

بررسی تغییرات کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی *Nepeta crispa* Willd. در رویشگاه‌های مختلف طبیعی زراعی

محمد کرمی^۱، محمدتقی عبادی^۲، مهدی عیاری^{۲*}

^۱دانشجو کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۸

چکیده

گیاه مفرّاح با نام علمی *Nepeta crispa* Willd. از تیره نعنائیان، از جمله گیاهان بومی ایران می‌باشد که به صورت خودرو اطراف کوه الوند استان همدان رویش دارد. از این گیاه به‌عنوان ضدنفخ، ضدالتهاب، مسکن، ضد باکتری و ضد قارچ استفاده می‌شود. هدف این تحقیق، بررسی فیتوشیمیایی ترکیبات اسانس اندام هوایی این گیاه در مرحله رویشی، کشت شده در دانشگاه تربیت مدرس تهران با ارتفاع ۱۲۸۳ متر از سطح دریا، و مقایسه با نمونه‌های برداشت شده از مناطق خودروی: ارزان فود و گشانی به‌ترتیب با ارتفاعات ۳۰۱۵ و ۲۴۸۹ متر از سطح دریا می‌باشد. نمونه گیاهان در اوایل مرداد ماه ۱۳۹۷ برداشت شدند. اسانس هر سه نمونه در مرحله رویشی با روش تقطیر با آب استخراج گردید و با استفاده از دستگاه‌های GC-FID و GC-MS آنالیز گردید. درصد اسانس در نمونه‌های جمع‌آوری شده از ارزان فود، گشانی و مزرعه، به‌ترتیب ۲/۱۳، ۱/۹۷ و ۰/۵۵ درصد بود. ترکیبات اصلی شناسایی شده: ۸،۱- سینتول (۴۰/۳، ۴۸/۵، ۴۹/۹ درصد)، $4\alpha,7\beta,7a\alpha$ -نپتالاکتون^۱ (۳۴/۸، ۳/۷، ۲۴/۷ درصد) و بتا- پینن (۶/۲، ۵/۴، ۵/۴ درصد) به‌ترتیب در نمونه‌های مزرعه، گشانی و ارزان فود مشاهده شد. هرچند میزان درصد اسانس و ماده ۱، ۸-سینتول، در نمونه کشت شده در تهران کاهش یافت، با این حال میزان ترکیب نپتالاکتون در این نمونه‌ها افزایش یافت. با توجه به نتایج به‌دست آمده تغییر شرایط محیطی نقش مهمی در تغییر کمیت و کیفیت اسانس این گیاه داشته است، ولی کشت در محلی با اختلاف ارتفاع بیش از ۱۲۰۰ متر، پایین تر نسبت به محل رویش اصلی، نشانی امیدبخش برای پتانسیل اهلی کردن *N. crispa* می‌باشد. بهینه‌سازی عوامل دیگری مانند کشت در منطقه‌ای نزدیک رویشگاه اصلی و یا تیمارهای تغذیه، تنش‌های زیستی و غیر زیستی، می‌تواند کیفیت گیاه را نسبت به نمونه خودرو بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، ۱ و ۸- سینتول، (*Nepeta crispa* Willd.)، نپتالاکتون.

*نویسنده مسئول: mahdiayyari@gmail.com

مقدمه

β -Pinene و (Z) - β -Ocimene و همچنین سسکوئنی ترپن‌هایی مانند β -Caryophyllene، Caryophyllene oxide و (E) - β -Farnesene نیز در گونه‌های مختلف این جنس یافت شده است که البته نسبت به دسته‌های قبلی از فراوانی کمتری برخوردار هستند. گونه *Nepeta crispa* از گونه‌هایی است که عمده ترکیبات اسانس آن ۱، ۸-سینئول بوده است ولی درعین حال مشتقات نپتالاکتونی آن نیز از فراوانی قابل قبولی برخوردار هستند (Salehi, et al., 2018). سنبل و همکاران (Sonboli et al., 2004) بیست و سه ترکیب در اسانس این گیاه شناسایی کردند که ۸،۱-سینئول (۴۷/۹ درصد) و $4\alpha\alpha$ ، 7β ، $7\alpha\alpha$ -nepetalactone (۲۰/۳ درصد) از فراوان ترین ترکیبات مفراخ بودند. سفیدکن و همکارانش (Sefidkon et al., 2006) نیز اسانس مفراخ را آنالیز کردند. میزان ۱، ۸ سینئول در این گزارش ۶۲/۸ درصد بود ولی درصد مشتقات نپتالاکتونی آن نیز کمی متفاوت بود. در این گزارش $4\alpha\alpha$ - 7α - $7\alpha\alpha$ -nepetalactone ۱۰/۳ درصد و مشتق دیگر $4\alpha\beta$ - 7α - $7\alpha\beta$ -nepetalactone ۹/۲ درصد بود. در تحقیقی مشابه، گیاه دارویی مفراخ، از رویشگاه‌های طبیعی استان همدان جمع‌آوری و اسانس آن مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات ۸،۱-سینئول (۷۱ درصد)، آلفا-پینن (۵ درصد) و گاما-ترپینئول (۴/۱ درصد) از مهمترین ترکیبات اسانس گیاه گزارش شده است و البته گزارشی از حضور مشتقات نپتالاکتونی نشده است. همچنین بازده اسانس در این گزارش ۰/۹ درصد بود (Mojab et al., 2009). بالاترین شباهت از نظر ترکیبات اصلی فرار در جنس *Nepeta* به گونه *N. crispa* را می‌توان گونه *Nepeta distans* دانست. فراوان ترین ترکیب در این گونه ترکیب ۱، ۸-سینئول (۴۸/۸ درصد) بوده و مشتقات نپتالاکتون (۳۷/۱ درصد) نیز از جمله ترکیبات اصلی شناسایی شده در این گونه می‌باشند (Rehman et al.,

