استفاده از NIST98، کتابخانه آدامز (Adams, 2007) و مقایسه شاخص نگهداری سایر اسناد مورد مقایسه قرار گرفت. کمیت داده‌ها از درصد سطح FID بدون استفاده از شاخص تصحیح بدست آمد.

1 Gas chromatography-mass spectrometry

محاسبات آماری: آزمایش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار صورت پذیرفت. داده‌های به‌دست آمده از آزمایشات مذکور در ۹ جمعیت مختلف ارس با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین اعداد به‌دست آمده با آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵ درصد محاسبه و گزارش گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2016 استفاده شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس فاکتورهای اندازه‌گیری شده در جمعیت‌های مای‌مرز در آمده است. جمعیت‌های مای‌مرز از نظر میزان ترکیباتی نظیر ۳-تویون، ساینین، بتا-میرسن، آلفا-ترپینن، سیکما-ترپینن، آلفا-ترپینول، میرتنیل استات و ۴-ترپینول در سطح ۰/۰۱ و از نظر درصد اسانس و بتا-کادینن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری با هم داشتند. درحالی که آلفا-پینن، لیمونن و المول به عنوان دیگر ترکیبات مهم از این گروه در بین جمعیت‌ها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین درصد اسانس، فنل کل، میزان مهار رادیکال DPPH و آنتی‌اکسیدان کل (TAOC) در بین جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

استخراج اسانس: استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و با استفاده از کلونجر به مدت ۲ ساعت انجام شد. کلیه اسانس‌ها با استفاده از سولفات سدیم آگیری شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور تا هنگام آنالیز ترکیبات ذخیره شدند (Dahmane et al., 2015).

تجزیه و آنالیز اسانس به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-FID): آنالیز اسانس با

متانول ۸۰٪ استفاده شد. از هر عصاره ۳ تکرار در نظر گرفته شد. پس از آماده کردن محلول DPPH به غلظت ۰/۰۰۴ درصد، ۱ میلی‌لیتر از عصاره به همراه ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH داخل لوله‌آزمایش ریخته شد و به‌شدت در دستگاه ورتکس تکان داده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری UV عدد جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و ثبت شد. درصد بازدارندگی DPPH با مقایسه نمونه عصاره و نمونه شاهد با استفاده از فرمول زیر به دست آمد (Jahan et al., 2018):

$$AA(\%) = \left[\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

که در اینجا AA درصد مهار رادیکال‌های آزاد (برحسب درصد) A_{blank} : جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر به جای محلول نمونه با محلول DPPH مخلوط شد) و A_{sample} : جذب نمونه می‌باشد.

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل TAOC: مقدار توانمندی آنتی‌اکسیدان کل به روش سان و همکاران (Sun et al., 2011). مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه‌ی معرف TAOC از اسیدسولفوریک (H_2SO_4) ۰/۶ مولار، سدیم فسفات (Na_3PO_4) ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ($N_6H_{24}Mo_7O_{24}$) ۴ میلی‌مولار استفاده شد. به یک میلی‌لیتر از عصاره‌ی متانولی مقدار یک میلی‌لیتر معرف TAOC اضافه شد. پس از ورتکس کردن، لوله‌های آزمایش به مدت ۹۰ دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری انکوبه شد. پس از طی این مدت زمان و بلافاصله بعد از سرد شدن نمونه‌ها، عدد جذب آن‌ها نسبت به شاهد در طول موج ۶۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد در این روش از اسکوربیک‌اسید ($C_6H_8O_6$) استفاده شد و اعداد بر اساس معادل میلی‌گرم اسکوربیک‌اسید در گرم وزن خشک گیاه بیان شد.

1 Hydrodistillation
2 Gas Chromatography-Flame Ionization Detector

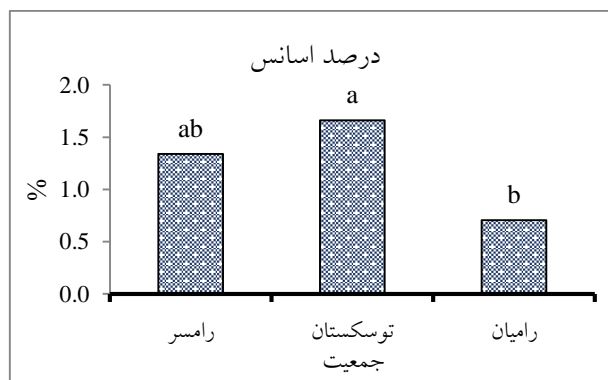
۱/۱ میلی لیتر در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. دمای آون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و سپس با سرعت ۴ درجه سانتی گراد در دقیقه با ۲۵۰ درجه سانتی گراد برنامه ریزی شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز (FID) به ترتیب در ۲۵۰ و ۲۸۰ درجه سانتی گراد ثابت شد.

استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل TRACE GC ساخت شرکت Thermoquest-Finnigan مجهز به آشکارساز FID (یونیزاسیون شعله هیدروژن) مجهز به ستون موئینه با فاز ساکن پلی دی متیل سیلوکسان با ۵ درصد فیل Rtx-5 (۳۰ متر طول × ۰/۲۵ قطر لایه داخلی، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرون) انجام شد. نیتروژن به عنوان گاز حامل با جریان ثابت

جدول ۲: تجزیه واریانس برخی از صفات فیتوشیمیایی بررسی شده در ۳ جمعیت *J. Sabina*

عوامل تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P-value
درصد اسانس	۱/۴۱۴	۲	۰/۷۰۷	۱۰/۶۶۷*	۰/۰۱۶
آلفا-توجون	۴/۴۹۶	۲	۲/۰۹۸	۲۰/۷۲۳**	۰/۰۰۲
آلفا-پینین	۴۰/۴۲۷	۲	۲۰/۲۱۳	۱/۹۲۹ ^{ns}	۰/۲۲۶
ساینین	۳۵۳۳/۷۴۹	۲	۱۷۶۶/۸۷۴	۵۳/۴۵۱**	۰/۰۰۰
بتا-میرسن	۸/۴۵۲	۲	۴/۲۲۶	۲۲/۶۰۲**	۰/۰۰۲
آلفا-تریپنین	۶/۲۴۵	۲	۳/۱۲۳	۲۱/۹۹۸**	۰/۰۰۲
لیمونن	۰/۴۰۵	۲	۰/۲۰۳	۱/۰۲۹ ^{ns}	۰/۴۱۳
سیکما-تریپنین	۱۶/۵۴۸	۲	۸/۲۷۴	۲۵/۴۹۵**	۰/۰۰۱
آلفا-تریپینول	۱۶۷/۱۴۳	۲	۸۳/۵۷۲	۴۲/۲۹۴**	۰/۰۰۰
میرتیل استات	۱۰۵۵۲/۱۷۱	۲	۵۲۷۶/۰۸۵	۱۵۵/۸۷۹**	۰/۰۰۰
۴-تریپینول	۱۰/۳۹۷	۲	۵/۱۹۸	۸۵/۶۴۱**	۰/۰۰۰
المول	۲۷/۳۷۴	۲	۱۳/۶۸۷	۱/۴۰۲ ^{ns}	۰/۳۱۷
بتا-کادینن	۸/۴۳۴	۲	۴/۲۱۷	۹/۴۵۴*	۰/۰۱۴
فنل کل	۰/۲۲۹	۲	۰/۱۱۵	۱/۰۹۳ ^{ns}	۰/۳۹۴
DPPH	۱۴۹/۴۴۵	۲	۷۴/۷۲۳	۳/۰۷۷ ^{ns}	۰/۱۲۰
TAOC	۰/۲۸۱	۲	۰/۱۴۱	۰/۵۷۱ ^{ns}	۰/۵۹۳