مفراخ، مفراخ یا پونه سای موج با نام علمی *Nepeta crispa* Willd. از خانواده نعناعیان است و در غرب ایران، نواحی کوهستان الوند در استان همدان رویش دارد. مفراخ از جمله گونه‌های انحصاری و در حال انقراض می‌باشد. این گیاه چندساله با ساقه‌های متعدد به ارتفاع ۲۰ تا ۴۰ و به ندرت تا ۶۰ سانتی‌متر است و برگ‌های قاعده‌ای، فلسی-غشایی و برگ‌های ساقه‌ای، دمبرگ‌دار می‌باشد. سطح برگ‌ها و ساقه پوشیده از کرک‌های سفید رنگ است (Jamzad, 2013). گونه *N. crispa* به‌عنوان آرام‌بخش، مقوی معده، ضد نفخ و ضد عفونی کننده در رفع اختلالات تنفسی و گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدلیل خواص دارویی و همچنین بوی معطر در استفاده‌های سنتی به عنوان طعم‌دهنده در غذاها و نوشیدنی‌ها و به خصوص در ماست و دوغ، استفاده می‌شود (Sonboli et al., 2004; Reyahi-Khoram et al., 2018). در مورد گیاه مفراخ تا کنون مقالات بسیار محدودی به چاپ رسیده است و معدود مقالات مرتبط نیز، به آنالیز اسانس گیاه جمع‌آوری شده از عرصه طبیعی و چند گزارش از اثرات بیولوژیک آن محدود شده است و تا کنون هیچ گزارشی در مورد مطالعات کشت و اهلی سازی آن منتشر نشده است. گونه‌های جنس *Nepeta* عموماً به واسطه دو دسته ترکیب ۱، ۸-سینئول و مشتقات نپتالاکتونی شناخته می‌شوند. به‌طوری که در برخی از گونه‌ها مانند *Nepeta cataria*، *N. caesarea* و *N. racemosa* و *N. argolica* مشتقات نپتالاکتونی، ترکیبات عمده اسانس را تشکیل می‌دهند و در برخی از گونه‌های دیگر مانند *Nepeta menthoides*، *N. italica* و *N. hormozganica* ترکیب ۱، ۸-سینئول ترکیب عمده اسانس این گونه‌ها را تشکیل می‌دهد. علاوه بر این دو دسته ترکیبات عمده از دسته مونوترپنی مانند

بر روی باکتری *Escherichia coli* بررسی شد که گیاه مفراح بیشترین هاله عدم رشد (ZOI)^۱ را بین گیاهان و همچنین تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش نشان داد (Momtaz et al., 2019). ۸،۱- سینئول یک ترکیب مونوترپن اکسیژن دار است که در فرمولاسیون بسیاری از داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب به عنوان یک داروی ضد التهاب، آسم و برونشیت شناخته شده است (Brown et al., 2017). ۸،۱- سینئول با عملکردی خاص بر گیرنده‌های اوپیوئیدی، باعث اثرات بی‌حسی و کاهش دردی می‌شود (Aydin et al., 1999) و همچنین در مورد نپتالاکتون‌ها نیز اثبات شده است که مسئول فعالیت آگونیستی در زیربخشی از گیرنده اوپیوئیدی می‌باشد و در نتیجه اثرات ضد دردی از خود نشان می‌دهد (Aydin et al., 1998). این مطلب نشان دهنده ارزش و اهمیت این دو دسته از ترکیبات است و اهمیت گیاهانی که مقادیر عمده‌ای از این ترکیبات دارند را نیز بالا خواهد برد.

شرایط رویشگاهی اعم از اختلاف ارتفاع، میزان بارش، نوع و کیفیت خاک و تنش‌های محیطی معمولاً بر کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان اثر دارد. با این حال، مطالعه جامعی در مورد گونه مفراح انجام نشده است و در مورد گونه‌های دیگر این جنس نیز محدود است. از آنجا که برخی از گونه‌های انحصاری می‌باشند و حتی برخی از آن‌ها در معرض انقراض بوده‌اند، مطالعات در مورد آن‌ها محدود می‌باشد. در تحقیقی اثرات آت اکولوژی بر گونه *Nepeta binaludensis* توسط نجفی و همکاران (Nadjafi et al., 2013) انجام شد که نشان داد، اختلاف ارتفاع حدود ۳۰۰ متر و شیب‌های مختلف در میزان اسانس آن تغییر معنی‌داری نداشت و تنها ترکیب عمده این اسانس که ۸،۱- سینئول بود را کمتر از ۵ درصد

در یک گزارش متفاوت نیز، با تزریق عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی، گونه *N. juncea* به دستگاه GC-MS ترکیبات ۱، ۸-سینئول و 4α-7α-7α-nepetalactone، بتا-پینن و ترپینن-۴-آل به‌عنوان ترکیبات اصلی فرار این گیاه معرفی شده‌اند، که شباهت قابل توجهی به ترکیبات اسانس *N. crispa* دارد. هرچند که بهتر است ترکیبات فرار این گیاه از طریق تقطیر با آب تهیه و مقایسه شود (Sharifi-Rad et al., 2020).

جنس *Nepeta* با بیش از ۳۰۰ گونه جهانی و ۷۵ گونه در ایران می‌روید، حدود ۴۰ گونه آن انحصاری بوده و همین امر نشان‌دهنده تنوع بالای این گونه در ایران و جهان است. فعالیت‌های بیولوژیک این جنس بسیار متنوع است و حتی در مورد برخی از گونه‌های انحصاری بسیار ناشناخته می‌باشد (Rechinger, 1987; Jamzad et al., 2003). مشخص شده است که در میان مردم محلی برخی از گونه‌های جنس *Nepeta* به‌عنوان داروی مدر، ضد آسم و برونشیت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sarikurkcu et al., 2019). در برخی گزارشات به‌عنوان آفت‌کش‌های طبیعی نیز از آن‌ها یاد شده است که وجود دسته ترکیبات نپتالاکتونی یکی از عوامل موثر در این فعالیت‌ها است (Amini et al., 2019). آزمایشات بیولوژیک در مورد *N. crispa* نیز بسیار محدود است. علی و همکاران (Ali et al., 2012) اثرات ضد دردی و ضدالتهابی اسانس گیاه مفراح را بررسی کردند و نشان دادند که این اسانس به‌صورت معنی‌داری باعث کاهش التهاب و درد می‌شود. فرکشن‌های اتیل استاتی و کلروفومی حاصل از عصاره هیدروالکلی مفراح نیز بر علیه سلول‌های سرطانی خون K562 اثرات قابل توجهی را از خود نشان داده و سبب کاهش تکثیر و رشد این سلول‌های سرطانی شدند (Badrhadad et al., 2015). تاثیر ۱۲ گونه از گیاهان خانواده نعناعیان