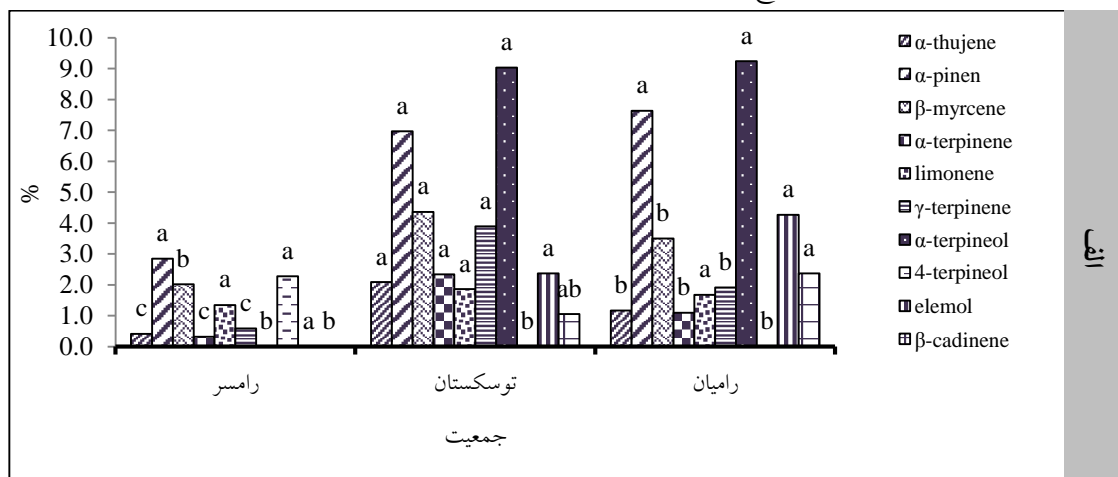
** تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۱ درصد، * تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ درصد، ^{ns} غیر معنی دار

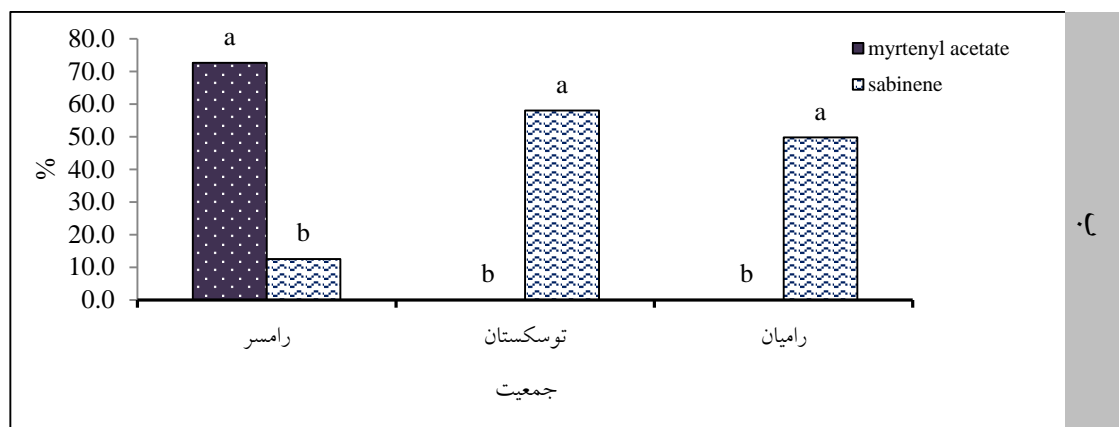


شکل ۱: مقایسه درصد اسانس حاصل از سرشاخه‌های برداشت شده *J. sabina* در رویگاه‌های مختلف

نشان داد که مقدار این مونوترپن در گونه *J. sabina* کمتر از ۱۰ درصد است. میزان این ترکیب در پژوهش حاضر در سه رویشگاه رامیان، توسکستان و رامسر به ترتیب ۷/۶، ۷ و ۲/۸ درصد بود. علاوه بر ترکیبات مذکور تعدادی دیگر از ترپنوئیدهای مهم در این پژوهش آشکار شدند که شامل ترکیبات زیر می‌شوند؛ آلفا-تویون (۰/۴ درصد)، بتا-میرسن (۲ درصد)، آلفا-ترپینن (۰/۳ درصد)، لیمونن (۱/۴ درصد)، سیکما-ترپینن (۰/۶ درصد)، ۴-ترپینئول (۲/۳ درصد)، آلفا-تویون (۱/۸ درصد) و آلفا-ترپینیل استات (۲/۲ درصد) از مهم‌ترین ترکیبات موجود در نمونه رامسر بودند. آلفا-تویون (۲/۱ درصد)، آلفا-ترپینن (۱/۱ درصد)، لیمونن (۱/۶ درصد)، سیکما-ترپینن (۱/۹ درصد)، سیس سابینن هیدرات (۱/۷ درصد)، آلفا-ترپینئول (۲/۹ درصد)، بورنیل استات (۳/۳ درصد)، المول (۴/۲ درصد) و جرماکرین-B (۱/۳ درصد) در نمونه رامیان از ترکیبات شاخص به حساب آمدند. همچنین آلفا-توجون (۲ درصد)، میرسن (۴/۳ درصد)، آلفا-ترپینن (۲/۳ درصد)، لیمونن (۱/۸ درصد)، سیکما-ترپینن (۳/۸ درصد)، ترنس سابینن هیدرات (۱/۳ درصد)، آلفا-ترپینئول (۹ درصد)، بتا-سیترونال (۹/۵ درصد) و المول (۲/۳ درصد) از جمله مهم‌ترین ترکیبات نمونه توسکستان بشمار آمدند. پروفایل کامل اسانس جمعیت‌های بررسی شده درآمده است.

درصد و تغییرات اجزای اسانس: درصد اسانس جمعیت‌های مورد مطالعه اگرچه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۱). به طوری که نمونه برداشت شده از توسکستان با مقدار ۱/۷ درصد نسبت به دو رویشگاه دیگر، درصد اسانس بالاتری را به خود اختصاص داد. کمترین درصد اسانس در نمونه رامیان (۰/۷ درصد) مشاهده شد. از مجموع ترپنوئیدهای آشکار شده در اسانس حاصل از سرشاخه‌های مای‌مرز ۱۲ مورد نسبت به سایر ترکیبات از مقدار بالاتری برخوردار بودند. سابینن به عنوان اصلی‌ترین ترکیب در این گیاه در بین جمعیت‌های مورد بررسی در نمونه توسکستان (۵۸/۰۳ درصد) با اختلاف معنی‌داری ($P=0.01$) نسبت به دو جمعیت دیگر در بالاترین مقدار بود. نمونه رامیان با ۴۹/۸۳ درصد و عدم معنی‌داری با نمونه توسکستان در ردیف دوم قرار داشت. کمترین مقدار سابینن متعلق به نمونه برداشت شده از رامسر (۱۲/۵) بود که در بین جمعیت‌ها از کمترین مقدار بود. در مقابل ترکیب میتریل استات با مقدار ۷۶/۲ درصد در نمونه رامسر بود به تنهایی بیشترین جزء تشکیل دهنده اسانس این گیاه در منطقه رامسر بود. نکته جالب توجه اینکه این ترکیب در دو جمعیت دیگر یافت نشده و تنها محدود به جمعیت رامسر است. آلفا-پینن از ترکیبات شاخص اسانس جمعیت‌های ارس می‌باشد. البته نتایج این پژوهش



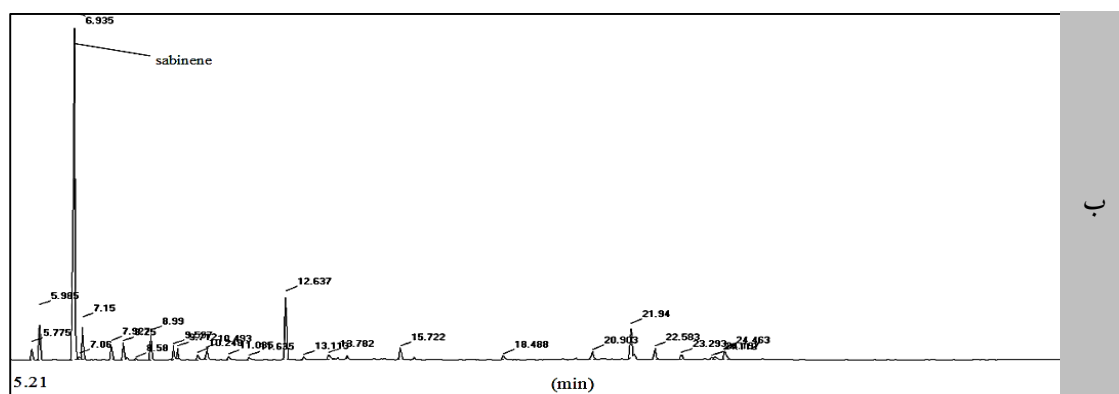
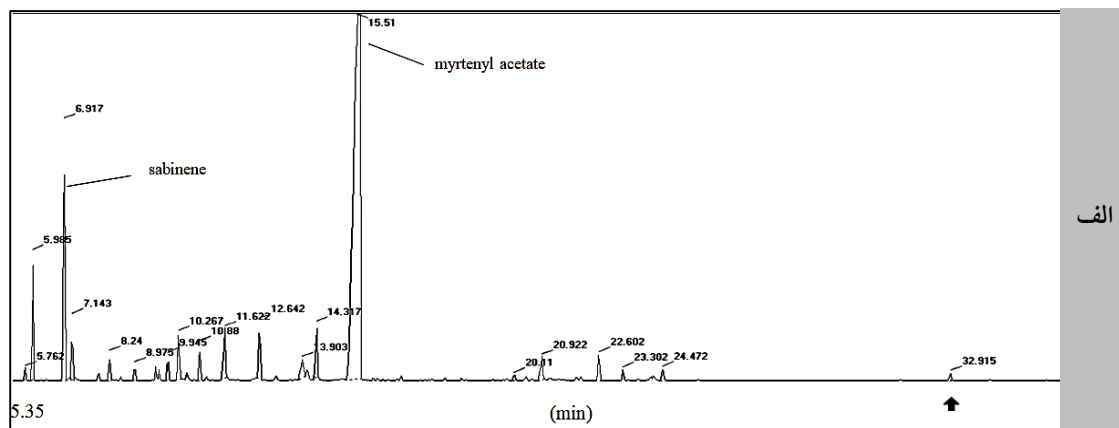


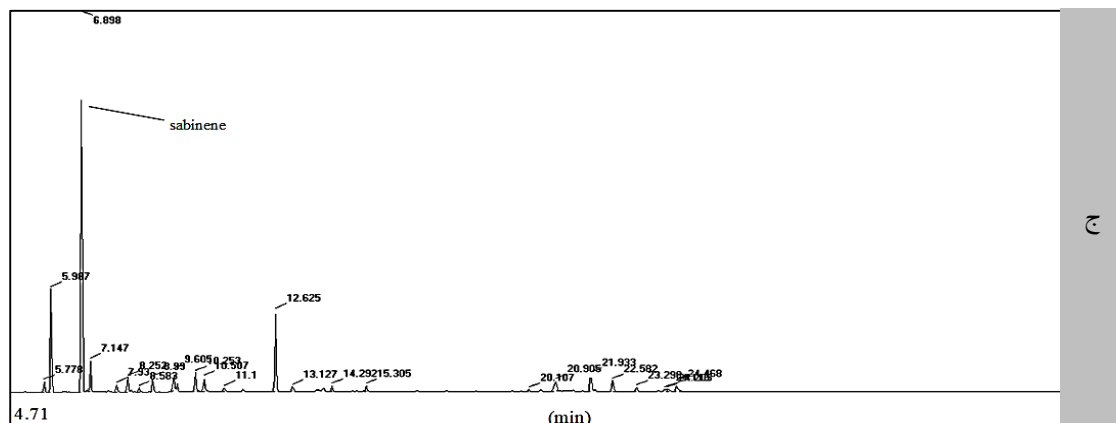
شکل ۲: مقایسه میانگین‌های برخی از مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس سرشاخه ۳ جمعیت ارس *J. sabina* الف: ترکیباتی که با غلظت کمتر از ۱۰ درصد مشاهده شدند ب: ترکیباتی که با غلظت بیش‌تر از ۱۰ درصد مشاهده شدند.