است که ضرورت کشت و اهلی سازی آن را چندین برابر می کند. لذا در این تحقیق، برداشت گیاه از دو منطقه رویشگاه اصلی و همچنین کشت آن در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده و ترکیبات فرار آن‌ها از نظر کمیت و کیفیت با یکدیگر مقایسه گردیده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: اندام هوایی شامل برگ و ساقه گیاه مفرح، در اوایل مرداد ماه سال ۱۳۹۷ از دو رویشگاه اصلی و طبیعی گشانی و ارزان فود، در کوهستان الوند، استان همدان در مرحله رویشی برداشت گردید. مشخصات جغرافیایی آن در جدول ۱ آورده شده است. گیاه پس از جمع آوری در شرایط سایه و دمای اتاق خشک شد. نمونه این گیاه نیز در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی با کد MPH-2672 ثبت و نگهداری می‌شود.

تغییر داد. از معدود مطالعات کشت توده‌های مختلف از گونه‌های جنس *Nepeta*، مطالعه‌های و همکاران (Hadi et al., 2017) است که در آن پس از کشت ۲۹ توده از چهار گونه مختلف *Nepeta*، تفاوت ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن‌ها مقایسه و ارزیابی شده است. با توجه به افزایش ۱۵ تا ۲۵ درصدی افزایش تقاضا برای مواد اولیه گیاهان دارویی، نگرانی استفاده بی‌رویه از گونه‌های نادر و در حال انقراض دوچندان می‌شود، یکی از راه‌حل‌های پیشنهادی کشت این گیاهان و جایگزین برداشت از طبیعت می‌باشد. همچنین کشت می‌تواند باعث بهبود بازده ترکیبات فعال و ثبات تولید این ترکیبات شود (Bariotakis et al., 2019). در این بین، با توجه به اهمیت مفرح، در استفاده‌های سنتی و پتانسیل بالای این گیاه در کاربردهای مدرن، استفاده روزافزون این گیاه، و همچنین برداشت بی‌رویه آن از رویشگاه‌های اصلی سبب در معرض انقراض قرار گرفتن این گیاه شده



شکل ۱: گیاه مفرح در مرحله رویشی در رویشگاه طبیعی ارزان فود (سمت چپ) و مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس (سمت راست)

کشت در تاریخ ۱۳ آذر ماه سال ۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. بذره‌های این گیاه پس از گذشت ۸ روز از تاریخ کشت، شروع به جوانه‌زنی کردند. پس از تولید نشاء، نشاءهای گیاه مفرح بعد از رسیدن به مرحله ۸

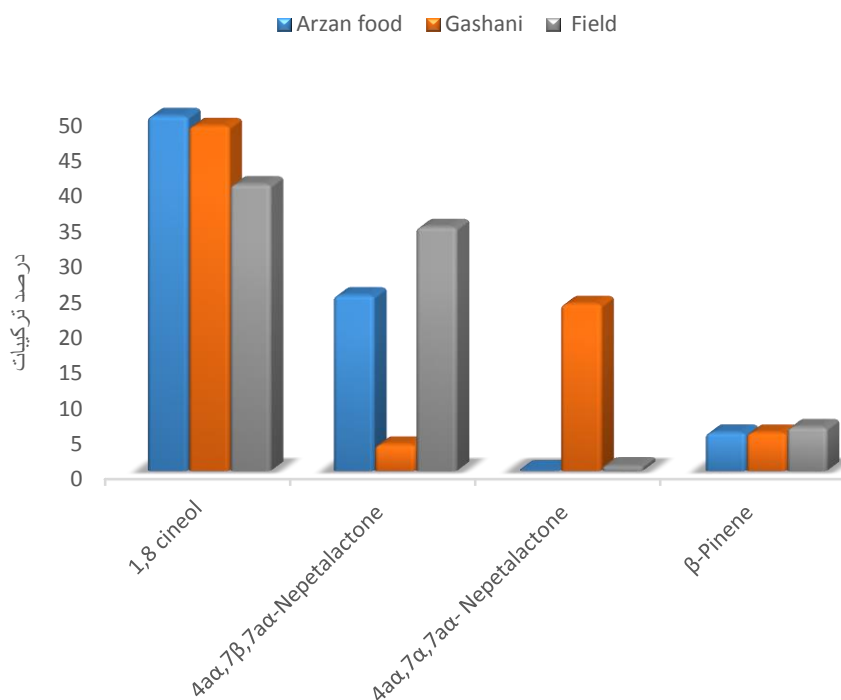
بذر مورد استفاده برای کشت در مزرعه تحقیقاتی از گیاهان موجود در رویشگاه در شهریور ماه سال ۱۳۹۶ از ارتفاعات کوهستان الوند جمع آوری گردید. بذرها با هیپوکلرید سدیم شستشو و ضدعفونی شدند. کشت بذور در بستر کشت کوکویت درون سینی

محیط خشک و جهت تهیه اسانس به آزمایشگاه منتقل شدند. گیاهان جمع‌آوری شده توسط آسیاب برقی خرد شده و سپس مقدار ۵۰ گرم از آنها جهت استخراج اسانس توزین شدند. اسانس گیری با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. اسانس‌های بدست آمده پس از آب‌گیری با سدیم سولفات، در شیشه‌های مخصوص درون یخچال نگهداری شدند. جداسازی و شناسایی کیفی ترکیبات با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) و اندازه گیری‌های کمی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) انجام شد.