جدول ۳: مقایسه کمی و کیفی مهمترین مواد موثره اسانس در سه رویشگاه (ترکیبات اصلی که از غلظت بالاتری برخوردار هستند پر رنگ تر نشان داده شده است)

ردیف	ترکیب	شاخص بازداری	رامسر	رامیان	توسکستان
۱	α -thujene	۹۲۵	۰/۴	۱/۱	۲
۲	α -pinene	۹۳۳	۲/۸	۷/۶	۶/۹
۳	sabinene	۹۴۷	۱۲/۵	۴۹/۸	۵۸
۴	β -pinene	۹۷۷	-	۰/۳	۰/۲
۵	myrcene	۹۹۰	۲	۰/۵	۴/۳
۶	α -terpinene	۱۰۱۷	۰/۳	۱/۱	۲/۳
۷	limonene	۱۰۲۹	۱/۳	۱/۶	۱/۸
۸	β -ocimene	۱۰۴۷	-	۱/۵	۰/۲
۹	γ -terpinene	۱۰۵۹	۰/۵	۱/۹	۳/۸
۱۰	trans sabinene hydrate	۱۰۶۹	-	۱/۲	۱/۳
۱۱	α -terpinolene	۱۰۹۰	-	۱/۴	۰/۸
۱۲	cis sabinene hydrate	۱۱۰۲	-	۱/۷	۱
۱۳	α -thujone	۱۱۲۰	۱/۸	-	-
۱۴	α -terpineol	۱۱۸۲	-	۲/۹	۹
۱۵	β -citronellol	۱۲۳۰	-	۱	۹/۵
۱۶	methyl citronellate	۱۲۶۳	-	۰/۶	۰/۴
۱۷	bornyl acetate	۱۲۸۸	-	۳/۳	۰/۶
۱۸	myrtenyl acetate	۱۳۲۵	۷۲/۶	-	-
۱۹	α -terpinyl acetate	۱۳۳۰	۲/۲	-	-
۲۰	β -cubebene	۱۳۹۲	۰/۱	-	-
۲۱	trans-caryophyllene	۱۴۳۰	-	۰/۳	-
۲۲	trans-muuroala-3-5-diene	۱۴۵۲	۰/۲	-	-
۲۳	τ -muurolene	۱۴۷۶	۰/۱	-	-
۲۴	epi-bicyclosesqui phellandrene	۱۴۹۴	۰/۵۵	-	-

۲۵	α -muurolene	۱۵۰۳	۰/۱۱	-	-
۲۶	γ -cadinene	۱۵۱۸	۱/۱	۰/۲	۰/۳
۲۷	δ -cadinene	۱۶۲۶	۰/۶	-	-
۲۸	β -cadinene	۱۵۲۷	-	۲/۳	۱/۰
۲۹	elemol	۱۵۵۵	-	۴/۲	۲/۳
۳۰	germacrene B	۱۵۶۱	-	۱/۳	۰/۳
۳۱	isoaromadendreneepoxid	۱۶۱۶	-	۰/۴	۰/۴
۳۲	δ -cadinol	۱۶۳۸	۰/۳	۰/۶	-
۳۳	cubenol	۱۶۴۵	-	۰/۷	۰/۱
۳۴	β -eudesmol	۱۶۴۸	-	۰/۳	۰/۱
۳۵	α -eudesmol	۱۶۵۲	-	۰/۸	۰/۳
۳۶	elemol acetate	۱۶۷۱	-	۰/۵	۰/۵
۳۷	16-kaurene	۲۰۴۵	-	۰/۱	-
۴۰	مقدار کل	-	۹۹/۹	۹۸/۹	۹۹/۹





ج

شکل ۳: کروماتوگرام بدست آمده از اسانس سرشاخه مای مرز (*J. sabina*) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با طیف سنج جرمی. الف: رامسر ب: توسکستان ج: رامیان

اسکوربیک اسید در گرم وزن خشک بود. کمترین مقدار در نمونه رامسر و بیشترین مقدار در نمونه توسکستان مشاهده شد. اگرچه نمونه‌های بررسی شده از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری بدلیل تفاوت رویشگاه‌ها نداشتند، اما نتایج نشان داد که این گیاهان خصوصا از نظر مهار رادیکال DPPH دارای توانمندی بالایی هستند.

نتایج همبستگی ساده بین صفات: آنالیز همبستگی ساده صفات به منظور درک بهتر از همبستگی‌ها و وجود روابط بین اصلی‌ترین ترپنوئیدهای اسانس گیاه مای مرزو سایر صفات بررسی شده انجام شد. نتایج نشان داد که برخی از ترپنوئیدها دارای همبستگی بسیار بالایی هستند. ساینین از جمله ترکیباتی بود که با بتا-میرسن ($r=0/960$)، آلفا-ترپینین ($r=0/868$)، سیکما-ترپینین ($r=0/879$) و آلفا-ترپینول ($r=0/905$) همبستگی مثبت و معنی دار اما با میرتنیل-استات ($r=-0/971$) و ۴-ترپینول ($r=-0/919$) همبستگی منفی و معنی دار نشان داد.