برگی در اوایل خرداد ماه، با فاصله (۴۰×۴۰ سانتیمتر) درون مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس با طول جغرافیایی "۵۶° ۹' ۵۱" و عرض جغرافیایی "۲۷° ۴۴' ۳۵" و ارتفاع ۱۲۸۵ متر از سطح دریا منتقل گردید. گیاهان در مزرعه تا زمان استقرار کامل هر روز آبیاری شدند. شکل ۱ شمای کلی گیاه مفراح کاشته شده در مزرعه و در عرصه طبیعی را نشان می‌دهد. زمانی که اندام هوایی گیاه به ارتفاع ۱۰ الی ۱۵ سانتی متری رسید، معمولا ۳ الی ۴ شاخه جانبی در آن نیز ظاهر می‌شود و هیچ گونه علائم گلدهی نیز در آنها مشاهده نشده است. در این مرحله گیاهان برداشت و در شرایط سایه و دمای

جدول ۱: مشخصات مناطق رویش گیاه، درصد و مقدار ترکیب اصلی اسانس

محل برداشت	شهرستان	ارتفاع محل	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	درصد اسانس (%)
مزرعه تحقیقاتی	تهران	۱۲۸۳	۲۷° ۴۴' ۳۵"	۵۱° ۹' ۵۶"	۰/۵۵
ارتفاعات ارزان فود	همدان	۳۰۱۵	۳۴° ۳۵' ۵۹"	۴۸° ۳۴' ۳۸"	۲/۱۳
ارتفاعات گشانی	تویسرکان	۲۴۸۹	۳۴° ۳۹' ۲۹"	۴۸° ۲۵' ۱۳"	۱/۹۷



شکل ۲: مقایسه تغییرات درصد ترکیبات اصلی اسانس در مناطق مختلف

جدول ۲: مقایسه کمیت و کیفیت مواد موثره اسانس *Nepeta crisper* در رویشگاه‌های مورد مطالعه و کشت شده در مزرعه

No.	Compounds	RT	RI ¹	Percentage in different locations		
				Arzanfood	Gashani	Cultivated in Field
۱	α -Thujene					
۲	α -Pinene					
۳	Sabinene					
۴	β -Pinene					
۵	1,8-Cineole					
۶	γ -Terpinene					
۷	Linalool					
۸	Isopentyl isovalerate					
۹	(E)-Epoxy-ocimene					
۱۰	Pinocarvone					
۱۱	ρ -Mentha-1,5-dien-8-ol					
۱۲	Myrtenol					
۱۳	Myrtenal					
۱۴	4 α ,7 α ,7 α - Nepetalactone					
۱۵	4 α ,7 β ,7 α - Nepetalactone					
۱۶	(E)-Caryophyllene					
۱۷	(E)- β -Farnesene					
۱۸	2-Phenyl ethyl methylbutanoate					
۱۹	3-Phenyl ethyl methylbutanoate					
۲۰	(Z)- α -Bisabolene					
	Monoterpene Hydrocarbon					
	Oxygenated Monoterpene					
	Sesquiterpene Hydrocarbon					
	Oxygenated Sesquiterpene					
	Others					
	Total					

¹ RI محاسباتی می‌باشد که با استفاده از نرمال آلکان‌های ۸-۲۴ به دست آمده است.

² tr مقادیر زیر ۰/۱ درصد ناچیز در نظر گرفته شده است.

و در نهایت، به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. دمای تزریق ۲۵۰ درجه و دمای دکتور FID، ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. مقدار نمونه تزریق شده ۱ میکرولیتر با اتوسمپلر مدل Agilent G4513A، تزریق به صورت اسپیلیت با نسبت ۵۰ و

دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC): دستگاه گاز کروماتوگراف از نوع Agilent مدل 7890B، ستون HP-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بود. برنامه‌ریزی حرارتی آن با ۶۰ درجه سانتی‌گراد شروع و سپس با افزایش دمای ۵ درجه در دقیقه ادامه یافت

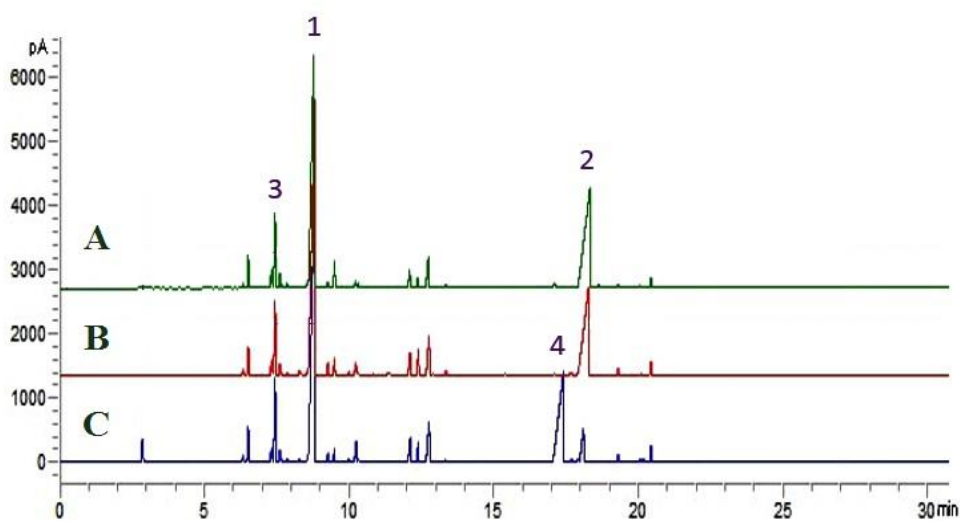
نافذ بود و بازده متوسط تولید اسانس گیاه مفرح (درصد وزنی نسبت به وزن خشک گیاه) از مناطق ارزان فود، گشانی و مزرعه به ترتیب ۲/۱۳، ۱/۹۷ و ۰/۵۵ درصد تعیین گردید که در جدول ۱ نمایش داده شده است. جدول ۲ نیز نتایج آنالیز اسانس‌ها را نشان می‌دهد که در نمونه جمع‌آوری شده از ارزان فود، ۱۸ ترکیب (در مجموع ۹۳/۸۷ درصد)، نمونه گشانی، ۲۰ ترکیب (در مجموع ۹۵/۱۴ درصد) و در نمونه کشت شده در مزرعه ۱۷ ترکیب (در مجموع ۹۶/۰۸ درصد) شناسایی شد. ترکیبات به همراه شاخص بازداری و درصد هر ترکیب در جدول ۲ آورده شده است. در بین ۱۸ ترکیب شناسایی شده در نمونه ارزان فود، اصلی‌ترین ترکیبات اسانس، ۸،۱-سینئول (۴۹/۹ درصد)، ۴aa,7β,7aa-نیتالاکتون (۲۴/۷۳ درصد)، بتا-پینن (۵/۳۹ درصد)، میرتنول (۴/۴ درصد) بودند.

گاز حامل هلیوم، با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود (Salehi et al., 2015).

کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) و تفسیر اسانس: دستگاه کروماتوگراف گازی Termoquest- Finnigan متصل شده به دستگاه طیف سنج جرمی مدل TRACE MS و برنامه دمایی و دمای محفظه تزریق مشابه با کروماتوگراف گازی می‌باشد. انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت بوده است. طول ستون مورد استفاده ۳۰ متر و قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بود. نوع گاز حامل هلیوم با جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بوده است. شناسایی طیف‌ها به کمک محاسبه شاخص بازداری و مطابقت هر ترکیب با منابع از طریق تزریق هیدروکربن‌های نرمال (C8-C24) تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها به دست آمد. همچنین مقایسه طیف‌های جرمی هر پیک با استاندارد موجود در کتابخانه دستگاه که شامل Adams و Wiley بود نیز صورت پذیرفت (Adams, 2011).

نتایج

اسانس بدست آمده شفاف، زرد کم‌رنگ با بویی



شکل ۳. کروماتوگرام‌های مربوط به GC نمونه‌های A: نمونه مزرعه B: منطقه ارزان فود

C: منطقه گشانی، چهار ترکیب اصلی نیز با شماره مشخص شده‌اند.

1: 1, 8-cineole; 2: 4αα, 7β, 7αα- nepetalactone; 3: β- pinene; 4: 4αα, 7α, 7αα- Nepetalactone

منطقه گشانی را چهار ترکیب ۸،۱- سینئول، 4αα, 7β, 7αα- نپتالاکتون، 4αα, 7α, 7αα- بتا-پینن تشکیل می‌دهد. سفیدکن و همکارانش (Sefidkon et al., 2006) از اسانس گیاه مفرح جمع-آوری شده از کوهستان الوند در استان همدان، ۲۶ ترکیب شناسایی کردند و ترکیبات اصلی موجود در اسانس این گیاه، ۸، ۱- سینئول (۶۲/۸ درصد)، 4αα, 7α, 7αα- نپتالاکتون (۱۰/۳ درصد)، 4αβ, 7α, 7αα- نپتالاکتون (۹/۲ درصد)، بتا-پینن (۳/۶ درصد) و آلفا-تریپینول (۳/۳ درصد) بودند. یکی از عوامل تفاوت در آنالیز تحقیق حاضر و مطالعه سفیدکن و همکاران، می‌تواند، مرحله برداشت نمونه باشد. در این مطالعه، از مرحله رویشی گیاه استفاده شده است، در حالی که در مطالعه سفیدکن و همکاران از مرحله گلدهی نمونه برداری شده است. محل جمع‌آوری نمونه نیز با یکدیگر متفاوت بوده که خود می‌تواند باعث تغییرات در ترکیبات این گیاه شود. البته در گزارش سنبل و همکاران نیز گیاه از کوهستان الوند و در مرحله گلدهی جمع‌آوری شده است ولی علاوه بر ترکیب ۸، ۱- سینئول (۴۷/۹ درصد)، تنها یک مشتق نپتالاکتونی 4αα-7α-7αβ-nepetalactone با ۲۰/۳ درصد ترکیب عمده است و دو مشتق دیگر نپتالاکتونی درصد بسیار پایین تری دارند. با این حال در گزارشات دیگر از اسانس این گیاه، هیچ مشتق نپتالاکتونی گزارش نشده است (Mojab et al., 2009; Azar et al., 2012). بررسی‌های انجام شده در گونه-های دیگر از این جنس نشان می‌دهد، عمده ترکیبات اسانس این گیاهان مربوط به ۸،۱- سینئول و ایزومرهای نپتالاکتون می‌باشد. در گزارشی از ترکیبات اسانس ۵ گونه از گیاهان جنس *Nepeta* مشخص شد،

در گیاهان جمع‌آوری شده از گشانی بیشترین تعداد ترکیب شناسایی شد. ترکیبات اصلی شامل ۸،۱- سینئول (۴۸/۸ درصد)، 4αα, 7α, 7αα- نپتالاکتون^۱ (۲۳/۴۹ درصد)، بتا-پینن (۵/۳۷ درصد)، میرتنول (۴/۰۶ درصد) و 4αα, 7β, 7αα- نپتالاکتون (۳/۷۴ درصد) بودند. اصلی‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گیاه مفرح کشت شده در مزرعه از بین ۱۷ ترکیب شناسایی شده، ۸،۱- سینئول (۴۰/۲۵ درصد)، 4αα, 7β, 7αα- نپتالاکتون (۳۴/۸۳ درصد)، بتا-پینن (۶/۱۶ درصد)، میرتنول (۳/۵۵ درصد) و آلفا-پینن (۲/۲۲ درصد) بودند. ساختار چهار ترکیب عمده مشترک در این اسانس‌ها در شکل ۲ نمایش داده شده است. مقایسه چهار ترکیب اصلی اسانس مفرح در سه منطقه مختلف نیز در شکل ۳ آورده شده است. کروماتوگرام‌های GC اسانس این سه نمونه نیز در شکل ۴ نمایش داده شده است. پیک مرتبط به چهار ترکیب اصلی نیز در آن‌ها نشان داده شده است.

بحث

نتایج آنالیز سه نمونه مختلف، مشخص کرد که ترکیبات شناسایی شده در نمونه‌های طبیعی خودرو این گیاه، در نمونه کشت شده آن هم حضور دارد. با این حال درصد اسانس نمونه کشت شده در مزرعه تحقیقاتی تهران نسبت به نمونه‌های خودرو ۷۰ تا ۷۵ درصد کاهش نشان داده است. با توجه به نتایج آنالیز ترکیبات اسانس در نمونه‌های برداشت شده از رویشگاه این گیاه مشخص شد، ۸۰/۱ درصد از ترکیبات نمونه جمع‌آوری شده از ارتفاعات ارزان فود و همچنین ۸۱/۶ درصد از کل ترکیبات اسانس نمونه

1. 4αα, 7α, 7αα- Nepetalactone

می‌باشد. اخیراً محققین صربستانی با یک مطالعه *in vitro*، متابولیسم ایزومرهای نپتالاکتونی را تحت استرس‌های کم آبی بررسی کرده‌اند. در این تحقیق، با ایجاد تنش‌های آبی، تولید حجم توده گیاهی و بازده نپتالاکتون‌ها در دو گونه *Nepeta rtanjensis* و *N. argolica* بررسی شد که افزایش تنش آبی باعث کاهش نپتالاکتون‌ها شد. در این راستا، ژن‌های موثر در بیوسنتز نپتالاکتون‌ها و فاکتورهای ترانسکریپشن کاهش فعالیت پیدا کردند (Aničić et al., 2020). این بدان معنا است که میزان نپتالاکتون‌ها به از دست دادن آب و یا خشکی منطقه بسیار وابسته است.

بررسی تاثیر ارتفاع بر ترکیبات اسانس سه گونه از گیاهان جنس *Nepeta* نشان داد، تفاوت در ارتفاع محل رویش گیاهان می‌تواند بر میزان ترکیبات فعال تغییراتی ایجاد کند. به عنوان مثال در گیاه *N. sessilifolia* Bunge از دو جمعیت با ارتفاع متفاوت نشان داد، با افزایش ارتفاع میزان ترکیبات سزکویی-ترپنی گیاهان افزایش پیدا کرده است و همچنین تفاوت دیگر در افزایش مقدار مونوترپن‌ها در گیاهان برداشت شده از ارتفاع بالاتر مشاهده شد. نتایجی مشابه آن نیز در میزان ترکیب ۸،۱- سینئول، که یک ترکیب مونوترپن می‌باشد مشاهده شد (Talebi et al., 2019). داراس و همکاران (Darras et al., 2020) توانستند بدون استفاده از هورمون‌های رشد گیاهی گونه انحصاری *Nepeta camphorata* را از کوهستان تایگتوس یونان برداشت کرده و مطالعات اهلی سازی آن را انجام داده و خصوصیات مورفولوژیک و آنتی اکسیدانتی آن را در شرایط کشت مختلف بررسی نمایند. داده‌ها نشان می‌دهد گونه‌ای که از ارتفاعات حدود ۲۴۰۰ متری برداشت شده است توانسته به صورت موفقیت آمیزی در سطح دریا تکثیر یابد و در بستر خاک کشت شود. در ضمن، میزان فنول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کشت شده نیز نسبت به

در گونه‌های *N. sibirica* و *N. melissifolia* ترکیب ۸،۱- سینئول و در گونه‌های *N. cataria* L. var. مشتقات *N. transcaucasica* و *N. nuda citriodora* نپتالاکتون دارای بالاترین مقدار در بین ترکیبات اسانس این گیاهان می‌باشند (Baranauskiene et al., 2019). در بررسی ترکیبات اسانس ۸ گونه از گیاهان جنس *Nepeta* مشخص شد مونوترپن‌های اکسیژن‌دار فراوان‌ترین دسته ترکیبات فرار در این گونه‌های مورد بررسی بوده و همچنین بالاترین میزان ترکیب ۱، ۸- سینئول (۷۰/۸۹ درصد)، در این تحقیق مربوط به گونه *N. racemosa* می‌باشد (Talebi et al., 2020).

با توجه به نتایج بدست آمده از درصد اسانس نمونه‌های جمع‌آوری شده از زیستگاه طبیعی گیاه مفراح با نمونه کشت شده آن در مزرعه تحقیقاتی، عوامل محیطی متعددی را می‌توان در آن دخیل دانست. از جمله ارتفاع از سطح دریا می‌تواند یکی از عوامل موثر اختلاف در درصد اسانس نمونه‌ها باشد. هرچند که عوامل دیگر نیز مانند اختلاف دمای هوا، بافت و ترکیبات خاک محل رویش اصلی و مزرعه و همچنین تنش‌های محیطی که معمولاً در عرصه طبیعی بیشتر رخ می‌دهند، نیز می‌توانند بر درصد و ترکیبات اسانس این گیاه تاثیرگذار باشند. اکبری نیا و همکاران (Akbarinia et al., 2003) ترکیبات اسانس *Nepeta pogonosperma* یک پونه سای دیگر انحصاری ایران، را در شرایط کشت شده و خودرو مقایسه کردند. محل کشت در نزدیکی محل برداشت نمونه ولی با ارتفاع پایین تری بوده است. در این پژوهش، درصد اسانس نمونه‌ها تفاوت چندانی نداشته است، اما درصد ترکیبات ۱، ۸- سینئول و نپتالاکتون در شرایط مختلف تفاوت کرده است. این مطالعه ضرورت مطالعه ترکیبات اسانس مفراح در مراحل مختلف فنولوژیک را نیز بیان می‌کند که در پژوهش‌های گروه تحقیقاتی حاضر، در حال اجرا

گیاه وحشی افزایش یافته است، با این حال در این مقاله در رابطه با ترکیبات اسانس و تغییرات آن با نمونه وحشی مطلبی آورده نشده است. تاثیر ارتفاع و مقایسه گیاه کشت شده و نمونه طبیعی در گیاهان دیگر نیز در تحقیقات متعددی ذکر شده است. صائب و همکاران (Saeb et al., 2012) در بررسی تاثیر ارتفاع بر میزان اسانس گیاه گزنه گزارش کردند، سطوح ارتفاع مورد مطالعه تاثیر معنی داری بر درصد اسانس این گیاه داشت و میزان ترکیبات اصلی اسانس به استثنای لیلانول به طور معنی داری تغییر کردند. اهلی سازی گیاه زیره کوهی (کرمانی) باعث کاهش درصد اسانس در گیاهان کشت شده در مزرعه نسبت به گیاهان جمع آوری شده از رویشگاه گردید، این درحالی بود که میزان ترکیبات اصلی گیاه شامل گاما-ترپینن (۴۴/۲، ۴۰/۸، ۳۶/۸ درصد)، کیومن آلدئید (۱۶/۹، ۱۴/۱، ۱۱/۸ درصد) و گاما-ترپینن-۷-آل (۱۰/۵، ۱۰/۶، ۱۸/۷ درصد) به ترتیب در نمونه های خودرو، برداشت در سال اول و سال دوم، در نمونه کشت شده با گیاه خودرو اختلاف معنی داری نداشتند (Azizi et al., 2011). بررسی تاثیر ویژگی های اکولوژیک بر کمیت و کیفیت اسانس گل و برگ بومادران نیز نشان داد، اختلاف معنی داری بین طبقات ارتفاعی از نظر بازده اسانس گل وجود ندارد. در حالی که با افزایش ارتفاع در بازده اسانس برگ اختلاف معنی داری مشاهده شد و تعداد ترکیبات موجود در گل با افزایش ارتفاع افزایش یافت، اما ترکیبات برگ کاهش پیدا کرد (Azarnivand et al., 2009).