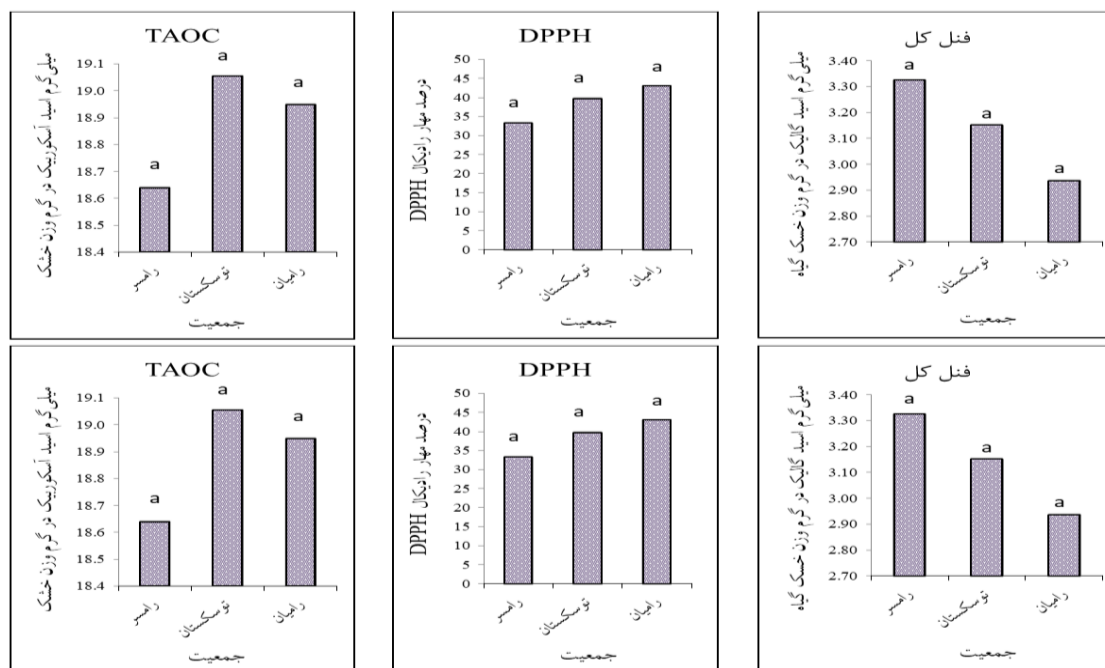
میزان فنل کل و توانمندی آنتی‌اکسیدانی: شکل ۴ نشان‌دهنده میزان و تفاوت نتایج حاصل از سه روش آزمایش شده است. نتایج بررسی میزان فنل کل نشان داد که جمعیت‌های مای مرز از درصد پایین ترکیبات فنلی برخوردار بودند. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در نمونه رامسر به مقدار $3/33 \pm 0/19$ و کمترین مقدار آن در نمونه رامیان به مقدار $2/94 \pm 0/19$ mg GAE/g dw برآورد شد. از سوی دیگر، اگرچه مقدار ترکیبات فنلی در این گیاه پایین بود اما میزان توانمندی مهار رادیکال‌های DPPH تا حد $4/99 \pm 43/1$ درصد در نمونه رامیان مشاهده شد. در این بین نمونه رامسر با $4/99 \pm 33/33$ کمترین درصد مهار این رادیکال را به خود اختصاص داد. نمونه توسکستان به‌عنوان سومین نمونه بررسی شده در این تحقیق به مقدار $4/99 \pm 39/83$ درصد رادیکال‌های DPPH را خنثی کرد. محدوده توانمندی آنتی‌اکسیدانی کل در بین نمونه‌های بررسی شده تا حد زیادی مشابه بود و در دامنه $0/21 \pm 18/64$ تا $19/05 \pm 0/12$ میلی‌گرم

جدول ۴- ضرایب همبستگی ساده بیناصلی ترین ترپنوئیدهای اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل در سرشاخه *J. sabinia*

پارامتر	α -thujene	α -pinene	sabinene	β -myrcene	α -terpinene	limonene	γ -terpinene	α -terpineol	myrtenyl acetate	4-terpineol	elemol	β -cadinene	فنل کل	DPPH	TAOC
درصد اسانس	۱														
α -thujene	۰/۳۶۶	۱													
α -pinene	-۰/۳۲۱	۰/۳۷۹	۱												
sabinene	۰/۰۶۷	۰/۹۰۳**	۰/۵۱۱	۱											
β -myrcene	۰/۳۱۸	۰/۹۴۱**	۰/۴۳	۰/۹۶۰***	۱										
α -terpinene	۰/۳۹۱	۰/۶۶۰***	۰/۲۷۳	۰/۹۱۲**	۰/۶۹۲	۱									
limonene	۰/۵۹۸	۰/۵۲۹	۰/۵۴۷	۰/۶۸۹*	۰/۴۹۲	۰/۵۱۱	۱								
γ -terpinene	۰/۳۸۸	۰/۹۸۹**	۰/۸۷۹**	۰/۹۲۴**	۰/۹۶۹**	۰/۵۱۱	۰/۵۰۲	۱							
α -terpineol	-۰/۱۱۱	۰/۸۴۱*	۰/۶۳۷	۰/۸۴۸**	۰/۸۰۱*	۰/۵۰۲	-۰/۸۱۷*	۰/۹۵۱**	۱						
myrtenyl acetate	۰/۰۷۵	-۰/۸۹۴*	-۰/۹۱۵	-۰/۹۰۸**	۰/۸۶۵*	-۰/۵۴۵	-۰/۸۶۱*	-۰/۹۵۷**	۰/۹۵۱**	۱					
4-terpineol	۰/۱۹۶	۰/۸۴۶*	-۰/۵۶۶	-۰/۹۱۹**	۰/۸۲۲	-۰/۳۸۸	-۰/۸۳۵*	-۰/۹۵۰**	۰/۹۵۱**	۱					
elemol	-۰/۳۶۴	۰/۰۸	-۰/۰۲۵	۰/۳۴۳	۰/۲۰۱	۰/۰۱	۰/۲۲۶	۰/۴۲	۰/۵۰۱	-۰/۴۶۷	۱				
β -cadinene	-۰/۳۹۵	۰/۲۳۵	۰/۵۸۷	۰/۴۴۴	۰/۱۶۲	۰/۴۶۲	۰/۸۷۹	۰/۸۳۲*	-۰/۸۱۹*	-۰/۷۱۴*	۰/۳۳۷	۱			
فنل کل	۰/۵۴	-۰/۸۷۱	-۰/۴۴	-۰/۲۲۴	-۰/۱۲۶	۰/۱۲۸	-۰/۱۳۶	-۰/۲۴۴	۰/۴۲۶	۰/۳۷۶	-۰/۴۱	-۰/۴۴۲	۱		
DPPH	-۰/۰۴۹	۰/۳۳۳	-۰/۱۷۱	۰/۵۶۳	۰/۳۵۳	۰/۶۸۳*	۰/۳۸۱	۰/۵۹۸	-۰/۶۸۱*	-۰/۶۴۶	۰/۴۲۱	۰/۸۲۰**	-۰/۴۱۷	۱	
TAOC	۰/۱۲۵	۰/۲۰۲	-۰/۰۹۴	۰/۲۷۵	۰/۲۶۱	۰/۴۱۲	۰/۲۷۹	۰/۴۲۷	-۰/۳۲۹	-۰/۴۸۱	۰/۷۵۸	۰/۴۳۶	۰/۲۹۴	۰/۵۵۶	۱

** همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۱

* همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۵



شکل ۴: نمودار مقایسه میانگین‌های داده‌های مربوط به آنتی‌اکسیدان کل، DPPH و فنل کل در ۳ جمعیت ارس

J. sabina حروف درج شده در بالای هر ستون بیانگر شباهت‌ها و تفاوت‌های بین داده‌ها است. علائم اختصار در پایین هر ستون مربوط به نام جمعیت‌ها است که در آورده شده.

تاکنون تنوع بالای ترکیبات اسانس در گونه‌های مختلف ارس نیز گزارش شده است (Dahmane et al., 2015; Nikolić et al., 2016). پیش از این، آدامز و همکاران (Adams et al., 2006) ترکیبات اسانس موجود در برگ گونه *Juniperus sabina var. arenaria* را مورد شناسایی قرار دادند که ترکیبات آشکار شده در بین جمعیت‌ها متفاوت بود. سدرول، سیترونال، سافرول، ترنس-سابینیل استات، ترپین-۴-ال و ترنس-تویون به عنوان اصلی‌ترین شاخص‌های تنوع در این گیاه بدست آمدند. در یک مطالعه موردی بر روی گیاه *J. sabinavar. balkanensis* یک پروفایل کاملاً متفاوت از اسانس این گیاه آشکار شد. میزان سابینین در برخی از جمعیت‌ها تا حد ۵۰ درصد مشاهده شد که با نتایج حاضر مطابقت داشت. متیل-اوژنول (۱۳/۲ درصد)، المیسین (۶ درصد) و ترنس-سابینیل استات (۳۹/۹ درصد) ترکیباتی بودند که در درصد بالایی به عنوان

میرتیل استات به‌عنوان ترکیب کموتیپ جدید مشاهده شده در این تحقیق، در آنالیز همبستگی ساده بین صفات، با دیگر ترکیبات همبستگی منفی داشت. همبستگی این ترکیب با آلفا-توجون ($r = -0.974$)، سابینین ($r = -0.971$)، بتا-میرسن ($r = -0.908$)، سیکما-ترپین ($r = -0.791$) و آلفا-ترپینول ($r = -0.957$) از بارزترین روابط منفی در بین ترکیبات بود. نکته جالب توجه اینکه تغییرات آلفا پینن با سایر ترکیبات رابطه معنی‌داری نداشت. به این معنی که بیوستز این ترکیب مستقل از سایر ترکیبات است. در مقابل رابطه مثبت و معنی‌داری بین آلفا توجون با اغلب ترکیبات وجود داشت. رابطه این ترکیبات با هم تحت تاثیر شرایط فیزیولوژیکی و محیطی گیاه قرار دارد. با این وجود نقش ژنتیکی در این خصوص پررنگ‌تر است.

بحث

اجزای جدید مشاهده شدند (Adams, 2018). در یک بررسی دقیق از روند تغییرات اسانس در شرایط رویشگاهی متفاوت، نتایج نشان داد که ترکیبات اسانس با فاصله گرفتن رویشگاه از دریا با تغییرات جدی روبه‌رو می‌شود و میزان رطوبت موجود در رویشگاه می‌تواند به عنوان یکی از عمده‌ترین دلایل در تغییرات ترکیبات اسانس تلقی شود (Demasi et al., 2018). در بین سه رویشگاه مطالعه شده در تحقیق حاضر از لحاظ جغرافیایی منطقه رامسر نسبت به دو منطقه دیگر هم از رطوبت بالاتری برخوردار است و هم فاصله نزدیک‌تری به دریا دارد. لذا تغییرات به وجود آمده در ترکیبات اسانس ای نمونه می‌تواند به دلیل تفاوت فاصله هر کدام از رویشگاه‌ها با دریا و تغییر میزان رطوبت در هر منطقه باشد. از سوی دیگر ارتفاع از سطح دریا از جمله مهم‌ترین فاکتورهایی است که کمیت و کیفیت مواد موثره را در گیاهان دارویی تحت تاثیر قرار می‌دهد (Sadeghi et al., 2015). با این اوصاف، وجود تفاوت آشکار شده بدلیل تفاوت ارتفاع خیلی دور از انتظار نیست.

اگرچه عوامل محیطی تاثیر قابل ملاحظه بر مواد موثره بر جای می‌گذارد، اما اصلی‌ترین عامل تعیین کننده نوع و مقدار مواد موثره پایه و اسانس ژنتیکی گیاه می‌باشد (Demasi et al., 2018). بنابراین به دلیل اینکه سه جمعیت برداشت شده از رویشگاه‌های مختلف متعلق به یک گونه مشابه بودند، در ابتدا انتظار می‌رفت تنها تفاوت‌های جزئی و کمی در ترکیبات مشاهده شود. اما پروفایل اسانس نمونه رامسر به مقدار بسیار زیادی متفاوت ظاهر شد. خصوصاً درصد بالای میرتینیل استات (۷۲/۶ درصد) که نه تنها در سایر نمونه‌ها پیدا نشد، بلکه تاکنون در رابطه با وجود این ترکیب در اسانس گونه‌های ارس (*Juniperus spp.*) هیچ گونه گزارشی ارائه نشده است. اخیراً دامز و شارزباچ (Adams and

Schwarzbach, 2016) در بررسی ژنتیکی و شناسایی تنوع در تعدادی از جمعیت‌های گونه *J. sabina* موفق به کشف یک زیر گونه جدید شدند. در ابتدا زیر گونه جدید در بررسی‌های ژنتیکی متفاوت ظاهر شد. سپس در ادامه تحقیقات اجزای اسانس مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج نسبت به گزارش‌های پیشین در مورد این گیاه متفاوت بود. که آنها علت تفاوت مشاهده شده را به تفاوت ژنتیکی مرتبط دانستند. این زیر گونه به نام *Juniperus sabina var. balkanensis* R.P. نام Adams & A.N. Tashev نام‌گذاری شد (Adams, 2018). از این رو حجم بالایی تغییرات در اجزای اسانس نمونه رامسر ممکن است بخاطر وجود برخی تفاوت‌های ژنتیکی در این سه جمعیت باشد که تاکنون ناشناخته بوده و نیاز به بررسی ژنتیکی بیشتری دارد.