نتیجه گیری نهایی

این مطالعه برای اولین بار کشت گیاه دارویی مفرح در شرایط آب و هوایی تهران را بررسی کرد. اولین مرحله در اهلی سازی هر گیاه، کشت در منطقه و امکان سنجی کشت آن می باشد. کشت گیاه مفرح در ارتفاعی با اختلاف حدود ۱۲۰۰ متر پایین تر نسبت به رویشگاه اصلی خود و در آب و هوای غرب تهران، صورت گرفت، ولی میزان موثره موجود در اسانس آن به طور معنی داری کاهش یافت. این مطلب را ممکن است بتوان با بهبود شرایط دیگر از جمله سایر پارامترهای بومشناسی توجیه کرد و شاید نیز بتوان با سایر عوامل موثر تغذیه ای و تنش های مناسب بهبود بخشید. شاید بتوان یکی از عوامل مهم تاثیرگذار بر میزان اسانس این گیاه را ارتفاع محل رویش دانست ولی به تاکید عوامل دیگر بومشناسی نیز می تواند در کاهش میزان اسانس تاثیر گذار باشند. تعداد و مقدار اجزای اسانس در شرایط زراعی در مقایسه با نمونه های رویشگاهی تغییر چندانی نداشت و صرفا کاهش میزان اسانس در نمونه های زراعی دیده شد و مطمئنا با روش های به زراعی مانند تغذیه اصولی و رعایت برخی از تنش های مفید برای افزایش متابولیت های گیاه، می توان محتوای اسانس نمونه های اهلی شده این گیاه را نیز افزایش داد. با این حال، می توان بیان کرد که گیاه مفرح قابلیت اهلی سازی در بوم نظام های کشاورزی را دارا می باشد.

References

1. Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA.
2. Akbarinia, A., Sefidkon, F., Rezaei, M.B. and Bakhshi Khaniki G.R. 2003. Investigation of essential oil composition of *Nepeta pogonosperma* on wild catnip and cultivation. *Pajouhesh-va-sazandegi*, 16(1): 14-19.

3. Ali, T., Javan, M., Sonboli, A. and Semnianian, S. 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. In experimental rat models. *Natural Product Research*, 26(16): 1529-1534.
4. Amini, S., Nohooji, M.G., Khani, M., Labbafi, M.R. and Khalighi-Sigaroodi, F. 2019. Biological activity of some essential oil constituents in four *Nepeta* L. species against *Sitophilus oryzae* L. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20: 338-343.
5. Aničić, N., Matekalo, D., Skorić, M., Živković, J.N., Petrović, L., Dragičević, M., Dmitrović, S. and Mišić, D. 2020. Alterations in nepetalactone metabolism during polyethylene glycol (PEG)-induced dehydration stress in two *Nepeta* species. *Phytochemistry*, 174: 112340.
6. Aydin, S., Beis, R., Öztürk, Y., Hüsni, K. and Baser, C. 1998. Nepetalactone: A new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(7): 813-817.
7. Aydin, S., Demir, T., Öztürk, Y. and Başer, K. H. C. 1999. Analgesic activity of *Nepeta italica* L. *Phytotherapy Research*, 13(1): 20-23.
8. Azar, P.A., Porgham-Daryasari, A., Saber-Tehrani, M. and Soleimani, M. 2012. Analysis of the volatile compounds in *Nepeta crispa* willd. Using improved HS-SPME-GC-MS and comparison with conventional methods. *Acta Chromatographica*, 24(1): 75-84.
9. Azarnivand, H., Ghavam Arvani, M., Sefidkon, F. and Tului, A. 2009. Investigating the effect of ecological characteristics (soil and altitude) on the quality and quantity of essential oils of *Achillea millefolium* L. subsp. *millefolium*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25(4): 556-571.
10. Azizi, M. and Davarenejad, G., Bos, R., Woerdenbag, H.J. and Kayser, O. 2011. Essential oil content and constituents of black zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (Domestication). *Journal of Essential Oil Research*, 21(1): 78-82.
11. Badrhadad, A., Piri, K. and Mansouri, K. 2015. Anti-proliferative effects of some fractions of *Elaeagnus angustifolia* L. flower and aerial part of *Nepeta crispa* L. on K562 leukemic cells. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31(5): 881-890.
12. Baranauskienė, R., Bendžiuvienė, V., Ragažinskienė, O. and Venskutonis, P.R. 2019. Essential oil composition of five *Nepeta* species cultivated in Lithuania and evaluation of their bioactivities, toxicity and antioxidant potential of hydrodistillation residues. *Food and Chemical Toxicology*, 129: 269-280.
13. Bariotakis, M., Georgescu, L., Laina, D., Oikonomou, I., Ntagounakis, G., Koufaki, M.-I., Souma, M., Choreftakis, M., Zormpa, O.G., Smykal, P., Sourvinos, G., Lionis, C., Castanas, E., Karousou, R. and Pprintsos, S.A. 2019. From wild harvest towards precision agriculture: Use of ecological niche modelling to direct potential cultivation of wild medicinal plants in Crete. *Science of the Total Environment*, 694: 133681.
14. Brown, S., Garver, W. and Orlando, R. 2017. 1,8-cineole: an underappreciated anti-inflammatory therapeutic. *Journal of Biomolecular Research and Therapeutics*, 6(1): 2167-7956.
15. Darras, A.I., Spiliopoulos, I., Kartsonas, E., Assimomitis, P. and Karras, S. 2020. Antioxidant profile, propagation and cultivation of *Nepeta camphorata*, the endemic species of Mt Taygetos (Greece). *South African Journal of Botany*, 131: 391-397.
16. Jamzad, Z., Ingrouille, M. and Monique, S.J.S. 2003. Three new species of *Nepeta* (Lamiaceae) from Iran. *Taxon*, 52: 93-98.
17. Jamzad, Z., 2013. Flora Iran Lamiaceae family. Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR), Tehran, 1074p.
18. Mojab, F., Nickavar, B. and Hooshdr Tehrani, H. 2009. Essential oil analysis of *Nepeta crispa* and *N. menthoides*