به دلیل تعامل مداوم گیاهان با شرایط استرس‌زا خصوصاً تنش‌های اکسیداتیو، انواع سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی می‌توانند همواره در یک گیاه فعال باشند. لذا واضح است که تنها یک روش نمی‌تواند جهت سنجش میزان توان آنتی‌اکسیدانی یک گیاه موثق باشد (Baba et al., 2015). بنابراین در بررسی حاضر از دو روش به منظور درک بهتر از قدرت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد استفاده شد. ظرفیت تولید رادیکال‌های آزاد با توجه به تماس گیاهان با عوامل تنش‌زای محیطی متعدد نظیر قارچ‌ها، انواع میکروارگانیسم‌ها و حمله علف‌خواران و تنش‌های محیطی متعدد از جمله تنش خشکی، شوری، وجود فلزات سنگین و آلاینده‌ها می‌تواند متفاوت باشد و گیاهان بومی و وحشی موجود در طبیعت مسلماً نسبت به گیاهانی که در شرایط کنترل شده هستند تماس بیشتری با این عوامل استرس‌زا دارند. لذا میزان ترکیبات دفاعی در جهت حفظ بقاء در این

است. این نتایج تا حدودی مشابه نتایج صبور و همکاران (Saboor et al., 2013) است. آن‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنل کل را در میخک بررسی کردند که نتایج نشان داد که میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بعضی از نمونه‌ها همبستگی مثبت و در برخی فاقد رابطه‌ی معنی‌دار هستند. در برخی از روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی همبستگی منفی این دو عامل نیز گزارش شده است. بنابراین به دلیل پیچیدگی مواد مؤثره موجود در گیاهان، بیان یک رابطه مستقیم بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و یک سری ترکیبات خاص کمی دشوار است (Žugić et al., 2014).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد که در بین جمعیت‌های گونه *J. Sabina* از نظر ترکیبات اسانس تنوع بسیار بالایی وجود دارد. ساینین به‌عنوان ترکیب قالب در جمعیت‌های توسکستان و رامیان بیش از ۴۵ درصد از مجموع کل ترکیبات را به خود اختصاص می‌دهد. سایر ترکیبات از جمله آلفا-پینن، لیمونن، میرسن، آلفا-ترپینن، المول، جرماکریل و بتا-سیترونال با غلظت کمتر از ۱۰ درصد نیز از ترکیبات تاثیرگذار اسانس این گیاهان هستند. در پژوهش حاضر اطلاعات اولیه از یک کموتیپ جدید گونه *J. sabina* تحت عنوان میرتیل-استات (با غلظت ۷۲/۶ درصد) در نمونه رامسر ارائه شده است. با این وجود این ادعا نیازمند بررسی بیشتر است.

دسته از گیاهان تا حدودی بیشتر است (Joo et al., 2010)

فنل‌ها از جمله ترکیبات دهنده الکترون محسوب می‌شوند و به‌طور مؤثری می‌توانند رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند. از این رو می‌تواند ارتباط مستقیمی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در گیاهان داشته باشند (Küçük et al., 2007). تاویانو و همکاران (Taviano et al., 2011) میزان فنل و اثرات بیولوژیکی پنج گونه ارس را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بین مقدار فنل کل و میزان توانمندی آنتی‌اکسیدانی رابطه مثبت وجود دارد که با نتایج حاضر مغایرت داشت. البته ارتباط بین محتوای فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی همیشه یکسان نیست. دلایل متعددی توجیه‌کننده عدم وجود رابطه مستقیم و ثابت در بین ترکیبات فنلی و میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی است. حلالیت ترکیبات فنولی در حلال استفاده شده جهت عصاره‌گیری بسته به قطبیت حلال، پلیمراسیون فنل‌ها و تعامل با سایر ترکیبات می‌تواند متفاوت باشد. حلال‌های مختلفی همچون متانول، اتانول، استون، آب، اتیل‌استات و یا سایر ترکیبات مرسوم در اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی و سنجش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در هر کدام ممکن است نتایج متفاوتی حاصل شود. همچنین نوع و ساختار مولکولی ترکیبات فنلی می‌تواند تعیین‌کننده قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها باشد (Kopjar et al., 2015). لذا اگرچه یکی از فرضیات این پژوهش وجود همبستگی مثبت بین ترکیبات فنلی و میزان توانمندی آنتی‌اکسیدانی بود، ولی نتایج بیانگر عدم همبستگی بین میزان فنل کل و توانمندی مهار رادیکال‌های آزاد

References

- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured publishing corporation Carol Stream, Texas, 804 p.
- Adams, R.P. 2018. The composition of the leaf essential oils of *J. sabina* var. *balkanensis*: chemotypes high in trans-sabinyl acetate and methyl eugenol

- discovered in three natural populations .
Phytologia, 100(1): 43–50.
3. Adams, R.P., Nguyen, S. and Liu, J. 2006. Geographic Variation in the Leaf Essential Oils of *Juniperus sabina* L. and *J. sabina* var. *arenaria* (EH Wilson) Farjon. Journal of Essential Oil Research, 18(5): 497–502.
 4. Asgary, S., Naderi, G.A., Sahebkar, A., Ardekani, M.R.S., Kasher, T., Aslani, S. and Emami, S.A. 2013. Essential oils from the fruits and leaves of *Juniperus sabina* possess inhibitory activity against protein glycation and oxidative stress: An in vitro phytochemical investigation. Journal of Essential Oil Research, 25(1): 70–77.
 5. Asili, J., Emami, S.A., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B.S. and Hassanzadeh, M.K. 2010. Chemical and antimicrobial studies of *Juniperus sabina* L. and *Juniperus foetidissima* Willd. Essential oils. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 13(1): 25–36.
 6. Baba, S.A., Malik, A.H., Wani, Z.A., Mohiuddin, T., Shah, Z., Abbas, N. and Ashraf, N. 2015. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. South African Journal of Botany, 99: 80–87.
 7. Bais, S., Gill, N.S. and Kumar, N. 2015. Neuroprotective Effect of *Juniperus communis* on Chlorpromazine Induced Parkinson Disease in Animal Model. Chinese Journal of Biology, 2015: 1–7.
 8. Banerjee, S., Singh, H. and Chatterjee, T.K. 2013. Evaluation of anti-diabetic and anti-hyperlipidemic potential of methanolic extract of *Juniperus Communis* L. in strep to zotoc in nicotinamide induced diabetic rats. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 4(3): 10–17.
 9. 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.
 10. Demasi, S., Caser, M., Lonati, M., Cioni, P.L., Pistelli, L., Najar, B. and Scariot, V. 2018. Latitude and altitude influence secondary metabolite production in peripheral alpine populations of the mediterranean species *lavandula angustifolia* mill. Frontiers in Plant Science, 9: 1-11.
 11. Emami, S.A., Asgary, S., Naderi, G.A., Ardekani, M.R.S., Kasher, T., Aslani, S. and Sahebkar, A. 2011. Antioxidant activities of *Juniperus foetidissima* essential oils against several oxidative systems. Revista Brasileira de Farmacognosia, 21(4): 627–634.
 12. Emami, S.A., Asili, J., Mohagheghi, Z. and Hassanzadeh, M.K. 2007. Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Iranian Conifers. 4(3): 313–319.
 13. 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). International Journal of Essential Oil Therapeutics, 3: 163–170.
 14. Hojjati, F., Sereshti, H. and Hojjati, M. 2019. Leaf essential oils and their application in systematics of *Juniperus excelsa* complex in Iran. Biochemical Systematics and Ecology, 84: 29–34.
 15. Hosseinihashemi, S.K., Dadpour, A. and Lashgari, A. 2017. Antioxidant activity and chemical composition of *Juniperus excelsa* ssp. *polycarpus* wood extracts. Natural Product Research, 31(6): 681–685.
 16. Jahan, I.A., Hossain, M.H., Ahmed, K.S., Sultana, Z., Biswas, P.K. and Nada, K. 2018. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* seed extracts. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 18(4): 299-307.
 17. Joo, S.S., Kim, Y.B. and Lee, D.I. 2010. Antimicrobial and antioxidant properties of secondary metabolites from white rose flower. Plant Pathology Journal, 26(1): 57–62.
 18. Kopjar, M., Tadić, M. and Piližota, V. 2015. Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. Chemical and Biological

- Technologies in Agriculture, 2(1): 1–6.
19. Korouri, S.A.A., Khoushnevis, M. and Matinizadeh, M. 2011. Comprehensive studies of Juniper species in Iran. Forest, Ranges and Watershed Organization of Iran, Tehran, 560 p.
 20. Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C. and Candan, F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chemistry, 100(2): 526–534.
 21. Loizzo, M.R., Tundis, R., Conforti, F., Saab, A.M., Statti, G.A. and Menichini, F. 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. Food Chemistry, 105(2): 572–578.
 22. Moeina, S. and Moeinb, M. 2010. Antioxidant activities and phenolic content of *Juniperus excelsa* extract. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 6(2): 133–140.
 23. Nikolić, B., Vasiljević, B., Mitić-Culafić, D., Lesjak, M., Vuković-Gačić, B., Dukić, N. M. and Knežević-Vukčević, J. 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.
 24. Orhan, N., Orhan, I.E. and Ergun, F. 2011. Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species. Food and Chemical Toxicology, 49(9): 2305–2312.
 25. Patel, M. and Patel, J. 2011. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research, 1, 52–68.
 26. Pokorný, J. 2007. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? European Journal of Lipid Science and Technology, 109(6): 629–642.
 27. Rabeta, M.S. and Nur Faraniza, R. 2013. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *garcinia atrovirdis* and *cynometra cauliflora*. International Food Research Journal, 20(4): 1691–1696.
 28. Saboora, A., Dadmehr, K. and Ranjbar, M. 2013. Total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of stem and leaf extracts in six Iranian species of wild *Dianthus* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29(2): 281–295.
 29. Sadeghi, H., Robati, Z. and Saharkhiz, M.J. 2015. Variability in *Zataria multiflora* Bioss. essential oil of twelve populations from Fars province, Iran. Industrial Crops and Products, 67: 221–226.
 30. Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L. and Zhang, Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food and Chemical Toxicology, 49(10): 2689–2696.
 31. Taviano, M.F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., La Barbera, T.M., Güvenç, A. and Miceli, N. 2011. Antioxidant and antimicrobial activities of branches extracts of five *Juniperus* species from Turkey. Pharmaceutical Biology, 49(10): 1014–1022.
 32. Taviano, M.F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., Dugo, P. and Miceli, N. 2013. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. Food and Chemical Toxicology, 58: 22–29.
 33. Wojdyło, A., Oszmiański, J. and Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 105(3): 940–949.
 34. Xie, S., Li, G., Qu, L., Zhong, R., Chen, P., Lu, Z. and Zhu, Y. 2017. Podophyllotoxin Extracted from *Juniperus sabina* Fruit Epididymal Epithelial Cell Apoptosis. (2017): 1-14.
 35. Xu, D.P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J. and Li, H. Bin. 2017. Natural antioxidants in foods and

- medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1): 20–31.
36. Zheljzkov, V.D., Kacaniova, M., Dincheva, I., Radoukova, T., Semerdjieva, I.B., Astatkie, T. and Schlegel, V. 2018. *Industrial Crops & Products* Essential oil composition , antioxidant and antimicrobial activity of the galbuli of six juniper species. *Industrial Crops and Products*, 124: 449–458.
37. Žugić, A., Dordević, S., Arsić, I., Marković, G., Živković, J., Jovanović, S. and Tadić, V. 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Industrial Crops and Products*, 52: 519–527.

Phytochemical evaluation and comparison of essential oil and antioxidant activity of *Juniperus sabina* L. branches in different habitats of Mazandaran and Golestan provinces

Ghorbanzadeh, A.¹, Ghasemnezhad, A.^{2*}, Khoshhal Sarmast, M.³,
Nezhad Ebrahimi, S.⁴

¹M.Sc., Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

²Associate Prof., Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

³Assistant Prof., Department of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

⁴Assistant Prof., Department of Phitochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Received: 2019-8-8 ; Accepted: 2019-12-16

Abstract

Juniperus sabina L. is one of the valuable medicinal plants belonging to Cupressaceae family which has precious pharmaceutical effects such as anti-cancer properties, prevention of cell division, anti-malarial and anti-fertility. The aim of the current study was to evaluate the quantity and quality of essential oil compounds as well as antioxidant activity in the brunchlets of *Juniperus sabina*. samples were collected from three habitats of Ramsar, Ramyan and Tooskestan in the summer of 2018. The essential oils compounds were analyzed by using GC-FID and GC-MS. Both TAOC and DPPH methods were used to evaluate the antioxidant potential and the colorimetric method (Folin-ciocalteu) for measuring total phenol. The highest amount of total phenol in Ramsar sample (3.33 ± 0.19 mg GAE/g dw), DPPH radical scavenging in Ramyan sample ($43.1 \pm 4.99\%$) and total antioxidant in Tooskestan sample (19.5 ± 0.12 mg ascorbic acid /g dw) was observed. Sabinene was one of the major constituents in all samples (12.5, 49.8 and 58 % respectively). The notable finding of this study was the presence of myrtenyl-acetate (72.6%) in the Ramsar sample that has been never reported in this plant. Due to the significant difference observed in the essential oil composition of Ramsar, further studies on this plant is suggested and it may be introduced as a new chemotype in the future.

Keywords: Antioxidant, Essential oil, *Juniperus sabina* L., Myrtenyl-acetate, North of Iran, Sabinene, Terpenoid.

*Corresponding author; aghasemnajad@hotmail.com