- from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 5(1): 43-46.
19. Momtaz, H., Moradkhani, S.H., Alikhani, M., Esnaashari, F. and Afkhami M. 2019. Study of antimicrobial effect of some plants of Lamiaceae family on *Escherichia coli* species isolated from children with urinary tract infection. Journal of Renal Injury Prevention, 8(1): 38-43.
 20. Nadjafi, F., Koocheki, A., Honermeier, B. and Asili, J. 2013. Autecology, ethnomedicinal and phytochemical studies of *Nepeta binaludensis* Jamzad a highly endangered medicinal plant of Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 12(1): 97-110.
 21. Rechinger, K.-H. 1987. *Nepeta*, Flora Iranica, Graz, Austria.
 22. Rehman, N.U., Hussain, J., Ali, S., Hussain, H., Abbas, G., Bakht, N. and Al-Harrasi, A. 2020. Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta distans*. Chemistry of Natural Compounds, 56(1): 159-160.
 23. Reyahi-Khoram, R., Daraei-Garmakhani, A., Kalvandi, R. and Reyahi-Khoram, M. 2018. Physicochemical assessment of stirred yogurt enriched with Mofarrah (*Nepeta crispa* Willd). Chiang Mai University Journal of Natural Sciences, 17(3): 231-240.
 24. Saeb, K., Kakuie, A., Babakhani, B., Hoseini Baldachi, A., Rahdari, P., Poorshamsian, K. and Jafari, R. 2012. Investigating the effect of height on the amount of medicinal compounds of the nettle (*Urtica dioica* L.) in Ramsar area. Plant and Ecosystem, 32: 31-40.
 25. Salehi, B., Valussi, M., Jugran, A.K., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., Stojanović-Radić, Z.Z., Antolak, H., Kręgiel, D., Mileski, K.S., Sharifi-Rad, M., Setzer, W.N., Cádiz-Gurrea, M.d.l.L., Segura-Carretero, A., Şener, B. and Sharifi-Rad, J. 2018. *Nepeta* species: From farm to food applications and phytotherapy. Trends in Food Science and Technology, 80: 104-122.
 26. Salehi, P., Abedini, N., Sonboli, A., Aliahmadi, A. and Ayyari, M. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of *Ajania semnanensis* essential oil in two growing stages. Journal of Essential Oil Research, 27 (2): 96-100.
 27. Sarikurkcu, C., Eskici, M., Karanfil, A. and Tepe, B. 2019. Phenolic profile, and antioxidant activities of two endemic *Nepeta* species: *Nepeta nuda* subsp. *glandulifera* and *N. cadmea*. South African Journal of Botany, 120: 298-301.
 28. Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Mirza, M. 2006. Chemical composition of the essential oil of five Iranian *Nepeta* species (*N. crispa*, *N. mahanensis*, *N. ispahanica*, *N. eremophila* and *N. rivularis*). Flavour and Fragrance Journal, 21: 764-767.
 29. Sharifi-Rad, M., Epifano, F., Fiorito, S. and Álvarez-Suarez, J.M. 2020. Phytochemical Analysis and Biological Investigation of *Nepeta juncea* Benth. Different Extracts. Plants, 9: 646.
 30. Sonboli, A., Salehi, P. and Yousefzadi, M. 2004. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. From Iran. Zeitschrift für Naturforschung C, 59(9-10): 653-656.
 31. Talebi, S.M., Nohooji, M.G., Yarmohammadi, M., Khani, M. and Matsyura, A. 2019. Effect of altitude on essential oil composition and on glandular trichome density in three *Nepeta* species (*N. sessilifolia*, *N. heliotropifolia* and *N. fissa*). Mediterranean Botany, 40(1): 81-93.
 32. Talebi, S.M., Nohooji, M.G. and Yarmohammadi, M. 2020. Essential oil analysis of eight *Nepeta* taxa in Iran. Mediterranean Botany, 41(1): 43-53.

Study of qualitative and quantitative changes in *Nepeta crispa* Willd. essential oil in natural habitats and agronomical conditions**Karami, M.¹, Ebadi, M.T.², Ayyari, M.^{2*}**¹MSc candidate, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran²Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 7-9-2019; Accepted: 29-8-2020

Abstract

Nepeta crispa Willd. Locally known as Mofarrah belongs to Lamiaceae family. It is an Iranian endemic self-growing medicinal plant to Alvand Mountains in Hamadan province. *N. crispa* has carminative, anti-inflammatory, antinociceptive, antibacterial and antifungal properties. The aim of this study was to investigate the phytochemical composition of essential oil compounds of this plant in the vegetative stage, which cultivated in Tarbiat Modares University of Tehran at an altitude of 1283 m above sea level, and compare with samples taken from natural habitats in Arzanfood and Gashani with the altitude of 3015 and 2489 m above sea level, respectively. The plants were harvested during the late July 2018. The essential oils of all samples were obtained by hydrodistillation and were analyzed by GC-MS and GC-FID. The yield of essential oil in the sample collected from Arzanfood, Gashani and field samples were 2.13, 1.97 and 0.55% (w/w), respectively. Twenty components were identified among the samples, representing 93-96% of the oils. The main components were 1, 8-cineole (40.25%, 48.5, 49.9%), 4 α , 7 β , 7 α -nepetalactone) 34.8%, 3.7%, 24.7%) and β - pinene) 6.2%, 5.4%, 5.4%) for cultivated field, Gashani and Arzanfood samples, respectively. Although the percentage of oil and 1, 8-cineole in the cultivated sample were low, but the amount of nepetalactome compounds was high. According to the results, the environmental conditions had an important role in the qualitative and quantitative changes in the essential oil of this plant but cultivation of *N. crispa* in a place with more than 1200 m difference in altitude, lower than the main habitat, was a promising sign for domestication of *N. crispa*. Optimization of other factors including, cultivation in an area close to the natural habitat, nutrition, biotic and abiotic stresses treatment could even improve the quality of this plant compared to the self-growing ones.

Keywords: Essential oil, 1, 8-Cineole, Eco-phytochemistry, Nepetalactone. *Nepeta crispa*.

*Corresponding author; mahdiayyari@gmail.com